

【総説】

遺伝子改変を可能とする発生工学技術の歴史と進展

徳永 暁憲

福井大学ライフサイエンス支援センター・生物資源部門

要約

発生工学技術の進展に伴い、細胞のみならず生体レベルで遺伝子機能を解析する事が可能となり、これまでは主に遺伝子ターゲティング法を用いた遺伝子改変マウスの作出を通じて生体恒常性や疾患に関わる個々の遺伝子に関する機能の検証が進められてきた。しかしながら、従来法では胚性幹細胞（ES細胞）での相同組換えおよびES細胞由来のキメラマウスの産出が必要となるため、生体リソースでの研究はマウスなど一部の生物種に限定されていた。近年のCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集技術の登場によってその様相は一変し、生物種や細胞種を問わず遺伝学的解析が可能となったことで、発生・老化研究などの生体を対象とする生命科学研究分野において革新的な技術展開が予想されている。また食料品の品種改良や資源エネルギーなど幅広い分野への技術応用も期待されており、本稿ではこれまで発生工学技術がどのようなブレイクスルーを通して発展してきたのかその歴史を概説すると共に、様々な研究分野において今後の貢献が期待される最新のゲノム改変技術を紹介する。

キーワード：TALEN、CRISPR/Cas9、相同組換え、非相同末端結合、マイクロホモロジー媒介末端結合

1. はじめに

ゲノム編集技術の登場により、これまで特定の生物種に限定されていた遺伝子改変操作が微生物、昆虫および動植物を含む様々な生物種において利用可能となったことで非モデル動物での新たな研究の可能性が開かれた。特にCRISPR/Cas9によるゲノム編集では遺伝子改変に伴う煩雑な操作が大幅に簡略化されたことで、多くの研究者にとって身近なツールとなり急速に普及している。最近では遺伝子の欠損や置換だけでなく染色体レベルでのゲノム編集（大規模欠損や転座など）の報告もなされており、その発展は目覚ましい。本稿では、これまでに発生工学研究が幾つものブレイクスルーを経て進展してきたその歴史を振り返りつつ、近年の実用的なゲノム編集技術基盤について概説する。また、後半では様々な研究分野での貢献が期待される最新の遺伝子改変動物の作

出法についてその動向を紹介したい。

2. これまでの遺伝子組換えマウス作出法としての発生工学研究

ヒトゲノムプロジェクトの完了が2003年に宣言され、またその後には次世代高速シーケンサーの開発も伴ってゲノムの解読能力が飛躍的に向上した。そのため現在までにヒトを含む多様な生物種の遺伝子配列情報が明らかとなっている。加えて生物種間で見られるゲノム多様性やヒト疾患関連遺伝子に関する情報も蓄積されつつあり、今世紀に入って遺伝子機能や形質を理解するためのポストゲノム研究が精力的に進められている。しかし特定の遺伝子異常と生体で生じる病態との相関関係を遺伝子配列の一次情報から解明することは容易では無く、その解明には特定の遺伝子配列を人為的に操作して細胞や個体レベルで解析を進める必要がある。そのため遺伝学的アプローチを可能とする発生工学技術は、発生や老化研究など生体レベルでの遺伝子機能を解析する上で極めて重要なツールと位置付けられ進展してきた。

発生工学の基盤となる技術は1980年代に確立され、1989年にCapecchiらがES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製を成功させたことが最初のブレイクスルーとなり^[1]、汎用性の高いマウスを主要なモデル生物とし

連絡先：徳永暁憲 〒910-1193

福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

TEL：0776-61-8427

FAX：0776-61-8124

E-mail：aktoku@u-fukui.ac.jp

て発展してきた (図 1 a)。従来の遺伝子組換え技術では胚形成に寄与する ES 細胞の樹立ならびに変異 ES 細胞株に由来するキメラマウスの作製が必須であったが、当初は 129 系統の特殊なマウス ES 細胞以外から遺伝子改変動物を作成することが難しく 129 系統と C57BL/6 系統との交雑系として研究に利用されていた。遺伝子背景の均一化が必要な研究課題では数世代に渡る戻し交配を行うなど個体の作製および解析に年単位の期間を要していた。しかしその後 2006 年に報告された iPS 細胞の登場によって幹細胞研究が急速に進展したことで C57BL/6 系統由来の ES 細胞株 (JM8 など) が複数樹立され^[2]、近年では数ヶ月単位で遺伝子背景が均一なマウス系統を作製することが可能となっている。

2010 年代に入って米国 National Institutes of Health (NIH) と欧州 Sanger Institute を中心に国際ノックアウトマウスコンソーシアム (International Knockout Mouse Consortium : IKMC) が立ち上がり、各遺伝子の Targeting vector (約 25,000 遺伝子) および変異 ES 細胞株 (約 20,000 遺伝子) の作製が精力的に進められた。現在は 2011 年に発足した国際マウス表現型解析コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium : IMPC) へと業務が引継がれ、基礎医学や創薬研究に役立てることを目的として国際的な基準に基づいた表現型解析が行われている。既に 5,000 系統近くのノックアウトマウスの表現型が報告されており 2021 年を目処に遺伝子機能カタログの作成が進められている^[3]。IMPC のサイトでは有用な遺伝子情報が公開されており、新たに遺伝子改変マウスを作製する際には是非本サイトを参考にして頂きたい (www.mousephenotype.org)。

この様に ES 細胞およびキメラマウスを経て作出される遺伝子改変動物は有用なツールとして利用されてきた一方で、生殖系列に寄与する ES 細胞の取扱いには煩雑な手間を要し、キメラマウスの作出にはマニピレーターなどの設備環境が必要となるなど作製上の制約も多かった。そのため一般の研究ツールとしては敷居の高いものとなっていた。加えて最近ではマウスで得られる解析結果がヒトの病態を反映しないケースも散見され、糖尿病やアルツハイマー型認知症など発症メカニズムが未だ不明な疾患の場合、単一遺伝子変異だけで手間と時間を要する本手法で病態を再現することは困難であった。またヒトとマウス間で異なる分子機構が働くケースも想定され、近年では霊長類など新たなモデル動物の利用も求められており従来のジーンターゲット法に代わる遺伝子組換え法が望まれていた。

3. ゲノム編集技術の登場

1) 人工ヌクレアーゼ ZFN (Zinc Finger Nuclease)

従来の遺伝子改変法に代わる革新的な技術として 1996 年に報告されたのが ZFN によるゲノム編集法である^[4]。この新技術の出現は、発生工学技術が現在の形まで進展する上での大きなブレイクスルーとなっている。これまでに DNA 二本鎖切断 (double-strand

break : DSB) が生じた際にはゲノム修復機構が誘導され遺伝子変異が促進されることが知られていた。そのため特定の遺伝子領域を人為的に切断する事が出来れば遺伝子欠損が可能となるという概念に基づきゲノム編集技術は開発された。ZFN は複数の ZF モチーフに制限酵素 FokI のヌクレアーゼドメインを融合させた構造からなり 28 アミノ酸の各 ZF モジュールが 3 塩基配列に対応し、複数の ZF モジュールを連結させる事で目的の遺伝子配列を認識する事が出来る (図 1 b)。ES 細胞を用いた従来の遺伝子改変法と異なり ZFN によるゲノム編集法は細胞種、動物種を問わずに利用出来る利点がある一方、連結した ZF モジュールが互いに干渉し DNA 配列の認識特異性が変化してしまうため配列に対応する ZF モジュールを予測して構築する事が困難であり機能的な ZFN の構築に極めて煩雑な作業を要するという欠点があった。加えてコマーシャルベースの価格が非常に高額であったため注目を浴びたが一般的な技術として普及するには至らなかった。

2) TALEN (transcription activator-like effector nuclease)

ZFN の報告から 10 年以上の期間を経て、汎用型の第二世代として登場したのが 2010 年に報告された TALEN である^[5]。TALEN はキサントモナス属の細菌由来の TALE ヌクレアーゼを改変したシステムで概念的には ZFN を踏襲しており、ATGC の各ヌクレオチドを認識する 34 アミノ酸からなる TALE モジュール部分が DNA 結合ドメインとして働き ZFN と同様に FokI ヌクレアーゼを付加させた融合タンパクから成る (図 1 c)。TALE は ZFN の問題点を見事にクリアしており各モジュール同士の干渉が少なく目的配列に対応する TALE を構築する事が出来るようになった^[6]。TALEN を用いたゲノム編集技術は実用性の高い技術として認知され、現在 Addgene などでアカデミア向けにマテリアルが配布されており多少の分子生物学的経験があれば誰もが簡単に自作して研究に用いることが可能となっている (www.addgene.org/genome-engineering/)。TALEN 法は 2 量体を形成することで二本鎖 DNA の切断活性を発揮するため高い特異性を有する反面、目的の配列に対応したモジュールを設計・構築するには一定の労力が必要とされ依然として利便性の面での課題は残されていた。

3) CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)

ZFN や TALEN と異なる簡便な手法として登場したのが第三世代となる CRISPR-Cas9 システムである^[7]。高い特異性を示す TALEN 法にも利点はあるが、CRISPR/Cas9 の持つ利便性・汎用性の高さから瞬く間に普及し現在ではゲノム編集技術の主流となっている。CRISPR/Cas9 システムは原核生物のもつ外来 DNA の排除機構を応用したもので、元々はファージなど細胞内に侵入した外来 DNA に対する防御機構として機能する。まず

Cas タンパク質群の働きによって外来 DNA がゲノム上の CRISPR 領域に取り込まれ、その後同領域から転写された単鎖 CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化型 crRNA (tracrRNA) が Cas9 タンパク質と複合体を形成し相補的な外来 DNA を認識して切断・排除する。Cas9 タンパク質は RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼであり、PAM (protospacer adjacent motif) 配列を認識して結合した Cas9 が二本鎖 DNA を開裂し、HNH ドメインおよび RuvC ドメインの持つヌクレアーゼ活性によって相補鎖および非相補鎖の切断がそれぞれ誘導される (図 1 d) ^[8,9,10]。CRISPR/Cas9 による遺伝子改変は 2012 年に発表され ^[11,12]、翌 2013 年に受精卵上でのゲノム編集が報告されてから僅か 5 年足らずだが ^[13,14]、CRISPR に関連する論文は既に 10,000 報近くに達していることからゲノム編集技術が多くの研究者にとって身近な技術となったことを示している。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集では crRNA と tracrRNA を人工的に繋いだガイド RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を細胞に共導入するだけでゲノム DNA を配列特異的に切断できる。この簡便さが広く利用されている理由であろう。これまで変異導入効率に違いは見られるものの様々な細胞や生物で CRISPR/Cas9 により遺伝子変異を導入した報告がなされ、また驚異的なスピードで技術革新が進んでおり遺伝子組換えマウスを始めとする個体レベルでの研究の様相と進展スピードを一変させつつある。最近の報告では CRISPR/Cas9 を用いる際に非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) の選択的阻害剤 SCR7 を加えることで相同組換え効率が数倍まで促進されることも明らかとなっている ^[15,16]。SCR7 は DSB の修

復に働く Ligase IV の活性をブロックすることで NHEJ 経路を阻害し、結果として CRISPR-Cas9 システムが介在する相同組換え (HDR) 効率を改善するようだ。他にも小分子 L755,507 でも同様の効果が得られる事が報告されており ^[17]、これらの小分子の毒性が低く多様な細胞種に適用できることから、鋳型 DNA を介する遺伝子挿入や一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を介する SNPs 編集の効率促進に利用できる有用なツールと期待されている。このように次々に新たな手法が報告されている段階であり、今後のスタンダードとなる手法が確立されるまでは有用な改良技術を自らの研究に積極的に取り入れていく姿勢が重要であろう。

4. 多彩な改変技術の開発

生体モデルでの遺伝子欠損に関し、既に CRISPR システムで十分な成果が挙がってきており、現在は GFP などのカセットの挿入や大きな遺伝子断片の効率的な挿入法の開発が課題となっている。例えば Exon 部を挟んで 2 箇所に loxp 配列の挿入を必要とする flox マウスの作成効率は 1 割程度と低く ^[13,14]、所謂コンディショナルノックアウト動物の簡便な作出法の開発が精力的に進められてきている。次では最近報告された有用な遺伝子挿入 (ノックイン) 法を幾つか紹介する。

1) 相同組換え効率を高めたノックイン手法

切断された DNA 部位は NHEJ により速やかに修復されるが、その際に DNA 変異が導入されることで遺伝子破壊が引き起こされる。また切断部位の修復時にドナー DNA を導入しておくことで相同組換え (homology-

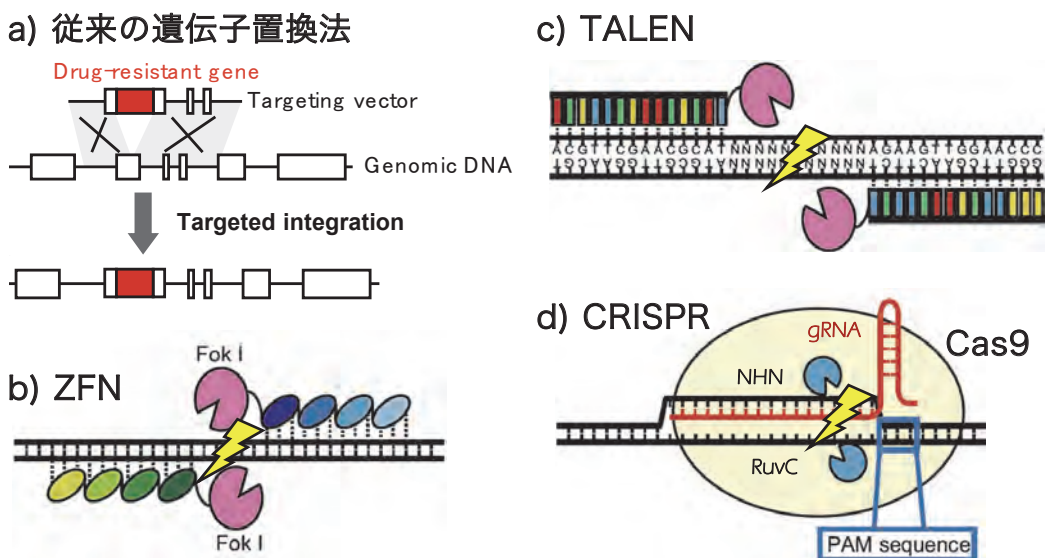


図 1 : 従来の遺伝子置換法および人工制限酵素 ZFN, TALEN, CRISPR の模式図

- 遺伝子置換法：両端に標的遺伝子座と相同な領域を持つターゲティングベクターを構築し、薬剤耐性遺伝子 (赤色) の発現を指標に相同組換え ES 細胞株を同定する。
- ZFN：1 モジュール毎に 3 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- TALEN：1 モジュール毎に 1 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- CRISPR/Cas9 システム：gRNA により相補的な DNA 配列を認識し切断する。HNH ドメインが gRNA と相補的な DNA 鎖を切断するのに対し RuvC ドメインは非相補的 DNA 鎖を切断する。(文献 7 より改変)

directed repair : HDR) により 1~数十塩基の DNA 配列を容易にノックインすることも可能となっている (図 2 a)。受精卵上では数百塩基以上のプラスミド DNA をノックインすることは HDR の活性が低いこともあり困難であったが、その後の解析から二本鎖 DNA に比べ ssODN の導入効率が高いことが示され、現在はドナー DNA として ssODN を導入する手法の効率が良いとされている。しかしながら ssODN は 200 塩基程度までしか合成できず大きな DNA 配列を ssODN でノックインすることは出来ていなかった。2016 年に吉見らが報告した 2 ヒット 2 オリゴ法 (2H2OP 法) では CRISPR/Cas9 システムにより標的部位を切断し、更に ssODN を繋ぎ目に利用する事で 5.5 キロ塩基の CAG-GFP カセットを標的部位へ効率的にノックインする事に成功している^[18]。2H2OP 法を利用することでそれまで不可能であった BAC プラスミド (~数百キロ塩基) のノックインや複数の遺伝子を含む DNA 領域の置換なども可能になり、現在ではマウス遺伝子をヒト遺伝子に置換する「ヒト化動物」の作製も可能となってきた。また長鎖の一本鎖 DNA (lsODN) の作製方法も新たに開発され、lsODN をドナー DNA として利用することで GFP などの遺伝子を効率的かつ正確にノックインすることが報告された^[18]。lsODN を用いた改良法としてその後報告された CLICK 法では flox マウス (条件付きノックアウトマウス) を作製するための置換カセット全体を lsODN にて行っており導入効率が更に改善されている^[19]。

2) 2-Step Electroporation 法

また上記と異なる方法で flox マウスの作成上での問題点を解決した画期的な方法が 2017 年に報告されている^[20]。flox マウスを作製するためにはエクソンの両端の 2 箇所を loxp サイトを挿入する必要があり、そのため ssODN を用いる場合は 2 箇所を CRISPR/Cas9 システムで切断し、おのおのに相補的な配列に loxp 配列を持つオリゴ DNA をノックインする手順となる。ssODN を用いる利点として、受精卵での CRISPR/Cas9 によるゲノム編集に関して長鎖 2 本鎖 DNA と比べ ssODN は格段にノックイン効率が高い事が挙げられる。しかし従来の方法で受精卵に導入しても、ゲノムの近接 2 箇所が切られた後にその間の染色体欠失が起こってしまい 2 箇所の置換を伴う flox マウスを得ることは非常に困難であった。この問題点を解決するため 2-Step 法では 2 箇所の loxp 配列を一度に挿入するのではなく、1 箇所ずつ段階的に loxp 配列を挿入することで欠失を避けるというシンプルな原理に基づいている。受精卵の 1 細胞期と 2 細胞期の 2 階的に分けて ssODN を導入する事で染色体欠失が減少し、少ないながら flox マウスを得ることができている。しかしながらマイクロインジェクションでの導入では 2 度の胚操作によるダメージから産仔の数が少ないなどの問題が生じたため、よりダメージが少ない電圧ポレーション法を用いることで生存率と flox マウス作製効率が大幅に上昇し、flox マウス

を効率良く作製できることが示された。2STEP 法は電圧ポレーション法により Cas9 と gRNA および ssODN を導入するだけの極めて簡便な手法であるため、現時点では CLICK 法および 2-Step Electroporation 法による遺伝子導入が一般的かつ簡便な遺伝子改変動物の作出法として挙げられるだろう。

3) 煩雑なベクター構築を必要としないノックイン手法の開発

従来ノックインマウスを作成する上では煩雑なターゲットベクターの作成が必要であったが、この点を簡略化したのがマイクロホモロジー媒介末端結合修復機構 (MMEJ) を利用した PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法である^[21]。通常は相同組換えを介して遺伝子ノックインが行われるが相同領域を含むターゲットベクターの構築には一定の労力が必要であり、生物種によっては HDR 活性が低いことから導入が困難なケースが知られていた。PITCh 法は MMEJ による新たな遺伝子ノックイン技術を利用している。遺伝子挿入の際に切断末端と重複する配列を 20 塩基程度付加するだけで外来ドナー DNA を一定の確率で挿入することができる (図 2 b)。PITCh 法による遺伝子挿入はヒト細胞にも適用できることが実証されており、特に HDR 活性の低い生物種などでの応用が期待される。

4) 非分裂細胞でのノックインを可能とする HITI 法

現在の CRISPR の急速な進歩にもかかわらず、成体組織を構成する非分裂細胞に対してゲノム標的部位に外来遺伝子を挿入することは未だに適用できていなかったが、これは遺伝子をノックインする際に利用される HDR 活性が分裂期 (S-G2 期) でのみ高く、増殖期にある細胞種での利用に限られる事に起因する。このことが基本的な生物学的原理の解明や広範な遺伝性疾患に対する治療法開発の障壁になっていたが、2016 年に NHEJ を利用した全く新しいノックイン手法として HITI (homology-independent targeted integration) 法が報告された^[22]。それまで非相同末端結合を利用した遺伝子ノックインの手法の報告は少なく、また挿入出来ても目的の遺伝子が順・逆両方向にランダムに挿入されるという欠点があり^[23]、NHEJ を応用したノックイン手法自体あまり検討されていなかった。HITI 法では導入する遺伝子配列の両端に gRNA の認識部位の一部を付加する事で、逆位で挿入された場合には再切断されるよう設計されており最終的に高い確率で準方向に遺伝子が挿入されるよう改良されている (図 2 c)。

HITI 法の特徴は相同組換えに伴う修復機構を必要とせずにノックインすることだが、HITI 法と相同組換えを利用した既存のノックイン手法と比較した結果、細胞種によっては HITI 法が明らかに高い効率でノックインされることが示された^[23,24]。また HITI 法により標的となる部位に挿入された約 90% の外来 DNA は末端が変異することがなく正確にゲノムに組み込まれていたことが

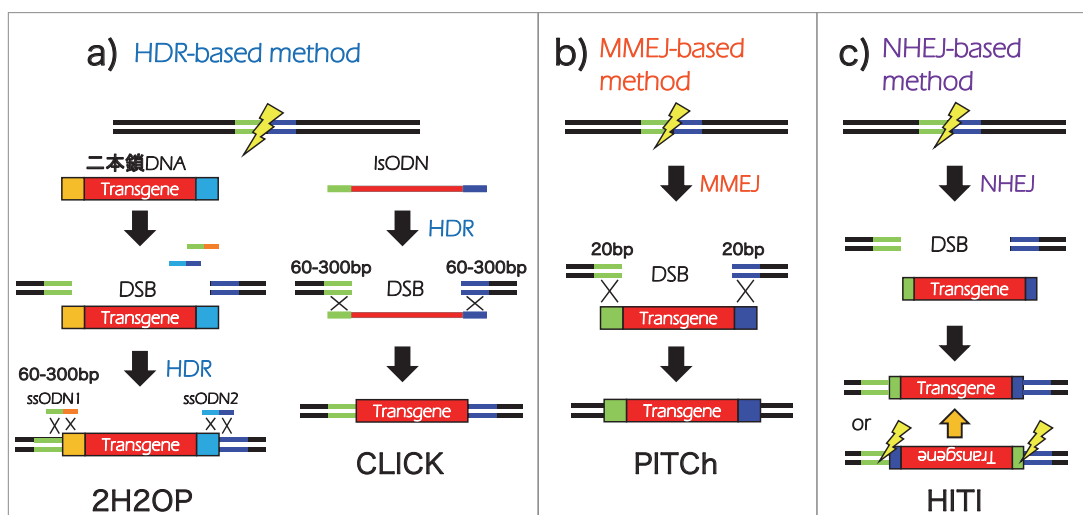


図2：遺伝子ノックイン法の概略図

CRISPR/Cas9 システムによる DNA 切断後、細胞内のインテグラーゼにより修復される。

- HDR 活性を利用した 2H2OP 法および CLICK 法では ssODN を用いており、従来よりも高効率なノックイン手法として広く利用される。
- MMEJ 機構を利用した PITCh 法では切断末端と重複する配列を 20 塩基程度付加することで一定の確率でノックインすることができ、HDR 活性の低い生物種などで利用される。
- NHEJ 機構を応用した HITI 法では従来は導入が困難であったニューロンなど非分裂細胞へのノックインが可能である。

ら NHEJ による修復機構を用いても正確にゲノムに組み込める可能性が示唆された。また一番の利点は HDR に依存した従来法では困難であったニューロンなど非分裂細胞への遺伝子挿入を可能とした点の特徴である。DNA 二本鎖切断の主要な修復機構の一つである NHEJ による修復は細胞周期を通して働くことから、HITI 法により分裂細胞および非分裂細胞の両方に対する高効率な DNA ノックイン手法が確立された。

以上の様に PITCh 法および HITI 法はベクター構築などに労力を必要とせず有用であるが、欠点は NHEJ を利用していることから挿入部位周辺に予期しない塩基欠損や挿入を伴う可能性があり今後の更なる手法改良が望まれる。また生体での遺伝子導入手法である子宮内エレクトロポレーション法やアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を組み合わせることで生体へ直接的に変異を導入する事も可能であるため^[25,26]、老齢動物などでの遺伝子改変に伴う表現型解析も可能となり、長期にわたる飼育・経過観察を必要とする老化・疾患研究の分野においてその利用が期待される。

5. 萌芽的ゲノム編集ツール

既に第四世代とも言える様々なヌクレアーゼを応用した新規のゲノム編集ツールも報告されてきている。CRISPR システムを利用している系としてヌクレアーゼ活性を消失させた変異 Cas9 タンパク質に脱アミノ化酵素デアミナーゼを連結させ、DNA 切断を伴わずに点変異のみを導入することの出来る Target-AID 法の開発や^[26]、RNA を対象に変異・切断を誘導する RNA リボヌクレアーゼ Cas13a/C2C2 による報告などがなされている^[27]。DNA の切断や分解を伴わない可逆的な技術であ

るためヒトでの遺伝子治療に向けて予期しないゲノム損傷リスクを避ける有効な手法として期待される。また変異 Cas9 タンパク質に FokI を融合させた Cas9-FokI を用いた報告では TALEN 同様に 2 量体で初めてヌクレアーゼ活性が獲得されるため特異性が高く、off-target 効果を低減できる CRISPR システムとなることが予想される^[28]。

TALEN や CRISPR システムを応用してゲノムの改変以外に遺伝子発現調節やエピジェネティック修飾を制御する試みも進められている。ヌクレアーゼ活性を持たない変異 Cas9 タンパク質に VP16,VP64 といった転写活性化ドメインを融合させる事で発現誘導が、また抑制ドメイン KRAB を融合させる事で目的遺伝子の発現抑制が可能である事が示されている^[29]。Tet-ON/OFF のシステムと組み合わせることで時期特異的な発現調節も可能であり、またエピジェネティック修飾の改変による表現型解析など今後の更なる解析が望まれる。その他、CRISPR と GFP などの蛍光分子と融合する事で染色体イメージングや FISH としての応用例も報告されている^[30]。

6. おわりに

本稿では、主に病態モデルなど生体解析を行う分野での利用が期待されるゲノム編集ツールに関して紹介を行った。現時点では CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法が広く利用されているが、最近ではより小型の構造から成る Cpf1 (Cas12a) も報告され^[31]、更に実用的なシステムへと進んでいくことが予想される。マウス受精卵上でのゲノム編集効率を例にすると通常の遺伝子欠損や置換であれば既に十分実用的なレベルにあり、数年内

には外来遺伝子のノックインや flox マウスの作成に関しても先述の技術改良によって高頻度で遺伝子改変を導入出来る段階へと進んでゆくだろう。ゲノム編集技術が登場する数年前はノックアウトマウスの作出だけでも年単位の歳月を必要としていたが現在では1ヶ月足らずで遺伝子改変動物の作出が可能となっており、生体を用いた疾患研究に欠かせない基盤的技術となることは想像に難しくなく今後の更なる技術進展が楽しみである。

これまでコストや労力の面から実現出来なかった様々な研究が新たにスタートすることで医療分野でのゲノム編集治療、食品の改良や藻類を用いたバイオ燃料など多方面でのゲノム編集技術の応用の可能性が予感され、様々な分野へゲノム編集技術が広がって行くことで次なるブレイクスルーを生み出す起爆剤となることを期待したい。

参考文献

1. Capecchi MR. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*. 5: 70-76, 1989.
2. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods* 6 (7) : 493-495, 2009.
3. Meehan TF, Conte N, West DB, et al. Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nat Genet*. 49 (8) : 1231-1238, 2017.
4. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (3) : 1156-1160, 1996.
5. Christian M, Cermak T, Doyle EL. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186 (2) : 757-761, 2010.
6. Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 29 (2) : 143-148, 2011.
7. Tokunaga A, Anai H, Hanada K. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci*. 73 (3) : 523-533, 2016.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337 (6096) : 816-821, 2012.
9. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (39) : E2579-2586, 2012.
10. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156 (5) : 935-949, 2014.
11. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339 (6121) : 819-823, 2013.
12. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339 (6121) : 823-826, 2013.
13. Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153 (4) : 910-918, 2013.
14. Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154 (6) : 1370-1379, 2013.
15. Srivastava M, Nambiar M, Sharma S, et al. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*. 151 (7) : 1474-1487, 2012.
16. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*. 33 (5) : 538-542, 2015.
17. Li G, Zhang X, Zhong C, et al. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci Rep*. 7 (1) : 8943, 2017.
18. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, et al. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun* 7 : 10431, 2016.
19. Miyasaka Y, Uno Y, Yoshimi K, et al., CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics*. 19 (1) : 318, 2018.
20. Horii T, Morita S, Kimura M, et al. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci Rep*. 7 (1) : 7891, 2017.
21. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5 : 5560, 2014.
22. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540 (7631) : 144-149, 2016.
23. Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*. 24 (1) : 142-153, 2014.
24. Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*. 27 (6) : 801-814, 2017.
25. Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, et al. High-

- Throughput, High-Resolution Mapping of Protein Localization in Mammalian Brain by In Vivo Genome Editing. *Cell* 165 (7) :1803-1817, 2016.
26. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*. 353 (6305) , pii : aaf8729, 2016.
 27. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 356 (6336) :438-442, 2017.
 28. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*. 32 (6) :577-582, 2014.
 29. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* 171 (7) :1495-1507, 2017
 30. Batra R, Nelles DA, Pirie E, et al. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*. 170 (5) :899-912, 2017.
 31. Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, et al. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems. *Mol Cell* 65 (6) :1109-1121, 2017.

History and application of genome editing technology.

Akinori Tokunaga

Division of Animal Resources, University of Fukui

Abstract

Targeted genome modifications using techniques that alter the genomic information of interest have contributed to multiple studies in both basic and applied biology. In gene targeting, the target-site integration of a targeting vector by homologous recombination is used. Mice carrying mutations in multiple genes are traditionally generated by sequential recombination in embryonic stem cells and time-consuming intercrossing of mice with a single mutation. However, this strategy has several technical problems. The first problem is the extremely low frequency of gene targeting, which makes obtaining recombinant clones an extremely labor-intensive task. The second issue is the limited number of biomaterials to which gene targeting can be applied. Traditional gene targeting hardly occurs in most of the cell lines. However, a new approach using designer nucleases that can introduce site-specific double-strand breaks in genomic DNAs has increased the efficiency of gene targeting in zygotes. This new method including CRISPR-Cas system is has also expanded the number of biomaterials to which gene targeting could be applied. Targeted integration of transgenes can be achieved by strategies based on homologous recombination (HR) , microhomology-mediated end joining (MMEJ) or non-homologous end joining (NHEJ) . Here, we summarize various strategies for target gene modification, including a comparison of traditional gene targeting with designer nucleases.

Keywords : TALEN, CRISPR-Cas, HDR, NHEJ, MMEJ