

# 21PO-am394

## ゲノム編集を利用したアデノウイルスベクターの新規改変法の開発

○西前 文敬<sup>1</sup>, 若林 圭作<sup>2</sup>, 塚本 智仁<sup>2</sup>, 酒井 英子<sup>1,2</sup>, 櫻井 文教<sup>1,2</sup>, 水口 裕之<sup>1,2,3,4</sup> (1) 阪大薬, (2) 阪大院薬, (3) 医薬健栄研, (4) 阪大 MEI セ)

【背景・目的】アデノウイルス (Ad) ベクターは、その優れた遺伝子導入特性から、遺伝子導入ベクターとして汎用されている。近年、様々な改良を加えた次世代型 Ad ベクターが開発されているが、その作製法は煩雑であり、簡便な Ad ベクター改変法の開発が求められている。我々は、近年、ゲノム編集ツールとして汎用されている CRISPR/Cas9 システムを用いることで、Ad ベクターゲノムを切断し、制限酵素部位に依存しない相同組換えにより Ad ベクターゲノムを改変できるのではないかと考えた。まず本研究では、その第一段階として、CRISPR/Cas9 システムを用いて Luciferase (Luc) 発現 Ad ベクターの Luc 遺伝子を、GFP 遺伝子に置換することを試みた。

【方法】Luc 遺伝子に対するガイド RNA (gRNA) を標的配列が切断されることで、レポーター遺伝子の相同組換えが起こり、蛍光が回復するアッセイ法により選定した。次に、HEK293 細胞に、Cas9/gRNA 共発現プラスミド及び Luc 発現 Ad ベクターを作用させたのち、T7E1 assay により Ad ベクターゲノムの切断効率を評価した。さらに、Ad ベクターゲノム上の Luc 遺伝子を GFP 遺伝子に置き換えられるように作製したドナーベクターを用いて、相同組換えによる置換効率を検討した。

【結果】Cas9/gRNA 共発現プラスミド及び Luc 発現 Ad ベクターを作用させたところ、約 15% の Ad ベクターゲノムの切断が認められた。また、Cas9/gRNA 共発現プラスミド及び GFP 遺伝子搭載ドナーベクターを導入後、Luc 発現 Ad ベクターを作用させることで、GFP 発現 Ad ベクターを得ることに成功した。本技術を応用すれば、任意のウイルスゲノム領域の簡便な改変が可能になり、新規ベクターの開発も可能になると期待される。