

遺伝子工学技術はDNA関連酵素に支えられている ～制限酵素, PCR, そしてゲノム編集へ～

石野 良純

20世紀後半に始まった分子生物学の急速な発展は、試験管内で人工的にDNAを切り貼りしたものを生きた細胞に導入する遺伝子組換え実験ができるようになったことに大きく依存している。この技術を使って実験を成功させるためには少し熟練を必要としたが、この技術誕生の15年後、PCRの登場によって試験管内遺伝子操作が画期的に容易になった。PCRは分子生物学の各種実験手法を一変させ、煩雑な操作が大きく簡略化されたことを、筆者の世代の分子生物学者は実感している。そして、PCRの登場から15年後、新たな遺伝子操作実験手法として、CRISPR-Cas9を利用した簡便な「ゲノム編集」技術が開発され、それから数年を経た現在、ゲノム編集実験は急速にその広がりを見せている。これらの遺伝子工学実験技術を支えているのは、DNAに作用する酵素であり、生物が自分の生命活動を維持するために有しているDNA関連酵素をうまく利用することによって、人工的にDNA鎖を合成したり、切断したり、連結したり、二本鎖を一本鎖に解くことが可能になった(図1)。本稿では、重要な遺伝子工学技術開発につながったDNA関連酵素に焦点を当てて、その歴史を辿ってみたい。

遺伝子を人工的切り貼りする夢の技術

筆者が大学の研究室に所属して研究を始めた頃、遺伝子操作技術が利用できるようになり、有用な生理活性物質が遺伝子組換えによって人工的に作れることを知った。制限酵素は、それぞれの酵素が特有の認識配列を有し、その配列のところどころで二本鎖を切断することから、タンパク質によるDNA認識機構を研究するための適した実験材料にもなった。制限酵素でゲノムDNAやcDNA

を切断して、適当なベクターにつなげる際にはDNAリガーゼが活躍した。その際にDNA末端の修飾にはDNAポリメラーゼが役立った。DNAポリメラーゼはcDNA合成や塩基配列解読のジデオキシ法などで爆発的な活躍をした。このようなDNA関連酵素を駆使して、試験管内で遺伝子を切り貼りして組換えDNAを作製し、それを生きた細胞に導入することによって、有用物質生産を行う遺伝子工学が夢の技術として登場し、生命科学が大きく前進した。筆者は元々DNAに興味があったので、関連する研究室を選んで、卒業研究生として配属された。卒業研究では転移RNA(tRNA)の部分配列を化学合成してそれをRNAリガーゼで連結してより長鎖のものを合成するというテーマであったが、大学院前期課程で選択したテーマは制限酵素の基質認識機構に関するものであり^{1,2)}、博士論文はDNAリガーゼの研究でまとめた³⁾。核酸酵素の基質認識機構に対する興味はそれ以来今日まで続いている。

この技術の普及には、上記のようなDNA関連酵素が製品化されて、容易に購入して利用できるようになったことが大きい。しかし、それでも実験操作自体は煩雑で、ある程度の熟練技術が必要であった。遺伝子操作実験はPCRが実用化されたことで一変する。

PCRは遺伝子操作実験を大きく変えた

1983年に生まれたPCRは1988年に耐熱性のDNAポリメラーゼの利用によって自動化が実現し、一般的実験技術として一気に普及した。PCRはそれまでの遺伝子操作実験手法を塗り替えてしまい、遺伝子実験に不慣れな研究者でも簡単に操作ができるようになった。

PCRの普及にとっては、耐熱性DNAポリメラーゼが欠かせなかった。高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* 由来の *Taq* DNAポリメラーゼ⁴⁾はPCR酵素の代表的な存在として有名である。*Taq* DNAポリメラーゼがPCRに利用されて以来、耐熱性DNAポリメラーゼの有用性は、その他の遺伝子工学実験にも利用され、その価値はさらに高まった。特に、ジデオキシ反応をPCRのように繰り返して、産物を増幅するサイクルシーケンシング法への応用は⁵⁾、蛍光式自動シーケンシング装置と合間って

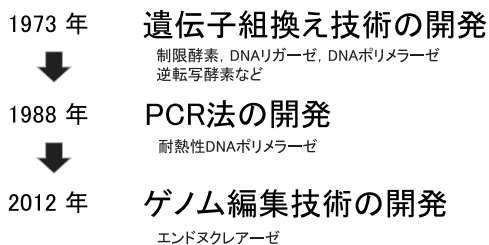


図1. 分子生物学における3度の技術革新

著者紹介 九州大学農学研究院蛋白質化学工学分野(教授) E-mail: ishino@agr.kyushu-u.ac.jp

生物の全ゲノム配列解読を現実化し、2003年のヒトゲノム解読完了につながった。PCRの実用化以降、遺伝子工学的に優れた耐熱性のDNAポリメラーゼの開発競争が始まり、PCR酵素としてもより正確性の高い酵素、より長鎖の増幅に適した酵素などのように目的に応じて使い分けられるような、種々の酵素が開発されてきた^{6,7)}。DNAポリメラーゼは塩基配列解読技術の主役となりえ、初代のジデオキシ法から次世代シーケンシング(NGS)、さらには次々世代の一分子シーケンシングでも欠かせない酵素である。DNAポリメラーゼの開発が今後も続くことは間違いない。

ゲノム編集技術開発を目指して

生物のゲノムDNA上の個々の遺伝子の機能を解明したい時に、その遺伝子が改変された変異体を野生型の遺伝子を持つ生物個体と比較し、表現型がどのように変化するかを調べることが有効な手段となる。この目的のために使われるジーンターゲットング技術として、生物が有する相同的DNA組換え能を利用した標的遺伝子改変の方法は、それが比較的容易な微生物の一部のモデル生物で盛んに用いられてきた。この方法を利用して1989年にできたノックアウトマウス作製技術は、変異個体作製までの煩雑な操作と長時間を要するにもかかわらず、ヒトに近い高等真核モデル生物のマウスにおいて特定の遺伝子に変異を持った個体の作製法として多くの研究に利用されてきた(2007年ノーベル賞)⁸⁾。

ゲノムDNA上の特定の遺伝子に対して人工的に置換、削除、挿入などの操作をすることが簡単にできれば、もっと簡単に遺伝子機能を解析することができるので、そのための方法が考えられてきた。その中で、ゲノム上の特定部位を狙って二本鎖DNA切断を起こすことができれば、生きた細胞が自らそれを修復する際に、切断された遺伝子の位置に高効率で変異が入ることがわかり(図2)、ノックアウトマウス技術に比べて遥かに簡単に遺伝子操作が行えることが期待された。ここから「ゲノム編集」という技術開発が始まる。

人工ヌクレアーゼ開発

制限酵素は特定の塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断する、初代遺伝子工学技術の“はさみ”である。通常同じタンパク質がホモ二量体を形成して、それぞれのサブユニットがそれぞれの鎖の認識と切断を担い、認識配列の中でDNA鎖を切断する。しかし、FokIという制限酵素は一つのタンパク質の中にDNA認識ドメインと非特異的DNA切断ドメインとがはっきり分かれてい

て、認識配列から離れた位置で切断を起こす⁹⁾。この酵素のDNA認識ドメインをジンクフィンガーモチーフに置換したZFN(zinc-finger nuclease)が1996年に開発された¹⁰⁾。

アフリカツメガエルの転写因子III Aには30アミノ酸長のZn結合ドメイン(ZF)がタンデムに並んでおり、それぞれのZFがDNAの3塩基を特異的に認識して結合することができる。このZFに変異を導入して認識する塩基を変換し、それらを組み合わせることによって特異的な配列を認識するDNA結合タンパク質を創製することが試みられた。一つのZFが3塩基を認識するので、3~6個のZFを持つZFNは9~18塩基に特異的に結合する。それをFokIのヌクレアーゼドメインと融合させることで、ZFが認識する塩基配列の近傍でDNA鎖を切断することが期待された。切断したい位置から、それぞれのDNA鎖に対して上流の9~18塩基配列に合わせてZFをデザインすると、それぞれの鎖の配列を認識してZFが結合し、FokIの切断ドメインがちょうど切断したい場所で二量体を形成して活性型になり、二本鎖切断が起こる(図3)。この人工ヌクレアーゼがZFNと呼ばれ、初代ゲノム編集技術に利用された。ゼブラフィッシュ、ラット、培養細胞などでゲノム編集した結果が報告された¹¹⁻¹³⁾。

植物の病原菌の一種であるキサントモナス属細菌が産生する転写エフェクター因子のTALE(transcription activator-like effector)タンパク質は、宿主の特定のDNA配列に結合して遺伝子発現様式を変えることで病原性を発揮する。TALEはエフェクタードメインとDNA結合ドメインから構成され、DNA結合ドメインは、34アミノ酸を1単位とするリピート構造をもち、一つの単位が1塩基を認識する。単位中の12番目と13番目のアミノ酸残基はRVD(repeat variable di-residue)と呼ばれ、塩基の結合特異性を決めている。この特性を利用して、結合させたい配列に合わせて、15~20単位をもつTALEを人工的にデザインし、それをFokI切断ドメインと融合させたものが第2世代の人工ヌクレアーゼとして、TALEN(transcription activator-like effector nuclease)と呼ばれる¹⁴⁻¹⁶⁾(図3)。TALENはZFNと比べて作製がより容易であるため、開発された2010年以降は、人工ヌクレアーゼによるゲノム編集操作の主役となった。しかしそのすぐ後に、さらに簡便なゲノム編集技術が登場してくる¹⁷⁾。

CRISPRの発見とその機能

筆者が1986年に大腸菌で発見した、相同性を持たな

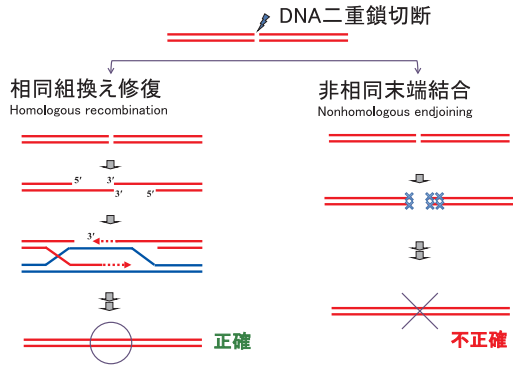


図2. DNA二重鎖切断修復経路. DNAに二本鎖切断が生じた時の主な修復機構として、同相組換え修復と非相同末端結合が知られている。ヒト細胞においては非相同末端結合が細胞周期を通してはたらく主流になっている。非相同末端結合は修復エラーが起きやすく、再結合の際に欠失、挿入によりその遺伝子に変異が入る。

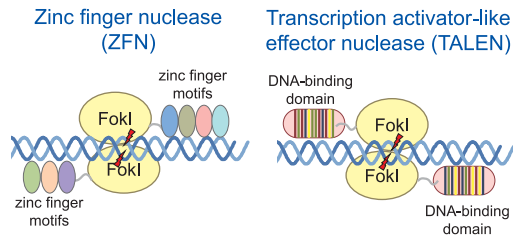


図3. FokIを利用した人工部位特異的エンドヌクレアーゼの創製. ZFやTALEの塩基特異的認識能を利用して、目的の配列に結合する人工タンパク質をテラーメイドで作製し、FokIのヌクレアーゼドメインとの融合タンパク質として人工ヌクレアーゼを創製する。

い一定の長さのスペーサーを挟んだ奇妙な繰り返し配列は^{17,18)}、その後1990年代に入って*Mycobacterium tuberculosis*¹⁹⁾、*Heloferax mediterranei*²⁰⁾などの、他の原核生物ゲノム中からも相次いで発見された。その後も、この特徴的な配列が真正細菌とアーキアのゲノム上に広く存在することが示され、繰り返し配列の長さは21–40 bp、またスペーサーは20–58 bpと多様であるが、スペーサーを挟み、逆向き二回対象性を含む繰り返し配列という共通の特徴から、SPIDR (spacers interspaced direct repeats)、SRSR (short regularly spaced repeats)、LCTR (large cluster of 20-nt tandem repeat sequences) などと種々の名称が提唱されたが、2002年にCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) という名称で統一された²¹⁾。CRISPRは原核生物に広く保存されているが、進化的にどの系統に多いという傾向はなく、むしろ菌種によって異なる。また、一つのゲノム中に存在するCRISPRは1コピーから18コピーと多様であり、一つのCRISPRの繰り返し数も2から124回

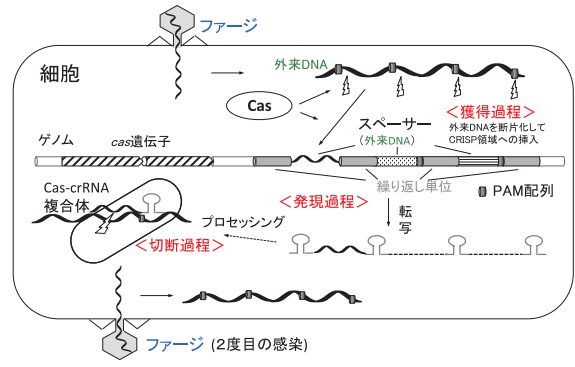


図4. CRISPR-Cas獲得免疫システムの進行過程. 獲得過程：細胞内に侵入したDNAが断片化され、CRISPRのスペーサー領域に組み込まれてゲノム上に記憶される。発現過程：CRISPR領域の転写によってpre-crRNAが生成され、それがプロセッシングを受けてcrRNAになる。切断過程：crRNAに存在するスペーサー配列の相同性を利用して外来DNAを捕らえ、ヌクレアーゼ活性を有するCasタンパク質との複合体がDNAを切断する。

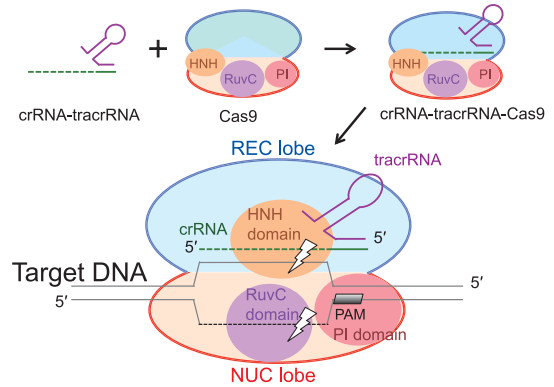


図5. ゲノム編集に応用されたcrRNA-tracrRNA-Cas9による標的DNAの二本鎖切断機構. Cas9-crRNA-tracrRNA複合体がPAMを含む外来DNAに結合する。その際、PAMに結合したCas9は二本鎖の外来DNAを開裂させ、crRNAと外来DNAとの二本鎖形成を誘導する。crRNAと二本鎖を形成している側のDNA鎖がCas9のH-N-Hドメインによって切断され、もう片方のDNA鎖は、RuvCドメインによって切断されて、外来DNAに二本鎖切断が起こる。Cas9はDNAを認識するRECローブと切断に関わるNUCローブの二つの耳たぶのような形をした領域から成り、NUCローブの中に二種のヌクレアーゼ活性部位が含まれる。NUCローブの中にはPAMを認識して結合するPI (PAM Interacting) ドメインも含まれる。

までさまざまである。さらに、ゲノム上のCRISPRの近傍には保存された遺伝子クラスターが存在する。これらは機能的にCRISPRと連動している遺伝子と予想してcas (CRISPR-associated) geneと名付けられた²¹⁾。

CRISPR領域のより詳細な配列解析の結果、CRISPRには既知のバクテリオファージやプラスミドに相同な配列が含まれていることがわかり、CRISPRの機能はこれらの進入物から細胞自身を守ること、すなわち、原核生物の生体防御システムに関係するのではないかという提

唱がなされ²²⁻²⁴⁾、その後実験的に証明された²⁵⁾。こうしてCRISPRは原核生物の獲得免疫として機能すること、Casタンパク質もこの免疫成立過程での役割を担うとして広く知られるようになった^{26,27)}。

CRISPR/Cas獲得免疫システムは、獲得 (adaptation)、発現 (expression)、切断 (interference) という3段階で進行する¹⁷⁾ (図4)。獲得過程で、外来DNAが断片化されてスペーサー領域に取り込まれ、その配列が細胞に記憶される。DNAの断片化はCas1-Cas2タンパク質が担っており、スペーサー領域に挿入されるためにはDNA中に数ヌクレオチドの短い特定の配列モチーフPAM (proto-spacer adjacent motifs) が必要である。このようにして細胞が免疫されると、次に同じ配列のDNAが侵入した際に、ゲノム中のCRISPR領域が転写されて、その外来DNAと相同な配列を有するRNA鎖 (pre-crRNA) ができる。これがCasタンパク質やその付随タンパク質の特異的エンドヌクレアーゼ活性によってプロセスされてcrRNAができる (発現過程)。そして、Casタンパク質と複合体を形成したcrRNAが、自身と相同な配列を有する外来DNAに結合して、その位置で外来DNA鎖を切断する (切断過程)。

CRISPR/Casのゲノム編集への応用

CRISPR/Casは、関連するCasタンパク質の違いによって大きく二つのクラスに分けられ、タイプI, III, IVとII, V, VIがそれぞれのクラスに属する²⁸⁾。クラス別けは、切断過程において外来DNAを切断するCasタンパク質 (エフェクターと呼ばれる) が複数の複合体 (クラス1) か単一タンパク質 (クラス2) であるかの違いである。技術開発に利用するには、できるだけシンプルなシステムのほうが望ましい。Cas9は単独エフェクターとして、crRNAと複合体を形成して標的DNAの切断を行うことができるクラス2の代表である。しかしCas9の場合、ゲノム上のCRISPRとは別の領域から転写されてきたRNA (*trans*-acting CRISPR-associated RNA, tracrRNAと呼ばれる) も必須因子である。Cas9-crRNA-tracrRNA複合体が外来DNAをスキャンして、crRNAとの相同配列を持つDNAに結合する。その際に、外来DNAに含まれるPAM配列が重要であり、PAMに結合したCas9は二本鎖のDNAを開裂させ、crRNAと外来DNAとの二本鎖形成を誘導する。PAMはCRISPRごとに異なる。*S. pyogenes*のCas9による認識に必要なPAM配列は5'-NGG-3' (Nは任意の塩基) である。Cas9タンパク質は組換え中間体解消酵素のRuvCに類似したドメインと制限酵素やホーミングエンドヌクレ

アーゼに見られるようなH-N-Hドメインを有する。それぞれのドメインは実際にヌクレアーゼ活性を持ち、crRNAと二本鎖を形成している方のDNA鎖がH-N-Hドメインによって、もう片方のDNA鎖がRuvCドメインによって切断されることまで詳細にわかっている^{29,30)} (図5)。

CRISPR-Cas9を利用して、人工的にヒトの腎臓細胞やマウスの神経細胞内のゲノムDNAの任意の標的位置での二本鎖切断に成功した^{31,32)}。その際には、crRNAとtracrRNAを人工的につなげて一本のRNA鎖 (guide RNA; gRNAまたはsingle guide RNA; sgRNAと呼ばれる) にしても機能に影響がないということも証明された。すなわち、タイプIIのCRISPR-Casシステムは、高等真核生物の細胞内で、ゲノムDNAを特定の位置で切断する技術として実用的であることが示されたわけである。CRISPR-Cas9による標的配列の認識・切断機構は、標的配列とguideRNAとの塩基対形成という単純な機構によるので、標的配列ごとに人工ヌクレアーゼを作製しなければならないZFNやTALENに比べて、圧倒的に簡便であることから、実用的なゲノム編集技術として急速に普及し始めた。

ゲノム編集技術の発展

ゲノム編集技術は間違いなく、今後の生命科学研究中心になる。CRISPR-Cas9を用いる実験系が基本になるが、より有用な技術とするために種々の改良がすでに報告されている。CRISPR-Cas9系で考慮すべき点は、ターゲットになるゲノム上の位置を制限しているPAM配列認識能と、狙ったところ以外の場所で切断が起きるオフターゲット作用の問題である。CRISPR-Cas9はそれを有する細菌種によって性質が異なり、認識するPAM配列も異なる。したがって、種々の細菌からCRISPR-Cas9を単離し、それらの性質を比べることによって、利用できるPAM配列の制限が広がる。たとえば、*Brevibacillus laterosporus*由来のCas9に対するPAM配列は、5'-NNNNCNDD-3' (Nは任意の塩基、DはA, GまたはT) であり³³⁾、*S. pyogenes*のCas9よりも利用できる配列の制限が緩い。また、Cas9に部位特異的変異を導入して、認識するPAMを人工的に変換した例もある^{34,35)}。オフターゲット作用を防ぐために、*S. pyogenes* Cas9のDNAに対する親和性を下げて非特異的な結合がより起こりにくくした変異体の作成も報告されている^{36,37)}。また、Cas9のDNA鎖切断活性はH-N-HヌクレアーゼドメインとRuvCヌクレアーゼドメインが担っているので、それぞれの活性中心のアミノ酸を置換

して切断活性のないCas9 (dCas9) を得ることができる。CRISPR-dCas9は標的DNA配列に結合することができるが、そこに留まって切断をすることはできない。ZFNやTALENのように、dCas9にFokIのヌクレアーゼドメインを融合させた人工ヌクレアーゼRFN (RNA-guided FokI nuclease) は、ヌクレアーゼドメインが二量体を形成できるようにガイドRNAを設計すればその位置での二本鎖切断に使い、上下のDNA鎖で異なるガイドRNAを用いてターゲットできるので、オフターゲットの確率を下げられる³⁸⁻⁴⁰⁾。

Cas9を利用した日本発の技術としては、Cas9タンパク質を二つに分割し、光スイッチタンパク質のしくみを併用することで、光を与えた時のみCas9が再構成されて活性化する光誘導型Cas9 (photoactivatable Cas9; paCas9) や⁴¹⁾、dCas9に塩基の脱アミノ化酵素 (deaminase) を融合させて、ゲノムDNAの部位特異的な脱アミノ化による変異導入を基にしたゲノム編集法 (Target AID法)⁴²⁾が開発されている。paCas9は、分断したCas9を薬剤処理で再構成して活性化するSplit Cas9法^{43,44)}を応用したものである。paCas9は元のCas9にくらべて活性が6割程度に減少するが、目的の二本鎖切断には十分利用可能で、培養条件を変えずに細胞に光を照射するだけでDNA切断のスイッチを入れられる利点がある。また、DNAを切断せずに改変することができるTarget AID法は、人工ヌクレアーゼやCas9ヌクレアーゼに比べて、細胞毒性が大幅に低減でき、細胞に大きな負担をかけない形で効率よく意図した改変、特に点変異導入を行える利点がある。

さらに、クラス2に属するCRISPR-Cas系でCas9以外のものが次々と見つかっている。たとえば、*Acidaminococcus* 属や *Lachnospiraceae* 属真正細菌由来のCpf1というタンパク質はCas9と同じようにガイドRNAでターゲットされた部位に二本鎖切断を入れる活性を有する^{45,46)}。その際、Cas9のようにtracrRNAを必要としないので、ガイドRNAをより短く設計できるので、RNA合成のコストが下がる。さらに、切断末端がCas9のように平滑ではなく、4~5塩基の突出型になるので、粘着末端を利用したノックイン変異の導入により有利である。

以上のようにCRISPR-Cas免疫系を利用したゲノム編集技術は *S. pyogenes* CRISPR-Cas9の利用だけに留まらず、さまざまな工夫がなされて進化を続けている。これらの工夫は、CRISPR-Cas9によるゲノム編集実験の向上に確実に貢献する。そして、クラス2の新しいエフェクターの探索もさらなる開発の主流になり、

CRISPR-Casを利用したゲノム編集ツールはさらに拡大されると予想される。

おわりに

筆者が大腸菌のゲノム中に独特の繰り返し配列を見つけてから間もなく30年になる。CRISPRを発見した時は、ちょうど制限酵素やDNAリガーゼを用いた遺伝子操作技術が利用できるようになった頃で、ワクワクしながら遺伝子解析をしていた。それからPCRによって、遺伝子解析・操作実験が格段に容易になり、そして今、CRISPR-Casによるゲノム編集技術が急速に広がっている。筆者が学生の時から今日までの遺伝子解析実験の発展を自ら経験してきて、生命現象に対する人類の理解とその応用に果たしたこれらの技術の功績の大きさを実感する。制限酵素や種々のDNA修飾酵素、またPCRに欠かせない耐熱性DNAポリメラーゼ、そしてゲノム編集に用いられるCRISPR-Cas9はすべて真正細菌、アーキアとそのウイルスに由来する。これら原核微生物の基礎分子生物学研究の進展が、優れた遺伝子解析技術開発につながった。生命科学の究極の目的は、ヒトの生命現象の理解と、健康維持のための応用であることは間違いないので、より多くの研究者が多額の研究費を投じてヒトを中心とする高等真核生物の研究へ向かっているが、原核微生物の基礎研究が果たしてきたこれまでの貢献を決して忘れてはいけない。地球上にはまだまだ無数の未同定微生物が存在する。それらは生命科学における今後の新しい技術革新にとっての金山である。原核微生物基礎研究の芽を決して摘んではいけないと思う。

第68回生物工学会大会におけるシンポジウム「新規な核酸関連酵素の開発とその産業応用」をお世話くださり、本特集を企画くださいました藤原伸介先生、保川清先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ohtsuka, E. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **139**, 447 (1983).
- 2) Ishino, Y. *et al.*: *Nucleos. Nucleot.*, **5**, 471 (1986).
- 3) Ishino, Y. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 1 (1986).
- 4) Chien, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **127**, 1550 (1976).
- 5) Carothers, A. M. *et al.*: *BioTechniques*, **7**, 494 (1989).
- 6) 石野良純: *生物工学*, **90**, 649 (2012).
- 7) Ishino, S. and Ishino, Y.: *Front. Microbiol.*, **5**, 465 (2014).
- 8) 石野良純: *化学*, **63**, 17 (2008).
- 9) Li, L. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4275 (1996).
- 10) Kim, Y. G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1156 (1992).
- 11) Meng, X. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 695 (2008).

- 12) Geurts, A. M. *et al.*: *Science*, **325**, 433 (2009).
- 13) Hockemeyer, D. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 851 (2009).
- 14) Christian, M. *et al.*: *Genetics*, **186**, 757 (2010).
- 15) Miller, J. C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **29**, 143 (2011).
- 16) Mussolino, C. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9283 (2011).
- 17) 石野良純 : 生物工程学, **94**, 336 (2016).
- 18) Ishino, Y. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **169**, 5429 (1987).
- 19) Groensen, P. M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **10**, 1057 (1993).
- 20) Mojica, F. J. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **36**, 244 (2000).
- 21) Jansen, R. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **43**, 1565 (2002).
- 22) Mojica, F. J. M. *et al.*: *J. Mol. Evol.*, **60**, 174 (2005).
- 23) Pourcel, C. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 653 (2005).
- 24) Bolotin, A. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 2551 (2005).
- 25) Barrangou, R. *et al.*: *Science*, **315**, 1709 (2007).
- 26) Horvath, P. and Barrangou, R.: *Science*, **327**, 167 (2010).
- 27) Wiedenheft, B., *et al.*: *Nature*, **482**, 331 (2012).
- 28) Shmakov, S., *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 169 (2017).
- 29) Gasiunas, G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2579 (2012).
- 30) Jinek, M. *et al.*: *Science*, **337**, 816 (2012).
- 31) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- 32) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 33) Karvelis, T. *et al.*: *Genome Biol.*, **16**, 253 (2015).
- 34) Kleinstiver, B. P. *et al.*: *Nature*, **523**, 481 (2015).
- 35) Hirano, H. *et al.*: *Cell*, **164**, 950 (2016).
- 36) Kleinstiver, B. P. *et al.*: *Nature*, **523**, 490 (2015).
- 37) Slaymaker, I. M. *et al.*: *Science*, **351**, 84 (2016).
- 38) Guilinger, J. P. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 577 (2014).
- 39) Tsai, S. Q. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 569 (2014).
- 40) Havlicek, S. *et al.*: *Mol. Ther.*, **25**, 342 (2017).
- 41) Nihongaki, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **33**, 755 (2015).
- 42) Nishida, K. *et al.*: *Science*, **353**, 6305 (2016).
- 43) Zetsche, B. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **33**, 139 (2015).
- 44) Wright, A. V. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2984 (2015).
- 45) Zetsche, B. *et al.*: *Cell*, **163**, 59 (2015).
- 46) Yamato, T. *et al.*: *Cell*, **165**, 949 (2016).