

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の 安全性確保に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書
(H25-食品-一般-015)

研究代表者 近藤一成

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究

近藤 一成 3

II. 分担報告書

1. Platinum TALEN 作製システムの確立とツメガエルでの遺伝子改変

山本 卓 16

2. 次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

近藤 一成、鎌田 博 25

3. 次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発

中村 公亮 69

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

吉松 嘉代 87

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 109

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
総括研究報告書

研究代表者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部
研究分担者	鎌田 博	筑波大学筑波大学生命環境系・筑波大学遺伝子実験センター
研究分担者	山本 卓	広島大学大学院理学研究科
研究分担者	吉松嘉代	医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
研究分担者	中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部

近年の遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、遺伝子組換え技術の痕跡がゲノム DNA 上に残らない手法が登場してきた。植物 RNA ウイルスを用いた開花促進遺伝子導入により品種改良の大幅な期間短縮を目的とした方法、遺伝子組換え台木の接ぎ木による穂木への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動物・植物への TALEN、CRISPR/Cas9 技術を用いた任意の標的配列に対するゲノム改変など進んでいる。これらの遺伝子組換え技術の痕跡が残らないと考えられてものの、技術的にはようやく確立されたばかりであり、その特徴や宿主に起こり得る現象、さらに、off-target 効果などについては現在世界各国で精力的に研究されている。今後近い将来これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているものの、こうして作出された生物の取り扱いや GM 生物の規制の在り方、GM 生物として申請がされた場合の検討項目、さらに、検知の可能性や検知可能な場合のその方法に関する検討がなされておらず、急務となっている。本研究では、これら多様な次世代遺伝子組換え技術について整理するとともに実際に様々な生物に適用した時の技術的な問題点や生物細胞内で起こる現象について調査研究を行うとともに、作出された GM 食品の検知可能性についての基礎的な検討を行った。特に、今後組換え技術の中心となる可能性の高い TALEN、CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる改変や off-target の頻度とそこで起こる改変について文献調査を行うとともに、植物や動物細胞レベルあるいは個体レベルで検討を行った。次世代遺伝子組換え技術の中で、TALEN や CRISPR/Cas は用いるシステムにより特性が異なるが、本研究では、TALEN に関しては、標的配列に対して高効率で DNA 二本鎖切断活性を誘導できる手法として新たに Platinum TALEN システムを開発した。これを動物細胞やカエル胚に効率的に変異導入できることを示した。また、特定遺伝子座への外来遺伝子導入した時の周辺遺伝子発現に与える影響とゲノムの高次構造に関して研究を行い、一部の周辺遺伝子発現が変動することを示した。2013 年に登場した CRISPR/Cas も同様に用いるシステムにより変異導入効率や off-target 部位での切断活性が異なること、ZFN や TALEN に比べて off-target 切断が起きやすいことから、より特異的な方法として 2 つの CRISPR/Cas を用いる方法がある。これらを含めてその特性について調査研究を行った。ゲノムへアクセス性が、変異導入効率に大きく影響することが示された。世界各国での遺伝子組換え植物および動物の開発状況を調査し、中国が積極的に研究開発を行っている実態が明らかになった。次世代遺伝子組換え技術を用いたモデル植物の作出をイネを用いて行うために、標的遺伝子部位のコピー数など検討を行った。次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の各国の規制状況は、アメリカでは一部個別な判断が行われている事例が存在するものの、まだ調査検討段階である。開発状況は、ごく一部の国を除いてヨーロッパではアメリカや中国ほど精力的な研究開発が行われていない。この痕跡が残らないことが想定される次世代遺伝子組換え技術を用いた食品の混入防止のための監視には中国の動向が重要である。

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え（GM）技術が急速に発展し、ZFN（Zinc-Finger Nuclease）に始まり2010年頃に登場したTALEN（Transcription Activator-Like Effector Nucleases）さらに、2013年に報告されたCRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）などの次世代遺伝子組換え技術が、疾患研究などの基礎研究のみならず食品分野でも応用されるようになってきた。また、リンゴRNAウイルスを用いた開花促進、接ぎ木やRdDM（RNA-directed DNA Methylation）の機構を用いた遺伝子サイレンシングにより、ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた。TALENやCRISPRとともに、遺伝子上の任意の塩基配列を人工的かつ意図的に改変した痕跡を残すことなく組換え生物、作物が作成可能である可能性があることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼであるZFN、TALEN、CRISPR法のほか、RdDMや接ぎ木によるRNA輸送による遺伝子サイレンシングを用いたもの、植物RNAウイルスを用いたものなどが存在する。それらについて、安全で高効率な遺伝子改変技術を確立するとともに、それぞれの技術ごとに整理し、その原理や作用機構について実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体（GM）として扱うか、GMとして扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える

必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要である。

遺伝子塩基配列上の変化については、意図しない領域での非特異的な改変（off-target効果）がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について、改変が欠失、置換、挿入に分けて整理して考える必要がある。

そこで、本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しいTALEN、CRISPR/Casシステムを中心に、上記観点から調査研究を行った。そして、最近開発された食用遺伝子組換え生物の文献調査を行うとともに、各国の規制に対する考え方、アジア地域での開発状況についても調査した。また、これらの次世代組換え技術は一般にはNBT（New Plant Bleeding Technology）と呼ばれているが、本研究班では、植物と動物の両方を対象としているために、次世代遺伝子組換え技術とし、海外での開発状況や規制状況についても調査した。

B. 研究方法

今後組換え技術の中心となると考えられる、次世代組換え技術に関する研究について、分担研究者の山本卓らのグループは、TALENの安全で高効率でゲノムDNA上の標的部位でゲノム編集が可能なシステムとして、Platinum TALENの開発と評価を行った。近藤一成らのグループは、CRISPR/Cas9システムを培養細胞に用いてその特性を評価した。中村公亮らは、外来遺伝子を導入した時に起きる現象、例えば周辺遺伝子発現に与える影響など検討した。また、吉松嘉代らのグループは、植物を対象に（特

にイネを標的として)TALEN を用いた時の変異解析に取り掛かるとともに、次世代組換え技術を用いた植物の世界各国の開発状況について、および医薬品用途の遺伝子組換え植物の調査を行った。

1. 人工ヌクレアーゼ(ZFN、TALEN、CRISPR)を用いた遺伝子改変に関する調査研究

(1) 文献情報に基づく人工ヌクレアーゼの特異性

手法と off-target(標的外塩基配列への影響) に関する論文を著名な論文中心に調査し、off-target の起きる程度とパターンについて調べた。また、標的配列に用いられている配列をゲノム情報サイト Genome Browser を用いて DNA accessibility, Histone modification state 等を調べた。

(2) TALEN および CRISPR を用いたモデル切断実験

CRISPR/Cas9 システムの切断活性や特異性等についての実験には、クローン化した PC12 細胞およびニワトリ DT40 細胞を用いた。

CRISPR/Cas9 および TALEN : 目的遺伝子周辺領域に複数の標的塩基配列の DNA 二本鎖切断を目的に必要なプラスミドを作製した。細胞回収後に標的部位の改変の有無とそのパターン、頻度を調べた。標的遺伝子として *AIFM1* exon3 を中心に検討を行った。

(3) 次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品(植物・動物)の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、

CRISPR/Cas9 である。一方、植物ではこれまでに開花促進の目的で植物 RNA ウィルスベクターを用いた手法が有望である。また、接ぎ木による手法も一見古典的に思われるが、台木と穂木の一方に遺伝子組換え体 (GM) を用い、遺伝子サイレンシング目的に RNA を師管輸送してもう一方に機能させる方法で、最終的に非遺伝子組換え体 (nonGM) のゲノムへの挿入も改変も起きないことから、期待される技術である一方で、その取扱い (GM か nonGM か) についての判断が必要になって来る。これらが、中心の技術と考えられることから、国内外の開発動向や規制に関する情報を収集した。

(4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

組換えタンパクの発現、精製は参考文献記載の方法に基づいて行った。大腸菌には pMJ806 を用い、精製は、キレートカラムおよび陽イオン交換カラムで行った。

2. Platinum TALEN の開発と応用

(1) 高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

広く利用されている Golden Gate 法で作製された TALEN (Golden TALE: ミネソタ大学 Voytas 博士が開発) の DNA 結合モジュールを改良した高活性型 TALEN の開発を行なった。TALEN の結合力を高める方法として、結合モジュールのアミノ酸配列に着目し、アミノ酸配列の改変を行なった。結合モジュールは 34 アミノ酸からなり、12 番目と 13 番目のアミノ酸は、塩基特異的な結合を担う多型配列 (RVD) として知られている。自然界の TALE のアミノ酸配列を調べたところ、この RVD 以

外に 4 番目と 32 番目のアミノ酸に多型のあることがわかった。そこで、この 4 番目と 32 番目の多型 (non-RVD variation) を利用した新しい TALEN の作製システムの確立を試み、培養細胞で評価した。

(2) Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体における効果を調べる目的で、アフリカツメガエルでの標的遺伝子破壊を行った。表現型を容易に観察できる色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊し、その効果を観察した。

3. 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究

(1) 培養細胞

ニワトリ細胞は、ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 及びニワトリ肝細胞 LMH を用いた。

(2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

ニワトリ 14 番染色体のグロビン遺伝子クラスターの非コード DNA 領域 (120,080,385 ~ 12,080,440) とした、TALEN によるゲノム改変を行った。外来遺伝子導入の影響を評価するために、AcGFP (*Aequorea coerulea* green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb のプラスミドを導入した。Cell アッセイ法、制限酵素 (HpyAV) 消化試験法、及び PCR 法により細胞をクローン化した。

(3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

遺伝子導入の標的配列から両側 100 kb 近傍に存在する遺伝子の発現測定には、RT-リアルタイム PCR 法を用いた。また、高次構造の解

析のために Chromosome conformation capture (3C) 解析を行った。

4. 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立

未知遺伝子組換え作物の迅速な解析と検知のために、次世代シーケンサーを用いた手法を検討した。モデル食品には、安全性未承認 GM パパイア PSRV-YK 系統の混入したパパイア茶から精製した DNA を使用、Illumina HiSeq でシーケンシング解析を行った。

5. GM 植物及び NBT 開発状況の調査

GM 植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲、土壌、水源、大気中の有害物質を高蓄積する GM 植物を環境浄化用 GM 植物の範囲、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産する GM 植物を工業用 GM 植物の範囲 (但し、食用作物のみ) とした。これら GM 植物及び NBT に関する情報を文献データベース (Scifinder®、検索語「transgenic plant」)、インターネット (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、産業用及び NBT の 10 種類を設定した。

6. NBT 応用状況の文献調査

NBT の植物への応用例について文献調査を行った。遺伝子工学的手法を用い従来の遺伝子組換え法の代替法となると考えられる、ZFN、TALEN、CRISPR の 3 手法を対象を絞った。

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で ZFN については、ZFN、zinc finger、plant、TALEN については、TALEN(s)、TAL effector、plant、そして CRIPR については CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、をキーワードとして検索を行った。

検索結果から、まず、植物を対象として遺伝子編集を行った論文を抽出し、リスト化した。次に、残る検索結果から、植物以外を対象としたものなどを除き、NBT 各技術に関する基礎科学的な知見を記した論文や、総説等を合わせてリスト化した。また、上記の 2 リストについて、発表年別に集計し、グラフ化した。

7. NBT 応用モデル植物の作製基盤整備

NBT を植物へ応用し、モデルを作製することにより、今後の NBT 応用植物の検知法等の開発の基盤整備を行うためのアプローチ手法を計画した。

ケース 1. NBT 応用植物 (モデル) を作成する

ケース 2. NBT 応用植物を入手し、解析する

step 1. NBT 応用植物を入手する

step 2. 入手した NBT 応用植物を解析に利用する

まず、上記のケース 1 を実施するため、表現形質で NBT による遺伝子変異の導入の確認を容易にするため、マーカー遺伝子を従来法の遺伝子導入法で導入した組換え体イネを作出または入手する。作出または入手したマーカー遺伝子 (たとえば β -glucuronidase : GUS) を発現するイネ組換え体を材料として、マーカー遺伝子を破壊するモデル実験を行う。

ケース 2 の実施については、TALEN を適用したイネ遺伝子変異体のうち、TALEN コンストラクトが残存し機能するものを入手し、これを用いてカルス培養時に TALEN により生じる遺伝子変異の各種性状について情報の収集を行う。TALEN 応用植物について、国内の NBT の関連研究者らと情報交換、調整を進めている。

C. 研究結果、考察および結論

(1) Off-target に関する調査

(a) zinc-finger nuclease (ZFN) について

DNA 結合ドメインは、真ん中のスパーサー 5~7 bp を挟んで両側に 9~12 bp、両 DNA 結合ドメイン合わせて 18~24 bp である。スパーサー部分で認識部位を持たない制限酵素 *FokI* の二量体形成により DNA 二本鎖切断を誘導するものである。これは、 3×10^9 bp のヒトゲノムに対してもただ一つの標的配列を設計することが理論的には可能であるが、ZFN は設計できる配列に制限がある。また、後述する TALEN 同様であるが、真ん中のスパーサー配列に認識部位を持たない制限酵素 *FokI* が二量体を形成して DNA 二本鎖切断 (double strand break, DSB) を誘導する。したがって、片側の ZFN モジュール内の DNA 結合ドメインの配列を基にした、標的配列 (target 配列) に類似した標的外配列への結合、切断 (いわゆる、off-target 効果) を予測することは難しいと考えられている。つまり、2 つのモジュールで DNA に結合し切断する ZFN では、片側の認識配列にミスマッチがあっても *FokI* が切断に必要な二量体形成をすればよいことから、off-target は理論的に考えられるよりも、その確率は高いと考えられる。ZFN では 3 塩基以

内のミスマッチがゲノム上に内容に設計することが望ましいとされている。その他、ZFNは設計が難しく、また標的配列の制限があり後述する TALEN や CRISPR に比べてゲノム上の配列のどこでも設計できるわけではないため、人工ヌクレアーゼの中では、利用は多くないと思われる。

(b) transcription activator-like effector nuclease (TALEN)について

ゲノム改変に用いる TALEN は、活性化ドメインを除き、代わりに制限酵素 *FokI* を連結したもので、ZFN 同様に、2 つの DNA 結合ドメインを間に、15 塩基前後のスペーサー部分での *FokI* 二量体形成により DNA 二本鎖切断を行う。DNA 結合ドメインは、片側 17-18 塩基で、合計 34-36 塩基と ZFN の DNA ドメインよりも認識部位が長いために特異性が高いと考えられている。現在、ゲノム改変に用いられている TALEN コンストラクトは、複数の研究グループから報告されておりいくつかのバリエーションにより、その特性（特に off-target 効果）が若干異なると予想される。ヒト細胞を用いて、on-target と off-target 部位での変異導入率と on-target に対するミスマッチ塩基数について調べた結果、片側 18 塩基（つまり、両側 36 塩基による DNA 認識）の TALEN を用いた場合に想定される off-target サイトは 7 塩基ミスマッチまで存在しないが、9 塩基で 70 サイト、11 塩基で 4338 サイト存在する。しかしながら、遺伝子 *CCR5A* を標的とした TALEN では、標的サイトでの変異導入率が 23-47% に対して、11 塩基ミスマッチがある off-target サイト（offC-5）では 2.3% で変異導入されている。この時のミスマッチは、

left-TALEN に 7 塩基、right-TALEN に 4 塩基のミスマッチがある状態であった。しかしながら、TALEN を用いた場合、多くのサイトでは 8 塩基以上のミスマッチ領域での off-target 切断効率はほとんどの場合 1% 以下であることから、特異性は後述する CRISPR よりは高いと考えられる。

次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスは、一つの手段であるが、まず、ゲノムの 100% をカバーすることは不可能であること（80% くらいなら可能）、変異部位を同定するためにはかなりのカバー率（coverage）でシーケンスする必要があり、その場合出力されるデータ量は膨大になる（たとえば、パパイゲノムは 370Mb として、200×でシーケンスすると 74Gb である）。さらに、見出した変異が人工ヌクレアーゼによる影響か、自然変異かを判断するのは難しい（大きな欠失や挿入があれば別であるが）。ZFN、TALEN および後述する CRISPR のいずれを用いたゲノム改変であっても、off-target サイトでの変異導入を次世代シーケンサーで解析している例はほとんどない。

(c) clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)について

CRISPR/Cas9 は、細菌がもつ一種の免疫システムで、一般に用いられている Cas9 は *Streptococcus pyogenes* 由来のものである。CRISPR/Cas9 システムの最大の利点は、コンストラクトの作成が非常に簡単であることにある。20 塩基+NGG の合計 23 塩基を標的とすることができ、NGG を除く 20 塩基を Cas9 をコードするプラスミド内の U6 プロモーター下に組み込むだけで作製できる。必要なもの

は一つの標的に対して、一つのプラスミドである点が、設計および作製が非常に難しい ZFN や、やや作製に時間と手間を要する TALEN に比べての大きな利点で、今後のゲノム改変分野での中心の一つであると考えられる。

CRISPR/Cas システムの特異性についても、5'側の 12 塩基はミスマッチを許容しやすいことや、GC 含量が 45~65%程度のときに切断効率が高いこと、また、極端に高い GC 含量(80%以上)では、かなりの割合で off-target 切断が起きることが示されている。

CRISPR/Cas9 は、TALEN などに比べて off-target サイトでの切断活性が高いことから、様々な off-target 低減のための工夫が試みられている。2 組の nickase Cas9 (Cas9n) と gRNA を用いて、それぞれの標的部位でニックを導入し、結果として DNA 二本鎖切断を起こすものはその一例である。ごく最近、ZFN や TALEN と同様に、左右に活性を欠失させた Cas9 (dCas9) からなる DNA 結合ドメイン、その間に DNA 切断活性を有する *FokI* 制限酵素から構成されるものが開発された。特異性が非常に高いことが期待される。

(d) ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 による DNA 切断部位での改変パターン

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムで誘導される標的配列 (on-target) での改変パターンを調査したところ、いずれの組換え技術を用いても差はなく、大部分は数塩基から数十塩基の欠失で、欠失は最大 400bp まで、挿入は数塩基から 100 塩基程度まで見られ。このパターンは、on-target でも off-target でも同様の結果が報告されている。また、off-target サイトが open chromatin で nucleosome free

領域などにあるときは高い頻度で起きる可能性があると考えられる。

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムなどの、いわゆる次世代遺伝子組換え技術はこれまでほとんどが動物を対象としたものであったが、ごく最近になって、植物への適用例が報告されるようになってきた。シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどを用いて研究が行われているが、標的部位での DNA 二本鎖切断による変異パターンは、既に述べた動物と異なることはなく、数塩基から 10 塩基程度の欠失を中心としたものであることが報告されている。

(2) CRISPR/Cas9 による標的遺伝子配列 DNA 切断

実験および解析が比較的容易で、かつ迅速に結果が得られることから動物培養細胞を用いて、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム改変を試みた。これまでの信頼できる重要な論文を参考に、問題点なども明らかにする目的で、ゲノムへのアクセス性がよくないと想定される遺伝子領域を選定して実験した。

標的とした遺伝子 *AIFM1* は、ENCODE (encyclopedia of DNA elements) データより、転写活性が弱く、かつ DNase I hypersensitivity 領域ではないこと、細胞を用いた SSA アッセイでは設計した Platinum TALEN は高い細胞内プラスミド上での同配列切断活性を有していることから判断して、ゲノム DNA 上の標的部位へのアクセス性が制限されていることが標的部位での切断活性が得られなかった原因と考えられた。Cas9 の結合領域は、ゲノムへのアクセス性 (accessibility) を反映する DNase I hypersensitivity サイト

と重なることが示されている。次世代遺伝子組換え技術である TALEN、CRISPR/Cas9 は、ゲノム DNA 上の二本鎖切断誘導をするための手段である。このことと、対象細胞核内のゲノム DNA へのアクセス性と変異導入効率は、宿主側の問題である。したがって、ゲノム上のどの位置でも DNA 二本鎖切断を発端するゲノム改変が行えるわけではない。次のステップとしては、本格的に普及するためにも宿主側での工夫が必要と考えられる。

CRISPR/Cas9 によるゲノム改変部位とクロマチン状態との関係について

最近報告された論文から、そのターゲット遺伝子領域とゲノム DNA へのアクセスしやすさについて、UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を用いて解析した。ヒト遺伝子導入領域として知られている AAVS locus 上の *PPP1R12C* 遺伝子を標的とした場合は 50% 前後の非常に高い変異導入率が得られており、ゲノム構造を見てみるとその標的サイトも高度に DNase I hypersensitivity (HS) 領域が集まった領域でアクセスしやすい環境にある。一方、*EMX1* 遺伝子を標的とした場合には、遺伝子全体には DNase I HS クラスターが存在するものの、転写が抑制されており、DNase I HS クラスターからすこし離れていることから、ゲノムへのアクセス性はあまりよくないと考えられ、実際変異導入率は 2.9% とかなり低い結果であった。

今回検討に用いた、*AIFM1* 遺伝子は、弱く転写されている領域で、かつ遺伝子全体に渡って DNase I HS クラスターの存在する領域がなく、ゲノム DNA へのアクセスは悪いと考えられた。実際の結果と合わせて、ZFN、TALEN、

CRISPR/Cas9 で改変できる領域は、アクセス性と関係する。

(3) 次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品(植物・動物)の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 である。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 の組換え技術は、アメリカを中心とした研究グループが精力的研究開発を行ってきたが、今後は日本、ヨーロッパに加えて、中国などの国々が幅広く使い、植物分野でも急激に論文数が伸びてきていることから今後数年でこれらの技術を用いた作物が商業ベースに入ってくるものと考えられる。

植物の分野では、実用段階に近いものは、植物の RNA ウィルスベクターを用いたものや接ぎ木による遺伝子サイレンシングを用いた組換え技術が原田らによって開発されている。

次世代組換え技術の各国の規制に関しては、欧米を含めて検討段階である。2011 年には EU の Joint Research Centre (JRC) が、報告書を公表している^{20, 21)}。そこでは、技術を以下の 5 つにグループ分けしている。

- 1 . site-directed mutagenesis
ZFN, TALEN, CRISPR (JRC の報告書には含まれていない), meganuclease
- 2 . cisgenesis and intragenesis
- 3 . breeding with transgenic inducer line
- 4 . grafting
- 5 . agro-infiltration
agro-infiltration, agro-infection,

floral dip

各国ともに、NBT などの次世代遺伝子組換え技術を用いて作出されたものについて、既存の GM の定義（自然界では起きない組換えを行う）や考え方に従っていくようなスタンスである。

また、プロセスベースの規制をしている EU においても、GM 作物に対する規制の考え方をプロダクトベースに見直す動きもあり、その方向で統一されることが望ましいと考える。

アメリカでは ZFN を用いて作製された個別に評価されているようである。

アジア地域での次世代遺伝子組換え技術を用いた研究

遺伝子組換え食品の開発、商業栽培は近年アジア各国で増加傾向である。インド、バングラディッシュ、フィリピンなどの発展途上国で開発、栽培される遺伝子組換え食品は、既に先進国で開発されたものが中心である（例えば、モンサントがこれまでに開発した系統）。一方、近年遺伝子改変した痕跡が残らないか自然界の変化と区別がつかないと考えられている、いわゆる次世代遺伝子組換え技術は、日本以外では中国が精力的に開発研究を行っている。

食用 GM 動物の文献調査

1. 該当する論文、特許などの数は以下の通り。
ウシ 32 報、ヤギ 20 報、ブタ 16 報、魚 15 報、ヒツジ 5 報、ニワトリ 1 報、ウサギ 1 報、エビ&カニ 1 報。合計 91 報。
2. 日本で馴染みの薄いヤギの報告が多かった。
3. 日本で馴染みのあるニワトリの報告が少なかった。（遺伝子導入法で良い方法がない。

ウイルス（主にレトロウイルス）が使われていたが、長い遺伝子は使えない。パッケージングできなくなる。また、食用としてはウイルスはイメージが良くない。ES 細胞などの幹細胞は研究途上、などの理由。）

4. 開発国は圧倒的に中国が多い。91 報中 70 報を占めた。
5. 導入あるいは改変遺伝子には頻繁に使われるものがあった。
6. エビ、カニについて
トランスジェニック藻類を作成してエビやカニに食べさせることを目指している。エビやカニに直接遺伝子導入するわけではない。しかし、間接的に組換え遺伝子やタンパクがエビやカニ導入されるので、本調査で該当するものとした（調査の対象を広く解釈した）。
7. ゲノム編集技術を利用した食用トランスジェニック動物については ZFN を利用した物が 8 報あった。最近になってノックインも出てきた。

(4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

Cas9 リコンビナントタンパクの発現精製を行った。今後は、これを用いて、タンパク消化試験や抗体作製を行う予定である。

(5) 高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

今回、4 つのモジュールを連結する方法を採用し、この方法で non-RVD variation をもった TALEN (Platinum TALEN) の効率的な作製方法 (Platinum Gate TALEN construction system) を確立した。オリジナルの 10 モジ

ール法での成功率は 10%程度であったが、4 モジュールでの成功率は 100%であった。

ヒト *HPRT1* 遺伝子座を切断する Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイおよび Cell アッセイにより活性を評価したところ、これまでの TALEN に比べて、高い活性を示した。

(6) Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体での遺伝子破壊効果を調べるために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子(*tyr*)破壊を試みた。受精卵に Platinum *tyr* TALEN を顕微注入したところ、多くのカエル胚でアルビノとなることが示された。加えて、毒性も低下し、これまでの TALEN で見られたいいた奇形胚は、Platinum TALEN 導入胚ではほとんど見られなかった。RFLP 解析によって、ほぼ 100%で変異導入されていることが明らかになった。

(7) 次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響を解析するため、ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の配列上に存在するグロビン遺伝子クラスターの グロビン遺伝子と グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に DSB するよう TALEN を設計した。DSB への相同組み換え HR は、ニワトリゲノムの DSB 標的配列から両側に約 800 bp の配列を利用して、targetting ベクターの設計を行った HR により作成した DT40 細胞株は限外希釈法によりクローン化し、PCR 法により、クローン 1 ~ 3 番を得た。DSB

標的配列周辺 (70 kb) のゲノム構造を解析するため、3C 解析を行い、CpGislet 配列は、

D グロビン遺伝子配列に結合しており、D グロビン遺伝子配列は A グロビン遺伝子配列と結合していることが示唆された。また、D グロビン遺伝子配列は、その上流に位置する MRE 及び 9DHS 遺伝子配列と結合していることが示された。DT40 細胞株と LMH 細胞株の同ゲノム領域の 3 次元構造は極めて類似しているものであることが示唆された。

DSB の 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子の発現量の差を、RT-リアルタイム PCR 法により定量した結果、DSB 挿入した両端に存在する D、及び MPG の遺伝子発現にて 10 ~ 100 倍上昇したことを確認した。

(8) 次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立

PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精製した DNA、Illumina HiSeq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。その結果、PSRV-YK 系統の既知部分配列 120 bp にヒットするリードは一本も得られなかった。今後、未知遺伝子を含む組換え生物の解析に次世代シーケンサーを用いるには、さらに、解析手法の改良が必要であった。

(9) GM 植物及び NBT 開発状況の調査

国内の状況について、第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会・シンポジウム講演要旨集で調査した結果、24 件の情報が得られ、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した。SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013 年に公表・出版された論文等を調査した結果、83 件が得られ、特に機能性食品、治療薬及び環境

浄化の件数が多かった。また、2013年の国別の件数は、中国：30件が最も多かった。

(10) NBT 応用状況の文献調査

NCBIPUBMED 各 NBT について検索し、検索結果について、基礎技術に関する論文や総説を除き、植物に NBT を適用した論文のみを抽出した。年度別の論文数推移について、全体の総数の推移と、植物への実施数のそれぞれをグラフ化した。

NBT 適用植物リストおよびグラフから、伺える NBT の利用動向は下記のとおりである。

ZFN の植物への応用について、キーワード：ZFN、zinc finger nuclease、plant で検索したところ、適用植物としてシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆の4種、12報の報告が認められた。ZFN の適用範囲はモデル植物が中心であり、応用例はマメ科にとどまっている。

TALEN の植物への応用について、キーワード：TALEN(s)、TAL effector、plant で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、トウモロコシ、*Brassica oleracea* (アブラナ科)、*Brachypodium* (イネ科、セルロースバイオマス増産研究のモデル植物として期待される)、大麦の7種、11報の報告が認められた。

CRISPR/Cas の植物への応用について、キーワード：CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、*Nicotiana benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケの8種、14報の報告が認められた。短期間に8種(ゼニゴケを含む)の植物に適用されていることは注目すべき点である。

研究が実施された国別でみると、NBT 研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループが活動する米国の報告数が多く、中国、とくに Chinese Academy of Sciences からの報告数が多い。今後、中国の動向については注意して見守る必要があると考えられる。

(11) NBT モデル植物作出のための基盤整備

NBT 文献調査の結果等をふまえ、本研究においては、まず TALEN を利用した遺伝子編集を実際に試行することとした。

NBT を適用したモデル植物を作成する上で、ホストとなる植物は、NBT による遺伝子破壊・変異の効果が目視等簡便な方法で確認できるように GUS 等のマーカー遺伝子を有していることが望ましい。

そこで、今年度は本研究の研究協力者である、東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章教授より、同教授らの作出した、GUS 遺伝子に *OsMacI* 遺伝子の 5'非翻訳領域を付加した、-glucuronidase (GUS)タンパク質を高効率に発現する UTRc::GUS rice (Ref.1)の種子の譲渡を受けた。

今後、UTRc::GUS rice をホストとして、本コンストラクト中の GUS 遺伝子を標的として TALEN のモジュールを設計し、二本鎖切断による変異導入の形態及び効率等の解析を計画している。

(12) (ケース 2) TALEN 応用植物の導入についての検討

農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターゲノム機能改変研究ユニット 土岐精一ユニット長より、TALEN を適用し、WAXY 遺伝子(イントロン)に変異を導入したイネ TALEN コンストラクトを有する組換え体について譲渡を受けることも検討している。

本組換え体については TALEN コンストラクトがゲノムに挿入されているため、カルスで培養を行った際の、培養期間、培養条件に応じた二本鎖切断 (Double Strand Break, DSB) の発生形態、頻度の解析に用いることができる見込みである。

技術的な考察や規制に対する考え方が、現在各国で議論がされている（EUのJRCやFSANZは報告書をまとめている）。その中で、cisgenesis&transgenesisは、微生物の場合とはちがいGMと扱うこと、reverse breedingやSPTは、後代に組換えに関連する遺伝子やその一部が残っていないことを精査されていればnonGM、GM rootstock graftingは、GM台木とnonGM穂木からなる植物体は、GMであり、nonGM穂木になる種子はnonGMであるが、実（果実）は台木からの遺伝子組換え由来のRNAやタンパク質がないことの証明の程度により判断する、ということは概ね各国で一致しているように考えられる。一方、ZFN、TALENやCRISPRを用いた小さな欠失、数塩基の置換は、nonGMとする考え方に向いているように思われるが、標的部位で小さな変異しか入っていないことを証明しても、off-targetサイトの大きな変異（数百塩基欠失）のないことを、だれが、どの段階でどのように証明するか、ミスマッチ塩基数の増加とともに指数関数的に増加するoff-target部位から安全性に関わる変異をどのように見つけるか、あるいは、プロダクトベースの考え方で最終産物の化学的同等性が野生型と変化なければよいとするのか、今後議論すべき点は少なくない。今後も、各国と状況を参考に、または協調しながら進める必要がある。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

各分担研究報告欄に記した。

F. 知的財産権の出願・登録状況

TALENの結合モジュール中の4番目と32番目の配列を改変することで、特異性の高いTALENの作製が可能であることを、特許出願した。

出願番号：特願2013-166768

「DNA結合ドメインを含むポリペプチド」

出願日：平成25年8月9日

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

Platinum TALEN 作製システムの確立とツメガエルでの遺伝子改変

研究分担者	山本 卓	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	鈴木賢一	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	佐久間哲史	広島大学大学院理学研究科

研究要旨

本研究では、部位特異的ヌクレアーゼの1つである Transcription activator-like nuclease (TALEN)の DNA 結合モジュールを改変した高活性型 TALEN (Platinum TALEN)を開発し、その作製システム (Platinum Gate System)を確立した。このシステムを用いることによって、高活性型 TALEN の効率的な作製が可能になった。ヒト培養細胞において Platinum TALEN は効率的に目的の遺伝子に変異を導入することが示された。さらに、個体レベルでの変異導入を確認するために、アフリカツメガエル卵に Platinum TALEN を導入して変異導入効率を調べた。その結果、変異率の高い胚では 100%の変異導入が確認された。これらの結果から、Platinum TALEN は、培養細胞や動物個体でのゲノム編集に有効なツールであることが示された。

A. 研究目的

人工ヌクレアーゼなどの部位特異的ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術(ゲノム編集)によって、様々な生物における目的の遺伝子改変が可能となってきた。しかしながら、対象とする生物によってゲノム改変効率は大きく異なり、より安全で効率の高い部位特異的ヌクレアーゼの作成が求められている。そこで、本研究では、部位特異的ヌクレアーゼの1つである Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を改良した高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発、Platinum TALEN 作製法の標準システムの開発、モデル生物(本実験ではアフリカツメガエル)での標的遺伝子の破壊を行なった。

これまで広く利用されている Golden Gate 法で作製された TALEN (Golden TALE:ミネソタ大学 Voytas 博士が開発)の DNA 結合モジュールを改良した高活性型 TALEN の開発を行なった。TALEN の結合力を高める方法として、結合モジュールのアミノ酸配列に着目し、アミノ酸配列の改変を行なった。結合モジュールは 34 アミノ酸からなり、12 番目と 13 番目のアミノ酸は、塩基特異的な結合を担う多型配列(RVD)として知られている。自然界の TALE のアミノ酸配列を調べたところ、この RVD 以外に 4 番目と 32 番目のアミノ酸に多型のあることがわかった。そこで、この 4 番目と 32 番目の多型(non-RVD variation)を利用した新しい TALEN の作製システムの確立を試みた。

B. 研究方法

1. 高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発

1) RVD の改変と Platinum TALEN の作製
Non-RVD variation をもつモジュールを化学合成によって作製し、pBSK ヘサブクローニ

ングすることによってモジュールプラスミド (p1HDp4HD, p1NG-p4NG, p1NI-p4NI, p1NN-p4NN)を作製した。また、Golden Gate 法による受け手ベクターを pFUS2 および pTALEN_v2 をベースとして作製した。これらのプラスミドを用いて、Golden Gate 法 (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013) をベースとした Platinum TALEN の構築法を確立し、培養細胞での評価に用いた。

2) 作製した Platinum TALEN の活性評価

Single strand annealing (SSA)アッセイ

構築した TALEN の活性を SSA アッセイにより評価した。HEK293T 細胞を 10%FBS の DMEM で培養した。SSA アッセイは落合の方法 (Ochiai et al., Genes to Cells, 2012) によって行なった。50,000 細胞に 200 ng の TALEN 発現ベクターと 100 ng の SSA のレポーターベクターと 20 ng の pRL-CMV ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションした。24 時間後に Dual-Glo luciferase assay system (プロメガ)を用いて活性を評価した。

CelI アッセイ

Sakumaらの方法 (Genes to Cells, 2013) の方法に従ってCelIアッセイを行なった。約 30,000 のHEK293T細胞に200 ng のTALEN 発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、ゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを鋳型として、標的配列をはさむプライマーを作製し、KOD FX Neo (東洋紡) を用いて標的配列部分をPCR増幅した。その後、CelIヌクレアーゼによりPCR産物を反応させ、アガロースゲル電気泳動によって切断の有無を確認した。

2. Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体における効果を調べる目的で、アフリカツメガエルでの標的遺伝子破壊を試みた。本研究では、表現型を容

易に観察できる色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊し、その効果を観察した。

mRNA 合成とカエル卵への顕微注入

アフリカツメガエルのチロシナーゼを破壊する TALEN を上記の方法により構築し、mMessage mMachine T7 Ultra Kit(ライフテクノロジーズ)のキットを用いて、mRNA を試験管合成した。ツメガエル受精卵は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与することで採取した。卵を 2%システイン溶液で脱ゼリーし、3% Ficoll in 0.36 X Marc's modified Ringer's (MMR)へ移した。約 250 pg の TALEN mRNA をナノジェット I (Drummond, Broomall, PA, USA)を用いて顕微注入した。顕微注入卵は、ゲンタシンを含む 0.16 X MMR 中で、胞胚から遊泳オタマジャクシ幼生まで飼育した。カエルの飼育については、広島大学のガイドラインに従って行なった。

RFLP 解析

Platinum TALEN を導入したカエル胚からキアゲン社の Blood and Tissue kit を用いてゲノム DNA を抽出した。標的配列を含む領域を PCR によって増幅し、PCR 産物を制限酵素 *HinfI* で消化し、アガロースゲル電気泳動によりバンドパターンを調べた。

C. 研究結果

高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発

我々は、以前 6 モジュール法によって TALEN を作製する方法を報告している (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013)。今回、我々は、4 つのモジュールを連結する方法を採用し、この方法で non-RVD variation をもった TALEN (Platinum TALEN) の効率的な作製方法 (Platinum Gate TALEN construction system) を確立した(図 1)。基本的な方法は、既存の Golden Gate 法と同様であるが、第一段階の連結を 4 モジュールに制限することで、成功率を向上させることに成功した。オリジナルの 10 モジュール法での成功率は 10% 程度であ

ったが、4モジュールでの成功率は100%であった。

ヒト *HPRT1* 遺伝子座を切断する Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイおよび Cell アッセイにより、活性を評価したところ、これまでの TALEN に比べて、高い活性を示した。また、ヒト ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) と adenomatous polyposis coli (*APC*)、および *eGFP* 遺伝子に関して SSA アッセイを、*ATM* 遺伝子と *APC* 遺伝子に関しては Cell アッセイによって活性が十分高いことを確認した (図 2)。

Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体での遺伝子破壊効果を調べるために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子 (*tyr*) 破壊を試みた。受精卵に Platinum *tyr* TALEN を顕微注入したところ、多くのカエル胚でアルビノとなることが示された (図 3 B)。加えて、毒性も低下し、これまでの TALEN で見られたいた奇形胚は、Platinum TALEN 導入胚ではほとんど見られなかった。さらに、RFLP 解析によって、ほぼ 100% で変異導入されていることが明らかになった (図 3 D)。

D. 考察

本研究の結果から、non-RVD variation の利用によって TALEN の活性を高めることが示された。これまで、多くのグループが N 末や C 末の構造やヌクレアーゼ部分の改変を行ってきたが、DNA 結合モジュールの構造改変による活性上昇の報告は、本研究が初めての報告である。しかしながら、non-RVD variation が結合活性を上昇させる機構については明らかにされていない。今後、X線結晶解析などの構造解析によって、その原理を明らかにする必要がある。

これまで、TALEN の作製には Vytas 博士によって提供されている Golden Gate キットが

主に使われて来た。この方法は、2ステップの安定した作製システムである一方、研究室によって作製効率が大きく異なることが知られていた。その原因は、第一段階で10個のモジュールを同時に連結する成功率が、研究室によってばらつくことにあると考えられる。今回、我々は同時に4個のモジュールを連結する方法に改良したことで、多くの研究者が失敗することなく TALEN を作製できるシステムへ改良できたと考えている。作製できるモジュール数は、これまでの31モジュールから21モジュールと制限されるが、15-20モジュールの TALEN で高い特異性を確保できるので問題とはならない。

様々な生物において、部位特異的ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変が報告されているが、生物種や細胞種によっては毒性の高いことが報告されている。これは、切断効果を高めるため、大量のヌクレアーゼを導入したことが原因である可能性が高い。本研究で開発した Platinum TALEN は、その活性の高さから、導入量を下げることが可能なことから毒性を下げることに成功した。今後は、様々な生物において、Platinum TALEN を利用し、その効果を調べる計画である。

E. 結論

本研究によって、高活性型の部位特異的ヌクレアーゼの開発と作製システムの確立に成功した。さらに、このシステムで作製した Platinum TALEN は培養細胞や動物個体において高い変異導入効果を持つことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells*, 2014, in press

- 2) Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1461-1466
 - 3) Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*, 2014, 63: 79-84
 - 4) Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T and Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in Ciona by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development*, 2014, 141: 481-487
 - 5) Sugi T, Sakuma T, Ohtani T and Yamamoto T. Versatile strategy for isolating TALEN-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 78-85
 - 6) Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of TALENs. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 108-114
 - 7) Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, Yokotani N, Inoue T, Kawaguchi E, Agata K, Yamamoto T and Takeuchi T. TALENs efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 115-121
 - 8) Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto A, Yamamoto T and Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 86-91
 - 9) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3379
 - 10) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*, 2013, *Genes Cells*, 18: 315-326
2. 学会発表
 - 1) 山本 卓, Platinum TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
 - 2) Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学 iPS 研究所セミナー、京都、2013
 - 3) Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, Genome Engineering -Research & Applications, Italy, 2013
 - 4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese

Society of Developmental Biologists,
Matsue, 2013

- 5) 山本 卓、鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型 TALEN を用いたゲノム編集、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 6) 李 紅梅、藤本直子、笹川典子、白井紗矢、山本 卓、Woltjen Knut、櫻井英俊、山中伸弥、堀田秋津、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞のゲノム手術、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 7) 山本 卓、高活性型 TALEN の開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第 65 回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013
- 8) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013
- 9) 山本 卓、ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成 25 年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013
- 10) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第 15 回京都心血管代謝セミナー、京都、2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

TALEN の結合モジュール中の 4 番目と 32 番目の配列を改変することで、特異性の高い TALEN の作製が可能であることを、特許出願した。

出願番号：特願 2013-166768

「DNA 結合ドメインを含むポリペプチド」

出願日：平成 25 年 8 月 9 日

【資料】

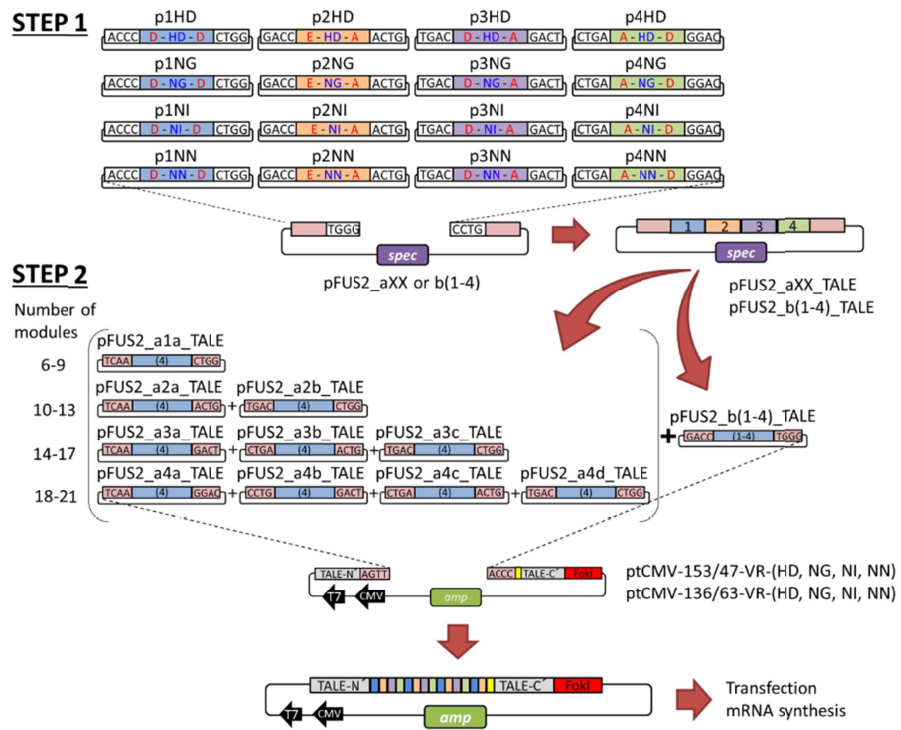


図 1 . 4 モジュール連結を基盤とした Platinum Gate TALEN 作製システム

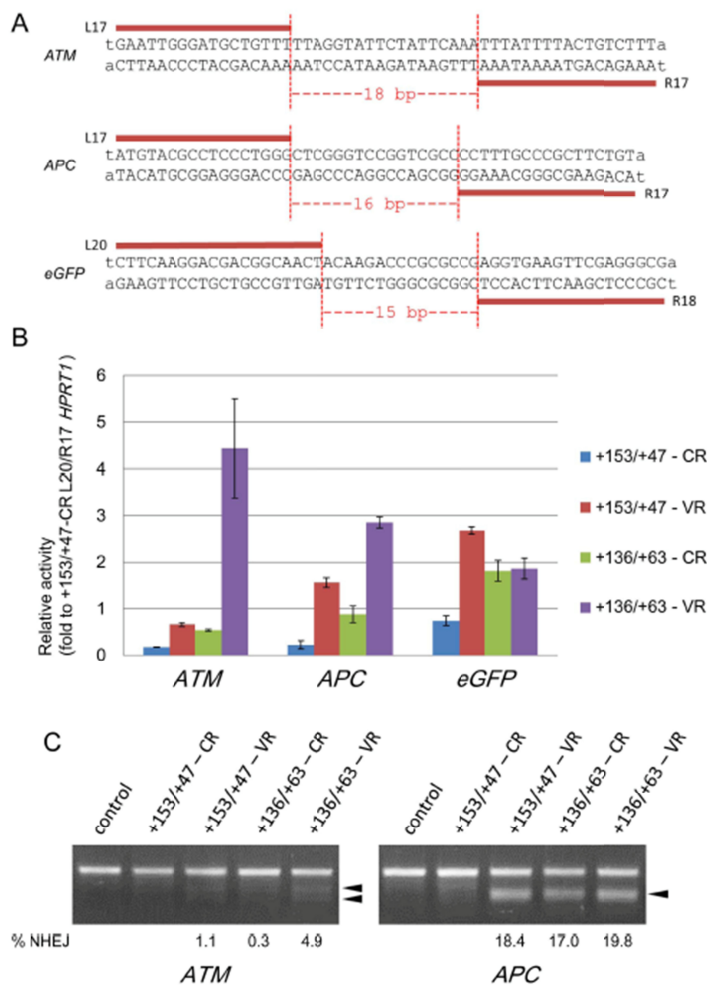


図2 . Platinum TALEN の SSA アッセイおよび CeII アッセイによる活性評価
 A: 3 種類の遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ
 B: Golden TALEN と Platinum TALEN の SSA 活性の比較
 C: Golden TALEN と Platinum TALEN の CeII 活性の比較
 矢印のバンドが活性の高さを示す。

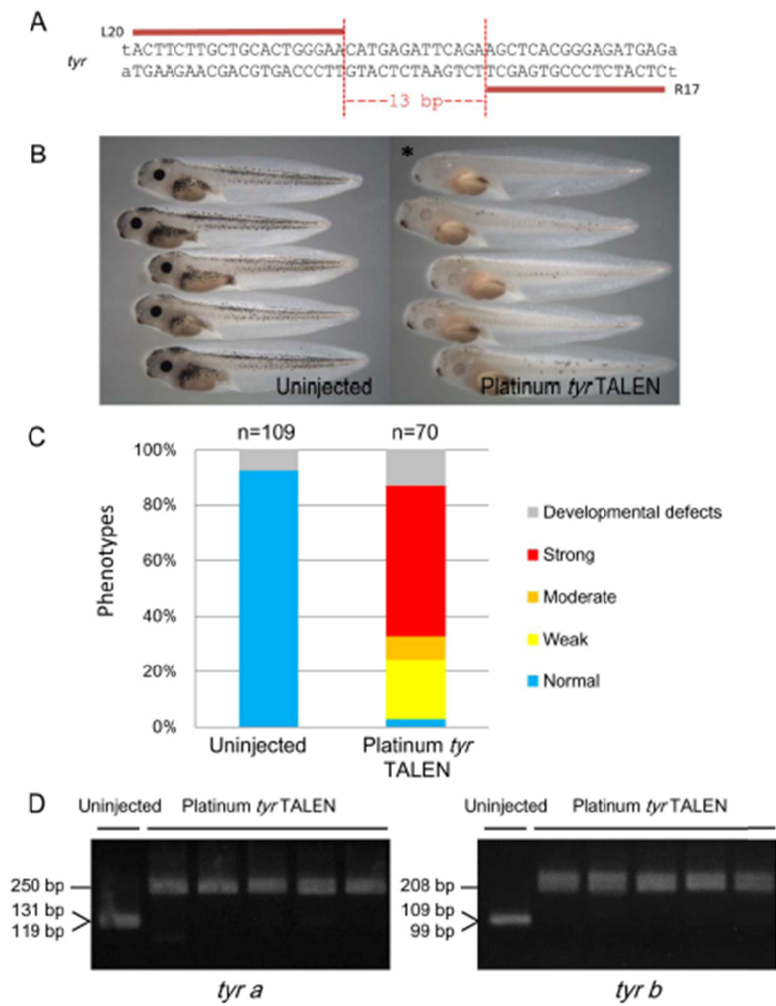


図3 . Platinum TALEN を用いたツメガエル標的遺伝子の破壊
 A: *tyr* 遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ
 B: *tyr* TALEN を導入した胚の写真
 C: アルビノ胚の比率
 D: RFLP による変異導入効率の解析

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部
研究分担者 鎌田 博 筑波大学筑波大学生命環境系・筑波大学遺伝子実験センター

研究要旨

遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、植物での開花を促進して品種改良の期間短縮を目的とした植物 RNA ウイルスを用いた方法、遺伝子組換え台木の接ぎ木による穂木への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動物・植物への TALEN、CRISPR/Cas9 技術の応用など進んでいる。これらの多くの技術の特徴は、遺伝子組換え技術の痕跡が残らないと考えられていることである。これら次世代遺伝子組換え技術は、技術的にもようやく確立されたばかりであり、その特徴や起こり得る現象も検討されていない。今後これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているため、こうして作出された GM 生物の規制の在り方や検知方法に関する検討が急務となっている。本研究では、これら多様な次世代遺伝子組換え技術について整理するとともに実際に適用した時の技術的な問題点や生物細胞内で起こる現象について研究を行うとともに、作出された GM 食品の検知可能かどうかについての基礎的な検討を行った。特に、今後組換え技術の中心となる可能性の高い TALEN、CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる改変や off-target の頻度とそこで起こる改変について、文献調査を行うとともに、細胞レベルで検討した。また、各国の次世代遺伝子組換え技術を用いた生物の研究開発状況や規制状況について調査を行った。

研究協力者

中島 治、野口秋雄、坂田こずえ、福田のぞみ（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え（GM）技術が急速に発展し、ZFN（Zinc-Finger Nuclease）に始まり 2010 年頃に登場した TALEN（Transcription Activator-Like Effector Nucleases）さらに、2013 年に報告された CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）などの次世代遺伝子組換え技術が、疾患研究などの基礎研究のみならず食品分野でも応用されるようになってきた。また、接ぎ木や RdDM（RNA-directed DNA Methylation）の機構を用いた遺伝子サイレンシングにより、

ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた。TALEN や CRISPR とともに、遺伝子上の塩基配列を人工的かつ意図的に改変した痕跡を残すことなく組換え生物、作物が作成可能であることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

これらの次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼである ZFN、TALEN、CRISPR 法のほか、RdDM や接ぎ木による RNA 輸送による遺伝子サイレンシングを用いたもの、植物 RNA ウイルスを用いたものなどが存在し、そ

れらについて、技術ごとに整理し、その原理や作用機構、実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体(GM)として扱うか、GMとして扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要である。

遺伝子塩基配列上の変化については、非特異的な改変(off-target効果)がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について、改変が欠失、置換、挿入に分けて考える必要がある。

そこで、本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しいTALEN, CRISPRを中心に、上記観点から調査研究を行った。また、最近開発された食用および非食用トランスジェニック生物の文献調査を行う。これらの技術は一般にはNBT(New Plant Breeding Technology)と呼ばれているが、本研究班では、植物と動物の両方を対象としているために、次世代遺伝子組換え技術とする。また、海外での開発状況や規制状況についても調査した。さらに、Cas9検知法や毒性評価のためのタンパク消化試験を行うために、リコンビナントタンパクを調製した。

B. 研究方法

(1) 人工ヌクレアーゼ(ZFN、TALEN、CRISPR)を用いた遺伝子改変に関する調査研究

手法と off-target(標的外塩基配列への影響)に関する著名な論文中心に調査し、off-targetの起きる程度とパターンについて調べた。

また、標的配列に用いられている配列をゲノム情報サイト Genome Browser を用いて DNA accessibility、Histone modification state 等を調べた。

(2) CRISPR を用いたモデル切断実験

CRISPR/Cas9システムの切断活性や特異性等についての実験

実験材料: 培養動物細胞として、クローン化したPC12細胞およびニワトリDT40細胞を用いた。

CRISPR/Cas9 および TALEN: Addgene より、human-codon optimized SpCas9 と guideRNA をコードするプラスミドを購入した。これを用いて、目的遺伝子内に複数の標的塩基配列のDNA二本鎖切断を誘導するのに必要なプラスミドを作製した。目的プラスミドは、細胞に、リポフェクションまたはエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、2-3日後に細胞を回収して、標的部位の改変の有無やそのパターン、頻度を調べた。また、標的配列には、これまでに論文で報告されているような遺伝子標的部位が多くの場合、構成的に発現している遺伝子の exon1 やその5'側上流で open chromatin で nucleosome free であると推定されるところが多い。本実験では弱く転写されている遺伝子の内部 exon で、chromatin accessibility がよくないと想定される *AIFM1* exon3 を中心に検討を行った。

TALEN: Platinum TALEN を用いて作製した。このプラスミドは、SSA アッセイを用いて、十分な活性があることは示されている。

indelの確認：細胞回収後に、予想切断部位を含む領域を、high-fidelity polymerase を用いて増幅し、SURVEYOR アッセイまたは T7 Endonuclease I アッセイを用いて調べた。また、増幅産物をクローニングベクター Zero Blunt に挿入し、DH5 大腸菌に transformation 後、最大 48 コロニーをシーケンズ解析した。

(3) 次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品(植物・動物)の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 である。一方、植物ではこれまでに開花促進の目的で植物 RNA ウイルスベクターを用いた手法が有望である。また、接ぎ木による手法も一見古典的に思われるが、台木と穂木の一方に遺伝子組換え体 (GM) を用い、遺伝子サイレンシング目的に RNA を師管輸送してもう一方に機能させる方法で、最終的に非遺伝子組換え体 (nonGM) ゲノムへの挿入も改変も起きないことから、期待される技術である一方で、その取扱い (GM か nonGM か) についての判断が必要になって来る。これらが、中心の技術と考えられることから、国内外の開発動向や規制に関する情報を収集した。

(4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

組換えタンパクの発現、精製は参考文献 (Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial

Immunity. Science (2012) 337, 816-821) に付属する Supplementary Materials に記載の方法に基づいて行った。

大腸菌における組換えタンパクの発現

発現プラスミド：Addgene から購入した pMJ806 を用い、大腸菌ホストには Rosetta2 (DE3) (Novagen) を使用した。精製は、キレートカラム (Ni-NTA Agarose、キアゲン) で行い、透析によるバッファー交換を行いつつ TEV プロテアーゼ (ProTEV Plus、プロメガ) で消化した。さらに、陽イオン交換カラム (MonoS、GE ヘルスケア) で精製し、タンパク定量は 280 nm における紫外吸収に基づいて行った。

C. 研究結果

(1) Off-target に関する調査

(a) zinc-finger nuclease (ZFN) について

Fig.1 に示すように¹⁾、DNA 結合ドメインは、真ん中のスペーサー 5~7 bp を挟んで両側に 9~12 bp、両 DNA 結合ドメイン合わせて 18~24 bp である。スペーサー部分で認識部位を持たない制限酵素 *FokI* の二量体形成により DNA 二本鎖切断を誘導するものである。これは、 3×10^9 bp のヒトゲノムに対してもただ一つの標的配列を設計することが理論的には可能であるが、ZFN は設計できる配列に制限があるためにその特異性は、理論値ほど高くないと予測される。また、後述する TALEN 同様であるが、真ん中のスペーサー配列に認識部位を持たない制限酵素 *FokI* が二量体を形成して DNA 二本鎖切断 (double strand break, DSB) を誘導する。したがって、構造上片側の ZFN モジュール内の DNA 結合ドメインの配列を基にした、

標的配列 (target 配列) に類似した標的外配列への結合、切断 (いわゆる、off-target 効果) を予測することは難しいと考えられている。つまり、2つのモジュールで DNA に結合し切断する ZFN では、片側の認識配列にミスマッチがあっても *FokI* が切断に必要な 2 量体形成をすればよいことから、off-target は理論的に考えられるよりも、その確率は高いと考えられる。この点について、Keith Joung らのグループは、target 配列に対して 7 塩基までのミスマッチ (mutation) を含む DNA ライブラリーを作成し (10¹¹ DNA sequences) *in vitro* selection 法で特異性を検討している²⁾。ヒト遺伝子 *CCR5* および *VEGFA* を標的とした ZFN (VF2468) で想定される off-target サイトは、Fig.2 に示すように、4 finger からなり 24 塩基を認識する *CCR5* 用 ZFN の方が、3 finger からなり 18 塩基を認識する VF2468 用 ZFN よりも特異性は高いが、数塩基のミスマッチを許容しやすく、結果、ZFN では 3 塩基以内のミスマッチがゲノム上に無いように設計することが望ましいとされている。その他、ZFN は設計が難しく、また標的配列の制限があり後述する TALEN や CRISPR に比べてゲノム上の配列のどこでも設計できるわけではないため、人工ヌクレアーゼの中では、利用は今後は多くないと思われる。

(b) transcription activator-like effector nuclease (TALEN) について

TALEN は、植物病原菌 *Xanthomonas* が持つタンパクで、宿主感染に必要なタンパク発現を誘導するために DNA 結合ドメインと活性化ドメインをからなる。ゲノム改変に用いる TALEN は、活性化ドメインを除去し、代わり

に制限酵素 *FokI* を連結したもので、ZFN 同様に、2つの DNA 結合ドメインを間に、15 塩基前後のスペーサー部分での *FokI* 二量体形成により DNA 二本鎖切断を行う³⁾ (Fig.3)。DNA 結合ドメインは、片側 17-18 塩基で、合計 34-36 塩基と ZFN の DNA ドメインよりも認識部位が長いために特異性が高いと考えられている。現在、ゲノム改変に用いられている TALEN コンストラクトは、複数の研究グループから報告されておりいくつかのバリエーションにより、その特性 (特に off-target 効果) が若干異なると予想される。TALEN は、2011 年頃から急速に普及してきたが、その特異性、すなわち off-target がどの程度生じるのか、何塩基までのミスマッチを許容するかの詳細な検討はごく最近まで行われていなかった。

Keith Joung らのグループは、ZFN の特異性研究で用いた手法 *in vitro* selection を用いて、DNA ライブラリーを作成し (10¹² DNA sequences) TALEN の特性について詳細に検討している⁴⁾。ヒト細胞を用いて、on-target と off-target 部位での変異導入率と on-target に対するミスマッチ塩基数について調べた結果、片側 18 塩基 (つまり、両側 36 塩基による DNA 認識) の TALEN を用いた場合に想定される off-target サイトは 7 塩基ミスマッチまで存在しないが、9 塩基で 70 サイト、11 塩基で 4338 サイト存在する。しかしながら、Fig.5 に示すように *CCR5* を標的とした TALEN では、標的サイトでの変異導入率が 23-47% に対して、11 塩基ミスマッチがある off-target サイト (offC-5) では 2.3% で変異導入されている。この時のミスマッチは、left-TALEN に 7 塩基、right-TALEN に 4 塩基のミスマッチがある状態であった。別の標的サイト (*ATM*)

を用いた場合でも、標的サイトでの変異導入率が 18% に対して、9 塩基ミスマッチである off-target サイト (offA-17) でも 1% で変異が起きることが示された。このような、off-target サイトでの変異導入は、ZFN 同様に、DNA 結合ドメインによる過剰な結合エネルギーによること (長い DNA 結合ドメインは特異性は高くなるが、ミスマッチを許容しやすくなる)、導入時の TALEN 濃度が高い場合に起きる可能性が示唆されている。さらに別の遺伝子標的 PMS においては、on-target サイトで 20% の変異導入率に対して、1.4~3.9% (いずれも 4 塩基ミスマッチ) の変異導入率であった。一方、1 塩基ミスマッチにおいても 0.25% 程度の変異導入しかないサイト (*SDHD*) もあることから⁴⁾、off-target 切断は、デザインした TALEN 配列や GC 含量、細胞に依存する。言い換えればゲノムへのアクセスのしやすさにも依存するが、最大上述したような off-target サイトでの変異導入が想定されることができると考えることができる。ただし、多くのサイトでは 8 塩基以上のミスマッチ領域での off-target 切断効率はほとんどの場合 1% 以下であることから、特異性は後述する CRISPR より高いと考えられる。

一方、off-target 切断を低減させるために TALEN 濃度を必要以上に低くすることは、特異性向上よりも変異導入効率の低下につながるため、off-target を少なくする TALEN コンストラクトを用いることが一つの手段として提案されている。

望みの標的サイトに対して用いた TALEN が、どのような off-target サイトで変異が導入されたかを明らかにすることは容易ではない。次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスは、一つの手段であるが、まず、ゲノ

ムの 100% をカバーすることは不可能であること (80% くらいなら可能)、変異部位を同定するためにはかなりのカバー率 (coverage) でシーケンスする必要がある、その場合出力されるデータ量は膨大になる (たとえば、パピイヤゲノムは 370Mb として、200x でシーケンスすると 74Gb である)。さらに、見出した変異が人工ヌクレアーゼによる影響か、自然変異かを判断するのは難しい (大きな欠失や挿入があれば別であるが)。ZFN、TALEN および後述する CRISPR のいずれを用いたゲノム改変であっても、off-target サイトでの変異導入を次世代シーケンサーで全ゲノム配列を解析している例はほとんどない。

(c) clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) について

CRISPR は、細菌がもつ一種の免疫システムのようなもので、外来のゲノム由来の配列の 1 部を取り込んで、次に同じ配列に遭遇した時に分解除去できるシステムで、ヌクレアーゼ活性を持つ Cas9 タンパクと認識配列を含むガイド RNA (gRNA) からなっている (Fig.6)⁵⁾。一般に用いられている Cas9 は *Streptococcus pyogenes* 由来のものである (SpCas9 と略されることもある)。

この CRISPR/Cas9 システムの最大の利点は、コンストラクトの作成が非常に簡単であることにある。20 塩基+NGG の合計 23 塩基を標的とすることができ、NGG を除く 20 塩基を Cas9 および gRNA となる配列をコードするプラスミド内の U6 プロモーター下に組み込むだけで作製できる (Fig.7)。

必要なものは一つの標的に対して、一つのプラスミドである点が、作製がやや複雑な ZFN や TALEN に比べての大きな利点で、今後のゲノム改変分野での中心の一つであると考えられる。

CRISPR/Cas システムの特異性についても、膨大な検討結果が 2013~2014 年にかけて複数の研究グループから報告されており、参考になる。NGG (N はすべての塩基) からなる PAM (protospacer adjacent motif) を除く 20 塩基で標的 DNA 配列を認識するが、PAM に近い 8 塩基は特異性が高いが、5'側の 12 塩基はミスマッチを許容しやすいことや⁶⁾(Fig.8)、GC 含量が 45~65%程度のときに切断効率が高いこと⁷⁾、また、極端に高い GC 含量 (80%以上) では、かなりの割合で off-target 切断が起きることが示されている(39% in on-target vs 30% in off-target with 3 mutations (OT2-9) in K562 細胞)⁸⁾(Fig.9)。また、複数塩基ミスマッチのある off-target サイトでの変異導入率は、連続していても相互に離れていても 2 塩基ミスマッチのある off-target サイトでは、かなり高い (on-target と同等の切断効率を示す)。3 塩基ミスマッチでも連続している場合は、on-target の半分程度の切断効率を示すことがあり(Fig.10)、ZFN や TALEN に比べて、3 塩基以内のミスマッチサイトでの off-target 切断効率はかなり高い傾向にある。他の標的遺伝子 (*CLTA4*) でも、3 塩基ミスマッチサイトで、on-target 85%に対して、72%の変異導入率で off-target 切断が見られる⁹⁾ (Fig.11)。

CRISPR/Cas9 は、TALEN などと比べて off-target サイトでの切断活性が高いことから、様々な off-target 低減のための工夫が試みられている。その 1 つは、DNA 認識配列の 20 塩

基を 5'側で 2~3 塩基短くした truncated gRNA を用いる方法である。17-18 塩基の DNA 認識配列からなるこの方法では、特異性が最大 5000 倍向上すると報告しているが、標的配列により効果がない場合もあり、その効果は不確定と考えられる¹⁰⁾。また、2 組の nickase Cas9 (Cas9n) と gRNA を用いて、それぞれの標的部位でニックを導入し、結果として DNA 2 本鎖切断を起こすものである。本方法では、DNA 認識配列がオリジナルの 2 倍になるため、および、片側の CRISPR/Cas9n が off-target サイトに結合してもニックしか誘導しないために、修復されると考えられることから、結果として特異性が向上するが、一方で、2 組の CRISPR/Cas9n が同等の活性を一定の近接した部位に設計しなければならないことから、より大きなタンパクがアクセスできるクロマチン環境にあることが必要になる。切断活性はオリジナルよりも一般には低い傾向にある¹¹⁾。これは CRISPR/Cas9 システムの特異性を高める有力な手段と考えられたが¹¹⁾、最近、片側の CRISPR/Cas9n 単独であっても変異導入されることが判ってきた。そのため、さらに off-target を押えた手法が報告された^{12,13)}。本方法は、ZFN や TALEN と同様に、左右にヌクレアーゼ活性を欠失させた Cas9 (dCas9) からなる DNA 結合ドメイン、その間に DNA 切断活性を有する *FokI* 制限酵素がデザインされている。したがって、片側 dCas9-FokI が off-target サイトに結合しても DNA 二本鎖、一本鎖いずれの切断活性を持たないので、off-target 切断にならないこと、on-target では左右 46 塩基で DNA 認識をしているため特異性が非常に高いことが期待される (Fig.12)。

(d) ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 による DNA 切断部位での改変パターン

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムで誘導される標的配列 (on-target) での改変パターンを調査したところ、いずれの組換え技術を用いても差はなく、大部分は数塩基から数十塩基の欠失で、欠失は最大 400bp まで、挿入は数塩基から 100 塩基程度まで見られる (Fig.13)。このパターンは、on-target でも off-target でも同様の結果が報告されている^{8, 10)}。また、off-target サイトが open chromatin で nucleosome free 領域などにあるときは高い頻度で起きる可能性があると思われる。

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 システムなどの、いわゆる次世代遺伝子組換え技術はこれまでほとんどが動物を対象としたものであったが、ごく最近になって、植物への適用例が報告されるようになってきた。シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどを用いて研究が行われているが、標的部位での DNA 二本鎖切断による変異パターンは、既に述べた動物と異なることはなく、数塩基から 10 塩基程度の欠失を中心としたものであることが報告されている (Fig.14)^{15, 16)}。

(2) CRISPR/Cas9 による標的遺伝子配列 DNA 切断

CRISPR/Cas9 システムは、遺伝子改変に必要なコンストラクトの作製が容易であるために、様々な生物に用いられる事が想定される。しかしながら、本手法を用いた時の安全性に関わる影響については今後の課題として重要で問題として存在している。本研究においては、実験および解析が比較的容易で、かつ迅速に結果が得られることから動物培養細胞を用いて、

標的遺伝子を設定し、その遺伝子内 exon3 周辺に複数の標的配列に対する CRISPR/Cas9 を複数デザインしてゲノム改変を試みた (Fig.15, 16 for PC12 細胞, Fig.18 for DT40 細胞)。

クローン化した PC12 細胞を用いて、*AIFM1* 遺伝子 exon3 付近を標的とした、TALEN、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を試みた。その結果を Fig.17 に示した。標的配列を含む領域を PCR 増幅させた (630 bp) 後に、SURVEYOR アッセイを行ったところ、切断によって得られる 200、400 bp のバンドは得られなかった。Platinum TALEN (TALEN-VR-AIF up-A) は、SSA アッセイにより、細胞内でプラスミドを標的とした場合に切断活性が確認されている。そこで、さらに、この PCR 産物をクローニングベクター pCR-Blunt を用いてクローン化し、48 コロニーからシーケンス解析を行った。TALEN 切断部位である spacer 付近には、いずれのコロニーからも変異導入の入ったものは得られなかった。一方、ニワトリ DT40 細胞を用いて同じ *AIFM1* 遺伝子 exon3 を標的として CRISPR/Cas9 システムで複数設計した。また、今回は、通常の *Streptococcus pyogenes* Cas9 に加え *Neisseria meningitidis* Cas9 も用いて検討した。その結果、PC12 細胞同様、SURVEYOR アッセイにより切断活性は認められず、シーケンス解析でも、変異導入の痕跡は認められなかった (Fig.18, 19)。

今回、標的とした遺伝子 *AIFM1* は、ENCODE (encyclopedia of DNA elements) データより、転写活性が弱くかつ DNase I hypersensitivity のない領域であることと、そして細胞を用いた SSA アッセイでは、設計し

た Platinum TALEN は高い切断活性を有していることから判断して、ゲノム DNA へのアクセス性が制限されていることが標的部位での切断活性が得られなかった原因と考えられた。最近の CRISPR/Cas9 システムのゲノムワイドな解析の報告でも²³⁾、Cas9 の結合領域は、ゲノムへのアクセス性 (accessibility) を反映する DNase I hypersensitivity サイトと重なることが示されており、次世代遺伝子組換え技術を用いた改変は、TALEN、CRISPR/Cas9 などツールとしてはほぼ完成されているが、ゲノム上のどの位置でも DNA 二本鎖切断を発端するゲノム改変が行えるわけではない。次のステップとしては、このような宿主側での工夫が、これらが本格的に普及するためにも必要と考えられる。

CRISPR/Cas9によるゲノム改変部位とクロマチン状態との関係について

最近報告された論文から、そのターゲット遺伝子領域とゲノム DNA へのアクセスしやすさについて、UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を用いて解析した。ヒト遺伝子導入領域として知られている AAVS locus 上の *PPP1R12C* 遺伝子を標的とした場合は 50%前後の非常に高い変異導入率が得られており、ゲノム構造を見てみるとその標的サイトも高度に DNase I hypersensitivity (HS) 領域が集まった領域でアクセスしやすい環境にある。*VEGFA* や *FANCF* 遺伝子を標的とした場合も同様に、DNase I HS クラスタ領域であることから、変異導入率も 24-54%または 12-18%と高い (Fig.20)。一方、*EMX1* 遺伝子を標的とした場合には、遺伝子全体には DNase I HS クラスタ

ーが存在するものの、転写が抑制されており、DNase I HS クラスタからすこし離れていることから、ゲノムへのアクセス性はあまりよくないと考えられ、実際変異導入率は遺伝子導入効率が 90%程度である HEK293 細胞においても 2.9%とかなり低い結果である (Fig.21)。

今回検討に用いた、*AIFM1* 遺伝子は、弱く転写されている領域で、かつ遺伝子全体に渡って DNase I HS クラスタの存在する領域がなく、ゲノム DNA へのアクセスは悪いと考えられた (Fig.22)。実際の結果と合わせて、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 で改変できる領域は、アクセス性と関係する。

(3)次世代遺伝子組換え技術を用いた遺伝子組換え食品(植物・動物)の国内外の開発動向及び規制に関する情報収集等

次世代遺伝子組換え技術は多岐に渡る。動物の場合は、次世代技術の中心は、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 である。ZFN、TALEN は技術的にはほぼ確立されている一方で、2013年に登場した CRISPR/Cas9 システムは、他の2者の技術に比べて off-target 領域での DNA2 本鎖切断、変異導入の確立が高いこと複数報告されていることから、現在も技術開発・改良が行われている。2014年になって off-target を極力抑えることができる手法が報告されたことから、今後は様々な生物に、遺伝子組換え食品の作出から遺伝子治療まで、積極的に使われるものと推測される。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 の組換え技術は、アメリカを中心とした研究グループが精力的に研究開発を行ってきたが、今後は日本、ヨーロッパに加えて、中国などの国々でも幅広く使われ、植物分野でも急激に論文数が伸びてきていることが

ら今後数年でこれらの技術を用いた作物が商業ベースに入って来るものと考えられる。

植物の分野では、これら以外に次世代遺伝子組換え技術として実用段階に近いものは、植物の RNA ウイルスベクターを用いたもので、開花促進遺伝子 (FT) を発現させ、例えば 10 年程度かかるリンゴの開花時期を数か月に短縮できることから期待されている¹⁶⁾。また、接ぎ木による遺伝子サイレンシングを用いた組換え技術が原田らによって開発されている¹⁷⁻¹⁹⁾。すでに、タバコ、トマト、ジャガイモで研究が進められており、実用化も近いと考えられている。

このような、次世代組換え技術の各国の規制に関しては、欧米を含めて検討段階である。

2011 年には EU の Joint Research Centre (JRC) が、報告書を公表している^{20, 21)}。そこでは、技術を以下の 5 つにグループ分けしている。

1 . site-directed mutagenesis

ODM, ZFN (JRC の報告書には含まれていない TALEN や CRISPR も含まれる) や meganuclease

- ・ 欠失を誘導する場合は、nonGM と扱うべきとする国が多い。したがって、ZFN-1 を使った場合は、nonGM。
- ・ 置換の場合は、種類やサイズによってケースバイケースもしくは、GM とすべき。一方で、反対意見の国もある。

2 . cisgenesis and intragenesis

Cisgenesis に関して、微生物と異なり、植物 (動物も同様) の場合は GM として考えるべきであるとして、各国で一致している。Intragenesis も GM。

3 . breeding with transgenic inducer line

RdDM (RNA-directed DNA methylation), accelerating breeding following early flowering, reverse breeding

育種の途中の段階で導入された遺伝子が、最終的に除かれていれば (逆育種) non-GM として考えてもいいという国がある (アルゼンチン、オーストラリア) が、規制の方向は定まっていない様である。RdDM によるエピジェネティック変化によるものは、その効果が後代で減衰していくという、技術的な問題がある。

4 . grafting

grafting on GM rootstock

GM rootstock が GM であることは明確であるが、その穂木になる実については、ケースバイケースで考える国と、non-GM と扱われても遺伝子組換え技術を用いて作られたものと分類されるかもしれないとする国がある。種子については、nonGM と考える。

5 . agro-infiltration

agro-infiltration, agro-infection, floral dip

扱いについては各国とも定まっていない。

オーストラリア・ニュージーランドは、FSANZ (Food Standards Australia New Zealand) 報告書では、以下の 6 つにグループ分けされている。

- 1 . SPT (seed production technology)
- 2 . Reverse breeding
- 3 . cisgenesis and intragenesis
- 4 . GM rootstock grafting
- 5 . ODM (oligonucleotide mutagenesis)

6. ZFN, TALEN (報告書にはないが、CRISPR も含まれると考える)

EU の JRC および FSANZ の報告書には述べられていないが、リンゴなどの植物 RNA ウイルスを用いた開花促進の技術も次世代遺伝子組換え技術に含まれる。

日本国内では、植物 RNA ウイルスを用いた開花促進の技術や GM rootstock grafting における RNAi を介した遺伝子サイレンシングは実用化に近い段階まで来ていると考えられる。

植物 RNA ウイルスでは、ウイルス由来の配列が除かれているかどうか、GM rootstock grafting でも未知成分 RNA が残存していないかが重要である。また、GM 台木につなげたの nonGM 穂木からなる植物体は GM であり、nonGM 穂木にできた実は、未知の RNA やタンパクなどが残っていないことが証明されなければ GM という扱いになる。種子は nonGM と考えられる。

各国ともに、NBT などの次世代遺伝子組換え技術を用いて作出されたものについて、既存の GM の定義（自然界では起きない組換えを行う）や考え方によっていくようなスタンスである。TALEN、CRISPR のような、最新技術で作られた植物・動物において、欠失を誘導した場合に、EU のような、プロセスの観点から ZFN-1 を nonGM とすると、一つの問題が生じると考える。プロセス（用いる技術）の観点から考えると、小さな欠失でも数百塩基の大きな欠失でも、必要な遺伝子の発現制御に関わる領域に起きた場合は、その遺伝子産物として生じるタンパクや低分子化合物にも含量変化が生じれば、組換え前後で同等性が崩れることになり、アメリカやオーストラリア、日本（実質

的に）などの国で用いられているプロダクトの観点（最終的に作出されたもの安全性、実質的同等性）で判断した場合と齟齬が生じる。EU においても、GM 作物に対する規制の考え方をプロダクトベースに見直す動きもあり²²⁾、その方向で統一されることが望ましいと考える。

また、アメリカでは ZFN を用いて作製された作物について個別事例として規制対象外を判断されており、欠失を誘導しただけであればその植物は規制対象にならないと考えられている。アメリカにはもともと GM 作物を统一的に規制する制度が存在しないために、項目ごとに担当省庁が分れ、個別に評価されているようである。NBT など次世代遺伝子組換え技術で作出されたものに関しても、これまでの方法で対応可能と考えているようである。

アジア地域での次世代遺伝子組換え技術を用いた研究

遺伝子組換え食品の開発、商業栽培は近年アジア各国で増加傾向である。インド、バングラディッシュ、フィリピンなどの発展途上国で開発、栽培される遺伝子組換え食品は、既に先進国で開発された系統のものが中心である（例えば、モンサントがこれまでに開発した系統）。一方、近年遺伝子改変した痕跡が残らないか自然界の変化と区別がつかないと考えられている、いわゆる次世代遺伝子組換え技術は、アメリカと日本以外では中国が精力的に開発研究を行っている。特に、研究能力の高い Chinese Academy of Science, Institute of Genetics and Developmental Biology (中国科学院)では、TALEN、CRISPR/Cas9 を用いた研究が進んでおり、生物学基礎研究では *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、植物では

Arabidopsis thaliana (シロイヌナズナ) や *Nicotiana benthamiana* (タバコ) をモデルとしての他に、*Oryza sativa* (コメ) や *Triticum aestivum* (コムギ) の 2 つの作物で研究が行われている^{24~26})。これらの研究は、欧米先進国と同水準にあると考えられた。その他、中国ではTALENやCRISPR/Cas9をブタに応用している²⁷)。

食用 GM 動物の文献調査

1. 該当する論文、特許などの数は以下の通り。
ウシ 32 報、ヤギ 20 報、ブタ 16 報、魚 15 報、ヒツジ 5 報、ニワトリ 1 報、ウサギ 1 報、エビ&カニ 1 報
合計 91 報 (Fig.23)
2. 日本で馴染みの薄いヤギの報告が多かった。
3. 日本で馴染みのあるニワトリの報告が少なかった。(遺伝子導入法で良い方法がない。ウイルス(主にレトロウイルス)が使われていたが、長い遺伝子は使えない。パッケージングできなくなる。また、食用としてはウイルスはイメージが良くない。ES 細胞などの幹細胞は研究途上、などの理由。)
4. 開発国は圧倒的に中国が多い。91 報中 70 報を占めた。
5. 導入あるいは改変遺伝子には頻繁に使われるものがあつた。(fig.23-3)
6. エビ、カニについて トランスジェニック藻類を作成してエビやカニに食べさせることを目指している。エビやカニに直接遺伝子導入するわけではない。しかし、間接的に組換え遺伝子やタンパクがエビやカ

ニ導入されるので、本調査で該当するものとした(調査の対象を広く解釈した)。

7. ゲノム編集技術を利用した食用トランスジェニック動物については ZFN を利用した物が 8 報あつた(Fig.23-4)。最近になってノックインも出てきた。

(4) 遺伝子組換え動物に関する情報収集および Cas9 リコンビナントタンパク作製

Cas9 リコンビナントタンパクの発現精製

1. 組換えタンパク Cas9-MBP-His6 が発現していることは His6 を検出する試薬、Ni-NTA AP Conjugate (キアゲン) を用いて確認した。この組換えタンパクはインクルージョンボディーと水溶性の物があつた。水溶性の物を使って以後の実験を行った。
2. キレートカラムで組換えタンパクを濃縮した。
3. TEV プロテアーゼで消化したものを SDS-PAGE、CBB 染色で分析すると元の約 200 kDa のバンドが消失して約 160 kDa のバンドが新たに検出された。非特異的な消化は観察されなかった。
4. 陽イオン交換カラムでは混入タンパクが効率良く除けて精製度が高くなった。
5. 陽イオン交換カラムで精製した約 160 kDa タンパクを N 末端シークエンシングしたところ、期待される配列が得られた(5 アミノ酸残基)。この結果を分子量やクロマトグラフィーでの挙動の情報と合わせて、得られたタンパクは Cas9 であると判断した。さらに、TEV プロテアーゼで融合タンパクが正確に消化できていることを確認できた (Fig.24)

6. 組換えタンパクの収量について 大腸菌の培養 80 ml からスタートして、陽イオン交換カラムによる精製が終了した時点で 220 µg 得ることができた。今後は、これを用いて、タンパク消化試験や抗体作製を行う予定である。

D. 考察

技術的な考察や規制に対する考え方が、現在各国で議論がされている（EU の JRC や FSANZ は報告書をまとめている）。次世代組換え技術（海外では NBT; new plant breeding technique として議論）には、以下のものが存在する。

- 1 . Cisgenesis and intragenesis
- 2 . RNA-virus mediated silencing
- 3 . GM rootstock grafting
- 4 . ZFN, TALEN, CRISPR (ODM も含める)
- 5 . Reverse breeding

その中で、cisgenesis&transgenesis は、微生物の場合とはちがい動物および植物では GM と扱うこと、reverse breeding や SPT は、後代に組換えに関連する遺伝子やその一部が残っていないことを精査されていれば nonGM（selection や遺伝子分離の方法や結果がきちんとされていることが前提）、GM rootstock grafting は、GM 台木と nonGM 穂木からなる植物体は一つの個体として機能するが、人工的な配列を植物に含むために、GM として扱うことになり、nonGM 穂木になる種子は nonGM であるが、一方、実（果実）は台木からの遺伝子組換え由来の RNA やタンパク質がないことの証明の程度により判断する、または GM と

するということは概ね各国で一致しているように考えられる。一方、ZFN、TALEN や CRISPR を用いた時の小さな欠失、数塩基の置換は、nonGM とする考え方に向いているように思われるが、標的部位で小さな変異しか入っていないことを証明しても、off-target サイトの大きな変異（数百塩基欠失）のないことを、だれが、どの段階でどのように証明するか、ミスマッチ塩基数の増加とともに指数関数的に増加する off-target 部位から安全性に関わる変異をどのように見つけるか、あるいは、プロダクトベースの考え方で最終産物の化学的同等性が野生型と変化しなければよいとするのか。現在の遺伝子組換え食品の安全性評価の考え方からすると、欠失があった場合に、その欠失に伴い機能している内在性遺伝子が破壊または影響されておらず、その他の安全性に関わる成分等も野生型と変化がなければ問題ないとなる。言い換えると、大きな欠失であっても、トランスポゾンの残骸などの機能していない遺伝子領域であれば問題ないということになる。変異の場所の特定が重要である。その他、今後議論すべき点は少なくないことから、各国と状況を参考に、または協調しながら進める必要がある。

E. 結論

次世代遺伝子組換え技術を用いた食品の安全性に関して、技術的には TALEN、CRISPR が中心なると考えられる。ただし、この技術を用いて行われた変異導入の程度や意図しない領域での改変は、対象生物にも大きく依存するために、各国とも個別に判断することになる。その他の、cisgenesis、GM rootstock grafting なども、概ね判断の方向は統一されつつあるように思われるが、事例が少ない間は個別のケー

スパイケースで判断されると考えられる。次世代技術の開発は、アメリカの他に中国がかなり力を入れて行っており、今後の動向を継続して調査する必要がある。

F. 文献

1. Fyodor D, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Review Genetics*, **11**, 636 (2010)
2. Vikram P, et al. Revealing off-target cleavages specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. *Nature Methods*, **8**, 765 (2011).
3. Kim H and Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Review Genetics*, advanced online (doi:10.1038/nrg3686, (2014).
4. Guilinger JP, et al. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature Methods*, **11**, 429 (2014).
5. Nishimatsu H, et al. Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, **156**, 1 (2014).
6. Hsu PD, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. **31**, 827 (2013).
7. Wang T, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, **343**, 80 (2014).
8. Fu Y, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, **31**, 822 (2013).
9. Pattanayak V, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, **31**, 839 (2013).
10. Fu Y, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, **32**, 279 (2014).
11. Ran FA, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**, 1380 (2013).
12. Tsai SQ, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2908 (2014).
13. Guilinger JP, et al. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2909 (2014).
14. Jiang W, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acid Res*, **41** e188 (2013).
15. Liang Z, et al. Targeted Mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR system. *J. Genetics and Genomics*, **41** 63 (2014).
16. Yamagishi N, et al. Reduced generation time of apple seedling to within a year by mean of a plants virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnology J.*, **12**, 60 (2014).
17. Dunoyer P, et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, **328** 912 (2010).
18. Bai S et al. A mobile signal transported over a long distance induces systemic

- transcriptional gene silencing in a grafted partner. *J. Experimental Botany* **62**, 4561 (2011).
19. Kasai A, et al. Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *Plos One*, **8**, e57736 (2013).
 20. Lusser M, et al. New plant breeding technologies: State-of the art and prospects for commercial development. JRC Reference Reports EUR24860EN (2011).
 21. Lusser M, et al. Comparative regulatory approaches for new plant breeding techniques. JRC Scientific and Technical Reports EUR25237EN (2012).
 22. Heat B. Europe should rethink its stance on GM crop. *Nature*, **498**, 409 (2013).
 23. Kuscu C et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2916 (2014).
 24. Shan Q, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR/Cas system. *Nature Biotechnology*, **31**, 686 (2013).
 25. Li FJ, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, **31**, 688 (2013).
 26. Feng Z, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, **23**, 1229 (2013).
 27. Hai T et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*, **24**, 372 (2013).
- G. 研究発表**
- 論文発表
1. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
 2. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
 3. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
 4. Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60, 283-288, 2013
 5. Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative

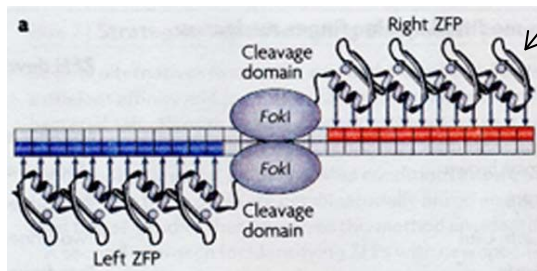
- real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136, 895-901, 2013
6. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.
 7. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
 8. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya. *Journal of AOAC International*, 96, 1054-1058, 2013.
 9. Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 32, 728-735, 2013.
 10. Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, 2012
 11. Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
- 学会発表
1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013年11月.
 2. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. *Pharma-nutrition 2013*, Singapore, 2013年4月.
 3. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子:安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメの場合) 第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
 4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月

5. 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月
6. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美: ダイレクトリアルタイム PCR による食品分析の可能性検証、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
7. 野口秋雄、坂田こずえ 真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
8. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
9. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
10. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上(西巻)知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
11. 近藤一成、中村公亮 野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
12. 坂田こずえ、小櫃冴未、中村公亮、小林友子、野口秋雄、福田のぞみ、最上(西巻)知子、手島玲子、近藤一成: クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法(第 2 報): 加熱、消化処理サンプルへの適用、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
13. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹: シリカモノリスベースによる複雑系穀物マトリックスから DNA の抽出・精製、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月
14. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穠山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
15. 中村公亮、穠山浩、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月
16. 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月

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

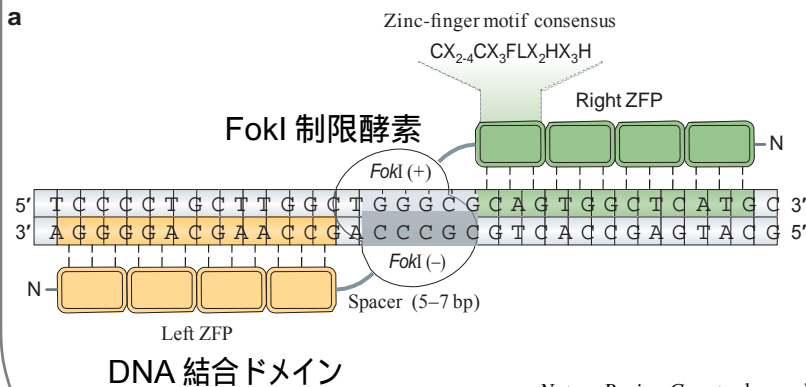
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



1つの Zinc finger
 によって、この場合片側
 4つの Zinc finger から
 なっている。
 片側 12bp, 両側合計 24bp
 で DNA を認識している。

Nature Review Genet, 11, 636 (2010)より



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

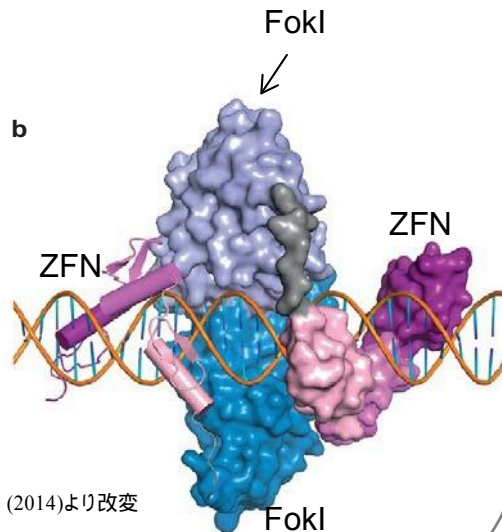
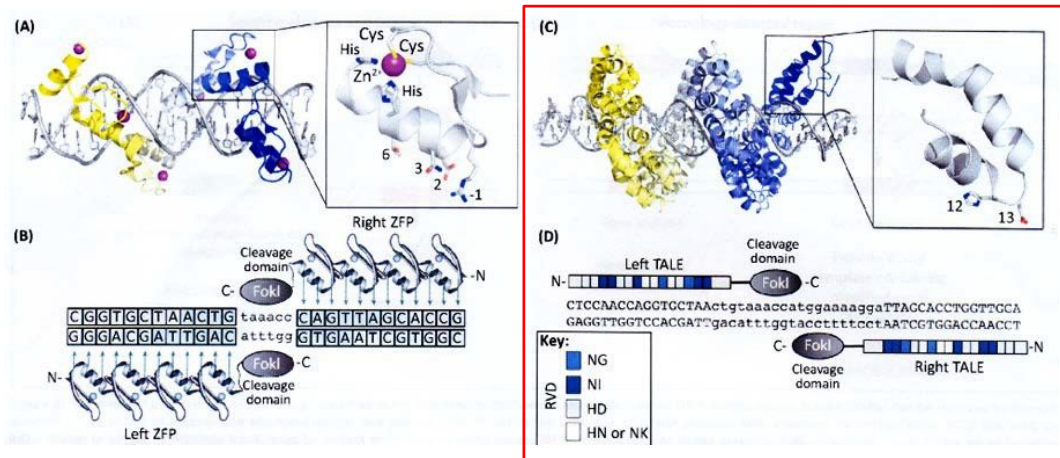


Fig.1 Structure of ZFN

CCR5-224		VF2468	
# of mutations	# of sites in genome	# of mutations	# of sites in genome
0	1	0	1
1	0	1	3
2	1	2	245
3	6	3	3,201
4	99	4	35,995
5	964	5	316,213
6	9,671	6	2,025,878
7	65,449		
8	372,801		
9	1,854,317		

Fig.2 Potential genomic target sites

Nature Methods, 8, 765 (2011)より



Trends in Biotechnology 31, 397 (2013)より (right panel)

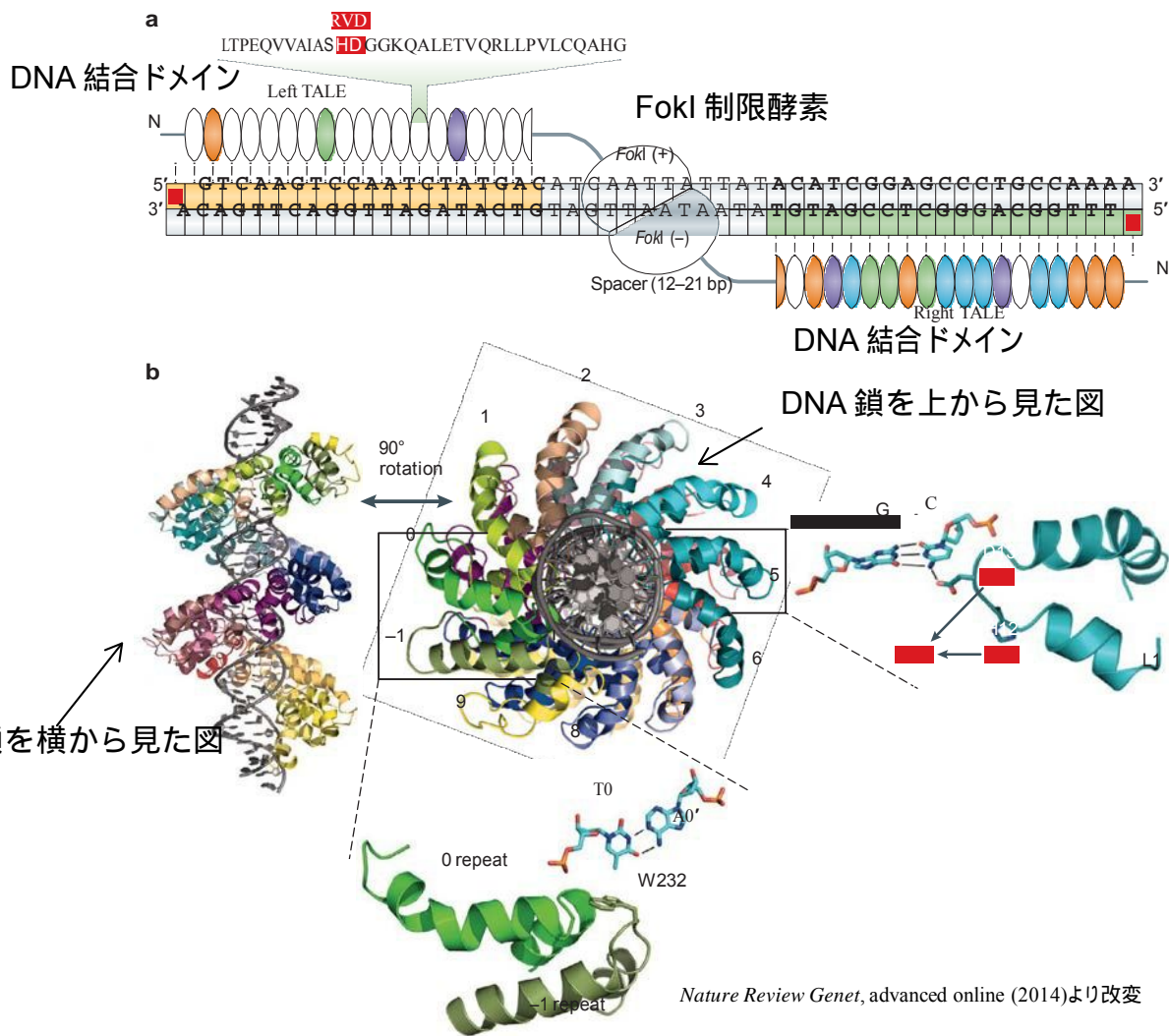


Fig.3 Structure of TALEN

Mutations in site	Off-target sites to CCR5A	Statistically expected
0	1	1
1	0	0.0
2	0	0.0
3	0	0.0
4	0	0.0
5	0	0.0
6	0	0.0
7	0	0.3
8	8	3.6
9	7	34.1
	0	
10	634	275.9
11	4338	1956.3
12	27114	12226.7
13	149005	67716.9
14	648230	333747.3
15	2657598	1468488.3
16	9783617	5782172.6

Fig.4 Potential genomic off-target sites related to *CCR5A* on-target site
 (片側 18bp、両側 36bp TALEN 使用)
Nature Methods, 11, 429 (2014)より

Cellular modification induced by TALENs at on-target and predicted off-target genomic sites

site	no tAlen (%)	CCR5A eI/KK	CCR5A eId/KK _r	CCR5A	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnCCR5A	<0.006	9.8	28	47	0 (on-target)
OffC-5	<0.006	0.53	2.3	2.3	11
OffC-15	<0.020	<0.014	0.23	0.043	
OffC-16	<0.006	<0.006	0.031	<0.006	
OffC-28	<0.009	0.014	0.16	0.056	
OffC-36	<0.006	<0.006	0.15	0.028	
OffC-38	<0.006	ND	ND	0.067	
OffC-49	<0.006	ND	ND	0.110	
OffC-69	<0.010	ND	ND	0.089	
OffC-76	<0.006	ND	ND	0.149	9

site	no tAlen (%)	ATM eI/KK	ATM eId/KK _r	ATM	number of mutation
		Foki (%)	Foki (%)	homo Foki (%)	
OnATM	0.007	6.8	16	18	0 (on-target)
OffA-1	<0.006	<0.006	0.026	0.077	
OffA-11	<0.006	<0.006	0.036	0.39	10
OffA-13	<0.006	0.008	0.025	<0.006	
OffA-16	<0.006	<0.006	<0.006	0.057	
OffA-17	<0.051	<0.14	<0.17	0.94	9
OffA-23	0.018	<0.006	0.29	0.23	
OffA-35	<0.006	<0.006	<0.006	0.070	

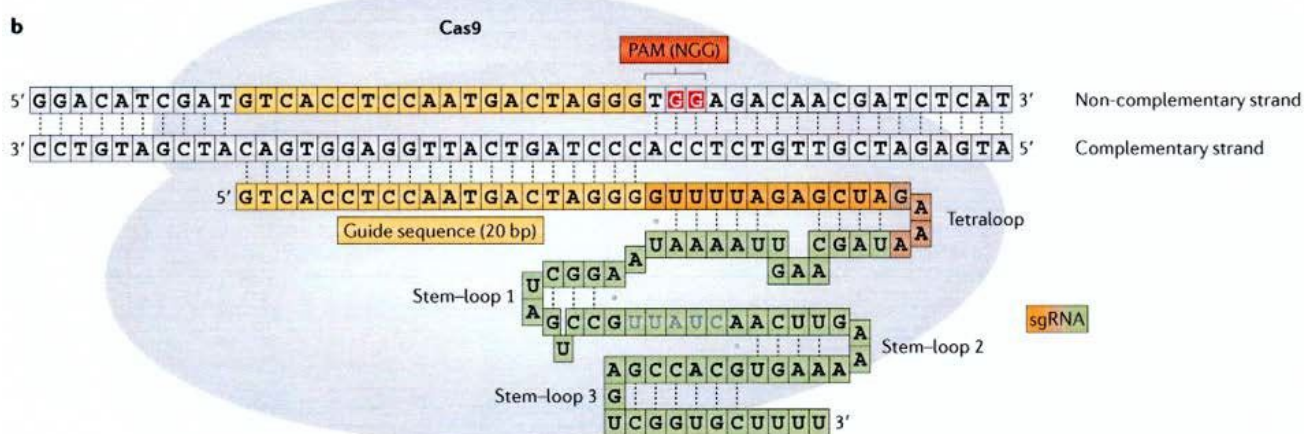
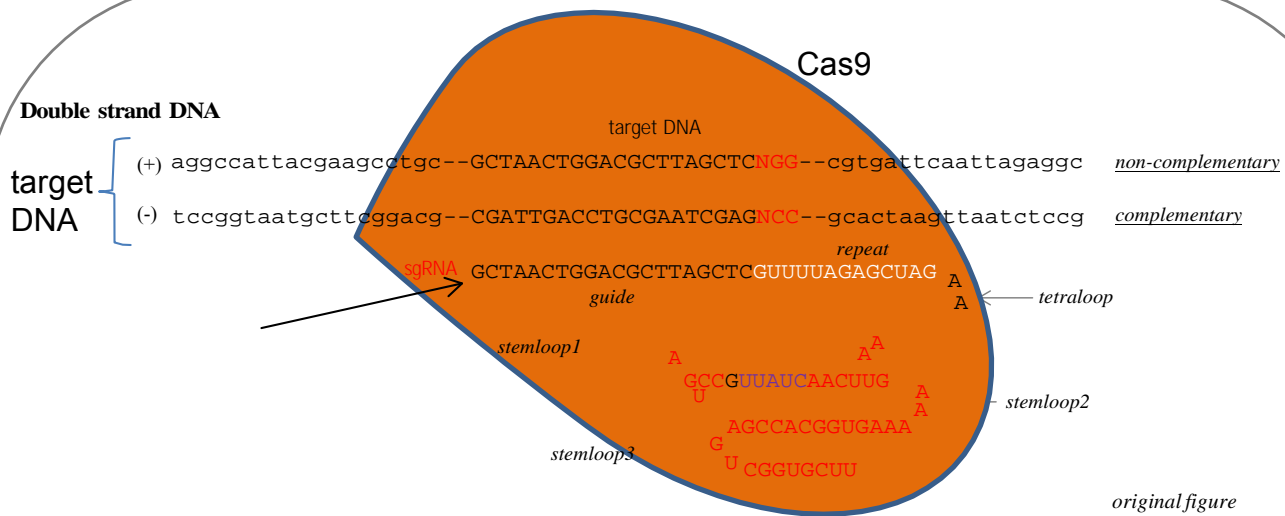
Fig.5A Cellular modification rate (%) at on-target and off-target genomic sites
Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変

CCR5A Site	Score	Mut.	Left half-site	Spacer length	Right half-site
OnCCR5A	0.008	0	TTCATTACACCTGCAGCT	18	AGTATCAATTCTGGAAGA
OffC-1	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-2	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-3	0.747	9	TaCATcACAtaTGCAaaT	29	tGTATCAAtTTCTGGgAGA
OffC-4	0.747	11	TcCATaACACaTctttCT	10	tGcATCAAtTcCTGGAAGA
★ OffC-5	0.804	11	TcCAaTACctCTGcCaCa	14	AGgAgCAAcTCTGGgAGA
OffC-6	0.818	10	TTCAgTcAtCTGaAaac	16	gGTATCAAtTTCTGGAgGA
OffC-7	0.834	14	TaCAaaACcCtTGcCa	27	taTATCAATTtgGGgAGA
OffC-8	0.837	12	TcCAagACACCTGcttac	26	tcTATCAATTtgGGgAGA
OffC-9	0.874	10	TTCATaACAtCTtaAaaT	27	AaTAcCAAcTCTGGAtGA
OffC-10	0.89	12	TcCAaaACAtCTGaAaaT	25	tGgATCAAAAttgGGAAGA

Fig.5B Predicted off-target sites

(2.3%で変異導入が検出された on-target サイト OffC-5 でのミスマッチ塩基(小文字))

Nature Methods, 11, 429 (2014)より改変



Nature Review Genet, advanced online (2014)より改変

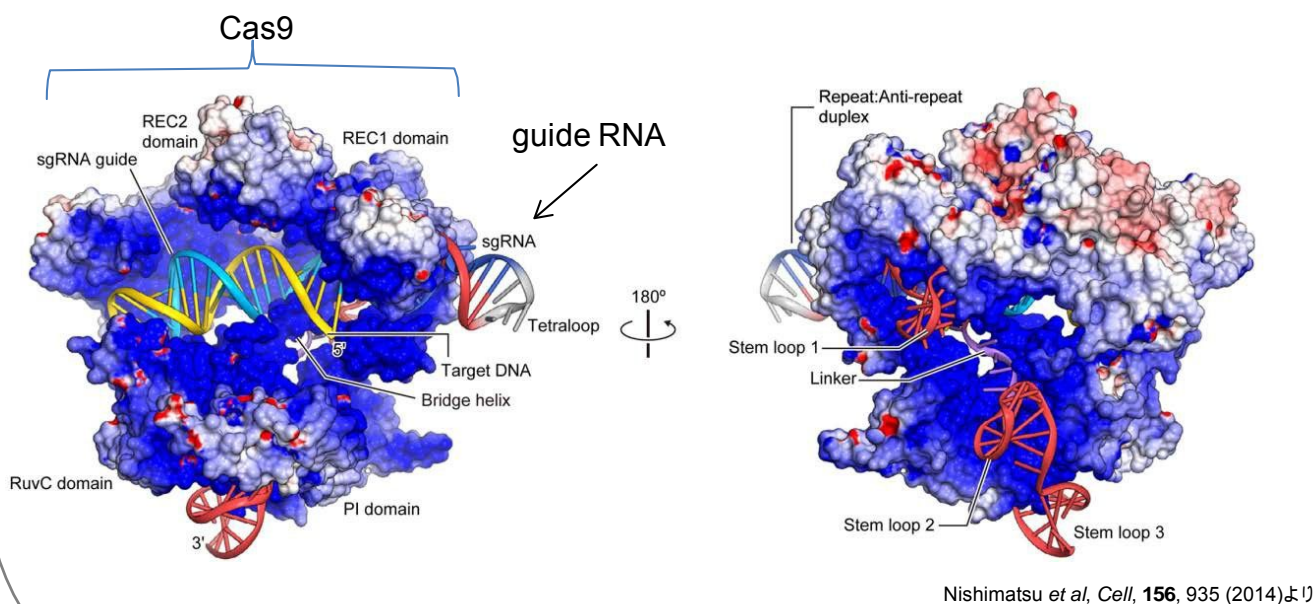
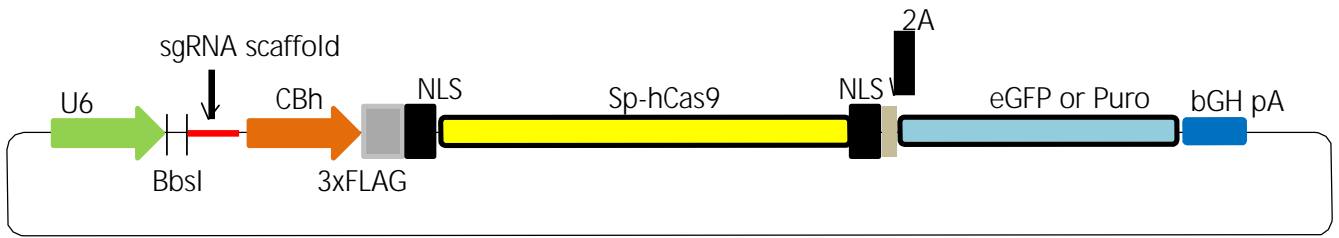


Fig.6 Structure of CRISPR/Cas9 system

for mammalian expression



for plant expression

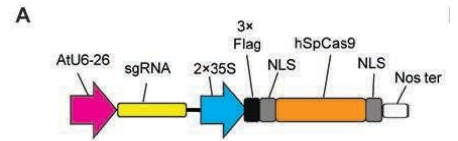
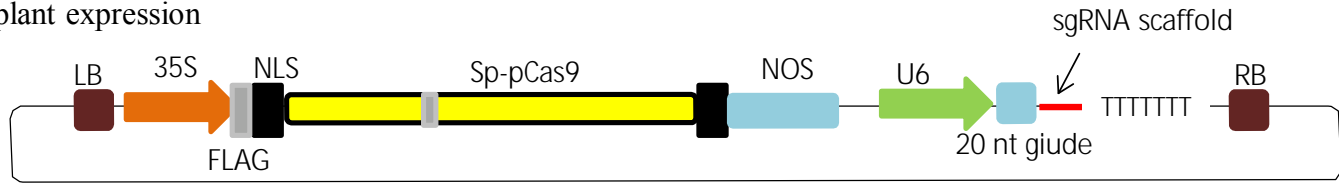
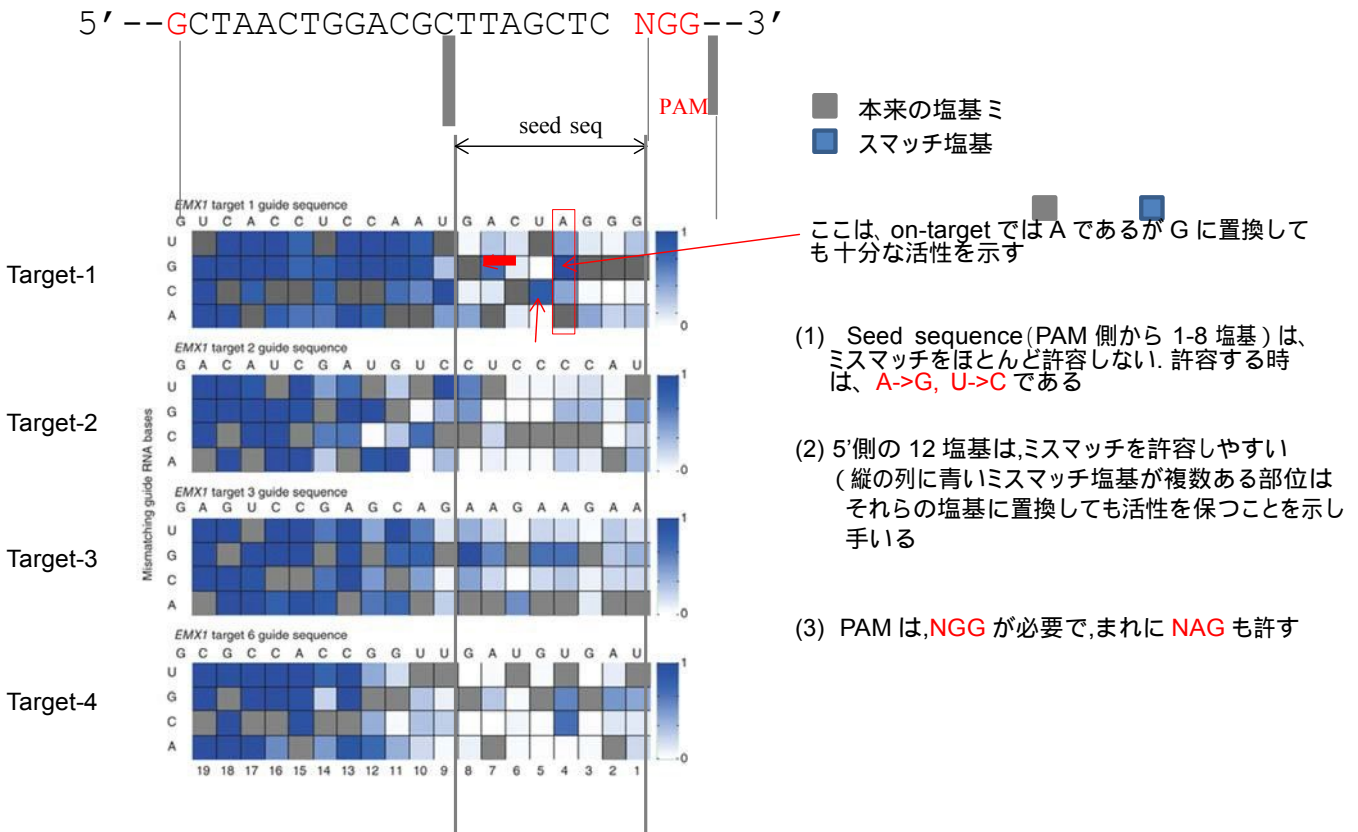


Fig.7 CRISPR/Cas plasmids for mammalian and plant

1塩基ずつ mismatch を入れて、活性を比較



Hsu et al, Nat Biotech, 31, 827 (2013)より改変

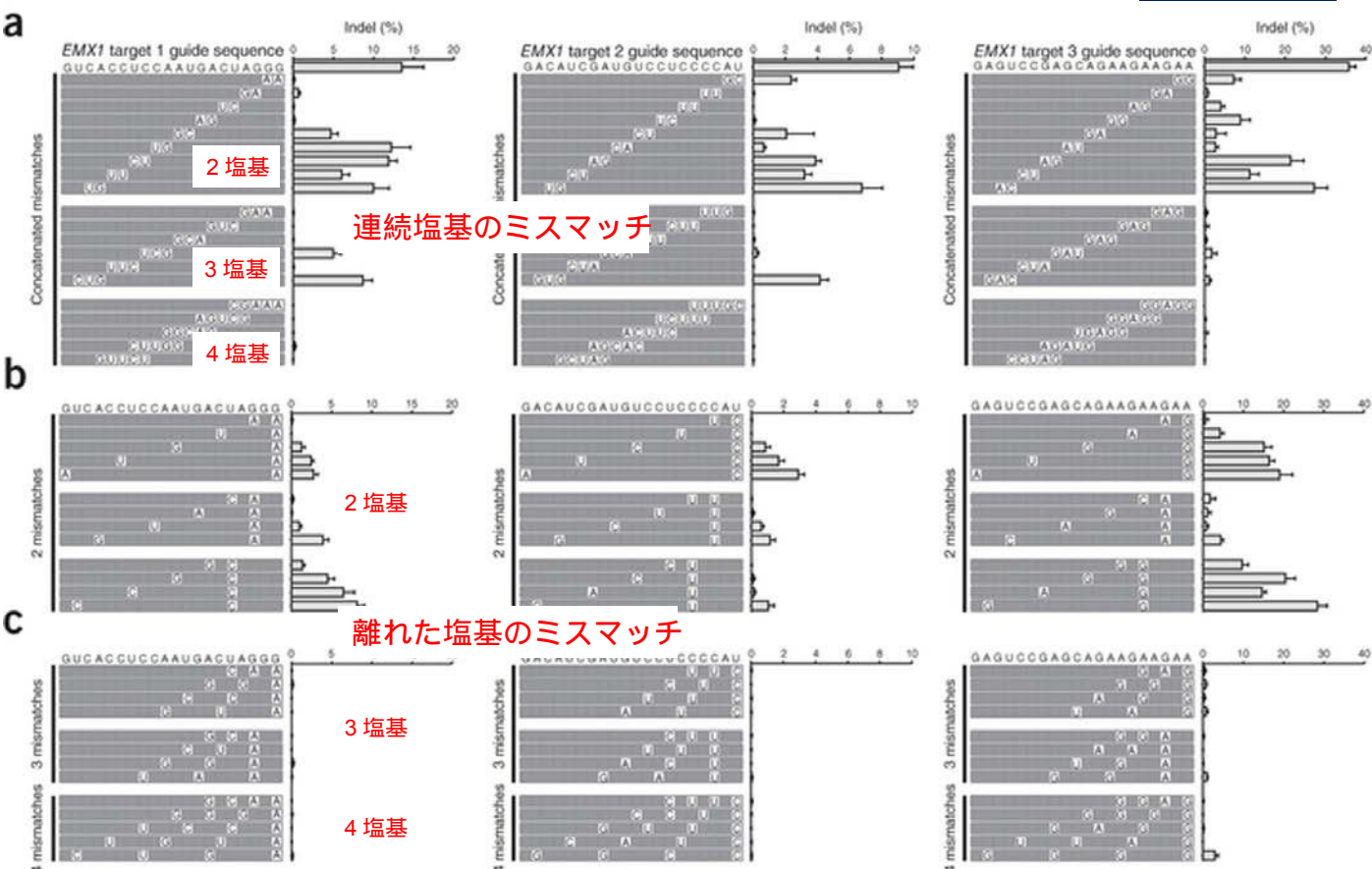
Fig.8 Single-nucleotide specificity of Cas9

On- and off-target mutations induced by RGNs designed to endogenous human genes

Target	Site name	Sequence	Indel mutation frequency (%) ± s.e.m.			Gene	
			U2OS.EGFP	HEK293	K562		
Target 1 (VEGFA site 1) GC 含量 70%	T1	GGGTGGGGGGAGTTTGCTCCTGG	26.0 ± 2.9	<u>10.5</u> ± 0.07	3.33 ± 0.42	VEGFA	on-target
	OT1-3	GGATGGAGGGAGTTTGCTCCTGG	25.7 ± 9.1	<u>18.9</u> ± 0.77	2.93 ± 0.04	IGDCC3	off-target
	OT1-4	GGGAGGGTGGAGTTTGCTCCTGG	9.2 ± 0.8	8.32 ± 0.51	N.D.	LOC116437	
	OT1-6	CGGCGGAGGGAGTTTGCTCCTGG	5.3 ± 0.2	3.67 ± 0.09	N.D.	CACNA2D	
	OT1-11	GGGAGGGGGAGTTTGCTCCTGG	17.1 ± 4.7	8.54 ± 0.16	N.D.		
Target 2 (VEGFA site 2) GC 含量 80%	T2	GACCCCTCCACCCCGCCTCCGG	50.2 ± 4.9	<u>38.6</u> ± 1.92	15.0 ± 0.25	VEGFA	on-target
	OT2-1	GACCCCTCCACCCCGCCTCCGG	14.4 ± 3.4	33.6 ± 1.17	4.10 ± 0.05	FMN1	off-target
	OT2-2	GGCCCTCCACCCCGCCTCTGG	20.0 ± 6.2	15.6 ± 0.30	3.00 ± 0.06	PAX6	
	OT2-6	CTACCCCTCCACCCCGCCTCCGG	8.2 ± 1.4	15.0 ± 0.64	5.24 ± 0.22	PAPD7	
	OT2-9	GCCCCACCCACCCCGCCTCTGG	50.7 ± 5.6	<u>30.7</u> ± 1.44	7.05 ± 0.48	LAMA3	
	OT2-15	IACCCCTCCACCCCGCCTCTGG	9.7 ± 4.5	6.97 ± 0.10	1.34 ± 0.15	SPNS3	
	OT2-17	ACACCCCTCCACCCCGCCTCAGG	14.0 ± 2.8	12.3 ± 0.45	1.80 ± 0.03		
	OT2-19	ATTCCCTCCACCCCGCCTCAGG	17.0 ± 3.3	19.4 ± 1.35	N.D.	HDLBP	
	OT2-20	CCCCACCCCTCCACCCCGCCTCAGG	6.1 ± 1.3	N.D.	N.D.	ABLIM1	
	OT2-23	CGCCCTCCACCCCGCCTCCGG	44.4 ± 6.7	<u>28.7</u> ± 1.15	4.18 ± 0.37	CALY	
	OT2-24	CTCCCTCCACCCCGCCTCAGG	62.8 ± 5.0	<u>29.8</u> ± 1.08	21.1 ± 1.68		
	OT2-29	TGCCCTCCACCCCGCCTCTGG	13.8 ± 5.2	N.D.	N.D.	ACLY	
	OT2-34	AGGCCCTCCACCCCGCCTCAGG	2.8 ± 1.5	N.D.	N.D.		
	Target 3 (VEGFA site 3) GC 含量 60%	T3	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	49.4 ± 3.8	<u>35.7</u> ± 1.26	27.9 ± 0.52	VEGFA
OT3-1		GGTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	7.4 ± 3.4	8.97 ± 0.80	N.D.	(abParts)	off-target
OT3-2		AGTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	24.3 ± 9.2	<u>23.9</u> ± 0.08	8.9 ± 0.16	MAX	
OT3-4		GCTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	20.9 ± 11.8	<u>11.2</u> ± 0.23	N.D.		
OT3-9		GGTGAGTGAGTGTGTGCGGTTGG	3.2 ± 0.3	2.34 ± 0.21	N.D.	TPCN2	
OT3-17		GTTGAGTGAGTGTGTGCGTGAGG	2.9 ± 0.2	1.27 ± 0.02	N.D.	SLIT1	
OT3-18		TGTGGTGAGTGTGTGCGTGAGG	13.4 ± 4.2	12.1 ± 0.24	2.42 ± 0.07	COMDA	
OT3-20		AGAGTGAGTGTGTGCGTGTGG	16.7 ± 3.5	7.64 ± 0.05	1.18 ± 0.01		

Fu et al, Nature Biotechnology, 31, 822 (2013)より改変

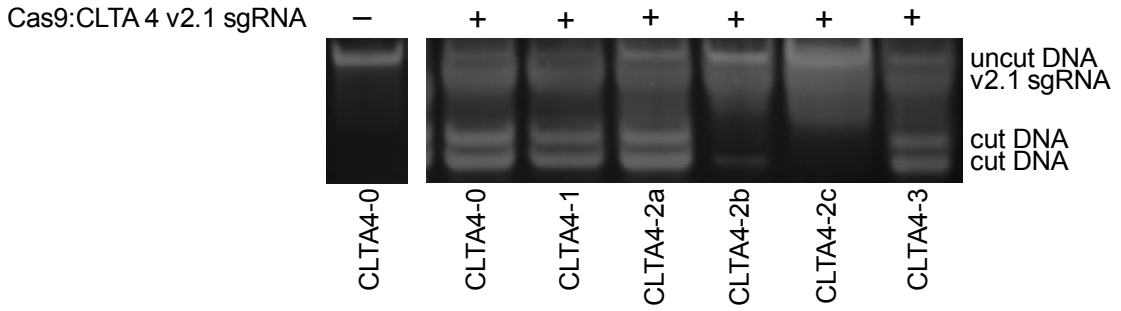
Fig.9 Single-nucleotide specificity of Cas9



ポイント: 3塩基以上のミスマッチはほとんど起きないため、2塩基ミスマッチ以内がゲノム上に存在しないように設計すればよい
 (GC含量が高く75%以上とか、PAM distal領域に集中した時には3 - 4塩基ミスマッチもあるが、設計で回避可能)

Hsu et al, *Nature Biotechnology*, **31**, 827 (2013)より改変

Fig.10 Single-nucleotide specificity of Cas9

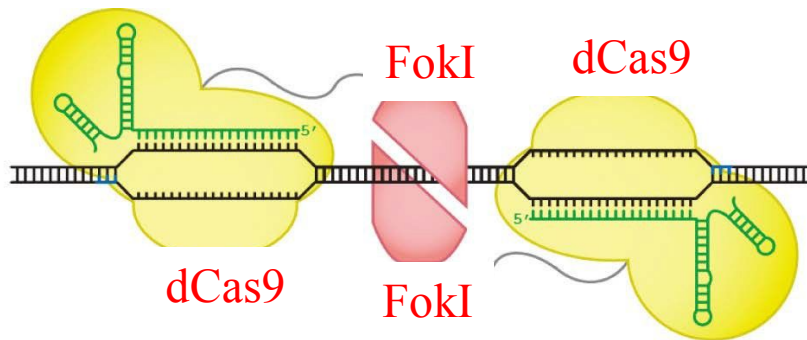


	sequence	<i>In vitro</i> selection enrichment value	% cut
CLTA4-0	GCAGATGTAGTGTTCACAGGG	7.9	85%
CLTA4-1	GaAGATGTAGTGTTCACAGGG	27.5	84%
CLTA4-2a	GaAGATGTAGTGTTCACtGGG	43.9	79%
CLTA4-2b	GCAGATGgAGgGTTTCACAGGG	1.0	35%
CLTA4-2c	GCAGATGTAGTGTTaCCAgAGGG	0.064	none detected
CLTA4-3	GggGATGTAGTGTTCACtGGG	95.9	72%

赤字は、ミスマッチ塩基

Pattanayak V *et al*, *Nature Biotechnology*, **31**, 839 (2013)より改変

Fig.11 Off-target DNA sequence and cut ratio (%)



Tsai SQ, *et al*, *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2908 (2014)より改変

Fig.12 Off-target DNA sequence and cut ratio (%)

I Deletions:

```

CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA wt
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-AACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -1
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATC-----TAAACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -4
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-----CAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -7
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTC-----ACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -10
CTTGATGCCGTTCTTCTGGT-----CTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -10
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGA-----AACTTGTTCGGCCATGATA -13
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCC-----AAGAACTTGTTCGGCCATGATA -19
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTC-----AAAGAACTTGTTCGGCCATGATA -22
  
```

Insertions:

```

CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA wt
CTTGATGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCtTttTGccg-ACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA +2
TGCCGTTCTTCTGGTCATCCTCATCCTGAtctgaggAACTGCAAAAAGAACTTGTTCGGCCATGATA +5
  
```

Gaj T, *et al, Nature Methods*, **9**, 805 (2012)より
 (-は deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.13-1 Indel pattern of the cleavage site by ZFN

(a) **noggin TALEN**

TCCTAGTGA~~AA~~ACCTACCACTGGTGGACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA

```

TCCTAGTGAAAACCTA----- (Δ274)
GTCTTCCTG-----//-----GGAGGAGAGACTTGGAG (Δ197)
-----CCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ57)
TCCTAG-----TTGAGCATCCGGATCCTA (Δ26)
TCCTAGTGAAAACCTAC-----TGAGCtCCGGATCCTA (Δ17,+1)
TCCTAGTGAAAAACC-----TATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ16)
TCCTAGTGAAAA-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ15)
TCCTAGTGAAAACCTACCAC-----TGAGCATCCGGATCCTA (Δ13)
TCCTAGTGAAAACCTACC-----TTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ11)
TCCTAGTGAAAA-----GGAtgCCTTATTGAGCATCCGGATCCT (Δ11,+2)
TCCTAGTGAAAACCTACCACT-----TTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ9)
TCCTAGTGAAAACCTACC-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ8)
TCCTAGTGAAAACCTACCACTGG-----TATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ7)
TCCTAGTGAAAACCTACctC-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ7,+1)
TCCTAGTGAAAACCTACCAcCT-----ACCTTATTGAGCATCCGGATCCTA (Δ5,+1)
TCCTAGTGAAAACCTACCACTaccacctaccACCTTATTGAGCATCCGGA (Δ5,+10)
  
```

(b) **noggin ZFN**

GGACCTTATTGAGCATCCGGATCCTATCTATGATCCCAAGGAGAAGGATCCTT

```

ACCTACCAC-----//-----AT--CCTAGGACCAG (Δ332)
CTTATTGAGCAT-----//-----CCACTTGCACCCA (Δ68)
GGACCTTATTGAG-----//-----CAAGGAGAAGGATCCT (Δ23)
GGACCTTATTGAGCATCCGGAT-----CAAGGAGAAGGATCCT (Δ14)
GGACCTTATTGAGga-----CCT-TC-----TCCCAAGGAGAAGGATCCT (Δ14,+1)
  
```

(c) **ets1 TALEN**

TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTTCAGAAAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA

```

TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTT----- (Δ403)
-----TATGAGCGGAGCAGCA (Δ400)
TTACTCTGAAAG-----GAGCGGAGCAGCA (Δ25)
TTACTCTGAAAGGA-----GTATGAGCGGAGCAGCA (Δ19)
TTACTCTGAAAGGAG-----cGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ18,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----ATGAGCGGAGCAGCA (Δ17)
TTACTCTGAAAGGAGTGA-----CTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12)
TTACTCTGAAAGGAGT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----GcTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ12,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ11)
TTACTCTGAAAGGAGT-----AGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ11)
TTACTCTGAAAGGAGTGGAC-----TCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ10)
TTACTCTGAAAGGAGTGG-----AGcTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ10,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGAC-----TTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ9)
TTACTCTGAAAGGAGT-----ACT-----cAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ8,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ7)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----TTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ7)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----GTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ6)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACT-----AAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ6,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTT-----AtGTTaTGATGAGCGGAGCAGCA (Δ6,+2)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTTT-----tGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ5,+1)
TTACTCTGAAAGGAGTGGACTgt-----AAGTTCTGTATGAGCGGAGCAGCA (Δ4,+1)
  
```

Lei Y, *et al, PNAS*, **109**, 17484 (2012)より改変
 (Δは deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.13-2 Indel pattern of the cleavage site by ZFN and TALEN

(c) **Target 4 (EMX1):** (EMX1 の off-target サイト)

OT4-1

ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCATGCC	TTTCTTCTTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Wild-type x20
-----	-----ATC	Δ64
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCC	-----ACAATC	Δ28
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCAT	-----ACTCTGACAATC	Δ20
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGC	-----CTTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Δ20
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCATGCCTTTCT	-----CAATC	Δ19
ACCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCCA	-----TGCTCTAACTCTGACAATC	Δ14
TCCTGTACATCTGCACAAGATTGCCTTTACTCC	-----CTTCTTCTGCTCTAACTCTGACAATC	Δ8

(d) **Target 3 (VEGFA site 3):** (VEGFA site3 の off-target サイト)

OT3-2

GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGA	AGTGAGTGAGTGTGTGGGGGGG	GGACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Wild-type x14
GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGAGTGA	-----GTGTGTGGGGGGG	ACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Δ4
GAGTGAGAGAGCGAGTGAGTGAGTGA	-----GTGTGGGGGGG	ACTCGGCTTGTGTGTGTCGG	Δ6 x2

OT3-9

GTGTTGGGATGCGGGAGTGG	GGTGAGTGAGTGCCTGCGGGTGGC	GATGCAAGCGTGTGCGAATGCGTG	x173
GTGTTGGGATGCGGGGA	-----	----->	Δ80
GTGTTGGGATGC	-----	-----GCGTG	Δ50
GTGTTGGGATGCGGGAGTGGGTGAGTGA	-----GTGGCGATGCAAGCGTGTGCGAATGCGTG		Δ10

GTGTTGGGATGCGGGAGTGGGTGAGTGAGTGCAAC	TGCGGGTGGCGATGCAAGCGTGTGCGAATGCGTG	+2
-------------------------------------	------------------------------------	----

OT3-18

TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGT	CCTCACGCACACACTCACCCACAC	ATAAAAAGGTGGTAACTG	Wild-type x27
TTTCAAAGACAGTAGATCT	-----TAAAAGGTGGTAACTG		Δ32
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGT	-----CATAAAAGGTGGTAACTG		Δ23
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCT	-----CACATAAAAAGGTGGTAACTG		Δ18 x4
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCT	-----CCACACATAAAAAGGTGGTAACTG		Δ15
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCT	-----CTCACCCACACATAAAAAGGTGGTAACTG		Δ12
TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTCA	-----CACACACTCACCCACACATAAAAAGGTGGTAACTG		Δ2

TTTCAAAGACAGTAGATCTTAAATGTCTCTCAC	AGGCTGGAGTACAGTGGCATGATATCAGCTCACTGCAATCTCGGGCTCCCGGTTCAAG	
CCATGCACACACTCACCCACACATAAAAAGGTGGTAAAC	+63	

Fig.13-4 Indel pattern of the cleavage site by CRISPR/Cas9

Arabidopsis: mutations in 12 out of 25 sequenced clones

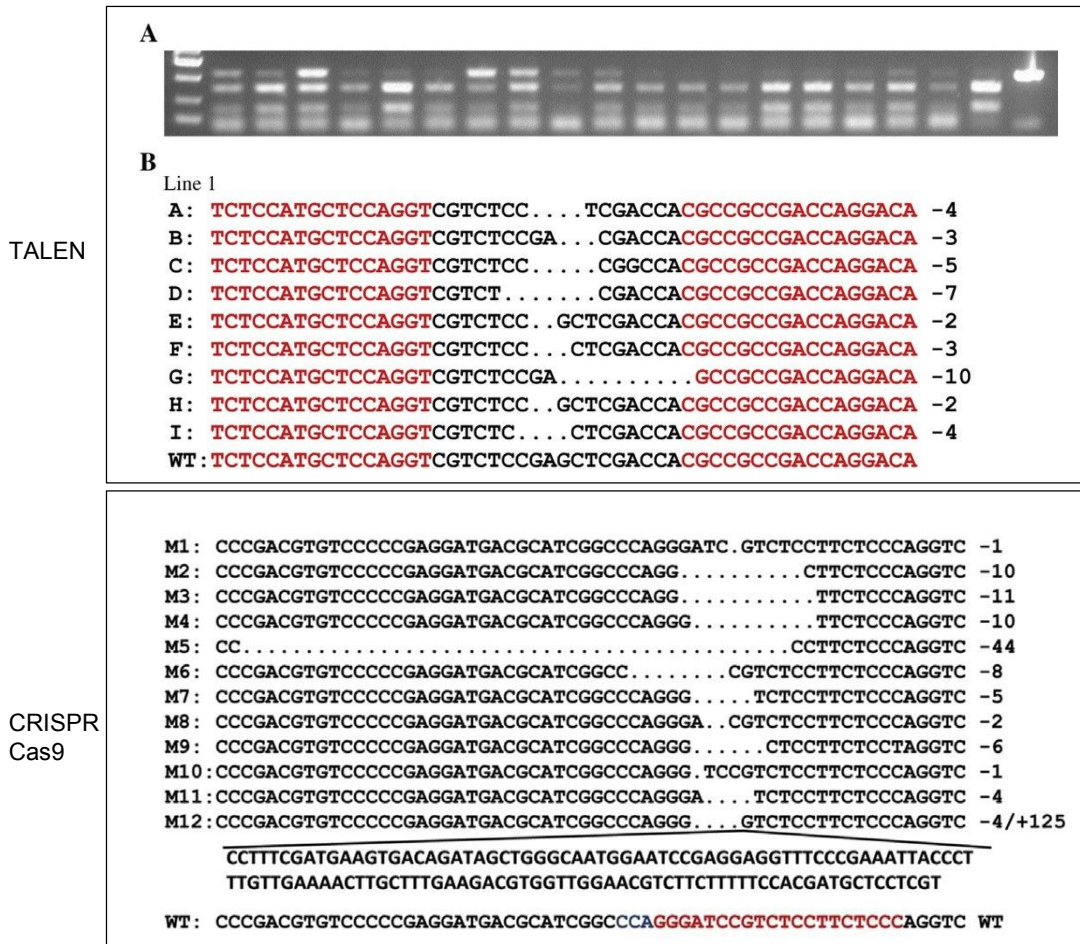
Sequence	In/Del	Freq.
CATGGA <u>CGCCTTCAAGGTGCACATGGA</u> GGACTAGTAAAGGAGAAGAAC		
CATGGAGCGCTTCAAGGT <u>CCC</u> CATGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	0 (-3, +3)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCAC <u>A</u> ATGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	+1	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... GGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-3	4x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-5	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-6	2x
CATGGAGCGCT... .. GACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-17	1x

Tobacco: mutations in 15 out of 28 sequenced clones

Sequence	In/Del	Freq.
CATGGA <u>CGCCTTCAAGGTGCACATGGA</u> GGACTAGTAAAGGAGAAGAAC		
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCACATG <u>A</u> AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	+1 (+1)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCACATG <u>C</u> AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	0 (-1, +1)	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... GGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-3	4x
CATGGAGCGCTTCAAGGTG... .. TGGAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-4	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. GAGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-4	1x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-5	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGC... .. AGGACTAGTAAAGGAGAAGAAC	-6	3x
CATGGAGCGCTTCAAGGTGCA... .. AGGAGAAGAAC	-16	1x

Jian W, et al, *Nucleic Acid Research*, **41**, e188 (2013)より改変
(-は deletion の数、+は insertion の数、x は頻度を示す)

Fig.14-1 Indel pattern of the cleavage site by CRISPR/Cas9 in Plants (Arabidopsis and Tobacco)



Lian Z, et al, *J. Genetics Genomics*, **41**, 63 (2014)より改変
(-は deletion の数、+は insertion の数を示す)

Fig.14-2 Indel pattern of the cleavage site by TALEN and CRISPR/Cas9 in Plant (Zea mays)

CRISPR plasmid construct

target in genome 5'-gctaggctatatttcggatGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGaaattcaccgcatta-3' (+)鎖
 3'-cgatccgatataaagcctaCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCttaagtggcgtaat-5' (-)鎖



Note: (-)鎖に設計する時は、向きに注意

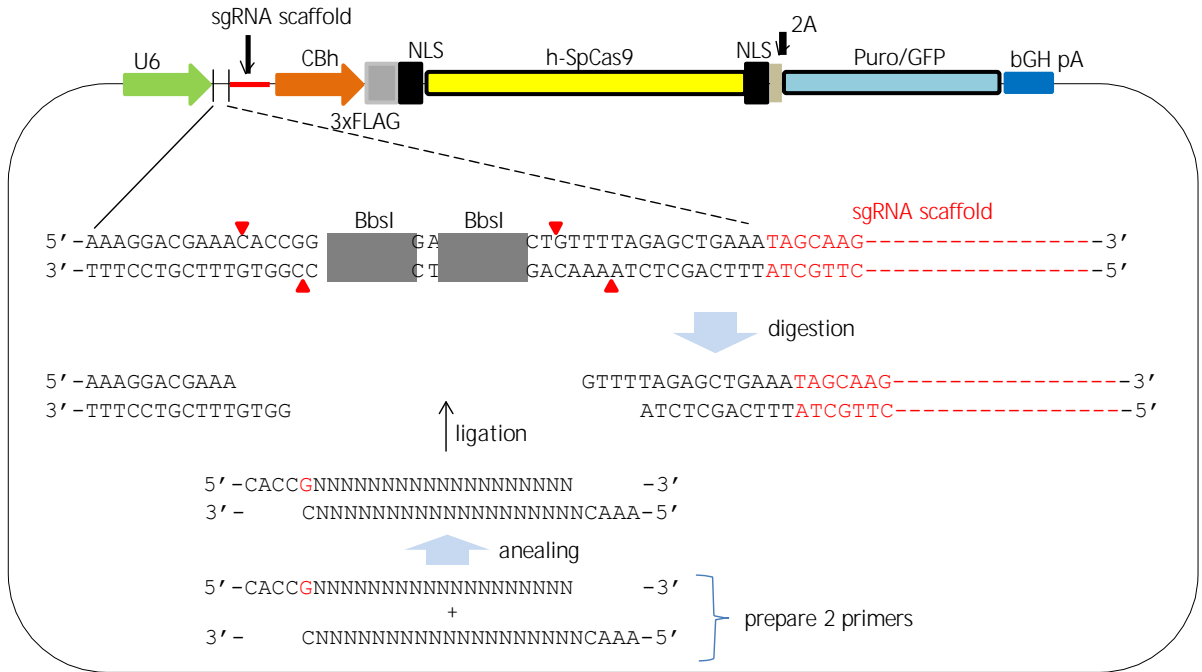
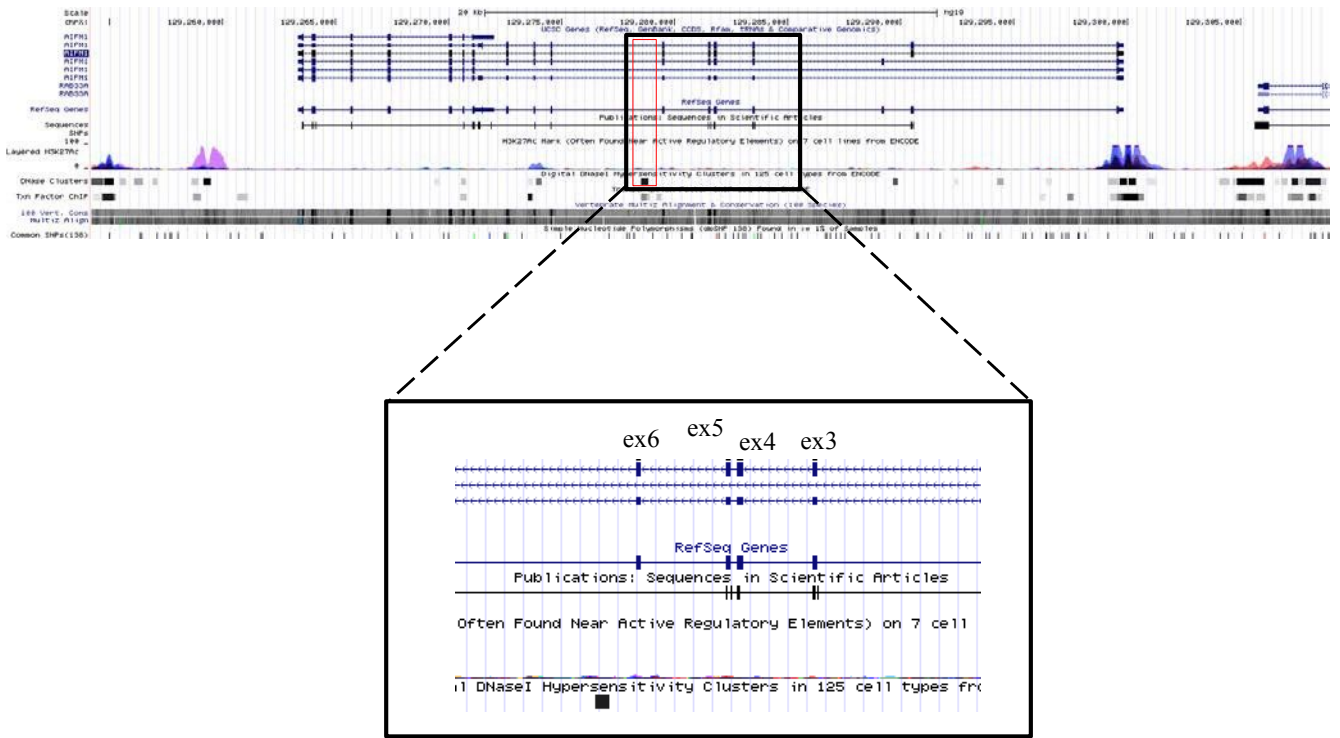


Fig.15 CRISPR/Cas9 plasmid we used in this study



ATTAGGGCTAGGGAATATAGCTCAGTGGCCTGATATGCGTAAGCCATAGGTAGTCTCTAGCTTCTAAATACATTAAAACTAAGTTAAAAGTCACTA
 AATAATCCTTCTGCTATGTATTATAAAGATGAAAAGCAGAACTAGTCATAATACTAAAAATCCTTCTCAATTTGAAAGTATAGGGGAAAGAGTA
 TGCTTGAAATAAAACACTTTAGTGAATATGATGTTGACCCCTACTAATTATTAATTTGAGTGTCTCTAGTCTAGATTTCCACC

GCAGAGCGCTTGATTAGTATGCATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTGTGTTGCATAAAAGGAGCTAAC
 TAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTCTCATTTAATTGAAATGATGTTAGCCTATGTTATGATATAGGTGATCATGAAATAAACCTTCTCCATGTTTGG
 GTCTACAGGCTACAAGACTATTAAGAAGACCAAAAAGATATAATGAAAGAATAATGGGATTAG
 GACTGTCACCAGAAGAGAAACAGAGAAGAGCCATTGCCTCTGGTAAGGACTCCCTATGTCTCTCTGTGTGACT
 TGAGATTAATAAGGAAAGTGATTAAGGTTGAGGTGCTATGATTTGCTAATATCCTGTTGAAGTGTAACAATGTGAGATGTAAGCTTCTAGAAAC
 TATGGTTTTACCCATAGCAGAGAGCAGTTTCCCTAAAGTATTTGATTTGACATTTTAACCTTGAGAGTAAAATTAATATTCTGGGTACCTATCCTTT
 TTTAATTTGTTTATTACATTCCAAATGTTACCCCACTTCTGGTCCCCCTCCAAGATTTCTTACCCCATACCCCTCCCTTTGCTCTGAG

U6-Rev-exon3mae

TALEN-VR-AIF-up-A

U6-Rev-exon3mae2

U6-Rev-exon3usiro

U6-Rev-left-2

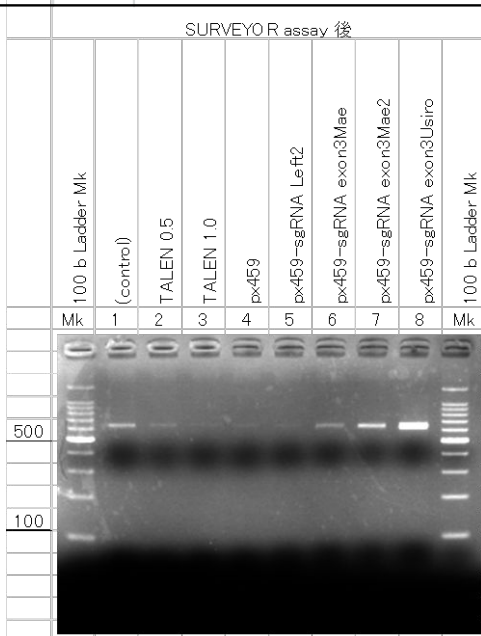
AGGGTGATCTTCCCCCCCCAACTCCCCCGTCAATCCTCCTTCTGTGGGGGCATCAGTCTCTACAGGATTAGGCACATCCTTCCCTCTGAAGCCA
 GCCAAGGCAGTCCCTCTGCTACATGAGTGCCAGGGCCTGAGATCAGCCTATGTATGCTTTTGGTTGGTGGCACAGTCCCTGGGAGCTTCCAGGGGT
 CCAGGTTAGTTGACACCGTTGTTCTTCTATGGGGTTGCATCCACTTCACTTCCCTAACCTTTTCATTGGGGTCCCTGTGCTCAGAACAAATG
 CTCACCTGTGAGTATCTGCATCTGTCTCAGTCAGCTGCTGGTAGAGCCTCTCAGAGGACAGCCATGCTAGGCTCCTGCCTGAAAGTACAACATAGCA
 TCAGTAATAGTGTGGTGGTGGTGCCTGCCATGGGATGAATCCTAACCTGGGCCCTGGCARTGGTGGCCCTCCCTCAGTCTCTGCTCCATTTT
 GTCTTTGCATTTCTTTAGACAGGAACCAATTTGGGTCAGAAATTTGAAGTGGTGTATATTTGGTGATTACTGGGAAAGATAGGAAGCC
 ATTTTCCAATGACTAAACCTTTCAATCACATTAATCCCTTGAATCTTTGGAGTTTGTAGTTGTATAGATGTTTTCCTGTAGCACAAGCTC
 TAGCCTTCTATTTGATTCAGTTGGATTTTCAAAGAGGAATACTTTAATCCTTTAATAGGCCTATAATCTGGGTAGGCGGTTTGTATTGCTTTTCG
 AATAATGCCTCCTTCTCATGAACATTGTATAATAATCCCAATGACCTCCTAGGTGTTTCCCTTTATGC

Fig.16 TALEN and CRISPR/Cas9 design targeted for AIFM1 exon3 region
 四角で囲んだ配列は、CRISPR 標的配列、太字黒または茶で示した配列は
 TALEN 標的配列を示す。大文字(緑)は、exon3を示す

・Platinum TALEN の Target: TTTCATCCCTAGTACTG-AAAAGTCAAATTCGC-CTTAGTAGTGTTCGATA

・CRSIPR/Cas9 の Target:

Name	Length	Start	End	Strand	Nucleotide sequence	GC% in spacer	Ranking	Match-start	Match-end
U6-Rev-exon3mae2	23	20	42	minus	GAATTGACTTTTCAGTACTAGG	30	100	135399601	135399625
U6-Rev-exon3mae	23	116	138	plus	GTTAGCCTATGTTATGATATAGG	30	100	23972	23996
U6-Rev-left2	23	288	310	minus	GTACACAGAAGAGACATAGGGG	45	100	23800	23824
U6-Rev-exon3us icro	23	419	441	minus	GGAACTGCTCTCTGCTATGGG	50	100	23669	23693



TALEN spacer (talen-VR-AIF-up-A)

```

SUR-PCR4_T1-2 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-3 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-13 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-24 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-9 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-15 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-19 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-20 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-22 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-5 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-18 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-4 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-23 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-11 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-10 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-7 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-16 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-6 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-8 110 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-17 109 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
PC12HS-tetoff10 111 TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
  
```

```

SUR-PCR4_T1-33 111 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
SUR-PCR4_T1-42 111 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 220
SUR-PCR4_T1-27 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-35 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-30 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-31 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-29 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-39 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-32 110 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 219
SUR-PCR4_T1-36 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-25 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-37 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-45 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-44 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-26 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-38 107 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 216
SUR-PCR4_T1-48 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-34 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-28 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-46 109 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 218
SUR-PCR4_T1-43 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
SUR-PCR4_T1-47 108 S TTGATTAGTATGCAATGAAGCTCTGGGTTTCATCCCTAGTACTGAAAAGTCAAATTCGCCTTAGTAGTGTTCGATAAAGGAGCTAACTAGCTCAATGTAGACAAAAGCTTT 217
  
```

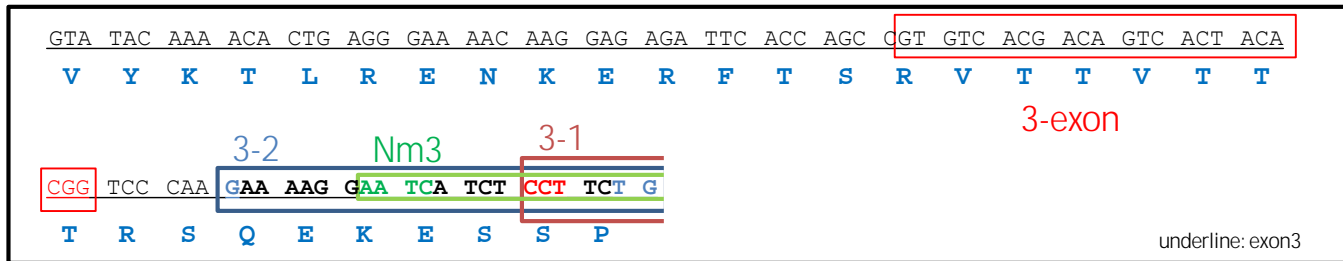
Fig.17 AIFM1 遺伝子 exon3 前後 intron 領域を標的にデザインした sgRNA と切断活性 (SURVEYOR Assay), シークエンス解析

AIFM1 KO by disruption of exon3

(chicken DT40 exon 3 region)

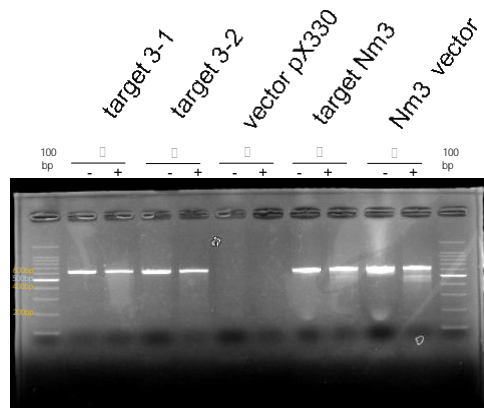
intron2

AGACAATCGGTTCTGCAGCCCCAAGACCAAATGTATGCAGAAAGCTTCATTGCTTGCTCATGGAAAGCAATCGGTCTGCT
 GAGTCCCATCCTATCATAAGTAGAGCAGGTAGTTTTCTGAGTGCATTCCTCCTACAGCTATGTATAACATCCCCAGGTGCT
 TTTTAAACTCAGGTATATCTGGGTTTGGTTTGCCTTAGTTGAAAGCAATGATGCCTTTTCTGAGCAAGTAGGATAGACAAAAG
 TGTGTGGGGAACAGAAGCAGAATGATGCCTTGATGCTGTAACACATACAAGGTGAATGTCTTCTGCTGTGTCCAG



GTGGGTAAGTGCCTGCAAGTTCTGGGTTTGGAGCTGTTTTTTCGTGAGCTGCTAACTTGAGACATCCAAAACAGATAGAACG
 GAGCCTGCATGAAAACACAGTGGTAAAAAGAGGAGGGGCCCTGCTTTGGGCTGTACCTTTTCCCAGCCTGGCAAAGAAG
 CAGTGCAGTTCCAGCACAAAATCCTCAGTGCCTGTGCCATGTCCCTGTTCCATTCAAGGAGCCTCACAGAGGGGAGAAATG
 AGGACAAAAGTAGCAAAGCTCTTGATAATTTCTTGCAGACTGTATGTGGACCACAGGTCACCTGAAAGGTTAAGTGATT
 GTGCAGATCTAGCTTAGAGAAACATTTGCTGCAGTGTGGCACTTTGAGTCGTGCATGGAGCAGGCTTCAAGAGAAGGAG
 GGCTTAGGAAATACAGTGGGGGAGAAGGAAGGGAGGAGAACGTATTTGGAGTGTGTCTGCCAAAGGAGGTCCGTACA
 TGAAAAGATCTGGTGACACACTCTGT

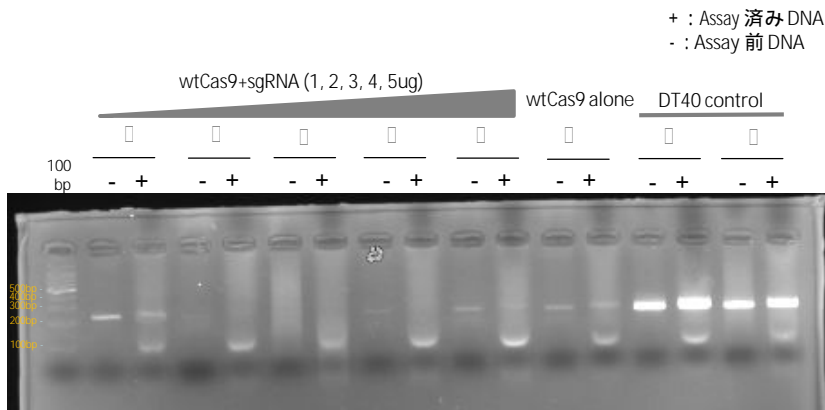
intron3



(px330: *Streptococcus pyogenes* Cas9,
 Nm3: *Neisseria meningitidis* Cas9)

surveyor nuclease assay

Fig.18 AIFM1 遺伝子 exon3-intron3 にデザインした sgRNA シーケンスと切断活性 (SURVEYOR Assay)



sequencing 結果

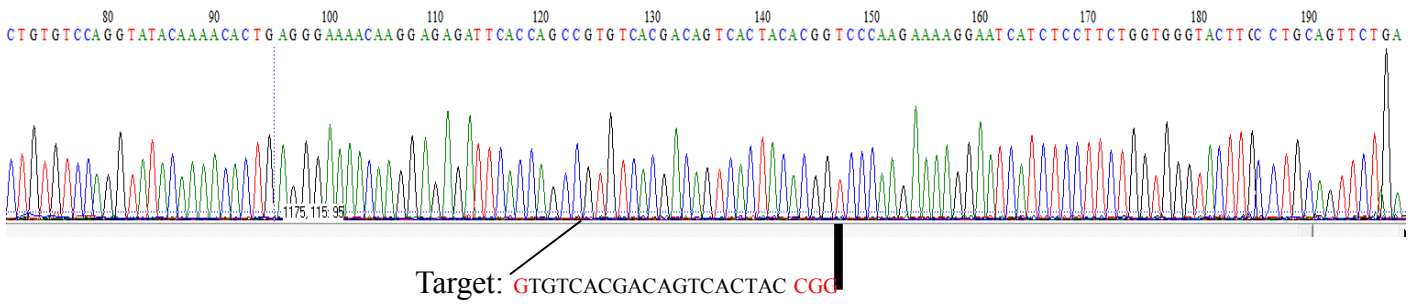
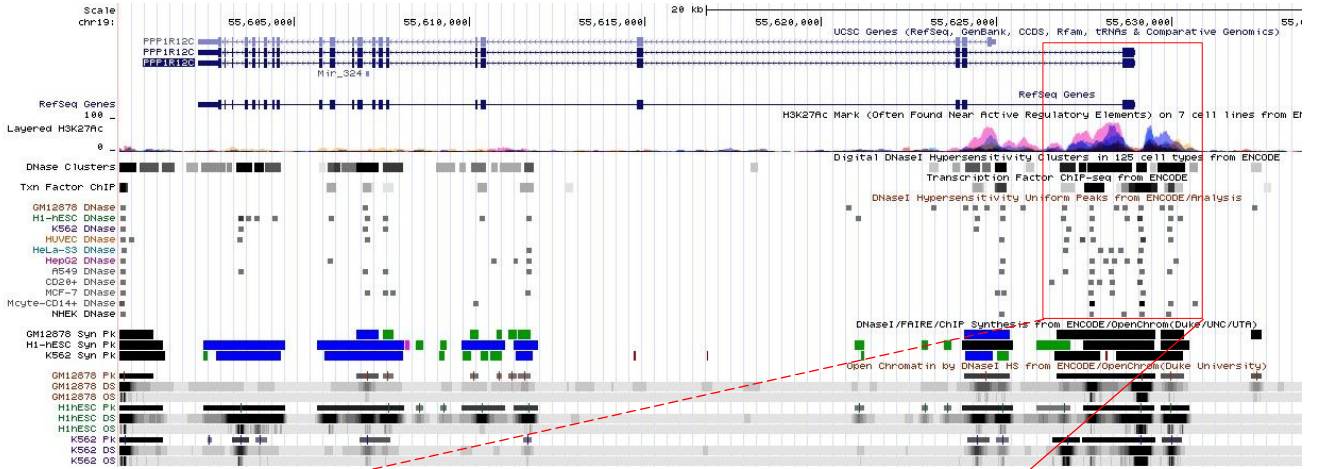


Fig.19 *AIFM1* 遺伝子 exon3 内部にデザインした sgRNA シークエンスと切断活性 (SURVEYOR Assay)とターゲット領域のシークエンス結果

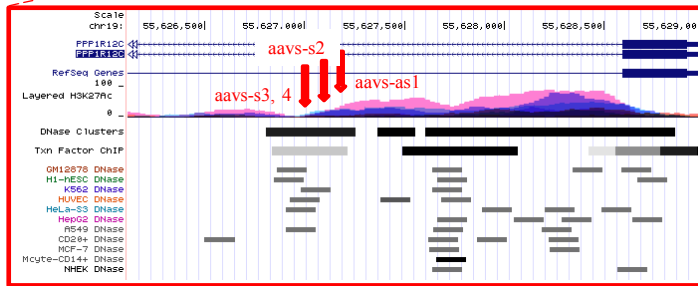
PPP1R12C gene

cell type: HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)
 target: AAVS1 locus PPP1R12C (protein phosphatase 1, regulatory subunit 12C)

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)



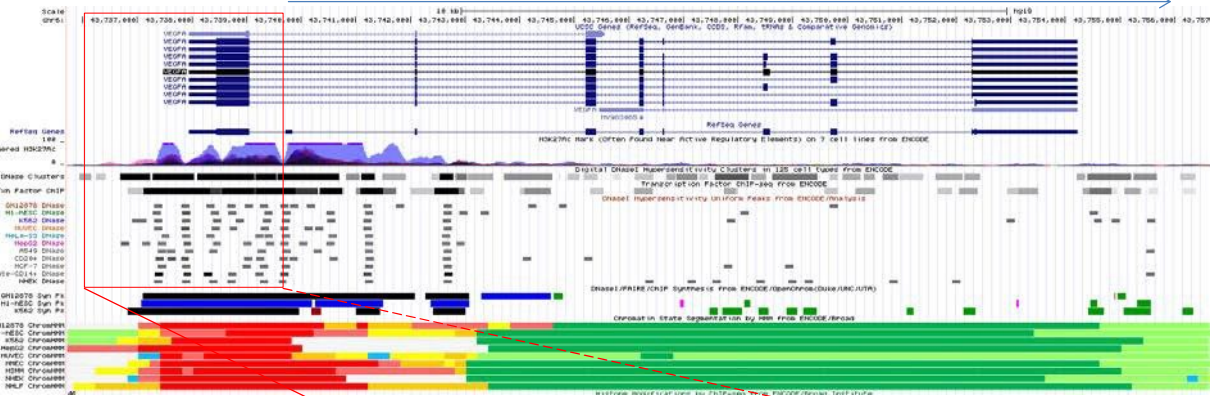
aavs-s2 indel 70%
 aavs-s3, s4 indel 55-60%
 aavs-as1 indel 20%



VEGFA gene

cell type: HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)
 target: VEGFA (vascular endothelial growth factor A)

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)



target-1 indel 24%
 target-3 indel 54%

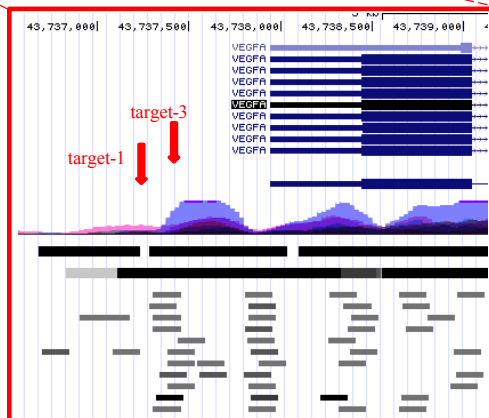
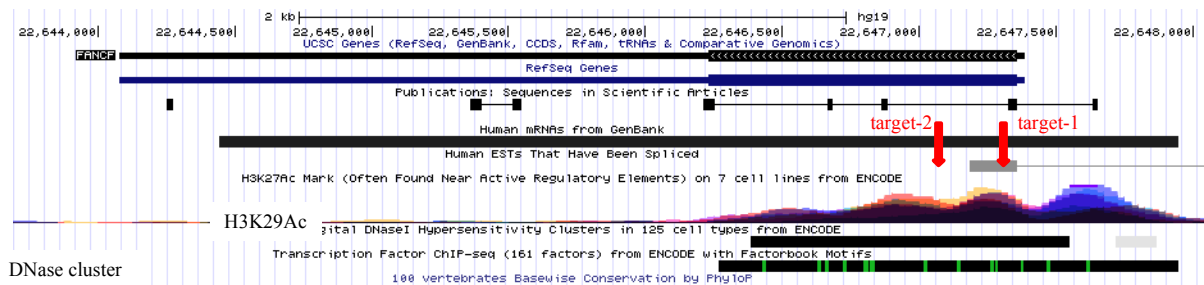


Fig.20 ENCODE データからみた各遺伝子標的部位のゲノム構造 (continued)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

FANCF gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: FANCF (Fanconi anemia, complementation group F)



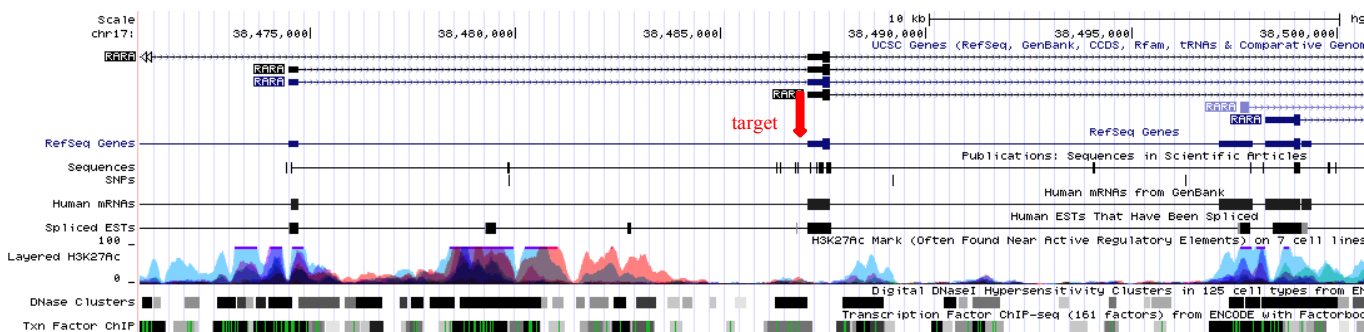
target-1 indel 17.8%
target-2 indel 12%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

RARA gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: RARA (retinoic acid receptor, alpha)



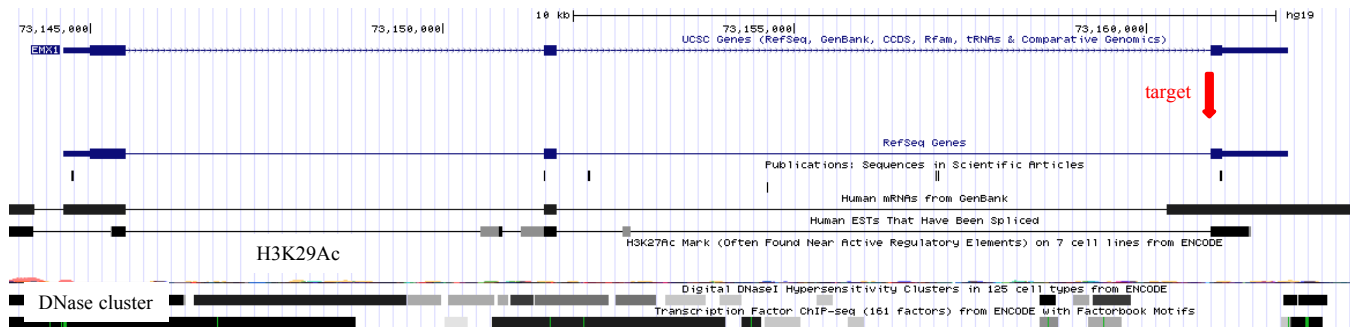
target indel 6.1%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Joung's group, *Nature Biotech*, advanced online doi:10.1038/nbt.2908 (2014)

EMX1 gene

cell type: HEK293& (Human Embryonic Kidney 293)
target: EMX1 (empty spiracles homeobox 1)



target indel 2.9%

(UCSC genome browser, GRCh37/hg19)

Fig.21 ENCODE データからみた各遺伝子標的部位のゲノム構造 (continued)

AIFM1 gene



Fig.22 ENCODE データからみた AIFM1 遺伝子 exon3 周辺のゲノム構造)

組換えウシ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	α-ラクタアルブミン、ラクtofエリン、リゾチーム	トランスジェニックウシの牛乳の成分を調べた	中国	-		1	
	ヒトラクトフェリン	鉄貧血を起こしたラットにトランスジェニックウシの牛乳を飲ませた	中国	-		2	
	ヒトラクトフェリン	鉄を結合させたヒトラクトフェリンをトランスジェニックウシの牛乳から調製して、鉄貧血を起こしたラットに与えた	中国	体細胞核移植		3	
	ヒトラクトフェリン	GMウシの牛乳を新生児ブタに飲ませて腸内細菌叢を調べた	中国	-		4	
	2	ラクtofエリン、インターフェロン α	線維芽細胞に導入。細胞は乳腺炎と口蹄疫に耐性	中国	トランスフェクション	細胞の実験	5
		口蹄疫ウイルスの遺伝子に対する shRNA	口蹄疫に耐性のウシを作ることを目指す	中国	体細胞核移植		6
		ウシウイルス性下痢のウイルスに対する shRNA	ウイルスの複製を抑制することを目的とする	中国	トランスフェクション	細胞の実験	7
		β-ディフェンシン 3	乳腺において発現させた	中国	体細胞核移植		8
		lysostaphin	ぶどう球菌の感染からウシを守ることを目指す	中国	-		9
		インテグリン av サブユニット、ノックアウト	口蹄疫の感染効率が低下した	中国	体細胞核移植		10
		インテグリン b6 サブユニット、ダブルノックアウト	口蹄疫に耐性になった	中国	体細胞核移植		11
		ウシラクtofエリン、ヒトインターフェロン α	インターフェロン α の発現を検出した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	12
Ipr1		ウシ型結核菌に耐性になった	中国	体細胞核移植		13	
FMDV 由来するカプシドをコードする領域		アデノウイルスベクターの性質を調べた	米国	アデノウイルス		14	
3	線虫 Fat1	不飽和脂肪酸の含量が増えた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	15	
	線虫 mfat-1	組織と牛乳中で不飽和脂肪酸が大きく増えた	中国	-		16	
	線虫 fat-1	ゲノムに組み込まれ、タンパクが発現する胚を作った	中国	-		17	
	4	ミオスタチン遺伝子にフレームシフトを導入	肉の量を増やす、質を良くすることを目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	18
		ミオスタチン遺伝子に対する shRNA	筋肉の量を増加させることを目指す	米国	体細胞核移植		19
	ミオスタチン遺伝子に対する miRNA	筋肉量が 2 倍になった	中国	体細胞核移植		20	
	5	ヒトラクトフェリン、ヒトラクトアルブミン α	GM 製品から外来遺伝子を検出できた	中国	-		21
		β-ラクtoグロブリンに対する miRNA	β-ラクtoグロブリンの発現を抑制した	ニュージーランド	-		22
		プリオン	ウシ細胞で発現させた。狂牛病にならないウシの開発を目指す	中国	トランスフェクション	細胞の実験	23
		リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		24
ヒトトランスフェリン		導入遺伝子が染色体に導入されたことを FISH 法で検出した	中国	-		25	
線虫 Fat1		3 通りにコドン最適化して異なる触媒効率が得られた	中国	トランスフェクション	細胞の実験	26	
プリオン遺伝子に対する shRNA		プリオンの発現を抑制した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	27	
ヒト α-ラクtoアルブミン		血液学的、血清の生化学的指標は正常の範囲内だった	中国	-		28	
ヒトコラーゲン cDNA		胚は外来遺伝子を含んでいる	中国	体細胞核移植		29	
ヒトラクトフェリン		導入遺伝子を蛍光定量 PCR で検出する方法を作成した	中国	-		30	
ヒトラクトフェリン	導入遺伝子を次世代シーケンサーで調べた	中国	-		31		
プリオン遺伝子に対する shRNA	mRNA、タンパクの発現を抑制した。	中国	トランスフェクション	細胞の実験	32		
カテゴリー							
1. 牛乳に抗菌性タンパクを含ませる		2. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		3. 不飽和脂肪酸を作らせる			
4. 筋肉の量を増やす		5. その他					
	食用トランスジェニックウシ (2012 年)						

組換えヤギ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献	
1	ヒトラクトフェリン	マーカー 1 つ、2 つで出生率などに差がなかった	中国	体細胞核移植		1	
	ヒトリゾチーム	高濃度のリゾチームを含むヤギミルクは腸細胞の損傷の修復を促進した	ブラジル	-		2	
	ヒトラクトフェリン	子孫の生殖能力、導入遺伝子発現の安定性に問題なかった	中国	-		3	
	β-ラクtoグロブリンに対する shRNA	線維芽細胞中で β-ラクtoグロブリンの発現を抑制した	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	4	
	ヒトラクトフェリン	泌乳サイクルの期間すべてで安定に発現した	中国	-		5	
	ヒトリゾチーム	ミルクを子豚に飲ませると糞便中の微生物が変わった	米国	-		6	
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカーを使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		7	
	リパーゼ	低脂肪牛乳を作るために利用できる	中国	-		8	
	ヒトリゾチーム	GM 胚盤胞を作った	中国	体細胞核移植		9	
	ヤギリパーゼ	F1 において導入遺伝子が発現した	中国	精巢注入		10	
	ヒトラクトフェリン	GM 個体作成のためのドナー細胞の調製法と受容側の卵母細胞供給源の効果を調べた	中国	体細胞核移植		11	
2	ヒトラクトフェリン	組換えタンパクは天然の物と物理、化学的性質が同じだった	ロシア、ベラルーシ	-		12	
	ヒトラクトフェリン	ミルク中の組換えタンパクの量を経時的に調べた	ベラルーシ	-		13	
	ヒトラクトフェリン	細胞を正確に選抜するために二重マーカーを使用し、悪影響はなかった	中国	体細胞核移植		14	
	ヤギ成長ホルモン	乳腺特異的な発現ベクターを作成した。ミルクの増産を目指す	中国	-		15	
	ヒトラクトフェリン	生殖機能に影響はなく、導入遺伝子は次世代に伝達して安定に発現した	中国	-		16	
	fat-1	脂肪組織で特異的に発現させるベクターを作り、線維芽細胞に導入した	中国	トランスフェクション	細胞の実験	17	
		ミオスタチン遺伝子に点突然変異を導入	ミオスタチンタンパクの発現量が減少した	中国	エレクトロポレーション	細胞の実験	18
	3	インテグリン b6 サブユニット遺伝子ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロインジェクション		19
		Toll-like receptor 2	個体に侵入したバクテリアの除去が促進された	中国	マイクロインジェクション		20
		1. ミルクの改良 2. 肉の改良 3. その他					
	食用トランスジェニックヤギ (2012 年)						

Fig.23-1 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

組換えブタ

カテゴリー	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
1	SIGLEC1 遺伝子不活性化、 CD163 遺伝子不活性化	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスに耐性のブタの作成を目指す	米国	-		1
	O 型口蹄疫ウイルスの遺伝子に対する shRNA	トランスジェニックブタの線維芽細胞はウイルスを阻害した	中国	-		2
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に対する shRNA	細胞においてウイルスの複製を阻害した	中国	トランスフォーメーション	細胞の実験	3
	PBD-2	広い抗菌活性を持つ可能性がある	中国	体細胞核移植		4
	インテグリン b6 サブユニット遺伝子 ダブルノックアウト	口蹄疫に対する感染率が低かった	中国	体細胞核移植、マイクロ インジェクション		5
	ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス の遺伝子に対する shRNA	この疾患に耐性だった	中国	体細胞核移植		6
	IFITM3	ウイルス性疾患に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		7
	FUT1 遺伝子に対する shRNA	腸管毒素原性大腸菌 F18 に耐性かもしれない	中国	体細胞核移植		8
	古典的ブタ熱ウイルスの遺伝子に 対する siRNA	siRNA の発現を検出した	中国	-	細胞の実験	9
	口蹄疫ウイルスに対する ScFv	導入遺伝子を持つ細胞を選抜した	中国	レトロウイルス	細胞の実験	10
	sFat-1	導入遺伝子が F1 から F2 へ伝わった	中国	-		11
	ブタ成長ホルモン	F1 において野生型よりも成長ホルモンの発現が多かった	中国	-		12
	ヒトリゾチーム	糞、周辺の土壌、胃腸の微生物相を調べた	中国	-		13
	線虫 Fat-1	筋肉と主要な組織で n-6/n-3 比が下がった	中国	体細胞核移植		14
	ブタ成長ホルモン	Tet-On システムを利用してコンディショナルに発現させた	中国	-	細胞の実験	15
	ブタ成長ホルモン	導入遺伝子が次世代に伝わった	中国	ナノ遺伝子キャリアー法		16
カテゴリー						
1. 病原菌、ウイルスへの耐性付与		2. その他				
	食用トランスジェニックブタ (2012 年)					

組換えヒツジ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ミオスタチン、その RNAi	線維芽細胞でのミオスタチン遺伝子の発現を調べた	中国	レンチウイルスベクター	細胞の実験	1
線虫 fat-1	CMV プロモーターを用いたときはサイレンシングを受け、 高度なメチル化によるかもしれない	中国	体細胞核移植		2
ミオスタチンに対する shRNA	ミオスタチン遺伝子の発現が抑制された	中国	体細胞核移植		3
ミオスタチンに対する siRNA	ミオスタチンの発現を抑制した。GM 桑実胚を作った。	中国	体細胞核移植		4
ミオスタチンに対する shRNA	筋芽細胞の分化におけるミオスタチンの役割を調べた	中国	-		5
	食用トランスジェニックヒツジ (2012 年)				

組換えウサギ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
ヒト fucosyltransferase 1	乳の分泌期間が短くなった	米国	-		1

Fig.23 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

組換え魚

カテゴリー	魚の種類	導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
1	アマゴ	ベニザケ成長ホルモン 1	肝において脂肪酸の組成と量が変わった	日本	-		1
	コイ	成長ホルモン	ラットに食べさせて亜慢性毒性は現れなかった	中国	-		2
	サケ	成長ホルモン	酸化ストレスを調べた	スウェーデン	-		3
	ドジョウ	ドジョウ成長ホルモン	トジウレクチンプロモーターを使って成長速度を抑制した	韓国	-		4
	コイ	コイ成長ホルモン	大きくなった	韓国	-		5
	サケ	サケ成長ホルモン	プロモーターと魚の系統によって成長が異なった	カナダ	-		6
	コイ	成長ホルモン	子孫の間に成長にばらつきがあった	中国	-		7
	サケ	成長ホルモン	ウシ成長ホルモンを投与して成長と内分泌効果を調べた	カナダ	-		8
	不明	コイインシュリン様成長因子 2b	高い生存率を持った	中国	マイクロインジェクション		9
	サケ	成長ホルモン?	脳の大きさと構造を調べた	スウェーデン	-		10
	アマゴ	成長ホルモン1	脳下垂体の iTRAQ プロテオーム解析を行った	日本	-		11
	ニジマス	ミオスタチンノックアウト、ミオスタチン阻害剤	運動の成長への効果を調べた	米国	-		12
	サケ、マス、ティラピア	成長ホルモン	Aqua Bounty 社のサケは FDA の審査を受けている	米国	-		13
	サケ	成長ホルモン	早熟性の雄の成熟が減少する	カナダ	-		14
	2	サケ	抗凍結タンパク	凍結に耐性のサケを作ることを試みた	カナダ	-	
カテゴリー							
1. 体を大きくする		2. その他					
		食用トランスジェニック魚 (2012 年)					

組換えエビ・カニ

導入あるいは改変遺伝子	研究内容	開発国	遺伝子改変法	備考	文献
white spot syndrome virus env gene (VP28, VP19)、これらの融合遺伝子	トランスジェニック藻は魚、エビ、カニなどに用いる 予防薬、治療薬、餌、添加物に使える	中国	トランスダクション		1
	食用トランスジェニックエビ、カニ (2012 年)				

導入遺伝子の説明

- 1) ラクトフェリン 母乳・涙・汗・唾液などの外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパク質である。ラクトフェリンは、強力な抗菌活性を持つことが知られている。鉄を奪い去ることで、細菌の増殖を抑制する。また、グラム陰性菌の細胞膜の主要な構成成分であるリポポリサッカライドと結合することで、細胞膜構造を脆弱化し、抗菌活性を示す。さらに、免疫系に対する効果があることが知られている。
- 2) ラクトフェリシン ラクトフェリンをペプシンで分解した部分ペプチドである。細菌の細胞壁に障害を与えることでラクトフェリンよりも 10 倍以上強力な抗菌活性を示す。
- 3) ラクトアルブミン 乳に含まれ、乳清から得られるアルブミンである。ラクトアルブミンは、多くの哺乳類の乳に含まれる。
- 4) リゾチーム 真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素である。ヒトの場合涙や鼻汁、母乳などに含まれている。
- 5) ミオスタチン 筋肉成長を抑制する因子である。
- 6) fat-1
 - -3-脂肪酸サチュラーゼという酵素を作り、□ -6-脂肪酸を □ -3-脂肪酸に変える動物では不飽和脂肪酸を体内で合成できる量だけでは必要量を満たすことができず、摂取する必要がある。不飽和脂肪酸は主に植物や魚に含有されるが、人の食事では十分に摂取できていないケースがあると考えられている。動物の体内で少量作られる □ -6-脂肪酸を □ -3-脂肪酸に変えて、人が肉を食したときに □ -3 脂肪酸を摂取することを可能にするために GM 動物が作成されている例がある。

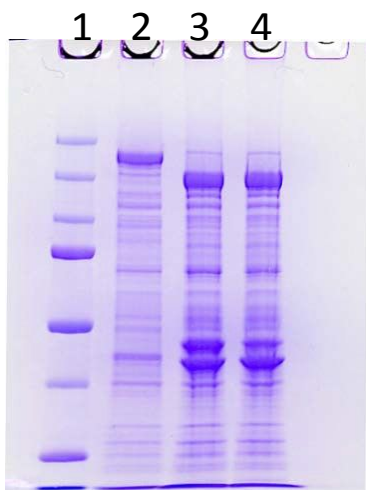
Fig.23-3 遺伝子組換え動物の開発動向調査 (2012)

次世代遺伝子組換え技術を用いた GM 動物

1. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* (2011) 21 (11) 1638-1640
2. Dong Z, Ge J, Li K, Xu Z, Liang D, Li J, Li J, Jia W, Li Y, Dong X, Cao S, Wang X, Pan J, Zhao Q. Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases. *PLoS One* (2011) 6 (12) e28897
3. + He, Hongbin; Wu, Jianming; Wang, Hongmei; Liu, Xiao; Liu, Wenhao; Fang, Yongzhi; Zhong, Jifeng. Method for knocking out bovine integrin $\beta 6$ subunit gene with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2012), CN 102660577 A 20120912.
4. Liu, Xu; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Chang, Bohao; Liu, Jun; Guo, Zekun; Quan, Fusheng; Zhang, Yong . Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows . *Nature Communications* (2013), 4, 3565, 11 pp
5. Liu, Xu; Zhang, Yong; Wang, Yongsheng; Guo, Wenjiang; Quan, Fusheng. A kind of targeting vector for site-directed integration of Lys gene in β -casein locus and its constructed cell. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103215295 A 20130724.
6. Li, Rongfeng; Li, Xueling; Zhao, Yuhang; Yun, Ting; Liang, Hao. Method for rapidly knocking out myostatin gene and integrating exogenous gene at specific site with zinc finger nuclease. *Faming Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103088046 A 20130508.
7. Liu, Mingjun; Zhang, Xuemei; Li, Wenrong; Zhang, Ning; He, Sangang; Liu, Chenxi; Ma, Yila. Method for knocking out ovine myostatin gene with zinc finger nuclease. *Zhuanli Shenqing* (2013), CN 103290045 A 20130911.
8. Yu, Shengli; Luo, Junjie; Ding, Fangrong; Li, Song; Tang, Bo; Li, Ning. Method for knocking out bovine myostatin gene with zinc finger nucleases. *Faming Zhuanli Shenqing* (2011), CN 102260711 A 20111130.

Fig.23-4 次世代遺伝子組換え技術を用いて作製され GM 動物に関する論文

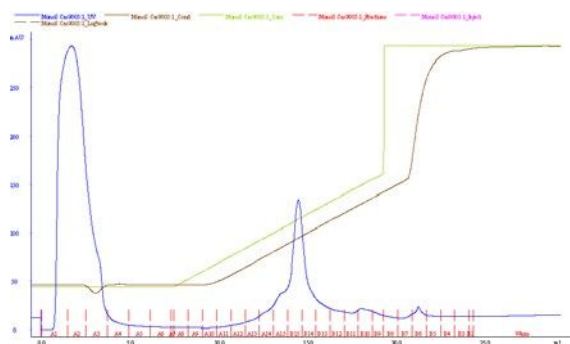
ProTEV Plus による SpCas9-MBP-His₆ の消化



キレートカラムのフラクションを2つに分けて、ProTEV Plus の使用量を変えて消化

レーン1：分子量マーカー
レーン2：消化前
レーン3：ProTEV Plus, 750 u
レーン4：ProTEV Plus, 250 u

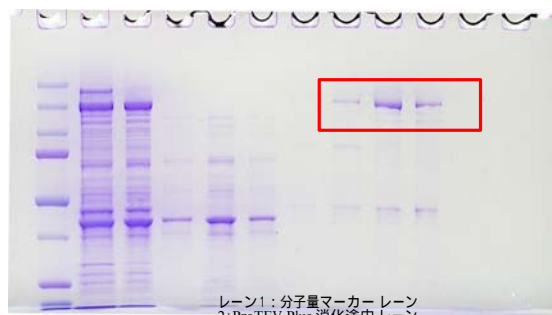
Mono S による精製



バッファーA: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10% グリセロール; pH 7.5
バッファーB: 20 mM HEPES, 1 mM TCEP, 10% グリセロール, 1 M KCl; pH 7.5

グラジエントは 15-55%B を緩やかにした。

1 2 3 4 10



レーン1：分子量マーカー
レーン2：ProTEV Plus 消化途中
レーン3：消化後、カラム前
レーン4-10：カラムのフラクション

Fig.24 human-condon optimized SpCas9: 発現と精製

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発

研究分担者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：次世代バイオ技術は、ゲノム上のあらゆる場所を標的に遺伝子の挿入や欠失などの遺伝子組換え（GM）を可能とする一方で、このような遺伝子操作によるゲノムへの影響に関する知見は十分に得られていない。そこで本研究では、次世代バイオ技術を用いてゲノム上の特定の場所を DNA 二本鎖切断（DSB）または様々な配列の遺伝子を導入することによる、ゲノムへの影響及びゲノム改変部位の検出の可能性に関する解析を行った。次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検出法の確立：近年、GM 技術が身近なものとなり、次世代バイオ技術のみならず従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いて主に新興国で開発され規制外に流通した安全性未承認 GM 作物の食品への混入が社会問題となっている。そこで、多種多様な安全性未承認 GM 作物の検出法の確立を目的に、2011 年に国内のパパイヤ加工食品より検出された安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統の混入した食品をモデルとして次世代シーケンサーで解読した情報を基に GM 配列を解読する手法の開発を行った。

A. 研究目的

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

次世代バイオ技術は、ゲノム上のあらゆる場所に変異導入や目的遺伝子の導入などの遺伝子操作を可能とする一方で、技術の安全性を念頭に遺伝子操作による生物への影響については解析が行われていない。そこで本研究では、TALEN を利用してゲノムの特定箇所に二本鎖切断（DSB）及び non-homologous end joining（NHEJ）による DSB 修復、また様々な配列及び配列長の遺伝子をゲノムの標的配列へ特異的に導入（homologous recombination [HR]）することによる、エピゲノムやゲノム構造変化並

びにその変化がもたらす近傍遺伝子の発現への影響について解析を行った。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検出法の確立：

近年、遺伝子組換え（GM）技術が身近なものとなり、次世代バイオ技術のみならず従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いて主に新興国で開発され規制外に流通した安全性未承認 GM 作物の食品への混入が社会問題となっている。そのような GM 作物の混入をより迅速・精確に解析し、かつ詳細な情報を得ることが求められている。そこで、2011 年に国内のパパイヤ加工食品より検出された未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統をモデルとして GM 配列を次世代シーケンサーより

解読する新規な未承認 GM 解析法の確立を試みた。

B. 研究方法

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

1) 培養細胞

ニワトリ細胞は、(独)医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入したニワトリ B リンパ細胞株 DT40 (細胞番号:JCRB9130) 及びニワトリ肝細胞 LMH (細胞番号:JCRB0237) を用いた。DT40 細胞は、RPMI 1640 medium、0.05 mM 2-mercaptoethanol、10% (v/v) fetal bovine serum、5% (v/v) chicken serum を含有する培養液で 40℃、5% CO₂ 環境下で培養を行った。LMH 細胞は、Waymouth's MB752/1 medium、10% (v/v) fetal bovine serum を含有する培養液で 37℃、5% CO₂ 環境下で培養を行った。

2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローン化

TAL effector nuclease (TALEN) を用いて培養細胞への GM 操作を行った。TALEN の標的配列は、ニワトリ 14 番染色体のグロビン遺伝子クラスターの非コード DNA 領域 (120,080,385 ~ 12,080,440) とした。TALEN の DNA 結合ドメイン標的配列は、上流側には、5'-TCTTTCATGTTCCACCTAC-3'、下流側には 5'-TAGTGATTTCCAAACACAC-3' のそれぞれ 18 bp とし、それぞれの配列を認識する TALEN 発現ベクターを細胞へ導入した。TALEN による DSB 導入後の遺伝子挿入配列は SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する AcGFP (*Aequorea coerulescens*

green fluorescent protein) 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pAcGFP1-N1 プラスミド (Clontech, CA, USA) とした。Targeting ベクターには、導入配列の 5' 及び 3' 側にニワトリゲノムの相同組換え配列 (800 bp) を組み込んだ。DT40 株はエレクトロポレーション法 (Poring pulse 1 回: 電圧 175 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 10%、Transfer pulse +極 5 回-極 5 回計 10 回: 電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%)、LMH 株はリポフェクタミン法によりプラスミドを細胞へ導入した。標的配列への GM 操作の確認は、Cel1 アッセイ法、制限酵素 (HpyAV) 消化試験法、及び PCR 法により行った。

導入した細胞は、G418 を 2 mg/ml 加え、薬剤耐性細胞を選択的に培養し、また GFP を発現する細胞を視覚的に選択することでクローン細胞を得た。また、細胞のクローンは、DT40 細胞は 96 穴プレートを使用した限外希釈、LMH 細胞はシングルコロニーをトリプシン-EDTA 処理し細胞を剥離する方法により行った。

3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

遺伝子導入の標的配列から両側 100 kb 近傍に存在する遺伝子の発現測定には、RT-リアルタイム PCR 法を用いた。80%コンフルエントに培養した細胞を (5 ~ 10 × 10⁷ 個) を回収し、全細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。DNA は RNase-free DNase I (Qiagen) を用いて完全に消化させた。500 ng の精製 RNA を逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20 µl の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2 µl の

cDNA を鋳型に、exon-intron 間でスプライシング標的的境界領域に設定したプライマー対による QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) を用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子発現の定量を行った。PCR 反応液は、20 μ L /well として調製した。組成は以下のとおりである。2 \times QuantiTect SYBR® Green PCR master mix 10 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.2 μ L を混合し、cDNA 試料液 0.5 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 20 μ L に調製した。反応条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間加温し、その後、95 15 秒、60 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

4) Chromosome conformation capture (3C) 解析

10 mL 培養液に懸濁させた 1×10^7 細胞を 2% (v/v)ホルムアミドでタンパク質-DNA の架橋固定を行い、0.125 M グリシンを添加することにより反応を停止させた。その後、PBS で細胞を洗浄し、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl [pH8.0], 10 mM NaCl, 0.2% NP-40, proteinase inhibitors cocktail [Nacalai, Kyoto, Japan]) を加え細胞を溶解させた。1 \times 制限酵素緩衝液中に 0.3% (w/v) SDS を加え 37 1 時間インキュベーションさせタンパク質を変性した後、1.8% (v/v) Triton X-100 を加えさらに 37 1 時間反応させた。次に、400 U *Bgl*II/400 U *Bam*HI 又は 400 U *Mbo*I を加え、DNA を 37 16 時間消化させた後、65 20 分間加熱し、制限酵素を不活化させた。反応液は、7 mL 1 \times T4DNA ligase buffer と 1% (v/v) TritonX-100 に調製し、37 1 時間インキュベーション後、4000 U T4DNA ligase を加え、16 で 4 時間反応させた。反応後、proteinaseK 及び RNase でタンパク質及び RNA をそれぞれ分

解後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿より DNA の回収・精製を行った。ゲノムの構造解析には、TaqMan Chemistry 法を使用したリアルタイム PCR より定量を行った。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立 :

モデル食品には、安全性未承認 GM パパイヤ PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精製した DNA を使用した。DNA は illumina 解析用サンプル識別インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動より 400 ~ 500 bp の断片を切り出し精製を行い、アダプター-PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina Hiseq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。

C. 研究結果

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究 :

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響を解析するため、ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の配列上に存在するグロビン遺伝子クラスターの π グロビン遺伝子と α グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に DSB するよう TALEN を設計した (Fig.1)。DSB への HR は、ニワトリゲノムの DSB 標的配列から両側に約 800 bp の配列を利用して、targetting ベクターの設計を行った (Fig.1B)。Fig.2 は、細胞中で発現させる TALEN F/R のアミノ酸配列を示す。DNA 結合ドメインは、18 の反復ドメインからなるものを設計し、それぞれのドメインは特定の 1 塩基への結合性を示すよう設計した。LMH 細胞株

へ TALEN F/R 発現ベクター (各 10 μg) をエレクトロポレーション法より導入し、DT40 細胞株へ TALEN F/R 発現ベクター (各 1.6 μg) をリポフェクタミン法より導入し、Cell アッセイで DSB を確認した (Fig.3A)。NHEJ させた DT40 細胞株は、限外希釈によりクローン化させた細胞より精製した DNA を HpyAV 制限酵素処理しクローンタイプを判別した。その結果、クローン 1-2 番と 5-4 番はヘテロ、6-5 番はホモであった (Fig.3B)。HR により作成した DT40 細胞株は限外希釈法によりクローン化し、PCR 法により、クローン 1~3 番を得た (Fig.3C)。DSB 標的配列周辺 (70 kb) のゲノム構造を解析するため、3C 解析を行った (Fig.4,5)。その結果、CpGislet 配列 (配列番号 45000) は、 αD グロビン遺伝子配列 (配列番号 50200) に結合しており、 αD グロビン遺伝子配列は αA グロビン遺伝子配列 (配列番号 54000) と結合していることが示唆された。また、 αD グロビン遺伝子配列は、その上流に位置する MRE 及び -9DHS 遺伝子配列 (配列番号 26233 と 37000) と結合していることが示された。さらに、DT40 細胞株と LMH 細胞株の同ゲノム領域の 3 次元構造は極めて類似しているものであることが示唆された。

DSB の 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子 (TFIIC, Loc425933, RHBDF1, MPG, ggPRX, π , αD , α , TMEM8, P15, Axin1) の発現量の差を、RT-リアルタイム PCR 法により定量した結果、 αA を 1 とした場合、DSB 挿入した両端に存在する π , αD , 及び MPG の遺伝子発現にて 10 ~ 100 倍上昇したことを確認した。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立 :

PSRV-YK 系統の混入したパパイヤ茶から精

製した DNA (226 ng/ μl , $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1.82$, $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 2.12$) は、平均 DNA 鎖長 5149 bp に分解されていることが示唆された (Fig.7A,B)。精製した DNA は、ソニケーション (Duty cycle 10%, Intensity 5.0 Bursts per second 200, Duration 40 sec Mode, Frequency sweeping Power 23 W, Temperature 5.5~6) illumina 解析用サンプル識別インデックスタグ配列を含むアダプターをライゲーション後、アガロース電気泳動より 400~500 bp の断片を切り出し精製を行った (Fig.7C)。アダプター-PCR によりゲノム断片を増幅させ、Illumina HiSeq (Illumina, CA, USA) を使用しシーケンシング解析を行った。その結果、シーケンス解析用インプットデータとして 37.174 Mean quality score で、4,005 Mb、38,747,994 (アダプタートリミング後、% of 30 bases: 95.64%) リード数を得た。ゲノム配列遺伝子バンク Plaza にて提供されている全パパイヤゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) を使用し、得られたリードのマッピングを行った結果、マップされたリード数は、全リード数の 47.5% 18,406,191 であった。PRSV-YK 系統の既知部分配列 120 bp にヒットするリードは一本も得られなかった。Local Blast で、パパイヤ内在性キモパイン遺伝子 (GenBank no.: AY803756) の contig 番号 (contig_27841) を得た (Fig.8)。

D. 考察

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究 :

ニワトリ 14 番染色体の α グロビン遺伝子クラスター (100 kb) に存在する 11 種類の遺伝子 (TFIIC, loc425933, RHBDF1, MPG1, CGTHBA, π , αD , αA , TMEM6/8, P15, Axin1) の発現を確認

したところ、DT40 株と LMH 株で異なる発現パターンを示す遺伝子は αD のみであった。3C 解析法により α グロビン遺伝子クラスターのゲノム構造の解析を行ったところ、 αD 遺伝子の周辺配列において両細胞間で異なるゲノム構造様式を有していることが示唆された。また、 αD 遺伝子のプロモーターは上流 1 kb に存在する CpG アイランドに非常に強固に結合していることが明らかとなった。そこで、 αD 遺伝子のプロモーターの TATA box と αD 遺伝子上流に存在する π グロビン遺伝子の polyA tail の間の配列を DSB する TALEN の設計を行い、ゲノム構造に及ぼす影響について解析を行った。Cell アッセイ並びに制限酵素消化試験により調製した TALEN の特異性を確認し、標的配列ヘターゲティングベクターを導入することに成功した。現在、 α グロビン遺伝子クラスターの遺伝子発現の違いを野生型及び GM 型で調べ、また細胞に導入する配列の長さによるゲノム構造並びに表現型への影響について解析を行っている。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立：

加工食品中の断片化されたゲノムを illumina HiSeq を用いてゲノム配列を解析することに成功した。また、得られた次世代シーケンサーのデータは、公開されているパパイヤゲノム配列をリファレンスとしてマッピング解析を可能とした。しかし、パパイヤ加工食品中の GM パパイヤの含有量が少なく、GM パパイヤ由来の配列をアセンブルできなかった。また、パパイヤゲノム配列とマッピングされなかった配列の多くが BLASTn 検索よりバクテリア由来のものであることが示唆された。今後、次世代

シーケンサーで解析可能な GM パパイヤの食品中の濃度を調べる予定である。

E. 結論

次世代バイオ技術によるゲノム構造への影響に関する研究：

ニワトリ染色体 14 番 (GenBank accession no. UCD001) の π グロビン遺伝子と α グロビン遺伝子の間に存在する非コード DNA 領域 (nt no. 12080385 ~ 12080439) を標的に設計した TALEN を使用し、DSB の NHEJ と HR を確認した。NHEJ したクローン株については、ヘテロ株 2 種類とホモ株 1 種類を得た。HR したクローン株については、4.7 kb のインサート配列を挿入した TG 株 3 種類を得た。遺伝子クラスター内の 100 kb 間に存在する内在性遺伝子の発現量を比較したところ、DSB を挟む形でインサートないの遺伝子発現カセットと同じ方向の π 遺伝子と αD グロビン遺伝子で 10 ~ 100 倍の発現量の上昇が見られた。また、今後、ゲノム構造変化を解析するに当たり、野生株の細胞を使用し、グロビン遺伝子クラスター周辺の 3C 解析を行った。その結果、DT40 細胞株及び LMH 細胞株において CpGislet と αD 遺伝子間には、5.2kb と 3.8kb のループを形成していることが明らかとなった。

次世代シーケンサーを使用した新規未承認 GM 作物検知法の確立：

ゲノム解析済みの DNA 配列データをリファレンスとして、加工食品中に存在する断片化された DNA のアセンブリを行った。モデル実験には安全性未承認 GM パパイヤ PRSV-YK 系統の混入したパパイヤ加工食品 (パパイヤ茶) を使用した。その結果、次世代シーケンスで解

読可能なインプットデータとして 37.174 Mean quality score で、4,005 Mb、38,747,994 (アダプタートリミング後、% of 30 bases: 95.64%) リード数を得た。今後は、導入された全配列を迅速かつ精確に解読する方法を構築する予定である。

F. 研究発表

論文発表：

1. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
2. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
3. Nakamura, K., Sakagami, H., Asanuma-Date, K., Nagasawa, N., Nakahara, Y., Akiyama, H., Ogawa, H. Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures. *Carbohydrate Research*, 382, 77-85, 2013.
4. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
5. Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60, 283-288, 2013
6. Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136, 895-901, 2013
7. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.
8. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
9. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase

- chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya. *Journal of AOAC International*, 96, 1054-1058, 2013.
10. Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 32, 728-735, 2013.
 11. Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, 2012
 12. Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
 13. Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research*, 94, 89-97, 2012
 14. Mano, J., Harada, M., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Iizuka T. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516, 2012
- 学会発表：
1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013年11月.
 2. Ogawa, H., Kano, F., Otsuki, T., Hoshino, H., Nakamura, K., Mori, H., Sakagami, H. Characterization of the anti-HIV-1 mechanism of a pseudoproteoglycan produced by conjugating unsulfated dextran with poly-L-lysine. the 22nd International Symposium on Glycoconjugates, Dalian, China, 2013年6月.
 3. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. *Pharma-nutrition 2013*, Singapore, 2013年4月.
 4. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメの場合) 第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
 5. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月

6. 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第50回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013年11月
7. 真野潤一、波田野修子、布藤 聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美: ダイレクトリアルタイムPCRによる食品分析の可能性検証、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
8. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
9. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
10. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
11. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、最上(西巻)知子、手島玲子、長澤栄史、近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種のPCR-RFLPを用いた迅速同定法の検討、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
12. 近藤一成、中村公亮、野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ、手島玲子、最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
13. 坂田こずえ、小櫃冴未、中村公亮、小林友子、野口秋雄、福田のぞみ、最上(西巻)知子、手島玲子、近藤一成: クサウラベニタケおよび近縁種のPCR-RFLPを用いた迅速同定法(第2報): 加熱、消化処理サンプルへの適用、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
14. 東城雄満、西野浩史、中村公亮、近藤一成、深谷 崇、大平真義、中西和樹: シリカモノリスペースによる複雑系穀物マトリックスからDNAの抽出・精製、第106回日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013年11月
15. 伊東篤志、田口朋之、田名網健雄、羽田聖治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、佐々木伸大、山口友紀絵、宮原 平、山田晃世、小関良宏: DNA マイクロアレイによるGMOスクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
16. 中村公亮、穠山浩、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来DNAを高感度に検出するためのPCRプライマー設計について、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
17. 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月
18. 真野潤一、原田美央子、波田野修子、布藤 聡、峯岸恭孝、則武寛通、飯塚太由、中村

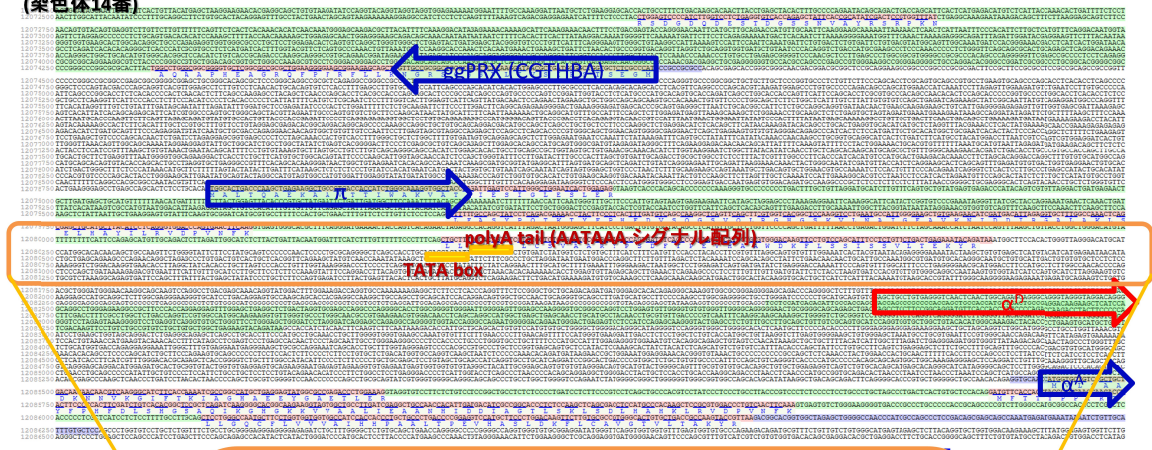
公亮、穂山 浩、手島玲子、高畠令王奈、古井 聡、橘田和美：遺伝子組換え農産物網羅的検知法の単一試験室による妥当性確認、2013 年度 AOAC International 日本セッション年次大会、東京、2013 年 6 月。

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

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A. ニワトリゲノム配列
(染色体14番)



B.



■ TALEN標的配列
■ 標的配列から<400 bp
■ 標的配列から<800 bp

C.

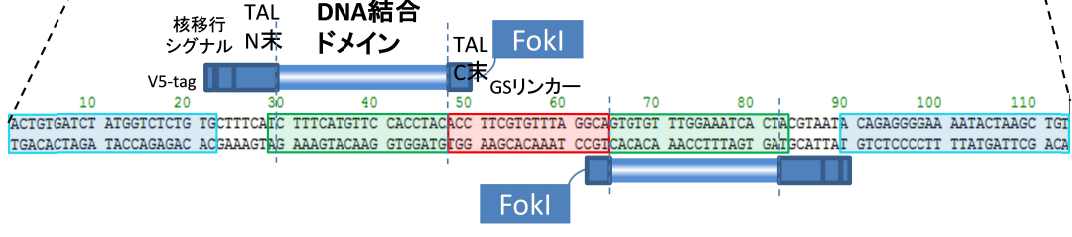


Fig.1 TALEN を使用した標的配列 DNA2 本鎖切断
(A)ニワトリ染色体 14 番(GenBank accession no. UC001, nt no. 12080385 ~ 12080439)を標的に DSB するように設計した。(B)TALEN 標的部より両端<400bp 及び>800bp の配列を示す。(C)TALEN の DNA 結合ドメインと FokI 切断部位を示す。

V5-tag
MGKPIPPLLGLDST

核移行シグナル
GGMAPKKKRKVDGG

TAL N末
VDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTVAQHHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLT
VAGELRGPPLQLDTGQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN

TAL-FokI Fw

DNA 結合ドメイン 18.5 repeats ※0 番目の T は N 末ドメインで結合

LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1st Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2nd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	3rd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	5th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	6th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	7th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	8th Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	9th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	10th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	11th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	12th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	13th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	14th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	15th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	16th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	17th Repeat ; NI → A
LTPQVVAIASHDGGRPALE	18th Repeat ; HD → C

TAL-FokI Rv

DNA 結合ドメイン 18.5 repeats ※0 番目の T は N 末ドメインで結合

LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1st Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2nd Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	3rd Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4th Repeat ; NN → G
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	5th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	6th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	7th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	8th Repeat ; NG → T
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	9th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	10th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	11th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	12th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	13th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	14th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	15th Repeat ; NI → A
LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	16th Repeat ; HD → C
LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	17th Repeat ; NI → A
LTPQVVAIASHDGGRPALE	18th Repeat ; HD → C

TAL C末
SIVAQLSRPDPALAALTNHDLVALACLGGRRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVA

Gly-Serリンカー
GS

FokI
QLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRY
VEENQTRNKHINPNEWKVPYSSVTEFKFLVSGHFHGKGYKAQLTRLNHNITCNGAVLSVEELIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF*

Fig.2 TALEN アミノ酸配列

設計した TALEN のアミノ酸配列を機能ドメインに分けて示した。N 末→C 末：V5-tag、核移行シグナル、TAL N 末、DNA 結合ドメイン(TAL-FokI Fw と TAL-FokI Rv)、TALC 末、Gly-Ser リンカー、FokI

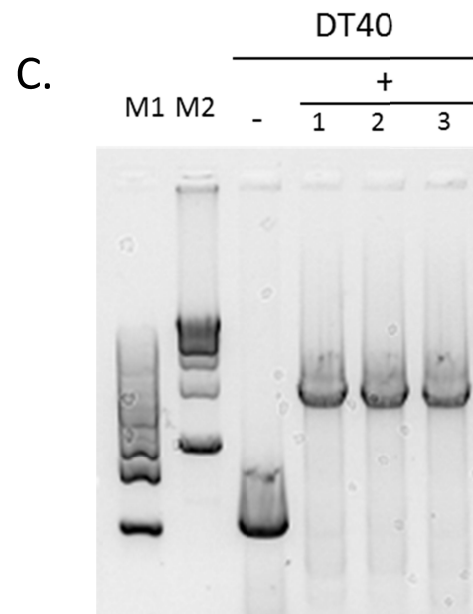
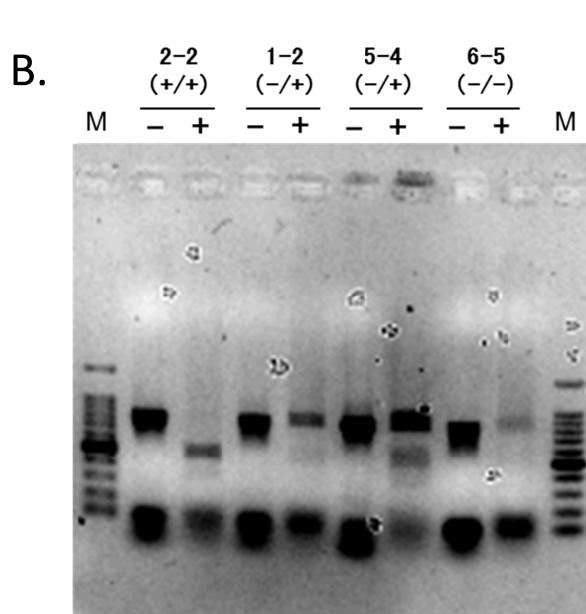
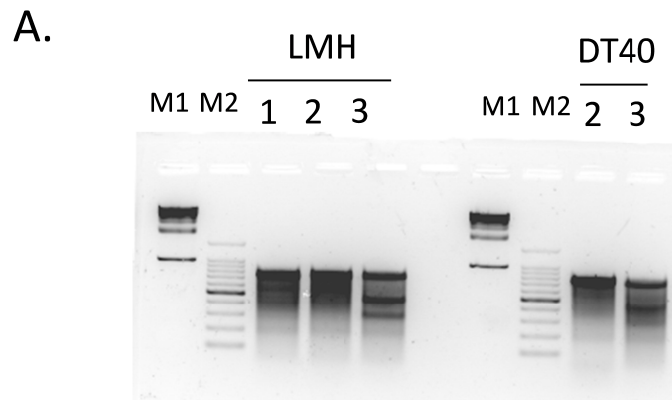


Fig.3 TALEN を使用したゲノム配列ノックアウト、ノックイン細胞株の作成

ニワトリ LMH 細胞及び DT40 細胞を使用し、設計した TALEN の標的配列の切断を Cel1 アッセイより確認した。レーン 1, ブランク細胞 (OptiM 培地のみ、ベクター無); レーン 2, pmaxGFP ベクターを導入した細胞; レーン 3, TALEN/R を導入した細胞; レーン M1, 1 kb DNA ladder marker; レーン M2, 100 b DNA ladder marker

制限酵素 (HpyAV) アッセイ法によるノックアウトクローン株の確認 クローン 2-2 (野生株), クローン 1-2 (ヘテロ株), クローン 5-4 (ヘテロ株), クローン 6-5 (ホモ株) レーン M: 100 b DNA ladder marker +, HpyAV 処理後; -, HpyAV 処理前

C. PCR によるノックインクローン株の確認 レーン 1~3, クローン株 1~3; レーン -, 野生株細胞; レーン M1, 100 b DNA ladder marker; レーン M2, 1 kb DNA ladder marker

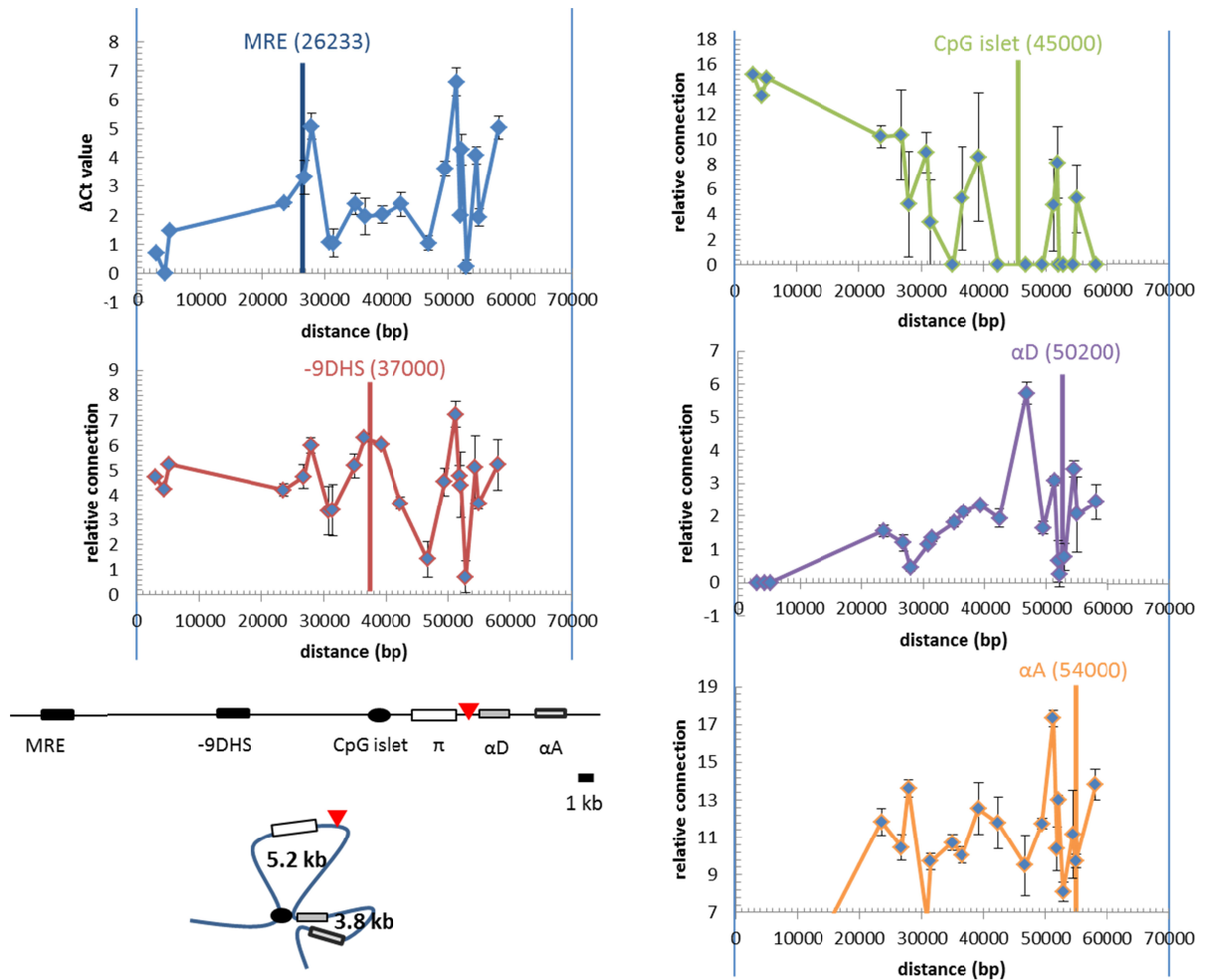


Fig.4 3C analysis (DT40 細胞株)

ゲノムを *Bgl*III, *Bam*HI 処理し、3C 解析に供した。染色体構造パターン解析 (70 kb 範囲) を示す。

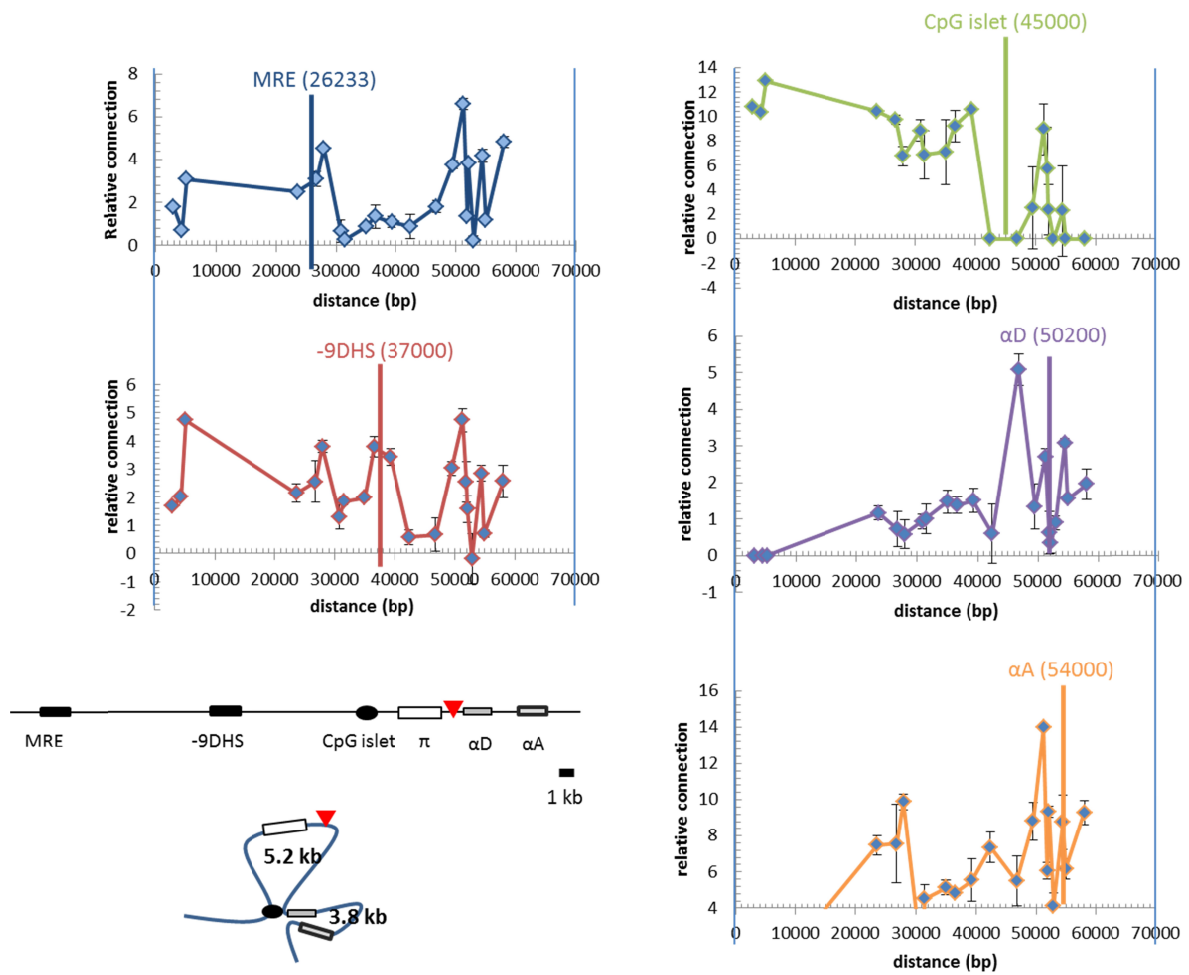


Fig.5 3C analysis (LMH 細胞株)

ゲノムを *Bgl*III, *Bam*HI 処理し、3C 解析に供した。染色体構造パターン解析 (70 kb 範囲) を示す。

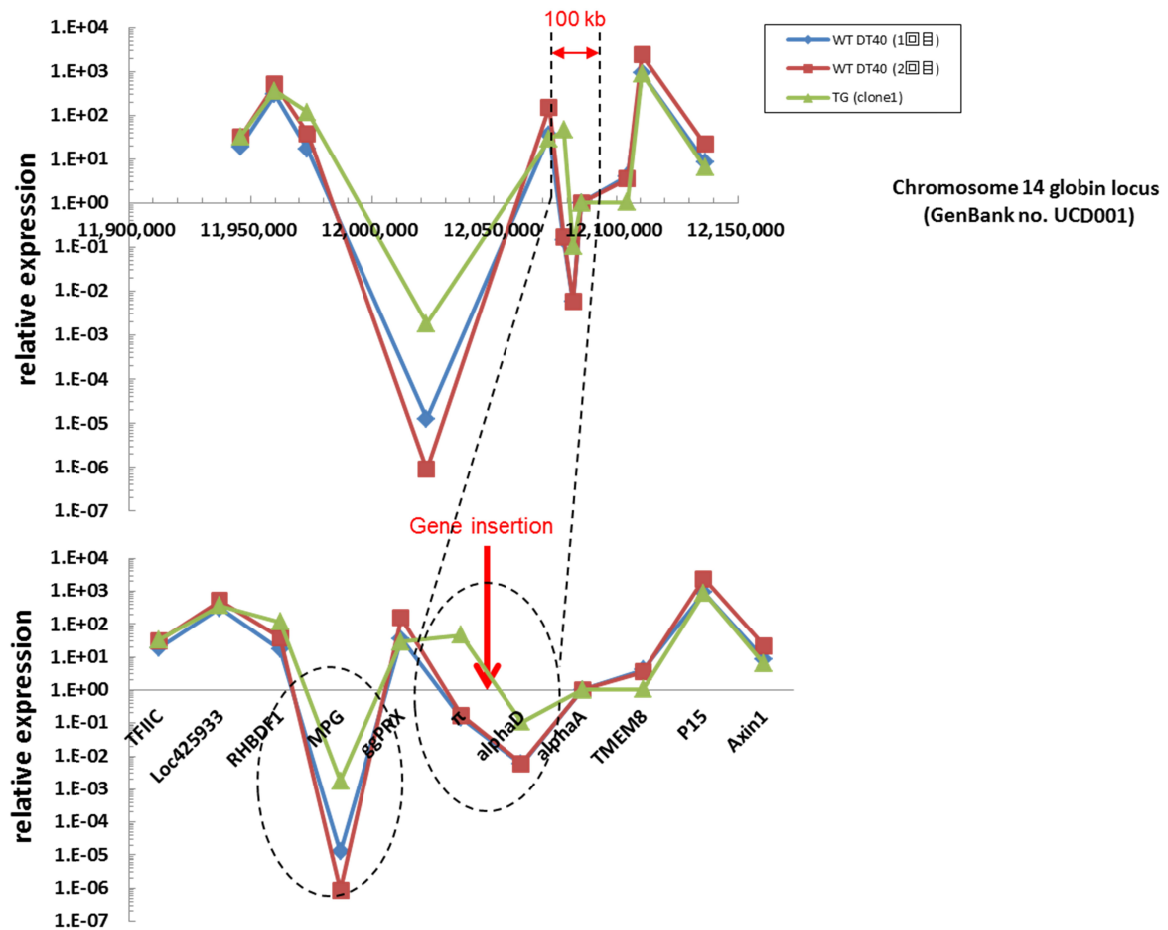
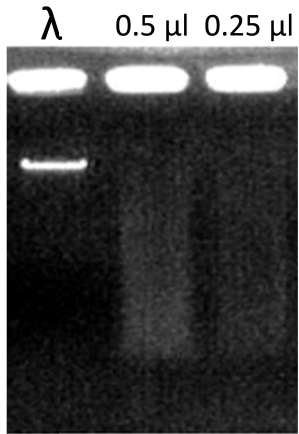


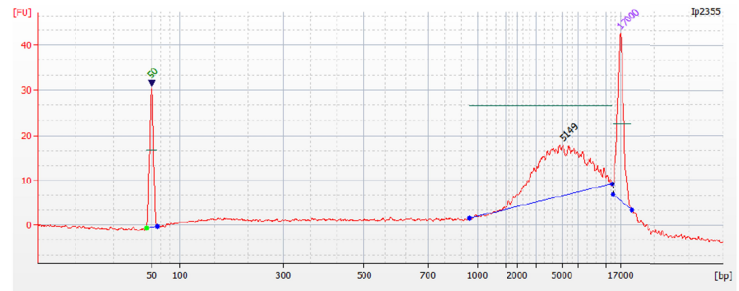
Fig.6 周辺配列の遺伝子発現量の比較

TALENにより作成したTG株の100 kb内に存在する内在性遺伝子の発現パターンをRT-PCR法より解析した。

A.



B.



C.

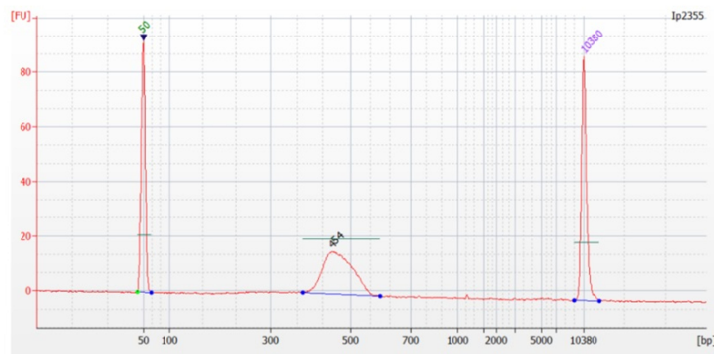


Fig.7 パパイヤ加工食品の次世代シーケンシング解析試料調整

A.パパイヤ加工食品（パパイヤ茶）から精製したゲノム DNA アガロース（1% [w/v]）電気泳動図を示す。

B.バイオアナライザーにより解析したゲノム DNA の分解度（平均 DNA 鎖長 5149 bp）

C.アダプター結合させた IlluminaHiseq シーケンシングに供したパパイヤゲノム断片（400～500 bp）

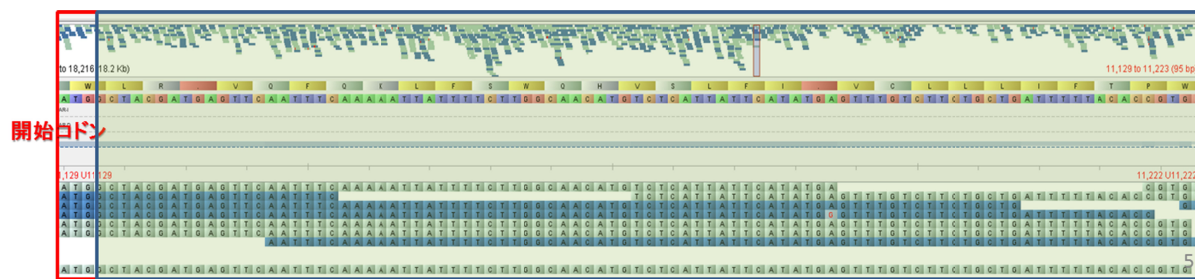


Fig.8 illuminaHiSeq で得られた配列のマッピング解析一例
 Plaza にて提供されているパパイアゲノム配列 (Rainbow ゲノム配列[Nature, 452, 991-996, 2008]) をリファレンスとして、パパイア内在性遺伝子 (GenBank accession no. AY803756) をマッピングした例を示す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

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

研究分担者	吉松嘉代	医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 育種生理研究室長
研究協力者	河野徳昭	医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 主任研究員
研究協力者	島田浩章	東京理科大学基礎工学部生物工学科 教授
研究協力者	草野博彰	東京理科大学基礎工学部生物工学科 助教

研究要旨

遺伝子組換え（GM）植物のうち、薬用 GM 植物、環境浄化用 GM 植物及び食用作物を用いた産業用 GM 植物に関する情報を収集し、また、新規植物育種法（NBT：New Breeding Techniques）の開発状況を調査した。得られた情報を分類するカテゴリーとして、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、産業用及び NBT の 10 種類を設定した。国内の状況について調査した結果、24 件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：7 件（1 件は治療薬と重複）、経口ワクチン：1 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：0 件、抗体医薬：1 件、治療薬：4 件（1 件は機能性食品と重複）、診断薬・試薬：0 件、環境浄化：1 件、産業用（バイオ燃料）：1 件、NBT：7 件であった。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013 年に公表・出版された論文等を調査した結果、83 件が得られ、その内訳は、機能性食品：27 件（香料に関する 10 件を含む）、経口ワクチン：4 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：3 件、抗体医薬：7 件、治療薬：19 件（5 件は他の項目と重複）、診断薬・試薬：3 件（2 件は他の項目と重複）、環境浄化：14 件（1 件は治療薬と重複）、産業用：0 件、NBT：9 件（4 件は他の項目と重複）であり、国別の件数は、中国：30 件が最も多かった。

NBT は急速な発展の途上にある技術である。そこで、本分野の技術潮流を把握するため、NBT の植物への応用例について文献調査を行った。とくに、遺伝子工学的手法による従来の遺伝子組換え法の代替法となると考えられる、ZFN、TALEN、CRISPR の 3 手法を対象を絞った調査では、TALEN 及び、CRISPR が積極的に植物へ利用されている実態が明らかになった。また、今年度は TALEN 応用モデル植物の構築を開始する方針を固め、ホストとする予定であるマーカー遺伝子導入組換えイネを候補のひとつとして準備した。今後、標的コンストラクトのコピー数の解析等を行い、TALEN によりマーカー遺伝子の破壊等を計画している。

A. 研究目的

遺伝子組換え生物 (genetically modified organism, GMO) は、植物分野においては、経口ワクチン等の医薬品生産(薬用 GM 植物) や土壌浄化等(環境浄化用 GM 植物)の目的への利用が年々増加している。これらの新 GMO は、従来の除草剤耐性の食用植物などの GM 植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性が高い。また、近年、植物の分子育種技術は長足の進化を遂げており、いわゆる New Plant Breeding Techniques (NBT)に含まれる育種技術のなかには、標的とする遺伝子領域に正確に目的遺伝子を導入可能なものや、標的とする遺伝子領域のみを正確に破壊するような技術が開発されている。

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

また、これらの非食用 GM 植物ならびに NBT 応用植物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知技術の確立を行うことを目的とする。

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

本研究では、NBT を用いた作物と非食用組換え作物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知技術の確立を行う。遺伝子組換え食品の安全性確保に関する研究は既に行われているが、NBT による改変の場合は、ゲノム中に組換えの痕跡が残らない、または残っても非常にわずかなものであるため、それらを在来の PCR 法で検知することは困難と考えられる。本研究においてはそのような検出の困難な組換え体を検知のターゲットとし、次世代型シーケンサー等を活用した新規検知法の開発に取り組む点が独創的である。

B. 研究方法

1. GM 植物及び NBT 開発状況の調査

GM 植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲、土壌、水源、大気中の有害物質を高蓄積する GM 植物を環境浄化用 GM 植物の範囲、生分解性プラスチック、バイオ燃料等の工業用途の物質を生産する GM 植物を工業用 GM 植物の範囲(但し、食用作物のみ)とした。これら GM 植物及び NBT(図 1)に関する情報を文献データベース (Scifinder®、検索語「transgenic plant」)、インターネット (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、産業用及び NBT の 10 種類を設定した。

2. NBT ゲノム編集技術の概要

研究方法について述べる上で基礎的な情報として、NBT ゲノム編集技術(図 1)の概要、特に、ZFN、TALEN 及び CRISPR の概要を以下にまとめた。

ZFN (Zinc Finger Nuclease)

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

TALEN

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

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

CRISPR/Cas9 (CRISPR)

現在のところ、NBT とされるものの中では最新の技術である。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR Associated)は、細菌や古細菌における獲得免疫の機構を利用したものであり、標的配列と相補的なガイド RNA(gRNA)に誘導され、Cas9ヌクレアーゼが標的配列を特異的に認識し、切断する。

標的塩基配列に対する相補的な塩基配列 (guide RNA)を破壊に用いるので TALEN よりも簡便標的を認識する部位が標的部の一か

所のみであるため、TALEN と比較して、off-target 活性が高いとされる。

3. NBT 応用状況の文献調査

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

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で ZFN については、ZFN、zinc finger、plant、TALEN については、TALEN(s)、TAL effector、plant、そして CRIPR については CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、をキーワードとして検索を行った。

検索結果から、まず、植物を対象として遺伝子編集を行った論文を抽出し、リスト化した。

次に、残る検索結果から、植物以外を対象としたものなどを除き、NBT 各技術に関する基礎科学的な知見を記した論文や、総説等を合わせてリスト化した。また、上記の 2 リストについて、発表年別に集計し、グラフ化した。

4. NBT 応用モデル植物の作製基盤整備

NBT を植物へ応用し、モデルを作製することにより、今後の NBT 応用植物の検知法等の開発の基盤整備を行うため、下記の 2 つのアプローチ手法を計画した。

ケース 1. NBT 応用植物 (モデル) を作成する

step 1. NBT を適用する植物を作成・入手する

step 2. マーカー遺伝子を NBT により破壊する

step 3. 作成した NBT 応用植物を解析に利用する

ケース 2. NBT 応用植物を入手し、解析する

step 1. NBT 応用植物を入手する

step 2. 入手した NBT 応用植物を解析に利用する

まず、上記のケース 1を実施するため、表現形質で NBT による遺伝子変異の導入の確認を容易にするため、マーカー遺伝子を従来法の遺伝子導入法で導入した組換え体イネを作出または入手する。同時に、TALEN 技術の習得を進め、同技術を用いて、作出または入手したマーカー遺伝子（たとえば *-glucuronidase* : GUS）を発現するイネ組換え体を材料として、マーカー遺伝子を破壊するモデル実験を行う。

ケース 2の実施については、TALEN の技術を適用したイネ遺伝子変異体のうち、TALEN のコンストラクトが残存し機能するものを入手し、これを用いてカルス培養時に TALEN により生じる遺伝子変異の各種性状について情報の収集を行う。現在、被譲渡可能な TALEN 応用植物について、国内の NBT の関連研究者らと情報交換、調整を進めているところである。

C. 研究結果

1. GM 植物及び NBT 開発状況の調査

国内の状況について、第 31 回日本植物細胞分子生物学会（札幌）大会・シンポジウム講演要旨集で調査した結果、24 件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：7 件（1 件は治療薬と重複）、経口ワクチン：1 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：0 件、抗体医薬：1 件、治療薬：4 件（1 件は機能性食品と重複）、診断薬・試薬：0 件、環境浄化：1 件、産業用（バイオ燃料）：1 件、NBT：7 件であり、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した（表 1-3）。

また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013 年に公表・出版

された論文等を調査した結果、83 件が得られ、その内訳は、機能性食品：27 件（香料に関する 10 件を含む）、経口ワクチン：4 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：3 件、抗体医薬：7 件、治療薬：19 件（5 件は他の項目と重複）、診断薬・試薬：3 件（2 件は他の項目と重複）、環境浄化：14 件（1 件は治療薬と重複）、産業用：0 件、NBT：9 件（4 件は他の項目と重複）であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。また、2013 年の国別の件数は、中国：30 件が最も多かった（表 4-10）。

2. NBT 応用状況の文献調査

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で各 NBT について検索し、検索結果について、基礎技術に関する論文や総説を除き、植物に NBT を適用した論文のみを抽出した（表 11-13）。その他の基礎技術に関する論文や総説については、表 14-16 にまとめた。また、年度別の論文数推移について、全体の総数の推移と、植物への実施数のそれぞれをグラフ化した（図 2、図 3）。

これらの NBT 適用植物リストおよびグラフから、伺える NBT の利用動向は下記のとおりである。（論文数は 2014 年 3 月 5 日現在のもの。）

ZFN の植物への応用について、キーワード：ZFN、zinc finger nuclease、plant で検索したところ、適用植物：シロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆の 4 種、12 報の報告が認められた。ZFN の適用範囲はモデル植物が中心であり、応用例はマメ科にとどまっている。

TALEN の植物への応用について、キーワード：TALEN(s)、TAL effector、plant で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ（*N. tabacum*）、トウモロコシ、*Brassica oleracea*（アブラナ科）、*Brachypodium*（イネ科、セルロースバイオマス増産研究のモデル植物として期待される）大麦の 7 種、11 報の報告が認められた。TALEN は 2010 年からモデル植

物をはじめ、実用作物である穀類へと広く適用されている。

CRISPR/Cas の植物への応用について、キーワード：CRISPR, cas9, plant, arabidopsis, nicotiana、で検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、タバコ(*N. tabacum*)、*Nicotiana benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケの 8 種、14 報の報告が認められた。CRISPR の植物への応用は 2013 年に Nature Biotechnology に 3 報が同時に報告されたのを皮切りに、論文数が急速に増加しており、短期間に 8 種(ゼニゴケを含む)の植物に適用されていることは注目すべき点である。

研究が実施された国別でみると、NBT 研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループが活動する米国の報告数が多く、中国、とくに Chinese Academy of Sciences からの報告数が多い。今後、中国の動向については注意して見守る必要があると考えられる。

上記の適用例数は、ZFN は標的部位の設計に塩基配列の制限がある、TALEN は標的部位の配列の自由度は高いがタンパク質で塩基配列を認識するためコンストラクトの設計が煩雑、CRISPR は標的部位の自由度が高く、標的部位に相補的な塩基配列(guide DNA, gRNA)の設計のみが必要とされるといった各 NBT の技術的特徴、とくに、いかに簡便であるかをよく反映していると考えられ、技術的に簡便な CRISPR が急速に適用例を増やしている実態が明らかになった。

ただし、現在のところ、CRISPR は TALEN と比較して特異的認識部位(標的配列)が一か所であるため、off-target 活性が高いとされ、TALEN と CRISPR のどちらが優れているかは、操作の簡便さのみではなく、標的配列特異性などを詳細に検討する必要があると考えられる。

3. (ケース1) NBT モデル植物作出のための基盤整備

NBT 文献調査の結果等をふまえ、本研究においては、まず TALEN を利用した遺伝子編集を実際に試行することとした。

NBT を適用したモデル植物を作成する上で、ホストとなる植物は、NBT による遺伝子破壊・変異の効果が目視等簡便な方法で確認できるように GUS 等のマーカー遺伝子を有していることが望ましい。

そこで、今年度は本研究の研究協力者である、東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章教授より、同教授らの作出した、GUS 遺伝子に OsMacI 遺伝子の 5'非翻訳領域を付加した、-glucuronidase (GUS)タンパク質を高効率に発現する UTRc::GUS rice (Ref.1)の種子の譲渡を受けた。

UTRc::GUS rice に導入されているマーカー遺伝子(GUS)の発現コンストラクト(図4)を構成する遺伝子群は下記のとおりである。

- ・イネ (*Oryza sativa*)由来 UTRc (OsMacI 遺伝子 5' 非翻訳領域)
- ・カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来 35S プロモーター(35S-Pro)
- ・アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*)由来ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター(NOS-Pro)
- ・アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*)由来ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター(NOS-ter)
- ・大腸菌(*E. coli*)由来ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)
- ・大腸菌(*E. coli*)由来カナマイシン耐性遺伝子 (NPT II)
- ・アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*)由来 T-DNA 境界配列(LB, RB)

今後、UTRc::GUS rice をホストとして、本コンストラクト中の GUS 遺伝子を標的として TALEN のモジュールを設計し、二本鎖切断による変異導入の形態及び効率等の解析を計画している。

なお、この遺伝子組換え体は導入コンストラクトのコピー数が確定していない。TALEN 導

入のためのホストとしては、標的のコンストラクトは 1 コピーであることが望ましいため、realtime-PCR 法等でコピー数の確認ののち、TALEN 応用モデル植物構築に使用する予定である。

4. (ケース2)TALEN 応用植物の導入についての検討

上記の UTRc::GUS rice に加え、本研究においては、農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターゲノム機能改変研究ユニット土岐精一ユニット長より、TALEN を適用し、WAXY 遺伝子(イントロン)に変異を導入したイネ TALEN コンストラクトを有する組換え体について譲渡を受けることも検討している。

本組換え体については TALEN コンストラクトがゲノムに挿入されているため、カルスで培養を行った際の、培養期間、培養条件に応じた二本鎖切断(Double Strand Break, DSB)の発生形態、頻度の解析に用いることができる見込みである。

5. TALEN コンストラクト構築技術の習得

TALEN の技術習得のため、2014 年 3 月 26 日~28 日に広島大学で開催される「ゲノム編集コンソーシアム」(主宰:広島大学理科学研究科数理分子生命理学専攻分子遺伝学研究室山本卓教授)主催の第 7 回人工ヌクレアーゼ作製講習会(Platinum TALEN の作製)に参加する予定である。

D. 考察

国内の GM 植物及び NBT 研究・開発状況について調査した結果、24 件の情報が得られ、そのうち、機能的食品:7 件、NBT:7 件であり、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で調査した結果、83 件が得られ、そのうち、機能的食品:27 件、治療薬:19 件、環

境浄化:14 件が多かったが、NBT:9 件であり、本キーワードでは NBT に関する情報の取得が難しいことが伺えた。

そこで今年度は、NBT ゲノム編集に着目し、その植物分野への応用の状況について論文の調査を行ったところ、同技術が積極的に植物へ利用されはじめている実態が明らかになった。特に TALEN 及び CRISPR の植物への使用が急速に進んでいることが判明し、本研究においては両技術の動向を注視すべきと考えられる。

遺伝子編集技術分野の技術革新は急速に進んでおり、今後、いずれの技術が主流となるのか、現在のところ未知である。また、今後出現するであろう新技術についても注意深く情報収集を続ける必要があると考えられる。

本研究においては、NBT ゲノム編集技術を利用して作出された組換え体をモデルとして入手または、作出することにより、検知法開発等に関する種々のモデル実験系の構築が可能になり、組換え植物の食品への混入検知法の開発等、厚生労働行政に貢献する研究成果が挙げられると考えられる。

E. 結論

GM 植物及び NBT 研究・開発状況について調査した結果、国内では NBT に関する研究が徐々に増えている実態が明らかになった。今年度は、TALEN や CRISPR/Cas9 といった NBT のうちゲノム編集技術の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、特に TALEN と CRISPR が積極的に植物へ利用されている実態が明らかになった。なかでも、CRISPR の植物への利用の急伸は特筆に値する。

また、今年度は TALEN 応用モデル植物の構築から試行を開始する方針を固め、ホストとする予定であるマーカー遺伝子導入組換え体 UTRc::GUS rice を候補のひとつとして準備した。今後、標的コンストラクトのコピー数の解析等を行い、TALEN によりマーカー遺伝子の破壊等を試み、遺伝子の破壊形態等の解析に用

いる予定である。

F. 文献

Ref. 1) A long 5'UTR of the rice OsMac1 mRNA enabling the sufficient translation of the downstream ORF. Teramura, H., Enomoto, Y., Aoki, H., Sasaki, T., and Shimada, H. Plant Biotechnology 29, 43-49 (2012) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.1209a

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【資料】

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

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

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

図 1. New Plant Breeding Techniques (NBT)

表 1. 国内での NBT 研究・開発状況

NBTの種類	作物	演題	研究・開発機関
NBT①	シロイヌナズナ	安本周平, 關光, 福島エリオデット, 佐久間哲史, 山本卓, 村中俊哉: 植物テルペノイド代謝工学への人工ヌクレアーゼTALENの利用, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-04, p.96, 2013年9月.	日本・阪大院・工・生命先端, 広大院・理
NBT⑦-2	タバコ	福澤徳穂, 一町田紀子, 増田税, 松村健: Cucumber mosaic virus (CMV) ベクターを基としたアグロインフュージョンシステムの開発, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-09, p.199, 2013年9月.	日本・産総研・生物プロセス, 北大院農
NBT⑦-2	タバコ	谷内田藍, 志村華子, 増田税: ロベリアにおけるアントシアニン合成経路のVIGS制御, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-31, p.273, 2013年9月.	日本・北大院農
NBT⑥	イネ	小沢憲二郎, 川東弘幸, 若佐雄也, 高岩文雄: アグロバクテリウム法を用いたイネ相組換え系のさらなる効率化, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-57, p.299, 2013年9月.	日本・農生研
NBT⑥	イネ	雑賀啓明, 森明子, 遠藤真咲, 刑部敬史, 土岐精一: イネにおけるジーンターゲットング効率の評価系の開発, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-62, p.304, 2013年9月.	日本・生物研・ゲノム機能改変, 埼玉大・環境科学研究センター, 横浜市大・木原生研
NBT①	イネ	笹岡大暉, 望月真衣, 大里修一, 佐久間美子, 近藤聡, 村本伸彦, 杉本広樹, 光川典弘, 大音徳, 太田邦史: イネにおけるゲノム再編誘発技術「TAQing システム」の発現制御, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-63, p.305, 2013年9月.	日本・明治大・農, 理研・基幹研, トヨタ自動車・バイオラボ, 豊田中研・バイオ研, 東大・総合文化
NBT⑦-1	タバコ	川口大地, 山内靖雄, 杉本幸裕, 水谷正治: アグロインフィルトレーション法による植物発現系を用いた植物代謝酵素の機能解析, 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-67, p.309, 2013年9月.	日本・神戸大院・農・生命機能科学

表2. 国内でのGM植物（機能性食品）研究・開発状況

区分	作物	演題	研究・開発機関
機能性食品	シロイヌナズナ	平井優美, 李一蒙, 荒木良一, 澤田有司, 西澤治, 斉藤和季, 小川俊也: グルコシノレート生合成を制御するMYB転写因子の機能解析. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集Aa-07, p.85, 2013年9月.	日本・理研PSC, 理研CSRS・JST-CREST, 東北林業大学, キリン株式会社, 千葉大院・薬
機能性食品	タバコ(培養細胞BY-2)	中塚貴司, 佐々木伸大, 山田恵理, 藤田晃平, 高橋秀行, 今村智弘, 鈴木万里子, 小関良宏, 辻村郁子, 齋藤美沙, 坂本裕一, 西原昌宏: タバコ培養細胞BY-2を用いたベタレイン色素合成系の確立. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Aa-12, p.90, 2013年9月.	日本・静岡大院・農・共生バイオ, 岩手生工研セ, 農工大・工・生命
機能性食品	レタス(葉緑体遺伝子の位置特異的組換え)	佐々木貴子, 小川拓水, 岡澤敦司, 三沢典彦, 太田大 策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスの代謝プロファイル. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-03, p.151, 2013年9月.	日本・大阪府立大学・生環・細胞代謝機能学, 石川県立大学・生物資源工学研究所
機能性食品	クラミドモナス(藻類)	木平 成子, 梶川昌孝, 福澤秀哉: 遺伝子改変によるスクアレン蓄積緑藻の作出. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-12, p.202, 2013年9月.	日本・京大院・生命
機能性食品	テンサイ	吉田みどり, 松平洋明, 田村健一: チモシーのフルクタン合成酵素遺伝子を導入した組換えテンサイによるレバンの生産. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-92, p.333, 2013年9月.	日本・(独)農研機構・北海道農業研究センター
機能性食品	ジャガイモ	梅基直行, 佐々木勝徳, 大山清, 山下まり, 水谷正治, 関光, 斉藤和季, 村中俊哉: グリコアルカロイド生合成遺伝子群の同定について. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-01, p.93, 2013年9月.	日本・キリン(株)・基盤研, 理研CSRS, 東工大院・理工, 東北大院・農, 神戸大院・農, 阪大院・工・, 千葉大院・薬
機能性食品, 治療薬	ジャガイモ	大山清, 斉藤和季, 村中俊哉, 梅基直行: ステロイドアルカロイド生合成の改変による有用サボニンの蓄積. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ap-02, p.94, 2013年9月.	日本・東工大院・理工, 理研CSRS, 千葉大院・薬, 阪大院・工, キリン(株)・基盤研

表3. 国内でのGM植物（経口ワクチン、食用医薬、抗体医薬、治療薬、環境浄化、バイオ燃料）研究・開発状況

区分	作物	演題	研究・開発機関
経口ワクチン	イネ	佐生麗, 星光隆成, 齊藤雄飛, 田中聖実, 森田麗人, 佐藤茂, 増村威宏: 経口ワクチン用キャリアーを目標したイネ種子PB-1の特定部位への外来タンパク質局在化と消化酵素耐性に関する研究. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ca-12, p.146, 2013年9月.	日本・京都府大院・生命環境, 京都農技セ・生資セ
食用医薬	イネ	菊田桃香, 佐生麗, 星光隆成, 森田麗人, 佐藤茂, 増村威宏: 抗腫瘍タンパク質を発現するイネに関する研究. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Ca-13, p.147, 2013年9月.	日本・京都府立大学院・生命環境, 京都府立大学・生命環境学部, 京都農技セ・生資セ
食用医薬	ダイズ(主要な貯蔵タンパク質である7S及び11Sグロブリンを欠失した変異ダイズ系統JQ)	寺川雅彦, 豊谷川久和, 瓦林純, 島田康, 丸山伸之, 石本政秀, 東海林幹夫: アルツハイマー病エビトープ融合タンパク質のダイズへの高蓄積化と予防効果. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-01, p.149, 2013年9月.	日本・北興化学・開発研, 弘前大院・医京都大院・農・生物研
食用医薬	イネ	赤岡一仁, 後藤香樹, 越智ありさ, 二川健: 廃用性筋萎縮の予防と治療を目的とした健康機能性米の開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-02, p.150, 2013年9月.	日本・鳥根大・生資, 鶴島大・生体栄養
抗体医薬	タバコ	永利友佳里, 池田美穂, 高木優: シロイヌナズナ At1BH1遺伝子を用いた植物工場適性植物の開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-68, p.310, 2013年9月.	日本・産総研・バイオプロセス, 埼玉大学・環境科学
治療薬	ハナビシソウ	山田 泰之, 本村幸也, 島田友直, 小倉康平, 宮本忠司, 加藤伸彦, 小山知剛, 佐藤文彦: イソキリソールアルカロイド生合成系を制御する転写因子 CJWRKY1 の機能解析. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Aa-09, p.87, 2013年9月.	日本・京大院・生命科学, サントリー・生科材因・生有研
治療薬	イネ	高岩文雄, 工藤孝子, 太田寛, 梅原真, 若佐雄也: 転写因子IL-7のイネ種子胚乳中での発現によって誘導される小胞体ストレス. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集2Aa-10, p.200, 2013年9月.	日本・農業生物資源研・組換えセンター・機能性作物
治療薬	イネ	藤原結博, 高岩文雄, 梅原真, 関川麗二: 組換えイネによるサイトカイン(IL-4, IL-6)の発現と精製. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-91, p.332, 2013年9月.	日本・プリバンテック, 農業生物資源研
環境浄化	タバコ(BY-2培養細胞)	増山文博, 保倉明子, 阿部知子, 平野智也, 寺田靖子, 佐野 俊夫: 放射光分光 X線分析によるタバコBY-2培養細胞におけるCd蓄積機構の解明. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集P-75, p.317, 2013年9月.	日本・東京電機大学・院・工学研, 理研・イノベーションセンター, 理研・仁科センター, JASRI, 法政大学・生命科学・生命機能学科
バイオ燃料	イネ	古川佳世子, 瀧川隆, 岡本和典, 伊藤 幸博: 老化誘導プロモーターとセルラーゼを用いた高糖化性イネの開発. 第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集1Cp-07, p.155, 2013年9月.	日本・東北大・農, 弘前大・農学生命

表 4. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（NBT、試薬、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
NBT⑦-1、治療薬	タバコ	フランス: Angany Genetics, Fr.	Gomord, Veronique; Fitchette, Anne Catherine; Faye, Loic, "Cloning, hydroponic transfection, expression and IMAC affinity purification of recombinant allergens in <i>Nicotiana benthamiana</i> ", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013186495 A1 20131219.
NBT⑦-1、治療薬	タバコ	フランス: Angany Genetics, Fr.	Gomord, Veronique; Fitchette, Anne Catherine; Faye, Loic, "Cloning, hydroponic transfection, expression and IMAC affinity purification of recombinant allergens in <i>Nicotiana benthamiana</i> ", Fr. Demande (2013), FR 2991996 A1 20131220.
NBT⑦-2	植物	韓国: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	Moon, Jae Sun; Lee, Su Heon; Kim, Sung Uk; Yoo, Ran Hee; Lim, Seung Mo; Lim, Hyoun Sub; Hwang, In Gyu, "SYCMV-derived recombinant viral vector, and use thereof", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013154233 A1 20131017.
NBT⑥	植物	中国: Southwest University	Pei, Yan; Zou, Xiuping, "Gene-auto-excision binary carrier for controlling biosafety of transgenic plant by sexual reproduction", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013000279 A1 20130103.
NBT④	植物	米国: E. I Du Pont De Nemours and Company, USA; Pioneer Hi-Bred International	Kurek, Itzhak; Magonigle, Brian; Zhu, Genhai, "Silencing genes using artificial microRNAs and expression constructs with high degree of sequence specificity", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013063487 A1 20130502.
NBT⑧	植物	中国: The Chinese University of Hong Kong	Chui, Ceon Fai; Yu, Wai Chang, "Method for preparation of plant cell minichromosome by transforming first vector containing telomeric repetitive sequence and second vector containing recombination site", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103289959 A 20130911.
NBT①	シロイヌナズナ	英国: Department of Genetics, Cell Biology, and Development and Center for Genome Engineering, University of Minnesota	Christian Michelle; Qi Yiping; Zhang Yong; Voytas Daniel F, "Targeted mutagenesis of <i>Arabidopsis thaliana</i> using engineered TAL effector nucleases", G3 (Bethesda, Md.) (2013), 3(10), 1697-705.
NBT⑧、試薬	チコリー	インド: Department of Biotechnology, Faculty of Science Jamia Hamdard	Ohadi R, Mehrnaz S; Alvari, Amene; Samim, M; Abdin, Malik Z, "Plant bio-transformable HMG-CoA reductase gene loaded calcium phosphate nanoparticle: in vitro characterization and stability study", Current Drug Discovery Technologies (2013), 10(1), 25-34.
NBT③-1、治療薬	オタネニンジン	韓国: Inje University, Industry-Academy Cooperation Foundation	Heo, Gyeong Hye; Choi, Yong Uli, "Panax ginseng dammarenediol synthase gene promoter region, its sequence and use in constructing genetic vectors for generating transgenic plants with increased resistances and ginsenoside content", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013132082 A 20131204.

表 5. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（環境浄化、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
環境浄化	タバコ	韓国: Department of Environment Horticulture The University of Seoul	Jeoung, Yoon-hwa; Kim, Young-Nam; Kim, Kwon-Rae; Kim, Kye-Hoon, "Physiological response and cadmium accumulation of MuS1 transgenic tobacco exposed to high concentration of Cd in soil: implication to phytoremediation of metal contaminated soil", Korean Journal of Soil Science and Fertilizer (2013), 46(1), 58-64.
環境浄化	タバコ (BY-2細胞)	中国: Biotechnology Research Center, Chenggong Campus Kunming University of Science and Technology	Chen, Qi; Wu, Kong-Huan; Wang, Ping; Yi, Jia; Li, Kun-Zhi; Yu, Yong-Xiong; Chen, Li-Mei, "Overexpression of MsALMT1, from the Aluminum-Sensitive <i>Medicago sativa</i> , Enhances Malate Exudation and Aluminum Resistance in Tobacco", Plant Molecular Biology Reporter (2013), 31(3), 769-774.
環境浄化	植物	中国: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China	Xu, Wenzhong; Ma, Mi; Chen, Yanshan, "Application of PvARRP1 protein and its encoding gene of <i>Pteris vittata</i> in arsenic transporters detoxification and accumulation", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102899348 A 20130130.
環境浄化	タバコ	中国: Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Guo, Chuanlong; Li, Song; Zhou, Lei; Wang, Lin, "Plant expression vector of Glycine max Tamba gene SGF14a for effectively increasing aluminum resistance of plants", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103045640 A 20130417.
環境浄化	タバコ	中国: Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Chen, Qi; Wu, Konghuan; Li, Kunzhi; Yu, Yongxiong, "Plant expression vector of soybean Tamba black C2H2-type zinc-finger protein gene STOP1 and its use in enhancing AL toxicity resistance of plant", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102952822 A 20130306.
環境浄化	植物	中国: Kunming University of Science and Technology	Chen, Limei; Chen, Qi; Wu, Konghuan; Li, Kunzhi; Yu, Yongxiong, "", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102952821 A 20130306.
環境浄化	タバコ、ヤセイカンラン、アルファルファ、カラシナ	中国: Qingdao University of Science and Technology	Zhang, Yuanyuan; Liu, Junhong; Zhang, Yuyan; Gong, Tingyun; Wang, Jing, "Method for repairing polluted soil with transgenic plant- <i>Clonostachys rosea</i> system", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103042025 A 20130417.
環境浄化	植物、シロイヌナズナ	中国: Wuxi BIOGoodland Biotechnology Co., Ltd.	Xue, Yong, "Method for repairing polluted environment with transgenic plant transformed with genes RhlA and RhlB", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103146742 A 20130612.
環境浄化	タバコ	中国: Kunming University of Science and Technology	Li, Kunzhi; Wang, Yuying; Xu, Huini; Chen, Limei, "Plant expression vector containing celery serine acetyltransferase gene SAT", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103215306 A 20130724.
環境浄化	トウモロコシ	中国: Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, The Ministry of Agriculture Chinese Academy of Agricultural Sciences	Hou, Wen-tong; Yang, Li-ping; Chen, Ru-mei; Zhang, Shao-jun, "Effects of <i>Aspergillus niger</i> phyA2 transgenic maize on utilization of organic phosphorus in soil", Zuowu Xuebao (2013), 39(8), 1360-1365.
環境浄化	植物	中国: Shanghai Ruifeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Peop. Rep. China; Shanghai Academy of Agricultural Sciences	Peng, Rihe; Yao, Quanhong; Wang, Rongtan; Fu, Xiaoyan; Tian, Yongsheng; Zhao, Wei; Yan, Peilan; Zang, Xiaoyun; Wang, Bo; Wang, Lijuan, "A method for enhancing degradation of PAHs by using transgenic plants transformed with P 450 monooxygenase gene and glutathione S-transferase gene", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103468738 A 20131225.
環境浄化	タバコ	トルコ: Department of Soil Science and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture Mustafa Kemal University	Daghan, Hatice; Arslan, Mehmet; Uygur, Veli; Koleli, Nurcan, "Transformation of Tobacco with ScMTII Gene-Enhanced Cadmium and Zinc Accumulation", Clean: Soil, Air, Water (2013), 41(5), 503-509.
環境浄化	シロイヌナズナ	日本: Hiroshima University, Japan	Kuroda, Akio; Hirota, Ryuichi, "Transgenic plants having <i>Ralstonia</i> -derived phosphite dehydrogenase gene and cultivation of the plants", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013031429 A 20130214.
環境浄化、治療薬	ハッカ	インド: Plant Biology Laboratory, Drug Development/Diagnostics & Biotechnology Division CSIR-Indian Institute of Chemical Biology	Sinha, Ragini; Bhattacharyya, Dipto; Majumdar, Aparupa Bose; Datta, Riddhi; Hazra, Saptarshi; Chattopadhyay, Sharmila, "Leaf proteome profiling of transgenic mint infected with <i>Alternaria alternata</i> ", Journal of Proteomics (2013), 93, 117-132.

表 6. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（機能性食品その 1）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
機能性食品	ナガミノアマナズナ	英国: Department of Biological Chemistry and Crop Protection, Rothamsted Research	Ruiz-Lopez Noemi; Haslam Richard P; Napier Johnathan A; Sayanova Olga, "Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop", The Plant Journal : for cell and molecular biology (2013).
機能性食品	ナタネ、シロイヌナズナ	オーストラリア: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia; Grains Research and Development Corporation; Nuseed Pty. Ltd.	Petrie, James Robertson; Singh, Surinder Pal; De Feyter, Robert Charles, "Production of long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plant cells", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013185184 A2 20131219.
機能性食品	植物	カナダ: University of Alberta	Weselake, Randall; Pan, Xue; Siloto, Rodrigo, "Method for enrichment of oils with polyunsaturated fatty acids using phospholipid acyltransferases and desaturase", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013181761 A1 20131212.
機能性食品	植物	韓国: Chungnam University Industry Collaboration Foundation, S. Korea	Park, Yeon Il; Shin, Dong Ho, "Arabidopsis thaliana PTR2 gene utilized as anthocyanin biosynthesis regulator for controlling accumulation of anthocyanin pigment in plant", Repub. Korea (2013), KR 1337243 B1 20131205.
機能性食品	ダイズ	韓国: Dong-A University, Research Foundation for Industry-Academy Cooperation	Jung, Yeong Su; Lee, Jae Heon; Kim, Mi Jin; Kim, Hye Jeong; Park, Jeong Hun; Hong, Ha Nui, "Psy-2a-tp-crt1 multi-expression gene for increasing carotenoid content of transgenic plant, and method for manufacturing transgenic plant with increased carotenoid content", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013022520 A 20130307.
機能性食品	イネ	韓国: National Institute of Crop Science, Rural Development Administration	Baek, So-Hyeon; Shin, Woon-Chul; Ryu, Hak-Seung; Lee, Dae-Woo; Moon, Eunjung; Seo, Chum-Sun; Hwang, Eunson; Lee, Hyun-Seo; Ahn, Mi-Hyun; Jeon, Youngju; Kang, Hyeon-Jung; Lee, Sang-Won; Kim, Sun Yeou; D'Souza, Roshan; Kim, Hyeon-Jin; Hong, Seong-Tshool; Jeon, Jong-Seong, "Creation of resveratrol-enriched rice for the treatment of metabolic syndrome and related diseases", PLoS One (2013), 8(3), e57930.
機能性食品	イネ	韓国: Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, "Polynucleotide for biosynthesis of zeaxanthin and transgenic plant using the same", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013055708 A 20130529.
機能性食品	イネ	韓国: Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, " ", Repub. Korea (2013), KR 1229887 B1 20130208.
機能性食品	イネ	韓国: Rural Development Administration	Ha, Seon Hwa; Kim, Jae Gwang; Jung, Ye Sol; Lim, Seon Hyeong; Lee, Yeon Hui; Ku, Bon Seong; Kim, Yeong Mi; Lee, Jong Ryeol, "Polynucleotide utilized for biosynthesis of astaxanthin, and method for producing transgenic plants with anti-oxidant property using the same", Repub. Korea (2013), KR 1229885 B1 20130208.
機能性食品	植物	中国: Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences	Li, Mimi; Hang, Yueyu; Sun, Xiaojin; Pang, Hui; Li, Ying; Guo, Jianlin; Yan, Qinqin, "Brassica carinata fatty acid elongase, its encoded gene and application thereof", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102978172 A 20130320.
機能性食品	ダイズ	中国: Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences	Liu, Baohui; Kong, Fanjiang; Cao, Dong, "Glycine max glucose phosphate transporter gene and its protein", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103352040 A 20131016.
機能性食品	トウモロコシ	中国: State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University	Wang, Meizhen; Liu, Chen; Li, Shixue; Zhu, Dengyun; Zhao, Qian; Yu, Jingjuan, "Improved nutritive quality and salt resistance in transgenic maize by simultaneously overexpression of a natural lysine-rich protein gene, SBGLR, and an ERF transcription factor gene, TSRF1", International Journal of Molecular Sciences (2013), 14(5), 9459-9474, 16 pp.
機能性食品	イネ	中国: State Key Laboratory of Agrobiotechnology, School of Life Sciences, The Chinese University of Hong Kong	Long, Xiaohang; Liu, Qiaocun; Chan, Manling; Wang, Qing; Sun, Samuel S. M., "Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine", Plant Biotechnology Journal (2013), 11(4), 490-501.
機能性食品	ナタネ	中国: Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing	Nie, X.; Zhao, Z. P.; Chen, G. P.; Zhang, B.; Ye, M.; Hu, Z. L., "Brassica napus possesses enhanced antioxidant capacity via heterologous expression of anthocyanin pathway gene transcription factors", Russian Journal of Plant Physiology (2013), 60(1), 108-115.

表 7. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（機能性食品その 2）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
機能性食品	植物	中国: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences; Runke Biological Engineering (Fujian) Co., Ltd.	Huang, Junchao; Zhong, Yujuan; Jiang, Yue, "Method for producing astaxanthin with transgenic plant", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102888425 A 20130123.
機能性食品	トウモロコシ	米国: Department of Agronomy, Iowa State University Ames	Kanobe Mily N; Rodermeil Steven R; Bailey Theodore; Scott M Paul, "Changes in endogenous gene transcript and protein levels in maize plants expressing the soybean ferritin transgene", Frontiers in plant science (2013), 4, 196.
機能性食品	植物	中国: Northeast Normal University, Peop. Rep. China	Pang, Jinsong; Yu, Xiaoming; Jiang, Lili; Li, Ning; Yu, Qian; Xia, Qiong; Liu, Bao, "A method for increasing the starch content of transgenic plant using multi-gene transformation and cultivation", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103173485 A 20130626.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Catinot, Jeremy; Schwaar, Joanne, "Genetic modulation of β -damascenone in tobacco plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013064499 A1 20130510.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Catinot, Jeremy; Schwaar, Joanne, "Genetic modulation of β -damascenone in tobacco plants", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2586792 A1 20130501.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bakher, Nicholas; Bindler, Gregor Nicholas; Blanc, Michel Philippe; Goepfert, Simon; Martin, Florian, "Isopropylmalate synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses for modulating sucrose esters and producing β -methylvaleric acid in transgenic plants", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2565265 A1 20130306.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bakher, Nicholas; Bindler, Gregor Nicholas; Blanc, Michel Philippe; Goepfert, Simon; Martin, Florian, "Isopropylmalate synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses for modulating sucrose esters and producing β -methylvaleric acid in transgenic plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013029799 A1 20130307.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Sierro, Nicolas, "Threonine synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses to modulate methionine in transgenic plant cells", Eur. Pat. Appl. (2013), EP 2565271 A1 20130306.
機能性食品(香料)	タバコ	スイス: Philip Morris Products S.A.	Bovet, Lucien; Sierro, Nicolas, "Threonine synthase from Nicotiana tabacum and methods and uses to modulate methionine in transgenic plant cells", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013029800 A1 20130307.
機能性食品(香料)	チャノキ	中国: Zhejiang University	Lu, Jianling; Fan, Fangyuan; Liu, Yang; Li, Nana; Zheng, Xinqiang; Liang, Yuerong, " ", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103224946 A 20130731.
機能性食品(香料)	植物	日本: Suntory Holdings Ltd.	Nakamura, Noriko, "Cloning of cDNAs for linalool synthases and application to breeding of plant transformants with altered fragrance", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013013406 A 20130124.
機能性食品(香料)	植物	日本: Suntory Holdings Ltd.	Nakamura, Noriko, "Cloning of cDNAs for terpenoid synthases and application to breeding of plant transformants with altered fragrance", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013074829 A 20130425.
機能性食品(香料)	植物	米国: Chromatin, Inc., USA; The Ohio State University	Blakeslee, Joshua; Cornish, Katrina; Crasta, Oswald; Folkerts, Otto; Jessen, Dave; Nair, Ramesh, "Enhanced farnesene production in metabolically engineered transgenic plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013106868 A1 20130718.

表 8. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
経口ワクチン	植物	台湾: National Taiwan University	Chan, Hui Ting; Chia, Min Yuan; Do, Yi Yin; Pang, Victor Fei; Jeng, Chian Ren; Huang, Pung Ling, "Oral vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome produced by plant and use thereof", Taiwan, (2013), TW 391487 B 20130401.
経口ワクチン	タバコ	中国: First Affiliated Hospital of Medical College Xi'an Jiaotong University	Liu, Hongli; Li, Xukui; Li, Wensheng; Si, Lusheng; Zheng, Jin, "Transgenic tobacco expressed HPV16-L1 and LT-B combined immunization induces strong mucosal and systematic immune response in mice", Human Vaccines & Immunotherapeutics (2013), 9(1), 83-89.
経口ワクチン	トマト	中国: Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Northwest University	Guo, Bin; He, Wei; Wu, Daochang; Che, Delu; Fan, Penghui; Xu, Lingling; Wei, Yahui, "Proteomic Analysis of Tomato (Lycopersicon esculentum var. cerasiform) Expressing the HBsAg Gene by 2-dimensional Difference Gel Electrophoresis", Plant Foods for Human Nutrition (New York, NY, United States) (2013), 68(4), 424-429.
経口ワクチン	タバコ	ロシア: All-Russia Research Institute for Agricultural Biotechnology	Tarasenko, I. V.; Taranov, A. I.; Firsov, A. P.; Dolgov, S. V., "Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants", Applied Biochemistry and Microbiology (2013), 49(8), 695-701.
食用医薬	植物	米国: University of Arkansas-Jonesboro	Cramer, Carole L.; Dolan, Maureen C.; Medrano, Giuliana; Radin, David N., "Plant-based expression of avian interleukin-12 and methods of producing and using same", U.S. (2013), US 8431774 B1 20130430.
食用医薬	トマト	米国: University of California, USA	Fogelman, Alan M.; Reddy, Srinivasa T.; Navab, Mohamad, "Edible transgenic plant expressing active apolipoprotein or mimetic peptide for use in modulating disease by altering plasma levels of LPA, SSA, paraoxonase and HDL index", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013148214 A1 20131003.
食用医薬	トマト	米国: University of California, USA	Fogelman, Alan M.; Reddy, Srinivasa T.; Navab, Mohamad, "Edible transgenic plant expressing active apolipoprotein or mimetic peptide for use in modulating disease by altering plasma levels of LPA, SSA, paraoxonase and HDL index", U.S. Pat. Appl. Publ. (2013), US 20130344173 A1 20131226.
ワクチン抗原	タバコ、イネ、フタ、スラッシュ、ジュバイン	中国: College of Horticulture and Gardening Yangtze University	Tang, Wei; Page, Michael, "Inducible expression of Norwalk virus capsid protein gene in plant cell suspension cultures", In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant (2013), 49(2), 129-136.
ワクチン抗原	植物	米国: Pharma Green LLC	Golovkin, Maxim, "Methods and compositions to produce vaccines against smallpox in plants", U.S. Pat. Appl. Publ. (2013), US 20130266608 A1 20131010.
ワクチン抗原	タバコ	チェコスロバキア: Biology Centre AS CR Institute of Plant Molecular Biology Ceske Budejovice	Briza, Jindrich; Vlasak, Josef; Ryba, Stepan; Ludvikova, Viera; Niedermeierova, Hana, "Transformation of tobacco cpDNA with fusion E7GGG/GUS gene and homologous recombination mediated elimination of the marker gene", Biotechnology & Biotechnological Equipment (2013), 27(2), 3644-3648.

表 9. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（抗体医薬、試薬、治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
抗体医薬	タバコ	カナダ: Department of Chemical Engineering McMaster University	Mayani, Mukesh; Filipe, Carlos D. M.; McLean, Michael D.; Hall, J. Christopher; Ghosh, Raja, "Purification of transgenic tobacco-derived recombinant human monoclonal antibody", Biochemical Engineering Journal (2013), 72, 33-41.
抗体医薬	ハウサイ	中国: College of Life Science Qingdao Agricultural University	Zhao, Mei-Ai; An, Song-Ji; Lee, Suk-Chan; Kim, Do-Sun; Kang, Byoung-Cheol, "Overexpression of a Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody Confers Unstable Resistance to TuMV in Chinese Cabbage", Plant Molecular Biology Reporter (2013), 31(6), 1203-1211.
抗体医薬	タバコ	インド: Department of Biochemistry, C.B.S.H. G. B. Pant University of Agriculture and Technology	Dobhal, S.; Chaudhary, V. K.; Singh, A.; Pandey, D.; Kumar, A.; Agrawal, S., "Expression of recombinant antibody (single chain antibody fragment) in transgenic plant Nicotiana tabacum cv. Xanthi", Molecular Biology Reports (2013), 40(12), 7027-7037.
抗体医薬	イネ	韓国: Department of Biological Engineering Inha University	Kwon, Jun-Young; Jeong, Sun-Hee; Choi, Ji-Won; Pak, Yun-Young; Kim, Dong-Il, "Assessment of long-term cryopreservation for production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell suspension cultures", Enzyme and Microbial Technology (2013), 53(3), 216-222.
抗体医薬	イネ	韓国: Inha University, Department of Biological Engineering	Kwon, Jun-Young; Yang, Yong-Suk; Cheon, Su-Hwan; Nam, Hyung-Jin; Jin, Gi-Hong; Kim, Dong-Il, "Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures", Biotechnology and Bioengineering (2013), 110(9), 2412-2424.
抗体医薬	タバコ	キューバ: Department of Monoclonal Antibody Production Center for Genetic Engineering and Biotechnology Havana	Gomez, Leonardo; Padilla, Sigifredo; Fuentes, Alejandro; Ruiz, Yoslane; Gonzalez, Tatiana; Somoza, Margarita; Lopez, Lisette; Sanchez, Julio; Gavilan, David; Espinosa, Elio; Avila, Yenisleydis; Mendoza, Otto; Masforrol, Yordanka; Garcia, Cristina; La, O. Maylin; Valdes, Rodolfo, "Assessment of two transgenic tobacco plant varieties for the HBsAg-specific plantibody production", Journal of Agronomy (2013), 12(1), 11-19.
抗体医薬	タバコ	ドイツ: Department Plant Biotechnology, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME)	Vasilev Nikolay; Gromping Ulrike; Lipperts Anja; Raven Nicole; Fischer Rainer; Schillberg Stefan, "Optimization of BY-2 cell suspension culture medium for the production of a human antibody using a combination of fractional factorial designs and the response surface method", Plant biotechnology journal (2013), 11(7), 867-74.
試薬	タバコ	オランダ: Keygene N.V.	Bouwmeester, Hendrik Jan; Henquet, Maurice Gerard Leon; Jongma, Maarten Anthonie, "Plant genes of drimenol biosynthesis and their use in drimenol manufacture", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013058655 A1 20130425.
治療薬、試薬	イネ	中国: Engineering Research Center for Plant Biotechnology and Germplasm Utilization, Ministry of Education, State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences Wuhan University	An, Na; Ou, Jiquan; Jiang, Daiming; Zhang, Liping; Liu, Jingru; Fu, Kai; Dai, Ying; Yang, Daichang, "Expression of a functional recombinant human basic fibroblast growth factor from transgenic rice seeds", International Journal of Molecular Sciences (2013), 14, 3556-3567.
治療薬	タバコ	イラン: Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture Tarbiat Modares University	Goojani, Hojat Ghasemi; Javaran, Mokhtar Jalali; Nasiri, Jaber; Goojani, Esmaeel Ghasemi; Alizadeh, Houshang, Expression and Large-Scale Production of Human Tissue Plasminogen Activator (t-PA) in Transgenic Tobacco Plants Using Different Signal Peptides", Applied Biochemistry and Biotechnology (2013), 169(6), 1940-1951.
治療薬	オタネニンジン	韓国: Kangwon National University, University-Industry Cooperation Foundation	Choi, Yong Ui; Han, Jeong Yeon; Kim, Hyeon Jung, "Composition for promoting biosynthesis of protopanaxadiol containing CYP716A47 protein or it encoding protein, a host cell or transgenic plant transfected with recombinant vector containing the gene or plasmid", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013049270 A 20130514.

表 10. 2013 年の薬用、環境浄化用、工業用（食用作物）GM 植物及び NBT 研究・開発状況（治療薬）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
治療薬	イネ	韓国:NBM Co., Ltd.	Kwon, Tae Ho, "Transgenic plant <i>Oryza sativa</i> producing light chain protein of human enterokinase and use thereof", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013113765 A 20131016.
治療薬	イネ	韓国:NBM Co., Ltd.	Kwon, Tae Ho, "Transgenic plant <i>Oryza sativa</i> producing light chain protein of human enterokinase and use thereof", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013151211 A1 20131010.
治療薬	植物	韓国:Rural Development Administration	Kim, Hyeon Uk; Lee, Gyeong Ryeol; Kim, Jong Beom; Noh, Gyeong Hui; Kim, Sun Hui, "Polypeptide, gene derived from cytochrome b5 of castor, composition and method for promoting hydroxy fatty acid production of plant", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2013), KR 2013011325 A 20130130.
治療薬	タバコ	中国:College of Animal Science and Technology, China Agriculture University	Sun, Yan; Long, Ruicai; Kang, Junmei; Zhang, Tiejun; Zhang, Ze; Zhou, He; Yang, Qingchuan, "Molecular cloning and characterization of three isoprenyl diphosphate synthase genes from alfalfa", Molecular Biology Reports (2013), 40(2), 2035-2044.
治療薬	タバコ	中国:Henan Agricultural University	Zhao, Mingqin; Wang, Jing; Yun, Fei; Liu, Guoshun; Zhang, Songtao; Yang, Yongfeng; Jia, Hongfang, "Cloning of nicotine biosynthesis-related PMT2 gene promoter and application in regulating biosynthesis of nicotine", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 102851287 A 20130102.
治療薬	油料作物	中国:Jilin Agricultural University, Peop. Rep. China; Bioreactor Engineering Co., Ltd., Jilin Agricultural University	Jiang, Chao; Li, Xiaokun; Li, Haiyan; Tian, Haishan; Yang, Jing; Wang, Lan; Chen, Yubin; Jin, Libo, "Vegetable oil body gel preparation containing KGF2", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103417954 A 20131204.
治療薬	シソ	中国:Laboratory of Food Additives and Nutrition, College of Food Engineering and Biological Technology Tianjin University of Science and Technology	Lu, Xiaoling; Hao, Lei; Wang, Fang; Huang, Chen; Wu, Shuwei, "Molecular cloning and overexpression of the tyrosine aminotransferase (TAT) gene leads to increased rosmarinic acid yield in <i>Perilla frutescens</i> ", Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2013), 115(1), 69-83.
治療薬	タンジン	中国	Liu, Dehu, "Application of human basic fibroblast growth factor fusion gene", Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103319609 A 20130925.
治療薬	イネ、ダイズ、エンバク、ニホンカボチャ、シロイヌナズナ	日本:Kyushu University, Japan; National Institute of Agrobiological Resources (Niar)	Kumamaru, Toshihiro; Fukuda, Masako; Sato, Mio; Sato, Hikaru; Kawagoe, Yasushi, "Cloning and application of the genes which are involved in accumulation of plant storage proteins", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013066465 A 20130418.
治療薬	植物	日本:Suntory Holdings Ltd.	Ono, Eiichiro; Tsuruoka, Nobuo, "Cloning of gene for monoterpene glycosyltransferase from <i>Thea sinensis</i> and its application", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2013), JP 2013176361 A 20130909.
治療薬	サトウキビ	米国:Department of Biological and Agricultural Engineering Texas A&M University	Barros, G. O. F.; Ballen, M. A. T.; Woodard, S. L.; Wilken, L. R.; White, S. G.; Damaj, M. B.; Mirkov, T. E.; Nikolov, Z. L., "Recovery of bovine lysozyme from transgenic sugarcane stalks: extraction, membrane filtration, and purification", Bioprocess and Biosystems Engineering (2013), 36(10), 1407-1416.
治療薬	植物	米国:J.R. Simplot Company, USA	Rommens, Caius M.; Shakya, Roshani; Ye, Jingsong, "Aureusidin-producing transgenic plants", PCT Int. Appl. (2013), WO 2013169369 A1 20131114.

表11. NBT 応用植物に関する文献調査結果(ZFN)

keywords: ZFN/zinc finger nuclease/plant

ID	Year	Applied plant species	Affiliation, country
Identifiers		Title	
		Description	
		Details	
1	2013	soybean	University of Minnesota, MN, USA
PMID:23996306	Targeted mutagenesis for functional analysis of gene duplication in legumes. Curtin SJ, Anderson JE, Starker CG, Baltes NJ, Mani D, Voytas DF, Stupar RM. Methods Mol Biol. 2013;1069:25-42. doi: 10.1007/978-1-62703-613-9_3.		
2	2013	Arabidopsis thaliana	University of Minnesota, MN, USA
PMID:23979943	Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Qi Y, Li X, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. G3 (Bethesda). 2013 Oct 3;3(10):1707-15. doi: 10.1534/g3.113.006270.		
3	2013	Arabidopsis	University of Minnesota, MN, USA
PMID:23282329	Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in Arabidopsis by manipulating DNA repair pathways. Qi Y, Zhang Y, Zhang F, Baller JA, Cleland SC, Ryu Y, Starker CG, Voytas DF. Genome Res. 2013 Mar;23(3):547-54. doi: 10.1101/gr.145557.112. Epub 2013 Jan 2.		
4	2013	Arabidopsis	Leiden University, Leiden, The Netherlands
PMID:23279135	ZFN-mediated gene targeting of the Arabidopsis protoporphyrinogen oxidase gene through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. de Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. Plant Biotechnol J. 2013 May;11(4):510-5. doi: 10.1111/pbi.12040. Epub 2012 Dec 28.		
5	2011	soybean	University of Minnesota, MN, USA
PMID:21464476	Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM. Plant Physiol. 2011 Jun;156(2):466-73. doi: 10.1104/pp.111.172981. Epub 2011 Apr 4.		
6	2011	Nicotiana tabacum	King Abdullah University of Science and Technology, Kingdom of Saudi Arabia
PMID:21262818	De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 8;108(6):2623-8. doi: 10.1073/pnas.1019533108. Epub 2011 Jan 24.		
7	2011	Arabidopsis	University of Minnesota, MN, USA
PMID:21181530	Targeted mutagenesis in Arabidopsis using zinc-finger nucleases. Zhang F, Voytas DF. Methods Mol Biol. 2011;701:167-77. doi: 10.1007/978-1-61737-957-4_9.		
8	2010	Arabidopsis thaliana	University of Minnesota, MN, USA
PMID:20508152	High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):12028-33. doi: 10.1073/pnas.0914991107. Epub 2010 May 27.		
9	2010	Arabidopsis	NIAS, Tsukuba, Japan
PMID:20508151	Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):12034-9. doi: 10.1073/pnas.1000234107. Epub 2010 May 27.		
10	2009	Arabidopsis	Leiden University, Leiden, The Netherlands
PMID:19754840	ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. Plant Biotechnol J. 2009 Oct;7(8):821-35. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00446.x.		
11	2009	Zea mays	Dow AgroSciences, IN, USA
PMID:19404259	Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKaveler RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, et al. Nature. 2009 May 21;459(7245):437-41. doi: 10.1038/nature07992. Epub 2009 Apr 29.		
12	2005	Arabidopsis	University of Utah, UT, USA
PMID:15677315	Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 8;102(6):2232-7. Epub 2005 Jan 26.		

表12. NBT 応用植物に関する文献調査結果(TALEN)

keywords: TALEN(s)/TAL effector/plant

ID	Year	Applied plant species	Affiliation, country
Identifiers		Title	
		Description	
		Details	
1	2014	Zea mays	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24576457		Targeted Mutagenesis in Zea mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. J Genet Genomics. 2014 Feb 20;41(2):63-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001. Epub 2013 Dec 14.	
2	2014	rice	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24556552		An efficient TALEN mutagenesis system in rice. Chen K, Shan Q, Gao C. Methods. 2014 Feb 17. doi:pii: S1046-2023(14)00043-7. 10.1016/j.ymeth.2014.02.013. [Epub ahead of print]	
3	2013	Arabidopsis thaliana	University of Minnesota, MN, USA
PMID:23979944		Targeted mutagenesis of Arabidopsis thaliana using engineered TAL effector nucleases. Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. G3 (Bethesda). 2013 Oct 3;3(10):1697-705. doi: 10.1534/g3.113.007104.	
4	2013	Brassica oleracea	Southwest University, Chongqing, China
PMID:23870552		Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in Brassica oleracea. Sun Z, Li N, Huang G, Xu J, Pan Y, Wang Z, Tang Q, Song M, Wang X. J Integr Plant Biol. 2013 Nov;55(11):1092-103. doi: 10.1111/jipb.12091. Epub 2013 Sep 18.	
5	2013	barley	Aarhus University, Slagelse, Denmark
PMID:23689819		TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB. Plant Mol Biol. 2013 Oct;83(3):279-85. doi: 10.1007/s11103-013-0078-4. Epub 2013 May 21.	
6	2013	rice	Iowa State University, IA, USA.
PMID:23430045		Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice. Li T, Huang S, Zhou J, Yang B. Mol Plant. 2013 May;6(3):781-9. doi: 10.1093/mp/sst034. Epub 2013 Feb 21.	
7	2013	Brachypodium	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:23288864		Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs. Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu J, Voytas DF, Zheng X, Zhang Y, Gao C. Mol Plant. 2013 Jul;6(4):1365-8. doi: 10.1093/mp/sss162. Epub 2013 Jan 2.	
8	2013	Nicotiana tabacum	University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, China
PMID:23124327		Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. Plant Physiol. 2013 Jan;161(1):20-7. doi: 10.1104/pp.112.205179. Epub 2012 Nov 2.	
9	2012	rice	Colorado State University, CO, USA
PMID:23078195		Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (Oryza sativa) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of Xanthomonas oryzae. Verdier V, Triplett LR, Hummel AW, Corral R, Cernadas RA, Schmidt CL, Bogdanove AJ, Leach JE. New Phytol. 2012 Dec;196(4):1197-207. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04367.x. Epub 2012 Oct 18.	
10	2012	rice	Iowa State University, IA, USA.
PMID:22565958		High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Nat Biotechnol. 2012 May 7;30(5):390-2. doi: 10.1038/nbt.2199.	
11	2011	Arabidopsis	University of Minnesota, MN, USA
PMID:21493687		Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(12):e82. doi: 10.1093/nar/gkr218. Epub 2011 Apr 14.	

2014: data of 2014/1/1~3/5

表13. NBT 応用植物に関する文献調査結果(CRISPR)

keywords: CRISPR/cas9/plant/arabidopsis/nicotiana

ID	Year	Applied plant species	Affiliation, country
Identifiers		Title	
		Description	
		Details	
1	2014	Zea mays	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24576457		Targeted Mutagenesis in Zea mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. J Genet Genomics. 2014 Feb 20;41(2):63-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001. Epub 2013 Dec 14.	
2	2014	Arabidopsis	Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:24550464		Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu JK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 18. [Epub ahead of print]	
3	2014	Liverwort	Kyoto University, Kyoto, Japan
PMID:24443494		CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> L. Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T. Plant Cell Physiol. 2014 Feb 20. [Epub ahead of print]	
4	2013	crop	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24277082		Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. Chen K, Gao C. Plant Cell Rep. 2013 Nov 24. [Epub ahead of print]	
5	2013	wheat	Government of India, Punjab, India
PMID:24122057		RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8. doi: 10.1534/g3.113.008847.	
6	2013	model and crop plants	The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK
PMID:24112467		Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant Methods. 2013 Oct 11;9(1):39. doi: 10.1186/1746-4811-9-39.	
7	2013	rice	Peking University, Beijing, China
PMID:23999856		Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu LJ. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1233-6. doi: 10.1038/cr.2013.123. Epub 2013 Sep 3.	
8	2013	Arabidopsis, tobacco, sorgl	Iowa State University, IA, USA.
PMID:23999092		Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2.	
9	2013	(plant)	Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23963532		Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):2008-11. doi: 10.1093/mp/sst121. Epub 2013 Aug 22.	
10	2013	rice	Pennsylvania State University, PA, USA
PMID:23956122		RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. Xie K, Yang Y. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/sst119. Epub 2013 Aug 17.	
11	2013	Arabidopsis, rice	Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23958582		Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1229-32. doi: 10.1038/cr.2013.114. Epub 2013 Aug 20.	
12	2013	crop plants	Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:23929338		Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):686-8. doi: 10.1038/nbt.2650.	
13	2013	Nicotiana benthamiana	The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK
PMID:23929340		Targeted mutagenesis in the model plant <i>Nicotiana benthamiana</i> using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):691-3. doi: 10.1038/nbt.2655.	
14	2013	Arabidopsis and Nicotiana	Massachusetts General Hospital, MA, USA
PMID:23929339		Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and <i>Nicotiana benthamiana</i> using guide RNA and Cas9. Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):688-91. doi: 10.1038/nbt.2654.	

2014: data of 2014/1/1~3/5

表14. NBT 関連論文一覧(ZFN、植物への実施報告以外)

keywords: ZFN/zinc finger nuclease/plant

ID	Year	ShortDetails	Title	Identifiers
1	2014	Virus Genes. 2014	Inhibiting replication of begomoviruses using artificial zinc finger nucleases that target viral-conserved nucleotide motif.	PMID:24474330
2	2014	Plant Cell. 2014	DNA replicons for plant genome engineering.	PMID:24443519
3	2013	Plant Biotechnol J. 2013	Trait stacking via targeted genome editing.	PMID:23953646
4	2013	Sci Rep. 2013	Expanded activity of dimer nucleases by combining ZFN and TALEN for genome editing.	PMID:23921522
5	2013	Curr Protoc Mol Biol. 2013	Engineering customized TALE nucleases (TALENs) and TALE transcription factors by fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput (FLASH) assembly.	PMID:23821439
6	2013	Plant Mol Biol. 2013	A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta.	PMID:23625357
7	2013	Plant Physiol. 2013	Nonhomologous end joining-mediated gene replacement in plant cells.	PMID:23509176
8	2013	Nucleic Acids Res. 2013	EENdb: a database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering.	PMID:23203870
9	2013	Plant J. 2013	Nuclear gene targeting in Chlamydomonas using engineered zinc-finger nucleases.	PMID:23137232
10	2013	Transgenic Res. 2013	Analysing patent landscapes in plant biotechnology and new plant breeding techniques.	PMID:2289309
11	2012	Dev Growth Differ. 2012	Efficient targeted mutagenesis of the chordate <i>Ciona intestinalis</i> genome with zinc-finger nucleases.	PMID:22640377
12	2012	Methods Mol Biol. 2012	Targeting DNA to a previously integrated transgenic locus using zinc finger nucleases.	PMID:22351024
13	2012	Plant Physiol. 2012	Zinc finger nuclease and homing endonuclease-mediated assembly of multigene plant transformation vectors.	PMID:22082504
14	2012	J Anim Sci. 2012	Cell Biology Symposium: Zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (<i>Sus scrofa</i>) genome.	PMID:22038991
15	2011	Plant J. 2011	Localized egg-cell expression of effector proteins for targeted modification of the Arabidopsis genome.	PMID:21848915
16	2011	Plant Biotechnol Rep. 2011	Targeted genome engineering via zinc finger nucleases.	PMID:21837253
17	2011	Trends Biotechnol. 2011	Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors.	PMID:21536337
18	2011	Yi Chuan. 2011	[The mechanism and application of zinc finger nucleases].	PMID:21377968
19	2011	BMC Genomics. 2011	ZFNGenome: a comprehensive resource for locating zinc finger nuclease target sites in model organisms.	PMID:21276248
20	2011	Nat Methods. 2011	Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA).	PMID:21151135
21	2011	J Mol Biol. 2011	Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity.	PMID:21094162
23	2011	Nucleic Acids Res. 2011	Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases.	PMID:20843781
22	2010	Plant Physiol. 2010	Nontransgenic genome modification in plant cells.	PMID:20876340
24	2010	Methods Mol Biol. 2010	Validation and expression of zinc finger nucleases in plant cells.	PMID:20680844
25	2010	Methods Mol Biol. 2010	A transient assay for monitoring zinc finger nuclease activity at endogenous plant gene targets.	PMID:20680843
26	2010	Plant Mol Biol. 2010	Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion.	PMID:20454835
28	2010	PLoS One. 2010	Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases.	PMID:20111598
29	2010	Genome Res. 2010	Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases.	PMID:19952142
27	2009	J Soc Biol. 2009	[Applications of genetically modified animals].	PMID:20122391
30	2009	Methods Mol Biol. 2009	Custom-designed molecular scissors for site-specific manipulation of the plant and mammalian genomes.	PMID:19488728
31	2009	Nature. 2009	High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases.	PMID:19404258
32	2009	PLoS One. 2009	Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENGINEERING (OPEN).	PMID:19198653
33	2009	Plant Mol Biol. 2009	Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases.	PMID:19112554
34	2009	Plant J. 2009	A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells.	PMID:18980651
35	2008	Proc Natl Acad Sci U S A. 2008	Increasing cloning possibilities using artificial zinc finger nucleases.	PMID:18725642
36	2008	Mol Cell. 2008	Rapid open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification."	PMID:18657511
37	2008	FEBS Lett. 2008	Ribonuclease activity is a common property of Arabidopsis CCH-containing zinc-finger proteins.	PMID:18582464
38	2008	Arch Biochem Biophys. 2008	Redox and heavy metal effects on the biochemical activities of an Arabidopsis polyadenylation factor subunit.	PMID:18331819
39	2007	Cell Mol Life Sci. 2007	Custom-designed zinc finger nucleases: what is next?	PMID:17763826
40	2007	Nucleic Acids Res. 2007	A novel endonuclease activity associated with the Arabidopsis ortholog of the 30-kDa subunit of cleavage and polyadenylation specificity factor.	PMID:17576667
41	2006	Trends Plant Sci. 2006	Gene targeting in plants: fingers on the move.	PMID:16530459
42	2005	Plant J. 2005	High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases.	PMID:16262717
43	2005	Nucleic Acids Res. 2005	Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells.	PMID:16251401
44	2005	Biochem Biophys Res Commun. 2005	Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases.	PMID:16084494

2014: data of 2014/1/1-3/5

表15. NBT 関連論文一覧(TALEN、植物への実施報告以外)

keywords: TALEN(s)/TAL effector/plant

No.	Year	ShortDetails	Title	Identifiers
1	2014	PLoS Pathog. 2014	Code-Assisted Discovery of TAL Effector Targets in Bacterial Leaf Streak of Rice Reveals Contrast with Bacterial Blight and a Novel Susceptibility Gene.	PMID:24586171
2	2014	Mol Plant Pathol. 2014	The last half-repeat of transcription activator-like effector is dispensable and thereby TALE-based technology can be simplified.	PMID:24521457
3	2014	Planta. 2014	Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement.	PMID:24510124
4	2014	Plant Cell. 2014	The Rice TAL Effector-Dependent Resistance Protein XA10 Triggers Cell Death and Calcium Depletion in the Endoplasmic Reticulum.	PMID:24489961
5	2014	Proc Natl Acad Sci U S A. 2014	Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease.	PMID:24474801
6	2014	Biochem Biophys Res Commun. 2014	TALE activators regulate gene expression in a position- and strand-dependent manner in mammalian cells.	PMID:24380858
7	2013	PLoS One. 2013	TAL Effector Specificity for base 0 of the DNA Target Is Altered in a Complex, Effector- and Assay-Dependent Manner by Substitutions for the Tryptophan in Cryptic Repeat -1.	PMID:24312634
8	2013	Mol Plant Pathol. 2013	The broad bacterial blight resistance of rice line CBB23 is triggered by a novel transcription activator-like (TAL) effector of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:24286630
9	2013	PLoS One. 2013	ULTIMATE system for rapid assembly of customized TAL effectors.	PMID:24228087
10	2013	Int J Dev Biol. 2013	Gene targeting in plants: 25 years later.	PMID:24166445
11	2013	Int J Dev Biol. 2013	From Agrobacterium to viral vectors: genome modification of plant cells by rare cutting restriction enzymes.	PMID:24166446
12	2013	Sci Rep. 2013	Expanded activity of dimer nucleases by combining ZFN and TALEN for genome editing.	PMID:23921522
13	2013	New Phytol. 2013	Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:23879865
14	2013	PLoS One. 2013	An improved method for TAL effectors DNA-binding sites prediction reveals functional convergence in TAL repertoires of <i>Xanthomonas oryzae</i> strains.	PMID:23869221
15	2013	Curr Protoc Mol Biol. 2013	Engineering customized TALE nucleases (TALENs) and TALE transcription factors by fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput (FLASH) assembly.	PMID:23821439
16	2013	J Genet Genomics. 2013	TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants.	PMID:23790626
17	2013	Annu Rev Phytopathol. 2013	Engineering plant disease resistance based on TAL effectors.	PMID:23725472
18	2013	Trends Cell Biol. 2013	TAL effectors: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins.	PMID:23707478
19	2013	New Phytol. 2013	Breaking the DNA-binding code of <i>Ralstonia solanacearum</i> TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease.	PMID:23692030
20	2013	BMC Biotechnol. 2013	Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants.	PMID:23617583
21	2013	Nat Commun. 2013	Compact designer TALENs for efficient genome engineering.	PMID:23612303
22	2013	PLoS Comput Biol. 2013	Computational predictions provide insights into the biology of TAL effector target sites.	PMID:23526890
23	2013	Mol Plant. 2013	Characterization and DNA-binding specificities of <i>Ralstonia</i> TAL-like effectors.	PMID:23300258
24	2013	World J Microbiol Biotechnol. 2013	Identification of non-TAL effectors in <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> Chinese strain 13751 and analysis of their role in the bacterial virulence.	PMID:23296915
25	2013	Nucleic Acids Res. 2013	EENdb: a database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering.	PMID:23203870
26	2012	Proc Natl Acad Sci U S A. 2012	RNA-seq pinpoints a <i>Xanthomonas</i> TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome.	PMID:23132937
27	2012	Curr Protoc Mol Biol. 2012	Engineering designer transcription activator-like effector nucleases (TALENs) by REAL or REAL-Fast assembly.	PMID:23026907
28	2012	New Phytol. 2012	Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak.	PMID:22747776
29	2012	Nucleic Acids Res. 2012	TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction.	PMID:22693217
30	2012	PLoS One. 2012	The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA.	PMID:22384209
31	2012	Plant Mol Biol. 2012	Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification.	PMID:22271303
32	2012	Nat Protoc. 2012	A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering.	PMID:22222791
33	2012	Science. 2012	The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target.	PMID:22223736
34	2012	Microbiology. 2012	Identification of seven <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> genes potentially involved in pathogenesis in rice.	PMID:22075022
35	2011	GM Crops. 2011	TALE nucleases and next generation GM crops.	PMID:21865862
36	2011	Mol Plant Microbe Interact. 2011	Colonization of rice leaf blades by an African strain of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 Os11N3 gene.	PMID:21679014
37	2011	Mol Plant Microbe Interact. 2011	A novel regulatory role of HrpD6 in regulating hrp-hrc-hpa genes in <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:21615204
38	2011	Appl Environ Microbiol. 2011	Hpa2 required by HrpF to translocate <i>Xanthomonas oryzae</i> transcriptional activator-like effectors into rice for pathogenicity.	PMID:21478322
39	2011	Curr Opin Microbiol. 2011	TAL effectors are remote controls for gene activation.	PMID:21215685
40	2011	Mol Plant. 2011	Characterization of <i>Xanthomonas oryzae</i> -responsive cis-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene Xa13.	PMID:21208999
41	2010	Virulence. 2010	TAL effector-DNA specificity.	PMID:21178484
42	2010	Plant Cell. 2010	Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3.	PMID:21098734
43	2010	Genetics. 2010	Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.	PMID:20660643
44	2010	Mol Plant Microbe Interact. 2010	Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ(PXO99) in <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:20521952
45	2010	New Phytol. 2010	Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:20345643
46	2010	Annu Rev Phytopathol. 2010	<i>Xanthomonas</i> AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.	PMID:19400638
47	2009	Science. 2009	A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.	PMID:19933106
48	2009	Science. 2009	Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.	PMID:19933107
49	2009	Proc Natl Acad Sci U S A. 2009	A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens.	PMID:19910532
50	2009	Mol Plant Pathol. 2009	Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on OsTFIIAgamma5 for the activation of Xa27 transcription in rice that triggers disease resistance to <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	PMID:19849788
51	2007	Proc Natl Acad Sci U S A. 2007	Two type III effector genes of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> control the induction of the host genes OsTFIIAgamma1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice.	PMID:17563377

2014: data of 2014/1/1-3/5

表16. NBT 関連論文一覧(CRISPR、植物への実施報告以外)

keywords: CRISPR/cas9/plant/arabidopsis/nicotiana

ID	Year	ShortDetails	Title	Identifiers
1	2014	Planta. 2014	Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement.	PMID:24510124
2	2014	Mol Plant. 2014	Genome-Wide Prediction of Highly Specific Guide RNA Spacers for the CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Model Plants and Major Crops.	PMID:24482433
3	2014	Curr Opin Struct Biol. 2014	Fitting CRISPR-associated Cas3 into the Helicase Family Tree.	PMID:24480304
4	2014	Bioinformatics. 2014	Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases.	PMID:24463181
5	2014	Bioinformatics. 2014	CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool.	PMID:24389662
6	2014	Appl Environ Microbiol. 2014	CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping.	PMID:24162568
7	2013	Yi Chuan. 2013	[CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing].	PMID:24579309
8	2013	J Integr Plant Biol. 2013	Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing.	PMID:24373158
9	2013	Int J Dev Biol. 2013	Gene targeting in plants: 25 years later.	PMID:24166445
10	2013	Plant J. 2013	Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future.	PMID:24112784
11	2013	Syst Appl Microbiol. 2013	Phylogenetic position and virulence apparatus of the pear flower necrosis pathogen <i>Erwinia piflorinigrans</i> CFBP 5888T as assessed by comparative genomics.	PMID:23726521
12	2013	Mol Plant. 2013	Zinc fingers, TAL effectors, or Cas9-based DNA binding proteins: what's best for targeting desired genome loci?	PMID:23718948
13	2013	PLoS Genet. 2013	Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands.	PMID:23637624
14	2012	PLoS One. 2012	In vivo protein interactions and complex formation in the <i>Pectobacterium atrosepticum</i> subtype I-F CRISPR/Cas System.	PMID:23226499
15	2012	Int J Microbiol. 2012	Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens.	PMID:22934116
16	2012	PLoS One. 2012	<i>Erwinia amylovora</i> CRISPR elements provide new tools for evaluating strain diversity and for microbial source tracking.	PMID:22860008
17	2012	Mol Plant Pathol. 2012	Lipopolysaccharide biosynthesis genes discriminate between <i>Rubus</i> - and <i>Spiraeoideae</i> -infective genotypes of <i>Erwinia amylovora</i> .	PMID:22583486
18	2012	PLoS One. 2012	Identification and characterization of small RNAs in the hyperthermophilic archaeon <i>Sulfolobus solfataricus</i> .	PMID:22514725
19	2012	J Biotechnol. 2012	Insights into the completely annotated genome of <i>Lactobacillus buchneri</i> CD034, a strain isolated from stable grass silage.	PMID:22465289
20	2011	Annu Rev Genet. 2011	CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.	PMID:22060043
21	2011	Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2011	Characterization of the multiple CRISPR loci on <i>Streptomyces</i> linear plasmid pSHK1.	PMID:21705768
22	2011	RNA Biol. 2011	Csy4 is responsible for CRISPR RNA processing in <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .	PMID:21519197
23	2011	Appl Environ Microbiol. 2011	Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen <i>Erwinia amylovora</i> .	PMID:21460108
24	2010	BMC Genomics. 2010	Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen <i>Enterococcus faecium</i> and identification of a large transferable pathogenicity island.	PMID:20398277
25	2009	FEMS Microbiol Lett. 2009	Analysis of CRISPR system function in plant pathogen <i>Xanthomonas oryzae</i> .	PMID:19459963
26	2009	Immunol Rev. 2009	RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors.	PMID:19120484
27	2008	BMC Genomics. 2008	Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99A.	PMID:18452608

2014: data of 2014/1/1-3/5

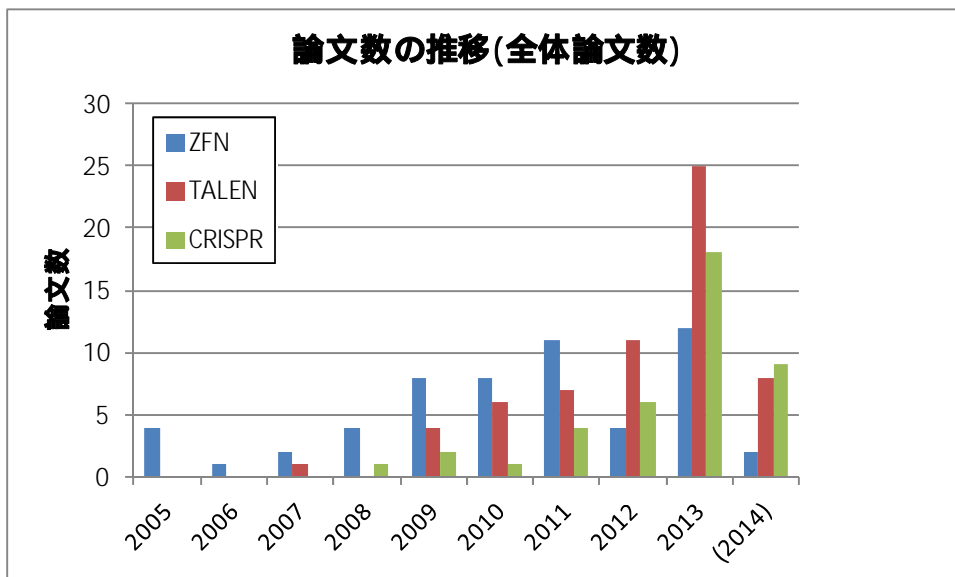


図2. NBT の植物関連論文数の推移(全体論文数)

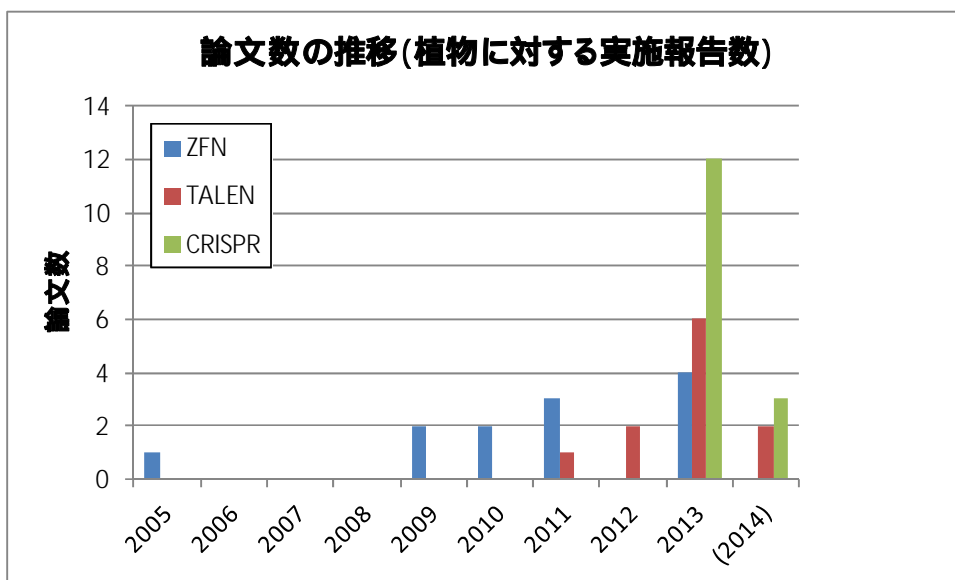


図3. NBT の植物関連論文数の推移(植物に対する実施報告数)

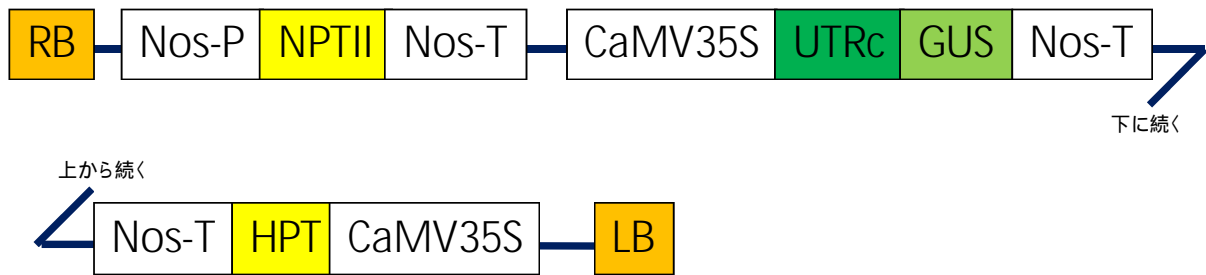


図3. UTRc::GUS riceに導入されたコンストラクトの構造（概略）

RB, LB:アグロバクテリウム由来T—DNA境界配列; NOS-P:アグロバクテリウム由来ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター; NPTII:大腸菌由来カナマイシン耐性遺伝子; HPT:大腸菌由来ハイグロマイシン耐性遺伝子; NOS-T:アグロバクテリウム由来ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター; CaMV35S:カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来35Sプロモーター; UTRc:イネ由来OsMacI遺伝子5'非翻訳領域(セルフクローニング); GUS:大腸菌由来β-グルクロニダーゼ遺伝子

平成 25 年度 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T.	Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand.	Biol Pharm Bull	37	1-5	2014
Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods.	Jap J Food Chem	20	161-169	2013
Nakamura, K., Sakagami, H., Asanuma-Date, K., Nagasawa, N., Nakahara, Y., Akiyama, H., Ogawa, H.	Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures.	Carbohydrate Research	382	77-85	2013
Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R.	Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct.	Food Chemistry	141	2618-2624	2013
Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S.	Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in Pichia pastoris using codon	Biotech Appl Biochem	60	283-288	2013
Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R.	Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products.	Food Chemistry	136	895-901	2013
Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K.	Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns.	Food Hyg Saf Sci	54	309-315	2013
Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R.	Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene.	Biol Pharm Bull	36	1454-1459	2013
Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R.	Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya.	J AOAC Int	96	1054-1058	2013
Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified	Food Control	32	728-735	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kasama, K., Inoue, Y, Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R.	Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples.	Jap J Food Chem	19	215-222	2012
Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R.	Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System.	Food Hyg Saf Sci	53	157-165	2012
Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H., Mano, J., Harada, M.	Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine.	Antiviral Research	94	89-97	2012
Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y.,	Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation	J AOAC Int	95	508-516	2012
Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T.	FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions	Genes Cells	in press		
Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S.	TALEN-mediated single-base -pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome.	Proc Natl Acad Sci U S A	111	1461-1466	2014
Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T.	Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice.	Exp Anim	63	79-84	2014
Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T and Sasakura Y.	Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in Ciona by electroporating TALENs provide new	Development	141	481-487	2014
Sugi T, Sakuma T, Ohtani T and Yamamoto T.	Versatile strategy for isolating TALEN-mediated knockout mutants in	Dev Growth Differ	56	78-85	2014
Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K.	Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in Xenopus laevis using two pairs of TALENs.	Dev Growth Differ	56	108-114	2014
Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, Yokotani N, Inoue T, Kawaguchi E, Agata K, Yamamoto T and Takeuchi T.	TALENS efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (Pleurodeles waltl), an experimental model animal for regeneration.	Dev Growth Differ	56	115-121	2014
Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto A, Yamamoto T and Hayashi S.	TALEN-induced gene knock out in Drosophila.	Dev Growth Differ	56	86-91	2014
Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T.	Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity.	Scientific Reports	3	3379	2013
Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and	Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications.	Genes Cells	18	315-326	2013