

ゼブラフィッシュ胚における Cas9 バリエーション切断活性の比較
Evaluation of cleavage activity of Cas9 variants in zebrafish embryos

1210221 清水 理貴
Riki Shimizu

CRISPR-Cas9 を利用することで、迅速かつ高い効率で遺伝子をノックアウト、あるいは目的の DNA 断片をノックインするゲノム編集を行うことが可能となっている。CRISPR-Cas9 がターゲットを認識する際の PAM 配列要求性を低減し、その認識範囲を拡張するため、PAM 配列が本来の NGG から NG へと改変された Cas9 バリエーション SpCas9-NG が開発されている。しかし、SpCas9-NG の生体内におけるオンターゲット活性やオフターゲットの問題は十分には調べられていない。本研究では、ゼブラフィッシュ胚における SpCas9-NG の活性を野生型 SpCas9 と比較した。この目的のため *sox* 遺伝子の HMG ボックス内の保存性が高い配列をターゲットにした複数の crRNA を設計し、特定のオンターゲットに対して複数の類似した配列における切断活性を測定できるようにした。1 細胞期の受精卵に Cas9 mRNA と gRNA(crRNA と tracrRNA の複合体)をインジェクションした後、1 日胚の DNA を抽出しターゲット領域を PCR 増幅した。その PCR 産物のサンガーシーケンスの波形データを分析することで、ターゲットごとの Cas9 切断活性とオフターゲット切断の頻度を調べた。これらの結果に基づいて、ゼブラフィッシュ胚における野生型 Cas9 と Cas9-NG の切断活性と特異性の相違を明らかにしたい。