

CRISPR-Cas9 を利用したゼブラフィッシュ *ctslb* 遺伝子の機能解析

1220218 近藤 大輝

Functional analysis of zebrafish *ctslb* genes using CRISPR-Cas9

Daiki Kondo

Cathepsin L (CTSL)は、リソソーム酵素の一種で、ヒトではその発現亢進と骨そしょう症、関節リウマチや癌などの疾患との関連が示唆されている。これらの疾患では、CTSL が骨吸収やがん転移などのプロセスに関与すると考えられている。ゼブラフィッシュ cathepsin L の遺伝子である *ctslb* は、塩基配列が非常の保存された 13 個の遺伝子群で構成されており、隣接してゲノム上に並んでいる。*ctsl1b* は脊索前板やふ化腺の発現マーカーとして多用されているが、胚発生過程における機能は分かっていない。そこで本研究では CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により *ctslb* の機能を調べることにした。まず、13 個の内 12 個の *ctslb* の配列と一致する gRNA を設計した。この gRNA 含む CRISPR-Cas9 のリボヌクレオタンパク質複合体の顕微注入を行い、ゼブラフィッシュ胚の形態を観察したところ、様々な程度の形態異常が見られた。次に、形態異常が軽度、中程度、重度のゼブラフィッシュ胚においてゲノムがどの程度切断されているかを調べたところ、軽度の胚では切断はほぼ生じていない一方、中程度胚の indel 率は 51%、重度胚は 67%であった。このことから、形態異常と indel 率には相関があることが分かった。現在複数の *ctslb* が同時に除かれるような大きな DNA 領域の欠失が生じているかを調べている。