



## 来自细菌的魔剪：2020 年诺贝尔化学奖

向华\*

中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

### Genetic Scissors from Bacteria: the 2020 Nobel Prize in Chemistry

XIANG Hua\*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China



#### 作者简介：

向华，中国科学院微生物研究所研究员，中国科学院大学教授，国家杰出青年科学基金项目获得者，国家重点研发计划项目首席科学家。现任中国科学院微生物研究所副所长，微生物资源前期开发国家重点实验室主任，中国遗传学会微生物遗传专业委员会主任，国际专业期刊 *Front Microbiol*、*Front Genome Edit*、*J Genet Genomics*、*Appl Environ Microbiol* 副主编或编委等。目前致力于极端微生物合成生物学、极端环境微生物组、极端古菌遗传与代谢、CRISPR-Cas 分子机制及基因组编辑技术创新等研究，已在 *Cell*、*Nat Commun*、*Nucleic Acids Res*、*Cell Rep*、*Biomaterials*、*Mol Microbiol* 和 *Appl Environ Microbiol* 等期刊上发表科研论文 120 余篇。在 CRISPR-Cas 抗病毒适应机制方面的系统工作，多次被诺贝尔奖得主 Emmanuelle Charpentier 等正面引用和评价。

**摘要：**CRISPR-Cas 系统是在原核微生物中广泛存在的抵抗病毒(或质粒)入侵的防御系统。基于 CRISPR-Cas9 系统发展的基因组编辑工具可以方便快捷地实现对生物体内基因组的精确编辑，如突变基因的修复、有益基因的强化和有害基因的删除等，已在生命科学基础研究、经济物种遗传改良和人类医药健康等领域获得广泛应用，其主要发明人 Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer A. Doudna 教授于 2020 年荣获“诺贝尔化学奖”。CRISPR-Cas9 基因组编辑技术在深刻改变生命科学与医学领域研究范式的同时，也提示丰富多彩的微生物资源依然是颠覆性生物技术创新的源泉，微生物前沿基础研究具有极其重要的战略意义。

**关键词：**原核微生物免疫系统，CRISPR-Cas，基因组编辑

**Keywords:** Immune systems in prokaryotes, CRISPR-Cas, Genome Editing

地球上所有的生命形式使用几乎完全相同的一套遗传密码，这套密码就贮存在它们的基因组 DNA 分子中。自 20 世纪中叶 DNA 结构解析、遗

传密码破译和遗传信息传递的中心法则发现以来，如何对基因组中的遗传信息进行操控，尤其是如何实现高等生物精准的基因组编辑，成为科学家探索

\*通信作者：E-mail: xaingh@im.ac.cn

生命奥秘时亟待解决的瓶颈问题。2012年,法国微生物学家 Emmanuelle Charpentier 和美国生物化学家 Jennifer A. Doudna 基于对 CRISPR-Cas9 靶向切割 DNA 分子机制的精细解析,联袂创建了史上最方便快捷且精准高效的 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术<sup>[1]</sup>,深刻改变了生命科学的研究范式,于2020年荣获“诺贝尔化学奖”。

CRISPR-Cas 系统广泛存在于原核微生物中,是细菌和古菌抵抗入侵病毒(或质粒)的获得性可遗传的核酸免疫系统。CRISPR 结构由高度保守的重复序列和各不相同的间隔序列组成。其间隔序列来源于曾经入侵过的病毒(或质粒),是对这类外源遗传因子的信息贮存。CRISPR 结构经转录加工后可生成 crRNA。当病毒(或质粒)再次入侵时,带有其序列信息的 crRNA 可以引导 Cas 效应蛋白(如 Cas9)或 Cas 效应蛋白复合物(如 Cascade)识别该病毒(或质粒)进而将其清除<sup>[2]</sup>。CRISPR-Cas9 基因组编辑技术正是巧妙地利用了可编程的 crRNA 介导 Cas9 核酸酶靶向特定的 DNA 序列,从而实现目标 DNA 的精准编辑。这是继微生物抗病毒的限制性核酸内切酶及其在分子遗传学领域的应用获得1978年“诺贝尔奖”之后,同样基于微生物抗病毒机制创新发展的颠覆性基因组编辑技术再次荣获“诺贝尔奖”,显示丰富多彩的微生物资源依然是生命科学技术创新的源泉。

从1987年 CRISPR 序列结构的偶然发现到2012年 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术取得关键突破用了25年时间,这是微生物学与其他学科交叉促进的经典范例。CRISPR 前20余年的研究主要由微生物学家出于对生命现象的好奇心在推动。CRISPR 序列是1987年由日本学者 Ishino Y 等在研究大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶转换基因时首先发现的<sup>[3]</sup>。由于当时基因组信息很少,这种序列结构与功能的普遍性还完全没有线索。直到1993年,西班牙科学家 Mojica FJ 等在一株名为地中海富盐菌的嗜盐古菌中再次发现了类似的 CRISPR 序列,之后又在细菌和古菌中发现了更多的类群,暗示了

CRISPR-Cas 系统的多样性和在原核生物中的普遍性<sup>[4-5]</sup>。Mojica FJ 是早期坚持探索 CRISPR 奥秘的主要科学家。随着基因组数据的持续增加,他终于通过 BLAST 序列比对发现 CRISPR 间隔序列主要来源于外源病毒和质粒,并于2005年首次预测 CRISPR-Cas 的生物学功能可能是通过贮存外源病毒(或质粒)的序列信息而抵御这类外源遗传因子的再次入侵<sup>[6]</sup>,这一论断同年得到了另外两个研究团队独立数据的支持。科学家的兴趣驱动和基于生物信息数据库的创新性运用首次揭开了 CRISPR 神秘的面纱。

上述理论预测促进了实验探索的突破,在 CRISPR 序列结构首次报道20年之后的2007年,法国 Horvath P 团队实验证实酸奶生产菌嗜热链球菌从病毒(噬菌体)获取新的间隔序列贮存到 CRISPR 结构中后,获得了对该病毒的抗性,新的间隔序列和 Cas9 蛋白(当时还命名为 Cas5)对于抵抗相应病毒入侵都是不可或缺的,首次证明了 CRISPR 的抗病毒功能<sup>[7]</sup>;紧接着的2008年,荷兰瓦格宁根大学 van der Oost 研究团队对大肠杆菌 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的工作机制进行了精细解析,并提出了 I 型 CRISPR 系统抗病毒复合物 Cascade 的概念<sup>[8]</sup>。我们团队从2009年开始从事嗜盐古菌 I-B 型 CRISPR 分子机制的研究,并于2013年首次揭示地中海富盐菌 CRISPR 功能机制时,距离 Mojica FJ 在该菌中发现首个古菌 CRISPR 也正好20年<sup>[9]</sup>。

本届“诺贝尔化学奖”得主 Charpentier E 和 Doudna JA 则是 II 型 CRISPR-Cas9 系统机制深入研究和技术创新的关键学者。2011年,已到瑞典工作的法国微生物学家 Charpentier E 报道了其团队在研究酿脓链球菌 CRISPR-Cas9 工作机制时不同寻常的发现。该菌 CRISPR-Cas 基因簇上游与 CRISPR 相反的方向转录产生了一组奇特的非编码 RNA,即 tracrRNA,她敏锐地意识到 tracrRNA 可能参与了 CRISPR-Cas9 系统功能,并最终发现 tracrRNA 不仅帮助 crRNA 成熟,而且是 CRISPR-Cas9 系统

抵抗外源遗传因子所必需<sup>[10]</sup>。为了进一步理解 tracrRNA 在 Cas9 核酸酶活性中的作用, Charpentier E 和美国生物化学家 Doudna JA 在结构生物学与生物化学机制方面进行了深入合作, 发现 Cas9-crRNA-tracrRNA 三个组分是 Cas9 体外核酸酶活性所必需, 并共同解析了其复合物结构<sup>[1]</sup>。特别需要指出的是, Doudna JA 和 Charpentier E 团队基于结构生物学信息还对该三组分系统进行了简化, 创新性地将 tracrRNA 与 crRNA 联合成一条单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 从而只需 sgRNA 和 Cas9 蛋白两个组分即可靶向切割特定的 DNA 序列, 催生了 2012 年颠覆性 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术的横空出世<sup>[1]</sup>。值得一提的是, 同一年立陶宛科学家 Siksnys V 实验室也独立发现了 crRNA 介导的 Cas9 靶向酶切 DNA 活性, 不过他们没有注意到 tracrRNA 在此过程中发挥的重要作用<sup>[11]</sup>。CRISPR-Cas9 基因组编辑技术因其简单高效, 很快被 Zhang F、Church GM、高彩霞等全球众多研究团队开发应用于各种动植物的基因组编辑, 显示了巨大的应用潜力<sup>[12-14]</sup>。2015 年 CRISPR-Cas 基因组编辑技术被美国 *Science* 杂志评为十大科学突破之首, 并在随后几年内, 相继衍生出单碱基编辑、引导基因组编辑等升级版<sup>[15-16]</sup>, 形成了基于 CRISPR-Cas 基因组编辑底层技术的创新体系。

当前, CRISPR-Cas9 技术正被广泛应用于推动基础科学和生物技术的发展, 包括发展面向未来的基因治疗技术等<sup>[17]</sup>。进一步推动现有 CRISPR 基因组编辑技术的优化升级, 保持其高效性并降低其脱靶率, 同时加强对微生物资源和基因组大数据的深入挖掘, 开发全新的基因组写书工具, 提升我国在基因组编辑领域的源头创新能力和国际竞争力, 是未来需要大力发展的研究领域和研究方向。

## REFERENCES

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [2] Hille F, Richter H, Wong SP, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [3] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. 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
- [4] Mojica FJM, Juez G, Rodriguez-Valera F, et al. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(3): 613-621
- [5] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-246
- [6] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182
- [7] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [8] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964
- [9] Li M, Liu HL, Han J, et al. Characterization of CRISPR RNA biogenesis and Cas6 cleavage-mediated inhibition of a provirus in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(4): 867-875
- [10] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607
- [11] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586
- [12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [13] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826
- [14] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686-688
- [15] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424
- [16] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157
- [17] Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869