

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

- NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発 -

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
研究協力者 河野徳昭 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
研究協力者 島田浩章 東京理科大学基礎工学部生物工学科
研究協力者 草野博彰 東京理科大学基礎工学部生物工学科

研究要旨

New Plant Breeding Techniques (NBT)は、急速な発展の途上にある技術である。そこで、本分野の技術潮流を把握するため、昨年度に引き続きTALENやCRISPRといったNBTの植物分野への応用の状況について論文の調査を行った。その結果、NBTのうち、特にTALENとCRISPRがモデル植物だけではなく、穀類等の実用作物へも盛んに応用されている実態が鮮明になった。世界的には、米国と中国が植物に対する二大NBT実施国となっているが、中国におけるTALEN及びCRISPRの、とくにイネへの使用実態については今後注視する必要があるといえる。また、TALENを適用したモデル植物の作出のため、イネの*FLO2*遺伝子を標的としたTALEN遺伝子の構築を行い、これを用いた形質転換の操作に着手した。これによって得られた植物はTALENを用いたNBT応用植物の各種解析に供することができると考えられる。

A. 研究目的

遺伝子組換え生物（genetically modified organism, GMO）は、植物分野においては、経口ワクチン等の医薬品生産や土壌浄化等の目的に利用されている。これらの新 GMO は、従来の除草剤耐性の食用作物などの GM 植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性が高い。また、近年、植物の分子育種技術は長足の進化を遂げており、いわゆる New Plant Breeding Techniques (NBT) に含まれる育種技術のなかには、標的とする遺伝子領域に正確に目的遺伝子を導入可能なものや、標的とする遺伝子領域のみを正確に破壊するような技術が

開発されている。

本研究においては、これらの非食用組換え体ならびに NBT 応用植物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知技術の確立を行うことを目的とする。そのために、代表的な NBT である TALEN を用いたゲノム編集を行ったイネの作出を試みる。

これまでに、厚生労働省による安全性審査の手続きを経た遺伝子組換え食品等のうち、遺伝子組換えトウモロコシ、大豆、じゃがいも等については検査法が公定法として存在するが、中国産の未承認組換えイネの混入事例のように、今後は、未承認または NBT 応用生物を含む未知の組換え、または遺伝子編集技術適用作物の市場への混入が、より深刻

な問題となり得る。薬用植物資源を生産・管理する立場にある医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、そのような事態に対処可能な検知システムを開発し、未知の危険性に備える意義は危機管理の面からも非常に大きい。

本研究では、NBT を用いた作物と非食用組換え作物の食品中への混入を防止するための、安全性確保に有用な検知技術の確立を行う。遺伝子組換え食品の安全性確保に関する研究は既に行われているが、NBT による改変の場合は、ゲノム中に組換えの痕跡が残らない、または残っても非常にわずかなものであるため、それらを在来の PCR 法で検知することは困難と考えられる。本研究においてはそのような検出の困難な組換え体を検知のターゲットとし、次世代型シーケンサー等を活用した新規検知法の開発に取り組む点が独創的である。

B. 研究方法

NBT 応用状況の文献調査

NBT はいずれも急速な発展途上にある技術であり、検知法の開発と技術の開発、改良が並行して進む状況である。そこで、NBT の植物への応用例について文献調査を行い、急速に革新が進む本分野の技術潮流を把握するため、文献調査を行った。昨年度と同様に、NBT と称されるもののなかでも、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 (Zinc Finger Nuclease) 、 TALEN(s) (Transcription activator-like effector nucleases)、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR Associated)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 CRISPR 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 (最終検索結果更新日: 2015 年 2 月 24 日)。

検索結果から、植物を対象として遺伝子編集を実施した論文のみを抽出し、リスト化した。また、作成したリストについて発表年別、国別、技術カテゴリー別等に集計し、開発動向の解析を行った。

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、下記の実験を行った。

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) は、植物病原細菌 *Xanthomonas* が持つ転写因子の DNA 結合ドメインと制限酵素 *FokI* の DNA 切断ドメインの融合酵素であり、標的塩基配列を認識するタンパク質のモジュールにより標的配列に結合し、二量体を形成して二本鎖 DNA を切断し、切断部位が相同組換えまたは非同末端連結により修復される際に変異が導入される。

標的とする遺伝子は、すでに変異体が存在し、その表現型が詳しく調べられているイネの *FLO2* 遺伝子 (文献 1) とした。この遺伝子に関する変異体 (*flo2* 変異体) の 1 つである EM37 変異体において、*FLO2* 遺伝子の変異部位が同定されているため、この部位のゲノム編集を試みた。また、この遺伝子の開始コドン付近などの部位についてのゲノム編集を試みるため、Platinum TALEN キットを用いて、対応する塩基配列を認識する TALEN (人工ヌクレアーゼ) 遺伝子の構築を行った。さらに、得られた人工ヌクレアーゼが正常に機能するかどうかを検定するための評価系を構築した。

これによって作製された人工ヌクレアーゼ遺伝子はイネの形質転換に供することができる。

C. 研究結果

文献調査結果

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で各 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(表 1-3)。また、年度別の実施報告(論文)数、植物種別の実施数、技術カテゴリー及び国別の実施数及び割合、そして、特に、中国が実施した NBT (TALEN, CRISPR)の対象植物種の割合についてグラフ化した。これらの 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。

1) NBT カテゴリー別開発動向の解析結果

1-1) ZFN

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、2005 年から 2014 年の 10 年間に、27 報の植物に対する実施報告が見出された(表 1、図 1)。適用された植物は図 2 に示すシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆等の 9 種であり、モデル植物が中心であるが、2014 年にりんごやイチジクへの適用例が報告されている。

年次別の実施数を見ると、ZFN は 2012 年に一時、実施報告数が 1 件と減少したが、その後、2013 年は 7 件、2014 年は 4 件と回復している(図 1)。これは 2011 年ごろより ZFN の代替手法として TALEN が注目されはじめ、一時的に ZFN から TALEN にシフトしたものの、その後、ZFN に回帰する動きがあったものと考えられる。

ZFN については、報告数は図 3 及び 4 に示すように米国が全体の 70%と圧倒的に多

いが、その内訳は、古くから ZFN をはじめとする NBT 研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループと、Dow AgroSciences LLC のグループからの報告が大半を占めている。これら米国の 2 グループの報告を除くと、ZFN の報告数は、2013 年は 3 報、2014 年は 2 報であり、他の NBT と比較すると、実施数が低調となっている傾向が認められた。

1-2) TALEN

次に、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、2011 年から 2015 年にかけて 21 報の植物に対する実施報告が見出された(表 2、図 1)。適用された植物は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、イネ、タバコ(*Nicotiana tabacum*)、*N. benthamiana*、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、大豆、小麦の 10 種であった(図 2)。TALEN は 2011 年からモデル植物をはじめ、実用作物である穀類へと広く適用されており、その報告数は、2011 年の 2 件から、2012 年の 3 件、2013 年は 7 件、そして 2014 年は 6 件と推移している(図 1)。また、2014 年以降は CRISPR との比較研究も行われるようになってきている。

2014 年の Haun らの報告(表 2、ID5)は、大豆の脂肪酸の生合成に関わる 2 種の相同な酵素遺伝子 FAD2-1A 及び FAD2-1B に TALEN を適用することにより、両遺伝子に同時に変異を導入し、大豆油中の一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の含有比率を 20% から 80%に増加させるとともに、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸を 50%から 4%未満に低下させるという品質向上を達成したもので、相同遺伝子に対し同時に変異を導入することができる TALEN の特徴を生かし、

かつ、食用作物を対象として実用的機能改変を達成した好例といえる。なお、Haunらが属する Collectis Plant Sciences 社は Voytasらが属するミネソタ大との共同研究を行っており、これまでに大豆だけではなく、ジャガイモ、小麦、キャノーラの遺伝子組換え作物作出の実績がある。

また、2015年の Chinese Academy of Sciences の Shanらの報告(表2、ID2)によると、Shanらはイネの betaine aldehyde dehydrogenase に TALEN を用い変異を導入し、香り米(fragrant rice)の主要香気成分である 2-acetyl-1-pyrroline の T1 世代コメでの含有量を、遺伝子改変前の 0 から 0.35-0.75 mg/kg に増加させることに成功した。このように中国においては主食作物に NBT を適用し、機能改変を達成している。

1-3) CRISPR

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、2013年から2015年までのわずか2年あまりで31報の実施例が確認された(表3、図1)。適用された植物種は、昨年度に報告した、シロイヌナズナ、イネ、タバコ(*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケに加え、2014年以降、オレンジ、グループフルーツ、トマトと実施された植物種が増え、計11種となった(図2)。

CRISPR の植物への応用は 2013 年に Nature Biotechnology に 3 報が同時に報告されたのを皮切りに、論文数が急速に増加しており、短期間に 11 種(ゼニゴケを含む)もの植物に適用されていることは注目すべき点である。報告数も、2013年に9報だったものが、2014年に18報と倍増しており、2013年の7報から2014年の6報に微減した TALEN と比較すると、その普及の勢いは驚異的である。

また、これまで、CRISPR の実施報告は対象とする植物への適用可能性の検討といったトライアル的なもので占められていたが、2015年の Ningらの報告(表3、ID1)は、CRISPR を用いシロイヌナズナの開花に関わる新規 NAC 転写因子を見出したもので、遺伝子の分子機能解析の手法として利用され始めている実態が明らかになった。

上記の技術カテゴリー別の適用例数は、ZFN は標的部位の設計に塩基配列の制限がある、TALEN は標的部位の配列の自由度は高いがタンパク質で塩基配列を認識するためコンストラクトの設計が煩雑、CRISPR は標的部位の自由度が高く、標的部位に相補的な塩基配列 (guide RNA, gRNA) の設計のみが必要とされるといった各 NBT の技術的特徴、特に、いかに簡便であるかをよく反映していると考えられ、技術的に簡便な CRISPR が急速に適用例を増やしている実態が明らかになった。

2) 国別開発動向の解析結果

研究が実施された国別でみると、図4に示すように、TALEN 及び CRISPR については、TALEN では米国と中国が全体の 71%、CRISPR では米国と中国で全体の 74%と、米国と中国が 2 大開発国となっていることが示された。中国では、Chinese Academy of Sciences からの報告数が多い。

中国の開発動向についてさらに詳しくみると、図5のように TALEN、CRISPR 両技術の適用対象植物としてイネがそれぞれ 4 割を占めており、主食作物であるイネに対する遺伝子改変の取り組みが盛んであることが明らかになった。

NBT モデル植物作出のための基盤技術整備

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

実際に試行した。

1) TALEN コンストラクト構築技術の習得

TALEN の技術習得のため、2014 年 3 月 25 日～26 日に広島大学で開催された「ゲノム編集コンソーシアム」(主宰：広島大学理学研究科数理分子生命理学専攻分子遺伝学研究室山本卓教授)主催の第 7 回人工ヌクレアーゼ作製講習会(Platinum TALEN の作製)に参加した(河野、草野)。これにより TALEN を用いたゲノム編集技術を習得した。

2) TALEN を利用した人工ヌクレアーゼの構築

イネの *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子を構築した。標的部位はこれまでに知られている *flo2* 変異体の変異部位とした。これに加えて、この遺伝子の開始コドン領域などにも標的部位を設定し、それぞれの部位でのゲノム編集が可能な遺伝子構築を終えた(図 6)。TALEN 遺伝子(人工ヌクレアーゼ遺伝子)は Platinum TALEN キットを利用し、標的配列の 2 つの鎖を認識するための TALEN 遺伝子を構築した後、それぞれを 1 つのバイナリーベクターに組み込み、植物で機能するプラスミドを構築した。

3) Platinum TALEN の検証

公表されている Platinum TALEN キットで使用されている *FokI* 遺伝子領域の塩基配列を解析したところ、ここで用いられている *FokI* はホモダイマー型酵素遺伝子であることがわかった。このため、ホモダイマー型 *FokI* によるこのシステムではオフターゲットを引き起こす可能性が高いものと推測された。

4) 形質転換イネの作出

構築した *FLO2* を標的とする TALEN 遺伝子を用いて、イネの形質転換を開始した。

また、これと平行して作製した TALEN 遺伝子の人工ヌクレアーゼ活性の検定を行うためのシステム構築を行った。

D. 考察

今年度は、昨年度に引き続き、NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、同技術が積極的に植物へ利用されている実態が明らかになった。急速に植物への利用が進んでいる TALEN 及び CRISPR であるが、2014 年の報告数を勘案すると、CRISPR は 2013 年から 2014 年にかけて報告数が倍増したのに対し、TALEN は微減しており、実験手法が簡便な CRISPR が台頭しはじめている感がある。また、実施国については、米国と中国が二大 NBT 大国となっている状況が伺える。中国においては、TALEN や CRISPR の実施対象植物として、イネに対する実施報告数が全体の 4 割を占めることも明らかになった。これらの状況より、「中国」の「CRISPR」によって遺伝子改変された「イネ」のフードチェーンへの混入に、今後一層注視する必要があると考えられる。

TALEN を利用した植物の遺伝子編集の試みについては、今年度は、*FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を終えた。これを用いてイネの形質転換をする予定である。形質転換した後、植物個体が再分化するまで数ヶ月を要するが、今後はこれらの再分化植物の中で、ゲノム編集が起こっている個体を選抜することになる。さらに個々の植物におけるゲノム編集パターンを詳しく調べる予定である。

本研究においては、NBT を利用した組換え体をモデルとして作出することにより、検知法開発等に関する種々のモデル実験系の構築が可能になり、組換え植物の食品への混入検知法の開発等、厚生労働行政に貢献する

研究成果が挙げられると考えられる。

E. 結論

今年度は、昨年度に引き続き、TALEN や CRISPR といった NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、NBT、特に TALEN と CRISPR がモデル植物だけでなく、穀類等の実用植物へも盛んに応用されている実態が鮮明になった。世界的には、米国と中国が二大 NBT 実施国となっているが、中国における TALEN 及び CRISPR の、特にイネへの使用実態については今後注視する必要があるといえる。

また、イネの *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を行い、これを用いた形質転換の操作に着手した。これによって得られた植物は、TALEN を用いた NBT の解析に供することができると考えられる。

F. 文献

1) A long 5'UTR of the rice OsMac1 mRNA enabling the sufficient translation of the downstream ORF. Teramura, H., Enomoto, Y., Aoki, H., Sasaki, T., and Shimada, H. *Plant Biotechnology* **29**, 43-49 (2012) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.1209a

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 紀平望帆、小野寺瞳、青木裕美、草野博彰、島田浩章 (東京理科大・生物工) 「植物ゲノム編集 活性評価ベクター pDual35S-R-Luc+ の開発」第56回植物生理学会年会 2015年3月16日(月)-18日(水) 東京農業大学世田谷キャンパス

2. 論文発表

無し

H. 知的財産権の出願, 登録状況

無し

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その1)

query: ZFN, zinc finger nuclease, plant

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 1	apple, fig Agricultural Research Organization, Bet-Dagan, Israel
PMID:25528147	Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees.
ZFN	Peer R, Rivin G, Golobovitch S, Lapidot M, Gal-On A, Vainstein A, Tzfira T, Flaishman MA. <i>Planta</i> . 2014 Dec 21. [Epub ahead of print]
2014 2	rice International Rice Research Institute Metro Manila, Philippines
PMID:25018764	Identification of safe harbor" loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair."
ZFN	Cantos C, Francisco P, Trijatmiko KR, Slamet-Loedin I, Chadha-Mohanty PK. <i>Front Plant Sci</i> . 2014;5:302. doi: 10.3389/fpls.2014.00302.
2014 3	tobacco University of Minnesota, MN, USA.
PMID:24443519	DNA replicons for plant genome engineering.
ZFN	Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. <i>Plant Cell</i> . 2014 Jan;26(1):151-63. doi: 10.1105/tpc.113.119792. Epub 2014 Jan 17.
2014 4	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:24057367	Tailor-made mutations in Arabidopsis using zinc finger nucleases.
ZFN	Qi Y, Starker CG, Zhang F, Baltes NJ, Voytas DF. <i>Methods Mol Biol</i> . 2014;1062:193-209. doi: 10.1007/978-1-62703-580-4_10.
2013 5	soybean University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23996306	Targeted mutagenesis for functional analysis of gene duplication in legumes.
ZFN	Curtin SJ, Anderson JE, Starker CG, Baltes NJ, Mani D, Voytas DF, Stupar RM. <i>Methods Mol Biol</i> . 2013;1069:25-42. doi: 10.1007/978-1-62703-613-9_3.
2013 6	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23979943	Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases.
ZFN	Qi Y, Li X, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. <i>G3 (Bethesda)</i> . 2013 Oct 3;3(10):1707-15. doi: 10.1534/g3.113.006270.
2013 7	corn Dow AgroSciences LLC, IN, USA
PMID:23953646	Trait stacking via targeted genome editing.
ZFN	Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Zeitler B, Amora R, Corbin DR, Miles RR, Arnold NL, Strange TL, Simpson MA, Cao Z, Carroll C, Pawelczak KS, Blue R, West K, Rowland LM, Perkins D, Samuel P, Dewes CM, Shen L, Sriram S, et al. <i>Plant Biotechnol J</i> . 2013 Dec;11(9):1126-34. doi: 10.1111/pbi.12107. Epub 2013 Aug 19.
2013 8	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:23625357	A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta.
ZFN/TALEN	Johnson RA, Gurevich V, Levy AA. <i>Plant Mol Biol</i> . 2013 Jun;82(3):207-21. doi: 10.1007/s11103-013-0052-1. Epub 2013 Apr 28.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2013 9	tobacco, Arabidopsis University of Michigan, Michigan, USA
PMID:23509176 ZFN	Nonhomologous end joining-mediated gene replacement in plant cells. Weinthal DM, Taylor RA, Tzfira T. Plant Physiol. 2013 May;162(1):390-400. doi: 10.1104/pp.112.212910. Epub 2013 Mar 18.
2013 10	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23282329 ZFN	Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in Arabidopsis by manipulating DNA repair pathways. Qi Y, Zhang Y, Zhang F, Baller JA, Cleland SC, Ryu Y, Starker CG, Voytas DF. Genome Res. 2013 Mar;23(3):547-54. doi: 10.1101/gr.145557.112. Epub 2013 Jan 2.
2013 11	Arabidopsis Leiden University, Leiden, The Netherlands
PMID:23279135 ZFN	ZFN-mediated gene targeting of the Arabidopsis protoporphyrinogen oxidase gene through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. de Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. Plant Biotechnol J. 2013 May;11(4):510-5. doi: 10.1111/pbi.12040. Epub 2012 Dec 28.
2012 12	Arabidopsis University of Michigan, Michigan, USA
PMID:22082504 ZFN	Zinc finger nuclease and homing endonuclease-mediated assembly of multigene plant transformation vectors. Zeevi V, Liang Z, Arieli U, Tzfira T. Plant Physiol. 2012 Jan;158(1):132-44. doi: 10.1104/pp.111.184374. Epub 2011 Nov 14.
2011 13	Arabidopsis the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:21848915 ZFN	Localized egg-cell expression of effector proteins for targeted modification of the Arabidopsis genome. Even-Faitelson L, Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N, Lew AA. Plant J. 2011 Dec;68(5):929-37. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04741.x. Epub 2011 Oct 4.
2011 14	soybean University of Minnesota, MN, USA.
PMID:21464476 ZFN	Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM. Plant Physiol. 2011 Jun;156(2):466-73. doi: 10.1104/pp.111.172981. Epub 2011 Apr 4.
2011 15	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:21181530 ZFN	Targeted mutagenesis in Arabidopsis using zinc-finger nucleases. Zhang F, Voytas DF. Methods Mol Biol. 2011;701:167-77. doi: 10.1007/978-1-61737-957-4_9.
2011 16	Arabidopsis, soybean Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA
PMID:21151135 ZFN	Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JR, et al. Nat Methods. 2011 Jan;8(1):67-9. doi: 10.1038/nmeth.1542. Epub 2010 Dec 12.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2010 17 PMID:20876340 ZFN	tobacco, petunia Danziger Innovations Ltd., Beit Dagan, Israel Nontransgenic genome modification in plant cells. Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Ovadis M, Tzfira T, Vainstein A. Plant Physiol. 2010 Nov;154(3):1079-87. doi: 10.1104/pp.110.164806. Epub 2010 Sep 27.
2010 18 PMID:20508152 ZFN	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA. High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):12028-33. doi: 10.1073/pnas.0914991107. Epub 2010 May 27.
2010 19 PMID:20508151 ZFN	Arabidopsis NIAS, Tsukuba, Japan Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):12034-9. doi: 10.1073/pnas.1000234107. Epub 2010 May 27. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 4;108(1):433.
2010 20 PMID:20454835 ZFN	tobacco Dow AgroSciences LLC, IN, USA Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. Petolino JF, Worden A, Curlee K, Connell J, Strange Moynahan TL, Larsen C, Russell S. Plant Mol Biol. 2010 Aug;73(6):617-28. doi: 10.1007/s11103-010-9641-4. Epub 2010 May 8.
2009 21 PMID:19754840 ZFN	Arabidopsis Leiden University, Leiden, The Netherlands ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. Plant Biotechnol J. 2009 Oct;7(8):821-35. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00446.x.
2009 22 PMID:19404259 ZFN	corn Dow AgroSciences LLC, IN, USA Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, et al. Nature. 2009 May 21;459(7245):437-41. doi: 10.1038/nature07992. Epub 2009 Apr 29.
2009 23 PMID:19404258 ZFN	tobacco University of Minnesota, MN, USA. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. Nature. 2009 May 21;459(7245):442-5. doi: 10.1038/nature07845. Epub 2009 Apr 29.
2009 24 PMID:19112554 ZFN	tobacco Dow AgroSciences LLC, IN, USA Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Garrison R, Schulenberg L, Blue R, Worden A, Baker L, Faraji F, Zhang L, Holmes MC, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Plant Mol Biol. 2009 Apr;69(6):699-709. doi: 10.1007/s11103-008-9449-7. Epub 2008 Dec 27.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その4)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2008 25 PMID:18657511 ZFN	tobacco Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA Rapid open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification." Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Gabel C, Dassie JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, et al. Mol Cell. 2008 Jul 25;31(2):294-301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
2005 26 PMID:16262717 ZFN	tobacco University of Minnesota, MN, USA. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ Jr, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF. Plant J. 2005 Nov;44(4):693-705.
2005 27 PMID:15677315 ZFN	Arabidopsis University of Utah, UT, USA Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 8;102(6):2232-7. Epub 2005 Jan 26.

表2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その1)

query: TALEN(s), TAL effector, plant

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2015	corn
1	Iowa State University, Ames, USA
PMID:25644697	Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize.
TALEN	Char SN, Unger-Wallace E, Frame B, Briggs SA, Main M, Spalding MH, Vollbrecht E, Wang K, Yang B. Plant Biotechnol J. 2015 Feb 3. doi: 10.1111/pbi.12344. [Epub ahead of print]
2015	rice
2	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:25599829	Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN
TALEN	Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C. Plant Biotechnol J. 2015 Jan 20. doi: 10.1111/pbi.12312. [Epub ahead of print]
2015	Nicotiana benthamiana
3	Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:25403732	Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta.
TALEN/CRISPR	Johnson RA, Gurevich V, Filler S, Samach A, Levy AA. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):143-56. doi: 10.1007/s11103-014-0266-x. Epub 2014 Nov
2014	bread wheat
4	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:25038773	Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew.
TALEN/CRISPR	Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Nat Biotechnol. 2014 Sep;32(9):947-51. doi: 10.1038/nbt.2969. Epub 2014 Jul 20.
2014	soybean
5	Cellectis plant sciences Inc., MN, USA
PMID:24851712	Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene
TALEN	Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Plant Biotechnol J. 2014 Sep;12(7):934-40. doi: 10.1111/pbi.12201. Epub 2014 May 23.
2014	barley
6	Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany
PMID:24643227	True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid
TALEN	Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. PLoS One. 2014;9(3):e92046. doi: 10.1371/journal.pone.0092046.
2014	corn
7	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:24576457	Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system.
TALEN/CRISPR	Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. J Genet Genomics. 2014 Feb 20;41(2):63-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001. Epub 2013 Dec
2014	rice
8	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:24556552	An efficient TALEN mutagenesis system in rice.
TALEN	Chen K, Shan Q, Gao C. Methods. 2014 Aug 15;69(1):2-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.02.013. Epub 2014 Feb 17.

2015: data of 2015/1/1 ~ 2/24

表2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 9	Nicotiana benthamiana, rice Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing, China
PMID:24521457	The last half-repeat of transcription activator-like effector (TALE) is dispensable and thereby TALE-based technology can be simplified.
TALEN	Zheng CK, Wang CL, Zhang XP, Wang FJ, Qin TF, Zhao KJ. Mol Plant Pathol. 2014 Sep;15(7):690-7. doi: 10.1111/mpp.12125. Epub 2014 Apr 10.
2013 10	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA
PMID:23979944	Targeted mutagenesis of Arabidopsis thaliana using engineered TAL effector nucleases.
TALEN	Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. G3 (Bethesda). 2013 Oct 3;3(10):1697-705. doi: 10.1534/g3.113.007104.
2013 11	Brassica oleracea Southwest University, Chongqing, China
PMID:23870552	Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in Brassica oleracea.
TALEN	Sun Z, Li N, Huang G, Xu J, Pan Y, Wang Z, Tang Q, Song M, Wang X. J Integr Plant Biol. 2013 Nov;55(11):1092-103. doi: 10.1111/jipb.12091. Epub 2013 Sep 18.
2013 12	barley Aarhus University, Slagelse, Denmark
PMID:23689819	TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants.
TALEN	Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB. Plant Mol Biol. 2013 Oct;83(3):279-85. doi: 10.1007/s11103-013-0078-4. Epub 2013 May
2013 13	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:23625357	A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta.
TALEN/ZFN	Johnson RA, Gurevich V, Lewy AA. Plant Mol Biol. 2013 Jun;82(3):207-21. doi: 10.1007/s11103-013-0052-1. Epub 2013 Apr 28.
2013 14	rice Iowa State University, Ames, USA
PMID:23430045	Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice.
TALEN	Li T, Huang S, Zhou J, Yang B. Mol Plant. 2013 May;6(3):781-9. doi: 10.1093/mp/sst034. Epub 2013 Feb 21.
2013 15	rice, Brachypodium Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:23288864	Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs.
TALEN	Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu J, Voytas DF, Zheng X, Zhang Y, Gao C. Mol Plant. 2013 Jul;6(4):1365-8. doi: 10.1093/mp/sss162. Epub 2013 Jan 2. No abstract available.
2013 16	tobacco University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, China
PMID:23124327	Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering.
TALEN	Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. Plant Physiol. 2013 Jan;161(1):20-7. doi: 10.1104/pp.112.205179. Epub 2012 Nov 2.

表2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2012 17	rice Colorado State University, CO, USA
PMID:23078195	Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (<i>Oryza sativa</i>) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of <i>Xanthomonas oryzae</i> .
TALEN	Verdier V, Triplett LR, Hummel AW, Corral R, Cernadas RA, Schmidt CL, Bogdanove AJ, Leach JE. New Phytol. 2012 Dec;196(4):1197-207. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04367.x. Epub 2012 Oct 18.
2012 18	rice Iowa State University, IA, USA
PMID:22565958	High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice.
TALEN	Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Nat Biotechnol. 2012 May 7;30(5):390-2. doi: 10.1038/nbt.2199. No abstract available.
2012 19	tobacco King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia
PMID:22271303	Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification.
TALEN	Li L, Piatek MJ, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, Sabir JS, Zhu JK, Mahfouz MM. Plant Mol Biol. 2012 Mar;78(4-5):407-16. doi: 10.1007/s11103-012-9875-4. Epub 2012 Jan
2011 20	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA
PMID:21493687	Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.
TALEN	Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(12):e82. doi: 10.1093/nar/gkr218. Epub 2011 Apr 14. Erratum in: Nucleic Acids Res. 2011 Sep 1;39(17):7879.
2011 21	tobacco King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia
PMID:21262818	De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks.
TALEN	Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 8;108(6):2623-8. doi: 10.1073/pnas.1019533108. Epub 2011 Jan 24.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その1)

query: CRISPR, cas9, plant, arabidopsis, nicotiana

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2015 1	Arabidopsis National Institute of Biological Sciences, Beijing, China
PMID:25578968	Two novel NAC transcription factors regulate gene expression and flowering time by associating with the histone demethylase JMJ14.
CRISPR	Ning YQ, Ma ZY, Huang HW, Mo H, Zhao TT, Li L, Cai T, Chen S, Ma L, He XJ. Nucleic Acids Res. 2015 Jan 10. doi:pil: gku1382. [Epub ahead of print]
2015 2	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:25403732	Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta.
CRISPR/TALEN	Johnson RA, Gurevich V, Filler S, Samach A, Lewy AA. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):143-56. doi: 10.1007/s11103-014-0266-x. Epub 2014 Nov 18.
2015 3	tobacco Southwest University, Chongqing, China
PMID:25344637	CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Nicotiana tabacum.
CRISPR	Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X, Wu Y, Zhao P, Xia Q. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):99-110. doi: 10.1007/s11103-014-0263-0. Epub 2014 Oct 26.
2015 4	Arabidopsis Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany
PMID:25269397	Site-directed mutagenesis in Arabidopsis thaliana using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles.
CRISPR	Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G. Planta. 2015 Jan;241(1):271-84. doi: 10.1007/s00425-014-2180-5. Epub 2014 Oct 1.
2014 5	corn, Arabidopsis China Agricultural University, Beijing, China
PMID:25432517	A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants.
CRISPR	Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327. [Epub ahead of print]
2014 6	Arabidopsis, tobacco Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA
PMID:25398353	Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco.
CRISPR	Li JF, Zhang D, Sheen J. Methods Enzymol. 2014;546:459-72. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00022-2.
2014 7	rice NIAS, Tsukuba, Japan
PMID:25392068	Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice.
CRISPR	Endo M, Mikami M, Toki S. Plant Cell Physiol. 2014 Nov 11. doi:pil: pcu154. [Epub ahead of print]
2014 8	Arabidopsis Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
PMID:25327456	The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny.
CRISPR	Schimi S, Fauser F, Puchta H. Plant J. 2014 Dec;80(6):1139-50. doi: 10.1111/tpj.12704. Epub 2014 Nov 11.

2015: data of 2015/1/1 ~ 2/24

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 9	rice, wheat Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:25232936 CRISPR	Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C. Nat Protoc. 2014 Oct;9(10):2395-410. doi: 10.1038/nprot.2014.157. Epub 2014 Sep 18.
2014 10	tomato Boyce Thompson Institute for Plant Science, NY, USA
PMID:25225186 CRISPR	Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Plant Physiol. 2014 Nov;166(3):1292-7. doi: 10.1104/pp.114.247577. Epub 2014 Sep 15. No abstract available.
2014 11	rice Iowa State University, Ames, IA, USA
PMID:25200087 CRISPR	Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Nucleic Acids Res. 2014;42(17):10903-14. doi: 10.1093/nar/gku806. Epub 2014 Sep 8.
2014 12	grapefruit University of Florida, FL, USA
PMID:25146436 CRISPR	Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. Jia H, Wang N. Plant Cell Rep. 2014 Dec;33(12):1993-2001. doi: 10.1007/s00299-014-1673-9. Epub 2014 Aug 22.
2014 13	bread wheat Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:25038773 CRISPR/TALEN	Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Nat Biotechnol. 2014 Sep;32(9):947-51. doi: 10.1038/nbt.2969. Epub 2014 Jul 20.
2014 14	rice Anhui University, Hefei, China
PMID:24920971 CRISPR	Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas system in rice. Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J. Rice (N Y). 2014;7(1):5. doi: 10.1186/s12284-014-0005-6.
2014 15	Arabidopsis University of Nebraska, Nebraska, USA
PMID:24918588 CRISPR	Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Arabidopsis thaliana and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. Jiang W, Yang B, Weeks DP. PLoS One. 2014;9(6):e99225. doi: 10.1371/journal.pone.0099225.
2014 16	tomato, Arabidopsis University of California, Davis, California, USA
PMID:24868032 CRISPR	Hairy root transformation using Agrobacterium rhizogenes as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, Wang D, Reynoso MA, Zumstein K, Garcha J, Winte S, Masson H, Inagaki S, Federici F, Sinha N, Deal RB, Bailey-Serres J, Brady SM. Plant Physiol. 2014 Oct;166(2):455-69. doi: 10.1104/pp.114.239392. Epub 2014 May 27.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 17	rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:24854982	The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation.
CRISPR	Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu JK. Plant Biotechnol J. 2014 Aug;12(6):797-807. doi: 10.1111/pbi.12200. Epub 2014 May 23.
2014 18	Arabidopsis Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
PMID:24836556	Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in Arabidopsis thaliana.
CRISPR	Fausser F, Schiml S, Puchta H. Plant J. 2014 Jul;79(2):348-59. doi: 10.1111/tpj.12554. Epub 2014 Jun 17.
2014 19	sweet orange University of Florida, FL, USA
PMID:24710347	Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA.
CRISPR	Jia H, Wang N. PLoS One. 2014;9(4):e93806. doi: 10.1371/journal.pone.0093806.
2014 20	corn Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24576457	Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system.
CRISPR/TALEN	Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. J Genet Genomics. 2014 Feb 20;41(2):63-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001. Epub 2013 Dec 14.
2014 21	Arabidopsis Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:24550464	Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis.
CRISPR	Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu JK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 25;111(12):4632-7. doi: 10.1073/pnas.1400822111. Epub 2014 Feb 18.
2014 22	liverwort Kyoto University, Kyoto, Japan
PMID:24443494	CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort Marchantia polymorpha L.
CRISPR	Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T. Plant Cell Physiol. 2014 Mar;55(3):475-81. doi: 10.1093/pcp/pcu014. Epub 2014 Jan 18.
2013 23	wheat National Agri-Food Biotechnology Institute, Government of India, India
PMID:24122057	RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat.
CRISPR	Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8. doi: 10.1534/g3.113.008847.
2013 24	rice Peking University, Beijing, China
PMID:23999856	Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system.
CRISPR	Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu LJ. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1233-6. doi: 10.1038/cr.2013.123. Epub 2013 Sep 3. No abstract available.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その4)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2013 25	Arabidopsis, tobacco, sorghum , rice Iowa State University, IA, USA
PMID:23999092	Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice.
CRISPR	Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Nucleic Acids Res. 2013 Nov;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2.
2013 26	Arabidopsis, rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23963532	Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants.
CRISPR	Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):2008-11. doi: 10.1093/mp/sst121. Epub 2013 Aug 22. No abstract available.
2013 27	Arabidopsis, rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23958582	Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system.
CRISPR	Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1229-32. doi: 10.1038/cr.2013.114. Epub 2013 Aug 20. No abstract available.
2013 28	rice Pennsylvania State University, PA, USA
PMID:23956122	RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system.
CRISPR	Xie K, Yang Y. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/sst119. Epub 2013 Aug 17.
2013 29	Nicotiana benthamiana The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK
PMID:23929340	Targeted mutagenesis in the model plant <i>Nicotiana benthamiana</i> using Cas9 RNA-guided endonuclease.
CRISPR	Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):691-3. doi: 10.1038/nbt.2655. No abstract available.
2013 30	Arabidopsis, <i>Nicotiana benthamiana</i> Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA
PMID:23929339	Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in <i>Arabidopsis</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i> using guide RNA and Cas9.
CRISPR	Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):688-91. doi: 10.1038/nbt.2654. No abstract available.
2013 31	rice Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:23929338	Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system.
CRISPR	Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):686-8. doi: 10.1038/nbt.2650. No abstract available.

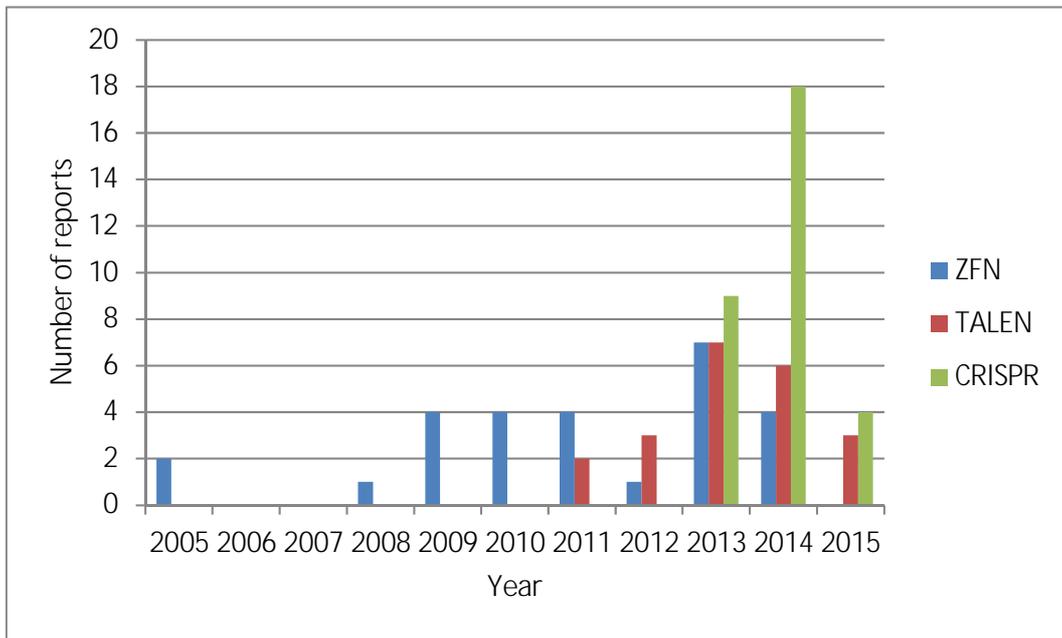


図1. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の植物関連論文数の推移（植物に対する実施報告数）

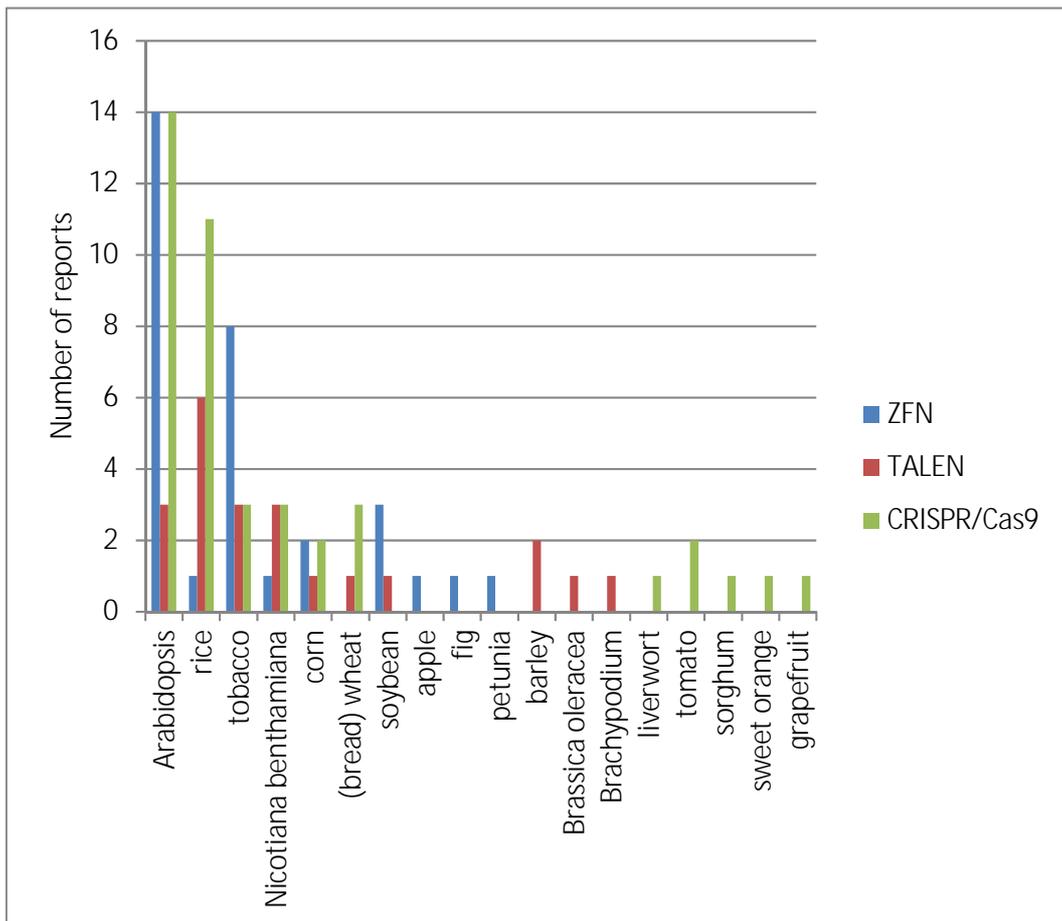


図2. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の対象植物別報告数

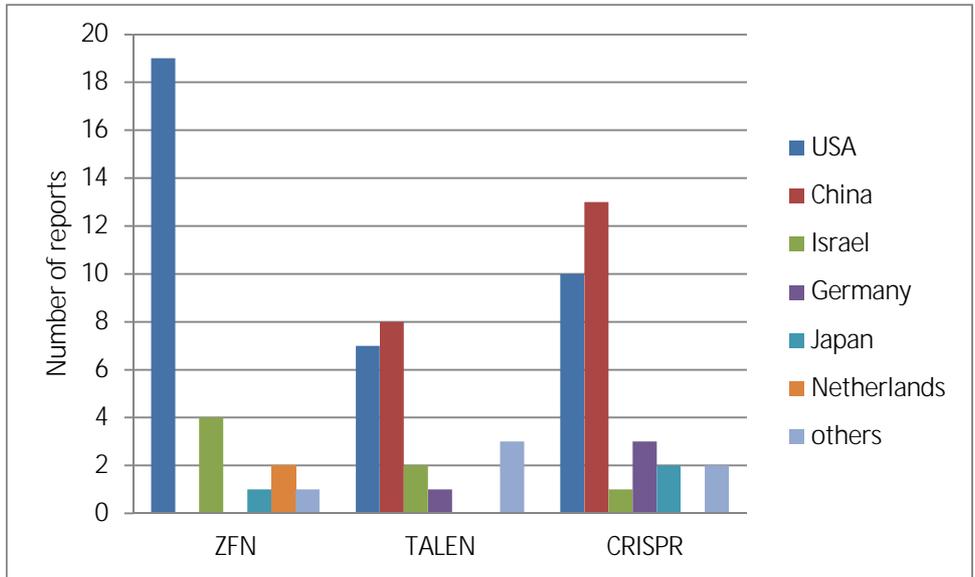


図3. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数

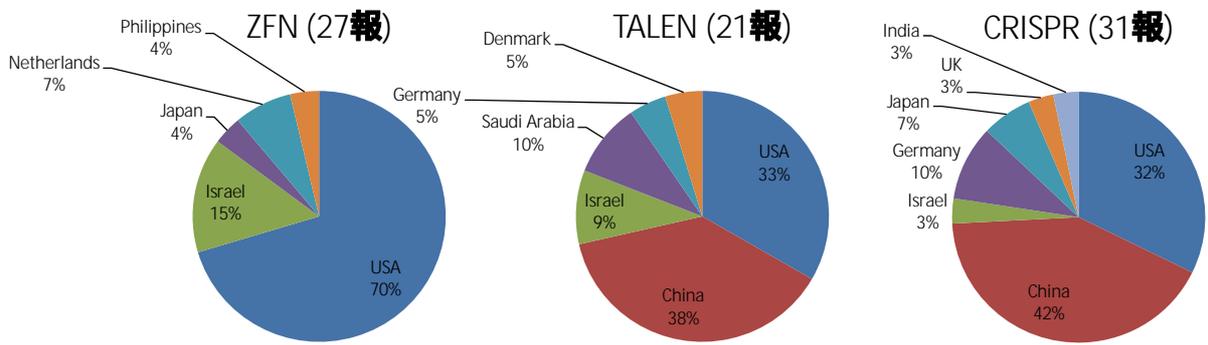


図4. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数の割合

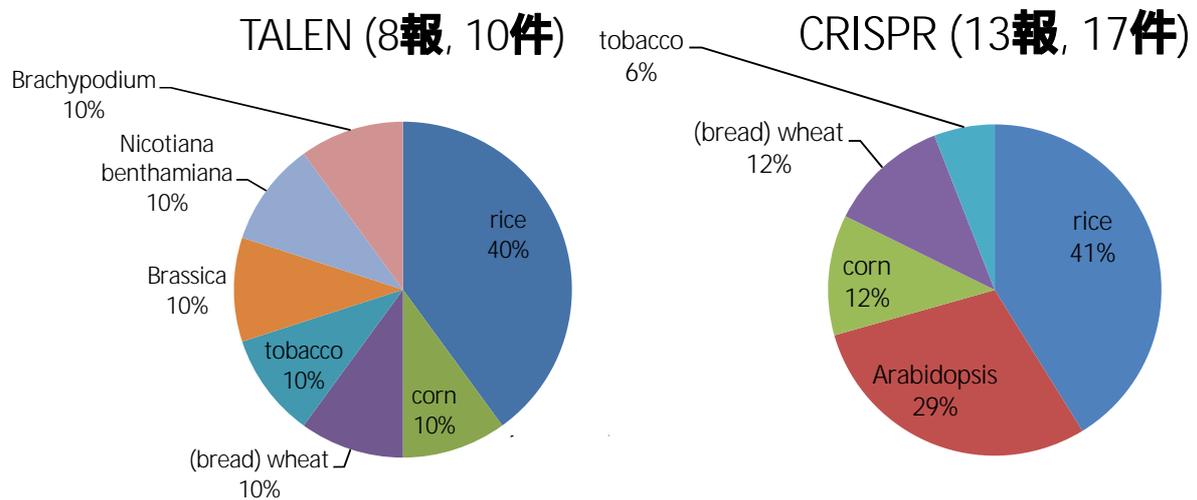


図5. 中国が実施したNBT(TALEN, CRISPR)の対象植物種の割合

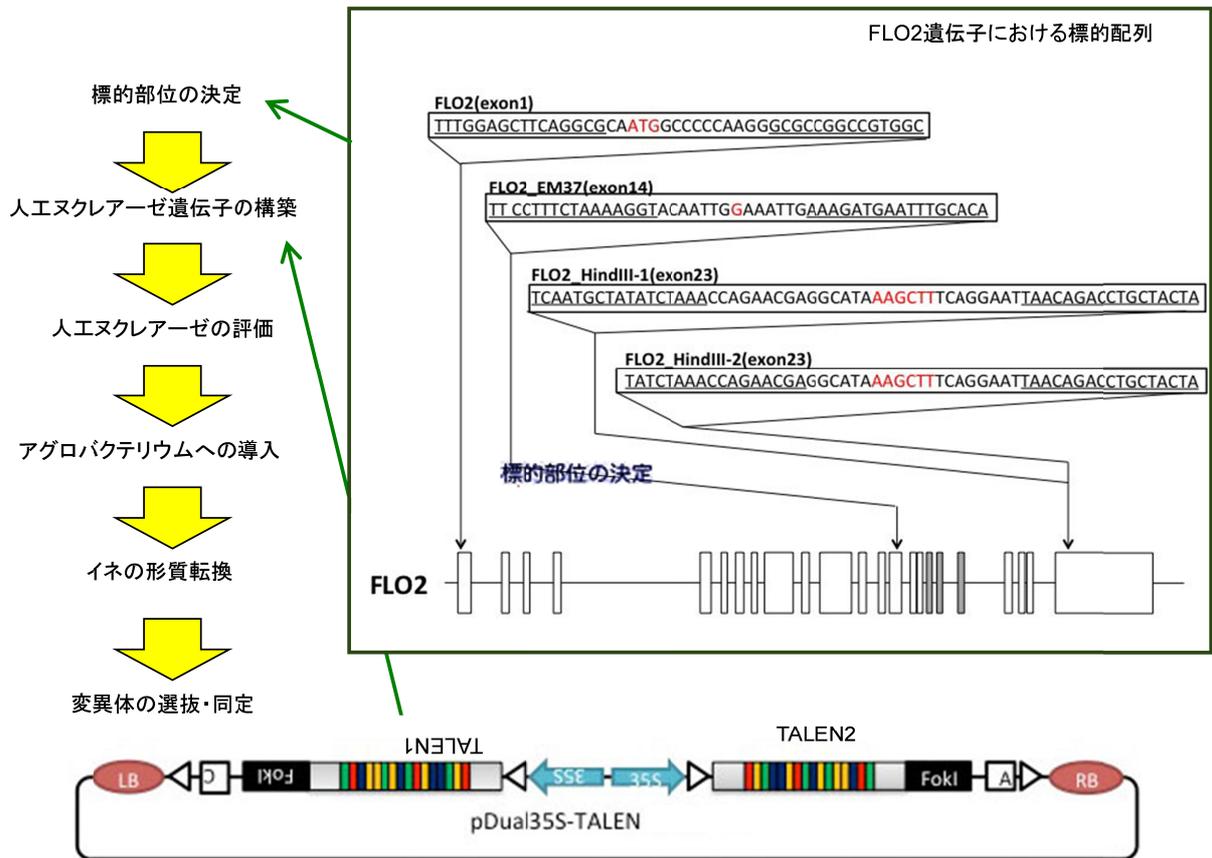


図6. FLO2遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼの標的配列の決定と変異体取得の戦略