

# 研究報告書

## 「立体構造にもとづく次世代ゲノム編集ツールの創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 西増 弘志

### 1. 研究のねらい

II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cas9 はガイド RNA と複合体を形成し相補的な標的二本鎖 DNA を切断する。2013 年、Cas9 を応用したゲノム編集技術が報告され、基礎研究から臨床研究にいたる様々な分野において急速に普及した。しかし、Cas9 の RNA 依存的 DNA 切断機構は不明であった。本さがけ研究では、Cas9 の X 線結晶構造を決定し、Cas9 の作動機構の解明をめざす。さらに、構造情報にもとづき Cas9 を改変することにより、新規のゲノム編集ツールを創出する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ゲノム編集に広く利用されている *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9)、小型の *Staphylococcus aureus* 由来 Cas9 (SaCas9)、Cas9 オルソログのなかで最大の *Francisella novicida* 由来 Cas9 (FnCas9)、Cas9 オルソログのなかで最小の *Campylobacter jejuni* 由来 Cas9 (CjCas9) の結晶構造を世界にさががけて決定し、CRISPR-Cas9 の作動機構を原子レベルで解明した。さらに、立体構造をもとづき SpCas9、SaCas9、FnCas9 を改変することにより新規ツールを開発した。また、V 型 CRISPR-Cas 系にかかわる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cpf1 の結晶構造を世界にさががけて決定し、CRISPR-Cpf1 の作動機構を解明した。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「CRISPR-Cas9 の結晶構造」

2012 年、Cas9 は原核生物のもつ II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構にかかわる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼであることが報告された。Cas9 は 2 つのヌクレアーゼドメイン (RuvC と HNH) をもち、crRNA (CRISPR RNA)、tracrRNA (*trans*-activating crRNA) とよばれる 2 種類のガイド RNA と複合体を形成し、crRNA 中のガイド配列と相補的な標的二本鎖 DNA を特異的に切断する。標的二本鎖 DNA のうち、crRNA と相補的な DNA 鎖 (相補鎖 DNA) は HNH ドメインにより切断され、もう一方の DNA 鎖 (非相補鎖 DNA) は RuvC ドメインにより切断される。Cas9 による標的 DNA の認識には、PAM (protospacer adjacent motif) とよばれる特定の数塩基が標的配列の近傍に存在することが必要である。PAM は生物種によって異なり、SpCas9 は NGG という配列を PAM として認識する。crRNA と tracrRNA を連結した sgRNA (single-guide RNA) もガイド RNA として機能し、ガイド配列は自由に交換できる。2013 年、Cas9 と sgRNA を用いることにより、ゲノム DNA の標的配列を選択的に切断し、その近傍の配列を改変することが可能であることが報告され、Cas9 は効率的なゲノム編集ツールとして広く普及した。さらに、sgRNA 依存的にゲノムの任意の場所にターゲティングできるという性質を利用した新規の技術も多数報告されている。

本さがけ研究では、ゲノム編集に広く利用されている SpCas9 に関して、SpCas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定し、Cas9 による RNA 依存性 DNA 切断機構を解明した (Nishimasu et al. Cell 2014 成果 7) (図 1)。結晶構造から、(1)SpCas9 は REC ロープと NUC ロープの 2 つのローブからなること、(2)sgRNA のガイド配列は標的 DNA と RNA-DNA ヘテロ二本鎖を形成し 2 つのローブのあいだに收容されること、(3)ガイド RNA は特徴的な立体構造をとり Cas9 によって広範囲に認識されること、(4)2 つのヌクレアーゼドメインは標的 DNA を切断するのに適した位置に存在すること、(5)PAM は C 末端の PI ドメインによって認識されることが明らかになった。本研究成果は世界初の Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造として基礎・応用の両面において極めて高い評価を得ている。

異なる生物種に由来する Cas9 とガイド RNA には多様性があり、Cas9 は特定のガイド RNA とのみ複合体を形成する。Cas9 の多様性を理解するために、SaCas9 (Nishimasu et al. Cell 2015 成果 5)、FnCas9 (Hirano et al. Cell 2016 成果 4)、CjCas9 (Yamada, Watanabe et al. Mol Cell 2017 成果 1) に関して、Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶構造を決定し、Cas9 オルソログによるガイド RNA および PAM の認識機構を解明した (図 1)。結晶構造の比較から、異なる生物種に由来するガイド RNA は異なる立体構造をとり、Cas9 によって特異的に認識されていることが明らかになった。さらに、SpCas9、SaCas9、FnCas9、CjCas9 は異なるアミノ酸残基を用いることにより、NGG、NNGRRT、NGG、NNNVRYM という多様な PAM 配列をそれぞれ認識していることが明らかになった。また、PAM 特異性の異なる SpCas9 変体の結晶構造を決定し、その PAM 認識機構を解明した (Hirano, Nishimasu et al. Mol Cell 2016 成果 3) (図 1)。

#### 研究テーマ B 「立体構造にもとづく CRISPR-Cas9 の機能改変」

Cas9 の構造情報は誘導型 Cas9 や高精度 Cas9、PAM 特異性の異なる Cas9 など様々な Cas9 変体の開発にも大きく貢献してきた。本研究では、立体構造にもとづき SpCas9-sgRNA 複合体を改変し新規の転写活性化ツールを開発した (Konermann et al. Nature 2014 成果 2)。これは世界初の機能獲得型のゲノムワイドスクリーニング系として高く注目され、Nature 誌の News & Views においても紹介された。同様に、SaCas9-sgRNA 複合体を改変し小型の誘導型 SaCas9 および転写活性化ツールを開発した (Nishimasu et al. Cell 2015 成果 3)。また、立体構造にもとづき、FnCas9 にアミノ酸変異を導入することにより、YG という配列を PAM として認識する FnCas9 変体の作製に成功した。

#### 研究テーマ C 「新規 CRISPR-Cas9 ヌクレアーゼの結晶構造」

2015 年、V 型 CRISPR-Cas 系に関わる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cpf1 が発見された。Cpf1 は Cas9 と同様に、ガイド RNA 依存的に標的二本鎖 DNA を切断するはたらきをもつ一方、Cas9 とは異なる特徴をもつためゲノム編集ツールとして注目されている。RuvC ドメインをのぞき、Cpf1 は既知のタンパク質とアミノ酸配列の相同性をもたないため、Cpf1 の crRNA 依存的な DNA 切断機構は不明であった。本研究では、Cpf1-crRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定し、その作動機構を世界にさがけて解明した (Yamano, Nishimasu et al. Cell 2016 成果 2) (図 1)。Cpf1 は 2 つのローブ (REC と NUC) からなる構造をとっていた。REC ロープは REC1 ドメインと REC2 ドメインから構成されていた。一方、NUC ロープは WED ドメイン、RuvC ドメイン、PI ドメイン、Nuc ドメインから構成されていた。crRNA のガイド配列は標的 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ていた。crRNAの5'末端領域はシュードノット構造を取りWEDドメインとRuvCドメインにより認識されていた。さらに、Cpf1は保存されたリジン残基を用いてPAM二本鎖の配列と構造の両方を認識していることが明らかになった。さらに、Cas9とCpf1の構造比較から、これらの間の機能収斂が示唆された。

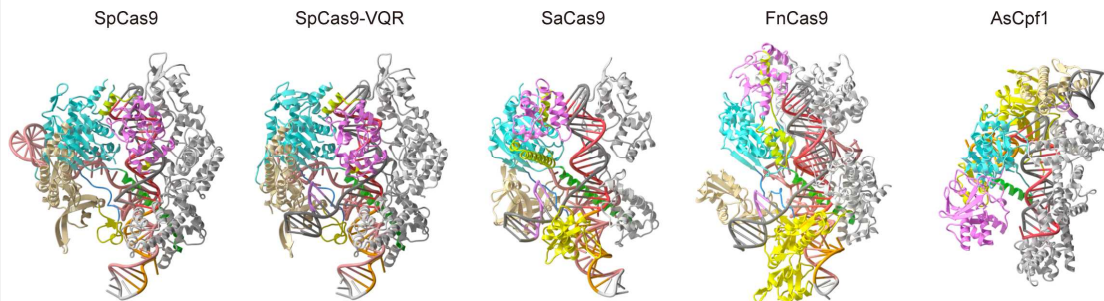


図1 本さがけ研究において決定したCRISPR-Casヌクレアーゼの結晶構造

### 3. 今後の展開

これまでの研究を基盤とし、異なる細菌に由来する多様なCas9やCpf1、新規のCRISPR-Casヌクレアーゼの構造機能解析を推進し、それらの作動機構の全容解明をめざす。さらに、立体構造にもとづく機能改変により新規のゲノム改変ツールを作製する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

CRISPR-Cas9の構造決定と機能改変という研究開始当初の目標の達成にとどまらず、自身の想定をはるかに凌駕する研究成果を上げることができた。研究開始当初、世界的に最も注目されているという過言ではないCRISPR-Cas9の構造解析に挑戦することに関し、熾烈な研究競争を不安視されていたアドバイザーの先生も多かった。しかし、Cas9単体の結晶を捨て、Cas9-sgRNA-DNA複合体の結晶化に集中するという戦略をとることにより、熾烈な研究競争のなか、世界初のCas9-sgRNA-DNA複合体の結晶構造を報告することに成功した。そのちょうど一週間前には競争を予想していたDoudna研からSpCas9単体の結晶構造がScience誌に報告された。SpCas9に加えて、SaCas9、FnCas9、CjCas9の結晶構造を決定し、CRISPR-Cas系の保存性と多様性を解明することにも成功した。これまでにSpCas9以外のCas9オルソログの複合体構造の決定に成功しているのは世界的に見ても我々の研究グループのみである。さらに、本さがけ研究中に発見された新規のCRISPR-CasヌクレアーゼCpf1に関して、Cpf1-crRNA-DNA複合体の結晶構造を世界にさがけて報告した。Cpf1の構造解析も熾烈な競争があり、我々の報告のちょうど1日前にはCpf1-crRNA複合体の結晶構造がNature誌に報告された。本さがけ研究では、結晶構造解析に加えて、SpCas9、SaCas9、FnCas9を改変した新規ツールの開発にも成功した。本さがけ研究において、1、2年次は自身の手で実験を行い、筆頭著者としてCell誌に2報発表した。さらに、3年次からは数人の学

生が研究に加わり、学生の指導を行いながら、筆頭著者として Cell 誌に 1 報、学生が筆頭著者の論文を責任著者として Cell 誌に 1 報、Mol Cell 誌に 2 報発表した。さらに、当初予定になかったが、本さがけ領域の古寺博士との共同研究を開始し、高速 AFM を用いて CRISPR-Cas9 のダイナミクスを可視化することにも成功した(論文準備中)。本さがけ研究の成果は世界的にも反響が大きく、CRISPR-Cas 分野の世界的なトップランナーの一人として認知され、研究者としての大躍進につながった。また、CRISPR-Cas9 のトップランナーである Feng Zhang 博士とのエキサイティングな共同研究を通じて、研究者として圧倒的な成長をとげることができた。本さがけ領域に採択されていなかったら、私の研究者人生はまったく違ったものになっていたのは間違いない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

各種の CRISPR-Cas9 の結晶構造解析を立て続きに成功した。また、PAM(protospacer adjacent motif)認識配列を変えた各種 Cas9 の変異体の構造ベース設計・機能確認・結晶構造解析にも成功した。また、古寺さんとの共同研究により、高速 AFM を使ってダイナミックな動きの観察ができたことは今回のさがけの大きな成果である。

ゲノム編集の応用に関しても国際競争になっているので、これから画期的な成果を挙げて頂きたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. 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 in press (2017)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)

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 517, 583–588 (2015)

7. 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 156, 935–949 (2014)

## (2)特許出願

研究期間累積件数:5 件

1.

発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani

発明の名称: Crispr-Cas, Crystal Structure and Uses Thereof

出願人: MIT、東京大学

出願日: 2014/1/22

出願番号: 61/930,214 CASTI 整理番号: 13-0667-001US02

2.

発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu

発明の名称: Crispr-Cas, New Nickases and Uses Thereof

出願人: MIT、東京大学

出願日: 2013/12/12

出願番号: 61/915,260 CASTI 整理番号: 14-0099-001US01

3.

発明者: Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Le Cong, Wiston Yan, Ann Ran, Bernd Zetsche, Yinqing Li, Feng Zhang

発明の名称: ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS, ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS OF CAS9 ORTHOLOGS AND VARIANTS FOR SEQUENCE MANIPULATION

出願人: MIT、東京大学

出願日: 2015/8/19

出願番号: 米国仮出願 62/207318

4.

発明者: 平野央人、西増弘志、石谷隆一郎、濡木理

発明の名称: 改変された FnCas9 タンパク質及びその使用

出願人: 東京大学

出願日: 2015/7/15

出願番号: 特願 2015-140761

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

2014/12/5

大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪大学蛋白質研究所(大阪) (招待講演)

Cas9-ガイド鎖 RNA-標的 DNA の結晶構造

西増弘志

2015/9/15

第 53 回日本生物物理学会年会 金沢大学(石川) (招待講演)

CRISPR-Cas9 の結晶構造

西増弘志

2016/9/25

第 89 回日本生化学会大会 仙台国際センター(仙台) (招待講演)

CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cpf1 の結晶構造

西増弘志、山野 峻、平野央人、石谷隆一郎、濡木理

2016/10/6

第 42 回 内藤コンファレンス シヤトレーゼガトーキングダムサッポロ(北海道)

RNA-guided DNA cleavage mechanism of class 2 CRISPR-Cas effectors

Hiroshi Nishimasu

2016/11/15

第 2 回核酸医薬学会 東京理科大学(東京) (招待講演)

RNA-guided DNA cleavage mechanism of class 2 CRISPR-Cas effectors

西増弘志、濡木理

受賞

平成 26 年 日本結晶学会 進歩賞

平成 26 年 日本生化学会 奨励賞

平成 26 年 SPRUC 2014 Young Scientist Award





平成 26 年 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

著作物

新着論文レビュー V 型 CRISPR-Cas 系にかかわる Cpf1 の結晶構造  
山野 峻・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー Cas9 の改変体による PAM の認識機構  
平野清一・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー 細菌 *Francisella novicida* に由来する Cas9 の結晶構造および機能の改変  
平野央人・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー *Staphylococcus aureus* に由来する小型の Cas9 の結晶構造  
西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー Cas9-ガイド鎖 RNA-標的 DNA 三者複合体の結晶構造  
西増弘志・濡木 理

プレスリリース

ゲノム編集のための新たな「はさみ」のかたちーCRISPR-Cpf1 の構造解明ー  
ゲノム編集のための新たな「はさみ」ー立体構造にもとづく CRISPR-Cas9 の改変ー  
ゲノム編集のための“小さなはさみ”のかたちー小型 CRISPR-Cas9 の立体構造を解明ー  
ゲノム DNA を自在に切断する“はさみ”のかたち