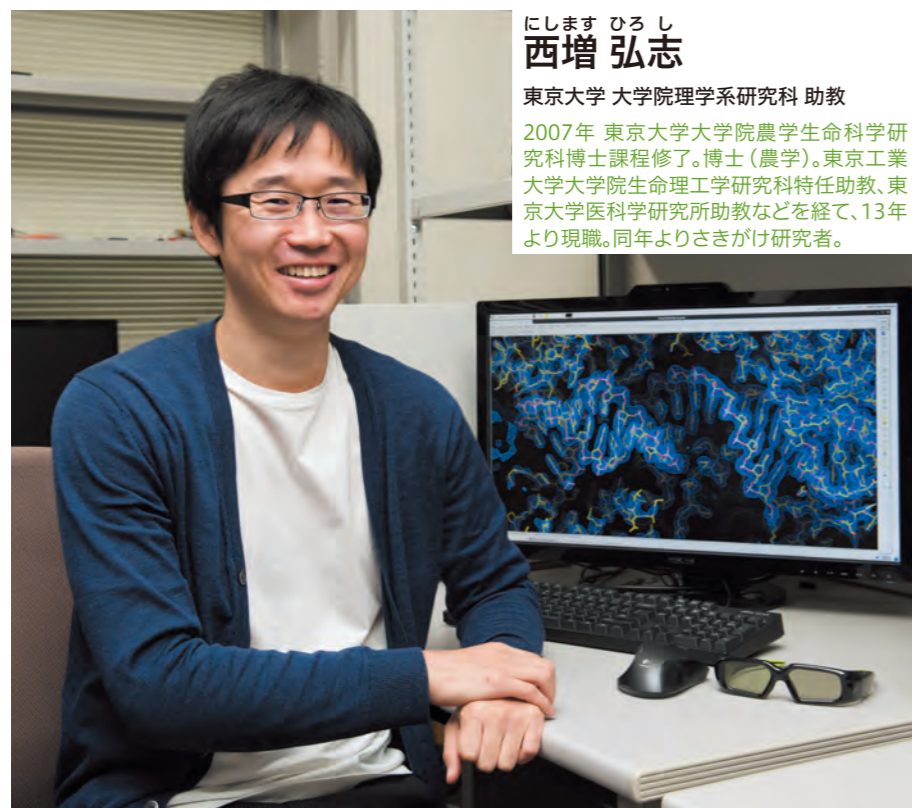


CRISPR-Cas酵素の構造解明で 新たな「はさみ」をつくる

細菌が持つ「CRISPR-Cas9」免疫系を利用したゲノム編集技術は、近年、幅広い分野で急速に普及が進んでいる。東京大学大学院理学系研究科の西増弘志助教は、CRISPR-Cas酵素の分子構造を基に、ゲノム編集技術の高度化をめざす。



にします ひろし
西増 弘志

東京大学 大学院理学系研究科 助教

2007年 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了。博士(農学)。東京工業大学大学院生命理工学研究科特任助教、東京大学医科学研究所助教などを経て、13年より現職。同年よりさきがけ研究者。

モニター画面は、Cas9 - ガイドRNA - 標的DNA複合体の立体構造。手前の3Dメガネで立体視できる。

構造解析で CRISPR-Cas9の改良に貢献

生命の設計図である遺伝子情報を書き換えるゲノム編集。Cas9の登場により簡便なゲノム編集が可能となったが、Cas9がどのようにガイドRNAに結合して標的DNAを切断するのか、誰も見たことがなかった。東京大学大学院理学系研究科の

西増弘志助教が解き明かすまでは——。CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集技術の開発者の1人、ファン・ツァン (Feng Zhang) 博士との共同研究をきっかけに、西増さんはCRISPR-Cas9に魅せられた。「構造解析は米国が先行しているのは明白でしたが、複合体なら勝算があるはず」と、Cas9にガイドRNAと標的DNAが結合した複合体の構造解析に狙いを定めた。■

■西増さんがCas9の構造解析をめざしたのと同時期に、さきがけの研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」が立ち上がった。「挑戦的な面白い研究になる」と確信して、さきがけに応募した。試行錯誤の末、複合体の結晶化に成功し、大型放射光施設SPring-8でX線回折データを収集、Cas9-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造を世界で初めて報告した(図1)。

ガイドRNAと標的DNAが結合した複合体の構造情報は、Cas9の改良につながる。実際に、Cas9のアミノ酸残基を変えることにより、誤った場所を切断しにくいCas9など、さまざまな改良型のCas9が開発されている。

はさみの切り口の 違いを解明

異なる特徴を持つCRISPR-Cas酵素が次々と発見され、新たなはさみ役として注目されている。中でもCas9と同様に利用されているのがCpf1 (Cas12a)だ。Cas9に続き、Cpf1-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶化に成功した。SPring-8の運用期間中は、スイスの放射光施設でX線回折実験を進めて解析を急ぎ、世界に先駆けて論文発表した。

Cas9とCpf1はどちらもガイドRNAと協働して2本鎖DNAを切断するが、立体構造は大きく異なることが明らかになった。特に、はさみとして働く部分の構造が違っ



図1 Cas9-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造。ガイドRNA (sgRNA) と標的DNA (Target DNA) は二重らせんを形成してCas9と結合する。Cas9のはさみの部分は標的DNAを切断するのに適した位置に存在している。

ていた(図2)。

Cas9はDNAに垂直にはさみを入れて、2本鎖がそろった平滑末端をつくる。Cpf1は切り口が斜めで、2本鎖のうち一方がずれた突出末端をつくる。このため、挿入するDNA配列の向きが変わりにくい。また、Cas9はGGという塩基配列を目印にDNAを切断するのに対し、Cpf1はTTTを目印にするので、異なる部位を切断することができる。Cas9とCpf1の分子構造の違いは、両者の動き方の違いを説明するものだった。

DNA切断の瞬間を動画撮影

結晶構造は、いわばスナップ写真だ。西増さんは「Cas9がDNAを切断する際の動きを実際に見てみたい」と、さきがけの同期で、高速AFM (高速原子間力顕微鏡)を開発している金沢大学の古寺哲幸准教授に声をかけた。高速AFMは、ナノメートル(10億分の1メートル)の空間分解能で、水溶液中の生体分子をリアルタイム

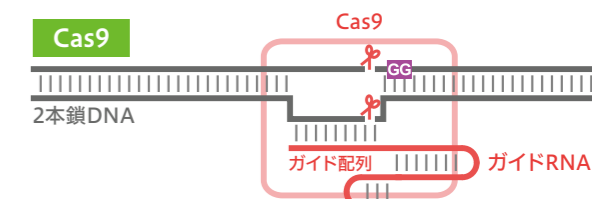
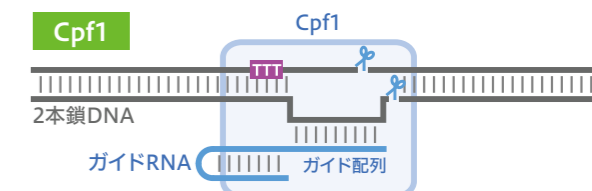


図2 Cpf1 (Cas12a)とCas9による2本鎖DNAの切断メカニズム

に撮影できる(参照: JSTnews 2017年8月号「はかる」)。

「さきがけは気軽に共同研究できる雰囲気があります。すぐに高速AFMで観測してもらえることになりました」。サンプルを送り、インターネット電話のスカイプで数回打ち合わせをした後、Cas9がDNAを切断する過程の動画撮影に世界で初めて成功した(図3)。

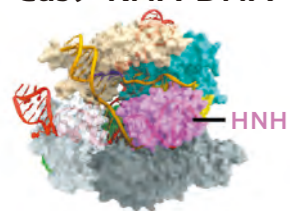
Cas9は柔軟な構造をしているが、ガイドRNAと結合すると構造が安定化した。Cas9-RNA複合体がDNAに衝突を繰り返すことで、切断する部分を見つけ出すことも突き止めた。そして結晶構造から予測された通り、はさみとして働くHNHドメインが構造を大きく変化させ、DNAの切断部位に移動する様子を撮影することに成功した。

ツイッターに動画を投稿すると、世界中から想像以上の反響があったという(図4)。「どの場面を撮るべきかは明らかでした。古寺さんらにしかできない技術で、非常に鮮明な動画を得られました。双方にとって実りの多い共同研究になりました」。

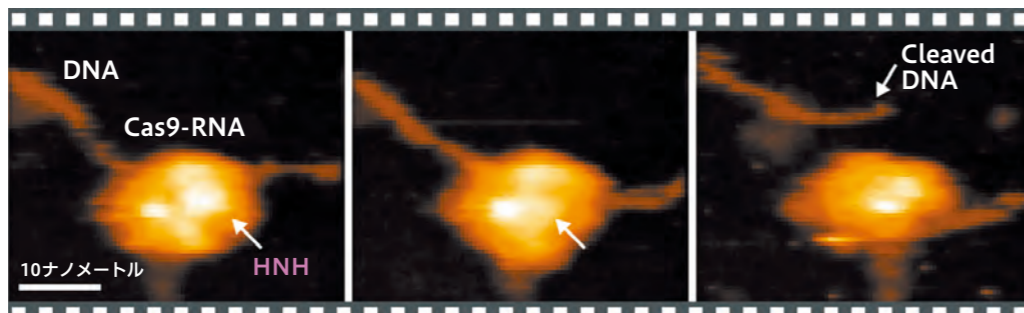
驚くべきスピードで、世界初と名の付く成果を次々と挙げてきた西増さん。「CRISPR-Cas酵素の立体構造を基に、より効果的で安全なゲノム編集技術の開発に貢献したい」と語る。今後は、他のCRISPR-Cas酵素の研究や、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析など、新しい試みにも挑戦しながら、より優れたはさみの形を追究していく。

図3 Cas9によるDNA切断の高速AFM動画。黄色の塊がCas9で、茶色いひもがDNA鎖。矢印で示す部分がはさみとして動く。

Cas9-RNA-DNA



Cas9-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造



DNAの切断部位から離れた状態のHNHドメイン

切断部位に近い状態のHNHドメイン

DNA切断の瞬間



図4 世界で大きな反響を呼んだツイッターの投稿。5,000件近くの「いいね」が付いた。QRコードを読み取ると、動画を見ることができる。

