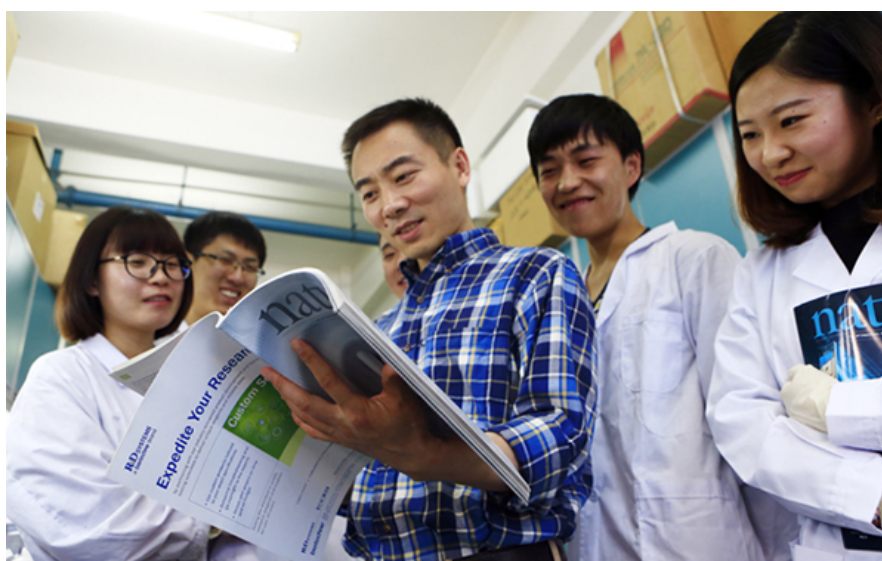


## 哈尔滨工业大学 Nature 破译分子机制让 CRISPR 更高效可控

### Harbin Institute of Technology discovered the Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein

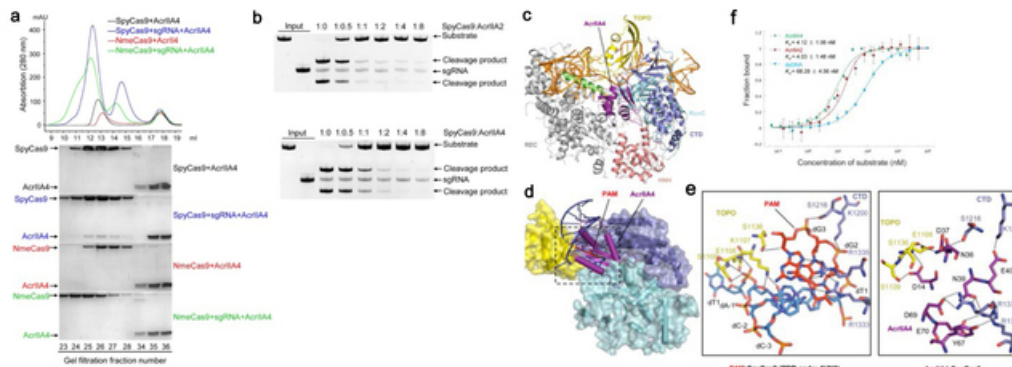


黄志伟教授（中间）及其团队成员

6月15日，哈尔滨工业大学生命科学与技术学院黄志伟教授课题组在《Nature》期刊发表最新研究成果，揭示 CRISPR 系统“关闭开关” anti-CRISPR 抑制 SpyCas9 活性的分子机制。这一成果为设计时间或空间上特异性或条件性精确控制 SpyCas9 活性的基因编辑工具提供了结构基础。

CRISPR/Cas 系统原本是细菌用来保护自身免受噬菌体感染的适应性免疫系统。近几年，CRISPR/Cas9 (SpyCas9) 已经在全世界范围内被广泛应用于生物医学研究，成为目前最重要的、也是最广泛使用的基因编辑工具。2016年，Cell 杂志发表了一项重要成果，发现了在细菌和人类细胞中都能阻止 CRISPR 系统基因编辑活性的“关闭开关” anti-CRISPRs: AcrIIA2 和 AcrIIA4，证实它们能够阻断 CRISPR 系统中 Cas9/SpyCas9 酶的活性。

黄志伟团队首次建立体外生物化学研究系统，证实 AcrIIA2 或 AcrIIA4 蛋白可以直接结合 SpyCas9-sgRNA 复合物，有趣的是 AcrIIA2 或 AcrIIA4 只和结合有 sgRNA 的 SpyCas9 有相互作用。他们进一步实验发现，AcrIIA2 或 AcrIIA4 能够直接抑制 SpyCas9 介导的目的 DNA 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，并通过结构生物学研究方法解析了 SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4 复合物的晶体结构。他们证实，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始生化研究结果显示的 AcrIIA4 只结合 SpyCas9-sgRNA 复合物，而不结合单独 SpyCas9。

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（CRISPR-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，而且为设计时间、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。



## Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein

Anti-CRISPR 蛋白抑制 CRISPR-SpyCas9 活性的分子机制

哈尔滨工业大学 黄志伟

2017年6月15日

doi:10.1038/nature22377

CRISPR-Cas9 systems are bacterial adaptive immune systems that defend against infection by phages. Through the RNA-guided endonuclease activity of Cas9 they degrade double-stranded DNA with a protospacer adjacent motif (PAM) and sequences complementary to the guide RNA<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>. Recently, two anti-CRISPR proteins (AcrIIA2 and AcrIIA4 from *Listeria monocytogenes* prophages) were identified, both of which inhibit *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9) and *L. monocytogenes* Cas9 activity in bacteria and human cells<sup>6</sup>. However, the mechanism of AcrIIA2- or AcrIIA4-mediated Cas9 inhibition remains unknown. Here we report a crystal structure of SpyCas9 in complex with a single-guide RNA (sgRNA) and AcrIIA4. Our data show that AcrIIA2 and AcrIIA4 interact with SpyCas9 in a sgRNA-dependent manner. The structure reveals that AcrIIA4 inhibits SpyCas9 activity by structurally mimicking the PAM to occupy the PAM-interacting site in the PAM-interacting domain, thereby blocking recognition of double-stranded DNA substrates by SpyCas9. AcrIIA4 further inhibits the endonuclease activity of SpyCas9 by shielding its RuvC active site. Structural comparison reveals that formation of the AcrIIA4-binding site of SpyCas9 is induced by sgRNA binding. Our study reveals the mechanism of SpyCas9 inhibition by AcrIIA4, providing a structural basis for developing ‘off-switch’ tools for SpyCas9 to avoid unwanted genome edits within cells and tissues.