

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年04月20日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
 職 名 講師
 研究代表者名 増本博司

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:191010)

| | | | | |
|------------------|--|------------------------------|-------|------|
| 1. 共同利用研究 課題名 | sgRNA に依存しない CRISPR システムの開発 | | | |
| 2. 共同利用研究 目的 | CRISPR/Cas9 は sgRNA と呼ばれる single guide RNA (sgRNA) を用いて標的 DNA 配列に二重鎖切断を加えるが、申請者は sgRNA に依存しない改良型 CRISPR を使った新しいゲノム編集技術の確立を目指す。 | | | |
| 3. 共同利用研究 期間 | 2019年7月1日 ～ 2020年3月31日 | | | |
| 4. 共同利用研究組織 | | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役割分担 | |
| (研究代表者) 増本博司 | 医学部 | 講師 | 研究の実施 | |
| (分担研究者) | | | | |
| 5. センター内受入研究者 | 研究部門・ 分野名 | シグナル統合経路研究部門 ・ゲノム機能制御研究分野 | 氏 名 | 横井雅幸 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:191010)

6. 共同利用研究計画

ゲノム編集技術は様々な生物種に適用され、基礎あるいは応用分野で広く活用されている。CRISPR/Cas9 は sgRNA と RNA 依存性エンドヌクレアーゼ Cas9 で構成されており、sgRNA 内の protospacer 配列 20 nt を相補する染色体中の標的 DNA 配列に二重鎖切断を導入する。申請者は sgRNA 非存在下でも Cas9 が出芽酵母染色体中にプラスミドを挿入でき、その挿入には、プラスミド中に酵母染色体中にある相同配列が存在すること、宿主細胞の相同組換え機構がこのプラスミド挿入に重要な役割を果たしていることを見いだした(増本ら、未発表データ)。本共同研究では sgRNA 非存在下で Cas9 による相同組換えによる外来 DNA の挿入機構の解明を行なう。

7. 共同利用研究の成果

国立遺伝学研究所・微生物遺伝研究室の荒木弘之教授との共同研究により、大腸菌で dCas9 タンパクを精製した。その結果、dCas9 単量体と二量体を別々に精製した。この精製した二種類の dCas9 を使用し、生化学的解析を行った。生化学的解析は神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・横井准教授と共に行なった。

1. Cas9 は sgRNA と複合体を形成して、独立した二本鎖 DNA が持つ相同配列間で組換え反応を起こすことができる。sgRNA がなくても、dCas9 が相同配列を持つ独立した二本鎖 DNA 断片の融合を促進できるか調べた。精製した dCas9(単量体・二量体)を使い、異なった蛍光色素(Cy3およびCy5)で標識した二本の二重鎖 DNA 断片を反応させ、生じた DNA をポリアクリルアミド電気泳動で解析した。その結果、二本の DNA 断片の融合を示す Cy3, Cy5 の蛍光が一致するバンドは検出されず、期待した dCas9 による二本の DNA 断片間の融合は検出できなかった。
2. 独立した二本鎖 DNA 間で相同配列間での融合が起こるためには、dCas9 によって二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に乖離する反応が必須である。精製した dCas9 で二重鎖 DNA の一本鎖乖離反応が起こるか調べるために、精製した dCas9(単量体・二量体)と TAMRA および BHQ で末端標識した二本鎖 DNA 断片を反応させた。一本鎖 DNA に乖離した場合には、TAMRA の蛍光を検出できるが、規定時間内で TAMRA の蛍光を検出することができなかった。

今回の共同研究では、期待した sgRNA を加えず dCas9 による DNA 断片間での相同配列間での融合および二本鎖 DNA のから一本鎖 DNA への乖離反応を検出することができなかった。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

Hanasaki, M and Masumoto, H., CRISPR/Transposon gene integration (CRITGI) can manage gene expression in a retrotransposon-dependent manner. *Scientific Reports*, 9, 15300, 2019.

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

なし。