# 原核Ago抗噬菌体功能研究进展

梁佳敏<sup>1,2</sup> 甄向凯<sup>1,2</sup> 欧阳松应<sup>1,2\*</sup> ('福建师范大学生命科学学院,福州 350117; <sup>2</sup>南方生物医学研究中心,福州 350117)

摘要 Ago(Argonaute)是一类广泛存在于各界生物的蛋白家族, 真核生物中, Ago作为RNA干扰(RNA interference, RNAi)过程中沉默复合物的核心组分, 是一个以小RNA分子(长度21 nt)为引导, 特异性降解与之配对的RNA的核糖核酸内切酶。原核生物中存在大量原核Ago(prokaryotic Argonaute, pAgo), 与真核Ago相比, pAgo的组成具有多样性, 然而对pAgo的功能缺乏研究。最近研究表明占pAgo大部分的短pAgo可通过多种方式发挥抗噬菌体的功能。该文总结了近期关于原核生物 短pAgo抗噬菌体功能及分子机制, 对其他短pAgo的功能研究具有参考价值。

关键词 Ago; 原核Ago; 真核Ago; RNA干扰; 抗噬菌体

# **Research Progress on the Anti Phage Function of Prokaryotic Ago**

LIANG Jiamin<sup>1,2</sup>, ZHEN Xiangkai<sup>1,2</sup>, OUYANG Songying<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; <sup>2</sup>FJNU Biomedical Research Center of South, Fuzhou 350117, China)

**Abstract** Ago (Argonaute) is a protein family widely present in various organisms. In eukaryotic organisms, Ago is the core component of silencing complexes in RNAi (RNA interference) processes. It is an RNA endonuclease guided by a small RNA (21 nt in length) that specifically degrades its paired RNA. In prokaryotes, there are numerous Agos, compared to eAgo (eukaryotic Ago), pAgo (prokaryotic Ago) exhibits diversity, but there is a lack of research on its functions. Recent studies have found that short pAgo, which accounts for the majority of pAgo, can exert its anti-phage function in various ways. This article summarizes recent research regarding anti-phage functios and molecular mechanisms of short pAgo, providing reference value for the functional research of other short pAgo.

Keywords Ago; prokaryotic Ago; eukaryotic Ago; RNA interference; anti phage

Ago(Argonaute)是一类数量庞大且保守的蛋白 家族,Ago最早于1998年在一项对拟南芥突变体的研 究中被发现,Ago1的功能丧失会使拟南芥叶片呈管 状,看起来像小鱿鱼,因此,这类蛋白被命名为Argonaute<sup>[1-3]</sup>。真核Ago(eukaryotic Argonaute, eAgo)作为一 类短核酸引导的核酸内切酶,在RNA干扰过程中发挥 重要功能, eAgo可以与外源导入或者内源产生的21 个碱基的小RNA及其他蛋白形成RNA诱导沉默复合体RISC,从而参与转录后基因沉默<sup>[49]</sup>。eAgo蛋白在结构上非常保守,通常由四个结构域N、PAZ、MID和PIWI结构域以及两个linker组成,eAgo整体结构呈一个双叶(bilobal structure)状,其中N-PAZ组成一叶<sup>[10]</sup>,而MID-PIWI组成另一叶<sup>[11]</sup>,引导和靶核酸分子位于它们形成的隧道中。通过对它们的生化研究发现,

\*通信作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

Received: June 25, 2024 Accepted: September 11, 2024

收稿日期: 2024-06-25 接受日期: 2024-09-11

国家自然科学基金(批准号: 321700145)和福州市科技局(批准号: 2022ZD019)资助的课题

This work was supported by the the National Natural Science Foundation of China (Grant No.321700145) and the Fuzhou Science and Technology Bureau (Grant No.2022ZD019)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn



Fig.1 General mechanism of nucleic acid cleavage by Agos (modified from reference [71])

MID和PAZ结构域分别与引导RNA的5'和3'端相互作用, MID结构域负责结合引导RNA的5'端, 而PAZ结构域与引导链的3'末端结合<sup>[12-15]</sup>。PIWI与核糖核酸酶H(RNase H)相似, 其结构域中的DEDX(其中X是天冬氨酸、组氨酸或赖氨酸残基)作为催化四分体, 可以与催化活性所需的两种二价阳离子结合, 赋予Agos核酸内切酶活性, 进而介导靶标链的切割<sup>[16-17]</sup>(图1)。

通过对已测序微生物基因组的分析,发现大约 30%的古菌<sup>[18]</sup>和10%的细菌<sup>[19]</sup>存在原核Ago(prokaryotic Argonaute, pAgo)。然而长期以来,人们对pAgo的 生物学功能认知有限,但是通过研究嗜热菌<sup>[20-21]</sup>中 pAgo参与的生化过程,如引导核酸的结合、靶核酸 的识别及切割等,可以更深入地了解eAgo蛋白的功 能和结构,从而促进人们对eAgo在RNA干扰过程中 的功能的认识<sup>[19]</sup>。与eAgo相比,pAgo的组成和功能 更具多样性,如pAgo不仅可以利用RNA作为引导<sup>[22]</sup>, 还可用DNA作为引导<sup>[23-28]</sup>,其切割的与之互补的核 酸不仅可以是RNA还可以是DNA<sup>[29]</sup>。根据pAgo的 系统发育分析,可将其细分为三类:长A(long A)、长 B(long B)和短pAgo(short pAgo),长A型pAgo和长 B型pAgo与eAgo类似,都具有四个结构域,并且长 A型pAgo具有完整的催化四联体,而长B型pAgo的 PIWI结构域的催化四联体发生突变<sup>[23,30-32]</sup>。与前 两者相比,短pAgo仅仅具有MID和PIWI结构域,而 缺乏N和PAZ结构域,但人们发现其与编码APAZ结 构域的基因位于同一操纵子,并且APAZ结构域通 常与SIR2(silent informator regulator 2)、TIR(Tollinterleukin-1 receptor)等结构域融合<sup>[33]</sup>。近来多项研 究表明,pAgo特别是短的pAgo在抵御噬菌体感染过 程中发挥重要作用<sup>[34-41]</sup>。本论文对近期发现的具有 抗噬菌体功能的pAgo进行系统总结,也为研究其他 类型pAgo的生物学功能提供参考。

# 1 短pAgo相关抗噬菌体防御系统

短pAgo占所有pAgo的比例最高(约60%)<sup>[33]</sup>,由 于其PIWI结构域负责水解核酸的活性位点DEDX催 化四分体发生了突变<sup>[42-46]</sup>,所以几乎所有短pAgo都 是无活性的。虽然科学家们早在2009年就意识到 这类pAgo常与一些编码TIR、SIR2等结构域的基因 位于同一操纵子,然而,他们当时并不清楚短pAgo 的具体功能, 仅推测这些结构域可能弥补了PIWI核酸水解酶活性位点的丧失, 起到降解核酸的作用, 但并未引起重视。直到2022年多篇文章证实短的 pAgo与相邻的效应蛋白共同发挥抗噬菌体功能(表 1)。

KOOPAL等<sup>[47]</sup>在短pAgo系统发育分析中,根据 短pAgo相关效应蛋白的特征,将其分为4个亚分支, 分别为S1A、S1B、S2A、S2B,在这些亚分支里,短 pAgo通常与包含假定酶结构域和APAZ结构域的效 应蛋白相关联,并组成了不同的"短pAgo系统"。在 S1A、S1B中,与短pAgo聚集或融合的效应蛋白包含 SIR2结构域,因此将这两分支的短pAgo系统命名为 "SPARSA系统",即"短的原核Argonaute SIR2-APAZ 系统",相应地,由于S2A和S2B中短pAgo分别与TIR 结构域和DREN结构域相关联,因此将S2A、S2B分 别命名为"SPARTA系统"和"SPARDA系统"。

### 1.1 SPARSA系统

在SPARSA这类短的pAgo抗噬菌体系统中, pAgo相关的效应蛋白是一个N-端具有SIR2结构域 和C-端为APAZ结构域的蛋白(图2A), SIR2也是一类 保守的蛋白家族,在真核生物中,包含SIR2结构域的 是一个NAD<sup>+</sup>依赖的组蛋白脱乙酰化酶, 对染色体形 成、DNA修复和程序性细胞死亡起到重要作用<sup>[48-49]</sup>。 在原核生物中,包含SIR2结构域的蛋白近年来被发 现具有NAD<sup>+</sup>水解酶活性,其包含两个亚结构域,一 个是大结构域包括罗斯曼折叠和一个小结构域<sup>[50]</sup>, NAD<sup>+</sup>结合在两个结构域之间的裂隙中,当NAD<sup>+</sup>结 合时, SIR2催化位点上的组氨基酸能够使NAD<sup>+</sup>分子 糖苷键断裂,进而生成非环腺苷二磷酸核糖(adenosine diphosphate ribose, ADPR)和烟酰胺(nicotinamide, NAM),导致细菌体内NAD<sup>+</sup>的快速消耗,引起细菌 的死亡<sup>[36,51]</sup>。而在SPARSA系统中, ZAREMBA等<sup>[34]</sup> 证明SIR2自身仅可结合NAD+,但不能将其水解,结 合NAD<sup>+</sup>的SIR2可与pAgo相互作用,形成稳定的异 源二聚体, SIR2-APAZ/pAgo识别入侵的噬菌体的 DNA激活SIR2的NAD<sup>+</sup>水解酶活性。

最近通过冷冻电镜解析了GsSPARSA系统及GsSPARSA与引导RNA和靶DNA的结构,进一步证实GsSIR2-APAZ和GsAgo可以形成异源二聚体复合物,pAgo被SIR2结构域和APAZ结构域夹在中

表1 原核长Ago与短Ago功能及结构域对比分析

Table 1 Comparative analysis of functions and domains between long ago and short ago proteins in prokaryotes						
蛋白	类型	来源	引导核酸	靶向核酸	结构域组成	参考文献
Protein	Types	Host	Guide NA	Target NA	Domain organization	References
TtAgo	Long Ago	Thermus thermophilus	DNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[23]
MjAgo	Long Ago	Methanocaldococcus jannaschii	DNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[25]
CbAgo	Long Ago	Clostridium butyricum	DNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[23]
NgAgo	Long Ago	Natronobacterium gregoryi	DNA	RNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[26]
MpAgo	Long Ago	Marinitoga piezophila	RNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[22]
PfAgo	Long Ago	Pyrococcus furiosus	DNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[27]
AfAgo	Long Ago	Archaeoglobus fulgidus	RNA	DNA	MID PIWI	[14]
RsAgo	Long Ago	Rhodobacter sphaeroides	RNA	DNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[7]
KmAgo	Long Ago	Kurthia massiliensis	DNA/RNA	DNA/RNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[29]
AaAgo	Long Ago	Aquifex aeolicus	DNA	RNA	N L1 PAZ L2 MID PIWI	[28]
MapAgo	Short Ago	Maribacter polysiphoniae	RNA	DNA	TIR APAZ MID PIWI	[40]
CrtAgo	Short Ago	Crenotalea thermophila	RNA	DNA	TIR APAZ MID PIWI	[39]
GsAgo	Short Ago	Geobacter sulfurreducens	RNA	DNA	SIR2 APAZ MID PIWI	[35]
KjAgo	Short Ago	Kordia jejudonensis	DNA/RNA	DNA	SIR2 APAZ MID PIWI	[34]
NbaAgo	Short Ago	Novosphingopyxis baekryungensis	RNA	DNA	DREN APAZ MID PIWI	[41]
CmeAgo	Short Ago	Cupriavidus metallidurans	RNA	DNA	DREN APAZ MID PIWI	[41]
SiAgo	Short Ago	Sulfolobus islandicus	RNA	DNA	agaR ago aga1 aga2	[65]
fAfAgo	Short Ago	Archaeoglobus fulgidus	RNA	DNA	N MID PIWI	[67]

NA:核酸。

NA: nucleic acid.



A: GsSPARSA的结构域组成; B: SPARSA系统与引导RNA-靶DNA结合后, 其NAD\*酶活性被激活, 从而保护细胞免受损伤。 A: the domain organization of GsSPARSA; B: upon binding to the guide RNA-target DNA complex, the NAD\* enzyme activity of the SPARSA system is activated, thereby protecting the cell from damage.

图2 SPARSA系统抗噬菌体模式图 Fig.2 Phage resistance model of SPARSA system

间,而pAgo和APAZ共同组成一个类似于典型的Ago 蛋白样的双叶结构(图2B)。令人意外的是,解析的 SPARSA结构中捕捉到了大肠杆菌体内的NAD<sup>+</sup>,发 现NAD<sup>+</sup>呈舒展的构象。NAD<sup>+</sup>结合在SIR2 N-端的 小结构域和Rossmann折叠组成的腔中,并且NAD<sup>+</sup> 与SIR2结构域催化位点H186的距离约为7~8Å,因 此,这解释了SPARSA不能发挥NAD<sup>+</sup>水解酶功能 的原因。此外,他们还解析了SPARSA与引导RNA 和靶DNA的结构,发现结合引导RNA与靶DNA的 SPARSA的SIR2结构域并未发生显著变化。他们进 一步通过动力学模拟方法探究了靶DNA结合激活 SIR2 NADase活性的可能机制:当核酸结合时,SIR2 结构域包含催化氨基酸H186的loop靠近NAD<sup>+</sup>发生 一个3Å的位移,使得水分子可以进入,进而将NAD<sup>+</sup> 水解<sup>[3435]</sup>。

因此SPARSA系统的抗噬菌体机制分为三个阶段。(1) 识别阶段: SIR2-APAZ/pAgo优先利用5'-AU-RNA(以21 nt为主)识别与之互补的入侵噬菌体的DNA,形成杂交双链后嵌入pAgo与SIR2-APAZ形成的核酸结合通道中,并且APAZ与MID结构域之间的

通道在结合杂交双链后不会打开;(2)激活阶段:此前, 非活性的SPARSA虽可结合NAD<sup>+</sup>,然而SPARSA的 NAD<sup>+</sup>水解酶活性位点与NAD<sup>+</sup>糖苷键距离较远,杂交 双链结合后,可能通过改变SIR2小结构域的构象,激 活SIR2的NAD<sup>+</sup>水解酶活性;(3)效应阶段:最后,由于 SIR2结构域中包含催化残基的loop的构象发生变化, 促使SPARSA系统发挥NAD<sup>+</sup>水解酶活性,耗竭内源 性NAD<sup>+</sup>,引发细胞死亡,从而限制噬菌体的传播。

## 1.2 SPARTA系统

APAZ结构域除了与SIR2结构域融合外,其与 短pAgo相邻的基因编码的TIR结构域也融合,这 类pAgo相关的抗噬菌体系统被称为SPARTA[short pAgo (prokaryotic Argonaute)/TIR-APAZ]。TIR结构 域广泛存在于生物中,最初在真核Toll/interleukin-1 受体蛋白中被鉴定为起到信号转导功能的支架蛋 白,2017年首次发现对轴突再生障碍起关键作用的 TIR蛋白SARM1具有NAD<sup>+</sup>水解酶功能,其通过快速 耗竭NAD<sup>+</sup>,进而导致轴突变性<sup>[52]</sup>;2019年研究发现动 物和植物中的TIR结构域同样具有NAD<sup>+</sup>水解酶活性, 随后研究表明微生物中,具有TIR结构域的蛋白同样

通过发挥NAD<sup>+</sup>水解酶功能抵御噬菌体的感染,意味 着TIR对真核生物以及原核生物发挥免疫功能至关 重要<sup>[53-54]</sup>。一些TIR结构域耗尽细胞NAD<sup>+</sup>,作为流产 感染系统发挥作用,而另一些TIR结构域产生信号分 子(例如环状ADPR和v-ADPR)以触发下游效应,例如 在Thoeris系统中, ThsB TIR结构域产生的 cADPR异 构体-3'cADPR作为信号分子激活ThsA,导致细菌内 的NAD<sup>+</sup>的快速降解,引起细菌生长抑制和/或细胞 死亡<sup>[37-38]</sup>。通过对高等生物中TIR NAD<sup>+</sup>水解酶催 化活性的研究,发现TIR NAD<sup>+</sup>酶活性的发挥需要 依靠自身寡聚化,形成NAD+结合口袋,导致TIR结 构域的重排,引发"BB环"构象变化以暴露出催化 位点<sup>[53]</sup>。KOOPAL等<sup>[47]</sup>初步证明在SPARTA系统中, TIR-APAZ以单体形式存在,因此未表现出NADase 活性,而TIR-APAZ可以和pAgo结合,进而与引导 RNA和靶DNA特异性结合,形成具有NAD<sup>+</sup>酶活性 的四聚体。GAO等<sup>[39]</sup>利用冷冻电镜解析了 SPARTA 的结构,发现TIR-APAZ围绕着pAgo,pAgo同样具有 与其他Ago家族蛋白MID和PIWI结构域类似紧凑 的结构,而TIR-APAZ呈现一种延展的结构,TIR和 APAZ都与 MID和 PIWI结构域存在大量盐桥和氢键

介导的相互作用。TIR-MID之间的相互作用使得 TIR结构域不能形成头-尾相接的寡聚化形式,因此, 单体形式的SPARTA并不能水解NAD<sup>+[47]</sup>。此外,当 缺乏靶DNA时, TIR-APAZ C-端的富含酸性氨基酸 的一个"尾巴"插入到pAgo MID结构域(负责结合引 导RNA和靶DNA)的腔中,表明该"尾巴"区域能抑 制引导RNA和靶DNA的结合,使TIR处于抑制状态, 将该区域删除后, SPARTA在体外可检测到NAD<sup>+</sup>酶 活性<sup>[40]</sup>。SPARTA与引导RNA和靶DNA复合物的结 构显示它呈现一个蝴蝶状的四聚体结构(图3)。与 其他Ago蛋白类似, RNA-DNA结合在APAZ与MID、 PIWI结构域带正电荷的沟槽中,而APAZ C-端的"尾 巴"则被核酸推出,变为无序区域,解除了TIR结构 域的自我抑制。激活态四聚体的 SPARTA由两个非 对称的二聚体形成,由于TIR结构域之间的BCD界 面之间存在大量相互作用,因此最终形成了有活性 的TIR四聚体<sup>[39-40,47]</sup>。此外,引导RNA和靶DNA的结 合引发了pAgo之间的相互作用,这对于TIR结构域 的四聚化至关重要。TIR结构域的寡聚化有两种形 式: 支架蛋白形式和酶活形式, 而 SPARTA中 TIR的 四聚化属于前者[40]。



SPARTA系统与引导RNA-靶DNA结合后, 其NAD<sup>+</sup>酶活性被激活, 从而保护细胞免受损伤。 Upon binding to the guide RNA-target DNA complex, the NAD<sup>+</sup> enzyme activity of the SPARTA system is activated, thereby protecting the cell from damage.

图3 SPARTA系统抗噬菌体模式图(根据参考文献[40]修改) Fig.3 Phage resistance model of SPARTA system (modified from reference [40])

基于结构解析以及多个团队的功能实验探索, SPARTA抗噬菌体系统的防御机制也可以分为三个 阶段。(1) 识别阶段: 当外源 DNA(噬菌体感染或外 源DNA转化)入侵时,SPARTA从入侵转录组中募集 具有5'-P的引导RNA(15~50 nt),来靶向与之互补的 高转录DNA进行特异性结合,在此阶段,引导RNA 可能会从MID结构域上释放出来,以便与靶DNA 形成杂交双链;(2)激活阶段:杂交双链的识别导致 SPARTA构象发生变化,并通过 MID结构域促进装 载核酸的 SPARTA二聚化, 在形成二聚体的过程中, 一个功能模块的TIR结构域翻转与另一个功能模 块的TIR结构域头尾相接,在其接触界面上形成了 一个完整的NADase活性位点;(3)效应阶段:两个 SPARTA二聚体通过其TIR结构域形成具有NAD+ 酶活性的四聚体,消耗细菌细胞内的NAD(P)⁺, NAD(P)<sup>+</sup>的缺失将影响细胞的能量供应和其他代谢 途径,最终导致细胞死亡。此外,外源基因的高转 录会导致 SPARTA系统发挥更强的活性从而诱导细 胞死亡,并且SPARTA无法保护单个细胞免受外源 DNA的侵害,其发挥类似于流产感染系统的群体免 疫作用<sup>[40,47]</sup>。

#### ·综述·

#### 1.3 SPARDA系统

许多抗噬菌体系统都通过核酸酶效应物发挥 免疫功能,例如基于环状寡核苷酸的抗噬菌体信号 系统(cyclic oligonucleotide-based anti-phage signaling system, CBASS), 以及CRISPR-Cas系统。APAZ结构 域还与核酸酶结构域融合,如一类注释为DUF4365 的类似于PD-(D/E)XK超家族中的核酸内切酶<sup>[32]</sup>, 它的活性位点与Tn7家族的TnsA转座酶一致<sup>[55-58]</sup>。 在最近的研究中,将这类短的pAgo相关的具有 DUF4365结构域的效应蛋白命名为DREN,并将包 含DREN-APAZ和短pAgo的系统命名为SPARDA系 统<sup>[41]</sup>。PROSTOVA等<sup>[41]</sup>证明了SPARDA同样可以通 过触发核酸酶活性从而保护细菌免受噬菌体的侵 害,并可能通过延迟噬菌体复制和阻止噬菌体诱导 细胞裂解来发挥作用。在 SPARDA系统中, DERN-APAZ与短pAgo共同编码,能够在体外形成二元复 合物<sup>[41]</sup>,通过结构预测发现,DREN-APAZ的C-端与 短pAgo和APAZ形成的核酸结合间隙相结合,并且 邻近MID结构域结合引导核酸的口袋,因此PROS-TOVA等<sup>[41]</sup>认为SPARDA中的核酸酶可能是以识别 位点侧边核酸为降解目标的(图4)。



SPARDA系统与引导RNA-靶DNA结合后,其核酸酶活性被激活,从而保护细胞免受损伤。

Upon binding to the guide RNA-target DNA complex, the nuclease activity of the SPARDA system is activated, thereby protecting the cell from damage.

图4 SPARDA系统抗噬菌体模式图(根据参考文献[41]修改) Fig.4 Phage resistance model of SPARDA system (modified from reference [41]) 类似于SPARTA系统和SPARSA系统, SPARDA 系统的防御机制同样分为三个阶段。(1) 识别阶段: 当SPARDA被噬菌体激活后,此二聚体以RNA为引 导核酸结合序列互补的单链靶DNA,并可能在此过 程中偏好具有5'-P或5'-OH基团和5'-AU基序的引导 RNA(16~24 nt); (2) 激活阶段:当引导RNA与靶DNA 共同存在时,将引发DREN的构象变化,从而释放 DREN的核酸酶活性; (3) 效应阶段: SPARDA被激 活后,将促使体外侧链ssDNA、dsDNA、ssRNA和 DNA-RNA底物的切割,以及体内细胞DNA的无差 别降解,最终导致细胞死亡。因此, SPARDA系统在 细菌免疫防御过程中的功能已被证实,但其确切的 激活机制仍待探究<sup>[41,58]</sup>。

# 2 长pAgo相关防御系统

# 2.1 DdmDE 系统

DdmDE是最近发现的位于霍乱弧菌第七大流 行株(7PET)的质粒防御系统,包含两个蛋白:DdmD 和DdmE。其中DdmD为一个具有N-端RecA解旋酶 结构域和C-端PD(D/E)XK基序的核酸酶;然而DdmE 的一级序列与已知的蛋白没有任何同源性,基于AlphaFold的结构分析,发现它呈现出Ago样的三维结 构,特别是它的MID和PIWI结构域与其他相同结构 域的蛋白具有相似的结构, 推测DdmE可能起到pAgo 类似的DNA感受器的功能,从而感知入侵的质粒,而 DdmD作为效应器发挥清除入侵的小质粒的功能<sup>[59]</sup>。 DdmD的冷冻电镜结构显示单独 DdmD为一个钳子 状的二聚体, 二聚化主要依赖于RecA结构域, 该特 殊的结构堵塞了DNA通道的3′端,阻止DNA的易位, 因此, DdmD处于自我抑制状态。DdmE呈一个类似 pAgo的结构,能够以具有5'-磷酸基的DNA为引导, 靶向DNA,从进化上,DdmE与长A-型pAgo更近<sup>[60]</sup>, 最近YANG等<sup>[61]</sup>证明DdmE包括N、L1、PAZ、L2、 MID和PIWI结构域, PIWI结构域由于突变丧失了核 酸酶功能。此外, DdmE具有独特的 DID结构域, 在 装载单链DNA靶标后,形成D-loop,从而结合DdmD, 每一分子 DdmE将一分子 DdmD二聚体招募到质粒 上,使得DdmD会从一个自抑制的二聚体蛋白转变 为单体,随后,单体DdmD在其解旋酶结构域的驱动 下,沿着质粒DNA转移,并通过其核酸酶结构域高 效地降解质粒DNA。总之, DdmDE-引导DNA-靶 DNA复合物结构为人们提供了一个全面的视角,揭

示了DNA识别是如何触发质粒清除过程的<sup>[62]</sup>。

#### 2.2 BPAN系统

长B型pAgo具有完整的Ago蛋白结构域,但其 PIWI结构域同样处于失活状态,关于该类型pAgo的 生物学功能及机制一直缺乏研究[41]。2023年11月 SONG等<sup>[63]</sup>发现了几种保守的长B型pAgo,其与核 酸酶、SIR2家族蛋白或膜蛋白在遗传和功能上相关 联。如来源于大肠杆菌CAP29菌株的长B型pAgo系 统,其基因簇中编码一个长B型pAgo蛋白EcAgo以 及一个核酸酶bAgaN, 根据之前对短Ago系统提出 的命名,将该系统称为长B型pAgo及其关联核酸酶 (long-B prokaryotic argonaute nuclease, BPAN)系统。 EcAgo可以在5'-P-RNA介导下结合靶ssDNA, bAgaN 是一种非特异性的 DNase, 结构预测发现 bAgaN能 够形成二聚体结构,其与III型CRISPR-Cas系统中 的辅助核酸酶Card1和Can2以及IIS型限制性内切 酶R.BspD61皆具有结构相似性,且可以切割提取自 大肠杆菌的质粒和基因组DNA。为了探究BPAN 系统在体内的生理功能,研究人员在大肠杆菌中表 达BPAN系统,发现BPAN系统能够特异性识别含有 CloDF13复制子的外源遗传元件,在引导RNA的指 导下识别靶DNA后激活效应蛋白bAgaN, 降解细胞 基因组DNA,导致细胞死亡,从而有效清除入侵者 质粒。此外,还研究了另外两种较为保守的长B型 pAgo系统, 其基因簇中编码的关联蛋白分别为SIR2 家族蛋白和跨膜蛋白。其中,长B型pAgo及其关联 SIR2家族蛋白(long-B prokaryotic Argonaute SIR2, BPAS)系统,也由CloDF13复制子激活,通过降解细 胞内的NAD<sup>+</sup>引发流产感染,这与SIR2-like结构域 在许多防御系统中的典型功能一致。然而长B型 pAgo及其关联膜蛋白(long-B prokaryotic Argonaute trans-membrane, BPAM)系统的激活机制则尚不清 楚<sup>[63]</sup>。

## 3 其他pAgo抗噬菌体防御系统

古菌SiAgo形成了系统发育pAgo树中的一个 独立分支,其发挥功能时,依赖两个蛋白: Aga1和 Aga2<sup>[64-65]</sup>。这其中Aga2是一种膜蛋白,可作为毒性 因子发挥功能。在SiAgo系统中,这三种蛋白质形成 大型低聚复合物并发挥原核免疫系统的功能——保 护宿主免受dsDNA病毒SMV1感染<sup>[66]</sup>。在病毒感染 之前,SiAgo和SiAga1在细胞质中或细胞膜上形成异



SiAgo系统与引导DNA-靶DNA结合后, 激活Aga2, 触发细胞膜去极化, 从而导致被入侵细胞死亡。 Upon binding to the guide DNA-target DNA complex, the SiAgo system activates Aga2, triggering depolarization of the cell membrane, thereby leading to the death of the invaded cell.



二聚体复合物;而在病毒感染过程中,病毒基因组的高转录和快速复制为SiAgo和SiAga1提供了充足的DNA和RNA底物,方便二者获取引导核酸以及靶向核酸,但只有它们二者并不足以对抗噬菌体,还需要效应器Aga2的协助。靶向核酸结合后,SiAgo-Aga1复合物向细胞膜迁移,与Aga2结合,从而激活Aga2导致细胞膜极性的丧失,触发被入侵细胞的死亡(图5)。综上,相比其他短pAgo系统,虽然SiAgo依赖于不同的辅助蛋白,但SiAgo系统同样通过流产感染介导细胞免疫过程,从而阻止病毒复制增殖<sup>[67]</sup>。

此外,AfAgo仅包含MID和PIWI结构域<sup>[68]</sup>,通过 解析AfAgo的结构,发现其能形成同源二聚体,并结 合DNA片段的两端形成环状复合物,与其他pAgo-核酸复合物不同的是,在AfAgo-核酸复合物中,只有 引导核酸和靶核酸的末端与MID结构域接触,而其 余的部分远离蛋白<sup>[6]</sup>。最近的一项研究表明,AfAgo 的上游蛋白(AfAgo-N)可替代长pAgo中的N-L1-L2 结构域,与AfAgo形成异源二聚体复合物(fAfAgo), 并优先利用引导RNA识别互补的靶向DNA,并将引 导核酸和靶核酸结合在一个特殊的裂隙里,形成了 比AfAgo-引导-靶核酸复合物更为紧密的组合<sup>[69]</sup>。 从结构上看, fAfAgo类似于短pAgo, AfAgo-N亚基在 空间上掩盖了AfAgo,使其不能参与同源二聚化,然 而fAfAgo异源二聚体和AfAgo同源二聚体之间是否 存在动态平衡尚不清楚。同时, AfAgo-N蛋白与SiAga1类似,其形成的异二聚体可视为SiAgo-SiAga1复 合物的结构等价物,并且发现fAfAgo的下游相关效 应蛋白与SiAga2相似,但二者是否能够形成复合物, 是否能够发挥类似SiAgo系统的相应免疫防御功能, 这些仍然都是悬而未决的问题<sup>[69]</sup>。

## 4 总结与展望

随着研究的深入,人们发现pAgo特别是短pAgo 在抵御噬菌体侵染过程中发挥重要作用,一些短 pAgo如SPARSA、SPARTA等抗噬菌体机制被陆续 揭示,然而其他类型的pAgo系统防御噬菌体的机 制、pAgo与其他微生物免疫系统之间的互相调节 机制等尚待深入研究。此外,仅包含MID和PIWI的 短pAgo可能具有不同的系统发育起源<sup>[27-28,70]</sup>,虽然 它们结构域缺乏催化活性,但其可能与不同的效应 蛋白相关联从而发挥功能,同时,考虑到它们具有使用引导核酸结合靶向目标的能力,因而认为它们可作为"传感器"被用于检测入侵DNA<sup>[71]</sup>。迄今为止,几乎所有短pAgo的功能特征都介导流产感染:它们与"效应"蛋白形成复合物,在引导核酸的介导下被激活,检测"入侵者",从而杀死宿主以保护邻近细胞,但其作用的分子机制尚不清楚。因此大部分短pAgo的多样性还尚待探索,例如,某些S2A分支TIR-APAZ结构域额外融合到Mrr结构域,并且许多S2B分支短pAgo与功能尚不清楚的结构域相关,其遗传背景也尚待研究。

#### 参考文献 (References)

- BOHMERT K, CAMUS I, BELLINI C, et al. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development [J]. EMBO J, 1998, 17(1): 170-80.
- [2] HUTVAGNER G, SIMARD M J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 22-32.
- [3] SHABALINA S A, KOONIN E V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference [J]. Trends Ecol Evol, 2008, 23(10): 578-87.
- [4] BAEK D, VILLÉN J, SHIN C, et al. The impact of microRNAs on protein output [J]. Nature, 2008, 455(7209): 64-71.
- [5] FAEHNLE C R, JOSHUA-TOR L. Argonaute MID domain takes centre stage [J]. EMBO Rep, 2010, 11(8): 564-5.
- [6] MA J B, YUAN Y R, MEISTER G, et al. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein [J]. Nature, 2005, 434(7033): 666-70.
- [7] MIYOSHI T, ITO K, MURAKAMI R, et al. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11846.
- [8] OLOVNIKOV I, CHAN K, SACHIDANANDAM R, et al. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA [J]. Mol Cell, 2013, 51(5): 594-605.
- [9] SONG J J, SMITH S K, HANNON G J, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity [J]. Science, 2004, 305(5689): 1434-7.
- [10] SWARTS D C, JORE M M, WESTRA E R, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute [J]. Nature, 2014, 507(7491): 258-61.
- [11] TADEO X, LÓPEZ-MÉNDEZ B, TRIGUEROS T, et al. Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archea [J]. PLoS Biol, 2009, 7(12): e1000257.
- [12] HEGGE J W, SWARTS D C, VAN DER OOST J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools [J]? Nat Rev Microbiol, 2018, 16(1): 5-11.
- [13] LIU Y, ESYUNINA D, OLOVNIKOV I, et al. Accommodation of helical imperfections in rhodobacter sphaeroides Argonaute ternary complexes with guide RNA and target DNA [J]. Cell Rep, 2018, 24(2): 453-62.
- [14] PARKER J S, ROE S M, BARFORD D. Structural insights into

mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex [J]. Nature, 2005, 434(7033): 663-6.

- [15] WANG Y, SHENG G, JURANEK S, et al. Structure of the guidestrand-containing argonaute silencing complex [J]. Nature, 2008, 456(7219): 209-13.
- [16] LISITSKAYA L, ARAVIN A A, KULBACHINSKIY A. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5165.
- [17] OLINA A V, KULBACHINSKIY A V, ARAVIN A A, et al. Argonaute proteins and mechanisms of RNA interference in eukaryotes and prokaryotes [J]. Biochemistry, 2018, 83(5): 483-97.
- [18] MAKAROVA K S, WOLF Y I, VAN DER OOST J, et al. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements [J]. Biol Direct, 2009, 4: 29.
- [19] SWARTS D C, MAKAROVA K, WANG Y, et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins [J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(9): 743-53.
- [20] 刘子赫, 吴书娴, 甄向凯. 嗜肺军团菌效应蛋白Lpg1972与 CNOT7相互作用研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版) (LIU Z H, WU S X, ZHEN X K. Study on the interaction between Lpg1972 effector protein of legionella pneumophila and CNOT7 [J]. Journal of Fujian Normal University, Natural Science Edition), 2024, 40(1): 23-33.
- [21] 林念念, 甄向凯, 欧阳松应. 磷酸化修饰介导的病原微生物 致病机制研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版)(LIN N N, ZHEN X K, OUYANG S Y. Research on the pathogenic mechanisms of pathogenic microorganisms mediated by phosphorylation modification [J]. Journal of Fujian Normal University, Natural Science Edition), 2024, 40(1): 14-22,33.
- [22] KAYA E, DOXZEN K W, KNOLL K R, et al. A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(15): 4057-62.
- [23] SHENG G, ZHAO H, WANG J, et al. Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(2): 652-7.
- [24] HEGGE J W, SWARTS D C, CHANDRADOSS S D, et al. DNAguided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(11): 5809-21.
- [25] ZANDER A, WILLKOMM S, OFER S, et al. Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii* [J]. Nat Microbiol, 2017, 2: 17034.
- [26] XING J, MA L, CHENG X, et al. Prokaryotic Argonaute protein from natronobacterium gregoryi requires RNAs to activate for DNA interference *in vivo* [J]. mBio, 2022, 13(2): e0365621.
- [27] SWARTS D C, HEGGE J W, HINOJO I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(10): 5120-9.
- [28] YUAN Y R, PEI Y, MA J B, et al. Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage [J]. Mol Cell, 2005, 19(3): 405-19.
- [29] KROPOCHEVA E, KUZMENKO A, ARAVIN A A, et al. A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*

[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(7): 4054-65.

- [30]. BOLAND A, TRITSCHLER F, HEIMSTÄDT S, et al. Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein [J]. EMBO Rep, 2010, 11(7): 522-7.
- [31] RYAZANSKY S, KULBACHINSKIY A, ARAVIN A A. The expanded universe of prokaryotic argonaute proteins [J]. mBio, 2018, doi: 10.1128/mBio.01935-18.
- [32] SUN K, LIU Y, ZHAO W, et al. Prokaryotic argonaute proteins: a new frontier in point-of-care viral diagnostics [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14987.
- [33] GARB J, LOPATINA A, BERNHEIM A, et al. Multiple phage resistance systems inhibit infection via SIR2-dependent NAD<sup>+</sup> depletion [J]. Nat Microbiol, 2022, 7(11): 1849-56.
- [34] ZAREMBA M, DAKINEVICIENE D, GOLOVINAS E, et al. Short prokaryotic Argonautes provide defence against incoming mobile genetic elements through NAD<sup>+</sup> depletion [J]. Nat Microbiol, 2022, 7(11): 1857-69.
- [35] ZHEN X, XU X, YE L, et al. Structural basis of antiphage immunity generated by a prokaryotic Argonaute-associated SPARSA system [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 450.
- [36] WANG X, LI X, YU G, et al. Structural insights into mechanisms of Argonaute protein-associated NADase activation in bacterial immunity [J]. Cell Res, 2023, 33(9): 699-711.
- [37] ESSUMAN K, MILBRANDT J, DANGL J L, et al. Shared TIR enzymatic functions regulate cell death and immunity across the tree of life [J]. Science, 2022, 377(6605): eabo0001.
- [38] OFIR G, HERBST E, BAROZ M, et al. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules [J]. Nature, 2021, 600(7887): 116-20.
- [39] GAO X, SHANG K, ZHU K, et al. Nucleic-acid-triggered NA-Dase activation of a short prokaryotic Argonaute [J]. Nature, 2024, 625(7996): 822-31.
- [40] NI D, LU X, STAHLBERG H, et al. Activation mechanism of a short argonaute-TIR prokaryotic immune system [J]. Sci Adv, 2023, 9(29): eadh9002.
- [41] PROSTOVA M, KANEVSKAYA A, PANTELEEV V, et al. DNA-targeting short Argonautes complex with effector proteins for collateral nuclease activity and bacterial population immunity [J]. Nat Microbiol, 2024, 9(5): 1368-81.
- [42] ARKOV A L. RNA selection by PIWI Proteins [J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(3): 153-6.
- [43] PARKER J S, PARIZOTTO E A, WANG M, et al. Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein [J]. Mol Cell, 2009, 33(2): 204-14.
- [44] PARKER J S, ROE S M, BARFORD D. Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71: 45-50.
- [45] WILLKOMM S, OELLIG C A, ZANDER A, et al. Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein [J]. Nat Microbiol, 2017, 2: 17035.
- [46] YIN H, LI X, WANG X, et al. Insights into the modulation of bacterial NADase activity by phage proteins [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 2692.
- [47] KOOPAL B, POTOCNIK A, MUTTE S K, et al. Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA [J]. Cell, 2022, 185(9): 1471-86.e19.
- [48] AVALOS J L, BEVER K M, WOLBERGER C. Mechanism of

sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD<sup>+</sup> cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme [J]. Mol Cell, 2005, 17(6): 855-68.

- [49] BENNETT C B, SNIPE J R, WESTMORELAND J W, et al. SIR functions are required for the toleration of an unrepaired doublestrand break in a dispensable yeast chromosome [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(16): 5359-73.
- [50] NORTH B J, VERDIN E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases [J]. Genome Biol, 2004, 5(5): 224.
- [51] GALLEGO-JARA J, ORTEGA Á, LOZANO TEROL G, et al. Bacterial sirtuins overview: an open niche to explore [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 744416.
- [52] ESSUMAN K, SUMMERS D W, SASAKI Y, et al. The SARM1 Toll/interleukin-1 receptor domain possesses intrinsic NAD<sup>+</sup> cleavage activity that promotes pathological axonal degeneration [J]. Neuron, 2017, 93(6): 1334-43,e5.
- [53] HORSEFIELD S, BURDETT H, ZHANG X, et al. NAD<sup>+</sup> cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways [J]. Science, 2019, 365(6455): 793-9.
- [54] WAN L, ESSUMAN K, ANDERSON R G, et al. TIR domains of plant immune receptors are NAD<sup>+</sup>-cleaving enzymes that promote cell death [J]. Science, 2019, 365(6455): 799-803.
- [55] BUJNICKI J M, RYCHLEWSKI L. Identification of a PD-(D/E) XK-like domain with a novel configuration of the endonuclease active site in the methyl-directed restriction enzyme Mrr and its homologs [J]. Gene, 2001, 267(2): 183-91.
- [56] ZHAO L, BONOCORA R P, SHUB D A, et al. The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing endonuclease with a PD-(D/E)-XK motif [J]. Embo J, 2007, 26(9): 2432-42.
- [57] STECZKIEWICZ K, MUSZEWSKA A, KNIZEWSKI L, et al. Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(15): 7016-45.
- [58] LU X, XIAO J, WANG L, et al. The nuclease-associated short prokaryotic Argonaute system nonspecifically degrades DNA upon activation by target recognition [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(2): 844-55.
- [59] JASKÓLSKA M, ADAMS D W, BLOKESCH M. Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic Vibrio cholerae [J]. Nature, 2022, 604(7905): 323-9.
- [60] LOEFF L, ADAMS D W, CHANEZ C, et al. Molecular mechanism of plasmid elimination by the DdmDE defense system [J]. Science, 2024: eadq0534.
- [61] YANG X Y, SHEN Z, WANG C, et al. DdmDE eliminates plasmid invasion by DNA-guided DNA targeting [J]. Cell, 2024.
- [62] BRAVO J P K, RAMOS D A, FREGOSO OCAMPO R, et al. Plasmid targeting and destruction by the DdmDE bacterial defence system [J]. Nature, 2024, doi: 10.1038/s41586-024-07515-9.
- [63] SONG X, LEI S, LIU S, et al. Catalytically inactive long prokaryotic Argonaute systems employ distinct effectors to confer immunity via abortive infection [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6970.
- [64] RENO M L, HELD N L, FIELDS C J, et al. Biogeography of the Sulfolobus islandicus pan-genome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(21): 8605-10.
- [65] ZHANG C, PHILLIPS A P R, WIPFLER R L, et al. The essential genome of the crenarchaeal model Sulfolobus islandicus [J]. Nat

Commun, 2018, 9(1): 4908.

- [66] GUO T, HAN W, SHE Q. Tolerance of Sulfolobus SMV1 virus to the immunity of I-A and III-B CRISPR-Cas systems in Sulfolobus islandicus [J]. RNA Biol, 2019, 16(4): 549-56.
- [67] ZENG Z, CHEN Y, PINILLA-REDONDO R, et al. A short prokaryotic Argonaute activates membrane effector to confer antiviral defense [J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(7): 930-43,e6.
- [68] PARKER J S, ROE S M, BARFORD D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity [J]. EMBO J, 2004, 23(24): 4727-37.
- [69] MANAKOVA E, GOLOVINAS E, POCEVIČIŪTĖ R, et al. The missing part: the Archaeoglobus fulgidus Argonaute forms a functional heterodimer with an N-L1-L2 domain protein [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(5): 2530-45.
- [70] DORON S, MELAMED S, OFIR G, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome [J]. Science, 2018, 359(6379).
- [71] BOBADILLA UGARTE P, BARENDSE P, SWARTS D C. Argonaute proteins confer immunity in all domains of life [J]. Curr Opin Microbiol, 2023, 74: 102313.