

CRISPR-Cas システムをゲノム編集で利用するには、高い特異性と切断効率を持つ gRNA を選択することが重要である。Cas9 と PAM 配列が異なる Cas12a の利用が広がりつつあるが、その gRNA を設計する際の指針は確立されていない。そこで本研究では、Cas12a の切断効率に影響を与える gRNA の要因を調べた。まず、サンガーシーケンスに基づいて CRISPR-Cas の切断効率を分析するウェブツールである TIDE, ICE, DECODR, SeqScreener の 4 つを比較した。このために CRISPR-Cas12a 複合体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、様々なインデルをもつ DNA をクローン化した。それらを混合し、サンガーシーケンスを行った後、各ツールで分析したところ、DECODR が最も正確な結果を出力した。Cas12a では Cas9 よりも複雑なインデルが生じる傾向があるため、このような場合には DECODR で分析した方がいいことがわかった。次に、安定化修飾を含む化学合成 gRNA と *in vitro* で酵素的に合成した gRNA の活性比較を行った。複数の gRNA について比較したところ、ゼブラフィッシュ胚においては、同程度の切断効率であったことから、必ずしも高価な化学合成 gRNA を使用する必要がないことがわかった。さらに、gRNA のスペーサー配列の長さが切断効率に影響を与えるかを調べるために、スペーサー長が 20, 21, 22, 23, 24 塩基の gRNA を作製した。現在、これらの切断活性の違いを調べている。