

# 平成 26 年度「地神芳文記念研究助成」 成果報告要旨

研究題目： 分裂酵母 G0 細胞のテロメア維持機構の解析

研究者： 山崎 晴文

所属： 新潟薬科大学応用生命科学部

真核生物は染色体末端にテロメアと呼ばれる構造体を有しており、テロメアに結合する蛋白質複合体であるシェルタリンが中心となって (図)、DNA 損傷修復機構の活性化を抑制すると同時に、逆転写酵素テロメラーゼを呼び込むことで末端複製問題を克服している。これまでのテロメア研究は細胞が増殖している状態に焦点をあてて精力的に行われてきた。しかしヒトをはじめ多細胞生物を構成する細胞のほとんどは分化後に分裂 (増殖) しない状態で機能していることや、野生の酵母は生涯のほとんどを栄養飢餓のため増殖できない状態で生存していることを考えると、増殖を停止した細胞でのテロメア維持機構の解明は、増殖細胞のテロメア維持機構の解明と同等に重要だと考えられる。そこで本研究では、シェルタリン複合体 (Pot1, Tpz1, Ccq1, Poz1, Rap1, Taz1) が、G0 細胞でのテロメア維持に果たす役割の解明を目的とした。

分裂酵母は窒素源枯渇により G0 期に誘導され、長期にわたり生存可能であることが知られている。G0 期のテロメア長について検討したところ、20 日間にわたりテロメア長は変化なく維持されることが明らかとなった。増殖細胞で逆転写酵素テロメラーゼの呼び込みや末端保護に機能している Ccq1 は、G0 期でテロメア結合量が大幅に増加しており、G0 期のテロメア維持に機能していると考えられたが、G0 期に特異的に蛋白質量を抑えるシステムを Ccq1 に導入してもテロメア長に変化はなかった。これらのことから、増殖細胞と異なり G0 細胞のテロメア維持には Ccq1 は必須ではないと考えられた。同様に、特異的に蛋白質量を抑えるシステムを他のシェルタリン構成因子にも導入し、解析を行っている。また経時培養した際の静止期の細胞のテロメア維持についても検討を行っているのであわせて報告したい。

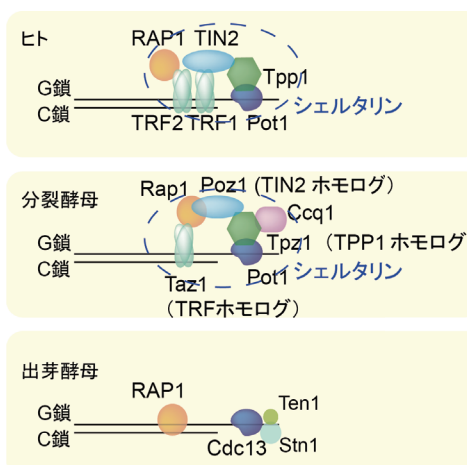


図 酵母とヒトのテロメア構造とシェルタリン

テロメア DNA は、3' 末端方向へ向かうグアニンを多く含む G 鎖と、その相補鎖である C 鎖で構成される。G 鎖は末端が一本鎖となっている。分裂酵母とヒトでは、テロメア結合蛋白質シェルタリンが高度に保存され、一本鎖と二本鎖 DNA を繋ぐブリッジ構造を取る。一方、出芽酵母にはシェルタリン相当因子は Rap1 しか存在せず、ブリッジ構造も取らないと考えられている。

## 平成 26 年度「地神芳文記念研究助成」 成果報告要旨

研究題目： CRISPR 干渉を利用した新規合成致死遺伝子スクリーニング法の  
開発

研究者： 笹野 佑

所属： 大阪大学 大学院工学研究科 生命先端工学専攻

CRISPR/Cas システムは guide RNA (gRNA) により規定された特異的な DNA 配列を Cas9ヌクレアーゼが認識し DNA 二重鎖切断を引き起こす機構であり、広範な生物種におけるゲノム編集に利用されている。CRISPR/Cas システムの派生技術として CRISPR 干渉が発表された<sup>1)</sup>。CRISPR 干渉では標的部位への結合能は保持しているがヌクレアーゼ活性を失った Cas9 (dCas9) を用いる。dCas9 は標的部位に係留することで、遺伝子の特異的な転写抑制を引き起こすことが出来る。CRISPR 干渉は、同時に複数の遺伝子の転写抑制を簡便に行う事が出来るだけでなく、dCas9 を誘導性プロモーターの支配下で発現させることで、条件特異的な転写抑制を引き起こすことが出来るという利点がある。

一方、我々の研究グループが開発した染色体分断技術 (PCS 法) を用いて、ある程度以上の長さに渡って必須遺伝子を含まないゲノム領域の生育における必須性を解析したところ、出芽酵母のゲノム上にはこれまでに知られていない合成致死の関係にある遺伝子が多数存在することが示唆された<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、CRISPR 干渉を応用して、合成致死の関係にある遺伝子の組み合わせを迅速かつ簡便に明らかにする手法を開発することを目標とした。

最初に、生育に必須な遺伝子をターゲットにした CRISPR 干渉を行った場合に、どの程度の生育抑制が起きるのかを解析した。条件特異的な転写抑制を行うためにガラクトース誘導性プロモーター *GALI* 支配下で dCas9 を発現するプラスミドを保持する株に、必須遺伝子である *ACT1* 及び *SPT15* をターゲットにした gRNA 発現プラスミドを導入した。得られた株はグルコース培地での生育は全く正常であったが、ガラクトース誘導条件においては、対照として非必須遺伝子である *CAN1* 遺伝子をターゲットにした場合と比較して大幅な生育抑制が観察された。また、dCas9 を発現するプラスミドのコピー数を増加させることで生育抑制の程度が強くなることも見出した。以上の結果より、CRISPR 干渉が遺伝学的な解析の手法として応用出来る可能性が示された。

1) Gilbert L. A. et al.: *Cell*, 154(2), 442–451 (2013).

2) Kaboli S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 42, 9838–9853 (2014).