黄志伟等揭示 CRISPR-Cpf1 结合 crRNA 的复合物晶体结构

Zhiwei Huang Resolved the Crystal Structure of Cpf1 in Complex with CRISPR RNA

哈工大生命学院黄志伟教授团队 4 月 28 日在《自然》(《Nature》)发表了题目为《CRISPR-Cpf1 结合 crRNA 的复合物晶体结构》(《The crystal structure of Cpf1 incomplex with CRISPR RNA》)的研究论文。该项研究通过结构生物学和生化研究手段揭示了 CRISPR-Cpf1 识别 CRISPR RNA（crRNA）以及 Cpf1 剪切 pre-crRNA 成熟的分子机制，这对认识细菌如何通过 CRISPR 系统抵抗病毒入侵的分子机理具有十分重要的科学意义，而且为成功改造 Cpf1 系统，使之成为特异的、高效的全新基因编辑系统提供了结构基础，让人们可以更加高效地对目的基因进行“关闭”、“恢复”和“切换”等精准“手术”，使战胜癌症和艾滋病等疾病成为可能。

CRISPR-Cas 系统是细菌编码的适应性免疫系统，该系统通过 RNA 引导的效应蛋白剪切病毒的 DNA 或者 RNA 从而抵抗病毒的感染。该系统之一的 CRISPR-Cas9 系统被用来作为可编程的基因编辑工具用于细胞内目的 DNA 的剪切、激活表达、修饰、突变等。由于 CRISPR-Cas9 系统能够在活细胞中高效地、便捷地“编辑”任何基因，作为科研、医疗等领域的强有力工具，已被广泛地应用于全世界的生物和医学实验室。

刚刚发现的 CRISPR-Cpf1 系统是一类新型的 CRISPR-Cas 系统，能够在 crRNA 引导下在人类细胞内剪切目的 DNA 底物。而且，Cpf1 本身也是一个具有序列特异性的 RNase,这也是目前发现的唯一一个具有核酸序列特异性且同时具有 DNase 和 RNase 活性的核酸酶。Cpf1 和 Cas9 很大的不同还在于：Cpf1 仅需要一个拷贝的 crRNA，而 Cas9 需要序列更长的 tracrRNA 和 crRNA 去识别、剪切底物 DNA，较短的 crRNA 在转染细胞过程中将更高效；Cpf1 和 Cas9 识别 DNA 底物上的模块（PAM）也不同；Cpf1 剪切底物是通过粘性末端剪切，而 Cas9 是末端剪切，粘性末端剪切将更有利于基因编辑后的修复。

在该项研究中，黄志伟团队首先解析了结合了 crRNA 的 Cpf1 复合物的晶体结构。非常意外的是，Cpf1 并不是之前人们推测的二聚体状态，而是一个呈三角形的单体，位于该结构中间是一个带有正电荷的凹槽。crRNA 通过发卡结构形成高度扭曲的构象紧密结合在 Cpf1 的核酸结合结构域，和底物 DNA 配对的 crRNA 3'末端位于 Cpf1 凹槽的一端。和 Cas9 结合的 sgRNA 显著不同的是，Cpf1 结合的 crRNA 的引导序列部分（guide sequence）并没有电子密度，这说明在没有底物结合的状态下这部分序列和 Cpf1 的结合比较松散。据黄志伟介绍，结构观察发现一个紧密结合 crRNA 的六水合镁离子对稳定 crRNA 构象激活 Cpf1 的催化活性非常关键。当然，我们也不能排除镁离子也同时直接参与了对底物的催化反应。通过比较 Cpf1 和 Cas9 复合物的结构发现，LHD 区域推测可能是双链 DNA 底物结合的 PAM 区域。

该研究发现 Cpf1 在没有 crRNA 结合的状态下处于松散的构象，crRNA 的结合引起 Cpf1 发生显著的构象变化。与 Cas9 结合 sgRNA 极为不同的是，仅仅 crRNA 的重复序列部分（repeat sequence）就能引起 Cpf1 构象的巨大变化，这反映了这类短小的 crRNA 与 Cas9 结合的长 sgRNA 的识别机制的巨大差别。该结构显示来自于 H843、 K852 以及 K869 催化残基侧链上

的氮原子位于一个平面上，同时和 RNA A(+20)的磷酸基团形成氢键，该结构证据表明 Cpf1 剪切 pre-crRNA 成为 crRNA 是一个碱催化的反应。

The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA
CRISPR-Cpf1 结合 crRNA 的复合物晶体结构

哈尔滨工业大学 黄志伟
2016 年 4 月 28 日
doi:10.1038/nature17944

The CRISPR–Cas systems, as exemplified by CRISPR–Cas9, are RNA-guided adaptive immune systems used by bacteria and archaea to defend against viral infection. The CRISPR–Cpf1 system, a new class 2 CRISPR–Cas system, mediates robust DNA interference in human cells. Although functionally conserved, Cpf1 and Cas9 differ in many aspects including their guide RNAs and substrate specificity. Here we report the 2.38 Å crystal structure of the CRISPR RNA (crRNA)-bound Lachnospiraceae bacterium ND2006 Cpf1 (LbCpf1). LbCpf1 has a triangle-shaped architecture with a large positively charged channel at the centre. Recognized by the oligonucleotide-binding domain of LbCpf1, the crRNA adopts a highly distorted conformation stabilized by extensive intramolecular interactions and the $(Mg(H_2O)_6)^{2+}$ ion. The oligonucleotide-binding domain also harbours a looped-out helical domain that is important for LbCpf1 substrate binding. Binding of crRNA or crRNA lacking the guide sequence induces marked conformational changes but no oligomerization of LbCpf1. Our study reveals the crRNA recognition mechanism and provides insight into crRNA-guided substrate binding of LbCpf1, establishing a framework for engineering LbCpf1 to improve its efficiency and specificity for genome editing.