

# 1. 部位特異的ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集技術

山本 卓, 坂本 尚昭, 佐久間 哲史

広島大学・大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻

ゲノム編集は、TALEN や CRISPR/Cas9 などの部位特異的ヌクレアーゼを用いて、細胞内で標的遺伝子を改変する技術である。ゲノム編集を用いることによって、これまで遺伝子改変が難しかった生物種においても遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能となったことから、現在、疾患モデルの培養細胞や動物の作製が競って進められている。本稿では、部位特異的ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集技術の基本原則と研究の現状を紹介する。

## 部位特異的ヌクレアーゼ

ゲノム編集に利用する部位特異的ヌクレアーゼは、人工ヌクレアーゼと RNA 誘導型ヌクレアーゼに大別される。人工ヌクレアーゼは、標的配列に特異的に結合するように設計・作製された DNA 結合ドメインと制限酵素 FokI の DNA 切断ドメイン（ヌクレアーゼドメイン）を連結した人工制限酵素である。1組の人工ヌクレアーゼが隣接する標的配列に結合すると、ヌクレアーゼドメインの部分で2量体を形成し、標的配列の間のスペーサー配列に DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘導する。これに対して RNA 誘導型ヌクレアーゼは、ガイドとなる短鎖 RNA が標的に結合し、2つのヌクレアーゼドメインをもつ CRISPR-associated (Cas) 9 によって DSB を誘導するシステムである。

第一世代の Zinc finger nuclease (ZFN) は、DNA 結合ドメインとして zinc finger を利用した人工ヌクレアーゼである (図 1A)。1つの zinc finger が3塩基を認識するので、3~6個の zinc finger をもつ ZFN は9~18bp に特異的に結合し、左右併せて18~36bp の特異性で DSB を誘導する。ZFN は、1996年に報告されて以来<sup>1)</sup>、ゼブラフィッシュ<sup>2)</sup> やラット<sup>3)</sup>、培養細胞<sup>4)</sup> での標的遺伝子改変など

多くの先駆的な研究で実績を有している。他の部位特異的ヌクレアーゼと比較して、ZFN は分子量が小さいことなどの利点はあるが、標的配列と zinc finger の結合様式が複雑で実験室レベルでの作製が煩雑なことから<sup>5)</sup>、広く利用されるに至っていない。

次世代の Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) は、植物病原 *Xanthomonas* 属細菌の転写因子 TAL effector (TALE) を DNA 結合ドメインにもつ人工ヌクレアーゼである (図 1B)。TALE の DNA 結合ドメインは、34 アミノ酸を1単位 (モジュール) とするリピート構造をもち、1つのモジュールが1塩基を認識することが知られている。モジュール中の12番目と13番目のアミノ酸残基は Repeat variable di-residue (RVD) と呼ばれ、RVD が塩基の結合特異性と安定化に働く<sup>6,7)</sup>。自然界では数個から30リピートモジュールの TALE が存在するが、ゲノム編集では15~20モジュールをもつ TALEN が、現在広く使われている。ZFN と比較して作製が容易であることから、2010年以降、TALEN を用いたゲノム編集が急速に進められている。筆者らは、ミネソタ大学の Voytas 博士らの Golden Gate 法<sup>8)</sup> を改良した6モジュール法を開発し<sup>9)</sup>、Golden TALEN によるゼブラフィッシュやカエルなどの遺伝子ノックアウトを報告してきた。しかしながら、Golden TALEN を用いた場合、マウスやラットの遺伝子ノックアウト効率が低いことから、複数のグループによって DNA 結合モジュールの改良が進められてきた。筆者らは、自然界の TALEs に存在する4番目と32番目のアミノ酸残基のバリエーションに着目し、この2か所の残基を改変した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) を開発し<sup>10)</sup>、その作製システム Platinum Gate TALEN システムを報告した。Platinum TALEN は、マウスやラットにおいても改

## 連絡先

〒739-8526

広島県東広島市鏡山1-3-1

広島大学・大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻

TEL: 082-424-7446

FAX: 082-424-7498

E-mail: tybig@hiroshima-u.ac.jp

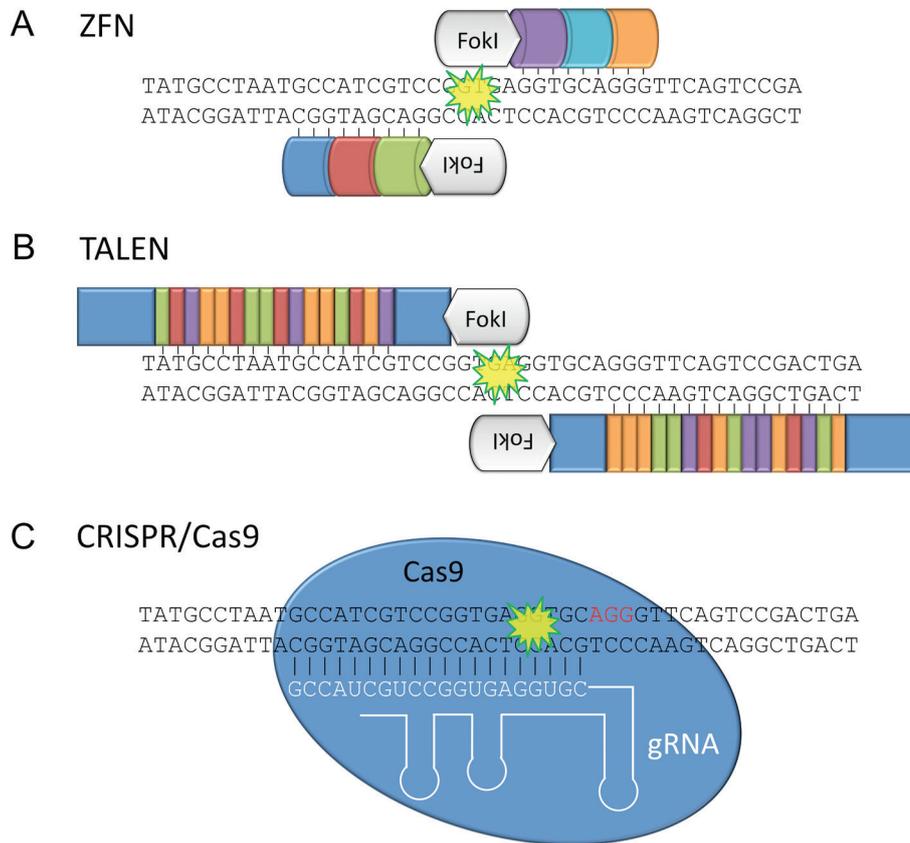


図1 部位特異的ヌクレアーゼ (A) ZFN (B) TALEN (C) CRISPR/Cas9の構造

変効率が大きく<sup>10,11)</sup>、今後 TALEN を利用する研究者に推奨されるシステムである。

第三世代の CRISPR/Cas9 は、細菌や古細菌の獲得免疫システムを利用した RNA 誘導型のヌクレアーゼである<sup>12)</sup>。外来の DNA (ファージ DNA など) が侵入すると、菌内で断片化され、ゲノム中の CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 領域に挿入される。この挿入された外来 DNA 断片を含む領域を鋳型として CRISPR RNA (crRNA) が合成され、tracrRNA と結合した後、プロセッシングを受ける。この tracrRNA:crRNA が Cas9 と複合体を形成し、再び侵入してきた外来 DNA を不活化するのである。ゲノム編集では、短鎖の RNA (ガイド RNA) と Cas9 を発現させることによって、ゲノム DNA の標的遺伝子に DSB を誘導する (図 1C)。ガイド RNA を増やすことによって複数遺伝子の同時改変が可能なこと、必要なプラスミドの構築が簡便であることから、2013 年始めにヒト細胞での応用例が報告されて以来、CRISPR/Cas9 システムの利用が急速に広がっている<sup>13)</sup>。今後のゲノム編集研究は、CRISPR/Cas9 を中心に展開されることが予想されるが、細胞株によっては類似配列へ変異を導入する off-target 効果が高いことも報告されており<sup>14,15)</sup>、安

全性を重視する研究での使用には注意が必要である。その場合、off-target 効果の低いガイド RNA の選択や Cas9 のニッカーゼ<sup>16,17)</sup>の利用によって、off-target 効果を低下させる工夫も必要となる。

#### ゲノム編集による標的遺伝子の改変

細胞内で起こる DSB は、主に非相同末端連結 (NHEJ) と相同組換え (HR) の2つの経路によって修復される。部位特異的ヌクレアーゼによって標的配列へ誘導された DSB についても、NHEJ あるいは HR によって修復され、これらの修復過程を利用して遺伝子改変が行われる (図 2)。標的配列は修復後もヌクレアーゼによって繰り返し切断されるため、エラーの起こりやすい NHEJ では欠失 (数塩基から数百塩基程度) や挿入 (数塩基から数十塩基程度) などの Insertion/deletion (Indel) 変異が導入される。Indel 変異が遺伝子のコード領域に導入されると、フレームシフトを生じ、遺伝子が破壊される (遺伝子ノックアウト)。一方、相同配列を有するターゲティングベクターをヌクレアーゼと共導入すると、相同配列を利用した HR によって、レポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子などの外来 DNA の標的配列への挿入が可能となる (遺伝子ノックイ

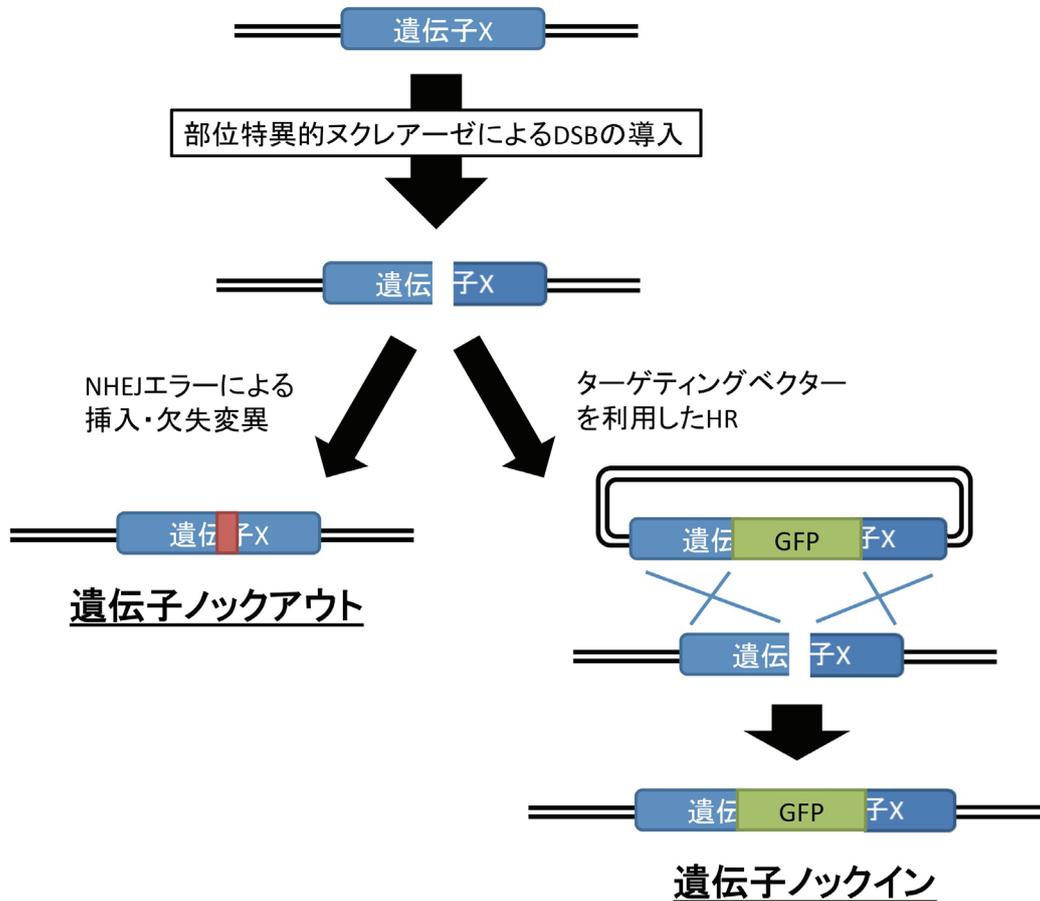


図2 部位特異的ヌクレアーゼを用いたゲノム編集

ン)。また、短鎖一本鎖DNA (ssODN) を共導入することによって、1塩基置換や数十塩基を挿入する方法も開発されている<sup>18)</sup>。

ゲノム編集では、同一染色体上の2か所を切断することによって、大きな欠失(～数Mb)や逆位を導入することも可能である<sup>19,20)</sup>。大きな欠失については比較的高い確率で導入できるのに対し、逆位の頻度は低いことがゼブラフィッシュにおいて報告されている<sup>21)</sup>。また、異なる染色体を切断することによって染色体転座が起こることがある種のガン細胞で報告されている<sup>22)</sup>。

培養細胞でのゲノム編集は、CRISPR/Cas9の開発によって、より身近になってきたが、細胞株によって変異導入効率は異なり、依然として最適条件の検討が必要である。特に、使用する発現ベクターのトランスフェクション効率にゲノム編集の成否は左右される。トランスフェクション効率の低い細胞株では、NHEJによって変異導入された細胞のクローン化に多大な労力が必要とされる。そのため、ターゲティングベクターを用いて標的配列へ薬剤耐性遺伝子をノックインし、その後、変異導入細胞を薬剤選別する方法が推奨される<sup>23)</sup>。また、HRは細胞周期に依存し、細胞株

によってその修復活性も異なることから、増殖活性やHR活性の低い細胞株での遺伝子ノックインは非常に難しいと予想されている。

動物個体でのゲノム編集は、一般的にin vitroで合成した部位特異的ヌクレアーゼmRNA(DNAでもよい)の受精卵への顕微注入によって行われる。mRNAから翻訳された部位特異的ヌクレアーゼタンパク質は、初期卵割の過程で細胞ごとに異なる変異を導入する。理想的には、第一卵割までに両アリルに変異を導入できれば、ワンステップで完全なノックアウト個体が作製できるが、多くの動物においてF0個体は様々な変異をもつモザイクとなる。モザイク性を抑えるためには、より活性の高い部位特異的ヌクレアーゼを用いて発生の早い時期に変異を導入することが重要である。その点で我々の開発したPlatinum TALENは、様々な動物種でゲノムの50～100%に変異を導入できモザイク性の低い高効率なゲノム編集が可能である。さらに、CRISPR/Cas9によって、マウスでは高効率に複数の遺伝子に同時に変異導入が可能なが報告され<sup>24)</sup>、その簡便さに多くの研究者が驚かされた。国内では、大阪大学の伊川教授のグループがCRISPR/Cas9の発現プラスミドを

導入することによって簡便にマウスの遺伝子改変ができることを報告している<sup>25)</sup>。

### 疾患モデルの細胞や動物の作製

ゲノム編集の魅力は、これまで技術的に困難であった疾患モデルの細胞や動物個体を比較的簡便に作製できる点にある。培養細胞では、単純な遺伝子ノックアウトに加えて、疾患の原因と考えられる様々な変異（1塩基置換やIndel変異、大きな欠失など）の導入が可能である。これらの変異を導入した細胞をクローン化する場合、部位特異的ヌクレアーゼとターゲティングベクターを用いたHR経路による遺伝子改変が基本となる。例えば、一塩基変異を導入する場合、ターゲティングベクターのホモロジーアーム（700bp～1kb程度）中に目的の変異を入れておき、HRを利用して薬剤耐性遺伝子を挿入すると共にホモロジーアームの変異を導入する。薬剤選別により細胞株を樹立した後、薬剤耐性遺伝子を種々の方法（Cre-loxPシステムやPiggyBacシステム）により除去する<sup>26,27)</sup>。現状では、ssODNを用いた一塩基改変法の効率が低いため、上記の2段階での改変方法が変異細胞をクローン化するための確実な方法である。大きな欠失を導入した細胞をクローン化する場合、2か所の切断部位の外側の配列をホモロジーアームとしてもつターゲティングベクターを作製し、大きな欠失部分に薬剤耐性遺伝子を挿入後、薬剤選別によってクローン化する方法が報告されている<sup>28)</sup>。ターゲティングベクターを利用しない方法としては、部位特異的ヌクレアーゼの発現を蛍光タンパク質でモニターし、FACSにより変異細胞を濃縮する方法も報告されている<sup>29,30)</sup>。

疾患モデル動物は、マウスではES細胞のHRによる遺伝子ターゲティングを基盤として作製され、これまで多大な労力を必要としていた。これに対して、受精卵へ部位特異的ヌクレアーゼとssODNの受精卵への共導入によって、一塩基変異を導入したマウスが簡単かつ高効率に作製できることが示されている<sup>31)</sup>。この方法は、ターゲティングベクターの構築を必要としないことから、簡便な疾患モデル動物の作製法として今後中心的に利用されることが予想される。また、2か所を切断する部位特異的ヌクレアーゼをマウス受精卵に導入することによって、大きな欠失を導入することも示されている<sup>32)</sup>。これらの状況から、ゲノム編集技術によって疾患モデルマウスの作製および疾患研究はスピードアップしていくことは疑いがない。さらに、これまでES細胞での遺伝子ターゲティングが困難であったラットやマーモセットにおいても、ゲノム編集は有効で

あることが報告されており、大型哺乳類を用いた糖尿病や神経疾患などのモデル動物の作製が競って進められると考えられる。

### ゲノム編集によるウイルスの増殖抑制および破壊の試み

ゲノム編集によってウイルスの感染を抑制する試みは、造血幹細胞のHIVの主要な共受容体CCR5遺伝子やCXCR4遺伝子をZFNによって破壊する研究によって進められてきた<sup>33,34)</sup>。ZFNによってCCR5遺伝子を破壊したヒト造血幹細胞を、HIVを感染させた免疫不全マウスに移植することによって、HIVウイルス量を低下させることが示され、ZFNを用いた臨床試験も米国で進められている。また、ZFNやCRISPR/Cas9を用いて、HIVプロウイルスのゲノム編集が可能であることが最近報告されている<sup>35,36)</sup>。更に、同様のストラテジーで、単純ヘルペスウイルス（HSV-2）やヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）のプロウイルス破壊も可能であることが示唆されている<sup>37,38)</sup>。

B型肝炎ウイルス（HBV）は、感染肝細胞の核内に閉環状完全二重鎖DNA（cccDNA）として存在し、肝炎再発の原因となっている。そのため、ゲノム編集技術によってcccDNAからの転写の抑制やcccDNAの切断による不活性化の研究が進められてきた。2010年にHBVゲノムを切断可能なZFNが報告されている<sup>39)</sup>。他、昨年には、TALENを用いてHepG2細胞やマウスモデルにおいてHBV DNAへの変異導入による不活性化が報告されている<sup>40)</sup>。

部位特異的ヌクレアーゼを実際の遺伝子治療に応用するためには、高い安全性（すなわちオフターゲット切断の低減）やウイルスDNAの切断効率の向上が求められるだけでなく、標的とする細胞へのデリバリーの手法も大きな課題となっている。現状ではex vivoの遺伝子治療法が現実的であるが、ごく最近になってマウスを用いたin vivoゲノム編集の成功例も散見され始めており<sup>41,42)</sup>、今後の技術改良に期待が寄せられている。

### おわりに

ゲノム編集技術の開発は予想を超えるスピードで進んでいる一方、国内のゲノム編集ツールの開発や研究での利用は遅れている。そのため筆者らのグループを中心に、2012年にゲノム編集コンソーシアム<sup>43)</sup>を立ち上げ、最新の論文情報の提供や研究会・講習会を行っている。本稿が、ゲノム編集技術の導入を検討されている研究者の参考になり、積極的な利用につながれば幸いである。

## 参考文献

- 1) Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1156-1160.
- 2) Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA (2008) Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26: 695-701.
- 3) Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Menoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325: 433.
- 4) Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, Dekelver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng X, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27: 851-857.
- 5) Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, Voytas DF, Joung JK (2009) Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc* 4: 1471-1501.
- 6) Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335: 716-719.
- 7) Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335: 720-723.
- 8) Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39: e82.
- 9) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, Yamamoto T (2013) Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* 18: 315-326.
- 10) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T (2013) Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep* 3: 3379.
- 11) Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki K, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M, Sakuma T (2014) Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim* 63: 79-84.
- 12) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
- 13) Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32: 347-355.
- 14) Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31: 822-826.
- 15) Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31: 827-832.
- 16) Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31: 833-838.
- 17) Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154: 1380-1389.
- 18) Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, Collingwood TN, Frodin M, Davis GD (2011) High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 8: 753-755.
- 19) Lee HJ, Kim E, Kim JS (2010) Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res* 20: 81-89.
- 20) Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS (2012) Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res* 22: 539-548.
- 21) Gupta A, Hall VL, Kok FO, Shin M, McNulty JC, Lawson ND, Wolfe SA (2013) Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome Res* 23: 1008-1017.
- 22) Piganeau M, Ghezraoui H, De Cian A, Guittat L, Tomishima M, Perrouault L, Rene O, Katibah GE, Zhang L, Holmes MC, Doyon Y, Concordet JP, Giovannangeli C, Jasin M, Brunet E (2013) Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res* 23: 1182-1193.
- 23) 落合博, 佐久間哲史, 松浦伸也, 山本卓 (2013) TALE nuclease (TALEN) を用いた培養細胞におけるゲノム編集. *実験医学* 31: 95-100.
- 24) Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-918.
- 25) Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M (2013) Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 3: 3355.
- 26) Soldner F, Laganier J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S, Zhang L, Guschin D, Fong LK, Vu BJ,

- Meng X, Urnov FD, Rebar EJ, Gregory PD, Zhang HS, Jaenisch R (2011) Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 146: 318-331.
- 27) Yusa K (2013) Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease-based gene targeting and the piggyBac transposon. *Nat Protoc* 8: 2061-2078.
- 28) 野村淳, 内匠透 (2014) TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた染色体改変法. 実験医学別冊「今すぐ始めるゲノム編集」(山本卓編), 羊土社, 73-80.
- 29) Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia Y, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA (2013) A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 12: 238-251.
- 30) Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, Yamamoto T (2014) FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells* 19: 419-431.
- 31) Meyer M, Ortiz O, Hrabe de Angelis M, Wurst W, Kuhn R (2012) Modeling disease mutations by gene targeting in one-cell mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 9354-9359.
- 32) Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K (2013) Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res* 41: e187.
- 33) Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* 28: 839-847.
- 34) Wilen CB, Wang J, Tilton JC, Miller JC, Kim KA, Rebar EJ, Sherrill-Mix SA, Patro SC, Secreto AJ, Jordan AP, Lee G, Kahn J, Aye PP, Bunnell BA, Lackner AA, Hoxie JA, Danet-Desnoyers GA, Bushman FD, Riley JL, Gregory PD, June CH, Holmes MC, Doms RW (2011) Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog* 7: e1002020.
- 35) Qu X, Wang P, Ding D, Li L, Wang H, Ma L, Zhou X, Liu S, Lin S, Wang X, Zhang G, Liu S, Liu L, Wang J, Zhang F, Lu D, Zhu H (2013) Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res* 41: 7771-7782.
- 36) Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* 3: 2510.
- 37) Wayengera M (2011) Identity of zinc finger nucleases with specificity to herpes simplex virus type II genomic DNA: Novel HSV-2 vaccine/therapy precursors. *Theor Biol Med Model* 8: e23.
- 38) Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J (2013) A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. *Leukemia* 27: 1621-1627.
- 39) Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP (2010) Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 18: 947-954.
- 40) Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P (2013) Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 21: 1889-1897.
- 41) Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, Miller JC, Li H, Haurigot V, Rohde ME, Wong SY, Davidson RJ, Zhou S, Gregory PD, Holmes MC, High KA (2013) Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* 122: 3283-3287.
- 42) Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG (2014) Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, doi: 10.1038/nbt.2884.
- 43) [http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/genome\\_editing/index.html](http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/genome_editing/index.html)

# Genome editing with programmable site-specific nucleases

**Takashi YAMAMOTO, Naoaki SAKAMOTO, Tetsushi SAKUMA**

Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University

1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan

E-mail: tybig@hiroshima-u.ac.jp (to T.Y.)

Genome editing is a cutting-edge technology that enables to modify the target gene using programmable site-specific nucleases, such as TALENs and CRISPR/Cas9. Currently, cell and animal models of human diseases have been competitively created throughout the world, because genome editing technology paved the way for genetic modifications even in cells and organisms that had been difficult to manipulate the genome. In this review, we introduce the basic principles and current situations of genome editing with programmable nucleases.

