Science：从结构上揭示I型CRISPR-Cas系统降解靶DNA机制

作者：writer 来源：本站

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/1127.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

2018年7月11日讯，作为最流行的CRISPR 系统，I型CRISPR-Cas的特征是有序的靶标搜索和降解。

首先，多亚基监测复合物Cascade(用于抗病毒防御的CRISPR相关复合物)识别相匹配的两侧具有最佳的前间区序列邻近基序(protospacer-adjacent motif, PAM)的双链DNA靶标，促进CRISPR RNA(crRNA)和靶DNA链之间形成异源双链体，并将非靶DNA链置换掉，从而导致在靶位点上形成R-环(R-loop)。随后，将具有解螺旋酶活性和核酸酶活性的酶Cas3特异性地招募到Cascade/R-loop上并切割和渐进性地降解靶DNA链。来自褐色嗜热裂孢菌(Thermobifida fusca, Tfu)的I-E型Cascade/R-loop和Cas3/单链DNA(ssDNA)复合物的高分辨率结构阐明了PAM识别和R-环形成机制。然而，Cas3招募、DNA切割和降解机制仍然是难以捉摸的。

在一项新的研究中，来自美国康奈尔大学和哈佛医学院的研究人员重建出TfuCascade/R-loop/Cas3(即来自褐色嗜热裂孢菌的Cascade/R-loop/Cas3)三元复合物，并利用单颗粒低温电镜技术(cryo-EM)解析出它在R-环切割前状态和R-环切割后状态下的结构。这些结果为理解I型CRISPR-Cas系统中crRNA指导的DNA降解提供了结构基础。相关研究结果发表在2018年7月6日的Science期刊上，论文标题为Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3。

这些研究人员解析出TfuCascade/R-loop/Cas3在非靶DNA链切割前状态下的分辨率为3.7埃的低温电镜图。Cas3的结合不会引起形成R-环的Cascade复合物发生进一步构象变化，这提示着Cascade-Cas3相互作用在很大程度上是一种构象捕获机制而不是一种诱导契合机制。Cas3-Cascade相互作用完全是由Cascade中的Cse1亚基介导的。Cas3对Cascade的识别是由于与Cascade/R-loop在电荷和表面轮廓上是互补的，但与Cascade的种泡状态(seed-bubble state)并不是互补的。这是因为在R-环充分形成之前，Cse1的C-末端结构域处于一种替代性方向。通过与Cse1的两个结构域进行广泛接触，Cas3能够检测Cse1的表面轮廓发生变化，从而排斥处于这样的功能状态下的Cascade。有条件地将Cas3招募到Cascade上就能够避免错误靶向仅具有部分互补性的DNA。

再者，这些研究人员提供了直接的证据表明一种底物移交机制对I-E型CRISPR干扰是至关重要的。Cas3的HD核酸酶结构域直接捕获非靶DNA链用于链切割，而且这种作用完全绕过了它的解旋酶结构域。这种底物捕获依赖于非靶DNA链中存在的柔性凸起，而且这种切割位点偏好性是由这种招募通路预先确定的。 这些研究人员进一步解析出TfuCascade/R-loop/Cas3在非靶DNA链切割后状态下的分辨率为4.7埃的结构，这就允许他们鉴定出与这种链切割反应相伴随的结构变化。这种结构揭示出由于增加的柔性，R环区域中的完整非靶DNA链消失了。一旦腺苷5-三磷酸(A

TP)水解，与PAM相邻的一半非靶DNA链自发地重新定位到Cas3中的解旋酶结构域的开口处。因此，在ATP水解时，Cas3的解旋酶结构域让非靶DNA链通过它自身并进一步进入Cas3的HD核酸酶结构域，从而进入一种渐进性DNA降解模式。

总之，这些研究人员描述了导致I-E型CRISPR干扰的分子事件的结构-功能特征。CRISPR干扰的出现在Cas3招募步骤中受到严格控制，从而降低脱靶效应。然而，当切割非靶DNA链时，I型CRISPR-Cas系统在靶标破坏方面表现优异，这是因为Cas3渐进性地降解DNA而不是停下来产生双链DNA断裂。这些特征可能解释着为什么I型CRISPR-Cas系统进化成为自然界中最常见的CRISPR-Cas系统。观察I型CRISPR-
Cas系统是否可能转化为一种具有与Cas9不同的实用性的基因组编辑工具将是令人关注的。

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发