

靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统研究进展

洪甜^{1*}, 罗庆华²

1 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850000

2 四川大学华西医院, 四川 成都 610044

洪甜, 罗庆华. 靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1363-1373.

HONG Tian, LUO Qinghua. Advances in the RNA-targeting CRISPR-Cas systems[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1363-1373.

摘 要: CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR associated proteins)系统是细菌和古细菌抵抗噬菌体、质粒等外源遗传物质的一种适应性免疫系统,该系统利用一种特殊的 RNA (CRISPR RNA, crRNA)指导的内切酶来切割与 crRNA 相互补的外源遗传物质,从而阻碍外源核酸的侵染。根据效应复合物组成形式的不同,CRISPR-Cas 系统分为 1 类(I型、IV型和III型)和 2 类(II型、V型和VI型)两大类。目前已发现多个 CRISPR-Cas 系统具有非常强的特异靶向 RNA 编辑能力,如VI型 CRISPR-Cas13 系统和III型 CRISPR-Cas7-11 系统。随着研究的深入,相关系统在 RNA 编辑领域应用日渐广泛,使其成为基因编辑的有力工具。本文介绍了靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统的组成、结构、分子机制以及其潜在应用,这为更好地研究该类系统的作用机制奠定基础,也为后期开发为稳定的基因编辑工具提供新的思路。

关键词: CRISPR-Cas 系统; 基因编辑; Cas13; Cas7-11

Advances in the RNA-targeting CRISPR-Cas systems

HONG Tian^{1*}, LUO Qinghua²

1 School of Medicine, Tibet University, Lhasa 850000, Tibet, China

2 West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610044, Sichuan, China

Abstract: The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR associated proteins) system is an adaptive immune system of bacteria and archaea against phages, plasmids and other exogenous genetic materials. The system uses a special RNA (CRISPR RNA, crRNA) guided endonuclease to cut the exogenous genetic materials complementary to crRNA, thus blocking the infection of exogenous nucleic acid. According to the composition of the effector complex, CRISPR-Cas system can be divided into two

*Corresponding author. E-mail: hong_tian@163.com

Received: 2022-08-10; Accepted: 2022-10-17; Published online: 2022-10-19

categories: class 1 (including type I, IV, and III) and class 2 (including type II, V, and VI). Several CRISPR-Cas systems have been found to have very strong ability to specifically target RNA editing, such as type VI CRISPR-Cas13 system and type III CRISPR-Cas7-11 system. Recently, several systems have been widely used in the field of RNA editing, making them a powerful tool for gene editing. Understanding the composition, structure, molecular mechanism and potential application of RNA-targeting CRISPR-Cas systems will facilitate the mechanistic research of this system and provide new ideas for developing gene editing tools.

Keywords: CRISPR-Cas system; gene editing; Cas13; Cas7-11

CRISPR-Cas 系统是细菌长期进化过程中抵御噬菌体入侵和外源质粒转移而形成的一种获得性免疫系统^[1-3]。该系统的发现最早可追溯至 1987 年, 日本的 Ishino^[4]团队在大肠埃希菌的碱性磷酸酶基因中观察到一个 29 bp 的重复序列。这一发现在当时并没有引起人们的关注, 但随后更多的研究发现在细菌和古细菌中广泛存在这种重复序列。直到 2002 年将其正式命名为规律成簇间隔短回文序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)^[5-7]。目前研究表明, 自然界中的 CRISPR-Cas 系统根据效应复合物的组成形式不同, 可将其分为 1 类和 2 类两大类^[8-12]: 1 类 CRISPR-Cas 系统利用多 Cas 蛋白效应物复合物来识别和切割靶标核酸, 包括 I、III 和 IV 型; 2 类 CRISPR-Cas 系统利用单个较大的 Cas 蛋白发挥作用, 包括 II、V 和 VI 型^[13](图 1)。其中, 靶向 RNA 的系统是 2 类中的 VI 型和 1 类中的 III 型系统, VI 型 CRISPR-Cas 系统有 A-D 四个亚型, 而 III 型 CRISPR-Cas 系统包括 A-F 六个亚型^[14]。尽管 DNA 靶向系统已经发展成为一套强大的遗传修饰工具, 但靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统近几年才作为可编程的工具出现^[15-16]。

作为新开发的 RNA 敲除和编辑工具, 由 Cas13 蛋白和 crRNA 组成的 2 类 VI 型效应器已占据领先地位^[17-18]。然而, Cas13 系统在多种细胞类型中观察到显著毒性和脱靶效应^[19]。因

此, 迫切需要更好地能够靶向 RNA 的单效应器 CRISPR-Cas 系统。2019 年, III-E 型 CRISPR-Cas 系统被发现^[10]。随后, 两项研究确定了 III-E 型 CRISPR-Cas 系统的特征, 分别被 Özcan 等称为 Cas7-11^[20], 被 van Beljouw 等称为巨型重复相关的神秘蛋白(giant repeat associated mysterious protein, gRAMP)^[21], 并证明了它们作为高度特异、可编程、一体化 RNA 靶向系统的适用性。本文简介了靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统的最新研究进展, 将 cas13 蛋白和 Cas7-11 蛋白作为 RNA 编辑工具进行比较(表 1), 并从结构的角度分别阐述它们特异性识别并处理 pre-crRNA 以及靶向切割 RNA 的分子机制; 另外, 还对它们在基因编辑领域的潜在应用进行了分析。

1 Cas7-11 和 Cas13 系统简介

1.1 Cas7-11 和 Cas13 的发现

2015 年, 美国 Eugene Koonin 实验室和张锋团队合作, 利用计算生物学方法在微生物宏基因组数据库中发现了 Cas13a (也被称为 C2c2) 系统^[22], 并从这种计算方法中得到启示, CRISPR-Cas 基因位点中 *cas1* 和 *cas2* 基因的存在并非必不可少, 这使得他们设计了一个新的计算方法, 在 2017 年发现了 Cas13b 系统, 即 VI-B 型系统^[23-24]。2018 年, 通过进一步改进以前的计算方法, 并将搜索范围扩大到更小的效应物而发现了 Cas13d 系统。Cas13d 的大小约

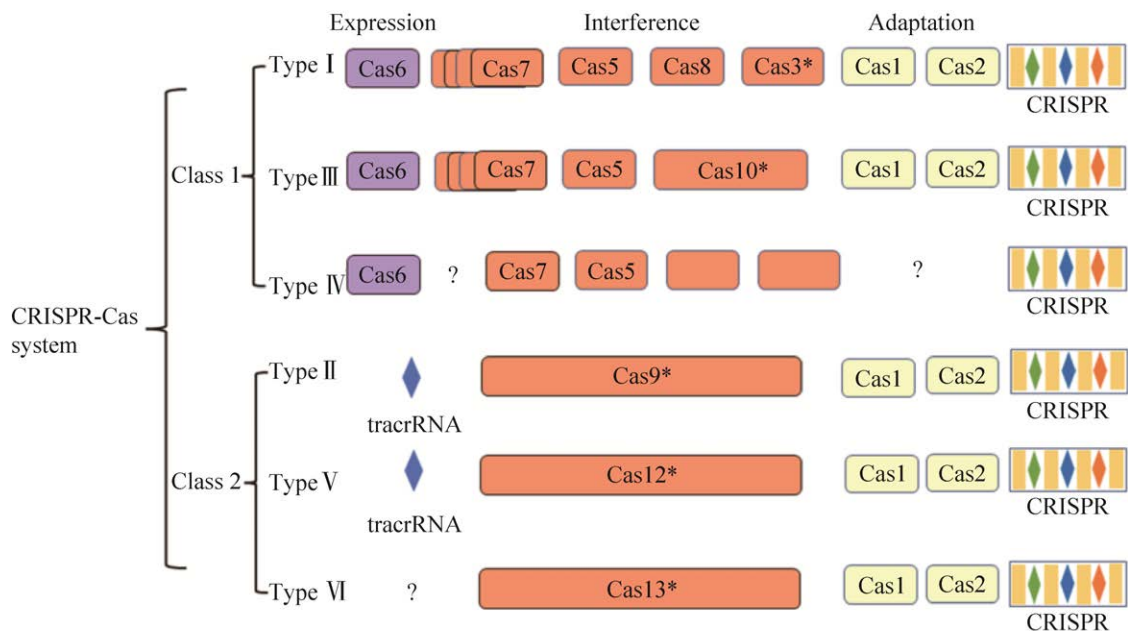


图 1 CRISPR-Cas 系统分类

Figure 1 Classification of the CRISPR-Cas system. *: The representative effector protein of this system.

表 1 Cas13 和 Cas7-11 蛋白作为 RNA 编辑工具的特点比较

Table 1 Comparison of the characteristics of proteins Cas13 and Cas7-11 as RNA editing tools

	Editing efficiency	Escribed activity	Cytotoxicity	Delivery efficiency
Cas13	High	Common, will cause serious off-target effect	Common	Cas13X has the smallest molecular weight and high delivery efficiency
Cas7-11	High	None	None	High molecular weight and high delivery efficiency for modified protein

为 930 个氨基酸，是目前发现的较小的 VI 型 CRISPR-Cas 效应物^[24-25]。2021 年，杨辉研究组报道了目前最小的 RNA 编辑工具 Cas13X 系统(仅 775 个氨基酸)，2022 年该课题组在此基础上进一步开发出了具有高效编辑活性但极低旁切活性的高保真 Cas13X 蛋白变体 hfCas13X，其将在基于 RNA 编辑的基因治疗领域展现出巨大的应用潜力^[26]。

2021 年，美国麻省理工学院的 Omar O. Abudayyeh 及 Jonathan S. Gootenberg 实验室通过大量筛选细菌基因组序列，将 III-E 亚型系统的集合扩大到 17 个基因座。与传统的多组分效应蛋白复合物不同，这个独特的 III-E 型系统由 Cas7 和 Cas11 融合形成单一的效应蛋白，即

Cas7-11^[20]。同年荷兰代尔夫特理工大学的 Stan J J Brouns 团队也报道了该类型的 CRISPR-Cas 系统，该团队将其称为 gRAMP^[21]。该系统的独特之处在于 Cas7-11 能将 pre-crRNA 加工为成熟的 crRNA，而这被普遍认为是第二大类 CRISPR 系统的特征之一。

1.2 组成和结构

所有的 Cas13 蛋白都是由 crRNA 和具有两个独立的催化位点的核糖核酸酶组成。crRNA 包含 5' 端的重叠区域以及 3' 端的间隔区域，重叠区域呈相对简单的茎-环结构。两个催化位点分别加工 pre-crRNA 和介导单链 RNA 切割，切割位点由该蛋白的 2 个较高等的真核和原核核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes

nuceotide-binding, HEPN)结构域中的一对 R-X₄-H 基序所组成(图 2)。Cas13 效应蛋白的空间结构与 II 型和 V 型效应蛋白在结构域组织水平上存在显著差异。然而, Cas13a 仍然形成类似于其他第二大类 Cas 效应蛋白中由 REC

lobe (crRNA recognition lobe)和 NUC lobe (nuclease lobe)组成的双叶型结构(图 2A)。Cas13d 三元结构与 Cas13a 比较相似,但因其结构偏小(Cas13d 的平均大小为 930 aa,而 Cas13a 和 Cas13b 平均大小分别为 1 250 aa 和 1 120 aa)

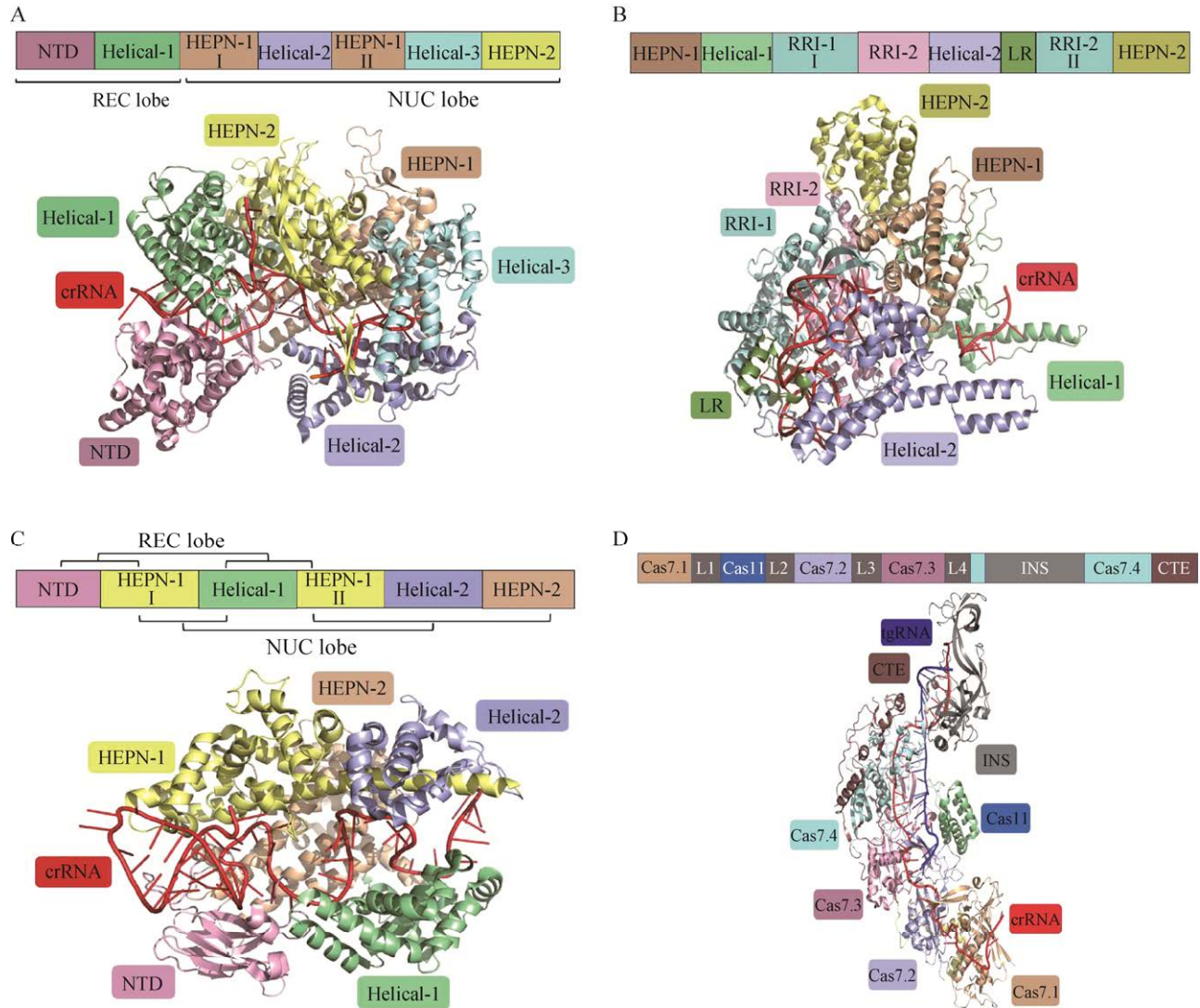


图 2 靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 效应器的结构 A: LbaCas13a-crRNA 二元复合物(PDB ID: 5W1H)的结构. B: BzCas13b-crRNA 二元复合物(PDB ID: 6AAY)的结构. C: UrCas13d-crRNA 二元复合物(PDB ID: 6IV9)的结构. D: DiCas7-11-crRNA-ssRNA 三元复合物(PDB ID: 7WAH)的结构

Figure 2 Structure of the RNA-targeting CRISPR-Cas effectors. A: Structure of the LbaCas13a-crRNA binary complex (PDB ID: 5W1H). B: Structure of the BzCas13b-crRNA binary complex (PDB ID: 6AAY). C: Structure of the UrCas13d-crRNA binary complex (PDB ID: 6IV9). D: Structure of the DiCas7-11-crRNA-ssRNA ternary complex (PDB ID: 7WAH).

而呈紧凑的双叶型结构(图 2C)。与 Cas13a 和 Cas13d 相反,在至今报道的二元复合物结构中 Cas13b 具有独特的金字塔结构,区分不出明显的 REC 和 NUC lobe^[22](图 2B)。

Cas7-11 效应子由 4 个 Cas7 结构域(Cas7.1–Cas7.4)和 1 个 Cas11 结构域组成。其中, Cas11 位于 Cas7.1 与 Cas7.2 之间, Cas7.4 结构域包含一个额外的插入结构域(insertion, INS)和一个羧基末端延伸(carboxy-terminal extension, CTE)(图 2D)。这 4 个 Cas7 结构域相互堆叠,形成了右手螺旋结构以结合 pre-crRNA 与靶 RNA 复合物的不同区域。Cas7-11 效应子还伴随一种特殊的附属蛋白 Csx29, 该蛋白由一个四肽重复(tetratricopeptide repeat, TPR)结构域与一个类似 caspase 的蛋白酶 CHAT 融合,这表明它有可能类似于 caspase, 具有诱导细胞死亡或蛋白酶活性的功能。Csx29 能与 Cas7-11 形成稳定的复合物^[12], 但它的辅助功能目前未知。

2 分子机制

2.1 pre-crRNA 的识别和处理

2017 年,来自加州大学伯克利分校的研究人员报道了一个毛螺科菌(*Lachnospiraceae bacterium*) crRNA 结合 Cas13a (LbaCas13a)的晶体结构(图 2A), 该结构表明在新转录的 pre-crRNA 通过 5'端茎环结构与 Cas13a 的 REC 识别并结合,形成 pre-crRNA 与 Cas13a 复合物的中间过渡态, NUC 的 Helical-1 和 HEPN2 结构域之间保守残基的构象发生变化,从而形成一个酸碱催化中心,催化 pre-crRNA 形成成熟的 crRNA^[27]; 2018 年,福建师范大学欧阳松应教授课题组解析了动物溃疡伯格菌(*Bergeyella zoohelcum*)中 Cas13b (BzCas13b)与 crRNA 二元复合物的晶体结构(图 2B)。该结构表明, Cas13b 的所有结构域(HEPN-2 除外)与 pre-crRNA 进行

广泛的分子间相互作用,并通过盖子(Lid)结构域的碱基催化水解来实现对 pre-crRNA 的加工^[28]; 2019 年,欧阳松应教授课题组解析了瘤胃球菌(uncultured *Ruminococcus* sp.)中 Cas13d (UrCas13d)与 crRNA 二元复合物高分辨率晶体结构(图 2C),在结构中观察到 Cas13d 的 REC 和 NUC 之间有一个带正电的溶剂暴露通道,在这个通道中, crRNA 重复区位于 N-末端结构域(N-terminal domain, NTD)、HEPN-1 和 HEPN-2 结构域之间,间隔区位于除 NTD 以外的所有结构域形成的通道中。这些相互作用大多集中在 crRNA 重复区域的 3'端,其中保守的碱基特异性接触在维持 crRNA 的正确结合和定位方面起着重要作用,另外水合 Mg²⁺对 crRNA 重复区域的构象稳定也起着重要作用^[29-30]。相比较于 VI-B 型系统的 crRNA 重复区域以结构特异性的方式被识别, VI-A 和 VI-D 型则是以序列特异性的方式被识别。

2022 年,日本东京大学 MIZUSHIMA 实验室联合美国麻省理工学院的 Omar O. Abudayyeh 及 Jonathan S. Gootenberg 实验室采用冷冻电镜技术,解析了石本氏脱硫丝菌(*Desulfonema ishitomonii*)Cas7-11 (DiCas7-11)与其 crRNA 和靶 RNA 复合物的高分辨率结构^[31](图 2D)。该结构表明, pre-crRNA 的 5'标签(由 15 个核苷酸组成)采用单链构象,被 Cas7-11 中的 Cas7.1 结构域识别。Cas7.1 的拇指状 β 发卡位于 A (-2) (pre-crRNA 的 5'标签上第 2 位腺嘌呤碱基)和 G (-4)之间,导致 A (-3)的碱基翻转。A (-2)和 G (-4)的碱基分别与 β 发卡中的 F186/V172 (Cas7-11 蛋白中第 186 位的苯丙氨酸和第 172 位的缬氨酸)和 F187 形成堆积相互作用(图 3)。5'标签序列在 Cas7-11 正构体中高度保守,这表明 5'标签区域以类似的方式被 Cas7-11 正构体识别。Cas7.1 通过酸碱催化机制催化 pre-crRNA 的加工。其 H43 活性位点对 pre-crRNA 在 G (-15)与 G (-16)之间进行切割,

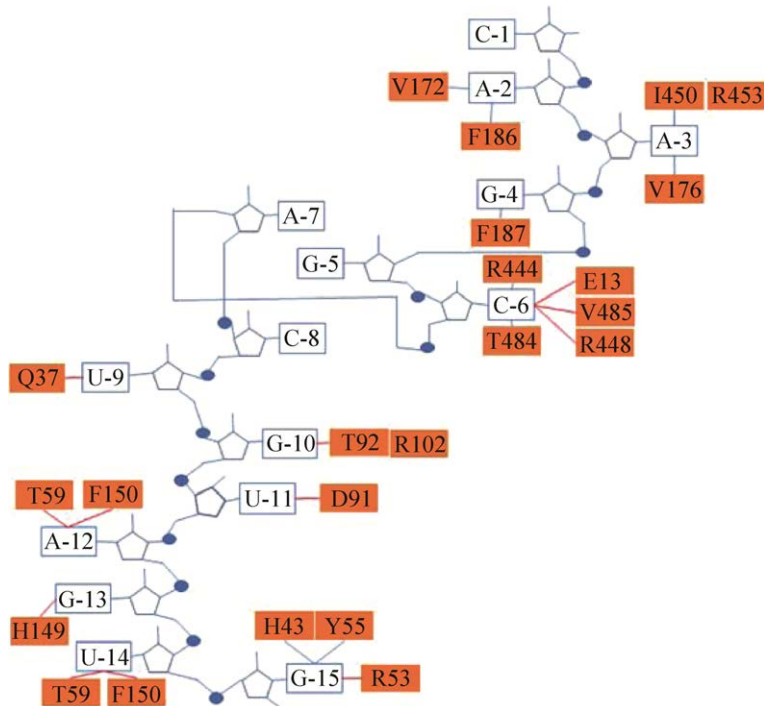


图3 Cas7-11与crRNA 5'标签的相互作用示意图

Figure 3 Schematic representation of the interactions between Cas7-11 and the 5' tag of crRNA.

从而得到成熟的 crRNA (图 3)。Cas7-11 在 1 类效应物中是独特的, 与 2 类效应物相似, 如 Cas12^[32]和 Cas13^[33], 它们可以自行处理 pre-crRNA。尽管如此, Cas7-11 的 pre-crRNA 处理域 (Cas7.1) 在结构上与 Cas12 和 Cas13 的处理域 (分别为楔形结构域 (wedge domain, WED) 和 Helical-1) 不相关, 突出了 CRISPR-Cas 系统中 pre-crRNA 处理机制的多样性。

2.2 靶 RNA 的识别机制

在 Cas13 结构中, 当一段单链 RNA (activator RNA) 被 Cas13-crRNA 复合物结合, crRNA 的重复区域将会对该单链 RNA 进行序列互补性探测, 并启动 crRNA-单链 RNA 双链的形成。在 VI-A 型系统中, crRNA 含有两个对错配高度灵敏的亚区域, 即对引发 activator RNA 结合至关重要的中心种子区以及对 HEPN 酶活位点激活起着关键作用的“HEPN 核酸酶开关”区^[27]。

在 VI-B 型系统中, crRNA 间隔区域不耐受两个连续的错配碱基, 但间隔区域中间部分中的单个错配就能破坏 Cas13b 的 RNA 干扰活性^[28]。在 VI-D 型系统中, Cas13d 的部分构象变化最少需要 18 个 crRNA 间隔区域与 activator RNA 互补配对的碱基, 50% 干扰活性需要 18–20 个互补配对碱基, 而最佳干扰活性需要 21 个以上的互补配对碱基^[30]。Cas13-crRNA 复合物首先利用其 crRNA 间隔区域的中心部分来探测与潜在 activator RNA 序列的互补性, 然后在完全互补情况下继续在 5' 和 3' 端序列上进行探测和结合。

在 Cas7-11-crRNA-ssRNA 三元复合物结构中, crRNA 的间隔区 (C1-A23, U4 和 C10 除外) 与靶 RNA (G1*-U23*, * 表示靶 RNA 的核苷酸) 进行碱基配对, 形成杂合双链。crRNA-ssRNA 杂合双链在第 13–14、15–16 和 19–20 个碱基对处形成扭结 (图 4)。杂合双链的第 14–23 个碱基

对段采用一种特征性的扭曲构象,并被 Cas7.4、INS 和 CTE 结构域识别^[31]。CTE 中的 L1564 和 INS 中的 A981/I1292 插入到第 15–16 和第 19–20 个碱基对之间,从而分别形成扭结(图 4)。Cas7.4 的 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 环穿透杂合双链中的第 13–14 碱基对之间,也导致了该处扭结的产生。第 3 和第 5 碱基对分别与 Cas7.2 中 β 发卡的 F517 和 L516 形成堆积相互作用,而第 9 和第 11 碱基对分别与 Cas7.3 中 β 发卡的 F757 和 K756 形成堆积相互作用(图 4)。这 4 个氨基酸残基在 Cas7-11 蛋白中是保守的,突出了它们对杂合双链识别的功能重要性。翻转的 U4 和 C10 碱基分别位于 Cas7.3 的 I504/V682 和 Cas7.4 的

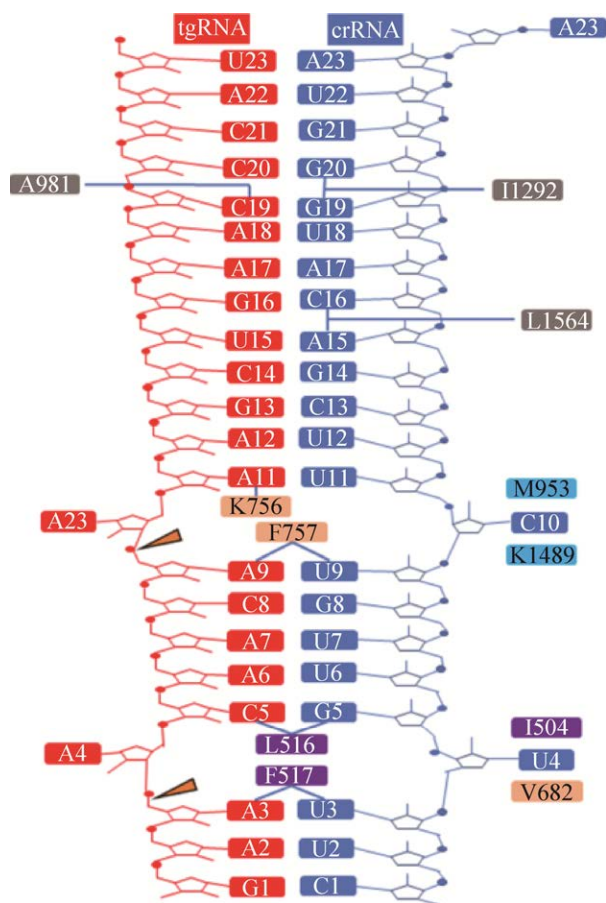


图 4 Cas7-11 与结合的核酸之间的相互作用示意图
Figure 4 Schematic representation of the interactions between Cas7-11 and the bound nucleic acids.

M953/K1489 之间。这些结构上的发现共同解释了 Cas7-11 如何在 crRNA 的引导下,靶向识别 RNA 的分子机制。

2.3 靶向切割 RNA 的分子机制

Cas13a 和 crRNA 的构象随着 activator RNA 序列探测与 crRNA 间隔区域-activator RNA 双链的形成,逐渐地发生协同变化,直至形成可执行 RNA 干扰的三元复合物为止。已报道的有关 Cas13a 和 Cas13d 三元复合物结构的研究表明,这些构象变化扩展了结合 crRNA 间隔区域与 activator RNA 的通道,使该双链和 NUC lobe 形成相互作用,且通过将一对 R-X₄-H 基序暴露在蛋白表面并使它们彼此更靠近来激活 HEPN 酶活。Cas13 中的 HEPN 酶活位点位于暴露在蛋白质外表面的一个沟槽中,其距离结合 crRNA-activator RNA 双链的中央通道较远^[27-30]。因此,Cas13-crRNA 复合物自身结合的 activator RNA 只有在足够长的情况下才能结合在酶活位点中被切割,但周围环境中的任何 RNA 都可以很容易地结合在酶活位点并被切割,从而说明 Cas13 效应蛋白的非特异 RNA 切割活性。

在 Cas7-11 系统中,Cas7.2 和 Cas7.3 结构域识别杂合双链并诱导靶 RNA 中第 4 和第 10 个核苷酸的碱基翻转,从而在这些核苷酸之前的位置实现对靶 RNA 的精准切割^[31]。尽管第 20–23 位杂合双链碱基配对是 Cas7-11 切割靶 RNA 所必需的,但删除与该段相互作用的 INS 结构域并不影响对靶 RNA 的切割。这些结果表明,第 20–23 位杂合双链的碱基配对,对靶 RNA 的切割至关重要。生化实验表明,Cas7-11 使用保守的天冬氨酸残基(D429 和 D654),在间隔互补区 3'端附近相隔 5–6 个核苷酸的两个裂解位点切割靶 RNA。在结构中,D429 和 D654 分别位于靶 RNA 上 A3–A4 和 U9–C10 之间的磷酸二酯键。此外,A3*和 A4*之间以及 U9*和 C10*

之间的骨架磷酸盐基团分别被 Cas11 的 Y360 和 H306 识别。这些结构表明, Cas7-11 分别利用 Cas7.2 中的 D429 和 Cas7.3 中的 D654, 在第 3 和第 4 核苷酸之间(部位 1)和在第 9 和第 10 核苷酸之间(部位 2)切割靶 RNA (图 4), 而 van Beljouw 等^[21]的研究也证明了这一点。

3 潜在应用

目前已知 III 型和 VI 型 CRISPR-Cas 系统的靶点为 RNA, 其中 VI 型系统的 Cas13 蛋白已经被广泛应用于 RNA 敲低、RNA 单碱基编辑、RNA 定点修饰、RNA 活细胞示踪以及核酸检测领域。例如, 高错配灵敏性可以使得 Cas13 选择性地敲除突变的癌基因转录本, 而不影响野生型转录本, 从而特异性地作用于癌细胞; 再例如, 基于碱基水平编辑开发出的工具 REPAIRv2 (RNA editing for programmable A to I replacement version 2)^[18]和 RESCUE (RNA editing for specific C to U exchange)^[34]; 此外, 快速、低成本且超灵敏的便携式核酸诊断平台 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzyme reporter unlocked) 已经被报道成功用于多种病毒检测(包括 COVID-19)、移植物排斥、癌症突变、疾病相关单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)以及植物遗传特征的诊断与检测^[35]。相比于传统的 RNA 干扰技术, Cas13 系统具有更高的敲低效率和特异性^[36]; 而且, 相比于 Cas9 介导的 DNA 编辑技术, Cas13 不会对基因组造成永久性改变, 甚至可以通过药物来调控 RNA 编辑, 使其具有可逆性, 因此在疾病治疗上具有比较独特的优势。CRISPR-Cas13 系统天然具备很强的 RNA 旁切效应, 因此使其具有较高的细胞毒性而限制了 Cas13 系统的进一步应用。虽然 III 型 CRISPR-Cas 系统并没有表现出附带单链 RNA 切割活性, 但该

系统已经被证实在靶向 RNA 之后没有旁切活性, 使其在细胞内的毒性大大降低, 未来有巨大的潜力, 与 Cas13 一起成为 RNA 编辑器的承担者。III 型 CRISPR-Cas 系统可以通过 crRNA 与靶 RNA 碱基配对来靶向 RNA, 从而激活非模板链上的 DNA 靶向活性^[37-38], 从而赋予了该系统进行基因沉默和基因组编辑的可能。值得注意的是, Cas7-11 的切割能力对于两个剪切位点附近的碱基错配十分敏感。单碱基错配可以导致该剪切位点的切割完全失效, 对于两个剪切位点进行联合突变可以丧失全部的切割活性。这意味着 Cas7-11 对于靶向 RNA 序列具有高度的特异性, 有潜力被开发为新一代安全与高效的体内 RNA 编辑工具。

4 总结与展望

CRISPR-Cas 系统作为细菌在适应噬菌体攻击进化所形成的“免疫系统”, 在抵御外来入侵时发挥重要作用。到目前为止, CRISPR 位点在约 90% 的古细菌以及 40% 的细菌基因组中都有发现, 证明该位点对于细菌的生存进化有着举足轻重的作用, 因此成为众多科学家研究的重点。CRISPR-Cas 系统作为一个强大的靶向基因编辑工具, 越来越多的研究旨在将 VI 型 CRISPR-Cas 系统开发成用于基础研究、生物技术和医学治疗等的工具。然而, 脱靶效应、细胞毒性、免疫原性等能影响宿主细胞活力的作用以及真核细胞抑制附带 RNA 切割活性的机制还需要进行系统的研究, 特别是在 Cas13 工具的长期使用情况下。2022 年, Jonathan S. Gootenberg 和 Omar O. Abudayyeh 团队成功地将 Cas7-11 改造为哺乳动物细胞适用的 RNA 编辑系统, 该系统对细胞活性无明显影响, 这显著优于具有明显细胞毒性的短发夹 RNA 及

Cas13 系统。全长的 DiCas7-11 (由 1 601 个氨基酸组成)蛋白因为编码 DNA 长度限制而难以通过单 AAV 方式进行递送,从而限制了它的应用范围。Kato 等根据结构生物学信息,对 Cas7-11 蛋白进行了工程化改造。通过对结构和功能相对单一且灵活的 INS 插入域进行截短,发现截短的 Cas7-11 可以在体内对肽酰脯氨酰异构酶 B 和肺腺癌转录相关因子的 mRNA 进行敲除^[31]。这一结果在 AAV 病毒包裹与转染实验中得到进一步证实。这一工程化 Cas7-11S 可以与 crRNA 一同通过单 AAV 病毒颗粒进行体内递送,极大地扩展了 Cas7-11 作为体内 RNA 编辑工具的应用前景,为其在生物体内作为 RNA 调节和编辑的工具铺平了道路。然而,未来对 III-D 和 III-E 型 CRISPR-Cas 系统及其效应核酸酶的机制理解,还需要对其他同源 Cas7-11 家族,如 Cas7x3,以及推测的结合蛋白,如 Csx29 蛋白酶的结构和功能进行研究。此外,还需要对其他物种 Cas7-11 的结构进行研究来阐明 Cas7-11 家族蛋白之间的机理异同。随着对 CRISPR-Cas 系统的深入研究,CRISPR-Cas 系统将会在更多的领域发挥更重要的作用。

REFERENCES

- [1] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, ROMERO DA, HORVATH P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [2] BARRANGOU R, MARRAFFINI LA. CRISPR-cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity[J]. *Molecular Cell*, 2014, 54(2): 234-244.
- [3] WIEDENHEFT B, STERNBERG SH, DOUDNA JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [4] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [5] JANSEN R, EMBDEN JD, GAASTRA W, SCHOOLS L M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [6] JANSEN R, van EMBDEN JDA, GAASTRA W, SCHOOLS LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 2002, 6(1): 23-33.
- [7] MOJICA FJ, FERRER C, JUEZ G, RODRÍGUEZ-VALERA F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 17(1): 85-93.
- [8] KOONIN EV, MAKAROVA KS. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-cas systems: all the way there and back[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(10): 2812-2825.
- [9] KOONIN EV, MAKAROVA KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, 374(1772): 20180087.
- [10] MAKAROVA KS, WOLF Y I, IRANZO J, SHMAKOV SA, ALKHNABASHI OS, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, CHENG D, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, SCOTT D, SHAH SA, SIKSNYS V, TERNS MP, VENCLOVAS Č, WHITE MF, YAKUNIN AF, YAN W, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- [11] MAKAROVA KS, WOLF YI, KOONIN EV. Classification and nomenclature of CRISPR-cas systems: where from here?[J]. *The CRISPR Journal*, 2018, 1(5): 325-336.
- [12] MURUGAN K, BABU K, SUNDARESAN R, RAJAN R, SASHITAL DG. The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR-cas toolkit[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 15-25.
- [13] XU CL, ZHOU YS, XIAO QQ, HE BB, GENG GN, WANG ZK, CAO BR, DONG X, BAI WY, WANG YF,

- WANG X, ZHOU DM, YUAN TL, HUO XN, LAI JS, YANG H. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(5): 499-506.
- [14] TAMULAITIS G, VENCLOVAS Č, SIKSNYS V. Type III CRISPR-Cas immunity: major differences brushed aside[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(1): 49-61.
- [15] HSU PD, LANDER ES, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [16] TERNS MP. CRISPR-based technologies: impact of RNA-targeting systems[J]. *Molecular Cell*, 2018, 72(3): 404-412.
- [17] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, ESSLETZBICHLER P, HAN S, JOUNG J, BELANTO JJ, VERDINE V, COX DBT, KELLNER MJ, REGEV A, LANDER ES, VOYTAS DF, TING AY, ZHANG F. RNA targeting with CRISPR-Cas13[J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-284.
- [18] COX DBT, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, FRANKLIN B, KELLNER MJ, JOUNG J, ZHANG F. RNA editing with CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [19] PERČULIJA V, LIN JY, ZHANG B, OUYANG SY. Functional features and current applications of the RNA-targeting type VI CRISPR-Cas systems[J]. *Advanced Science: Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany*, 2021, 8(13): 2004685.
- [20] ÖZCAN A, KRAJESKI R, IOANNIDI E, LEE B, GARDNER A, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS. Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11[J]. *Nature*, 2021, 597(7878): 720-725.
- [21] van BELJOUW SPB, HAAGSMA AC, RODRÍGUEZ-MOLINA A, van den BERG DF, VINK JNA, BROUNS SJJ. The gRAMP CRISPR-Cas effector is an RNA endonuclease complexed with a caspase-like peptidase[J]. *Science*, 2021, 373(6561): 1349-1353.
- [22] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OO, MAKAROVA KS, WOLF YI, GOOTENBERG JS, SEMENOVA E, MINAKHIN L, JOUNG J, KONERMANN S, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN EV. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [23] SMARGON AA, COX DBT, PYZOSKA NK, ZHENG KJ, SLAYMAKER IM, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OA, ESSLETZBICHLER P, SHMAKOV S, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 618-630.e7.
- [24] KONERMANN S, LOTFY P, BRIDEAU NJ, OKI J, SHOKHIREV MN, HSU PD. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 665-676.e14.
- [25] YAN WX, CHONG SR, ZHANG HB, MAKAROVA KS, KOONIN EV, CHENG DR, SCOTT DA. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(2): 327-339.e5.
- [26] TONG HW, HUANG J, XIAO QQ, HE BB, DONG X, LIU YH, YANG XL, HAN DY, WANG ZK, WANG XC, YING WQ, ZHANG RZ, WEI Y, XU CL, ZHOU YS, LI YF, CAI MQ, WANG QF, XUE MX, LI GL, et al. High-fidelity Cas13 variants for targeted RNA degradation with minimal collateral effects[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(1): 108-119.
- [27] KNOTT GJ, EAST-SELETSKY A, COFSKY JC, HOLTON JM, CHARLES E, O'CONNELL MR, DOUDNA JA. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(10): 825-833.
- [28] ZHANG B, YE WW, YE YM, ZHOU H, SAEED AFUH, CHEN J, LIN JY, PERČULIJA V, CHEN Q, CHEN CJ, CHANG MX, CHOUDHARY MI, OUYANG S. Structural insights into Cas13b-guided CRISPR RNA maturation and recognition[J]. *Cell Research*, 2018, 28(12): 1198-1201.
- [29] ZHANG B, YE YM, YE WW, PERČULIJA V, JIANG H, CHEN YY, LI Y, CHEN J, LIN JY, WANG SQ, CHEN Q, HAN YS, OUYANG SY. Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2544.
- [30] ZHANG C, KONERMANN S, BRIDEAU NJ, LOTFY P, WU XB, NOVICK SJ, STRUTZENBERG T, GRIFFIN PR, HSU PD, LYUMKIS D. Structural basis

- for the RNA-guided ribonuclease activity of CRISPR-Cas13d[J]. *Cell*, 2018, 175(1): 212-223.e17.
- [31] KATO K, ZHOU WY, OKAZAKI S, ISAYAMA Y, NISHIZAWA T, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, NISHIMASU H. Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex[J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2324-2337.e16.
- [32] SWARTS DC, van der OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(2): 221-233.e4.
- [33] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL MR, KNIGHT SC, BURSTEIN D, CATE JHD, TJIAN R, DOUDNA JA. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection[J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-273.
- [34] FREIJE CA, MYHRVOLD C, BOEHM CK, LIN AE, WELCH NL, CARTER A, METSKY HC, LUO CY, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, YOZWIAK NL, ZHANG F, SABETI PC. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(5): 826-837.e11.
- [35] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, FRANKLIN B, KOOB J, KELLNER MJ, LADHA A, JOUNG J, KIRCHGATTERER P, COX DBT, ZHANG F. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing[J]. *Science*, 2019, 365(6451): 382-386.
- [36] HE BB, PENG WB, HUANG J, ZHANG H, ZHOU YS, YANG XL, LIU J, LI ZJ, XU CL, XUE MX. Modulation of metabolic functions through Cas13d-mediated gene knockdown in liver[J]. *Protein & Cell*, 2020, 11(7): 518-524.
- [37] DENG L, GARRETT RA, SHAH SA, PENG X, SHE QX. A novel interference mechanism by a type IIIB CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1088-1099.
- [38] ESTRELLA MA, KUO FT, BAILEY S. RNA-activated DNA cleavage by the type III-B CRISPR-Cas effector complex[J]. *Genes & Development*, 2016, 30(4): 460-470.

(本文责编 陈宏宇)