

欢迎访问哈尔滨工业大学新闻网！今天是2018年10月13日 星期六！

网站首页 学校要闻 综合新闻 人才培养 科研在线 服务管理
深度策划 时势关注 理论学习 他山之石 哈工大报 热点专题

学校要闻

当前位置：首页

黄志伟课题组在《自然》发表论文揭示Anti-CRISPR蛋白抑制SpyCas9分子机制

2017年04月28日 08时07分19秒 新闻网 浏览次数： 8811

哈工大报讯（王计/文）近日，我校生命学院黄志伟教授课题组通过研究揭示Anti-CRISPR蛋白抑制活性的分子机制，为设计时间、空间特异性地，条件性地精确控制SpyCas9基因编辑活性的工具提供了基础。4月27日，该项研究成果以研究论文形式在《自然》（《Nature》）在线发表，题目为《Anti-CRISPR制CRISPR-SpyCas9活性的分子机制》（Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-protein）。

CRISPR-Cas系统是细菌编码的用来保护细菌免受噬菌体感染的适应性免疫系统，该系统通过crRNA核酸酶剪切入侵病毒的DNA或者RNA从而防御病毒感染。由于CRISPR-Cas系统与sgRNA组合具备高效、便捷”目的DNA的能力，CRISPR II-A亚型系统之一的链球菌Cas9（SpyCas9）系统已被广泛应用于全世界生物医学研究以及基因治疗领域，进行细胞、组织或个体内DNA的敲除、激活、修饰、突变等，而且该成为目前最重要的、也是最广泛使用的基因编辑工具。

但是，如何减少SpyCas9过度激活或者长时间活性带来的基因编辑脱靶效应，以及如何对SpyCas9的时间、空间或条件性的精确控制，是当下SpyCas9系统用于细胞或组织基因编辑、基因治疗等亟需解决具挑战性的科学问题。早先的研究发现一类来自于Listeria monocytogenes前噬菌体的Anti-CRISPR基等在细胞内能够抑制SpyCas9的基因编辑活性，然而这些Anti-CRISPR基因抑制SpyCas9活性的分子机制清楚。

为了研究AcrIIA2或AcrIIA4是否能够直接结合SpyCas9，课题组首先建立体外生物化学研究系统，Anti-CRISPR蛋白AcrIIA2或AcrIIA4直接结合SpyCas9-sgRNA复合物，有趣的是AcrIIA2或AcrIIA4只和sgRNA的SpyCas9有相互作用，而和单独SpyCas9并没有相互作用；进一步实验发现AcrIIA2或AcrIIA4能制SpyCas9介导的目的DNA的剪切。

为了研究AcrIIA4直接抑制SpyCas9活性的分子机制，课题组纯化出SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4复合物结构生物学研究方法解析了SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4复合物的晶体结构，该复合物结构揭示AcrIIA4蛋白一个新的折叠，它结合在SpyCas9的CTD、TOP0和RuvC三个结构域形成的凹槽区域。该凹槽区域正是SpyCas9 PAM DNA的结合位点；另外来自AcrIIA4的 β 1折叠片前的Loop与RuvC活性位点接触也加强了AcrIIA4的抑制作用。上述结构观察结果显示AcrIIA4和底物PAM DNA竞争性结合SpyCas9，AcrIIA4比底物PAM DNA强的亲和力的实验结果进一步支持了结构观察的结果。接下来的生化实验结果进一步证实AcrIIA4结合抑制底物PAM DNA结合SpyCas9，从而拮抗SpyCas9的活性。

非常显著的是，AcrIIA4的酸性氨基酸Asp14、Asp37、Glu40、Asp69和Glu70的位置完全与结合SpyCas9 PAM DNA的磷酸主链位置一致，而且上述AcrIIA4的氨基酸直接和SpyCas9 PI结构域上的PAM DNA识别Glu1108、Ser1109、Ser1216、Lys1200、Arg1335和Arg1333互作。这些结构观察结果揭示AcrIIA4通过DNA结合SpyCas9。SpyCas9蛋白的AcrIIA4结合氨基酸在同亚型*N. meningitidis* Cas9 (NmeCas9)中保守，而同亚型II-C *Listeria monocytogenes* Cas9 (LmoCas9)中并不保守，从而很好地解释了AcrIIA4为什么能抑制LmoCas9的活性，却不能抑制NmeCas9的活性。

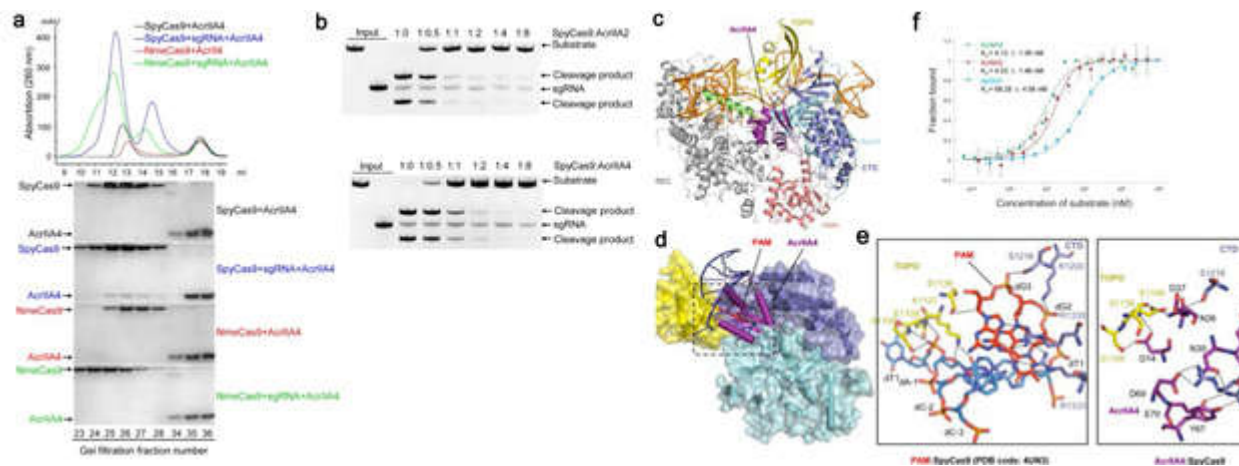
课题组通过进一步结构比较、分析发现，单独SpyCas9上并不存在AcrIIA4的结合位点，SpyCas9-sgRNA复合物的形成，使得SpyCas9构象发生显著变化，组装形成AcrIIA4结合位点，从而很好地解释了本项目初步结果显示的AcrIIA4只结合SpyCas9-sgRNA复合物，而不结合单独SpyCas9。该结果也和细菌细胞内单独存在的AcrIIA4瞬时存在的，而SpyCas9-sgRNA复合物是主要存在形式相一致。SpyCas9-sgRNA复合物形成时，也是噬菌体CRISPR免疫系统“发现”并将被“干扰”之时，因此，这个阶段（SpyCas9-sgRNA复合物期）是噬菌体的适应性免疫系统（CRISPR-Cas9）的最合适时期。

该研究揭示的Anti-CRISPR 蛋白AcrIIA4抑制SpyCas9活性的分子机制，不仅对揭示细菌免疫系统（Cas9）与噬菌体防御系统（Anti-CRISPR）“军备竞赛”的共进化分子机制具有重要的科学意义，而且时间、空间特异性地，或条件性地精确控制SpyCas9基因编辑活性的工具提供了结构基础。该成果是黄志伟课题组在CRISPR-Cpf1 (*Nature*, 2016; *RNA Biology*, 2017)、CRISPR-C2c1 (*Cell Research*, 2017)等研究成果与病原与宿主相互作用和基因编辑分子机制研究领域取得的又一重要研究成果。

黄志伟教授为本研究论文的通讯作者，该团队的博士研究生董德、郭明慧和硕士研究生王思涵3位论文的并列第一作者。该团队的师资博士后朱玉威、硕士生王硕、熊智、杨建增、本科生徐增亮参与合作。全部研究工作在哈工大完成。上海同步辐射中心为晶体数据收集提供了支持。本项目受到国家自然科学基金委、哈工大青年科学家工作室等基金的资助。

Nature文章链接：[http://www.nature.com/nature/journal/vaap/ncurrent/full/nature22377.h](http://www.nature.com/nature/journal/vaap/ncurrent/full/nature22377.html)

<http://www.nature.com/nature/journal/vaap/ncurrent/pdf/nature22377.pdf>



编辑

欢迎扫描下方二维码关注哈尔滨工业大学新闻网官方网站。

