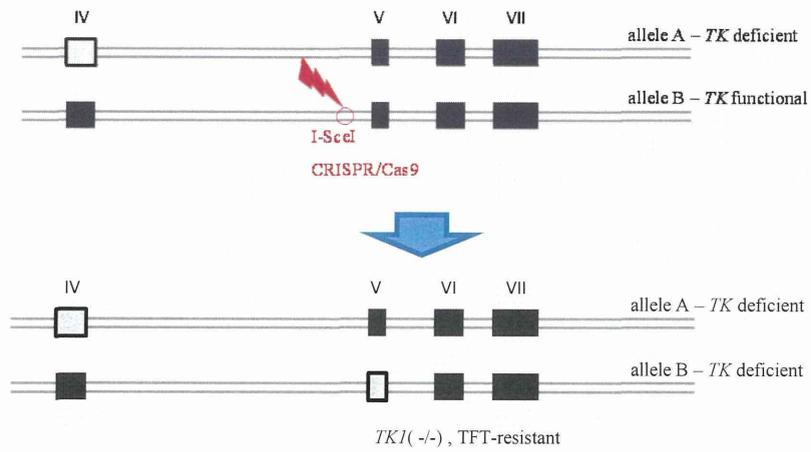


Top 20 genome-wide off-target sites				
sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
GCTGAGAGAGCCTCGAGAGTTGG	1.4	3MMs [5:6:10]		chr8:-28175626
TAGGCCACATCCTCGAGAGTTGG	1.4	4MMs [1:2:3:8]		chr19:+52714881
CCTGTCAGGTA C TCGAGAGTCAG	0.5	4MMs [1:5:9:11]		chr15:+89916350
GCCGCTCATCCTCGAGAGCAAG	0.5	4MMs [3:7:8:20]	NM_003604	chrX:-107978964
TGTGCCAGTTCCTCGAGAGTTGG	0.4	4MMs [1:2:9:20]		chr21:+41403103
GCTGTCAGATACTCAAGAGTTAG	0.4	3MMs [5:11:15]		chr8:+95249213
GCTGCCTTAGCCTCGAGAGGAGG	0.4	4MMs [7:8:10:20]		chr6:-80578142
GCTGCCAAATCCTCGAGATAAAG	0.4	3MMs [8:19:20]		chr1:+208175911
GCAGCAAGA A C T TCGAGAGTAAG	0.4	4MMs [3:6:10:12]		chr10:-18700814
TCTTCCAGACCTCCAGAGTTAG	0.4	4MMs [1:4:10:15]		chr22:-28142582
GGAGCCAGTTCCTCGACAGTAAG	0.4	4MMs [2:3:9:17]	NM_019600	chr15:-52903762
CCTGCAGGTTCTCGAGAGTGAG	0.4	4MMs [1:6:7:9]		chr22:-26180757
ACTTCCAGATCATCGAGAGCTAG	0.3	4MMs [1:4:12:20]		chr12:-125125766
GCTGCCAAAACCTAGAGAGTAGG	0.3	3MMs [8:10:14]		chr10:+98189212
GCTGACAGAGGGTTCGAGAGTTAG	0.3	4MMs [5:10:11:12]		chr11:+117570658
GCTGCCCCGGGCGTCGAGAGTAGG	0.3	4MMs [7:9:10:12]		chr12:+93967281
GATGCTATATCCTCTAGAGTGAG	0.2	4MMs [2:6:8:15]		chr10:+29316179
GGAGCCAGCTCCTCTAGAGTCAG	0.2	4MMs [2:3:9:15]		chr13:-60897384
GCTATAAGATCCTCTAGAGTAAG	0.2	4MMs [4:5:6:15]		chr6:-154163106
GCAGCCACAGCCTCGGGAGTGAG	0.2	4MMs [3:8:10:16]		chr10:+80621430
GCTGACAAATCCACGACAGTGGG	0.2	4MMs [5:8:13:17]		chrY:+26484238
GCTGACAAATCCACGACAGTGGG	0.2	4MMs [5:8:13:17]		chrY:-27478177
GCAGCCAGTCCCTCCAGAGTCAG	0.2	4MMs [3:9:10:15]		chr17:+64235696
GTAGCCACATCCTGGAGAGTTAG	0.2	4MMs [2:3:8:14]		chr8:+37097265
TCTGCGAGATCGTCGAGAGACAG	0.2	4MMs [1:6:12:20]		chr19:-4744947
GTTGCCACATCATCAAGAGTGAG	0.2	4MMs [2:8:12:15]		chr13:+24371806
GCTGACAGGTACCCGAGAGTTGG	0.2	4MMs [5:9:11:13]		chr14:-69347938
GGGGCCAGATCCTCTAGAGATAG	0.2	4MMs [2:3:15:20]		chr9:+99254711
CCTCCCAGATCCTCCAAAGTGGG	0.2	4MMs [1:4:15:17]		chr15:-49538632
TCTGCCCTATCCTTGAGAGTGAG	0.2	4MMs [1:7:8:14]		chr18:+37945076
GCAGCAAGCTCCTCCAGAGTGGG	0.1	4MMs [3:6:9:15]		chr11:+18062758
GCTGCTGGAGCCTCAAGAGTTGG	0.1	4MMs [6:7:10:15]		chr15:-77882104
GCTGCCAGGGCCTCGATAGGCAG	0.1	4MMs [9:10:17:20]	NR_033248	chr2:+206981126
GCTCCCACATCCTCGAGGGCCAG	0.1	4MMs [4:8:18:20]		chr9:+136566707
GCTCCCTGATCCTCTAGAGAAGG	0.1	4MMs [4:7:15:20]		chr3:-123579299
GCTGCCAGGGCTCTAGAGTTGG	0.1	4MMs [9:10:11:15]		chr3:+186678092
CCTGCCAGATAGTCCAGAGTGAG	0.1	4MMs [1:11:12:15]		chr2:-151208576
TCTGCCAAATCATGGAGAGTAGG	0.1	4MMs [1:8:12:14]		chr7:-25952792
GCAGCCAGACACTGGAGAGTAAG	0.1	4MMs [3:10:11:14]		chr3:+154306690
GCTGGCAGCTCCTCCAGAGGAAG	0.1	4MMs [5:9:15:20]		chr12:-48180027
GCTCACAGATCTTTGAGAGTGGG	0.1	4MMs [4:5:12:14]		chr16:+73378786
CCTGCCAAATCCTAGAGAGCTAG	0.1	4MMs [1:8:14:20]		chr19:+38381086
GCTGACAGAGCCTCGGGAGCCAG	0.1	4MMs [5:10:16:20]		chr2:+238262494
GCTGCCTGATCCTCCAGCGTGAG	0.1	3MMs [7:15:18]		chr10:-114766149
ACTGCCAGGTCATCGAGTGTCAG	0.1	4MMs [1:9:12:18]		chr2:+110033471
GATGCCACATCCTTGACAGTAGG	0.1	4MMs [2:8:14:17]		chr7:-98373019
GCTGCCACTTCCCCAGAGTCAG	0.1	4MMs [8:9:13:15]		chr15:-90434317
GGTCCCAGATCCCAGAGAGTCAG	0.1	4MMs [2:4:13:14]		chr2:-219255176
GATGCCAGGTCCTCCAGAATAGG	0.1	4MMs [2:9:15:19]		chr4:+113324701
GCTGCCAGAAGCTCAAGAGAAAG	0.1	4MMs [10:11:15:20]		chr1:-157963812

Table 3. Top 20 genome-wide off-target sites of guide#8. There are total 131 off-target sites (11 in genes, one of 3 mismatch and ten of 4 mismatches).



mutation frequency

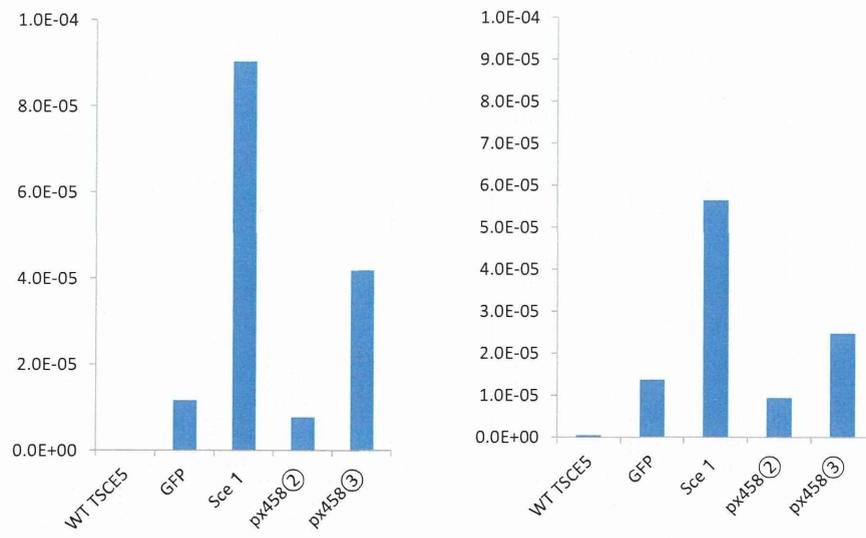


Fig.8. TK1 assay. Mutation frequencies of cells treated with I-SceI and CRISPR/Cas9

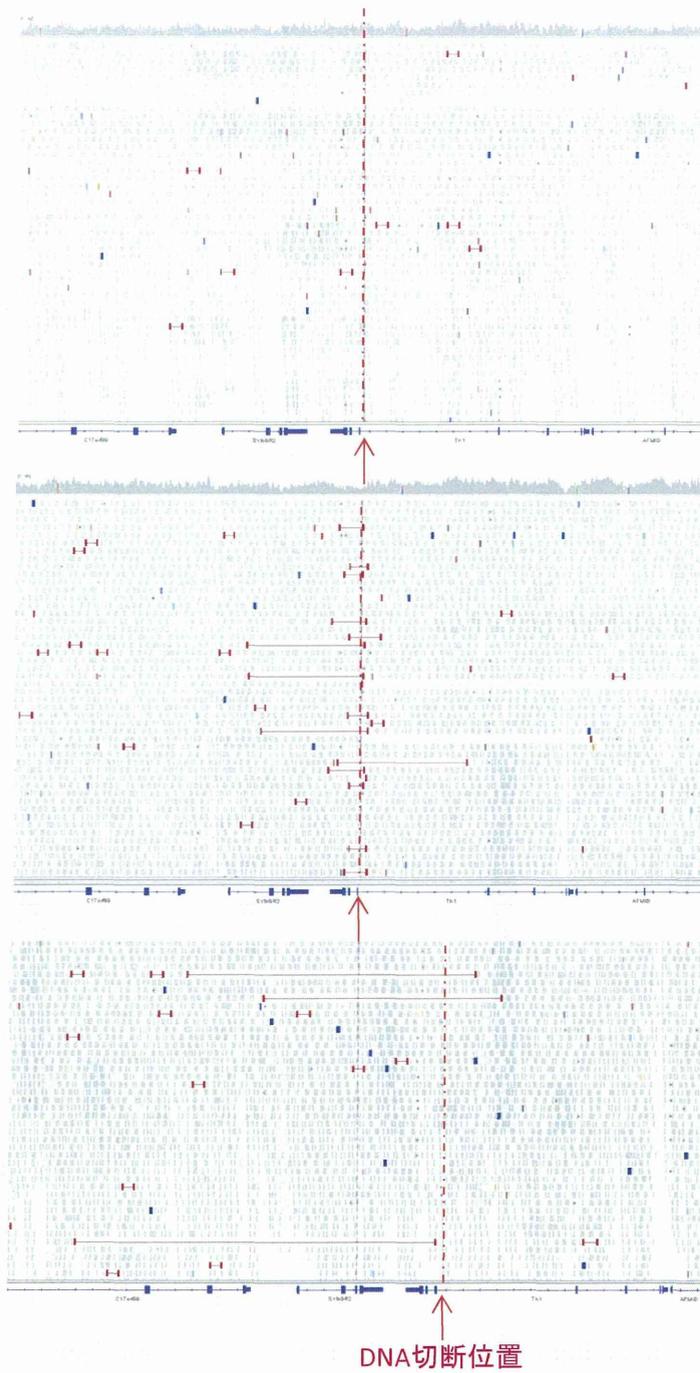
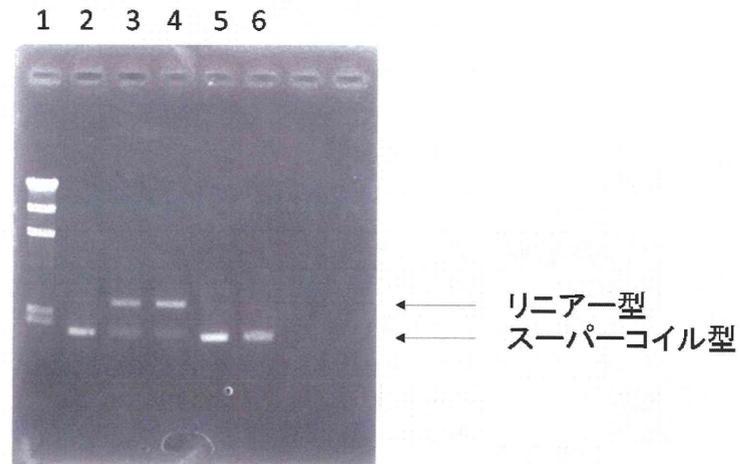


Fig.9. Cleavage patterns at on-target sites by I-SceI and CRISPR/Cas9.

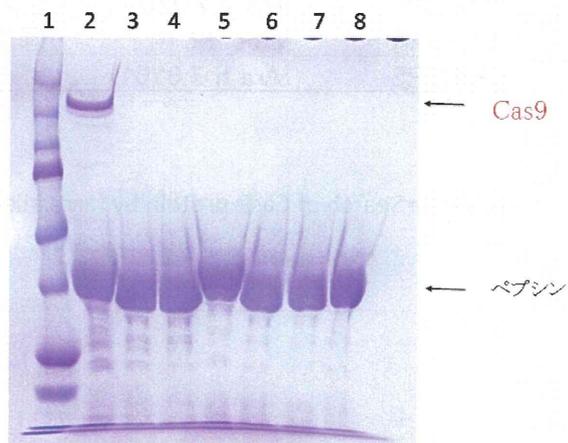
Cas9の活性測定



レーン1: 分子量マーカー λ -Hind III
 レーン2, 3, 4: プロトスペーサー2プラスミド 0, 30, 60分
 レーン5, 6: pUC19 0, 60分

Fig.10. Cleavage activity of recombinant Cas9.

Cas9の人工胃液中での分解性試験 (CBB染色)



レーン1: 分子量マーカー
 レーン2-8: 0, 1, 3, 7, 15, 30, 60分

Fig.11. stability of Cas9 protein in artificial gastric juice.

Cas9

アミノ酸配列	アレルゲン名	生物種
QVSGQG	Ric c 1	トウゴマの実
IANLAG	Ara h 3	ピーナツ
QLQNEK	Pis v 5.0101	ピスタチオ
NEKLYL	Ana o 1.0101	カシュー
NEKLYL	Ana o 1.0102	カシュー

他の読み枠

ORF No.	アミノ酸配列	アレルゲン名	生物種
2-21	PEASPR	Jug n 2	クログルミ
3-13	KLLAAA	Len c 3.0101	レンティル
4-7	SFLLLS	Sola t 3.0102	ジャガイモ
5-4	SSPALA	Api g 3	セロリ
5-4	SLTLLS	Pru p 2.0301	桃
5-4	LTLLSF	Pru p 2.0301	桃
5-5	GSQSFL	Ses i 6.0101	ゴマ
5-11	SLKVRE	Gly m conglycinin	大豆
5-16	SSLLSF	Pis v 2.0101	ピスタチオ
5-16	SSLLSF	Pis v 2.0201	ピスタチオ
5-19	LASSAR	Bos d 6	国産牛
5-20	GFRSPS	Ara h 7.0201	ピーナツ

Table 4. Allergenic Protein Sequence Search of Cas9 protein by farrp allergen protein database

ウシ

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
fat-1	cDNAマイクロアレイで遺伝子発現の変化を調べた	中国	-		1
lysostaphin	得られたGM繊維芽細胞は核供与細胞になりうる	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	2
ヒトリゾチーム	乳腺炎を減らすことを目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	3
lpr1	結核に耐性のGMウシ作成の基礎となる	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	4
線虫 ω-3脂肪酸不飽和酵素cDNA	核供与細胞を作成した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	5
ヒトリゾチーム、ヒトラクトフェリン、ヒトαラクトアルブミン	糞、表土の微生物から導入遺伝子は検出されなかった	中国	-		6
ヒトラクトフェリン	GM粉ミルクは通常の粉ミルクと同様に安全である	中国	-		7
ヒトリゾチーム	核供与細胞の大きさや処理が発生に与える効果を調べた	中国	体細胞核移植		8
lpr1	得られたGM繊維芽細胞は核供与細胞になりうる	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	9
アンギオジェニン	筋肉が過形成された	オーストラリア	-	ウシに限らず動物一般	10
ウシプリオン遺伝子をノックダウン	RNAiによってmRNAの発現を大きく低下させた	日本	体細胞核移植		11
口蹄疫に耐性を与える阻害性RNA	口蹄疫の感染率を大きく低下させることができる	中国	体細胞核移植	ウシに限らず家畜一般	12
α-ラクトアルブミン	哺乳類のミルク中へ組み換えタンパクを分泌させる方法を作成した	米国	-	ウシに限らず哺乳類一般	13

精製した物

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
ヒトリゾチーム	組換えタンパクは天然型と同じ物理化学的性質を示した	中国	-		1
ヒトラクトフェリン	牛乳中で発現させた組換えタンパクに付加させる糖鎖を部位特異的に調べた	中国	-		2
ヒトラクトフェリン	組換えタンパクを精製するときのイオン交換樹脂の混入を調べた	中国	-		3
ヒトαラクトアルブミン	タンパクを大量精製する方法を作成した	中国	-		4
ヒトラクトフェリン	ラットの成長を促進するかもしれない	中国	-		5

検知法の作成

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
ヒトラクトフェリン	導入遺伝子をマルチプレックスPCRで検出した	中国	-		1
ラクトフェリン	ウシ、GMウシ、ヒトのミルク中のラクトフェリンをSDS-PAGEと薄層クロマトグラフィースキャニングによって検出した	中国	-		2
ヒトラクトフェリン、ヒトリゾチーム、ヒトαラクトアルブミン	ジーンチップを使ってGMウシを検出する方法を作成した	中国	-		3
ヒトαラクトアルブミン	導入遺伝子を検出できるLAMP法を作成した	中国	-		4
ヒトラクトフェリン	LAMP法で導入遺伝子を検出するときのプライマーを設計した	中国	-		5
ヒトβ-ディフェンシン3	導入遺伝子の流れを検出するためのPCR法を作成した	中国	体細胞核移植		6

Table 5. Transgenic animals

ブタ

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
ブタインテグリンαVサブユニットに対する3つのsiRNA	FMDV受容体を阻害する研究に有益である	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
線虫sFat-1	ω-6:ω-3の比率が下がった	中国	マイクロインジェクション		2
sFat-1	腸管と糞中の微生物は影響を受けなかった	中国	マイクロインジェクション		3
PRRSV ORF 1b, 5, 6, 7遺伝子に対するshRNA	ブタ繁殖・呼吸障害症候群の予防に使える	中国	体細胞核移植		4
fat-1	腰肉中で長鎖ω-3脂肪酸が増加した	米国	-		5
ミオスタチン遺伝子に対するshRNA	ミオスタチン遺伝子をノックアウト	中国	レンチウイルス		6
ヒトリゾチーム	ミルクを仔に飲ませると生存率が上がるかもしれ	中国	体細胞核移植		7
口蹄疫に抵抗する阻害性RNA	口蹄疫の感染率を大きく低下させるかもしれ	中国	体細胞核移植		8
古典的ブタ熱ウイルスNS3遺伝子に対するsiRNA	ウイルスの複製を阻害した	中国	-	細胞の実験	9
真菌のセルラーゼ、バクテリアのフィターゼ	餌の消化を促進して糞便を減らすことを目指す	台湾	-		10
インスリン様成長因子-1	血液の生理学的指標は野生型と同じだった	中国	-		11
ヒトMxA	ウイルスの増殖を阻害した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	12
ブタMx1	GM線維芽細胞を作成した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	13

発現ベクターの作成

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
ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス遺伝子の非翻訳領域に対する	ウイルスの複製を阻害する	中国	-		1
抗古典的ブタ熱ウイルス遺伝子	プラスミドをマウス胚性線維芽細胞にトランスフェクションした	中国	トランスフェクション		2
ブタ成長ホルモン	GMブタの作成に利用できる	中国	レンチウイルス		3
ルリジサΔ6-デサチュラーゼ	細胞中でγ-リノール酸の含量が増えた	中国	トランスフェクション	ブタに限らず家畜一般	4

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
フォリスタチン	GM胎児線維芽細胞はGM個体の作成の基礎となる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
ミオスタチン遺伝子に対するsiRNA	GM線維芽細胞はGM個体の作成の基礎となる	中国	レンチウイルス	細胞の実験	2
タナチン	抗菌活性を促進するかもしれない	中国	精巢注入		3
アンギオジェニン	筋肉が過形成された	オーストラリア	-	ヒツジに限らず動物一般	4
口蹄疫に耐性を与える阻害性RNA	口蹄疫の感染率を大きく低下させることができる	中国	体細胞核移植	ヒツジに限らず家畜一般	5
タナチン	病気に耐性の動物作成の基礎になる	中国	精巢注入		6

発現ベクターの作成

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
ヤギ痘ウイルスのDNAポリメラーゼに対するsiRNA	細胞中でウイルスの増殖を抑制した。ヤギ痘ウイルスに耐性のGMヒツジの開発につながる	中国	-		1

Table 5. Transgenic animals (続き)

ヤギ

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
ヒトラクトフェリン	GM胎児繊維芽細胞はGM個体作成に利用できる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
ヒトリゾチーム	GMミルクを若いブタに飲ませると、腸のサイトカインの発現と形態に良い影響があった	米国	-		2
ヒトβ-ディフェンシン3	導入遺伝子の流れを検出するためのPCR法を作成した	中国	体細胞核移植		3
ヒトラクトフェリン	GMミルクをラットに短期間飲ませると成長が促進し代謝に影響はなかった	中国	-		4
アンギオジェニン	筋肉が過形成された	オーストラリア	-	ヤギに限らず動物一般	5
ヒトラクトフェリン	GM胎児繊維芽細胞の作成の基礎となる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	6
ヒトリゾチーム	ヒトリゾチームをヤギのミルクで発現させた物を子供に飲ませて下痢の治療に有効であるかを考えた	ブラジル	-		7

発現ベクターの作成

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
ヤギインシュリン様成長因子-1	乳腺に特異的な発現ベクターを作った。GMヤギの作成に利用できる。	中国			1

魚

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
ギンザケ	成長ホルモン	成長に関連する遺伝子の発現パターンを調べた	日本	-		1
大西洋サケ	成長ホルモン	雄の生殖に関する能力を調べた	カナダ	-		2
金魚とコイの交配種	マゴイ成長ホルモン	Po異質4倍体は成長速度が速い	中国	マイクロインジェクション		3
日本フナ	マゴイ成長ホルモン	成長速度の速いPoを作成した	中国	マイクロインジェクション		4
コイ	成長ホルモン	行動の変化で摂食の増加が説明できるかもしれない	中国	-		5
コイ	エビのゲノミックDNA断片	筋肉の質を改良するために有効だろう	中国	マイクロインジェクション		6
コイ	魚成長ホルモン	激しい運動に対する血液学的な反応を調べた	中国	-		7
大西洋サケ	成長ホルモン	餌が少ない環境で稚魚のときの摂食能力を野生型と比較した	イギリス	-		8
サケ	チヌークサケ成長ホルモン	米国の審査で指摘された問題点を解説した	米国	-		9
ギンザケ	成長ホルモン	飼育されたGMサケは野生のサケに生殖で負ける	オーストラリア	-		10
サケ	成長ホルモン	環境による導入遺伝子の安定性への影響を調べた	カナダ	-		11
ギンザケ	成長ホルモン	生態学的にストレスの多い条件でも成長速度が大きいことは有利である	カナダ	-		12
コイ	成長ホルモン	GM3倍体は生殖能力がない	中国	-		13
大西洋サケ	ニジマスリゾチーム	免疫系を増強して病気の大発生を防止することを目指す	カナダ、米国、シンガポール	-		14
コイ	成長ホルモン	アンドロゲン効果、抗アンドロゲン作用はなかった	中国	-		15
コイ	サケ成長ホルモン	マウスに食べさせて生殖毒性はなかった	中国	-		16
日本フナ	黒コイ成長ホルモン	POは体が大きかった	中国	マイクロインジェクション		17
ナイルティラピア	鯛科の魚、アルテミア、ヨーロッパヘダイから単離したDNA断片	塩分に耐性になった	サウジアラビア、エジプト			18
ナイルティラピア、青ティラピア	青ティラピア、ナイルティラピア	成長、体の組成、餌の利用が改善された	サウジアラビア、エジプト	精巣注入		19

発現ベクターの作成

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
コイ、ダントウボウ、コウライギ	成長ホルモン受容体	成長速度の速いGM魚の作成に利用できる	中国	-		1

Table 5. Transgenic animals (続き)

ニワトリ

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
EGFP-MMx融合遺伝子	ウイルス抵抗性のGMニワトリが作れるかもしれない	中国	精巣注入		1
EGFP-MMx融合遺伝子	ウイルス抵抗性のGMニワトリが作れるかもしれない	中国	精巣注入		2
カモRIG-I	RNAウイルスの感染に抵抗性を持つかもしれない	米国	レトロウイルスベクター		3
interferon induced transmembrane protein 1, 2, 3 (IFITM1, 2, 3)	ウイルス感染を阻害できるかもしれない	米国	-	ニワトリに限らず動物一般	4
アンギオジェニン	筋肉が過形成された	オーストラリア	-	ニワトリに限らず動物一般	5
インフルエンザウイルスポリメラーゼを阻害するおとりのshRNA	インフルエンザの伝達を阻害した	イギリス	-		6
インフルエンザウイルスポリメラーゼを阻害するおとりのshRNA	インフルエンザの伝達を阻害した	イギリス	-		7
RIG-I	RNAウイルスへの耐性が増加している	米国	-		8

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
ヒトリゾチーム	乳腺で特異的に発現させる方法を作成した	中国	人工染色体		1
アンギオジェニン	筋肉が過形成された	オーストラリア	-	ウサギに限らず動物一般	2
線虫Fat1	GMウサギを作成した	中国	精巣注入		3

Table 5. Transgenic animals (続き)

動物の種類	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	年	文献
ウシ	ミオスタチン	GM線維芽細胞を作った	中国	ZFN	2011	1
ブタ	ミオスタチン	ZFN用発現ベクターを作成した	中国	ZFN	2011	2
ヒツジ	ミオスタチン	抗生物質を使わずにGMヤギを作成した	中国	ZFN	2013	3
ヤギ	β -ラクトグロブリン	ヤギの遺伝子をゲノム編集した	中国	ZFN	2013	4
ブタ	ミオスタチン	背中の筋肉繊維を増やすことを目指す	中国	ZFN, TALEN, CRISPR	2014	5
ニワトリ	オボアルブミン	遺伝子の機能を喪失させた	韓国	TALEN	2014	6
ウシ	ヒトリゾチーム	ミルクは黄色ブドウ球菌を殺す能力があった	中国	ZFN	2014	7
ヒツジ	ミオスタチン	インビトロで初代細胞の増殖を促進した	中国	ZFN	2014	8

Table 6. Transgenic animals using genome editing techniques.

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

次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発

研究分担者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 石垣拓実 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

① 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：次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである **Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)** を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、動物細胞内で構成的にかつ大量の転写産物の発現を可能にする汎用性の高い **Cytomegarovirus (CMV)** 及び **Simian virus 40 (SV40)** ウィルスプロモーター遺伝子発現カセットを導入し、内在性遺伝子発現量、ゲノム構造及びエピゲノムに及ぼす影響に関して解析した。

② 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。今後は、GM 作物の開発に汎用されている従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、安全性未承認 GM パパイア PRSV-YK 系統をモデルに、19 bp 程度の短い配列をアンカーとして次世代シーケンサー MiSeq を使用し得られた配列データベースより、GM 作物のゲノムに挿入されたトランスジェニック構造配列の解析及び系統の特定を可能とする迅速検知法を開発を行った。

A. 研究目的

① 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：

次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである **Transcription**

activator-like effector nuclease (TALEN) を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに解析し総合的に解釈した。

② 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。2013年1月から2014年11月末現在までに欧州食品飼料緊急警告システム（RASFF）では GM トウモロコシ

(Bt176 系統)、コメ (Bt63 系統など)、パパイヤ (系統名不明) の混入 66 件を報じた。日本では、2013 年 7 月にタイ産未承認 GM パパイヤ PRSV-SC 系統の食品への混入を報じている。今後は、従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、2011 年に国内のパパイヤ加工食品より検出された安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統の果実から精製したゲノム DNA をモデルに、次世代シーケンサー MiSeq を使用した GM 作物の迅速検知法の開発を行った。

B. 研究方法

①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

細胞は、(独) 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入したニワトリ B リンパ細胞株 DT40 (細胞番号:JCRB9130) 及びニワトリ肝細胞 LMH (細胞番号:JCRB0237) を用いた。DT40 細胞は、RPMI 1640 medium、0.05 mM 2-mercaptoethanol、10% (v/v) fetal bovine serum、5% (v/v) chicken serum を含有する培養液で 37°C、5% CO₂ 環境下で培養を行った。LMH 細胞は、Waymouth's MB752/1 medium、10% (v/v) fetal bovine serum を含有する培養液で 37°C、5% CO₂ 環境下で培養を行った。

2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローニング

TALEN を用いて培養細胞への GM 操作を行った。TALEN の標的配列は、昨年度と同様にニワトリ 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 の DNA 結合ドメイン標的配列は、上流側には、5'-CTTTCATGTTCCACCTAC-3'、下流側には 5'-AGTGATTCCAAACACAC-3' の 18 bp とし、それぞれの配列を認識する TALEN 発現ベクターを *in vitro* で転写後、得られた mRNA を細胞

へ導入した。pCDNA-DEST40 ベクター中の T7 プロモーターで T7RNA polymerase により転写させた。*In vitro* 転写には、mMESSAGE mMACHINE[®] T7 ULTRA Transcription Kit (Life Technologies) を使用して mRNA の合成を行い、MEGAclean[™] Transcription Clean-Up Kit (Life Technologies) より mRNA の精製を行った。TALEN による DNA 二本鎖切断 (DSB) 処理後に導入した配列は、SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する AcGFP (*Aequorea coerulescens* green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pAcGFP1-N1 プラスミド (Clontech, CA, USA) の遺伝子発現カセットと、SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するピューロマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する Venus 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pcDNA4-TO-Puromycin-mVenus- MAP プラスミド (ID no.44118, Addgene, MA, USA) の遺伝子発現カセットとした。Targeting ベクターには、pUC19 プラスミドを使用し標的配列の 5'及び 3'側にニワトリゲノムの相同組換え配列 (800 bp) を組み込んだものを使用した。標的配列のセンス側及びアンチセンス側をそれぞれ認識する TALEN をコードする 16 µg mRNA と 10 µg ターゲティングベクターを DT40 株にはエレクトロポレーション法 (Poring pulse 1 回: 電圧 175 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 10%、Transfer pulse +極 5 回-極 5 回計 10 回: 電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%)、LMH 株にはリポフェクタミンによりトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、終濃度 2 mg/ml G418 及び 0.75 µg/ml puromycin を加え、薬剤耐性細胞を選択的に 10 日間培養し、その後、通常培地に戻しクローニングを行った。細

胞のクローン化は、浮遊系の DT40 細胞は限外希釈法、接着性の LMH 細胞はシングルコロニーよりトリプシン-EDTA 処理により剥離する方法により行った。標的配列への GM 操作の確認は、Cel-1 アッセイ法、制限酵素 (HpyAV) 消化試験法及び PCR 法により行った。

3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量化

組換えの標的とする配列から両側 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子の発現測定は、RT-リアルタイム PCR 法より行った。80%コンフルエントに培養した細胞を ($5\sim 10\times 10^7$ 個) を回収し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。DNA は RNase-free DNase I (Qiagen) を用いて完全に消化させた。500 ng の精製 RNA を逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20 μ l の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2 μ l の cDNA を鋳型に、exon-intron 間でスプライシング標的境界領域に設定したプライマー対による QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) を用いたリアルタイム PCR により遺伝子発現を定量化した。PCR 反応液は、20 μ l/well として調製した。組成は以下のとおりである。2 \times QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10 μ l、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.2 μ l を混合し、cDNA 試料液 0.5 μ l を添加し滅菌蒸留水で全量 20 μ l に調製した。反応条件は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間加熱し、その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

4) Chromosome conformation capture (3C) 解析

10 mL 培養液に懸濁させた 1×10^7 細胞を 2% (v/v) ホルムアミドでタンパク質-DNA の架橋固定を行い、0.125 M グリシンを添加することにより反応を停止させた。その後、PBS で細胞を洗浄し、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl [pH8.0],

10 mM NaCl, 0.2% NP-40, proteinase inhibitors cocktail [Nacalai, Kyoto, Japan]) を加え細胞を溶解させた。1 \times 制限酵素緩衝液中に 0.3% (w/v) SDS を加え 37°C 1 時間インキュベーションさせタンパク質を変性した後、1.8% (v/v) Triton X-100 を加えさらに 37°C 1 時間反応させた。次に、400 U *Bgl*II/400 U *Bam*HI 又は 400 U *Mbo*I を加え、DNA を 37°C 16 時間消化させた後、65°C 20 分間加熱し、制限酵素を不活化させた。反応液に 7 mL 1 \times T4DNA ligase buffer と終濃度が 1% (v/v) になるよう TritonX-100 を加え、37°C 1 時間インキュベーションした後、4000 U T4DNA ligase を 16°C で 4 時間反応させた。反応後、proteinaseK 及び RNase でタンパク質及び RNA をそれぞれ分解後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿より DNA の回収・精製を行った。ゲノムの構造解析には、得られた DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施した。

②次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

モデル食品には、安全性未承認 GM パパイヤ PSRV-YK 系統の果実から精製したゲノム DNA を使用した。DNA はサンプル識別用インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動により 400~500 bp の断片を切り出し精製し、アダプター PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina Miseq による全シーケンシングを行った。マッピング解析には、既知のパパイヤゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスとして使用した。マッピングに使用した配列は、両側とも 50 塩基以上にわたり QV20 を保っていた配列のフォワード側の最初の 50 塩基 (一番信頼性の高い部分) で、解析には bowtie2 を使用した。De novo assemble には、velvet を使用し、k=21 とし全結果をまとめてインプットした。

C. 研究結果

①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：

遺伝子発現カセットを挿入した際に起こり得る、内在性遺伝子の発現量の変化を解析するため、遺伝子導入の標的としたニワトリゲノム14番染色体に存在する α グロビン遺伝子クラスター周辺270 kb内に存在する9つの内在性遺伝子（uncharacterized protein KIAA0556 [GenBank accession no. XP_003642159.2], general transcription factor 3C polypeptide 1 [TFIIC, GenBank accession no. XP_004945401.1], protein argonaute 14 isoform X5 [Loc425933, GenBank accession no. XP_423619.3], inactive rhomboid protein 1 isoform X18 [RHBDF1, GenBank accession no. XP_004945411.1], DNA-3-methyladenine glycosylase [MPG, GenBank accession no. XP_414945.4], nitrogen permease regulator 3-like protein isoform X1 [ggPRx, GenBank accession no. XP_003642182.1], transmembrane protein 8A isoform X3 [TMEM8, GenBank accession no. XP_004945418.1], 39S ribosomal protein L28, mitochondrial-like [P15, GenBank accession no. XP_003642183.1], Axin-1 [Axin1, GenBank accession no. NP_990275.1]）と α グロビン遺伝子クラスター内の π 、 αD 及び αA の発現量をRT-リアルタイムPCRより定量した。GFP/Neo^R遺伝子を挿入して作成したホモ型細胞と野生型内における内在性遺伝子の発現量を測定した（Figure 1）。挿入配列から123 kb離れたLoc425933、5 kb離れた αA 、55 kb離れたAxin1遺伝子の発現量をそれぞれリファレンスとして他の遺伝子の発現量比を算出したところ、遺伝子導入箇所から20 kb内に存在する π 、 αD 及び αA 遺伝子の発現量が顕著に上昇した。ヘテロ型細胞株においても同様に20 kb内の遺伝子 π 、 αD 及び αA 遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された（Figure 2）。導入した遺伝子やカセット配列長による影響について解析するため、GFP/Neo^RとVenus/Puro^Rを有するホモ型細胞株を作成し

た（Figure 3, 4）。内在性遺伝子の発現量変化について解析を行ったところ、遺伝子発現コンストラクトを変えたホモ型細胞株も、20 kb内の遺伝子 π 、 αD 及び αA 遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された（Figure 5）。4.7 kbのGFP/NeoRとVenus/PuroRをそれぞれ発現させる発現カセットのゲノムへの導入によるゲノム構造への影響について解析するため、3C解析を行った（Figure 6）。その結果、4.7 kbの発現カセットを新たに導入することによるゲノム構造の大きな変化は誘導されず、野生型と同様の5.2 kbと3.8 kbのゲノムループ構造が検出された。

遺伝子導入によるエピゲノム変化を解析するため、5.2 kbと3.8 kbのゲノムループ構造に近接して存在するDNAメチル化標的配列であるCpGアイランド配列を検索したところ、5～6 kb上流にCpG繰り返し配列の多いCpGアイランドを見出した（Figure 7）。DNAメチル化解析を行うためバイサルファイトシーケンシング用プライマー対を3対設計し、CpGアイランド内の約1 kbを解析した（Figure 8）。バイサルファイト処理後のDT40細胞及びLMH細胞より抽出精製したDNAを鋳型にPCRを行ったところ、特異性の高いPCRを行うことに成功した（Figure 9）。PCR産物をクローニング後、DNAメチル化パターンを調べた結果（Figure 10, 11）、細胞株によってメチル化パターンが異なることが示唆された（Figure 12）。

②次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

本研究では、Illumina HiSeqと比較しより安価でランニングコストの低いMiSeqを使用し、パパイヤ果実から精製したゲノムDNAのシーケンスを行った。その結果、パパイヤゲノムの31.16倍（18,177,038 pair、10,906,222,800 bp）の出力配列を得た。解析用インプット配列は、低精度トリミングの閾値をQ20（99%精度）50塩基以上の長さとした場合、17,375,285 pairを得ることができた。

パパイヤ SunUp 品種のゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスに bowtie2 を使用してマッピングを行った結果、49.84%マッピングされた。マップリードとそのペアリード配列を特定し、リードの抽出を行い、抽出したリードを出力データとして、ショートリード用アSEMBラーである velvet を用いてアSEMBルを行った。その結果、411,911 Contigs、267,082,851 bases を得た。この *de novo* アSEMBルデータを使用して、アグロバクテリウム法により挿入された遺伝子組換え配列に共通して存在する Right border 配列、及び、Left border 配列をアンカーに検索を行ったところ、19 bp の right-border 周辺配列 (TCAGTGTGAATGAGATAG) をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、100%相同配列を有する NODE_446,121 (1740 bp) のコンティグを得た (Figure 13)。このパパイヤゲノム配列は、Sunup リファレンスの Supercontig16 に帰属するものであることが示唆された。配列を詳細に解析したところ、1~836 bp にトランスジーン配列と Right border 配列、837~1740 bp にパパイヤゲノム配列であることが判明した。以上の結果から、19 bp の right-border 周辺配列をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、GM パパイヤの系統特異的な配列を得ることが可能であることが示唆された。次に 19 bp の left-border 周辺配列 (TGTTTACACCAC AATAT) をアンカーとして、*de novo* アSEMBルデータを検索したところ、一致する配列は得られなかった。そこで、リファレンス配列にマッピングされなかった unmapped reads を基に検索したところ、369 bp 配列長の 1 リード一致する配列 (A5FPB:1:1114:21442:18611) が得られた (Figure 14)。同配列中にはパパイヤゲノム配列 (1~132 bp) と Right border 配列と Transgene 配列 (133~369 bp) を含むものであった。

GM パパイヤの transgene 発現に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス 35SRNA プ

ロモーターの部分配列から GM パパイヤに導入された遺伝子発現用カセット構造配列が抽出可能であることを検証した。その結果、リファレンス配列にマップされなかった配列を含む 719 bp の 1 リードに P35S 配列 (GenBank access. no. EU327975) に一致する配列とマップされた配列をアSEMBルした contig から得られた 1 リード (NODE_344501) に PRSV coat protein gene (GenBank access. no. X97251.1) と一致する配列が得られた。両リードは 68 bp 合致する配列を有した (Figure 15,16)。

D. 考察

①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：

DT40 及び LMH において α 遺伝子クラスター周辺の 270 kb ゲノム領域に 3.8 kb と 5.2 kb の 2 つのループを形成することが確認された。5.2 kb ループ内へ導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の 20 kb 内であつた遺伝子クラスター内で同じゲノムループ内で構成する π と αD 遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、 π 遺伝子は hetero 型で 1 オーダー、homo 型で 2 オーダー、 αD 遺伝子は homo 型で 1 オーダーの違いがあつた。遺伝子発現カセット内の遺伝子を代えても同様の結果を示した。また、遺伝子発現カセットのプロモーターと同じ転写方向に並んだ遺伝子 (タンDEM遺伝子) の発現は上昇した。この結果から、ループ内で構成するタンDEM遺伝子は、基本転写因子群を共有し転写活性を調節する可能性が示唆された。

②次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

MiSeq を利用して得られた 18.2 M pair reads、10,906,222,800 bases のデータベースより、アグロバクテリウム法を利用し組換えら

れた際に共通して存在する Ti ベクター由来の Right border と Left border 配列 (19 bp) をアンカーに GM パパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GM パパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター (P35S) をアンカーに GM パパイアの構造特異的配列を得ることができた。次世代シーケンシング解析より得られる配列データベースより、リアルタイム PCR やシーケンシング解析より得られる GM 作物の部分配列を基にどのような構造遺伝子がゲノム中に導入され、どのような GM 作物の系統であるかを特定できる可能性が示唆された。

E. 結論

①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：

ゲノムループなどゲノムの高次構造の変化は、遺伝子発現カセットを挿入した配列から 20 kb 内に存在する内在性遺伝子の発現量を大きく変化させる可能性が示唆された。またゲノムループ構造内では、転写因子複合体が遺伝子間で共有することで転写効率を上げていることを示唆するデータを得た。

②次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

GM 作物に共通する 19 bp 程度の配列から illumina Miseq で得られる配列データを利用し、GM 作物の系統特異的及び構造特異的な配列を探索可能であることが示された。今後は、加工食品より得られる DNA より同方法で解析可能かを検証する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura,

K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015

2. Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R. Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK, *Ikushugaku Kenkyu*, 16, 158-161, 2014
3. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
4. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
5. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
6. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014

7. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014

学会発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月.
2. Fukasawa, A., Sakagami, H., Nakahara, Y., Nakamura, K., Ogawa, H. Immobilization method of glycosylated Fmoc-amino acid for SPR and interaction analysis between *Pleurocybella porrigens* lectin and carbohydrates, 27th International Carbohydrate Symposium, India, 2014年1月.
3. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
5. 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：加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しいDNA抽出精製法の検討、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
6. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
7. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子：Multiplex real-time PCRを用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
8. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
9. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
10. 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年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
11. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子：RFLPおよびReal-time PCR法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月

12. 高島令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度 AOAC International 日本セッション年次大会、東京、2014年6月
13. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
14. 中村公亮：未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
15. 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、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏：DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイヤのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
16. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月

H. 知的財産権の取得状況

特許取得

1. 小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一：抗ウイルス剤、特許第5633717号、登録日：2014年10月24日。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

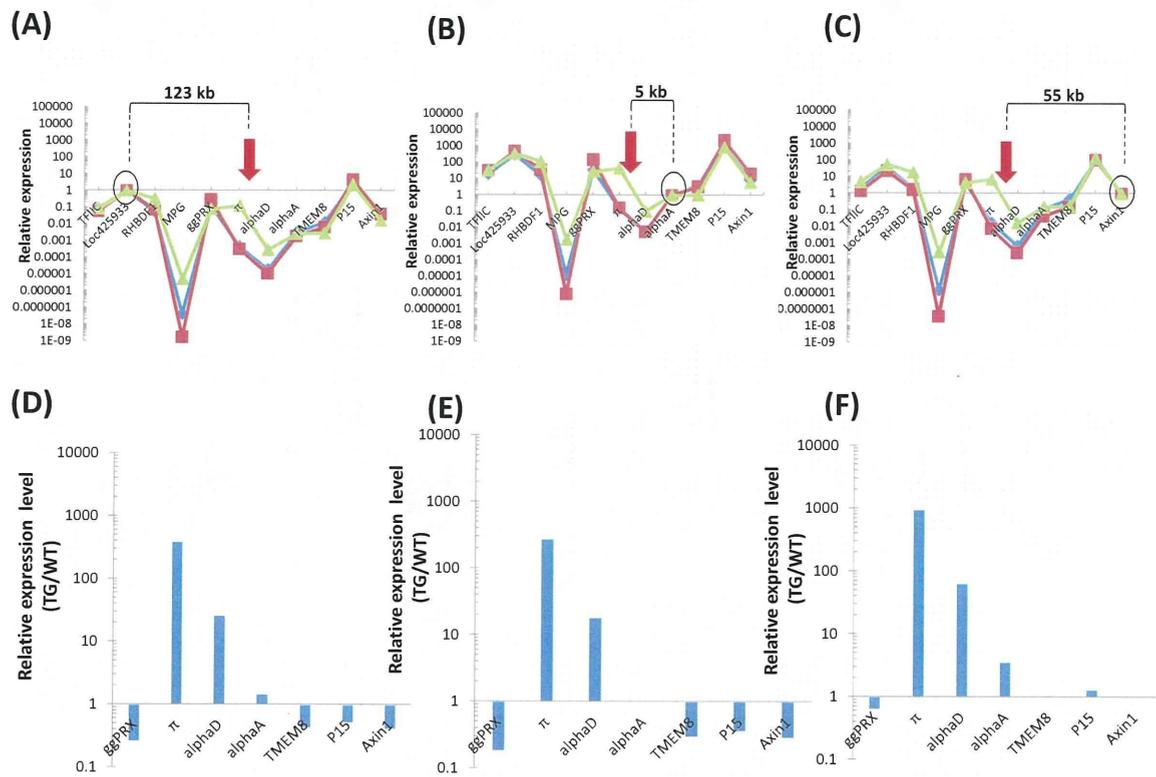


Figure 1. 遺伝子挿入に伴う内源性遺伝子発現量の変化

野生型 DT40 細胞 (□) と GFP/Neo^R ホモ型細胞 (△) 内で発現する 11 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR にて解析した。(A) *Loc425933*、(B) αA 、(C) *Axin1* 遺伝子発現量をリファレンスに発現量を定量化した結果を示す。(D) ~ (F) は野生型細胞内での発現量をリファレンスに相対発現量を定量化した結果を示す。矢印は遺伝子挿入部位を示す。

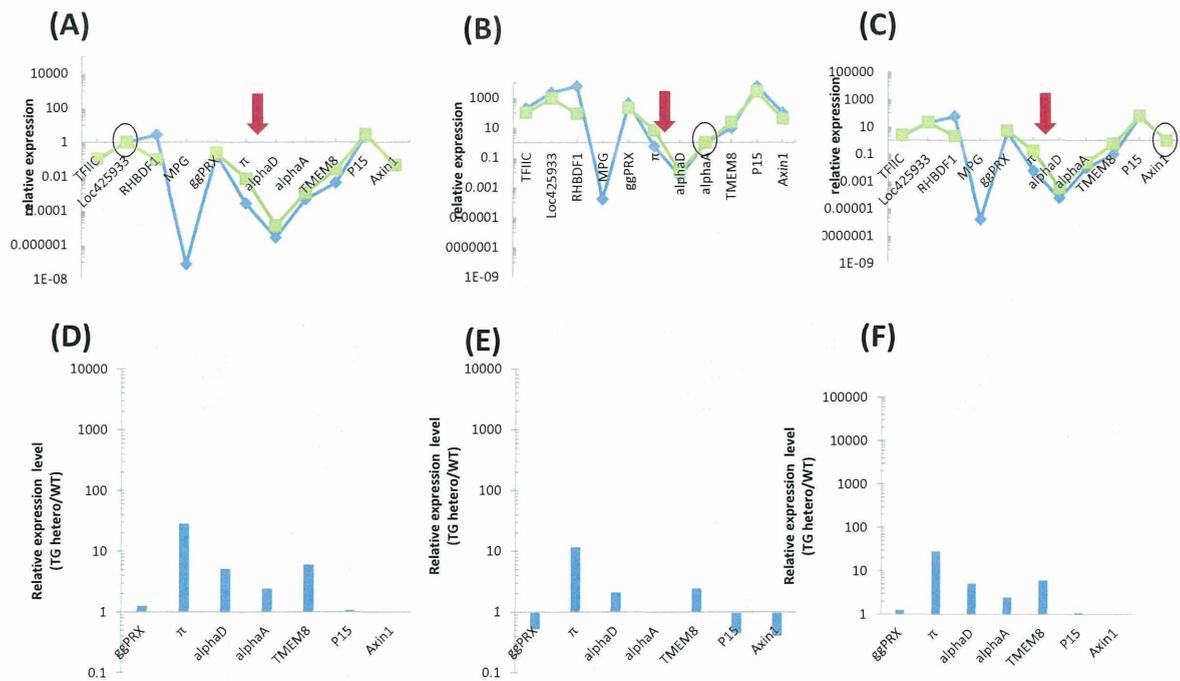


Figure 2. 遺伝子挿入に伴う内在性遺伝子発現量の変化

野生型 DT40 細胞 (\diamond) と GFP/Neo^Rヘテロ型細胞 (\square) 内で発現する 11 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR にて解析した。(A) Loc425933、(B) αA 、(C) Axin1 遺伝子発現量をリファレンスに発現量を定量化した結果を示す。(D) ~ (F) は野生型細胞内での発現量をリファレンスに相対発現量を定量化した結果を示す。矢印は遺伝子挿入部位を示す。