

生物物理所在III-E型CRISPR-Cas系统研究方面取得进展

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/21720.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！

生物物理所在III-E型CRISPR-

Cas系统研究方面取得进展。CRISPR-Cas系统广泛存在于细菌、古菌和某些细菌的病毒中（bacteriophage），可以特异性识别并降解外源入侵的基因。根据CRISPR-Cas系统干扰机制的不同，这些系统被分为两类，即Class1和Class2。Class1由多个蛋白构成效应复合物（包括I、III和IV型），Class2由单个蛋白行使功能（包括II、V和VI型）。III型CRISPR-Cas系统进一步可分为III-A和III-B两个亚型，其特点是具有Cas10蛋白。Cas10通过与Cas5、多个拷贝的Cas11、Cas7以及一条crRNA（CRISPR RNA）组装成多亚基效应复合物。III-A和III-B型CRISPR-Cas系统的多亚基构成在某种程度上限制了这些系统作为基因编辑和检测工具的可操作性。

2020年，Makarova等报道了新型的III型CRISPR-Cas系统，即III-E型CRISPR-Cas系统。生物信息学分析显示该系统的关键蛋白（称为Cas7-11或gRAMP）是一个包含有数个Cas7结构域和一个Cas11结构域的单链蛋白。生化实验进一步表明，Cas7-11能够加工pre-crRNA使之成为成熟的crRNA，且Cas7-11能够特异性切割单链目标RNA（target RNA，tgRNA）底物。这一生化特点和VI型CRISPR-Cas系统中的Cas13a相似（Class2），但Cas7-11并不显示出Cas13a所具有的底物旁切活性，且Cas7-11敲低细胞RNA时无明显的细胞毒性，这使得Cas7-11在被改造成一款可靠的RNA操控工具方面颇具潜能。Cas7-11基因附近含有多個CRISPR-Cas相关蛋白，包括Csx29（TPR-CHAT）、Csx30、Csx31和RpoE等。尤其是Csx29，可与Cas7-11形成稳定的复合物，并能够抑制Cas7-11切割tgRNA的活性。Csx29由N端的TPR结构域和C端的CHAT结构域组成。CHAT结构被认为具有可调控的蛋白酶活性且与细胞程序性死亡相关。上述研究揭示了III-E型CRISPR-Cas可能具有全新的免疫应答机制。然而，Cas7-11如何加工pre-crRNA、如何识别并切割tgRNA，Csx29如何调节Cas7-11的活性，Csx29如何被激活等机制尚不清楚。为了回答这些科学问题，中国科学院生物物理研究所对来自*Desulfonema ishimotonii*菌的DiCas7-11-crRNA复合物开展了结构与功能研究，并解析了一系列该复合物相关的冷冻电镜结构（图1）。

该研究解析了Di

Cas7-11-crRNA未结

合底物tgRNA的3.53 Å的冷冻电镜结构。

结构分析揭示了Di

Cas7-11-crRNA结构整体呈现“海马”状。Di

Cas7-11由4个Cas7L (Cas7-like) 结构域 (Cas7L1-4)、1个Cas11L结构域和1个Insertion结构域组成, 且一条长38nt的crRNA (15 nt 5 handle + 23 nt spacer) 贯穿于整个DiCas7-11蛋白内部。15 nt 5 handle和Cas7L1、Cas7L2紧密结合, 进一步的生化实验证实Cas7L1保守的残基His43可切开pre-crRNA的-15和-16碱基之间的磷酸二酯键以生成成熟的crRNA。为了剖析Di

Cas7-11-crRNA如何识别并切割tgRNA, 该团队解析了Di

Cas7-11-crRNA与tgRNA复合物的3.64 Å的冷冻电镜结构。结构分析揭示了crRNA和tgRNA形成碱基互

补配对,

阐释了Cas7L2和Cas7

L3切割tgRNA的结构细节。删除Insertion

结构域能够增强DiCas7-11切割tgRNA活性的同时不损害其切割底物的特异性和加工pre-crRNA的能力, 这表明可通过删除Insertion

结构域可将Di

Cas7-11改造成更小的RNA操控工具。研究进一步解析了DiCas7-11-crRNA和含有与5 handle配对的3 anti-tag的tgRNA (tgRNA中与crRNA 5 handle对应的部分称为3 anti-tag) 复合物的冷冻电镜结构 (3.46 Å), 以及DiCas7-11-crRNA和含有与5 handle不配对的3 anti-tag的tgRNA复合物的冷冻电镜结构 (3.14 Å), 同时, 从结构和生化上揭示了tgRNA的3 anti-tag不参与DiCas7-11-crRNA切割底物活性的调节, 这不同于Cas13a的重要性特性。

为了探究DiCsx29调节Di

Cas7-11切割tgRNA的分子机制, 科研人员解析了DiCas7-11-crRNA-Di

Csx29复合物3.29 Å的电镜结构, 发现了Di

Cas7-11-crRNA结构中两段观察不到的区域即FR1 (366-397 aa) 和FR2 (1316-1337 aa) 在结合Di

Csx29后变得稳定有序。FR1与FR2通过形成一对氢键共同阻碍了tgRNA与crRNA在A1至G9的碱基配对, 从而调控了Di

Cas7-11切割tgRNA活性, 这

一结论随之得到生化实验的证实。此外, DiCas7-11-crRNA-Csx29切割tgRNA同样不依赖5

handle碱基的配对与否。通过DiCas7-11-crRNA-Csx29与III-A型CRISPR-

Cas系统以及相关结构的比较, 研究推测DiCsx29活性的激活可能依赖tgRNA 3anti-

tag的调控, 这一假设得到该研究后续生化实验的支持。当tgRNA的3 anti-tag与crRNA 5

handle碱基不配对时, DiCsx29蛋白酶活性被激活并切割DiCsx30, 被切割后的Di

Csx30可能引起宿主的死亡 (图2)。该研究进一步发现, 当tgRNA与crRNA 5

handle碱基不配对大于4 nt, 且与spacer碱基配对不少于12

nt时, DiCsx29均可以有效切割Di

Csx30。由于该蛋白的重要性, 近期有多个类似的工作发表, 与这些工作相比, 研究人员在crRNA的3端区域充当“种子区域” (seed

region) 的作用来调节Di

Cas7-11活性, 以及利用

FR1与FR2所形成的“离子锁”的别构效应来调

节DiCas7-11活性等方面提出了较为新颖的观点 (图2)。

该研究详细阐述了DiCas7-11加工pre-

crRNA和切割tgRNA的机制、DiCsx29对Di

Cas7-11切割tgRNA活性调控的机制以及Di
Csx
29蛋白
酶活性激活
的调控机制。该工作丰
富了科学家对CRISPR-
Cas系统的认知，有助于将DiCas7-11改造为新型的、无细胞毒性的RNA操控工具。

1月26日，相关研究成果以Cryo-EM structure and protease activity of the type III-E CRISPR-Cas effector为题，发表在Nature Microbiology上。研究工作得到科技部、中科院战略性先导科技专项的支持。该研究样品的鉴定、冷冻电镜样品的筛查和数据收集工作得到生物物理所蛋白质科学研究平台和生物成像中心等帮助。

论文链接

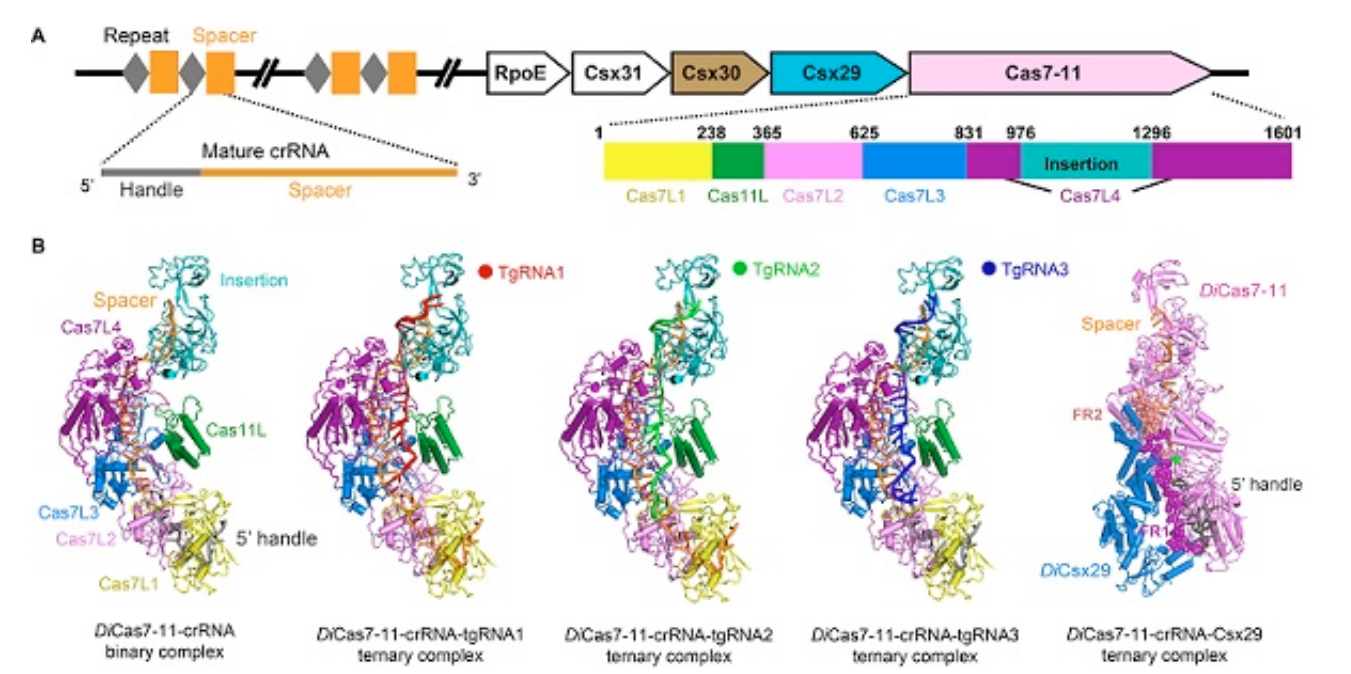


图1.A、*Desulfonema ishimotonii* III-E型CRISPR-Cas系统的基因组成形式；B、解析的一系列DiCas7-11-crRNA相关复合物的结构。

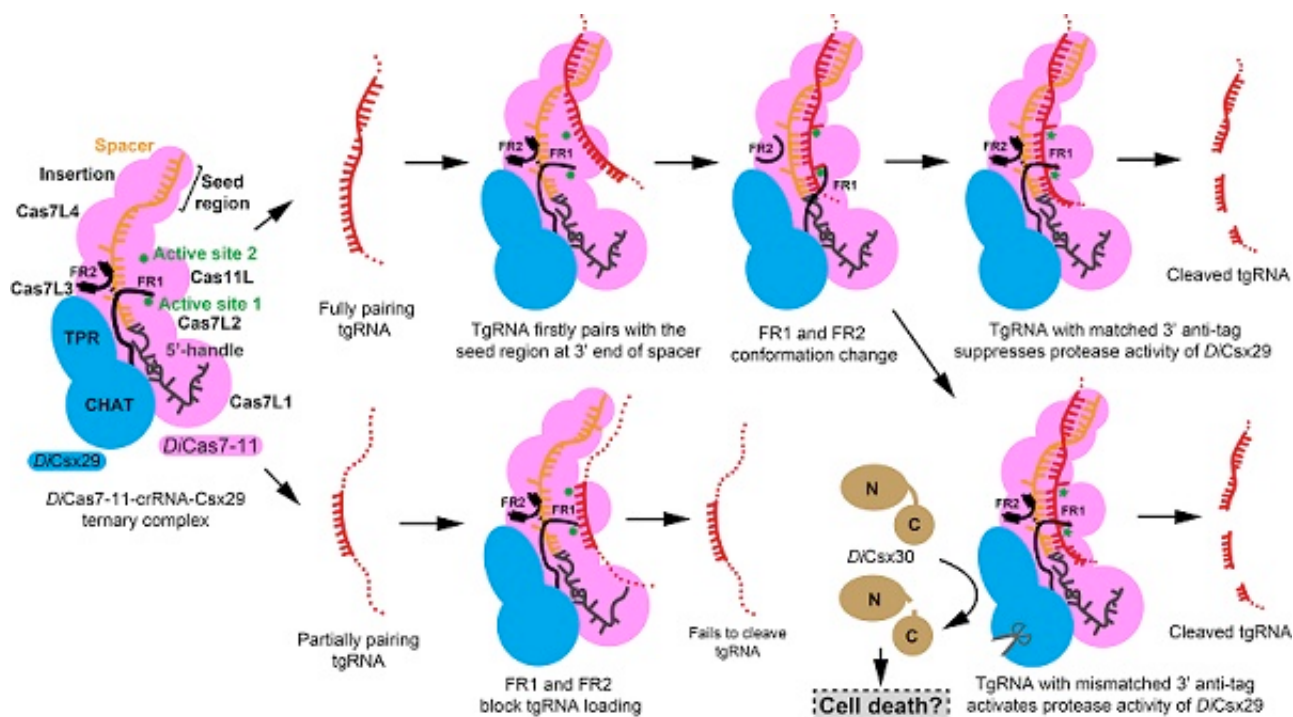


图2.DiCas7-11-crRNA-Csx29活性的调节

研究团队单位：生物物理研究所

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](https://www.iikx.com)转发