

2種の guide RNA を同時に用いた CRISPR/Cas9 システムによる 高率なノックアウトマウスの作出

関 信輔¹⁾, 場崎 恵太¹⁾, 小松 幸恵¹⁾, 塚本 智史²⁾, 門脇 歩³⁾,
山口 智和³⁾, 幸丸 純貴⁴⁾, 福田 康義¹⁾, 矢野 愛美¹⁾, 小畑 孝弘¹⁾,
小代田宗一⁴⁾, 久場 敬司³⁾, 西島 和俊¹⁾

¹⁾秋田大学 バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

²⁾量子科学技術研究開発機構放射線医学研究所 生物研究推進課

³⁾秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座

⁴⁾秋田大学 バイオサイエンス教育・研究サポートセンター分子医学部門

(received 19 December 2016, accepted 2 March 2017)

Efficient generation of knock out mice by the CRISPR/Cas9 system with two guide RNAs

Shinsuke Seki¹⁾, Keita Basaki¹⁾, Yukie Komatsu¹⁾, Satoshi Tsukamoto²⁾, Ayumi Kadowaki³⁾,
Tomokazu Yamaguchi³⁾, Junki Kohmaru⁴⁾, Yasuyoshi Fukuda¹⁾, Manami Yano¹⁾, Takahiro Obata¹⁾,
Souichi Koyota⁴⁾, Keiji Kuba³⁾ and Kazutoshi Nishijima¹⁾

¹⁾*Experimental Animal Division, Bioscience Education and Research Support Center,
Akita University, 1-1-1 Hondo, Akita, Akita 010-8543, Japan*

²⁾*Laboratory of Animal and Genome Sciences Section, National Institutes for Quantum and Radiological
Science and Technology, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan*

³⁾*Department of Biochemistry and Metabolic Science, Akita University Graduate School of Medicine,
1-1-1 Hondo, Akita, Akita 010-8543, Japan*

⁴⁾*Molecular Medicine Division, Bioscience Education and Research Support Center,
Akita University, 1-1-1 Hondo, Akita, Akita 010-8543, Japan*

Abstract

The CRISPR/Cas9 system is a powerful genome editing tool for generating knockout mice. To generate mutant mice, single guide RNA (sgRNA) for *tyrosinase* was transcribed *in vitro* with template Oligo DNA and a mixture of either one or two sgRNAs and Cas9 mRNA were microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6J (black hairs and eyes). To determine whether *tyrosinase* gene is successfully knocked out, their phenotype (black hairs/eyes or albino) was observed. In this study, to investigate whether knockout efficiency can be increased by microinjection of two sgRNAs, either one or two sgRNAs were microinjected. Results indicated that when one sgRNA was microinjected, albino mice were obtained at relatively low efficiency (3/16, 19% or 13/23, 65%); however, the efficiency was increased by microinjecting two sgRNAs (24/26 92.9%). In

Corresponding author : Shinsuke Seki
Bioscience Education and Research Support Center, Akita
University, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6195
Fax : 81-18-836-2626
E-mail : sseki@gipc.akita-u.ac.jp

conclusion, we demonstrate here that knockout mice at F0 can be obtained by microinjection of two sgRNA and Cas9 mRNA at high efficiency.

Key words : CRISPR/Cas9, knock out mice, two guide RNA

緒 言

医学・薬学・生命科学研究において、古くから実験動物として用いられ、また、現在最も利用されているモデル生物はマウスである。これには、マウスは短時間で性成熟するため（雄：6週間、雌：4週間）そのライフサイクルが比較的短いこと、また、多産で飼育しやすいという背景がある。さらに、体外受精や胚操作などの生殖工学的手法も確立されており、膨大な種類の遺伝子改変マウスが既に作製され、個体レベルでの遺伝子機能や病態の解明、創薬に貢献してきた。

特定の遺伝子を標的にした遺伝子ノックアウト技術（遺伝子ターゲティング）は、遺伝子の機能を調べる上で重要な技術である。マウスにおける従来の遺伝子ターゲティングは、ES細胞（embryonic stem cell）での自然発生的な相同組換えを介したターゲティングベクターのゲノムへの挿入に依存していた¹⁾。しかし、この方法で使用するターゲティングベクターの構築は容易ではないうえ、それが標的とする領域に挿入される効率も高くなく、目的の細胞クローンを得るためには甚大な労力が必要である。さらに、ES細胞からまずキメラマウスを作製し、その後交配により目的のノックアウトマウスを得る必要があるため、時間と費用を要する。

近年開発されたゲノム編集法は、長く切望されてきた画期的な遺伝子改変法である。ゲノム編集では、人工ヌクレアーゼにより標的領域の2本鎖DNAを切断し、ゲノムDNAの修復過程を利用して標的遺伝子を改変する。これまでのゲノム編集研究における最初のブレイクスルーは、1996年に報告された第一世代のゲノム編集ツールであるジンクフィンガーヌクレアーゼ（zinc-finger nuclease: ZFN）である²⁾。これは、3塩基を認識するZFモチーフとその末端にFokIヌクレアーゼを結合させた人工キメラタンパク質であるが、標的領域でヘテロダイマーを形成してゲノムDNAを切断する。しかしながら、ZFモチーフを連結すると塩基配列の特異性が低下することが多く、思い通りのベクター構築が困難であった。その後、2010年に、ZFNのDNA結合ドメインを植物病原細菌であ

る *Xanthomonas* 属細菌の TAL ファクターに変えた TALEN (transcription activator-like effector nuclease) が開発された³⁾。ZFN と異なり、幾つかのモジュールをつなぎ合わせても塩基配列の特異性が維持されるため、TAL ファクターの構築が一般の研究者でも可能なレベルになった。ZFN や TALEN の登場で人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集が注目を集めていたが、そのような状況の中、2013年に原核生物の獲得免疫として働く CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) を利用した新たなゲノム編集ツールが開発された^{4,5)}。CRISPR/Cas システムは、ファージなどを介して侵入する外来 DNA を断片化して自らのゲノム上に取り込み、2度目の感染の際は、先に取り込んだゲノム断片から発現する2つの小分子 RNA を用いて外来 DNA の標的部位を認識し、Cas9 ヌクレアーゼをリクルートしてこれを切断する⁶⁾。この原理を利用し、2つの小分子 RNA を一つにしたキメラ RNA (single guide RNA: sgRNA) と Cas9 の2因子を発現させれば、標的ゲノム DNA を切断できる。ZFN や TALEN では、DNA 結合ドメインと切断ドメインを融合タンパク質として機能させるため、標的遺伝子ごとに複雑なベクター構築が必要である。一方、CRISPR/Cas9 システムでは、標的配列に対応するように塩基を変えるだけで良い。このような簡便さにもかかわらず、CRISPR/Cas9 は、特に哺乳類細胞においては、TALEN と同等かそれ以上の活性効率が低コストで再現性も高く得られる^{7,8)}。

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを最も利用されている哺乳類モデル生物であるマウスに用い、効率的にノックアウトマウスを作成することを目的とした。すなわち、合成オリゴ DNA (gBlocks) を鋳型としてチロシナーゼ遺伝子を標的とした sgRNA を合成し、その sgRNA と Cas9 mRNA をインジェクションすることで、C57BL/6J マウス（黒毛・黒目）のチロシナーゼ遺伝子をノックアウトすることが可能かどうかを検証した。現在のところ、1種の sgRNA を用いることでマウスの遺伝子をノックアウトできることが報告されているが、その効率はまちまちである⁹⁻¹¹⁾。1

種の sgRNA を用いてノックアウトを試みた場合、その sgRNA が認識する配列に欠損が起こりうるが、2種の sgRNA を用いてノックアウトを試みた場合、2種の sgRNA それぞれが認識する配列において欠損が起こりうるとともに、2種の sgRNA の認識配列の間が欠損する可能性がある。そこで、本研究では、2種の sgRNA を用いることで、F0 世代であっても両アレルの標的遺伝子をノックアウトすることが可能かどうかを検証した。

材料および方法

本論文における動物実験は、秋田大学 バイオサイエンス安全委員会 動物実験倫理委員会により審査され、秋田大学学長より承認された動物実験計画に沿って実施した（承認番号：第 a-1-2735 号）。

マウス精子・未受精卵の採取および体外受精

安定的に受精卵を採取するために体外受精をおこなった。媒精開始1時間前に、C57BL/6J 成熟雄マウス（3-6ヶ月）精巢上体尾部から採取した精子塊を、HTF 培養液（アーク・リソース株式会社）で60分間

前培養することで精子懸濁液とした。成熟雌マウス（8-12週齢）に、48時間間隔で妊馬血清性腺刺激ホルモン（あすかアニマルヘルス株式会社）およびヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG、あすか製薬株式会社）を7.5 IU ずつ腹腔内投与することで過排卵処理を施した。hCG 投与15時間後、第二減数分裂中期の未受精卵を HTF 培養液に回収した。調製した精子懸濁液を未受精卵の入った HTF 培養液に添加することで媒精を行った。媒精3時間後に受精卵を HTF 培養液で洗浄し、その後培養したものを、sgRNA と Cas9 mRNA のマイクロインジェクションに供した。

sgRNA および Cas9 mRNA の合成

C57BL/6J 系統のチロシナーゼ遺伝子の2箇所を標的配列とした sgRNA を、CRISPR・Cas9・gRNA デザインツールの CHOP CHOP Harvard (<http://chopchop.cbu.uib.no>)、または CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) を用いて設計した。各標的配列を含んだ sgRNA (全長 130 bp) を T7 プロモーターから転写できるようにオリゴ DNA (gBlocks, IDT オリゴ) として人工的に合成し（図1）、*in vitro* 転写によって sgRNA 1 および sgRNA 2 を合成した。Cas9 mRNA は、Cas9 mRNA を

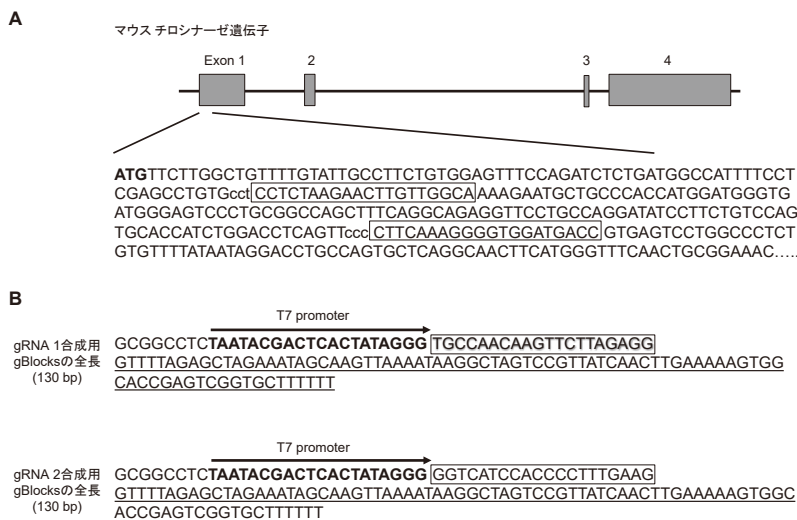


図1. チロシナーゼ遺伝子を標的にした sgRNA および gBlocks の設計。A) チロシナーゼ遺伝子エクソン1の開始コドン（太字）、sgRNA を白枠、PAM 配列を小文字で示す。B) sgRNA を精製するために必要な gBlocks の全長（130 bp）の DNA 配列。5' 末端側から Buffer Sequence（125 bp 以上必要となる gBlocks を合成するために必要な配列）、T7 プロモーター（太字）、sgRNA 認識配列（白枠）、sgRNA scaffold 配列（下線配列）を示す。

コードする DNA (humanized *S. pyogenes* Cas9: hSp-Cas9⁴⁾) を含むプラスミド (pTAC-1 plasmid) を鋳型に mRNA を合成した。

培養および里親への卵管移植

合成した 2 種の sgRNA (15 ng/ul) を、それぞれあるいは混合したものに Cas9 の mRNA (100 ng/ul) を混合し、受精 4-5 時間後の 1 細胞期胚の細胞質にマイクロインジェクションした。HTF 培養液で 18 時間培養後、2 細胞期へと卵割した胚を偽妊娠マウスへ卵管移植した。また、一部の実験では 1 種の sgRNA (30 ng/ul) および Cas9 mRNA (100 ng/ul) をマイクロインジェクションすることで、sgRNA の濃度が変異効率に影響を及ぼすのかを調べた。産仔について以下の解析を行った。

表現型の観察、シークエンス解析、および次世代の表現型

チロシナーゼ遺伝子がノックアウトされているかどうかは、マウスがアルビノの表現型を示すことで判断した。アルビノの表現型を示したマウスの一部については 2 種の sgRNA の標的配列を含む配列をダイレクトシークエンスにより解析し、チロシナーゼ遺伝子のノックアウトを確認した。また、それらのアルビノマウス同士を交配することで、次世代もノックアウトマウスであることを確認した。

結 果

sgRNA 1 (15 ng/ul) と sgRNA 2 (15 ng/ul) のどちらか 1 種、または sgRNA 1 と sgRNA 2 の混合物をマイクロインジェクションした 1 細胞期胚のうち、それぞれ 89 個/92 個、75 個/85 個、または 91 個/97 個が 2 細胞期胚へと卵割し、そのうち 72 個ずつを偽妊娠マウスへ卵管移植した。sgRNA 1 または sgRNA 2 をインジェクションした実験群では、チロシナーゼ遺伝子のノックアウトを示すアルビノが、それぞれ 3/16 匹 (19%) または 13/20 匹 (65%) 得られた。一方、sgRNA 1 と sgRNA 2 を混合してインジェクションした実験群では、26/28 匹 (93%) がアルビノの表現型を示し、その変異効率は大幅に改善された (表 1, 図 2)。また、sgRNA 1 (30 ng/ul) をマイクロインジェクションしたところ、1/15 匹 (6.7%) がアルビノの表現型を示し、sgRNA の濃度を上げても変異効率の向上は観察されず、異なる sgRNA を混合することで変異効率が向上することが示唆された。

また、アルビノマウスについて、マウスの尻尾から抽出したゲノム DNA を用いて標的配列を含む配列を PCR で増幅し、電気泳動にてサイズ確認をしたところ (図 3A)、野生型 (WT) のマウスの増幅産物 (438 bp) よりもサイズの小さい増幅産物や複数の増幅産物 (Mouse#1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 15, 21, 26, 27) が得られるか、増幅産物が得られず (Mouse#18)、チロシナーゼ遺伝子の配列が欠損していることが推測された。さらに、単一の増幅産物が得られたマウスに関して、ダ

表 1. CRISPR/Cas9 システムによるアルビノ C57BL/6J マウスの作出効率。

インジェクション RNA	インジェクション受精卵数	2 細胞期へ発生した受精卵数	移植受精卵数	出生マウス数	出生マウスの毛色 (匹, %)
Tyr-gRNA 1 (15 ng/ul) Cas9 mRNA (100 ng/ul)	92	89	72	16	黒色 (野生型) (1, 6%) モザイク ¹ (12, 75%) 白色 (変異型) (3, 19%)
Tyr-gRNA 2 (15 ng/ul) Cas9 mRNA (100 ng/ul)	85	75	72	20	黒色 (野生型) (2, 10%) モザイク (5, 25%) 白色 (変異型) (13, 65%)
Tyr-gRNA 1 (15 ng/ul) Tyr-gRNA 2 (15 ng/ul) Cas9 mRNA (100 ng/ul)	97	91	72	28	黒色 (野生型) (0, 0%) モザイク (2, 7%) 白色 (変異型) (26, 93%)

¹ 黒色の毛と白色の毛を持つ個体。少しでも黒色の毛および白色の毛があればモザイクと判定した。

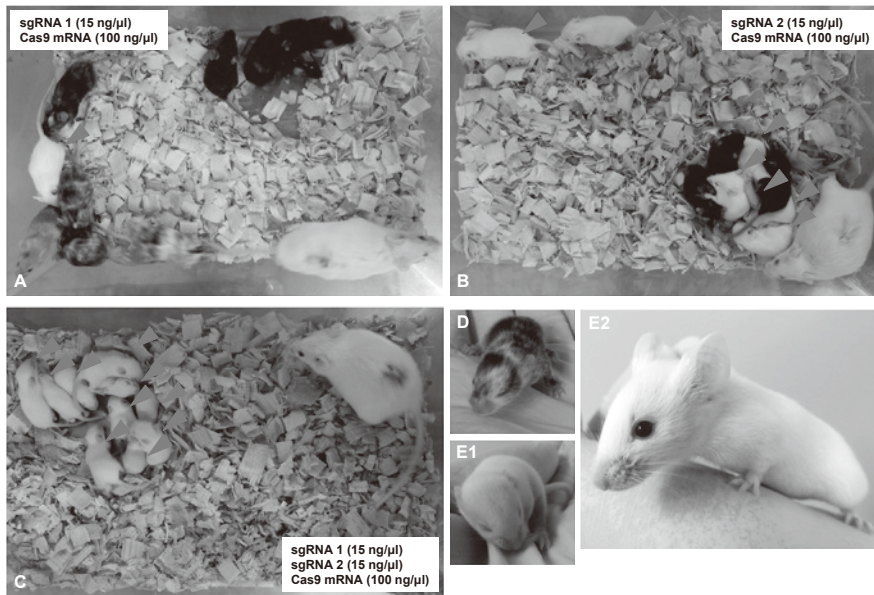


図2. CRISPR/Cas9 システムによるアルビノ C57BL/6J マウスの作出. A) sgRNA 1 (15 ng/ μ l) および Cas9 mRNA (100 ng/ μ l) マイクロインジェクションにより得られたアルビノマウス. B) sgRNA 2 (15 ng/ μ l) および Cas9 mRNA (100 ng/ μ l) マイクロインジェクションにより得られたアルビノマウス. C) sgRNA 1 (15 ng/ μ l), sgRNA 2 (15 ng/ μ l) および Cas9 mRNA (100 ng/ μ l) マイクロインジェクションにより得られたアルビノマウス. 矢印はチロシナーゼ遺伝子のノックアウトに成功したマウスを示す. D) CRISPR/Cas9 システムにより作出されたモザイクマウス. E) CRISPR/Cas9 システムにより作出されたアルビノマウス (E1: 2 週齢, E2: 4 週齢).

イレクトシーケンスにより塩基配列を解析したところ、2 個体 (Mouse#2, #11) においては変異が確認されたが (図 3B), 他のアルビノマウスにおいては複数のピークが重なっているため、チロシナーゼ遺伝子に変異が入っていることは確認できたが、詳細な塩基配列解析は不可能であった (図 3B, 例 Mouse#20). また、sgRNA1 の認識配列と sgRNA 2 の認識配列の間は 130 bp であるが、Mouse #7, 14, 15, 27 において 130 bp の欠損が確認されており (図 3A), 2 種の sgRNA を用いることで、効率よくノックアウトマウスを得られているのではないかと考えられる.

アルビノ個体の雌雄 3 組を交配したところ、全ての仔 (8/8 匹, 9/9 匹, 11/11 匹) がアルビノの表現型を示し、ノックアウトした遺伝子は次世代のすべてで確認された.

考 察

本研究により、ターゲット遺伝子を同じくする 2 種

の sgRNA を用いることで、効率的に F0 ホモノックアウトマウスを得ることに成功した. 1 種の sgRNA を用いてノックアウトを試みた場合、その sgRNA が認識する配列に欠損が起こりうるが、2 種の sgRNA を用いてノックアウトを試みた場合、2 種の sgRNA それぞれが認識する配列において欠損が起こりうることも、2 種の sgRNA の認識配列の間が欠損していることが示唆された. また、1 種の sgRNA の濃度を 2 倍にしても変異効率は向上しないことから、sgRNA の濃度が高いからではなく sgRNA が 2 種であるために変異効率が向上したことが示唆された. 2 種の sgRNA を用いることで、効率よく F0 世代であっても両アレルの標的遺伝子をノックアウトすることが可能であった.

ZFN や TALEN は約 20 塩基 \times 2 箇所の合計 30~40 塩基で塩基配列を認識するのに対し、CRISPR/Cas9 システムは 20 塩基 \times 1 箇所での認識となるため、標的配列と類似した配列が意図せずに切断されてしまうオフターゲット効果が問題とされる¹²⁻¹⁴⁾. 30 塩基の

(42)

高率なノックアウトマウス作出法の開発

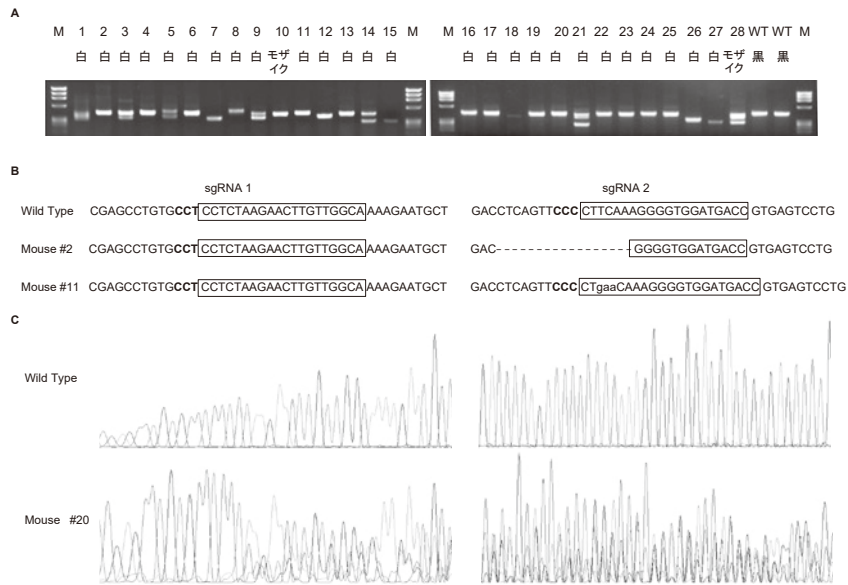


図3. A) sgRNA 1, sgRNA 2 および Cas9 mRNA をマイクロインジェクションしたマウスの標的配列を含む PCR 増幅産物の電気泳動. B) ダイレクトシーケンスによる標的配列の解析結果. PAM 配列 (太字), sgRNA の標的配列 (白枠), 挿入配列 (小文字) を示す. C) ダイレクトシーケンスによる標的配列の解析結果.

sgRNA を細胞に導入しても、その後のプロセシングにより 20 塩基になるため、sgRNA の伸長で認識配列の特異性を上げることはできない¹⁵⁾。PAM (protospacer adjacent motif) 配列である NGG とすぐ上流の 13 塩基以上が完全一致するオフターゲット配列が切断されやすいことから⁴⁾、その数が少ない (5 個程度以下) sgRNA を選んでインジェクションすることが望ましい。この点を考慮した過去の報告では、解析を行ったオフターゲット候補 382 箇所中 3 箇所のみ (0.7%) でオフターゲット切断が見られたという報告がある¹⁶⁾。また、CRISPR/Cas9 システムを使った iPS 細胞のゲノム編集においても、オフターゲット切断が少なかったことが示されている¹⁷⁾。しかしながら、全てのオフターゲット切断の可能性を否定することは難しいことから、本研究ではオフターゲット効果についての詳細な解析は行わなかった。

CRISPR/Cas9 システムを用いることで、遺伝子改変マウスあるいはノックインマウスを作出することが可能であることも報告されている^{18,19)}。すなわち、受精卵に sgRNA, ドナー DNA (ベクター), Cas9 mRNA あるいは Cas9 タンパク質をマイクロインジェクションすることで、ノックインマウスを作出するこ

とが可能である。CRISPR/Cas9 システムを用いたさらなる技術開発により、遺伝子改変マウス、ノックインマウス、あるいはコンディショナルノックアウトマウスの効率的な作出が期待される。

本研究では、2 種の sgRNA を用いた CRISPR/Cas9 システムをインジェクションすることで、F0 世代において効率的にホモノックアウトマウスを作出する可能性が示された。また、ホモノックアウトした場合、致死の可能性のある遺伝子に関しては、1 種の sgRNA を用いた CRISPR/Cas9 システムをインジェクションすることで、F0 世代でヘテロノックアウトマウスを作出したのちに F1 世代での解析が可能である。

謝 辞

本研究は、秋田大学 若手支援事業の支援を受けて実施された。本研究で使用したインジェクションニードルの作製には、尾野恭一教授 (秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座) に提供して頂いたマイクロピペット・プレーを用いた、バイオサイエンス教育・研究サポートセンター 動物実験部門の管理・運営は部門長である田中正光教授 (秋田大学, 医学部, 腫瘍

制御医学, 分子生化学講座) の監督により行った。心より御礼申し上げる。

文 献

- 1) Capecchi, M.R. (2005) Gene targeting in mice : functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 507-512.
- 2) Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes : zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1156-1160.
- 3) Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, **186**, 757-761.
- 4) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., *et al.* (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819-823.
- 5) Mali, P., Yang, L., Exvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. and Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339**, 823-826.
- 6) Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**, 167-170.
- 7) Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**, 1258096.
- 8) Chen, L., Tang, L., Xiang, H., Jin, L., Li, Q., Dong, Y., Wang, W. and Zhang, G. (2014) Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *Gigascience*, **3**, 24.
- 9) Fujii, W., Onuma, A., Sugiura, K. and Naito, K. (2014) One-step generation of phenotype-expressing triple-knockout mice with heritable mutated alleles by the CRISPR/Cas9 system. *J. Reprod. Dev.*, **60**, 324-327.
- 10) Mizuno, S., Dinh, T.T., Kato, K., *et al.* (2014) Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm. Genome*, **25**, 327-334.
- 11) Terao, M., Tamano, M., Hara, S., Kato, T., Kinoshita, M. and Takada, S. (2016) Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Exp. Anim.*, **65**, 275-283.
- 12) Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. and Sander, J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 822-826.
- 13) Hsu, P.D., Lander, E.S. and Zhang, F. (2015) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, **157**, 1262-1278.
- 14) Lin, Y., Cradick, T.J., Brown, M.T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B.M., Vertino, P.M., Stewart, F.J. and Bao, G. (2014) CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7473-7485.
- 15) Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., *et al.* (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**, 1380-1389.
- 16) Mashiko, D., Young, S.A., Muto, M., *et al.* (2014) Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev. Growth Differ.*, **56**, 122-129.
- 17) Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., *et al.* (2015) Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reprots*, **4**, 143-154.
- 18) Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K.F., Sakuma, T., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2015) Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in mice. *Genome Biology*, **16**, 87.
- 19) Chu, V.T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., Volchkov, P., Rajewsky, K. and Kuhn, R. (2016) Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotech.*, **16**, 4.