



Anti-CRISPR蛋白AcrVA2的结构生物学研究*

陈鹏^{1,2,3)} 孙伟^{1,3)} 程志^{1,2,3)} 杨晶¹⁾ 王敏¹⁾
王久宇^{1,3)} 陈慧卿⁴⁾ 刘亮^{5)**} 王艳丽^{1)**}¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院生物大分子卓越中心, 核酸重点实验室, 北京 100101; ²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049;³⁾ 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家实验室, 北京 100101; ⁴⁾ 江苏大学生命科学学院, 镇江 212000;⁵⁾ 厦门大学生命科学学院, 厦门 361102)

摘要 大多数古生菌及半数细菌都含有成簇有规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 CRISPR 相关 (CRISPR-associated, Cas) 蛋白质构成的适应性免疫系统, 来抵御外界噬菌体的入侵。而噬菌体为了对抗这种免疫系统, 也进化出许多抗 CRISPR (anti-CRISPR, Acr) 的蛋白质, 使得 CRISPR-Cas 系统受到抑制。来自牛眼莫拉氏菌 (*Moraxella bovoculi*) 的 AcrVA2 是目前发现的可抑制 V-A 型 CRISPR-Cas 系统效应蛋白 Cas12a 发挥切割活性的 Acr 蛋白之一, 其作用机理尚不清楚。本文解析了自由状态的 AcrVA2 和 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 复合物的晶体结构, 发现 AcrVA2 蛋白采用了一种新的 α - β 折叠结构, 且只与自由状态的 Cas12a 结合。此外, AcrVA2 与 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶ 的结合主要依靠氢键和盐桥的相互作用力, 并通过疏水界面得到进一步稳定。这些结果提示, AcrVA2 是通过与自由状态的 MbCas12a 结合来发挥抑制活性的, 这对进一步理解 Acr 蛋白抑制 V-A 型 CRISPR-Cas 系统的多样化机制有重要意义。

关键词 CRISPR-Cas 系统, Cas12a, Anti-CRISPR 蛋白, AcrVA2, 晶体结构

中图分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0223

细菌和古生菌利用 CRISPR-Cas 系统对可移动基因元件 (mobile genetic elements, MGEs) 和噬菌体等外来入侵的核酸产生适应性免疫^[1-2]。CRISPR-Cas 系统可分为 2 大类, 第 1 大类由多个 Cas 蛋白组装成复合物并由 RNA 介导来发挥效应作用, 可进一步分为 I 型、III 型和 IV 型; 第 2 大类则是由包含多个结构域的单个 Cas 蛋白在 RNA 的介导下发挥效应作用, 分为 II 型、V 型和 VI 型^[3]。

为了有效地对抗 CRISPR-Cas 系统的免疫, 噬菌体也进化出了 anti-CRISPR (Acr) 蛋白质^[4-5]。2013 年, Bondy-Denomy 等^[6] 首次在侵染含有 I-F 亚型 CRISPR-Cas 系统的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的噬菌体基因组中发现了 5 种 anti-CRISPR 基因, 他们将其归类并命名为 AcrIF1~5。2014 年, 他们又发现了 4 种能抑制 I-E 亚型 CRISPR-Cas 系统的蛋白质, 命名为 AcrIE1~4^[7]。此后, 陆续有不同种类的 Acr 蛋白特别是 II 型 CRISPR-Cas 系统的 Acr 蛋白被报道^[8-9]。紧随其后

的结构生物学研究发现, Acr 蛋白通过多样化的机制发挥抑制活性^[10-11]。例如: AcrIIC2 蛋白直接与 Cas9 的 BH 结构域相互作用, 通过阻断向导 RNA 的结合来达到抑制效果^[12-13]; AcrIIA2 和 AcrIIA4 通过与 SpyCas9-sgRNA 复合物的结合阻断 Cas9 对 PAM 序列的识别^[14-17]; AcrIIC3 则是通过促进 NmeCas9 二聚化, 将 HNH 结构域锚定在非活性状态, 从而抑制 NmeCas9 对 DNA 的切割^[13, 18]。最近, 国内外的两个研究团队分别报道了能够抑制 Cas13a 效应蛋白 RNase 活性的 Acr 蛋白, 这进一步拓宽了人们对 Acr 家族的认识^[19-20]。

V-A 亚型 CRISPR-Cas 系统的效应蛋白 Cas12a (也称为 Cpf1) 与 crRNA 组成的效应复合物, 在识

* 国家自然科学基金 (31930065, 31725008, 31630015, 31571335, 31700662, 91440201) 资助项目。

** 通讯联系人。

刘亮. Tel: 0592-2182563, E-mail: liangliu2019@xmu.edu.cn

王艳丽. Tel: 010-64881316, E-mail: ylwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2020-07-07, 接受日期: 2020-07-20

别并结合含有特定PAM序列的靶dsDNA后,通过RuvC结构域依次切割dsDNA的两条链^[21].目前,Cas9和Cas12a作为高效的基因编辑工具被广泛应用于生物技术领域^[22-23],而Acr蛋白有潜力作为调控基因编辑的“开关”,因此对于Acr蛋白的研究具有深远的意义.在2018年,有研究报道了5种可抑制V-A型CRISPR-Cas12a系统的蛋白(AcrVA 1~5)^[24-25],其中AcrVA1、AcrVA4和AcrVA5的作用机制已经被很好地阐明.AcrVA1是一种广谱性的Cas12a抑制剂,而AcrVA4和AcrVA5只对某些特定物种的Cas12a具有抑制效果^[24-25].AcrVA1与Cas12a-crRNA结合后被激活并切割crRNA,从而阻止Cas12a识别和降解靶DNA;AcrVA4能够在Cas12a-crRNA复合物识别与切割靶DNA的不同阶段抑制Cas12a的活性^[26-28];而AcrVA5作为一种乙酰转移酶,通过乙酰化修饰Cas12a中识别PAM序列所需的关键氨基酸残基使得Cas12a失活^[29].然而,迄今为止,关于另外两种AcrVA蛋白(AcrVA2和AcrVA3)结构和功能的详细研究还没有被报道.本研究解析了自由状态下的AcrVA2和来源于*Moraxella bovoculi*(Mb)物种的Cas12a第620~636位氨基酸(MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶)与AcrVA2复合物的晶体结构,并进行相关的体外结合实验研究,发现AcrVA2的作用机制不同于上述3种AcrVA蛋白,为进一步理解AcrVA2的抑制机理提供了重要帮助.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因、表达菌株和表达载体

实验所用到的各种基因均由生工公司合成,分别将MbCas12a蛋白基因和AcrVA蛋白基因克隆至pET-SUMO和pET-30b载体上,表达菌株为*E. coli* Rosetta(DE3)和*E. coli* BL21(DE3).

1.1.2 仪器和试剂

PCR仪、核酸电泳仪购自美国Bio-Rad公司;AKTA purifier/FPLC蛋白质纯化系统购自美国GE公司;蛋白质电泳仪购自北京市六一仪器厂;高保真DNA聚合酶购自Takara公司;T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自New England Biolab(NEB)公司;质粒小提试剂盒、DNA胶回收试剂盒均购自Axygen公司.

1.2 方法

1.2.1 蛋白质的表达

将表达载体转化至*E. coli* Rosetta(DE3)和*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布至含100 mg/L卡那霉素的抗性LB固体平板,37℃恒温培养过夜.挑取单菌落到100 ml卡那霉素抗性的LB液体培养基中,37℃、220 r/min培养12 h.按1:100(体积比)接种到750 ml卡那霉素抗性的LB液体培养基中,37℃、220 r/min扩大培养至 $A_{600}=0.6\sim 0.8$,加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG,18℃培养12 h.菌液于4℃、3 500 r/min离心30 min以收集菌体.

1.2.2 蛋白质的纯化

将收集到的菌体按25:1的体积比用裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl)充分重悬,然后在冰上进行超声波破碎,功率200 W,工作3 s,间歇8 s,共20 min.破碎后的菌液在4℃、18 000 r/min离心40 min,收集离心后的上清,进行镍柱亲和层析纯化,分别用含终浓度20 mmol/L和40 mmol/L咪唑的裂解缓冲液洗去杂蛋白,最后用含终浓度200 mmol/L咪唑的裂解缓冲液洗脱目的蛋白.

向收集的蛋白质中加入ULP1蛋白酶切除His-SUMO标签并透析到缓冲液A(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl)随后第二次流穿镍柱进行His-SUMO标签和目的蛋白的分离.

对于MbCas12a,进一步使用heparin柱(GE Healthcare)进行纯化.在AKTA系统上进行梯度洗脱,其中缓冲液A为:20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl;缓冲液B为:20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mol/L NaCl.洗脱流速均为2 ml/min,根据系统检测的UV₂₈₀吸收情况收集样品.

将目的蛋白加入超滤管(Millipore)中,3 500 g离心,进行浓缩,高速离心后在AKTA purifier系统(GE Healthcare)上进行凝胶过滤层析.对于AcrVA2使用的层析柱为Superdex 75 10/300(GE Healthcare),对于MbCas12a使用的层析柱为Superdex 200 10/300(GE Healthcare),凝胶过滤层析缓冲液为:20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl.SeMet_AcrVA2蛋白的纯化方法与天然的AcrVA2蛋白相同.

每一步纯化步骤得到的蛋白质样品均通过SDS-PAGE进行检测.

1.2.3 晶体生长及优化

对于自由状态下AcrVA2蛋白的结晶, 将纯化得到的AcrVA2蛋白样品浓缩至10 g/L左右, 使用商品化结晶条件试剂盒 (Hampton research), 用坐滴法在16°C进行结晶条件的筛选与优化, 最终在0.085 mol/L HEPES, pH 7.5, 1.7% PEG400, 1.7 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% 甘油 (glycerol) 条件下得到可用于收集数据的单晶。

对于MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2复合物的晶体生长及优化, 首先制备MbCas12a-AcrVA2复合物, 将MbCas12和AcrVA2以1:1.2 (摩尔比) 在冰上孵育30 min, 孵育的缓冲液为20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 80 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂. 然后按照质量比 (样品: 蛋白酶=8 000:1) 加入蛋白酶Endoproteinase Glu-C后进行结晶条件的筛选, 并使用悬滴法在16°C进行晶体优化, 最终在0.035 mol/L 二甲胍酸钠 (sodium cacodylate), pH 6.5, 12.6 mmol/L MgCl₂, 1.58 mmol/L 精胺 (spermine), 6.3% 异丙醇 (isopropanol), 15 mmol/L HEPES, pH 6.8, 0.75% PEG5K MME, 0.2 mol/L NDSB-211 (Hampton research) 条件下得到可用于衍射收集数据的单晶。

1.2.4 数据收集与处理及结构解析

自由状态的SeMet_AcrVA2晶体和MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2晶体的X射线衍射数据分别在上海同步辐射光源 (SSRF) 与国家蛋白质科学中心 (上海) 的BL17U1和BL19U1线站上采集, 并用HKL2000进行处理^[30]. AcrVA2的初始相位通过使用Phenix程序包中AutoSol的Se单波长反常衍射法求解. MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2复合物的结构通过分子置换法解析, 以自由状态AcrVA2的晶体结构为模型, 用Phenix程序包中的 Phaser-MR 进行分子置换. 原子模型的搭建和修正分别使用COOT^[31]和Phenix^[32]交替进行. 晶体数据收集及结构修正统计见表1. 结构图用PyMOL分子图形系统绘制 (<http://www.pymol.org/>).

1.2.5 分析性凝胶排阻层析实验

使用Superdex 200 Increase 10/300凝胶过滤层析柱 (GE Healthcare) 进行分析AcrVA2与MbCas12a的结合情况. a. 对于自由状态的MbCas12a蛋白与AcrVA2的结合试验, 将野生型MbCas12a蛋白和AcrVA2以1:1.4的摩尔比混合, 并在冰上孵育30 min. 所用缓冲液为20 mmol/L

Tris-HCl, pH 7.5, 80 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂. b. 对于MbCas12a-crRNA复合物与AcrVA2的结合试验, 将野生型MbCas12a与crRNA在冰上孵育30 min, 随后加入AcrVA2蛋白继续在冰上孵育30 min, MbCas12a: crRNA: AcrVA2=1:1.2:1.4 (摩尔比). 所用缓冲液为20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 80 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂. c. 对于MbCas12a-crRNA-DNA复合物与AcrVA2的结合试验, 以1:1.2:1.5:1.4的摩尔比按顺序加入野生型MbCas12a、crRNA、dsDNA和AcrVA2, 每加入一种新的组分后都在冰上孵育30 min. 为了避免MbCas12a对dsDNA的剪切, 所使用的缓冲液为20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 80 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA. 用SDS-PAGE对各蛋白质组分进行鉴定.

1.2.6 Pull-down实验

将C端带His标签的AcrVA2与无标签的MbCas12a按2:1 (摩尔比) 在缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 80 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂) 中混合, 并在冰上孵育30 min后上样到装载有Ni-NTA填料 (Qiagen) 的层析柱中, 分别用含有20 mmol/L和50 mmol/L咪唑的缓冲液洗涤, 然后用含300 mmol/L咪唑的缓冲液洗脱结合蛋白质. 用SDS-PAGE进行鉴定. 实验对照组设置为单独、无标签的MbCas12a.

用C端带His标签的Cas12a和不带标签的AcrVA2 (摩尔比为2:1) 按照上述方法进行实验. 实验对照组设置为单独的无标签的AcrVA2.

对于截短体MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹与AcrVA2的pull-down实验, 将纯化的带His-SUMO标签的截短体MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹与AcrVA2在缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂) 中冰上孵育20 min, 按照上述方法进行实验. 对照组将截短体MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹替换为His-SUMO标签.

1.2.7 crRNA的体外转录和纯化

转录体系中含有终浓度50 mg/L的质粒模板, 0.1 mol/L HEPES, pH 7.9, 3 mmol/L NTPs, 30 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L spermidine, 30 mmol/L DTT, 0.1 g/L T7 RNA聚合酶, 在37°C转录4 h. 转录产物用20%尿素丙烯酰胺凝胶电泳分离, 切取crRNA条带后在4°C进行电洗脱回收.

2 结 果

2.1 AcrVA2的晶体结构

我们首先解析了AcrVA2蛋白分辨率为2.3 Å的晶体结构(表1)。在AcrVA2的晶体结构中,一个不对称单元内有两个蛋白质分子,通过结构比对发

现,这两个AcrVA2分子非常相似,在对应的297个主链C α 原子叠合时,其r.m.s.d值为0.2609 Å。在蛋白质数据库(PDB)中,通过DALI搜索没有发现任何与AcrVA2结构具有显著相似性的蛋白质结构,这表明AcrVA2的结构与目前已知的Acr蛋白结构都不相同,AcrVA2采用了一种新的折叠方式。

Table 1 Crystallographic data collection and refinement statistics

	Se-AcrVA2	AcrVA2	MbCas12a ⁶²⁰⁻⁶³⁶ -AcrVA2
PDB code		7CI1	7CI2
Beamline	SSRF BL17U1	SSRF BL19U1	SSRF BL19U1
Space group	P6 ₅	P6 ₅	P3 ₁
Cell Dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	84.8, 84.8, 263.2	84.3, 84.3, 264.2	90.8, 90.8, 137.7
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Data Collection*			
Wavelength (Å)	0.979	0.979	0.979
Resolution (Å)	50.00–2.50 (2.54–2.50)	50.00–2.30 (2.34–2.30)	50.00–2.80 (2.85–2.80)
Completeness (%)	100.00 (99.90)	99.90 (99.80)	99.90 (99.70)
Redundancy	13.3 (6.6)	10.1 (7.0)	5.3 (4.8)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	21.8 (2.2)	31.5 (2.0)	21.7 (1.7)
<i>R</i> _{merge} (%)	12.6 (73.6)	6.8 (86.2)	6.9 (76.3)
<i>R</i> _{pim} (%)	3.4 (28.6)	2.2 (34.2)	3.2 (38.0)
Refinement			
Resolution (Å)		48.97–2.30	45.41–2.80
No. reflections		40304	28918
<i>R</i> _{free} / <i>R</i> _{work} (%)		26.25 / 23.95	26.85 / 24.85
<i>B</i> -factors (Å ²)			
Protein		34.77	51.45
Water		29.95	29.33
ligand		43.76	
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)		0.006	0.008
Bond angles (°)		1.282	1.463
Number of Atoms			
Protein		4529	5257
Water		111	55
ligand		32	0
Ramachandran Plot			
Favored (%)		95.02	92.63
Allowed (%)		4.09	6.02
Outliers (%)		0.89	1.35

*Numbers in parentheses represent statistics in highest resolution shell.

AcrVA2 三维结构由 3 个结构域组成, 分别为 N 端结构域 (NTD, 氨基酸残基 1~82 位)、作为主体的中间结构域 (MID, 氨基酸残基 83~256 位) 和比较松散的 C 端结构域 (CTD, 氨基酸残基 257~312 位) (图 1a)。

NTD 主要由 5 个 α 螺旋组成, 其中第一个 α 螺旋 (4~13 位氨基酸残基) 标记为 $\alpha 1$, 它与第二个 α 螺旋 $\alpha 2$ (18~32 位氨基酸残基) 之间有一个短的转变 (图 1a, b)。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 几乎相互垂直, 而 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 都比较短, 它们之间也是通过一个紧密的转变连接起来。 $\alpha 5$ 比较长, 位于 NTD 的尾部。

MID 主要由 β 片层结构组成, 第一条 β 链 (β

1) 与第二条 β 链 ($\beta 2$) 同向平行, 中间由两个短 α 螺旋 ($\alpha 6$ 和 $\alpha 7$) 连接。 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 是两条反向平行的 β 链, 位于蛋白质结构的一侧, 主要由疏水的氨基酸残基组成。 两条长的 β 链 ($\beta 5$ 和 $\beta 6$) 和 $\beta 7$ 交替反向平行, 最后一条 β 链 ($\beta 8$) 与 $\beta 1$ 同向平行并列, 使得 MID 的头尾相遇, 形成稳定的 β 片层结构 (图 1b)。

CTD 仅由一个 α 螺旋 ($\alpha 12$) 和一个跨度约 42 Å 的无规则卷曲组成 (图 1a, b)。 此外, 272~283 位和 316~322 位氨基酸残基的密度缺失, 提示这部分的柔性可能较大, 这表明 AcrVA2 的 C 端具有一定的灵活性。

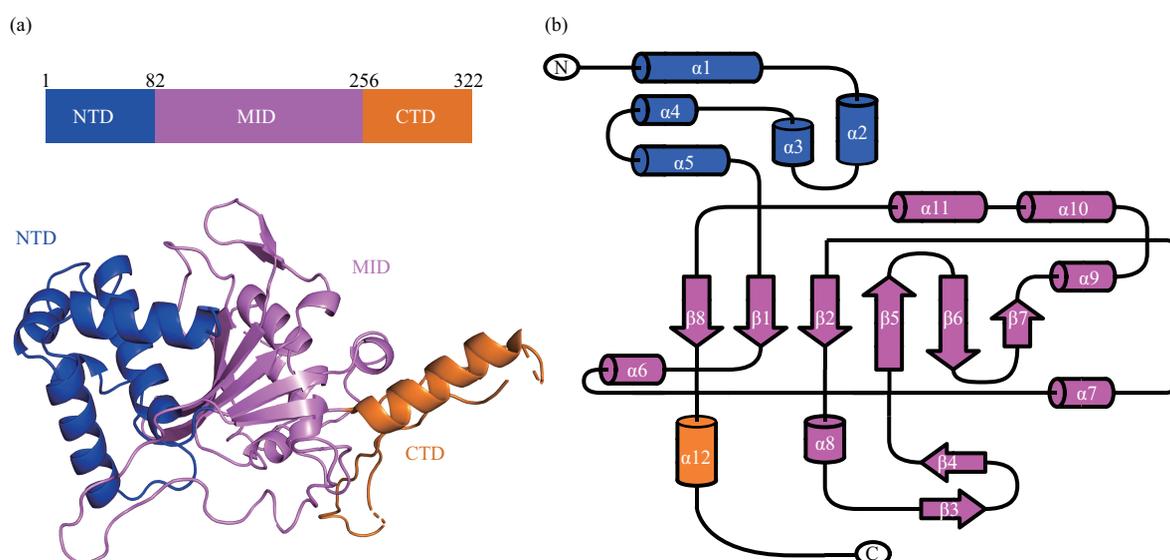


Fig. 1 Crystal structure of the apo AcrVA2

(a) Domain organization (top) and overall structure (bottom) of the AcrVA2. NTD, MID and CTD domains are colored in blue, violet and orange. (b) Topological diagram of the AcrVA2 structure.

2.2 AcrVA2结合自由状态下的MbCas12a

为了分析 AcrVA2 如何与 MbCas12a 相互作用, 我们用分析性凝胶排阻层析实验检测了 AcrVA2 与不同状态下的 MbCas12a 之间的结合情况 (图 2a~c)。 结果表明 AcrVA2 只能与自由状态下的 MbCas12a 结合 (图 2a), 而不与 MbCas12a-crRNA 和 MbCas12a-crRNA-dsDNA 复合物结合 (图 2b~c)。

为了进一步验证 AcrVA2 和自由状态的 MbCas12a 之间的结合, 用无标签的 MbCas12a 和 C 端带有 His 标签的 AcrVA2 进行 pull-down 实验 (图 2d)。 另外, 用 C 端带有 His 标签的 MbCas12a 和无

标签的 AcrVA2 重新进行 pull-down 实验 (图 2e)。 在这两种情形下, MbCas12a 与 AcrVA2 都能一起被洗脱下来, 这些实验结果证明 AcrVA2 蛋白确实与自由状态的 MbCas12a 有相互作用。

2.3 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2复合物的晶体结构

基于上述结合实验的结果, 为了更深入地理解 AcrVA2 如何与 MbCas12a 相互作用, 首先尝试结晶 MbCas12a-AcrVA2 复合物。 经过大量尝试, 并未获得全长的 MbCas12a 与 AcrVA2 复合物的晶体。 可能是由于自由状态的 MbCas12a 具有很高的柔性, 影响了晶体的生长。 因此, 为了去除 MbCas12a 蛋白中不与 AcrVA2 相互作用的柔性部位, 在结晶前

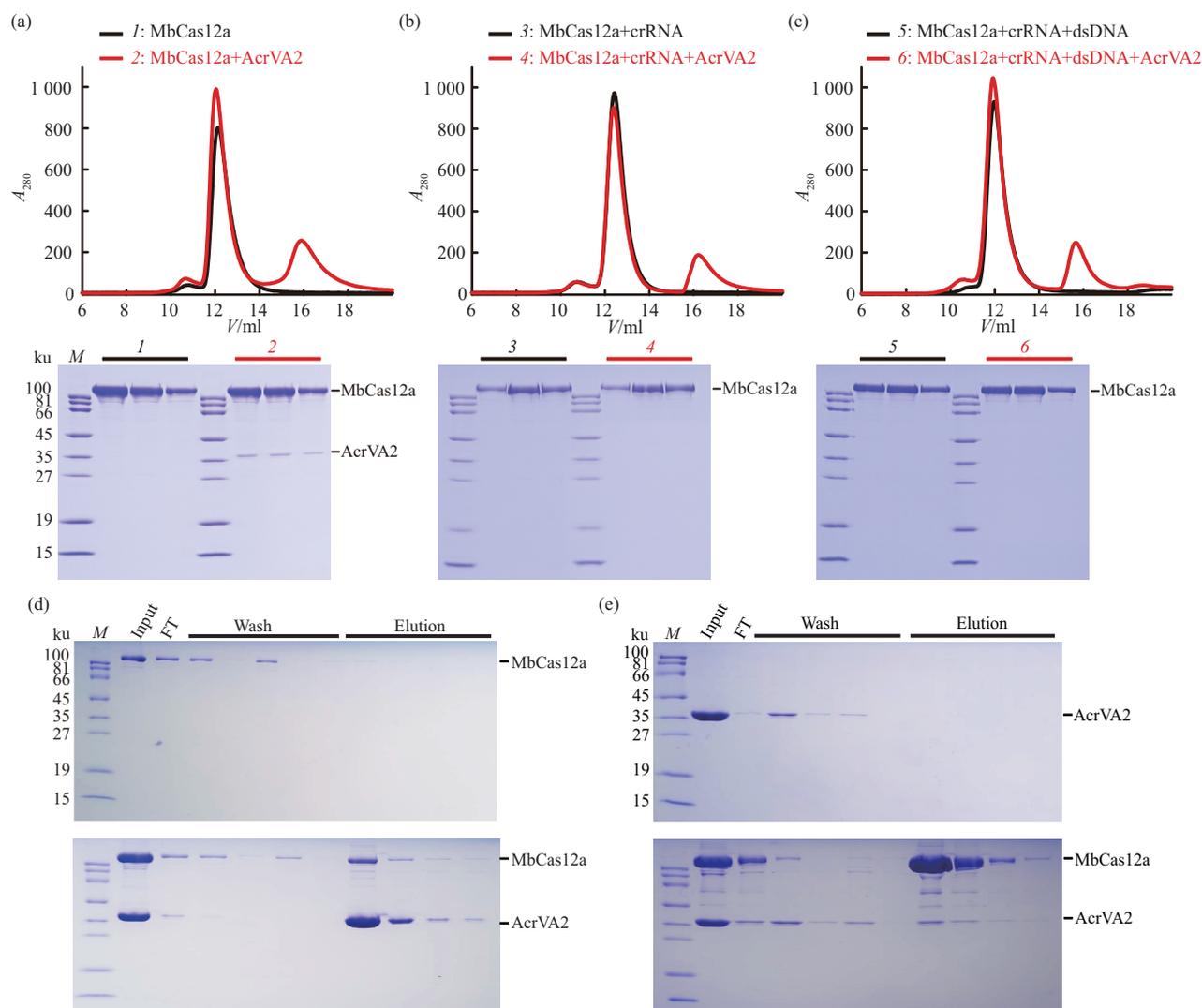


Fig. 2 AcrVA2 directly binds to MbCas12a in apo state

(a-c) Analytical SEC assays for testing the binding of AcrVA2 with apo MbCas12a (a), MbCas12a-crRNA binary complex (b), and MbCas12a-crRNA-dsDNA ternary complex (c). (d) Untagged MbCas12a coeluted with the His-tagged AcrVA2 (lower panel) as the untagged MbCas12a alone in control (upper panel). (e) His-tagged MbCas12a coeluted with the untagged AcrVA2 (lower panel) as the untagged AcrVA2 alone in control (upper panel).

对MbCas12a-AcrVA2复合物进行蛋白酶处理. 在使用蛋白酶Endoproteinase Glu-C消化之后, 获得了AcrVA2结合MbCas12a其中一段肽段的晶体, 并解析了其晶体结构, 分辨率为2.8 Å (表1). 电子密度图显示MbCas12a与AcrVA2相互作用的肽段是620~636位氨基酸残基, 我们将这一肽段命名为MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶.

在MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2复合物的结构中, MID结构域的两个反向平行β链(β3和β4)附近结合有一段来自MbCas12a的WED-II和PI结构域

17个氨基酸残基(第620~636位)的肽段(图3a, b). 通过比较自由状态下AcrVA2与结合MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶后AcrVA2的结构, 发现r.m.s.d值为0.93 Å (292个主链Ca原子参与叠合), 表明MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶结合后, AcrVA2的整体结构没有发生较大的构象改变. 但是, 在MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2复合物的结构中, 位于MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶附近的β3和β4发生了较为明显的构象变化(图3c), 这种构象变化很可能是由MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶的结合引起的. 分析AcrVA2与MbCas12a之间的结合面, 发

现 AcrVA2 与 MbCas12a 的结合主要通过氢键和盐桥的相互作用 (图 4a)。其中 AcrVA2 的 Gln172、Asp195 和 Ser198 通过其侧链与 MbCas12a 的 Asn630 形成氢键相互作用, AcrVA2 的 Glu98 与

MbCas12a 的 Lys624 形成盐桥, AcrVA2 的 Asp129 与 MbCas12a 的 Lys631 之间形成盐桥 (图 4a)。此外, 二者结合界面的疏水相互作用进一步稳定了 AcrVA2 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-复合物 (图 4b)。

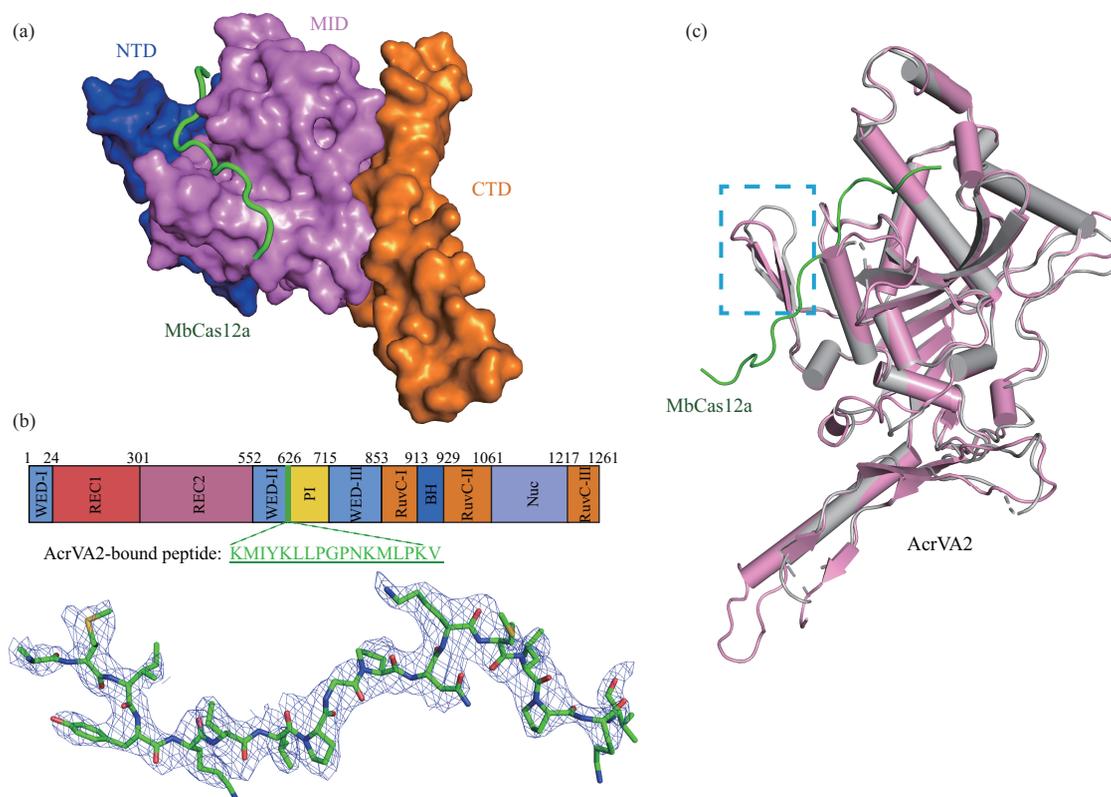


Fig. 3 Crystal structure of MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 complex

(a) Surface representation of AcrVA2 in complex with MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶, MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶ is shown in green; (b) The sequence and location of MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶ bound with AcrVA2 is shown (upper panel). The 2mF_o-F_c omit electron density map (contoured at 1.2) of MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶ is shown as a blue mesh (lower panel); (c) Structural comparison between MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 (in green and pink) and apo-AcrVA2 (in gray).

为了验证上述从结构中观察到的结果, 我们表达并纯化了 MbCas12a 蛋白 616~641 位氨基酸残基的截短体 (MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹), 用带有 His-SUMO 标签的 MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹ 与 AcrVA2 进行 pull-down 实验, 并用单独的 His-SUMO 标签与 AcrVA2 的 pull-down 实验作为对照。结果显示 AcrVA2 能够与 MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹ 共同被洗脱, 而不能与单独的 His-SUMO 标签一起被洗脱 (图 4c), 表明 AcrVA2 与 MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹ 截短体确有相互作用。为了进一步验证 AcrVA2 与 MbCas12a 的特异性相互作用, 我们检测了全长 MbCas12a 和 AcrVA2 突变体之间的结合能力。结果发现 AcrVA2 的突变体 (E98A/D129A/D195A) 完全失去了与全长 MbCas12a 的亲

和力, 而另外 3 种 AcrVA2 突变体 (I125A、V168A 和 I125A/L201A) 则表现出与野生型相当的结合力 (图 4d), 说明在破坏了 AcrVA2 与 MbCas12a 的氢键互作网络后, AcrVA2 丧失了与 MbCas12a 的结合能力, 表明 AcrVA2 与 MbCas12a 结合时, 氢键-盐桥的互作网络可能占主导地位。

虽然到目前为止还没有自由状态下的 Cas12a 高分辨率结构被报道, 但是之前有研究报道 Cas12a 电镜负染的结果, 并预测在自由状态下 Cas12a 处于一种“打开”的伸展状态^[33], 在这种状态下 Cas12a 的 620~636 位氨基酸残基会暴露出来, 有利于 AcrVA2 与 Cas12a 结合。而 crRNA 的结合引起 Cas12a 发生显著的构象变化, 使 Cas12a 变

成一种“闭合”状态^[33-34], 在这种闭合状态下 Cas12a的620~636位氨基酸残基被包裹在较窄的沟

中(图4e)^[29], 从而在空间上阻断了AcrVA2与Cas12a的结合.

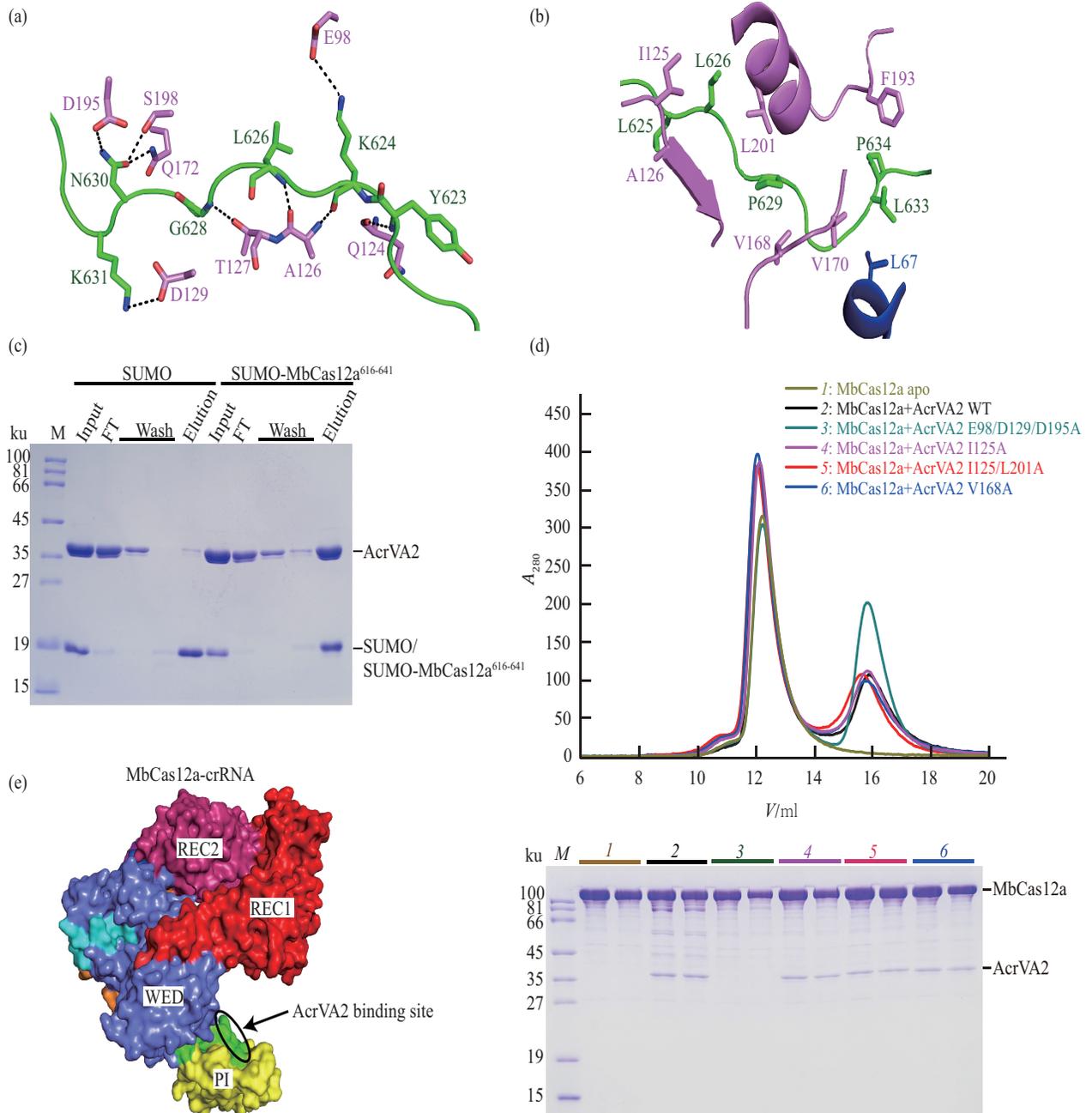


Fig. 4 Structural and biochemical analysis for the interaction between AcrVA2 and MbCas12a

(a) Hydrogen bonds and salt-bridges between AcrVA2 and MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶; (b) Hydrophobic interactions between AcrVA2 and MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶. (c) Pull-down assays for AcrVA2 with His-SUMO tagged MbCas12a⁶¹⁶⁻⁶⁴¹ truncation or His-SUMO tag. (d) SEC assays for testing the affinity between full-length MbCas12a and AcrVA2 mutants. (e) In the MbCas12a-crRNA structure (PDB: 6IV6), the residues 620-636 of MbCas12a (shown in green) are located in a narrow valley.

3 结 论

Cas12a 目前作为基因编辑工具和核酸检测工具等被广泛应用^[23, 35-36], 而 AcrVA 蛋白作为 Cas12a 的抑制剂能够调控 Cas12a 的活性, 因此对 AcrVA 蛋白抑制 Cas12a 作用机理的研究可以促进 Cas12a 调控开关的开发, 对于 Cas12a 的精细应用具有重要意义.

通过解析 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 复合物的结构发现, AcrVA2 是通过特异性识别 620~636 位氨基酸残基结合 MbCas12a, 尤其是 AcrVA2 的 Gln172、Asp195 和 Ser198 与 MbCas12a 的 Asn630 形成氢键相互作用, AcrVA2 的 Glu98 和 Asp129 分别与 MbCas12a 的 Lys624 和 Lys631 形成盐桥, 这些相互作用对 MbCas12a 的识别非常重要. 我们的结构解析以及相应的结合实验证明了 AcrVA2 能够与自由状态的 MbCas12a 结合, 并且这种结合是通过特异性识别 620~636 位氨基酸实现的.

根据之前的研究结果, 自由状态下的 Cas12a 处于一种伸展状态, 有利于暴露出 AcrVA2 的结合位点, 我们推测 AcrVA2 与 Cas12a 结合后, 可能产生空间位阻, 从而影响 Cas12a 与 crRNA 的结合. 值得注意的是, AcrVA2 的这种结合特点一定程度上类似于 AcrIIC2, 同样作为 Acr 蛋白家族的一员, AcrIIC2 能够特异性识别并结合自由状态 Cas9 的 BH 结构域, 从而阻止 sgRNA 与 Cas9 的结合, 达到抑制 Cas9 活性的效果^[12-13].

目前, AcrVA1、AcrVA4 和 AcrVA5 的抑制机理已经得到研究^[26-29]. 它们分别通过降解 Cas12a 的 crRNA、阻止 Cas12a 与靶 DNA 结合, 以及对 Cas12a 进行乙酰化修饰的方式抑制 Cas12a 的活性. 通过解析 AcrVA2 和 MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 复合物的晶体结构, 阐明 AcrVA2 与自由状态 MbCas12a 的结合方式, 提出了 AcrVA2 抑制 MbCas12a 活性的可能机制. 这些研究结果有利于我们进一步理解 AcrVA 蛋白抑制 Cas12a 活性的多样化机制, 同时表明 AcrVA 蛋白可以在多个水平上通过不同的机理实现对 Cas12a 的抑制作用, 为 Cas12a 活性抑制剂的开发和应用提供了结构基础.

致谢 我们感谢上海同步辐射光源 (SSRF) 与国家蛋白质科学中心 (上海) 的 BL17U1 和 BL19U1 线站为晶体衍射数据收集提供的支持和帮助.

参 考 文 献

- [1] Marraffini L A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 2015, **526**(7571): 55-61
- [2] Sorek R, Lawrence C M, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem*, 2013, **82**: 237-266
- [3] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, **37**: 67-78
- [4] Koonin E V, Makarova K S. Anti-CRISPRs on the march. *Science*, 2018, **362**(6411): 156-157
- [5] Maxwell K L. The anti-CRISPR story: a battle for survival. *Molecular Cell*, 2017, **68**(1): 8-14
- [6] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell K L, *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 2013, **493**(7432): 429-432
- [7] Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung V H, *et al.* A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 2014, **5**(2): e00896
- [8] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, *et al.* Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 2016, **167**(7): 1829-1838
- [9] Rauch B J, Silvis M R, Hultquist J F, *et al.* Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 2017, **168**(1-2): 150-158
- [10] Zhu Y, Zhang F, Huang Z. Structural insights into the inactivation of CRISPR-Cas systems by diverse anti-CRISPR proteins. *BMC biology*, 2018, **16**(1): 32
- [11] Pawluk A, Davidson A R, Maxwell K L. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nat Rev Microbiol*, 2018, **16**(1): 12-17
- [12] Thavalingam A, Cheng Z, Garcia B, *et al.* Inhibition of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex assembly by anti-CRISPR AcrIIC2. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2806
- [13] Zhu Y, Gao A, Zhan Q, *et al.* Diverse mechanisms of CRISPR-Cas9 inhibition by type IIC anti-CRISPR proteins. *Mol Cell*, 2019, **74**(2): 296-309
- [14] Liu L, Yin M, Wang M, *et al.* Phage AcrIIA2 DNA mimicry: structural basis of the CRISPR and anti-CRISPR arms race. *Mol Cell*, 2019, **73**(3): 611-620
- [15] Shin J, Jiang F, Liu J-J, *et al.* Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNAmimic. *Sci Adv*, 2017, **3**(7): e1701620-e1701620
- [16] Yang H, Patel D J. Inhibition mechanism of an anti-CRISPR suppressor AcrIIA4 targeting SpyCas9. *Mol Cell*, 2017, **67**(1): 117-127
- [17] Dong D, Guo M, Wang S, *et al.* Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 2017, **546**(7658): 436-439
- [18] Sun W, Yang J, Cheng Z, *et al.* Structures of *Neisseria meningitidis* Cas9 complexes in catalytically poised and anti-CRISPR-inhibited states. *Mol Cell*, 2019, **76**(6): 938-952
- [19] Lin P, Qin S, Pu Q, *et al.* CRISPR-Cas13 inhibitors block RNA editing in bacteria and mammalian cells. *Mol Cell*, 2020, **78**(5): 850-861

- [20] Meeske A J, Jia N, Cassel A K, *et al.* A phage-encoded anti-CRISPR enables complete evasion of type VI-A CRISPR-Cas immunity. *Science*, 2020, **369**(6499): 54-59
- [21] Swarts D C. Making the cut(s): how Cas12a cleaves target and non-target DNA. *Biochem Soc Trans*, 2019, **47**(5): 1499-1510
- [22] Platt R J, Chen S, Zhou Y, *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, **159**(2): 440-455
- [23] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(1): 31-34
- [24] Marino N D, Zhang J Y, Borges A L, *et al.* Discovery of widespread type I and type V CRISPR-Cas inhibitors. *Science*, 2018, **362**(6411): 240-242
- [25] Watters K E, Fellmann C, Bai H B, *et al.* Systematic discovery of natural CRISPR-Cas12a inhibitors. *Science*, 2018, **362**(6411): 236-239
- [26] Knott G J, Cress B F, Liu J J, *et al.* Structural basis for AcrVA4 inhibition of specific CRISPR-Cas12a. *eLife*, 2019, **8**: e49110
- [27] Peng R, Li Z, Xu Y, *et al.* Structural insight into multistage inhibition of CRISPR-Cas12a by AcrVA4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(38): 18928-18936
- [28] Zhang H, Li Z, Daczkowski C M, *et al.* Structural basis for the inhibition of CRISPR-Cas12a by anti-CRISPR proteins. *Cell Host Microbe*, 2019, **25**(6): 815-826
- [29] Dong L, Guan X, Li N, *et al.* An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, **26**(4): 308-314
- [30] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, **276**: 307-326
- [31] Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, *et al.* Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(Pt 4): 486-501
- [32] Adams P D, Grosse-Kunstleve R W, Hung L W, *et al.* PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, **58**(Pt 11): 1948-1954
- [33] Dong D, Ren K, Qiu X, *et al.* The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 522-526
- [34] Min K, Yoon H, Jo I, *et al.* Structural insights into the apo-structure of Cpf1 protein from *Francisella novicida*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **498**(4): 775-781
- [35] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436-439
- [36] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Kellner M J, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, **360**(6387): 439-444

Structural Study on Anti-CRISPR Protein AcrVA2*

CHEN Peng^{1,2,3}, SUN Wei^{1,3}, CHENG Zhi^{1,2,3}, YANG Jing¹, WANG Min¹,
WANG Jiu-Yu^{1,3}, CHEN Hui-Qing⁴, LIU Liang⁵** , WANG Yan-Li¹**

¹Key Laboratory of RNA Biology, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁴School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China;

⁵School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract To defend against the invasion of phages, most Archaea and bacteria possess the adaptive immune systems, which are formed by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas) proteins. To counteract the CRISPR-Cas systems, phages express anti-CRISPR (Acr) proteins to inhibit CRISPR-dependent response. AcrVA2 from *Moraxella bovoculi* is an inhibitor of Type V-A CRISPR-Cas system. However, the structure and inhibition mechanism of AcrVA2 remain to be elucidated. Here we report the crystal structures of AcrVA2 in the apo state and MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 complex. AcrVA2 adopts a novel α - β fold and binds to MbCas12a in free state. The structure of MbCas12a⁶²⁰⁻⁶³⁶-AcrVA2 complex reveals that AcrVA2 interacts with MbCas12a *via* hydrogen bonds and salt bridges, as well as hydrophobic interaction. These results suggest that AcrVA2 affect the activity of Cas12a by binding to the MbCas12a in the apo state. These results provide significant insights into the mechanism of AcrVA2 disabling Type V-A CRISPR-Cas system.

Key words CRISPR-Cas system, Cas12a, anti-CRISPR, AcrVA2, crystal structure

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0223

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31930065, 31725008, 31630015, 31571335, 31700662, 91440201).

** Correspondence author.

LIU Liang. Tel: 86-592-2182563, E-mail: liangliu2019@xmu.edu.cn

WANG Yan-Li. Tel: 86-10-64881316, E-mail: ylwang@ibp.ac.cn

Received: July 7, 2020 Accepted: July 20, 2020