



当前位置：首页 > 新闻动态 > 科研进展

青岛能源所与德国弗莱堡大学合作揭示CAST基因编辑系统的内源转录调控机制

供稿部门：微生物制造工程中心

发布时间：2023-02-19 | 【大 中 小】 | 【打印】 【关闭】

CRISPR-Cas基因编辑技术是本世纪颇具影响力的颠覆性创新技术，其发明者荣获2020年诺贝尔化学奖。当前已开发CRISPR-Cas基因编辑工具多依赖于靶点DNA双链切割，并需借助宿主自身的同源重组或者非同源末端连接DNA修复系统实现基因编辑，脱靶效应和编辑效率低是其瓶颈问题，阻碍了该技术在人类疾病治疗等关键领域的应用。开发更高效精准的无需DNA双链断裂的基因编辑工具是该领域亟待解决的科学问题。

V-K型CRISPR相关转座酶（CRISPR-associated transposases, CAST）系统可借助转座机制而非DNA双链断裂实现基因的靶向整合插入，在精准、多重、无痕编辑及大片段删除、插入等方向表现出巨大应用潜力，引起领域内多个顶尖团队的重点关注，但研究方向尚局限于其基因编辑能力的应用探索和核心组分蛋白结构的解析，对其内源调控机理知之甚少。近日，青岛能源所与德国弗莱堡大学相关团队合作，证实CAST系统在原生宿主蓝细菌中受控于一类新型MerR-type转录调控因子CvkR (Cas V-K repressors)。该研究对CAST系统原型工作模式的认识和基因编辑工具的开发优化具有重要意义，相关成果发表于Nature Communications杂志《自然·通讯》。

CRISPR-Cas是原核生物中分布广泛的一类免疫防御系统，可以攻击入侵的病毒、质粒等外源遗传元件，保护宿主细胞。转座子则是可移动的遗传因子，能够在物种基因组上“跳跃”。因此，前者保持基因组的完整性，后者则破坏基因组的完整性，两者是“天敌”。而CAST是上述防御和进攻元件的兼容系统，是生命进化史上“敌对势力”之间携手合作的典型案例，这一“化敌为友”的实现，即由转录调控因子CvkR来“协调”完成。

蓝细菌是地球上最古老的生命形式之一，包含丰富多样的CRISPR-Cas系统，本研究选择了一类可以进行遗传操作的丝状蓝细菌鱼腥藻PCC 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120) 作为研究模式，该藻株基因组上至少包含11种CRISPR元件，其CAST系统 (AnCAST) 涵盖一个长约21 kb的基因簇，包含CRISPR模块 (*cas12k*、CRISPR array、tracrRNA、crRNA)、Tn7转座模块 (*tnsB*、*tnsC*、*tniQ*) 和运载基因模块三大组分 (图1)。CAST系统的工作原理是由Cas12k效应蛋白和转座酶协同作用来催化RNA指导的DNA转座，可实现在protospacer下游单向插入DNA。

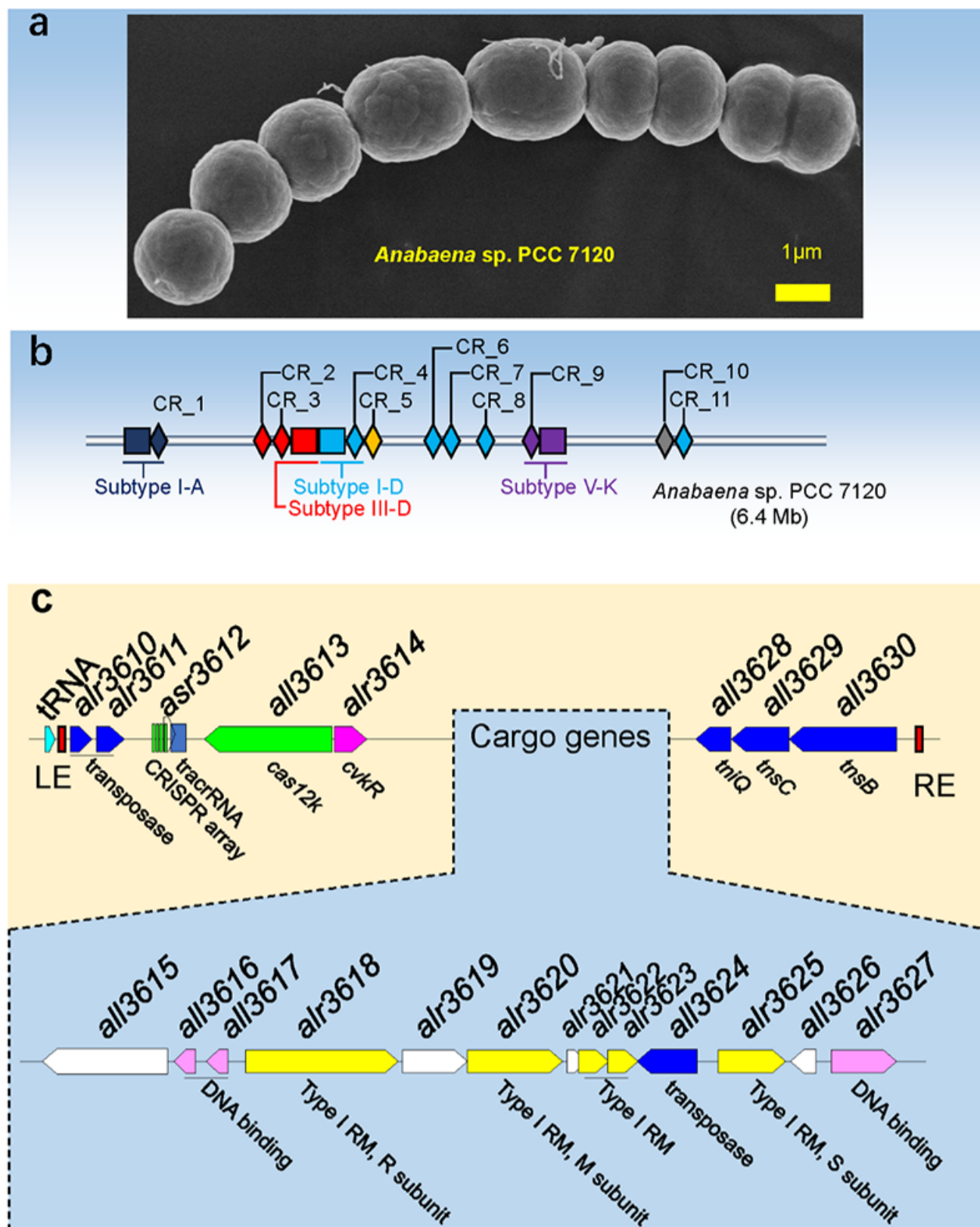


图1 鱼腥藻PCC 7120 CAST (AnCAST) 系统

本研究立足AnCAST，基于全局性生物信息学分析，证实 $cvkR$ 基因广泛存在于蓝细菌CAST系统，与 $cas12k$ 邻近且反向排布。通过遗传学分析发现该系统的基因表达具备一个鲜明特征，即 $cas12k$ 和 $cvkR$ 均转录形成无5'-非翻译区（5'-UTR）的leaderless mRNA，并证实CvkR在原生宿主中抑制CAST核心组分 $cas12k$ 、 $tnsB$ 和 $tracrRNA$ - $crRNA$ 的表达，是AnCAST的转录抑制因子。本研究还借助生化实验，鉴定了CvkR转录因子特异性识别的核心motif（5'-AnnACATnATGTnnT-3'），深度解析了CvkR靶标启动子的序列特征（图2）。

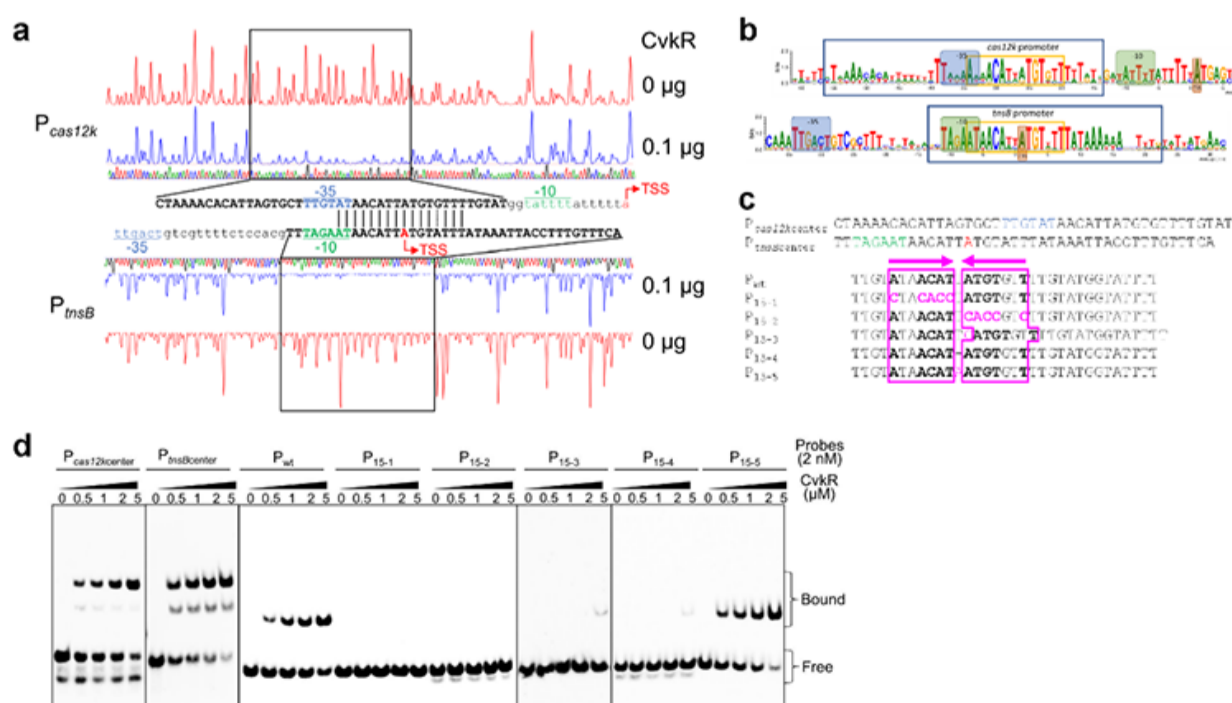


图2 AnCAST系统转录抑制因子CvkR识别motif的鉴定

为了进一步探究CvkR转录调控因子的作用机制，该工作还获得了1.6埃分辨率的CvkR晶体结构。证实该因子在溶液中以二聚体形式存在，具备典型MerR家族转录因子的基本特征

(DNA结合结构域、二聚化结构域和效应物结合结构域)，但其二聚化和效应物结合结构域的结构折叠模式均与结构已知MerR家族成员差别显著，是一类非常新颖的MerR-type转录调控因子。研究人员还基于定点突变和系列生化实验，初步鉴定了CvkR蛋白参与结合DNA的关键氨基酸残基（图3）。

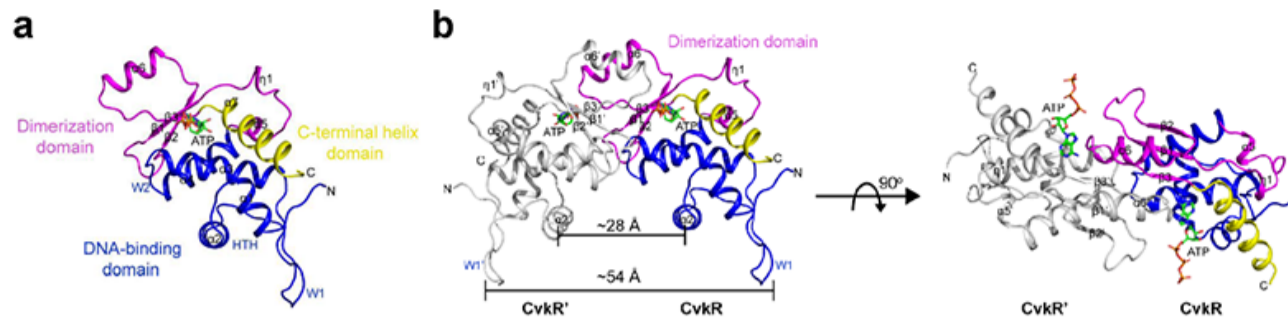


图3 MerR-type转录因子CvkR蛋白结构解析

综上所述，该工作系统解析了AnCAST系统的内源转录调控机制，鉴定了一个新型MerR-type转录调控因子CvkR，发现其对CAST系统关键组分的表达起核心调控作用。本研究为未来新型位点特异性转座型基因编辑工具的开发奠定了重要的理论基础。

德国弗莱堡大学Wolfgang R. Hess教授、青岛能源所微生物制造工程中心吕雪峰研究员和朱涛副研究员为该论文的共同通讯作者，德方Marcus Ziemann、Viktoria Reimann和微生物制造工程中心梁雅静副研究员为本文的并列第一作者。本研究获得了国家重点研发计划、中德国际(地区)合作与交流项目、国家自然科学基金、青岛能源所科研创新基金等项目的资助。（文/图 朱涛 梁雅静）

原文链接：<https://www.nature.com/articles/s41467-023-36542-9>

Marcus Ziemann[#], Viktoria Reimann[#], Yajing Liang[#], Yue Shi, Honglei Ma, Yuman Xie, Hui Li, Tao Zhu^{*}, Xuefeng Lu^{*}, Wolfgang R. Hess^{*}. CvkR is a MerR-type transcriptional repressor of class 2 type V-K CRISPR-associated transposase systems. *Nature Communications* 14, 924. (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36542-9>

版权所有 © 中国科学院 鲁ICP备12003199号-2 鲁公网安备 37021202001253号
地址：山东省青岛市崂山区松岭路189号 邮编：266101 Email: info@qibebt.ac.cn
电话：+86-532-80662776 传真：+86-532-80662778

