

図 2. Platinum TALEN の SSA アッセイおよび CeII アッセイによる活性評価  
 A: 3 種類の遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ  
 B: Golden TALEN と Platinum TALEN の SSA 活性の比較  
 C: Golden TALEN と Platinum TALEN の CeII 活性の比較  
 矢印のバンドが活性の高さを示す。

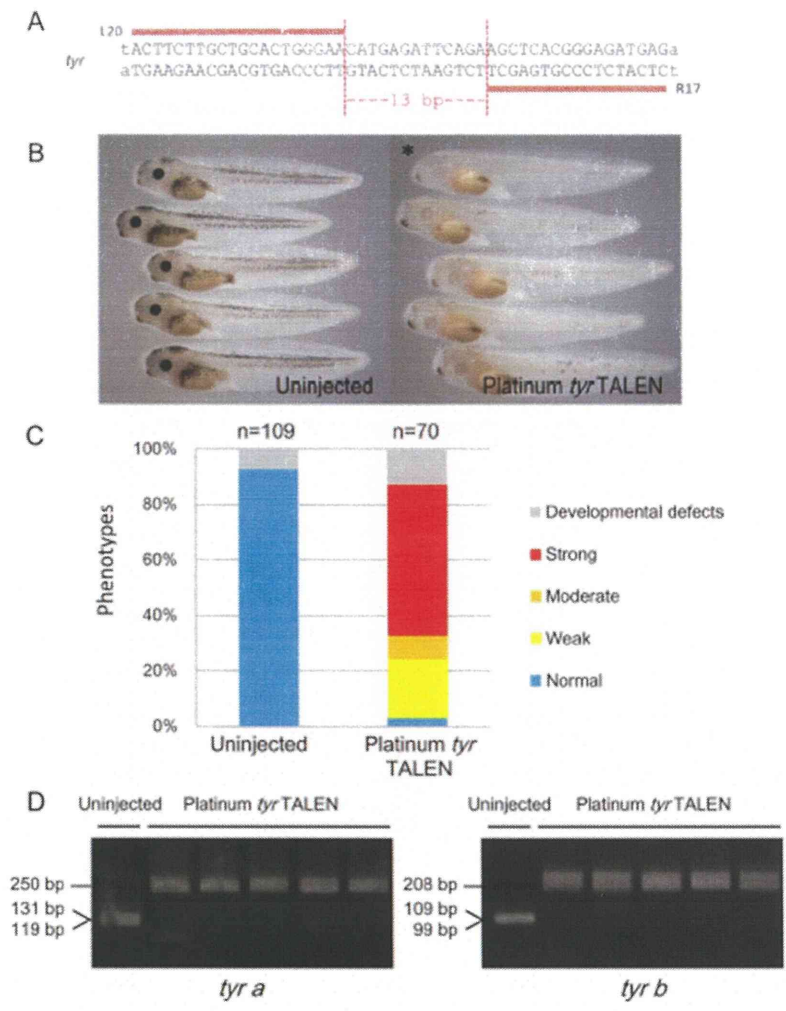


図3. Platinum TALEN を用いたツメガエル標的遺伝子の破壊  
A: *tyr* 遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ  
B: *tyr* TALEN を導入した胚の写真  
C: アルビノ胚の比率  
D: RFLP による変異導入効率の解析

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）  
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書

次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部  
研究分担者 鎌田 博 筑波大学筑波大学生命環境系・筑波大学遺伝子実験センター

研究要旨

遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、植物での開花を促進して品種改良の期間短縮を目的とした植物 RNA ウイルスを用いた方法、遺伝子組換え台木の接ぎ木による穂木への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動物・植物への TALEN、CRISPR/Cas9 技術の応用など進んでいる。これらの多くの技術の特徴は、遺伝子組換え技術の痕跡が残らないと考えられていることである。これら次世代遺伝子組換え技術は、技術的にもようやく確立されたばかりであり、その特徴や起こり得る現象も検討されていない。今後これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているため、こうして作出された GM 生物の規制の在り方や検知方法に関する検討が急務となっている。本研究では、これら多様な次世代遺伝子組換え技術について整理するとともに実際に適用した時の技術的な問題点や生物細胞内で起こる現象について研究を行うとともに、作出された GM 食品の検知可能かどうかについての基礎的な検討を行った。特に、今後組換え技術の中心となる可能性の高い TALEN、CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる改変や off-target の頻度とそこで起こる改変について、文献調査を行うとともに、細胞レベルで検討した。また、各国の次世代遺伝子組換え技術を用いた生物の研究開発状況や規制状況について調査を行った。

研究協力者

中島 治、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ （国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え（GM）技術が急速に発展し、ZFN（Zinc-Finger Nuclease）に始まり 2010 年頃に登場した TALEN（Transcription Activator-Like Effector Nucleases）、さらに、2013 年に報告された CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）などの次世代遺伝子組換え技術が、疾患研究などの基礎研究のみならず食品分野でも応用されるようになってきた。また、接ぎ木や RdDM（RNA-directed DNA Methylation）

の機構を用いた遺伝子サイレンシングにより、ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた。TALEN や CRISPR とともに、遺伝子上の塩基配列を人工的かつ意図的に改変した痕跡を残すことなく組換え生物、作物が作成可能であることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

これらの次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼである ZFN、TALEN、CRISPR 法のほか、RdDM や接ぎ木による RNA 輸送に

よる遺伝子サイレンシングを用いたもの、植物 RNA ウイルスを用いたものなどが存在し、それらについて、技術ごとに整理し、その原理や作用機構、実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体 (GM) として扱うか、GM として扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要である。

遺伝子塩基配列上の変化については、非特異的な改変 (off-target 効果) がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について、改変が欠失、置換、挿入に分けて考える必要がある。

そこで、本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しい TALEN, CRISPR を中心に、上記観点から調査研究を行った。また、最近開発された食用および非食用トランスジェニック生物の文献調査を行う。これらの技術は一般には NBT (New Plant Breeding Technology) と呼ばれているが、本研究班では、植物と動物の両方を対象としているために、次世代遺伝子組換え技術とする。また、海外での開発状況や規制状況についても調査した。さらに、Cas9 検知法や毒性評価のためのタンパク消化試験を行うために、リコンビナントタンパクを調製した。

## B. 研究方法

### (1) 人工ヌクレアーゼ (ZFN、TALEN、CRISPR) を用いた遺伝子改変に関する調査研究

手法と off-target (標的外塩基配列への影響) に関する著名な論文中心に調査し、off-target の起きる程度とパターンについて調べた。

また、標的配列に用いられている配列をゲノム情報サイト Genome Browser を用いて DNA accessibility、Histone modification state 等を調べた。

### (2) CRISPR を用いたモデル切断実験 CRISPR/Cas9 システムの切断活性や特異性等

実験材料: 培養動物細胞として、クローン化した PC12 細胞およびニワトリ DT40 細胞を用いた。

CRISPR/Cas9 および TALEN: Addgene より、human-codon optimized SpCas9 と guideRNA をコードするプラスミドを購入した。これを用いて、目的遺伝子内に複数の標的塩基配列の DNA 二本鎖切断を誘導するのに必要なプラスミドを作製した。目的プラスミドは、細胞に、リポフェクションまたはエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、2-3 日後に細胞を回収して、標的部位の改変の有無やそのパターン、頻度を調べた。また、標的配列には、これまでに論文で報告されているような遺伝子標的部位が多くの場合、構成的に発現している遺伝子の exon1 やその 5'側上流で open chromatin で nucleosome free であると推定されるところが多い。本実験では弱く転写されている遺伝子の内部 exon で、chromatin accessibility がよくないと想定される *AIFM1* exon3 を中心に検討を行った。

TALEN: Platinum TALEN を用いて作製した。このプラスミドは、SSA アッセイを用いて、十分な活性があることは示されている。

indel の確認: 細胞回収後に、予想切断部位を含む領域を、high-fidelity polymerase を用いて増幅し、SURVEYOR アッセイまたは T7 Endonuclease I アッセイを用いて調べた。また、増幅産物をクローニングベクター Zero Blunt に挿入し、DH5 $\alpha$  大腸菌に transformation 後、最大 48 コロニーをシーケンス解析した。

### (3) 次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品 (植物・動物) の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 である。一方、植物ではこれまでに開花促進の目的で植物 RNA ウイルスベクターを用いた手法が有望である。また、接ぎ木による手法も一見古典的に思われるが、台木と穂木の一方に遺伝子組換え体 (GM) を用い、遺伝子サイレンシング目的に RNA を師管輸送してもう一方に機能させる方法で、最終的に非遺伝子組換え体 (nonGM) ゲノムへの挿入も改変も起きないことから、期待される技術である一方で、その取扱い (GM か nonGM か) についての判断が必要になって来る。これらが、中心の技術と考えられることから、国内外の開発動向や規制に関する情報を収集した。

### (4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

組換えタンパクの発現、精製は参考文献 (Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer

M., Doudna J.A., Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science (2012) 337, 816-821) に付属する Supplementary Materials に記載の方法に基づいて行った。

### 大腸菌における組換えタンパクの発現

発現プラスミド: Addgene から購入した pMJ806 を用い、大腸菌宿主には Rosetta2 (DE3) (Novagen) を使用した。精製は、キレートカラム (Ni-NTA Agarose、キアゲン) で行い、透析によるバッファー交換を行いつつ TEV プロテアーゼ (ProTEV Plus、プロメガ) で消化した。さらに、陽イオン交換カラム (MonoS、GE ヘルスケア) で精製し、タンパク定量は 280 nm における紫外吸収に基づいて行った。

## C. 研究結果

### (1) Off-target に関する調査

#### (a) zinc-finger nuclease (ZFN) について

Fig.1 に示すように、DNA 結合ドメインは、真ん中のスペーサー 5~7 bp を挟んで両側に 9~12 bp、両 DNA 結合ドメイン合わせて 18~24 bp である。スペーサー部分で認識部位を持たない制限酵素 *FokI* の二量体形成により DNA 二本鎖切断を誘導するものである。これは、 $3 \times 10^9$  bp のヒトゲノムに対してもただ一つの標的配列を設計することが理論的には可能であるが、ZFN は設計できる配列に制限があるためにその特異性は、理論値ほど高くないと予測される。また、後述する TALEN 同様であるが、真ん中のスペーサー配列に認識部位を持たない制限酵素 *FokI* が二量体を形成して DNA 二

本鎖切断 (double strand break, DSB) を誘導する。したがって、構造上片側の ZFN モジュール内の DNA 結合ドメインの配列を基にした、標的配列 (target 配列) に類似した標的外配列への結合、切断 (いわゆる、off-target 効果) を予測することは難しいと考えられている。つまり、2つのモジュールで DNA に結合し切断する ZFN では、片側の認識配列にミスマッチがあっても *FokI* が切断に必要な 2 量体形成をすればよいことから、off-target は理論的に考えられるよりも、その確率は高いと考えられる。この点について、Keith Joung らのグループは、target 配列に対して 7 塩基までのミスマッチ (mutation) を含む DNA ライブラリーを作成し (10<sup>11</sup> DNA sequences)、*in vitro* selection 法で特異性を検討している<sup>2)</sup>。ヒト遺伝子 *CCR5* および *VEGFA* を標的とした ZFN (VF2468) で想定される off-target サイトは、Fig.2 に示すように、4 finger からなり 24 塩基を認識する *CCR5* 用 ZFN の方が、3 finger からなり 18 塩基を認識する VF2468 用 ZFN よりも特異性は高いが、数塩基のミスマッチを許容しやすく、結果、ZFN では 3 塩基以内のミスマッチがゲノム上に無いように設計することが望ましいとされている。その他、ZFN は設計が難しく、また標的配列の制限があり後述する TALEN や CRISPR に比べてゲノム上の配列のどこでも設計できるわけではないため、人工ヌクレアーゼの中では、利用は今後は多くないと思われる。

#### (b) transcription activator-like effector nuclease (TALEN) について

TALEN は、植物病原菌 *Xanthomonas* が持つタンパクで、宿主感染に必要なタンパク発現

を誘導するために DNA 結合ドメインと活性化ドメインをからなる。ゲノム改変に用いる TALEN は、活性化ドメインを除去し、代わりに制限酵素 *FokI* を連結したもので、ZFN 同様に、2つの DNA 結合ドメインを間に、15 塩基前後のスペーサー部分での *FokI* 二量体形成により DNA 二本鎖切断を行う<sup>3)</sup> (Fig.3)。DNA 結合ドメインは、片側 17-18 塩基で、合計 34-36 塩基と ZFN の DNA ドメインよりも認識部位が長いために特異性が高いと考えられている。現在、ゲノム改変に用いられている TALEN コンストラクトは、複数の研究グループから報告されておりいくつかのバリエーションにより、その特性 (特に off-target 効果) が若干異なると予想される。TALEN は、2011 年頃から急速に普及してきたが、その特異性、すなわち off-target がどの程度生じるのか、何塩基までのミスマッチを許容するかの詳細な検討はごく最近まで行われていなかった。

Keith Joung らのグループは、ZFN での特異性研究で用いた手法 *in vitro* selection を用いて、DNA ライブラリーを作成し (10<sup>12</sup> DNA sequences)、TALEN の特性について詳細に検討している<sup>4)</sup>。ヒト細胞を用いて、on-target と off-target 部位での変異導入率と on-target に対するミスマッチ塩基数について調べた結果、片側 18 塩基 (つまり、両側 36 塩基による DNA 認識) の TALEN を用いた場合に想定される off-target サイトは 7 塩基ミスマッチまで存在しないが、9 塩基で 70 サイト、11 塩基で 4338 サイト存在する。しかしながら、Fig.5 に示すように *CCR5* を標的とした TALEN では、標的サイトでの変異導入率が 23-47% に対して、11 塩基ミスマッチがある off-target サイト (offC-5) では 2.3% で変異導入されてい

る。この時のミスマッチは、left-TALEN に 7 塩基、right-TALEN に 4 塩基のミスマッチがある状態であった。別の標的サイト (*ATM*) を用いた場合でも、標的サイトでの変異導入率が 18% に対して、9 塩基ミスマッチである off-target サイト (offA-17) でも 1% で変異が起きることが示された。このような、off-target サイトでの変異導入は、ZFN 同様に、DNA 結合ドメインによる過剰な結合エネルギーによること (長い DNA 結合ドメインは特異性は高くなるが、ミスマッチを許容しやすくなる)、導入時の TALEN 濃度が高い場合に起きる可能性が示唆されている。さらに別の遺伝子標的 *PMS* においては、on-target サイトで 20% の変異導入率に対して、1.4~3.9% (いずれも 4 塩基ミスマッチ) の変異導入率であった。一方、1 塩基ミスマッチにおいても 0.25% 程度の変異導入しかないサイト (*SDHD*) もあることから<sup>4)</sup>、off-target 切断は、デザインした TALEN 配列や GC 含量、細胞に依存する。言い換えればゲノムへのアクセスのしやすさにも依存するが、最大上述したような off-target サイトでの変異導入が想定されると考えることができる。ただし、多くのサイトでは 8 塩基以上のミスマッチ領域での off-target 切断効率はほとんどの場合 1% 以下であることから、特異性は後述する CRISPR より高いと考えられる。

一方、off-target 切断を低減させるために TALEN 濃度を必要以上に低くすることは、特異性向上よりも変異導入効率の低下につながるため、off-target を少なくする TALEN コンストラクトを用いることが一つの手段として提案されている。

望みの標的サイトに対して用いた TALEN が、どのような off-target サイトで変異が導入

されたかを明らかにすることは容易ではない。次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスは、一つの手段であるが、まず、ゲノムの 100% をカバーすることは不可能であること (80% くらいなら可能)、変異部位を同定するためにはかなりのカバー率 (coverage) でシーケンスする必要があり、その場合出力されるデータ量は膨大になる (たとえば、パパイヤゲノムは 370Mb として、200× でシーケンスすると 74Gb である)。さらに、見出した変異が人工ヌクレアーゼによる影響か、自然変異かを判断するのは難しい (大きな欠失や挿入があれば別であるが)。ZFN、TALEN および後述する CRISPR のいずれを用いたゲノム改変であっても、off-target サイトでの変異導入を次世代シーケンサーで全ゲノム配列を解析している例はほとんどない。

### (c) clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) について

CRISPR は、細菌がもつ一種の免疫システムのようなもので、外来のゲノム由来の配列の 1 部を取り込んで、次に同じ配列に遭遇した時に分解除去できるシステムで、ヌクレアーゼ活性を持つ Cas9 タンパクと認識配列を含むガイド RNA (gRNA) からなっている (Fig.6)<sup>5)</sup>。一般に用いられている Cas9 は *Streptococcus pyogenes* 由来のものである (SpCas9 と略されることもある)。

この CRISPR/Cas9 システムの最大の利点には、コンストラクトの作成が非常に簡単であることにある。20 塩基+NGG の合計 23 塩基を標的とすることができ、NGG を除く 20 塩基を Cas9 および gRNA となる配列をコードす

るプラスミド内の U6 プロモーター下に組み込むだけで作製できる (Fig.7)。

必要なものは一つの標的に対して、一つのプラスミドである点が、作製がやや複雑な ZFN や TALEN に比べての大きな利点で、今後のゲノム改変分野での中心の一つであると考えられる。

CRISPR/Cas システムの特異性についても、膨大な検討結果が 2013~2014 年にかけて複数の研究グループから報告されており、参考になる。NGG (N はすべての塩基) からなる PAM (protospacer adjacent motif) を除く 20 塩基で標的 DNA 配列を認識するが、PAM に近い 8 塩基は特異性が高いが、5'側の 12 塩基はミスマッチを許容しやすいこと<sup>6)</sup>(Fig.8)、GC 含量が 45~65%程度 のときに切断効率が高いこと<sup>7)</sup>、また、極端に高い GC 含量 (80%以上) では、かなりの割合で off-target 切断が起きることが示されている (39% in on-target vs 30% in off-target with 3 mutations (OT2-9) in K562 細胞)<sup>8)</sup>(Fig.9)。また、複数塩基ミスマッチのある off-target サイトでの変異導入率は、連続していても相互に離れていても 2 塩基ミスマッチのある off-target サイトでは、かなり高い (on-target と同等の切断効率を示す)。3 塩基ミスマッチでも連続している場合は、on-target の半分程度の切断効率を示すことがあり (Fig.10)、ZFN や TALEN に比べて、3 塩基以内のミスマッチサイトでの off-target 切断効率はかなり高い傾向にある。他の標的遺伝子 (*CLTA4*) でも、3 塩基ミスマッチサイトで、on-target 85%に対して、72%の変異導入率で off-target 切断が見られる<sup>9)</sup> (Fig.11)。

CRISPR/Cas9 は、TALEN など に比べて off-target サイトでの切断活性が高いことから、

様々な off-target 低減のための工夫が試みられている。その 1 つは、DNA 認識配列の 20 塩基を 5'側で 2~3 塩基短くした truncated gRNA を用いる方法である。17・18 塩基の DNA 認識配列からなるこの方法では、特異性が最大 5000 倍向上すると報告しているが、標的配列により効果がない場合もあり、その効果は不確定と考えられる<sup>10)</sup>。また、2 組の nickase Cas9 (Cas9n) と gRNA を用いて、それぞれの標的部位でニックを導入し、結果として DNA 2 本鎖切断を起こすものである。本方法では、DNA 認識配列がオリジナルの 2 倍になるため、および、片側の CRISPR/Cas9n が off-target サイトに結合してもニックしか誘導しないために、修復されると考えられることから、結果として特異性が向上するが、一方で、2 組の CRISPR/Cas9n が同等の活性を一定の近接した部位に設計しなければならぬことから、より大きなタンパクがアクセスできるクロマチン環境にあることが必要になる。切断活性はオリジナルよりも一般には低い傾向にある<sup>11)</sup>。これは CRISPR/Cas9 システムの特異性を高める有力な手段と考えられたが<sup>11)</sup>、最近、片側の CRISPR/Cas9n 単独であっても変異導入されることが判ってきた。そのため、さらに off-target を押えた手法が報告された<sup>12,13)</sup>。本方法は、ZFN や TALEN と同様に、左右にヌクレアーゼ活性を欠失させた Cas9 (dCas9) からなる DNA 結合ドメイン、その間に DNA 切断活性を有する *FokI* 制限酵素がデザインされている。したがって、片側 dCas9-FokI が off-target サイトに結合しても DNA 二本鎖、一本鎖いずれの切断活性を持たないので、off-target 切断にならないこと、on-target では



左右 46 塩基で DNA 認識をしているため特異性が非常に高いことが期待される (Fig.12)。

#### (d) ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 による DNA 切断部位での改変パターン

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムで誘導される標的配列 (on-target) での改変パターンを調査したところ、いずれの組換え技術を用いても差はなく、大部分は数塩基から数十塩基の欠失で、欠失は最大 400bp まで、挿入は数塩基から 100 塩基程度まで見られる (Fig.13)。このパターンは、on-target でも off-target でも同様の結果が報告されている<sup>8, 10)</sup>。また、off-target サイトが open chromatin で nucleosome free 領域などにあるときは高い頻度で起きる可能性があると思われる。

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムなどの、いわゆる次世代遺伝子組換え技術はこれまでほとんどが動物を対象としたものであったが、ごく最近になって、植物への適用例が報告されるようになってきた。シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどを用いて研究が行われているが、標的部位での DNA 二本鎖切断による変異パターンは、既に述べた動物と異なることはなく、数塩基から 10 塩基程度の欠失を中心としたものであることが報告されている (Fig.14)<sup>15, 16)</sup>。

#### (2) CRISPR/Cas9 による標的遺伝子配列 DNA 切断

CRISPR/Cas9 システムは、遺伝子改変に必要なコンストラクトの作製が容易であるために、様々な生物に用いられる事が想定される。しかしながら、本手法を用いた時の安全性に関わる影響については今後の課題として重要で

問題として存在している。本研究においては、実験および解析が比較的容易で、かつ迅速に結果が得られることから動物培養細胞を用いて、標的遺伝子を設定し、その遺伝子内 exon3 周辺に複数の標的配列に対する CRISPR/Cas9 を複数デザインしてゲノム改変を試みた (Fig.15, 16 for PC12 細胞, Fig.18 for DT40 細胞)。

クローン化した PC12 細胞を用いて、*AIFM1* 遺伝子 exon3 付近を標的とした、TALEN、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を試みた。その結果を Fig.17 に示した。標的配列を含む領域を PCR 増幅させた (630 bp) 後に、SURVEYOR アッセイを行ったところ、切断によって得られる 200、400 bp のバンドは得られなかった。Platinum TALEN (TALEN-VR-AIF up-A) は、SSA アッセイにより、細胞内でプラスミドを標的とした場合に切断活性が確認されている。そこで、さらに、この PCR 産物をクローニングベクター pCR-Blunt を用いてクローン化し、48 コロニーからシーケンス解析を行った。TALEN 切断部位である spacer 付近には、いずれのコロニーからも変異導入の入ったものは得られなかった。一方、ニワトリ DT40 細胞を用いて同じ *AIFM1* 遺伝子 exon3 を標的として CRISPR/Cas9 システムで複数設計した。また、今回は、通常 *Steptococcus pyogenes* Cas9 に加え *Neisseria meningitidis* Cas9 も用いて検討した。その結果、PC12 細胞同様、SURVEYOR アッセイにより切断活性は認められず、シーケンス解析でも、変異導入の痕跡は認められなかった (Fig.18, 19)。

今回、標的とした遺伝子 *AIFM1* は、ENCODE (encyclopedia of DNA elements)

データより、転写活性が弱くかつ DNase I hypersensitivity のない領域であることと、そして細胞を用いた SSA アッセイでは、設計した Platinum TALEN は高い切断活性を有していることから判断して、ゲノム DNA へのアクセス性が制限されていることが標的部位での切断活性が得られなかった原因と考えられた。最近の CRISPR/Cas9 システムのゲノムワイドな解析の報告でも<sup>23)</sup>、Cas9 の結合領域は、ゲノムへのアクセス性 (accessibility) を反映する DNase I hypersensitivity サイトと重なることが示されており、次世代遺伝子組換え技術を用いた改変は、TALEN、CRISPR/Cas9 などツールとしてはほぼ完成されているが、ゲノム上のどの位置でも DNA 二本鎖切断を発端するゲノム改変が行えるわけではない。次のステップとしては、このような宿主側での工夫が、これらが本格的に普及するためにも必要と考えられる。

#### CRISPR/Cas9 によるゲノム改変部位とクロマチン状態との関係について

最近報告された論文から、そのターゲット遺伝子領域とゲノム DNA へのアクセスしやすさについて、UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を用いて解析した。ヒト遺伝子導入領域として知られている AAVS locus 上の *PPP1R12C* 遺伝子を標的とした場合は 50% 前後の非常に高い変異導入率が得られており、ゲノム構造を見てみるとその標的サイトも高度に DNase I hypersensitivity (HS) 領域が集まった領域でアクセスしやすい環境にある。*VEGFA* や *FANCF* 遺伝子を標的とした場合も同様に、DNase I HS クラスタ領域であることから、

変異導入率も 24-54% または 12-18% と高い (Fig.20)。一方、*EMX1* 遺伝子を標的とした場合には、遺伝子全体には DNase I HS クラスタが存在するものの、転写が抑制されており、DNase I HS クラスタからすこし離れていることから、ゲノムへのアクセス性はあまりよくないと考えられ、実際変異導入率は遺伝子導入効率が 90% 程度である HEK293 細胞においても 2.9% とかなり低い結果である (Fig.21)。

今回検討に用いた、*AIFM1* 遺伝子は、弱く転写されている領域で、かつ遺伝子全体に渡って DNase I HS クラスタの存在する領域がなく、ゲノム DNA へのアクセスは悪いと考えられた (Fig.22)。実際の結果と合わせて、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 で改変できる領域は、アクセス性と関係する。

#### (3) 次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品 (植物・動物) の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 である。ZFN、TALEN は技術的にはほぼ確立されている一方で、2013 年に登場した CRISPR/Cas9 システムは、他の 2 者の技術に比べて off-target 領域での DNA2 本鎖切断、変異導入の確立が高いこと複数報告されていることから、現在も技術開発・改良が行われている。2014 年になって off-target を極力抑えることができる手法が報告されたことから、今後は様々な生物に、遺伝子組換え食品の作出から遺伝子治療まで、積極的に使われるものと推測される。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 の組換え技術は、アメリカを中心とした研究グループが精力的に研究開発を

行ってきたが、今後は日本、ヨーロッパに加えて、中国などの国々でも幅広く使われ、植物分野でも急激に論文数が伸びてきていることから今後数年でこれらの技術を用いた作物が商業ベースに入ってくるものと考えられる。

植物の分野では、これら以外に次世代遺伝子組換え技術として実用段階に近いものは、植物の RNA ウイルスベクターを用いたもので、開花促進遺伝子 (FT) を発現させ、例えば 10 年程度かかるリンゴの開花時期を数か月に短縮できることから期待されている<sup>16)</sup>。また、接ぎ木による遺伝子サイレンシングを用いた組換え技術が原田らによって開発されている<sup>17-19)</sup>。すでに、タバコ、トマト、ジャガイモで研究が進められており、実用化も近いと考えられている。

このような、次世代組換え技術の各国の規制に関しては、欧米を含めて検討段階である。

2011 年には EU の Joint Research Centre (JRC) が、報告書を公表している<sup>20, 21)</sup>。そこでは、技術を以下の 5 つにグループ分けしている。

#### 1. site-directed mutagenesis

ODM, ZFN (JRC の報告書には含まれていない TALEN や CRISPR も含まれる) や meganuclease

- ・ 欠失を誘導する場合は、nonGM と扱うべきとする国が多い。したがって、ZFN-1 を使った場合は、nonGM。
- ・ 置換の場合は、種類やサイズによってケースバイケースもしくは、GM とすべき。一方で、反対意見の国もある。

#### 2. cisgenesis and intragenesis

Cisgenesis に関して、微生物と異なり、植物 (動物も同様) の場合は GM とし

て考えるべきであるとして、各国で一致している。Intragenesis も GM。

#### 3. breeding with transgenic inducer line

RdDM (RNA-directed DNA methylation), accelerating breeding following early flowering, reverse breeding

育種の途中の段階で導入された遺伝子が、最終的に除かれていれば (逆育種) non-GM として考えてもいいという国がある (アルゼンチン、オーストラリア) が、規制の方向は定まっていない様である。RdDM によるエピジェネティック変化によるものは、その効果が後代で減衰していくという、技術的な問題がある。

#### 4. grafting

grafting on GM rootstock

GM rootstock が GM であることは明確であるが、その穂木になる実については、ケースバイケースで考える国と、non-GM と扱われても遺伝子組換え技術を用いて作られたものと分類されるかもしれないとする国がある。種子については、nonGM と考える。

#### 5. agro-infiltration

agro-infiltration, agro-infection, floral dip

扱いについては各国とも定まっていない。

オーストラリア・ニュージーランドは、FSANZ (Food Standards Australia New Zealand) 報告書では、以下の 6 つにグループ分けされている。

1. SPT (seed production technology)
2. Reverse breeding

3. cisgenesis and intragenesis
4. GM rootstock grafting
5. ODM (oligonucleotide mutagenesis)
6. ZFN, TALEN (報告書にはないが、CRISPR も含まれると考える)

EU の JRC および FSANZ の報告書には述べられていないが、リンゴなどの植物 RNA ウィルスを用いた開花促進の技術も次世代遺伝子組換え技術に含まれる。

日本国内では、植物 RNA ウィルスを用いた開花促進の技術や GM rootstock grafting における RNAi を介した遺伝子サイレンシングは実用化に近い段階まで来ていると考えられる。

植物 RNA ウィルスでは、ウィルス由来の配列が除かれているかどうか、GM rootstock grafting でも未知成分 RNA が残存していないかが重要である。また、GM 台木につなげた nonGM 穂木からなる植物体は GM であり、nonGM 穂木にできた実は、未知の RNA やタンパクなどが残っていないことが証明されなければ GM という扱いになる。種子は nonGM と考えられる。

各国ともに、NBT などの次世代遺伝子組換え技術を用いて作出されたものについて、既存の GM の定義（自然界では起きない組換えを行う）や考え方に従っていくようなスタンスである。TALEN、CRISPR のような、最新技術で作られた植物・動物において、欠失を誘導した場合に、EU のような、プロセスの観点から ZFN-1 を nonGM とすると、一つの問題が生じると考える。プロセス（用いる技術）の観点から考えると、小さな欠失でも数百塩基の大きな欠失でも、必要な遺伝子の発現制御に関わる領域に起きた場合は、その遺伝子産物として生

じるタンパクや低分子化合物にも含量変化が生じれば、組換え前後で同等性が崩れることになり、アメリカやオーストラリア、日本（実質的に）などの国で用いられているプロダクトの観点（最終的に作出されたもの安全性、実質的同等性）で判断した場合と齟齬が生じる。EU においても、GM 作物に対する規制の考え方をプロダクトベースに見直す動きもあり<sup>22)</sup>、その方向で統一されることが望ましいと考える。

また、アメリカでは ZFN を用いて作製された作物について個別事例として規制対象外を判断されており、欠失を誘導しただけであればその植物は規制対象にならないと考えられている。アメリカにはもともと GM 作物を統一的に規制する制度が存在しないために、項目ごとに担当省庁が分れ、個別に評価されているようである。NBT など次世代遺伝子組換え技術で作出されたものに関しても、これまでの方法で対応可能と考えているようである。

#### アジア地域での次世代遺伝子組換え技術を用いた研究

遺伝子組換え食品の開発、商業栽培は近年アジア各国で増加傾向である。インド、バングラディッシュ、フィリピンなどの発展途上国で開発、栽培される遺伝子組換え食品は、既に先進国で開発された系統のものが中心である（例えば、モンサントがこれまでに開発した系統）。一方、近年遺伝子改変した痕跡が残らないか自然界の変化と区別がつかないと考えられている、いわゆる次世代遺伝子組換え技術は、アメリカと日本以外では中国が精力的に開発研究を行っている。特に、研究能力の高い Chinese Academy of Science, Institute of Genetics and Developmental Biology (中国科学院)では、

TALEN、CRISPR/Cas9 を用いた研究が進んでおり、生物学基礎研究では *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、植物では *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) や *Nicotiana benthamiana* (タバコ) をモデルとしての他に、*Oryza sativa* (コメ) や *Triticum aestivum* (コムギ) の2つの作物で研究が行われている<sup>24~26)</sup>。これらの研究は、欧米先進国と同水準にあると考えられた。その他、中国ではTALENやCRISPR/Cas9をブタに応用している<sup>27)</sup>。

#### 食用 GM 動物の文献調査

1. 該当する論文、特許などの数は以下の通り。  
ウシ 32 報、ヤギ 20 報、ブタ 16 報、魚 15 報、ヒツジ 5 報、ニワトリ 1 報、ウサギ 1 報、エビ&カニ 1 報  
合計 91 報 (Fig.23)
2. 日本で馴染みの薄いヤギの報告が多かった。
3. 日本で馴染みのあるニワトリの報告が少なかった。(遺伝子導入法で良い方法がない。ウイルス(主にレトロウイルス)が使われていたが、長い遺伝子は使えない。パッケージできなくなる。また、食用としてはウイルスはイメージが良くない。ES細胞などの幹細胞は研究途上、などの理由。)
4. 開発国は圧倒的に中国が多い。91報中70報を占めた。
5. 導入あるいは改変遺伝子には頻繁に使われるものがあつた。(fig.23-3)
6. エビ、カニについて トランスジェニック藻類を作成してエビやカニに食べさせることを目指している。エビやカニに直接遺

伝子導入するわけではない。しかし、間接的に組換え遺伝子やタンパクがエビやカニ導入されるので、本調査で該当するものとした(調査の対象を広く解釈した)。

7. ゲノム編集技術を利用した食用トランスジェニック動物についてはZFNを利用した物が8報あつた(Fig.23-4)。最近になってノックインも出てきた。

#### (4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

##### Cas9 リコンビナントタンパクの発現精製

1. 組換えタンパク Cas9-MBP-His6 が発現していることは His6 を検出する試薬、Ni-NTA AP Conjugate (キアゲン) を用いて確認した。この組換えタンパクはインクルージョンボディと水溶性の物があつた。水溶性の物を使って以後の実験を行った。
2. キレートカラムで組換えタンパクを濃縮した。
3. TEV プロテアーゼで消化したものを SDS-PAGE、CBB 染色で分析すると元の約 200 kDa のバンドが消失して約 160 kDa のバンドが新たに検出された。非特異的な消化は観察されなかつた。
4. 陽イオン交換カラムでは混入タンパクが効率良く除けて精製度が高かつた。
5. 陽イオン交換カラムで精製した約 160 kDa タンパクを N 末端シークエンシングしたところ、期待される配列が得られた(5 アミノ酸残基)。この結果を分子量やクロマトグラフィーでの挙動の情報と合わせて、得られたタンパクは Cas9 であると判断した。さらに、TEV プロテアーゼで融

合タンパクが正確に消化できていることを確認できた (Fig.24)。

6. 組換えタンパクの収量について 大腸菌の培養 80 ml からスタートして、陽イオン交換カラムによる精製が終了した時点で 220 µg 得ることができた。今後は、これを用いて、タンパク消化試験や抗体作製を行う予定である。

#### D. 考察

技術的な考察や規制に対する考え方が、現在各国で議論がされている (EU の JRC や FSANZ は報告書をまとめている)。次世代組換え技術 (海外では NBT; new plant breeding technique として議論) には、以下のものが存在する。

1. Cisgenesis and intragenesis
2. RNA-virus mediated silencing
3. GM rootstock grafting
4. ZFN, TALEN, CRISPR (ODM も含める)
5. Reverse breeding

その中で、cisgenesis&transgenesis は、微生物の場合とはちがい動物および植物では GM と扱うこと、reverse breeding や SPT は、後代に組換えに関連する遺伝子やその一部が残っていないことを精査されていれば nonGM (selection や遺伝子分離の方法や結果がきちんとされていることが前提)、GM rootstock grafting は、GM 台木と nonGM 穂木からなる植物体は一つの個体として機能するが、人工的な配列を植物に含むために、GM として扱うことになり、nonGM 穂木になる種子は nonGM であるが、一方、実 (果実) は台木からの遺伝

子組換え由来の RNA やタンパク質がないことの証明の程度により判断する、または GM とするということは概ね各国で一致しているように考えられる。一方、ZFN、TALEN や CRISPR を用いた時の小さな欠失、数塩基の置換は、nonGM とする考え方に向いているように思われるが、標的部位で小さな変異しか入っていないことを証明しても、off-target サイトの大きな変異 (数百塩基欠失) のないことを、だれが、どの段階でどのように証明するか、ミスマッチ塩基数の増加とともに指数関数的に増加する off-target 部位から安全性に関わる変異をどのように見つけるか、あるいは、プロダクトベースの考え方で最終産物の化学的同等性が野生型と変化なければよいとするのか。現在の遺伝子組換え食品の安全性評価の考え方からすると、欠失があった場合に、その欠失に伴い機能している内在性遺伝子が破壊または影響されておらず、その他の安全性に関わる成分等も野生型と変化がなければ問題ないとなる。言い換えると、大きな欠失であっても、トランスポゾンの残骸などの機能していない遺伝子領域であれば問題ないということになる。変異の場所の特定が重要である。その他、今後議論すべき点は少なくないことから、各国と状況を参考に、または協調しながら進める必要がある。

#### E. 結論

次世代遺伝子組換え技術を用いた食品の安全性に関して、技術的には TALEN、CRISPR が中心なると考えられる。ただし、この技術を用いて行われた変異導入の程度や意図しない領域での改変は、対象生物にも大きく依存するために、各国とも個別に判断することになる。その他の、cisgenesis, GM rootstock grafting

なども、概ね判断の方向は統一されつつあるように思われるが、事例が少ない間は個別のケースバイケースで判断されると考えられる。次世代技術の開発は、アメリカの他に中国がかなり力を入れて行っており、今後の動向を継続して調査する必要がある。

## F. 文献

1. Fyodor D, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Review Genetics*, 11, 636 (2010)
2. Vikram P, et al. Revealing off-target cleavages specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. *Nature Methods*, 8, 765 (2011).
3. Kim H and Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Review Genetics*, advanced online (doi:10.1038/nrg3686, (2014).
4. Guilinger JP, et al. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature Methods*, 11, 429 (2014).
5. Nishimatsu H, et al. Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156, 1 (2014).
6. Hsu PD, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 31, 827 (2013).
7. Wang T, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, 343, 80 (2014).
8. Fu Y, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31, 822 (2013).
9. Pattanayak V, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 31, 839 (2013).
10. Fu Y, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32, 279 (2014).
11. Ran FA, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154, 1380 (2013).
12. Tsai SQ, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2908 (2014).
13. Guilinger JP, et al. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2909 (2014).
14. Jiang W, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acid Res*, 41 e188 (2013).
15. Liang Z, et al. Targeted Mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR system. *J. Genetics and Genomics*, 41 63 (2014).
16. Yamagishi N, et al. Reduced generation time of apple seedling to within a year by mean of a plants virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnology J.*, 12, 60 (2014).
17. Dunoyer P, et al. Small RNA duplex function as mobile silencing signals

- between plant cells. *Science*, 328 912 (2010).
18. Bai S et al. A mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. *J. Experimental Botany* 62, 4561 (2011).
  19. Kasai A, et al. Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *Plos One*, 8, e57736 (2013).
  20. Lusser M, et al. New plant breeding technologies: State-of the art and prospects for commercial development. JRC Reference Reports EUR24860EN (2011).
  21. Lusser M, et al. Comparative regulatory approaches for new plant breeding techniques. JRC Scientific and Technical Reports EUR25237EN (2012).
  22. Heat B. Europe should rethink its stance on GM crop. *Nature*, 498, 409 (2013).
  23. Kuscu C et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2916 (2014).
  24. Shan Q, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR/Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, 686 (2013).
  25. Li FJ, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31, 688 (2013).
  26. Feng Z, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23, 1229 (2013).
  27. Hai T et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 24, 372 (2013).
- G. 研究発表  
論文発表
1. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
  2. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
  3. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
  4. Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60, 283-288, 2013
  5. Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi,



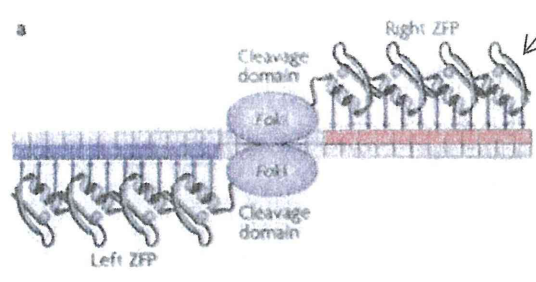
- Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136, 895-901, 2013
6. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.
  7. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
  8. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya. *Journal of AOAC International*, 96, 1054-1058, 2013.
  9. Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 32, 728-735, 2013.
  10. Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, 2012
  11. Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
- 学会発表
1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013年11月.
  2. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. *Pharma-nutrition 2013*, Singapore, 2013年4月.
  3. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメの場合)、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
  4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知

- 法の試験室間共同試験による妥当性確認、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
5. 野口秋雄、穂山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
  6. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美: ダイレクトリアルタイム PCR による食品分析の可能性検証、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  7. 野口秋雄、坂田こずえ 真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  8. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  9. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高畠令王奈、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  10. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上(西巻)知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  11. 近藤一成、中村公亮 野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  12. 坂田こずえ、小櫃冴未、中村公亮、小林友子、野口秋雄、福田のぞみ、最上(西巻)知子、手島玲子、近藤一成: クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法(第2報): 加熱、消化処理サンプルへの適用、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  13. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹: シリカモノリスペースによる複雑系穀物マトリックスから DNA の抽出・精製、第106回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
  14. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
  15. 中村公亮、穂山浩、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
  16. 中村公亮、穂山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化

17. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：デジタルPCRを利用した遺伝子組換え農産物の高精度定量、日本食品衛生学会第105回大会、東京、2013年5月。

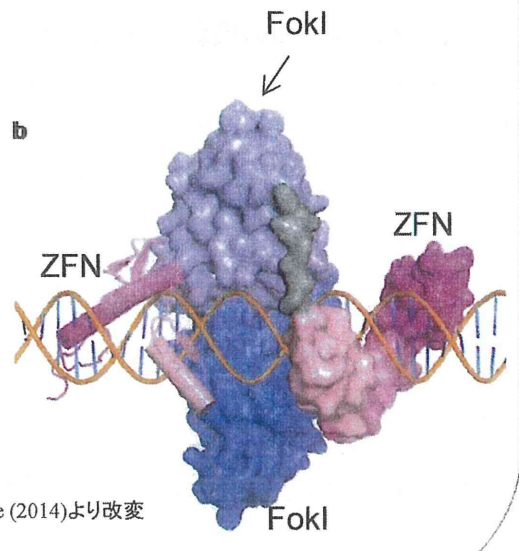
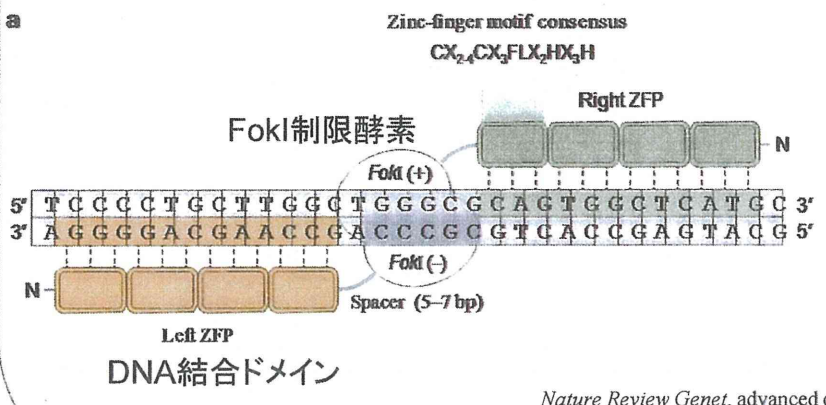
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



1つのZinc finger  
 によって、この場合片側  
 4つのZinc fingerから  
 なっている。  
 片側12bp,両側合計24bp  
 でDNAを認識している。

Nature Review Genet, 11, 636 (2010)より



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

Fig.1 Structure of ZFN

CCR5-224		VF2468	
# of mutations	# of sites in genome	# of mutations	# of sites in genome
0	1	0	1
1	0	1	3
2	1	2	245
3	6	3	3,201
4	99	4	35,995
5	964	5	316,213
6	9,671	6	2,025,878
7	65,449		
8	372,801		
9	1,854,317		

Fig.2 Potential genomic target sites  
 Nature Methods, 8, 765 (2011)より