

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

2020 年度 年次報告書

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。DNA 複製フォークの進行が停止すると様々な修復機構が発動され、その過程でゲノム上に重複・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分化による新遺伝子の創出に不可欠である。そこで我々は、複製フォークの進行を狙ったゲノム部位で停止させることによって、遺伝子重複を誘導する技術の開発を目指している。

これまでに、出芽酵母を用いて触媒不活性型 Cas9 (dCas9) が *in vivo* で複製フォークの進行を阻害することを明らかにし、dCas9 の結合が *CUP1* アレイなどの縦列反復構造にコピー数多型を誘導することを示してきた。dCas9 による *CUP1* アレイの短縮に対しては、停止複製フォークを安定化するレプリソーム進行複合体の構成因子 Ctf4 と Mrc1 および複製フォーク前方の障害物を除去するアクセサリヘリケース Rrm3 が抑制的効果を持つものに対して、組換えタンパク質 Rad52 と Rad59 の一本鎖 DNA アニール活性が促進的効果を発揮する。これらの結果は、dCas9 が複製フォークの進行を阻害し、それに対する組み換え修復機構の発動が標的ゲノム部位に不安定性を誘導し、構造多型の創出につながることを示している。

その一方で、我々は細胞周期制御機構を改編することによって G2 期における DNA の再複製が誘導可能な変異株を構築した。更に、遺伝学的アッセイと長鎖 DNA シーケンシングを用いて、標的ゲノム領域の再複製誘導性重複 (RRIGA: Re-Replication Induced Gene Amplification) が起こることを確認した。

以上の2つの成果を踏まえて、今後は dCas9 による再複製フォークの効率的な進行停止を介して RRIGA の効率と範囲の制御を目指す。

§ 2. 研究実施体制

(1) 伊藤グループ

- ① 研究代表者: 伊藤 隆司 (九州大学大学院医学研究院 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
 - ・任意のゲノム領域に変異を導入する技術

【代表的な原著論文情報】

- 1) 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.