様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　５ 月 １９ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｈ０２８２７

研究課題名（和文）抗CRISPR分子を活用したオフターゲット作用機序の解明とゲノム編集の安全化

研究課題名（英文）Elucidation of off-target effects mechanisms of action using anti-CRISPR molecules for genome editing safety

研究代表者
野村　渉（Nomura, Wataru）

広島大学・医系科学研究科（薬）・教授

研究者番号：８０４６３９０９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム編集技術の正確性と安全性を高める細胞周期依存型ゲノム編集方法について、細胞内での作用メカニズムについて転写活性化の仕組みを利用してanti-CRISPRとCas9の相互作用タイミングなどを観察することに成功した。また、複数の標的遺伝子で正確なゲノム編集が行えることが示され、広い適用範囲が期待できる結果が得られた。発現タイミングの異なるGemininを利用した検討も行い、Cdt1の有用性が改めて確認できたが、Gemininの利用方法に関する示唆も得ることができた。細胞周期依存型ゲノム編集のin vivoへの応用に関してアデノ随伴ウイルスに搭載可能なSaCas9を取り入れた検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
オフターゲット作用の低減に関する研究は国外のグループによる開発競争が激化しており、特に安全面が重要となる医療分野、育種・品種改良分野での応用においては非常に重要な要素技術になる。今回の成果で、anti-CRISPRを利用したオフターゲット作用の抑制について、細胞内でのCas9との相互作用メカニズムを明らかできたことで、さらに正確性の高いゲノム編集法へと改良できる可能性が示された。anti-CRISPRの医療や産業への応用は比較的進んでいないため、正確性の高いゲノム編集法のin vivoなどへの応用だけでなく、新しい活用方法にもつながる成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Regarding the cell cycle-dependent genome editing method that enhances the accuracy and safety of genome editing technology, we succeeded in observing the interaction timing of anti-CRISPR and Cas9 in cells using transcriptional activation by dCas9-VPR. The results also showed that accurate genome editing can be performed on multiple target genes, and that a wide range of applications can be expected. We also examined the use of Geminin, which shows different expression timing from Cdt1, and the usefulness of Cdt1 was once again confirmed. But we also obtained suggestions on how to use Geminin in future applications. We also examined the in vivo application of cell cycle-dependent genome editing by incorporating SaCas9, which can be carried by adeno-associated viruses.

研究分野：生物化学

キーワード：ゲノム編集　CRISPR-Cas　アンチクリスパー　オフターゲット作用　タンパク質間相互作用

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術は安全面が最も憂慮される事項であり、特にゲノム上に存在する標的配列に類似した箇所での「意図しない」切断（オフターゲット作用）が問題視されている。特に医療などでの応用を考えた場合、オフターゲット作用による変異が引き起こす影響を精査する必要があり、そのためのコストは莫大になると予測される。一方で、オフターゲット作用を低減させるための研究も国際的に競争が激化している。そのアプローチとしてはヌクレアーゼ Cas9 が作用する時間（発現している時間）を極力短くすることを主眼に置き、ヌクレアーゼタンパク質の細胞内への直接的導入などの手法が報告されている。しかし、これまでにオフターゲット作用を完全に抑制できる決定的な技術の報告はない。その一因として DNA 切断後に起こる修復メカニズムが複雑であり、完全には理解されていないことが挙げられる。DNA 切断後には主に非相同末端結合（non-homologous end joining（NHEJ））が起こることが知られている。また、DNA 切断酵素と同時に切断サイト周辺配列に相同性をもつ１本鎖オリゴヌクレオチド（ssODN）やプラスミド DNA などのドナー遺伝子を導入しておくことで Homology Directed Repair（HDR）あるいは Homologous Recombination（HR）が起こる。NHEJ と HR/HDR それぞれの反応メカニズムに関与するタンパク質因子は異なることが知られているが、細胞周期などへの異なる依存性を示唆する結果も報告されている。NHEJ は主に G1 期で優先され、HR/HDR は S/G2/M 期で優先されるとされている。NHEJ の場合は生成する変異配列から望みの配列を選抜する段階が必要となるが、HR/HDR を利用することで DNA 切断後に導入される変異配列はドナー遺伝子の配列によって決定することができ、より正確なゲノム編集操作を行うことが可能になる。NHEJ と HR/HDR の細胞周期依存性を利用することで HR/HDR 反応を優先させることができると考えられた。

多様に存在する CRISPR 関連のタンパク質のなかでも抗活性（阻害）作用を有する多様な Anti-CRISPR タンパク質の存在が確認されている。CRISPR-Cas9 に働く Anti-CRISPR は AcrII であり、A1～A4 まで存在するうち特に AcrIIA4 が高い阻害活性を示すことが報告されている。AcrIIA4 は sgRNA と複合体を形成した Cas9 に対して結合し、その DNA 結合を阻害する。そのため、AcrIIA4 の存在下では Cas9 と sgRNA による DNA 切断が起こらない。この Anti-CRISPR の存在は Cas9 に対してより多彩な機能を付与できる可能性を拡げるものであると考えられた。その利用方法の一つとして細胞周期依存的に細胞内発現量が変化する Cdt1 との融合タンパク質の構築を試みた。細胞周期の特定の時期だけに発現する制御タンパク質である Cdt1 は DNA 複製の開始因子であり、G1 期に発現量が最大になり S/G2 期には分解される。この性質を利用して Anti-CRISPR の細胞内発現量を変化させることで細胞周期に応じた Cas9 ヌクレアーゼ活性の制御が可能になることが期待された。

２．研究の目的

本研究課題では多様な生物種において利用できるゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 について、特に安全性が重要になる応用面での懸念事項であるオフターゲット作用を抑制するために DNA 切断作用と DNA 修復機構がどのように関連してオフターゲット作用が現れるか、について独自に見出した Anti-CRISPR＋Cdt1 の融合タンパク質の作用によるオフターゲット作用抑制をヒントに作用機序を解明することで普遍的原理を探求することを目的とした。Anti-CRISPR＋Cdt1 を利用した HR/HDR 反応向上効果とオフターゲット作用抑制効果について Anti-CRISPR＋Cdt1 が Cas9 に対してどのような周期で作用し機能を阻害しているかを明らかにする。また、HR/HDR 反応の促進効果について現在得られているデータでは 1.6%から 2.0%への向上と幅の小さいものであるが、より促進効果のある発現タイミングなどの条件を明らかにする。さらに、現在実用されている SpCas9 以外の CRISPR-Cas システムにおいても同様の作用が確認されるか、Anti-CRISPR タンパク質の探索も含めて明らかにする。

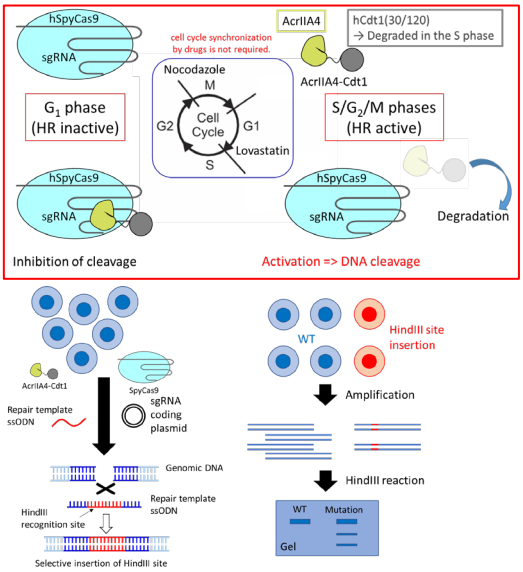


図 1.　細胞周期依存型ゲノム編集の概要

３．研究の方法

３－１．Single strand oligonucleotide（ssODN）を利用した HR 活性向上効果の検討

SpCas9 を用いたゲノム編集において SpCas9 に対する阻害作用を有する Anti-CRISPR である AcrIIA4 と G1 期において発現し、S/G2 期においてはユビキチンプロテアソーム系によって分解を受けるドメインである Cdt1 の融合ドメインを利用した場合に、HR 活性が高くなる S/G2 期でのゲノム編集活性が優位となり、HR/HDR 効率が向上し、オフターゲット作用が低下することを見出した（図 1）。更に HR/HDR 活性の向上を検討するために、ドナー遺伝子としてプラスミド DNA

ではなく、ssODN の利用を検討した。ssODN を用いた組み換えの場合は HDR 反応と統一する。SpCas9 と AcrIIA4-Cdt1 は自己分解ペプチド配列である T2A を介して遺伝子をつなげて発現ベクター上に配置した。これによって、細胞内で発現する SpCas9 と AcrIIA4-Cdt1 が等量に保たれる仕組みとなっている。発現ベクターにはエピソーマルベクターとして細胞内に安定的に保持されることが知られている pEBmulti-Hyg を利用した。pEB ベクター上に AcrIIA4-T2A-SpCas9 遺伝子を導入して構築したベクターを 293A 細胞に導入し、ハイグロマイシンを用いた薬剤選抜を 5 日間行った。その後、AAVS1、EMX1、VEGFA 遺伝子を標的とした sgRNA と HDR に必要な鋳型 DNA となる ssODN をエレクトロポレーションによって導入した。この ssODN には制限酵素 HindIII による認識配列が組み込まれるように設計されている。エレクトロポレーション後 48 時間後の細胞を回収し、ゲノムを抽出した。標的配列および相同性の高い非標的配列の切断配列周辺を PCR で増幅した。PCR 産物に対して、HindIII 処理、または T7E1 アッセイを行うことにより、HDR および NHEJ 効率を評価した。

３－２．転写制御系を利用した Anti-CRISPR と SpCas9 の細胞内相互作用の解析

AcrIIA4+Cdt1 を利用した細胞周期依存型ゲノム編集において、HR/HDR 効率の向上とオフターゲット作用の抑制が確認されたが、実際に細胞内において細胞周期依存的に AcrIIA4+Cdt1 と SpCas9 の相互作用が起こっているか、直接的に観察することは困難であった。そこで、DNA 切断を不活化した dCas9 に転写活性化ドメインである VPR を融合した人工転写因子を利用して、細胞内で AcrIIA4+Cdt1 と同時に発現することで AcrIIA4+Cdt1 が発現している場合は転写活性化が抑制され、AcrIIA4+Cdt1 が S/G2 期に分解を受けたタイミングで転写活性化が確認できる仕組みを構築して検証を行うことにした（図 2）。

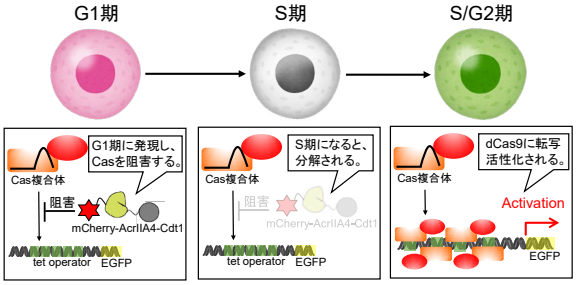

図 2.　dCas9-VPR を使った転写活性化系を利用した観察について

293A 細胞に mCherry+AcrIIA4+Cdt1 をコードした pEB ベクターを導入し、48 時間後から Hygromycin による薬剤選択を行った。その後、96 ウェルにてシングルセル化を行い、mCherry+AcrIIA4+Cdt1 が安定発現している細胞株を取得した。得られた細胞に dCas9-VPR 遺伝子（pcDNA3.1 に搭載）と標的となる tet-on promoter+EGFP 遺伝子配列、gRNA 発現カセットを搭載したベクターを同時に導入した。24 時間培養後に蛍光顕微鏡（BX-800Z, キーエンス社）でタイムラプス蛍光観察を 48 時間行った。

３－３．Adeno-associated virus（AAV）を利用した SaCas9 発現系の構築

細胞周期依存型ゲノム編集の in vivo（生体内）での利用を実現するためには、細胞・組織へのデリバリー効率が優れているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの利用が必要とされる。AAV ベクターは特徴として、エピソーマルベクターと同じ複製機能を有している点、細胞・組織へのデリバリー効率が優れている点、低い抗原性などヒトへの副作用が少ない点が挙げられ、遺伝子治療の手法としての適用が増えてきている。しかし、搭載可能な遺伝子サイズが通常 4.4～4.7kb と限定されているため、SpCas9 を利用する場合は異なる 2 個の AAV ベクターに SpCas9 遺伝子の前半部分（SpCas9-N）と後半部分（SpCas9-C）を搭載し、細胞感染後に組み換え反応が起こることで SpCas9 遺伝子の全長が得られる仕組みを利用する必要があり、感染効率や発現効率に問題が生じる。そこで、より分子量（遺伝子サイズ）の小さい SaCas9 の利用を検討することにした。比較的感染性が広汎な血清型 2 の AAV ベクターを選択して、標的遺伝子として AAVS1, EMX1, VEGFA 遺伝子を選択し、ガイド RNA を設計して、AAV ベクター上にコードした U6 プロモーター配列下流に導入した。SaCas9+gRNA 配列を搭載した AAV ベクターは AAV 産生用細胞株 AAVpro293T 細胞に導入して AAV を産生し、AAV を精製後に 293A 細胞に感染させ、各標的配列におけるゲノム編集効率を算出した。

３－４．細胞周期依存型ゲノム編集における活性化タイミングの検討

これまで、S/G2 期に分解を受ける Cdt1 を利用したゲノム編集を行ってきたが、Cdt1 とは逆の発現パターンを示す Geminin においてユビキチン化を受けるペプチド配列を付与した AcrIIA4-Geminin（AcrIIA4-Gem）を構築し、ゲノム編集効率への影響を検証することにした。293A 細胞を用いて、細胞周期的な Cas9 の活性化と切断後の修復経路における関係性を評価した。（３－１）と同様に、AcrIIA4-Gem の遺伝子をエピソーマルベクター上に導入した。AcrIIA4-Gem と SpCas9 は同一プロモーターから転写・翻訳され、それらの間にある自己切断ペプチド配列（T2A）を介した切断により、細胞内で等量産生される。ベクターを 293A 細胞に導入し、ハイグロマイシンを用いた薬剤選抜を 5 日間行った。その後、AAVS1、EMX1、VEGFA 遺伝子を標的とした sgRNA と HDR に必要な鋳型 DNA となる ssODN をエレクトロポレーションによって導入した。この一本鎖オリゴ DNA には制限酵素 HindIII による認識配列が組み込まれるように設計されている。エレクトロポレーション後 48 時間後の細胞を回収し、ゲノムを抽出した。標的配列および相同性の高い非標的配列の切断配列周辺を PCR で増幅した。PCR 産物に対して、HindIII 処理、または T7E1 アッセイを行うことにより、HDR および NHEJ 効率を評価した。

３－５．AcrIIA4 と AcrIIA5 の活性制御能に関する検討

AcrIIA4 と同様に SpCas9 を阻害することが知られる anti-CRISPR である、AcrIIA5 を細胞周期依存的に発現させた場合でも HDR 効率の向上が可能かを評価した。（３－４）で示した方法のうち AcrIIA4 遺伝子を AcrIIA5 に置換したベクターを構築し、安定発現株の樹立、gRNA および ssODN の導入、その後のゲノム編集効率の算出については同様の手法を用いて評価を行った。

## ４．研究成果

### ４－１．Single strand oligonucleotide（ssODN）を利用した HR 活性向上効果の検討

AAVS1 遺伝子でのゲノム編集では、SpCas9 単独で発現した場合と比較して AcrIIA4+Cdt1 を同時に発現することで HDR 効率は約 1.7 倍に 向上した。また、標的配列での NHEJ を 79%低下させることが明らかになった。オフターゲット作用については、MYBPC2 遺伝子において SpCas9 単独での発現時は 2.1%だったが、AcrIIA4+Cdt1 を同時に発現することで 0.4%まで低下させることがわかった（図 3A）。この結果より、ドナー遺伝子にプラスミドを用いた場合と比較して ssODN を用いるほうが HDR 効率を向上させる効果が高いことが示された。この理由としては、ドナー遺伝子のトランスフェクション効率の違いや、二本鎖 DNA ドナーの場合に SpCas9 による切断が必要となるため、その切断効率の影響などが考えられる。EMX1 遺伝子を標的とした場合にも同様の結果が得られるか検証した。その結果、SpCas9 単独の場合と比較して AcrIIA4+Cdt1 を同時発現した場合には HDR 効率が約 4 倍向上し、オフターゲット配列候補の HCN1 遺伝子での変異導入は 86.5%低下した。しかし、もう一つのオフターゲット候補配列である MFAP1 遺伝子ではあまり効果が得られていなかった（図 3B）。同様に、VEGFA 遺伝子においては HDR 効率が 4.5 倍に向上した。 VEGFA 遺伝子におけるオフターゲット作用は 2 箇所の候補配列のどちらにおいてもオフターゲット作用の低下が確認された（図 3C）。

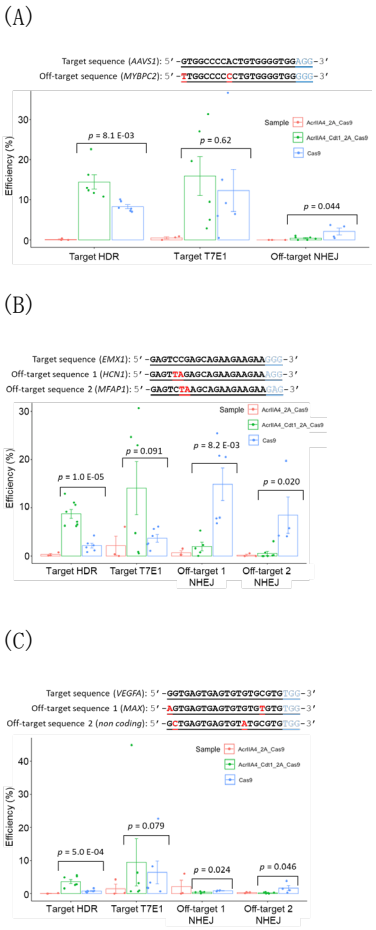


図 3．ssODN を用いた細胞周期依存型ゲノム編集における NHEJ/HR 効率の評価

### ４－２．転写制御系を利用した Anti-CRISPR と SpCas9 の細胞内相互作用の解析

予備検討として、mCherry-AcrIIA4-Cdt1、dCas9-VPR、tet-on promoter-EGFP、U6p-gRNA の各プラスミドを同時にリポフェクション法で細胞内導入し、蛍光観察を行った。mCherry-AcrIIA4-Cdt1 が導入されれば、G1 期に mCherry の蛍光が観察できる。また、dCas9-VPR、tet operater-EGFP 及び U6p-gRNA が導入されれば、S/G2 期で GFP の蛍光が観察できる。しかし、タイムラプス観察において、mCherry と GFP 両方の蛍光が観察できる細胞はほぼ得られなかったため、4 種のプラスミド全てを同時に導入するのは困難であると考えられた。そこで、研究方法に述べたように、Tet-on promoter-EGFP と U6p-gRNA のプラスミドを同一のプラスミドベクターに組み込み、導入するベクターの数を減少させた。また、mCherry-AcrIIA4-Cdt1 の発現ベクターはエピソーマルベクターとして細胞内に維持される pEBmulti-Hyg をベースとしたプラスミドに切り替えた。mCherry-AcrIIA4-Cdt1 安定発現株はシングルセルクローニングにて取得し、それを用いて dCas9-VPR と EGFP-U6p-gRNA の各発現ベクターを導入した細胞の蛍光観察を行った。mCherry と GFP の蛍光が共に観察できる細胞に着目し、蛍光強度の経時的変化を解析した。mCherry の蛍光は Cdt1 が発現している G1 期で強くなり、GFP の蛍光は AcrIIA4-Cdt1 が分解される S/G2 期で強くなることが想定された。G1 期で mCherry-AcrIIA4-Cdt1 が発現している間は dCas9-VPR による転写活性が抑制されており、S/G2 期に移行した際に dCas9-VPR による転写が活性化され、EGFP 発現が起こっていると考えられる様子が観察された（図 4）。このことから、細胞内での AcrIIA4-Cdt1 と

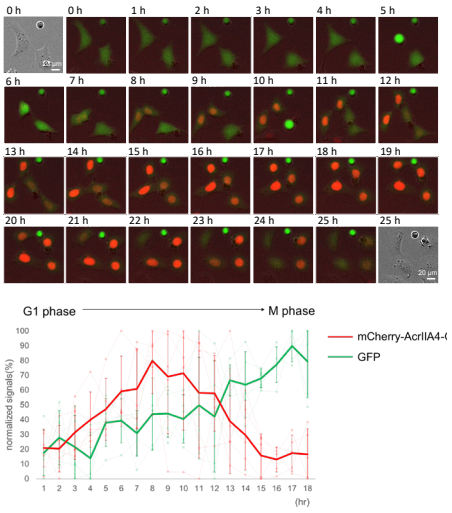


図 4．dCsa9-VPR を利用した細胞内での SpCas9/AcrIIA4+Cdt1 の相互作用解析

Cas9 の細胞周期依存的な相互作用変化について、転写活性化反応を介するシステムで観察可能になったことが示されたと考えられる。

AcrIIA4-Cdt1 と Cas9 を利用した S/G2 期に限定したゲノム編集タイミングにより HR 効率の向上とオフターゲット作用の抑制効果が得られることがこれまでに示されていたが、本システムを利用することで、当初想定したように細胞周期に依存して AcrIIA4 と Cas9 の相互作用が変化していると考えられる結果を得ることができた。mCherry と EGFP の蛍光タンパク質発現においては翻訳からフォールディング過程とクロモフォア形成に要する時間のために AcrIIA4 と Cas9 の実際の相互作用タイミングとは時間的なタイムラグが生じていることが考えられる。今後は転写活性化の開始から EGFP が転写、翻訳、フォールディングを経て蛍光観察が可能になるまでの時間について補正を行っていくことで、幅広く Anti-CRISPR と Cas エンドヌクレアーゼの細胞内での相互作用解析に利用できる手法としての確立が期待される。

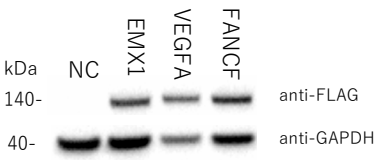


図 5. SaCas9 の AAV デリバリーによる発現確認

４－３．Adeno-associated virus（AAV）を利用した SaCas9 発現系の構築

SaCas9 を搭載した AAV ベクターによって作成した AAV を 293A 細胞に感染させ、48 時間後にゲノム抽出を行い、それをテンプレートとして EMX1、VEFGA、FANCF の各標的配列を増幅するためのプライマーを用いて PCR を行った。増幅したフラグメントについては T7E1 アッセイを行い、ゲノム編集効率の算出を行った。各標的配列でのゲノム編集効率は EMX1; 85.0%、VEGFA; 19.0%、FANCF; 71.5%であった。また、AAV 感染後の細胞での SaCas9 の発現を確認するためにウェスタンブロッティングを行った。SaCas9 には核移行シグナル配列とエピトープタグの FLAG 配列が付加されており、分子量は約 130 kDa と見積もられたが、同分子量付近にバンドを確認することができた（図 5）。細胞周期依存型ゲノム編集の In vivo での利用に関しては SaCas9 の発現と anti-CRISPR-Cdt1 の発現タイミングを厳密に調整する必要があるため、さらに詳細な検討が必要となる。

４－４．細胞周期依存型ゲノム編集における活性化タイミングの検討

AAVS1 遺伝子において、AcrIIA4-Cdt1 と Cas9 の共発現により、Cas9 単体と比べて、約 1.7 倍の HDR 効率向上とオフターゲット配列での変異導入率は約 80%減少した（図 6A）。一方で、AcrIIA4 や AcrIIA4-Gem と共発現した場合では、HDR の向上は確認されなかった。また、AcrIIA4-Gem との共発現では標的配列における HDR はほとんど起こっていなかったが、NHEJ は比較的高頻度で起きていた。EMX1 や VEGFA 遺伝子を標的とした場合も同様に、HDR の向上（EMX1:約 4 倍 , VEGFA:約 4.5 倍）が確認され、オフターゲット配列での変異導入率は 70%以上減少した（図 6B、6C）。AAVS1 遺伝子の場合と同様に、AcrIIA4 と AcrIIA4-Gem との共発現では標的配列における HDR はほとんど起こっていなかった。また、AcrIIA4-Gem との共発現では標的配列での NHEJ は比較的高頻度で起きていた。これらの結果から、AcrIIA4-Cdt1 と Cas9 を共発現させ、細胞周期の S/G2 期で Cas9 を活性化させることが、HDR 効率向上に重要であると示唆された。

４－５．AcrIIA4 と AcrIIA5 の活性制御能に関する検討

AAVS1 と VEGFA 遺伝子を標的とした sgRNA を利用して評価した結果、AcrIIA4 と同様に AcrIIA5 を利用し、Cas9 を細胞周期依存的に活性化することによっても HDR の向上効果が得られることが確認された。

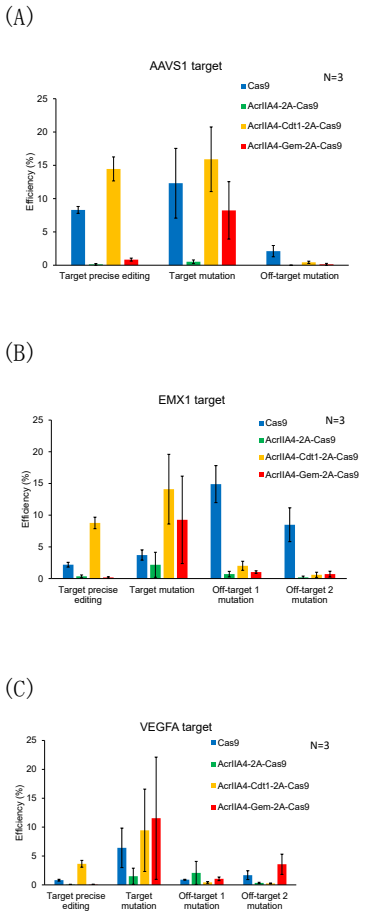


図 6. Cdt1、Geminin を利用した SpCas9 活性化タイミングの違いによる編集効率への影響の検討

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Sakyiamah M. Maxwell, Wataru Nomura, Takuya Kobayakawa, Hirokazu Tamamura | ４．巻<br>30 |
| ２．論文標題<br>Development of a NanoBRET-Based Sensitive Screening Method for CXCR4 Ligands | ５．発行年<br>2019年 |
| ３．雑誌名<br>Bioconjugate Chemistry | ６．最初と最後の頁<br>1442-1450 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.bioconjchem.9b00182 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Takuya Kobayakawa, Kento Ebihara, Yuzuna Honda, Masayuki Fujino, Wataru Nomura, Naoki Yamamoto, Tsutomu Murakami, Hirokazu Tamamura | ４．巻<br>20 |
| ２．論文標題<br>Dimeric C34 Derivatives Linked through Disulfide Bridges as New HIV‐1 Fusion Inhibitors | ５．発行年<br>2019年 |
| ３．雑誌名<br>ChemBioChem | ６．最初と最後の頁<br>2101-2108 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/cbic.201900187 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura, Wataru Nomura | ４．巻<br>59 |
| ２．論文標題<br>TALEN-Based Chemically Inducible, Dimerization-Dependent, Sequence-Specific Nucleases | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>Biochemistry | ６．最初と最後の頁<br>197-204 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.biochem.9b00798 | 査読の有無<br>無 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Takuya Kobayakawa, Hikaru Takano, Takahiro Ishii, Kohei Tsuji, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Toshiaki Furuta, Hirokazu Tamamura | ４．巻<br>18 |
| ２．論文標題<br>Synthesis of Hydrophilic Caged DAG-lactone for Chemical Biology Applications | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>Organic & Biomolecular Chemistry | ６．最初と最後の頁<br>4217-4223 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1039/D0OB00807A | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura, Wataru Nomura | 4．巻<br>3 |
| 2．論文標題<br>A Cell Cycle-dependent CRISPR-Cas9 Activation System Based on an Anti-CRISPR Protein Shows Improved Genome Editing Accuracy | 5．発行年<br>2020年 |
| 3．雑誌名<br>Communications Biology | 6．最初と最後の頁<br>601 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-020-01340-2 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>Jan Vincent V. Arafiles, Hisaaki Hirose, Yusuke Hirai, Masashi Kuriyama, Maxwell M. Sakyiamah, Wataru Nomura, Kazuhiro Sonomura, Miki Imanishi, Akira Otaka, Hirokazu Tamamura, Shiroh Futaki | 4．巻<br>60 |
| 2．論文標題<br>Discovery of a Macropinocytosis‐Inducing Peptide Potentiated by Medium‐Mediated Intramolecular Disulfide Formation | 5．発行年<br>2021年 |
| 3．雑誌名<br>Angewandte Chemie, International Edition | 6．最初と最後の頁<br>2-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/anie.202016754 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>Kohei Tsuji, Takahiro Ishii, Takuya Kobayakawa, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura | 4．巻<br>19 |
| 2．論文標題<br>Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Screening for Protein Kinase C Ligands Using 6-methoxynaphthalene-labeled 1,2-diacylglycerol-lactones | 5．発行年<br>2021年 |
| 3．雑誌名<br>Organic & Biomolecular Chemistry | 6．最初と最後の頁<br>8264-8271 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1039/D1OB00814E | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>Daisuke Matsumoto, Wataru Nomura | 4．巻<br>32 |
| 2．論文標題<br>Molecular Switch Engineering for Precise Genome Editing | 5．発行年<br>2021年 |
| 3．雑誌名<br>Bioconjugate Chemistry | 6．最初と最後の頁<br>639-648 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.bioconjchem.1c00088 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計9件（うち招待講演　7件／うち国際学会　1件）

| |
|---|
| 1．発表者名<br>野村 渉 |
| 2．発表標題<br>CRISPR-Cas based methods toward precision and secure genome editing/regulation. |
| 3．学会等名<br>第13回バイオ関連化学シンポジウム（招待講演） |
| 4．発表年<br>2019年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>Wataru Nomura |
| 2．発表標題<br>Development of CRISPR-Cas/TALEN-based tools for precision genome editing and gene regulation. |
| 3．学会等名<br>iPOPS 2020（招待講演） |
| 4．発表年<br>2020年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>Wataru Nomura, Takumi Kamimura, Takuya Kobayakawa, Hirokazu Tamamura |
| 2．発表標題<br>Endogenous Protein Expression Imaging by Fluorogenic ZIP Tag-probe System |
| 3．学会等名<br>第57回ペプチド討論会 |
| 4．発表年<br>2020年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>野村 渉 |
| 2．発表標題<br>ノーベル賞解説講演・”ゲノム編集”その概念と技術革命 |
| 3．学会等名<br>第10回CSJ化学フェスタ（招待講演） |
| 4．発表年<br>2020年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>野村 渉 |
| ２．発表標題<br>テイラーメードタンパク質による精密、安全なゲノム編集・機能制御技術 |
| ３．学会等名<br>第93回日本生化学会大会（招待講演） |
| ４．発表年<br>2020年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>野村 渉 |
| ２．発表標題<br>アミノ酸のつながったモノとゲノムを眺めて |
| ３．学会等名<br>第53回若手ペプチド勉強会　特別講演（招待講演） |
| ４．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>野村 渉 |
| ２．発表標題<br>機能性ドメインのゲノム編集への応用 |
| ３．学会等名<br>第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| ４．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>Wataru Nomura |
| ２．発表標題<br>CRISPR-Cas/TALEN-based tools for precision genome editing and gene regulation |
| ３．学会等名<br>Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会） |
| ４．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>岸 果苗、濁川 清美、長谷川 有希、松本 大亮、野村 渉 |
| ２．発表標題<br>CRISPRaを用いた自律制御型ゲノム編集におけるAnti-CRISPR作用の解析 |
| ３．学会等名<br>日本薬学会第142年会 |
| ４．発表年<br>2022年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 広島大学大学院医系科学研究科　創薬標的分子科学研究室　webページ<br>https://nomulab.hiroshima-u.ac.jp/publications |

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究協力者 | 松本　大亮<br>(Matsumoto Daisuke) | | |
| 研究協力者 | 濁川　清美<br>(Nigorikawa Kiyomi) | | |

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
| --- | --- |