

# ゼブラフィッシュ胚における CRISPR-Cas9 の切断効率に影響を与える CRISPR RNA 配列の特徴 Sequence features of CRISPR RNA affecting cleavage efficiency of CRISPR-Cas9 in zebrafish genome editing

1235036 岡田 啓汰  
Keita Okada

CRISPR-Cas9 は革新的なゲノム編集技術である。CRISPR RNA (crRNA) を変更することで任意のゲノム領域を切断することができ、ゲノム編集に活用されている。しかし、切断効率が低い CRISPR-Cas9 では効率よくゲノム編集が行えないため、切断効率に影響する crRNA の選択が重要である。従来は crRNA と trans-activating crRNA (tracrRNA) を融合した single guide RNA (sgRNA) が CRISPR-Cas9 に利用されてきた。一方で、T7 プロモーターを用いて *in vitro* 転写反応により sgRNA を合成すると、5'末端の 2 つがグアニンとなり CRISPR-Cas9 の切断効率を低下させることが報告された。そのため、化学合成された crRNA と tracrRNA から構成される dual guide RNA (dgRNA) が利用されつつある。しかし、従来の研究で特定された切断効率に影響を与える sgRNA の特徴や、設計ツールが dgRNA を構成する crRNA に適用できるかは不明である。

本研究では、ゼブラフィッシュゲノム上の 17 個の遺伝子に対して 51 個の crRNA を設計し、切断効率を評価した。CRISPR-Cas9 をゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、受精後 1 日胚のゲノム DNA を調製した。crRNA の標的部位を PCR で増幅し、サンガーシーケンスを行った。得られた波形データより Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) および Inference of CRISPR Editing (ICE) を用いてインデルを分析し、切断効率を求めた。51 個の crRNA の切断効率と標的配列を基に k-mer probability logo (kpLogo) を用いて各位置におけるヌクレオチドの切断効率に応じた出現頻度の統計的有意性を解析し、CRISPR-Cas9 の切断効率に影響を与える配列特徴を見出した (図 1)。そこで、配列特徴が CRISPR-Cas9 の切断効率に与えている影響度を調べるため、*in vivo* においてゲノム上に存在しない配列の切断効率を分析することができる Plasmid assay を開発した (図 2A)。

Plasmid assay によって配列特徴部位に変異を持つ crRNA (mutant crRNA) の切断効率を評価したところ、実際に crRNA 配列の特徴が切断効率に影響を与えていることがわかった (図 2B、C)。加えて、既存の sgRNA 設計ツールで評価した 51 個の crRNA の予測スコアと、実測した切断効率のスピアマンの順位相関係数を求めたところ、ディープラーニングによって構築されたツールの予測精度が高いことがわかった。本研究で得られた結果は、CRISPR-Cas9 を用いたより確実なゲノム編集の確立に応用されることが期待される。

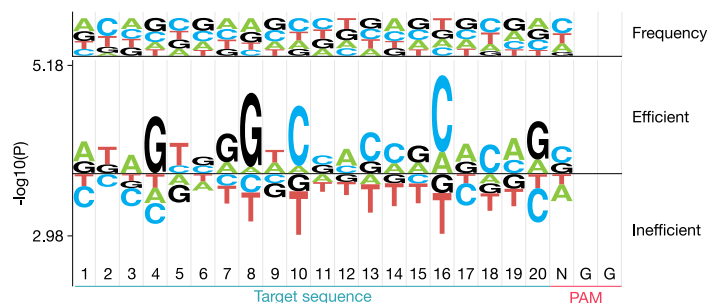


図 1. CRISPR-Cas9 の切断効率に影響する crRNA の配列特徴

切断効率に影響する crRNA の標的配列と protospacer adjacent motif (PAM) 配列の各ヌクレオチドの統計的優位性を示す。

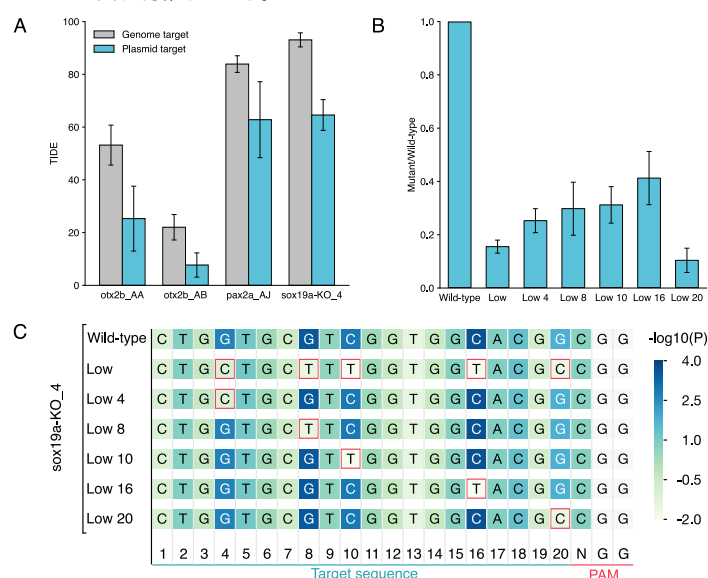


図 2. Plasmid assay により測定した crRNA 配列の特徴が切断効率に与える影響

(A) プラスミドまたはゲノムに存在する標的配列を用いて評価した crRNA の切断効率の違いを示す。(B) *sox19a* を標的とした wild-type crRNA と mutant crRNA の切断効率から算出した、wild-type crRNA に対する mutant crRNA の切断効率の相対比を示す。(C) *sox19a* を標的とした wild-type crRNA と mutant crRNA の標的配列を示す。