

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

培養細胞における遺伝子ノックインの効率化とプロトコール化

研究分担者 山本 卓 広島大学大学院 理学研究科

研究要旨

申請者は、マイクロホモロジー末端結合（MMEJ）経路を利用して、外来遺伝子を効率的にノックインする方法（PITCh 法）を開発してきた。本研究では、培養細胞において、これまでの PITCh 法より効率的かつ正確に遺伝子ノックインする方法（改良型 PITCh 法）を開発した。連結部分の正確性を向上させる目的で、DSB 末端より内側のマイクロホモロジー配列を利用する MMEJ 経路である distal-MMEJ の利用を検討した。CRISPR/Cas9 ベクターと distal-MMEJ 用ドナーベクターを HEK293T 細胞に導入し、核小体に局在した緑色蛍光を確認した後、蛍光を発する細胞でのノックインの連結部の塩基配列の解析を行った。その結果、約 80 %の細胞において正確に連結されていることがわかった。これらの結果から、CRISPR/Cas9 による切断を distal-MMEJ を介して連結することにより正確な遺伝子ノックインが可能であることが示された。

研究協力者 佐久間哲史 広島大学大学院 理学研究科

A. 研究目的

人工ヌクレアーゼなどの人工 DNA 切断酵素を利用した遺伝子改変技術（ゲノム編集）によって、様々な生物における目的の遺伝子改変が可能となってきた。しかしながら、対象とする生物によってゲノム改変効率は大きく異なり、特に相同組換え（HR）を介した遺伝子ノックインは、内在の HR 活性に依存する。山本は、培養細胞や動物個体での遺伝子破壊法および遺伝子ノックイン法を確立するために、独自に開発した高活性型 TALEN(Platinum TALEN)の作製システムの確立を行い、このシステムで作製した Platinum TALEN を用いた遺伝

子破壊および遺伝子ノックインを行ってきた。さらに CRISPR-Cas9 を用いた PITCh 法によるノックインを行ってきた。しかしながら、これらの方法では効率や正確性において、十分とは言えない状況であった。そこで本研究では、システムの改良を行い、培養細胞での正確な挿入を可能にする CRISPR-Cas9 を用いた改良型 PITCh 法の開発をおこなった。さらに、安全性を調べるために類似配列への変異導入の可能性（off-target 作用）について検討した。

B. 研究方法

1. CRISPR-Cas9 を用いた Distal-MMEJ

(Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (改良型 PITCh 法) の開発

MMEJ は 5~25bp の短い相同配列を介した修復経路であり、様々な細胞周期で利用可能である。そこで本研究では、標的遺伝子を切断するための 1 種類の sgRNA とドナーベクターの 2 箇所を切断する 1 種類の sgRNA を利用し、切断面から内側に生じるマイクロホモロジー(20bp)を利用した標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた (図 1)。

改良型 PITCh 法を評価する目的で、核小体に局在する FBL の C 末に mNeonGreen を融合するための CRISPR-Cas9 と改良型 PITCh 用ベクターの作製を行なった。FBL の C 末端をコードするエキソンを標的とする複数の sgRNA を発現する all-in-one vector を Sakuma らの方法 (Scientific Reports, 2013) によって作製し、single strand annealing (SSA) アッセイにより活性を評価した。改良型 PITCh 用ベクターには、哺乳類ゲノムには類似配列の存在しない人工の標的サイトを付加し、distal-MMEJ で修復されると inframe で mNeonGreen が融合し、2A 配列と薬剤耐性遺伝子が発現する構造とした。CRISPR 発現ベクターと PITCh ベクターをヒト Hek293 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンによって選抜し、蛍光遺伝子の発現と局在を観察した。さらに、FBL 遺伝子の蛍光局在が観察された細胞からゲノム DNA を抽出し、蛍光遺伝子の挿入配列について PCR による増幅と塩基配列の解析をおこなった。

2. ゲノム編集の安全性評価 (Off-target 解析)

CRISPR デザインツールを用いてヒトゲノム配列中の CRISPR-Cas9 のオフターゲット配列を検索し、上位 3 候補を選抜した。この配列を含む領域を増幅する PCR プライマーをそれぞれ作製し、クローン化したノックイン細胞のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した。この増幅産物をシーケンスすることによって類似配列への変異導入の有無を解析した。

C. 研究結果

1. CRISPR-Cas9 を用いた distal-MMEJ を介した遺伝子ノックイン法の開発

FBL 切断および改良型 PITCh 用ドナーを切断する sgRNA を設計し、SSA アッセイにより活性評価を行なったところ、ポジティブコントロールの ZFN と同程度の高い活性を示した。これらの sgRNA と Cas9 の発現ベクターと改良型 PITCh 用ベクターをヒト Hek293 細胞へ共導入した後、ピューロマイシンによる選抜を行なった。その結果、複数の耐性クローンが得られた。これらのクローンでは FBL タンパク質の核小体に局在を蛍光で観察することができた (図 2)。さらに、蛍光遺伝子の挿入されたつなぎ目部分を PCR で増幅し、塩基配列を解析したところ、5'側では 80%、3'側では 50%のクローンにおいて正確に挿入されていることが示された (図 2)。

2. ゲノム編集の安全性評価 (off-target 解析)

CRISPR-Cas9 を用いた改良型 PITCh 法で作製した遺伝子ノックイン細胞のクロー

ンを樹立し、そのゲノムを用いて類似配列の候補について変異が導入されていないかどうかをシーケンス解析したところ、3種類の sgRNA に対して3箇所ずつ合計9箇所に変異は導入されていないことがわかった。

D. 考察

本開発によって、これまで困難であった比較的大きいサイズの DNA を正確に挿入することが可能になった。培養細胞においては、HR との効率比較においても MMEJ での効率が2-3倍であることから、実用レベルの方法であることが証明されている。また、同時に薬剤選抜が可能であること、これまでの長いホモロジーアームをもったベクターの構築が必要ないことから、簡便なノックイン法となることが期待される。これまでの PITCh 法でつなぎ目の配列について不正確なものが多かったが、これは切断面の短い配列を利用した proximal-MMEJ を利用していたことが原因で、今回 distal-MMEJ を利用する改良型を利用することによって、ノックイン効率と正確性が向上した。今後は、マイクロホモロジー配列の長さの最適化などを行い、培養細胞および個体での汎用技術に発展させて行くことが必要とされる。

E. 結論

本研究によって、HR に依存しない MMEJ を利用した遺伝子ノックイン法である PITCh 法を改良することによって正確性の高い方法の確立に成功した。さらに、この方法での改変によって、予期せぬ変異導入は低いことが示された。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT and Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nature Protocols*, 11: 118–133, 2016
- 2) Ochiai H, Sugawara T and Yamamoto T. Simultaneous live imaging of the transcription and nuclear position of specific genes. *Nucleic Acid Research*, 43: e127, 2015
- 3) 山本 卓編集、論文だけではわからない「ゲノム編集成功の秘訣 Q&A」、羊土社、2015
- 4) 佐久間哲史、山本 卓. 相同組換えに依存しない簡便・正確・高効率な遺伝子ノックイン法：PITCh システム、進化するゲノム編集技術、p59-66 (2015)

学会発表

- 1) 山本 卓. ゲノム編集の応用と将来. 平成27年度広島バイオフィオーラム, 広島, 2015.
- 2) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と医学分野での可能性. 日本人類遺伝学会第60回対会, 東京, 2015.
- 3) 山本 卓. ゲノム編集技術の開発と応用 (基盤技術から遺伝子治療・生物育種まで). 平成27年度先端技術研修 (特許庁), 東京, 2015.
- 4) 山本 卓. ゲノム編集が生命科学に革新を起こす. 読売フォーラム, 東京,

2015

- 5) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性, 第17回KNU研究推進セミナー (金沢医科大学), 金沢, 2015
- 6) 山本 卓. TALENやCRISPR/Casを用いたゲノム編集研究の現状と動向, 遺伝子デリバリー研究会第15回シンポジウム, 東京, 2015
- 7) 山本 卓. 部位特異的ヌクレアーゼを用いた培養細胞や動物でのゲノム編集, 第62回日本実験動物学会総会シンポジウム, 京都, 2015
- 8) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状, 第88回日本内分泌学会, 東京, 2015

G. 知的所有権の出願・登録状況

該当無し

【資料】

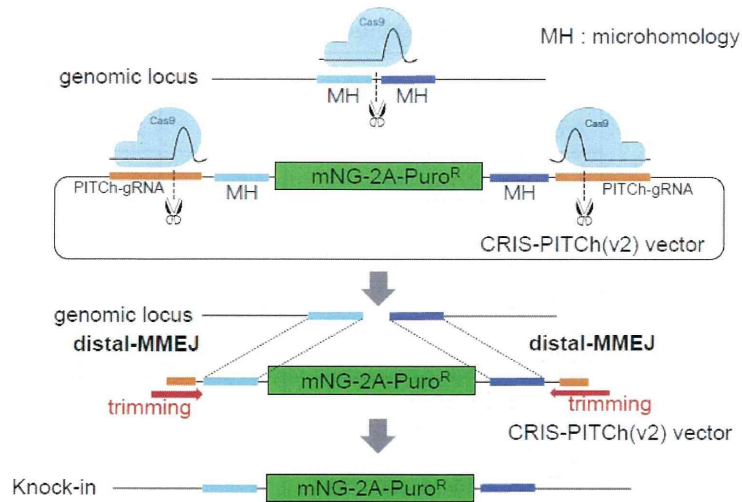


図 1. 改良型 PITCh 法の原理

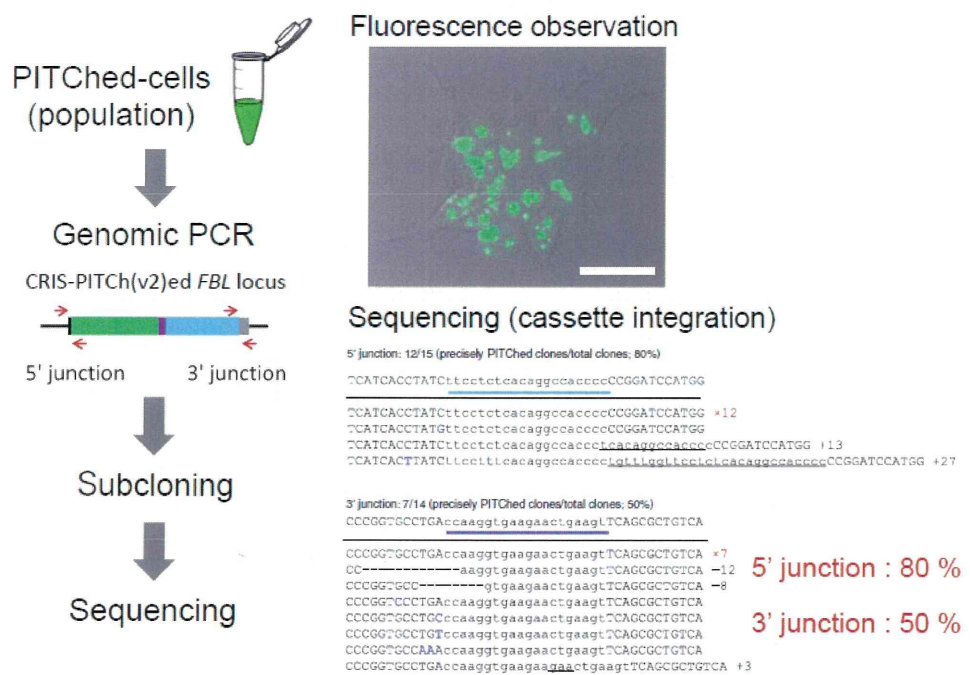


図 2. 改良型 PITCh 法による FBL 遺伝子座への遺伝子ノックイン

Name	Score**	Mutation
On-target (gRNA on the genome)		
CRIS-OT1A	3.6	Not detected
CRIS-OT2A	2.3	Not detected
CRIS-OT3A	2.2	Not detected
On-target (gRNA at the 5' junction)		
CRIS-OT1B	4.3	Not detected
CRIS-OT2B	2.5	Not detected
CRIS-OT3B	2.3	Not detected
On-target (gRNA at the 3' junction)		
CRIS-OT1C	2.5	Not detected
CRIS-OT2C	1.6	Not detected
CRIS-OT3C	1.4	Not detected

図3. 改良型 PITCH 法によって作製された細胞での off-target 解析

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

次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

研究要旨

新規育種技術の登場に伴い、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、ODM 作物の開発、動物・植物への TALEN、CRISPR/Cas9 を用いた主要作物の開発研究が活発に行われている。食品分野においても数年内に商業化される可能性も有る一方で、こうして作出された GM 生物の安全性や規制についての検討は十分されていない。そこで、安全面から科学的な検討を行い、それをもとに規制の在り方や検知方法に関する検討が必要となっている。本研究では、急速に普及しているゲノム編集技術 TALEN、CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる大きな変化や off-target の頻度やパターン、ゲノム上に与える変化について哺乳類細胞を用いて検討した。その結果、標的部位は、通常の場合では数百から数 kb ないし 10 数 kb の大きな欠失が観察されたのに対して、細胞周期を S から G₂/M 期に同期させた場合は、大きな欠失は認められなかったが、欠失発生頻度は大きく上昇した。また、細胞周期に関わらず、テロメア末端融合などの染色体異常は認められなかった。各国の次世代遺伝子組換え技術を用いた生物の研究開発状況や規制状況について調査を行った。トウモロコシや大豆、小麦などでゲノム編集を利用した新規系統の商業化が数年以内に行われる可能性がある。EU などの、新規育種技術の規制上の取り扱いの最終判断については、これまでに各国から公表されているものはなかった。

研究協力者	中島 治	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
	野口秋雄	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
	坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
	福田のぞみ	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

A. 研究目的

遺伝子組換え(GM)技術が急速に発展し、ZFN (Zinc-Finger Nuclease)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) のゲノム編集技術やオリゴヌクレオチド指向変異導入 (ODM) 接ぎ木を利用した遺伝子制御など次世代組換え技術(新

育種技術)が、食品分野でも急速に開発が進んでいる。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である。TALEN や CRISPR とともに、遺伝子上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、技術そのものの安全性と並んで近々の課題として求められている。

次世代組換え技術には、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し、それらについて、技術ごとに整理し、その原理や作用機構、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。ゲノム編集技術がゲノムに与える影響については、標的配列で起きる切断の程度 (長さ) やパターン、そして、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、について検討する必要がある。

本研究では、次世代組換え技術の中で、特に進歩が著しいゲノム編集技術で CRISPR を中心に、安全性の観点から標的配列とその周辺、および、標的外領域におけるゲノム上の変化について、異なる培養条件下での結果の解析を行った。

B. 研究方法

TK1 遺伝子エクソン 4 の片側アレル (allele A) に変異を持つヒト TK6 細胞に、もう一方のアレル (allele B) エクソン 5 上

流約 80bp に I-SceI サイトを含む 31 bp を導入した TSCE5 細胞を実験に用いた。I-SceI サイトとほぼ同一の領域に CRISPR/Cas9 の標的サイトを設計し、I-SceI とともに DNA2 本鎖切断実験を行った。本年度は、通常の細胞培養条件下の他に、S/G2/M 期に同期させた状態で Cas9 を遺伝子導入して比較検討した。

TK アッセイに用いる細胞中のエクソン 5 欠失を持つ細胞を最大限除去してバックグラウンド変異検出を抑えるために、あらかじめ 2 日以上 HAT 処理を行った。Mutation frequency (MF) を算出するために、1 処理群あたり 96 穴プレート最大約 30 枚を用いてトリフルオロチミジン薬剤選抜 (TFT) を行いエクソン 5 の欠失した細胞を分離した。実験で分離した細胞から、ゲノム DNA を抽出して、Nanodrop で総核酸量と精製度を確認した後 (260/280, 260/230 値が 2 以上)、Quant-iT dsDNA assay kit で 2 本鎖 DNA の濃度を蛍光法により定量した。切断パターンを分析するために、標的配列を含む 7 kb を含む領域を PCR 増幅して、そのバンドを高分子 DNA 分離用チップを用いて Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した。また、ゲノム DNA は、次世代シーケンサー Illumina HiSeq2000 で全ゲノム解析を昨年同様に行った。サンプルあたり 11 億リード (1100 億塩基) が得られた。得られたシーケンスデータは、Illumina Isaac 解析ソフト (Issac aligner および caller) でマッピングおよび変異コール (SNV, Indel, SV, CNV) を行った。CLC genomicworkbench (ver8.0.1) の clc mapper を用いてもヒトゲノムへマッピングと変異検出を行い比較した。

また、HumanOmni2.5-8 v1.2 を用いた BeadChip によるビーズアレイ解析でジェノタイピングを行い、SNP や CNV (copy number variation) の検出を行った。マッピングデータは IGV または Tablet を用いて比較解析した。

Cas9 の毒性・アレルゲン性—分解性試験

アレルゲン性および毒性についての知見を得るために、大腸菌から作製した組換え Cas9 を用いて、人工胃液処理による分解性試験を行った。また、Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測を行った。組換え Cas9 タンパクの発現、精製は参考文献¹⁾に付属する Supplementary Materials に記載の方法に基づいて行った。精製度は次の2つの方法、1. SDS-PAGE と CBB 染色。2. 紫外吸収 280nm と 254nm でモニターしながらのゲルろかを行い、クロマトグラムのピーク面積比から精製度を求めた。人工胃液中での分解性試験は参考文献²⁾に基づいて行った。つまり、人工胃液 (0.32%ペプシン、0.03 M NaCl、0.084 M HCL (pH 1.2)) 35 µl 中で 420 ng/µl の Cas9 を消化した。0、0.5、1、2、4 分後に 7 □l を順にサンプリングして 2.1 µl の 0.2 M Na₂CO₃ と混合して反応を停止し、等量の Laemmli SDS-PAGE sample loading buffer と混合して泳動後、CBB 染色またはウエスタンブロッティングを行った。また、加熱により、分解抵抗性がますますかどうかが検討するために、熱安定性試験を行った。720 ng/µl Cas9 を 100 度で加熱、0、0.5、1、2、5 分加熱後、サンプルを氷の上に置いて急冷した。また、同様に人工胃液を用いて消化液分解性について調べた。

参考文献

- 1) Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science (2012) 337, 816-821
- 2) Mali P., Yang L., Esvelt KM., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science (2013) 339, 823-826

文献調査 (組換え動物)

2013、2014 年に発表された論文や特許などを 3 つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用して調べた。キーワードには、

PubMed : transgenic animal、GMO
SciFinder、Google Scholar : transgenic
または GM プラス個別の動物名 (pig, cow or cattle, chicken, fish, goat, sheep, rabbit, quail, horse, shrimp, prawn, octopus, devil fish, squid, crab, soft-shell turtle, shellfish) を用いた。

タイトルと要旨から該当する論文や特許などを選抜した。導入あるいは改変遺伝子、研究内容、開発国、遺伝子改変法などの情報をまとめて一覧表を作成した。ゲノム編集について。本年度は 2014、2015 年に発表の論文や特許を対象として、ジंकフィンガーヌクレアーゼ (以下 ZFN)、TALEN、CRISPR が利用されて作成された組換え動物についての論文や特許を SciFinder、PubMed を利用して調べた。

次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

次世代組換え技術の規制に関する情報収集を行った。

C. 研究結果および考察

1. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

ゲノム編集による **off-target** の検出は、標的配列 **on-target** と類似性のある配列を検索する方法の他に、近年、標的配列との類似性に関係なく、つまり、バイアスのない分析方法も開発されている。これらの解析結果の報告からは、特異性と効率を挙げてことは可能であるが、**off-target** はゼロにすることは難しいことが示されている。また、次世代シーケンス解析技術を用いても、通常の方法では 0.1%以下で起きる **off-target** やゲノム上の以上は検出できないことが欠点として存在する。

そこで、本研究ではゲノム編集技術 **CRISPR/Cas9** を用いて 0.1%以下の低頻度で起きる変化を全ゲノムに渡って解析することを試みた。検出感度の向上のために、遺伝毒性試験で用いられている **TK** アッセイを応用した。

(1) **TK** アッセイ

TK6 細胞の片側アレルのエキソン 5 上流に **I-SceI** サイトを挿入した **TSCE5** 細胞に対して、**I-SceI** とほぼ同じ位置に **CRISPR/Cas9** 用の **gRNA** を 2 種設計し、**Cas9** をコードするゲノム編集用プラスミドを作製した。また、比較のために、**pmaxGFP**, **I-SceI** を発現するプラスミドを用いた、48 時間以上培養した後、96 穴培養プレートに 20,000 cells/well になるように播き、トリフルオロチミジン (**TFT**) 選抜しながら 2 週間程度培養してコロニー形成

させた。コントロール (無処理)、**GFP**、**I-SceI**, **CRISPR** 処理群のコロニー形成ウェル数、空ウェル数をカウントして変異発生率 (**MF**) を算出した。本アッセイでは、非相同末端結合 (**NHEJ**) により 80bp 以上の欠失によりエキソン 5 が **non-functional** になったもの (**TKI+**) のみが 10^{-7} レベルまで検出される。

この時、昨年度は通常培養条件で遺伝子導入した。今年度は、**Ca9** が発現するまで細胞周期を **S-G2/M** 期に揃えた。これは、ゲノム編集で遺伝子をノックアウトするときには、数塩基欠失を誘導するが、これは主に **NHEJ** の機構により細胞周期の大部分を占める **G1** 期に起きる。逆に、**S/G2/M** 期でゲノム編集を実行した時に **NHEJ** による **DNA** 修復機能が抑制されるためどのような変化が起きるかこれまで全く知られていないことから検討した。その結果、**I-SceI** で **DNA2** 本鎖切断を誘導した時は、**G1** 期においても **S/G2/M** 期においても変異発生頻度は大きな差は見られなかったが (2 倍程度)、**CRISPR/Cas9** を用いた時には **S/G2/M** 期における変異発生頻度は **G1** 期の 10 倍となり、この細胞周期で処理した場合は、変異が修復されずにそのまま増殖されることが示唆された (図 1)。**DNA** 切断領域周辺を 700 bp から 7 kb に渡って調べたところ、小さな欠失は **I-SceI** では細胞周期に関係なく数百 bp の欠失が認められたが、**CRISPR/Cas9** においては **I-SceI** 同様に数パターンの **G1** 期で数百 bp の欠失が認められるが、**S/G2/M** 期においてはかなり複雑な欠失パターンを示し (図 2)、これが **DNA** 修復能に影響していると考えられた。また、テロメア末端に与える影響についても検討

した結果、I-SceI、CRISPR/Cas9 いずれの場合もコントロールと比べて末端融合に変化はなかったことから（図3）、染色体異常は誘導しないと考えられた。

2. Cas9 の毒性・アレルゲン性の検討および調査

1) Cas9 の分解性試験

ゲノム編集である CRISPR/Cas9 システムに用いる Cas9 タンパク質の毒性やアレルゲン性を検討するために、リコンビナント Cas9 を作製して活性を測定した。さらに、熱安定性や加熱変性時の分解性についても検討した。胃液による分解性では、CBB 染色およびポリクローナル抗体を用いた免疫染色結果から、Cas9 は 0.5 分以内で完全に分解された。Cas9 は加熱により大部分が分解して熱安定性は低い。一方、残存した加熱 Cas9 を胃液処理したところ、0.5 分以内で完全に分解された。これらの結果から、Cas9 は胃液によりほぼ完全に消化され、アレルゲン性や毒性を示すタンパクやペプチドも存在しないものと考えられた。

2) Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測

昨年度、Cas9 のアレルゲン性をアレルゲンデータベースを用いて調査した。このとき用いた Cas9 タンパクは哺乳類に最適化された配列を用いた。今年度は、植物に最適化された配列を持つ Cas9 について、同様に検討している。

3) 文献調査（トランスジェニック動物）

① 2013 年度の該当する論文、特許などの数は以下の通りである。ウシ 22 報、魚

22 報、ブタ 30 報、ヤギ 18 報、ニワトリ 7 報、ヒツジ 10 報、エビとカニ 1 報（合計 110 報）。（エクセルファイル「文献調査 2013 年」を参照）。

② 2013 年度の開発国は圧倒的に中国が多かった。110 報中 79 報を占めた。魚はいろいろな国から報告があるが、それ以外は中国が多かった。

③ 2014 年度の該当する論文、特許などの数は以下の通り。ウシ 15 報、魚 24 報、ブタ 21 報、ヤギ 17 報、ニワトリ 4 報、ヒツジ 5 報、ウサギ 1 報（合計 87 報）。（エクセルファイル「文献調査 2014 年」を参照）。

④ 2014 年度の開発国は圧倒的に中国が多かった。87 報中 50 報を占めた。魚はいろいろな国から報告があるが、それ以外は中国が多かった。

⑤ 導入遺伝子としては以下の物が多く使われていた：ミオスタチン、fat-1、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモン、ウイルス遺伝子に対する shRNA。

⑥ 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 2014、2015 年度発表の論文、特許等が 15 報ずつあった。（エクセルファイル「新技術の論文」を参照）。開発国は中国が多かった。改変遺伝子はミオスタチンが多かった。

3. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

EU の規制に関する正式な報告は、2012 年以降はない。2015 年度第 4 四半期（2016 年 1-3 月）には、EU の NBT 技術の組換え規制に関する判断がなされると言われている

たが、現在までにそれは確認できなかった。遺伝子組換え作物開発企業などから規制当局に激しいロビー活動が行われている。一方で、ドイツは公式見解ではないものの、最終産物に外来遺伝子を含まない ODM やゲノム編集を規制の範囲内と報告している。EU の判断が注目される。欧州科学アカデミー協議会 (European Academies Science Advisory Council, EASAC) は、2013 年の報告書に続き 2015 年の声明においても EU 規制当局者に、EU の農業分野での進歩や革新に対する政策は透明性を持ち、科学的な証拠に基づいて行う必要があり、また、外来遺伝子を最終産物に含まない NBT 技術は GMO 規制から除外すべき提言している。米国は、科学技術政策局 (the White House Office of Science and Technology Policy, OSTP) が UDA, EPA, FDA などの規制当局に対しバイオテク製品規制のフレームワーク改訂 (modernizing) するよう求めた Memorandum を出している。最近のバイオテクノロジー技術に対応するように、科学的に、透明性を持ってそれぞれの規制機関が強調して対応していくという方針であるが、具体的な施策は記述されていない。米国科学アカデミーは、これまでの遺伝子組み換え作物に関する過去 20 年の研究論文を精査した結果、ヒトや動物に健康上のリスクの増加は認められないという報告書を発表した。

D. 結論

次世代遺伝子組換え技術 (新規育種法) を用いた食品の中で、開発研究はゲノム編集技術が最も活発である。これまでに、数塩基欠失 (置換) による除草剤耐性獲得し

た作物が報告されている。ODM も 1 または数塩基置換で除草剤耐性を獲得させた作物がアメリカで商業化されている。これらの技術は自然界でも起きる変化と同等であるが、既存の GMO 規制の解釈では、除外するかどうかの結論は各国とも出ていない。

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 の切断領域について、低頻度の変異誘導まで精査した結果、導入する細胞の周期によって変異頻度が上昇する現象が見られたが、その程度に違いはなかった。また、染色体異常は認められなかったことから、後代選抜を行う農業用途では、懸念される現象はこれまでに認められなかった。一方、遺伝子を導入した場合は、周辺領域の遺伝子発現に大きく影響する可能性があることが示唆された。従来法ではできなかった、ゲノム領域への遺伝子導入も可能である新しい技術を用いた場合は、新たな検討項目となるかもしれない。

接ぎ木に関しては、低分子 RNA の台木と穂木間の移行が可能であるが、その量は小さく、また最終産物には検出できなかったことから、安全上の懸念はないか、あっても小さいと考えられた。

小さな変異のみを誘導する技術は、GMO 規制の枠組みから場外すべきとの意見が多いが、各国 (EU など) の判断は遅れている。

各次世代組換え技術に対する見解：

(1) ゲノム編集技術には、ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, Meganuclease, PiggyBac などが存在する。これらの技術を用いた数塩基欠失による除草剤耐性作物 (トウモロコシや大豆) が報告されている。ゲノム編

集のみを使用した場合、ゲノム編集の正確性の確保とオフターゲットの存在しないことの証明がされている場合においては、従来育種よりもリスクが高い可能性はないと考える。DNA 組換え技術を用いているため、その過程で用いたすべての目的以外の DNA 断片の存在がゲノム上にないこと、オフターゲット変異やその他 **adverse effect** がないことが証明されれば、最終産物は従来育種との区別は困難で、検知もできないことから組換え体として扱わない判断には問題ないと考えられる。また、1 または数塩基変異誘導をゲノム編集ツールとともに変異誘導用にオリゴヌクレオチドを用いる手法がある。この場合は、塩基置換であればその数、用いるオリゴヌクレオチドの種類によって判断は異なると考えられる。一般に、ゲノム編集のみでは塩基置換の起きる頻度は非常に小さい。ゲノム編集とオリゴヌクレオチドを用いた場合は、ゲノム編集と ODM を同時に用いた手法となり、ODM 自体の扱いが影響する。さらに、遺伝子を新たに導入した場合は、全く宿主が持たない遺伝子を導入する場合はトランスジェニック生物である。すべて内在性遺伝子および制御配列からなるカセットを導入した場合は、ゲノム編集により目的標的部位へ挿入するシスジェネシスであるが、シスジェネシスは、組換えとして扱うとの判断が一般的であることから、この場合も、トランスジェニックと考えるのが適切と考える。

(2) ODM は、1 または数塩基変異導入するために、短いオリゴヌクレオチドのみを用いる手法である。オリゴヌクレオチドとして、従来は RNA-DNA ハイブリッドオ

リゴヌクレオチドが用いられたが、最近ではゲノムへの挿入起らないよう末端修飾した 1 本鎖 DNA が用いられることがある。いずれにしても、オリゴヌクレオチド自体は生物に移入してもそれ自身は増殖しないため組換え DNA 分子ではないと考える。ODM で誘導される変化は、1 または数塩基の変異である。目的部位以外の他の場所に変異がなく（培養変異以上の変化がない）、かつ、用いたオリゴヌクレオチド（およびその断片）がゲノムに挿入されていなければ、従来育種との区別は困難で検出もできないことから、ODM を用いた作物は組換え体として扱わない判断には問題ないと考えられる。オリゴヌクレオチドを単に化合物として扱うか、組換え DNA 分子として扱うかによって判断が異なる可能性がある。前者の場合は、実験自体も組換え実験に該当しない。

(3) 接ぎ木を用いた遺伝子制御

接ぎ木を利用した遺伝子組換え体の場合、遺伝子産物「タンパク」がある場合は、その産物が最終産物である実に残存している限りは、遺伝子がゲノムに挿入されていても遺伝子組換え体として扱わないとの判断はできないのではないかと。プロダクトベースで見ても、遺伝子産物が最終製品に存在すればトランスジェニックとの判断がされると考える。一方、今回の検討のように、遺伝子産物はなく、移行先（GM 穂木から台木）で遺伝子サイレンシングを誘導するが最終産物には残存しない場合の判断をどうするかである。GM 穂木には siRNA を産生するための遺伝子カセットが導入されている。ここから生成する siRNA は師管輸送により台木にごく一部移行するが、接ぎ木

を分離して最終産物である実の中には siRNA は残存しないのであれば、この最終製品には組み換え体であることを示すものは何も存在しない。同じ形質を示す野生型が存在すれば、それとの区別はできない。移行した台木中でプロモーターのメチル化を介して遺伝子サイレンシングを誘導しただけである。RNA ウイルスを用いた開花促進法と同様であり、同じ判断がされると考えられる。ただし、最終産物が組換え体でないとの判断でも、接ぎ木は一つの個体として見るとトランスジェニック生物であることから、ケースバイケースでの精査が必要であると考えられる。

余談であるが、トマトとジャガイモを接ぎ木した作物が市販されているが、これは非組換え体であり（接ぎ木自体は従来育種法）、一つの木になったそれぞれの実（地上部のトマトと地下部のジャガイモ）に相互の遺伝子産物の移動や遺伝子制御が起きているかどうかは検討もされていない。

（４）その他

シスジェニック・イントラジェネシスは、トランスジェニックである。セルフクロニングと同一であるが、この考え方は微生物にのみ適用されているため。アグロインフィルトレーションや逆育種は、まだ研究例が少ない（特に食品用途）ため、現段階では判断するための材料が十分でなく、今後の継続的議論が必要である。合成生物学は、宿主生物が持たない生合成経路を人工的に構築するために、必要な遺伝子群を導入したものなどである。食品添加物合成に用いられる。

E. 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. 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*, 240, 413-422, 2015.
3. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo, S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., & Nishimaki-Mogami, T. Interlaboratory study on unauthorized genetically modified papaya PRSV-YK real-time PCR detection method. *Data in Brief*, 7, 1165-1170, 2016.
4. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Ishigaki, T., Noguchi, A., Katsumata, H., Takasaki, K., Futo,

S., Sakata, K., Fukuda, N., Mano, J., Kitta, K., Tanaka, H., Akashi, R., Nishimaki-Mogami, T. Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method. Food Chemistry, 205, 272-279, 2016.

学会発表

- 1) Nakamura, K., Ishigaki, T., Hanada, K., Akimoto, S., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. DNA methylation pattern analysis of common plant virus promoter used to develop genetically modified crops, PacifiChem2015, Hawaii, USA, 2015年12月.
- 2) Kondo, K., Sakata, K., Noguchi, A., Nakamura, K., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Tomoko. A new analytical methodology for unknown genetically modified organisms using linear-amplified mediated PCR (LAM-PCR), 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015年11月.
- 3) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上（西巻）知子：汎用性ウイルスプロモーター導入によるクロマチンループ内の内在性遺伝子発現への影響、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月
- 4) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、布施谷実聡、川上浩、田中秀典、明石良、真野潤一、橘田和美、最上（西巻）知子：我が国における未承認遺伝子組換えパパイヤの食品への混入に関する事例と検知法開発の現状、第52回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015年12月
- 5) 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、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妥当性評価、第52回全国衛生化学技術協議会年会、静岡、2015年12月
- 6) 福田（佐藤）のぞみ、近藤一成、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、最上（西巻）知子：遺伝毒性試験および全ゲノム解析を用いた CRISPR/Cas9 の DNA2 本鎖切断ポテンシャル、第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月
- 7) 坂田こずえ、近藤一成、野口秋雄、中村公亮、福田のぞみ、石垣拓実、最上（西巻）知子、LAM-PCR を用いた組換え作物中の未知領域解析法の検討、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 8) 野口秋雄、町井香苗、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発、第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015年10月
- 9) 中村公亮、近藤一成、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ、大森清美、真野潤一、橘田和美、最上（西巻）知子：安全性未承認遺伝子組換え

- パパイヤ (PRSV-HN 系統) の検出と検知法開発、第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015 年 10 月
- 10) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、福田のぞみ、野口秋雄、穂山浩、近藤一成、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：未承認遺伝子組換え食品検知法の開発：未承認遺伝子組換えジャガイモ検知を例に、第 1 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、千葉、2015 年 9 月
- 11) 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：食品遺伝子検査を簡易化するダイレクトリアルタイム PCR、2015 年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2015 年 6 月
- 12) 中村公亮、石垣拓実、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術による遺伝子組換え食品の内在性遺伝子発現への影響、日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月
- 13) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えヒヨコマメ検査法確立に向けたヒヨコマメ内在性遺伝子 (CaNCED) 特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第 21 回総会・学術大会、東京、2015 年 5 月
- 14) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)知子、高畠令王奈、橘田和美：リアルタイム PCR による DNA 断片化測定法の改良と市販加工食品の分析、第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会京都、2015 年 10 月
- 15) 高畠令王奈、鍵屋ゆかり、峯岸恭孝、Sabina Yeasmin、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)知子、真野潤一、橘田和美：LAMP 法による安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの網羅的簡易迅速検知法の開発、第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会京都、2015 年 10 月野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)知子：LAMP 法を用いた遺伝子組換え作物の簡易検査法の開発、第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015 年 10 月

F. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

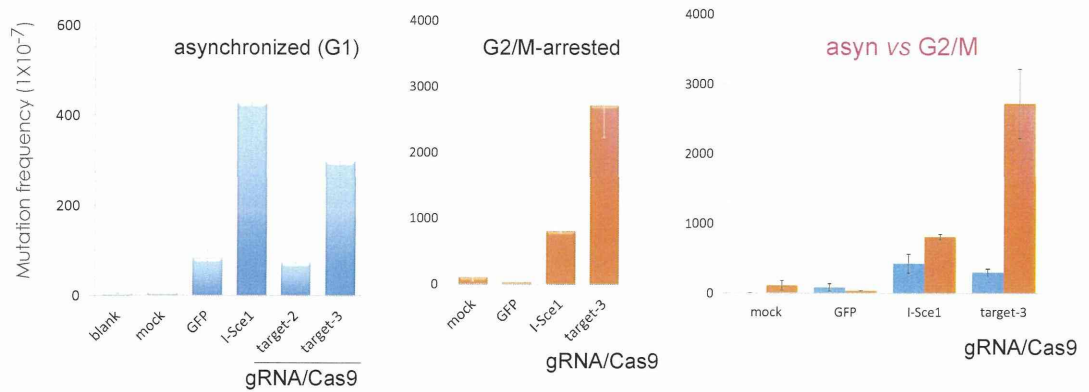


FIGURE-1

TSC5 細胞を、通常培養条件および double thymidine block/colcemid/Ro3306 で G2/M に同期させた時変異導入率を求めた。gRNA/Cas9 は、G2/M 期において切断活性が著しく上昇する (81 bp 以上の比較的大きな欠失等の変異率は、 10^5 to 10^{-4} に)。

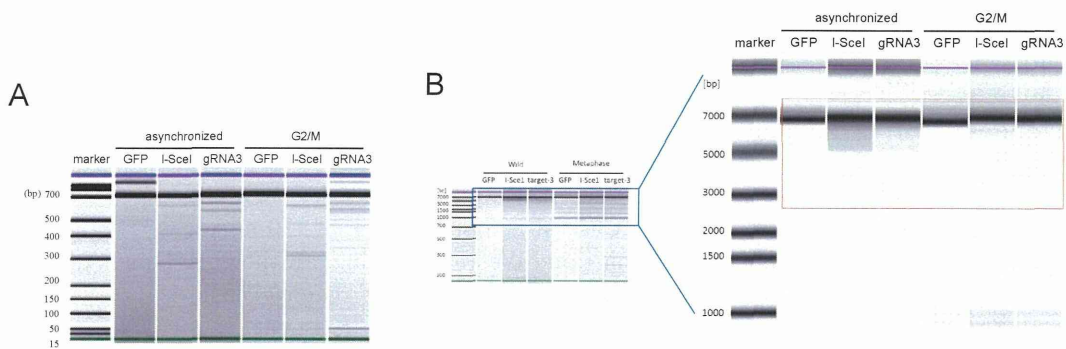


FIGURE-2

(A, B) I-SceI, gRNA 標的配列周辺 700 bp (A, left panel) または 7 kb (B, right panel) を増幅して Bioanalyzer 2100 で解析した。通常培養条件 (G1 major) では、I-SceI, gRNA/Cas9 いずれの処理においても 700 bp 範囲の変化では一定の大きさの欠失が中心であるが、G2/M 期での gRNA/Cas9 処理では、複雑な切断が起きている。一方 7 kb 範囲では、I-SceI, gRNA3/Cas9 いずれの場合も 1-3 kb の欠失が観察されるのに対して、G2/M 期では大欠失が見られなかった。

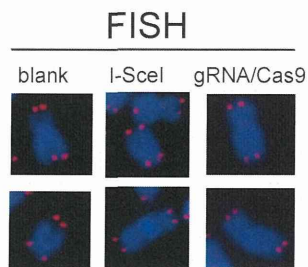


FIGURE-3

Telomere PNA probe (Cy3) を用いて I-SceI, gRNA/Cas9 electroporation, TFT 選抜後の細胞を FISH 解析した。各処理群間でバックグラウンド (blank レベル) のテロメア融合以上の変化はなかった。

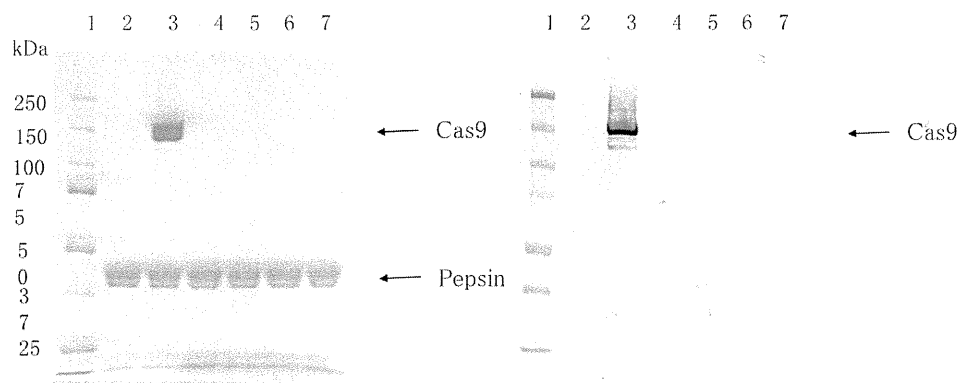


图5. Digestion in SGF of Cas9 at a concentration of 420 ng/ μ l.
 The patterns of CBB staining and Western blotting are shown in Panel A, B.
 Lane 1: Molecular weight markers . Lane 2: SGF reagent blank.
 Lanes 3-7: Cas9 incubated in SGF for 0, 0.5, 1, 2, 4 min.

文献調査(2013)
ウシ

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ミオゲニンに対する阻害性RNA	導入	GMウシの肉の量が増えるかもしれない	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
lpr1	導入	結核に耐性の動物が作れるかもしれない	中国	体細胞核移植		2
リソスタフィン、エンドリシン	導入	乳腺炎に耐性なGMウシが作れるかもしれない	中国	体細胞核移植		3
ヒトラクトフェリン	導入	GMウシの肉をラットに投与して亜急性毒性を調べた	中国	-		4
ヒトラクトフェリン	導入	ミルクを子豚に飲ませると胃腸などで良い変化があった	米国	-		5
ミオスタチン遺伝子ノックアウト	改変	ZFNを使って筋肉量が倍のGMウシが作れる	中国	体細胞核移植		6
VP1遺伝子に対するshRNA	導入	口蹄疫に耐性なGMウシが作れるかもしれない	中国	体細胞核移植		7
ヒトラクトフェリン	導入	肉の栄養分の組成は野生型と同じだった	中国	-		8
ウシNramp1	導入	細胞内の病原菌に耐性なGMウシが作れるかもしれない	中国	体細胞核移植		9
ヒトラクトフェリン	導入	組換えタンパクを含む牛乳をブタに与えて免疫への効果を調べた	米国	-		10
リソスタフィン	導入	牛乳中に分泌される組換えタンパクは黄色ブドウ球菌を殺す	中国	ZF nickase		11
線虫mfat-1	導入	組織と牛乳中でn-3不飽和脂肪酸が増えて、n-6不飽和脂肪酸が減った	中国	体細胞核移植		12
リソスタフィン	導入	乳腺炎に耐性なGMウシが作れるかもしれない	スウェーデン			13

発現ベクターの作成

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ミオスタチン遺伝子ノックアウト	改変	GMウシの作成に使えるかもしれない	中国	-		1
ウシフォリスタチン	導入	高い肉係数のGMウシが作れるかもしれない	中国	-		2
ウシPEPCK-C	導入	高い肉係数、脂肪の多いGMウシが作れるかもしれない	中国	-		3

精製した組換えタンパクを使った研究

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	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	ウシ乳腺で発現させた組換えタンパクをマウスに投与して亜急性毒性を調べた	中国	-		1
ヒトラクトフェリン	導入	牛乳中で発現させた組換えタンパクのアレルゲン性を評価した	中国	-		2

検知法の作成

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ヒト α -ラクトアルブミン	導入	導入遺伝子のコピー数を求める方法を作成した	中国	-		1
bfat-1	導入	導入遺伝子のコピー数をリアルタイムPCRで求めた	中国	-		2
ヒトラクトフェリン	導入	ミルク中の組換えタンパクをイムノクロマトグラフィーで検出する方法を開発した	中国	-		3
ヒトリゾチーム	導入	LAMP法による検知法を作成した	中国	-	ブタにも適用可	4

ワクチンの開発

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
口蹄疫ウイルスの遺伝子	導入	導入遺伝子の発現の分布を経時的に調べた	米国	アデノウイルス		1

文献調査(2013)
 ブタ

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	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の遺伝子に対するshRNA	導入	細胞中でウイルスの増殖を抑制した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対するshRNA	導入	GMブタにおけるウイルスの抑制の研究について	中国	-		2
ヒトリゾチーム	導入	クローニングの効率を改良するための条件を比較した	中国	体細胞核移植		3
口蹄疫ウイルスVP1遺伝子に対するshRNA	導入	GMブタの細胞中で抗ウイルス活性が示された	中国	-		4
抗日本脳炎ウイルスベクター	導入	ドナー細胞を作成することを目的とする	中国	トランスフェクション	細胞の実験	5
ヒト成長ホルモン	導入	血清の生化学的性質を調べた	ロシア	-		6
ブタヒストンデアセチラーゼ6	導入	ウイルス感染に耐性になると期待される	中国	体細胞核移植		7
ブタ成長ホルモン	導入	導入遺伝子の発現制御ができる	中国	-	細胞の実験	8
線維分解酵素	導入	唾液腺で線維分解酵素を発現するGMブタの開発につながる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	9
ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの遺伝子に対するshRNA	導入	疾病に耐性なGMブタを作成する新しい方法になるかもしれない	中国	体細胞核移植		10
フィターゼ	導入	ペプシン、トリプシンに耐性なフィターゼを組み込んだ	中国	レンチウイルス	細胞の実験	11
ブタCD28受容体	導入	免疫応答、ワクチンの効果が強くなる	中国	エレクトロポレーション		12
キシナーゼ	導入	キシランの栄養阻害作用を除去する	中国	-		13
マンナーゼ	導入	成長を促進するかもしれない	中国	体細胞核移植		14
ブタJiv遺伝子に対するshRNA	導入	古典的ブタ熱ウイルスに耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		15
フィターゼ	導入	唾液腺からフィターゼを分泌して植物のリン、カルシウム、主要な電解質多量ミネラルを消化する	カナダ	-		16
大腸菌フィターゼ	導入	GMブタのゲノム構造と導入遺伝子の安定性を調べた	カナダ	-		17
FUT1遺伝子に対するshRNA	導入	大腸菌F18に関連した疾病に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		18
ブタサーコウイルス2の増殖を阻害するshRNA	導入	ブタサーコウイルスの感染を防ぐかもしれない	中国	体細胞核移植		19
sFat-1	導入	導入遺伝子の水平移動は起きないらしい	中国	-		20
ブタ成長ホルモン	導入	染色体への挿入部位を調べた	中国	精巢注入		21
フィターゼ	導入	人が摂取したときの安全性を検討した	カナダ	-		22
口蹄疫ウイルス遺伝子の保存された領域に対するshRNA	導入	細胞がウイルスに耐性になった	中国	-	細胞の実験	23
ウシ α -ラクトアルブミン	導入	導入遺伝子の水平伝播は起きないと考えられる	米国	-		24

発現ベクターの作成

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ブタ成長ホルモン	導入	細胞中でmRNA、タンパクを発現させた	中国	-	ブタに限らず動物一般	1
ブタサーコウイルス2の遺伝子に対するshRNA	導入	ウイルスに耐性のGMブタが作成できるかもしれない	中国	体細胞核移植		2
follicle-stimulating hormone (FSH) 遺伝子	導入	赤肉の割合が増えたGMブタが作れるかもしれない	中国	-		3
ブタPEPCK-C	導入	赤肉の割合と繁殖力が上昇するかもしれない	中国	-		4
ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの増殖を抑制するshRNA	導入	GM細胞を作成する方法を作った	中国	トランスフェクション		5

検知法の開発

導入あるいは改変遺伝子	導入、改変	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ヒトリゾチーム	導入	LAMP法による検知法を作成した	中国	-	ウシにも適用可	1