



## 细菌中 RNase HI 介导 RNA 降解的研究进展

沈崇杰<sup>#</sup>, 包乌尼尔<sup>#</sup>, 莫日根<sup>\*</sup>

内蒙古大学生命科学学院 省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010020

沈崇杰, 包乌尼尔, 莫日根. 细菌中 RNase HI 介导 RNA 降解的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1031-1043.

SHEN Chongjie, BAO Wunier, Morigen. Research progress in RNase HI-mediated RNA degradation in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 1031-1043.

**摘要:** 在细菌细胞中, 为了维持基因组稳定和正常的生命活动, RNase HI 通常以降解 RNA/DNA 杂合链中 RNA 的方式来防止复制中引物的积累以及转录中 R 环的形成。RNase HI 对底物的识别主要依赖于 DNA 与 RNA 结合槽, 对底物的催化主要依赖于 DEDD 基序和位于活性位点附近柔性环中的一个组氨酸。以  $Mg^{2+}$  为代表的金属离子在催化过程中发挥了至关重要的作用。杂交双链中 ssDNA 突出部分的类型决定了 RNase HI 的作用模式: 在没有突出或在 ssDNA 的 5' 端存在突出部分的情况下, RNase HI 作为一种非序列特异性核酸内切酶随机地降解 RNA; 当 ssDNA 的 3' 端存在突出部分时, RNase HI 依靠 5' 核酸外切酶活性对 RNA 进行连续切割。RNase HI、Rep、DinG 和 UvrD 通过与单链 DNA 结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)的 C 端尾部的 6 个残基相互作用被招募到复制叉附近, 并可能以协作的方式解决复制-转录冲突。RNase HI 的缺失或活性降低将引起 DNA 结构不稳定、基因突变、转录装置回溯和复制不协调等一系列有害后果。RNase HI 在反义技术、R 环检测和联合抗生素的靶向治疗等方面展现出巨大的应用价值。关于 RNase HI 与其他酶降解引物的合作机制也是未来值得研究的一个内容。

**关键词:** RNase HI; RNA/DNA 杂合链; RNA 降解; DNA 复制; 转录; 引物; R 环

资助项目: 国家自然科学基金(32260233); 内蒙古自治区细胞分子调控重点实验室项目(2021PT0002); 内蒙古大学本科一流课程建设项目(21400-12105/014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260233), the Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory for Molecular Regulation of the Cell (2021PT0002), and the Undergraduate First-class Course Construction Project of Inner Mongolia University (21400-12105/014).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: morigenm@imu.edu.cn

Received: 2023-11-28; Accepted: 2024-01-19; Published online: 2024-01-22

# Research progress in RNase HI-mediated RNA degradation in bacteria

SHEN Chongjie<sup>#</sup>, BAO Wunier<sup>#</sup>, Morigen<sup>\*</sup>

State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, Inner Mongolia, China

**Abstract:** In bacterial cells, RNase HI usually degrades RNA in the RNA/DNA hybrids to prevent the accumulation of primers in replication and the formation of R-loops in transcription, thus maintaining genomic stability and normal life activities. The recognition of substrates by RNase HI mainly depends on DNA- and RNA-binding grooves, and the catalysis of substrates by RNase HI mainly depends on the DEDD motif and a histidine located in a flexible loop near the active site. Metal ions represented by  $Mg^{2+}$  play an important role in the catalytic process. The mode of action of RNase HI is determined by the type of ssDNA overhangs on RNA/DNA hybrids. In the presence of a 5' ssDNA overhang or in the absence of any overhang on RNA/DNA hybrids, RNase HI functions as a non-sequence-specific endonuclease to degrade RNA randomly. In the presence of a 3' ssDNA overhang on RNA/DNA hybrids, RNase HI relies on 5'-exonuclease activity for the successive degradation of RNA. RNase HI, Rep, DinG, and UvrD are recruited near the replication forks by interacting with the six residues of the C-terminal tail of single-stranded DNA-binding protein (SSB), and may resolve replication-transcription conflicts in a cooperative manner. The deletion of RNase HI or the decrease in RNase HI activity will cause a series of harmful events such as DNA structural instability, gene mutation, transcriptional machinery backtracking, and replication incoordination. RNase HI has shown great application prospects in antisense technology, R-loop detection, and targeted therapy combined with antibiotics. The cooperative mechanism of primer degradation by RNase HI and other enzymes is also worth studying in the future.

**Keywords:** RNase HI; RNA/DNA hybrids; RNA degradation; DNA replication; transcription; primer; R-loop

核糖核酸酶 H (ribonuclease H, RNase H) 是一种金属依赖的非序列特异性内切核酸酶, 属于逆转录病毒整合酶超家族 (retroviral integrase superfamily, RISF), 其广泛存在于真细菌、古细菌和真核生物中<sup>[1-3]</sup>。根据氨基酸序列的差异, RNase H 被分为 RNase HI、RNase HII 和 RNase HIII。RNase HI 是一种由 155 个氨基酸组成的蛋白质, 等电点 (isoelectric point, pI) 约为 6.4, 分子量为 17.6 kDa, 通常以单体的形式存

在; 同样以单体形式存在的 RNase HII 由 198 个氨基酸组成, 分子量为 21.5 kDa<sup>[4]</sup>。尽管 RNase HII 与 RNase HI 的氨基酸序列只有 17% 的一致性, 但是结构分析表明 RNase HII 的催化核心采用了与 RNase HI 非常相似的折叠<sup>[5]</sup>。RNase HIII 仅存在于少数细菌中, 其不仅在一级结构上与 RNase HII 同源, 而且在立体结构上也与其密切相关<sup>[6]</sup>。两者都采用“RNase H 折叠”作为催化结构域的主要结构。

RNase H 参与许多基本的细胞进程, 如基因复制、转录和DNA修复<sup>[7]</sup>。在DNA复制中, RNase HI 参与滞后链上DNA合成所需的RNA引物的降解; 在转录过程中, RNase HI 通过从R环中移除RNA链, 从而挽救间歇性转录停滞<sup>[8]</sup>。两者都依赖于RNase HI对RNA/DNA杂合链中RNA的特定切割, 并且这种切割通常需要至少4个连续的核糖核苷一磷酸(ribonucleoside monophosphate, rNMP)<sup>[9]</sup>。RNase HII 通过将单个rNMP从基因组DNA中移除的方式参与核糖核苷酸切除修复(ribonucleotide excision repair, RER)途径<sup>[10]</sup>。这项功能主要是依靠RNase HI将单个核糖核苷酸的5'磷酸置于自身的活性位点来实现的。RNase HIII在体内的生理作用尚未完全了解<sup>[11]</sup>。虽然RNase HIII在序列和结构上与RNase HII密切相关, 但是其具有类似RNase HI的酶学特性和底物结合偏好<sup>[10]</sup>。RNase HIII可能通过与RNase HI类似的方式切割RNA/DNA杂合链中的RNA, 但是切口位置不同。

鉴于RNase HI在细胞过程中的两项功能, 其缺失或活性降低对于细胞的生存是不利的。RNA引物在基因组中的积累将导致复制受阻并引起基因组不稳定; 而当转录装置遇到R环等转录障碍时引起的回溯可能更为致命<sup>[9,12]</sup>。同时, Kochiwa等<sup>[13]</sup>通过对RNase H基因的全基因组和系统发育分析发现, 在235种细菌中, 210种含有至少一个负责编码RNase HI的*rnhA*基因。因此, 深入研究RNase HI的功能及其作用机制, 对于理解细菌的细胞遗传过程和生理活动具有普适且重要的意义。本文主要综述了细菌中RNase HI降解RNA/DNA杂合链中RNA所依赖的结构特征、催化模型、作用模式及招募机制, 还分析了RNase HI介导的降解的生物学意义, 并对其在相关领域的应用前景和研究内容进行了展望。

## 1 RNase HI的结构特征

细菌中RNase HI的整体结构已经被以核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)为代表的各种高分辨率技术解析: 其含有 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠各5个<sup>[4]</sup>。根据Ohtani等<sup>[14]</sup>的序列比对, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)与大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中RNase HI的氨基酸序列一致性分别为29%、24%、27%。关键的是, 大多数对于底物识别和催化活性功能重要的位点和基序是保守的, 且不仅仅局限于这些细菌<sup>[4,14-15]</sup>。鉴于这种保守性以及为了便于表示, 本文出现的氨基酸序号以大肠杆菌中的残基顺序为准。

### 1.1 基于底物识别与结合的结构特征

RNase HI识别与结合底物主要基于两个分别结合RNA和DNA主链的凹槽。由残基Asn16、Asn44和Asn45构成的脊状突起与RNA/DNA杂合链的小槽相互作用, 并将RNA结合槽和DNA结合槽隔开; 在RNA结合槽上, 4个连续核糖核苷酸的2'-OH基团与RNase HI的Glu48侧链, 以及Cys13、Gly15、Asn16和Gln72的骨干原子接触(图1)<sup>[16]</sup>。DNA结合槽包含2个DNA结合位点, DNA依靠链扭曲的灵活性与之结合, 脱氧核糖环较之磷酸基团在结合中发挥着更为重要的作用<sup>[17]</sup>。第1个也是主要的结合位点是由Arg41、Thr43和Asn100形成的磷酸盐结合口袋(图1), 其磷酸二酯骨架因DNA的结合发生形变, 从而只能容纳B型DNA而非RNA。第2个位点是由Trp81、Trp85和Ala93在碱性突起(亦称为“柄状区域”)中形成的通道(图1)。聚集在碱性突起中的碱性氨基酸使其带有强正电荷, 这将促进酸性底物与RNase HI的非特异性结合<sup>[18]</sup>。RNA链不能适

合这个凹槽，因为 RNA 的 2'-OH 基团与 Trp81 的吡咯环冲突。因此，这 2 个结合位点可能通过特异性结合 RNA/DNA 杂交链中的 DNA 从而将 RNA 与 DNA 区分开来。

如前所述，碱性突起是由一大簇阳性氨基酸组成的延伸环(由残基 81-101 组成)，其参与识别和结合 DNA 底物。最近 Martin 等<sup>[19]</sup>通过研究 RNase HI 及其同源物发现，当第 88 位氨基酸为带正电荷的长侧链氨基酸(Arg/Lys)时，碱性突起处于“开放”(能够结合底物)或“封闭”(不能结合底物)的状态；当其为中性的短侧链氨基酸(Asn)时，碱性突起处于“开放”和“封闭”构象之间的中间态<sup>[19]</sup>。因此，RNase HI 的 Arg88 对于底物结合至关重要(图 1)，该位点氨基酸的替换

将较大程度改变碱性突起的动力学和构象偏好，而 Asn88 可能对于 RNase HI 的疏水核心的热稳定性有着重要贡献。

一些细菌，如耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)，其 RNase HI 的 N 端含有一个保守的杂合结合域(hybrid binding domain, HBD)，其能够选择性识别 RNA/DNA 杂合分子<sup>[20]</sup>。3 条反向平行的  $\beta$  折叠和 2 个  $\alpha$  螺旋以  $\beta\beta\alpha\beta$  的顺序组成了 HBD；HBD 使用一个 RNase HI 活性所需的柔性接头连接到 C 末端的催化结构域，该接头区域的灵活性较高，并允许 N 端和 C 端结构域相对于彼此迁移与调动<sup>[15]</sup>。

## 1.2 基于催化活性的结构特征

所有的 RNase HI 都有一个包含 150 个氨基

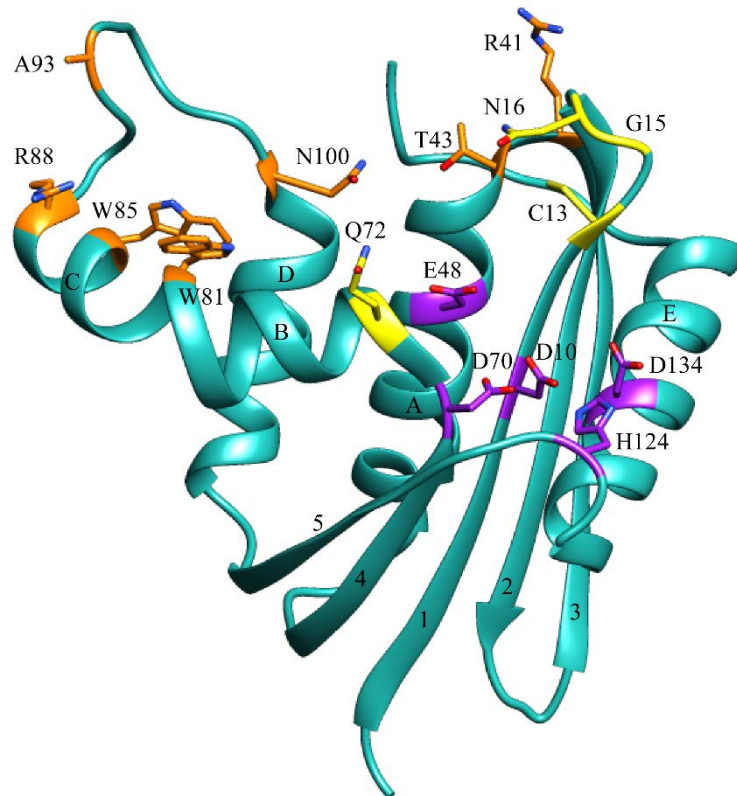


图 1 大肠杆菌 RNase HI 的结构(PDB: 1RNH)

Figure 1 Structure of RNase HI in *Escherichia coli* (PDB: 1RNH). The important residues in RNase HI for binding DNA substrate, binding RNA substrate and catalytic activity are highlighted in orange, yellow and purple, respectively. Besides being involved to catalysis, Glu48 is also an important residue for binding RNA. Five  $\alpha$ -helices (A-E) and five  $\beta$ -folds (1-5) of RNase HI are also marked in the figure.

酸的催化结构域, 其采用一个称之为“RNase HI 折叠”的典型链折叠<sup>[21]</sup>。在该折叠的中心存在一个以 32145 为排列顺序的五链  $\beta$  折叠( $\beta 1$ – $\beta 5$ ), 其中  $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$  和  $\beta 5$  同向平行,  $\beta 2$  则与它们反向平行(图 1);  $\beta 1$ – $\beta 3$  通常比  $\beta 4$  和  $\beta 5$  长<sup>[15]</sup>。3 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha A$ 、 $\alpha B$  和  $\alpha D$ )以类似字母“H”的形状排列并定位于  $\beta$  折叠的一侧。 $\alpha A$  加固了  $\beta$  折叠并位于  $\beta 3$  和  $\beta 4$  之间; 而  $\alpha B$  和  $\alpha D$  位于  $\beta 4$  和  $\beta 5$  之间, 3 个螺旋一起形成  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  罗斯曼样折叠; 与上述 3 个螺旋不同, 螺旋 E ( $\alpha E$ )单独位于  $\beta$  折叠的另一侧(图 1)<sup>[15]</sup>。重要的是, 位于该折叠中的 4 个保守的羧酸盐残基(DED D 基序, 分别对应于 Asp10、Glu48、Asp70 和 Asp134)共同组成了 RNase HI 的活性部位。Asp10 位于  $\beta 1$ , Glu48 位于  $\alpha A$ , Asp70 位于  $\beta 4$ , Asp134 位于  $\alpha E$  (图 1)<sup>[15]</sup>。带负电荷的活性位点会结合二价金属离子, 这是 RNase HI 通过金属离子机制发生催化作用的关键。作为活性中心的核心, 前 3 个残基对于催化作用至关重要, 其定点突变消除了 RNase HI 的催化活性<sup>[22]</sup>。除 DED D 基序外, His124 对于催化功能也同样关键, 其位于活性位点附近( $\beta 5$  和  $\alpha E$  间)的柔性环(由残基 122–125 组成)中, 并且与催化中心的金属离子发生弱而短暂的相互作用, 其突变为 Ala 后将导致酶活性大幅度降低<sup>[23]</sup> (图 1)。

## 2 RNase HI 的金属离子催化模型

在 RNA/DNA 杂合双链中, RNase HI 裂解 RNA 的磷酸二酯键, 并在每个裂解部位留下 3'羟基和 5'磷酸基团<sup>[24]</sup>。这种催化作用需要二价阳离子, 如  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$ 。作为金属配体, DED D 基序根据催化模型的不同, 全部或部分地配位 2 个二价阳离子, 并构成催化反应的关键支架<sup>[23]</sup>。截至目前, 研究者们主要提出了 2 种 RNase HI 的催化模型: 单金属模型和双金属模型。单金属离子模型被认为是一种普遍的碱基羧

酸盐-羟基接力机理; His124 残基的咪唑侧链有助于保守的 Asp70 的酸性侧链去质子化, 从而进一步将一个水分子去质子化并产生攻击易裂磷酸盐的亲核羟基离子; 单个金属离子由 2 个保守的酸性残基(Asp10 和 Glu48)配位, 通过产生外部球状配位化合物来稳定过渡态中间体<sup>[25–26]</sup> (图 2A)。在双金属离子催化模型中, 一种金属由 Asp10 和 Asp134 配位并作为亲核试剂活化一个水分子来攻击易裂磷酸盐, 另一种金属同样像单金属模型中那样由 Asp10 和 Glu48 配位, 其作为亲电子催化剂与易裂磷酸二酯的桥联/非桥联氧原子结合, 稳定作为过渡态的五共价磷烷中间体并促进磷酰基转移反应<sup>[25–26]</sup> (图 2B)。在该催化模型下, His124 也被提出可能通过与水分子形成氢键的方式间接参与金属离子的配位, 尽管此氢键较弱<sup>[23]</sup>。然而, Samara 等<sup>[27]</sup>从耐盐芽孢杆菌 RNase HI 与 RNA/DNA 杂合双链形成的复合体的晶体结构中, 发现第 3 个二价金属离子( $Mg^{2+}$ )通过配位亲核试剂来参与 RNase HI 的催化, 暗示在 RNase HI 中可能存在三金属离子依赖的催化机制。

RNase HI 的催化效率在很大程度上取决于金属离子的种类及性质<sup>[23]</sup>。Kitagawa 等<sup>[28]</sup>对金属离子和 RNase HI 的结合热力学分析表明, 在几种常见的配位金属中( $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$ ),  $Mg^{2+}$  的结合亲和力最低。较高的结合亲和力可以使金属离子、酶和底物形成更加稳定的配合物, 但是会导致底物周转受阻以及酶活性的抑制<sup>[24]</sup>。因此, 与  $Mg^{2+}$  相比, 其他金属离子活化 RNase HI 的效率相对有限。作为活细胞中含量最丰富的二价阳离子,  $Mg^{2+}$  在大肠杆菌细胞内的浓度为 15–25 mmol/L<sup>[24,29]</sup>。此外, 在所有阳离子中,  $Mg^{2+}$  的原子半径最小, 水合半径最大, 电荷密度最高<sup>[29–30]</sup>。高电荷密度使得  $Mg^{2+}$  适合作为酶催化中用于磷酸酯水解和磷酰基转移反应的路易斯酸<sup>[30]</sup>。因此, 凭借优越的丰

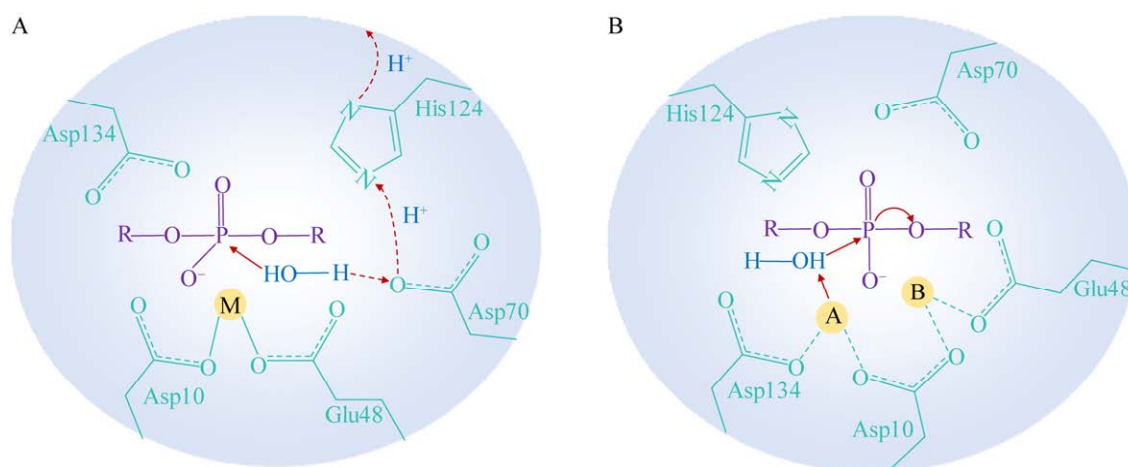


图 2 RNase HI 的催化模型

Figure 2 The catalytic models of RNase HI. A: One-metal model. The deprotonation process of the water molecule is indicated by red dotted arrows. The attack of the nucleophilic hydroxyl on the phosphodiester bond is indicated by a red solid arrow. The coordination bonds formed between the single metal ion M and the corresponding residues are indicated by green dotted lines. B: Two-metal model. The activation of the water molecule, the attack of hydroxyl on the phosphate and the phosphoryl transfer reaction are all indicated by red solid line arrows. The coordination bonds formed between the metal ion A/B and the corresponding residues are indicated by green dotted lines.

度以及本身特殊的性质,  $Mg^{2+}$  成为了配位大多数生物 RNase HI 催化口袋的强制性辅因子<sup>[26]</sup>。

### 3 ssDNA 突出类型决定的 RNase HI 作用模式

截至目前, 对 RNase HI 的结构和生化研究主要集中在不含有单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 突出的 RNA/DNA 杂交体。RNase HI 也一般被认为是一种随机且非序列特异性的分散内切酶<sup>[7]</sup>。然而, 最近的研究表明, RNase HI 降解作用的方向性和动力学取决于 RNA/DNA 杂交双链中 ssDNA 的突出部分的类型: 如果在 ssDNA 的 5' 或者 3' 端均没有突出部分(图 3A), 或者在 ssDNA 的 5' 端存在突出部分(图 3B), RNase HI 将成为一种非序列特异性核酸内切酶并利用一种非定向且分散的作用模式随机降解 RNA, 此过程经历多个结合和解离事件; 如果在 ssDNA 的 3' 端存在突出部分(图 3C), 则使 RNase HI

成为一种进行性的核酸外切酶并促进整个切割反应的发生<sup>[31]</sup>。在这种情况下, RNase HI 沿 RNA/DNA 杂交链移位的同时连续降解 RNA, 而不会脱落<sup>[31]</sup>。无论是哪种类型的突出, RNA 与侧翼 ssDNA 连接处的不连续性有助于 RNase HI 在长基因组 DNA 中识别杂交底物; 重要的是, 这种不对称的双功能酶活性使得 RNase HI 作为一种无可替代的因子在复制、转录和修复过程中有效去除 RNA<sup>[31]</sup>。RNase HI 依靠 5' 核酸外切酶活性对 RNA 的切割是主要的生理学降解方式。在大肠杆菌中, 细胞约每 20 min 分裂一次, 冈崎片段的数量大约为 2 300–4 600, 并且蛋白质往往需要 1–5 min 才能到达目标位置, 因此 RNase HI 很难在有限的时间内定位到小片段的 RNA<sup>[31–32]</sup>。分散作用模式的降解经过几轮就将 RNA 切割成后续 RNase HI 难以定位的小片段。因此, 与分散性降解相比, 特别是当细胞内资源紧张时, 3' 端进行性的降解可能更有利于及时清除滞后链复制过程中产生的引物。



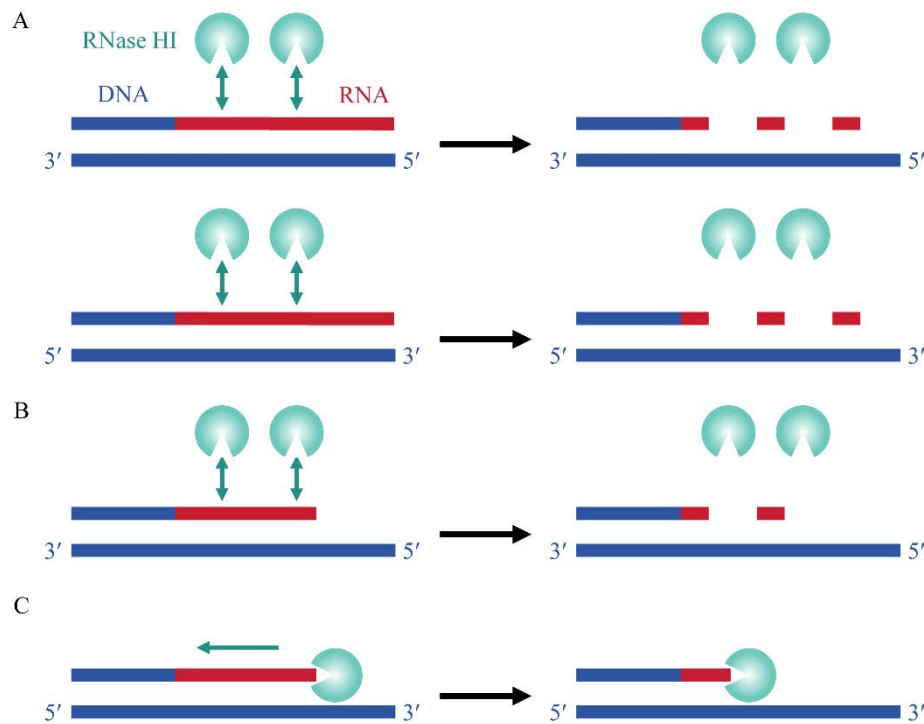


图 3 RNA/DNA 杂合物中 ssDNA 突出类型决定的 RNase HI 作用模式

Figure 3 The mode of action of RNase HI determined by the type of ssDNA overhangs in RNA/DNA hybrids. A: The mode of action of RNase HI in the absence of overhang at either the 5' or 3' end of ssDNA. B: The mode of action of RNase HI in the presence of overhang at the 5' end of ssDNA. C: The mode of action of RNase HI in the presence of overhang at the 3' end of ssDNA. The green double arrows indicate the non-directed degradation of RNAs by dispersed RNase HIs, and the green single arrow indicates the continuous cutting of RNA by RNase HI in the 5' to 3' direction.

#### 4 SSB 介导的 RNase HI 招募机制

在细菌中, DNA 滞后链模板在复制叉处暴露一个长约 1–2 kb 的 ssDNA 片段。单链 DNA 结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)能够与 ssDNA 在多个位点结合<sup>[33]</sup>。具体而言, SSB 的 N 端结构域介导与 ssDNA 的结合并形成同源四聚体, 而 C 端尾部的 6 个残基(Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe, 也称作 SSB-Ct)所形成的对接位点供互作伴侣结合<sup>[34]</sup>。由于每个 SSB 四聚体都有 4 个 SSB-Ct 对接位点, 因此复制叉处的 SSB/ssDNA 结构为每个复制叉处的互作伴侣提供了丰富的结合位点<sup>[33]</sup>。

RNase HI 利用一个由碱性、疏水的残基组

成的结合口袋与 SSB-Ct 相互作用并在复制位点形成焦点, 这种相互作用使复制叉上的 RNase HI 将其核酸酶活性集中在复制叉附近的焦点上<sup>[33-34]</sup>。因此, RNase HI/SSB 复合体的形成可以通过将 RNase HI 招募到滞后链上以促进引物的降解, 并防止反应性 RNA 与基因组 DNA 相结合以及 DNA 链断裂的积累; 同时, 这种互作允许 RNase HI 降解靠近前进复制叉处的 R 环, 以帮助清除原本会阻碍复制进程的转录复合体(图 4)。此外, SSB 对 RNase HI 活性影响的稳态动力学分析表明, SSB 与 RNase HI 的相互作用通过使酶  $K_m$  降低 10% 从而提高了 RNase HI 的催化效率, 并且失去相互作用能力的 SSB 或

RNase HI 突变体将导致这种效应消失<sup>[34]</sup>。这表明 RNase HI 与 SSB 的互作在 RNase HI 的定位及其酶活性的提高方面发挥双重作用。

值得注意的是,其他几个与 SSB 互作的蛋白以相同的方式定位于复制叉,包括细菌中直接与 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)或复制叉结合蛋白相关的 Rep、DinG 和 UvrD 解旋酶(图 4)<sup>[33]</sup>。细菌复制体穿越阻碍性的 DNA-蛋白质复合物(主要是转录复合物)的能力被证明依赖于这 3 种酶<sup>[35]</sup>。Rep 通过与复制相关的 DnaB 解旋酶和与 SSB 相结合的 DinG 的相互作用定位于复制位点;其作为一种复制叉特异性马达,通过将阻碍复制叉运行的蛋白质(如 RNAP)移除以促进 DNA 的复制<sup>[36-37]</sup>。DinG 能够与 SSB 形成稳定的蛋白质复合物并利用其 ATP 依赖的解旋酶

活性解开 RNA/DNA 双链体,从而有利于复制穿过高度转录的区域<sup>[38]</sup>。与 SSB 结合的 UvrD 为核蛋白复合物周转提供了通用马达,这可能有助于其移除停滞的转录复合物来解决复制/转录冲突<sup>[36,39]</sup>。重要的是,Rep、DinG 和 UvrD 在反向转录的 *rrn* 操纵子的复制叉前进中发挥重叠作用<sup>[35]</sup>。综上所述, RNase HI 与 3 种解旋酶(Rep、DinG 和 UvrD)以协作的方式解决 RNA/DNA 杂合障碍并促进基因组复制,这种协作基于 SSB 对这些蛋白在复制叉附近的招募。值得注意的是,相较于  $\Delta rep\Delta rnhA$  或  $\Delta uvrD\Delta rnhA$  导致的致死表型而言, *dinG* 的删除不会导致 *rnhA* 缺失突变体产生严重的生长缺陷<sup>[39]</sup>,表明 DinG 与 RNase HI 的协同作用与另两种解旋酶相比程度较小,也可能是间接的。

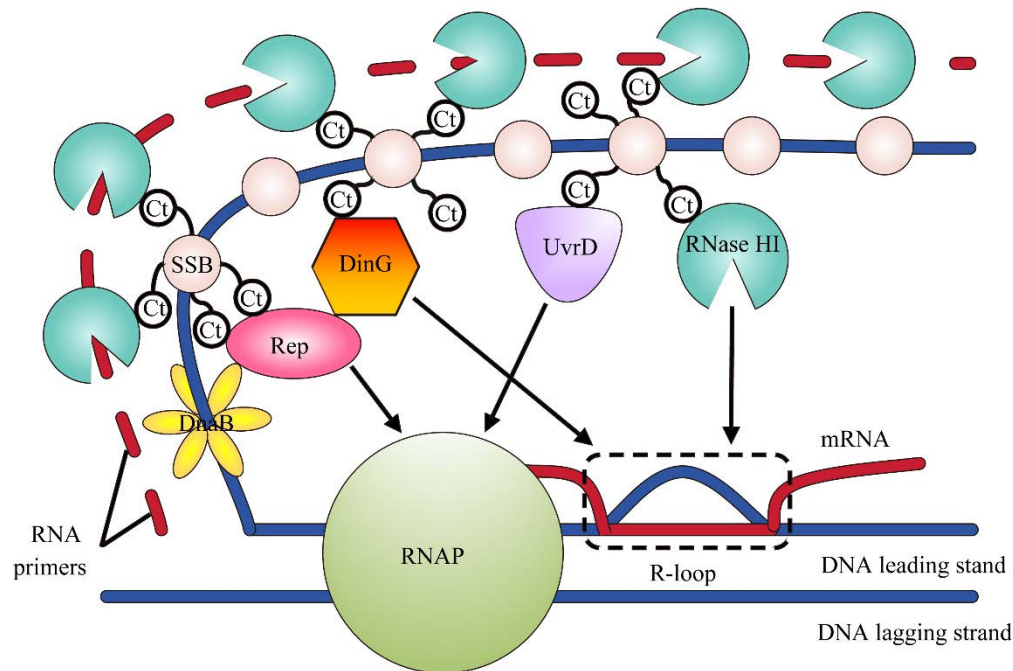


图 4 SSB 介导的 RNase HI 的招募机制

Figure 4 The recruitment mechanism of RNase HI mediated by SSB. In addition to RNase HI, Rep, DinG and UvrD are also recruited near the replication fork through interaction with SSB-Cts. Several proteins cooperate with each other to promote DNA replication. The objects indicated by the arrows represent the targets of the corresponding enzymes. The actions of RNase HI on the RNA primers are not shown with the arrows due to lack of space.



## 5 RNase HI 介导 RNA 降解的意义

尽管 RNA 引物对于基因组复制是不可或缺的, 但是其与 DNA 模板的共价结合仅发生于短暂的时间内。引物如果没有被 RNase HI 及时降解, 将对细胞产生一系列不利影响。一方面, RNA/DNA 杂交体的持久性可能会导致 DNA 结构的不稳定<sup>[40]</sup>。RNA/DNA 杂合链采用 A 型和 B 型的混合双链形式, 而双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 通常采用 B 型构象<sup>[31]</sup>。虽然嵌入的 RNA 不会对 DNA 造成过度严重的扭曲, 但是其仍然足以阻碍复制装置的运行<sup>[40]</sup>。关键是, 当核糖上的反应性 2' 羟基与磷酸二酯键反应时, 形成一个造成缺口和双链断裂 (double-strand DNA breaks, DSBs) 的 2', 3' 环状磷酸<sup>[8]</sup>。DNA 中核糖核苷酸含量达到 5% 或更高还会破坏核小体的形成<sup>[40]</sup>。因此, 嵌入的 RNA 可能会改变 DNA 分子的形状并降低其稳定性。另一方面, 由于 RNA 通常以单链形式存在于细胞内, 这种结构的不稳定性使其较之双链 DNA 很容易发生突变。这也与 Schroeder 等<sup>[41]</sup>的结论一致: RNA/DNA 双连体的积累会引起总突变率的上升, 特别是插入/缺失突变。

R 环通常是新生的 mRNA 分子与模板 DNA 杂交时形成的一种 3 链核酸结构<sup>[42-43]</sup>。在细胞缺乏 RNase HI 的条件下, 往往会引发 DNA 复制停滞和细胞致死。R 环的形成将阻碍后方 RNAP 向前延伸甚至使其回溯, 导致复制体与 RNAP 的同向或正向碰撞, 从而进一步引发诸如 DNA 断裂、基因组重排、突变增加和 DNA 损伤反应的激活等有害事件<sup>[8, 41, 43-44]</sup>。在非寻常条件下, 如进入稳定期或 DNA 损伤后, 大肠杆菌可以激活一种称为组成型稳定 DNA 复制 (constitutive

stable DNA replication, cSDR) 的染色体复制方式来完成遗传信息传递<sup>[45]</sup>。与一般的 DNA 复制 (依赖于复制原点 *oriC* 和复制起始蛋白 DnaA)<sup>[46]</sup> 不同, 这种复制依靠起始活性较弱的 *oriK* 位点进行复制起始。在 *oriK* 位点处, 发现了由 RNA 入侵同源 DNA 双链所形成的 R 环; 与 DNA 结合的 RNA 链可能作为 *oriK* 位点处复制起始的引物, 而被置换的 DNA 链可能作为复制解旋酶的组装位点; RNase HI 的缺失被证明会引起 cSDR; 尽管细胞能够存活, 但是 *oriK* 处的复制叉的运行方向与正常复制的方向相反, 这将最终导致复制叉的合并<sup>[47]</sup>。因此, RNase HI 对于复制的良好协调也是必要的。

## 6 总结与展望

RNase HI 中 DNA 结合槽、RNA 结合槽 (磷酸盐结合口袋与碱性突起) 和 HBD 帮助 RNase HI 特异性识别底物; 位于保守“RNase H 折叠”中的 DEDD 基序和 His124 维持着 RNase HI 的催化活性。RNase HI 的单/双金属离子催化模型都需要  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  等金属离子的支持。RNase HI 的作用模式取决于杂交链中 ssDNA 突出部分的类型: 无突出的 ssDNA 或 ssDNA 5' 端的突出将使 RNase HI 作为一种非序列特异性核酸内切酶发挥功能; ssDNA 3' 端的突出将使 RNase HI 发挥其 5' 核酸外切酶活性。RNase HI、Rep、DinG 和 UvrD 在复制叉附近的招募依赖于这些蛋白与 SSB-Ct 的相互作用。RNase HI 介导的 RNA 降解对于细菌保持基因组稳定和正常的细胞进程具有重要意义: 首先, RNase HI 通过将复制中产生的 RNA 引物清除, 减少了不稳定性 RNA 和突变的积累; 其次, RNase HI 和 Rep、DinG 和 UvrD 以合作的方式解决复制叉进程中的 R 环等障碍, 有效避免了复制-转录冲突并确保细胞周期的顺利运行。

基于 RNase HI 在生物体中的 2 个关键作用(引物降解与 R 环消除), 未来或许将有许多与之相关的应用诞生。首先, RNase HI 可以在反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)技术中充当关键效应子<sup>[48]</sup>。利用 RNase HI 在体内的泛表达特性, 通过在目标 RNA 设计与之序列互补的一段短 ssDNA (ssASO), 或许能够简单而高效地实现对于特定基因的敲除。其次, RNase HI 有望成为揭示 R 环生理和病理作用的重要工具<sup>[49]</sup>。RNase HI 在不同系统中的表达有助于理解 R 环的形成、位置、丰度、稳定性和降解机制等方面。例如, R 环形成的论证已经通过在体外和体内使用质粒测定来检测 RNase HI 敏感的负超螺旋或含有 R 环的 DNA 来实现<sup>[50]</sup>。此外, RNase HI 本身可能是一个有前途的抗菌靶点。大肠杆菌中 RNase HI 功能的丧失会导致利福平和链霉素耐药菌株在多态性群体中的灭绝<sup>[51]</sup>。RNase HI 活性的缺失也增加了耻垢分枝杆菌对莫西沙星、利福平和链霉素的敏感性<sup>[52]</sup>。加上 RNase HI 活性消除或抑制对细菌的固有影响, 因此, 通过将 RNase HI 抑制剂与抗生素治疗相结合或许可以大大增强药物的治疗效果, 这将为开发新型靶向抗菌药物提供新的思路。

当前的一些证据表明, 除 RNase HI 外, 其他酶也在降解引物方面发挥着重要作用。在大肠杆菌中, 碱性蔗糖密度沉降实验表明, 编码 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I, DNA Pol I) 的基因 *polA* 突变后, 含有 RNA 引物的新生 DNA 片段积累<sup>[53]</sup>。在此基础上再将 *rnhA* 基因突变后, 杂合片段的积累更为明显<sup>[53]</sup>。表明 RNase HI 和 DNA Pol I 在引物去除中共同发挥功能。而在枯草芽孢杆菌中, 核酸酶活性测定实验则显示, 一种具有 5'→3'瓣内切酶活性和 5'→3'外切酶活性的核酸酶 YpcP 对 RNA/DNA 杂合底物具有强烈偏好并对其展现出最强的核酸酶活性, 表明

YpcP 可能在引物降解中发挥主要作用<sup>[8]</sup>。此外, 过量表达 YpcP 不能挽救 DNA Pol I 相关功能缺失的温度敏感型菌株, 并且 PolA 或 YpcP 的过度表达仅能够部分抑制 RNase HI 缺陷菌株的细丝状表型<sup>[8]</sup>。因此 YpcP、DNA Pol I 和 RNase HI 三者对于枯草芽孢杆菌是必要的, 并且其各自的功能无法互相替代或补充。本课题组 Lv 等<sup>[54]</sup>的研究发现, 一种 ATP 依赖的 RNA 解旋酶 CsdA 可以在低温下降解 RNA, 并且在功能上与核糖核酸酶 R (ribonuclease R, RNase R) 互补。因此, 我们推测, 细胞内各种参与降解 RNA (引物) 的酶可能通过协作的方式发挥功能。了解不同酶在不同细菌中如何相互配合以降解引物有助于更清晰地阐明细菌生理生化 and 生命过程, 因此是一个值得研究的内容。本课题组 Yao 等<sup>[55]</sup>已经成功通过将不同种类的荧光蛋白基因构建到待研究基因末端(*torR/torS*), 再运用荧光显微以及流式细胞技术成功检测了这些融合蛋白在细胞内的亚细胞定位及表达量(特异性荧光强度)。因此, 可以通过分别将绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)、黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 和红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 插入到 YpcP、DNA Pol 和 RNase HI 的基因终止密码子前, 随后在缓慢培养的细菌中, 跟踪这些融合表达的蛋白, 并根据不同蛋白荧光的读数在相同位置(如复制叉附近)随时间变化的情况, 从而初步判断这些酶在合作途径中作用的先后顺序。相信随着技术和手段的发展, 相关问题将得到更好的解决。

## 致谢

感谢呼和浩特市第二中学的左乐吉雅对第 1 节“RNase HI 的结构特征”的撰写及参与修改全文的工作。

## 参考文献

- [1] NOWOTNY M. Retroviral integrase superfamily: the structural perspective[J]. *EMBO Reports*, 2009, 10(2): 144-151.
- [2] QIN C, HAN WC, XU Y, ZHAO Y, XU H, TIAN B, WANG LY, HUA YJ. Structural and functional characterization of the holliday junction resolvase RuvC from *Deinococcus radiodurans*[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6): 1160.
- [3] POHL TJ, ZAKIAN VA. Pif1 family DNA helicases: a helpmate to RNase H?[J]. *DNA Repair*, 2019, 84: 102633.
- [4] LI ZW, DEUTSCHER MP. Exoribonucleases and endoribonucleases[J]. *EcoSal Plus*, 2004, 1(1): 10.1128/ecosalplus.4.6.3.
- [5] MOHANTY BK, KUSHNER SR. Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(5): 1315-1324.
- [6] CHON H, MATSUMURA H, KOGA Y, TAKANO K, KANAYA S. Crystal structure and structure-based mutational analyses of RNase HIII from *Bacillus stearothermophilus*: a new type 2 RNase H with TBP-like substrate-binding domain at the N terminus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 356(1): 165-178.
- [7] ZHAO HZ, LIU YZ, CUI J, YANG CL, GAO N, JING J, ZHANG XL. Enzyme-triggered DNA nanomimosa: a ratiometric nanoprobe for RNase H activity sensing in living cells[J]. *Talanta*, 2021, 233: 122547.
- [8] LOWDER FC, SIMMONS LA. *Bacillus subtilis* encodes a discrete flap endonuclease that cleaves RNA-DNA hybrids[J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19(5): e1010585.
- [9] ASHOUR ME, MOSAMMAPARAST N. Mechanisms of damage tolerance and repair during DNA replication[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(6): 3033-3047.
- [10] DUPUY P, GLICKMAN MS. The C-terminal acid phosphatase module of the RNase HI enzyme RnhC controls rifampin sensitivity and light-dependent colony pigmentation of *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2023, 205(4): e0043122.
- [11] RANDALL JR, HIRST WG, SIMMONS LA. Substrate specificity for bacterial RNases HII and HIII is influenced by metal availability[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(4): e00401-17.
- [12] MOHAMED AA, VAZQUEZ NUNEZ R, VOS SM. Structural advances in transcription elongation[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2022, 75: 102422.
- [13] KOCHIWA H, TOMITA M, KANAI A. Evolution of ribonuclease H genes in prokaryotes to avoid inheritance of redundant genes[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 128.
- [14] OHTANI N, HARUKI M, MORIKAWA M, CROUCH RJ, ITAYA M, KANAYA S. Identification of the genes encoding Mn<sup>2+</sup>-dependent RNase HII and Mg<sup>2+</sup>-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: classification of RNases H into three families[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(2): 605-618.
- [15] HYJEK M, FIGIEL M, NOWOTNY M. RNases H: structure and mechanism[J]. *DNA Repair*, 2019, 84: 102672.
- [16] TADOKORO T, KANAYA S. Ribonuclease H: molecular diversities, substrate binding domains, and catalytic mechanism of the prokaryotic enzymes[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(6): 1482-1493.
- [17] MASAKI Y, TABIRA A, HATTORI S, WAKATSUKI S, SEIO K. Insertion of a methylene group into the backbone of an antisense oligonucleotide reveals the importance of deoxyribose recognition by RNase H[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2022, 20(45): 8917-8924.
- [18] OTA C, SUZUKI H, TANAKA SI, TAKANO K. Dispersion effect of molecular crowding on ligand-protein surface binding sites of *Escherichia coli* RNase HI[J]. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2022, 38(47): 14497-14507.
- [19] MARTIN JA, PALMER AG 3rd. Comparisons of ribonuclease HI homologs and mutants uncover a multistate model for substrate recognition[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(12): 5342-5349.
- [20] STOPAR A, NICHOLSON AW. Multivalent forms of the ribonuclease H1 hybrid binding domain are high-affinity binders of RNA-DNA hybrids[J]. *FEBS Letters*, 2023, 597(3): 472-482.
- [21] KATAYANAGI K, MIYAGAWA M, MATSUSHIMA M, ISHIKAWA M, KANAYA S, IKEHARA M, MATSUZAKI T, MORIKAWA K. Three-dimensional structure of ribonuclease H from *E. coli*[J]. *Nature*, 1990, 347: 306-309.

- [22] KAMADA K, HANAOKA F, BURLEY SK. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition[J]. *Molecular Cell*, 2003, 11(4): 875-884.
- [23] LIAO ZW, OYAMA T, KITAGAWA Y, KATAYANAGI K, MORIKAWA K, ODA M. Pivotal role of a conserved histidine in *Escherichia coli* ribonuclease HI as proposed by X-ray crystallography[J]. *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology*, 2022, 78(Pt 3): 390-398.
- [24] ANDO T, JONGRUJA N, OKUMURA N, MORIKAWA K, KANAYA S, TAKAO T. Identification of the ternary complex of ribonuclease HI: RNA/DNA hybrid: metal ions by ESI mass spectrometry[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100462.
- [25] KECK JL, GOEDKEN ER, MARQUSEE S. Activation/attenuation model for RNase H. A one-metal mechanism with second-metal inhibition[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(51): 34128-34133.
- [26] PANG J, GUO QY, LU Z. The catalytic mechanism, metal dependence, substrate specificity, and biodiversity of ribonuclease H[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1034811.
- [27] SAMARA NL, YANG W. Cation trafficking propels RNA hydrolysis[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018, 25: 715-721.
- [28] KITAGAWA Y, LIAO ZW, MORIKAWA K, ODA M. Metal-binding and folding thermodynamics of *Escherichia coli* ribonuclease HI related to its catalytic function[J]. *Biophysical Chemistry*, 2023, 295: 106961.
- [29] MOOMAW AS, MAGUIRE ME. The unique nature of Mg<sup>2+</sup> channels[J]. *Physiology*, 2008, 23: 275-285.
- [30] Maguire ME, COWAN JA. Magnesium chemistry and biochemistry[J]. *Biometals*, 2002, 15(3): 203-210.
- [31] LEE H, CHO H, KIM J, LEE SA, YOO J, PARK D, LEE G. RNase H is an exo- and endoribonuclease with asymmetric directionality, depending on the binding mode to the structural variants of RNA: DNA hybrids[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(4): 1801-1814.
- [32] HAMMAR P, LEROY P, MAHMUTOVIC A, MARKLUND EG, BERG OG, ELF J. The *lac* repressor displays facilitated diffusion in living cells[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1595-1598.
- [33] WOLAK C, MA HJ, SOUBRY N, SANDLER SJ, REYES-LAMOTHE R, KECK JL. Interaction with single-stranded DNA-binding protein localizes ribonuclease HI to DNA replication forks and facilitates R-loop removal[J]. *Molecular Microbiology*, 2020, 114(3): 495-509.
- [34] PETZOLD C, MARCEAU AH, MILLER KH, MARQUSEE S, KECK JL. Interaction with single-stranded DNA-binding protein stimulates *Escherichia coli* ribonuclease HI enzymatic activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(23): 14626-14636.
- [35] BOUBAKRI H, de SEPTENVILLE AL, VIGUERA E, MICHEL B. The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units *in vivo*[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(1): 145-157.
- [36] GUY CP, ATKINSON J, GUPTA MK, MAHDI AA, GWYNN EJ, RUDOLPH CJ, MOON PB, van KNIPPENBERG IC, CADMAN CJ, DILLINGHAM MS, LLOYD RG, McGLYNN P. Rep provides a second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(4): 654-666.
- [37] SYEDA AH, WOLLMAN AJM, HARGREAVES AL, HOWARD JAL, BRÜNING JG, McGLYNN P, LEAKE MC. Single-molecule live cell imaging of Rep reveals the dynamic interplay between an accessory replicative helicase and the replisome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(12): 6287-6298.
- [38] CHENG ZS, CAILLET A, REN BB, DING HG. Stimulation of *Escherichia coli* DNA damage inducible DNA helicase DinG by the single-stranded DNA binding protein SSB[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(21): 3825-3830.
- [39] HAWKINS M, DIMUDE JU, HOWARD JAL, SMITH AJ, DILLINGHAM MS, SAVERY NJ, RUDOLPH CJ, McGLYNN P. Direct removal of RNA polymerase barriers to replication by accessory replicative helicases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(10): 5100-5113.
- [40] POTENSKI CJ, KLEIN HL. How the misincorporation of ribonucleotides into genomic DNA can be both harmful and helpful to cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(16): 10226-10234.
- [41] SCHROEDER JW, HURTO RL, RANDALL JR, WOZNIAC KJ, TIMKO TA, NYE TM, WANG JD, FREDDOLINO PL, SIMMONS LA. RNase H genes cause distinct impacts on RNA: DNA hybrid formation and mutagenesis genome-wide[J]. *Science Advances*, 2023, 9(30): eadi5945.

- [42] CHENG LL, WANG WJ, YAO Y, SUN QW. Mitochondrial RNase H1 activity regulates R-loop homeostasis to maintain genome integrity and enable early embryogenesis in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Biology*, 2021, 19(8): e3001357.
- [43] 沈崇杰, 莫日根. 大肠杆菌中转录-翻译耦合的机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(3): 515-524. SHEN CJ, Morigen. Mechanisms of transcription-translation coupling in *Escherichia coli*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2024, 51(3): 515-524 (in Chinese).
- [44] WAHBA L, AMON JD, KOSHLAND D, VUICA-ROSS M. RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA: DNA hybrids from generating genome instability[J]. *Molecular Cell*, 2011, 44(6): 978-988.
- [45] KOGOMA T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1997, 61(2): 212-238.
- [46] 沈崇杰, 王晓洁, 范丽菲, 莫日根. 肺炎链球菌 CcrZ 蛋白在细胞周期调控中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(12): 2313-2325. SHEN CJ, WANG XJ, FAN LF, Morigen. The role of CcrZ protein of *Streptococcus pneumoniae* in cell cycle regulation[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2022, 44(12): 2313-2325 (in Chinese).
- [47] MADUIKE NZ, TEHRANCHI AK, WANG JD, KREUZER KN. Replication of the *Escherichia coli* chromosome in RNase HI-deficient cells: multiple initiation regions and fork dynamics[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(1): 39-56.
- [48] CROOKE ST, LIANG XH, BAKER BF, CROOKE RM. Antisense technology: a review[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100416.
- [49] CERRITELLI SM, SAKHUJA K, CROUCH RJ. RNase H1, the gold standard for R-loop detection[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2528: 91-114.
- [50] VLACHOS-BRETON É, DROLET M. R-loop detection in bacteria[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2528: 31-37.
- [51] BALBONTÍN R, FRAZÃO N, GORDO I. DNA breaks-mediated fitness cost reveals RNase HI as a new target for selectively eliminating antibiotic-resistant bacteria[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(8): 3220-3234.
- [52] AL-ZUBAIDI A, CHEUNG CY, COOK GM, TAIAROA G, MIZRAHI V, LOTT JS, DAWES SS. RNase HI depletion strongly potentiates cell killing by rifampicin in mycobacteria[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2022, 66(10): e0209121.
- [53] RANDALL JR, NYE TM, WOZNIAK KJ, SIMMONS LA. RNase HIII is important for Okazaki fragment processing in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(7): e00686-18.
- [54] LV XL, ZHANG R, WANG J. The absence of CsdA in *Escherichia coli* increases DNA replication and cell size but decreases growth rate at low temperature[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 631: 41-47.
- [55] YAO Y, FAN LF, SHI YX, ODSBU I, Morigen. A spatial control for correct timing of gene expression during the *Escherichia coli* cell cycle[J]. *Genes*, 2016, 8(1): 1.