

組換えウシ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1.	α-ラクトアルブミン、ラクトフェリン、リゾチーム	トランスジェニックウシの牛乳の成分を調べた	中国	-		1	
	ヒトラクトフェリン	鉄貧血を起こしたラットにトランスジェニックウシの牛乳を飲ませた	中国	-		2	
	ヒトラクトフェリン	鉄を結合させたヒトラクトフェリンをトランスジェニックウシの牛乳から調製して、鉄貧血を起こしたラットに与えた	中国	体細胞核移植		3	
	ヒトラクトフェリン	GMウシの牛乳を新生児ブタに飲ませて腸内細菌叢を調べた	中国	-		4	
	2.	ラクトフェリン、インターフェロンα	線維芽細胞に導入。細胞は乳腺炎と口蹄疫に耐性	中国	トランスフェクション	細胞の実験	5
		口蹄疫ウイルスの遺伝子に対するshRNA	口蹄疫に耐性のウシを作ることを目指す	中国	体細胞核移植		6
		ウシウイルス性下痢のウイルスに対するshRNA	ウイルスの複製を抑制することを目的とする	中国	トランスフォーメーション	細胞の実験	7
		β-ディフェンシン3	乳腺において発現させた	中国	体細胞核移植		8
		lysostaphin	ぶどう球菌の感染からウシを守ることを目指す	中国	-		9
		インテグリンavサブユニット、ノックアウト	口蹄疫の感染効率が低下した	中国	体細胞核移植		10
		インテグリンb6サブユニット、ダブルノックアウト	口蹄疫に耐性になった	中国	体細胞核移植		11
		ウシラクトフェリン、ヒトインターフェロンα	インターフェロンαの発現を検出した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	12
		Ipri	ウシ型結核菌に耐性になった	中国	体細胞核移植		13
		FMDVに由来するカプシドをコードする領域	アデノウイルスベクターの性質を調べた	米国	アデノウイルス		14
	3.	線虫Fat1	不飽和脂肪酸の含量が増えた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	15
		線虫mfat-1	組織と牛乳中で不飽和脂肪酸が大きく増えた	中国	-		16
		線虫fat-1	ゲノムに組み込まれ、タンパクが発現する胚を作った	中国	-		17
	4.	ミオスタチン遺伝子にフレームシフトを導入	肉の量を増やす、質を良くすることを目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	18
		ミオスタチン遺伝子に対するshRNA	筋肉の量を増加させることを目指す	米国	体細胞核移植		19
	5.	ミオスタチン遺伝子に対するmiRNA	筋肉量が2倍になった	中国	体細胞核移植		20
		ヒトラクトフェリン、ヒトラクトアルブミンα	GM製品から外来遺伝子を検出できた	中国	-		21
		β-ラクトグロブリンに対するmiRNA	β-ラクトグロブリンの発現を抑制した	ニュージーランド	-		22
		プリオン	ウシ細胞で発現させた。狂牛病にならないウシの開発を目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	23
		リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		24
		ヒトラランスフェリン	導入遺伝子が染色体に導入されたことをFISH法で検出した	中国	-		25
		線虫Fat1	3通りにコドン最適化して異なる触媒効率が得られた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	26
		プリオン遺伝子に対するshRNA	プリオンの発現を抑制した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	27
		ヒトα-ラクトアルブミン	血液学的、血清の生化学的指標は正常の範囲内だった	中国	-		28
		ヒトコラーゲンcDNA	胚は外来遺伝子を含んでいる	中国	体細胞核移植		29
	ヒトラクトフェリン	導入遺伝子を蛍光定量PCRで検出する方法を作成した	中国	-		30	
	ヒトラクトフェリン	導入遺伝子を次世代シーケンサーで調べた	中国	-		31	
	プリオン遺伝子に対するshRNA	mRNA、タンパクの発現を抑制した。	中国	トランスフェクション	細胞の実験	32	
カテゴリー							
1. 牛乳に抗菌性タンパクを含ませる		2. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		3. 不飽和脂肪酸を作らせる			
4. 筋肉の量を増やす		5. その他					
食用トランスジェニックウシ(2012年)							

組換えヤギ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
1.	ヒトラクトフェリン	マーカ-1つ、2つで出生率などに差がなかった	中国	体細胞核移植		1
	ヒトリゾチーム	高濃度のリゾチームを含むヤギミルクは腸細胞の損傷の修復を促進した	ブラジル	-		2
	ヒトラクトフェリン	子孫の生殖能力、導入遺伝子発現の安定性に問題なかった	中国	-		3
	β-ラクトグロブリンに対するshRNA	線維芽細胞中でβ-ラクトグロブリンの発現を抑制した	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	4
	ヒトラクトフェリン	泌乳サイクルの期間すべてで安定に発現した	中国	-		5
	ヒトリゾチーム	ミルクを子豚に飲ませると糞便中の微生物が変わった	米国	-		6
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカ-を使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		7
	リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		8
	ヒトリゾチーム	GM胚盤胞を作った	中国	体細胞核移植		9
	ヤギリパーゼ	F1において導入遺伝子が発現した	中国	精巢注入		10
	ヒトラクトフェリン	GM個体作成のためのドナー細胞の調製法と受容側の卵母細胞供給源の効果を調べた	中国	体細胞核移植		11
	ヒトラクトフェリン	組換えタンパクは天然のものと物理、化学的性質が同じだった	ロシア、ベラルーシ	-		12
	ヒトラクトフェリン	ミルク中の組換えタンパクの量を経時的に調べた	ベラルーシ	-		13
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカ-を使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		14
	ヤギ成長ホルモン	乳腺特異的な発現ベクターを作成した。ミルクの増産を目指す	中国	-		15
	ヒトラクトフェリン	生殖機能に影響はなく、導入遺伝子は次世代に伝達して安定に発現した	中国	-		16
	2.	fat-1	脂肪組織で特異的に発現させるベクターを作り、線維芽細胞に導入した	中国	トランスフェクション	細胞の実験
ミオスタチン遺伝子に点突然変異を導入		ミオスタチンタンパクの発現量が減少した	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	18
3.	インテグリンb6サブユニット遺伝子ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロインジェクション		19
	Toll-like receptor 2	個体に侵入したバクテリアの除去が促進された	中国	マイクロインジェクション		20
1. ミルクの改良 2. 肉の改良 3. その他						
食用トランスジェニックヤギ(2012年)						

Fig.23-1 遺伝子組換え動物の開発動向調査(2012)

組換えブタ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	SIGLEC1遺伝子不活性化、CD163遺伝子不活性化	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスに耐性のブタの作成を目指す	米国	-		1	
	O型口蹄疫ウイルスの遺伝子に対するshRNA	トランスジェニックブタの線維芽細胞はウイルスを阻害した	中国	-		2	
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対するshRNA	細胞においてウイルスの複製を阻害した	中国	トランスフォーメーション	細胞の実験	3	
	PBD-2	広い抗菌活性を持つ可能性がある	中国	体細胞核移植		4	
	インテグリンb6サブユニット遺伝子ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロインジェクション		5	
	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの遺伝子に対するshRNA	この疾患に耐性だった	中国	体細胞核移植		6	
	IFITM3	ウイルス性疾患に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		7	
	FUT1遺伝子に対するshRNA	腸管毒素原性大腸菌F18に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		8	
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対するsiRNA	siRNAの発現を検出した	中国	-	細胞の実験	9	
	口蹄疫ウイルスに対するScFv	導入遺伝子を持つ細胞を選別した	中国	レトロウイルス	細胞の実験	10	
	2	sFat-1	導入遺伝子がF1からF2へ伝わった	中国	-		11
		ブタ成長ホルモン	F1において野生型よりも成長ホルモンの発現が多かった	中国	-		12
		ヒトリゾチーム	糞、周辺の土壌、胃腸の微生物相を調べた	中国	-		13
		線虫Fat-1	筋肉と主要な組織でn-6/n-3比が下がった	中国	体細胞核移植		14
		ブタ成長ホルモン	Tet-Onシステムを利用してコンディショナルに発現させた	中国	-	細胞の実験	15
		ブタ成長ホルモン	導入遺伝子が次世代に伝わった	中国	ナノ遺伝子キャリアー法		16
カテゴリー							
1. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		2. その他					
	食用トランスジェニックブタ(2012年)						

組換えヒツジ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ミオスタチン、そのRNAi	線維芽細胞でのミオスタチン遺伝子の発現を調べた	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	1
線虫fat-1	CMVプロモーターを用いたときはサイレンシングを受け、高度なメチル化によるかもしれない	中国	体細胞核移植		2
ミオスタチンに対するshRNA	ミオスタチン遺伝子の発現が抑制された	中国	体細胞核移植		3
ミオスタチンに対するsiRNA	ミオスタチンの発現を抑制した。GM桑実胚を作った。	中国	体細胞核移植		4
ミオスタチンに対するshRNA	筋芽細胞の分化におけるミオスタチンの役割を調べた	中国	-		5
食用トランスジェニックヒツジ(2012年)					

組換えウサギ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ヒトfucosyltransferase 1	乳の分泌期間が短くなった	米国	-		1

Fig.23 遺伝子組換え動物の開発動向調査(2012)

組換え魚

カテゴリー	魚の種類	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
1	アマゴ	ベニザケ成長ホルモン1	肝において脂肪酸の組成と量が変った	日本	-		1
	コイ	成長ホルモン	ラットに食べさせて亜慢性毒性は現れなかった	中国	-		2
	サケ	成長ホルモン	酸化的ストレスを調べた	スウェーデン	-		3
	ドジョウ	ドジョウ成長ホルモン	トジョウレクチンプロモーターを使って成長速度を抑制した	韓国	-		4
	コイ	コイ成長ホルモン	大きくなった	韓国	-		5
	サケ	サケ成長ホルモン	プロモーターと魚の系統によって成長が異なった	カナダ	-		6
	コイ	成長ホルモン	子孫の間で成長にばらつきがあった	中国	-		7
	サケ	成長ホルモン	ウン成長ホルモンを投与して成長と内分泌効果を調べた	カナダ	-		8
	不明	コイインシュリン様成長因子2b	高い生存率を持った	中国	マイクロインジェクション		9
	サケ	成長ホルモン?	脳の大きさと構造を調べた	スウェーデン	-		10
	アマゴ	成長ホルモン1	脳下垂体のiTRAQプロテオーム解析を行った	日本	-		11
	ニジマス	ミオスタチンノックアウト、ミオスタチン阻害剤	運動の成長への効果を調べた	米国	-		12
	サケ、マス、 ティラピア	成長ホルモン	Aqua Bounty社のサケはFDAの審査を受けている	米国	-		13
	サケ	成長ホルモン	早熟性の雄の成熟が減少する	カナダ	-		14
	2	サケ	抗凍結タンパク	凍結に耐性のサケを作ることを試みた	カナダ	-	
カテゴリー							
1. 体を大きくする	2. その他						
		食用トランスジェニック魚 (2012年)					

組換えエビ・カニ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
white spot syndrome virus env gene (VP28, VP19)、これらの融合遺伝子	トランスジェニック藻は魚、エビ、カニなどに用いる 予防薬、治療薬、餌、添加物に使える	中国	トランスダクション		1
食用トランスジェニックエビ、カニ (2012年)					

導入遺伝子の説明

1) ラクトフェリン

母乳・涙・汗・唾液などの外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパク質である。ラクトフェリンは、強力な抗菌活性を持つことが知られている。鉄を奪い去ることで、細菌の増殖を抑制する。また、グラム陰性菌の細胞膜の主要な構成成分であるリポポリサッカライドと結合することで、細胞膜構造を脆弱化し、抗菌活性を示す。さらに、免疫系に対する効果があることが知られている。

2) ラクトフェリシン

ラクトフェリンをペプシンで分解した部分ペプチドである。細菌の細胞壁に障害を与えることでラクトフェリンよりも10倍以上強力な抗菌活性を示す。

3) ラクトアルブミン

乳に含まれ、乳清から得られるアルブミンである。ラクトアルブミンは、多くの哺乳類の乳に含まれる。

4) リゾチーム

真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素である。ヒトの場合涙や鼻汁、母乳などに含まれている。

5) ミオスタチン

筋肉成長を抑制する因子である。

6) fat-1

ω -3-脂肪酸サチュラーゼという酵素を作り、 ω -6-脂肪酸を ω -3-脂肪酸に変える。動物では不飽和脂肪酸を体内で合成できる量だけでは必要量を満たすことができず、摂取する必要がある。不飽和脂肪酸は主に植物や魚に含有されるが、人の食事では十分に摂取できていないケースがあると考えられている。動物の体内で少量作られる ω -6-脂肪酸を ω -3-脂肪酸に変えて、人が肉を食したときに ω -3-脂肪酸を摂取することを可能にするためにGM動物が作成されている例がある。

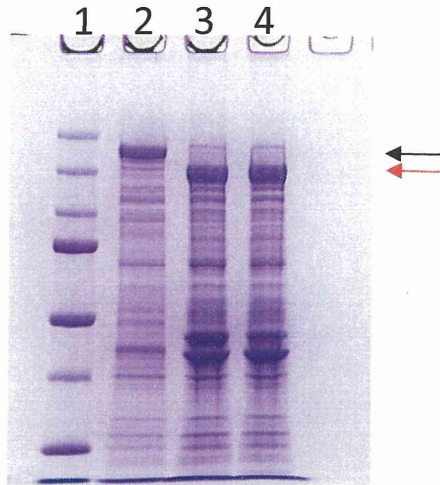
Fig.23-3 遺伝子組換え動物の開発動向調査(2012)

次世代遺伝子組換え技術を用いた GM 動物

1. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* (2011) 21 (11) 1638-1640
2. Dong Z, Ge J, Li K, Xu Z, Liang D, Li J, Li J, Jia W, Li Y, Dong X, Cao S, Wang X, Pan J, Zhao Q. Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases. *PLoS One* (2011) 6 (12) e28897
3. + He, Hongbin; Wu, Jianming; Wang, Hongmei; Liu, Xiao; Liu, Wenhao; Fang, Yongzhi; Zhong, Jifeng. Method for knocking out bovine integrin $\beta 6$ subunit gene with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102660577 A 20120912.
4. Liu, Xu; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Chang, Bohao; Liu, Jun; Guo, Zekun; Quan, Fusheng; Zhang, Yong . Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows . *Nature Communications* (2013), 4, 3565, 11 pp
5. Liu, Xu; Zhang, Yong; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Quan, Fusheng. A kind of targeting vector for site-directed integration of Lys gene in β -casein locus and its constructed cell. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103215295 A 20130724.
6. Li, Rongfeng; Li, Xueling; Zhao, Yuhang; Yun, Ting; Liang, Hao. Method for rapidly knocking out myostatin gene and integrating exogenous gene at specific site with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103088046 A 20130508.
7. Liu, Mingjun; Zhang, Xuemei; Li, Wenrong; Zhang, Ning; He, Sangang; Liu, Chenxi; Ma, Yila. Method for knocking out ovine myostatin gene with zinc finger nuclease. *Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103290045 A 20130911.
8. Yu, Shengli; Luo, Junjie; Ding, Fangrong; Li, Song; Tang, Bo; Li, Ning. Method for knocking out bovine myostatin gene with zinc finger nucleases. *Faming Zhuanli Shenqing* (2011), CN 102260711 A 20111130.

Fig.23-4 次世代遺伝子組換え技術を用いて作製されGM動物に関する論文

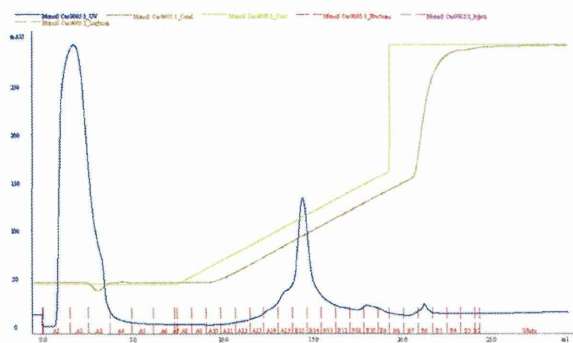
ProTEV PlusによるSpCas9-MBP-His₆の消化



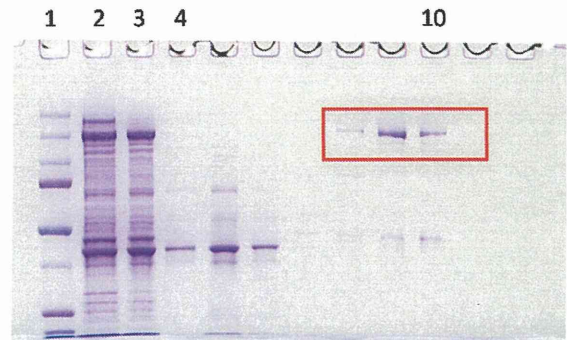
キレートカラムのフラクションを2つに分けて、ProTEV Plusの使用量を変えて消化

- レーン1: 分子量マーカー
- レーン2: 消化前
- レーン3: ProTEV Plus, 750 u
- レーン4: ProTEV Plus, 250 u

Mono Sによる精製

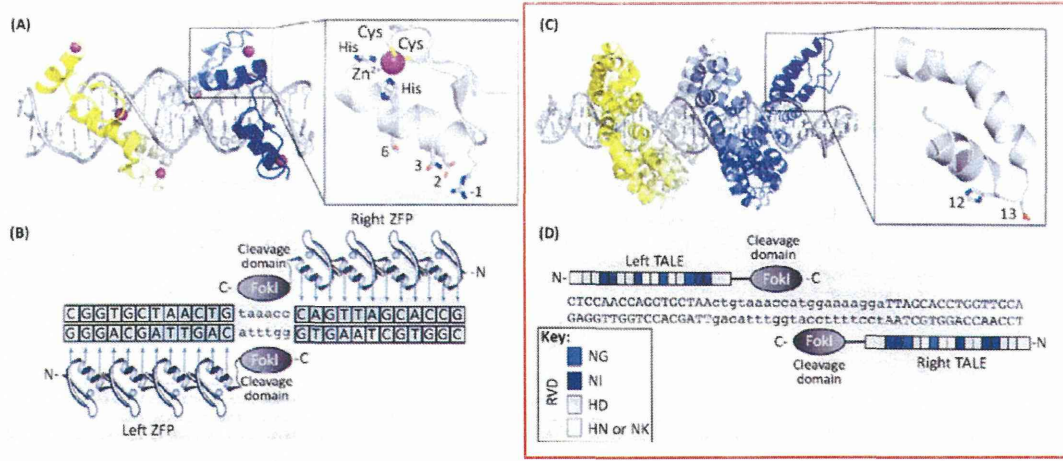


バッファーA: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10%グリセロール; pH 7.5
 バッファーB: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10%グリセロール, 1 M KCl; pH 7.5
 グラジエントは15-55%Bを緩やかにした。

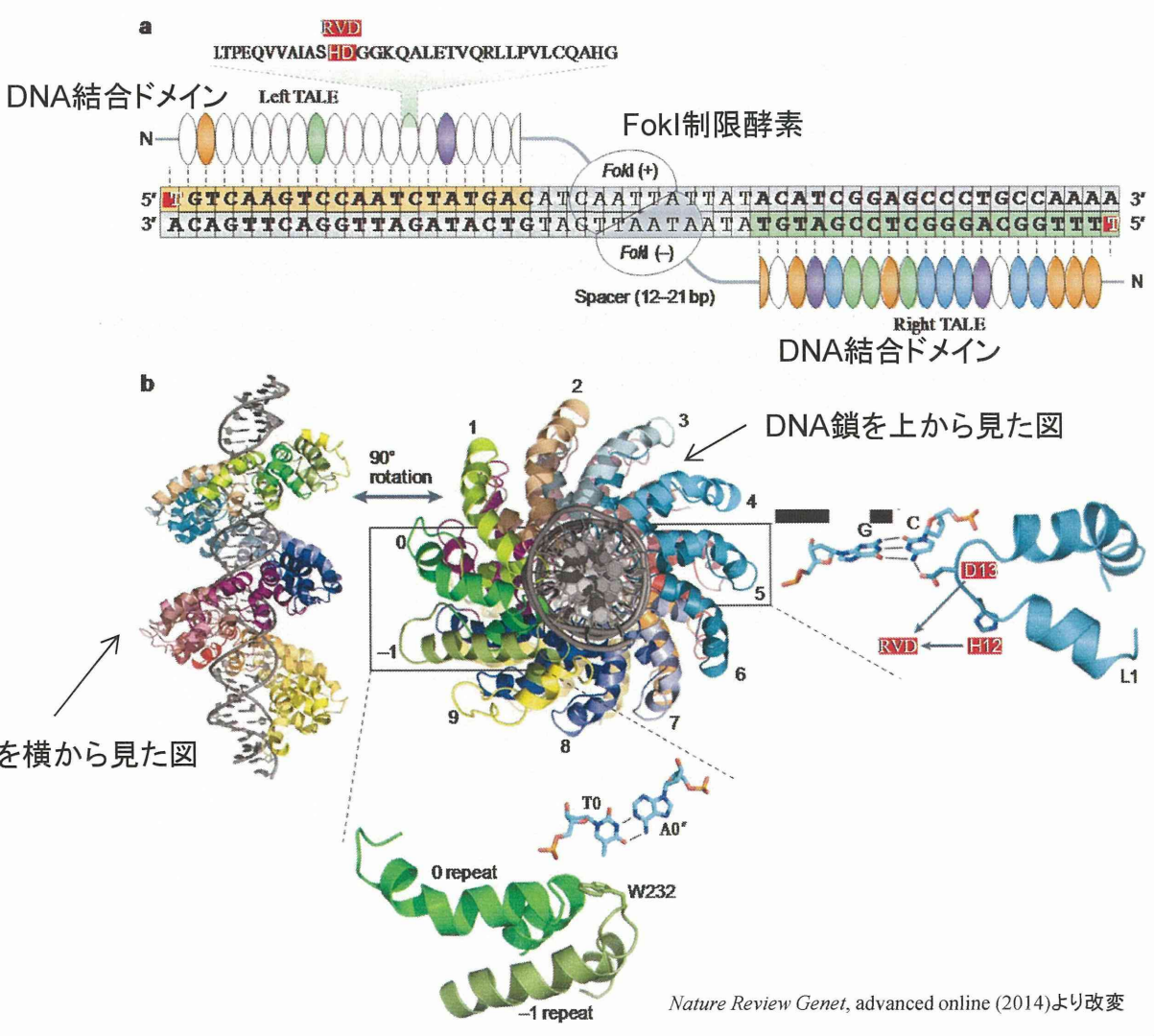


- レーン1: 分子量マーカー
- レーン2: ProTEV Plus消化途中
- レーン3: 消化後、カラム前
- レーン4-10: カラムのフラクション

Fig.24 human-condon optimized SpCas9: 発現と精製



Trends in Biotechnology 31, 397 (2013)より (right panel)



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

Fig.3 Structure of TALEN

Mutations in site	Off-target sites to CCR5A	Statistically expected
0	1	1
1	0	0.0
2	0	0.0
3	0	0.0
4	0	0.0
5	0	0.0
6	0	0.0
7	0	0.3
8	8	3.6
9	7	34.1
	0	
10	634	275.9
11	4338	1956.3
12	27114	12226.7
13	149005	67716.9
14	648230	333747.3
15	2657598	1468488.3
16	9783617	5782172.6

Fig.4 Potential genomic off-target sites related to *CCR5A* on-target site
(片側18bp、両側36bp TALEN使用)
Nature Methods, 11, 429 (2014)より

Cellular modification induced by TALENs at on-target and predicted off-target genomic sites

site	no tAlen (%)	CCR5A eI/KK	CCR5A eId/KKr	CCR5A	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnCCR5A	<0.006	9.8	28	47	0 (on-target)
OffC-5	<0.006	0.53	2.3	2.3	11
OffC-15	<0.020	<0.014	0.23	0.043	
OffC-16	<0.006	<0.006	0.031	<0.006	
OffC-28	<0.009	0.014	0.16	0.056	
OffC-36	<0.006	<0.006	0.15	0.028	
OffC-38	<0.006	ND	ND	0.067	
OffC-49	<0.006	ND	ND	0.110	
OffC-69	<0.010	ND	ND	0.089	
OffC-76	<0.006	ND	ND	0.149	9

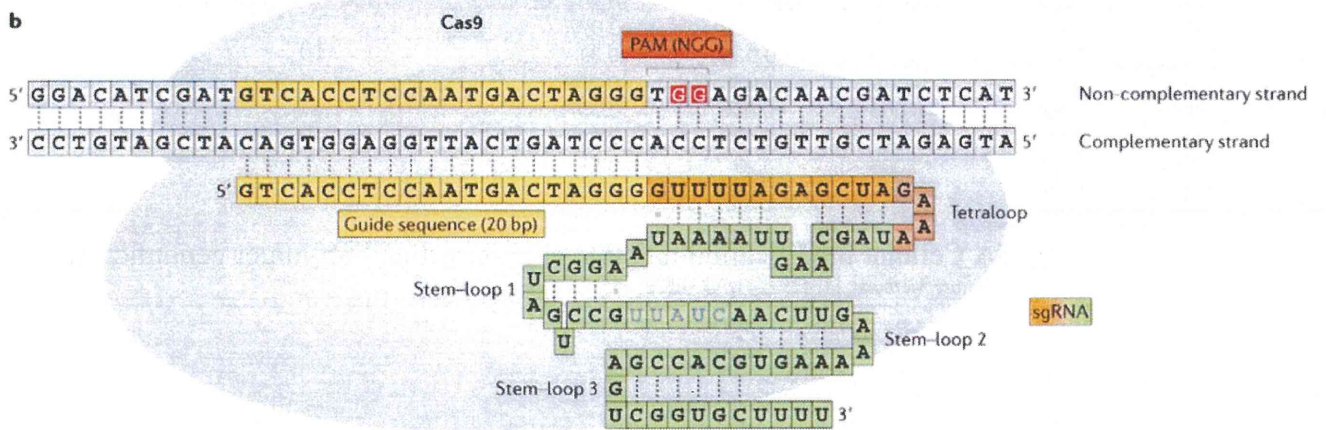
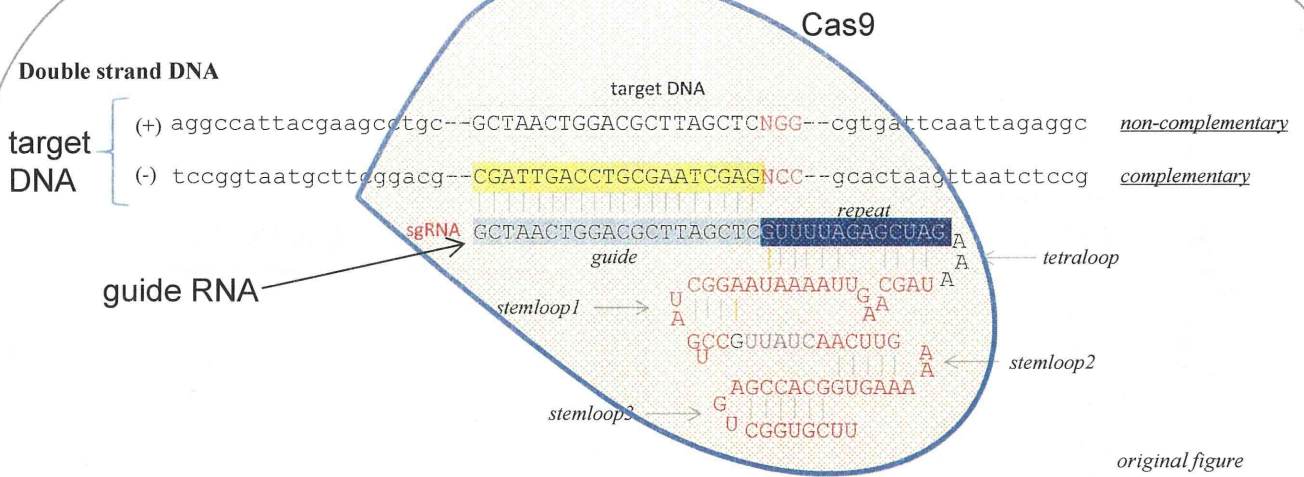
site	no tAlen (%)	ATM eI/KK	ATM eId/KKr	ATM	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnATM	0.007	6.8	16	18	0 (on-target)
OffA-1	<0.006	<0.006	0.026	0.077	
OffA-11	<0.006	<0.006	0.036	0.39	10
OffA-13	<0.006	0.008	0.025	<0.006	
OffA-16	<0.006	<0.006	<0.006	0.057	
OffA-17	<0.051	<0.14	<0.17	0.94	9
OffA-23	0.018	<0.006	0.29	0.23	
OffA-35	<0.006	<0.006	<0.006	0.070	

Fig.5A Cellular modification rate (%) at on-target and off-target genomic sites
Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変

CCR5A Site	Score	Mut.	Left half-site	Spacer length	Right half-site
OnCCR5A	0.008	0	TTCATTACACCTGCAGCT	18	AGTATCAATTCTGGAAGA
OffC-1	0.747	9	TaCATcACaTaTGCAaaT	29	tGTATCAtTTCTGGgAGA
OffC-2	0.747	9	TaCATcACaTaTGCAaaT	29	tGTATCAtTTCTGGgAGA
OffC-3	0.747	9	TaCATcACaTaTGCAaaT	29	tGTATCAtTTCTGGgAGA
OffC-4	0.747	11	TcCATaACACaTctttCT	10	tGcATCAtTcCTGGAAGA
★ OffC-5	0.804	11	TcCAaTACctCTGcCaCa	14	AGgAgCAAcTCTGGgAGA
OffC-6	0.818	10	TTCaGTcCaTCTGaAaac	16	gGTATCAtTTCTGGAgAGA
OffC-7	0.834	14	TaCAaaACcCtTGcCaAaa	27	taTATCAATTtgGGgAGA
OffC-8	0.837	12	TcCAagACACCTGcTtac	26	tcTATCAATTtgGGgAGA
OffC-9	0.874	10	TTCATaACaTCTtaAaaT	27	AaTAcCAAcTCTGGAtGA
OffC-10	0.89	12	TcCAaaACaTCTGaAaaT	25	tGgATCAAAtTgGGAAGA

Fig.5B Predicted off-target sites
 (2.3%で変異導入が検出されたoff-targetサイトOffC-5でのミスマッチ塩基(小文字))

Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変



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

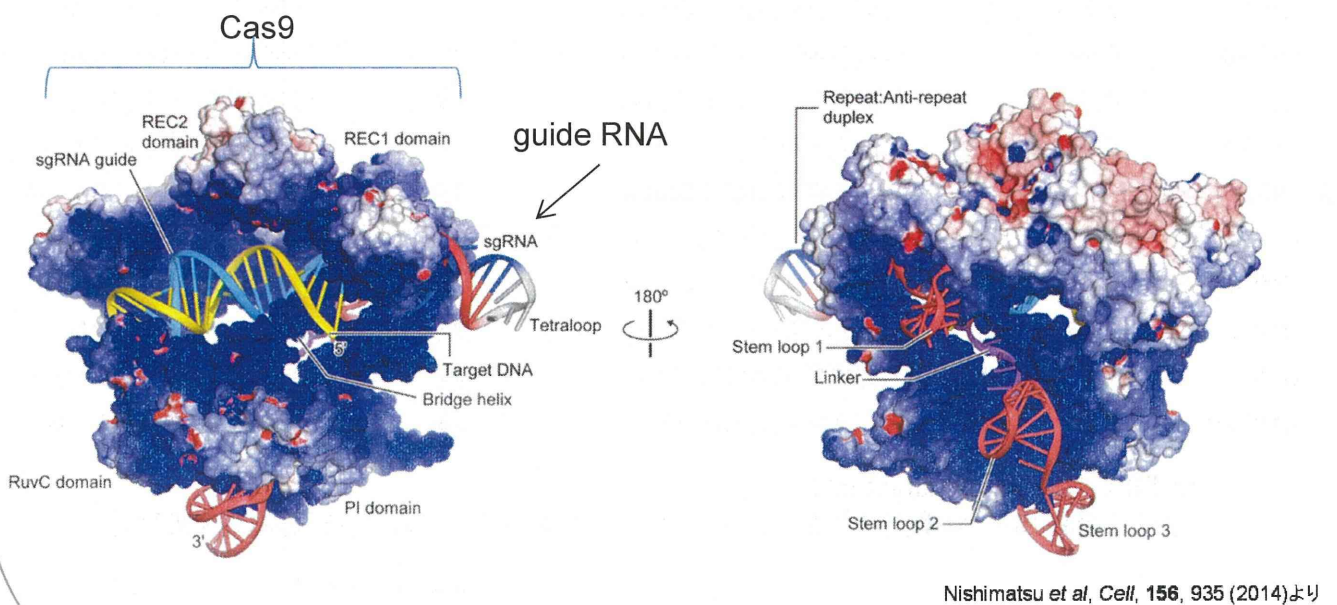
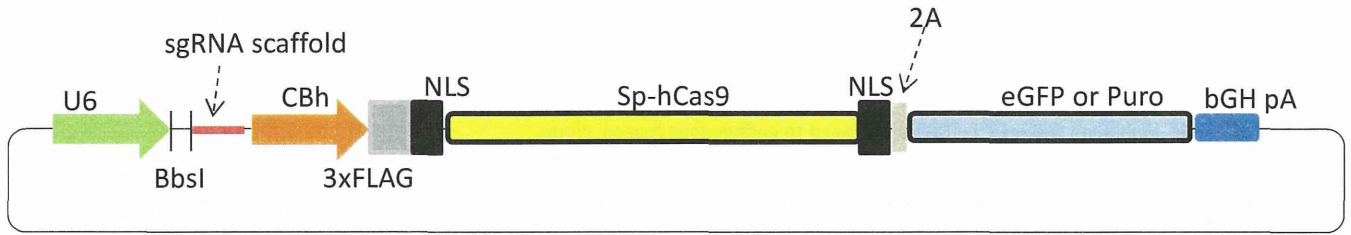


Fig.6 Structure of CRISPR/Cas9 system

for mammalian expression



for plant expression

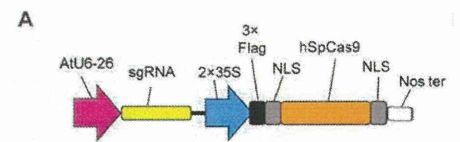
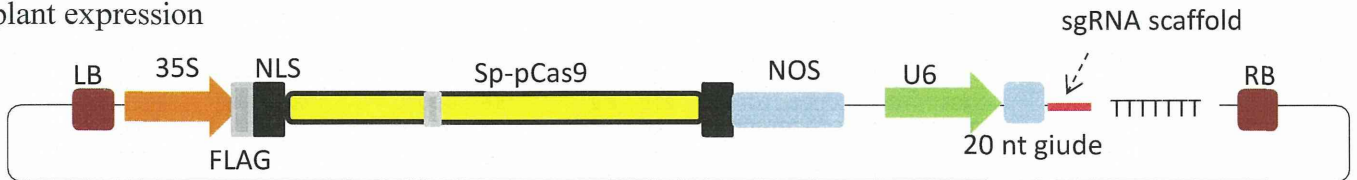
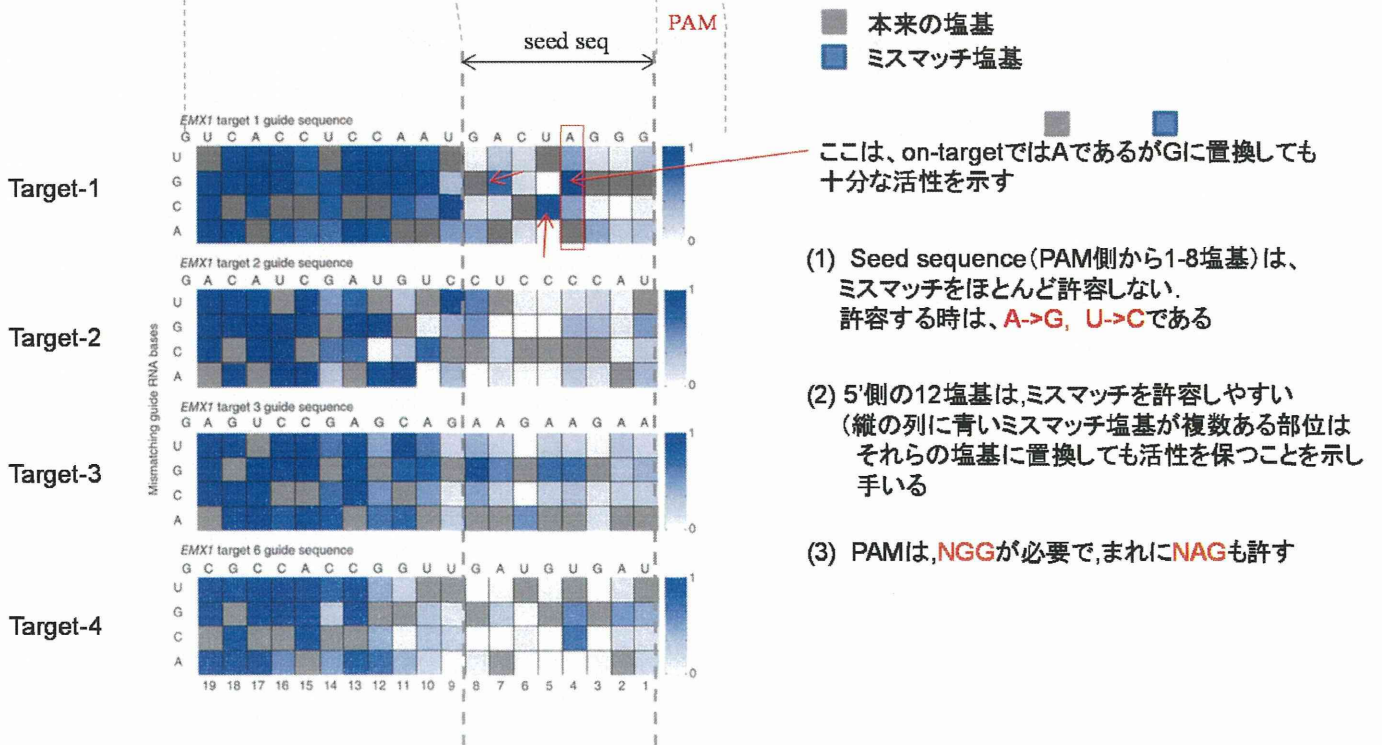


Fig.7 CRISPR/Cas plasmids for mammalian and plant

1塩基ずつmismatchを入れて、活性を比較

5' --GCTAACTGGACGCTTAGCTC NGG--3'



Hsu et al, Nat Biotech, 31, 827 (2013)より改変

Fig.8 Single-nucleotide specificity of Cas9