

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）
「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」
分担研究報告書（平成 29 年度）

未承認遺伝子組換え作物検知法、規制および安全性に関する情報収集

研究分担者 近藤 一成（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 中島 治（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：近年のバイオテクノロジー技術の著しい進歩により、ゲノム編集技術等これまでにない正確な改変が可能なツールを用いた新品種開発が盛んに行われている。一方で、ゲノム編集技術が規制の枠組みの中でどのように扱われるべきかの議論は進んでいない。ゲノム編集技術を用いた場合は、その改変の痕跡が残りにくいことから従来の方法では検出は難しい。しかし、汎用される既知配列があればそこから未知配列の解析も可能になるため、その手法の一つとして、Genome-walking または LAM-PCR と次世代シーケンサーを組合せた解析手法が欧州で検討されている。ゲノム編集をはじめとする新育種技術（NBT）は、欧州 JRC 分類を再検討して、遺伝子操作で起きる変化による新たな分類を行い、潜在的懸念事項やリスクを考える上で有用であることが示唆された。欧州では、遺伝子組換え食品の承認に係る規則（regulation）が幾つか改定された。遺伝子組換え作物を用いた 90 日間反復投与毒性試験では、作物の実質的同等性で確認した以上の付加的な毒性・アレルゲン情報は得られなかったが、小腸などのトランスクリプトーム解析を行うことで従来の毒性実験で得られない情報が得られる可能性が示された。EFSA は、遺伝子組換え作物のアレルゲン性評価についてより具体的に検討行うようになった。Non-IgE 反応であるセリアック病のための配列類似性検索や新規発現タンパクの胃消化性試験の条件を実際の生理学的条件に合わせたより幅広い条件での検討、および内在性アレルゲンの変化の解析が求められる。国内においてもゲノム編集技術の取扱いを考える時に考慮する必要がある。NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などの調査の結果、食用については動物の報告が 28 報、植物については 33 報あった。用いた技術では圧倒的に CRISPR/Cas9 が多かった。開発国を見ると、食用の動物については中国が圧倒的に多く 21 報あった。植物については中国からの 17 報、米国からの 8 報が多かった。ゲノム編集技術を用いた農作物開発が活発で報告も多いが、ゲノム編集を用いることで生じるフレームシフト（読み枠のズレ）によって新規に生産されるペプチド・タンパクについて検討している報告は皆無であり、この点に開発者は注意を払っていない。食用の新しい生物を開発するときにはこのような新規に生産されるペプチドの安全性も含めて評価することを我々は提案する。

A. 研究目的

今年度は、研究に関することも併せて情報調査を中心に行った。

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

安全性が確認されていない、いわゆる未承認遺伝子組換え作物に対する検査は、日本の他に EU 諸国やアジアの国々で、同定された特定の品目に対して行われている。また、今後ゲノム編集技術を用いた農作物の開発、商業化が始まると意図しない環境中、食品中への拡散が懸念される。このような状況で、諸外国、特に EU の検知法に関する取り組みを調査した。

(2) ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

新育種技術（NBT）として欧州 JRC が 2012 年に行った分類をもとに、その区分で行ったときと、現象という区分で分類した時の問題点などを検討した。

(3) 欧州 EFSA における遺伝子組換え生物のリスク評価に関するプロジェクトの調査

欧州 EFSA では GRACE プロジェクトにおいて、アレルゲン性評価法についての新たなガイドラインの報告、90 日間動物実験および 1 年間動物実験の有用性、動物実験後に採取した小腸組織のトラン

スクリプトーム解析の有用性に関する科学的意見書が報告されたのでレビューした。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

本研究は以下の4点を目的とする。

1. NBT を利用して最近開発された動物、植物を把握する。
2. NBT を利用して作成された動物や植物の規制に関する世界の国々の状況を調べる。
3. NBT を利用して最近開発された食用の動物、植物の問題点を考える。
4. 将来の新しい食品の開発に影響を及ぼす可能性のあるゲノム編集の基礎研究について情報収集を行なう。

B. 研究方法

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

オランダを中心にした未承認遺伝子組換え作物検知法のプロジェクトである、Decathlon プロジェクトについて、文献情報および HP (<http://www.decathlon-project.eu>) をもとに調査を行った。

(2) ゲノム編集生物の取扱いに関するアプローチ検討

EU は、2012 年にゲノム編集技術を含む新育種技術 (NBT) について7種に分類した。しかし、それから5年以上が経過して、ゲノム編集技術は進歩してゲノム上のあらゆる変化を誘導できるツールに成長した。そのため、新しい技術について規制上の取扱いを考える上で分類の再検討がされてもよいと考えられる。そこで、諸外国では分類の見直しはされていないが、原理に則って分類した場合について検討した。

(3) 諸外国での安全性評価に関する調査

欧州 EFSA における遺伝子組換え生物のリスク評価に関するプロジェクトの調査

文献情報および HP (<http://www.grace-fp7.eu>) をもとに行った。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

1) 2016 年に報告された、NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などを調査した。3つのデータベース (SciFinder、Pubmed、Google

Scholar) を検索して、種名、用いた技術、ターゲット遺伝子、論文や特許のタイトルと誌名、要旨などの情報を一覧表にまとめた。該当する論文や特許は食用、研究用、医薬品の生産用、工業用などに分類した。植物の研究ではタバコとアラビドプシスはモデル植物として他の植物に先駆けて新しい研究が行なわれてきたので、特にこれらの植物における報告は研究用を含めた。

2) NBT を利用して作成された動物や植物の規制に関する世界の国々の状況を論文を読んで調査した。

3) ゲノム編集を利用して作成された食用の動物、植物においてフレームシフトによって新たに生産される可能性のあるペプチドの研究状況を調べた。特許は省略して、論文を調査の対象とした。論文に記載されているターゲット遺伝子における塩基の挿入または欠失とデータベース、DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html) の配列を基にして新規なペプチドの配列を推定した。このペプチドが食物アレルギーと相関性があるかを Allergen Online Org (www.allergenonline.org) を利用して 8 amino acid exact match と sliding 80 mer 35% homology search を基準にして調べた。また、この新規ペプチドが電気泳動やオミックスの手法によって研究されているかを調べた。

4) 2017 年に発表されたゲノム編集の基礎研究の論文を読んで、研究の発展状況を調査した。

C. 研究結果および考察

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

安全性承認済遺伝子組換え作物の場合は、ゲノム中の挿入部分 (ジャンクション領域) を含む導入遺伝子配列が既知であるために、唯一の系統を特定できるいわゆる「系統特異的」検知法を作製可能である。本法をもとに、トレーサビリティや意図しない混入割合の定量コントロールが可能となる (図1)。一方、安全性未承認遺伝子組換えではほとんどの場合配列情報はなく、唯一共通で汎用されるプロモーター (p35S) やターミネーター (tNOS) の情報のみが入手可能である (図1)。従来は、その限られた情報から周辺配列を PCR 法を繰り返して解析していた。本研究班でも、1,2 年目において既知配列情報をもとに周辺配列情報を得るために LAM-PCR 法の検討を行い、その有用性を示してきた。ハイスループットのためには次世代シー

クエンサー (NGS) の活用が必要とされていたが、EUにおいて類似の方法でNGSを活用する手法が報告されたのでこれをまず精査した。すなわち、論文ではLAM-PCR法の代わりにDNA walking法を用いて僅かな既知配列からその両側未知配列を増幅したのち(図2)、それぞれにタグ標識を結合した試料を調製する。同様に調整した多検体を同時にNGS解析し、データ解析時にタグ情報をもとにそれぞれの試料ごとに結果を分離するものである(図3)。本手法は、未承認遺伝子作物に対する検知法を作製する上で極めて強力な方法と考えられた。今後は、最初に如何に既知情報を取得できるかが重要であると考えられた。

(2)ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

EUのJRCが2012年に示した分類では、その分け方があるものは技術(ゲノム編集)で、あるものは現象であり(RdDM、RNA依存性DNAメチル化)で統一されていない(表1)。さらに、CRISPR/Casの利用範囲の拡大も相まって、接ぎ木のなかにRdDMがあり、ODMの中にゲノム編集があり、ゲノム編集の中にODMやRdDMが存在するという矛盾が生じている(図4)。JRCの分類の問題点などを整理したものを表1に示す。そこで、「起きる現象」で分類するとどうなるのか整理を行った(表1、2)。

まず、DNA2本鎖を切断するかどうかで区別する。DNA2本鎖切断される場合は、標的配列と類似したゲノム上の配列(類似配列)でのオフターゲット切断のほかに、標的配列と全く類似性のない配列でのオフターゲット切断を考慮しなくてはならない。前者は、事前に各種データベースを参考に予測可能であるが後者は事前に予測できないため、それを解析する手段が必要である。一方、DNAメチル化や非活性化Cas9を用いた塩基置換などDNA2本鎖切断しない場合は、類似配列での置換、メチル化の可能性をデータベースから予測して解析することで対応が可能と考えられる。

つまり、

DNA切断起きる場合=全ゲノム領域の解析

DNA切断起きない時=類似配列の解析

が必要である。

ODMは、この区分けでは表2の項目1に該当する。用いるオリゴヌクレオチドがDNA2本鎖の場合は、両末端が保護されていなければゲノムへの

挿入が懸念される。2本鎖や1本鎖で両末端保護されている場合は、ゲノムへの挿入の可能性は非常に低いため、ゲノム上での類似配列箇所でのオフターゲット置換を考慮する必要があると考えられる。

接ぎ木では、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)を用いた開花促進遺伝子(FT)の一過的導入による果樹品種改良期間の短縮や特定遺伝子の抑制などある。想定される懸念事項は、植物ウイルスの残存や開花促進でできた果実の特性・安定性および果樹における幼若期間の長さの生理学的意味などの基礎的理解も安全性を考える上で必要である。接ぎ木では、低分子RNAを台木から穂木または穂木から台木に移行させて、移行先で形質誘導(例えば、顆粒デンプン合成酵素遺伝子抑制によるもち性向上)が行われる。懸念事項は、移行先の台木又は穂木、最終果実への低分子RNANの残存性があるが、接ぎ木を切り離した後は移行しないため低分子RNAは速やかに分解され残存しないことが報告されている例もある(厚労科研費「次世代バイオ研究班27年度報告書」参照)。

(3)諸外国での安全性評価に関する調査

欧州食品安全局EFSAの遺伝子組換え生物の安全性に関する科学的意見書、規則および毒性に関する研究報告に関する最近の情報を整理した。The GRACE (GMO Risk Assessment and Communication of Evidence; www.grace-fp7.eu, Arch Toxicol (2016) 90:2531-2562, Arch Toxicol (2014) 88:2289-2314) projectでは、モンサント社の害虫抵抗性遺伝子組換えトウモロコシMON810(承認済)を用いて、90日反復投与試験および1年間反復投与試験を行い、既にトウモロコシMON810と組換え前のトウモロコシとの間について同等性が確認された製品を用いた動物実験で毒性に関わる付加的情報が得られるか検討した。その結果、動物実験では、比較解析から得られた製品の同等性に追加される毒性情報は得られないことが報告された。除草剤耐性や害虫抵抗性などの遺伝子組換え体では、組換え前後の同等性確認が得られたものについて、動物実験を行う重要性があるかどうかの判断が難しい。また、製品の組換え前後の比較による同等性の確認については、その方法、これまで通りに既知有害成分、栄養成分等を確認することで十分なのか、オミックス解析必要であるかどうかは、さらに議論が必要

と考えられる。

遺伝子組換え体のアレルゲン性評価について EFSA の科学的意見書 (EFSA J, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4862) を検討した。内容は3点から構成される— (1) non-IgE 型の免疫反応、 (2) タンパク消化性、 (3) 内在性アレルゲンの変化、である。Non-IgE 型の好ましくない免疫反応は、小麦グルテンなどが原因となるセリアック病に対するもので、新規に発現するタンパクについて原因となる E/Q-X1-P-X2 モチーフの存在や類似性を確認して、一致又は類似性が認められた場合は HLA 結合実験を行っていくものである。タンパク消化性は、現在胃酸モデルとして pH1 前後の強酸性条件で胃消化性試験を行っているが、空腹時ではそうであるものの、満腹時や胃に食物が入っている場合は、胃酸 pH は 4 程度まで上昇することが知られている。これまでの、胃および腸での消化性試験の例を見てみると腸での消化性はよくなるものも多くあることから、胃の酸性度が下がった場合、難分解性となり腸でも分解されない可能性もある。そのため、胃酸中の消化酵素であるトリプシンおよび酸性度 pH の条件を振ってタンパク消化性試験を行うことが望ましいとしている。内在性タンパクについては、組換えられた作物がアレルゲン性を持つものと考えられる場合は、組換え前との比較からアレルゲン性の変化について試験することが求められる。また、内在性アレルゲンについて、ダイズではアレルゲンとして記載されているものに加えて、多くの潜在的アレルゲン候補があるためそれらも考慮する必要がある。OECD consensus report on compositional consideration (soybean) に記載されているアレルゲンだけではなく、最新の科学的文献を調査して考慮することが重要であるとしている。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

1) 2016 年に報告された、NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などの調査の結果を表 3, 4 にまとめた。食用については、動物の報告が 28 報、植物については 33 報あった。用いた技術では圧倒的に CRISPR/Cas9 が多かった。開発国を見ると、食用の動物については中国が圧倒的に多く 21 報あった。植物については中国からの 17 報、米国からの 8 報が多かった。

2) NBT を利用して作成された動物や植物の食品としての利用についての規制に関する世界の国々

の状況を述べる。米国は容認する方向であると思われるが、EU はまだ結論が出ない。また、世界全体ではそれらを規制する国、地域と規制から外す国、地域に分かれると予想される。

3) フレームシフトを起こしたペプチドを生産する動植物の調査の結果を表 5 にまとめた。問題点を以下に記す。i) 植物の文献 ID, 6 (コメ、ターゲット遺伝子 OsMT7) においては新規ペプチドの 1 つがウシコラーゲン α -2(I) 鎖前駆体と相同性があることが明らかになった。しかし、論文中ではそれに対する言及はなかった。ii) ターゲット遺伝子がコードする元のタンパク質の N 末端が食物アレルゲンと相同性がある、新規ペプチドも同じくその食物アレルゲンと相同性があるケースがあった。新規ペプチドが元のタンパク質よりもアップレギュレートされると食物アレルギーを起こす可能性がある。iii) 動物、文献 ID, 14 におけるウシの PRNP 遺伝子に EGFP 遺伝子を挿入したケースについて。ウシ PRNP は食物アレルゲンであるコムギグルテニンやウシコラーゲン α -2(I) 鎖前駆体と相同性がある。本研究で作成されたウシにおいては PRNP と EGFP が融合タンパク質として生産される可能性がある。この融合タンパク質も上記の食物アレルゲンと相同性を有する。したがって、この融合タンパク質が元の PRNP タンパク質よりもアップレギュレートされると、食物アレルギーを起こす可能性がある。iv) 論文に記載されているターゲット遺伝子の配列がデータベースの配列と一致しないことがあった。このケースはターゲット遺伝子についての情報が十分にそろっていないことを意味する。このような場合には、ターゲット遺伝子についての情報をさらに充実させる必要がある。以上をまとめると、フレームシフトの結果得られる新規ペプチドについては論文中で言及がなかった。これらの新規ペプチドが電気泳動やオミックスの手法によって実験的に調べられている例は皆無だった。

4) ゲノム編集の基礎研究の進展について述べる。i) SpCas9 と gRNA 複合体が DNA に結合して切断する様子が高速原子間顕微鏡を用いてリアルタイムで観測された 2)。ii) 今までの報告よりも小型の Cas9 である CjCas9 が報告された (遺伝子 2952bp、984 アミノ酸残基) 3)。この CjCas9 について X 線結晶回折による構造決定が行われた。以前から報告があった Cas9 オルソログとの構造の比較から、Cas9 ファミリーの構造の詳細な情報が得られ

た4)。iii) RNAを切断するCRISPR/Casシステムが以前から知られていたが、Cas13が哺乳類と植物の細胞内でRNAを切断することが報告された5)。以上に述べたように2017年にはゲノム編集に関する基礎研究が急速に進展した。

D. 結論

(1) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

欧州では、配列情報が未知な未承認遺伝子組換え作物の検査で、次世代シーケンサーNGSを活用した手法を開発している。日本国内では、現在、相手国で商業化されているが日本ではされていない作物を中心に未承認遺伝子組換え食品検査を行っている。今後、ゲノム編集などが普及するに連れて、その拡散防止の観点から農作物を特定するための手法の一つにNGSを用いた検査体制を整備していく必要があると考えられた。

2) ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

ゲノム編集を含む新育種法(NBT)について、最初に分類を行った欧州JRC分類を見直し、変化の種類で分類して、潜在的リスクやそのためのアプローチの検討を行った結果、分類を再検討して整理することが、規制を考える上で必要と考えられた。

(3) 諸外国での安全性評価に関する調査

欧州プロジェクトでは、遺伝子組換え作物の実質的同等性に加えて、動物実験で付加的な毒性関連情報が得られるか90日あるいは1年間投与試験で検討した結果、付加的な情報は与えないが、組織トランスクリプトーム解析などで追加の情報が得られる可能性を示した。ゲノム編集農作物などでは、その製品の実質的同等性を判断するための情報が不足する。そのため、毒性実験が最終的な判断材料として重要になる可能性がある。オミックス解析などの可能性を検討しておく必要があると考えられた。

(4) ゲノム編集生物の開発状況調査

NBTを利用して作成された動物、植物の開発の論文や特許などの調査を我々は数年前から継続しているが、2016年に発表された物はそれ以前の物と比較して特別大きな変化はなかったように感じ

る。一方で、ゲノム編集の基礎研究は急速に進展している。近い将来にこの基礎研究の進展が新しい動植物の作成に影響を及ぼす可能性がある。したがって、今後も同様な調査を継続する必要がある。また、ゲノム編集によって誘発されるフレームシフトによって新規に生産されるペプチドについて開発者は注意を払っていなかった。食用の新しい生物を開発するときにはこのような新規に生産されるペプチドの安全性も含めて評価することを我々は提案する。また、ゲノム編集を利用して作られた動植物を食品として認めるかについては諸国で足並みがそろわず、世界的に統一した規制はできないと予想される。

D. 業績

論文発表

1. Takabatake R, Kagiya Y, Minegishi Y, Yeasmin S, Futo S, Noguchi A, Kondo K, Mano J, Kitta K. Development and evaluation of rapid screening detection methods for genetically modified crops using loop-mediated isothermal amplification. *Food Chem*, 252, 390 (2018).
2. Nakanishi, K., Fujii, U., Ohtsuki, T., Kimata, S., Soga, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Ikeda, M., Nakamura, K., Kondo, K. Effect of sodium carboxymethyl cellulose in processed rice foods on detection of genetically modified rice-derived DNA. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 2018 (Submitted)
3. Nakamura, K., Ishigaki, T., Kobayashi, T., Fujii, U., Soga, K., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kawakami, H., Nishimaki-Mogami, T., Kondo, K. Identification of chickpea (*Cicer arietinum*) in foods using a novel real-time polymerase chain reaction detection method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018 (Submitted)
4. Kondo, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Sakata, K., Obitsu, S., Noguchi, A., Fukuda, N., Nagasawa, E., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. *Molecular*

- phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Scientific Reports*, 7, 14942, 2017
5. Sugano, Y., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Nozomi, F., Suzuki, T., Kondo, K. Rapid identification method of *Omphalotus japonicas* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 58, 113-123, 2017
 6. 邦文 (PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法: 菅野洋平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成)
 7. Miyahara, T., Miyake, N., Sawahuji, K., Kitta, K., Nakamura, K., Kondo, K., Ozeki, Y. Wheat DNA fragmentation of commercial processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 23, 141-148, 2016.
 8. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Sato-Fukuda, N., Ishigaki, T., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. Development and interlaboratory validation of a simple screening method for genetically modified maize using $\Delta\Delta Cq$ -based multiplex real-time PCR. *Analytical Chemistry*, 88, 4285-4293, 2016.
 9. 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 validation data on real-time polymerase chain reaction detection for unauthorized genetically modified papaya line PRSV-YK. *Data in Brief*, 7, 1165-1170, 2016.
 10. 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
2. 学会発表
 - 1) 中村公亮、石垣拓実、榎藤崇裕、菅野洋平、田中秀典、橋口正嗣、明石良、近藤一成: ダイズ品種間における発芽遺伝子の発現プロファイルの違い-第1報-、第113回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017年11月
 - 2) 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、佐藤恵美、瀧屋俊幸、田中智樹、布藤聡、曾我慶介、中村公亮、近藤一成、高畠令王奈、橘田和美: デジタル PCR による組換えトウモロコシ定量スクリーニング法のコーンスターチへの適用、第113回 日本食品衛生学会学術講演会、東京、2017年11月
 - 3) 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、鈴木智宏、近藤一成: LAMP 法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築-国内産クサウラベニタケ判別法の開発について-、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
 - 4) 近藤一成、加藤怜子、中村公亮、坂田こずえ: Apoptosis inducing factor (AIF) 核内作用解明のためのミトコンドリア局在性 AIF 変異体細胞の構築、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
 - 5) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、近藤一成: LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築、第54回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017年11月
 - 6) 藤井宇希、中西希代子、中村公亮、大槻 崇、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、亀山浩、池田恵、近藤一成: コメ加工食品中のカルボキシメチルセルロースナトリウムが DNA 抽出精製効率、並びに、遺伝子組換え食品検査へ与える影響について、第54回全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017年11月
 - 7) 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、栗本洋一、布藤聡、中村公亮、近藤一成、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トウモロコシ定量分析法の開発とその性能評価、AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第20回記念年次大会、東京、2017年7月
 - 8) 中村公亮、石垣拓実、坂田こずえ、加藤怜子、高崎一人、布藤聡、近藤一成: 食品中のゲ

ノム DNA の 1 塩基変異を検知する方法の開発と性能比較、日本食品化学学会 第 23 回総会・学術大会、2017 年 6 月

9) 石垣拓実、中村公亮、近藤一成：遺伝子組換えサケ (AquAdvantage salmon) を対象とした系統特異的検知法の開発、日本食品化学学会 第 23 回総会・学術大会、2017 年 6 月

10) 坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、石垣拓実、加藤怜子、近藤一成：ITS-RPB2 領域を用いたクサウラベニタケ系統分類と中毒事例検体の分析、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月

11) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上 (西巻) 知子、近藤一成：遺伝子組換えトウモロコシ粒検査法の簡易化、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月

12) 中村公亮、石垣拓実、野口秋雄、坂田こずえ、加藤怜子、高畠令王奈、岸根、真野潤一、橘田和美、最上 (西巻) 知子、近藤一成：アクリルアミド産生低減並びに打撲黒斑低減を目的に開発された遺伝子組換えジャガイモ (J3, F10, E12 系統) の検知法開発 (第 1 報)、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、青森、2016 年 11 月

13) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、石垣拓実、加藤怜子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、最上 (西巻) 知子、近藤一成：遺伝子組換えトウモロコシの簡易粒検査法の開発 (続報)、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016 年 10 月

14) 菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成：Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016 年 10 月

15) 高畠令王奈、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、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016 年 7 月

16) 真野潤一、西辻泰之、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、佐藤恵美 3、新畑智也、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、高

畠令王奈、橘田和美：リアルタイム PCR を用いた DNA 断片化測定法の開発と性能評価、AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2016 年 7 月

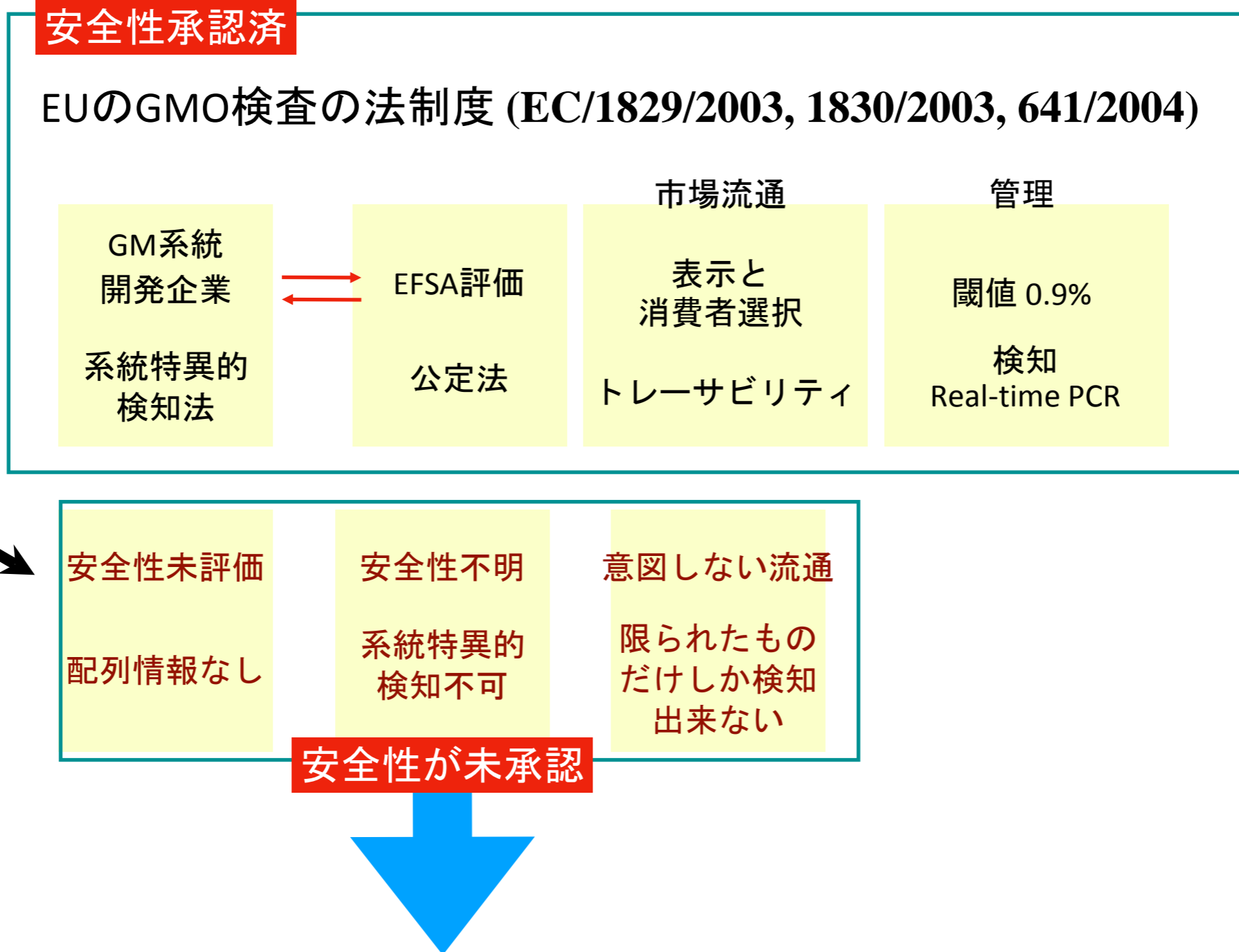
17) 中村公亮、近藤一成、穂山浩、石垣拓実、野口秋雄、勝又啓史、高崎一人、布藤聡、坂田こずえ、福田のぞみ、真野潤一、橘田和美、田中秀典、明石良、最上 (西巻) 知子：安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ検知に向けた全ゲノムシーケンシング技術応用の検討について、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月

18) 石垣拓実、中村公亮、布施谷実聡、川上浩、近藤一成：ドライフルーツ食品を例とした、標的遺伝子コピー数の差に伴う内在性遺伝子の検出感度の違いについて、日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会、高知、2016 年 6 月

19) 真野潤一、野間聡、菊池洋介、福留真一、川上裕之、栗本洋一、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、最上 (西巻) 知子、高畠令王奈、橘田和美：デジタル PCR を用いた遺伝子組換えトウモロコシ簡易定量スクリーニング法の開発、第 111 回日本食品衛生学会学術講演会、東京、2016 年 5 月

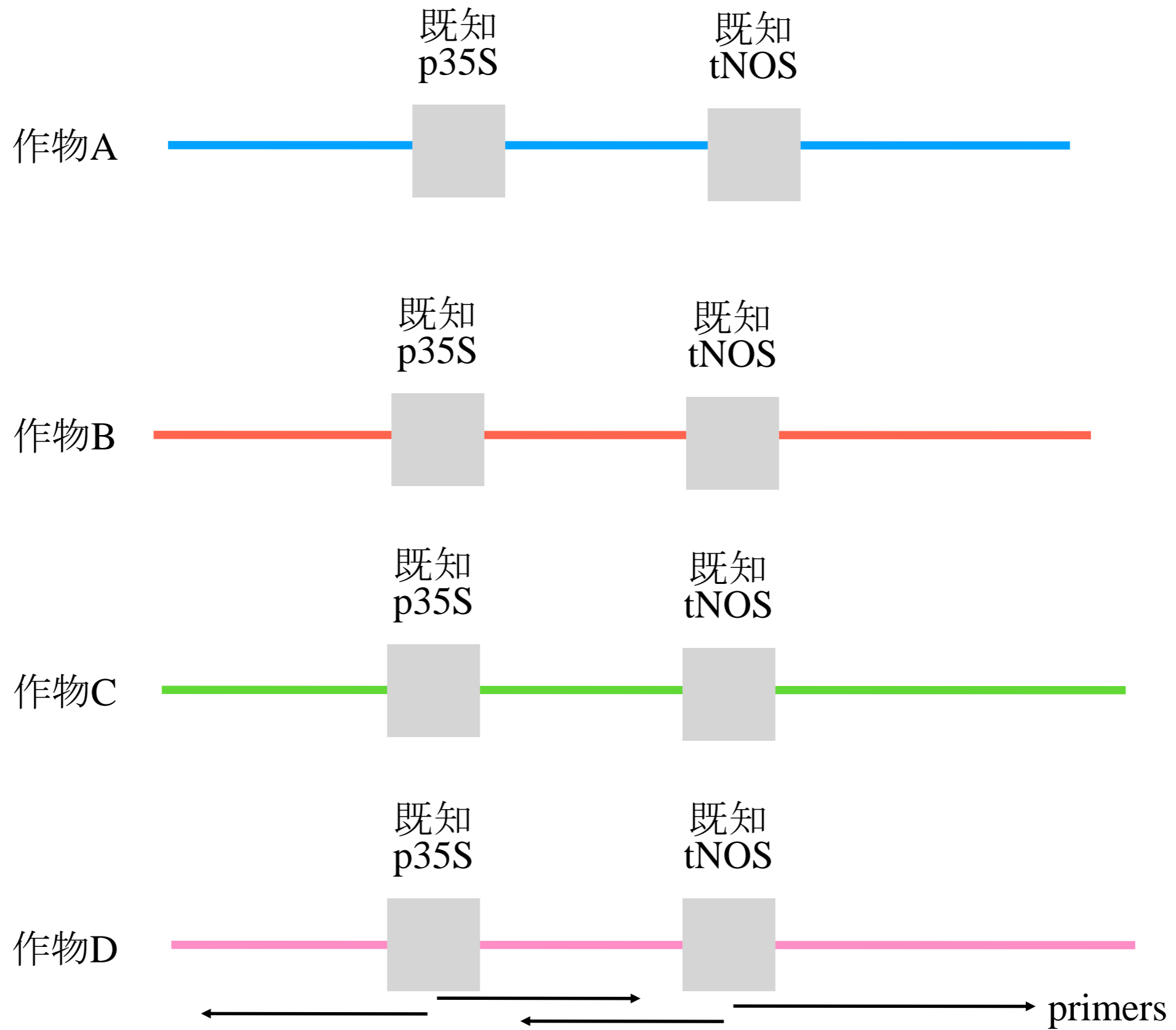
20) 三宅奈穂、宮原平、沢藤ことは、中村公亮、近藤一成、小関良宏：小麦加工食品におけるゲノム DNA 断片化の評価、日本食品化学学会 第 22 回 総会・学術大会、高知、2016 年 6 月

図 1



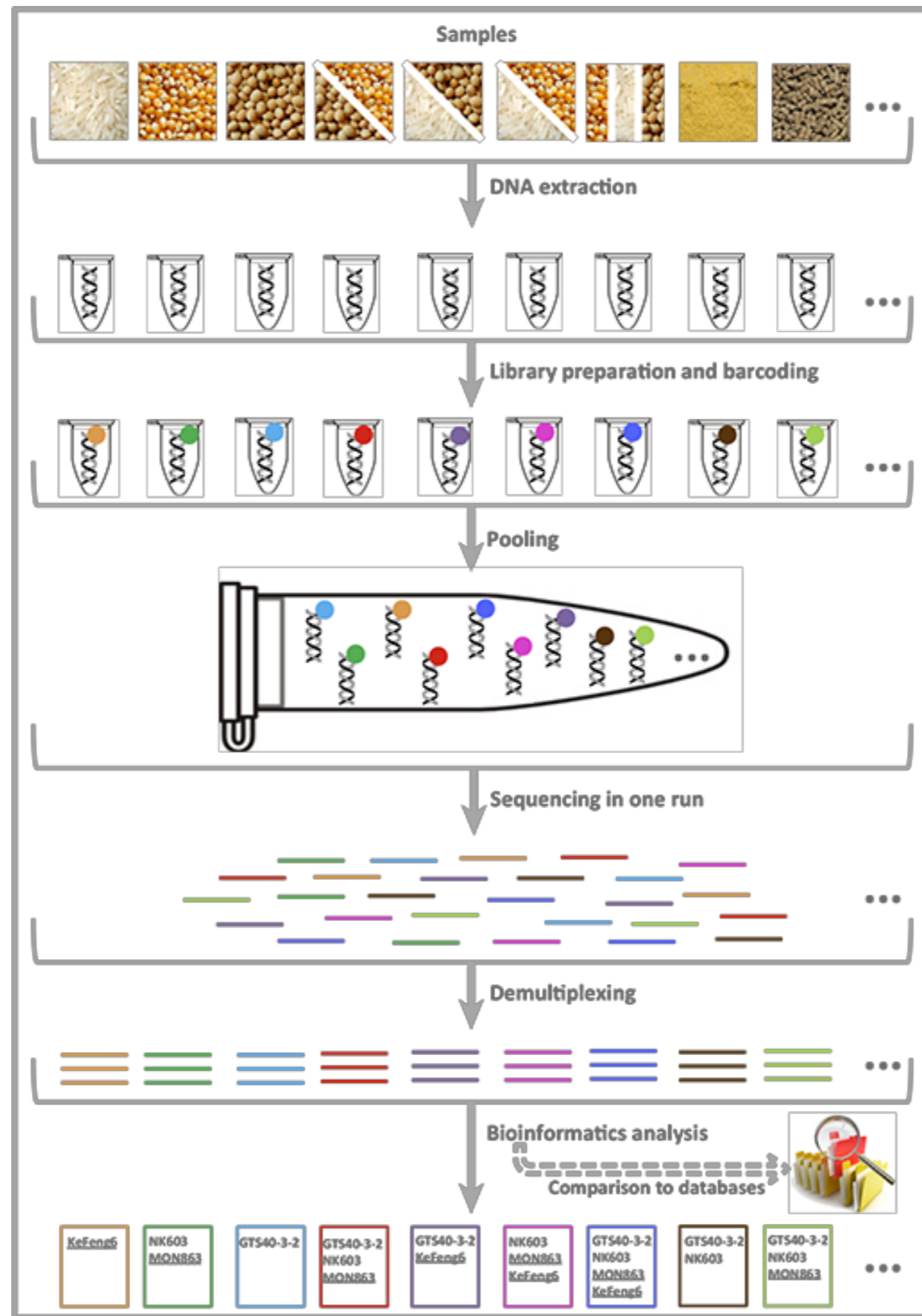
安全性承認済のような制度が確立できないため
未承認遺伝子組換え食品検知には新たな手法・アプローチが必要

図 2



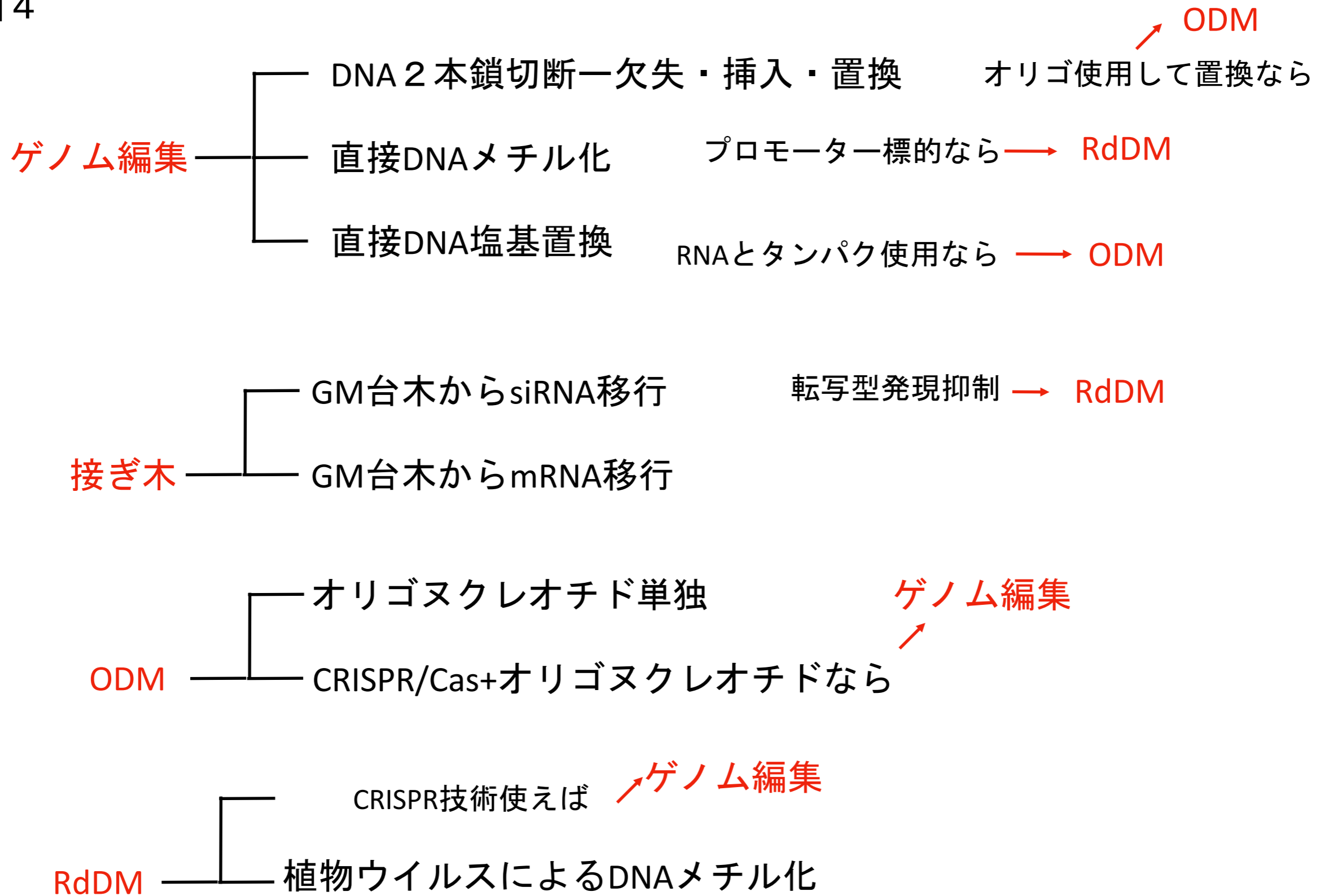
既知配列からDNA watingで増幅後
複数サンプルまとめて次世代シーケンサーで解析

图 3



Trends in Biotech (2017)

図 4



2012年JRCの分類でNBTを整理すると一つの技術の中に他の技術があることになる

表 1

表1

EUの 2012年分類	(日本名)	(区分)	(英名)	(技術概要)	(この分類で整理することの問題点)
1	シス・トランスジェネシス	現象	Cisgenesis/Intragenesis	シスジェネシスは、交配可能な品種間で、かつ、その組合せを変更しない遺伝子導入。 トランスジェネシスは、組合せを変更した内在性遺伝子または異種遺伝子の導入	シスジェネシスでも、導入方法がアグロバクテリウムであれば、既存の内在性遺伝子をそのまま改変なく導入したものと同等で、既存の遺伝子組換え食品として扱うことができる。組合せを変えたイントラジェネシスは、現在のSimplotジャガイモと同じで、現行の考えで対応でき、新たな分類として必ずしも必要でない。シスジェネシスの要件が明確でない。
2	オリゴヌクレオチド指向変異導入	手法	Oligo-directed mutagenesis (ODM)	一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチドを導入して1塩基または数塩基置換。 DNA、DNA/RNAハイブリッド、RNAを用いる。 Cibusでは40塩基で両端保護された一本鎖DNAであるためゲノムへの挿入はない。 効率は非常に低いため、自然変異との区別もできない。	ODMは単独使用での効率が非常に低い (<0.02%) ため、今後も普及は難しくCibus以外では出てこない。 CRISPR/Casとの併用で効率が大きく改善されるため、DNA二本鎖切断をするゲノム編集との併用が主流になり、ゲノム編集に含めるべき。一定の長さのDNA二本鎖であれば単純に相同組換えになる。
3	RNA依存性DNAメチル化	現象	RNA-dependent DNA methylation (RdDM)	低分子RNAによるプロモーター領域メチル化は植物で見られる現象。 接ぎ木でこれが利用されている。台木(穂木)への低分子RNA産生遺伝子の導入で、これ自身は遺伝子組換え体。そこから移動する接ぎ木先の穂木(台木)でのプロモーター領域DNAメチル化による遺伝子発現抑制。移動先での低分子RNAは最終的に分解されて残らない。	RdDMは、1例では接ぎ木を介して用いられる。(台木(穂木))への低分子RNA産生遺伝子の導入で、これ自身は遺伝子組換え体。そこから移動する接ぎ木先の穂木(台木)でのプロモーター領域DNAメチル化による遺伝子発現抑制させる。低分子RNAを産生するDNAがゲノムに残っていない場合は、ゲノム編集でのCas9産生コンストラクトをその後の組換えや交配で削除したものと同等 (null segregant) に考えられて現行の考え方で対応可能。接ぎ木との分類をどうする。ウイルスを用いた一過的遺伝子発現の場合も同様で、ウイルス(植物ウイルス)とその由来配列の残存の有無を考慮。ゲノム編集CRISPR/Casでも可能である。
4	ゲノム編集	手法	Genome editing	ZFN,TALEN, CRISPR/Cas9を用いてDNAメチル化、塩基置換、二本鎖切断誘導する。 DNAメチル化、塩基置換では、二本鎖切断しない。DNAだけでなくRNAも標的にできる。 CRISPR/Cas9では、Cas9はタンパク、ガイドRNAは合成RNAを使用すれば、組換えDNA実験に該当しないと解釈もできる。	ゲノム編集は、現在では、欠失、挿入、置換、DNAメチル化、転写制御と広範囲な遺伝子発現制御が可能な技術になった。また、DNA二本鎖切断するものとしがないものがあり、リスクの考え方(特にオフターゲット)が異なるため同一に扱えない。
5	接ぎ木	手法 現象	(Trans) Grafting	遺伝子組換え (GM)台木または穂木を用いて、低分子RNAなどが移行することで接ぎ木した穂木や台木の新たな形質を付与。接ぎ木は従来からある一つの育種技術で新技術ではない。移行先(台木や穂木)でタンパク発現させる場合は、mRNAの移行が必要。一部のmRNAと多くのsiRNAは師管を介して双方向に移動できる。	遺伝子抑制では低分子RNAの移行が行われる。遺伝子プロモーター領域を標的にDNAメチル化を行う低分子RNAを師管経由で移行させることで、移行先で転写型遺伝子抑制。接ぎ木中は移行して残存、切り離すと低分子RNAは分解されて残らないnull segregant。 最終産物で見れば、ゲノムに遺伝子が残らないもので、他のゲノム編集で外来遺伝子のないものと同列。 植物ウイルスを用いて遺伝子発現制御することもある(FT遺伝子導入による早期開花促進)が良く研究されているが、ウイルスベクター使用の一過的遺伝子発現で既存の考えで対応可能であるが、この分類に入れるべきか明確でない。

表 2

表1

起きる変化 で整理	(区分)	(該当する技術)	(潜在的リスク)	(その他)
外来遺伝子なし	DNA塩基置換する方法 (DNA切断なし)	1塩基または数塩基置換技術的には、相同組換え、オリゴヌクレオチド指向変異導入法(ODM)、置換誘導型ゲCRISPR/Casを用いる方法がある	リスクは技術で異なる可能性 オリゴヌクレオチド指向形変異導入 (ODM) はDNA切断しないため、懸念事項は用いるオリゴヌクレオチドの種類と末端保護の有無に依存。ゲノム編集を併用するとDNA切断する(項目2で整理)。ODMで用いるオリゴがDNA 2本鎖の場合、ゲノムへの挿入。DNA切断せずに直接塩基置換するCRISPR/Cas法がある。標的配列との類似配列での置換の可能性。	オリゴヌクレオチドでは、DNAかRNAなのか、1本鎖か2本鎖なのか、末端が保護されているかを考慮。CRISPR/Cas法による置換では、unbiasオフターゲットは起こりにくいため、標的配列との類似配列での置換を調査する必要。1塩基置換で新たな形質が獲得できるため、得た形質の影響を考慮。ただし、今の遺伝子組換え食品の審査でunbiasオフターゲットまで求めていない状況がある。
外来遺伝子なし	DNAメチル化する方法 (DNA切断なし)	メチル化誘導型CRISPR/Cas、プロモーター配列標的低分子RNA (RdDM)	DNA切断せずにDNAメチル化するCRISPR/Cas法があり、標的配列との類似配列箇所でのDNAメチル化の可能性。植物ウイルスを用いたRNAによるDNAメチル化、接ぎ木で台木または穂木でのsiRNA導入を用いたDNAメチル化誘導があり、用いられる低分子RNAのヒトゲノム上への影響を考慮。	ウイルスを用いる場合は、その残存や配列断片の残存の確認。unbiasオフターゲットは起こりにくいため、標的配列との類似配列での置換を考慮。低分子RNA (siRNAなど) のヒトへのオフターゲット影響があるが、作用機構が異なるなどヒト影響は低い想定外の遺伝子発現変化がないか。
外来遺伝子なし	DNA 2本鎖切断する方法	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, MegaNuclease (I-SceIなど) PiggyBac, SleepingBeauty	DNA 2本鎖切断修復で起こるのは、欠失、挿入、置換の3種類がある。DNA切断する場合は、オフターゲット切断を考慮する必要がある。中でも、本来の標的配列と類似性のない領域でのオフターゲット切断を考慮する。DNA 2本鎖を誘導して置換を行う場合は、分類「1」と違い、同時に用いるオリゴヌクレオチドのゲノムへの挿入の可能性。欠失では、その後の読み枠、翻訳開始位置のズレによる新たなタンパク質出現に注意。	標的配列との類似配列の検索だけでは十分でない。Unbiasなオフターゲット評価、読み枠のズレによる新たなタンパクの毒性・アレルゲン性評価を考慮。通常、遺伝子欠失のために欠失の後ろに終始コドンが来るものを想定するが、第一エクソン破壊の場合は、一つのmRNA上でのエクソンスキップ等で終止コドン以降で翻訳が開始されてタンパクが合成されることがある。この場合は、新たに産生されるタンパクがあればその毒性・アレルゲン性評価が必要。機能ドメイン破壊と第一エクソン破壊を区別して考える。
外来遺伝子あり	外来遺伝子を導入する方法	シス・トランスジェネシス、ゲノム編集いずれの場合も現行の枠組みで対応可能	技術ごとに再度整理する必要ない	既存の遺伝子組換えに従う
外来遺伝子あり	合成生物学	微生物を用いる微生物ゲノムの改変、最適化	酵母など微生物を用いて、生合成経路まるごと遺伝子セットの導入、酵素合成に関わる遺伝子の導入と改変など	使用した微生物の残存の有無、人工遺伝子を用いての遺伝子セット(一つ以上の生合成回路など)導入による微生物自身の生合成経路による影響、有害成分の増減、有無、生産物がタンパク質であれば毒性・アレルゲン性評価。比較対象はない場合もある。
外来遺伝子の一過的発現	植物ウイルスALSVなどを用いる方法、接ぎ木で一過的にmRNA移行で発現するが、最終的には残存しない。	遺伝子発現と遺伝子抑制	AVSVを用いたものでは、FT遺伝子の一過的発現での開花促進とMdTFL1-1の一過敵遺伝子抑制幼若期間の短縮がある。接ぎ木では、一過的タンパク発現。	ウイルスを用いた一過的遺伝子導入で分類可能。一過的タンパク発現で、残存しなければ他と同様null segregantと考える。

* この分類の仕方だと、現象で分けているが、これが最終産物に残る現象でもあるためProductベースの考え方へ展開可能

表 3

文献ID	生物種	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	誌名	タイトル	年	ページ	要旨	所属
1	動物	ブタ	ZFN	RELA	Sci. Rep.	Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing	2016	6, 21645.	農学のプロタイプの正確で効率的な置換を記す。RELA遺伝子は免疫を調節する。ZFNによって胚のRELA座を編集してアフリカ豚コレラへの回復力に関連するイボイノシシのRELAオルソログを持つブタが生きて生まれた。一世代で種間で対立遺伝子を移入する効率のよい能力は今までになかった農業と基礎研究の機会を作る。	[Lilico SG et al.] The Roslin Institute and R(D)SVS, Easter Bush Campus University of Edinburgh Edinburgh イギリス
2	動物	ブタ	ZFN	ミオスタチン	PLoS One	A 90-Day Feeding Study in Rats to Assess the Safety of Genetically Engineered Pork	2016	11(11), e0165843.	私たちは最近ZFNを利用してミオスタチンの機能を喪失させたGEブタを作成した。このGEブタは野生型のブタと同じく正常に成長するが、赤身肉の収量が多く、脂肪の塊が少ない肉を生産する。このGEブタ肉の潜在的な垂慢性の毒性を評価するために、ラットにおいて90日間の摂取の研究を行なった。ラットを無作為に5つのグループに分けて、90日間基礎的な食事とそれに野生型ブタとGEブタから調製した低容量と高容量のブタ肉を加えた食事を与えた。動物の行動と臨床的な徴候を観察して、体重と食事の消費を1週間単位で記録した。45, 90日目に血液検査を行なった。成長速度、食事の消費、血液検査の数値はGEブタ肉と野生型ブタ肉を食べさせたラットのグループの間で有意差がなかった。高容量のGEブタ肉と基礎的な食事を食べさせたグループの間では肝機能のパラメーターと白血球数で差があったが、GEブタ肉を食べさせたグループの結果はすべて正常の範囲内だった。45, 90日目にすべてのグループから単離した臓器に障害はなかった。GEブタ肉をラットに食べさせたときに長期間の悪い効果はなかった。	[Xiao GJ et al.] Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
3	動物	ブタ	?	aminopeptidase N	Faming Zhuanli Shenqing	Pig with site-directed modification of porcine aminopeptidase N (pAPN) gene	2016	CN 10554 3257 A 20160504.	本発明はブタのアミノペプチダーゼN (pAPN) 遺伝子の部位特異的な修飾を持ったブタに関連する。pAPN遺伝子のクローニングとシーケンシング分析、pAPN編集ベクターの構築と活性の分析、ドナーベクターの構築、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つST細胞系列の構築、伝染性胃腸炎コロナウイルスの病原性の研究、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つトランスジェニック繊維芽細胞の構築、再構築された胚の獲得、pAPN遺伝子の部位特異的な修飾の同定によってこのブタは構築される。本発明はブタのウイルス性の下痢とK88の感染を遺伝的な観点から絶滅させて、ブタの育種における伝染病を制御するための費用を削減して、環境汚染を低減し、抗生物質の乱用を減らして健康的な育種の方法を提供する。また、ヒトのガンや他の関連した病気の病原性の研究と関連する治療のスクリーニングと前臨床的なテストの基礎を提供する。	[Chen J et al.] Anhui Agricultural Univ. 中国
4	動物	ブタ	TALEN	ミオスタチン	Mol. Reprod. Dev.	Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets	2016	83(1), 61-70.	ゲノム編集技術と体細胞核移植 (SCNT) を使ってミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。Platinum TALENはブタの体細胞において遺伝子を修飾することにおいて効率が高かった。修飾した体細胞をSCNTに持ってミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。これらの子ブタは筋肉が2倍になる表現型を示し、体重は増えており、最長筋の塊は野生型の170%になっており、筋肉繊維の数は倍になった。ブタにおけるミオスタチンの喪失は筋肉の塊を増やし、将来ブタ肉の生産を増加させるかもしれない。	[Rao S et al.] Research and Development Center NH Foods Ltd. Tsukuba 日本
5	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao	Generation of porcine MSTN knockout cell line using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination	2016	32(10), 1161-1167.	ミオスタチン (MSTN) は大型の家畜で肉の性質を改善するための重要な遺伝子の候補である。2種類のベクターMSTN Cas9とドナーDNAはブタPK15細胞系列へエレクトロポレーションによって導入された。G418耐性の選抜と蛍光顕微鏡の観察によってNeo-EGFP陽性の細胞を単離した。MSTNのエクソン3において部位特異的で相同的な組換えを検出するために、crossover PCR、long-distance PCR、ウエスタンブロット、サザンブロット、DNAシーケンシングを使った。CRISPR/Cas9発現ベクターの効率的な標的部位はMSTN遺伝子のエクソン3に見出され、複数のスクリーニングによってMSTN遺伝子に変異を持つ細胞系列を得た。本研究はMSTNの機能の研究のための実験材料を提供する。	[Qi S et al.] Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Plateau Mountainous Region, Ministry of Education Guiyang 中国
6	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Rep.	Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP	2016	6, 31729.	CRISPR/Cas9とCre/LoxPによって選択マーカー遺伝子 (SMG) を含まない、機能的にミオスタチン (MSTN) をノックアウトしたクローンブタの作成を報告する。CRISPR/Cas9による相同組換えを利用してブタの初代細胞でMSTNの1つの対立遺伝子をノックアウトした。次に、Creリコンビナーゼを使って82.7%の効率でSMGを削除した。フローサイトメトリーによってSMGとEGFPを含まない細胞を単離して核移植のためのドナーの核として使った。685個の再構築された胚は3頭の代理母に移されて、1頭が2匹の雄の生きた子ブタを出産した。これらのクローンブタでは1つの対立遺伝子でMSTNがノックアウトされてSMGを欠失していることが確認された。筋肉においてMSTNの発現はおよそ50%減少し、筋原性の遺伝子の発現は増加していた。組織学的検査では筋原線維の量は増加していたが、その大きさは変化がないことが明らかになった。本研究は優れた家畜の生産のための信頼できる方法であり、潜在的な生物学的リスクを最小にする戦略である。	[Bi Y et al.] Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Hubei Institute of Animal Science and Veterinary Medicine Hubei Academy of AgroSciences Wuhan 中国

表3つづき

7	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	CD163	PCT Int. Appl.	Preparation method for anti-porcine reproductive and respiratory syndrome cloned pig	2016	WO 2016/10214 A1 20160714.	本発明は豚繁殖・呼吸障害症候群に抵抗性のあるクローンブタの作成方法を提供する。本方法は以下の段階から構成される。CRISPR/Cas9ターゲティングベクターとCD163遺伝子相同組換え修飾ベクターをブタの線維芽細胞へ入れて陽性のクローン細胞を得る。その細胞ではブタの内在性CD163遺伝子の第7エクソンがヒトのCD163-L1遺伝子の第10エクソンと置換されて、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの侵入を媒介できない。ドナー細胞と受容細胞としてこの陽性細胞と卵母細胞を使い、体細胞核移植の技術を利用してクローン化した胚を得る。その胚を子宮へ移してブタを妊娠させてクローンブタを得る。	[Li N et al.] China Agricultural University 中国
8	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	細胞表面のウイルスが侵入するときに利用するタンパク質	Sci. Am.	You Can Edit a Pig, but It Will Still Be a Pig	2016	314(3), 22.	ブタの感染症を防ぐためにCRISPRを利用する	[Brouillette M]
9	動物	ブタを含む哺乳類	CRISPR/Cas9	MC3R	Faming Zhuanli Shenqing	A method for producing MC3R gene knock-out pig by CRISPR/CAS9 system	2016	CN 10619113 A 20161207	本発明はCRISPR/Cas9システムによってMC3R遺伝子をノックアウトしたブタを作る方法を開示する。本方法は、MC3R遺伝子をノックアウトした動物の細胞を得るために、gRNA1および/またはgRNA2をコードする遺伝子を動物の細胞へ導入することを含む。動物の細胞は哺乳類の細胞であり、たとえばブタの細胞である。MC3R遺伝子をノックアウトする効率は29.16%である。本発明は標的MC3R遺伝子の大きな断片を迅速に効率良くノックアウトして、外来遺伝子を残さない。本発明はMC3Rの機能を解明するための研究と動物の育種に使える。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
10	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	MC4R	Faming Zhuanli Shenqing	Method for preparation of pigs with MC4R gene knocked out	2016	CN 106191064 A 20161207.	本発明はCRISPR/Cas9システムと体細胞核移植を使ってMC4R遺伝子を編集することでノックアウトしたブタを作ることに関する。本方法では、MC4R遺伝子の大きな断片を欠失させてその欠失を持ったブタを作るためにブタのMC4R遺伝子のコード領域内で2ヶ所の部位に対するsgRNAを設計することで特徴付けられる。本発明はブタMC4R遺伝子を研究するための実行可能な研究である。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
11	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Faming Zhuanli Shenqing	Swine myostatin gene editing site, and application thereof	2016	CN 106086031 A 20161109.	本発明はブタのミオスタチン遺伝子の編集部位とその応用を開示する。その編集部位はミオスタチン遺伝子のコード領域内、第1エクソン中に存在する。その部位はCas9によって特異的に認識されて、ターゲティングベクターと相同組換えを行い変異した遺伝子または選択マーカー遺伝子を受容細胞のゲノムの決まった部位に取り込まれるようにする。統計的な結果ではターゲティングの効率は80.5%である。この方法によって高い肉係数を持った新しい品種のブタが開発できて、ミオスタチンの研究のための材料を提供できる。	[Bi Y et al.] Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences 中国
12	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	Faming Zhuanli Shenqing	sgRNA set for specific identification of swine MSTN gene promoter and its encoding DNA set and application in gene editing of MEF3M factor binding site of MSTN gene promoter	2016	CN 105950625 A 20160921.	本発明はブタのゲノム中のミオスタチン (MSTN) 遺伝子のプロモーターのMEF3M因子結合部位を遺伝子編集するためのsgRNAの組み合わせとその応用を提供する。sgRNAは特異性が高く、MEF3M因子の結合部位をノックアウトするために使える。本発明によりブタの筋細胞の発達を促進して筋肉量を増やせる。	[Li K et al.] Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
13	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Adv.	Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs.	2016	2(9):e1600803.	医療に応用するためのGMブタは主に体細胞核移植を使って作られる。しかし、この方法は複雑な細かい技術が必要とし、ドナーの体細胞の核の不完全なエピジェネティックのリプログラミングのために出産前および出産後に死ぬリスクをしばしば大きくする。その結果、GMブタの生産は広く行なわれなかった。体外受精させた受精卵へエレクトロポレーションによってCas9とsgRNAを導入させることを含むブタにおけるCRISPR/Cas9による遺伝子編集のための簡単な方法を提供する。Cas9のエレクトロポレーションによる遺伝子編集は高い効率で標的遺伝子の破壊を起こし、ミオスタチンに変異のあるブタの作成によって確認した。この方法はGMブタの生産を促進する潜在的能力がある。	[Tanihara F et al.] Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Bioscience and Bioindustry, Tokushima Univ. Tokushima 日本
14	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	PRNP	Theriogenology	Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system	2016	86(8), 1886-1896.e1.	CRISPRをウシに適用した報告は少ない。本研究ではウシPRNP遺伝子をCRISPR/Cas9システムでノックアウトとノックインした。ウシ胎児の線維芽細胞と体外受精の胚を使った。PRNP遺伝子エクソン3を標的にするために5つのsgRNAを設計してCas9と一緒に細胞へ導入した。相同組換えの効率はEGFP遺伝子の両側に1kbpのPRNP遺伝子を連結させたレポーターベクターを使って評価した。体細胞についてはCas9とsgRNAをコードするプラスミドを2つの条件下でトランスフェクトした。体外受精の受精卵にはプラスミドまたはmRNAを使って顕微授精を行なった。体細胞と胚において標的部位に挿入、欠失と大きな欠失が起きた。胚では相同組換えも検出された。CRISPR/Cas9システムはウシのゲノムで部位特異的に編集ができて、重要な人獣共通伝染病に耐性な大きな動物の開発につながるだろう。	[Bevacqua RJ et al.] Animal Biotechnology Laboratory Buenos Aires アルゼンチン

表 3 つづき

15	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	Reprod. Fertil. Dev.	EFFICIENT GENERATION OF MYOSTATIN PROMOTER MUTATIONS IN BOVINE EMBRYOS USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM	2016	29(1), 212.	ミオスタチンを不活性化させると、肉を増やせるが、難産や生殖能力の低下などの悪影響もある。ミオスタチンの発現を低下させて、これらの悪影響を出さないために、ミオスタチンのプロモーターの異なる因子の欠失をCRISPR/Cas9システムを使って作った。ミオスタチンのプロモーター中の-1577、-689、-555、-116の位置を標的とする4つのsgRNAを設計した。ウシの胎児線維芽細胞で試した後に、ウシの受精卵でミオスタチンのプロモーターを修飾した。Cas9 mRNAとそのタンパク質を導入したときに94.12%と64.17%で編集が起きた。得られるプロモーターはヘテロになることが多かった。ウシの胚でCRISPR/Cas9システムを利用するにはさらなる改良が必要である。	[Pinzon CA et al.] Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station 米国
16	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	オボアルブミン、オボムコイド	Sci. Rep.	Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system	2016	6, 23980.	受精卵にアクセスすることが難しいために、ニワトリではCRISPR/Cas9システムは利用されていなかった。私たちはニワトリにおいてCRISPR/Cas9システムによる遺伝子ターゲティングを報告する。Cas9、sgRNA、薬剤耐性マーカーをコードする遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションすることによって、ニワトリの培養した始原生殖細胞 (PGCs) において2つの卵白の遺伝子であるオボアルブミンとオボムコイドを効率良く変異させた。CRISPRによってオボムコイド遺伝子に変異を持つPGCsをニワトリの胚へ移植して、3匹の生殖細胞系列のキメラな雄鶏 (GO) を確立した。すべての雄鶏はドナーに由来する変異型のオボムコイド遺伝子を持った精子を作った。2匹については高い効率でその変異型の遺伝子を次世代 (G1) に伝達してヘテロな遺伝子型のニワトリが得られた。G1変異型のニワトリを交配してオボムコイド遺伝子がホモな変異型の子孫 (G2) を作った。これらの結果からCRISPR/Cas9システムはニワトリで利用できることが証明された。	[Oishi I et al.] Biomedical Research Institute National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Osaka 日本
17	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	peroxisome proliferator-activated receptor- γ , ATP synthase epsilon subunit, オボアルブミン	G3 (Bethesda, Md.)	Efficient Genome Editing in Chicken DF-1 Cells Using the CRISPR/Cas9 System	2016	6(4), 917-23.	CRISPR/Cas9のニワトリにおける利用は情報が少ない。私たちはニワトリのDF-1細胞において peroxisome proliferator-activated receptor- γ 、ATP synthase epsilon subunit、オボアルブミン遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。T7E1アッセイの結果では3つの遺伝子座における変異の率は、0.75%、0.5%、3%だった。変異の効率を高めるために、代理のレポーターシステムと一緒にGM細胞を効率良く濃縮するために私たちはPuro(R)遺伝子を使った。T7E1アッセイでは変異の効率は上昇して、60.7%、61.3%、47.3%となった。後のシーケンシングによる分析では変異の効率は上昇して、94.7%、95%、95%だった。T7E1アッセイによって3ヶ所の潜在的なオフターゲット部位を調べたところ、オフターゲット変異は検出されなかった。このように、CRISPR/Cas9システムはニワトリのゲノム編集に利用できる。	[Bai Y et al.] College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 中国
18	動物	ヤギ	TALEN	β -ラクトグロブリン、ヒト α -ラクトアルブミン	PLoS One	Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination	2016	11(6), e0156636/1-14.	人間に対する栄養としてのヤギのミルクの価値は、 β -ラクトグロブリン (BLG) のようなミルクのタンパク質によって引き起こされる食物アレルギーの問題に関連している。本研究では、ヤギのBLG遺伝子座へヒト α -ラクトアルブミン (hLA) 遺伝子を導入するためにヤギの線維芽細胞においてTALENを利用した相同組換えを行なった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたコロニーが選抜の後に単離される率は10.1%、1.1%だった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたヤギの乳房上皮細胞においてBLG mRNAの濃度は徐々に低下して、hLAの発現が確認された。遺伝子ターゲティングされた線維芽細胞は効率良く体細胞核移植に使用した。ミルク中にBLGが少なく、hLAを豊富に含むhLAをノックインしたヤギが作れた。私たちの研究は動物のミルクの最適化の基礎となり、農業と生態臨床医学の発展を促進する。	[Zhu H et al.] College of Veterinary Medicine Northwest A&F University Yangling, Shaanxi 中国
19	動物	ヤギ	TALEN	β -ラクトグロブリン、ヒトラクトフェリン	Faming Zhuanli Shengqing	Goat blg gene targeted-deletion modification system for constructing blg ⁻ /hlf ⁺ fetal fibroblast	2016	CN 105734032 A 20160706.	本発明はヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させる方法とその応用に関連する。本発明ではTALENを使ってBLGの標的配列を切断する。ヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させて、ヒトのラクトフェリン (hLF) 遺伝子をノックインして、BLG/hLF ⁺ トランスジェニック胎児線維芽細胞を得る。この細胞をドナーとして体細胞核移植を行なってBLG/hLF ⁺ トランスジェニックヤギを作る。本発明はターゲティングによって欠失させたトランスジェニック哺乳類を作るための優れた技術である。	[Cheng Y et al.] Yangzhou University 中国
20	動物	ヤギ	TALEN	β -ラクトグロブリン	Transgenic Res.	The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β -lactoglobulin-knockout bucks	2016	25(5), 721-729.	本研究の目的は、設計されたヌクレアーゼを利用して遺伝子ターゲティングされた雄のヤギの生殖能力に遺伝子ターゲティングとリクローニングが影響しているかを調べることである。TALENによって β -ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子の1つの対立遺伝子をノックアウトした (BLG ⁻) ヤギと、BLG ⁻ の雄ヤギの線維芽細胞において遺伝子ターゲティングとリクローニングによって作られた2つの対立遺伝子がノックアウトされた (BLG ⁻) 雄のヤギを使って健康状態と生殖能力を調べた。BLG ⁻ の雄ヤギの出生のときの体重と出産後の成長は野生型のヤギと同等だった。BLG ⁻ またはBLG ⁻ の雄ヤギから得た新鮮なまたは凍結融解した精子の質のための指標は対照の物との間で有意差がなかった。体外受精によって得られた受精卵の中で胚盤胞まで育つ割合はBLG ⁻ 、BLG ⁻ 、野生型の間で同じだった。BLG ⁻ 、BLG ⁻ 、野生型の雄ヤギから得た凍結融解した精子を使ったときの人工授精の受胎率は42.3%、38.0%、42.6%だった。ターゲティングしたBLGの修飾の生殖細胞系伝達はメンデルの法則と一致した。解析した成長と生殖の性質はBLG遺伝子をターゲティングしたことで影響を受けておらず、BLG ⁻ およびBLG ⁻ の雄ヤギの育種の可能性を示唆する。	[Ge H et al.] College of Veterinary Medicine Northwest A&F University Shaanxi 中国

表3つづき

21	動物	ヤギ	TALEN	ミオスタチン	BMC Dev. Biol.	Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats	2016	16(1), 26.	TALENによるミオスタチン (MSTN) の編集がヤギにおいて可能であることを調べた。ヤギのMSTNを認識する一対のTALEN (MTAL-2) を作った。ヤギの線維芽細胞をMTAL-2でトランスフェクトして272個のモノクローナルな細胞がMSTNの1つまたは2つの対立遺伝子において変異を持つことが確認された。異なる遺伝子型を持つ10種類の細胞をドナー細胞として体細胞核移植を行なって、3頭の子ヤギ (K179/MSTN(-/-), K52-2/MSTN (+/-), K52-1/MSTN (+/+)) が得られた。MTAL-2はヤギのゲノムの中のMSTNを効率良く破壊できた。得られた体細胞からは発生に異常のないMSTNに変異を持つヤギが作れた。TALENを使ってヤギにおいて正確なゲノム編集ができた。	[Yu B et al.] College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 中国
22	動物	ヤギ	TALEN	β-ラクトグロブリン、ヒトラクトフェリン	Sheng wu cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology	BLG gene knockout and hLF gene knock-in at BLG locus in goat by TALENs	2016	32(3), 329-38.	ヤギの胎児の線維芽細胞においてβ-ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子をノックアウトして、BLG遺伝子座へヒトのラクトフェリン (hLF) 遺伝子のコード領域を挿入するためにTALENを利用して組換えを行なった。それをドナー細胞として体細胞核移植を行なった。ヤギBLGのエクソン3を認識するTALENをコードするプラスミドTALEN-3-L/Rと、hLF遺伝子をノックインするための陰性選択遺伝子HSV-TKを含むベクター-BLC14-TKを設計した。BLC14-TKとTALEN-3-L/Rと一緒にヤギの胎児線維芽細胞へトランスフェクトして薬剤によって細胞を選抜した。TALEN-3-L/Rによる変異導入効率は25-30%だった。6個のBLG/hLFの細胞系列に由来する335個の再構築された胚を16匹の代理ヤギに移植した。9匹のヤギが妊娠して50日生きたBLG/hLFの胎児が得られた。この研究はアレルゲンが少なくhLFを豊富に含むヤギのミルクを得る研究の基礎となる。	[Song S et al.] 中国
23	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Sci. Rep.	Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system.	2016	6:29855.	ミオスタチン (MSTN) を正確に破壊することで安全に肉の生産性を改善できるかは証明されていない。この問いに答えるために、私たちはCRISPR/Cas9システムを応用してMstnをノックアウトしたウサギとヤギを作って表現型の変化を解析した。4頭のヤギの中で1頭はMstn遺伝子座に編集が起きた。このヤギの早い段階での成長速度は対照を上回った。しかし、Mstnノックアウトは重大な健康上の問題を引き起こし、他の生物種でも同様な効果があるかもしれない。この安全性の問題はさらに研究する必要がある。	[Guo R et al.] Jiangsu Livestock Embryo Engineering Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 中国
24	動物	ヒツジ	ZFN	ミオスタチン	Asian-Australas. J. Anim. Sci.	Knockout of Myostatin by Zinc-finger Nuclease in Sheep Fibroblasts and Embryos	2016	29(10), 1500-7.	ヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子を標的とするZFNを培養線維芽細胞へ導入した。2つのコロニーは1つの対立遺伝子に変異があって、1つのコロニーは2つの対立遺伝子に欠失があった。さらに、MSTN-ZFN mRNAをヒツジの胚へマイクロインジェクションによって導入した。37個の単為生殖の胚の中で13個がZFNによってターゲティングされて効率は35%だった。本研究はマイクロインジェクションと体細胞核移植によってMSTN遺伝子を編集したヒツジを作るための基礎となる。	[Zhang X et al.] Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 中国
25	動物	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	Asian-Australas. J. Anim. Sci.	Targeted editing of myostatin gene in sheep by transcription activator-like effector nucleases	2016	29(3), 413-418.	本研究の目的は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチド (ssODN) とTALENを使ってヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子が編集できるかを調べることである。私たちはヒツジMSTN遺伝子のコード領域の中で高度に保存された配列を標的とする一対のTALENを設計した。ヒツジの初代線維芽細胞へTALENとssODNと一緒にトランスフェクトしてMSTN遺伝子の正確な遺伝子編集を誘導した。MSTN遺伝子を編集された細胞は核ドナーとして使われてクローン胚が作られた。TALENとssODNを組み合わせて使うと家畜で正確な遺伝子の修飾ができる。	[Zhao X et al.] College of Animal Science and Technology, College of Life Sciences Shihezi University Shihez 中国
26	動物	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	Sci. Rep.	Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing and somatic cell nuclear transfer	2016	6, 33675.	私たちはヒツジのミオスタチン (MSTN) に特異的なTALENプラスミドを作ってSTHヒツジの胎児の線維芽細胞へトランスフェクトした。2つの対立遺伝子がノックアウトされた細胞を体細胞核移植のためのドナー細胞として選んだ。クローン胚を37頭の代理ブタに移植して、28頭 (75.7%) が妊娠して、15頭が出産した。23頭の子ヒツジが生まれて12頭は生きていた。子ヒツジの遺伝子変異はドナー細胞の物と一致した。オフターゲット変異は検出されなかった。MSTNノックアウトはMSTN関連遺伝子のmRNAの発現に影響していた。MSTNノックアウトによって体重が顕著に増加し、筋肉繊維の肥大が起きた。これらのMSTNに変異を持つヒツジは正常に発生と成長した。	[Li H et al.] State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan Yunnan Agricultural University Kunming 中国
27	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	MSTN, ASIP, BCO2	Faming Zhuanli Shenqing	Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep	2016	CN 105950656 A 20160921.	1細胞の胚へCas9 mRNAと3つの遺伝子 (MSTN, ASIP, BCO2) を標的とするgRNAをマイクロインジェクションすることによってヒツジにおいて正確な遺伝子ターゲティングを行なった。sgRNA: Cas9によるターゲティングの効果をクローニングとシーケンシングによって注入した胚、体細胞組織、生殖腺において調べた。子ヒツジにおけるこれら3つの遺伝子のターゲティングの効率は27-33%で、3つの遺伝子が同時にターゲティングされた効率は5.6%だった。受精卵へのマイクロインジェクションは遺伝子修飾されたヒツジを作るための効率的な方法であることが証明された。MSTN遺伝子の破壊では筋原線維が大きくなって筋肉の肥大が起きた。これは遺伝子修飾が遺伝子と形態学の両方のレベルで起きたことを支持する最初の詳細な証拠である。CRISPR/Cas9システムを利用して、商業的に重要な性質に関連する複数の遺伝子を同時にターゲティングすることによって家畜の改良ができることを本研究は示唆する。	[Zhao J et al.] Qingdao Agricultural University 中国 Shihezi University Shihez 中国
28	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Faming Zhuanli Shenqing	Detection method of MSTN gene targeted knockout and the effects on muscle differentiation in sheep thereof	2016	CN 105821116 A 20160803.	ヒツジのMSTN遺伝子をターゲティングによってノックアウトして筋肉の分化への影響を調べる方法は以下の段階から構成される。標的遺伝子のクローニング、gRNAの設計と合成、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの構築、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの外因性の活性の検出、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの内因性の活性の検出、CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターのノックアウト効果の検出。本発明は実験の期間が短く、操作が簡単で、再現性が高く、ノックアウトの効率が低いという利点がある。	[Li B et al.] Yangzhou University 中国

表 4

文献ID	生物種	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	誌名	タイトル	年	ページ	要旨	所属
1	植物	キュウリ	CRISPR/Cas9	elF4E	Mol. Plant Pathol.	Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology.	2016	17(7), 1140-53	キュウリを材料とし、ウイルス耐性の付与を目的としてCRISPR/Cas9により、elF4E遺伝子の破壊を行った。ElF4E遺伝子のN末端及びC末端を標的としたCas9/sgRNAを導入したT1世代においては、標的部位において小規模の遺伝子欠損またはSNPsが認められた。非組換え (T-DNA脱落の意味か?) の系統を用い、ホモ変異体を取得した。T3世代ホモ系統は、cucumber vein yellowing virus (ipomovirus)、potyviruses Zucchini yellow mosaic virus、Papaya ring spot mosaic virus-WIに抵抗性を示したが、ヘテロ及び非変異体はこれらのウイルスに高い感受性を示した。このように初めて非遺伝子組換えで、生育に影響を与えることなく、また長期間の戻し交配を必要とせず、ウイルス抵抗性のキュウリを作出することに成功した。	[Chandrasekaran J et al.] Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, Volcani Center イスラエル
2	植物	コメ	CRISPR/Cas9	acetolactate synthase (ALS1)	Mol. Plant	Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase.	2016	9(4), 628-31	コメのALS1遺伝子に変異を導入するために種々の実験を行った。①トウモロコシで成功している、一本鎖オリゴDNAを用いる手法: Cas9-gRNAとW548LまたはS627I変異を導入するための一本鎖オリゴDNAをparticle bombardmentにより導入したが、ALS遺伝子に変異が導入された系統は取得できなかった。②ALS遺伝子上2カ所の変異を導入するための2カ所を認識し切断するためのgRNAをCas9と共に発現し、さらに、2カ所のアミノ酸点変異導入のためのドナー断片となる配列を組み込んだベクターを構築した。このドナー断片の両端にはgRNAで切断される認識部位が置かれていることを特徴とする。このベクターを、相同組換えにおいてドナー断片となる本鎖DNAとともに、コメカルス (日本晴) にparticle bombardmentにより導入したところ、T0世代で48/52の高効率でホモ変異体を取得することに成功した。③②で用いたベクターをアグロバクテリウム法で導入したところ、ヘテロ変異体を取得された。ホモ変異体についてbispyribac sodiumを散布したところ、変異体は耐性を示したが、非変異体は枯死した。このように、2つのgRNAと修復用の鋳型をプラスミドと二本鎖DNAの形で同時に供すること、効率よく点変異導入ができることが示された。また、植物種において変異導入方法を最適化する必要があることが示唆された。	[Sun Y et al.] Institute of Crop Sciences (ICS), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) 中国
3	植物	アマ	TALEN, CRISPR/Cas9	BFP transgenic model (Arabidopsis thaliana), EPSPS (グリホサート耐性) (亜麻)	Plant Physiol.	Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants.	2016	1917-28	標的配列の改変配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)とTALENまたはCRISPR-Cas9を同時に導入することで正確なゲノム編集を行う方法を示す。シロイヌナズナでは、PhleomycinまたはTALENによる変異導入 (BFP(H66:Blue)がGFP(Y66:Green)への変換) 効率が、ssODNとの同時導入により導入量依存的に上昇することが示された。TALENとssODNを併用することで、ssODNの長さ依存的にBFPからGFPへの変換効率が上がることが示された。なお、TALENまたはCRISPR/Cas9単体では、TALENと比較してCRISPR/Cas9の方が変異導入活性 (NHEI活性) が高い。アマにおいて、グリホサート耐性に関わるEPSPS遺伝子 (2遺伝子) を標的とするssODN(2配列)をCRISPR/Cas9と同時導入し、得られたカルスに目的の変異が導入された割合は、0.15%または0.08%であった。変異導入に成功した系統のひとつA23のカルスおよびその再生植物体はGlyphosate耐性を示した。	[Sauer NJ et al.] Cibus, San Diego 米国
4	植物	コメ	TALEN	WAXY	Faming Zhuanni Shengqing	TALEN recognition targeting site for efficient editing rice WAXY gene.	2016	CN 105367628 A 20160302.	本発明は、コメのWAXY遺伝子を効率良く編集するためのTALEN用の一対のターゲッティング部位とその応用を提供する。TALENの遺伝子を含むプラスミドを使う方法を提供する。TALENのアミノ酸配列とヌクレオチド配列を設計して、TALEN遺伝子を含むプラスミドを構築する。そして、ターゲッティングの効率を改善する。	[Lei W et al.] BGI Shenzhen Technology Co., Ltd. 中国
5	植物	ジャガイモ	TALEN	vacuolar invertase	Plant Biotechnol. J.	Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout.	2016	14(1), 169-176	ジャガイモを低温保存することは、発芽を抑制して保存期間を延長するために広く行なわれる。しかし、低温保存によって還元糖の蓄積を促進してしまう。高温で加工すると、これらの還元糖から茶色の苦味の製品ができてしまい、潜在的な発がん物質であるアクリルアミドの含有量が高くなってしまふ。本研究では、還元糖の蓄積を抑制するためにTALENを利用してvacuolar invertase遺伝子(Vinv) をノックアウトした。少なくとも1つのVinv対立遺伝子に変異がある18個の植物を得た。これらの植物の中で5つは全てのVinv対立遺伝子に変異があった。Vinv遺伝子をノックアウトした植物から得られたイモには還元糖が検出されず、加工されたチップスはアクリルアミドの含有量が減少し、色が薄かった。7つの植物はゲノム中にTALEN DNAの挿入がなかった。本研究は同質4倍体であるジャガイモの品種改良にTALENを利用する基礎となる。	[Benjamin CM et al.] Collectis plant sciences Inc. New Brighton 米国
6	植物	コメ	TALEN	OsCSA1, OsDERF1, OsGN1a, OsMST7, OsMST8, OsPMS3, OsTAD1	Plant Biotechnol. J.	TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice.	2016	14(1), 186-194	コメのゲノム編集にN287C230 TALEN骨格を使うと低い変異効率 (0-6.6%) だった。しかし、TALEN骨格のC末端を除去すると変異効率が25%まで大きく上昇した。多くのトランスジェニックT0植物では1つの頻りに現れる変異と多くの低頻度の変異があった。独立のT0植物において1つのひこばえの中の大部分の組織において頻りに現れる変異が存在した。また、調べたすべてのひこばえにもそれは存在し、TALENによって誘導される変異は芽の頂点の分裂組織の発生においてかなり早く起きることを示唆する。数世代の解析はTALENによって誘導される変異は安定に標準的なメンデル型でT1とT2世代に伝達されることを示した。TALENによって誘導される変異の大部分 (約81%) は複数の塩基に影響して、それらの約70%は欠失だった。この結果は、コメにおけるCRISPR/Cas9システムの報告とは対照的であり、そこでは一塩基が影響を受けることが多く、欠失は全体の変異のわずか3.3%だった。	[Hui Z et al.] Shanghai Center for Plant Stress Biology Chinese Academy of Sciences 上海、中国
7	植物	コメ	TALEN	WAXY	Plant Physiol.	A Defect in DNA Ligase4 Enhances the Frequency of TALEN-Mediated Targeted Mutagenesis in Rice.	2016	170(2), 653-66	植物でのTALENに誘導される変異においてclassical nonhomologous end joining (cNHEJ) と alternative nonhomologous end joining (altNHEJ) の役割を分析するために、DNA Ligase 4 (Lig 4) 欠損がコメ細胞においてTALENに誘導される二本鎖切断の修復の反応速度論へ影響するかを調べた。Deep-sequencing分析から、すべてのタイプの変異の頻度はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損した変異型のカルスにおいて高いことが示された。すべての欠失の変異に対する大きな欠失 (10 bp以上) またはマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEI) によって修復される欠失の割合はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損する変異体のカルスにおいて高かった。さらに、ほぼすべての挿入 (2 bp以上) は、遺伝的背景に関係なく、TALEN切断部位の周辺の1つ以上の領域のコピーアンドペーストによって加工されてMMEIによって結合されることが示された。cNHEJの機能不全はcNHEJからaltNHEJまたは合成に依存したストランドアニーリングへと修復経路が変わることを本研究は示している。	[Nishizawa-Yokoi A. et al.] Plant Genome Engineering Research Unit National Institute of Agrobiological Sciences 日本
8	植物	?	TALEN, CRISPR/Cas9	AIP10	U.S. Pat. Appl. Publ.	Method for promoting an increase in plant biomass, productivity and drought resistance.	2016	US 20160177327 A1 20160623.	植物のバイオマスと収量の増加を促進する方法を記載する。この増加は葉、幹、根および果実と実の生産において効果が見られる。さらに干ばつへの耐性が増加して環境への変化への適応が向上し、成長、バイオマス、収量が改善する。	[Silva HA et al.] Universidade Federal do Rio de Janeiro ブラジル
9	植物	?	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9	?	Curr. Genomics	Genomics Approaches for Improving Salinity Stress Tolerance in Crop Plants.	2016	17(4), 343-357.	世界的に塩分は穀物の生産を減らす大きな要因の1つである。塩分への植物の反応は複雑で多くの遺伝子を含む。植物がどのように塩分に反応するかを完全に理解することは難しい。私たちはゲノミクスを通じて塩分ストレス応答に関連する遺伝子を同定して、特徴を調べ、シグナル経路を地図にして精密に示し、穀物の塩分耐性を改善するためにこの情報を利用することができた。Gene pyramidingのような新しい手法を遺伝子工学とマーカーに支援された育種に利用してストレス耐性の穀物を作る能力を大きく増強した。ゲノム編集技術も正確な育種に利用できる。	[Nongpiur RC et al.] Jawaharlal Nehru Univ. New Delhi インド

表 4 つづき

10	植物	?	CRISPR/Cas9	TRV配列	PCT Int. Appl.	Nucleic acid constructs for plant genome editing	2016	WO 2016084084 A1 20160602.	核酸コンストラクトを提供する。このコンストラクトはタバコ萎えそウイルス (TRV) 配列と興味のあるゲノムの標的配列において配列特異的な切断を媒介するsgRNAをコードする核酸配列から構成されて、その場所でTRV配列は機能的な2b配列を欠損している。このコンストラクトを含む植物細胞とゲノム編集におけるこのコンストラクトの使用も提供する。	[Alexander V et al.] Danziger Innovations Ltd. イスラエル
11	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Badh2	Faming Zhuanli Shenqing	A method and CRISPR/Cas system for rapidly transforming rice into scented rice by Badh2 gene knockout.	2016	CN 105543228 A 20160504.	本発明は、コメを香りのするコメに迅速に形質転換するための方法とCRISPR/Casシステムを開示する。この方法は、コメの香りを代謝する過程の関連遺伝子の配列に対するベクターを設計して、香りのする物質が代謝されずに大量に蓄積するように遺伝子の特定の部位で欠失やサイレンシングを誘導するためにアグロバクテリウムで媒介する形質転換によって香りのしないコメニベクターをトランスフェクトする。標準的なコメが香りのするコメに形質転換された後に、改変された遺伝子を分離するために自殖または交配が行なわれて、他の遺伝子の構造や性質に影響を与えずに安定的に遺伝するホモ接合性の香りのするコメが得られる。	[Wang J et al.] Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences 中国
12	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Badh2	Faming Zhuanli Shenqing	Method for obtaining fragrant rice line through targeting Badh2 gene with CRISPR/Cas9 gene editing technology.	2016	CN 105505979 A 20160420.	本方法はCas9によって認識される香りの遺伝子のエクソンとイントロンから配列を選び、ゲノミックDNAを切りDNA修復を誘導して欠失変異を作り、機能しないBadh2遺伝子を得ることから構成される。形質転換を行なうのはOryza sativa. ssp. indica, Oryza sativa. ssp. Japonicaともち米のカルスを使い、二倍体のカルスを誘導するための外植片として成熟した胚、若い穂と子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカルス細胞へターゲティングベクターを移して、スクリーニングして、陽性の植物を同定して、T1グループから香りのするコメ系列を分離して、半数体のカルスを誘導するための外植片として薬、花粉、不受精の子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカルス細胞にターゲティングベクターを移して、陽性カルスをスクリーニングして、コルヒチンで処理して、苗に分化させて、陽性の形質転換植物を同定して、香りのするコメ系統を得る。	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
13	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Acetate Synthase	Mol. Plant	Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase.	2016	9(4), 628-631	CRISPR/Casに媒介される相同組み換えによってコメにおけるacetolactate synthaseの除草剤への耐性を導入する方法を記載する。本方法は、二本鎖切断を作り、1つ以上の変異を含むcDNAと宿主の遺伝子を置換するために2つのgRNAを使う。この方法はコメにおいて1つのgRNAを使うよりも効率が高い。	[Sun Y et al.] Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
14	植物	コメ	CRISPR/Cas9	Gn1a, DEP1, GS3, IPA1	Front. Plant Sci.	Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System.	2016	7, 377.	コメの栽培品種Zhonghua11においてGn1a、DEP1、GS3とIPA1遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。これらの遺伝子は粒の数、円すい花序の構造、粒の大きさ、植物の構造を制御すると報告されている。形質転換した植物の第一世代 (T0) における表現型と編集された遺伝子の頻度の分析は、CRISPR/Cas9システムはゲノム編集を誘導する効率が高いことが示された。形質転換された植物においてゲノム編集された割合は42.5% (Gn1a)、67.5% (DEP1)、57.5% (GS3)、27.5% (IPA1) だった。gn1a、dep1、gs3変異体のT2世代の特徴はそれぞれ粒の数の増加、高濃度の直生の円すい花序、大きな粒だった。さらに、dep1とgs3変異体ではそれぞれやや矮小植物で、長い芒を持つ粒の表現型が見られた。ipa1変異体は2つの対照的な表現型を示し、OsmiR156標的領域において誘導される変化に依存して、少ないまたは多いひこばえができた。さらに、以前の報告よりも欠失の変異の頻度が高いことが明らかになった。オフターゲットは高度に類似の配列で起きていた。この結果は、CRISPR/Cas9によって単一の栽培品種において重要な性質の複数の制御因子を修飾できることを証明した。そして、これらの結果は同じ遺伝的背景における複雑な遺伝子制御のネットワークと栽培品種における重要な性質の重なりを調査を促進する。	[Li M et al.] Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of SciencesGuangzhou 中国
15	植物	トマト	ZFN	LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (L1L4)	Plant Cell Rep.	A novel arrangement of zinc finger nuclease system for in vivo targeted genome engineering: the tomato LEC1-LIKE4 gene case.	2016	35(11), 2241-2255.	植物において、特に穀物において正確な遺伝子ターゲティングを行なうことは遺伝子機能の解明や分子育種の前進のために長年求められてきた。この問題に取り組むために、トマトの種に対してZFNに基づく技術を開発した。2つのDNA認識配列の間のイントロンの配列とともにZFNの設計をターゲティングした遺伝子の変異導入に関して評価した。核因子Yのβサブユニットをコードする発生の制御因子LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (L1L4) に対して特別に作成したZFNはトマトの種で一過性に発現させると、標的部位を切断して、非相同末端結合による不完全な修復を刺激して、内在性の標的部位に変異を導入した。ZFNの技術を植物に適用できて、発生の段階でヘテロクローナな表現型をもたらすL1L4変異が得られた。L1L4のDNA結合ドメインの上流での配列の変化は果実の組織を含めて表現型の多様性につながる可能性がある。これらの結果は、トマトでのターゲティングによる変異導入のためにZFNの方法が使用できることを明確に示しており、トランスレシヨナルリサーチとトマトの育種を加速するかもしれない。	[Hiloti Z et al.] Institute of Applied Biosciences Centre for Research and Technology Hellas Thessaloniki ギリシャ
16	植物	コメ	CRISPR/Cas9	thermo-sensitive genic male sterility (TGMS)	Sci. Rep.	Development of Commercial Thermo-sensitive Genic Male Sterile Rice Accelerates Hybrid Rice Breeding Using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 Editing System.	2016	6, 37395.	ハイブリッド米はコメの生産の改善のための重要な戦略を提供する。その中で不妊の雄の系列の栽培は交雑育種の成功のための鍵である。CRISPR/Cas9システムが穀物の遺伝的改良のために応用された報告は少ない。本研究ではCRISPR/Cas9システムを使ってTMS5に特異的な変異を導入した。TMS5は中国において最も広く応用される熱に感受性な遺伝子の雄の不妊の遺伝子である。そして私たちは「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ったターゲティングの変異導入のためにTMS5のコード領域において10個の標的配列を設計して、オンターゲットとオフターゲットの効果的な割合を評価した。最後に、私たちは潜在的に应用可能な「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を育種するために最も効率の良いコンストラクトであるTMS5abコンストラクトを作成した。私たちは異なる標的配列の特徴にしたがって編集に影響する因子も議論した。注目すべきは、TMS5abコンストラクトを使って私たちは11個の新しい「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。この方法は2つのコメの亜種においてわずか1年以内に雑種育種の潜在的な応用が可能である。私たちの方法の応用は不妊の系列の育種を大きく加速するだけでなく、雑種強勢の開発を促進するだろう。	[Zhou H et al.] State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources Guangzhou 中国
17	植物	コメ	CRISPR/Cas9	?	Faming Zhuanli Shenqing	Targeting vector and method for modifying non-glutinous rice line into glutinous line using CRISPR/Cas9 technology.	2016	CN 106119275 A 20161116.	本発明はCRISPR/Cas9技術に基づいてモチゴメではないコメの系統をモチゴメの系統に変えるためのターゲティングベクターに関連する。ターゲティングベクターは、sgRNA発現カセット、Cas9発現カセットとスクリーニングマーカーから構成される。sgRNAは第一のプロモーターと第一のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするsgRNAから構成される。Cas9発現カセットは第二のプロモーターと第二のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするCas9から構成される。第一のプロモーターと第二のプロモーターはコメにおいて恒常的に発現する強い同じまたは異なるプロモーターである。本発明はこのターゲティングベクターを使ってモチゴメではないコメの系統をモチゴメの系統に変えるための方法も提供する。本発明によって育種の時間を大幅に短縮できる。	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
18	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsARF4	Faming Zhuanli Shenqing	Application of gene OsARF4 for controlling rice grain length and grain weight.	2016	CN 105950633 A 20160921.	本発明は分子生物学と遺伝子工学技術の分野、特にコメの粒の長さや重さを制御するOsARF4遺伝子への応用に関連する。本発明はコメにおいて発現する、オーキシン反応因子をコードするOsARF4を狙っている。コメの粒の長さや重さを改善して収量を改善するためにOsARF4をノックアウトする。本発明はOsARF4遺伝子のコード領域に特異的なsgRNAを利用してCRISPR-Cas9技術を使い、OsARF4遺伝子のコード領域に損傷を与えて、T-DNAを除去して非トランスジェニックコメを得る。遺伝子組換えコメは粒の長さや重さにおいてのみ明らかな改善があり、他の農学の性質には大きな変化がない。本発明の遺伝子と操作技術は実用的な価値があり、植物の収量を改善するうえで大きな役割を果たす。	[Liu J et al.] Fudan Univ. 中国
19	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsLCT1	Faming Zhuanli Shenqing	Breeding method for decreasing cadmium content of rice grain by gene LCT1 knockout with CRISPR/Cas9 system.	2016	CN 105936907 A 20160914.	本方法は、コメのLCT1エクソンのクローニング、CRISPR/Cas9システムの利用、エクソンの配列にしたがって標的配列を選び、pCRISPR/Cas9組換えベクターを構築し、それをコメのカルスに導入する。トランスジェニック苗を得て、トランスジェニックな陽性の植物をスクリーニングする。本発明は、CRISPR/Cas9技術を使ってターゲティングによってコメのOsLCT1をノックアウトして、カドミウムトランスポーターOsLCT1を完全に不活性化させる。外来遺伝子を含まない利点とコメの粒のカドミウム含量が大幅に減少して、包括的な農学的特徴は大きく変わらないようなコメの育種を行なう。本発明は安全で、時間がかからず、コストが安いという利点がある。	[Tang L et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国

表 4 つづき

20	植物	ブドウ	CRISPR/Cas9	IdnDH	Sci. Rep.	CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (Vitis vinifera L.).	2016	6, 32289	CRISPR/Cas9システムは多くの植物に適用されてきたが、ブドウにおいてゲノム編集のために利用できるかは不明である。本研究では「シャルドネ」懸濁細胞と植物においてCRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集とターゲティングした遺伝子の変異を述べる。L-idonate dehydrogenase遺伝子 (IdnDH) の異なる部位を標的として2つのsgRNAを設計した。CEL1エンドヌクレアーゼアッセイとシーケンシングの結果から標的部位において予想される挿入と欠失があることが明らかになった。sgRNA1/Cas9を発現させたトランスジェニックな細胞集団とそれに対応する再生させた植物においては100%の変異の頻度が得られた。トランスジェニックな細胞集団において検出される変異の中で大多数は1 bpの挿入であり、それに続いて1-3 bpの欠失が見られた。オフターゲット活性は、潜在的なオフターゲット部位をシーケンシングすることによって評価したその結果、明らかなオフターゲット変異は検出されなかった。私たちの結果はブドウにおいて正確なゲノム編集のためにCRISPR/Cas9システムが利用できることを証明した。	[Ren C et al.] Beijing Key Laboratory of Grape Science and Enology and Key Laboratory of Plant Resource, Institute of Botany the Chinese Academy of Sciences Beijing 中国
21	植物	グレープフルーツ	CRISPR/Cas9	GfPT	U.S. Pat. Appl. Publ.	Method for inhibiting production of furanocoumarins in plants by inhibiting grapefruit prenyltransferase.	2016	US 20160244771 A1 20160825.	本発明は、グレープフルーツのクマリンに特異的なプレニルトランスフェラーゼ (GfPT) を阻害することによって、植物においてフラノクマリンの生産を阻害する方法を提供する。植物においてフラノクマリンの発現を阻害する方法は、部位特異的突然変異誘発法、EMS突然変異生成、TILLING、ノックアウト技術、CRISPR/Cas9、TALEN、ZFNを使う遺伝子編集技術、またはRNA干渉によって誘導される遺伝子サイレンシングによってGfPTを不活性化することを含む。	[Bourgauud F. et al.] Universite de Lorraine フランス
22	植物	トマト	CRISPR/Cas9	DMR6オルソログ	bioRxiv	CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance	2016	64824/1-64824/23	病原菌による穀物の生産への被害は世界的に大きい。病原菌に対して耐性な穀物の品種の使用は世界の増加する人口の食料需要に合致した持続可能な方法になりうる。私たちは病気耐性に関連した特異的な遺伝子を修飾することによってトマトにおいてゲノム編集を行い持続できる病気耐性な性質を獲得した。最近、アラビドプシスにおいてDMR6 (downy mildew resistance 6) と呼ばれる1つの遺伝子の不活性化によっていくつかの病原菌に耐性を与えることが示された。この遺伝子は病原菌の感染中は特異的に発現が上昇して、dmr6遺伝子における変異はサリチル酸濃度の上昇が起きた。トマトのSIDMR6-1オルソログであるSolyC O 3 g O 8 O 1 9 OもPseudomonas syringae pv. tomatoとPhytophthora capsiciの感染中に発現が上昇する。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ってトマトにおいてSIDMR6-1遺伝子に小さな欠失を作り、フレームシフトを起こして未成熟な先の欠けたタンパク質を作るようにした。これらの変異は温室の条件下では成長や発生について大きな有害な効果はなく、P. syringae、P. capsici、Xanthomonas spp.を含む異なる病原菌に対して耐性を示した。	[Thomazella DPT et al.] Univ. California Berkeley 米国
23	植物	コメ	CRISPR/Cas9	CSA	Faming Zhuanli Shengqing	Application of rice CSA gene and method for site-directed knocking out by CRISPR/Cas9 system.	2016	CN 105671075 A 20160615	コメの雄性不稔遺伝子CSAのタンパク質の配列とヌクレオチド配列を開示する。CRISPR/Cas9システムに基づいてCSA遺伝子をノックアウトする、変える、または抑制することによって通常のコメの品種におけるCSA遺伝子の発現量が減少して、コメの雄性不稔系統を得る。部位特異的ノックアウトの方法は、CH-CRISPR/Cas9システムに基づいたCC-CSA-1ベクターとGateway-CRISPR/Cas9システムに基づいたGC-CSA-1ベクターによる雄性不稔遺伝子CSAの遺伝子編集を含む。本発明は、コメの雄性不稔遺伝子CSAに基づいた雄性不稔系列の生産質の資源とコメの二系統の交配による種子の生産のために効率の良いノックアウトの方法と育種の様式を提供する。	[Zhang D et al.] Shanghai Jiao Tong Univ. 中国
24	植物	ブドウ、リンゴ	CRISPR/Cas9	MLO-7, DIPM-1, 2, 4	Front. Plant Sci.	DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins.	2016	7, 1904.	全ゲノムシーケンスとゲノム編集を組み合わせて利用することによって、初めて得られる表現型を獲得するため、新しい機能を導入するために、以前にはできなかった制御と正確さで標的とした部位での遺伝子の変化を導入することが可能となり果物のバイオテクノロジー分野に革命が起きた。プラスミドによってゲノム編集の成分を導入するとともに効率が良く宿主のゲノムにプラスミドの配列がランダムに取り込まれてしまう可能性があるなど、いくつかの欠点もある。さらには、現在のプロセスベースのGMOの規制に阻まれて、改良した品種の商品化が難しくなるかもしれない。私たちは、効率の良い標的部位への変異誘導のために、ブドウの栽培品種シャルドネとリンゴの栽培品種Golden delicious fruitの穀物植物のプロトプラストへ精製したCRISPR/Cas9リボヌクレオプロテイン (RPNs) を直接導入することを試みた。ブドウの栽培品種においてうどん粉病への耐性を強化させるために、影響を受けやすい遺伝子である、MLO-7を標的とした。リンゴにおいては火傷病への耐性を強化させるためにDIPM-1、DIPM-2、DIPM-4を標的にした。さらに、各々のブドウとリンゴの栽培品種に対して、効率の良いプロトプラストの形質転換、Cas9とsgRNAのモル比を最適化した。標的部位のディーブシーケンシングを使って、標的部位の挿入と欠失の割合を解析した。CRISPR/Cas9 RPNsをプロトプラスト系へ直接導入することで遺伝子編集が可能であり、DNAを使わないゲノム編集でブドウとリンゴの植物を作ることへ可能性を開いたことを私たちの結果は証明する。	[Malony M] Research and Innovation Centre, Genomics and Biology of Fruit Crop Department, Fondazione Edmund Mach Trento イタリア、韓国
25	植物	コメ	CRISPR/Cas9	qSH1	Faming Zhuanli Shengqing	Molecular improvement method for reducing shattering performance of rice seed.	2016	CN 106191107 A 20161207.	本発明は、CRISPR/Cas9システムを使ってコメの種子が砕け散ることに関連した遺伝子qSH1のターゲティングによる修飾によってコメが砕け散る性質を低下させるための分子遺伝学的な方法を提供する。本方法は、qSH1またはLOC_Os01g62920またはOs01g0848400のコード領域と5'末端の開始コドンの付近に適切な標的を選ぶこと、標的配列を含むベクター-pYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aを構築すること、ベクター-pYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aと標的配列を含む組換えベクター-pCRISPR/Cas9を構築すること、コメに組換えベクター-pCRISPR/Cas9を導入すること、トランスジェニック陽性植物を得ること、トランスジェニック陽性植物とともに標的部位で変異を持つ植物を得ること、変異体の植物を数世代栽培することによって遺伝子組換え実験の成分を含まないホモ接合性の変異体植物を得ること、砕け散る性質が大きく低下した植物を得るためにホモ接合性の変異体の植物の砕け散る性質の試験を行うことを含む。この方法は高い指向性があり、遺伝的背景の変化はほとんどなく遺伝子組換えのリスクを避けることができ、遺伝子組換え実験の成分を含まず、砕け散る性質が大きく低下した新しいコメの品種と新しい組み合わせを得ることができる。	[Sheng X et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国
26	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsERF922	PLoS One	Enhanced rice blast resistance by CRISPR/cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922.	2016	11(4), e0154027/1-e0154027/18.	コメのイモチ病は世界的にコメに影響を与えるもっとも破壊的な病気である。宿主の耐性の獲得はそれを制御するためのもっとも経済的で効率の良い方法であることが証明されている。私たちは、コメのOsERF922遺伝子を標的にするCRISPR/Cas9配列特異的ヌクレアーゼ (C-ERF922) を利用することでコメのイモチ病への耐性を改善したことを報告する。50個のトランスジェニック植物から21個のC-ERF922によって誘導される変異植物 (42.0%) が同定された。サンガーシーケンシングによってこれらの植物は標的部位に様々な挿入と欠失の変異を持っていることが明らかになった。C-ERF922によって誘導される対立遺伝子の変異のすべてが次世代に伝達されることを私たちは示した。望ましい遺伝子修飾を持っているが、導入されたDNAを含まない変異植物がT1とT2世代の分離によって得られた。6個のT2ホモ接合性の変異系統はイモチ病に対する耐性の表現型と様々な農学的な性質についてさらに調べた。病原菌の感染の後に形成されるイモチ病の損傷の数は野生型の植物と比較して苗と分けつの両方の段階で大きく減少した。さらには、6個のT2変異体系統と野生型の植物の間には調べた農学的な性質について大きな違いはなかった。2、3個の部位に変異を持つ植物を得るために、Cas9/Multi-target-sgRNAs (C-ERF922S1S2およびC-ERF922S1S2S3) を使うことによってOsERF922の中に複数の部位を標的にした。CRISPR/Cas9による遺伝子修飾はコメにおけるイモチ病への耐性を強化するための有用な方法であることを私たちの結果は示している。	[Wang F et al.] College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Agriculture Sciences (CAAS), Beijing 中国
27	植物	コメ	TALEN	OSALS	J. Genet. Genomics.	TALEN-Mediated Homologous Recombination Produces Site-Directed DNA Base Change and Herbicide-Resistant Rice.	2016	43(5), 297-305.	DNA二本鎖切断に対する相同組換え (HR) による修復を通じた部位特異的な置換または本物のゲノム編集は課題である。コメにおけるTALENに基づいたHRIによる遺伝子置換として、TALENと希望する変異を含むドナーDNAを使って、私たちはコメのacetolactate synthase遺伝子 (OsALS) へ2つの点突然変異を作り、除草剤に耐性なコメの系統を作った。3回の実験でTALEN遺伝子を含むDNAとドナーDNAをコメのカルスへ導入した後に、1.4 - 6.3%の効率でT0世代においてOsALSの異なる遺伝子型を持つ9個の植物を得た。HRIによって媒介される遺伝子編集はT1世代の子孫へ遺伝する。編集されたT1植物は強い除草剤への耐性を示し、対照の植物と同じくらい形態学的に正常だった。この結果は、コメにおいてTALENによって媒介されるゲノム編集の実現可能性を証明し、他のヌクレアーゼに基づいたゲノム編集に有用な情報を提供する。	[Li T et al.] Department of Genetics, Development and Cell Biology, Iowa State University, Ames 米国

表 4 つづき

28	植物	ジャガイモ	TALEN, CRISPR/Cas9	ALS1	Front. Plant. Sci.	Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Using Sequence-Specific Nucleases.	2016	7, 1045	相同組換え (HR) による遺伝子ターゲティングは理解しにくい、DNA修復のための強力な方法かもしれない。遺伝子ターゲティングに関連した障壁を克服するために、ジャガイモのacetolactate synthase 1 (ALS1) 遺伝子を標的とする配列特異的なヌクレアーゼ (SSNs) と ALS1 遺伝子座の中に除草剤を阻害するための点突然変異を導入するために設計された修復の鋳型を導入するためにジミニウイルスのレプリコン (GVR) を使った。GVRs を使って得られた形質転換体の植物は、除草剤への感受性が弱くなる表現型を支えることのできる点突然変異を持っていた。一方で、古典的なT-DNAを使って形質転換した植物は検出可能な変異を持っておらず、野生型と同じだった。形質転換した植物の再生は、除草剤への感受性をより大きく低下させた表現型を支える点突然変異の検出を改善した。これらの結果は、植物ゲノム編集のための試薬を導入するためのジミニウイルスの使用の有効性を証明し、栄養繁殖する種における遺伝子ターゲティングのための新しい方法を示した。	[Butler NM et al.] Department of Plant, Soils and Microbial Sciences, Michigan State Univ., East Lansing 米国
29	植物	ダイズ	TALEN	FAD2-1A, FAD2-1B, FAD3A	BMC Plant Biol.	Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil.	2016	16(1), 225.	ダイズ油の中の個々の脂肪酸の量を調節できれば、保存可能期間と炒めるときの安定性を増加させて、栄養的特徴を改善できる可能性がある。ダイズ油は高濃度の多価不飽和リノール酸とリノレン酸を含んでいて、それが酸化的な不安定につながる。この問題は部分的な水素化によって取り組まれてきた。しかし、部分的な水素化はトランス脂肪酸の量を増加させてしまい、それが心臓血管の病気に関連していた。以前に私たちは脂肪酸デサチュラーゼ2-1A (FAD2-1A) と FAD2-1B 遺伝子にノックアウト変異を持つダイズ系統を作成した。そのダイズ系統では一価不飽和オレイン酸 (18:1) の量が上昇してリノール酸 (18:2) とリノレン酸 (18:3) の量が減少した油が得られた。本研究では、リノレン酸の量をさらに低下させるために、FAD2-1A と FAD2-1B の中の変異に脂肪酸デサチュラーゼ3A (FAD3A) の変異を積み重ねた。fad2-1a fad2-1b fad3a ダイズ植物へTALENを直接導入することによってFAD3Aの中に変異を導入した。fad2-1a fad2-1b fad3a ダイズの油はfad2-1a fad2-1b ダイズと比較すると、リノレン酸の濃度が有意に低かった (4.7%に対して2.5%)。さらに、油はリノール酸の量が有意に低く (5.1%に対して2.7%)、オレイン酸の量は有意に高かった (77.5%に対して82.5%)。外来遺伝子を含まないfad2-1a fad2-1b fad3a ダイズ系統が同定された。本方法はダイズにおいて性質を積み重ねるために配列に特異的なヌクレアーゼを使うための効率的な方法を提供する。得られた生産品は80%以上のオレイン酸と5%以下のリノール酸とリノレン酸から構成される。	[Demorest ZL et al.] Calyxt, Inc., New Brighton 米国
30	植物	コメ	CRISPR/Cas9	QTL遺伝子群	J. Integr. Plant Biol.	QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties.	2016	Sep 15, doi: 10.1111/jipb.12501. [Epub ahead of print]	粒子の収量は穀物において遺伝的改良をするためのもっとも重要で複雑な性質である。それは量の性質の遺伝子座 (quantitative trait loci, QTLs) として知られる多くの遺伝子によって制御されていることが知られている。過去10年で穀物において収量に貢献している多くのQTLsが同定された。しかし、これらのQTLsは異なる遺伝的背景において同じ収量をもたらすかは不明である。本研究では私たちは5つの広く栽培されているコメの品種においてCRISPR/Cas9によってQTLを編集した。そして、同じQTLが異なる遺伝的背景において粒子の収量に対して多様な、ときには逆の効果を与えることを示した。	[Shen L et al.] Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 中国
31	植物	コメ	CRISPR/Cas9	OsEPSPS	Nat. Plants.	Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9.	2016	Sep 12, doi: 10.1038/nplants.2016.139.	植物のゲノムの特定の遺伝子座において、遺伝子の断片を置換することと遺伝子の挿入を行なうことはとても難しい。本研究ではNHX経路とCRISPR/Cas9システムを使って変異を作る効率の良いイントロンによって媒介される部位特異的な遺伝子の置換と挿入の方法を報告する。近接するイントロンを標的とする一対のsgRNAと、そのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って、コメの内在性遺伝子5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 遺伝子において2%の頻度で遺伝子置換を達成した。1つのイントロンを標的とした1つのsgRNAとそのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って2.2%の頻度でターゲティングによる遺伝子の挿入も行った。意図した置換を持つOsEPSPS遺伝子を含むコメの植物はグリホサートに耐性だった。さらに、部位特異的な遺伝子の置換と挿入は正確に次世代へ伝達された。これらの新しく開発された方法は、コメと他の植物においてターゲティングによる遺伝子の断片の置換と外来DNA配列を挿入するために一般的に使える。	[Jun L et al.] State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 中国
32	植物	マッシュルーム	CRISPR/Cas9	polyphenol oxidase	Nature	Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation.	2016	532 (7599) 293	マッシュルームの6つあるpolyphenol oxidase遺伝子の1つに数塩基の欠失を起こさせた。酵素活性が30%減少した。マッシュルームが茶色くなるのが遅くなり、保存可能期間が長くなる。CRISPR/Cas9を利用したケースで米国の規制から外れる結論になった最初の例。米国はGMOを規制するための規則を改革している。	[Waltz E] Freelance writer based in New York 米国
33	植物	ダンカングレープフルーツ	CRISPR/Cas9	T1CsLOBP遺伝子のプロモーター	Plant Biotechnol. J.	Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccApthA4:dCsLOB1.3 infection.	2016	14, 1291-1301	Xanthomonas citri 亜種 citri (Xcc) が引き起こすかんきつ類潰瘍病は大部分の商業的なかんきつ類の栽培品種に対して深刻な病気であり、世界的に大きな経済的な被害をもたらしている。潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作ることは、かんきつ類潰瘍病の効率的で持続的な解決策を提供するだろう。本研究では、CsLOB1 (Citrus sinensis Lateral Organ Boundaries) 遺伝子のCsLOB1プロモーター (EBE _{PthA4} -CsLOBP) の中のPthA4エフェクター結合成分 (EBEs) を修飾することによって潰瘍病に耐性なグレープフルーツを作ることにおける進歩を報告する。CsLOB1はかんきつ類潰瘍病によって影響を受けやすい遺伝子であり、病原因子PthA4によって誘導される。PthA4はCsLOB1遺伝子の発現を誘導するためにEBE _{PthA4} -CsLOBPへ結合する。ダンカングレープフルーツにはCsLOB1の中に2つの対立遺伝子タイプ、Iがある。本研究では、ダンカングレープフルーツの上胚軸の形質転換によってタイプI CsLOB1プロモーター (T1 CsLOBP) のPthA4EBEsを破壊するためにバイナリーベクターを設計した。EBE _{PthA4} -T1 CsLOBPの標的部位に修飾を持つ4つのトランスジェニックダンカン植物が作られた。タイプI CsLOB1プロモーターについては、変異の率は15.63% (#D13)、14.29% (#D17)、54.54% (#D18) と81.25% (#D22) だった。野生型のXccの存在下ではトランスジェニックダンカングレープフルーツは野生型と同じように潰瘍病の症状が現れた。人工的に設計したgTALE dCsLOB1.3は特異的にタイプI CsLOBPを認識して、変異型のタイプI CsLOBPまたはタイプII CsLOBPを認識しない。これをダンカンの形質転換体に感染させるために開発した。結果はXccApthA4:dCsLOB1.3の存在下で#D18は弱い潰瘍病の症状を示し、#D22は目に見える潰瘍病の症状はなかった。PthA4による影響を受けやすい遺伝子CsLOB1の1つの対立遺伝子の活性化はかんきつ類潰瘍病の誘導に十分であり、かんきつ類潰瘍病に耐性な植物を作るためにはCsLOB1の両方の対立遺伝子のプロモーターの変異がたぶん必要であることを私たちのデータは示唆する。本研究は、将来Cas9/sgRNAによって潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作るための基礎となるだろう。	[Jia H et al.] Citrus Research and Education Center, Department of Microbiology and Cell Science, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida, Lake Alfred 米国

表 5

文献ID	特記事項	植物、動物	生物種	標的遺伝子	indelのパターン	標的部位 (エクソン?)	フレームシフトしたペプチドの性質について論文での記載	フレームシフト後の配列の性質	電気泳動などの解析	オミックスなどの解析
1	点突然変異、該当せず							フレームシフトは起きない		
2	論文中で遺伝子修飾していない、割愛									
3	中国特許 割愛									
4		動物	ブタ	ミオスタチン	-10, -3.4 kb, -3.6 kb, -7 kb, +2, +5	第2, 3エクソン、イントロン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
5	中国語雑誌 割愛	動物								
6		動物	ブタ	ミオスタチン	配列情報なし					
7	国際特許 割愛									
8		動物	ブタ	不明						
9	中国特許 割愛									
10	中国特許 割愛									
11	中国特許 割愛									
12	中国特許 割愛									
13		動物	ブタ	ミオスタチン	-6, -17, +1	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
14		動物	ウシ	PRNP	大小のindelあり、EGFPを挿入	第3エクソン	なし	EGFPはアレルゲンとホモロジーなし。ウシPRNPは小麦グルテニン、ウシコラーゲンα-2(I)鎖前駆体と元々ホモロジーあり。PRNPの第1, 2エクソンは発現する?もし、発現して、アップレギュレーションされれば、問題あり。		
15	プロモーターの修飾 割愛							タンパク質の配列に変化なし	なし	なし
16		動物	ニワトリ	オボムコイド	-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -12, -19, -21, -22, -31		なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
17	細胞の実験 割愛									
18		動物	ヤギ	β-ラクトグロブリン	ヒトα-lactalbuminを挿入		なし	ヤギβ-ラクトグロブリン、ヒトα-lactalbuminはウシの物とホモロジーがある。ウシの物はアレルゲンである。β-ラクトグロブリンについてはアレルゲンとして論文で言及があって問題視している。β-ラクトグロブリン遺伝子の5'末端は残らない。β-ラクトグロブリン遺伝子のエクソン2-7は残るが、発現しないことを確認している?もし、発現すれば、問題かも。	なし	なし
19	中国特許 割愛									
20		動物	ヤギ	β-ラクトグロブリン	BLG ^{neo} : -20, neo遺伝子を挿入		なし	β-lactamase (neo) はアレルゲンとホモロジーなし。	なし	なし
					BLG ^{neo} : 開始コドンを含む80bpを puroと置換			β-ラクトグロブリンの5'末端の配列は残らない。Puromycin resistance protein はアレルゲンとホモロジーなし。	なし	なし
21		動物	ヤギ	ミオスタチン	-3, -13	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
22	中国語雑誌 割愛									
23		動物	ヤギ	ミオスタチン	-1, -3, +1	第3エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
24		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-95, -113	第3エクソン	なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
25		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-2, -3, -6, -7, +3	第2エクソン	なし	データベースの配列と一致しない。解析できない。	なし	なし
26		動物	ヒツジ	ミオスタチン	-3, -4	第1エクソン	なし	アレルゲンとホモロジーなし	なし	なし
27	中国特許 割愛									
28	中国特許 割愛									

フレームシフトを起こしたペプチドを生産する動物の調査
文献IDは、NBTを利用して作成された遺伝子組換え動物（2016年、食用）の表の文献IDに対応する。