

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。そこで、本研究では、標的ゲノム配列への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、ニワトリ由来細胞株を使用し、*in vitro* にて解析した。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  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター領域へ導入し解析した。遺伝子発現カセット内の配列を操作し、遺伝子導入に伴う変化を総合的に解析誌得られたデータに基づいて解釈を行った。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い得られたゲノム情報を基に、パパイヤゲノムへ挿入されたトランスジェニック構造配列及び GM パパイヤ系統特異的配列を探索した。その結果、GM パパイヤ敗発に汎用性の高い配列 (>17 bp) の配列を基に探索可能であることを実証した。得られた配列葉、GM パパイヤの系統の同定及び、様々はパパイヤ食品に適用可能な GM パパイヤ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様々な型の遺伝子発現カセットをニワトリゲノムの  $\alpha$  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相次いで報告された。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。また、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% CO<sub>2</sub> 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

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

り 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、MEGAclean™ 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  $\mu\text{g}$  mRNA と 10  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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。細胞のクローン化は、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  $\mu\text{L}/\text{well}$  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  $\mu\text{L}$ 、400  $\mu\text{M}$  dNTP、0.5  $\mu\text{M}$  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°C 5 分間の条件で保持した後、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、75°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°C 5 分間の条件で保持し、4°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 GelRed™ 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 製ケミルミイメーリアナライザーに 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 (5~10×10<sup>7</sup> 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 µl の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2 µl 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 µL /well として調製した。組成は以下のとおりである。2×QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各 0.2 µL を混合し、cDNA 試料液 0.5 µL を添加し滅菌蒸留水で全量 20 µL に調製した。反応条件は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間加温し、その後、95°C 15 秒、60°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。

#### TFIIIC:

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'-CATCTTGGTCCTCTGAGGTGTCAC-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'-ATTCAGAGTAGGCAGATAACC-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<sup>7</sup> 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°C1 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°C1 時間反応させた。次に、400 U *Bgl*II/400 U *Bam*HI 又は 400 U *Mbo*I を加え、DNA を 37°C16 時間消化させた後、65°C20 分間加熱し、制限酵素を不活化させた。反応液に 7 mL 1×T4DNA ligase buffer と終濃度が 1% (v/v) になるよう TritonX-100 を加え、37°C1 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、proteinaseK 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：

モデル食品には、安全性未承認 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。DNA はサンプル識別用インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動により 400~500 bp の断片を切り出し精製し、アダプターPCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina Miseq による全シーケンシングを行った。マッピング解析には、既知のパパイヤゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスとして使用した。マッピングに使用した配列は、両側とも 50 塩基以上にわたり QV20 を保っていた配列のフォワード側の最初の 50 塩基 (一番信頼性の高い部分) で、解析には bowtie2 を使用した。De novo assemble には、velvet を使用し、k=21 とし全結果をまと

めてインプットした。

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。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 µL /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 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µL を混合し、DNA 試料液 2.5 µL を添加し滅菌蒸留水で全量 25 µL 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  $\Delta R_n$  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：

ルシ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*、*AscI* 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 *AscI* 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*、*AscI* 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  $\mu\text{L}$ 、10xLA Taq buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  free) 5  $\mu\text{L}$ 、dNTPmix (2.5 mM each)

8  $\mu\text{L}$ 、25mM  $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{L}$ 、LA Taq (5 Unit/ $\mu\text{L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 、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  $\mu\text{L}$  に、*PacI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ 、*AscI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ 、CutSmart Buffer (10 $\times$ ) 5  $\mu\text{L}$ 、milliQ 水 37  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、T4DNA Ligase 1  $\mu\text{L}$ 、人工遺伝子断片 1  $\mu\text{L}$ 、pGL4-SSA 断片 1  $\mu\text{L}$ 、milliQ 水 15  $\mu\text{L}$  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 $\alpha$  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  $\mu\text{L}$ 、DH5 $\alpha$  30  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{M}$  Tag primerF (5'-GCCGCACTTATCCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN TTGGTTCTGCAGTTGAC-3') および Tag-primer-R

(5'-GTCAACTGCAGAACCAA-3') をそれぞれ 14  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、NEBuffer2 (10 $\times$ ) 2  $\mu\text{L}$ 、dNTP (2.5 mM each) 3  $\mu\text{L}$ 、KlenowFragment (3' 5'-exo-) (5 unit/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、milliQ 水 2  $\mu\text{L}$  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  $\beta$ -Agarase Buffer I (10 $\times$ )、DW 140  $\mu\text{L}$  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  $\beta$ -Agarase I (NEB 社) (1 unit/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、3M NaOAc 20  $\mu\text{L}$  を加えてエタノール沈殿を行い、milliQ 水 25  $\mu\text{L}$  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/ $\mu\text{L}$  NEB 社)、(10 $\times$ ) NEBuffer3.1 を 3  $\mu\text{L}$ 、pGL4-SSA/loxP ベクター 1  $\mu\text{g}$  分を milliQ 水で 30  $\mu\text{L}$  にメスアップし、37°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  $\mu\text{L}$ 、DNATag 断片 10 ng、pGL4-SSA/loxP 断片を 75 ng を milliQ 水で 10  $\mu\text{L}$  分にメスアップし、50°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 *Stu*I (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、(10 $\times$ ) CutSmartBuffer 5  $\mu\text{L}$  を加えた後、milliQ 水で 20  $\mu\text{L}$  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う。沈殿物を 37  $\mu\text{L}$  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'→5' exo-) (5 U/ $\mu\text{L}$ , NEB 社) 3  $\mu\text{L}$ 、(10 $\times$ ) NEBuffer 2.0 5  $\mu\text{L}$ 、dNTP (1 mM) 5  $\mu\text{L}$  を加え、milliQ 水で 50  $\mu\text{L}$  にメスアップし、37°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  $\mu\text{L}$  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/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、(10 $\times$ ) CutSmartBuffer 5  $\mu\text{L}$  を加え、milliQ 水で 200  $\mu\text{L}$  にメスアップし、37°C 30 分、65°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  $\mu\text{L}$  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 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/200  $\mu\text{L}$  に調製、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN 社) を用いて細胞希釈液 200  $\mu\text{L}$  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、MgCl<sub>2</sub> (200 mM) 1  $\mu\text{L}$ 、(10 $\times$ ) Fragmentase Reaction Buffer v2 2  $\mu\text{L}$ 、fragmentase 2  $\mu\text{L}$  を milliQ 水で 20  $\mu\text{L}$  にメスアップ、3 秒ボルテックスをかけて混合した後、37°C 20 分の条件で反応後、0.5 M EDTA を 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、End Repair Reaction Buffer (10 $\times$ ) 6.5  $\mu\text{L}$ 、断片化済みのゲノム DNA 20 ng 分を、milliQ 水で 65  $\mu\text{L}$  にメスアップ、ピペッティングで混合した後、30 $^{\circ}\text{C}$  30 分、65 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、DT40 WT random fragment 2.5  $\mu\text{L}$  を混合し、Blunt/TA Ligase Master mix (NEB 社) 5  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティングで 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  $\mu\text{L}$ 、XL10-Gold Ultra competent cells 30  $\mu\text{L}$  を氷上にて混合し 20 分置いた後、42 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  を加え、37 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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<sup>TM</sup> 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 96 well plate に  $5 \times 10^4$  suspension cells/100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  を加え、無菌 Opti-MEM で 10  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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<sup>TM</sup> Luciferase Assay System を用いた。まず ONE-Glo<sup>TM</sup> buffer を ONE-Glo<sup>TM</sup> substrate ボトルへ加え、OneGlo reagent とした。OneGlo reagent と培養細胞をともに室温 (25 $^{\circ}\text{C}$ ) にして、測定用 96well 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  $\mu\text{L}$  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 $\beta$ 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、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 (100ng/ $\mu\text{L}$ ) 10  $\mu\text{L}$ 、*Bg/II* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、*SalI* (20 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、NEBuffer3.0 4  $\mu\text{L}$  を milliQ 水 24  $\mu\text{L}$  の反応組成で 37 $^{\circ}\text{C}$  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/ $\mu\text{L}$ ) 10  $\mu\text{L}$ 、*Bg/II* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、*SalI* (20 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、NEBuffer3.0 4  $\mu\text{L}$  を milliQ 水 24  $\mu\text{L}$  の反応組成で 37 $^{\circ}\text{C}$  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 *AvrII* 1  $\mu\text{L}$ 、CutSmartBuffer 5  $\mu\text{L}$  を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L、T4DNA Ligase 1  $\mu$ L、人工遺伝子断片 1  $\mu$ L、pGL4-SSA 断片 1  $\mu$ L、milliQ 水 15  $\mu$ 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 $\alpha$  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  $\mu$ L、DH5 $\alpha$  30  $\mu$ L を氷上にて混合し 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M

Tag primerF  
5'-GCCGCACTTATCCAANNTNNNNNNNTNN  
NNNNCN NTTGGTTCTGC AGTTG-3'

および

Tag-primer-R  
5'-GTCAACTGCAGAACCAA-3'

をそれぞれ 14  $\mu$ 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  $\mu$ L、NEBuffer2 (10 $\times$ ) 2  $\mu$ L、dNTP (2.5 mM each) 3  $\mu$ L、KlenowFragment (3' 5'-exo-) (5 unit/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、milliQ 水 2  $\mu$ 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  $\beta$ -Agarase Buffer I (10 $\times$ )、DW 140  $\mu$ 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  $\beta$ -Agarase I (NEB 社) (1 unit/ $\mu$ L) 1  $\mu$ 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  $\mu$ L、3 M NaOAc 20  $\mu$ L を加えてエタノール沈殿を行い、milliQ 水 25  $\mu$ 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/ $\mu$ L NEB 社)、(10 $\times$ ) NEBuffer3.1 を 3  $\mu$ L、pGL4-SSA/HygBr ベクター 1  $\mu$ g 分を milliQ 水で 30  $\mu$ 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  $\mu$ L、DNATag 断片 10ng、pGL4-SSA/HygBr 断片を 75 ng を milliQ 水で 10  $\mu$ L 分にメスアップし、50 $^{\circ}$ 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/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 $\times$ CutSmartBuffer 2  $\mu$ L を加えた後、milliQ 水で 20  $\mu$ 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い、沈殿物を 20  $\mu$ L 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  $\mu$ L、DT40WT random fragment 2.5  $\mu$ L を混合し、Blunt/TA Ligase Master mix (NEB 社) 5  $\mu$ 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  $\mu$ L、XL10-Gold Ultra competent cells 30  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $5 \times 10^5$  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  $\mu$ g 分混合し、ViaFect 9  $\mu$ L を加え、無菌 opti-MEM で 300  $\mu$ L 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  $\mu$ g/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  $\mu$ L、10xEx Taq buffer ( $Mg^{2+}$  free) 2.5  $\mu$ L、dNTPmix (2.5 mM each) 2  $\mu$ L、Ex Taq (5 Unit/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、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 サイクルとして行った。反応液は 0.8% アガロースゲルに電気泳動で流し、得られた 1800 bp バンドから Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて cDNA を精製し、これをシーケンスし、HygBr 配列が細胞ゲノム内に組み込まれている事を確認した。

#### C. 研究結果

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：ニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞株を使用して、ニワトリゲノム 14 番染色体上の  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、ゲノム編集の標的配列周辺のクロマチン構造、CpG アイランド内の DNA メチル化修飾、並びに、内在性遺伝子の発現への影響を解析した。

遺伝子発現カセットを挿入した際に起こり得る、内在性遺伝子の発現量の変化を解析するため、遺伝子導入の標的としたニワトリゲノム 14 番染色体に存在する  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター周辺 270 kb 内に存在する 9 つの内在性遺伝子 (uncharacterized protein KIAA0556 [GenBank

accession no. XP\_003642159.2], general transcription factor 3C polypeptide 1 [TFIIC, GenBank accession no. XP\_004945401.1], protein argonaute 14 isoform X5 [Loc425933, GenBank accession no. XP\_423619.3], inactive rhomboid protein 1 isoform X18 [RHBDF1, GenBank accession no. XP\_004945411.1], DNA-3-methyladenine glycosylase [MPG, GenBank accession no. XP\_414945.4], nitrogen permease regulator 3-like protein isoform X1 [ggPRx, GenBank accession no. XP\_003642182.1], transmembrane protein 8A isoform X3 [TMEM8, GenBank accession no. XP\_004945418.1], 39S ribosomal protein L28, mitochondrial-like [P15, GenBank accession no. XP\_003642183.1], Axin-1 [Axin1, GenBank accession no. NP\_990275.1]) と  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター内の  $\pi$ 、 $\alpha D$  及び  $\alpha A$  の発現量を RT-リアルタイム PCR より定量した。GFP/Neo<sup>R</sup> 遺伝子を挿入して作成したホモ型細胞と野生型内における内在性遺伝子の発現量を測定した。挿入配列から 123 kb 離れた Loc425933、5 kb 離れた  $\alpha A$ 、55 kb 離れた Axin1 遺伝子の発現量をそれぞれリファレンスとして他の遺伝子の発現量比を算出したところ、遺伝子導入箇所から 20 kb 内に存在する  $\pi$ 、 $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量が顕著に上昇した。ヘテロ型細胞株においても同様に 20 kb 内の遺伝子  $\pi$ 、 $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された。導入した遺伝子やカセット配列長による影響について解析するため、GFP/Neo<sup>R</sup> と Venus/Puro<sup>R</sup> を有するホモ型細胞株を作成した。内在性遺伝子の発現量変化について解析を行ったところ、遺伝子発現コンストラクトを変えたホモ型細胞株も、20 kb 内の遺伝子  $\pi$ 、 $\alpha D$  及び  $\alpha A$  遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された。4.7 kb の GFP/NeoR と Venus/PuroR をそれぞれ発現させる発現カセットのゲノムへの導入によるゲノム構造への影響について解析するため、

3C 解析を行った。その結果、4.7 kb の発現カセットを新たに導入することによるゲノム構造の大きな変化は誘導されず、野生型と同様の 5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造が検出された。

トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向が内在性遺伝子の転写方向と対立方向 (ディバージェント) に並んだ場合の影響

TALEN を使用して、蛍光タンパク質 AcGFP 又は mVenus、及び、薬剤定性遺伝子 Neo<sup>R</sup> 又は Puro<sup>R</sup> を発現するトランスジェニック構造配列を、 $\pi$  グロビン遺伝子のターミネーター配列下流と  $\alpha D$  グロビン遺伝子のプロモーター配列の上流に挿入するよう設計したターゲティングベクターを作成した。内在性遺伝子である  $\pi$  と  $\alpha D$  グロビン遺伝子の転写方向と比較して挿入した両遺伝子の転写方向は、ディバージェント型となるように設計した。細胞へのトランスフェクション後、ネオマイシン及びピューロマイシン耐性株を単離し、限界希釈してクローニングした細胞株を定性 PCR にて、ゲノム標的配列への遺伝子導入の確認を行った。その結果、細胞株 4B において、標的配列への AcGFP/Neo<sup>R</sup> と mVenus/Puro<sup>R</sup> からなる 2 種類のトランスジェニック構造配列ホモ型細胞株の構築に成功した。昨年度の結果より、内在性遺伝子の転写方向と平行 (タンデム) に配列させた 5.4 kb からなるトランスジェニック構造配列を導入した際、ゲノム構造の変化は確認されなかった。そこで、同サイズのトランスジェニック構造配列を導入した細胞株 4B におけるゲノム構造変化の有無を確認するため 3C 解析を行った。その結果、5.2 kb 及び 3.8 kb のクロマチンループ構造が検出されたことから、野生型細胞株と比較してゲノム構造変化は見られないことが確認された。よって、細胞株 4B の  $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター領域周辺のゲノム構造において、大きなゲノム変化は認められなかった。

トランスジェニック構造配列の CMV プロモーター約 1 kb を削除し、AcGFP 遺伝子を発現しないよう作成したトランスジェニック構造配列を含むターゲティングベクターを構築した。TALEN を使用して同ターゲティングベクターを細胞へ導入した結果、同トランスジェニック構造配列がゲノム標的配列へ挿入された細胞 FF4 株のクローニングに成功した。そのクローニング細胞株中に発現する内在性遺伝子の発現量をリアルタイム PCR より定量した。Loc425933、 $\alpha A$ 、又は、Axin1 遺伝子の発現量リファレンスに、野生型細胞株の遺伝子発現量と比較定量した。その結果、数十倍以上の差の変化のある遺伝子は、トランスジェニック配列の挿入された 5.3 kb のクロマチンループ構造内に存在する  $\pi$  と  $\alpha D$  グロビン遺伝子のみであることが確認された。タンデム方向に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では  $\pi$  グロビン遺伝子は 2 オーダー、 $\alpha D$  グロビン遺伝子は 1 オーダーの上昇が検出された。一方で、ヘテロ型細胞では、遺伝子発現量の上昇は、ホモ型細胞と比較して 1 オーダー低かった。ディバージェント型に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では  $\pi$  グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 $\alpha D$  グロビン遺伝子は 4 オーダーの上昇が検出された。蛍光タンパク質を発現させる際に使用した CMV プロモーターを削除したトランスジェニック構造配列をゲノムへ導入したホモ型細胞株では、同じく  $\pi$  グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 $\alpha D$  グロビン遺伝子は 1 オーダーの上昇が検出された。以上の結果より、トランスジェニック構造配列の転写方向は、クロマチンループ構造内の内在性遺伝子発現量に影響を与え、タンデム方向では上昇に働くことが示唆された。なお、ディバージェント方向では内在性遺伝子の発現量の変化は検出されなかった。また、発現量の変化は、トランスジェニック構造内のプ

ロモーターの影響によることが示唆された。

## 2. $\alpha$ グロビン遺伝子クラスター内の CpG アイランドメチル化への影響

遺伝子導入によるエピゲノム変化を解析するため、5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造に近接して存在する DNA メチル化標的配列である CpG アイランド配列を検索したところ、5~6 kb 上流に CpG 繰り返し配列の多い CpG アイランドを見出した。DNA メチル化解析を行うためバイサルファイトシーケンシング用プライマー対を 3 対設計し、CpG アイランド内の約 1kb を解析した。バイサルファイト処理後の DT40 細胞及び LMH 細胞より抽出精製した DNA を鋳型に PCR を行ったところ、特異性の高い PCR を行うことに成功した。PCR 産物をクローニング後、DNA メチル化パターンを調べた結果、細胞株によってメチル化パターンが異なることが示唆された。

ゲノム編集技術を利用して作成した遺伝子組換え細胞内において、標的配列周辺に存在する CpG アイランドの DNA メチル化に与える影響について、バイサルファイトシーケンシング法を用いて解析を行った。バイサルファイトシーケンシング用 PCR プライマー対を使用して、バイサルファイト後の DNA を鋳型に標的配列を 3 分割し、PCR より得られた約 300 bp のアンプリコンのシーケンシング解析を行った。その結果、野生型細胞株と比較し、標的配列に挿入したタンデム型及びディバージェント型 GM 細胞株中の CpG アイランドのメチル化量の大きな変化は認められなかった。

## 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：

本研究では、Illumina HiSeq と比較しより安価でランニングコストの低い MiSeq を使用し、パ

パイヤ果実から精製したゲノム DNA のシーケンスを行った。その結果、パパイヤゲノムの 31.16 倍 (18,177,038 pair、10,906,222,800 bp) の出力配列を得た。解析用インプット配列は、低精度トリミングの閾値を Q20 (99%精度) 50 塩基以上の長さとした場合、17,375,285 pair を得ることができた。パパイヤ SunUp 品種のゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスに bowtie2 を使用してマッピングを行った結果、49.84%マッピングされた。マップリードとそのペアリード配列を特定し、リードの抽出を行い、抽出したリードを出力データとして、ショートリード用アsemblerである velvet を用いてアセンブルを行った。その結果、411,911 Contigs、267,082,851 bases を得た。この *de novo* アセンブルデータを使用して、アグロバクテリウム法により挿入された遺伝子組換え配列に共通して存在する Right border 配列、及び、Left border 配列をアンカーに検索を行ったところ、19 bp の right-border 周辺配列 (TCAGTGTGAATGAGATAG) をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、100% 相同配列を有する NODE\_446,121 (1740 bp) のコンティグを得た。このパパイヤゲノム配列は、Sunup リファレンスの Supercontig16 に帰属するものであることが示唆された。配列を詳細に解析したところ、1~836 bp にトランスジーン配列と Right border 配列、837~1740 bp にパパイヤゲノム配列であることが判明した。以上の結果から、19 bp の right-border 周辺配列をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、GM パパイヤの系統特異的な配列を得ることが可能であることが示唆された。次に 19 bp の left-border 周辺配列 (TGTTTACACCACAATAT) をアンカーとして、*de novo* アセンブルデータを検索したところ、一致する配列は得られなかった。そこで、リファレンス配列にマッピングされなかった

unmapped reads を基に検索したところ、369 bp 配列長の 1 リード一致する配列 (A5FPB:1:1114:21442:18611) が得られた。同配列中にはパパイヤゲノム配列 (1~132 bp) と Right border 配列と Transgene 配列 (133~369 bp) を含むものであった。

GM パパイヤの transgene 発現に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス 35SRNA プロモーターの部分配列から GM パパイヤに導入された遺伝子発現用カセット構造配列が抽出可能であるかを検証した。その結果、リファレンス配列にマップされなかった配列を含む 719 bp の 1 リードに P35S 配列 (GenBank access. no. EU327975) に一致する配列とマップされた配列をアセンブルした contig から得られた 1 リード (NODE\_344501) に PRSV coat protein gene (GenBank access. no. X97251.1) と一致する配列が得られた。両リードは 68 bp 合致する配列を有した。

#### 次世代シーケンシングデータを基にした未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統特異的検知法の開発

得られた次世代シーケンシングデータより、GM 作物開発において汎用性の高い既知のカリフラワーモザイクウイルス 35SRNA プロモーター配列 (P35S) を基に検索して得られた Contig\_1 と Contig\_344501 のリード配列をパパイヤゲノムリファレンス配列にマッピングした。得られた 2 つの Contig は、安全性未承認 GM パパイヤのトランスジェニック構造配列を含むものであることが判った。得られた配列を基に、P35S を認識するよう設計したプライマー p981 及び GM パパイヤ PRSV-YK 系統の目的遺伝子であるパイヤリングスポットウイルス外皮タンパク質遺伝子 (PRSV CP) 配列を認識するよう設計したプライマー p982 を使用して、定性 PCR を行った。得られた PCR 増幅産物のシーケンシング結果より得られた配列には、P35S と PRSV CP の

境界領域にトランスジェニックベクター配列などを含む人工配列が検出された。そこで、得られた情報を基に、P35S と PRSV CP の境界領域の配列を検知するためのリアルタイムPCR用プライマープローブを設計した。設計したプライマープローブ配列は、全ゲノムシーケンシングデータ及びデータベース上の配列と BLASTn 検索して、配列ベースで特異性を確認した。

#### 次世代シーケンシングデータを基にした GM パパイヤ PRSV-YK 系統検知法の特異性及び検出限界試験結果

パパイヤを含む 9 種類の作物より抽出精製したゲノム DNA を鋳型に、開発した未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統検知法 (PRSV-YK 検知法) の特異性試験を行った。その結果、パパイヤ内在性遺伝子検知試験 (Chy 検知法) を使用しパパイヤ由来ゲノム DNA を鋳型に反応させた試験のみ 2 並行試験で Ct 値 23.93/23.91 の指数関数的な増幅曲線を得た。一方、PRSV-YK 検知法においては、すべてのゲノム DNA を鋳型に指数関数的な増幅曲線は得られなかった。よって設計した PRSV-YK 検知法の高い特異性が示唆された。

PRSV-YK 検知法の検出限界試験には、PRSV-YK 系統のパパイヤ果実から精製したゲノム DNA を野生型パパイヤのゲノム DNA で、0.001~0.100% (w/w) となるよう希釈し、希釈して得られた DNA 溶液を鋳型に使用した。21 並行試験を行い、全ての反応でリアルタイム PCR 増幅曲線 (Ct 値 RSD<2.15%、閾値 0.2) が得られた濃度は 0.010%以上であった。この結果から、PRSV-YK 系統検知法の検出限界は 0.001%~0.010%であることが示唆された。

#### 開発した PRSV-YK 系統検知法を使用したパパイヤ食品への適用性について

インターネットより購入可能なパパイヤ加工

食品 (パパイヤ漬物、パパイヤ茶、パパイヤジャム、パパイヤ果実) から得られた DNA サンプルを鋳型に使用し、本研究で開発した PRSV-YK 系統検知法の様々なパパイヤ加工食品への適用性について解析を行った。その結果、全ての加工食品において、PRSV-YK 系統の混入が認められるものにおいて、陽性反応が得られた。以上の結果より、開発した PRSV-YK 系統検知法は幅広いパパイヤ加工食品へ適用可能であることが示唆された。

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：全ゲノム配列を対象にした人工ヌクレアーゼ標的配列の新規検知法を考案し、実証実験を試みた。エンドヌクレアーゼを使用して 300~400 bp 程度に分解したゲノム断片をルシフェラーゼ又はハイグロマイシン耐性遺伝子をコードする配列の間に挿入した。ベクターライブラリに特有のタグを付加するため、N<sub>17</sub> のランダム配列をベクターに組込んだ。ベクター中に組換えられ、特有のタグ配列を有したベクターを、次世代シーケンサーで解析し、各ゲノム断片にタグ配列を付加し識別可能な配列データベースの作成を試みた。また、前述した、 $\alpha$  グロビン遺伝子クラスター内の  $\pi$  と  $\alpha D$  グロビン遺伝子の間の配列を特異的に切断する TALEN を使用して、ニワトリゲノム断片を導入し作成したベクターライブラリを HEK293 細胞へトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイと薬剤耐性アッセイを行った。その結果、TALEN を同時にトランスフェクションした細胞においてルシフェラーゼの発光が確認され、また、ハイグロマイシン耐性株を得ることができた。

#### D. 考察

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：DT40 及び LMH におい

て $\alpha$ 遺伝子クラスター周辺の270 kb ゲノム領域に3.8 kbと5.2 kbの2つのループを形成することが確認された。5.2 kb ループ内へ導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の20 kb 内でかつ遺伝子クラスター内で同じゲノムループ内で構成する $\pi$ と $\alpha D$ 遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、 $\pi$ 遺伝子はhetero型で1オーダー、homo型で2オーダー、 $\alpha D$ 遺伝子はhomo型で1オーダーの違いがあった。遺伝子発現カセット内の遺伝子を代えても同様の結果を示した。また、遺伝子発現カセットのプロモーターと同じ転写方向に並んだ遺伝子(タンデム遺伝子)の発現は上昇した。この結果から、ループ内で構成するタンデム遺伝子は、基本転写因子群を共有し転写活性を調節する可能性が示唆された。

以上の結果より、トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向とタンデムに並んだ $\alpha$ グロビンクラスター領域内の内在性遺伝子発現量の変化は、クロマチンループ構造内に限定されることが判った。最終年度では、ディバージェント型細胞株を作成することに成功し、ゲノム構造、並びに、内在性遺伝子の発現量の変化を詳細に解析した。その結果、ディバージェント方向に挿入したトランスジェニック遺伝子の影響により、ホモ型細胞では $\pi$ グロビン遺伝子の発現量の変化は検出されず、 $\alpha D$ グロビン遺伝子は4オーダーの上昇が検出された。また、蛍光タンパク質を発現させる際に使用したCMVプロモーターを欠失させたトランスジェニック配列を標的ゲノム配列へ挿入した場合、遺伝子発現量の変化は低下することが確認された。トランスジェニック構造配列内の遺伝子の転写方向は、クロマチンループ構造内の内在性遺伝子発現量に影響を与え、タンデム方向では上昇に働くことが示唆され、ディバージェント方向で

は内在性遺伝子の発現量の変化は検出されないことが確認された。また、遺伝子発現量の変化は、トランスジェニック構造内のプロモーターの影響を受けることが示唆された。なお、トランスジェニック構造配列をゲノムへ導入することで、ゲノムの周辺領域に存在するCpGアイランドのDNAメチル化への影響は確認されなかった。以上の結果より、トランスジェニック構造配列をゲノムへ挿入し、GM食品を開発する際には、意図しない標的配列周辺のゲノム構造並びにクロマチンループ内の内在性遺伝子の発現量変化を避ける必要があ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 : MiSeq を利用して得られた18.2 M pair reads、10,906,222,800 bases のデータベースより、アグロバクテリウム法を利用し組換えられた際に共通して存在するTiベクター由来のRight borderとLeft border配列(>17 bp)をアンカーにGMパパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GMパパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター(P35S)をアンカーにGMパパイアの構造特異的配列を得ることができた。次世代シーケンシング解析より得られる配列データベースより、リアルタイムPCRやシーケンシング解析より得られるGM作物の部分配列を基にどのような構造遺伝子がゲノム中に導入され、どのようなGM作物の系統であるかを特定できる可能性が示唆された。

また、得られた僅か1リードのみの情報を利用し、ゲノムDNAサンプルより目的配列をPCR増幅可能であることが示された。得られたPCR増幅産物より、GMパパイアのトランスジェニック構造配列並びに系統特異的配列の情報を得ることが可能であった。得られた情報は、リアルタイムPCR用のプライマープローブを設計する際に使用し、様々なパパイア加工食品を検体

に高い特異性と検出感度を有した GM パパイア検知法を開発可能であることが示唆された。

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：全ゲノムを対象に人工ヌクレアーゼ標的配列を検出する新規 *in vitro* アッセイ方法を考案した。今後は、ルシフェラーゼアッセイと薬剤耐性アッセイ用のライブラリー構築する条件を検討し、また全ゲノムを網羅したベクターライブラリーデータベースの作成を目指す予定である。

## E. 結論

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：ゲノム編集技術を応用し作成される GM 作物中の意図しない内在性遺伝子発現量の変化を避けるため、トランスジェニック構造配列導入の標的配列として内在性遺伝子が存在するクロマチンループ構造内を避ける必要があることが示唆された。すなわち、ゲノム編集技術を応用し組換えを行う際の内在性遺伝子発現量の変化を回避させるため、「ゲノムセーフバーバー座位」の必要性が改めて示唆された。

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：次世代シーケンサーを利用して、得られる配列データを基に、>17 bp の既知配列より遺伝子組換えパパイア由来の系統特異的及び構造特異的な配列を検知することが可能であることを報告した (Nakamura, et al., *Food Chemistry*, 2016 in press)。得られた配列を基に、リアルタイム PCR を使用した特異的で高感度な検知法を開発することが可能であることを実証した (Nakamura, et al., *Data in Brief*, 2016 in press)。なお開発したリアルタイム PCR 法を使用して、様々な加工食品へ適用可能であ

ることが判った。今後、本研究手法が、パパイアよりもゲノムサイズの大きい他の作物や加工食品へ適用可能かを検証していく予定である。

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：人工ヌクレアーゼのゲノム DNA 切断標的配列検出用の新規 *in vitro* アッセイ法を構築した。今後は、全ゲノムを網羅したベクターライブラリーの実用化を目指し、構築した方法の実証実験を行う予定である。

## 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. Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R. Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK, *Ikushugaku Kenkyu*, 16, 158-161, 2014
  5. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
  6. 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
  7. 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.
  8. 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
  9. 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
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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
  14. 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.
  15. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceu-*

- tical Bulletin, 36, 1454-1459, 2013.
16. 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.
  17. 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.
  18. 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
  19. 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
  20. Mano, J., Harada, M., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Iizuka, T. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516, 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DNA二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、梶山浩、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. 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
20. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高島令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、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
  21. 高島令王奈、大西真理、布藤聡、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
  22. 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
  23. 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
  24. 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ヤ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
  25. 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
  26. 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.
  27. 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.
  28. 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
  29. 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、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ（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
  30. 野口秋雄、穂山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、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
  31. 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、高島令王奈、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
  32. 野口秋雄、坂田こずえ 真野潤一、中村公亮、高島令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、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