

ゲノム編集技術を用いた脳の進化発生学研究の展開

野村 真¹、河本 昌也²

1 京都府立医科大学大学院神経発生生物学 2 京都府立医科大学医学部医学科

要旨

近年急速に進歩した CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術は、これまでのマウス ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えによる標的遺伝子破壊の手法に大きな変革をもたらした。本稿では、この技術を用いて種特異的な遺伝子機能の解析を行った最近の研究について概説するとともに、我々が行ったニワトリ胚における *Pax6* 遺伝子の標的遺伝子破壊の研究について紹介する。特に、CRISPR/Cas9 を用いた組織特異的な遺伝子破壊に必要な検証実験について考察し、脳の進化発生学研究におけるあらたな研究戦略について議論する。

はじめに

2003 年に完了したヒトゲノム全塩基配列決定（ヒトゲノム計画）以降、様々なヒト集団や動物種のゲノム配列情報が加速度的に蓄積している。しかしながら、ゲノムを構成する塩基配列に記載されている遺伝情報が生物の構造や機能発現にどのような役割を担っているのか、完全な解読には未だ遠い状態である。さらに、ある生物種で解明された遺伝情報の意味（すなわち、遺伝子がコードするタンパク質の機能）が他の生物種においても普遍的であるのか、実際に検証された例は少ない。

生体における特定の遺伝子の機能を検証する場合、最も直接的な方法は遺伝子を破壊した個体を作製し、その表現型を正常な個体の表現型と比較するというものである。これまで、標的遺伝子破壊の方法は相同遺伝子組換えを利用した方法がスタンダードであった。しかしながら、相同遺伝子組換えは非常に確率が低いため、ES 細胞が樹立されている哺乳類（主に齧歯類や霊長類）以外でこの方法を適用することは極めて困難であった。また、破壊された遺伝子をホモ接合に持つ個体を得るまでに長い時間と多くの手間がかかることも問題であった。これに対し、近年飛躍的に進歩したゲノム編集技術によって、ES 細胞を介さずに極めて簡便に精度の高い標的遺伝子破壊が

可能となった。ゲノム編集技術を用いた論文数は近年加速度的に増加しており、様々な研究分野においてこの技術が応用されていることは周知の事実である。ゲノム編集技術は哺乳類以外の動物種にも適用可能なため、この技術を用いて進化発生学文脈における表現型模写実験を行った研究も少しずつ報告され始めている。本稿では、特にゲノム編集技術を用いた脳の進化研究に関する報告、そして我々が最近発表した鳥類の *Pax6* 遺伝子の機能解析に関する研究成果を紹介し、この分野の将来的展望について論じたい。

ゲノム編集技術による遺伝子機能の解析

ゲノム編集とは、人工ヌクレアーゼを用いて特定のゲノム DNA 配列を破壊あるいは改変する技術のことである。人工ヌクレアーゼには第 1 世代の ZFN (Zn Finger Nuclease) や第 2 世代の TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) 法などが当初用いられていたが、汎用性と利便性に優れた CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated sequence) が報告されて以来、ゲノム編集といえばほぼ CRISPR/Cas9 を指すまでに現在この手法が普及している。CRISPR/Cas9 はもともと一部の細菌が持つ獲得免疫機構として同定された。ファージが細菌に感染した際に、ファージの DNA の断片が細菌自身のゲノムに取り込まれることで感染が「記憶」される。その後、同じファージが感染した際、以前に取り込んだゲノム断片からガイド RNA と呼ばれる RNA が転写され、Cas と呼ばれるヌクレアーゼによって侵入したファージゲノムが分解される。こうした特異的な DNA 配列の認識と切断機構を利用したものが CRISPR/Cas9 である。CRISPR/Cas9 の詳細な原理とその応用に関してはすでに多くの解説が報告されているのでそちらを参照されたい¹⁻³。一方、TALEN は植物病原細菌キサントモナスモナス属が分泌する TALE タンパク質の DNA 結合ドメインと制限酵素 FokI を融合させた人工ヌクレアーゼである。標的 DNA に対して二量体を形成するような結合が必要なため、比較的長い標的 DNA 配列 (約 36 塩基) を必要とする。従来の相同遺伝子組換えを利用した標的遺伝子破壊と比較した場合、これらの方法は 1) 標的遺伝子配列をもとにコンストラクションを設計し、これを専用の発現ベクターに組み込むだけでターゲティングベクターが完成する点、2) 受精卵にコンストラクションを直接導入することによって標的遺伝子配列の欠失や挿入 (indel:insertion-deletion)

が誘導される点が画期的である（図1）。ES細胞が樹立されていない動物種においても標的遺伝子破壊が可能になったことにより、いわゆるモデル動物（ショウジョウバエや線虫、マウスなど）以外の多様な動物種を対象とした遺伝子機能解析にゲノム編集技術が広く普及している。

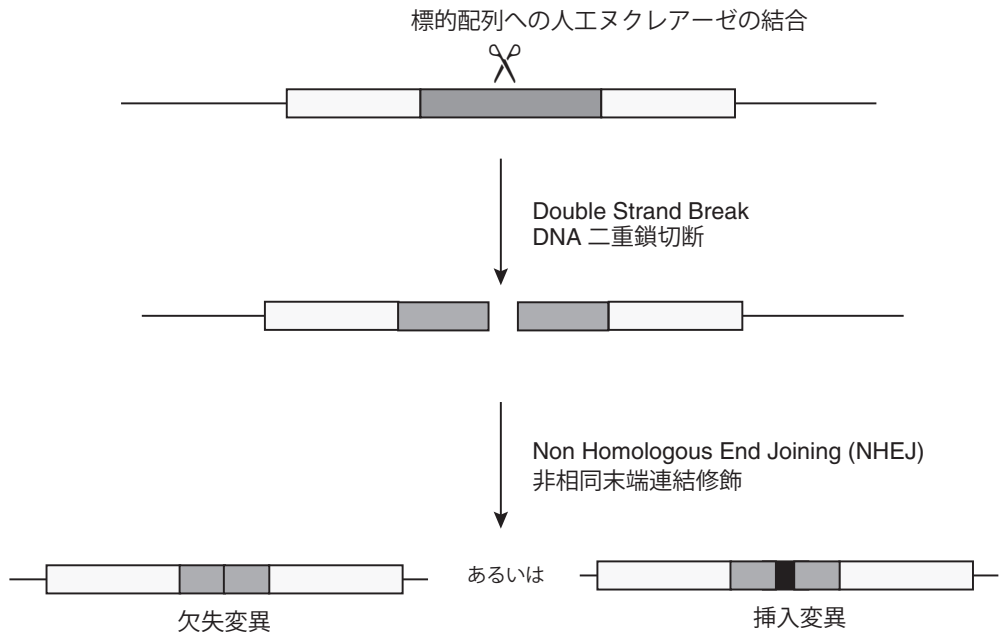


図1 ゲノム編集による標的遺伝子破壊の原理。人工ヌクレアーゼが特異的な標的配列に結合し、二重鎖切断を行うと、非相同末端連結修飾という現象により切断された部位近傍の配列が欠失したり、余分な配列が挿入されたりする。こうした現象を利用し、遺伝子の機能破壊を行う。

我々が取り組んでいる脳の進化発生学の研究分野では、これまで主に比較形態学的手法を基盤とした解析が主流であった。1990年代より組織における mRNA の発現を確認できる *in situ hybridization* 法が普及し、形態と遺伝子発現を対応づけることが可能となった。この技術により、脳の形態的多様性の背景にある相同性の議論に理論的根拠が与えられた⁴。しかしながら、こうした遺伝子発現のカタログ作製は形態学や実験発生学によって蓄積された事実を上塗りしているにすぎない場合もあった。事実、多くの脳の進化発生学研究が遺伝子発現の種間比較に留まっており、保存された遺伝子の機能からなぜ多様な脳形態がつくられるのか、という根本的課題に迫る研究は未だ少ない。こうした状況の中、最近ゲノム編集技術を用いてマウス以外の哺乳類

を対象として脳の発生に関わる遺伝子を破壊した成果が報告され始めた。

ゲノム編集によるフェレット *Aspm* 遺伝子の標的遺伝子破壊

脳の発生過程で機能する重要な遺伝子の一つに、*Aspm* (Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein) 遺伝子がある。*Aspm* は一般的な劣性のヒト小頭症の原因遺伝子の一つとして同定された⁵。*Aspm* 遺伝子から産生されるタンパク質は、細胞分裂の際に染色体を分配するために不可欠な紡錘体 (mitotic spindle) と結合することにより、娘細胞への染色体の正常な分配と細胞質の分裂面 (細胞がどのような方向で分裂するか) をコントロールしている。マウス脳における RNAi 法を用いた *Aspm* のノックダウン (機能障害) 実験から、機能的な *Aspm* タンパク質が産生されなくなった場合、神経前駆細胞の分裂面の制御が異常となることが報告されている⁶。こうした事実から、*Aspm* 遺伝子は哺乳類脳の発生過程における神経前駆細胞の分裂に必須の遺伝子であることが推測される。ところが、従来の標的遺伝子組換え法によってマウス *Aspm* 遺伝子を破壊した個体を作製しても、マウス脳の大きさはほとんど変化しない⁷。ヒトとマウスの *Aspm* 遺伝子は進化的に高度に保存されているため、これらの生物における表現型の違いは脳皮質の構築過程の種間差異に基づいている可能性が考えられた。

こうした中、最近 *Aspm* 遺伝子を破壊したフェレット脳の解析結果が報告された⁸。この論文では、マウスと比較してより大きな脳皮質を持つフェレットの *Aspm* 遺伝子の標的遺伝子破壊を行うため、フェレット *Aspm* を特異的に認識する TALEN を発現するベクターが 148 個のフェレット受精卵に導入された。TALEN が採用された理由は正確には不明だが、オフ・ターゲット効果の低さが理由の一つではないかと推測される。論文では出産後成体まで育った 11 匹の F0 個体すべてにおいて *Aspm* 遺伝子のタンパク質コード領域に特異的な indel が確認されている。これら F0 個体を交配させて、*Aspm* 遺伝子変異をホモ接合に持つ個体を作製された。

興味深いことに、*Aspm* 遺伝子が破壊されたフェレットでは脳の大きさが著しく減少する、いわゆる小頭症を発症することが明らかとなった。マウスとの表現型の違いを説明する要因の一つとして、神経前駆細胞のサブタイプの違いが挙げられる。胎盤を持つ哺乳類の脳皮質の発生過程では、脳室帯における神経前駆細胞 (放射状グリア細胞: RG) の他、脳室下帯 (SVZ) における神経前駆細胞の増殖も神経細胞の

産生に重要な役割を果たす。ヒトを含む霊長類、あるいはフェレットなどのより大きな大脳皮質を持つ哺乳類では、SVZが2つに区分され、より脳表面に近い脳室下帯(OSVZ)が顕著に発達する⁹。このOSVZには放射状グリア細胞が豊富に存在するが、これらの細胞をOuter RG (oRG)と呼ぶ¹⁰。こうしたoRGはマウス大脳皮質ではわずかしか存在しない¹¹。このoRGはもともと脳室帯の放射状グリア細胞(ventricular RG: vRG)に由来するが、大脳皮質の発生過程で、vRGは脳室帯から脳室下帯の外側に向けて順次移動していくことにより、OSVZにoRGが蓄積される。今回の研究結果によって、*Aspm* 遺伝子が破壊されたフェレットでは通常よりも早期にvRGが脳の外側へと移動してしまうことにより、VZにおけるvRGが減少することが明らかとなった。つまり、フェレットの大脳皮質の発生過程では*Aspm* タンパク質がvRGのOSVZへの移動のタイミングを制御することにより、vRGとoRGの量のバランスを保っていると推測される。こうした*Aspm*の役割はvRGとoRGという2つの神経前駆細胞サブタイプを獲得した哺乳類系統に特異的と考えられる。

はたして、このような遺伝子ノックアウトフェレットがマウスのような研究ツールとして確立されていくだろうか？フェレットは個体価格がマウスと比較すると大変高価であり、さらにライセンスの問題で一般の研究者がフェレットコロニーを維持して交配と繁殖を行うことが極めて困難である。上記論文では、*Aspm* ヘテロ接合変異フェレットはすべてライセンスを所有するMarshall社に輸送され、そこで系統維持されている。したがって、今後は受精卵を用いた個体全体での標的遺伝子破壊ではなく、次項で紹介するような体細胞にCRISPR/Cas9ベクターを導入することによる組織特異的遺伝子破壊が主流になっていくと推測される。

体細胞へのCRISPR/Cas9の導入による標的遺伝子破壊

CRISPR/Cas9によるゲノム編集の場合、従来の相同遺伝子組換えに用いるターゲット・ベクターと比較して使用するベクターのサイズが圧倒的に小さいことから、当初よりこのベクターを体細胞に直接導入しても標的遺伝子破壊が可能であることが予想された。2014年にNature誌に報告された論文では、ガイドRNAとCas9遺伝子を挿入したプラスミドを成体マウスに直接注入することにより組織特異的な*Pten*および*p53*遺伝子の標的破壊を行っている¹²。前述のようにこれらのゲノム編集技術は、標的としていない遺伝子や塩基配列も同時に編集してしまうという、いわゆるオフ・

ターゲット効果を引き起こす可能性がある。特に CRISPR/Cas9 法の問題は比較的短いガイド RNA の標的配列特異性であり、オフ・ターゲット効果をどの程度検証すべきかが問題となる。この論文では、1) 得られた表現型が相同遺伝子組換えによる標的遺伝子破壊の表現型と同一であること、2) 潜在的にオフ・ターゲット効果が及びそうなゲノム配列について次世代シーケンサーを用いてディープ・シーケンシングを実施し、標的遺伝子以外に indel が確認されないことを報告している。これらの検証実験の問題は、1) すでにノックアウトマウスが作製されていることが前提となり、未知の遺伝子機能を探るといって本来の研究目標に適応できないという矛盾、また 2) 潜在的なオフ・ターゲット配列すべてについて次世代シーケンスにより配列決定を実施する場合の煩雑さやコストの増加であった。こうした問題は、配列特異性の向上によるオフ・ターゲット効果の解消、さらにオフ・ターゲット効果を検証する「スタンダードな実験プロトコル」の普及によって改善されることが期待された。

ここ数年、異なる生物種のゲノム配列情報をもとにオフ・ターゲット効果を最小限にするようなガイド RNA 配列を決定するアルゴリズムが急速に進歩している。2016年に Shinmyo らによって報告された論文では、こうしたアルゴリズム用いたフリーの公共ソフトを利用して作製したコンストラクションを発生中のマウス大脳皮質に電気穿孔法を用いて導入し、神経前駆細胞および神経細胞での標的遺伝子破壊を実現している¹³。標的遺伝子の特異的な破壊については、1) 蛍光タンパク質を指標として遺伝子導入細胞を単離し、次世代シーケンサーを用いて標的遺伝子の INDEL を確認する、2) *in situ* hybridization 法や免疫組織化学的手法による mRNA やタンパク質の消失を確認している。また、こうした手法をフェレット大脳皮質に導入し、得られた表現型をドミナントーネガティブ型のタンパク質を発現するベクターの導入による表現型と比較している¹⁴。これらの報告により、体細胞に CRISPR/Cas9 ベクターを導入した際に行うべき一連の検証実験がほぼ標準化されたといえよう。

CRISPR/Cas9 によるニワトリ *Pax6* 遺伝子の破壊

電気穿孔法による CRISPR/Cas9 ベクターの胚組織への導入とオフ・ターゲット効果の検証法が確立されたことを受け、我々は非哺乳類胚の標的遺伝子破壊実験に着手した。我々が標的としたのは *Pax6* と呼ばれる遺伝子である。*Pax6* 遺伝子はペアード・ドメインとホメオ・ドメインを持つ転写因子をコードし、1990 年代に相次いで同定さ

れた Pax ファミリー遺伝子群の一つである。Pax6 は当初眼を形成するマスター遺伝子として周知されたが、その後中枢神経系の形成過程においても重要な役割を果たすことが明らかとなった^{15,16}。脳の発生過程において Pax6 は神経前駆細胞に強く発現し、前駆細胞の増殖と分化の制御を行っている。Pax6 のタンパク質構造と発現様式は脊椎動物間で極めて高度に保存されており、誰もが Pax6 の機能は種を超えて普遍的であると予測していた。

我々は進化発生学的な研究文脈から、鳥類の脳における Pax6 遺伝子を CRISPR/Cas9 ベクターによって破壊することを試みた¹⁷。我々が Pax6 遺伝子を標的に選んだ理由として 1) 高度に保存された遺伝子が脳の多様性にどのように寄与しているかを探る良いモデルとなること、2) Pax6 変異マウスの脳サンプルが入手可能であり、鳥類における標的遺伝子破壊の結果と比較可能なこと、3) 種を超えて適応可能な抗体やドミナント・ネガティブ型 Pax6 の発現ベクターが入手可能であり、標的遺伝子破壊の効果を検証するツールが揃っていたこと、4) Pax6 が発現している脳背側部(外套領域)に他の Pax ファミリー遺伝子が発現していないため、標的遺伝子破壊の際に機能を補償する遺伝子発現が無いこと、5) マウス外套における Pax6 の機能が極めて詳細に解析されているため、こうした知見と実験の結果を比較することが容易であること、があげられる。

ニワトリ Pax6 標的破壊のためのガイド RNA は「CHOPCHOP」と呼ばれるパブリックソフトウェア¹⁸ (<http://chopchop.cbu.uib.no>) を利用し作製した。基盤となるアルゴリズムは鳥類ゲノム配列全体を網羅し、オフ・ターゲット効果を最小限にするようなガイド RNA の候補を選び出す(したがって、作製されたコンストラクションが認識する標的遺伝子の配列が同一であっても、別の種にコンストラクションを導入した場合にオフ・ターゲット効果が起こる可能性は否定できない)。我々は選定された 3 種類のガイド RNA について、それぞれ Cas9 を共発現するベクターに組み込み、電気穿孔法によって発生中の鳥類外套領域に導入した。導入後 36 時間で胚を固定し、免疫組織化学的手法により Pax6 の発現を検証すると、コンストラクションが導入された細胞において Pax6 タンパク質の顕著な減少が確認された(図 2)。これに対し、すでに報告のある鳥類 Pax6 を標的とした RNAi ベクターの導入では免疫組織化学的手法による Pax6 タンパク質の減少が確認できなかった(HEK 細胞を用いたウェスタン・ブロットでは対照群と比較し 50% 程度の発現抑制が確認できたが、*in vivo* で後

述するような特異的な表現型を検出することができなかった)。さらに、CRISPR/Cas9 ベクターと共導入したベクターより発現する GFP の蛍光を指標として、遺伝子導入部位を蛍光顕微鏡下で単離し、*Pax6* 遺伝子を含むゲノム領域を次世代シーケンサーにて解析した結果、特異的な INDEL が標的配列に検出された (図 2)。こうした結果より、我々の作製したコンストラクションによってニワトリ *Pax6* 遺伝子が特異的に破壊されたことが支持された。

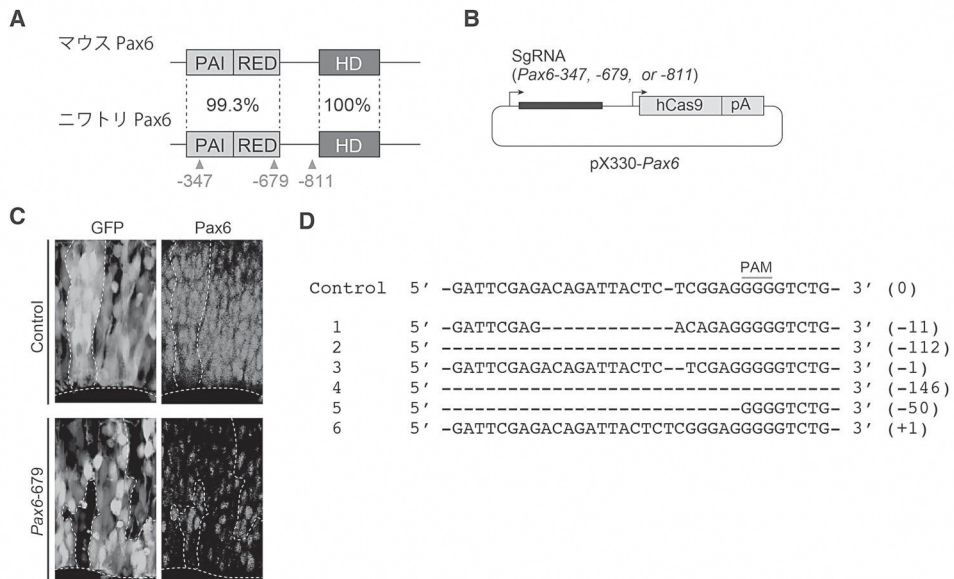


図 2 CRISPR/Cas9 によるニワトリ Pax6 の大脳における標的遺伝子破壊。A: マウスとニワトリ Pax6 のタンパク質構造の比較。PAIRED: ペアード・ドメイン (PAI と RED の 2 つの部分に区別される)。HD: ホメオドメイン。矢印は設計したガイド RNA の標的部位。B: 標的遺伝子破壊に用いたコンストラクション (pX330-Pax6)。C: 電気穿孔法によりコンストラクションを E4 ニワトリ胚外套に導入したサンプル。遺伝子導入後 36 時間で胚を固定し、抗 Pax6 抗体で免疫染色を行った。Control (pX330 ベクターと GFP 発現ベクターの導入) と比較して、pX330-679 の導入によって Pax6 の顕著な発現低下が認められた。D: 遺伝子導入を行った細胞における Pax6 のゲノム DNA 配列。pX330-Pax6 の導入により、Pax6 の標的配列付近で特異的な indel が確認された。図は文献¹⁷より改変。

CRISPR/Cas9 によるニワトリ外套の *Pax6* 遺伝子破壊は幾つかの興味深い知見をもたらした。まず、1) 外套領域と外套下領域の境界が不明瞭となり、外套下領域で発現する *Gsh2* タンパク質が外套領域でも発現するようになった。また 2) 外套領域で特異的に発現している *Tbr2* および *Tbr1* の発現が消失した。これらの表現型はい

ずれもコンストラクションが導入された細胞に限定されており、遺伝子破壊された細胞自律的な表現型であると推測された。また、こうした表現型は脳の腹側外套領域で顕著であるが、より背側あるいは内側の外套では観察されなかった。こうした表現型はマウス *Pax6* 変異体の外套領域の表現型と極めて類似しており、*Pax6* による外套-外套下の境界形成、さらに外套における興奮性神経細胞の分化制御は羊膜類の種を超えて普遍的な機能であることが予測された。こうした結果と、ドミナント・ネガティブ型タンパク質の導入による表現型とを比較し、我々は羊膜類で高度に保存された *Pax6* の機能と、種特異的な *Pax6* の機能（哺乳類の脳皮質発生後期における神経前駆細胞の維持）を同定することに成功した¹⁷。興味深いことに、RNA シーケンシングの結果からマウスとニワトリの外套において *Pax6* は異なる遺伝子を制御していることが示されている。こうした遺伝子発現制御の種間差異が脳の形態的多様性とどのように関連しているのか、現在マウスとニワトリの初期胚を用いて研究を進めている（野村、河本ら、未発表）。

おわりに

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム改変技術は爆発的な進展を見せている。容易なコンストラクション作製による遺伝子の完全破壊という利点に加えて、オフ・ターゲット効果の改善が急速に進み、これまで非モデル動物の遺伝子機能阻害に使用されていた RNAi 法を今後代替していく可能性がある。特に脳皮質の発生過程では子宮内電気穿孔法との組み合わせが容易であり、この技術を用いた脳進化研究も徐々に報告され始めた。indel による標的遺伝子の破壊のみならず、外来遺伝子の標的遺伝子座へのノックイン^{19,20}、特定のエンハンサー領域を標的とした遺伝子発現抑制（CRISPRi）など、最近の生命科学の国際誌は CRISPR の技術革新が目白押しである。こうした新規手法を積極的に脳進化発生学の研究戦略に取り入れることにより、遺伝子と表現型との因果関係の証明、あるいは種特異的な発生拘束の分子機構など、これまでアプローチが困難であった課題にチャレンジできる時代となった。一方、生殖細胞系列で CRISPR を作動させることにより特異的な遺伝子変異を生物集団中に急速に拡散させる手法（Gene Drive）も開発されており、ゲノム編集技術で作製された遺伝子改変動物の潜在的なリスクについても議論を深めることが急務であろう。

謝辞

ニワトリ Pax6 の標的遺伝子破壊の実験を行った山下航氏、また本稿に適切な助言を頂いた京都府立医科大学・生物学教室の小野勝彦教授、後藤仁志講師に感謝する。本稿で紹介した研究の一部は科学研究費補助金・基盤研究 B (17H03552) の研究資金による支援を受けている。

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1 ジェニファー・ダウドナ, サミュエル・スターンバーグ (著), 櫻井祐子 (訳) クリスパー CRISPR 究極の遺伝子編集技術の発見 文芸春秋社 (2017).
- 2 城石俊彦, 真下知士 (監修) 進化するゲノム編集技術 エヌ・ティー・エス (2015).
- 3 Gilles, A. F. & Averof, M. Functional genetics for all: engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. *Evodevo* **5**, 43, doi:10.1186/2041-9139-5-43 (2014).
- 4 Puelles, L. *et al.* Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes Dlx-2, Emx-1, Nkx-2.1, Pax-6, and Tbr-1. *J Comp Neurol* **424**, 409-438 (2000).
- 5 Bond, J. *et al.* ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* **32**, 316-320, doi:10.1038/ng995 (2002).
- 6 Fish, J. L., Kosodo, Y., Enard, W., Paabo, S. & Huttner, W. B. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10438-10443, doi:10.1073/pnas.0604066103 (2006).
- 7 Pulvers, J. N. *et al.* Mutations in mouse Aspm (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16595-16600, doi:10.1073/pnas.1010494107 (2010).
- 8 Johnson, M. B. *et al.* Aspm knockout ferret reveals an evolutionary mechanism governing cerebral cortical size. *Nature* **556**, 370-375, doi:10.1038/s41586-018-0035-0 (2018).

- 9 Smart, I. H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M. & Kennedy, H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* **12**, 37-53 (2002).
- 10 Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. & Kriegstein, A. R. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* **464**, 554-561, doi:10.1038/nature08845 (2010).
- 11 Shitamukai, A., Konno, D. & Matsuzaki, F. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci* **31**, 3683-3695, doi:10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011 (2011).
- 12 Xue, W. *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* **514**, 380-384, doi:10.1038/nature13589 (2014).
- 13 Shinmyo, Y. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Sci Rep* **6**, 20611, doi:10.1038/srep20611 (2016).
- 14 Shinmyo, Y. *et al.* Folding of the Cerebral Cortex Requires Cdk5 in Upper-Layer Neurons in Gyrencephalic Mammals. *Cell Rep* **20**, 2131-2143, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.024 (2017).
- 15 Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K. & Maekawa, M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* **26**, 1663-1672, doi:10.1634/stemcells.2007-0884 (2008).
- 16 Manuel, M. N., Mi, D., Mason, J. O. & Price, D. J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci* **9**, 70, doi:10.3389/fncel.2015.00070 (2015).
- 17 Yamashita, W. *et al.* Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain. *Development* **145**, doi:10.1242/dev.159764 (2018).
- 18 Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M. & Valen, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing.

- Nucleic Acids Res* **42**, W401-407, doi:10.1093/nar/gku410 (2014).
- 19 Suzuki, K. *et al.* In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144-149, doi:10.1038/nature20565 (2016).
- 20 Tsunekawa, Y. *et al.* Developing a de novo targeted knock-in method based on in utero electroporation into the mammalian brain. *Development* **143**, 3216-3222, doi:10.1242/dev.136325 (2016).