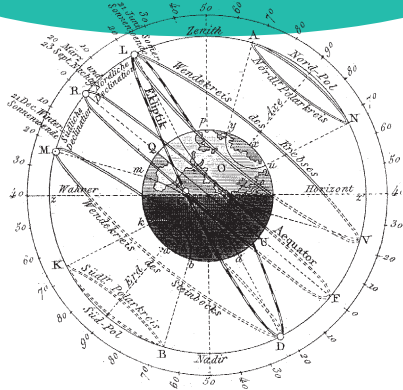


【解説】

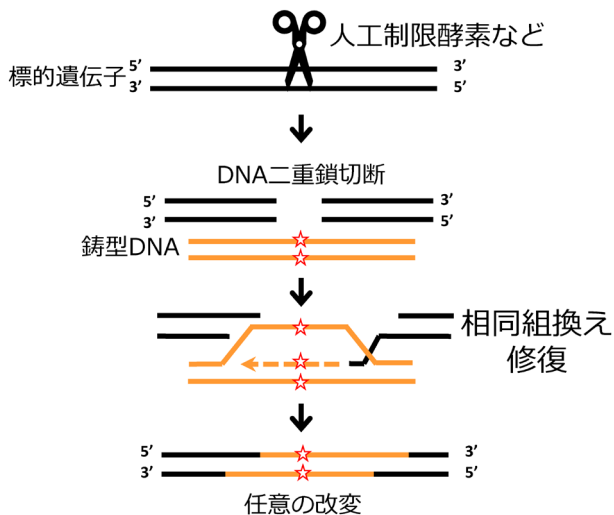


【2022年農芸化学女性研究者賞】

植物における相同組換えを介した精密ゲノム編集 ジーンターゲティング技術の展開

標的遺伝子を狙い通りに書き換えることができる技術

横井彩子



2020年のノーベル化学賞を受賞した人工制限酵素 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Proteins 9 (CRISPR/Cas9) の開発により、ゲノム編集技術の開発は大きく進展し、医療、産業、農業など幅広い分野に革命をもたらしている。一方、相同組換えを介したジーンターゲティング (GT) 技術は1980年代には動物細胞で確立され⁽¹⁾、その後すぐに植物細胞への適用が様々なグループにおいて試みられてきた。多様な植物種へのGT技術の適用は未だチャレンジングではあるが、本稿ではこれまでに植物において開発されてきたGT技術の状況とその展望について紹介する。

ゲノム編集技術とは？

ゲノム編集は、内在性の遺伝子の塩基配列を変化させる技術であるが、大きく分けて二つの技術がある (図1)。一つは、CRISPR/Cas9などの人工制限酵素で標的遺伝子にDNA二重鎖切断 (DSBs) を誘発し、DSBの末端が再結合される修復 (非相同末端結合) の過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子に挿入・欠失変異などを導入する「標的変異」技術 (図1A) である。この技術は修復エラーを利用して変異を導入することから、変異

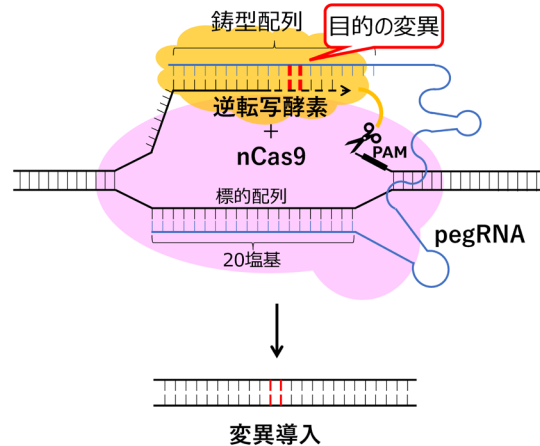
キーワード : Genome editing, Homologous recombination, DNA repair, Plant, Gene targeting

The Development of Homologous Recombination-mediated Genome Editing, Gene Targeting, in Plants: The Technology Allowing for the Pinpoint Modifications of Endogenous Target Gene
Ayako NISHIZAWA-YOKOI, 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

◆◆◆ コラム ◆◆◆

CRISPR/Casシステムは、細菌の免疫機構（外来性のウイルスなどを撃退する機構）として発見されたもので、近年世界中で最も広く利用されているCRISPR/Cas9は化膿レンサ球菌（*Streptococcus pyogenes*, SpCas9）に由来する。このシステムは、二本鎖のDNAを切断する酵素（エンドヌクレアーゼ）であるCas9と“ガイドRNA（gRNA）”と呼ばれる短いRNA分子から構成される。gRNAは、5'末端に位置する標的配列に相補的な20塩基の配列とCas9の足場となる配列から成り、足場配列にCas9が結合することでCas9-gRNA複合体を形成する。Cas9による標的配列の認識には、gRNAの5'末端の20塩基に相補的な配列に隣接するProtospacer Adjacent Motif（PAM）とよばれる特定の配列（SpCas9の場合NGG）が必要で、ガイドRNAの相補配列+PAM配列が存在する部位にCas9-ガイドRNAが結合してDNA二重鎖切断を生じる。CRISPR/Cas9システムはDNAを切断することに利用するだけでなく、Cas9タンパク質のDNA切断活性を部分的あるいは完全に欠損させたCas9タンパク質に様々なエフェクターを結合させることでDNA二重鎖切断を必要としないゲノム編集技術が次々と開発されている。その一つが、Prime editingと呼ばれる技術で、DNA切断活性を部分的に欠損させたCas9（ニックアーゼ型Cas9, nCas9）タンパク質に逆転写酵素を連結した融合タンパク質とgRNAの3'末端に逆転写酵素の鋳型となる配列を連結させたRNA分子を発現させることで、RNAを鋳型にして標的遺伝子に任意の変更を導入することができる。

る。この技術の開発により、任意の塩基置換、短い配列の挿入、正確な配列の欠損などの精密な遺伝子の書き換えが比較的簡便にできるようになった。



Prime editingによる精密ゲノム編集

nCas9に逆転写酵素を付加した融合タンパク質とgRNAの末端に逆転写酵素の鋳型を付加したprime editing gRNA (pegRNA)により、標的遺伝子への単鎖DNA切断とその部位からの逆転写により標的遺伝子に目的の変異（太線）を導入することができる。

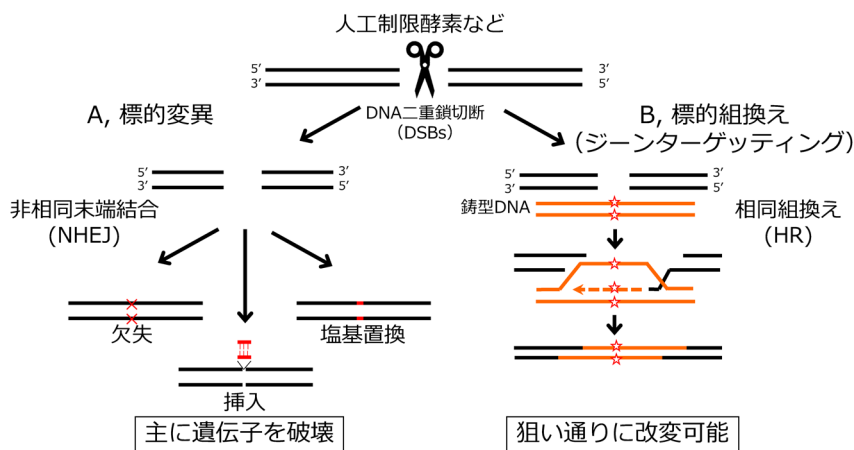


図1 ■ゲノム編集の主な2つの技術の概略図

A. 人工制限酵素により誘発したDSBsを修復する過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子を主に壊す技術。B. 任意の変異（☆）を挿入した鋳型DNAを細胞内に導入し、その配列を相同組換え修復により標的遺伝子にコピーペーストする。

パターンを制御することはできず、主に機能欠損型変異体の作出に用いられている。既に様々な植物種に適用されており^(2, 3)、日本国内でもこの技術で作出された健康機能性成分を高濃度で含むトマト⁽⁴⁾が販売されている。もう一つの技術は、「標的組換え（ジーンターゲティング, GT）」技術（図1B）であり、標的遺伝子上に生じたDSBsを相同組換え経路により修復する過程で、外来DNA（相同組換えの鋳型DNA）として導入した配列をコピーペーストするため、任意の変異（アミノ酸置換、ドメイン交換、ノックインなど）を標的遺伝子に導入することが可能である。機能獲得型の変異体作出には

不可欠な技術であるが、高等植物では相同組換え頻度が低い^(5, 6)ためGT効率が非常に低く^(5, 6)、様々な方面からその効率化に取り組まれてきた。

稀なGT細胞を効率良く選抜する方法の開発

前述のとおり、GTは標的遺伝子上に生じたDSBsを外来DNAを鋳型とした相同組換えにより修復する際に任意の変更を導入する技術であるが、高等植物では一般的に非同末端結合経路が相同組換えよりも優先的に機能しており、生じたDSBsを即座に再結合させるために

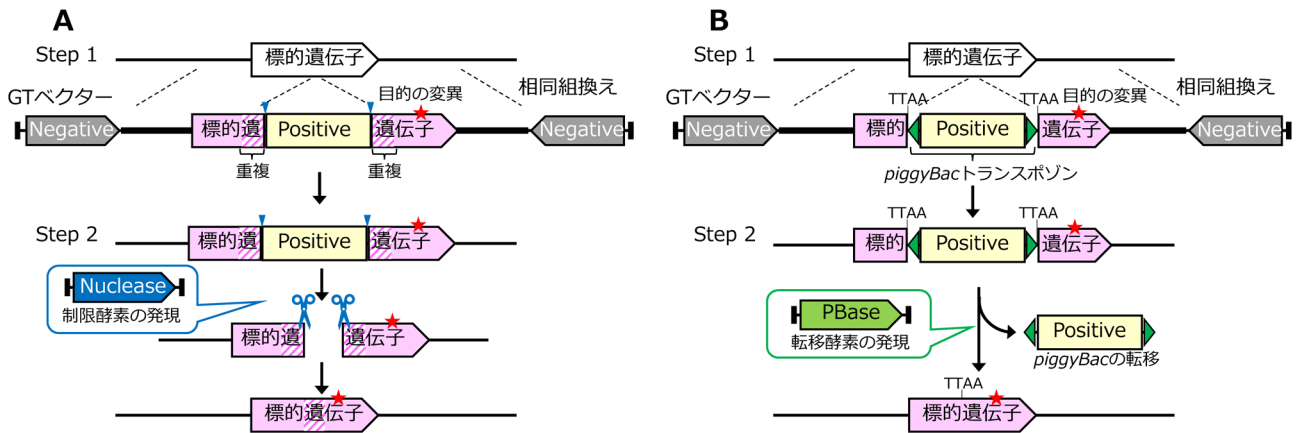


図2 ■ ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと痕跡を残さないマーカー除去法の組み合わせによる精緻な標的遺伝子改変

A. 制限酵素によるDSBsの誘導と単鎖アニーリング修復によるマーカー除去法の利用. Step1. アグロバクテリウムを介してGTベクターをイネカルスに導入し、ポジティブ・ネガティブ選抜によりGT細胞を濃縮する. GTの鋳型配列を部分的に重複(反復)させ、その内側に制限酵素などの認識配列(青矢印)を配置する. Step2. GTが成功した細胞において制限酵素を発現させてDSBsを誘発し、DNA修復により反復配列が単一の配列に再構成する過程でマーカーを除去して目的の変異(☆)のみを残す. B. *piggyBac*トランスポソンの転移によるマーカー除去法の利用. Step1. アグロバクテリウムを介してGTベクターをイネカルスに導入し、ポジティブ・ネガティブ選抜によりGT細胞を濃縮する. ポジティブ選抜マーカーを*piggyBac*トランスポソンの内部に配置する. Step2. GTが成功した細胞において*piggyBac*転移酵素(PBase)を発現させ、*piggyBac*トランスポソンの転移によりマーカーを除去し、目的の変異(☆)のみを残す.*piggyBac*の転移にはTTAA配列が必要である. いずれのマーカー除去法においても、次世代において標的遺伝子に目的の変異をホモで持ち、制限酵素あるいはPBase発現カセットを持たない個体を選抜する必要がある.

GT効率は低いと考えられている. また、細胞内で自然発生的に生じるDSBsを利用する場合、標的遺伝子上よりもその他の領域でランダムに生じるDSBsが圧倒的に多く、細胞内に導入した相同組換えの鋳型DNA(外来DNA)は標的遺伝子以外の領域に非相同末端結合経路によりランダムに取り込まれる、いわゆる通常の形質転換イベントが多数生じてしまう. そのため、GTに成功する細胞の割合は、形質転換細胞の 10^{-4} から 10^{-6} と非常に低くなると考えられている⁽⁵⁻⁸⁾. そこで、極めて稀なGT細胞を効率良く選抜する方法が開発されてきた.

1. ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGT

ポジティブ・ネガティブ選抜法は、ポジティブ選抜マーカー(薬剤耐性遺伝子など)を相同組換えの鋳型配列の内部に、ネガティブ選抜マーカー(致死あるいは生育阻害遺伝子など)を鋳型配列の外側に配置したGTベクター(図2, Step1)を用いることで、ベクターがランダムにゲノムに挿入された細胞はネガティブ選抜マーカーの発現によって排除され、相同組換えによって標的遺伝子が改変された細胞はポジティブ選抜マーカーの発現によって効率良く濃縮される選抜法である. この選抜法は、Teradaら⁽⁹⁾によってイネにおけるGT細胞の選抜に適用され、ポジティブ選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子(hygromycin phosphotransferase; hpt)、ネガティブ選抜マーカーとしてジフテリア毒素タ

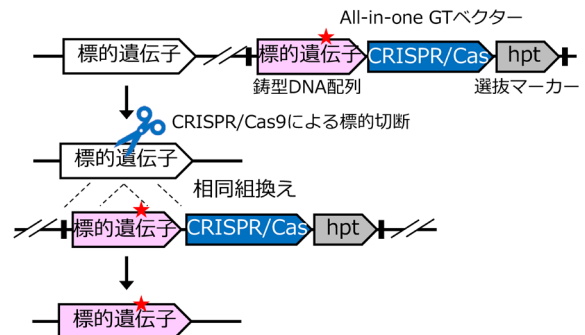


図3 ■ all-in-oneGTベクターを用いたCRISPR/Cas9による標的変異誘導的なGT系

GT鋳型DNA配列、CRISPR/Cas9(gRNA, Cas9)発現カセット、選抜マーカーを一つのT-DNAに配置したall-in-one GTベクターを植物細胞に導入し、形質転換細胞の選抜の過程でCRISPR/Cas9による標的切断が生じる. その多くは非相同末端結合による修復エラーで欠損や挿入変異が生じるが、ごく稀にゲノムに挿入されたベクター上の鋳型配列を利用した相同組換え修復が生じ、目的の変異(☆印)が標的遺伝子に挿入される.

ンパクAフラグメント(diphtheria toxin A fragment; DT-A)を用いてイネにおいては再現性の高いGT系として確立されてきた⁽¹⁰⁻¹³⁾. しかしながら、DT-Aはタンパク質そのものが毒性を持ち、ベクターからの一過的発現により細胞毒性を示すなどの理由から、未だイネ以外の植物種には適用されていない.

そこで筆者は、汎用的なポジティブ・ネガティブ選抜法の確立を目指して、選抜の開始時期や強度を任意に調

節することができる条件的ネガティブ選抜マーカーの開発にも取り組んできた。その一つとして、ポジティブ選抜マーカーの発現をネガティブ選抜マーカーの発現で抑制するポジティブ・ネガティブ選抜法を考案した。より汎用的な選抜系となるように、多くの植物種において利用されている nptII (Neomycin phosphotransferase II) 遺伝子をポジティブ選抜マーカーとして利用し、その発現を抑制するアンチセンス鎖 (anti-nptII) をネガティブ選抜マーカーとした。実際に、この選抜法を用いて、イネの複数の内在遺伝子のGTによる改変に成功した⁽¹⁴⁾。現在筆者らは、より強力な条件的ネガティブ選抜マーカーを開発し、イネ以外の植物種におけるGT細胞の選抜に適用することを試みている。

2. ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと痕跡を残さないマーカー除去法の組み合わせによる精緻な標的遺伝子改変

ここまで述べた通り、少なくともイネにおいてはポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTを用いることで、あらゆる遺伝子を狙い通りに改変することが可能である。しかしながらこの方法を用いると、標的遺伝子座に任意の改変と共にポジティブ選抜マーカー発現カセットを挿入することでGT細胞を濃縮するため、標的遺伝子座に望むべき変異のみを残したい場合は、ポジティブ選抜マーカー発現カセットを綺麗に除去する必要がある (図2, Step 2)。そこで筆者らのグループでは、ポジティブ選抜マーカーを痕跡無く取り除く2種類の実験系を開発してきた。その一つは、DSBsの誘導と単鎖アニーリングによる修復を利用したマーカー除去法である (図2A)。この方法は、ポジティブ選抜マーカーの両側に配置する相同組換えの鋳型配列を部分的に重複 (反復) させ、その内側を制限酵素で切断して反復配列が単一の配列に再構成されることでマーカーを痕跡無く除去できる。このマーカー除去法は、効率は低いながらもマーカーを挿入する位置や配列に制限がないため汎用性が高く、実際にイネにおいてGTで改変した遺伝子座からのマーカー除去にも成功している^(15, 16)。もう一つは、昆虫由来の *piggyBac* トランスポゾンを利用したマーカー除去法である (図2B)。この *piggyBac* トランスポゾンは、宿主ゲノムの TTAA サイトに挿入され、再転移する際にはフットプリントを残さない特徴を持つ。植物細胞においても *piggyBac* トランスポゾンは効率良く、かつ、正確に転移することが明らかになったこと⁽¹⁷⁾ から、GTにより改変した遺伝子座からのマーカー除去に適用した。その結果、転移酵素を発現させた再分化個体の9

割以上の個体で、*piggyBac* トランスポゾンはゲノムに再挿入することなくマーカー除去に成功した⁽¹⁸⁾。これまでに筆者らは、ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと痕跡を残さないマーカー除去法の組み合わせにより、標的遺伝子へのアミノ酸置換の導入^(15, 18, 19)、micro RNA 結合配列の改変⁽¹⁶⁾、タグ配列のノックイン、コード領域のスワッピングなど (Unpublished)、イネ内在性遺伝子の様々な改変に成功している。

人工制限酵素を利用した標的切断誘導的なGTの開発

ゲノム上の任意の部位を切断できる制限酵素として、人工制限酵素の開発が進められてきた。第一世代の Zinc Finger Nucleases (ZFNs)⁽²⁰⁾、第二世代の Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs)⁽²¹⁾、第三世代の CRISPR/Cas9^(22, 23) が人工制限酵素として開発されており、特に CRISPR/Cas9 が開発されて以降は、様々な生物種においてゲノム中の狙った箇所に DSBs を誘発することが容易になった。

相同組換えを介したGTは標的遺伝子座上に DSBs が生じることが引き金となることから、標的遺伝子座上に DSBs を誘導することでGT効率は飛躍的に向上すると考えられている。そのため、CRISPR/Cas9による標的切断の誘導と同時に相同組換えの鋳型配列を細胞内に導入するGT系 (標的切断誘導的GT) が様々な植物種において確立された⁽²⁴⁾。その一つが、*in-planta* GTと呼ばれる方法で、両端に人工制限酵素の認識配列を配置したGTの鋳型配列と人工制限酵素発現カセットをゲノムに形質転換し、標的遺伝子の切断と鋳型配列の切り出しを同時に生じさせることで効率良くGTが生じる⁽²⁵⁾。この方法は、シロイヌナズナにおける再現性のあるGT系として初めて確立された。また、卵細胞特異的プロモーターで人工制限酵素を発現させること⁽²⁶⁾や人工制限酵素の発現系の改良⁽²⁶⁾、DSBを誘導する際に突出末端を生じる Cas12a^(27, 28) や Cas9 の paired-nickase⁽²⁹⁾ を利用すること⁽³⁰⁾でGT効率を改善し、*in-planta* GTによるイネ⁽³⁰⁾やタバコ⁽³¹⁾の内在性遺伝子の成功例も報告された。

筆者らのグループも、イネにおいて標的切断誘導を利用したGT効率の確立を試みてきた。簡便な標的切断誘導的なGT系として、標的遺伝子を切断する人工制限酵素発現カセットとGTの鋳型DNA配列、形質転換細胞を選抜するための選抜マーカーを同一のベクター上に配置した all-in-one GTベクターを利用することで、形質転

換細胞の選抜過程で標的切断が生じ、ゲノム上に挿入されたT-DNA上の鋳型配列を切り出すことなく標的遺伝子の相同組換えによる修復が生じてGTが成立することを明らかにしている⁽³²⁾。またこの時のGT効率は、形質転換細胞を相同組換えの活性化剤で処理することで限定的ながらも向上することを見出し、イネだけでなくタバコにおいてもGTによる内在性遺伝子の改変に成功した⁽³²⁾。All-in-one GTベクターを利用した標的切断誘導的なGT系は、シロイヌナズナ^(33, 34)にも適用されている。

本項で述べたように、相同組換え経路と競合して機能する非相同末端結合経路の変異体⁽³²⁾や阻害剤⁽³⁵⁾の利用、相同組換え活性化剤処理⁽³¹⁾により、GT効率は向上することが明らかになっている。さらに筆者らのグループは、イネにおいて標的切断と同時に相同組換え関連因子である exonuclease 1 や RecQ helicase の1つの RecQ14 を単独あるいは両方を過剰発現させることで、相同組換え効率が相乗的に増加することを示している⁽³⁶⁾。また、非相同末端結合経路のDSB末端保護に機能するKu70、Ku80あるいはDNA ligase Lig4の発現を抑制させたイネでは、T-DNAのゲノムへの挿入が抑制され、相同組換え効率の向上が見られることも明らかにしている⁽³⁷⁾。さらに最近、非相同末端結合のバックアップ経路で機能するDNA polymerase θ (PolQ) がT-DNA挿入やDNA修復に重要な役割を果たしていることを明らかにした⁽³⁸⁾。現在、非相同末端結合経路の阻害剤や相同組換え活性化剤の利用によりDNA修復経路の調節し、GT効率をさらに向上させることに取り組んでいる。

■ 相同組換えの鋳型DNAデリバリーの効率化によるGT効率の改良

前項で紹介したCRISPR/Cas9などの人工制限酵素を用いた標的切断誘導的なGT系は様々な植物種において適用されてきたが、より広範な植物種に適用させるために更なる効率化が試みられてきた。その一つのアプローチとして、標的遺伝子を切断するタイミングでGTの鋳型DNAを多量に複製させる（ウイルスベクターの利用）、あるいは、標的遺伝子付近に効率的にデリバリーさせる（DNA切断部位への鋳型DNAデリバリー）実験系が確立されてきた。

1. ウイルスベクターの利用

植物ウイルスの一種であるジェミニウイルスは、ゲノムとして1本鎖環状DNAを持つDNAウイルスである⁽³⁹⁾。感染した宿主の核内で多量に複製されるので、

古くから植物組織を利用した物質生産などに用いられてきた⁽⁴⁰⁾。ジェミニウイルスのベクター上に人工制限酵素発現カセットとGTの鋳型DNA配列を配置して植物細胞に導入し、ウイルス由来のreplication initiator protein (Rep) およびRepAタンパクを同時に発現させることでジェミニウイルスベクターを核内で大量に複製させ、人工制限酵素を高発現させるとともに鋳型DNAを大量に供給する高効率GT系が確立されている⁽⁴¹⁾。双子葉にはbean yellow dwarf virus、単子葉にはwheat dwarf virusが用いられ、これまでにタバコ⁽⁴¹⁾、シロイヌナズナ⁽⁴²⁾、トマト^(43, 44)、ジャガイモ⁽⁴⁵⁾、キャッサバ⁽⁴⁶⁾、イネ⁽⁴⁷⁾、コムギ⁽⁴⁸⁾、ワタ⁽⁴⁹⁾など、モデル植物だけでなく難形質転換植物や高次倍数性の植物など様々な植物種においてGTによる標的遺伝子の改変の成功例が報告されている。

我々のグループでは、従来のジェミニウイルスベクターよりも高い複製能を持つ改良型のジェミニウイルスベクターを開発し、更なるGTの効率化に現在取り組んでいる (Unpublished)。

2. DNA切断部位への鋳型DNAデリバリー

人工制限酵素による標的切断部位へGTの鋳型配列を積極的にリクルートすることでGT効率は向上すると考えられる。そこで、Cas9タンパク質にアグロバクテリウム由来のT-DNA輸送のパイロットタンパクとして知られるVirD2タンパクを融合し、VirD2が結合するright border配列を末端に付加した鋳型DNAをssDNAとして連結させ、ガイドRNAと共に細胞内に共導入したところ、VirD2 fusionなしのCas9あるいはborder配列無し鋳型ssDNAを用いたコントロールに比べてGT効率が向上することを明らかにしている⁽⁵⁰⁾。この実験系を発展させ、CRISPR/Cas9のガイドRNAの末端に標的遺伝子のアンチセンス配列を付加したキメラガイドRNAをCas9と共に発現させることで、RNAを鋳型として標的遺伝子を改変することに植物細胞で成功している⁽⁵¹⁾。

■ GTを用いた精密ゲノム編集によるカスタムメイド改変の汎用化に向けて

近年、DSBを伴わないゲノム編集技術として、塩基置換を導入できるBase editor^(52, 53)やRNAを鋳型に逆転写反応で短い任意の改変を導入できるPrime editing (コラムを参照)⁽⁵⁴⁾が開発され、植物にも適用されている。これらの技術は精密なゲノム編集が可能であるが、塩基置換の方向性や変異を導入できる部位、導入可能な

改変の大きさなどに制限があり、あらゆる任意の改変を導入できる技術はGTの他にないのが現状である。これまでのGTによる植物の精密ゲノム編集の報告では、転写因子の活性制御に関わるリン酸化部位の改変⁽¹⁹⁾、レポーター遺伝子のノックイン^(11, 12, 19)、タグ配列のノックイン、遺伝子コード領域のスワッピングなど (Unpublished), 植物の生命現象の分子機構解明への貢献だけでなく、アミノ酸置換による除草剤耐性の付与や代謝経路の改変^(9, 14, 15, 18, 28, 30, 32), micro RNA 標的部位の改変による閉花性の付与⁽¹⁶⁾, プロモータースワップによる収量増加⁽⁵⁵⁾など、種々の優良な農業形質を付与することに成功している。さらに最近, CRISPR/Cas9を介したDSBsの誘導が体細胞における相同染色体間の組換えを生じさせることがシロイヌナズナ⁽⁵⁶⁾やトマト^(57, 58)で明らかになっており, 交配育種の精密化に貢献することが期待される。今後, 本稿で紹介した技術をさらに効率化させて様々な植物種に適用可能なGT系を確立し, 希望する植物種で標的の遺伝子を狙い通りに改変できるカスタムメイド変異創出を可能にし, 植物科学の発展と作物育種の加速化の両方に貢献したい。

文献

- O. Smithies, R. G. Gregg, S. S. Boggs, M. A. Koralewski & R. S. Kucherlapati: *Nature*, **317**, 230 (1985).
- X. Ma, Q. Zhu, Y. Chen & Y.-G. Liu: *Mol. Plant*, **9**, 961 (2016).
- L. Arora & A. Narula: *Front. Plant Sci.*, **8**, 1932 (2017).
- S. Nonaka, C. Arai, M. Takayama, C. Matsukura & H. Ezura: *Sci. Rep.*, **7**, 7057 (2017).
- M. Hroudá & J. Paszkowski: *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 106 (1994).
- R. Offringa, M. J. de Groot, H. J. Haagsman, M. P. Does, P. J. van den Elzen & P. J. Hooykaas: *EMBO J.*, **9**, 3077 (1990).
- M. E. Gallego, P. Sirand-Pugnet & C. I. White: *Plant Mol. Biol.*, **39**, 83 (1999).
- H. Puchta: *Plant Mol. Biol.*, **48**, 173 (2002).
- R. Terada, H. Urawa, Y. Inagaki, K. Tsugane & S. Iida: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1030 (2002).
- R. Terada, Y. Johzuka-Hisatomi, M. Saitoh, H. Asao & S. Iida: *Plant Physiol.*, **144**, 846 (2007).
- A. Ono, K. Yamaguchi, S. Fukada-Tanaka, R. Terada, T. Mitsui & S. Iida: *Plant J.*, **71**, 564 (2012).
- T. Yamauchi, Y. Johzuka-Hisatomi, S. Fukada-Tanaka, R. Terada, I. Nakamura & S. Iida: *Plant J.*, **60**, 386 (2009).
- T. Yamauchi, Y. Johzuka-Hisatomi, R. Terada, I. Nakamura & S. Iida: *Plant Mol. Biol.*, **85**, 219 (2014).
- A. Nishizawa-Yokoi, S. Nonaka, K. Osakabe, H. Saika & S. Toki: *Plant Physiol.*, **169**, 362 (2015).
- M. Endo, S. Iwakami & S. Toki: *Plant Biotechnol. J.*, **19**, 563 (2020).
- N. Ohtsuki, K. Kizawa, A. Mori, A. Nishizawa-Yokoi, T. Komatsuda, H. Yoshida, K. Hayakawa, S. Toki & H. Saika: *Front. Genome Editing*, **2**, 617713 (2021).
- A. Nishizawa-Yokoi, M. Endo, K. Osakabe, H. Saika & S. Toki: *Plant J.*, **77**, 454 (2014).
- A. Nishizawa-Yokoi, M. Endo, N. Ohtsuki, H. Saika & S. Toki: *Plant J.*, **81**, 160 (2015).
- A. Nishizawa-Yokoi, R. Motoyama, T. Tanaka, A. Mori, K. Iida & S. Toki: *Plant Physiol.*, in press.
- Y. G. Kim, J. Cha & S. Chandrasegaran: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1156 (1996).
- M. Christian, T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove & D. F. Voytas: *Genetics*, **186**, 757 (2010).
- L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville & G. M. Church: *Science*, **339**, 823 (2013).
- D. Miki, R. Wang, J. Li, D. Kong, L. Zhang & J.-K. Zhu: *Plant Cell Physiol.*, **62**, 752 (2021).
- F. Fauser, N. Roth, M. Pacher, G. Ilg, R. Sanchez-Fernandez, C. Biesgen & H. Puchta: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7535 (2012).
- F. Wolter, J. Klemm & H. Puchta: *Plant J.*, **94**, 735 (2018).
- P. Schindele, L. Merker, T. Schreiber, A. Prange, A. Tissier & H. Puchta: *Plant Biotechnol. J.*, in press.
- F. Wolter & H. Puchta: *Plant J.*, **100**, 1083 (2019).
- S. Schiml, F. Fauser & H. Puchta: *Plant J.*, **80**, 1139 (2014).
- M. Endo, M. Mikami & S. Toki: *Plant Physiol.*, **170**, 667 (2016).
- T.-K. Huang, B. Armstrong, P. Schindele & H. Puchta: *Plant Biotechnol. J.*, **19**, 1314 (2021).
- A. Nishizawa-Yokoi, M. Mikami & S. Toki: *Front. Genome Editing*, **2**, 604289 (2020).
- N. V. Permyakova, T. V. Marenkova, P. A. Belavin, A. A. Zagorskaya, Y. V. Sidorchuk, E. A. Uvarova, V. V. Kuznetsov, S. M. Rozov & E. V. Deineko: *Cells*, **10**, 2137 (2021).
- Z. Zhengjing, Z. Wenjie, Z. Wenxin, L. Jing, K. Dali, Z. Lei, W. Rui, P. Fangnan, K. Zhe, K. Yongping *et al.*: *Plant Physiol.*, **190**, 2203 (2022).
- T. V. Vu, D. T. H. Doan, M. T. Tran, Y. W. Sung, Y. J. Song & J.-Y. Kim: *Front. Plant Sci.*, **12**, 722552 (2021).
- Y. I. Kwon, K. Abe, K. Osakabe, M. Endo, A. Nishizawa-Yokoi, H. Saika, H. Shimada & S. Toki: *Plant Cell Physiology*, **53**, 2142 (2012).
- A. Nishizawa-Yokoi, S. Nonaka, H. Saika, Y. I. Kwon, K. Osakabe & S. Toki: *New Phytol.*, **196**, 1048 (2012).
- A. Nishizawa-Yokoi, H. Saika, N. Hara, L. Y. Lee, S. Toki & S. B. Gelvin: *New Phytol.*, **299**, 2859 (2020).
- 池上正人: *化学と生物* **41**, 311 (2003).
- Y. Peretz, R. Mozes-Koch, F. Akad, E. Tanne, H. Czosnek & I. Sela: *Plant Physiol.*, **145**, 1251 (2007).
- N. J. Baltes, J. Gil-Humanes, T. Cermak, P. A. Atkins & D. F. Voytas: *Plant Cell*, **26**, 151 (2014).
- F. Hahn, M. Eisenhut, O. Mantegazza & A. P. M. Weber: *Front Plant Sci*, **9**, 424 (2018).
- T. Cermak, N. J. Baltes, R. Cegan, Y. Zhang & D. F. Voytas: *Genome Biol.*, **16**, 232 (2015).
- T. Dahan-Meir, S. Filler-Hayut, C. Melamed-Bessudo, S. Bocobza, H. Czosnek, A. Aharoni & A. A. Levy: *Plant J.*

- 95, 5 (2018).
- 45) N. M. Butler, N. J. Baltes, D. F. Voytas & D. S. Douches: *Front Plant Sci*, **7**, 1045 (2016).
- 46) A. W. Hummel, R. D. Chauhan, T. Cermak, A. M. Mutka, A. Vijayaraghavan, A. Boyher, C. G. Starker, R. Bart, D. F. Voytas & N. J. Taylor: *Plant Biotechnol. J.*, **16**, 1275 (2018).
- 47) M. Wang, Y. Lu, J. R. Botella, Y. Mao, K. Hua & J. K. Zhu: *Mol. Plant*, **10**, 1007 (2017).
- 48) J. Gil-Humanes, Y. Wang, Z. Liang, Q. Shan, C. V. Ozuna, S. Sanchez-Leon, N. J. Baltes, C. Starker, F. Barro, C. Gao *et al.*: *Plant J.*, **89**, 1251 (2017).
- 49) B. Li, C. Fu, J. Zhou, F. Hui, Q. Wang, F. Wang, W. Guanying, X. Zhongping, C. Lianlian, Y. Daojun *et al.*: *Cells*, **11**, 2902 (2022).
- 50) E. J. Aird, K. N. Lovendahl, A. St Martin, R. S. Harris & W. R. Gordon: *Commun. Biol.*, **1**, 54 (2018).
- 51) S. Li, J. Li, Y. He, M. Xu, J. Zhang, W. Du, Y. Zhao & L. Xia: *Nat. Biotechnol.*, **37**, 445 (2019).
- 52) K. Nishida, T. Arazoe, N. Yachie, S. Banno, M. Kakimoto, M. Tabata, M. Mochizuki, A. Miyabe, M. Araki, Y. H. Kiyotaka *et al.*: *Science*, **353**, 1248 (2016).
- 53) N. M. Gaudelli, A. C. Komor, H. A. Rees, M. S. Packer, A. H. Badran, D. I. Bryson & D. R. Liu: *Nature*, **551**, 464 (2017).
- 54) A. V. Anzalone, P. B. Randolph, J. R. Davis, A. A. Sousa, L. W. Koblan, J. M. Levy, P. J. Chen, C. Wilson, G. A. Newby, A. Raguram *et al.*: *Nature*, **576**, 149 (2019).
- 55) J. Shi, H. Gao, H. Wang, H. R. Lafitte, R. L. Archibald, M. Yang, S. M. Hakimi, H. Mo & J. E. Habben: *Plant Biotechnol. J.*, **15**, 207 (2017).
- 56) S. Filler-Hayut, K. Kniazev, C. Melamed-Bessudo & A. A. Levy: *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12096 (2021).
- 57) S. Filler-Hayut, C. Melamed Bessudo & A. A. Levy: *Nat. Commun.*, **8**, 15605 (2017).
- 58) I. Ben Shlush, A. Samach, C. Melamed-Bessudo, D. Ben-Tov, T. Dahan-Meir, S. Filler-Hayut & A. A. Levy: *Genes*, **12**, 59 (2021).

プロフィール



横井 彩子 (Ayako NISHIZAWA-YOKOI)
 <略歴>2002年近畿大学大学院農学研究科水産学専攻博士前期課程修了/同年同大学農学部バイオサイエンス学科植物分子生理学研究室研究補助員/2010年博士号取得/同年農業生物資源研究所特別研究員/2015年同期付研究員 (2016年組織改組により農研機構生物機能利用研究部門に改称)/2018年同主任研究員/2019年同上級研究員, 現在に至る<研究テーマと抱負>植物のDNA損傷応答, 修復機構の解明, ゲノム編集技術の高度化<趣味>ウォーキング, バスケットボール (前十字靭帯断裂して以降は見る専門です)

Copyright © 2023 公益社団法人日本農芸化学会
 DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.61.281