

**【目的】** 原核生物のもつ CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する Cas タンパク質はガイド RNA と複合体を形成し様々な反応を触媒する。RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas9 はガイド RNA と相補的な 2 本鎖 DNA を切断する性質をもつため、ゲノム編集をはじめとする様々な新規技術に利用されている。近年、DNA 組換え反応を触媒する CAST (CRISPR-associated transposase) 複合体が報告され注目を浴びている。CAST は I 型 Q-Cascade と V 型 Cas12k に分類される。CAST はトランスポゾン因子 (TnsA, TnsB, TnsC, TniQ) と協働しドナー DNA をターゲット DNA に挿入する。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。Cas7-11 は 4 つの Cas7 ドメイン (Cas7.1~Cas7.4) と 1 つの Cas11 ドメインをもち、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA を特異的に切断する。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。しかし、CAST や Cas7-11 の作動メカニズムは不明な点が残されている。本研究では、CAST および Cas7-11 の作動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。

**【方法】** Cas12k および Cas7-11 を大腸菌で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーによりに精製した。精製した Cas タンパク質、ガイド RNA、標的 DNA/RNA を混合することにより、複合体を再構成したのち、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。精製試料を用いてクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、複合体構造を決定した。

**【結果】** クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体、および、Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体の立体構造を決定した。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。Cas12k のガイド RNA は既知の 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。標的 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 による DNA 認識の分子メカニズムが明らかとなった。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。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、スパーサー領域は標的 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触媒残基 (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 RNA 切断の分子メカニズムが明らかになった。

Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体および Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造

