

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22397

研究課題名(和文) 不活性化Cas9によるゲノム不安定性誘導機構の解明とそれに基づく構造多型の操作

研究課題名(英文) Catalytically inactive Cas9-induced genome destabilization: mechanistic study and applications to manipulation of structural variations

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：触媒不活性型Cas9(dCas9)は、標的遺伝子発現制御、生細胞可視化、塩基編集のツールとして盛んに利用されている。我々は出芽酵母においてdCas9が複製フォークの進行を阻害し、縦列反復構想を不安定化することを見出した。この不安定化は、複製フォーク進行複合体の構成因子Ctf4とMrc1およびアクセサリーヘリケースRrm3によって抑制される一方で、組換えタンパク質Rad52およびRad59の一本鎖アニーリング活性によって加速される。dCas9による複製フォーク停止は、従来のdCas9の応用にとっては潜在的风险となるが、ゲノム安定性の機構研究や人為的操作における新しいツールとなるであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

dCas9が複製フォークの進行を阻害して、ゲノムを不安定化させることを見出した。これによって、ゲノム中の任意の部位で複製フォークを停止させる途が示された。dCas9によるゲノム不安定性の誘導は、ゲノム安定性研究における新しい研究手法を提供するとともに、構造多型を誘導する新しいゲノム操作技術の礎となることが期待される。また、様々な応用が試みられているdCas9の潜在的危険性を示したことにより、dCas9の様々な社会的応用の安全性向上にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Catalytically inactive Cas9 (dCas9) has become an increasingly popular tool for targeted gene activation/inactivation, live-cell imaging, and base editing. Here we show that dCas9 impedes replication fork progression to destabilize tandem repeats in budding yeast. When targeted to the CUP1 array comprising ~16 repeat units, dCas9 induced its contraction in most cells, especially in the presence of nicotinamide. Replication intermediate analysis demonstrated replication fork stalling in the vicinity of dCas9-bound sites. Genetic analysis indicated that while destabilization is counteracted by the replisome progression complex components Ctf4 and Mrc1 and the accessory helicase Rrm3, it involves single-strand annealing by the recombination proteins Rad52 and Rad59. Although dCas9-mediated replication fork stalling is a potential risk in conventional applications, it may serve as a novel tool for both mechanistic studies and manipulation of genomic instability.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：dCas9 ゲノム不安定性 複製フォーク停止 構造多型 組換え修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集のツールと幅広く利用されている Cas9 は2つのヌクレアーゼ活性中心を有するタンパク質である。その2つの活性中心に D10A 変異と H840A 変異を有する触媒不活性型 Cas9 (dCas9) は、ガイド RNA (gRNA) が指定する領域に結合はできるが、DNA を切断することはできない。この性質を利用して dCas9 は様々な用途に利用されている。例えば、蛍光タンパク質を融合することによって、ゲノム上の特定座位の生細胞可視化が可能になった。また、転写活性化・抑制ドメインあるいはエピジェネティック修飾酵素を結合することによって、結合部位近傍の遺伝子発現を制御することも盛んに行われている。またシチジンやアデノシンの脱アミノ化酵素と融合させることによって、結合部位近傍に変異を誘導する塩基編集にも注目が集まっている。これは Cas9 が標的部位周辺に大きな欠失を起こすなどの想定外の副作用を持つのに対して、塩基編集は DNA 2本鎖切断 (DSB) を起こさないで安全性が高い方法と見做されている。

2. 研究の目的

我々は、出芽酵母ゲノム中で 2-kb ユニットが十数回縦列に反復している CUP1 アレイに dCas9 をターゲットする実験を行っている過程で、CUP1 のコピー数が減少することを見出した。この事実は、dCas9 の結合がゲノム不安定性を誘導する場合があることを意味している。本研究では、dCas9 によるゲノム不安定性誘導の機構を明らかにして、その性質を構造多型誘導のためのツールとして利用できないかを検討することとした。

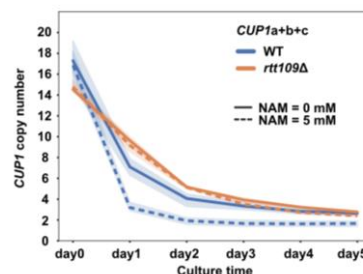
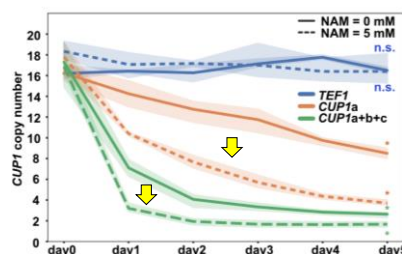
3. 研究の方法

- 1) エストラジオールによって dCas9 の発現を誘導できる株を作成して、発現誘導後、経時的に定量 PCR を行い、CUP1 コピー数を検討した。
- 2) CUP1 アレイの中央に URA3 を挿入した株を作成し、dCas9 を CUP1 あるいは URA3 にターゲットし、URA3 の欠失を 5-FOA 耐性株の出現頻度で評価した。
- 3) dCas9 を CUP1 アレイにターゲットした株について、ナノポアシーケンシングでアレイ構造の決定を行った。
- 4) 2次元ゲル電気泳動法とサザンブロットハイブリダイゼーションを用いて、dCas9 が複製フォーク中間体に与える影響を検討した。
- 5) 複製や修復に関与する遺伝子の破壊株に作成して、dCas9 による CUP1 コピー数減少に関与する遺伝子を検索した。

4. 研究成果

- 1) CUP1 アレイに dCas9 をターゲットすると経時的に CUP1 リpeatユニット数が減少することが分かった。この現象は DNA 鎖のどちらに dCas9 をターゲットした場合でも起こり、複数の gRNA を同時に発現させると更に、コピー数減少の速度は加速した (右図上)。同様の現象は5コピーのパラログが縦列に反復する ENA1/2/5 座位においても観察された。

この現象はニコチンアミド (NAM) の存在下で加速された (右図上)。NAM は Sirtuin などのヒストン脱アセチル化酵素を阻害するが、NAM による加速効果は、ヒストン H3K56 をアセチル化する唯一の酵素である Rtt109 を欠失させると観察されなくなった (右図下)。ヒストン H3K56 アセチル化は DNA 複製後のヌクレオソーム再構成に関与することが知られており、この現象と DNA 複製との関係が示唆された。



- 2) CUP1 アレイの中央部に挿入した URA3 に dCas9 をターゲットしたところ、5-FOA 耐性コロニーの出現率が有意に上昇した。したがって、単一分子の dCas9 が結合するだけで CUP1 アレイの短縮が起こることが判明した。
- 3) dCas9 を CUP1 アレイにターゲットした株から単一コロニーを単離して、定量 PCR を行ったところ、大半のコロニーではコピー数が減少していたものの逆に増加したコロニーも見出された。そこでナノポアシーケンシングによって、コピー数の増加が CUP1 アレイの伸長によるか否かを確認することとした。具体的には、CUP1 アレイ上流と下流の双方の配列を有するリードを抽出して、CUP1 リpeatユニットの配列との間でドットプロット解析を実施した。その結果、伸長したアレイの存在が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Doi Goro, Okada Satoshi, Yasukawa Takehiro, Sugiyama Yuki, Bala Siqin, Miyazaki Shintaro, Kang Dongchon, Ito Takashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Catalytically inactive Cas9 impairs DNA replication fork progression to induce focal genomic instability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 954 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1241	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 悟、中川 志都美、伊藤 隆司
2. 発表標題 Rad52の可視化を利用してガイドRNAのin vivoでの機能性を評価する簡便な顕微鏡手法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井 吾郎、岡田 悟、伊藤 隆司
2. 発表標題 dCas9はタンDEMリピート配列のコピー数を不安定化させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------