

CRISPR-Cas9 の構造と機能

西増 弘志

CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関わる RNA 依存性 DNA スクレアーゼとして発見された Cas9 は、ゲノム編集を初めとするさまざまな新規技術に応用され生命科学を一変させた。最近の結晶構造解析により、Cas9 の RNA 依存性 DNA 切断機構が明らかになってきた。さらに、Cas9 の構造情報は新たなゲノム編集ツールの開発にも大きく貢献している。本稿では、CRISPR-Cas9 の構造生物学研究の最新の知見を紹介したい。

1. はじめに

Cas9 は原核生物のもつ CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR-associated proteins) と呼ばれる獲得免疫機構¹⁻³⁾に関わる RNA 依存性 DNA スクレアーゼとして発見された。これまでに *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9)⁴⁾ や *Staphylococcus aureus* 由来 Cas9 (SaCas9)⁵⁾ を利用したさまざまな新規技術が開発されてきた。また、SpCas9 単体⁶⁾、SpCas9-sgRNA (single-guide RNA) 複合体⁷⁾、SpCas9-sgRNA-標的 DNA 複合体^{8,9)}、および SaCas9-sgRNA-標的 DNA 複合体¹⁰⁾ の結晶構造から、Cas9 による RNA 依存的な DNA 切断機構が明らかになってきた。Cas9 の構造情報は転写活性化 CRISPR-Cas9¹¹⁾ や誘導型 Cas9¹²⁻¹⁴⁾ などの新規ツールの開発、および、PAM (protospacer adjacent motif) 特異性の異なる Cas9 変異体の開発¹⁵⁾ にも大きく貢献している。本稿では、CRISPR-Cas9 の構造生物学研究の最新の知見を紹介したい。

2. CRISPR-Cas9

原核生物のゲノムには CRISPR アレイと Cas オペロンから構成される CRISPR 領域が存在する¹⁶⁾。CRISPR アレイは外来核酸に由来する塩基配列 (スパーサー配列) とリピート配列からなる。細菌に感染した外来核酸は Cas1-

Cas2 複合体により断片化され新たなスパーサー配列として CRISPR アレイに取り込まれる¹⁷⁾。CRISPR アレイは crRNA (CRISPR RNA) 前駆体として転写されたのち crRNA へとプロセッシングされる。最終的に crRNA は特定の Cas スクレアーゼと複合体を形成し、Cas-crRNA 複合体は crRNA 中のガイド配列 (スパーサー配列) と相補的な外来核酸を切断する。CRISPR-Cas システムは外来核酸の分解機構などに基づき I~III 型に分類される。I 型 CRISPR-Cas システムにおいては Cascade 複合体¹⁸⁻²⁰⁾ が標的 DNA を分解し、III 型 CRISPR-Cas システムにおいては Cmr 複合体^{21,22)} が標的 RNA を分解する。一方、II 型 CRISPR-Cas システムにおいては Cas9 が crRNA および tracrRNA (*trans*-activating crRNA) と複合体を形成し標的 DNA を切断する^{4,23)}。

2011 年 3 月、Charpentier のグループにより、II 型 CRISPR-Cas システムにおいては Cas9 と 2 本のガイド鎖 RNA (crRNA と tracrRNA) が外来核酸からの防御を担っていることが報告された²³⁾。crRNA はスパーサー領域 (ガイド配列) とリピート領域からなり、tracrRNA は crRNA のリピート領域と相補的な領域 (アンチリピート領域) を持つ。機能解析の結果、crRNA、tracrRNA、Cas9、および、RNase III が crRNA の成熟化および外来核酸に対する防御に必要であることが示された。これらの結果から、crRNA 前駆体と tracrRNA は二本鎖を形成して Cas9 と結合し、RNase III によってリピート:アンチリピート二本鎖領域が切断されることにより成熟型 crRNA:tracrRNA が生成することが示唆された。さらに、Cas9 は二つのスクレアーゼドメイン (RuvC ドメインと HNH ドメイン) を持つことから、Cas9-crRNA:tracrRNA 複合体が標的二本鎖 DNA の切断に関与していることが予想された。I 型および III 型 CRISPR-Cas システムと異なり、II 型 CRISPR-Cas システムにおいて crRNA:tracrRNA がガイド鎖 RNA として機能するという予想外の発見は Cas9 の機能解明のブレイクス

東京大学大学院理学系研究科、JST さきがけ (〒113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16)

Structure and function of CRISPR-Cas9

Hiroshi Nishimasu (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo/JST, PRESTO, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032)

本総説は 2014 年奨励賞を受賞した。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870686

© 2015 公益社団法人日本生化学会

ルーとなった。

その約1年後の2012年6月, CharpentierとDoudnaらのグループにより, Cas9はRNA依存性のDNAエンドヌクレアーゼであることが示された(図1)⁴⁾。精製したCas9タンパク質およびcrRNA:tracrRNAを用いた生化学的解析の結果, (1)Cas9はcrRNA:tracrRNAと複合体を形成し, crRNA中のガイド配列(〜20塩基)と相補的な標的二本鎖DNAを切断すること, (2)標的二本鎖DNAのうち, crRNAと相

補的なDNA鎖(相補鎖DNA)はHNHドメインによって切断され, もう一方のDNA鎖(非相補鎖DNA)はRuvCドメインによって切断されること, (3)Cas9による標的二本鎖DNAの切断には標的配列に隣接する数塩基のモチーフ(PAM)が必要なこと, (4)crRNAの3'末端とtracrRNAの5'末端をテトラループによって連結したsgRNAもガイド鎖RNAとして機能すること, が明らかになった。PAMは生物種によって異なり, SpCas9は非相補鎖DNA中の5'-NGG-3'をPAMとして認識する。さらに, Cas9および任意のガイド配列を持つsgRNAを用いることにより, *in vitro*において標的DNAを切断できることが示された。これらの結果から, Cas9-sgRNAを応用したゲノム編集の可能性が示唆された。

この半年後の2012年12月, Zhangのグループにより, CRISPR-Cas9を利用して哺乳類細胞のゲノム情報を“編集”できることが報告された²⁴⁾。その直後, Doudnaのグループを含む複数のグループから, CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集の成功例が相次いで報告された^{25, 26)}。さらに, sgRNA依存的にゲノムDNAにターゲティングできるというCas9の特性を利用した多くの新規技術も開発されている^{11, 27-31)}。筆者らの共同研究者でもあるFeng Zhangの話によると, 彼らは2011年ごろからCas9を利用したゲノム編集を試みており, 2011年のCharpentierらによるtracrRNAの発見²³⁾が彼らの成功の鍵となったようだ。

二つのヌクレアーゼドメインを除き, Cas9は既知のタンパク質と配列相同性を持たない(図2)。そのため, CRISPR-Cas9を利用した応用研究が急速な進展をみせる一方, そのRNA依存性DNA切断機構は不明だった。しかし, 最近の結晶構造解析によりCRISPR-Cas9の作動機構が明らかになってきた(図3)。

3. SpCas9の結晶構造

1) SpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体の結晶構造

2014年2月13日, 筆者らのグループはSpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体の結晶構造を報告した(図3C)⁹⁾。結晶構

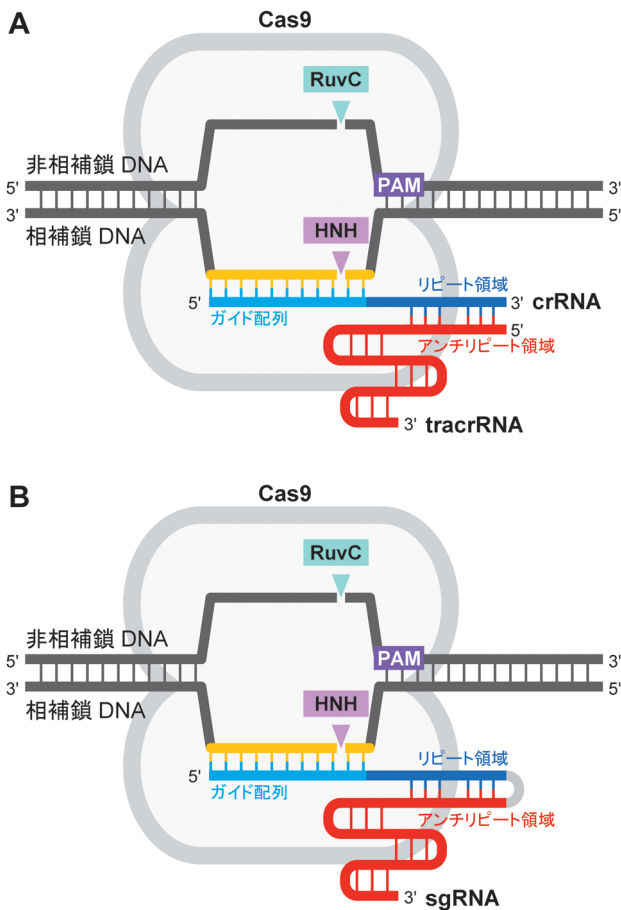


図1 CRISPR-Cas9の機能
(A) Cas9-crRNA:tracrRNAによる標的二本鎖DNA切断機構。(B) Cas9-sgRNAによる標的二本鎖DNA切断機構。

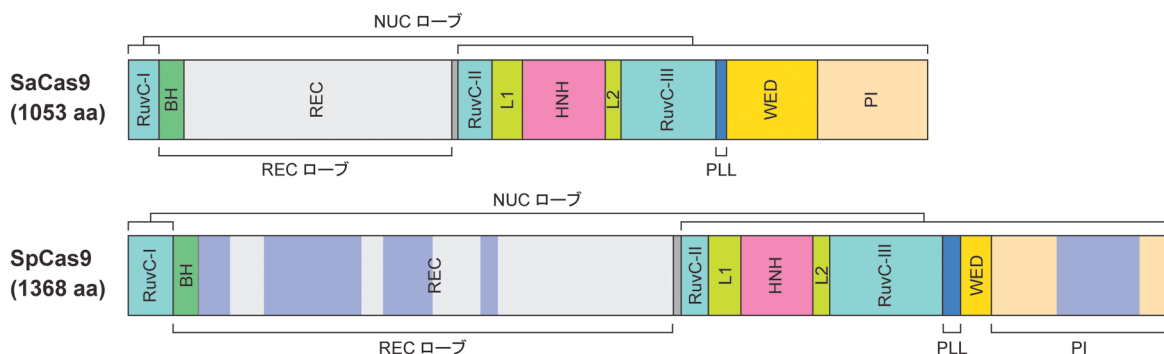


図2 SpCas9とSaCas9のドメイン構造
SpCas9は二つヌクレアーゼモチーフ(RuvCとHNH)を持つ新規のタンパク質として同定された。結晶構造から, RECロープ, WEDドメイン, および, PIドメインは新規フォールドを持つことが明らかになった。SpCas9のRECロープおよびPIドメインに存在する挿入領域を薄い青色で示した。BH:ブリッジヘリックス, PLL:PLループ

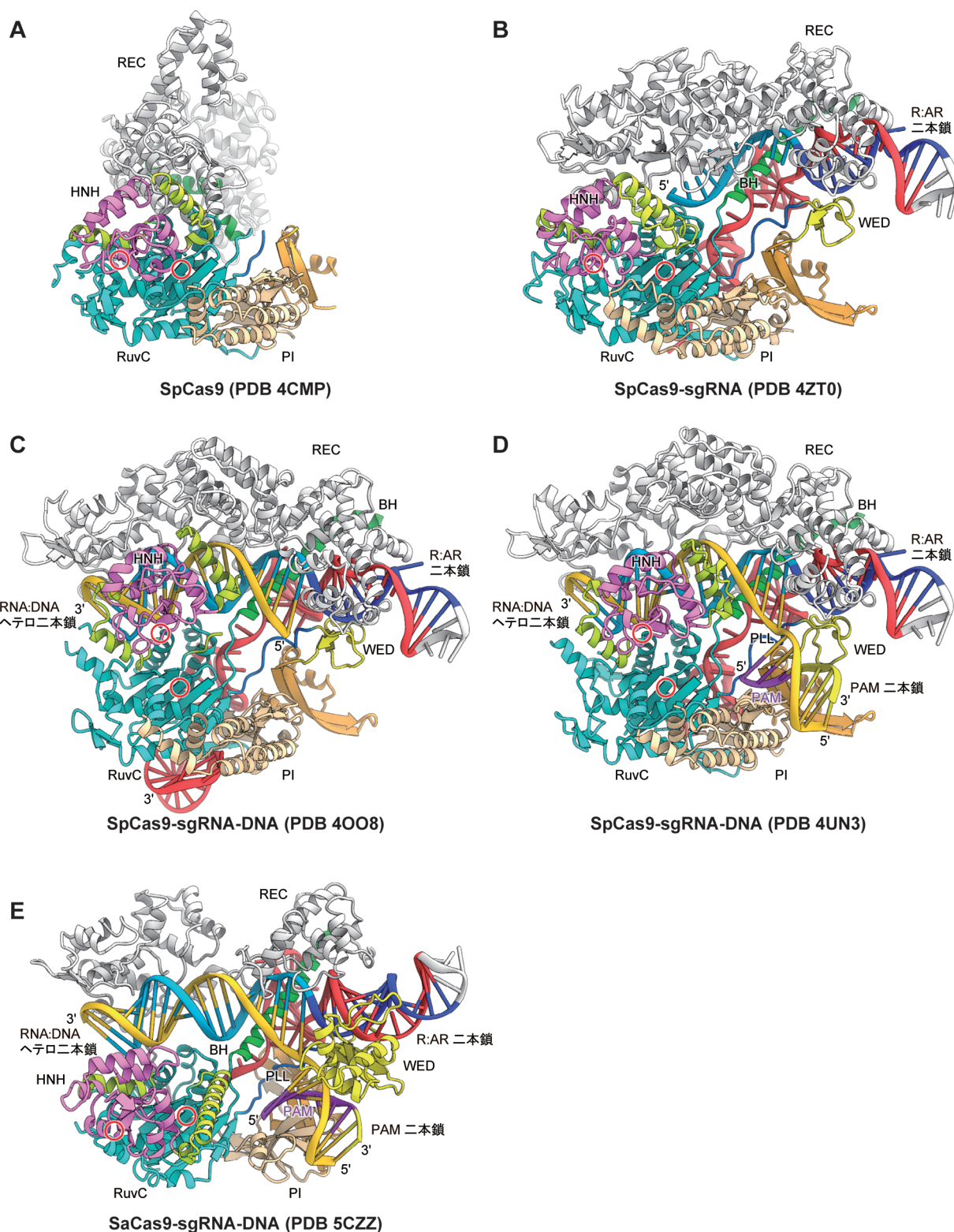


図3 Cas9の結晶構造

(A) SpCas9単体 (PDB 4CMP). (B) SpCas9-sgRNA複合体 (PDB 4ZT0). (C) SpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体 (PDB 4OO8). (D) SpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体 (PDB 4UN3). (E) SaCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体 (PDB 5CZZ). 酵素活性部位を赤色の丸で示した. R:ARはリピート:アンチリピート.

造から, SpCas9は二つのローブから構成されることが明らかになった. 一方のローブはほとんどが α ヘリックスからなる新規な構造を持ち, sgRNAおよび標的DNAの認識に関与していた. そこで, REC (recognition) ローブと命

名した. もう一方のローブは二つのヌクレアーゼドメイン (RuvCとHNH) を含んでいたことから NUC (nuclease) ローブと命名した. RuvCドメインとHNHドメインの活性部位は既知のヌクレアーゼと類似した構造をとっていたこ

とから, Cas9は既知のヌクレアーゼと同様の反応機構によって標的二本鎖DNAを切断すると考えられた。さらに, NUCローブは新規な α/β フォールドを持つC末端ドメインを含んでいた。C末端ドメインは非相補鎖DNA中のPAMと相互作用するのに適した位置に存在し, 変異体解析の結果から実際にPAMの認識に関与していることが明らかになった。そこで, C末端ドメインをPI (PAM-interacting) ドメインと命名した。RECローブとNUCローブはアルギニン残基に富む長い α ヘリックス (ブリッジヘリックス) によって連結されていた。HNHドメインはRuvCドメインに挿入されており, 二つのドメインはリンカー領域 (L1とL2) により連結されていた。HNHドメインは標的DNAと離れた位置に存在していたことから, この結晶構造は不活性型をとらえたものであり, 標的DNA切断のためにHNHドメインは構造変化することが示唆された。

crRNAに由来するガイド領域は相補鎖DNAとRNA:DNAヘテロ二本鎖を形成し, RECローブとNUCローブの間に結合していた。一方, crRNAに由来するリピート領域はtracrRNAに由来するアンチリピート領域とリピート:アンチリピート二本鎖を形成し, RECローブによって認識されていた。さらに, tracrRNAに由来する3'領域は三つのステムループを形成し, Cas9と広範囲に相互作用していた。これはsgRNAのステムループがDNA切断活性に重要であることと一致していた³²⁾。

2) SpCas9単体の結晶構造

筆者らがSpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体の結晶構造を報告するちょうど1週間前の2014年2月6日, Doudnaらのグループにより, SpCas9単体の結晶構造が報告された (図3A)⁶⁾。SpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体⁹⁾と異なり, SpCas9単体はRECローブとNUCローブが閉じた構造をとっていた。結晶構造と一致して, 電子顕微鏡単粒子解析からも, SpCas9単体は二つのローブが閉じた構造とる一方, SpCas9-RNA複合体およびSpCas9-RNA-DNA複合体は二つのローブが開いた構造をとることが明らかになった⁶⁾。これらの結果から, ガイド鎖RNAの結合によりSpCas9は閉じた不活性型から開いた活性型へと大きな

構造変化を起こすことが明らかになった。

3) SpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造

2014年7月, Jinekのグループにより, PAMを含むSpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造が報告された (図3D)⁸⁾。SpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体とSpCas9-sgRNA-相補鎖DNA複合体⁹⁾の全体構造はよく似ていた。SpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造から, SpCas9による5'-NGG-3' PAM認識機構が明らかになった。5'-TGG-3' PAMを含む非相補鎖DNAは相補鎖DNAと二本鎖 (PAM二本鎖) を形成しPIドメインと相互作用していた (図3D)。5'-TGG-3' PAMの1文字目のT塩基はCas9と相互作用していなかった一方, 5'-TGG-3' PAMの2文字目と3文字目のG塩基はPIドメインのArg1333とArg1335とそれぞれ水素結合を形成していた (図4A)。さらに, SpCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造から, 標的二本鎖DNAの巻き戻し機構が明らかになった (図5A)。RuvCドメインとPIドメインの間のPL (phosphate lock) ループは相補鎖DNAの+1リン酸基 (RNA:DNAヘテロ二本鎖とPAM二本鎖の間のリン酸基) と相互作用し, sgRNAのガイド領域と相補鎖DNAとの間の塩基対形成を促進していた。これは, Cas9がPAMを認識することにより標的二本鎖DNAの巻き戻しが誘導され, PAMの近傍側からRNA:DNAヘテロ二本鎖が形成されるという生化学的解析の結果と一致していた³³⁾。

4) SpCas9-sgRNA複合体の結晶構造

2015年6月, Doudnaのグループにより, SpCas9-sgRNA複合体の結晶構造が報告された (図3B)⁷⁾。SpCas9-sgRNA複合体はSpCas9-sgRNA-DNA複合体^{8,9)}と同様の開いた構造をとっていた。したがって, ガイド鎖RNAの結合によってCas9は不活性型から活性型へと構造変化することが確かめられた。sgRNAのガイド領域 (20塩基) のうちPAM近傍のシード領域 (10塩基) はA型ヘリックス構造をとりブリッジヘリックスと相互作用していた。一方, シード領域以外は結晶構造中においてディスオーダーしていた。これらの結果から, SpCas9-sgRNA複合体において

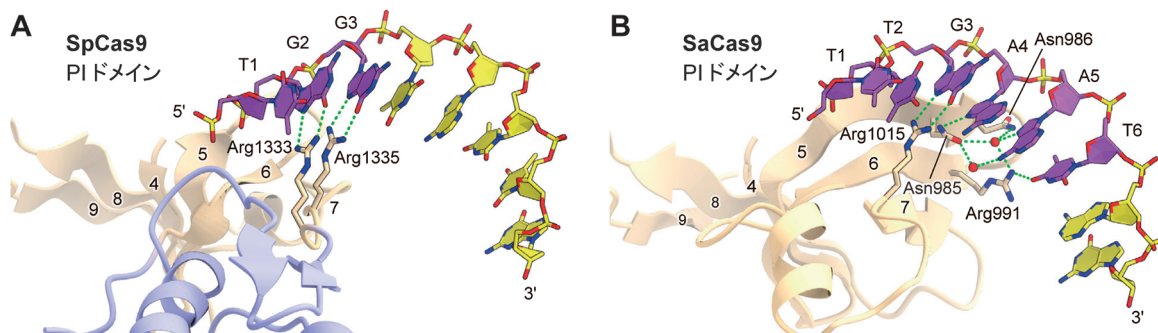


図4 PAM認識機構

(A) SpCas9によるPAM認識機構 (PDB 4UN3)。 (B) SaCas9によるPAM認識機構 (PDB 5CZZ)。水素結合を緑色の点線で示した。水分子を赤色の球で示した。非相補鎖DNAは省略した。

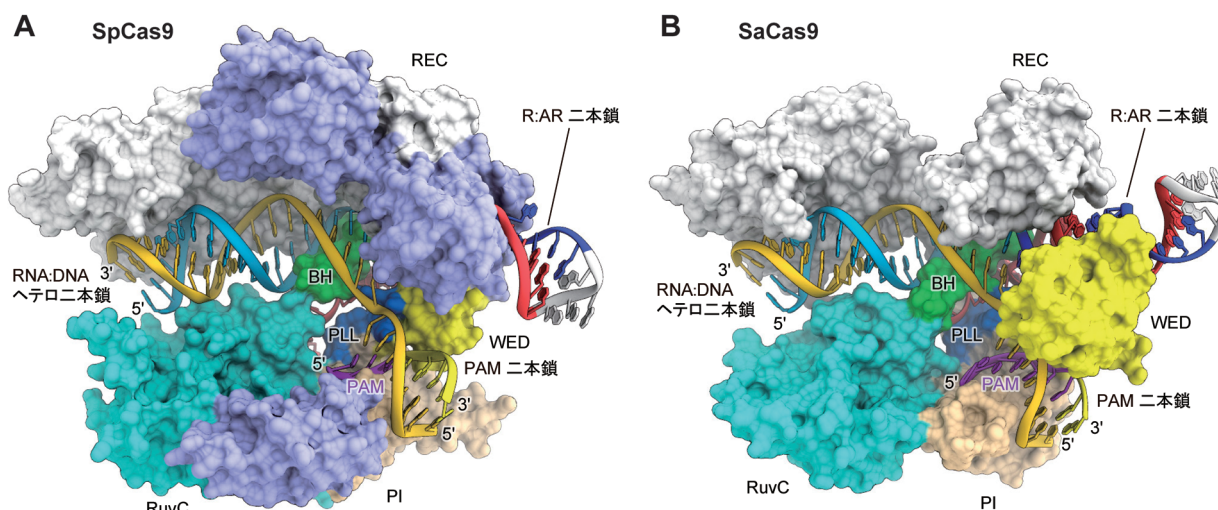


図5 SpCas9とSaCas9の構造比較

(A) SpCas9 (PDB 4UN3) の全体構造. (B) SaCas9 (PDB 5CZZ) の全体構造. SpCas9のRECローブおよびPIドメインに存在する挿入領域を薄い青色で示した. HNHドメインを省略した.

sgRNAのシード領域はあらかじめA型ヘリックス構造をとってCas9に結合しており、標的DNAとの塩基対形成の起点として働くことが明らかになった。これは、PAM近傍のシード領域の塩基対形成はCas9によるDNA切断活性に重要であるという結果と一致していた^{4,32)}。

4. SaCas9の結晶構造

1) SaCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造

ゲノム編集にはSpCas9が広く利用されているが、分子量が大きいためウイルスベクターへの導入効率が低いなどの問題点が残されていた。最近、SpCas9 (1368残基) よりも分子量が小さくウイルスベクターへの導入効率の高いSaCas9 (1053残基) が報告された⁵⁾。SpCas9が5'-NGG-3'をPAMとして認識する一方、SaCas9は5'-NNGRRT-3' (R=A/G) をPAMとして認識する。しかし、小型のSaCas9の作動機構は不明だった。

2015年8月、筆者らのグループはSaCas9-sgRNA-二本鎖DNA複合体の結晶構造を報告した (図3E)¹⁰⁾。SaCas9による5'-NNGRRT-3' PAM認識機構を解明するため、5'-TTGAAT-3' PAMおよび5'-TTGGGT-3' PAMを含む二つの複合体構造を決定した。SpCas9と同様に、SaCas9はRECローブとNUCローブから構成されていた (図3E)。NUCローブはRuvCドメイン、HNHドメイン、WEDドメイン、PIドメインから構成されていた。HNHドメインはRuvCドメインと二つのリンカー領域 (L1とL2) により連結されていた。sgRNAはガイド配列、リピート：アンチリピート二本鎖、ステムループ1から構成されていた。ガイド配列は相補鎖DNAとRNA：DNAヘテロ二本鎖を形成し、非相補鎖DNAは相補鎖DNAとPAM二本鎖を形成していた。

結晶構造から、SaCas9による5'-NNGRRT-3' PAM認識機構が明らかになった。5'-TTGAAT-3' PAM複合体と5'-

TTGGGT-3' PAM複合体の両方において、非相補鎖DNA中のPAMはPIドメインにより認識されていた (図3E)。1文字目と2文字目のT塩基はSaCas9と相互作用していなかった (図4B)。一方、5'-NNGRRT-3' PAMの3文字目がGであることと一致して、3文字目のG塩基はArg1015と2本の水素結合を形成していた。5'-TTGAAT-3' PAM複合体において、4文字目のA塩基のN7はAsn985と水素結合し、5文字目のA塩基のN7はAsn985/Asn986/Arg991と水分子を介して水素結合していた。一方、5'-TTGGGT-3' PAM複合体において、4文字目のG塩基のN7はAsn985と水素結合し、5文字目のG塩基のN7はAsn985/Asn986/Arg991と水分子を介して水素結合していた。したがって、SaCas9はプリン塩基に共通のN7と水素結合を形成し、5'-NNGRRT-3' PAMの4文字目、5文字目のプリン塩基を認識していることが明らかになった。さらに、6文字目のT塩基はArg991と水素結合していた。これは5'-NNGRRT-3' PAMの6文字目のTに対する嗜好性と一致していた。

2) SaCas9とSpCas9の比較

SaCas9とSpCas9の構造比較から、両者の間の類似点が明らかになった (図5)。SpCas9-sgRNA-標的DNA複合体^{8,9)}と同様に、SaCas9-sgRNA-標的DNA複合体は開いた構造をとり、RNA：DNAヘテロ二本鎖は二つのローブの間に結合していた。SpCas9と同様に、sgRNAのシード領域はブリッジヘリックスによって固定され、相補鎖DNAの+1リン酸基はPLループによって認識されていた。したがって、sgRNA依存的な標的DNA認識機構はSaCas9とSpCas9において保存されていることが明らかになった。

SaCas9とSpCas9の構造比較から、両者の間の相違点も明らかになった (図5)。異なる生物種のCRISPR-Cas9システムにおいて、リピート：アンチリピート二本鎖の

塩基配列は異なり、Cas9オルソログはそれぞれのガイド鎖RNAを特異的に認識する⁵⁾。これはCas9とガイド鎖RNAの直交性と呼ばれる。結晶構造から、SaCas9とSpCas9は構造の異なるRECドメインとWEDドメインを持ち、sgRNAのリピート：アンチリピート二本鎖およびステムループ1を特異的に認識していることが明らかになった(図5)。Cas9オルソログにおいてWEDドメインのアミノ酸配列は多様であることから、WEDドメインはCas9とガイド鎖RNAの直交性の決定に貢献していることが示唆された。さらに、SaCas9とSpCas9の構造比較から、PIドメインの配列保存性は低いにも関わらず、共通のコアフォールドを持つことが明らかになった(図4)。しかし、SpCas9(5'-NGG-3')とSaCas9(5'-NNGRRRT-3')が異なるPAMを認識することと一致して、SpCas9とSaCas9のPAM認識残基の種類と配置は異なっていた。

5. Cas9の作動機構

結晶構造解析および生化学的解析から、以下のような分子機構によりCas9はsgRNA依存的に標的二本鎖DNAを切断すると考えられる。(1)Cas9-sgRNA複合体は標的DNA中のPAMと結合する。(2)PAM近傍から二本鎖DNAが巻き戻されガイド配列と塩基対が形成される。(3)HNHドメインがRNA:DNAヘテロ二本鎖中の相補鎖DNAを切断し、RuvCドメインが一本鎖になった非相補鎖DNAを切断する。これまでに決定されたCas9-sgRNA-標的DNA複合体の結晶構造において、HNHドメインは標的DNAと離れているため、HNHドメインがどのように標的DNAを切断するかは不明である。Cas9の活性化機構の理解にはさらなる研究が必要である。

6. おわりに

2012年にCas9の生化学的な機能が報告⁴⁾されてからわずか3年の間にCRISPR-Cas9を利用したゲノム編集は広く普及した。さらに、結晶構造によりCas9の作動機構が解明され、立体構造に基づいた新規のツールも開発されている。異なる原核生物に由来するCas9オルソログは異なるガイド鎖RNAおよびPAM配列を認識する。今後、Cas9オルソログの構造解析により、多様なガイド鎖RNAおよびPAM認識機構が解明されることが期待される。これらの構造情報はゲノム編集への応用においても重要であると考えられる。

最近、V型CRISPR-Casシステムに関与するRNA依存性DNAヌクレアーゼCpfIが発見され、新たなゲノム編集ツールとして注目されている³⁴⁾。CpfIはCas9と以下の点異なる。(1)Cas9は二つのヌクレアーゼドメイン(RuvCとHNH)を持つのに対し、CpfIはRuvCドメインのみを持つ。(2)Cas9は二つのガイド鎖RNA(crRNAとtracrRNA)を利用するのに対し、CpfIはcrRNAのみをガイド鎖RNA

として利用する。(3)Cas9による切断部位は平滑末端であるのに対し、CpfIによる切断部位は突出末端である。CpfIの結晶構造から、Cas9とCpfIの作動機構の類似点・相違点が明らかになることが期待される。さらに、CpfIの構造情報に基づく新たなゲノム編集ツールの開発も期待される。

謝辞

本研究は、東京大学大学院理学系研究科濡木研究室において、MITのFeng Zhang博士のグループとの共同研究として行われました。CRISPR-Cas9の構造解析に挑戦する機会と最高の研究環境を与えてくれた濡木理教授に心より感謝いたします。SPRING-8のBL32XU, BL41XU, SLS PXIのビームラインスタッフの方々にはX線回折実験の際に大変お世話になりました。最後に、研究の重要性を理解し、研究に没頭できる環境を与えてくれた家族に感謝いたします。

文 献

- 1) Marraffini, L.A. (2015) *Nature*, **526**, 55–61.
- 2) Hsu, P.D., Lander, E.S., & Zhang, F. (2014) *Cell*, **157**, 1262–1278.
- 3) Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2014) *Science*, **346**, 1258096.
- 4) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2012) *Science*, **337**, 816–821.
- 5) Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A., & Zhang, F. (2015) *Nature*, **520**, 186–191.
- 6) Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E., & Doudna, J.A. (2014) *Science*, **343**, 1247997.
- 7) Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S., & Doudna, J.A. (2015) *Science*, **348**, 1477–1481.
- 8) Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014) *Nature*, **513**, 569–573.
- 9) Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014) *Cell*, **156**, 935–949.
- 10) Nishimasu, H., Cong, L., Yan, W.X., Ran, F.A., Zetsche, B., Li, Y., Kurabayashi, A., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2015) *Cell*, **162**, 1113–1126.
- 11) Konermann, S., Brigham, M.D., Trevino, A.E., Joung, J., Abudayyeh, O.O., Barcena, C., Hsu, P.D., Habib, N., Gootenberg, J.S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015) *Nature*, **517**, 583–588.
- 12) Zetsche, B., Volz, S.E., & Zhang, F. (2015) *Nat. Biotechnol.*, **33**, 139–142.
- 13) Wright, A.V., Sternberg, S.H., Taylor, D.W., Staahl, B.T., Barad, J.A., Kornfeld, J.E., & Doudna, J.A. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2984–2989.
- 14) Nihongaki, Y., Kawano, F., Nakajima, T., & Sato, M. (2015) *Nat. Biotechnol.*, **33**, 755–760.
- 15) Kleinstiver, B.P., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Topkar, V.V., Nguyen, N.T., Zheng, Z.L., Gonzales, A.P.W., Li, Z.Y., Peterson, R.T., Yeh, J.R.J., Aryee, M.J., & Joung, J.K. (2015) *Nature*, **523**, 481–485.

- 16) Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., & Horvath, P. (2007) *Science*, **315**, 1709–1712.
- 17) Nunez, J.K., Lee, A.S., Engelman, A., & Doudna, J.A. (2015) *Nature*, **519**, 193–198.
- 18) Zhao, H., Sheng, G., Wang, J., Wang, M., Bunkoczi, G., Gong, W., Wei, Z., & Wang, Y. (2014) *Nature*, **515**, 147–150.
- 19) Mulepati, S., Heroux, A., & Bailey, S. (2014) *Science*, **345**, 1479–1484.
- 20) Jackson, R.N., Golden, S.M., van Erp, P.B., Carter, J., Westra, E.R., Brouns, S.J., van der Oost, J., Terwilliger, T.C., Read, R.J., & Wiedenheft, B. (2014) *Science*, **345**, 1473–1479.
- 21) Osawa, T., Inanaga, H., Sato, C., & Numata, T. (2015) *Mol. Cell*, **58**, 418–430.
- 22) Taylor, D.W., Zhu, Y., Staals, R.H., Kornfeld, J.E., Shinkai, A., van der Oost, J., Nogales, E., & Doudna, J.A. (2015) *Science*, **348**, 581–585.
- 23) Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011) *Nature*, **471**, 602–607.
- 24) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. (2013) *Science*, **339**, 819–823.
- 25) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., & Church, G.M. (2013) *Science*, **339**, 823–826.
- 26) Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013) *eLife*, **2**, e00471.
- 27) Zalatan, J.G., Lee, M.E., Almeida, R., Gilbert, L.A., Whitehead, E.H., La Russa, M., Tsai, J.C., Weissman, J.S., Dueber, J.E., Qi, L.S., & Lim, W.A. (2015) *Cell*, **160**, 339–350.
- 28) Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C., Qi, L.S., Kampmann, M., & Weissman, J.S. (2014) *Cell*, **159**, 647–661.
- 29) Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., & Huang, B. (2013) *Cell*, **155**, 1479–1491.
- 30) Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S., & Qi, L.S. (2013) *Cell*, **154**, 442–451.
- 31) Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., & Lim, W.A. (2013) *Cell*, **152**, 1173–1183.
- 32) Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., & Zhang, F. (2013) *Nat. Biotechnol.*, **31**, 827–832.
- 33) Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., & Doudna, J.A. (2014) *Nature*, **507**, 62–67.
- 34) Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V., & Zhang, F. (2015) *Cell*, **163**, 759–771.

著者寸描

●西増 弘志 (にします ひろし)



東京大学大学院理学系研究科助教, JST さきがけ研究者, 博士 (農学)。

■略歴 1979年北海道に生る。2002年東京大学農学部卒業。07年同大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻博士課程修了。同年東京工業大学生命理工学研究科特任助教。08年東京大学医科学研究所基礎医科学部門助教。10年東京大学大学院理学系研究科特任助教。13年より現職。

14年JST さきがけ研究者 (兼任)。

■研究テーマと抱負 CRISPR-Cas9, RNAサイレンシング。たった一度の人生, やりたいことを貫きたい。

■ウェブサイト <http://www.nurekilab.net>

■趣味 研究, ボクシング (C級ボクサー)。