

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19284

研究課題名（和文）CRISPR-Cas9の改変によるゲノム編集技術の効率化

研究課題名（英文）Improvement of genome-editing technologies by engineering of CRISPR-Cas9

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：原核生物のもつCRISPR-Cas獲得免疫機構に關与するRNA依存性DNAヌクレアーゼCas9はガイドRNAと複合体を形成し、標的となる2本鎖DNAを切断する。したがって、Cas9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。本研究では、Cas9やCas12fの立体構造を決定することにより、それらのRNA依存性DNA切断機構を解明した。さらに、立体構造に基づき利便性の向上したCas9改変体を作製し、ゲノム編集技術の高度化に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、小型Cas9の結晶構造および小型Cas12fのクライオ電子顕微鏡構造を決定した。これらの立体構造から、CRISPR-Cas酵素の多様なRNA認識機構、DNA認識機構、DNA切断機構が原子レベルで明らかになった。さらに、得られた構造情報を利用し、標的範囲の拡張したCas9改変体の開発にも成功した。これらの成果は、ゲノム編集技術の高度化に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Cas9 is an RNA-guided DNA nuclease derived from prokaryotic CRISPR-Cas adaptive immune systems, and associates with a guide RNA to cleave double-stranded DNA targets. Therefore, Cas9 is widely used as a powerful genome-editing tool. In this study, we determined the 3D structures of Cas9 and Cas12f, which provide mechanistic insights into their RNA-guide DNA cleavage. Based on the structural information, we further engineered Cas9 variants with improved functionality, thereby extending the utility of CRISPR-based genome engineering technologies.

研究分野：構造生命科学

キーワード：CRISPR

1. 研究開始当初の背景

原核生物のもつ II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関する RNA 依存性 DNA ヌクレアーゼ Cas9 は CRISPR RNA (crRNA) と tracrRNA (*trans*-activating crRNA) と複合体を形成し、標的となる 2 本鎖 DNA を切断する (Jinek et al. Science 2012)。crRNA と tracrRNA を連結した sgRNA (single-guide RNA) も同様に機能する。ガイド配列は自由に変更できるため、Cas9-sgRNA 複合体は効率的なゲノム編集ツールとして広く利用されている。Cas9 が標的 DNA を認識するためには、sgRNA と標的 DNA とのあいだの相補性に加え、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。PAM は Cas9 によって異なり、ゲノム編集に利用されている *S. pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9) は NGG という塩基配列を PAM として認識する。結晶構造から、SpCas9 は 2 つ Arg 残基 (Arg1333 と Arg1335) を用いて PAM の GG 塩基を認識することが明らかになっている (Anders et al. Nature 2014)。Cas9 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が、標的とすることのできるゲノム領域は PAM によって制限されるという問題点が残されている。異なる細菌に由来する Cas9 は多様であり、認識するガイド RNA や PAM の塩基配列が大きく異なる (Ran et al. Nature 2015; Karvelis et al. Genome Biol 2015)。異なる PAM を認識する小型 Cas9 である *C. jejuni* 由来 Cas9 (CjCas9)、*C. diphtheriae* 由来 Cas9 (CdCas9)、*B. laterosporus* 由来 Cas9 (BICas9) はゲノム編集への応用が期待されている。しかし、これらの小型 Cas9 は DNA 切断活性が弱いため、ゲノム編集への応用が遅れている。また、CdCas9 や BICas9 の立体構造は決定されていないため、PAM 認識機構は不明である。Cas9 に加え、V 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関する RNA 依存性 DNA ヌクレアーゼ Cas12 もゲノム編集をはじめとする様々な新規技術に応用されている。特に、Cas12f (~500 残基) は他の Cas9 や Cas12 (>1000 残基) に比べて分子量が小さいため、ウイルスベクターへの搭載が容易なゲノム編集ツールとして期待されている (Harrington et al. Science 2018)。しかし、小型 Cas12f による RNA 依存性 DNA 切断機構は謎に包まれていた。

2. 研究の目的

BICas9、CdCas9、Cas12f の立体構造を決定することにより、それらの RNA 依存性 DNA 切断機構を解明する。さらに、立体構造に基づき Cas タンパク質にアミノ酸変異を導入することにより、PAM 特異性の異なる改変体や DNA 切断機構の向上した改変体を作製し、ゲノム編集技術の適用範囲の拡張を目指す。

3. 研究の方法

BICas9、CdCas9 に関して Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行った。Cas9 の N 末端に His×6-SUMO 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精製した。His×6-SUMO タグはイオン交換カラムを通したのち、プロテアーゼを用いて切除した。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 Cas9、sgRNA、標的 DNA を混合し、Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体を再構成したのち、ゲルろ過カラムを用いて精製した。精製した複合体試料を用いて結晶化スクリーニングを行い、初期結晶を得た。さらに、バッファーや沈殿剤、塩などの結晶化条件を最適化し、X 線回折実験に適した結晶を得た。大型放射光施設 SPring-8 において X 線回折データを収集し、分子置換法や多波長異常分散法により位相決定を行い、電子密度マップを取得、Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定した。

Cas12f-sgRNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行った。Cas12f の N 末端に His×6-SUMO 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精製した。His×6-SUMO タグはイオン交換カラムを通したのち、プロテアーゼを用いて切除した。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 Cas12f、sgRNA、標的 DNA を混合し、Cas12f-sgRNA-標的 DNA 複合体を再構成したのち、ゲルろ過カラムを用いて精製した。クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて複合体の粒子画像データを収集し、単粒子解析を行い密度マップを取得、Cas12f-sgRNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定した。

BICas9、CjCas9 の結晶構造において、DNA や RNA の近傍に位置するアミノ酸残基を核酸と新たな相互作用を形成するようなアミノ酸残基に置換した変異体を作製し、*in vitro* における DNA 切断実験を行い、DNA 切断活性を向上させるアミノ酸変異を同定した。さらに、活性を向上させる変異を組み合わせた変異体を調製、活性評価を繰り返すことにより、PAM 特異性が異なり DNA 切断活性の向上した Cas9 改変体を取得した。さらに、Cas9 改変体を哺乳類細胞に導入し様々な PAM をもつ標的配列に対する DNA 切断活性を測定することにより、ゲノム編集ツールとしての有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) C 塩基を含む PAM を認識する小型 Cas9 である BICas9 に関して、BICas9-sgRNA-標的 DNA 複

合体の結晶構造を決定した(図1)。結晶構造から、BICas9は他のCas9と同様に、2つのローブ(RECローブとNUCローブ)から構成されることが明らかになった。BICas9のガイドRNAは既知のCas9のガイドRNAと異なる立体構造をもち、BICas9によって特異的に認識されていた。既知のCas9と異なり、BICas9は水素結合を介してPAMのC:G塩基対を特異的に認識していることが明らかとなった。さらに、BICas9の構造情報を基に、アミノ酸変異を導入し、PAM特異性の異なるBICas9改変体を作製に成功した。これらの成果は、CRISPR-Cas9におけるPAM認識機構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。

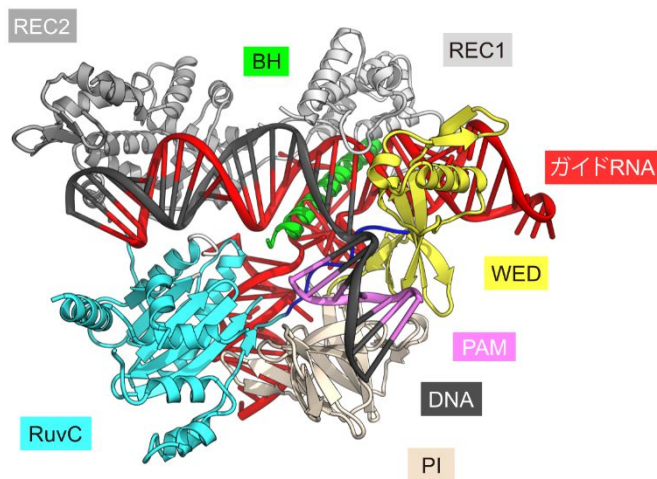


図1 BICas9-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造

(2)様々な塩基配列をPAMとして認識する小型Cas9であるCdCas9に関して、CdCas9-sgRNA-標的DNA複合体の結晶構造を決定した(図2)。結晶構造から、CdCas9は他のCas9と同様に、2つのローブ(RECローブとNUCローブ)から構成されることが明らかになった。CdCas9のガイドRNAは既知のCas9のガイドRNAと異なる立体構造をもち、CdCas9によって特異的に認識されていた。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塩基配列をPAMとして認識していることが明らかとなった。これらの結果は、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。

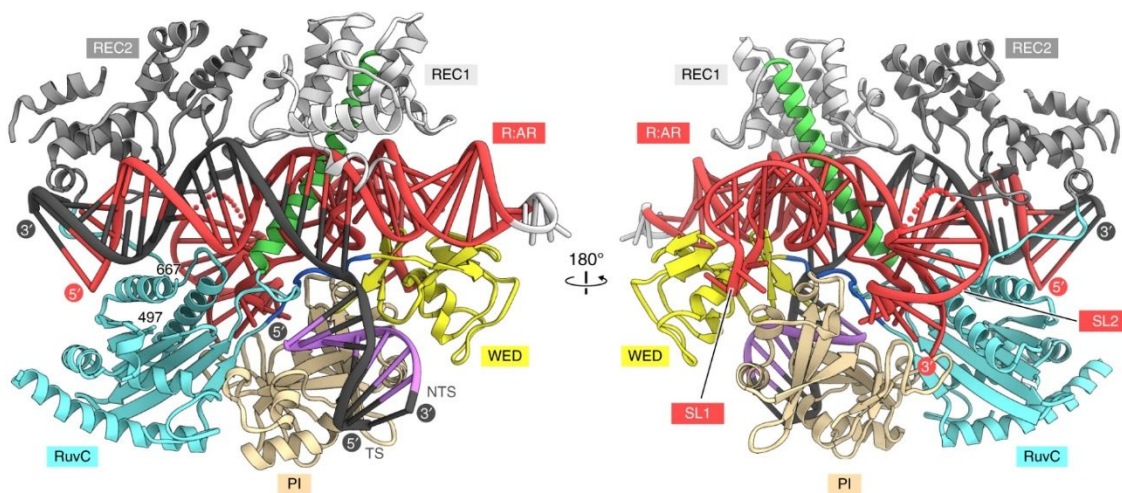


図2 CdCas9-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造

(3) *in vitro* DNA切断実験により、CjCas9のPAM特異性を明らかにした。様々なPAMをもつ標的DNAを基質として用いて *in vitro* DNA切断実験を行ったところ、CjCas9はNNNRYACという塩基配列をPAMとして認識するが、NNRGCACやNNNCGYACなどの塩基配列に対して低い活性を示すことが明らかになった。立体構造を基にCjCas9にアミノ酸変異を導入した複数のCjCas9変異体を作製し、*in vitro*においてDNA切断活性を評価した結果、活性の向上したCjCas9改変体(enCjCas9)を取得することに成功した。enCjCas9はCjCas9と比較して、ヒト培養細胞において、様々なPAMをもつ標的部位に対して高いゲノム編集活性を示した(図3)。さらに、enCjCas9とシチジンデアミナーゼを融合させた塩基編集ツールenCjCas9-AIDは、ヒト培養細胞において

標的部位の C から T への変換を誘導することが明らかになった。これらの成果は、ゲノム編集および塩基編集における CjCas9 の有用性を高めるものである。

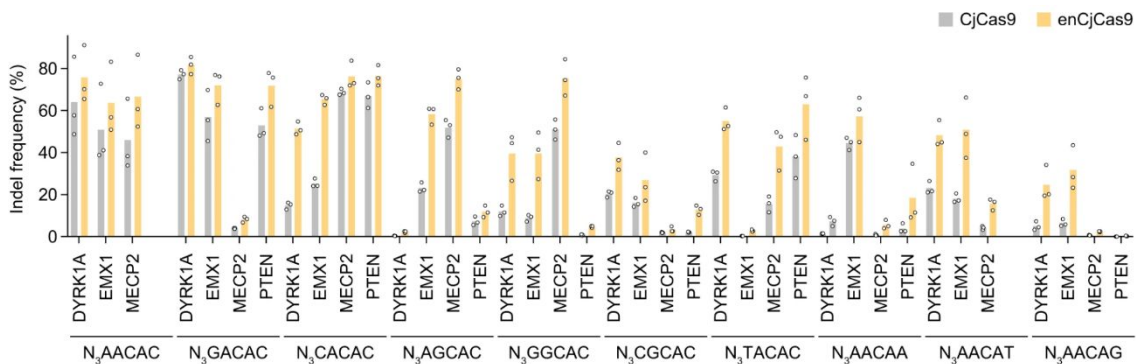


図3 CjCas9 および enCjCas9 のゲノム編集活性

(4) 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4)。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、既知の Cas9 や Cas12 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。興味深いことに、2つの Cas12f 分子は部分的に異なる構造をとり、sgRNA と標的 DNA に結合していた。変異体解析の結果、二量体の形成が DNA 切断に必要であり、Cas12f.1 が DNA 切断反応を触媒することが示唆された。Cas12a など他の Cas12 タンパク質との比較から、Cas12 ファミリータンパク質は小型の Cas12f から進化した可能性が示唆された。これらの成果は、CRISPR-Cas 酵素の多様性の理解、および、小型ゲノム編集ツールの開発につながることで期待される。

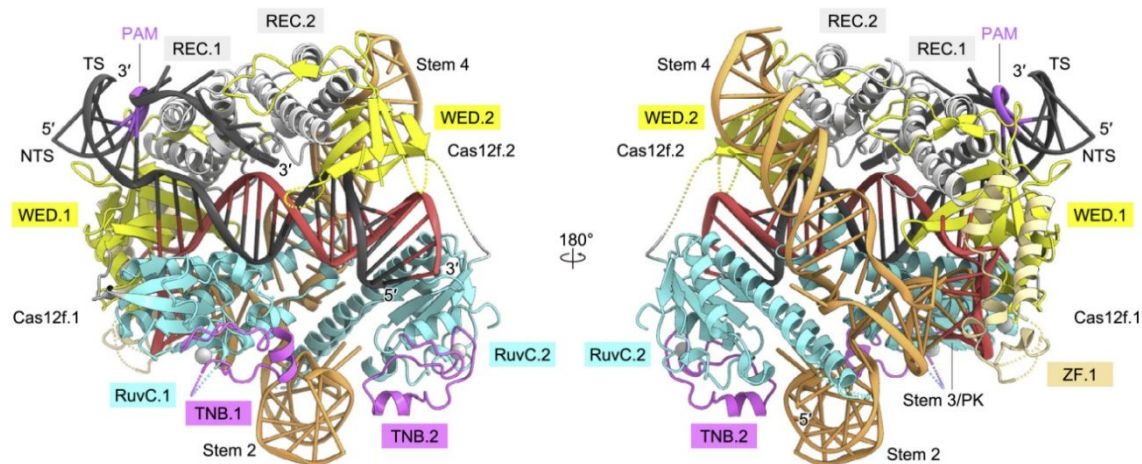


図4 Cas12f-ガイド RNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造

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 1件/うちオープンアクセス 2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 Sakata Rina C., Ishiguro Soh, Mori Hideto, Tanaka Mamoru, Tatsuno Kenji, Ueda Hiroki, Yamamoto Shogo, Seki Motoaki, Masuyama Nanami, Nishida Keiji, Nishimasu Hiroshi, Arakawa Kazuharu, Kondo Akihiko, Nureki Osamu, Tomita Masaru, Aburatani Hiroyuki, Yachie Nozomu	4. 巻 38
2. 論文標題 Publisher Correction: Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 901 ~ 901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-020-0585-1	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 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 Nakagawa Ryoya, Ishiguro Soh, Okazaki Sae, Mori Hideto, Tanaka Mamoru, Aburatani Hiroyuki, Yachie Nozomu, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu	4. 巻 5
2. 論文標題 Engineered Campylobacter jejuni Cas9 variant with enhanced activity and broader targeting range	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03149-7	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

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〕

-

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
---------	---------