

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07285

研究課題名(和文) 高分解能な立体構造解析による、高度好熱菌獲得免疫システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the bacterial adaptive immune system of extremely thermophilic bacterium by high-resolution structural studies

研究代表者

新海 暁男 (Shinkai, Akeo)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・前任研究員

研究者番号：10391989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌特有の獲得免疫系であるCRISPR-Cas系は、ウイルスのDNAやRNAなどの、細胞に侵入してきた核酸を分解する。CRISPR-Cas系の構成要素の一つであり、6種類(Cmr1～Cmr6)の蛋白質と1分子の低分子RNA(crRNA)から構成されているCmr複合体は、1本鎖RNAを切断する。高度好熱菌由来のCmr複合体、および、Cmr1あるいはCmr5を欠失させた変異Cmr複合体を大腸菌無細胞蛋白質合成系を用いて試験管内で構築し、これらの立体構造とRNA分解活性を解析した。その結果、Cmr1、Cmr5共に複合体の構造形成およびRNA分解活性の制御に関与していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR-Cas系は多くの細菌が持つ獲得免疫系で、細胞へ侵入してくるウイルスなどのDNAやRNAを分解する装置である。CRISPR-Cas系はヒトなどの高等生物が持つ獲得免疫システムの原型とも考えられるので、本システムの作用機構を解明することは獲得免疫システムの進化を考察する際に重要である。CRISPR-Casシステムを構成しているCmr複合体は6種類のタンパク質と1種類の低分子RNAからなる超分子複合体で、一本鎖RNAを分解する活性を持つ。Cmr複合体の構造形成や活性発現において複合体を構成している蛋白質がどのように機能しているのかを明らかにすることは、蛋白質科学的にも重要である。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas system is a bacterial adaptive immune system, which degrade foreign DNA or RNA such as that derived from virus. Cmr complex, which is composed of six proteins (Cmr1～Cmr6) and a small RNA (crRNA), is one of the components of the CRISPR-Cas. The Cmr complex cleaves the single strand RNA complementary to the crRNA. The Cmr complex derived from extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*, and the two mutant complexes, which lacks Cmr1 or Cmr5, were constructed in vitro by using *E. coli* cell free protein synthesis method, and then, their structures and RNase activities were investigated. We found that RNase activity of the Cmr complex was increased by lacking Cmr1. Without Cmr5, structure of the Cmr complex become unstable and the target RNA was irregularly cleaved. Thus, the Cmr1 and Cmr5 play roles in controlling the RNase activity of the Cmr complex.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR-Cas Cmr複合体 超分子複合体 リボヌクレオタンパク質 リボヌクレアーゼ 低分子RNA 無細胞タンパク質合成法

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、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

クリスパーキャス[CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated protein)]システムは、約半数の真正細菌と、ほとんどの古細菌に見出されている、細菌に特有の獲得免疫システムです。このシステムは、CRISPR と呼ばれる特徴的な DNA 配列と、CRISPR の近傍にコードされている Cas タンパク質とから構成されています。CRISPR は、約 25~50 塩基対の回文様配列 (リピート) が、約 25~50 塩基対の間隔 (スペーサー) で繰り返し存在する DNA 領域です。Cas タンパク質は数十種類あり、数種類のサブユニットから成る超分子複合体を形成しているものもあります。CRISPR のスペーサーが外部から侵入してきたファージ (細菌に感染するウイルス) のゲノムの一部や外来プラスミドの一部と同じ塩基配列を持つ場合、細菌はそのファージや外来プラスミドに対して耐性を示します。

CRISPR-Cas システムによる防御反応は主に 3 つのフェーズから成り立っています。フェーズ 1 は、外から侵入してきた核酸由来の配列が新たなスペーサーとして CRISPR 領域に挿入されるアダプテーション (adaptation) フェーズです。フェーズ 2 は、CRISPR 領域が転写されて合成された pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) がリピート部分で切断され、1 単位のスペーサー配列を持つ crRNA が合成されるエクスプレッション (expression) フェーズです。インターフェレンス (interference) フェーズと呼ばれるフェーズ 3 では、まず crRNA がある種の Cas タンパク質に結合し、Cas タンパク質-crRNA 複合体 (エフェクター分子) が形成されます。そして、crRNA の塩基配列がファージ由来の DNA や RNA などの、外部から侵入してきた核酸の一部に対して相補的な配列を持つ場合、そのエフェクター分子は crRNA との相補的な結合によって侵入してきた核酸に結合し、それを分解します。CRISPR-Cas システムは、システムを構成している Cas タンパク質群や作用機作の違いによって Type I、-II、-III、-IV、-V、-VI の 6 つのタイプに分類され、各タイプはそれぞれいくつかのサブタイプに分類されています。ゲノムに存在する CRISPR 領域の数や配列、cas 遺伝子の種類は細菌によって異なります。真核生物における獲得免疫システムの原型とも言えるこれらの防御機構を解明することは生命システムやその進化を考察する際に重要です。

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 株は、ゲノムの長さが 220 万塩基対と比較的小さいにも関わらず多種類の CRISPR-cas 遺伝子、すなわち、11 箇所の CRISPR 領域と約 30 種類の cas 遺伝子を持っていること、そして、それらの cas 遺伝子群には、Type I-E、-III-A、および、-III-B システムの 3 つのシステムが含まれていることから、本菌株は一つの細菌における獲得免疫システムを体系的に理解するための格好のモデル生物の一つと考えられています。さらに、本菌株由来の多くのタンパク質は熱に対する安定性が高く変性し難いので実験試料としても適しています。本研究課題を開始した当初、私たちは本菌株における Type III-CRISPR システムの Interference フェーズに関与している二つの超分子複合体; Cmr 複合体 (TtCmr) および、Csm 複合体 (TtCsm) のおおまかな (低分解能の) 構造を得、さらに、これらの複合体が RNA を分解する活性を持つことを明らかにしていました。すなわち、両複合体のサブユニット構成はそれぞれ Cmr_{1,2,3,4,5,6}:crRNA₁ (Cmr1~6 はタンパク質サブユニット、下付きの数字は分子数) と Csm_{1,2,3,4,5,6}:crRNA₁ で、結合している crRNA は両複合体で類似しており数種類の配列に偏っていました。さらに、両複合体共に、試験管内で、crRNA と相補的な配列を含む一本鎖 RNA を crRNA の 5'末端側から順に 3'末端側へ向かって 6 塩基毎に切断しました。TtCmr の電子顕微鏡構造 (4.4 Å) を解析した結果、RNA 切断活性を持つ 4 分子の Cmr4 が分子の中央部に螺旋状に位置しており、そこに二本鎖 RNA (crRNA: 標的 RNA) が巻き付いていました。そして、Cmr4 由来の突出した -ヘアピン構造が 6 塩基毎に 4 ヶ所で二本鎖 RNA にインターカレーションしているために、その部分の二本鎖がほどけていました。近傍には Cmr4 の予想活性残基が位置しているため、TtCmr が 6 塩基毎に標的 RNA を分解するのはこのためであると推察されました。TtCsm の電子顕微鏡構造 (17 Å) を解析した結果、この複合体も TtCmr と同様の螺旋構造をしていたことから、TtCsm も TtCmr と同様のメカニズムで標的 RNA を分解することが示唆されました。

TtCmr および TtCsm を構成しているサブユニット同士の結合のメカニズムや RNA 切断のメカニズムを原子レベルで理解するためには、より高分解能な X 線結晶構造を解析する必要があります。Cmr 複合体の X 線結晶構造 (2.1 Å) は他の研究グループによって決定されていましたが、この複合体は 2 種類の古細菌由来のサブユニット同士を再構成したキメラであり、全サブユニットを含んでいませんでした。一方、興味深いことに、*Staphylococcus* 株の Csm 複合体は一本鎖 RNA だけでなく転写途上にある二本鎖 DNA のうちの非鋳型鎖も切断すること、RNA の切断は Csm3 サブユニットが司り DNA の切断は Csm1 が司ることが他の研究グループにより明らかにされました。さらに、古細菌由来の Cmr 複合体も DNA と RNA の両方を分解する活性を持つことが示唆されていました。そこで、標的 RNA あるいは標的 DNA を含む場合と含まない場合とのそれぞれで、全サブユニットを持つ完全な TtCmr あるいは TtCsm の高分解能な立体構造解析が必要であると考えました。

2. 研究の目的

本研究課題は、*T. thermophilus* HB8 株が持つ CRISPR-Cas システムを構成している Cas タンパク質群、特に、複数種のサブユニットから成り RNA や DNA を分解する活性を持つ超分子複合体

や、それらの超分子複合体と標的 RNA や DNA との複合体の立体構造を詳細に解析することによって CRISPR-Cas システムを理解し、さらに、生物が持つ獲得免疫システムの原型を理解することを最終目的としています。

本菌株が持つ、Cascade 複合体、Cmr 複合体 (TtCmr) および、Csm 複合体 (TtCsm) は、それぞれ、Type I-E、Type III-A、および、Type III-B システムにおいて細胞へ侵入してきた RNA や DNA を分解する活性を持つ分子で、CRISPR-Cas システムにおいて中心的な役割を担っている分子です。私たちは、当初、これらの複合体がどのようにして形成されているのか、あるいは、RNA や DNA を分解する活性における各サブユニットの役割を解析することを研究の目的としました。

3. 研究の方法

タンパク質を結晶化構造解析するためには均一なタンパク質標品を調製する必要があります。私たちは、まず、6 種類 (11 分子) のタンパク質サブユニットと 1 分子の低分子 RNA (crRNA) とから構成されている Cmr 複合体 (TtCmr) を *T. thermophilus* HB8 株から調製し結晶化を試みましたが、X 結晶構造解析が可能な良質な結晶を得ることができませんでした。その原因の一つは、TtCmr の構成要素の一つである crRNA の塩基配列が均一でないことであると考えました。そこで、大腸菌、および、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて調製した各種のタンパク質サブユニットと、化学合成した均一な crRNA とから TtCmr を試験管内で構築し、その結晶化を試みましたがこの方法でも良質な結晶を得ることができませんでした。一方、試験管内で構築した TtCmr を用いてクライオ電子顕微鏡法による構造解析を行った結果、低分解能ではあったものの、*T. thermophilus* HB8 株から調製した天然型の TtCmr と同様の立体構造をしていることが分かりました。さらに、ある種のサブユニットを欠失させた変異 TtCmr も試験管内で構築可能であることが分かりました。そこで、当初予定していた方法とは異なりますが、これらの方法を用いて、TtCmr を構成しているサブユニットの役割を解析しました。以下にその方法を記述します。

(1)天然型 TtCmr の調製

TtCmr を構成しているタンパク質の 1 つである Cmr6 の C 末端側に His タグを融合させたタンパク質 (Cmr6H) を発現する *T. thermophilus* HB8 株の細胞破碎液から、ニッケルレジンカラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、および、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって天然型 TtCmr を調製しました。

(2)大腸菌無細胞タンパク質合成法を用いた各種 Cmr サブ複合体の調製

Cmr1-Cmr4-Cmr5-Cmr6H、Cmr4-Cmr5-Cmr6H、あるいは、Cmr1-Cmr4-Cmr6H から構成されるサブ複合体を、T7 RNA ポリメラーゼを用いた大腸菌無細胞タンパク質合成法を用いて調製しました。合成の効率を上げるために、それぞれの遺伝子の使用コドンで大腸菌用に改変し、さらに、タンパク質の N 末端側には N11-SUMO タグを持つ融合タンパク質の遺伝子を作製しました。複数の遺伝子を反応液に添加し同時に発現させました。その際に、SUMO プロテアーゼを同時に添加し Cmr タンパク質を発現させながら N11-SUMO タグを切断しました。タンパク質合成反応の後、その反応液から、熱処理、ニッケルレジンカラムクロマトグラフィー、および、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって目的のサブ複合体を調製しました。

(3)大腸菌を用いた各種 Cmr サブユニットの調製

文献 [Staals RH. *et al.*, (2013) *Mol. Cell*, **52**, 135-145.]に記載されている方法に従って、Cmr1、-2、-3、-4、-5、および、-6H サブユニットの各遺伝子を大腸菌/pET ベクター発現系で発現させ、それらの細胞液からそれぞれのタンパク質を各種クロマトグラフィーを用いて調製しました。Cmr4 の変異体 (Cmr4_D27A) 遺伝子や Cmr6H の変異体遺伝子 (Cmr6H_E93A) は、PCR を用いた部位特異的変異法で作製しました。

(4)TtCmr、Cmr1 を欠失させた複合体 (TtCmr_ Cmr1) および、Cmr5 を欠失させた複合体 (TtCmr_ Cmr5) の試験管内での構築

TtCmr は、上記(2)で調製した Cmr1-Cmr4-Cmr5-Cmr6H サブ複合体、(3)で調製した Cmr2 と Cmr3、および、化学合成した RNA を試験管内で混合して保温した後、ニッケルレジンカラムクロマトグラフィーを用いて調製した。TtCmr_ Cmr1、および、TtCmr_ Cmr5 は、それぞれ、Cmr4-Cmr5-Cmr6H サブ複合体、あるいは、Cmr1-Cmr4-Cmr6H サブ複合体を用いて、TtCmr の場合と同様の方法で構築しました。

(5)RNA 切断活性の測定

化学合成した 50 nt の一本鎖 RNA (5'末端を Cy3 で修飾したもの、あるいは、修飾していないもの) を基質として用い、各種 Cmr 複合体と 65 ° で 10~120 分間反応させました。反応後のサンプルをアクリルアミドゲル電気泳動で分離しました。基質として 5'末端を Cy3 で修飾した RNA を用いた場合は蛍光で、修飾していない RNA を用いた場合には SYBR Green II 染色と UV 照射で RNA のバンドを検出しました。

(6)クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析

大阪大学・蛋白質研究所（現・筑波大学）の岩崎憲治先生、宮崎直幸先生と共に、上記(1)と(4)で調製した各種 Cmr 複合体の電子顕微鏡構造を解析しました。

4. 研究成果

(1)試験管内で構築した TtCmr の RNA 切断活性と構造

46 nt の crRNA を用いて構築した場合(TtCmr_46 nt)と 34 nt の crRNA を用いた場合(TtCmr_34 nt) の二種類の TtCmr を作製しました。二種類共に RNA を分解する活性を持っていましたが、TtCmr_46 nt に比べて TtCmr_34 nt の活性が弱いことが分かりました。次に、TtCmr_46 nt と TtCmr_34 nt のクライオ電子顕微鏡構造をそれぞれ 6.1 Å と 6.6 Å の分解能で解析した結果、何れの複合体も天然型 TtCmr と同様の構造をしていました。これらの結果から、私たちが行った方法によって天然型と同様の活性と構造を持つ TtCmr を試験管内で構築できることが分かりました。さらに、TtCmr_34 nt の RNA 切断活性が弱いのは構造形成の異常ではなく crRNA の長さが不十分なためであることが分かりました。crRNA の長さが不十分であるために十分な活性を發揮できない複合体でも天然型と同様の構造を形成できるということは新たな知見です。

活性・構造共に天然型と同様の TtCmr 複合体を試験管内で構築できることが分かったので、Cmr1、あるいは、Cmr5 を欠失させた変異複合体を同様の方法で構築し、それらの構造と活性を解析することによってそれらのサブユニットの機能の解明を試みました。以下に説明します。

(2)TtCmr_ Cmr1 の構造と活性から推察した Cmr1 の機能

TtCmr_ Cmr1 を 46 nt の crRNA を用いて構築しました。TtCmr_ Cmr1 は、TtCmr_46 nt よりも高い RNA 切断活性を示しました。TtCmr は、crRNA に対して相補的な配列を持つ一本鎖 RNA を crRNA の 5'末端側から順に 3'末端側へ向かって 5 か所で切断します。TtCmr_ Cmr1 は、特に、5 か所目での切断活性が高いことが分かりました。TtCmr_ Cmr1 に Cmr1 を添加すると、活性の低下が認められました。一方、TtCmr_ Cmr1 のクライオ電子顕微鏡構造を 9.6 Å の分解能で解析した結果、TtCmr と同様の構造をしていました。しかし、TtCmr_ Cmr1 には、中央部に螺旋状に位置して RNA 切断活性を持つ Cmr4 サブユニットの数が多い分子が混在している可能性が認められ、5 か所目での切断活性が高いのはこのためであることが示唆されました。

以上の結果、Cmr1 は、TtCmr の形成において Cmr4 の数を調節している可能性が示唆されました。

(3)TtCmr_ Cmr5 の構造と活性から推察した Cmr5 の機能

TtCmr_ Cmr5 を 46 nt の crRNA を用いて構築しました。TtCmr_ Cmr5 も RNA を分解する活性を示しました。しかし、野生型 TtCmr が crRNA の 5'末端側から順に 3'末端側へ向かって切断するのに対し、TtCmr_ Cmr5 はランダムに切断し、5 か所目での切断活性も高いことが分かりました。TtCmr_ Cmr5 に Cmr5 を添加すると、野生型 TtCmr と同様の活性を示しました。電子顕微鏡で TtCmr_ Cmr5 を観察したところ、分子の形状が均一でないために本複合体の立体構造を決定することができませんでした。

以上の結果、Cmr5 は、TtCmr の形成において Cmr4 の数の調節をするとともに、複合体上の Cmr4 を安定化させる作用を持つ可能性が示唆されました。

(4)TtCmr において RNA 分解活性を持つサブユニットは Cmr4 だけであることを支持する実験結果

天然型 TtCmr は一本鎖 RNA を 5 か所で切断しますが、本複合体は RNA 切断活性を持つ Cmr4 サブユニットを 4 分子しか持っておらず、残り的一か所を切断しているサブユニットは不明でした。そこで、まず、RNA 切断活性を消失させた Cmr4 の変異体 (Cmr4_D27A) を含む TtCmr、TtCmr_ Cmr1、および、TtCmr_ Cmr5 を試験管内で構築し、それらの RNA 分解活性を調べました。その結果、何れの複合体も、5 か所目を含むすべての箇所でも RNA を切断する活性が認められませんでした。次に、Cmr4 のアミノ酸配列と Cmr6 のアミノ酸配列を比較解析することにより Cmr6 の活性部位を予測し、そのアミノ酸の変異体 (Cmr6H_E93A) を調製しました。Cmr6H_E93A を含む TtCmr、TtCmr_ Cmr1、および、TtCmr_ Cmr5 を試験管内で構築し、それらの RNA 分解活性を調べました。その結果、何れの複合体にも、5 か所目を含むすべての箇所でも RNA を切断する活性が認められました。以上の結果、天然型 TtCmr においても RNA を切断しているサブユニットは Cmr4 だけであり、天然型 TtCmr が RNA を 5 か所で切断するのは Cmr4 を 5 分子持つ分子が混入しているためである可能性が示唆されました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新海 暁男、横山 茂之
2. 発表標題 大腸菌無細胞タンパク質合成法を利用した、 <i>Thermus thermophilus</i> CRISPR-Cmr複合体の再構成
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 新海 暁男、横山 茂之
2. 発表標題 大腸菌無細胞タンパク質合成法を用いた、 <i>Thermus thermophilus</i> CRISPR-Cmr複合体の再構成
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016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