

RNA 制御型タンパク質分解酵素 Cas7-11-Csx29 を発見！

1. 発表者：

加藤 一希（東京大学先端科学技術研究センター 特任講師）
岡崎 早恵（東京大学先端科学技術研究センター 学術専門職員）
西増 弘志（東京大学先端科学技術研究センター 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆Cas7-11-Csx29 複合体は標的 RNA に結合すると活性化し Csx30 タンパク質を切断する RNA 依存性タンパク質分解酵素であることを発見した。
- ◆クライオ電子顕微鏡解析により、標的 RNA の結合によって Csx29 タンパク質が構造を変化させ活性化する分子機構を明らかにした。
- ◆Cas7-11-Csx29 複合体は RNA 検出技術などの新規テクノロジーへの応用が期待される。

3. 発表概要：

CRISPR-Cas 獲得免疫機構（注 1）に關与する Cas7-11 タンパク質はガイド RNA と複合体を形成し、標的となる 1 本鎖 RNA を切断する RNA 依存性 RNA 切断酵素（ヌクレアーゼ）としてはたります。Cas7-11 は Csx29 タンパク質と複合体を形成することが報告されていましたが、Csx29 の機能は不明でした。東京大学先端科学技術研究センターの加藤一希特任講師、岡崎早恵学術専門職員、西増弘志教授らは、Massachusetts Institute of Technology の Jonathan S. Gootenberg フェロー、Omar O. Abudayyeh フェローとの共同研究として、Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体は標的 RNA が結合すると活性化し、Csx30 タンパク質を切断する RNA 依存性タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）であることを発見しました。さらに、クライオ電子顕微鏡（注 2）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、標的 RNA が結合すると Csx29 の構造が変化し活性化することを明らかにしました。また、Cas7-11、Csx29、Csx30 を応用することにより、特定の RNA を生細胞内で検出することにも成功しました。本研究により、Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体は、（1）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、（2）標的 RNA と結合すると活性化し Csx30 タンパク質を切断するプロテアーゼ活性、という 2 つの酵素活性をもつ RNA 依存性ヌクレアーゼ-プロテアーゼであることが明らかとなりました。このような酵素は前例がないため、Cas7-11-Csx29 複合体は様々な新規テクノロジーへの応用が期待されます。

本研究成果は、2022 年 11 月 3 日（米国東部夏時間）に米国科学誌「Science」のオンライン版に掲載されます。

4. 発表内容：

原核生物のもつ II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に關与する Cas9 タンパク質はガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な 2 本鎖 DNA を切断するはたらきをもつため、ゲノム編集をはじめとする様々な新規技術に応用されています。Cas9 の発見の後 Cas12 や Cas13 といった新規の CRISPR-Cas 酵素が相次いで発見され、核酸検出などの新規テクノロジーに応用されています。2021 年に発見された III-E 型 CRISPR-Cas 酵素である Cas7-11 は、ガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA を 2 か所で切断する RNA 依存性 RNA 切断酵素（ヌクレアーゼ）としてはたります（図 1）。2022 年 5 月、本研究チームは Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体の立体構造を決定し、Cas7-11 が標的 RNA を切断する分子機構を世界にさきがけて報告しました（図 1）（Kato *et al.* *Cell* 2022；プレスリリース <https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20220528.html>）。

原核生物のゲノムに存在する III-E 型 CRISPR-Cas 領域には、Cas7-11 に加えて、Csx29、Csx30、Csx31、RpoE といったタンパク質がコードされていることから、これら 5 種類のタンパク質が協働して抗ウイルス防御を担っている可能性が示唆されていました (図 2)。Csx29 は既知の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ましたが、実際に Csx29 がプロテアーゼ活性をもつかは不明でした。Csx30 と Csx31 は既知のタンパク質と配列類似性をもたないため、それらの機能は謎に包まれていました。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ましたが、その役割は不明でした。

今回、本研究チームは生化学的解析を行い、(1) Cas7-11 はガイド RNA および Csx29 と複合体を形成すること、および、(2) ガイド RNA と相補的な標的 RNA が複合体に結合すると Csx29 が活性化し Csx30 を 2 つの断片 (N 末端断片 Csx30-1 および C 末端断片 Csx30-2) に切断することを発見しました (図 3)。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となりました。さらに、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、Csx29 は TPR ドメインと CHAT 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を明らかにしました (図 4)。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触媒残基は Cas7-11 によって塞がれているため、Csx29 は Csx30 を切断できない一方、標的 RNA が結合すると Csx29 の立体構造が変化し Csx30 が結合できる活性化状態になることが示唆されました。したがって、2 つの構造の比較から、Cas7-11-Csx29 複合体が RNA 依存的プロテアーゼとして機能する分子機構が明らかになりました。

次に、本研究チームは、Csx30、Csx30-1、Csx30-2、および、Csx30 と Csx31 をそれぞれ大腸菌に導入し生育を追跡することにより、Csx30 と Csx31 の機能を調べました。Csx30 や Csx30-1 を導入すると大腸菌の増殖が阻害された一方、Csx30-2 や Csx31 は生育に影響を与えなかったことから、Csx30-1 は細胞の増殖を阻害することが示唆されました。また、Csx31 は Csx30 による生育阻害を抑制することがわかりました。さらに、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ました。実際に、生化学的解析の結果、Csx30、Csx31、RpoE は複合体を形成することが確認されました。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ました。以上の結果を総合し、III-E 型 CRISPR-Cas 免疫機構において、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ました (図 5)。

さらに、本研究チームは、Cas7-11-Csx29 および Csx30 をヒト培養細胞に導入し、ガイド RNA と相補的な標的 RNA が存在する場合のみ、Csx29 が Csx30 を切断することを利用し、標的 RNA の存在を蛍光として検出することに成功しました。Cas9 や Cas13 と異なり、Cas7-11-Csx29 は RNA 依存性ヌクレアーゼ-プロテアーゼとしてはたらくため、今後、様々な新規テクノロジーへの応用が期待されます。

本研究は、稲盛財団 InaRIS フェローシップ、武田科学振興財団武田報彰医学研究助成、AMED「新興・再興感染症研究基盤創生事業(多分野融合研究領域)(課題番号: JP21wm0325048h0001)」、科研費「挑戦的研究(開拓)(課題番号: 20K20579)」、「学術変革領域研究(A)(課題番号: 21H05281)」などの支援により実施されました。

5. 発表雑誌:

雑誌名: 「Science」(オンライン版: 11月3日)

論文タイトル: RNA-triggered protein cleavage and cell growth suppression by the RNA-guided type III-E CRISPR-Cas nuclease-protease complex

著者：Kazuki Kato*, Sae Okazaki*, Cian Schmitt-Ulms*, Kaiyi Jiang*, Wenyuan Zhou, Junichiro Ishikawa, Yukari Isayama, Shungo Adachi, Tomohiro Nishizawa, Kira S. Makarova, Eugene V. Koonin, Omar O. Abudayyeh**, Jonathan S. Gootenberg**, Hiroshi Nishimasu** (*筆頭著者、**責任著者)

DOI 番号：10.1126/science.add7347

アブストラクト URL：https://www.science.org/doi/10.1126/science.add7347

6. 注意事項：

日本時間 11 月 4 日（金）午前 3 時（米国東部夏時間：3 日（木）午後 2 時）以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学先端科学技術研究センター 構造生命科学分野

教授 西増 弘志（にします ひろし）

TEL：03-5452-5351

E-mail：nisimasu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

（注 1）CRISPR-Cas 獲得免疫機構：

原核生物のもつ生体防御機構のひとつ。原核生物に感染するウイルス由来の核酸（RNA や DNA）の分解を担う。I～VI 型に分類される。ウイルス由来核酸の分解には Cas9（II 型）、Cas12（V 型）、Cas13（VI 型）、Cas7-11（III-E 型）など様々な CRISPR-Cas 酵素が関与する。

（注 2）クライオ電子顕微鏡：

液体窒素冷却下でタンパク質などの分子に電子線を照射し、試料の観察を行うための装置。タンパク質や核酸の立体構造の決定に利用されている。

9. 添付資料：

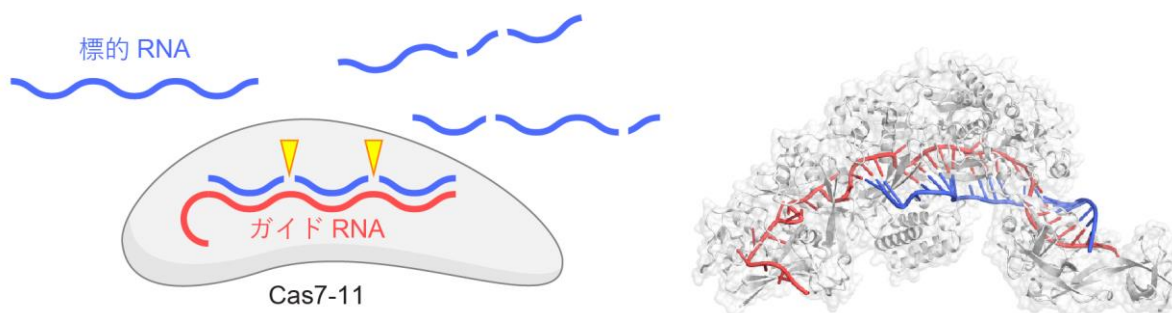


図 1 Cas7-11 の機能と構造

Cas7-11 はガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA を 2 か所（塩基 3 と 4 および塩基 9 と 10 の間）で特異的に切断する。

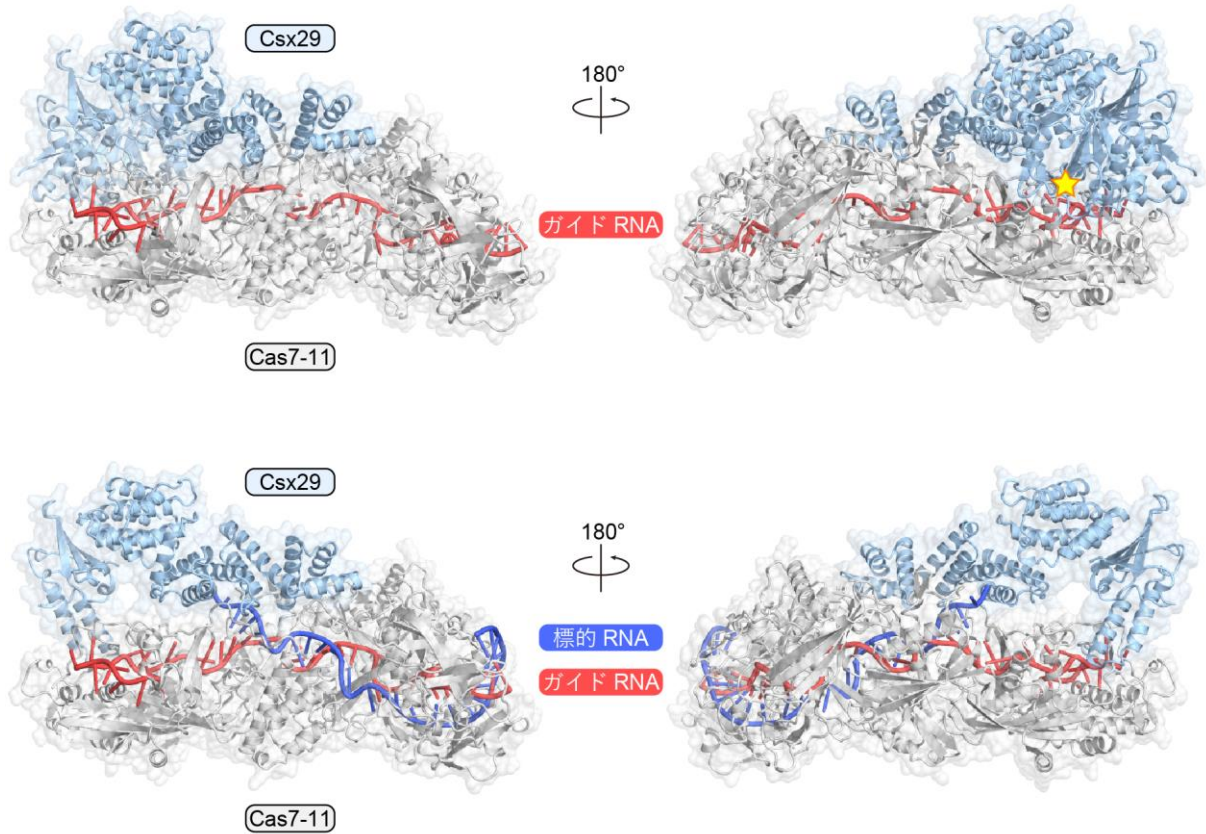


図4 Cas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体およびCas7-11-ガイドRNA-Csx29-標的RNA複合体の立体構造
 Csx29の活性部位を星印で示した。標的RNAが結合した構造では、活性部位を含む領域の密度が観察されなかったことから、標的RNAが結合するとCsx29の構造が変化しCsx30が結合できる活性化状態になると考えられる。

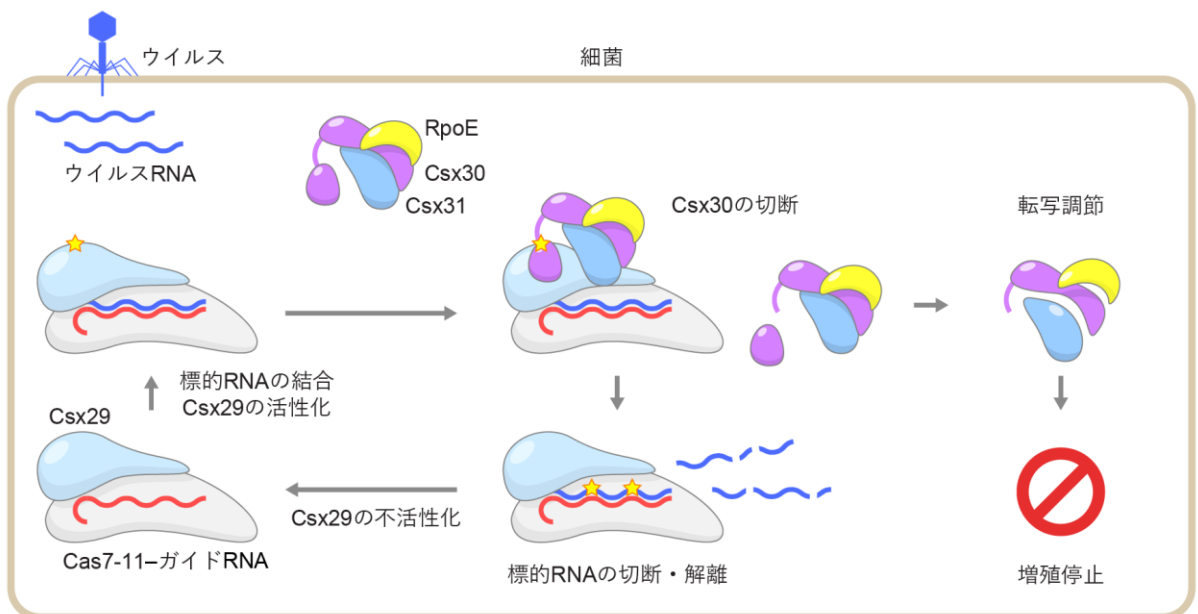


図5 III-E型CRISPR-Cas免疫機構
 Cas7-11-ガイドRNA-Csx29複合体にウイルス由来RNAが結合すると、Csx29が活性化しCsx30-Csx31-RpoE複合体中のCsx30を切断する。Csx30のC末端領域(Csx30-2)が切り

離されると、Csx30-Csx31-RpoE 複合体の細胞内局在が変化し、RpoE のはたらきにより mRNA の合成（転写）が変化する。この結果、細胞の増殖が停止し、ウイルスの感染が抑制されると考えられる。Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体に結合したウイルス由来 RNA は Cas7-11 によって切断される。切断された標的 RNA は複合体から解離し、Csx29 は不活化する。Csx30-Csx31-RpoE 複合体による転写制御の分子機構の詳細は不明であり、III-E 型 CRISPR-Cas 免疫機構の理解にはさらなる研究が必要である。