

令和 4 年度 修士論文

**CRISPR-Cas9 リボヌクレオタンパク質複合体の  
切断効率に影響を与える crRNA の配列特徴とそ  
れに基づいた crRNA の活性予測**

**Key sequence features of CRISPR RNA for  
CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes  
and feature-based crRNA activity prediction**

高知工科大学大学院 基盤工学専攻 生命科学コース

分子発生制御学研究室

青木 伽奈枝

指導教員  
蒲池 雄介 教授

令和 4 年 9 月 16 日

# 目次

<b>第 1 章 要旨</b> .....	<b>1</b>
<b>第 2 章 序論</b> .....	<b>3</b>
<b>第 3 章 結果</b> .....	<b>5</b>
CRISPR-Cas9 のゼブラフィッシュ胚における 27crRNA の切断効率の評価 .....	5
CRISPR-kp スコアと crRNA による CRISPR-Cas9 切断活性予測ツールの比較 .....	13
RNP 複合体の顕微注入量による CRISPR-Cas9 の切断活性 .....	16
CRISPR-Cas9 タンパク質の導入方法による切断活性の相違 .....	19
<b>第 4 章 考察</b> .....	<b>24</b>
dgRNA CRISPR-Cas9 RNP 複合体を用いた crRNA 切断活性測定の特長 .....	24
ゲノム編集する際にはある程度高効率の crRNA を選ぶ必要がある .....	25
gRNA 設計ツールの予測精度は基となったデータの環境が影響する .....	25
<b>第 5 章 結論</b> .....	<b>26</b>
<b>第 6 章 方法</b> .....	<b>27</b>
ゼブラフィッシュの飼育 .....	27
CRISPR-Cas9 RNP 複合体の調製 .....	27
CRISPR-Cas9 mRNA の調整 .....	27
CRISPR-Cas9 の 27 個の crRNA 設計 .....	27
Microinjection によるゼブラフィッシュ胚への CRISPR RNP Complex の注入 .....	28
Microinjection によるゼブラフィッシュ胚への dgRNA / Cas9 mRNA 混合液の注入 .....	28
ゼブラフィッシュ胚の DNA 抽出 .....	28
TIDE と ICE によるインデル頻度の評価 .....	28
CRISPR-kp の算出方法と他予測ツールのスコア算出 .....	30
<b>第 7 章 参考文献</b> .....	<b>31</b>
<b>第 8 章 謝辞</b> .....	<b>33</b>

## 第1章 要旨

CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) 複合体は、CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA) がハイブリダイズした guide RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質から構成されており、crRNA と相補的な配列に加えて隣接した PAM 配列を持つ DNA を切断する。そのため、crRNA を変更することで任意のゲノム領域を切断することができ、遺伝子のノックアウトやノックインに幅広く活用されている。しかし、CRISPR-Cas9 の切断効率は crRNA の配列に大きく影響を受けるため、その選択がゲノム編集の成功には重要である。従来は crRNA と tracrRNA を融合した single guide RNA (sgRNA) が広く利用されてきたが、in vitro 転写反応により合成される sgRNA は 5'末端が GG となるため標的配列の選択に制限をかけるだけでなく、CRISPR-Cas9 の切断効率を大幅に低下させることが報告された。そのため、そのような制限がない化学合成された gRNA がゲノム編集には有利であり、化学合成が容易になるようにターゲット特異的な crRNA と普遍的な tracrRNA から構成された dual guide RNA (dgRNA) の利用が広がっている。しかし、CRISPR-Cas9 の大部分の研究は sgRNA を用いて進められており、従来の研究で特定された切断効率に影響を与える sgRNA の特徴や、gRNA 設計ツールが dgRNA を構成する crRNA に対して適用できるかは不明である。また、現在の予測ツールの多くは培養細胞を用いたデータに基づいており、それ以外の条件では適用出来ない可能性がある。

そこで、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて 51 個の crRNA の切断活性を調べた。SpCas9 タンパク質あるいは特異性が向上したバリエーションである High Fidelity SpCas9 タンパク質と dgRNA から構成される RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、受精後 1 日胚のゲノム DNA を調製した。CRISPR-Cas9 の標的部位をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、サンガーシーケンスを行った。得られた波形データより Inference of CRISPR Editing (ICE) を用いて、CRISPR-Cas9 の DNA 切断反応によって誘発された挿入・欠失を分析し、切断効率を求めた。その切断効率と標的配列の関連を k-mer probability logo (kpLogo) プログラムを用いて各位置におけるヌクレオチドの切断効率に応じた出現頻度の統計的有意性を求めたところ、crRNA の切断効率に影響を与える配列特徴が見いだされた。

さらにこの研究では、51 個の crRNA の切断効率より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値を積算したスコア (CRISPR-kp) が、別の crRNA の活性を予測できるかを調べた。その結果、このスコア値は、新たに設計した 27 個の crRNA の切断効率とよく相関することがわかった。既存の予測ツールとの比較では、一般的によく用いられている予測ツールである Doench Rule Set2 や、ゼブラフィッシュ胚で sgRNA を用いたデータに基づく CRISPRscan のスコアよりも予測精度が高かった。CRISPR-kp スコアは、RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入することにより得られた配列特徴に基づいているため、RNA の安定性の影響の多くは排除されると考えられる。実際、gRNA と Cas9 mRNA を顕微注入し、in vivo で RNP 複合体を形成させた場合の切断活性は、CRISPR-kp スコアとは高い相関を示さなかった。

また、切断効率が高・中・低の区分より各 2 つの crRNA を選び、RNP 複合体の量

が切断効率に及ぼす影響を調べた。その結果、RNP複合体の量を変更することで、各 crRNA の相対的活性をさらに正確に評価できることがわかった。

本研究で得られた結果は、ゼブラフィッシュ胚における CRISPR-Cas9 を用いたより確実なゲノム編集技術の確立に応用されることが期待される。

## 第2章 序論

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)と CRISPR-Associated protein (Cas) は、配列特異的なヌクレアーゼとして働くことで、細菌や古細菌に侵入してきた核酸に対する適応免疫を担っている。その中でも、CRISPR-Cas9 は、その特異性と使いやすさから、様々なゲノム編集に利用されている。CRISPR-Cas9 は、Cas9 タンパク質に加え、CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA) の2つの RNA がハイブリダイズした guide RNA (gRNA)が CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) 複合体を構成している。CRISPR-Cas9 は NGG という PAM(Protospacer adjacent motif)配列を認識し二重鎖を開き、ターゲット配列と相同的な gRNA が結合することで二重鎖切断を行う。PAM に隣接した 20 ヌクレオチドの Protospacer 配列を認識する crRNA を変更することで、PAM があればどのようなゲノム配列でも切断する標的にすることが可能である。CRISPR-Cas9 gRNA の転写をしやすくするために、crRNA と tracrRNA を融合させた single guide RNA (sgRNA)と呼ばれる単一のキメラ RNA は作成された(1)。sgRNA は、培養細胞だけではなく、ゼブラフィッシュ(Danio rerio)をはじめとする様々なモデル生物のゲノム編集に広く利用されてきた(2)。その一方で、細菌や古細菌で機能している自然な形に近い crRNA と tracrRNA を化学合成し、アニーリングした dual guide RNA (dgRNA)が利用されるようになってきた。sgRNA の *in vitro* 合成では、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応が一般的に用いられており、5'末端に 2 塩基のグアニンが付加される。標的配列の選択に制限をかけるだけではなく、CRISPR-Cas9 の切断効率を大幅に低下させることが報告された(3)。同様に、sgRNA の *in vivo* 合成に使用される U6 プロモーターは、RNA ポリメラーゼ III (Pol III)による転写反応のために、最初の 5'末端ヌクレオチドにグアニンを必要とし、標的配列選択の柔軟性を低下させるだけではなく、切断効率を低下させる可能性がある。

生体内の DNA 修復を利用する遺伝子のノックアウト(KO)およびノックイン(KI)にはゲノム DNA の二本鎖切断が必要である。そのため、切断効率に影響を与える gRNA の選択が、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の成功には重要な要素である。そのため、高い切断効率を持つ gRNA を選択することが重要である。gRNA 設計をより容易にするために、CRISPR-Cas9 の切断効率に影響を与える gRNA 配列の特徴が解析され、これらの特徴に基づいて様々な gRNA 設計ツールが開発されてきた(6,7)。それらの研究を通じて、gRNA の切断効率を評価するために様々な実験方法が行われており、CRISPR-Cas9 の DNA 切断反応によって誘発した挿入、欠失(インデル)頻度をサンガーシーケンシングの波形データを基盤とした Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE) (4)、Inference of CRISPR Edits (ICE) (5)と呼ばれる手法を用いて、インデル頻度を直接解析することができる。しかし直接切断効率を解析する方法では実験系によっては手間がかかる。そこで、切断効率を予測するための様々な gRNA 設計ツールが開発された(6,7)。しかし、これらは培養細胞またはモデル生物における sgRNA を用いたデータに基づいているため、類似の実験条件の場合のみ適用可能である可能性がある(8)。一般的に培養細胞では、U6 プロモーターに

よる in vivo 転写が sgRNA 転写に用いられ、5'末端の 1 位がミスマッチしている sgRNA が使用されることが多い。このため、U6 プロモーター由来の sgRNA を用いた研究では、最初の数ヌクレオチドに関連する配列の特徴が不明瞭になっている可能性がある。

また、CRISPR-Cas9 に関する大きな問題点の 1 つとして、オフターゲット作用がある。この問題を解決するために、より高い特異性を持つ High Fidelity SpCas9 (HiFi Cas9) バリエントが開発されてきた。最近の研究により、これらの特異性が高い Cas9 バリエントは部分的に WT (野生型) Cas9 とは異なる塩基選好性を持つことが明らかになってきた。また、これらの Cas9 バリエントは、高い切断効率のために、20 塩基のプロトスペーサー配列を完全に一致させる必要があることが示されている(9)。したがって、5'末端がミスマッチしていない gRNA 配列を用いて、Cas9 バリエント間の gRNA 配列特徴の比較研究が重要である。

そこで、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて 51 個の crRNA の dgRNA RNP 複合体の切断活性を調べ、切断効率と標的配列の関連を k-mer probability logo (kpLogo) プログラムを用いて各位置におけるヌクレオチドの切断効率に応じた出現頻度の統計的有意性を求めたところ、crRNA の切断効率に影響を与える配列特徴が見いだされた(10)。さらに、51 個の crRNA の切断効率より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値を積算したスコアを CRISPR-kp とした。

本研究では、積算したスコア (CRISPR-kp) が、別の crRNA の活性を予測できるかを調べた。その結果、このスコア値は、新たに設計した 27 個 crRNA の切断効率とよく相関することがわかった。また、既存の予測ツールとの比較として、一般的によく用いられている予測ツールである Doench Rule Set2(6) や、ゼブラフィッシュ胚で sgRNA を用いたデータに基づく CRISPRscan(7) のスコアとも比較を行った。CRISPR-kp の方が Rule Set2 や CRISPRscan に比べ予測精度が高かった。

また、CRISPR-kp スコアは、RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入することにより得られた配列特徴に基づいているため、RNA の安定性の影響を受けにくいと考えられる。実際、gRNA と Cas9 mRNA を顕微注入し、in vivo で RNP 複合体を形成させた場合の切断活性は、CRISPR-kp スコアとは高い相関を示さなかった。

また、27crRNA の RNP 複合体の切断効率が CRISPR-kp スコアが 0 以上になるとほとんど切断効率が 90% になっていた。高効率のものは、顕微注入量を調節することでより差が出る可能性がある。さらに、低効率のものでも量を増やせばより高い切断活性を示す可能性がある。そこで、切断効率が高・中・低の区分より各 2 つの crRNA を選び、RNP 複合体の量が切断効率に及ぼす影響を調べた。その結果、RNP 複合体の量を変更することで、各 crRNA の相対的活性をさらに正確に評価できることがわかった。また、低効率の crRNA は RNP 複合体の量を増やしてもあまり効率が良くならなかったことから、ゲノム編集で用いる際はあらかじめ高効率のものを使用する必要であることが分かった。

本研究で得られた結果は、ゼブラフィッシュ胚における CRISPR-Cas9 の dgRNA システムを用いたより確実なゲノム編集技術の確立に応用されることが期待される。

### 第3章 結果

#### CRISPR-Cas9 のゼブラフィッシュ胚における 27crRNA の切断効率の評価

CRISPR-Cas9 の切断効率は crRNA の配列に大きく影響を受けるため、その選択がゲノム編集の成功には重要である(11)。従来は crRNA と tracrRNA を融合した single guide RNA (sgRNA) が広く利用されてきたが、in vitro 転写反応により合成される sgRNA は 5'末端にグアニンが付加されるため標的配列の選択に制限をかけるだけでなく、CRISPR-Cas9 の切断効率を大幅に低下させることが報告された。そのため、そのような制限がない化学合成された gRNA がゲノム編集には有利であり、化学合成が容易になるようにターゲット特異的な crRNA と普遍的な tracrRNA から構成された dual guide RNA (dgRNA) の利用が広がっている。しかし、CRISPR-Cas9 の大部分の研究は sgRNA を用いて進められており、従来の研究で特定された切断効率に影響を与える sgRNA の特徴や、gRNA 設計ツールが dgRNA を構成する crRNA に対して適用できるかは不明である。また、現在の予測ツールの多くは培養細胞を用いたデータに基づいており、それ以外の条件では適用出来ない可能性がある。

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて 51 個の crRNA の切断活性を調べ、位置特異的な配列特徴を見出した(10)。本研究では、51 個の crRNA の切断効率より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値を積算したスコア (CRISPR-kp) が、別の crRNA の活性を予測できるかを調べた。そのため新たに Integrated DNA Technologies (IDT) が提供する設計ツールである Custom Alt-R CRISPR-Cas9 guide RNA ([https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_SEQUENCE](https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE)) を用いて、11 個の遺伝子を標的とした 27 個の crRNA を設計した(表 1)。SpCas9 タンパク質あるいは特異性が向上したバリエーションである High Fidelity SpCas9 タンパク質と dgRNA から構成される RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、受精後 1 日胚のゲノム DNA を調製した。CRISPR-Cas9 の標的部位をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) で増幅し、サンガーシーケンスを行った。得られた波形データより Inference of CRISPR Editing (ICE) または Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) を用いて、CRISPR-Cas9 の DNA 切断反応によって誘発された挿入・欠失を分析し、切断効率を求めた(表 2, 図 1)。さらに、WT Cas9 RNP 複合体と HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率の平均値を比較すると、ほとんど同じであったが多少の差が見られた(図 1, 2A-B)。この結果は、切断効率はわずかに劣るものの HiFi Cas9 が WT Cas9 と同等の切断効率を示すという報告と一致している(17,18)。

表 1. 新たに設計した 27 個の CRISPR-Cas9 の crRNA 配列

crRNA	Sequence	Target Sequence	PAM Sequence
egr2b_KI_4	CGGUCCAGUUGAAAGUUCACGUUUUAGAGCUAUGCU	CGGTCCAGTTGAAAGTTCAC	TGG
egr2b_KI_6	CAAACCAGUGAACUUUCAACGUUUUAGAGCUAUGCU	CAAACCAGTGAAC TTTCAAC	TGG
pou2_KO_12	GUAGUUCACCCCGUGGGGAGUUUAGAGCUAUGCU	G TAGTTCACCCCGTGGGGA	CGG
pou2_KO_42	UGGAACCCUAAUUUCUGGCCGUUUUAGAGCUAUGCU	TGGAACCC TAATTTCTGGCC	TGG
pou2_KO_60	AAAGAAGGUCUGGGCUGUCGGUUUAGAGCUAUGCU	AAAGAAGGTCTGGGCTGTCG	CGG
pou2_KO_64	GAUGUUCGCCGCUGAGUGGGUUUAGAGCUAUGCU	GATGTT CGCCGCTGAGTGG	CGG
pou3f2a_KI_16	ACCGUCGUCGCCCAGAACGUUUUAGAGCUAUGCU	ACCGTCGGTCCGCCAGAAC	GGG
pou3f2a_KI_20	GACACCUGUUCGUGAGAGAGUUUAGAGCUAUGCU	GACACCTGTTCCGTGAGAGA	GGG
pou3f2a_KI_21	ACACCUGUUCGUGAGAGAGGUUUUAGAGCUAUGCU	ACACCTGTTCCGTGAGAGAG	GGG
pou3f2b_KI_9	UCAGACGCCAGUUCAGUGAGGUUUUAGAGCUAUGCU	TCAGACGCCAGTTCAGTGAG	GGG
pou3f2b_KI_15	GUUCAGACGCCAGUUCAGUGGUUUUAGAGCUAUGCU	G TTCAGACGCCAGTTCAGTG	AGG
rx3_Ki_4	UUCAGUCUAUAGGGAAGACGGUUUAGAGCUAUGCU	TTCAGTCTATAGGGAAGACG	TGG
rx3_Ki_6	AAGGAACACAUUCAGUCUAUGUUUAGAGCUAUGCU	AAGGAACACATTCAGTCTAT	AGG
sox1a_KI_2	CUGUUUCAAAU AUGCGUCAGGUUUUAGAGCUAUGCU	CTGTTTCAAATATGCGTCAG	TGG
sox1a_KI_5	UGUUUCAAAU AUGCGUCAGUUUUAGAGCUAUGCU	TGTTTCAAATATGCGTCAGT	GGG
sox1b_KI_7	UCAU AUGUGUCAGUGGAAGUUUAGAGCUAUGCU	TCATATGTGTGTCAGTGGAA	CGG
sox9a_KI_7	AUUCAGACGUGCUC AUGGUCGUUUUAGAGCUAUGCU	ATTCAGACGTGCTCATGGTC	TGG
sox11b_KO_4	GUACAUGCUCGCGCCAUGCUGUUUAGAGCUAUGCU	GTACATGCTCGGCCATGCT	CGG
sox11b_KO_8	CAAGUCGUCGGAGUCCUCGCGUUUAGAGCUAUGCU	CAAGTCGTCGGAGTCCCTCGC	TGG
sox11b_KO_10	AGCGGCGGGCUCUCACACCGUUUAGAGCUAUGCU	AGCGGCGGGCTCTCACACCG	CGG
sox11b_KO_21	GAAGUCCACCAGCAAGUCGUGUUUAGAGCUAUGCU	GAAGTCCACCAGCAAGTCTGT	CGG
sox11b_KO_22	UUCAGUUUGAACUAGCGGCGUUUAGAGCUAUGCU	TTCAGTTTGAACCTAGCGGC	GGG
sox11b_KO_29	AGGGUAAGCUGCGCUCUGCUGUUUAGAGCUAUGCU	AGGGTAAGCTGCGCTCTGCT	TGG
sox32_KI_4	CCUCAAUCCAGCACAGACUUGUUUAGAGCUAUGCU	CCTCAATCCAGCACAGACTT	TGG
zic2b_KI_2	UUUAACGAGUGGUACGUUUUAGUUUAGAGCUAUGCU	TTTAACGAGTGGTACGTTTA	AGG
zic2b_KI_7	UUAGGAUAUGCAGUUCUUGGGUUUAGAGCUAUGCU	T TAGGATATGCAGTTCTTGG	CGG
zic2b_KI_9	AACGUACCACUCGUUAAAAUGUUUAGAGCUAUGCU	AACGTACCACTCGTTAAAAT	TGG

表 2A. ICE で測定した WT Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率

crRNA	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample									
				1	2	3	4	5	6	7	8		
egr2b_KI_4	83.5	1.4	4	80.0	84.0	83.0	87.0						
egr2b_KI_6	75.2	4.4	6	77.0	74.0	84.0	89.0	67.0	60.0				
pou2_KO_12	94.0	0.7	4	94.0	95.0	92.0	95.0						
pou2_KO_42	15.0	2.0	4	18.0	17.0	9.0	16.0						
pou2_KO_60	94.3	0.6	4	93.0	94.0	94.0	96.0						
pou2_KO_64	89.0	1.4	4	85.0	91.0	91.0	89.0						
pou3f2a_KI_16	93.3	0.8	4	92.0	94.0	95.0	92.0						
pou3f2a_KI_20	89.3	3.5	4	97.0	80.0	91.0	89.0						
pou3f2a_KI_21	94.8	0.3	4	94.0	95.0	95.0	95.0						
pou3f2b_KI_9	88.8	2.7	4	91.0	83.0	95.0	86.0						
pou3f2b_KI_15	89.5	2.3	4	85.0	88.0	89.0	96.0						
rx3_KI_4	87.9	1.6	8	91.0	78.0	92.0	86.0	87.0	92.0	90.0	87.0		
rx3_KI_6	63.4	3.1	8	67.0	61.0	64.0	81.0	65.0	55.0	62.0	52.0		
sox1a_KI_2	89.8	2.5	6	94.0	82.0	96.0	90.0	94.0	83.0				
sox1a_KI_5	15.5	4.0	4	26.0	11.0	17.0	8.0						
sox1b_KI_7	92.8	1.3	4	89.0	94.0	94.0	94.0						
sox9a_KI_7	88.8	4.6	4	93.0	95.0	75.0	92.0						
sox11b_KO_4	90.5	2.5	4	93.0	94.0	92.0	83.0						
sox11b_KO_8	93.8	1.3	4	95.0	94.0	96.0	90.0						
sox11b_KO_10	94.8	0.3	4	94.0	95.0	95.0	95.0						
sox11b_KO_21	94.8	1.7	4	97.0	90.0	97.0	95.0						
sox11b_KO_22	61.0	3.3	5	65.0	72.0	57.0	54.0	57.0					
sox11b_KO_29	85.3	3.1	4	79.0	93.0	82.0	87.0						
sox32_KI_4	86.3	5.5	4	70.0	91.0	94.0	90.0						
zic2b_KI_2	92.3	1.2	8	94.0	96.0	89.0	90.0	92.0	96.0	87.0	94.0		
zic2b_KI_7	86.0	3.2	4	92.0	82.0	91.0	79.0						
zic2b_KI_9	1.8	1.3	8	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	11.0	1.0		

表 2B. ICE で測定した HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率

crRNA	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample									
				1	2	3	4	5	6	7	8		
egr2b_KI_4	89.5	1.0	4	90.0	92.0	89.0	87.0						
egr2b_KI_6	33.4	5.1	8	48.0	21.0	19.0	33.0	54.0	47.0	18.0	27.0		
pou2_KO_12	94.0	0.7	5	94.0	95.0	95.0	92.0	35.0					
pou2_KO_42	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0						
pou2_KO_60	92.5	0.9	4	94.0	93.0	90.0	93.0						
pou2_KO_64	92.3	1.5	4	91.0	89.0	96.0	93.0						
pou3f2a_KI_16	90.0	2.0	4	91.0	92.0	93.0	84.0						
pou3f2a_KI_20	94.5	0.5	4	94.0	94.0	96.0	94.0						
pou3f2a_KI_21	95.8	0.8	4	95.0	95.0	95.0	98.0						
pou3f2b_KI_9	81.0	7.3	4	71.0	93.0	94.0	66.0						
pou3f2b_KI_15	95.3	2.1	4	98.0	97.0	97.0	89.0						
rx3_KI_4	1.2	1.0	6	1.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0				
rx3_KI_6	37.6	3.4	7	34.0	41.0	28.0	29.0	46.0	52.0	33.0			
sox1a_KI_2	0.0	0.0	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
sox1a_KI_5	0.5	0.3	4	1.0	0.0	0.0	1.0						
sox1b_KI_7	82.0	4.8	4	87.0	84.0	89.0	68.0						
sox9a_KI_7	75.0	1.8	4	78.0	75.0	77.0	70.0						
sox11b_KO_4	92.8	1.3	4	94.0	94.0	94.0	89.0						
sox11b_KO_8	95.3	0.5	4	95.0	96.0	96.0	94.0						
sox11b_KO_10	94.5	0.3	4	94.0	95.0	94.0	95.0						
sox11b_KO_21	86.5	6.5	4	91.0	94.0	67.0	94.0						
sox11b_KO_22	6.5	1.7	6	13.0	8.0	6.0	8.0	2.0	2.0				
sox11b_KO_29	93.0	1.1	4	95.0	90.0	93.0	94.0						
sox32_KI_4	70.8	3.6	4	62.0	75.0	78.0	68.0						
zic2b_KI_2	4.0	0.9	5	3.0	2.0	3.0	7.0	5.0					
zic2b_KI_7	91.3	1.5	4	94.0	92.0	92.0	87.0						
zic2b_KI_9	0.0	0.0	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

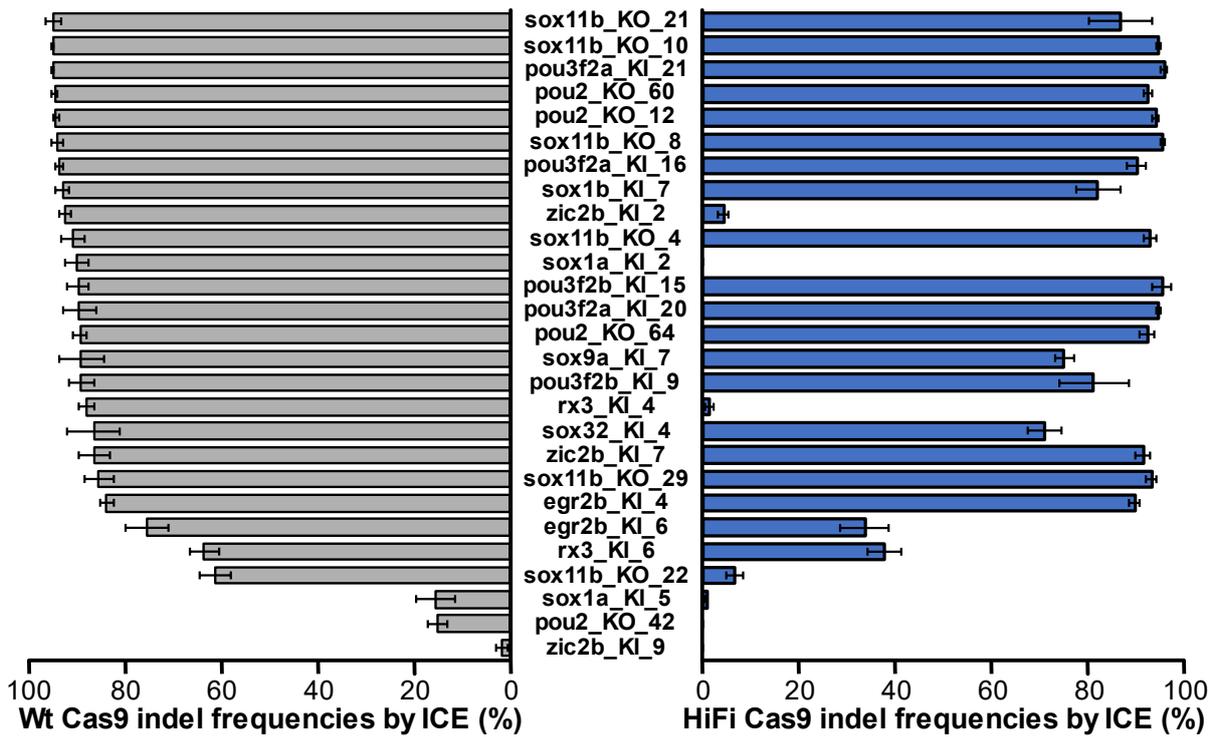
表 2C. TIDE で測定した WT Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率

crRNA	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample									
				1	2	3	4	5	6	7	8		
egr2b_KI_4	72.5	4.6	4	59.7	79.3	71.9	79.0						
egr2b_KI_6	74.5	3.5	6	76.5	72	81.7	85.9	67.4	63.5				
pou2_KO_12	85.8	2.7	4	78.4	85.4	89.1	90.1						
pou2_KO_42	18.5	3.4	4	27.8	17.8	11.5	16.7						
pou2_KO_60	86.8	1.4	4	82.8	87.3	88.5	88.5						
pou2_KO_64	42.1	7.0	4	39.5	46.5	24.6	57.9						
pou3f2a_KI_16	87.0	1.5	4	82.8	90.2	87.7	87.3						
pou3f2a_KI_20	85.0	4.0	4	96.7	79.8	83.7	79.7						
pou3f2a_KI_21	87.0	4.4	4	90.1	74.0	92.9	91.1						
pou3f2b_KI_9	79.8	3.9	4	76.0	73.5	91.2	78.4						
pou3f2b_KI_15	82.9	4.5	4	81.7	71.3	85.7	92.9						
rx3_KI_4	84.1	1.4	8	82.8	78	89.8	80.2	83.8	88.9	85.0	84.5		
rx3_KI_6	65.2	2.5	8	68.7	64.1	66.7	77.4	67	59	64.8	53.6		
sox1a_KI_2	86.3	1.6	6	89	81.2	90	87.2	89.1	81.3				
sox1a_KI_5	27.3	4.4	4	38.6	22.7	29.5	18.4						
sox1b_KI_7	87.8	2.5	4	81.9	92.2	85.7	91.5						
sox9a_KI_7	79.2	7.4	4	86.3	89.3	57.3	83.8						
sox11b_KO_4	14.7	2.1	4	17.1	12.8	9.8	19						
sox11b_KO_8	21.7	4.4	4	29.4	26.9	21	9.6						
sox11b_KO_10	66.6	9.8	4	44.7	74.8	89.3	57.5						
sox11b_KO_21	93.1	2.2	4	95.1	87.6	97.7	91.8						
sox11b_KO_22	62.3	2.0	5	64	68.8	61.7	56.7	60.5					
sox11b_KO_29	81.2	3.9	4	74	92	78.1	80.5						
sox32_KI_4	70.1	7.1	4	62.1	83.7	80.3	54.1						
zic2b_KI_2	79.6	1.8	8	83.6	83.9	77.7	82.7	76.2	83.7	69.2	80.1		
zic2b_KI_7	73.6	4.4	4	64.6	67.4	81.6	80.8						
zic2b_KI_9	9.6	2.6	8	5.3	5	5.3	4.8	10.9	8.8	26.8	10.2		

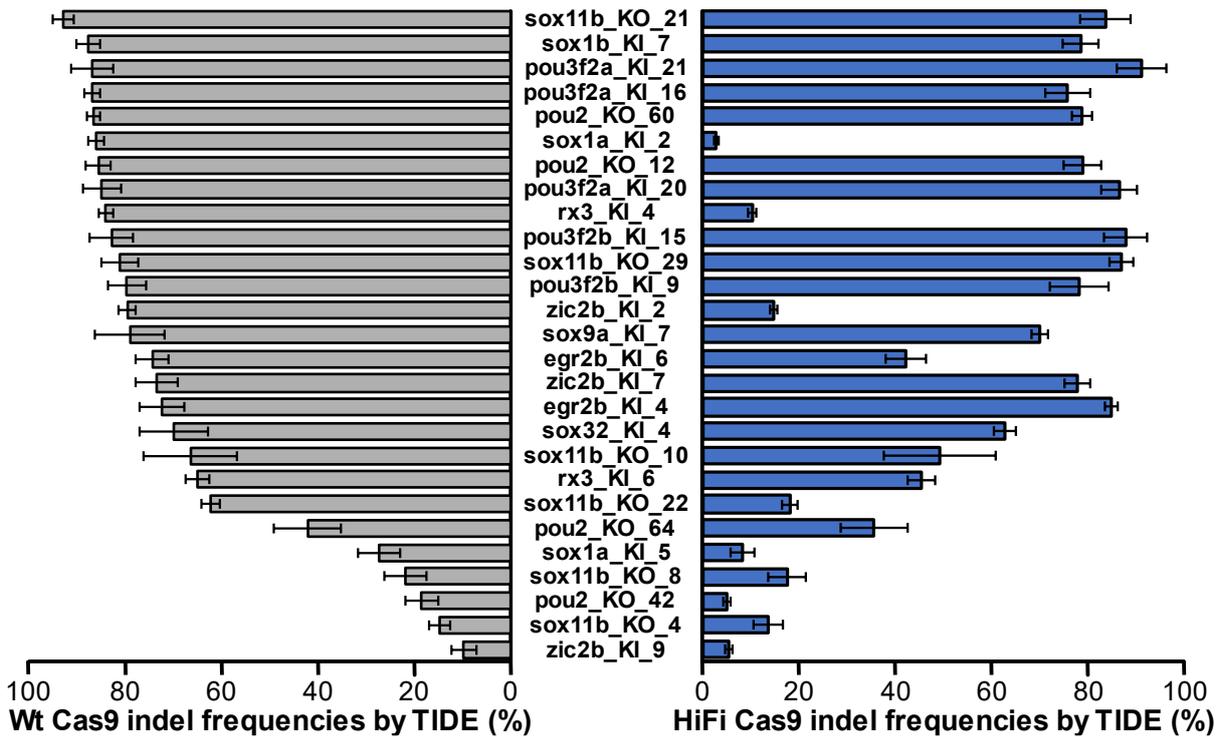
表 2D. TIDE で測定した HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率

crRNA	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample									
				1	2	3	4	5	6	7	8		
egr2b_KI_4	84.9	1.3	4	86.8	84.5	86.9	81.3						
egr2b_KI_6	42.1	4.2	8	51.5	33.1	28.8	40.7	58.9	55.4	28.6	39.7		
pou2_KO_12	78.9	3.9	5	89.5	72.2	74.0	80.0	47.5					
pou2_KO_42	4.9	0.7	4	4.6	4.7	6.9	3.5						
pou2_KO_60	78.8	2.1	4	74.1	82.9	76.4	81.6						
pou2_KO_64	35.5	7.0	4	31.1	25.5	29.4	56.1						
pou3f2a_KI_16	75.8	4.7	4	83.0	77.7	80.4	62.2						
pou3f2a_KI_20	86.6	3.8	4	75.4	89.8	91.7	89.5						
pou3f2a_KI_21	91.2	5.1	4	76.1	93.5	97.6	97.6						
pou3f2b_KI_9	78.2	6.1	4	70.9	87.2	90.0	64.8						
pou3f2b_KI_15	87.9	4.5	4	94.9	96.3	79.5	80.9						
rx3_KI_4	10.2	0.8	6	8.8	10.1	14	9.5	9.1	9.4				
rx3_KI_6	45.4	2.9	7	42.9	47.7	37.0	38.1	53	57.8	41.3			
sox1a_KI_2	2.7	0.5	8	0.1	0.8	3.1	3.6	3.5	3.3	3.9	2.9		
sox1a_KI_5	8.1	2.5	4	9.3	1	13.1	9.1						
sox1b_KI_7	78.6	3.7	4	84.2	79.8	82.6	67.8						
sox9a_KI_7	70.0	1.8	4	70.2	73.3	71.6	65.0						
sox11b_KO_4	13.6	3.0	4	21.6	13.5	6.9	12.2						
sox11b_KO_8	17.4	3.9	4	10.5	25.3	10.8	23.1						
sox11b_KO_10	49.3	11.6	4	16.5	52.1	57.4	71						
sox11b_KO_21	83.8	5.3	4	88.1	89.6	68	89.3						
sox11b_KO_22	18.0	1.7	6	22.4	19.5	20.4	20	13.0	12.6				
sox11b_KO_29	87.1	2.5	4	93.5	81.7	85.2	88						
sox32_KI_4	62.8	2.3	4	60	66.6	66.7	57.9						
zic2b_KI_2	14.7	0.8	5	12.7	14.7	13.8	14.9	17.4					
zic2b_KI_7	77.9	2.7	4	85.4	75.7	77.5	73.1						
zic2b_KI_9	5.2	0.8	8	3.9	3.5	3.7	2.2	6.3	8.7	7.1	6.5		

**A**

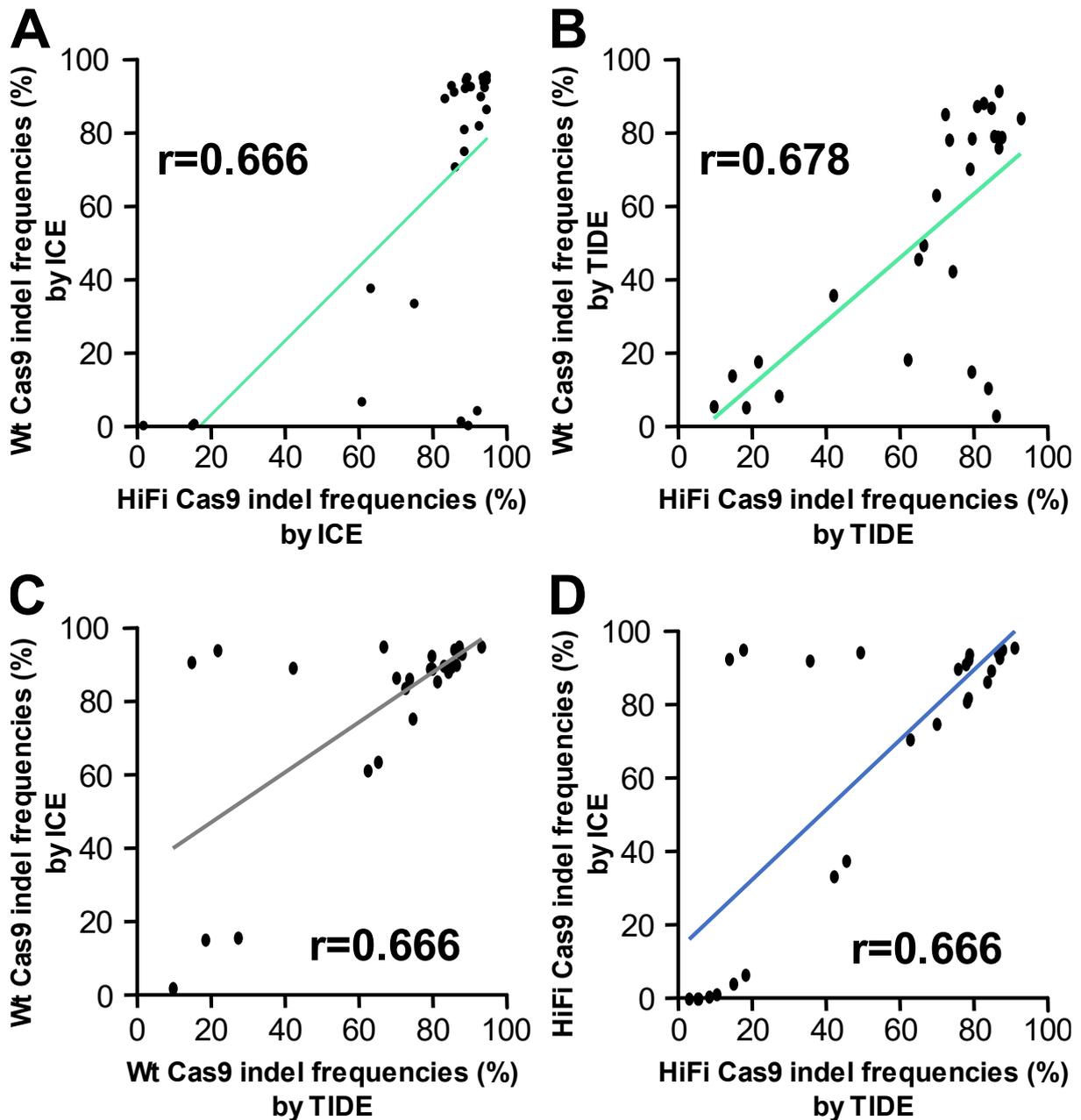


**B**



**図 1. WT Cas9 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率**

表 2 の WT 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA の切断効率の平均値を WT Cas9 RNP 複合体の平均値の降下順に並べ示している。エラーバーは標準偏差、左の棒グラフは WT Cas9 RNP 複合体の切断効率、右の棒グラフは HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率を表している。(A)表 2A 及び表 2B の ICE で測定した切断効率、(B) 表 2C 及び表 2D の TIDE で測定した切断効率を示している。



**図 2. WT Cas9 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA による切断効率の相関関係**  
ICE (A) または TIDE (B) で測定した WT Cas9 RNP 複合体と HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率の平均値の散布図。WT Cas9 (C) または HiFi Cas9 (D) の切断効率の ICE と TIDE で測定した平均値の散布図。線グラフは近似線を示しており、WT Cas9 RNP 複合体と HiFi Cas9 RNP 複合体それぞれで測定した 27 個の crRNA の切断効率より算出したピアソンの積率相関係数 ( $r$ ) を示している。

## CRISPR-kp スコアと crRNA による CRISPR-Cas9 切断活性予測ツールの比較

CRISPR-Cas9 の切断効率に影響を与えるヌクレオチド組成は sgRNA を用いた多くの研究で報告されている (6,7)。しかし、dgRNA CRISPR-Cas9 システムを用いた crRNA についての研究は行われておらず、sgRNA の配列特徴が crRNA の配列特徴としても適用できるかは不明である。そこで、51 個の切断効率を測定し、k-mer probability logo (kpLogo) (<http://kplogo.wi.mit.edu/>) (12) を用いて、crRNA の標的配列から位置特異的な特徴を検出し、ヌクレオチドロゴの大きさによって可視化した。kpLogo は、タンパク質や核酸のモチーフを可視化する probability logo (pLogo) (<http://plogo.uconn.edu/>) (13) を基にした確率ロゴにより、重み付け配列から配列特徴を可視化できる。入力配列は各位置の crRNA 標的配列と PAM 配列の統計的有意性を  $-\log_{10}(P)$  とし、ヌクレオチドロゴの大きさによって相対的にスケールされる。kpLogo 解析のための重み付き入力配列として、51 個の crRNA の標的配列と PAM 配列を合わせた配列と ICE で測定した WT Cas9 RNP 複合体または HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率を用いた (10)。その結果より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値 (表 11,12) を積算したスコアを CRISPR-kp とした。

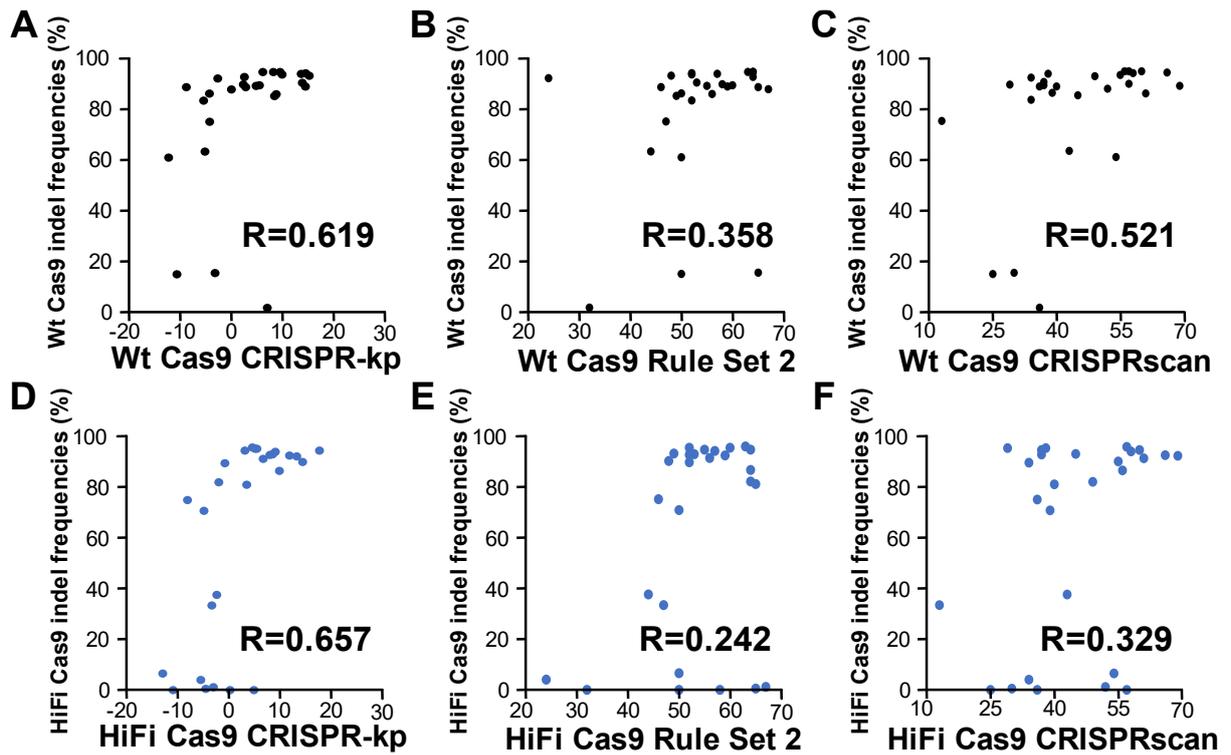
本研究では CRISPR-kp スコアと実測した切断効率との比較を行った (表 4, 図 3)。また、CRISPR-Cas9 の gRNA の設計の際よく用いられる Rule Set2 と、ゼブラフィッシュで CRISPR を用いる際によく用いられる CRISPRscan と比較を行った (表 3, 4, 図 3)。CRISPR-kp スコアは、実測した 27 個の crRNA の切断効率とよく相関しており、Rule Set2 や CRISPRscan よりも予測精度が高かった。また、Rule Set2 よりも同じゼブラフィッシュ胚をデータ基としている CRISPRscan の方がより実測した切断効率と相関していた。

表 3. gRNA 設計ツールの特徴

データ基	CRISPR-kp	Rule Set2	CRISPRscan
モデル生物	ゼブラ フィッシュ胚	培養細胞 ヒト・マウス ゲノム	ゼブラ フィッシュ胚
RNA合成 システム	dgRNA (化学合成)	sgRNA (U6 Promoter)	sgRNA (T7 Promoter)
5'末端 Gの付加	なし	1塩基	2塩基
Cas9 導入方法	RNP 複合体	Vector DNA	mRNA

表 4. gRNA 設計ツールで算出した crRNA の切断効率の予測値

crRNA	CRISPR-kp		IDT		Rule Set 2 (Doench 2016)	CRISPRscan
	WT Cas9	HiFi Cas9	On-target	Off-target		
egr2b_KI_4	-5.48	-0.69	76	91	52	34
egr2b_KI_6	-4.30	-3.28	53	77	47	13
pou2_KO_12	13.58	9.15	27	97	57	58
pou2_KO_42	-10.70	-10.82	45	67	50	25
pou2_KO_60	14.43	11.94	60	87	52	66
pou2_KO_64	14.41	13.34	35	91	59	69
pou3f2a_KI_16	15.13	14.49	38	95	48	55
pou3f2a_KI_20	4.73	3.20	49	88	55	37
pou3f2a_KI_21	6.08	4.65	42	92	63	57
pou3f2b_KI_9	2.75	3.55	32	50	65	40
pou3f2b_KI_15	5.41	5.53	21	70	60	29
rx3_Ki_4	-0.05	-2.97	47	83	67	52
rx3_Ki_6	-5.22	-2.29	84	68	44	43
sox1a_KI_2	2.24	0.30	39	81	58	57
sox1a_KI_5	-3.28	-4.47	53	75	65	30
sox1b_KI_7	2.46	-1.89	68	57	64	49
sox9a_KI_7	-8.87	-8.01	51	83	46	36
sox11b_KO_4	13.79	8.07	9	98	53	37
sox11b_KO_8	9.85	5.17	67	99	52	38
sox11b_KO_10	9.42	17.77	33	97	64	60
sox11b_KO_21	8.12	9.93	88	95	64	56
sox11b_KO_22	-12.32	-12.86	29	91	50	54
sox11b_KO_29	8.34	8.62	17	89	49	45
sox32_KI_4	-4.35	-4.82	54	84	50	39
zic2b_KI_2	-2.75	-5.44	51	83	24	34
zic2b_KI_7	8.70	6.77	34	83	56	61
zic2b_KI_9	6.93	4.96	60	83	32	36



**図 3. WT Cas9 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率の実測値と予測値との散布図**  
 WT Cas9(A-C)及び HiFi Cas9 (D-F) RNP 複合体を構成する crRNA の切断効率を ICE で測定した実測値と、crRNA の標的配列を基に 3 種類の gRNA 設計ツール CRISPR-kp (A,D)、Rule Set 2 (Doench/Fusi 2016) (B,E) または CRISPRscan (C, F) で得られたスコアを散布図によって比較した。R はスピアマンの順位相関係数を示す。

## RNP 複合体の顕微注入量による CRISPR-Cas9 の切断活性

27crRNA の RNP 複合体の切断効率が CRISPR-kp スコアが 0 以上になるとほとんど切断効率が 90% になっていた(図 3)。高効率のものは、顕微注入量を調節することでより差が出る可能性がある。また、低効率のものでも量を増やせばより高い切断活性を示す可能性がある。そこで、1.5 fmol の RNP 複合体顕微注入した際、切断効率が低効率、中効率、高効率の crRNA をそれぞれ 2 つずつ選び(表 5)、0.75、1.5、3、4.5 fmol の 4 種類の量で RNP 複合体の顕微注入量を変更し切断効率を測定した(表 6、図 4)。中活性グループの crRNA は RNP 量に依存して様々な切断活性を示したが、低活性グループの crRNA は切断効率がわずかに増加しただけだった。一方、低活性グループの crRNA では、4.5 fmol でも切断活性があまり増加しなかった。また、高活性のグループでは、切断効率が 90% 以上は顕微注入量を増やしてもほとんど変化しなかったが、0.75 fmol の場合では、切断活性に差が見られた。

表 5. 顕微注入量 1.5 fmol における、低、中、高活性 crRNA の RNP 複合体の切断効率と CRISPR-kp のスコア

crRNA	ICE		CRISPR-kp	
	WT Cas9 indels (%)	HiFi Cas9 indels (%)	WT Cas9 Score	HiFi Cas9 Score
sox2-KO_3	91.5	85.0	6.73	5.52
sox19a-KO_4	93.8	93.0	13.95	16.87
gsc_AA	73.6	27.3	5.56	0.63
gsc_AB	54.5	76.0	7.66	15.53
sox2-KO_19	0.0	0.0	-9.80	-10.51
sox19a-KO_50	11.5	0.0	-15.14	-13.78

表 6. ICE で測定した crRNA の RNP 複合体の顕微注入量による切断効率

Cas9	crRNA	RNP amount (fmol)	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample					
						1	2	3	4	5	6
WT	gsc_AA	0.75	1.5	1.0	6	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	6.0
		1.5	30.3	4.3	6	22.0	25.0	28.0	44.0	43.0	20.0
		3.0	69.6	10.0	5	84.0	84.0	57.0	36.0	87.0	
		4.5	73.8	6.1	5	88.0	78.0	53.0	82.0	68.0	
	gsc_AB	0.75	8.0	2.0	4	5.0	6.0	7.0	14.0		
		1.5	60.3	8.5	4	72.0	75.0	38.0	56.0		
		3.0	74.0	5.9	5	81.0	85.0	64.0	56.0	84.0	
		4.5	84.6	5.6	5	89.0	91.0	85.0	63.0	95.0	
	sox2-KO_3	0.75	85.0	4.5	5	78.0	90.0	93.0	93.0	71.0	
		1.5	92.0	3.1	5	97.0	95.0	80.0	93.0	95.0	
		3.0	93.0	1.2	4	91.0	96.0	94.0	91.0		
		4.5	92.3	1.1	4	93.0	90.0	95.0	91.0		
	sox2-KO_19	0.75	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.5	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		3.0	3.8	1.8	4	5.0	2.0	0.0	8.0		
		4.5	19.2	4.5	6	31.0	29.0	5.0	13.0	27.0	10.0
	sox19a-KO_4	0.75	20.2	9.9	5	45.0	42.0	0.0	0.0		14.0
		1.5	89.2	5.7	5	67.0	97.0	95.0	97.0		90.0
		3.0	96.5	0.3	4	97.0	97.0	96.0	96.0		
		4.5	93.0	1.5	4	95.0	96.0	91.0	90.0		
sox19a-KO_50	0.75	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0			
	1.5	0.0	0.0	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	3.0	5.4	2.6	5	7.0	6.0	0.0	0.0	14.0		
	4.5	4.0	2.7	6	3.0	4.0	0.0	0.0	17.0	0.0	
HiFi	gsc_AA	0.75	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.5	19.0	2.6	4	13.0	17.0	21.0	25.0		
		3.0	22.5	4.1	4	15.0	19.0	22.0	34.0		
		4.5	37.5	3.9	4	29.0	33.0	46.0	42.0		
	gsc_AB	0.75	3.3	1.6	6	4.0	8.0	0.0	0.0	8.0	0.0
		1.5	35.0	7.6	6	50.0	53.0	16.0	25.0	52.0	14.0
		3.0	57.0	9.3	6	84.0	67.0	41.0	38.0	80.0	32.0
		4.5	73.0	8.2	5	85.0	86.0	43.0	68.0	83.0	
	sox2-KO_3	0.75	27.0	9.9	6	4.0	7.0	63.0	40.0	8.0	40.0
		1.5	93.8	0.8	4	95.0	95.0	92.0	93.0		
		3.0	90.5	2.0	4	85.0	90.0	94.0	93.0		
		4.5	93.8	2.6	4	86.0	97.0	96.0	96.0		
	sox2-KO_19	0.75	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.5	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		3.0	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
		4.5	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0		
	sox19a-KO_4	0.75	8.3	3.5	6	15.0	4.0	4.0	2.0	23.0	2.0
		1.5	71.2	11.2	6	96.0	97.0	51.0	48.0	95.0	40.0
		3.0	85.7	5.1	6	97.0	96.0	75.0	80.0	97.0	69.0
		4.5	86.8	4.3	6	95.0	96.0	71.0	76.0	93.0	90.0
sox19a-KO_50	0.75	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0			
	1.5	0.0	0.0	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	3.0	0.5	0.5	6	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	
	4.5	6.7	2.1	6	1.0	4.0	12.0	14.0	3.0	6.0	

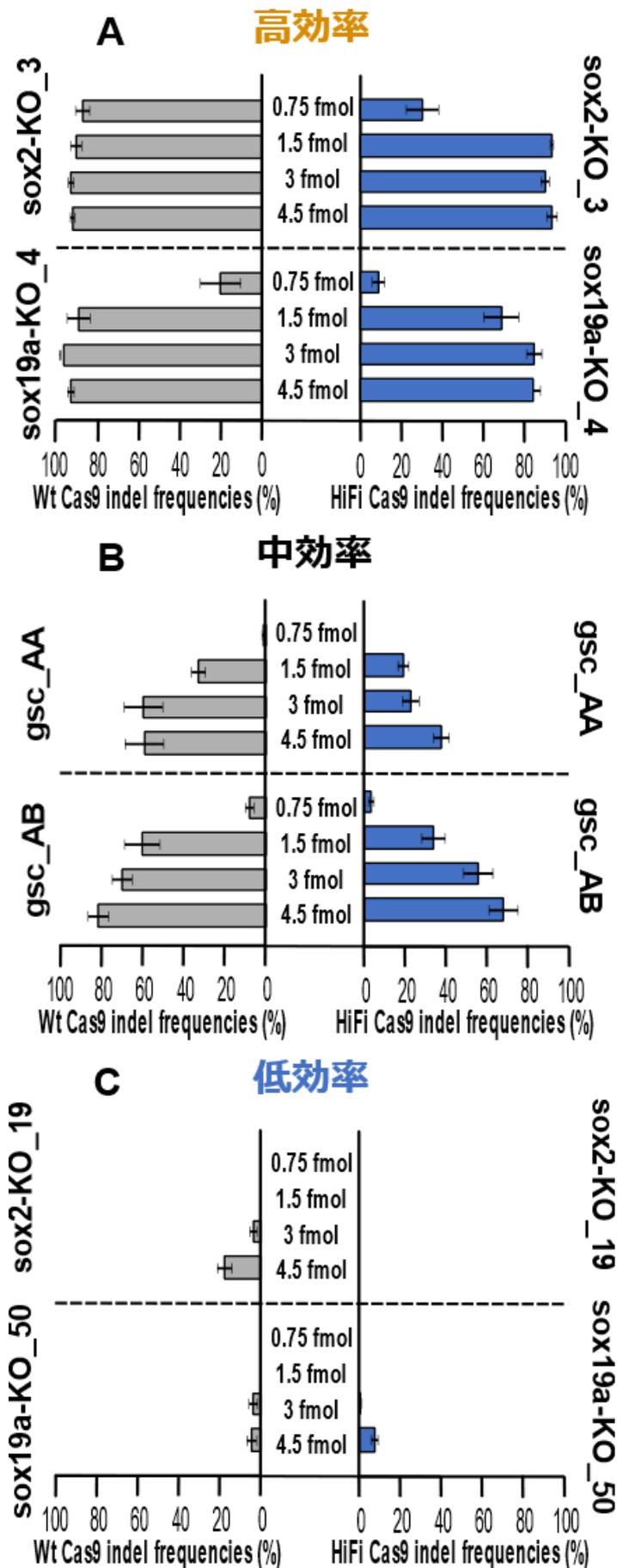


図4. 低、中、高活性 crRNA の RNP 複合体の顕微注入量による切断効率

表5の WT 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の顕微注入量ごとの高(A)、中(B)、低(C)活性の crRNA 切断効率の平均値を示している。エラーバーは標準偏差、左の棒グラフは WT Cas9 RNP 複合体の切断効率、右の棒グラフは HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率を示している。

## CRISPR-Cas9 タンパク質の導入方法による切断活性の相違

CRISPR-Cas9 の gRNA の切断効率は、RNA 安定性や Cas9 との相互作用に影響され、RNP 複合体形成効率に関連すると報告されている (7,14,15)。最近の研究 (16) では、今回の研究のように dgRNA と Cas9 タンパク質を *in vitro* で 1 : 1 の割合で混合するとほとんどが完全な RNP 複合体が形成されるが、Cas9 mRNA を用いた場合の *in vivo* RNP 複合体形成率は予測不可能であることが示されている。

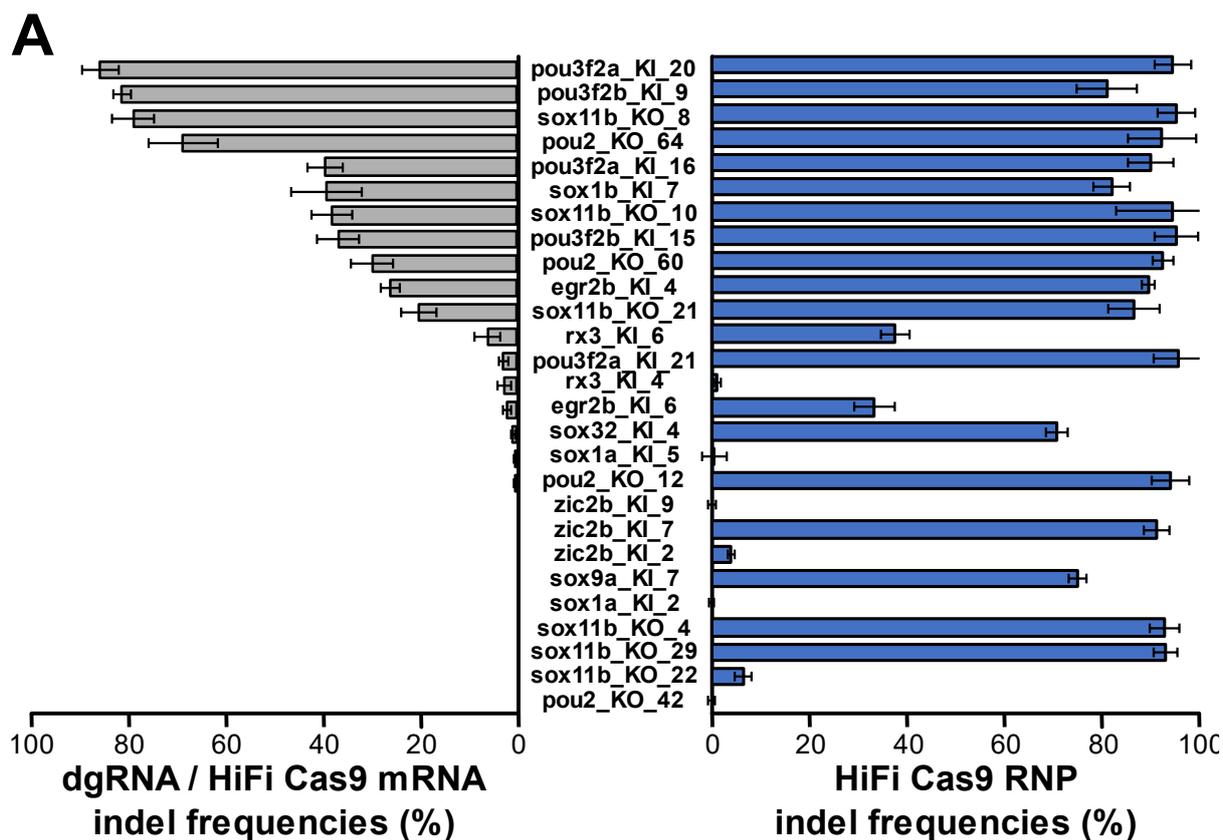
初めに、HiFi Cas9 mRNA、WT Cas9 mRNA (hWT:ヒトのコドン頻度、zWT:ゼブラフィッシュのコドン頻度) の 3 種類の Cas9 mRNA と dgRNA とのそれぞれ顕微注入量を変更し切断活性を測定した (表 7)。また、HiFi Cas9 mRNA (200 pg) を用いて、27 の crRNA (100 pg : dgRNA) の切断効率を調べた。RNP による場合と比較して、大部分の crRNA が低い切断効率を示した (表 8, 図 5A)。この結果から、RNP 複合体顕微注入下では高い活性を示す crRNA のいくつかは、dgRNA/Cas9 mRNA 顕微注入下では切断活性が極端に低下するか、全くないことが示され、RNP と mRNA の切断活性とはあまりの相関関係が見られなかった (ピアソン相関係数、 $r = 0.505$ ) (図 5B)。これに伴い、CRISPR-kp スコアとの相関も低下し (スピアマン相関係数、 $R = 0.407$ ) (図 5C)、Rule Set2 スコアとの相関とほぼ同様であった (スピアマン相関係数、 $R = 0.408$ ) (図 5D)。また、CRISPRscan においてはあまりの相関関係が見られなかった (スピアマン相関係数、 $R = 0.183$ ) (図 5E)。この結果から、CRISPR-Cas9 を *in vivo* で RNP 複合体を形成すると、RNA の安定性と RNP 複合体形成効率に依存する配列特徴によって、gRNA の効率が大きく左右される可能性がある。

表 7. ICE で測定した crRNA の RNP 複合体の顕微注入量による切断効率

Cas9	crRNA	Cas9 mRNA (ng)	gRNA (ng)	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample			
							1	2	3	4
HiFi	gsc_AB	225	113	18.0	0.0	1	18.0			
		300	150	47.0	0.0	1	47.0			
		450	225	50.0	0.0	1	50.0			
hWT		225	113	13.0	1.2	4	10.0	12.0	15.0	15.0
		300	150	28.0	0.0	1	28.0			
		450	225	35.0	9.0	2	26.0	44.0		
zWT		225	113	0.3	0.3	4	1.0	0.0	0.0	0.0
		300	150	1.5	0.5	4	0.0	2.0	2.0	2.0
		450	225	4.0	0.7	4	4.0	5.0	2.0	5.0
HiFi	sox19a-KO_4	225	113	96.5	0.3	4	97.0	97.0	96.0	96.0
		300	150	95.8	0.9	4	93.0	97.0	97.0	96.0
		450	225	96.8	0.3	4	97.0	97.0	97.0	96.0
hWT		225	113	96.5	0.3	4	96.0	97.0	97.0	96.0
		300	150	97.0	0.0	4	97.0	97.0	97.0	97.0
		450	225	96.3	0.3	3	96.0	96.0	97.0	
zWT		225	113	23.3	2.0	3	23.0	20.0	27.0	
		300	150	66.5	2.2	4	65.0	71.0	69.0	61.0
		450	225	76.5	4.4	4	89.0	71.0	70.0	76.0

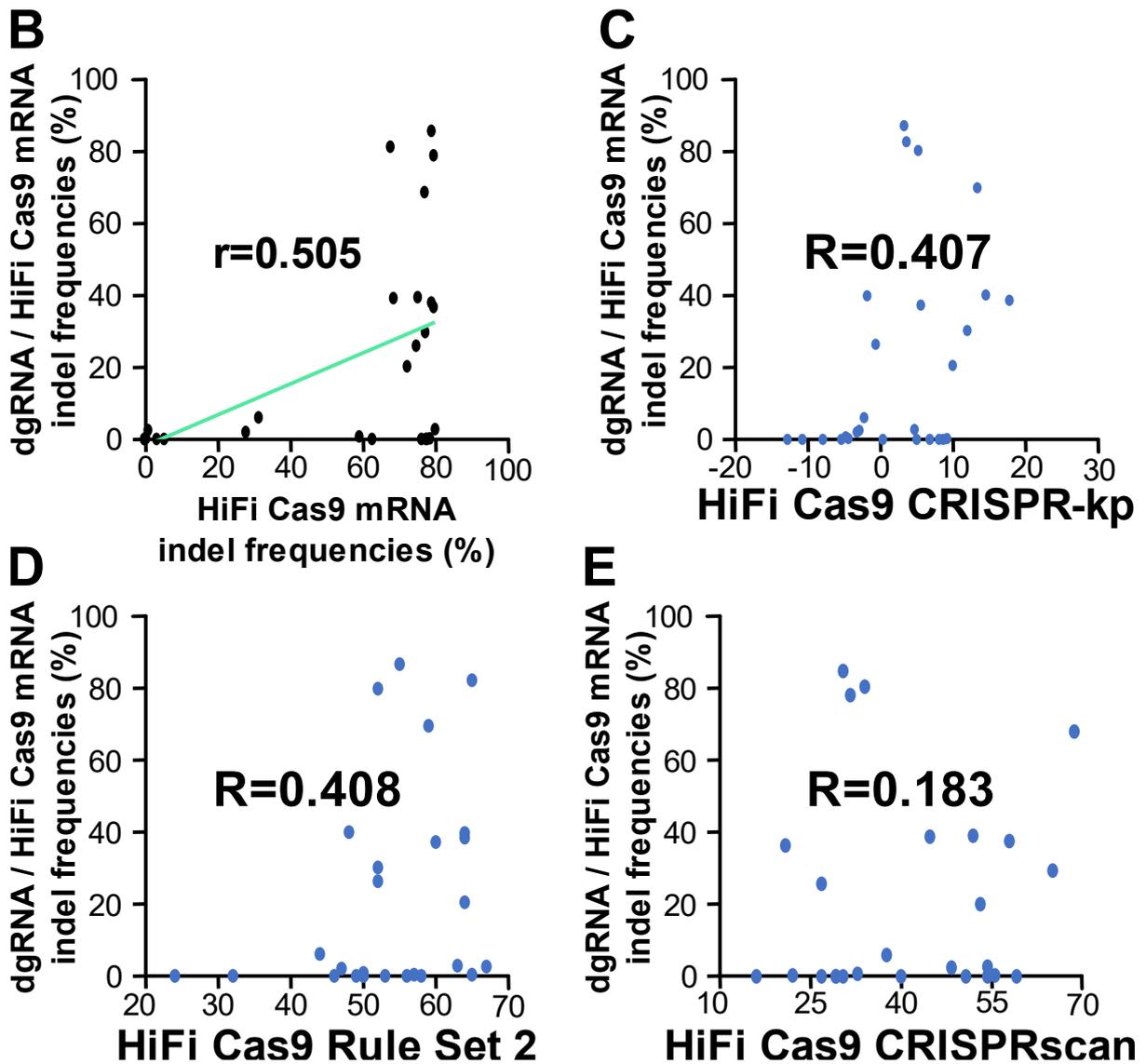
表 8. ICE で測定した dgRNA / HiFi Cas9 mRNA による切断効率

crRNA	Mean of indels (%)	Standard error	Sample size (n)	Sample			
				1	2	3	4
egr2b_KI_4	26.0	1.9	4	26.0	21.0	27.0	30.0
egr2b_KI_6	2.0	0.7	4	4.0	1.0	1.0	2.0
pou2_KO_12	0.3	0.3	4	1.0	0.0	0.0	0.0
pou2_KO_42	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
pou2_KO_60	29.8	4.4	4	25.0	41.0	32.0	21.0
pou2_KO_64	68.8	7.2	4	74.0	62.0	53.0	86.0
pou3f2a_KI_16	39.5	3.6	4	35.0	49.0	33.0	41.0
pou3f2a_KI_20	85.8	3.9	4	85.0	87.0	76.0	95.0
pou3f2a_KI_21	2.8	0.9	4	4.0	4.0	0.0	3.0
pou3f2b_KI_9	81.3	1.9	3		85.0	80.0	79.0
pou3f2b_KI_15	36.8	4.3	4	31.0	29.0	48.0	39.0
rx3_KI_4	2.5	1.4	4	5.0	5.0	0.0	0.0
rx3_KI_6	6.0	2.7	4	13.0	6.0	5.0	0.0
sox1a_KI_2	0.0	0.0	3	0.0	0.0	0.0	
sox1a_KI_5	0.3	0.3	4	1.0	0.0	0.0	0.0
sox1b_KI_7	39.3	7.3	4	51.0	36.0	20.0	50.0
sox9a_KI_7	0.0	0.0	3	0.0	0.0	0.0	
sox11b_KO_4	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
sox11b_KO_8	79.0	4.4	4	88.0	72.0	85.0	71.0
sox11b_KO_10	38.0	4.1	4	43.0	39.0	26.0	44.0
sox11b_KO_21	20.3	3.6	4	26.0	26.0	18.0	11.0
sox11b_KO_22	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
sox11b_KO_29	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
sox32_KI_4	0.8	0.5	4	0.0	2.0	0.0	1.0
zic2b_KI_2	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
zic2b_KI_7	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0
zic2b_KI_9	0.0	0.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0



**図 5A. dgRNA / HiFi Cas9 mRNA 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率**

表 8 の WT 及び HiFi Cas9 RNP 複合体の crRNA の切断効率の平均値を dgRNA / HiFi Cas9 mRNA の平均値の降下順に並べ示している。エラーバーは標準偏差、左の棒グラフは dgRNA / HiFi Cas9 mRNA の切断効率、右の棒グラフは HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率を表している。



**図 5B-E. dgRNA/HiFi Cas9 mRNA の切断効率と RNP 複合体及び予測値の相関関係**  
 (B)ICE で測定した dgRNA / HiFi Cas9 mRNA と HiFi Cas9 RNP 複合体の切断効率の平均値の散布図。dgRNA / HiFi Cas9 mRNA と HiFi Cas9 RNP 複合体それぞれで測定した 27 個の crRNA の切断効率より算出したピアソンの積率相関係数 ( $r$ ) を示している。dgRNA / HiFi Cas9 mRNA (C-E) の切断効率を ICE で測定した実測値と、crRNA の標的配列を基に 3 種類の gRNA 設計ツール CRISPR-kp (C)、Rule Set 2 (Doench/Fusi 2016) (D)または CRISPRscan (E) で得られたスコアを散布図によって比較した。 $R$  はスピアマンの順位相関係数を示す

## 第4章 考察

### dgRNA CRISPR-Cas9 RNP 複合体を用いた crRNA 切断活性測定の特長

crRNA と tracrRNA を融合させた single guide RNA (sgRNA) と呼ばれる単一のキメラ RNA は、培養細胞だけではなく、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) をはじめとする様々なモデル生物のゲノム編集に広く利用されてきた (2)。しかし、sgRNA の *in vitro* 合成では、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応が一般的に用いられており、5' 末端に 2 塩基のグアニンが付加される。標的配列の選択に制限をかけるだけでなく、CRISPR-Cas9 の切断効率を大幅に低下させることが報告された (3)。同様に、sgRNA の *in vivo* 合成に使用される U6 プロモーターは、RNA ポリメラーゼ III (Pol III) による転写反応のために、最初の 5' 末端ヌクレオチドにグアニンを必要とし、標的配列選択の柔軟性を低下させるだけでなく、切断効率を低下させる可能性があった。そのため、そのような制限がない化学合成された gRNA がゲノム編集には有利であり、化学合成が容易になるようにターゲット特異的な crRNA と普遍的な tracrRNA から構成された dual guide RNA (dgRNA) の利用が広がっている。しかし、CRISPR-Cas9 の大部分の研究は sgRNA を用いて進められており、従来の研究で特定された切断効率に影響を与える sgRNA の特徴や、gRNA 設計ツールが dgRNA を構成する crRNA に対して適用できるかは不明である。また、現在の予測ツールの多くは培養細胞を用いたデータに基づいており、それ以外の条件では適用出来ない可能性がある (8)。

本研究で算出された CRISPR-kp スコアは、dgRNA から構成される CRISPR-Cas9 RNP 複合体の切断効率に影響を与える crRNA の配列特徴を、WT Cas9 及び HiFi Cas9 で特定したデータを基にしている。そのため、RNA の安定性の影響を受けにくいと考えられる。実際、CRISPR-kp スコアは、実測した 27 個の crRNA の切断効率とよく相関しており、sgRNA を用いたデータを基にした Rule Set2 や CRISPRscan よりも予測精度が高かった (図 3)。また、gRNA と Cas9 mRNA を顕微注入し、*in vivo* で RNP 複合体を形成させた場合の切断活性は、CRISPR-kp スコアとは高い相関を示さなかった (スピアマン相関係数、 $R = 0.407$ ) (図 5C)。これより、CRISPR-kp スコアは gRNA の安定性などの影響を受けにくい実験条件では予測がしやすい可能性がある。また、RNP による場合と比較して、Cas9 mRNA を用いた場合は大部分の crRNA が低い切断効率を示した (表 8, 図 5A)。この結果から、RNP 複合体顕微注入下では高い活性を示す crRNA のいくつかは、dgRNA/Cas9 mRNA 顕微注入下では切断活性が極端に低下するか、全くないことが示され、RNP と mRNA を用いた場合の切断活性はあまり相関関係が見られなかった (ピアソン相関係数、 $r = 0.505$ ) (図 5B)。この結果から、CRISPR-Cas9 を *in vivo* で RNP 複合体を形成させると、RNA の安定性と RNP 複合体形成効率に依存する配列特徴によって、gRNA の効率が大きく左右される可能性がある。そのため、sgRNA と比べ影響の受けにくい化学合成した dgRNA を用いることで、gRNA の安定性による切断効率の低下を防ぐことができると考えられる。

## ゲノム編集する際はある程度高効率の crRNA を選ぶ必要がある

切断効率が高・中・低の区分より各2つの crRNA を選び、RNP 複合体の量 0.75、1.5、3、4.5 fmol の4種類の量で RNP 複合体の顕微注入量を変更し切断効率を測定した際、中活性グループの crRNA は RNP 量に依存して様々な切断活性を示したが、低活性グループの crRNA は切断効率がわずかに増加しただけだった(表 6, 図 4)。低効率の crRNA は RNP 複合体の量を 4.5 fmol まで増やしてもあまり効率が良くならなかったことから、ゲノム編集で用いる際はあらかじめ高効率のものを使用する必要がある。また、CRISPR-Cas9 はオフターゲット作用があるため、量を増やせば、より高い特異性を持つ HiFi Cas9 でもオフターゲット効果も上げてしまう可能性がある。

## gRNA 設計ツールの予測精度は基となったデータの影響を受ける

本研究で検証した crRNA の切断効率を用いて、gRNA 設計ツールの予測精度を比較したところ、各ツールで予測値にかなりの差があることがわかった。先行研究では、予測モデルを構築したデータセットに含まれる sgRNA 発現系が in vivo では U6 プロモーター、または in vitro では T7 プロモーターであることが予測精度に影響することが示されている(8)。さらに、我々は、位置特異的なモノヌクレオチドの特徴の類似性が高いほど、より予測精度が高いという一般的なことがわかった。これら結果より、gRNA 切断効率を含むデータセットの全体的な品質が、gRNA 設計ツールの予測精度に影響する最も重要な要素であることが示唆される。

## 第5章 結論

dgRNA から構成される CRISPR-Cas9 の 51 個の crRNA の切断効率より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値を積算したスコア (CRISPR-kp) は、新たに設計した 27 個の crRNA の切断効率とよく相関することがわかった。既存の予測ツールとの比較では、一般的によく用いられている予測ツールである Doench Rule Set2 や、ゼブラフィッシュ胚で sgRNA を用いたデータに基づく CRISPRscan のスコアよりも予測精度が高かった。このことから、CRISPR-Cas9 の gRNA 切断活性予測ツールを用いる際は、実験で用いる環境と同じ環境から得られたデータを基にしたツールを用いる必要がある。

また、切断効率が高・中・低の区分より各 2 つの crRNA を選び、RNP 複合体の量が切断効率に及ぼす影響を調べた。その結果、RNP 複合体の量を変更することで、各 crRNA の相対的活性をさらに正確に評価できることがわかった。また、低効率の crRNA は RNP 複合体の量を増やしてもあまり効率が良くならなかったことから、ゲノム編集で用いる際はあらかじめ高効率のものを使用する必要があることが分かった。

さらに、CRISPR-kp スコアは RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入することにより得られた配列特徴に基づいているため、RNA の安定性の影響の多くは排除されていると考えられ、実際、gRNA と Cas9 mRNA を顕微注入し、in vivo で RNP 複合体を形成させた場合の切断活性は、CRISPR-kp スコアとは高い相関を示さなかった。

本研究で得られた結果は、ゼブラフィッシュ胚における CRISPR-Cas9 の dgRNA システムを用いたより確実なゲノム編集技術の確立に応用されることが期待される。

## 第 6 章 方法

### ゼブラフィッシュの飼育

ゼブラフィッシュは、明期を 14 時間 (9:00 - 23:00)、暗期を 10 時間 (23:00 - 9:00) の明暗サイクル下で飼育した。ゼブラフィッシュの実験は、文部科学省の研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に基づき、高知工科大学動物実験委員会の承認を受けたプロトコルを用いて実施した。また、高知工科大学の「高知工科大学魚類実験取扱指針」を遵守するとともに、実験動物の取り扱いの基本的考え方である三原則 (苦痛の軽減、代替法の活用、使用数の削減) を踏まえた適切な措置下で実施した。

### CRISPR-Cas9 RNP 複合体の調製

crRNA (Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA) (表 1)、tracrRNA (Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA-ATTO 550)、および Cas9 タンパク質 (Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 および Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3) は IDT から購入した。CRISPR-Cas9 RNP 複合体は、IDT のプロトコルにしたがって調製した (Essner J. (2016) Zebrafish embryo microinjection: Ribonucleoprotein delivery using the Alt-R CRISPR-Cas9 System.)。

まず、100  $\mu\text{M}$  crRNA と 100  $\mu\text{M}$  tracrRNA を Nuclease-Free Duplex Buffer (IDT) 中で混合し、3.0  $\mu\text{M}$  gRNA 溶液を調製した。この溶液を 95°C で 5 分間加熱し、室温まで冷却した。3.0  $\mu\text{M}$  gRNA 溶液を Cas9 working buffer (20 mM HEPES; 150 mM KCl, pH 7.5) で希釈した同量の 3.0  $\mu\text{M}$  Cas9 溶液と混合し、37°C で 10 分間インキュベートして、1.5  $\mu\text{M}$  RNP 複合体を調製した。その後、室温に戻し、4°C で保存した。

### CRISPR-Cas9 mRNA の調整

ヒトのコドン頻度に合わせた WT Cas9、ゼブラフィッシュのコドン頻度に合わせた WT Cas9、HiFi Cas9 をそれぞれコードしている環状プラスミド DNA を制限酵素処理により直鎖 DNA にし、精製後 AmpliCap™ SP6 High Yield Message Maker Kit (CELLSCRIPT) を使用して直鎖 DNA を鋳型として mRNA を合成し、DNase で鋳型 DNA を分解した後、RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research) を使用して mRNA を精製した。

### CRISPR-Cas9 の 27 個の crisprRNA 設計

実験に使用する TL 系統のゼブラフィッシュ (Danio Rerio) の CRISPR の切断部位と gRNA 結合部位中心で決定された配列をもとに Integrated DNA Technologies 社の CRISPR-Cas9 Design custom gRNA ([https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_CUSTOM](https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM)) を用い設計を行っ

た。コード領域 (KO)、あるいは終止コドンまたは開始コドン(KI)に近接した配列で、ゲノム配列の多様性がない場所に gRNA が結合し、できるだけ CRISPR-kp スコアがばらつくように 27 個の crRNA を選出した。

## Microinjection によるゼブラフィッシュ胚への CRISPR RNP Complex の注入

基本的には、Tüpfel long fin (TL) 系ゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に、1.5  $\mu$ M RNP 複合体 (1.5 fmol RNP 複合体) を 1.0 nL の卵黄嚢に顕微注入した。0.75、1.5、3、4.5 fmol の 4 種類の量で RNP 複合体の顕微注入量を変更した際は、1.5  $\mu$ M RNP 複合体 (1.5 fmol RNP 複合体) の顕微注入量をそれぞれ 0.5 nL、1.0 nL、2 nL、3 nL と変更しゼブラフィッシュ胚の卵黄嚢に顕微注入した。顕微注入した胚を 28°C で 24 hpf まで飼育した。

## Microinjection によるゼブラフィッシュ胚への dgRNA / Cas9 mRNA 混合液の注入

Tüpfel long fin (TL) 系ゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に、mRNA 混合液 (75ng/ $\mu$ L dgRNA, 150 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA) の顕微注入量をそれぞれ 1.5nL、2nL、3nL と変更しゼブラフィッシュ胚の卵黄嚢に顕微注入した(表 7)。また、HiFi Cas9 mRNA と 27crRNA の際には mRNA 混合液 (50 ng/ $\mu$ L : 1.5 fmol dgRNA, 100 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA) を 2 nL ゼブラフィッシュ胚の卵黄嚢に顕微注入した(表 7)。顕微注入した胚を 28°C で 24 hpf まで飼育した。

## ゼブラフィッシュ胚の DNA 抽出

24 hpf のゼブラフィッシュ胚から 5 embryo 選別し、20  $\mu$ L/embryo の Genomic DNA extraction buffer (low EDTA) + Proteinase K (10 mM Tris pH8, 0.1 mM EDTA pH8, 0.2% (v/v) Triton-X, 200 mM NaCl, 0.2 mg/mL Proteinase K) を加え 55°C で 1 時間加熱し胚を溶かした後、95°C で 10 分間加熱し Proteinase K を失活させた。その後、-20°C で保存した。

## TIDE と ICE によるインデル頻度の評価

CRISPR の切断部位と gRNA 結合部位を中心に約 600 bp を増幅するように primer を設計した(表 9)。PCR は Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) を用いて、1x ThermoPol Reaction Buffer、200  $\mu$ M dNTPs、0.5  $\mu$ M forward および reverse primers、0.15 embryo equivalent of genome DNA、0.75 units の Taq DNA Polymerase と、1x red sucrose solution (10% sucrose, 0.17 mM cresol red) を含む反応液 30  $\mu$ L 中で行った。PCR 条件は、95°C で 30 秒間の初期熱変性、続いて 95°C で 15 秒間の熱変性、60°C または 65°C で 30 秒間のアニーリング、68°C で 45 秒間の伸長反応を 1 サイクルとし、30 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 5 分間の伸長反応を行った。アガロース

ゲル電気泳動により PCR 産物の増幅を確認した後、KAPA Pure Beads (Kapa Biosystems, Inc.) または NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select (TaKaRa Bio)を用いて PCR 産物を精製した。精製された PCR 産物を、表 10 に記載されたプライマーを用いてサンガーシーケンスをした。CRISPR-Cas9 を注入した胚および注入していない胚から調製したゲノム DNA から得られたトレースデータを使用して、TIDE (version 3.2.0) (<https://tide.nki.nl>) (デフォルトに設定 : Indel size range を 10 に設定)および ICE (v2) (<https://ice.synthego.com>)でインデル頻度を測定した。

**表 9. 切断部位増幅に用いた Primer**

Target Region	Forward primer			Reverse primer		
		Sequence (5' to 3')	Length (nt)		Sequence (5' to 3')	Length (nt)
egr2b_stop	F	ACAAACCCCTCCAGTGTCCGAT	22	R	AGACACAATTCTCCACGTGCT	22
pou2_exon1-downstream	F2	CAAGTCTGATTTTAAACAAGGCCA	25	R2	CAGAGTGATGCGCTTGTGTTAAG	24
pou2_exon1-upstream	F	GGAAGAGTTGGAGGTGGTAATTA	24	R	GGGAGCTTGGGAAATATTAGCTTG	24
pou3f2a_stop	F	AAGAACATGTGCAAACCTAAGCC	23	R	AGACACTGCACCGGATTAATATCA	24
pou3f2b_stop	F	CAGACCACAATATGCAGGTTTGAG	24	R	TGCAAAAAGCAAATGCAGTGAATG	23
rx3_stop	F2	TGCAATCTCTGCCAGCTTCAT	22	R2	GCCTTTTGAATGCCAATGCGAT	23
sox1a_stop	F	TCCGGCTACGGTGGGATATCAT	22	R	AGTGTGTCGCATATTTCTTGGCG	23
sox1b_stop	F	CTCGCTTCAGGATATGGGG	21	R	GCACCCACTCTTATTCGCGTTTT	23
sox9a_stop	F	GCCCCGAACGACGCATATTA	21	R	TGCACAACCTCATTGAAACGCC	22
sox11b_CDS	F	CCAGCAAACCGGGGAACATTAC	22	R	GTCTGAAAAGTTCGCCTCCAGC	22
sox32_stop	F2	GAAACGTGTTTCATGGTGGCG	21	R	TCTATGGTTATCATAAAATAGTACCTGTG	30
zic2b_stop	F	ACAAGTCTACACACCCCCAG	22	R	CACTCTTTGTCTTTGGCAACGC	22

**表 10. サンガーシーケンスに用いた Primer**

Target Region		Sequence (5' to 3')	Length (nt)
egr2b_stop	F3	ACCCACATTCGCACGCACAC	20
pou2_exon1-downstream	F3	GACAGCCCAGACCTTCTTTCC	21
pou2_exon1-upstream	F3	TGTTTGGATCATCCTGGGATGG	22
pou3f2a_stop	F3	GCAGGGCAGGAAAAGGAAAAGC	23
pou3f2b_stop	F3	AGTGGTTGGAGGAGGCAGACT	21
rx3_stop	F3	TCTCTGCCAGCTTCATCACC	21
sox1a_stop	F3	ACACGCAGCATCAGAACTCCAG	22
sox1b_stop	F3	CAAACTCGAGTGTGGCGTCG	21
sox9a_stop	F3	CAGCACATCAGCTACGGTTCC	21
sox11b_CDS	F3	GCCAGAGCATCCACACAAGACT	22
sox32_stop	F3	GTTTCATGGTGGCGGACTT	20
zic2b_stop	F3	CCTTGAGAAAACACATGAAGGTGAG	25

## CRISPR-kp の算出方法と他予測ツールのスコア算出

crRNA の配列特徴は、GitHub (<https://github.com/xuebingwu/kpLogo>)からインストールした kpLogo (v1.1) を用いて、デフォルトのオプション設定で解析した。crRNA の標的配列と ICE で得られた切断効率を重み付けデータとして入力しロゴを生成した。各位置の crRNA 標的配列と PAM 配列の統計的有意性を $-\log_{10}(P)$ とし、ヌクレオチドロゴの大きさによって相対的にスケールされる(表 11,12)。その結果より得られた crRNA の配列のポジションごとの塩基の $-\log_{10}(P)$  の積算をした。また、Rule Set2、CRISPRscan のスコアについては crRNA の配列を基に CRISPOR(<http://crispor.tefo.net/>)にて予測スコアを算出した。

表 11. kp Logo で得られた WT Cas9 における crRNA と PAM 配列のポジションごとの各塩基における $-\log_{10}(P)$ の値

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.31	0.00	1.74	-0.54	-0.56	0.52	0.87	-0.47	0.57	0.43	-0.62	0.67
T	-0.59	1.17	-0.58	-1.10	3.50	0.34	-1.56	-0.59	0.66	-1.43	-0.54	-1.73
G	1.18	-0.85	-0.45	1.50	-1.08	-0.52	2.25	1.27	-0.75	-0.42	0.50	1.07
C	-0.65	0.33	-0.67	-0.32	-0.48	-0.30	-0.40	-0.46	-0.31	1.24	0.66	0.35

PAM

Position	13	14	15	16	17	18	19	20	21	G	G
A	-0.88	-0.55	-0.50	0.89	1.03	-0.61	1.07	1.96	-0.92		
T	-1.64	-0.35	-0.67	-1.42	-0.33	0.36	-1.18	-0.70	-1.15		
G	2.11	-0.51	0.33	-1.01	0.88	-0.84	-0.57	0.92	0.97		
C	0.89	1.32	0.80	2.72	-1.97	1.03	0.72	-2.29	1.73		

表 12. kp Logo で得られた HiFi Cas9 における crRNA と PAM 配列のポジションごとの各塩基における $-\log_{10}(P)$ の値

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.84	0.00	1.01	-0.87	-0.35	-0.45	0.45	0.33	0.64	-0.31	-0.44	0.97
T	-0.51	1.09	-0.49	-0.92	1.26	-0.41	-0.93	-1.42	0.63	-2.17	-0.57	-0.76
G	0.59	0.35	-0.38	2.60	-0.91	0.39	1.56	3.39	-0.85	-0.75	0.49	-0.31
C	-0.99	-0.53	-0.65	-0.69	-0.34	0.46	-0.47	-0.84	-0.36	2.75	0.51	0.30

PAM

Position	13	14	15	16	17	18	19	20	21	G	G
A	-0.51	0.55	0.42	0.87	0.83	-0.55	0.80	0.90	-1.02		
T	-1.48	-1.01	-0.98	-2.42	-0.40	-0.56	-0.86	-0.58	-0.48		
G	0.66	-0.46	0.73	-0.65	0.69	-0.64	-0.49	1.73	0.49		
C	1.41	0.83	-0.32	3.31	-1.33	1.32	0.59	-2.24	0.94		

## 第 7 章 参考文献

1. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821 (2012).
2. Varshney, G. K. et al. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Research* 25, 1030–1042 (2015).
3. Hoshijima, K. et al. Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. *Developmental Cell* 51, 645–657.e4 (2019).
4. Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., Steensel, B. van & van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic acids research* 42, e168 (2014).
5. Hsiao, T. et al. Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *bioRxiv* 251082 (2018) doi:10.1101/251082.
6. Doench, J. G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* 34, 184–191 (2016).
7. Moreno-Mateos, M. A. et al. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods* 12, 982–988 (2015).
8. Haeussler, M. et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* 17, 148 (2016).
9. Zhang, D. et al. Perfectly matched 20-nucleotide guide RNA sequences enable robust genome editing using high-fidelity SpCas9 nucleases. *Genome Biology* 18, 191 (2017).
10. Okada, K. et al. Key sequence features of CRISPR RNA for dual-guide CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes assembled with wild-type or HiFi Cas9. *Nucleic Acids Research*, gkac100 (2022).
11. Paquet, D. et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533, 125–129 (2016).
12. Wu, X. & Bartel, D. P. KpLogo: Positional k-mer analysis reveals hidden specificity in biological sequences. *Nucleic Acids Research* 45, W534–W538 (2017).
13. O’Shea, J. P. et al. PLogo: A probabilistic approach to visualizing sequence motifs. *Nature Methods* 10, 1211–1212 (2013).
14. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80–84 (2014).
15. Gagnon, J. A. et al. Efficient Mutagenesis by Cas9 Protein-Mediated Oligonucleotide Insertion and Large-Scale Assessment of Single-Guide RNAs. *PLOS ONE* 9, e98186 (2014).
16. Chenouard, V. et al. Highly Efficient Knockin in Human iPS Cells and Rat Embryos by CRISPR/Cas9 Molecular Optimization. 2021.09.03.458921 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.09.03.458921> (2021).
17. Schmid-Burgk, J. L. et al. Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. *Molecular Cell* 78, 794–800.e8 (2020).

18. Vakulskas, C. A. et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Medicine* 24, 1216–1224 (2018).

## 第 8 章 謝辞

本研究は高知工科大学分子発生制御学研究室の蒲池雄介教授の御指導の下で行いました。蒲池雄介教授からは本研究を遂行するにあたり様々な面で御指導、御鞭撻を頂きましたことに厚くお礼申し上げます。また、本研究の一部は岡田啓汰氏と共同で実験を行いました。その間、実験技術の御指導並びに有益な助言を頂きましたことに心から感謝申し上げます。また、修士 2 年生の梶尾浩大君の手伝いの下で研究を進め、多くの刺激と示唆を得ることができました。感謝の意を表します。分子発生制御学研究室の皆様には、ゼブラフィッシュの世話、管理または維持にご尽力、協力して頂きました。おかげさまで無理なくスムーズに研究を進めることができました。本当にありがとうございました。