

ゼブラフィッシュにおける CRISPR ゲノム編集技術を用いた
蛍光タンパク質レポーターのノックインと発現効率の最適化
Optimization of CRISPR genome editing mediated knock-in of
fluorescent protein reporters in zebrafish

1235039 盆子原 友希
Yuki Bonkohara

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術は、生命科学の発展を加速させる技術として注目を集めており、基礎研究にとどまらず、医療・農業・工業など幅広い分野での活用が期待されている。特に医療分野では、ガンや希少疾病などの治療へ向けた応用が拡がりつつある。ゼブラフィッシュにおいて、このゲノム編集技術を利用し、未だ解明されていない遺伝子機能を明らかにすることは、ヒトの遺伝子機能の解明や疾患の原因追及につながると期待される。胚における遺伝子機能の解明には、その発現の観察と、それがコードするタンパク質の解析が重要である。両者を同時に容易にする方法として、タグ配列とともにその下流にタンパク質の共発現を可能とする 2A 配列と蛍光タンパク質遺伝子をもつカセットを目的遺伝子にノックインする方法が考えられる。本研究では、ゼブラフィッシュゲノムへこのようなカセットをノックインすることにより、目的タンパク質へのタグ付けと胚における遺伝子発現の可視化を同時に実現させることを目指した。

これまでゼブラフィッシュにおいて CRISPR-Cas9 を利用し、目的の DNA 配列を正確にノックインした例は報告されているが、そのノックイン効率は一般的に低い。また、短いタグ配列は比較的効率よくノックインされるが、蛍光タンパク質遺伝子を含むカセットは 1 kb 程度の長さの DNA となることから、ゲノムへのノックインはさらに困難になる。そこで、最初にノックインを効率よく行える方法の確立を目指した。

近年、一本鎖 DNA(ssDNA)を相同組換え修復のドナーに用いることで、ノックイン効率が高まるとともに、ゲノムへのランダムな挿入が低減することが報告されている。そこで、まず長い ssDNA をドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率を調べた。今回は約 900 nt のカセットとその両端にホモロジーアーム(HA)をもつ ssDNA である *sox3*(LHA)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-*sox3*(RHA)を、両方の DNA 鎖について作製した。5'側のホモロジーアームは 300nt、3'側のホモロジーアームは 50 nt 長とした。この ssDNA ドナーと *sox3* の C 末部を切断する CRISPR-Cas9 RNP を同時にゼブラフィッシュ胚へ顕微注射した。そして、蛍光顕微鏡で GFP の発現を調べた後、受精後 1 日胚のゲノムを抽出し、PCR によりゲノムへのノックイン効率を調べた。その結果、どちらの鎖の ssDNA を使用するかがノックイン効率に大きく影響し、gRNA が結合するターゲット鎖の方がより効率が良いことが分かった。しかし、PCR によりノックインが確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルが確認できなかったことから、*sox3* 遺伝子へのノックインの効率はかなり低いことが示唆された。

次に、ノックイン効率を高めるために二本鎖 DNA(dsDNA)をドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率を調べた。この際、プラスミドドナーが *in vivo* で 2 箇所切断され、直鎖状 dsDNA ドナーが作り出されるように、カセットの両端にユニバーサル gRNA(UgRNA)のターゲット配列を挿入した。UgRNA としては、先行研究で用いられたものと、私たちの研究から得られた切断効率に影響を及ぼす crRNA の配列特徴のデータに基づき設計された新たな UgRNA の合わせて 2 つを試した。この UgRNA を HA の外側に隣接して挿入した UgRNA-*sox3*(LHA)-FLAGx3-2A-EGFP-loxP-*sox3*(RHA)-UgRNA プラスミドを作成した。このプラスミドをドナーとして用い、ユニバーサル gRNA と *sox3* の C 末部を切断するための gRNA および Cas9 mRNA を同時にゼブラフィッシュ胚へ顕微注射した。そして、GFP の発現を調べた後、PCR によりゲノムへのノックイン効率を調べた。同時に *sox3* 部位でインデルが生じた頻度をサンガーシーケンスに基づく方法(ICE, TIDE)で調べた。その結果、新たに設計した UgRNA の方がノックイン効率が高かった。しかし、この方法でも PCR によりノックインが確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルは確認できなかった。この時 *sox3* 部位で生じたインデルの頻度は、*sox3* の gRNA を単独で用いた場合より低かった。このことより、gRNA 間の干渉作用により *sox3* 部位での切断が起りにくくなることもノックイン効率に影響している可能性がある。