

—総説—

特集：ゲノム編集技術の基本～基礎から臨床に向けて～

## ゲノム編集技術による遺伝子改変家畜の作出

### Gene editing-mediated production of genetically modified livestock

谷原 史倫<sup>1\*</sup>・平田 真樹<sup>2,3</sup>・音井 威重<sup>2,3</sup>

Fuminori Tanihara<sup>1\*</sup>, Maki Hirata<sup>2,3</sup>, Takeshige Otoi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学医学部先端医療技術開発センター 〒329-0498 下野市

<sup>2</sup>徳島大学バイオイノベーション研究所 〒779-3233 徳島市

<sup>3</sup>徳島大学生物資源産業学部 〒770-8513 徳島市

<sup>1</sup>Center for Development of Advanced Medical Technology, Jichi Medical University, Tochigi, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

<sup>2</sup>Bio-Innovation Research Center, Tokushima University, 2272-2 Ishii, ishii, Ishii-cho, Myozai-gun, Tokushima 779-3233, Japan

<sup>3</sup>Faculty of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University, 2-1 Jyosanjima-cho, Tokushima, Tokushima 770-8513, Japan

**要旨：**CRISPR/Cas9システムをはじめとするゲノム編集技術の登場により、生物が持つゲノム配列の任意の箇所を高効率に改変することが可能となった。細胞や胚での遺伝子改変が格段に容易になったことで、マウスやラットなどのげっ歯類実験動物からブタやウシ、ヒツジ、ヤギなどの家畜も含めた幅広い動物種で遺伝子ノックアウト・ノックイン個体の作出に要した労力と時間が大幅に削減された。ゲノム編集は、小型げっ歯類実験動物では遺伝子の司る機能、病態への関連などを解明するために多く用いられ、今や必須のツールである。一方家畜では、産業面で有用な形質の付与および、先端的な医療技術のヒトへの橋渡し、ならびに前臨床研究を推し進めるための医用モデル作出が加速している。本稿では、ゲノム編集技術による遺伝子改変個体の作出報告を基に、家畜におけるゲノム編集の現況を概説する。

**キーワード：**ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, ゲノム編集, 家畜

**Abstract:** With the advent of gene editing technologies such as the CRISPR/Cas9 system, it has become possible to introduce desired mutations into an organism's genome. High efficiency gene modification of cells and embryos has greatly reduced the labor and time required to produce gene knock-out and knock-in animals across a wide range of species, including rodent laboratory animals such as mice and rats, as well as livestock such as pigs, cattle, sheep, and goats. Gene editing has been widely used in rodents to elucidate the functions of genes and their relationships to pathogenesis. On the other hand, in livestock, gene editing technology has accelerated the provision of useful traits for industry, and the generation of research models for human medicine, promoting preclinical research into the translation of advanced medical technologies for humans. In this paper, we review the current status of gene editing in livestock, covering studies of genetically modified livestock generated using gene editing technology.

**Key words:** ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, Gene editing, Livestock

#### はじめに

(受付 2021年12月1日／受理 2021年12月20日)

別刷請求先：〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1

自治医科大学医学部先端医療技術開発センター

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: f\_tanihara@jichi.ac.jp

ブタやウシ、ヒツジ、ヤギといった産業動物は人類の生活に無くてはならない存在である(以下、本稿ではブタ、ウシ、ヒツジおよびヤギを家畜と呼称する)。遺伝子改変技術の発展に伴い、成長ホルモン遺伝子の導入による成長促進や動物由来製品に含まれるアレルゲンの除去、有用な生理活性

物質を生産するバイオリクター（動物工場）としての利用など、家畜の産業的価値・生産性を向上させるための数多くの試みがなされてきた。一方、安全な飼養・繁殖管理技術が確立されており、生体の確保が容易で生殖工学技術も発展していることから、マウスやラットなど小型げっ歯類に次ぐ実験動物としても注目されている。

マウスやラットは遺伝的背景が統一され、扱いやすく繁殖が容易であるなど、実験動物として優れた形質を多数有する。遺伝子改変により多様なモデル系統が樹立されており、遺伝子機能の解明、疾患メカニズム解析、医薬品開発、薬理薬効試験などに広く活用され、人類の科学技術の発展に無くてはならない存在である。一方、サイズおよび生理学的差異から完全にヒトを模倣することはできず、小型げっ歯類を用いて得られた研究成果を効率的にヒトへ橋渡しする新たなモデル動物が求められてきた<sup>1)</sup>。近年、家畜に遺伝子改変を行うことで、小型げっ歯類実験動物では再現が難しい疾患モデルの作出や、更にはヒトへの臓器移植ドナーとしての活用も検討されている。しかし、これまで家畜で遺伝子改変個体を得ることは容易ではなかった。マウスやラットでは妊娠、出産、性成熟までのサイクルが非常に短く、遺伝子改変個体を低コストで、素早く系統化することができる。一方、家畜では妊娠期間が長く、ウシなどの単胎動物では産子数も限られる。さらに、遺伝改変系統の樹立には期間や人手、豊富な資金が必要となるだけでなく、技術的な制限も存在している。マウスでは相同遺伝子組換え法と生殖細胞系列に寄与する胚性幹細胞（embryonic stem cells：ESCs）が樹立され、ESCsを経由したノックイン・ノックアウトが実現した結果、多様な遺伝子の機能解明と疾患モデルの作出が急激に進み、医学研究の発展に大きな進歩をもたらした。しかしブタやウシといった動物種では、キメラとして寄与するESCsを含む多能性幹細胞は樹立されておらず、ましてや生殖細胞へ寄与させることは現状極めて困難であり、マウスと同様の戦略をとることはできない<sup>2)</sup>。

1985年にウサギ、ヒツジ、ブタで受精卵の前核内へ外来遺伝子を顕微注入（マイクロインジェクション）することにより、世界ではじめて遺伝子改変個体の作出が成し遂げられた<sup>3)</sup>。方法としてはシンプルではあるが胚の顕微操作に技術的な熟練が必要であり、さらに変異導入効率は極めて低い。加えて、注入した外来遺伝子がランダムにゲノムに組み込まれるため表現型が不安定になり、意図しない遺伝子のサイレンシングが起きるなどの問題がある。その後、1997年にヒツジではじめて体細胞核移植胚から産子が作出され<sup>4)</sup>、ウシ<sup>5)</sup>、ヤギ<sup>6)</sup>、ブタ<sup>7-9)</sup>で体細胞核移植技術が確立された。次いで、遺伝子改変体細胞をドナーとして用いた遺伝子改変個体の作出がブタとウシで相次いで報告された<sup>10, 11)</sup>。核移植胚の作製手順は非常に複雑で技術的な習熟も必要であるものの、家畜で困難とされてきたノックアウトおよびノックインが可能となる極めて重要なブレイクスルーであり、それ以降、体細胞核移植は家畜での遺伝子改変個体作出のための強力なツールとして現在まで広く用いられている。

しかし、当時は細胞の特定のゲノム配列を標的とした遺伝子改変は相同遺伝子組換え（Homologous recombination; HR）に依存した方法が主であり、その効率は決して高くはなかった<sup>12)</sup>。理論上、際限なく増殖可能なESCsとは異なり体細胞では継代できる回数は限られ、また細胞種によっても相同組換えの効率は影響された。

## 任意のゲノム配列へアプローチできる ゲノム編集技術

ゲノム編集技術は、遺伝子改変動物の作出効率を劇的に改善した。ゲノム編集とは、任意のゲノム配列を認識するヌクレアーゼを用いてゲノムの特定の部位を切断し、細胞内で修復される過程で塩基置換、挿入、欠損、あるいはドナー配列を挿入することで遺伝子改変を行う技術である。切断されたDNAは主に非相同性末端結合（non-homologous end-joining：NHEJ）あるいはHRによって修復される<sup>13)</sup>。DNA末端同士を接続することで修復するNHEJではエラーが起りやすく、数～数十程度の塩基の挿入や欠損によりフレームシフト変異が起り、遺伝子がノックアウトされる。一方HRによる修復では損傷を受けていない姉妹染色分体を鋳型とし正確な修復を行うためエラーは少ない。また、相同配列を有する外来性DNA（合成した一本鎖オリゴやDNA断片など）も鋳型となり得るため、任意の配列の挿入、すなわち点変異の導入や遺伝子ノックインが可能となる。

代表的なものでは人工ヌクレアーゼであるZinc finger nuclease（ZFN）<sup>14, 15)</sup>やTranscription activator-like effector nuclease（TALEN）<sup>16)</sup>、RNA誘導型ヌクレアーゼのthe clustered regularly interspaced short palindromic repeats（CRISPR）/CRISPR-associated protein（CRISPR/Cas）<sup>17, 18)</sup>が現在までに確立され、さまざまな動物種の体細胞、幹細胞、初期胚においてこれまでにない高精度・高効率な遺伝子改変が可能となった。ZFNは第一世代のゲノム編集技術とも言え、特定のゲノム配列を認識・結合するジンクフィンガードメインにDNAを切断するFokIエンドヌクレアーゼを結合させたキメラタンパク質であり、二量体として機能させる。1フィンガーが3塩基を認識し、複数のフィンガーを結合させることで運用するが、隣り合うモジュールが干渉し認識塩基配列に影響を及ぼすため実験室レベルでの作製難易度は極めて高く、コストもかかるため現在ではあまり用いられていない。第二世代のゲノム編集技術であるTALENは基本的な構成はZFNと似ているものの、ZFNと比較して作製が容易であり広く普及した。DNA切断ドメインはZFNと同様FokIエンドヌクレアーゼであるが、植物の病原細菌Xanthomonas属のTALEタンパク質を特定の配列を認識するドメインとして利用している。1モジュールが1塩基を認識するため、ZFNで見られるような認識塩基配列への干渉が起きない。しかし、ZFNと同様TALENでもDNAの特定の配列の認識・結合をタンパク質が担っているため、標的配列ごとに設計しなおす必要がある。正確にタンパク質を設計するには依然として高度な技術が必要である。

CRISPR/Cas9 システムは、もともと細菌の有する獲得免疫機構を利用して開発され、2012年に初めて報告されて以降、最も一般的に使用されている第三世代のゲノム編集技術である。ゲノムを切断するCas9ヌクレアーゼと標的部位にCas9を誘導するguide RNA (gRNA) から構成され、簡便かつ高効率に配列特異的なDNA切断を行う。どのゲノム配列を標的とする場合でもCas9は共通であるため、標的配列に応じてgRNAを設計しなおすだけで非常に広範なゲノム配列を標的にできる。現在では研究者個人でgRNA配列の設計<sup>19)</sup>やgRNAの効率・特異性を評価<sup>20)</sup>できるウェブツールも多く存在し、gRNA合成を請け負う関連各社からCas9とともに容易に入手できるため、ゲノム編集を開始するための垣根は低い。また、本システムにおいてCas9はDNAを切断するハサミの一つに過ぎず、異なる性質を持つCas12a<sup>21)</sup>やCas3<sup>22)</sup>などハサミの種類は多岐にわたる。CRISPR/Casシステムは現在に至るまで改良が続けられ、多くの派生研究が展開されている。

### ゲノム編集により受精卵・胚での 遺伝子改変が容易に

ゲノム編集技術は、体細胞への遺伝子改変効率を劇的に向上させた。非常に広範な体細胞で標的遺伝子のノックアウト、ノックイン、点変異の導入を高効率に行うことが可能となり、遺伝子改変細胞を体細胞核移植のドナーとすることで数多くの遺伝子改変家畜が作出されている(図1)。体細胞核移植の最大の利点は、望ましい変異を有する体細胞をセレクトして使用できることである。上述した通りゲノム上の任意の箇所を切断するゲノム編集技術と鋳型となる核酸を細胞内へ同時に導入し、HR経路による修復を利用することで点変異の導入やノックインが可能であるが、通常切断されたDNAの修復はNHEJ経路が優位である<sup>23)</sup>。これは後述する受精卵・胚のゲノム編集でも同様であり、一般的にノックイン効率は低い。体細胞でのゲノム編集では、望む遺伝子改変が導入された細胞を選択し体細胞核移植ドナーとして使用することが可能であり、複雑なコンストラクトがノックインされた個体の作出も現実的となる。2021年現在でも体細胞核移植は家畜の遺伝子改変における主要なツールとなっている。

一方、ゲノム編集技術を用いることで供試数に限りのある受精卵や胚での高効率な遺伝子改変が可能となった。マウスやラットと比較し、家畜、特にブタでは卵細胞質内の脂肪含有量が非常に多く、前核内注入を行うには遠心処理により脂肪を片側へ寄せ、前核を可視化させなければならない<sup>3)</sup>(図2)。ゲノム編集に用いるヌクレアーゼには核移行シグナルを付与するのが一般的であり、受精卵や胚の細胞質に導入するだけで核内への移行が起こりゲノムDNAに変異を導入することが可能である<sup>24)</sup>。特にヒツジやヤギではCRISPR/Cas9システムを受精卵へのマイクロインジェクションにより導入することで遺伝子改変個体を作成している報告が多い(図3)。マイクロインジェクションでは分子量の大きな核酸の注

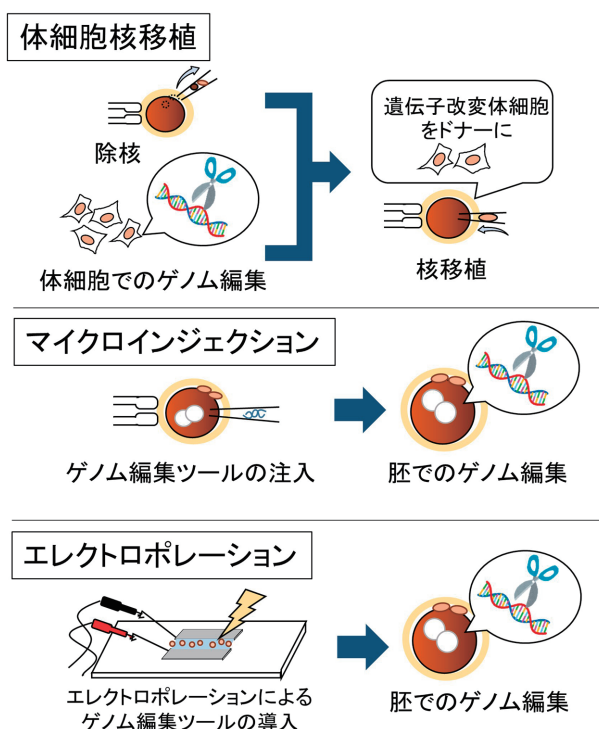


図1 ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変家畜の作出方法  
体細胞核移植法では、未受精の成熟卵から核を除き、核のドナーとして遺伝子改変細胞を用いる。マイクロインジェクション法とエレクトロポレーション法では受精卵・胚を使用する。体細胞核移植法とマイクロインジェクション法では、マイクロマニピュレーターを用いた顕微操作が必要となる。一方エレクトロポレーション法では同時に複数個の受精卵を処理できるのが特徴であるが、分子量の大きなタンパク質、核酸などの導入は現時点では難しい。

入も可能であり、家畜においてもワンステップでノックイン動物を作成した報告が挙がっている<sup>25,26)</sup>。さらに、生殖工学研究に家畜を用いる利点の一つは、屠場卵巣が利用できることである。これまでも多くの遺伝子改変家畜が屠場卵巣由来の卵母細胞から作出されており、初期胚を確保しやすいという点においては、胚でのゲノム編集との親和性は高い。

体細胞核移植における除核や細胞の注入、マイクロインジェクションなどの顕微操作を必要としないゲノム編集技術の初期胚への導入方法として、マウスではエレクトロポレーションが広く用いられている<sup>27)</sup>(図1)。筆者らはブタの受精卵においてエレクトロポレーションによるCRISPR/Cas9システムの導入とゲノム編集を成功させ<sup>28)</sup>、これまで複数の遺伝子ノックアウトブタを作成した<sup>29-32)</sup>。更に近年、ウシでもエレクトロポレーションによる受精卵へのCRISPR/Cas9システムの導入が報告され<sup>33-35)</sup>、実際に遺伝子改変ウシの作出が達成されている<sup>36)</sup>。エレクトロポレーションを用いる手法は簡便であり、胚を物理的に傷つけないため、適切な条件設定を行えば胚の生存性を高く維持で

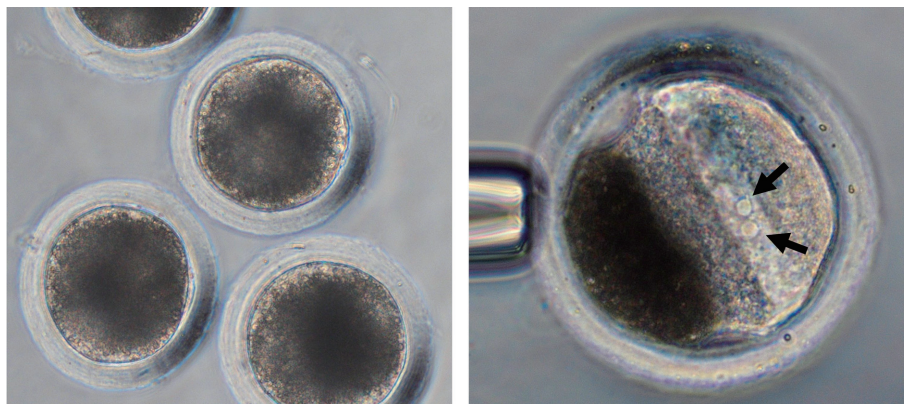


図2 ブタの体外受精卵  
通常ブタの卵母細胞・受精卵は脂肪滴が豊富で顕微鏡下では写真左のように黒く見える。右の写真は遠心処理を行って脂肪滴を寄せ、前核(黒矢印)を可視化した受精卵。

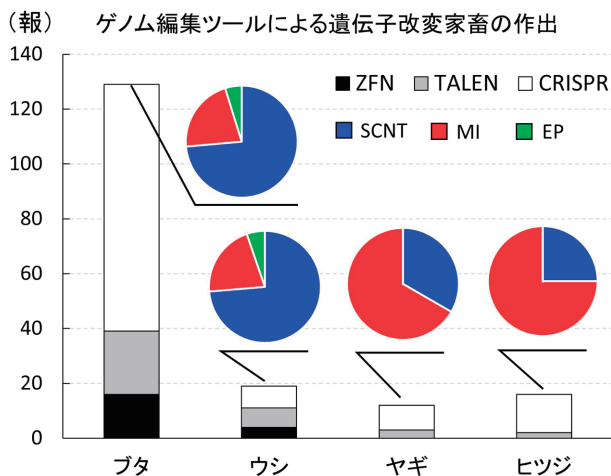


図3 ゲノム編集技術を使用して作出された遺伝子改変家畜に関する論文数

検索ワードは "pig", "cow", "goat", "sheep", "ZFN", "TALEN", "CRISPR" とし, PubMedに掲載されている論文から遺伝子改変産子・胎子の作出に関する研究のみをピックアップした。棒グラフは論文数を示している。棒グラフの脇にあるカラーの円グラフは, 全体の報告数のうち, 個体作出のために用いられたゲノム編集技術の導入方法の割合を示している。SCNT: 体細胞核移植法, MI: マイクロインジェクション法, EP: エレクトロポレーション法。

きる。しかし, ブタやウシでは未だエレクトロポレーションを用いた初期胚へのゲノム編集技術の導入によるノックイン個体の作出は報告されていない。エレクトロポレーションを用いて細胞内に分子を導入する場合, その効率(電圧やパルス強度に比例すると報告されている<sup>37)</sup>)。ブタやウシの体外受精卵はエレクトロポレーションに対する耐性がマウス受精卵と比較的(低く<sup>34, 38)</sup>)、分子量の大きな核酸の導入が現状は困難であり, 今後, さらなる改良が必要である。

### 初期胚のゲノム編集におけるモザイクの発生

上述の通り, 受精卵や胚へ直接ゲノム編集技術を導入することで, 体細胞核移植と比較し簡便にノックアウト動物を作出できるようになった。しかし, 異なる遺伝子型を持つ割球(細胞)が混在するモザイク胚(モザイク個体)の発生が問題となる<sup>39)</sup>。これは, 初期の卵割後にゲノム編集が起きることに起因するとされる。モザイク個体では遺伝子のノックアウトに起因する表現型が野生型アレルの残存により妨げられる。生殖系列に変異が導入されていれば, 兄妹交配によりF1世代を作製することで解決するが, 家畜では妊娠期間と性成熟に至るまでの期間がマウス・ラットに比べて圧倒的に長く, F1世代の作出にはブタで最短1年近く, ウシなどではそれ以上の期間を要する。その間飼養コストも膨らみ, 研究の進展が著しく妨げられる。一度の出産における産子数が1~2頭と限られるウシ, ヤギ, ヒツジでは特に問題となる。

一方, 体細胞核移植技術を用いて遺伝子改変動物を作出する場合, 核のドナーとなる細胞の遺伝子型を事前に確認, 選別できるため, 理論上は目的とする変異を有する個体が確実に得られモザイク個体が生まれる心配はない。欠点ともいえる技術的な難易度の高さを差し引いても余りあるほどの長所である。特に家畜でゲノム編集技術により遺伝子改変個体を作成する場合, どのような方法を採用するか, それぞれの利点と欠点を理解し慎重に戦略を練る必要がある。

### どのようなゲノム編集家畜が作出されているか: 実際の報告例と傾向

現在までの家畜におけるゲノム編集の目的は, 大きく分けると①疾患モデルの樹立, ②産業的に有用な形質の付与, ③疾病抵抗性の付与, ④バイオリクター(有用な医薬用タンパク質の製造; 動物工場)としての利用である。以下, それぞれの動物種で実際にどのような目的でゲノム編集が行われているかを概説する。

### I. ブタでのゲノム編集

ブタは家畜の中でもゲノム編集による遺伝子改変個体の作出報告が群を抜いて多い(図3)。ブタは周年繁殖可能であり、多産であることなど、非常に繁殖能力が高いことも遺伝子改変系統を樹立する際の長所となる。また、ブタはヒトと解剖学および生理学的に類似した特徴を持ち、ヒトモデル動物として注目されている。さらにブタはヒトと同じく雑食性であり、消化管や心血管系、免疫系、皮膚組織などもヒトとの共通点が多い<sup>1, 40)</sup>。生存させたままの経時的な採血や採材が充分量可能で、ヒトに近いサイズのブタを選ぶことでヒト用の医療デバイスをそのまま試用でき、外科手術トレーニングや外科的処置モデルの作製などの実験に利用することができる。ブタを用いることでげっ歯類など小型のモデル動物では得ることができない知見の獲得が可能であり、医学研究における有用性は高い。加えてブタからヒトへの組織・臓器の異種移植、すなわち臓器ドナーとしての活用が期待されている点もブタの特徴である<sup>41)</sup>。

#### 疾患モデルブタ

これまでのゲノム編集ブタに関する報告では、他の反芻類家畜と比較し疾患モデルの作出研究が多くみられる(図4)。この点もブタがヒトの医用モデルとして最適な動物であることを示す証拠である。ブタでは品種や系統、年齢を適切に選択することで、ヒトの医療で一般的に使用される外科的および非外科的処置(カテーテル治療、内視鏡検査など)が適用できる。これらの臨床手技は、サイズの問題から小型の疾患モデル動物では実施が困難または不可能である。外科的処置により作製した心疾患モデルや腎不全モデルも用いられているが、遺伝子改変によりこれまで小型げっ歯類のモデルでは成しえなかったヒトの病態の再現ならびに、先天性疾患モデルの作出がブタで可能となる。ゲノム編集を用いて作出された代表的な疾患モデルブタとして、血友病や糖尿病、重症免疫不全症、筋ジストロフィー、パーキンソン病、腫瘍モデル、心疾患モデルなどが挙げられ、多岐にわたる<sup>42)</sup>。ゲノム編集技術により疾患モデルブタの作出は今後より一層加速していくだろう。

#### 異種移植：ブタからヒトへの組織・臓器移植ドナー

ブタは臓器の大きさや構造がヒトと似ていることから、理想的な組織・臓器ドナーとしても注目されている。現在の臓器移植医療における慢性的なドナー不足を解決する有望な手段のひとつであるが、ブタが有する異種抗原が超急性拒絶反応を引き起こすため、そのままでは異種移植を実施することはできない。そこで、ゲノム編集の登場以前からGGTA1, CMAH, B4GALNT2といった異種抗原の発現に関わる遺伝子のノックアウトブタや、ホスト側の補体反応を抑制する目的でヒト補体活性制御遺伝子のノックインブタなどが作出されてきた<sup>41)</sup>。ゲノム編集技術が確立されて以降、異種抗原除去の試みは加速しZFN, TALEN, CRISPR/Cas9それぞれのゲノム編集技術を用いて、関連遺伝子のシ

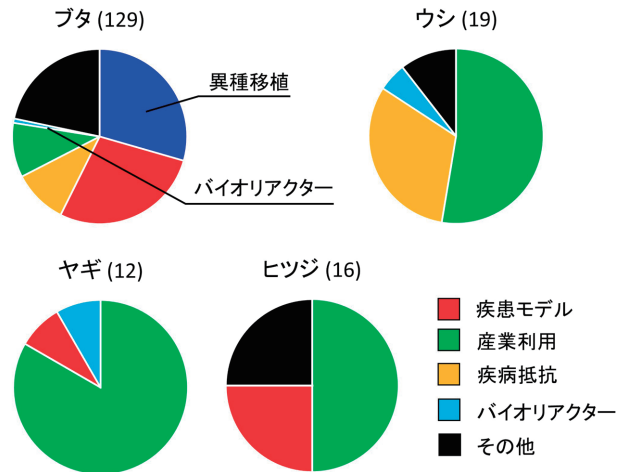


図4 各家畜種におけるゲノム編集の目的別割合  
括弧内の数字は報告された論文数を示している。今回取り上げた4種の家畜種のうち、ブタでは組織・臓器のヒトへの異種移植を目的とした研究が多数報告されている(円グラフ青色部分、「異種移植」と記載)。

ングル、ダブル、トリプルノックアウトブタが作出されている<sup>42)</sup>。

一方、懸念されているのがブタからヒトへの異種臓器・組織移植による人獣共通感染症への感染である。なかでも内在性レトロウイルス(porcine endogenous retrovirus: PERV)は、ブタのゲノム上に複数コピー存在しており、培養細胞レベルでヒトの細胞に感染することが報告されている。異種移植のリスクの一つとして認識されているものの、従来の遺伝子改変技術ではPERVの除去(不活化)は困難であった。しかし、ゲノム編集技術を用いることで複数コピーのPERVを同時に標的にすることが可能となり、2017年にはCRISPR/Cas9システムを用いてPERVを除去したブタが作出された<sup>43)</sup>。このように、ブタからヒトへの異種移植は、実現に向けて着実に歩みを続けている。

#### 疾病抵抗性

有用な形質を付与することは、産業動物の遺伝子改変では当然期待される事柄である。特に特定の伝染病に対して抵抗性を与えることは、淘汰により命を落とす動物数を減らし、経済的損失を抑制、飼育現場レベルではワクチネーションや群管理の労力削減など利点は多い。後述するがウシなど他の家畜においても重要視されている。特にブタで近年注目されたのは、豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)抵抗ブタである<sup>44)</sup>。PRRSは、世界的規模で養豚産業に莫大な経済的損失を引き起こしているが、ウイルス自体の遺伝的変異によりワクチンによる制圧が困難な伝染病の一つである。PRRSに関してはPRRSウイルスの感染に関わる受容体がCD163であることが明らかとなっていた。そこでこの研究は、CD163をゲノム編集によりノックアウトすること

で感染抵抗性を達成した画期的な成功例である。現在特に期待されているのはアフリカ豚熱といった致死率の高い家畜伝染病への抵抗性獲得であるが、感染に関与する決定的な因子が同定されていないこともあり、今後の基礎的研究成果が待たれている状況である。

## II. 反芻類家畜でのゲノム編集

ゲノム編集技術の登場によりウシ、ヤギ、ヒツジでも受精卵・胚で直接遺伝子改変を行うことが可能となった<sup>24)</sup>。技術的に簡便であり、比較的素早く遺伝子改変動物を得られるという利点があり、特にヤギとヒツジでは比較的多くのマイクロインジェクション法を用いた遺伝子改変個体の作出が報告されている(図3)。反芻類家畜では産業的に有用な形質獲得のため、ゲノム編集を活用するといった傾向がある<sup>20, 45)</sup>。今回取り上げているすべての畜種、特にヤギで多く報告されているのが、ノックアウトすることで骨格筋量を増加させることができる *MSTN* 遺伝子を標的としたゲノム編集であり、動物性タンパク質の生産性向上による将来的な全世界規模での食糧不足への対応が目的の一つとなっている<sup>28, 46-52)</sup>。さらに、動物の健康とウェルフェアの向上のため疾病抵抗性の付与やウシの無角化などが海外では試みられている<sup>20)</sup>。一方、ヤギやヒツジはヒトとサイズが近く動物モデルとしての活用も期待できる<sup>45)</sup>。

### ヒツジ

ヒツジでは絶対数は少ないながらもブタに次いでゲノム編集による疾患モデルの作製報告が多く(図4)、嚢胞性繊維症モデル<sup>53)</sup>、骨の低石灰化を伴う低フォスファターゼ症(*ALPL* 遺伝子への点変異の導入)<sup>54)</sup>、神経疾患(神経セロイドリポフスチン症)モデル<sup>55)</sup>が報告されており、反芻類家畜の中では、特にヒトへの医療応用が期待される動物種となっている。加えて、ヒツジでは胎子が子宮外への露出を伴う外科的侵襲に耐性があり、ヒト胎児モデルとして先天性疾患に対する胎子外科手術の手技開発・技術トレーニングが可能である<sup>56)</sup>。ヒツジでのゲノム編集による有用形質強化については、*MSTN* 遺伝子改変による産肉量増加<sup>49, 50, 52)</sup>のほか、羊毛の産業利用が行われていることから、ノックアウトにより毛量が増加する *FGF5* 遺伝子の改変個体<sup>57)</sup>や、毛色に関連する *ASIP* 遺伝子改変個体<sup>50, 58)</sup>がそれぞれCRISPR/Cas9 システムを使用して作出されている。

### ウシ・ヤギ

ウシとヤギでは、少数であるが疾患モデルも報告されているものの<sup>59)</sup>、産業的に重要な形質の改良、乳汁中への有用な生理活性物質の分泌、アレルギーの除去といった試みが多くみられ、ブタとは傾向が異なる(図4)。ヤギのゲノム編集で行われているのは多くが *MSTN* 改変による産肉量増加であり<sup>48, 51)</sup>、バイオリアクターとしてヒトラクトフェリンの乳汁中への分泌<sup>60)</sup>やアレルギーとなるβラクトグロブリンの除去(およびαラクトアルブミンの分泌)<sup>48, 61)</sup>も報告

されている。

一方、ウシにおけるゲノム編集では、*MSTN* 遺伝子改変による産肉量の増加<sup>47, 49)</sup>、産業的に被害が大きい疾病に対する抵抗性の付与(結核<sup>62-64)</sup>、乳房炎<sup>65, 66)</sup>)の他、乳汁に関連する報告でβラクトグロブリンのノックアウトによる乳汁中アレルギーの除去や<sup>67-69)</sup>、乳糖を分解・吸収できない乳糖不耐症対策としてゲノム編集によりあらかじめラクターゼを乳汁中に分泌させ、乳糖を分解させやすくするという試みもある<sup>70)</sup>。さらにウシでは、動物愛護の観点、および畜産業従事者の安全性の向上のため遺伝子ノックインにより無角化を試みていることが特徴的といえる<sup>71, 72)</sup>。

以上の様に、反芻類家畜では産業的に有用な形質を獲得させるための研究が目立つ。一方、注意すべき点として、研究者と消費者での意識の乖離がある<sup>20)</sup>。例えばゲノム編集を用いたノックアウト法では、従来の遺伝子組み換えと異なり個体のゲノム上に外来遺伝子断片を残さない。そのため、突然変異により自然に発生した有用形質を残していく交配育種(品種改良)と同様であるという考え方もできる。しかし、家畜は一般消費者の生活に深く根付いた動物であり、実験動物としてのげっ歯類や霊長類などとは異なる事情を有している。ゲノム編集動物の食利用については今後のゲノム編集の取り扱いとガバナンスをめぐる世界的な決定に依るところが大きく、海外と本邦でも家畜を取り巻く事情は異なるが、研究者らは高い倫理観と確かな知識を持ってゲノム編集に取り組む必要がある。

## おわりに

ゲノム編集技術の登場により、遺伝子改変家畜の作出報告は年々増加している。医学研究や再生医療への利用が期待されるブタでは、必要な遺伝子改変を施した個体をオンデマンドに供給できるようになれば、研究の発展を強力に推し進めることが期待できる。ウシやヤギ、ヒツジでは産業動物としての強みをさらに活かし、人類の生活をより豊かにするため研究が進められている。現時点での技術的な制限も今後徐々に解決されていくものと期待され、急速に進展していくゲノム編集技術を確かな知識と倫理観を持って運用・適用していくことで、家畜はこれまで以上の価値を人類に与えてくれるであろう。

## 文 献

- 1) Bahr, A. and Wolf, E. (2012): Domestic animal models for biomedical research. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 Suppl 4, 59-71, doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02056.x.
- 2) Shiue, Y.L., Yang, J.R., Liao, Y.J., Kuo, T.Y., Liao, C.H., Kang, C.H., Tai, C., Anderson, G.B. and Chen, L.R. (2016): Derivation of porcine pluripotent stem cells for biomedical research. *Theriogenology*, 86, 176-181, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.030.
- 3) Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and

- Brinster, R.L. (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680–683, doi:10.1038/315680a0.
- 4) Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810–813, doi:10.1038/385810a0.
  - 5) Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280, 1256–1258, doi:10.1126/science.280.5367.1256.
  - 6) Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. (1999): Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 17, 456–461, doi:10.1038/8632.
  - 7) Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. and Campbell, K.H. (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407, 86–90, doi:10.1038/35024082.
  - 8) Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C. (2000): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289, 1188–1190, doi:10.1126/science.289.5482.1188.
  - 9) Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. and Bishop, M. (2000): Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotechnol.*, 18, 1055–1059, doi:10.1038/80242.
  - 10) Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J. and Prather, R.S. (2002): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295, 1089–1092, doi:10.1126/science.1068228.
  - 11) Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Matsushita, H., Sathiyaselan, J., Sullivan, E.J., Kakitani, M., Tomizuka, K., Ishida, I. and Robl, J.M. (2004): Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, 36, 775–780, doi:10.1038/ng1373.
  - 12) Niemann, H. and Lucas-Hahn, A. (2012): Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 Suppl 5, 2–10, doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x.
  - 13) Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H. and van Gent, D.C. (1998): Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.*, 8, 483–489, doi:10.1016/s0962-8924(98)01383-x.
  - 14) Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 1156–1160, doi:10.1073/pnas.93.3.1156.
  - 15) Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A., Gregory, P.D., Pabo, C.O. and Rebar, E.J. (2007): An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 25, 778–785, doi:10.1038/nbt1319.
  - 16) 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, doi:10.1534/genetics.110.120717.
  - 17) 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, doi:10.1126/science.1231143.
  - 18) 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, doi:10.1126/science.1232033.
  - 19) Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Lindsey, K., Zhang, X. and Jin, S. (2020): CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Adv. Sci.*, (Weinh), 7, 1902312, doi:10.1002/adv.201902312.
  - 20) Singh, P. and Ali, S.A. (2021): Impact of CRISPR-Cas9-Based Genome Engineering in Farm Animals. *Vet. Sci.*, 8, doi:10.3390/vetsci8070122.
  - 21) 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, doi:10.1016/j.cell.2015.09.038.
  - 22) Morisaka, H., Yoshimi, K., Okuzaki, Y., Gee, P., Kunihiko, 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, doi:10.1038/s41467-019-13226-x.
  - 23) Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. and Takeda, S. (2006): Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 5, 1021–1029, doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.022.
  - 24) Navarro-Serna, S., Vilarino, M., Park, I., Gadea, J. and Ross, P.J. (2020): Livestock Gene Editing by One-step Embryo Manipulation. *J. Equine. Vet. Sci.*, 89, 103025, doi:10.1016/j.jevs.2020.103025.

- 25) Owen, J.R., Hennig, S.L., McNabb, B.R., Mansour, T.A., Smith, J.M., Lin, J.C., Young, A.E., Trott, J.F., Murray, J.D., Delany, M.E., Ross, P.J. and Van Eenennaam, A.L. (2021): One-step generation of a targeted knock-in calf using the CRISPR-Cas9 system in bovine zygotes. *BMC Genomics*, 22, 118, doi:10.1186/s12864-021-07418-3.
- 26) Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., Ding, C., Qin, J., Liu, L., Wang, W., Liu, J., Huang, X., Wei, H. and Zhang, P. (2015): Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR/Cas9-Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes. *Sci. Rep.*, 5, 16705, doi:10.1038/srep16705.
- 27) Sato, M., Takabayashi, S., Akasaka, E. and Nakamura, S. (2020): Recent Advances and Future Perspectives of In Vivo Targeted Delivery of Genome-Editing Reagents to Germ Cells, Embryos, and Fetuses in Mice. *Cells*, 9, doi:10.3390/cells9040799.
- 28) Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L.T., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S., Suzuki, S., Nakai, M., Hashimoto, M., Yasue, A., Matsuhisa, M., Noji, S., Fujimura, T., Fuchimoto, D. and Otoi, T. (2016): Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci. Adv.*, 2, e1600803, doi:10.1126/sciadv.1600803.
- 29) Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Le, Q.A., Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D.I. and Otoi, T. (2018): Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. *PLoS One*, 13, e0206360, doi:10.1371/journal.pone.0206360.
- 30) Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Le, Q.A., Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D.I. and Otoi, T. (2019): Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation. *Anim. Sci. J.*, 90, 55–61, doi:10.1111/asj.13129.
- 31) Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Sawamoto, O., Kikuchi, T., Doi, M. and Otoi, T. (2020): Efficient generation of GGTA1-deficient pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into in vitro-fertilized zygotes. *BMC Biotechnol.*, 20, 40, doi:10.1186/s12896-020-00638-7.
- 32) Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Sawamoto, O., Kikuchi, T. and Otoi, T. (2021): One-Step Generation of Multiple Gene-Edited Pigs by Electroporation of the CRISPR/Cas9 System into Zygotes to Reduce Xenoantigen Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, doi:10.3390/ijms22052249.
- 33) Miao, D., Giassetti, M.I., Ciccarelli, M., Lopez-Biladeau, B. and Oatley, J.M. (2019): Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. *Biol. Reprod.*, 101, 177–187, doi:10.1093/biolre/iox075.
- 34) Namula, Z., Wittayarat, M., Hirata, M., Hirano, T., Nguyen, N.T., Le, Q.A., Fahrudin, M., Tanihara, F. and Otoi, T. (2019): Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 55, 598–603, doi:10.1007/s11626-019-00385-w.
- 35) Camargo, L.S.A., Owen, J.R., Van Eenennaam, A.L. and Ross, P.J. (2020): Efficient One-Step Knockout by Electroporation of Ribonucleoproteins Into Zona-Intact Bovine Embryos. *Front. Genet.*, 11, 570069, doi:10.3389/fgene.2020.570069.
- 36) Ciccarelli, M., Giassetti, M.I., Miao, D., Oatley, M.J., Robbins, C., Lopez-Biladeau, B., Waqas, M.S., Tibary, A., Whitelaw, B., Lillico, S., Park, C.H., Park, K.E., Telugu, B., Fan, Z., Liu, Y., Regouski, M., Polejaeva, I.A. and Oatley, J.M. (2020): Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout males. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 117, 24195–24204, doi:10.1073/pnas.2010102117.
- 37) 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, doi:10.1038/srep11315.
- 38) Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, T.V., Kunihara, T., Nii, M., Hirata, M., Takemoto, T. and Otoi, T. (2018): Effects of voltage strength during electroporation on the development and quality of in vitro-produced porcine embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 53, 313–318, doi:10.1111/rda.13106.
- 39) Mehravar, M., Shirazi, A., Nazari, M. and Banan, M. (2019): Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev. Biol.*, 445, 156–162, doi:10.1016/j.ydbio.2018.10.008.
- 40) Lunney, J.K., Van Goor, A., Walker, K.E., Hailstock, T., Franklin, J. and Dai, C. (2021): Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci. Transl. Med.*, 13, eabd5758, doi:10.1126/scitranslmed.abd5758.
- 41) Lu, T., Yang, B., Wang, R. and Qin, C. (2019): Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front. Immunol.*, 10, 3060, doi:10.3389/fimmu.2019.03060.
- 42) Tanihara, F., Hirata, M. and Otoi, T. (2021): Current status of the application of gene editing in pigs. *J. Reprod. Dev.*, 67, 177–187, doi:10.1262/jrd.2021-025.
- 43) Niu, D., Wei, H.J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I.H., Zhao, H.Y., Wang, Y., Kan, Y., Shrock, E., Leshia, E., Wang, G., Luo, Y., Qing, Y., Jiao, D., Zhao, H., Zhou, X., Wang, S., Wei, H., Guell, M., Church, G.M. and Yang, L. (2017): Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 357, 1303–1307, doi:10.1126/science.aan4187.
- 44) Burkard, C., Lillico, S.G., Reid, E., Jackson, B., Mileham, A.J., Ait-Ali, T., Whitelaw, C.B. and Archibald, A.L. (2017): Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog.*, 13, e1006206,



- doi:10.1371/journal.ppat.1006206.
- 45) Kalds, P., Zhou, S., Cai, B., Liu, J., Wang, Y., Petersen, B., Sonstegard, T., Wang, X. and Chen, Y. (2019): Sheep and Goat Genome Engineering: From Random Transgenesis to the CRISPR Era. *Front. Genet.*, 10, 750, doi:10.3389/fgene.2019.00750.
  - 46) Rao, S., Fujimura, T., Matsunari, H., Sakuma, T., Nakano, K., Watanabe, M., Asano, Y., Kitagawa, E., Yamamoto, T. and Nagashima, H. (2016): Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Mol. Reprod. Dev.*, 83, 61–70, doi:10.1002/mrd.22591.
  - 47) Gim, G.M., Kwon, D.H., Eom, K.H., Moon, J., Park, J.H., Lee, W.W., Jung, D.J., Kim, D.H., Yi, J.K., Ha, J.J., Lim, K.Y., Kim, J.S. and Jang, G. (2021): Production of MSTN-mutated cattle without exogenous gene integration using CRISPR-Cas9. *Biotechnol. J.*, e2100198, doi:10.1002/biot.202100198.
  - 48) Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I.A. and Chen, C. (2014): Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 9, e106718, doi:10.1371/journal.pone.0106718.
  - 49) Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R., Long, C.R., Pryor, J.H., King, T.J., Lillico, S.G., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Whitelaw, C.B. and Fahrenkrug, S.C. (2015): Genome edited sheep and cattle. *Transgenic. Res.*, 24, 147–153, doi:10.1007/s11248-014-9832-x.
  - 50) Wang, X., Niu, Y., Zhou, J., Yu, H., Kou, Q., Lei, A., Zhao, X., Yan, H., Cai, B., Shen, Q., Zhou, S., Zhu, H., Zhou, G., Niu, W., Hua, J., Jiang, Y., Huang, X., Ma, B. and Chen, Y. (2016): Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci. Rep.*, 6, 32271, doi:10.1038/srep32271.
  - 51) Yu, B., Lu, R., Yuan, Y., Zhang, T., Song, S., Qi, Z., Shao, B., Zhu, M., Mi, F. and Cheng, Y. (2016): Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev. Biol.*, 16, 26, doi:10.1186/s12861-016-0126-9.
  - 52) Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Zhang, W., Jin, J., Li, T., Zhao, R., Yu, X., Zuo, Q. and Li, B. (2018): CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *J. Cell. Biochem.*, doi:10.1002/jcb.27474.
  - 53) Fan, Z., Perisse, I.V., Cotton, C.U., Regouski, M., Meng, Q., Domb, C., Van Wettere, A.J., Wang, Z., Harris, A., White, K.L. and Polejaeva, I.A. (2018): A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight*, 3, doi:10.1172/jci.insight.123529.
  - 54) Williams, D.K., Pinzon, C., Huggins, S., Pryor, J.H., Falck, A., Herman, F., Oldeschulte, J., Chavez, M.B., Foster, B.L., White, S.H., Westhusin, M.E., Suva, L.J., Long, C.R. and Gaddy, D. (2018): Genetic engineering a large animal model of human hypophosphatasia in sheep. *Sci. Rep.*, 8, 16945, doi:10.1038/s41598-018-35079-y.
  - 55) Eaton, S.L., Proudfoot, C., Lillico, S.G., Skehel, P., Kline, R.A., Hamer, K., Rzechorzek, N.M., Clutton, E., Gregson, R., King, T., O'Neill, C.A., Cooper, J.D., Thompson, G., Whitelaw, C.B. and Wishart, T.M. (2019): CRISPR/Cas9 mediated generation of an ovine model for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1 disease). *Sci. Rep.*, 9, 9891, doi:10.1038/s41598-019-45859-9.
  - 56) Morrison, J.L. (2008): Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 35, 730–743, doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04975.x.
  - 57) Li, W.R., Liu, C.X., Zhang, X.M., Chen, L., Peng, X.R., He, S.G., Lin, J.P., Han, B., Wang, L.Q., Huang, J.C. and Liu, M.J. (2017): CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. *FEBS. J.*, 284, 2764–2773, doi:10.1111/febs.14144.
  - 58) Zhang, X., Li, W., Liu, C., Peng, X., Lin, J., He, S., Li, X., Han, B., Zhang, N., Wu, Y., Chen, L., Wang, L., MaYila, Huang, J. and Liu, M. (2017): Alteration of sheep coat color pattern by disruption of ASIP gene via CRISPR Cas9. *Sci. Rep.*, 7, 8149, doi:10.1038/s41598-017-08636-0.
  - 59) Hao, F., Yan, W., Li, X., Wang, H., Wang, Y., Hu, X., Liu, X., Liang, H. and Liu, D. (2018): Generation of Cashmere Goats Carrying an EDAR Gene Mutant Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Int. J. Biol. Sci.*, 14, 427–436, doi:10.7150/ijbs.23890.
  - 60) Cui, C., Song, Y., Liu, J., Ge, H., Li, Q., Huang, H., Hu, L., Zhu, H., Jin, Y. and Zhang, Y. (2015): Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of beta-lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci. Rep.*, 5, 10482, doi:10.1038/srep10482.
  - 61) Zhu, H., Liu, J., Cui, C., Song, Y., Ge, H., Hu, L., Li, Q., Jin, Y. and Zhang, Y. (2016): Targeting Human alpha-Lactalbumin Gene Insertion into the Goat beta-Lactoglobulin Locus by TALEN-Mediated Homologous Recombination. *PLoS One*, 11, e0156636, doi:10.1371/journal.pone.0156636.
  - 62) Wu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, M., Lv, J., Liu, J. and Zhang, Y. (2015): TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 112, E1530–1539, doi:10.1073/pnas.1421587112.
  - 63) Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J. and Zhang, Y. (2017): Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome. Biol.*, 18, 13, doi:10.1186/s13059-016-1144-4.
  - 64) Yuan, M., Zhang, J., Gao, Y., Yuan, Z., Zhu, Z., Wei, Y., Wu, T., Han, J. and Zhang, Y. (2021): HMEJ-based safe-harbor genome editing enables efficient generation of cattle with increased resistance to tuberculosis. *J. Biol. Chem.*, 296, 100497, doi:10.1016/j.jbc.2021.100497.
  - 65) Liu, X., Wang, Y., Tian, Y., Yu, Y., Gao, M., Hu, G., Su, F., Pan, S., Luo, Y., Guo, Z., Quan, F. and Zhang, Y. (2014): Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus

- using zinc-finger nucleases. *Proc. Biol. Sci.*, 281, 20133368, doi:10.1098/rspb.2013.3368.
- 66) Liu, X., Wang, Y., Guo, W., Chang, B., Liu, J., Guo, Z., Quan, F. and Zhang, Y. (2013): Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.*, 4, 2565, doi:10.1038/ncomms3565.
- 67) Wei, J., Wagner, S., Maclean, P., Brophy, B., Cole, S., Smolenski, G., Carlson, D.F., Fahrenkrug, S.C., Wells, D.N. and Laible, G. (2018): Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Sci. Rep.*, 8, 7661, doi:10.1038/s41598-018-25654-8.
- 68) Sun, Z., Wang, M., Han, S., Ma, S., Zou, Z., Ding, F., Li, X., Li, L., Tang, B., Wang, H., Li, N., Che, H. and Dai, Y. (2018): Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. *Sci. Rep.*, 8, 15430, doi:10.1038/s41598-018-32024-x.
- 69) Singina, G.N., Sergiev, P.V., Lopukhov, A.V., Rubtsova, M.P., Taradajnic, N.P., Ravin, N.V., Shedova, E.N., Taradajnic, T.E., Polejaeva, I.A., Dozev, A.V., Brem, G., Dontsova, O.A. and Zinovieva, N.A. (2021): Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 496, 48–51, doi:10.1134/S1607672921010099.
- 70) Su, X., Wang, S., Su, G., Zheng, Z., Zhang, J., Ma, Y., Liu, Z., Zhou, H., Zhang, Y. and Zhang, L. (2018): Production of microhomologous-mediated site-specific integrated LacS gene cow using TALENs. *Theriogenology*, 119, 282–288, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.07.011.
- 71) Carlson, D.F., Lancto, C.A., Zang, B., Kim, E.S., Walton, M., Oldeschulte, D., Seabury, C., Sonstegard, T.S. and Fahrenkrug, S.C. (2016): Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat. Biotechnol.*, 34, 479–481, doi:10.1038/nbt.3560.
- 72) Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A., Haderer, K.G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. and Petersen, B. (2020): CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Sci. Rep.*, 10, 13570, doi:10.1038/s41598-020-70531-y.