

—総説—

特集：ゲノム編集技術の基本～基礎から臨床に向けて～

実験動物（マウス）におけるゲノム編集： 疾患モデルマウス作製の実際

Genome editing for developing disease models in mice

小林 良祐・堀居 拓郎・畑田 出穂*
Ryosuke Kobayashi, Takuro Horii, Izuho Hatada*

群馬大学生体調節研究所ゲノム科学リソース分野 〒371-8512 前橋市

Laboratory of Genome Science, Institute of Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi 371-8512, Japan

要旨：遺伝子改変技術を用いた疾患モデル動物は生命医学研究の発展に大きく貢献してきた。従来、胚性幹細胞（ES細胞）を用いた遺伝子改変マウス作製法は、大変な時間と労力を要するものだった。しかし、2012年に発表されたCRISPR-Cas9システムによるゲノム編集法は任意のゲノム領域に効率良く変異を導入することを可能とし、これを受精卵に応用することで遺伝子改変マウス作製に飛躍的な簡便化・迅速化がもたらされた。本総説では、ゲノム編集による遺伝子改変で疾患モデルを作製するための技術の基礎と応用を、最新の知見を織り交ぜて紹介する。

キーワード：ゲノム編集, 疾患モデル, マウス, Cre-lox

Abstract: Disease models using genetically modified animals have contributed to the progress of research in medical science. The conventional method for producing genetically modified mice using embryonic stem (ES) cells is time-consuming. However, genome editing based on the CRISPR-Cas9 system, which was introduced in 2012, enables the efficient introduction of mutations into given genomic regions, and the application of this method to fertilized eggs has dramatically simplified and accelerated the production of genetically modified mice. In this review, we introduce the basics and applications of genome editing technology used to produce disease models with reference to the latest findings.

Key words: Genome editing, Disease model, Mice, Cre-lox

はじめに

人や動物における生理現象や疾患を科学的に理解するためには、実験動物モデルを用いた個体レベルでの統合的解析が欠かすことができないステップとなる。特に生命医学分野では、マウスなど小型齧歯類を用いた遺伝子改変動物が疾患病態の理解や新規創薬に大きく貢献してきた。従来、遺伝子改変動物の作製は主に胚性幹細胞（ES細胞）を用いて行われていた。この方法ではES細胞に培養下でター

ゲティングベクターを導入し、組換えが起きたES細胞を薬剤により選抜、これをマウス胚盤胞に注入することで組換えES細胞由来のキメラマウスを得る。このキメラマウスをさらに交配させ、子を得ることで全身性の遺伝子改変マウスが作出される。ES細胞を用いた遺伝子改変動物作製は熟練した技術と手間、時間を要するものであり、新規ラインの作製は多くの研究者にとって非常に敷居の高いものだった。ところがCRISPR-Cas9システムを中心としたゲノム編集技術の登場により、この状況は一変した¹⁾。CRISPR-Cas9により受精卵での遺伝子改変が可能となったことで、遺伝子改変マウス作製は飛躍的に容易となり、作製に要する労力や時間も大幅に削減された。遺伝子改変マウスはもはや「高嶺の花」ではなく、多くの研究者が自ら作製し使用できるツールとなりつつある。本総説では条件付きノックアウトマウスなど疾患モデル動物の作製を通して、ゲノム編集に

(受付 2021年11月30日/受理 2021年12月18日)

別刷請求先：〒371-8512 群馬県前橋市昭和町3-39-15

群馬大学生体調節研究所ゲノム科学リソース分野

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: hatada@gunma-u.ac.jp

よるノックイン技術に焦点を当て、その基礎から最新までを紹介したい。

ゲノム編集による遺伝子改変マウス作製の基本

ゲノム編集による遺伝子改変マウスの作製は、マウス受精卵にゲノム編集因子を導入することで行われる(図1)。CRISPR-Cas9 システムの場合、ゲノム編集因子としてCas9 やガイドRNA (gRNA) の発現プラスミドやCas9 mRNA の形で導入されてきたが、近年ではCas9 タンパク質とgRNA から成るリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) の形の導入が効率面や簡便性の観点から主流になりつつある²⁻⁴⁾。

最も単純なノックアウトマウス作製では、標的遺伝子のタンパク質コード領域内に1種類のgRNAを設計する。gRNAによって標的領域にリクルートされたCas9はDNA二本鎖を切断しDSB (Double stranded break) ができる。DSBが非同末端結合 (Non-homologous end-joining: NHEJ) による不完全な修復を受けることで異常な挿入や欠失 (Indel変異) が導入され、ノックアウトが達成される。Indel変異によるノックアウトは高効率だが、変異パターンがランダムであり、その後の遺伝子型解析が難しくなる。そこで同一染色体上に設計した2種類のgRNAを同時導入し、一定の遺伝子領域を欠損させてノックアウトを作製すると遺伝子型解析が簡単になるだけでなく、予期せぬ機能残存を回避することができる。またゲノム編集因子に加えて、DSB領域周辺との相同配列を有する鋳型 (ドナー) DNAを同時に導入することにより、HDR (Homology-directed repair) を介した点変異や各種タグなどの導入 (ノックイン) も可能である。

ゲノム編集において、目的以外の領域に変異が挿入されてしまう現象をオフターゲット効果と呼ぶ。オフターゲット効果を抑制するための工夫として、CRISPR等のWebツールを使ってより特異性の高いgRNAを設計すること⁵⁾、正確性の高いCas9変異体を使用することなどが挙げられ^{6, 7)}、これらはマウス作製でも予期せぬ変異挿入を回避するために有効である⁸⁾。

一般的に、妊娠マウスから得た受精卵や体外受精卵に対して *in vitro* でゲノム編集因子の導入を行うが、その主な方法としては、微細ガラスキャピラリーで受精卵の核内もしくは細胞質内に注入するマイクロインジェクション法と、電気刺激を与えることで細胞内への因子取り込みを一過性に促進させるエレクトロポレーション法とがある(図1)。マイクロインジェクション法は比較的高度な技術を要し、また受精卵一つ一つにゲノム編集因子を注入していく必要がある。一方、エレクトロポレーション法はマイクロインジェクションと比べると技術的に簡便であり、また一度に大量の受精卵を処理できる。我々の研究室でゲノム編集マウスを作製する際は、エレクトロポレーション法でCas9-RNPを導入する方法を基本的には採用している。エレクトロポレーション法の欠点は、プラスミドDNAなど一部の核酸を受精卵に導入することができないことである。受精卵は糖

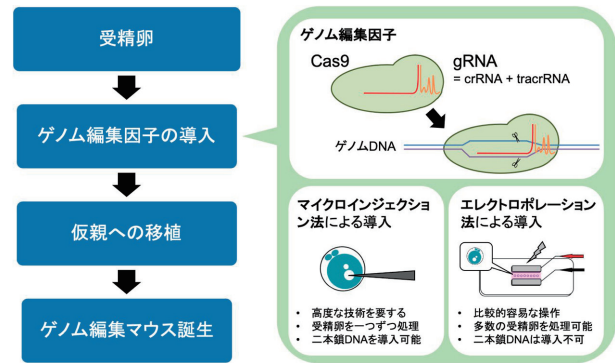


図1 ゲノム編集による遺伝子改変マウス作成の手順と方法

タンパクから構成される透明帯に囲まれており、この構造が高分子の通過を妨げていることが原因の一つであると考えられる^{9, 10)}。したがって、ノックインのドナーとしてプラスミドDNA等を用いる際には依然としてマイクロインジェクションが必要となる。

最近では、交配したメスマウスの卵管内にゲノム編集因子を注入し、卵管ごとエレクトロポレーションを行うことで卵管内の受精卵に対してゲノム編集を行う *i-GONAD* 法が開発された^{11, 12)}。 *i-GONAD* 法では、これまで技術的な障壁となっていたマウス初期胚操作を必要としないため、より多くの研究者がゲノム編集マウス作製に挑戦できるようになったといえる。

受精卵ゲノム編集によるノックインマウス作製

loxP配列 (34 bp) やHisタグ (18 bp~) など短い配列の挿入から、Creリコンビナーゼ配列 (1,032 bp) やEGFPタグ (720 bp) のような長鎖配列の挿入まで、ゲノム編集による遺伝子ノックインはドナー DNAを鋳型としたHDRを介して行われる。しかしゲノム編集によるノックイン効率はノックアウトと比べると依然として低く、ノックイン効率の向上を目指した取り組みが盛んに行われてきた。

ノックインに用いるドナー DNAの種類

ドナー DNAとして、二本鎖DNAもしくは一本鎖DNAを使用することができる。二本鎖DNAは大腸菌を用いたプラスミド増幅やPCRによって簡単に合成・複製することができるが、受精卵に導入するためには前述の通りマイクロインジェクション法が必要である。最近では、アデノウイルス随伴ベクターの感染を介して受精卵に二本鎖DNAドナーを導入可能であることが明らかとなり、マイクロインジェクション法を必要としない長鎖ノックインマウス作製法が2つの研究グループより報告された^{13, 14)}。

一本鎖DNAをドナーとして用いる場合は、エレクトロポレーション法による導入が可能である。少数塩基の置換や、100 bp程度までの短い配列の挿入を行う場合、合成オリゴ(single-

stranded oligo DNA nucleotide, ssODN) を鋳型として用いることができる。ssODNの末端塩基をphosphorothioateで修飾することによりノックイン効率を向上させることが可能であり¹⁵⁾、これはおそらく修飾によってssODNが細胞内のヌクレアーゼ分解から回避しているためだと考えられる¹⁶⁾。数100塩基以上の長鎖一本鎖DNA (long ssODN, lsODN) の場合、外注合成は高価であり、配列や長さによっては合成が困難だったりエラーが発生したりすることが問題だった。高品質なlsODNを安定的に調製するためのシステムとして、プラスミドからニックアゼ処理によって一本鎖DNAを切り出す方法や¹⁷⁾、リン酸化プライマーで増幅したPCR産物をヌクレアーゼで処理することで一本鎖DNAを調製するphospho-PCR法などが登場し¹⁸⁾、現在ではノックインドナーとしてより扱いやすくなっている。しかし、一本鎖DNAドナーは2,000bp以上のノックインには低効率であり、より長鎖のノックインには依然として二本鎖DNAが有効である¹⁹⁾。

ドナー DNA の設計とノックイン効率

ゲノム上の狙った領域に正しくノックインを行うためには、ドナー DNA の両端に標的領域の配列と相同なホモロジーアーム (Homology arm, HA) を適切に設けることが重要である。二本鎖DNAドナーに設けたHAの長さがノックイン効率に与える影響を調査した研究では、培養細胞では短いHA (50 bp) よりも長いHA (600 bp以上) を持つドナーで効率よくノックインができることを示している²⁰⁾。マウス受精卵におけるゲノム編集でも同様に、ドナーHA長は20 bpよりも800 bp設けた方が~2倍ほど効率が良い^{21, 22)}。二本鎖DNAドナーを用いる場合、プラスミドDNAを環状のままノックインドナーとして使用することもできるが、細胞内もしくは細胞外でプラスミドDNAを切断し、HAを持った直鎖ドナーとすることでノックイン効率が向上する^{20, 22, 23)}。

一本鎖DNAドナーの場合は30塩基以上にHAを設けるのが一般的であり、少なくともssODNではより長いHAを持つドナーでノックイン効率が良い傾向にある^{15, 24)}。

ゲノム編集によるノックインがノックアウトよりも非効率である原因は、ゲノム上のDSBのほとんどがNHEJによる修復を受けることにある²⁵⁾。このことを逆手に取り、環状DNAドナーの1箇所をgRNAを設計して細胞内で切断することで、一方のノックイン末端はNHEJによる修復、もう一方の末端では相同組換え (Homologous recombination, HR) による組換えを誘導し、効率的なノックインを可能にしたCombi-CRISPR法、およびSAT1法がそれぞれ日本の研究グループから報告されている^{19, 26)}。

ゲノム編集の時期とノックイン効率

ノックイン効率の向上には、受精卵にゲノム編集を行うタイミングも重要である。Cas9による切断で形成したDSBが、どのような経路で修復を受けるかは細胞周期に大いに依存する。細胞内でのDSB修復は基本的にはNHEJが優位

ではあるが、細胞周期のS期後期からG2期にかけてHRが活性化する。理化学研究所の阿部らは、マウス受精卵でHRによるノックインが効率よい時期を検討した²⁷⁾。その結果、S期の受精卵前核にゲノム編集因子をインジェクションする方法が、G2期にインジェクションを行うよりも効率よくノックインできることを明らかにした。G2期に入った受精卵ではまもなく雌雄の前核で融合に伴う核膜崩壊が起きる。したがって、G2期の前核にゲノム編集因子を注入すると溶液が核外に漏出してしまうが、S期に注入することで核膜崩壊までにノックインを完了できることが効率に関係していると考えられている。また、2細胞期胚では受精卵と比べてHR活性の高まるG2期の期間が長い。2細胞期胚の割球にゲノム編集因子をマイクロインジェクションすることも効率よい長鎖ノックインマウス作製に繋がるようだ²⁸⁾。

ゲノム編集による条件付きノックアウトマウス作製

疾患モデル動物として、ノックアウトマウスは生命医学研究に数多くのブレイクスルーをもたらしてきた。しかし国際マウス表現型コンソーシアムのデータによると、60%以上 (667/1,089遺伝子) のノックアウトマウスは胚性致死の表現型を示す (<https://www.mousephenotype.org>)。つまりほとんどの遺伝子は、ノックアウトマウスを使って成体での遺伝子機能を解析することが不可能なのである。このような全身性遺伝子欠損による胚性致死を回避し、成体組織における遺伝子機能解析を可能とするのが条件付きノックアウトマウスである。最も使用されているCre-loxシステムによる条件付きノックアウトマウスの樹立には、任意の組織でCreリコンビナーゼを発現するCreドライバーマウスと、欠損させる遺伝子領域を2つのlox配列で挟んだfloxマウスを交配させる必要がある。どちらの遺伝子改変マウスもゲノム編集によるノックインで作製することが可能だが、特にfloxマウスでは同一染色体上に2カ所のノックインを行う必要があるため、特別な技術やノウハウが必要となる。

2ステップ法によるfloxマウスの作製

loxP配列 (34 bp) の挿入には、ノックインドナーとしてssODNを用いるのが最も簡単である。CRISPR-Cas9ゲノム編集が登場して間もない2013年、Yangらは*Mecp2*遺伝子のエクソン3の5'末および3'末側イントロンに2種類のgRNAおよびそれに対応したssODNドナーを設計し、マウス受精卵でlox配列を同時にノックインすることで*Mecp2* floxマウスを作製した²⁹⁾。しかしこの方法では、同一染色体上に2カ所のDSBが同時に生じるため遺伝子欠損が頻繁に発生し、結果としてfloxが得られる効率が低くなるのが問題となった (図2A)³⁰⁾。これを解決するため、我々は受精卵に対し一方のlox配列挿入に関するゲノム編集を行い、その翌日に2細胞期胚でもう一方のlox配列挿入に関するゲノム編集を実行することで、段階的なゲノム編集による遺伝子欠損の回避を試みた (図2B)³¹⁾。実際、この方法でゲノム編集を行った処理胚から発生した胚盤胞では、従来法でゲノ

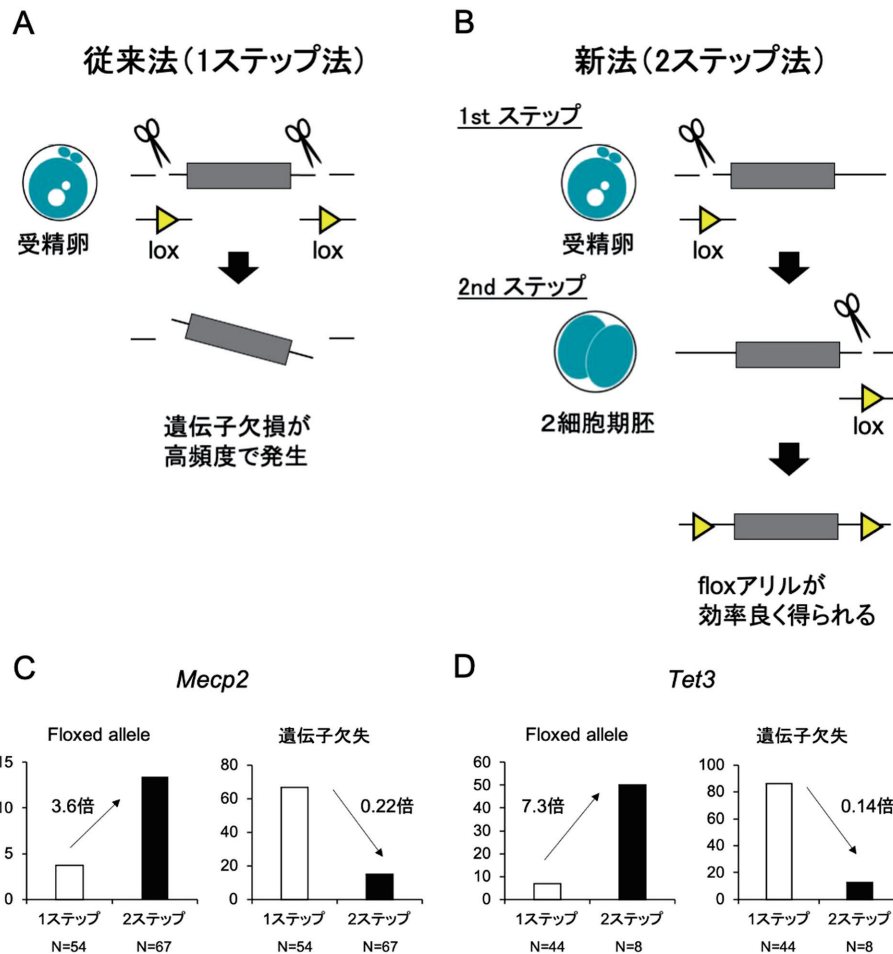


図2 flox マウス作製技術の比較

従来式の1ステップ法(A), および新法である2ステップ法(2)によるflox作製の手順. 1ステップ法と比較して, 2ステップ法では*Mecp2* (C) および*Tet3* (D) 遺伝子座におけるflox作製効率が向上し, 遺伝子欠損率は減少した. Horii *et al.*, 2017³¹⁾より改変.

ム編集を行った胚盤胞と比較して遺伝子欠損の発生を抑えることができ, flox作製率が大幅に向上した. また本手法では, マイクロインジェクション法だけでなく電圧ポレーション法による導入でも効率よくfloxアレルが得られた. 実際にゲノム編集した胚を仮親に移植して産子を得ると, 従来法と比較して3倍以上の効率でfloxマウスが得られた(図2C, D)³¹⁾. このように, 我々は段階的にゲノム編集を実行する“2ステップ法”の開発によりfloxマウス作製の効率化に成功した.

2ステップ法の改良: 細胞融合の抑制

受精卵へのCas9複合体の導入に電圧ポレーションを用いることは, マイクロインジェクション法のように高度な技術を必要とせず, また一度に大量の受精卵を処理できるため極めて合理的である. しかし, 2細胞期胚での電圧ポレーション処理は割球同士の細胞融合を促し4倍

体胚を生む. 4倍体胚は正常胚(2倍体)と同様に胚盤胞まで発生するが, 着床後にエピプラストの発生異常により胚性致死となる³²⁾. つまり2ステップ法では, 細胞融合の発生がflox作製効率の歩留まり低下を招くのである. 電圧ポレーションに伴う2細胞期胚の細胞融合を抑制することを目指し, 我々はゲノム編集条件の検討を行った³³⁾. すると, 2細胞期胚の2つの割球が接着する面積が小さいほど細胞融合が起こりにくいことがわかった. 細胞間の接着を阻害する条件に注目して検討を続けたところ, Ca²⁺フリー培地(カドヘリン結合の抑制)や, アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンB添加培地で胚を前処理することによって, ゲノム編集効率を維持しつつ, 電圧ポレーションによる細胞融合の発生を阻止できることが明らかとなった.

長鎖DNAドナーを用いたfloxマウス作製

2つのloxを同時に含むような長鎖DNAドナーを用いた

相同組換えでfloxマウスを作製しようとする試みもある^{3, 23, 34)}。宮坂らは、Creドライバーマウスの精子を用いた体外受精卵に対してIsODNドナーを用いてfloxアリのノックインを行うことにより、交配を経ずに条件付きノックアウトマウス(すなわち、Cre/+かつflox/flox)を作製することに成功した³⁴⁾。長鎖DNAドナーを用いたflox作製の制限としては、2つのloxをドナーDNAの長さに収まる範囲(1,000 bp以内)に設置する必要があり、数kbp以上の組換えが起きるような条件付きノックアウトを設計することができない。それぞれの方法には一長一短あるが、lox間距離が数kbpに渡るfloxを設計する必要がある場合は、loxの設置距離に制限の無い2ステップゲノム編集が有効である。

おわりに

CRISPR-Cas9ゲノム編集の登場により、遺伝子改変マウス作製は飛躍的に簡便化し、デザインもよりフレキシブルなものになった。その一方で、期待通りにゲノム編集が施されたマウスが得られる割合は依然として高いとはいえ、ゲノム編集処理胚から生まれてくるマウスのほとんどは遺伝子改変が起きていなかったりエラーが含まれていたりするため、その後の実験には使用することができず処分せざるを得ない。オフターゲット効果により予期せぬ変異挿入が生じた個体も排除しなくてはならない。したがって、ゲノム編集効率や正確性の向上を目指すことは生物倫理の観点からも重要な課題であるといえる。世界中の研究者がCRISPR-Cas9システムに注目を集めている中で、今回紹介したように実験動物におけるゲノム編集の分野では特に日本の研究グループの活躍が目立つ。このことを大変誇らしく感じるとともに、今後もさらなる発展が続くことを期待せずにはいられない。

文献

- 1) 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.
- 2) Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. and Kim, J. S. (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.*, 24, 1012–1019.
- 3) Quadros, R. M., Miura, H., Harms, D. W., Akatsuka, H., Sato, T., Aida, T., Redder, R., Richardson, G. P., Inagaki, Y., Sakai, D., Buckley, S. M., Seshacharyulu, P., Batra, S. K., Behlke, M. A., Zeiner, S. A., Jacobi, A. M., Izu, Y., Thoreson, W. B., Urness, L. D., Mansour, S. L., Ohtsuka, M. and Gurumurthy, C. B. (2017): Easi-CRISPR: A robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biol.*, 18, 1–15.
- 4) Chen, S., Lee, B., Lee, A. Y. F., Modzelewski, A. J. and He, L. (2016): Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J. Biol. Chem.*, 291, 14457–14467.
- 5) Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J. B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J. S. and Concordet, J. P. (2016): Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.*, 17, 1–12.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Anderson, K. R., Haeussler, M., Watanabe, C., Janakiraman, V., Lund, J., Modrusan, Z., Stinson, J., Bei, Q., Buechler, A., Yu, C., Thamminana, S. R., Tam, L., Sowick, M. A., Alcantar, T., O’Neil, N., Li, J., Ta, L., Lima, L., Roose-Girma, M., Rairdan, X., Durinck, S. and Warming, S. (2018): CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. *Nat. Methods.*, 15, 512–514.
- 9) Grabarek, J. B., Plusa, B., Glover, D. M. and Zernicka-Goetz, M. (2002): Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis*, 32, 269–276.
- 10) Peng, H., Wu, Y. and Zhang, Y. (2012): Efficient delivery of DNA and morpholinos into mouse preimplantation embryos by electroporation. *PLoS One*, 7, e43748.
- 11) Gurumurthy, C. B., Sato, M., Nakamura, A., Inui, M., Kawano, N., Islam, M. A., Ogiwara, S., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Nakagawa, S., Miura, H. and Ohtsuka, M. (2019): Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat. Protoc.*, 14, 2452–2482.
- 12) 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, 1–15.
- 13) Mizuno, N., Mizutani, E., Sato, H., Kasai, M., Ogawa, A., Suchy, F., Yamaguchi, T. and Nakauchi, H. (2018): Intra-embryo Gene Cassette Knockin by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing with Adeno-Associated Viral Vector. *iScience*, 9, 286–297.
- 14) Chen, S., Sun, S., Moonen, D., Lee, C., Lee, A. Y. F., Schaffer, D. V. and He, L. (2019): CRISPR-READI: Efficient Generation of Knockin Mice by CRISPR RNP Electroporation and AAV Donor Infection. *Cell Rep.*, 27, 3780–3789.
- 15) Renaud, J. B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochenne, J., Duvernois-Berthet, E., Perrouault, L.,

- Tesson, L., Edouard, J., Thinard, R., Cherifi, Y., Menoret, S., Fontanière, S., de Crozé, N., Fraichard, A., Sohm, F., Anegon, I., Concordet, J. P. and Giovannangeli, C. (2016): Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Rep.*, 14, 2263–2272.
- 16) Putney, S. D., Benkovic, S. J. and Schimmel, P. R. (1981): A DNA fragment with an α -phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 78, 7350–7354.
- 17) Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B. and Mashimo, T. (2016): SsODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat. Commun.*, 7, 1–10.
- 18) Inoue, Y. U., Morimoto, Y., Yamada, M., Kaneko, R., Shimaoka, K., Oki, S., Hotta, M., Asami, J., Koike, E., Hori, K., Hoshino, M., Imayoshi, I. and Inoue, T. (2021): An optimized preparation method for long ssDNA donors to facilitate quick knock-in mouse generation. *Cells*, 10, 1–15.
- 19) Yoshimi, K., Oka, Y., Miyasaka, Y., Kotani, Y., Yasumura, M., Uno, Y., Hattori, K., Tanigawa, A., Sato, M., Oya, M., Nakamura, K., Matsushita, N., Kobayashi, K. and Mashimo, T. (2021): Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. *Hum. Genet.*, 140, 277–287.
- 20) Zhang, J. P., Li, X. L., Li, G. H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., Baylink, D., Zhang, L., Wen, W., Fu, Y. W., Xu, J., Chun, N., Yuan, W., Cheng, T. and Zhang, X. B. (2017): Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol.*, 18, 1–18.
- 21) Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Li, S., Cheng, L., Wang, Q., Wu, Y., Huang, P., Sun, Q., Shi, L. and Yang, H. (2017): Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.*, 27, 801–814.
- 22) Yao, X., Zhang, M., Wang, X., Ying, W., Hu, X., Dai, P., Meng, F., Shi, L., Sun, Y., Yao, N., Zhong, W., Li, Y., Wu, K., Li, W., Chen, Z. and Yang, H. (2018): Tild-CRISPR Allows for Efficient and Precise Gene Knockin in Mouse and Human Cells. *Dev. Cell*, 45, 526–536.e5.
- 23) Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Izu, Y., Oishi, A., Mochida, K., Ishikubo, H., Usami, T., Aizawa, H., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2016): Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics*, 17, 1–18.
- 24) Okamoto, S., Amaishi, Y., Maki, I., Enoki, T. and Mineno, J. (2019): Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. *Sci. Rep.*, 9, 1–11.
- 25) Lieber, M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 79, 181–211.
- 26) Suzuki, K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Li, Z., Wei, C., Soligalla, R. D., Aizawa, E., Hatanaka, F., Kurita, M., Reddy, P., Ocampo, A., Hishida, T., Sakurai, M., Nemeth, A. N., Nuñez Delicado, E., Campistol, J. M., Magistretti, P., Guillen, P., Rodriguez Esteban, C., Gong, J., Yuan, Y., Gu, Y., Liu, G. H., López-Otín, C., Wu, J., Zhang, K. and Izpisua Belmonte, J. C. (2019): Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction. *Cell Res.*, 29, 804–819.
- 27) Abe, T., Inoue, K. ichi, Furuta, Y. and Kiyonari, H. (2020): Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes. *Cell Rep.*, 31, 107653.
- 28) Gu, B., Posfai, E. and Rossant, J. (2018): Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nat. Biotechnol.*, 36, 632–637.
- 29) Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L. and Jaenisch, R. (2013): One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154, 1370.
- 30) Gurumurthy, C. B., O'Brien, A. R., Quadros, R. M., Adams, J., Alcaide, P., Ayabe, S., Ballard, J., Batra, S. K., Beauchamp, M. C., Becker, K. A., Bernas, G., Brough, D., Carrillo-Salinas, F., Chan, W., Chen, H., Dawson, R., Demambro, V., D'Hont, J., Dibb, K. M., Eudy, J. D., Gan, L., Gao, J., Gonzales, A., Guntur, A. R., Guo, H., Harms, D. W., Harrington, A., Hentges, K. E., Humphreys, N., Imai, S., Ishii, H., Iwama, M., Jonasch, E., Karolak, M., Keavney, B., Khin, N. C., Konno, M., Kotani, Y., Kunihiro, Y., Lakshmanan, I., Larochelle, C., Lawrence, C. B., Li, L., Lindner, V., Liu, X. De, Lopez-Castejon, G., Loudon, A., Lowe, J., Jerome-Majewska, L. A., Matsusaka, T., Miura, H., Miyasaka, Y., Morpurgo, B., Motyl, K., Nabeshima, Y. I., Nakade, K., Nakashiba, T., Nakashima, K., Obata, Y., Ogiwara, S., Ouellet, M., Oxburgh, L., Piltz, S., Pinz, I., Ponnusamy, M. P., Ray, D., Redder, R. J., Rosen, C. J., Ross, N., Ruhe, M. T., Ryzhova, L., Salvador, A. M., Alam, S. S., Sedlacek, R., Sharma, K., Smith, C., Staes, K., Starrs, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., Tanaka, T., Trafford, A. W., Uno, Y., Vanhoutte, L., Vanrockeghem, F., Willis, B. J., Wright, C. S., Yamauchi, Y., Yi, X., Yoshimi, K., Zhang, X., Zhang, Y., Ohtsuka, M., Das, S., Garry, D. J., Hocheppied, T., Thomas, P., Parker-Thornburg, J., Adamson, A. D., Yoshiki, A., Schmouth, J. F., Golovko, A., Thompson, W. R., Lloyd, K. C. K., Wood, J. A., Cowan, M., Mashimo, T., Mizuno, S., Zhu, H., Kasperek, P., Liaw, L., Miano, J. M. and Burgio, G. (2019): Reproducibility of CRISPR-Cas9 methods for generation of conditional mouse alleles: A multi-center evaluation. *Genome Biol.*, 20, 1–14.

- 31) Horii, T., Morita, S., Kimura, M., Terawaki, N., Shibutani, M. and Hatada, I. (2017): Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci. Rep.*, 7, 7891.
- 32) Horii, T., Yamamoto, M., Morita, S., Kimura, M., Nagao, Y. and Hatada, I. (2015): P53 suppresses tetraploid development in mice. *Sci. Rep.*, 5, 1–9.
- 33) Horii, T., Kobayashi, R., Kimura, M., Morita, S. and Hatada, I. (2020): Calcium-Free and Cytochalasin B Treatment Inhibits Blastomere Fusion in 2-Cell Stage Embryos for the Generation of Floxed Mice via Sequential Electroporation. *Cells*, 9, 1088.
- 34) Miyasaka, Y., Uno, Y., Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Yoshimura, T., Tanaka, T., Ishikubo, H., Hiraoka, Y., Takemoto, N., Tanaka, T., Ooguchi, Y., Skehel, P., Aida, T., Takeda, J. and Mashimo, T. (2018): CLICK: One-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics*, 19, 1–8.