

原核生物免疫システム因子の結晶構造解析 Crystal structure analysis of a ribonucleoprotein complex responsible for the immune system in prokaryote

沼田倫征*, 大澤拓生

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, 〒305-8566 つくば市東 1-1-1

Tomoyuki Numata and Takuo Osawa

Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan.

1 はじめに

原核生物のゲノムには、ウイルス核酸に由来する配列を含んだ遺伝子座が存在する。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) と呼ばれるこのゲノム領域には、外来核酸に由来するスペーサー配列とリピートと呼ばれる決まった配列が交互に繰り返し配置されている。個々のスペーサーの塩基配列は異なり、多様な配列が CRISPR 領域に挿入されている。近年、このゲノム領域がウイルス感染の抑制に関わるなど原核生物の生体防御において重要な役割を担うことが明らかとなっている。CRISPR-Cas システムと呼ばれるこの生体防御システムは 2 つの段階からなる。まず、ウイルスが原核生物に感染した際、原核生物はウイルス DNA を異物として認識・切断し、その一部を新たなスペーサー配列として自己の CRISPR 領域に取り込む。これは、ウイルスの感染をゲノムに記憶することを意味し、また、過去の感染記録をゲノムにコードしていることを示している。その後、ウイルスが再感染すると、それに呼応して CRISPR 領域から crRNA (CRISPR RNA) が合成され、Cas (CRISPR associated) タンパク質と会合してエフェクター複合体を形成し、crRNA のスペーサー配列と相補的な配列を持った外来核酸を切断し排除する。このように CRISPR-Cas システムは、スペーサー配列特異的に外来遺伝子の発現を抑制しウイルスの増殖を阻止するという、いわば原核生物における免疫様システムを構築している。

タイプ III-B のエフェクター複合体は 6 種類 (Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6) の Cas タンパク質と crRNA から構成され、RNA を切断する。本申請研究では、タイプ III-B のエフェクター複合体の構造機能解析を推進し、エフェクター複合体が外来遺伝子の発現をサイレンシングする仕組みを原子分解能レベルで理解することを目指す。

2 実験

大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を宿主として、Cmr2 と Cmr3 の組換えタンパク質を調製した。得られたサンプルを用いて、Cmr2-Cmr3 複合体の結晶化

条件をスクリーニングした。その結果、ヌクレオチド (3'-AMP または ATP) 存在下で、12.5-15% 2-propanol, 18 mM MgCl₂, 45 mM MES (pH 6.0), 20 mM ammonium acetate, 10 mM sodium acetate, 3% PEG4000 をリザーバーとした条件下において複合体の結晶を得た[1]。PF の BL-17A において複合体結晶の回折データを測定し、Cmr2 をサーチモデルとした分子置換法により、Cmr2-Cmr3 複合体結晶の位相を決定した。最終的に、3'-AMP が結合した Cmr2-Cmr3 複合体の結晶構造を分解能 2.6 Å で、また、ATP が結合した Cmr2-Cmr3 複合体の結晶構造を分解能 2.5 Å で決定した[2]。

3 結果および考察

Cmr2 は 4 つのドメイン (ドメイン I, II, III, IV) から構成されており、複合体中における Cmr2 の構造は、Cmr2 単独の結晶構造とよく類似していた。一方、Cmr3 は 3 つのドメイン (N 末端ドメイン, 挿入ドメイン, C 末端ドメイン) から成り、N 末端ドメインと C 末端ドメインの構造は、フェレドキシン様フォールドとよく類似していた。また、Cmr3 の N 末端ドメインと C 末端ドメインの立体的な配置は、前駆体 crRNA のプロセッシングに関わる Cas6 のそれと類似していることが明らかとなった。さらに、Cmr3 において、Cas6 の一本鎖 RNA 結合領域に相当する部分は、塩基性領域を形成していたことから、Cmr3 は一本鎖 RNA と相互作用することが推定された。

Cmr3 は挿入ドメインを利用して、Cmr2 のドメイン I と会合していた。また、Cmr2 および Cmr3 の分子会合面には、深いクレバスが形成されており、そのクレバスの奥深くにヌクレオチド (3'-AMP または ATP) がアデニン塩基特異的に結合していた (図 1)。このクレバスがプラスにチャージしていること、クレバスの大きさが一本鎖 RNA の結合に適していること、また、crRNA の 5' 末端がアデノシンとして保存されていることから、このクレバスに crRNA の 5' 側が結合することが示唆された。ゲルシフトアッセイを行ったところ、Cmr2-Cmr3 複合体は一本鎖 RNA と相互作用することが確認された。以上から、Cmr2-Cmr3 複合体は crRNA の 5' 側の認識

に関わることが推定され、エフェクター複合体が外来 RNA を認識・分解する際、Cmr2-Cmr3 複合体は crRNA が結合するためのプラットフォームとして機能していると考えられる。

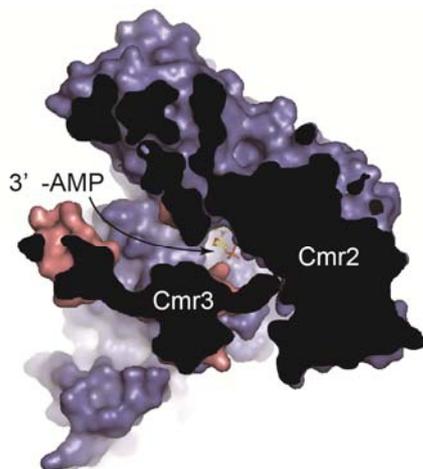


図 1: 3'-AMP と結合した Cmr2-Cmr3 複合体の結晶構造. 分子会合面に大きなクレバスが存在し,その奥深くにヌクレオチド (3'-AMP または ATP) がアデニン塩基特異的に結合している.

4 まとめ

Cmr2-Cmr3 複合体の結晶構造を決定し、エフェクター複合体中における Cmr2-Cmr3 複合体の役割を提案した。

謝辞

X 線回折データの収集にあたり、数多くの技術的支援を賜りました PF ビームラインスタッフの皆様にご感謝いたします。

参考文献

- [1] T. Osawa *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F* **69**, 585-587 (2013).
- [2] T. Osawa *et al.*, *J. Mol. Biol.* **425**, 3811-3823 (2013).

* t-numata@aist.go.jp