

表 3. 国内での NBT 研究・開発状況

NBTの種類	作物	演題	研究・開発機関
NBT①	シロイヌナズナ	安本周平, 開光, 福島エリオデット, 佐久間哲史, 山本卓, 村中俊哉: 植物テルペノイド代謝工学への人工スクリューゼTALENの利用, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-04, p.96, 2013年9月.	日本・阪大院・工・生命先端, 広大院・理
NBT⑦-2	タバコ	福澤徳穂, 一町田紀子, 増田税, 松村健: Cucumber mosaic virus (CMV) ベクターを基としたアグロインフエクションシステムの開発, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-09, p.199, 2013年9月.	日本・産総研・生物プロセス, 北大院農
NBT⑦-2	タバコ	谷内田藍, 志村華子, 増田税: ロベリアにおけるアントシアニン合成経路のVIGS制御, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-31, p.273, 2013年9月.	日本・北大院農
NBT⑥	イネ	小沢憲二郎, 川東弘幸, 若佐雄也, 高岩文雄: アグロバクテリウム法を用いたイネ相同組換え系のさらなる効率化, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-57, p.299, 2013年9月.	日本・農生研
NBT⑥	イネ	雑賀啓明, 森明子, 遠藤真咲, 刑部敬史, 土岐精一: イネにおけるジーンターゲット効率の評価系の開発, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-62, p.304, 2013年9月.	日本・生物研・ゲノム機能改変, 埼玉大・環境科学研究センター, 横浜市大・木原生研
NBT①	イネ	笹岡大暉, 望月真衣, 大里修一, 佐久間美子, 近藤聡, 村本伸彦, 杉本広樹, 光川典弘, 大首徳, 太田邦史: イネにおけるゲノム再編誘発技術「TAQing システム」の発現制御, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-63, p.305, 2013年9月.	日本・明治大・農, 理研・基幹研, トヨタ自動車・バイオラボ, 豊田中研・バイオ研, 東大・総合文化
NBT⑦-1	タバコ	川口大地, 山内靖雄, 杉本幸裕, 水谷正治: アグロインフィルトレーション法による植物発現系を用いた植物代謝酵素の機能解析, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-67, p.309, 2013年9月.	日本・神戸大院・農・生命機能科学

表 4. 国内での GM 植物（機能性食品）研究・開発状況

区分	作物	演題	研究・開発機関
機能性食品	シロイヌナズナ	平井優美, 李一蒙, 荒木良一, 澤田有司, 西澤治, 齊藤和季, 小川俊也: グルコシノレート合成を制御する MYB 転写因子の機能解析, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集Aa-07, p.85, 2013年9月.	日本・理研 PSC, 理研 CSRS・JST・CREST, 東北林業大学, キリン株式会社, 千葉大院・薬
機能性食品	タバコ(培養細胞BY-2)	中塚貴司, 佐々木伸大, 山田恵理, 藤田晃平, 高橋秀行, 今村智弘, 鈴木万里子, 小関良宏, 辻村郁子, 齋藤美沙, 坂本裕一, 西原昌宏: タバコ培養細胞BY-2を用いたベタレイン色素合成系の確立, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Aa-12, p.90, 2013年9月.	日本・静岡大院・農・共生バイオ, 岩手工研セ, 農工大・工・生命
機能性食品	レタス(葉緑体遺伝子の位置特異的組換え)	佐々木貴子, 小川拓水, 岡澤敦司, 三沢典彦, 太田大策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスの代謝プロファイリング, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-03, p.151, 2013年9月.	日本・大阪府立大学・生環・細胞代謝機能学, 石川県立大学・生物資源工学研究所
機能性食品	クラミドモナス(藻類)	木平 成子, 梶川昌孝, 福澤秀哉: 遺伝子改変によるスクアレン蓄積緑藻の作出, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-12, p.202, 2013年9月.	日本・京大院・生命
機能性食品	テンサイ	吉田みどり, 松平洋明, 田村健一: チモシーのフルクタン合成酵素遺伝子を導入した組換えテンサイによるレバンの生産, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-92, p.333, 2013年9月.	日本・(独)農研機構・北海道農業研究センター
機能性食品	ジャガイモ	梅基直行, 佐々木勝徳, 大山清, 山下まり, 水谷正治, 開光, 齊藤和季, 村中俊哉: グリコアルカロイド合成遺伝子群の同定について, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-01, p.93, 2013年9月.	日本・キリン(株)・基盤研, 理研 CSRS, 東大院・理工, 東北大院・農, 神戸大院・農, 阪大院・工・, 千葉大院・薬
機能性食品, 治療薬	ジャガイモ	大山清, 齊藤和季, 村中俊哉, 梅基直行: ステロイドアルカロイド合成の改変による有用サポニンの蓄積, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-02, p.94, 2013年9月.	日本・東工大 院・理工, 理研 CSRS, 千葉大院・薬, 阪大院・工・キリン(株)・基盤研

表 5. 国内での GM 植物（経口ワクチン、食用医薬、抗体医薬、治療薬、環境浄化、バイオ燃料）研究・開発状況

区分	作物	演題	研究・開発機関
経口ワクチン	イネ	佐生愛, 重光隆成, 齊藤雄飛, 田中愛実, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏: 経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子PB-10の特定部位への外来タンパク質局在化と消化酵素耐性に関する研究. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ca-12, p.146, 2013年9月.	日本・京都府大院・生命環境, 京都農技セ・生資セ
食用医薬	イネ	菊田桃香, 佐生愛, 重光隆成, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏: 抗菌タンパク質を発現するイネに関する研究. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ca-13, p.147, 2013年9月.	日本・京都府立大学院・生命環境, 京都府立大学・生命環境学部, 京都農技セ・生資セ
食用医薬	ダイズ(主要な肝臓タンパク質である7S及び11Sグロブリンを欠失した変異ダイズ系統JQ)	寺川輝彦, 長谷川久和, 瓦林毅, 島田康, 丸山伸之, 石本政男, 東海林幹夫: アルツハイマー病エビトープ融合タンパク質のダイズへの高蓄積化と予防効果. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-01, p.149, 2013年9月.	日本・北興化学・開発研, 弘前大院・医京都大院・農・生物研
食用医薬	イネ	赤間一仁, 後藤春樹, 越智ありさ, 二川健: 廃用性筋萎縮の予防と治療を目的とした健康機能性米の開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-02, p.150, 2013年9月.	日本・島根大・生資, 徳島大・生体栄養
抗体医薬	タバコ	永利友佳里, 池田美穂, 高木優: シロイヌナズナ AtBIH1遺伝子を用いた植物工場適性植物の開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-68, p.310, 2013年9月.	日本・産総研・バイオプロセス, 埼玉大・環境科学
治療薬	ハナビシソウ	○山田 泰之, 本村幸也, 島田友恵, 小倉康平, 吉本忠司, 加藤伸彦, 小山知嗣, 佐藤文彦: イソキノリンアルカロイド生合成系を制御する転写因子 GWRKY1 の機能解析. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Aa-09, p.87, 2013年9月.	日本・京大院・生命科学, サントリー生科財団・生有研
治療薬	イネ	高岩文雄, 工藤恭子, 太田賢, 楊麗軍, 若佐雄也: ヒト IL-7 のイネ種子胚乳中での産生によって誘導される小胞体ストレス. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-10, p.200, 2013年9月.	日本・農業生物資源研・組換えセンター・機能性作物
治療薬	イネ	藤原義博, 高岩文雄, 楊麗軍, 関川賢二: 組換えイネによるサイトカイン(IL-4, IL-6)の発現と精製. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-91, p.332, 2013年9月.	日本・プリベンテック, 農業生物資源研
環境浄化	タバコ(BY-2培養細胞)	増山文博, 保倉明子, 阿部知子, 平野智也, 寺田靖子, 佐野 俊夫: 放射光蛍光 X 線分析によるタバコ BY-2培養細胞におけるCd 蓄積機構の解明. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-75, p.317, 2013年9月.	日本・東京電機大学・院・工学研, 理研・イノベーションセンター, 理研・仁科センター, JASRI, 法政大学・生命科学・生命機能学
バイオ燃料	イネ	古川佳世子, 濁川陸, 園木和典, 伊藤 幸博: 老化誘導プロモーターとセル ラーゼを用いた高糖化性イネの開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-07, p.155, 2013年9月.	日本・東北大・農, 弘前大・農学生命

表 6. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（NBT、試薬、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
NBT⑦-1, 治療薬	タバコ	フランス: Angany Genetics, Fr.	Gomord, Veronique; Fitchette, Anne Catherine; Faye, Loic, "Cloning, hydroponic transfection, expression and IMAC affinity purification of recombinant allergens in Nicotiana benthamiana", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013186495 A1 20131219.
NBT⑦-1, 治療薬	タバコ	フランス: Angany Genetics, Fr.	Gomord, Veronique; Fitchette, Anne Catherine; Faye, Loic, "Cloning, hydroponic transfection, expression and IMAC affinity purification of recombinant allergens in Nicotiana benthamiana", Fr. Demande (2013), FR 2991996 A1 20131220.
NBT⑦-2	植物	韓国: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	Moon, Jae Sun; Lee, Su Heon; Kim, Sung Uk; Yoo, Ran Hee; Lim, Seung Mo; Lim, Hyouon Sub; Hwang, In Gyu, "SYCMV-derived recombinant viral vector, and use thereof", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013154233 A1 20131017.
NBT⑥	植物	中国: Southwest University	Pei, Yan; Zou, Xiuping, "Gene-auto-excision binary carrier for controlling biosafety of transgenic plant by sexual reproduction", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013000279 A1 20130103.
NBT④	植物	米国: E. I. Du Pont De Nemours and Company, USA; Pioneer Hi-Bred International	Kurek, Itzhak; Mcgonigle, Brian; Zhu, Genhai, "Silencing genes using artificial microRNAs and expression constructs with high degree of sequence specificity", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013063487 A1 20130502.
NBT⑧	植物	中国: The Chinese University of Hong Kong	Ghui, Ceon Fai; Yu, Wai Chang, "Method for preparation of plant cell minichromosome by transforming first vector containing telomeric repetitive sequence and second vector containing recombination site", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103289959 A 20130911.
NBT①	シロイヌナズナ	米国: Department of Genetics, Cell Biology, and Development and Center for Genome Engineering, University of Minnesota	Christian Michelle; Qi Yiping; Zhang Yong; Voytas Daniel F, "Targeted mutagenesis of Arabidopsis thaliana using engineered TAL effector nucleases", G3 (Bethesda, Md.) (2013), 3(10), 1697-705.
NBT⑧、試薬	テコリー	インド: Department of Biotechnology, Faculty of Science Jamia Hamdard	Ohadi R, Mehrnaz S, Alvani, Amene; Samim, M; Abdin, Malik Z, "Plant bio-transformable HMG-CoA reductase gene loaded calcium phosphate nanoparticle: in vitro characterization and stability study", Current Drug Discovery Technologies (2013), 10(1), 25-34.
NBT③-1, 治療薬	オタネニンジン	韓国: Inje University, Industry-Academy Cooperation Foundation	Heo, Gyeong Hye; Choi, Yong Ui, "Panax ginseng dammarensin synthase gene promoter region, its sequence and use in constructing genetic vectors for generating transgenic plants with increased resistances and ginsenoside content", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013132082 A 20131204.

表 7. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（環境浄化、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
環境浄化	タバコ	韓国:Department of Environment Horticulture The University of Seoul	Jeoung, Yoon-hwa; Kim, Young-Nam; Kim, Kwon-Rae; Kim, Kye-Hoon, "Physiological response and cadmium accumulation of MuS1 transgenic tobacco exposed to high concentration of Cd in soil: implication to phytoremediation of metal contaminated soil", Korean Journal of Soil Science and Fertilizer (2013), 46(1), 58-64.
環境浄化	タバコ (BY-2細胞)	中国:Biotechnology Research Center, Chengong Campus Kunming University of Science and Technology	Chen, Qi; Wu, Kong-Huan; Wang, Ping; Yi, Jia; Li, Kun-Zhi; Yu, Yong-Xiong; Chen, Li-Mei, "Overexpression of MsALMT1, from the Aluminum-Sensitive Medicago sativa, Enhances Malate Exudation and Aluminum Resistance in Tobacco", Plant Molecular Biology Reporter (2013), 31(3), 769-774.
環境浄化	植物	中国:Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China	Xu, Wenzhong; Ma, Mi; Chen, Yanshan, "Application of PvARRP1 protein and its encoding gene of Pteris vittata in arsenic transporters detoxification and accumulation", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102899348 A 20130130.
環境浄化	タバコ	中国:Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Guo, Chuanlong; Li, Song; Zhou, Lei; Wang, Lin, "Plant expression vector of Glycine max Tamba gene SGF14a for effectively increasing aluminum resistance of plants", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103045640 A 20130417.
環境浄化	タバコ	中国:Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Chen, Qi; Wu, Konghuan; Li, Kunzhi; Yu, Yongxiong, "Plant expression vector of soybean Tamba black C2H2-type zinc-finger protein gene STOP1 and its use in enhancing AL toxicity resistance of plant", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102952822 A 20130306.
環境浄化	植物	中国:Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Chen, Qi; Wu, Konghuan; Li, Kunzhi; Yu, Yongxiong, "", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102952821 A 20130306.
環境浄化	タバコ、ヤセイカシラン、アルファルフア、カラシナ	中国:Qingdao University of Science and Technology	Zhang, Yuyuan; Liu, Junhong; Zhang, Yuyan; Gong, Tingyun; Wang, Jing, "Method for repairing polluted soil with transgenic plant-Clonostachys rosea system", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103042025 A 20130417.
環境浄化	植物、シロイヌナズナ	中国:Wuxi BIOGoodland Biotechnology Co., Ltd.	Xue, Yong, "Method for repairing polluted environment with transgenic plant transformed with genes RhlA and RhlB", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103146742 A 20130612.
環境浄化	タバコ	中国:Kunming University of Science and Technology	Li, Kunzhi; Wang, Yuying; Xu, Huihui; Chen, Limei, "Plant expression vector containing celery serine acetyltransferase gene SAT", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103215306 A 20130724.
環境浄化	トウモロコシ	中国:Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, The Ministry of Agriculture Chinese Academy of Agricultural Sciences	Hou, Wen-tong; Yang, Li-ping; Chen, Ru-mei; Zhang, Shao-jun, "Effects of Aspergillus niger phyA2 transgenic maize on utilization of organic phosphorus in soil", Zuowu Xuebao (2013), 39(6), 1360-1365.
環境浄化	植物	中国:Shanghai Ruifeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Peop. Rep. China; Shanghai Academy of Agricultural Sciences	Peng, Rihe; Yao, Quanhong; Wang, Rongtan; Fu, Xiaoyan; Tian, Yongsheng; Zhao, Wei; Yan, Peilan; Zang, Xiaoyun; Wang, Bo; Wang, Lijuan, "A method for enhancing degradation of PAHs by using transgenic plants transformed with P 450 monoxygenase gene and glutathione S-transferase gene", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103468738 A 20131225.
環境浄化	タバコ	トルコ:Department of Soil Science and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture Mustafa Kemal University	Daghan, Hatice; Arslan, Mehmet; Uygur, Veli; Koleli, Nurcan, "Transformation of Tobacco with ScMTII Gene-Enhanced Cadmium and Zinc Accumulation", Clean: Soil, Air, Water (2013), 41(5), 503-509.
環境浄化	シロイヌナズナ	日本:Hiroshima University, Japan	Kuroda, Akio; Hirota, Ryuichi, "Transgenic plants having Ralstonia-derived phosphite dehydrogenase gene and cultivation of the plants", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013031429 A 20130214.
環境浄化、治療薬	ハッカ	インド:Plant Biology Laboratory, Drug Development/Diagnostics & Biotechnology Division CSIR-Indian Institute of Chemical Biology	Sinha, Ragini; Bhattacharyya, Dipto; Majumdar, Aparupa Bose; Datta, Riddhi; Hazra, Saptarshi; Chattopadhyay, Sharmila, "Leaf proteome profiling of transgenic mint infected with Alternaria alternata", Journal of Proteomics (2013), 93, 117-132.

表 8. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（機能性食品その 1）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
機能性食品	ナガミノアマナズナ	英国:Department of Biological Chemistry and Crop Protection, Rothamsted Research	Ruiz-Lopez Noemi; Haslam Richard P; Napier Johnathan A; Sayanova Olga, "Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop", The Plant journal : for cell and molecular biology (2013).
機能性食品	ナタネ、シロイヌナズナ	オーストラリア:Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia; Grains Research and Development Corporation; Nuseed Pty, Ltd.	Petrie, James Robertson; Singh, Surinder Pal; De Feyter, Robert Charles, "Production of long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plant cells", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013185184 A2 20131219.
機能性食品	植物	カナダ:University of Alberta	Weselake, Randall; Pan, Xue; Siloto, Rodrigo, "Method for enrichment of oils with polyunsaturated fatty acids using phospholipid acyltransferases and desaturase", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013181761 A1 20131212.
機能性食品	植物	韓国:Chungnam University Industry Collaboration Foundation, S. Korea	Park, Yeon Il; Shin, Dong Ho, "Arabidopsis thaliana PTR2 gene utilized as anthocyanin biosynthesis regulator for controlling accumulation of anthocyanin pigment in plant", Repub. Korea (2013), KR 1337243 B1 20131205.
機能性食品	ダイズ	韓国:Dong-A University, Research Foundation for Industry-Academy Cooperation	Jung, Yeong Su; Lee, Jae Heon; Kim, Mi Jin; Kim, Hye Jeong; Park, Jeong Hun; Hong, Ha Nui, "Psy-2a-tp-crtI multi-expression gene for increasing carotenoid content of transgenic plant, and method for manufacturing transgenic plant with increased carotenoid content", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013022520 A 20130307.
機能性食品	イネ	韓国:National Institute of Crop Science, Rural Development Administration	Baek, Se-Hyeon; Shin, Woon-Chul; Ryu, Hak-Seung; Lee, Dae-Woo; Moon, Eunjung; Seo, Chun-Sun; Hwang, Eunson; Lee, Hyun-Seo; Ahn, Mi-Hyun; Jeon, Youngju; Kang, Hyeon-Jung; Lee, Sang-Won; Kim, Sun Yeou; D'Souza, Roshan; Kim, Hyeon-Jin; Hong, Seong-Tshool; Jeon, Jong-Seong, "Creation of resveratrol-enriched rice for the treatment of metabolic syndrome and related diseases", PLoS One (2013), 8(3), e57930.
機能性食品	イネ	韓国:Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, "Polynucleotide for biosynthesis of zeaxanthin and transgenic plant using the same", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013055706 A 20130529.
機能性食品	イネ	韓国:Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, "", Repub. Korea (2013), KR 1229887 B1 20130208.
機能性食品	イネ	韓国:Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, "Polynucleotide utilized for biosynthesis of astaxanthin, and method for producing transgenic plants with anti-oxidant property using the same", Repub. Korea (2013), KR 1229885 B1 20130208.
機能性食品	植物	中国:Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences	Li, Mimi; Hang, Yuyue; Sun, Xiaoqin; Pang, Hui; Li, Ying; Guo, Jianlin; Yan, Qinqin, "Brassica carinata fatty acid elongase, its encoded gene and application thereof", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102978172 A 20130320.
機能性食品	ダイズ	中国:Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences	Liu, Baohui; Kong, Fanjiang; Cao, Dong, "Glycine max glucose phosphate transporter gene and its protein", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103352040 A 20131016.
機能性食品	トウモロコシ	中国:State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences China Agricultural University	Wang, Meizhen; Liu, Chen; Li, Shixue; Zhu, Dengyun; Zhao, Qian; Yu, Jinguan, "Improved nutritive quality and salt resistance in transgenic maize by simultaneously overexpression of a natural lysine-rich protein gene, SBGLR, and an ERF transcription factor gene, TSRF1", International Journal of Molecular Sciences (2013), 14(5), 9459-9474, 16 pp.
機能性食品	イネ	中国:State Key Laboratory of Agrobiotechnology, School of Life Sciences The Chinese University of Hong Kong	Long, Xiaohang; Liu, Qiaoquan; Chan, Manling; Wang, Qing; Sun, Samuel S. M., "Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine", Plant Biotechnology Journal (2013), 11(4), 490-501.
機能性食品	ナタネ	中国:Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing	Nie, X.; Zhao, Z. P.; Chen, G. P.; Zhang, B.; Ye, M.; Hu, Z. L., "Brassica napus possesses enhanced antioxidant capacity via heterologous expression of anthocyanin pathway gene transcription factors", Russian Journal of Plant Physiology (2013), 60(1), 108-115.

表 9. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（機能性食品その 2）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
機能性食品	植物	中国: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences; Runke Biological Engineering (Fujian) Co., Ltd.	Huang, Junchao; Zhong, Yujuan; Jiang, Yue. "Method for producing astaxanthin with transgenic plant", Faming Zhuanli Shenqing (2013). CN 102888425 A 20130123.
機能性食品	トウモロコシ	米国: Department of Agronomy, Iowa State University Ames	Kanobe Milly N, Rodermel Steven R, Bailey Theodore, Scott M Paul. "Changes in endogenous gene transcript and protein levels in maize plants expressing the soybean ferritin transgene", Frontiers in plant science (2013), 4, 196.
機能性食品	植物	中国: Northeast Normal University, Peop. Rep. China	Pang, Jimsong; Yu, Xiaoming; Jiang, Lili; Li, Ning; Yu, Qian; Xia, Qiong; Liu, Bao. "A method for increasing the starch content of transgenic plant using multi-gene transformation and cultivation", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103173485 A 20130626.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Catinot, Jeremy; Schwaar, Joanne. "Genetic modulation of β -damascenone in tobacco plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013064499 A1 20130510.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Catinot, Jeremy; Schwaar, Joanne. "Genetic modulation of β -damascenone in tobacco plants", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2586792 A1 20130501.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bakaher, Nicholas; Bindler, Gregor Nicholas; Blanc, Michel Philippe; Goepfert, Simon; Martin, Florian. "Isopropylmalate synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses for modulating sucrose esters and producing β -methylvaleric acid in transgenic plants", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2565265 A1 20130306.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bakaher, Nicholas; Bindler, Gregor Nicholas; Blanc, Michel Philippe; Goepfert, Simon; Martin, Florian. "Isopropylmalate synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses for modulating sucrose esters and producing β -methylvaleric acid in transgenic plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013029799 A1 20130307.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Sierro, Nicolas. "Threonine synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses to modulate methionine in transgenic plant cells", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2565271 A1 20130306.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Sierro, Nicolas. "Threonine synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses to modulate methionine in transgenic plant cells", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013029800 A1 20130307.
機能性食品(香料)	チャノキ	中国: Zhejiang University	Lu, Jianliang; Fan, Fangyuan; Liu, Yang; Li, Nana; Zheng, Xinqiang; Liang, Yuerong. " ", Faming Zhuanli Shenqing (2013). CN 103224946 A 20130731.
機能性食品(香料)	植物	日本: Suntory Holdings Ltd.	Nakamura, Noriko. "Cloning of cDNAs for linalool synthases and application to breeding of plant transformants with altered fragrance", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013013406 A 20130124.
機能性食品(香料)	植物	日本: Suntory Holdings Ltd.	Nakamura, Noriko. "Cloning of cDNAs for terpineol synthases and application to breeding of plant transformants with altered fragrance", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013074829 A 20130425.
機能性食品(香料)	植物	米国: Chromatin, Inc., USA; The Ohio State University	Blakeslee, Joshua; Cornish, Katrina; Crasta, Oswald; Folkerts, Otto; Jessen, Dave; Nair, Ramesh. "Enhanced farnesene production in metabolically engineered transgenic plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013106888 A1 20130718.

表 10. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
経口ワクチン	植物	台湾: National Taiwan University	Chan, Hui Ting; Chia, Min Yuan; Do, Yi Yim; Pang, Victor Fei; Jeng, Chian Ren; Huang, Pung Ling. "Oral vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome produced by plant and use thereof", Taiwan. (2013), TW 391487 B 20130401.
経口ワクチン	タバコ	中国: First Affiliated Hospital of Medical College Xi'an Jiaotong University	Liu, Hongli; Li, Xukui; Li, Wensheng; Si, Lusheng; Zheng, Jin. "Transgenic tobacco expressed HPV16-L1 and LT-B combined immunization induces strong mucosal and systematic immune response in mice", Human Vaccines & Immunotherapeutics (2013), 9(1), 83-89.
経口ワクチン	トマト	中国: Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Northwest University	Guo, Bin; He, Wei; Wu, Daochang; Che, Delu; Fan, Penghui; Xu, Lingling; Wei, Yahui. "Proteomic Analysis of Tomato (Lycopersicon esculentum var. cerasiform) Expressing the HBsAg Gene by 2-dimensional Difference Gel Electrophoresis", Plant Foods for Human Nutrition (New York, NY, United States) (2013), 68(4), 424-429.
経口ワクチン	タバコ	ロシア: All-Russia Research Institute for Agricultural Biotechnology	Tarasenko, I. V.; Taranov, A. I.; Firsov, A. P.; Dolgov, S. V. "Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants", Applied Biochemistry and Microbiology (2013), 49(8), 695-701.
食用医薬	植物	米国: University of Arkansas-Jonesboro	Cramer, Carole L.; Dolan, Maureen C.; Medrano, Giuliana; Radin, David N. "Plant-based expression of avian interleukin-12 and methods of producing and using same", U.S. (2013), US 8431774 B1 20130430.
食用医薬	トマト	米国: University of California, USA	Fogelman, Alan M.; Reddy, Srinivasa T.; Navab, Mohamad. "Edible transgenic plant expressing active apolipoprotein or mimetic peptide for use in modulating disease by altering plasma levels of LPA, SSA, paraoxonase and HDL index", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013148214 A1 20131003.
食用医薬	トマト	米国: University of California, USA	Fogelman, Alan M.; Reddy, Srinivasa T.; Navab, Mohamad. "Edible transgenic plant expressing active apolipoprotein or mimetic peptide for use in modulating disease by altering plasma levels of LPA, SSA, paraoxonase and HDL index", U.S. Pat. Appl. Publ. (2013), US 20130344173 A1 20131226.
ワクチン抗原	タバコ、イネ、ワタ、スラッシュユバイン	中国: College of Horticulture and Gardening Yangtze University	Tang, Wei; Page, Michael. "Inducible expression of Norwalk virus capsid protein gene in plant cell suspension cultures", In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant (2013), 49(2), 129-136.
ワクチン抗原	植物	米国: Pharma Green LLC	Golovkin, Maxim. "Methods and compositions to produce vaccines against smallpox in plants", U.S. Pat. Appl. Publ. (2013), US 20130266608 A1 20131010.
ワクチン抗原	タバコ	チェコスロバキア: Biology Centre AS CR Institute of Plant Molecular Biology Ceske Budejovice	Briza, Jindrich; Vlasak, Josef; Ryba, Stepan; Ludvikova, Viera; Niedermeierova, Hana. "Transformation of tobacco cpDNA with fusion E7GGG/GUS gene and homologous recombination mediated elimination of the marker gene", Biotechnology & Biotechnological Equipment (2013), 27(2), 3644-3648.

表 11. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（抗体医薬、試薬、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
抗体医薬	タバコ	カナダ: Department of Chemical Engineering McMaster University	Mayani, Mukesh; Filipe, Carlos D. M.; McLean, Michael D.; Hall, J. Christopher; Ghosh, Raja, "Purification of transgenic tobacco-derived recombinant human monoclonal antibody", <i>Biochemical Engineering Journal</i> (2013), 72, 33-41.
抗体医薬	ハクサイ	中国: College of Life Science Qingdao Agricultural University	Zhao, Mei-Ai; An, Song-Ji; Lee, Suk-Chan; Kim, Do-Sun; Kang, Byoung-Cheorl, "Overexpression of a Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody Confers Unstable Resistance to TuMV in Chinese Cabbage", <i>Plant Molecular Biology Reporter</i> (2013), 31(6), 1203-1211.
抗体医薬	タバコ	インド: Department of Biochemistry, C.B.S.H. G. B. Pant University of Agriculture and Technology	Dobhal, S.; Chaudhary, V. K.; Singh, A.; Pandey, D.; Kumar, A.; Agrawal, S., "Expression of recombinant antibody (single chain antibody fragment) in transgenic plant <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi", <i>Molecular Biology Reports</i> (2013), 40(12), 7027-7037.
抗体医薬	イネ	韓国: Department of Biological Engineering Inha University	Kwon, Jun-Young; Jeong, Sun-Hee; Choi, Ji-Won; Pak, Yun-Young; Kim, Dong-Il, "Assessment of long-term cryopreservation for production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell suspension cultures", <i>Enzyme and Microbial Technology</i> (2013), 53(3), 216-222.
抗体医薬	イネ	韓国: Inha University, Department of Biological Engineering	Kwon, Jun-Young; Yang, Yong-Suk; Cheon, Su-Hwan; Nam, Hyung-Jin; Jin, Gi-Hong; Kim, Dong-Il, "Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures", <i>Biotechnology and Bioengineering</i> (2013), 110(9), 2412-2424.
抗体医薬	タバコ	キューバ: Department of Monoclonal Antibody Production Center for Genetic Engineering and Biotechnology Havana	Gomez, Leonardo; Padilla, Sigifredo; Fuentes, Alejandro; Ruiz, Yoslane; Gonzalez, Tatiana; Somoza, Margarita; Lopez, Lisette; Sanchez, Julio; Gavilan, David; Espinosa, Elio; Avila, Yenilsydis; Mendoza, Otto; Masforrol, Yordanka; Garcia, Cristina; La, O. Maylin; Valdes, Rodolfo, "Assessment of two transgenic tobacco plant varieties for the HBsAg-specific plantibody production", <i>Journal of Agronomy</i> (2013), 12(1), 11-19.
抗体医薬	タバコ	ドイツ: Department Plant Biotechnology, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME)	Vasilev Nikolay; Gromping Ulrike; Lipperts Anja; Raven Nicole; Fischer Rainer; Schillberg Stefan, "Optimization of BY-2 cell suspension culture medium for the production of a human antibody using a combination of fractional factorial designs and the response surface method", <i>Plant biotechnology journal</i> (2013), 11(7), 867-74.
試薬	タバコ	オランダ: Keygene N.V.	Bouwmeester, Hendrik Jan; Henquet, Maurice Gerard Leon; Jongma, Maarten Anthonie, "Plant genes of drimenol biosynthesis and their use in drimenol manufacture", <i>PCT Int. Appl.</i> (2013), WO 2013058655 A1 20130425.
治療薬、試薬	イネ	中国: Engineering Research Center for Plant Biotechnology and Germplasm Utilization, Ministry of Education, State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences Wuhan University	An, Na; Ou, Jiquan; Jiang, Daiming; Zhang, Liping; Liu, Jingru; Fu, Kai; Dai, Ying; Yang, Daichang, "Expression of a functional recombinant human basic fibroblast growth factor from transgenic rice seeds", <i>International Journal of Molecular Sciences</i> (2013), 14, 3556-3567.
治療薬	タバコ	イラン: Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture Tarbiat Modares University	Goojani, Hojjat Ghasemi; Javaran, Mokhtar Jalali; Nasiri, Jaber; Goojani, Esmaeel Ghasemi; Alizadeh, Houshang, Expression and Large-Scale Production of Human Tissue Plasminogen Activator (t-PA) in Transgenic Tobacco Plants Using Different Signal Peptides", <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> (2013), 169(6), 1940-1951.
治療薬	オタネニンジン	韓国: Kangwon National University, University- Industry Cooperation Foundation	Choi, Yong Ui; Han, Jeong Yeon; Kim, Hyeon Jung, "Composition for promoting biosynthesis of protopanaxadiol containing GYP716A47 protein or its encoding protein, a host cell or transgenic plant transfected with recombinant vector containing the gene or plasmid", <i>Repub. Korean Kongkae Taehe Kongbo</i> (2013), KR 2013049270 A 20130514.

表 12. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
治療薬	イネ	韓国: NBM Co., Ltd.	Kwon, Tae Ho, "Transgenic plant <i>Oryza sativa</i> producing light chain protein of human enterokinase and use thereof", <i>Repub. Korean Kongkae Taehe Kongbo</i> (2013), KR 2013113765 A 20131016.
治療薬	イネ	韓国: NBM Co., Ltd.	Kwon, Tae Ho, "Transgenic plant <i>Oryza sativa</i> producing light chain protein of human enterokinase and use thereof", <i>PCT Int. Appl.</i> (2013), WO 2013151211 A1 20131010.
治療薬	植物	韓国: Rural Development Administration	Kim, Hyeon Uk; Lee, Gyeong Ryeol; Kim, Jong Beom; Noh, Gyeong Hui; Kim, Sun Hui, "Polypeptide, gene derived from cytochrome b5 of castor, composition and method for promoting hydroxy fatty acid production of plant", <i>Repub. Korean Kongkae Taehe Kongbo</i> (2013), KR 2013011325 A 20130130.
治療薬	タバコ	中国: College of Animal Science and Technology, China Agriculture University	Sun, Yan; Long, Ruicai; Kang, Junmei; Zhang, Tiejun; Zhang, Ze; Zhou, He; Yang, Qingchuan, "Molecular cloning and characterization of three isoprenyl diphosphate synthase genes from alfalfa", <i>Molecular Biology Reports</i> (2013), 40(2), 2035-2044.
治療薬	タバコ	中国: Henan Agricultural University	Zhao, Mingqin; Wang, Jing; Yun, Fei; Liu, Guoshun; Zhang, Songtao; Yang, Yongfeng; Jia, Hongfang, "Cloning of nicotine biosynthesis-related PMT2 gene promoter and application in regulating biosynthesis of nicotine", <i>Faming Zhuanli Shenqing</i> (2013), CN 102851287 A 20130102.
治療薬	油料作物	中国: Jilin Agricultural University, Peop. Rep. China, Bioreactor Engineering Co., Ltd., Jilin Agricultural University	Jiang, Chao; Li, Xiaokun; Li, Haiyan; Tian, Haishan; Yang, Jing; Wang, Lan; Chen, Yubin; Jin, Libo, "Vegetable oil body gel preparation containing KGF2", <i>Faming Zhuanli Shenqing</i> (2013), CN 103417954 A 20131204.
治療薬	シソ	中国: Laboratory of Food Additives and Nutrition, College of Food Engineering and Biological Technology Tianjin University of Science and Technology	Lu, Xiaoling; Hao, Lei; Wang, Fang; Huang, Chen; Wu, Shuwei, "Molecular cloning and overexpression of the tyrosine aminotransferase (TAT) gene leads to increased rosmarinic acid yield in <i>Perilla frutescens</i> ", <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> (2013), 115(1), 69-83.
治療薬	タンジン	中国	Liu, Dehu, "Application of human basic fibroblast growth factor fusion gene", <i>Faming Zhuanli Shenqing</i> (2013), CN 103319609 A 20130925.
治療薬	イネ、ダイズ、エンバク、ニホンカボチャ、シロイヌナズナ	日本: Kyushu University, Japan; National Institute of Agrobiological Resources (Niar)	Kumamaru, Toshihiro; Fukuda, Masako; Sato, Mio; Sato, Hikaru; Kawagoe, Yasushi, "Cloning and application of the genes which are involved in accumulation of plant storage proteins", <i>Jpn. Kokai Tokkyo Koho</i> (2013), JP 2013066465 A 20130418.
治療薬	植物	日本: Suntory Holdings Ltd.	Ono, Eiichiro; Tsuruoka, Nobuo, "Cloning of gene for monoterpene glycosyltransferase from <i>Thea sinensis</i> and its application", <i>Jpn. Kokai Tokkyo Koho</i> (2013), JP 2013176361 A 20130909.
治療薬	サトウキビ	米国: Department of Biological and Agricultural Engineering Texas A&M University	Barros, G. O. F.; Ballen, M. A. T.; Woodard, S. L.; Wilken, L. R.; White, S. G.; Damaj, M. B.; Mirkov, T. E.; Nikolov, Z. L., "Recovery of bovine lysozyme from transgenic sugarcane stalks: extraction, membrane filtration, and purification", <i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i> (2013), 38(10), 1407-1416.
治療薬	植物	米国: J.R. Simplot Company, USA	Rommens, Caius M.; Shkays, Roshani; Ye, Jingsong, "Aureusidin-producing transgenic plants", <i>PCT Int. Appl.</i> (2013), WO 2013169369 A1 20131114.

表 13. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（国・区分別集計）

国名\区分	NBT	環境浄化	産業用	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	試薬・診断薬	小計
カナダ	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
米国	2	0	0	2	0	3	1	0	2	0	10
キューバ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
韓国	2	1	0	6	0	0	0	2	5	0	16
中国	2	10	0	8	2	0	1	1	6	1	31
台湾	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
日本	0	1	0	2	0	0	0	0	2	0	5
オーストラリア	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
インド	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5
イラン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
トルコ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ロシア	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
チェコスロバキア	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
オランダ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ドイツ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
スイス	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6
フランス	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4
英国	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
小計	9	14	0	27	4	3	3	7	19	3	89

区分別集計は、重複を含む

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成25年度)

(ii) ゲノム編集動物由来食品の安全性評価に関する研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

研究要旨:

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術は、新しい農畜産物の育種技術として注目されている。そこで本研究では、本技術を用いて今後開発される食品を想定し、食品としての安全性を担保する上で必要な科学的な要件を整理することを目的とした。平成25年度は、ゲノム編集技術を用いたアレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの再設計並びに構築、SSA(single-strand annealing) assay による活性評価、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件の検討、および変異導入効果を評価した。その結果、平成24年度に作製したエフェクターよりも強い活性を持つエフェクターの構築に成功し、また多能性幹細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件を決定した。さらに Cel-1 assay を用いた変異導入活性評価試験では、ニワトリ多能性幹細胞に対して、構築したエフェクターが十分な変異導入活性を有することが示唆された。

協力研究者

堀内 浩幸 国立大学法人広島大学 大学院
生物圏科学研究科 教授

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階まできており、その安全性評価や対策が進められている。しかし陸域の遺伝子組換え動物は、現在、研究段階であるものが多く、今後5~10年後の実用化を目指すものが多い。

一方、最近、遺伝子の組換えを伴わないゲノム編集という技術が開発され、次世代の遺伝子改変技術として注目されている。ゲノム編集技術では、基本的にDNAの塩基配列に特異的に

結合するタンパク質と Fok I というヌクレアーゼを細胞内で一過性に発現させ、標的領域に二重鎖切断(DSB)を誘導する手法である。DSBは、自然界でも、例えば紫外線や放射線の影響により起こる現象であり、生体にとっては生死に関わる問題である。そこで、細胞は非相同末端連結という修復機構を有し、この切断面を修復する能力を有している。ところが、細胞は極稀にこの修復過程で塩基の欠失や挿入といったエラーを起こしてしまう場合がある。このエラーを利用した遺伝子改変技術がゲノム編集技術と呼ばれるものである。例えば、このエラーがゲノム上の翻訳領域で起こった場合、そのゲノム上にコードされた遺伝子の翻訳産物は正常なものとは異なるかもししくは翻訳されなくなり、これがゲノム編集技術を用いた新しい遺伝子のノックアウト技術となる。現在、ゲノム編集に利用される人工ヌクレアーゼには、zinc-finger nuclease (ZFN) と transcription activator-like (TAL) effector nuclease (TALEN) がある

が、認識配列のバリエーションが豊富な TALEN が主流である。TALEN は、植物病原細菌キサントモナスの TAL エフェクターに由来する人工ヌクレアーゼであり、その DNA 結合ドメインは、1 リピート 33~35 残基が 1 塩基を認識して結合する。TALEN の開発以降、いろいろな細胞や生物でこの技術を用いたゲノム編集生物が作製できるようになり、遺伝子組換えに変わる新規の遺伝子改変生物の作出が加速している。

そこで本研究では、TALEN の技術を用いたゲノム編集動物が 5 年以内に実用化されることを想定し、そこから得られる食品の安全性の評価基準を考える上で必要な科学的な知見を整理することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、今後想定されるゲノム編集技術を用いた食品のアレルゲンノックアウト技術を念頭に、鶏卵をモデルケースに選択し、本年度は鶏卵のアレルゲンであるオボムコイドの TAL エフェクターの再設計と構築を行い、活性評価試験並びにニワトリ多能性幹細胞へのエフェクター導入実験を行なった。

1) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの再設計と構築

平成 24 年度には、標的アレルゲン (オボムコイド) に対して、Addgene の Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit を用いて、TAL エフェクター発現ベクターの構築を行なった。平成 25 年度には、広島大学において開発された platinum TALEN and TAL Effector Kit を用いて、TAL エフェクター発現ベクターの再構築を行なった。両エフェクターセットは、標的領域を人工的に組込んだ HEK293T 細胞を用いた single-strand annealing (SSA) assay のルシフェラーゼ発現活性を指標に評価・比較した。

2) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの導入条件の検討

SSA assay により高活性が得られたアレルゲン破壊 TAL エフェクターをニワトリ多能性幹細胞に導入するために、ネッパジーン NEPA21 typeII システムを使用した 11 種 (条件 2-12) の導入条件により至適条件の検討を行なった。なお遺伝子導入条件の評価には、GFP 発現ベクターを用いた導入後の細胞生存率と GFP 発現により行なった。

3) アレルゲン破壊 TAL エフェクターによる変異導入

高活性のアレルゲン破壊 TAL エフェクターは、2 で決定した至適条件によりニワトリ多能性幹細胞へ導入した。変異導入の有無は、Cel-1 assay により評価した。

C. 研究結果

1) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの再構築と活性評価

平成 24 年度には、オボムコイド遺伝子座の exon 3 を標的に Golden Gate 法により TAL エフェクターを構築した。平成 25 年度はより確実にアレルゲンがノックアウトできるように、exon 1 を標的に platinum 法により、TAL エフェクターを再構築し、この 2 種を SSA assay により活性評価を行なった。その結果、図 1 に示したように対象 TALEN を 1 とした場合の相対評価において、exon3 を標的にした場合で約 2 倍、exon1 を標的にした場合で約 5 倍の高い活性が得られた。

2) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの導入条件の検討

アレルゲン破壊 TAL エフェクターをニワトリ多能性幹細胞 (epiblast-derived stem cell; epiSC) に導入するにあたり、エレクトロポレーションに使用する NEPA21 typeII システムの条件検討を行なった。poring pulse を変えた全 11 条件を用いて、epiSC に GFP 発現ベクターを導入し 48 時間後に細胞の生存率と GFP 発現細胞 (導入効率) を算出し比較したところ条件 9 (150 v, 5 ms, 2 times) の条件で最も高い生存率と導入効率

得られることがわかった（図2）。

3) アレルゲン破壊 TAL エフェクターによる変異導入活性

変異導入活性では、2で決定した TAL エフェクター発現ベクター導入条件をもとに epiSC へのベクターを導入し、48時間培養後の epiSC からゲノム DNA を回収した後、Cel-1 assay に供試した。Cel-1 assay とは、TALEN の標的部位を挟み込むように PCR を行い、未変異と変異断片を増幅し、再ハイブリダイゼーションさせることで hetero-duplex を育成させ、Cel-1 nuclease による消化で断片を確認する方法である（図3）。電気泳動後、この断片が確認されれば、変異導入が起きていることが示唆される。本研究では、ニワトリ ES 細胞 (M22) 1種と5種の epiSC に対して、Cel-1 assay を行なったところ、3種の epiSC において、hetero-duplex の育成を示す消化断片が確認された（図4）。

（倫理面への配慮）

本研究で実施している組換え DNA 実験は、我が国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書（承認番号 C09-1）を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

D. 考察

2010年に初めて、ZFNを用いたゲノム編集技術が報告されて以降、続いて TALEN の技術開発が行なわれ、いろいろな培養細胞や生物種でこの技術を用いた遺伝子改変がおこなわれるようになってきた。2013年には、多能性幹細胞を用いた遺伝子組換え技術が進まないラットにおいて、メラニン色素合成遺伝子を TALEN により破壊した人為的なアルビノラットも作出されている。人工ヌクレ

アーゼの利点は、細胞内に導入した人工ヌクレアーゼの発現でゲノム DNA に変異を導入できる点であり、遺伝子を組換える必要がない点である。即ちこれは、ノックアウトやノックインなど多能性幹細胞の樹立が必須であった技術から培養細胞でない受精卵への適応を可能とし、ほぼマウスのみで可能であった遺伝子組換え技術を微生物、植物からさまざまな動物種への適応を可能にしている。よって今後、ゲノム編集技術を活用した新開発バイオテクノロジー応用食品が比較的短期間に研究、開発されていくことが予想される。

現状、ゲノム編集技術を活用したノックアウト技術は、ナチュラルオカレンス扱いであり、組換え DNA 実験を規制するカルタヘナ法適応外であるが、この技術を活用した応用食品は、現行の食品安全委員会で検討される事項である。そこで本研究では、その科学的な評価基準の設定に必要な要件の整理を目的にモデルケースの構築をおこなった。

ゲノム編集技術を活用した応用食品の開発では、アレルゲンのノックアウトが非常に現実的な開発項目であり、鶏卵はその最も身近な対象食品である。しかし、未だ鳥類ではゲノム編集技術の導入は進んでいない。本研究では、鶏卵アレルゲンであるオボムコイドに対する2種の TAL エフェクター発現ベクターセットを作製し、変異導入に十分な活性を有する TALEN の合成に成功した。またこの TALEN を実際にニワトリ多能性幹細胞に導入した所、変異導入を示す hetero-duplex の存在が確認された。しかし、hetero-duplex はゲノムの1塩基多型 (SNP) でも検出されることがあり、今後は変異導入領域の塩基配列を解析し、どのような変異が起きているのかを明らかにする必要があるものと思われる。

E. 結論

平成25年度は、ゲノム編集技術で可能なアレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの再設計並びに構築、SSA assay による活性評価、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件並び

に epiSC への変異導入を検討した。アレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターセットは、exon1 と exon3 を標的に2種作製した。その結果、exon3 を標的にした場合で約2倍、exon1 を標的にした場合で約5倍の高い比活性が得られた。次に epiSC に GFP 発現ベクターを導入し48時間後に細胞の生存率と GFP 発現細胞（導入効率）を算出し比較したところ、条件 9 (150 v, 5 ms, 2 times) の条件で最も高い生存率と導入効率が得られることがわかった。決定した条件をもとに、epiSC に対して変異導入を行い Cel-1 assay 供試したところ、変異導入を示す hetero-duplex の存在が示唆された。

3. その他
なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G. Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cell. *Methods Mol. Biol.* 1074: 151-173, 2013.

2. 学会発表

1) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞の遺伝子改変技術の現状とこれから」 第2回実験動物科学シンポジウム, 公益社団法人日本実験動物学会主催, 名古屋, 2013年12月(招待講演)

2) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞を用いた鶏卵の低アレルゲン化」, 第1回タマゴシンポジウム, タマゴ科学研究会主催, 東京, 2013年5月(招待講演)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

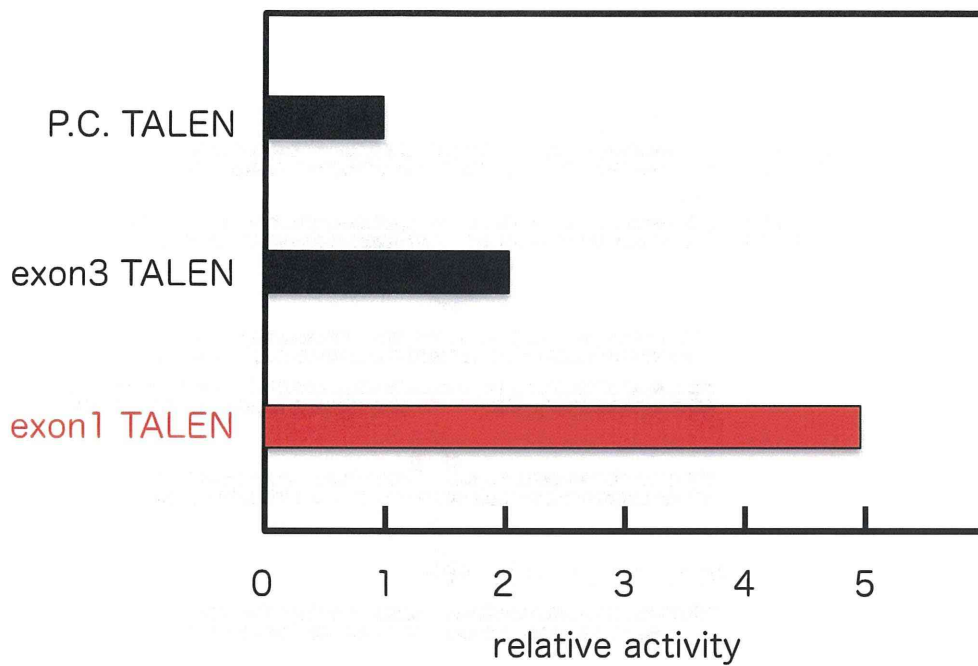


図1 SSA assayによる2種のTALENエフェクターの活性評価

P.C. :標準活性測定用TALEN

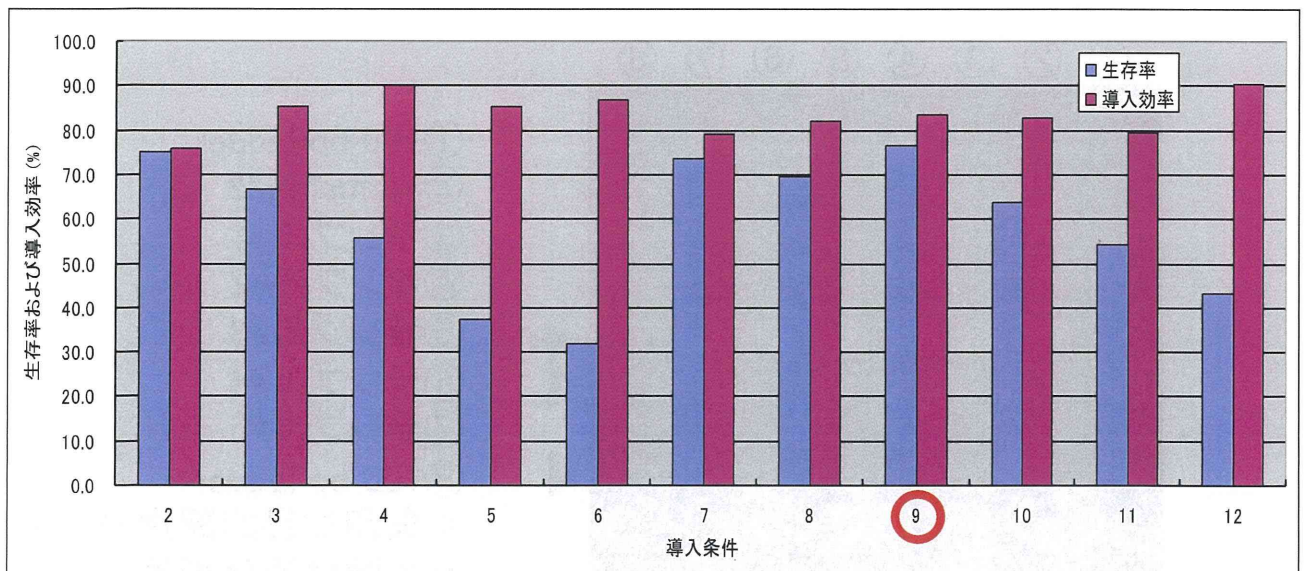


図2 NEPA21エレクトロポレーターを用いたエフェクター導入条件の検討

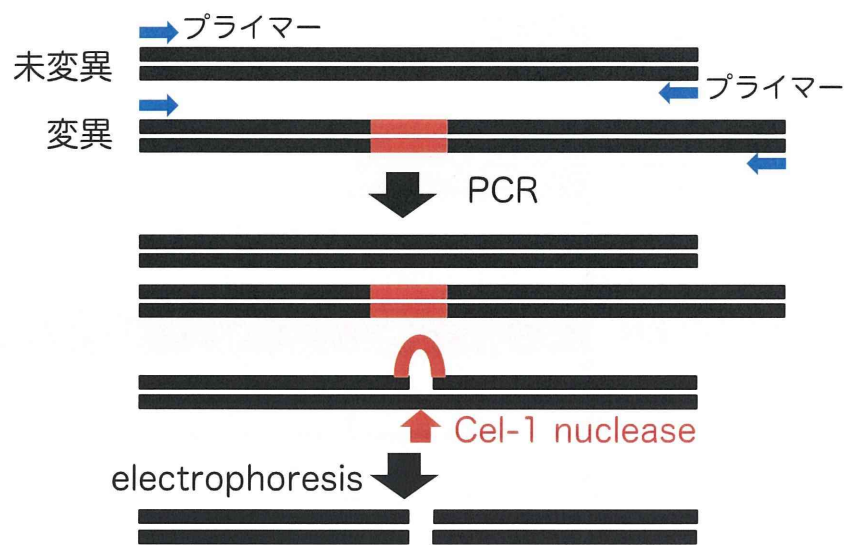


図3 Cel-1 assayの原理

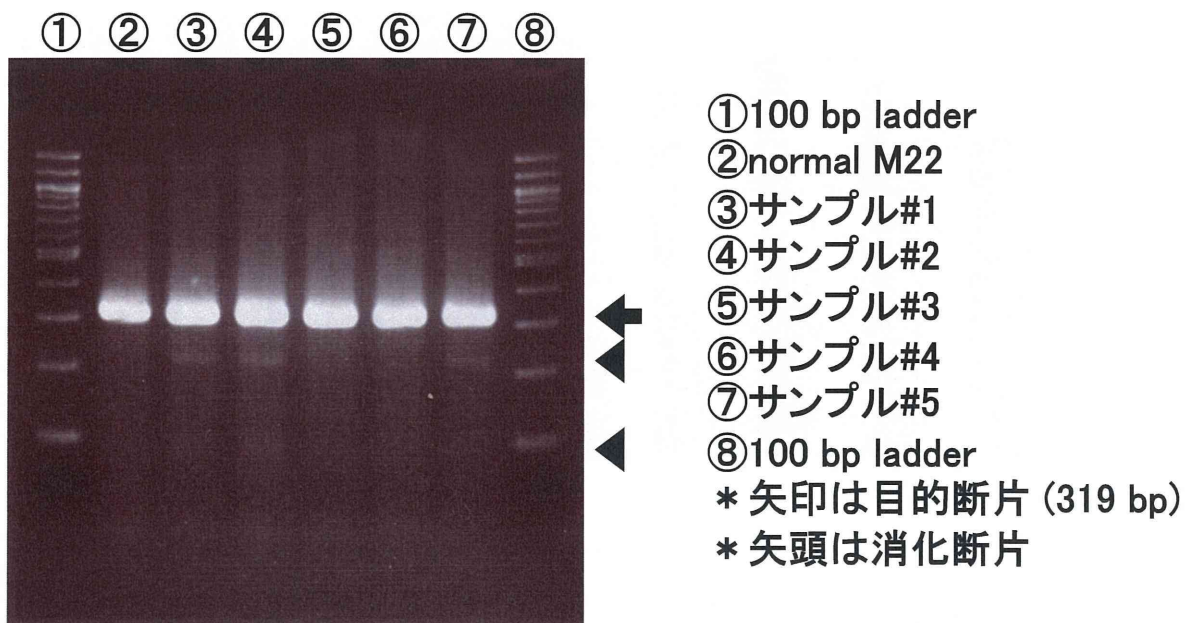


図4 epiSCへのエフェクター導入後のCel-1 assay

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成25年度)

組換え魚の安全性に関する研究

研究分担者 名古屋 博之 独立行政法人水産総合研究センター 増養殖研究所
養殖技術部育種グループ グループ長

研究要旨:

米国において成長ホルモン (GH) 遺伝子を導入した遺伝子組換え大西洋サケは FDA の審査が終了したが、許可されていない状況である。許可が遅れている理由は公表されていない。その他の国でもコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚を作出し、一部では食用として利用することを想定しているが、こちらの情報も公表されていない。遺伝子組換え魚の安全性に関する資料は AquaBounty Technologies 社が FDA の審査を受ける際に提出した資料が公開されているだけで、その他の魚類で安全性に係わる資料が公開された例はない。そこで、日本で開発されている GH 遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴを実験動物として、安全性に関する研究を行う。本年度は昨年度に引き続き、遺伝子組換え大西洋サケと同様にベクター領域を除去したプロモーターと GH 遺伝子だけの配列をアマゴにマイクロインジェクションして新しい系統の作出を試みた。遺伝子組換えアマゴを用いた実験では肝臓の形態がコントロールと比べ顕著に異なることから、肝臓の代謝について網羅的に調べた。その結果、本研究で行った網羅的イルミナ解析によって、GH transgenic アマゴは肝臓での脂肪酸の異化作用を活発にさせることで、高成長の維持に必要なエネルギーを生産していることが明らかとなった。また、GH transgenic アマゴ肝臓の形態変化には微小管繊維の減少や安定性の低下が関与していることが示唆された。

協力研究者

森 司 日本大学生物資源科学部 教授

A. 研究目的

米国において成長ホルモン (GH) 遺伝子を導入した遺伝子組換え大西洋サケは FDA の審査が終了し、パブリックコメントを求め期間は終了したにもかかわらず、その後何の進展も無い。また、その他の国でもコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚を作出し、一部では食用として利用することを想定しているとの論文もあったが、その他の国でも遺伝子組換え魚の利用が開始されたという報道は無い。

遺伝子組換え魚の安全性に関する資料は AquaBounty Technologies 社が FDA の審査を受ける際に提出した資料が公開されているだけで、その他の魚類で安全性に係わる資料が公開された例はない。そこで、日本で開発されている GH 遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴを実験動物として、安全性に関する研究を行う。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えアマゴの作出

米国で申請中の遺伝子組換え大西洋サケに導入されている遺伝子配列にはベクター領域は挿入されていない。そこで、ベクター領域の入っていない

い遺伝子組換え魚を作出するため、ベクター部分を取り除いたベニザケメタロチオネインプロモーターとベニザケ成長ホルモン遺伝子をつなげた配列を準備し、50ng/ μ l になるように調整し、昨年引き続きアマゴ受精卵にマイクロインジェクションした。

2. 遺伝子組換えアマゴの肝臓における脂質代謝の解析

昨年に引き続き、導入遺伝子がホモに入っている遺伝子組換えアマゴと非遺伝子組換えアマゴ(コントロール)のそれぞれ5検体ずつの肝臓から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築し、そのライブラリーをIllumina GA IIx sequencerで解析した。さらに、ガスクロマトグラフィーを用いて、GH遺伝子組換えアマゴとコントロール肝臓の脂肪酸分析を行った。

3. 遺伝子組換えアマゴの筋肉(可食部)におけるオミックス解析

サケ科魚類の可食部分である筋肉中のオミックス解析を行うため、体重100、125、150gの遺伝子組換えアマゴ、それぞれ3から9尾の筋肉を採取後、すぐに液体窒素で急速凍結し、試験を実施する機関へサンプルを提供した。

4. 遺伝子組換え魚の情報収集

文献やインターネットを用いて、遺伝子組換え魚の開発状況について収集を行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子組換えアマゴの作出

3組の異なったアマゴを用いて、それぞれ105粒、106粒及び128粒の受精卵にベニザケメタロチオネインプロモーターの下流にベニザケGHゲノム遺伝子をつなげた配列を50ng/ μ l になるようにリバースPBSで調整してマイクロインジェクションした。ふ化率はコントロールが52.4、7.7及び7.6%であったのに対し、マイクロインジェクション区ではそれぞれ

18.1、13.2及び27.3%と低い値であった。ふ化死魚はマイクロインジェクション区で合計399尾がふ化した。2014年4月現在61尾が生存して、飼育中である。昨年マイクロインジェクションしたアマゴも2尾生存しており、飼育中である。

2. 遺伝子組換えアマゴの肝臓における脂質代謝の解析

遺伝子組換えアマゴの内臓組織をコントロールと比較した結果、肝臓の形態に著しい変化があった。そこで、GH導入遺伝子組換えアマゴの肝臓の形態変化は肝臓の成長に伴う形態変化なのか、過剰量のGHの影響なのかを調べた。

リコンビナントGHを餌に混ぜ、アマゴに与えた結果、遺伝子組換えアマゴのような形態の変化を起こすことは無かった。そこで、GH組換えアマゴに観察される肝臓の形態変化は成長ホルモンの過剰投与が原因で無く、遺伝子組換えによる影響と考えられた。

肝臓における遺伝子発現の解析結果から細胞骨格遺伝子の発現に低下が認められ、このことによって細胞内骨格が不安定になり、細胞形態の歪みに繋がって、形態異常を示していることが考えられた。

また、CE-TOFMSによる肝臓のメタボローム解析の結果、餌料由来の物質が認められた。この物質は通常のアマゴでは代謝され認められないが、遺伝子組換えアマゴでは代謝されずに残っていて、これが肝臓での代謝異常を起こしていることも考えられた。

3. 遺伝子組換えアマゴの筋肉(可食部)におけるオミックス解析

体重100、125、150gの時に、それぞれの分析で必要量になるように遺伝子組換えアマゴの筋肉をサンプリングし、それぞれの解析機関に送った。

4. 遺伝子組換え魚の情報収集

マスコミ報道によれば2012年12月21日

FDA は、AquaBouty Technologies 社の遺伝子組換え大西洋サケに対する環境影響評価を発表し、仮承認を行った。60日間のパブリックコメントと、その後の延長期間が終了したにもかかわらず、FDA が遺伝子組換え大西洋サケを承認したとの情報は未だに無い。FDA のホームページを見ても何も情報が無く、どのような理由によって認可が遅れているかはわからない状況である。一方、カナダ環境省は AquaBouty Technologies 社の遺伝子組換え大西洋サケを飼育する施設が研究施設としてだけでなく、環境や人間の健康に害を与えること無く、商業規模で遺伝子組換え大西洋サケの受精卵を生産する施設であることを認めた。既に、パナマにある施設で受精卵から出荷するまでの許可はFDAによって承認済みである。

また、遺伝子組換え魚に関する論文では Lian et al. (2013) が遺伝子組換え魚は生産性に有利な展が無く、稚魚期の生存率も低いので、逃げたとしても自然集団を破壊するようなことは無いと結論した。他に Zhong et al. (2013) は組換え魚の餌の摂取量の増加は視床下部で発現している因子で食欲を促進させる AgRP I の発現増加によるものであることを報告した。

D. 考察

肝臓における脂質代謝の解析や形態異常の解析の結果から魚類で本来存在したい代謝産物を見つけた。この代謝産物は餌料由来で有り、コントロールの非組み換え魚では分解してしまい、認められないが、組換え魚は分解できずに存在が確認されたと思われる。今後も詳しい解析によりこの様な代謝産物があるかを見つけることは重要である。しかし、実際には食品として生産しようとする遺伝子組換え魚を用いて調べなければ、これと同じことが起こっているかは全くわからない。本研究では遺伝子組換えアマゴを用いて起こっている現象を把握し、前もって遺伝子組換え魚の申請が日本においてなされた場合、考慮すべき点について前もって把握しておくことが重要である。

E. 結論

本研究で行った肝臓中での代謝産物の解析によって、本来動物で存在したい産物があることが確認された。これは餌料由来で有り、コントロールでは代謝してしまい、存在したいが、遺伝子組換え魚では何らかの原因で代謝されずに残っていることが推測された。これらの問題を解決するための手段として、ベクター領域を除いた遺伝子組換え魚の作出に取り組んだ。最初の世代は導入遺伝子がモザイク状になっているので、染色体上に導入された次世代を得なければ実験には使用できない。

遺伝子組換え大西洋サケはすべての審査が FDA で終了したが、未だに許可されていない状況である。カナダ環境省は AquaBouty Technologies 社の研究施設を種苗生産施設として認めた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

I. 参考文献

1) Lian et al. (2013) Transgenic common carp do not have the ability to expand populations. PLOS ONE 8(6), 1-6.

2) Zhong et al. (2013) Increased food intake in growth hormone-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) may be mediated by upregulating agouti-related protein (AgRP). Gen. Comp. Endocrinol. 192, 81-88.

組換え微生物の安全性に関する研究

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

研究要旨:

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行う。

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。細胞を用いた評価系が示した結果は、ヒトや動物の腸管の M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変重要であり検討を進めた。また、この現象のメカニズムの解明に向けて、実用性が高いヒト M 細胞モデル系の更なる改良を行った。

協力研究者

梶田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
江川 智哉 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

なった免疫影響が観察されることがある。平成25年度はこの点について引き続き検討を行った。

平成24年度には免疫系に影響を及ぼすことが期待される遺伝子を組み込み、モデル組換え体を作成した。エルシニアの侵入因子である Invasin を発現する遺伝子組換え大腸菌および同様な遺伝子を挿入した組換え乳酸菌を用いて、これらのモデル組換え体とそれぞれの宿主菌の挙動を比較しながら、分子レベルでの比較検討を行った。評価系は、消化管からの免疫抗原の取り込みに重要な働きをする腸管上皮細胞に存在する M 細胞に相当する2細胞共存型の評価系を用いて検討した。動物愛護の精神から、動物による評価を最小限に留めるため、免疫系への影響の概要については継代細胞を用いた評価系を作成した。腸管上皮細胞 C2BBel 細胞と免疫担当細胞 Raji 細胞の共培養による M 細胞評価系を用いて、遺伝子組換えモデル

A. 研究目的

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、これらの検討により得られた有用な安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み込む遺伝子産物単独の性質を必ずしも反映しないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組み合わせにより多様な免疫影響が起こることが示されており、挿入遺伝子産物単独の示す免疫影響とは異

乳酸菌と大腸菌での免疫への影響の違いについて検討し、大腸菌と乳酸菌でその挙動が全く異なることを報告した。

平成 25 年度は、ヒト M 細胞モデル系の改良として、トランスフェクションを利用した腸管上皮細胞単層モデルの構築を試み、評価系として実用性が高く、前年度得られた大腸菌と乳酸菌の挙動の違いを分子レベルで解明することを目標に研究を進めた。

B. 研究方法

ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への *spiB* 遺伝子の導入

実験の概要は、図 1 に示した。

1. 使用細胞及び培養条件

ヒト結腸癌由来の C2BBel 細胞 (ATCC CRL-2102) は 10 % FBS、1 % GlutaMax (Gibco)、penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco)、Transferrin (Merck Millipore) を含む DMEM (Sigma) を用い、5 % CO₂ 存在下、37 °C で培養した。

ヒトバーキットリンパ腫由来の Raji 細胞 (RBRC-RCB1647) は 10 % FBS (Gibco)、penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco) を含む RPMI1640 (Sigma) を用い 5 % CO₂ 存在下、37 °C で培養した。

2. *spiB* 遺伝子の発現確認および *spiB* 遺伝子のクローニング

C2BBel 細胞および Raji 細胞を培養後、RNeasy Mini kit (Qiagen) により RNA を抽出した。抽出した RNA を Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche) により逆転写し、cDNA を調整した。調整した cDNA を鋳型とし PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR により *spiB* 遺伝子を増幅した。プライマーは 5' -aaaactcgagatgctcgccctggaggctgc と 5' -ggaagatcttcaggccccggcggaactgcag を用い、PCR の条件はメーカーの指示書に従った。

3. *spiB* 遺伝子発現用プラスミドの作成

テトラサイクリン誘導プラスミド pTRE3G (Clontech) を FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) により大腸菌から抽出後、BamHI (TaKaRa) および XhoI (TaKaRa) を添加し、37 °C で制限酵素処理した。

PCR により増幅した *spiB* 遺伝子は Bgl II (TaKaRa) および Xho I を添加し、37 °C で制限酵素処理を行った。

プラスミドおよび PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction (日本ジェネティクス) により精製後、T4 DNA ligase (Invitrogen) を加えそれぞれの断片を結合し、*Escherichia coli* JM109 (ニッポンジーン) の形質転換を行った。

4. C2BBel 細胞への Tet-On 調節ベクターの導入
C2BBel 細胞を 4.0 x 10⁴/well の濃度で 24 穴プレートに播種し 2 日間培養後、Lipofectamine (Invitrogen) を用いて pCMV-Tet3G (Clontech) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの条件はメーカーの指示書に従った。

トランスフェクションした細胞を継代培養後、ネオマイシン G418 (Clontech) を 400 µg/ml の濃度で添加し、生育が良好な細胞を選抜した。

5. 安定細胞株の目的遺伝子の発現誘導能

安定細胞株の目的遺伝子の誘導効率をルシフェラーゼアッセイにより測定した。ルシフェラーゼ発現プラスミドを一時的に安定細胞株に導入後、doxycycline (Clontech) を 1.0 µg/ml の濃度で添加しルシフェラーゼの発現を誘導した。ルシフェラーゼの活性は Luciferase Assay Systems (Promega) を用い、GloMax-Multi Detection System (Promega) により測定し、活性の高いクローンを選抜した。

6. *spiB* を発現する二重安定細胞株の作成

選抜した安定細胞株をトランスフェクションに適した密度になるまで培養し、pTRE3G::*spiB* および Hygromycin 耐性遺伝子のトランスフェクシ

オンを行った。トランスフェクション後、400 µg/ml Hygromycin (Clontech) 存在下で培養し、二重安定細胞株を作成した。

二重安定細胞株の *spiB* RNA の発現は RNA 抽出後、cDNA を合成し *spiB* 増幅プライマーにより検出した。

C. 研究結果

ヒト腸管モデル細胞 C2BBE1 単層膜への *spiB* 遺伝子の導入

1. *spiB* RNA の検出およびプラスミドの作成

C2BBE1 細胞および Raji 細胞の RNA を抽出し *spiB* の転写段階での発現を確認した。*spiB* 増幅用プライマーによる cDNA を鋳型とした PCR の結果、C2BBE1 細胞の RNA から *spiB* 遺伝子の増幅は見られなかったが、Raji 細胞の RNA からは増幅が確認された (図 2)。

Raji 細胞由来の cDNA から得られた *spiB* 遺伝子はシーケンス確認後、哺乳類細胞発現用プラスミド pTRE3G へクローニングした。

2. テトラサイクリン発現誘導安定細胞株の樹立

C2BBE1 細胞にプラスミド pTRE3G をトランスフェクション法により導入し、ネオマイシン G418 存在下で培養した結果、134 コロニーが得られた。30 クローンを選抜、培養し、生育が良好な 18 クローンを選抜した。これらのクローンに対しルシフェラーゼ発現用プラスミドを導入し、ルシフェラーゼ活性によるスクリーニングを行い、誘導が良好なクローンを確認した (図 3)。

3. *spiB* 発現二重安定細胞株の樹立

樹立した安定細胞株に対し *spiB* 発現用プラスミドをトランスフェクション法により導入し、130 コロニーを得た。生育が良好な 30 クローンから RNA を抽出し、*spiB* RNA の発現を PCR により検出した結果、3 クローンから *spiB* RNA の発現を確認した (図 4)。

D. 考察

腸管内の抗原取り組み口である「M細胞」の分化に必須である転写因子が新たに報告された (Kanaya et al. Nature Immunology, 2012) ことから、これまでの実験に用いていた、2 細胞共存実験系を、腸管上皮細胞のトランスフェクションにより単層培養系に改良することとした。M細胞への分化に関わる *spiB* をコードする遺伝子の cDNA を Raji 細胞からクローニングし、C2BBE1 細胞にプラスミド pTRE3G を用いてトランスフェクション法により導入することにより、単層の M細胞系を作出することを試みた。

これまで用いてきた異なった 2 細胞の共存系では、上皮細胞の単層膜形成に 2 週間、その後さらに Raji 細胞との共存により M細胞への分化させるために 1 週間が必要であり、実際の M細胞としての実験までに 3 週間以上が必要である。

今回の検討は、ヒト腸管上皮由来である C2BBE1 細胞を M細胞への分化に関わる *spiB* 遺伝子産物のもつ機能により M細胞活性を付与し、腸管内の免疫抗原の取り込まれ方に関する評価を行うことを想定している。

トランスフェクションにより、生育が良好な 30 クローンを得ることができ、そのうち RNA を抽出し、*spiB* RNA の発現を PCR により検出した結果、3 クローンから *spiB* RNA の発現を確認することができた。これらのクローンは、テトラサイクリン発現誘導安定細胞株である今回用いたのは市販の哺乳類細胞におけるテトラサイクリン発現誘導システムを利用しているので、遺伝子発現をドキシサイクリンの用量依存的に調節可能である。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いて確認したところ、この細胞でトランスフェクションにより導入したシステムが有効に機能していることが確認された。

E. 結論

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管上皮細胞 C2BBel 単層膜を Raji 細胞と共存させることにより M 細胞化することに成功し、この評価系を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。しかし、この評価系は M 細胞化するのに最低 3 週間を必要とし、実用的ではないため改良型の評価系の構築を試みた。

ヒト腸管上皮細胞 C2BBel 細胞へトランスフェクションにより、M 細胞への分化に必須である spiB を、ドキシサイクリンの用量依存的に発現を調節可能な 3 つのクローンを作成することができた。今後、この細胞を用いて、M 細胞のマーカーの評価、2 細胞系で観察された M 細胞としての機能の評価を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. PLOS one. 8(10): e75073. (2013)

2. 学会発表

五十君静信：プロバイオティクスの安全性評価について。2013 年度日本乳酸菌学会秋期セミナー。

2013 年 11 月。東京

3. その他発表

五十君静信：プロバイオティクスの安全性をどう考えるか。日本生菌製剤協会講演会。

2013 年 5 月。東京

五十君静信：遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発。明治大学大学院特別講義。

2013 年 11 月