

## 平成30年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 篠原 美紀
2. 研究課題名 創薬ターゲット探索のためのゲノム編集効率上昇をもたらす酵母変異株の単離
3. 研究目的・内容

これまでの我々の解析から、C-NHEJ 経路を阻害するとゲノム編集が高頻度で起こり、通常よりも広範囲にわたる塩基配列の IN/DEL を引き起こすことを見いだしている。そこで、私たちは、C-NHEJ 経路を阻害することでゲノム編集効率を上昇させる方法を開発することを本研究の目的とする。方法として、ゲノム編集効率上昇について、まずは酵母をモデルとしてゲノム編集効率を上昇させる変異株を単離し、その変異の分子的作用機序を明らかにする。その中から、多くの生物種で保存されているタンパク質機能に焦点をあて、その機能を特異的に阻害する化合物・あるいはペプチドを開発することを将来的な最終目標とする。

### 4. 研究の経過

ゲノム編集技術は、部位特異的な DNA 二重鎖切断 (DSB) をゲノム上に TALEN や CRISPR/Cas9 などの人工エンドヌクレアーゼによって引き起こし、細胞内で「不正確に」修復することを利用した技術である。しかし、生理活性として修復反応は原則として正確に修復することが必須であり、IN/DEL 産物を生み出す不正確な Alternative-NHEJ (A-NHEJ) はゲノム情報の再編を引き起こすことから、通常は細胞内では積極的に抑制され正確な Canonical-NHEJ (C-NHEJ) 経路が優先されている。そこで私たちは C-NHEJ を抑え、ゲノム編集に必要な A-NHEJ を上昇させる酵母変異株の単離と解析を行った。

#### ①酵母におけるゲノム編集効率上昇変異の単離と評価

##### 1. *sae2* (CtIP) 変異の作用機序の解明と機能阻害ターゲットドメインの選定

出芽酵母において Sae2 の活性を失うと、DSB 末端の短鎖化が阻害されることが知られている。また、*sae2* 変異株ではゲノム編集効率が飛躍的に上昇することを我々は見いだしている。そこで、Sae2 と相互作用する因子について解析を行ったところ、Rad50 と C-NHEJ に必須な DNA ligase のサブユニットである Lif1 を見いだした。Lif1 と Sae2 との相互作用部位を明らかにし、相互作用に欠損がある変異株を作成し、部位特異的な DSB に依存したゲノム遺伝情報の改変効率について解析を行った。その結果、Lif1 との相互作用欠損の *sae2* 点変異株で *sae2* 欠損株よりも約 2 倍の高い頻度でゲノム編集が起こることがわかった。また、この変異株では DSB 末端の短鎖化には部分的欠損しか示さないことがわかった。

##### 2. *rad50* 点変異の作用機序の解明と ATPase 活性阻害方法の確立

一方で、*rad50-47* 変異は Rad50 の C 末端に変異があり、*sae2* 変異株と同様に DSB 末端の短鎖化が阻害されることを明らかにした。同様にゲノム編集効率を出芽酵母ないで解析したところ、ゲノム編集効率が野生株よりも低くなることがわかった。この結果は、*sae2* 変異でのゲノム編集効率が DSB 末端の短鎖化阻害によるものではないことを示唆している。そこで、*rad50-47 sae2* 変異を作成したところ、*sae2* 変異と同様の高頻度のゲノム編集効率を示したことから Sae2 の機能がゲノム編集を抑制していることがわかった。

##### 3. 新規変異株のスクリーニング

ゲノム編集を上昇させる他の要因について知見を得るために DNA 上の傷が修復不可能な場合に損傷があるまま細胞周期を再開させるアダプテーション機構に欠損を示す *tid1* 変異株、また、ミトコンドリアを欠いた *rho*-酵母株がいずれも C-NHEJ を上昇させることを明らかにした。これらは、細胞周期の進行及び、細胞内での効率的な ATP 産生がゲノム編集に必要であることを示唆している。

#### ②ヒト細胞における変異株の作成と様々な条件下でのゲノム編集の評価

また、*tid1* 変異については、ヒトホモログである RAD54B-/-細胞においてはゲノム編集効率の上昇が観察されたことからヒトと酵母でのゲノム編集の起こる反応経路の違いが示唆された。

### 5. 本研究と関連した今後の研究計画

今回の研究から、高いゲノム編集効率を示すために必要な Sae2 の部位をアミノ酸入れてレベルで特定することができた。この部分が Lif1 との相互作用に必要なことから、その相互作用をブロックすることでゲノム編集効率を上昇させられる可能性がある。Lif1 側の相互作用変異株の解析とともに、相互作用をブロックするペプチドの添加などの効果について解析を行う。また、これまで DSB 末端の短鎖化の阻害によって、高いゲノム編集効率が引き起こされると考えられてきたが、これら 2 つの事象の間には必ずしも関連があるとはいえないことがわかった。このことは、IN/DEL によるゲノム編集と遺伝子標的が細胞内で共存できる可能性を示唆している。今後、これら変異株での相同組換え効率について解析を行う。