

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02916

研究課題名(和文) CRISPR-Cas系とトランスポゾンの相互作用によるDNA転移の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis for transposition by CRISPR-associated transposon

研究代表者

沼田 倫征 (Numata, Tomoyuki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：10401564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：CASTは、CRISPR-Casエフェクター(Cascade)とトランスポジションタンパク質(TnsA、TnsB、TnsC、TniQ)が共同してDNA上を転移するトランスポゾンである。本研究では、標的DNAと結合したTniQ-Cascadeを調製して、クライオ電顕単粒子解析により、複合体の構造を決定した。その結果、エフェクターとPAMとの相互作用機構が明らかになった。PAM配列に変異を導入した標的プラスミドを作製してDNA転移効率を測定し、TniQ-CascadeによるPAM配列の特異性が明らかになった。また、変異型TniQ-Cascadeを調製しDNA転移効率を定量PCRにより解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cas9を利用したゲノム編集では、細胞に備わっている相同組換え修復を利用して遺伝子をノックインする。一方、CASTはトランスポジションタンパク質の活性を利用してゲノムにDNAを挿入するため、既存のしくみとは全く異なる機構でゲノムを編集することができる。さらに、CASTは長鎖DNAをゲノムに挿入することが可能であるため、これまで困難であった大きな遺伝子を細胞のゲノムにノックインすることが可能になると考えられる。このように、CASTを利用することで既存のゲノム編集を凌駕する技術開発が期待できる。CASTの研究は、細菌における病原因子の伝達機構を理解する上でも重要であり、意義の大きな研究である。

研究成果の概要(英文)：CAST is a transposon in which the CRISPR-Cas effector (Cascade) and transposition proteins (TnsA, TnsB, TnsC, and TniQ) collaborate to transfer it on the genome or plasmid. In this study, TniQ-Cascade in complex with the target DNA were prepared, and its three-dimensional structure was determined by cryo-EM single particle analysis. The structure revealed the interactions between TniQ-Cascade and PAM sequence of the target DNA. The PAM sequence of the target DNA in the plasmid was mutated, and then I evaluated the transposition efficiencies of each mutant PAM. The results elucidated the PAM preference of TniQ-Cascade. I also prepared TniQ-Cascade mutant and analyzed their transposition efficiencies by qPCR.

研究分野：応用生物化学

キーワード：CRISPR-Cas トランスポゾン CAST PAM ゲノム編集 クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 定量PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CRISPR-Cas 系は様々な生物種において利用可能なゲノム編集ツールとして大きな注目を集めている。CRISPR-Cas 系を利用したゲノム編集技術によって、これまで困難であった複数の遺伝子の同時ノックアウトや、霊長類におけるノックアウト動物の作製が迅速かつ簡便に行うことが可能となった。さらに、CRISPR-Cas 系はゲノム編集だけでなく、遺伝子の発現調節やライブイメージングなどの分野においても利用されている。このように、CRISPR-Cas 系を利用した新たな技術が生命科学に革命を起こしつつある。CRISPR-Cas 系を有益な分子ツールとして多方面においてさらに活用するためには、その作動原理を詳細に理解することが不可欠であると同時に、新たな分子特性をもったエフェクターの発見と開発が強く求められる。

自然界では、CRISPR-Cas 系は原核生物における獲得免疫系として機能する。原核生物のゲノムには CRISPR 遺伝子座が存在し、ウイルスなどに由来する配列がコードされている。ウイルスに感染すると、原核生物はウイルス核酸の一部を CRISPR 遺伝子座に取り込み感染履歴をゲノムに記録する。ウイルスに再感染すると、CRISPR 遺伝子座から産生された crRNA が Cas タンパク質と会合してエフェクターを形成する。crRNA はウイルス核酸と相補的な配列を持ち、この配列相補性を利用してエフェクターがウイルス核酸をターゲティングして分解する。この際、エフェクターは、標的 DNA に隣接する短い DNA 配列 (PAM: Protospacer adjacent motif) を特異的に認識して、切断すべき標的 DNA を正確に選別する。エフェクターは Cas タンパク質の種類により 6 種類の型 (I~VI 型) に分類される。I, III, IV 型のエフェクターは、複数の Cas タンパク質と crRNA から構成された巨大なタンパク質-RNA 複合体である。一方、II, V, VI 型は一つの Cas タンパク質と crRNA から構成されている。これまでに研究代表者は、III 型エフェクターの機能構造解析を実施して、エフェクターが標的となるウイルス核酸を認識して分解するしくみを解明していた。

一般的に、CRISPR-Cas 系は原核生物がウイルスなどの外来核酸から身を守る生体防御システムとして機能する。しかし、近年、DNA 転移に関する CRISPR-Cas 系が発見された。これは、CRISPR-associated transposon (CAST) とよばれ、トランスポゾン crRNA のガイド配列特異的に転移させる。CAST 内には、トランスポジションタンパク質や CRISPR-Cas エフェクターを構成する因子だけでなく様々な遺伝子が含まれており、長いものではその DNA サイズが数十 kbp にもおよび、CAST は病原細菌であるビブリオ属細菌でよく保存されている。CAST はウイルスなどの外来核酸の発現を抑制する機能はなく、DNA の転移に特化している。現在のところ、CAST の生体内における機能は未解明であるが、CAST 内に病原因子や制限-修飾系をコードする遺伝子がコードされていることから、病原細菌による疾患との関連や抗ウイルス作用に関わることが推定されている。CAST が DNA の転移を誘導する方法としては、まず、CRISPR-Cas エフェクターが crRNA を利用して標的となるゲノム領域を配列特異的に認識し、続いてトランスポジションタンパク質が標的部位にリクルートされて、ドナーとなる DNA 配列を標的部位に挿入すると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

本研究で対象とする CAST の転移には、I-F 型 CRISPR-Cas エフェクターと 4 種類のトランスポジションタンパク質 (TnsA, TnsB, TnsC, TniQ) が関与する。I-F 型 CRISPR-Cas エフェクターは Cas6, Cas7, Cas8 の 3 種類の Cas タンパク質と crRNA から構成されている。本研究では、トランスポジションタンパク質と CRISPR-Cas エフェクターの機能構造解析を実施し、両者の相互作用機構とその結果として引き起こされる DNA 転移反応の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CAST 内において、cas6-cas7-cas8-tniQ と tnsA-tnsB-tnsC の遺伝子はそれぞれ二つのオペロンに分割されてコードされている。まず、これら二つのオペロンをベクターにクローニングして発現プラスミドを構築した。また、crRNA を発現するプラスミドも構築した。cas6-cas7-cas8-tniQ および crRNA の発現プラスミドを同時に大腸菌に導入して、TniQ と結合した CRISPR-Cas エフェクター (以降、TniQ-Casceade) を産生する系を構築した。各種クロマトグラフィーにより TniQ-Casceade を精製した。調製した TniQ-Casceade に標的 DNA を加えて、標的 DNA と結合した TniQ-Casceade を調製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、その立体構造を決定した。さらに、大腸菌内にプラスミドを導入して、細胞内において DNA 転移を再構成した。また、定量 PCR を利用して、DNA 転移効率を定量的に測定した。

4. 研究成果

cas6-cas7-cas8-tniQ および crRNA の発現プラスミドを同時に大腸菌に導入して、TniQ-Casceade を産生した。各種クロマトグラフィーを利用して、TniQ-Casceade を精製した。crRNA のガイド

配列に相同な二本鎖 DNA を調製して、TniQ-Casceade と混合し、標的 DNA に結合した TniQ-Casceade をサイズ排除クロマトグラフィーにより調製した。得られたサンプルについて、Vitrobot を利用してグリッドを作製した。クライオ電子顕微鏡を用いて複合体の単粒子解析を実施した。その結果、分解能 3.6 の三次元マップが得られ原子構造モデルを構築した。TniQ-Cascade は 1 分子の Cas6, 6 分子の Cas7, 1 分子の Cas8, 2 分子の TniQ, 1 分子の crRNA を含むと考えられたが、この解析では、Cas6 および TniQ の電子マップに相当する部分を確認することができなかった。また、Cas8 の構造も揺らいでおり完全な複合体構造の決定には至らなかった。

そこで、グリッドを作製時の各種条件を検討・最適化して、データを収集しなおし単粒子解析によって複合体の三次元マップを 2.7 分解能で再構成した。その結果、Cas7 に加えて Cas8 に相当する三次元マップを得ることに成功した。一方、Cas6 と TniQ に関しては、明瞭な三次元マップを得ることができなかった。しかしながら、Cas6 および TniQ と考えられるマップを確認することができ、複合体中に全てのタンパク質サブユニットが含まれていることが明らかとなった。次に、Cas6 および TniQ と推定される領域をマスクして再解析した結果、これら 2 つのサブユニットの三次元マップを低分解能ではあるが得ることができた。また、今回のクライオ電子顕微鏡単粒子解析から、PAM の認識に重要なアミノ酸残基を複数特定した。

さらに、大腸菌内において DNA 転移活性を評価する系を確立した。また、定量 PCR により DNA 転移効率を定量的に測定する実験系を構築した。PAM 配列に変異を導入した標的 DNA プラスミドを作製して、定量 PCR により DNA 転移効率を測定した。その結果、TniQ-Cascade による PAM 配列の特異性の一端を明らかにした。また、PAM 配列の認識に關与するアミノ酸残基を特定して、変異型 TniQ-Cascade を調製し DNA 転移効率を定量 PCR により解析した。

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 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Balaratnam, S., Rhodes, C., Bume, D.D., Connelly, C.M., Lai, C.C., Kelley, J.A., Yazdani, K., Homan, P.J., Incarnato, D., Numata, T. and Schneckloth, J.S. Jr. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 A chemical probe based on the PreQ1 metabolite enables transcriptome-wide mapping of binding sites | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nat. Commun. | 6. 最初と最後の頁 5856 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25973-x | 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 Oki, K., Nagata, M., Yamagami, T., Numata, T., Ishino, S., Oyama, T. and Ishino, Y. | 4. 巻 gkab799 |
| 2. 論文標題 Family D DNA polymerase interacts with GINS to promote CMG-helicase in the archaeal replisome | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Res. | 6. 最初と最後の頁 gkab799 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab799 | 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 Oki, K., Yamagami, T., Nagata, M., Mayanagi, K., Shirai, T., Adachi, N., Numata, T., Ishino, S. and Ishino, Y. | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 DNA polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Res. | 6. 最初と最後の頁 4599-4612 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab243 | 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 Teramoto, T., Koyasu, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Numata, T., Senda, T. and Kakuta, Y. | 4. 巻 297 |
| 2. 論文標題 Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J. Biol. Chem. | 6. 最初と最後の頁 101028 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101028 | 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0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|