

收藏本站 设为首页

English 联系我们 网站地图 邮箱 旧版回顾



面向世界科技前沿, 面向国家重大需求, 面向国民经济主战场, 率先实现科学技术跨越发展, 率先建成国家创新人才高地, 率先建成国家高水平科技智库, 率先建设国际一流科研机构。

——中国科学院办院方针



官方微博



官方微信

首页 组织机构 科学研究 人才教育 学部与院士 资源条件 科学普及 党建与创新文化 信息公开 专题

搜索

首页 > 科研进展

生物物理所揭示噬菌体防御CRISPR-SpyCas9的分子机制

文章来源: 生物物理研究所 发布时间: 2019-01-03 【字号: 小 中 大】

我要分享

2018年12月31日,《分子细胞》(*Molecular Cell*)杂志在线发表了中国科学院生物物理研究所王艳丽课题组在CRISPR-Cas系统研究中取得的最新进展。标题为*Phage AcrIIA2 DNA Mimicry: Structural Basis of the CRISPR and Anti-CRISPR Arms Race*。该研究工作成功解析了Anti-CRISPR蛋白AcrIIA2与*Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9) 蛋白及single-guide RNA (sgRNA) 的三元复合物3.3 埃的晶体结构,并结合体内和体外的功能实验,系统地阐述了噬菌体运用Anti-CRISPR蛋白防御CRISPR-SpyCas9系统的分子机制。王艳丽课题组一直致力于CRISPR-Cas系统抗病毒作用机理的研究,前期研究揭示了一系列重要的CRISPR-Cas系统的作用机理(*Nature* 2014, *Cell* 2015, *Cell Res.* 2016, *Cell* 2017a, *Cell* 2017b, *Mol. Cell* 2017, *Cell* 2018);该工作是王艳丽课题组首次在Anti-CRISPR蛋白防御CRISPR-Cas系统作用机理的研究中取得突破。

CRISPR/Cas系统是古菌和细菌抵抗病毒和质粒侵染的重要免疫防御系统。CRISPR-Cas系统划分为两大类,第一类CRISPR-Cas系统由多亚基组成的效应复合物发挥功能;第二类是由单个效应蛋白(如Cas9, Cas12a, Cas12b, Cas13等)来发挥功能。其中, Cas9, Cas12a, Cas12b均具有RNA介导的DNA核酸内切酶活性, Cas13a具有RNA介导的RNA核酸酶活性。面对细菌的免疫系统(CRISPR-Cas),噬菌体也相应进化出了自己的防御系统(Anti-CRISPR)。2017年首次发现了*Listeria monocytogenes* 噬菌体来源的四个Anti-CRISPR蛋白, AcrIIA1, AcrIIA2, AcrIIA3 和AcrIIA4。研究发现AcrIIA2和AcrIIA4蛋白在细胞内能够抑制SpyCas9的基因编辑活性。随后的结构和功能研究表明AcrIIA4通过阻断DNA与SpyCas9的结合来抑制SpyCas9的功能,然而AcrIIA2抑制SpyCas9活性的分子机制一直未能阐述清楚。

在该研究中,研究人员首先通过生化实验发现AcrIIA2只与结合有sgRNA的SpyCas9二元复合物结合,并不与自由状态下的SpyCas9结合,也并不与同时结合有sgRNA和dsDNA的SpyCas9三元复合物结合。为了研究AcrIIA2直接抑制SpyCas9活性的分子机制,研究人员利用X-ray晶体学的方法成功解析了AcrIIA2-SpyCas9-sgRNA的三元复合物晶体结构(3.3 埃)。结构发现AcrIIA2是由三个 α 螺旋及一个 β 折叠组成的紧凑结构,它结合在SpyCas9的一个带正电荷的凹槽区域。该区域由PI、HNH、WED和REC2结构域形成。PI结构域上R1333和R1335是识别dsDNA的PAM序列的关键氨基酸, AcrIIA2通过与R1333和R1335形成稳固的氢键从而阻断SpyCas9对PAM序列的识别,进而阻止SpyCas9对dsDNA的结合。而AcrIIA2的 α 1螺旋与HNH结构域的相互作用可以锚定HNH结构域,阻止其结合DNA必须发生的构象变化。另外,通过结构比对分析发现AcrIIA2有大量的带负电荷的氨基酸占据着dsDNA中PAM结合的位置,这表明AcrIIA2模拟带负电荷的DNA与SpyCas9结合从而阻止DNA与SpyCas9的结合。有趣的是,竞争性结合实验表明AcrIIA2并不能取代已经与SpyCas9-sgRNA结合的dsDNA,而dsDNA也不能取代已经与SpyCas9-sgRNA结合的AcrIIA2。总之,通过结构和功能实验的证明, AcrIIA2主要通过三个步骤来抑制dsDNA的结合。首先, AcrIIA2可以阻断PAM的识别;其次, AcrIIA2占据了dsDNA的结合位点;最后, AcrIIA2通过限制HNH结构域的构象变化来抑制dsDNA的结合。

目前, SpyCas9蛋白作为基因组编辑工具被广泛应用于DNA领域的基因编辑,克服了传统基因编辑技术步骤繁琐、耗时长、效率低等缺点,以其较少的成分、便捷的操作以及较高的效率满足了大多数领域的基因编辑需求,并有着潜在的临床应用价值。但是CRISPR-SpyCas9基因编辑系统也存在着一定的脱靶问题,该研究对Anti-CRISPR蛋白抑制SpyCas9活性分子机制的阐述为控制或终止SpyCas9活性提供了新的参考和思路。有望将Anti-CRISPR蛋白开发成新的基因编辑终止工具,实现精准基因编辑。

王艳丽为论文通讯作者。王艳丽课题组的刘亮为论文第一作者。该研究得到科技部、国家自然科学基金以及中科院战略性先导科技专项(B类)的资助,上海同步辐射光源(SSRF)以及日本同步辐射光源Spring-8为该研究提供了重要的技术支持。

[文章链接](#)

热点新闻

“南仁东星”等“入选”习近平主席2...

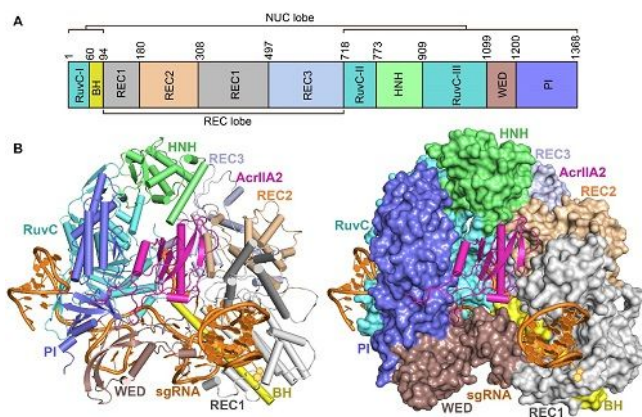
中科院党组学习贯彻庆祝改革开放四十周...
中国成功实现人类探测器首次月背软着陆
《科技强国建设之路:中国与世界》入选...
中科院与天津市举行科技合作座谈
中科院党组传达学习贯彻中央经济工作会...

视频推荐

**【新闻联播】“率先行动”计划 领跑科技体制改革****【北京卫视】怀柔从“西大荒”到科学城**

专题推荐





图注: AcrIIA2-SpyCas9-sgRNA三元复合物的晶体结构。(A) SpyCas9的结构域; (B) AcrIIA2-SpyCas9-sgRNA三元复合物的结构展示图。

(责任编辑:叶璐优)



© 1996 - 2019 中国科学院 版权所有 京ICP备05002857号 京公网安备110402500047号 联系我们
地址:北京市三里河路52号 邮编:100864