

—総説—

特集：ゲノム編集技術の基本～基礎から臨床に向けて～

## 受精卵を用いたゲノム編集の基礎 Basics of the genome editing in embryos

寺川 純平

Jumpei Terakawa

麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 比較毒性学研究室 〒252-5201 相模原市

Laboratory of Toxicology, Department of Animal Science and Biotechnology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa 252-520, Japan

**要旨：**1990年代後半から進んだゲノム編集ツールの開発は、2012年のCRISPR-Cas9システムの登場によって一気に加速した。CRISPR-Cas9システムはその簡便性と効率の良さから、いまや個々の研究者が扱えるまでに普及している。それに伴い、ゲノム編集ツールの受精卵導入によるゲノム編集動物の作製も進んでいる。マウスやラットの小型実験動物では従来法よりもかなり短時間で遺伝子改変個体の作製ができるようになり、ブタやウシなどの産業動物をはじめとして、これまで遺伝子改変が難しかった動物にも適応されている。作出された個体は基礎生命科学研究だけでなく、医療や産業においても利用され、動物性ゲノム編集食品の流通も始まった。ヒトでの遺伝子治療の可能性を大いに秘め、受精卵ゲノム編集技術は今後ますます重要かつ身近になるだろう。本稿では、改めて動物における受精卵ゲノム編集について概説する。

**キーワード：**ゲノム編集, 受精卵, CRISPR-Cas9, オフターゲット効果

**Abstract:** The development of genome editing tools, which started in the late 1990s, has been accelerated by the discovery of the CRISPR-Cas9 system in 2012. The CRISPR-Cas9 system is now widely used by individual researchers due to its simplicity and efficiency, and genome-editing animals have been produced by introducing genome-editing tools into fertilized eggs. Using this system, genetically modified small laboratory animals such as mice and rats can be produced in much shorter times than with conventional methods. The same genome-editing tools and methods have been applied to domestic animals, including pigs and cattle, as well as other animals for which genetic modification was difficult in the past. Genome-edited animals are used not only in basic life science research, but also in medicine and industry, and genome-edited food animals are now being distributed. Genome editing technology will become more important and common in the future as it holds great potential for gene therapy in humans. In this article, the basics of genome editing in embryos are reviewed.

**Key words:** Genome editing, Embryos, CRISPR-Cas9, Off-target

### はじめに

2018年11月、香港で開かれた国際会議である中国人研究者が、世界初のゲノム編集した双子の女兒、いわゆる“デザ

(受付 2021年11月29日／受理 2021年12月10日)

別刷請求先：〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺

1-17-71

麻布大学獣医学部動物応用科学科

比較毒性学研究室

e-mail: terakawa@azabu-u.ac.jp

イナーベビー”，を誕生させたと発表して大きな話題になるとともに世間に衝撃を与えた<sup>1)</sup>。この事例では、本稿で述べるCRISPR-Cas9によるゲノム編集技術を利用して、CCR5という遺伝子を編集したとされている。CCR5はヒト免疫不全ウイルス(HIV)が標的細胞に侵入する際に必要な受容体で、この遺伝子を働かなくすることによりHIV感染抵抗性の付与が期待される。しかしながら、実際には医学的に必要でない操作であったこと、研究の倫理審査手続きに問題があったことなど、各所から非難があがり、その後研究者に対して厳しい処分が行われた。受精卵でゲノム編集を行うことは、次世代の細胞をつくる生殖細胞でも遺伝子改変が起

こるため、その影響は当該個体にとどまらず、世代を超えて引き継がれることになる。現在、我が国を始めとした多くの国において、ゲノム編集技術を用いたヒト受精卵の作製・利用は、法律により禁止あるいは厳しく制限されている。

一方で、動物においてはCRISPR-Cas9をはじめとする受精卵ゲノム編集技術は広く普及し、それによって作製された動物個体あるいはその系統が研究や産業に大いに利活用されている。昨今、ゲノム編集で作製された肉付きのよいマダイ<sup>2)</sup>が、初の動物性ゲノム編集食品として日本で流通し始めたことも話題になっている。かつて敷居の高かったゲノム編集は、CRISPR-Cas9の登場と普及により一気に個々の研究者レベルで行われるまでになった。本稿では、改めてCRISPR-Cas9によるゲノム編集技術について概説し、受精卵ゲノム編集技術により実際にどのように遺伝子改変動物が作製されているのかについて解説する。本稿が受精卵ゲノム編集について考える一助になれば幸いである。

### ゲノム編集とは

まずゲノム「genome」とは、遺伝子を意味する「gene」と全てを意味する「ome」を合わせた言葉であり、ある生物種の構成に必要な遺伝情報のセットである。遺伝情報は、細胞の核内にデオキシリボ核酸 (DNA) の形で保存されている。DNAには4種類の塩基 (A: アデニン, T: チミン, C: シトシン, G: グアニン) が含まれ、塩基配列、すなわちそれらの並びが遺伝情報ということである。DNAは二本の鎖が互いに逆向きで結合し、相補的な塩基 (AとT, CとG) が対になった二重らせん構造をとっている。最新のデータベース (Ensembl; <https://asia.ensembl.org/index.html>) によると、塩基配列の長さ (ゲノムサイズ) は例えばヒトでは31億塩基対、マウスでは27億塩基対、ブタでは25億塩基対である。これらの膨大な塩基配列情報が、動物種に固有の数の染色体と呼ばれる構造体に分散して格納されている。

ゲノム編集とは、塩基配列情報の一部を削除したり、別の塩基配列に置換したり、あるいは別の塩基配列を挿入したりすることによって、遺伝情報を書き換えることである。遺伝情報のなかには蛋白質を作るための情報を指定する領域 (コード領域) が~2%ほど含まれており、これらがいわゆる遺伝子と呼ばれる。遺伝子を標的にゲノム編集を行えば、遺伝子の機能欠失や機能異常を引き起こしたり、逆に変異した遺伝子を修復したりすることも可能である。また、蛋白質をコードしない領域 (非コード領域) も遺伝子の発現や機能に影響を及ぼすことが明らかになってきており、非コード領域もゲノム編集の標的となりうる。ゲノム編集は細胞や生体を対象に行うことができ、一般的に受精卵を用いたゲノム編集個体の作出には受精後の前核期胚が用いられる。受精卵でゲノム編集を行うと、始原生殖細胞 (次世代を作るための精子や卵の元になる細胞) でも遺伝情報の改変が起こり、ゲノム編集の影響はその個体だけでなく次世代以降にも継承されることになる。

ゲノム編集技術の歴史はゲノム編集ツール開発の歴史で

あり、その基本原理はDNAを「切断する」ことにある。狙った場所、すなわち特定の塩基配列を認識して切断するためのツール開発がこれまで行われてきた。ゲノム編集ツールによりDNAの二本鎖切断 (Double stranded break; DSB) が生じると、図1に示したように非相同末端結合 (Non-homologous end-joining: NHEJ) を介して修復される<sup>3)</sup>。正しく修復された場合にはまた切断の対象となるため、修復時にエラーが起こり不完全な修復となった場合にのみ、その変異が残ることになる。結果として、修復エラーによる短鎖の塩基配列の挿入 (Insertion) や欠損 (Deletion) が生じることになる (これらの変異は合わせてIndel変異と呼ばれる)。先に述べたいわゆる遺伝子の機能欠失には、この方法が用いられる。蛋白質のアミノ酸配列指定に必要な領域 (エキソン) を直接的にすれば、ランダムなIndel変異による遺伝子の破壊が可能である。蛋白質は、塩基配列のmRNAへの転写と翻訳によるアミノ酸の結合の過程を経て合成される。エキソンにある塩基配列情報をもとに、mRNAから3塩基1組 (コドン) としてアミノ酸へと翻訳されるため、3の倍数でないIndel変異が生じると変異箇所以降で翻訳の際に読み枠がずれる (フレームシフト)。これにより本来とは全く異なる蛋白質が合成される。実際には、翻訳停止を意味する終止コドンが変異箇所下流にすぐ現れることが多い。早期の終止コドンの出現により、ナンセンス変異 (終止変異) 依存mRNA分解機構<sup>4)</sup>とよばれるmRNA品質管理機構の働きによって変異のあるmRNAが分解除去され、蛋白質合成が全く起こらなくなる場合もある。エキソンではなく、単独あるいは複数のエキソンを挟む形でエキソン外の領域 (イントロン) を2箇所切断すれば、特定のエキソンを大きく取り除くことも可能である。また、切断領域周辺の相同配列を有する鋳型 (ドナー) DNAがある場合は、その鋳型を元に修復が行われ、これが相同組換え修復 (Homology-directed repair; HDR) を促す (図1)。これを利用することによって、特定の位置に狙った配列を挿入することが可能となり、塩基置換や別の遺伝子の挿入が行える。

### CRISPR-Cas9 システム

CRISPR-CasシステムとはClustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats - CRISPR associatedシステムの略であり、細菌や古細菌が有する獲得免疫機構を応用したものである。この仕組みをJennifer Doudna博士とEmmanuelle Charpentier博士らが初めて報告し<sup>5)</sup>、その後2013年にゲノム編集ツールとして利用可能なことが報告されて<sup>6,7)</sup>、以来急速に普及した。Doudna博士とCharpentier博士はこれらの功績により、2020年にノーベル化学賞を受賞した。CRISPR-Casシステムは、システムを構成している蛋白質群や作用機序の違いによって、現在6つの型 (Type I-VI) に分類されており<sup>8)</sup>、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に由来するType IIのDNA切断酵素 Cas9 (SpCas9) がゲノム編集に最も広く利用されている。

CRISPR-Cas9は第3世代ゲノム編集ツールである。第1

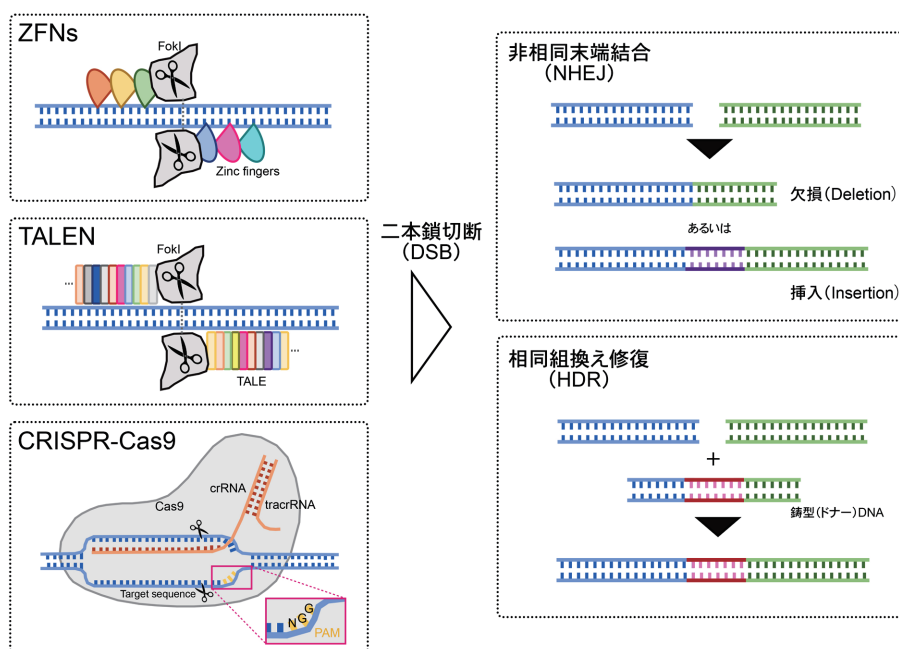


図1 ゲノム編集ツールと二本鎖切断修復のメカニズム

ゲノム編集ツール (ZFNs, TALEN, CRISPR-Cas9) は、狙った塩基配列に二本鎖切断 (DSB) を誘発する。DSBは、非同末端結合 (NHEJ) や、鋳型 (ドナー) テンプレートが存在する場合は相同組換え修復 (HDR) によって修復される (Li *et al.*, Signal Transduction and Targeted Therapy 2020 より引用, 改変)。

表1 ゲノム編集ツールの特徴比較

	ZFNs	TALEN	CRISPR-Cas9
認識機構	蛋白質-DNA	蛋白質-DNA	RNA-DNA
特異性	中	高	中
クロマチン構造の影響	感受性大	感受性大	感受性中
メチル化の影響	有	有	なし
オフターゲット効果	大	小	中
標的遺伝子数	一遺伝子ごと	一遺伝子ごと	複数可能
コスト	高	中	低
調整難易度	高	高	低
時間	ベクター構築に時間がかかる	ベクター構築に時間がかかる	crRNA の設計のみ

世代ゲノム編集ツールは、1996年に開発されたDNA結合モチーフであるZinc-Fingerと制限酵素FokIを利用した人工キメラ蛋白質ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Zinc finger nucleases; ZFNs) である<sup>9)</sup>。第2世代ゲノム編集ツールは、2010年に発表された植物病原細菌が有するTALエフェクター (Transcription activator-like effector; TALE) というDNA結合モチーフを利用した改変型TALEヌクレアーゼ (TALE nucleases; TALEN) である<sup>10)</sup>。CRISPR-Cas9とこれらとの違いは他所ですでに多く解説されているため、主な違いを簡単にまとめる (図1と表1)。CRISPR-Cas9システムの最大の特徴は、塩基配列の認識機構がRNAであるという点である。ZFNsとTALENはどちらも蛋白質による塩基配列の認識機構を利用しており、それらの技術的な合成

の困難さとコスト高が普及の障壁であった。核内においてDNAはヒストン蛋白質に巻き付いたヌクレオソームを形成し、それらが連なってクロマチンを構成する。ZFNsとTALENではDNA結合蛋白質による認識機構のため、遺伝子発現制御に関わるクロマチンの構造変化やDNAメチル化 (DNAのシトシンにメチル基が転移する) の影響を強く受ける。一方でCRISPR-Cas9ではDNAの一次配列依存的な認識機構であるため、クロマチン構造の影響をZFNsやTALENより受けづらく、DNAメチル化による影響を受けない。

CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集に必要な要素は、DNA切断酵素であるCas9蛋白質と塩基配列を認識するguide RNA (gRNA) である (図1)。gRNAは標的配列を認識するための相補配列 (CRISPR RNA; crRNA) と、Cas9蛋白

質との複合体形成に必要なトランス活性化型配列 (Trans-activating crRNA; tracrRNA) から構成される。Cas9蛋白質とtracrRNA配列は共通のため、標的配列に応じてcrRNAの配列を変更するだけでよい。例えば実際のマウス受精卵でのゲノム編集では、Cas9蛋白質とgRNA (crRNA と tracrRNAの組合せ) からなる複合体の導入が主流になってきており、複合体形成の際、標的毎にcrRNAのみを変更する。crRNAは、カスタムオリゴ合成を取り扱う各社にてウェブ上で簡単に注文できるため、1配列あたり1万円程度で入手可能である。

crRNAの配列決定の制約は、標的配列にPAM (Protospacer adjacent motif) と呼ばれる特定の配列が必要な点である。最も一般的なSpCas9を使用したCRISPR-Cas9システムの場合には、標的配列の末端がNGG (NはA, T, G, Cのどれでもよい) でなくてはならない (図1)。PAM配列から上流の20塩基 (あるいは19塩基) を標的配列として使用することができ、PAM配列の上流3塩基目と4塩基目でCas9蛋白質による切断が生じる。Cas9蛋白質のアミノ酸を変化させることで、より広範なPAM配列が使用できるよう変異体の探索が行われており、xCas9 (NG, GAAおよびGATをPAMとする)<sup>11)</sup>やSp-Cas9-NG (NGをPAMとする)<sup>12)</sup>などが開発されている。

### オフターゲット効果

CRISPR-Cas9システムは標的配列の設計が非常に簡便であるが、一方で標的とする配列以外を認識して切断・編集してしまう「オフターゲット効果」には注意が必要である。オフターゲット効果はgRNAによる配列認識のミスが原因であり、crRNAの配列の特異性を高めることである程度回避することが可能である。PAM配列上流の10塩基がシード領域と呼ばれ、特異性を決める重要な領域であることが立体構造解析からも示されている<sup>13)</sup>。オフターゲット効果を低下させるために、様々な標的配列を決定するためのアルゴリズムが考えられており、実際のゲノム編集の際にはこれらのツールを用いることになる。crRNAの配列決定ツールの例として、CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no>) やCRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) などが利用できる。また、ゲノム編集関連試薬の販売を担う各社においても独自のツールが提供されている。マウスにおいては、遺伝子名を入れるだけで遺伝子欠損マウス作製のために必要な情報が入手できるKOnezumi<sup>14)</sup> (<http://www.md.tsukuba.ac.jp/LabAnimalResCNT/KOanimals/konezumi.html>) のようなウェブツールも利用可能である。

実際の遺伝子改変動物作製において、マウスなどの小型実験動物の場合は、得られたゲノム編集個体を野生型と交配させて次世代や系統作製を行うことが多いため、オフターゲット効果による影響はほとんど無視される場合もある。ゲノム編集によるなにかしらの影響が該当個体で確認された際、少なくとも選定した認識配列と類似した配列がないか、ある場合はその周辺領域で意図しない編集が起こっていないか確認する必要があるだろう。アルゴリズムで見逃

されるおそれのあるオフターゲット効果の確認には、次世代シーケンサーを利用した全ゲノムシーケンシングが必要となる。オフターゲット効果を抑えるべく、フィデリティの高いeSpCas9<sup>15)</sup>やSpCas9-HF<sup>16)</sup>の開発、あるいは後述する塩基置換 (Base editing) やプライム編集 (Prime editing) といった新しい編集ツールが開発されている。

### ゲノム編集動物の作製

胚性幹細胞 (ES細胞; Embryonic stem cell) が存在していたマウスやラットでは遺伝子改変動物の作製が行われていたが、ゲノム編集技術を用いることによって、これまで遺伝子改変ができなかった動物種でも作製が行われるようになった。CRISPR-Cas9システムの登場によりその流れは一気に加速した。マウスにおいても、これまで最短でも1年近くかかっていたES細胞を使った遺伝子ターゲティングが、CRISPR-Cas9システムによって数ヶ月程度で可能となり、また一度に複数の遺伝子を標的とすることも容易になった。ゲノム編集動物の作製では、前核期の受精卵にゲノム編集に必要な要素を導入するだけでよい。次稿でも述べられるように、マウスにおいてCRISPR-Cas9システムによるゲノム編集因子の導入は当初マイクロインジェクション法が使用されていたが、その後エレクトロポレーション法でも効率よく行えることが報告された<sup>17,18)</sup>。これによって、基本的な体外での胚操作技術さえあれば比較的簡単に遺伝子欠損個体や短鎖の塩基置換や挿入を有する遺伝子改変個体の作製が可能となり、ゲノム編集技術導入のハードルがかなり下がったといえる。さらに、自然交配後に卵管膨大部にある受精卵に直接ゲノム編集因子を導入するi-GONAD法<sup>19)</sup>が開発され、体外での胚操作も必要なくなった。技術的な改良の余地は残されているものの、体外での胚操作が難しいハムスターなどでは、このi-GONAD法によって遺伝子改変動物作製が行われている<sup>20)</sup>。

すでに作製報告されたゲノム編集動物として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの実験動物からアカゲザルやカニクイザル<sup>21)</sup>、コモンマーモセット<sup>22)</sup>などの霊長類実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどの産業動物<sup>23)</sup>が挙げられる。魚類においても、実験動物として使用されるメダカやゼブラフィッシュから、食用のマダイやクロマグロ<sup>24)</sup>の報告がある。作製されたゲノム編集動物がカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当するかどうかは、当該動物が最終的に外来の核酸やその複製物を保持するかどうかによる。しかし実際のところ、国内の大学・研究所でのゲノム編集技術を使用した研究開発は、「遺伝子組換え実験」として取扱われている場合がほとんどであり、作製されたゲノム編集動物の取扱いもそれに準じている。

### CRISPR-Casシステムの応用と展開

ゲノム編集技術は遺伝子治療への応用も期待されていることから、より広範に適用できるよう改良が進められ、CRISPR-Casシステムの応用や展開も進んでいる。一般的に

用いられているCRISPR-Cas9システムでは化膿性連鎖球菌に由来するSpCas9を使用するが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に由来するSaCas9<sup>25)</sup>もある。SaCas9はSpCas9より分子量が小さく、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたゲノム編集ツールのパッケージングに適している。これ以外に細菌*Acidaminococcus*や*Lachnospiraceae*に由来するCas12a (Cpf1)<sup>26)</sup>がある。Cas9とは異なったPAMを認識し、tracrRNAを必要としない。実際にCas9と同じように受精卵ゲノム編集にも使用できることが報告されている<sup>27)</sup>。また、近年発見されたCas12f<sup>28)</sup>はCas9の半分以下の分子サイズであることから、こちらもAAVベクターに搭載可能な小型のゲノム編集ツールとして今後の展開が期待されている。国産のゲノム編集技術として、狙ったゲノム配列の上流側を大きく削る性質を持つCRISPR-Cas3システム<sup>29)</sup>や標的配列に対して両方向に長鎖欠失を誘導するTIDシステム<sup>30)</sup>なども開発されている。

さらに、CRISPR-Cas9を改変し二本鎖切断 (DSB) をすることなく、塩基置換 (Base editing) を行う技術が登場している<sup>31)</sup>。これにはDNA切断活性のない変異型Cas9に脱アミノ化酵素 (デアミナーゼ) を付加した塩基編集ツールが用いられる。これまでのところ、塩基置換はC→T, G→A, A→G, T→Cの変換が可能であり、今後の研究により更に自由な編集が可能になるだろう。DNAの切断なしに変異の導入が可能のため、意図しないゲノム編集を抑えることができると期待される。

このほかに正確で効率のよいゲノム編集を実現するためのツールとして、プライム編集 (Prime editing) も登場した<sup>32)</sup>。プライム編集では、DNAの二本鎖のうち一本鎖だけを切るよう設計された改変Cas9蛋白質が使用される。改変Cas9蛋白質には逆転写酵素が結合しており、標的部位に導くgRNAと修正用のテンプレートRNAが繋がったPrime editing guide RNA (pegRNA) を用いることで、標的配列においてテンプレートRNAからDNAを合成し任意の配列に置換する。プライム編集の利点は、二本鎖切断 (DSB) を起こすことなく、また外来ドナーDNAを必要とせずにゲノムの書き換えが可能なことである。

## おわりに

ZFNsやTALENによるゲノム編集技術の開発の歴史のうに、CRISPR-Cas9が登場したことにより、ゲノム編集技術は目覚ましく発展している。CRISPR-Cas9はその簡便さと効率の良さから、どの研究者でも比較的簡単に扱えるツールとなって急速に普及した。この流れは今後ますます加速し、ゲノム編集技術を活用した基礎研究のための動物モデルの作製や産業利用可能な動物個体・系統の作製は増えていくだろう。さらに受精卵ゲノム編集は、およそ9,000種あるヒトでのあらゆる遺伝性疾患の根本的治療法としての可能性を秘めている。より正確に、より効率的にゲノムを編集するためのツールや周辺技術の開発も日々進んでおり、技術的な道は開けつつある。しかしながら最初に述べたよう

に、ヒトでの受精卵ゲノム編集は十分な基礎研究と議論を経たうえで、倫理的な課題を一つずつクリアしていく必要があるだろう。

## 謝辞

本稿の執筆にあたり、貴重なご助言をいただいた小林良祐博士に感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Cyranoski, D. (2019): What's next for CRISPR babies. *Nature*, 566, 440–442.
- 2) Washio, Y., Ohama, M., Kishimoto, K., Kinoshita, M. and Kato, K. (2021): Growth performance and edible ratio of myostatin-knockout young red sea bream *Pagrus major* produced by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture science*, 69(1), 101–112.
- 3) Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M. and Zhao, X. (2020): Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.*, 5, 1-019-0089-y.
- 4) 石垣靖人 (2005) : ナンセンス変異依存mRNA分解機構 (NMD) の機構と役割について. *金沢医科大学雑誌*, 30(4): 320–325.
- 5) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821.
- 6) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819–823.
- 7) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. and Church, G.M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823–826.
- 8) Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksny, V., Terns, M.P., Venclovas, C., White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou, R. and Koonin, E.V. (2020): Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, 18, 67–83.
- 9) Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 1156–1160.
- 10) Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186, 757–761.
- 11) Hu, J.H., Miller, S.M., Geurts, M.H., Tang, W., Chen,

- L., Sun, N., Zeina, C.M., Gao, X., Rees, H.A., Lin, Z. and Liu, D.R. (2018): Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556, 57–63.
- 12) Nishimasu, H., Shi, X., Ishiguro, S., Gao, L., Hirano, S., Okazaki, S., Noda, T., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Mori, H., Oura, S., Holmes, B., Tanaka, M., Seki, M., Hirano, H., Aburatani, H., Ishitani, R., Ikawa, M., Yachie, N., Zhang, F. and Nureki, O. (2018): Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 361, 1259–1262.
  - 13) Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S. and Doudna, J.A. (2015): STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 348, 1477–1481
  - 14) Kuno, A., Mizuno, S. and Takahashi, S. (2019): KOnezumi: a web application for automating gene disruption strategies to generate knockout mice. *Bioinformatics*, 35, 3479–3481.
  - 15) Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016): Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351, 84–88.
  - 16) Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. and Joung, J.K. (2016): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529, 490–495.
  - 17) Kaneko, T. and Mashimo, T. (2015): Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One*, 10, e0142755.
  - 18) Hashimoto, M. and Takemoto, T. (2015): Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci. Rep.*, 5, 11315.
  - 19) Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., Arifin, N., Nakamura, S., Wada, K. and Gurumurthy, C.B. (2018): i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.*, 19, 25-018-1400-x.
  - 20) Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Tamura-Nakano, M., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., Ohtsuka, M., Baba, T., Yanagimachi, R. and Ogura, A. (2020): Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 117, 2513–2518.
  - 21) Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., Xiang, A.P., Zhou, J., Guo, X., Bi, Y., Si, C., Hu, B., Dong, G., Wang, H., Zhou, Z., Li, T., Tan, T., Pu, X., Wang, F., Ji, S., Zhou, Q., Huang, X., Ji, W. and Sha, J. (2014): Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156, 836–843.
  - 22) Sato, K., Oiwa, R., Kumita, W., Henry, R., Sakuma, T., Ito, R., Nozu, R., Inoue, T., Katano, I., Sato, K., Okahara, N., Okahara, J., Shimizu, Y., Yamamoto, M., Hanazawa, K., Kawakami, T., Kametani, Y., Suzuki, R., Takahashi, T., Weinstein, E.J., Yamamoto, T., Sakakibara, Y., Habu, S., Hata, J., Okano, H. and Sasaki, E. (2016): Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*, 19, 127–138.
  - 23) 中島 治, 近藤一成 (2018) : 食用と考えられるゲノム編集動植物に関する調査. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 136: 52–69.
  - 24) Higuchi, K., Kazeto, Y., Ozaki, Y., Yamaguchi, T., Shimada, Y., Ina, Y., Soma, S., Sakakura, Y., Goto, R., Matsubara, T., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Yasuike, M., Nakamura, Y., Matsuura, A., Masuma, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Masaoka, T., Kobayashi, T., Fujiwara, A. and Gen, K. (2019): Targeted mutagenesis of the ryanodine receptor by Platinum TALENs causes slow swimming behaviour in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Sci. Rep.*, 9, 13871-019-50418-3.
  - 25) Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A. and Zhang, F. (2015): In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520, 186–191.
  - 26) Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V. and Zhang, F. (2015): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163, 759–771.
  - 27) Dumeau, C.E., Monfort, A., Kissling, L., Swarts, D.C., Jinek, M., and Wutz, A. (2019): Introducing gene deletions by mouse zygote electroporation of Cas12a/Cpf1. *Transgenic Res.*, 28, 525–535.
  - 28) Wu, Z., Zhang, Y., Yu, H., Pan, D., Wang, Y., Wang, Y., Li, F., Liu, C., Nan, H., Chen, W. and Ji, Q. (2021): Programmable genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease. *Nat. Chem. Biol.*, 17, 1132–1138.
  - 29) Morisaka, H., Yoshimi, K., Okuzaki, Y., Gee, P., Kunihiro, Y., Sonpho, E., Xu, H., Sasakawa, N., Naito, Y., Nakada, S., Yamamoto, T., Sano, S., Hotta, A., Takeda, J. and Mashimo, T. (2019): CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat. Commun.*, 10, 5302-019-13226-x.
  - 30) Osakabe, K., Wada, N., Murakami, E., Miyashita, N. and Osakabe, Y. (2021): Genome editing in mammalian cells using the CRISPR type I-D nuclease. *Nucleic Acids Res.*, 49, 6347–6363.
  - 31) Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. and Liu, D.R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420–424.
  - 32) Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. and Liu, D.R. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, 149–157.