

ゼブラフィッシュにおけるCRISPR-Cas12a の特性解析とノックインへの応用

著者	田部井 輝侑
発行年	2022-03
その他のタイトル	Characterization of CRISPR-Cas12a in zebrafish and its application to knock-in
URL	http://doi.org/10.32149/00002470

令和3年度 修士論文

ゼブラフィッシュにおける CRISPR-Cas12a の特性解析とノックインへの応用

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

高知工科大学大学院
生命科学コース基盤工学専攻

1245101

田部井 輝侑

指導教員

蒲池 雄介 教授

1. 要旨

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 がいないため 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 *hexx1* 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、3 種の Cas12a タンパク質の活性を比較するために、8 個の遺伝子のいずれかをターゲットする 10 個の crRNA を設計し、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、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、オフターゲットがなるべく起こらないように設計した。これらのリボヌクレオプロテイン複合体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。

2.序論

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(Pickar-Oliver and Gersbach,2019)。CRISPR-Cas9 の利用の仕方として Cas9 タンパク質, crRNA, tracrRNA を混合させることでリボヌクレオプロテイン(RNP)複合体を作製し(あるいはこれらを細胞内で発現させ、細胞内で RNP を作らせるための mRNA や DNA ベクターの混合物)、この溶液を利用している細胞に対し顕微注入を行い、目的遺伝子配列において CRISPR-Cas9 による二重鎖切断を引き起こす。この時非相同末端結合(non-homologous end joining(NHEJ))による DNA 配列修復の際における indel (insertion/deletion)の発生が起き目的の遺伝子のノックアウトを引き起こす。またはドナーDNA 配列を用意し、相同組み換え修復(Homology directed repair(HDR))による修復を誘導することによって目的遺伝子にタグや蛍光タンパク質遺伝子のノックインまたはその両方をノックインする。このようなゲノム編集により研究している遺伝子の機能の解明することが可能である(Pickar-Oliver and Gersbach,2019)。CRISPR-Cas9 RNP は、Cas9 が PAM 配列と相互作用するとともに、crRNA が PAM 配列と隣接する標的 DNA 配列の相補的な配列に結合することで標的 DNA 配列を認識し、その後 Cas9 が二重鎖切断を誘導する。しかしこのゲノム編集を CRISPR-Cas9 で行おうとする時、目的遺伝子配列付近に CRISPR-Cas9 が認識する PAM 配列-NGGが存在するとは限らない。そのため、異なる PAM 配列をもつ CRISPR-Cas9 が開発されてきた(Pickar-Oliver and Gersbach,2019)。また別の種の由来の Cas9 は、最も利用されている SpCas9 とは異なる PAM を持つ場合もある。このような複数のバリエーションを利用することで、PAM の制約を緩和することができる。しかし基本的に Cas9 が認識する配列は GC リッチな配列であるため、ゲノム編集ができるターゲット配列の範囲は限られる。

ゲノム編集ができる範囲を広げるには CRISPR-Cas9 とは別の PAM 配列を認識する CRISPR-Cas を利用することが考えられる(Pickar-Oliver and Gersbach,2019)。その中に、最近利用が広まりつつある CRISPR-Cas12a がある(Liu,et al., 2019; Moreno,et al., 2017; Pickar-Oliver and Gersbach,2019)。Cas12a は、AT リッチな TTTV を PAM 配列として認識する。CRISPR-Cas12a は PAM 配列から離れた配列を切断し、5'突出末端が発生する二重鎖切断を誘導する。

本研究の開始当初、神経系の胚発生に関わる転写因子遺伝子である *hesx1* と *otx2b* の 2 つの遺伝子について、タンパク質を標識するための複合タグと 2A-蛍光タンパク質遺伝子を含むカセットをノックインし、タグ付きタンパク質と蛍光タンパク質を共発現させることを計画した。そのためノックインを行いたい終止コドン付近で CRISPR-Cas9 のターゲット配列を見つける必要があるが、切断活性が低い配列、あるいは切断はされるがノックインする部位から遠いという理由で CRISPR-Cas9 のノックインにおける利用は困難であることが予想された。そのためこの研究では、CRISPR-Cas12a のターゲット配列を探索したところ、CRISPR-Cas9 と比べて終止コドンに近い切断可能部位が見いだされた。切断活性が高いターゲット配列をノックインに利用することで、*otx2b* と *hesx1* においてノックインの可能性が高くなることが期待される。本研究では、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 の切断特性を調べた。

3.結果と考察

3.1 CRISPR-Cas12a の切断効率の解析

hesx1, *otx2b*, *sox11b*, *sox19a*, *sox19b*, *sox2*, *sox21a*, *sox21b* の8種の遺伝子のいずれかをターゲットとする crRNA をゲノム配列の情報をもとに設計した。使用した Cas12a は AsCas12a-Ultra (Zhang et al., 2021)、AsCas12a-V3、LbCas12a-Ultra (Zhang et al., 2022)の3種である。これらの CRISPR-Cas12a の主な違いと特徴を表1に示す。crRNA の設計は、オンライン上で利用できる CRISPROR という検索ツールを用い、目的の遺伝子の DNA 配列を入力することで、Cas12a が認識する配列リストを表示させた。その中でノックイン部位に近接し、Off-target 効果予測値が低いものを選び、IDT に AsCas12a と LbCas12a 用の crRNA の化学合成を依頼した。RNP 複合体を調製後、その 1.5 fmol 量をゼブラフィッシュの一細胞期胚に顕微注入した。受精後 24 時間まで発生させた胚を 20 個回収し、そこからゲノム DNA を調製し切断効率の解析を行った。サンガーシーケンスのデータの DNA 配列の波形を利用した ICE (Hsiao et al. 2018)と呼ばれるプログラムを利用して indel が生じた割合を調べた(図1)。

Cas12a nucleases	Cas12a protein sequence	NLS	Activity at 25°C/37°C
AsCas12a V3	Wild type	Optimized (OpT)	+ / ++
AsCas12a Ultra	Optimized mutant (M537R, F870L)	Improved	++ / +++
LbCas12a Ultra	Optimized mutant (E795L)	Improved	+++ / +++

表1. 使用する Cas12a タンパク質の特徴

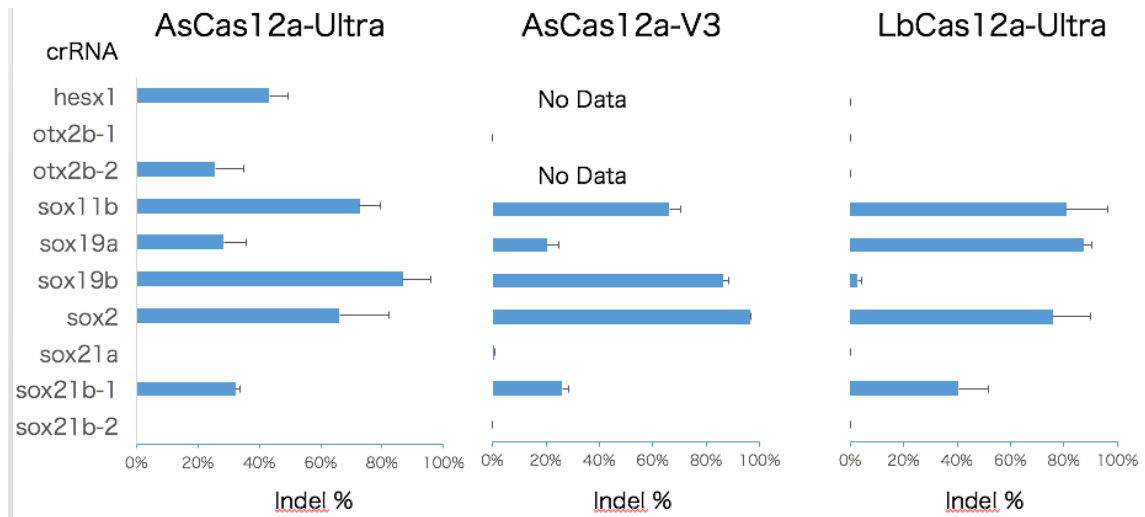


図 1. CRISPR-Cas12a の切断効率解析結果

各 crRNA をそれぞれ AsCas12a-Ultra, AsCas12a-V3, LbCas12a-Ultra のタンパク質と組み合わせて RNP 複合体を作製し、それぞれの切断活性を比較した。1 つの組み合わせにつき複数のサンプルを得て、indel の割合の平均値を算出し、棒グラフとして表示した。棒グラフがないものは indel が全く生じなかったサンプルであり、No data と記載されているものはサンプルが調製できなかったもの、または ICE によって解析ができなかったものである。

また AsCas12a-V3 の RNP 複合体の顕微注入において、otx2b-1, otx2b-2, sox2, sox19a の 4 種の crRNA については、RNP 複合体を約 3 fmol 程度顕微注入したサンプルも作製した。その結果、otx2b-2 と sox19a の 2 つにおいて通常量に比べて大幅な indel が生じた割合の増加が見られた(図 2)。この結果から切断活性の低い crRNA でも注入量を増やすことにより切断活性が改善される可能性がある。

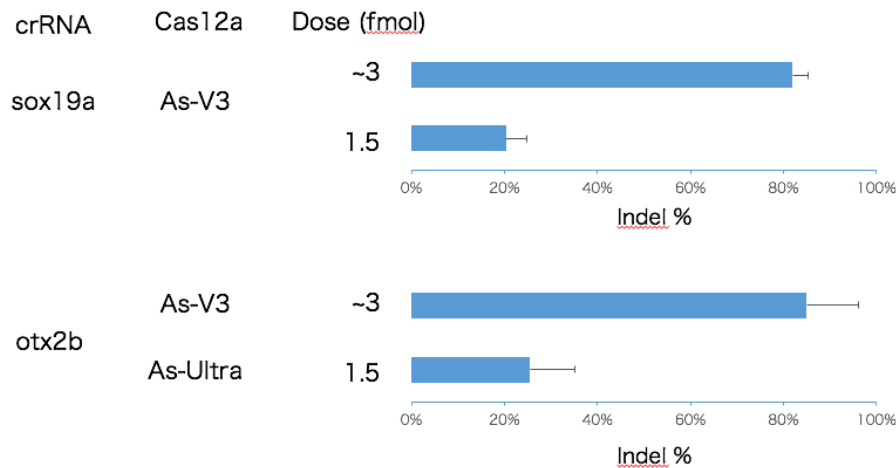


図 2.RNA 量に依存した切断効率の変化

上パネルが sox19a における AsCas12a-V3 RNP 複合体の液量を増やした顕微注入の結果であり、液量を増やしたことにより大幅な indel が生じた割合の増加が見られる。

下パネルでは otx2b における 1.5 fmol 量の AsCas12a-Ultra RNP 複合体と 3 fmol 量の AsCas12a-V3 RNP 複合体の比較を示す。使用した Cas12a タンパク質は異なるが同じ AsCas12a であるため生じる indel の割合の差は大きくないと考えたため比較した。この結果から液量を増やしたことにより大幅な indel が生じた割合の増加が起きたと考える。

CRISPR-Cas12a の切断活性の傾向の分け方として、10%未満を切断活性が低いとして(-)、10%~60%を切断活性が中程度にあるとして(+)、60%以上を切断活性が高いとして(++)と評価し、表 1 のようにグループ分けをした。

As と Lb の両方で同傾向の切断活性を示すグループ (薄緑)、Lb より As のほうが高い切断活性を示すグループ (ベージュ)、As より Lb のほうが高い切断活性を示すグループ (薄青)、As と Lb の両方で切断活性を示さないグループ (グレー) の 4 グループに分けられた。このことから crRNA の配列によっては、As Cas12a と Lb Cas12a の間で異なる切断活性を示す場合があることがわかった。

crRNA	As-Ultra	As-V3	Lb-Ultra	
sox2	++	++	++	
sox21b-1	+	+	+	
sox11b	++	++	+	
sox19b	++	++	-	10%< -
hesx1	+	+	-	10%~60% +
otx2b-2	+	+	-	60%≥ ++
sox19a	+	+	++	
otx2b-1	-	-	-	
sox21a	-	-	-	
sox21b-2	-	-	-	

表 2. CRISPR-Cas12a の切断活性傾向のグループ化

3.2 CRISPR-Cas9 と CRISPR-Cas12a の比較

Cas9 と Cas12a の間における PAM 配列の位置と切断位置の違いを *hesx1* と *otx2b* において図 3 に示す。初期の研究で *hesx1* と *otx2b* において CRISPR-Cas9 の RNP 複合体をゼブラフィッシュの初期胚に顕微注入し、受精後 24 時間まで発生させた胚を回収し、DNA 抽出を行い、indel の割合を調べた。その実験で得られた Cas9 の切断活性を Cas12a の切断活性と比較したものを図 3 に示す。*otx2b* においては切断部位に大きな違いはないものの、Cas9 より Cas12a の方が切断活性は高い。*hesx1* においては Cas9 より Cas12a の方が終止コドンにより近い部位が切断可能である。Cas12a の切断活性は少し低いが、Cas12a では顕微注入する RNP 複合体量を変えることにより切断活性の増強ができると考えている。以上の結果から *hesx1* と *otx2b* においては、この部位でノックインを行うゲノム編集においては Cas9 より Cas12a のほうが適していると考えられる。

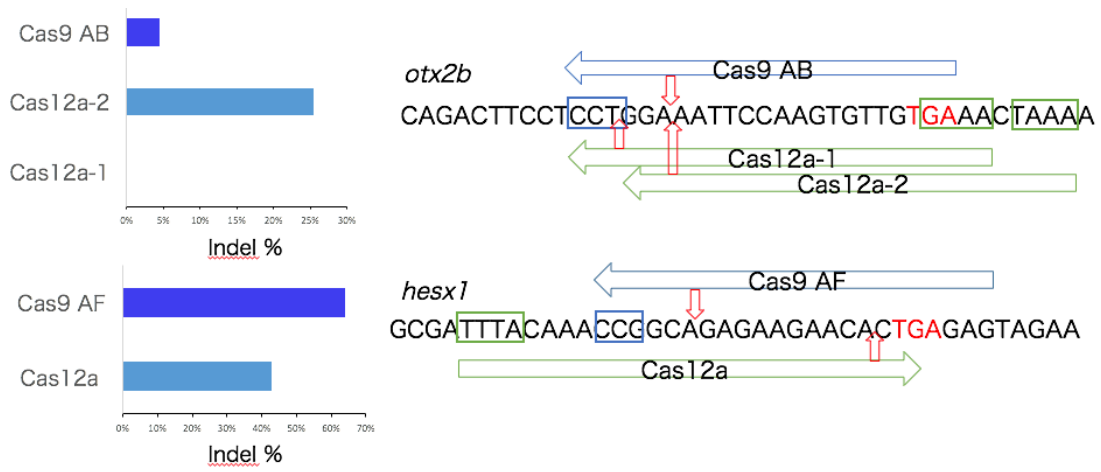


図 3. *otx2b* と *hesx1* 遺伝子のターゲット部位における CRISPR-Cas9 と CRISPR-Cas12 の比較

4.材料と方法

4.1 CRISPR-Cas12a の切断効率解析

使用した CRISPR-Cas システムの Cas タンパク質

AsCas12a-Ultra (Integrated DNA Technologies, IDT)

AsCas12a-V3 (IDT)

LbCas12a-Ultra (IDT)

4.1.1 プライマーの設計

PCR プライマーの作製は、以下の条件を考慮することで行った。

- ・23～28 塩基の間の長さで、59℃～65℃の Tm 値となるようにする。
- ・GC 含量を 45～60%の間にする。
- ・GC が 3'端領域に偏らないようにする

primer name	Sequence
hesx1 stop Seq F2	GGCTAATAATTCTGACTTTAACTGTGTG
hesx1 stop Seq R2	ACATTTAATAAATTACAATTTGGTAACAGAG
otx2b stop F	TACTTTGGGGGTATGGACTGCG
otx2b stop R	TGTTCCGTGGCTTTGACCTAAC
sox2 stop Seq F	TACATGAACGGCTCGCCCAC
sox2 stop Seq R	ATTTGATTCATTCTCCCCCGC
sox11b start Seq F	TCGCTGTCCTTCAGCATTTTCC
sox11b start Seq R	GCCACAGTAGCCTGTCATTTGG
sox19a stop Seq F	TTTACAATTGCTCTCGCGTGCTT
sox19a stop Seq R	ACCGGGCCTCAATGACAAAATC
sox19b stop Seq F	GATTCTCTGTGCTGTTAATCCTGG
sox19b stop Seq R	AGGAAGAGGATGTCTGAACTGGA
sox21a stop Seq F	CGGAATTACCTCCTGCACCT
sox21a stop Seq R2	GCCAAGTAGTTTGGGCATCTC
sox21b stop Seq F	ACCGTCTTTCTCCTACGCCTCA
sox21b stop Seq R	ACCGATCTTCTCTGCAACAGC

サンガーシーケンスには PCR とは別の以下のプライマーを使用した。

primer name	Sequence
hesx1 BC NM primer F	TGGTTCCAGAACAGAGCAAAG
otx2b stop Seq F2	AACGCTGTCACCAGTCACCTAA
sox2 stop Seq F2	CAGCATGTCCTATTCGCAGCAAA
sox11b start Seq R2	CTAGTCTACTCCGGCAGCGAAG
sox19a stop Seq F2	GTTACTTGCAGCCCCATGTCC
sox19b stop Seq F2	TGTTTGCCCTTTTTTCCTCTCCA
sox21a stop Seq F2	CACCTTTCCCGCATTATTCCGTG
sox21b stop Seq R2	GTATTAGGCTGAGCTAGTTACAGAG

4.1.2 crRNA 設計

Cas9 の crRNA は、IDT(Integrated DNA Technologies)のデザインツールを用いて設計した。Cas12a の crRNA は、CRISPROR(<http://crispor.tefor.net>)を用いて以下のように設計した。

目的遺伝子配列を入力する事で crRNA の候補が表示される。

他の特定領域を認識する可能性を示す Off-target risk が低いものを選択する。

この条件を満たし、ターゲット部位に近接する crRNA をさらに選択する。

crRNA	Spacer sequence
sox2-Cas12a-crRNA-1	CATATGCGATAAGGGAATCGT
sox19a-Cas12a-crRNA-1	CTGATCAGATGTGTGTGAGAG
sox19b_Cas12a_1	CCTAAACTTCAGATGTGAGTG
sox11b-Cas12a-crRNA-1	AACATGGTGCAGCAGACGGAC
sox21a-Cas12a-crRNA-1	AACTCCACTCATATCGTTGCA
sox21b-Cas12a-crRNA-1	GAGTCTCATAACGCCGCCGCG
sox21b-Cas12a-crRNA-2	TCGCTTTAGAGTCTCATAACG
hesx1-Cas12a-crRNA-1	CAAACCGGCAGAGAAGAACAC
otx2b-Cas12a-crRNA-1	ACAACACTTGGAATTTCCAGG
otx2b-Cas12a-crRNA-2	GTTTCACAACACTTGGAATTT

4.1.3 RNP 複合体の調製

① 100 μ M crRNA 溶液の調製

Alt-RcrRNA	2 nmol (powder)
------------	-----------------

Nuclease Free IDTE (IDT)	20 μ L
終濃度	0.1 nmol/ μ L

AsCas12a-Ultra を使用する場合

② 3 μ M gRNA 溶液の調製

100 μ M Alt-R™ CRISPR-Cas12a crRNA	1 μ L
Nuclease Free Duplex Buffer (IDT)	32.3 μ L
Total	33.3 μ L

③ Cas12a 希釈溶液(0.5 μ g/ μ L)の調製

Cas12a protein working concentration 0.5 μ g/ μ L	
10 μ g/ μ L Cas12a protein	0.5 μ L
Cas12a working buffer (20mM HEPES pH7.5; 150mM KCl)	9.5 μ L
Total	10 μ L

④ gRNA と Cas12a protein を混合する

RNP complex	
3 μ M gRNA solution	3 μ L
Cas12a 希釈溶液 0.5 μ g/ μ L	3 μ L
Total	6 μ L

⑤ 37°Cで10分間インキュベートした。その後使用するまで冷蔵保存した。

AsCas12a-V3 と LbCas12a-Ultra を使用する場合

①～②は同様

③ 1.5 μ M gRNA 溶液の調製

3 μ M gRNA solution	3 μ L
Nuclease Free Duplex Buffer	3 μ L
Total	6 μ L

④ Cas12a 希釈溶液(0.25 μ g/ μ L)の調製

10 μ g/ μ L Cas12a protein	0.5 μ L
Cas12a working buffer (20mM HEPES pH7.5; 150mM KCl)	19.5 μ L
Total	20 μ L

⑤ gRNA と Cas12a protein を混ぜる

RNP complex	
1.5 μ M gRNA solution	6 μ L
Cas12a 希釈溶液 0.25 μ g/ μ L	6 μ L
Total	12 μ L

⑥37°Cで10分間インキュベートした。その後使用するまで冷蔵保存した。

4.1.4 RNP 複合体のインジェクション

①ゼブラフィッシュの一細胞期胚に RNP 複合体を顕微注入

- ・各 RNP 複合体 1 つにつき胚 30 個に顕微注入した。
- ・AsCas12a-Ultra を使用する場合 1 nL 顕微注入した。
- ・AsCas12a-V3 と LbCas12a-Ultra を使用する場合 2 nL 顕微注入した。
- ・インジェクション後 28°C条件でインキュベートした。
- ・AsCas12a-V3 は顕微注入後 34°C条件で4時間インキュベートしたあと、28°Cに戻した。

②受精胚と未受精胚の選別

4.1.5 胚から DNA 抽出

①顕微注入後、翌朝に胚を5個ずつチューブに入れた。

②DNA extraction buffer の作製

2M Tris-HCl(pH8)	250 μ L
0.5M EDTA	10 μ L
10% Triton X-100	1 mL
D ₃ W	48.74 mL
Total	50 mL

③胚5個につき DNA extraction buffer を 100 μ L 分注した

④Proteinase K 20 mg/mL を DNA extraction buffer の 1%分加え混ぜた。

(例 DNA extraction buffer 200 μ L に対し proteinase 20 mg/mL を 2 μ L)

⑤胚5個につき溶液を 100 μ L 加え、50°Cでインキュベートを開始した。

⑥10分毎に取り出しボルテックスで攪拌した。

溶液が透明になるまで繰り返した。

⑦計2時間インキュベート後、95°Cで10分間インキュベートし Proteinase K を不活化し、その後冷凍庫で保管した。

4.1.5 PCR

① 反応液の作製

5×One Taq standard Reaction buffer	6 μ L
2.5mM dNTPs	2.4 μ L
100 μ M primer F	0.06 μ L
100 μ M primer R	0.06 μ L
One taq DNA polymerase	0.15 μ L
template DNA	3 μ L
6×sucrose Red	5 μ L
D ₃ W	13.33 μ L
total	30 μ L

cold スタートをするため、氷上で溶液を作製した。

② Thermal cycler

	temperature	time	cycle
Initial denaturation	94°C	30sec	1
Denature	94°C	15sec	30
Annealing	60°C	30sec	
Extension	68°C	45sec	
Final extension	68°C	5min	1
Hold	4°C	∞	1

③ アガロースゲル電気泳動

600 bp 前後の長さであれば 1% Agarose のゲル (EtBr 含有) を使用し、サンプルを 4 μ L 入れ、150 V 18 分間で電気泳動した。DNA のサイズマーカーとして Gene ruler を用い、目的とする PCR 産物のサイズを持つ DNA の増幅ができているかを確認した。

4.1.6 DNA 精製

NGS clean up and size selection キット (MACHEREY-NAGEL) を使用した。

① PCR 産物 25 μ L に NucleoMag NGS Bead Suspension を 45 μ L 加え、強めにボルテックスした。

② DNA をビーズに結合させるため室温で 5~15 分インキュベートした。

- ③ マグネットチューブ立てにチューブを移した。
- ④ ビーズの吸着を確認後、ビーズを吸わないように溶液を吸い取った。
- ⑤ 200 μ L の 80%Ethanol をチューブに加え 30 秒静置し、その後ビーズを吸わないように、溶液を吸うこの作業を 2 回行った。
- ⑥ 乾燥のため 5 分間静置した。
- ⑦ Elution buffer を 30 μ L 加え、ボルテックスした。
- ⑧ 2 分間静置後、金属チューブ立てに立て、ビーズを吸わないように、溶液を別のチューブに移した。
- ⑨ 吸光度を測り、DNA 濃度を決定した。

4.1.7 サンガーシーケンス

増幅されている PCR サンプルを選んだ。

サンプル調製

	プラスミド	450 - 900 ng
PCR 産物	150 - 200 bp	3 - 9 ng
	200 - 500 bp	9 - 30 ng
	500 - 1000 bp	15 - 60 ng
	1000 - 2000 bp	30 - 120 ng

DNA サンプル	N μ L
プライマー 3 μ M	3 μ L
D ₃ W	up to 21 μ L
Total	21 μ L

eurofins に解析の依頼をした。

4.1.8 CRISPR の切断効率の解析

ICE という CRISPR の切断効率を求めるウェブ上のツールを使用し解析した(Hsiau et al. 2018)。サンガーシーケンスによる解析データを基に

コントロール胚と CRISPR 注入胚の 2 つを入力し解析した。

目的遺伝子配列を切断後修復する際に非相同末端結合が起こる。
 これにより挿入や欠失といった Indel が起き、配列が変化する。
 ICE では、この変化を波形から計算し、Indel 率を推測している。

Cas12a protein	crRNA	Cas12a gRN (ng)	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
LBUltra	hesx1_LB	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
AsUltra	hesx1_UI_1	100	43.3	6.0	4	46	26	54	47				
LBUltra	otx2b_LB_1	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
LBUltra	otx2b_LB_2	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
AsUltra	otx2b_UI_1	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
AsUltra	otx2b_UI_2	100	25.5	9.5	4	13	18	58	13				
AsV3	otx2b_V3_OV_1	100	0.0	0.0	2	0	0						
AsV3	otx2b_V3_OV_2_T	100	85.0	11.0	2	96	74						
LBUltra	sox11b_LB	100	81.0	15.5	3	96	97	50					
AsUltra	sox11b_UI	100	72.7	6.9	3	59	81	78					
AsV3	sox11b_V3	100	66.1	4.2	8	63	61	59	61	47	79	81	78
LBUltra	sox19a_LB	100	87.3	3.3	3	92	89	81					
AsUltra	sox19a_UI	100	28.3	7.4	3	19	43	23					
AsV3	sox19a_V3	100	20.3	4.5	4	24	29	8	20				
AsV3	sox19a_V3_OV	100	82.0	3.2	3	76	83	87					
LBUltra	sox19b_LB	100	2.7	1.5	3	0	5	3					
AsUltra	sox19b_UI	100	86.8	8.9	4	96	95	96	60				
AsV3	sox19b_V3	100	86.3	1.9	4	84	90	89	82				
LB	sox2_LB	100	75.8	14.4	4	33	86	96	88				
AsUltra	sox2_UI	100	66.0	16.3	3	59	97	42					
AsV3	sox2_V3	100	96.3	0.3	4	96	96	97	96				
AsV3	sox2_V3_OV	100	96.7	0.3	3	96	97	97					
LBUltra	sox21a_LB	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
AsUltra	sox21a_UI	100	0.0	0.0	3	0	0	0					
AsV3	sox21a_V3	100	0.5	0.3	4	1	0	1	0				
LBUltra	sox21b_LB_1	100	40.5	11.1	4	70	45	26	21				
LBUltra	sox21b_LB_2	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				
AsUltra	sox21b_UI_1	100	32.3	1.5	3	32	35	30					
AsUltra	sox21b_UI_2	100	0.0	0.0	6	0	0	0	0	0	0		
AsV3	sox21b_V3_1	100	26.1	2.5	8	15	24	26	21	38	25	34	26
AsV3	sox21b_V3_2	100	0.0	0.0	4	0	0	0	0				

表 3 各 CRISPR-Cas12a RNP 複合体の解析結果

引用文献

Hsiao T., Maures T., Waite K., Yang J., Kelso R., Holden K., Stoner R. Inference of CRISPR edits from sanger trace data. 2018; bioRxiv doi:20 January 2018, preprint: not peer reviewed <https://doi.org/10.1101/251082>.

Liu, P., Luk, K., Shin, M., Idrizi, F., Kwok, S., Roscoe, B., Mintzer, E., Suresh, S., Morrison, K., Frazão, J.B., Bolukbasi, M.F., Ponniselvan, K., Luban, J., Zhu, L.J., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., Enhanced Cas12a editing in mammalian cells and zebrafish, *Nucleic Acids Research*, **47**, 8, 4169–4180 (2019).

<https://doi.org/10.1093/nar/gkz184>

Moreno-Mateos, M.A., Fernandez, J.P., Rouet, R. *et al.* CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nat Commun* **8**, 2024 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>

Pickar-Oliver, A., Gersbach, C.A. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 490–507 (2019).

<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>

Zhang, L., Zuris, J.A., Viswanathan, R. *et al.* AsCas12a ultra nuclease facilitates the rapid generation of therapeutic cell medicines. *Nat Commun* **12**, 3908 (2021).

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24017-8>

Zhang Y, Cheng Y, Fang H, Roberts N, Zhang L, Vakulskas CA, Niedz RP, Culver JN and Qi Y (2022) Highly Efficient Genome Editing in Plant Protoplasts by Ribonucleoprotein Delivery of CRISPR-Cas12a Nucleases. *Front. Genome Ed.* 4:780238. doi: 10.3389/fgeed.2022.780238