

2023 年度年次報告書

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

2019 年度採択研究代表者

小林 武彦

東京大学 定量生命科学研究所
教授

遺伝子増幅装置と染色体ベクターの構築

主たる共同研究者:

岩川 弘宙 (立教大学 理学部 准教授)

研究成果の概要

出芽酵母のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は遺伝子増幅および維持機構を持ち、100 コピー以上が常に安定に維持されています。本課題の目標は、その増幅・維持機構を利用して、多数の遺伝子を組み込むことができる「染色体ベクター」を作成することです。さらに染色体ベクターに異なる生物のタンパク質複合体や代謝系に関わる遺伝子群を丸ごと組み込み、それらを酵母内で再構築する「*in saccharo* 実験系」を確立します。この実験系は、将来的には人工細胞の作成の基盤技術になると期待されます。

現在の3つの研究項目を実施しています。1) rDNA の増幅およびその安定性維持機構の解析、2) 多数の異種遺伝子を組み込むことができる巨大染色体ベクターの作成、3) 染色体ベクターを用いた異種生物反応系の酵母内での再構築、解析系の確立。

今年度は以下のような結果を得ました。1) 酸性培地では rDNA が安定化し、寿命が延びることを発見しました。そのメカニズムとして rDNA の安定性に関わる非コードの転写が酸性条件では抑制されていることを見つけました (Hasegawa et al, 2023)。また酵母の長期培養実験を行い rDNA のコピー数の変化を調べたところ、そのコピー数維持には、複製阻害に依存した組換えが必須であることを証明しました (Murai et al, 2024)。2) 40 個のバーコードを挿入した染色体ベクターを完成させました。1つのバーコードに2つの遺伝子が入れられますので最大 80 個の遺伝子導入が可能です、世界最大級です。3) 出芽酵母には存在しない RNA サイレンシングに関わる遺伝子群を、染色体ベクターにより導入しています。現在分裂酵母の 8 つ遺伝子の導入が完了し、サイレンシングに関わるヘテロクロマチン構造が観察されました。さらに主たる共同研究者である岩川博士は植物の遺伝子のサイレンシング遺伝子についても同様に研究を進めています。

【代表的な原著論文情報】

1. Murai T., *Yanagi, S., Hori, Y., and ***Kobayashi, T.** (2024). Replication fork blocking deficiency leads to a reduction of rDNA copy number in budding yeast. *iScience* 27(3) <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109120>
2. Hasegawa, Y., Ooka, H., Wakatsuki, T., Sasaki, M., Yamamoto, A. and ***Kobayashi, T.** (2023). Acidic growth conditions stabilize the ribosomal RNA gene cluster and extend lifespan through non-coding transcription repression. *Genes to Cells*, <https://doi.org/10.1111/gtc.13089>
3. Shioi T, Hatazawa S, Oya E, Hosoya N, Kobayashi W, Ogasawara M, **Kobayashi T**, Takizawa Y, Kurumizaka H. (2024) Cryo-EM structures of RAD51 assembled on nucleosomes containing a DSB site. *Nature* , 628 , 212 – 220 <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07196-4>
4. Yoshimoto, R., Nakayama, Y., Nomura, I., Yamamoto, I., Nakagawa, Y., Tanaka, S., Kurihara, M., Suzuki, Y., **Kobayashi, T.**, Kozuka-Hata, H., Oyama M., Mito, M., Iwasaki, S., Yamazaki, T., Hirose, T., Araki, K., Nakagawa, S. (2023). 4.5SH RNA counteracts deleterious exonization of SINE B1 in mice. *Mol Cell* 83: 4479-4493. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.019>