

Figure 3. ゲノム標的配列の遺伝子挿入に使用したターゲティングベクターの構造図

(A) GFP/Neo^R 遺伝子導入に使用したベクター、(B) Venus/Puro^R 遺伝子導入に使用したベクター、(C) TALEN を使用してニワトリゲノムの相同組換え領域を示す。矢印は遺伝子挿入を確認する際に使用したプライマーの標的箇所を示す。

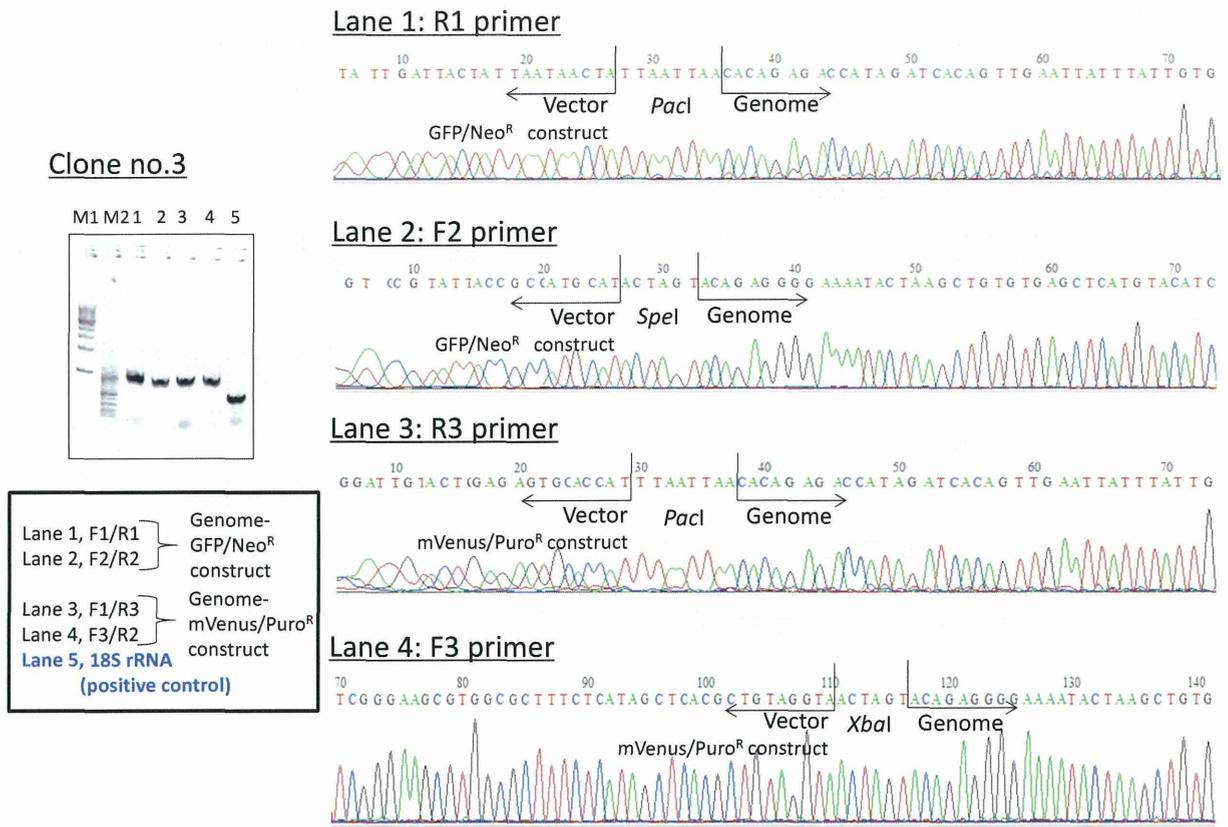
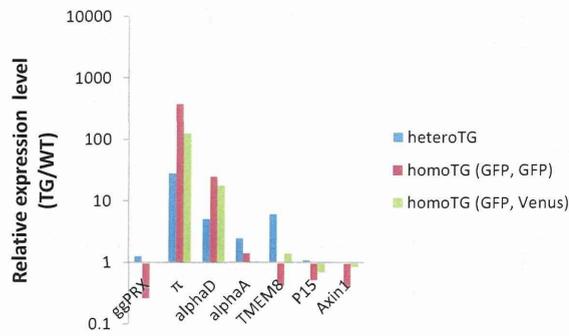


Figure 4. GFP/Neo^R と Venus/Puro^R 遺伝子を標的配列へ導入し作成したホモ型細胞株 (clone3 番) のシーケンシング解析結果

遺伝子導入の標的配列周辺の配列を検出するために増幅させた PCR 産物 (lane1~4) のシーケンシングを行った。Lane1, F1/R1 プライマー; lane2, F2/R2 プライマー; lane3, F1/R3 プライマー; lane4, F3/R2 プライマー; lane5, 18S r RNA コントロールプライマー

(A)



(B)

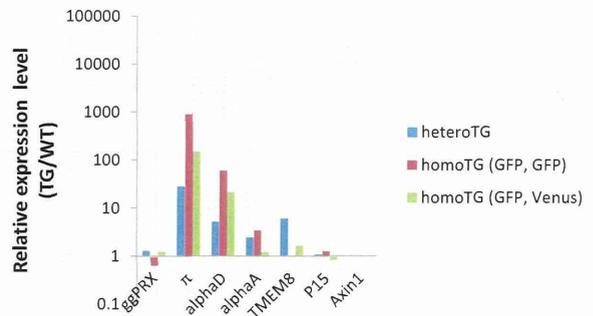


Figure 5. GFP/Neo^R と Venus/Puro^R 遺伝子を標的配列へ導入した細胞の内在性遺伝子発現量の変化
GFP/Neo^R を挿入し作成したホモ型及びヘテロ型細胞株と、GFP/Neo^R と Venus/Puro^R を挿入し作成したヘテロ型細胞株中の内在性遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて測定し、野生型と比較定量した。(A) Loc425933 又は (B) Axin1 の遺伝子発現量の変化をリファレンスに算出した。

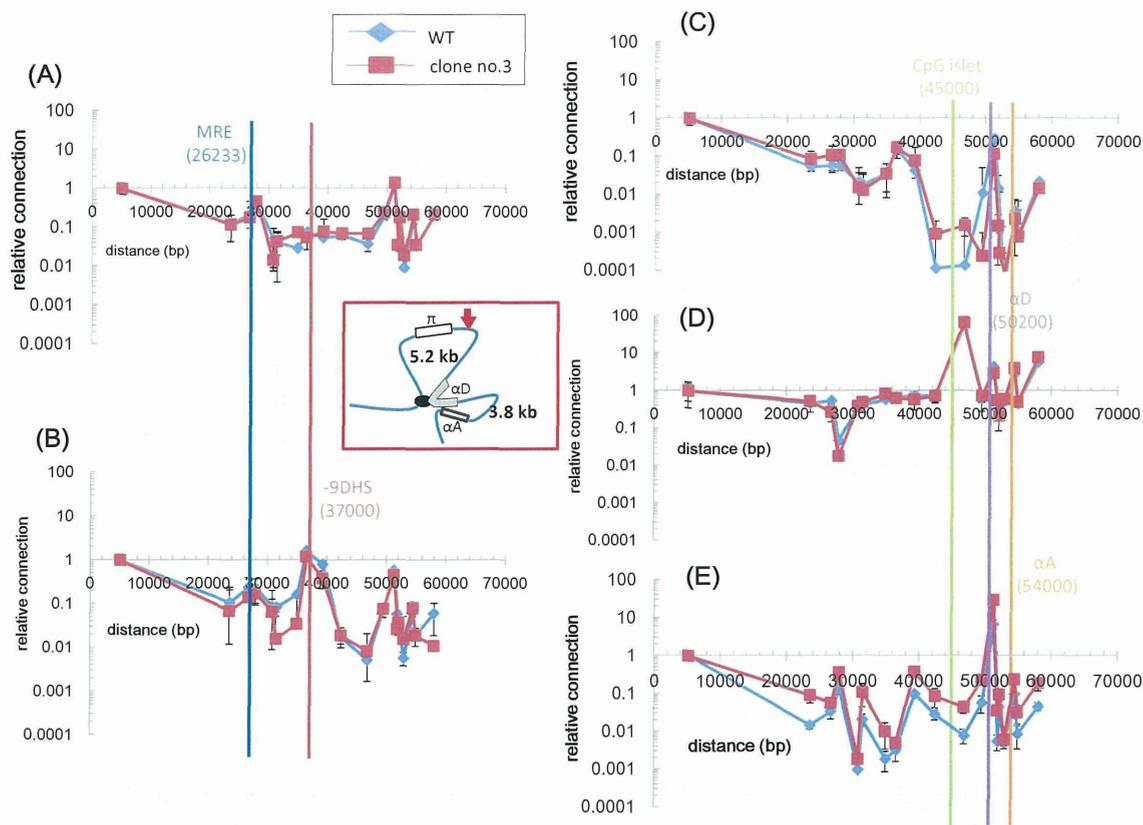


Figure 6. ホモ型 DT40 細胞 (GFP,Neo^R & Venus,Puro^R) の 3C 解析

野生型及びホモ型 DT40 細胞 (clone no. 3) より抽出精製したゲノム DNA を *Bgl*III 及び *Bam*HI で断片化し、ライゲーション反応した DNA を鋳型に、3C 解析を行った。アンカー配列には、(A) MRE anchor (26233)、(B) -9DHS anchor (37000)、(C) CpG island anchor (45000)、(D) α D anchor (50200)、(E) α A anchor (54000) を検出するフォワードプライマーとプローブを使用した。

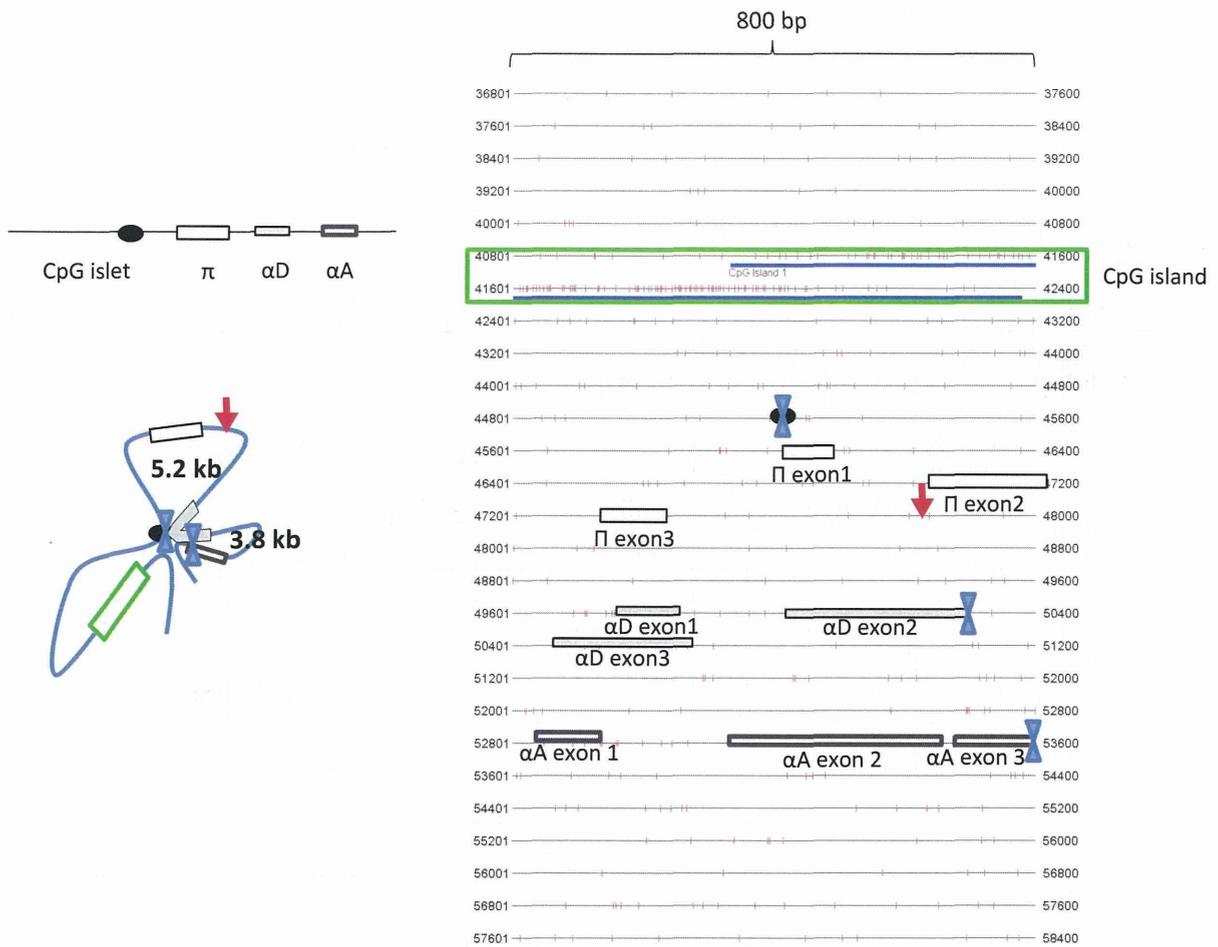


Figure 7. α グロビン遺伝子クラスター内の CpG Island search 結果
 α グロビン遺伝子クラスターのエキソン領域と CpG アイランド領域を示す。



Figure 8. α グロビン遺伝子クラスター上流に位置する CpG アイランド領域の DNA メチル化を検出するためのメチル化検出用プライマーの構築

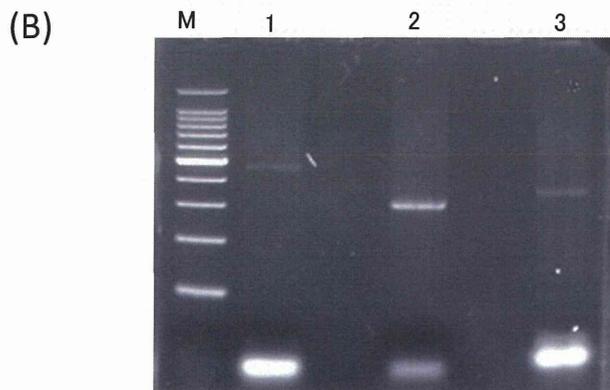
プライマーセット 1 (437 bp)、プライマーセット 2 (313 bp)、プライマーセット 3 (363 bp) の位置と配列を示す。

(A)

	ul
TaKaRa EpiTaq HS (5U/ul)	0.25
10 × EpiTaq PCR buffer	5
MgCl ₂ (25mM)	5
dNTP mixture (2.5mM)	6
primer F (50uM)	0.25
primer R (50uM)	0.25
DNA (10ng/ul)	5
MQ	28.25
	50

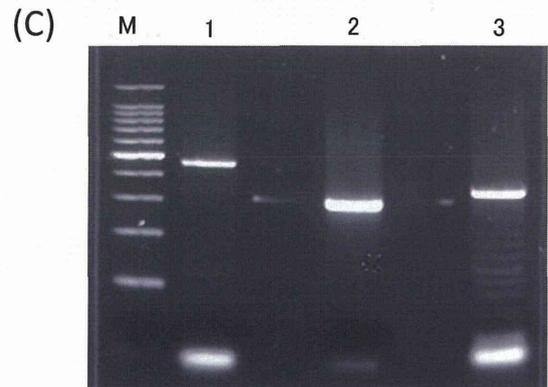
NO.	primer名	primer配列(5'-3')	増幅産物
1	CpGislet1F	GGATAGAAATATTAGGGTTGGTTG	475bp
	CpGislet1R	ATCCTAACAACCCCTCCCC	
2	CpGislet2F	YGGGAGTTTGGGGATAGTAGTA	313bp
	CpGislet2R	AAACACCAACCCCATCAAC	
3	CpGislet3F	GTTGATGGGGTTGGTGTT	363bp
	CpGislet3R	CTACACTTCAAACACRACTACACTAC	

94°C	55°C	72°C
30sec	30sec	30sec
30cycle		



2%アガロースゲル
M: 100 bp マーカー
1: 475 bp
2: 313 bp
3: 363 bp

切り出し



2%アガロースゲル
M: 100 bp マーカー
1: 475 bp
2: 313 bp
3: 363 bp

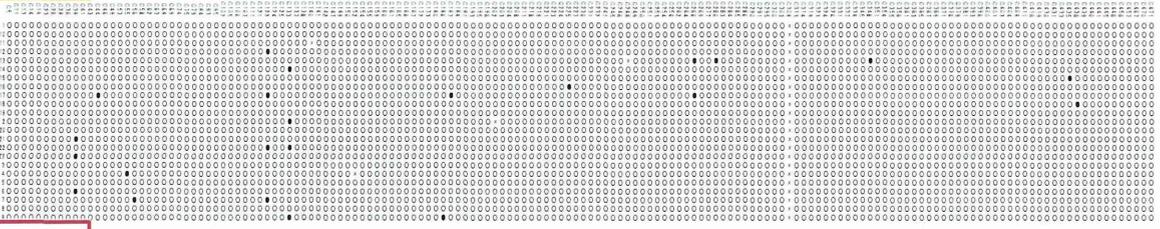
切り出し

Figure 9. バイサルファイト処理済みゲノム DNA を鋳型に PCR を行った結果

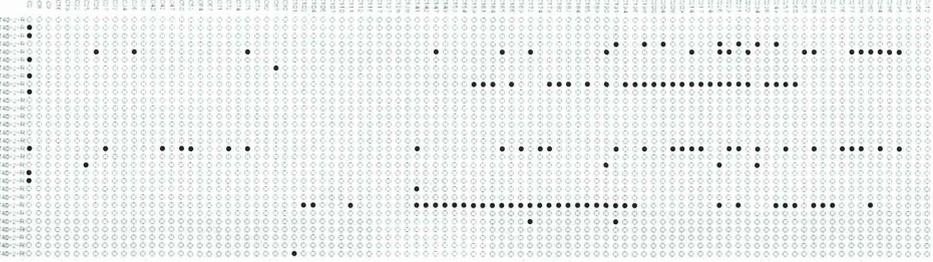
(A) バイサルファイト PCR 反応組成

(B) DT40 細胞株と (C) LMH 細胞株より得られたゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったアガロース電気泳動図

DT40-1



DT40-2



DT40-3

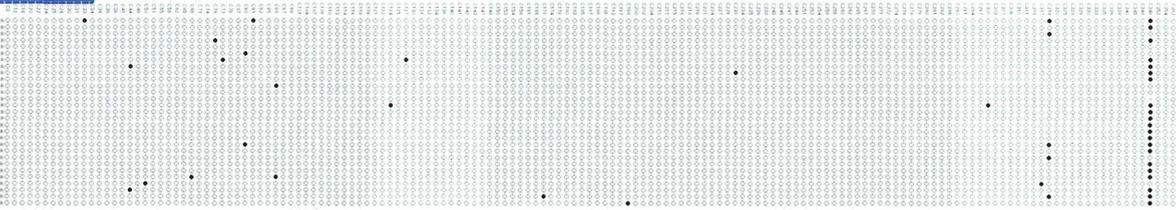
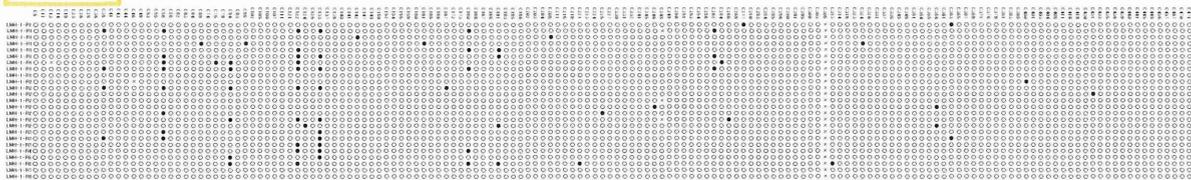
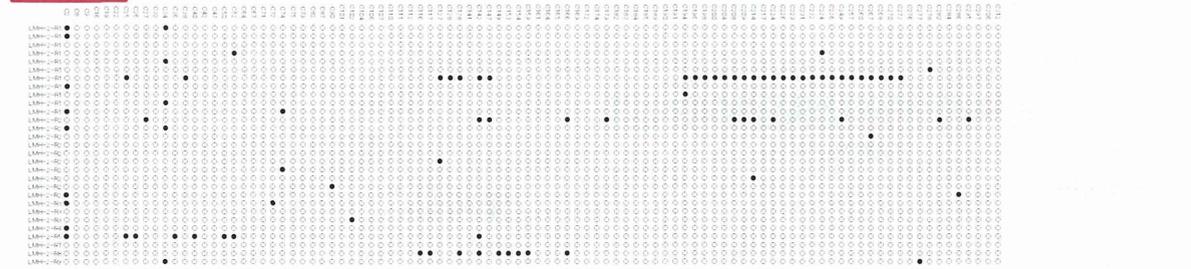


Figure 10. DT40 細胞株のバイサルファイトシーケンシング結果
黒、メチル化シトシン ; 白、非メチル化シトシン

LMH-1



LMH-2



LMH-3

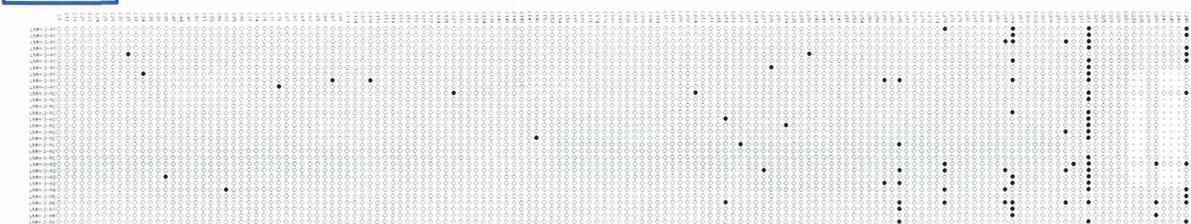
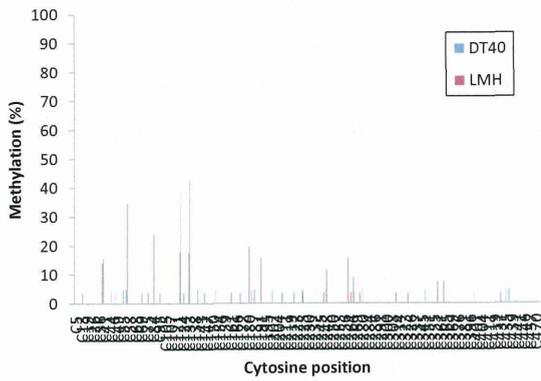
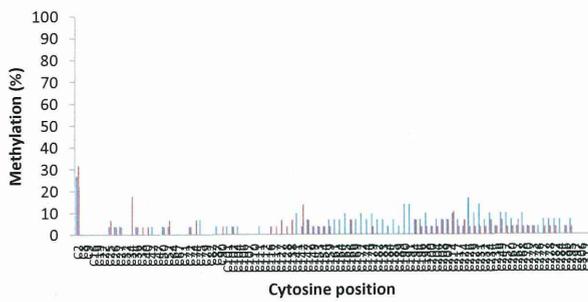


Figure 11. LMH 細胞株のバイサルファイトシーケンシング結果
黒、メチル化シトシン；白、非メチル化シトシン

領域①



領域②



領域③

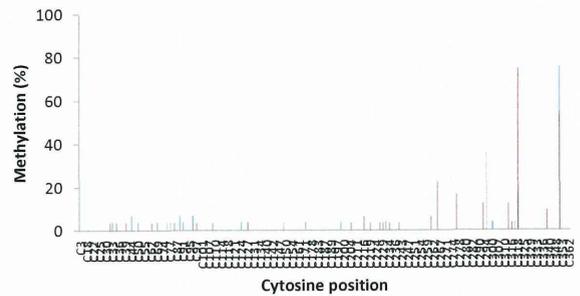


Figure 12. DT40 と LMH 細胞株のバイサルファイトシーケンシング結果
各メチル化標的配列のメチル化率を示す。

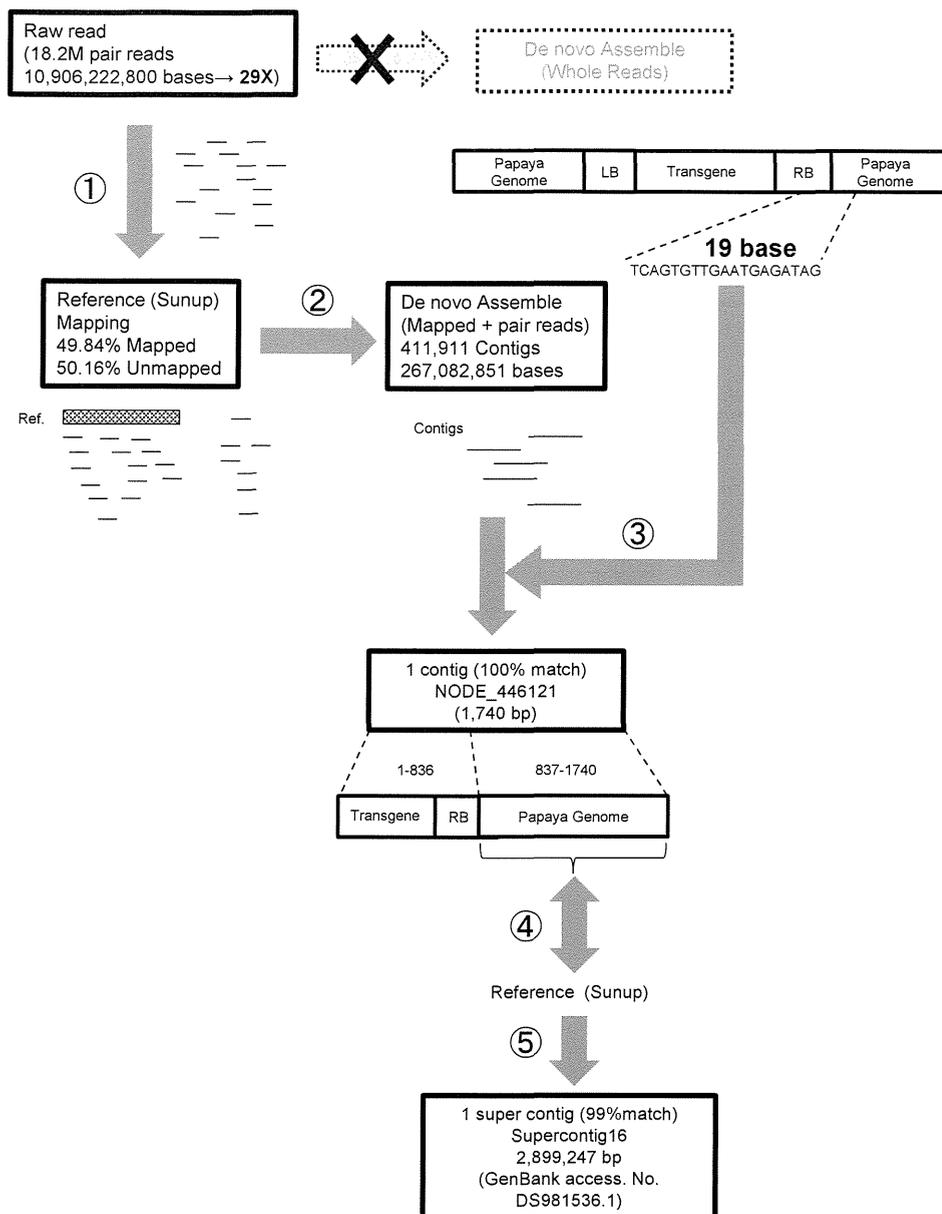


Figure 13. Tiベクターの Right-border (RB) 配列を含む 19 bp をアンカーに使用して、次世代シーケンシングデータから得られた配列を解析した結果

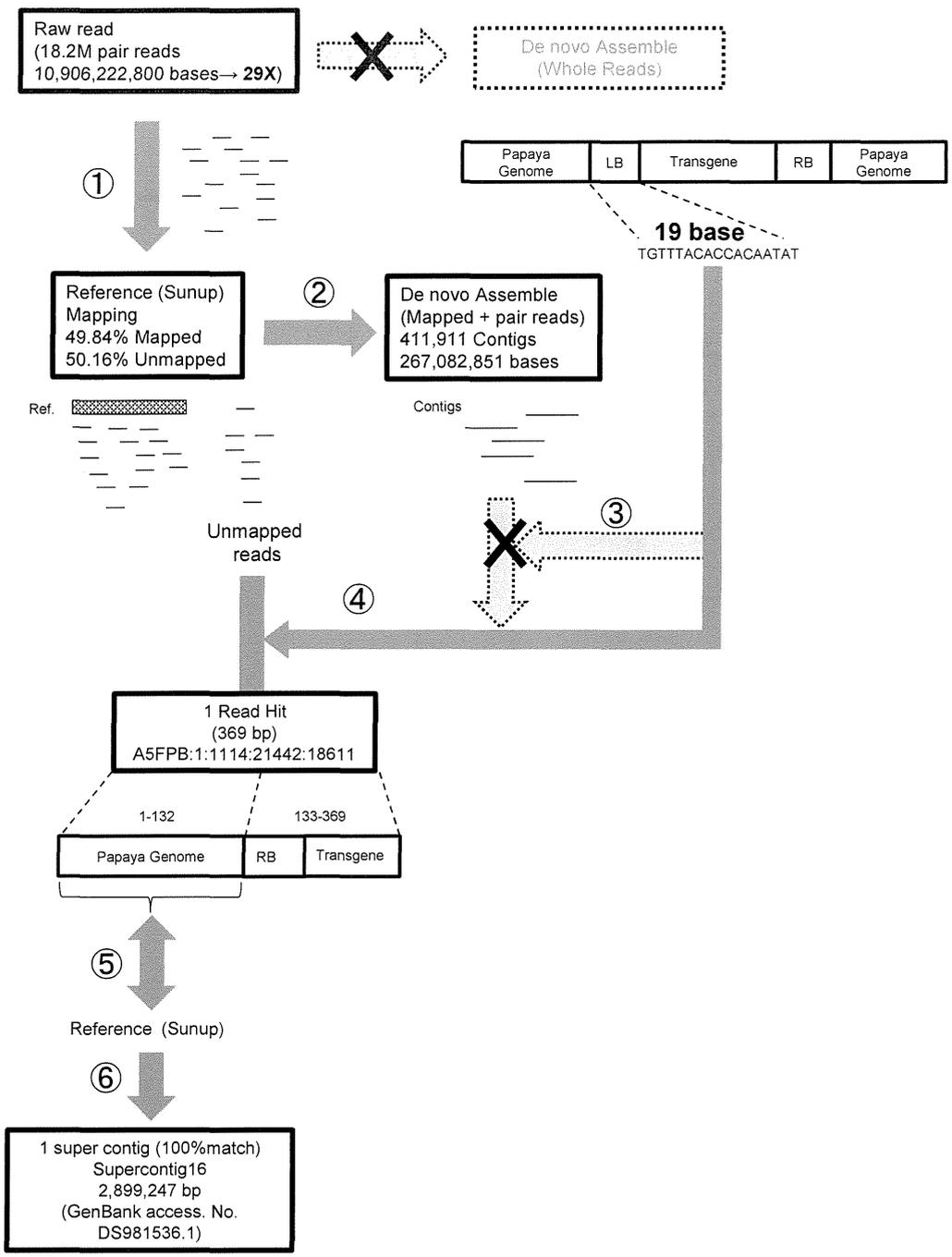


Figure 14. Tiベクターの Right-border (LB) 配列の 19 bp をアンカーに使用して、次世代シーケンシングデータから得られた配列を解析した結果

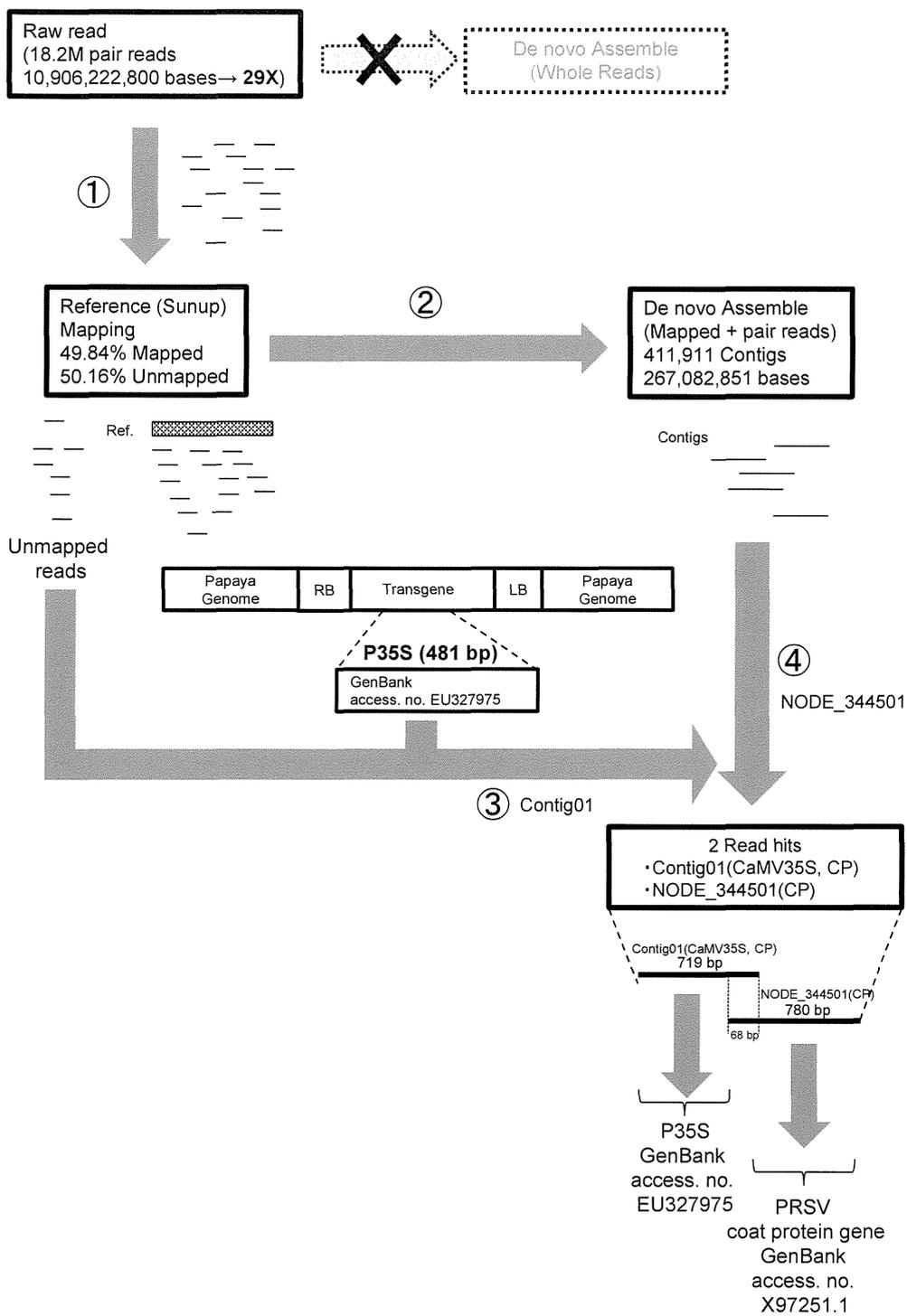


Figure 15. P35S 配列をアンカーに使用して次世代シーケンシングデータから得られた配列を解析した結果

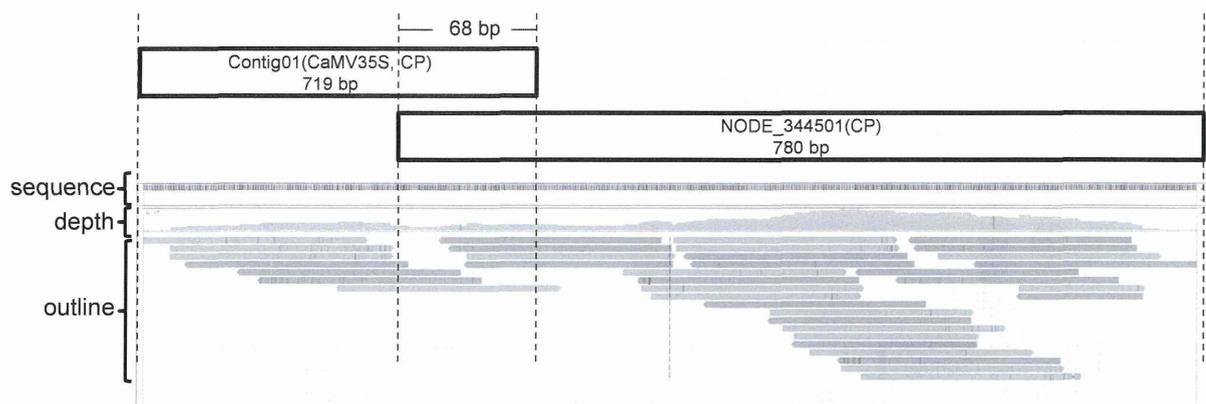


Figure 16. GM パパイヤゲノムに挿入された配列を含むトランスジェニック構造配列 P35S と PRSV 外皮タンパク質をコードする配列を含むリードを示す。

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

統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた作物と
非食用組換え作物の検知技術の開発

—統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究—

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

研究要旨

遺伝子組換え(GM)植物のうち、新規植物育種法(NBT:New Plant Breeding Techniques)の開発状況を中心に調査した。また、NBTを用いた薬用及び工業用GMも出てきたため、それらも合わせて調査した。カテゴリーとして、NBT、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、工業用(食用作物)の10種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、NBT:14件、機能性食品:1件、経口ワクチン:2件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:1件(NBTと重複)、抗体医薬:1件(NBTと重複)、治療薬:1件、診断薬・試薬:0件、環境浄化:0件、工業用:0件であり、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。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で2014年に公表・出版された論文等を調査した結果、65件が得られ、その内訳は、NBT:9件、機能性食品:11件、経口ワクチン:3件、食用医薬:3件、ワクチン抗原:1件、抗体医薬:3件(2件はNBTと重複)、治療薬:15件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:14件、工業用:3件であった。国別では、中国の28件が最も多かった。

A. 研究目的

機能性、薬用、工業用などのGM植物においても新しい遺伝子組換え技術が使用され始めている。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。

そこで本研究では、新規植物育種法(NBT:New Plant Breeding Techniques)¹⁾及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物の開発状況・生産実態に関する

情報を収集して整理し、食品の安全性確保のための基盤情報を整備する。

B. 研究方法

NBT(図1)に関する情報を文献データベース(SciFinder®、検索語「transgenic plant」)、関連学会講演要旨集等を用いて調査した。また併せて薬用、環境浄化、工業用GM植物についても調査した。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。

カテゴリーはNBTのほか、薬用GM植物

に関するものとして、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・試薬の7種を設定し、その他、環境浄化、工業用の2種を設定し、計10種類を設定した(図2)。

C. 研究結果

本研究班で独自に行ったNBTを用いたGM植物の調査結果を以下に記した。

1) 2014年に国内学会で公表・出版されたNBT及びGM植物に関する論文等

2014年8月開催の第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウムで公表されたNBT及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物に関する報告を表1-表3に示した。19件の情報が得られ、その内訳は、NBT:14件、機能性食品:1件、経口ワクチン:2件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:1件(NBTと重複)、抗体医薬:1件(NBTと重複)、治療薬:1件、診断薬・試薬:0件、環境浄化:0件、工業用:0件であり、NBTに関連した研究・開発が最も多かった(表1、表2)。

作物別集計では、イネ6件が最も多かった(表3)。

2) 2014年の国際学会(IAPB2014)でのNBT研究・開発状況

2014年8月10日-15日にオーストラリア、メルボルンで開催されたInternational Association for Plant Biotechnology Congress 2014で公表されたNBT及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物に関する報告を表4-表9に示した。39件の情報が得られ、その内訳は、NBT:12件(1件は治療薬と重

複)、機能性食品:12件(飼料に関するもの2件を含む)、経口ワクチン:7件(1件は食用医薬と重複)、食用医薬:1件(経口ワクチンと重複)、ワクチン抗原:0件、抗体医薬:2件、治療薬:3件(1件はNBTと重複)、診断薬・試薬:0件、環境浄化:1件、工業用:3件であり、機能性食品とNBTがいずれも12件と最も多かった(表4-表7)。国別集計では、オーストラリアでの開催のため、オーストラリアが12件と最も多く、次いで米国10件、ドイツ6件であった(表8)。作物別集計では、食用作物はイネ6件が最も多かった(表9)。

3) 2014年に国内外で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等(SciFinder®)

SciFinder®(キーワード:transgenic plant)で調査した2014年に公表・出版されたNBT及び薬用、環境浄化、工業用(食用作物)GM植物に関する論文等を表10-表19に示した。65件の情報が得られ、その内訳は、NBT:9件、機能性食品:11件、経口ワクチン:3件、食用医薬:3件、ワクチン抗原:1件、抗体医薬:3件(2件はNBTと重複)、治療薬:15件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:14件、工業用:3件であり、特に治療薬及び環境浄化の件数が多かった(表10-表16)。また、2014年の国別の件数は、中国28件が最も多く(表17)、作物別集計では、食用作物はイネ9件が最も多かった(表18)。

D. 考察

今回の調査から、国内外でNBTに関する研究・開発が増加しており、本分野において、中国での研究開発が、昨年度と同様に活発であ

ることが判明した。今後は、NBT を用いた GM 植物の調査結果を中心に、薬用、工業用 GM 植物、及び GM 動物の調査結果も合わせたデータベース作成のための資料をまとめる必要がある。

E. 結論

NBT 及び薬用、環境浄化用及び工業用（食用作物）GM 植物の研究・開発状況の調査の結果、国内では NBT に関する件数が多く、国内外では治療薬及び環境浄化の件数が多いことが判明した。また、国内外での研究・開発のうち、件数が最も多い国は、昨年度と同様、中国であった。次世代組換え技術を用いた動物の開発も活発に行われており、引き続き情報収集が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 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

3. その他

なし

I. 参考文献

- 1) 鎌田博：遺伝子組換え植物・食品を巡る最近の状況～新植物育種技術（New plant Breeding Techniques）への対応～
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002tccm-att/2r9852000002tcgt.pdf>

EUがNBTとして取り上げ、その技術開発の現状や今後の動向、規制のための考え方をまとめているもの [New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development, the European Commission's Joint Research Center (JRC)-Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) and JRC-Institute for Health and Consumer Prospection (IHCP), 2011年]

- ① Zinc finger nuclease technology (ZFNs) ゲノム編集(人工ヌクレアーゼによる塩基配列の改変)
- ② Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM) ゲノム編集による新塩基配列の挿入
- ③ Cisgenesis & Intragenesis 同種・遺伝子交換可能種由来遺伝子のみ挿入
Cisgenesis プロモーター・ターミネーター等も同じ
Intragenesis プロモーター・ターミネーター等を変更
- ④ RNA-dependent DNA methylation (RdDM) エピゲノム編集(DNAのメチル化状態のみの変化)
- ⑤ Grafting on GM rootstock 組換え体を用いた接ぎ木
- ⑥ Reverse Breeding 育種途中で組換え遺伝子を挿入、しかし育成した品種中には組換え遺伝子がない
- ⑦ Agro-infiltration (agro-infiltration "sensu stricto", agro-inoculation, floral dip)
agro-infiltration "sensu stricto" 体細胞組織で局所的に非増殖性核酸を導入
agro-inoculation 体細胞組織にウイルス等を導入
floral dip 花芽組織にAgrobacteriumを接種し、次世代で組換え体を選抜
- ⑧ Synthetic Genomics 人工染色体

米国: NBTを用いて開発された植物品種の一部については、個別事例ごとではあるが、遺伝子組換え生物としての規制を適用しないことを既に決定

図 1. New Plant Breeding Techniques (NBT)¹⁾

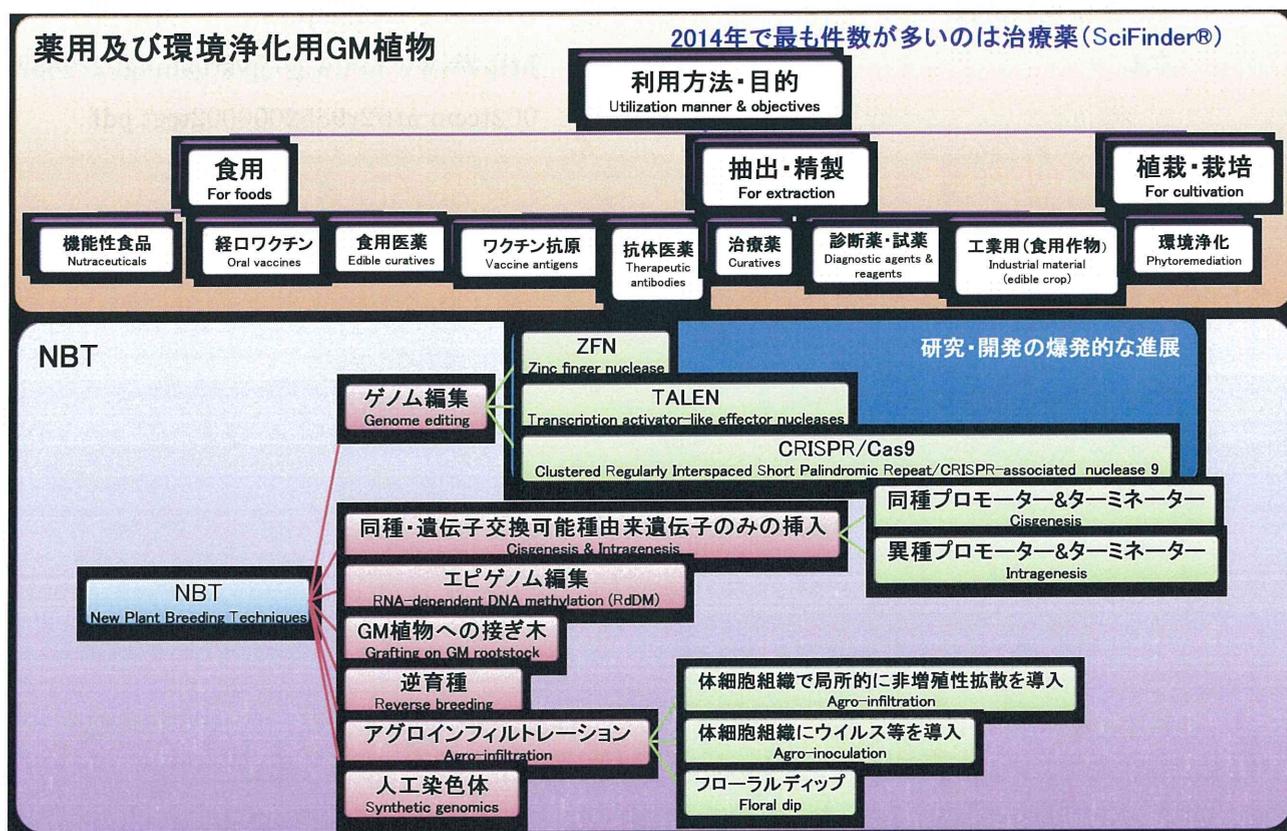


図 2. NBT と薬用、環境浄化用、工業用 GM 植物の研究・開発状況の調査

表 1. NBT 研究・開発状況 (国内 ; 2014)

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)では以下の例が報告

NBTの種類	作物	演題	研究・開発機関
NBT①	イネ	CRISPR/Casシステムを利用したイネの多重遺伝子破壊	日本・農業生物資源研、横浜市立大院
NBT①	シロイヌナズナ	人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたシロイヌナズナ多重変異体の作製	日本・大阪大院、JSPS、広島大院
NBT②	イネ	イネに適したCRISPR/Casコンストラクトの選定	日本・横浜市立大院、農業生物資源研
NBT②	イネ	植物におけるピンポイント変異導入技術の開発	日本・農業生物資源研、横浜市立大
NBT②	イネ	形質転換技術を利用したイネゲノムの人為的改変	日本・農業生物資源研
NBT④	シロイヌナズナ、タバコ	dsRNA-ペプチド複合体の導入による一過性RNAi技術の開発	日本・理研、奈良先端大院、慶應大、宇都宮大
NBT④	リンドウ	リンドウの生長・開花を抑制するSVP様遺伝子の発現と機能	日本・岩手大、八幡平市花き開発研セ
NBT⑤	植物	遺伝子置換による形質転換促進技術の開発	日本・信州大
NBT⑦-1	イチゴ	アグロインフィルトレーション法を用いた F3'5'H 過剰発現によるイチゴ花托の着色への影響	日本・徳島大、徳島大院
NBT⑦-1	タバコ	多孔プレートを用いたアグロインフィルトレーション法のハイスループット化	日本・横浜国立大
NBT⑦-1、抗体医薬	タバコ(Nicotiana benthamiana)	組換え植物発現タンパク質におけるN-結合型糖鎖修飾の解析	日本・産総研、ホクサン
NBT⑦-2	タバコ(Nicotiana benthamiana)	Cucumber mosaic virusゲノム発現組換え植物体を用いたCMVベクター利用の簡便化	日本・産総研、北海道大院
NBT⑦-2、ワクチン抗原	タバコ(Nicotiana benthamiana)	ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産;栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響	日本・東京大院、オーエンスポロ癌研究プロ、ルイビル大
NBT⑦-3	シロイヌナズナ	初期生長量が増大したアラビドプシス形質転換体の作出	日本・千葉大院

2014年の調査ではNBT14件のうち、⑦Agro-infiltrationが6件で最も多い

表 2. GM 植物 (機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、抗体医薬、ワクチン抗原、治療薬) 研究・開発状況 (国内 ; 2014)

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)では以下の例が報告

区分	作物	演題	研究・開発機関
機能性食品	イネ	イネ由来改変AK-HSDH 遺伝子を導入した形質転換カラスにおける遊離スレオニンの蓄積	日本・農研機構・作物研、北興化学
経口ワクチン	レタス(Lactuca sativa var. crispata)	食べるワクチンの開発に向けたレタスにおけるウイルス様粒子の一過性発現	日本・筑波大、医薬基盤研
経口ワクチン	レタス	遺伝子組換えレタスを用いたブタ大腸菌症用コンビネーションワクチンの開発	日本・出光興産、国立国際医療研セ
食用医薬	イネ	抗菌タンパク質を発現するイネカラスの解析	日本・京都府立大、京都農技セ
NBT⑦-1、抗体医薬	タバコ(Nicotiana benthamiana)	組換え植物発現タンパク質におけるN-結合型糖鎖修飾の解析	日本・産総研、ホクサン
NBT⑦-2、ワクチン抗原	タバコ(Nicotiana benthamiana)	ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産;栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響	日本・東京大院、オーエンスポロ癌研究プロ、ルイビル大
治療薬	緑藻 (Chlamydomonas reinhardtii)	組換え緑藻によるマツ(Picea abies)由来ジテルペンの生産	日本・大阪大院、名古屋大

黄色背景:NBTと重複

2014年の調査では、薬用・環境浄化用・産業用(食用作物)に関する研究例は2013年の調査に比較すると少ない(2013年:17件、2014年:7件、重複含む)

表 3. NBT を含む GM 植物：作物別集計（国内；2014）

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)での調査結果

作物名\区分	NBT	機能的食品	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	工業用	小計
イネ	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	6
イチゴ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
レタス	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
リンドウ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
シロイヌナズナ	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
タバコ	5	0	0	0	1	1	0	0	0	0	7
緑藻	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
植物	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
小計	15	1	2	1	1	1	1	0	0	0	22

NBT:重複1件(シロイヌナズナ-タバコ) タバコ:重複2件(NBT-抗体医薬、NBT-ワクチン抗原)

食用作物ではイネが最も多く、その中でもNBTへの使用例が多い

表 4. NBT 研究・開発状況（海外；2014）

International Association for Plant Biotechnology Congress 2014, Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014
NBT12件のうち、②Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM):7件が最も多い

区分	作物	演題	研究・開発機関
NBT①	オオムギ	True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells	ドイツ & イタリア: Leibniz-institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Institute of Biosciences and BioResources
NBT①、NBT②	カノーラ	Genome editing in canola: ZFN mediated precision targeting	オーストラリア&米国: Bundoora, La Trobe University, Dow AgroSciences
NBT①、NBT②	コムギ	Precise trait engineering in wheat using EXZACT™ technology	オーストラリア&米国: VIC Australia, Dow AgroSciences LCC
NBT①、NBT②	トウモロコシ	EXZACT™ Precision technology: engineering plant genome with ZFNs	米国: Dow AgroSciences
NBT②	イネ	Site-directed mutagenesis in rice by a combination of gene targeting and marker elimination	日本: National Institute of Agrobiological Sciences, University of Tokushima, Yokohama City University
NBT②	ジャガイモ	Targeted gene insertion through genome editing	米国: J.R. Simplot Company
NBT②	植物	KeyBase®: a targeted mutagenesis technology for the improvement of crop species	オランダ: Keygene N.V. Wageningen
NBT②	タバコ、イネ	Recombinase-directed plant gene transfer	中国: Chinese Academy of Sciences
NBT⑦-1	タバコ (Nicotiana benthamiana)	Medium-chain fatty acid biosynthesis in plant leaf lipids: synthesis in combination with high accumulation	オーストラリア: Food Futures National Research Flagship, Graham Centre for Agricultural Innovation, CSIRO Ecosystem Sciences, CSIRO Plant Industry
NBT⑦-1、治療薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	Improving the expression and activity of recombinant human epidermal growth factor in Nicotiana benthamiana	オーストラリア: Monash University, Alfred Hospital
NBT⑦-2	植物	Gene expression in stably and transiently modified plants	ドイツ: Icon Genetics
NBT⑧	植物	Development of engineered minichromosomes in plants	米国: University of Missouri