

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成  
による細胞制御技術の創出」  
研究課題「ゲノム配列の新解釈による設計自由度と  
進化可能性の獲得」

## 研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：伊藤 隆司  
(九州大学 大学院医学研究院 教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

ゲノム DNA の正確な複製は、最も基本的な細胞機能である。複製フォークが停止・崩壊すると様々な組換え修復機構が作動し、その副産物として重複・欠失・逆位等の構造多型が生じる。構造多型は進化的一大駆動力である。特に遺伝子重複は、遺伝子量効果の発揮のみならず、配列多様化によるパラログ創成にも不可欠であることから、最も創造的な変異とも云える。しかしながら、それを狙って誘導できるゲノム編集技術はこれまで存在していなかった。

我々は、触媒不活性型 Cas9 (dCas9) が出芽酵母の複製フォーク進行を阻害して、局所的にゲノム不安定性を増大させることを明らかにした。これを契機に我々は、細胞に Cas9 変異体標的部位を複製困難点として解釈させることによって、設計自由度の高い遺伝子重複誘導技術を開発できる可能性に思い至った。出芽酵母をモデルにこの可能性を追求した結果、戦略的に配置した Cas9 ニッケース (nCas9) と複製フォークの衝突による単一末端性 DNA 2 本鎖切断 (seDSB) の生成を利用して、メガベース (Mb) サイズの單一コピー領域であっても高率に重複可能な技術 PNAAmp と、縦列反復を 2 コピーから数百コピーにまで伸長可能な技術 BITREx の開発に成功した。さらに、両技術の哺乳類細胞への拡張にも成功した。また、DSB 修復時のシトシン脱アミノ化による変異導入の拡がりを dCas9 が制御できることも見出して、領域特異的変異導入法の基盤も構築した。これらにより、遺伝子重複による進化に対する構成的アプローチに必要な技術基盤が整備された。

### (2) 顕著な成果

#### < 優れた基礎研究としての成果 >

##### 1. Cas9 変異体による複製フォーク進行の阻害

概要: 出芽酵母を用いて、dCas9 と nCas9 が *in vivo* で複製フォークの停止・崩壊を誘導し、それに対する組み換え修復機構によってゲノムの構造多型が生じることを示した。この発見は、Cas9 変異体を利用する際の潜在的リスクに対する注意を喚起するとともに、ゲノム不安定性研究における新しい方法論を提供することになった。

##### 2. nCas9 の戦略的配置による新しいカテゴリのゲノム編集技術

概要: 直列反復配列 (ダイレクトリピート) に挟まれたゲノム領域の両外側に nCas9 を配置して、反復配列間の Single Strand Annealing (SSA) による当該領域の縦列重複を誘導する技術 PNAAmp と、縦列反復構造の隣接部位に nCas9 を配置して Break-Induced Replication (BIR) による当該反復構造の伸長を誘導する技術 BITREx を開発した。いずれも「複製フォーク進行の操作による内在性ゲノム領域の重複」という全く新しい概念のゲノム編集技術である。これにより、進化において最も創造的な変異である遺伝子重複の誘導が可能になった。

#### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

##### 1. 遺伝子量効果の操作

概要: PNAAmp は Mb サイズの領域でも 10% 超の効率で重複可能な能力を有する技術である。この特性を利用すれば、有用物質の生合成経路を構成する多数の酵素をコードする遺伝子座を出芽酵母ゲノム上でそのまま重複させることも可能である。また、BITREx は、長期培養によって標的遺伝子のコピー数を数百コピーまで增幅可能である。したがって、両技術とともに有用物質の生産への応用が期待される。一方、ヒト培養細胞における PNAAmp や BITREx は、疾患関連コピー数多型や縦列反復変動の再現・是正を通して、疾患・治療のモデリングにおけるユニークな手法となることが期待される。

##### 2. 超多重遺伝子族の創出

概要: BITREx における標的ゲノム領域は、細胞内で一本鎖 DNA の状態で存在する時間が長いため、変異原に対する感受性が高い。そのため、例えばシトシン脱アミノ化剤・酵素の存在下

で BITREx を行うと、反復単位を多様化しながら縦列反復を伸張させることができるのである。したがって、多重遺伝子族の創出や、それに基づくリンパ球や嗅覚神経のような独特な細胞集団創出への応用が期待される。

#### ＜代表的な論文＞

- Doi G, Okada S, Yasukawa T, Sugiyama Y, Bala S, Miyazaki S, Kang D, Ito T. (2021) Catalytically inactive Cas9 impairs DNA replication fork progression to induce focal genomic instability. *Nucleic Acids Res.* 49, 954-968.

概要:dCas9 の結合によって、出芽酵母 *CUP1* アレイが短縮することを見出した。この現象の解析から、dCas9 が *in vivo* で複製フォークの進行を阻害することを初めて示した。更に、遺伝学的解析から、Rad52、Rad59 および Ctf4、Mrc1、Rrm3 が短縮をそれぞれ正と負に制御することを明らかにした。dCas9 に関して、その利用における潜在的な危険性とゲノム不安定性研究における新しいツールとしての可能性を示した。

- Sugiyama Y, Okada S, Daigaku Y, Kusumoto E, Ito T. (2024) Strategic targeting of Cas9 nickase induces large segmental duplications. *Cell Genom.* 4, 100610.

概要:両末端のダイレクトリピートと内部の複製開始点を有するゲノム領域の両外側に、それぞれ別の DNA 鎖を切断するように一对の nCas9 を配置することによって、縦列反復を誘導する PNAAmp 法を開発した。出芽酵母では 1 Mb の領域であっても 10%超の効率で重複が可能であった。また、スプリント DNA の併用で両末端に配列相同性を欠く領域の縦列反復も誘導可能になった。更に、哺乳類細胞においても PNAAmp が可能であった。PNAAmp は、複製フォークの崩壊によって構造多型を生み出す新しいタイプのゲノム編集技術である。

- Takesue H, Okada S, Doi G, Sugiyama Y, Kusumoto E, Ito T. (2025) Strategic targeting of Cas9 nickase expands tandem gene arrays. *Cell Genom.* 5, 100811.

概要:隣接部位への nCas9 の配置によって縦列反復構造を伸長する BITREx 法を開発した。出芽酵母では、*CUP1* 遺伝子の反復回数を 14 回から 500 回以上に増やして、*CUP1* アレイを 28 kb から 1 Mb 以上に伸長できた。また、スプリント DNA の併用で單一コピー遺伝子からでも縦列遺伝子アレイを創成することが可能になった。更に、哺乳類細胞においても BITREx が可能であった。BITREx も、PNAAmp と同様に、複製フォークの崩壊によって構造多型を生み出す新しいタイプのゲノム編集技術である。

## § 2 研究実施体制

### (1)研究チームの体制について

#### ①伊藤グループ

研究代表者:伊藤隆司(九州大学 大学院医学研究院 教授)

- ・研究項目1:任意のゲノム領域を重複させる技術
- ・研究項目2:任意のゲノム配列に選択圧をかける技術
- ・研究項目3:任意のゲノム領域に変異を導入する技術
- ・研究項目4:遺伝子重複による進化の再構成
- ・研究項目5:縦列反復構造による適応の構成的理解

#### ②大学グループ

主たる共同研究者:大学保一(公益財団法人がん研究会 がん研究所 プロジェクトリーダー)

- ・研究項目6:遺伝子重複を形成する DNA 複製フォーク動態

### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

出芽酵母ゲノム編集用プラスミドシリーズを構築し、当研究室およびナショナルバイオリソースプロジェクト酵母 (NRBP::Yeast) から国内外の 63 研究室に配布した。