

Characterization of CRISPR-Cas12a in zebrafish and its application to
knock-in

現在ゲノム編集のツールとして CRISPR-Cas9 が広く利用されている。しかし遺伝子によっては目的としている配列の近くに PAM 配列である NGG がないため CRISPR-Cas9 が利用できないことがある。別の種に由来し異なる PAM 配列を認識する CRISPR-Cas を用いることで、この問題を解決出来る可能性がある。本研究では、ゼブラフィッシュの *otx2b* と *hesx1* 遺伝子にタグと蛍光タンパク質をノックインすることを計画していたが、Cas9 の PAM 配列がノックインを行いたい部位の近くにないため、他の CRISPR-Cas の PAM 配列を探索したところ、Cas12a の PAM 配列 TTTV が見いだされた。しかし、Cas12a のゼブラフィッシュにおける利用はあまり進んでいないことから、まず複数の crRNA を用いて Cas12a の切断特性を調べることにした。

この実験では、Cas12a は *Acidaminococcus sp.* (As)由来のものと *Lachnospiraceae bacterium* (Lb)由来のものを使用した。AsCas12a としては野生型と Cas12a Ultra タンパク質、および enAsCas12a の mRNA を、LbCas12a としては LbCas12a Ultra を使用した。8 個の遺伝子をターゲットする 10 個の crRNA を設計した。これらのリボヌクレオプロテイン複合体または crRNA と Cas mRNA の混合物をゼブラフィッシュ胚にインジェクションをした。Cas12a の切断活性は、切断部位に indel が生じた割合により評価した。その結果、10 個のうち 4 個についてはほとんど indel が見られなかったことから、Cas12a により効率よく切断される配列は限られている可能性がある。

otx2b と *hesx1* 遺伝子に対する 2 つの crRNA で切断活性を示したため、蛍光タンパク質遺伝子カセットをノックインすることを試みた。このカセットは、遺伝子産物の C 末にタグを付加するための配列と、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。このカセットをノックインすることにより、遺伝子の発現の観察と、それがコードするタンパク質の解析が容易になる。この目的のため UgrNA-*otx2b*(50nt)-FLAG×3-2A-nEGFP-loxP-3'UTR(50nt)-UgrNA ドナープラスミドと *hesx1* のホモロジーアームをもつ同様のプラスミドを製作した。ホモロジーアーム配列の両端に配置したユニバーサル gRNA(UgrNA)のターゲット配列を切断する CRISPR-Cas9 を同時に導入することで、挿入したいカセット配列を含む直鎖状の二重鎖 DNA ドナーが生じる。現在ドナープラスミド、CRISPR-Cas12a および CRISPR-Cas9 のリボヌクレオプロテイン複合体または crRNA と Cas mRNA の混合物をゼブラフィッシュ胚にインジェクションすることによりタグと蛍光タンパク質が遺伝子にノックインされる効率を調べている。