

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20579

研究課題名（和文）CRISPRを用いた新規ゲノム改変技術の開発

研究課題名（英文）Development of new CRISPR-based genome engineering technologies

研究代表者

西増 弘志（Nishimasu, Hiroshi）

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：00467044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：原核生物のCRISPR-Cas獲得免疫機構に關与するCRISPR-Cas複合体は、ガイドRNAと相補的な標的核酸を認識し切断するため、ゲノム編集など様々なテクノロジーに応用されている。本研究課題では、Cas12k、Cas13bt3、Cas7-11、Cas7-11-Csx29などのCRISPR-Cas複合体の構造機能解析を推進し、その多様な作動機構を解明した。さらに、IscBの構造機能解析から、CRISPR-Cas9の分子進化の可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において決定した複数のCRISPR-Cas複合体の立体構造と、それらに基づく機能解析の結果、新たな作動メカニズムが明らかになった。したがって、本研究結果により、CRISPR-Cas酵素の多様性に関する理解が大きく推進した。さらに、本研究で得られた構造情報は新規の技術開発の基盤として期待される。

研究成果の概要（英文）：CRISPR-Cas enzyme complexes involved in the prokaryotic CRISPR-Cas adaptive immune system recognize and cleave target nucleic acids complementary to RNA guides. Thus, they have been applied to various technologies such as genome editing. In this research project, we performed structural and functional analyses of CRISPR-Cas complexes, such as Cas12k, Cas13bt3, Cas7-11, and Cas7-11-Csx29, elucidating their diverse action mechanisms. In addition, we determined the structure of IscB, providing insights into the molecular evolution of CRISPR-Cas9.

研究分野：構造生物学

キーワード：CRISPR クライオ電子顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原核生物のもつ CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関する RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas9 はガイド RNA (sgRNA) と複合体を形成し、sgRNA のもつガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA を切断する。sgRNA のガイド配列は自由に変更できるため、Cas9-sgRNA 複合体を細胞に発現させることにより、ゲノム DNA の狙った位置に 2 本鎖 DNA 切断を引き起こし、塩基配列を改変することができる。この技術はゲノム編集とよばれ、基礎研究から動植物の品種改良、遺伝病の治療などの応用にいたる様々な分野において広く利用されている。CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関する Cas タンパク質は極めて多様であり、Cas9 に続き、RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas12a や RNA 依存性 RNA 切断酵素 Cas13 といった新規の CRISPR-Cas タンパク質が相次いで発見され、ゲノム編集や RNA 編集、核酸検出といった新規技術に応用されている。

近年、DNA 組換え反応を触媒する CRISPR-Cas 複合体として CAST (CRISPR-associated transposase) が報告された。CAST は I 型 Q-Cascade と V 型 Cas12k に分類される。Q-Cascade は 3 つの Cas タンパク質 (Cas6、Cas7、Cas8)、TniQ タンパク質、および、ガイド RNA からなる超分子複合体であり、ガイド RNA のガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA に結合する。Cas9 と異なり、Q-Cascade は DNA を切断せず、Tn7 様トランスポゾン因子 (TnsA、TnsB、TnsC) と協働し、ドナー DNA をターゲット DNA に挿入する。TnsA/TnsB はトランスポザーゼと相同性をもち、DNA 転移反応を触媒することが示唆されている。一方、TnsC、TniQ はそれぞれ AAA+ ATPase、DNA 結合タンパク質に分類され、DNA 転移反応に必須であることが示されているが、詳細な役割は不明である。他の Cas12 タンパク質と同様に、Cas12k は RuvC ドメインをもつが、その他の領域は既知のタンパク質と配列相同性をもたない。Cas12k は sgRNA と複合体を形成し、sgRNA のガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA に結合する。Cas12k は DNA 切断活性をもたず、TnsB、TnsC、TniQ と協働し、ドナー DNA をターゲット DNA に挿入する。Q-Cascade、Cas12k のガイド RNA のガイド配列は自由に変更できるため、CAST を用いることにより、2 本鎖 DNA 切断を引き起こすことなくゲノムの狙った位置へのノックインが可能であると期待されている。しかし、CAST による DNA 挿入の分子メカニズムには不明な点が残されている。

### 2. 研究の目的

CAST 超分子複合体の立体構造を決定し、その DNA 転移メカニズムを原子レベルで解明する。さらに、立体構造に基づく CAST の分子改変を行い、哺乳類細胞においても機能するノックイン技術を開発する。また、CAST に加え、Cas13bt3 や Cas7-11 など新規の CRISPR-Cas 酵素の構造機能解析を進め、それらの多様な作動機構の解明および応用技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

CAST 複合体による DNA 転移メカニズムの解明を目指し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。Cas12k に His タグを付加して大腸菌で大量発現させ、NiNTA カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。sgRNA は T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により大量合成し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。精製した Cas12k タンパク質、sgRNA、標的 DNA を混合することにより、Cas12k-sgRNA-標的 DNA 複合体を再構成し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。Vitrobot を用いて精製試料をグリッド上で瞬間凍結したのち、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて粒子画像を収集し、cryoSPARC を用いて単粒子解析を行い、密度マップを取得した。COOT を用いてモデル構築を行い、Phenix を用いて構造精密化を行い、Cas12k-sgRNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定した。さらに、同様の戦略により、Cas13、Cas7-11、IscB に関してもクライオ電子顕微鏡解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CAST の構造機能解析

クライオ電子顕微鏡解析により、Cas12k-sgRNA-標的 DNA 複合体構造を決定した。その結果、Cas12k は WED、REC、PI、RuvC ドメインからなることが明らかになった (図 1)。sgRNA は既知の CRISPR-Cas タンパク質のガイド RNA とは異なる複雑な立体構造をとり、Cas12k によって特異的に認識されていた。DNA は PI ドメインと REC ドメインによって認識されていた。以上の結果から、Cas12k が sgRNA と協働して標的 DNA を認識する分子メカニズムが明らかになった。さらに、Cas12k、sgRNA、標的 DNA、TniQ、TnsC を混合することにより再構成した複合体を用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、Cas12k-sgRNA-標的 DNA-TniQ-TnsC 複合体の構造決定にも成功した。その結果、Cas12k が TniQ/TnsC と協働し、標的 DNA を認識する分子メカニズムが明らかになった。

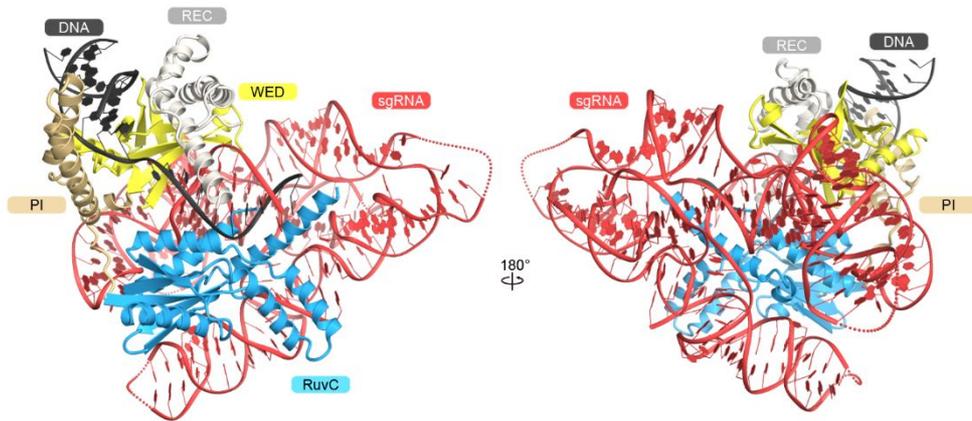


図1 Cas12kの立体構造

### (2) Cas13bt3の構造機能解析

Cas13bt3はcrRNAと複合体を形成し、相補的な標的RNAと結合すると活性化し、1本鎖RNAを切断する小型のCas13酵素であるが、その作動機構は不明だった。結晶構造解析により、Cas13b-crRNA複合体の立体構造を決定した(図2)。その結果、Cas13bt3はRECローブとNUCローブからなり、crRNAはRECローブによって認識されていることが明らかになった。RECローブはHelical-1ドメイン、Lidドメイン、Helical-2ドメインから構成される一方、NUCローブはHEPN1およびHEPN2ドメインから構成されていた。crRNAはガイド領域、2つのステム領域、および2つのループ領域から構成されており、フリップアウトした3つの塩基がHelical-1ドメイン、Lidドメイン、Helical-2ドメインによって塩基特異的に認識されていることが明らかになった。Cas13bt3と既知のCas13bとの構造比較から、それぞれのドメインが小型化することにより、Cas13bt3は全体として約350残基の小型化を達成していることが明らかになった。さらに、クライオ電子顕微鏡解析により、Cas13b-crRNA-標的RNA複合体の立体構造を決定し、標的RNAの結合によりCas13bt3は大きな構造変化を起こすことを明らかにした。以上の結果から、小型Cas13bt3によるRNA依存的RNA切断の分子メカニズムが明らかになった。

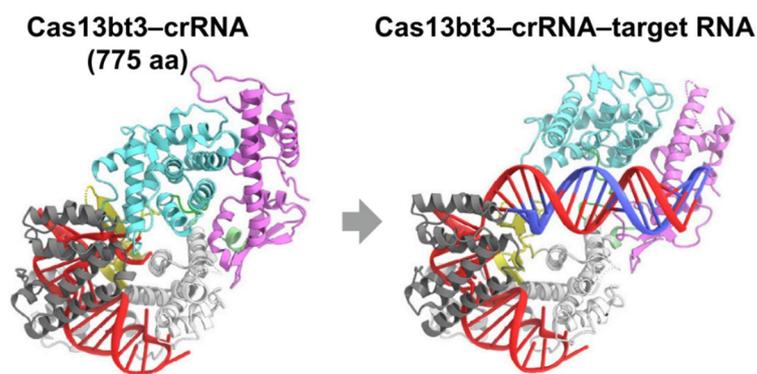


図2 Cas13bt3の立体構造

### (3) Cas7-11の構造機能解析

クライオ電子顕微鏡解析により、Cas7-11-ガイドRNA-標的RNA複合体の立体構造を決定した(図3)。その結果、Cas7-11は4つのCas7ドメイン(Cas7.1-Cas7.4)、Cas11ドメイン、INSドメイン、CTEドメインが4つのリンカー領域(L1-L4)で連結した特徴的な構造をもつことが明らかになった。ガイドRNAの5'タグ領域はCas7.1とCas7.2によって認識されており、Cas7.1がガイドRNAのプロセッシングを担うことが明らかになった。一方、スパーサー領域は標的RNAと対合し、Cas7.2-Cas7.4、Cas11、INSによって認識されていた。ガイドRNA-標的RNAの4番目、10番目の塩基はそれぞれCas7.2、Cas7.3との相互作用により、フリップアウトし、切断されるホスホジエステル結合の近傍に保存されたアスパラギン酸残基が位置していた。RNA切断実験の結果、これらのアスパラギン酸残基はそれぞれ標的RNAの塩基3-4間、塩基9-10間のホスホジエステル結合の切断に関与することが明らかになった。以上の構造機能解析の結果、Cas7-11によるRNA依存的RNA切断の分子メカニズムが明らかになった。

さらに、決定したCas7-11-ガイドRNA-標的RNA複合体の立体構造において、INSドメインがRNA切断部位から離れていることに着目し、INSドメインを削除した小型のCas7-11改変体(Cas7-11Sと命名)を作製した。RNA切断活性を測定した結果、Cas7-11Sは野生型Cas7-11と同様のRNA

切断活性を示した。さらに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて Cas7-11S をヒト培養細胞に導入し、標的 RNA に対する抑制効果を調べたところ、Cas7-11S は標的 RNA を効率的に抑制することが確認された。したがって、Cas7-11S は有用な小型 RNA 抑制ツールとしての利用が期待される。

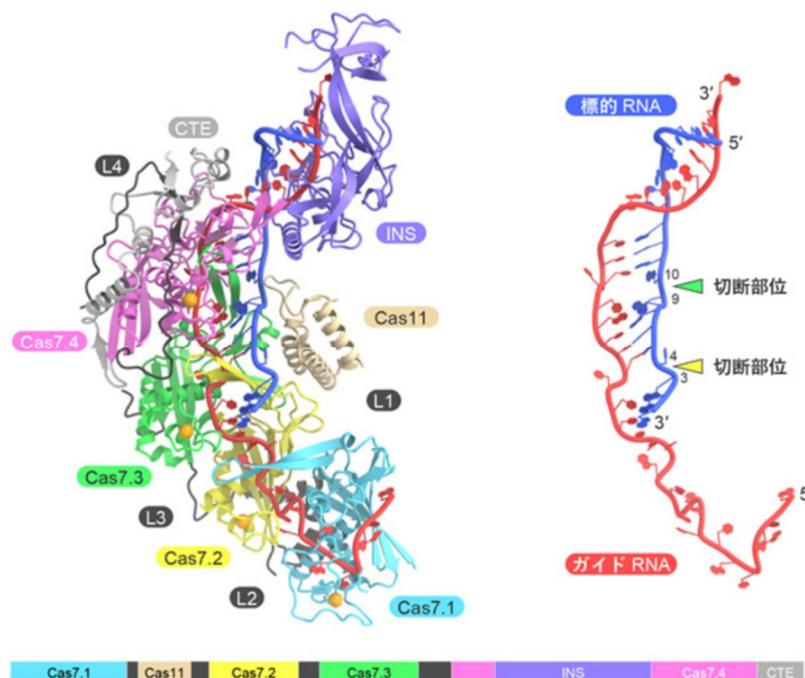


図3 Cas7-11の立体構造

#### (4) Cas7-11-Csx29の構造機能解析

原核生物のゲノムに存在する III-E 型 CRISPR-Cas 領域には、Cas7-11に加えて、Csx29、Csx30、Csx31、RpoE といったタンパク質がコードされており、これら5種類のタンパク質が協働して抗ウイルス防御を担っている可能性が示唆されていた。Csx29は既知のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)とアミノ酸配列の類似性を持ち、Cas7-11と複合体を形成することが報告されていたが、Csx29がプロテアーゼ活性をもつかは不明であった。Csx30とCsx31は既知のタンパク質と配列類似性をもたないため、それらの機能は謎に包まれていた。一方、RpoEはシグマ因子として転写制御に関与する可能性が示唆されていたが、その役割は不明だった。

III-E型CRISPR-Casシステムによる抗ウイルス防御機構の理解を目指し、生化学的解析を行い、(1) Cas7-11はガイドRNAおよびCsx29と複合体を形成すること、および、(2) ガイドRNAと相補的な標的RNAが複合体に結合するとCsx29が活性化しCsx30を2つの断片に切断することを発見した。これらの結果から、Cas7-11-Csx29複合体は標的RNAの結合によって活性化する新規のRNA依存性プロテアーゼであることが明らかとなった。

さらに、クライオ電子顕微鏡解析により、Cas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体、および、Cas7-11-ガイドRNA-Csx29-標的RNA複合体の立体構造を決定した。その結果、Csx29はTPRドメインとCHATプロテアーゼドメインからなり、Cas7-11と結合していることが明らかになった。注目すべきことに、標的RNAが結合していない場合、CHATプロテアーゼドメインの触媒残基はCas7-11によって塞がれておりCsx29はCsx30を切断できない一方、標的RNAが結合するとCsx29の立体構造が変化しCsx30が結合できる活性化状態に変化することが示唆された。したがって、これら2つの構造の比較から、Cas7-11-Csx29複合体がRNA依存性プロテアーゼとして機能する分子メカニズムが明らかになった。

さらに、Csx30、Csx31を大腸菌に導入し生育を追跡することにより、Csx30とCsx31の機能を調べた。Csx30を導入すると大腸菌の増殖が阻害された一方、Csx31は生育に影響を与えなかったことから、Csx30は細胞の増殖を阻害することが示唆された。また、Csx31はCsx30による生育阻害を抑制することがわかった。さらに、構造予測の結果、(1) Csx30、Csx31、RpoEは複合体を形成すること、および、(2) Csx30-Csx31はRpoEと相互作用しアンチシグマ因子としてRpoEの機能を阻害することが示唆された。生化学的解析の結果、Csx30、Csx31、RpoEは複合体を形成することが確認された。これらの結果から、Csx30-Csx31はRpoEと結合し転写を制御することにより、細胞増殖を阻害することが示唆された。以上の結果を総合し、III-E型CRISPR-Cas免疫機構において、Cas7-11-Csx29複合体はウイルス由来RNAを切断するとともに、Csx30の切断を介して細胞増殖を停止させることにより、細胞集団をウイルス感染から守るといった新規の分子機構が示唆された(図4)。

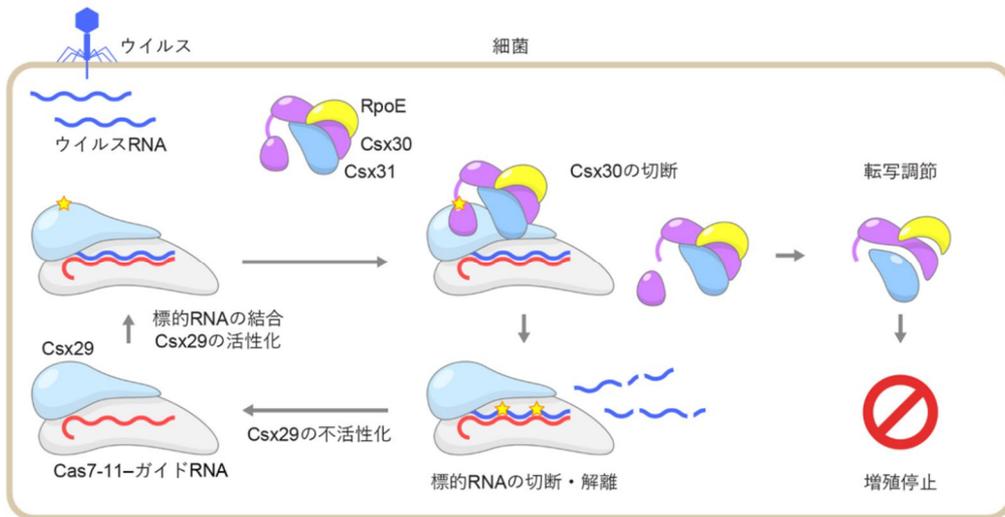


図4 III-E型CRISPRシステムによる抗ファージ防御機構

(5) IscBの構造機能解析

トランスポゾンにコードされる IscB ファミリーのタンパク質は、OMEGA (obligate mobile element-guided activity) システムに属する RNA 依存性ヌクレアーゼであり、II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する RNA 依存性ヌクレアーゼ Cas9 の祖先タンパク質であると考えられている。IscB は RNA と結合し、RNA のガイド領域と相補的な標的 DNA を切断するが、小型の IscB が標的 DNA を切断する分子メカニズムは不明だった。クライオ電子顕微鏡解析により、IscB-RNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定した (図5)。その結果、IscB は Cas9 と類似した RuvC および HNH エンドヌクレアーゼドメインをもつ一方、ヘリックスからなる REC ロープをもたないため、Cas9 に比べて小型化していることが判明した。Cas9 のガイド RNA に比べて大きな RNA は、Cas9 の REC ロープと同様の位置に存在し、ガイド RNA-ターゲット DNA ヘテロ二本鎖の認識に関与していた。IscB と Cas9 の構造比較により、II 型 CRISPR-Cas9 複合体の分子進化についての知見が得られた。

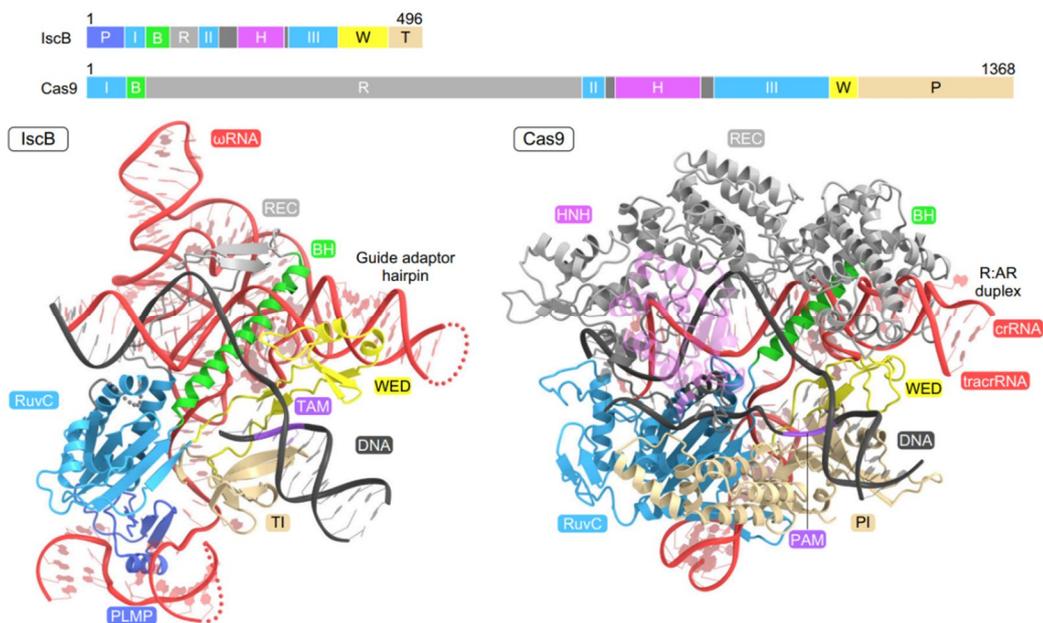


図5 IscB と Cas9 の立体構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagawa Ryoya, Kannan Soumya, Altae-Tran Han, Takeda Satoru N., Tomita Atsuhiko, Hirano Hisato, Kusakizako Tsukasa, Nishizawa Tomohiro, Yamashita Keitaro, Zhang Feng, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu	4. 巻 82
2. 論文標題 Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 3178 ~ 3192.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.08.001	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 該当する
1. 著者名 Kato Kazuki, Zhou Wenyuan, Okazaki Sae, Isayama Yukari, Nishizawa Tomohiro, Gootenberg Jonathan S., Abudayyeh Omar O., Nishimasu Hiroshi	4. 巻 185
2. 論文標題 Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 2324 ~ 2337.e16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.05.003	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 該当する
1. 著者名 Kato Kazuki, Okazaki Sae, Kannan Soumya, Altae-Tran Han, Esra Demircioglu F., Isayama Yukari, Ishikawa Junichiro, Fukuda Masahiro, Macrae Rhiannon K., Nishizawa Tomohiro, Makarova Kira S., Koonin Eugene V., Zhang Feng, Nishimasu Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of the IscB- RNA ribonucleoprotein complex, the likely ancestor of CRISPR-Cas9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34378-3	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 該当する
1. 著者名 Kato Kazuki, Okazaki Sae, Schmitt-Ulms Cian, Jiang Kaiyi, Zhou Wenyuan, Ishikawa Junichiro, Isayama Yukari, Adachi Shungo, Nishizawa Tomohiro, Makarova Kira S., Koonin Eugene V., Abudayyeh Omar O., Gootenberg Jonathan S., Nishimasu Hiroshi	4. 巻 378
2. 論文標題 RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 882 ~ 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.add7347	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure, function and engineering of the type III-E CRISPR nuclease-protease complex
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure and engineering of CRISPR nuclease-protease
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------