

適切なガイド RNA 選択のための *in silico* 解析リソース○中前 和恭¹¹広島大学ゲノム編集イノベーションセンター

Computational resources for designing appropriate guide RNAs

○Kazuki Nakamae¹¹Hiroshima University, Genome Editing Innovation Center

CRISPR-Cas9 システムは、幅広い生物種に対する適用例が報告されているゲノム編集ツールであり、一般的な分子生物学的手法として普及して久しい。しかしながら、CRISPR-Cas9 システムによる変異導入において、その効率（変異導入活性）は必ずしもターゲットに対して一定ではなく、ガイド RNA の配列パターンによって差異が生じることが広く知られている。また、ガイド RNA の特異性についても、ターゲットの塩基配列と対象生物の全ゲノム配列の組み合わせに依存しており、意図しない領域への変異導入（off-target effect）がしばしば確認されている。このためガイド RNA の選択は CRISPR-Cas9 システムを使ったゲノム編集の成否を左右する非常に重要な要素である。その選択にあたっては、プロトスペーサー配列の GC contents や seed 領域（8-12 nt PAM 近位）の特異性に着目するといった簡単な指針は存在するものの、こうした基準だけで多数のガイド RNA 候補から実験に利用する配列を選び出すのは難しい場合が多い。

このようなガイド RNA 選択をより確実にするべく、*in silico* 解析リソースを活用してターゲティングする塩基配列を精査し、ガイド RNA の変異導入活性や特異性を予測する試みが世界中で実施されてきた。たとえば、変異導入活性の予測は、特に *Streptococcus pyogenes* に由来する Cas9（SpCas9）で盛んに研究されており、SpCas9 による CRISPR スクリーニング等によって得た大量の変異導入活性データセットを学習した予測システム（Azimuth, CrisprScan, DeepSpCas9 など）が開発されている。一方、特異性の予測においても、ゲノムリファレンス内のミスマッチ配列等を参照して、スコアリングを行う種々のアルゴリズム（COSMID score, MIT Specificity Score, CRISTA score, CFD specificity score, Elevation score, MOFF score）が発表されている。さらに、CRISPR-Cas9 によって発生するインデルの種類と割合を予測するソフトウェア（Microhomology-Predictor, inDelphi, Lindel など）も登場しており、これはノックアウトや病原変異の改変において極めて有用であると考えられる。こうしたリソースはさまざまなゲノム編集設計ウェブツール（CRISPOR, CHOPCHOP, Benchling, KOnezumi など）に実装されており、これらを活用することで、ゲノム編集の確実性を向上させることができると考えられる。

本講演では、そのようなガイド RNA 選択を支える *in silico* 解析リソースに焦点をあて、当該研究分野の大まかな動向と主要な知見について紹介したい。