

Cas7-11-Csx29ヌクレアーゼ-プロテアーゼ複合体の構造, 機能, 応用

西増 弘志^{1,2}

1. CRISPR-Cas獲得免疫システム

原核生物のもつCRISPR-Cas獲得免疫システムでは、多様なCas酵素がガイドRNAと協働し、ウイルスなどの外来核酸に対する防御を担っている。Cas酵素はガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAの一部(ガイド配列)と相補的な核酸を認識・切断する。Cas酵素の種類に基づき、CRISPR-Casシステムは二つのクラス(クラス1とクラス2)に分類される¹⁾。クラス1システムでは、複数のCasタンパク質とガイドRNAからなるエフェクター複合体が外来核酸の分解に関与する。一方、クラス2システムでは、一つのCasタンパク質とガイドRNAからなるエフェクター複合体が外来核酸を切断する。クラス1システムは三つのタイプ(I型, III型, IV型)に分類される一方、クラス2システムは三つのタイプ(II型, V型, VI型)に分類される。さらに、これらは複数のサブクラスに分類される。

II型システムに関与するCas9はガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAと相補的な二本鎖DNAを切断する²⁾。2013年、Cas9とガイドRNAを哺乳類細胞に導入することにより、狙った位置でゲノムDNAを切断し周辺の塩基配列を書き換える「ゲノム編集技術」が報告された³⁾。それ以降、CRISPR-Cas9は生命科学の基礎研究から動植物の品種改良や遺伝子治療といった応用に至るさまざまな分野において革新的なゲノム編集ツールとして広く利用されている。また、V型システムに関与するCas12はRNA依存

性DNA切断酵素として機能する一方⁴⁾、VI型システムに関与するCas13はRNA依存性RNA切断酵素として機能する⁵⁾。このようにCas酵素は異なるユニークな活性を持つため、ゲノム編集や転写制御、RNAノックダウン、RNA検出などさまざまな新規技術に応用されている。

2. III-E型CRISPR-Casシステム

*Desulfonema ishimotonii*などの細菌のゲノムに存在するIII-E型CRISPR-Cas領域には、ガイドRNA(CRISPR RNA)に加え、5種類のタンパク質(Cas7-11, Csx29, Csx30, Csx31, RpoE)がコードされており、これらが協働して抗ウイルス防御を担っていることが示唆されていた⁶⁾(図1)。興味深いことに、Cas7-11タンパク質はクラス1に分類されるが、他のクラス1のエフェクター複合体は複数のCasタンパク質から構成されるのに対し、Cas7-11は四つのCas7ドメイン(Cas7.1~Cas7.4)と一つのCas11ドメインからなる一つのタンパク質である。Csx29はプロテアーゼとアミノ酸配列の類似性を持ち、Cas7-11と複合体を形成することが報告されていたが、実際にCsx29がプロテアーゼ活性を持つかは不明だった⁷⁾。Csx30とCsx31は既知のタンパク質と配列類似性を持たないため、それらの機能は謎に包まれていた。また、RpoEはシグマ因子として転写制御に関与する可能性が示唆されていたが、その役割は不明だった。

2021年、生化学的解析により、*D. ishimotonii*由来Cas7-11はガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAと相補的な一本鎖RNAを2か所で切断するRNA依存性RNA切断酵素であることが報告された⁶⁾(図1)。さらに、Cas7-11は標的RNAを特異的に切断し哺乳類細胞においても機能することから、細胞毒性の低い新規のRNAノックダウンツールとして利用できることが示された⁶⁾。しかし、Cas7-11は新規のタンパク質であり、立体構造も不明であるため、その標的RNA切断機構は不明だった。

3. Cas7-11-ガイドRNA-標的RNA複合体の構造解析

Cas7-11のRNA切断機構を解明するために、筆者らはクライオ電子顕微鏡を用いて、Cas7-11-ガイドRNA-標的RNA複合体の立体構造を決定した⁸⁾(図2)。構造解析の結果、Cas7-11は四つのCas7ドメイン(Cas7.1~Cas7.4)と

¹ 東京大学先端科学技術研究センター (〒153-8904 東京都目黒区駒場4-6-1)

² 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

Structure, function, and engineering of Cas7-11-Csx29 nuclease-protease complex

Hiroshi Nishimasu^{1,2} (¹Structural Biology Division, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan, ²Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)
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.2023.950640

© 2023 公益社団法人日本生化学会

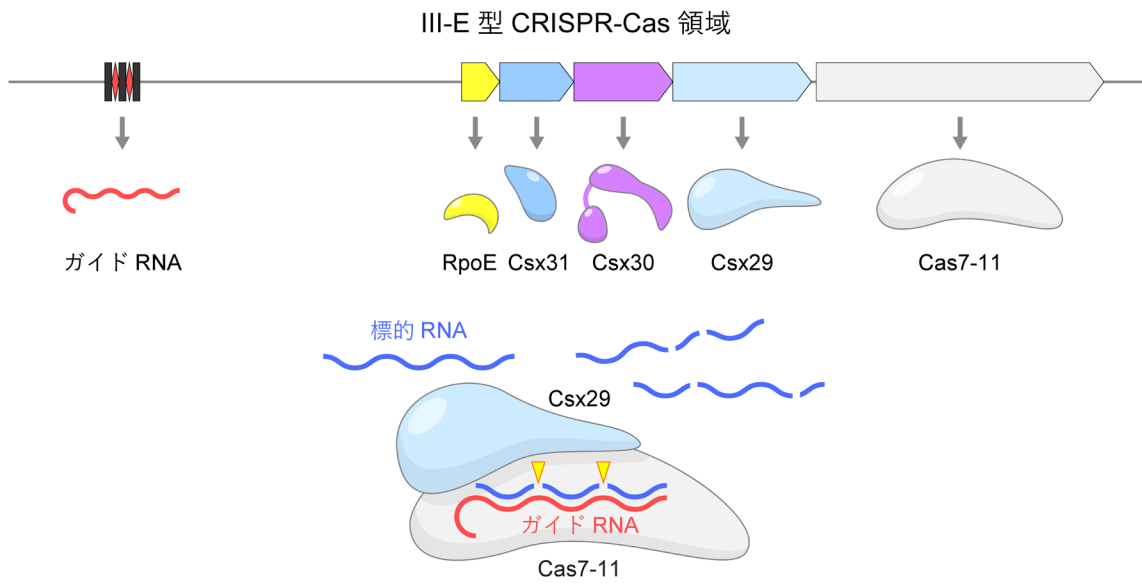


図1 III-E型 CRISPR-Cas 領域, および, Cas7-11による標的 RNA 切断
標的 RNA の切断部位を黄色の三角形で示した.

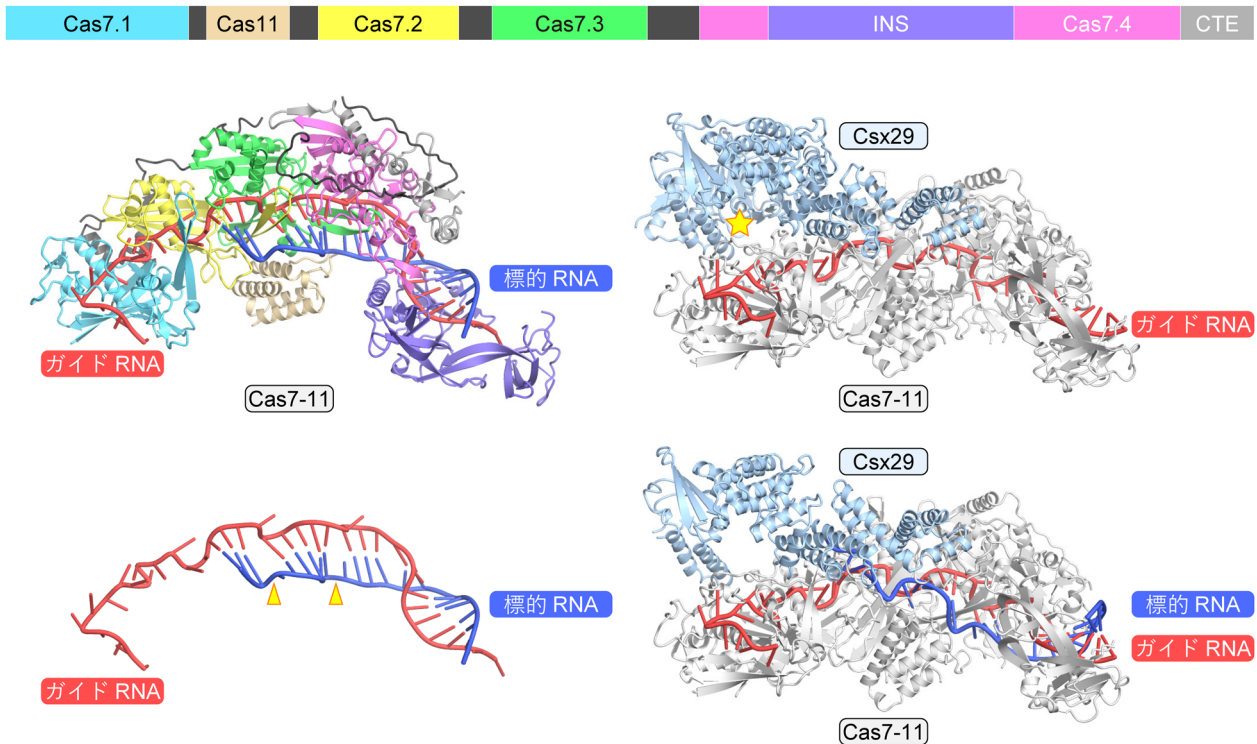


図2 Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体, Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体, および, Cas7-11-ガイド RNA-Csx29-標的 RNA 複合体の立体構造

L1~L4 リンカー領域を灰色で示した。標的 RNA の切断部位を黄色の三角形で示した。Csx29 の活性部位を星印で示した。Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体では, Csx29 の活性部位は分子内に埋もれている。一方, Cas7-11-ガイド RNA-Csx29-標的 RNA 複合体では, Csx29 の活性部位の密度は観察されなかった。したがって, 標的 RNA が Cas7-11-Csx29 複合体に結合すると, Csx29 と Cas7-11 との間の相互作用が弱まり, Csx29 の活性部位が構造変化し, Csx30 を認識できるようになると考えられる。

Cas11ドメインに加えて、INS (insertion) ドメインとCTE (C-terminal extension) ドメインからなり、それぞれのドメインが四つのリンカー領域 (L1~L4) でつながった特徴的な立体構造を持つことが明らかになった。Cas7.4ドメインの挿入配列はINSドメインを形成していた。INSドメインは低温ショックタンパク質と類似した構造を持ち、RNAと相互作用していた。ガイドRNAの5'領域 (特定の15塩基からなる) はCas7.1ドメインとCas7.2ドメインによって配列特異的に認識されていた。一方、ガイドRNAのガイド領域 (任意の23塩基からなる) は標的RNAと対合し、Cas7.2ドメイン、Cas7.3ドメイン、Cas7.4ドメイン、Cas11ドメイン、および、INSドメインによって認識されていた。興味深いことに、ガイドRNA-標的RNAの4番目、10番目の塩基はそれぞれCas7.2ドメイン、Cas7.3ドメインとの相互作用によって外側を向き、切断されるホスホジエステル結合の近傍に触媒残基であるD429 (Cas7.2ドメイン) とD654 (Cas7.3ドメイン) が位置していることが明らかになった。in vitroにおけるRNA切断実験から、D429とD654はそれぞれ標的RNAの塩基3と塩基4との間、および、塩基9と塩基10との間のホスホジエステル結合の切断に関与することが確認された⁸⁾。以上の構造機能解析から、Cas7-11-ガイドRNA複合体が標的RNAを特定の位置で切断する分子機構が明らかになった。

4. 小型Cas7-11S改変体の開発

Cas7-11は1601残基からなるタンパク質であるため、AAVベクター (挿入可能な遺伝子サイズが4.7kb) に搭載できないという問題があった。Cas7-11の立体構造において、INSドメインはCas7.2およびCas7.3に存在する活性部位から離れているため、RNA切断に関与しない可能性が示唆された。そこで、INSドメインを削除したCas7-11改変体 (Cas7-11Sと命名) を作製し、in vitroにおいてRNA切断実験を行ったところ、Cas7-11Sは野生型Cas7-11と同様のRNA切断活性を示すことが明らかになった⁸⁾。Cas7-11Sは1290残基からなるため、ガイドRNAを含めても遺伝子サイズは約4.6kbであり、AAVベクターに搭載可能である。実際にAAVベクターを用いてCas7-11SとガイドRNAをヒト培養細胞に導入したところ、標的RNAの抑制が確認された⁸⁾。したがって、Cas7-11SはAAVベクターに搭載可能なRNAノックダウンツールとして利用可能ことが明らかになった。

5. Cas7-11-Csx29複合体の機能解析

III-E型CRISPR-Cas領域にはCas7-11、Csx29、Csx30、Csx31、RpoEという5種類のタンパク質がコードされてい

る (図1)。Csx29はプロテアーゼと配列相同性を持ち、Cas7-11と複合体を形成するため、筆者らはCas7-11-Csx29複合体はCsx30またはCsx31を分解するのではないかと考えた。Csx30とCsx31を組換えタンパク質として大腸菌において発現させたところ、Csx31は不溶性画分に発現した一方、Csx30は可溶性タンパク質として精製できた。そこで、標的RNAの存在下および非存在下において、Csx30がCas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体によって切断されるかどうかを検証した⁹⁾。その結果、標的RNA存在下において、Csx30は二つの断片 (N末端断片Csx30-1およびC末端断片Csx30-2) に切断された。さらに、Csx29の触媒残基を変異させると、Csx30は切断されなかった。これらの結果から、Cas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体に標的RNAが結合すると、Csx29が活性化しCsx30を二つの断片に切断することが明らかになった。さらに、N末端解析の結果、Csx30はM427とK428の間で切断されることが明らかになった。これらの結果から、Cas7-11-Csx29複合体は標的RNAの結合によって活性化するRNA依存性プロテアーゼであることが明らかになった。

6. Cas7-11-ガイドRNA-Csx29-標的RNA複合体の構造解析

Csx29の活性化機構を解明するために、筆者らはクライオ電子顕微鏡を用いて、Cas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体、および、Cas7-11-ガイドRNA-Csx29-標的RNA複合体の立体構造を決定した⁹⁾ (図2)。構造解析の結果、Csx29はTPR (tetratricopeptide repeats) ドメインとCHAT (caspase HetF associated with TPRs) プロテアーゼドメインからなり、Cas7-11と結合していることが明らかになった。注目すべきことに、標的RNAが結合していない場合、CHATプロテアーゼドメインの活性部位はCas7-11によって塞がれており、Csx29はCsx30を切断できないことが示唆された。一方、標的RNAが結合するとCsx29の立体構造が変化し、Csx30が結合できる状態になることが示唆された。したがって、二つの構造の比較から、Cas7-11-Csx29複合体がRNA依存性プロテアーゼとして機能する分子機構が示唆された。

7. III-E型CRISPR-Casシステムによる抗ウイルス防御機構

Csx30とCsx31の生理的な役割を明らかにするために、筆者らはCsx30、Csx30-1、Csx30-2、および、Csx30とCsx31をそれぞれ大腸菌において発現させ生育への影響を調べた⁹⁾。Csx30やCsx30-1を発現させると大腸菌の増殖が阻害された一方、Csx30-2やCsx31は生育に影響

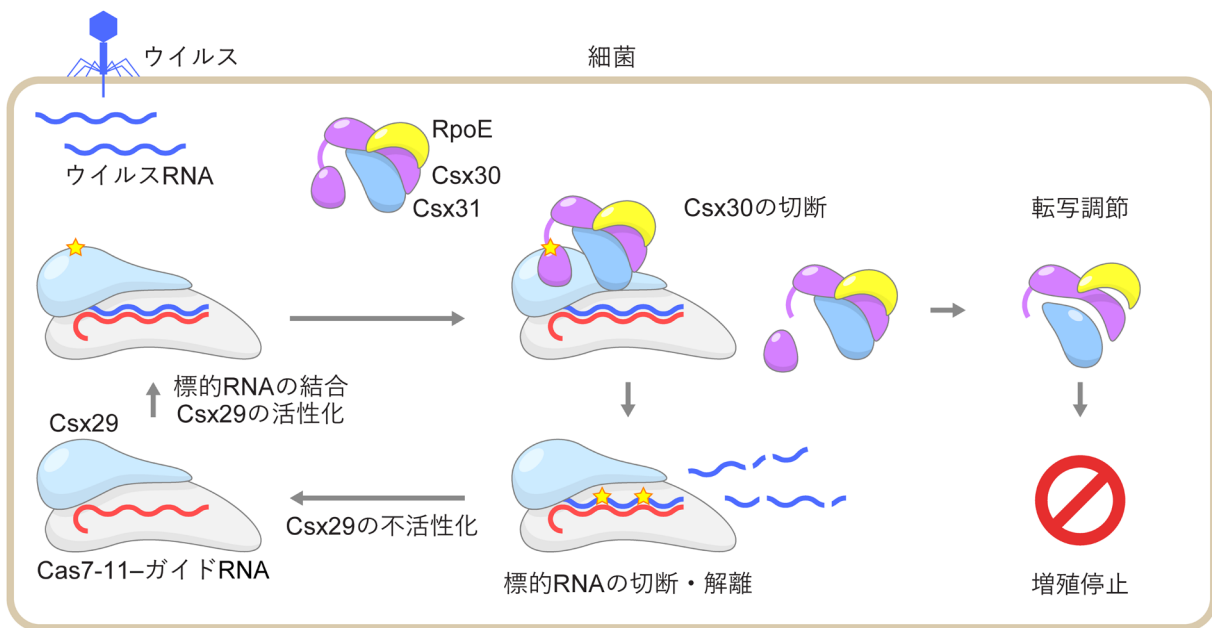


図3 III-E型CRISPR-Casシステム
Cas7-11の活性部位（標的RNA切断），および，Csx29の活性部位（Csx30切断）を星印で示した。

を与えなかったことから，Csx30-1（N末端断片）は大腸菌の増殖を阻害することが示唆された。また，Csx31はCsx30による生育阻害を抑制した。構造予測の結果，(1)Csx30，Csx31，RpoEは複合体を形成すること，および，(2)Csx30-1はRpoEと相互作用しRpoEの機能を阻害することが示唆された。実際に，ゲルろ過実験の結果，Csx30（Csx30-1），Csx31，RpoEは複合体を形成することが確認された。これらの結果から，Csx30-1はRpoEと結合し転写を制御することにより，細胞の増殖を阻害することが示唆された。以上の結果を総合し，III-E型CRISPR-Casシステムでは，Cas7-11-Csx29複合体はウイルス由来RNAを切断するとともに，Csx30の切断を介して細胞増殖を停止させることにより，細胞集団をウイルス感染から守るという分子機構が示唆された⁹⁾（図3）。

8. Cas7-11-Csx29-Csx30を用いたRNA検出技術

筆者らはCas7-11，Csx29，Csx30を利用した新規のRNA検出技術を開発した⁹⁾。Cas7-11-ガイドRNA-Csx29，および，Citrine-Csx30-DHFR融合タンパク質をヒト培養細胞に発現させ，標的RNAの存在下および非存在下において蛍光タンパク質Citrineに由来する蛍光を観察した。標的RNAが存在しない場合，DHFRはデグロン（タンパク質分解シグナル）として機能しCitrine-Csx30-DHFRは分解されるため，蛍光は観察されないのに対し，標的RNAが存在する場合，Csx29が活性化しCitrine-Csx30-DHFRはCitrine-Csx30-1とCsx30-2-DHFRに切断されるため，

Citrine-Csx30-1は分解されず蛍光が観察されることが考えられる。実際に，標的RNA存在下においてのみ蛍光が観察された。したがって，Cas7-11，Csx29，Csx30を利用することにより，細胞内の標的RNAの存在を蛍光として検出できることが示された。

9. おわりに

筆者らの研究の結果，Cas7-11-Csx29複合体はこれまでに報告のないRNA依存性ヌクレアーゼ-プロテアーゼであり，ガイドRNAと相補的な標的RNAを切断するヌクレアーゼ活性，および，標的RNAの結合によって活性化しCsx30タンパク質を切断するプロテアーゼ活性を持つことが明らかになった。大腸菌を用いた機能解析から，III-E型CRISPR-CasシステムにおいてCas7-11-Csx29複合体はCsx30を切断することにより細胞増殖を停止させることが示唆された。しかし，III-E型CRISPR-Casシステムによる抗ウイルス防御機構には多くの不明点が残されている。まず，Csx30-Csx31-RpoE複合体中のCsx30がCsx29によって切断されたのちのシグナル経路は不明である。構造予測から，RpoEはCsx30-1（N末端断片）との結合が示唆されており，実際，Csx29による切断後もRpoEはCsx30（Csx30-1）と結合できることが確認されている⁹⁾。したがって，Csx29による切断後，Csx30-1が他のプロテアーゼによって分解されることにより，RpoEが解離しシグマ因子として機能する可能性が考えられる。大腸菌を用いた生育実験では，Csx30は大腸菌由来RpoEと相

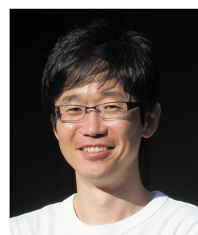
相互作用し生育阻害を引き起こしていると考えられるため、III-E型CRISPR-Casシステムの分子機構を理解するためには、*D. ishimotonii*を用いた機能解析が必要である。Csx31は、(1)抗ウイルス防御に必須であること、(2)Csx30およびRpoEと複合体を形成すること、および、(3)大腸菌においてCsx30による生育阻害を抑制することが明らかになっているが、その詳細な機能は不明である。さらに、Csx29がCsx30を特定の位置(M427とK428の間のペプチド結合)で切断する分子機構も不明である。したがって、III-E型CRISPR-Casシステムの理解にはさらなる構造機能研究が必要である。また、Cas7-11-Csx29複合体は前例のないRNA依存性ヌクレアーゼ-プロテアーゼであるため、さまざまな新規テクノロジーへの応用が期待される。

文 献

- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67–83.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816–821.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819–823.
- 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., et al. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, **163**, 759–771.
- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I.M., Cox, D.B., Shmakov, S., Makarova, K.S., Semenova, E., Minakhin, L., et al. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, **353**, aaf5573.
- Özcan, A., Krajeski, R., Ioannidi, E., Lee, B., Gardner, A., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Abudayyeh, O.O., & Gootenberg, J.S. (2021) Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11. *Nature*, **597**, 720–725.
- van Beljouw, S.P.B., Haagsma, A.C., Rodríguez-Molina, A., van den Berg, D.F., Vink, J.N.A., & Brouns, S.J.J. (2021) The gRAMP CRISPR-Cas effector is an RNA endonuclease complexed with a caspase-like peptidase. *Science*, **373**, 1349–1353.
- Kato, K., Zhou, W., Okazaki, S., Isayama, Y., Nishizawa, T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., & Nishimasu, H. (2022) Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex. *Cell*, **185**, 2324–2337.
- Kato, K., Okazaki, S., Schmitt-Ulms, C., Jiang, K., Zhou, W., Ishikawa, J., Isayama, Y., Adachi, S., Nishizawa, T., Makarova, K.S., et al. (2022) RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease. *Science*, **378**, 882–889.

著者寸描

●西増 弘志 (にします ひろし)



東京大学先端科学技術研究センター 教授。博士(農学)。

■略歴 1979年北海道北見市に生る。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博士課程修了。20年より現職。21年度より東京大学大学院工学系研究科教授を兼任。

■研究テーマと抱負 CRISPRなどのタンパク質-核酸複合体が機能する分子メカニズムの解明に取り組んでいます。新しい機能をもつタンパク質の発見や設計にも挑戦したいと考えています。

■ウェブサイト <https://www.youtube.com/watch?v=H7AG5hhnhKY>

■趣味 食べ歩き, ボクシング。