

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15100

研究課題名（和文）ゲノム編集タンパク質Cas9の動的構造解析に基づくDNA配列認識機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of Cas9's target DNA recognition mechanism.

研究代表者

小森 智貴 (Komori, Tomotaka)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・客員共同研究員

研究者番号：50542289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Cas9は取り込ませたguide RNA配列を変更する事で任意のターゲットDNA配列を認識させて、切断する事が可能であることから、ゲノム上の任意のDNA配列に改変を加えるためのゲノム編集のためのツールとして広く利用されている。本研究では、Cas9がDNA配列を認識して切断する際のタンパク質の分子内構造変化を1分子計測を用いて計測することで、DNA切断を担うハサミに当たる部位であるHNHドメインの動的なゆらぎがCas9の切断活性に重要である事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cas9はsgRNAの配列を変更する事で任意のターゲットDNA配列の切断が可能である事から近年、ゲノム編集のためのツールとして広く利用されている。これまでにCas9がDNA配列を切断する際の詳細な分子機構は解明されていなかった。本研究では1分子FRET法を用いる事でCas9がターゲットDNA配列を切断する際のCas9内部の動的な構造変化を明らかにした。本研究で得られた分子機構を基盤とすることで、本成果は将来のより効率的なCas9の改良へと繋がる事が期待出来る。

研究成果の概要（英文）：Cas9 bound with single-guide RNA (sgRNA) cleaves its target DNA sequence depending on the sgRNA's sequence. Because of this Cas9's property, Cas9 is widely utilized for the genome editing tool. In this study, we revealed using single-molecule FRET technique that dynamic fluctuation of HNH domain (Cas9's nuclease domain) is important for DNA cleavage activity of Cas9.

研究分野：生物物理学

キーワード：ゲノム編集タンパク質 1分子計測 FRET

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

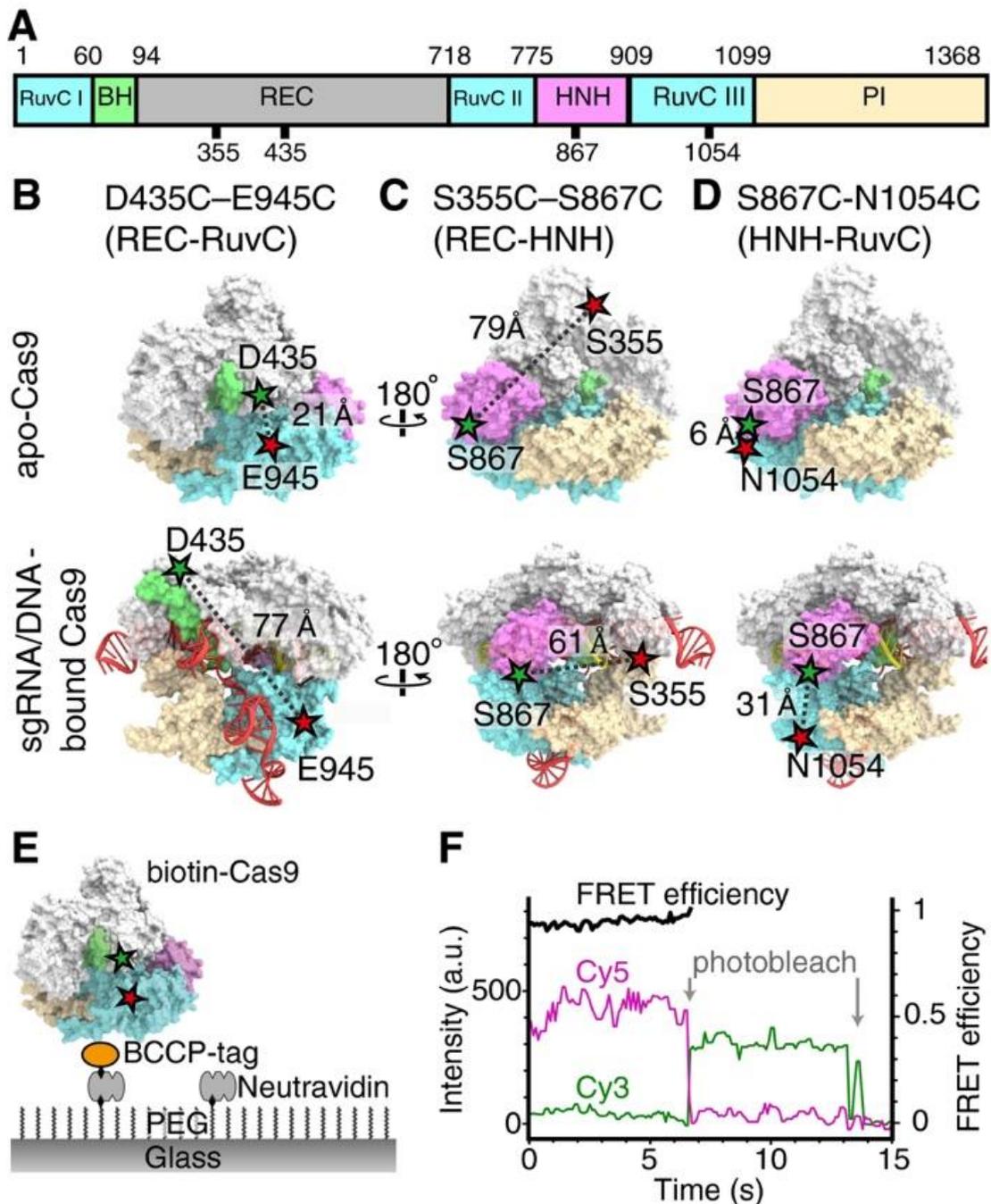
1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集タンパク質 Cas9 はターゲット DNA 配列を認識して、切断する事で任意の部位での DNA 配列の編集を可能とするタンパク質である。Cas9 が DNA 切断活性を有する事が知られている一方で、Cas9 が DNA 配列を切断する際の詳細な分子機構は未だに解明されていない。また、Cas9 の DNA 配列の認識特異性は比較的高い一方で、認識配列以外の DNA 配列を認識・切断してしまうオフターゲット活性が依然として問題として残っていた。

2. 研究の目的

本研究においてはまず Cas9 上の DNA 切断活性を有する HNH ドメインを含めた各種ドメインの動きを 1 分子レベルで直接可視化する事で、Cas9 が切断活性を示す際の Cas9 分子内の動的な構造変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

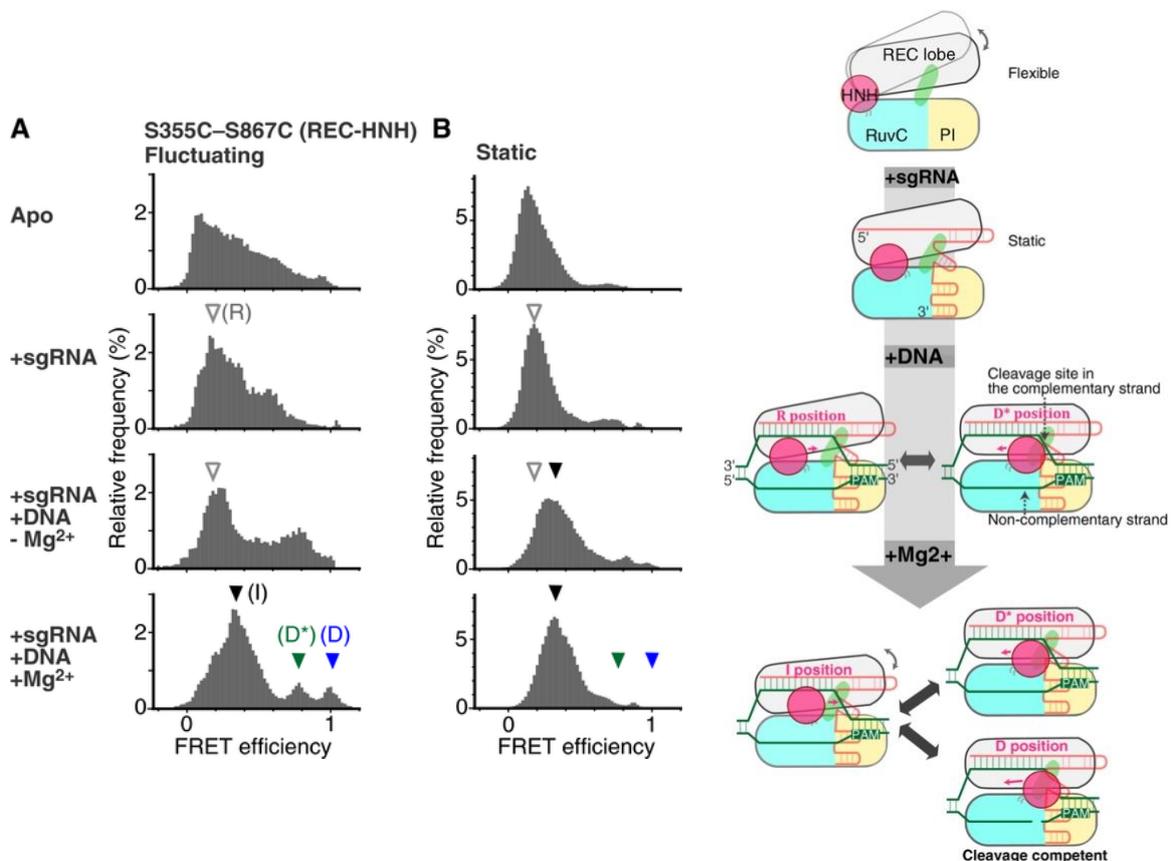


Cas9 がターゲット DNA 配列を切断する際の Cas9 分子内の動的な構造変化を 1 分子レベルで計測する事を目的として、1 分子 FRET 計測を行う為の 3 種類の Cas9 変異体を作製した。また全ての Cas9 には BCCP タグを付加することでビオチン化を発現中に行っている。作製した Cas9 変異体を Cy3 及び Cy5 の FRET ペアを用いて蛍光標識した後に、PEG および Biotin-PEG で修飾したガラス基盤上にアビジン-ビオチンシステムを用いて Cas9 を固定する事で 1 分子 FRET 計測を行った。得られた Cy3 および Cy5 の蛍光強度時系列データを解析する事で、FRET 効率変化の時系列データの取得を行った。Apo 状態、sgRNA 結合状態、target-DNA 結合状態および切断活性を示す Mg 及び target-DNA 結合状態の各状態での FRET 効率を計測する事で、Cas9 がターゲット DNA 切断活性を示す際の動的な構造変化の解析を行った (Saki Osuka et al. EMBO J. 2018)。

4. 研究成果

Apo 状態、sgRNA 結合状態、target-DNA 結合状態および切断活性を示す Mg 及び target-DNA 結合状態の全ての状態に共通して、Cas9 は頻りに FRET 状態が変化する動的な状態 (fluctuating state) と、特定の FRET 状態を維持する静的な状態 (Static state) を取る事が判明した。Cas9 は核酸が全く結合していない Apo 状態では動的な状態を取る事が多く、Cas9 への核酸 (sgRNA) の結合に伴い、その構造状態が安定されて静的な状態の割合が増加することが観察された。一方で、DNA を切断可能な状態である sgRNA, target DNA 及び Mg が結合した状態においては再び動的な状態を取る分子の割合が増加することが観察された。また Cas9 は分布の広い FRET 状態を取る事が 1 分子 FRET 計測から示されたが、核酸などの結合状態に応じた FRET 状態の最頻値の変化は、近年の X 線結晶構造解析や溶液系の FRET 計測を用いて示されてきた結果とよく一致していた。

興味深い事に Cas9 がターゲット DNA を切断する状態においては動的な構造状態を取る時のみに FRET 効率の高い D 状態と D' 状態が観察された。本サンプルの設計的に FRET 状態が高い状態においてはより HNH ドメインとターゲット DNA が接近した状態であると予想できる。このことから観察されたこれら 2 状態の中で、より高い FRET 状態を示す D 状態が HNH ドメインがターゲットを切断する状態であると推測できる。また切断活性を有さない状態である Mg 非結合状態では D 状態が観察されていないこと、および D 状態が Mg 濃度依存的に出現して、更に D 状態が観察されるようになる Mg 濃度と生化学的に計測した Cas9 の DNA 切断活性が相関していたことから、HNH ドメインが D 状態にあるときに Cas9 が DNA 切断活性を示すとするモデルを提唱した。



これまでの研究により、Cas9 の切断活性には HNH ドメインの構造状態のゆらぎが切断活性に重要である事が示唆された事から、オフターゲット活性は間違った配列が結合したにも関わらず、

HNH ドメインの構造のゆらぎを増加させてしまう事から引き起こされていると推測された。その為に、ターゲット配列結合以外には HNH ドメインが動的な構造状態を取らないように、Cas9 の構造安定性を上昇させる事でオフターゲット活性を抑える事が出来る可能性が示唆された。

また、本研究では Cas9 に類似した分子機構を有すると期待できるアルゴノートタンパク質にも研究展開を行い、アルゴノートタンパク質の N 末端領域が活性制御に重要な役割を示す可能性を示した (Haruka Narita et al. 投稿準備中論文 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osuka Saki, Isomura Kazushi, Kajimoto Shohei, Komori Tomotaka, Nishimasu Hiroshi, Shima Tomohiro, Nureki Osamu, Uemura Sotaro	4. 巻 37
2. 論文標題 Real time observation of flexible domain movements in CRISPR/Cas9	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e96941 ~ e96941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.201796941	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 成田 晴香, 桑原 誠, 小森 智貴, 村上 僚, 島 知弘, 塩見 美喜子, 上村 想太郎
2. 発表標題 N-terminal residues of Drosophila Argonaute2 possess the ability to form amyloid fibrils
3. 学会等名 日本蛋白質科学会第18回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Narita, Makoto F Kuwabara, Tomotaka Komori, Ryo Murakami, Tomohiro Shima, Mikiko C Siomi, Sotaro Uemura
2. 発表標題 N-terminal residues of Drosophila Argonaute2 possesses the ability to form amyloid fibrils.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成田 晴香, 桑原 誠, 小森 智貴, 村上 僚, 島 知弘, 塩見 美喜子, 上村 想太郎
2. 発表標題 N-terminal residues of Drosophila Argonaute2 possess the ability to form amyloid fibrils
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	桑原誠、和佐野浩一郎、高橋里枝、Justin Bodner、小森智貴、上村想太郎、Jing Zheng、島知弘、本 間和明
2. 発表標題	電位駆動型モータープレスチン以外の SLC26 イオン輸送体にも電位感受能は存在する
3. 学会等名	日本蛋白質科学会第18回年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Tomotaka Komori, Ryo Murakami, Tomohiro Shima, Mikiko C. Siomi, Sotaro Uemura
2. 発表標題	Reconstitution system of Siwi- and Vasa- coupled piRNA biogenesis
3. 学会等名	日本蛋白質科学会第18回年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Tomotaka Komori, Ryo Murakami, Tomohiro Shima, Mikiko C Siomi, Sotaro
2. 発表標題	Reconstitution system of Siwi- and Vasa-coupled piRNA biogenesis.
3. 学会等名	日本生物物理学会第55回年会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	T. Komori, R. Murakami, M. Moriya, K.M. Nishida, M.C. Siomi, S. Uemura
2. 発表標題	Single molecule pathway monitoring of the Argonaute RISC formation process.
3. 学会等名	The 43rd Naito Conference (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 Haruka Narita, Makoto F Kuwabara, Tomotaka Komori, Ryo Murakami, Tomohiro Shima, Mikiko C Siomi, Sotaro Uemura
2. 発表標題 N-terminal region of Drosophila Argonaute2 can form amyloid fibrils.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Narita, Makoto F Kuwabara, Tomotaka Komori, Ryo Murakami, Tomohiro Shima, Mikiko C Siomi, Sotaro Uemura
2. 発表標題 N-terminal region of Drosophila Argonaute2 can form amyloid fibrils.
3. 学会等名 The 20th international Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田 晴香, 桑原 誠, 小森 智貴, 村上 僚, 島 知弘, 塩見 美喜子, 上村 想太郎
2. 発表標題 N-terminal region of Drosophila Argonaute2 can form amyloid fibrils.
3. 学会等名 日本蛋白質科学会第19回年会
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
---------------------------	-----------------------	----