

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26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27(2015)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. 分担研究報告書

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	13
------	----

2. 次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

近藤 一成	23
-------	----

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	53
-------	----

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

4-1 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究	77
-------------------------------	----

4-2 NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発	91
------------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 113

IV. 研究成果の刊行物・別刷 115

I. 總括研究報告書

II. 分担研究報告書

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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
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

研究要旨

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。これら次世代遺伝子組換え技術は、痕跡が残らないと考えられてものの、技術的には確立されたとは言えず、その特徴や宿主に起こり得る現象、オフターゲット効果などについては十分な検討が必要である。一方で、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、技術開発と標準化を行い、文献調査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研究を行った。また、検知可能性についての基礎的な検討を行った。具体的には、(1) 技術開発について、遺伝子ノックインを簡便に行う新規手法 (PITCh 法) を開発しカイコなどの動物細胞に適用した。また、ジャガイモに TALEN を適用して目的遺伝子のノックアウトを行った。(2) 安全性について、TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた時のオフターゲット効果は、エキソ領域のみの解析ではあるが、自然界で起きる変異以上の変化はなかった。染色体構造上の有意な変化は認められなかった。リコンビナント Cas9 タンパクの消化管内安定性のための分解性試験を行い、素早く分解し、毒性やアレルギー性を示す可能性は低いことを明らかにした。(3) 組換え食品を想定して、遺伝子ノックインによる周辺遺伝子発現量の変化を調べたところ、最大 2 桁変化することが示され、挿入位置の重要性が示唆された。また、次世代シーケンサーを用いてアグロバクテリウム法由来の短いボーダー配列等を指標に導入遺伝子の解明を可能にした。(4) イネを用いて TALEN による変異体作製を行った。(5) 情報収集について、次世代遺伝子組換え技術を用いた動物および植物について検索した結果、ヤギ、ヒツジ、ニジマス、サケなどの動物のほか、小麦、トウモロコシにも適用され始めており商業化も今後進んでいくことが考えられた。ゲノム編集技術では、CRISPR/Cas9 の適応が多く、イネ、コムギ、トウモロコシ、トマトなど多くの作物に実施されていた。国別ではアメリカと中国の研究が大部分であった。また、オリゴヌクレオチド指向型変異導入法 (ODM) を用いたナタネがアメリカで市場に出始めた。

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を用いて、遺伝子上の任意の位置を人工的かつ改変した痕跡を残すことなく意図的に組換え生物を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（GMO）として扱うか、GMO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（オフターゲット、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。また、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。さらに、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。

B. 研究方法

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の開発と評価をこれまでにを行った。TALENおよびCRISPR/Cas9を用いた新しい遺伝子ノックイン手法を開発して、細胞及び生物に応用した。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。リコンビナントCas9タンパクのアレルゲン性について検討した。また、遺伝子組換え動物の文献調査も行った。中村公亮らは、外来遺伝子を導入した時に起きる現象、ゲノム構造と周辺遺伝子発現に与える影響を検討した。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を行うために、Platinum

TALEN の設計を行い、イネに遺伝子導入した。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継続して行った。次世代遺伝子組換え技術の特徴や問題点、各国の規制に対する情報や開発状況は、初年度から継続して近藤、中村で行った。

1. 次世代遺伝子組換え技術の開発

1) Platinum TALEN を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (TAL-PITCh 法)の開発

標的遺伝子とドナーベクターを同一の Platinum TALEN で切断することによって、切断面に生じるマイクロホモロジー(8bp)を利用した標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた。PITCh 法を評価する目的で、ヒト *FBL* 遺伝子座への蛍光遺伝子 (mNeonGreen) の挿入を行った。TALEN 発現ベクターと PITCh ベクターをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンによって選抜し、蛍光遺伝子の発現と局在を観察した。*FBL* 遺伝子の蛍光局在が観察された細胞からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックスアザン解析と蛍光遺伝子の挿入配列について PCR による増幅と塩基配列の解析をおこなった。また、動物個体における標的遺伝子へのノックインが PITCh 法で可能かどうかを検討するために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子およびケラチン遺伝子への蛍光遺伝子の挿入を試みた。蛍光が観察できたカエル胚からゲノム DNA を抽出し、標的遺伝子座を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

2) CRISPR/Cas9 を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh 法)の開発

CRISPR/Cas9 を利用した発現カセットのノックイン法を開発をした。ガイド RNA (gRNA) 発現ベクターの構築と SSA アッセイによる機能評価を行なった後、*FBL* 遺伝子座へのワンステップでのノックインを試みた。ノックインが成功した細胞を単離した後、ゲノム DNA の抽出と標的遺伝子座の PCR 増幅と塩基配列の解析を行った。

2. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

ニワトリ DT40、ヒト TK6、ラット PC12 など動物培養細胞を用いて、複数の標的配列の CRISPR/Cas9 用 gRNA を設計してピューロマイシンをコードするプラスミドに挿入した。プラスミドを細胞に導入して変異パターンの解析を行った。標的配列は、ゲノム環境の異なると考えられる領域 (*AIFM1*, *Rosa26*, *TK1*) を用いた。リポフェクションまたはエレクトロポレーション法で遺伝子導入を行い、ピューロマイシンで選抜した後、ゲノム DNA をカラム抽出した。目的領域周辺を PCR 増幅して、クローニングベクターに組み込み、コロニー化した後に各コロニーをシーケンズ解析して変異パターンを調べた。また、ヒト TK6 由来の TSCE5 細胞を用いた *TK1* 遺伝子を指標にした TK アッセイを行い、低頻度で他の方法では解析することが難しい大きな変異を中心に解析した。変異発生率は情報により求めた。大きな変異を含む細胞を、トリフルオロチミジン (TFT) で選抜して、高精製度のゲノム DNA

を抽出した。この DNA を、次世代シーケンサー Illumina HiSeq および HumanOmni ビーズアレイ解析を行い、変異パターン解析、コピー数多型解析 (CNV)、一塩基変異 (SNV) 検出を行った。

3. Cas9 の毒性およびアレルゲン性

リコンビナント Cas9 を作製した。活性を確認するために、Cas9、gRNA、標的としてのプロトスペーサー2 プラスミドを加えて反応を開始し、経時的にサンプリングして電気泳動で分析した。人工胃液中での分解性試験は、崩壊試験第 1 液にペプシンを添加して人工胃液とした。37 °C でインキュベートし、経時的にサンプリングして電気泳動後 CBB 染色により分析した。また、アレルゲンデータベースを用いて、既知のアレルゲンと相同性の有無を調べた。哺乳類に最適化した Cas9 配列は参考文献から得た。センス鎖およびアンチセンス鎖から 6 つの読み枠でアレルゲンになりうるペプチドとしてアミノ酸残基 20 mer 以上の長さの物を選んで検索を行った。

4. 文献調査 (次世代組換え技術を含む組換え動物)

3 つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用した。本年度は 2011 年に発表された論文や特許などを調査した。ジンクフィンガーヌクレアーゼ (以下 ZFN)、TALEN、CRISPR が利用されて作成された組換え動物についての論文や特許を SciFinder、PubMed を利用して調べた。

5. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

次世代組換え技術の規制に関する情報を収集するために、ドイツ、オーストリア、オランダ、イギリス、カナダ、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランドの GM 規制に關与する機関の報告書等を調査した。また、最近の科学論文から次世代遺伝子組換え生物に関する報告を調査して、技術的な問題点、開発状況、規制の考え方および検知の可能性についてまとめた。

6. 遺伝子ノックインによる周辺遺伝子の発現量変化

TALEN を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、動物細胞内で構成的にかつ大量の転写産物の発現を可能にする汎用性の高い Cytomegarovirus (CMV) 及び Simian virus 40 (SV40) ウィルスプロモーター遺伝子発現カセットを導入し、内在性遺伝子発現量、ゲノム構造及びエピゲノムに及ぼす影響に関して解析した。遺伝子発現の定量化は、リアルタイム PCR を用いて行った。ゲノム構造の解析には、Chromosome conformation capture (3C) 解析を行った。得られた DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施した。

7. 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立

未知の遺伝子組換え作物を検知するためには、わずかな情報から導入された遺伝子カセットを明らかにする必要がある。遺伝子組換えパパイヤをモデル植物として、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行い、わずかな情報プロモーター配列やアグロバクテリウム由来

のボーダー配列を手掛かりに導入遺伝子配列を明らかにすることを試みた。

8. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究

薬用 GM 植物、環境浄化用 GM 植物、工業用（食用作物）GM 植物に関する情報を、文献データベース（Scifinder®、検索語「transgenic plant」）関連学会講演要旨集等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。

9. 次世代遺伝子組換えモデル植物の作製

次世代応用植物の検知法等の開発の基盤整備を行うため、イネの FLO2 遺伝子を標的にして、この遺伝子変異体 flo2 変異体) の 1 つである EM37 変異体を用いてゲノム編集した。また、機能評価のための評価系を構築した。

10. 次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の文献調査

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 に絞って調査した。検索結果から、植物を対象として遺伝子編集を実施した論文のみを抽出し、リスト化した。また、作成したリストについて発表年別、国別、技術カテゴリー別等に集計し、開発動向の解析を行った。

C. 研究結果、考察および結論

1. 次世代遺伝子組換え技術の開発

HEK293細胞を用いた場合、ランダム挿入が起きていない、蛍光遺伝子の挿入されたものを解析したところ、67%のクローンにおいて正確に挿入されていることが示された。ツメガエ

ルでのTAL-PITCh法による遺伝子ノックインでは、顕微注入を行なった約10%の幼生において、蛍光遺伝子（mKate2）の蛍光がチロシナーゼを発現する網膜上皮細胞などで検出された。次に、ツメガエルにおいてPITCh法を用いた内在遺伝子の可視化が可能であるかどうかを、ケラチン遺伝子を対象としたGFP遺伝子ノックインにより確認した。ケラチンの発現するエラおよびヒレにおいて特異的にGFP蛍光を発する幼生が複数観察された。

CRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックイン法（CRIS-PITCh法）では、HEK293細胞へ導入したところ、FBLタンパク質の局在を示す核小体での蛍光が観察された。DNAを解析したところ、予期せぬ欠失や挿入が見られるものの正確につながったクローンが含まれていた。

本法によって、これまで困難であった比較的大きいサイズのDNAを正確に挿入することが可能になった。培養細胞においては、HRとの効率比較においてもMMEJでの効率が2-3倍であることから、実用レベルの方法であると考えられた。

2. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

ニワトリ DT40 細胞、ヒト TK6 細胞、ラット PC12 細胞を用いて、ゲノム環境の異なる複数の標的配列に対する CRISPR/Cas9 による DNA2 本鎖切断後の変異パターン解析を行った。転写活性が弱い AIFM1 遺伝子では、内部エキソンは切断できなかったが、第一エキソンは 3 または 4 塩基の小さな欠失が中心であった。遺伝子ノックインに用いられる Rosa26 領域では、7 から 103 塩基のやや大きい欠失とともに、1 または 2 塩基挿入が認められた。また、

TK6 細胞で、TK1 遺伝子を指標にした低頻度で起きる変異を次世代シーケンサーで解析し、10 kb 以上の欠失がメガヌクレアーゼ I-SceI や CRISPR/Cas9 処理で見られた。標的部位に起きるのは違って、もし、このような複数の遺伝子にまたがる大きな欠失が予測できないゲノム上の領域に生じた場合は、解析が困難と考えられた。

3. Cas9 の毒性およびアレルゲン性

リコンビナント Cas9 を作製し、活性を保持しているか確認した。この Cas9 を用いて、人工胃液中での安定性(分解性)について検討したところ、1 分以内に速やかに分解されることが判明し、消化管から吸収されて毒性やアレルゲン性を示す可能性は低いことが示唆された。また、アレルゲンデータベースを用いて Cas9 の既知アレルゲンとの相同性を検索したところ、該当するものは存在しなかった。

4. 文献調査(次世代組換え技術を含む組換え動物)

3 つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用して行った。

その結果、開発国は圧倒的に中国が多かった。また、導入遺伝子はミオスタチン、fat-1、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモンが多くつかわれていた。中国は、幅広く動植物にゲノム編集を含めて遺伝子改変を行っており、今後も監視をする必要がある。

5. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

EU 各国、オーストラリア ニュージーランド、カナダなどの次世代遺伝子組換え技術に関

する報告を調査し、ODM は、ゲノム編集のような DNA2 本鎖切断を伴わない場合には、GM 規制から除外すべきと考える国が多かった。ゲノム編集技術は、数塩基以内の小さな欠失、挿入、変異は自然界でも起きることから GM 規制外と考えてもいいとの立場をとっている国が多いが、標的外で大きな欠失等の可能性もあり、オフターゲットをどのように判断するかがポイントであるが、そこまで突っ込んだ議論はどの国もされていない。今後も継続して、多くの情報を収集するとともに実験結果から科学的な知見をもとに判断することが重要である。

6. 遺伝子ノックインによる周辺遺伝子の発現量変化

導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の 20 kb 内にかつ遺伝子クラスター内で同じゲノムグループ内で構成すると D 遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、遺伝子 homo 型で 2 オーダー、D 遺伝子は homo 型で 1 オーダーの違いであった。ゲノム上には、多くのトポロジカルドメインが存在していることから、遺伝子ノックインした場合は、周辺遺伝子への影響は無視できないと考えられた。

7. 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立

GM パパイアをモデル作物として、次世代シーケンサー-Miseq を用いて、アグロバクテリウム法由来のボーダー配列など短い配列情報を指標に、導入遺伝子カセットを解明することを検討した。その結果、Ti ベクター由来の

Right border と Left border 配列 (19 bp) をアンカーに GM パパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GM パパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター (P35S) をアンカーに GM パパイアの構造特異的配列を得ることができた。本手法を用いることで、次世代組換え技術を用いた作物を含めて、未知の遺伝子組換え体の特定と検知法開発に有効な手段であると考えられた。

8. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究

2014年に国内学会で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等から、19件の情報が得られ、NBTに関連した研究・開発が最も多かった。また、2) 2014年の国際学会 (IAPB2014)でのNBT研究・開発状況調査から、39件の情報が得られ、機能性食品とNBTがいずれも12件と最も多かった。国別集計では、オーストラリアでの開催のため、オーストラリアが12件と最も多く、次いで米国10件、ドイツ6件であった。作物別集計では、食用作物はイネ6件が最も多かった。国内外でNBTに関する研究・開発が増加しており、本分野において、中国での研究開発が、昨年度と同様に活発であることが判明した。

9. 次世代遺伝子組換えモデル植物の作製

イネの *FLO2* 遺伝子を標的としたTALEN遺伝子を構築した。この遺伝子の開始コドン領域などにも標的部位を設定し、それぞれの部位でのゲノム編集が可能なTALEN遺伝子構築を行った。構築した *FLO2* を標的とするTALEN遺伝子を用いて、イネの形質転換を開始した。

今後は、TALENの活性の検定を行い、標的部位の解析を行う。

10. 次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の文献調査

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で各NBTについて検索した。TALENは、2011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おり、その報告数は、2011年の2件から、2012年の3件、2013年は7件、そして2014年は6件と推移している。また、2014年以降はCRISPRとの比較研究も行われるようになってきている。中国においては主食作物にNBTを適用し、機能改変を達成している。CRISPR/Cas9は、2013年から2015年までのわずか2年あまりで31報の実施例が確認された。適用された植物種は、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケ、オレンジ、グループフルーツ、トマトと計11種となった。

また、研究が実施された国別でみると、TALEN及びCRISPRについては、TALENでは米国と中国が全体の71%、CRISPRでは米国と中国で全体の74%と、米国と中国が2大開発国となっている。中国の開発動向について、TALEN、CRISPR両技術の適用対象植物としてイネがそれぞれ4割を占めており、主食作物であるイネに対する遺伝子改変の取り組みが盛んであることが明らかになった。

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

- 1) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願

PCT/JP2014/062518 (平成26年5月9日)

- 2) 核酸挿入用ベクター、国際出願

PCT/JP2014/079515(平成26年10月24日)

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、申請者が開発した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) を用いて、培養細胞や動物個体において効率的に遺伝子を挿入する方法を開発した。このシステムを用いることによって、これまで困難であった動物個体での標的遺伝子のノックインが可能となった。これまで遺伝子ノックインには、相同組換え (HR) を利用した方法が主流であったが、HR は細胞種や動物によって効率が低く、HR を介した遺伝子ノックインは限られた種においてのみ利用可能であった。そこで本研究では、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用した新しい方法 (PITCh 法) を開発し、培養細胞と動物個体での遺伝子ノックイン効率を調べた。その結果、ヒト培養細胞およびカエル個体においてワンステップでの遺伝子ノックインが観察され、PITCh 法の有効性が示された。

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、特に相同組換え (HR) を介した遺伝子ノックインは、内在の HR 活性に依存することから動物個体ではほとんど成功していない。そこで本研究では、我々が開発した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) で効率的な標的遺伝子の切断とマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を組み合わせることによって、新しい遺伝子ノックイン法である PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法を開発し、PITCh 法によるヒト培養細胞と動物個体での効果を調べた。さらに、CRISPR/Cas9 を用いた PITCh 法によってヒト培養細胞において遺伝子ノックインを試みた。

B. 研究方法

A. Platinum TALEN を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (TAL-PITCh 法) の開発

MMEJ は 5~25 bp の短い相同配列を介した修復経路であり、様々な細胞周期で利用可能である。そこで本研究では、標的遺伝子とドナーベクターを同一の Platinum TALEN で切断することによって、切断面に生じるマイクロホモロジー (8 bp) を利用した標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた。

1) ヒト FBL 遺伝子座への蛍光遺伝子 (mNeonGreen) の挿入

PITCh 法を評価する目的で、核小体に局在する FBL の C 末に mNeonGreen を融合するための Platinum TALEN と PITCh 用ベクターの作製を行なった(図 1)。FBL の C 末端をコードするエクソンを標的とする Platinum TALEN を Sakuma らの方法 (Scientific

Reports, 2013)によって作製し、Single strand annealing (SSA) アッセイにより活性を評価した。PITCh用ベクターには、FBL 遺伝子のTALEN 標的サイトを付加し、inframe でmNeonGreen が融合し、2A 配列と薬剤耐性遺伝子が発現する構造とした。TALEN 発現ベクターとPITChベクターをヒト Hek293 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンによって選抜し、蛍光遺伝子の発現と局在を観察した。さらに、FBL 遺伝子の蛍光局在を観察された細胞からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックサザン解析と蛍光遺伝子の挿入配列についてPCRによる増幅と塩基配列の解析をおこなった。

2) カエル胚における PITCh 法による遺伝子ノックイン

動物個体における標的遺伝子へのノックインがPITCh法で可能かどうかを検討するために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子およびケラチン遺伝子への蛍光遺伝子の挿入を試みた。チロシナーゼ遺伝子切断用のPlatinum TALENの作製を行なった後、SSAアッセイによって活性評価を行なった。PITCh用ベクターは、チロシナーゼの第一エキソンにinframeで蛍光遺伝子をノックインし、チロシナーゼ遺伝子の破壊とノックインを同時に実現する設計とした。これによって、色素が合成される細胞での色素の欠失とその細胞での蛍光の局在が予想される。

カエルのケラチン遺伝子は、オタマジャクシ幼生のヒレとエラの細胞に発現する細胞骨格タンパク質をコードしている。本研究では、ケラチンタンパク質のC末端にinframeでGFP遺伝子が融合することによってケラチン遺伝子の発現の可視化を目的とした(図2)。

2つの遺伝子を破壊するPlatinum TALENをmMessage mMachine T7 Ultra Kit(ライフテクノロジー)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。

蛍光が観察できたカエル胚からゲノムDNAを抽出し、標的遺伝子座をPCR増幅し、塩基配列を決定した。

B. CRISPR/Cas9 を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh 法) の開発

TAL-PITCh法では、ベクター全長の配列が挿入されるため、CRISPR/Cas9を利用した発現カセットのノックイン法の開発を試みた。CRISPR/Cas9によって標的配列の切断とベクターの発現カセットの切り出しを同時に行なう。そのため、標的遺伝子に対してgRNAを1種類、ベクターに対して2種類のgRNAを必要とする。これら3種類のgRNAを発現するためにGolden Gate Assemblyを利用したall-in-oneベクターシステムの確立を試みた(図3)。さらにこのシステムを利用した3種類のgRNA発現ベクターの構築とSSAアッセイによる機能評価を行なった後、FBL 遺伝子座へのワンステップでのノックインを試みた(図4)。ノックインが成功した細胞を単離した後、ゲノムDNAの抽出と標的遺伝子座のPCR増幅と塩基配列の解析を行なった。

C. 研究結果

MMEJ を介した TALEN を用いた遺伝子ノックイン法の開発

FBL切断用のPlatinum TALENを作製し、SSAアッセイにより活性評価を行なったところ、ポジティブコントロールのZFNより高い活性を示した。このPlatinum TALENの発現

ベクターとPITCh用ベクターをヒトHek293細胞へ共導入した後、ピューロマイシンによる選抜を行なった。その結果、複数の耐性クローンが得られた。これらのクローンではFBLタンパク質の核局在を蛍光で観察することができた(図1)。さらに、ゲノミックサザン解析によって、ランダム挿入がおきていないことがわかった。蛍光遺伝子の挿入されたつなぎ目部分をPCRで増幅し、塩基配列を解析したところ、67%のクローンにおいて正確に挿入されていることが示された。

ツメガエルでのTAL-PITCh法による遺伝子ノックインの有効性を示す目的で、チロシナーゼ遺伝子への蛍光遺伝子(mKate2)の挿入を行なった。チロシナーゼ遺伝子切断用のPlatinum TALENのmRNAとPITChベクターをツメガエルの受精卵に顕微注入し、オタマジャクシ幼生での蛍光を観察した。その結果、顕微注入を行なった約10%の幼生において、mKate2の蛍光がチロシナーゼを発現する網膜上皮細胞などで検出された。

次に、ツメガエルにおいてPITCh法を用いた内在遺伝子の可視化が可能であるかどうかを、ケラチン遺伝子を対象としたGFP遺伝子ノックインにより確認した。TALEN mRNAとPITChベクターを顕微注入したところ、ケラチンの発現するエラおよびヒレにおいて特異的にGFP蛍光を発する幼生が複数観察された。この蛍光は、細胞骨格に局在することから、内在性のケラチンの局在とよく一致していることが確認された。ゲノムDNAを回収し、挿入部分の配列を解析したところ、5'部分は解析した全ての配列で正確に挿入されていることが確認された(図2)。

MMEJを介したCRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックイン法の開発

TALENを用いたPITCh法では、ベクター全長が挿入されるため、HRを介した方法のように発現カセットのみを正確に挿入する方法が必要と考えられた。そこで、CRISPR/Cas9

を利用した、MMEJでの遺伝子ノックイン法の開発を行なった。この方法を実現するためには、複数のgRNAを1つのベクターで発現するシステムの確立が不可欠と考え、まずはじめにall-in-one CRSIPR/Cas9システムを確立した。この方法は、TALENの構築で採用されているGolden Gate Assemblyを利用した方法で、一度に複数のgRNAの発現ベクターを1つに統合することができる。そこで1つのgRNAとCas9を発現するpX330ベクターを改良し、7つのgRNAが発現するベクターに統合できるシステムを開発した(図3)。このall-in-one CRSIPR/Cas9システムを用いて3つのgRNA(FBL遺伝子の1ヶ所およびPITChベクターの2ヶ所を標的)を発現するベクターを構築した。このベクターとCRIS-PITChベクターをHek293細胞へ今日導入し、薬剤選抜によって挿入クローンを得た。得られた薬剤耐性クローンでは、FBLタンパク質の局在を示す核小体での蛍光が観察された(図4)。さらに、ゲノムDNAを解析したところ、つなぎ目では予期せぬ欠失や挿入が見られるものの正確につながったクローンが含まれていた。

D. 考察

本開発によって、これまで困難であった比較的大きいサイズのDNAを正確に挿入することが可能になった。培養細胞においては、HRとの効率比較においてもMMEJでの効率が2-3倍であることから、実用レベルの方法であることが証明されている。また、同時に薬剤選抜が可能であること、これまでの長いホモロジーアームをもったベクターの構築が必要ないことから、簡便なノックイン法となることが期待される。特に、個体レベルにおいては、これまでES細胞を介した方法しかなく、標的遺伝子座への遺伝子ノックインはマウスでしか成功していなかったため、PITCh法の有用性は高い。さらにCRISPR/Cas9を利用した方法では、HRと同じく、必要な配列のみを挿入できる点でも

有効である。しかしながら、つなぎ目の配列については不正確なものが多く、これはマイクロホモロジー配列が短いことが原因と考えられる。実際、共同研究者が20-40 bpのマイクロホモロジー配列を用いてノックインを行なったところ、正確性と効率が向上したことを報告している。今後は、マイクロホモロジー配列の最適化などを行い、培養細胞と個体での汎用技術に発展させて行くことが必要とされる。

E. 結論

本研究によって、HR に依存しない MMEJ を利用した遺伝子ノックイン法である PITCH法を確立した。さらに、この方法と Platinum TALEN および CRISPR/Cas9 を組み合わせることによって培養細胞や動物個体において正確な遺伝子ノックインや内在遺伝子の可視化が可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015
- 2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5: 5560, 2014
- 3) Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse

embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 4: 7125, 2014

- 4) Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T and Mori K. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *Journal of Cell Biology*, 206: 347-356, 2014
- 5) Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014

2. 学会発表

- 1) Yamamoto T, Suzuki K and Sakuma T. Targeted genome editing using Platinum TALENs. 第47回日本発生生物学会, 名古屋, 2014
- 2) 山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での標的遺伝子改変. 第10回肝免疫・ウイルスフロンティア, 東京, 2014.
- 3) Yamamoto T. Genome editing using Platinum TALENs, Technical Symposium. Application of haploid cell lines and innovative genome-editing technologies in cell biology. 第66回日本細胞生物学会, 奈良, 2014
- 4) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状. 第87回日本生化学会フォーラム次世代ゲノム編集技術の展開, 京都, 2014
- 5) 山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変, 平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京2014
- 6) 山本 卓. ゲノム編集技術の基本原則と現状. 第6回遺伝子組換え実験安全研修会, 東京, 2014

- 7) Yamamoto T. Genome editing cultured cells and animals and using TALENs and CRISPR/Cas. The 3rd International Institute for Advanced Studies". Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, Kyoto, 2014
- 8) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性、第12回日本再生歯科医学会学術大会総会教育講演、徳島、2014
- 9) Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using TALENs. JARI & ISEV Japan 6th Annual meeting, Genome editing makes new RNA world, Hiroshima, 2014
- 10) 佐久間哲史, 中出翔太, 西川綾美, 茶山一彰, 鈴木賢一, 山本 卓. マルチgRNAシステムを用いたCRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014
- 11) Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using site-specific nucleases, The 8th meeting of Bone Cartilage Frontier, Tokyo, 2014
- 12) Yamamoto T. Targeted Genome Editing in Cultured Cells and Animals. Genome Editing Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Niigata, 2015
- 13) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第20回分子複合医薬研究会, 大阪, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願PCT/JP2014/062518（平成26年5月9日）
- 2) 核酸挿入用ベクター、国際出願PCT/JP2014/079515（平成26年10月24日）

【資料】

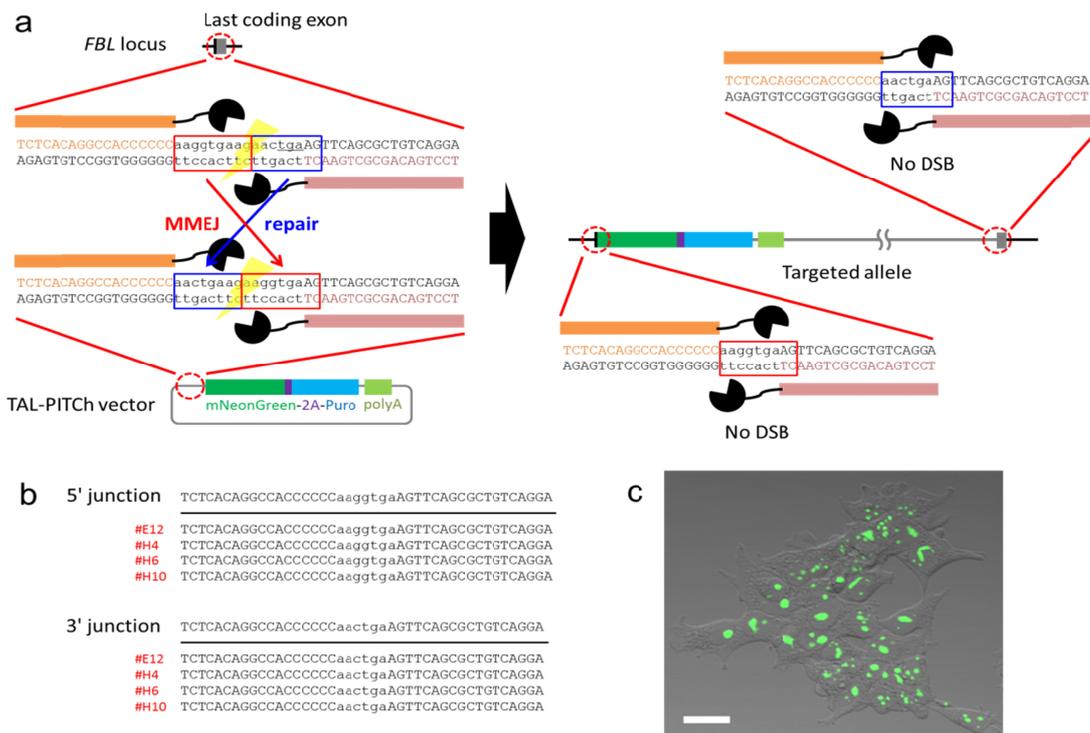


図1 .TAL-PITCh 法によるヒト *FBL* 遺伝子座への遺伝子ノックイン(Nakade et al., 2014)
a. TAL-PITCh ベクターの設計と標的遺伝子座へのノックイン、b. 配列解析、c. 蛍光観察

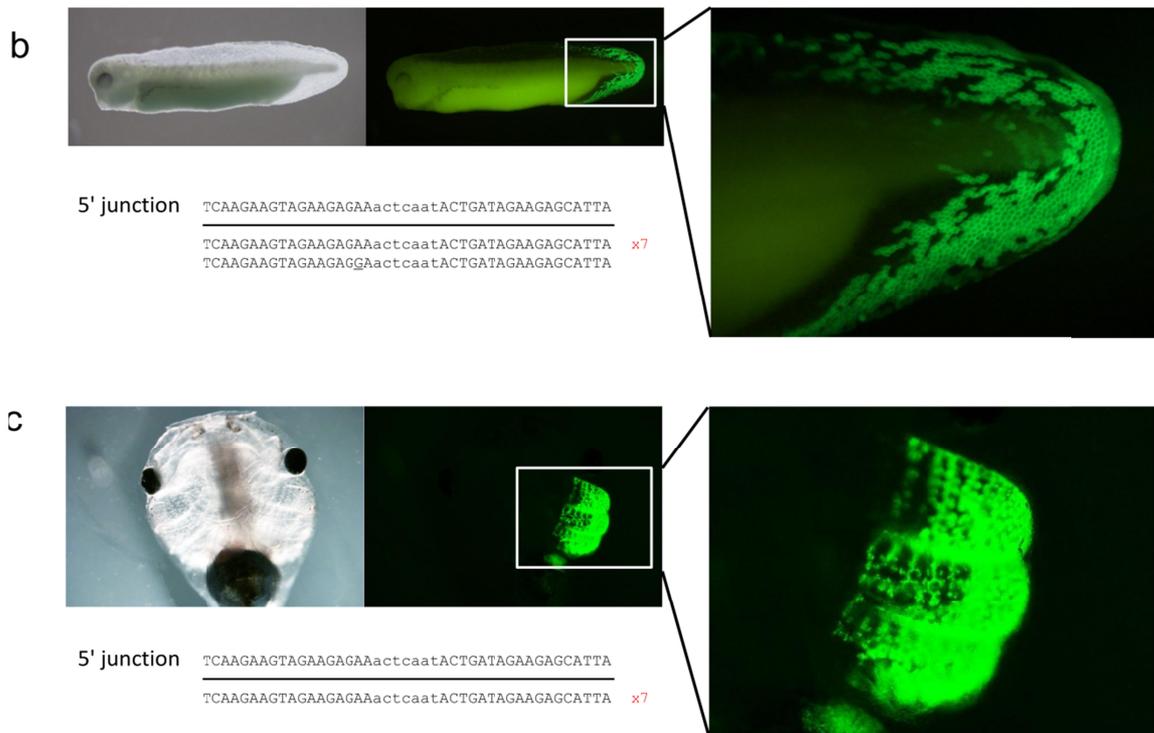


図2 . TAL-PITCh 法によるツメガエルケラチン遺伝子座への遺伝子ノックイン
(Nakade et al., 2014)

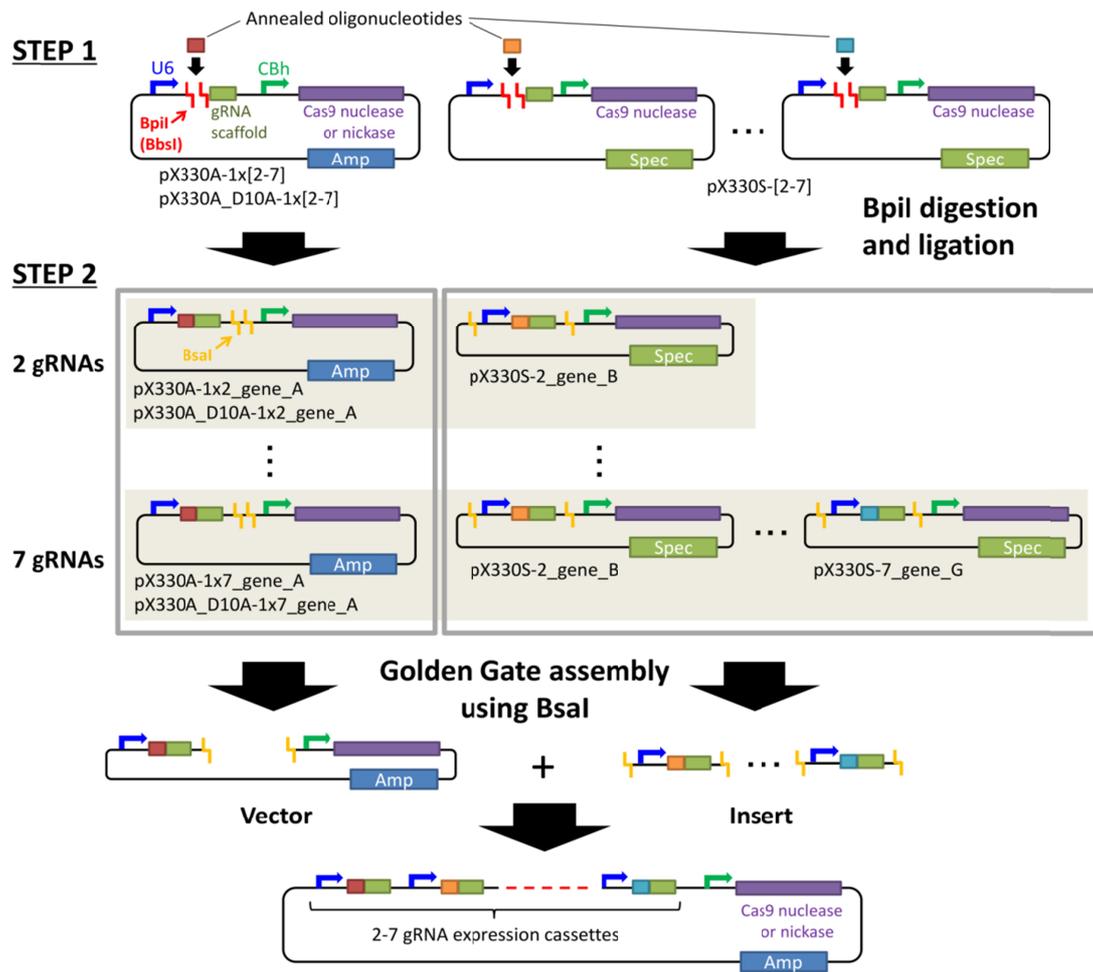


図3 . all-in-one CRSIPR/Cas9 ベクターシステム(Sakuma et al., 2014)

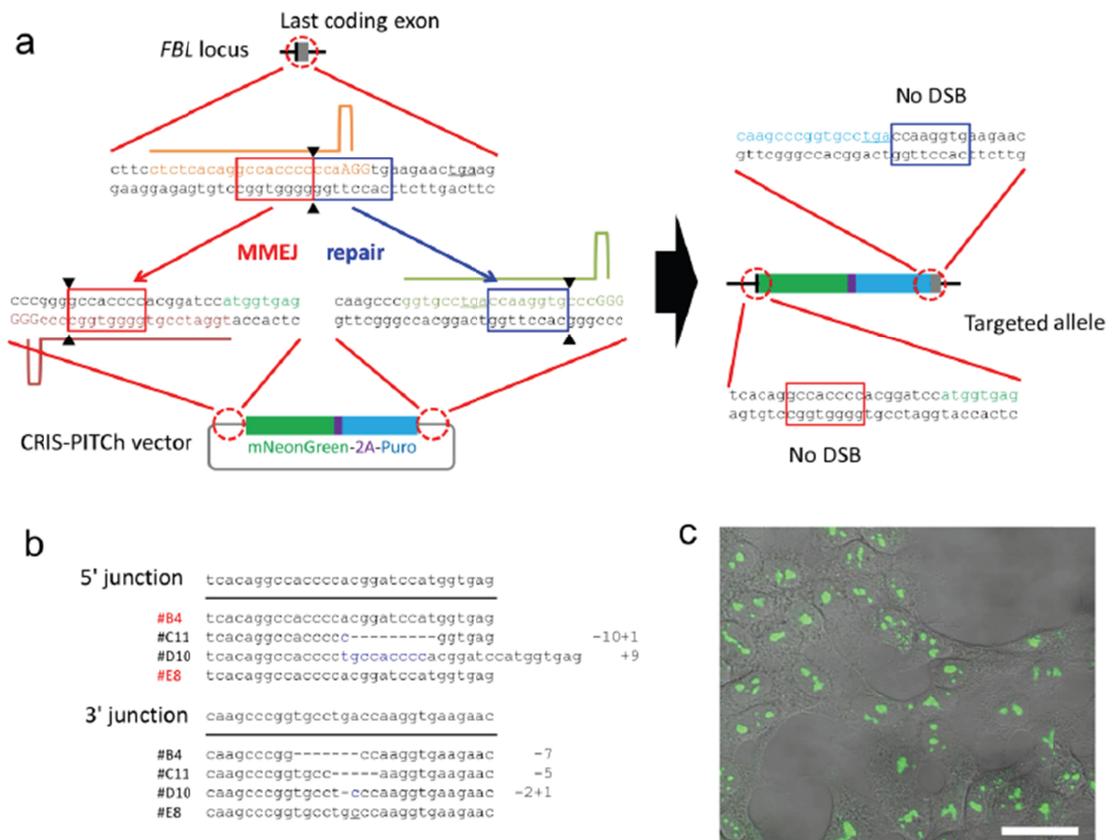


図4 . CRIS-PITCh 法によるヒト *FBL* 遺伝子座への遺伝子ノックイン(Nakade et al., 2014)
 a. CRIS-PITCh ベクターと標的遺伝子座へのノックイン、b. 配列解析、c. 蛍光観察

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・生化学部
研究協力者 中島 治 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
坂田こずえ 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
福田のぞみ 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

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ncing誘導、動物・植物への TALEN, CRISPR/Cas9 技術の応用など進んでいる。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ものの、こうして作出された GM 生物の安全性についての検討は十分されていない。そこで、安全面から科学的な検討を行い、その結果をもとに規制の在り方や検知方法に関する検討が必要となっている。本研究では、急速に普及しているゲノム編集技術 TALEN, CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる改変や off-target の頻度やパターン、ゲノム上に与える変化について、哺乳類細胞を用いて検討した。これら技術の潜在的ポテンシャルを明らかにするために *TK1* 遺伝子を指標にしたアッセイおよび全ゲノムシーケンス解析を行った結果、大きな欠失により *TK1* 遺伝子第 5 エキソン以降が機能喪失する確率は、メガヌクレアーゼ I-SceI および CRISPR/Cas9 では 10^{-4} から 10^{-5} であった。また、CRISPR/Cas9 処理では I-SceI 同様に数 kb から 10 数 kb の大きな欠失が観察された。コントロール細胞、I-SceI, CRISPR/Cas9 処理細胞およびゲノム配列との比較から、バックグランドで起きる変化、処理および細胞培養時にゲノム上の塩基配列の変化について検討した。また、文献調査を行うとともに、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。

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。

ゲノム編集技術がゲノムに与える影響については、標的配列で起きる切断の程度(長さ)やパターン、そして、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、について検討する必要がある。

本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しいゲノム編集技術であるCRISPRを中心に標的配列領域(on-target)の解析を行うとともに、制限酵素であるI-SceIの結果と比較検討した。一般に、ゲノム構造やDNA切断修復機構は酵母から哺乳類まで比較的よく保存されている。そのため、本実験ではゲノム関連情報が豊富で他のデータとの比較も容易であり、解析手法も多く用意されているヒト細胞を中心として用いることにした。

ゲノム編集技術を用いて改変を行った場合に、最も懸念されることはoff-target切断である。そのため、これまでに精力的な検討がされてきた。標的配列(on-target)から数塩基ミスマッチがある配列などon-target配列から推測されるoff-target配列のほかに、

on-target配列とは関連性のない、いわゆるバイアスのないoff-target解析が報告されている。いずれも、DNA2本鎖切断が起きた箇所などの特定領域を濃縮して次世代シーケンサーでその領域のみを解析するものである。これらの手法を用いた時に検出できる頻度は、概ね1%(最小0,1%)またはそれ以上の頻度で起きる変化である。これまでに、高頻度では、通常細胞では1から数塩基、または10数塩基程度の欠失および数塩基の挿入が主たる変化であることが報告されている(高頻度で起きる変化)。

しかしながら、用いる細胞や標的領域のゲノム環境(構造)による大きく影響することが考えられる。そのため、ゲノム環境が異なると考えられる領域(転写が弱い領域と転写活性が高い領域など)に対して、標的部位を設定して高頻度で起きる変異パターンの解析を行った。また、これまでに低頻度で起きる変異については解析されたことがない。標的部位であれば解析可能であるが、想定できない領域で発生した場合は、全ゲノムシーケンス解析以外に検出は困難であるが、検出感度は高くない。そのため、ゲノム編集技術の潜在的な能力を明らかにするために、低頻度で起きる変化についても明らかにすることを目的に行った。

さらに、Cas9検知法や毒性・アレルギー性評価のためのタンパク分解性試験を行うために、リコンビナントタンパクを調整し、Cas9の人工胃液中での分解実験を行った。

情報収集では、最近開発された食用トランスジェニック生物の文献調査を行った。

B. 研究方法

1. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

(1) ニワトリ、ヒト、ラット由来の細胞 (DT40, TK6, PC12) を用いて、標的配列に対して 3 塩基以内のミスマッチ配列が該当生物ゲノム上に存在しないか、少なくともエキソン領域に存在しないように設計した CRISPR/Cas9 を用いて DNA2 本鎖切断のパターン解析を行った。GGgenome (<https://gggenome.dbcls.jp/ja/>) と CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>) を参考に設計した。

標的配列は、DT40 細胞では *AIFM1* 遺伝子エキソン 1、PC12 細胞では *Rosa26* 領域、TK6 細胞では *TK1* 遺伝子を標的として、それぞれ 2 種類の CRISPR/Cas9 用の gRNA を作製した。CRISPR/Cas9 用のプラスミドは addgene から購入したもの (pX330, pX458, pX459) にガイド RNA (gRNA) 標的配列を組み込んだ。遺伝子導入は、PC12 細胞にはリポフェクション法 (Lipofectamine 2000) で行った。DT40 および TK6 細胞は、2 種のエレクトロポレーション法 (Amaxa nucleofector II, Lonza AG または NEPA21、ネッパジーン) を比較して、最終的に導入効率の優れた Amaxa を用いた。導入効率は GFP ベクターをコントロールに用いて確認した。解析をより容易にするために、DT40 および PC12 細胞では、遺伝子導入 24 時間後にピュアマイシンにより遺伝子導入細胞の選択を行い、72 時間後に細胞を回収した。細胞から DNeasyBlood and Tissue kit (Qiagen) を用いて抽出したゲノム DNA を鋳型にして、標的配列含む領域を HighFidelity ポリメラーゼで PCR 増幅、コロニー化した後に illustra TempliPhi DNA Amplification Kit

(GE ヘルスケア) を用いてシーケンス解析を行った。また、細胞のクローン化したもののシーケンス解析は、各クローンを QuickExtract (Epicentre) で DNA 抽出したものをシーケンス解析した。

(2) *TK1* 遺伝子エキソン 4 の片側アレル (allele A) に変異を持つヒト TK6 細胞に、もう一方のアレル (allele B) エキソン 5 上流約 80bp に I-SceI サイトを含む 31 bp を導入した TSCE5 細胞を実験に用いた。I-SceI サイトとほぼ同一の領域に CRISPR/Cas9 の標的サイトを設計し、I-SceI とともに DNA2 本鎖切断実験を行った。TK アッセイに用いる細胞中のエキソン 5 欠失を持つ細胞を最大限除去してバックグランド変異検出を抑えるために、あらかじめ 2 日以上 HAT 処理を行った。Mutation frequency (MF) を算出するために、1 処理群あたり 96 穴プレート最大約 30 枚を用いてトリフルオロチミジン薬剤選抜 (TFT) を行いエキソン 5 の欠失した細胞を分離した。

(3) (2) の実験で分離した細胞から、ゲノム DNA を抽出して、Nanodrop で総核酸量と精製度を確認した後 (260/280, 260/230 値が 2 以上)、Quant-iT dsDNA assay kit で 2 本鎖 DNA の濃度を蛍光法により定量した。切断パターンを分析するために、標的配列を含む 7 kb を含む領域を PCR 増幅して、そのバンドを高分子 DNA 分離用チップを用いて Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した。また、ゲノム DNA は、次世代シーケンサー-Illumina HiSeq2000 で全ゲノム解析を行った。サンプルあたり 11 億リード (1100 億塩基) が得られた。得られたシーケンスデータは、Illumina

Isaac 解析ソフト(Isaac aligner および caller) でマッピングおよび変異コール(SNV, Indel, SV, CNV)を行った。CLC genomicworkbench (ver8.0.1)の clc mapper を用いてもヒトゲノムへマッピングと変異検出を行い比較した。また、HumanOmni2.5-8 v1.2 を用いた BeadChip によるビーズアレイ解析でジェノタイプングを行い、SNP や CNV (copy number variation) の検出を行った。マッピングデータは IGV または Tablet を用いて比較解析した。

(4) アレルゲン性および毒性についての知見を得るために、大腸菌から作製した組換え Cas9 を用いて、人工胃液処理による分解性試験を行った。また、Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測を行った。

1) 組換え Cas9 の作製と活性測定

組換えタンパクの発現、精製及び活性測定は参考文献 1) の方法に基づいて行った。

Cas9 (25 nM) とガイド RNA (gRNA、25 nM) を切断バッファー中で 37 度、15 分プレインキュベートした。標的としてのプロトスペーサー 2 プラスミド (5 nM) を加えて反応を開始した。30 分、60 分後にサンプリングしてアガロースゲル電気泳動によって分析した。LAS4000mini と Image Quant TL (GE ヘルスケア・ジャパン) を使ってスーパーコイル型、リニア型プラスミドの割合を求めた。gRNA の配列は : 5' -AUA ACU CAA UUU GUA AAA AAG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CG-3'。プロトスペーサー 2 プラスミドは以下の配列を pUC19 の Sma I サイトに組み込んだ : 5'-TTA TAT GAA CAT AAC TCA ATT TGT AAA AAA GGG TAT TGG GGA ATT

CAT TA-3'。ネガティブコントロールの実験には、プロトスペーサー 2 プラスミドの代わりに pUC19 を使った。

2) Cas9 の人工胃液中での分解性試験を以下のように行った。崩壊試験第 1 液、pH1.2 (関東化学 Cat. No. 11500-76) に 0.32% ペプシンブタ胃粘膜由来 (シグマアルドリッチ Cat. No. P6887-250MG) を添加して人工胃液とした。ここに Cas9 を加えて 50 μ l の反応液を調製した。これを 37 度でインキュベートした。1, 3, 7, 15, 30, 60 分後にサンプリングし、Na₂CO₃ に加えて反応を止めた。0 分については人工胃液と Na₂CO₃ 後に Cas9 を加えた。これらを CBB 染色で分析した。また、コントロール実験として、ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ) と γ -ラクトグロブリン (シグマ) を用いて同様な実験を行った。

3) データベースを用いたアレルゲン性の検索を行った。ヒト用にコドン最適化した Cas9ヌクレオチド配列は参考文献 2) から得た。この配列を GENETYX Ver. 12 を用いてアミノ酸配列に翻訳した。翻訳の枠をずらして、センス鎖からオープンリーディングフレーム (ORF) 1-3 を得た。Cas9 は ORF1 に相当する。アンチセンス鎖から ORF4-6 を得た。アレルゲンになりうるペプチドとしてアミノ酸残基 20 mer 以上の長さの物を選んだ。なお、開始コドン ATG がなくてもよいとした。Sliding 80 mer window search は Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP、https://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.html) を利用してホモロジー 35% 以上を陽性とした。8 mer exact search は Allergen Database

(<http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>) を利用した。6 mer exact search は SDAP を利用した。これらの検索で陽性となった配列が食物アレルゲンに由来する配列とホモロジーがある場合を選択した。

参考文献

- 1) 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
- 2) Mali P., Yang L., Esvelt KM., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* (2013) 339, 823-826

(5) 文献調査 (組換え動物)

- ・ 調査に用いたデータベース

3つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用した。本年度は 2011 年に発表された論文や特許などを調査した。

- ・ キーワードについて

PubMed : transgenic animal、GMO
SciFinder、Google Scholar : transgenic または GM プラス個別の動物名 (pig, cow or cattle, chicken, fish, goat, sheep, rabbit, quail, horse, shrimp, prawn, octopus, devil fish, squid, crab, soft-shell turtle, shellfish)

- ・ タイトルと要旨から該当する論文や特許などを選抜した。導入あるいは改変遺伝子、研究内容、開発国、遺伝子改変法などの情報をまとめて一覧表を作成した。

- ・ ジンクフィンガーヌクレアーゼ (以下 ZFN)、TALEN、CRISPR が利用されて作成

された組換え動物についての論文や特許を SciFinder、PubMed を利用して調べた。2010 年以降に発表の論文や特許を対象とした。

(6) 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

次世代組換え技術の規制に関する情報を収集するために、EU 報告書の他に、ドイツ (Central Committee on Biological Safety (ZKBS , 生物学的安全性に関する中央委員会))、オーストリア (Bundesministerium für Gesundheit (連邦保健省)) および Umweltbundesamt (連邦環境局))、オランダ (The Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM , 遺伝子組換えに関する委員会))、イギリス (Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE , 環境排出に関する諮問委員会))、オーストラリア - ニュージーランド (Food Standard Australia New Zealand (FSANZ , 食品基準機関)) のポジションレポート、およびカナダ (Canadian Food Inspection Agency (CFIA , 食品検査庁)) と Health Canada (HC , 保健省))、アメリカ (Environmental Protection Agency (EPA , 環境保護庁))、Food and Drug Administration (FDA , 食品医薬品局)、US Department of Agriculture-Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS , 農務省動植物検疫局)) の情報を調査するとともに、2014 年 10 月までの Nature、Science などの科学雑誌から次世代組換え技術に関する論文を調査して技術的な整理と問題点を明らかにした。また、各次世代組換え技術を用いた作物等の開発状況について調べた。

C. 研究結果および考察

1. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

1) 変異パターンの解析

次世代遺伝子組換え技術の中で、急速に利用されてきているゲノム編集 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) について、その活性やオフターゲット切断についてこれまでに多くの報告があり、バイアスのないオフターゲット解析の報告から、標的配列からは推測できない切断も見られている。そこで、ゲノム編集技術のポテンシャルを解明するための検討を行った。

DT40 細胞 *AIFM1* 遺伝子第一エキソンを標的にデザインしたガイド RNA (gRNA#3, #7) の中で、切断活性を示した gRNA#7 は、CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、220 箇所存在し、そのうち遺伝子上には 39 箇所存在するが 1 つを除き 4 塩基ミスマッチのため標的配列から予測される範囲では特異性は高いと考えられた (Fig. 1 and Table 1)。変異パターンの解析から、32 個中 3 塩基欠失が 26 個、4 塩基欠失が 1 個、置換が 1 個であった。欠失体は、いずれも ATG 開始コドンの破壊またはフレームシフトにより目的遺伝子のノックダウンが誘導できた (Fig. 2)。次に、PC12 細胞を用いて遺伝子ノックインのターゲットとして知られるマウス *Rosa26* 相同領域を標的配列にして同様の実験を行った。gRNA を 2 箇所設計し (Figs. 3 and 4)、活性を示した gRNA#21 について CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、理論上の off-target サイトは全ゲノム上に 323 箇所存在するが、そのうち遺伝子上にあるものはなかった (Table 2)。変異パターン解析から野生型以

外には 7 および 103 塩基の欠失のほか、1 または 2 塩基の挿入が見られた (Fig. 5)。TK6 細胞については、*TK1* 遺伝子の標的配列周辺に変異が観察された。なお、TK6 細胞を用いた解析は、以下の TK アッセイと関連するため解析中である。以上の結果から、正常な DNA 修復機構を保持した細胞を用いた場合は、CRISPR/Cas9 によって誘導される切断パターンは主に 2~4 塩基欠失が中心であり、ゲノム改変しやすい (あるいはオープンクロマチン) 領域では、やや大きな欠失 (100 塩基程度) や 1 または 2 塩基挿入も一定の頻度見られた。

2) TK アッセイ

TK6 細胞の片側アレルのエキソン 5 上流に I-SceI サイトを挿入した TSCE5 細胞に対して、I-SceI とほぼ同じ位置に CRISPR/Cas9 用の gRNA を 2 種設計した (gRNA#8, #17, in Figs. 6 and 7)。切断活性が認められた gRNA#8 は、CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、全ゲノム上に 131 箇所、そのうち遺伝子上に 11 箇所 off-target サイトが存在し。ほとんどが 4 塩基のミスマッチで切断される可能性が低いものであった (Table 3)。

ゲノム編集用プラスミド (pmaxGFP, I-SceI, gRNA#8, #17) を導入、48 時間以上培養した後、96 穴培養プレートに 20,000 cells/well になるように播き、トリフルオロチミジン (TFT) 選抜しながら 10 から 12 日間培養してコロニー形成させた。コントロール (無処理)、GFP、I-SceI、CRISPR 処理群のコロニー形成ウェル数、空ウェル数をカウントして変異発生率 (MF) を算出した。本アッセイでは、非相同末端結合 (NHEJ) により 80bp 以上の欠失に

よりエキソン 5 が non-functional になったもの (*TK1*^{-/-})のみが検出される。その結果、自然界でこの標的部位にこのような変異が起きる確立は 10^{-7} レベルであり、I-SceI 処理による DNA 切断で誘導される場合は最大 10^{-4} レベルと大きく増加した。また、CRISPR/Cas9 処理では、 4×10^{-5} レベルで NHEJ により 80 bp 以上の欠失 が起きることが示された (Fig.8)。また、Fig.9 には I-SceI および CRISPR/Cas9 による標的部位での切断パターンを示した。10 kb 以上の欠失も見られた。これまでの研究で、on-target 配列から数塩基ミスマッチのあるような、予測できる off-target サイトであれば問題ないが、それ以外の場所でこのような大きな off-target 切断が起きた場合に、見つけ出すことは困難であると考えられる。

3) TK アッセイにより得られた、control、I-SceI、CRISPR/Cas9 処理で *TK1* (^{-/-}) になった細胞を集めて、次世代シーケンサーにより全ゲノム解析を行い解析中であるが、ビーズアレイ解析結果から、I-SceI 処理細胞では 1.9 Mb の LOH (ヘテロ接合性喪失) が、CRISPR/Cas9 処理細胞では 3.4 kb (loss) のコピー数変異 CNV が観察された。

2. Cas9 の毒性・アレルゲン性の検討および調査

1) Cas9 の分解性試験

ゲノム編集である CRISPR/Cas9 システムに用いる Cas9 タンパク質の毒性やアレルゲン性を検討するために、リコンビナント Cas9 を作製して活性を測定した。プロトスペーサー 2 プラスミドを使った場合、30 分で DNA 2 本鎖切断されてリニア型バンドが 0.8%ア

ガロスゲル電気泳動によって検出された。コントロールとして pUC19 を使った場合には 60 分でリニア型が検出されず、スーパーコイル型のみが検出された (Fig.10)。この結果から、作成した Cas9 が活性を保持していることが確認された。Cas9 の人工胃液で処理したところ、Cas9 は 1 分未満で分解されて、断片も検出されなかったコントロール実験として、BSA は 0.5 分未満で分解されて、 α -ラクトグロブリンは 16 分でも分解されなかった (Fig.11)。Cas9 は容易に消化液中で分解されることが判明した。

2) Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測

Cas9 のアレルゲン性をアレルゲンデータベースを用いて調査した。条件として、既知アレルゲンとの 8 アミノ酸完全一致や 80 アミノ酸をウィンドウとした検索 (8 mer exact match と sliding 80 mer window search) したところ、該当するものは存在しなかった。そこで、条件を緩くして 6 アミノ酸完全一致で検索したところ、他の読み枠と合わせて 17 個ヒットした (Table 4)。

3) 文献調査 (トランスジェニック動物)

2011 年度の該当する論文、特許などの数は以下の通り。ウシ 24 報、魚 20 報、ブタ 17 報、ヤギ 8 報、ニワトリ 8 報、ヒツジ 7 報、ウサギ 3 報。合計 87 報 (Table 5)。

開発国は圧倒的に中国が多かった。87 報中 61 報を占めた。

導入遺伝子としては以下の物が多く使われていた: ミオスタチン、*fat-1*、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモン。

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昨年度の報告書以降の論文、特許が8報あった。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9が利用されていた。(Table 6)。

Table 6中の文献6では、TALENを利用してオボアルブミン遺伝子の6-29ヌクレオチドを欠失でノックアウトしており、この二ワトリに由来する肉を従来のPCR法やリアルタイムPCR法を適用して検知することは困難であると考えられる。

3. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

EU各国、オーストラリア、ニュージーランド、カナダなどの次世代遺伝子組換え技術に関する報告を調査した。EUは、現在のGMOの枠組みの中でどの技術が遺伝子組換え体として規制対象になるのかを議論しているところである。各国ともオリゴヌクレオチド指向型変異導入(ODM)は、1または2塩基程度の変異を入れた短い一本鎖DNA(ssDNA)のみを用いた場合は、ゲノム編集のようなDNA2本鎖切断誘導しない限りは自然界で起きる現象を差はない。また1塩基変異導入による新規形質獲得も自然界で認められることからGM規制対象外になると考えられる。シスジェネシスは、微生物におけるセルフクローニング/ナチュラルオカレンスと同様であるが、微生物以外ではGMという考え方が多いと考えられる。アメリカでは、交雑可能な品種由来の配列のみからなっているが、自然界には存在しない配列(逆位繰返し配列)をもつイントラジェネシスも規制対象外としているが、それ以外の国ではGM規制内と考えられる。もっとも判断が難しいのは、現在急速に普及しているゲノム編集技

術であるTALEN、CRISPR/Cas9である。小さな改変、1~3塩基程度の欠失によるノックアウトはODMに似ているが、TALEN、CRISPR/Cas9は自然界で起きるよりはるかに高頻度で目的部位にDNA2本鎖切断を誘導し、また、目的外領域にも低頻度ながら変異が導入される可能性があることから、目的領域の改変部分のみでの判断はできないと考えられる。いずれも、継続して多くの情報を収集するとともに実験結果から科学的な知見をもとに判断することが重要である。次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の安全性については、これまでの研究調査結果を総説にまとめた。

D. 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/Cas9が重要であると考えられる。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、当面は各国とも個別に判断することになると考えられる。

本研究では、ゲノム編集技術を用いた時に起きる変異のパターンや頻度を解析して、主に数塩基から100塩基程度の欠失が起きること、低頻度では10kbを超える欠失も起きることが分かった。このような変化がゲノム上の予測できない位置に生じた場合は、検出は全ゲノムシーケンスのような網羅的な解析が必要である。その他のシスジェネシスや接ぎ木などは、概ね判断の方向はGM規制外と考える場合が多いと思われるが、当面は個別のケースバイケースでその内容の判断がされると考えられる。次世代遺伝子組換え技術の開発は、特にゲノム編集技術は、アメリカの他に中国が様々な生物

に対して行っており、今後の動向を継続して調査する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015
2. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
3. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
4. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
5. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R.,

Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014

6. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014

学会発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月.
2. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み、第 108 回 日本食品衛生学会 学術講演会、金沢、2014 年 12 月
3. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
4. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹：加工食品中の遺伝子組換えコマ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しい DNA 抽出精製法の検討、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年

- 12月
5. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 6. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 7. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 8. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子: 成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 9. 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、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 10. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 11. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美: 遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度AOAC International日本セクション年次大会、東京、2014年6月
 12. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回総会・学術大会、東京、2014年5月
 13. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイアのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第20回総会・学術大会、東京、2014年5月
 14. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月
 15. 中島治、近藤一成、最上(西巻)知子 食用遺伝子組換え動物の最近の開発状況についての調査 日本薬学会第135年会、2015年3月

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
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
研究協力者 石垣拓実 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：次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである Transcription activator-like effector nuclease（TALEN）を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、動物細胞内で構成的にかつ大量の転写産物の発現を可能にする汎用性の高い Cytomegarovirus（CMV）及び Simian virus 40（SV40）ウィルスプロモーター遺伝子発現カセットを導入し、内在性遺伝子発現量、ゲノム構造及びエピゲノムに及ぼす影響に関して解析した。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。今後は、GM 作物の開発に汎用されている従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、安全性未承認 GM パパイア PRSV-YK 系統をモデルに、19 bp 程度の短い配列をアンカーとして次世代シーケンサー MiSeq を使用し得られた配列データベースより、GM 作物のゲノムに挿入されたトランスジェニック構造配列の解析及び系統の特定を可能とする迅速検知法を開発を行った。

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：

次世代ゲノム編集技術は、ゲノム上の任意の配列を標的に DNA の導入や欠失を高効率で行うことを可能にする。今後、この技術を応用した遺伝子組換え（GM）食品の開発が期待される。しかし、DNA の導入や欠失に伴うゲノムへの影響、特にゲノム構造、内在性遺伝子の発現やエピゲノムに与える影響に関する情報は十分に得られていない。本研究では、次世代ゲノム編集技術の一つである Transcription

activator-like effector nuclease（TALEN）を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに解析し総合的に解釈した。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

近年、主に新興国で開発され規制外に流通した GM 食品の食品への混入が欧州及び日本で度々問題となっている。2013 年 1 月から 2014 年 11 月末現在までに欧州食品飼料緊急警告システム（RASFF）では GM トウモロコシ

(Bt176 系統) コメ (Bt63 系統など) パパイア (系統名不明) の混入 66 件を報じた。日本では、2013 年 7 月にタイ産未承認 GM パパイア PRSV-SC 系統の食品への混入を報じている。今後は、従来のアグロバクテリウム法やパーティクルガン法を用いた組換えのみならず、次世代バイオ技術を応用した多種多様な形態の GM 食品の意図せぬ混入が考えられる。そこで、2011 年に国内のパパイア加工食品より検出された安全性未承認 GM パパイア PRSV-YK 系統の果実から精製したゲノム DNA をモデルに、次世代シーケンサー-MiSeq を使用した GM 作物の迅速検知法の開発を行った。

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

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 37 °C、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 °C、5% CO₂ 環境下で培養を行った。

2) 遺伝子導入と GM 細胞株のクローニング

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、昨年度と同様にニワトリ 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'-CTTTCATGTTCCACCTAC-3'、下流側には 5'-AGTGATTTCCAAACACAC-3' の 18 bp とし、それぞれの配列を認識する TALEN 発現ベクターを *in vitro* で転写後、得られた mRNA を細胞

へ導入した。pCDNA-DEST40 ベクター中の T7 プロモーターで T7RNA polymerase により転写させた。*In vitro* 転写には、mMESSAGE mMACHINE[®] T7 ULTRA Transcription Kit (Life Technologies) を使用して mRNA の合成を行い、MEGAclean[™] Transcription Clean-Up Kit (Life Technologies) より mRNA の精製を行った。TALEN による DNA 二本鎖切断 (DSB) 処理後に導入した配列は、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) の遺伝子発現カセットと、SV40 early promoter と SV40 polyA シグナル制御下で発現するピューロマイシン耐性遺伝子と immediate early promoter of CMV と Herpes simplex virus thymidine kinase polyA シグナル制御下で発現する Venus 遺伝子を含む全長 4.7 kb の pcDNA4-TO-Puromycin-mVenus- MAP プラスミド (ID no.44118, Addgene, MA, USA) の遺伝子発現カセットとした。Targeting ベクターには、pUC19 プラスミドを使用し標的配列の 5' 及び 3' 側にニワトリゲノムの相同組換え配列 (800 bp) を組み込んだものを使用した。標的配列のセンス側及びアンチセンス側をそれぞれ認識する TALEN をコードする 16 µg mRNA と 10 µg ターゲティングベクターを DT40 株に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 株にはリポフェクタミンによりトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、終濃度 2 mg/ml G418 及び 0.75 µg/ml puromycin を加え、薬剤耐性細胞を選択的に 10 日間培養し、その後、通常培地に戻しクローニングを行った。細

胞のクローン化は、浮遊系の DT40 細胞は限外希釈法、接着性の LMH 細胞はシングルコロニーよりトリプシン-EDTA 処理により剥離する方法により行った。標的配列への GM 操作の確認は、Cel-I 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。

3) リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量化

組換えの標的とする配列から両側 100 kb 近傍に存在する内在性遺伝子の発現測定は、RT-リアルタイム PCR 法より行った。80%コンフルエントに培養した細胞を ($5 \sim 10 \times 10^7$ 個) を回収し、RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて total RNA を精製した。DNA は RNase-free DNase I (Qiagen) を用いて完全に消化させた。500 ng の精製 RNA を逆転写酵素 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) と oligo dT20 のプライマーを使用して 20 μ l の反応液中で逆転写反応を行い cDNA を作成した。2 μ l 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 により遺伝子発現を定量化した。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。反応液に 7 mL 1 \times T4DNA ligase buffer と終濃度が 1% (v/v) になるよう TritonX-100 を加え、37 1 時間インキュベーションした後、4000 U T4DNA ligase を 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、得られた DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施した。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立:

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

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：

遺伝子発現カセットを挿入した際に起こり得る、内在性遺伝子の発現量の変化を解析するため、遺伝子導入の標的としたニワトリゲノム 14 番染色体に存在する α グロビン遺伝子クラスター周辺 270 kb 内に存在する 9 つの内在性遺伝子 (uncharacterized protein KIAA0556 [GenBank accession no. XP_003642159.2], general transcription factor 3C polypeptide 1 [TFIIC, GenBank accession no. XP_004945401.1], protein argonaute 14 isoform X5 [Loc425933, GenBank accession no. XP_423619.3], inactive rhomboid protein 1 isoform X18 [RHBDF1, GenBank accession no. XP_004945411.1], DNA-3-methyladenine glycosylase [MPG, GenBank accession no. XP_414945.4], nitrogen permease regulator 3-like protein isoform X1 [ggPRx, GenBank accession no. XP_003642182.1], transmembrane protein 8A isoform X3 [TMEM8, GenBank accession no. XP_004945418.1], 39S ribosomal protein L28, mitochondrial-like [P15, GenBank accession no. XP_003642183.1], Axin-1 [Axin1, GenBank accession no. NP_990275.1]) と α グロビン遺伝子クラスター内の π , αD 及び αA の発現量を RT-リアルタイム PCR より定量した。GFP/Neo^R 遺伝子を挿入して作成したホモ型細胞と野生型内における内在性遺伝子の発現量を測定した (Figure 1)。挿入配列から 123 kb 離れた Loc425933、5 kb 離れた αA 、55 kb 離れた Axin1 遺伝子の発現量をそれぞれリファレンスとして他の遺伝子の発現量比を算出したところ、遺伝子導入箇所から 20 kb 内に存在する π , αD 及び αA 遺伝子の発現量が顕著に上昇した。ヘテロ型細胞株においても同様に 20 kb 内の遺伝子 π , αD 及び αA 遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された (Figure 2)。導入した遺伝子やカセット配列長による影響について解析するため、GFP/Neo^R と Venus/Puro^R を有するホモ型細胞株を作成し

た (Figure 3, 4)。内在性遺伝子の発現量変化について解析を行ったところ、遺伝子発現コンストラクトを変えたホモ型細胞株も、20 kb 内の遺伝子 π , αD 及び αA 遺伝子の発現量に変化を与えていることが確認された (Figure 5)。4.7 kb の GFP/NeoR と Venus/PuroR をそれぞれ発現させる発現カセットのゲノムへの導入によるゲノム構造への影響について解析するため、3C 解析を行った (Figure 6)。その結果、4.7 kb の発現カセットを新たに導入することによるゲノム構造の大きな変化は誘導されず、野生型と同様の 5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造が検出された。

遺伝子導入によるエピゲノム変化を解析するため、5.2 kb と 3.8 kb のゲノムループ構造に近接して存在する DNA メチル化標的配列である CpG アイランド配列を検索したところ、5 ~ 6 kb 上流に CpG 繰り返し配列の多い CpG アイランドを見出した (Figure 7)。DNA メチル化解析を行うためバイサルファイトシーケンシング用プライマー対を 3 対設計し、CpG アイランド内の約 1kb を解析した (Figure 8)。バイサルファイト処理後の DT40 細胞及び LMH 細胞より抽出精製した DNA を鋳型に PCR を行ったところ、特異性の高い PCR を行うことに成功した (Figure 9)。PCR 産物をクローニング後、DNA メチル化パターンを調べた結果 (Figure 10, 11)、細胞株によってメチル化パターンが異なることが示唆された (Figure 12)。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

本研究では、Illumina HiSeq と比較しより安価でランニングコストの低い MiSeq を使用し、パパイヤ果実から精製したゲノム DNA のシーケンスを行った。その結果、パパイヤゲノムの 31.16 倍 (18,177,038 pair 、 10,906,222,800 bp) の出力配列を得た。解析用インプット配列は、低精度トリミングの閾値を Q20 (99%精度) 50 塩基以上の長さとした場合、17,375,285 pair を得ることができた。

パパイヤ SunUp 品種のゲノム配列 (Nature, 452, 991-996, 2008) をリファレンスに bowtie2 を使用してマッピングを行った結果、49.84%マッピングされた。マップリードとそのペアリード配列を特定し、リードの抽出を行い、抽出したリードを出力データとして、ショートリード用アセンブラーである velvet を用いてアセンブルを行った。その結果、411,911 Contigs、267,082,851 bases を得た。この *de novo* アセンブルデータを使用して、アグロバクテリウム法により挿入された遺伝子組換え配列に共通して存在する Right border 配列、及び、Left border 配列をアンカーに検索を行ったところ、19 bp の right-border 周辺配列 (TCAGTGTGAATGAGATAG) をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、100%相同配列を有する NODE_446,121(1740 bp) のコンティグを得た (Figure 13)。このパパイヤゲノム配列は、Sunup リファレンスの Supercontig16 に帰属するものであることが示唆された。配列を詳細に解析したところ、1~836 bp にトランスジーン配列と Right border 配列、837~1740 bp にパパイヤゲノム配列であることが判明した。以上の結果から、19 bp の right-border 周辺配列をアンカーとして、illumina Miseq で得られた配列から、GM パパイヤの系統特異的な配列を得ることが可能であることが示唆された。次に 19 bp の left-border 周辺配列 (TGTTTACACCAC AATAT) をアンカーとして、*de novo* アセンブルデータを検索したところ、一致する配列は得られなかった。そこで、リファレンス配列にマッピングされなかった unmapped reads を基に検索したところ、369 bp 配列長の 1 リード一致する配列 (A5FPB:1:1114:21442:18611) が得られた (Figure 14)。同配列中にはパパイヤゲノム配列 (1~132 bp) と Right border 配列と Transgene 配列 (133~369 bp) を含むものであった。

GM パパイヤの transgene 発現に汎用されるカリフラワーモザイクウイルス 35SRNA プ

ロモーターの部分配列から GM パパイヤに導入された遺伝子発現用カセット構造配列が抽出可能であるかを検証した。その結果、リファレンス配列にマップされなかった配列を含む 719 bp の 1 リードに P35S 配列 (GenBank access. no. EU327975) に一致する配列とマップされた配列をアセンブルした contig から得られた 1 リード (NODE_344501) に PRSV coat protein gene (GenBank access. no. X97251.1) と一致する配列が得られた。両リードは 68 bp 合致する配列を有した (Figure 15,16)。

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：

DT40 及び LMH において α 遺伝子クラスター周辺の 270 kb ゲノム領域に 3.8 kb と 5.2 kb の 2 つのループを形成することが確認された。5.2 kb ループ内へ導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の 20 kb 内でかつ遺伝子クラスター内で同じゲノムループ内で構成する π と αD 遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、 π 遺伝子は hetero 型で 1 オーダー、homo 型で 2 オーダー、 αD 遺伝子は homo 型で 1 オーダーの違いがあった。遺伝子発現カセット内の遺伝子を代えても同様の結果を示した。また、遺伝子発現カセットのプロモーターと同じ転写方向に並んだ遺伝子 (タンデム遺伝子) の発現は上昇した。この結果から、ループ内で構成するタンデム遺伝子は、基本転写因子群を共有し転写活性を調節する可能性が示唆された。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

MiSeq を利用して得られた 18.2 M pair reads、10,906,222,800 bases のデータベースより、アグロバクテリウム法を利用し組換えら

れた際に共通して存在する Ti ベクター由来の Right border と Left border 配列 (19 bp) をアンカーに GM パパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GM パパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター (P35S) をアンカーに GM パパイアの構造特異的配列を得ることができた。次世代シーケンシング解析より得られる配列データベースより、リアルタイム PCR やシーケンシング解析より得られる GM 作物の部分配列を基にどのような構造遺伝子がゲノム中に導入され、どのような GM 作物の系統であるかを特定できる可能性が示唆された。

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：

ゲノムループなどゲノムの高次構造の変化は、遺伝子発現カセットを挿入した配列から 20 kb 内に存在する内在性遺伝子の発現量を大きく変化させる可能性が示唆された。またゲノムループ構造内では、転写因子複合体が遺伝子間で共有することで転写効率を上げていることを示唆するデータを得た。

次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立：

GM 作物に共通する 19 bp 程度の配列から illumina Miseq で得られる配列データを利用し、GM 作物の系統特異的及び構造特異的な配列を探索可能であることが示された。今後は、加工食品より得られる DNA より同方法で解析可能かを検証する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura,

K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. Food Control, 50, 949-955, 2015

2. Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R. Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK, Ikushugaku Kenkyu, 16, 158-161, 2014
3. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, Food Hygiene and Safety Science, 55, 231-246, 2014
4. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. Food Hygiene and Safety Science, 55, 247-253, 2014
5. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. European Food Research and Technology, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
6. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 21, 48-56, 2014

7. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014

学会発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月.
2. Fukasawa, A., Sakagami, H., Nakahara, Y., Nakamura, K., Ogawa, H. Immobilization method of glycosylated Fmoc-amino acid for SPR and interaction analysis between *Pleurocybella porrigens* lectin and carbohydrates, 27th International Carbohydrate Symposium, India, 2014年1月.
3. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
5. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹：加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しい DNA 抽出精製法の検討、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
6. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物の DNA 精製効率に与える影響について、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
7. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子：Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
8. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
9. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子：成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月
10. 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 年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月
11. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子：RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014 年 11 月

12. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美：遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2014年6月
13. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
14. 中村公亮：未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
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、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏：DNA マイクロアレイによる未

承認遺伝子組換えパパイアのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月

16. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月

H. 知的財産権の取得状況

特許取得

1. 小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一：抗ウイルス剤、特許第5633717号、登録日：2014年10月24日.
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

- NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発 -

研究分担者 吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
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
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
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

研究要旨

New Plant Breeding Techniques (NBT)は、急速な発展の途上にある技術である。そこで、本分野の技術潮流を把握するため、昨年度に引き続きTALENやCRISPRといったNBTの植物分野への応用の状況について論文の調査を行った。その結果、NBTのうち、特にTALENとCRISPRがモデル植物だけではなく、穀類等の実用作物へも盛んに応用されている実態が鮮明になった。世界的には、米国と中国が植物に対する二大NBT実施国となっているが、中国におけるTALEN及びCRISPRの、とくにイネへの使用実態については今後注視する必要があるといえる。また、TALENを適用したモデル植物の作出のため、イネの*FLO2*遺伝子を標的としたTALEN遺伝子の構築を行い、これを用いた形質転換の操作に着手した。これによって得られた植物はTALENを用いたNBT応用植物の各種解析に供することができると考えられる。

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や土壌浄化等の目的に利用されている。これらの新 GMO は、従来の除草剤耐性の食用作物などの GM 植物とは異なり、基本的に非食用であることから、フードチェーンへの混入は健康被害等の重大な問題を引き起こす可能性が高い。また、近年、植物の分子育種技術は長足の進化を遂げており、いわゆる New Plant Breeding Techniques (NBT) に含まれる育種技術のなかには、標的とする遺伝子領域に正確に目的遺伝子を導入可能なものや、標的とする遺伝子領域のみを正確に破壊するような技術が

開発されている。

本研究においては、これらの非食用組換え体ならびに NBT 応用植物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用な検知技術の確立を行うことを目的とする。そのために、代表的な NBT である TALEN を用いたゲノム編集を行ったイネの作出を試みる。

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

NBT 応用状況の文献調査

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

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で ZFN については、ZFN、zinc finger、plant、TALEN については、

TALEN(s)、TAL effector、plant、そして CRISPR については CRISPR、cas9、plant、arabidopsis、nicotiana、をキーワードとして検索を行った (最終検索結果更新日: 2015 年 2 月 24 日)。

検索結果から、植物を対象として遺伝子編集を実施した論文のみを抽出し、リスト化した。また、作成したリストについて発表年別、国別、技術カテゴリー別等に集計し、開発動向の解析を行った。

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、下記の実験を行った。

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

標的とする遺伝子は、すでに変異体が存在し、その表現型が詳しく調べられているイネの *FLO2* 遺伝子 (文献 1) とした。この遺伝子に関する変異体 (*flo2* 変異体) の 1 つである EM37 変異体において、*FLO2* 遺伝子の変異部位が同定されているため、この部位のゲノム編集を試みた。また、この遺伝子の開始コドン付近などの部位についてのゲノム編集を試みるため、Platinum TALEN キットを用いて、対応する塩基配列を認識する TALEN (人工ヌクレアーゼ) 遺伝子の構築を行った。さらに、得られた人工ヌクレアーゼが正常に機能するかどうかを検定するための評価系を構築した。

これによって作製された人工ヌクレアーゼ遺伝子はイネの形質転換に供することができる。

C. 研究結果

文献調査結果

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で各 NBT について検索し、検索結果について、基礎技術に関する論文や総説を除き、植物に NBT を適用した論文のみを抽出した(表 1-3)。また、年度別の実施報告(論文)数、植物種別の実施数、技術カテゴリー及び国別の実施数及び割合、そして、特に、中国が実施した NBT (TALEN, CRISPR)の対象植物種の割合についてグラフ化した。これらの NBT 適用植物リストおよびグラフから、伺える NBT の利用動向は下記のとおりである。

1) NBT カテゴリー別開発動向の解析結果

1-1) ZFN

ZFN の植物への応用について、キーワード: ZFN、zinc finger nuclease、plant で検索したところ、2005 年から 2014 年の 10 年間に、27 報の植物に対する実施報告が見出された(表 1、図 1)。適用された植物は図 2 に示すシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、大豆等の 9 種であり、モデル植物が中心であるが、2014 年にりんごやイチジクへの適用例が報告されている。

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

ZFN については、報告数は図 3 及び 4 に示すように米国が全体の 70%と圧倒的に多

いが、その内訳は、古くから ZFN をはじめとする NBT 研究に注力しているミネソタ大の Voytas らのグループと、Dow AgroSciences LLC のグループからの報告が大半を占めている。これら米国の 2 グループの報告を除くと、ZFN の報告数は、2013 年は 3 報、2014 年は 2 報であり、他の NBT と比較すると、実施数が低調となっている傾向が認められた。

1-2) TALEN

次に、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、2011 年から 2015 年にかけて 21 報の植物に対する実施報告が見出された(表 2、図 1)。適用された植物は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、イネ、タバコ(*Nicotiana tabacum*)、*N. benthamiana*、トウモロコシ、*Brassica oleracea*(アブラナ科)、*Brachypodium*(イネ科、セルロースバイオマス増産研究のモデル植物として期待される)大麦、大豆、小麦の 10 種であった(図 2)。TALEN は 2011 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おり、その報告数は、2011 年の 2 件から、2012 年の 3 件、2013 年は 7 件、そして 2014 年は 6 件と推移している(図 1)。また、2014 年以降は CRISPR との比較研究も行われるようになってきている。

2014 年の Haun らの報告(表 2、ID5)は、大豆の脂肪酸の生合成に関わる 2 種の相同な酵素遺伝子 FAD2-1A 及び FAD2-1B に TALEN を適用することにより、両遺伝子に同時に変異を導入し、大豆油中の一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の含有比率を 20% から 80%に増加させるとともに、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸を 50%から 4%未満に低下させるという品質向上を達成したもので、相同遺伝子に対し同時に変異を導入することができる TALEN の特徴を生かし、

かつ、食用作物を対象として実用的機能改変を達成した好例といえる。なお、Haunらが属するCollectis Plant Sciences社はVoytasらが属するミネソタ大との共同研究を行っており、これまでに大豆だけではなく、ジャガイモ、小麦、キャノーラの遺伝子組換え作物作出の実績がある。

また、2015年のChinese Academy of SciencesのShanらの報告(表2、ID2)によると、Shanらはイネのbetaine aldehyde dehydrogenaseにTALENを用い変異を導入し、香り米(fragrant rice)の主要香気成分である2-acetyl-1-pyrrolineのT1世代コメでの含有量を、遺伝子改変前の0から0.35-0.75 mg/kgに増加させることに成功した。このように中国においては主食作物にNBTを適用し、機能改変を達成している。

1-3) CRISPR

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、2013年から2015年までのわずか2年あまりで31報の実施例が確認された(表3、図1)。適用された植物種は、昨年度に報告した、シロイヌナズナ、イネ、タバコ(*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケに加え、2014年以降、オレンジ、グループフルーツ、トマトと実施された植物種が増え、計11種となった(図2)。

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11種(ゼニゴケを含む)もの植物に適用されていることは注目すべき点である。報告数も、2013年に9報だったものが、2014年に18報と倍増しており、2013年の7報から2014年の6報に微減したTALENと比較すると、その普及の勢いは驚異的である。

また、これまで、CRISPRの実施報告は対象とする植物への適用可能性の検討といったトライアル的なもので占められていたが、2015年のNingらの報告(表3、ID1)は、CRISPRを用いシロイヌナズナの開花に関わる新規NAC転写因子を見出したもので、遺伝子の分子機能解析の手法として利用され始めている実態が明らかになった。

上記の技術カテゴリー別の適用例数は、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 RNA, gRNA)の設計のみが必要とされるといった各NBTの技術的特徴、特に、いかに簡便であるかをよく反映していると考えられ、技術的に簡便なCRISPRが急速に適用例を増やしている実態が明らかになった。

2) 国別開発動向の解析結果

研究が実施された国別でみると、図4に示すように、TALEN及びCRISPRについては、TALENでは米国と中国が全体の71%、CRISPRでは米国と中国で全体の74%と、米国と中国が2大開発国となっていることが示された。中国では、Chinese Academy of Sciencesからの報告数が多い。

中国の開発動向についてさらに詳しくみると、図5のようにTALEN、CRISPR両技術の適用対象植物としてイネがそれぞれ4割を占めており、主食作物であるイネに対する遺伝子改変の取り組みが盛んであることが明らかになった。

NBTモデル植物作出のための基盤技術整備

文献調査の結果等をふまえ、本研究においては、まずTALENを利用した遺伝子編集を

実際に試行した。

1) 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 25 日～26 日に広島大学で開催された「ゲノム編集コンソーシアム」(主宰：広島大学理学研究科数理分子生命理学専攻分子遺伝学研究室山本卓教授)主催の第 7 回人工ヌクレアーゼ作製講習会(Platinum TALEN の作製)に参加した(河野、草野)。これにより TALEN を用いたゲノム編集技術を習得した。

2) TALEN を利用した人工ヌクレアーゼの構築

イネの *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子を構築した。標的部位はこれまでに知られている *flo2* 変異体の変異部位とした。これに加えて、この遺伝子の開始コドン領域などにも標的部位を設定し、それぞれの部位でのゲノム編集が可能な遺伝子構築を終えた(図 6)。TALEN 遺伝子(人工ヌクレアーゼ遺伝子)は Platinum TALEN キットを利用し、標的配列の 2 つの鎖を認識するための TALEN 遺伝子を構築した後、それぞれを 1 つのバイナリーベクターに組み込み、植物で機能するプラスミドを構築した。

3) Platinum TALEN の検証

公表されている Platinum TALEN キットで使用されている *FokI* 遺伝子領域の塩基配列を解析したところ、ここで用いられている *FokI* はホモダイマー型酵素遺伝子であることがわかった。このため、ホモダイマー型 *FokI* によるこのシステムではオフターゲットを引き起こす可能性が高いものと推測された。

4) 形質転換イネの作出

構築した *FLO2* を標的とする TALEN 遺伝子を用いて、イネの形質転換を開始した。

また、これと平行して作製した TALEN 遺伝子の人工ヌクレアーゼ活性の検定を行うためのシステム構築を行った。

D. 考察

今年度は、昨年度に引き続き、NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、同技術が積極的に植物へ利用されている実態が明らかになった。急速に植物への利用が進んでいる TALEN 及び CRISPR であるが、2014 年の報告数を勘案すると、CRISPR は 2013 年から 2014 年にかけて報告数が倍増したのに対し、TALEN は微減しており、実験手法が簡便な CRISPR が台頭しはじめている感がある。また、実施国については、米国と中国が二大 NBT 大国となっている状況が伺える。中国においては、TALEN や CRISPR の実施対象植物として、イネに対する実施報告数が全体の 4 割を占めることも明らかになった。これらの状況より、「中国」の「CRISPR」によって遺伝子改変された「イネ」のフードチェーンへの混入に、今後一層注視する必要があると考えられる。

TALEN を利用した植物の遺伝子編集の試みについては、今年度は、*FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を終えた。これを用いてイネの形質転換をする予定である。形質転換した後、植物個体が再分化するまで数ヶ月を要するが、今後はこれらの再分化植物の中で、ゲノム編集が起こっている個体を選抜することになる。さらに個々の植物におけるゲノム編集パターンを詳しく調べる予定である。

本研究においては、NBT を利用した組換え体をモデルとして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

今年度は、昨年度に引き続き、TALEN や CRISPR といった NBT の植物分野への応用の状況について論文の調査を行い、NBT、特に TALEN と CRISPR がモデル植物だけでなく、穀類等の実用植物へも盛んに応用されている実態が鮮明になった。世界的には、米国と中国が二大 NBT 実施国となっているが、中国における TALEN 及び CRISPR の、特にイネへの使用実態については今後注視する必要があるといえる。

また、イネの *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子の構築を行い、これを用いた形質転換の操作に着手した。これによって得られた植物は、TALEN を用いた NBT の解析に供することができると考えられる。

F. 文献

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. 学会発表

1) 紀平望帆、小野寺瞳、青木裕美、草野博彰、島田浩章 (東京理科大・生物工)「植物ゲノム編集 活性評価ベクター pDual35S-R-Luc+ の開発」第56回植物生理学会年会 2015年3月16日(月)-18日(水) 東京農業大学世田谷キャンパス

2. 論文発表

無し

H. 知的財産権の出願, 登録状況

無し

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その1)

query: ZFN, zinc finger nuclease, plant

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 1	apple, fig Agricultural Research Organization, Bet-Dagan, Israel
PMID:25528147	Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees.
ZFN	Peer R, Rivin G, Golobovitch S, Lapidot M, Gal-On A, Vainstein A, Tzfira T, Flaishman MA. <i>Planta</i> . 2014 Dec 21. [Epub ahead of print]
2014 2	rice International Rice Research Institute Metro Manila, Philippines
PMID:25018764	Identification of safe harbor" loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair."
ZFN	Cantos C, Francisco P, Trijatmiko KR, Slamet-Loedin I, Chadha-Mohanty PK. <i>Front Plant Sci</i> . 2014;5:302. doi: 10.3389/fpls.2014.00302.
2014 3	tobacco University of Minnesota, MN, USA.
PMID:24443519	DNA replicons for plant genome engineering.
ZFN	Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. <i>Plant Cell</i> . 2014 Jan;26(1):151-63. doi: 10.1105/tpc.113.119792. Epub 2014 Jan 17.
2014 4	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:24057367	Tailor-made mutations in Arabidopsis using zinc finger nucleases.
ZFN	Qi Y, Starker CG, Zhang F, Baltes NJ, Voytas DF. <i>Methods Mol Biol</i> . 2014;1062:193-209. doi: 10.1007/978-1-62703-580-4_10.
2013 5	soybean University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23996306	Targeted mutagenesis for functional analysis of gene duplication in legumes.
ZFN	Curtin SJ, Anderson JE, Starker CG, Baltes NJ, Mani D, Voytas DF, Stupar RM. <i>Methods Mol Biol</i> . 2013;1069:25-42. doi: 10.1007/978-1-62703-613-9_3.
2013 6	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23979943	Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases.
ZFN	Qi Y, Li X, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. <i>G3 (Bethesda)</i> . 2013 Oct 3;3(10):1707-15. doi: 10.1534/g3.113.006270.
2013 7	corn Dow AgroSciences LLC, IN, USA
PMID:23953646	Trait stacking via targeted genome editing.
ZFN	Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Zeitler B, Amora R, Corbin DR, Miles RR, Arnold NL, Strange TL, Simpson MA, Cao Z, Carroll C, Pawelczak KS, Blue R, West K, Rowland LM, Perkins D, Samuel P, Dewes CM, Shen L, Sriram S, et al. <i>Plant Biotechnol J</i> . 2013 Dec;11(9):1126-34. doi: 10.1111/pbi.12107. Epub 2013 Aug 19.
2013 8	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:23625357	A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta.
ZFN/TALEN	Johnson RA, Gurevich V, Levy AA. <i>Plant Mol Biol</i> . 2013 Jun;82(3):207-21. doi: 10.1007/s11103-013-0052-1. Epub 2013 Apr 28.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2013 9	tobacco, Arabidopsis University of Michigan, Michigan, USA
PMID:23509176 ZFN	Nonhomologous end joining-mediated gene replacement in plant cells. Weinthal DM, Taylor RA, Tzfira T. Plant Physiol. 2013 May;162(1):390-400. doi: 10.1104/pp.112.212910. Epub 2013 Mar 18.
2013 10	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:23282329 ZFN	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.
2013 11	Arabidopsis Leiden University, Leiden, The Netherlands
PMID:23279135 ZFN	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.
2012 12	Arabidopsis University of Michigan, Michigan, USA
PMID:22082504 ZFN	Zinc finger nuclease and homing endonuclease-mediated assembly of multigene plant transformation vectors. Zeevi V, Liang Z, Arieli U, Tzfira T. Plant Physiol. 2012 Jan;158(1):132-44. doi: 10.1104/pp.111.184374. Epub 2011 Nov 14.
2011 13	Arabidopsis the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:21848915 ZFN	Localized egg-cell expression of effector proteins for targeted modification of the Arabidopsis genome. Even-Faitelson L, Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N, Lewy AA. Plant J. 2011 Dec;68(5):929-37. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04741.x. Epub 2011 Oct 4.
2011 14	soybean University of Minnesota, MN, USA.
PMID:21464476 ZFN	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.
2011 15	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA.
PMID:21181530 ZFN	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.
2011 16	Arabidopsis, soybean Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA
PMID:21151135 ZFN	Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JR, et al. Nat Methods. 2011 Jan;8(1):67-9. doi: 10.1038/nmeth.1542. Epub 2010 Dec 12.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2010 17 PMID:20876340 ZFN	tobacco, petunia Danziger Innovations Ltd., Beit Dagan, Israel Nontransgenic genome modification in plant cells. Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Ovadis M, Tzfira T, Vainstein A. Plant Physiol. 2010 Nov;154(3):1079-87. doi: 10.1104/pp.110.164806. Epub 2010 Sep 27.
2010 18 PMID:20508152 ZFN	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA. 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.
2010 19 PMID:20508151 ZFN	Arabidopsis NIAS, Tsukuba, Japan 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. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 4;108(1):433.
2010 20 PMID:20454835 ZFN	tobacco Dow AgroSciences LLC, IN, USA Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. Petolino JF, Worden A, Curlee K, Connell J, Strange Moynahan TL, Larsen C, Russell S. Plant Mol Biol. 2010 Aug;73(6):617-28. doi: 10.1007/s11103-010-9641-4. Epub 2010 May 8.
2009 21 PMID:19754840 ZFN	Arabidopsis Leiden University, Leiden, The Netherlands 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.
2009 22 PMID:19404259 ZFN	corn Dow AgroSciences LLC, IN, USA Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver 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.
2009 23 PMID:19404258 ZFN	tobacco University of Minnesota, MN, USA. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. Nature. 2009 May 21;459(7245):442-5. doi: 10.1038/nature07845. Epub 2009 Apr 29.
2009 24 PMID:19112554 ZFN	tobacco Dow AgroSciences LLC, IN, USA Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Garrison R, Schulenberg L, Blue R, Worden A, Baker L, Faraji F, Zhang L, Holmes MC, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Plant Mol Biol. 2009 Apr;69(6):699-709. doi: 10.1007/s11103-008-9449-7. Epub 2008 Dec 27.

表1. NBT応用植物に関する文献調査結果(ZFN) (その4)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2008 25 PMID:18657511 ZFN	tobacco Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA Rapid open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification." Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Gabel C, Dassie JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, et al. Mol Cell. 2008 Jul 25;31(2):294-301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
2005 26 PMID:16262717 ZFN	tobacco University of Minnesota, MN, USA. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ Jr, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF. Plant J. 2005 Nov;44(4):693-705.
2005 27 PMID:15677315 ZFN	Arabidopsis University of Utah, UT, USA 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2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その1)

query: TALEN(s), TAL effector, plant

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2015	corn
1	Iowa State University, Ames, USA
PMID:25644697	Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize.
TALEN	Char SN, Unger-Wallace E, Frame B, Briggs SA, Main M, Spalding MH, Vollbrecht E, Wang K, Yang B. Plant Biotechnol J. 2015 Feb 3. doi: 10.1111/pbi.12344. [Epub ahead of print]
2015	rice
2	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:25599829	Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN
TALEN	Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C. Plant Biotechnol J. 2015 Jan 20. doi: 10.1111/pbi.12312. [Epub ahead of print]
2015	Nicotiana benthamiana
3	Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:25403732	Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta.
TALEN/CRISPR	Johnson RA, Gurevich V, Filler S, Samach A, Levy AA. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):143-56. doi: 10.1007/s11103-014-0266-x. Epub 2014 Nov
2014	bread wheat
4	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:25038773	Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew.
TALEN/CRISPR	Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Nat Biotechnol. 2014 Sep;32(9):947-51. doi: 10.1038/nbt.2969. Epub 2014 Jul 20.
2014	soybean
5	Cellectis plant sciences Inc., MN, USA
PMID:24851712	Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene
TALEN	Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Plant Biotechnol J. 2014 Sep;12(7):934-40. doi: 10.1111/pbi.12201. Epub 2014 May 23.
2014	barley
6	Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany
PMID:24643227	True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid
TALEN	Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. PLoS One. 2014;9(3):e92046. doi: 10.1371/journal.pone.0092046.
2014	corn
7	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:24576457	Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system.
TALEN/CRISPR	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
2014	rice
8	Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:24556552	An efficient TALEN mutagenesis system in rice.
TALEN	Chen K, Shan Q, Gao C. Methods. 2014 Aug 15;69(1):2-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.02.013. Epub 2014 Feb 17.

2015: data of 2015/1/1 ~ 2/24

表2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 9	Nicotiana benthamiana, rice Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing, China
PMID:24521457	The last half-repeat of transcription activator-like effector (TALE) is dispensable and thereby TALE-based technology can be simplified.
TALEN	Zheng CK, Wang CL, Zhang XP, Wang FJ, Qin TF, Zhao KJ. Mol Plant Pathol. 2014 Sep;15(7):690-7. doi: 10.1111/mpp.12125. Epub 2014 Apr 10.
2013 10	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA
PMID:23979944	Targeted mutagenesis of Arabidopsis thaliana using engineered TAL effector nucleases.
TALEN	Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. G3 (Bethesda). 2013 Oct 3;3(10):1697-705. doi: 10.1534/g3.113.007104.
2013 11	Brassica oleracea Southwest University, Chongqing, China
PMID:23870552	Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in Brassica oleracea.
TALEN	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.
2013 12	barley Aarhus University, Slagelse, Denmark
PMID:23689819	TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants.
TALEN	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
2013 13	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:23625357	A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta.
TALEN/ZFN	Johnson RA, Gurevich V, Lewy AA. Plant Mol Biol. 2013 Jun;82(3):207-21. doi: 10.1007/s11103-013-0052-1. Epub 2013 Apr 28.
2013 14	rice Iowa State University, Ames, USA
PMID:23430045	Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice.
TALEN	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.
2013 15	rice, Brachypodium Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
PMID:23288864	Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs.
TALEN	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. No abstract available.
2013 16	tobacco University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, China
PMID:23124327	Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering.
TALEN	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.

表2. NBT応用植物に関する文献調査結果(TALEN) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2012 17	rice Colorado State University, CO, USA
PMID:23078195	Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (<i>Oryza sativa</i>) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of <i>Xanthomonas oryzae</i> .
TALEN	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.
2012 18	rice Iowa State University, IA, USA
PMID:22565958	High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice.
TALEN	Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Nat Biotechnol. 2012 May 7;30(5):390-2. doi: 10.1038/nbt.2199. No abstract available.
2012 19	tobacco King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia
PMID:22271303	Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification.
TALEN	Li L, Piatek MJ, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, Sabir JS, Zhu JK, Mahfouz MM. Plant Mol Biol. 2012 Mar;78(4-5):407-16. doi: 10.1007/s11103-012-9875-4. Epub 2012 Jan
2011 20	Arabidopsis University of Minnesota, MN, USA
PMID:21493687	Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.
TALEN	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. Erratum in: Nucleic Acids Res. 2011 Sep 1;39(17):7879.
2011 21	tobacco King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia
PMID:21262818	De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks.
TALEN	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.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その1)

query: CRISPR, cas9, plant, arabidopsis, nicotiana

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2015 1	Arabidopsis National Institute of Biological Sciences, Beijing, China
PMID:25578968	Two novel NAC transcription factors regulate gene expression and flowering time by associating with the histone demethylase JMJ14.
CRISPR	Ning YQ, Ma ZY, Huang HW, Mo H, Zhao TT, Li L, Cai T, Chen S, Ma L, He XJ. Nucleic Acids Res. 2015 Jan 10. doi:pil: gku1382. [Epub ahead of print]
2015 2	Nicotiana benthamiana, Arabidopsis Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
PMID:25403732	Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta.
CRISPR/TALEN	Johnson RA, Gurevich V, Filler S, Samach A, Lewy AA. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):143-56. doi: 10.1007/s11103-014-0266-x. Epub 2014 Nov 18.
2015 3	tobacco Southwest University, Chongqing, China
PMID:25344637	CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Nicotiana tabacum.
CRISPR	Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X, Wu Y, Zhao P, Xia Q. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):99-110. doi: 10.1007/s11103-014-0263-0. Epub 2014 Oct 26.
2015 4	Arabidopsis Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany
PMID:25269397	Site-directed mutagenesis in Arabidopsis thaliana using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles.
CRISPR	Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G. Planta. 2015 Jan;241(1):271-84. doi: 10.1007/s00425-014-2180-5. Epub 2014 Oct 1.
2014 5	corn, Arabidopsis China Agricultural University, Beijing, China
PMID:25432517	A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants.
CRISPR	Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327. [Epub ahead of print]
2014 6	Arabidopsis, tobacco Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA
PMID:25398353	Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco.
CRISPR	Li JF, Zhang D, Sheen J. Methods Enzymol. 2014;546:459-72. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00022-2.
2014 7	rice NIAS, Tsukuba, Japan
PMID:25392068	Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice.
CRISPR	Endo M, Mikami M, Toki S. Plant Cell Physiol. 2014 Nov 11. doi:pil: pcu154. [Epub ahead of print]
2014 8	Arabidopsis Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
PMID:25327456	The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny.
CRISPR	Schimi S, Fauser F, Puchta H. Plant J. 2014 Dec;80(6):1139-50. doi: 10.1111/tpj.12704. Epub 2014 Nov 11.

2015: data of 2015/1/1 ~ 2/24

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その2)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 9	rice, wheat Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:25232936	Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system.
CRISPR	Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C. Nat Protoc. 2014 Oct;9(10):2395-410. doi: 10.1038/nprot.2014.157. Epub 2014 Sep 18.
2014 10	tomato Boyce Thompson Institute for Plant Science, NY, USA
PMID:25225186	Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system.
CRISPR	Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Plant Physiol. 2014 Nov;166(3):1292-7. doi: 10.1104/pp.114.247577. Epub 2014 Sep 15. No abstract available.
2014 11	rice Iowa State University, Ames, IA, USA
PMID:25200087	Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice.
CRISPR	Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Nucleic Acids Res. 2014;42(17):10903-14. doi: 10.1093/nar/gku806. Epub 2014 Sep 8.
2014 12	grapefruit University of Florida, FL, USA
PMID:25146436	Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves.
CRISPR	Jia H, Wang N. Plant Cell Rep. 2014 Dec;33(12):1993-2001. doi: 10.1007/s00299-014-1673-9. Epub 2014 Aug 22.
2014 13	bread wheat Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:25038773	Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew.
CRISPR/TALEN	Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Nat Biotechnol. 2014 Sep;32(9):947-51. doi: 10.1038/nbt.2969. Epub 2014 Jul 20.
2014 14	rice Anhui University, Hefei, China
PMID:24920971	Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas system in rice.
CRISPR	Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J. Rice (N Y). 2014;7(1):5. doi: 10.1186/s12284-014-0005-6.
2014 15	Arabidopsis University of Nebraska, Nebraska, USA
PMID:24918588	Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Arabidopsis thaliana and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations.
CRISPR	Jiang W, Yang B, Weeks DP. PLoS One. 2014;9(6):e99225. doi: 10.1371/journal.pone.0099225.
2014 16	tomato, Arabidopsis University of California, Davis, California, USA
PMID:24868032	Hairy root transformation using Agrobacterium rhizogenes as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model.
CRISPR	Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, Wang D, Reynoso MA, Zumstein K, Garcha J, Winte S, Masson H, Inagaki S, Federici F, Sinha N, Deal RB, Bailey-Serres J, Brady SM. Plant Physiol. 2014 Oct;166(2):455-69. doi: 10.1104/pp.114.239392. Epub 2014 May 27.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その3)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2014 17	rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:24854982	The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation.
CRISPR	Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu JK. Plant Biotechnol J. 2014 Aug;12(6):797-807. doi: 10.1111/pbi.12200. Epub 2014 May 23.
2014 18	Arabidopsis Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
PMID:24836556	Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in Arabidopsis thaliana.
CRISPR	Fausser F, Schiml S, Puchta H. Plant J. 2014 Jul;79(2):348-59. doi: 10.1111/tpj.12554. Epub 2014 Jun 17.
2014 19	sweet orange University of Florida, FL, USA
PMID:24710347	Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA.
CRISPR	Jia H, Wang N. PLoS One. 2014;9(4):e93806. doi: 10.1371/journal.pone.0093806.
2014 20	corn Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:24576457	Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system.
CRISPR/TALEN	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.
2014 21	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.
CRISPR	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 Mar 25;111(12):4632-7. doi: 10.1073/pnas.1400822111. Epub 2014 Feb 18.
2014 22	liverwort Kyoto University, Kyoto, Japan
PMID:24443494	CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort Marchantia polymorpha L.
CRISPR	Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T. Plant Cell Physiol. 2014 Mar;55(3):475-81. doi: 10.1093/pcp/pcu014. Epub 2014 Jan 18.
2013 23	wheat National Agri-Food Biotechnology Institute, Government of India, India
PMID:24122057	RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat.
CRISPR	Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8. doi: 10.1534/g3.113.008847.
2013 24	rice Peking University, Beijing, China
PMID:23999856	Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system.
CRISPR	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. No abstract available.

表3. NBT応用植物に関する文献調査結果(CRISPR) (その4)

Year	Applied plant species
ID	Affiliation, country
Identifiers	Title
Category	Description
	Details
2013 25	Arabidopsis, tobacco, sorghum , rice Iowa State University, IA, USA
PMID:23999092	Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice.
CRISPR	Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Nucleic Acids Res. 2013 Nov;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2.
2013 26	Arabidopsis, rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23963532	Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants.
CRISPR	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. No abstract available.
2013 27	Arabidopsis, rice Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
PMID:23958582	Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system.
CRISPR	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. No abstract available.
2013 28	rice Pennsylvania State University, PA, USA
PMID:23956122	RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system.
CRISPR	Xie K, Yang Y. Mol Plant. 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/sst119. Epub 2013 Aug 17.
2013 29	Nicotiana benthamiana The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK
PMID:23929340	Targeted mutagenesis in the model plant <i>Nicotiana benthamiana</i> using Cas9 RNA-guided endonuclease.
CRISPR	Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):691-3. doi: 10.1038/nbt.2655. No abstract available.
2013 30	Arabidopsis, <i>Nicotiana benthamiana</i> Massachusetts General Hospital, Massachusetts, USA
PMID:23929339	Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in <i>Arabidopsis</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i> using guide RNA and Cas9.
CRISPR	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. No abstract available.
2013 31	rice Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
PMID:23929338	Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system.
CRISPR	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. No abstract available.

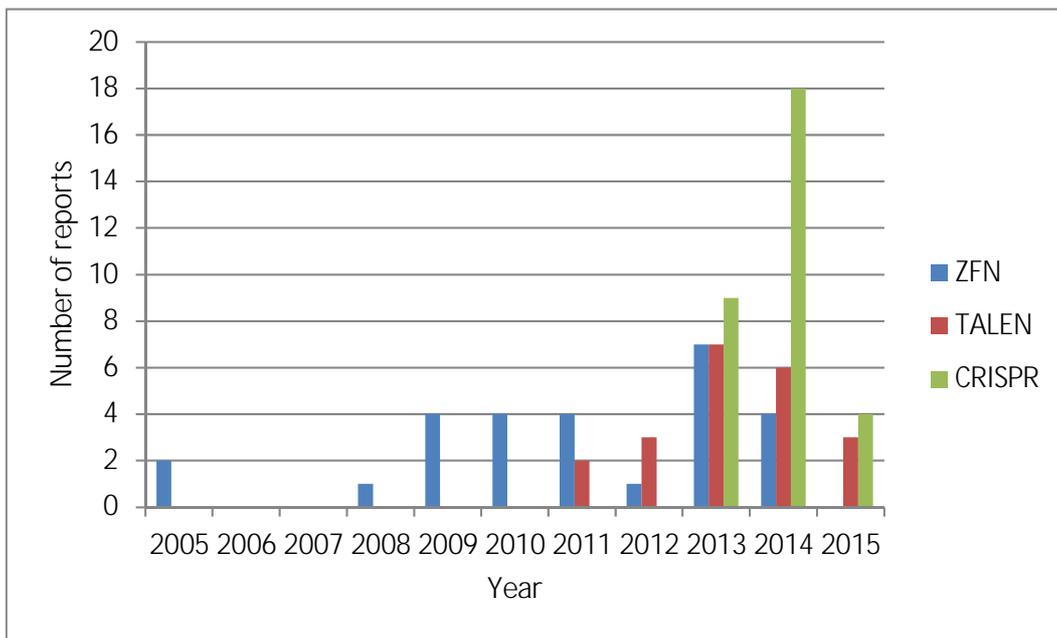


図1. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の植物関連論文数の推移（植物に対する実施報告数）

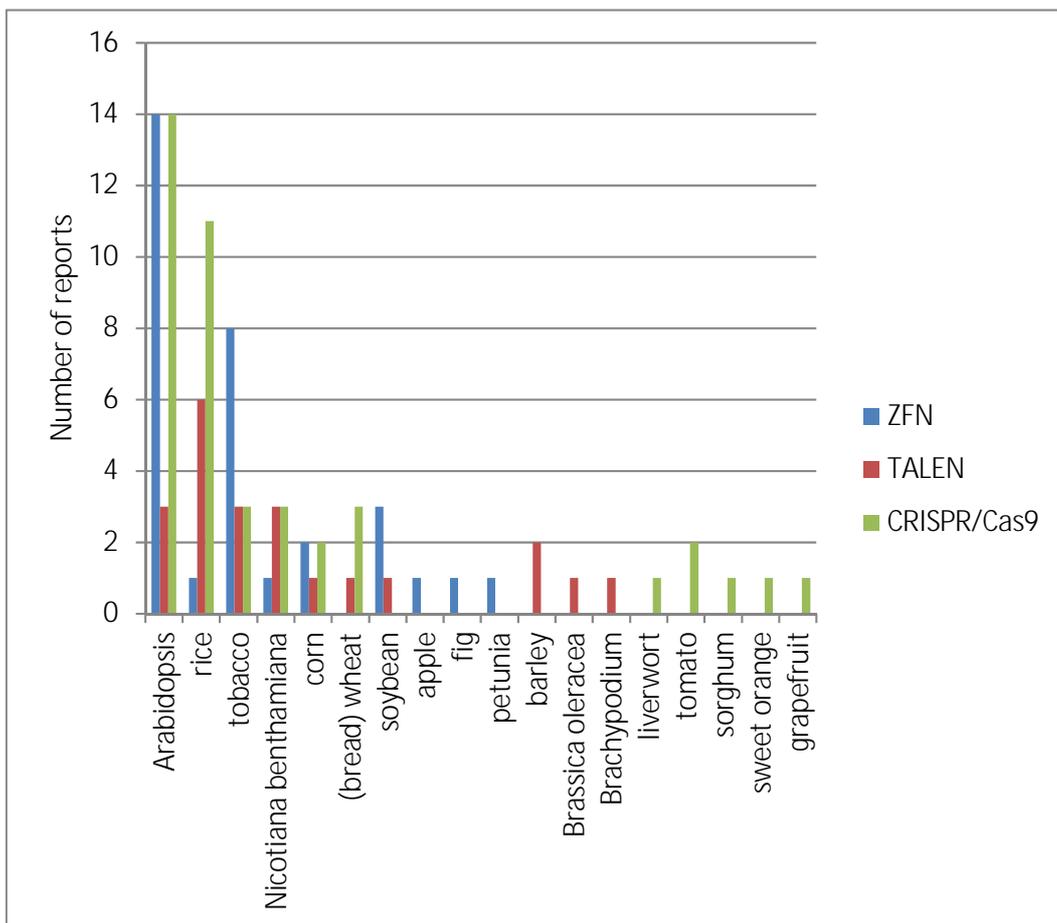


図2. NBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の対象植物別報告数

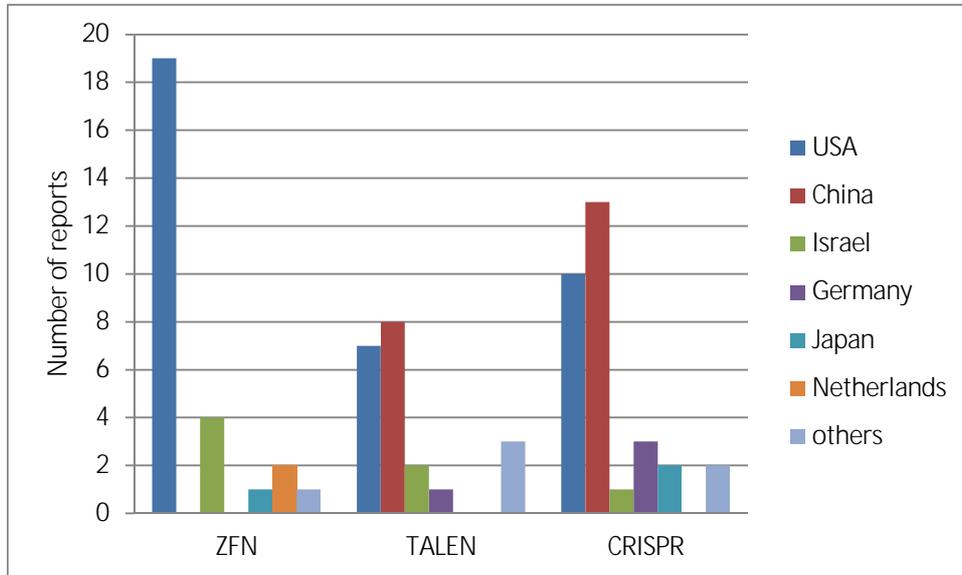


図3. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数

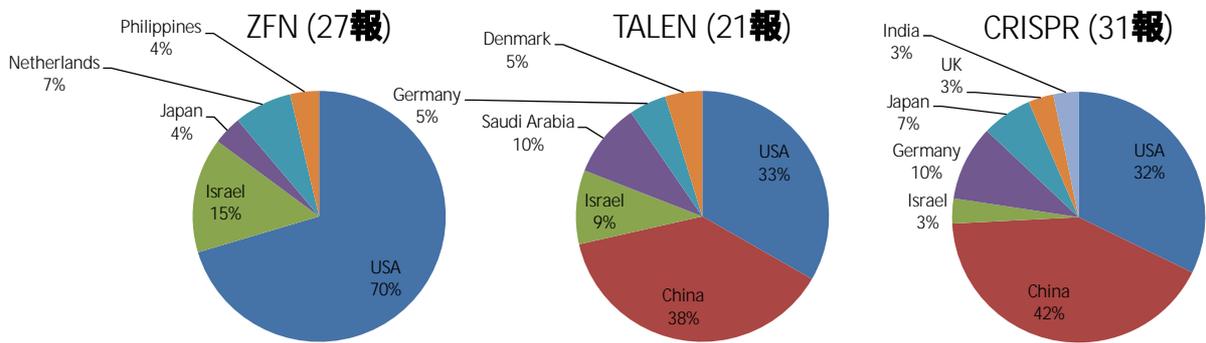


図4. 植物に対し実施されたNBT(ZFN, TALEN, CRISPR)の技術カテゴリー及び国別報告数の割合

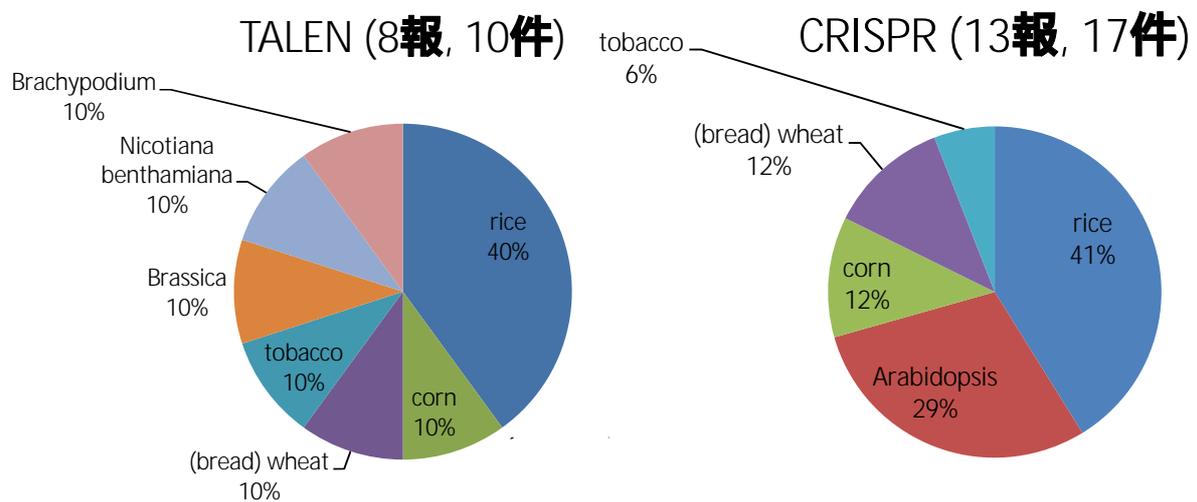


図5. 中国が実施したNBT(TALEN, CRISPR)の対象植物種の割合

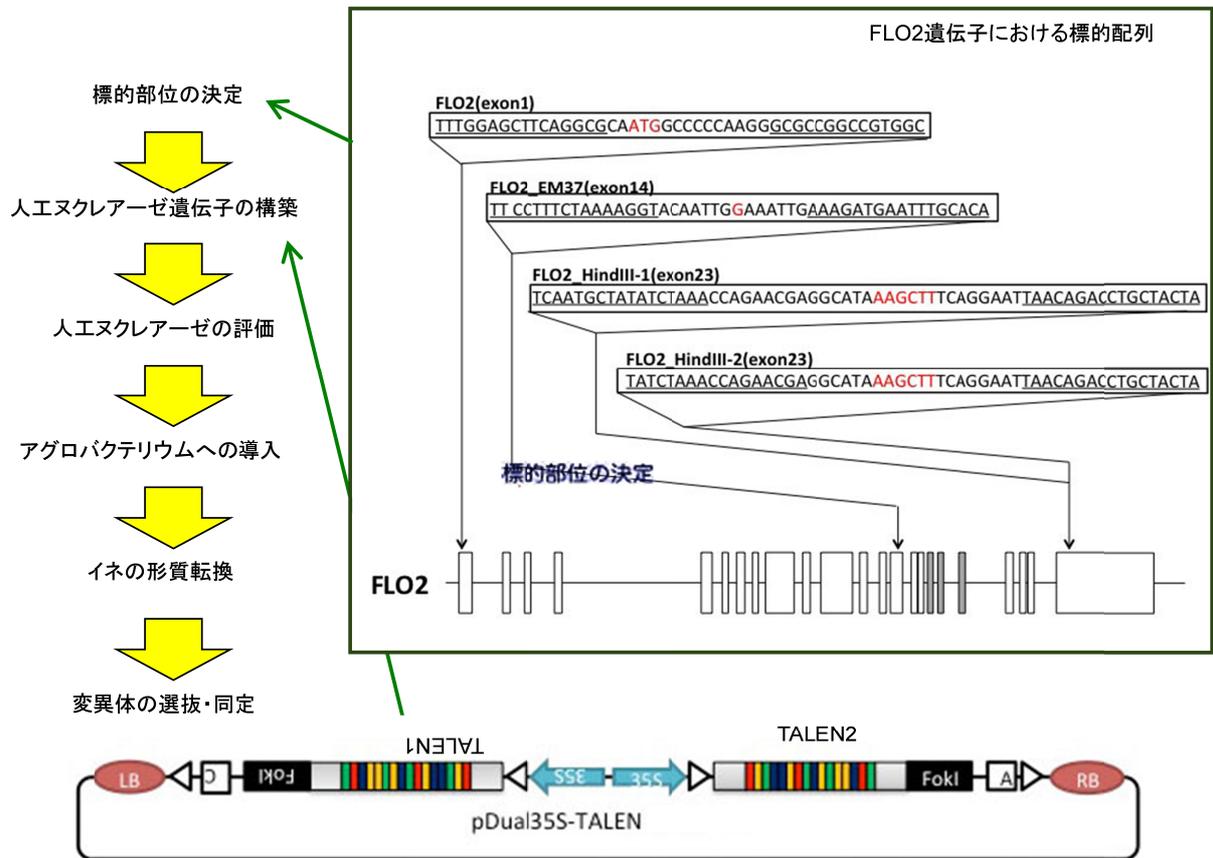


図6. FLO2遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼの標的配列の決定と変異体取得の戦略

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

- 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究 -

研究分担者 吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

研究要旨

遺伝子組換え(GM)植物のうち、新規植物育種法(NBT:New Plant Breeding Techniques)の開発状況を中心に調査した。また、NBTを用いた薬用及び工業用GMも出てきたため、それらも合わせて調査した。カテゴリーとして、NBT、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、工業用(食用作物)の10種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、NBT:14件、機能性食品:1件、経口ワクチン:2件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:1件(NBTと重複)、抗体医薬:1件(NBTと重複)、治療薬:1件、診断薬・試薬:0件、環境浄化:0件、工業用:0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2014年に公表・出版された論文等を調査した結果、65件が得られ、その内訳は、NBT:9件、機能性食品:11件、経口ワクチン:3件、食用医薬:3件、ワクチン抗原:1件、抗体医薬:3件(2件はNBTと重複)、治療薬:15件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:14件、工業用:3件であった。国別では、中国の28件が最も多かった。

A. 研究目的

機能性、薬用、工業用などのGM植物においても新しい遺伝子組換え技術が使用され始めている。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。

そこで本研究では、新規植物育種法(NBT:New Plant Breeding Techniques)¹⁾及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物の開発状況・生産実態に関する

情報を収集して整理し、食品の安全性確保のための基盤情報を整備する。

B. 研究方法

NBT(図1)に関する情報を文献データベース(Scifinder®、検索語「transgenic plant」)、関連学会講演要旨集等を用いて調査した。また併せて薬用、環境浄化、工業用GM植物についても調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。

カテゴリーはNBTのほか、薬用GM植物

に関するものとして、機能的食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬の7種を設定し、その他、環境浄化、工業用の2種を設定し、計10種類を設定した(図2)。

C. 研究結果

本研究班で独自に行ったNBTを用いたGM植物の調査結果を以下に記した。

1) 2014年に国内学会で公表・出版されたNBT及びGM植物に関する論文等

2014年8月開催の第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウムで公表されたNBT及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物に関する報告を表1-表3に示した。19件の情報が得られ、その内訳は、NBT:14件、機能的食品:1件、経口ワクチン:2件、食用医薬:1件、ワクチン抗原:1件(NBTと重複)、抗体医薬:1件(NBTと重複)、治療薬:1件、診断薬・試薬:0件、環境浄化:0件、工業用:0件であり、NBTに関連した研究・開発が最も多かった(表1、表2)。

作物別集計では、イネ6件が最も多かった(表3)。

2) 2014年の国際学会(IAPB2014)でのNBT研究・開発状況

2014年8月10日-15日にオーストラリア、メルボルンで開催されたInternational Association for Plant Biotechnology Congress 2014で公表されたNBT及び薬用、環境浄化用、工業用(食用作物)GM植物に関する報告を表4-表9に示した。39件の情報が得られ、その内訳は、NBT:12件(1件は治療薬と重

複)、機能的食品:12件(飼料に関するもの2件を含む)、経口ワクチン:7件(1件は食用医薬と重複)、食用医薬:1件(経口ワクチンと重複)、ワクチン抗原:0件、抗体医薬:2件、治療薬:3件(1件はNBTと重複)、診断薬・試薬:0件、環境浄化:1件、工業用:3件であり、機能的食品とNBTがいずれも12件と最も多かった(表4-表7)。国別集計では、オーストラリアでの開催のため、オーストラリアが12件と最も多く、次いで米国10件、ドイツ6件であった(表8)。作物別集計では、食用作物はイネ6件が最も多かった(表9)。

3) 2014年に国内外で公表・出版されたGM植物及びNBTに関する論文等(SciFinder®)

SciFinder®(キーワード:transgenic plant)で調査した2014年に公表・出版されたNBT及び薬用、環境浄化、工業用(食用作物)GM植物に関する論文等を表10-表19に示した。65件の情報が得られ、その内訳は、NBT:9件、機能的食品:11件、経口ワクチン:3件、食用医薬:3件、ワクチン抗原:1件、抗体医薬:3件(2件はNBTと重複)、治療薬:15件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:14件、工業用:3件であり、特に治療薬及び環境浄化の件数が多かった(表10-表16)。また、2014年の国別の件数は、中国28件が最も多く(表17)、作物別集計では、食用作物はイネ9件が最も多かった(表18)。

D. 考察

今回の調査から、国内外でNBTに関する研究・開発が増加しており、本分野において、中国での研究開発が、昨年度と同様に活発であ

ることが判明した。今後は、NBT を用いた GM 植物の調査結果を中心に、薬用、工業用 GM 植物、及び GM 動物の調査結果も合わせたデータベース作成のための資料をまとめる必要がある。

E. 結論

NBT 及び薬用、環境浄化用及び工業用（食用作物）GM 植物の研究・開発状況の調査の結果、国内では NBT に関する件数が多く、国内外では治療薬及び環境浄化の件数が多いことが判明した。また、国内外での研究・開発のうち、件数が最も多い国は、昨年度と同様、中国であった。次世代組換え技術を用いた動物の開発も活発に行われており、引き続き情報収集が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

I. 参考文献

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

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

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

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

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

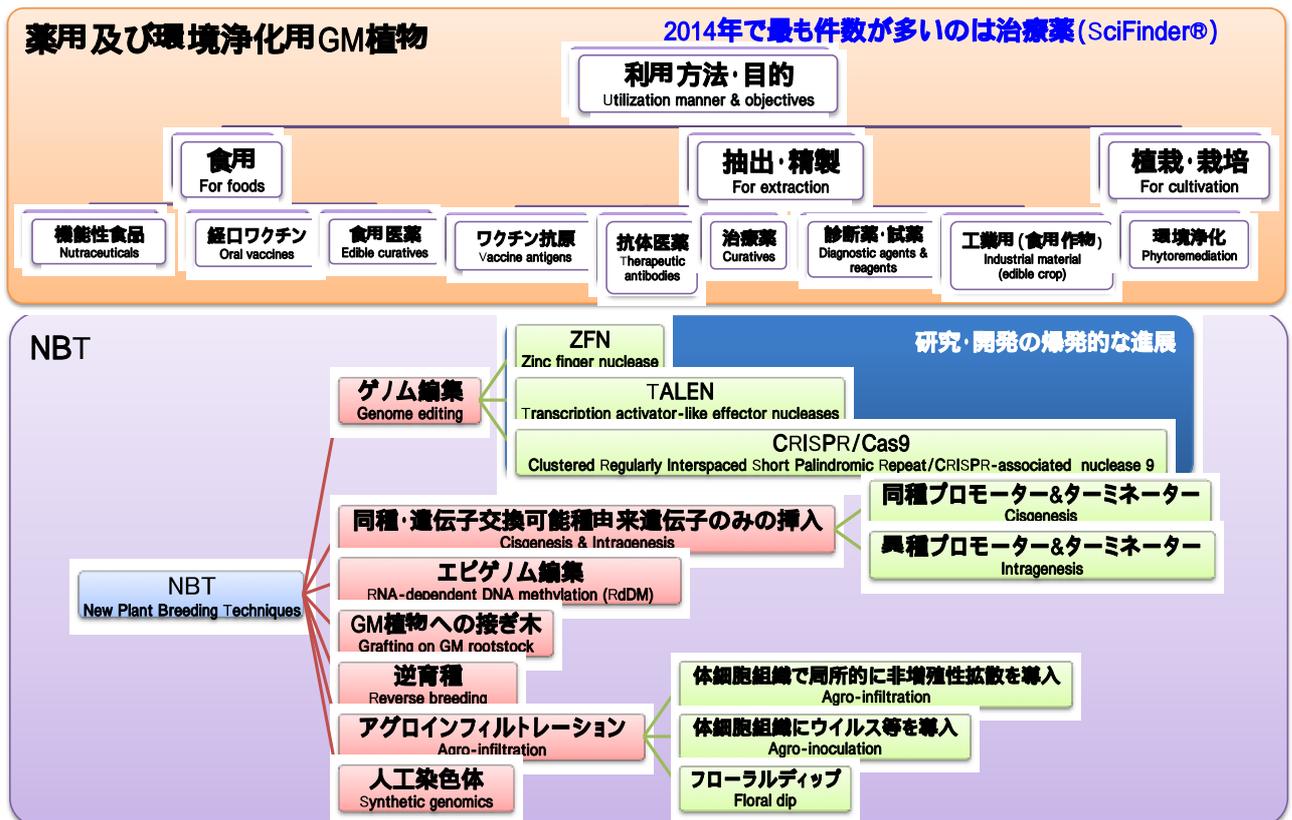


図 2. NBT と薬用、環境浄化用、工業用 GM 植物の研究・開発状況の調査

表1. NBT 研究・開発状況 (国内 ; 2014)

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)では以下の例が報告

NBTの種類	作物	議題	研究・開発機関
NBT	イネ	CRISPR/Casシステムを利用したイネの多重遺伝子破壊	日本・農業生物資源研、横浜市立大院
NBT	シロイヌナズナ	人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたシロイヌナズナ多重変異体の作製	日本・大阪大院、JSPS、広島大院
NBT	イネ	イネに適したCRISPR/Casコンストラクトの選定	日本・横浜市立大院、農業生物資源研
NBT	イネ	植物におけるピンポイント変異導入技術の開発	日本・農業生物資源研、横浜市立大
NBT	イネ	形質転換技術を利用したイネゲノムの人為的改変	日本・農業生物資源研
NBT	シロイヌナズナ、タバコ	dsRNA-ペプチド複合体の導入による一過性RNAi技術の開発	日本・理研、奈良先端大院、慶應大、宇都宮大
NBT	リンドウ	リンドウの生長・開花を抑制するSVP様遺伝子の発現と機能	日本・岩手大、八橋平市花き開発研セ
NBT	植物	遺伝子置換による形質転換促進技術の開発	日本・信州大
NBT -1	イチゴ	アグロインフィルトレーション法を用いた F3'5'H 過剰発現によるイチゴ花托の着色への影響	日本・徳島大、徳島大院
NBT -1	タバコ	多孔プレートを用いたアグロインフィルトレーション法のハイスループット化	日本・横浜国立大
NBT -1、抗体医薬	タバコ(Nicotiana benthamiana)	組換え植物発現タンパク質におけるN-結合型糖鎖修飾の解析	日本・産総研、ホクサン
NBT -2	タバコ(Nicotiana benthamiana)	Cucumber mosaic virusゲノム発現組換え植物体を用いたCMVベクター利用の簡便化	日本・産総研、北海道大院
NBT -2、ワクチン抗原	タバコ(Nicotiana benthamiana)	ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産:栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響	日本・東京大院、オーエンスポロ癌研究プロ、ルイビル大
NBT -3	シロイヌナズナ	初期生長量が増大したアラビドプシス形質転換体の作出	日本・千葉大院

2014年の調査ではNBT14件のうち、Agro-infiltrationが6件で最も多い

表2. GM 植物(機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、抗体医薬、ワクチン抗原、治療薬) 研究・開発状況 (国内 ; 2014)

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)では以下の例が報告

区分	作物	議題	研究・開発機関
機能性食品	イネ	イネ由来改変AK-HSDH 遺伝子を導入した形質転換カルスにおける遊離スレオニンの蓄積	日本・農研機構・作物研、北興化学
経口ワクチン	レタス(Lectuca sativa var. crispa)	食べるワクチンの開発に向けたレタスにおける ウイルス様粒子の一過性発現	日本・筑波大、医薬基盤研
経口ワクチン	レタス	遺伝子組換えレタスを用いたブタ大腸菌症用 コンビネーションワクチンの開発	日本・出光興産、国立国際医療研セ
食用医薬	イネ	抗菌タンパク質を発現するイネカルスの解析	日本・京都府立大、京都農技セ
NBT -1、抗体医薬	タバコ(Nicotiana benthamiana)	組換え植物発現タンパク質におけるN-結合型糖鎖修飾の解析	日本・産総研、ホクサン
NBT -2、ワクチン抗原	タバコ(Nicotiana benthamiana)	ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産:栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響	日本・東京大院、オーエンスポロ癌研究プロ、ルイビル大
治療薬	緑藻 (Chlamydomonas reinhardtii)	組換え緑藻によるマツ(Picea abies)由来ジテルペンの生産	日本・大阪大院、名古屋大

黄色背景:NBTと重複

2014年の調査では、薬用・環境浄化用・産業用(食用作物)に関する研究例は2013年の調査に比較すると少ない(2013年:17件、2014年:7件、重複含む)

表3. NBTを含むGM植物：作物別集計（国内；2014）

第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム(2014.8、盛岡)での調査結果

作物名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
イネ	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	6
イチゴ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
レタス	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
リンドウ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
シロイヌナズナ	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
タバコ	5	0	0	0	1	1	0	0	0	0	7
緑藻	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
植物	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
小計	15	1	2	1	1	1	1	0	0	0	22

NBT:重複1件(シロイヌナズナ-タバコ) タバコ:重複2件(NBT-抗体医薬、NBT-ワクチン抗原)

食用作物ではイネが最も多く、その中でもNBTへの使用例が多い

表4. NBT研究・開発状況（海外；2014）

International Association for Plant Biotechnology Congress 2014, Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10–15, 2014
NBT12件のうち、②Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM):7件が最も多い

区分	作物	演題	研究・開発機関
NBT①	オオムギ	True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells	ドイツ & イタリア: Leibniz-institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Institute of Biosciences and BioResources
NBT①、NBT②	カノーラ	Genome editing in canola: ZFN mediated precision targeting	オーストラリア&米国: Bundoora, La Trobe University, Dow AgroSciences
NBT①、NBT②	コムギ	Precise trait engineering in wheat using EXZACT™ technology	オーストラリア&米国: VIC Australia, Dow AgroSciences LCC
NBT①、NBT②	トウモロコシ	EXZACT™ Precision technology: engineering plant genome with ZFNs	米国: Dow AgroSciences
NBT②	イネ	Site-directed mutagenesis in rice by a combination of gene targeting and marker elimination	日本: National Institute of Agrobiological Sciences, University of Tokushima, Yokohama City University
NBT②	ジャガイモ	Targeted gene insertion through genome editing	米国: J.R. Simplot Company
NBT②	植物	KeyBase®: a targeted mutagenesis technology for the improvement of crop species	オランダ: Keygene N.V. Wageningen
NBT②	タバコ、イネ	Recombinase-directed plant gene transfer	中国: Chinese Academy of Sciences
NBT⑦-1	タバコ (Nicotiana benthamiana)	Medium-chain fatty acid biosynthesis in plant leaf lipids: synthesis in combination with high accumulation	オーストラリア: Food Futures National Research Flagship, Graham Centre for Agricultural Innovation, CSIRO Ecosystem Sciences, CSIRO Plant Industry
NBT⑦-1、治療薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	Improving the expression and activity of recombinant human epidermal growth factor in Nicotiana benthamiana	オーストラリア: Monash University, Alfred Hospital
NBT⑦-2	植物	Gene expression in stably and transiently modified plants	ドイツ: Icon Genetics
NBT⑧	植物	Development of engineered minichromosomes in plants	米国: University of Missouri

表5. GM植物(機能性食品)研究・開発状況(海外;2014)

International Association for Plant Biotechnology Congress 2014, Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014
 機能性食品12件のうち、トマト:5件が最も多い

区分	作物	演題	研究・開発機関
機能性食品	イネ	Nutritional enhancement of rice bran oil: Metabolic engineering using Brassica juncea microsomal w-3 desaturase gene (BjFad3)	インド: Indian Institute of Technology Kharagpur
機能性食品	カノーラ、油糧作物	Novel plant products: multi-gene engineering comes of age	オーストラリア: CSIRO Food
機能性食品	シロイヌナズナ	Storage triacylglycerol mobilization in germinating transgenic Arabidopsis seeds containing nutritionally important polyunsaturated fatty acids	オーストラリア: CSIRO Food Futures National Research Flagship, CSIRO Plant Industry
機能性食品	トマト、ジャガイモ	"Golden" tomato fruit and potato tubers show elongated shelf-life and hormone production	イタリア&ドイツ&カナダ&米国: ENEA, University of Rome, Max-Planck Institute for Molecular Plant Physiology, University of British Columbia, Boyce Thompson Institute
機能性食品	トマト	Metabolic engineering in crops for comparative nutrition and health-promoting foods	英国&ドイツ&イタリア: the John Innes Centre, Max-Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Institute of Sciences of Food Production CNR Unit of Lecce
機能性食品	トマト	Transgenic tomato accumulating miraculin, a possible diet for human health	日本: University of Tsukuba, Inplanta Innovations Inc.
機能性食品	トマト	The enhancement of umami flavour in tomato (Solanum lycopersicum) through the overexpression of adenosine monophosphate (AMP) deaminase gene	マレーシア & 英国: Universiti Sains Malaysia, University of Nottingham
機能性食品	トマト	Production of marker-free transgenic tomato plants using inducible site-specific recombinase and a bifunctional selectable gene	ロシア: Branch of Shemyakin Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology
機能性食品	バナナ	Genetically modified bananas with enhanced micronutrients	オーストラリア&ウガンダ: Queensland University, Queensland Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, National Agricultural Research Organization, Uganda
機能性食品	ワタ	Extreme makeover of cotton seed oil through RNAi-mediated gene down-regulation	オーストラリア: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Plant Industry, ACT
機能性食品(飼料)	ライグラス	Engineered cysteine-oleosin and enhanced DGAT1 for lipid manipulation in ryegrass	ニュージーランド: AgResearch Grassland
機能性食品(飼料)	ライグラス	High energy perennial ryegrass with elevated levels of unsaturated, protected fatty acids	ニュージーランド: AgResearch Ltd.

表6. GM植物(経口ワクチン、食用医薬、抗体医薬)研究・開発状況(海外;2014)

International Association for Plant Biotechnology Congress 2014, Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014
 薬用GM植物の中では機能性食品: 12件に次いで経口ワクチン: 7件が多い

区分	作物	演題	研究・開発機関
経口ワクチン	ニンジン	Expression of TSOL 18 antigen in carrots cell: towards the development of a vaccine against porcine cysticercosis	メキシコ&スペイン: Universidad Autonoma de San Luis Potosi, Ciudad Universitaria, Instituto de Salud Carlos III
経口ワクチン	イネ	Whole genome analysis selection marker-free Muco-Rice-CTB, a rice-based oral cholera vaccine	日本: The University of Tokyo, Asahikogyocho, Co., Ltd., National Agriculture and Food Research Organization
経口ワクチン	イネ	Establishment of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccines and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis	日本: The University of Tokyo, Niigata University, NARO Agriculture Research Center
経口ワクチン	ウキクサ	The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B ricin in transgenic duckweed plants	ロシア: Branch of Shemyakin Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS
経口ワクチン	タバコ	A plant-based recombinant PlpE vaccine for Fowl Cholera	オーストラリア: Monash University
経口ワクチン	ナス科植物	Plant roots as an efficacious vaccine production system using E. coli LTB as a model antigen	オーストラリア: Deakin University, Monash University
経口ワクチン、食用医薬	レタス	Low cost green oral vaccines confer protection against infectious and inherited diseases	米国: University of Pennsylvania
抗体医薬	ジャガイモ	Production of potyvirus-resistant potato (Solanum tuberosum L.) plants expressing a recombinant antibody against the viral replicase NIa	ドイツ&エジプト: Leibniz University Hannover, University of Cairo
抗体医薬	トウモロコシ、タバコ	Plant-derived biopharmaceuticals: the path forward towards clinical trials and regulatory approval	ドイツ: RWTH Aachen University & Fraunhofer IME

表 7. GM 植物（治療薬、環境浄化、工業用）研究・開発状況（海外；2014）

International Association for Plant Biotechnology Congress 2014, Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014
 (黄色背景はNBTと重複)

区分	作物	演題	研究・開発機関
NBT⑦-1、治療薬	タバコ(Nicotiana benthamiana)	Improving the expression and activity of recombinant human epidermal growth factor in Nicotiana benthamiana	オーストラリア: Monash University, Alfred Hospital
治療薬	キク科植物	Production of the anti-malarial drug artemisinin in chrysanthemum	ロシア&イスラエル: Russian Academy of Sciences, The Hebrew University of Jerusalem
治療薬	ニチニチソウ	Metabolic engineering of terpenoid indole alkaloid pathway in Catharanthus roseus	フィンランド: VTT Technical Research Centre of Finland
環境浄化	ポプラ	Analysis of the role of a Kunitz trypsin inhibitor in the response of poplar (Populus deltoides) to copper stress	チリ&フランス: Universidad de Talca, Universite de Lorraine
工業用(バイオ燃料)	サトウキビ	Engineering plants as biofactories for the production of biobased bulk chemicals	米国&オーストラリア: The University of North Texas, The University of Queensland
工業用(バイオ燃料)	イネ	Down-regulation of genes involved in lignin biosynthesis in rice	米国: University of Arkansas
工業用(バイオ燃料)	カノーラ、ナガミノアマナズナ	Enhanced DGAT1s for TAG manipulation in seed-oil crops	ニュージーランド&カナダ: AgResearch Grassland, National Research Council: Plant Biotechnology Institute

表 8. NBT を含む GM 植物研究・開発状況：国別集計（海外；2014）

国名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
日本	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	4
中国	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
台湾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
韓国	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
オーストラリア	4	4	2	0	0	0	1	0	0	1	12
ニュージーランド	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	3
マレーシア	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
インド	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
イスラエル	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
トルコ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
カナダ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
米国	5	1	1	1	0	0	0	0	0	2	10
メキシコ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
チリ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
ロシア	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
チェコ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
フィンランド	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
スウェーデン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
英国	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
ドイツ	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	6
フランス	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
オランダ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
イタリア	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
スペイン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
エジプト	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
ウガンダ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
小計	15	19	8	1	0	3	4	0	2	5	57

区分:重複2件(NBT-治療薬:1件、経口ワクチン-食用医薬:1件) NBT:重複3件(オーストラリア-米国:2件、ドイツ-イタリア:1件)
 機能性食品:重複6件(オーストラリア-ウガンダ:1件、マレーシア-英国:1件、英国-ドイツ-イタリア:1件、イタリア-ドイツ-カナダ-米国:1件) 経口ワクチン:重複1件(メキシコ-スペイン)
 抗体医薬:重複1件(ドイツ-エジプト) 治療薬:重複1件(ロシア-イスラエル) 環境浄化:重複1件(チリ-フランス) 工業用:重複2件(米国-オーストラリア:1件、ニュージーランド-カナダ:1件)

表9. NBTを含むGM植物研究・開発状況：作物別集計（海外；2014）

作物名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断・薬試薬	環境浄化	工業用	小計
イネ	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1	6
オオムギ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
カノーラ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3
コムギ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
サトウキビ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ジャガイモ	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
トウモロコシ	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
トマト	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ナス科植物	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ニンジン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
バナナ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
レタス	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
ワタ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
油糧作物	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ウキクサ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
キク科植物	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
シロイヌナズナ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
タバコ	3	0	1	0	0	1	1	0	0	0	6
ナガミノアマナズナ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ニチニチソウ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ボブラ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
ライグラス	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
植物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
小計	13	14	7	1	0	3	3	0	1	4	46

NBT:重複1件(イネ-タバコ) 機能性食品:重複2件(カノーラ-油糧作物:1件、トマト-ジャガイモ:1件) 抗体医薬:重複1件(トウモロコシ-タバコ)
 工業用:重複1件(カノーラ-ナガミノアマナズナ) レタス:重複1件(経口ワクチン-食用医薬) タバコ:重複1件(NBT-治療薬:1件)

表10. NBTを用いたGM植物研究・開発状況（海外；2014）

区分	作物	研究・開発機関	文献等
NBT	イネ	中国: Anhui Academy of Agricultural Sciences, Anhui University	Xu Rongfang; LI Li; LI Hao; Wei Pengcheng; Qin Ruiying; Wang Lu; Yang Jianbo, "Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas system in rice", Rice (New York, N.Y.) (2014), 7(1), 5.
NBT	シロイヌナズナ	日本: The University of Tokyo, Japan; Kabushiki Kaisha Toyota	Muramoto, Nobuhiko; Sugimoto, Hiroki; Mitsukawa, Norihiro; Ohta, Kunihiro; Kugou, Kazuto, "Method for increasing prodn. of plant biomass by expressing endonuclease that promotes double-stranded DNA breaks and endoreduplication while not inducing RAD51 transcription", U.S. Pat. Appl. Publ. (2014), US 20140273126 A1 20140918.
NBT	マテバシイ	日本: 記載なし	Shimizu, Nobuyoshi; Ito, Hayao, "Generation of transgenic plant with fire-resisting leaf for prevention of forest fire", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2014), JP 2014236719 A 20141218.
NBT	ナタネ	米国: Dow AgroSciences LLC	Cogan, Noel; Forster, John; Hayden, Matthew; Sawbridge, Tim; Spangenberg, German; Webb, Steven R.; Gupta, Manju; Ainley, W. Mike; Henry, Matthew J.; Mason, John; et al, "Methods for targeted integration of transforming DNA into plant genomes using synthetic site-specific nucleases", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014039872 A1 20140313.
NBT -1	イネ	日本: National Institute of Agrobiological Sciences	Nishizawa-Yokoi, Ayako; Endo, Masaki; Osakabe, Keishi; Saika, Hiroaki; Toki, Seichi, "Precise marker excision system using an animal-derived piggyBac transposon in plants", Plant Journal (2014), 77(3), 454-463.
NBT	トマト、トウゴマ、ボブラ、ブドウ、イネ、ソルガム	米国: University of Arkansas	Khodakovskaya, Mariya, "Method for producing abiotic stress tolerant transgenic plants by silencing gene encoding calcium-dependent lipid-binding proteins with C2 domain", U.S. Pat. Appl. Publ. (2014), US 20140082767 A1 20140320.
NBT	バラ科の果樹(リンゴ、モモ)	日本: Iwate University	Yoshikawa, Nobuyuki; Yamagishi, Noriko, "Genetic method for shortening breeding cycle of a Rosaceae fruit tree", Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2014), JP 2014183754 A 20141002.
NBT -2, 抗体医薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	スペイン: CSIC, Universidad Politecnica de Valencia; Universidad de las Palmas de Gran Canaria	Orzaez Calatayud, Diego Vicente; Julve Parreno, Jose Manuel; Granell Richart, Antonio; Sarrion-Perdigones, Alejandro; Gutierrez, Cabrera Carlos, "Method for the production of complex repertoires of recombinant molecules", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014044892 A1 20140327.
NBT -2, 抗体医薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	スペイン: CSIC, Universidad Politecnica de Valencia, Universidad de las Palmas de Gran Canaria	Orzaez Calatayud, Diego Vicente; Julve Parreno, Jose Manuel; Granell Richart, Antonio; Sarrion-Perdigones, Alejandro; Gutierrez, Cabrera Carlos, "Method for the production of complex repertoires of recombinant molecules, such as antibodies, in transgenic plants", Span. (2014), ES 2456823 A1 20140423.

検索語「transgenic plant」では抽出されるNBTはそれほど多くなく、2014年度は9件(2013年と同数) そのうち、nuclease technology(ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas)が最も多い

表 11. 2014 年の GM 植物（機能性食品）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
機能性食品	アムールブドウ	ロシア: Far East Branch of Russian Academy of Sciences	Aleynova-Shumakova, O. A.; Dubrovina, A. S.; Manyakhin, A. Y.; Karetin, Y. A.; Kiselev, K. V., "VaCPK20 gene overexpression significantly increased resveratrol content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of Vitis amurensis Rupr." Applied Microbiology and Biotechnology (2014), 98(12), 5541-5549.
機能性食品	イネ	中国: South China Agricultural University	Tian, Hua; Tang, Xiangru; Pan, Shenggang; Duan, Meiyang; Xiao, Lizhong; Zhong, Keyou, "Cloning and application of aromatic rice fragrance content related gene OsPRO", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104031927 A 20140910.
機能性食品	オオムギ	中国: Gansu Academy of Agricultural Sciences	Li, Jing-wen; Zhang, Zheng-ying; Ling, Li-jun; Li, Shu-jie, "Creating low grain protein content barley by suppressing B-hordein synthesis through RNA interference", Zhongguo Nongye Kexue (Beijing, China) (2014), 47(19), 3746-3756.
機能性食品	植物	カナダ: University of Alberta	Weselake, Randall J.; Mietkiewska, Elzbieta, "Gene combinations for producing punicic acid in transgenic plants", Can. Pat. Appl. (2014), CA 2810336 A1 20140925.
機能性食品	植物	韓国: Rural Development Administration	Lim, Seon Hyeong; Ha, Seon Hwa; Song, Ji Hye; Kim, Jae Gwang; Lee, Jong Ryeol; Kim, Yeong Mi; Ku, Bon Seong, "Anthocyanin biosynthesis gene rsmby1 of protein and expression vector utilized for producing transgenic plant with accumulated anthocyanin", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2014), KR 2014126528 A 20141031
機能性食品	植物	中国: Sun Yat-Sen University	Li, Yin; Huang, Shangzhi; Liu, Chen; Yan, Ruiqing, "Sequence of peanut lysophosphatidic acid acyl transferase gene LPAAT1 and its use in increasing seed polyunsaturated fatty acids", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103725700 A 20140416.
機能性食品	タバコ、イネ	中国&日本: China Agricultural University, China; The University of Tokyo, Japan; Ishikawa Prefectural University, Japan	Xiong Hongchun; Guo Xiaotong; Shen Hongyun; Qiu Wei; Kobayashi Takonori; Nishizawa Naoko K; Kakei Yusuke; Nakanishi Hiromi; Nozoye Tomoko; Zhang Lixia; et al, "Expression of peanut Iron Regulated Transporter 1 in tobacco and rice plants confers improved iron nutrition", Plant physiology and biochemistry: PPP / Societe francaise de physiologie vegetale (2014), 80, 83-9.
機能性食品	トマト	中国: Hefei University of Technology	Li, Guangwei; Niu, Xiangli; Zhou, Ang; Chen, Danyang; Liu, Yongsheng, "Actinidia chinensis gene capable of increasing Lycopersicon esculentum fruit nutritional quality and application", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104004768 A 20140827.
機能性食品	ナガミノアマナズナ	英国: 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", Plant Journal (2014), 77(2), 198-208.
機能性食品	ナス科作物	イスラエル: Yeda Research and Development Co. Ltd.	Aharoni, Asaph; Itkin, Maxim, "Plant with altered content of steroidal glycoalkaloids resulting from modulated expression of GAME9-transcription factor, GAME11 gene encoding 2-oxoglutarate dependent dioxygenase and BHLH-transcription factor", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014195944 A1 20141211.
機能性食品	トウモロコシ	米国: JM Biologicals	Messing, Joachim; Ciclitira, Paul J., "A method for detecting CD-inducing epitopes in wheat glutenin and gliadin proteins for the production of gluten free food products", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014182897 A2 20141113.

表 12. 2014 年の GM 植物（経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
経口ワクチン	アルファルファ	中国: Inner Mongolia University of Science and Technology	Zhao, Liang; Wang, Jing-yan; Wang, Jian-ying; Guo, Jiang-bo; Xin, Cui-hua, "Construction of Brucella rOmp3148-74-BLS expression vector and its transformation into alfalfa", Zhiwu Yanjiu (2014), 34(4), 505-509.
経口ワクチン	シロイヌナズナ、ニンジン	スウェーデン: Orebro University	Lindh, Ingrid; Braave, Andreas; Hallengaerd, David; Hadad, Ronza; Kalbina, Irina; Strid, Aake; Andersson, Soeren, "Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses", Vaccine (2014), 32(20), 2288-2293.
経口ワクチン	タバコ	イタリア: Universita di Milano	Rossi, Luciana; Pinotti, Luciano; Agazzi, Alessandro; Dell'Orto, Vittorio; Baldi, Antonella, "Plant bioreactors for the antigenic hook-associated flgK protein expression", Italian Journal of Animal Science (2014), 13(1), 23-29.
食用医薬	タバコ	イスラエル: Protalix Ltd., Israel; Hadasit Medical Research Services and Development Ltd.	Ilan, Yaron; Shaaltiel, Yoseph; Hanania, Uri; Kizhner, Tali; Ariel, Tami; Gingis-Velitski, Svetlana, "Tumor necrosis factor receptor fusion proteins for use as tumor necrosis factor antagonists and their manufacture in plants", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014136117 A1 20140912.
食用医薬	タバコ	インド: CSIR-NBRI	Pandey, Ashutosh; Misra, Prashant; Khan, Mohd. P.; Swarnkar, Gaurav; Tewari, Mahesh C.; Bhambhani, Sweta; Trivedi, Ritu; Chattopadhyay, Naibedya; Trivedi, Prabodh K., "Co-expression of Arabidopsis transcription factor, AtMYB12, and soybean isoflavone synthase, GmIFS1, genes in tobacco leads to enhanced biosynthesis of isoflavones and flavonols resulting in osteoprotective activity", Plant Biotechnology Journal (2014), 12(1), 69-80.
食用医薬	ヒマワリ	中国: Tianjin University	Guan, Chunfeng; Ji, Jing; Jin, Chao; Wang, Gang; Li, Xiaozhou; Guan, Wenzhu, "Expression of cholera toxin B subunit-lumbrokinase in edible sunflower seeds—the use of transmembrane carrier to enhance its fusion protein's effect on protection of rats and mice against thrombosis", Biotechnology Progress (2014), 30(5), 1029-1039.
ワクチン抗原	ゲンゲ属植物 (Astragalus)	中国: Jilin Agricultural University	Gao Yugang; Zhao Xueliang; Zang Pu; Liu Qun; Wei Gongqing; Zhang Lianxue, "Generation of the bovine viral diarrhea virus e0 protein in transgenic astragalus and its immunogenicity in sika deer", Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM (2014), 2014, 372503.
抗体医薬	植物	韓国: Chung-Ang University	Lim, Chae-Yeon; Kim, Deuk-Su; Lee, Kyung Jin; Hwang, Kyung-A.; Choo, Young-Kug; Ko, Kisung, "Optimization of storage temperature for the pollen viability of transgenic plants that express the anti-breast cancer monoclonal antibody mAb BR55", Plant Omics (2014), 7(5), 403-409, 7 pp.
NBT⑦-2、抗体医薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	スペイン: CSIC, Universidad Politecnica de Valencia; Universidad de las Palmas de Gran Canaria	Orzaez Calatayud, Diego Vicente; Julve Parreno, Jose Manuel; Granell Richart, Antonio; Sarrion-Perdigones, Alejandro; Gutierrez, Cabrera Carlos, "Method for the production of complex repertoires of recombinant molecules", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014044892 A1 20140327.
NBT⑦-2、抗体医薬	タバコ (Nicotiana benthamiana)	スペイン: CSIC, Universidad Politecnica de Valencia; Universidad de las Palmas de Gran Canaria	Orzaez Calatayud, Diego Vicente; Julve Parreno, Jose Manuel; Granell Richart, Antonio; Sarrion-Perdigones, Alejandro; Gutierrez, Cabrera Carlos, "Method for the production of complex repertoires of recombinant molecules, such as antibodies, in transgenic plants", Span. (2014), ES 2456823 A1 20140423.

表 13. 2014 年の GM 植物（治療薬）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
治療薬	植物	韓国: Dong-A University Research Foundation for Industry-Academy Cooperation	Nam, Jae Sung; Kwon, Taek Min; Cho, Yang, "Method for preparing transformed plant with increased syringin production, and plant prepared by same", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014058104 A1 20140417.
治療薬	植物	米国: 記載なし	Chen, Feng; Li, Guanglin, "Terpene syntheses of Selaginella moellendorffii and the genes encoding them and their uses", U.S. Pat. Appl. Publ. (2014), US 20140030784 A1 20140130.
治療薬	シロイヌナズナ	日本: Tokyo University of Agriculture and Technology	Tamura, Masayuki; Tsuji, Yukiko; Kusunose, Tatsuya; Okazawa, Atsushi; Kamimura, Naofumi; Mori, Tetsuya; Nakabayashi, Ryo; Hishiyama, Shojiro; Fukuhara, Yuki; Hara, Hirofumi; et al., "Successful expression of a novel bacterial gene for pinoresinol reductase and its effect on lignan biosynthesis in transgenic Arabidopsis thaliana", Applied Microbiology and Biotechnology (2014), 98(19), 8165-8177.
治療薬	タバコ、シロイヌナズナ、イネ	スペイン: University of Girona.	Company Nuri; Nadal Anna; La Paz Jose-Luis; Martinez Silvia; Rasche Stefan; Schillberg Stefan; Montesinos Emilio; Pla Maria, "The production of recombinant cationic α -helical antimicrobial peptides in plant cells induces the formation of protein bodies derived from the endoplasmic reticulum", Plant biotechnology journal (2014), 12(1), 81-92.
治療薬	タバコ、シロイヌナズナ	韓国: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	Kim, Cha Yeong; Jung, Yu Jeong; Kim, Uk Jin; Jung, Hyeong Jae; Ahn, Cheol Han, "Method and composition for increasing stilbene synthase and changing flower color in plant using resveratrol o-methyltransferase and stilbene synthase utilized for manufacturing transgenic plants and its seeds", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2014), KR 2014040372 A 20140403.
治療薬	チクセツニンジン	中国: Huo, Mengrui	Zhang, Shaopeng; Chen, Ping; Zhao, Xiaolong; Wang, Qi; Zhu, Wenjun; Wu, Chong; Wang, Rufeng; Deng, Chen; Zheng, Yonglian, "Panax japonicus squalene epoxidase gene and its application.", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104232597 A 20141224.
治療薬	トマト	インド: Parul Institute of Pharmacy	Jha, Lalit Lata; Shah, Darshika; Rajesh, K. S., "Transgenic Lycopersicon esculentum mill (tomato) plant as bioreactor for the production of human neutrophil peptide-1 (HNP-1): a useful protein based pharmaceutical", International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (2014), 5(8), 3209-3215.
治療薬	油糧作物	中国: Jilin Agricultural University	Li, Xiaokun; Li, Haiyan; Guan, Lili; Yang, Jing; Wang, Fawei; Jiang, Chao; Du, Linna; Wang, Yanfang; Dong, Yuanyuan; Yao, Na; et al., "Vegetable oil body gel containing aFGF", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103720743 A 20140416.
治療薬	油糧作物	中国: Jilin Agricultural University	Li, Haiyan; Li, Xiaokun; Guan, Lili; Wang, Fawei; Yang, Jing; Jiang, Chao; Dong, Yuanyuan; Du, Linna; Wang, Nan; Liu, Xiuming; et al., "Vegetable oil gel containing human basic fibroblast growth factor (bFGF)", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103725649 A 20140416.
治療薬	植物	韓国: Dong-A University, Research Foundation for Industry-Academy Cooperation	Nam, Jae Seong; Kwon, Taek Min; Cho, Yang, "Preparation of transgenic plant having increased syringin production", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2014), KR 2014046740 A 20140421.
治療薬	ザツシヨクノボリフジ	カナダ: National Research Council of Canada-Saskatoon	Polowick, Patricia L.; Loukanina, Natalia N.; Doshi, Ketan M., "Agrobacterium-mediated transformation of tarwi (Lupinus mutabilis Sweet), a potential platform for the production of plant-made proteins", In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant (2014), 50(4), 401-411

表 14. 2014 年の GM 植物（治療薬：続き、診断薬・試薬、工業用）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
治療薬	植物	韓国: Chung-Ang University	Ahn, Junsik; Lee, Kyung Jin; Ko, Kisung, "Optimization of ELISA Conditions to Quantify Colorectal Cancer Antigen-Antibody Complex Protein (GA733-Fc) Expressed in Transgenic Plant", Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy (2014), 33(1), 1-7.
治療薬	タバコ	中国: Ministry of Education in China, Anhui Agricultural University	Wang Yun-Sheng; Xu Yu-Jiao; Gao Li-Ping; Yu Oliver; Wang Xin-Zhen; He Xiu-Juan; Jiang Xiao-Lan; Liu Ya-Jun; Xia Tao, "Functional analysis of Flavonoid 3,5 -hydroxylase from Tea plant (Camellia sinensis): critical role in the accumulation of catechins", BMC plant biology (2014), 14(1), 347.
治療薬	チャノキ	中国: Zhejiang University	Lu, Jianliang; Liu, Yang; Fan, Fangyuan; Gan, Quan; Zheng, Xinqiang; Liang, Yuerong, "Cloning of gene for polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) of Camellia sinensis and its application", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103509806 A 20140115
治療薬	油糧作物	中国: Jilin Agricultural University, Bioreactor Engineering Co., Ltd.	Li, Haiyan; Li, Xiaokun; Guan, Lili; Yang, Jing; Wang, Fawei; Du, Linna; Jin, Libo; Jiang, Chao; Wang, Yanfang; Wang, Nan; et al., "Epidermal growth factor-containing vegetable oil gel", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103736079 A 20140423.
診断薬・試薬	イネ	韓国: Industrial Cooperation Foundation Chonbuk National University	Yang, Mun Sik; Kim, Yong Sang; Eom, Tae Bung, "Effective purification method for recombinant trypsin produced by transgenic rice cell suspension culture", Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo (2014), KR 2014078285 A 20140625.
診断薬・試薬	植物	インド: CSIR-National Botanical Research Institute	Jha Shweta; Sanyal Indraneel; Amla D V, "Single amino acid substitutions in recombinant plant-derived human α 1-proteinase inhibitor confer enhanced stability and functional efficacy", Biochimica et biophysica acta (2014), 1840(1), 416-27.
診断薬・試薬	植物	中国: Shenzhen University, Peop. Rep. China	Zheng, Yizhi; Liu, Guobao; Hu, Yueming; Liu, Yun, "Method for establishing plant cell model for high-throughput screening active substances for treating Huntington's disease and its application", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103525858 A 20140122.
診断薬・試薬	植物	ドイツ: Greenovation Biotech GmbH, Germa	Fode, Benjamin; Schaaf, Andreas, "Expression of phosphorylated glycoproteins in plants", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014167094 A1 20141016.
診断薬・試薬	植物	ドイツ: Greenovation Biotech GmbH	Fode, Benjamin; Schaaf, Andreas, "Expression of phosphorylated glycoproteins in plants", Eur. Pat. Appl. (2014), EP 2789686 A1 20141015.
工業用	シロイヌナズナ ダイズ、油糧作物	中国: Chinese Academy of Sciences	Zhang, Jinsong; Chen, Shouyi; Liu, Yunfeng; Li, Qingtian; Zhang, Wanke; Ma, Biao; Lin, Qing; He, Sijie, "Application of Glycine max transcription factor GmMYB172 in regulating plant grease metabolism", From Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104059136 A 20140924.
工業用	ダイズ、カノーラ	米国: Monsanto Technology LLC	Tripodi, Frederico; Honary, Lou A. T., "High pufa oils for industrial applications", PCT Int. Appl. (2014), WO 2014066127 A2 20140501.
工業用	油糧作物	中国: Chinese Academy of Sciences	Qu, Yueqing; Liu, Wenxian, "Expression cassette and application in breeding transgenic plant with increased seed grease content", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104232654 A 20141224.

表 15. 2014 年の GM 植物（環境浄化）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
環境浄化	イネ	インド: CSIR-NBRI	Shri Manju; Tripathi Rudra Deo; Trivedi Prabodh Kumar; Chakrabarty Debasis; Dave Richa; Diwedi Sanjay; Shukla Devesh; Kesari Ravi, "Heterologous expression of Ceratophyllum demersum phytochelatin synthase, CdPCS1, in rice leads to lower arsenic accumulation in grain", Scientific reports (2014), 4, 5784.
環境浄化	植物	台湾: Academia Sinica	Yeh, Kuo-Chen; Shin, Lung-Jiun, "Copper resistant plant overexpressing ATX1-like protein and use for phytoremediation", U.S. Pat. Appl. Publ. (2014), US 20140298534 A1 20141002.
環境浄化	植物	中国: Chinese Academy of Agricultural Sciences	Sun, Jingwen; Cheng, Mingfang; Wang, Yujun; Li, Shutian; Zhou, Wei, "Application of heavy metal-induced promoter from Arabidopsis thaliana", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103923923 A 20140716.
環境浄化	植物	中国: Nanjing Boou Biotechnology Co., Ltd.	Xue, Yong; Yin, Hao; Jiang, Xiaohui; Hou, Xiaoguang; Wu, Shunxia; Hou, Shuguang; Zhou, Hui; Wang, Rui; Wu, Guangcai; Zhang, Yang, "Heavy metal binding protein gene from antiradiation microorganism, and application in heavy metal resistance", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104099346 A 20141015.
環境浄化	植物	中国: Nanjing Boou Biotechnology Co., Ltd., Peop. Rep. China	Xue, Yong; Jiang, Xiaohui; Xu, Xiaoyun; Hou, Xiaoguang; Wu, Shunxia; Hou, Shuguang; Zhou, Hui; Wu, Guangcai; Zhang, Yang, "Application of heavy metal binding protein gene from Methylobacterium extorquens", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104099347 A 20141015.
環境浄化	シロイヌナズナ	中国: Chinese Academy of Agricultural Sciences	Sun, Jingwen; Cheng, Mingfang; Wang, Yujun; Li, Shutian; Zhou, Wei, "Application of heavy metal induced promoter AtMT1a of Arabidopsis thaliana in breeding transgenic plant for prewarning heavy metal pollution in soil", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103923922 A 20140716.
環境浄化	シロイヌナズナ	中国: Shanghai Academy of Agricultural Sciences	Xue, Yong; Yao, Quanhong; Peng, Rihe; Zhu, Bo; Han, Hongjuan; Han, Jing; Wang, Bo; Wang, Hongjuan; Zhao, Wei, "Construction of transgenic Arabidopsis thaliana expressing Thermus thermophilus heavy metal-binding protein gene", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104099348 A 20141015.

表 16. 2014 年の GM 植物（環境浄化：続き）研究・開発状況

区分	作物	研究・開発機関	文献等
環境浄化	セツレンカ	中国: College of Life Science Shihezi University	Wang, Haixia; Zhang, Linhua; Yang, Jing; Zhang, Yamin; Zhang, Wei; Wang, Aiyang; Hu, Yuanlei; Zhu, Jianbo, "Clone and aluminum tolerance analysis of unknown gene from Saussurea involucrata kar. et kir.", Xibei Zhiwu Xuebao (2014), 34(1), 32-39
環境浄化	ダイズ	中国: Nanjing Agricultural University	Zhu, Yuelin; Ge, Junyi; Chen, Guohu; Yang, Lifei, "Cultivation method for OsPT2 transgenic soybean with efficient utilization of phosphorus", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104004755 A 20140827.
環境浄化	タバコ	チェコ: ICT Prague	Viktorovta Jitka; Novakova Martina; Trbolova Ladislava; Vrchoťova Blanka; Lovecka Petra; Mackova Martina; Macek Tomas, "Characterization of transgenic tobacco plants containing bacterial bphC gene and study of their phytoremediation ability", International journal of phytoremediation (2014), 16(7-12), 937-46
環境浄化	インゲンマメ、シロイヌナズナ	中国: South China Agricultural University	Tian, Jiang; Liao, Hong; Sun, Lili, "Sequence of malic enzyme gene ME1 from Stylosanthes Guianensis and its use in increasing aluminum tolerance and acidic soil adaptation of transgenic plants", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103525838 A 20140122.
環境浄化	シロイヌナズナ、イネ	中国: Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Ruifeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd.	Peng, Rihe; Yao, Quanhong; Wang, Rongtan; Fu, Xiaoyan; Tian, Yongsheng; Zhao, Wei; Yan, Peilan; Ding, Weixing, "A method for improving the tolerance and degradation capability of plant to polycyclic aromatic hydrocarbons", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103509819 A 20140115.
環境浄化	スチロサントス属植物	中国: South China Agricultural University	Tian, Jiang; Liao, Hong; Chen, Zhijian, "Sequence of malate dehydrogenase gene MDH1 from Stylosanthes and its use in increasing manganese tolerance and acidic soil adaptation of transgenic plants", Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 103525825 A 20140122.
環境浄化	タバコ	トルコ: Mustafa Kemal University	Eren, Abdullah; Daghan, Hatice, "Transgenic tobacco-bearing p-cV-ChMTIIGFP gene accumulated more lead compared to wild type", Polish Journal of Environmental Studies (2014), 23(2), 569-571.

表 17. 2014 年の GM 植物研究・開発状況：国別集計

国名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
日本	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	6
中国	1	5	1	1	1	0	6	1	10	2	28
台湾	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
韓国	0	1	0	0	0	1	4	1	0	0	7
インド	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	4
イスラエル	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
トルコ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
米国	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	5
カナダ	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
ロシア	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
チェコ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
スウェーデン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
英国	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ドイツ	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
イタリア	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
スペイン	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	5
小計	9	12	3	3	1	3	15	5	14	3	68

区分:重複2件(NBT-抗体医薬) 機能性食品:重複1件(中国-日本)
68件のうち、28件が中国で最も多い

表 18. 2014 年の GM 植物研究・開発状況：作物別集計（食用作物）

作物名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
アルファルファ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
イネ	3	2	0	0	0	0	1	1	2	0	9
インゲンマメ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
オオムギ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
カノーラ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ダイズ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3
チクセツニンジン	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
チャノキ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
トウモロコシ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
トマト	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3
ナス科植物	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ナタネ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ニンジン	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ヒマワリ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
ブドウ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
モモ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
リンゴ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
油糧作物	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	5

NBT:重複2件(トマト-トウモロコシ-ポプラ-ブドウ-イネ-ソルガム:1件、リンゴ-モモ:1件) 機能性食品:重複1件(タバコ-イネ:1件)
経口ワクチン:重複1件(シロイヌナズナ-ニンジン:1件)
治療薬:重複2件(タバコ-シロイヌナズナ-イネ:1件、タバコ-シロイヌナズナ:1件)
環境浄化:重複2件(インゲンマメ-シロイヌナズナ:1件、シロイヌナズナ-イネ:1件)
産業用:重複2件(シロイヌナズナ-ダイズ-油糧作物:1件、ダイズ-カノーラ:1件) タバコ:重複2件(NBT-抗体医薬:2件)
食用作物の中ではイネ:9件が最も多い

表 19. 2014 年の GM 植物研究・開発状況：作物別集計（非食用作物）

作物名\区分	NBT	機能性食品	経口ワクチン	食用医薬	ワクチン抗原	抗体医薬	治療薬	診断薬・試薬	環境浄化	工業用	小計
ゲンゲ属植物	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
ザッショクノボリフジ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
シロイヌナズナ	1	0	1	0	0	0	3	0	4	1	10
ステロサントス属植物	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
セツレンカ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
ソルガム	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
タバコ	2	1	1	2	0	2	3	0	2	0	13
トウゴマ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ナガミアマナズナ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ボブラ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
マテバシイ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
植物	0	3	0	0	0	1	4	4	4	0	16
小計	15	12	4	3	1	3	18	5	16	6	83

NBT: 重複2件(トマト-トウゴマ-ボブラ-ブドウ-イネ-ソルガム:1件、リンゴ-モモ:1件) 機能性食品: 重複1件(タバコ-イネ:1件)
 経口ワクチン: 重複1件(シロイヌナズナ-ニンジン:1件)
 治療薬: 重複2件(タバコ-シロイヌナズナ-イネ:1件、タバコ-シロイヌナズナ:1件)
 環境浄化: 重複2件(インゲンマメ-シロイヌナズナ:1件、シロイヌナズナ-イネ:1件)
 工業用: 重複2件(シロイヌナズナ-ダイズ-油糧作物:1件、ダイズ-カノーラ:1件) タバコ: 重複2件(NBT-抗体医薬:2件)

小計は食用作物+非食用作物

書籍

著者氏名	書籍タイトル名	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
Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, <u>Yamamoto T</u> , Yamanaka S and Hotta A.	Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9.	Stem Cell Reports	4	143-154	2015
Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, <u>Yamamoto T</u> , Sakuma T and Suzuki K.	Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9.	Nature Communications	5	5560	2014
Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and <u>Yamamoto T</u> .	Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells.	Scientific Reports	4	7125	2014
Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, <u>Yamamoto T</u> and Mori K.	EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step.	Journal of Cell Biology	206	347-356	2014
Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and <u>Yamamoto T</u> .	Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system.	Scientific Reports	4	5400	2014
Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K.	Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice.	Food Control	50	949-955	2015
Kondo, K., Nakamura, K.	Scientific review on novel genome editing techniques	Food Hygiene and Safety Science	55	231-246	2014
Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H.	Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods.	Food Hygiene and Safety Science	55	247-253	2014
Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T.	A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize.	European Food Research and Technology	DOI 10.1007/s00217-014-2340-7		2014
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H.	Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice.	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	21	48-56	2014
Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R.	Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK	Ikushugaku Kenkyu	16	158-161	2014
Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K.	Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products.	Food Hygiene and Safety Science	55	25-33	2014