

CRISPR-Cas の分子機構の構造基盤の解明とこれに基づく遺伝子治療を目指した新規ゲノム編集ツールの開発

○濡木 理¹¹東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻○Osamu Nureki¹¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

近年 CRISPR-Cas を用いたゲノム編集による遺伝子治療が脚光を浴びている。最近になって血液疾患やがん、眼疾患などで治療や治験の報告が相次いでいる。しかし、Cas 本来の問題に加えてデリバリーやロックイン効率の問題が立ちはだかっており、対象疾患は未だ限定的である。特に CRISPR-Cas には、1. 分子量が大きくウイルスベクターに載せることが困難で細胞導入効率が低い、2. CRISPR-Cas は標的配列の下流にある 2～7 塩基からなる PAM 配列を（バクテリアが自己と非自己を識別するために）厳密に認識しており、Cas をゲノム編集に用いる適用制限となっている、3. 非特異的切断による Off target の問題など、現時点では医療応用に用いることは事実上不可能である。我々は、5 生物の Cas9 と 4 生物種の Cas12 に関して、ガイド RNA、ターゲット DNA との複合体の構造解析に成功している。さらに、立体構造に基づき、小型で単純化した PAM 配列を認識する変異体の創出にも成功した。今後改良型 CRISPR-Cas を用いて、さらに新しい遺伝子治療への応用を試みて行く。

〈文献〉

1. "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA" H. Nishimasu, F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang F and O. Nureki. *Cell* **156**, 935-949 (2014).
2. "Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9" H. Nishimasu, L. Cong, W. X. Yan, F. A. Ran, B. Zetsche, Y. Li, A. Kurabayashi, R. Ishitani, F. Zhang and O. Nureki. *Cell* **162**, 1113-1126 (2015).
3. "Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9" H. Hirano, J. S. Gootenberg, T. Horii, O. O. Abudayyeh, M. Kimura, P. D. Hsu, T. Nakane, R. Ishitani, I. Hatada, F. Zhang, H. Nishimasu and O. Nureki. *Cell* **164**, 950-961 (2016).
4. "Structural basis for the altered Pam specificities of engineered CRISPR-Cas9" S. Hirano, H. Nishimasu, R. Ishitani and O. Nureki. *Mol. Cell* **61**, 886-894 (2016).
5. "Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA" T. Yamano, H. Nishimasu, B. Zetsche, H. Hirano, I. M. Slaymaker, Y. Li, I. Fedorova, T. Nakane, K. S. Makarova, E. V. Koonin, R. Ishitani, F. Zhang and O. Nureki. *Cell* **165**, 949-962 (2016).
6. "Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems" M. Yamada, Y. Watanabe, J. S. Gootenberg, H. Hirano, F. A. Ran, T. Nakane, R. Ishitani, F. Zhang, H. Nishimasu and O. Nureki. *Mol. Cell*. **65**, 1109-1121 (2017).
7. "Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy" M. Shibata, H. Nishimasu, N. Kodera, S. Hirano, T. Ando, T. Uchihashi and O. Nureki. *Nat. Commun.* **8**, 1430 (2017).
8. "Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space" H. Nishimasu, X. Shi, S. Ishiguro, L. Gao, S. Hirano, S. Okazaki, T. Noda, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, H. Mori, S. Oura, B. Holmes, M. Tanaka, M. Seki, H. Hirano, H. Aburatani, R. Ishitani, M. Ikawa, N. Yachie, F. Zhang and O. Nureki. *Science* **361**, 1259-1262 (2018).
9. "Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme" S. N. Takeda, R. Nakagawa, S. Okazaki, H. Hirano¹, K. Kobayashi, T. Kusakizako, T. Nishizawa, K. Yamashita, H. Nishimasu and O. Nureki. *Mol. Cell* **81**, 558-570 (2021).