

Strategic targeting of Cas9 nickase induces large segmental duplications

杉山, 友貴

<https://hdl.handle.net/2324/7363620>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (医学), 課程博士
バージョン :
権利関係 : © 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.



氏 名： 杉山 友貴

論文名：

Strategic targeting of Cas9 nickase induces large segmental duplications

(Cas9ニッケースの戦略的配置により長大なゲノム重複を誘導する)

区 分： 甲

論 文 内 容 の 要 旨

比較ゲノム学の進歩に伴い、遺伝子重複やゲノムの分節重複がゲノムの進化や多様性に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。一方で、分節重複を含んだ任意の構造多型を誘導する技術はこれまで開発されていなかった。我々はCas9ニッケースを戦略的に配置することによって、長大な分節重複を効率よく誘導する技術、Paired Nicking-Induced Amplification (PNAm)を開発した。PNAmでは、2つのCas9ニッケースを複製起点の上流と下流に、しかも互い違いの鎖に配置する。このことにより、複製起点から両方向に出現した2つの複製フォークがニック導入部位で破綻し、その結果one-endedな二本鎖切断のペアが生じる。このとき2つの二本鎖切断の近傍に相同配列が存在すると、end resectionによりそれらが一本鎖DNAとなり、両者が互いにアニールすることで相同配列に挟まれた領域の重複が誘導される。この原理の検証のため、出芽酵母で遺伝的レポーターを用いて解析したところ、約47 kbから1 Mbの長さの領域の重複を、10%~35%の効率で誘導できることが判明した。各種変異体を用いた解析により、PNAmがsingle strand annealingを介して起こることがわかった。また領域内部に複製起点がない場合でも、複製起点がある場合と比べて効率は低下するもののPNAmが起こることが判明した。また、適切な架橋DNAを用いることで、相同配列に挟まれていない領域の重複も誘導することができた。またPNAmが繰り返し起こることにより、複数コピーにまで縦列重複を誘導することも判明した。さらに、PNAmが哺乳類細胞中でも成立することも示した。これらのことから、PNAmは複製フォークの進行を操作することで構造変異を誘導する、新しい技術を示したといえる。