

講演番号：3B04-03

質疑応答日時、会場：3月16日 10:30～ ミーティングルーム B

Cas9 ニッケースの戦略的配置による汎用的な遺伝子増幅法の開発

Development of a versatile method for gene amplification by strategic targeting of Cas9 nickase

○武居 宏明、岡田 悟、土井 吾郎、杉山 友貴、藤和 思琴、伊藤 隆司（九大院医）

○Hiroaki TAKESUE, Satoshi Okada, Goro Doi, Yuki Sugiyama, Suchin Towa, Takashi Ito (Kyusyu Univ.)

遺伝子増幅の分子機構には未解明の部分が多く、そのため十分な制御が出来ず、偶然と選択に頼らざるを得ない状況が続いている。そこで我々は、出芽酵母をモデルに、制御可能な特定の分子機構に基づき、しかも選択圧を必要としない新規遺伝子増幅法 **BiTREx** を開発した。**BiTREx** は、Cas9 ニッケースで導入したニックによって縦列反復の隣接部位で進行中の複製フォークを崩壊させて単一末端からなる DNA 2 本鎖切断を惹起し、それに対する修復機構 **break-induced replication** が縦列反復構造によって高い頻度で非アレリックに作動することに基づく。我々は、**BiTREx** によって 16 コピーの *CUP1* アレイ (約 32 kb) を ~500 コピー (~1 Mb) にまで伸長させることに成功した。また、*CUP1* アレイのみならず、*ENA1* アレイや *CUP1* 遺伝子座に挿入した ~10 kb の反復単位からなる人工遺伝子アレイも伸長できたことから、**BiTREx** が合成ゲノミクスの様々な応用を可能にする汎用性のある手法と考えられた。当日は、上記研究結果を基に構築した、簡易的に複数遺伝子を増幅させる手法を紹介し、**BiTREx** による遺伝子増幅の種々の研究への応用可能性を提示したい。

Molecular mechanisms of gene amplification are diverse, and most remain elusive. Accordingly, the application of gene amplification to construct stable gene expression systems is insufficient. We have developed a novel gene amplification method “**BiTREx**” based on a defined molecular mechanism that is controllable and does not require selection pressure, using budding yeast as a model. **BiTREx** stems from the fact that a nick introduced by Cas9 nickase causes replisome disassembly to generate a single-end double-strand break to be repaired by break-induced replication. Suppose the replisome that has just replicated the target tandem repeat encounters a nick at its flanking site. In that case, BIR should frequently initiate thorough non-allelic single-strand DNA invasion to expand the tandem repeat. Indeed, **BiTREx** successfully expanded a *CUP1* array consisting of 16 copies of 2 kb repeat units to ~500 repeat units (~1 Mb). Furthermore, **BiTREx** successfully expanded not only another natural tandem gene array (*ENA1* array) but artificial ones consisting of ~10-kb repeat units inserted at the *CUP1* locus. Thus, **BiTREx** is a versatile method to enable various novel applications in synthetic genomics. We will also show a seamless system for gene integration followed by **BiTREx** in this symposium, and present the possibility of applying gene amplification by **BiTREx** to various researches.

Gene amplification, Cas9 nickase, DNA replication

発表責任者：武居 宏明 (takesue.hiroaki.479@m.kyushu-u.ac.jp)