

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）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書

ゲノム編集と合成生物学に関する情報収集、ケーススタディー

研究分担者 近藤 一成 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：

ゲノム編集技術や合成生物学を利用した農作物の開発研究が活発で、申請直近と言われている。一方で、規制上の取扱いや安全性の確認方法などについては早急に対応しなければならない状況である。ゲノム編集技術を用いて作られた食品（ゲノム編集食品）の食品衛生法上の取扱いは厚労省で議論されているところである。ゲノム編集食品の安全性を確認するためには既存の分析・解析手法で対応できない点もあることから、新たな手法の開発検討を開始した。それに先立ち本研究では、上記検討に必要なため、ゲノム編集技術及び合成生物学を利用した食品・添加物についてデータベース等を用いて情報収集し、それをもとに想定されるモデル生物を設定したケーススタディーを行った。また、タンパクアレルギー性とも関連する、消化液、特に胃液でのタンパク消化性についてヒトの消化管の状態に合わせた複数の反応条件で検討して、タンパク消化性の変化を比較解析した。

その結果、ゲノム編集食品開発の多くは中国からで、生物種もイネ、コムギからオレンジ、メロンまで多岐にわたること、ゲノム編集技術も DNA2 本鎖切断するものや切断せずに塩基置換するものや標的がいくつかから多数、鑄型を用いるかどうか、など多様な方式があり、それぞれ個別に安全性確認で重要な点や考慮する点が異なる場合があること、胃液でのタンパク消化性は pH 条件で大きく変化し、これまで易消化性と考えられているタンパクも十分消化されない可能性があること、が判明した。

研究協力者 中島 治 （国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

ゲノム編集技術を利用した作物（ゲノム編集作物）から作られる新たな食品の研究開発が国内外で活発に行なわれている。ゲノム編集作物では、従来の遺伝子組換え作物のような外来遺伝子を導入することはなく、内在性遺伝子の配列を数塩基欠失により機能欠失させて新たな形質（もち性向上、筋肉量増加、GABA 量増加など）を付与できる。しかしながら、最終的に外来遺伝子が存在しないゲノム編集作物は、規制上（食品衛生方法上）どう扱われるか、また、ゲノム編集食品の安全性を確認するために新たに必要とされる分析手法は何か、は十分に議論されていない。そこで、本研究ではゲノム編集作物の開発状況の情報収集を PubMed、Scifinder などデータベースを用いて行い、その結果をもとに可能なゲノム編集生物を設定したケーススタディーを実施して、安全性を確認するときに必要な項目や課題、問題点を抽出す

ることによって、実際に申請がされたときに対応可能になる。ケーススタディーによって、実際のモデル植物・動物を作製することなく多くの事例を解析可能となる。また、アレルギー性とも関連するタンパク分解性試験について、EU ではヒトの実際に合わせた細かい条件での検討が推奨されているため、国内においてもその影響を考える必要が生じている。そのため、人工胃液による分解性試験条件 pH、酵素濃度について細かく設定して検討して分解性に与える影響を調査した。

B. 研究方法

1. 文献調査

データベースとして PubMed、SciFinder、および、Google scholar を主に用いて 2017 年～2018 年前半について検索した。検索キーワードは、下記の A 群と B 群から 1 つずつ選んだ物を組み合わせて利用した。

A 群 : zinc finger nuclease, ZFN, TALEN (transcription activator-like effector nuclease), TAL effector, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), Cas9, Cpf1

B 群 : pig, cow, chicken, fish, sheep, goat, plant

検索した論文や特許から、種名、用いた技術、ターゲット遺伝子、要旨、開発国などの情報をまとめた表を作成した。

2. ケーススタディー

1の文献調査した結果から、想定されるゲノム編集食品の代表的なパターンを設定した。それぞれのパターンについて、特に確認すべき項目や考慮すべき点などを抽出した。

3. 人工胃液によるタンパク分解性試験

食品中のモデルタンパクとして、易分解性のウシアルブミン (BSA) とベータカゼインと、難分解性のオボムコイドを用いた。

分解性を正確に評価するために、市販購入したウシ血清アルブミン (BSA)、オボムコイド (OVM) をそれぞれ MonoQ (陰イオン交換)、Superdex75 10/300GL (ゲルろか) を用いて精製してゲル状でシングルバンドになるよう純度を高めた。一方で、ベータカゼインは溶解度が低く取り扱いが難しいこと、市販品ではほぼシングルバンドのため更なる精製を行わず人工胃液中での分解性試験に供した。分解性試験の条件は以下の通りである。pH は 2.0、3.3、5.5 の 3 点とした。分解酵素であるペプシン濃度は高濃度の条件として、ペプシン : テストタンパク質 = 10 U : 1 mg とした。ペプシンの低濃度の条件として 1,000 U/mL とした。インキュベーションの条件は 37 度で、1、2、5、10、30、60、120 分とした。

C. 研究結果および考察

1. 文献調査

ゲノム編集技術を利用した遺伝子組換え動物では、全部で 39 報が該当した。内訳は、食用 20 報、研究用 15 報、医薬品製造用 1 報、繊維用 2 報である (Table 1)。開発国別に見ると、中国から 30 報の報告があり、圧倒的に中国からの報告が多かった。食用の遺伝子組換え動物については中国から 15 報の報告があった。技術的に見ると、TALEN を

使用した報告が 2 報、CRISPR/Cas9 を利用した報告が 37 報あり、圧倒的に CRISPR/Cas9 が利用されることが多かった。なお、ZFN を利用した報告はなかった。生物種はほとんどがブタであり、目的形質はミオスタチン遺伝子欠失による筋肉量増大とブタ呼吸障害症候群ウイルス耐性であった。研究段階として、ヒツジでもミオスタチン遺伝子改変が報告されている。

ゲノム編集を使って作られた遺伝子組換え植物では、全部で 122 報が該当した (Table 2)。内訳は、食用 42 報、研究用 76 報、医薬品製造用 3 報、工業用 1 報である。開発国別に見ると、中国から 65 報の報告と非常に多かった。特に食用については中国の報告が 29 報あり、全体の 69% を占めていた。中国に次いで米国から 24 報の報告があった。また、ゲノム編集を使って作られた遺伝子組換え植物の報告の中で特許が 48 件と多く、特に食用では特許が 26 件あった。技術的に見ると、TALEN、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1 を使用した報告がそれぞれ 11 報、104 報、9 報あった。CRISPR/Cas9 が利用されることが圧倒的に多く、新しい点では CRISPR/Cpf1 が複数の報告で使用されていた。また、CRISPR/Cas9 のオルソログを利用した報告もあった。なお、ZFN を利用した報告はなかった。目的とする形質では、ダイズ中のリノレン酸合成抑制による酸化安定性向上、オレンジのかんきつ類潰瘍病耐性、イネで高収量、キュウリのウイルス抵抗性、トマトの長期保存性、コムギのうどんこ病耐性などである。

2. ケーススタディー

ケーススタディーは、収集した文献・特許情報を参考にして、想定される代表的な 12 ケースについて事例を解析して、特に確認すべき点や問題点を抽出した。

3. 人工胃液によるタンパク分解性試験

1) BSA (ウシアルブミン) は、分解しやすいタンパクの例として用いる。人工胃液による分解性試験は、pH 2.0 & 高ペプシン濃度、pH 3.3 & 低ペプシン濃度、pH 5.5 & 低ペプシン濃度の 3 条件で調べた。最初の 2 つの条件で電気泳動のパターンが大きく変わった (Fig. 1 上)。そこで、この 2 つの条件について pH またはペプシン濃度だけを変えた 4 通りの条件で分解性を調べると、ペプシン濃度よりも pH の変化の方がタンパク分解性に与える影響

が大きいことが明らかになった (Fig. 1 下)。

2) OVM (オボムコイド) は分解しにくいタンパクの例として用いる。分解しやすいタンパクの例として用いる。分解性試験は、BSA の Fig. 1 のときと同じく 3 条件で OVM の分解性を調べた。最初の 2 つの条件で電気泳動のパターンが大きく変わった (Fig. 2 上)。そこで、この 2 つの条件について pH またはペプシン濃度だけを変えた 4 通りの条件で分解性を調べると、ペプシン濃度よりも pH の方が分解性に与える影響が大きいことが明らかになった (Fig. 2 下)。OVM についても BSA の分解性と同様な結果が得られた。

3) ベータカゼインは分解しやすいタンパクの例として用いる。分解性試験は、pH 2.0&高ペプシン濃度、pH 3.3&低ペプシン濃度、pH 5.5&低ペプシン濃度の 3 つの条件で試した。一番弱い条件である pH 5.5、低ペプシン濃度の条件でさえベータカゼインは 1 分以内に分解した。ベータカゼインは BSA や OVM よりも分解されやすいことが明らかになった (Fig. 3)。

いずれのタンパクも条件が異なると分解性 (時間、分解度) が大きく異なることが示されたことから考えると、ヒトの胃の状態で食品中のタンパク分解性は影響を受けて、本来分解されるべきタンパクも、部分的にしか分解されず、抗原として認識されうる長さの断片が残存している可能性があると考えられた

D. 結論

ゲノム編集技術を利用した植物、動物の研究開発は、植物で盛んで様々な形質発現に利用されている。生物種もトウモロコシや大豆、イネからオレンジやメロンなど柑橘類にまで利用され始めている。このことから、ゲノム編集食品の法律上の取扱いや食品としての安全性確認方法の確立が一層重要になっている。

ゲノム編集技術や合成生物学利用食品の規制上の取扱いや安全性確認に必要な項目、問題点を、ケーススタディーで検討して、食品衛生法上の扱いが難しいもの、安全性確認において既存の手法だけで十分安全性が確保されるのか明確でないケースも出現すると考えられた。

人工胃液による消化性は、その条件により胃内

タンパク分解性は大きく変化する。これまで易分解性であったタンパクも条件により部分的にしか分解されないことが示唆された。今後、タンパク分解性とタンパク質のアレルゲン性を考えるうえで重要であると考えられた。

E. 業績

1. 論文発表

1) Takabatake, R., Kagiya, Y., Minegishi, Y., Futo, S., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Mano, J., Kitta, K. Rapid screening detection of genetically modified crops by loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 7839-7845, 2018.

2) Soga, K., Nakamura, K., Kishine, M., Takashima, Y., Miyahara, T., Kimata, S., Mano, J., Takabatake, R., Ozeki, Y., Kitta, K., Kondo, K. Studies on the detection of maize genomic DNAs in cornflakes using real-time PCR. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, 136, 31-39, 2018

邦文 (リアルタイム PCR を用いたコーンフレーク中のトウモロコシゲノム DNA 検出について: 曾我慶介、中村公亮、岸根雅宏、高嶋康晴、宮原平、木俣真弥、真野潤一、高島令王奈、小関良宏、橘田和美、近藤一成)

3) Nakanishi, K., Fujii, U., Nakamura, K., Ohtsuki, T., Kimata, S., Soga, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Ikeda, M., 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*, 25, 77-85, 2018

4) Nakamura, K., Ishigaki, T., Kobayashi, T., Kimata, S., 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*, 71, 8-16, 2018

- 5) Kishine, M., Noguchi, A., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kitta, K. Detection of DNA in highly processed foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 59, 151-156, 2018

邦文（高度加工食品からの原材料農産物 DNA 検出の検討：岸根雅宏、野口秋雄、真野潤一、高畠令王奈、中村公亮、近藤一成、橘田和美）

2. 学会発表

- 1) Kondo, K., Kato, R., Sakata, K., Nakamura, K. Mitochondria-resident non-releasable AIF mutant may regulate gene expressions related to cell differentiation and proliferation, 2018 ASCB EMBO Meeting, San Diego, CA, USA, 2018年12月
- 2) Nakamura, K., Kimata, S., Soga, K., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kondo, K. Effect of food additives in processed foods on endogenous gene detection, 132nd AOAC Annual Meeting & Exposition, Toronto, Canada, 2018年8月
- 3) 中村公亮、木俣真弥、秋本智、志波優、曾我慶介、田中さやか、権藤崇裕、明石良、近藤一成：SITE-seq法とオンラインツールを用いたゲノム編集におけるオフターゲット効果の解析結果の比較と評価、日本薬学会 第139年会、千葉、2019年3月
- 4) 曾我慶介、中村公亮、石垣拓実、木俣真弥、大森清美、岸根雅宏、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、名古屋博之、近藤一成：未承認遺伝子組換えサク検知法の開発、日本薬学会 第139年会、千葉、2019年3月

- 5) 木俣真弥、中村公亮、石垣拓実、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成：遺伝子組換えバレイショ Y9 系統と X17 系統を対象とした検知試験法の開発、第54回全国衛生化学技術協議会年会、神奈川、2018年11月

- 6) 曾我慶介、中村公亮、岸根雅宏、高嶋康晴、宮原平、木俣真弥、真野潤一、高畠令王奈、小関良宏、橘田和美、近藤一成：リアルタイムPCRを用いたコーンフレーク中のトウモロコシゲノムDNA検出法の検討、第54回全国衛生化学技術協議会年会、神奈川、2018年11月

- 7) 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迅速判別法の構築-ツキヨタケとクサウラベニタケの同時検出に関する検討-、日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会、東京、2018年5月

- 8) 木俣真弥、中村公亮、石垣拓実、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成：ダイズにおけるゲノムDNAの位置に依存したDNA分解度の違い、日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会、東京、2018年5月

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1 ゲノム編集技術を利用した遺伝子組換え動物の文献調査

1-1 食用

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	TALEN	ミオスタチン	RSC Advances	Generation of cloned adult muscular pigs with myostatin gene mutation by genetic engineering	2017	7 (21): 12541-12549	ブタ胎児線維芽細胞において TALEN を利用してミオスタチン遺伝子をダブルノックアウトした。1つの対立遺伝子に2 bp の欠失、もう1つの対立遺伝子に4 bp の欠失ができた。体細胞核移植を行なって、18匹の子ブタが生まれて、正常に発育した。これらは肉が増えている。これらのブタは肉の生産の増加のために、人の疾病のモデルとして利用できるかもしれない。	[Kang JD et al.] Jilin Provincial Yanbian Univ. Yanji 中国
2	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	マウス adiponectin-uncoupling protein 1 (UCP1)	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity	2017	114(45), E9474-E9482	マウス adiponectin-uncoupling protein 1 (UCP1) 遺伝子をブタ内在性 UCP1 遺伝子座にノックインした。得られたブタは寒冷な状況で体温を維持する能力が増強していた。また、白色脂肪組織において異所的に UCP1 を発現させると、脂肪の沈着が4.89%と大きく減少して、赤身肉の割合が増えた。これは脂肪分解の上昇に関連していることが示された。このブタは寒冷な気候への適応によるブタの幸福の改善、経済的な損失の減少、赤身肉の生産の増強の観点から有益である。	[Zheng Q et al.] State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology Chinese Academy of Sciences Beijing 中国
3	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Transgenic Research	CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs	2017	26(6), 799-805	中国原産の Erhualian ブタにおいてミオスタチンをノックアウトした。ランドレース種においてミオスタチンをノックアウトすると、しばしば健康の問題が起きてすぐ死ぬ。一方で、ミオスタチンをダブルノックアウトした Erhualian ブタは生きていける。しかも、このブタは部分的に筋肉が2倍になる表現型を示した。Erhualian ブタのゲノム編集は成長の改善と絶滅寸前の遺伝的資源の保護という観点からとも有益である。	[Wang K et al.] Jilin Univ. Jilin Province 中国
4	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	CD163	Faming Zhuanli Shenqing	Targeting sgRNA for porcine CD163 gene editing, modified vector and preparation method and application thereof in preparation of anti-porcine reproductive and respiratory syndrome pig	2017	CN 107177595 A 20170919.	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)の受容体である CD163 を遺伝子編集するための sgRNA とベクターを作成した。得られたブタは PRRSV に対して強い耐性を示した。	[Zhang K et al.] Zhejiang Univ. 中国
5	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	CD163 遺伝子第7エクソン	PLoS Pathogens	Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function	2017	13(2), e1006206/1-e1006206/28.	CD163 は繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) の融合受容体として記載されており、スカベンジャー受容体システインリッチドメイン5 (SRCR5) は in vitro でウイルスと相互作用する部位であることが示されている。ブタ受精卵に CRISPR/Cas9 を導入して、SRCR5 をコードする CD163 遺伝子第7エクソンを欠失させた。肺胞のマクロファージと末梢血単球に PRRSV を感染させたところ、完全に耐性になっていた。共焦点顕微鏡で観察すると、CD163 から SRCR5 を欠失させたマクロファージには複製の構造がなく、遺伝子発現の前に感染を阻害していることを示す。	[Burkard C et al.] The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies Univ. of Edinburgh Easter Bush, Midlothian イギリス
6	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	自然抵抗関連マクロファージタンパク質1 (NRAMP1)	Genome Biology	Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects	2017	18, 13/1-13/15.	1つの Cas9 nickase (Cas9n) を使ってウシの選択した遺伝子座に遺伝子を初めて挿入した。ウシ胎児線維芽細胞において dCas9 の主要な結合部位を同定した。1つの Cas9n が誘導する一本鎖切断はオフターゲット切断を減らしながら自然抵抗関連マクロファージタンパク質1 (NRAMP1) 遺伝子の挿入を刺激できることを示した。体細胞核移植によって結核に対する耐性が増強したトランスジェニックウシを得た。	[Gao Y et al.] Northwest A&F Univ. Yangling 中国
7	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	腫瘍ウイルス遺伝子座 B (tvb)	Veterinary Research	Acquisition of resistance to avian leukosis virus subgroup B through mutations on tvb cysteine-rich domains in DF-1 chicken fibroblasts.	2017	48, 48/1-48/10.	トリ白血ウイルス(ALV)は鳥に腫瘍を起こすレトロウイルスであり、鳥の群れの中で広がるので経済的な損害が大きい。DF-1 ニワトリ線維芽細胞において ALV サブグループ B に対する耐性の獲得を試みた。ALV サブグループ B が宿主細胞に入るときに必要な TVB 受容体をコードする腫瘍ウイルス遺伝子座 B (tvb) 遺伝子に CRISPR/Cas9 システムを使って変異を導入した。Tvb 遺伝子の Cys の多いドメインにストップコドンを作ると、ALV サブグループ B に耐性になった。CRISPR/Cas9 システムは鳥の細胞で使えて、ウイルス感染に耐性なニワトリ細胞を作れる。	[Lee H et al.] Seoul National Univ. Seoul 韓国
8	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	Na ⁺ /H ⁺ 交換1 (chNHE1)	Developmental & Comparative Immunology	Precise gene editing of chicken Na ⁺ /H ⁺ exchange type 1 (chNHE1) confers resistance to avian leukosis virus subgroup J (ALV-J).	2017	340-349.	トリ白血ウイルスサブグループ J (ALV-J) は経済的に大きな損害をもたらしてきた。ALV-J 受容体であるニワトリ Na ⁺ /H ⁺ 交換1 (chNHE1) 遺伝子に CRISPR/Cas9 システムを使ってニワトリ細胞で変異を導入した。ORF の途中にストップコドンを導入すると、このウイルスに対して完全に耐性になった。また、Trp38 を含む領域を欠失させると、このウイルスにかなり耐性になった。ターゲティングによる変異導入は疾病に耐性なニワトリ細胞を開発するために利用できそうだ。	[Lee H et al.] Seoul National Univ. Seoul 韓国

(続き)

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
9	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Asian-Australian journal of animal sciences	Myostatin gene knockout mediated by Cas9-D10A nickase in chicken DF1 cells without off-target effect	2017	30(5), 743-748.	ニワトリのミオスタチン遺伝子に対して Cas9-D10A nickase を使って欠失と変異の導入を行なった。正常の細胞とノックアウトした細胞の間に表現型の明らかな違いはなかった。ノックアウトした細胞ではウエスタンブロッディングによってミオスタチンは検出されなかった。予想される6つのオフターゲット部位では非特異的な変異は起きていなかった。	[Lee JH et al.] Seoul National Univ. Pyeongchang 韓国
10	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン、線維芽細胞増殖因子5(FGF5)	Faming Zhuanli Shengqing	Method for simultaneously knocking out goat MSTN gene and FGF5 gene by CRISPR/Cas9 system	2017	CN 1069 57857 A 2017071 8.	本発明は、ヤギのミオスタチンと線維芽細胞増殖因子5をCRISPR/Cas9システムを使って同時にノックアウトする方法を提供する。これら2つの遺伝子から標的配列を選んでsgRNAを設計した。Cas9 mRNAとsgRNAをインビトロ転写によって調製する。これらを使ってトランスジェニックヤギが作れる。	[Wang X et al.] Northwest A & F Univ. 中国
11	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	β -ラクトグロブリン (BLG)	PLoS one	Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9	2017	12(10), e018605 6.	ヤギのミルクは牛乳の代用品と考えられるが、 β -ラクトグロブリン (BLG) などのアレルゲンを含む。CRISPR/Cas9システムを利用してヤギのBLGをノックアウトした。まず、Cas9 mRNAとsgRNAをヤギ線維芽細胞に注入してsgRNAを最適化した。次に、Cas9 mRNAとsgRNAを1細胞のヤギの胚へ注入してBLGをノックアウトしたヤギを作った。BLGをノックアウトしたヤギの乳腺ではBLGの発現は大きく低下した。また、ミルクにはBLGタンパク質は検出されなかった。	[Zhou W et al.] Nanjing Agricultural Univ. Nanjing 中国
12	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	β -ラクトグロブリン (BLG)、ヒトラクトフェリン	Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology	RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin	2017	33(8), 1224-1234.	ヤギの耳の線維芽細胞においてCRISPR-Cas9システムを使って β -ラクトグロブリン遺伝子座にヒトラクトフェリン遺伝子をノックインした。さらに、RAD51 刺激性化合物 (RS-1) の相同組換えへの効果を調べた。RS-1には最適濃度があり、その条件ではノックインの効率を改善する。	[Zhou W et al.] Nanjing Agricultural Univ. Nanjing 中国
13	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン、アグーチタンパク質 (ASIP)、ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2)	Bio-Protocol	Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 system in sheep	2017	7(13), e2385/1-e2385/13.	ヒツジにおいて複数の遺伝子を修飾するためにCRISPR/Cas9システムを使った。1細胞の胚へCas9 mRNAと3つの遺伝子 (ミオスタチン、アグーチタンパク質 (ASIP)、ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2)) を標的とするRNAガイドを注入してGMヒツジを作るプロトコールを提供する。CRISPR/Cas9法は経済的に重要な性質に関わっている複数の遺伝子を同時に標的として家畜を改良するための強力な道具になりうる。	[Niu Y et al.] Northwest A&F Univ. Yangling 中国
14	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン、アグーチタンパク質 (ASIP)、ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2)	Faming Zhuanli Shengqing	Method for jointly knocking out sheep genes MSTN, ASIP and BCO2 by CRISPR/Cas9 system	2017	CN 1069 57858 A 2017071 8.	本発明はヒツジにおいてCRISPR/Cas9システムを使ってミオスタチン、アグーチタンパク質 (ASIP)、ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2) 遺伝子を同時にノックアウトする方法を提供する。これらの遺伝子の配列からsgRNAの認識部位を選ぶ。Cas9とsgRNAをインビトロ転写して、それらのmRNAを受精卵に注入してトランスジェニックヒツジを作ることができる。	[Chen Y et al.] Northwest A & F Univ. Yangling 中国
15	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	メラトニン鍵合成酵素 AANAT, HIOMT	Faming Zhuanli Shengqing	Method for improving melatonin content in milk through mammary gland bioreactor	2017	CN 1069 47779 A 2017071 4.	本発明は、乳腺のバイオリアクターを利用してミルク中でメラトニンの量を増やす方法を提供する。メラトニン鍵合成酵素 AANAT, HIOMT をカゼインプロモーターで制御して、CRISPR/Cas9システムを利用してヒツジの胚のゲノムに組み込む。トランスジェニックヒツジの乳腺のバイオリアクターでは組換えメラトニン合成酵素の発現は強く、ミルクにおけるメラトニンの量は増える。	[Liu G et al.] China Agricultural Univ. 中国
16	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	AANAT, ASMT	Journal of Pineal Research	An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep	2017	63(1), n/a.	メラトニンは強い抗酸化剤として栄養学的にも医薬品としても重要である。本研究では、ヒツジのバイオリアクターを作ってメラトニンに富んだミルクを生産させた。Cas9 mRNA, sgRNA, AANATとASMT遺伝子を含んだベクターをリニアーにした物を前核の胚へ一緒に注入した。それを卵管へ移してトランスジェニックヒツジを得た。AANAT, ASMT 遺伝子の1つまたは2つを含むトランスジェニックヒツジは野生型よりもメラトニン含量の高いミルクを生産した。	[Ma T et al.] China Agricultural Univ. Beijing 中国
17	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2)	Animal Genetics	Biallelic β -carotene oxygenase 2 knockout results in yellow fat in sheep via CRISPR/Cas9	2017	48(2), 242-244.	ベータカロテンオキシゲナーゼ2 (BCO2) はベータカロテンの代謝の進行の鍵酵素であり、ヒツジの黄色い脂肪組織の色と関連がある。CRISPR/Cas9システムの成分を受精卵へ注入してBCO2遺伝子を破壊したヒツジを作成した。BCO2遺伝子の2つの対立遺伝子が修飾されたヒツジは1つの対立遺伝子が修飾されたヒツジや野生型よりも黄色い脂肪になった。CRISPR/Cas9システムは遺伝子の機能を評価したり、家畜において経済的に重要な性質について好ましい表現型を得るために有効である。	[Niu Y et al.] Northwest A&F Univ. Yangling 中国

(続き)

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
18	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	骨形成タンパク質 15 (BMP15)	Yi Chuan	Improving efficiency on the porcine BMP15 gene mediated by CRISPR/Cas9 by using the RGS surrogate reporter system.	2017	39(1):48-55.	ヒツジの骨形成タンパク質 15 (BMP15) は排卵速度と多産の性質を制御する主要な遺伝子として同定されている。ブタの BMP15 遺伝子には天然に存在する同様な変異が見出されていない。そこで、ヒツジの多産の性質を持つ変異を CRISPR/Cas9 システムを使ってブタの BMP15 遺伝子に導入した。	[Wang M et al.] Sun Yat-sen Univ., Guangzhou 中国
19	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	アミノペプチダーゼ N (APN)	Virus Res.	Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry.	2017	235:6-13	ブタ流行性下痢ウイルス (PEDV) は新たに発生した病原性のコロナウイルスであり、ブタに関連した産業では大きな問題である。他のアルファコロナウイルスであるブタ伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) ではアミノペプチダーゼ N (APN) が受容体であると報告されていたが、PEDV の場合は違うらしいという研究結果が得られた。これを確実にするために、PEDV に感染するブタとヒトの細胞において CRISPR/Cas9 システムを使って APN の発現をノックアウトした。これらの細胞には TGEV-S1 と HCoV-229E-S1 は感染しなかった。しかし、PEDV の感染には影響せず、APN は PEDV の侵入には不可欠ではないことが明らかになった。	[Li W et al.] Utrecht Univ., Utrecht 他 オランダ、中国
20	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	腫瘍ウイルス遺伝子座 B (tvb)、Na+/H+交換 1 (chNHE1)	Theses, College of Agricultural and Life Sciences	Studies on Genome Editing in Avian Species for Acquiring Resistances Against to Avian Leukosis Virus and Site-Specific Recombination	2017		トリ白血ウイルス (ALV) はレトロウイルスでニワトリに腫瘍を起こし、大きな経済的な損失を引き起こす。DF-1 ニワトリ線維芽細胞において ALV サブグループ B に対する獲得免疫を得られるようにした。ALV サブグループ B が宿主細胞へ入るときに不可欠な TVB 受容体をコードする腫瘍ウイルス遺伝子座 B (tvb) 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを使って修飾した。TVB 受容体のシステインに富んだ領域 (CRD) に人工的に未成熟なストップコドンを作ると ALV サブグループ B に対して耐性になった。ALV サブグループ B の侵入には CRD2 のシステイン残基 (C80) が重要であることが明らかになった。次に、ALV サブグループ J が特異的に結合することが知られているニワトリ Na+/H+交換 1 (chNHE1) を修飾した。CRISPR/Cas9 システムを使って chNHE1 受容体の中に人工的に未成熟なストップコドンを作ると、ALV サブグループ J に対して完全に耐性になった。W38 を含む indel 変異が大きな効果を持つ。CRISPR/Cas9 システムを使ってニワトリのウイルスの疾病に耐性な系統を作ることができるかもしれない。	[이홍조] College of Agricultural and Life Sciences 韓国

1-2 研究用

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
21	動物	ブタ	TALEN	pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1)	Oncotarget	Apancreatic pigs cloned using Pdx1-disrupted fibroblasts created via TALEN-mediated mutagenesis	2017	8(70): 115480-115489	PDX1 は膵臓の発生やβ-細胞の分化などで重要な役割を果たす。ブタ胎児線維芽細胞において TALEN を利用して PDX1 をダブルノックアウトしたクローンを得た。体細胞核移植を行なって生まれた子ブタは誕生のときは野生型と表現型において大きな違いがなかった。しかし、重篤な下痢と嘔吐を起こして2日以内に死んだ。この子ブタを解剖すると、膵臓がなかった。	[Kang JD et al.] Yanbian Univ., Yanji 中国、韓国
22	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	PRV のゲノム中の必須遺伝子と非必須遺伝子	Archives of Virology	CRISPR/Cas9-mediated multiple single guide RNAs potentially abrogate pseudorabies virus replication	2017	162(12), 3881-3886	ブタ仮性狂犬病 (PRV) はブタを扱う産業に大きな損失を与えてきた。PRV ゲノム中の必須遺伝子と非必須遺伝子を標的とする 75 個の sgRNA を設計した。これら sgRNA のスクリーニングを行なうと、大部分の物が PRV の複製を大きく阻害した。複数の sgRNA を使って PRV を同時にターゲットングすると、細胞において感染性のウイルスの生産が完全に停止した。CRISPR/Cas9 は将来 PRV に対する新しい治療法になるかもしれない。	[Tang YD et al.] Research Inst. Chinese Academy of Agricultural Sciences Harbin 中国
23	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	MC4R	Faming Zhuanli Shengqing	sgRNA targeting sequence of special targeting pig MC4R gene and its application	2017	CN 107 119053 A 20170 901.	本研究は、ブタ 4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) をノックアウトまたは編集して、その発現を抑制するための sgRNA を提供する。MC4Rトランスジェニックブタを作成するための基礎となる。	[Mou Y et al.] Northeast Agricultural Univ. 中国
24	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao	Generation of porcine Mstn Bi-allelic knock-out cell line using Cre/LoxP and CRISPR genome engineering	2017	33(3), 311-318.	筋肉が2倍になる表現型のメカニズムは不明である。ミオスタチン遺伝子の1つの対立遺伝子に異常のある PK3108 細胞から CRISPR/Cas9 と Cre/LoxP システムを使って2つの対立遺伝子がノックアウトされた細胞系列を作った。	[Qi S et al.] Guizhou Univ. Guiyang 中国

(続き)

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
26	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	4-1BB	Front Immunol.	Improved Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Vaccination with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in 4-1BB Transgenic Pigs.	2017	8: 1846	4-1BB の副刺激を増強することでホストの免疫がウイルス感染に反応するかを決めるために、4-1BB 遺伝子の余分な 1 コピーを CRISPR/Cas9 システムによる相同組換えで Rosa26 遺伝子座に組み込んだトランスジェニックブタを作った。ブタ繁殖・呼吸障害症候群 (PRRSV) に対するトランスジェニックブタの免疫反応は、4-1BB、IL-2、TNF α などの mRNA の発現が上昇していた。この結果は、Th1 分化を促進して、PPRV に特異的な細胞障害性 T 細胞の反応を増強することを示す。この方法は、感染症を制御するワクチンの効力を上昇させる新しい方法である。	[Huang G et al.] China Agricultural Univ., Beijing, 中国
27	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	マウス脱共役タンパク質 1	Faming Zhuanli Shenqing	Cold resistant and lean type transgenic pig and preparation method thereof	2017	CN 1071 8294 A 2017092 2.	マウス脱共役タンパク質 1 遺伝子をブタのゲノムに導入することによってトランスジェニックブタは寒冷に強くなり、脂肪の沈着が減少することで赤身肉の割合を増やせる。1 つの遺伝子を部位特異的に導入することによって 2 つの重要な性質を改良する。	[Zhao J et al.] Chinese Academy of Sciences 中国
28	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	APN	Faming Zhuanli Shenqing	Targeting sgRNA for editing pig APN gene, modification vector and its making method and use.	2017	CN 1070 34218 A 2017081 1.	ブタ APN 遺伝子を標的とした sgRNA とそれらを発現するためのベクターを設計した。このベクターは 2 つの sgRNA、Cas9 nickase、蛍光標識したタンパク質を含む。乳を飲むブタの下痢に耐性を持つブタの育種にこのベクターを使う。	[Zhang K et al.] Zhejiang Univ. 中国
29	動物	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	Faming Zhuanli Shenqing	Editing locus 864-833 of porcine myostatin gene and its application as target for accurate editing of myostatin gene.	2017	CN 1067549 49 A 2017053 1	ミオスタチン遺伝子のエクソン 3 に位置する 864-833 遺伝子座は Cas9 によって編集できる。ここに変異遺伝子や選択マーカーを導入できる。この遺伝子座を編集することによって赤身の肉の割合を増やしたブタを育種したり、ミオスタチンの分子生物学的研究が行なえるかもしれない。	[Bi Y et al.] Hubei Academy of Agricultural Sciences 中国
30	動物	ヒト、動物	CRISPR/Cas9	?	PCT Int. Appl.	Gene editing complexes comprising CRISPR/Cas9 endonucleases encoded by recombinant viral vectors for prevention or treatment of retroviral infections	2017	WO 201 7142835 A1 2017 0824.	潜伏感染したヒトの細胞と動物の疾病モデルからゲノムに組み込まれたレトロウイルスの配列を除去するために、遺伝子編集のための CRISPR/Cas9 複合体を in vivo で送達するための化合物が開発された。この化合物はレトロウイルスの感染の予防と治療に使える。	[Khalili K et al.] Temple Univ. 米国
31	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	自然抵抗関連マクロファージタンパク質 1 (NRAMP1)	Faming Zhuanli Shenqing	Method for preparing transgenic bovine fetal fibroblasts using NRAMP1 site-directed insertion mediated by single Cas9 nickase	2017	CN 1065 91364 A 2017042 6.	ウシ胎児線維芽細胞をドナーベクターと 1 つの CRISPR/Cas9 nickase 発現ベクターで同時にトランスフェクトする。ドナーベクター中の NRAMP1 遺伝子の制御にはその天然のプロモーターを使って食細胞において特異的に発現させる。陽性細胞を得て体細胞核移植を行なう。部位特異的に NRAMP1 遺伝子を挿入したトランスジェニックウシを得る。	[Zhang Y et al.] Northwest A&F Univ. Yangling 中国
32	動物	ウシ	CRISPR/Cas9	インロイシル tRNA 合成酵素	Scientific Reports	Correction of a Disease Mutation using CRISPR/Cas9-assisted Genome Editing in Japanese Black Cattle.	2017	7(1), 17827.	インロイシル tRNA 合成酵素症候群 (IARS) は一塩基置換で起きる日本の黒ウシの劣性の疾病である。ホモ接合性のウシから得た胎児線維芽細胞に CRISPR/Cas9 とドナー DNA を導入した。細胞選抜によって修復された対立遺伝子を含むクローンが得られた。体細胞核移植によって得られた胎児のゲノミック DNA では IARS 変異が正しく修復されており、他に変異はなかった。	[Ikeda M et al.] Inst. of Agrobiological Sciences, Tsukuba 日本
33	動物	ニワトリ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	PloS one	Enhancing Targeted Genomic DNA Editing in Chicken Cells Using the CRISPR/Cas9 System	2017	12(1), e0169768.	ニワトリ DF-1 細胞において CRISPR と酵母 Rad52 (yRad52) を組み合わせてゲノム編集の効率を高めた。この方法で ssODN をドナー DNA としてミオスタチン遺伝子にターゲティングによる置換を行なうと、ヒューロマイシン選抜の後で効率が 36.7% まで上昇した。ニワトリのゲノムへの外来遺伝子の導入の効率は yRad52 を使うことで 3 倍以上に上昇した。この方法は他の生物にも広く応用できるかもしれない。	[Wang L et al.] Shaanxi SCI-TECH Univ., Hanzhong 他 中国
34	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	Toll 様受容体 4 (TLR4)	Faming Zhuanli Shenqing	Goat TLR4 gene knockout vector and its construction method	2017	CN 1067 55097 A 2017053 1.	ヤギ Toll 様受容体 4 (TLR4) をノックアウトするための sgRNA を設計した。sgRNA と Cas9 を発現させるためのベクターを作成した。菌槽上皮細胞において TLR4 遺伝子の欠失が起きた。これはマイコプラズマによる肺炎感染の免疫反応を研究するための基礎となる。	[Hui W et al.] Anhui Academy of Agricultural Sciences 中国
35	動物	ヤギ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン、線維芽細胞増殖因子 5 (FGF5)	PloS one	RNA-seq reveals transcriptome changes in goats following myostatin gene knockout	2017	12(12), e0187966.	CRISPR/Cas9 技術を使って Shaanbei カシミアヤギにおいてミオスタチンをノックアウトした。野生型、線維芽細胞増殖因子 5 (FGF5) ノックアウトヤギ、FGF5 とミオスタチンの両方をノックアウトしたヤギに由来する筋肉のトランスクリプトームプロファイルを比較した。脂肪酸の代謝と不飽和脂肪酸の生合成に関わる遺伝子に大きな変化があり、これらはミオスタチンによって直接制御されているかもしれない。	[Wang L et al.] Northwest A&F Univ. 他 中国

1-3 医薬品製造用

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
30	動物	ヒト、動物	CRISPR/Cas9	?	PCT Int. Appl.	Gene editing complexes comprising CRISPR/Cas9 endonucleases encoded by recombinant viral vectors for prevention or treatment of retroviral infections	2017	WO 2017142835 A1 20170824.	潜伏感染したヒトの細胞と動物の疾病モデルからゲノムに組み込まれたレトロウイルスの配列を除去するために、遺伝子編集のためのCRISPR/Cas9複合体をin vivoで送達するための化合物が開発された。この化合物はレトロウイルスの感染の予防と治療に使える。	[Khalili K et al.] Temple Univ. 米国

1-4 繊維用

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
37	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	線維芽細胞成長因子 (FGF5)	FEBS Journal	CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep	2017	284(17), 2764-2773.	線維芽細胞成長因子5 (FGF5) はヒトと多くの動物で毛の長さを制御している。中国メリノヒツジにおいてCRISPR/Cas9システムを使ってFGF5遺伝子に機能喪失突然変異を作り、羊毛への効果を調べた。1歳のGMヒツジの羊毛のステープルの長さとして伸ばしたときの長さは野生型の物よりも長かった。脂っぽい羊毛の重さはGMヒツジに由来する物の方が野生型の物よりも重かった。CRISPR/Cas9システムによってFGF5活性を喪失させると羊毛の長さや収量を増やせるかもしれない。	[Li WR et al.] Xinjiang Univ. Urumqi 中国
38	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	線維芽細胞成長因子 (FGF5)	Journal of Animal Science	Rapid communication: generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system	2017	95(5), 2019-2024.	線維芽細胞成長因子 (FGF5) は毛のサイクルの成長期の長さを優性に阻害する。本研究では、ヒツジにおいてCRISPR/Cas9システムを使ってFGF5をノックアウトした。FGF5遺伝子に3種類の欠失(5, 13, 33 bp)が起きた。これらに由来するタンパク質は機能を失っていると考えられる。ヘテロ接合性の個体ではFGF5 mRNAの発現量は野生型よりも減少していた。FGF5遺伝子をノックアウトしたヒツジの羊毛は野生型の物よりも有意に長いことが明らかになった。FGF5遺伝子をノックアウトしたヒツジはヒツジの育種を改善する効率的な方法であり、羊毛産業の発展を促進するだろう。	[Hu R et al.] China Agricultural Univ., Beijing 中国
39	動物	ヒツジ	CRISPR/Cas9	アグーチタンパク質 (ASIP)	Scientific reports	Alteration of sheep coat color pattern by disruption of ASIP gene via CRISPR Cas9	2017	7(1), 8149.	ヒツジにおいて毛の色は重要な経済的な性質である。中国メリノヒツジの毛の色を変えるために、CRISPR/Cas9システムを利用してアグーチタンパク質 (ASIP) 遺伝子を破壊した。生まれた6匹の仔ヒツジの中の5匹に7種類のindelが同定された。ASIP遺伝子を破壊された仔ヒツジは様々な毛の色のパターンを有した。CRISPR/Cas9システムによるASIP遺伝子の修飾、自発的なD9/D5変異、ASIP遺伝子の重複が絡み合っており、ターゲットイングされた仔ヒツジでは様々な毛の色のパターンができる。	[Zhang X et al.] Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 中国

Table 2 ゲノム編集技術を利用した遺伝子組換え植物の文献調査

2-1 食用

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	ダイズ	TALEN	FAD3A, FAD3B, FAD3C	PCT Int. Appl.	Modifying soybean oil composition through TALEN nuclease targeted knockout of the FAD3A/B/C genes	2017	WO 2017134601 A1 2017 0810.	TALENを使ってFAD3A, FAD3B, FAD3C遺伝子だけで変異を導入して、またはFAD2-1AとFAD2-1B遺伝子における変異と組み合わせることで油の組成を変えたダイズの品種を作るための材料と方法を提供する。	[Mathis L et al.] Collectis フランス
2	植物	セイヨウアブラナ	CRISPR/Cas9	12個の遺伝子	Scientific Reports	CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in Brassica napus	2017	7(1), 1-13.	セイヨウアブラナは異質4倍体のゲノムを持ち、油糧種子を作る重要な穀物である。セイヨウアブラナにおいて12個の遺伝子に対するCRISPR/Cas9法の変異導入の効率、特異性、遺伝を調べた。1つの遺伝子を標的とした変異導入の効率の平均はT0世代において65.3%だった。ホモ接合体はT0世代において容易に検出された。全体の遺伝子変異の48.2%は古典的なメンデルの法則に従って安定にT1世代に遺伝して、新規な変異の出現や元の配列へ戻ることはなかった。予想される部位にオフターゲット変異は検出されなかった。	[Yang H et al.] Huazhong Agricultural Univ. Wuhan 中国
3	植物	オレンジ	CRISPR/Cas9	CsLOB1遺伝子のプロモーター中のエフェクター結合因子(EBE _{Pth4})	Plant Biotechnology Journal	Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus	2017	15(12), 1509-1519.	CRISPR/Cas9システムを利用して、かんきつ類の感受性の高い遺伝子であるCsLOB1のプロモーターをターゲットングによって修飾して、カンキツ潰瘍病に耐性になるようにした。オレンジは少なくとも3コピーのCsLOB1 ^G 対立遺伝子と1コピーのCsLOB ^B 対立遺伝子を含む。両対立遺伝子のプロモーターはエフェクター結合因子(EBE _{Pth4})を含み、カンキツ潰瘍病菌(Xcc)の主要なエフェクターであるPth4によって認識されて、CsLOB1の発現が活性化されてカンキツ潰瘍病が促進される。オレンジのCsLOB11プロモーター中のEBE _{Pth4} を修飾するために、Cas9とsgRNAを含む5つのコンストラクトを設計した。これらのコンストラクトを利用したときの変異率は11.5-64.7%だった。38個の変異植物からEBE _{Pth4} に修飾のある6系統が同定された。4個の変異系統はXccの感染に反応してCsLOB1の誘導がかわらず、耐性だった。CsLOB ^G のプロモーターの修飾だけでカンキツ潰瘍病への耐性が上昇した。	[Peng A et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 他 Chongqing 中国
4	植物	イネ	CRISPR/Cas9	デンブン分岐酵素SBE3	Faming Zhuanli Shengqing	Artificial site-directed mutant of rice starch branching enzyme SBE3 gene	2017	CN 107384946 A 20171124.	本発明はイネのデンブン分岐酵素SBE3遺伝子の人工的な部位特異的な変異を開示する。イネのデンブン分岐酵素の部位特異的な変異はSBE3遺伝子の第8エクソンをCRISPR/Cas9システムによって修飾することによって調整すると欠失が起きる。変異体を選抜すると、レジスタントスターチの量が大きく増えて(10%以上)、子孫の分離によって選択マーカーを除去する。	[Yang R et al.] Shanghai Academy of Agricultural Sciences 中国
5	植物	トマト	CRISPR/Cas9	DFD	Faming Zhuanli Shengqing	Application of Cas9-mediated tomato gene editing carrier in breeding transgenic tomato variety with good fruit storage property	2017	CN 107312793 A 20171103.	Cas9とsgRNAを含む発現ベクターを構築してアグロバクテリウムLBA4404によってそれをトマトM82へ導入してDFD遺伝子を編集する。得られたトランスジェニックトマトの新しい品種は保存しやすい。植物の成長やその他の性質には影響しない。	[Li N et al.] Xinjiang Academy of Agricultural Sciences 中国
6	植物	トウモロコシ	CRISPR/Cas9	ZmbZIP22	Faming Zhuanli Shengqing	Zea mays transcription factor bZIP22 and application in regulation of 27KDa γ -gliadin	2017	CN 107298701 A 20171027.	本発明はグリアジンを制御することにおいてトウモロコシの転写因子を応用することに関連する。この遺伝子によってコードされるタンパク質ZmbAIP22は27kDaの γ -グリアジンのプロモーターに結合して活性化される。本発明はトウモロコシの若い胚をgRNAとしてZmbZIP22遺伝子断片とともにCRISPR/Cas9技術によって形質転換して、遺伝子の欠失を持った植物を作る。トランスジェニックトウモロコシの種子は不規則で比較的薄いタンパク質の殻の特徴を持ち、熟した種子ではグリアジンの量が大きく減少しており、必須アミノ酸(通常のトウモロコシには含まれないリジンも含む)の量は大きく増加した。本発明はトウモロコシの栄養学的な性質を改善する。	[Song R et al.] Shanghai Univ. 中国
7	植物	トウモロコシ	CRISPR/Cas9	ZmbHLH167	Faming Zhuanli Shengqing	Application of Zea mays transcription factor ZmbHLH167	2017	CN 107266541 A 20171020.	本発明はトウモロコシの転写因子ZmbHLH167とその応用に関連する。ZmbHLH167の遺伝子の配列を示す。この配列をCRISPR/Cas9技術で利用して遺伝子の欠失を持った変異植物を作ることができる。トランスジェニックトウモロコシは発芽速度は影響を受けず、種子が小さくなる。トランスジェニックトウモロコシはデンブンの量が減り、タンパク質と油脂の量が増える。本発明は高品質なトウモロコシの育種のための遺伝的資源である。	[Song R et al.] Shanghai Univ. 中国

(続き)

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
8	植物	イネ	CRISPR/Cas9	PIL15	Faming Zhuanni Shenqing	rice PIL15 mutagenesis using CRISPR/Cas9 technology	2017	CN 107 164401 A 20170 915.	本発明は CRISPR/Cas9 技術を使ってイネ PIL15 遺伝子に変異導入することに關連する。OsPIL15 遺伝子から標的配列を設計して、CRISPR/Cas9-gRNA ベクターをアグロバクテリウムを利用して、もち米ではないイネに導入して、除草剤耐性マーカーを使って陽性のトランスジェニック植物をスクリーニングして、酵素消化とシークエンシングによって変異植物を同定する。得られたコメは 4.79 % 長くなり、高くて安定な収量が得られる。	[Du Y et al.] Henan Agricultural Univ. 中国
9	植物	ジャガイモ	CRISPR/Cas9	GBSSI	Faming Zhuanni Shenqing	Method for reducing amylose content in plant by GBSSI gene editing with CRISPR-CAS9 system	2017	CN 107 119071 A 20170 901.	本発明は、植物においてアミロース含量を減らす方法とその応用に關連する。この方法では CRISPR/Cas9 システムを利用してジャガイモの GBSSI 遺伝子を編集することを含む。ここでは 2 つ以上の sgRNA の配列を使う。本方法は貯蔵根の形成の特徴とジャガイモのアミロース含量を調整できる。植物のでんぷんの質を改良できる可能性がある。	[Zhang P et al.] Jiangsu Sanshu Biotechnology Co., Ltd. 中国
10	植物	ジャガイモ	CRISPR/Cas9	SBEI, SBEII	Faming Zhuanni Shenqing	Method for increasing plant amylose content and application thereof	2017	CN 107 058328 A 20170 818.	本発明は、CRISPR/Cas9 システムを使ってキャツサバの SBEI または SBEII 遺伝子を編集することにある。それによって、でんぷんの組成とジャガイモ植物の性質を大きく変えて、ジャガイモ植物のでんぷん中のアミロース含量を改善して、ジャガイモのでんぷん中のアミロペクチンを減らすことができる。また、ジャガイモ植物の貯蔵根の重さ、直径、数を制御して、外来遺伝子の断片を導入せずに新しい系統を作ることができる。	[Zhang P et al.] Jiangsu Sanshu Biotechnology Co., Ltd. 中国
11	植物	コムギ	CRISPR/Cas9	DEP1	Faming Zhuanni Shenqing	wheat DEP1 gene knockout by CRISPR-Cas9 system	2017	CN 1070 22564 A 2017080 8.	本発明は CRISPR-Cas9 システムによる DEP1 遺伝子のノックアウトに關連する。この方法はコムギの DEP1 タンパク質の発現かつまたは活性を阻害することから構成される。この方法は DEP1 遺伝子の 3 つの部位に同時に変異を導入することによって達成されて、光合成の増強した背の低いコムギを得る。	[Gao C et al.] Chinese Academy of Sciences 中国
12	植物	トウモロコシ	CRISPR/Cas9	Waxy1 (Wx1)	PCT Int. Appl.	Methods for engineering corn lines with knockout mutations in waxy gene using CRISPR/Cas systems	2017	WO 201 7132239 A1 2017 0803.	本発明はろうの多いトウモロコシの生産を含む。Cas エンドヌクレアーゼを使ってトウモロコシの Waxy1 (Wx1) 遺伝子をノックアウトするための化合物と方法を提供する。	[Cigan A et al.] Pioneer Hi-Bred International , Inc. 米国
13	植物	ナタネ	CRISPR/Cas9	ALCATRAZ (ALC)	Plant Physiology	CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (Brassica napus)	2017	174(2), 935-942.	倍数体の種では遺伝子の重複のためにランダム変異導入法による形質の改変はとも効率が低い。私達は 2 つの ALCATRAZ (ALC) ホモログを標的として CRISPR-Cas9 コンストラクトを使って 4 倍体のナタネを安定的に形質転換した。ALC は弁膜の縁の発達に含まれており、成熟した果実から種子が粉々になることに貢献している。もし、ALC 遺伝子をノックアウトすれば、種子が粉々になることを減らして機械的な収穫の間の種子の損失を避けることができるだろう。私達は 1 つの標的配列を使って 4 つの alc 変異対立遺伝子を持つトランスジェニック T1 植物を得た。すべての変異は T2 子孫へ安定に遺伝した。T2 世代は野生型の対立遺伝子を持っておらず、元の T1 はキメラではない二重のヘテロ接合体であることを証明した。T-DNA と ALC 遺伝子座はリンクしておらず、T2 世代ではランダムに分離した。したがって、私達は初代の子孫の世代ですべてに T-DNA を含まない二重変異体を選抜できた。全ゲノムシークエンシングからの情報ではベクター骨格の配列が 5 つ独立に挿入されていることが明らかになった。標的配列に相対的な 2 つのゲノム領域にオフターゲット効果は検出されなかった。	[Braatz J et al.] Christian-Al brechts-Uni v. of Kiel Kiel ドイツ
14	植物	イネ	CRISPR/Cas9	SD1	Faming Zhuanni Shenqing	Method for targeted knockout of rice dwarf gene SD1 by CRISPR/Cas9 technology	2017	CN 1069 57855 A 2017071 8.	本発明は、CRISPR/Cas9 技術を使ってイネの矮性遺伝子 SD1 を標的としてノックダウンする方法を開示する。イネのカルスにアグロバクテリウムを利用して CRISPR/Cas9 を導入する。スクリーニングを行なってトランスジェニック DNA を含まない、SD1 遺伝子に変異のあった矮性イネを同定する。	[Chu H et al.] Shanghai Academy of Agricultural Sciences 中国
15	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OsPCCD5	Faming Zhuanni Shenqing	Method for site-directed knockout of second exon of OsPCCD5 gene in paddy rice through CRISPR/Cas9 system	2017	CN 1069 39316 A 2017071 1.	CRISPR/Cas9 システムを利用してイネの OsPCCD5 遺伝子の第 2 エクソンをノックアウトした。イネのカルスにアグロバクテリウムを利用して CRISPR/Cas9 を導入した。得られた植物は背が高く、収量が増えた。	[Luo X et al.] Fudan Univ. 中国

(続き)

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
16	植物	コムギ	CRISPR/Cas9	enhanced disease resistance 1 (EDR1)	Plant Journal	Simultaneous modification of three homologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat	2017	91(4), 714-724.	コムギは真菌によって起こされるうどん粉病によって大きな損害を受ける。enhanced disease resistance 1 (EDR1) はシロイヌナズナにおいてうどん粉病に対する防御反応で負の役割を果たす。しかし、edr1 変異体は恒常的に活性化された防御反応を示さない。EDR1 を標的としてゲノム編集を行ってうどん粉病に対する耐性を改善することを目指す。6 倍体のコムギから TaEDR1 遺伝子をクローニングして、3 つのホモログの間で高い類似性を見出した。CRISPR/Cas9 技術を使ってコムギ EDR1 遺伝子の 3 つのホモログを同時に修飾して Taedr1 コムギ植物を作った。オフターゲット変異は検出されなかった。Taedr1 植物はうどん粉病に対して耐性であり、うどん粉病によって誘導される細胞死はなかった。	[Zhang Y et al.] Chinese Academy of Sciences Beijing 米国
17	植物	イネ	CRISPR/Cas9	ALS	Faming Zhuanni Shengqing	System for obtaining herbicide resistant rice by site-specific modification of ALS gene by using CRISPR/Cas9 system and application thereof	2017	CN 106811479 A 20170609.	本発明は、CRISPR/Cas9 システムを使って ALS 遺伝子を部位特異的に修飾して除草剤に耐性なイネを得る方法とその応用を開示する。本発明で利用するベクターは Cas9 タンパク質を発現するためのカセット、gRNA を発現するためのカセットおよびドナー-DNA を含む。gRNA を発現するためのカセットは 2 つの gRNA をコードする。それらの標的部位の間に修飾する断片が位置する。	[Xia L et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
18	植物	イネ	CRISPR/Cas9	ALS	PCT Int. Appl.	System for obtaining herbicide-tolerant rice by site-directed modifying ALS gene using CRISPR-Cas9 system and use thereof	2017	WO 2017092201 A1 20170608.	本発明は、CRISPR/Cas9 システムを使って ALS 遺伝子を部位特異的に修飾して除草剤に耐性なイネを得る方法とその応用を提供する。	[Xia L et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
19	植物	イネ	CRISPR/Cas9	DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP 1)	Plant Cell Reports	Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9	2017	36(8), 1333-1343.	CRISPR/Cas9 システムを使って、インディカ米において収量に関連する遺伝子 DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP 1) の大きな断片を高頻度に欠失させて、機能獲得型の dep1 変異体を作った。T0 世代において 430 bp の標的について 21%、10 kb の標的について 9% の頻度で遺伝子の欠失を起こした。重要な収量の性質である、濃密で直生の円すい花序が得られて、植物の背が低くなった。	[Wang Y et al.] Syngenta Biotechnology China Beijing 中国
20	植物	イネ	CRISPR/Cas9	BADH2	Faming Zhuanni Shengqing	Method for site-directed mutagenesis of rice BADH2 gene by using CRISPR-Cas9 technology	2017	CN 106676130 A 20170517.	本発明は、CRISPR/Cas9 システムを使ってイネの BADH2 遺伝子に部位特異的に変異を導入する方法を提供する。これによって遺伝資源が効率的に得られる。	[Shen Q et al.] Huazhi Rice Bio-Tech Co., Ltd. 中国
21	植物	カメリナ・サティイバ	CRISPR/Cas9	delta-12-desaturase (FAD2)	Plant Biotechnology Journal	Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid Camelina sativa	2017	15(6), 729-739.	多くの植物種において遺伝子量は表現型の変動の重要な原因である。6 倍体のゲノムを持つ油糧種子作物であるカメリナ・サティイバは 3 つの近縁の発現するサブゲノムを持ち、コンビナトリアル変異の大きな収集物を作る研究のための理想的な種である。3 つの delta-12-desaturase (FAD2) 遺伝子に対して CRISPR/Cas9 システムを利用してターゲティングによって変異を導入すると、多価不飽和脂肪酸の濃度が減少して、オレイン酸の蓄積が上昇した。3 つの FAD2 遺伝子座についての異なる対立遺伝子の組み合わせ関係はオイル中でのオレイン酸の蓄積が 10-62% まで変わる多様な脂質の組成を持ったカメリナ系統を提供する。	[Morineau C et al.] Univ. Paris-Saclay Versailles フランス
22	植物	トマト	CRISPR/Cas9	PSY1	Faming Zhuanni Shengqing	Construction of CRISPR-Cas9 system of tomato PSY1 gene and application thereof	2017	CN 106636182 A 20170510.	本発明は、CRISPR/Cas9 システムを使ってトマトの PSY1 遺伝子を編集することに関する。本発明によってトマトの果実が熟する過程での PSY1 遺伝子の効果を調べることができる。また、PSY1 遺伝子を欠失したトランスジェニックトマトを作ることが可能であり、日持ちのよいトマトの新しい品種を栽培するための重要な役割を果たす。	[Cheng Y et al.] Shanxi Academy of Agricultural Sciences 中国

(続き)

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
23	植物	カメリナ・サティバ	CRISPR/Cas9	FAD2	Plant Biotechnology Journal	Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, <i>Camelina sativa</i> , using CRISPR/Cas9 gene editing	2017	15(5), 648-657.	CRISPR/Cas9 システムを使って種子のオイルの組成を改良することを目的としてシロイソナズナとカメリナ・サティバの FAD2 遺伝子を編集した。脂肪酸の組成の中でオレイン酸の量が 16%から 50%以上に増えたカメリナの種子を得た。この増加はあまり好ましくない多価不飽和脂肪酸であるリノール酸(約 16%から 4%以下へ)とリノレン酸(約 35%から 10%以下へ)の大きな減少と関連している。これらの結果、健康のためにより好ましい、酸化に対してより安定など優れたオイルが得られた。異質 6 倍体であるカメリナでは 3 つの相同的な FAD2 遺伝子を同時に編集するように gRNA を設計した。カメリナ種子の T ₃ と T ₄ 世代においてオイルの組成を大きく改良したこの戦略は、3 つのカメリナのサブゲノムの各々に存在する FAD2 遺伝子への生殖細胞変異と体細胞変異の組み合わせと関連していた。	[Jiang WZ et al.] Univ. of Nebraska Lincoln 米国
24	植物	トマト	CRISPR/Cas9	SIAGAMOUS-LIKE6 (SIAGL6)	Plant Biotechnology Journal	Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function	2017	15(5), 634-647.	適度な高温または低温に対する小胞子形成の過程の極端な感受性はトマトの有性生殖と年間を通した収穫の大きな妨害になっている。したがって、単位結実つまり受精に依存しない着果は地球温暖化の観点から持続可能な農業を行なうために価値のある目標である。高品質の種子のない(単位結実の)果実を作ることができる変異体が、EMS によって変異を誘導したトマトの集合体から熱ストレスの下での収穫を指標にしてスクリーニングして見出された。次世代シーケンシング、マーカーに支援されたマッピングと CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトによって、SIAGAMOUS-LIKE6 (SIAGL6) が単為結実の表現型の原因であることが確認された。この変異体は、受精に依存した着果を強く妨害する熱ストレスの条件下で果実を生産できる。Slagl6 変異体は、正常な重さで形であり、花粉の生存能力は影響を受けず、有性生殖の能力を維持している。したがって、SIAGL6 は条件的な単為結実のための魅力的な遺伝子である。	[Klap C et al.] The Volcani Center Agricultural Research Organization Rishon イスラエル
25	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OSNramp5	Faming Zhuanli Shengqing	Method for breeding indica rice with low cadmium accumulation	2017	CN 106544357 A 20170329.	カドミウムの蓄積の低いインディカ米の育種の方法を作った。インディカ米から OSNramp5 遺伝子をクローニングして、標的部位を決める。CRISPR/Cas9 をイネのカルスへ導入して、トランスジェニック苗を得る。陽性クローンをスクリーニングして、トランスジェニック成分を含まない変異植物を得る。	[Tang L et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国
26	植物	イネ、トマト	CRISPR/Cas9	acetolactate synthase (ALS)、DELLA (Solyc11g011260)、ETR1 (Solyc12g011330)	Nature Biotechnology	Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion	2017	35(5), 441-443.	CRISPR-Cas9 と活性化誘導シチジン脱アミノ酵素との融合タンパク質 (Target AID) を 2 つの作物において sgRNA によって特定されるゲノム領域で点突然変異を誘導するために応用した。イネにおいては、除草剤による選抜を使ってマルチプレックスの編集によって除草剤に耐性にするための複数の点突然変異を誘導した。トマトにおいては、ホモ接合性の遺伝するマーカーを含まない植物を作った。これらによって、作物の改良のために塩基置換が実行できることを証明した。	[Shimatani Z et al.] Kobe University Kobe 日本
27	植物	トウモロコシ、キャノーラ、アルファルファ、イネ、ライ、ソルガム、コムギ、ダイズ	CRISPR/CPF1	?	PCT Int. Appl.	CRISPR-associated protein from Francisella and uses to confer pest resistance in crop plants	2017	WO 2017015015 A1 20170126.	本開示は、Francisella に由来する CRISPR 関連 CPF1 とその変異体、融合体、と核酸の複合体に関連する。CPF1 はトウモロコシ、キャノーラ、アルファルファ、イネ、ライ、ソルガム、コムギ、ダイズにおいて害虫への耐性を与えることができ発現できる。	[Weiss D et al.] Emory Univ. 米国 Beijing 中国

(続き)

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
28	植物	トウモロコシ	CRISPR/Cas9	ARGOS8	Plant Biotechnology Journal	ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions	2017	207-216.	トウモロコシ ARGOS8 はエチレン反応を負に制御している。ARGOS8 を恒常的に過剰発現するトランスジェニック植物はエチレン感受性が減少しており、干ばつストレス条件下で穀物収量が改善したことを以前の研究で示した。干ばつに耐性な植物を作る育種において ARGOS8 の天然の発現の変動を利用できるかを調べるために ARGOS8 の mRNA の発現について 400 以上のトウモロコシの近交を調べたところ、すべての系統でその発現は元の ARGOS8 トランスジェニック系統よりも少なかった。次に、CRISPR-Cas を使って ARGOS8 の新しい変異体を作った。天然のトウモロコシ GOS2 プロモーターは適度な恒常的な発現をもたらすが、これを天然の ARGOS8 遺伝子の 5'-非翻訳領域に挿入するか、または ARGOS8 の天然のプロモーターを置換するために使った。ARGOS8 変異体は天然の対立遺伝子に対して ARGOS8 転写物が増えており、これらの転写物は調べたすべての組織で検出された。野生型と比較すると、ARGOS8 変異体は開花ストレス条件下で 1 エーカー当たり 5 プッシュェルほど穀物の収量が増加しており、十分に灌漑した条件下では収量が減少しないことが現場調査から示された。	[Shi J et al.] DuPont Pioneer Johnston 米国
29	植物	コムギ	CRISPR/Cas9	?	Nature Communications	Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes	2017	8, 14261	CRISPR/Cas9 リボヌクレオプロテイン (RNP) を使ってコムギにおける効率的なゲノム編集の方法を記載する。RNP の調製から始めて全体のプロトコールは 7-9 週間しかかからず、4-5 個の独立した変異体が 100 個の未成熟なコムギの胚から作られた。CRISPR/Cas9 DNA を使った編集よりも RNP に媒介されるゲノム編集ではコムギの細胞でのオフターゲット変異の確率ははるかに低くなることでディープシーケンシングから明らかになった。この知見と一致して、変異植物においてオフターゲット変異は検出されなかった。CRISPR/Cas9 RNP に媒介されるゲノム編集では外来遺伝子が使われていないので、得られた変異体は導入遺伝子を完全に含まない。	[Liang Z et al.] Chinese Academy of Sciences Beijing 中国
30	植物	ジャガイモ	CRISPR/Cas9	顆粒結合デンプンシンターゼ (GBSS)	Plant Cell Reports	Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts	2017	36(1), 117-128.	一過性のトランスフェクションと単離したプロトプラストからの再生と CRISPR-Cas9 技術によって 4 倍体のジャガイモにおいて顆粒結合デンプンシンターゼ (GBSS) 遺伝子の機能を完全にノックアウトしてデンプンの質を変えた。再生した系統の 2% までにおいて 1 回のトランスフェクションですべての 4 つの対立遺伝子に変異が導入された。GBSS をコードする遺伝子の 3 つの領域でターゲットングを行なって、再生した芽の 2-12% で少なくとも 1 つの対立遺伝子で変異が起きて、確認された変異系統の 67% までで複数の対立遺伝子に変異が導入された。大部分の変異は 1-10 bp の小さな indel であるが、分析した系統の 10% で 34-326 bp のベクター DNA の挿入が見出された。ガイド配列と 1 塩基異なる対立遺伝子では変異がなかった。デンプンの表現型の研究によって 4 つの対立遺伝子で変異した系統において GBSS の酵素活性が完全にノックアウトされたことを確認した。大量のアミロースを生産するための GBSS の酵素活性を維持するためには 1 つの野生型の対立遺伝子が残っていれば十分であることが示された。	[Anderson M et al.] Swedish Univ. of Agricultural Sciences Alnarp スウェーデン
31	植物	トマト	CRISPR/Cas9	?	Scientific Reports	Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion	2017	7(1), 1-6	CRISPR/Cas9 技術を使って 10 ヶ月以内に真菌の病原菌であるうどんこ病病菌に対して耐性な非トランスジェニックなトマトの品種、Tomelo を作成したことを報告する。Tomelo は外来 DNA 配列を含まず、自然界に存在する変異と区別できない欠失のみを含むことを示すために全ゲノムシーケンシングを使った。CRISPR/Cas9 は高度に正確なツールであって、Tomelo にオフターゲット変異が検出されないことを示した。本研究の方法を使えば、優良のまたは地域に適応させたトマトの品種に 1 年以内に簡単に変異を導入できる。	[Nekrasov V et al.] Norwich Research Park Norwich イギリス

(続き)

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
32	植物	イネ	CRISPR/Cas9		Scientific Reports	Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield	2017	7(1), 1-12.	過剰のカドミウムを含む米は食事からのカドミウムの摂取の主要な源であり、米を食物として消費する人々にとって健康上の深刻な脅威である。カドミウム含量の低い優れたイネの品種の開発は伝統的な育種では難しく、新しい戦略の開発が必要である。本研究では、CRISPR/Cas9 を使って金属トランスポーターOsNramp5 をノックアウトすることによってカドミウムの蓄積が低く、外来遺伝子を含まないインディカ米の新しい系統を開発した。水耕培養から、osnramp5 変異体の芽と根においてカドミウムの濃度が大きく下がり、カドミウムの高い条件で損なわれていた成長が回復することが明らかになった。カドミウムで汚染された水田での試験では、osnramp5 の米ではカドミウム濃度は常に0.05 mg/kgより低く、一方で野生型のインディカ米ではカドミウム濃度は0.33-2.90 mg/kgと高いことを証明した。osnramp5 変異体では米の収量は有意に変わらなかった。さらに、米においてカドミウム含量の極めて低い有望なハイブリッド系統を開発した。	[Tang L et al.] Hunan Agricultural Univ. Changsha 中国
33	植物	トマト	CRISPR/Cas9		Scientific Reports	CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines	2017	7(1), 118-74	本研究では、相同的な修復のための鋳型の存在下または非存在下でのトマト ALC 遺伝子の変異および置換を得るために、アグロバクテリウム ツメファシエンシスによって媒介される CRISPR/Cas9 システムの形質転換の方法を使った。T ₀ トランスジェニック植物においては平均の変異頻度(72.73%)と低い置換の効率(7.69%)が達せられた。T ₀ トランスジェニック植物においてはホモ接合性の変異は検出されなかったが、1つの植物でヘテロ接合性遺伝子(Cas9/*-ALC/alc)は分離と遺伝子型決定のための T ₁ 世代へ安定に伝達された。最後に、T ₁ 世代における T-DNA の挿入のない望ましい alc のホモ接合性の変異(*/*-alc/alc)得られて、優れた貯蔵の成績に重点を置いて、その変異を遺伝子型と表現型の特徴付けによって確認した。したがって、長い保存可能期間の特徴を持ち、劣性でホモ接合性の育種のために優れた品種を作った。	[Yu QH et al] Xinjiang Academy of Agricultural Science Urumqi 中国
34	植物	イネ	CRISPR/Cas9	MPK21-1	Faming Zhuanli Shengqing	Application of rice kinase MPK21-1 in plant drought resistance control	2017	CN 1073 38231 A 20171110.	本発明は以下の点でイネの MPK21-1 キナーゼの応用を開示する。(1)植物の干ばつ耐性の制御。(2)減少または改善された干ばつ耐性をもつ植物品種の育種。干ばつ耐性に関連するイネの MPK21-1 キナーゼのタンパク質とヌクレオチドの配列を開示する。	[Gao C et al] Chinese Academy of Sciences 中国
35	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OsMPK11	Faming Zhuanli Shengqing	Identification of Oryza sativa OsMPK11 gene and protein for application in plant drought resistance control	2017	CN 107 338230 A 20171110.	本発明は以下の点で OsMPK11 タンパク質と関連する生物学的材料の応用を開示する。(1)植物の干ばつ耐性の制御。(2)減少または改善された干ばつ耐性をもつ植物品種の育種。OsMPK11 のアミノ酸配列を示した。植物の干ばつ耐性に関連する1個または数個のアミノ酸が置換された OsMPK11 の配列、欠失および/または挿入のある OsMPK11 の配列も示す。	[Gao C et al] Chinese Academy of Sciences 中国
36	植物	イネ	CRISPR/Cas9	KTN80b	Faming Zhuanli Shengqing	Application of KTN80b gene knockout in reducing plant height of rice	2017	CN 1073 12785 A 20171110 3.	本発明は、イネの高さを減らすために使われる KTN80b 遺伝子のヌクレオチド配列を提供する。本発明は、OsKTN80b 遺伝子をノックアウトするために使われる使われる標的配列も提供する。本発明は、CRISPR-CAS システムを使って OsKTN80b 遺伝子をノックアウトすることによってイネの高さを減らす方法にも関連する。野生型と比較して、このノックアウトした植物は高さが13.56-16.33%ほど減っていた。この方法は遺伝的なバックグラウンドによって制限されず、悪い性質との連鎖がない。	[Qin P et al] Sichuan Agricultural Univ. 中国
37	植物	イネ	CRISPR/Cas9	NPT1	Faming Zhuanli Shengqing	Ideal plant type gene NPT1 of rice and its application	2017	CN 107 164347 A 20170915.	本発明は、イネの理想的な植物型遺伝子 NPT1 を開示する。NPT1 はイネのひこばえの数、茎の厚さ、円すい花序あたりの米の数、1000個の米の重さ、収量を制御できる。本発明は、NPT1 の対立遺伝子、プロモーター配列と相同的な遺伝子も開示して、NPT1 に関連する組換えベクター、タンパク質、組換え宿主細胞も開示する。本発明は、改善された収量が得られるイネの栽培法も開示して、それは NPT1 遺伝子の発現を低下させることによって、または OsUBC13 および OsSPL14 の発現を増強することによって収量を増やすことを目的とする。	[Fu X et al] Chinese Academy of Sciences 中国

(続き)

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
38	植物	イネ	CRISPR/Cas9	BG10SGA01651	Faming Zhuanni Shenqing	Gene BG10SGA01651 controlling plant hopper resistance of rice and its application	2017	CN 1070 34223 A 2017081 1.	イネにおいてヨコバイ目に対する耐性を制御する遺伝子 BG10SGA01651 はイネの品種である BG1222 と TN1 の研究から見出された。BG10SGA01651 は害虫に耐性な品種と感受性のある品種で発現量が有意に異なる。遺伝子工学を利用して BG10SGA01651 遺伝子を低下させるまたはノックアウトすることができて、それによって害虫に感受性のある植物を耐性のある植物へ変える。害虫に感受性のあるイネの品種である TN1 はこの遺伝子をノックアウトする前は害虫耐性の評価は 9 であり、ノックアウト後は評価は 0-1 へと有意に改善された。	[Li Y et al] Guangdong Academy of Agricultural Sciences 中 国
39	植物	?	CRISPR/Cas9	NRT2	PCT Int. Appl.	Method for improving yield, growth and/or nitrogen use efficiency in plants by expressing NRT2 genes	2017	WO 2017 107983 A1 2017 0629.	NRT2 遺伝子の発現プロファイルを変えることによって、収量、植物の成長および/または窒素の使用の効率を改善するための方法をここに開示する。核酸コンストラクトと上記の性質を持つ遺伝子操作された植物を含めてそのような植物を作るための方法も提供する。	[Fan X et al] Nanjing Agricultural Univ. 他 中 国
40	植物	トウモロコシ	CRISPR/Cas9	LG1	Faming Zhuanni Shenqing	Method for constructing compact plant type germplasm of Zea mays through site-directed mutagenesis and application thereof	2017	CN 1068 68036 A 2017062 0.	ゲノム編集を利用して小型の直立するトウモロコシを作る方法を開発した。このトウモロコシは野生型と比較して葉の角度が小さくなる。この方法では Cas9 をコードする遺伝子、sgRNA をコードする遺伝子とそのプロモーターを使う。標的は LG1 タンパク質をコードする遺伝子である。LG1 タンパク質は、a1 タンパク質または a1 タンパク質の配列中に 1 個のアミノ酸または複数のアミノ酸に置換および/または欠失および/または挿入のある a2 タンパク質である。	[Xie C et al] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中 国
41	植物	キュウリ	TALEN、 CRISPR/Cas9	IF4E	PCT Int. Appl.	Methods of increasing virus resistance in cucumber using genome editing and plants generated thereby	2017	WO 201 7098508 A1 2017 0615.	IF4E 遺伝子に機能を失わせる変異をホモ接合性で持つキュウリを提供する。そのような植物を作る方法も提供する。このキュウリはウイルスへの耐性が向上している。	[Gal-On A et al] Volcani Center イス ラエル
42	植物	ナツメヤシ	CRISPR/Cas9	?	Frontiers in plant science	CRISPR/Cas9: A Practical Approach in Date Palm Genome Editing	2017	8, 1469.	オアシスの農業で重要な果実の穀物であるナツメヤシにおいてゲノム編集が行われたことはない。ナツメヤシはゲノムが大きく複雑であることなどのために、CRISPR/Cas9 を応用することは難しいかもしれない。持続性のあるナツメヤシの生産を改善するために、CRISPR/Cas9 に基づいた手法の潜在的な応用を記す。	[Sattar M N et al] King Faisal Univ. Al- Ahsa 他 サウジア ラビア、パキ スタン

2-2 研究用

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
43	植物	トマト、 タバコ、 タルウマゴヤシ、 コムギ、 大麦	TALEN、 CRISPR/Cas9	?	Plant Cell	A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants	2017	29(6), 11 96-1217.	単子葉と双子葉植物においてターゲティングによる特異的なゲノムの修飾を可能にする包括的なツールキットを報告する。これは TALEN と CRISPR/Cas9 システムを基本とする。ベクターは単独または複数の遺伝子のノックアウトと染色体の大きな欠失を作るために最適化した。ウェブを基本としたツールはベクターの選択と構築の効率を向上させる。本ツールキットはトマト、タバコ、タルウマゴヤシ、コムギ、大麦において有効性を確認した。	[Cermak T et al.] Univ. of Minnesota Minneapolis 米国
44	植物	イネ	CRISPR/Cpf1	?	Scientific Reports	Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases	2017	7(1), 1-6 .	Francisella novicida と Lachnospiraceae bacterium ND2006 から得られた Cpf1 について HDR によるターゲティングした遺伝子挿入を誘導する能力を調べた。両方の Cpf1 はイネのゲノムにおいて gRNA と修復用の DNA 鋳型の存在下で正確な遺伝子挿入を起こし、標的部位において indel 変異も誘導する。これらの Cpf1 は他のゲノム編集用のヌクレアーゼよりもターゲティングによる遺伝子の挿入の効率が高く、8% だった。これらの Cpf1 の活性の高さを示す。	[Mockler T et al.] Benson Hill Biosystems St. Louis 米 国
45	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	?	Bio-Protocol	Generation of targeted knockout mutants in Arabidopsis thaliana using CRISPR/Cas9	2017	7(13), e 2384/1- e2384/2 0.	シロイヌナズナにおいて 2 個までの標的部位に変異を誘導するための Cas9 に依存した植物ベクターシステムを開発した。このプロトコールは Cas9 と sgRNA の遺伝子を含む 1 つの T-DNA ベクターのための単純な 1 週間で行えるクローニングを記載する。また、植物における誘導された変異の検出も含む。この手順は他の形質転換ができる植物種へ適用できると思われる。	[Hahn F et al.] Heinrich Heine Univ. Duesseldorf ドイツ

(続き)

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
46	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	?	Bio-Protocol	Multiplexed guideRNA-expression to efficiently mutagenize multiple loci in Arabidopsis by CRISPR-Cas9	2017	7(5), 1-14.	シロイヌナズナにおいて効率良くマルチプレックスでゲノム編集を行うために、シロイヌナズナユビキチン 10 (UBQ10)プロモーターに制御されるコドン最適化した SpCas9 とシロイヌナズナ U6プロモーターに制御される gRNA の発現カセットを含むバイナリーベクターを設計した。古典的なクローニングの手順に基づいて低コストでこのベクターを作る手順を記載した。	[Schumacher J et al.] Univ. of Potsdam Potsdam ドイツ
47	植物	タバコ、キャベツ、様々な他の植物	CRISPR/Cas9	?	Faming Zhuani Shengqing	Multi-target sequence sgRNA expression vector based on endogenous tRNA processing system and application in plant gene editing	2017	CN 1074 75256 A 2017121 5.	本発明は tRNA-sgRNA 発現配列を提供する。tRNA、II 型制限酵素部位と sgRNA を順につなげて単位配列を作り、4 つの単位配列が並ぶ。tRNA-sgRNA 発現配列は複数の標的配列を徐々に tRNA-sgRNA 発現ベクターの中に集合させて、タバコ、キャベツ、様々な他の植物の複数の部位の遺伝子編集を実現する。	[Song H et al.] Southwest Univ. 中国
48	植物	イネ	CRISPR/Cas9	ZYGO1	Faming Zhuani Shengqing	Application of rice ZYGO1 protein and encoding gene in regulating pollen fertility	2017	CN 107 459564 A 20171 212.	本発明はイネ ZYGO1 タンパク質を応用して雄性的な稔性を調節することに関する。本発明は ZYGO1 遺伝子の配列を提供する。本発明は CRISPR/Cas9 システムを利用して変異を誘導して ZYGO1 遺伝子の発現を阻害することによって雄性的に不稔性の植物を育種する方法に関する。ZYGO1 遺伝子はイネの育種に重要であり、ヘテロ接合性の有利な方法を使ってコメの質と収量を改善するための有用な供給源を提供できる。	[Cheng Z et al.] Chinese Academy of Sciences 中国
49	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	アントシアニン色素 1 (PAP1)、液胞 H ⁺ -ピロホスファターゼ (AVP1)	PLoS One	RNA-guided transcriptional activation via CRISPR/dCas9 mimics overexpression phenotypes in Arabidopsis	2017	12(6), e0179410/1-e0179410/13.	NF-κB の p65 トランス活性化サブユニットとヒートショック因子 (HSF) 1 活性化ドメインを、VP64 (VP16 のデラマー) 活性化ドメインに結合させた dCas9 へ加えることによって CRISPR/Cas9 活性化システムを再設計した。これをシロイヌナズナで利用して、内在性のアントシアニン色素 1 (PAP1) と液胞 H ⁺ -ピロホスファターゼ (AVP1) の転写レベルが上昇するかを試した。PAP1 の発現は 2-3 倍に上昇して、PAP1 を過剰発現させた植物と同じく紫色の葉ができた。AVP1 を活性化させた植物は葉の数が増えて 1 つの葉が大きくなり干ばつストレスに対する耐性が上昇した。AVP1 を活性化させた植物は AVP1 を過剰発現させた植物の表現型に似ている。	[Park JJ et al.] The Samuel Roberts Noble Foundation Ardmore 米国
50	植物	タバコ	CRISPR/Cas9	オーキシン輸送体 PIN4	Faming Zhuani Shengqing	cloning of tobacco auxin translocator gene PIN4 and construction of PIN4 knock-out strain	2017	CN 1071 77603 A 2017091 9.	本発明はタバコのオーキシン輸送体 PIN4 遺伝子のクローニングと CRISPR/Cas9 システムを利用して PIN4 遺伝子をノックアウトしたシステムの作成に関する。タバコ PIN4 のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を示す。本発明は CRISPR/Cas9 システムのための組換えベクターを応用して PIN4 遺伝子の発現を低下させるまたは失わせる方法を提供する。また、本発明は CRISPR/Cas9 システムのための組換えベクターをアグロバクテリウム ツメファシエンスによって導入することを含むトランスジェニック植物を培養するための方法を提供する。	[Xie X et al.] Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC 中国
51	植物	トマト	CRISPR/Cas9	SIMAPK3	Journal of Agricultural and Food Chemistry	Reduced Drought Tolerance by CRISPR/Cas9-Mediated SIMAPK3 Mutagenesis in Tomato Plants	2017	65(39), 8674-8682.	MAP キナーゼは干ばつストレスに反応する重要なシグナル分子である。本研究では SIMAPK3 は干ばつストレスによって誘導されて、CRISPR/Cas9 システムによってその遺伝子の変異体を作った。野生型と比較して、干ばつストレス下においては simap3 変異体はより重症なしおれる症状、より高い過酸化水素含量、より低い抗酸化酵素活性を示し、より大きな膜の障害を受けた。SIMAPK3 遺伝子をノックアウトすると、SILOX、SIGT、SIDREB を含む干ばつストレスに反応する遺伝子の発現は上昇するか抑制された。SIMAPK3 は、酸化的障害から細胞膜を守り、かつストレス関連遺伝子の転写を調節することによってトマトにおける干ばつに対する反応に含まれることをこれらの結果は示唆する。	[Wang L et al.] China Agricultural Univ. Beijing 中国
52	植物	イネ	CRISPR/nCas9	イネフィトン不飽和化酵素 (OsPDS)、OsSBEIIb	Faming Zhuani Shengqing	Application of CRISPR/nCas9-mediated site-directed base substitution in plant	2017	CN 1070 43779 A 2017081 5.	本発明は CRISPR/nCas9 による植物における部位特異的な塩基置換の応用に関する。本発明は、nCas9 (D10A)、デアミナーゼとウルラン-DNA グリコシラーゼを阻害するタンパク質から構成される融合タンパク質を発現する BE3 植物発現ベクターを含む。このシステムはイネフィトン不飽和化酵素 (OsPDS) と OsSBEIIb を標的として有効性を確認する。イネにおいて正確な点突然変異が約 20 %までの効率で得られた。本発明は穀物の育種において効率的な塩基置換の方法を提供する。	[Xia L et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国

(続き)

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
53	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OsHAK1	Plant Journal	Production of low-Cs+ rice plants by inactivation of the K+ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system	2017	92(1), 43-56.	原子力発電所の事故の後で食品中の放射性セシウムが存在が健康上の大きな問題になっている。2011年の福島における原発事故の後で、低濃度のセシウムイオンを取り込む植物の能力が日本の米の生産に大きく影響している。本研究では、CRISPR-Cas システムを利用してセシウムイオンを透過させるカリウムイオントランスポーターOsHAK1を不活性化させてイネにおけるセシウムイオンの取り込みを大きく減らしたことを示す。イネの根とOsHAK1を発現させた形質転換酵母におけるセシウムイオンの取り込みはよく似た速度論的なパラメーターを示した。OsHAK1はセシウムイオンとカリウムイオンをあまり区別しない。OsHAK1は外部のとても低い濃度のセシウムイオンを輸送する強い能力があり、能動的メカニズムが含まれると思われる。放射性セシウムイオンで高度に汚染された福島の土壌を使った実験では、OsHAK1機能を欠損した植物は根と新芽において放射性セシウムイオンの濃度が大きく低下した。今回の結果は原発事故で汚染された地域で安全な食品を生産する方法につながるかもしれない。	[Nieves-Cordones M et al.] Univ. Montpellier Montpellier フランス
54	植物	イネ	CRISPR/Cas9	?	Molecular Plant	Genome-wide Targeted Mutagenesis in Rice Using the CRISPR/Cas9 System	2017	10(9), 1242-1245.	本研究ではsgRNAライブラリーを使ってコムにおいて遺伝子のゲノム規模での変異導入を集める方法を開発した。標的を狙った、機能を失った全部で91004個の変異体が得られた。これらはイネの研究と育種のための有用な資源を供給する。次世代シーケンシング(NGS)の結果によると、これらの同定された5541個の植物において全部で2326個の遺伝子座が網羅された。この方法は研究と育種を促進するために他の植物にも応用できる。	[Lu Y et al.] Biogle Genome Editing Center Jiangsu Province 中国
55	植物	?	CRISPR/Cas9	?	Faming Zhuanli Shengqing	Method for improving RNA virus resistance of plant	2017	CN 106939317 A 20170711.	CRISPR/Cas9 システムを利用して RNA ウィルスである CMV に耐性な植物を作成した。	[Zhang T et al.] South China Agricultural Univ. 中国
56	植物	イネ	CRISPR/Cpf1	?	bioRxiv, Plant Biology	Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases	2017	1-16.	Francisella novicida と Lachnospiraceae bacterium ND2006 から得られた Cpf1 について HDR によるターゲティングした遺伝子挿入を誘導する能力を調べた。両方の Cpf1 はイネのゲノムにおいて gRNA と修復用の DNA 鋳型の存在下で正確な遺伝子挿入を起こし、標的部位において indel 変異も誘導する。これらの Cpf1 は他のゲノム編集用のヌクレアーゼよりもターゲティングによる遺伝子の挿入の効率がが高く、8%だった。これらの Cpf1 の活性の高さを示す。	[Begemann M B et al.] Benson Hill Biosystems St. Louis 米国
57	植物	?	CRISPR/Cas9	?	Faming Zhuanli Shengqing	Construction and application of vector for site-directed mutation of gene	2017	CN 106834341 A 20170613.	本発明は部位特異的突然変異を起こすためのベクターに関連する。ベクターは 5' から 3' 方向へ向かってプロモーター、sgRNA、シトシンデアミナーゼ遺伝子、Cas9 遺伝子、ウラシル DNA グリコシラーゼ阻害剤遺伝子とターミネーターを含む。このベクターを使ってシトシンをウラシルに変えて、植物細胞の自発的な修復によってそのウラシルはさらにチミンに変わる。これによって除草剤耐性になる。また、標的部位以外で点突然変異を作れる。	[Jiang L et al.] China Agricultural Univ. 中国
58	植物	トマト	CRISPR/Cas9	フィトエンシスターゼ (PSY1)	Nature Communications	Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato	2017	8, 15605.	親の染色体の間の相同組換え (HR) は確率的に起こる。トマトのフィトエンシスターゼ (PSY1) 遺伝子に変異を導入すると黄色い果実ができて、HR による DNA 二本鎖切断の修復によって野生型の赤い部分が形成される。CRISPR に対して免疫のある psy1 対立遺伝子と感受性のあるそれを含むヘテロ接合性の植物では破壊されていない対立遺伝子の配列を鋳型に利用して破壊された対立遺伝子の修復がしばしば起こる。また、食用の psy1 トマトの変異体と野生型 Solanum pimpinellifolium の雑種において体細胞で誘導した DNA 二本鎖切断は S. pimpinellifolium の対立遺伝子においてのみ起こる証拠を得た。	[Filler H et al.] Weizmann Inst. of Science Rehovot イスラエル
59	植物	イネ	CRISPR/Cas9	CENH3	Faming Zhuanli Shengqing	Method for site-directed mutation of rice CENH3 gene by using CRISPR-CAS9 technology	2017	CN 106755077 A 20170531.	本発明は CRISPR/Cas9 技術によってイネの CENH3 遺伝子に部位特異的な変異を導入する方法を提供する。CENH3 によって媒介される染色体除去の機構をイネの倍加半数体の育種へ応用することが期待される。	[Shen Q et al.] Huazhi Rice Bio-Tech Co., Ltd. 中国

(続き)

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
60	植物	イネ	CRISPR/Cas9	ジェニック雄性不稔遺伝子	Faming Zhuani Shenqing	A method for cultivating paddy rice common genic male sterile line	2017	CN 1067 01818 A 2017052 4.	本発明はイネのジェニック雄性不稔遺伝子をCRISPR/Cas9によって修飾して、イネの雄性不稔系統を培養する方法を記す。	[Yuan D et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国
61	植物	イネ	CRISPR/CpfI	OsPDS、OsBEL	Plant Biotechnology Journal	Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-CpfI system	2017	15(6), 71 3-717.	CRISPR/CpfI システムがイネの変異体を作成できるかを調べるために、2つの標的としてOsPDSとOsBEL 遺伝子を選んだ。2つの標的において効率良く変異が導入された。また、これらの変異は遺伝した。	[Xu R et al.] Anhui Academy of Agricultural Sciences Hefei 中国
62	植物	イネ	CRISPR/Cas9、CRISPR/CpfI	Epidermal Patterning Factor like-9 (EPFL9) のイネにおけるオルソログ	Plant Cell Reports	CRISPR-Cas9 and CRISPR-CpfI mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice	2017	36(5), 74 5-757.	シロイヌナズナにおいて気孔の発達を正に制御している Epidermal Patterning Factor like-9 (EPFL9) のオルソログをイネにおいてCRISPR/Cas9 と CRISPR-CpfI 技術を使ってノックアウトした。生殖細胞系列の変異は、Cas9 を含まないホモ接合性の変異体で得られたときに T2 世代まで遺伝した。ホモ接合性の変異体は背軸の表面にある気孔の直径が 8 倍以上小さくなった。オフターゲットはあまりなかった。CRISPR-LbCpfI (Lachnospiraceae バクテリア CpfI) も使って同じ OsEPFL9 遺伝子を編集した。CpfI でも遺伝子編集ができて、CRISPR-Cas9 で得られた同じ表現型が次世代へ遺伝した。	[Yin X et al.] International Rice Research Inst. Metro Manila フィリピン
63	植物	タバコ	CRISPR/Cas9	NtPIN4	Physiologia Plantarum	Analysis of Nicotiana tabacum PIN genes identifies NtPIN4 as a key regulator of axillary bud growth	2017	160(2), 2 22-239.	植物に特異的な PIN-FORMED (PIN) オーキシン流出タンパク質は多くの植物種においてよく調べられており、植物の発生の様々な点でオーキシンの輸送の制御に重要である。しかし、タバコの種での植物の発生の間の PIN の役割についてはあまり知られていない。本研究では、タバコと2つの祖先の種において PIN 遺伝子を調べた。タバコのゲノムの解析から PINファミリーの20個の遺伝子が同定された。NtPIN4 の発現はオーキシンによって正に制御されていることが示唆された。CRISPR-Cas9 技術を使って NtPIN4 についての変異体を作ると、T0 と T1 植物で腋生の芽の生長が大きくなる表現型を示した。したがって、NtPIN4 はオーキシンに依存した枝分かれの過程を研究する機会を提供する。	[Xie X et al.] Zhengzhou Tobacco Research Inst. of CNTC Zhengzhou 中国
64	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	TTG1	Plant Cell Reports	Generation of stable nulliplex autopolyploid lines of Arabidopsis thaliana using CRISPR/Cas9 genome editing	2017	36(6), 10 05-1008.	倍数性は植物の適応を可能にする進化のメカニズムであるが、すべての遺伝子コピーをノックアウトした変異を作ることに関連した難しさのために、倍数性の植物における遺伝子機能の解析は限定されていた。本研究は、シロイヌナズナにおいて零式型の4倍体の変異体の系統を作れるかを調べた。さらに、4倍体と2倍体のバックグラウンドにおいてターゲットニングによる変異誘導の相対的な効率を比較した。TTG1 遺伝子のノックアウト対立遺伝子を作るためにCRISPR/Cas9 システムを使って、ホモ接合性の零式型変異体が4倍体のシロイヌナズナにおいて直接作れることを証明した。	[Ryder P et al.] National Univ. of Ireland Galway アイルランド
65	植物	タバコ	CRISPR/Cas9	NtNAC096	Faming Zhuani Shenqing	Application of tobacco NAC096 gene for controlling tobacco aging	2017	CN 1064 80067 A 2017030 8.	タバコの NAC096 遺伝子をクローニングして、その配列や機能を調べる。CRISPR/Cas9 技術を使って NAC096 をノックアウトする。本発明はタバコの老化を制御する方法を提供する。	[Guo Y et al.] Tobacco Research Inst. of Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
66	植物	ダイズ、タバコ	CRISPR/CpfI	FAD2 バラログ、AOC	Nature Communications	CRISPR/CpfI-mediated DNA-free plant genome editing	2017	8, 14406	CpfI タンパク質とインビトロ転写したまたは化学合成した crRNA のダイズまたは野生のタバコから単離したプロトプラストへの送達を記載する。ターゲットニングによるディープシーケンシング解析から、ダイズの FAD2 バラログと野生型タバコの AOC に変異が誘導されたことが示された。SpCas9 とは異なって、CpfI は標的部位で主に多様なヌクレオチドの欠失を誘導した。ダイズのゲノムにおいて潜在的なオフターゲット部位において多くの変異は検出されなかった。	[Kim H et al.] Inst. for Basic Science Daejeon 韓国

(続き)

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
67	植物	イネ、シロイヌナズナ	CRISPR/Cpf1	4つの独立した部位	Nature Plants	A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants	2017	3(3), 170-18.	二重 RNA ポリメラーゼ II プロモーター発現システムを使って、Acidaminococcus sp. BV3L6 (As)と Lachnospiraceae bacterium ND2006 (Lb)に由来する Cpf1 の活性を植物で比較する。Lb Cpf1 はイネ T0 トランスジェニック植物において4つの独立した部位においてほぼ 100% の効率で2対立遺伝子の変異を作った。シロイヌナズナにおいて As Cpf1 と Lb Cpf1 を転写の抑制のために使って、miR159b の転写を 10 倍以上減少させた。	[Tang X et al.] Univ. of Electronic Science and Technology of China Chengdu 中国
68	植物	シロイヌナズナ	SpCas9, SaCas9	?	Scientific Reports	MISSA 2.0: an updated synthetic biology toolbox for assembly of orthogonal CRISPR/Cas systems	2017	7, 41993	2種類以上の CRISPR/Cas9 システムを使って複数の遺伝子に変異を持つ植物を作ることができる。しかし、これらのシステムの組み立てには頑強で高容量のツールキットが必要である。ここでは、複数の CRISPR/Cas システムの組み立てのために広範に更新されたツールキットである MISSA 2.0 (multiple-round in vivo site-specific assembly 2.0) を記載する。私達は、最初のプラスミド R6K に基づいたシステムよりもはるかに高いクロニング容量を持つプラスミド RK2 に基づいた新しい自殺ドナーベクターシステムを開発した。大腸菌の染色体中へ複数の DNA 断片を組み立てて、複数の遺伝子を恒常的にまたは誘導的に過剰発現するトランスジェニックシロイヌナズナを作ることによって MISSA 2.0 の有効性を確認した。次に、RK2 に由来する MISSA 2.0 ドナーベクターのより高いクロニング容量は、SpCas9 と SaCas9 を含む 2 つの CRISPR/Cas システムの組み立てを促進して、これらのシステムを持つトランスジェニック系統の作成を促進することを証明した。私達は、2 つ以上の CRISPR/Cas9 システムに基づいたマルチプレックスのゲノム編集において、また植物の合成生物学において大きな進歩を可能にすると期待する。	[Zhang HY et al.] China Agricultural Univ. Beijing 中国
69	植物	イネ	CRISPR/Cas9	miRNA 遺伝子座	Faming Zhuanli Shengqing	Method of rice miRNA directional knockout by CRISPR-Cas9 system	2017	CN 1063 67435 A 2017020 1.	本発明はイネの miRNA の変異体を得る方法を開示する。この方法は、1 つの miRNA をノックアウト、複数の miRNA をノックアウト、miRNA の大きな断片をノックアウトする CRISPR-Cas9 の方法を使うことによって特徴づけられる。この方法は、ノックアウトのためのベクターを構築して、それをイネのカルスへ導入して、スクリーニングしてイネの miRNA 変異体を得る段階から構成される。	[Zhou J et al.] Univ. of Electronic Science and Technology of China 中国
70	植物	イネ	CRISPR/Cas9	?	Molecular Plant	Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System	2017	10(3), 526-529.	シチジンデアミナーゼとウラシルグロシラーゼ阻害剤を融合させた nCas9 を使ったイネにおけるターゲティングによる点突然変異の作成を報告する。	[Li J et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) Beijing 中国
71	植物	イネ	CRISPR/Cas9	?	Molecular Plant	Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System	2017	10(3), 523-525.	CRISPR/Cas9 とラット APOBEC1 を使ってイネのゲノム中の標的塩基を正確に編集するシステムを開発した。哺乳類では塩基編集の効率を向上させるために DNA グリコシラーゼ阻害剤を使った。	[Lu Y et al.] Chinese Academy of Sciences Shanghai 中国
72	植物	メロン	CRISPR/Cas9	phytoene desaturase (CIPDS)	Plant Cell Reports	Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon	2017	36(3), 399-406.	メロンの phytoene desaturase (CIPDS) を CRISPR/Cas9 システムによってゲノム編集した。トランスフェクトしたメロンのプロトプラストの標的的部位において挿入または欠失が起きた。すべてのトランスジェニックメロンは CIPDS の変異を持ち、ゲノム編集の効率は 100% であり、明瞭なまたはモザイクのアルビノの表現型を示した。sgRNA 配列に高い相同性を持つ領域を調べると、オフターゲット変異はないらしい。CRISPR/Cas9 システムを使ってメロンでノックアウト変異が作れる。	[Tian S et al.] National Engineering Research Center for Vegetables Beijing 中国
73	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	グリコシルトランスフェラーゼ UGT79B2, UGT79B3	Plant Journal	The Arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and 79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation	2017	89(1), 85-103.	2 つのシロイヌナズナのグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子 UGT79B2, UGT79B3 は寒冷、塩、干ばつストレスを含む様々な非生物学的なストレスによって強く誘導できることを明らかにした。UGT79B2/B3 の過剰発現は低温などのストレスに対する耐性を大きく増強させた。一方で、RNAi と CRISPR-Cas9 戦略で作られた ugt79b2/b3 二重変異体は有害な条件に対してより感受性が高かった。UGT79B2 と 79B3 はアントシアニン/シルトランスフェラーゼとして同定されて、CBF1 によって制御されて、アントシアニンの蓄積を調節することによって非生物学的なストレスへの耐性を与えることを示した。	[Li P et al.] Shandong Univ. Jinan 中国

(続き)

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
74	植物	ベンサミアナタバコ、シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	6 個の遺伝子座	Plant Journal	Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit	2017	89(1), 155-168.	CRISPR/Cas9 システムをマルチプレックスで利用して、ベンサミアナタバコとシロイヌナズナの 6 個の遺伝子座において遺伝する染色体の欠失を誘導した。両方の種において小さな欠失が多く形成されることが観察されて、欠失の大きさが増えると効率が低下することを示唆する。100 bp 以下の小さな欠失はベンサミアナタバコ T0 集団とシロイヌナズナ T2 集団において高頻度で検出された。120 kb までの表現型で選択される欠失はシロイヌナズナでは低頻度で起きて、遺伝子クラスターや非コード DNA などの有用な対立遺伝子の発見につながるだろう。	[Ordon J et al.] Martin Luther Univ. Halle ドイツ
75	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	寒冷に反応する C-リビート/DRE 結合因子 (CBF1、CBF2、CBF3)	Frontiers in plant science	Accession-Dependent CBF Gene Deletion by CRISPR/Cas System in Arabidopsis	2017	8, 1910.	3 つの異なるシロイヌナズナ accession [Col-0、Ler、ストレスに反応する RD29A プロモーターに駆動されるルシフェラーゼリポーターを含む C24 accession (C24RDLUC)] において CRISPR/Cas のゲノム編集の効率を比較した。比較のために、寒冷に反応する C-リビート/DRE 結合因子 (CBF) を標的に選んだ。CBF1、CBF2、CBF3 遺伝子は寒冷ストレスシグナリングと耐性において機能する重要な転写因子として重複した機能を有して 4 番染色体の上に直列に位置する。これらの CBF 遺伝子は染色体上で接近しているため、伝統的な交配によって三重変異体 cbf123 を作ることは不可能である。そこで、CRISPR/Cas ツールを使って cbf123 変異体を作って、異なるシロイヌナズナ accession におけるゲノム編集の効率を比較することを試みた。Ler が CRISPR/Cas による欠失に対してもっとも回復力があり、T1 と T2 世代において遺伝子欠失の比がもっとも低かった。C24RDLUC は T1 世代で遺伝子欠失が観察されたときだけ T2 において高い CBF123 欠失の頻度を示した。C24RDLUC バックグラウンドにおいて単離された cbf123 変異体は CBF1、CBF2、CBF3 遺伝子とタンパク質の発現が見られず、寒冷ストレス下で CBF 標的遺伝子の発現は減少した。	[Cho S et al.] Sogang Univ. Seoul 他 韓国、中国、米国
76	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OsPsbS1	Frontiers in plant science	Genetic Architecture of Natural Variation in Rice Nonphotochemical Quenching Capacity Revealed by Genome-Wide Association Study	2017	8, 1773.	光化学に依存しない消光 (NPQ) によって与えられる光防御の過程は植物の適応度と持続可能な収量を維持することにおいて基本的な役割を果たす。529 種のイネの accession を使って NPQ 能力のためのゲノムワイド関連解析を行った。OsPsbS1 は繰り返し検出されて、2 年間の全体の関連集団の変動の 40 % 以上を説明して、集団間の交配に由来するすべての 3 つのマッピング集団において一般的で重要な量的形質遺伝子座であることが証明された。PsbS1 タンパク質の配列は高度に保存されている。OsPsbS1 RNAi 植物と CRISPR/Cas9 変異体は NPQ 値が大きく減少した。OsPsbS1 はイネの緑色の組織で特異的に強く発現する。	[Wang Q et al.] Huazhong Agricultural Univ. 他 Wuhan 中国
77	植物	イネ	CRISPR/Cas9	?	Plant & cell physiology	In Planta Processing of the SpCas9-gRNA Complex	2017	58(11), 1857-1867.	植物で CRISPR/Cas9 システムを利用するときに gRNA の発現を制御するために一般的に使われる RNA ポリメラーゼ (pol) II はモデル植物以外ではあまり特徴が調べられていない。また、pol II 転写物は機能する gRNA になるためにプロセッシングを受けなければならない。本研究では、特別な RNA プロセッシングシステムを必要とせず、機能的な gRNA が SpCas9 タンパク質と植物の内在性の RNA 切断システムを使って効率良くプロセッシングされることを示す。私たちのシステムでは 1 つの pol II プロモーターを使って 1 つの RNA として SpCas9 と gRNA を転写させる。翻訳された SpCas9 タンパク質はこの RNA に結合できて、余分な RNA 配列は植物の RNA プロセッシングシステムによって除去されて、機能的な SpCas9-gRNA 複合体を形成する。この方法を使ったときのターゲティングによる変異導入の効率はイネにおいて 100 % までの効率が得られた。	[Mikami M et al.] Yokohama City Univ. 横浜 日本
78	植物	タバコ	CRISPR/Cas9	?	Bio-Protocol	Use of geminivirus for delivery of CRISPR/Cas9 components to tobacco by agro-infiltration	2017	7(7), e209/1-e209/17.	CRISPR/Cas9 システムを利用した植物のゲノム編集のためにウイルスを用いた gRNA の送達システムを詳述する。この方法は、特にアグロバクテリウムを用いた形質転換が難しい植物細胞へ gRNA を送達するための効率の良い方法を提供する。	[Yin K et al.] Tsinghua Univ. Beijing 中国

(続き)

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
79	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	AtPAP1、AtCSTF64	Methods in molecular biology	Multiplexed Transcriptional Activation or Repression in Plants Using CRISPR-dCas9-Based Systems	2017	1629, 167-184.	CRISPR-dCas9 キメラエフェクター調節遺伝子または CRISPR 人工転写因子 (CRISPR-ATF) として知られる物の最近の進歩のために、in vivo で植物の遺伝子発現を制御するための新しい方法が急速に使われるようになった。遺伝子機能と様々な調節因子のネットワークの相互作用の研究のためにこれらの手段は特に有用である。第一世代の CRISPR-ATF は、dCas9 タンパク質が既知の転写活性ドメイン (VP64) または抑制ドメイン (SRDX) と融合されている dCas9-CRISPR システムである。複数のキメラ dCas9-エフェクター融合タンパク質が CRISPR gRNA を介して遺伝子調節領域へ導かれたとき、植物体において転写のレベルの発現を調節できる。ここで示すプロトコールはシロイヌナズナにおいて AtPAP1 を活性化して AtCSTF64 を抑制するための詳細な手順である。このプロトコールは、マルチプレックスの CRISPR-Cas9 転写制御コンストラクトの結合とクローニングを効率化するための私たちの植物 CRISPR ツールボックスを使う。	[Lowder L G et al.] East Carolina Univ., Greenville 米国
80	植物	ブドウ	CRISPR/Cas9	フィットエンデサチュラーゼ (VvPDS)	PLoS one	CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape	2017	12(5), e0177966.	ブドウは果物とワインの原料として重要な作物であるが、現在までにゲノム編集が行われた報告はほとんどない。本研究では、ブドウにおいて CRISPR/Cas9 システムを使っているターゲットングによる変異導入に成功したことを報告する。フィットエンデサチュラーゼ (VvPDS) 遺伝子を標的とした sgRNA 発現コンストラクトとともに Cas9 発現コンストラクトで胚のカルス形成質転換させたときにアルビノの葉を持つ再生された植物が得られた。DNA シークエンシングによって標的部位に変異が導入されていることを確認した。変異した細胞の比は低くて古い葉において高かった。	[Nakajima I et al.] National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba 他 日本
81	植物	?	CRISPR/Cpf1	?	Trends in plant science	CRISPR-Cpf1: A New Tool for Plant Genome Editing	2017	22(7), 550-553.	Prevotella と Francisella に由来する Cpf1 は CRISPR-Cas9 よりも効率や特異性が高く、潜在的に広く応用できる。Cpf1 は DNA を使わないゲノム編集を含めて効率の良いゲノム編集のための新しいツールとして登場した。	[Zaidi S S E A et al.] National Inst. for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), Faisalabad, パキスタン
82	植物	ベンサミアアナタバコ	CRISPR/Cas9	?	Plant Cell Physiology	A Split Staphylococcus aureus Cas9 as a Compact Genome-Editing Tool in Plants	2017	58(4), 643-649	活性のあるタンパク質を形成するためには再結合が必要になる 2 つの不活性な断片にタンパク質を分割するタンパク質分割法はタンパク質の活性を制御できて転写単位を小さくできる。本研究では Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) は分割できて、アグロバクテリウムから発見させた分割した SaCas9 はベンサミアアナタバコにおいてターゲットングによる変異を誘導できることを示す。SaCas9 は SpCas9 よりも小さく、分割した SaCas9 は植物のゲノム編集のための CRISPR/Cas9 として最小である。2 つの組み合わせの分割した SaCas9 はゲノム編集の活性を示し、その 1 つの活性は全長の SaCas9 とほぼ同じだった。植物ウイルスベクターを使った分割した SaCas9 システムはゲノムへの取り込みのない植物のゲノム編集のための有望なツールであることを示唆する結果が得られた。分割した SaCas9 は CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の活性を植物細胞において時間的にかつ空間的に制御するための潜在的な能力がある。	[Kaya H et al.] National Agriculture and Food Research Organization Tsukuba 他 日本
83	植物	トマト	CRISPR/Cas9	SlIAA9	Scientific reports	Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9	2017	7(1), 507	園芸用の作物の単為結実、直接的な食物の品質と多様な産業の目的のための農業の価値とともに重要な性質である。ここでは、CRISPR/Cas9 システムを使って単為結実するトマトを作るための育種の戦略を証明する。単為結実を制御する重要な遺伝子である SlIAA9 に体細胞レベルで 100 % までの効率で T0 世代に変異を導入するために CRISPR/Cas9 システムを最適化した。私たちが設計した gRNA を使うと、オフターゲット変異が誘導されないことをディープシークエンシングの解析で示した。再生した変異体は葉の形に形態学的な変化があつて種のない果実ができた。分離した T1 世代はホモ接合性の変異に関連した重大な表現型を示した。この方法は多くの品種で単為結実するトマトを作るために応用できるかもしれない。	[Ueta R et al.] Tokushima Univ. Tokushima 他 日本

(続き)

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
84	植物	シロイヌ ナズナ	CRISPR/Cas9	TRANSPARENT TESTA4 (TT4) 遺伝子 上の 3 つ の別の遺伝子 座	Methods in molecular biology	Rapid Construction of Multiplexed CRISPR-Cas9 Systems for Plant Genome Editing	2017	1578, 291-307.	本研究では、マルチプレックス CRISPR-Cas9 を使ってシロイヌナズナの TRANSPARENT TESTA4 (TT4) 遺伝子上の 3 つの別の遺伝子座に対して同時のターゲティングを行なうための詳細なプロトコールの形で技術的なサポートを提供する。私達はシロイヌナズナの 1 つの遺伝子上の複数の遺伝子座を標的とするが、同じ方法で他の植物における複数の遺伝子または対立遺伝子を標的にできる。プロトコールは試葉の概説から始まって、gRNA の設計と Golden Gate クローニングとマルチサイト Gateway LR 組換えを使って最終的な T-DNA ベクターへ成分を結合させることを取り上げる。	[Lowder L et al.] Univ. of Maryland, Greenville 米国
85	植物	シロイヌ ナズナ	CRISPR/Cas9	?	Frontiers in plant science	An Efficient Visual Screen for CRISPR/Cas9 Activity in Arabidopsis thaliana	2017	8, 39.	本研究では恒常的に発現する Cas9 遺伝子を含む DNA ベクターへ任意の sgRNA 配列をクローニングするために使えるベクターシステムを設計した。このベクターを使って <i>in vivo</i> で Cas9 による遺伝子編集を追求するための 2 つの代替のマーカである BIALPHOS RESISTANCE (BAR) と GLABROUS1 (GL1) の可能性を調べた。BAR はグルホシネートへの耐性を与えて正の選択マーカとして広く使われる。GL1 は毛状突起の形成に必要である。フレームシフトで生じた BAR のヌル対立遺伝子の機能を有する対立遺伝子への Cas9 に媒介される遺伝子編集による逆戻りは期待されたよりも多くの植物をもたらした。驚くことに、これらの植物中の BAR が逆戻りした数少ない細胞がグルホシネートへのシステム全体での耐性を提供していると私達は仮説を立てて、Cas9 に媒介される遺伝子編集を追求するためのマーカとして BAR は適さないことを私達は示唆する。Cas9 を使って破壊のために GL1 遺伝子をターゲティングすると、部分的にまたは完全に無毛の植物という明らかに判別できる表現型を提供する。解析した T1 植物の 50 % はキメラ表現型の子孫を作り、高い効率で T3 世代において完全にホモ接合性の植物を回復できた。シロイヌナズナにおいて Cas9 に媒介される遺伝子編集を評価して最適化するために GL1 のターゲティングが適切であると私達は提案する。	[Hahn F et al.] Heinrich Heine Univ. Duesseldorf 他 ドイツ
86	植物	アサガオ	CRISPR/Cas9	ジヒドロフラボノール-4-レダクターゼ-B (DFR-B)	Scientific Reports	CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory Ipomoea (Pharbitis) nil	2017	7(1), 10028.	CRISPR/Cas9 技術を実験に適用した。アントシアニン合成酵素のジヒドロフラボノール-4-レダクターゼ-B (DFR-B) を標的遺伝子として選んだ。アグロバクテリウムに媒介される形質転換による組織培養の初期に茎の色の変化が観察された。32 個のトランスジェニック植物の中の 24 個 (75 %) は 2 つの対立遺伝子で標的部位に変異があつてアントシアニンの少ない白い花ができた。これらの変異は一塩基または数塩基の indel だった。この研究は CRISPR/Cas9 技術を使って高等植物の花の色を変えた最初の報告である。	[Watanabe K et al.] Univ. of Tsukuba Tsukuba 日本
87	植物	ポプラ、シロイヌ ナズナ	CRISPR/Cas9	PtoMYB170	Tree Physiology	PtoMYB170 positively regulates lignin deposition during wood formation in poplar and confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis	2017	37(12), 1713-1726.	ポプラの生合成の制御で重要であると同定されている転写因子は限定される。本研究では、重複しているパラログの PtoMYB216 と比較しながらリグニンの蓄積と干ばつへの耐性において保存されて独自の機能を持ち、中国白ポプラから単離された転写因子である PtoMYB170 を報告する。PtoMYB170 は若い葉と木部の組織で好んで発現する。トランスジェニックポプラ植物で PtoMYB170 を過剰発現させると、野生型と比較してより強い木質化が起きて木部においてより厚い二次壁ができた。一方で、CRISPR/Cas9 を使って作った PtoMYB170 の変異はリグニンの蓄積を弱めて、より柔らかくつづれた木部の表現型になった。一過性の発現の実験は、PtoMYB170 はリグニンの生合成遺伝子の発現を特異的に活性化して、PtoMYB216 の機能と一致することを証明した。しかし、GUS 染色アッセイから、PtoMYB170 はトランスジェニックシロイヌナズナの孔辺細胞で特異的に発現しているが、PtoMYB216 はそうではないことが明らかになった。シロイヌナズナにおける PtoMYB170 の異種発現は、暗い場所で気孔の閉鎖が増強されて水分を失うことが減ってトランスジェニック植物が干ばつに耐性になり、PtoMYB216 とは異なる役割を持つことを示している。	[Xu C et al.] Southwest Univ. Chongqing 中国

(続き)

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
88	植物	ベンサミアナタバコ、トマト	CRISPR/Cas9	トマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)ゲノム中の外被タンパク質とレプリカゼ遺伝子	bioRxiv, Plant Biology	Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato	2017	1-18.	私達はベンサミアナタバコとトマトに CRISPR/Cas9 システムを応用してトマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)に対する免疫を与えた。TYLCV ゲノム中の外被タンパク質とレプリカゼ遺伝子を標的のすると、効率の良いウイルス干渉が起きて、トランスジェニック植物において TYLCV DNA ゲノムの蓄積が小さくなった。ベンサミアナタバコとトマトの複数の世代にわたって CRISPR/Cas9 による免疫は活性が続いた。他の穀物においても CRISPR/Cas9 システムを使って一つまたは複数の感染性ウイルスに対する抵抗性を与えることができるかもしれない。	[Tashkandi M et al.] King Abdullah Univ. of Science and Technology Thuwal サウジアラビア
89	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	?	bioRxiv, Molecular Biology	High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and its prevention by improving specificity of the tools	2017	1-27.	シロイヌナズナの変異体の T1 世代では CRISPR/Cas9 によって誘導されるオフターゲット変異の頻度は予想よりもかなり高いことを示す。オフターゲット効果は T2 世代でさらに悪くなることも示す。オフターゲット効果を防ぐために、2 つの戦略を試して最適化した。それらは、Cas9 を含まない変異体を簡単に単離するために mCherry カセットを導入したこと、高度に特異的な SpCas9 変異体の使用である。元の sgRNA の足場よりも tRNA と変異体の融合は編集の効率を有意に改善する。8 個の高特異性の SpCas9 変異体と改良された tRNA-sgRNA の融合戦略を組み合わせて編集の効率を調べた。高度に特異的な SpCas9 変異体は高い編集効率を維持するために野生型よりも高い発現レベルを要求する。CRISPR/Cas9 による切断部位に T-DNA が高頻度で挿入されることも示した。	[Zhang Q et al.] China Agricultural Univ. Beijing 中国
90	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	CLV3、CLE40、CLE44	Plant and Cell Physiology	A collection of mutants for CLE-peptide-encoding genes in Arabidopsis generated by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting	2017	58(11), 1848-1856.	植物では CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE) ペプチドとその受容体は生活環の様々な局面に関連していると考えられる。この重要性は広く認識されているが、大部分の CLE ペプチドは機能的にまだ同定されていない。シグナルを伝える小さなペプチドをコードする遺伝子の研究の大きな問題は、遺伝子が小さいために入手できる機能を喪失した変異体の数が限定されることである。CRISPR/Cas9 に媒介される遺伝子ターゲティングは、遺伝子の大きさに関わらず任意の遺伝子にターゲティングによる変異を作れるので、この問題を克服する潜在的な能力がある。本研究では、CLE ペプチドをコードする遺伝子の一連の変異体を作成した。新たに作成した clv3 と cle40 変異体は、それぞれ芽の頂端分裂組織と根分裂組織において期待された表現型を再現した。私達の結果は、CRISPR/Cas9 によって媒介される遺伝子ターゲティングは小さな遺伝子に対しても遺伝子の解析に有用であることを示す。tracheary elements differentiation inhibitory factor (TDIF) をコードすると考えられる CLE44 に対する新しい変異体も報告する。CLE44 は維管束の発生に寄与することを示す。ここに示す生物資源は CLE ペプチドのさらなる同定に有用だろう。	[Yamaguchi Y et al.] Kumamoto Univ. Kumamoto 日本
91	植物	カマリナ・サティバ	CRISPR/Cas9	CsDGAT1、CsPDAT1	Plant and Cell Physiology	Simultaneous targeting of multiple gene homeologs to alter seed oil production in <i>Camelina sativa</i>	2017	58(7), 1260-1267.	他の植物に由来する生合成酵素でカマリナ・サティバを容易に形質転換する能力は、この油糧種子穀物を他の応用に有用なまねな脂質を生産するための理想的な基盤とする。しかし、標的の化合物の生産を増強するためには、外来の酵素の発現に加えて共通の基質や補因子に対する競合を減らすために内在性の酵素活性の抑制も必要である。カマリナは比較的未分化な 6 倍体のゲノムを持つので、3 個までの遺伝子ホモログが任意の酵素活性をコードするので、内在性の生合成経路を変えることは難しい。3 個のホモログに共通の配列を認識する gRNA を設計して、発生中の種子のトリアシルグリセロール (TAG) 合成に重要な CsDGAT1 と CsPDAT1 遺伝子の 3 個の全てのホモログに変異を導入する CRISPR/Cas9 システムの能力を証明する。トランスジェニック T1 植物の配列解析から、CsDGAT1 または CsPDAT1 の各々のホモログは複数の変異によって変えられており、遺伝的モザイクになっていることが明らかになった。CsDGAT1 および CsPDAT1 の両方をターゲティングした系統から収穫された種子は、しばしば縮んでしわができていた。さらに、脂質の分析から、多くの系統は油の量の減った、脂肪酸の組成が変わった種子を生産することが明らかになり、種の油の生合成における標的とされた遺伝子の役割と一致する。	[Aznar-Morano J A et al.] Kansas State Univ. Manhattan 米国

(続き)

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
92	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	PHYTOENE DESATURASE 3, AGAMOUS, DUO POLLEN, アルコール脱水素酵素	Plant and Cell Physiology	pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2017	58(1), 46-56.	植物における CRISPR/Cas9 のためのバイナリーベクターには低い効率に伴う問題がある。本研究では、シロイヌナズナにおける CRISPR/Cas9 のために新しく開発された、高い効率のベクターである pKAMA-ITACHI Red (pKIR) を示す。これは、Cas9 を駆動するための RIBOSOMAL PROTEIN S5A (RPS5A) を含む。RPS5A プロモーターは、卵細胞から始まって分裂組織細胞を含めて全ての発生の段階で高い恒常的な発現を維持する。T1 世代においてさえ pKIR は PHYTOENE DESATURASE 3, AGAMOUS, DUO POLLEN においてヌル表現型を誘導した。pKIR によって誘導される変異は T1 世代の生殖細胞系統において運ばれる。驚くことに、いくつかの系統では 100% の T2 植物がアルコール脱水素酵素のヌル表現型を持ち、pKIR は遺伝する変異を強く誘導することを示す。pKIR の蛍光マーカーを発現する T2 種子を取り除くことによって、Cas9 を含まない T2 変異植物を得た。	[Tsuji H et al.] Nagoya Univ. Nagoya 日本
93	植物	コムギ	TALEN, CRISPR/Cas9	?	Methods in Molecular Biology	Targeted mutagenesis in hexaploid bread wheat using the TALEN and CRISPR/Cas systems	2017	1679, 169-185.	TALEN と CRISPR/Cas9 システムは複数コピーまたは 1 コピーの遺伝子を標的とすることによってコムギにおいて機能を喪失させた対立遺伝子を作るために使われてきた。本研究では、この 2 つのシステムを使ってコムギのゲノムを修飾するためのプロトコールを提供する。そのプロトコールは、TALEN と CRISPR/Cas9 の標的部位の設計、それらの構築、プロトプラストでの活性の評価、植物の形質転換と変異のスクリーニングを含む。	[Wang Y et al] 米国
94	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	?	Methods in Molecular Biology	Use of the Cas9 orthologs from <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> for non-homologous end-joining mediated site-specific mutagenesis in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2017	1669, 365-376.	本研究では、シロイヌナズナにおけるターゲティングによる NHEJ に媒介される変異の導入のために <i>Streptococcus thermophilus</i> と <i>Staphylococcus aureus</i> に由来する 2 つの Cas9 のオルソログの応用を記述する。2 つのオルソログについて、誘導された変異の効率の良い遺伝子が示された。これらのオルソログは SpCas9 よりも小さく、PAM が異なっており、植物のゲノム工学において魅力的な代替のためのツールである。	[Steinert J et al]
95	植物	イネ	CRISPR/Cas9	OsFH15	Scientific Reports	OsFH15, a class I formin, interacts with microfilaments and microtubules to regulate grain size via affecting cell expansion in rice	2017	7(1), 1-14.	米の大きさは収量を決める重要な性質であり、小穂の外皮の大きさによって主に制限される。しかし、小穂の外皮の大きさがどのように制御されるかはほとんど知られていない。本研究では、イネのクラス I の formin タンパク質である OsFH15 が細胞と小穂の大きさを制御できることを見出した。OsFH15-Cas9 と OsFH15-RNAi 変異体は野生型と比較して、細胞の長さや幅、外花穎の内表皮細胞の面積が小さくて米が小さかった。対照的に、OsFH15 を過剰発現させた植物は、より豊富な微小管 (MTs) とアクチン線維 (AFs) の配列があり、より大きな細胞を持つ大きな米が得られた。OsFH15 は AFs と MTs を制御することによって細胞の拡大に影響して米の大きさを制御することにおいて重要な役割を果たすことを本研究は証明した。	[Sun T et al.] Beijing Normal University Beijing 中国
96	植物	?	CRISPR/Cas9	カリフラワーモザイクウイルスの外被タンパク質のコード領域	bioRxiv, Plant Biology	CRISPR/Cas9-mediated resistance to cauliflower mosaic virus	2017	1-25.	抵抗遺伝子 (R 遺伝子) を利用してウイルスに耐性な植物を育種するときには、遺伝資源の中から R 遺伝子を見つけられるか、その系統特異性によって限定される。私達は、CRISPR/Cas9 システムを使ってウイルスの外被タンパク質の配列にマルチプレックスのターゲティングをすることで、パラレトウイルスであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) に強い耐性ができることを証明する。さらに、siRNA が生産されて、その大部分が sgRNA の 3' 末端へマッピングされて、ほんのわずかな分がスプーサー領域へもマッピングされる。しかし、Cas9 が存在しないと抵抗性がないので、これらの siRNA が CaMV 感染の阻害をもたらすのではない。いくつかのトランスジェニック植物の感染した葉において、外被タンパク質のコード領域中の標的部位で Cas9 によって誘導される DNA の切断と一致した短い欠失または挿入が起きている編集されたウイルスが観察された。これらの編集された外被タンパク質は多くの場合に翻訳の早い終了が起きて機能しない。感染したトランスジェニック植物から野生型の外被タンパク質も回収されて、これらの編集されたウイルスのゲノムは野生型の外被タンパク質によってパッケージングされたことを示唆する。さらに修飾すれば、植物のパラレトウイルスの制御のために CRISPR/Cas9 システムが使えることを本研究は証明する。	[Liu H et al] Virginia Tech, Blacksburg 米国

(続き)

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
97	植物	?	CRISPR/Cas9	?	Nature Plants	A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells	2017	3(12), 930-936.	合成した転写活性化因子は、プログラム可能なDNA結合モジュールによって内在性の遺伝子座の狙ったプロモーターへ自己の転写活性化ドメイン(TAD)をつなぐことによって遺伝子を活性化するための有望な代替戦略を提供する。既知のプログラム可能なDNA結合モジュールの中では、ヌクレアーゼとして機能しないSpCas9(dCas9)がZFNやTALENよりも優れている。dCas9に基づいた強い転写活性化システムであるVPR、SAMとSunTagは動物細胞用に開発された。しかし、植物細胞のための効率の良いdCas9に基づいた転写活性化の方法はまだない。本研究では、植物細胞に基づいたスクリーニングによって新しいdCas9-TADであるdCas9-TVを開発した。dCas9-TVは、植物細胞と哺乳動物細胞の両方で広く使われるdCas9-VP64よりもずっと強い転写活性化を1つまたは複数の標的遺伝子に与える。	[Li Z et al] Sun Yat-sen Univ. Guangzhou 中国
98	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	GRXS17	bioRxiv, Plant Biology	A dual sgRNA approach for functional genomics in Arabidopsis thaliana	2017	1-31.	T-DNAの挿入によって作られた系統がいつもマル対立遺伝子を持つとは限らないので、モデル植物であるシロイヌナズナにおいてさえ遺伝子編集技術の登場は歓迎される。本研究では、遺伝子を過剰発現する系統を作るのと同じくらいの仕事量でCRISPR/Cas9を使ってシロイヌナズナにおいて遺伝する変異を効率良く作った。T2世代で2つの対立遺伝子に変異を持つCas9のマル分離個体を得た。ここで報告する7つの新しい変異対立遺伝子の中で、ヒトGRX3/PICOTのオルソログであるGRXS17の1つの対立遺伝子は以前に特徴付けられたマルを表現模写しなかった。変異はフレームシフトを起こし、ナンセンスコドンに媒介される減衰をもたらした。私たちの作業の流れは2つのsgRNAを利用する方法でも一緒に使えることを証明した。	[Pauwels L et al] Ghent Univ. Ghent ベルギー
99	植物	?	CRISPR/Cas9	?	U.S. Pat. Appl. Publ.	Engineering plants comprising synthetic signal transduction systems including hormone-degradable nuclease-null Cas9, nuclear localization signal, phytohormone degron and transcriptional regulation domain	2017	US 2017 0369892 A1 2017 1228.	合成のシグナル伝達システムを提供する。合成のシグナル伝達システムは、ヌクレアーゼとして機能しないCas9タンパク質、核局在化シグナル、植物ホルモンデグロン、転写制御ドメインを含むホルモンによって分解されるCRISPRに基づいた転写因子である。天然に存在しない植物を作る方法も提供する。この方法は植物における合成のシグナル伝達システムを発現させることを含めてよい。この方法によって形成された天然には存在しない植物も提供する。	[Klavins E et al] Univ. of Washington 米国
100	植物	トマト	CRISPR/Cas9	SIMYB12	Faming Zhuani Shengqing	Gene editing using crispr/cas9 system to create pink-fruit tomato	2017	CN 107 312795 A 20171 103.	本発明は、CRISPR/Cas9システムを使ってSIMYB12遺伝子を編集して赤い果実のトマトをピンクの果実のトマトに変える。遺伝子編集の標的部位を決めて、Cas9とgRNAの遺伝子を含むベクターをアグロバクテリウムを使ってトマトのカルスへ導入する。シークエンシングによってホモ接合性の変異体を選ぶ。ピンクの果実のトマトではSIMYB12の機能が完全に失われていた。	[Cheng Y et al] Zhejiang Academy of Agricultural Sciences 中国
101	植物	トウモロコシ	TALAN、CRISPR/Cas9	アゼトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS)	Faming Zhuani Shengqing	Application of herbicide resistant protein and its application in plant breeding	2017	CN 1072 67480 A 2017102 0.	除草剤耐性タンパク質であるアゼトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)、その遺伝子、植物の育種におけるその応用を開示する。この方法は、トウモロコシにおいて変異ライブラリーを構築すること、除草剤耐性の一連の変異体をスクリーニングすること、除草剤に耐性なAHAS遺伝子を得ることから構成される。	[Wang Z et al.] Weiming Xingwang System Crop Design Frontal Laboratory Co., Ltd. Beijing 中国
102	植物	トマト	CRISPR/Cas9	?	Cell	Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing	2017	171(2), 470-480.e 8.	本研究では、プロモーターをCRISPR/Cas9を使ってゲノム編集することで育種のための有用な定量的な変動を提供するシス制御性の多様な対立遺伝子を作れることを証明する。私達は簡単な遺伝的な手順を工夫した。そこでは、ヘテロ接合性の機能を失った変異のバックグラウンドにおいて世代を超えたCas9活性の遺伝子を利用した。トマトにおける3つの重要な生産性に関する性質(果実の大きさ、花序の枝分かれ、植物の構造)を制御する遺伝子のための多様なプロモーターの変異体の表現型に対する影響を迅速に評価した。私達の方法は、外来遺伝子を含まない植物において新しい対立遺伝子の直接的な選抜と固定、収量に関連する因子の精妙な操作を可能にする。	[Rodriguez-Leal D et al.] Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor 米国

(続き)

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
103	植物	ベンサミアナタバコ	CRISPR/Cas9	テロメア	Plant Journal	Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements	2017	91(4), 565-573.	ゲノムの空間的、時間的な構造の解明は発生や環境の変化のときの遺伝子の制御を理解するうえで不可欠である。私達は CRISPR/Cas9 の 2 つのオルソログを使ったイメージング技術を証明する。触媒的に不活性化された SpCas9 と SaCas9 へ eGFP/mRuby2 を融合することによって、ベンサミアナタバコの生きた葉の細胞においてテロメアの繰り返し配列をしっかりと方法で可視化した。中間期の 30 分間で 2 mm までテロメアが動くことを明らかにした。さらに、CRISPR-dCas9 は蛍光ラベルしたタンパク質と組み合わせて in vivo における DNA-タンパク質の相互作用を可視化できることを示した。2 つの dCas9 オルソログを同時に使うことによって生きた植物細胞において複数の遺伝子座をイメージングする道を開く。	[Dreissig S et al] Leibniz Inst. of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben ドイツ
104	植物	?	CRISPR/Cas9	?	PCT Int. Appl.	Nucleotide base conversion in specific target double-stranded DNA sequence in monocotyledonous plant genome by CRISPR-Cas system using Cas9 nickase-cytidine deaminase chimera	2017	WO 2017090761 A1 2017 0601.	単子葉植物の細胞中に存在する DNA 中の標的部を修飾する方法を提供する。この方法では、標的のヌクレオチドとヌクレオチドを変換する酵素が結合して、DNA 二本鎖中の一本鎖を切断せずに 1 個または複数のヌクレオチドが変換、欠失、挿入される。核酸配列を認識してヌクレオチドを変換する複合体をコードする遺伝子を単子葉植物の細胞へ導入することによって行なわれる。	[Nishida K et al] National Univ. Corporation Kobe Univ. 日本
105	植物	?	TALEN, CRISPR/Cas9	パタチン様のホスホリパーゼ lia (pPLAIIa, MATRINIEAL)	PCT Int. Appl.	Chemical applications and mutated patatin-like phospholipase 2alpha (PLA2 or MATRILINEAL)-based compositions for haploid induction in plants	2017	WO 2017087682 A1 2017 0526.	植物で単数を誘導するために変異したパタチン様のホスホリパーゼ lia (pPLAIIa, ここでは MATRINIEAL と改名する) を使うこと、pPLAIIa をクローニングすること、変異した pPLAIIa を含む植物を遺伝子工学によって作るための方法をここでは提供する。単数の生産を誘導するために受粉のときに化学物質、脂質、MATRINIEAL RNAi 分子を局所的に噴霧する方法も提供する。さらに、胚の流産を減らして種子の形成を増やしつつ単数の誘導をするために受粉のときに植物を化学物質で処理する方法も提供する。	[Kelliher T et al] Syngenta Participations AG スイス
106	植物	イネ	CRISPR/Cas9	Broad-Spectrum Resistance 1 (BSR1)	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	The receptor-like cytoplasmic kinase BSR1 mediates chitin-induced defense signaling in rice cells	2017	81(8), 1497-1502.	Broad-Spectrum Resistance 1 (BSR1) はイネの受容体様の細胞質のキナーゼをコードして、過剰発現させると疾病への耐性が増強される。BSR1 を過剰発現するイネは様々な病原菌に対して高度に耐性である。しかし、この耐性のメカニズムは不明である。BSR1 の機能を解析するために、CRISPR/Cas9 システムを使って BSR1-ノックアウト (BSR1-KO) 植物を作った。懸濁培養細胞を使った実験から、イネいもち病菌のオートクレーブした分生子によって誘導される過酸化水素の生産と防御関連遺伝子の発現が BSR1-KO 細胞において減少していることが明らかになった。さらに、イネいもち病菌の微生物に関連した分子パターンとして機能するキチンオリゴマーによる処理では BSR1-KO 細胞で防御応答がかなり抑制されていた。	[Kanda Y et al] Institute of Agrobiological Sciences NARO Tsukuba 日本
107	植物	イネ、コムギ、トウモロコシ	CRISPR/Cas9	?	Nature Biotechnology	Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion	2017	35(5), 438-440.	外来 DNA ドナーや DNA 二本鎖の切断を必要としない標的塩基の置換は多くの穀物においてゲノムの修飾と育種を加速するだろう。私達は CRISPR-Cas9 ニッカーゼ-シチジンデアミナーゼの融合タンパク質を使ってプロトスペーサー内の 3-9 位のシトシンをチミンへターゲットイングによる変換を行なった。プロトプラストと再生させたイネ、コムギ、トウモロコシにおいて 43.48 % までの頻度で得られた。	[Zong Y et al] Chinese Academy of Sciences Beijing 中国
108	植物	?	CRISPR/Cas9	?	PCT Int. Appl.	Methods for autocatalytic genome editing and neutralizing autocatalytic genome editing and compositions thereof	2017	WO 2017049266 A2 2017 0323.	ここで開示するのは、自己触媒的なゲノム編集とその中和のための方法と化合物である。自己触媒的なゲノム編集は複数の因子を含むコンストラクトのゲノムへの取り込みまたは遺伝因子が別個に増殖するトランス相補性に基づいてよい。本開示は、CRISPR/Cas9 システムに基づいた自己触媒的なゲノム編集の方法を提供する。さらに、本開示は、病原菌を排除する、穀物の害虫を狙って抑制する、ウイルス(たとえば HIV) やレトロウイルスに引き起こされる疾病(たとえば癌) と戦う、ほぼ全ての子孫に伝達されるホモ接合性の変異を作るために動物、ヒト、植物における自己触媒的なゲノム編集の方法も提供する。	[Bier E et al] The Regents of the Univ. of California 米国
109	植物	?	TALEN, CRISPR/Cas9	Dipgene、そのホモログや変異体	PCT Int. Appl.	Diplospory gene and prodn. of apomictic seed in transgenic crop plants	2017	WO 2017039452 A1 2017 0309.	本発明は、Dipgene とその(機能的な)ホモログ、断片と変異体のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を提供して、それらは無配偶生殖の一部として複相胞子生殖を提供する。複相胞子生殖をする植物とそれらを作るための方法、これらを使うための方法、無配偶生殖でできる種子を作る方法も提供する。	[Van D et al] Keygene N.V. オランダ

(続き)

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
110	植物	?	TALEN、CRISPR/Cas9、Cpf1	?	PCT Int. Appl.	Enhanced recombination of plant genomic loci for greater plant disease resistance	2017	WO 2017034971 A1 20170302.	本発明は、選んだ遺伝子座において組換えを加速して、選んだ遺伝子座で分子的な変動の起きる出来事を選ぶ方法を提供する。加速した組換えは、植物や哺乳動物のゲノムに存在する遺伝子クラスターの中の新しい変動を作る。植物では疾病に対する耐性を強化できる。	[Caldwell D et al] Monsanto Technology LLC 米国
111	植物	?	CRISPR/Cas9	VPS23A	Faming Zhuani Shengqing	Plant drought resistance-associated protein VPS23A and its coding gene, and application thereof	2017	CN 106432449 A 20170222.	本発明は干ばつに関連する VPS23A タンパク質、それをコードする遺伝子、その応用を開示する。VPS23A のアミノ酸配列を表に示す。また、その配列に 1 個または複数のアミノ酸残基の置換および/または欠失および/または挿入によって得られる配列も本発明に関連する。VPS23A 遺伝子の発現を阻害する実験では、植物の干ばつへの耐性が有意に改善されることが証明された。本発明は、穀物の改善と干ばつに耐性な穀物の栽培においてとても重要である。	[Xie Q et al] Chinese Academy of Sciences 中国
112	植物	コムギ	TALEN、CRISPR/Cas9	?	PCT Int. Appl.	Modified wheat with resistance to powdery mildew	2017	WO 2017013409 A2 20170126.	本発明は、ターゲティングによるゲノム修飾を使ってコムギにおいて病原菌に対する耐性を増強することに関連する。	[Gao C et al] The Inst. of Genetics and Developmental Biology 中国
113	植物	イネ	CRISPR/Cas9	β -グルクロニダーゼ (GUS)	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	Dual-targeting by CRISPR/Cas9 for precise excision of transgenes from rice genome	2017	129(1), 153-160.	本研究は植物ゲノムからマーカー遺伝子を切除するために CRISPR/Cas9 システムが使えるかを調べた。これは、マーカーを含まないトランスジェニック植物を開発することに関連した応用である。 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を発現するトランスジェニックイネの系統を Cas9 と 1.6 kb の GUS 遺伝子の両端を標的とする gRNA を発現するコンストラクトをアグロバクテリウムまたは遺伝子銃によって形質転換した。形質転換した系統の解析から、カルス系統では切除は低頻度で起きて、植物の系統ではより高頻度で起きることが明らかとなり、再生した植物において Cas9:gRNA の効率が低い。3 個の独立したイベントから由来する植物において 2 つの対立遺伝子に切除が観察されて、T0 世代でホモ接合性の切除を受けた系統の回収が可能だった。切除の部位または周辺で変異が起きず、正確な切断と 2 つの平滑末端の正確なライゲーションによって切除が形成された。	[Srivastava V et al] Univ. of Arkansas Fayetteville 米国
114	植物	?	TALEN、CRISPR/Cas9	?	U.S. Pat. Appl. Publ.	DNA methyltransferase fusion protein method for increasing plant yields	2017	US 20170016017 A1 20170119.	本発明は、先祖の植物における DNA メチルトランスフェラーゼ融合タンパク質を発見させることによって有用な性質を示す植物を得るための方法を提供する。たとえば、収量の増加した植物である。植物で有用な性質を得るために利用できる遺伝子座およびそのような遺伝子座を持って生産される植物を同定するための方法も提供する。さらに、有用な性質を示す植物、種子を含む植物の部分、植物の製品、その植物を使うための方法も提供する。組換え DNA ベクターと、DNA メチルトランスフェラーゼ融合タンパク質を発見するベクターを含む植物も提供する。	[Fromm ME] 米国
115	植物	イネ	CRISPR/Cas9	miRNA 遺伝子 (OsMIR408、OsMIR528) と miRNA 遺伝子ファミリー (miR815a/b/c、miR820a/b/c)	Frontiers in plant science	CRISPR-Cas9 Based Genome Editing Reveals New Insights into MicroRNA Function and Regulation in Rice	2017	8, 1598.	本研究では、イネにおいて 1 つの miRNA 遺伝子 (OsMIR408、OsMIR528) と miRNA 遺伝子ファミリー (miR815a/b/c、miR820a/b/c) を CRISPR/Cas9 によってターゲティングした。CRISPR/Cas9 によって作られた変異体を同定するために RFLP よりも SSCP がより信頼できる手法であることを示した。再生した T0 系統の中でターゲティングによる変異導入の頻度は、すべての試した miRNA 標的部位の中で 48-89 % だった。miRNA528 の場合には 3 つの独立した gRNA は確認された系統の中ですべて 2 つの対立遺伝子に変異を作った。2 つの gRNA によってターゲティングされたときには、T0 イネ系統で 60 % までの頻度で miRNA 遺伝子は容易に削除できた。したがって、CRISPR-Cas9 は植物の miRNA をノックアウトするための効率の良いツールであることを証明した。OsMIR408 と OsMIR528 の変異体を使って、1 つの miRNA をノックアウトすると、無関係に思える他の多くの miRNA の発現プロファイルの変化が起ることを見出した。OsMIR528 は塩によるストレスで正の制御因子であることが明らかになった。	[Zhou J et al] Univ. of Electronic Science and Technology of China 他 中国

(続き)

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
116	植物	?	CRISPR/Cas9	?	Progress in molecular biology and translational science	Engineering Molecular Immunity Against Plant Viruses	2017	149, 167-186.	本研究では、植物において DNA および RNA ウイルスに対して分子免疫を作るために CRISPR/Cas9 システムなどの部位特異的なスクリーニングを使うことを議論する。1つまたは複数のウイルス感染に耐性になるようにした植物を作るときに出会う潜在的な課題にどう取り組むかも考えた。	[Zaidi SSSA et al] Univ. of Science and Technology 他 サウジアラビア
117	植物	シロイヌナズナ	CRISPR/Cas9	?	Progress in molecular biology and translational science	On Improving CRISPR for Editing Plant Genes: Ribozyme-Mediated Guide RNA Production and Fluorescence-Based Technology for Isolating Transgene-Free Mutants Generated by CRISPR	2017	149, 151-166.	選んだ任意のプロモーターから sgRNA の生産を可能とするリボゾームに基づいた戦略の開発を記す。この方法は時間的および空間的に正確に sgRNA を生産することを可能として、CRISPR/Cas9 技術の範囲と応用を大きく広げる。また、Cas9 を含まないシロイヌナズナ変異体を効率良く単離するための蛍光に基づいた技術も開発した。	[He Y et al] Huazhong Agricultural Univ. 他 中国、米国
118	植物	ベンサミアナタバコ	CRISPR/Cas9	GFP、NbAGO1 のパラログ	Plant physiology	Multiplexed Gene Editing and Protein Overexpression Using a Tobacco mosaic virus Viral Vector	2017	175(1), 23-35.	5' と 3' sgRNA の中心に近いヌクレオチドのプロセッシング能力を持つように設計されたタバコモザイクウイルス (TRBO) を使って一過的に sgRNA を送達することによって sgRNA の細胞内の濃度を上げた。原理を証明するために、ベンサミアナタバコ (16c) の GFP を標的として TRBO-sgRNA 輸送法を使った。5'ヌクレオチドの突出のある TRBO-sgRNA コンストラクトを使ったときに接種して 7 日以内に indel の平均は約 70 % だった。5' sgRNA ヌクレオチド突出端を取り除いたときだけ in vitro Cas9 切断アッセイで DNA が編集された。これは植物に新しいプロセッシングのメカニズムがあることを示唆する。次に、ベンサミアナタバコの NbAGO1 のパラログを 1 つの sgRNA およびマルチプレックス用に 2 つの sgRNA と 1 つの TRBO コンストラクトでターゲティングすると、3 つの遺伝子に indel が起きた。GFP のコード領域に隣接する sgRNA から構成される RNA 転写物の TRBO に媒介される発現は indel とウイルスに基づいた GFP の過剰発現を起こした。	[Cody W B et al] Texas A&M Univ. College Station 米国

2-3 医薬品製造用

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
119	植物	タバコ	CRISPR/Cas9	2 つの XylT 遺伝子と 4 つの FucT 遺伝子 (全部で 12 個の対立遺伝子)	Frontiers in plant science	Inactivation of the β (1,2)-xylosyltransferase and the α (1,3)-fucosyltransferase genes in <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans	2017	8, 403.	植物や植物細胞は、抗体やワクチンなどの医薬用の糖タンパク質を生産するために使える。しかし、これらのタンパク質は植物に典型的な残基を含む N-グリカンを持ち、それがタンパク質の免疫原性、アレルゲン性または活性に大きく影響しうる。b(1, 2)-キシリルトランスフェラーゼ (XylT) と a(1, 3)-フコシルトランスフェラーゼの 2 つの酵素が植物に特異的なグルカンの付加に重要である。私たちの目的は、CRISPR/Cas9 を使ってタバコ BY-2 懸濁細胞において 2 つの XylT 遺伝子と 4 つの FucT 遺伝子 (全部で 12 個の対立遺伝子) をノックアウトすることである。保存された領域を標的とするために XylT 遺伝子中の 3 つ配列と FucT 遺伝子中の 6 つの配列に対する gRNA を設計した。sgRNA、Cas9 と選択マーカー (bar) をコードする遺伝子でタバコ BY-2 細胞を形質転換した後で、トランスジェニック系列が得られて、細胞外と細胞内タンパク質をウェスタンブロッティングによって分析した。3 つの系統は b(1, 2)-キシロースと a(1, 3)-フコースが大きく減少しており、2 つの系統にはそれらは存在しなかった。これらの糖がないことは細胞外タンパク質のマスマス分析によって確認した。標的領域を分析すると、小さな indel と標的部位の間の欠失が見出された。ノックアウトされた系統は特定の形態を示さず、野生型と同じように成長した。ノックアウトされた系統の 1 つについてヒト IgG2 抗体をコードする遺伝子で形質転換した。マスマス分析で確認された IgG の糖鎖付加の結果は糖鎖中に b(1, 2)-キシロースと a(1, 3)-フコースは存在せず、主要な糖の形態は GnGn だった。これらの結果は、タバコ BY-2 細胞で発現させた医薬用のタンパク質の糖鎖付加のヒト化に向けた重要な段階であることを意味する。	[Mercx S et al.] Univ. catholique de Louvain Louvain-la-Neuve, 他 ベルギー

(続き)

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
120	植物	丹参	CRISPR/Cas9	ジテルペンシンターゼ (SmCPS1)	Scientific reports	Targeted mutagenesis in the medicinal plant <i>Salvia miltiorrhiza</i>	2017	7, 43320	本研究では、強い薬理学的活性をもつ伝統的な中国の薬用植物である丹参においてタンシンの生合成に含まれるジテルペンシンターゼ (SmCPS1) 遺伝子を CRISPR/Cas9 を使って正確にノックアウトした。アグロバクテリウムリノゲネスに媒介される形質転換で得られた 26 個の独立したトランスジェニック毛状根の系統から 3 個のホモ接合性の変異体と 8 個のキメラの変異体が得られた。ホモ接合性の変異体はタンニンが完全に存在しないが、他のフェノール酸化代謝産物には影響がないことが代謝物の分析から明らかになった。キメラの変異体ではタンニンは減っていたが検出できて、SmCPS1 の RNAi についての以前の報告と同じだった。この研究を基にして、中国の薬用植物における二次代謝物の解明、品質向上、収量の増加につながるだろう。	[Li B et al.] Huazhong Univ. of Science and Technology Wuhan 他 中国
121	植物	オオムギ	CRISPR/Cas9	HPT	Faming Zhuanli Shengqing	Method to knock out key gene HPT in barley VE synthesis pathway with crispr-cas9 system	2017	CN 1069 06240 A 2017063 0.	CRISPR/Cas9 システムによる高度な遺伝子編集とアグロバクテリウムツメファシエンズによる形質転換を利用して、オオムギにおいてビタミン E の合成経路中の鍵遺伝子である HPT にターゲットニングによる遺伝子編集を行った。この遺伝子が機能しない変異体を得て、オオムギにおいて生物学的な活性を持つ化合物を研究するための基礎を作った。	[Bian H et al] Zhejiang Univ. 中国

2-4 工業用

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
122	植物	タンポポ	TALEN、CRISPR/Cas9	?	U.S. Pat. Appl. Publ.	Engineering herbicide-resistant rubber-producing <i>Taraxacum kok-saghyz</i> and <i>Taraxacum brevicorniculatum</i> plants and methods for transformation and regeneration	2017	US 2017 0314033 A1 2017 1102.	本発明は、遺伝子操作された除草剤に耐性のゴムを生産するタンポポとその種子を提供する。本発明の別の観点では、子孫の植物、種子または植物の再生できる部分および遺伝子操作された除草剤に耐性のタンポポの種子から構成される。発明者は形質転換のための根の細胞の使用を見出して、別の最適化したプロトコールは高い植物再生が可能な迅速な形質転換を可能にする。さらに、発明者はホルモン処理を行わずに可能な最初の形質転換/再生のためのプロトコールを開発した。	[Cornish K et al] Ohio State Innovation Univ. 米国

Fig. 1

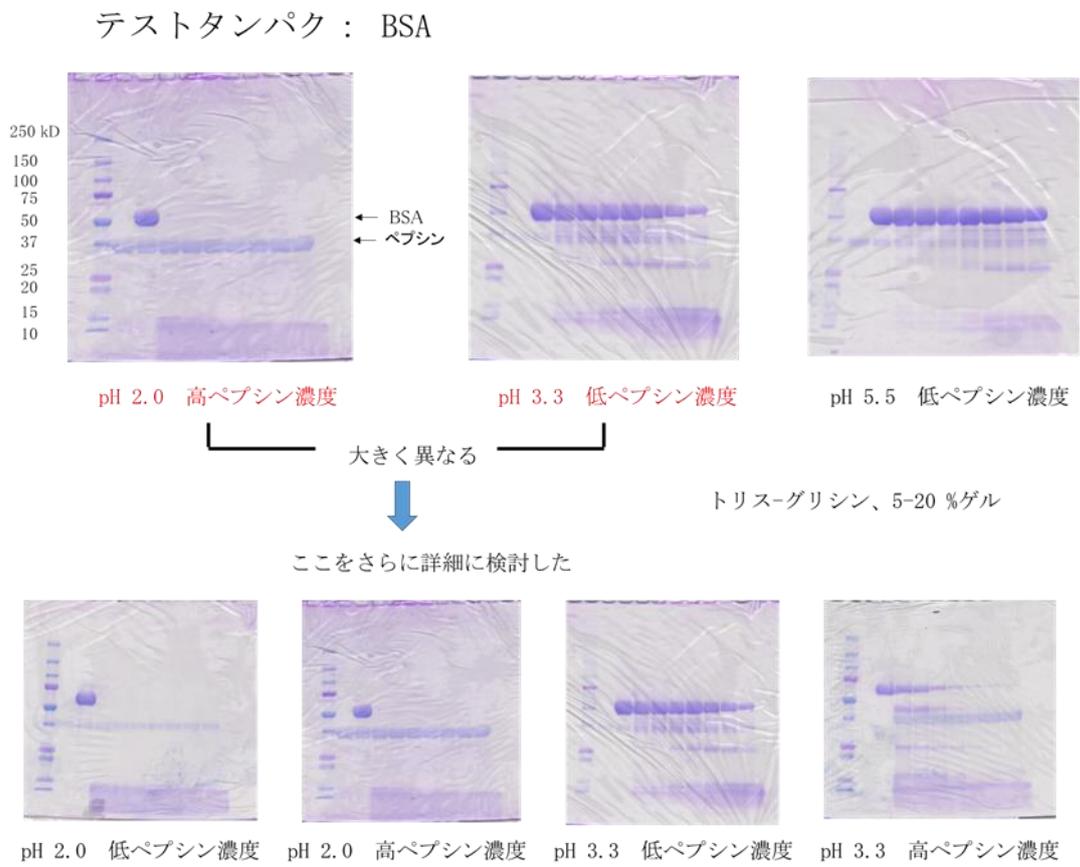


Fig. 2

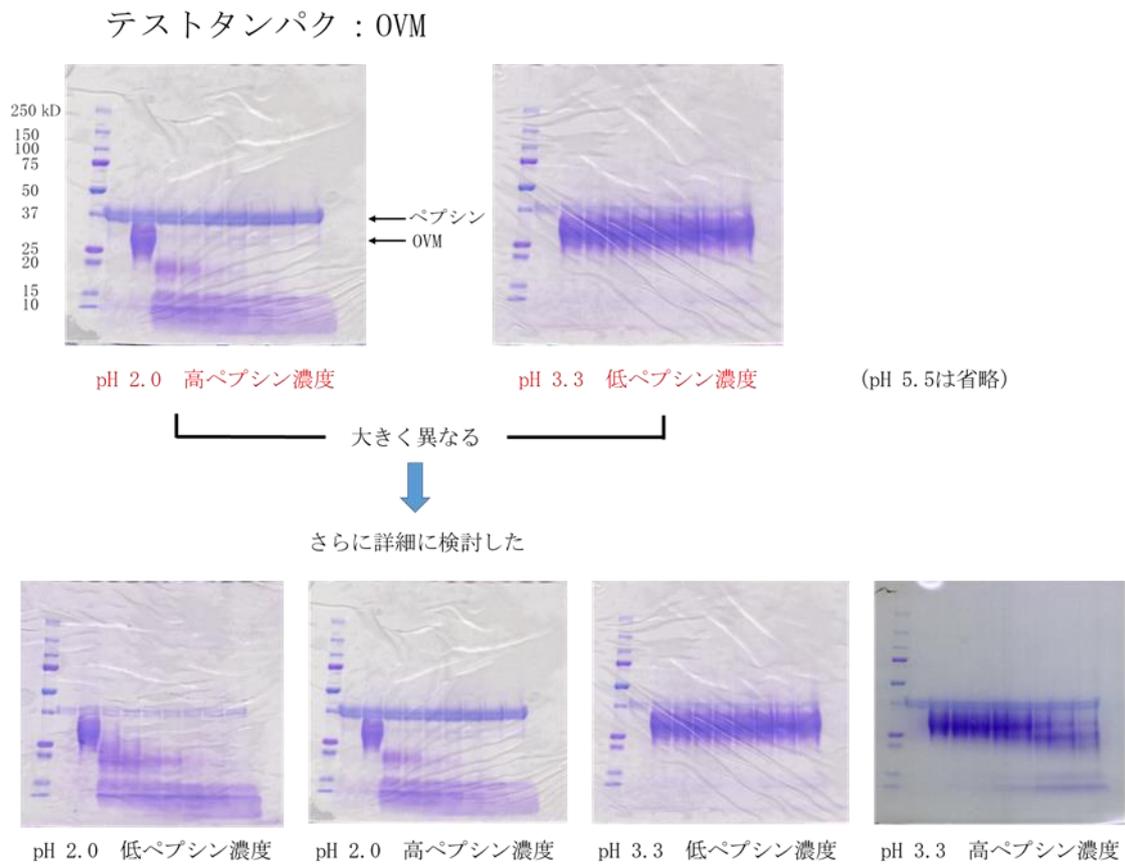
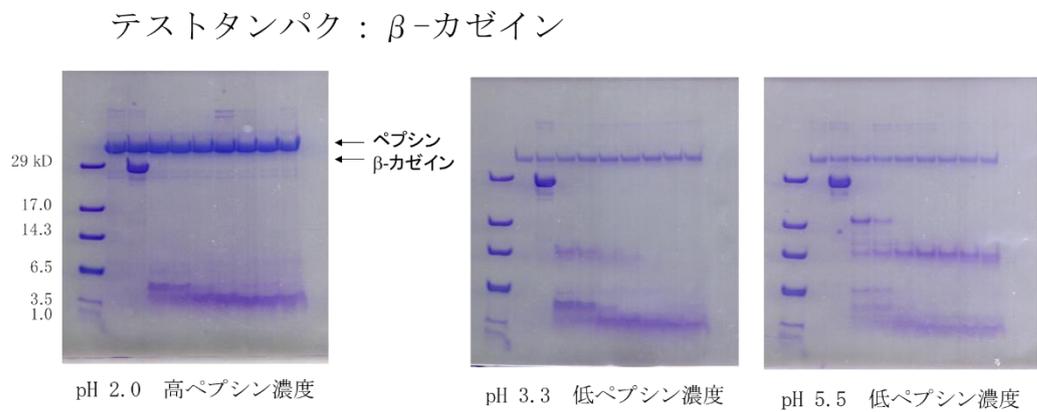


Fig. 3



トリス-トリシン、15%ゲル

ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例 1. **ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた欠失の場合のケース①—数塩基欠失による遺伝子破壊**

生物種：マダイ、標的遺伝子：ミオスタチン

ゲノム編集ツール：CRISPR/Cas9 の mRNA またはプラスミド DNA および gRNA

遺伝子導入方法：受精卵へのマイクロインジェクション

標的配列の改変：フレームシフトによる遺伝子発現抑制（少し後に終始コドン生成）

参照ゲノム配列の有無：なし（ドラフトゲノムは存在、精密ゲノム作成中）

作成者：大学

CCAAATATCAGCCGGGACATCGTGAAGCAGCTCCTGCC（元の配列）

CCAAATATCAGCCGGGA--TCGTGAAGCAGCTCCTGCC（2塩基欠失）

CCAAATATCAGCC-----ATCGTGAAGCAGCTCCTGCC（5塩基欠失）

CCAAATATCAGCCG-----TGAAGCAGCTCCTGCC（8塩基欠失）

数十塩基以上後にいずれも終始コドンが来る

（特に確認すべき点）

- ・ 目的改変箇所およびその周辺の詳細な塩基配列の確認。
- ・ 遺伝子欠失させるためには欠失は3の倍数以外であるため、いずれもフレームシフトが起きている。新たに生成した終始コドンから次の終始コドンまで、6つの読み枠でORF検索して、既知の毒性タンパクやアレルゲンタンパクとの相同性がないか確認。
- ・ ゲノム編集ツールにCRISPR/Cas9のmRNAおよびgRNAを使用していることから、プラスミドDNAの配列、gRNAの配列がゲノムに挿入されていないか（RNA→DNA逆転写の後）の可能性も含めて確認。
- ・ ミオスタチン遺伝子の機能、その生物にとっての役割とその生物に及ぼす影響。
- ・ 主要アミノ酸、脂肪酸、ミネラル分が組換え前後で大きな差がないかどうかで、マダイの生合成経路への重大な影響がないことを間接的に示すことができればいい。

（問題点）

- ・ 魚の遺伝子組換え食品としての審査経験がない（さらに全くの新規形質である）。
- ・ マダイの精密参照ゲノムが存在しないこと。
- ・ マダイが成長していく過程でゲノムの変化がある。
- ・ マダイの主要構成成分が、文献上どこまで明らかになっているか。
- ・ 審査対象は、可食部の筋肉のみか、それ以外も含むか明確にする必要。

ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例 2. ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた欠失の場合のケース②—大きな欠失 (4 kb) による遺伝子欠失

生物種：トウモロコシ、標的遺伝子：Waxy

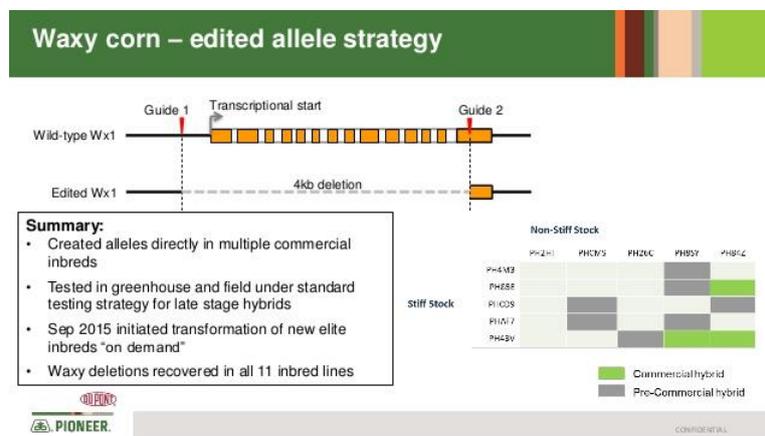
ゲノム編集ツール：CRISPR/Cas9 をコードするプラスミド DNA、および、2つの gRNA をコードするベクター

遺伝子導入方法：アグロバクテリウム法による感染

標的配列の改変：遺伝子を完全に削除

参照ゲノム配列の有無：あり

作成者：Corteva Agriscience



(特に確認すべき点)

- ・ 遺伝子を開始コドン前から終始コドンの後ろまで完全に削除しているため、Waxy 遺伝子内で生じるフレームシフトによる新たなタンパク生成の可能性などの影響はない。一方で2つの gRNA で切断された後、切り口が結合している。結合部位周辺での新たな ORF の出現がないか検索する必要がある。
- ・ ゲノム編集ツールに CRISPR/Cas9 および gRNA をコードするプラスミド DNA (ベクター) を使用している場合は、それらの配列が完全に除去されているか確認する必要 (残存していれば組換え食品となる)。
- ・ Waxy 遺伝子の機能、その生物にとっての役割と影響。
- ・ 主要アミノ酸、脂肪酸、ミネラル分が組換え前後で大きな差がないかどうかで、生合成経路への重大な影響がないことを間接的に示すことができればいい。

(問題点)

- ・ 4 kb という大きな欠失であるため、周辺の遺伝子発現に与える影響がないか。
(周辺にどのような遺伝子があるか、重要な遺伝子であればその発現量変化は安全性に影響するか)
- ・ 小さな欠失によるフレームシフトよりも、遺伝子完全削除は安全といえるか。

ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例 3. ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた欠失の場合のケース③—代謝成分の改変

生物種：ダイズ、 標的遺伝子：FAD3 (fatty acid desaturase)

ゲノム編集ツール:CRISPR/Cas9をコードするプラスミド DNAまたはタンパク質、および、

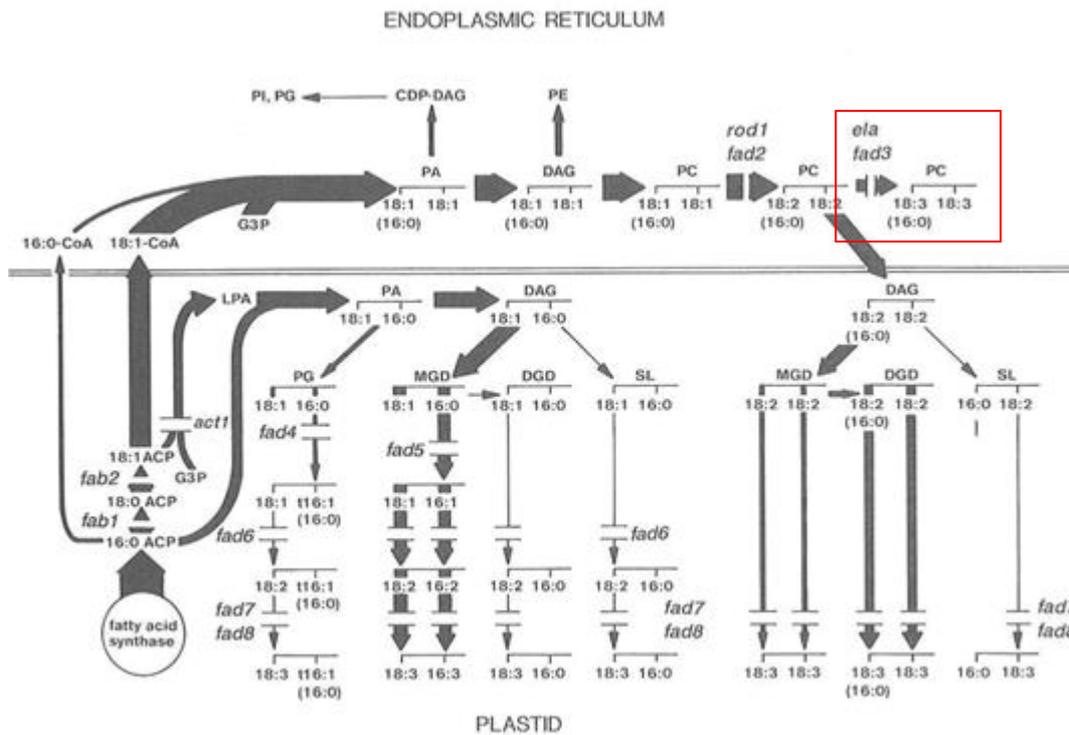
gRNA またはそれをコードするプラスミド DNA

遺伝子導入方法：アグロバクテリウム法による感染、パーティクルガン

標的配列の改変：遺伝子欠失による脂肪酸合成の改変 (ω -3 デサチュラーゼ遺伝子)

参照ゲノム配列の有無：あり

作成者：Feng Zhang, Luc Mathis, et al



(特に確認すべき点)

- ・ 数塩基欠失であればケース①と同様の考え方になるため、ケース①で代謝成分改変に特有な点のみに限定する。
- ・ FAD 3 遺伝子は小胞体に局在して、上図赤囲みの部分で 18:3 などのトリエン脂肪酸を合成する。この遺伝子の改変で、そのほかの脂肪酸合成がどう変化するかの確認は必要。

(問題点)

- ・ 今後多様な栄養改変も出現すると考えられるが、複雑な生合成系の中心にあるような遺伝子、影響が多岐にわたる遺伝子の改変は、その及ぶ範囲を正確に把握、評価する必要がある。

ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例4. ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた欠失の場合のケース③—①および②に関連して

生物種：ダイズ、パパイア、ジャガイモ、トマトなどでも同様に考える。

果樹（リンゴ、ブドウなど）の場合も同様に考えられるか？

標的遺伝子：遺伝子の種類は関係しない

ゲノム編集ツール：CRISPR/Cas9 と 2つの gRNA をコードするベクターを使用していれば残存がないことの確認、mRNA と gRNA だけであれば組換え DNA 技術に該当しないと解釈可能。

遺伝子導入方法：アグロバクテリウム法による感染ではゲノムに入るので、残存性と関連。mRNA と gRNA で一過性であれば残存性はないと考えるが、厳密には逆転写されて RNA 由来の DNA が挿入する可能性がないわけではない。電子銃による遺伝子導入の場合は、挿入ベクター等が断片化されてゲノムに入る可能性も多く、ベクターとその断片がゲノム上に残存していないかどうかの確認が重要。

標的配列の改変：数塩基欠失によるフレームシフトと遺伝子完全削除がある。前者では常に読み枠のずれを考慮する必要がある。

参照ゲノム配列の有無：ある場合は、オフターゲットの検索が容易であるが、完成された参照ゲノムが存在しない場合はオフターゲットの検索が実行できない場合も想定され、これの代替法が必要。

育種選抜過程：ダイズ、トウモロコシ、イネなどは組換え後に野生種との後代交配を数世代（e.g. 5 世代）行うことで遺伝子安定性の確認とともに、意図しない変化を除くことができる。後代交配を行っても意図した改変と意図しない改変が同一染色体の近い位置に存在する場合は除去できないため、育種選抜イコール安全ではない。リンゴ、ブドウなどの果樹では後代交配による選抜は難しいためゲノム解析等によって選抜することで対応することになる。

ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例 5. ゲノム編集技術 (SDN-2) を用いた塩基置換の場合のケース①

生物種：ナタネ、標的遺伝子：acetolactate synthase (ALS) アセト乳酸合成酵素遺伝子

ゲノム編集ツール：CRISPR/Cas9 および gRNA のベクター

遺伝子導入方法：アグロバクテリウム感染

標的配列の改変：一本鎖または2本鎖オリゴヌクレオチド (核酸 DNA) を鋳型にした1塩基置換

参照ゲノム配列の有無：なし

(置換場所は赤字)

-----GGATGGTTCATGCAAT G GGAAGATCGG-----

から



-----GGATGGTTCATGCAAT T GGAAGATCGG-----

へ

ALS gene W574L mutation (TGG>TTG)

鋳型となるオリゴヌクレオチドは

-----GGATGGTTCATGCAAT T GGAAGATCGG-----のような DNA 1 または 2 本鎖

を用いると、

(特に確認すべき点)

- ・ゲノム編集ツールに CRISPR/Cas9 および gRNA をコードするベクターを使用している場合は、それらの配列が完全に除去されているか確認する必要 (残存していれば組換え食品となる)。
- ・用いるオリゴヌクレオチドは2本鎖で、かつ、両末端が保護されていないとゲノムに挿入される可能性はあるためその残存性の確認が重要となる。
- ・用いるオリゴヌクレオチドは1本鎖で、かつ、両末端が保護されて場合ゲノムに入る可能性は少ないが、相補鎖が合成されて2本鎖になる可能性も想定して残存性の確認。
- ・用いたオリゴヌクレオチド配列と類似した配列が、ゲノム上にないか検索 (オフターゲット部位の検索)。
- ・主要アミノ酸、脂肪酸、ミネラル分が組換え前後で大きな差がないかどうかで、その生物の主要な生合成経路への影響がないことを示すことで、完全にはできないゲノム解析からの安全性確認を補足できればいいのでは。

(考察)

用いるオリゴヌクレオチド中の変異箇所が、2か所以上の時も同様に考えるか？

-----GGATGGTTCATGCAAT T GGAAGATCGG----- (3塩基改変のためのオリゴヌクレオチド)

変異導入箇所が多くなれば、その分成功率は低下する (5塩基改変の予定が、2、3塩基改変しかできなかった) 例が多くなると推測される。この時に、部分改変体の場合は再実験することが通常。

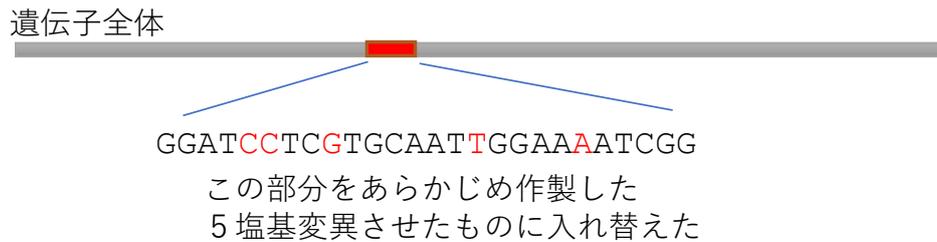
ゲノム編集技術等応用食品のケーススタディー

想定事例 6. ゲノム編集技術 (SDN-2) を用いた塩基置換の場合のケース②

-- ケース①の用いるオリゴヌクレオチド中の変異箇所が、2 か所以上の時、入れ替えの場合

-----GGATCCTCGGGCAAT T GGAAAATCGG----- (5 塩基改変の例)

5 塩基を同時に改変することは想定されるが、成功率はかなり低い。そのため、変異箇所が多い場合は、該当する改変部分 (赤) をあらかじめ生物外で作製して入れ替える方法が考えられる (下図)。



この場合は、できた結果を見ればオリゴヌクレオチドを用いて変異させたものと区別はできないが、この例では26塩基の入れ替えを行っており、外来遺伝子の入れ替えとみるかどうか(SDN-3)、で何塩基以上なら外来遺伝子の挿入とみるかの判断基準がない。

(特に確認すべき点)

- ・ 入れ替えでは、2 か所で CRISPR/Cas9 であれば gRNA を用いるので、2 つの gRNA 配列のオフターゲットを検索して、新規アレルゲン性タンパクの生成がないかなどの確認が必要。
- ・ 遺伝子全体を入れ替えるときは、明らかに遺伝子組換え体として扱う (見た目は変異導入だが)。

---似たケース---

切断活性のない Cas9 に deaminase 等の酵素を結合させた、ゲノム編集による塩基置換

一般には、DNA2 本鎖切断しないので安全性も高いと考えられている。一方で、塩基置換 A->G や C->G のうち、後者ではこれまで想定されている以上にオフターゲットが存在することが報告された (以下の論文より)。通常のゲノム編集と同様に、十分なオフターゲット検索とタンパクの変換とその影響、安全性を確認する必要がある。

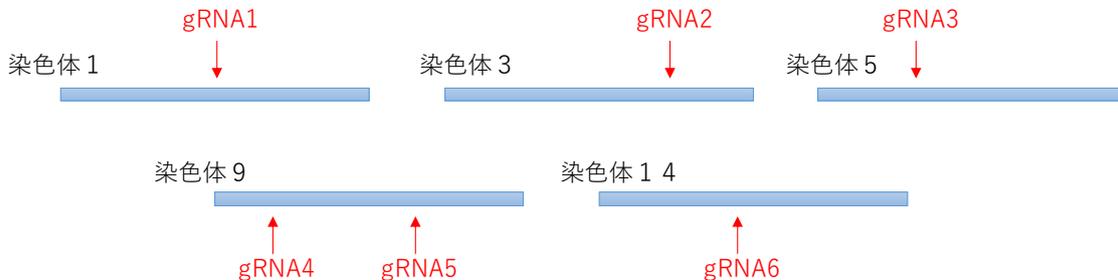
Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice.

(イネにおいてオフターゲット変異をゲノム全域にわたり誘導する)

S. Jin et al., Science, 10.1126/science.aaw7166 (2019)

想定事例 7. ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた同時複数標的の欠失、置換の場合

ここでは、標的染色体 5 つ、標的配列 (gRNA) の数を 6 として、



(特に確認すべき点)

- ・ 6 つの gRNA のオフターゲット検索 (データベースを利用した検索) で検出された配列の、PCR による確認 (戻し交配させた後で確認するかどうか)。
- ・ 同時に異なる染色体で DNA2 本鎖切断されているので、異なる染色体間の結合、転座、逆位など、標的部位における詳細な解析が必要。
- ・ Cas9 遺伝子を、ベクターで入れた場合はその残存性のないことの確認。
- ・ 同時複数標的の場合、単一標的にない確認項目があるかは不明であるが、すべての標的部位 (上の 6 つの場合) が望み通り改変される確率は、あまり高くない。そのため、成功した場合は、その細胞の機能 (他の遺伝子部位、例えば遺伝子修復に関係する) に異常がある場合が想定されるため、オフターゲットを含めた詳細な解析が推奨される。
- ・ 従来からの X 線などによる突然変異育種の場合と比べて、組換え実験直後であればゲノム編集技術の方がはるかに部位特異的でオフターゲットも少ない。完成された作物で比較すると、多くの場合塩基欠失なので大きな差異はないと考えられる。
- ・ 例えば、6 個の異なる染色体上の同じ A 遺伝子 (重複している) 6 か所を同時に改変したときの影響は知られていない。

想定事例 8. ゲノム編集技術 (SDN-1) を用いた同時複数標的の欠失、置換の場合 (反復配列)

多コピーの反復配列不活性化の例である。LINE-1 などの反復配列の同時不活性化により、何からの望む形質が獲得すると仮定、この場合、特定の遺伝子改変ではないので改変の影響は評価困難と想定される。

通常、多くの標的部位 (>数百) に DNA 切断を誘導すると細胞死に至る。DNA 二本鎖切断 (DSBs) と一本鎖切断 (SSBs) に伴う細胞死を回避しつつ、一細胞内の数万の遺伝子座の同時編集することが可能である。米 MIT の G. Church らは DNA 切断型ではなく、塩基置換を利用することで 2,000 か所以上の同時編集が可能としている (bioRxiv preprint)。

(特に確認すべき点)

- ・ 特定遺伝子の破壊ではなく、かつ、数百～数千か所の反復配列部位の同時改変であるため、すべての部位について確認可能か、反復配列を標的にした gRNA を用いた時に反復配列以外にオフターゲットは存在するのか、など不明な点が多い。

(考察)

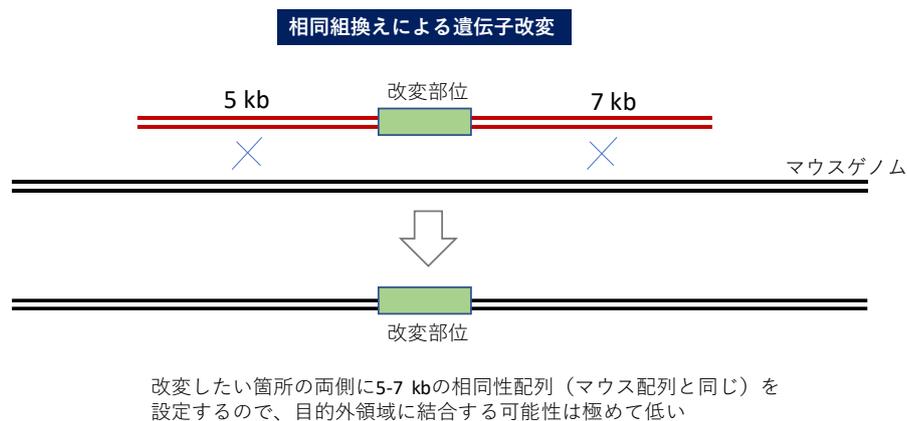
切断活性を持たない Cas9 にバクテリア由来塩基置換酵素を結合したものが報告されている。

反復配列での数百の同時改変でも細胞死を誘導しないことは示しているが、今後の報告を調査していく必要あり。

想定事例9. 「相同組換えによる改変」と「ゲノム編集による改変」の違い（考察）

従来からマウスなどの遺伝子改変で行われている、「相同組換えによる遺伝子改変方法」はきわめて正確性の高い方法である。理由は、改変部位の両側にマウスゲノムと全く同じ配列を 5 kb 程度と長く設計してそれ以外の領域には結合しないようにしている（オフターゲットは、確率的にゼロと言える）ためである。

一方、ゲノム編集は、認識部位がわずか 20 bp でしかない。その範囲で理論上オフターゲットがないように設計はできるが、3 塩基程度のミスマッチは許容されるためオフターゲットは一定の確率で必ず起きる。したがって、両者はその正確性で大きく異なる。



また、「相同組換えによる改変」では、改変箇所をもとの配列と入れ替えることで塩基の欠失はないため、フレームシフトによる新たなタンパクの出現可能性はない。

一方、「ゲノム編集による改変」では、多くの場合は数塩基（3 の倍数でない数）欠失したものを選抜する（結果として、特定遺伝子の機能が破壊されたもの）が、フレームシフトによる新たなタンパクの出現に常に注意を払う必要がある。また、オフターゲットが *in silico* で推測できるところだけでいいのか、の疑問は解決されない。（可能性としては低いと考えるが）未知成分が新たに出現したときに、それを検出することができないので、ゲノム編集後の表現型との選抜、戻し交配で常に悪い影響は除けるのかは確定的に言えない。遺伝子を完全に除去する方法もある。この場合は、フレームシフトは起きないが、除去後にその部位と周辺について新たな読み枠 ORF がないかは常に確認する必要がある。

将来的な展望

塩基欠失、置換で、新たな形質（筋肉量増大、除草剤耐性、病原菌抵抗性など）を生み出すのは、種類、数ともに限られると予想する。特に、消費者にメリットがある形質となるとなおさらである。なぜなら、多くの生物種でゲノム解析がなされてきたが、その生物のゲノムのどこを改変したら、どういう性質が生まれるかの、いわゆる「ゲノム配列とフェノタイプをつなぐデータ」が十分整備されていないからである。

想定事例10. 「突然変異育種による遺伝子改変」と「ゲノム編集による改変」の違い（考察）

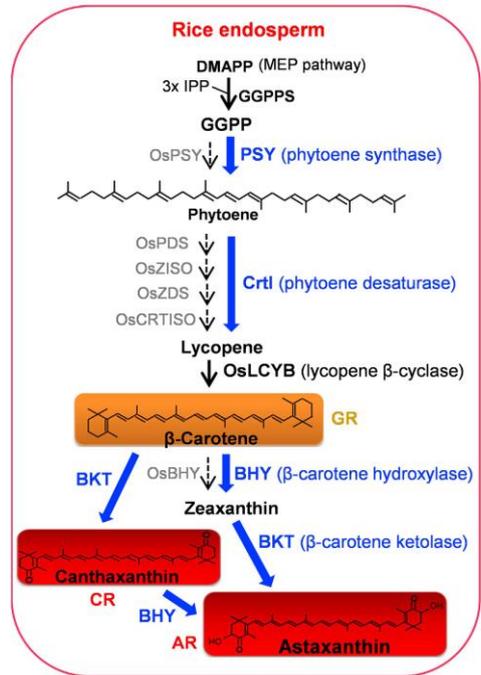
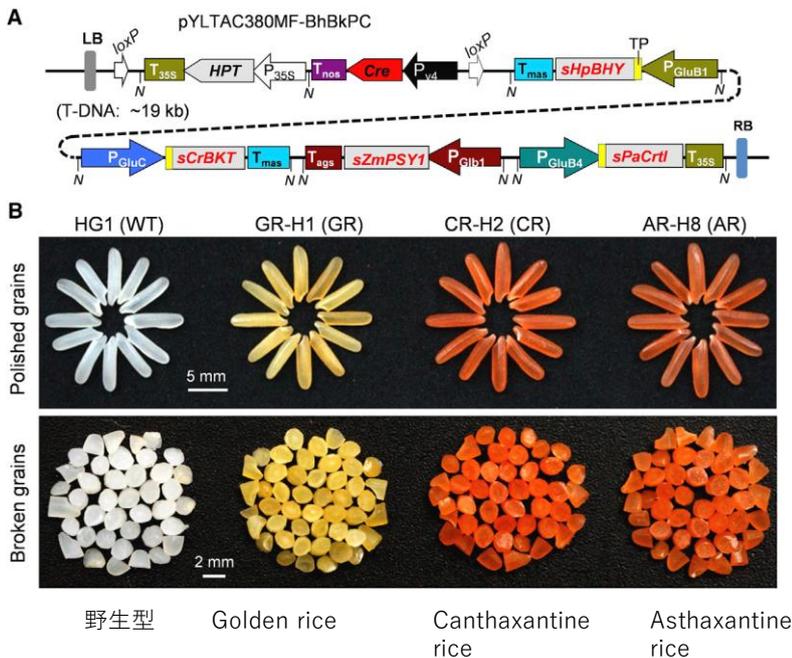
X線などの突然変異育種による遺伝子改変は、ゲノム全体に渡り、数bpの欠失から数100kbの欠失からなるランダム変異が導入される。その後、育種選抜を行って、望む形質を保持し、かつ、成長する大きさ、速度などの表現型も見ながら選抜していく。最終的にできた作物のゲノム解析も行われており、望む形質獲得に関わる遺伝子内において、多くは数bp程度（まれに数100kb以上）と小さな変異であると報告されている。一方、ゲノム編集による改変では、標的部位の改変（主に欠失、置換など）後、戻し交配などを行うことで意図しない変異を除く。ただし、望む改変と意図しない改変が同じ染色体にあるなどの場合は、除去できない。

- ・異なる点は、ランダム変異か特異的変異導入かである。
- ・同じ点は、交配など選抜育種を行う。ただし、ゲノム編集で時間のかかる数世代戻し交配など育種選抜を行うかは不明である。
- ・共通する点、イネ、トウモロコシなどの主要作物のみで実績がある。
- ・懸念点は、ゲノム編集では、戻し交配ができない果樹や魚類での実績がない。

想定事例 1 1. 合成生物学を利用した組換え食品--- ケース①

β -carotene を合成するゴールデンライスに、カンタキサンチンやアスタキサンチンを合成する 4 遺伝子を導入して、 β -carotene からカンタキサンチンやアスタキサンチン合成に至る生合成経路を確立したもので、合成生物学利用作物の開発として期待されるもの。

改変の程度は、まだ小さいが、今後、一つの生合成経路のすべての遺伝子群を導入した作物も作成されると考えられる。



すでに、ゴールデンライスは開発がされていた。そこに、ベータカロテンからさらにアスタキサンチンへ変換する酵素群 4 つを導入したもの。その他の代謝系や新たなタンパクの発現がないのであれば、導入した 4 つの遺伝子の機能、影響の及ぶ範囲、アスタキサンチン生成量から考えられる許容人摂取量、組換え体の遺伝子の安定性、その他のベクターに由来する配列の残存性のないこと、などが確認事項と考えられる。この場合、比較対象はゴールデンライスである。一連の数十またはそれ以上の全く新しい生合成経路に関わる遺伝子を導入した場合は、比較対象が設定できないことも想定されるため、安全性の確認方法について検討する必要がある。

合成生物学を利用した食品等について

米国では、酵母など微生物ゲノムを大規模に改変して、新たな物質生産や化学合成が難しい香料などの開発が行われている。天然からの収量が少なく高価なバラ香料の生産などがベンチャー企業で行われている。また、細菌などの微生物を用いて食品添加物としての香料（低分子化合物）を製造する企業もあり、今後増加すると考えられる。

想定事例 1 2. ゲノム編集技術に関連した論文等から潜在的リスクとなる可能性は不明であるが、考慮した方がよいもの

新たなタンパク出現の可能性

現在利用されているゲノム編集技術を用いた作物は、多くの場合その生物自身が持つ遺伝子の欠失を数塩基削除することで新たな形質を得ている。したがって、必ずフレームシフトが発生し、その結果、改変個所の後ろに新たな終始コドン（未成熟終始コドン、Premature termination codon (PTC)）が生成する。PTCにより本来より短い mRNA が生成すると一般的にはナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構 (nonsense mutation-mediated mRNA decay ; NMD) によりほとんどが分解される。しかし、変異が最終エキソンやエキソン-エキソン接合部の 50 塩基上流などの場合は分解されないことがあるため、一定の大きさの新たなタンパク出現の可能性はある。その観点でもフレームシフトした場合の ORF 検索による毒性・アレルギー性タンパクの出現可能性は十分に配慮する必要がある。(pre-review 論文あり)

また、開始コドン (AUG) の上流 5'-UTR に存在する領域にある uORF (upstream ORF) から生成される短いポリペプチド鎖が遺伝子発現調節を行うことがあり、開始コドン上流の塩基配列にも考慮が必要である。また、終始コドン (UAA、UAG、UGA) が改変変異等で存在しない場合は、non-stop mRNA が合成される。通常はノンストップ mRNA 分解系 (non-stop decay ; NMD) により分解されると考えられているが、残存して何らかの機能を発揮する可能性もある。

さらに、一般的な開始コドン AUG でない開始コドンからのタンパク合成については、生体機能維持に関与していることが報告されている。

現在、直接リスク要因となると明確に判断できるものは認められないが、植物、動物から作られる食品について、どこまで考慮して解析するかは今後の課題である。