

ゲノム編集を利用した正確なゲノムの改変技術は、モデル生物において遺伝子やゲノムの機能の解析に使用されている。これまでの研究より CRISPR-Cas9 とドナーとして long ssDNA(lssDNA)を用いたノックインでは、lssDNA の構造によってその効率が変動することがわかっているが、変動要因は明らかではない。そこで本研究では、lssDNA ドナーによるノックインの効率を qPCR を用いて定量的に分析することで、効率に影響をあたえる要因を探索した。この実験では、転写因子をコードする *sox11a*, *pax6a*, *sox3* の 3 つの遺伝子に複合タグをノックインする際に、3'側のホモロジーアーム長が異なる Target 鎖と Non-Target 鎖の双方の lssDNA を用いた。これらの lssDNA 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、プローブをノックインの挿入部位に設定した qPCR を行うことでノックイン効率を定量的に調べた。また、生殖系列細胞におけるノックイン効率は、インジェクションを行った胚を成魚になるまで飼育し、F1 胚のゲノム DNA を用いて PCR を行うことで分析した。その結果、3'側のホモロジーアーム長および Target 鎖と Non-Target 鎖の違いがノックイン効率に与える影響は、ノックイン部位ごとに異なることがわかった。ノックイン部位の上流と下流のつなぎ目におけるノックイン効率を比較したところ、ドナーの 3'側の方がいずれのノックイン部位でも効率が高かった。この結果は、lssDNA による DNA 二重鎖切断修復は、ドナーの 3'側が最初にゲノムの反対鎖にアニーリングすることで開始するというモデルを支持する。