

CRISPR-Cas と OMEGA システムの分子基盤

平野 清一

1. はじめに

生物のゲノムにはさまざまな機能を持ったシステムがコードされており、人類に有用な基盤技術として利用されることがある。本稿では、生命科学を中心としたさまざまな分野に影響を与える CRISPR-Cas と呼ばれるシステム、および、CRISPR-Cas とともに注目を集める OMEGA と呼ばれるシステムについて、それぞれの分子基盤を解説する。

2. CRISPR-Cas

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR associated) システムは原核生物に備わる生体防御機構である¹⁾(図1A)。宿主がウイルスやプラスミドに侵入されたとき、侵入者の配列情報は CRISPR-Cas システムに記録される。宿主は記録された配列情報と Cas タンパク質を用いて、侵入者を無力化する。このように、宿主は CRISPR-Cas システムを用いて、侵入者の配列情報から免疫を獲得する。

後述する OMEGA システムと関連が深い II 型の CRISPR-Cas システムでは、Cas9 タンパク質が侵入者の DNA (以下、外来 DNA と呼ぶ) を切断する¹⁾(図1B)。Cas9 は、外来 DNA の配列情報を含む crRNA (CRISPR RNA) と機能的な足場を形成する tracrRNA (*trans*-activating crRNA) と協働して、外来 DNA を標的とする。このとき、標的配列 (protospacer) が crRNA のガイド配列 (spacer) と相補性を持つことに加えて、PAM (protospacer adjacent motif) と呼ばれる塩基モチーフが標的配列の近傍にあることが必要である。CRISPR-Cas システムに記録する外来 DNA を選ぶときは PAM を近傍に持つようにしている一方で、記録する

ときには PAM はトリミングされる^{2,3)}。したがって、Cas9 は外来 DNA を記録した宿主の DNA (PAM を持たない) は認識せず、外来 DNA (PAM を持つ) だけを標的とし、切断する。このように、Cas9 は II 型の CRISPR-Cas システムで中心的役割を果たす。

3. Cas9 の作動機構

Cas9 の作動機構が生化学解析、構造解析、動態解析より明らかになった⁴⁾(図1C)。Cas9 は標的 DNA を認識する REC ロープと標的 DNA を切断する NUC ロープに分かれ、REC ロープは α ヘリックスに富んだ Cas9 独自のフォールディングを形成し、NUC ロープは二つのヌクレアーゼドメイン (RuvC, HNH ドメイン) と二つの新規ドメイン (WED, PI ドメイン) から構成される。Cas9 が WED と PI ドメインによって形成される溝で標的 DNA の PAM 配列を認識した後、Cas9 と協働する crRNA が標的 DNA と塩基対を形成する。crRNA と標的 DNA で形成される RNA-DNA ヘテロ二本鎖が REC ロープによって認識されることで、NUC ロープの二つのヌクレアーゼドメインが活性化されて標的 DNA の二本鎖切断が行われる。

4. Cas9 の応用

Cas9, crRNA, tracrRNA のエンジニアリングによって Cas9 は生命科学と医療の分野で応用されるようになった¹⁾。crRNA と tracrRNA からなるガイド RNA と Cas9 を導入することによってヒト細胞やモデル生物のゲノムを編集することができる。Cas9 がゲノムの標的部位を二本鎖切断した後、DNA 修復によってランダムに塩基を挿入、欠損させたり、特定の塩基配列を挿入したりすることができる。Cas9 の二つのヌクレアーゼドメインの両方を不活性化した dCas9 に各種エフェクタータンパク質を融合、リクルートすることによって、ゲノムの標的部位を転写制御、エピジェネティック修飾することができる。Cas9 の片方のヌクレアーゼドメインを不活性化した Cas9 ニッカーゼに脱アミノ化酵素や逆転写酵素を融合させることによって、ゲノムの標的部位の塩基編集やプライム編集を行える⁵⁾。Cas9 を用いたゲノム編集により、疾患モデル細胞、動物が簡便に作製できるようになった他、病原性変異修復、有

ブロード研究所 (マサチューセッツ州ケンブリッジ市エイムス街 75 番地)

Molecular basis of CRISPR-Cas and OMEGA systems

Seiichi Hirano (Broad Institute, 75 Ames street, Cambridge, MA, USA)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950632

© 2023 公益社団法人日本生化学会

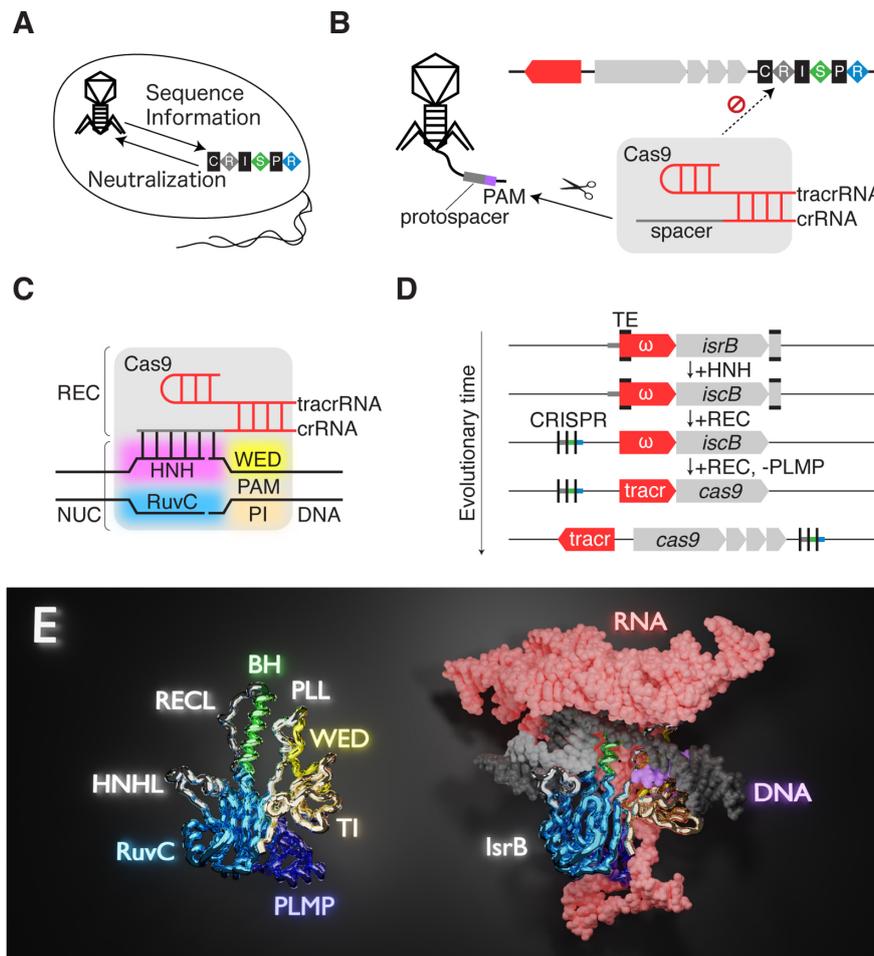


図1 Cas9の機能, 構造, 進化

(A) 生体防御機構 CRISPR-Cas システム. (B) II 型の CRISPR-Cas システム. (C) Cas9 の作動機構. (D) Cas9 と関連する遺伝子座の変遷. TE: トランスポゾン末端領域. ω : ω RNA をコードする領域. (E) IsrB- ω RNA-標的 DNA 複合体の構造. ω RNA のガイド配列, 標的 DNA の TAM 配列を灰色, 紫色で示した.

用変異導入, 免疫細胞改変による治療が可能となった. 実例として, 鎌状赤血球症患者に対し, *BCL11A* 遺伝子のエンハンサー領域を Cas9 でゲノム編集した造血幹細胞を移植して有効な結果を得ている⁶⁾.

5. Cas9の進化—IscBとIsrB

近年, ゲノミクスの分野において, 細菌のゲノムが年間数千件, メタゲノムではさらに多くのデータが公共レポジトリに登録され続けており, 技術革新のための生体高分子が探索されている. Cas9 の特徴であるブリッジヘリックス (REC, NUC ロープを連結する α ヘリックス, BH), および, 二つのヌクレアーゼドメイン (RuvC と HNH) を持つ IscB (insertion sequences Cas9-like ORF B) と呼ばれるタンパク質が IS200/605 トランスポゾンにコードされていることが発見され, Cas9 の祖先にあたと推定された⁷⁾. このトランスポゾンから RuvC ドメインと BH を持つ IsrB

(insertion sequences RuvC-like ORF B) も発見された.

当研究室は IscB, IsrB とノンコーディング RNA の関連および機能を解明した⁸⁾ (図 1D). crRNA がコードされている CRISPR アレイを近傍に持つ *iscB* 遺伝子を発見し, この遺伝子産物を CasIscB (CRISPR-associated IscB) と命名した. CasIscB は CRISPR アレイと *iscB* 遺伝子の中間領域より発現するノンコーディング RNA と crRNA に関わり, Cas9 のように, crRNA のガイド配列を利用して標的 DNA を切断する. CRISPR アレイを持たない *iscB* 遺伝子座では IscB と関わる RNA がトランスポゾンの末端領域から *iscB* 遺伝子にかけてコードされ, *iscB* 遺伝子を持つ微生物で発現している. これを ω RNA と命名した. CasIscB の RNA と ω RNA は同様の二次構造を持ち, 特にガイド配列の近傍の二本鎖領域が保存されている⁹⁾. 当研究室は ω RNA にガイド配列を追加することで, IscB が任意の DNA を切断することができることを示した⁸⁾. 同様に, IsrB はガイド配列の追加された ω RNA を利用して標的 DNA を一本鎖切断

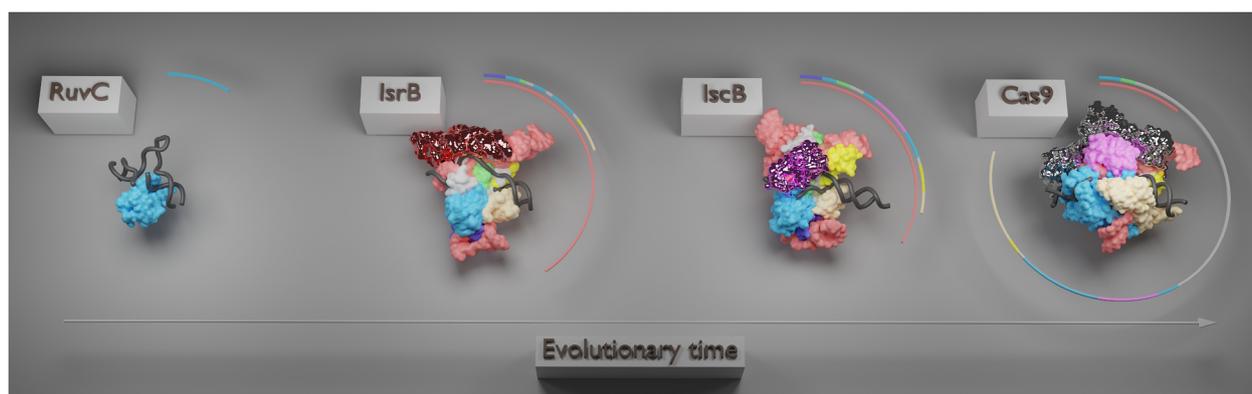


図2 Cas9と関連するヌクレアーゼの分子進化

PDB番号6S16 (RuvC), 8CSZ (IscB), 7S4X (Cas9) を使用. 円グラフでタンパク質, RNAの分子量を示した. 分子進化で獲得され, ヌクレアーゼの機能を改変, 向上させた領域を光沢で示した.

し, ニックを導入することができる. IscB, IsrBはCas9にはないPLMPドメインを持ち, TAM (target adjacent motif) と呼ばれる塩基モチーフを含む標的DNAを, それぞれ二本鎖切断, 一本鎖切断することができる. このような特徴を持ち, ω RNAとともにトランスポゾンにコードされたRNA依存性エンドヌクレアーゼをOMEGA (obligate mobile element guided activity) システムと命名した.

CRISPR-CasとOMEGAシステムの進化的関連を調べるため, IscB, IsrB, Cas9を系統解析したところ, 三つのヌクレアーゼは共通の進化系譜より発生したことがわかった⁸⁾. IsrBは系統樹における発生初期の位置にあり, ほとんどすべてのIsrBが ω RNAを持っていたことから, OMEGAシステムは, RuvCエンドヌクレアーゼが挿入配列および ω RNAを得て進化したRNA依存性エンドヌクレアーゼIsrBに始まり, HNHドメインの獲得によって進化したIscBへ変遷したことが示唆された. IscBの進化の中でCasIscBはまれに現れ, このときCasIscBへのRECローブ様ドメイン挿入とCRISPRアレイとの相関が同時に起こっている. PLMPドメインを欠いたCasIscBからCas9ファミリーが発生した. 発生初期のCas9のtracrRNAが有意にCasIscBの ω RNAと類似していたことから, tracrRNAは ω RNAから進化したことが示唆された. このように, OMEGAからCRISPR-Casシステムにかけて, エフェクターのヌクレアーゼとそれに関わるRNAが共進化していることが明らかになった.

6. IsrBの構造

IsrBは, Cas9と異なるドメイン, RNA構造を持つ一方で, Cas9と同様のRNA依存的なDNA標的機構を成立させており, その分子機構は不明であった. そこで著者らは, IsrB, ω RNA, 標的DNAからなる複合体の立体構造を

決定した¹⁰⁾ (図1E). 立体構造と変異体解析の結果から, IsrBの機能性ドメイン, モチーフを決定した. RuvCドメインは, 三つの触媒モチーフ (RuvC I-III) の間に, 三つの配列 (BH, A, B) を持つ. 配列Aは, BHとRuvC IIの間をわずか17残基でショートカットするリンカーであり, Cas9では350から800残基ほどのRECローブに置き換えられるため, RECLと命名した. RuvC IIとIIIの間にある配列Bは, ループと α ヘリックスからなる単純なリンカーで, Cas9ではHNHドメインに置き換えられるため, HNHLと命名した. C末端の三つの領域はTAMを含むDNA二重鎖に結合しており, Cas9と類似の機能を持っていたため, PLL (phosphate lock loop), WEDドメイン, TI (TAM-interacting) ドメインと命名した. PLMPドメインは, β シートと α ヘリックスからなり, 翻訳開始因子IF3のN末端ドメインと似た構造を持つ¹¹⁾. PLMPドメインは, RuvCドメインとTIドメインの両方と広範囲に相互作用しており, その機能を支えることが示唆された.

ω RNAは, 標的DNAと対合するガイド部位とスカフォールド部位から構成されている. ω RNAスカフォールドでは, 10個のRNAヘリックスがシュードノットやスタッキング相互作用を介して球状構造をとっていた. ω RNAが自律的に球状構造を形成し, 足場として機能すれば, エフェクタータンパク質はRNAの折りたたみや機能をサポートする補助モチーフやドメインを必要としないため, OMEGAシステムにとって有益であると考えられる. さらに, もし球状構造がRNA分解に対する抵抗力を持つなら, ω RNAがエフェクタータンパク質とトランスで機能することを促進する可能性もある. この可能性は, 異なる遺伝子座にコードされたIscBと機能することができる自律的な ω RNAの発見によって支持されている⁸⁾. ω RNAの5'末端ステム領域には, シュードノットを形成するヘアピンが挿入されており, 球状構造形成に寄与し

ていた。CRISPR-Cas システムへの進化の過程で、5'末端領域がCRISPRアレイの配列に適合することで、機能的なCas9-crRNA-tracrRNA複合体の形成が可能になったと考えられる。 ω RNAの3'末端はIsrBのN末端に向かってのびており、二つのヘアピンがPLMPドメインと相互作用していた。このヘアピンにはIsrBコード領域上流のShine-Dalgarno配列が含まれていることから、IsrBと ω RNAの相互作用がIsrB発現制御に寄与する可能性が示された。

IsrBの構造から、RNA依存的なDNA標的機構の起源が明らかになった。さらに、IscB、Cas9との構造比較から、OMEGAからCRISPR-Casシステムにかけてどのようにこの機構が変遷したか明らかになった^{12,13)}(図2)。まず、RuvCヌクレアーゼにさまざまなモチーフ、ドメインが挿入されたIsrBが、 ω RNAと協働することによって、DNAを標的とすることができるようになった。WED、TIドメインがDNAの塩基モチーフを認識し、PLLやBHと協働することによってDNAをほどくことができる。このとき、 ω RNAスカフォールドが直接DNAを認識することによって標的DNAが選択される。IscBでは ω RNAスカフォールドが縮退し、HNHドメインを獲得することによって、よりタンパク質に依存したDNA標的機構へ移行する。Cas9ではRNAの構成が変わり、RECローブを獲得することによってタンパク質によるDNA標的機構が確立する。以上、立体構造からCRISPR-Casの進化について理解が深まった。OMEGAシステムはかさ高いRNAを利用することによって、エフェクターヌクレアーゼの機能をRNAに移行し、ヌクレアーゼの小型化を可能にしている。今後はIsrB、IscBの構造情報を利用して、塩基編集、プライム編集のためのエフェクタータンパク質を開発し、生命科学や医療に有用な基盤技術を発展させることが期待される¹⁴⁾。

文 献

- Zhang, F. (2019) Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Q. Rev. Biophys.*, **52**, e6–e6.
- Heler, R., Samai, P., Modell, J.W., Weiner, C., Goldberg, G.W., Bikard, D., & Marraffini, L.A. (2015) Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*, **519**, 199–202.
- Wang, J.Y., Tuck, O.T., Skopintsev, P., Soczek, K.M., Li, G., Al-Shayeb, B., Zhou, J., & Doudna, J.A. (2023) Genome expansion by a CRISPR trimmer-integrase. *Nature*, **618**, 855–861.
- Wang, J.Y., Pausch, P., & Doudna, J.A. (2022) Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nat. Rev. Microbiol.*, **20**, 641–656.
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., et al. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, **576**, 149–157.
- Mehta, J. (2021) CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N. Engl. J. Med.*, **384**, e91.
- Kapitonov, V.V., Makarova, K.S., & Koonin, E.V. (2015) ISC, a novel group of bacterial and archaeal DNA transposons that encode Cas9 homologs. *J. Bacteriol.*, **198**, 797–807.
- Altae-Tran, H., Kannan, S., Demircioglu, F.E., Oshiro, R., Nety, S.P., McKay, L.J., Dlakić, M., Inskip, W.P., Makarova, K.S., Macrae, R.K., et al. (2021) The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science*, **374**, 57–65.
- Weinberg, Z., Perreault, J., Meyer, M.M., & Breaker, R.R. (2009) Exceptional structured noncoding RNAs revealed by bacterial metagenome analysis. *Nature*, **462**, 656–659.
- Hirano, S., Kappel, K., Altae-Tran, H., Faure, G., Wilkinson, M.E., Kannan, S., Demircioglu, F.E., Yan, R., Shiozaki, M., Yu, Z., et al. (2022) Structure of the OMEGA nickase IsrB in complex with ω RNA and target DNA. *Nature*, **610**, 575–581.
- Biou, V., Shu, F., & Ramakrishnan, V. (1995) X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact alpha/beta domains linked by an alpha-helix. *EMBO J.*, **14**, 4056–4064.
- Schuler, G., Hu, C., & Ke, A. (2022) Structural basis for RNA-guided DNA cleavage by IscB- ω RNA and mechanistic comparison with Cas9. *Science*, **376**, 1476–1481.
- Bravo, J.P.K., Liu, M.S., Hibshman, G.N., Dangerfield, T.L., Jung, K., McCool, R.S., Johnson, K.A., & Taylor, D.W. (2022) Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9. *Nature*, **603**, 343–347.
- Aliaga Goltsman, D.S., Alexander, L.M., Lin, J.L., Fregoso Ocampo, R., Freeman, B., Lamothe, R.C., Perez Rivas, A., Temoche-Diaz, M.M., Chadha, S., Nordenfelt, N., et al. (2022) Compact Cas9d and HEARO enzymes for genome editing discovered from uncultivated microbes. *Nat. Commun.*, **13**, 7602.

著者寸描

●平野 清一 (ひらの せいいち)

ブロード研究所 博士研究員、博士 (理学)。

■略歴 2020年3月東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻にて博士号取得。同年7月より現職。

■研究テーマ CRISPR-Cas9の構造と機能。