

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」
総括研究報告書

研究代表者	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
研究分担者	山本 卓	広島大学大学院理学研究科
研究分担者	吉松嘉代	医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
研究分担者	中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部

近年の遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、遺伝子組換え技術の痕跡がゲノム DNA 上に残らない手法が登場してきた。植物 RNA ウイルスを用いた開花促進遺伝子導入により品種改良の大幅な期間短縮を目的とした方法、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 技術を用いた任意の標的配列に対するゲノム改変など進んでいる。これらの遺伝子組換え技術の痕跡が残らないと考えられてものの、技術的にはようやく確立されたばかりであり、その特徴や宿主に起こり得る現象、さらに、off-target 効果などについては現在世界各国で精力的に研究されている。今後近い将来これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているものの、こうして作出された生物の取り扱いや GM 生物の規制の在り方、GM 生物として申請がされた場合の検討項目、さらに、検知の可能性や検知可能な場合のその方法に関する検討がなされておらず、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様々な生物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調査研究を行うとともに、作出された GM 食品の検知可能性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、植物や動物細胞レベルあるいは個体レベルで検討を行った。次世代遺伝子組換え技術の中で、TALEN や CRISPR/Cas は用いるシステムにより特性が異なるが、本研究では、TALEN に関しては、標的配列に対して高効率で DNA 二本鎖切断活性を誘導できる手法として新たに Platinum TALEN システムを開発した。これを動物細胞やカエル胚に効率的に変異導入できることを示した。また、特定遺伝子座への外来遺伝子導入した時の周辺遺伝子発現に与える影響とゲノムの高次構造に関して研究を行い、一部の周辺遺伝子発現が変動することを示した。2013 年に登場した CRISPR/Cas も同様に用いるシステムにより変異導入効率や off-target 部位での切断活性が異なること、ZFN や TALEN に比べて off-target 切断が起きやすいことから、より特異的な方法として 2 つの CRISPR/Cas を用いる方法がある。これらを含めてその特性について調査研究を行った。ゲノムへアクセス性が、変異導入効率に大きく影響することが示された。世界各国での遺伝子組換え植物および動物の開発状況を調査し、中国が積極的に研究開発を行っている実態が明らかになった。次世代遺伝子組換え技術を用いたモデル植物の作出をイネを用いて行うために、標的遺伝子部位のコピー数など検討を行った。次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の各国の規制状況は、アメリカでは一部個別な判断が行われている事例が存在するものの、まだ調査検討段階である。開発状況は、ごく一部の国を除いてヨーロッパではアメリカや中国ほど精力的な研究開発が行われていない。この痕跡が残らないことが想定される次世代遺伝子組換え技術を用いた食品の混入防止のための監視には中国の動向が重要である。

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、リンゴRNAウイルスを用いた開花促進、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、遺伝子上の任意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可能性があることから、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。

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する。それらについて、安全で高効率な遺伝子改変技術を確立するとともに、それぞれの技術ごとに整理し、その原理や作用機構について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、意図しない領域での非特異的な改変（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、挿入に分けて整理し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/Casシステムを中心に、上記観点から調査研究を行った。そして、最近開発された食用遺伝子組換え生物の文献調査を行うとともに、各国の規制に対する考え方、アジア地域での開発状況についても調査した。また、これらの次世代組換え技術は一般にはNBT（New Plant Bleeding 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し、海外での開発状況や規制状況についても調査した。

B. 研究方法

今後組換え技術の中心となると考えられる、次世代組換え技術に関する研究について、分担研究者の山本卓らのグループは、TALENの安全で高効率でゲノムDNA上の標的部位でゲノム編集が可能なシステムとして、Platinum TALENの開発と評価を行った。近藤一成らのグループは、CRISPR/Cas9システムを培養細胞に用いてその特性を評価した。中村公亮らは、外来遺伝子を導入した時に起きる現象、例えば周辺遺伝子発現に与える影響など検討した。また、吉松嘉代らのグループは、植物を対象に（特

にイネを標的として)TALEN を用いた時の変異解析に取り掛かるとともに、次世代組換え技術を用いた植物の世界各国の開発状況について、および医薬品用途の遺伝子組換え植物の調査を行った。

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

(1) 文献情報に基づく人工ヌクレアーゼの特異性

手法と off-target(標的外塩基配列への影響) に関する論文を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) TALEN および 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についての実験には、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 : 目的遺伝子周辺領域に複数の標的塩基配列の DNA 二本鎖切断を目的に必要なプラスミドを作製した。細胞回収後に標的部位の改変の有無とそのパターン、頻度を調べた。標的遺伝子として *AIFM1* exon3 を中心に検討を行った。

(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 ウィ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) の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、精製は参考文献記載の方法に基づいて行った。大腸菌には pMJ806 を用い、精製は、キレートカラムおよび陽イオン交換カラムで行った。

2. Platinum TALEN の開発と応用

(1) 高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

広く利用されている Golden Gate 法で作製された TALEN (Golden TALE: ミネソタ大学 Voytas 博士が開発) の DNA 結合モジュールを改良した高活性型 TALEN の開発を行なった。TALEN の結合力を高める方法として、結合モジュールのアミノ酸配列に着目し、アミノ酸配列の改変を行なった。結合モジュールは 34 アミノ酸からなり、12 番目と 13 番目のアミノ酸は、塩基特異的な結合を担う多型配列 (RVD) として知られている。自然界の TALE のアミノ酸配列を調べたところ、この RVD 以

外に 4 番目と 32 番目のアミノ酸に多型のあることがわかった。そこで、この 4 番目と 32 番目の多型 (non-RVD variation) を利用した新しい TALEN の作製システムの確立を試み、培養細胞で評価した。

(2) Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体における効果を調べる目的で、アフリカツメガエルでの標的遺伝子破壊を行った。表現型を容易に観察できる色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊し、その効果を観察した。

3. 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究

(1) 培養細胞

ニワトリ細胞は、ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 及びニワトリ肝細胞 LMH を用いた。

(2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

ニワトリ 14 番染色体のグロビン遺伝子クラスターの非コード DNA 領域 (120,080,385 ~ 12,080,440) とした、TALEN によるゲノム改変を行った。外来遺伝子導入の影響を評価するために、AcGFP (*Aequorea coerulea* green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb のプラスミドを導入した。Cell アッセイ法、制限酵素 (HpyAV) 消化試験法、及び PCR 法により細胞をクローン化した。

(3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

遺伝子導入の標的配列から両側 100 kb 近傍に存在する遺伝子の発現測定には、RT-リアルタイム PCR 法を用いた。また、高次構造の解

析のために Chromosome conformation capture (3C) 解析を行った。

4. 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立

未知遺伝子組換え作物の迅速な解析と検知のために、次世代シーケンサーを用いた手法を検討した。モデル食品には、安全性未承認 GM パパイア PSRV-YK 系統の混入したパパイア茶から精製した DNA を使用、Illumina HiSeq でシーケンシング解析を行った。

5. GM 植物及び NBT 開発状況の調査

GM 植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲、土壌、水源、大気中の有害物質を高蓄積する GM 植物を環境浄化用 GM 植物の範囲、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産する GM 植物を工業用 GM 植物の範囲 (但し、食用作物のみ) とした。これら GM 植物及び NBT に関する情報を文献データベース (Scifinder®、検索語「transgenic plant」)、インターネット (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。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、診断薬・試薬、環境浄化、産業用及び NBT の 10 種類を設定した。

6. NBT 応用状況の文献調査

NBT の植物への応用例について文献調査を行った。遺伝子工学的手法を用い従来の遺伝子組換え法の代替法となると考えられる、ZFN、TALEN、CRISPR の 3 手法を対象を絞った。

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で ZFN については、ZFN、zinc finger、plant、TALEN については、TALEN(s)、TAL effector、plant、そして CRIPR については CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、をキーワードとして検索を行った。

検索結果から、まず、植物を対象として遺伝子編集を行った論文を抽出し、リスト化した。次に、残る検索結果から、植物以外を対象としたものなどを除き、NBT 各技術に関する基礎科学的な知見を記した論文や、総説等を合わせてリスト化した。また、上記の 2 リストについて、発表年別に集計し、グラフ化した。

7. NBT 応用モデル植物の作製基盤整備

NBT を植物へ応用し、モデルを作製することにより、今後の NBT 応用植物の検知法等の開発の基盤整備を行うためのアプローチ手法を計画した。

ケース 1. NBT 応用植物 (モデル) を作成する

ケース 2. NBT 応用植物を入手し、解析する

step 1. NBT 応用植物を入手する

step 2. 入手した NBT 応用植物を解析に利用する

まず、上記のケース 1 を実施するため、表現形質で NBT による遺伝子変異の導入の確認を容易にするため、マーカー遺伝子を従来法の遺伝子導入法で導入した組換え体イネを作出または入手する。作出または入手したマーカー遺伝子 (たとえば β -glucuronidase : GUS) を発現するイネ組換え体を材料として、マーカー遺伝子を破壊するモデル実験を行う。

ケース 2 の実施については、TALEN を適用したイネ遺伝子変異体のうち、TALEN コンストラクトが残存し機能するものを入手し、これを用いてカルス培養時に TALEN により生じる遺伝子変異の各種性状について情報の収集を行う。TALEN 応用植物について、国内の NBT の関連研究者らと情報交換、調整を進めている。

C. **研究結果、考察および結論**

(1) Off-target に関する調査

(a) zinc-finger nuclease (ZFN) について

DNA 結合ドメインは、真ん中のスパーサー 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。スパ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、 3×10^9 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。また、後述する TALEN 同様であるが、真ん中のスパ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、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* が切断に必要な二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。ZFN では 3 塩基以

内のミスマッチがゲノム上に内容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、利用は多くないと思われる。

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

ゲノム改変に用いる TALEN は、活性化ドメインを除き、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。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。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、遺伝子 *CCR5A* 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。しかしながら、TALEN を用いた場合、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 よりは高いと考えられる。

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/Cas9 は、細菌がもつ一種の免疫システムで、一般に用いられている Cas9 は *Streptococcus pyogenes* 由来のものである。CRISPR/Cas9 システムの最大の利点は、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 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。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、設計および作製が非常に難しい ZFN や、やや作製に時間と手間を要する 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、5'側の 12 塩基はミスマッチを許容しやすいことや、GC 含量が 45~65%程度のときに切断効率が高いこと、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。

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。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 二本鎖切断を起こすものはその一例である。ごく最近、ZFN や TALEN と同様に、左右に活性を欠失させた 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* 制限酵素から構成されるものが開発された。特異性が非常に高いことが期待される。

(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。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。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考えられる。

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。

(2) CRISPR/Cas9 による標的遺伝子配列 DNA 切断

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、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム改変を試みた。これまでの信頼できる重要な論文を参考に、問題点なども明らかにする目的で、ゲノムへのアクセス性がよくないと想定される遺伝子領域を選定して実験した。

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 領域ではないこと、細胞を用いた SSA アッセイでは設計した Platinum TALEN は高い細胞内プラスミド上での同配列切断活性を有していることから判断して、ゲノム DNA 上の標的部位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。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いる。次世代遺伝子組換え技術である TALEN、CRISPR/Cas9 は、ゲノム DNA 上の二本鎖切断誘導をするための手段である。このことと、対象細胞核内のゲノム DNA へのアクセス性と変異導入効率は、宿主側の問題である。したがって、ゲノム上のどの位置でも DNA 二本鎖切断を誘導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、本格的に普及するためにも宿主側での工夫が必要と考えられる。

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。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 2.9% とかなり低い結果であった。

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。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、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、中国などの国々が幅広く使い、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、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や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。

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^{20, 21)}。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
ZFN, TALEN, CRISPR (JRC の報告書には含まれていない), meganuclease
- 2 . cisgenesis and intragenesis
- 3 . breeding with transgenic inducer line
- 4 . grafting
- 5 . agro-infiltration
agro-infiltration, agro-infection,

floral dip

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。

また、プロセスベースの規制をしている 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、その方向で統一されることが望ましいと考える。

アメリカでは ZFN を用いて作製された個別に評価されているようである。

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、日本以外では中国が精力的に開発研究を行っている。

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。
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。パッケージングできなくなる。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った。
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 報あった。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を行った。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。

(5) 高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

今回、4 つのモジュールを連結する方法を採用し、この方法で non-RVD variation をもった TALEN (Platinum TALEN) の効率的な作製方法 (Platinum Gate TALEN construction system) を確立した。オリジナルの 10 モジ

ール法での成功率は 10%程度であったが、4 モジュールでの成功率は 100%であった。

ヒト *HPRT1* 遺伝子座を切断する Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイおよび Cell アッセイにより活性を評価したところ、これまでの TALEN に比べて、高い活性を示した。

(6) Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体での遺伝子破壊効果を調べるために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子(*tyr*)破壊を試みた。受精卵に Platinum *tyr* TALEN を顕微注入したところ、多くのカエル胚でアルビノとなることが示された。加えて、毒性も低下し、これまでの TALEN で見られたいいた奇形胚は、Platinum TALEN 導入胚ではほとんど見られなかった。RFLP 解析によって、ほぼ 100%で変異導入されていることが明らかになった。

(7) 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響を解析するため、ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の配列上に存在するグロビン遺伝子クラスターの グロビン遺伝子と グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に DSB するよう TALEN を設計した。DSB への相同組み換え HR は、ニワトリゲノムの DSB 標的配列から両側に約 800 bp の配列を利用して、targetting ベクターの設計を行った HR により作成した DT40 細胞株は限外希釈法によりクローン化し、PCR 法により、クローン 1 ~ 3 番を得た。DSB

標的配列周辺 (70 kb) のゲノム構造を解析するため、3C 解析を行い、CpGislet 配列は、

D グロビン遺伝子配列に結合しており、D グロビン遺伝子配列は A グロビン遺伝子配列と結合していることが示唆された。また、D グロビン遺伝子配列は、その上流に位置する MRE 及び 9DHS 遺伝子配列と結合していることが示された。DT40 細胞株と LMH 細胞株の同ゲノム領域の 3 次元構造は極めて類似しているものであることが示唆された。

DSB の 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子の発現量の差を、RT-リアルタイム PCR 法により定量した結果、DSB 挿入した両端に存在する D、及び MPG の遺伝子発現にて 10 ~ 100 倍上昇したことを確認した。

(8) 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立

PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精製した DNA、Illumina HiSeq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。その結果、PSRV-YK 系統の既知部分配列 120 bp にヒットするリードは一本も得られなかった。今後、未知遺伝子を含む組換え生物の解析に次世代シーケンサーを用いるには、さらに、解析手法の改良が必要であった。

(9) GM 植物及び NBT 開発状況の調査

国内の状況について、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で調査した結果、24 件の情報が得られ、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した。SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013 年に公表・出版された論文等を調査した結果、83 件が得られ、特に機能性食品、治療薬及び環境

浄化の件数が多かった。また、2013年の国別の件数は、中国：30件が最も多かった。

(10) NBT 応用状況の文献調査

NCBIPUBMED 各 NBT について検索し、検索結果について、基礎技術に関する論文や総説を除き、植物に NBT を適用した論文のみを抽出した。年度別の論文数推移について、全体の総数の推移と、植物への実施数のそれぞれをグラフ化した。

NBT 適用植物リストおよびグラフから、伺える NBT の利用動向は下記のとおりである。

ZFN の植物への応用について、キーワード：ZFN、zinc finger nuclease、plant で検索したところ、適用植物としてシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆の4種、12報の報告が認められた。ZFN の適用範囲はモデル植物が中心であり、応用例はマメ科にとどまっている。

TALEN の植物への応用について、キーワード：TALEN(s)、TAL effector、plant で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、トウモロコシ、*Brassica oleracea* (アブラナ科)、*Brachypodium* (イネ科、セルロースバイオマス増産研究のモデル植物として期待される)、大麦の7種、11報の報告が認められた。

CRISPR/Cas の植物への応用について、キーワード：CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、*Nicotiana benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケの8種、14報の報告が認められた。短期間に8種(ゼニゴケを含む)の植物に適用されていることは注目すべき点である。

研究が実施された国別でみると、NBT 研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループが活動する米国の報告数が多く、中国、とくに Chinese Academy of Sciences からの報告数が多い。今後、中国の動向については注意して見守る必要があると考えられる。

(11) NBT モデル植物作出のための基盤整備

NBT 文献調査の結果等をふまえ、本研究においては、まず TALEN を利用した遺伝子編集を実際に試行することとした。

NBT を適用したモデル植物を作成する上で、ホストとなる植物は、NBT による遺伝子破壊・変異の効果が目視等簡便な方法で確認できるように GUS 等のマーカー遺伝子を有していることが望ましい。

そこで、今年度は本研究の研究協力者である、東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章教授より、同教授らの作出した、GUS 遺伝子に *OsMacI* 遺伝子の 5'非翻訳領域を付加した、-glucuronidase (GUS)タンパク質を高効率に発現する UTRc::GUS rice (Ref.1)の種子の譲渡を受けた。

今後、UTRc::GUS rice をホストとして、本コンストラクト中の GUS 遺伝子を標的として TALEN のモジュールを設計し、二本鎖切断による変異導入の形態及び効率等の解析を計画している。

(12) (ケース 2) TALEN 応用植物の導入についての検討

農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターゲノム機能改変研究ユニット 土岐精一ユニット長より、TALEN を適用し、WAXY 遺伝子(イントロン)に変異を導入したイネ TALEN コンストラクトを有する組換え体について譲渡を受けることも検討している。

本組換え体については TALEN コンストラクトがゲノムに挿入されているため、カルスで培養を行った際の、培養期間、培養条件に応じた二本鎖切断 (Double Strand Break, DSB) の発現形態、頻度の解析に用いることができる見込みである。

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）。その中で、cisgenesis&transgenesisは、微生物の場合とはちがい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、GM rootstock graftingは、GM台木とnonGM穂木からなる植物体は、GMであり、nonGM穂木になる種子はnonGMであるが、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、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、今後議論すべき点は少なくない。今後も、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。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

各分担研究報告欄に記した。

F. 知的財産権の出願・登録状況

TALENの結合モジュール中の4番目と32番目の配列を改変することで、特異性の高いTALENの作製が可能であることを、特許出願した。

出願番号：特願2013-166768

「DNA結合ドメインを含むポリペプチド」

出願日：平成25年8月9日