

## 食用と考えられるゲノム編集動植物に関する調査

中島治, 近藤一成

### Study on status of development of animals and plants generated for food purposes using genome editing techniques.

Osamu Nakajima<sup>#</sup>, Kazunari Kondo

We have studied development of genetically modified animals and plants for food purposes for a while. Genome editing techniques have been used in many fields recently. And many animals and plants have been newly developed for food purposes using genome editing techniques. Foods may be produced from these organisms in a near future. Recent status of development of these organisms was studied. We would like to use our study as basic information when we think about future possible problems in the field of genetically modified foods. Literature searching was performed by surveying three databases (SciFinder, PubMed, Google Scholar) and information was collected. Seventy-three articles and patents published during 2011-2016 regarding animals were found to be relevant to our study. Thirty-three of those published on 2016 regarding plants were found to be relevant to it. The vast majority of these articles and patents were from China. So movements in China should be watched carefully to prevent foods originating from these organisms being mixed into Japanese food supply from overseas.

Myostatin (39 articles and patents),  $\beta$ -lactoglobulin (11), prion (5) and ovomcoid (3) were used frequently as target genes for knock-out experiments in animals. Lactoferrin gene (3) was occasionally incorporated for knock-in experiments in animals. As for animal species, cow (21), pig (19), sheep (14) and goat (12) were used frequently. As for plant species, rice (18) was used frequently.

From a technical point of view, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 system has been used on an increasing number of occasions recently.

When indels are made and then frameshifts are induced at target genes, new peptides can be produced in the generated organisms. However, these peptides were not referred to nor analyzed in these articles at all. We propose that these peptides should be evaluated for their safety before these organisms are used for food purposes.

We would like to continue this research on newly developed animals and plants and contribute to ensuring food safety in Japan.

Keywords: food safety, genetically modified food, genome editing, CRISPR/Cas9 system

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Osamu Nakajima; Division of Biochemistry, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel: +81-44-270-6600 ext. 2411; Fax: +81-044-270-6611; E-mail: onakajim@nihs.go.jp

### 1. はじめに

私達は遺伝子組換え食品の素材となる遺伝子組換え動植物の開発状況を調査してきた<sup>62, 63</sup>。近年にはゲノム編集の技術が登場して、それが様々な分野で広く利用されるようになった。このような状況において、ゲノム編集の技術を利用して食用と考えられる動植物が作られており、それらから将来に食品が生産される可能性がある。本研究ではそのようなゲノム編集動植物の開発状況を調

査した。この調査を今後の遺伝子組換え食品の分野で将来に起きるかもしれない問題を考えるときの基礎資料としたい。

## 2. 方法

食用と考えられるゲノム編集動物については2011年から2016年、同植物については2016年に報告された論文や特許などを調べた。なお、同植物については2015年以前の調査は他で報告されている<sup>64)</sup>。データベースにはSciFinder, PubMed, Google Scholarを利用した。キーワードには下記のA群とB群から1つずつ選んだ物を組み合わせ利用した。

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

B群：pig, cow, chicken, fish, sheep, goat, plant. 該当する論文や特許から、種名、用いた技術、ターゲット遺伝子、要旨、開発国などの情報をまとめた表を作成した。さらに、開発国の内訳、頻繁に使われるターゲット遺伝子などこの表から読み取れる様々な傾向を調べた。

## 3. 結果と考察

食用と考えられるゲノム編集動物についての論文や特許は73報 (2011-2016年)、同じく植物について33報 (2016年) と多数見出された。このような動植物を食品として利用するときの各国、各地域の規制はまだ最終的に決定されていないが、それらの開発は活発に行なわれていることが明らかになった。

食用と考えられるゲノム編集動物の報告数の推移を図1に示した。ほぼ右肩上がりに増加している傾向があつて、特に2016年の報告数は前年の報告数を大きく上回った。ゲノム編集植物については2016年に報告された物しか調査をしていないが、ゲノム編集動物よりも報告数は

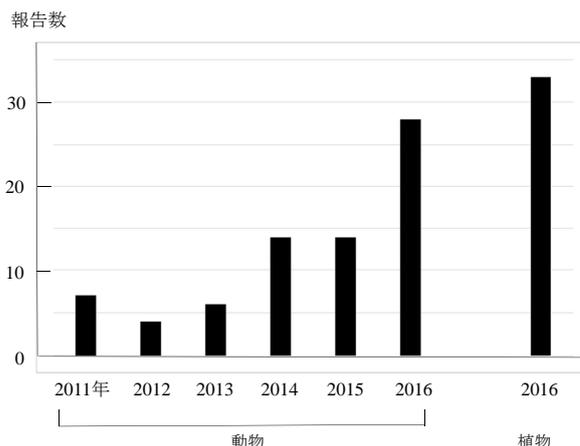


図1 年度別報告数

本研究に該当する論文、特許の報告数を年度別に示した。ゲノム編集動物については2011-2016年、ゲノム編集植物については2016年に発表された物を対象とした。

多かった。

食用と考えられるゲノム編集動植物に関する報告数を国別に集計した結果を表1に示した。中国からの報告が圧倒的に多く、2011年から2016年の間に報告数が大きく増えた。したがって、これらの動植物に由来する食品の海外から日本への混入の防止を考える際には、中国におけるそれらの開発の状況を注意深く観察する必要がある。次いで、米国と日本からの報告が中国に続いた。

食用と考えられるゲノム編集動物の種ごとの内訳を図2に示した。大型動物であるウシは飼育に手間がかかるので、報告は比較的少ないと私達は予想していたが、実際は多くの報告があつた。ニワトリは報告が少なかった。ニワトリの場合は技術的な問題が知られており、そのために報告数が少なかったと推定される。

食用と考えられるゲノム編集植物の種ごとの内訳を図3に示した。イネが圧倒的に多かった。上に述べたように、中国における開発がとても多く、中国で主食となるイネがよく研究されたためであると推定される。

食用と考えられるゲノム編集動植物の作成において類

表1 食用と考えられるゲノム編集動植物の開発国別の報告数

植物については1報の国はその他としてまとめた。

年	動・植物	中国	米国	日本	英国	韓国	イスラエル	アルゼンチン	その他
2011年	動物	4	3						
2012年	動物	4	0						
2013年	動物	5	1						
2014年	動物	11	2		1	1			
2015年	動物	9	2	2	1	1			
2016年	動物	19	2	3	1			1	
2016年	植物	17	8	1		1	2		5
合計		69	18	6	3	3	2	1	5

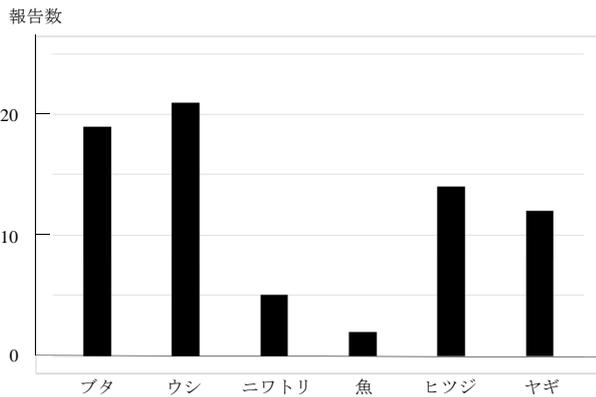


図2 食用と考えられるゲノム編集動物の種別の報告数 (2011-2016年)

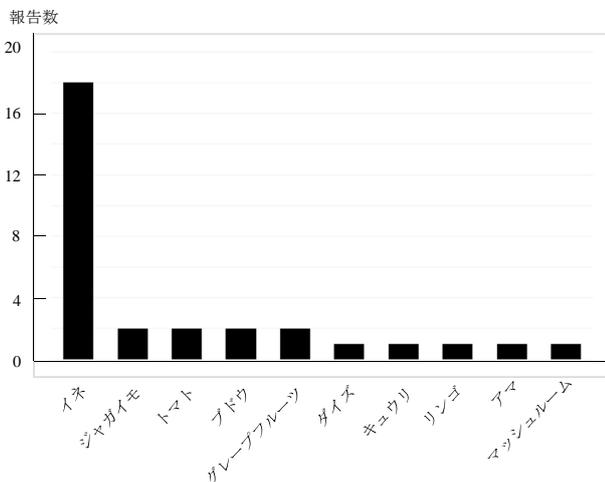


図3 食用と考えられるゲノム編集植物の種別の報告数 (2016年)

なお、マッシュルームは植物ではないが、データベースの検索で引っかかってきたので、図3に含めた。

繁に使われるターゲット遺伝子が存在しており、それらを表2に示した。

数塩基の欠失または挿入 (indel) と長いDNAの導入

の報告数を比較した。食用と考えられるゲノム編集動物については、2016年発表分は表3 (後述) から、2011-2015年発表分は表3と同様な表から情報をまとめた。食用と考えられるゲノム編集植物については表4 (後述) から情報をまとめた。ゲノム編集動物 (2011-2016年) とゲノム編集植物 (2016年) の報告をまとめて調べると、indelの導入は83報、長いDNAの導入は21報であり、indelの導入の報告が圧倒的に多かった。その理由は、内在性遺伝子を微細に改変した動植物は食品として消費者から比較的受け入れやすいとの期待が開発者側にあると思われる。また、indelの誘導は長いDNAを導入するよりも技術的に容易であるためと推定される。

利用されたゲノム編集の手法別に食品用と考えられるゲノム編集動物の報告数の推移を分析した結果を図4に示した。2011年には古くから存在していたジンクフィンガーヌクレアーゼが使われていた。その後、その使用は減少の傾向にあり、TALENの報告が増えて、さらにその後ではCRISPR/Cas9システムの報告が増えた。特に、2015年から2016年にかけてはCRISPR/Cas9システムを使った報告が大きく伸びた。新しく開発された手法は優れており、古い手法が新しい手法で置き換わっていった状況が見て取れる。

最近、使用頻度の高いCRISPR/Cas9システムについてさらに詳しく調べた。CRISPRシステムの中には最も有名な*Streptococcus pyogenes*に由来するSpCas9以外にもそのオルソログやCpf1が知られている。これらについて使用頻度を調べてみると、食用と考えられるゲノム編集動植物の作成にはすべての報告でSpCas9が使われていた。ゲノム編集に関する基礎研究はSpCas9が一番良く行なわれており、今回の結果はそれを反映していると思われる。一方で、食用ではなく研究用と考えられる報告ではCas9のオルソログやCpf1が利用されているケースが少数ながら見受けられた。

今回の調査の中から、2016年に発表された食用と考えられるゲノム編集動物と植物に関する情報をまとめた結

表2 頻繁に使われるターゲット遺伝子

食用と考えられるゲノム編集動物については、2016年発表分は表3から、2011-2015年発表分は表3と同様な表から情報をまとめた。食用と考えられるゲノム編集植物については表4から情報をまとめた。

ターゲット遺伝子	動植物	報告数	研究内容
ミオスタチン	動物	39	ノックアウト. 肉を増やす.
$\beta$ -ラクトグロブリン	動物	11	ノックアウト. ウシやヤギのミルクの低アレルゲン化.
プリオン	動物	5	ノックアウト. 狂牛病になりづらくする.
オボムコイド	動物	3	ノックアウト. 鶏卵の低アレルゲン化.
ヒトラクトフェリン	動物	3	ノックイン. ヤギのミルクに抗菌活性などの機能を付加.
アセト乳酸合成酵素	植物	4	点突然変異. 除草剤耐性な植物を作る.

表3 食用と考えられるゲノム編集動物 (2016年)

文献 No.	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	要旨	所属
1	ブタ	ZFN	RELA	農学のハプロタイプの正確で効率的な置換を記す。RELA遺伝子は免疫を調節する。ZFNによって胚のRELA座を編集してアフリカ豚コレラへの回復力に関連するイボイノシシのRELAオルソログを持つブタが生きて生まれた。一世代で種間で対立遺伝子を移入する効率のよい能力は今までになかった農業と基礎研究の機会を作る。	[Lilico SG et al.] The Roslin Inst., Univ. of Edinburgh, Edinburgh イギリス
2	ブタ	ZFN	ミオスタチン	私たちは最近ZFNを利用してミオスタチンの機能を喪失させたGEブタを作成した。このGEブタは野生型のブタと同じく正常に成長するが、赤身肉の取量が多く、脂肪の塊が少ない肉を生産する。このGEブタ肉の潜在的な亜慢性的毒性を評価するために、ラットにおいて90日間の摂取の研究を行った。ラットを無作為に5つのグループに分けて、90日間基礎的な食事とそれに野生型ブタとGEブタから調製した低容量と高容量のブタ肉を加えた食事を与えた。動物の行動と臨床的な徴候を観察して、体重と食事の消費を1週間単位で記録した。45、90日目に血液検査を行った。成長速度、食事の消費、血液検査の数値はGEブタ肉と野生型ブタ肉を食べさせたラットのグループの間で有意差がなかった。高容量のGEブタ肉と基礎的な食事を食べさせたグループの間では肝機能のパラメーターと白血球数で差があったが、GEブタ肉を食べさせたグループの結果はすべて正常の範囲内だった。45、90日目にすべてのグループから単離した臓器に障害はなかった。GEブタ肉をラットに食べさせたときに長期間の悪い効果はなかった。	[Xiao GJ et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
3	ブタ	?	アミノペプチダーゼN	本発明はブタのアミノペプチダーゼN (pAPN) 遺伝子の部位特異的な修飾を持ったブタに関連する。pAPN遺伝子のクローニングとシークエンシング分析、pAPN編集ベクターの構築と活性の分析、ドナーベクターの構築、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つST細胞系列の構築、伝染性胃腸炎コロナウイルスの病原性の研究、pAPN遺伝子に部位特異的な修飾を持つトランスジェニック繊維芽細胞の構築、再構築された胚の獲得、pAPN遺伝子の部位特異的な修飾の同定によってこのブタは構築される。本発明はブタのウイルス性の下痢とK88の感染を遺伝的な観点から絶滅させて、ブタの育種における伝染病を制御するための費用を削減して、環境汚染を低減し、抗生物質の乱用を減らして健康的な育種の方法を提供する。また、ヒトのガンや他の関連した病気の病原性の研究と関連する治療のスクリーニングと前臨床的なテストの基礎を提供する。	[Chen J et al.] Anhui Agricultural Univ. 中国
4	ブタ	TALEN	ミオスタチン	ゲノム編集技術と体細胞核移植 (SCNT) を使ってミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。Platinum TALENはブタの体細胞において遺伝子を修飾することにおいて効率が高かった。修飾した体細胞をSCNTに使用してミオスタチンをノックアウトしたブタを作った。これらの子ブタは筋肉が2倍になる表現型を示し、体重は増えており、最長筋の塊は野生型の170%になっており、筋肉繊維の数は倍になった。ブタにおけるミオスタチンの喪失は筋肉の塊を増やし、将来ブタ肉の生産を増加させるかもしれない。	[Rao S et al.] Research and Development Center NH Foods Ltd., Tsukuba 日本
5	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	ミオスタチン (MSTN) は大型の家畜で肉の性質を改善するための重要な遺伝子の候補である。2種類のベクター-MSTN Cas9とドナーDNAはブタPK15細胞系列へエレクトロポレーションによって導入された。G418耐性の選抜と蛍光顕微鏡の観察によってNeo-EGFP陽性の細胞を単離した。MSTNのエクソン3において部位特異的で相同的な組換えを検出するために、crossover PCR, long-distance PCR, ウェスタンブロット, サザンブロット, DNAシークエンシングを使った。CRISPR/Cas9発現ベクターの効率的な標的部位はMSTN遺伝子のエクソン3に見出され、複数のスクリーニングによってMSTN遺伝子に変異を持つ細胞系列を得た。本研究はMSTNの機能の研究のための実験材料を提供する。	[Qi S et al.] Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guiyang 中国
6	ブタ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	CRISPR/Cas9とCre/LoxPによって選択マーカー遺伝子 (SMG) を含まない、機能的にミオスタチン (MSTN) をノックアウトしたクローンブタの作成を報告する。CRISPR/Cas9による相同組換えを利用してブタの初代細胞でMSTNの1つの対立遺伝子をノックアウトした。次に、Creリコンビナーゼを使って82.7%の効率でSMGを削除した。フローサイトメトリーによってSMGとEGFPを含まない細胞を単離して核移植のためのドナーの核として使った。685個の再構築された胚は3頭の代理母に移されて、1頭が2匹の雄の生きた子ブタを出産した。これらのクローンブタでは1つの対立遺伝子でMSTNがノックアウトされてSMGを欠失していることが確認された。筋肉においてMSTNの発現はおおよそ50%減少し、筋原性の遺伝子の発現は増加していた。組織学的検査では筋原線維の量は増加していたが、その大きさは変化がないことが明らかになった。本研究は優れた家畜の生産のための信頼できる方法であり、潜在的な生物学的リスクを最小にする戦略である。	[Bi Y et al.] Hubei Inst. of Animal Science and Veterinary Medicine Hubei Academy of AgroSciences, Wuhan 中国
7	ブタ	CRISPR/Cas9	CD163	本発明は豚繁殖・呼吸障害症候群に抵抗性のあるクローンブタの作成方法を提供する。本方法は以下の段階から構成される。CRISPR/Cas9ターゲットベクターとCD163遺伝子相同組換え修飾ベクターをブタの線維芽細胞へ入れて陽性のクローン細胞を得る。その細胞ではブタの内在性CD163遺伝子の第7エクソンがヒトのCD163-L1遺伝子の第10エクソンと置換されていた。豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの侵入を媒介できない。ドナー細胞と受容細胞としてこの陽性細胞と卵母細胞を使い、体細胞核移植の技術を利用してクローン化した胚を得る。その胚を子宮へ移してブタを妊娠させてクローンブタを得る。	[Li N et al.] China Agricultural Univ. 中国

8	ブタ	CRISPR/ Cas9	細胞表面のウイルスが侵入するときに利用するタンパク質	ブタの感染症を防ぐためにCRISPRを利用する	[Brouillette M] Freelance writer based in Boston 米 国
9	ブタを含む哺乳類	CRISPR/ Cas9	MC3R	本発明はCRISPR/Cas9システムによってMC3R遺伝子をノックアウトしたブタを作る方法を開示する。本方法は、MC3R遺伝子をノックアウトした動物の細胞を得るために、gRNA1および/またはgRNA2をコードする遺伝子を動物の細胞へ導入することを含む。動物の細胞は哺乳類の細胞であり、たとえばブタの細胞である。MC3R遺伝子をノックアウトする効率は29.16%である。本発明は標的のMC3R遺伝子の大きな断片を迅速に効率良くノックアウトして、外来遺伝子を残さない。本発明はMC3Rの機能を解明するための研究と動物の育種に使える。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
10	ブタ	CRISPR/ Cas9	MC4R	本発明はCRISPR/Cas9システムと体細胞核移植を使ってMC4R遺伝子を編集することでノックアウトしたブタを作ることに関する。本方法では、MC4R遺伝子の大きな断片を欠失させてその欠失を持ったブタを作るためにブタのMC4R遺伝子のコード領域内で2ヶ所の部位に対するsgRNAを設計することで特徴付けられる。本発明はブタMC4R遺伝子を研究するための実行可能な研究である。	[Li Q et al.] China Agricultural Univ. 中国
11	ブタ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン	本発明はブタのミオスタチン遺伝子の編集部位とその応用を開示する。その編集部位はミオスタチン遺伝子のコード領域内、第1エクソン中に存在する。その部位はCas9によって特異的に認識されて、ターゲティングベクターと相同組換えを行い変異した遺伝子または選択マーカー遺伝子を受容細胞のゲノムの決まった部位に取り込まれるようにする。統計的な結果ではターゲティングの効率は80.5%である。この方法によって高い肉係数を持った新しい品種のブタが開発できて、ミオスタチンの研究のための材料を提供できる。	[Bi Y et al.] Hubei Academy of Agricultural Sciences 中国
12	ブタ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	本発明はブタのゲノム中のミオスタチン (MSTN) 遺伝子のプロモーターのMEF3M因子結合部位を遺伝子編集するためのsgRNAの組み合わせとその応用を提供する。sgRNAは特異性が高く、MEF3M因子の結合部位をノックアウトするために使える。本発明によりブタの筋細胞の発達を促進して筋肉量を増やせる。	[Li K et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
13	ブタ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン	医療に応用するためのGMブタは主に体細胞核移植を使って作られる。しかし、この方法は複雑な細かい技術を必要とし、ドナーの体細胞の核の不完全なエピジェネティックのリプログラミングのために出産前および出産後に死ぬリスクをしばしば大きくする。その結果、GMブタの生産は広く行なわれなかった。体外受精させた受精卵へエレクトロポレーションによってCas9とsgRNAを導入させることを含むブタにおけるCRISPR/Cas9による遺伝子編集のための簡単な方法を提供する。Cas9のエレクトロポレーションによる遺伝子編集は高い効率で標的遺伝子の破壊を起こし、ミオスタチンに変異のあるブタの作成によって確認した。この方法はGMブタの生産を促進する潜在的能力がある。	[Tanihara F et al.] Tokushima Univ., Tokushima 日本
14	ウシ	CRISPR/ Cas9	プリオン	CRISPRをウシに適用した報告は少ない。本研究ではウシPRNP遺伝子をCRISPR/Cas9システムでノックアウトとノックインした。ウシ胎児の線維芽細胞と体外受精の胚を使った。PRNP遺伝子エクソン3を標的にするために5つのsgRNAを設計してCas9と一緒に細胞へ導入した。相同組換えの効率はEGFP遺伝子の両側に1kbpのPRNP遺伝子を連結させたレポーターベクターを使って評価した。体細胞についてはCas9とsgRNAをコードするプラスミドを2つの条件下でトランスフェクトした。体外受精の受精卵にはプラスミドまたはmRNAを使って顕微授精を行なった。体細胞と胚において標的部位に挿入、欠失と大きな欠失が起きた。胚では相同組換えも検出された。CRISPR/Cas9システムはウシのゲノムで部位特異的に編集できて、重要な人獣共通伝染病に耐性な大きな動物の開発につながるだろう。	[Bevacqua RJ et al.] Animal Biotechnology Laboratory, Buenos Aires アル ゼンチン
15	ウシ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン遺伝子のプロモーター	ミオスタチンを不活性化させると、肉を増やせるが、難産や生殖能力の低下などの悪影響もある。ミオスタチンの発現を低下させて、これらの悪影響を出さないために、ミオスタチンのプロモーターの異なる因子の欠失をCRISPR/Cas9システムを使って作った。ミオスタチンのプロモーター中の-1577、-689、-555、-116の位置を標的とする4つのsgRNAを設計した。ウシの胎児線維芽細胞で試した後に、ウシの受精卵でミオスタチンのプロモーターを修飾した。Cas9 mRNAとそのタンパク質を導入したときに94.12%と64.17%で編集が起きた。得られるプロモーターはヘテロになることが多かった。ウシの胚でCRISPR/Cas9システムを利用するにはさらなる改良が必要である。	[Pinzon CA et al.] Texas A&M Univ., College Station 米 国
16	ニワトリ	CRISPR/ Cas9	オボアルブミン、オボムコイド	受精卵にアクセスすることが難しいために、ニワトリではCRISPR/Cas9システムは利用されていなかった。私たちはニワトリにおいてCRISPR/Cas9システムによる遺伝子ターゲティングを報告する。Cas9, sgRNA, 薬剤耐性マーカーをコードする遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションすることによって、ニワトリの培養した始原生殖細胞 (PGCs) において2つの卵白の遺伝子であるオボアルブミンとオボムコイドを効率良く変異させた。CRISPRによってオボムコイド遺伝子に変異を持つPGCsをニワトリの胚へ移植して、3匹の生殖細胞系列のキメラ雄鶏 (G0) を確立した。すべての雄鶏はドナーに由来する変異型のオボムコイド遺伝子を持った精子を作った。2匹については高い効率でその変異型の遺伝子を次世代 (G1) に伝達してヘテロな遺伝子型のニワトリが得られた。G1変異型のニワトリを交配してオボムコイド遺伝子がホモな変異型の子孫 (G2) を作った。これらの結果からCRISPR/Cas9システムはニワトリで利用できることが証明された。	[Oishi I et al.] National Inst. of Advanced Industrial Science and Technology, Osaka 日本

17	ニワトリ	CRISPR/Cas9	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , ATP synthase epsilon subunit, オポアルブミン	CRISPR/Cas9のニワトリにおける利用は情報が少ない。私たちはニワトリのDF-1細胞において peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , ATP synthase epsilon subunit, オポアルブミン遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。T7E1アッセイの結果では3つの遺伝子座における変異の率は、0.75%、0.5%、3%だった。変異の効率を高めるために、代理のレポーターシステムと一緒にGM細胞を効率良く濃縮するために私たちはPuro(R) 遺伝子を使った。T7E1アッセイでは変異の効率は上昇して、60.7%、61.3%、47.3%となった。後のシーケンシングによる分析では変異の効率は上昇して、94.7%、95%、95%だった。T7E1アッセイによって3ヶ所の潜在的なオフターゲット部位を調べたところ、オフターゲット変異は検出されなかった。このように、CRISPR/Cas9システムはニワトリのゲノム編集に利用できる。	[Bai Y et al.] Northwest A&F Univ., Yangling 中国
18	ヤギ	TALEN	$\beta$ -ラクトグロブリン, ヒトa-ラクトアルブミン	人間に対する栄養としてのヤギのミルクの価値は、 $\beta$ -ラクトグロブリン (BLG) のようなミルクのタンパク質によって引き起こされる食物アレルギーの問題に関連している。本研究では、ヤギのBLG遺伝子座へヒトa-ラクトアルブミン (hLA) 遺伝子を導入するためにヤギの線維芽細胞においてTALENを利用した相同組換えを行なった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたコロニーが選抜の後に単離される率は10.1%、1.1%だった。1つ、2つの対立遺伝子に外来遺伝子が導入されたヤギの乳房上皮細胞においてBLG mRNAの濃度は徐々に低下して、hLAの発現が確認された。遺伝子ターゲティングされた線維芽細胞は効率良く体細胞核移植に使えた。ミルク中にBLGが少なく、hLAを豊富に含むhLAをノックインしたヤギが作れた。私たちの研究は動物のミルクの最適化の基礎となり、農業と生態臨床医学の発展を促進する。	[Zhu H et al.] Northwest A&F Univ., Yangling 中国
19	ヤギ	TALEN	$\beta$ -ラクトグロブリン, ヒトラクトフェリン	本発明はヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させる方法とその応用に関連する。本発明ではTALENを使ってBLGの標的配列を切断する。ヤギのBLG遺伝子をターゲティングによって欠失させて、ヒトのラクトフェリン (hLF) 遺伝子をノックインして、BLG-/hLF+トランスジェニック胎児線維芽細胞を得る。この細胞をドナーとして体細胞核移植を行なってBLG-/hLF+トランスジェニックヤギを作る。本発明はターゲティングによって欠失させたトランスジェニック哺乳類を作るための優れた技術である。	[Cheng Y et al.] Yangzhou Univ. 中国
20	ヤギ	TALEN	$\beta$ -ラクトグロブリン	本研究の目的は、設計されたヌクレアーゼを利用して遺伝子ターゲティングされた雄のヤギの生殖能力に遺伝子ターゲティングとリクローニングが影響しているかを調べることである。TALENによって $\beta$ -ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子の1つの対立遺伝子をノックアウトした (BLG+/-) ヤギと、BLG+/-の雄ヤギの線維芽細胞において遺伝子ターゲティングとリクローニングによって作られた2つの対立遺伝子がノックアウトされた (BLG-/-) 雄のヤギを使って健康状態と生殖能力を調べた。BLG+/-の雄ヤギの出生のときの体重と出産後の成長は野生型のヤギと同等だった。BLG+/-またはBLG-/-の雄ヤギから得た新鮮なまたは凍結融解した精子の質のための指標は対照の物との間で有意差がなかった。体外受精によって得られた受精卵の中で胚盤胞まで育つ割合はBLG+/-、BLG-/-、野生型の間で同じだった。BLG+/-、BLG-/-、野生型の雄ヤギから得た凍結融解した精子を使ったときの人工授精の受胎率は42.3%、38.0%、42.6%だった。ターゲティングしたBLGの修飾の生殖細胞系伝達はメンデルの法則と一致した。解析した成長と生殖の性質はBLG遺伝子をターゲティングしたことで影響を受けておらず、BLG+/-およびBLG-/-の雄ヤギの育種の可能性を示唆する。	[Ge H et al.] Northwest A&F Univ., Yangling 中国
21	ヤギ	TALEN	ミオスタチン	TALENによるミオスタチン (MSTN) の編集がヤギにおいて可能であることを調べた。ヤギのMSTNを認識する一对のTALEN (MTAL-2) を作った。ヤギの線維芽細胞をMTAL-2でトランスフェクトして272個のモノクローナルな細胞がMSTNの1つまたは2つの対立遺伝子において変異を持つことが確認された。異なる遺伝子型を持つ10種類の細胞をドナー細胞として体細胞核移植を行なって、3頭の子ヤギ (K179/MSTN (-/-), K52-2/MSTN (+/-), K52-1/MSTN (+/+)) が得られた。MTAL-2はヤギのゲノムの中のMSTNを効率良く破壊できた。得られた体細胞からは発生に異常のないMSTNに変異を持つヤギが作れた。TALENを使ってヤギにおいて正確なゲノム編集ができた。	[Yu B et al.] Yangzhou Univ., Yangzhou 中国
22	ヤギ	TALEN	$\beta$ -ラクトグロブリン, ヒトラクトフェリン	ヤギの胎児の線維芽細胞において $\beta$ -ラクトグロブリン (BLG) 遺伝子をノックアウトして、BLG遺伝子座へヒトラクトフェリン (hLF) 遺伝子のコード領域を挿入するためにTALENを利用して組換えを行なった。それをドナー細胞として体細胞核移植を行なった。ヤギBLGのエクソン3を認識するTALENをコードするプラスミドTALEN-3-L/Rと、hLF遺伝子をノックインするための陰性選択遺伝子HSV-TKを含むベクター-BLC14-TKを設計した。BLC14-TKとTALEN-3-L/Rと一緒にヤギの胎児線維芽細胞へトランスフェクトして薬剤によって細胞を選抜した。TALEN-3-L/Rによる変異導入効率は25-30%だった。6個のBLG-/hLF+の細胞系列に由来する335個の再構築された胚を16匹の代理ヤギに移植した。9匹のヤギが妊娠して50日生きたBLG-/hLF+の胎児が得られた。この研究はアレルギーが少なくhLFを豊富に含むヤギのミルクを得る研究の基礎となる。	[Song S et al.] 中国
23	ヤギ	CRISPR/Cas9	ミオスタチン	ミオスタチン (MSTN) を正確に破壊することで安全に肉の生産性を改善できるかは証明されていない。この問いに答えるために、私たちはCRISPR/Cas9システムを応用してMstnをノックアウトしたウサギとヤギを作って表現型の変化を解析した。4頭のヤギの中で1頭はMstn遺伝子座に編集が起きた。このヤギの早い段階での成長速度は対照を上回った。しかし、Mstnノックアウトは重大な健康上の問題を引き起こし、他の生物種でも同様な効果があるかもしれない。この安全性の問題はさらに研究する必要がある。	[Guo R et al.] Nanjing Agricultural Univ., Nanjing 中国

24	ヒツジ	ZFN	ミオスタチン	ヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子を標的とするZFNを培養線維芽細胞へ導入した。2つのコロニーは1つの対立遺伝子に変異があつて、1つのコロニーは2つの対立遺伝子に欠失があつた。さらに、MSTN-ZFN mRNAをヒツジの胚へマイクロインジェクションによって導入した。37個の単為生殖の胚の中で13個がZFNによってターゲティングされて効率は35%だった。本研究はマイクロインジェクションと体細胞核移植によってMSTN遺伝子を編集したヒツジを作るための基礎となる。	[Zhang X et al.] Xinjiang Univ., Urumqi 中国
25	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	本研究の目的は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチド (ssODN) とTALENを使ってヒツジのミオスタチン (MSTN) 遺伝子が編集できるかを調べることである。私たちはヒツジMSTN遺伝子のコード領域の中で高度に保存された配列を標的とする一対のTALENを設計した。ヒツジの初代線維芽細胞へTALENとssODNと一緒にトランスフェクトしてMSTN遺伝子の正確な遺伝子編集を誘導した。MSTN遺伝子を編集された細胞は核ドナーとして使われてクローン胚が作られた。TALENとssODNを組み合わせて使うと家畜で正確な遺伝子の修飾ができる。	[Zhao X et al.] Shihezi Univ., Shihezi 中国
26	ヒツジ	TALEN	ミオスタチン	私たちはヒツジのミオスタチン (MSTN) に特異的なTALENプラスミドを作ってSTHヒツジの胎児の線維芽細胞へトランスフェクトした。2つの対立遺伝子がノックアウトされた細胞を体細胞核移植のためのドナー細胞として選んだ。クローン胚を37頭の代理ブタに移植して、28頭 (75.7%) が妊娠して、15頭が出産した。23頭の子ヒツジが生まれて12頭は生きていた。子ヒツジの遺伝子変異はドナー細胞の物と一致した。オフターゲット変異は検出されなかった。MSTNノックアウトはMSTN関連遺伝子のmRNAの発現に影響していた。MSTNノックアウトによって体重が顕著に増加し、筋肉繊維の肥大が起きた。これらのMSTNに変異を持つヒツジは正常に発生と成長した。	[Li H et al.] Yunnan Agricultural Univ., Kunming 中国
27	ヒツジ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン, ASIP, BCO2	1細胞の胚へCas9 mRNAと3つの遺伝子 (MSTN, ASIP, BCO2) を標的とするgRNAをマイクロインジェクションすることによってヒツジにおいて正確な遺伝子ターゲティングを行なった。sgRNA : Cas9によるターゲティングの効果をクローニングとシーケンシングによって注入した胚、体細胞組織、生殖腺において調べた。子ヒツジにおけるこれら3つの遺伝子のターゲティングの効率は27-33%で、3つの遺伝子が同時にターゲティングされた効率は5.6%だった。受精卵へのマイクロインジェクションは遺伝子修飾されたヒツジを作るための効率的な方法であることが証明された。MSTN遺伝子の破壊では筋原線維が大きくなって筋肉の肥大が起きた。これは遺伝子修飾が遺伝子と形態学の両方のレベルで起きたことを支持する最初の詳細な証拠である。CRISPR/Cas9システムを利用して、商業的に重要な性質に関連する複数の遺伝子を同時にターゲティングすることによって家畜の改良ができることを本研究は示唆する。	[Zhao J et al.] Qingdao Agricultural Univ., Shihezi Univ., Shihezi 中国
28	ヒツジ	CRISPR/ Cas9	ミオスタチン	ヒツジのMSTN遺伝子をターゲティングによってノックアウトして筋肉の分化への影響を調べる方法は以下の段階から構成される。標的遺伝子のクローニング, gRNAの設計と合成, CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの構築, CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの外因性の活性の検出, CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターの内因性の活性の検出, CRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトベクターのノックアウト効果の検出。本発明は実験の期間が短く、操作が簡単で、再現性が高く、ノックアウトの効率が高いという利点がある。	[Li B et al.] Yangzhou Univ. 中国

表4 食用と考えられるゲノム編集植物 (2016年)

文献 No.	種名	用いた技術	ターゲット遺伝子	要旨	所属
29	キュウリ	CRISPR/Cas9	真核細胞翻訳開始因子4E (eIF4E)	劣性の真核細胞翻訳開始因子4E (eIF4E) の機能を破壊することによって Cas9/sgRNA技術を使ってキュウリにおいてウイルス耐性を獲得した。eIF4E のNおよびC末端をターゲットングした。形質転換したT1世代において標的部位で短い欠失と一塩基多型が検出された。想定されるオフターゲット部位にはこれらは検出されなかった。Cas9/sgRNAを導入したホモ接合体のT3子孫はキュウリ静脈黄変ウイルスに免疫を持ち、ズッキーニ黄斑モザイクウイルスとパパイヤリングスポットウイルス-wに耐性を示した。	[Chandrasekaran J et al.] Agricultural Research Organization, Volcani Center イスラエル
30	イネ	CRISPR/Cas9	アセト乳酸合成酵素 (ALS)	一本鎖オリゴDNAを修復の鋳型として使う方法が以前に報告されていたが、イネではこの方法を使ってゲノム編集ができなかった。2つのsgRNAを使ってプラスミドと遊離の二本鎖DNAの両方を修復の鋳型として提供する戦略によってアセト乳酸合成酵素遺伝子中の2つのアミノ酸残基を正確に置換できた。遺伝子の導入にはパーティクルガンを使った。一世代で除草剤に耐性なイネが作れた。この方法は容易に実行できて、効率が低い。	[Sun Y et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences 中国
31	アマ	TALEN, CRISPR/Cas9	青色蛍光タンパク質 BFP, 3-ホスホシキミ酸-1-カルボキシビニルトランスフェラーゼ (EPSPS)	DNAの二本鎖を非特異的に切断する。フレオマイシンで前処理したプロトプラストへ一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を導入すると、シロイヌナズナにおいて高頻度に正確なゲノム編集が起きた。ssODNとともにTALENまたはCRISPR/Cas9を同時に導入すると、DNAの二本鎖を切断する試薬だけで処理したときよりもゲノム編集の頻度は大きく増加した。ssODNとCRISPR/Cas9の組み合わせでアマにおいてEPSPSを正確に編集して除草剤耐性にした。ゲノム編集の頻度は高く、選抜をしなくても処理したプロトプラストから植物体を再生できた。再生させた植物は温室スプレー試験においてグリホサートに耐性だった。	[Sauer NJ et al.] Cibus, San Diego 米国
32	イネ	TALEN	WAXY	本発明は、イネのWAXY遺伝子を効率良く編集するためのTALEN用の一対のターゲットング部位とその応用を提供する。TALENの遺伝子を含むプラスミドを使う方法を提供する。TALENのアミノ酸配列とヌクレオチド配列を設計して、TALEN遺伝子を含むプラスミドを構築する。そして、ターゲットングの効率を改善する。	[Lei W et al.] BGI Shenzhen Technology Co., Ltd. 中国
33	ジャガイモ	TALEN	液胞型インベルターゼ	ジャガイモを低温保存することは、発芽を抑制して保存期間を延長するために広く行なわれる。しかし、低温保存によって還元糖の蓄積を促進してしまう。高温で加工すると、これらの還元糖から茶色の苦味の製品ができしまい、潜在的な発がん物質であるアクリルアミドの含有量が高くなってしまふ。本研究では、還元糖の蓄積を抑制するためにTALENを利用して液胞型インベルターゼ遺伝子 (Vinv) をノックアウトした。少なくとも1つのVinv対立遺伝子に変異がある18個の植物を得た。これらの植物の中で5つは全てのVinv対立遺伝子に変異があった。Vinv遺伝子をノックアウトした植物から得られたイモには還元糖が検出されず、加工されたチップスはアクリルアミドの含有量が減少し、色が薄かった。7つの植物はゲノム中にTALEN DNAの挿入がなかった。本研究は同質4倍体であるジャガイモの品種改良にTALENを利用する基礎となる。	[Benjamin CM et al.] Collectis Plant Sciences Inc., New Brighton 米国
34	イネ	TALEN	OsCSA1, OsDERF1, OsGN1a, OsMST7, OsMST8, OsPMS3, OsTAD1	イネのゲノム編集にN287C230 TALEN骨格を使うと低い変異効率 (0-6.6%) だった。しかし、TALEN骨格のC末端を除去すると変異効率が25%まで大きく上昇した。多くのトランスジェニックT0植物では1つの頻繁に現れる変異と多くの低頻度の変異があった。独立したT0植物において1つのひこばえの中の大部分の組織において頻繁に現れる変異が存在した。また、調べたすべてのひこばえにもそれは存在し、TALENによって誘導される変異は芽の頂点の分裂組織の発生においてかなり早く起きることを示唆する。数世代の解析はTALENによって誘導される変異は安定に標準的なメンデル型でT1とT2世代に伝達されることを示した。TALENによって誘導される変異の大部分 (約81%) は複数の塩基に影響して、それらの約70%は欠失だった。この結果は、イネにおけるCRISPR/Cas9システムの報告とは対照的であり、そこでは一塩基が影響を受けることが多く、欠失は全体の変異のわずか3.3%だった。	[Hui Z et al.] Chinese Academy of Sciences, Shanghai 中国
35	イネ	TALEN	WAXY	植物でのTALENに誘導される変異においてclassical nonhomologous end joining (cNHEJ) とalternative nonhomologous end joining (altNHEJ) の役割を分析するために、DNA Ligase 4 (Lig 4) 欠損がイネ細胞においてTALENに誘導される二本鎖切断の修復の反応速度論へ影響するかを調べた。Deep-sequencing分析から、すべてのタイプの変異の頻度はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損した変異型のカルスにおいて高いことが示された。すべての欠失の変異に対する大きな欠失 (10 bp以上) またはマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) によって修復される欠失の割合はlig 4ヘテロ接合の変異体または野生型よりもlig 4を完全に欠損する変異体のカルスにおいて高かった。さらに、ほぼすべての挿入 (2 bp以上) は、遺伝的背景に関係なく、TALEN切断部位の周辺の1つ以上の領域のコピーアンドペーストによって加工されてMMEJによって結合されることが示された。cNHEJの機能不全はcNHEJからaltNHEJまたは合成に依存したストランドアニーリングへと修復経路が変わることを本研究は示している。	[Nishizawa-Yokoi A. et al.] National Inst. of Agrobiological Sciences 日本
36	?	TALEN, CRISPR/Cas9	AIP10	植物のバイオマスと収量の増加を促進する方法を記載する。この増加は葉、幹、根および果実と実の生産において効果が見られる。さらに干ばつへの耐性が増加して環境への変化への適応が向上し、成長、バイオマス、収量が改善する。	[Silva HA et al.] Univ. Federal do Rio de Janeiro ブラジル

37	?	ZFN, TALEN, CRISPR/ Cas9	?	世界的に塩分は穀物の生産を減らす大きな要因の1つである。塩分への植物の反応は複雑で多くの遺伝子を含む。植物がどのように塩分に反応するかを完全に理解することは難しい。私たちはゲノミクスを通じて塩分ストレス応答に関連する遺伝子を同定して、特徴を調べ、シグナル経路を地図にして精密に示し、穀物の塩分耐性を改善するためにこの情報を利用することができた。Gene pyramidingのような新しい手法を遺伝子工学とマーカーに支援された育種に利用してストレス耐性の穀物を作る能力を大きく増強した。ゲノム編集技術も精確な育種に利用できる。	[Nongpiur RC et al.] Jawaharlal Nehru Univ., New Delhi インド
38	?	CRISPR/ Cas9	TRV配列	核酸コンストラクトを提供する。このコンストラクトはタバコ萎えそウイルス (TRV) 配列と興味のあるゲノムの標的配列において配列特異的な切断を媒介するsgRNAをコードする核酸配列から構成されて、その場所でTRV配列は機能的な2b配列を欠損している。このコンストラクトを含む植物細胞とゲノム編集におけるこのコンストラクトの使用も提供する。	[Alexander V et al.] Danziger Innovations Ltd. イスラエル
39	イネ	CRISPR/ Cas9	Badh2	本発明は、イネを香りのするイネに迅速に形質転換するための方法とCRISPR/Casシステムを開示する。この方法は、イネの香りを代謝する過程の関連遺伝子の配列に対するベクターを設計して、香りのする物質が代謝されずに大量に蓄積するように遺伝子の特定の部位で欠失やサイレンシングを誘導するためにアグロバクテリウムで媒介する形質転換によって香りのしないイネにベクターをトランスフェクトする。標準的なイネが香りのするイネに形質転換された後に、変更された遺伝子を分離するために自殖または交配が行なわれて、他の遺伝子の構造や性質に影響を与えずに安定的に遺伝するホモ接合性の香りのするイネが得られる。	[Wang J et al.] Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences 中国
40	イネ	CRISPR/ Cas9	Badh2	本方法はCas9によって認識される香りの遺伝子のエクソンとイントロンから配列を選び、ゲノミックDNAを切り、DNA修復を誘導して欠失変異を作り、機能しないBadh2遺伝子を得ることから構成される。形質転換を行なうのはOryza sativa. ssp. indica, Oryza sativa. ssp. Japonicaともち米のカスを使い、二倍体のカスを誘導するための外植片として成熟した胚、若い穂と子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカス細胞へターゲットングベクターを移して、スクリーニングして、陽性の植物を同定して、T1グループから香りのするコメ系列を分離して、半数体のカスを誘導するための外植片として約、花粉、不受精の子房を使う。アグロバクテリウムの媒介でカス細胞にターゲットングベクターを移して、陽性カスをスクリーニングして、コルヒチンで処理して、苗に分化させて、陽性の形質転換植物を同定して、香りのするイネ系統を得る。	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
41	イネ	CRISPR/ Cas9	アセト乳酸合成酵素	CRISPR/Casに媒介される相同組み換えによってイネにおけるアセト乳酸合成酵素の除草剤への耐性を導入する方法を記載する。本方法は、二本鎖切断を作り、1つ以上の変異を含むcDNAと宿主の遺伝子を置換するために2つのgRNAを使う。この方法はイネにおいて1つのgRNAを使うよりも効率が高い。	[Sun Y et al.] Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 中国
42	イネ	CRISPR/ Cas9	Gn1a, DEPI, GS3, IPA1	イネの栽培品種Zhonghua11においてGn1a, DEPI, GS3とIPA1遺伝子に変異を導入するためにCRISPR/Cas9システムを使った。これらの遺伝子は粒の数、円すい花序の構造、粒の大きさ、植物の構造を制御すると報告されている。形質転換した植物の第一世代 (T0) における表現型と編集された遺伝子の頻度の分析は、CRISPR/Cas9システムはゲノム編集を誘導する効率が高いことが示された。形質転換された植物においてゲノム編集された割合は42.5% (Gn1a), 67.5% (DEPI), 57.5% (GS3), 27.5% (IPA1) だった。gn1a, depl, gs3変異体のT2世代の特徴はそれぞれ粒の数の増加、高濃度の直生の円すい花序、大きな粒だった。さらに、deplとgs3変異体ではそれぞれやや矮小植物で、長い芒を持つ粒の表現型が見られた。ipa1変異体は2つの対照的な表現型を示し、OsmiR156標的領域において誘導される変化に依存して、少ないまたは多いひこばえができた。さらに、以前の報告よりも欠失の変異の頻度が高いことが明らかになった。オフターゲットは高度に類似の配列で起きていた。この結果は、CRISPR/Cas9によって単一の栽培品種において重要な性質の複数の制御因子を修飾できることを証明した。そして、これらの結果は同じ遺伝的背景における複雑な遺伝子制御のネットワークと栽培品種における重要な性質の重なるの調査を促進する。	[Li M et al.] Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 中国
43	トマト	ZFN	LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (LIL4)	植物において、特に穀物において精確な遺伝子ターゲットングを行なうことは遺伝子機能の解明や分子育種の前進のために長年求められてきた。この問題に取り組みするために、トマトの種に対してZFNに基づく技術を開発した。2つのDNA認識配列の間のイントロンの配列とともにZFNの設計をターゲットングした遺伝子の変異導入に関して評価した。核因子Yのβサブユニットをコードする発生の制御因子LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (LIL4) に対して特別に作成したZFNはトマトの種で一過性に発現させると、標的部位を切断して、非同相末端結合による不完全な修復を刺激して、内在性の標的部位に変異を導入した。ZFNの技術を植物に適用できて、発生の段階でヘテロクローニーな表現型をもたらすLIL4変異が得られた。LIL4のDNA結合ドメインの上流での配列の変化は果実の組織を含めて表現型の多様性につながる可能性がある。これらの結果は、トマトでのターゲットングによる変異導入のためにZFNの方法が使用できることを明確に示しており、トランスレシヨナルリサーチとトマトの育種を加速するかもしれない。	[Hiloti Z et al.] Inst. of Applied Biosciences, Thessaloniki ギリシャ

44	イネ	CRISPR/Cas9	温度感応性雄性不稔 (TGMS)	<p>ハイブリッド米はイネの生産の改善のための重要な戦略を提供する。その中で不妊の雄株の系列の栽培は交雑育種の成功のための鍵である。CRISPR/Cas9システムが穀物の遺伝的改良のために応用された報告は少ない。本研究ではCRISPR/Cas9システムを使って温度感応性雄性不稔5 (TMS5) 遺伝子に特異的な変異を導入した。TMS5は中国において最も広く応用される熱に感受性な遺伝子の雄株の不妊の遺伝子である。そして私たちは「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ったターゲティングの変異導入のためにTMS5のコード領域において10個の標的配列を設計して、オンターゲットとオフターゲットの効果の潜在的な割合を評価した。最後に、私たちは潜在的に应用可能な「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を育種するために最も効率の良いコンストラクトであるTMS5abコンストラクトを作成した。私たちは異なる標的配列の特徴にしたがって編集に影響する因子も議論した。注目すべきは、TMS5abコンストラクトを使って私たちは11個の新しい「外来遺伝子で汚染されていない」TGMS系列を作成した。この方法は2つのイネの亜種においてわずか1年以内に雑種育種の潜在的な応用が可能である。私たちの方法の応用は不妊の系列の育種を大きく加速するだけでなく、雑種強勢の開発を促進するだろう。</p>	[Zhou H et al.] State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 中国
45	イネ	CRISPR/Cas9	?	<p>本発明はCRISPR/Cas9技術に基づいてモチゴメではないイネの系統をモチゴメの系統に変えるためのターゲティングベクターに関連する。ターゲティングベクターは、sgRNA発現カセット、Cas9発現カセットとスクリーニングマーカーから構成される。sgRNAは第一のプロモーターと第一のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするsgRNAから構成される。Cas9発現カセットは第二のプロモーターと第二のプロモーターの制御下で転写される配列をコードするCas9から構成される。第一のプロモーターと第二のプロモーターはコメにおいて恒常的に発現する強い同じまたは異なるプロモーターである。本発明はこのターゲティングベクターを使ってモチゴメではないコメの系統をモチゴメの系統に変えるための方法も提供する。本発明によって育種の時間を大幅に短縮できる。</p>	[Ju C et al.] Hubei Univ. 中国
46	イネ	CRISPR/Cas9	OsARF4	<p>本発明は分子生物学と遺伝子工学技術の分野、特にイネの粒の長さと重さを制御するOsARF4遺伝子への応用に関連する。本発明はイネにおいて発現する、オーキシン反応因子をコードするOsARF4を狙っている。イネの粒の長さや重さを改善して収量を改善するためにOsARF4をノックアウトする。本発明はOsARF4遺伝子のコード領域に特異的なsgRNAを利用したCRISPR-Cas9技術を使い、OsARF4遺伝子のコード領域に損傷を与えて、T-DNAを除去して非トランスジェニックイネを得る。遺伝子組換えイネは粒の長さや重さにおいてのみ明らかな改善があり、他の農学の性質には大きな変化がない。本発明の遺伝子と操作技術は実用的な価値があり、植物の収量を改善するうえで大きな役割を果たす。</p>	[Liu J et al.] Fudan Univ. 中国
47	イネ	CRISPR/Cas9	OsLCT1	<p>本方法は、イネのLCT1エクソンのクローニング、CRISPR/Cas9システムの利用、エクソンの配列にしたがって標的配列を選び、pCRISPR/Cas9組換えベクターを構築し、それをイネのカルスに導入する。トランスジェニック苗を得て、トランスジェニックな陽性の植物をスクリーニングする。本発明は、CRISPR/Cas9技術を使ってターゲティングによってイネのOsLCT1をノックアウトして、カドミウムトランスポーターOsLCT1を完全に不活性化させる。外来遺伝子を含まない利点とイネの粒のカドミウム含量が大幅に減少して、包括的な農学的な特徴は大きく変わらないようなイネの育種を行なう。本発明は安全で、時間がかからず、コストが安いという利点がある。</p>	[Tang L et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国
48	ブドウ	CRISPR/Cas9	L-イドン酸-5-デヒドロゲナーゼ (IdnDH)	<p>CRISPR/Cas9システムは多くの植物に適用されてきたが、ブドウにおいてゲノム編集のために利用できるかは不明である。本研究では「シャルドネ」懸濁細胞と植物においてCRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集とターゲティングした遺伝子の変異を述べる。L-イドン酸-5-デヒドロゲナーゼ遺伝子 (IdnDH) の異なる部位を標的として2つのsgRNAを設計した。CEL I エンドヌクレアーゼアッセイとシーケンシングの結果から標的部位において予想される挿入と欠失があることが明らかになった。sgRNA1/Cas9を発現させたトランスジェニックな細胞集団とそれに対応する再生させた植物においては100%の変異の頻度が得られた。トランスジェニックな細胞集団において検出される変異の中で大多数は1 bpの挿入であり、それに続いて1-3bpの欠失が見られた。オフターゲット活性は、潜在的なオフターゲット部位をシーケンシングすることによって評価した。その結果、明らかなオフターゲット変異は検出されなかった。私たちの結果はブドウにおいて精確なゲノム編集のためにCRISPR/Cas9システムが利用できることを証明した。</p>	[Ren C et al.] Chinese Academy of Sciences, Beijing 中国
49	グレープフルーツ	CRISPR/Cas9	GfPT	<p>本発明は、グレープフルーツのクマリンに特異的なプレニルトランスフェラーゼ (GfPT) を阻害することによって、植物においてフラノクマリンの生産を阻害する方法を提供する。植物においてフラノクマリンの発現を阻害する方法は、部位特異的突然変異誘発法、EMS突然変異生成、TILLING、ノックアウト技術、CRISPR/Cas9、TALEN、ZFNを使う遺伝子編集技術、またはRNA干渉によって誘導される遺伝子サイレンシングによってGfPTを不活性化することを含む。</p>	[Bourgau F. et al.] Univ. de Lorraine フランス

50	トマト	CRISPR/ Cas9	べと病抵抗6 (DMR6) オルソログ	病原菌による穀物の生産への被害は世界的に大きい。病原菌に対して耐性な穀物の品種の使用は世界の増加する人口の食料需要に合致した持続可能な方法になりうる。私たちは病気耐性に関連した特異的な遺伝子を修飾することによってトマトにおいてゲノム編集を行い持続できる病気耐性な性質を獲得した。最近、シロイヌナズナにおいてべと病抵抗6 (DMR6) と呼ばれる1つの遺伝子の不活性化によっていくつかの病原菌に耐性を与えることが示された。この遺伝子は病原菌の感染中は特異的に発現が上昇して、dmr6遺伝子における変異はサリチル酸濃度の上昇が起きた。トマトのS1DMR6-1オルソログであるSolyc03g080190もPseudomonas syringae pv. tomatoとPhytophthora capsiciの感染中に発現が上昇する。私たちはCRISPR/Cas9システムを使ってトマトにおいてSIDMR6-1遺伝子に小さな欠失を作り、フレームシフトを起こして未成熟な先の欠けたタンパク質を作るようにした。これらの変異は温室の条件では成長や発生について大きな有害な効果はなく、P. syringae, P. capsici, Xanthomonas spp.を含む異なる病原菌に対して耐性を示した。	[Thomazella DPT et al.] Univ. California, Berkeley 米国
51	イネ	CRISPR/ Cas9	CSA	イネの雄性不稔遺伝子CSAのタンパク質の配列とヌクレオチド配列を開示する。CRISPR/Cas9システムに基づいてCSA遺伝子をノックアウトする、変える、または抑制することによって通常のイネの品種におけるCSA遺伝子の発現量が減少して、イネの雄性不稔系統を得る。部位特異的ノックアウトの方法は、CH-CRISPR/Cas9システムに基づいたCC-CSA-1ベクターとGateway-CRISPR/Cas9システムに基づいたGC-CSA-1ベクターによる雄性不稔遺伝子CSAの遺伝子編集を含む。本発明は、イネの雄性不稔遺伝子CSAに基づいた雄性不稔系列の生殖質の資源とイネの二系統の交配による種子の生産のために効率の良いノックアウトの方法と育種の様式を提供する。	[Zhang D et al.] Shanghai Jiao Tong Univ. 中国
52	ブドウ, リンゴ	CRISPR/ Cas9	MLO-7, DIPM-1, 2, 4	全ゲノムシーケンスとゲノム編集を組み合わせて利用することによって、初めて得られる表現型を獲得するため、新しい機能を導入するために、以前にはできなかった制御と正確さで標的とした部位での遺伝子の変化を導入することが可能となり、果物のバイオテクノロジーの分野に革命が起きた。プラスミドによってゲノム編集の成分を導入するととても効率が良いが、宿主のゲノムにプラスミドの配列がランダムに取り込まれてしまう可能性があるなど、いくつかの欠点もある。さらには、現在のプロセススペースのGMOの規制に阻まれて、改良した品種の商品化が難しくなるかもしれない。私たちは、効率の良い標的部位への変異誘導のために、ブドウの栽培品種シャルドネとリンゴの栽培品種Golden delicious fruitの穀物植物のプロトプラストへ精製したCRISPR/Cas9リボヌクレオプロテイン (RPNs) を直接導入することを試みた。ブドウの栽培品種においてうどん粉病への耐性を強化させるために、影響を受けやすい遺伝子である、MLO-7を標的とした。リンゴにおいては火傷病への耐性を強化させるためにDIPM-1, DIPM-2, DIPM-4を標的にした。さらに、各々のブドウとリンゴの栽培品種に対して、効率の良いプロトプラストの形質転換、Cas9とsgRNAのモル比を最適化した。標的部位のディーブシークエンシングを使って、標的部位の挿入と欠失の割合を解析した。CRISPR/Cas9 RPNsをプロトプラスト系へ直接導入することで遺伝子編集は可能であり、DNAを使わないゲノム編集でブドウとリンゴの植物を作ることへ可能性を開いたことを私たちの結果は証明する。	[Malony M] Fondazione Edmund Mach, Trento イタリア, 韓国
53	イネ	CRISPR/ Cas9	qSH 1	本発明は、CRISPR/Cas9システムを使ってイネの種子が砕け散ることに関連した遺伝子qSH1のターゲットイングによる修飾によってコメが砕け散る性質を低下させるための分子遺伝学的方法を提供する。本方法は、qSH1またはLOC_Os01g62920またはOs01g0848400のコード領域と5'末端の開始コドンの付近に適切な標的を選ぶこと、標的配列を含むベクターpYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aを構築すること、ベクターpYLgRNA-U3とpYLgRNA-U6aと標的配列を含む組換えベクターpCRISPR/Cas9を構築すること、イネに組換えベクターpCRISPR/Cas9を導入すること、トランスジェニック陽性植物を得ること、トランスジェニック陽性植物とともに標的部位で変異を持つ植物を得ること、変異体の植物を数世代栽培することによって遺伝子組換え実験の成分を含まないホモ接合性の変異体植物を得ること、砕け散る性質が大きく低下した植物を得るためにホモ接合性の変異体の植物の砕け散る性質の試験を行うことを含む。この方法は高い指向性があり、遺伝的背景の変化はほとんどなく、遺伝子組換えのリスクを避けることができ、遺伝子組換え実験の成分を含まず、砕け散る性質が大きく低下した新しいイネの品種と新しい組み合わせを得ることができる。	[Sheng X et al.] Hunan Hybrid Rice Research Center 中国

54	イネ	CRISPR/ Cas9	OsERF922	イネのイモチ病は世界的にイネに影響を与えるもっとも破壊的な病気である。宿主の耐性の獲得はそれを制御するためのもっとも経済的で効率の良い方法であることが証明されている。私たちは、イネのOsERF922遺伝子を標的にするCRISPR/Cas9配列特異的ヌクレアーゼ (C-ERF922) を利用することでイネのイモチ病への耐性を改善したことを報告する。50個のT0トランスジェニック植物から21個のC-ERF922によって誘導される変異植物 (42.0%) が同定された。サンガーシーケンシングによってこれらの植物は標的部位に様々な挿入と欠失の変異を持っていることが明らかになった。C-ERF922によって誘導される対立遺伝子の変異のすべてが次世代に伝達されることを私たちは示した。望ましい遺伝子修飾を持っているが、導入されたDNAを含まない変異植物がT1とT2世代の分離によって得られた。6個のT2ホモ接合性の変異系統はイモチ病に対する耐性の表現型と様々な農学的な性質についてさらに調べた。病原菌の感染の後に形成されるイモチ病の損傷の数は野生型の植物と比較して苗と分けつ両方の段階で大きく減少した。さらには、6個のT2変異系統と野生型の植物の間には調べた農学的な性質について大きな違いはなかった。2、3個の部位に変異を持つ植物を得るために、Cas9/Multi-target-sgRNAs (C-ERF922S1S2およびC-ERF922S1S2S3) を使うことによってOsERF922の中に複数の部位を標的にした。CRISPR/Cas9による遺伝子修飾はイネにおけるイモチ病への耐性を強化するための有用な方法であることを私たちの結果は示している。	[Wang F et al.] Guangxi Univ., Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 中国
55	イネ	TALEN	イネアセト乳酸合成酵素	DNA二本鎖切断に対する相同組換え (HR) による修復を通じた部位特異的な置換または本物のゲノム編集は課題である。イネにおけるTALENに基づいたHRによる遺伝子置換として、TALENと希望する変異を含むドナーDNAを使って、私たちはイネのアセト乳酸合成酵素遺伝子へ2つの点突然変異を作り、除草剤に耐性なイネの系統を作った。3回の実験でTALEN遺伝子を含むDNAとドナーDNAをイネのカルスへ導入した後に、1.4 - 6.3%の効率でT0世代においてOsALSの異なる遺伝子型を持つ9個の植物を得た。HRによって媒介される遺伝子編集はT1世代の子孫へ遺伝する。編集されたT1植物は強い除草剤への耐性を示し、対照の植物と同じくらい形態学的に正常だった。この結果は、イネにおいてTALENによって媒介されるゲノム編集の実現可能性を証明し、他のヌクレアーゼに基づいたゲノム編集に有用な情報を提供する。	[Li T et al.] Iowa State Univ., Ames 米国
56	ジャガイモ	TALEN, CRISPR/ Cas9	アセト乳酸合成酵素 (ALS1)	相同組換え (HR) による遺伝子ターゲティングは理解しにくい。DNA修復のための強力な方法かもしれない。遺伝子ターゲティングに関連した障壁を克服するために、ジャガイモのアセト乳酸合成酵素1 (ALS1) 遺伝子を標的とする配列特異的なヌクレアーゼ (SSNs) と修復の鋳型を導入するためにジュミニウイルスのレプリコン (GVR) を使った。なお、修復の鋳型はALS1に除草剤耐性の性質を付与するための点突然変異を導入するために設計された。GVRsを使って得られた形質転換体の植物は、除草剤への感受性が弱くなる表現型を支えることのできる点突然変異を持っていた。一方で、古典的なT-DNAを使って形質転換した植物は検出可能な変異を持っておらず、野生型と同じだった。形質転換した植物の再生は、除草剤への感受性をより大きく低下させた表現型を支える点突然変異の検出を改善した。これらの結果は、植物へゲノム編集のための試薬を導入するためのジュミニウイルスの使用の有効性を証明し、栄養繁殖する種における遺伝子ターゲティングのための新しい方法を示した。	[Butler NM et al.] Michigan State Univ., East Lansing 米国
57	ダイズ	TALEN	FAD2-1A, FAD2-1B, FAD3A	ダイズ油の中の個々の脂肪酸の量を調節できれば、保存可能期間と炒めるときの安定性を増加させて、栄養的特徴を改善できる可能性がある。ダイズ油は高濃度の多価不飽和リノール酸とリノレン酸を含んでいて、それが酸化的な不安定につながる。この問題は部分的な水素化によって取り組まれてきた。しかし、部分的な水素化はトランス脂肪酸の量を増加させてしまい、それが心血管の病気と関連していた。以前に私たちは脂肪酸デサチュラーゼ2-1A (FAD2-1A) とFAD2-1B遺伝子にロックアウト変異を持つダイズ系統を作成した。そのダイズ系統では一価不飽和オレイン酸 (18:1) の量が上昇してリノール酸 (18:2) とリノレン酸 (18:3) の量が減少した油が得られた。本研究では、リノレン酸の量をさらに低下させるために、FAD2-1AとFAD2-1Bの中の変異に脂肪酸デサチュラーゼ3A (FAD3A) の変異を積み重ねた。fad2-1a fad2-1bダイズ植物へTALENを直接導入することによってFAD3Aの中に変異を導入した。fad2-1a fad2-1b fad3aダイズの油はfad2-1a fad2-1bダイズと比較すると、リノレン酸の濃度が有意に低かった (4.7%に対して2.5%)。さらに、油はリノール酸の量が有意に低く (5.1%に対して2.7%)、オレイン酸の量は有意に高かった (77.5%に対して82.5%)。外来遺伝子を含まないfad2-1a fad2-1b fad3aダイズ系統が同定された。本方法はダイズにおいて性質を積み重ねるために配列に特異的なヌクレアーゼを使うための効率的な方法を提供する。得られた生産品は80%以上のオレイン酸と3%以下のリノール酸とリノレン酸から構成される。	[Demorest ZL et al.] Calyxt, Inc., New Brighton 米 国
58	イネ	CRISPR/ Cas9	QTL遺伝子群	粒子の収量は穀物において遺伝的改良をするためのもっとも重要で複雑な性質である。それは量の性質の遺伝子座 (quantitative trait loci, QTLs) として知られる多くの遺伝子によって制御されていることが知られている。過去10年で穀物において収量に貢献している多くのQTLsが同定された。しかし、これらのQTLsは異なる遺伝的背景において同じ収量をもたらすかは不明である。本研究では私たちは5つの広く栽培されているイネの品種においてCRISPR/Cas9によってQTLを編集した。そして、同じQTLが異なる遺伝的背景において粒子の収量に対して多様な、ときには逆の効果を与えることを示した。	[Shen L et al.] Yangzhou Univ., Yangzhou 中国

59	イネ	CRISPR/Cas9	イネ5-エノイルピルビニルシキミ酸-3-リン酸シターゼ (OsEPSPS)	植物のゲノムの特定の遺伝子座において、遺伝子の断片を置換することと遺伝子の挿入を行なうことはとても難しい。本研究ではNHEJ経路とCRISPR/Cas9システムを使って変異を作る効率の良いイントロンによって媒介される部位特異的な遺伝子の置換と挿入の方法を報告する。近接するイントロンを標的とする一対のsgRNAと、そのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って、イネの内在性遺伝子5-エノイルピルビニルシキミ酸-3-リン酸シターゼ (EPSPS) 遺伝子において2%の頻度で遺伝子置換を達成した。1つのイントロンを標的とした1つのsgRNAとそのsgRNAの標的部位を含むドナーのDNAの鋳型を使って2.2%の頻度でターゲティングによる遺伝子の挿入も行なった。意図した置換を持つOsEPSPS遺伝子を含むイネの植物はグリホサートに耐性だった。さらには、部位特異的な遺伝子の置換と挿入は正確に次世代へ伝達された。これらの新しく開発された方法は、イネと他の植物においてターゲティングによる遺伝子の断片の置換と外来DNA配列を挿入するために一般的に使える。	[Jun L et al.] Chinese Academy of Sciences, Beijing 中国
60	マッシュルーム	CRISPR/Cas9	ポリフェノールオキシダーゼ	マッシュルームの6つあるポリフェノールオキシダーゼ遺伝子の1つに数塩基の欠失を起こさせた。酵素活性が30%減少した。マッシュルームが茶色くなるのが遅くなり、保存可能期間が長くなる。CRISPR/Cas9を利用したケースで米国の規制から外れる結論になった最初の例。米国はGMOを規制するための規則を改革している。	[Waltz E] Freelance writer based in New York 米国
61	ダンカングレープフルーツ	CRISPR/Cas9	T1 CsLOBP遺伝子のプロモーター	Xanthomonas citri亜種citri (Xcc) が引き起こすかんきつ類潰瘍病は大部分の商業的なかんきつ類の栽培品種に対して深刻な病気で、世界的に大きな経済的な被害をもたらしている。潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作ることは、かんきつ類潰瘍病の効率的で持続的な解決策を提供するだろう。本研究では、CsLOB1 (Citrus sinensis Lateral Organ Boundaries) 遺伝子のCsLOB1プロモーター (EBEPthA4-CsLOBP) の中のPthA4エフェクター結合成分 (EBEs) を修飾することによって潰瘍病に耐性なグレープフルーツを作ることにおける進歩を報告する。CsLOB1はかんきつ類潰瘍病によって影響を受けやすい遺伝子であり、病原因子PthA4によって誘導される。PthA4はCsLOB1遺伝子の発現を誘導するためにEBEPthA4-CsLOBPへ結合する。ダンカングレープフルーツにはCsLOB1の中に2つの対立遺伝子タイプI, IIがある。本研究では、ダンカングレープフルーツの上胚軸の形質転換によってタイプI CsLOB1プロモーター (T1 CsLOBP) のPthA4EBEsを破壊するためにバイナリーベクターを設計した。EBEPthA4-T1 CsLOBPの標的部に修飾を持つ4つのトランスジェニックダンカン植物が作られた。タイプI CsLOB1プロモーターについては、変異の率は15.63% (#D13), 14.29% (#D17), 54.54% (#D18) と81.25% (#D22) だった。野生型のXccの存在下ではトランスジェニックダンカングレープフルーツは野生型と同じように潰瘍病の症状が現れた。人工的に設計したdTALE dCsLOB1.3は特異的にタイプI CsLOBPを認識して、変異型のタイプI CsLOBPまたはタイプII CsLOBPを認識しない。これをダンカンの形質転換体に感染させるために開発した。結果はXcc Δ pthA4:dCsLOB1.3の存在下で#D18は弱い潰瘍病の症状を示し、#D22は目に見える潰瘍病の症状はなかった。PthA4による影響を受けやすい遺伝子CsLOB1の1つの対立遺伝子の活性化はかんきつ類潰瘍病の誘導に十分であり、かんきつ類潰瘍病に耐性な植物を作るためにはCsLOB1の両方の対立遺伝子のプロモーターの変異がたぶん必要であることを私たちのデータは示唆する。本研究は、将来Cas9/sgRNAによって潰瘍病に耐性なかんきつ類の品種を作るための基礎となるだろう。	[Jia H et al.] Inst. of Food and Agricultural Sciences, Univ. of Florida, Lake Alfred 米国

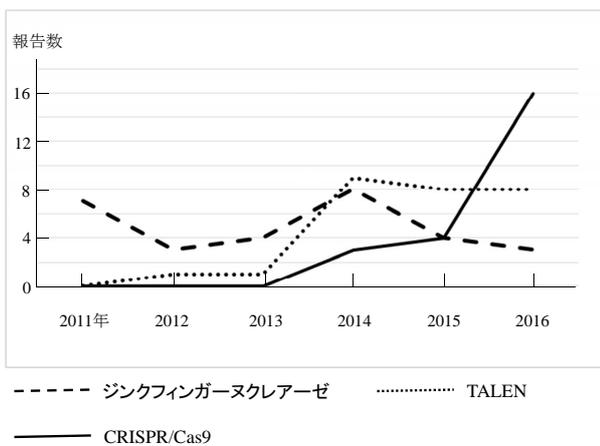


図4 ゲノム編集の手法別に分類したときの報告数の推移

食用と考えられるゲノム編集動物 (2011-2016年) と同植物 (2016年) を合わせて調査の対象とした。

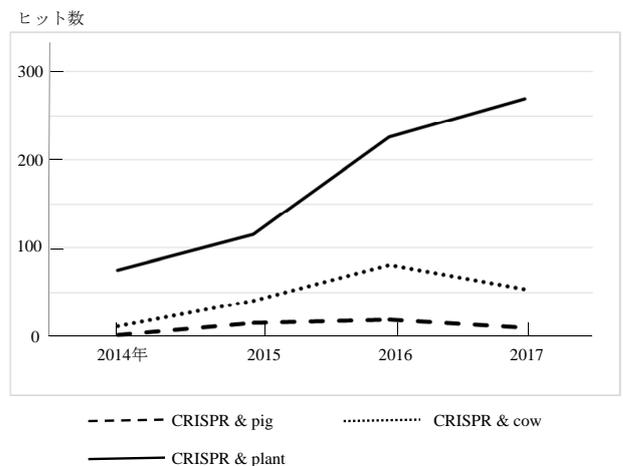


図5 SciFinderを検索したときのヒット数の推移  
キーワードは図中に示した。

果を表3, 4に示した。ここには示さないが、研究用、医薬品製造用、工業用などのゲノム編集動植物についても調査を行なった。これらについては近日中に国立医薬品食品衛生研究所・生化学部のホームページから閲覧できるようにする予定である。

食用と考えられるゲノム編集動植物においてはターゲット遺伝子にindelが誘導されてフレームシフトが起きると、新しいペプチドが生産される可能性がある。2016年に発表された論文において、これらのペプチドを生産する可能性のある動植物について私たちが調べた結果と論文での記載を表5, 6にまとめた。これらの中には、論文に記載されている配列がデータベースの配列と一致しないケースがあった。これらは、ターゲット遺伝子の情報が十分にそろっていないことを意味する。このようなゲノム編集動植物を食品として利用することを考えるならば、ターゲット遺伝子についての情報をさらに充実させることが必要である。第二に、これらのペプチドが食物アレルギーと相性を有することがあり、これらのペプチドを含む動植物に由来する食品を食したときに食物アレルギーの問題が起きる可能性がある。第三に、ターゲット遺伝子がコードする元のタンパク質のN末端付近が食物アレルギーと相性があると、これらのペプチドも同様に食物アレルギーとの相性を保持するケースがあった。これらのペプチドの発現量が元のタンパク質のそれよりも上昇していると、食物アレルギーを起こす可能性があるかもしれない。このように様々な問題があるが、これらのペプチドについては論文中でまったく言及がなく、その検出が試みられていることは皆無だった。ゲノム編集動植物を食品として利用するときには、このようなペプチドの安全性を評価することが必要である。

2017年に発表された論文や特許については現在調査を行なっている。SciFinderを検索したときのヒット数の推移を図5に示した。このヒット数と食用と考えられるゲノム編集動植物の報告数が相関すると仮定する。キーワードに“CRISPR pig”, “CRISPR cow”を用いると、ヒット数は2016年がピークとなり、2017年は減少している。したがって、食用と考えられるゲノム編集動物の報告数も2016年がピークであると予想される。一方で、“CRISPR plant”をキーワードとすると、ヒット数は2017年まで増加が続いているが、2016年から2017年にかけては増加の速度が鈍っている。したがって、食用と考えられるゲノム編集植物の報告数も2017年は2016年を上回るが、2015年から2016年にかけての増加には及ばないと予想される。

#### 4. まとめ

食用と考えられる編集動植物の報告が多数見出され、それらの研究が活発に行なわれていることを明らかにした。開発国を調べると、中国が圧倒的に多く、今後の中国の動向に注目する必要がある。ゲノム編集の手法としてはCRISPR/Cas9システムが多く使われるようになってきた。ところで、ターゲット遺伝子にindelが誘導されてフレームシフトが起きると、新規なペプチドが動植物中で生産されてしまうことが考えられる。しかし、このようなペプチドには論文中でまったく注意が向けられていなかった。ゲノム編集動植物を食品として利用するときにはこのようなペプチドの安全性を考慮することが必要である。

今後も同様な調査を継続して行い、ゲノム編集動植物を含む新規開発食品の開発状況を把握して食品の安全性確保につなげたい。

#### 5. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「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 (H25-食品-一般-015)」, 「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究 (H27-食品-一般-0041)」, 「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保とリスクコミュニケーションのための研究 (H30-食品-一般-007)」の一環として実施した。



表6 フレームシフトによって誘導されるペプチドを生産する可能性のあるゲノム編集植物

文献No.は、表4 食用と考えられるゲノム編集植物（2016年）の文献No.に対応する。

文献No.	特記事項	生物種	標的遺伝子	インデルのパターン (-: 欠失, +: 挿入)	標的部位 (エクソン?)	フレームシフトによって誘導される ペプチドの配列の性質	ペプチドに ついて論文 中での言及	ペプチドの 検出の試み	
								電気泳動	オミックス
29		キュウリ	真核細胞翻訳開始因子4E (eIF4E)	-1, -2, -3, -4, -5, -9, -11, -15, -20, +1	第1, 3エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
30	点突然変異, 該当せず	イネ				フレームシフトは起きない.			
31	点突然変異, 該当せず	アマ				フレームシフトは起きない.			
32	中国特許 割愛	イネ							
33		ジャガイモ	液胞型インベルターゼ	-2, -4, -5, -17	第1エクソン	元のタンパク質のN末端がsliding 80 mer windowと8 mer exact matchによって食物アレルゲンであるトマトβフルクトフラノシダーゼ前駆体とホモロジーあり, Sliding 80 mer windowで相同性95.4%. ペプチドも同じくホモロジーあり.	なし	なし	なし
34		イネ	OsMT8	-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -18, -21, -24, -25, -28, -67, +2	第1エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし		
		イネ	OsMT7	-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10, -11, -12, -14, -16, -17, -22, -29, -32, -35, -40, +1, +2	第1エクソン	-2の欠失のときに作られるペプチドは, sliding 80 mer windowでウシコラーゲンα2(1)鎖前駆体と37.3%のホモロジーあり.	なし		
		イネ	OsPMS3, OsCSA, OsDERF1	不明	プロモーター				
		イネ	OsGN1a, OsTAD1, OsDERF1	不明	エクソン				
35		イネ	WAXY	-2, -3, -4, -5, -6, -10, -15, -28, +1	第1イントロン				
36	米国特許 割愛								
37	割愛	?	情報なし						
38	国際特許 割愛	?							
39	中国特許 割愛	イネ							
40	中国特許 割愛	イネ							
41	点突然変異, 該当せず	イネ	アセト乳酸合成酵素			フレームシフトは起きない.			
42		イネ	DEP1	-1, -2, -4, -5, -6, -12, -21, -39, +1, +85	第5エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
		イネ	IPA1	-3, -5, -13, -20, -41, -46, +1	第3エクソン	元のタンパク質のN末端が8 mer exact matchによって食物アレルゲンであるトウモロコシキチナーゼとホモロジーあり. ペプチドも同じくホモロジーあり.	なし	なし	なし
		イネ	Gn1a	-1, -2, -3, -10, -112, -115, +1	第1エクソン	配列情報が入手できない.	なし	なし	なし
		イネ	GS3	-2, -4, -5, -7, -9, -19, -31, -37, -56, -145	第1エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
43		トマト	LEAFY-COTYLEDON1-LIKE4 (L1L4)			配列情報が入手できない.	なし	なし	なし
44		イネ	温度感応性雄性不稔 (TGMS)	不明					
45	中国特許 割愛								
46	中国特許 割愛								
47	中国特許 割愛								
48		ブドウ	L-イドロン酸-5-デヒドロゲナーゼ (IdnDH)	-1, -2, -3, -4, -6, -9, -10, -26, +1	第1, 2エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
49	米国特許 割愛								
50		トマト	べと病抵抗6 (DMR6) オルソログ	-5, -7	第2, 3エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
51	中国特許 割愛								
52		ブドウ	MLO-7	不明			なし		
		リンゴ	DIPM-1	不明			なし		
		リンゴ	DIPM-2	不明			なし		
		リンゴ	DIPM-4	不明			なし		
53	中国特許 割愛								
54		イネ	OsERF922			配列情報が入手できない.	なし		
55	点突然変異, 該当せず	イネ	イネアセト乳酸合成酵素			フレームシフトは起きない.			
56	点突然変異, 該当せず	ジャガイモ	アセト乳酸合成酵素 (ALS1)			フレームシフトは起きない.			
57		ダイズ	FAD3A	不明					
58		イネ	GS3	-1, -11, +1	第1エクソン	アレルゲンとホモロジーなし.	なし	なし	なし
			Gn1a	-1, -7, +1	第1エクソン	配列情報が入手できない.	なし	なし	なし
59	遺伝子の置換と挿入, 該当せず	イネ	イネ5-エノイルビルビニルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (OsEPSPS)						
60		マッシュルーム	ポリフェノールオキシダーゼ	不明					
61	プロモーターの修飾, 該当せず	タンカン グレープ フルーツ				タンパク質の配列に変化なし.			

## 引用文献

- 1) Lilico SG *et al.*: *Sci. Rep.* 2016:6, 21645.
- 2) Xiao GJ *et al.*: *PLoS One* 2016:11 (11), e0165843.
- 3) Chen J *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016:CN 105543257 A 20160504.
- 4) Rao S *et al.*: *Mol. Reprod. Dev.* 2016:83 (1), 61-70.
- 5) Qi S *et al.*: *Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao* 2016:32 (10), 1161-1167.
- 6) Bi Y *et al.*: *Sci. Rep.* 2016:6, 31729.
- 7) Li N *et al.*: *PCT Int. Appl.* 2016:WO 2016110214 A1 20160714.
- 8) Brouillette M: *Sci. Am.* 2016:314 (3), 22.
- 9) Li Q *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016:CN 106191113 A 20161207.
- 10) Li Q *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016:CN 106191064 A 20161207.
- 11) Bi Y *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016:CN 106086031 A 20161109.
- 12) Li K *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016:CN 105950625 A 20160921.
- 13) Tanihara F *et al.*: *Sci. Adv.* 2016: 2 (9) :e1600803.
- 14) Bevacqua RJ *et al.*: *Theriogenology* 2016:86 (8), 1886-1896.e1.
- 15) Pinzon CA *et al.*: *Reprod. Fertil. Dev.* 2016:29 (1), 212.
- 16) Oishi I *et al.*: *Sci. Rep.* 2016: 6, 23980.
- 17) Bai Y *et al.*: *G 3 (Bethesda, Md.)* 2016: 6 (4), 917-923.
- 18) Zhu H *et al.*: *PLoS One* 2016: 11 (6), e0156636/1-e0156636/14.
- 19) Cheng Y *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105734032 A 20160706.
- 20) Ge H *et al.*: *Transgenic Res.* 2016: 25 (5), 721-729.
- 21) Yu B *et al.*: *BMC Dev. Biol.* 2016: 16 (1), 26.
- 22) Song S *et al.*: *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* 2016: 32 (3), 329-338.
- 23) Guo R *et al.*: *Sci. Rep.* 2016: 6:29855.
- 24) Zhang X *et al.*: *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016: 29 (10), 1500-1507.
- 25) Zhao X *et al.*: *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016: 29 (3), 413-418.
- 26) Li H *et al.*: *Sci. Rep.* 2016: 6, 33675.
- 27) Zhao J *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105950656 A 20160921.
- 28) Li B *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105821116 A 20160803.
- 29) Chandrasekaran J *et al.*: *Mol. Plant Pathol.* 2016: 17 (7), 1140-1153.
- 30) Sun Y *et al.*: *Mol. Plant* 2016: 9 (4), 628-631.
- 31) Sauer NJ *et al.*: *Plant Physiol.* 2016: 1917-1928.
- 32) Lei W *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105367628 A 20160302.
- 33) Benjamin CM *et al.*: *Plant Biotechnol. J.* 2016: 14 (1), 169-176.
- 34) Hui Z *et al.*: *Plant Biotechnol. J.* 2016: 14 (1), 186-194.
- 35) Nishizawa-Yokoi A. *et al.*: *Plant Physiol.* 2016: 170 (2), 653-666.
- 36) Silva HA *et al.*: *U.S. Pat. Appl. Publ.* 2016: US 20160177327 A1 20160623.
- 37) Nongpiur RC *et al.*: *Curr. Genomics* 2016: 17 (4), 343-357.
- 38) Alexander V *et al.*: *PCT Int. Appl.* 2016: WO 2016084084 A1 20160602.
- 39) Wang J *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105543228 A 20160504.
- 40) Ju C *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105505979 A 20160420.
- 41) Sun Y *et al.*: *Mol. Plant* 2016: 9 (4), 628-631.
- 42) Li M *et al.*: *Front. Plant Sci.* 2016: 7, 377.
- 43) Hiloti Z *et al.*: *Plant Cell Rep.* 2016: 35 (11), 2241-2255.
- 44) Zhou H *et al.*: *Sci. Rep.* 2016: 6, 37395.
- 45) Ju C *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 106119275 A 20161116.
- 46) Liu J *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105950633 A 20160921.
- 47) Tang L *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105936907 A 20160914.
- 48) Ren C *et al.*: *Sci. Rep.* 2016: 6, 32289.
- 49) Bourgaud F. *et al.*: *U.S. Pat. Appl. Publ.* 2016: US 20160244771 A1 20160825.
- 50) Thomazella DPT *et al.*: *bioRxiv* 2016: 64824/1-64824/23.
- 51) Zhang D *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 105671075 A 20160615.
- 52) Malony M: *Front. Plant Sci.* 2016: 7, 1904.
- 53) Sheng X *et al.*: *Faming Zhuanli Shenqing* 2016: CN 106191107 A 20161207.
- 54) Wang F *et al.*: *PLoS One* 2016: 11 (4), e0154027/1-e0154027/18.
- 55) Li T *et al.*: *J. Genet. Genomics.* 2016: 43 (5), 297-305.

- 56) Butler NM *et al.*: *Front. Plant. Sci.* 2016: 7, 1045.
- 57) Demorest ZL *et al.*: *BMC Plant Biol.* 2016: 16 (1), 225.
- 58) Shen L *et al.*: *J. Integr. Plant Biol.* 2016: doi: 10.1111/jipb.12501.
- 59) Jun L *et al.*: *Nat. Plants* 2016: 2: 16139. doi: 10.1038/nplants.2016.139.
- 60) Waltz E: *Nature* 2016: 532 (7599) 293
- 61) Jia H *et al.*: *Plant Biotechnol. J.* 2016: 14, 1291-1301.
- 62) 近藤一成, 中島治, 野口秋雄, 坂田こずえ, 福田のぞみ: 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 平成24-26年度
- 63) 近藤一成, 中島治: 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保とリスクコミュニケーションのための研究」 分担研究報告書 新育種法を用いた作物の検出のための未知領域解析手法の検討と情報収集 平成27-29年度
- 64) 吉松嘉代, 河野徳昭: 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」 分担研究報告書 統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた作物と非食用組換え作物の検知技術の開発 平成24-26年度