

卒業論文要旨

CRISPR-Cas9 の gRNA 特異的な切断活性が in vivo と in vitro で異なる要因
Distinct gRNA-specific CRISPR-Cas9 activity between in vivo and in vitro

1220219 齋藤 優
Yu Saito

CRISPR-Cas9 は生命科学において画期的なゲノム編集技術である。CRISPR-Cas9 は、crRNA と tracrRNA がハイブリダイズした gRNA が Cas9 タンパク質とリボヌクレオタンパク質複合体を形成し、crRNA と相補的な配列に加えて隣接した PAM 配列を持つ DNA を切断する。しかし、crRNA の配列は切断の効率に大きな影響を与え、配列によりほとんど切れないものから 100% 近く切れるものがある。したがって、crRNA の選択がゲノム編集の成功のために重要であり、その際 in vitro の反応が利用されることもある。しかし、生体あるいは細胞内で行う in vivo 反応と試験管内の in vitro 反応での切断効率が関係するかどうかは議論が分かれている。そこで本研究では、まず 15 個の crRNA の in vitro 反応での切断効率を決定した。切断効率は、CRISPR-Cas9 により切断された DNA をゲル電気泳動し、バンドを撮影後、Image J の画像解析によって求めた。このデータとゼブラフィッシュ胚で得られていた in vivo での切断効率を比較したところ、低い相関しか見られなかった。この原因を明らかにするため、9 個の gRNA を用いて、in vitro 反応に用いる溶液の pH と塩組成、また反応温度を変更させて切断反応を行った。その結果、pH を生理的な値寄りに、塩を NaCl から KCl に、温度を 37°C から in vivo 反応で用いた 28°C にした時に最も良い相関が得られた。この中でどの要因の影響が大きいのかを現在調べている。