

## Cas9 を用いた高効率遺伝子組み換え手法の開発

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 修士課程 1 年  
先端生命科学 (BI)

森 秀人

### 研究概要

近年、バクテリアの持つ免疫応答システムである Crispr-Cas9 を利用したゲノム編集技術が急速に広まっている。本技術により、ゲノム配列の任意の場所を切断し、変異、置換、挿入といった編集を自由自在に行うことが可能になった。しかし、その効率や正確性は未だ発展途上である。一方、ヒト細胞における DNA 修復系に直接・間接的に関わっているタンパク質は数百以上にのぼっており、本研究では、これら全てのタンパク質から、Cas9 と融合体を形成したときに最も高効率かつ正確に遺伝子組み換えを誘導するタンパク質のスクリーニングを行う。手法としては、Gateway®テクノロジーを用いて、Cas9 と数百以上のタンパク質について融合体を一挙に作成することで、スクリーニングできる系の開発を行う。Gateway®テクノロジーとは、integrase という酵素が att 配列という特定の配列同士の間で組換えを起こすことを利用した技術である。本技術を利用し、DNA 修復タンパク質の遺伝子を持つ Gateway® entry ベクターと、Cas9 の遺伝子を持つ Gateway® destination ベクターとの間で組換え (Gateway® LR reaction) を起こし、Cas9 遺伝子の前後に、DNA 修復関連タンパク質遺伝子を挿入したベクターライブラリを作成する。今年度の結果として、Cas9 の前後に遺伝子を挿入するための Gateway® LR site を組み込んだ、3 種類の Gateway® destination ベクターの開発を完了した。実際に Gateway® LR reaction によって Cas9 の前と後ろに蛍光タンパク質である GFP を挿入したベクターをヒト培養細胞 (HEK293FT) に感染させて、その発現を確認した。本実験によって、開発した 3 つの Gateway® destination ベクターが Gateway® LR reaction の後、正常に Cas9-GFP, MCP-GFP の融合タンパク質を発現していることを確かめた。そして、ヒトタンパク質遺伝子の Gateway® entry ベクターのライブラリ (Human ORFeome V8.1) から、DNA 修復に関係しているタンパク質を持つベクターを選択し、開発した 3 つの Gateway® destination ベクターとの Gateway® LR reaction によって、Cas9 と DNA 修復タンパク質の融合タンパク質の発現ベクターのライブラリの作成を行った。

また、ゲノムを編集する際には組み換えや挿入ではなく、一部の塩基を書き換えが求められることもある。そのためゲノム書き換えのための別のアプローチとして、1 塩基書き換えの技術の開発も行った。本研究では、Cas9 に Cytidine deaminase という酵素を組み込んだ融合タンパクを lenti virus vector に組み込むことで、ヒト遺伝子における標的部位(数塩基)のみを書き換える系の構築を行っている。すでに、ベクターの構築が終了しており、今後ヒト培養細胞を用いた実験をしていく予定である。

※ 本報告書は web 公開されるため、論文発表前の詳細なデータは除いて作成した。