
可爱龙实验室成功解析“史上最小Cas9”的分子结构

作者：writer 来源：爱科学

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/18552.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！

可爱龙实验室成功解析“史上最小Cas9”的分子结构。

CRISPR开创了遗传疾病治疗的新时代。诸如流行的CRISPR-Cas9之类的工具已在实验室中被设计用于治愈许多遗传疾病，但是这些工具太大而无法有效地递送给患者。科学界的一项重大工作集中在尝试使CRISPR工具小型化，使其足够小以适应当前的递送方法，例如腺病毒相关病毒(AAV)载体。在小型化Cas9工具方面，目前还没有一种人工引导方法非常成功。

康奈尔大学的可爱龙实验室解决了这个大小问题，成功解析史上最小Cas9的分子结构——一种基于最近在转座子中发现的，Cas9远古亲属成员IscB，该成员大小仅Cas9的三分之一左右。

这项工作以Structural basis for RNA-guided DNA cleavage by IscB- RNA and mechanistic comparison with Cas9为题，发表在5月26日的《科学》杂志上。

Science

Cite as: G. Schuler *et al.*, *Science*
10.1126/science.abq7220 (2022).

Structural basis for RNA-guided DNA cleavage by IscB- ω RNA and mechanistic comparison with Cas9

Gabriel Schuler[†], Chunyi Hu[†], Ailong Ke^{*}

Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, 253 Biotechnology Building, Ithaca, NY 14853, USA

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Email: ailong.ke@cornell.edu

一眼万年的一瞥？

近年，有研究表明Cas9广泛存在着同源的Isc家族。哈佛大学张锋实验室已经证明这些Isc家族可能是Cas9蛋白的远古祖先，拥有更小的尺寸以及更广泛的生物界分布，甚至在真核生物一种陆生绿藻的叶绿体中也鉴定出多个iscB基因座。古语云，祖有功，宗有德，Cas9作为当前最具实力的基因编辑工具，在发现其功能后，在几年内便斩获诺奖，其功能和光芒不必多说，然而从进化

生物学角度看，如此强大的Cas9究竟是如何进化而来的？我们能不能追溯到Cas9的祖先？换句话说，我们能不能看见Cas9的祖先到底什么样子？

细菌内部的这些系统每分钟都在不断地被选择——大自然基本上已经掷骰子数十亿次，并想出了这些非常强大的工具。现在，通过以高分辨率捕捉了它们的祖先面容，我们能更好的定义和利用他们...可爱龙教授表示。

而从捕捉到的高分辨图像看，IscB和Cas9的HNH结构域，Bridge-RuvC结构域保持了和Cas9的高度同源。并且IscB的gRNA部分（guide RNA和RNA的嵌合体）和Cas9的sgRNA也有很多部分高度重合，这些高分辨图像比对充分证实了IscB是Cas9的进化源头。从这个角度看，IscB进化到Cas9花了数百万年，如今我们捕捉到其构象，正所谓一眼万年，即使你再光芒万丈，依然要不辞万年看我一眼。

斗转星移的百万年？

现在大家通用的Cas9，比如SpyCas9，长度达到1384个氨基酸，而IscB仅496个氨基酸，该项工作通过优化，最终可以得到450个氨基酸但是活性不变的版本。该版本仅仅Cas9的三分之一不到。因此横亘在大家面前的一个问题，如此小的祖先是怎样组装，依靠什么完成Cas9类似的功能的呢？或者说Cas9继承了IscB的哪些基因？

可爱龙实验室通过高分辨率结构解析，发现IscB虽然蛋白尺寸很小，但是通过RNA系统融合到引导RNA，再将剩余的RNA替换部分Cas9蛋白来实现更小的尺寸。通过用RNA替换较大Cas9中的蛋白质成分，IscB蛋白依旧保持核心化学（DNA切割）反应中心。虽然IscB拥有更长的RNA骨架（RNA比Cas9的sgRNA要长100个碱基），然而结构比对发现，IscB正是使用这多余的100个nt的RNA去替换了Cas9接近1000个氨基酸的功能，令人惊叹生命的起源初期，已经想好了如何去更节能地去执行生命活动。

当然IscB的RNA后来如何被Cas9替换成蛋白的进化的过程我们依然不得而知，只能说通过百万年的斗转星移，完成了大分子的更迭。IscB也好，Cas9也罢，作为生命进化不同阶段的免疫护卫，没有轰轰烈烈，已然满足。不管如何斗转星移，还是奋不顾身，埋头朝前奔去...如果有一天，你不再想起，我也不再记得，但是有人一定会代替我们寻找到彼此...其实，人生亦如是。

发现最迷你Cas9有何用？

人们对Cas9小型化以扩大使用范围产生了浓厚的兴趣。例如，需要将基于Cas9的基因组编辑器打包到成熟的递送工具中，例如腺病毒相关病毒(AAV)载体。在小型化RNA引导的核酸酶方面，无论是结构引导方法还是定向进化都不是特别成功。哈佛大学David R. Liu教授如是说。

基因编辑器需要很小，以便它们可以将它们放入病毒载体中再进一步递送进入细胞内。可爱龙教授说：有很多超级亮眼的应用进一步需要编辑器与其他酶和功能融合，而且它们的规模更大。如果我们可以将它们放入病毒载体中，那么我们更能实现将它们传递给患者。

基因编辑的小型化，一直都是科学家们一项乐此不疲的工作。目前流行的AAV递送工具的载量仅4.7 kb。而Cas9本身就占了接近4kb，再加上sgRNA表达区，以及现在开放出来越来越多的纷繁复杂的协同物（如cytosine deaminase），很容易超过AAV上限，而寸步难行。如果能找到一个超

级小巧而又具有同样编辑功能的替代者，这也许会引发一项未来基因编辑的革命。

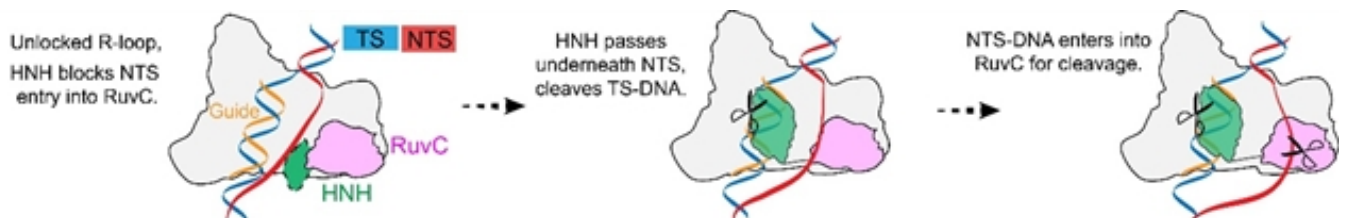
IscB只有1.3 kb, guide- RNA总计也只有0.2 kb左右。因此还有巨大的空间可以让科学家们去填充。只要发挥你的想象力，这个空间总有属于你的一份。

难能可贵的是，张锋团队体内已经证实IscB协同16 nt guide可以实现最大的插入/缺失率，加上其超小身材，因而确实有望成为下一代基因组编辑工具的候选者。

而可爱龙实验室的这些工作，无疑为该候选者投了一票。这是关于了解分子的结构以及它们如何进行化学反应，共同第一作者、微生物学领域的博士生 Gabriel Schuler 说。研究这些Cas9远古结构为我们提供了一个新的起点，可以生成更强大、更易于使用的基因编辑工具。

最迷你Cas9如何避险（脱靶）？

此外，作为基因编辑工具一项基本特质，便是脱靶低，效率高。因此以何种方式去避免脱靶，防止自我损伤？研究人员通过多种状态的比较，发现IscB在16个碱基的guide序列和target DNA没有完全互补配对时，其Non-target strand会以空间位阻的形式阻碍HNH核酸酶去结合Target strand, 这种结局就是两条链都不会被切割，从而保证了安全性。而guide序列和target DNA完全互补配对了，确定是对的人之后，该状态其更大的R-loop空间会允许HNH结构域结合target strand, 从而引发切割，HNH的运动又将Non-target strand推给RuvC核酸酶，引发第二步切割。按部就班，不急不躁，一切都是约定好的,不可以变。



IscB功能机制图：在没有确定是对的目标DNA底物的情况下（左），non-target strand DNA(NTS)通过空间位阻阻碍HNH核酸酶接近target strand（TS）,从而防止脱靶错切；当确定了正确的底物之后（中），更大的R-loop允许了HNH核酸酶结合TS，进行切割；HNH会进一步将NTS推给RuvC核酸酶，进行第二步切割，最终产生双链断裂。

未来

共同第一作者、分子生物学和遗传学系博士后研究员胡纯一说，更好地了解RNA的功能是该研究背后的一个动机。还有很多谜团——比如为什么转座子使用RNA引导系统？RNA起什么作用？RNA自身能否进一步进化为更小尺寸？这些在今后还有很多工作可以做...

研究人员仍然面临的一个挑战是，虽然IscB- RNA在试管中非常活跃，几分钟就能完成切割双链DNA，但它在改变人类细胞中的染色体DNA方面并不那么有效。他们研究的下一步将是利用分子结构来探索他们已经确定的导致人体细胞活性低的原因并实现优化。（来源：科学网）

相关论文信息：DOI: 10.1126/science.abq7220

作者：可爱龙等 来源：《科学》

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](http://www.iikx.com)转发