

文献調査(2013)
魚

魚の種類	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
コイ	ミオスタチン	導入	RNAi効果があり、体が大きくなった	中国	マイクロインジェクション		1
黄色ナマズ	黄色ナマズ成長ホルモン	導入	体の大きなGM魚を開発する基礎となる	中国	マイクロインジェクション		2
ニジマス	短いアクチビンIIb受容体	導入	筋繊維が肥大した	米国			3
ニジマス	成長ホルモン	導入	mRNAの発現パターンをマイクロアレイで調べた	カナダ			4
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	導入遺伝子発現、3倍体化について急性ストレスの指標への効果を調べた	米国			5
コイ	成長ホルモン	導入	導入遺伝子と栄養について成長と骨の発達への効果を調べた	中国			6
大西洋サケ	魚の成長ホルモン	導入	導入遺伝子と3倍体化について成長と栄養の利用への効果を調べた	カナダ			7
ナイルティラピア	魚の成長ホルモン	導入	餌中の大量のカルシウムとリンについて形態学的な異常を減らす効果を調べた	日本			8
コイ	魚の成長ホルモン	導入	GM魚は集団を大きくする能力がない	中国			9
コイ	成長ホルモン?	導入	腸の微生物叢が速い成長に貢献している	中国			10
サケ	成長ホルモン	導入	GM魚についてのヨーロッパでの懸念を述べた	イギリス			11
赤コイ	大黄色クローカーミオスタチンプロペプチド	導入	異なる遺伝子導入法でGM魚を作った。体が大きくなった	中国	精子媒介遺伝子転移、エレクトロポレーション、遺伝子銃		12
コイ	成長ホルモン	導入	摂食の増加はAgouti関連タンパクの発現上昇を介在するかもしれない	中国			13
ヨーロッパアンシールバス	ミオスタチン遺伝子に対するshRNA、dsRNA	導入	骨格筋でミオスタチン遺伝子の発現を阻害した	イタリア	筋肉注射、インビボで電氣的に		14
ギンザケ	成長ホルモン	導入	病気への抵抗性と健康の指標を野生型と比較した	カナダ			15
コイ	魚の成長ホルモン	導入	捕食のときの高い死亡数をリスクを伴う行動で説明できるかもしれない	中国			16
サケ	成長ホルモン	導入	人が摂取したときの安全性を検討した	カナダ			17
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	GMサケと野生の茶色サケの交配によって新しい生態学の相互作用が明らかになった	カナダ			18
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	成長速度と肝の遺伝子発現における家族に特異的な相違を若いGM魚で調べた	カナダ			19
サケ	成長ホルモン	導入	AquaBounty社は体の大きなGM魚を作った	米国			20
コイ	成長ホルモン	導入	導入遺伝子はSOCS1-4遺伝子発現の調節をする	中国			21
サケ	成長ホルモン	導入	GMサケに対する大衆の態度を調べた	カナダ			22

エビ・カニ

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
ホワイスポット病ウイルスVP28	導入	アオコ中で経口ワクチンを調製して、若いエビを処理してウイルスの感染を防ぐ	中国	-	エビに直接遺伝子導入しない	1

文献調査(2013)
ヤギ

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	ミルクのタンパク量、7つの必須アミノ酸量は野生型の物とは異なった	中国	-		1
ヤギToll-like receptor 9	導入	病気に抵抗性のGMヤギ作成の基礎になる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	2
ヒトラクトフェリン	導入	胚の培養のための培地を比較した	中国	体細胞核移植		3
ヤギ成長ホルモン、インシュリン様成長因子-1、ソマトスタチン	導入	GMヤギ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	4
ヒトリゾチーム	導入	ミルク中で組換えタンパクを高濃度で発現させた	中国	体細胞核移植		5
ヒトラクトフェリン	導入	生まれたGMヤギと死んだGMヤギの遺伝子はメチル化の状態が異なる	中国	体細胞核移植		6
ヒトリゾチーム	導入	体細胞核移植のための胎児線維芽細胞の性質を調べた	中国	体細胞核移植		7
ヒトβ-ディフェンシン-3	導入	ミルク中で発現させると乳腺炎に耐性になった	中国	体細胞核移植		8
ヒトリゾチーム	導入	組換えタンパクを含むミルクを子豚に与えると下痢からの回復を助けた	米国	-		9
Cecropin B	導入	乳腺炎を阻害した	中国	乳腺にプラスミドを注射		10
ヒトβ-ディフェンシン-3	導入	GM乳房上皮細胞から胚を作成した	中国	体細胞核移植		11
ミオスタチン遺伝子ノックアウト?	改変?	GM線維芽細胞からGMヤギを作成できる可能性がある	中国	体細胞核移植		12
ヒトリゾチーム	導入	組換えタンパクを含むミルクをブタに与えて免疫への効果を調べた	米国	-		13
ミオスタチン遺伝子ノックダウン	導入	細胞中でミオスタチンmRNAの発現が減少した	中国	レンチウイルス	細胞の実験	14
リソスタフィン	導入	抗菌活性に対する糖鎖付加の影響を調べた	台湾	-	細胞の実験	15
ヒトリゾチーム	導入	生殖、導入遺伝子の遺伝と発現の安定性を調べた	中国			16

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
ヒトラクトフェリン	導入	ミルク中で組換えタンパクを発現させるためのベクターを作成した	ロシア	-	ヤギに限らず動物一般	1

組換えタンパクを精製した物

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	ヒトとヤギのラクトフェリンの混合物Neolactoferrinの性質を調べた	ロシア	-		1

文献調査(2013)
ヒツジ

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
インシュリン様成長因子2	導入	GMヒツジ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
Toll-like receptor 4	導入	病気に抵抗性のあるGMヒツジを作成することを目指す	中国	体細胞核移植		2
ミオスタチン遺伝子ノックアウト	改変	ZFNを使ってGMヒツジを作成した	中国	ZFN		3
コドン最適化した線虫Fat-1	導入	GMヒツジ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	4
ヤギペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ	導入	肉の性質を改善することを目指す。F1で導入遺伝子が発現した。	中国	精巢注入		5
フォリスタチン	導入	ミオスタチンの発現を抑制し、骨格筋の形成を促進するかもしれない	中国	トランスフェクション	細胞の実験	6
ヒツジToll-like receptor 4	導入	病気に抵抗性のあるGMヒツジを作成できるかもしれない	中国	体細胞核移植		7
ミオスタチン遺伝子に対するshRNA	導入	筋肉の成長を促進できるかもしれない	中国	体細胞核移植		8
コドン最適化した線虫mfat-1	導入	ハンドメイドクローニングによって ω -3脂肪酸を多く含むGMヒツジを作った	中国	ハンドメイドクローニング		9
ヤギペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ	導入	GMヒツジの性質を調べた	中国	精巢注入		10

文献調査(2013)
ニワトリ

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に対するshRNA	導入	胚性筋芽細胞においてミオスタチンmRNAの発現が抑制された	インド	トランスフェクション	細胞の実験	1
ニワトリインターフェロン λ	導入	インターフェロン λ システムは哺乳類と鳥類で基本的に同様である。	ドイツ	複製不能レトロウイルス		2
ニワトリMx	導入	抗ウイルス活性を刺激してウイルスの子孫の放出を抑制することを示唆する	韓国			3

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
ヒトラクトフェリン	導入	ミルク中で組換えタンパクを発現させるためのベクターを作成した	ロシア	-	ニワトリに限らず動物一般	1
ニューカッスル病ウイルスの遺伝子に対するshRNA	導入	ウイルスに耐性のGMニワトリの作成に応用できるかもしれない	中国	レンチウイルス		2

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
CaMV35S	導入	餌の中の外来遺伝子をリアルタイムPCRによって検出するためのプローブとプライマーを作成した	中国	-	ニワトリに限らず肉、乳製品	1
ヒトエリスロポエチン	導入	鶏肉中から導入遺伝子をリアルタイムPCRによって検出する方法を作成した	日本	-		2

文献調査(2014)
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
ミオスタチンプロペプチドとshRNA	導入	ミオスタチン発現の抑制効果を調べる	中国	トランスフェクション	細胞の実験	1
ヒト α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、リゾチーム	導入	milk fat globule membrane proteinsの相対的なプロテオミクス解析を行った	中国	-		2
ヒトインターフェロン α	導入	細胞内で発現させると抗ウイルス活性があった	中国	体細胞核移植		3
線虫fat-1、fat-2	導入	ω -3多価不飽和脂肪酸を肉中で増やすために利用できるだろう	中国	体細胞核移植	ウシに限らず動物一般	4
ヒトリゾチーム	導入	導入遺伝子がゲノムに組み込まれた部位を決めた	中国	体細胞核移植		5
ヒトリゾチーム	導入	ミルクは黄色ブドウ球菌を殺す能力があった	中国	ZFN		6
ヒト β -ディフェンシン-3	導入	microRNAの発現と胎盤でのシグナル経路の影響を調べた	中国	体細胞核移植		7
ヒトラクトフェリン	導入	ミルクを仔豚に飲ませると全身と腸の免疫反応が増強した	中国	-		8
ヒトラクトフェリン	導入	栄養失調の豚にミルクを飲ませて効果を調べた	米国	マイクロインジェクション		9
ヒトラクトフェリン	導入	ミルクを仔豚に飲ませると腸と全身の健康が改善された	米国	-		10
MSTN阻害	導入?	トランスジェニック細胞系統を作成して解析した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	11
ヒトラクトフェリン	導入	ミルクを豚に飲ませたとき十二指腸の好酸球の減少をラクトフェリン受容体が媒介するかもしれない	米国	-		12
ミオスタチンに対するshRNA	導入	P21、CDK2の発現が減少、増加した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	13
ヒト β -ディフェンシン-3	導入	胎盤で発現しているmiRNAとシグナル経路を調べた	中国	-		14

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
ヒトリゾチーム	導入	乳腺で特異的に発現させるベクターを作成した	中国	-	ウシに限らず大きな動物	1

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
フィターゼ	導入	唾液腺で特異的に発現する胚を作った	中国	体細胞核移植		1
FUT1	導入	刷り込み遺伝子IGF2の発現解析を行った	中国	-		2
FUT1	導入	受胎率、妊娠の持続などを調べた	中国	体細胞核移植		3
Mx1	導入	トランスジェニックブタの細胞がウイルスに耐性になった	中国	体細胞核移植		4
フィターゼ	導入	死体と組織の栄養学的組成を調べた	カナダ	-		5
線虫fat-1、fat-2	導入	家畜の肉中で多価不飽和脂肪酸を生産することを目指す	中国	体細胞核移植	ブタに限らず動物一般	6
ヒトリゾチーム	導入	乳を飲むブタにおいて十二指腸の大腸菌の成長を阻害して、腸の形態に影響を与えた	中国	体細胞核移植		7
フィターゼ	導入	触媒の活性と組織分布を調べた	カナダ	-		8
古典的ブタ熱ウイルスに対するshRNA	導入	microRNA経路が飽和するために早死にすることがあるかもしれない	中国	-		9
ブタIFIT1	導入	PRRSウイルスの複製を阻害する	中国	体細胞核移植		10
ブタBID	導入	PRRSウイルスを阻害する	中国	-	細胞の実験	11
sFat-1	導入	ω 3脂肪酸を多く含む豚肉をマウスに与えて、害はなく肝臓の免疫系が改善された	中国	-		12
PRRSウイルスに特異的なshRNA	導入	ウイルスを感染させたときに血清中のタイターが低下した	中国	-		13
ブリグサ線虫fat-1	導入	n-3脂肪酸が増えた	中国	-		14
Follistatin	導入	Rosa2座において組織特異的なプロモーターが利用できる	中国	-		15
FUT1		トランスジェニックブタの遺伝的、エピジェネティックな解析をした	中国			16
ミオスタチン		筋肉量が2倍になったブタを作る方法を開発した	中国	TALEN		17

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
Follistatin-317	導入	筋肉で発現させるベクターを作成した	中国	体細胞核移植		1
dextranase, xylanase, phytase	導入	唾液腺で特異的に発現させるベクターを作成した	中国	体細胞核移植		2

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
ブタ成長ホルモン、IGF-1	導入	外来遺伝子の発現をリアルタイムPCRで検出した	中国	ナノ遺伝子キャリアー法		1
appA、MxA	導入	外来遺伝子をPCRで検出する能力を分析して環境の安全性評価を行った	中国	-		2

文献調査(2014)
魚

魚の種類	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
ギンザケ	成長ホルモン	導入	海に似せた環境では産卵の成績が改善した	カナダ	-		1
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	初期の個体発生中に遅れた表現系の発現はある?	カナダ	-		2
ヨーロッパナ	ゼブラフィッシュIGF-1	導入	骨格筋の過形成と細胞性変化を調べた	中国	-		3
コイ	サクラマス $\Delta 5$ -desaturase-like gene	導入	食事と導入遺伝子と、 $\Delta 6$ -desaturaseとstearoyl-CoA desaturase遺伝子の発現とN-3脂肪酸濃度の相互作用を調べた	米国	-		4
コイ、ダントボウ、コウライギギ	fat1, fat2	導入	ω -3多価不飽和脂肪酸を多く含む魚の製品を得ることを目指す	中国	-		5
ギンザケ	成長ホルモン	導入	グルコースの代謝に関連する遺伝子の発現を調べた	フランス	-		6
-	ヒトプロコラーゲン、コラーゲン	導入	魚の卵で組換えタンパクを生産させることを目指す	台湾	-		7
イシモチ	サクラマスelongase	導入	脂肪酸代謝経路を修飾できるかもしれない	日本	-		8
コイ	コイ成長ホルモン	導入	生殖への効果を調べた	中国	-		9
ニジマス	cecropin P1, CF-17	導入	病原菌に耐性なホモの魚を作成した	米国	精子媒介遺伝子転移法		10
ギンザケ	成長ホルモン	導入	カロリー制限をすると、筋繊維サイズの最適化はエネルギー収支の柔軟性を提供する	英国、カナダ	-		11
コイ	成長ホルモン	導入	速い成長は固有の捕食のリスクを高める	中国	-		12
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	遺伝子導入と倍数性は卵黄嚢種魚において代謝効率を上げ、心肺の反応を変え、ヒートショックプロテインの発現に影響する	カナダ	-		13
ギンザケ	成長ホルモン	導入	他のサケの種の集団に侵入したときの影響を調べた	カナダ、スウェーデン	-		14
ニジマス	cecropin P1	導入	先天性、適応免疫経路の遺伝子発現パターンを調べた	米国	-		15
大西洋サケ	成長ホルモン	導入	GMサケの生態学的な危険分析を論じた	カナダ	-		16
アフリカナマズ	ナマズ成長ホルモン	導入	器官における成長ホルモンの発現と血漿中のIGF-1濃度を調べた	インドネシア	-		17
ギンザケ	成長ホルモン	導入	二倍体、三倍体における導入遺伝子数の成長と内分泌への効果を調べた	カナダ、日本、米国	-		18
サケ	成長ホルモン	導入	資本主義とサケの商品化について論じた	米国	-		19
サケ	成長ホルモン	導入	GMサケの卵の生産のリスク評価について政府に質問した	カナダ	-		20
サケ	成長ホルモン	導入	マレーシアの公衆のGMサケに対する態度を評価した	マレーシア、バングラディッシュ	-		21
コイ	成長ホルモン	導入	低温ではストレスに対する耐性が強かった	インドネシア	-		22
コイ	成長ホルモン	導入	雄のGM魚は野生型と同等の生殖能力を持つ	インドネシア	-		23

発現ベクターの作成

魚の種類	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
-	siMSTN阻害断片	導入	効率良くGM魚が作れる	中国	-		1

文献調査(2014)
ヤギ

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	ミルクを仔豚に飲ませると腸と全身の健康が改善された	米国	-		1
合成Fat-1	導入	細胞内でn-3多価不飽和脂肪酸が増えた	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	2
IGF-1	導入	コピー数と導入遺伝子の挿入部位を調べた	中国	体細胞核移植		3
ヤギ成長ホルモン	導入	乳腺の発育を促進する	中国	体細胞核移植		4
ヒトラクトフェリン	導入	ヤギミルクにおいてヒトラクトフェリンをヤギラクトフェリンを分離する方法を作った	ロシア	-		5
ミオスタチンに対するshRNA	導入	GMヤギの作成のための基礎となる	インド	レンチウイルス	細胞の実験	6
IGF-1	導入	乳腺で特異的に発現させるプラスミドを作成した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	7
甘味タンパクBrazzein	導入	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	8
ヒト α -ラクトアルブミン	導入	ヤギミルクの栄養改善を目指す	中国	体細胞核移植		9
ヒトリゾチーム、ヒトラクトフェリン	導入	ミルクで発現させて、下痢、栄養不良、子供の死亡を防ぐことを目指す	ブラジル	-		10
アクチビン受容体タイプIIBIに対するmicroRNA	導入	筋肉で特異的にノックダウンして筋肉量を増やした動物が作成できるかもしれない	インド、米国	-	細胞の実験	11
ミオスタチンに対するmiRNA	導入	mRNAのサイレンシングができた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	12
stearoyl-CoA desaturase	導入	一価不飽和脂肪酸が増えた	中国	-	細胞の実験	13
ミオスタチン、プリオン、 β -ラクトグロブリン、NUP	改変	ヤギにおいてCRISPR/Cas9によるノックアウトができた	中国、米国	CRISPR/Cas9		14
アクチビン受容体タイプIIBIに対する人工microRNA	導入	複数のmicroRNAの中でノックダウンの効率を比較した	インド	トランスフェクション	細胞の実験	15

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
合成甘味タンパクBrazzein	導入	乳腺特異的に発現させるためのベクターを作成した	中国			1
ヒトリゾチーム	導入	乳腺で特異的に発現させるベクターを作成した	中国		ヤギに限らず大きな動物	2

文献調査(2014)
ヒツジ

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	改変	インビトロで初代衛星細胞の増殖を促進した	中国	ZFN	細胞の実験	1
線虫fat-1、fat-2	導入	家畜の肉中で多価不飽和脂肪酸を生産することを目指す	中国	体細胞核移植	ヒツジに限らず動物一般	2
VP1、SB-SW	導入	腸の微生物の多様性をPCR-DGGEを使って調べた	中国	-		3
Follistatin	導入	筋芽細胞の増殖を誘導する	中国	アデノ関連ウイルス	細胞の実験	4

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
Follistatin	導入	PCR法によって検知する方法を作成した	中国	レンチウイルス		1

ニワトリ

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
ニワトリインターフェロンλ	導入	抗ウイルス活性が検出された。モザイクトランスジェニック体は孵化後すぐ死んだ	ドイツ	複製不能レトロウイルス		1
オボアルブミン	改変	遺伝子の機能を喪失させた	韓国	TALEN		2
ヒトβ-インターフェロン	導入	導入遺伝子が子に存在した。ウイルス耐性を目指す。	ロシア	手術によって卵に注入		3
Mx-NA	導入	病気に耐性になった	中国	睾丸注射		4

ウサギ

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
sFat-1	導入	n-3多価不飽和脂肪酸が筋肉中で増えた	中国	-		1

新技術の論文(2014,2015)

研究内容	開発国	遺伝子改変法	プロモーター	ターミネーター	オフターゲットの調査	年	文献
ミルクは黄色ブドウ球菌を殺す能力があった	中国	ZFN	CMVプロモーター	ウン成長ホルモンターミネーター	-	2014	1
インビトロで初代衛星細胞の増殖を促進した	中国	ZFN	-	mRNAを使用	-	2014	2
背中の筋肉繊維を増やすことを目指す	中国	ZFN, TALEN, CRISPR	-	-	-	2014	3
遺伝子の機能を喪失させた	韓国	TALEN	-	-	予想される部位をシーケンシングした	2014	4
魚でのミオスタチンの役割の研究に役立つ	中国	TALEN	-	mRNAを使用	有っても、戻し交配で除ける	2014	5
ヤギにおいてCRISPR/Cas9によるノックアウトができた	中国、米国	CRISPR/Cas9	CMVプロモーター	ウン成長ホルモンターミネーター	予想される部位をシーケンシングした	2014	6
筋肉量が2倍になったブタを作る方法を開発した	中国	TALEN	-	-	-	2014	7
ミオスタチンをノックアウトした細胞を作った	中国	TALEN	-	-	-	2014	8
アフリカブタ熱ウイルスへの耐性が強まった	英国	TALEN, ZFN	-	mRNAを使用	-	2014	9
mRNAを注入して遺伝子編集を試みた	米国	TALEN, ZFN	-	mRNAを使用	-	2014	10
高品質な赤身の肉を作る	中国	TALEN	-	-	-	2014	11
ミオスタチン遺伝子に変異を導入したウシの作成の基礎となる	中国	ZFN, TALEN, CRISPR	-	-	-	2014	12
ミオスタチン遺伝子に変異を持つウシを初めて作った	中国	ZFN	-	mRNAを使用	-	2014	13
GM繊維芽細胞を作った	中国	ZFN	-	-	-	2014	14
体重と筋肉が増えた	日本	TALEN	-	-	-	2015	15
ゲノム編集がウシとヒツジで行われた	英、米国	TALEN	-	mRNAを使用	-	2015	16
成長がよくなった	米国	CRISPR/Cas9	-	-	-	2015	17
Cas9は育種に利用できる	中国	CRISPR/Cas9	-	mRNAを使用	オフターゲット変異あり	2015	18
CRISPR/Cas9システムを迅速に構築した	中国	CRISPR/Cas9	-	-	-	2015	19
胚盤胞を作った。プリオンの研究に有益だろう。	韓国	TALEN	?	?	?	2015	20
結核への耐性が強くなった	中国	TALE nickase	CAGプロモーター	SV40ポリA	-	2015	21
マクロファージに特異的にターゲティングした	中国	TALEN	-	-	-	2015	22
筋肉と肉係数が増えて脂肪が減った	中国	ZFN	-	-	-	2015	23
筋肉と肉係数が増えた	中国	ZFN	-	-	-	2015	24
遺伝子ターゲティングの効率が低い	中国	TALEN	-	mRNAを使用	-	2015	25
ミルクにおいてラクトフェリンが大量に発現して	中国	TALEN	-	-	-	2015	26
β-ラクトグロブリンが減った	中国	TALEN	-	-	-	2015	26
低アレルギー性の卵を作るために有用	日本	単にゲノム編集	-	-	-	2015	27
筋肉量が増えた	中国	ZFN	-	-	-	2015	28

研究内容	開発国	遺伝子改変法	プロモーター	ターミネーター	オフターゲットの調査	年	文献
ZFNの発現を誘導するベクターを作った	中国	ZFN	CMVプロモーター	SV40ポリA	-	2014	1
ZFNを大腸菌で発現させて活性を確認した	中国	ZFN	タンパクを使用する予定	-	-	2015	2

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・生化学部

研究要旨

①ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響：ゲノム編集技術は、ゲノム上のあらゆる塩基配列を標的に DNA の導入を高い効率で可能にする。今後はこの技術を応用した新しい遺伝子組換え (GM) 食品の開発が期待される。しかし、遺伝子導入に伴うクロマチン構造や内在性遺伝子の発現などへの影響については、十分な情報が得られていない。ゲノム編集技術の一つである Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を利用して、GM 動物の開発で汎用性の高い Cytomegarovirus (CMV)、Simian virus 40 (SV40) 並びに CAG プロモーターを含む遺伝子発現カセットをニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域へ導入し解析した。その結果、DNA 導入箇所のクロマチン構造並びに遺伝子の転写方向によっては、内在性遺伝子の発現は大きく変化することが示唆された。②安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用：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や日本で度々問題となっている。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。得られたゲノム情報を基に GM パパイヤ PRSV-YK 系統を検知するリアルタイム PCR 法を構築した。③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発：ゲノム編集を可能にする組換え技術の一つに、人工ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas9, TALEN, ZNF) を使用した方法が報告されている。人工ヌクレアーゼを使用することで、ゲノムの標的配列を切断することが可能である。特異性が飛躍的に向上した方法が報告されるなど技術の進歩が目覚ましい。全ゲノムを対象に切断したゲノム配列を検出する方法の一つに、全ゲノムシーケンシングする方法が挙げられる。しかし、時間、コスト並びにバイオインフォーマティックスの知識が必要であることから、汎用性に乏しい。そこで本研究では、人工ヌクレアーゼ標的配列を全ゲノムを網羅して容易に解析する新規 *in vitro* アッセイ法を考案した。

協力研究者 石垣拓実 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

A. 研究目的

①ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響：ゲノム編集技術は、ゲノム上のあらゆる塩基配列を標的

に DNA の導入を高い効率で可能にする。

今後はこの技術を応用した新しい遺伝子組換え (GM) 食品の開発が期待される。しかし、遺伝子導入に伴うクロマチン構造や内

在性遺伝子の発現などへの影響については、十分な情報が得られていない。本研究では、細胞への影響のないゲノム編集による遺伝子導入箇所「セーフハーバー座位 (Safe harbor loci)」を検討する上で重要な情報を提供する。ゲノム編集技術の一つである Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を利用して、GM 動物の開発で汎用性の高い Cytomegarovirus (CMV)、Simian virus 40 (SV40) 並びに CAG プロモーターを含む遺伝子発現カセットをニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域へ導入し解析した。その結果、DNA 導入箇所のクロマチン構造並びに遺伝子の転写方向によっては、内在性遺伝子の発現は大きく変化することが示唆された。

②安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用: 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や日本で度々問題となっている。2013 年 1 月から 2016 年 3 月末現在まで欧州食品飼料緊急警告システム(RASFF)は、未承認の 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) の食品への混入 76 件を報じた。日本では、安全性未審査の 2013 年 7 月にタイ産未承認 GM パパイヤ PRSV-SC 系統、2014 年 6 月に中国産未承認 GM パパイヤ PRSV-HN 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。得られたゲノム情報を基に GM パパイヤの系統判別法の開発、及び、同定した GM パパイヤを検知するリアルタイム PCR 法を構築することを目的とした。

③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発: ゲノム編集を可能にする組換え技術の一つに、人工ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas9, TALEN, ZNF) を使用した方法が報告されている。人工ヌクレアーゼを使用することで、ゲノムの標的配列を切断することが可能である。特異性が飛躍的に向上した方法が報告されるなど技術の進歩が目覚ましい。全ゲノムを対象に切断したゲノム配列を検出する方法の一つに、全ゲノムシーケンシングする方法が挙げられる。しかし、時間、コスト並びにバイオインフォーマティックスの知識が必要であることから、汎用性に乏しい。そこで本研究では、人工ヌクレアーゼ標的配列を全ゲノムを網羅して容易に解析する新規 *in vitro* アッセイ法を考案した。

B. 研究方法

①ゲノム特異的配列への遺伝子導入または欠失に伴うゲノムへの影響:

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)を用いた。DT40 細胞は、RPMI 1640 medium、0.05

mM 2-mercaptoethanol、10% (v/v) fetal bovine serum 及び 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。

遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

昨年度と同様に TALEN を用いて培養細胞への GM 操作を行った。すなわち、TALEN の標的配列は、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'-AGTGATTTCCAAACACAC-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。mRNA は、pCDNA-DEST40 ベクター中の T7 プロモーターで T7RNA polymerase により転写させることによって得た。*In vitro* 転写には、mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して mRNA の合成を行い、MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher Scientific) より mRNA の精製を行った。TALEN による DNA 二本鎖切断 (DSB) 処理後に標的ゲノム配列へのトランスジェニック構造配列の挿入には、以下 3 種類の発現カセットを有するターゲティングベクターを使用した。

1) 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 coerulea* 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

2) 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

3) CAG プロモーターと bGH-PA-terminator 制御下で mCherry とピューロマイシン耐性遺伝子を発現する全長 3.0 kb の pSLQ1653_sgSOD1 プラスミド (ID no.63711, Addgene, MA, USA) の遺伝子発現カセット

ターゲティングベクターには、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。TALEN F 及び TALEN R16 µg mRNA と 10 µg ターゲティングベクターを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%) 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 又は 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。細胞のクローニングは、限外希釈法により行った。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。PCR ステップに使用したプライマーは、相同組換え配列を認識するよう設計した、

p784 (C region F) プライマー:

5'-CAGCTGCTTTCCCACTGTATCCTGTG-3'

p785 (C region R) プライマー:

5'-GATCTCCAGGAGCCATTAGTCTTCCC-3'

を使用した。定性 PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。調製は以下のとおりである。2 \times KODFX buffer 12.5 μ L、400 μ M dNTP、0.5 μ M 各プライマー、50 ng DNA 試料を混合し反応液を調整した。定性 PCR 装置にチューブをセットし、反応を開始した。反応条件は以下のとおりである。95 $^{\circ}$ C 5 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、75 $^{\circ}$ C 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った後、72 $^{\circ}$ C 5 分間の条件で保持し、4 $^{\circ}$ C 保存した。定性 PCR 後の反応液は、Tris-acetate-EDTA buffer (TAE, pH8.3) 溶液中で GelRedTM を含む 1% (w/v) アガロースゲルを用いアガロースゲル電気泳動 (100 V、15~20 分程度) に供した。泳動後のゲルの画像解析は、Raytest 製ケミルミイメージアナライザーに Diana システムを組み込んだゲルイメージ解析装置を用いて行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

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 (5~10 \times 10⁷ 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 法により遺伝子発現の定量を行った。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 $^{\circ}$ C で 2 分間、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加温し、その後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ 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。使用したプライマー配列は以下の通りである。

TFIIC:

5'-CTACCACGATGAAGCTGACC-3',

5'-GGATTCCTGACAATGTAACG-3'

Loc425933:

5'-GAGGCCGAGGAGGAGCTGCT-3',

5'-CGCCTTCTTCAGGTCCAGCAC-3'

RHBDF1:

5'-CGTCACTCTGCTCCTTCA-3',

5'-TCCACTGTATCCTCCTCCA-3'

MPG:
 5'-AACTATGCCAAGAAAAAGAA-3',
 5'-TGTCCCAGGAAGGATTTG-3'

ggPRX:
 5'-CATCTTGTCCTCTGAGGTGTCAC-3',
 5'-CATCAGCGTTATCCTTGTGAGCTC-3'

π:
 5'-ATGGCACTGACCCAAGCTGAGAAG-3',
 5'-CTGAACTGAGCCTTGGCTGACATC-3'

alphaD:
 5'-TGCCGAGGACAAGAAGC-3',
 5'-AGGTTGTAGGCATGCAGGTT-3'

alpha:
 5'-AACCAAGACCTACTTCCCC-3',
 5'-GTACTTGGCGGTCAGCAC-3'

TMEM8:
 5'-AGCTGCACAGACGATACCA-3',
 5'-TTTCAGAATCTTCTTCACCC-3'

P15:
 5'-GGATGGACTTGAAGCGAAC-3',
 5'-AAGCCTCTGTTTTTCTATTGC-3'

Axin1:
 5'-ATCAAACCAGCCACAAAAAG-3',
 5'-ATTGAGAGTAGGCAGATAACC-3'

Ovalbumin:
 5'-AATGGACCAGTTCTAATGT-3',
 5'-GTCAGCCCTAAATTCTTC-3'

18S RNA:
 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAGACC-3',
 5'-CGTAGAGGTGAAATTCTTGGACC-3'

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×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 *BglII*/400 U *BamHI* 又は 400 U *MboI* 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 1xT4DNA 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、proteinase K 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安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用:

食品サンプル (生鮮パパイヤ果実、パパイヤ漬物、パパイヤ茶、パパイヤジャム、コメ、ダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、ナタネ、パイナップル、モモ、パッションフルーツ) はインターネットより購入したものを使用した。次世代シーケンシング解析用のサンプルは、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。昨年度より得られたゲノムシーケンシングデータより、GM パパイヤ

PRSV-YK 系統に特異的なトランスジェニック構造配列を探索し、その配列を検知するようリアルタイム PCR 用プライマープローブの塩基配列を設計した (Table 1)。開発したリアルタイム PCR 法の検出限界試験は、GM パパイヤ PSRV-YK 系統陽性の果実より抽出精製した DNA を野生型パパイヤ果実より抽出精製した DNA で希釈し、0.001~0.100% (w/w) となるよう調製した。試料からの DNA の抽出・精製は、厚生労働省通知試験法 (食安発 0623 第 3 号別添[平成 27 年 6 月 23 日]) に基づき陰イオン交換樹脂タイプ DNA 抽出カラム (Qiagen 社製 Genomic-tip 100/G) の改変法を用いた。特異性試験には、パパイヤを含む 9 種類の作物 (コメ、ダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、ナタネ、パイナップル、モモ、パッションフルーツ) より抽出精製したゲノム DNA を鋳型に供した。リアルタイム PCR 増幅装置には、ABI PRISM 7900 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。リアルタイム PCR 反応液の調製、反応及びデータの解析は以下の通り行った。PCR 用反応液は、25 μ L /well として調製した。反応液の組成は以下の通りとした。GeneExpression PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.4 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ L を混合し、DNA 試料液 2.5 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ L に調製した。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA 試料液あたり 2 ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression

Pad をのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、50°C 2 分、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び、multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. Line 0.2) を選択した。その Th. line から Ct 値を得た。

③全ゲノム中の人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する技術開発：

ルンフェラーゼアッセイ

pGL4-SSA ベクターへの *Loxp* 配列の導入

Luciferase 下流配列の両端に *loxp* 配列を挿入した人工遺伝子を用意し、ライゲーションによって *Luciferase* 配列と組換えた。人工遺伝子の両端には *PacI*、*Ascl* の二種類の制限酵素切断配列を設計することでセルフライゲーションを避けるよう設計した。まず *pGL4-SSA* ベクター (ID no. 42962, Addgene, MA, USA) から PCR を用いて配列両端に *PacI* および *Ascl* を付加した断片配列を得た。人工遺伝子導入箇所の両端 20 bp の配列に *PacI*、*Ascl* 配列をつなげたプライマーを設計し、*pGL4-SSA* vector を鋳型に *LA Taq* (Takara 社) を用いて PCR

を行った。PCR 反応組成は以下の通りである。MilliQ 水 25.6 μL 、10xLA Taq buffer (Mg²⁺ free) 5 μL 、dNTPmix (2.5 mM each) 8 μL 、25mM MgCl₂ 5 μL 、LA Taq (5 Unit/ μL) 0.4 μL 、サイクル条件は 94°C 1 min の熱変性後、94°C 30 秒の熱変性、72°C のアニーリング・伸長反応の 2 ステップを 40 サイクルとして行った。反応液は 0.8% (w/v) アガロースゲルに電気泳動で流し、得られたバンドから Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて cDNA を精製した。得られた cDNA 5 μL に、*PacI* (10 U/ μL) 1.5 μL 、*AscI* (10 U/ μL) 1.5 μL 、CutSmart Buffer (10 \times) 5 μL 、milliQ 水 37 μL の反応組成で制限酵素処理を行った後、電気泳動して得られたバンドをカラム精製した。注文した人工遺伝子ベクターについても、同一組成で、制限酵素処理を行った。こうして得られた 2 種類の断片を T4DNA Ligase (NEB 社) を用いてライゲーションを行った。反応組成は Ligation Buffer (10 \times) 2 μL 、T4DNA Ligase 1 μL 、人工遺伝子断片 1 μL 、pGL4-SSA 断片 1 μL 、milliQ 水 15 μL で、反応条件を 16°C オーバーナイトとした。得られた反応液は competent cell (DH5 α TOYOBO 社) をトランスフォーメーションした。ライゲーション反応液 3 μL 、DH5 α 30 μL を氷上にて混合し 20 分置いた後、42°C 45 秒間ヒートショックを加えた。これに SOC 培地 300 μL を加え、37°C で 1 時間程、回復培養を行った後、アンピシリン LB プレートに培養液 50 μL を塗布し、37°C オーバーナイトで培養した。得られたコロニーから miniprep (promega 社) を用いてプラスミドを精製した。

DNA タグの導入

1. タグ断片の精製

ライブラリ構築に向けて N=17 の DNA ランダムタグを pGL4-SSA に In Fusion HD Enzyme Premix (Clontech 社) を用いて組換えた。Infusion 反応に必要な DNA タグ断片は Klenow Fragment (NEB 社) を用いて一本鎖プライマーを二本鎖化することで作成した。まず、pGL4-SSA のタグ挿入箇所両端の 15 塩基分と、17 塩基分のランダム配列からなる 50 μM Tag primerF (5'-GCCGCACTTATCCAANNNNNNNNNNNNNNNNTTGGTTCTGCAGTTGAC-3') および Tag-primerR (5'-GTCAACTGCAGAACCAA-3') をそれぞれ 14 μL ずつマイクロチューブに加えて 95°C 3 分の条件で熱変性を行った後、氷上でピペティングしてアニーリングさせた。反応液組成は Primer 混合液 12 μL 、NEBuffer2 (10 \times) 2 μL 、dNTP (2.5 mM each) 3 μL 、KlenowFragment (3' 5'-exo-) (5 unit/ μL) 1 μL 、milliQ 水 2 μL とし、これを 37°C 30 分の条件で反応させた。全量を low melting の 2% (w/v) アガロースゲルに電気泳動し、得られたバンドのゲル断片からアガラーゼ処理により DNA 精製を行う。まず β -Agarase Buffer I (10 \times)、DW 140 μL を加え、65°C 15 分の条件でアガロースを溶解させた後、42°C に溶液を冷ましてから β -Agarase I (NEB 社) (1 unit/ μL) 1 μL を加え、1 時間反応させ、15000 rpm 4°C 10 分の遠心を行った。得られた上清に 100%エタノール 500 μL 、3M NaOAc 20 μL を加えてエタノール沈殿を行い、milliQ 水 25 μL に溶解させた。

2. Infusion reaction

pGL4-SSA/loxP のタグ導入箇所を制限酵素で切断した。NsiI (10 unit/ μ L NEB 社)、(10 \times) NEBuffer3.1 を 3 μ L、pGL4-SSA/loxP ベクター1 μ g 分を milliQ 水で 30 μ L にメスアップし、37 $^{\circ}$ C オーバーナイトで反応させた後、0.8% (w/v) アガロースゲルに電気泳動し、ゲルから Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて DNA を精製した。その後、5 \times Infusion HD Enzyme Premix 2 μ L、DNATag 断片 10 ng、pGL4-SSA/loxP 断片を 75 ng を milliQ 水で 10 μ L 分にメスアップし、50 $^{\circ}$ C 15 分の条件で反応させた。

3. T ベクター作成

infusion reaction 産物全量に StuI (10 U/ μ L) 1 μ L、(10 \times) CutSmartBuffer 5 μ L を加えた後、milliQ 水で 20 μ L にメスアップし、37 $^{\circ}$ C 1 時間の条件で反応後、電気泳動を行い得られたバンドをカラム精製し、エタノール沈殿を行う。沈殿物を 37 μ L の milliQ 水で溶解させた後、3' 末端に dT 付加するため、DNA 溶液全量に Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' exo-) (5 U/ μ L, NEB 社) 3 μ L、(10 \times) NEBuffer 2.0 5 μ L、dNTP (1 mM) 5 μ L を加え、milliQ 水で 50 μ L にメスアップし、37 $^{\circ}$ C 1 時間の条件で反応させた後、エタノール沈殿を行い、沈殿物を 10 μ L の milliQ 水に溶解した。その後、脱リン酸化を行うために Shrimp Alkaline Phosphatase (10 U/ μ L) 1 μ L、(10 \times) CutSmartBuffer 5 μ L を加え、milliQ 水で 200 μ L にメスアップし、37 $^{\circ}$ C 30 分、65 $^{\circ}$ C 5 分の条件で反応させ、反応液はエタノール

沈殿を行い、milliQ 水 10 μ L に溶解した。

4. ゲノム random fragment の精製

DT40 wild type の細胞培養液を PBS で洗浄した後、PBS 溶液中 5 \times 10⁶ cell/200 μ L に調製、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN 社) を用いて細胞希釈液 200 μ L 全量よりゲノムを抽出した。後に NEXT ds DNA Fragmentase (NEB 社) を用いて、得られた DNA のうち 250 ng について、MgCl₂ (200 mM) 1 μ L、(10 \times) Fragmentase Reaction Buffer v2 2 μ L、fragmentase 2 μ L を milliQ 水で 20 μ L にメスアップ、3 秒ボルテックスをかけて混合した後、37 $^{\circ}$ C 20 分の条件で反応後、0.5 M EDTA を 5 μ L 加えて反応を停止させた。電気泳動でスクリーニングをかけ、1 kbp marker 上で 300 ~400 bp を示す部分からゲルを切り出してカラム精製を行った。その後、NextUltra End Repair /dA-Tailing Module (NEB 社) を用いて末端処理を行った。Endprep enzyme mix 16 μ L、End Repair Reaction Buffer (10 \times) 6.5 μ L、断片化済みのゲノム DNA 20 ng 分を、milliQ 水で 65 μ L にメスアップ、ピペティングで混合した後、30 $^{\circ}$ C 30 分、65 $^{\circ}$ C 30 分の反応条件で反応および熱失活をした後、エタノール沈殿を行い、沈殿を 10 μ L の milliQ 水で溶解した。

5. ライゲーション~プラスミドの精製

T ベクター2.5 μ L、DT40 WT random fragment 2.5 μ L を混合し、Blunt/TA Ligase Master mix (NEB 社) 5 μ L を加え、ピペティングで 7~10 回混合し、室温で 15 分間反応させ、得られた反応液を XL10-Gold Ultra competent cells にトラン

スフォーメーションした。ライゲーション反応液 3 μL 、XL10-Gold Ultra competent cells 30 μL を氷上にて混合し 20 分置いた後、42°C の湯浴で 45 秒間ヒートショックを加えた。これに SOC 培地 300 μL を加え、37°C で 1 時間程、回復培養を行った後、アンピシリン LB 培養液に加え、37°C オーバーナイトで培養後、EndFree Plasmid Maxi kit (QIAGEN 社) を用いてプラスミド精製した。

ルシフェラーゼアッセイ

ViaFect™ Transfection Reagent (Promega 社) を用いて HEK293 細胞に作成したベクターおよび TALEN ベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。まずトランスフェクション前日に HEK293 細胞を 96well plate に 5×10^4 suspension cells/100 μL に希釈した細胞液を移し、1 日培養を行った。翌日、TALEN-forward、TALEN-reverse RNA、および pGL4-SSA ベクターをそれぞれ 30 ng 分混合し、ViaFect 0.4 μL を加え、無菌 Opti-MEM で 10 μL にメスアップ後、ただちにボルテックスをし、室温で 5 分間反応させた後、細胞培養液へ全量を静かに加え、30 秒ほどプレートを軽く振とうし、37°C のインキュベーター内で 48 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイした。アッセイには ONE-Glo™ Luciferase Assay System を用いた。まず ONE-Glo™ buffer を ONE-Glo™ substrate ボトルへ加え、OneGlo reagent とした。OneGlo reagent と培養細胞とともに室温 (25°C) にして、測定用 96 well plate にトランスフェクション済み細胞液を全量移し、OneGlo reagent

を 100 μL 加え、室温で 3 分間インキュベートした後、アナライザーにて解析した。

ハイグロマイシンアッセイ

Hygromycin assay 用ベクターの作成

Hygromycin β Resistance gene (*HygBr*) 全長 1026 bp (NCBI accession no AA2473.1) を、570 bp が重複するよう二つの断片に分割し、pGL4-SSA のルシフェラーゼ遺伝子部位と入れ替えた。尚、設計においては片方配列だけで活性を持たぬよう、ATP binding site の中でも酵素活性に必須のアミノ酸配列 no198, no203, no216 が、それぞれ no198, no203 を上流側断片に、no216 を下流側断片に分割した。また、HygBr の中間領域には、後にゲノムの random fragment を TA クローニング用いて導入できるように、二か所の *XcmI* 認識配列を組み込んで配列設計した。これを人工遺伝子として注文した。人工遺伝子ベクターから、目的配列を切り出すため、ベクター (100 ng/ μL) 10 μL 、*Bg*II (10 U/ μL) 1 μL 、*S*all (20 U/ μL) 1 μL 、NEBuffer3.0 4 μL を milliQ 水 24 μL の反応組成で 37°C 1 時間の条件で制限酵素処理を行った後、電気泳動して得られたバンドをカラム精製した。pGL4-SSA ベクターについても同様に、ベクター (100 ng/ μL) 10 μL 、*Bg*II (10 U/ μL) 1 μL 、*S*aI (20 U/ μL) 1 μL 、NEBuffer3.0 4 μL を milliQ 水 24 μL の反応組成で 37°C 1 時間の条件で制限酵素処理を行い、カラム精製をした後、更に DNA 溶液全量に *Avr*II 1 μL 、CutSmartBuffer 5 μL を加えて 37°C 1 時間の条件で制限酵素処理、電気泳動で目的のバンドを切り出し、カラム精製後、エタノール沈殿を行い、沈

殿を milliQ 水 25 μ L に溶解した。こうして得られた二つの断片を T4DNA Ligase (NEB 社) を用いてライゲーションした。反応組成は Ligation Buffer (10 \times) 2 μ L、T4DNA Ligase 1 μ L、人工遺伝子断片 1 μ L、pGL4-SSA 断片 1 μ L、milliQ 水 15 μ L で、反応条件を 16 $^{\circ}$ C オーバーナイトとした。得られた反応液は competent cell (DH5 α TOYOBO 社) にトランスフォーメーションを行った。ライゲーション反応液 3 μ L、DH5 α 30 μ L を氷上で混合し 20 分置いた後、42 $^{\circ}$ C の湯浴で 45 秒間ヒートショックを加えた。これに SOC 培地 300 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間程、回復培養を行った後、アンピシリン LB プレートに培養液 50 μ L を塗布し、37 $^{\circ}$ C オーバーナイトで培養した。得られたコロニーから miniprep (promega 社) を用いてプラスミドを精製した。

DNA タグの導入

1. タグ断片の精製

ライブラリ構築に向けて N=17 の DNA ランダムタグを pGL4-SSA/HygBr ベクターに In-Fusion HD Enzyme Premix (Clontech 社) を用いて組換えた。Infusion 反応に必要な DNA タグ断片は KlenowFragment (NEB 社) を用いて一本鎖プライマーを二本鎖化することで作成した。後に *XcmI* を用いた制限酵素処理を行うため、ランダム配列内に *XcmI* 認識部位が生じないように設計した。まず、pGL4-SSA のタグ挿入箇所両端の 15 塩基分と、17 塩基分のランダム配列からなる 50 μ M Tag primerF (5'-GCCGCACTTATCC AANNTNNNNNNNTNNNNNNCNNTT GGTTCTGCAGTTG-3') および

Tag-primer-R (5'-GTCAACTGCAGAAC CAA-3') をそれぞれ 14 μ L ずつマイクロチューブに加えて 95 $^{\circ}$ C 3 分の条件で熱変性を行った後、氷上でピペッティングしてアニーリングさせた。反応液組成は Primer 混合液 12 μ L、NEBuffer2 (10 \times) 2 μ L、dNTP (2.5 mM each) 3 μ L、KlenowFragment (3' 5'-exo-) (5 unit/ μ L) 1 μ L、milliQ 水 2 μ L とし、これを 37 $^{\circ}$ C 30 分の条件で反応させた。全量を low melting の 2% (w/v) アガロースゲルに電気泳動し、得られたバンドのゲル断片からアガラーゼ処理により DNA 精製を行った。まず β -Agarase Buffer I (10 \times)、DW 140 μ L を加え、65 $^{\circ}$ C 15 分の条件でアガロースを溶解させた後、42 $^{\circ}$ C に溶液を冷ましてから β -Agarase I (NEB 社) (1 unit/ μ L) 1 μ L を加え、1 時間反応させ、15000 rpm 4 $^{\circ}$ C 10 分の遠心を行った。得られた上清に 100% エタノール 500 μ L、3 M NaOAc 20 μ L を加えてエタノール沈殿を行い、milliQ 水 25 μ L に溶解した。

2. Infusion reaction

pGL4-SSA/HygBr のタグ導入箇所を制限酵素で切断した。*NsiI* (10 unit/ μ L NEB 社)、10 \times NEBuffer3.1 を 3 μ L、pGL4-SSA/HygBr ベクター 1 μ g 分を milliQ 水で 30 μ L にメスアップし、37 $^{\circ}$ C オーバーナイトで反応させた後、0.8% (w/v) アガロースゲルに電気泳動し、ゲルから Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega 社) を用いて DNA を精製した。その後、5 \times Infusion HD Enzyme Premix 2 μ L、DNATag 断片 10ng、pGL4-SSA/HygBr 断片を 75 ng を milliQ

水で 10 μL 分にメスアップし、50°C 15 分の条件で反応させた。

3. TA クローニング

Infusion reaction 産物全量に *XcmI* (10 U/ μL) 1 μL 、10 \times CutSmartBuffer 2 μL を加えた後、milliQ 水で 20 μL にメスアップし、37°C 1 時間の条件で反応後、電気泳動を行い得られたバンドをカラム精製し、エタノール沈殿を行い、沈殿物を 20 μL の milliQ 水で溶解させた。

4. ライゲーション～プラスミドの精製

T ベクター 2.5 μL 、DT40WT random fragment 2.5 μL を混合し、Blunt/TA Ligase Master mix (NEB 社) 5 μL を加え、ピペティングで 7~10 回混合し、室温で 15 分間反応させ、得られた反応液を XL10-Gold Ultra competent cells にトランスフォーメーションした。ライゲーション反応液 3 μL 、XL10-Gold Ultra competent cells 30 μL を氷上にて混合し 20 分置いた後、42°C の湯浴で 45 秒間ヒートショックを加えた。これに SOC 培地 300 μL を加え、37°C で 1 時間程、回復培養を行った後、アンピシリン LB 培養液に加え、37°C オーバーナイトで培養後、EndFree Plasmid Maxi kit (QIAGEN 社) を用いてプラスミド精製した。

ハイグロマイシンアッセイ

1. トランスフェクション

ViaFact™ Transfection Reagent (Promega 社) を用いて HEK293 細胞に作成したベクターおよび TALEN ベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行っ

た。トランスフェクション前日に HEK293 細胞を 6 well plate に 5×10^5 suspension cells/3 mL に希釈した細胞液を移し、1 日培養を行う。翌日、TALEN-forward、TALEN-reverse、および pGL4-SSA ベクターをそれぞれ 1 μg 分混合し、ViaFect 9 μL を加え、無菌 opti-MEM で 300 μL にメスアップ後、ただちにボルテックスをし、室温で 5 分間反応させた後、細胞培養液へ全量を静かに加え、30 秒ほどプレートを軽く振とうし、37°C のインキュベーター内で 48 時間培養した。

2. 薬剤選抜

Hygromycin 入り培地に培養液を交換した。まず培養液をアスピレーターで吸引した。このとき、細胞まで吸い込まないように慎重に行った。細胞が乾かないうちに Hygromycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した培養液 3 ml を加え、更に 5 日間程培養した。薬剤選抜された細胞を顕微鏡で観察し、生細胞があることを確認した。

3. 確認 PCR

薬剤選抜された細胞培養液から DNeasy Blood&Tissue kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。assay-primerF および lox-up-colony-R2 のプライマーを用いて、得られた DNA を鋳型に Ex Taq (Takara 社) を用いて PCR を行った。反応組成は milliQ 水 14.45 μL 、10 \times Ex Taq buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL 、dNTPmix (2.5 mM each) 2 μL 、Ex Taq (5 Unit/ μL) 0.125 μL 、サイクル条件は 95°C 2min の熱変性後、95°C 15 秒の熱変性、62°C のアニーリング、72°C の伸長反応の 3 ステップを 40 サイク