

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02384

研究課題名(和文) RNA依存性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 RNA-guided effector nucleases

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ由来PIWIタンパク質Piwiの結晶構造を決定し、PiwiがpiRNAと結合して生殖細胞を保護する分子基盤を明らかにした。さらに、様々な細菌に由来するCas9およびCas12の立体構造を解明し、CRISPR-Cas酵素の多様な作動機構の理解に貢献するとともに新たなゲノム編集技術の開発基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原核生物のCRISPR-Cas獲得免疫機構および真核生物のRNAサイレンシング機構にかかわるRNA依存性ヌクレアーゼ複合体の構造機能解析を推進し、その多様な作動機構の一端を明らかにした。その結果、原核生物および真核生物のもつRNA依存性ヌクレアーゼの類似点および相違点が明らかになった。さらに、本研究の成果はゲノム編集やRNA干渉といった応用技術の開発基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined the crystal structure of the PIWI protein from *Drosophila melanogaster* (Piwi). The structure revealed the molecular mechanism by which Piwi binds piRNA to protect germ cells from transposable elements. In addition, we determined the structures of Cas9 and Cas12 from various organisms, thereby improving our mechanistic understanding of diverse CRISPR-Cas enzymes and paving the way for further development of new genome-editing technologies.

研究分野：構造生命科学

キーワード：RNA タンパク質 CRISPR RNAサイレンシング 立体構造

## 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 獲得免疫機構はファージやプラスミドなどの外来核酸からの防御を担う。細菌に感染した外来核酸は、Cas1-Cas2 複合体のはたらきによりゲノム中の CRISPR アレイにスペーサー配列として取り込まれる。CRISPR アレイはスペーサー配列とリピート配列からなり crRNA (CRISPR RNA) を産生する。crRNA は Cas タンパク質と Cas-crRNA エフェクター複合体を形成し、crRNA 中のスペーサー配列 (ガイド配列) と相補的な外来核酸を認識・切断する。Cas-crRNA 複合体の違いに基づき、CRISPR-Cas 系は 2 つのクラス (クラス 1 とクラス 2) 6 つの型 (I 型 ~ VI 型) に分類される。クラス 1 のエフェクター複合体は複数の Cas タンパク質からなる一方、クラス 2 のエフェクター複合体は 1 種類の Cas タンパク質とガイド RNA から構成される。II 型 CRISPR-Cas 系に関与する Cas9 は crRNA と tracrRNA (trans-activating crRNA) と複合体を形成し、標的となる二本鎖 DNA を切断する。crRNA と tracrRNA をテトラループで連結した sgRNA (single-guide RNA) も同様に機能する。Cas9 による標的 DNA の認識には、RNA:DNA 間の相補性に加え、標的配列の近傍に PAM (protospacer adjacent motif) とよばれる特定の塩基配列が必要である。sgRNA のガイド配列 (20 塩基) は変更できるため、Cas9-sgRNA は様々なゲノム領域を選択的に切断することが可能である。したがって、現在、*S. pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9) は革新的なゲノム編集ツールとして広く利用されている。一方、V 型 CRISPR-Cas 系に関与する Cas12 (Cpf1) は crRNA と複合体を形成し、標的となる二本鎖 DNA を切断する。SpCas9 は NGG (N は A/T/G/C) という配列を PAM として認識する一方、Cas12 は TTTV (V は A/G/C) という配列を PAM として認識するため、Cas9 と Cas12 は相補的なゲノム編集ツールとして利用されている。最近の構造研究により、CRISPR-Cas 酵素の作動機構の理解が進んできた。しかし、その作動機構は多様で複雑であるため、不明な点が多く残されている。たとえば、Cas9 は生物種によって大きく異なり (約 1000 ~ 1600 残基) 配列保存性も 10~20% と低い。さらに、sgRNA や PAM の塩基配列も多様である。Cas9 ファミリー酵素の多くが G に富む配列を PAM として認識するのに対し、*C. diphtheriae* 由来 Cas9 (CdCas9) は他の Cas9 に比べて長い NNRHHHY という配列を PAM として認識する。また、最近の研究により、Cas12 は Cas9 と異なり、1 つの活性部位 (RuvC ヌクレアーゼドメイン) を用いて二本鎖 DNA を切断することが明らかにされたが、その DNA 切断機構の詳細は不明である。

真核生物において、小分子 RNA は Argonaute タンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex) を形成し、標的遺伝子の発現を制御する。この現象は RNA サイレncing とよばれ、小分子 RNA は Argonaute を標的となる RNA へと導き、切断や転写・翻訳抑制を引き起こす。Argonaute は AGO と PIWI の 2 つのサブファミリーに分類される。AGO タンパク質は全身の組織に広く発現し、siRNA や miRNA と複合体を形成し様々な生命現象に関与する。一方、PIWI タンパク質は生殖組織において piRNA (PIWI-interacting RNA) と複合体を形成し、トランスポゾンの発現を抑制することにより遺伝情報を保護する。PIWI タンパク質はピンポンサイクルとよばれる piRNA 経路にかかわる。たとえば、カイコにおいては 2 種類の PIWI タンパク質 (Siwi と BmAgo3) がトランスポゾンに由来する転写産物を切断したのち、切断産物を互いに受け渡すことにより、トランスポゾン抑制と piRNA 増幅を共役する。この際、Siwi の切断産物は RNA ヘリカーゼ Vasa のはたらきにより BmAgo3 へと効率的に受け渡される。また、PIWI によるトランスポゾン抑制機構は生物種によって大きく異なる。たとえば、ショウジョウバエの PIWI タンパク質である Piwi はヒストン H1 と複合体を形成し、トランスポゾン領域をヘテロクロマチン化する。PIWI タンパク質の構造情報は長い間不明であったが、我々は最近、試料調製系を確立し、PIWI タンパク質として初めて Siwi-piRNA 複合体の結晶構造を解明した。しかし、PIWI タンパク質は配列相同性が低く、結合する piRNA の長さ・配列、および、複合体を形成する相互作用因子も異なるため、その多様な作動機構は謎に包まれている。

### 2. 研究の目的

CRISPR-Cas 系および RNA サイレncing の中核因子としてはたらく RNA 依存性ヌクレアーゼの多様な作動機構の理解を目指し、構造機能解析を推進する。CRISPR-Cas 酵素に関しては、(1) 構造未知の CdCas9 をふくむ様々な Cas9 ファミリー酵素の結晶構造、および、(2) Cas12-crRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定し、CRISPR-Cas 酵素による多様な DNA 認識・切断機構を解明する。さらに、RNA サイレncing 因子に関しては、(3) Piwi をはじめとする PIWI タンパク質の結晶構造を決定し、PIWI タンパク質による多様なトランスポゾン抑制機構を解明する。これら RNA 依存性ヌクレアーゼの作動機構の理解は、ゲノム編集ツールをはじめとする様々な新規の研究ツールの開発においても重要な基盤となることが期待される。

### 3. 研究の方法

Cas タンパク質の試料調製は、Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の構造解析と同様の戦略により行う。N 末端に His<sub>6</sub>-SUMO-TEV プロテアーゼ認識配列を付加した Cas を大腸菌において大

量発現させ、NiNTA カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムなどを用いて精製する。His×6-SUMO タグはイオン交換カラムを通したのちに、TEV プロテアーゼにより切除する。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する。精製した Cas とガイド RNA、標的 DNA を混合し、Cas-ガイド RNA-標的 DNA 複合体を再構成する。複合体をゲルろ過カラムを用いて高純度に精製し、結晶化ロボット Mosquito と市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化の初期スクリーニングを行う。初期結晶が得られた際は、バッファーや沈殿剤、塩など結晶化条件を最適化する。X 線回折実験に適した結晶が得られた際は、大型放射光施設 SPring-8 や SLS において X 線回折データを収集する。結晶構造が決定できた際は、重要性が示唆されたアミノ酸残基の変異体を作製し、機能解析を行い、その役割を検証する。

PIWI タンパク質の試料調製は、Siwi の構造解析と同様の戦略により行う。PIWI タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を CNBr 活性化セファロース樹脂に固定化し、抗体カラムを作製する。次に、各 PIWI タンパク質を発現している培養細胞や生体試料から抗体カラムを用いて内在性の PIWI-piRNA 複合体を単離し、イオン交換カラムやゲルろ過カラムを用いて高純度に精製する。PIWI-piRNA 複合体が得られた際は、上記の CRISPR-Cas 酵素と同様の戦略により、構造解析を推進する。

#### 4. 研究成果

##### (1) SpCas9 に 7 つのアミノ酸変異

(R1335V/L1111R/D1135V/G1218R/E1219F/A1322R/T1337R) を導入することにより、NGG に加え、NGA、NGT、NGC を PAM として認識する SpCas9 改変体 (SpCas9-NG) を開発した (図 1)。SpCas9-NG をヒト培養細胞に発現させることにより、NGA、NGT、NGG、NGC を PAM としてもつ標的配列のゲノム編集に成功した。野生型 SpCas9 は NGG という塩基配列を PAM として認識するため、ゲノム領域の約 1/16 しか標的とすることができない。一方、SpCas9-NG は NG という短い塩基配列を PAM として認識するため、その 4 倍のゲノム領域を標的とすることができる。したがって、SpCas9-NG の利用により、これまで標的とすることができなかった遺伝子のゲノム編集が可能となった。

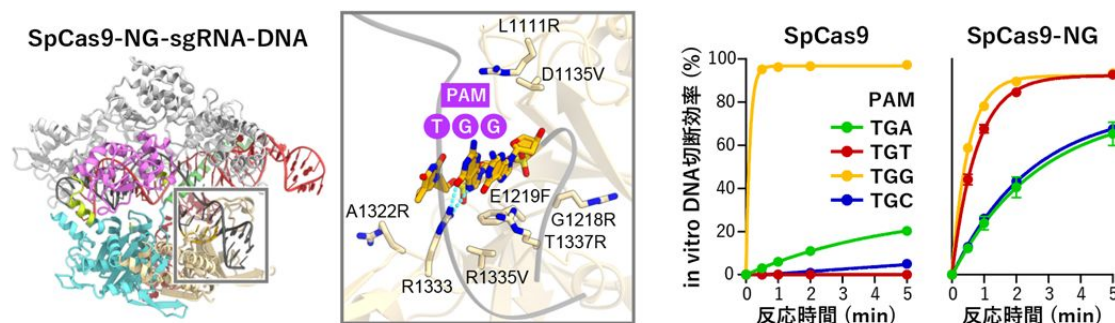


図 1 SpCas9-NG 改変体

(2) 小型の Cas9 として注目されている CdCas9 に関して、CdCas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定した。結晶構造から、CdCas9 は他の Cas9 と同様に、2 つのローブ (REC ロープと NUC ロープ) から構成される構造をもつことが明らかになった (図 2)。さらに、SpCas9 や SaCas9 といった既知の Cas9 は水素結合を介して PAM の塩基配列を認識するのに対し、CdCas9 は水素結合に加えファンデルワールス相互作用を介して様々な配列を PAM として認識していることが明らかとなった。今回の結果は、CRISPR-Cas9 における PAM 認識機構の予想外の多様性を明らかにするとともに、新たなゲノム編集技術の開発基盤となることが期待される。

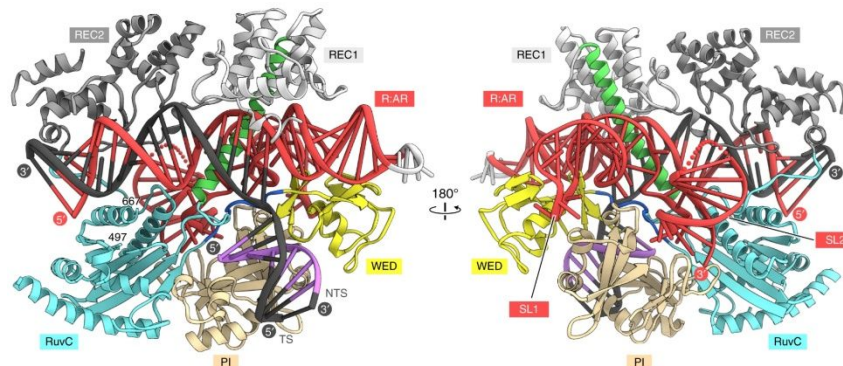


図 2 CdCas9 の立体構造

(3) 小型の Cas12f に関して、クライオ電子顕微鏡を用いて、Cas12f-sgRNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定した(図3)。その結果、予想外なことに、2つの Cas12f 分子(Cas12f.1 と Cas12f.2)が1つの sgRNA 分子に結合し、標的 DNA を認識することが明らかになった。すなわち、Cas9 と異なり、Cas12f は Cas12f.1 と Cas12f.2 からなる二量体として機能することが明らかになった。Cas12f.1 と Cas12f.2 の構造比較から、2つの Cas12f 分子は部分的に構造を変化させ、sgRNA と標的 DNA と結合していることが明らかになった。変異体解析の結果、(1) 二量体の形成が DNA 切断に必要なこと、(2) Cas12f.1 が DNA 切断を触媒することが示唆された。さらに、Cas12a など他の Cas12 酵素との比較から、Cas12 酵素は小型の Cas12f から分子進化した可能性が示唆された。これらの成果は、多様な CRISPR-Cas 酵素のさらなる理解、および、小型で効率的なゲノム編集ツールの開発につながることを期待される。

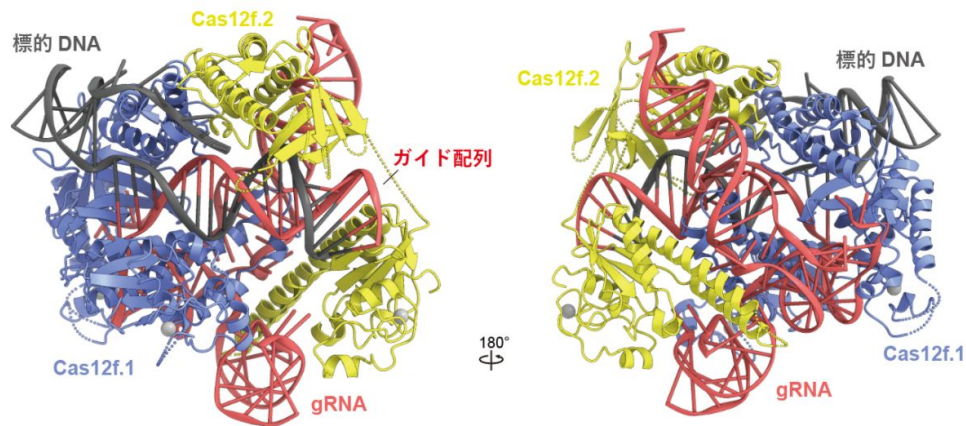


図3 Cas12f の立体構造

(4) ショウジョウバエ由来 Piwi タンパク質に関して結晶構造解析を行った。Piwi を特異的に認識するモノクローナル抗体を CNBr 活性化セファロース樹脂に固定化した抗体カラムを作製し、ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞から内在性の Piwi-piRNA 複合体を回収した。Piwi-piRNA 複合体の結合したセファロース樹脂をプロテアーゼで処理することにより、Piwi-piRNA 複合体を抗体樹脂から単離したのち、イオン交換カラムとゲルろ過カラムを用いて Piwi-piRNA 複合体を高純度に精製した。精製試料を用いて結晶化スクリーニングを行い、結晶を得て、大型放射光施設 SPring-8 において X 線回折データを収集した。既知 Argonaute の構造を用いた分子置換法により立体構造を決定した。その結果、Piwi は他の Argonaute タンパク質と同様に4つのドメイン(N、PAZ、MID、PIWI)から構成されており、Siwi と類似の構造的特徴を持つことが明らかになった(図4)。AGO サブファミリーに分類される Argonaute と異なり、Piwi は piRNA の 5'末端のリン酸基を金属イオン依存的に認識していた。Piwi の PIWI ドメインは Argonaute に共通の RNaseH フォールドを持っていたが、触媒部位は DEDH テトラッドではなく DVDK テトラッドにより形成されていた。RNA 切断実験の結果、Piwi は標的 RNA を切断しない一方、DVDK を DEDH に変異させた Piwi 変異体は標的 RNA 切断活性を示した。さらに、Piwi は数塩基のミスマッチを含む標的 RNA にも結合する一方、Piwi 変異体はミスマッチを含む標的 RNA と解離しやすいことが明らかになった。これらの結果から、Piwi は RNA 切断活性を失い、RNA 依存性 RNA 結合タンパク質としてトランスポゾンの転写を抑制するように分子進化したことが示唆された。

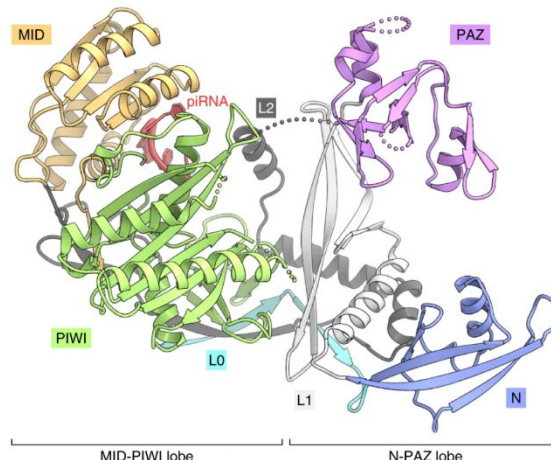


図4 Piwi の立体構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeda Satoru N., Nakagawa Ryoya, Okazaki Sae, Hirano Hisato, Kobayashi Kan, Kusakizako Tsukasa, Nishizawa Tomohiro, Yamashita Keitaro, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu	4. 巻 81
2. 論文標題 Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.11.035	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 Yamaguchi Sonomi, Oe Akira, Nishida Kazumichi M., Yamashita Keitaro, Kajiya Asako, Hirano Seiichi, Matsumoto Naoki, Dohmae Naoshi, Ishitani Ryuichiro, Saito Kuniaki, Siomi Haruhiko, Nishimasu Hiroshi, Siomi Mikiko C., Nureki Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 Crystal structure of Drosophila Piwi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14687-1	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 Hirano Seiichi, Abudayyeh Omar O., Gootenberg Jonathan S., Horii Takuro, Ishitani Ryuichiro, Hatada Izuho, Zhang Feng, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural basis for the promiscuous PAM recognition by Corynebacterium diphtheriae Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09741-6	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 Endo Masaki, Mikami Masafumi, Endo Akira, Kaya Hidetaka, Itoh Takeshi, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Toki Seiichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Genome editing in plants by engineered CRISPR-Cas9 recognizing NG PAM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 14 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0321-8	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 該当する

1. 著者名 Akichika Shinichiro, Hirano Seiichi, Shichino Yuichi, Suzuki Takeo, Nishimasu Hiroshi, Ishitani Ryuichiro, Sugita Ai, Hirose Yutaka, Iwasaki Shintaro, Nureki Osamu, Suzuki Tsutomu	4. 巻 363
2. 論文標題 Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eaav0080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aav0080	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 Kato Kazuki, Nishimasu Hiroshi, Oikawa Daisuke, Hirano Seiichi, Hirano Hisato, Kasuya Go, Ishitani Ryuichiro, Tokunaga Fuminori, Nureki Osamu	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural insights into cGAMP degradation by Ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06922-7	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 Nishimasu Hiroshi, Shi Xi, Ishiguro Soh, Gao Linyi, Hirano Seiichi, Okazaki Sae, Noda Taichi, Abudayyeh Omar O., Gootenberg Jonathan S., Mori Hideto, Oura Seiya, Holmes Benjamin, Tanaka Mamoru, Seki Motoaki, Hirano Hisato, Aburatani Hiroyuki, Ishitani Ryuichiro, Ikawa Masahito, Yachie Nozomu, Zhang Feng, Nureki Osamu	4. 巻 361
2. 論文標題 Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1259 ~ 1262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aas9129	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西増 弘志
2. 発表標題 立体構造に基づく CRISPR-Cas9の分子改変
3. 学会等名 MBSJ2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Engineered CRISPR-Cas9 recognizing a single guanine PAM
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure and Engineering of the CRISPR-Cas9 Genome Editor Nucleases
3. 学会等名 The 22nd US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure-based molecular engineering of CRISPR-Cas9
3. 学会等名 MBSJ2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure, Mechanism & Evolution of CRISPR-Cas Enzymes
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Structure, Mechanism & Evolution of CRISPR-Cas Enzymes
3. 学会等名 MBSJ2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/6021/">https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/6021/</a>
---

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		
米国	Broad Institute		