

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2013 74 PMID:23958582 CRISPR	Arabidopsis, rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1229-32. doi: 10.1038/cr.2013.114. Epub 2013 Aug 20. No abstract available.
2013 75 PMID:23956122 CRISPR	rice Pennsylvania State University, PA, USA RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. Xie K, Yang Y. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/ss119. Epub 2013 Aug 17.
2013 76 PMID:23929340 CRISPR	Nicotiana benthamiana The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK Targeted mutagenesis in the model plant <i>Nicotiana benthamiana</i> using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):691-3. doi: 10.1038/nbt.2655. No abstract available.
2013 77 PMID:23929339 CRISPR	Arabidopsis, <i>Nicotiana benthamiana</i> Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in <i>Arabidopsis</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i> using guide RNA and Cas9. Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):688-91. doi: 10.1038/nbt.2654. No abstract available.
2013 78 PMID:23929338 CRISPR	rice Chinese Academy of Sciences, Beijing, China Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):686-8. doi: 10.1038/nbt.2650. No abstract available.

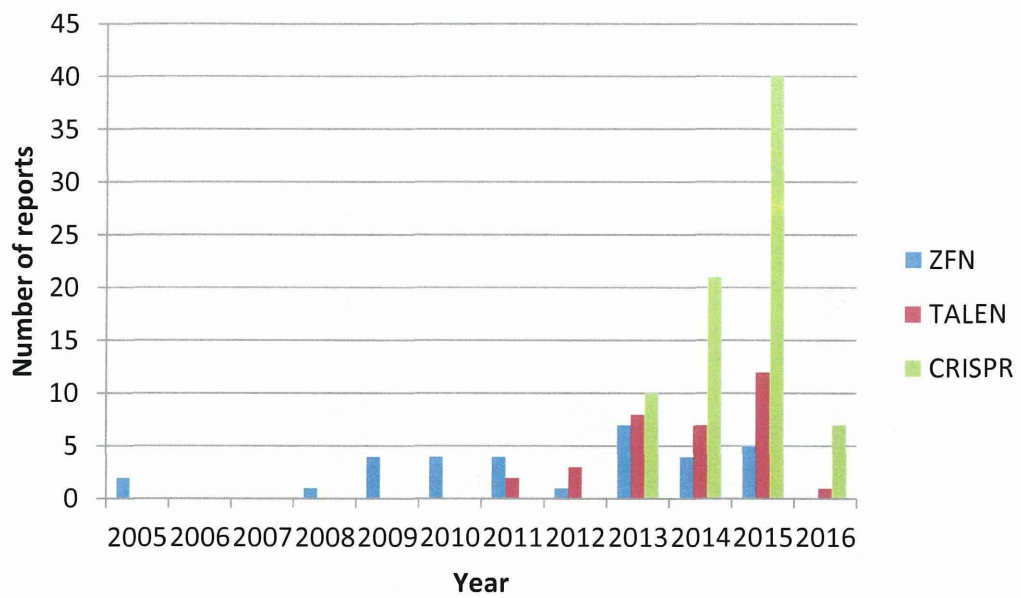


図1. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の植物関連論文数の推移
(植物に対する実施報告数、2016年は2月19日集計時まで)

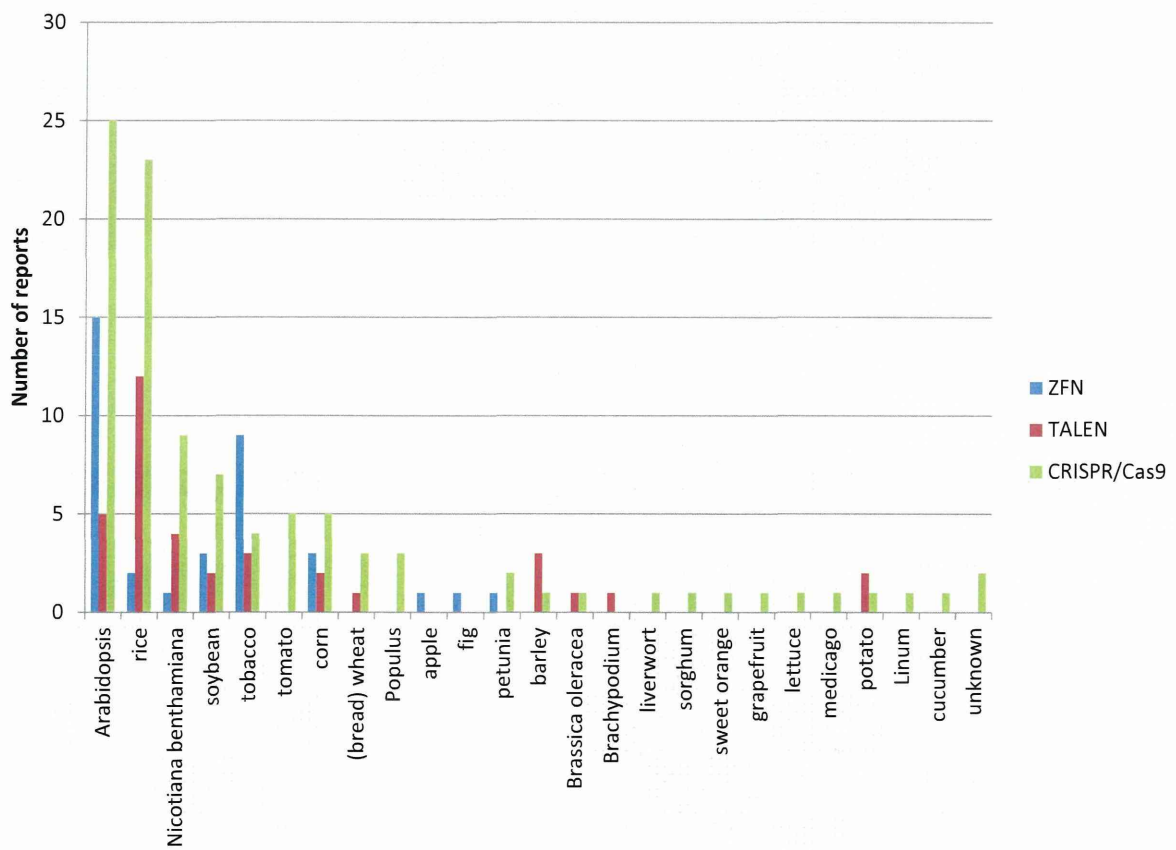


図2. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の対象植物別報告数

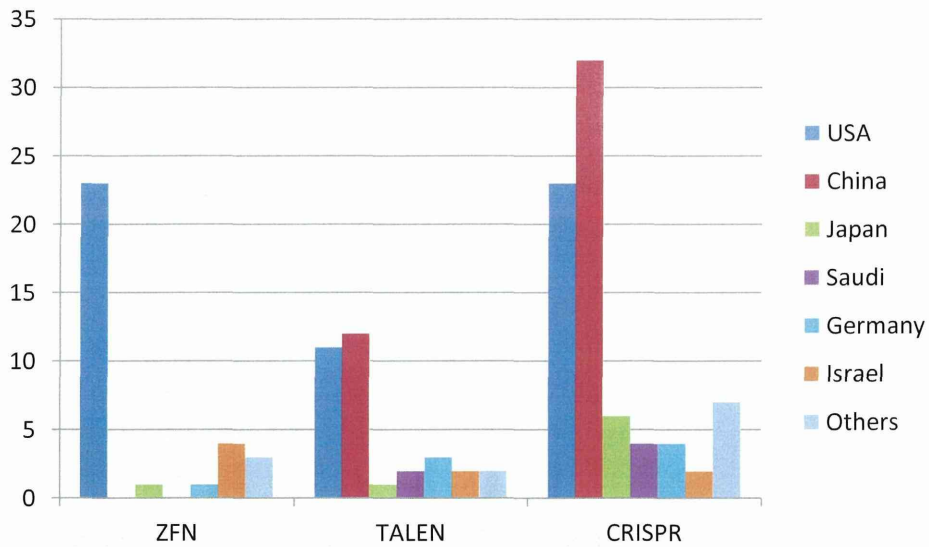


図3. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数

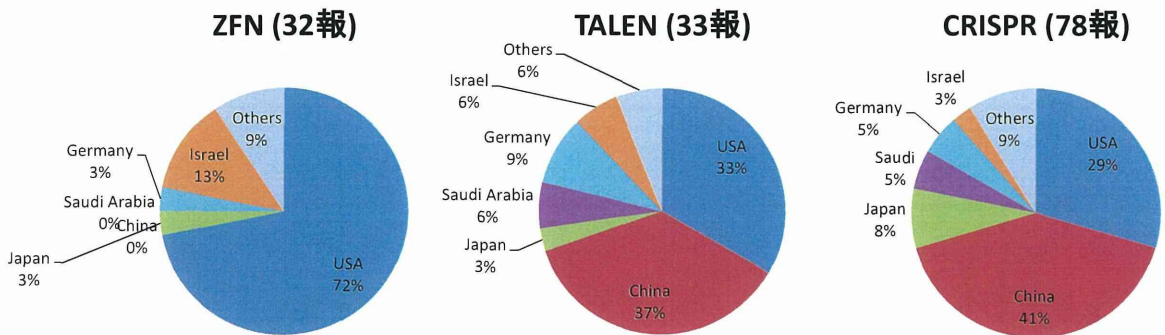


図4. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数の割合

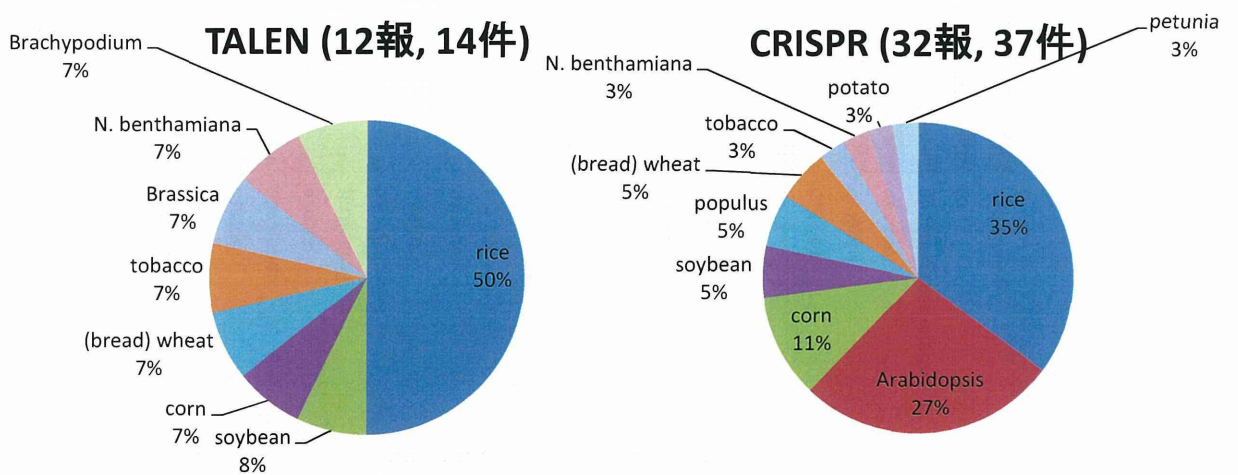
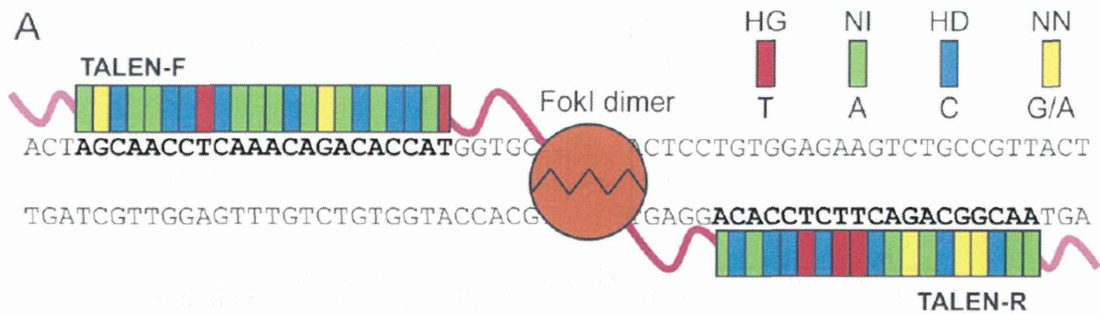


図5. 中国が実施したNBT(TALEN, CRISPR)の対象植物種の割合

- ・標的配列を認識する部位とDNAを切断するヌクレアーゼ部位からなる。
- ・ヌクレアーゼ部位は2分子が結合して初めて活性型となる。
- ・2分子が揃うまで活性型にならないため、特異性が高い。



- ・標的配列の両端をそれぞれ1分子のTALENが認識すると、標的配列の近傍でヌクレアーゼ部位が近接してヘテロダイマーを形成する。

図6. TALENによる部位特異的なゲノム切断の原理

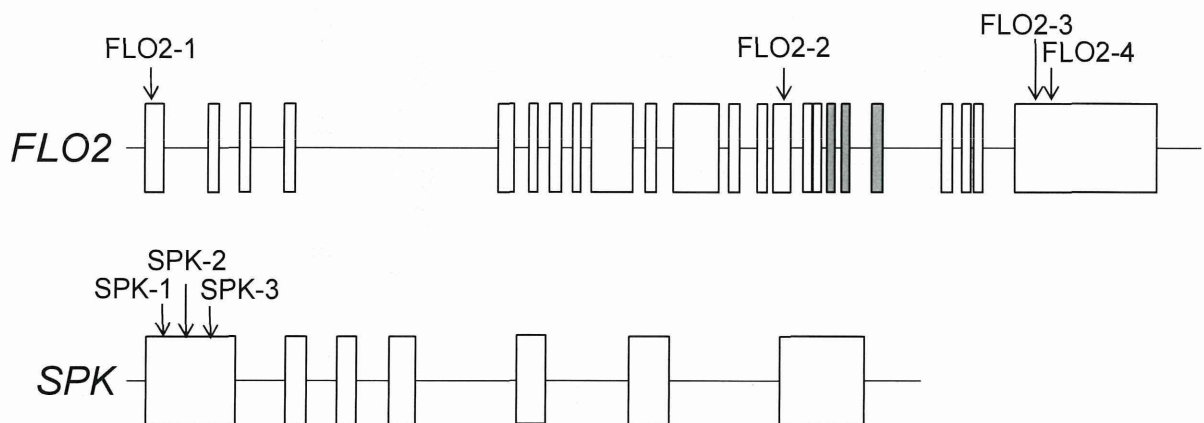


図7. TALENによる標的部位 (*FLO2*遺伝子、*SPK*遺伝子)

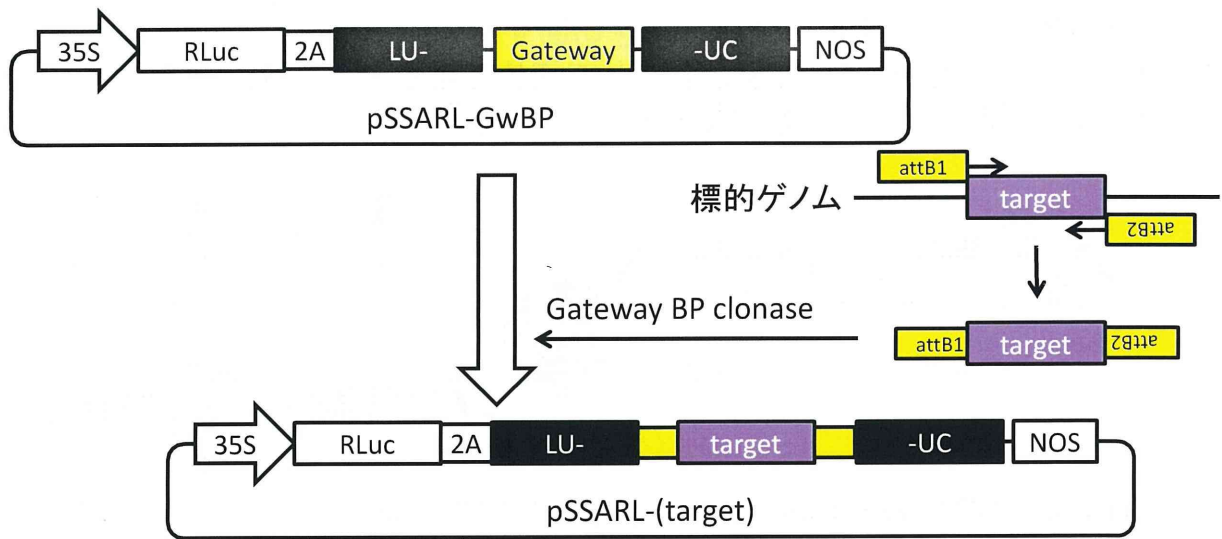


図8. ルシフェラーゼをレポーターとしたSSAアッセイ用プラスミドの構造
 分断されたルシフェラーゼ遺伝子の間の領域にGateway法により標的配列を挿入することができる。

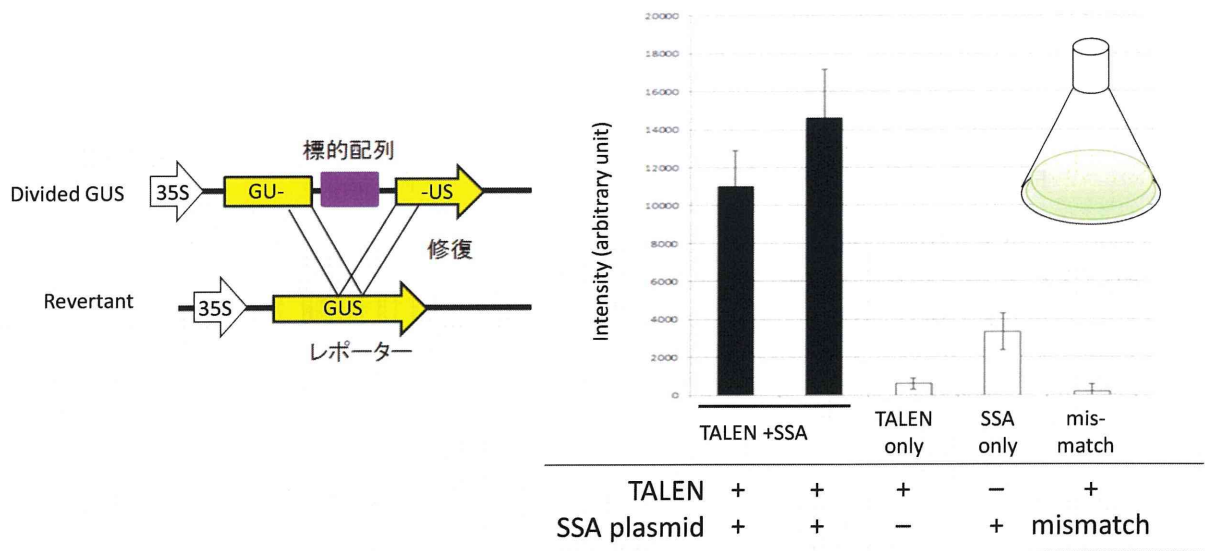


図9. イネ培養細胞を用いたTALENの活性の検出(SSAアッセイ)
 β グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)を2部位に分け、TALENの標的となる配列を挿入した遺伝子をレポーターとした。2分割された各断片は一部で重複している。
 イネ培養細胞にこのレポーターを含むベクターと、TALENをコードするプラスミドを導入し、24時間後にGUS活性を測定した。その結果、TALENの標的配列とSSAプラスミドに含まれる標的配列とが一致する場合に高いGUS活性が観察された。

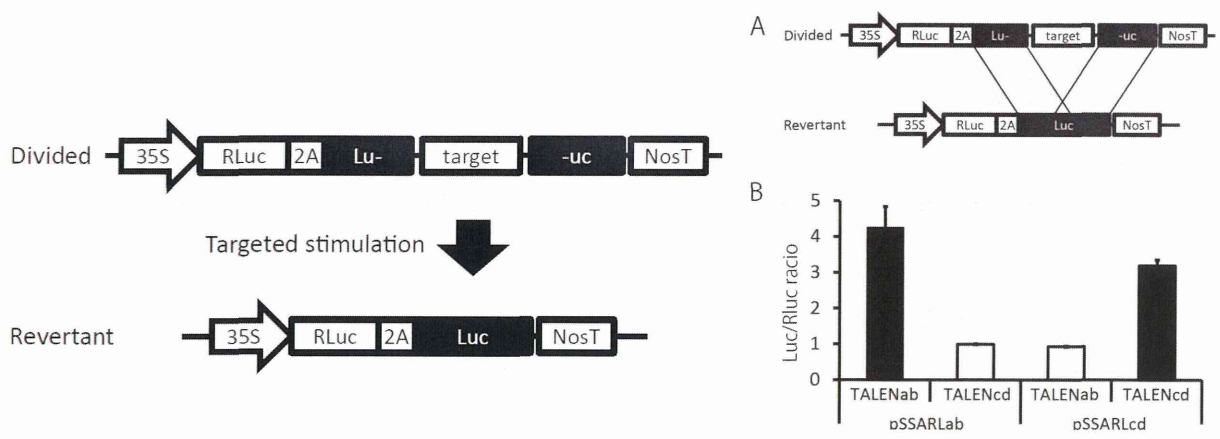


図10. 大腸菌を用いたTALENの活性の検出

ルシフェラーゼ遺伝子(Luc)を2部位に分け、TALENの標的となる配列を挿入した遺伝子をレポーターとした。2分割された各断片は一部で重複している。イネ培養細胞にこのレポーターを含むベクターと、TALENをコードするプラスミドを導入し、24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、SSAプラスミドに含まれる配列がTALENの標的配列と一致する場合に高いルシフェラーゼ活性が観察された。なお、ウミシイタケルシフェラーゼを内部標準として使用した。

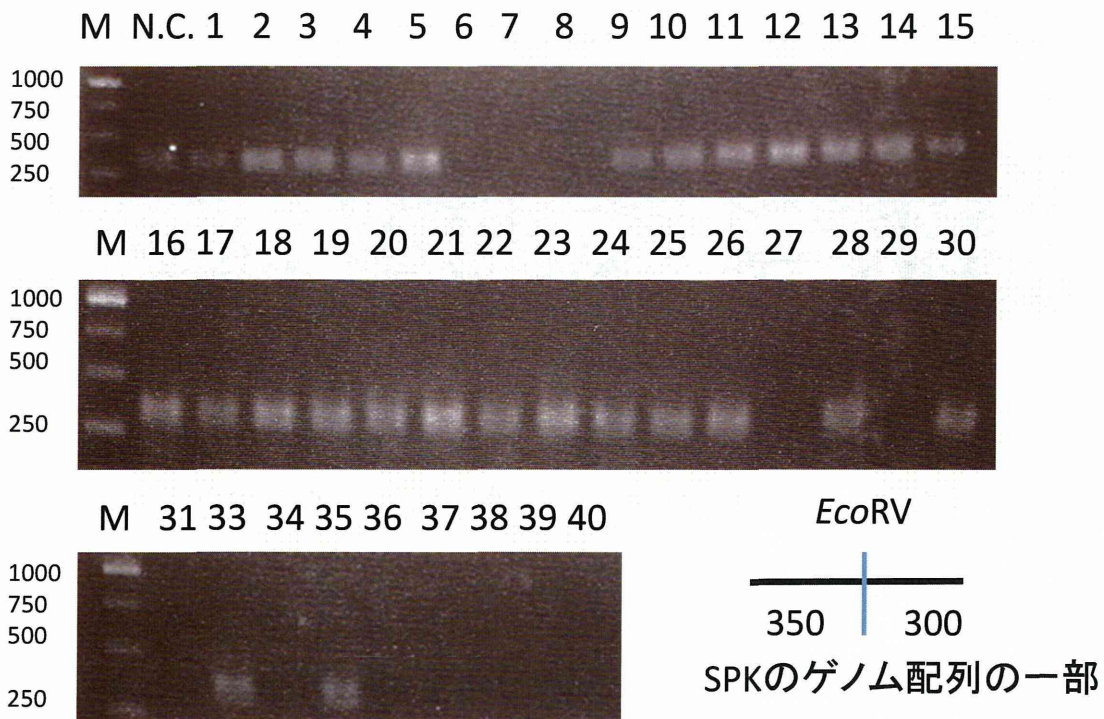


図11. TALENを導入した形質転換植物の検定

イネの遺伝子を標的とするTALEN遺伝子を構築し、イネに導入した。合計63個体の形質転換体全てで導入遺伝子の存在が確認されたため、これらの個体から抽出したゲノムDNAの標的領域をPCRで増幅した後、EcoRVで切断し、ゲノム編集が起こっているかどうかを調べた。ゲノム編集が起こっているとEcoRVでの切断パターンが変わることが予想される。



図12. TALENコンストラクト導入組換え体イネをモデルとした検知法の検討
 (a)植物における遺伝子組換えを伴うTALENにおいては、2つのTALENユニットを同時に発現させるため、図のような構造のコンストラクトが導入されている可能性が高い。
 (b)検知対象領域として(1) CaMV35Sプロモーター領域、(2)TALE-C-FokI領域、そして陽性対照としてイネのSucrose Phosphate Synthase (SPS)を選択した。

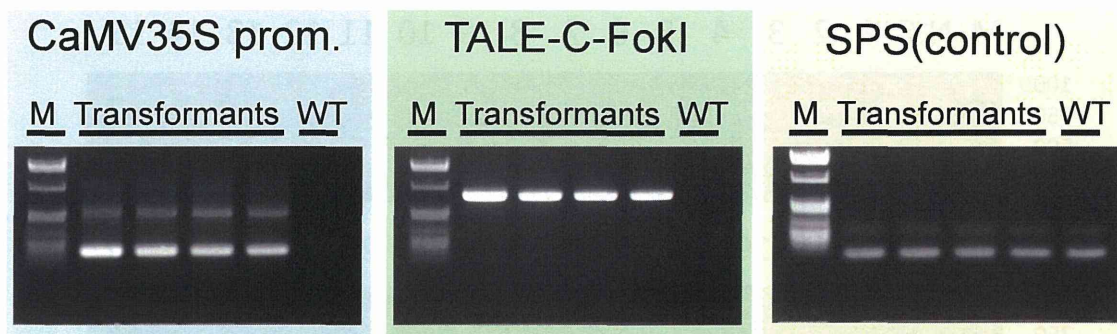


図13. 各領域に対して設計したプライマーを用い、モデル組換え体イネより調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った結果
 いずれの組換え体もCaMV35Sプロモーター領域及びTALE-C-FokI領域を標的としたPCRで陽性となった。これらの2領域は非組換え体(WT)では検出されない。

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26870061
Target plant	Nicotiana tabacum BY-2 cells
Target gene	mCherry (red fluorescent protein, model target)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (BY-2 suspension cells)
Abstract	タバコBY-2懸濁細胞にアグロバクテリウム法で赤色蛍光タンパク質mCherryを発現するT-DNAを挿入した組換え細胞を構築し、CRISPR/Cas9によるmCherry遺伝子を標的とした遺伝子編集実験のプラットフォームとした。mCherry上3ヶ所を標的としたCRISPR/Cas9遺伝子sgRNA1-3を設計し、Cas9と共にmCherry導入BY-2細胞にアグロバクテリウム法で導入したところ、20個の遺伝子導入体のうち7つにおいて標的部位の短絡が生じていることが判明した。3ヶ所の標的部位で切断、欠損が起こり、標的部位3において1塩基の欠損、標的部位1と3、2と3の間でそれぞれ168bp、41bpの欠損が生じた変異体が取得された。以上のようにCRISPR/Cas9がタバコBY-2細胞で使用できることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	TALEN/CRISPR/Cas9
PMID	26864017
Target plant	Arabidopsis thaliana, Linum usitatissimum (flax, 亜麻)
Target gene	BFP transgenic model (Arabidopsis thaliana), EPSPS (グリホサート耐性) (亜麻)
Gene transfer method	Arabidopsis thaliana: TALEN, CRISPR/Cas9, flax: CRISPR/Cas9 ssODN + phleomycin, protoplast, TALEN + ssODN, protoplast, CRISPR/Cas9 + ssODN, protoplast PEG法, transient expression
Abstract	標的配列の改変配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)とTALENまたはCRISPR-Cas9を同時に導入することで正確なゲノム編集を行う方法を示す。シロイヌナズナでは、PhleomycinまたはTALENによる変異導入(BFP(H66:Blue)がGFP(Y66:Green)への変換)効率が、ssODNとの同時導入により導入量依存的に上昇することが示された。TALENとssODNを併用することで、ssODNの長さ依存的にBFPからGFPへの変換効率が上がることが示された。なお、TALENまたはCRISPR/Cas9単体では、TALENと比較してCRISPR/Cas9の方が変異導入活性(NHEJ活性)が高い。亜麻において、グリホサート耐性に関わるEPSPS遺伝子(2遺伝子)を標的とするssODN(2配列)をCRISPR/Cas9と同時導入し、得られたカルルスに目的の変異が導入された割合は、0.15%または0.08%であった。変異導入に成功した系統のひとつA23のカルルスおよび
Off-target analysis	標的配列と相同な配列(BFPについてはCas-OFFinderで見出された5つ、亜麻EPSPSについてはPhytozyme 10.2で検索された8つ)についてNGS(MiSeq)で解析。BFPでは、5つの標的配列に相同な配列に対するOff-target analysis (CAS-OFFinder)を行った結果、1つの配列のみに1/13の頻度で変異導入(indel)が認められた。また、EPSPSでは、個体A23においては、off-target変異導入は認められなかった。
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26842992 (abstract only)
Target plant	maize
Target gene	Zmzb7 gene
Gene transfer method	protoplast transformation
Abstract	CRISPR/Cas9をトウモロコシのゲノム編集に適用した。10系統のカルルスから取得した120個のseedlingから期待されたアルビノの形質を示す変異体が得られた。また、トウモロコシのヘテロクロマチン領域についても変異導入効率を検討した。セントロメア及びベリセントロメアの発現レベルの異なる12領域を選び、プロトプラストに対しCRISPR/Cas9を適用したところ、発現の有無に関わらず、ヘテロクロマチン領域は標的となることが示された。また、PAM配列を欠く場合や、ミスマッチが2塩基以上ある場合は、相同な配列であってもoff-target活性は認められないことが判明した。以上のように、CRISPR/Cas9はトウモロコシにおいて、ユークロマチン、ヘテロクロマチンの両領域にゲノム編集に適用可能であることが示された。
Off-target analysis	off-target解析あり(詳細不明)
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26842991 (abstract only)
Target plant	maize
Target gene	phytoene synthase gene (PSY1)
Gene transfer method	protoplast transformation
Abstract	コドン最適化したCas9及び、トウモロコシU6 snRNAプロモーター発現のsgRNAを用いたトウモロコシにおける標的ゲノム編集について検討した。プロトプラストアッセイでは90の遺伝子座において標的遺伝子変異が認められ、平均切断効率は10.67%であった。トウモロコシのPSY1遺伝子に対する安定ノックアウト変異体が得られた。生じた変異は後代に引き継がれた。さらに、計算上予測されたoff-target領域についてはoff-target活性は認められなかった。また、Cas9発現及び非発現系統でトランスクリプトーム解析を行った結果、顕著な差異は認められなかった。
Off-target analysis	Off-target予測サイトにおいてはoff-target活性は認められなかった。
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26839579
Target plant	Nicotiana benthamiana
Target gene	xylosyltransferase (XT)
Gene transfer method	Agroinfiltration (Agrobacterium tumefaciens GV3101) transient expression assay
Abstract	植物合成生物学において頻用されるようになりつつあるモジュラーDNA構築システムであるGoldenBraid (GB)をCRISPR/Cas9遺伝子の構築に適用した。構築したCRISPR/Cas9はベンタミアナタバコにおける一過性発現によりアッセイにより標的遺伝子破壊及び、転写調節に利用可能であった。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26837606
Target plant	Petunia (Petunia hybrid)
Target gene	phytoene desaturase (PDS), carotenoid biosynthesis
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (young leaves) Basta selection
Abstract	ベチュニアを材料として、phytoene desaturase(PDS)遺伝子のCRISPR/Cas9による編集を試みた。PDS遺伝子の2カ所を標的とするsgRNAをデザインし、それぞれ単独または同時に発現させた。1カ所を認識するsgRNAを導入した場合、バスタ耐性を示したT0世代の55.6%-87.5%がアルビノの形質を示した。また、2つの異なる部位を標的とするsgRNAを同時に導入した場合は、両者の間の約1 kbの領域が欠損した系統が得られた。また、Cas9とsgRNAの同時発現と比較すると変異導入効率は低下するが、はじめにCas9を組換えにより導入しておき、その組換え体にsgRNAを導入した場合も変異を誘導で
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26825596 (abstract only)
Target plant	Petunia x hybrida
Target gene	nitrate reductase (NR)
Gene transfer method	direct delivery of purified recombinant Cas9 and sgRNA to protoplast
Abstract	ペチュニアを材料として、プロトプラストに精製した組換えCas9タンパク質及び標的(nitrogen reductase, NR)特異的なsgRNAを導入した。RGEN RNPの一過的導入ののち、T7E1アッセイによって標的部位の変異を検出し、標的部位に対する塩基配列解析を確認を行った。T7E1アッセイの結果、NR1,2,4,6の4部位で2.4-21%の頻度で変異が生じ、平均変異導入率は14.9±2.2%であった。変異導入を行ったプロトプラストに対する塩基配列解析では、5.3-17.8%、平均11.5±2%の頻度で変異が確認された。また、欠損と挿入の割合は63:37であった。RGEN RNPのプロトプラスト細胞への直接導入は植物での標的変異導入、ゲノム編集に有用であることが示された。
Off-target analysis	off-target解析不明 (abstract only)

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26808139 (abstract only)
Target plant	cucumber (Cucumis sativus L.)
Target gene	eIF4E, ウィルス耐性の付与
Gene transfer method	導入手法不明
Abstract	キュウリ(cucumber)を材料とし、ウィルス耐性の付与を目的としてCRISPR/Cas9により、eIF4E遺伝子の破壊を行った。EIF4E遺伝子のN末端及びC末端を標的としたCas9/sgRNAを導入したT1世代においては、標的部位において小規模の遺伝子欠損またはSNPsが認められた。非組換え(T-DNA脱落の意味か?)の系統を用い、ホモ変異体を取得した。T3世代ホモ系統は、cucumber vein yellowing virus (ipomovirus), potyviruses Zucchini yellow mosaic virus, Papaya ring spot mosaic virus-WIに抵抗性を示したが、ヘテロ及び非変異体はこれらのウィルスに高い感受性を示した。このように初めて非遺伝子組換えで、生育に影響を与えることなく、また長期間の戻し交配を必要とせず、ウィルス抵抗性のキュウリを作出す
Off-target analysis	off-target解析: 推定off-target部位のみ対象

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26768120
Target plant	rice
Target gene	acetolactate synthase (ALS1), confers bispyribac sodium resistance
Gene transfer method	particle bombardment, Agrobacterium-mediated
Abstract	イネのALS1遺伝子に変異を導入するために種々の実験を行った。①トウモロコシで成功している、一本鎖オリゴDNAを用いる手法: Cas9-gRNAとW548LまたはS627I変異を導入するための一本鎖オリゴDNAをparticle bombardmentにより導入したが、ALS遺伝子に変異が導入された系統は取得できなかった。②ALS遺伝子上2カ所の変異を導入するための2カ所を認識し切断するためのgRNAをCas9と共に発現し、さらに、2カ所のアミノ酸点変異導入のためのドナー断片となる配列を組み込んだベクターを構築した。このドナー断片の両端にはgRNAで切断される認識部位が置かれていることを特徴とする。このベクターを、相同組換えにおいてドナー断片となる二本鎖DNAとともに、イネカルス(日本晴)にparticle bombardmentにより導入したところ、T0世代で48/52の高効率でホモ変異体を取得することに成功した。③②で用いたベクターをアグロバクテリウム法で導入したところ、ヘテロ変異体が取得された。ホモ変異体についてbispyribac sodiumを散布したところ、変異体は耐性を示したが、非変異体は枯死した。このように、2つのgRNAと修復用の鋳型をプラスミドと二本鎖DNAの形で同時に供することで、効率よく点変異導入ができることが示された。また、植物種において変異導入方法を最適化する必要がある
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	ZFN
PMID	26687994 (abstract only)
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	ADH1 locus
Gene transfer method	method不詳 (abstract only)
Abstract	シロイヌナズナのADH1遺伝子座特異的なDSBを生じるZFNを用い、ヒストンH2AX及びDSBにより生じる小さなRNAが、NHEJ及びHRの両遺伝子修復に関わっている遺伝子的なエビデンスを示す。
Off-target analysis	off-target解析不明

Category	ZFN
PMID	26681515
Target plant	soybean
Target gene	DICER-LIKE1 (DCL1a and DCL1b)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (A. rhizogenes 18r12)
Abstract	MicroRNA (miRNAs)はほとんどの真核生物においてRNAサイレンシングを介した遺伝子発現調節において中心的役割を果たしている。植物ではDICER-LIKE1 (DCL1)がmiRNAを生成するRnase III like endonucleaseの高度保存遺伝子ファミリーの一員として知られている。大豆におけるDCL1の相同遺伝子と考えられるDCL1a及びDCL1bの機能解析を行うため、ZFNにより両遺伝子のsingle またはdouble mutantを構築した。その結果、どちらか一方のsingle mutantでは変異形質は生じず、double mutantにおいて強い形態変異が生じた。すなわち、大豆においては、DCL1aとDCL1bはmiRNA生成機構において冗長的に機能し、正常な生育に重要な役割を果たしていることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26668334
Target plant	rice
Target gene	acetolactate synthase (ALS1), confers bispyribac sodium resistance
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (3wk cultured rice scutellum derived calli)
Abstract	イネを材料としてCas9、sgRNAと相同組換え修復に使用するDNA断片の導入・作用時期に対する検討を行った。イネカルスに①Cas9を導入したのち、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、②Cas9及びLig4遺伝子破壊用gRNAを先に導入したのち、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、③対照として、Cas9の代わりにsGFPを導入したのち、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、の各条件でALS上2カ所の変異点(W548L, S627I)への点変異導入効率を検討した。その結果、筆者らの予想に反し、Cas9発現細胞と、Cas9非発現細胞において1カ所の変異導入効率に顕著な差は認められなかったが、変異導入に先だってCas9と共にLig4破壊用のgRNAを導入することにより劇的に変異効率が上昇し、2カ所の変異を有するバイアレリック変異がALSに導入された系統が1系統以上得られた。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	26668331
Target plant	rice
Target gene	waxy locus, Glb33 locus
Method	Agrobacterium mediated
Abstract	TALENを導入した植物におけるclassical NHEJとalternative NHEJの役割を解析するため、cNHEJに寄与すると考えられるDNA Ligase4変異体イネにおけるTALENの変異導入効率を解析した。イネの野生型株及びLig4のhetero, null各変異体に対し、waxy遺伝子にTALENを適用したところ、Lig4のnull変異体においては、野生型株と比較して、変異導入率が高いことが判明した。この傾向は、waxyだけではなく、Glb33遺伝子についても確認された。以上の結果は、Lig4の変異によりcNHEJ機構が作動しなくなると、altNHEJ機能が作動することを示す。
Off-target analysis	off-target 解析なし
Category	CRISPR/Cas9, multiplex CRISPR/Cas9 system (6 genes)
PMID	26661595 (abstract only)
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	PYL genes
Gene transfer method	手法不明 (abstract only)
Abstract	筆者らは、一つのバイナリーベクターで6つのsgRNAモジュールを同時発現可能なmultiplex CRISPR/Cas9システムを開発した。sgRNAモジュールは異なる3種のRNA polymerase III依存プロモーターにより発現される。筆者らは、ABAレセプター遺伝子ファミリー14遺伝子のうち、一度の遺伝子導入で6つを標的とした実験を行い、multiplexシステムの効率を検証した。その結果、T1世代の15個体において、6つのPYLすべてに変異が入っていることが判明した。T1世代における6遺伝子それぞれの変異導入割合は13%から93%の幅があった。ABA存在下、6つのPYL遺伝子に変異が入っていることが判明した系統はT2世代において最も高い発芽率(37%)を示した。発芽個体のうち、半数(15/30)がすくなくとも4遺伝子においてホモ変異体で、2個体は5つのPYL遺伝子に変異を有していた。T3世代において、6遺伝子のホモ変異体が得られた。このようにmultiplex CRISPR/Cas9システムは遺伝子ファミリーや生合成経路の解析に有用と期待される。
Off-target analysis	off-target解析不明
Category	TALEN
PMID	26641666
Target plant	rice
Target gene	lipoxygenase LOX3
Gene transfer method	Agrobacterium mediated
Abstract	TALEN構築のためのligation-independent cloning method (LIC)を開発し、適用した。イネ種子の保存性の向上を目的とし、不飽和脂肪酸の酸化に関わるリポキシゲナーゼの一つであるLOX3を標的として、TALENにより遺伝子破壊を行った。1個体(4%)のヘテロ変異体がNPTII耐性系統25個体から得られた。変異導入個体を解析した結果、種子の保存性が向上している可能性が示唆された。なお、LOX3の基質であるlinoleic acidの含有量は非変異体、変異体ともに経日処理とともに減少、差は認められなかった。また、LOX3の破壊はその他のイネの特性に影響を与えなかった。
Off-target analysis	off-target 解析なし
Category	CRISPR/Cas9, single target site
PMID	26617267
Target plant	rice
Target gene	DROOPING LEAF (DL)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (rice calli)
Abstract	イネのDROOPING LEAF (DL)遺伝子を標的にCRISPR/Cas9で遺伝子破壊を行った。その結果、7/9の供試植物においてバイアレリックな変異が導入されていることが判明した。これらの変異体の葉の垂れ下がる形態はdl変異体と同様であった。CRISPR/Cas9システムはイネの発生学的研究に利用可能である。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26616834
Target plant	barley (<i>Hordeum vulgare</i>), Brassica oleracea
Target gene	HvPM19
Gene transfer method	barley, B. oleraceaともにAgrobacterium-mediated
Abstract	大麦及びBrassica oleraceaを材料として、マルチコピー遺伝子を標的としてCRISPR/Cas9システムの適用性、off-target活性を含む特異性を検討した。大麦では、HvPM19の2コピーを標的とし、それぞれ初代で23%及び10%の変異導入を確認した。また、B. oleraceaでは、BoIC.GA44.aを標的としたところ、初代で10%の変異導入が認められた。両植物において変異はT-DNAコンストラクトとは独立してT2世代に引き継がれた。また、両植物種において、マルチコピーの最低1塩基のミスマッチを有する遺伝子に対し、off-target活性が生じることが確認された。大麦では、導入遺伝子フリーな個体においてHvPM19遺伝子の標的及び非標的コピーの両者同時に変異が生じていた。Off-target活性は根本的な問題であると同時に、マルチコピーファミリーを標的とする場合に有用性があると考えられる。
Off-target analysis	マルチコピーファミリーの標的遺伝子のホモログ(コピー)に対しoff-target活性を解析した
Category	TALEN/CRISPR/Cas9
PMID	26603121 (Abstract only)
Target plant	soybean
Target gene	GmPDS11, GmPDS18
Gene transfer method	不明
Abstract	大豆のGmPDS11およびGmPDS18遺伝子を標的として、TALENおよびCRISPR/Cas9による遺伝子編集を行い、その効率を比較した。その結果、大豆毛状根における一遺伝子破壊の効率はTALENでは17.5-21.1%、AtU6-26プロモーターCRISPR/Cas9では11.7-18.1%、GmU6-16g-1プロモーターでは43.4-48.1%であった。また、2遺伝子破壊の場合では、TALENでは6.25%、CRISPR/Cas9では、AtU6-26プロモーターでは12.5%、GmU6-16g-1プロモーターでは43.4-48.1%と複数遺伝子の同時編集ではCRISPR/Cas9の方が優位であることを示した。また、PDの破壊によって、アルビノや矮性変異が
Off-target analysis	不明(アブストラクトに記載なし)

Category	CRISPR/Cas9 遺伝子破壊により、遺伝子(タンパク質)の機能同定に使用した、single site targeted
PMID	26582727
Target plant	soybean
Target gene	Rj4
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (<i>A. rhizogenes</i> strain K599, hairy root transformation)
Abstract	大豆においてはRj4は根粒菌 ブラジリジビウム・エルカニ による結節形成を抑制する遺伝子であり、Rj4遺伝子を有する系統がよいとされる。Rj4遺伝子の分子機能を理解し、大豆の窒素固定能を向上させるうえで、Rj4遺伝子のクローニングは第一ステップである。筆者らは、1番染色体上にRj4遺伝子をマッピングすることに成功し、その遺伝子をcomplementationまたはCRISPR/Cas9により破壊し、機能解析を行った。その結果、これまでにRj4として報告されていた遺伝子とは異なる遺伝子(複製されたもう一方)がRj4遺伝子であることを明らかにした。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26576927 (abstract only)
Target plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Target gene	ADH1
Gene transfer method	手法不明 (abstract only)
Abstract	CRISPR/Cas9においては、現在、 <i>Streptococcus pyogenes</i> (SpCas9)の使用が一般的であるが、筆者らは、 <i>Streptococcus thermophilus</i> (St1Cas9)、及び <i>Staphylococcus aureus</i> (SaCas9)のそれぞれのコドンをも最適化したものが、シロイヌナズナにおいてエラープローンNHEJ変異導入に有用であり、少なくともSpCas9を用いた系と同様の変異導入率を示すことを明らかにした。またADH1遺伝子について、両Cas9による導入変異の安定な後代への遺伝も確認された。また、SaCas9及びSpCas9について、両種に特異的なsgRNAと共存したときのみ、DSBにより誘導される相同組換えが生じることが示され、種の異なるsgRNA間での相互作用はできないことが示された。このように <i>S. pyogenes</i> と <i>S. aureus</i> の各CRISPR/Cas9システムは、同一細胞内での異なる配列を認識する用途に適していると考えられる。
Off-target analysis	off-target解析不明

Category	CRISPR/Cas9, sgRNA delivered by plant virus vector
PMID	26556628
Target plant	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Target gene	structural genes of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)
Gene transfer method	<i>N. benthamiana</i> Cas9 plant; previously constructed, sgRNA deliver: <i>Agrobacterium</i> - tobacco rattle virus (TRV) vector
Abstract	CRISPR/Cas9システムによって植物に植物ウイルス抵抗性を付与することが可能か、 <i>N. benthamiana</i> を用い検討した。先に、筆者らはCas9を過剰発現する <i>N. benthamiana</i> を作成しており、これを材料とした。Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)の遺伝子数カ所に特異的なsgRNAをそれぞれTRVベクターを用い、アグロインフィルトレーションによりCas9発現 <i>N. benthamiana</i> に接種した。さらに、TYLCVを感染させたところ、CRISPR/Cas9システムによってTYLCVに変異が導入されたことが示された。とくにTYLCV構成遺伝子のintergenic regionを標的とした場合、効率が高かった。CRISPR/Cas9システムを導入した <i>N. benthamiana</i> はウイルス感染の病態が出ないか、顕著に弱くなることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9 (single site break), TALEN (single site break)
PMID	26541286
Target plant	tomato
Target gene	ANT1 gene
Gene transfer method	<i>Agrobacterium</i> (LBA4404) transferred geminivirus replicon
Abstract	Geminivirusのレプリコン活性を利用して、アグロバクテリウム法の従来法と比較して10倍の導入効率でトマトゲノムに遺伝可能な変異を導入できる新手法を開発した。Geminivirusのcoat protein及びmovement proteinをTALENまたはCRISPR/Cas9、そして相同組換えの鋳型となるドナー遺伝子に置換したものをT-DNAのRBとLBの間に配置し、トマトに導入することで、ひとたびトマトゲノムに組み込まれると、改変Geminivirus由来の部分がローリング複製によって増殖し、標的部位の変異導入効率を上昇させる。筆者らは、トマトのアントシアニン合成経路のANT1遺伝子のプロモーターとANT1遺伝子間にCaMV35プロモーターを挿入するため、TALENまたはCRISPR/Cas9で挿入部位にニックを生じ、ANT1プロモーターとANT1遺伝子の相同部位で組換え・CaMV35プロモーター導入用のコンストラクトを設計し、導入した。その結果、TALEN、CRISPR/Cas9の両手法により同程度の効率で、トマト細胞において色素の蓄積が認められた。また、ドナー分子は複製されるが、余分な染色体の複製物や、オフターゲットのT-DNAや複製配列のオフターゲットの挿入は認められ
Off-target analysis	TALEN標的部位について、TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0のPaired Target Finder機能で候補とされた領域についてPCRで増幅し、増幅産物に対するT7 endonuclease I (T7E1) assay及びダイレクトシーケンシングにて行い、検知可能なoff-target変異は生じなかったと結論している。

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26496757 (abstract only)
Target plant	<i>Populus tomentosa</i> Carr. (ケチウセンヤマナラシ)
Target gene	導入手法不明
Gene transfer method	phytoene dehydrogenase (PDS)
Abstract	<i>Populus tomentosa</i> を材料として、phytoene dehydrogenase (PDS)遺伝子を標的としたsgRNAを用い、遺伝子破壊を試みた。標的遺伝子に対するsgRNAの塩基配列に対し検討を行い、ミスマッチがあると効率は低下もしくは、変異導入が起こらなくなることを示した。とくに、sgRNAの3'末端側の相補性が変異導入効率に重要であるとのことである。また、 <i>Populus</i> のPDS相同遺伝子、PtPDS1とPtPDS2は同時にそれぞれ86.4%または50%の効率でノックアウトされることが示され、CRISPR/Cas9により、 <i>Populus</i> の2つ以上の遺伝子に変異を導入し、複数遺伝子に変異が入ったシステムを取得することが可
Off-target analysis	off-target解析不明

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26482477 (abstract only)
Target plant	rice
Target gene	GT-1 element of promoter region of OsRAV2 gene
Gene transfer method	method不明
Abstract	イネにおいては塩ストレス下、AP2/ERFドメインを有するRAV転写因子ファミリーのひとつである、OsRAV2遺伝子の発現が誘導される。筆者らは、OsRAV2遺伝子のプロモーター領域P OsRAV2に着目し、プロモーター領域に存在するGT-1エレメントが塩ストレスによるP OsRAV2の発現誘導に必須であることを突き止めた。そこでGT-1エレメントの機能解析のため、筆者らはCRISPR/Cas9システムを使用し、最終的にGT-1エレメントが直接OsRAV2の塩ストレスのレスポンスを制御している
Off-target analysis	off-target解析不明

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26479970
Target plant	soybean, <i>Medicago truncatula</i> (GUS)
Target gene	soybean: GS1, CHI20, <i>Medicago truncatula</i> : GUS (transformed previously)
Gene transfer method	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Arqual), soybean: cotyledon, <i>M. truncatula</i> : hairy-root transformation
Abstract	大豆におけるCRISPR/Cas9の標的部位を迅速に抽出できるオンラインwebツールを作成した。本ソフトを使用することにより、ゲノム配列や生配列データから多数のCRISPR/Cas9の標的候補サイトを制限酵素サイトと共に迅速に抽出することが可能である。このウェブツールの開発と同時に、大豆にコドン最適化したCRISPR/Cas9のプラットホームを構築し、毛状根において、標的部位にDSBを誘導した。この大豆にコドン最適化したCRISPR/Cas9システムによって、大豆および <i>M. truncatula</i> の2種のマメ科植物において標的遺伝子(大豆: GS1, CHI20, <i>M. truncatula</i> : GUS)への変異導入に成功した。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9 (RGEN RNPs)
PMID	26479191
Target plant	<i>Arabidopsis thaliana</i> , tobacco (<i>Nicotiana attenuata</i>), lettuce, rice
Target gene	<i>A. thaliana</i> : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), two separated (201 bp) sites PHYTOCHROME B (PHYB), <i>N. attenuata</i> : AOC <i>O. sativa</i> : P450, DWD1 lettuce: <i>A. thaliana</i> BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) homologue
Gene transfer method	transfection of preassembled complexes of purified Cas9 protein and gRNA into protoplasts
Abstract	植物におけるRGEN RPNによるCRISPR/Cas9の初めての報告。 <i>A. thaliana</i> , rice, lettuce, <i>N. attenuata</i> の葉より調製したプロトプラストに、PEG法で標的遺伝子(<i>A. thaliana</i> : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), two separated (201 bp) sites), PHYTOCHROME B (PHYB); <i>N. attenuata</i> : AOC ; <i>O. sativa</i> : P450, DWD1; lettuce: <i>A. thaliana</i> BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) homologue)に対するCas9 protein gRNA ribonucleoprotein (RNP)を導入した。レタスについては、カルスでの変異導入効率は46%であり、変異が導入された再生植物体が得られた。得られた変異導入体の標的遺伝子部位には後代に遺伝可能な、自然に発生する変異と区別できない小規模の挿入または欠損が認められた。本手法は、組換えDNAを使用しないため、現行のGMO規制からは除外されるものと考えられる。
Off-target analysis	off-target analysis by T7E1, deep sequencing (CAS OFFinder program) BIN2 targeted lettuce: 91 homologous sites (1-5 nucleotides difference)単細胞由来のクローンにおいては、CRISPR RGENIによって誘導されたoff-target変異はほとんど認められなかった。

Category	CRISPR/Cas9, <i>A. thaliana</i> codon optimized Cas9 (oCas9)
PMID	26450012
Target plant	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Target gene	<i>N. benthamiana</i> NbPDS3, NbIspsH genes, (single site mutation)
Gene transfer method	Agroinfiltration (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101) of modified plant virus (Cabbage Leaf Curl virus, CaLCuV) vector
Abstract	植物のCRISPR/Cas9によるゲノム編集のためのgeminivirus由来ベクターを使用したgRNA導入システムの開発。植物(シロイヌナズナ)にコドン最適化したCas9(oCas9)をアグロバクテリウム法により <i>Nicotiana benthamiana</i> に導入し、oCas9発現組換え体を構築しておき、これをプラットホームとして、geminivirusの一種であるCaLCuV由来のベクターを用いて標的遺伝子に対するgRNAをアグロバクテリウムを用い、アグロインフィルトレーションにより一過発現させた。gRNAの標的部位をあらかじめ挿入したマーカー遺伝子GUSの機能回復によりこのシステムの機能性を検証したのち、NbPDS3遺伝子及びNbIspsH遺伝子を標的として変異導入を試みた。その結果、CaLCuVは接種した植物において感染を広げるため、非接種の葉においてもNbPDS3及びNbIspsH遺伝子における変異導入が確認された。さらに、変異導入体においては、新たに成長し
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	ZFN
PMID	26452472
Target plant	rice
Target gene	modification of transgene construct
Gene transfer method	particle bombardment of plasmid DNA
Abstract	マーカーフリーの多重遺伝子導入を行うため、Cre-lox, I-SceI, ZFNを使用した。ZFNは遺伝子導入されたコンストラクトに2カ所組み込まれており、ZFNが発現すると、2つのZFN間のマーカー遺伝子ユニットが脱落し、マーカーフリーとなる。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	ZFN
PMID	26426390
Target plant	tobacco BY-2 cells
Target gene	modification of transgene construct
Gene transfer method	<i>Agrobacterium</i> -mediated (<i>A. tumefaciens</i> LBA4404, construction of model BY-2 cells), particle bombardment (BY-2 cells), electroporation (BY-2 protoplasts)
Abstract	2つのZFNで挟まれた7 kbpの領域を4 kbpのドナー配列(カナマイシン耐性遺伝子, red fluorescent protein (RFP))とHDRにより置換することに成功した。1326個のカナマイシン耐性カルスより18個のHDRを生じたカルスを得た。そのうち16個が境界部分において完全にドナー配列との置換に成功し、13個がRFP蛍光を示した。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas9を利用した遺伝子機能解析
PMID	26408904 (abstract only)
Target plant	tomato
Target gene	果実成熟に関わるMADS-box転写因子であるRIN遺伝子
Gene transfer method	method不明
Abstract	トマトゲノムDNAの高効率編集法。トマトの果実成熟に関わるMADS-box転写因子であるRIN遺伝子上3カ所を標的としたところ、1塩基挿入または3塩基以上の欠損からなる変異がT0再生植物において得られた。RINタンパク質生産能欠損変異体においては野生型と比較して赤色素が減退した未熟果実を形成した。一方、ヘテロ変異体は完熟し、RINの成熟過程における重要性が示された。3カ所の独立した部位に導入した変異のうちいくつかはT1世代に移行し、トマトにおける本遺
Off-target analysis	off-target解析不明 (abstract only)

Category	CRISPR/Cas9, germ-line-specific CRISPR/Cas9 system
PMID	26360626
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	A. thaliana APETALA1 (AP1), TRANSPARENT TESTA 4 (TT4)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (floral dipping method)
Abstract	遍在性発現CRISPR/Cas9(UC)と、生殖細胞特異的発現CRISPR/Cas9(GSC)の比較。シロイヌナズナにおいてSPOROCTELESS (SPL)発現カセットを適用し、雄性配偶子(葯)特異的な遺伝子改変を可能にする生殖細胞特異的Cas9システム(GSC)を構築した。2遺伝子(AP2, TT4)上の4遺伝子座についてUCとGSCの変異導入効率の比較を行った。その結果、GSCではT1世代において変異導入は稀であったがT2世代では30%で変異導入が認められた。UCを用いた場合、T2世代の70%がキメラであったが、GSCではキメラは29%であり、70%がヘテロ変異体であった。2つの標的遺伝子座について解析したところ、T2世代へ変異が遺伝された割合はGSCの方がUCと比較し37%高かった。開発したGSCシステムは標的遺伝子、とくに致死性変異のT2世代におけるスクリーニングに有用と考えられる。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, development of comprehensive molecular toolbox for plant CRISPR/Cas9
PMID	26297141
Target plant	tobacco (Nicotiana benthamiana), Arabidopsis thaliana, rice (Oryza sativa)
Target gene	tobacco: Flagellin Sensitive 2 (NbFLS2), Brassinosteroid Kinase1 (NbBAK1); rice: Rice Young Seedling Albino (OsYSA), Rice Outermost Cell-specific Gene5 (OsROC5); A. thaliana: Arabidopsis Fertilization-Independent Seed2 (AtFIS2), Arabidopsis Cleavage Stimulating Factor64 (AtCSTF64), miR1591A, miR159B, Arabidopsis Production of Anthocyanin Pigment1 (AtPAP1), miR319
Gene transfer method	tobacco (Nicotiana benthamiana): transient expression by agroinfiltration Agrobacterium tumefaciens GV3101/pVP90 A. thaliana: floral dipping using A. tumefaciens GV3101/pVP90 rice: protoplast transformation by PEG method or Agrobacterium mediated method (A. tumefaciens EHA105)
Abstract	37種のGolden Gate ベクターまたはGatewayベクターから構成される多用途のマルチプレックスCRISPR/Cas9ツールボックスを開発した。このツールボックスは、単子葉および双子葉植物に対するCRISPR/Cas9のDNAコンストラクトを迅速かつ効率よく構築するためのプロトコルとベクターを提供するものである。またCRISPR/Cas9による複数遺伝子の同時ゲノム編集だけではなく、内在性遺伝子の転写活性化(VP64)または抑制(SRD)が可能であることが特徴である。このベクターシステムを使用し、29種のgRNAを、タバコ、イネ、そしてシロイヌナズナのゲノム編集または転写制御に用いる14の種のT-DNAコンストラクトにアセンブルし、適用することに成功した。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, codon-optimized Streptococcus pyogenes Cas9, single site mutation
PMID	26294043
Target plant	soybean (Glycine max)
Target gene	genomic sites DD20 and DD43, acetolactate synthase1
Gene transfer method	particle bombardment
Abstract	大豆の4番染色体上の2遺伝子座、DD20とDD43を標的とし、CRISPR/Cas9により遺伝子破壊を行った。その結果、カルス期ではそれぞれ59%、76%の割合でNHEJ変異の導入が認められた。変異導入システムの無作為の塩基配列解析により、導入された変異は小規模の欠失または挿入であることが判明した。DD43における相同組換え(HDR)では、カルスを試料としたPCR解析でHDRが確認され、T1世代に遺伝していることが明らかになった。導入されたHDRはメンデル則に従い遺伝し、DD43標的部位にドナー遺伝子が正確に導入され、cas9-gRNAが無い'clean'なホモ変異体T1世代が得られた。なお、DD20を標的とした変異導入では、'clean'な変異導入体は得られなかった。また、acetolactate synthase1遺伝子を標的とした
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, single site mutation
PMID	26284791
Target plant	soybean (Glycine max)
Target gene	bar, GmFEI2, GmFEI1, GmSHR
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated hairy root transformation (A. rhizogenes K599)
Abstract	大豆毛状根を材料とし、内在の遺伝子GmFEI2及びGmSHR、外来のbar遺伝子のCRISPR/Cas9による変異導入を行った。その結果、内在遺伝子、外来遺伝子も同様の効率で機能することが示された。また、遺伝子(GmFEI2, GmFEI1)間の共通配列を利用し、複数の遺伝子座をひとつのgRNAにより変異導入することにも成功した。本手法は、大豆の根特異的な遺伝子の機能解析に有用と考えられる。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, maize codon-optimized Streptococcus pyogenes Cas9
PMID	26269544
Target plant	maize (Zea mays)
Target gene	upstream of liguleless1 (LIG1), male fertility genes (Ms26, Ms45), acetolactate synthase (ALS1, ALS2)
Gene transfer method	particle bombardment (immature embryos), Agrobacterium-mediated transformation
Abstract	トウモロコシに、コドン最適化したCas9と、upstream of liguleless1 (LIG1), male fertility genes (Ms26, Ms45), acetolactate synthase (ALS1, ALS2)の5遺伝子を標的としたgRNAをベクター単独で、もしくは、修復用DNA鋳型とともにparticle bombardmentにより未成熟胚に導入した。その結果、いずれの標的部位においても変異導入が認められ、LIG1, Ms26, Ms45の多重遺伝子のバイアレル変異体も得られた。また、Cas9をあらかじめ導入しておいた未成熟胚に、gRNAを導入した場合も標的遺伝子の変異体を得ることができた。ALS2遺伝子を標的とした変異導入の場合、1本鎖オリゴDNAまたは、2本鎖DNAのいずれを用いてもchlorsulfuron耐性の植物が得られた。また、LIG1遺伝子の近傍にDSBを誘導した場合、相同修復機構により外来遺伝子(MoPAT)を導入することもできた。導入した変異や遺伝子は、後代植物においてメンデル則に従った遺伝様式を示した。本研究は、CRISPR/Cas9技術が、将来の農産物需要に応じた作物の育種研究を推進させる
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, Zea mays codon-optimized Cas9, Egg cell (female gametophyte) specific promoter
PMID	26193878
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	TRY, CPC (targeted by TRY, CPC common sgRNA, single site mutation), ETC2 (targeted by ETC2 specific sgRNA, single site mutation)
Gene transfer method	Agrobacterium (GV3101) floral dipping
Abstract	CRISPR/Cas9によって作成されたT1世代植物は通常モザイク状に変異が導入されている。本研究では、egg-cell (雌性配偶子) 特異的なプロモーターを使用することにより、複数の遺伝子を標的とする非モザイク型のT1変異体が得られることを示す。8種のプロモーターと2種のターミネーターから成る12種の組み合わせを比較検討したところ、rbsS E9ターミネーターの方がnosターミネーターより適しており、2種の雌性配偶子特異的なプロモーターEC1.2とEC1.1を連結したプロモーターの方が、単独プロモーターよりもT1世代において高効率に変異体が得られることが明らかになった。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26193631
Target plant	Populus tomentosa Carr. (Populus)
Target gene	phytoene desaturase gene 8 (PtoPDS), targeting four sites on the gene
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (leaf disk method)
Abstract	CRISPR/Cas9の木性植物への適用性については未知である。本研究では、Populus tomentosa Carr.を材料として、CRISPR/Cas9によるゲノム編集並びに標的遺伝子への変異導入を試みた。PtoPDS遺伝子上の4か所に対応する4つのgRNAを設計した。Agrobacterium法による遺伝子導入の結果、遺伝子組換えポプラにおいて顕著なアルビノ形質が観察された。59のPCRクローンのうち、28がホモ変異体で、2つがヘテロ変異体であった。また標的部位における変異導入効率は51.7%と見積もられた。以上の結果は、木本性植物においてもゲノム編集にCRISPR/Cas9システムを適用することができ、
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26188471
Target plant	rice (Oryza sativa L. cv. Nipponbare)
Target gene	PDS, DL, LigIV, ALS
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (Scutellum-derived calli)
Abstract	CRISPR/Cas9の植物への適用に関する報告においては、標的遺伝子、Cas9の発現法や用いたgRNA、遺伝子導入に用いた植物組織が異なるため、標的変異導入の効率の比較ができない。そこで、本研究では、イネにおいて異なるCas9またはgRNA発現カセットの標準化した実験条件下での変異導入効率の評価を行った。Cas9及びgRNA発現カセットを別々に、または連続してイネカルスに導入し、同じ遺伝子の標的配列に対する変異導入効率を評価した。その結果、変異効率は使用したCas9の発現カセットに顕著に依存することが判明した。また、gRNAのプロモーターについては、OsU6プロモーターの方が、OsU3プロモーターよりも優れていた。ベストな組み合わせのCas9/gRNA発現カセットをall-in-oneの発現ベクターで導入した結果、イネカルスにおける標的変異導入の効率が改善され、また、T0世代においてバイアル変異体が取得された。本研究の手法は、種々の植物におけるCas9/gRNA発現カセット構築の最適化に適用できる。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	TALEN
PMID	26153077
Target plant	barley (Hordeum vulgare)
Target gene	GFP (model construct), GFPからYFPへの変換による遺伝子編集効率解析
Gene transfer method	Agrobacterium (embryogenic pollen transformation) / particle-bombardment (leaf cells, embryo cells)
Abstract	GFP遺伝子を組み込んだBarleyを材料として、GFPを標的としたTALENをアグロバクテリウム法により導入したのち、yfpの遺伝子断片をparticle bombardmentにより導入したところ、TALENにより生じたDSBにおいて、Homology directed repair (HDR)により、gfpがyfpに変換され、標的遺伝子配列の、目的とする配列への正確な遺伝子編集が達成されたことが示さ
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26134856(abstract only)
Target plant	rice
Target gene	target gene 不明
Gene transfer method	transformation method 不明
Abstract	イネカルスにおけるCRISPR/Cas9システムによる変異導入効率に影響する要素について検討した。イネカルスにCas9及びgRNAを発現するコンストラクトを順に導入し、それぞれのCas9遺伝子導入システムについて変異発生率を解析した。その結果、Cas9の発現レベルと変異発生率の間に、内在、外来遺伝子を問わず、正の相関が認められた。さらに、培養期間を延長することにより、変異が導入された細胞の割合及び、変異の種類が増加することが明らかになった。変異が導入された細胞と、非導入細胞は同様に増殖すると考えられるため、上記の結果は、変異が導入されていない細胞についても培養期間を延長することにより変異を導入する割合が増加することを示唆する。
Off-target analysis	off-target解析不明
Category	CRISPR/Cas9, single site mutation
PMID	26089199
Target plant	rice
Target gene	AOX family genes (OsAox1a, OsAox1b, OsAox1c), OsBEL
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (rice embryonic calli from mature seeds, A. tumefaciens EHA105)
Abstract	CRISPR/Cas9の遺伝子デザインツールCRISPR-P及びCRISPR-PLANTを用い、イネの4遺伝子を標的としたゲノム編集についての報告。CRISPR/Cas9によるゲノム編集により、T0世代において高頻度かつ高い割合でのバイアレリックな変異導入が認められたが、その変異導入は予測が困難で、後代への変異の伝搬様式は従来型の規則に従わないことがしばしばであった。これは、イネにおける変異導入が体細胞変異により生じていることを示唆する。次に、T1世代における遺伝様式を解析したところ、CRISPR/Cas9遺伝子の有無にかかわらず、変異は後代に安定して伝搬され、生殖細胞において変異が導入されていることが示された。さらに、off-target解析を行ったところ、off-target活性は1塩基の差異がある候補遺伝子においてのみ観察された。これは、CRISPR/Cas9によるイネのゲノム編集においては稀であり、off-target変異は起こるとしても導入したCRISPR/Cas9遺伝子が存在しているときに限られることを示唆する。
Off-target analysis	CRISPR-PIによりoff-target活性の候補として選択された標的遺伝子に対する各2遺伝子について解析を行った。

Category	CRISPR/Cas9, rice codon optimized SpCas9, single site mutation
PMID	26082432
Target plant	potato
Target gene	StIAA2 gene, single site mutation
Gene transfer method	N. benthamiana: Agrobacterium-mediated transient expression (trial) potato: A. tumefaciens EHA105 (stem segment)
Abstract	ジャガイモの栽培種は4倍体であるため、分子遺伝子学による遺伝子の機能解析は非常に難しいとされるが、筆者らはCRISPR/Cas9によるジャガイモの遺伝子ノックアウトに成功した。得られた12系統のT1世代のうち代表的な6系統についてPCRで解析したところ、2系統がモノアレルのホモ変異体、1系統がバイアレルのホモ変異体、2系統がヘテロ変異体で、残る1系統は野生型であることが判明した。以上の結果は、本手法がジャガイモのT1世代において、高効率な標的型変異導入に有用であることを示すものである。
Off-target analysis	StIAA2の標的配列同じ配列を有し、PAMモチーフが無い領域についてPCR増幅し、塩基配列を解析したところ、変異は認め
Category	CRISPR/Cas9, human codon optimized Cas9
PMID	26039254 (abstract only)
Target plant	Nicotiana benthamiana
Target gene	target不明
Gene transfer method	Tobacco rattle virus (TRV)-mediated genome editing, agroinfection
Abstract	Tobacco rattle virus (TRV)ベクターを使用したCRISPR/Cas9システムによる持続的かつ特異的なNicotiana benthamianaの標的型遺伝子導入についての報告。TRVによるCas9の活性は接種後30日間持続し、また、潜在的off-targetサイトに対するoff-target活性は認められなかった。これらの結果は、本手法の持続性と高い精度が示すものである。
Off-target analysis	潜在的off-targetに対する解析ではoff-target活性は検出されなかった。
Category	TALEN
PMID	26011187
Target plant	Nicotiana benthamiana
Target gene	two α (1,3)-fucosyltransferase(FucT), two β (1,2)-xylosyltransferase(XylT)
Gene transfer method	protoplast transformation (PEG法) - regeneration
Abstract	植物で生産された糖タンパク質は植物特異的なN-グリカンを持つ。本研究では、TALENによって、Nicotiana benthamianaのFucTとXylTの両遺伝子の破壊を行った。その結果、全8アレルのミュータントが3%の割合で得られた。この完全変異体においては、外来タンパク質のN-グリカンのレベルが野生型株の40%に低下しており、リツキシマブを生産させた場合も同様であった。 α (1,3)-fucoseと β (1,2)-xyloseの両者が無い抗体の割合は野生型では2%だが、変異体では55%に増加した。この変異体は、バイオ製剤の生産プラットフォームとして有用である。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9, single site mutation (one gRNA per gene)
PMID	25970829
Target plant	Populus: Populus tremula x alba clone 717
Target gene	4-coumarate:CoA ligase (4CL) gene family, 4CL1, 4CL2, 4CL5(duplicate of 4CL1)
Gene transfer method	Agrobacterium tumefaciens C58/pMP90, CaMV35S promoter expression
Abstract	木本の多年生植物であるポプラにおいてそれぞれリグニン及びフラボノイドの生合成に関わる4CL1および4CL2遺伝子に対しCRISPR/Cas9により遺伝子編集を行った。コンストラクトあたり合計30を超える独立した遺伝子導入システムを取得し、これらより無作為に選択した系統について標的配列の塩基配列解析を行った結果、いずれの遺伝子も標的とした場合においてもバイアレル変異体の取得に成功していることが示された。また、4CL1のduplicateである4CL5は4CL1と89%の塩基配列の同一性を示すが、4CL1変異導入系統において、4CL5においてoff-target変異が検出されたものはなかった。また4CL5を標的としたgRNAを用いた場合は、標的配列中のSNPsの存在のため、変異が導入された系統は得られなかった。以上のように、CRISPR/Cas9システムはポプラにおいて高効率かつ高精度に機能することが示された。
Off-target analysis	off-target活性予測を実施
Category	CRISPR/Cas9
PMID	25917172 (abstract only)
Target plant	rice, Arabidopsis thaliana
Target gene	標的遺伝子不詳 (abstract only), 46 target sites in rice
Gene transfer method	method不明
Abstract	植物コドンに最適化したCas9遺伝子を使用した、単子葉、双子葉植物の両者に対し、簡便且つ高効率な多重遺伝子編集が可能で、強力なCRISPR/Cas9ベクターシステムについての報告。筆者らは、PCRにより発現カセット用の複数のsgRNAを合成し、Golden Gate ligationまたはGibson AssemblyによりCRISPR/Cas9バイナリーベクターにアセンブルする方法を構築した。このシステムにより、イネの46標的部位を85.4%の導入効率で改変することに成功し、そのほとんどがバイアレルかつホモ変異体であった。また、シロイヌナズナにおいて、単一バイアレル、ヘテロ、ホモ、キメラの各変異体を取得することにも成功した。また、イネ、シロイヌナズナ両者の標的型変異は次世代に遺伝した。また、筆者らは、T0イネまたはT1シロイヌナズナにおいて、複数(最大8遺伝子)の遺伝子ファミリー、生合成経路の遺伝子群、または単一遺伝子の複数領域への同時変異導入による機能欠損型変異体の取得に成功した。ここで報告する手法は、複数の遺伝子や遺伝子ファミリーの基礎研究及び遺伝子改良のための機能解析に利用可能な多機能なツールボックスを提供するものである。
Off-target analysis	off-target解析不明
Category	ZFN
PMID	25913173 (abstract only)
Target plant	corn
Target gene	unique intron (downstream of a promoter driving a selectable marker gene)
Gene transfer method	transformation method不明
Abstract	標的配列とドナー配列の相同部位として選択マーカープロモーター直下のイントロン配列を利用し、あらかじめ標的ゲノム領域を設定しておき、当該標的領域においてZFNにより二本鎖DNA破壊(DSB)を生じさせることで高効率な標的遺伝子改変を実現した。本手法では、プロモーター下流の標的部位に導入された遺伝子のみがマーカーとして機能するため、選択培地上で標的遺伝子導入に成功した個体が得られる割合が向上する。本研究では、トウモロコシにおいてpatマーカーの導入を試み、ピアラホス耐性を示した個体の30%以上で、標的部位への遺伝子導入が起きていることが確認された。
Off-target analysis	off-target解析不明
Category	CRISPR/Cas9, human codon optimized Cas9 gene

PMID	25879861
Target plant	soybean
Target gene	GFP(transgene), Glyma07g14530 (putative glucosyl-transferase), Glyma01g38150 and Glyma11g07220 (orthologs of A. thaliana DDM1 gene) MicroRNAs: miR1514, miR1509
Gene transfer method	Hairy root transformation: Agrobacterium rhizogenes (K599) Somatic embryo: biolistic transformation (particle bombardment)
Abstract	大豆を材料として、CRISPR/Cas9によりGFP(外来遺伝子)、または、9種の内在性遺伝子のノックアウトを行った。88の毛根への遺伝子導入では95%において標的遺伝子への変異導入が認められた。また、9つの標的ベクターのうち、8つのベクターにおいてバイアル変異導入が認められた。同祖遺伝子の単体もしくは全体での変異導入にも成功し、CRISPR/Cas9システムが選択的もしくは包括的に遺伝子を標的とすることができることが示された。また、不定胚を材料として遺伝子導入を行うことにより遺伝可能な変異を挿入することに成功し、また、変異導入の頻度は、培養期間によって増大することが示された。In-Fusionクローニングシステムを使用した簡便なベクター構築法についても報告されている。
Off-target analysis	off-target候補サイトは23-bpのgRNAと大豆レファレンスゲノム配列(Glyma v1.1)をBLASTで比較することにより抽出し、PCR増幅産物について塩基配列を解析した。Glyma07g14530, DDM1, MET1, MiR1514ベクターについてoff-target想定サイトが見出された。使用したgRNAのうち2つがoff-target活性を示した。

Category	TALEN
PMID	25867543
Target plant	rice
Target gene	OsMST7 他9gene (rice)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated
Abstract	TALENバックボーンのC末端を削ると、遺伝子変異導入効率が削らない場合(N287C230)の0-6.6%から25%に上昇することが判明した。また、TALENによる変異誘導はシュートapical meristemの発生段階の初期に生じることが示唆された。TALENにより導入された変異はメンデル則に従いT1およびT2世代に遺伝した。また、TALENの変異の多く(~81%)は複数の塩基に影響し、その70%は欠失であった。これは、CRISPR/Cas9では1塩基の変異が報告の72.4%を占め、欠失は全体の
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	25856577
Target plant	rice
Target gene	OsEPSPS
Gene transfer method	particle bombardment (TALEN, TALEN + chimeric RNA/DNA oligo)
Abstract	TALENにより、グリホサート耐性に関わるOsEPSPS遺伝子の1塩基置換を目的とし、TALENとRNA/DNAまたはDNA/RNAのキメラオリゴを導入した。その結果、RNA/DNAキメラをTALENと共に導入した場合のみ、1個体の目的の変異が導入された変異体が得られたが、12塩基の意図しない欠損が認められた。この変異体に加え、TALENの標的位周辺に種々の長さの欠損を有する変異体を得られた。これらの変異はT1世代にも受け継がれたが、致死性の変異のためか、通常の変異様式は示さなかった。ヘテロ変異を有するT1世代の植物は、グリホサートへの感受性が増したり、種子をつける割合が
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	25848989
Target plant	potato
Target gene	不明(アブストラクトのみ)
Gene transfer method	transient TALEN expression in protoplast
Abstract	4倍体ジャガイモのプロトプラストにおける一過的TALEN発現による部位特異的な変異導入法を開発した。プロトプラストへの感染効率は38-39%で、部位特異的な変異は7-8%の割合で、数塩基の欠損が主に観察された。プロトプラストから誘導されたカルスは11-13%に変異が認められ、再生された根においてもその割合は同様(10%)であった。本手法はジャガイモにおける新育種法並びに重要な遺伝子の機能解析法として有用である。
Off-target analysis	不明(アブストラクトに記載なし)

Category	TALEN
PMID	25846201
Target plant	potato
Target gene	vacuolar invertase gene (VInv)
Gene transfer method	protoplast PEG法 - shoot regeneration
Abstract	ジャガイモの低温貯蔵は発芽を抑制し、収穫後の保存期限を延長する。しかし、低温処理は還元糖の蓄積を増進する。これらの還元糖は加熱によってアミノ酸と反応し、発がん性を有するアクリルアミドの量を増加させる。本研究では、還元糖の生成に関わるvacuolar invertase遺伝子(VInv)をTALENにより破壊した。18個体のVInv遺伝子変異体を構築し、そのうち5個体は全VInvアレルに変異を有していた。完全ノックアウト体からは還元糖は検出されず、加熱したチップは薄い色で、アクリルアミドの量も低下していた。さらに18個体のうち、7個体はゲノムにTALEN遺伝子を含んでいなかった。本研究結果は、4倍体ジャガイモの有用系統の迅速な育種にTALENが使用できることを示す。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	25822541
Target plant	Arabidopsis thaliana Col-0
Target gene	CLV3 (clv3 loss-of-function: broadened stem and distinctly misshaped club-like siliques)
Gene transfer method	Agrobacterium/ floral dip method
Abstract	シロイヌナズナにおいて、成長点特異的なプロモーターを使用し、2つのTALENアームを発現させたところ、T2世代で高頻度の形質変異が認められた。一部、T1世代においてもCLV3のノックアウト形質は確認され、TALENを遺伝子導入することにより高い変異効率が得られることが示唆された。一方、茎頂分裂組織において恒常的にTALENを発現させたところ、新たな変異形質の出現は認められず、また、ゲノムのリシーケンシングによってもoff-target変異は少ないことが確認され、非
Off-target analysis	off-target解析あり whole genome sequencing (NGS)

Category	CRISPR/Cas9, methods, plant codon optimized Cas9 (pcoCas9), dual gRNAs
----------	--

PMID	25757776 (abstract only)
Target plant	Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana (実施なし?)
Target gene	target 詳細不明
Gene transfer method	protoplast (詳細不明)
Abstract	シロイヌナズナ及び、Nicotiana benthamianaのプロトプラストをモデル細胞系として、植物にコード最適化したCas9ゲノム編集に使用するdual gRNAの具体的な設計、構築、評価法について述べる。また、植物体(whole plant)における標的変異導入法へのCRISPR/Cas9の適用についても議論する。
Off-target analysis	off-target解析不明 (abstract only)

Category	CRISPR/Cas9, polycistronic tRNA-gRNA (PTG) system, multiple site (two sites) mutation
PMID	25733849
Target plant	rice
Target gene	MPK1, 2, 5, 6; rice phytoene desaturase (PDS) gene
Gene transfer method	rice protoplast (transient expression, plasmid DNA), rice seed derived calli: Agrobacterium-mediated transformation (A. tumefaciens)
Abstract	CRISPR/Cas9においてはその変異導入効率はgRNAを発現させる方法に大きく依存する。筆者らは、複数のgRNAを単一のポリシストロニックな遺伝子から生成する手法を開発した。CRISPR/Cas9の持つ、簡便かつ目的遺伝子を標的とする多重遺伝子編集能を向上させる強力な技術基盤として、tRNA前駆体の両遺伝子端を正確に切り出す配列内tRNAプロセス法を検討した。その結果、タンデムに連結されたtRNA-gRNAコンストラクトは、生体内においてCas9を染色体上の標的遺伝子に誘導するため、効率よく正確にgRNAに加工された。本手法を用いることで、イネの安定形質転換体で100%に上る効率で多重遺伝子への変異導入及び染色体断片の欠損を誘導することに成功した。tRNAおよびそのプロセスシステムは全生物において保存されているため、本手法はCRISPR/Cas9の標的性と編集効率の向上に広く使用できる可能性が
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, functional analysis of ABP1 gene, single site mutation
PMID	25646447
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	auxin binding protein 1(ABP1)
Gene transfer method	floral dipping
Abstract	シロイヌナズナにおいて、先にauxin binding protein1として報告されていた遺伝子のノックダウンによる機能解析にCRISPR/Cas9を使用した。ABP1を標的としたgRNAを設計し、遺伝子破壊を行い、T2世代においてABP1のホモノックアウト変異体を取得した。さらに、戻し交配により導入遺伝子が除かれたABP1の変異体を得た。このABP1ノックアウト変異体はABP1タンパク質を生成しないが、野生型株と形態、成長の差異は認められず、IAAやNAAに対する応答も野生型株と同様であった。また、ABP1に変異を有するT-DNA変異体も、CRISPR/Cas9により得られた変異体と同様のオーキシン応答性を示した。以上の結果からABP1はオーキシン応答とは無関係であるとの結論に達した。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	25644697
Target plant	maize
Target gene	glossy2 (gl2) locus
Gene transfer method	Agrobacterium (EHA101)-mediated (immature embryos)
Abstract	トウモロコシのglossy2遺伝子を対象にTALENでの変異導入を行った。その結果、monoまたはdi-allelicな変異を有する系統がHi-II系統を材料とした場合10%の頻度で得られた。さらに、3系統について後代の形質を検討したところ、これらはglossy(光沢のある)形質を示した。ほとんどの変異系統でTALENのT-DNAは変異形質と分離し、T1世代においてT-DNAの脱落した変異が得られた。本研究の結果は、TALENがトウモロコシにおける遺伝子変異導入や、遺伝子の機能解析、そして品種改良に有用であることを示すものである。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN
PMID	25599829
Target plant	rice
Target gene	OsBADH2, CKX2, DEP1
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (OsBADH2 gene, embryogenic calli), particle bombardment (simultaneous three genes knock)
Abstract	イネにおいてbetaine aldehyde dehydrogenase(BADH2)遺伝子欠損株は香り米の主な香り成分である2APを生産する。本研究では、TALENによりOsBADH2遺伝子の破壊を試み、20のハイグロマイシン耐性系統から6系統のヘテロ変異体を取得した。また、T1及びT2世代において変異を有し、TALEN T-DNAが脱落した後代を取得することができた。T1世代ホモ変異体における2APの含有量は非変異体の0から0.35-0.75mg/kgに増加した。また、筆者らは3遺伝子を標的としたTALENを同時にparticle bombardmentにより導入し、3遺伝子の変異体を取得することにも成功した。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, functional analysis of NAC050/NAC052 gene, single site mutation (common sequence)
PMID	25578968
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	transcription factors NAC050 and NAC052
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated transformation
Abstract	シロイヌナズナの転写因子NAC050、NAC052のCRISPR/Cas9によるノックアウト変異体を用いた転写因子の機能解析。CRISPR/Cas9によるNAC050及びNAC052のダブルミュータント(T3世代)はヒストン脱メチル化酵素JMJ14のノックアウト体と同様に早期開花の変異形質を示した。RNA-seq解析により、JMJ14及びNAC050/052により発現制御される遺伝子が多数あることが判明した。ChIP解析により、JMJ14及びNAC050/052のRNAi変異体において発現上昇する遺伝子においては、JMJ14及びNAC050が直接結合することにより、H3K4脱メチル化を介し転写が抑制されていることが示され、さらに、NAC050/052が認識するcisエレメントが、これらが標的とする遺伝子のプロモーター領域に見いだされた。以上のように、新たな2つのNAC転写抑制因子が、ヒストン脱メチル化酵素JMJ14と共に開花期の調節を行っていることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし

PMID: 26743988, 26524930, 25749112 abstract not available

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26870061
Target plant	Nicotiana tabacum BY-2 cells
Target gene	mCherry (red fluorescent protein, model target)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (BY-2 suspension cells)
Abstract	タバコBY-2懸濁細胞にアグロバクテリウム法で赤色蛍光タンパク質mCherryを発現するT-DNAを挿入した組換え細胞を構築し、CRISPR/Cas9によるmCherry遺伝子を標的とした遺伝子編集実験のプラットフォームとした。mCherry上3ヶ所を標的としたCRISPR/Cas9遺伝子sgRNA1-3を設計し、Cas9と共にmCherry導入BY-2細胞にアグロバクテリウム法で導入したところ、20個の遺伝子導入体のうち7つにおいて標的部位の短絡が生じていることが判明した。3ヶ所の標的部位で切断、欠損が起こり、標的部位3において1塩基の欠損、標的部位1と3、2と3の間でそれぞれ168bp、41bpの欠損が生じた変異体が取得された。以上のようにCRISPR/Cas9がタバコBY-2細胞で使用できることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	TALEN/CRISPR/Cas9
PMID	26864017
Target plant	Arabidopsis thaliana, Linum usitatissimum (flax, 亜麻)
Target gene	BFP transgenic model (Arabidopsis thaliana), EPSPS (グリホサート耐性) (亜麻)
Gene transfer method	Arabidopsis thaliana: TALEN, CRISPR/Cas9, flax: CRISPR/Cas9 ssODN + phleomycin, protoplast, TALEN + ssODN, protoplast, CRISPR/Cas9 + ssODN, protoplast PEG法, transient expression
Abstract	標的配列の変更配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)とTALENまたはCRISPR-Cas9を同時に導入することで正確なゲノム編集を行う方法を示す。シロイヌナズナでは、PhleomycinまたはTALENによる変異導入(BFP(H66:Blue)がGFP(Y66:Green)への変換)効率が、ssODNとの同時導入により導入量依存的に上昇することが示された。TALENとssODNを併用することで、ssODNの長さ依存的にBFPからGFPへの変換効率が上がることが示された。なお、TALENまたはCRISPR/Cas9単体では、TALENと比較してCRISPR/Cas9の方が変異導入活性(NHEJ活性)が高い。亜麻において、グリホサート耐性に関わるEPSPS遺伝子(2遺伝子)を標的とするssODN(2配列)をCRISPR/Cas9と同時導入し、得られたカルスに目的の変異が導入された割合は、0.15%または0.08%であった。変異導入に成功した系統のひとつA23のカルスおよび標的配列と相同な配列(BFPについてはCas-OFFinderで見出された5つ、亜麻EPSPSについてはPhytozyme 10.2で検索された8つ)についてNGS(MiSeq)で解析。BFPでは、5つの標的配列に相同な配列に対するOff-target analysis (CAS-OFFinder)を行った結果、1つの配列のみに1/13の頻度で変異導入(Indel)が認められた。また、EPSPSでは、個体A23においては、off-target変異導入は認められなかった。
Off-target analysis	

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26842992 (abstract only)
Target plant	maize
Target gene	Zmzb7 gene
Gene transfer method	protoplast transformation
Abstract	CRISPR/Cas9をトウモロコシのゲノム編集に適用した。10系統のカルスから取得した120個のseedlingから期待されたアルビノの形質を示す変異体が得られた。また、トウモロコシのヘテロクロマチン領域についても変異導入効率を検討した。セントロメア及びペリセントロメアの発現レベルの異なる12領域を選び、プロトプラストに対しCRISPR/Cas9を適用したところ、発現の有無に関わらず、ヘテロクロマチン領域は標的となることが示された。また、PAM配列を欠く場合や、ミスマッチが2塩基以上ある場合は、相同な配列であってもoff-target活性は認められないことが判明した。以上のように、CRISPR/Cas9はトウモロコシにおいて、ユークロマチン、ヘテロクロマチンの両領域にゲノム編集に適用可能であることが示された。
Off-target analysis	off-target解析あり(詳細不明)

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26842991 (abstract only)
Target plant	maize
Target gene	phytoene synthase gene (PSY1)
Gene transfer method	protoplast transformation
Abstract	コドン最適化したCas9及び、トウモロコシU6 snRNAプロモーター発現のsgRNAを用いたトウモロコシにおける標的ゲノム編集について検討した。プロトプラストアッセイでは90の遺伝子座において標的遺伝子変異が認められ、平均切断効率は10.67%であった。トウモロコシのPSY1遺伝子に対する安定ノックアウト変異体が得られた。生じた変異は後代に引き継がれた。さらに、計算上予測されたoff-target領域についてはoff-target活性は認められなかった。また、Cas9発現及び非発現系統でトランスクリプトーム解析を行った結果、顕著な差異は認められなかった。
Off-target analysis	Off-target予測サイトにおいてはoff-target活性は認められなかった。

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26839579
Target plant	Nicotiana benthamiana
Target gene	xylosyltransferase (XT)
Gene transfer method	Agroinfiltration (Agrobacterium tumefaciens GV3101) transient expression assay
Abstract	植物合成生物学において頻用されるようになりつつあるモジュラーDNA構築システムであるGoldenBraid (GB)をCRISPR/Cas9遺伝子の構築に適用した。構築したCRISPR/Cas9はベンタミアナタバコにおける一過性発現によりアッセイにより標的遺伝子破壊及び、転写調節に利用可能であった。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26837606
Target plant	Petunia (Petunia hybrid)
Target gene	phytoene desaturase (PDS), carotenoid biosynthesis
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (young leaves) Basta selection
Abstract	ペチュニアを材料として、phytoene desaturase(PDS)遺伝子のCRISPR/Cas9による編集を試みた。PDS遺伝子の2カ所を標的とするsgRNAをデザインし、それぞれ単独または同時に発現させた。1カ所を認識するsgRNAを導入した場合、バスタ耐性を示したT0世代の55.6%-87.5%がアルビノの形質を示した。また、2つの異なる部位を標的とするsgRNAを同時に導入した場合は、両者の間の約1 kbの領域が欠損した系統が得られた。また、Cas9とsgRNAの同時発現と比較すると変異導入効率は低下するが、はじめにCas9を組換えにより導入しておき、その組換え体にsgRNAを導入した場合も変異を誘導で
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26825596 (abstract only)
Target plant	Petunia x hybrida
Target gene	nitrate reductase (NR)
Gene transfer method	direct delivery of purified recombinant Cas9 and sgRNA to protoplast
Abstract	ベチュニアを材料として、プロトプラストに精製した組換えCas9タンパク質及び標的 (nitrogen reductase, NR)特異的なsgRNAを導入した。RGEN RNPの一過的導入のうち、T7E1アッセイによって標的部位の変異を検出し、標的部位に対する塩基配列解析で確認を行った。T7E1アッセイの結果、NR1,2,4,6の4部位で2.4-21%の頻度で変異が生じ、平均変異導入率は14.9±2.2%であった。変異導入を行ったプロトプラストに対する塩基配列解析では、5.3-17.8%、平均11.5±2%の頻度で変異が確認された。また、欠損と挿入の割合は63:37であった。RGEN RNPのプロトプラスト細胞への直接導入は植物での標的変異導入、ゲノム編集に有用であることが示された。
Off-target analysis	off-target解析不明 (abstract only)

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26808139 (abstract only)
Target plant	cucumber (Cucumis sativus L.)
Target gene	eIF4E, ウィルス耐性の付与
Gene transfer method	導入手法不明
Abstract	キュウリ(cucumber)を材料とし、ウィルス耐性の付与を目的としてCRISPR/Cas9により、eIF4E遺伝子の破壊を行った。EIF4E遺伝子のN末端及びC末端を標的としたCas9/sgRNAを導入したT1世代においては、標的部位において小規模の遺伝子欠損またはSNPsが認められた。非組換え (T-DNA脱落の意味か?)の系統を用い、ホモ変異体を取得した。T3世代ホモ系統は、cucumber vein yellowing virus (ipomovirus), potyviruses Zucchini yellow mosaic virus, Papaya ring spot mosaic virus-WIに抵抗性を示したが、ヘテロ及び非変異体はこれらのウィルスに高い感受性を示した。このように初めて非遺伝子組換えで、生育に影響を与えることなく、また長期間の戻し交配を必要とせず、ウィルス抵抗性のキュウリを作成す 推定off-target部位のみ対象
Off-target analysis	推定off-target部位のみ対象

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26768120
Target plant	rice
Target gene	acetolactate synthase (ALS1), confers bispyribac sodium resistance
Gene transfer method	particle bombardment, Agrobacterium-mediated
Abstract	イネのALS1遺伝子に変異を導入するために種々の実験を行った。①トウモロコシで成功している、一本鎖オリゴDNAを用いる手法: Cas9-gRNAとW548LまたはS627I変異を導入するための一本鎖オリゴDNAをparticle bombardmentにより導入したが、ALS遺伝子に変異が導入された系統は取得できなかった。②ALS遺伝子上2カ所の変異を導入するための2カ所を認識し切断するためのgRNAをCas9と共に発現し、さらに、2カ所のアミノ酸点変異導入のためのドナー断片となる配列を組み込んだベクターを構築した。このドナー断片の両端にはgRNAで切断される認識部位が置かれていることを特徴とする。このベクターを、相同組換えにおいてドナー断片となる二本鎖DNAとともに、イネカルス(日本晴)にparticle bombardmentにより導入したところ、T0世代で48/52の高効率でホモ変異体を取得することに成功した。③②で用いたベクターをアグロバクテリウム法で導入したところ、ヘテロ変異体を取得された。ホモ変異体についてbispyribac sodiumを散布したところ、変異体は耐性を示したが、非変異体は枯死した。このように、2つのgRNAと修復用の鋳型をプラスミドと二本鎖DNAの形で同時に供することで、効率よく点変異導入ができることが示された。また、植物種において変異導入方法を最適化する必要がある
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9
PMID	26668334
Target plant	rice
Target gene	acetolactate synthase (ALS1), confers bispyribac sodium resistance
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (3wk cultured rice scutellum derived calli)
Abstract	イネを材料としてCas9、sgRNAと相同組換え修復に使用するDNA断片の導入・作用時期に対する検討を行った。イネカルスに①Cas9を導入したのち、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、②Cas9及びLig4遺伝子破壊用gRNAを先に導入したのち、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、③対照として、Cas9の代わりにsGFPを導入したのちに、ALSの2カ所を個別に切断するgRNAと相同組換え修復用点変異導入ALSを導入、の各条件でALS上2カ所の変異点(W548L, S627I)への点変異導入効率を検討した。その結果、筆者らの予想に反し、Cas9発現細胞と、Cas9非発現細胞において1カ所の変異導入効率に顕著な差は認められなかったが、変異導入に先だてCas9と共にLig4破壊用のgRNAを導入することにより劇的に変異効率が上昇し、2カ所の変異を有するバイアレリック変異がALS1に導入された系統が1系統以上得られた。
Off-target analysis	off-target解析なし

Category	CRISPR/Cas9, multiplex CRISPR/Cas9 system (6 genes)
PMID	26661595 (abstract only)
Target plant	Arabidopsis thaliana
Target gene	PYL genes
Gene transfer method	手法不明 (abstract only)
Abstract	筆者らは、一つのバイナリーベクターで6つのsgRNAモジュールを同時発現可能なmultiplex CRISPR/Cas9システムを開発した。sgRNAモジュールは異なる3種のRNA polymerase III依存プロモーターにより発現される。筆者らは、ABALセプター遺伝子ファミリー14遺伝子のうち、一度の遺伝子導入で6つを標的とした実験を行い、multiplexシステムの効率を検証した。その結果、T1世代の15個体において、6つのPYLすべてに変異が入っていることが判明した。T1世代における6遺伝子それぞれの変異導入割合は13%から93%の幅があった。ABA存在下、6つのPYL遺伝子に変異が入っていることが判明した系統はT2世代において最も高い発芽率(37%)を示した。発芽個体のうち、半数(15/30)がすくなくとも4遺伝子においてホモ変異体で、2個体は5つのPYL遺伝子に変異を有していた。T3世代において、6遺伝子のホモ変異体が得られた。このようにmultiplex CRISPR/Cas9システムは遺伝子ファミリーや生合成経路の解析に有用と期待される。
Off-target analysis	off-target解析不明

Category	CRISPR/Cas9, single target site
PMID	26617267
Target plant	rice
Target gene	DROOPING LEAF (DL)
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (rice calli)

Abstract	イネのDROOPING LEAF (DL)遺伝子を標的にCRISPR/Cas9で遺伝子破壊を行った。その結果、7/9の供試植物においてバイアレリックな変異が導入されていることが判明した。これらの変異体の葉の垂れ下がる形態はdl変異体と同様であった。CRISPR/Cas9システムはイネの発生学的研究に利用可能である。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26616834
Target plant	barley (<i>Hordeum vulgare</i>), <i>Brassica oleracea</i>
Target gene	HvPM19
Gene transfer method	barley, <i>B. oleracea</i> ともにAgrobacterium-mediated
Abstract	大麦及び <i>Brassica oleracea</i> を材料として、マルチコピー遺伝子を標的としてCRISPR/Cas9システムの適用性、off-target活性を含む特異性を検討した。大麦では、HvPM19の2コピーを標的とし、それぞれ初代で23%及び10%の変異導入を確認した。また、 <i>B. oleracea</i> では、BoIG.GA44.aを標的としたところ、初代で10%の変異導入が認められた。両植物において変異はT-DNAコンストラクトとは独立してT2世代に引き継がれた。また、両植物種において、マルチジーンファミリーの最低1塩基のミスマッチを有する遺伝子に対し、off-target活性が生じることが確認された。大麦では、導入遺伝子フリーな個体においてHvPM19遺伝子の標的及び非標的コピーの両者同時に変異が生じていた。Off-target活性は根本的な問題であると同時に、マルチジーンファミリーを標的とする場合に有用性があると考えられる。
Off-target analysis	マルチジーンファミリーの標的遺伝子のホモログ(コピー)に対しoff-target活性を解析した
Category	TALEN/CRISPR/Cas9
PMID	26603121 (Abstract only)
Target plant	soybean
Target gene	GmPDS11, GmPDS18
Gene transfer method	不明
Abstract	大豆のGmPDS11およびGmPDS18遺伝子を標的として、TALENおよびCRISPR/Cas9による遺伝子編集を行い、その効率を比較した。その結果、大豆毛状根における一遺伝子破壊の効率はTALENでは17.5-21.1%、AtU6-26プロモーターCRISPR/Cas9では11.7-18.1%、GmU6-16g-1プロモーターでは43.4-48.1%であった。また、2遺伝子破壊の場合では、TALENでは6.25%、CRISPR/Cas9では、AtU6-26プロモーターでは12.5%、GmU6-16g-1プロモーターでは43.4-48.1%と複数遺伝子の同時編集ではCRISPR/Cas9の方が優位であることを示した。また、PDの破壊によって、アルビノや矮性変異が
Off-target analysis	不明(アブストラクトに記載なし)
Category	CRISPR/Cas9 遺伝子破壊により、遺伝子(タンパク質)の機能同定に使用した, single site targeted
PMID	26582727
Target plant	soybean
Target gene	Rj4
Gene transfer method	Agrobacterium-mediated (<i>A. rhizogenes</i> strain K599, hairy root transformation)
Abstract	大豆においてはRj4は根粒菌 ブラジリソビウム・エルカニ による結節形成を抑制する遺伝子であり、Rj4遺伝子を有する系統がよいとされる。Rj4遺伝子の分子機能を理解し、大豆の窒素固定能を向上させるうえで、Rj4遺伝子のクローニングは第一ステップである。筆者らは、1番染色体上にRj4遺伝子をマッピングすることに成功し、その遺伝子をcomplementationまたはCRISPR/Cas9により破壊し、機能解析を行った。その結果、これまでにRj4として報告されていた遺伝子とは異なる遺伝子(複製されたもう一方)がRj4遺伝子であることを明らかにした。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9
PMID	26576927 (abstract only)
Target plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Target gene	ADH1
Gene transfer method	手法不明 (abstract only)
Abstract	CRISPR/Cas9においては、現在、 <i>Streptococcus pyogenes</i> (SpCas9)の使用が一般的であるが、筆者らは、 <i>Streptococcus thermophilus</i> (St1Cas9)、及び <i>Staphylococcus aureus</i> (SaCas9)のそれぞれのコドン最適化したものが、シロイヌナズナにおいてエラープルーブNHEJ変異導入に有用であり、少なくともSpCas9を用いた系と同様の変異導入率を示すことを明らかにした。またADH1遺伝子について、両Cas9による導入変異の安定な後代への遺伝も確認された。また、SaCas9及びSpCas9について、両種に特異的なsgRNAと共存したときのみ、DSBにより誘導される相同組換えが生じることが示され、種の異なるsgRNA間での相互作用はできないことが示された。このように <i>S. pyogenes</i> と <i>S. aureus</i> の各CRISPR/Cas9システムは、同一細胞内での異なる配列を認識する用途に適していると考えられる。
Off-target analysis	off-target解析不明
Category	CRISPR/Cas9, sgRNA delivered by plant virus vector
PMID	26556628
Target plant	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Target gene	structural genes of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)
Gene transfer method	<i>N. benthamiana</i> Cas9 plant: previously constructed, sgRNA deliver: Agrobacterium - tobacco rattle virus (TRV) vector
Abstract	CRISPR/Cas9システムによって植物に植物ウイルス抵抗性を付与することが可能か、 <i>N. benthamiana</i> を用い検討した。先に、筆者らはCas9を過剰発現する <i>N. benthamiana</i> を作成しており、これを材料とした。Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)の遺伝子数カ所に特異的なsgRNAをそれぞれTRVベクターを用い、アグロインフィルトレーションによりCas9発現 <i>N. benthamiana</i> に接種した。さらに、TYLCVを感染させたところ、CRISPR/Cas9システムによってTYLCVに変異が導入されたことが示された。とくにTYLCV構成遺伝子のintergenic regionを標的とした場合、効率が高かった。CRISPR/Cas9システムを導入した <i>N. benthamiana</i> はウイルス感染の病態が出ないか、顕著に弱くなることが示された。
Off-target analysis	off-target解析なし
Category	CRISPR/Cas9 (single site break), TALEN (single site break)
PMID	26541286
Target plant	tomato
Target gene	ANT1 gene
Gene transfer method	Agrobacterium (LBA4404) transferred geminivirus replicon