

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 10. 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」
平成 25～27 年度総合分担研究報告書

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

近年、新規育種法（NBT）と言われる次世代組換え技術の急速な進歩に伴い、組換えた痕跡が残らない手法が可能になってきた。植物 RNA のウイルスを用いた開花促進、接ぎ木を利用した遺伝子サイレンシングやゲノム編集などが研究されている。これら組換え技術は、技術的に十分確立されたとは言えず、その特徴や宿主に起こり得る現象、オフターゲット効果などについて十分な検討が必要である。一方で、近い将来これらの技術を用いた作物が登場すると予想されるが、こうして作出された生物の取り扱いや規制の在り方さらに、検知の可能性に関する検討はほとんど行われていなかった。

本研究では、ゲノム編集技術の安全性を検証するために、CRISPR/Cas9 を用いて標的配列で起きる DNA2 本鎖切断の程度やその周辺領域で起きる変異とその発生率、テロメア融合などの染色体異常について、様々な条件で比較検討した。哺乳類細胞を用いて、これら技術の潜在的ポテンシャルを明らかにするために *TK1* 遺伝子を指標にしたアッセイおよび全ゲノムシーケンズ解析を行った。その結果、通常の細胞培養条件下では 100 bp 以上の欠失により *TK1* 遺伝子第 5 エキソン以降が機能喪失する確率は、メガヌクレアーゼ I-SceI および CRISPR/Cas9 では 10^{-4} から 10^{-5} であった。また、いずれを用いた時も数 kb から 10 数 kb の大きな欠失が観察された。細胞周期を S/G2/M に同期させた場合には、I-SceI では通常条件と変化がなかったが、CRISPR/Cas9 では変異頻度が大きく上昇したが、大きな欠失は I-SceI と同様になく、また、FISH 解析からテロメア融合などの染色体異常は認められなかった。

遺伝子組換え動物の文献調査からは、ウシ、ブタ、魚などの開発が多く、改変遺伝子としてはミオスタチン、*fat-1*、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモン遺伝子が多かった。また、開発国は圧倒的に中国が多く、ゲノム編集技術を利用した動物では 2014 年、2015 年度に発表された物が大きく増加している。これらの研究では、オフターゲット切断を徹底的に調査した報告はない。

現在、ゲノム編集技術の中心となりつつある CRISPR/Cas9 システムで用いる Cas9 タンパク質の毒性やアレルゲン性についての知見を得るために、熱安定性や人工消化液中での分解性、および、アレルゲンデータベース等の検討を行った結果、Cas9 は消化液中で速やかに分解すること、熱変性させた場合でも分解性に変化はなく、データベース検索からも毒性やアレルゲン性を示す可能性は低いと考えられた。

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

そこで、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

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

細胞周期を同調させない条件と S~G2/M 期に同調させた細胞を用いて、以下の実験を行った。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、CRISPR を遺伝子導入して、その後細胞内で発現されたタイミングで S-G2/M 期に同期させた条件で検討して比較した。

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 \square 中で 420 ng/ \square の Cas9 を消化した。0、0.5、1、2、4 分後に 7 \square を順にサンプリ

ングして 2.1 ml 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、分解抵抗性がますかどうか検討するために、熱安定性試験を行った。720 ng/ml 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)

2011 年から 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) を利用して検索した。

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。ジンク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 を利用して検索した。

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

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

ゲノム編集技術の DNA 切断ポテンシャル、特異性、染色体へ与える影響などを検討した。ニワトリ DT40 細胞を用いた時、標的配列部位では、大部分 3~4 塩基の欠失で、塩基置換も認められた。哺乳類 PC12 細胞を用いた時には、7~103 塩基の欠失および 2 塩基挿入が認められた。これらの変化は、これまでに論文上で報告されている他の生物種と比較しても、同程度であった。Off-target については、TK6 系細胞を用いた検討から、標的配列から予測される

off-target 部位約 30 ヶ所程度を次世代シーケンス解析して調べたところ、off-target 切断は検出されなかった。CRISPR/Cas9 でゲノム編集するときに実験条件を適切に（可能な限り必要最小限）すること、標的配列デザインを最適化することで極力抑制可能であると考えられた。ゲノム編集による off-target の検出について、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、バイアスのない分析方法も開発されている。それらの解析報告からは、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 やゲノム上の異常は検出できない欠点が存在する。

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 種設計した (gRNA#8, #17, in Figs.6 and 7)。そして、ゲノム編集用プラスミド (pmaxGFP, I-SceI, gRNA#8, #17) を導入、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 (TK1-) 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に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、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、変異が修復されずにそのまま残ることが示唆された。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 同様に数パターンでの 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、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テロメア末端融合に変化はなかったことから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、現在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)。(分担研究報告書の「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)。(分担研究報告書の「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。（「新技術の論文 H25-27」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たが、現在までに報告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ことから、判断が遅れている可能性がある。一方で、ドイツは政府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ると報告。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 を提出した。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。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、これまでの遺伝子組換え作物について、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）による除草剤耐性を獲得した作物が報告されていることから、5 年以内に商業化される可能性がある。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及びカナダ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 の標的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大きく上昇する現象が見られたが、欠失される頻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を念頭ににした時に懸念されると考えら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、また最終産物には残存しないことから、安全上の懸念はないか、あっても極めて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こ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（およそその断片）がゲノムに挿入されていないならば、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 ウィ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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表：

1. 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.
2. 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.157
3. 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
4. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
5. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
6. 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.
7. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014
 8. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014
 9. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
 10. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
 11. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
 12. Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136, 895-901, 2013
 13. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.

14. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
 15. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya. *Journal of AOAC International*, 96, 1054-1058, 2013.
 16. Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 32, 728-735, 2013.
 17. Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, 2012
 18. Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
- 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：汎用性ウィ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ア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ア（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日本セッション年次大会、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. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014 年 9 月.
 15. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 16. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子: CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 17. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹: 加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しい DNA 抽出精製法の検討、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 18. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物の DNA 精製効率に与える影響について、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 19. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 20. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
 21. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月
 22. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：2010 年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月
 23. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、

- 野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上（西巻）知子：RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月
24. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014 年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2014 年 6 月
25. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第 20 回総会・学術大会、東京、2014 年 5 月
26. 中村公亮：未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会 第 20 回総会・学術大会、東京、2014 年 5 月
27. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏：DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイアのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第 20 回 総会・学術大会、東京、2014 年 5 月
28. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上（西巻）知子：遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月
29. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013 年 11 月.
30. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. Pharma-nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月.
31. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について（コメの場合）、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
32. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換えパパイア（PRSV-YK）検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月

33. 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
34. 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: ダイレクトリアルタイムPCRによる食品分析の可能性検証、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
35. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
36. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
37. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
38. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上(西巻)知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種のPCR-RFLPを用いた迅速同定法の検討、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
39. 近藤一成、中村公亮、野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
40. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹: シリカモノリスペースによる複雑系穀物マトリックスからDNAの抽出・精製、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
41. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穠山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによるGMOスクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
42. 中村公亮、穠山浩、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換

えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月

43. 中村公亮、穂山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子：コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
44. 真野潤一、原田美央子、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、則武寛通、飯塚太由、中村公亮、穂山浩、手島玲子、高畠令王奈、古井聡、橘田和美：遺伝子組換え農産物網羅的検知法の単一試験室による妥当

性確認、2013 年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2013 年 6 月.

45. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR を利用した遺伝子組換え農産物の高精度定量、日本食品衛生学会第 105 回大会、東京、2013 年 5 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

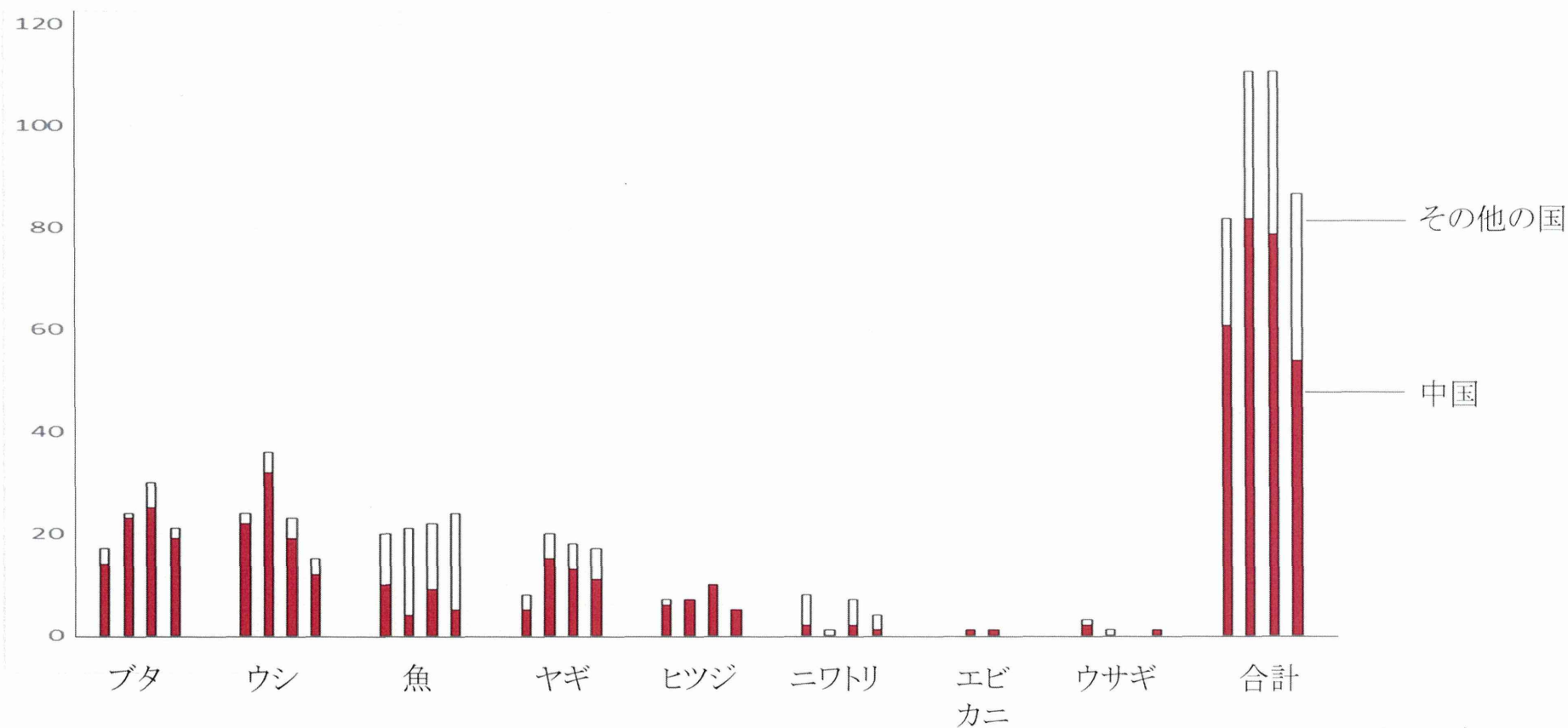
【新技術の論文H25-27】

動物の種類	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	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
ウシ	β-ラクトグロブリン	改変	牛乳中の主要アルブミン遺伝子をノックアウトした	中国	ZFN	-	mRNAを使用	低いと推定	2011	1
ウシ	ミオスタチン	改変	GM線維芽細胞を作った	中国	ZFN	-	-	-	2011	2
黄色ナマズ	ミオスタチン	改変	筋肉量を増加させることを目指す	中国	ZFN	-	mRNAを使用	有っても、戻し交配で除ける	2011	3
ウシ	β-ラクトグロブリン	改変	GMウシを作る方法を開発した	中国	ZFN	-	-	-	2011	4
ウシ	osteopontin	改変	牛乳の生産が増加する	米国	ZFN	-	-	-	2011	5
ブタ	ミオスタチン 成長ホルモン フィターゼ	改変 導入	ブタのゲノム編集の方法を開発した	米国	ZFN	-	mRNAを使用	-	2011	6
ヒツジ	MLPH、プリオン	改変	ヒツジでゲノム編集を行う方法を作った	米国	ZFN	-	-	-	2011	7
ウシ	インテグリンβ6サブユニット	改変	口蹄疫耐性を旨指す？	中国	ZFN	CMVプロモーター	ウシ成長ホルモンターミネーター	-	2012	8
ウシ	β-ラクトグロブリン	改変	GM細胞を作った	中国	ZFN	-	-	-	2012	9
ヒツジ	ミオスタチン	改変	アデノウイルスベクターを作り、細胞に感染させた	中国	ZFN	CMVプロモーター	-	-	2012	10
ヤギ	プリオン	改変	高効率で正確に遺伝子を修飾する	中国	TALEN	-	-	-	2012	11
ウシ	リソスタフィン	導入	ミルクはインビトロで黄色ブドウ球菌を殺した	中国	ZF nickase	CMVプロモーター	ウシ成長ホルモンターミネーター	-	2013	12
ウシ	Lys遺伝子	導入	乳腺炎耐性ウシの作成の基礎となる	中国	ZFN	-	-	-	2013	13
ウシ	ミオスタチン	導入	筋肉量を増加させることを目指す	中国	ZFN	-	-	-	2013	14
ヒツジ	ミオスタチン	改変	抗生物質を使わずにGMヒツジを作成した	中国	ZFN	-	-	-	2013	15
ヤギ	β-ラクトグロブリン	改変	ヤギの遺伝子をゲノム編集した	中国	ZFN	-	-	-	2013	16
ウシ	FOLLED対立遺伝子	導入	角をなくすことを旨指す	米国	TALEN	-	mRNAを使用	-	2013	17
ウシ	トリソチウム	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	CMVプロモーター	ウシ成長ホルモンターミネーター	-	2014	18
ヒツジ	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	-	mRNAを使用	-	2014	19
ブタ	ミオスタチン	改変	背中中の筋肉繊維を増やすことを旨指す	中国	ZFN, TALEN, CRISPR	-	-	-	2014	20
ニワトリ	オボアルブミン	改変	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クエンシングした	2014	21
黄色ナマズ	ミオスタチンBノックアウト	改変	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	22
ヤギ	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	CMVプロモーター	ウシ成長ホルモンターミネーター	予想される部位をシークエンシングした	2014	23
ブタ	ミオスタチン	改変	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	24
ウシ	ミオスタチン	改変	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	25
ブタ	RelA	改変	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	26
ブタ、ウシ、ヒツジ	GDP8	改変	mRNAを注入して遺伝子編集を試みた	米国	TALEN, ZFN	-	mRNAを使用	-	2014	27
ヤギ	ミオスタチン	改変	高品質な赤身の肉を作れる	中国	TALEN	-	-	-	2014	28
ウシ	ミオスタチン	改変	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	29
ウシ	ミオスタチン	改変	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	30
ヒツジ	ミオスタチン	改変	GM線維芽細胞を作った	中国	ZFN	-	-	-	2014	31
ブタ	ミオスタチン	改変	体重と筋肉が増えた	日本	TALEN	-	-	-	2015	32
ウシ、ヒツジ	ミオスタチン	改変	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	33
ブタ	ZBB16	改変	成長がよくなった	米国	CRISPR/Cas9	-	-	-	2015	34
ヒツジ	ミオスタチン、FGF5	改変	Cas9は有種に利用できる	中国	CRISPR/Cas9	-	mRNAを使用	オフターゲット変異あり	2015	35
ニワトリ	内源性鳥レトロウイルス、ミオスタチン	？	CRISPR/Cas9システムを迅速に構築した	中国	CRISPR/Cas9	-	-	-	2015	36
ウシ	プリオン	改変	胚盤胞を作った。プリオンの研究に有益だろう。	韓国	TALEN	？	？	？	2015	37
ウシ	SP110 nuclear body protein	導入	結核への耐性が強くなった	中国	TALEN nickase	CAGプロモーター	SV40ポリA	-	2015	38
ウシ	SP110	導入	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	39
ブタ	ミオスタチン	改変	筋肉と肉係数が増えて脂肪が減った	中国	ZFN	-	-	-	2015	40
ブタ	ミオスタチン	改変	筋肉と肉係数が増えた	中国	ZFN	-	-	-	2015	41
ヤギ	β-ラクトグロブリン	改変	遺伝子ターゲティングの効率が低い	中国	TALEN	-	mRNAを使用	-	2015	42
ヤギ	β-ラクトグロブリン ヒトラクトフェリン	改変 導入	ミルクにおいてラクトフェリンが大量に発現して、β-ラクトグロブリンが減った	中国	TALEN	-	-	-	2015	43
ニワトリ	オボアルブミン、オボムコイド等	改変	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	44
ブタ	ミオスタチン	改変	筋肉量が増えた	中国	ZFN	-	-	-	2015	45

発現ベクター、組換えタンパクの調製

動物の種類	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	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
ブタ	ミオスタチン	改変	ZFN用発現ベクターを作成した	中国	ZFN	-	-	-	2011	1
ヒツジ	ミオスタチン	改変	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	2
ヤギ	β-ラクトグロブリン	改変	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	3

2011 - 2014年に発表された論文、特許などの報告数



左 → 右
2011 → 2014年