

**【目的】**本研究では、発ガン過程で見られる転座や異所組換えなどの染色体再編をヒト培養細胞内で再現する実験系を確立し、染色体不安定化による発ガンメカニズムの基礎的知見を得ることである。

**【方法】**蛍光タンパク質 GFP バリエントの EYFP と ECFP を用いて姉妹相同染色体間の組換え体を検出するヒト細胞株を作製する。EYFP と ECFP は GFP のバリエントであり、その DNA 配列は高い相同性（全体で 97.8%、N 末端と C 末端は 100%）を示す。一方で、励起・発光波長が異なるため FACS（fluorescence activated cell sorting）により検出、分離が可能である。この特性を利用し、姉妹染色体間の組換えが起きた場合 EYFP が、相同染色体間の組換えが起きた場合には ECFP が発現するような細胞株を作製する。また、異所組換え、染色体腕部全体の欠失を検出するために、mCherry を同染色体腕部に導入する。組換え体（交叉型／非交叉型）の違いは制限酵素の多型を用いて区別する。

プラスミド構築の追加点、改善点は以下の通りである。EYFP、ECFP の N 末端、C 末端の相同領域の長さが相同組換えを行うことができる最低限の長さであったため、Gal4-bindig タグを付加することで、左右の相同領域の長さを調整した。DNA 二重鎖切断を誘導した際、単純なライゲーションで修復されてしまうもの、切断されていないもの等を除外するため切断部位に制限酵素配列を付加した。ゲノム DNA への挿入において CRISPR/Cas9 のシステムを用いて挿入を行った。

**【結果】**今回、GFP バリエントによる組換え体検出システムのプラスミド構築とゲノム DNA への挿入を行った。上述のように実際に想定される副産物等を除外できる改善を行った。ゲノム DNA への挿入では、予想に反して細胞株を得ることができなかったが、CRISPR/Cas9 システムを用いることで目的配列が挿入された細胞株を作製することができた。当初予定していた計画よりも遅れはしたものの、順調に実験系の構築は進んでいる。またゲノム DNA への挿入の実験と同時に CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊、点変異の挿入方法を確立できたので、作製した細胞株を用いた解析にスムーズに移行できると考えられる。

相同／姉妹染色体間の組換えを検出する蛍光蛋白質カセットの構築

