

## 精密な遺伝子改変を志向したゲノム編集技術への細胞機能の利用

(広大院医系科学) ○野村 渉

Genome Editing Technology Using Cellular Functions for Precise Genetic Modification  
(Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University) ○Wataru  
Nomura

Genome editing has paved the way for highly efficient gene correction toward the next generation gene therapy. CRISPR-Cas9 has been developed for genetic modification of a variety of organisms. In human gene therapy applications, the low efficiency of homologous recombination in genome editing and off-target effects are critical issues that must be resolved for safer use. In homologous recombination, the target sites are modified precisely as per the donor sequences. Homologous recombination is known to be predominant in the S/G2 phases of cell cycle. There are several applications that utilize small molecules to control genome editing activity in cells to repress off-target effects or increase homologous recombination. However, it is difficult to apply these methods to in vivo therapy. We have developed “cell cycle-dependent genome editing” to control genome editing without the help of small molecules and found that it can solve the above critical issues.

*Keywords* : Anti-CRISPR; Cell Cycle; CRISPR-Cas9; Genome Editing; Homologous Recombination

CRISPR-Cas9 を利用したゲノム編集技術は生物種を問わず遺伝子改変を高効率に行える技術として発展してきている。特にヒトを対象とした遺伝子治療においても *ex vivo* での鎌状赤血球症の治療法は FDA 承認を得ており、ヒト体内 (*in vivo*) でのゲノム編集法も開発が進んでいる。標的遺伝子における特異的な遺伝子切断にはゲノム編集ツールが機能するが、切断後の修復過程は細胞内因子に依存する。修復過程には非相同末端結合 (Non-homologous End Joining; NHEJ) と相同組み換え (Homology-directed Repair ; HDR) が存在する。NHEJ は効率が高いが、標的配列における数塩基の挿入や欠失 (Indel) が様々に起こる。それに対して HDR では標的周辺の配列と新たに導入する配列を有するドナー遺伝子をゲノム編集の際に同時に細胞に導入することで、低効率ではあるが標的箇所に正確に新しい配列を有する細胞が得られる。HDR は S/G2 期に優位になるため、薬剤で細胞周期を停止させる手法などが報告されている<sup>1)</sup>。これらの手法は培養細胞では有効な手段となるが、*in vivo* での利用は困難なことが容易に予測できる。また、薬剤による細胞への影響も考慮する必要がある。

CRISPR-Cas システムは細菌や古細菌が有している防御システムであり、ファージの侵入時に発動する。それに対するカウンター分子として様々な anti-CRISPR がプロファージから発見されている。CRISPR-Cas システムのヒト細胞におけるゲノム編集への応用は化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の Cas9 (SpCas9) が最初に報告され、最も汎用されている。SpCas9 を強力に阻害する anti-CRISPR として AcrIIA4 が知られている。我々は、『細胞周期』と『anti-CRISPR (AcrIIA4)』に着目し、HDR 反応効率の向上を試みた。S/G2 期において SpCas9 を活性化するために、G1 期に細胞

核内に集積し、S/G2期に分解される Cdt1 と AcrIIA4 の融合タンパク質 (AcrIIA4+Cdt1) をゲノム編集時に利用することで G1 期では SpCas9 が阻害され、S/G2 期ではゲノム編集活性が回復すると考えられた。解析の結果、HDR 効率が向上することに加えて、オフターゲット作用の抑制も見られることが明らかとなった<sup>2)</sup>。この手法では薬剤や光刺激などを用いることなく細胞周期に依存してゲノム編集活性を制御することが可能であるため、*in vivo* での正確なゲノム編集への応用も可能であると考えて研究を進めている。また、CRISPR-Cas システムは SpCas9 以外にも多数発見されており、ヒト細胞のゲノム編集への応用が進められている。それらに対する anti-CRISPR も同様に存在するため、非常に高い拡張性も期待される。また、Cas9 側の機能と組み合わせることでより正確なゲノム編集も可能になることも明らかとなってきている<sup>3,4)</sup>。

本手法において AcrIIA4+Cdt1 が細胞周期依存的に核内への集積と分解を繰り返していることは確認されていたが、実際にゲノム編集活性も制御していることを確かめることは困難であった。そこで転写活性制御を中心としたエピゲノム編集に利用される人工転写活性化因子の dCas9-VPR を Cas9 に代替して用い、蛍光タンパク質の発現制御によって細胞周期依存性を検討した<sup>5)</sup>。dCas9 はヌクレアーゼの活性中心に変異が導入 (D10A/H840A) されており、DNA 結合機能だけを保持している。VPR は強力な転写活性化ドメイン (VP64-p65-Rta) であり、dCas9-VPR がプロモーター領域に結合するようガイド RNA を設計した。蛍光観察により AcrIIA4+Cdt1 と転写活性の指標となる蛍光レポーターの発現を解析した結果、それらの発現は負の相関を示しており、AcrIIA4+Cdt1 の分解から蛍光レポーターが最大値を示すまでの時間差が約 5 時間程度であり、蛍光タンパク質のクロモフォア形成に要する時間などを考慮すると AcrIIA4+Cdt1 による dCas9-VPR の活性制御が細胞周期に応じて起こることが示唆されたと考えられる。

本講演ではこれらの結果に加え、細胞機能を利用するスマートケミストリーの可能性やゲノム編集技術の開発動向なども紹介する。

- 1) Molecular Switch Engineering for Precise Genome Editing. D. Matsumoto, W. Nomura, *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32, 639-648.
- 2) A Cell Cycle-dependent CRISPR-Cas9 Activation System Based on an Anti-CRISPR Protein Shows Improved Genome Editing Accuracy. D. Matsumoto, H. Tamamura, W. Nomura, *Commun. Biol.* **2020**, 3, 601.
- 3) Cas9-Geminin and Cdt1-fused Anti-CRISPR Protein Synergistically Increase Editing Accuracy. D. Matsumoto, K. Kishi, E. Matsugi, Y. Inoue, K. Nigorikawa, W. Nomura, *FEBS Lett.* **2023**, 597, 985-994.
- 4) SpCas9-HF1 Enhances Accuracy of Cell Cycle-dependent Genome Editing by Increasing HDR Efficiency, and by Reducing Off-target Effects and Indel Rates. D. Matsumoto, E. Matsugi, K. Kishi, Y. Inoue, K. Nigorikawa, W. Nomura, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2024**, 35, 102124.
- 5) Cell Cycle-dependent Regulation of CRISPR-Cas9 Repetitive Activation by Anti-CRISPR and Cdt1 Fusion in the CRISPRa System. K. Kishi, K. Nigorikawa, Y. Hasegawa, Y. Ohta, E. Matsugi, D. Matsumoto, W. Nomura, *FEBS Lett.* **2024**, *in press*.