

要 旨

原核生物のもつ CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated) 獲得免疫機構はウイルスなどの外来核酸からの防御を担う。II 型 CRISPR-Cas 系においては Cas9 タンパク質が 2 種類のガイド RNA (crRNA および tracrRNA (trans-activating crRNA)) と Cas9-crRNA-tracrRNA 複合体を形成し、crRNA と相補的な二本鎖 DNA を認識・切断する。標的 DNA の認識にはガイド RNA との相補性に加え、PAM (protospacer adjacent motif) とよばれる特定の塩基配列が標的配列の近傍に存在する必要がある。異なる生物種に由来する Cas9 のアミノ酸配列は多様であり、ガイド RNA や PAM の配列も異なる。ガイド RNA のガイド配列 (20 塩基) は変更可能であるため、Cas9-sgRNA 複合体は PAM をもちガイド配列と相補的な標的二本鎖 DNA を選択的に切断することができる。さらに、crRNA と tracrRNA を連結した sgRNA (single-guide RNA) も同様に機能する。したがって、Cas9-sgRNA は効率的なゲノム編集ツールとして急速に普及してきた。さらに、DNA 切断活性をもたない Cas9 変異体 (dCas9) はゲノム DNA の狙った位置に結合させることができるため、dCas9 を利用した様々な新規の技術も開発されている。一方、V 型 CRISPR-Cas 系においては、Cpf1 タンパク質が crRNA と複合体を形成し、標的二本鎖 DNA を切断する。Cpf1 は、(1) tracrRNA を必要としない、(2) T リッチな配列を PAM として認識する、(3) PAM から離れた位置で標的 DNA を切断し突出末端をつくる、(4) HNH ドメインをもたない、など Cas9 と異なる特徴をもつ。いくつかの Cpf1 オルソログは真核細胞においても DNA 切断活性を示すため、Cas9 とは異なるゲノム編集ツールとして利用されている。

Cas9 は 2 つのヌクレアーゼドメイン (RuvC と HNH) を除き、既知のタンパク質と相同性をもたないため、その RNA 依存性の DNA 切断機構は謎に包まれていた。そこで、我々は、Cas9 による DNA 切断機構の解明を目指し、*Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定した¹⁾ (図 1)。結晶構造から、Cas9 は 2 つのローブ (REC ローブと NUC ローブ) から構成され、sgRNA は相補鎖 DNA と RNA-DNA ヘテロ二本鎖を形成し、2 つのローブの間に收容されることが明らかになった。HNH ヌクレアーゼドメインと RuvC ヌクレアーゼドメインは相補鎖 DNA および非相補鎖 DNA を切断するのに適した位置に存在していた。さらに、C 末端ドメインは PAM (非相補鎖の NGG 配列) の認識に関与することが明らかになった。以上の結果から、Cas9 の RNA 依存性 DNA 切断機構が説明された。*S. pyogenes* 由来 Cas9 に加え、小型の *Staphylococcus aureus* 由来 Cas9²⁾、

大型の *Francisella novicida* 由来 Cas9³⁾、および、最小の *Campylobacter jejuni* 由来 Cas9⁴⁾の結晶構造を決定し、CRISPR-Cas9 の予想外の保存性と多様性を原子レベルで解明した。さらに、Cpf1-crRNA-DNA 複合体の結晶構造を決定し、Cpf1 の crRNA・PAM 認識、および、標的 DNA 切断の分子機構を明らかにした⁵⁾ (図 2)。また、Cas9 と Cpf1 の構造比較から、CRISPR-Cas ヌクレアーゼの機能的な収斂が明らかになった。結晶構造解析に加え、得られた構造情報をもとに Cas9 を改変し、新規の転写活性化系⁶⁾や PAM 特異性の異なる Cas9 改変体の作製³⁾にも成功した。

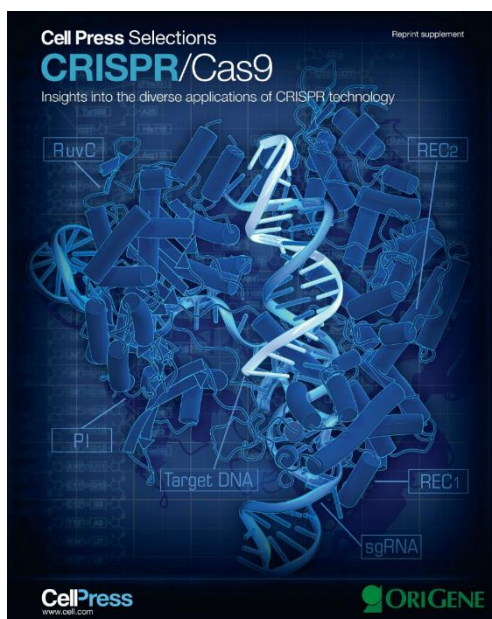


図 1 Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶構造



図 2 Cpf1-crRNA-DNA 複合体の結晶構造

文献

1. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014; 156: 935-949.
2. 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*. 2015; 162: 1113-1126.
3. 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*. 2016; 164: 950-961.
4. 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*. 2017; 65: 1109-1221.

5. 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*. 2016; 165: 949-962.
6. 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*. 2015; 517: 583-588.