

国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 が二本鎖 DNA を切断する仕組みを解明 ——社会利用が可能なゲノム編集法として期待——

1. 発表者：

吉見 一人（東京大学 医科学研究所附属実験動物研究施設 先進動物ゲノム研究分野 講師）
竹下 浩平（理化学研究所 放射光科学研究センター 研究員）
古寺 哲幸（金沢大学 ナノ生命科学研究所 ナノ計測学 教授）
真下 知士（東京大学 医科学研究所附属実験動物研究施設 先進動物ゲノム研究分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆日本発のゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 が、狙った DNA 配列を認識して切断する仕組みを世界で初めて明らかにしました。
- ◆CRISPR-Cas3 は狙った場所の二本鎖 DNA をほどいて片方の鎖を手繰り寄せながら、一本鎖 DNA をそれぞれ別々に切ることを見出しました。高速原子間力顕微鏡を用いて、この一連の反応をリアルタイムで撮影することにも成功しました。
- ◆本研究成果によって CRISPR-Cas3 の技術改良を進めることが可能になり、CRISPR-Cas3 が安全性の高い国産ゲノム編集技術として医療応用、産業応用へ活用されることが期待されます。

3. 発表概要：

細胞内のゲノム情報を操作するためのツールとして注目される「ゲノム編集技術」は、基礎研究への利用はもちろんのこと、工業、農水産業、医療など、さまざまなライフサイエンス分野への社会実装が展開されています。

今回、東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野の吉見一人講師、真下知士教授らは、理化学研究所、金沢大学との共同研究で、これまでに国産ゲノム編集技術として開発してきた CRISPR-Cas3（注1）が狙ったゲノム配列を認識して二本鎖 DNA を切断する仕組みを、世界で初めて明らかにしました。従来広く使われている CRISPR-Cas9 のハサミのように二本鎖 DNA を同時に切る方法とは異なり、CRISPR-Cas3 は二本鎖 DNA をほどいて片方の鎖を手繰り寄せながら、一本鎖 DNA をそれぞれ別々に切ることで、大きな DNA 断片を切断していることを見出しました。またこうした一連の反応を、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM、注2）を用いて映像として撮影することに成功しました。

本研究成果によって CRISPR-Cas3 の効率化や安全性の強化といった技術改良が容易になり、優れた国産ゲノム編集技術として新たな創薬や遺伝子治療などへの利用、農水産物の品種改良といった産業利用など、さまざまな分野への応用が進展することが期待されます。本研究成果は、2022年8月30日、国際科学雑誌「*Nature Communications*」オンライン版で公開されました。

4. 発表内容：

細胞内のゲノム情報を操作できるゲノム編集技術は、生命現象を解明するような基礎研究はもちろんのこと、工業におけるバイオ生産の効率化、農水産業における品種改良、医学分野における遺伝子治療や新規薬剤開発など、幅広い分野における活用が期待されています。これまでに発表者らは、クラス 1 に属する大腸菌由来 CRISPR-Cas3 がヒト細胞でゲノム編集できることを見出し、日本発の新しいゲノム編集技術として確立しました。CRISPR-Cas3 は、世界中で利用されている CRISPR-Cas9 とは異なり大きくゲノムを削る特徴を持ち、さらに認識標的配列が長いことターゲットへの影響も極めて低いと考えられています。そのため、安全性が高く確実に遺伝子を破壊できる国産ゲノム編集技術として医療応用、産業応用が期待されています。

ゲノム編集技術で遺伝子の変異を入れるためには、原則、狙ったゲノム部位の二本鎖 DNA を両方の鎖とも切ることが必要です。CRISPR-Cas3 システムは、Cascade と呼ばれる crRNA を含むタンパク質複合体が狙った DNA 配列を認識して結合し、そこに Cas3 タンパク質が結合することで DNA を切断します（図 1）。このように Cas3 タンパク質が DNA を切断する役目を担いますが、その機能を持つヌクレアーゼドメイン（注 3）は 1 つしか持たず、どのように二本鎖の DNA を切断するのかはこれまで明らかにされていませんでした。

今回、東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野の吉見一人講師、真下知士教授らは、理化学研究所放射光科学研究センターの竹下浩平研究員、金沢大学ナノ生命科学研究所の古寺哲幸教授らと共に、CRISPR-Cas3 システムを *in vitro* で再構築して特性解析を行った結果、CRISPR-Cas3 の DNA を切断するメカニズムを明らかにすることに成功しました。

第一に、Cascade 複合体が狙った DNA に結合した際、Cas3 は非特異的な一本鎖 DNA の切断活性が生じることを見出しました。すなわち、狙った配列周辺の一本鎖 DNA を非特異的に切断することが明らかになりました。この反応は「コラテラル切断」と言われています。第二に、Cas3 の持つ ATP 依存性ヘリカーゼドメイン（注 4）によって一本鎖 DNA が手繰り寄せられることで、標的部位の上流側で一本鎖 DNA の切断が繰り返され、結果的に二本鎖切断が導入されることが明らかになりました（図 1）。

さらに金沢大学が世界にさきがけて開発してきた顕微鏡技術である高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を用いることにより、この CRISPR-Cas3 の DNA 配列の認識から切断までの一連の様子を動画撮影することに成功しました。特に、Cascade 複合体が結合した部位の上流が「手繰り寄せ反応」によって短くなったり長くなったりする様子、さらには短くなった時に二本鎖 DNA が切断される様子は世界で初めて観測されました（図 2）。

本研究により CRISPR-Cas3 による狙った二本鎖 DNA 切断のダイナミクスが明らかになりました。大腸菌などの細菌内では、ウイルスやファージなどの外来 DNA を分解・除去するために、CRISPR-Cas3 のこうした一連の反応が生じていると推測され、細菌内での CRISPR-Cas システムの一端が明らかになりました。

同時に、ヒト細胞内でゲノム編集技術として利用した場合、本反応が繰り返し生じることで DNA を大きく削り、大規模な欠失を引き起こすと考えられました。本研究により得られた動的情報は、CRISPR-Cas3 を、さらなる高効率・高精度なゲノム編集技術へ発展させる上で重要かつ基盤的な知見になり、今後の改良が期待されます。

なお本研究成果は、独立行政法人日本学術振興会科学研究費基金（19K16025, 19KK0401）、科学研究費補助金（18H03974, 20H00327）、独立行政法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業（CREST）（JPMJCR1762）、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（JP20am0101070（番号 1251, 2463））の支援のもと、行われました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Communications」

論文タイトル：Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3

著者：Kazuto Yoshimi, Kohei Takeshita, Noriyuki Kodera, Satomi Shibumura, Yuko Yamauchi, Mine Omatsu, Kenichi Umeda, Yayoi Kunihiro, Masaki Yamamoto, and Tomoji Mashimo*

DOI：10.1038/s41467-022-32618-0

URL：<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32618-0>

6. 問い合わせ先：

<研究に関するお問い合わせ>

東京大学 医科学研究所附属実験動物研究施設 先進動物ゲノム研究分野
教授 真下 知士（ましも ともじ）

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/lab/animalresearch/section01.html>

金沢大学 ナノ生命科学研究所 ナノ計測学

教授 古寺 哲幸（こでら のりゆき）

<https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=3403>

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学 医科学研究所 国際学術連携室（広報）

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/>

理化学研究所 広報室 報道担当

<https://www.riken.jp/>

金沢大学 ナノ生命科学研究所 広報・事業企画グループ

<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/>

7. 用語解説：

(注1) CRISPR-Cas3

多くの細菌は、獲得性免疫に似た「CRISPR-Cas (クリスパー・キャス) システム」と呼ばれる防御システムを備えています。CRISPR-Cas3は、細菌、古細菌が持つCRISPRシステムの中でクラス1に属するCRISPRシステムのことです。複数タンパク質の複合体でDNAを人工的に切断する国産ゲノム編集ツールとして、2019年に報告しました。

(注2) 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM)

板バネの先に付いた針の先端で試料に触れ、試料の表面形状を可視化する顕微鏡。針と試料の水平方向の相対位置を変えながら試料表面の高さを計測することにより、試料の表面形状を可視化します。試料の表面を高速にスキャンすることにより1分子レベルで試料の動きを映像化できます。

(注3)ヌクレアーゼドメイン

タンパク質内のDNAを切断する役割を担う部分。Cas3タンパク質は1分子の中に1つこのドメインを有しています。

(注4) ATP依存性ヘリカーゼドメイン

タンパク質内のATP (アデノシン三リン酸) のエネルギーを利用してDNA二重らせんを一本にほどく部分。

8. 添付資料：

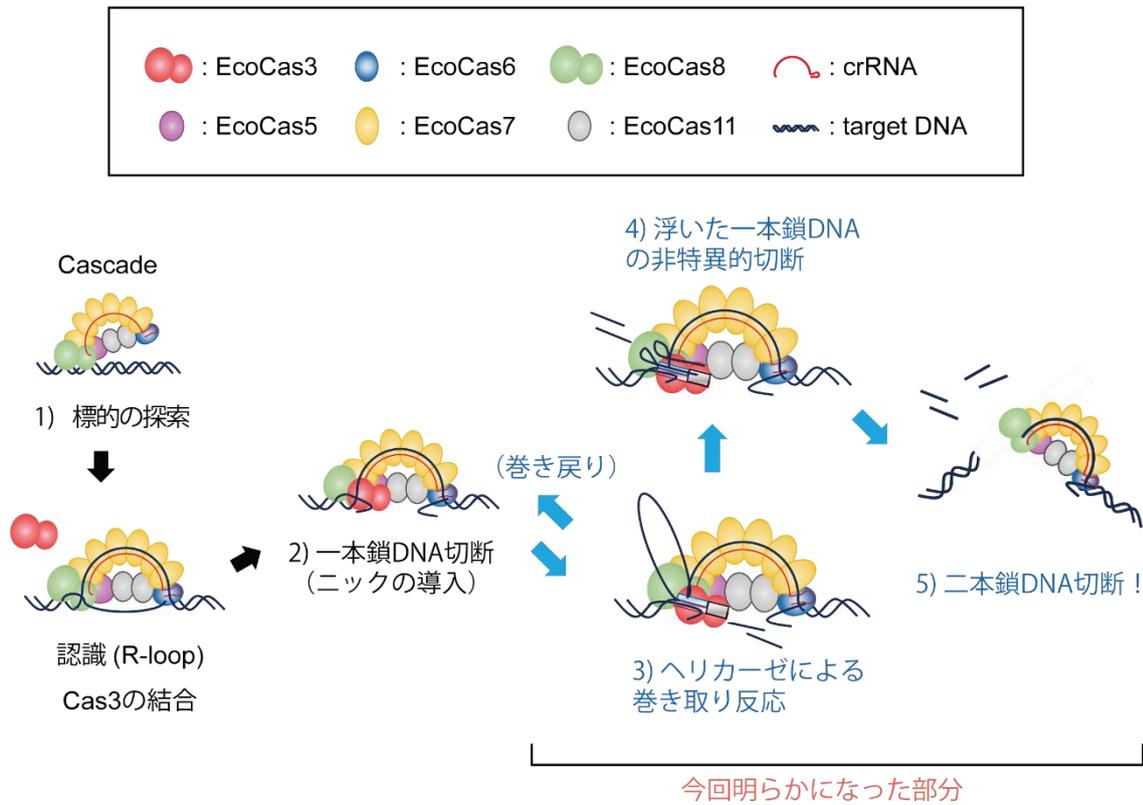


図1、CRISPR-Cas3 システムの二本鎖 DNA 切断の分子メカニズム

以下に記す順によって大規模ゲノム領域の欠失が起これと考えられる。1) Cascade 複合体が標的鎖を認識、結合して R-loop を形成し、Cas3 タンパク質が結合する。2) 構造的に浮いている一本鎖の DNA (非標的鎖) が切断される (ニックの導入)。3) Cas3 のヘリカーゼ活性により、標的配列の上流側の非標的鎖が手繰り寄せられ、削られる。4) 浮いたもう一本の DNA 鎖 (標的鎖) が Cas3 のコラテラル切断活性により切断され、二本鎖とも切断される。5) 本反応が繰り返し起きることで、上流側が削られる。

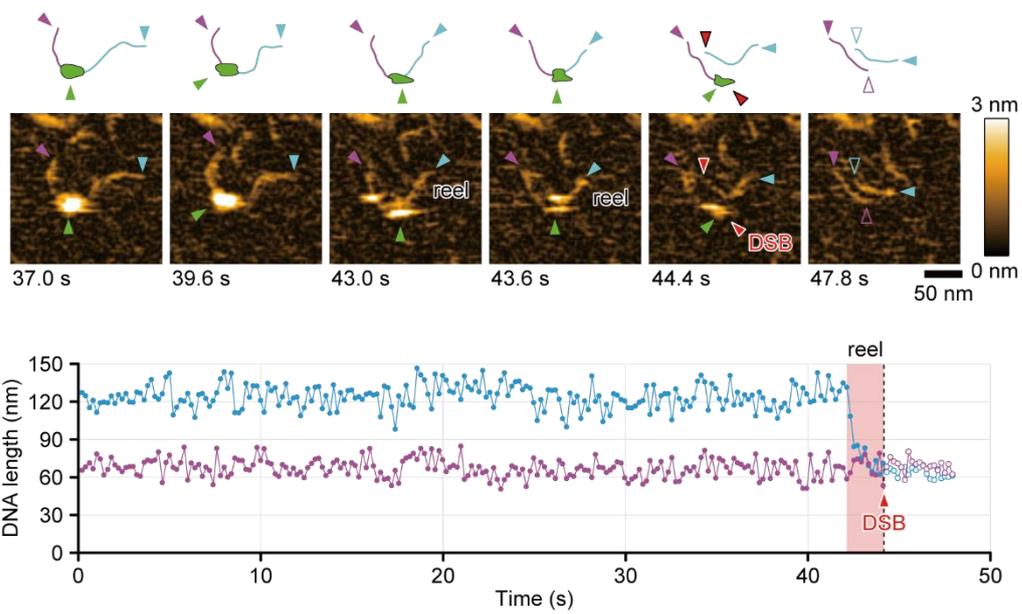


図 2、CRISPR-Cas3 による二本鎖 DNA の切断

高速 AFM の像。標的部位に結合した Cascade-Cas3 複合体（緑色）が上流の長鎖側（青色）を巻き取り、短くなった時に二本鎖切断（赤色、DSB）が導入される様子がわかる。下は長さを経時的に測定した図。