

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291010

研究課題名(和文) RNAサイレンシングの分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of RNA silencing

研究代表者

西増 弘志 (Nishimasu, Hiroshi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：00467044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：カイコに由来するPIWIタンパク質(Siwi)を精製し、その結晶構造を世界で初めて解明した。その結果、SiwiがpiRNAと結合して生殖細胞を守る分子機構の一端が明らかになった。さらに、様々な細菌に由来するCas9およびCpf1の結晶構造を解明し、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。

研究成果の概要(英文)：We purified the PIWI protein from silkworm (Siwi) and determined its crystal structure. The structure revealed the molecular mechanism by which Siwi binds piRNA to protect germ cells. In addition, we determined the crystal structures of Cas9 and Cpf1 from various bacteria, 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：非コードRNA CRISPR Cas9 Argonaute piRNA ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) 非コード RNA は原核生物から高等真核生物にいたる多くの生物において重要な役割を担っている。たとえば、動物においては、PIWI-interacting RNA (piRNA) と PIWI タンパク質が協働し、トランスポゾンから生殖細胞のゲノム DNA を保護している (piRNA 経路)。一方、原核生物では、CRISPR RNA (crRNA) と Cas タンパク質が協働し、外来核酸からの防御を担っている (CRISPR-Cas 系)。これらの防御機構にはエフェクタータンパク質が非コード RNA と複合体を形成し、標的配列を特異的に抑制するという共通点が存在するが、その分子機構は多様である。

(2) 遺伝情報を次世代に正確に継承する必要のある生殖細胞では、約 30 塩基長の piRNA が生殖細胞に特異的な Argonaute タンパク質である PIWI タンパク質と結合し、トランスポゾンによる損傷からゲノム情報を保護している。ショウジョウバエの piRNA 経路には PIWI タンパク質 (Piwi, Aub, Ago3) \ Zucchini (Zuc) \ Maelstrom (Mael) \ Armitage (Armi) \ Yb といった数多くの因子が関与する。piRNA は、piRNA クラスターとよばれるゲノム領域から長い一本鎖 RNA として転写された後、Zuc により切断されることで産生される。piRNA は Armi と Yb のはたらきにより Piwi に組み込まれ、Piwi-piRNA 複合体 (piRISC) が形成される。Piwi-piRISC は核へ移行し、Mael と協働してトランスポゾンの転写を抑制する。Argonaute は 2 つのサブファミリー (AGO と PIWI) に分類される。AGO の結晶構造は報告されている一方、PIWI の結晶構造は不明であり、両者の機能的な差異を生み出す構造基盤は謎に包まれていた。また、piRNA 経路因子の生化学的解析は遅れており、piRNA 経路によるトランスポゾン抑制機構には不明な点が多く残されていた。

(3) CRISPR-Cas 系は原核生物の獲得免疫機構であり、ファージやプラスミドといった外来核酸に対する防御を担う。ゲノム中の CRISPR 領域は CRISPR アレイと Cas オペロンからなる。CRISPR アレイは外来核酸に由来するスペーサー配列とリピート配列からなり、Cas オペロンは Cas タンパク質群をコードする。菌体内に侵入した外来核酸は Cas1-Cas2 複合体により CRISPR アレイに取り込まれる。CRISPR アレイから転写された crRNA 前駆体は crRNA へとプロセッシングされ、特定の Cas タンパク質とエフェクター複合体を形成する。Cas-crRNA 複合体は crRNA と相補的な標的核酸を切断する。II 型 CRISPR-Cas 系に關与する Cas9 や V 型 CRISPR-Cas 系に關与する Cas12a (Cpf1) はガイド RNA と協働し標的となる二本鎖 DNA を切断するため、ゲノム編集技術に応用されている。しかし、異なる細菌に由来する Cas9 や Cpf1 による RNA・DNA 認識機構は謎に包まれていた。

2. 研究の目的

(1) piRNA 経路因子の機能解析および構造解析を行い、piRNA 経路によるトランスポゾン抑制の分子機構を解明する。

(2) CRISPR-Cas 酵素の機能解析および構造解析を行い、その多様な作動機構を解明する。さらに、CRISPR-Cas 酵素を改変することにより、有用なゲノム編集ツールを開発する。

3. 研究の方法

まず結晶化のために高純度の標的タンパク質を調製する。MAEL、Cas9、Cpf1 は、大腸菌において組換えタンパク質として大量発現させ、カラムクロマトグラフィーを用いて精製する。Cas9 と Cpf1 に関しては、ガイド RNA および標的 DNA と混合した後、ゲルろ過カラムを用いて Cas-RNA-DNA 複合体として精製する。カイコ由来 PIWI (Siwi) は、抗体カラムを用いて BmN4 細胞抽出液から回収し、カラムクロマトグラフィーを用いて Siwi-piRISC として精製する。精製試料を結晶化し、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し、結晶構造を決定する。変異体解析を行い、機能的に重要なアミノ酸残基を同定し、標的タンパク質の作動機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ由来 Mael の MAEL ドメイン (DmMAEL) の結晶構造を決定した。結晶構造から、DmMAEL は既知のヌクレアーゼファミリーに類似した RNase H 様フォールドをもつが、活性残基 (DEDDh モチーフ) はもたないことが明らかになった。生化学的解析の結果、DmMAEL は 1 本鎖 RNA を切断することが明らかになった。カイコ由来 Mael およびマウス由来 Mael の MAEL ドメインも同様の RNase 活性をもつことを明らかにした。構造情報にもとづき DmMAEL 変異体を調製し、生化学的解析を行い、RNase 活性に關与するアミノ酸残基を同定した。さらに、東京大学の塩見博士らとの共同研究により、ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞を用いた細胞生物学的解析を行い、DmMAEL の RNase 活性はトランスポゾン抑制には必要ないことを明らかにした。

(2) 抗 Siwi 抗体カラムとプロテアーゼを用いた精製法を確立し、BmN4 細胞抽出液から Siwi-piRISC を精製することに成功した。Siwi-piRISC を結晶化し、結晶構造を 2.4 分解能で決定した (図 1)。結晶構造から、Siwi は 4 つのドメイン (N, PAZ, MID, PIWI) と 3 つのリカードメイン (L0, L1, L2) から構成されており、2 つのロープ (N-PAZ ロープと MID-PIWI ロープ) からなる構造をもつことが明らかになった。piRNA の 5' 末端および 3' 末端は、それぞれ MID/PIWI ドメインお

よび PAZ ドメインに結合していた。Siwi は 1 位に U 塩基をもつ piRNA に結合することと一致し、5 末端には U に対応する電子密度が観察された。Siwi と hAgo2 の構造比較から、各ドメインの構造は類似している一方、MID-PIWI ロープに対する N/PAZ ドメインの配置が顕著に異なることが明らかになった。したがって、これらの構造の違いが両者の機能的な違いを反映している可能性が示唆された。

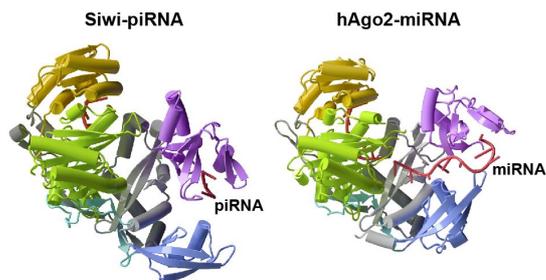


図 1 Siwi と hAgo2 の結晶構造

(3) *Staphylococcus aureus* に由来する小型の Cas9 (SaCas9)、sgRNA、標的 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した(図 2)。結晶構造から、SaCas9 によるガイド RNA・PAM 認識機構が明らかになった。SaCas9 は Asn985、Asn986、Arg991 を用いて NNGRRT という配列を PAM として認識していることが明らかになった。SpCas9 との構造比較から、配列相性は低いにもかかわらず、両者の作動原理は高度に保存されていることが明らかになった。一方、SaCas9 と SpCas9 は構造の異なる WED ドメインおよび PI ドメインをもち、ガイド RNA および PAM を特異的に認識していた。さらに、構造情報をもとに SaCas9 を改変し、新規の転写活性化ツールおよび誘導型ヌクレアーゼの作製に成功した。

(4) *Francisella novicida* に由来する大型の Cas9 (FnCas9)、sgRNA、標的 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した。結晶構造から、FnCas9 によるガイド RNA・PAM 認識機構が明らかになった。FnCas9 は Arg1556、Arg1585 を用いて NGG という配列を PAM として認識していることが明らかになった。さらに、構造情報をもとに YG を PAM として認識する FnCas9 改変体を作製した。FnCas9-sgRNA 複合体をマウス受精卵に導入し、標的配列のゲノム編集に成功した。

(5) *Campylobacter jejuni* に由来する最小の Cas9 (CjCas9)、sgRNA、標的 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した。結晶構造から、CjCas9 のガイド RNA は三重らせんをふくむ予想外の構造をもつことが明らかになった。CjCas9 は Arg866、Ser915、Ser951 を用いて NNNVRYM という配列を PAM として認識していることが明らかになった。また、既知の Cas9 は非相補鎖の塩基を PAM として認識するのに対し、CjCas9 は相補鎖および非相補鎖の両方

の塩基と相互作用していた。CjCas9 と他の Cas9 との構造比較から、CRISPR-Cas9 の多様性が明らかにされた。

(6) 3 種類の SpCas9 改変体 (VQR、EQR、VRER) の結晶構造を決定し、それらの PAM 認識機構を解明した。野生型 SpCas9 との比較から、アミノ酸置換により標的 2 本鎖 DNA の構造変化が引き起こされ、PAM 認識が変化していることが明らかになった。

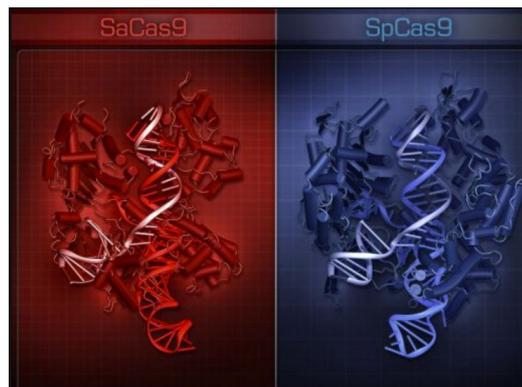


図 2 SaCas9 と SpCas9 の結晶構造

(7) *Acidaminococcus sp. BV3L6* に由来する Cpf1 (AsCpf1)、crRNA、標的 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した(図 3)。結晶構造から、Cpf1 は 2 つのローブからなる新規な構造をもつことが明らかになった。予想外に、crRNA は単純なステムループではなくシュードノット構造をとり、Cpf1 によって認識されていた。TTTV をふくむ PAM 二本鎖は配列・構造特異的に認識されていた。Cpf1 と Cas9 の構造比較から、これら 2 つの CRISPR-Cas 酵素のあいだの共通性および多様性が明らかになった。



図 3 AsCpf1 の結晶構造

(8) *Lachnospiraceae bacterium ND2006* に由来する Cpf1 (LbCpf1)、crRNA、標的 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した。4 種類の異なる PAM をふくむ複合体の構造比較から、Cpf1 による寛容な PAM 認識機構が明らかにな

った。

(9) Zhang 博士との共同研究として、異なる PAM を認識する AsCpf1 変体 (RVR および RR) を作製した。さらに、AsCpf1 変体の結晶構造を決定し、その PAM 認識機構を解明した。

(10) 古寺博士との共同研究として、高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた一分子解析を行い、CRISPR-Cas9 による標的 DNA の切断反応のダイナミクスを解明した。Cas9 単体は柔軟な構造をとる一方、Cas9-ガイド RNA 複合体は安定な構造をとることが明らかになった。さらに、DNA 切断を担う HNH ドメインが大きく揺らぎ、DNA の切断部位に移動したのち、切断された DNA が Cas9-ガイド RNA 複合体から離れる瞬間を捉えることに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件) 査読あり

*Shibata M[†], *Nishimasu H[†], Kodera N, Hirano S, Ando T, Uchihashi T, *Nureki O. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nat Commun* 1430 (2017)

DOI: 10.1038/s41467-017-01466-8
Yamano T, Zetsche B, Ishitani R, Zhang F, *Nishimasu H, *Nureki O. Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1. *Mol Cell* 67, 633-645 (2017)

DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.035.
*Nishimasu H[†], Yamano T[†], Gao L, Zhang F, Ishitani R, *Nureki O. Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1. *Mol Cell* 67, 139-147 (2017)

DOI: 10.1016/j.molcel.2017.04.019.
Gao L, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, Nishimasu H, Nureki O, Crosetto N, *Zhang F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol* 35, 789-792 (2017)

DOI: 10.1038/nbt.3900.
Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, Ishitani R, Zhang F, *Nishimasu H, *Nureki O.

Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. *Mol Cell* 65, 1109-1221 (2017)
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.007.

*Nishimasu H, *Nureki O. Structures and mechanism of CRISPR-RNA guided effector nucleases. *Curr Opin Struct Biol* 43, 68-78 (2016)

DOI: 10.1016/j.sbi.2016.11.013.

Matsumoto N[†], *Nishimasu H[†], Sakakibara K, Nishida KM, Hirano T, Ishitani R, Siomi H, *Siomi MC, *Nureki O. Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell* 167, 484-497 (2016)
DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.002.

Yamano T[†], Nishimasu H[†], Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, *Zhang F, *Nureki O.

Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 165, 949-962 (2016)

DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.003.

Hirano S[†], *Nishimasu H[†], Ishitani R, *Nureki O. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 61, 886-894 (2016)

DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.018.

Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, Nakane T, Ishitani R, Hatada I, Zhang F, *Nishimasu H, *Nureki O. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell* 164, 950-961 (2016)

DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.039.

Nishimasu H, Cong L, Yan WX, Ran FA, Zetsche B, Li Y, Kurabayashi A, Ishitani R, *Zhang F, *Nureki O.

Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell* 162, 1113-1126 (2015)

DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.007.

Matsumoto N[†], Sato K[†], Nishimasu H[†], Namba Y, Miyakubi K, Dohmae N, Ishitani R, Siomi H, *Siomi MC, *Nureki O.

Crystal structure and activity of the endoribonuclease domain of the piRNA pathway factor Maelstrom. *Cell Rep* 11, 366-375 (2015)

DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.030.

Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, *Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583-588 (2015)

DOI: 10.1038/nature14136.

[学会発表](計11件)

Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki
Structure, dynamics and engineering of CRISPR-Cas9 ConBio2017 (2017)

西増弘志、濡木理 CRISPR-Cas の結晶構造と機能変化 日本結晶学会年会(2017)

西増弘志、濡木理 CRISPR-Cas の結晶構造と機能変化 日本バイオイメージング学会年会(2017)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の結晶構造と機能変化 大阪大学蛋白質研究所セミナー(2017)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の結晶構造と機能変化 千里ライフサイエンスセミナー(2017)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の機能と構造 第17回極限環境生物学会年会(2016)

西増弘志、山野峻、平野央人、石谷隆一郎、濡木理 CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cpf1 の結晶構造 第89回日本生化学会大会(2016)

西増弘志 化学の力で遺伝子の改編に挑む 化学への招待(2016)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の構造と機能 東京大学医科学研究所若手シンポジウム(2016)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の作動機構とその応用 放線菌学会学術講演会(2016)

西増弘志 CRISPR-Cas9 の結晶構造 第53回日本生物物理学会年会(2015)

[図書](計1件)

西増弘志 ゲノム編集ツール
CRISPR-Cas9 の DNA 切断機構 *医学のあゆみ* 262(5), 349-352 (2017)

[その他]
ホームページ等

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2017/5629/>

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/5019/>

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/4657/>

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/4599/>

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2015/36.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西増 弘志 (NISHIMASU, Hiroshi)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 00467044

(2) 連携研究者

濡木 理 (NUREKI, Osamu)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 10272460

塩見 美喜子 (SIOMI Mikiko)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 20322745

塩見 春彦 (SIOMI Haruhiko)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 60202107

柴田 幹大 (SHIBATA, Mikihiro)
金沢大学・新学術創成研究機構・准教授
研究者番号: 80631027

古寺 哲幸 (KODERA, Noriyuki)
金沢大学・理工研究域・准教授
研究者番号: 30584635

(4) 研究協力者

Feng Zhang
Broad Institute・Associate Professor