

【目的】ゲノムを構成する塩基配列を容易に置換、変換する手法として CRISPR-Cas システムを利用したゲノム編集技術が急速に発展し、細胞治療法や遺伝子治療への応用も期待されている。哺乳動物細胞をはじめ、適用範囲の拡張が進められており、塩基配列変換手法として中心的な役割を担う。その一方で、解決すべき課題も挙げられており、その中でも最も重要な課題の一つと考えられるのがオフターゲット作用の抑制である。また、Cas スクレアーゼ切断後の修復パスイエイのうち相同組換えでは外部ドナー配列を加えることで修復後に生成する配列を制御できるため、より精密なゲノム編集が可能になる。本研究では細胞周期を利用した手法を開発することによって外部刺激の必要ない高精度なゲノム編集方法の開発、またその *in vivo* への利用を見据えたデリバリー手法の確立を目的とした。

【方法】汎用されている SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* 由来) に対して阻害作用を有している Anti-CRISPR である AcrIIA4 を利用して、G1 期特異的に発現する Cdt1 ドメインとの融合体を構築した。これによって G1 期では AcrIIA4 - Cdt1 が Cas9 を阻害し、非相同末端結合 (Non homologous End Joining) による修復過程が抑制され、G1 期以外の細胞周期においては Cas9 が活性化されるため、相同組換えによる正確な修復過程が優先して起こると考えられた。AcrIIA4 - Cdt1 融合タンパク質と Cas9 を細胞内において等量発現させるためにエピソーマルベクター上に T2A ペプチド配列を介してそれぞれの遺伝子を搭載した。また、ドナー遺伝子には環状プラスミドと ssODN を利用して効率の比較を行った。アデノ随伴ウイルス (Adeno associate virus : AAV) ベクターでは搭載できる遺伝子サイズが限定されるため、SpCas9 の前半部分と後半部分の遺伝子を 2 種類のベクターに分けることで、細胞への導入後に SpCas9 遺伝子が再構成されて全長の SpCas9 が発現する手法を利用することにした。

【結果】SpCas9 と AcrIIA4-Cdt1 を同時に発現させることで相同組換え効率が向上していることが示された。さらに、オフターゲット作用の抑制にも効果があることが示された。また、ssODN を利用することで相同組換え効率がより向上することが示された。オフターゲット作用をより効率的に抑制する手法としてガイド RNA の配列認識部位の長さを短くすることが有効であると考えられた。外部からの刺激を必要としない仕組みのため、細胞に対する毒性も低く、*in vivo* での利用にも適しているゲノム編集技術として期待されるため、AAV ベクターを利用したデリバリーの適用も進めていく。

細胞周期特異的な発現量変化とアンチクリスパーを利用した高精度ゲノム編集技術の概要

