
総 説

ゲノム編集と DNA 修復機構

中田慎一郎^{*1}, 生木 裕也^{1,2}, 富田亜希子¹

¹京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学

²大阪大学大学院医学系研究科

Genome Editing and DNA Repair Mechanisms

Shinichiro Nakada¹, Yuya Namaki^{1,2} and Akiko Tomita¹

¹*Department of Biochemistry and Molecular Biology,*

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

²*Graduate School of Medicine, Osaka University*

抄 録

近年, Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins (Cas) といったゲノム編集ツールの開発により, 哺乳類細胞でのゲノム編集が広く普及した。これらのツールは, ゲノム中の特定配列を探索・認識し, DNA 損傷を誘発することでゲノム改変を可能にする。DNA 損傷の種類に応じて特定の DNA 修復機構が機能し, その過程でゲノム配列が変化することがある。ゲノム編集は, このような DNA 修復機構を利用して意図的にゲノムを改変する技術である。

本稿では, 代表的な DNA 修復機構と, ゲノム編集ツールによって誘発される DNA 損傷が修復機構を介してゲノムを改変する仕組みについて概説する。

キーワード: DNA 修復, ゲノム編集, CRISPR/Cas9, ニッカーゼ, 遺伝子治療。

Abstract

Recent developments in genome editing tools, such as Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins (Cas), have facilitated the widespread application of genome editing in mammalian cells. These tools recognize and target specific sequences in the genome, inducing DNA damage, which enables genome modification. Depending on the type of DNA damage, specific DNA repair mechanisms are activated, which can result in changes to the genome sequence. Genome editing harnesses these DNA repair mechanisms to intentionally modify the genome.

This review provides an overview of the major DNA repair mechanisms and explains how DNA damage induced by genome editing tools is repaired through these mechanisms to achieve genome

令和 7 年 1 月 31 日受付 令和 7 年 2 月 3 日受理

*連絡先 中田慎一郎 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路ル梶井町465番地

snakada@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.134.03.143

modifications.

Key Words: DNA repair, Genome editing, CRISPR/Cas9, Nickase, Gene therapy.

主要な DNA 修復機構の概要

ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR)

DNA 複製過程では、アデニン (A) とチミン (T), グアニン (G) とシトシン (C) が塩基対を形成するように、新生鎖にヌクレオチドが順次結合していく。DNA ポリメラーゼには校正機能が備わっており、誤ったヌクレオチドが付加された場合には迅速に除去される。しかし、まれに誤ったヌクレオチドが付加されたまま複製が進行することがある。このような場合、MMR 機構が作動し、ミスマッチを含む DNA 鎖の一部が削り取られ、DNA ポリメラーゼにより新たにヌクレオチドが付加されることで、ミスマッチが修正される¹⁾ (図 1a)。もし MMR が正確に機能しない場合、DNA 複製と細胞分裂を経て変異が娘細胞に受け継がれ、細胞内に変異が蓄積することとなる¹⁾。

MMR に関与する主要な遺伝子には、MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 などがある。これらの遺伝子変異は、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (Lynch 症候群) の原因として広く知られている²⁾。

ミスマッチが発生した際には、必ず誤ったヌクレオチドを修正しなくてはならない。MMR は、複製過程において新生鎖と鋳型鎖を区別することによって、誤ったヌクレオチドを認識し修正する。この際、新生鎖が部分的に未連結状態 (リガーゼによる連結が未完了) であることが手掛かりとして利用される。

塩基除去修復 (Base Excision Repair: BER)

DNA 塩基は日常的に化学的損傷を受ける。特に脱アミノ化は頻繁に発生し、例えば C が脱アミノ化されるとウラシル (U) に変化する。

この変化が修復されない場合、DNA 複製を経て C:G 塩基対が T:A 塩基対に変異する可能性がある。同様に、A がヒポキサンチンに脱アミノ化されると、A:T 塩基対が G:C 塩基対に変異することがある。B 細胞における免疫グロブリン遺伝子の可変領域に突然変異を導入する体細胞超変異 (somatic hypermutation) は、抗体の多様性を生み出すプロセスであり、Activation-Induced (Cytidine) Deaminase (AID) による C の脱アミノ化や error-prone DNA ポリメラーゼによって多くの突然変異が導入される³⁾。このような特殊な状況を除き、DNA 塩基の化学的損傷は BER により修復される⁴⁾。

BER の修復プロセスでは、損傷した塩基が特異的なグリコシラーゼによって切除され、アピリミジン (AP) サイトが形成される。例えば、U が DNA 中に出現した場合、ウラシル-DNA グリコシラーゼ (UNG) がそれを検出し、U を切除する。その後、AP サイトは AP エンドヌクレアーゼにより除去される。この過程で欠損したヌクレオチドは DNA ポリメラーゼによって埋められ、最終的に DNA リガーゼによってニック (ヌクレオチド間のリン酸基と水酸基が結合していない状態) が修復される⁵⁾ (図 1b)。酸化損傷やアルキル化損傷に対しても BER が機能し、DNA の安定性が維持される⁵⁾。

DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) 修復

DNA 一本鎖の損傷は、無傷の相補鎖を鋳型として利用することで正確に修復できる。MMR, BER, ヌクレオチド除去修復 (NER) などの異なる DNA 修復機構が、損傷部分を除去し、鋳型鎖を基に DNA ポリメラーゼで配列を復元するという共通のメカニズムを利用している。しかし、電離放射線などによって DNA の二本鎖が同時に損傷した場合、このようなメカニズムでは修復できない。DSB の修復には、

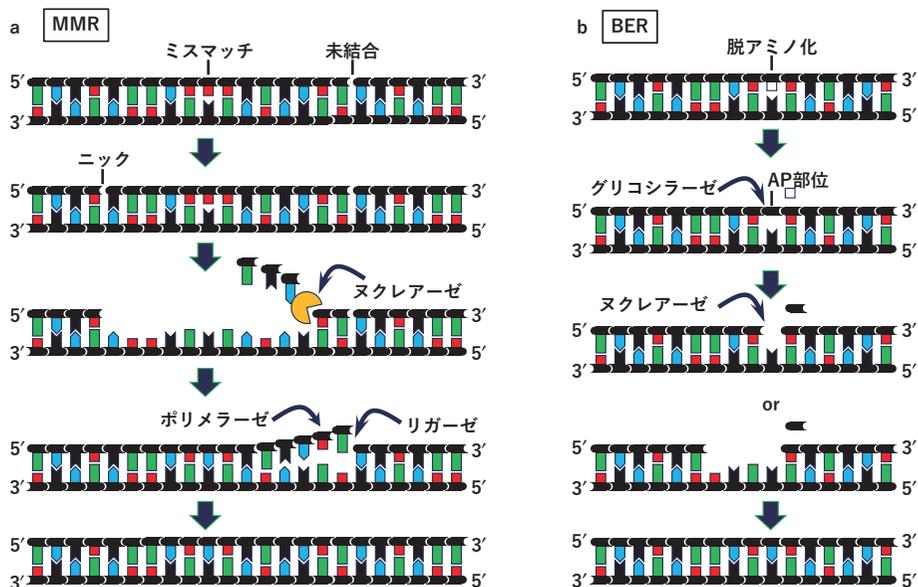


図1 MMRとBER

MMRは、未結合の状態が残存するDNA鎖において、誤ったヌクレオチドを認識することで機能する。この修復機構では、ミスマッチを形成しているヌクレオチドだけでなく、その周囲のヌクレオチドも一緒に除去され、その後、DNAポリマーラーゼによって正しい塩基配列が合成される。

一方、BERは、脱アミノ化、酸化損傷、アルキル化損傷、脱プリン化、脱ピリミジン化などによるDNA損傷を修復する。この修復機構では、損傷した塩基が特異的に認識され、最初にapurinic/aprimidinic (AP) サイトが形成される。その後、APサイトのみが修復される場合や、数ヌクレオチドが除去された上で修復が行われる場合がある。

以下の二つの主要なメカニズムが利用される。

1. DSB端を直接つなぐ方法

この方法には、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ), alternative end joining (Alt-EJ), single-strand annealing (SSA) などが含まれる。Alt-EJ および SSA は、短い相補配列を利用することから、マイクロホモロジー介在性末端結合 (microhomology-mediated end joining: MMEJ) とも呼ばれる。これらの修復機構では、DNA損傷時に失われた配列情報を回復することはできない。

2. 姉妹染色分体を鋳型に用いる方法

これは相同組換え (homologous recombination: HR) と呼ばれ、損傷発生前に複製されていた姉妹染色分体を鋳型として利用することで、配列情報を正確に回復することができる⁶⁾。

なお、MMEJとHRは共にホモロジーを利用するため、homology-directed repair (HDR) と総称されることもある。以下では、DSB修復機構についてももう少し詳しく説明する。

NHEJとMMEJ

NHEJは、DSB修復において最も迅速かつ頻繁に利用される機構である。NHEJでは、DSB断端プロセッシングにより、ヌクレオチドが欠失したり付加されたりすることがある (図2a)。ただし、必ずしも変異が伴うわけではなく、断端処理が最小限の場合には正確に修復されることもある。

NHEJは、外因性DSBの修復だけでなく、免疫グロブリンやT細胞受容体の産生におけるV(D)J recombinationの過程で生じる内

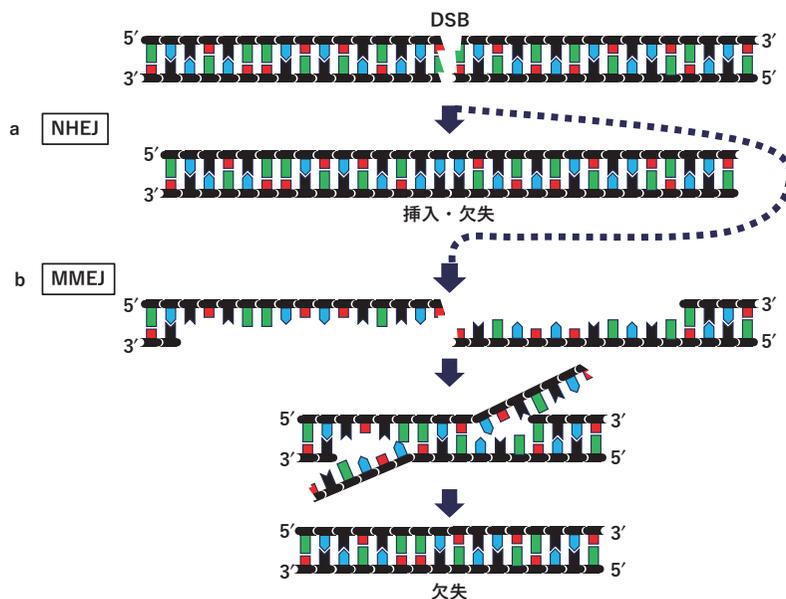


図2 NHEJとMMEJ

NHEJは、DSBを修復する主要な経路の1つであり、修復過程でDNA末端から数ヌクレオチドが除去または付加されることがある。しかし、DNA末端が適切に整っており、修復のための追加のプロセッシングが不要な場合には、NHEJでも正確にDSBが修復されることがある。一方、MMEJは、DNA末端を削り込み、わずかな塩基配列の相補性(マイクロホモロジー)を利用してDNA鎖を結合する修復経路である。この修復過程では、必然的に欠失変異が生じる。

因性DSBの修復でも重要な役割を果たす。V(D)J recombinationにおけるNHEJでは、Artemis⁷⁾、Cernunnos (XLF)⁸⁾、LIG4⁹⁾、DNA-PKcs¹⁰⁾などの分子が必須であり、それらの異常は放射線高感受性を伴う原発性複合型免疫不全症の原因となる。一方で、LIG4とともに機能するXRCC4の変異は、免疫不全を引き起こさない場合もあると報告されている¹¹⁾。MMEJでは、DSB端を結合する際に、両端の短い相補配列(マイクロホモロジー領域)を利用する。MMEJでは、ほとんどの場合、配列情報が欠失する(図2b)。

H R

HRによるDNA修復過程は複雑である。まず、5'末端のDNA鎖において、MRE11がエンドヌクレアーゼとして機能し、DNA鎖上にニックを入れる。その後、ニックを起点に両方

向へDNAが削り込まれるDNA end resectionが進行する¹²⁾。その結果、3'末端の一本鎖DNA(ssDNA)が形成される。

RAD51は、ヌクレオソームからDNAを解離させながらssDNAに巻き付き、フィラメント状の構造を形成する¹³⁾。このRAD51-ssDNAフィラメントは、姉妹染色分体内の相同な配列を探し、相補配列にアニールする。続いて、DNAポリメラーゼがDNA鎖の伸長を行い、欠失していた配列を正確に補完する。その結果、損傷部位は完全に修復される(図3)。

DSBに対する応答

DSB修復が行われる前に、損傷部位の検出機構とシグナル伝達機構が機能する。DSBの検出は主にMRE11-RAD50-NBS1(MRN)複合体により行われる。ATMはPI3キナーゼ様セリンスレオニンキナーゼであり、DSB周辺

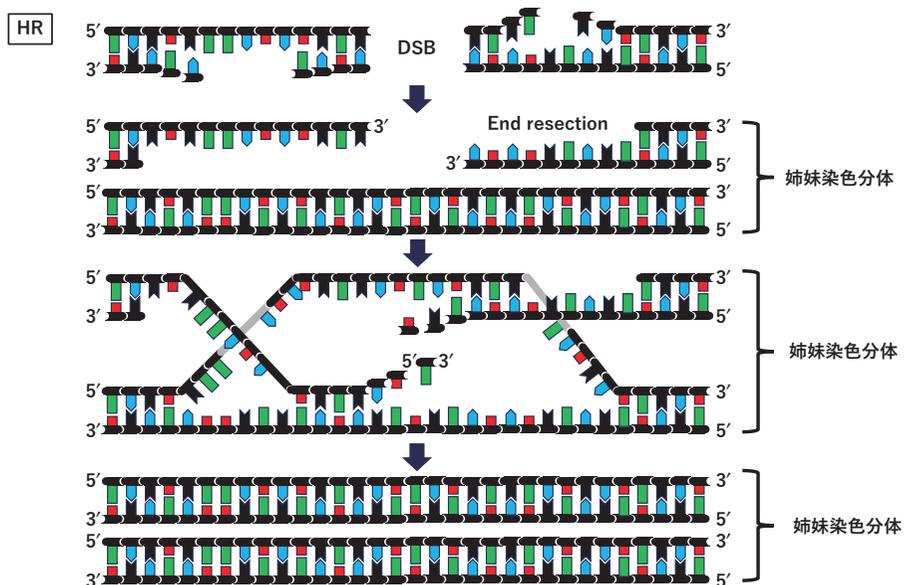


図3 HR

HRでは、まずDSB端で3'末端を持つDNA一本鎖が露出するように、DNAの削り込み (end resection) が行われる。次に、露出したssDNAが姉妹染色分体のDNA二本鎖に侵入 (strand invasion) し、相補的な配列にアニールすることで、損傷部位と姉妹染色分体との間にDループ構造が形成される。その後、DNAポリメラーゼによるDNA伸長が行われ、損傷DNAから失われた配列情報が正確に復元される。姉妹染色分体は損傷DNAの相同配列を完全に保持しているため、HRでは非常に高い精度でDNAが修復される。

のヌクレオソーム内に存在するヒストン H2AX をリン酸化する (図4)。このリン酸化 H2AX (γ H2AX) は DSB 周囲に広がり、損傷部位を修復分子に示す重要な目印となる⁶⁾。なお、 γ H2AX は、フォスファターゼである PP2A や PP4 により脱リン酸化され、H2AX に戻る¹⁴⁾ (図4)。

続いて、RNF8 や RNF168 などのユビキチン E3 リガーゼを含む複数の因子が DSB 周辺に集積する。これらのリガーゼは、モノユビキチン化や Lys63-linked ユビキチン鎖の形成を介して、53BP1 や BRCA1 といった DNA 修復制御分子の DSB 局在を促進する¹⁵⁾¹⁶⁾。この過程で、ユビキチン化は脱ユビキチン化酵素である OTUB1 や OTUB2 によって調節される。具体的には、OTUB2 が脱ユビキチン化を進める¹⁷⁾ 一方、OTUB1 は物理的に E2 酵素を抑制する

酵素活性非依存的な制御を行う¹⁸⁾ (図4)。

DSB 応答におけるユビキチン化の役割の一つは、DNA end resection の制御である。このプロセスは DNA 修復経路の選択に関与しており、end resection が進行すると NHEJ が抑制される。一方で、end resection が起こらなければ HR は開始されない。

DNA 末端が削り込まれた後、もう一つの PI3 キナーゼ様セリンスレオニンキナーゼである ATR が活性化する。ATR はリン酸化依存的なシグナリングを介して、DSB 応答のさらなる段階を進める¹⁹⁾。

ATM と ATR は、DNA 損傷応答における細胞周期チェックポイントの活性化においても中心的な役割を果たす。ATM と ATR は、それぞれ CHK2, CHK1 をリン酸化することで、細胞周期の停止を引き起こし、DNA 修復が完了

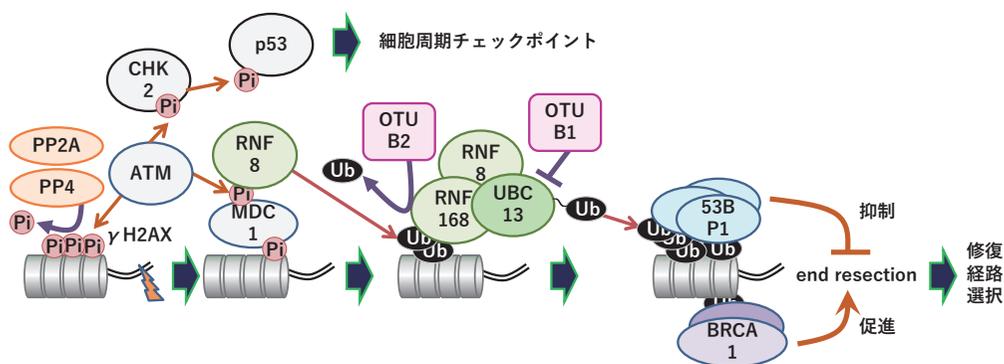


図4 DSBに対する応答

DSBが発生すると、リン酸化やユビキチン化を介するシグナリングによってDNA end resectionが制御され、DSB修復経路の選択が行われる。さらに、ATMやATRによって細胞周期チェックポイントが活性化される。

するまでの時間を確保する(図4)。このように、ATMとATRはゲノム安定性の保護において重要な司令塔として機能する。

DSBを利用したゲノム編集

ゲノム編集ツールとしては、ZFNs, TALENs, CRISPR/Casが代表的である。これらのツールは、いずれも特定のゲノム配列を認識し、標的配列にDSBを発生させる。ZFNsとTALENsはタンパク自体が標的配列を直接認識する。一方、CRISPR/Casシステムでは、ガイドRNAを介して標的配列を認識する(図5a)。

ゲノム編集ツールが細胞内に存在すると、DNAの切断と修復が繰り返され、最終的にNHEJやMMEJによって変異が導入される。この機構は遺伝子破壊に特に有効であり、臨床応用として、βサラセミアや鎌形赤血球症において、BCL11A遺伝子の破壊が行われている²⁰⁾。

標的配列の上流および下流に相同な配列を含むドナーDNA(プラスミドやsingle-strand oligodeoxynucleotide: ssODN)をゲノム編集ツールと同時に導入することで、DSBのHR(またはHDR)修復を誘導し、ドナー配列をゲノムに正確に組み込むことが可能である。しかし、HRの頻度は低く、NHEJやMMEJによる修復が優先されるため、非特異的な変異が導入されるリスクがある。また、CRISPR/Casシス

テムが誤認識する配列(オフターゲット部位)においてもNHEJやMMEJによる目的外変異が生じる可能性がある。

ニックを用いたゲノム編集法

DSBを利用したゲノム編集により、常染色体上の遺伝子にヘテロ接合性変異を導入する場合、片方のアレルで目的通りの編集が成功しても、もう一方のアレルに非特異的な変異が生じ、目的の細胞が得られないことが多い。この課題を克服するために、ニックをDSBの代替として用いる方法が考案された。例えば、Tandem Nick(TN)法やSingle Nicks in the Target Gene and Donor Plasmid(SNGD)法を用いれば、比較的効率的にヘテロ接合性変異を持つ細胞を作成できる²¹⁾(図6a, b)。ニックは、Cas9タンパクのヌクレアーゼドメインの一方を失活させた変異体(Cas9^{D10A}やCas9^{H840A}など)を用いて誘導できる(図5b)。

ニックを複数発生させることで、相同染色体間の相同組換えを促進する方法もある(図6c)。この手法は、NICER法(a method for correcting heterozygous mutations that employs multiple nicks induced by Cas9 nickase and a homologous chromosome as an endogenous repair template)と呼ばれ、オンターゲットおよびオフターゲットにおける目的外変異を

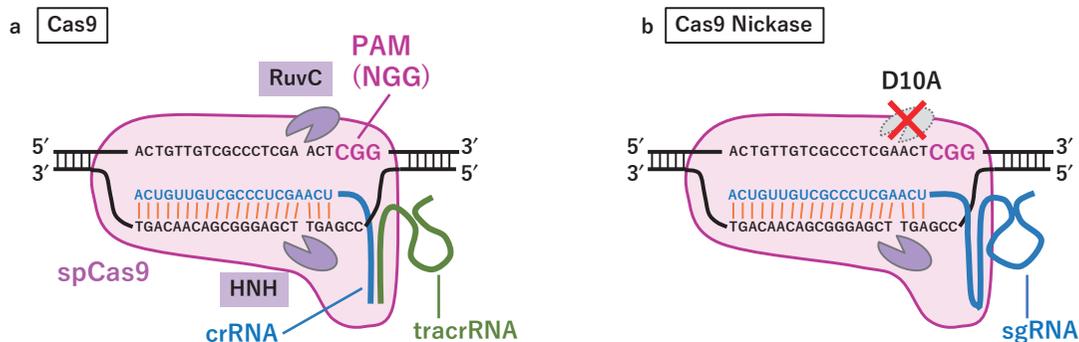


図5 Cas9 とニッカーゼ

Streptococcus pyogenes Cas9 (spCas9) は、crRNA および tracrRNA から構成されるガイド RNA と複合体を形成する。研究用途では、crRNA と tracrRNA を融合させた単一のガイド RNA (single-guide RNA, sgRNA) も利用される。spCas9 の PAM は 5'-NGG-3' であり、これが標的 DNA 配列の認識に必須となる。PAM の直上に存在する約 20 スクレオチドの配列が、ガイド RNA の 5' 末端配列と高い相同性を持つ場合、spCas9 は 2 つのヌクレアーゼドメイン (RuvC および HNH) によってそれぞれの DNA 鎖に切断を加え、結果として DSB を引き起こす。一方、Cas9 の 2 つのヌクレアーゼドメインのうち片方を失活させた変異体 (代表的な例として D10A 変異や H840A 変異) は、DSB ではなくニックを発生させるニッカーゼとして機能する。

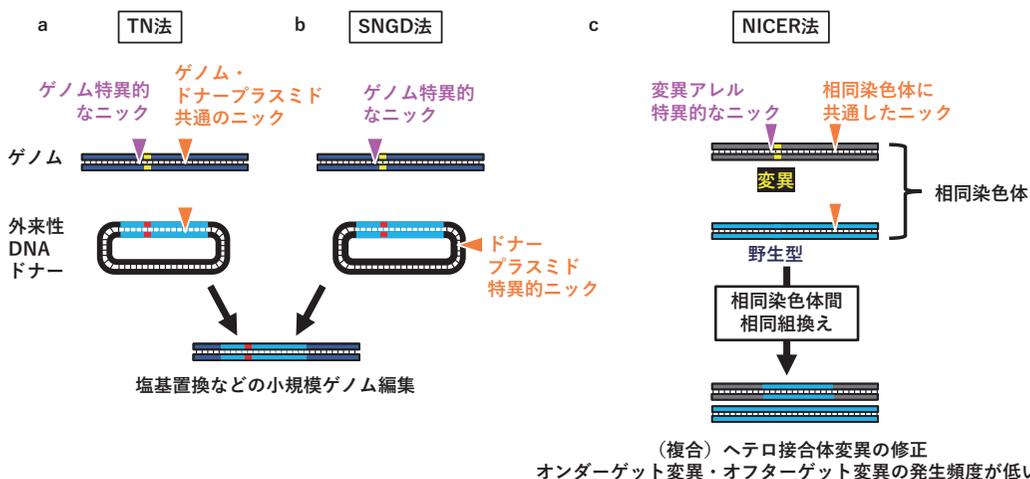


図6 TN 法, SNGD 法と NICER 法

a. TN 法, b. SNGD 法. ゲノムとプラスミドの両方にニックを発生させることで、ゲノム-プラスミド間の組換えを誘導し、ゲノム編集を行う手法。オンターゲットにおける indel がほとんど発生しないため、ヘテロ接合性変異の導入に有用である。c. NICER 法. ヘテロ接合性変異において、変異配列を含む変異アレル特異的なガイド RNA と、同じ遺伝子上的他の配列を認識するガイド RNA をニッカーゼとともに細胞に導入することで、相同染色体間で相同組換えを誘導する。この方法では、Cas9 に依存した変異の発生や外来性 DNA のランダムインテグレーションなどの目的外変異が起こりにくいため、正確にヘテロ接合性変異を修正することができる。(富田亜希子・中田慎一郎 医学のあゆみ 292 巻 5 号 429,430 ページの図を一部改変²³⁾。許可を得て転載。)

ほとんど発生させずに、ヘテロ接合性変異を野生型に修正することができる²²⁾。

Base editor (BE) と prime editor (PE)

CRISPR/Cas9 を基盤としたゲノム編集ツール

ルは、BE や PE へと発展している。これらの技術は、より精密なゲノム編集を可能にする。

BE には C:G 塩基対を T:A 塩基対に変換するシチジン BE (CBE)²⁴⁾ と A:T 塩基対を G:C 塩基対に変換するアデニン BE (ABE)²⁵⁾ がある。

CBE は Cas9^{D10A} ニッカーゼとシチジンデアミナーゼ (APOBEC あるいは AID)、および UNG インヒビター (UGI) を融合したタンパク質である。CBE が標的配列に結合すると、ガイド RNA がアニールしていない DNA 鎖の C が脱アミノ化され、U に変換される。UGI は UNG による U の切断を阻害し、BER による修復を抑制する。さらに、ガイド RNA がア

ニールした DNA 鎖に Cas9^{D10A} がニックを発生させる。ニックが発生した DNA 鎖は MMR により新生 DNA 鎖と誤認識され、U:G ミスマッチにおけるデオキシグアノシンーリン酸 (dGMP) は周囲のヌクレオチドとともに取り除かれ、DNA ポリメラーゼによりデオキシアデノシンーリン酸 (dAMP) に置き換えられる。この状態で DNA 複製・細胞分裂が行われると、C:G 塩基対から T:A 塩基対への編集が達成される²⁴⁾ (図 7a)。

ABE では、TadA-like deaminase (TadA) やその変異体がアデニンデアミナーゼとして利用されている。ABE は、A をヒポキサンチン (ヌ

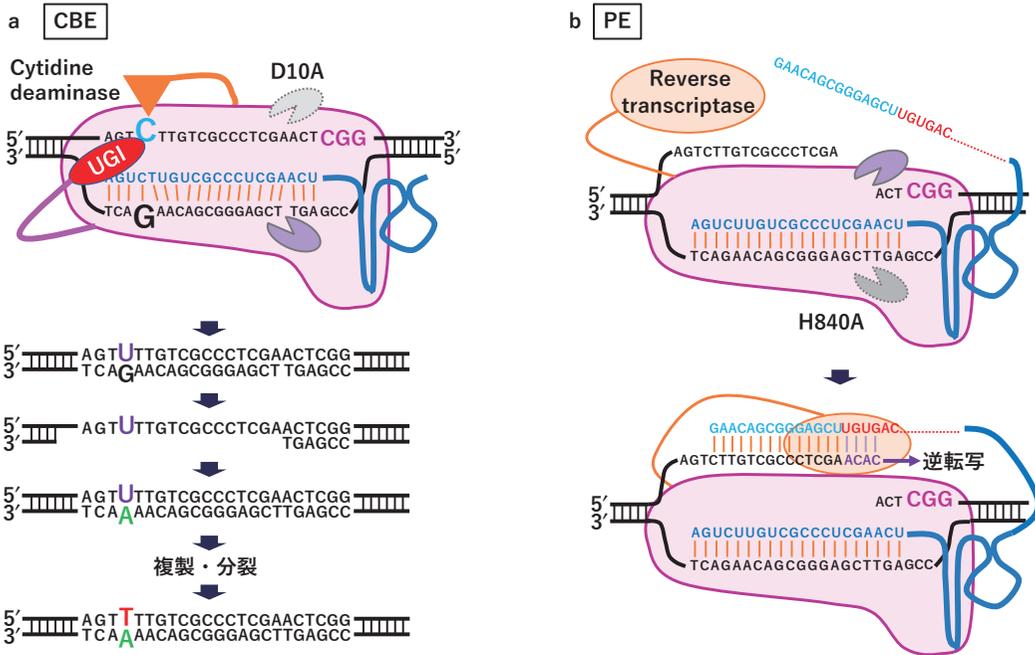


図 7 BE と PE

CBE では Cas9^{D10A} に APOBEC や AID などのデアミナーゼ、および UGI が融合している。この編集システムでは、ガイド RNA が結合していない DNA 鎖の C がデアミナーゼにより U に脱アミノ化される。同時に、Cas9^{D10A} はガイド RNA が結合している DNA 鎖にニックを発生させ、このニックが G を含む DNA 鎖に MMR を誘導する。MMR により、U が A と対合するように修復され、その後、DNA 複製・細胞分裂を経て、C:G 塩基対は T:A 塩基対へと変換される。

PE では Cas9^{H840A} に RT が融合している。このシステムでは、特殊なガイド RNA である pegRNA が利用される。Cas9^{H840A} は pegRNA が結合していない方の DNA 鎖にニックを加え、その結果、ニックが生じた DNA 鎖が pegRNA と結合する。この結合により、pegRNA の配列が逆転写の鋳型として利用され、RT は pegRNA に基づいて新たな DNA 配列を合成する。これにより、標的部位に目的の配列が導入される。

クレオシドとしてはアデノシンをイノシン)に脱アミノ化し, 脱アミノ化されていない DNA 鎖にニックを導入する. 最終的に A:T 塩基対は G:C 塩基対へと変換される²⁵⁾.

PE は Cas9^{H840A} に逆転写酵素 (RT) を融合させたタンパク質である. PE には, pegRNA という特別なガイド RNA を利用する. pegRNA は, sgRNA が 3' 方向に延長され, 編集内容を含む配列 (Reverse Transcription Template: RTT) と Cas9^{H840A} が誘導するニックの 3' 末端に相補的な配列 (Primer Binding Site: PBS) を含んでいる. PBS は Cas9^{H840A} の作用により発生するゲノム標的配列上の ssDNA とアニールする. pegRNA とアニールした部分は RT のプライマーとして機能し, RTT は RT によって逆転写される. このようなプロセスにより, 目的とするゲノム編集が達成される²⁶⁾.

ただし, PE を用いたゲノム編集は, ニックが加わった DNA 鎖で行われるため, MMR により元の配列に戻されてしまうことがある. この問題に対処する方法として, ドミナントネガティブ型の MLH1 を利用して MMR を抑制すると, PE によるゲノム編集効率が向上することが報告されている²⁷⁾.

おわりに

本稿では, 主にゲノム編集に関連する DNA 修復機構と代表的なゲノム編集手法について概説した. 近年, ゲノム編集技術は飛躍的な進歩を遂げ, ツールや手法の多様性, さらにそれらを支えるデータベースの整備が進んでいる. 今後も, さらなる革新的な技術の開発が期待されている. 臨床応用においては, 疾患ごとに最適なゲノム編集技術を選択し, 効果的に活用することの重要性が増していくだろう.

また, 本稿で取り上げた DNA 修復機構はその一部に過ぎず, 他にも多くの修復機構が存在している. ゲノムの恒常性維持や発がん機構の解明において, DNA 損傷と修復の理解は不可欠である. さらに, これらの修復機構を複製や転写などの生物学的プロセスと統合して考えることは, ゲノム編集技術の精度向上だけでなく, 基礎研究や応用研究の発展にも寄与する.

今後も DNA 修復とゲノム編集の研究を深化させることで, より高度な技術が開発されるとともに, それらの臨床的意義が一層明確になることが期待される.

開示すべき潜在的利益相反状態はない.

文 献

- 1) Thomas A Kunkel, Dorothy A Erie. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, 74: 681-710, 2005.
- 2) Asad Umar, C Richard Boland, Jonathan P Terdiman, Sapna Syngal, Albert de la Chapelle, Josef Rüschoff, Richard Fishel, Noralane M Lindor, Lawrence J Burgart, Richard Hamelin, Stanley R Hamilton, Robert A Hiatt, Jeremy Jass, Annika Lindblom, Henry T Lynch, Päivi Peltomäki, Scott D Ramsey, Miguel A Rodriguez-Bigas, Hans F A Vasen, Ernest T Hawk, J Carl Barrett, Andrew N Freedman, Sudhir Srivastava. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96: 261-268, 2004.
- 3) Javier M Di Noia, Michael S Neuberger. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*, 76: 1-22, 2007.
- 4) William A Beard, Julie K Horton, Rajendra Prasad, Samuel H Wilson. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annu Rev Biochem*, 88: 137-162, 2019.
- 5) Fatwa Adikusuma, Sandra Piltz, Mark A Corbett, Michelle Turvey, Shaun R McColl, Karla J Helbig, Michael R Beard, James Hughes, Richard T Pomerantz, Paul Q Thomas. Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 560: E8-E9, 2018.
- 6) Aaron A Goodarzi, Penelope A Jeggo. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv Genet*, 82: 1-45, 2013.
- 7) D Moshous, I Callebaut, R de Chasseval, B Corneo, M Cavazzana-Calvo, F Le Deist, I Tezcan, O Sanal, Y Bertrand, N Philippe, A Fischer, J P de Villartay. Ar-

- temis, a novel DNA double-strand break repair/V (D) J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105: 177-186, 2001.
- 8) Dietke Buck, Laurent Malivert, Régina de Chasseval, Anne Barraud, Marie-Claude Fondanèche, Ozden Sanal, Alessandro Plebani, Jean-Louis Stéphan, Markus Hufnagel, Françoise le Deist, Alain Fischer, Anne Durandy, Jean-Pierre de Villartay, Patrick Revy. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 124: 287-299, 2006.
- 9) M O'Driscoll, K M Cerosaletti, P M Girard, Y Dai, M Stumm, B Kysela, B Hirsch, A Gennery, S E Palmer, J Seidel, R A Gatti, R Varon, M A Oettinger, H Neitzel, P A Jeggo, P Concannon. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell*, 8: 1175-1185, 2001.
- 10) Mirjam van der Burg, Hanna Ijspeert, Nicole S Verkaik, Tuba Turul, Wouter W Wiegant, Keiko Morotomi-Yano, Pierre-Olivier Mari, Ilhan Tezcan, David J Chen, Malgorzata Z Zdzienicka, Jacques J M van Dongen, Dik C van Gent. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest*, 119: 91-98, 2009.
- 11) Chaowan Guo, Yuka Nakazawa, Lisa Woodbine, Andrea Björkman, Mayuko Shimada, Heather Fawcett, Nan Jia, Kaname Ohshima, Tao-Sheng Li, Yuji Nagayama, Norisato Mitsutake, Qiang Pan-Hammarström, Andrew R Gennery, Alan R Lehmann, Penny A Jeggo, Tomoo Ogi. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 136: 1007-1017, 2015.
- 12) Atsushi Shibata, Davide Moiani, Andrew S Arvai, Jefferson Perry, Shane M Harding, Marie-Michelle Genois, Ranjan Maity, Sari van Rossum-Fikkert, Aryandi Kertokalio, Filippo Romoli, Amani Ismail, Ermal Ismalaj, Elena Petricci, Matthew J Neale, Robert G Bristow, Jean-Yves Masson, Claire Wyman, Penny A Jeggo, John A Tainer. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol Cell*, 53: 7-18, 2014.
- 13) Takuro Shioi, Suguru Hatazawa, Eriko Oya, Noriko Hosoya, Wataru Kobayashi, Mitsuo Ogasawara, Takehiko Kobayashi, Yoshimasa Takizawa, Hitoshi Kurumizaka. Cryo-EM structures of RAD51 assembled on nucleosomes containing a DSB site. *Nature*, 628: 212-220, 2024.
- 14) Shinichiro Nakada, Ginny I Chen, Anne-Claude Gingras, Daniel Durocher. PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*, 9: 1019-1026, 2008.
- 15) Nadine K Kolas, J Ross Chapman, Shinichiro Nakada, Jarkko Ylanko, Richard Chahwan, Frédéric D Sweeney, Stephanie Panier, Megan Mendez, Jan Wildenhain, Timothy M Thomson, Laurence Pelletier, Stephen P Jackson, Daniel Durocher. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 318: 1637-1640, 2007.
- 16) Grant S Stewart, Stephanie Panier, Kelly Townsend, Abdallah K Al-Hakim, Nadine K Kolas, Edward S Miller, Shinichiro Nakada, Jarkko Ylanko, Signe Olivarius, Megan Mendez, Ceri Oldreive, Jan Wildenhain, Andrea Tagliaferro, Laurence Pelletier, Nadine Taubenheim, Anne Durandy, Philip J Byrd, Tatjana Stankovic, A Malcolm R Taylor, Daniel Durocher. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*, 136: 420-434, 2009.
- 17) Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima, Ayako Ui, Yuri Muto-Terao, Hideaki Ogiwara, Shinichiro Nakada. Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice. *Mol Cell*, 53: 617-630, 2014.
- 18) Shinichiro Nakada, Ikue Tai, Stephanie Panier, Abdallah Al-Hakim, Shun-Ichiro Iemura, Yu-Chi Juang, Lara O'Donnell, Ayako Kumakubo, Meagan Munro, Frank Sicheri, Anne-Claude Gingras, Tohru Natsume, Toshio Suda, Daniel Durocher. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature*, 466: 941-946, 2010.
- 19) Bunsyo Shiotani, Lee Zou. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell*, 33: 547-558, 2009.
- 20) Matthew C Canver, Elenoe C Smith, Falak Sher, Luca Pinello, Neville E Sanjana, Ophir Shalem, Diane D Chen, Patrick G Schupp, Divya S Vinjamur, Sara P Garcia, Sidinh Luc, Ryo Kurita, Yukio Nakamura, Yuko Fujiwara, Takahiro Maeda, Guo-Cheng Yuan, Feng Zhang, Stuart H Orkin, Daniel E Bauer. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature*, 527: 192-197, 2015.

- 21) Kazuhiro Nakajima, Yue Zhou, Akiko Tomita, Yoshihiro Hirade, Channabasavaiah B Gurumurthy, Shinichiro Nakada. Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. *Genome Res*, 28: 223-230, 2018.
- 22) Akiko Tomita, Hiroyuki Sasanuma, Tomoo Owa, Yuka Nakazawa, Mayuko Shimada, Takahiro Fukuoka, Tomoo Ogi, Shinichiro Nakada. Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells. *Nat Commun*, 14: 5607, 2023.
- 23) 富田亜希子, 中田慎一郎. 複数のニックにより誘導するゲノム編集. *医学のあゆみ*, 292: 427-431, 2025.
- 24) Alexis C. Komor, Yongjoo B. Kim, Michael S. Packer, John A. Zuris, David R. Liu. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 539: 121-124, 2016.
- 25) Nicole M. Gaudelli, Alexis C. Komor, Holly A. Rees, Michael S. Packer, Ahmed H. Badran, David I. Bryson, David R. Liu. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551: 464-471, 2017.
- 26) Andrew V. Anzalone, Peyton B. Randolph, Jessie R. Davis, Alexander A. Sousa, Luke W. Koblan, Jonathan M. Levy, Peter J. Chen, Christopher Wilson, Gregory A. Newby, Aditya Raguram, David R. Liu. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576: 149-157, 2019.
- 27) Peter J Chen, Jeffrey A Hussmann, Jun Yan, Friederike Knipping, Purnima Ravisankar, Pin-Fang Chen, Cidi Chen, James W Nelson, Gregory A Newby, Mustafa Sahin, Mark J Osborn, Jonathan S Weissman, Britt Adamson, David R Liu. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 184: 5635-5652.e29, 2021.

著者プロフィール



中田慎一郎 Shinichiro Nakada

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学・教授

略 歴：1998年3月 東京医科歯科大学医学部医学科卒

1998年4月～東京医科歯科大学小児科

2005年3月 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科終了, 博士 (医学)

2006年11月～ Samuel Lunenfeld Research Institute・博士研究員

2009年2月～慶應義塾大学医学部・特別研究講師/特任講師

2012年4月～大阪大学大学院医学系研究科・独立准教授

2017年5月～大阪大学高等共創研究院・教授

2024年8月～現職

専門分野：DNA修復, ゲノム編集



生木 裕也 Yuya Namaki

所属・職：大阪大学大学院医学系研究科 修士課程

京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学・研究補助員

略 歴：2024年3月 北海道大学農学部卒

2024年4月より現所属, 8月より現職

専門分野：DNA修復, ゲノム編集



富田亜希子 Akiko Tomita

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学・プロジェクト研究員

略 歴：2021年4月～大阪大学大学院医学系研究科・特任研究員

2024年9月～現職

専門分野：ゲノム編集

- 主な業績：1. Tomita A, ..., Nakada S* et al. Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells. *Nat Commun*, **14**: 5607, 2023.
2. Nakazawa Y, ..., Nakada S, Mashimo T, Ogi T* et al. Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNA-Pol II Promotes Transcription-Coupled Repair. *Cell*, **180**: 1228-1244, 2020.
3. Morisaka H, Yoshimi K, ..., Nakada S, ..., Hotta A*, Takeda J*, Mashimo T* et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun*, **10**: 5302, 2019.
4. Takahashi TS, ..., Tomita A, Nakada S*, Fukui S* et al. Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168. *Nat Commun*, **9**: 170, 2018.
5. Nakajima K, Tomita A, ..., Nakada S* et al. Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. *Genome Res*, **28**: 223-230, 2018.
6. Yasuhara T, ..., Nakada S, Shibata A, Miyagawa K* et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell*, **175**: 558-570. e11, 2018.
7. Tsutsui H, ..., Tomita A, Miyawaki A* et al. A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo. *Mol Cell*, **58**: 186-193, 2015.
8. Kato K, Nakajima K, ..., Nakada S* et al. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. *Mol Cell*, **53**: 617-630, 2014.
9. Nakada S*, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res*, **72**: 4974-4983, 2012.
10. Nakada S*, ..., Durocher D* et al. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature*, **466**: 941-946, 2010.
11. Stewart GS, ..., Nakada S, ..., Durocher D* et al. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*, **136**: 420-434, 2009.
12. Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D*. PP4 is a γ H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*, **9**: 1019-1026, 2008.
13. Kolas NK[#], Chapman JR[#], Nakada S^{#(Co-first authors)}, ..., Durocher D* et al. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, **318**: 1637-1640, 2007.
14. Nakada S, ..., Mizutani S* et al. Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest*, **116**: 80-89, 2006.