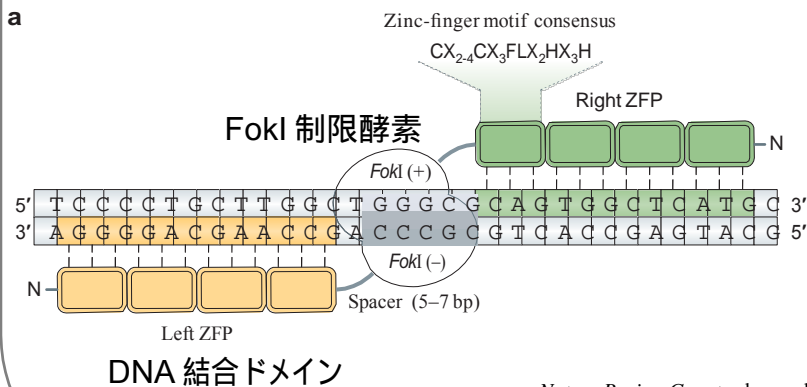


Nature Review Genet, 11, 636 (2010)より

1つの Zinc finger
 によって、この場合片側
 4つの Zinc finger から
 なっている。
 片側 12bp, 両側合計 24bp
 で DNA を認識している。



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

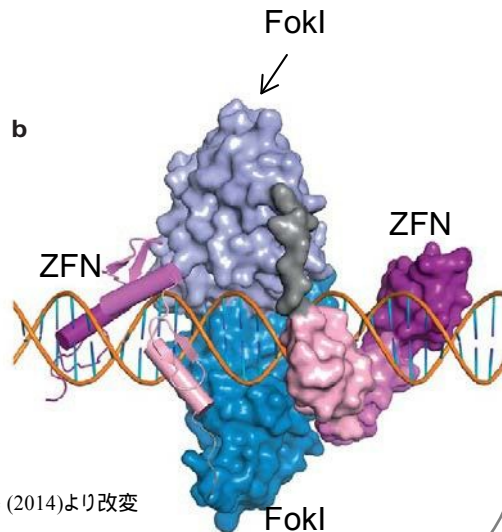
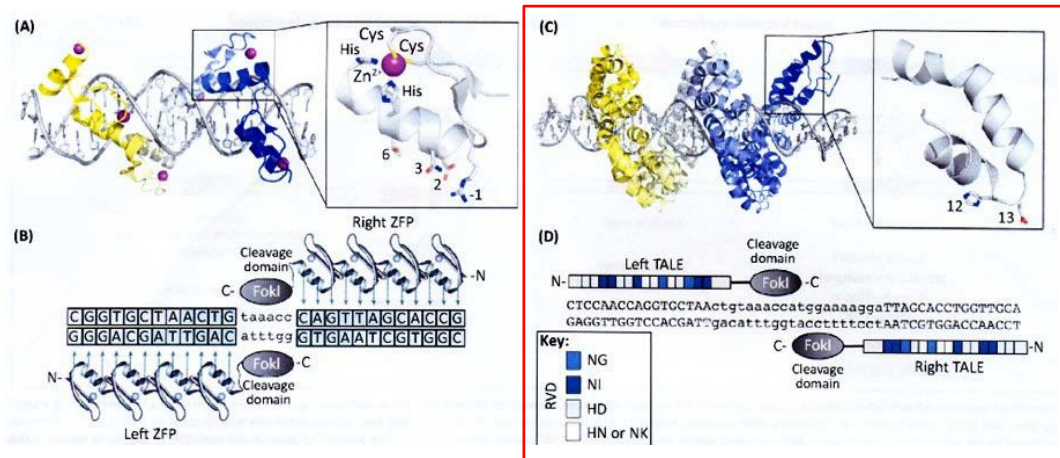


Fig.1 Structure of ZFN

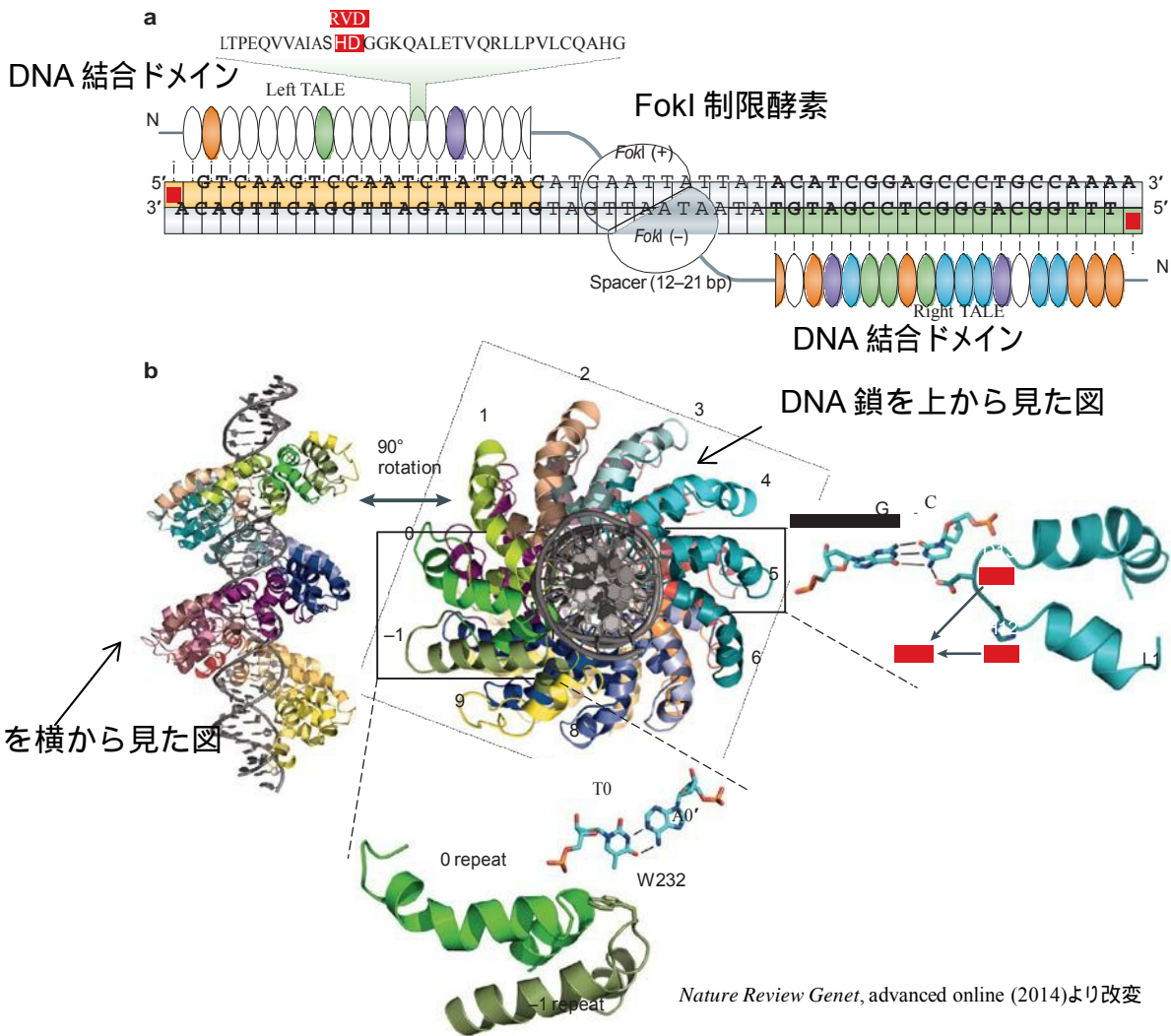
CCR5-224		VF2468	
# of mutations	# of sites in genome	# of mutations	# of sites in genome
0	1	0	1
1	0	1	3
2	1	2	245
3	6	3	3,201
4	99	4	35,995
5	964	5	316,213
6	9,671	6	2,025,878
7	65,449		
8	372,801		
9	1,854,317		

Fig.2 Potential genomic target sites

Nature Methods, 8, 765 (2011)より



Trends in Biotechnology 31, 397 (2013)より (right panel)



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

Fig.3 Structure of TALEN

Mutations in site	Off-target sites to CCR5A	Statistically expected
0	1	1
1	0	0.0
2	0	0.0
3	0	0.0
4	0	0.0
5	0	0.0
6	0	0.0
7	0	0.3
8	8	3.6
9	7	34.1
	0	
10	634	275.9
11	4338	1956.3
12	27114	12226.7
13	149005	67716.9
14	648230	333747.3
15	2657598	1468488.3
16	9783617	5782172.6

Fig.4 Potential genomic off-target sites related to *CCR5A* on-target site
(片側 18bp、両側 36bp TALEN 使用)
Nature Methods, 11, 429 (2014)より

Cellular modification induced by TALENs at on-target and predicted off-target genomic sites

site	no tAlen (%)	CCR5A eI/KK	CCR5A eId/KK _r	CCR5A	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnCCR5A	<0.006	9.8	28	47	0 (on-target)
OffC-5	<0.006	0.53	2.3	2.3	11
OffC-15	<0.020	<0.014	0.23	0.043	
OffC-16	<0.006	<0.006	0.031	<0.006	
OffC-28	<0.009	0.014	0.16	0.056	
OffC-36	<0.006	<0.006	0.15	0.028	
OffC-38	<0.006	ND	ND	0.067	
OffC-49	<0.006	ND	ND	0.110	
OffC-69	<0.010	ND	ND	0.089	
OffC-76	<0.006	ND	ND	0.149	9

site	no tAlen (%)	ATM eI/KK	ATM eId/KK _r	ATM	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnATM	0.007	6.8	16	18	0 (on-target)
OffA-1	<0.006	<0.006	0.026	0.077	
OffA-11	<0.006	<0.006	0.036	0.39	10
OffA-13	<0.006	0.008	0.025	<0.006	
OffA-16	<0.006	<0.006	<0.006	0.057	
OffA-17	<0.051	<0.14	<0.17	0.94	9
OffA-23	0.018	<0.006	0.29	0.23	
OffA-35	<0.006	<0.006	<0.006	0.070	

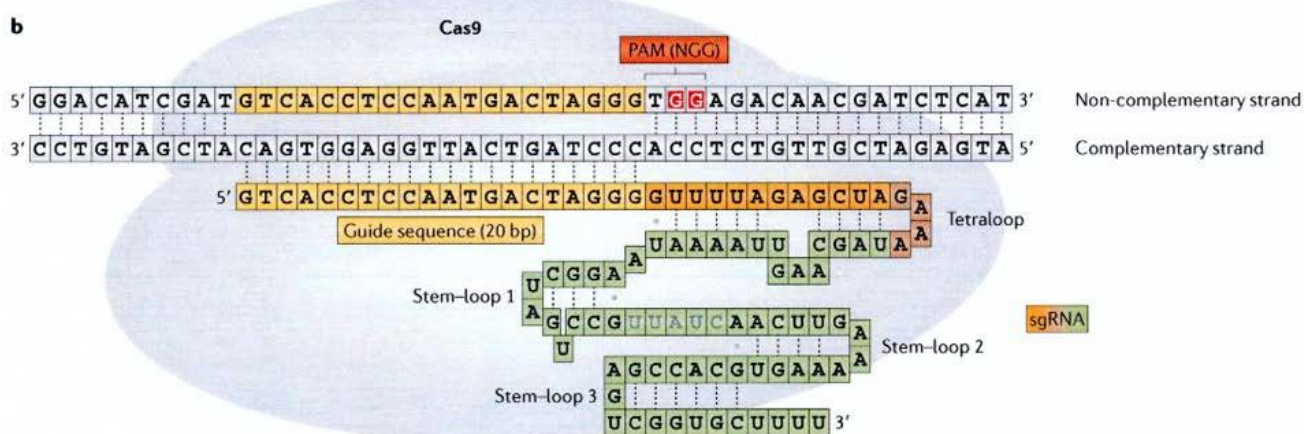
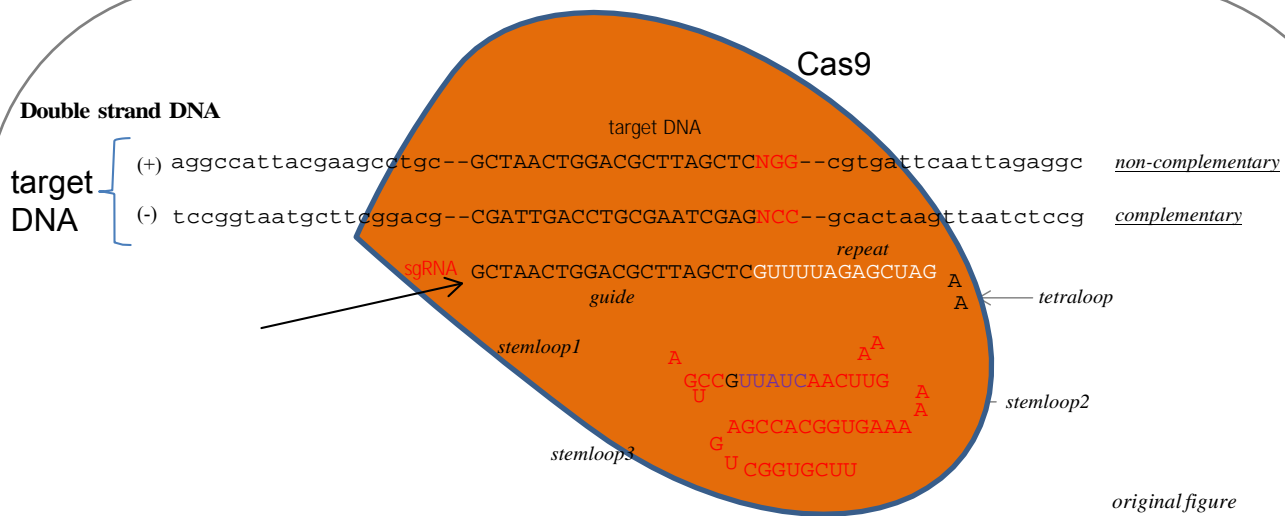
Fig.5A Cellular modification rate (%) at on-target and off-target genomic sites
Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変

CCR5A Site	Score	Mut.	Left half-site	Spacer length	Right half-site
OnCCR5A	0.008	0	TTCATTACACCTGCAGCT	18	AGTATCAATTCTGGAAGA
OffC-1	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-2	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-3	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-4	0.747	11	TcCATaACACaTctttCT	10	tGcATCAAtTcCTGGAAGA
★ OffC-5	0.804	11	TcCAaTACctCTGcCaCa	14	AGgAgCAAcTCTGGgAGA
OffC-6	0.818	10	TTCAgTcAtCTGaAaac	16	gGTATCAAtTTCTGGAgGA
OffC-7	0.834	14	TaCAaaACcCtTGcCa	27	taTATCAATTtgGGgAGA
OffC-8	0.837	12	TcCAagACACCTGcttac	26	tcTATCAATTtgGGgAGA
OffC-9	0.874	10	TTCATaACAtCTtaAaaT	27	AaTAcCAAcTCTGGAtGA
OffC-10	0.89	12	TcCAaaACAtCTGaAaaT	25	tGgATCAAAAttgGGAAGA

Fig.5B Predicted off-target sites

(2.3%で変異導入が検出された on-target サイト OffC-5 でのミスマッチ塩基(小文字))

Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

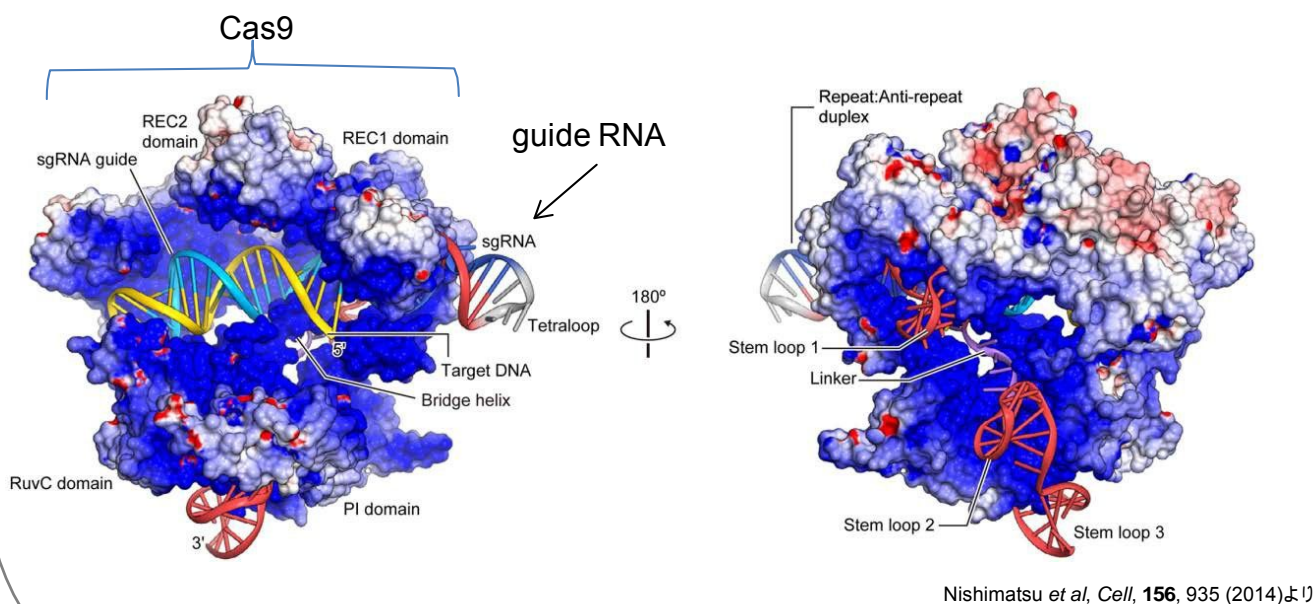
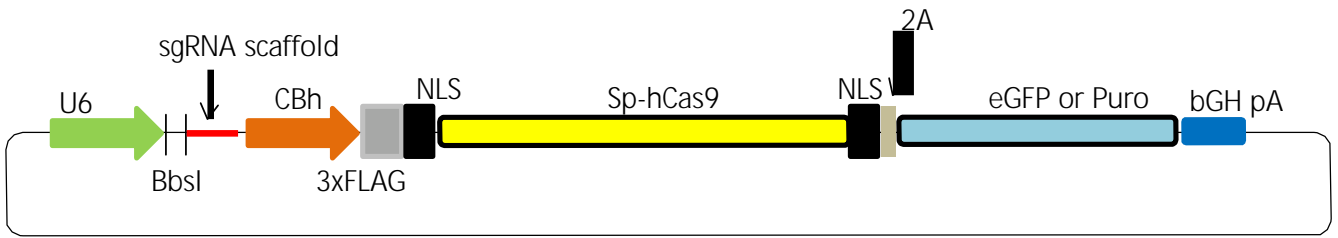


Fig.6 Structure of CRISPR/Cas9 system

for mammalian expression



for plant expression

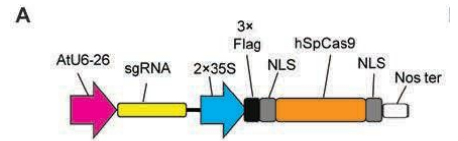
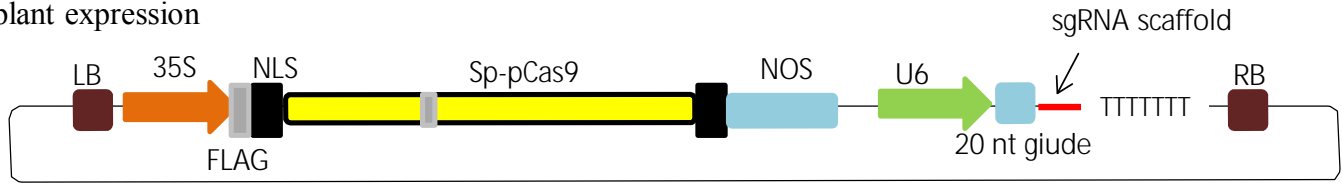
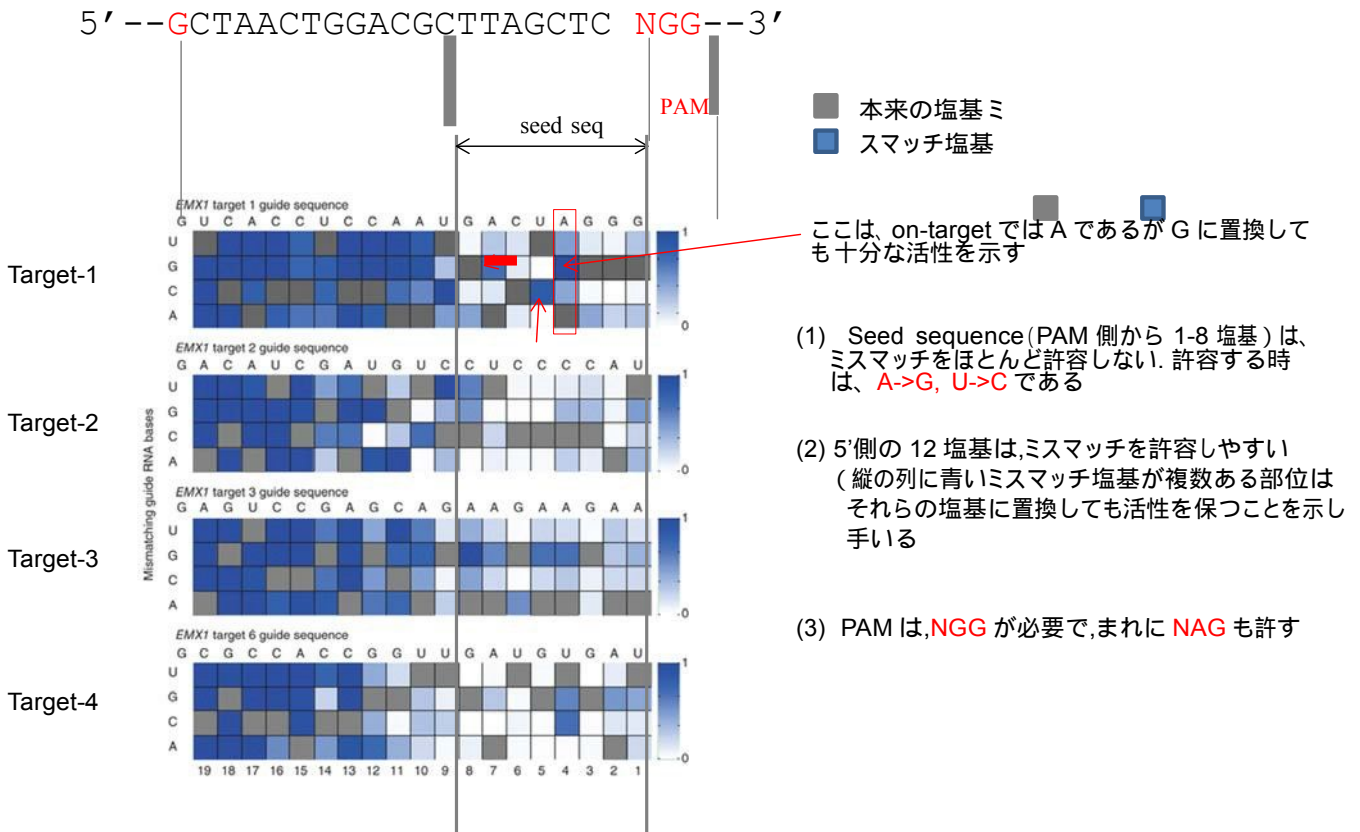


Fig.7 CRISPR/Cas plasmids for mammalian and plant

1塩基ずつ mismatch を入れて、活性を比較



Hsu et al, Nat Biotech, 31, 827 (2013)より改変

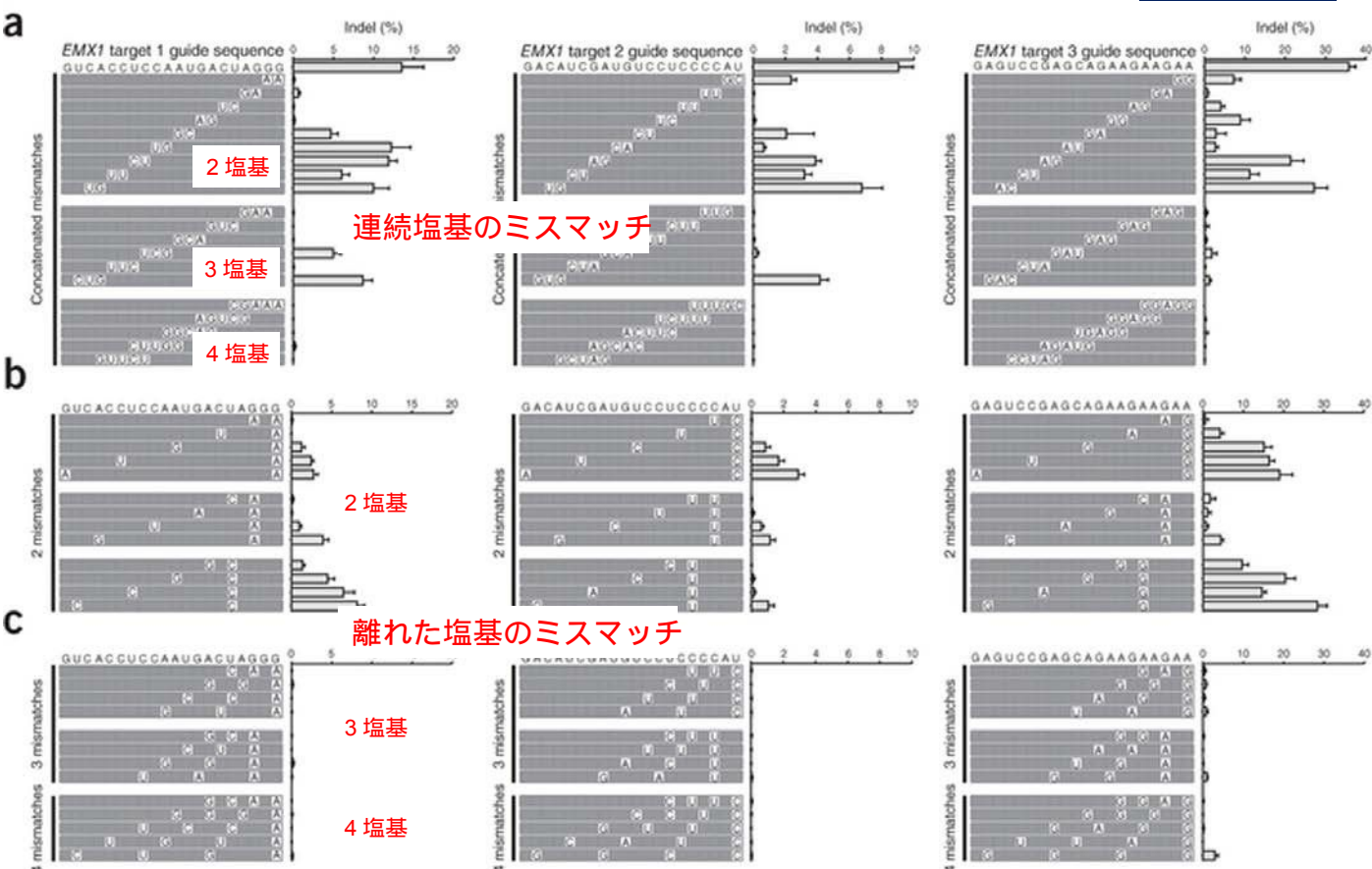
Fig.8 Single-nucleotide specificity of Cas9

On- and off-target mutations induced by RGNs designed to endogenous human genes

Target	Site name	Sequence	Indel mutation frequency (%) ± s.e.m.			Gene	
			U2OS.EGFP	HEK293	K562		
Target 1 (VEGFA site 1) GC 含量 70%	T1	GGGTGGGGGGAGTTTGCTCCTGG	26.0 ± 2.9	<u>10.5</u> ± 0.07	3.33 ± 0.42	VEGFA	on-target
	OT1-3	GG <u>AT</u> GGAGGGAGTTTGCTCCTGG	25.7 ± 9.1	<u>18.9</u> ± 0.77	2.93 ± 0.04	IGDCC3	off-target
	OT1-4	GGGAGGGTGGAGTTTGCTCCTGG	9.2 ± 0.8	8.32 ± 0.51	N.D.	LOC116437	
	OT1-6	<u>CGG</u> GGAGGGAGTTTGCTCCTGG	5.3 ± 0.2	3.67 ± 0.09	N.D.	CACNA2D	
	OT1-11	GGG <u>GAG</u> GGGAGTTTGCTCCTGG	17.1 ± 4.7	8.54 ± 0.16	N.D.		
Target 2 (VEGFA site 2) GC 含量 80%	T2	GACCCCTCCACCCGCCTCCGG	50.2 ± 4.9	<u>38.6</u> ± 1.92	15.0 ± 0.25	VEGFA	on-target
	OT2-1	GACCC <u>CC</u> CCACCCGCCTCCGG	14.4 ± 3.4	33.6 ± 1.17	4.10 ± 0.05	FMN1	off-target
	OT2-2	<u>GGG</u> CCCTCCACCCGCCTCTGG	20.0 ± 6.2	15.6 ± 0.30	3.00 ± 0.06	PAX6	
	OT2-6	<u>CTA</u> CCCTCCACCCGCCTCCGG	8.2 ± 1.4	15.0 ± 0.64	5.24 ± 0.22	PAPD7	
	OT2-9	<u>GCC</u> CCACCCGCCTCTGG	50.7 ± 5.6	<u>30.7</u> ± 1.44	7.05 ± 0.48	LAMA3	
	OT2-15	<u>IAC</u> CCCAACCCGCCTCTGG	9.7 ± 4.5	6.97 ± 0.10	1.34 ± 0.15	SPNS3	
	OT2-17	<u>ACA</u> CCCAACCCGCCTCAGG	14.0 ± 2.8	12.3 ± 0.45	1.80 ± 0.03		
	OT2-19	<u>ATT</u> CCCAACCCGCCTCAGG	17.0 ± 3.3	19.4 ± 1.35	N.D.	HDLBP	
	OT2-20	<u>CCC</u> ACCCGCCTCAGG	6.1 ± 1.3	N.D.	N.D.	ABLIM1	
	OT2-23	<u>CGC</u> CTCCACCCGCCTCCGG	44.4 ± 6.7	<u>28.7</u> ± 1.15	4.18 ± 0.37	CALY	
	OT2-24	<u>CTC</u> CCCAACCCGCCTCAGG	62.8 ± 5.0	<u>29.8</u> ± 1.08	21.1 ± 1.68		
	OT2-29	<u>TGC</u> CCCAACCCGCCTCTGG	13.8 ± 5.2	N.D.	N.D.	ACLY	
	OT2-34	<u>AGG</u> CCCAACCCGCCTCAGG	2.8 ± 1.5	N.D.	N.D.		
	Target 3 (VEGFA site 3) GC 含量 60%	T3	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	49.4 ± 3.8	<u>35.7</u> ± 1.26	27.9 ± 0.52	VEGFA
OT3-1		GGTGAGTGAGTGTGIGTGTGAGG	7.4 ± 3.4	8.97 ± 0.80	N.D.	(abParts)	off-target
OT3-2		<u>AGT</u> GAGTGAGTGTGTGTGGGG	24.3 ± 9.2	<u>23.9</u> ± 0.08	8.9 ± 0.16	MAX	
OT3-4		G <u>CT</u> GAGTGAGTGTATGCGTGTGG	20.9 ± 11.8	<u>11.2</u> ± 0.23	N.D.		
OT3-9		GGTGAGTGAGT <u>GCG</u> TGCGGTGG	3.2 ± 0.3	2.34 ± 0.21	N.D.	TPCN2	
OT3-17		G <u>TT</u> GAGTGAATGTGTGCGTGAGG	2.9 ± 0.2	1.27 ± 0.02	N.D.	SLIT1	
OT3-18		<u>ITG</u> GGTGAGTGTGTGCGTGAGG	13.4 ± 4.2	12.1 ± 0.24	2.42 ± 0.07	COMDA	
OT3-20		<u>AGA</u> GAGTGAGTGTGTGATGAGG	16.7 ± 3.5	7.64 ± 0.05	1.18 ± 0.01		

Fu et al, Nature Biotechnology, 31, 822 (2013)より改変

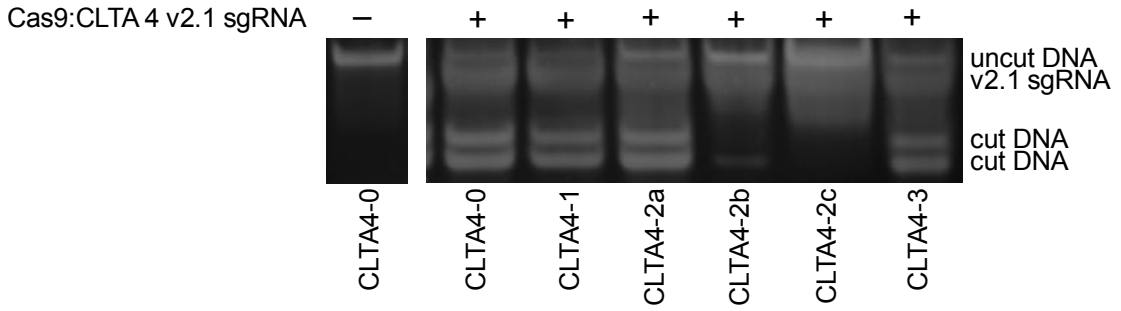
Fig.9 Single-nucleotide specificity of Cas9



ポイント: 3塩基以上のミスマッチはほとんど起きないため、2塩基ミスマッチ以内がゲノム上に存在しないように設計すればよい
 (GC含量が高く75%以上とか、PAM distal領域に集中した時には3 - 4塩基ミスマッチもあるが、設計で回避可能)

Hsu et al, Nature Biotechnology, 31, 827 (2013)より改変

Fig.10 Single-nucleotide specificity of Cas9

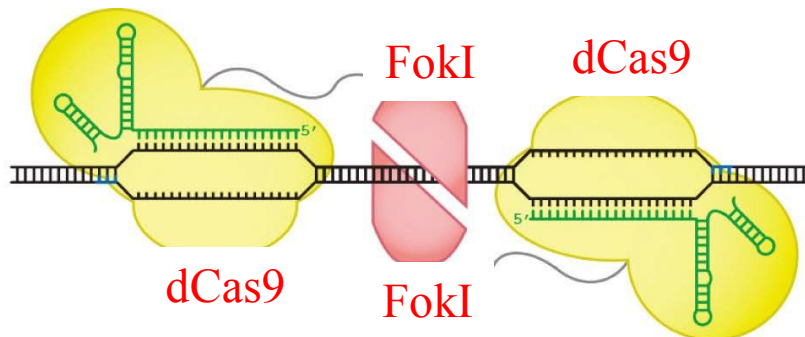


	sequence	<i>In vitro</i> selection enrichment value	% cut
CLTA4-0	GCAGATGTAGTGTTCACAGGG	7.9	85%
CLTA4-1	GaAGATGTAGTGTTCACAGGG	27.5	84%
CLTA4-2a	GaAGATGTAGTGTTCACtGGG	43.9	79%
CLTA4-2b	GCAGATGgAGgGTTTCACAGGG	1.0	35%
CLTA4-2c	GCAGATGTAGTGTtaCCAgAGGG	0.064	none detected
CLTA4-3	GggGATGTAGTGTTCACtGGG	95.9	72%

赤字は、ミスマッチ塩基

Pattanayak V *et al*, *Nature Biotechnology*, **31**, 839 (2013)より改変

Fig.11 Off-target DNA sequence and cut ratio (%)



Tsai SQ, *et al*, *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2908 (2014)より改変

Fig.12 Off-target DNA sequence and cut ratio (%)

I Deletions:

```

CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA wt
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-AACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -1
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATC-----TAAACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -4
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-----CAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -7
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTC-----ACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -10
CTTGATGCCGTTCTTCTGGT-----CTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -10
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-----AACTTGTCTGGCCATGATA -13
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCC-----AAGAACTTGTCTGGCCATGATA -19
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTC-----AAAGAACTTGTCTGGCCATGATA -22
    
```

Insertions:

```

CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA wt
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCtTttTGccg-ACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA +2
TGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGAtctgaggAACTGCAAAAAGAACTTGTCTGGCCATGATA +5
    
```

Gaj T, *et al*, *Nature Methods*, **9**, 805 (2012)より
 (-は deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.13-1 Indel pattern of the cleavage site by ZFN

(a) **noggin TALEN**

TCCTAGTGA~~AA~~ACCTACCACTGGTGGACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA

```

TCCTAGTGAAAACCTA----- (Δ274)
GTCTTCCTG-----//-----GGAGGAGAGACTTGGAG (Δ197)
-----CCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ57)
TCCTAG-----TTGAGCATCCGGATCCTA (Δ26)
TCCTAGTGAAAACCTAC-----TGAGCtCCGGATCCTA (Δ17,+1)
TCCTAGTGAAAAACC-----TATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ16)
TCCTAGTGAAAA-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ15)
TCCTAGTGAAAACCTACCAC-----TGAGCATCCGGATCCTA (Δ13)
TCCTAGTGAAAACCTACC-----TTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ11)
TCCTAGTGAAAA-----GGAtgCCTTATTGAGCATCCGGATCCT (Δ11,+2)
TCCTAGTGAAAACCTACCACT-----TTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ9)
TCCTAGTGAAAACCTACC-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ8)
TCCTAGTGAAAACCTACCCTGG-----TATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ7)
TCCTAGTGAAAACCTACctC-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ7,+1)
TCCTAGTGAAAACCTACCACCT-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ5,+1)
TCCTAGTGAAAACCTACCACCTaccactaccACCTTATTGAGCATCCGGA (Δ5,+10)
    
```

(b) **noggin ZFN**

GGACCTTATTGAGCATCCGGATCCTATCTATGATCCCAAGGAGAAGGATCCTT

```

ACCTACCAC-----//-----AT--CCTAGGACCAG (Δ332)
CTTATTGAGCAT-----//-----CCACTTTGACCCCA (Δ68)
GGACCTTATTGAG-----//-----CAAGGAGAAGGATCCTT (Δ23)
GGACCTTATTGAGCATCCGGAT-----CAAGGAGAAGGATCCTT (Δ14)
GGACCTTATTGAGga-----CCT-TC-----TCCCAAGGAGAAGGATCCTT (Δ14,+1)
    
```

(c) **ets1 TALEN**

TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTTCAGAAAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA

```

TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTT----- (Δ403)
-----TATGAGCGGAGCAGCA (Δ400)
TTACTCTGAAAG-----GAGCGGAGCAGCA (Δ25)
TTACTCTGAAAGGA-----GTATGAGCGGAGCAGCA (Δ19)
TTACTCTGAAAGGAG-----cGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ18,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----ATGAGCGGAGCAGCA (Δ17)
TTACTCTGAAAGGAGTGA-----CTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12)
TTACTCTGAAAGGAGT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----GcTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ11)
TTACTCTGAAAGGAGT-----AGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ11)
TTACTCTGAAAGGAGTGGAC-----TCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ10)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----AGcTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ10,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGAC-----TTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ9)
TTACTCTGAAAGGAGT-----ACT-----cAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ8,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ7)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----TTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ7)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ6)
TTACTCTGAAAGGAGTGGAC-----AAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ6,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----AtGTTaTGATGAGCGGAGCAGCA (Δ6,+2)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTT-----tGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ5,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTgt-----AAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ4,+1)
    
```

Lei Y, *et al*, *PNAS*, **109**, 17484 (2012)より改変
 (Δは deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.13-2 Indel pattern of the cleavage site by ZFN and TALEN



Fu Y, et al, *Nature Biotechnology*, 32, 279 (2014)より改変
 (Δ は deletion の数、+ は insertion の数、x は頻度を示す)

Fig.13-3 Indel pattern of the cleavage site by CRISPR/Cas9

(c) **Target 4 (EMX1):** (EMX1 の off-target サイト)

OT4-1

ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCATGCCTTCTCTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Wild-type x20
-----ATC	Δ64
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCC-----ACAATC	Δ28
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCAT-----ACTCTGACAATC	Δ20
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGC-----CTTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Δ20
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCATGCCTTTCT-----CAATC	Δ19
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCA-----TGCTCTAACTCTGACAATC	Δ14
TCCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCC-----CTTCTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Δ8

(d) **Target 3 (VEGFA site 3):** (VEGFA site3 の off-target サイト)

OT3-2

GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGAAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGGGGGGGGACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Wild-type x14
GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGAGTGAGTGA-----GTGTGTGGGGGGGGACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Δ4
GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGAGTGAGTGA-----GTGTGGGGGGGGACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Δ6 x2

OT3-9

GTGTGGGATGCGGGAGTGGGTGAGTGAGTGCGTGCGGGTGGCGATGCAAGCGTGTGCGAATGCGTG	x173
GTGTGGGATGCGGGGA----->	Δ80
GTGTGGGATGCG-----GCGTG	Δ50
GTGTGGGATGCGGGAGTGGGTGAGTGA-----GTGGCGATGCAAGCGTGTGCGAATGCGTG	Δ10

GTGTGGGATGCGGGAGTGGGTGAGTGAGTGCAAC	+2
------------------------------------	----

OT3-18

TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCCTCACAGGCTGGAGTACAGTGGCATGATATCAGCTCACTGCAATCTCGGGCTCCCGGTTCAAG	Wild-type x27
TTTCAAAGACAGTAGATCT-----TAAAAGGTGGTAACTG	Δ32
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGT-----CATAAAAGGTGGTAACTG	Δ23
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTC-----CACATAAAAGGTGGTAACTG	Δ18 x4
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTC-----CCACACATAAAAGGTGGTAACTG	Δ15
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCT-----CTCACCCACACATAAAAGGTGGTAACTG	Δ12
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTCTCA-----CACACTCACCCACACATAAAAGGTGGTAACTG	Δ2

TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTCTCACAGGCTGGAGTACAGTGGCATGATATCAGCTCACTGCAATCTCGGGCTCCCGGTTCAAG	+63
---	-----

Fig.13-4 Indel pattern of the cleavage site by CRISPR/Cas9

Arabidopsis: mutations in 12 out of 25 sequenced clones

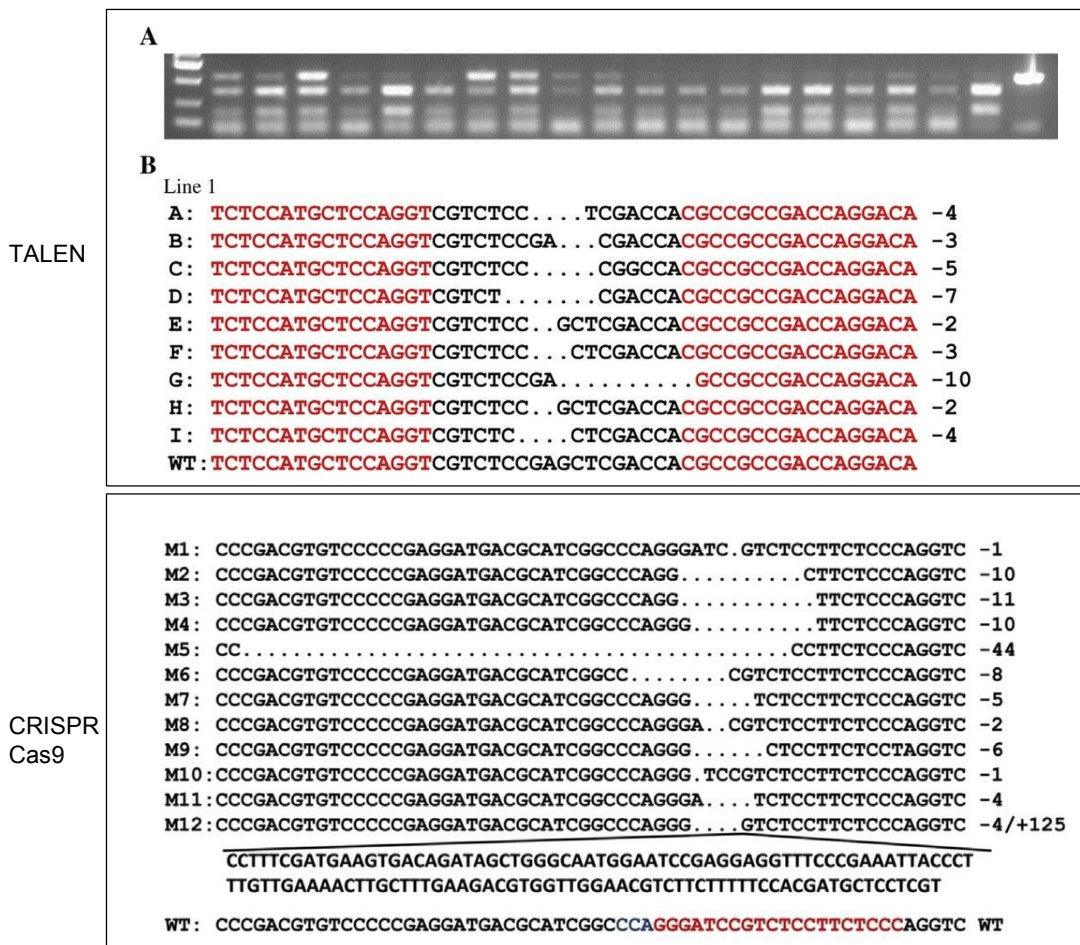
Sequence	In/Del	Freq.
CATGGA <u>CGCCTTCAAGGTGCACATGGA</u> GGACTAGTAAAGGAGAAGAAC		
CATGGAGCGCTTCAAGGT <u>CCC</u> CATGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	0 (-3, +3)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCAC <u>A</u> ATGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	+1	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... GGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-3	4x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-5	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-6	2x
CATGGAGCGCT... .. GACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-17	1x

Tobacco: mutations in 15 out of 28 sequenced clones

Sequence	In/Del	Freq.
CATGGA <u>CGCCTTCAAGGTGCACATGGA</u> GGACTAGTAAAGGAGAAGAAC		
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCACATG <u>A</u> AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	+1 (+1)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCACATG <u>C</u> AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	0 (-1, +1)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... GGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-3	4x
CATGGAGCGCTTCAAGGTG... .. TGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-4	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. GAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-4	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-5	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-6	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. AGGAGAAGAAC	-16	1x

Jian W, et al, *Nucleic Acid Research*, **41**, e188 (2013)より改変
(-は deletion の数、+は insertion の数、x は頻度を示す)

Fig.14-1 Indel pattern of the cleavage site by CRISPR/Cas9 in Plants (Arabidopsis and Tobacco)



Lian Z, et al, *J. Genetics Genomics*, **41**, 63 (2014)より改変
(-は deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.14-2 Indel pattern of the cleavage site by TALEN and CRISPR/Cas9 in Plant (Zea mays)

CRISPR plasmid construct

target in genome 5'-gctaggctatatttcggatGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGaatcaccgcatta-3' (+)鎖
 3'-cgatccgatataaagcctaCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCttaagtggcgtaat-5' (-)鎖



Note: (-)鎖に設計する時は、向きに注意

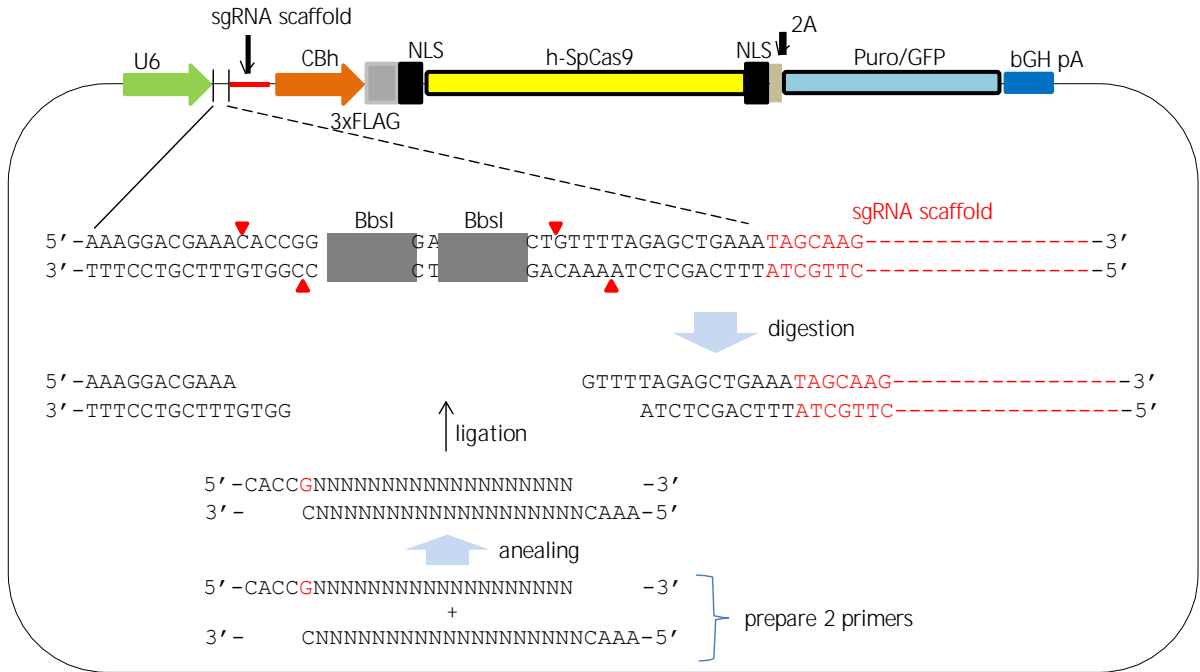
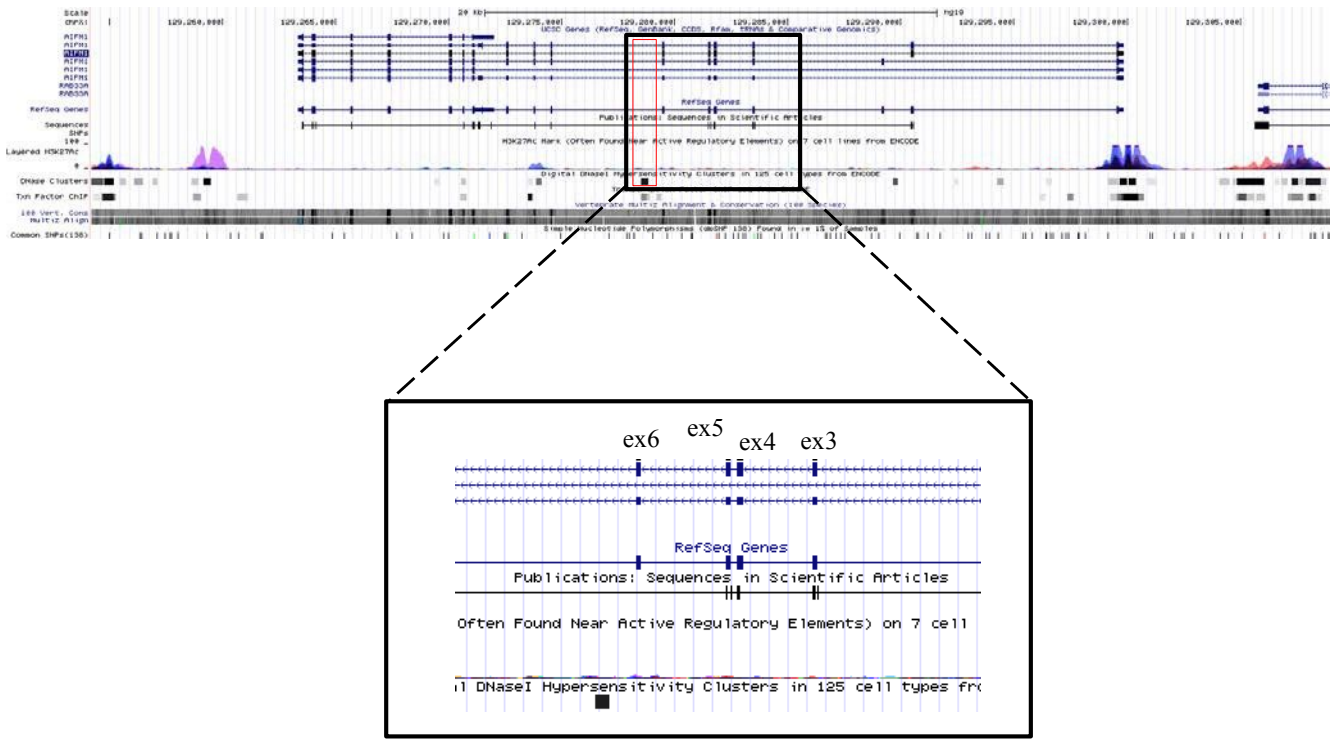


Fig.15 CRISPR/Cas9 plasmid we used in this study



ATTAGGGCTAGGGAATATAGCTCAGTGGCCTGATATGCGTAAGCCATAGGTAGTCTCTAGCTTCTAAATACATTAAAACTAAGTTAAAAGTCACTA
 AATAATCCTTCTGCTATGTATTATAAAGATGAAAAGCAGAACTAGTCATAATACTAAAAATCCTTCTCAATTTGAAAGTATAGGGGAAAGAGTA
 TGCTTGAAATAAAACACTTTAGTGAATATGATGTTTGACCCCTACTAATTATTAATTTGAGTGTCTCTGAGTCAGATTTCCACC

GCAGAGCGCTTGATTAGTATGCATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTGTGTTGCATAAAAGGAGCTAAC
 TAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTCTCATTTAATTGAAATGATGTTAGCCTATGTTATGATATAGGTGATCATGAAATAAACCTTCTCCATGTTTGG
 GTCTACAGGCTACAAGACTATTAAGAAGACCAAAAAGATATAATGAAAGAATAATGGGATTAG
 GACTGTCACCAGAAGAGAAACAGAGAAGAGCCATTGCCTCTGGTAAGGACTCCCTATGTCTCTCTGTGTGACT
 TGAGATAAATAAGGAAAGTGATTAAGTTGAGGTGCTATGATTTGCTAATATCCTGTTGAAGTGTAACAATGTGAGATGTAAGCTTCTAGAAAC
 TATGGTTTTACCCATAGCAGAGAGCAGTTTCCCTAAAGTATTTGATTTGACATTTTAACCTTGAGAGTAAAATTAATATTCTGGGTACCTATCCTTT
 TTTAATTTGTTTTATTACATTCCAAATGTTACCCCACTTCTGGTCCCCCTCCAAGATTTCTTACCCCATACCCCTCCCTTTGCTCTGAG

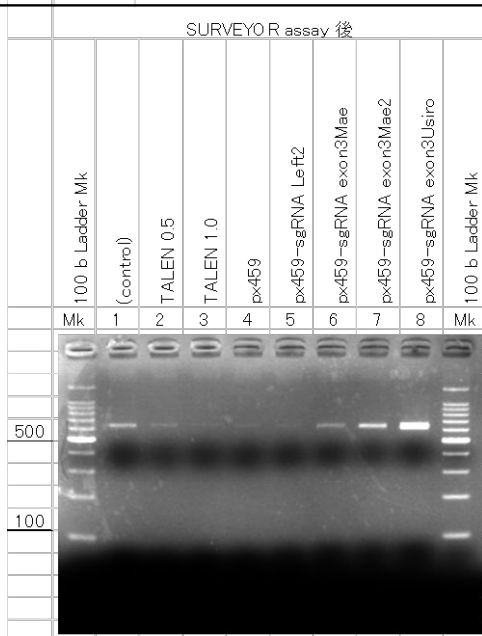
AGGGTGATCTTCCCCCCCCAACTCCCCCGTCAATCCTCCTTCTGTGGGGGCATCAGTCTCTACAGGATTAGGCACATCCTTTCCTCTGAAGCCA
 GCCAAGGCAGTCTCTGCTACATGAGTGCCAGGGCCTGAGATCAGCCTATGATGCTTTTTGGTTGGTGGCACAGTCCCTGGGAGCTTCCAGGGGT
 CCAGGTTAGTTGACACCGTTGTTCTTCTATGGGGTTGCATCCACTTCAGTCCTTCCCTAACCTTTTCATTGGGGTCCCTGTGCTCAGAACAATG
 CTCACCTGTGAGTATCTGCATCTGTCTCAGTCAGCTGCTGGTAGAGCCTCTCAGAGGACAGCCATGCTAGGCTCCTGCCTGAAAGTACAACATAGCA
 TCAGTAATAGTGTGGTGGTGGTGCCTGCCATGGGATGAATCCTAACCTGGGCCCTGGCARTGGTGGCCCTCCCTCAGTCTCTGCTCCATTTTT
 GTCTTTGCAATTTCTTTAGACAGGAACCAATTTGGGTCAAGAATTTGAAGTGGTGTGATGATATTTGGTGATTACTGGGAAAGATAGGAAGCC
 ATTTTCCAATGACTAAACCTTTCAATCACATTAATCCCTGAACTTTGGAGTTTGTAGTTGTTATAGATGTTGTTTCCCTGAGCACAAGCTC
 TAGCCTTCTATTTGATTCAGTTGGATTTTCAAAGAGGAATACTTTAATCCTTTAATAGGCCTATAATCTGGGTAGGCGGTTTGTATTGCTTTTCGC
 AATAATGCCTCCTTCTCATGAACATTGTATAATAATCCCAATGACCTCCTAGGTGTTTCCCTTTATGC

Fig.16 TALEN and CRISPR/Cas9 design targeted for AIFM1 exon3 region
 四角で囲んだ配列は、CRISPR 標的配列、太字黒または茶で示した配列は
 TALEN 標的配列を示す。大文字(緑)は、exon3を示す

・Platinum TALEN の Target: TTTCATCCCTAGTACTG-AAAAGTCAAATTCGC-CTTAGTAGTGTTCGATA

・CRSIPR/Cas9 の Target:

Name	Length	Start	End	Strand	Nucleotide sequence	GC% in spacer	Ranking	Match-start	Match-end
U6-Rev-exon3mae2	23	20	42	minus	GAATTGACTTTTCAGTACTAGG	30	100	135399601	135399625
U6-Rev-exon3mae	23	116	138	plus	GTTAGCCTATGTTTATGATATAGG	30	100	23972	23996
U6-Rev-left2	23	288	310	minus	GTACACAGAAGAGACATAGGGG	45	100	23800	23824
U6-Rev-exon3us iro	23	419	441	minus	GGAACTGCTCTCTGCTATGGGG	50	100	23669	23693



TALEN spacer (talen-VR-AIF-up-A)

```

SUR-PCR4_T1-2 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-3 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-13 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-24 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-9 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-15 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-19 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-20 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-22 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-5 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-18 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-4 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-23 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-11 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-10 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-7 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-16 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-6 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-8 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-17 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
PC12HS-tetoff10 111 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
  
```

```

SUR-PCR4_T1-33 111 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
SUR-PCR4_T1-42 111 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
SUR-PCR4_T1-27 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-35 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-30 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-31 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-29 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-39 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-32 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-36 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-25 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-37 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-45 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-44 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-26 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-38 107 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 216
SUR-PCR4_T1-48 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-34 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-28 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-46 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-43 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-47 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTTGCATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
  
```

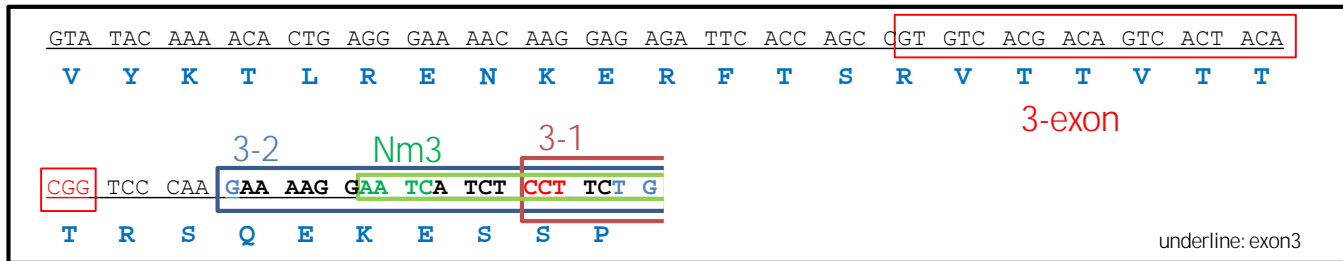
Fig.17 AIFM1 遺伝子 exon3 前後 intron 領域を標的にデザインした sgRNA と切断活性 (SURVEYOR Assay), シークエンス解析

AIFM1 KO by disruption of exon3

(chicken DT40 exon 3 region)

intron2

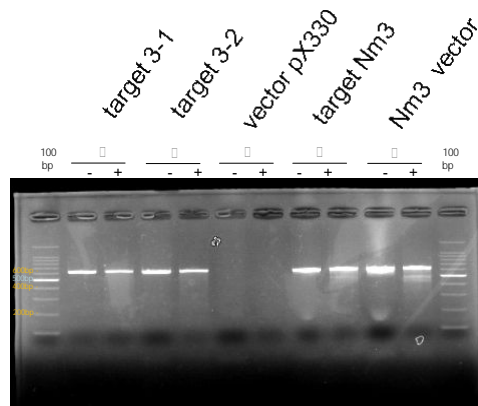
AGACAATCGGTTCTGCAGCCCCAAGACCAAATGTATGCAGAAAGCTTCATTGCTTGCTCATGGAAAGCAATCGGTCTGCT
 GAGTCCCATCCTATCATAAGTAGAGCAGGTAGTTTTCTGAGTGCATTCCTCCTACAGCTATGTATACATCCCCAGGTGCT
 TTTTAAACTCAGGTATATCTGGGTTTGGTTTGCCTTAGTTGAAAGCAATGATGCCTTTTCTGAGCAAGTAGGATAGACAAAAG
 TGTGTGGGGAACAGAAGCAGAATGATGCCTTGATGCTGTAACACATACAAGGTGAATGTCTTCTGCTGTGTCCAG



underline: exon3

GTGGGTAAGTGCCTGCAAGTTCTGGGTTTGGAGCTGTTTTTTCGTGAGCTGCTAACTTGAGACATCCAAAACAGATAGAACG
 GAGCCTGCATGAAAACACAGTGGTAAAAAGAGGAGGGGCCCTGCTTTGGGCTGTACCTTTTCCCAGCCTGGCAAAGAAG
 CAGTGCAGTTCCAGCACAAAATCCTCAGTGTGTCCTGTCCTGTTCCATTCAAGGAGCCTCACAGAGGGGAGAAATG
 AGGACAAAAGTAGCAAAGCTCTTGATAATTTCTTGCAGACTGTATGTGGACCACAGGTCACCTGAAAGGTTAAGTGATT
 GTGCAGATCTAGCTTAGAGAAACCATTTGCTGCAGTGTGGCACTTTGAGTCGTGCATGGAGCAGGCTTCAAGAGAAGGAG
 GGCTTAGGAAATACAGTGGGGGAGAAGGAAGGGAGGAGAACGTATTTGGAGTGTGTCTGCCAAAGGAGGTCCGTACA
 TGAAAAGATCTGGTGACACACTCTGT

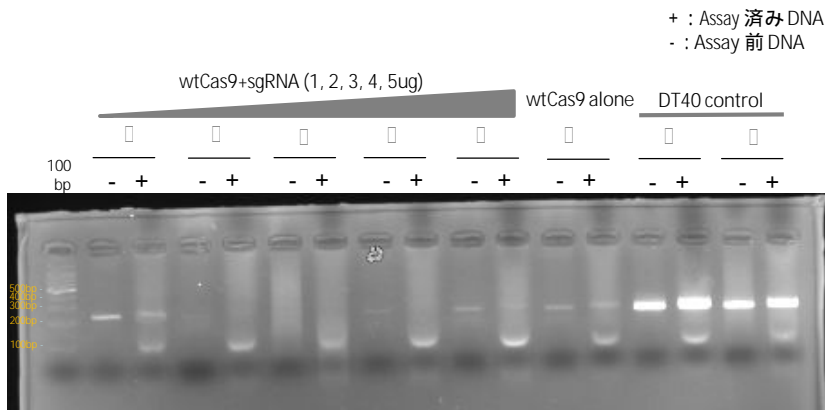
intron3



(px330: *Streptococcus pyogenes* Cas9,
 Nm3: *Neisseria meningitidis* Cas9)

surveyor nuclease assay

Fig.18 AIFM1 遺伝子 exon3-intron3 にデザインした sgRNA シーケンスと切断活性 (SURVEYOR Assay)



sequencing 結果

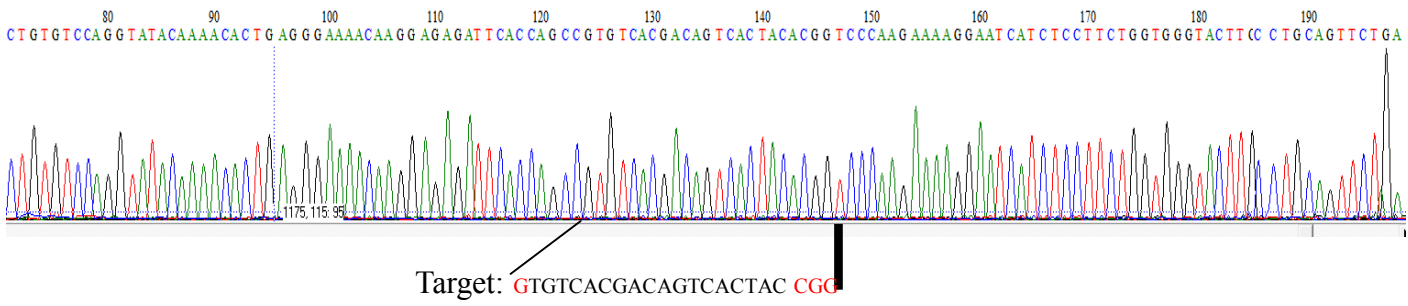
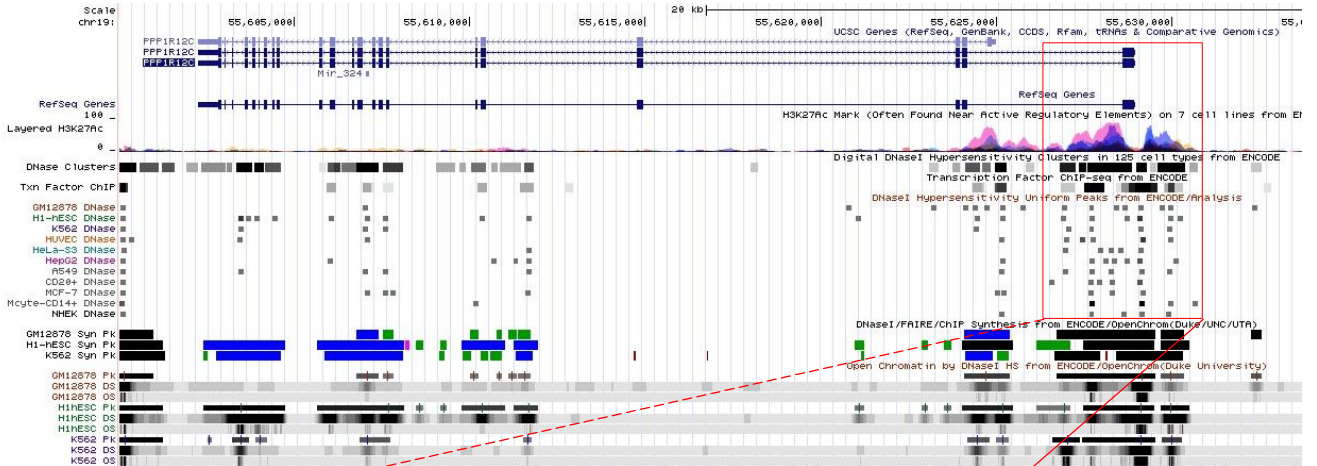


Fig.19 *AIFM1* 遺伝子 exon3 内部にデザインした sgRNA シークエンスと切断活性 (SURVEYOR Assay)とターゲット領域のシークエンス結果

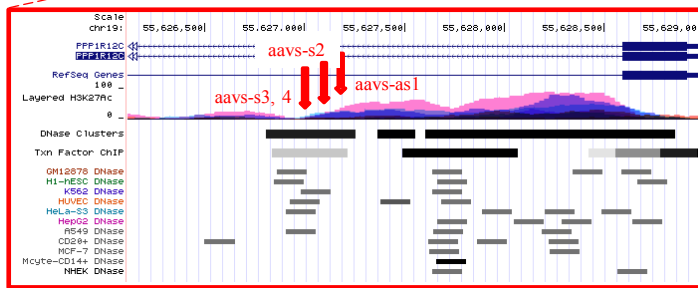
PPP1R12C gene

cell type: HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)
target: AAVS1 locus PPP1R12C (protein phosphatase 1, regulatory subunit 12C)

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)



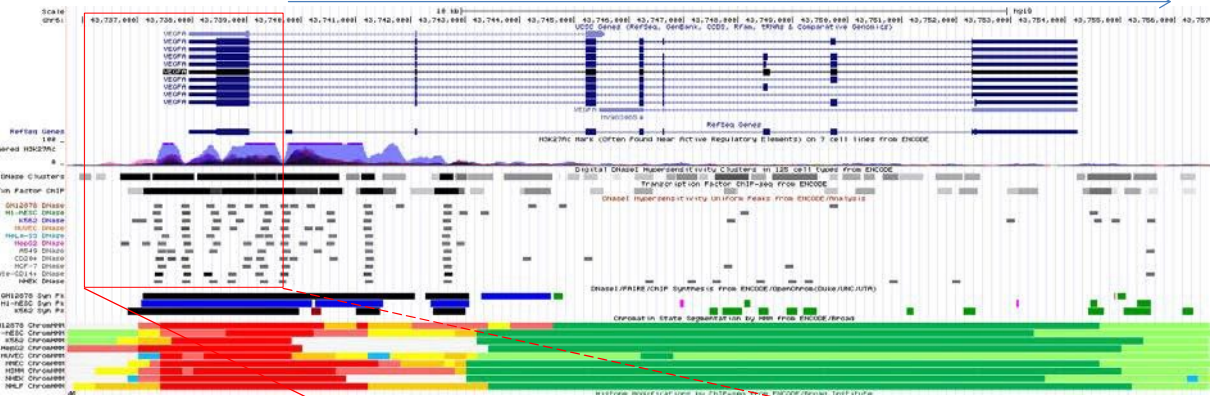
aavs-s2 indel 70%
aavs-s3, s4 indel 55-60%
aavs-as1 indel 20%



VEGFA gene

cell type: HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)
target: VEGFA (vascular endothelial growth factor A)

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)



target-1 indel 24%
target-3 indel 54%

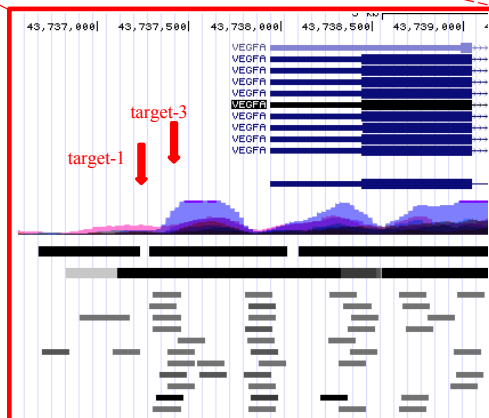
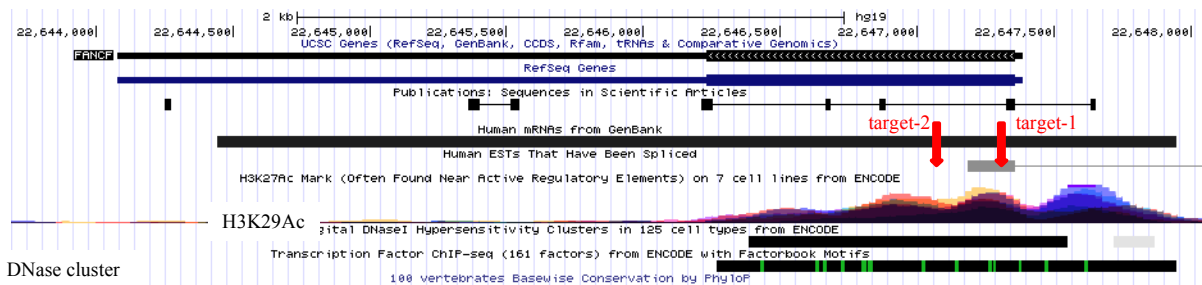


Fig.20 ENCODE データからみた各遺伝子標的部位のゲノム構造 (continued)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

FANCF gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: FANCF (Fanconi anemia, complementation group F)



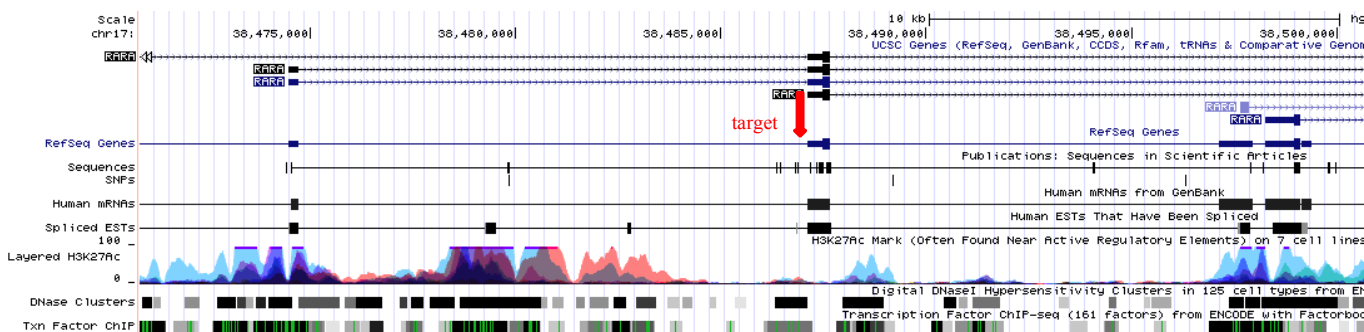
target-1 indel 17.8%
target-2 indel 12%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

RARA gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: RARA (retinoic acid receptor, alpha)



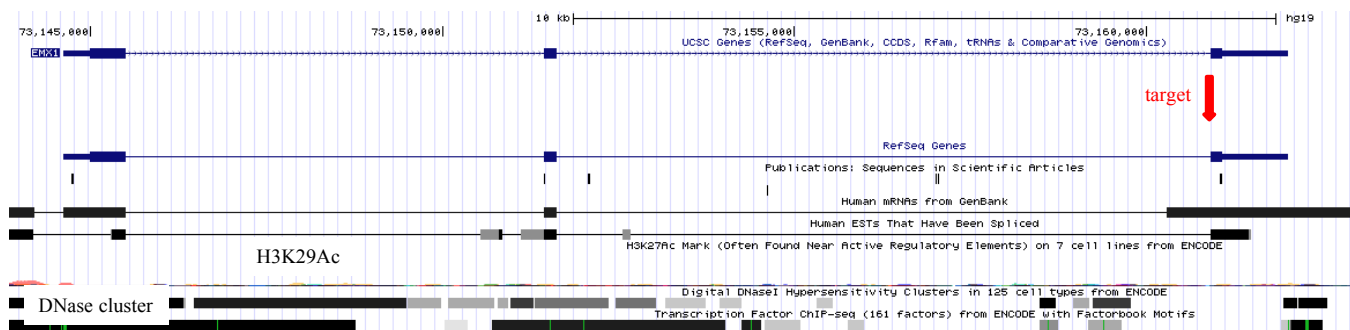
target indel 6.1%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

EMX1 gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: EMX1 (empty spiracles homeobox 1)



target indel 2.9%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Fig.21 ENCODE データからみた各遺伝子標的部位のゲノム構造 (continued)

AIFM1 gene



Fig.22 ENCODE データからみた AIFM1 遺伝子 exon3 周辺のゲノム構造)

組換えウシ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	α-ラクタアルブミン、ラクtofエリン、リゾチーム	トランスジェニックウシの牛乳の成分を調べた	中国	-		1	
	ヒトラクトフェリン	鉄貧血を起こしたラットにトランスジェニックウシの牛乳を飲ませた	中国	-		2	
	ヒトラクトフェリン	鉄を結合させたヒトラクトフェリンをトランスジェニックウシの牛乳から調製して、鉄貧血を起こしたラットに与えた	中国	体細胞核移植		3	
	ヒトラクトフェリン	GMウシの牛乳を新生児ブタに飲ませて腸内細菌叢を調べた	中国	-		4	
	2	ラクtofエリン、インターフェロン α	線維芽細胞に導入。細胞は乳腺炎と口蹄疫に耐性	中国	トランスフェクション	細胞の実験	5
		口蹄疫ウイルスの遺伝子に対する shRNA	口蹄疫に耐性のウシを作ることを目指す	中国	体細胞核移植		6
		ウシウイルス性下痢のウイルスに対する shRNA	ウイルスの複製を抑制することを目的とする	中国	トランスフォーメーション	細胞の実験	7
		β-ディフェンシン 3	乳腺において発現させた	中国	体細胞核移植		8
		lysostaphin	ぶどう球菌の感染からウシを守ることを目指す	中国	-		9
		インテグリン av サブユニット、ノックアウト	口蹄疫の感染効率が低下した	中国	体細胞核移植		10
		インテグリン b6 サブユニット、ダブルノックアウト	口蹄疫に耐性になった	中国	体細胞核移植		11
		ウシラクtofエリン、ヒトインターフェロン α	インターフェロン α の発現を検出した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	12
Ipr1		ウシ型結核菌に耐性になった	中国	体細胞核移植		13	
FMDV 由来するカプシドをコードする領域		アデノウイルスベクターの性質を調べた	米国	アデノウイルス		14	
3	線虫 Fat1	不飽和脂肪酸の含量が増えた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	15	
	線虫 mfat-1	組織と牛乳中で不飽和脂肪酸が大きく増えた	中国	-		16	
	線虫 fat-1	ゲノムに組み込まれ、タンパクが発現する胚を作った	中国	-		17	
	4	ミオスタチン遺伝子にフレームシフトを導入	肉の量を増やす、質を良くすることを目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	18
		ミオスタチン遺伝子に対する shRNA	筋肉の量を増加させることを目指す	米国	体細胞核移植		19
	ミオスタチン遺伝子に対する miRNA	筋肉量が 2 倍になった	中国	体細胞核移植		20	
	5	ヒトラクトフェリン、ヒトラクトアルブミン α	GM 製品から外来遺伝子を検出できた	中国	-		21
		β-ラクtoグロブリンに対する miRNA	β-ラクtoグロブリンの発現を抑制した	ニュージーランド	-		22
		プリオン	ウシ細胞で発現させた。狂牛病にならないウシの開発を目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	23
		リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		24
ヒトトランスフェリン		導入遺伝子が染色体に導入されたことを FISH 法で検出した	中国	-		25	
線虫 Fat1		3 通りにコドン最適化して異なる触媒効率が得られた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	26	
プリオン遺伝子に対する shRNA		プリオンの発現を抑制した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	27	
ヒト α-ラクtoアルブミン		血液学的、血清の生化学的指標は正常の範囲内だった	中国	-		28	
ヒトコラーゲン cDNA		胚は外来遺伝子を含んでいる	中国	体細胞核移植		29	
ヒトラクトフェリン		導入遺伝子を蛍光定量 PCR で検出する方法を作成した	中国	-		30	
ヒトラクトフェリン	導入遺伝子を次世代シーケンサーで調べた	中国	-		31		
プリオン遺伝子に対する shRNA	mRNA、タンパクの発現を抑制した。	中国	トランスフェクション	細胞の実験	32		
カテゴリー							
1. 牛乳に抗菌性タンパクを含ませる		2. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		3. 不飽和脂肪酸を作らせる			
4. 筋肉の量を増やす		5. その他					
食用トランスジェニックウシ (2012 年)							

組換えヤギ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	ヒトラクトフェリン	マーカー 1 つ、2 つで出生率などに差がなかった	中国	体細胞核移植		1	
	ヒトリゾチーム	高濃度のリゾチームを含むヤギミルクは腸細胞の損傷の修復を促進した	ブラジル	-		2	
	ヒトラクトフェリン	子孫の生殖能力、導入遺伝子発現の安定性に問題なかった	中国	-		3	
	β-ラクtoグロブリンに対する shRNA	線維芽細胞中で β-ラクtoグロブリンの発現を抑制した	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	4	
	ヒトラクトフェリン	泌乳サイクルの期間すべてで安定に発現した	中国	-		5	
	ヒトリゾチーム	ミルクを子豚に飲ませると糞便中の微生物が変わった	米国	-		6	
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカーを使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		7	
	リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		8	
	ヒトリゾチーム	GM 胚盤胞を作った	中国	体細胞核移植		9	
	ヤギリパーゼ	F1 において導入遺伝子が発現した	中国	精巢注入		10	
	ヒトラクトフェリン	GM 個体作成のためのドナー細胞の調製法と受容側の卵母細胞供給源の効果を調べた	中国	体細胞核移植		11	
2	ヒトラクトフェリン	組換えタンパクは天然の物と物理、化学的性質が同じだった	ロシア、ベラルーシ	-		12	
	ヒトラクトフェリン	ミルク中の組換えタンパクの量を経時的に調べた	ベラルーシ	-		13	
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカーを使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		14	
	ヤギ成長ホルモン	乳腺特異的な発現ベクターを作成した。ミルクの増産を目指す	中国	-		15	
	ヒトラクトフェリン	生殖機能に影響はなく、導入遺伝子は次世代に伝達して安定に発現した	中国	-		16	
	fat-1	脂肪組織で特異的に発現させるベクターを作り、線維芽細胞に導入した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	17	
		ミオスタチン遺伝子に点突然変異を導入	ミオスタチンタンパクの発現量が減少した	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	18
	3	インテグリン b6 サブユニット遺伝子ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロインジェクション		19
		Toll-like receptor 2	個体に侵入したバクテリアの除去が促進された	中国	マイクロインジェクション		20
	1. ミルクの改良 2. 肉の改良 3. その他						
食用トランスジェニックヤギ (2012 年)							

Fig.23-1 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

組換えブタ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
1	SIGLEC1 遺伝子不活性化、CD163 遺伝子不活性化	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスに耐性のブタの作成を目指す	米国	-		1
	O 型口蹄疫ウイルスの遺伝子に対する shRNA	トランスジェニックブタの線維芽細胞はウイルスを阻害した	中国	-		2
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対する shRNA	細胞においてウイルスの複製を阻害した	中国	トランスフォーメーション	細胞の実験	3
	PBD-2	広い抗菌活性を持つ可能性がある	中国	体細胞核移植		4
	インテグリン b6 サブユニット遺伝子ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロインジェクション		5
	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの遺伝子に対する shRNA	この疾患に耐性だった	中国	体細胞核移植		6
	IFITM3	ウイルス性疾患に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		7
	FUT1 遺伝子に対する shRNA	腸管毒素原性大腸菌 F18 に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		8
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対する siRNA	siRNA の発現を検出した	中国	-	細胞の実験	9
	口蹄疫ウイルスに対する ScFv	導入遺伝子を持つ細胞を選抜した	中国	レトロウイルス	細胞の実験	10
	sFat-1	導入遺伝子が F1 から F2 へ伝わった	中国	-		11
	ブタ成長ホルモン	F1 において野生型よりも成長ホルモンの発現が多かった	中国	-		12
	ヒトリゾチーム	糞、周辺の土壌、胃腸の微生物相を調べた	中国	-		13
	線虫 Fat-1	筋肉と主要な組織で n-6/n-3 比が下がった	中国	体細胞核移植		14
	ブタ成長ホルモン	Tet-On システムを利用してコンディショナルに発現させた	中国	-	細胞の実験	15
	ブタ成長ホルモン	導入遺伝子が次世代に伝わった	中国	ナノ遺伝子キャリアー法		16
カテゴリー						
1. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		2. その他				
	食用トランスジェニックブタ (2012 年)					

組換えヒツジ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ミオスタチン、その RNAi	線維芽細胞でのミオスタチン遺伝子の発現を調べた	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	1
線虫 fat-1	CMV プロモーターを用いたときはサイレンシングを受け、高度なメチル化によるかもしれない	中国	体細胞核移植		2
ミオスタチンに対する shRNA	ミオスタチン遺伝子の発現が抑制された	中国	体細胞核移植		3
ミオスタチンに対する siRNA	ミオスタチンの発現を抑制した。GM 桑実胚を作った。	中国	体細胞核移植		4
ミオスタチンに対する shRNA	筋芽細胞の分化におけるミオスタチンの役割を調べた	中国	-		5
	食用トランスジェニックヒツジ (2012 年)				

組換えウサギ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ヒト fucosyltransferase 1	乳の分泌期間が短くなった	米国	-		1

Fig.23 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

組換え魚

カテゴリー	魚の種類	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	アマゴ	ベニザケ成長ホルモン 1	肝において脂肪酸の組成と量が変わった	日本	-	-	1	
	コイ	成長ホルモン	ラットに食べさせて亜慢性毒性は現れなかった	中国	-	-	2	
	サケ	成長ホルモン	酸化ストレスを調べた	スウェーデン	-	-	3	
	ドジョウ	ドジョウ成長ホルモン	トジウレクチンプロモーターを使って成長速度を抑制した	韓国	-	-	4	
	コイ	コイ成長ホルモン	大きくなった	韓国	-	-	5	
	サケ	サケ成長ホルモン	プロモーターと魚の系統によって成長が異なった	カナダ	-	-	6	
	コイ	成長ホルモン	子孫の間で成長にばらつきがあった	中国	-	-	7	
	サケ	成長ホルモン	ウシ成長ホルモンを投与して成長と内分泌効果を調べた	カナダ	-	-	8	
	不明	コイインシュリン様成長因子 2b	高い生存率を持った	中国	マイクロインジェクション	-	9	
	サケ	成長ホルモン?	脳の大きさと構造を調べた	スウェーデン	-	-	10	
	アマゴ	成長ホルモン1	脳下垂体の iTRAQ プロテオーム解析を行った	日本	-	-	11	
		ニジマス	ミオスタチンノックアウト、ミオスタチン阻害剤	運動の成長への効果を調べた	米国	-	-	12
		サケ、マス、ティラピア	成長ホルモン	Aqua Bounty 社のサケは FDA の審査を受けている	米国	-	-	13
		サケ	成長ホルモン	早熟性の雄の成熟が減少する	カナダ	-	-	14
2	サケ	抗凍結タンパク	凍結に耐性のサケを作ることを試みた	カナダ	-	-	15	
カテゴリー	1. 体を大きくする	2. その他						
	食用トランスジェニック魚 (2012 年)							

組換えエビ・カニ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
white spot syndrome virus env gene (VP28, VP19)、これらの融合遺伝子	トランスジェニック藻は魚、エビ、カニなどに用いる予防薬、治療薬、餌、添加物に使える	中国	トランスダクション		1
食用トランスジェニックエビ、カニ (2012 年)					

導入遺伝子の説明

- ラクトフェリン 母乳・涙・汗・唾液などの外分泌液に含まれる鉄結合性の糖タンパク質である。ラクトフェリンは、強力な抗菌活性を持つことが知られている。鉄を奪い去ることで、細菌の増殖を抑制する。また、グラム陰性菌の細胞膜の主要な構成成分であるリポポリサッカライドと結合することで、細胞膜構造を脆弱化し、抗菌活性を示す。さらに、免疫系に対する効果があることが知られている。
- ラクトフェリシン ラクトフェリンをペプシンで分解した部分ペプチドである。細菌の細胞壁に障害を与えることでラクトフェリンよりも 10 倍以上強力な抗菌活性を示す。
- ラクトアルブミン 乳に含まれ、乳清から得られるアルブミンである。ラクトアルブミンは、多くの哺乳類の乳に含まれる。
- リゾチーム 真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素である。ヒトの場合涙や鼻汁、母乳などに含まれている。
- ミオスタチン 筋肉成長を抑制する因子である。
- fat-1
 - -3-脂肪酸サチュラーゼという酵素を作り、□ -6-脂肪酸を □ -3-脂肪酸に変える動物では不飽和脂肪酸を体内で合成できる量だけでは必要量を満たすことができず、摂取する必要がある。不飽和脂肪酸は主に植物や魚に含有されるが、人の食事では十分に摂取できていないケースがあると考えられている。動物の体内で少量作られる □ -6-脂肪酸を □ -3-脂肪酸に変えて、人が肉を食したときに □ -3脂肪酸を摂取することを可能にするために GM 動物が作成されている例がある。

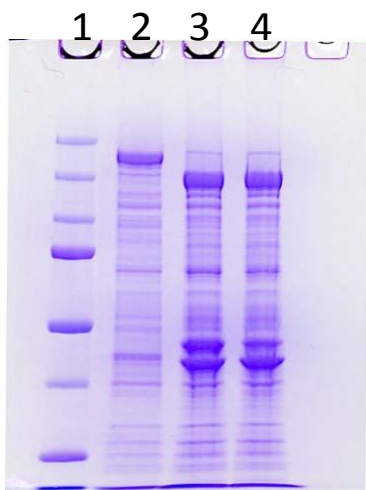
Fig.23-3 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

次世代遺伝子組換え技術を用いた GM 動物

1. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* (2011) 21 (11) 1638-1640
2. Dong Z, Ge J, Li K, Xu Z, Liang D, Li J, Li J, Jia W, Li Y, Dong X, Cao S, Wang X, Pan J, Zhao Q. Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases. *PLoS One* (2011) 6 (12) e28897
3. + He, Hongbin; Wu, Jianming; Wang, Hongmei; Liu, Xiao; Liu, Wenhao; Fang, Yongzhi; Zhong, Jifeng. Method for knocking out bovine integrin $\beta 6$ subunit gene with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102660577 A 20120912.
4. Liu, Xu; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Chang, Bohao; Liu, Jun; Guo, Zekun; Quan, Fusheng; Zhang, Yong . Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows . *Nature Communications* (2013), 4, 3565, 11 pp
5. Liu, Xu; Zhang, Yong; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Quan, Fusheng. A kind of targeting vector for site-directed integration of Lys gene in β -casein locus and its constructed cell. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103215295 A 20130724.
6. Li, Rongfeng; Li, Xueling; Zhao, Yuhang; Yun, Ting; Liang, Hao. Method for rapidly knocking out myostatin gene and integrating exogenous gene at specific site with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103088046 A 20130508.
7. Liu, Mingjun; Zhang, Xuemei; Li, Wenrong; Zhang, Ning; He, Sangang; Liu, Chenxi; Ma, Yila. Method for knocking out ovine myostatin gene with zinc finger nuclease. *Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103290045 A 20130911.
8. Yu, Shengli; Luo, Junjie; Ding, Fangrong; Li, Song; Tang, Bo; Li, Ning. Method for knocking out bovine myostatin gene with zinc finger nucleases. *Faming Zhuanli Shenqing* (2011), CN 102260711 A 20111130.

Fig.23-4 次世代遺伝子組換え技術を用いて作製され GM 動物に関する論文

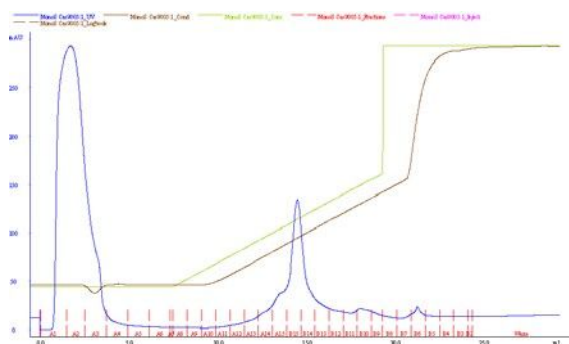
ProTEV Plus による SpCas9-MBP-His₆ の消化



キレートカラムのフラクションを2つに分けて、ProTEV Plus の使用量を変えて消化

レーン1：分子量マーカー
レーン2：消化前
レーン3：ProTEV Plus, 750 u
レーン4：ProTEV Plus, 250 u

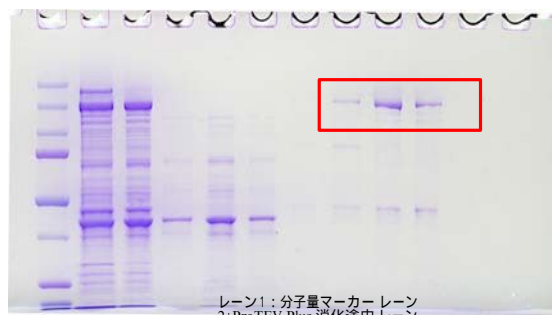
Mono S による精製



バッファーA: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10% グリセロール; pH 7.5
バッファーB: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10% グリセロール, 1 M KCl; pH 7.5

グラジエントは 15-55%B を緩やかにした。

1 2 3 4 10



レーン1：分子量マーカー
レーン2：ProTEV Plus 消化途中
レーン3：消化後、カラム前
レーン4-10：カラムのフラクション

Fig.24 human-condon optimized SpCas9: 発現と精製