脑智卓越中心等在新型RNA编辑工具开发及其优化研究中获进展

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/13717.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！

CRISPR/Cas13是一类RNA介导的靶向RNA切割的系统，它被广泛地应用于RNA敲低、RNA单碱基编辑、RNA定点修饰、RNA活细胞示踪及核酸检测领域。相比于传统的RNA干扰技术，Cas13系统具有更高的敲低效率和特异性；相比于Cas9介导的DNA编辑技术，Cas13不会对基因组造成永久性改变，甚至可通过药物来调控RNA编辑，使其具有可逆性，因此在疾病治疗上具有比较独特的优势。2015年，美国Eugene Koonin实验室和张锋团队合作，利用计算生物学方法在微生物宏基因组数据库中发现了Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)和Cas13c(c2c7)三种系统，并证明了这些系统在哺乳动物细胞中可对靶RNA进行高效地敲低。张锋团队对Cas13和RNA脱氨酶ADAR2进行改造，将其应用于哺乳动物的RNA单碱基编辑。2018年，张锋的学生毕业后报道了Cas13d系统，相对于之前的系统，Cas13d蛋白减少了100到200个氨基酸。其中，RfxCas13d展现出最佳的敲低效率，加上体积小的优势使其受到领域内科研人员的追捧。虽然RfxCas13d只有967个氨基酸，但整个系统已接近单个AAV的装载极限，而基于Cas13d的RNA单碱基编辑工具则更难用单个腺相关病毒（Adeno-associated virus,
AAV）载体进行递送，因此，开发出更小的、高效的RNA编辑工具对临床转化具有重要意义。

5月3日，*Nature Methods*在线发表了题为《利用未获培养的自然微生物中发现新型紧凑型CRISPR-Cas13系统进行可编程RNA编辑》
的研究论文。该研究由中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心（神经科学研究所）、上海脑科学与类脑研究中心、神经科学国家重点实验室研究员杨辉课题组和中国农业大学农学院教授赖锦盛团队合作完成。研究人员通过对微生物大规模宏基因组数据进行计算分析，发现了两类新的CRISPR/Cas13系统；通过功能实验和工程化改造，开发出一套高效率、高特异性的RNA编辑工具，该工具对开发基于RNA编辑的基因治疗手段具有重要的促进作用。

最近报道的Cas13系统是从可培养的微生物基因组数据中挖掘的，但自然界中90%的微生物都是不可培养的，因此，杨辉团队把目标聚焦在挖掘未获培养的自然微生物宏基因组数据。该研究通过计算生物学算法和实验设计，鉴定到两个新的Cas13家族，并命名为Cas13X和Cas13Y。其中，Cas13X.1蛋白比常用的RfxCas13d蛋白要小将近200个氨基酸，为目前最小的Cas13蛋白。通过对大量内源基因位点进行敲低实验，Cas13X.1展现出和RfxCas13d一样的高活性和高特异性。为进一步研究Cas13X.1在抗RNA病毒方面的应用潜力，研究人员分别对H1N1病毒和过表达的部分新冠病毒基因组上多个位点进行靶向切割，发现Cas13X.1在体外展现出良好的病毒抑制效果。最后，杨辉团队将突变的Cas13X.1与ADAR2dd进行融合，并进行了一系列蛋白截短改造，开发出一种迷你型的RNA单碱基编辑工具，通过与之前报道的RNA单碱基编辑系统进行比较发现，基于迷你型C

as13X.1蛋白的RNA单碱基编辑系统（miniCas13X-ADAR2dd）可对靶RNA进行高效的A到I和C到U的编辑。同时，miniCas13X-ADAR2dd比REPAIR和RESCUE系统小将近900aa，可包装到一个AAV里面。此外，全转录组分析显示，迷你碱基编辑器脱靶活性极低，是一项高保真的碱基编辑技术。

值得一提的是，目前Cas13系统应用于临床最大的障碍是Cas13蛋白本身的旁切活性（collateral activity，靶RNA激活的非靶标RNA切割活性）。已有证据表明，Cas13d的旁切活性会对动物细胞和个体产生一定的毒副作用。虽然Cas13X.1在体外切割实验中显示出比Cas13a和Cas13d更低的旁切活性，但Cas13X.1的进一步改进和体内的长期安全性评价对Cas13X.1的最终临床应用具有重要意义。

该研究从未获培养微生物宏基因组数据中鉴定到两个新的Cas13系统，丰富了Cas13家族的多样性；通过大量实验证明了Cas13X.1在RNA编辑方面具有应用潜力，小尺寸很好地解决了Cas13体内递送的问题，有望在未来成为一种高效安全的RNA治疗方法，为疾病（尤其是罕见病）的基因治疗提供更多选择。

该研究由脑智卓越中心博士后胥春龙和周英思、博士研究生肖庆全、博士后贺冰冰和耿冠男等在杨辉、周英思和赖锦盛的指导下完成。杨辉课题组的博士后汪子康和董雪、研究生曹碧蓉和本科生王一凡等其他成员积极参与了该研究。研究工作得到脑智卓越中心流式分选和高性能计算集群平台的协助，获得科学技术部、国家自然科学基金委、中科院、上海市的资助。

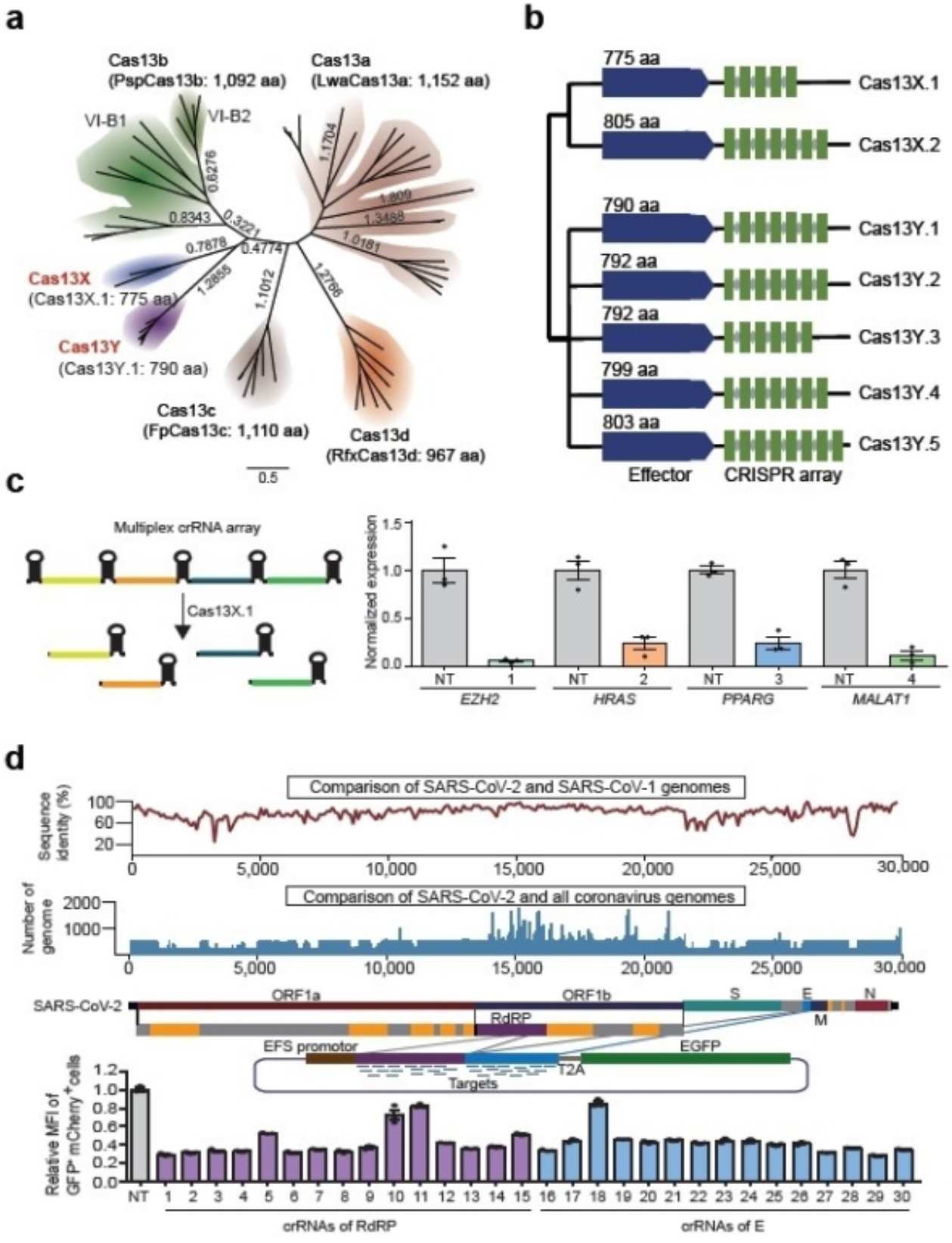

图1.从未获培养的自然微生物宏基因组数据挖掘新的Cas13蛋白应用于哺乳动物与病毒RNA的敲降

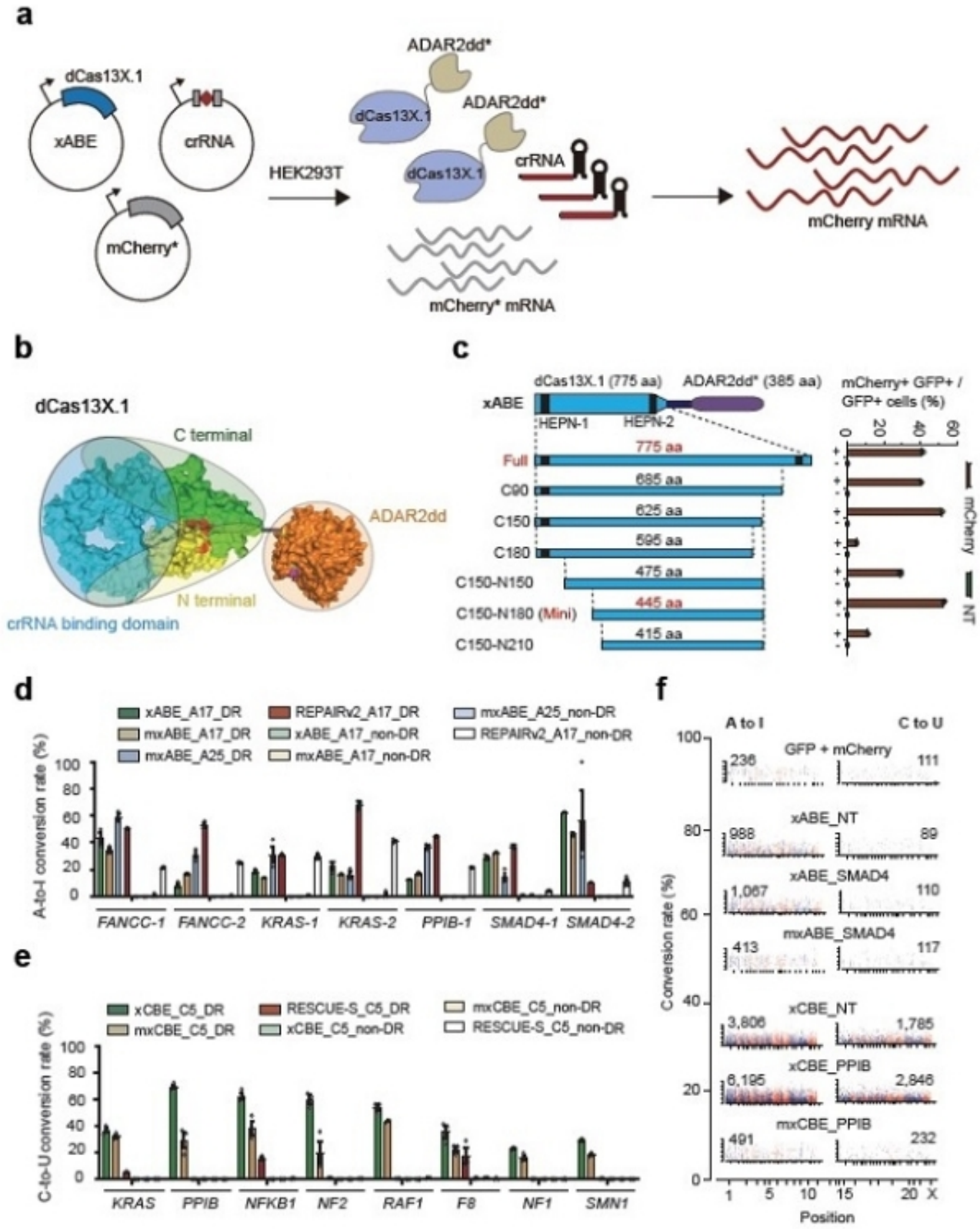

图2.开发基于Cas13X.1的迷你型RNA碱基编辑器应用于高效的A到I和C到U碱基替换

研究团队单位：脑科学与智能技术卓越创新中心

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