

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440013

研究課題名(和文) 1つの細胞が持つ新奇なウイルス防御システムの体系的理解

研究課題名(英文) Systematic understanding of novel anti-virus system in a cell

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・横山構造生物学研究室・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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas系は細菌特有の獲得免疫系で、ウイルスのDNAやRNA等、細菌に侵入してきた核酸を分解する。高度好熱菌*Thermus thermophilus*株が持つ数種類のCRISPR-Cas系のうちの2種類を構成する2つの超分子複合体の構造と機能を解析した結果、両複合体共に数種類のタンパク質と低分子RNAから成る螺旋構造をしており、低分子RNAの塩基配列も両複合体間で類似していた。さらに、両複合体は同様のメカニズムで1本鎖RNAを分解した。以上の結果は、2つの複合体が共通の祖先分子から派生したことで、本菌株はウイルス感染を防御するためのバックアップを備えていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas system is a bacterial adaptive immune system, which degrades foreign DNA or RNA such as that derived from virus. We selected a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, which has several CRISPR-Cas systems, for a model organism to study their systematic manner in a cell. We investigated structure and function of two large complexes comprising two CRISPR-Cas systems of the strain. We found that each complex was composed of several protein subunits and a small RNA molecule, and adopted a helical structure. Nucleotide sequences of the small RNA molecules are similar to each other. Both complexes degraded single-strand RNA in a similar manner. These results suggest that the two complexes have been evolved from a common ancestor, and that they comprise backup system in a cell to respond to virus infection.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR-Cas 獲得免疫 超分子複合体 電子顕微鏡構造 タンパク質 低分子RNA リボヌクレアーゼ
Thermus thermophilus

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、真正細菌の40%、古細菌の90%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タンパク質は約45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ペッション(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Casタンパク質-crRNA複合体は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の5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っています。

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。

私達が本研究課題を開始した当初は、各タイプ・サブタイプを構成する各種Casタンパク質、および、Casタンパク質-crRNA複合体の機能や構造が明らかにされていませんでした。しかしながら、これらはそれぞれ異なる生物種由来のタンパク質であったために、各システムの役割分担や、複数のタイプが存在する意義などを考察することは困難でした。

一方、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、タイプI-E、タイプIII-A、および、タイプIII-Bシステムの3つのシステムが含まれていることがゲノム解析によって明らかにされてきました。当初、本菌株のCRISPR-cas遺伝子群やcrRNAの発現解析、および、本菌株由来のいくつかのCasタンパク質の立体構造が報告されました。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適していることから、本菌株由来のタンパク質を用いればこれまで困難であったCasタンパク質超分子複合体の高分解能での構造解析が可能となり、それらの作用機作を原子レベルで説明できる可能性があるかと私達は考えました。すなわち、私達は、*T. thermophilus* HB8 株はCRISPR-Casシステムを研究するための格好のモデル生物であると考えました。

2. 研究の目的

本研究課題は、*T. thermophilus* HB8 株の各種CRISPR-Casシステムの全容を解明し、1つの細胞におけるCRISPR-Casシステムを体系的に理解し、生物が持つ獲得免疫システムの原型を理解することを目的としています。

本菌株のCRISPR-Casシステムは、Cascade複合体、Cmr複合体、および、Csm複合体を含んでいることがゲノム解析によって明らかにされてきました。これらの複合体は、それぞれ、タイプI-E、タイプIII-A、および、タイプIII-Bシステムにおいてインターフェレンスフェーズに関与している、CRISPR-Casシステムにおいて中心的な役割を担っていると考えられている分子です。私達は、まず、これらの複合体が如何にして外来のDNAあるいはRNAを切断するのか、そのメカニズムを生化学的、および、構造生物学的に明らかにしようと考えました。Cascade複合体に関しましては、大腸菌由来の分子の機能と高分解能な構造が他の研究グループによって明らかにされてきましたので、残された2つの複合体の研究を優先しました。

3. 研究の方法

(1) 複合体サンプルの調製

T. thermophilus HB8 株からCmr複合体を容易に調製するために、相同組み換えを利用して本菌株のゲノム配列を改変し、複合体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を発現する株を作製しました。この株から、Niレジンカラム、陰イオン交換カラム、および、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによってCmr複合体を調製しました。Csm複合体の場合は、複合体を構成しているタンパク質

の1つであるCsm5のC末端側にHisタグを融合させたタンパク質を発現する株を作製し、この株から、Cmr複合体の場合と同様の方法でCsm複合体を調製しました。

さらに、Cmr複合体に関しては、各サブユニットから複合体を再構成してサブユニット構成の解析や機能解析を行うために、各タンパク質サブユニットをそれぞれ大腸菌内で発現させ調製しました。

(2)複合体に含まれるRNA分子の解析

複合体から有機溶媒を用いてRNAを抽出し、次世代シーケンサーによって塩基配列を決定しました。

(3)複合体のサブユニット構成の解析

SDS-ゲル電気泳動、ブルー・ネイティブゲル電気泳動、および、マス・スペクトル解析によって解析しました。

(4)機能解析

単離・精製した各複合体によるRNAあるいはDNAを切断する活性を調べました。

(5)構造解析

負染色電子顕微鏡法による単粒子解析を行いました。Cmr複合体の場合は、より高分解能で解析可能なクライオ電子顕微鏡解析も行いました。

4. 研究成果

(1)Cmr複合体の構成要素

*T. thermophilus*由来のCmr複合体は、分子量約350 kDaで、6種類のCmrタンパク質(Cmr1-6)とCRISPRスペーサー由来の1本鎖RNA(crRNA)から構成されており、その構成比は1分子のCmr1、1分子のCmr2、1分子のCmr3、4分子のCmr4、3分子のCmr5、1分子のCmr6、および、1分子のcrRNAであることが分かりました。マス・スペクトルの解析から、Cmr1が欠失した分子が見出されたので、このサブユニットは複合体から解離しやすいことが分かりました。

(2)Cmr複合体に結合しているcrRNAの特徴

crRNAの長さは、30塩基から60塩基の間に分布しており、特に、40塩基(24.3%)と46塩基(16.7%)が多いことが分かりました。crRNAの塩基配列を解析した結果、81.2%の分子の5'末端側にはCRISPRリピート配列由来の、共通の8塩基(タグ配列)が見出されたので、crRNAの長さの違いは、3'末端の違いのためであることが分かりました。次に、タグ配列よりも下流の、CRISPRスペーサー由来の配列の特徴を解析しました。*T. thermophilus* HB8株のゲノムには、112種類のCRISPRスペーサー配列が存在しますが、それら全てが均等にCmrに結合しているのではなく、主として3つの配列に偏っていました。これらのスペーサーの塩基配列や予想二次

構造には共通性はありませんでした。

(3)Cmr複合体の活性

Cmr複合体は、結合しているcrRNAと相補的な塩基配列を含む1本鎖RNAを、*in vitro*で、crRNAの5'側から順に、6塩基ごとに5か所で切断することが分かりました。私達はこれを5'ルーラーメカニズムと名付けました。

その後、古細菌*Pyrococcus furiosus*株由来のCmr複合体もこのメカニズムによって標的RNAを切断すること、さらに、Cmr複合体におけるRNA分解活性の活性中心はCmr4サブユニット上にあることが他の研究グループによって明らかにされました。

(4)Cmr複合体の電子顕微鏡構造、および、RNAを切断するメカニズム

Cmr複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって4.1 Åの分解能で解析した結果、大きさ約100×220 Åの右巻きの螺旋形をしていました。そして、中央部には3分子のCmr5と、RNA分解活性を持つ4分子のCmr4が位置しており、そこにcrRNAが巻き付いていました。Cmr4は、突出した-ヘアピン構造が、隣接するCmr4分子の-ヘリックス構造と互いに噛み合うようにして連結していました。Cmr複合体分子の片方の端にはCmr6-Cmr1が、もう片方の端には、Cmr2-Cmr3が結合していました。crRNAの5'末端側はCmr2-Cmr3分子と結合していました。

次に、Cmr複合体がRNAを6塩基ごとに切断するメカニズムを解明するために、標的RNAに結合したCmrの立体構造を4.4 Åの分解能で解析しました。その結果、crRNAに標的RNAが結合することによって、分子の中央部が5 Å-10 Å外側に開いていました。そして、分子の中央部に位置している4つのCmr4分子由来の突出した-ヘアピン構造がそれぞれ6塩基毎に、合計4ヶ所で2本鎖RNAにインターカレーションしており、その部分の2本鎖がほどかれていました。近傍にはCmr4の予想活性残基が位置していました。これらの結果から、Cmr複合体が標的RNAを6塩基ごとに切断する5か所のうちの4か所は、この仕組みによると考えることができました。

(5)Csm複合体の構成要素

*T. thermophilus*由来のCsm複合体は、分子量約450 kDaで、5種類のCsmタンパク質(Csm1-5)とcrRNAから構成されており、その構成比は1分子のCsm1、3分子のCsm2、6分子のCsm3、2分子のCsm4、1分子のCsm5、および、1分子のcrRNAであることが分かりました。マス・スペクトル解析によって、Csm5が欠失した分子が見出されたので、このサブユニットは複合体から解離しやすいことが分かりました。

(6)Csm複合体に結合しているcrRNAの特徴

crRNAの長さは、11塩基から60塩基の間に

分布しており、特に、45塩基(12.5%)と53塩基(8.0%)が多いことが分かりました。crRNAの塩基配列を解析した結果、興味深いことに、配列の特徴はCmr複合体に結合したcrRNAと同じであることが分かりました。

(7)Csm複合体の活性

Csm複合体は、Cmr複合体の場合と同様に結合しているcrRNAと相補的な塩基配列を含む1本鎖RNAを、*in vitro*で、crRNAの5'側から順に、6塩基ごとに切断しました。切断箇所はCmr複合体の場合とは異なり6か所でした。

同時期に、Csm複合体におけるRNA分解活性の活性中心がCsm3サブユニット上にあることが、*Streptococcus thermophilus*株由来のCsm複合体を対象とした、他の研究グループによる研究で明らかにされました。

(8)Csm複合体の電子顕微鏡構造、および、RNAを切断するメカニズム

Csmの立体構造を負染色電子顕微鏡法による単粒子解析によって17 Åの分解能で解析した結果、大きさ約100×250 Åの右巻きの螺旋形をしていました。そして、中央部にはRNA分解活性を持つ6分子のCsm3が位置しており、そこにcrRNAが巻き付いていました。一方、Csm3の立体構造を他の細菌由来のCsm3の立体構造をもとにして推定した結果、Cmr複合体でRNA分解活性を持つCmr4の構造に類似していました。これらの結果から、Csm複合体はCmr複合体と同様のメカニズムでRNAを分解すると考えることができました。

(9)考察

5種類のタンパク質(1分子のCse1、2分子のCse2、1分子のCas6e、6分子のCas7、1分子のCas6e)と1分子のcrRNAから構成されている大腸菌のCRISPR-Cas Type I Cascade複合体は、DNAの切断に参与しているものの切断活性はなく、Cascadeに結合するCas3タンパク質がその役割を担っています。Cascade複合体はType III Csm/Cmr複合体と機能が異なりますが、類似した螺旋構造をしているので、これらの複合体は全て共通の祖先分子から派生・進化したと考えられます。これらの複合体は、crRNAを螺旋状に巻き付け、細胞に存在するRNA分解酵素から保護することによって、細胞に侵入してくるDNAやRNAを確実に捉えているのかも知れません。

以前、私達は、細菌にファージを感染させると*csm/cmr*両遺伝子群の転写量が上昇することを見出しました。さらに、*csm*遺伝子群の転写は転写因子cyclic AMP receptor protein(CRP)によって正に調節されていることを見出しました。*cmr*遺伝子群の転写はCRP以外の未知の因子によって調節されています。すなわち、この細菌はファージ感染に対する2つの類似した獲得免疫応答の仕組みを持っていると考えられます。この細菌は、Csm複合体、および、Cmr複合体という、構

造・機能共に類似している2つの分子を持ち、ファージ感染に対する2種類の応答のうちどちらかが機能していれば対応できるようなバックアップシステムを備えているのかも知れません。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

新海 暁男、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 Type III-B CRISPR-Cmr 複合体の構造と機能、生化学、査読有、87巻、4号、2015、pp.454-458、DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870454

Taylor DW, Zhu Y, Staals RHJ, Kornfeld JE, Shinkai A, van der Oost J, Nogales E, Doudna JA、Structures of the CRISPR-Cmr complex reveal mode of RNA target positioning、Science、査読有、2015、Vol.348、No.6234、pp.581-585、DOI:10.1126/science.aaa4535

新海 暁男、CRISPR-Cas システムの構造と機能、生物物理、査読有、2014、54巻、5号、pp.247-252、DOI:10.2142/biophys.54.247

Staals RHJ, Zhu Y, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, Koehorst JJ, Vlot M, Varossieau K, Neupane N, Sakamoto K, Suzuki T, Dohmae N, Yokoyama S, Schaap PJ, Urlaub H, Heck AJR, Nogales E, Doudna JA, Shinkai A, van der Oost J、RNA-targeting by the Type III-A CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*、Molecular Cell、査読有、2014、Vol.56、No.4、pp.518-530、DOI:10.1016/j.molcel.2014.10.005

Staals RHJ, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, Barendregt A, Vlot M, Koehorst JJ, Sakamoto K, Masuda A, Dohmae N, Schaap PJ, Doudna JA, Heck AJR, Yonekura K, van der Oost J, Shinkai A、Structure and activity of the RNA targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*、Molecular Cell、査読有、2013、Vol.52、No.1、pp.135-145、DOI:10.1016/j.molcel.2013.09.013

[学会発表](計4件)

新海 暁男、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の Type III CRISPR-Cas システムを構成しているリボヌクレオタンパク質複合体の構造と機能、BMB2015(第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会合同大会)2015年12月3日、「神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸

市)」

新海 暁男、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 Type III-B CRISPR-Cas システムを構成する Cmr 複合体の構造と機能、第 17 回 RNA 学会、2015 年 7 月 15 日、「ホテルライフオート札幌（北海道・札幌市）」

Shinkai A、Functional and structural genomics studies on *Thermus thermophilus* CRISPR-Cas systems、The 65th Fujihara Seminar, Internal Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids, The Fujihara Foundation of Science、2013 年 10 月 1 日、「グランドホテルニュー王子（北海道・苫小牧市）」

Staals RHJ, Agari Y, van der Oost J, Shinkai A、The Cmr complex of *Thermus thermophilus*、CRISPR: evolution, mechanisms and infection、2013 年 6 月 17 日、「St. Andrews (United Kingdom)」

〔その他〕

ホームページ等

新海 暁男、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株の CRISPR-Cas 系を構成する Cmr 複合体の構造と機能、2013 年 11 月 5 日、ライフサイエンス新着論文レビュー、情報・システム研究機構ライフサイエンス統合データベースセンター、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7779>、DOI:10.7875/first.author.2013.131

獲得免疫の起源を探る - 細菌の免疫システムを担う Cmr 複合体の構造と機能を解明 - 、2013 年 10 月 11 日、理化学研究所プレスリリース、http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131011_1/

獲得免疫の起源を探る - 細菌の免疫システムを担う Cmr 複合体の構造と機能を解明 - 、2013 年 10 月 11 日、理化学研究所 60 秒でわかるプレスリリース、http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131011_1/digest/

6. 研究組織

(1) 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・横山構造生物学研究室・前任研究員
研究者番号： 10391989

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

上利 佳弘 (AGARI Yoshihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・特別研究員
研究者番号： 50469889