

伊藤 隆司

九州大学大学院医学研究院
教授

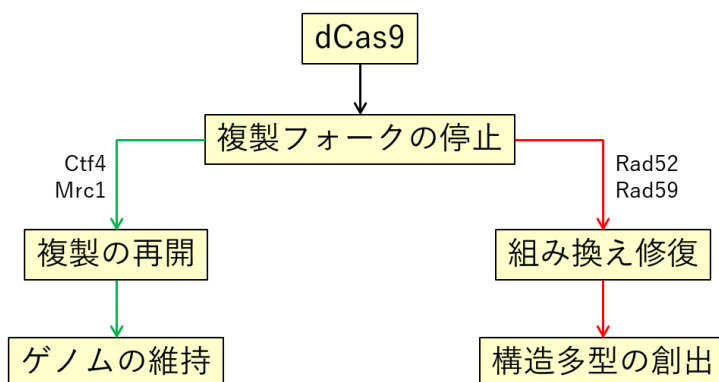
ゲノム配列の新解釈による設計自由度と進化可能性の獲得

§ 1. 研究成果の概要

ゲノム DNA の正確な複製は、細胞の最も基本的な機能である。しかし、複製が完全に正確に行われず、生命の本質である進化は起こらない。突然変異の蓄積によるゲノムの変化が進化を起こすが、ゲノム構造は一気に大きく変化することもある。その契機となるのが、ゲノム上を進行する複製装置(複製フォーク)の停止である。複製フォークが停止すると、細胞は様々な修復機構を発動させるが、その過程で重複・欠失・逆位などの構造多型が生じる。構造多型は進化を加速する駆動力であり、特に遺伝子重複は機能の多様化による新規遺伝子の創出に不可欠である。ゲノム上には複製フォークが停止しやすい複製困難点が散在し、そこには進化可能性が潜んでいると言える。しかし、複製困難点自体が進化の過程で生じたものであるから、そこに潜在する進化可能性も進化の軛の下にある。この軛を逃れてゲノムの進化可能性を自在に解き放つには、細胞に任意の配列を複製困難部位と解釈させることができればよい。つまり、ゲノム上の任意の場所で複製フォークの進行を阻止できればよい。本課題ではそのための技術の開発と応用を目指す。

近年、ゲノム編集のツールとして、gRNA と複合体を形成して gRNA と相補性を持つ DNA 配列を特異的に切断する Cas9 タンパク質が活用されている。dCas9 は標的配列に結合するが切断できない Cas9 変異体である。我々は、出芽酵母ゲノム中で *CUPI* 遺伝子が十数回縦列に反復している *CUPI* 座位に dCas9 をターゲットすると、反復回数が短期間で大きく変化すること、つまり縦列反復構造が不安定化することを見出した。この現象は細胞増殖依存性であったことから、我々は dCas9 による複製フォークの進行阻止が不安定化の原因ではないかと考えた。本年度は、この仮説を実証するために、*CUPI* 座位における複製フォークの状況を2次元ゲル電気泳動法という生化学的手法で調べた。その結果、dCas9 と *CUPI* に対する gRNA を同時に発現した時にのみ、複製フォークが *CUPI* 座位で停止することが示された。更に、様々な遺伝子の破壊が、dCas9 による *CUPI* 座位の不安定化に与える影響を調べた。その結果、複製フォーク構成因子である Ctf4 や Mrc1 を失うと不安定性が増強し、組換え因子である Rad52 や Rad59 を失うと不安定性が減弱する

ことが分かった。以上の結果は、dCas9 が複製フォークの進行を阻害し、それに伴う組み換え修復系の作動が標的ゲノム部位に不安定性を誘導することを示しており、本課題が目指すゲノムの進化可能性を解き放つ技術を開発する上での基盤となる知見が得られた。



§ 2. 研究実施体制

(1) 伊藤グループ

- ① 研究代表者:伊藤 隆司 (九州大学医学研究院 教授)
- ② 研究項目
 - ・任意のゲノム領域を重複させる技術
 - ・任意のゲノム配列に選択圧をかける技術