

CRISPR-Cas9 を用いたノックインに long ssDNA 修復ドナーのホモロジーアームの長さが与える影響

Effect of homology arm lengths of long ssDNA donors on CRISPR-Cas9 mediated knock-in

1200208 川口 雄也

Yuuya Kawaguchi

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術では、gRNA と Cas9 タンパク質の複合体によるゲノム DNA の二本鎖切断をまず誘導し、その後で生じる DNA 修復を利用する。この過程には非相同末端結合と相同組換え修復が存在することから、それぞれを利用することで遺伝子のノックアウトや任意の配列のノックインを行うことができる。しかし、ゼブラフィッシュでは、この CRISPR-Cas9 システムを用いて特定の遺伝座へ外来 DNA をノックインする効率は低いため、さらなる手法の改善が望まれている。そこで、本研究では相同組換え修復の鋳型として long ssDNA (1ssDNA) を用いた場合に、ホモロジーアームの長さがどのようにノックインの効率に影響を与えるかを調べた。この実験は、転写因子をコードする *sox3* 遺伝子に複合タグ配列をノックインするゲノム編集を対象として行った。まず、5' のホモロジーアームの長さを 300、200、100、50 塩基長となるように変化させた 1ssDNA ドナーを作成した。その 1ssDNA と CRISPR-Cas9 複合体をゼブラフィッシュの 1 細胞期の受精卵にインジェクションし、1 日胚の DNA を抽出した後、PCR を行うことでノックインの効率について調べた。