

重複遺伝子のゲノム編集のためのガイド RNA 設計ソフトウェアの開発

SATテクノロジー・ショーケース2025

■ はじめに

ゲノム編集に広く用いられているSpCas9は5'-NGG-3'のProtospacer Adjacent Motif(PAM)配列と20塩基長Spacer配列を認識しゲノムに二本鎖切断(DSB)を起こす。しかし、SpCas9はゲノム上に5'-NGG-3'を必要とすることから編集できるターゲットサイトが制限される。また、SpCas9は16塩基長以下の短いspacer配列を用いるとDSBがほとんど発生しないため複数の遺伝子を同時に編集するのは難しい。新規Casタンパクの一つであるCasΦはゲノム上の多く存在する5'-TBN-3'のPAM配列を認識し、かつ、16塩基長のspacerを用いてもゲノム編集ができる(菅野茂夫, 2022)。しかし、今まで開発されているguide RNA(gRNA)設計ツールは特定の遺伝子を特異的に編集するためのものが多く、複数の遺伝子と遺伝子群を対象にゲノム編集を目的とするgRNAを設計するには膨大な時間と努力を要する。

本研究では、複数の遺伝子や遺伝子群を対象にゲノム編集を行うためのgRNAを設計するプログラムを構築した。加えて、その設計ツールを用いて CasΦがもつ上記の特徴が複数の遺伝子を同時に破壊するうえで有用かを検討した。

■ 活動内容

1. コーディング

PythonとBowtieを用いて、図1.(a)にあるフローで、指定されたPAM配列に対して指定された長さを有するspacerを探索し、gRNAを設計するスクリプトを作成した。

2. Multiple gene target gRNA design

Arabidopsis thaliana の AP2-EREBP Transcription Factor Family(AP2/EREBP family)に属する複数の遺伝子に対して共通する配列を持つspacerを選抜した。

3. 系統樹作成

Arabidopsis thaliana の AP2/EREBP familyの amino acid配列を用いて系統樹を作成し、選抜されたspacerがターゲットする遺伝子を系統樹にて探索した。

4. CasΦタンパクを介したMultiple gene targeted genome editing (ウェット実験)

ポプラへのSpCas9およびCasΦでゲノム編集するためのspacerを設計しAgrobacteriumを用いて形質転換体を獲得した。今後、形質転換システムに対してGenotypingを行い、

多重変異体が取得できたか調べる予定である。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

菅野茂夫、長谷川玲花 (2022), Genome editing method for duplicated genes, WO-A1-2024/053677, <https://www.j-platpat.inpit.go.jp/c1801/PU/WO-A-2024-053677/50/ja>

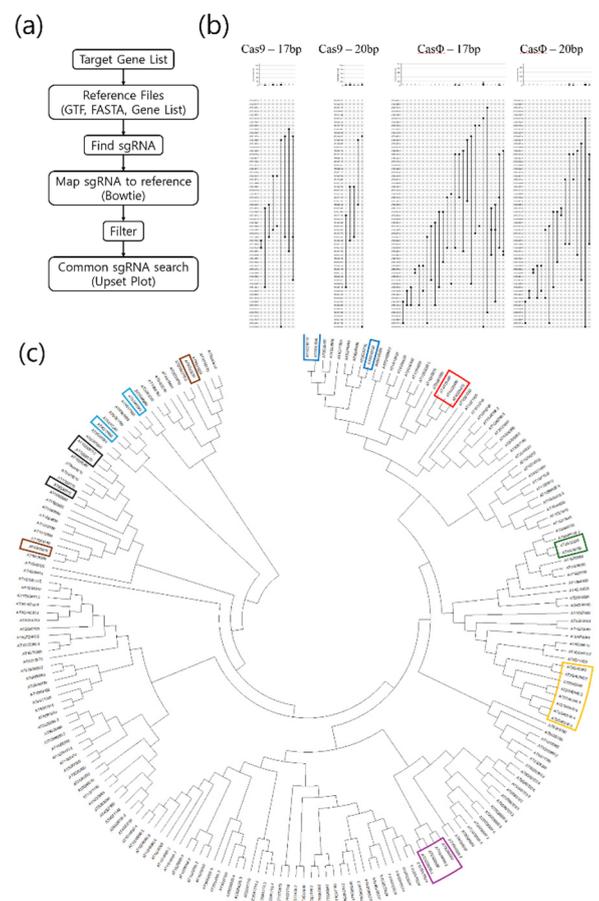


図1. CasΦはCas9より複数の遺伝子を同時に編集できる

(a) spacer 設計プログラムの Flow chart (b) *Arabidopsis thaliana* の AP2/EREBP Family を対象に設計されたガイド RNA のターゲット遺伝子を示す UpSet Plot (c) *Arabidopsis thaliana* の AP2/EREBP family 遺伝子の系統樹。同じ色の箱は共通の spacer でターゲットできる事を示す。

代表発表者 **Sim Jaechol(シム ジェ Chol)**
 所属 **産業技術総合研究所
 生物プロセス研究部門 特別研究員**
 問合せ先 〒305-8566 茨城県つくば市東
 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
 つくば中央第6事業所 6-8 棟
 Email : jaechol.sim@aist.go.jp

■キーワード: (1)ゲノム編集
 (2)プログラミング
 (3)CRISPR
 ■共同研究者: 菅野 茂夫(スガノ シゲオ)
 産業技術総合研究所
 生物プロセス研究部門