

45. Q-Cascade による RNA 依存性 DNA 挿入機構の解明

西増 弘志

東京大学 先端科学技術研究センター 構造生命科学分野

Key words : CRISPR, クライオ電子顕微鏡, Cas12k, Cas7-11

緒言

原核生物のもつ CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas9 はガイド RNA (sgRNA) と複合体を形成し、sgRNA のもつガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA を切断する (図 1) [1]。sgRNA のガイド配列は自由に変更できるため、Cas9-sgRNA 複合体を細胞に発現させることにより、ゲノム DNA の狙った位置に 2 本鎖 DNA 切断を引き起こし、塩基配列を改変することができる [2]。この技術はゲノム編集とよばれ、基礎研究から動植物の品種改良、遺伝病の治療などの応用にいたる様々な分野において広く利用されている。CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する Cas タンパク質は極めて多様であり、Cas9 に続き、RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas12a [3] や RNA 依存性 RNA 切断酵素 Cas13 [4] といった新規の CRISPR-Cas タンパク質が相次いで発見され、ゲノム編集や RNA 編集、核酸検出といった新規技術に応用されている。

近年、DNA 組換え反応を触媒する CRISPR-Cas 複合体として CAST (CRISPR-associated transposase) が報告された [5, 6]。CAST は I 型 Q-Cascade と V 型 Cas12k に分類される (図 1)。Q-Cascade は 3 つの Cas タンパク質 (Cas6, Cas7, Cas8)、TniQ タンパク質、および、ガイド RNA からなる超分子複合体であり、ガイド RNA のガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA に結合する。Cas9 と異なり、Q-Cascade は DNA を切断せず、Tn7 様トランスポゾン因子 (TnsA, TnsB, TnsC) と協働し、ドナー DNA をターゲット DNA に挿入する (図 1)。TnsA/TnsB はトランスポザゼと相同性をもち、DNA 転移反応を触媒することが示唆されている。一方、TnsC、TniQ はそれぞれ AAA+ ATPase、DNA 結合タンパク質に分類され、DNA 転移反応に必須であることが示されているが、詳細な役割は不明である。他の Cas12 タンパク質と同様に、Cas12k は RuvC ドメインをもつが、その他の領域は既知のタンパク質と配列相同性をもたない。Cas12k は sgRNA と複合体を形成し、sgRNA のガイド配列と相補的な 2 本鎖 DNA に結合する。Cas12k は DNA 切断活性をもたず、TnsB、TnsC、TniQ と協働し、ドナー DNA をターゲット DNA に挿入する (図 1)。Q-Cascade、Cas12k のガイド RNA のガイド配列は自由に変更できるため、CAST を用いることにより、2 本鎖 DNA 切断を引き起こすことなくゲノムの狙った位置へのノックインが可能であると期待されている。しかし、CAST による DNA 挿入の分子メカニズムには不明な点が残されている。さらに、ごく最近、新規の CRISPR-Cas 酵素として Cas7-11 が発見された [7]。Cas7-11 は 4 つの Cas7 ドメイン (Cas7.1~Cas7.4) と 1 つの Cas11 ドメインからなり、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA を配列特異的に 2 か所で切断する。Cas7-11 は特異性が高く細胞毒性の低い RNA 切断ツールとして期待されているが、Cas7-11 による RNA 切断の分子メカニズムは不明である。

本研究では、新規 CRISPR-Cas 酵素である CAST および Cas7-11 の機能構造解析を行った。その結果、Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体、および、Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造の決定に成功した。Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体構造から、Cas7-11 による標的 RNA 切断の分子メカニズムが明らかになった [8]。さらに、構造情報に基づき分子改変を行い、小型の Cas7-11 改変体 (Cas7-11S) の創出に成功した。

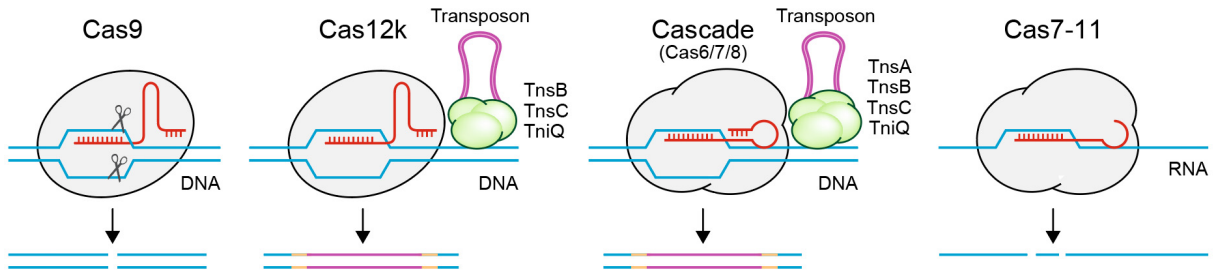


図 1. CRISPR-Cas タンパク質の多様な機能

Cas9 は標的となる 2 本鎖 DNA を切断する一方、CAST 複合体 (Cas12k、Q-Cascade) は標的となる 2 本鎖 DNA にドナー DNA を挿入する。Cas7-11 は標的となる 1 本鎖 RNA を切断する。

方法および結果

1. CAST の構造機能解析

CAST 複合体による DNA 転移の分子メカニズムの解明を目指し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。Q-Cascade の構造解析を目指したが、構造決定には至らなかった。一方、Cas12k に関しては、以下のように Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体構造の決定に成功した。Cas12k の N 末端に His 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高純度に精製した。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 Cas12k タンパク質、sgRNA、標的 DNA を混合することにより、Cas12k-sgRNA-標的 DNA 複合体を再構成し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。Vitrobot を用いて精製試料をグリッド上で瞬間凍結したのち、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて粒子画像を収集し、cryoSPARC を用いて単粒子解析を行い、密度マップを取得した。COOT を用いてモデル構築を行い、Phenix を用いて構造精密化を行った。Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体構造から、Cas12k は WED、REC、PI、RuvC ドメインからなることが明らかになった (図 2)。ガイド RNA は既知の CRISPR-Cas タンパク質のガイド RNA とは異なる複雑な立体構造をとり、Cas12k によって特異的に認識されていた。DNA は PI ドメインと REC ドメインによって認識されていた。以上の結果から、Cas12k がガイド RNA と協働して標的 DNA を認識する分子メカニズムが明らかとなった。

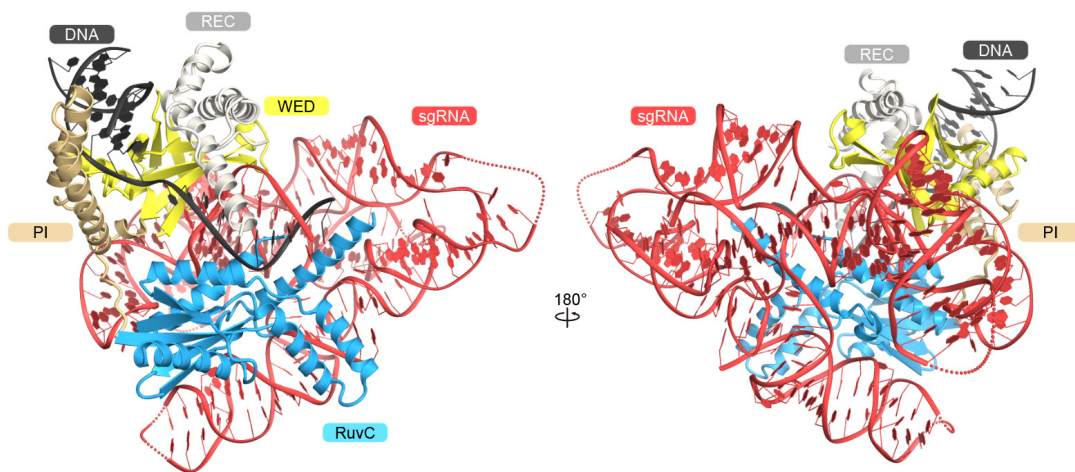


図 2. Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造
ディスオーダー領域を点線で示した。

2. Cas7-11 の構造機能解析

Cas7-11 による標的 RNA 切断の分子メカニズムの解明を目指し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。His タグを付加した Cas7-11 タンパク質を大腸菌において大量発現させ、NiNTA カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製した。ガイド RNA および標的 RNA は T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により合成し、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 Cas7-11 タンパク質、ガイド RNA、標的 RNA を混合し、Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体を再構成し、ゲルろ過カラムを用いて複合体を精製した。Vitrobot を用いて精製試料を瞬間凍結し、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて粒子画像を収集し、cryoSPARC を用いて単粒子解析を行い、密度マップを取得した。COOT を用いてモデル構築を行い、Phenix を用いて構造精密化を行った。Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体構造から、Cas7-11 は 4 つの Cas7 ドメイン (Cas7.1~Cas7.4)、Cas11 ドメイン、INS ドメイン、CTE ドメインが 4 つのリンカー領域 (L1~L4) で連結した構造をもつことが明らかになった (図 3)。ガイド RNA の 5' タグ領域は Cas7.1、Cas7.2 によって認識されていた。一方、スペーサー領域は標的 RNA と対合し、Cas7.2~Cas7.4、Cas11、INS によって認識されていた。ガイド RNA-標的 RNA の 4 番目、10 番目の塩基はそれぞれ Cas7.2、Cas7.3 との相互作用により、フリップアウトし、切断されるホスホジエステル結合の近傍に活性残基 (D429、D654) が位置していた。変異体解析の結果、D429、D654 はそれぞれ標的 RNA の塩基 3~4 間、塩基 9~10 間のホスホジエステル結合の切断に関与することが明らかになった。これらの結果から、Cas7-11 による標的 RNA 切断の分子メカニズムが明らかになった。さらに、RNA と相互作用していない領域を削除した複数の Cas7-11 変異体を作製し、RNA 切断活性を評価することにより、小型の Cas7-11 改変体 (Cas7-11S) の創出に成功した [8]。

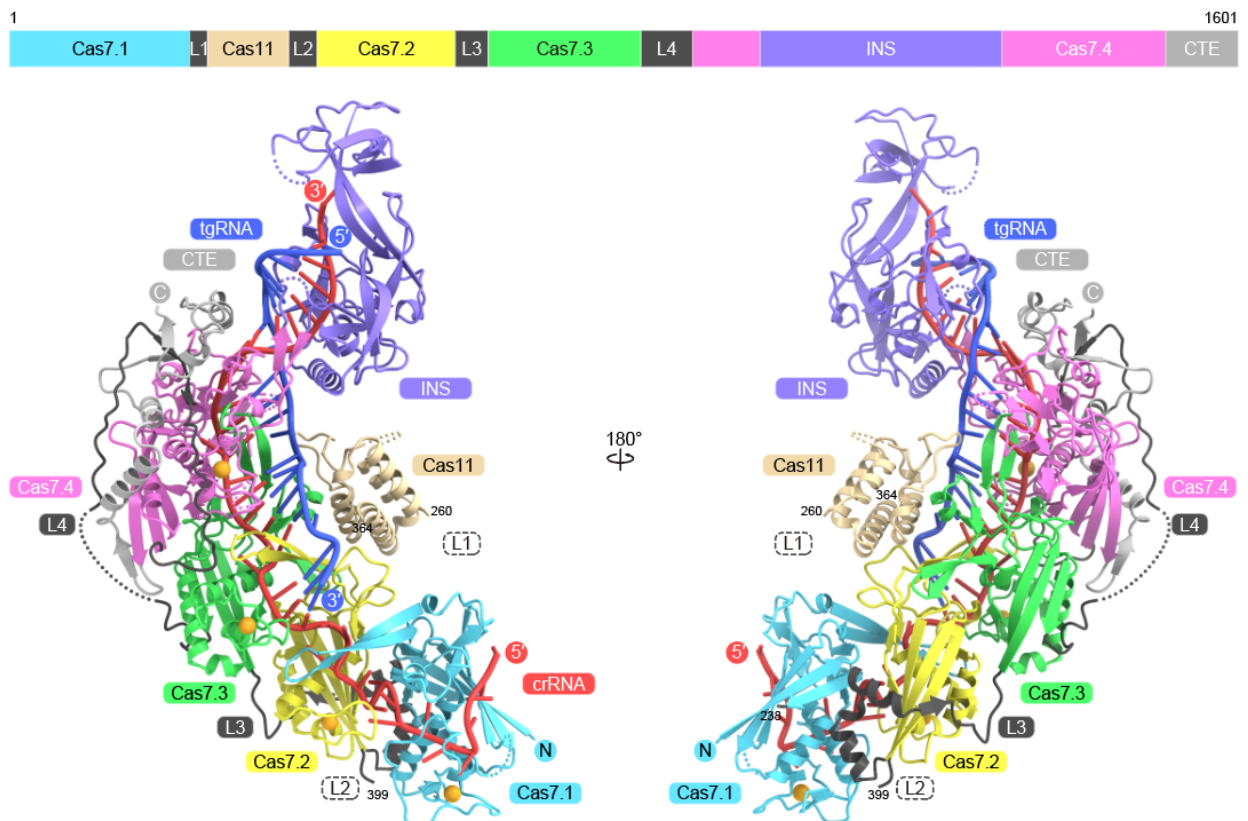


図 3. Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造
ディスオーダー領域を点線で示した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、MIT の Jonathan S. Gootenberg、Omar O. Abudayyeh である。

文 献

- 1) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249
- 2) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287718
- 3) Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):759-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26422227
- 4) Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 2016 Aug 5;353(6299):aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27256883f
- 5) Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, Sternberg SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*. 2019 Jul;571(7764):219-225. doi: 10.1038/s41586-019-1323-z. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31189177f
- 6) Strecker J, Ladha A, Gardner Z, Schmid-Burgk JL, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*. 2019 Jul 5;365(6448):48-53. doi: 10.1126/science.aax9181. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31171706
- 7) Özcan A, Krajeski R, Ioannidi E, Lee B, Gardner A, Makarova KS, Koonin EV, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11. *Nature*. 2021 Sep;597(7878):720-725. doi: 10.1038/s41586-021-03886-5. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34489594
- 8) Kato, K, Zhou, W, Okazaki, S, Isayama, Y, Nishizawa, T, Gootenberg, JS, Abudayyeh, OO, Nishimasu, H. Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex *Cell*. 2022 (in press)