

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04759

研究課題名(和文) CRISPR-Casエフェクター複合体の構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of CRISPR-Cas effector complex

研究代表者

沼田 倫征 (Numata, Tomoyuki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：10401564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas系は原核生物における獲得免疫系として機能する。本研究では、III-A型エフェクター複合体を構成するCasタンパク質(Csm2とCsm3)の結晶構造を決定した。また、エフェクター複合体のモデル構造を構築して、エフェクター複合体におけるCsm2の機能を明らかにした。さらに、III型エフェクター複合体を構成するcrRNAの3'末端のプロセッシングにおいて、Cmr1が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Cmr1による前駆体crRNAの3'末端のプロセッシング活性を解明するために、III-B型エフェクター複合体のクライオ電顕による単粒子解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR-Cas系には多様なタンパク質とRNA分子が関与する。現在、ゲノム編集で利用されているのはクラス2のCas9とCas12である。一方、それ以外の因子は現在のところゲノム編集をはじめあまり活用されていない。さらに、機能が分かっていないCRISPR関連タンパク質も多数存在する。したがって、CRISPR-Cas系に関してさらに理解を深めることは、新規なゲノム編集技術の開発や新たな遺伝子発現調節技術の創出などに応用できる可能性を秘めている。本研究は、III型のエフェクター複合体に焦点を当てたものであり、新たな技術に結びつくことが期待できる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas system serves as a prokaryotic adaptive immune system. In this study, I determined the crystal structures of Csm2 and Csm3, the Cas proteins that constitute the type III-A CRISPR-Cas effector complex. I constructed the model structure of the whole effector complex of the type III-A, and revealed the function of the Csm2 protein in the complex. Further, this study suggested the important role of Cmr1, one of the protein subunits of the type III-B CRISPR-Cas effector complex, in the 3' terminal processing of the pre-crRNA of the type III effectors. To elucidate the structural and functional roles of Cmr1 in the 3' terminal processing of the pre-crRNA, cryoEM analysis of the type III-B CRISPR-Cas effector complexes are currently in progress.

研究分野：構造生物学

キーワード：CRISPR-Cas crRNA Casタンパク質 エフェクター複合体 原核生物獲得免疫 ゲノム 核酸 立体構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界において、**CRISPR-Cas**系は原核生物における獲得免疫系として機能している。原核生物のゲノムには、**CRISPR**と呼ばれる遺伝子座が存在する。この遺伝子座にはウイルスなどの外来核酸に由来する多様な配列(スペーサー)が含まれており、それぞれのスペーサー配列はリピートと呼ばれる固有の塩基配列によって隔てられている。これまでに遭遇したことのないウイルスに感染すると、原核生物はウイルス核酸の一部を新たなスペーサーとして**CRISPR**遺伝子座に組み込み、ウイルスの感染履歴を自身のゲノムに記録する。その後、同じウイルスに再感染すると、**CRISPR**遺伝子座から**crRNA**前駆体が合成される。**crRNA**前駆体はリピート配列に由来する部分でプロセシングされ、スペーサーに由来する配列を一つずつ含んだ**crRNA**ができあがる。**CRISPR**遺伝子座の近傍には**Cas**遺伝子が存在し、翻訳合成された**Cas**タンパク質と**crRNA**が会合してエフェクター複合体を形成する。**crRNA**はウイルス核酸と相補的な配列を持つため、この配列相補性を利用してエフェクター複合体はウイルス核酸を特異的に認識し、そのヌクレアーゼ活性により外来核酸を分解して外来遺伝子の発現を抑制する。このように、原核生物は多様な配列を持った**crRNA**ライブラリーを利用して、さまざまな外来核酸の侵入に備えている。

エフェクター複合体は**Cas**タンパク質の種類により、2つのクラス(クラス1と2)にグループ化されている。クラス1と2はそれぞれ3つの型(I, III, IV型)と(II, V, VI型)に分類され、さらに幾つかのサブタイプに細分化されている。クラス1のエフェクター複合体が複数の**Cas**タンパク質と**crRNA**が会合した巨大な複合体を形成しているのに対して、クラス2のエフェクター複合体は一つのタンパク質と**crRNA**(およびサブタイプによってはCasタンパク質は、クラス2のII型およびV型に分類される**Cas9**および**Cas12**である。

研究開始当時、I型およびII型エフェクター複合体の立体構造が報告され、標的を切断する仕組みが解明されていた。III型エフェクター複合体については、III-B型エフェクター複合体である**Cmr**複合体の結晶構造を高分解能で我々が決定していた。III型エフェクターは幾つかのサブタイプに細分化される。特に、III-A型とIII-B型の機能解析研究が進んでおり、III型エフェクター複合体がウイルスの**RNA**を切断するだけでなく、ウイルス**DNA**を認識し切断することが遺伝学的および生化学的な研究からも明らかとなっていた。我々が決定したIII-B型エフェクター複合体の高分解能結晶構造は、III型エフェクター複合体が標的**RNA**を認識し分解する仕組みを見事に明らかにするものであった。III-B型エフェクター複合体の高分解能立体構造とは対照的に、III-A型エフェクター複合体については低分解能のクライオ電顕構造が報告されていたにすぎず、標的を認識して切断する詳細な仕組みは未解明であった。また、**crRNA**前駆体から**crRNA**が成熟化する仕組みについては、I型およびII型**CRISPR-Cas**系においてよく理解されていた。一方で、III型**CRISPR-Cas**系における**crRNA**の成熟化過程に関しては十分に理解されていなかった。つまり、まず、**Cas6**が**crRNA**前駆体をプロセシングした後、さらにその3側がトリミングされることは知られていたが、トリミングに関与する因子が分からず成熟化に関する詳しいしくみは不明であった。

2. 研究の目的

III-A型エフェクター複合体は5種類の**Cas**タンパク質(**Csm1**から**Csm5**)と**crRNA**から、一方、III-B型エフェクター複合体は6種類の**Cas**タンパク質(**Cmr1**から**Cmr6**)と**crRNA**から構成されている。これまでに、我々は**Cmr1**を含まないIII-B型エフェクター複合体(**CmrΔ1**)と標的核酸との複合体の結晶構造を解析していた。一方、III-A型エフェクター複合体については、他のグループにより低分解能のクライオ電顕構造が報告されていたにすぎず、当該複合体による標的核酸の認識と分解に関する詳細な分子機構は不明であった。そこで、III-A型エフェクター複合体の詳細な立体構造を解析して、その分子機構の解明を目指した。また、III型エフェクター複合体に取り込まれる**crRNA**の生合成機構(3側のプロセシング機構)については十分に理解されていなかった。そこで、前駆体**crRNA**の3側のプロセシングに関わるタンパク質因子を同定し、プロセシングする仕組みの解明も目指した。

3. 研究の方法

Staphylococcus epidermidis, **Thermoplasma volcanium**, **Methanocaldococcus jannaschii**, **Pyrococcus horikoshii**由来のIII-A型エフェクター複合体を構成する**Cas**タンパク質(**Csm1**から**Csm5**)をコードする遺伝子を発現ベクターにクローニングし、大腸菌内でタンパク質を合成した。アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにより各タンパク質を精製した。調製した各**Cas**タンパク質と**crRNA**を混合して、エフェクター複合体の形成の成否をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。また、調製した各**Cas**タンパク質と**crRNA**および**crRNA**のガイド鎖と相補的な配列をもつ標的**RNA**を混合し、III-A型エフェクター複合体による標的**RNA**の切断活性を評価した。

タンパク質の立体構造を決定するために、調製した各タンパク質や複合体の結晶化条件をシットティングドロップ蒸気拡散法によりスクリーニングした。その結果、**S. epidermidis**由来

Csm2 (SpCsm2) および *T. volcanium* 由来 **Csm3 (TvCsm3)** の結晶が得られた。結晶の回折データを高エネルギー加速器研究機構の光子ファクトリーのビームライン **BL-17A** にて収集した。**SpCsm2** 結晶の位相を単波長異常分散法で、**TvCsm3** 結晶の位相を分子置換法により決定し、それぞれ分解能 **2.4** と **2.7 Å** で結晶構造を決定した。

Cmr1 を欠損させた **III-B 型エフェクター複合体 (CmrΔ1)** をこれまでに確立した方法により調製した。また、**Cmr1** を単独で調製するとともに、**3'**側に余剰配列をもった **crRNA** 前駆体を合成した。**CmrΔ1**, **Cmr1** および **crRNA** 前駆体を混合して反応させ、**crRNA** 前駆体の **3'**側に付加していた余剰配列がプロセシングされるか否かを変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (変性 **PAGE**) により分析した。また、調製した **CmrΔ1** と **Cmr** 複合体 (**III-B 型エフェクター複合体**) の立体構造を解析するために、高エネルギー加速器研究機構にてクライオ電子顕微鏡 **Talos Arctica** を利用してデータを収集し、**Relion** を用いた単粒子解析により複合体のクライオ電顕構造を決定した。

4. 研究成果

精製した **Csm2** をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した結果、**Csm2** は溶液中においてモノマーとして存在することが判明した。**Csm2** の結晶化条件をスクリーニングした結果、**PEG3350** を沈殿剤として用いた条件下において **SpCsm2** の結晶が得られた。放射光施設を利用して **SAD** 法により **SpCsm2** 結晶の位相を決定した。結晶構造を解析したところ、**Csm2** は α ヘリックスから成り (図 **1A**)、**III-B 型エフェクター複合体** を構成する **Cmr5** の構造と類似することが判明した。これまでに我々は、**Cmr5** が **III-B 型エフェクター複合体** のヘリカル領域を構成するタンパク質であり、**Cmr4** や標的 **RNA** と相互作用することを明らかにしている。さらに、**TvCsm3** も結晶化して、その結晶構造を分子置換法により決定した (図 **1B**)。結晶中において、**TvCsm3** はらせん状の重合体を形成していた。また、各モノマーの立体構造は **III-B 型エフェクター複合体** を構成する **Cmr4** の構造と類似していた。これまでの我々の構造解析から、**Cmr4** は **III-B 型エフェクター複合体** 中においてらせん状に重合していることが判明しており、その重合様式が本研究において決定した **TvCsm3** のものと類似している。したがって、**TvCsm3** のらせん状構造は機能的な構造的特徴を反映していることが予想された。以上の結果および **III-B 型エフェクター複合体** との比較から、**III-A 型エフェクター複合体** を構成する **Csm2** と **Csm3** が多量体化し複合体のヘリカル領域を構成すること、さらにその領域が標的核酸と相互作用することが示唆された。また、本研究で決定した **Csm2** と **Csm3** の立体構造とこれまでに我々が決定していた各サブユニットの構造などに基づいて **III-A 型エフェクター複合体** のモデル構造を構築した (図 **1C**)。さらに、**Csm1** から **Csm5** および **crRNA** を含むエフェクター複合体を形成させ、試験管内における標的 **RNA** の切断活性を再構成した。**Csm2** の変異体を含むエフェクター複合体を調製して酵素活性を測定し、**Csm2** の機能を評価した。以上の結果から、**Csm2** が標的 **RNA** の切断活性に直接的に関与するのではなく、**III-A 型エフェクター複合体** の構造形成と活性型構造の維持に重要であり、酵素活性を促進する効果があることが明らかとなった。

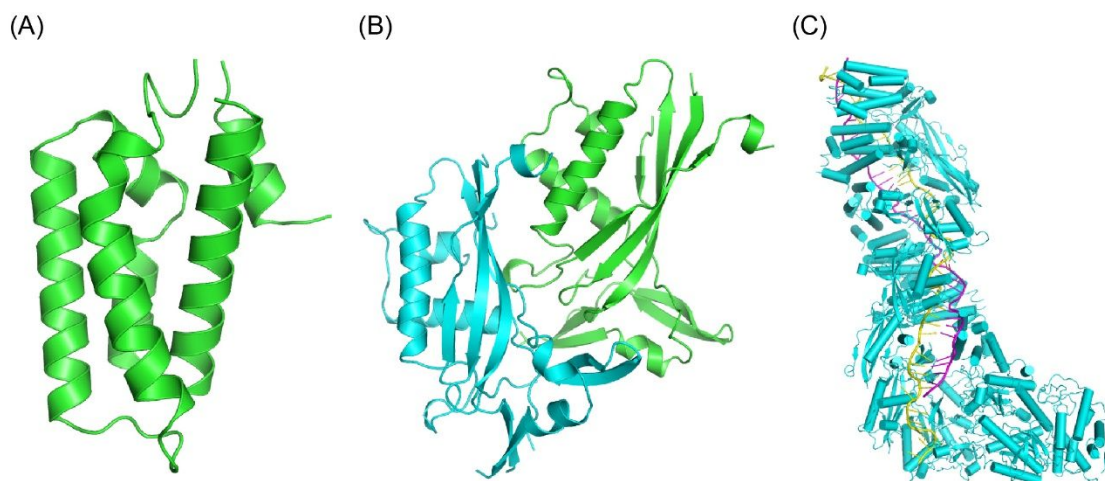


図 1: **III-A 型エフェクター複合体** を構成する **Csm** タンパク質の結晶構造とモデル構造

(A) **SpCsm2** の結晶構造。

(B) **TvCsm3** の結晶構造。結晶中において **Csm3** 分子が重合しらせん状の構造を形成している。

(C) **III-A 型エフェクター複合体** のモデル構造。水色: **Csm1** から **Csm5** のタンパク質サブユニット、黄色: **crRNA**、赤紫色: 標的核酸。

III 型エフェクター複合体 に取り込まれる **crRNA** は、**Cas6** が前駆体 **crRNA** をプロセシングした後、さらに **3'**末端がトリミングされ成熟化する。これまでの結果から、**crRNA** の **3'**側は **Cmr1** と結合することが推定された。**Cmr1** の立体構造は既に明らかとなっており、**Cmr1** にヌクレアーゼ活性があり複合体を形成する際に **3'**末端がトリミングされるのではないかと推定さ

れた。そこで、**Cmr1** が前駆体 **crRNA** の 3'側のプロセシングに関わるのではないかと仮説を立て、その寄与を検討した。まず、**CmrΔ1** を再構成し、**Cmr1** の有無による前駆体 **crRNA** のプロセシングの様子を観察した。変性 **PAGE** による解析の結果、**Cmr1** を添加した条件で、前駆体 **crRNA** が切断されることが明らかとなり、**Cmr1** が前駆体 **crRNA** の 3'側のプロセシングに関わることが示唆された。次に、**crRNA** の 3'末端と相互作用する **Cmr1** の領域を推定した。その結果、幾つかの親水性アミノ酸残基を特定した。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体 **Cmr1** を調製し、前駆体 **crRNA** のプロセシング活性を測定した結果、トリミング活性が消失するアミノ酸残基を特定した。現在、このアミノ酸残基の寄与を検討している段階である。

また、**Cmr1** の機能を解明するために、**III-B** 型エフェクター複合体 (**Cmr** 複合体) および **CmrΔ1** を再構成して、そのクライオ電顕構造の解析に取り組んだ。高エネルギー加速器研究機構のクライオ電子顕微鏡 **Talos Arctica** を利用して **CmrΔ1** のクライオ電顕データを収集し、**Relion** を用いた単粒子解析により **3.6 Å** 分解能のマップを得ることに成功した (図 2)。現在、モデルを構築するとともに、**Cmr** 複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析も進めている。両者の構造を精密化した後、両複合体の立体構造を比較して、これまでの実験から示唆された **Cmr1** の機能を明らかにする。

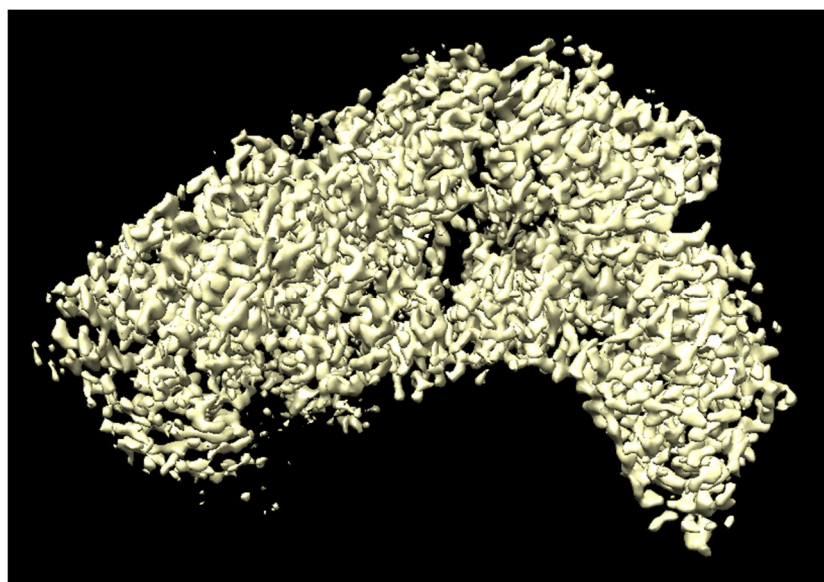


図 2: **Cmr1** を欠いた **III-B** 型エフェクター複合体 (**CmrΔ1**) のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析から得られた電子マップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takeshita, D., Sato, M., Inanaga, H. and Numata, T. | 4. 巻 431 |
| 2. 論文標題 Crystal Structures of Csm2 and Csm3 in the Type III-A CRISPR-Cas Effector Complex | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Mol. Biol. | 6. 最初と最後の頁 748-763 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2019.01.009. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takashima, T., Numata, T., Taira, T., Fukamizo, T. and Ohnuma, T. | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 Structure and enzymatic properties of a two-domain family GH19 chitinase from Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>) pollen | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J. Agric. Food Chem. | 6. 最初と最後の頁 5699-5706 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b01140. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamamoto, T., Goto, T., Kishita, Y., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., Tomizawa, K., Sakaguchi, Y. and Suzuki T. | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Res. | 6. 最初と最後の頁 1565-1583 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky068. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ohnuma, T., Taira, T., Umamoto, N., Kitaoku, Y., Søslas;h;rlie, M., Numata, T. and Fukamizo, T. | 4. 巻 494 |
| 2. 論文標題 Crystal structure and thermodynamic dissection of chitin oligosaccharide binding to the LysM module of chitinase-A from <i>Pteris ryukyuensis</i> | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun. | 6. 最初と最後の頁 736-741 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.08.143 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Shinya, S., Nishimura, S., Kitaoku, Y., Numata, T., Kimoto, H., Kusaoke, H., Ohnuma, T. and Fukamizo, T. | 4. 巻 473 |
| 2. 論文標題 Mechanism of chitosan recognition by CBM32 carbohydrate-binding modules from a Paenibacillus sp. IK-5 chitosanase/glucanase | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Biochem J. | 6. 最初と最後の頁 1085-1095 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20160045. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Kitaoku, Y., Fukamizo, T., Numata, T. and Ohnuma, T. | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Chitin oligosaccharide binding to the lysin motif of a novel type of chitinase from the multicellular green alga, Volvox carteri | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Plant Mol. Biol. | 6. 最初と最後の頁 97-108 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-016-0549-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Numata, T. and Osawa, T. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Crystal Structure of the CRISPR-Cas RNA Silencing Complex | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Photon Factory Highlights 2015 | 6. 最初と最後の頁 42-43 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoyuki Numata |
| 2. 発表標題 Crystal structure of the type III CRISPR-Cas Cmr complex bound to a target analog |
| 3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|