



## 古菌 RecJ 蛋白的研究进展

施静茹, 张立奎\*

扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127

施静茹, 张立奎. 古菌 RecJ 蛋白的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1318-1328.

SHI Jingru, ZHANG Likui. Research progress of archaeal RecJ protein[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(4): 1318-1328.

**摘要:** RecJ 蛋白属于 aspartate-histidine-histidine (DHH)磷酸酯酶超家族, 存在于细菌、真核生物和古菌中。细菌 RecJ 蛋白是一种 5'→3' ssDNA 外切酶, 参与错配修复、同源重组、碱基切除修复等生物学过程。真核生物 cell division cycle 45 (Cdc45)蛋白是细菌 RecJ 核酸酶的同源物, 但不具有核酸酶活性。Cdc45 蛋白能够与 minichromosome maintenance (MCM)和 Go-Ichi-Ni-San (GINS)形成 Cdc45-MCM-GINS (CMG)复合物, 是真核生物 DNA 复制的重要组分。在古菌中, 几乎所有基因组已测序的古菌均编码一种或多种 RecJ 蛋白同源物。与细菌 RecJ 核酸酶不同, 古菌 RecJ 蛋白具有多样化的核酸酶活性, 并且能够与 MCM 和 GINS 形成类似于真核生物 CMG 的复合物。因此, 古菌 RecJ 蛋白是参与古菌 DNA 复制、修复和重组的重要成分。基于目前古菌 RecJ 蛋白的研究报道, 本文综述了古菌 RecJ 蛋白的活性、结构与功能方面的研究进展, 聚焦于不同古菌 RecJ 蛋白以及它们与细菌 RecJ 核酸酶和真核生物 RecJ 同源物的异同点, 并对古菌 RecJ 蛋白未来的研究方向进行了展望。

**关键词:** 古菌; RecJ 蛋白; DNA 修复; DNA 复制

资助项目: 江苏省大学生创新创业训练计划(202211117084Y); 江苏省自然科学基金(BK20191219)

This work was supported by the Practice Innovation Training Program for College Students of Jiangsu Province (202211117084Y) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191219).

\*Corresponding author. Tel: +86-514-89795882, E-mail: lkzhang@yzu.edu.cn

Received: 2022-08-11; Accepted: 2022-10-14; Published online: 2022-10-19

# Research progress of archaeal RecJ protein

SHI Jingru, ZHANG Likui\*

College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu, China

**Abstract:** RecJ proteins, the members of aspartate-histidine-histidine (DHH) superfamily of phosphoesterases, are ubiquitous in bacteria, eukaryotes, and archaea. In bacteria, the archetypal RecJ protein is a 5'→3' ssDNA exonuclease that functions in biological processes such as mismatch repair, homologous recombination, and base excision repair. Cell division cycle 45 (Cdc45) protein, a homologue of bacterial RecJ nuclease, is essential in eukaryotes, but has no nuclease activity. Cdc45 protein forms Cdc45-MCM-GINS (CMG) complex with minichromosome maintenance (MCM) and Go-Ichi-Ni-Sa (GINS), and the complex plays a key role in DNA replication in eukaryotes. Almost all archaea whose genomes have been sequenced encode one or more RecJ protein homologues. Unlike bacterial RecJ nuclease, archaeal RecJ protein has diverse nuclease activities and can form a complex with MCM and GINS which shows functions similar to eukaryotic CMG complex. Thus, archaeal RecJ protein is an important component that is involved in archaeal DNA replication, repair and recombination. Based on current reports on archaeal RecJ protein, this study reviewed the activities, structures, and functions of archaeal RecJ protein, focusing on similarities and differences between different archaeal RecJ proteins and between archaeal RecJ proteins and bacterial RecJ nucleases/eukaryotic RecJ homologues. In addition, we summarized the research trends in archaeal RecJ protein.

**Keywords:** archaea; RecJ protein; DNA repair; DNA replication

RecJ 蛋白核酸酶属于 aspartate-histidine-histidine (DHH)磷酸酯酶超家族,具有保守的DHH结构域,位于蛋白的N末端<sup>[1]</sup>。根据它们生化功能和保守结构域的不同,DHH磷酸酯酶分为4个家族:家族I包含原核生物的RecJ核酸酶和真核生物的cell division cycle 45 (Cdc45)蛋白<sup>[1-3]</sup>;家族II由不同的nanoRNases组成,能够专一性地降解短小ssRNA分子<sup>[4]</sup>;家族III包括真核生物的Prune和PPX以及原核生物的无机焦磷酸酶<sup>[5-6]</sup>,能够降解核苷酸的衍生物;家族IV是仅为古菌所有的Hef associated nuclease (HAN)核酸酶<sup>[7]</sup>。

对于细菌RecJ核酸酶,目前研究较多的是 *Deinococcus radiodurans* 和 *Thermus thermophilus*

RecJ核酸酶<sup>[8-15]</sup>,人们对其生化功能、催化机制和结构特征的认识较为清楚。细菌RecJ具有5'→3' ssDNA外切酶活性,但不具有切割双链DNA的活性<sup>[15-16]</sup>。最新的研究发现,细菌RecJ还具有核酸内切酶活性<sup>[17-18]</sup>。真核生物基因组不编码细菌RecJ蛋白,但是真核生物Cdc45蛋白与细菌RecJ具有同源性<sup>[3]</sup>。真核生物Cdc45蛋白缺少细菌RecJ中DHH催化结构域中的关键氨基酸残基,表明该蛋白不是一个核酸酶<sup>[19]</sup>。

根据生化功能的不同,古菌RecJ蛋白分为4类:第1类,具有细菌RecJ核酸酶活性的古菌RecJ蛋白;第2类,不具有细菌RecJ核酸酶活性的古菌RecJ蛋白;第3类,参与形成古

菌 CMG 复合物的古菌 RecJ 蛋白；第 4 类，功能未知的古菌 RecJ 蛋白<sup>[2]</sup>。目前，几乎所有基因组已测序的古菌至少编码 1 个或多个 RecJ 蛋白。古菌 RecJ 蛋白具有细菌 RecJ 的核酸酶活性并且它们的核酸酶活性比细菌 RecJ 更加多样化。另外，古菌 RecJ 蛋白与真核生物 Cdc45 蛋白具有同源性和功能相似性。此外，古菌 RecJ 蛋白还具有独特的生化功能。因此古菌 RecJ 蛋白是古菌 DNA 复制、修复和重组过程中的重要成分。本文综述了古菌 RecJ 蛋白的研究进展，并对今后的研究进行了展望。

## 1 RecJ 蛋白的生物学功能

RecJ 蛋白是一种多功能的蛋白，现已证实其参与 DNA 修复和 DNA 复制(图 1)。Lovett 等最早对 *Escherichia coli* K-12 的 *recJ* 基因进行了遗传分析<sup>[20]</sup>。后来发现，*E. coli* RecJ 参与 UV 引起的损伤修复和 DNA 重组<sup>[21-22]</sup>。进一步的研究表明，RecJ、exonuclease X (ExoX)、exonuclease I (Exo I)和 exonuclease VII (Exo VII)参与 *E. coli* 细胞内甲基化介导的错配修复<sup>[23-24]</sup>。

双链断裂的 5'端切割，是重组 DNA 修复的必需步骤。*E. coli* RecF 介导的重组是修复双链断裂损伤的途径之一<sup>[25]</sup>。研究发现，3'→5'解旋

酶 RecQ、5'→3'外切酶 RecJ 和单链 DNA 结合 (single-strand DNA binding, SSB)蛋白相互协调参与 RecF 重组<sup>[26]</sup>。同样，细菌 *Neisseria gonorrhoeae* RecJ 也被证实参与同源重组和 DNA 修复途径<sup>[27]</sup>。

细菌 RecJ 具有脱氧核糖磷酸化酶(deoxyribose phosphatase, dRPase)活性<sup>[28]</sup>，能够去除无嘌呤/无嘧啶(apurinic/aprimidinic, AP)核酸内切酶切割 AP 位点所形成的脱氧核糖磷酸，暗示着该酶参与碱基切除修复。研究发现，敲除 *recJ* 基因的 *D. radiodurans* 菌株表现出对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 methyl-methanesulphonate (MMS)极强的敏感性，同时该突变株细胞内具有更高的自发突变频率和未被修复的 AP 位点含量<sup>[13]</sup>，从而证实了 *D. radiodurans* RecJ 在体内参与碱基切除修复。

研究发现，真核生物 Cdc45 蛋白能够与解旋酶 minichromosome maintenance (MCM)和 Go-Ichi-Ni-San (GINS)形成 Cdc45-MCM-GINS (CMG)复合物<sup>[29-30]</sup>，参与 DNA 复制。现已证实古菌 RecJ 蛋白能够与 GINS 和 MCM 形成功能类似真核生物 CMG 的复合物<sup>[31-35]</sup>。除此之外，古菌 RecJ 蛋白还能够与 helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA (Hef)蛋白相互作用，启动被阻止复制叉的修复<sup>[36-38]</sup>。

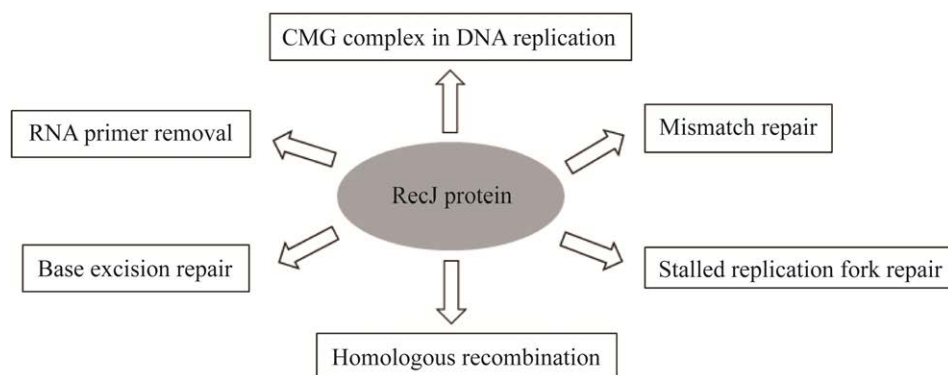


图 1 RecJ 蛋白的功能

Figure 1 Function of RecJ protein.

## 2 RecJ 蛋白的结构特征

目前, 晶体结构得到解析的细菌 RecJ 蛋白主要源自于 *D. radiodurans*<sup>[8-9]</sup> 和 *T. thermophilus*<sup>[10-11]</sup>。这些细菌 RecJ 蛋白晶体结构的解析, 为揭示其催化机制提供了重要的线索。

*D. radiodurans* RecJ 蛋白的晶体结构显示, 其催化中心由 N 端的催化核心 DHH 和 DHHA1 结构域、C 端的寡核苷酸/寡糖折叠结构域 (oligonucleotide/oligosaccharide-binding, OB) 组成(图 2A)<sup>[8]</sup>。生化研究发现, OB 折叠结构域具有结合单链和双链 DNA 的活性, 并能够增强 RecJ 核酸酶结合单链 DNA 能力<sup>[8]</sup>。另外, *D. radiodurans* RecJ 蛋白与含有 dRP 类似物 5'-P-dSpacer 基团的 ssDNA 形成复合物的晶体结构显示该酶存在 5'-单磷酸结合口袋, 并且 5'-dRP 占据该酶的活性中心, 从而暗示着该酶具有 5'-dRP 活性<sup>[9]</sup>。此外, *D. radiodurans* RecJ 蛋白与 dTMP、ssDNA 和 SSB C-末端形成复合

物的结构也得到了解析, 进一步从结构角度揭示了该酶切割 ssDNA 的机理<sup>[9]</sup>。同样, 细菌 *T. thermophilus* RecJ-Mn<sup>2+</sup>复合物的结构显示, RecJ 蛋白利用双金属离子机理催化水解反应<sup>[10]</sup>。

真核生物 Cdc45 蛋白的晶体结构也得到了解析, 包括人类和痢疾变形虫的 Cdc45 蛋白<sup>[19,39]</sup>。从整体结构上看, 人类 Cdc45 蛋白类似细菌 RecJ 蛋白, 由 DHH 和 DHHA1 结构域和连接区域组成(图 2B)。与细菌 RecJ 蛋白结构不同, 真核生物 Cdc45 蛋白缺少 DHH 催化结构域中关键的氨基酸残基。重要的是, 真核生物 Cdc45 蛋白具有 CMG-interacting domain (CID) 结构域, 而不存在细菌 RecJ 蛋白的 OB 结构域。而古菌 RecJ 蛋白的整体空间结构均类似于细菌 RecJ 蛋白和真核生物 Cdc45 蛋白(图 2C), 既具有细菌 RecJ 蛋白的 DHH 催化结构域, 又具有真核生物 Cdc45 蛋白的 CID 结构域, 表明古菌 RecJ 蛋白既具有核酸酶活性, 又能够形成 CMG 复合物。因此, 古菌 RecJ 蛋白具有独特的结构特征。

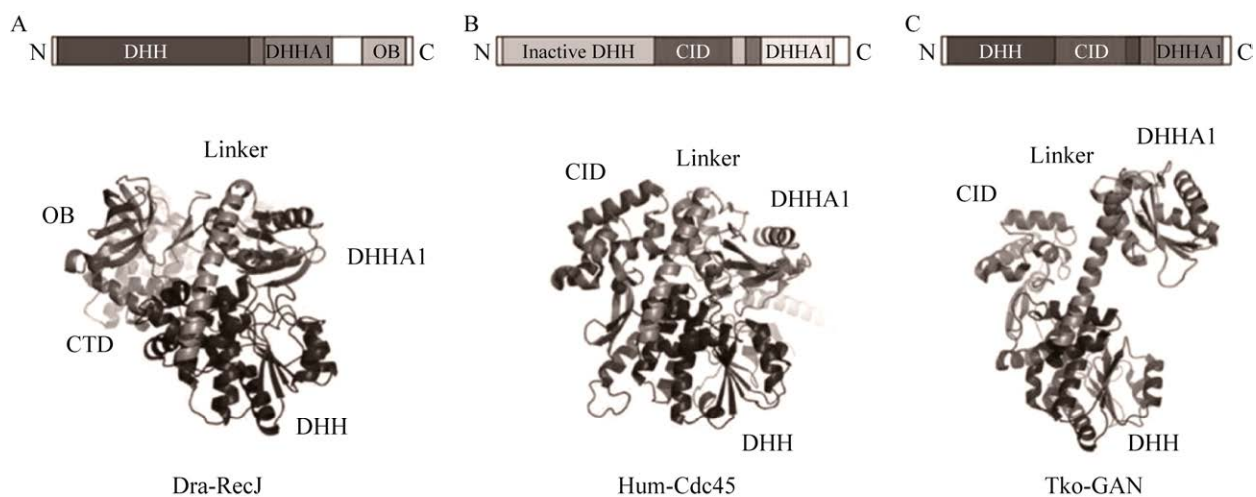


图 2 细菌 RecJ 核酸酶(A)、真核生物 Cdc45 蛋白(B)和古菌 RecJ 蛋白(C)的结构比较<sup>[2]</sup>

Figure 2 Comparison of structures of bacterial RecJ nuclease (A), eukaryotic Cdc45 protein (B) and archaeal RecJ protein (C). Dra-RecJ: *Deinococcus radiodurans* Rec J (PDB: 5F55); Tko-GAN: *Thermococcus kodakarensis* GAN (PDB: 5GHT); Hum-Cdc45: Human Cdc45 (PDB: 5DGO); CTD: C-terminal domain. This figure is modified from this reference [2].

### 3 古菌 RecJ 蛋白

目前,已被研究过的古菌 RecJ 蛋白主要来自广古菌,少数来自泉古菌(仅限于硫化叶菌属的 Cdc45 蛋白)。广古菌 RecJ 蛋白具有 3 个保守的结构域,而泉古菌 RecJ 蛋白缺少具有催化活性的 DHH 结构域(图 2)。表 1 比较了不同古菌 RecJ 蛋白的生化功能,表明古菌编码不同数量的 RecJ 蛋白,且具有功能多样性。

#### 3.1 *Thermococcus kodakarensis* RecJ 蛋白

极端嗜热古菌 *T. kodakarensis* 基因组编码 2 种 RecJ-like 蛋白: TK1252 和 TK0155。TK1252 蛋白称作是 GINS associated nuclease (Tko-GAN)<sup>[43]</sup>,是目前研究最详尽的古菌 RecJ 蛋白,其活性、结构和生理功能均得到了阐明<sup>[31-32,44-46]</sup>。研究发现,Tko-GAN 只具有 5'→3' ssDNA 外切酶活性,类似于细菌 RecJ,但是不能切割 dsDNA 或 RNA。

遗传学分析表明,Tko-GAN 对于 *T. kodakarensis* 细胞的生长和分裂是非必需的<sup>[45]</sup>,

不同于真核生物 Cdc45 蛋白是 DNA 复制和细胞周期所必需的。另外,Tko-GAN 能够去除 5' 端由 DNA 聚合酶 D 的链取代活性所形成的侧翼结构,暗示着该蛋白参与冈崎片段的加工。最新的研究发现,Tko-GAN 能够与 DNA 聚合酶 D 相互作用<sup>[46]</sup>,从而支持这一推测。敲除实验表明,单独敲除 FEN1 和 GAN 对菌株的完整性和生长没有影响,但是同时敲除 FEN1 和 GAN,细胞却无法生长<sup>[45]</sup>,表明细胞内 FEN1 或 GAN 完全能够维持细胞的完整性。进一步的研究发现,Tko-GAN 能够在同时缺失 FEN1 和 RNase HII 的条件下维持细胞的生长,证实了 Tko-GAN 参与冈崎片段的成熟。

*T. kodakarensis* 编码的第 2 个 RecJ 蛋白是 TK0155,称作为 HAN,即与 Hef 作用的核酸酶<sup>[7]</sup>。Hef 蛋白在修复被阻止的复制叉起着必要的作用,主要存在广古菌和一些 Asgard 古菌<sup>[47]</sup>,而在泉古菌中尚未发现。生化实验表明,Tko-HAN 具有 3'→5'外切酶活性,能够切割 ssDNA 和 RNA 底物,不同于 Tko-GAN<sup>[37]</sup>。另外,Tko-Hef

表 1 古菌 RecJ 蛋白的生化功能比较

Table 1 Biochemical function comparison of archaeal RecJ protein

Protein name	Component of CMG complex	Exonuclease activity				References
		ssRNA		ssDNA		
		5'→3'	3'→5'	5'→3'	3'→5'	
Tko-GAN	+	-	-	+	-	[32]
Pfu-RecJ	+	-	+	+	-	[38]
Afu-RecJ	-	-	+	-	+	[40]
Mja-RecJ1	-	+	-	+	-	[41]
Mja-RecJ2	-	-	+	-	+	[41]
Tac-RecJ1	-	-	-	+	-	[33]
Tac-RecJ2	+	-	+	-	+	[33]
Tga-RecJ	N.D.	-	-	+	-	[42]
Sso-Cdc45	+	-	-	-	-	[34]
Sac-Cdc45	+	-	-	-	-	[35]

Tga: *Thermococcus gammatolerans*; Tko: *Thermococcus kodakarensis*; Pfu: *Pyrococcus furiosus*; Sso: *Sulfolobus solfataricus*; Sac: *Sulfolobus acidocaldarius*; Afu: *Archaeoglobus fulgidus*; Tac: *Thermoplasma acidophilum*; Mja: *Methanocaldococcus jannaschii*. “+” indicates the presence of activity; “-” indicates the absence of activity; N.D.: Not determined.

促进 Tko-HAN 活性,而 Tko-HAN 抑制 Tko-Hef 核酸酶活性。遗传学的研究表明, Tko-HAN 对细胞的完整性为非必需的,而  $\Delta$ gan-han 基因突变株在 85 °C 的最适生长条件下不能生长<sup>[37]</sup>。但是,通过插入编码核酸酶缺陷 HAN 的基因到这个突变株的基因组内,该突变株仍不能恢复正常的生长<sup>[37]</sup>,表明缺失 GAN 的不稳定 CMG 复合物不能使 DNA 复制进行,进一步表明 HAN 对于修复被阻止的复制叉的重要性,并且其核酸酶活性是该蛋白在细胞内发挥其功能所必需的。

### 3.2 *Thermococcus gammatolerans* RecJ 蛋白

本实验室探讨了极端嗜热耐辐射古菌 *T. gammatolerans* RecJ (Tga-RecJ) 蛋白的生化功能和催化机理<sup>[42]</sup>。研究发现, Tga-RecJ 在高温条件下具有 5'→3' 方向切割 ssDNA, 类似于 Tko-GAN、Pfu-RecJ、Mja-RecJ1 和 Tac-RecJ1。与 Pfu-RecJ、Afu-RecJ、Mja-RecJ2 和 Tac-RecJ2 不同, Tga-RecJ 缺少 3'→5' 外切 ssRNA 活性。该酶活性的最适温度为 50–70 °C, 最适 pH 为 pH 7.0–9.0, 其活性依赖  $Mn^{2+}$ 。该酶是目前所有报道的 RecJ 蛋白中最为耐热的蛋白。另外, 本实验室在 50–70 °C 温度下测试 Tga-RecJ 切割 DNA 的反应速率, 从而揭示了该酶切割 DNA 的激活自由能为  $(10.5 \pm 0.6)$  kcal/mol, 这是 RecJ 蛋白切割 ssDNA 的激活能量的首次报道。突变分析结果表明, Tga-RecJ D36A、D83A、D105A、H106A、H107A 和 D166A 突变体活性完全损失, 表明氨基酸残基 D36、D83、D105、H106、H107 和 D166 是该酶切割 DNA 的关键位点。

### 3.3 *Pyrococcus furiosus* RecJ 蛋白

极端嗜热古菌 *P. furiosus* 编码两种 RecJ 蛋白: Q8U3Q7 和 Q8TZE0, 其中 Q8U3Q7 的蛋白为 Pfu-HAN, Q8TZE0 的蛋白为 Pfu-RecJ。目前 Pfu-HAN 尚未被研究。Pfu-RecJ 具有完整的 DHH 核酸酶结构域, 具有类似于 Tko-GAN

的 5'→3' ssDNA 活性。与 Tko-GAN 不同的是, Pfu-RecJ 还具有 3'→5' ssRNA 活性, 能够水解单链 RNA 和 RNA/DNA 中的 RNA 链<sup>[38]</sup>。进一步的研究发现, 复制蛋白 A 和 DNA 结合蛋白能够促进 Pfu-RecJ 去除 RNA/DNA 中的 RNA 链, 这暗示着 Pfu-RecJ 可能在体内校对 RNA 引物。另外, Pfu-RecJ 在体外切割 ssRNA 的活性高于切割 RNA/DNA 杂合体的活性, 暗示着该酶参与 RNA 降解。

Pfu-RecJ 蛋白的晶体结构显示, 其结构由 DHH、DHHA1 和 CID 组成, 类似于 Tko-GAN 结构<sup>[48]</sup>。Pfu-RecJ 和 Tko-GAN 结构的不同之处在于连接 DHH 和 DHHA1 结构域的定位不同。类似于 Tko-GAN, Pfu-RecJ 通过其 DHH 结构域结合 Pfu-GINS 中 GINS51 亚基的 B-结构域与 GINS 相互作用, 暗示着 Pfu-RecJ 能够形成 CMG 复合物。另外, Pfu-RecJ 蛋白与 2 个 CMPs 形成复合物的晶体结构也得到了解析, 其结构显示该酶存在由几个带有正电荷的氨基酸残基组成的通道, 用于结合 ssDNA 底物或者释放单个核苷酸产物。缺失 CID 结构域, 导致 Pfu-RecJ 增加 5 倍 5'→3' ssDNA 外切酶活性的  $k_{cat}/K_m$  值和 4 倍 3'→5' ssRNA 外切酶活性的  $k_{cat}/K_m$  值, 表明 CID 结构域调控该酶的活性。

### 3.4 *Thermoplasma acidophilum* RecJ 蛋白

嗜酸热古菌 *T. acidophilum* 基因组编码 2 个 RecJ-like 蛋白, 分别命名为 Tac-RecJ1 和 Tac-RecJ2, 但是不编码 HAN 同源物。生化研究表明, Tac-RecJ1 和 Tac-RecJ2 均是外切酶, 但是它们具有不同的底物偏好性和不同的极性<sup>[33]</sup>。Tac-RecJ1 具有 5'→3' ssDNA 专一性外切酶活性, 类似于 Tko-GAN。然而, Tac-RecJ2 具有 3'→5' 外切酶活性, 能够切割 ssRNA 和 ssDNA, 并且 RNA 是该酶的最适底物。尽管 Tac-RecJ1 与 Tko-GAN 具有相似的底物偏好性和极性, 但

是它不能形成 CMG 复合物, 而 Tko-GAN 却能形成 CMG 复合物。

Tac-RecJ2 通过与 Tac-Gins51 的 B 结构域相互作用, 与 Tac-GINS 按照 2:1 的摩尔比形成稳定的复合物<sup>[33]</sup>。进一步的研究发现, 该复合物能够促进 Tac-MCM 活性, 并且在细胞内证实了 CMG 复合物的存在。但是, Tac-RecJ2 不能直接与 Tac-MCM 相互作用, 在体外并不是激活解旋酶所必需。这些结果表明, 尽管古菌和真核生物 CMG 复合物形成的保守性, 古菌 RecJ 蛋白在 DNA 复制的功能仍不同于 Cdc45。Tac-RecJ1 作为细菌 RecJ 的类似物, 在修复被阻止的复制叉过程发挥功能。另外, Tac-RecJ1 能够降解冈崎片段。因此, *T. acidophilum* 所编码的这 2 个 RecJ 蛋白在复制叉准确前进的不同过程中发挥功能。

### 3.5 *Methanocaldococcus jannaschii* RecJ 蛋白

嗜热产甲烷古菌 *M. jannaschii* 基因组编码 3 个 RecJ-like 蛋白, 其中 2 个 RecJ-like 蛋白 (MJ0977 和 MJ0831) 为 Tko-GAN 同源物, 另一个 (MJ1198) 为 Tko-HAN 同源物。尽管 MJ1198 蛋白的生化功能尚未研究, 但是其 N 段的部分结构得到了解析 (PDB:2K52)。通过在 *E. coli* 中表达 MJ0977 或 MJ0831 蛋白, 能够部分补偿 *recJ* 基因缺失的 *E. coli* 突变株对 UV 的敏感性<sup>[49]</sup>, 表明 RecJ 蛋白参与 DNA 修复, 进一步表明 RecJ 蛋白在进化过程中的功能保守性。

MJ0977 和 MJ0831 蛋白分别定义为 Mja-RecJ1 和 Mja-RecJ2。研究发现, Mja-RecJ1 更加类似于 Tko-GAN 和 Tac-RecJ1, 具有 5'→3' 核酸外切酶活性, 能够切割 ssDNA 和 ssRNA 底物<sup>[41]</sup>。相对于 ssRNA 底物, 该酶偏好 ssDNA 底物。与 Mja-RecJ1 不同, Mja-RecJ2 具有 3'→5' 核酸外切酶活性, 也能够切割 ssDNA 和 ssRNA。

相对于 ssDNA, 该酶更偏好 ssRNA 为底物。另外, 5'端磷酸促进 Mja-RecJ1 活性, 而 3'端磷酸抑制 Mja-RecJ2 活性。与 *T. acidophilum* 不同, 其编码的 Tac-RecJ2 能够与 GINS 相互作用, 而 *M. jannaschii* 所编码的 Mja-RecJ1 和 Mja-RecJ2 均不能与 Mja-GINS 形成稳定的复合物。

### 3.6 *Archaeoglobus fulgidus* RecJ 蛋白

极端嗜热古菌 *A. fulgidus* 基因组编码 3 种 RecJ 蛋白: AF\_0699、AF\_0735 和 AF\_0075。AF\_0735 蛋白在大肠杆菌中表达时, 大部分形成包涵体, 对纯化到极少量可溶性蛋白的活性分析表明, 该蛋白不具有核酸酶活性。而 AF\_0075 蛋白与其他两个 RecJ 蛋白相比, 序列相似性较低, 也不具有核酸酶活性。但是, AF\_0699 蛋白具有核酸酶活性<sup>[40]</sup>。研究发现, 与 Pfu-RecJ 类似, *A. fulgidus* RecJ (Afu-RecJ, AF\_0699) 核酸酶不仅具有单链 DNA 特异性的 3'→5' 外切核酸酶活性, 还具有单链 RNA 3'→5' 外切酶活性<sup>[40]</sup>。Afu-RecJ 的活性需要二价金属离子, 其中 Mn<sup>2+</sup> 是该酶的最适二价金属离子。该酶最适反应温度为 55–65 °C, 其活性受高浓度 NaCl (高于 200 mmol/L) 抑制。进一步的研究发现, Afu-RecJ 对不同长度的单链 DNA 和单链 RNA 具有选择性, 优先切割长度 ≥4 个核苷酸长度的单链 RNA 和 ≥12 个核苷酸长度的单链 DNA。Afu-RecJ 的生化功能特征暗示着该酶在细胞内参与 DNA 修复和 RNA 降解。

### 3.7 硫化叶菌 RecJ-like 蛋白

上述描述的古菌 RecJ 蛋白来自广古菌, 目前泉古菌的 RecJ-like 蛋白的报道, 仅限于硫化叶菌属。 *Sulfolobus solfataricus* Cdc45 (Sso-Cdc45) 蛋白是第一个研究报道的泉古菌 RecJ-like 蛋白<sup>[34]</sup>。该蛋白最初被定义为 RecJdbh, 现在称为 Sso-Cdc45 蛋白。Sso-Cdc45 蛋白与广古菌 RecJ 蛋白的相似性低, 特别是缺少其他



RecJ 蛋白 DHH 催化结构域中的关键催化氨基酸残基(图 2)。因此, Sso-Cdc45 蛋白不具有核酸酶活性, 不是一个核酸酶。进一步的研究发现, Sso-Cdc45 蛋白能够与 GINS 相互作用, 并与 MCM 形成 CMG 复合物<sup>[35]</sup>。同样, 硫化叶菌属中的 *S. acidocaldarius* Cdc45 (Sac-Cdc45)蛋白得到了研究。利用 Sac-Cdc45、Sac-GINS 和 Sac-MCM, 体外构建 Sac-CMG 复合物, 证实了 Sac-Cdc45-GINS 促进 Sac-MCM 活性的功能<sup>[35]</sup>。

### 3.8 Asgard 古菌 RecJ-like 蛋白

目前, 已鉴定的 Asgard 古菌包括 4 种门类: *Thorarchaeota*、*Odinarchaeota*、*Heimdallarchaeota* 和 *Lokiarchaeota*<sup>[50]</sup>。序列分析表明<sup>[2]</sup>, 这 4 种门类的 Asgard 古菌均编码 GAN-like 蛋白, 与 Tko-GAN 具有 30%氨基酸序列相似性, 包含了具有活性的 RecJ-like 结构域。但是只有 *Heimdallarchaeota* 门编码 HAN-like 同源物, 暗示着 *Thorarchaeota*、*Odinarchaeota* 和 *Lokiarchaeota* 在进化过程中丢失了这一基因。

## 4 总结与展望

古菌编码多个 RecJ 蛋白, 具有核酸酶活性和不具有核酸酶活性的 RecJ 蛋白都已被发现, 暗示着古菌 RecJ 蛋白在古菌 DNA 复制和修复以及维持基因组稳定性中发挥作用。古菌 RecJ 蛋白的结构与细菌 RecJ 蛋白的结构高度相似, 并且具有真核生物 Cdc45 蛋白的特征。但是, 古菌 RecJ 蛋白在底物偏好和作用方式上与细菌 RecJ 蛋白存在显著差异。另外, 古菌 RecJ 蛋白与真核生物 Cdc45 蛋白相似, 能够与 MCM 和 GINS 形成复合物, 参与 DNA 复制。因此, 古菌 RecJ 蛋白在古菌 DNA 复制和修复中扮演重要角色。

目前, 利用生物化学、蛋白质晶体学和遗传学的方法对古菌 RecJ 蛋白的活性、结构特征

和生理功能进行了探讨, 从而使人们对古菌 RecJ 蛋白对不同底物偏好性和作用模式有了一定的认识。然而, 古菌 RecJ 蛋白的功能尚未完全弄清楚, 还有许多问题有待于回答:

(1) Tko-GAN 和 Tac-RecJ2 既具有核酸酶活性, 又是 CMG 的组分。作为 CMG 的组分, 当解开 DNA 双螺旋后, 它们是否在复制叉处发挥其核酸酶活性。如果是, 它们作用于什么底物。如果这些蛋白质作为 CMG 的组分没有活性, 它们的活性又如何被抑制。

(2) 古菌 RecJ 蛋白的核酸酶活性不是古菌 CMG 复合物功能所必需的, 至少在硫化叶菌中不需要。因此, 古菌细胞完全有可能存在含有抑制而非永久失活的 RecJ 蛋白的 CMG。在这种情况下, 古菌 RecJ 蛋白是否具有催化作用与结构作用, 取决于它们在溶液中是游离的还是 CMG 的组分。如何区分古菌 RecJ 蛋白的催化作用和结构作用, 需要进一步探讨。

(3) 生化数据表明, Pfu-RecJ 具有校对 3'端错配 RNA 引物的功能, 遗传学分析结果暗示着 Tko-GAN 参与冈崎片段的加工。这样会引起一个问题: 具有 3'→5' ssRNA 外切活性的 RecJ 蛋白的活性中心与其 5'→3' ssDNA 的活性中心是否一致。

(4) 古菌 RecJ 蛋白 3'→5' ssRNA 外切活性与其作为 CMG 成分的功能是如何实现的。

(5) 目前, 仍有一些古菌的遗传操作体系尚未建立, 如何识别这些古菌 RecJ 蛋白(比如 Tac-RecJ1)的生理功能。

### 参考文献

- [1] SRIVASTAV R, SHARMA R, TANDON S, TANDON C. Role of DHH superfamily proteins in nucleic acids metabolism and stress tolerance in prokaryotes and eukaryotes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127: 66-75.



- [2] MACNEILL SA. The archaeal RecJ-like proteins: nucleases and ex-nucleases with diverse roles in replication and repair[J]. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2018, 2(4): 493-501.
- [3] SANCHEZ-PULIDO L, PONTING CP. Cdc45: the missing RecJ ortholog in eukaryotes?[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(14): 1885-1888.
- [4] LIAO HB, LIU MF, GUO XL. The special existences: nanoRNA and nanoRNase[J]. *Microbiological Research*, 2018, 207: 134-139.
- [5] ARAVIND L, KOONIN EV. A novel family of predicted phosphoesterases includes *Drosophila* prune protein and bacterial recJ exonuclease[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23(1): 17-19.
- [6] BAYKOV AA, ANASHKIN VA, SALMINEN A, LAHTI R. Inorganic pyrophosphatases of Family II-two decades after their discovery[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(20): 3225-3234.
- [7] FENG L, CHANG CC, SONG D, JIANG C, SONG Y, WANG CF, DENG W, ZOU YJ, CHEN HF, XIAO X, WANG FP, LIU XP. The trimeric Hef-associated nuclease HAN is a 3'→5' exonuclease and is probably involved in DNA repair[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(17): 9027-9043.
- [8] CHENG KY, XU H, CHEN XY, WANG LY, TIAN B, ZHAO Y, HUA YJ. Structural basis for DNA 5'-end resection by RecJ[J]. *eLife*, 2016, 5: e14294.
- [9] CHENG KY, XU Y, CHEN XY, LU HZ, HE Y, WANG LY, HUA YJ. Participation of RecJ in the base excision repair pathway of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(17): 9859-9871.
- [10] YAMAGATA A, KAKUTA Y, MASUI R, FUKUYAMA K. The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn<sup>2+</sup> ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(9): 5908-5912.
- [11] WAKAMATSU T, KITAMURA Y, KOTERA Y, NAKAGAWA N, KURAMITSU S, MASUI R. Structure of RecJ exonuclease defines its specificity for single-stranded DNA[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9762-9769.
- [12] JIAO JD, WANG LY, XIA WR, LI MF, SUN HX, XU GZ, TIAN B, HUA YJ. Function and biochemical characterization of RecJ in *Deinococcus radiodurans*[J]. *DNA Repair*, 2012, 11(4): 349-356.
- [13] CAO Z, MUELLER CW, JULIN DA. Analysis of the recJ gene and protein from *Deinococcus radiodurans*[J]. *DNA Repair*, 2010, 9(1): 66-75.
- [14] CHENG KY, ZHAO Y, CHEN XY, LI T, WANG LY, XU H, TIAN B, HUA YJ. A novel C-terminal domain of RecJ is critical for interaction with HerA in *Deinococcus radiodurans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1302.
- [15] YAMAGATA A, MASUI R, KAKUTA Y, KURAMITSU S, FUKUYAMA K. Overexpression, purification and characterization of RecJ protein from *Thermus thermophilus* HB<sub>8</sub> and its core domain[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(22): 4617-4624.
- [16] HAN ES, COOPER DL, PERSKY NS, SUTERA VA, WHITAKER RD, MONTELLO ML, LOVETT ST. RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(4): 1084-1091.
- [17] MA LY, WANG W, HAO CZ, ZHENG L, WANG L, ZHENG MG. Coexistence of endonuclease and exonuclease activities in a novel RecJ from *Bacillus cereus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(7): 1349-1355.
- [18] WANG W, MA LY, WANG L, ZHENG L, ZHENG MG. RecJ from *Bacillus halodurans* possesses endonuclease activity at moderate temperature[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(14): 2303-2310.
- [19] KRASTANOVA I, SANNINO V, AMENITSCH H, GILEADI O, PISANI FM, ONESTI S. Structural and functional insights into the DNA replication factor Cdc45 reveal an evolutionary relationship to the DHH family of phosphoesterases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(6): 4121-4128.
- [20] LOVETT ST, CLARK AJ. Genetic analysis of the *recJ* gene of *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157(1): 190-196.
- [21] WANG TC, SMITH KC. Different effects of *recJ* and *recN* mutations on the postreplication repair of UV-damaged DNA in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6): 2555-2559.
- [22] UKITA T, IKEDA H. Role of the *recJ* gene product in UV-induced illegitimate recombination at the hotspot[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(8): 2362-2367.
- [23] HARRIS RS, ROSS KJ, LOMBARDO MJ, ROSENBERG SM. Mismatch repair in *Escherichia coli* cells lacking single-strand exonucleases ExoI, ExoVII, and RecJ[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(4): 989-993.
- [24] BURDETT V, BAITINGER C, VISWANATHAN M,

- LOVETT ST, MODRICH P. *In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(12): 6765-6770.
- [25] LAURETI L, LEE L, PHILIPPIN G, KAHN M, PAGÈS V. Single strand gap repair: the presynaptic phase plays a pivotal role in modulating lesion tolerance pathways[J]. PLoS Genetics, 2022, 18(6): e1010238.
- [26] MORIMATSU K, KOWALCZYKOWSKI SC. RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(48): E5133-E5142.
- [27] SKAAR EP, LAZIO MP, SEIFERT HS. Roles of the *recJ* and *recN* genes in homologous recombination and DNA repair pathways of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 919-927.
- [28] DIANOV G, SEDGWICK B, DALY G, OLSSON M, LOVETT S, LINDAHL T. Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(6): 993-998.
- [29] MAKAROVA KS, KOONIN EV, KELMAN Z. The CMG (Cdc45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all Archaea and eukaryotes[J]. Biology Direct, 2012, 7: 7.
- [30] SIMON AC, SANNINO V, COSTANZO V, PELLEGRINI L. Structure of human Cdc45 and implications for CMG helicase function[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11638.
- [31] NAGATA M, ISHINO S, YAMAGAMI T, OGINO H, SIMONS JR, KANAI T, ATOMI H, ISHINO Y. The Cdc45/RecJ-like protein forms a complex with GINS and MCM, and is important for DNA replication in *Thermococcus kodakarensis*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(18): 10693-10705.
- [32] OYAMA T, ISHINO S, SHIRAI T, YAMAGAMI T, NAGATA M, OGINO H, KUSUNOKI M, ISHINO Y. Atomic structure of an archaeal GAN suggests its dual roles as an exonuclease in DNA repair and a CMG component in DNA replication[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(19): 9505-9517.
- [33] OGINO H, ISHINO S, KOHDA D, ISHINO Y. The RecJ2 protein in the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* is a 3'→5' exonuclease that associates with a DNA replication complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(19): 7921-7931.
- [34] MARINSEK N, BARRY ER, MAKAROVA KS, DIONNE I, KOONIN EV, BELL SD. GINS, a central nexus in the archaeal DNA replication fork[J]. EMBO Reports, 2006, 7(5): 539-545.
- [35] XU YL, GRISTWOOD T, HODGSON B, TRINIDAD JC, ALBERS SV, BELL SD. Archaeal orthologs of Cdc45 and GINS form a stable complex that stimulates the helicase activity of MCM[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(47): 13390-13395.
- [36] FUJIKANE R, ISHINO S, ISHINO Y, FORTERRE P. Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*[J]. Genes & Genetic Systems, 2010, 85(4): 243-257.
- [37] NAGATA M, ISHINO S, YAMAGAMI T, SIMONS JR, KANAI T, ATOMI H, ISHINO Y. Possible function of the second RecJ-like protein in stalled replication fork repair by interacting with Hef[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16949.
- [38] YUAN H, LIU XP, HAN Z, ALLERS T, HOU JL, LIU JH. RecJ-like protein from *Pyrococcus furiosus* has 3'→5' exonuclease activity on RNA: implications for proofreading of 3'-mismatched RNA primers in DNA replication[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(11): 5817-5826.
- [39] KURNIAWAN F, SHI K, KURAHASHI K, BIELINSKY AK, AIHARA H. Crystal structure of *Entamoeba histolytica* Cdc45 suggests a conformational switch that may regulate DNA replication[J]. iScience, 2018, 3: 102-109.
- [40] 王天乐, 刘喜朋. 嗜热古菌 *Archaeoglobus fulgidus* RecJ 核酸酶的表达纯化及酶学特征[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 219-230.  
WANG TL, LIU XP. Expression, purification and characterization of RecJ nuclease from *Archaeoglobus fulgidus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 219-230 (in Chinese).
- [41] YI GS, SONG Y, WANG WW, CHEN JN, DENG W, CAO WG, WANG FP, XIAO X, LIU XP. Two archaeal RecJ nucleases from *Methanocaldococcus jannaschii* show reverse hydrolysis polarity: implication to their unique function in Archaea[J]. Genes, 2017, 8(9): 211.
- [42] ZHANG LK, LIN T, YIN YC, CHEN M. Biochemical and functional characterization of a thermostable RecJ

- exonuclease from *Thermococcus gammatolerans*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 204: 617-626.
- [43] LI Z, SANTANGELO TJ, CUBOŇOVÁ L, REEVE JN, KELMAN Z. Affinity purification of an archaeal DNA replication protein network[J]. *mBio*, 2010, 1(5): e00221-e00210.
- [44] LI Z, PAN M, SANTANGELO TJ, CHEMNITZ W, YUAN W, EDWARDS JL, HURWITZ J, REEVE JN, KELMAN Z. A novel DNA nuclease is stimulated by association with the GINS complex[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6114-6123.
- [45] BURKHART BW, CUBONOVA L, HEIDER MR, KELMAN Z, REEVE JN, SANTANGELO TJ. The GAN exonuclease or the flap endonuclease Fen1 and RNase HII are necessary for viability of *Thermococcus kodakarensis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(13): e00141-e00117.
- [46] OKI K, NAGATA M, YAMAGAMI T, NUMATA T, ISHINO S, OYAMA T, ISHINO Y. Family D DNA polymerase interacts with GINS to promote CMG-helicase in the archaeal replisome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 50(7): 3601-3615.
- [47] SPANG A, EME L, SAW JH, CACERES EF, ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA K, LOMBARD J, GUY L, ETTEMA TJG. Asgard Archaea are the closest prokaryotic relatives of eukaryotes[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(3): e1007080.
- [48] LI MJ, YI GS, YU F, ZHOU H, CHEN JN, XU CY, WANG FP, XIAO X, HE JH, LIU XP. The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* RecJ implicates it as an ancestor of eukaryotic Cdc45[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(21): 12551-12564.
- [49] RAJMAN LA, LOVETT ST. A thermostable single-strand DNase from *Methanococcus jannaschii* related to the RecJ recombination and repair exonuclease from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(3): 607-612.
- [50] ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA K, CACERES EF, SAW JH, BÄCKSTRÖM D, JUZOKAITE L, VANCAESTER E, SEITZ KW, ANANTHARAMAN K, STARNAWSKI P, KJELDEN KU, STOTT MB, NUNOURA T, BANFIELD JF, SCHRAMM A, BAKER BJ, SPANG A, ETTEMA TJG. Asgard Archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity[J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 353-358.