

11. CRISPR-Cas 酵素 Cas9 の分子進化を可視化する

東京医科歯科大学 統合研究機構 テニユアトラック准教授 加藤 一希

概要

CRISPR-Cas9 はゲノム編集技術として広く利用されているが、その進化的起源である小型タンパク質 IscB から、どのようにして高活性な Cas9 へと進化したのかは不明であった。本研究では、IscB と Cas9 の中間に位置する進化系統である Type II-D Cas9 の立体構造をクライオ電子顕微鏡により決定した。解析の結果、進化の過程で ω RNA の一部がタンパク質 (REC ドメイン) へと段階的に置換され、標的 DNA の認識機構が「RNA 主体」から「タンパク質主体」へと移行した軌跡を明らかにした。本成果は、Cas9 の分子進化に関する基礎的知見を提供するとともに、小型で高活性な新規ゲノム編集ツールの合理的設計への貢献が期待される。

背景および目的

化膿レンサ球菌由来 Cas9 (SpCas9) は優れたゲノム編集ツールであるが、1,368 アミノ酸という巨大なサイズのため、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる細胞導入に制限がある。これに対し、Cas9 の祖先とされる IscB は約 400–500 アミノ酸と非常に小型であるが、DNA 切断活性が低いという課題があった。申請者はこれまでに IscB の構造を解明し、IscB が巨大な ω RNA を用いて標的 DNA を認識していることを報告した。しかし、IscB から Cas9 へと進化する過程で、どのようにタンパク質が大型化し、機能が洗練されたのかという「ミッシングリンク」は未解明であった。本研究では、進化的に IscB と Cas9 の中間に位置する Type II-D Cas9 の構造解析を通じ、分子進化の軌跡を可視化することを目的とした。

方法

複数の細菌由来の Type II-D Cas9 および IscB ホモログを対象とした。大腸菌発現系を用いて各タンパク質を精製し、ガイド RNA および標的 DNA と複合体を形成させた。精製した複合体を金属グリッド上で急速凍結し、Titan Krios (東京大学 BINDS) を用いたクライオ電子顕微鏡データの収集を行った。得られた画像データは CryoSPARC ソフトウェアを用いて単粒子解析を行い、原子解読レベルの立体構造を決定した。

結果および考察

構造解析の結果、Type II-D Cas9 は IscB 様のコア構造を保持しつつ、Cas9 に特徴的なドメイン構成の一部を既に獲得しており、両者の中間的性質を有することが明らかとなった。特に重要な発見として、IscB においてガイド RNA である ω RNA が担っていた構造的・機能的役割の一部が、進化の過程でタンパク質側、すなわち REC (recognition) ドメインへと段階的に置換されてきたことが示された。この過程は単なる置換ではなく、 ω RNA の構造要素の縮小と、それに対応する REC ドメインの拡張が協調的に進行する「共進化」として理解される。

さらに詳細な比較解析から、IscB から Cas9 への進化は複数の段階を経て進行したことが示唆された。まず、IscB が CRISPR システムと結合することで RNA ガイド型ヌクレアーゼとしての基盤を獲得し、その後 Zn フィンガー構造を含む REC3 様ドメインが付加されることで、標的 DNA 認識機構が強化された。続いて、ヘリックスバンドル構造を有する REC1 ドメインの形成により、ガイド RNA と標的 DNA の複合体を安定に保持する能力が向上した。一方で、これらタンパク質ドメインの発達に伴い、ωRNA に含まれていた補助的な構造要素（特に target-holding stem など）は不要となり、徐々に消失していった。このように、RNA 依存的な構造からタンパク質主体の認識機構への移行が、段階的かつ機能的整合性を保ちながら進行したことが明らかとなった。

ガイド RNA の進化についても重要な知見が得られた。IscB においては単一の ωRNA がガイド機能を担っているのに対し、Cas9 では crRNA と tracrRNA に分離した二成分系へと進化している。本研究では、Type II-D Cas9 がこれら両者の中間的特徴を有することが構造的に示され、ガイド RNA の分化過程における連続性が裏付けられた。

機能的観点からは、IscB と Cas9 の間に顕著な違いが存在する。IscB は比較的低い標的特異性を有し、トランスポゾンの拡散に適した性質を持つのに対し、Cas9 は高い配列特異性を備え、外来核酸を正確に識別する免疫機構として機能する。本研究の構造解析は、この特異性の向上が REC ドメインの拡張と密接に関連していることを示している。すなわち、REC ドメインの発達により、より長い RNA-DNA ハイブリッド領域の形成と安定化が可能となり、標的配列の厳密な認識が実現されたと考えられる。

さらに、DNA 切断活性に関与する HNH ドメインの挙動にも進化的変化が認められた。IscB においては HNH ドメインが柔軟で不安定な配置をとるのに対し、Cas9 では標的 DNA に対して適切に配置されるよう構造的に固定化されている。本研究では、この安定化もまた REC ドメインの発達と連動していることが示唆され、標的認識と切断活性の統合的進化が進んだことが明らかとなった。

以上の結果から、CRISPR-Cas9 の進化は、RNA 主体の単純なガイド機構から、タンパク質ドメインによる高度に制御された認識・切断機構への移行として理解される。本研究は、その過程における中間体構造を初めて明確に提示し、分子進化の実体を構造レベルで解明した点において重要な意義を有する。これらの知見は、CRISPR-Cas システムの進化的理解にとどまらず、より小型で高機能なゲノム編集ツールの設計指針を与えるものとして、今後の応用研究にも大きく貢献すると期待される。

(完)

発表論文

- 1) 1) Nagahata, N., Kato, K. and Yamada, S. et al. "Molecular insights into the evolution of IscB and Cas9", Nature Structural & Molecular Biology, 32, 150-165 (2025).