

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 新規 CRISPR-Cas9 システムセットの開発とその医療応用  
(英語) Structure-based Innovation of genome-editing tool (CRISPR) system and its medical application

研究開発担当者 (日本語) 東京大学大学院理学系研究科 教授 濡木 理  
所属 役職 氏名： (英語) Nureki Osamu Professor, Graduate School of Science, The University of Tokyo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

原核生物のもつ CRISPR-Cas 系は獲得免疫機構としてはたらき、プラスミドやファージなどの外来核酸を認識・切断することで自身のゲノムを保護する役割をもつ。CRISPR-Cas 系では、宿主ゲノムの CRISPR 領域にコードされた様々な Cas ヌクレアーゼがガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な二本鎖 DNA を特異的に切断することにより外来核酸からの感染を防ぐ。ガイド RNA を変更することで異なる配列をもつ二本鎖 DNA を容易に標的とすることができるため、II 型 CRISPR-Cas 系ではたらく Cas9 はゲノム編集技術へと応用されている。本研究では、Cas9 のなかで最小の *Campylobacter jejuni* 由来 Cas9 (CjCas9)、ガイド RNA、標的二本鎖 DNA からなる複合体の結晶構造を決定した。結晶化のため、CjCas9 を大腸菌において発現させ、NiNTA カラム、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムを用いて精製し、sgRNA および標的 DNA と混合し四者複合体を再構成した。Cas9-RNA-DNA 複合体をゲルろ過カラムを用いて精製したのち、結晶化し、SPRING-8 において X 線回折データを収集し、分子置換法により結晶構造を決定した。結晶構造から、CjCas9 のガイド RNA は予想外の三重鎖を含むことが明らかになった。他の Cas9 が相補鎖を認識するのに対し、CjCas9 は PAM 二重鎖の両鎖と相互作用することにより PAM 認識を達成していた。さらに、CjCas9 と他の Cas9 との構造

比較から、CRISPR-Cas9系における立体構造の保存性と多様性が明らかになった。特に、Cas9の最小機能ドメインに関する知見が得られた。

昨年、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が同定され、新たなゲノム編集ツールとして注目されている。Cpf1はCas9とは異なる特徴をもつ。両者とも標的DNAの切断にはPAMとよばれる特定の塩基配列の認識が必須だが、Cas9はGリッチなPAMを認識し平滑末端でDNAを切断する一方、Cpf1はTリッチなPAMを認識し突出末端でDNAを切断する。本研究では、*Acidaminococcus* sp.に由来するCpf1、ガイドRNA、標的DNA複合体の結晶構造を2.8 Å分解能で決定した。結晶構造から、Cpf1はCas9と同様に2つのローブからなり、ガイドRNAと標的DNAからなるヘテロ2本鎖を収容していることが明らかになった。Cas9とは異なり、Cpf1はPAMを含む2本鎖DNAの配列と構造の両方を認識していた。さらに、Cpf1はCas9とは異なる新規のヌクレアーゼドメインをもつことが明らかになった。これらの結果から今後のゲノム編集技術の開発の基盤となることが期待される。

The RNA-guided endonuclease Cas9 from the type II CRISPR-Cas system generates a double-strand break at DNA target sites complementary to the guide RNA and has been harnessed for the development of a variety of new technologies, such as genome editing. Here, we report the crystal structures of Cas9 from *Campylobacter jejuni* (CjCas9), one of the smallest Cas9 orthologs characterized so far, in complex with sgRNA and its PAM-containing partially duplexed DNA target at 2.4 Å resolution. The crystal structures provided insights into a minimal Cas9 protein scaffold and elucidate the remarkable mechanistic diversity of the CRISPR-Cas9 systems. The CjCas9 guide RNA contains a triple-helix structure, which is different from known RNA triple helices, thus expanding the natural repertoire of RNA triple helices. Furthermore, unlike the previously reported Cas9 orthologs, CjCas9 makes contacts with the nucleotide sequences in both the target and non-target DNA strands and recognizes the NNNVRYM as the protospacer-adjacent motif (PAM). Overall, these findings enhance our mechanistic understanding of the CRISPR-Cas9 systems and facilitate Cas9 engineering.

Cpf1 is an RNA-guided endonuclease of the type V CRISPR-Cas system that has been recently harnessed for genome editing. Here, we report the crystal structure of Cpf1 from *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1) in complex with the crRNA and its target DNA at 2.8 Å resolution. The crystal structure revealed that AsCpf1 adopts a bilobed architecture, with the RNA-DNA heteroduplex bound inside the central channel. A structural comparison of AsCpf1 with Cas9, a type II CRISPR-Cas nuclease, elucidated both striking similarity and major differences, thereby explaining their distinct functionalities. Importantly, the structure revealed that AsCpf1 contains the RuvC domain and a putative novel nuclease domain, which are likely to be responsible for cleaving the non-target and target strands, respectively, and for jointly generating staggered DNA double-strand breaks. The structure also revealed that AsCpf1 recognizes the TTTN PAM via base and shape readout mechanisms. Our findings

provide mechanistic insights into RNA-guided DNA cleavage by Cpf1 and establish a framework for rational engineering of the CRISPR-Cpf1 toolbox.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 5 件)

1. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA.  
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**.  
Cell. 2016 May 5;165(4):949-62. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003. Epub 2016 Apr 21.
2. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases.  
Nishimasu H, **Nureki O**.  
Curr Opin Struct Biol. 2016 Nov 29;43:68-78. doi: 10.1016/j.sbi.2016.11.013.  
[Epub ahead of print] Review.
3. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems.  
Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, Ishitani R, Zhang F, Nishimasu H, **Nureki O**.  
Mol Cell. 2017 Mar 16;65(6):1109-1121.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.007.
4. A swine model of acute thrombocytopenia with prolonged bleeding time produced by busulfan.  
Abe T, Kono S, Ohnuki T, Hishikawa S, Kunita S, and **Hanazono Y**.  
Exp Anim. 2016 Nov 1; 65(4): 345-351.
5. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions.  
Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, **Hatada I**.  
Nat Biotechnol. 2016 Oct;34(10):1060-1065. doi: 10.1038/nbt.3658. Epub 2016 Aug 29.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Crystal structure of *Campylobacter jejuni* Cas9 reveals unexpected diversity in the CRISPR-Cas9 systems, ポスター, 山田真理、西増弘志、石谷隆一郎、**濡木理**, RNA2016, 2016/6/28
2. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA, 口頭, 山田真理、西増弘志、石谷隆一郎、**濡木理**, RNA2016, 2016/6/28
3. Crystal structure of *Campylobacter jejuni* Cas9 reveals unexpected diversity in the CRISPR-Cas9 systems, ポスター, 山田真理、西増弘志、石谷隆一郎、**濡木理**, 平成 28 年度日本結晶学会年会, 2016/11/17

4. V型 CRISPR-Cas 系にかかわる Cpf1 の結晶構造, ポスター, 山野峻, 西増弘志, 石谷隆一郎, 濡木理, 平成 28 年度日本結晶学会年会, 2016/11/17
5. 「無菌ブタの作出とその無菌的管理技術の確立」, 口頭, 原弘真, 大貫貴広, 河野正太, 阿部朋行, 柴田宏昭, 中野和明, 長嶋比呂志, 菱川修司, 國田智, 花園豊, 第 4 回日本先進医工学ブタ研究会, 10/7-8, 静岡県三島市(日本)
6. 「ブタを用いる研究の現状と展望」, 口頭, 花園豊, 第 4 回日本先進医工学ブタ研究会, 10/7-8, 静岡県三島市(日本)
7. Specific manipulation of DNA methylation, 口頭, Hatada I, Riken Epigenetics (Tsukuba, Japan) 2017/1/27, 国内.
8. エピゲノム編集とその可能性, 口頭, 畑田出穂, 蛋白研セミナー「生命システムを支配するエピジェネティクス」(大阪大学), 2016/12/21, 国内.
9. ゲノム編集技術を利用したエピゲノムの書き換え, 口頭, 森田純代, 野口浩史, 堀居拓郎, 中林一彦, 木村美香, 岡村浩司, 坂井淳彦, 中嶋秀行, 秦健一郎, 中島 欽一, 畑田出穂, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム(横浜), 2016/12/2, 国内.
10. CRISPR/Cas を用いたエピゲノム編集法, 口頭, 森田純代, 野口浩史, 堀居拓郎, 中林一彦, 木村美香, 岡村浩司, 坂井淳彦, 中嶋秀行, 秦健一郎, 中島 欽一, 畑田出穂, 日本核酸医薬学会 第 2 回年会(東京理科大学), 2016/11/15, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「立体構造に基づくゲノム編集ツールの開発と医療への展望」サイエンスアゴラ、濡木理、日本科学未来館、2016 年 11 月 5 日
2. “Structure-based development of genome-editing tool, CRISPR-Cas9 towards medical applications” KVA-JSPS seminar Osamu Nureki 2016 6/6-10 (Stockholm, Sweden)
3. “Structure-based development of genome-editing tool, CRISPR-Cas9 towards medical applications” 日本遺伝子細胞治療学会 濡木理 平成 28 年 7 月 29 日
4. 「立体構造に基づくゲノム編集ツールの開発と医療応用への展望」日本学術会議第二部主催の公開学術講演会 濡木理 東大医学部 平成 28 年 8 月 1 日
5. 「立体構造に基づく CRISPR の分子機構とゲノム編集ツールの開発」第 39 回日本分子生物学会年会 濡木理 11/30-12/2 (Yokohama, Japan)
6. 「立体構造に基づくゲノム編集ツール CRISPR-Cas9 の開発と医療への展望」協和発酵キリン腎臓シンポジウム 濡木理 10/29 (Tokyo Japan)