

卒業論文要旨

CRISPR-Cas9 を用いたゼブラフィッシュ *cathepsin Lb* 遺伝子クラスター欠失変異体の作製

岩渕 啓樹

Generation of a zebrafish *cathepsin Lb* gene cluster deletion using CRISPR-Cas9

Hiroki Iwabuchi

*Cathepsin L* はヒトのさまざまな疾患にも関わるシステインプロテアーゼ遺伝子であり、ゼブラフィッシュでは 12 個のオースログが遺伝子クラスターを形成している。本研究では、発生過程における本遺伝子群の機能を解明するため、CRISPR 法を用いてクラスター全体の欠失変異体の作製を目指した。まず、*cathepsin Lb* クラスター全体の欠失を誘導するために、約 400 kb 離れた上流と下流に CRISPR-Cas9 の gRNA を設計した (up/down gRNA)。それぞれの RNP 複合体を個別に受精卵へ導入したあと、24 時間後にゲノム DNA を調製した。OneTaq を用いた PCR で標的部位を増幅し、サンガーシーケンスを行った結果、それぞれの gRNA に切断活性があることがわかった。続いてクラスター全体の欠失を誘導するため、両 gRNA を混合した RNP を導入した。24 時間後にゲノム DNA を調製し、欠失が生じたかどうかを確かめるため、上流側と下流側の 3 つのプライマーセット (切断部位から遠い順に up F1/down R1, up F2/down R2, up F3/down R3) を用いた OneTaq での PCR を行った結果、F2/R2 と F3/R3 セットを用いた場合に欠失アレル特異的なバンドが見られた。現在、この DNA 断片のサンガーシーケンスを行い、予想される欠失が生じているのかを確かめている。さらに今後は、*cathepsin Lb* 遺伝子クラスター欠失変異体の確立し、表現型解析を目指す。