

日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月

33. 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
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 中村公亮、穠山浩、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

39. 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、穠山浩、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 日本セッション年次大会、東京、2013年6月。
40. 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

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

統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた作物と非食用
組換え作物の検知技術の開発

—統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究—

研究分担者 吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

研究要旨 遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人や家畜などの動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」、環境 (土壌、水源、大気など) 中の有害物質を高蓄積あるいは分解する GM 植物を「環境浄化用 GM 植物」、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産する GM 植物のうち、食用作物が使用されたものを「工業用 GM 植物 (食用作物)」と定め、その開発及び生産に関する情報を収集した。また、新規植物育種法 (NBT : New Plant Breeding Techniques) の開発状況を調査した。得られた情報を分類するカテゴリーとして、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、工業用 (食用作物) 及び NBT の 10 種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、2013 年-2015 年の 3 カ年で 64 件の情報が得られ、その内訳 (カテゴリーの重複を含む) は、機能性食品 : 10 件、経口ワクチン : 4 件、食用医薬 : 4 件、ワクチン抗原 : 2 件、抗体医薬 : 2 件、治療薬 : 6 件、診断薬・試薬 : 0 件、環境浄化 : 4 件、工業用 (食用作物) : 2 件、NBT : 36 件であり、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013-2015 年の 3 カ年に公表・出版された論文等を調査した結果、250 件が得られ、その内訳 (カテゴリーの重複を含む) は、機能性食品 : 55 件、経口ワクチン : 11 件、食用医薬 : 7 件、ワクチン抗原 : 7 件、抗体医薬 : 19 件、治療薬 : 57 件、診断薬・試薬 : 16 件、環境浄化 : 57 件、工業用 (食用作物) : 3 件、NBT : 30 件であり、特に治療薬、環境浄化及び機能性食品の件数が多かった。また、2013-2015 年の 3 カ年の国別の件数は、中国 : 96 件が最も多かった (96 件/250 件 : 38.4%)。

A. 研究目的

活発に研究開発が進んでいる高栄養、高機能または医薬品類を生産する遺伝子組換

え (GM) 植物や環境浄化を目的とする GM 植物、さらに食用作物を使用した工業用の GM 植物は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃

場栽培も行われている。また、遺伝子組換え技術は、近年多様化・複雑化し、検知が困難な組換え体の作出が進んでいる。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。

そこで本研究では、薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM植物及び新規植物育種法（NBT：New Plant Breeding Techniques）¹⁾（図1）の開発状況・生産実態に関する情報を収集して整理し、食品の安全性確保のための基盤情報を整備する。

B. 研究方法

GM植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用GM植物の範囲、土壌、水源、大気等の環境中の有害物質を高蓄積あるいは分解するGM植物を環境浄化用GM植物の範囲、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産するGM植物のうち、食用作物が使用されたものを工業用（食用作物）GM植物の範囲とした（図2）。これらGM植物及びNBTに関する情報を文献データベース（Scifinder®、検索語「transgenic plant」）、関連学会講演要旨集等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。

カテゴリーは、薬用GM植物に関するものとして、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬の7種を、その他、環境浄化、工業用（食用作物）及びNBTの3種を設定し、計10種を設定した。

C. 研究結果

1) 2013年-2015年の3ヶ年に国内学会で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論

文等（表1、2）

2013年から2015年に開催された第31、32、33回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウムで公表された薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM植物及びNBTに関する報告を調査した。収集した情報の件数は、2013：24件、2014：19件、2015：21件、3カ年の合計：64件であり、2014年に減少後に再び増加する傾向にあった（表1）。

2013年-2015年の3カ年の内訳（カテゴリーの重複を含む）は、機能性食品：10件、経口ワクチン：4件、食用医薬：4件、ワクチン抗原：2件、抗体医薬：2件、治療薬：6件、診断薬・試薬：0件、環境浄化：4件、工業用（食用作物）：2件、NBT：36件で、NBTが最も多く、年を追うごとに件数の増加が認められた（表1）。

2013-2015年の3カ年で使用された食用作物では、イネ20件が最多であった（表2）。

2) 2013年-2015年の3ヶ年に国内外で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等（SciFinder®：表3-5）

SciFinder®（キーワード：transgenic plant）で2013年-2015年の3ヶ年に国内外で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等を調査した。収集した情報の件数は、2013年：83件、2014年：65件、2015年：102件、3カ年の合計250件であり、国内での調査結果と同様に、2014年に一旦減少した後、増加に転じた（表3）。

2013年-2015年の3カ年の内訳（カテゴリーの重複を含む）は、機能性食品：55件、経口ワクチン：11件、食用医薬：7件、ワクチン

抗原：7件、抗体医薬：19件、治療薬：57件、診断薬・試薬：16件、環境浄化：57件、工業用（食用作物）：3件、NBT：30件であり、特に治療薬、環境浄化及び機能性食品の件数が多かった（表3）。NBTの件数は、増加傾向が認められるものの、微増であった。

2013-2015年の3カ年の国別の件数は、中国：96件（38.4%）が最も多く、いずれの年も30%以上であった（表4、5）。

2013-2015年の3カ年で使用された食用作物では、国内での調査と同様に、イネ36件が最多であった（表6）。

D. 考察

2013から2015年の3カ年の調査から、特に国内ではNBTに関する研究・開発が増加している状況が明らかになった。SciFinder®での3カ年の調査では、NBTは微増であったが、これは検索に用いたキーワード「transgenic plant」が植物におけるNBTに関する情報を検出するのに不十分であったためと考えられた。

E. 結論

薬用、環境浄化用及び工業用（食用作物）GM植物及びNBTの研究・開発状況の調査の結果、国内ではNBTに関する件数が多く、国内外では治療薬、環境浄化及び機能性食品の件数が多いことが判明した。また、国内外での研究・開発のうち、件数が最も多い国は、中国

であり、2013-2015年の3カ年のいずれも全体の30%以上を占めた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 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。

F. 参考文献

- 1) 鎌田博：遺伝子組換え植物・食品を巡る最近の状況～新植物育種技術（New plant Breeding Techniques）への対応～
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002tccm-att/2r9852000002tcgt.pdf>

EUがNBTとして取り上げ、その技術開発の現状や今後の動向、規制のための考え方をまとめているもの [New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development, the European Commission's Joint Research Center (JRC)-Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) and JRC-Institute for Health and Consumer Prospection (IHCP), 2011年]

- ① Zinc finger nuclease technology (ZFNs) ゲノム編集 (人工ヌクレアーゼによる塩基配列の改変)
- ② Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM) ゲノム編集による新塩基配列の挿入
- ③ Cisgenesis & Intragenesis 同種・遺伝子交換可能種由来遺伝子のみ挿入
Cisgenesis プロモーター・ターミネーター等も同じ
Intragenesis プロモーター・ターミネーター等を変更
- ④ RNA-dependent DNA methylation (RdDM) エピゲノム編集 (DNAのメチル化状態のみの変化)
- ⑤ Grafting on GM rootstock 組換え体を用いた接ぎ木
- ⑥ Reverse Breeding 育種途中で組換え遺伝子を挿入、しかし育成した品種中には組換え遺伝子がない
- ⑦ Agro-infiltration (agro-infiltration "sensu stricto", agro-inoculation, floral dip)
agro-infiltration "sensu stricto" 体細胞組織で局所的に非増殖性核酸を導入
agro-inoculation 体細胞組織にウイルス等を導入
floral dip 花芽組織にAgrobacteriumを接種し、次世代で組換え体を選抜
- ⑧ Synthetic Genomics 人工染色体

米国: NBTを用いて開発された植物品種の一部については、個別事例ごとではあるが、遺伝子組換え生物としての規制を適用しないことを既に決定

図 1. New Plant Breeding Techniques (NBT)¹⁾

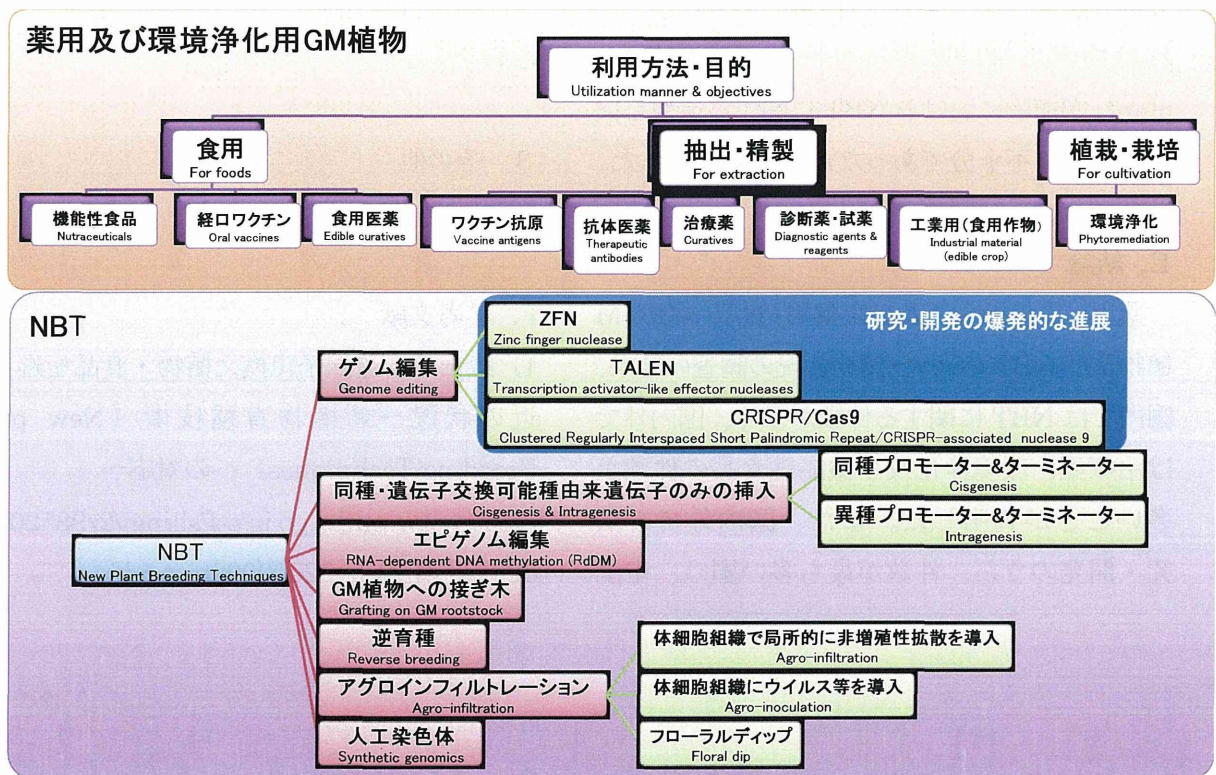


図 2. 薬用、環境浄化用、工業用 GM 植物及び NBT の開発状況・生産実態の調査カテゴリー

リーの内訳

表 1. 2013年～2015年の3ヶ年の国内でのGM植物[機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用(食用作物)]及びNBT研究・開発状況(年別、カテゴリー別集計)

年	全件数	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	NBT	小計
2013	24	7	1	3	0	1	4	0	1	1	7	25
2014	19	1	2	1	1	1	1	0	0	0	14	21
2015	21	2	1	0	1	0	1	0	3	1	15	24
計	64	10	4	4	2	2	6	0	4	2	36	70

カテゴリーは重複があるため、全件数の合計と小計の合計は一致しない

表 2. 2013年～2015年の3ヶ年の国内でのGM植物[機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用(食用作物)]及びNBT研究・開発状況(作物別集計)

年	作物区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
13-15	イネ	9	1	2	3	0	0	2	0	1	2	20
14	イチゴ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	サツマイモ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13, 15	ジャガイモ	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	5
13	ダイズ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13	テンサイ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	トマト	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	3
13-1	レタス	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3

4												
13 -1 5	シロ イヌ ズナ	4	1	0	0	0	0	0	0	2	0	7
15	セリ オレ ン	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13 -1 5	タバ コ	12	1	0	0	2	2	1	0	1	0	19
15	トレ ニア	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	ハビ ソウ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
14 -1 5	リン ドウ	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
13 -1 4	緑藻	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
14 -1 5	植物	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
2013-2 015 計		40	10	4	4	2	2	6	0	5	2	75

カテゴリー及び作物は重複があるため、表1の全件数の合計と2013-2015の合計は一致しない

表3. 2013年～2015年の3ヶ年の国内外でのGM植物[機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用(食用作物)]及びNBT研究・開発状況
(SciFinder®: 年別、カテゴリー別集計)

年	全件数	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	NBT	小計
2013	83	27	4	3	3	7	19	3	14	0	9	89
2014	65	11	3	3	1	3	15	5	14	3	9	67
2015	102	17	4	1	3	9	23	8	29	0	12	106
計	250	55	11	7	7	19	57	16	57	3	30	262

カテゴリーは重複があるため、全件数の合計と小計の合計は一致しない

表 4. 2013年～2015年の3ヶ年の国内外でのGM植物[機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用(食用作物)]及びNBT研究・開発状況 (SciFinder®: 国別集計)

年	国名 区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
13-15	日本	5	3	0	2	0	0	3	0	7	0	20
13-15	韓国	3	8	1	6	1	2	9	5	9	0	44
13-15	中国	6	21	2	9	3	0	14	6	33	3	97
13-15	台湾	2	1	0	0	2	0	0	0	1	0	6
15	フィリピン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
13	オーストラリア	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13-15	インド	1	1	0	1	0	2	2	2	2	1	12
15	パキスタン	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	イラン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
14	イスラエル	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
13-14	トルコ	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
13-15	カナダ	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	5
13-15	米国	9	3	2	3	0	5	7	1	3	1	34
13	キューバ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
13-15	ロシア	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
13-14	チェコ	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
15	ポーランド	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14	スウェーデン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
15	ノルウェー	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
15	デンマーク	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

13 -1 5	オランダ	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
13 -1 5	ドイツ	0	1	0	0	0	3	1	4	0	0	9
13	スイス	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6
13 -1 5	フランス	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	5
15	オーストリア	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14	イタリア	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
13 -1 5	英国	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	5
14 -1 5	スペイン	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	6
2013-2015 計		30	44	7	31	8	20	42	20	63	6	271

国、カテゴリーは重複があるため、表3の全件数の合計と2013-2015計の合計は一致しない

表5. 2013年～2015年の3ヶ年の中国でのGM植物【機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用（食用作物）】及びNBT研究・開発件数の推移と全件数に占める割合（SciFinder®）

年	全件数	中国の件数	全件数に占める中国の割合 (%)
2013	83	30	36.1%
2014	65	28	43.1%
2015	102	38	37.3%
計	250	96	38.4%

表 6. 2013年～2015年の3ヶ年の国内外でのGM植物[機能性食品、経口ワクチン、ワクチン抗原、治療薬、環境浄化、工業用(食用作物)]及びNBT研究・開発状況
(SciFinder®:作物別集計)

年	作物名 \ 区分	NBT	機能性食品	経口 ワクチン	食用医薬	ワクチン 抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬 試薬	環境浄化	工業用	小計
15	アマ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13 -1 5	アルファ ルファ	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3
13 -1 5	イネ	4	10	2	0	1	2	6	5	6	0	36
14	インゲン マメ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
13	エンバク	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	オタネニ ンジン	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3
14	オオムギ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	オリーブ	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
14	カノーラ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
13	カボチャ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
15	カラシ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
13	カラシナ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
15	キャベツ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
15	キュウリ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	ゴマ	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
13	サトウキ ビ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	シソ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13 -1 5	ダイズ	0	3	0	0	0	0	2	0	1	2	8
14	チクセツ ニンジン	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	チコリ	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
13 -1 4	チャノキ	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
13 -1 5	トウモロ コシ	0	5	0	0	0	0	1	1	1	0	8
13 -1 4	トマト	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	6
13 -1 4	ナガミノ アマナズ ナ	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
14	ナス科 植物	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13 -1 5	ナタネ	1	4	0	0	0	0	1	1	1	0	8
15	ナツメ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14	ニンジン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

13 ・1 5	ハクサイ	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
13	ハッカ	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
15	ハツカダイコン	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
14 -1 5	ヒマワリ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	3
14	ブドウ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
15	マンダリンオレンジ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14	モモ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	ラッカセイ	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
14	リンゴ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	ワタ	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
13 -1 4	油糧作物	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	6
15	植物 (農作物)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
15	アブラナ科植物	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
15	ウラルカンゾウ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
15	カワラニンジン	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
15	キク科植物	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
15	クソニンジン	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
15	ケシヨウヨモギ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
14	ゲンゲ属植物	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
14	ザッショクノボリフジ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13 -1 5	シロイヌナズナ	4	2	1	0	0	0	4	2	1 1	1	2 5
13	スラッシュユパイン	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
14	ステロサントス属植物	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
14	セツレンカ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
14	ソルガム	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13 -1 5	タバコ	7	8	4	2	3	1 1	1 4	2	1 2	0	6 3
13 ・1 5	タンジン	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
15	チクセツニンジン	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
15	テトラスティゲマ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

	属 植 物											
1 4 - 1 5	トウゴマ	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	4
1 5	ヒガンバナ科植物	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1 5	ヒメウキクサ	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
1 5	ペチュニア	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
1 4	ポプラ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1 5	ホホバ	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
1 4	マテバシイ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1 3	ヤセイカンラン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1 3 - 1 5	植 物	7	1 8	2	2	2	3	1 4	6	2 1	0	7 5
2 0 1 3 - 2 0 1 5 計		3 8	6 3	1 2	7	1 0	1 9	7 0	2 5	6 2	9	3 1 5

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

統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた作物と非食用
組換え作物の検知技術の開発

－NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発－

研究分担者 吉松嘉代 医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター

研究要旨 New Plant Breeding Techniques (NBT)は、急速な発展の途上にある技術である。本研究では NBT の技術潮流を把握するため、TALEN や CRISPR/Cas9 といった NBT の植物分野への利用状況について論文調査を行った。その結果、TALEN と CRISPR/Cas9 が広範な植物種で利用され、とくに、CRISPR/Cas9 の報告数が年々倍増し、本技術の利用が加速している実態が明らかになった。世界的には、米国と中国が植物に対する二大 NBT 実施国となっているが、とくに中国における TALEN 及び CRISPR/Cas9 の植物全般への実施状況について注視する必要がある。また、TALEN 技術の確立と検知モデルの作成のため、イネの *SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を行った。作製した TALEN の機能検定を SSA アッセイにより行い、これらが標的配列を認識して切断する活性を有することを示した。これらを用いイネを形質転換したところ、*SPK* 遺伝子を標的とする TALEN を導入した形質転換体 (SPK-TALEN イネ) は得られたものの、ゲノム編集が検出された個体は得られず、ゲノム編集の効率がそれほど高いものではないことが示唆された。さらに、SPK-TALEN イネを、NBT 適用植物の作成過程において構築されると想定される組換え体検知モデルとして使用し、その検知法を開発、評価した。その結果、一般的と考えられる TALEN の遺伝子構造を標的とした組換え体の PCR 法による検知が可能であることが示された。

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

A. 研究目的

遺伝子組換え生物 (genetically modified organism, GMO) は、植物分野においては、経口ワクチン等の医薬品生産や土壌浄化等の目的に利用されている。これらの新 GMO は、従来の除草剤耐性の食用作物などの GM 植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性

が高い。また、近年、植物の分子育種技術は長足の進化を遂げており、いわゆる New Plant Breeding Techniques (NBT) に含まれる育種技術のなかには、標的とする遺伝子領域に正確に目的遺伝子を導入可能なものや、標的とする遺伝子領域のみを正確に破壊するような技術が開発されている。

本研究においては、これらの非食用組換え体ならびに NBT 応用植物の食品中への

混入を防止するための安全性確保に有用な検知技術の確立を行うことを目的とする。そのために、代表的な NBT である TALEN を用いたゲノム編集を行ったイネの作出を試みる。

一般に NBT 応用生物は、NBT により改変された標的部を除くと、ゲノム DNA 等上の遺伝子レベルの“痕跡”がない、またはあったとしても自然変異との区別が困難なレベルであるため、その検知は困難であると考えられる。しかしながら、対象が植物の場合は、NBT 応用植物を作成する際に、TALEN や CRISPR/Cas9 の遺伝子コンストラクトを植物中で機能発現させるために、在来の遺伝子組換え法による遺伝子導入が用いられるケースが多いと考えられる。そのような NBT 植物の構築過程に派生する遺伝子組換え植物が逸出し、フードチェーンに混入する可能性は否定できない。今回、NBT 応用植物作成中間体として想定される TALEN 遺伝子を導入した遺伝子組換えイネを作成したのち、組換え体検知対象モデルとして使用し、その検知法を開発、評価した。

これまでに、厚生労働省による安全性審査の手続きを経た遺伝子組換え食品等のうち、遺伝子組換えトウモロコシ、大豆、じゃがいも等については検査法が公定法として存在するが、中国産の未承認組換えイネの混入事例のように、今後は、未承認または NBT 応用生物を含む未知の組換え、または遺伝子編集技術適用作物の市場への混入が、より深刻な問題となり得る。薬用植物資源を生産・管理する立場にある医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターにおいて、そのような事態に対処可能な検知システムを開発し、未知の危険性に備える意義は危機管理の面からも非常に大きい。

B. 研究方法

NBT ゲノム編集技術の概要

研究方法について述べる上で基礎的な情報として、ZFN、TALEN そして CRISPR の概要を以下にまとめた。

ZFN (Zinc Finger Nuclease)

ZFN は、DNA に結合する部位である 3 個から 6 個の zinc(Zn) finger と、制限酵素 *FokI* の DNA 切断ドメインからなる融合酵素であり、標的 DNA 配列に結合し、*FokI* が二量体を形成して 2 本鎖 DNA を切断する。ここで切断された二本鎖 DNA が相同組換えまたは非相同末端連結により修復される際に変異が導入される。ZFN は標的部位認識の特異性が高いが、zinc finger の部分が(GNN)_n で構成される配列を認識する傾向があるため、標的遺伝子配列の自由度が小さい。

TALEN

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

ZFN(Zinc Finger Nuclease)と比較して標的塩基配列の自由度が高く、CRISPR と比較して、オフターゲット(off-target:標的部位以外への意図しない変異の導入)が少ないとされるが、塩基を認識するタンパク質ユニットを設計し、コンストラクトを構築する必要がある。

CRISPR/Cas9

CRISPR (Clustered Regularly

Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR Associated)は、細菌や古細菌における獲得免疫の機構を利用したものであり、標的配列と相補的なガイドRNA(gRNA)に誘導され、Cas9ヌクレアーゼが標的配列を特異的に認識し、切断する。

標的塩基配列に対する相補的な塩基配列(guide RNA)を破壊に用いるのでTALENよりも簡便標的を認識する部位が標的部位の一か所のみであるため、TALENと比較して、off-target活性が高いとされる。

NBT 応用状況の文献調査

NBT はいずれも急速な発展途上にある技術であり、検知法の開発と技術の開発、改良が並行して進む状況である。そこで、NBTの植物への応用例について文献調査を行い、急速に革新が進む本分野の技術潮流を把握するため、文献調査を行った。昨年度と同様に、NBTと称されるもののなかでも、遺伝子工学的手法を用い従来の遺伝子組換え法の代替法となると考えられる、ZFN (Zinc Finger Nuclease)、TALEN(s) (Transcription activator-like effector nucleases)、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 (CRISPR Associated)の3手法を対象を絞った。

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)でZFNについては、ZFN、zinc finger、plant、TALENについては、TALEN(s)、TAL effector、plant、そしてCRISPRについてはCRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、をキーワードとして検索を行った(最終検索結果更新日: 2016年2月19日)。

検索結果から基礎研究に関する論文や総説を除き、植物を対象として遺伝子編集を実施した論文のみを抽出し、各技術カテゴリー別にPMID順にリスト化した。また、

作成したリストについて発表年(オンライン公開された論文はオンライン公開年)、国別、技術カテゴリー別等に集計し、開発動向の解析を行った。

イネの *SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)は、植物病原細菌 *Xanthomonas* が持つ転写因子のDNA結合ドメインと制限酵素 *FokI* のDNA切断ドメインの融合酵素であり、標的塩基配列を認識するタンパク質のモジュールにより標的配列に結合し、二量体を形成して二本鎖DNAを切断し、切断部位が相同組換えまたは非同相末端連結により修復される際に変異が導入される(文献1)。

標的となる遺伝子には、すでに変異体が存在し、その表現型が詳しく調べられているイネの *SPK* 遺伝子、*FLO2* 遺伝子を用いた。*SPK* 遺伝子に変異が導入された場合には種子の形態に以上が生じる。また *FLO2* 遺伝子に変異が生じた場合には貯蔵デンプンの生合成に障害が起きて異常な胚乳を形成する。これらの遺伝子についてのゲノム編集を試みた。そのために、Emerald Gateway TALEN kit を用いて対応する塩基配列を認識するTALEN(人工ヌクレアーゼ)遺伝子の構築を行った。Emerald Gateway TALEN kit は広島大学で構築されたPlatinum Gate TALENキットを植物用に最適化したものである(文献2)。これによりそれぞれの遺伝子に対応するTALEN遺伝子を構築した。さらに、得られた人工ヌクレアーゼが正常に機能するかどうかを検定するための評価系を構築し、これを用いて機能の検定を行った。これによって作製された人工ヌクレアーゼ遺伝子はイネの形質転換に供する。これらのTALEN遺伝子を用い、アグロバクテリウ

ム法によりイネの形質転換を行った。

TALEN モデル組換え体の検知法開発

植物の遺伝子を標的として TALEN を作動させ遺伝子改変を行い安定的な遺伝子改変体を得ようとする場合、遺伝子組換え植物の作製に一般的に用いられるアグロバクテリウム法によって TALEN コンストラクトを植物ゲノムに組み込み、TALEN による遺伝子改変体を交配によって取得する必要がある。この遺伝子組換え、改変の過程において、在来型の組換え体が逸出し、市場等のフードチェーンに混入する危険性が危惧される。

今回、この中間生成物型の組換え体の検知モデルとして、東京理科大島田研究室において作成された、*SPK* (Sucrose synthase kinase) 遺伝子 (文献 3) を標的とする TALEN 遺伝子を導入したイネ遺伝子組換え体を、TALEN 遺伝子導入組換え体モデルとして使用し、その PCR 法による検知法の開発を試みた。

本組換え体に導入されているコンストラクトのうち、遺伝子組換え植物において遺伝子発現に頻用されるプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス CaMV35S プロモーター、そして、TALEN 遺伝子において必須であり、標的遺伝子配列に関わらず遺伝子配列が固定されている TALE-C-FokI 遺伝子を検知対象領域として設定し、これらに特異的なプライマーを設計した。

イネ組換え体の葉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用しゲノム DNA を調製し、これを鋳型として CaMV35S プロモーター領域及び TALE-C-FokI 領域を標的とした PCR を行った。なお、イネの組換え体検知法 (文献 4) において陽性対照として使用される *SPS* 遺伝子を陽性対照として用いた。

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅産物の有無およびサイズの解析を行った。

C. 研究結果

文献調査結果

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) で各 NBT について検索し、検索結果について、基礎技術に関する論文や総説を除き、植物に NBT を適用した論文のみを抽出した。また、年度別の実施報告 (論文) 数、植物種別の実施数、技術カテゴリー及び国別の実施数及び割合、そして、特に、中国が実施した NBT (TALEN, CRISPR/Cas9) の対象植物種の割合についてグラフ化した。これらの NBT 適用植物リストおよびグラフから、伺える NBT の利用動向は下記のとおりである。

1) NBT カテゴリー別開発動向の解析結果 1-1) ZFN

ZFN の植物への応用について、キーワード: ZFN、zinc finger nuclease、plant で検索したところ、2005 年から 2016 年 (2 月 19 日まで) の間に、32 報の植物に対する実施報告が見出された。適用された植物はシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆等の 9 種であり、モデル植物が中心であるが、2014 年にりんごやイチジクへの適用例が報告されている。

年次別の実施数を見ると、ZFN は 2012 年に一時、実施報告数が 1 件と減少したが、その後、2013 年は 7 件、2014 年は 4 件、そして 2015 年は 5 件と推移している。これは 2011 年ごろより ZFN の代替手法として TALEN が注目されはじめ、一時的に ZFN から TALEN にシフトしたものの、その後、ZFN に回帰する動きがあったものと考えられる。

ZFNについては、報告数は米国が全体の70%と圧倒的に多いが、その内訳は、古くからZFNをはじめとするNBT研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループと、Dow AgroSciences LLCのグループからの報告が大半を占めている。これら米国の2グループの報告を除くと、ZFNの報告数は、2013年は3報、2014年及び2015年は2報であり、他のNBTと比較すると、実施数が低調となっている傾向が認められた。とくに中国からはZFN関連の報告は一切なされていない。

1-2) TALEN

次に、TALENの植物への応用については、キーワード:TALEN(s)、TAL effector、plantでの検索の結果、2011年から2016年(2月19日まで)の間に計33件の報告がなされていた。

適用された植物としては、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、イネ、タバコ(*Nicotiana tabacum*)、*N. benthamiana*、トウモロコシ、*Brassica oleracea*(アブラナ科)、*Brachypodium*(イネ科、セルロースバイオマス増産研究のモデル植物として期待される)、大麦、大豆、小麦、そしてジャガイモの11種が対象とされていることが判明した。TALENはモデル植物をはじめ、実用作物である穀類へと広く適用されており、その報告数は、2011年の2件から、2012年の3件、2013年は8件、そして2014年は7件そして、2015年に12報と推移している。また、2014年以降はCRISPR/Cas9との変異導入効率の比較研究も行われるようになってきている。直近の2015年に報告された12報中、実用作物への実施報告数は10報であり、*N. benthamiana*に対するモノクローナル抗体生産基盤構築のための糖鎖修飾様式の改変を含めると11報となった。このことから、TALENについて

はモデル植物に対する実験的ステージは終了し、実用ステージに移行した状況がうかがえる。

1-3) CRISPR

CRISPRの植物への応用は2013年にNature Biotechnology誌に3報が同時に報告されたのを皮切りに、論文数が急速に増加している。

CRISPR/Cas9の植物への応用については、キーワード:CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、での検索の結果、2013年、2014年のわずか2年間に31報の実施例が確認され、シロイヌナズナ、イネ、タバコ(*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケ、オレンジ、グループフルーツ、トマトの計11種への適用が確認されていた。直近の2015年及び2016年(2月19日まで)の報告数は2015年が40報、2016年が7報で、2015年の報告数は2014年の21報からほぼ倍増となっていることが明らかになった。2015年及び2016年に新たに適用が確認された植物は、亜麻、ペチュニア、キュウリ、大麦、*Brassica oleracea*(アブラナ科)、大豆、ポプラ、*Medicago truncatula*(マメ科)、レタス、ジャガイモの10種であり、これまでにモデル植物から実用作物まで、計21種の広範な植物へ適用されている実態が明らかになった。

上記の技術カテゴリー別の実施数は、ZFNは標的部位の設計に塩基配列の制限がある、TALENは標的部位の配列の自由度は高いがタンパク質で塩基配列を認識するためコンストラクトの設計が煩雑、CRISPR/Cas9は標的部位の自由度が高く、標的部位に相補的な塩基配列(guide RNA、gRNA)の設計のみが必要とされるといった各NBTの技術的特徴、特に、いかに簡

便であるかをよく反映していると考えられ、技術的に簡便な CRISPR/Cas9 が劇的に実施数を増やしている実態が明らかになった。

2) 国別開発動向の解析結果

研究が実施された国別で見ると、TALEN 及び CRISPR/Cas9 については、いずれも米国と中国が全体の 70%を占め、両国が 2 大開発国となっていることが示された。

中国の開発動向についてさらに詳しくみると、TALEN、CRISPR/Cas9 両技術の実施対象植物としてイネがそれぞれ 50%、35%を占めており、主食作物であるイネに対する遺伝子改変の取り組みが盛んである傾向が続いているだけでなく、実用作物や樹木への実施研究も進められていることが明らかになった。

NBT モデル植物作出のための基盤技術整備

文献調査の結果等をふまえ、本研究においては、TALEN の技術習得のため、2014 年 3 月 25 日～26 日に広島大学で開催された「ゲノム編集コンソーシアム」(主宰: 広島大学理学研究科数理分子生命理学専攻分子遺伝学研究室山本卓教授) 主催の第 7 回人工ヌクレアーゼ作製講習会 (Platinum TALEN の作製) に参加した (河野、草野)。

イネの *SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築

(a) Emerald Gateway TALEN を用いて作製した TALEN の評価

Emerald Gateway TALEN kit を用いてイネの *SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN の構築を行った。これによりそれぞれの遺伝子に対応する TALEN 遺伝子の作製に成功した。これらはそれぞれの遺伝子のコード領域に対応す

る配列を標的とする。さらに、得られた人工ヌクレアーゼが正常に機能するかどうかを後述する SSA アッセイ系を用いて評価を行った。

(b) SSA アッセイを利用した TALEN の検定

構築した TALEN が標的部位特異的な DNA 切断をするかどうかの検定を行った。検定は佐久間らにより報告されている SSA アッセイ法 (文献 5) をもとに、植物ゲノム用に改変を行った。また、大腸菌を利用した簡便なアッセイ法の構築を行った。まず、検定用のプラスミド DNA の構築を行った。SSA アッセイでは特定のレポーター遺伝子を前半部～中央部分までの領域と中央部分～後半部の 2 つの領域に分断し、両者は標的配列を挟む形で結合した検定用プラスミドを構築する必要がある。

そこで、レポーター遺伝子としてホタル・ルシフェラーゼ遺伝子および β グルクロニダーゼ遺伝子を用いた検定用プラスミドを作製した。これらを 2 つに分断し、これらを用いた SSA アッセイ系の構築を試みた。これらの遺伝子はそれぞれ 430 塩基および 700 塩基の重複部分を有し、両者の中央部には Gateway BP クロナーゼによるクロニング部位を配置した。これを pSSAGG-GwBP および pSSARL-GwBP と命名し、汎用的な SSA アッセイ用ベクターとした。TALEN の標的配列を合成すれば、これを BP クロナーゼによってこれらのベクターの中央部分に導入することができる。

TALEN が標的配列を認識し、この配列を特異的に切断することができれば、SSA 検定用プラスミド DNA にあるレポーター遺伝子の重複部分を介した相同組み換えを誘発し、これによりレポーター遺伝子が正常な形に復活する。そこで、標的配列を組み込んだ SSA アッセイ用プラスミドと検

定する TALEN 遺伝子を細胞に導入し、細胞内での反応を促すことで、レポーター活性が現れることが期待される。

植物細胞を用いた SSA アッセイを試みた。イネの培養細胞からプロトプラスト細胞を調製した。これに *FLO2* に対する標的配列を組み込んだ上記の SSA アッセイ用プラスミドと検定用の TALEN 遺伝子を有する 2 種類のプラスミド DNA を導入した。その結果、*FLO2* を標的とする TALEN を組み込んだ実験系では GUS 活性が検出された。このことから、この検定に用いた TALEN は標的配列を認識して切断する能力を有することが明らかになった。

これと並行して、大腸菌を利用して同様の検定を行った。その結果、検定に用いた TALEN は標的配列を認識して切断する一方、標的とならない配列を有する SSA アッセイプラスミドに対しては反応が起らなかった。この結果から TALEN の機能検定は大腸菌を用いたシステムでも可能であることが示された。

(c) 形質転換イネの作出と組換え体の検定

構築した *SPK* を標的とする TALEN 遺伝子を用いて、イネの形質転換を行った。これによりおよそ 100 個体の再分化個体を得た。これらの植物体よりゲノム DNA を抽出し、PCR により、これらの植物に TALEN 遺伝子が導入されているかどうかの検定を行った。その結果 70 個体中 63 個体で目的とする TALEN 遺伝子が検出された。そこで、これらの形質転換体について、*SPK* 遺伝子におけるゲノム編集が起こっているかどうかの検定を行った。TALEN の標的配列とした部分には *EcoRV* による制限酵素切断部位が含まれているため、この領域でゲノム編集が起こっている場合には *EcoRV* での切断が起こらない可能性が高いことが期待される。そこで、PCR によ

り当該の領域のゲノム配列を増幅後、この配列が *EcoRV* で切断されるかどうかを調べた。その結果、いずれの形質転換体においても *EcoRV* による切断パターンは野生型と同じであり、この時点では、これらの形質転換体でゲノム編集は起こっていないことが示唆された。

TALEN 遺伝子導入組換え体検知モデル実験

SPK 遺伝子を標的とした TALEN コンストラクト導入組換え体 (*SPK*-TALEN イネ) を検知モデルとし、本組換え体に導入されている TALEN 作動用コンストラクトの各パーツを対象として PCR による検知を行った。

その結果、CaMV35S プロモーター、TALEN コンストラクト内部配列 (TALE-C-FokI) 及び、コントロールとしたイネ *SPS* 遺伝子のいずれを標的とした場合においても *SPK*-TALEN モデルイネを材料とした場合は、明瞭な増幅産物を与えた。なお、非組換えの野生型株日本晴については、*SPS* のみ検知された。

このように、TALEN を発現・機能させるために必要なコンストラクトの各要素の遺伝子領域を標的とした検知が可能であることが示された。

D. 考察

本研究においては、NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、同技術が積極的に植物へ利用されている実態を明らかにした。急速に植物への利用が進んでいる TALEN 及び CRISPR/Cas9 であるが、CRISPR/Cas9 の報告数が 2013 年から 2014 年、そして 2015 年と毎年、倍増していることと比較すると、TALEN の報告数の伸びは低調であり、手法が簡便な CRISPR/Cas9 が頻用されていることが裏

付けられた。また、実施国については、米国と中国が二大 NBT 大国となっている状況は続いている。中国においては、TALEN や CRISPR/Cas9 の実施対象植物として、イネに対する実施報告数が全体の 3 割~5 割を占めることも明らかになったが、大豆やトウモロコシといった実用作物への利用も進んでおり、これらのフードチェーンへの混入に、今後一層注視する必要があると考えられる。

SPK 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築においては、SSA アッセイによりこれらの TALEN 遺伝子が部位特異的な DNA 切断を行う能力を有することが確認された。この結果から、われわれが開発した Emerald Gateway TALEN システムおよび SSA アッセイシステムが期待通りに機能することがわかった。これらの成果は今後のゲノム編集技術の普及及び標準化に寄与するものと考えられる。

作製した TALEN 遺伝子を用いてイネの形質転換を行い TALEN を導入した形質転換体を得た。このうち、*SPK* 遺伝子を標的とする TALEN を導入した形質転換体では、導入した TALEN 遺伝子の検出に成功したが、これらの形質転換個体ではゲノム編集を検出することができなかった。このことはゲノム編集が起こる効率があまり高くないことを示唆するものと考えられる。また、形質転換体に導入された TALEN は継続的に働くものと考えられるため、植物体を育成していく過程でゲノム編集が起こる可能性も考えられる。今後はこれらの再分化植物の中でのゲノム編集の事象について継続的に調べていく必要があると思われる。また、TALEN 遺伝子を導入した形質転換体を継続的に作製することでゲノム編集効率が高まるものと考えられる。

今回の文献調査の結果からは、中国における NBT 応用植物の開発が爆発的なスピ

ードで拡大していることがうかがわれた。TALEN 及び CRISPR/Cas9 といった NBT 応用植物は、その最終的な遺伝子改変植物の遺伝子レベルでの改変の痕跡は検出することが困難なレベルになっているが、そのような急激な開発状況下においては、遺伝子改変過程の途上にある、作出過程の TALEN コンストラクトの残存したものなど不完全な組換え体等が市場等に逸出、流出する可能性は否定できない。今回構築した検知システムはそのような組換え体の検知を可能にするものである。また、TALEN 遺伝子と同様に、PCR 検知のターゲットを CRISPR/Cas9 のコンストラクト特異的に設計することも可能と考えられる。

E. 結論

TALEN や CRISPR/Cas9 といった NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を 3 年間に渡り行った結果、NBT、特に TALEN と CRISPR/Cas9 がモデル植物だけでなく、穀類等の実用作物へも盛んに応用されている実態が判明した。とくに、CRISPR/Cas9 の報告数は年々倍増しており、本技術の植物に対する利用が加速していることが明らかになった。世界的には、米国と中国が二大 NBT 実施国となっているが、中国における TALEN 及び CRISPR/Cas9 の植物全般への適用状況について引き続き注視する必要があるといえる。

また、TALEN 技術の確立と検知モデルの作成のため、イネの *SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を行い、これを用いた形質転換を行った。*SPK* 遺伝子を標的とする TALEN を導入した形質転換体が 63 個体得られたが、これらのうちでゲノム編集が検出された個体は見出されていない。このことはゲノム編集の効率がそれほど高いものではないことを示唆する。また、作製した TALEN の