

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に係る実験計画報告書

2021年 06月 29日

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課
生命倫理・安全対策室安全対策官 殿

氏名 国立大学法人東京大学 総長 藤井 輝夫

提出者

住所 東京都文京区本郷 7-3-1

ゲノム編集技術により得られた生物の使用等を行いたいので、次のとおり報告します。

ゲノム編集技術により 得られた生物の名称	フロリゲン遺伝子をゲノム編集したイネ変異体群 (系統名 : <i>Hd3a_2-7-10-2</i> (二重変異体及びその分離後代も含む。), <i>RFT1_3-7-2-2-2</i> , <i>RFT1_21-4-7-5-3</i> , <i>Pro_3-5-1-6</i> , <i>Pro_6-15-6</i>)
使用等の内容	イネ品種日本晴の <i>Hd3a</i> (<i>Heading date 3a</i>)と <i>RFT1</i> (<i>RICE FLOWERING LOCUS T1</i>) の二つのフロリゲン遺伝子に機能欠損変異を導入した系統 (<i>Hd3a_2-7-10-2</i> , <i>RFT1_3-7-2-2-2</i> , <i>RFT1_21-4-7-5-3</i>) と、イネ品種コシヒカリのそれら遺伝子のプロモーター領域に変異を導入した系統 (<i>Pro_3-5-1-6</i> , <i>Pro_6-15-6</i>) を野外で栽培し、導入した突然変異による出穂期や収量性などの農業形質や関連遺伝子への影響を比較精査する。
使用等を 名称	東京大学 弥生キャンパス 実験圃場 実験温室

<p>する場所</p>		<p>詳細は別紙1 参照（使用等をする場所）</p>
	<p>所在地</p>	<p>東京都 文京区 弥生 1-1-1</p>
<p>宿主の名称</p>	<p>イネ rice <i>Oryza sativa</i> L. (品種 日本晴 & コシヒカリ)</p>	
<p>宿主の自然環境における 生理・生態学的特性</p>	<p>1) 関東では、通常品種は5~6月に移植、9~10月に収穫。</p> <p>2) 遺伝的に固定した品種・系統は約1週間以内の開花期間。</p> <p>3) 開花期は、品種ごとに遺伝的に決定。</p> <p>4) 葯開裂後の花粉の寿命は数分間。</p> <p>5) 開花日が重ならなると品種・系統間で自然交雑はしない。</p> <p>6) 栽培品種と交雑可能な野生イネは日本に自生しない。</p> <p>7) ほとんどの野生イネの系統は晩秋に開花し低温のため結実しない。</p> <p>8) 品種は自殖性が強い。通常栽培で隣の個体との交雑率が1%程度。</p> <p>9) 20m離れた個体との交雑率が、0.01%以下。</p> <p>10)多くの日本品種（日本晴&コシヒカリも）は脱粒性がなく、種子の自然拡散がない。</p> <p>11)水稲品種は、水田栽培に適応。畑作での結実が可能だが、自然環境では雑草との競合に負け、自生できない。</p> <p>12)冬期の気温によるが、ほぼ越冬しない。</p> <p>詳細は別紙2を参照（突然変異を導入した宿主種に関する情報）。</p>	
<p>使用したゲノム編集技術 の種類・導入方法</p>	<p>技術の種類：a. CRISPR/Cas9</p> <p>導入方法：c. 人工ヌクレアーゼ遺伝子を宿主のゲノムに挿入。</p>	

<p>細胞外で加工した核酸の 移入・残存の有無</p>	<ul style="list-style-type: none">・挿入した核酸の構成（別紙 3 参照）。・移入方法及び除去した方法：イネ種子由来のカルスにアグロバクテリウムを感染させ、T-DNA 領域をゲノムに導入する。T-DNA 導入細胞からなるカルスを抗生物質ハイグロマイシンで選抜、その後、植物体を再分化。この間、Cas9 酵素によりターゲット遺伝子中のガイド RNA 相同配列の PAM 配列近傍で二重鎖切断が起こり、その後の修復過程で、突然変異が導入される。この変異が生殖細胞系列に起こった場合、後代に変異が遺伝する。そこで、この CRISPR/Cas9 を含む T-DNA 領域が自殖後代世代で遺伝的に分離した T-DNA 非導入個体で、かつ、ターゲット遺伝子に変異をもつ個体を選抜し、自殖種子を得る。・残存の有無を確認した方法：解析対象の個体から調整したゲノム DNA を用い、約 11.2kb 長の T-DNA 断片を対象に、増幅断片がオーバーラップするように設計した、約 1kbp 長の PCR 断片(21 個)について、PCR による増幅を試みることで、残存の有無を確認した（別紙 3, PCR 法の確認）。加えて、サザン解析を行い、T-DNA 領域の非存在を確認した（別紙 3, サザン解析による確認）。さらに、NGS 解析を行い、k-mer 法により、導入断片の残存の有無を確認した（別紙 3, k-mer 法による NGS データを利用した確認）。その結果、いずれの手法においても導入した核酸の残存は認められなかった。詳細は別
---------------------------------	--

		紙 3 を参照 (外来核酸の移入・残存の有無の評価実験の報告)。
改変した 遺伝子等	名称	イネのフロリゲン遺伝子である <i>Hd3a</i> 遺伝子と <i>RFT1</i> 遺伝子のコード領域及びそれらのプロモーター領域
	機能	花芽形成ホルモン (フロリゲン) をコードし、栽培環境に応じた発現により、花芽形成のスイッチとして働き、開花期や穂サイズを調整する。
	予想される 機能の変化	フロリゲンの機能・発現パターン・タイミングが変化することで、出穂期 (開花期) の変化、結果として収穫期の変化、および、穂数・穂サイズの変化が期待される。
改変生物 の形質の 変化	当該改変によ り生じた変化	<i>Hd3a</i> 遺伝子と <i>RFT1</i> 遺伝子のコード領域の機能欠損変異。それぞれ、45bp と 6 bp の欠失変異 (<i>Hd3a</i> 遺伝子) と 18bp と 8bp と 17bp の欠失変異 (<i>RFT1</i> 遺伝子)。それらの遺伝子のプロモーター領域に、1bp の挿入変異(Pro_3-5-1-6)と 2bp の欠失変異(Pro_6-15-6)。変異が起きた遺伝子やプロモーターにより、出穂期に様々な変化が認められた。 詳細は別紙 3 を参照 (核酸の移入・有無の評価実験についての報告)。
	上記以外に生 じた変化	出穂期以外の可視的な形質等の変化なし (別紙 4 参照)。 ガイド RNA のイネの高精度全リファレンスゲノム配列(IRGSP1.0)に対する CRISPR-Pv2.0 による Off-target 予測を行った結果、完全一致の Off-target 配列は存在しなかった。また、ミスマッチ 2~4 塩基の

		<p>Off-target 候補のゲノム領域を調べたが、生物多様性に影響を与えることが予想される遺伝子は存在しなかった。よって、Off-target 候補領域において生じる変異がゲノム編集技術により得られた系統に想定外の変化を生じさせる可能性はほとんどないことが推察される（別紙 4 参照）。</p>
<p>生物多様性影響が生ずる可能性についての考察</p>		<p>競合における優位性：フロリゲンの変異による開花時期の変化によって、イネの競合性が高まることは考えにくいことから、生物多様性影響が生じる可能性はないものと考えられる。</p> <p>有害物質の産生性：栽培イネでアレロパシーをもつ系統が報告されているが、日本晴やコシヒカリといった日本品種のアレロパシー活性は低い。また、フロリゲンは茎頂で花芽を形成する転写制御複合体のメンバーであり、フロリゲンの変異で代謝経路が変わり、アレロパシー活性が高まるなど有害物質の産生性が高くなることは考えにくい。</p> <p>また、アレルゲンデータベース (Allergen Online) を検索しても、変異タンパク質は相同性を示すものはなかった。</p> <p>交雑性：フロリゲンの変異によって、受粉・受精効率に変化が生じることは考えにくく、また、日本に野生イネは自生しておらず、交雑可能な野生植物は存在しないことから生物多様性影響が生じる可能性は</p>

		<p>ないと言える。</p> <p>総合的評価：競合における優位性、有害物質の産生性、交雑性を総合的に考察して、本基礎研究段階の圃場栽培が生物多様性に影響を与える可能性は非常に低いと考えられる。</p>
緊急連絡先	所属機関の名称及び職名	東京大学 大学院 農学生命科学研究科
	氏名	
	住所	郵便番号 (113-8567) 東京都 文京区 弥生 1-1-1
緊急時の対応	<p>生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された事態が起きた場合は、刈り取りによる植物体の除去を行い、種子が拡散しないように緊急措置を行う。</p> <p>その後、すみやかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告するとともに、東京大学遺伝子組換え生物等専門委員会並びに東京大学大学院農学生命科学研究科ライフサイエンス室に報告する。</p>	
その他	東京大学 遺伝子組換え生物等専門委員会	

委員長

開催日 令和元年10月3日、令和2年12月22日

外来遺伝子の有無の確認等、組換え体を含みうる解析過程における廃棄物は、すべて、オートクレーブによる処理後、廃棄済み。

緊急時に当該生物の不活化処理が必要になった際に、刈り取った植物体等はすべてオートクレーブによる処理後、廃棄予定。

この計画書の実験においては、組換えにあたらなことがわかった植物体からの廃棄物も、念のため、オートクレーブによる処理後、廃棄予定。ゲノム編集した植物からの種子等の収穫物は、人がいないときは施錠される研究室内の種子庫で保管管理する。

1) 使用等をする場所



使用予定の場所を東大キャンスマップに赤枠で示した。また、写真を以下に示す。



2) 施設概要

東京大学 弥生キャンパスに設置された実験圃場。温室が主で、水田は、我々が管理しているコンクリート枠人工水田(約 1m x 約 5m x 8 基)と、道を挟んだ場所に、別の研究室のコンクリート枠水田がある。部外者の立入りを制限するための標識等を設置している。

3) 実験圃場の周辺の状況

道をはさんで、約 5~10 m の距離で、隣の研究室が管理する水田がある。その水田の管理者(藤原徹教授)には、今回の栽培に関する情報を提供し、了解を得ている。また、使用等を予定する実験圃場から、600m 以内に一般の水田は存在しない。実験ほ場からの距離 半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域(国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域)はない。また、当該実験ほ場は、文京区が作製した「洪水ハザードマップ」「土砂災害ハザードマップ」

(<https://www.city.bunkyo.lg.jp/bosai/bosai/bousai/Panfu.html>) において、浸水

想定区域に指定されていない。詳細は別紙 1 最後の添付図参照

4) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

実験ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、鳥類による被害は報告されていない

(防鳥網の設置等によってこれらの侵入を防ぐことができる)。

5) 実験ほ場周辺の生物相

(1) イネを実験ほ場で栽培することによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

(2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称交雑可能な近縁野生種はない。

突然変異を導入した宿主種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

イネ、rice、*Oryza sativa* L.

② 国内及び国外の自然環境における自生地域

日本国内において、イネという栽培種 *Oryza sativa* は基本的に自生しない。

約1万年前に始まったと推定される栽培化後、長きにわたり、人の手で管理された生育、いわゆる、栽培が続き、自然環境においては、雑草と競合できなくなっていると推察される。

また、日本国内においては、栽培イネの近縁野生種 (*O. nivara*、*O. rufipogon* 等) も自生しないし、過去にも自生したことがないと考えられている。この近縁野生種は世界中の熱帯・亜熱帯に分布し、様々な環境、特に生育地の多様な水条件に適応分化している。多くの系統は強い光周性を持ち、日本国内で実験的に栽培すると、11月以降の短日条件でのみ開花し、野外ではまず結実しない。遺伝的多様性の中核地域は、インド東部のアッサム地方、ラオス、中国雲南省南端のシーサンパンナ・タイ族自治州、ミャンマーと北

部タイの範囲であると考えられている。これらの地域はいずれも山岳地帯、丘陵地帯であり複雑な地形を有する地域である。

なお、水田圃場及び畦畔には栽培に伴って雑草イネが発生する場合があるが、その生育域は我が国においては主に農耕地及びその近傍に限られている。栽培種イネどうしの交雑でも雑草イネが生じることが示されていること、我が国には野生種イネが自生していないことなどから、我が国における雑草イネは栽培種イネに由来するものであり、栽培種イネ間の交雑により雑草性の形質が出てきたものと考えられる。この場合、古い品種の易脱粒性品種との交配が雑草化の大きな原因とされている。雑草イネが発生した場合、一年間、対象圃場を休耕することで雑草イネの更なる拡散は防ぐことができる。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における栽培の歴史

栽培イネ (*O. sativa*) は紀元前 1 万 5 千年から 1 万年の間に栽培化されたと考えられている。日本へは縄文時代晩期に中国から直接、ないしは、朝鮮半島を経由して伝来したと推定されている。イネは我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在も最も重要な作物として広く栽培されている。人工交配技術を使った育種は百数十年前から行われており、日本各地で、育種選抜が繰り返し行われ、品種として優れたものを選抜し、不適切な系統は排除し続けてきた歴史がある。また、約 50 年前から、ガンマー線等による突然変異育種も盛んにおこなわれており、交配育種と同様、これまで問題なく、想定外の有害変異を持

つ系統を野外の育種選抜で排除しながら、育種が進められてきた。培養変異を利用した育種（プロトプラスト育種等）で野外での育種選抜も行われたことがある。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

栽培イネは非常に広範な地域で栽培されており、北はロシアと中国国境のアムール川の河畔（北緯 53 度）から南はアルゼンチン中央部（南緯 40 度）にわたる種々の気候条件下で栽培されている。栽培面積は約 1 億 500 万 ha、玄米の総生産量は 5 億トンを越える。生産量はアジア(90 %以上)、中南米、アフリカ、北米、旧ソ連、ヨーロッパの順となっている。我が国でも栽培地は北緯 44 度にまで及び、また世界で最も生産力が高い生産地域になっている。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。この期間内で、田植え可能となる最低気温が 13 ℃、登熟が停止する最低気温は 15 ℃と見なされている。栽培方法によってイネは陸稲と水稲に分けられる。陸稲は畑に直接播種し、畑状態で栽培する。水稲は水田へ直接播種する直播栽培もあるが、苗を移植する栽培法が一般的である。コメは、主食用として、約 730 万トンが国内で生産されていて、ほとんどが国内消費向けに流通している。また、加工用、種子用、飼料用にコメの生産も行われている。

(3) ゲノム多様性

① レトロトランスポソンの解析から、栽培種のジャポニカ亜種とインディカ亜種の進化距離は、栽培化が開始されたと考えられる約一万年よりも、大きく離れていて、約 40 万年前と推定されている。そのため、イネ栽培種は、自然交配と人為選抜の繰り返しによる複雑な栽培化の過程で生まれたと想定されている。

② 次世代ゲノムシーケンサー解析により、他の作物と比べて、イネのゲノム多様性に関しては、多くが明らかとなっている。Depth（カバー率）の低い解析ではあるが、イネ栽培種（*Oryza sativa*）1083 系統、近縁野生種（*Oryza rufipogon*）446 系統の全ゲノム解析により、栽培イネは、ジャポニカ型、アウス型、インディカ型の亜種に大別でき、また、近縁野生イネの中で、OrIIIa タイプのゲノムとジャポニカのゲノムが似通っていること、インディカ・アウス型のゲノムと OrI タイプの野生イネ系統はゲノム配列では区別できないことが明らかとなっている。

③ また、3023 系統のイネ栽培種の平均 Depth が 20 を超える解析により、栽培種内の SNP(一塩基多型) の総数が 2900 万座位に確認されている。全ゲノム配列長が、リファレンス系統の日本晴で、約 3 億 8000 万座位（染色体 12 本分）であるので、栽培イネの種内多様性は大きいことが明らかになっている。また、日本のイネ品種間の比較も進んでおり、リファレンスゲノムである品種「日本晴」と、主要品種である「コシヒカリ」との間で、約 10 万弱の座位に違いがあることがわかってい

る。百年以上前から盛んにおこなわれているイネの人工交配育種では、この程度の DNA 配列の違いを持つ系統同士を交配し、後代で、多様な違いを持つゲノムが分離する集団から、野外による通常栽培条件での育種選抜を行ってきた。

④ EMS やガンマー線等による突然変異処理によるゲノムに対する変異も解析されており、変異導入条件の差が原因か、報告内容にかなりの振れがあるが、おおむね、個体あたり、数百から数千の新奇な SNP が導入される。こういった処理による育種選抜も 50 年以上の歴史があり、野外での通常栽培による育種選抜が行われている。

(4) 生理学的及び生態学的特性

① 基本特性

本来は、熱帯原産であり、生物学的には多年性であるが、日本国内の栽培上は、低温により越冬ができないことから、一年生作物として扱われる。自殖性の強い風媒花であり、通常環境では開花と同時に高率で自家受粉が行われる。イネは茎、葉、根、穂の各器官で構成されている。根は種子根と冠根に区別される。冠根は地上部の節部から発生する。茎は地上部の骨格をなすもので、ところどころ節で区切られ、伸長した節間は中空である。葉は葉身と葉鞘からなる。穂は茎の最上節につく。穂は総状花序型の分枝を呈す。

② 生息又は生息可能な環境の条件

イネの生育時期別の限界温度、最適温度を表 1 に示す。

イネの生育最低温度は 10～12 ℃、通常の栽培可能温度は 20 ℃以上で、

開花結実には 22 ℃を必要とする。逆に 34 ℃以上では高温障害が発生する。水稲は湛水条件(水田)で栽培する。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな植物であり、灌水がなく土壌水分が表層土で 10 %以下、下層土で 12 %以下で干ばつ害が発生する。

表 1 イネの生育時期別の限界温度、最適温度 (単位: ℃)

生育時期	限界温度			生育時期	限界温度		
	低	高	最適		低	高	最適
発芽	10	45	20～35	幼穂分化	15	—	—
出芽・苗立ち	12～13	35	25～30	幼穂形成	15～20	38	—
活着	16	35	25～28	開花	22	35	30～33
葉の伸長	7～12	45	31	登熟	12～18	30	20～25
分けつ	9～16	33	25～31				

③ 捕食性又は寄生性

捕食性、並びに寄生性は認められていない。

④ 繁殖又は増殖の様式

(ア) 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

イネは種子繁殖であり、熱帯に分布するインド型イネは比較的脱粒しやすいが日本で栽培される日本型イネでは、一般に脱粒性は低い。

イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネ品種では秋に収穫して室温に保管した場合、翌春には休眠は失われる。種子の寿命に関しては、低温・低湿条件下では長期間の保存が可能であり、室温下でも種子水分を 9.7 %以下にすることで 95 %以上の発芽率を 5 年間、維持することができる。一方、土壌中に種子が埋蔵された場合、赤米が 3 年以上の寿命があるのに対し、一般の白色米の種子では一部に翌年発芽するものもあるが、大部分の種子が発芽能を失う。

(イ) 栄養繁殖の様式（ひこばえ、塊茎、塊根、匍匐（ほふく）枝等）並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

イネは一年生の種子繁殖植物であるが、適切な水分や温度条件では種子収穫後も栄養体を維持できる。これは、“ひこばえ”と呼ばれる新しい分けつが節から発生し生長するものであるが、我が国の露地栽培においては温暖地域（沖縄等）以外、通常冬の低温のため枯死し、越冬することはない。

(ウ) 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる性質を有する場合にはその程度

イネは自殖性が非常に高い作物である。他殖性の程度を示す情報として、開花期間の重複する糯品種と粳品種とを用いた花粉飛散による交雑試験の結果、隔離距離が 4.5 m の場合は交雑率が 0.6 % 以下、10 m では 0.04 % 以下であることが報告されている。しかし、北海道立農業試験場のデータでは、種子親の低温による雄性不稔化処理、強風、大面積の花粉源等の条件が重なった特殊な状況では、600 m 程度の長距離交雑も起こりうるということが非常に低い頻度ではあるが報告されている。近縁野生種である *O. nivara*、*O. rufipogon* 等は、栽培イネと交雑可能であるが、交雑後代に雑種不稔・雑種弱勢が見られることが多い。日本国外では、それらが自生している地域もあるが、我が国に自生しているという報告はない。また、自家不和合性及びアポミクシスについての報告はない。

(エ) 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの穎花は、1 葯当たり 1000 個以上の花粉が詰まった 6 本の葯を持つ。花粉の稔性はほぼ 100 %、形状は球形で、葯内では粘質で花粉塊をなしているが、葯が開裂し始めると花粉表面が乾き、粘着性が失われ、飛散しやすくなる。基本的に自家受粉

作物で、受粉形式は風媒であり、葯は開花(穎)直前には開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる。すなわち、開花前に自花の葯から受粉してしまうため、他家(花)からの風媒による受粉は栽培品種においては極めて少数(1 %以下)である。花粉の飛散による交雑距離としては、多くの報告では 10 m 程度とされている。花粉の寿命は一般に 3~5 分、最大で 10 分程度とされる。

(オ) 病原性

病原性は認められていない。

(カ) 有害物質の産生性

レタスを用いたプラントボックス (PB) 法によってイネのアレロパシー (他感物質を産生することによる周囲の野生植物の生育抑制) 能について検討すると、水稻の中には、アレロパシーを示すものが存在し、この品種間差は大きい。品種、日本晴やコシヒカリは、低いことが知られている。また、他感物質の残存期間は長くて数ヶ月程度と考えられている。PB 法によりアレロパシー活性の強いことを見出した赤米 (阿波赤米、紅血糯等) は圃場でも雑草抑制作用を示した。イネはアレロパシー物質としてモミラクトン群を合成し、根から放出することで、周囲の植物との競争で優位となる

こと、また、ストレス条件下ではより強いアレロパシー活性を持つモミラクトンBの生合成を誘導し、根からの分泌量を増加させることなどが報告されている。

(キ) その他の情報

障害不稔が発生すると玄米の蛋白質含量が高くなる。

外来核酸の移入・残存の有無の評価実験の報告

【実験の目的】

開放系で栽培予定のイネが遺伝子組換え生物に該当しないことを確認する。

すなわち、ゲノム編集時に使用した外来遺伝子をゲノム内に持たないことを確認する。

【実験に使用するイネ系統の説明】

イネは自殖性の強い作物であり、今回実験に用いる系統も自殖（その個体の花粉がその個体の雌しべに受粉し、種子ができる）で維持する。

慣例で、カルスより再生させた形質転換個体当代を T0 世代と呼ぶ。自殖により得られた種子を発芽させて得られる個体を T1 世代と呼ぶ。T0 世代で導入された外来遺伝子や導入された突然変異はメンデルの法則により後代に遺伝するので、原則、T1 世代で、分離する。

以降、自殖を重ねるごとに Tn 世代（n は自殖の回数）と呼ぶ。一度、ホモに固定した外来遺伝子や突然変異は安定的に後代に伝わる一方、分離で、外来遺伝子を遺伝しなかった個体の自殖後代は、外来遺伝子が残存しない。図 1 参照。

今回の実験では、PCR による外来遺伝子の残存の確認（実験 1）、サザン解析による外来遺

伝子の残存の確認（実験2）、NGS（次世代ゲノムシーケンサー解析）データを k-mer 法を用いて外来遺伝子の残存の確認（実験3）を行い、全てを満たした個体（もしくは系統）からの自殖種子を野外での栽培に供試する。すべての結果の集計結果を表1にまとめている。

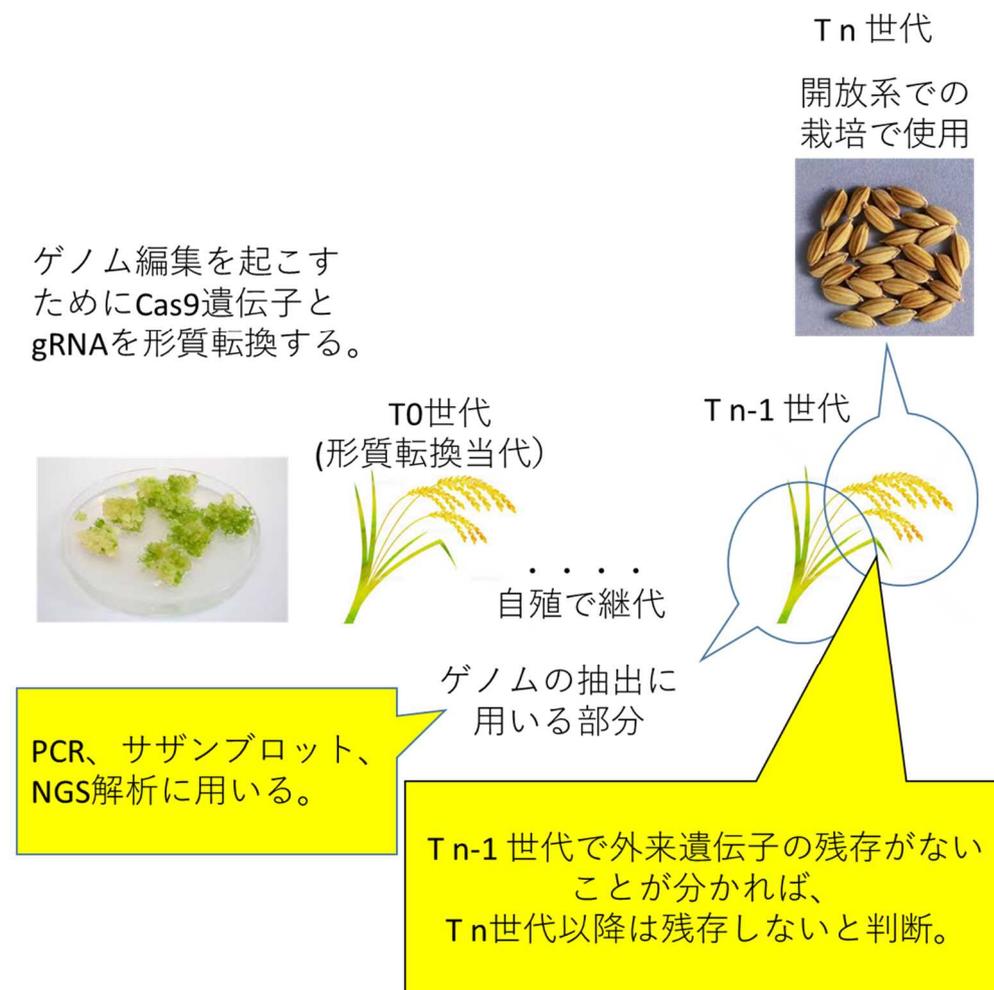


図1 ゲノム編集イネの開放系で栽培する株について

また、設計した gRNA 配列と遺伝子上の位置を図 3 に示す。

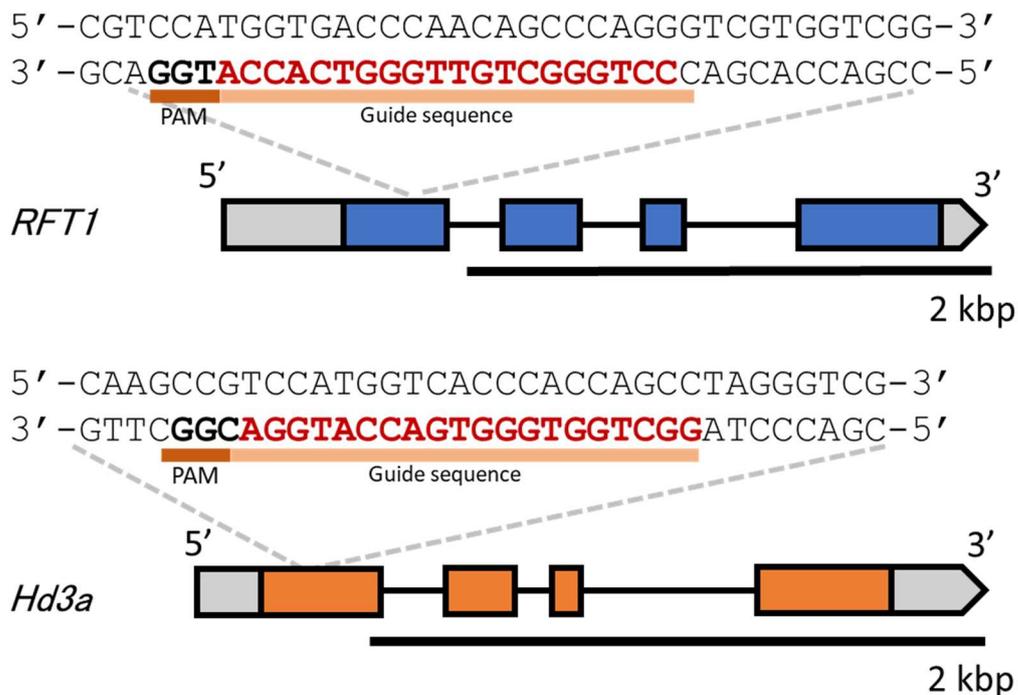


図 3 *Hd3a* と *RFT1* のガイド RNA 配列情報

サンプル番号 1~4 に対応。イネのフロリゲン遺伝子をターゲットにガイド RNA を、それぞれ、第一エクソンに変異を導入されるように設計した。

イ) 形質転換後、Cas9 や HPT の導入、および、対象配列への変異の導入を確認した系統の中で、今回供試する系統は 4 系統で、*Hd3a*_2-7-10-2, *Hd3a*_7-1-10-6, *RFT1*_3-7-2-2-2, *RFT1*_21-4-7-5-3 である。以下の実験では、サンプル番号の 1~4 に対応する。

系統 *Hd3a*_7-1-10-6 は、*Hd3a* 遺伝子に bi-allelic 変異、*RFT1* 遺伝子にヘテロ変異を持

ち、自殖後代のうち、二重変異体は実験室では開花せず、固定系統を得られなかった。そのため、*RFT1* 遺伝子の変異がヘテロな状態の植物体で自殖種子を得、系統維持している。これらの系統の該当ガイド RNA 領域に変異があることは後述する。また、次の確認実験の前に、これらの系統は、最初に、図 2 に示した抗生物質抵抗性遺伝子 HPT 遺伝子(ハイグロマイシンリン酸基転移酵素)と Cas9 遺伝子領域を増幅する PCR プライマーで、増幅が起こらないことを確認した。

2. プロモーター領域への変異の導入

イネ品種「コシヒカリ」を用い、2 個の CRISPR/Cas9 のコンストラクト(図 2 に示したものに特定のガイド RNA を 3 個ずつ導入したもの)、コンストラクト 3(Con 3)とコンストラクト 6(Con 6) (図 4 にガイド RNA の位置を示す) を形質転換し、それぞれにつき、T0 世代の再生個体を 10~20 個体、組み換え温室で栽培し、開花期を確認し、自殖種子を採種した。それらの種子を用い、T1 世代の分離集団を解析し、抗生物質抵抗性遺伝子 HPT 遺伝子と Cas9 遺伝子の有無を図 1 に示した PCR 断片で調べ、約 150 個体中、約 20 個体の T1 個体で HPT と Cas9 の両方の PCR 断片が増えないことを確認し、以下の実験に供試した。

ゲノム編集による変異の有無に関しては、後半の実験で確認をしたので、後述する。

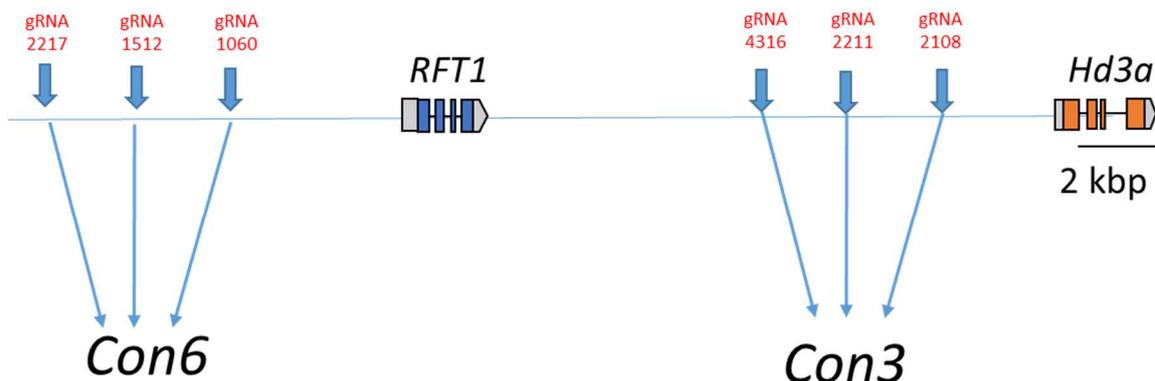


図 4 *Con6* と *Con3* の内のガイド RNA の位置情報

サンプル番号 5~32 に対応。コシヒカリの形質転換にも同じコンストラクトを使用した。この図にあるように、gRNA の発現ユニットは近接をする 3 か所をもつものを導入している。これは、プロモーター領域の欠失を期待してのことだが、今回、供試する系統の中には、大きな欠失系統は得られていない。

3. 確認実験に供試した系統

供試した系統は 後述の 表 1 にまとめてある。この中で、サンプル番号 5 とサンプル番号 32 の *Pro_3-3-1-4* 系統は、上記の PCR で、HPT 領域も Cas9 領域も増幅が確認される個体で、ポジティブコントロールとして実験に供試している。また、形質転換に使った親品種である日本晴とコシヒカリを比較対照としてサザン解析に供試している。

【外来遺伝子の残存の有無の確認】

上記の形質転換個体の自殖後代系統が、カルタヘナ法で規定する形質転換体かどうか、外来

遺伝子の残存を判定する実験は、以下のように行った。

1. PCR 法による確認

ア) アグロバクテリウムに導入したベクターの T-DNA 領域(6491bp-17743bp)を網羅的に増幅できるようにプライマーを設計し、サンプル番号 5 およびサンプル番号 32 の *Pro_3-3-1-4* 個体のポジティブコントロールの DNA をテンプレートに、増幅を確認した。LB(Left Border)の周辺は、増幅可能な PCR プライマーを設計できず、5 番の個体では少なくとも形質転換されていない領域と考えられたが、残りの領域は、図 5 に示すように、線でつないだ 21 の PCR 断片を設計でき、PCR で増幅を確認できた。断片としてのゲノム挿入の可能性を考慮し、各 PCR 断片は 1kbp のサイズを目安とした。

pZH_OsU6gRNA_MM Cas9 T-DNA

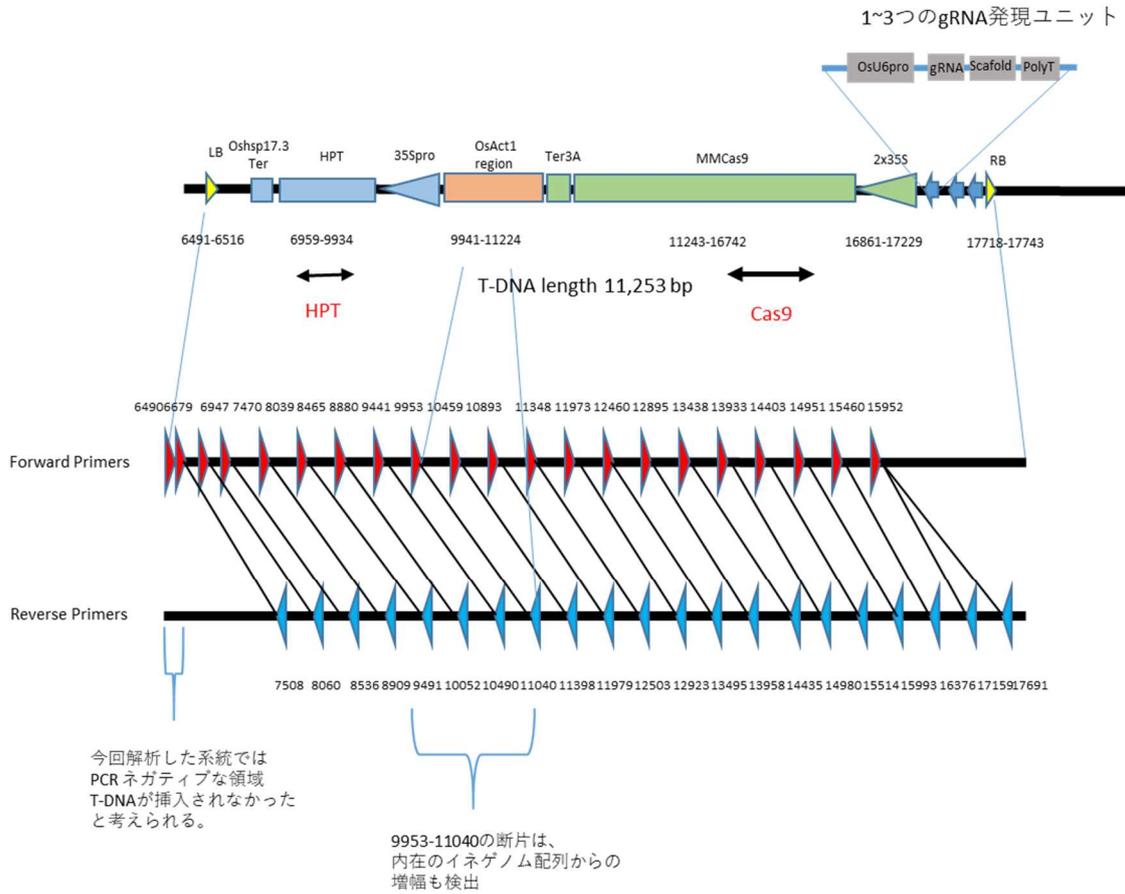


図5 導入 T-DNA の有無を確認するために設計した 21 の PCR 断片

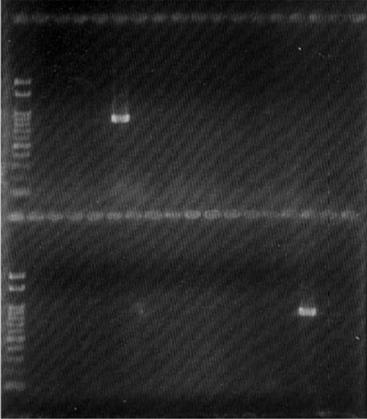
線で結んだ赤と青の三角形の間の領域を PCR 法で増幅を確認した。それぞれの PCR 産物は、オーバーラップするように設計し、形質転換された領域をもれなく確認できるように設計した。

イ) 上記の 21 組の PCR プライマーで網羅的にゲノム領域の特異的増幅が確認できたので、表 1 に記載した 31 サンプルのゲノム DNA を用いて、PCR をかけ、その PCR 産物を電気泳動にかけて、供試したゲノム DNA 中の形質転換した DNA 断片の有無を確認した。

図 6 参照。これらの結果のうち、9953-11040 の領域は、イネゲノムの *OsACT* 遺伝子と
相同で、イネゲノムの内在の断片を増幅してしまうので、外来遺伝子の有無の判断には使え
ない情報であった。

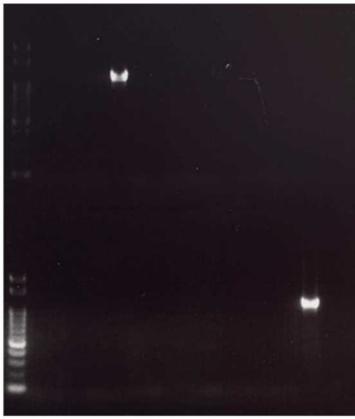
6679-7508

M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



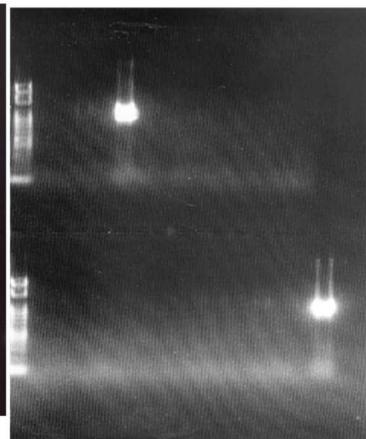
6947-8060

M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



7470-8536

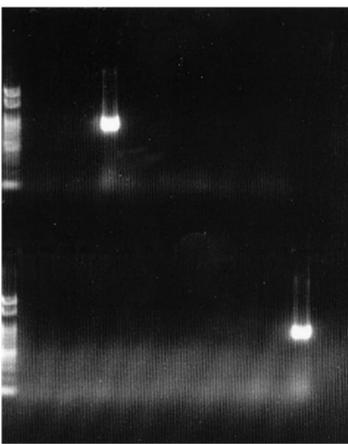
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

8039-8909

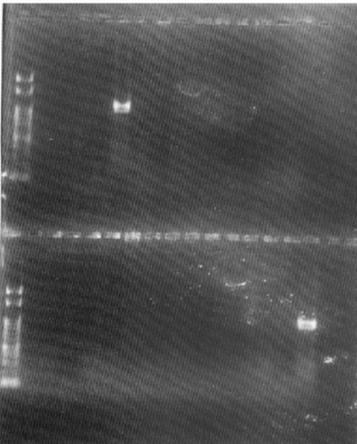
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

8465-9491

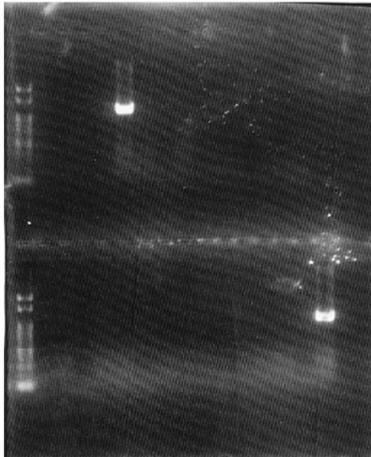
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

8880-10052

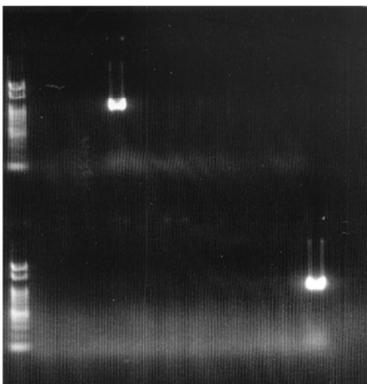
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

9441-10490

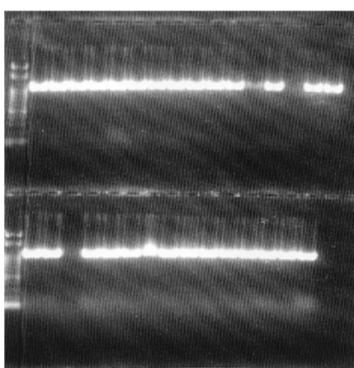
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

9953-11040

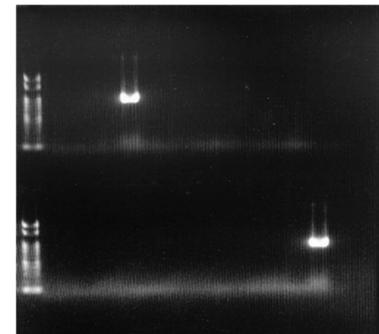
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

10459-11398

M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

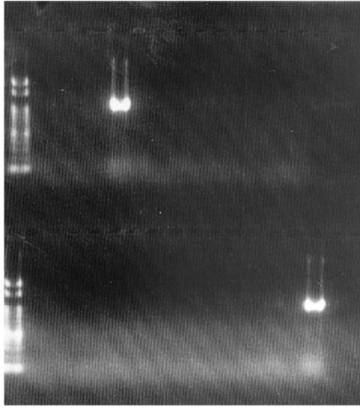
M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

図 6-1 PCR による T-DNA の有無の評価

- (ハイフン) でつないだ数字は増幅断片の位置を示す。M はサイズマーカーの DNA を電気泳動したレーン。レーンの番号はサンプル番号。表 1 と図 5 を参照。9953-11040 は、イネのゲノム配列と相同な配列が T-DNA 内に存在し、ほぼすべてのサンプルで増幅が確認できた。サンプル番号 5 と 32 はポジティブコントロール。09 個体は予備的に行ったサザン解析でも T-DNA 残存が確認できており、今回、PCR 解析に供試しなかった。

10893-11979

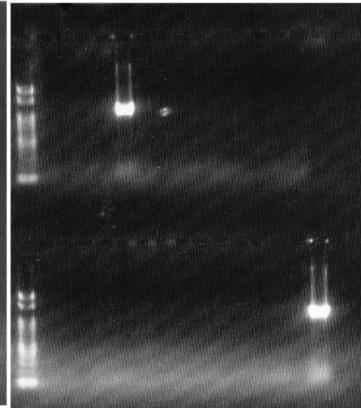
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

11348-12503

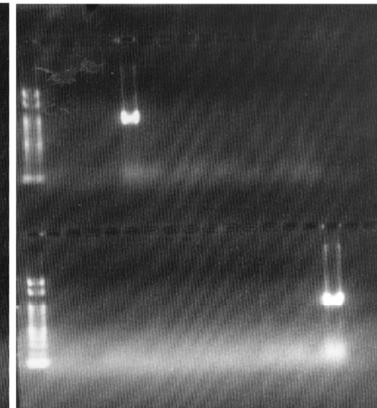
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

11973-12973

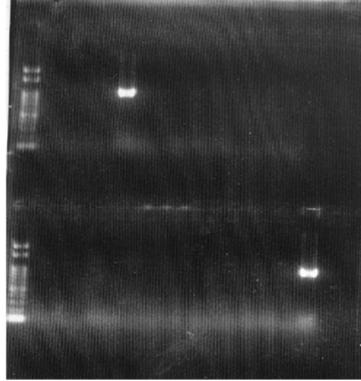
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

12460-13495

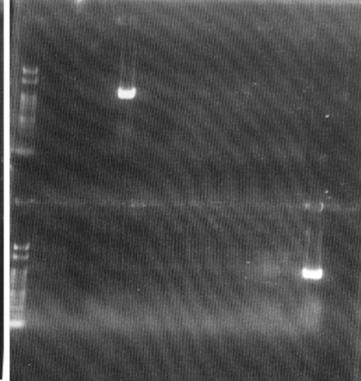
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

12895-13958

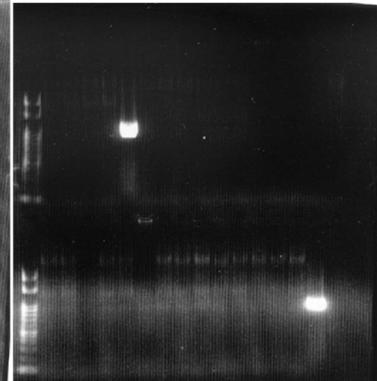
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

13438-14435

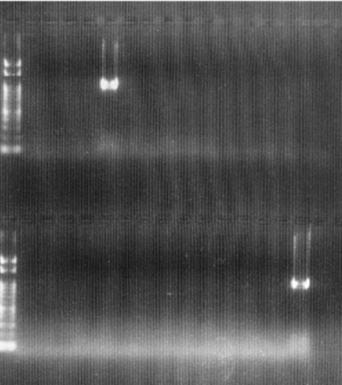
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

13933-14980

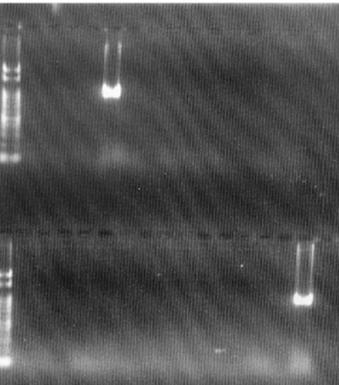
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

14403-15514

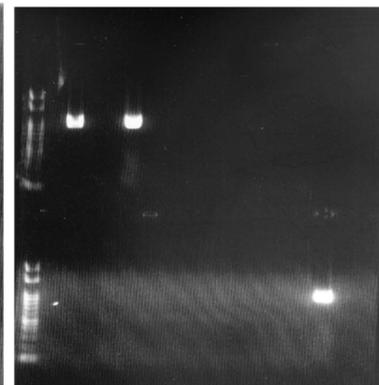
M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

14951-15993

M 01 02 03 04 05 06 07 08 10 11 12 13 14 15 16 17



M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

図 6-2 PCR による T-DNA の有無の評価

図 6-1 の注釈を参照。 14951-15993 の領域で、サンプル番号 2 で増幅が観察された。

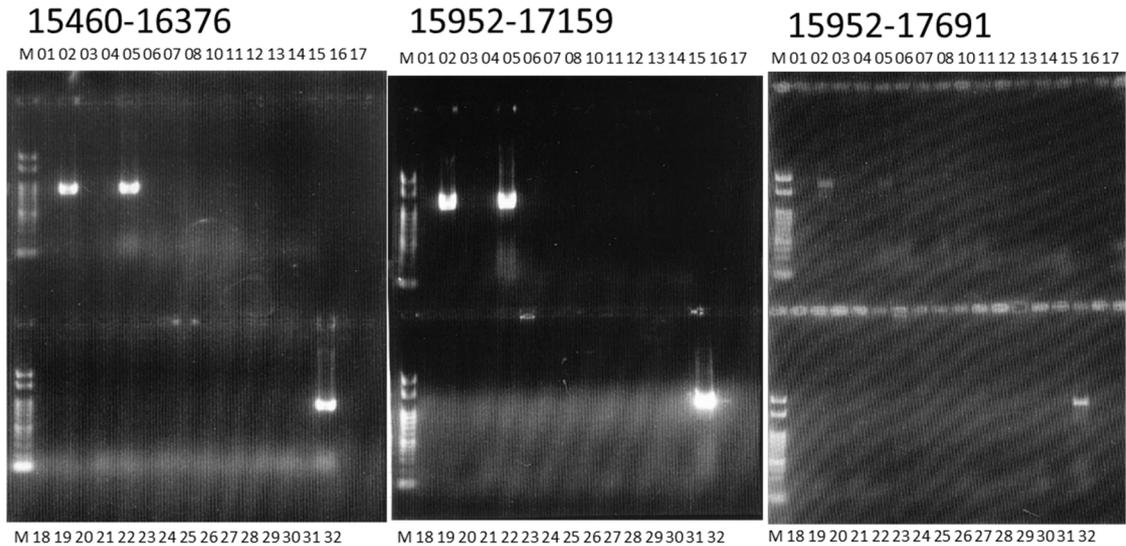


図 6-3 PCR による T-DNA の有無の評価

図 6-1 の脚注を参照。 15460-16376 と 15952-171159 の領域で、サンプル番号 2 で増幅が観察された。

ウ) この結果より、ポジティブコントロールとして使用したサンプル番号 5 と 32 に加え、サンプル番号 2 で、RB(Right Border)周辺の DNA 領域が増幅し、形質転換した T-DNA の一部が残っていることが明らかとなった。それ以外のサンプルでは、T-DNA の導入を確認できなかった。

続いて、調整したゲノム DNA の質の確認のために、内在性の遺伝子(染色体 6 番の Se5 遺伝子)のゲノム断片を増やし、調整した DNA の量と質を確認した。図 7 参照。その結果、サンプル番号 20 番の結果はゲノム調整に問題があり、評価できないことが判明し、今回の評価から除くこととした。

イネ内在性遺伝子 *Se5* 遺伝子 Chr06 23857468_23857810

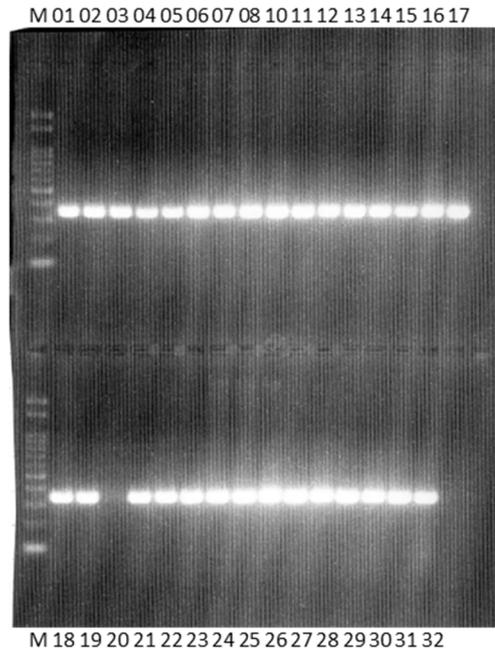


図 7 イネゲノムの内在性の断片の増幅確認

サンプル番号 20 は、ゲノム調整に問題があると考えられるので、この個体由来の後代は、今回の評価対象からはずす。

工) 9953-11040 の DNA 領域 (図 6-1) は、イネゲノムにも存在する DNA 配列であるが、
サンプル番号 13, 15, 20 のゲノム DNA は、この断片を PCR 増幅するのに不十分である
ことが分かった。また、イネ内在性遺伝子 *Se5* の PCR 増幅からは、サンプル番号 20 番の
ゲノム DNA に問題があることが分かった。そこで、今回の PCR 増幅による評価から、サ

ンプル番号 13,15,20 のサンプルの結果をすべて外すことにした。

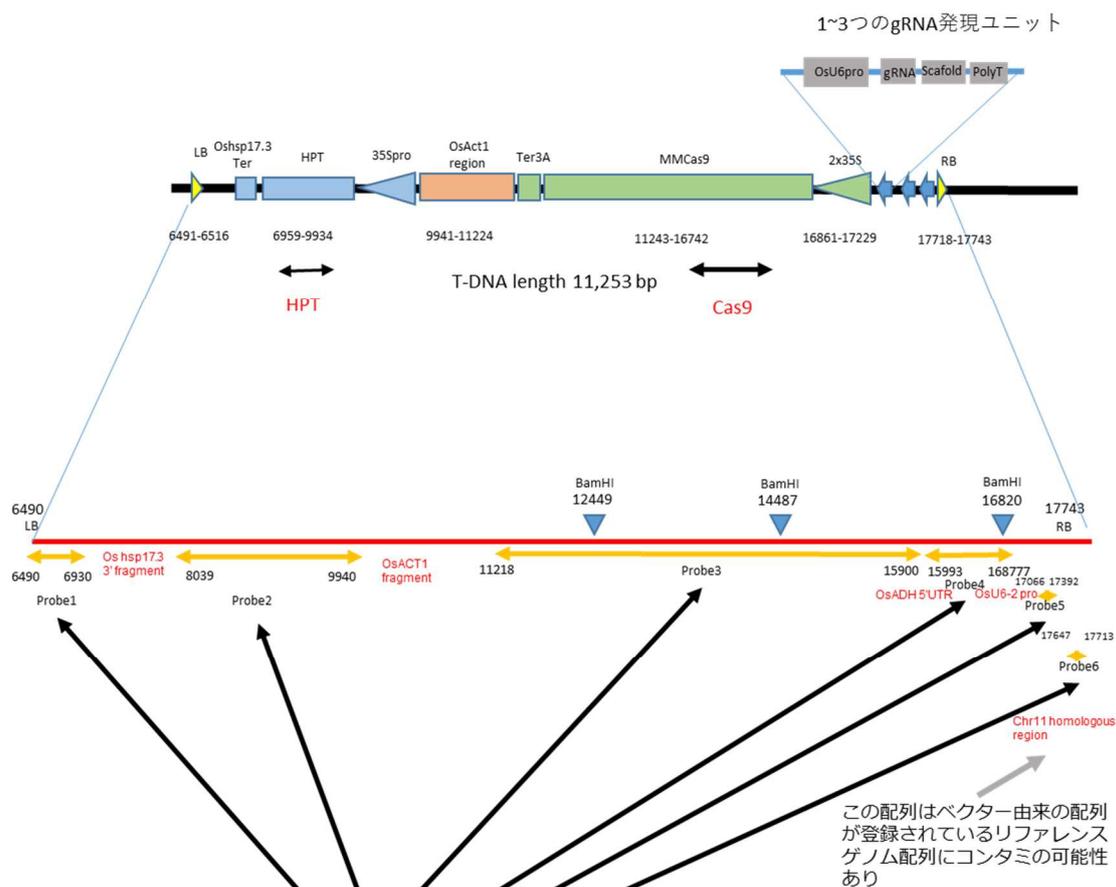
これらの PCR 解析の結果より、PCR 法による評価では、サンプル番号 1, 3, 4, 6~8, 10~12, 14, 16~19, 21~31 の個体（およびその自殖後代）は、形質転換した T-DNA が分離し、残存しないことが示唆された。

2. サザン解析による確認

ア) 続いて、イネのゲノム DNA を用いたサザン解析を行った。まず、Probe の調整を行った。図 8 に示すように、この T-DNA には、イネゲノムと相同な配列が数か所にわたり存在するので、その部分を除いた領域を、PCR 法でベクター DNA から増幅し、それらの PCR 断片を同じ分子数になるように混合して、サザン解析用の Probe として用いた。サザン解析法は、ECL-Direct キットを用いて行った。電気泳動時の DNA サイズマーカーは以下のものを使用した。ニッポンジーン製 Gene Ladder Wide 2 各バンドサイズは以下の pdf を参照。

(https://www.nippongene.com/siyaku/product/electrophoresis/tds/tds_gene-ladder-wide2.pdf)

pZH_OsU6gRNA_MMCas9 T-DNA



今回導入したT-DNAは、赤字で示した領域に、イネゲノムと相同な配列が存在するので、その領域を外したDNA断片をPCR法で増幅し、同じ分子数になるように混合して、Probeとしサザン解析を行った。

図8 サザン解析に用いた Probe

T-DNA の中で、赤字で示した領域はイネゲノム配列と 100%の相同性があるので、その領域を含む配列を Probe として使うとサザン解析での外来遺伝子の残存の評価ができない。そこで、プローブに使う領域をオレンジで示す複数箇所を PCR で増幅した DNA 断片を混合しプローブとしてサザン解析を行った。

イ) サザン解析におけるイネゲノム DNA は CTAB 法を用いて調整し、*Bam*HI 制限酵素を用いて切断し、NanoDrop を用いた定量で、4 μ g 相当のゲノム DNA を電気泳動してサザン解析を行った。図9には、電気泳動の結果と、サザン解析の結果を上下に示してある。この

結果から、ポジティブコントロールの5番のサンプルに加え、2番のサンプルは、ハイブリ
が確認され、形質転換体であることが明らかとなった。それ以外のサンプルは形質転換体で
はないと考えられたが、9番のサンプルは、目視では難しいレベルではあるが、弱いながら、
ハイブリのバンドが確認でき、サザン解析からは、DNA サンプルがキメラ的な状態であつ
たことを否定できなかったので、今回の実験結果として、この個体（およびその自殖後代）
は圃場栽培に回すべきではないとの評価をした。以上の解析の結果、サンプル番号1、3、
4、7、12、14、16～19、21～31 には、導入した T-DNA が残存していないことが示さ
れた。なお、サザン解析用に CTAB 法で再度ゲノム DNA の調整を行った際に、同じ個体、
もしくは、自殖後代個体の葉サンプルが入手しやすかったものを優先したため、サンプル番
号が飛んでいるものがある。

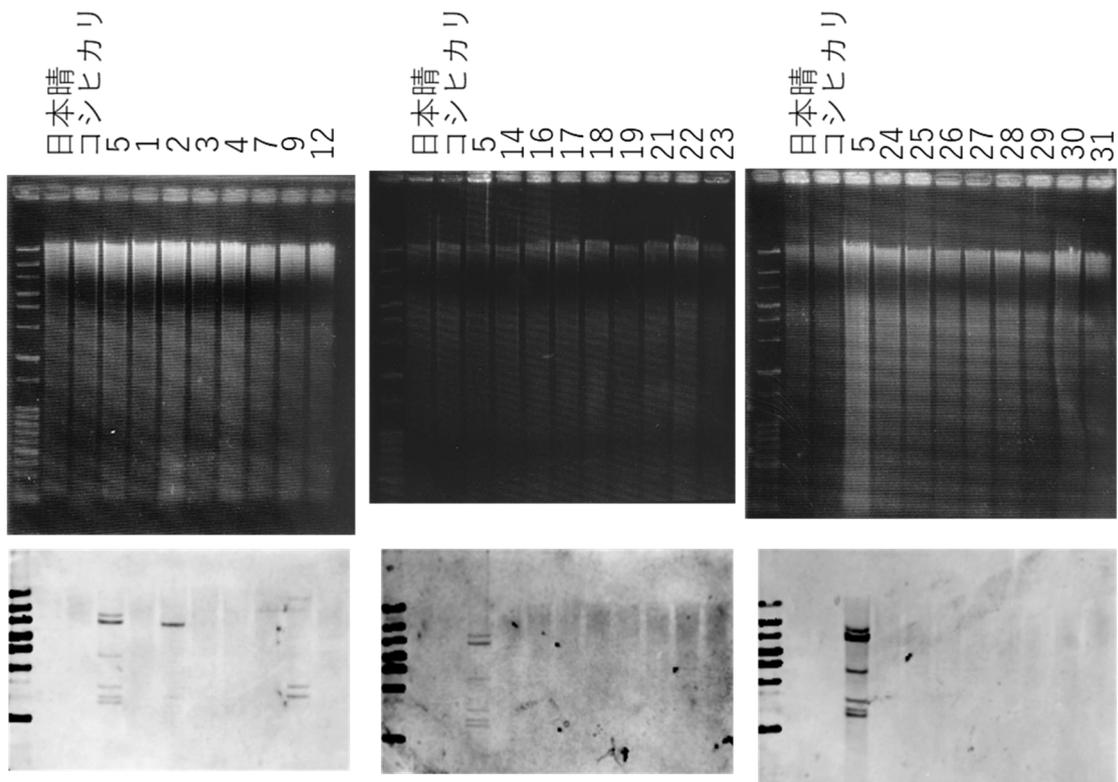


図 9 サザン解析の結果

上のゲルの写真は、サザン解析に使用した DNA の電気泳動写真。下の写真がサザン解析の結果。

3. k-mer 法による NGS データを利用した確認

ア) 各サンプルにつき、約 12Gbp の PE150(Pair End 150bp)の fastq データを用い、k-mer 法 (Itoh T et al. 2020 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61949-5>) による外来遺伝子の残存 DNA の有無の評価を行った。対象イネゲノムへの挿入の有無を確認する配列としては、T-DNA 全体の DNA 配列 (別紙 4 T-DNA 配列)を対象に解析を行った。20mer で解析した。

イ) 供試したゲノム DNA は、以下の 6 個体のゲノム DNA である。

- 1) No1(Hd3a_2-7-10-2) サザン解析を行った植物と同じ個体からの再抽出ゲノム DNA
- 2) No.3(RFT1_3-7-2-2-2)-1 サザン解析に使用した植物の自殖後代個体から抽出したゲノム DNA
- 3) No.4(RFT1_21-4-7-5-3)-1 サザン解析に使用した植物の自殖後代個体から抽出したゲノム DNA
- 4) No.12(Pro_3-5-1-6) サザン解析に使用した植物の自殖後代個体から抽出したゲノム DNA
- 5) No.16(Pro_3-16-2) サザン解析に使用した植物の自殖後代個体から抽出したゲノム DNA
- 6) No.31(Pro_6-15-6) サザン解析に使用した植物の自殖後代個体から抽出したゲノム DNA

ウ) 以下に、T-DNA 領域へのヒットの状況を示す。図 10-1&10-2 参照。

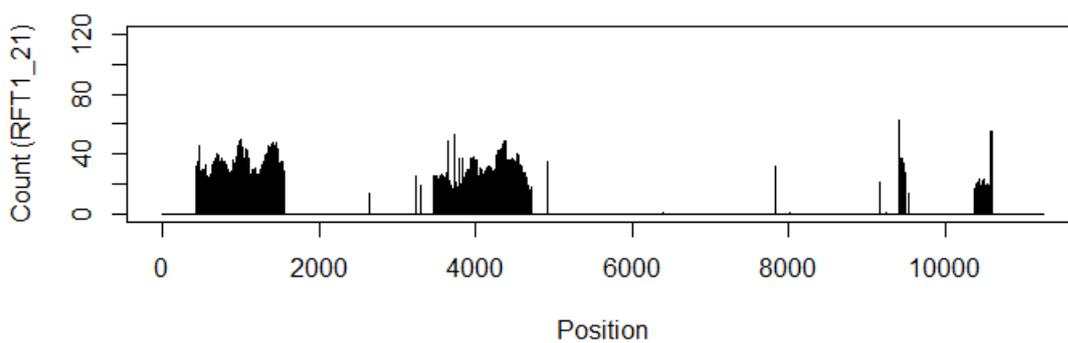
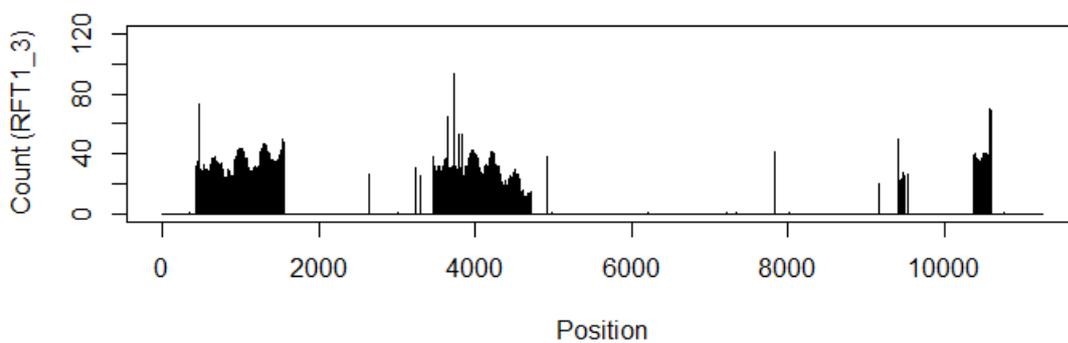
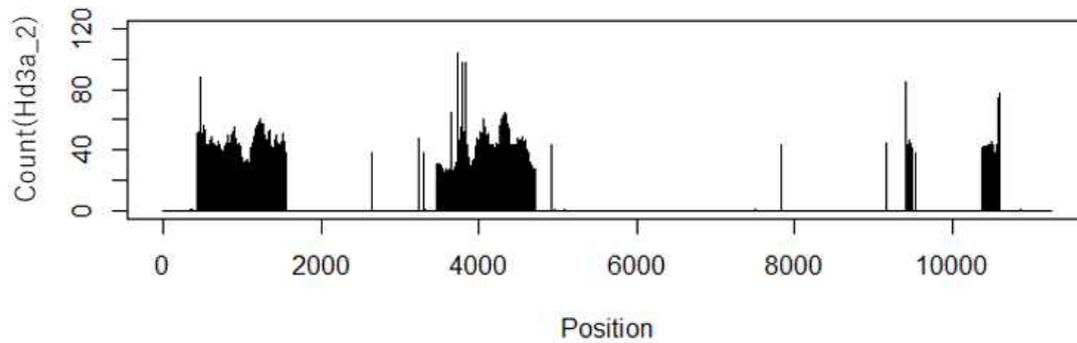


図 10-1 k-mer 法による解析結果 (1)

横軸は T-DNA 配列に相当。縦軸は、k-mer(今回は 20mer)のヒット数

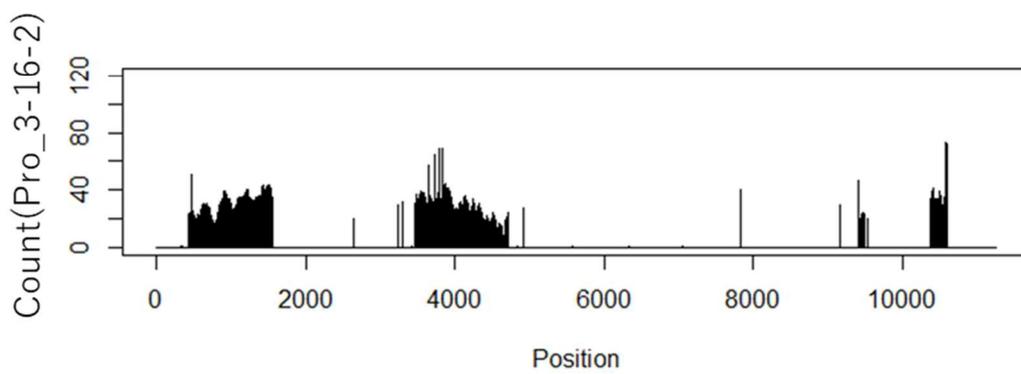
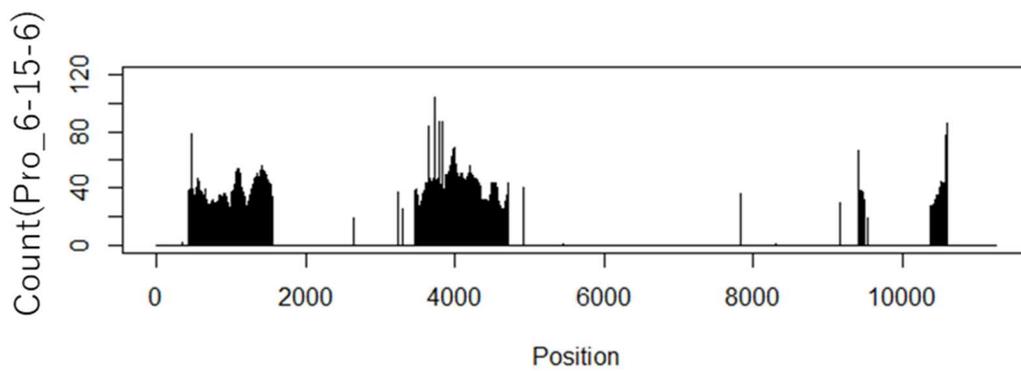
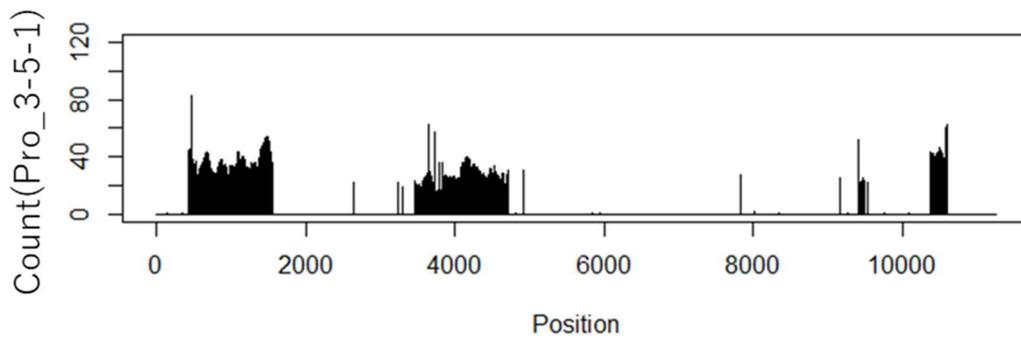


図 10-2 k-mer 法による解析結果 (2)

横軸は T-DNA 配列に相当。縦軸は、k-mer (今回は 20mer(bp))のヒット数

結果、T-DNA 領域の外來核酸由来の配列はヒットしなかった。一方で、カウントが1よりも大きな領域は、20bp ~1284bp の12か所であった。供試したすべてのDNAサンプルで同じ個所がヒットを示した。12か所のヒット配列領域を、以下に示す。図11参照。

1) T_DNA_in_pZH_OsU:433-1565 1133bp 長

gagtatatgcaaagtggcagagccaccgaaaagactgacgtctacagtttggagtttgctacttgaaatactaag
cgaaaaacgacctactgatgcatcatttattgaaaaggattgaacattggtgatgggatgtatgacctttatgtcc
ttcatttcatatccacagtttctgatatgaattacgtatgccttcaattgatttaattgtattcttgaaataatctacttgct
ctgtggcagttgaatttctggtcggtgagaatcgggagagggaaaattgtcgatccatattgtgagggagtgagat
tgagacctggatgctctactttctcttgctaaacaatgtgtaagttcttggcagaggagcggcctacaatgcacagg
gtggtacagatgttgagtcggatgtaattacccatgccccagtgatttctacgattcagaataggcttcgacttac
ggctgctctgaaaacgccacactgccgctggtttctgtggaggcacattccattattcttgcagattatgtaaatt
cattcctgcggtgttcggctccaatcggctagctcaatggggaggacatttttgtgtctatgtatctatgctacgtacaa
attattactactacatgtcaagtaataagaaacttaccaggagattactgtacttgattgaactgtcaatctcggaa
gaatggaaatggtagggattagggatgccaagtttctgaatctccatgagctgctgctagatatattaatatttg
agtataaccagctgaatttctcacgattgtgctctcgcgatcgagaaaatatgcacttgagggttcacatgtgct
aatttcttaagacataagaatataagattcatatttactaatcaaggatgaagaaaattgactaagtagagtagtag
tagaacataatatagttcactttcataatgagacaacaggttttaccgttttacatagcggagtagttcgagcggcaa

caacacacttgaaaggaaccagagcacaccaaaaacaccagtaattacacctcacataagtgatcgatacacttga
agccacagataaatcgtttagattagccca

2) T_DNA_in_pZH_OsU:2634-2653 _20bp 長

cttccttatatagaggaagg

3) T_DNA_in_pZH_OsU:3240-3259 _20bp 長

cttctgatcttgagaaatat

4) T_DNA_in_pZH_OsU:3303-3322 _20bp 長

actgcatcttaaccttctt

5) T_DNA_in_pZH_OsU:3451-4734 _1284bp 長

cctcatatctataccctttaccgctcaagtagcaagcaagatttccagataatatgaacagtttagtatagtataactcta
tatagcctggcttgataatatataaacagccagcctgggtgattgggtgaacaatttggatgacatctgcataacttga
aagatggaaatacataaagtaattttaaacaaggtcatgtacagattttaaactctgtcaagtcaaaacgtaca
gaaggcgaggaaaaagagtgatttactataagcatgatcatccttttttcttcatttctaacaaaattgaagtgct
gacacacaacgcgcacacaaacatagaaagcttgactcctcttccactgtgtgtgtacacaaacatagaaagc
ttacattcctcttccattgaaacttaaaaaattggcaggatcatgttcttaacagaatgccacatttaccttgagat
aaacagaattgtgctcttctacacgctaacatgttgaactgaaaacacttggttgaagacaggcagccaagccacg
aaccacgaacataggacccccactgtaccaaataattctgtgtaaagaaacaaaagcttctctgatccacatgggtc
cattcccctctcaattgtttaaggaaaagtgaaaagattatcacttctacaggggatgtctaagctgcgccgtacaa

ctttaagcggcaaagcgtgctcgtgtgctgctaaagcctgacgatgagaatatactgatgctgtgatgcatcttgc
atcatgctggcacaatagccaagaaagaaaagtatcagaagtgtgtgtgacatgtcattaaaatatcgaacagcaa
aggcaaagtggaagttacgtgatgtcgaacatcacaatacaaactcccatgcactagatcactgatgcacaagaca
gaagaaaagaacattcatgcgaaaatactgggatgataacttcgatgttattcattcatagaataatcgcaactcaa
aaacaaccagaacacgtatTTTTTctggtaccctcatcaggcatctgattaaattgaataaacgacatatgtgtcc
aaaatcacaagtgagaaccacaggtagcaataggtattacagtctttgaatagaagaaaatgataacagataggc
cggttgaaaactttgtccacgctaatagaagaacagcaacaaaaagagagaacaagcaggaggacggcgata
acagctcctcttggttagcattcttgggtccgaagaatta

6) T_DNA_in_pZH_OsU:4914-4933 _20bp 長

tgtagttcctttcttactt

7) T_DNA_in_pZH_OsU:7826-7847 _22bp 長

TTCGTTGGGGAGGTTCTTGTCG

8) T_DNA_in_pZH_OsU:9157-9177 _21bp 長

TCGCCTCCGCGGTCTCGCCGC

9) T_DNA_in_pZH_OsU:9395-9432 _38bp 長

TAATCCCCCTCTTTTTCAAAGAACAAGAAACCACTCCG

10) T_DNA_in_pZH_OsU:9434-9496 _63bp 長

AGAGATCGAAAGCTCAGGTTTTCTTTTTTCTTGAATCACTCGCAGTTCGTTGCTTGAAT

Tct

11) T_DNA_in_pZH_OsU:9525-9544 _20bp 長

cttccttatatagaggaagg

12) T_DNA_in_pZH_OsU:10371-10617 _247bp 長

GGATCATGAACCAACGGCCTGGCTGTATTTGGTGGTTGTGTAGGGAGATGGGGAGAAGA

AAAGCCCGATTCTCTTCGCTGTGATGGGCTGGATGCATGCGGGGGAGCGGGAGGCCCAA

GTACGTGCACGGTGAGCGGCCACAGGGCGAGTGTGAGCGCGAGAGGCCGGGAGGAACA

GTTTAGTACCACATTGCCAGCTAACTCGAACGCGACCAACTTATAAACCCGCGCGCTGT

CGCTTGTGTTg

図 11 k-mer 法で、ヒットが確認できた配列

供試した全てのサンプル DNA で、同じ 12 か所がヒットした。ヒット領域の長さは図の中に。

工) これらの 12 個の DNA 配列を、イネゲノムデータベース RAP-DB で、BLAST 検索したところ、12 個の全ての配列が、イネゲノムの一部と 100%一致した。つまり、この 12 か所のヒットは、T-DNA 内にもともと含まれるイネゲノム由来の断片、もしくは、20bp 程度の長さの配列に関しては、偶然の一致であると考えられる。よって、T-DNA 領域の外来核酸由来の配列は含まれなかった。この中で、20bp を大きく超えるヒットに関しては、イネゲノム上の 100%一致する配列のアノテーション情報を以下のように確認した。

- 1) T_DNA_in_pZH_OsU:433-1565 _1133bp HSP タンパクのプロモーターを含む配列
- 2) T_DNA_in_pZH_OsU:3451-4734 _1284bp アクチン遺伝子の3'末領域
- 3) T_DNA_in_pZH_OsU:9395-9432 _38bp ADH 遺伝子の5'UTR 領域
- 4) T_DNA_in_pZH_OsU:9434-9496 _63bp ADH 遺伝子の5'UTR 領域
- 5) T_DNA_in_pZH_OsU:10371-10617 _247bp OsU6-2 プロモーター

したがって、供試した6個体のゲノム DNA には、形質転換した T-DNA を全く含まないと

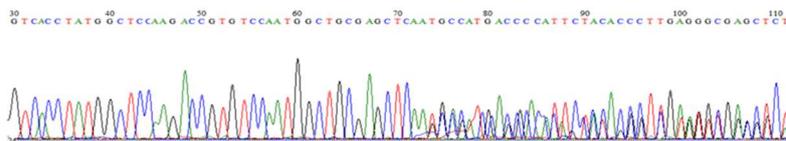
結論できた。

【シーケンスによる変異の確認】

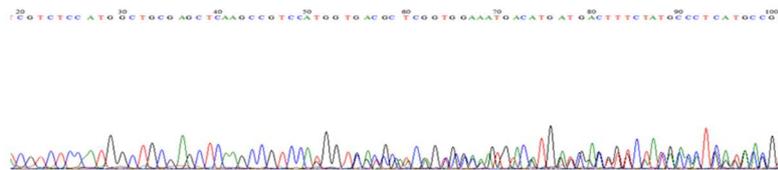
ア) 今回、野外栽培を計画する系統のもつ DNA 変異について、シーケンス解析を行い、確認した。サンプル番号 1, 3, 4 は、図 12 参照。

No 1 (Hd3a_2-7-10-2)

Hd3a 遺伝子のコード領域に
45bpと6bpの欠失変異(機能欠損変異) をbi-allelic にもつ



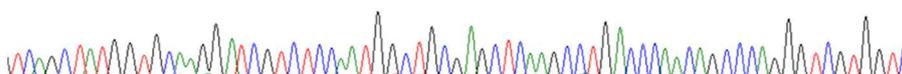
RFT1 遺伝子のコード領域に
18bpの欠失変異(機能欠損変異) をヘテロにもつ



No 3 (RFT1_3-7-22)

RFT1 遺伝子のコード領域に8bpの欠失変異(機能欠損ホモ変異)

T C A G C T A T G T G C A A G G A T C G T C T C C A A T G G C T C G G A G C T C A A G C C T G A C C C A A C A G C C C A G G G T C G T G G T C

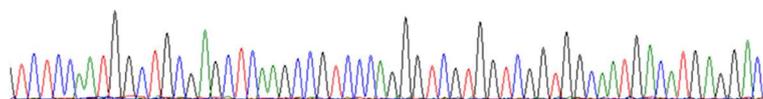


8bp欠失

No 4 (RFT1_21-4-7-5-3)

RFT1 遺伝子のコード領域に17bpの欠失変異(機能欠損ホモ変異)

T C T C C A A T G G C T G C G A G C T C A A G C C G T C C C A G G G T C G T G G T C G G T G G C A A T G A C A T G A G G A C



17bp欠失

図 12 *Hd3a* と *RFT1* のコーディング領域の変異のシーケンス結果

サンプル番号 1 のサンプルは、biallelic、もしくは、ヘテロな変異により、それ以降の波形が二つの波が重なったものになっている。したがって、サンプル番号 1 のサンプルは、二つのフロリゲン遺伝子の両方に変異を持っていることが確認できた。*Hd3a* は両方の相同染色体に変異が入っており、*RFT1* の方は機能型とのヘテロ変異である。サンプル番号 3 とサンプル番号 4 は、*RFT1* 遺伝子の青の三角で示した位置でそれぞれ 8bp あるいは 17bp の欠失が認められた。

以下に、図 12 に対応するシーケンスの該当領域の野生型 DNA 配列と変異の導入位置、様式を記載する。ガイド RNA 配列は図 3 と図 4 を参照。

Hd3a_2-7-10-2 について

Hd3a 遺伝子の 45bp 欠失と 6bp 欠失

WT 配列	AATGGCTGCGAGCTCAAGCCGTCATGGTCACCCACCAGCCTAGGGTCGAGGTCGGCGGCAATGACATGAGGACATTCTACA
45bp 欠失	AATGGCTGCGAGCTCAA-----TGACATGAGGACATTCTACA
6bp 欠失	AATGGCTGCGAGCTCAAGCCGTC-----CACCCACCAGCCTAGGGTCGAGGTCGGCGGCAATGACATGAGGACATTCTACA

RFT1 遺伝子の 18bp 欠失

WT 配列	CTCAAGCCGTCATGGTGACCCAACAGCCAGGGTCGTGGTCGGTGGCAATGACATGAGGACGT
18bp 欠失	CTCAAGCCGTCATGGT-----CGTGGTCGGTGGCAATGACATGAGGACGT

RFT1_3-7-22 について

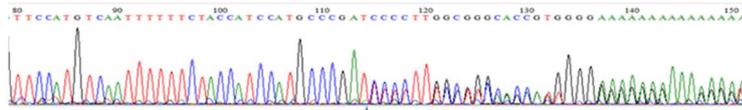
WT 配列	GCTATGGTGCAAGGATCGTCTCCAATGGCTGCGAGCTCAAGCCGTCCATGGTGACCCAACAGCCCAGGGTCGTGGTCGGTGGCAA
8bp 欠失	GCTATGGTGCAAGGATCGTCTCCAATGGCTGCGAGCTCAAGCC-----TGACCCAACAGCCCAGGGTCGTGGTCGGTGGCAA

RFT1_21-4-7-5-3 について

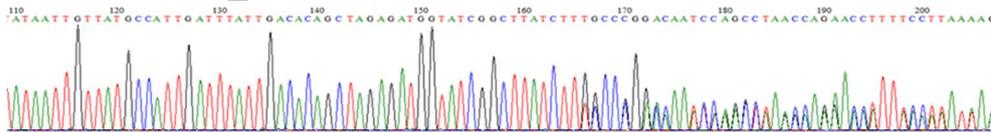
WT 配列	TCGTCTCCAATGGCTGCGAGCTCAAGCCGTCCATGGTGACCCAACAGCCCAGGGTCGTGGTCGGTGGCAATGACATGAGGACGT
17 bp 欠失	TCGTCTCCAATGGCTGCGAGCTCAAGCCGTCC-----CAGGGTCGTGGTCGGTGGCAATGACATGAGGACGT

イ) また、残りのコシヒカリに変異を導入した系統で、サザン解析に供試した個体に、設定したガイド RNA 領域に変異が遺伝しているかどうかを調べた。図 13 に示したように、解析した個体の中で、7 個体で、ガイド RNA 領域の変異が遺伝していることを確認した。

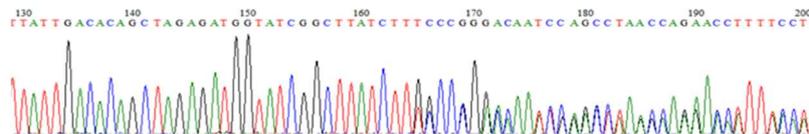
No 7 (Pro_3-3-2-10)



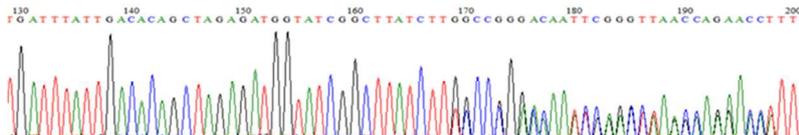
No 12 (Pro_3-5-1-6)



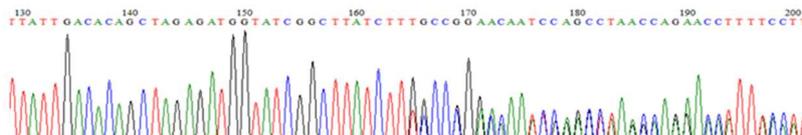
No 16 (Pro_3-16-2)



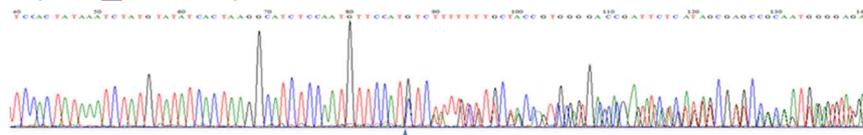
No 17 (Pro_3-16-3)



No 19 (Pro_3-16-11)



No 29 (Pro_3-22-2)



No 31 (Pro_6-15-6)

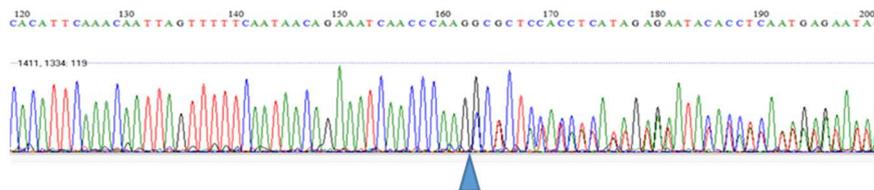


図 13 gRNA 領域における変異の確認

設計したガイド RNA の領域に、7 系統で変異の導入を確認できた。

以下に、図 13 に対応するシーケンスの該当領域の野生型 DNA 配列と変異配列を記載する。

まず、使用したガイド RNA 配列は、

Con3

gRNA2108: TTCTCTTACTGAAAACCAGA GGG - (GGG - PAM)

gRNA2211: TGGTATCGGCTTATCTTGCC CGG - (CGG - PAM)

gRNA4316: CCC GATTCTCTTTGCGTGCAGCA - (CCC- PAM)

Con6

gRNA1060: CAACAATATTAGTAGCTATA GGG - (GGG - PAM)

gRNA1512: CCG GCCGGGAATAATGTCTAGCC - (CCG - PAM)

gRNA2217: CCC AAGCCGCTCTACATCATAGT - (CCC - PAM)

である。

No.7(Pro_3-3-2-10) について gRNA4316 サイトに変異が生じた。

WT 配列	TGCCCGATTCTCTTTGCGTGCAGCAGTGGGGAG
1bp 欠失	TGCCCGAT-CTCTTTGCGTGCAGCAGTGGGGAG

No.12(Pro_3-5-1-6), No16(Pro_3-16-2), No17(Pro_3-16-3), No19(Pro_3-16-11)

について gRNA2211 サイトに変異が生じた。

WT 配列	GGTATCGGCTTATCTT-GCCCGGACAAATCG
1bp 挿入	GGTATCGGCTTATCTTTGCCCGGACAAATCG

No.29(Pro_3-22-2) について gRNA4316 サイトに変異が生じた。

WT 配列	TTCCATGTCAATTTTTCTACCATCCATGCCCGATTCTCTTTGCGTGC
30bp 欠失	TTCCAT-----CTCTTTGCGTGC

No.31(Pro_6-15-6) について gRNA2217 サイトに変異が生じた。

WT 配列	AACCCAAGCGCTCTACAT
2bp 欠失	AACCCAAG—GCTCTACAT

【開花期の表現型】

ア) サンプル番号 1,3,4 の系統に関しては、今回の解析を開始した時点で固定系統と考えられ、2019 年 9 月 15 日に播種し、長日条件と短日条件に設定した拡散防止措置がとられている人工気象室で栽培し、その表現型を観察した(図 14 参照)。サンプル番号 1 番の系統は変異配列解析の結果、*Hd3a* 遺伝子は、両方の相同染色体に変異が入り(biallelic)、*RFT1* 遺伝子は、片方の染色体に変異が入るヘテロアレルであった。したがって、自殖後代では *Hd3a* がホモの変異で *RFT1* がヘテロの変異を持つ個体と二重変異の個体に分離する。*Hd3a/RFT1* 二重変異体は開花しないので、本実験においても開花しない個体に分離した。サンプル番号 3、4 の系統は、*RFT1* の単独変異であり、日本晴に比べて出穂期が変化した。

イ) サンプル番号 12,31 の系統に関しては、組換え体を栽培できる温室で栽培した。

2019年8月2日に播種し、個体ごとに出穂期を調査した(図14参照)。その結果、サンプル番号12は、コシヒカリに比べて出穂期が早まった。

人工気象室での栽培 (播種日2019/09/15)

	長日条件 (14.5hL9.5hD)	短日条件 (10hL14hD)
日本晴	93日~101日	47日~49日
No.1 Hd3a_2-7-10-2	79日~未出穂	67日~未出穂
No.3 RFT1_3-7-2-2-2	80日~94日	56日~62日
No.4 RFT1_21-4-7-5-3	77日~98日	58日~61日

組換え体用温室での栽培 (播種日2019/08)

サンプル番号	系統付き個体名	出穂日数
	コシヒカリ	77~80日
No.12	Pro_3-5-1-6	69日
No.31	Pro_6-15-6	81日

図14 開花期の表現型

人工気象室の結果は各系統4~5個体の結果。組換え体用温室の結果は、各系統1個体の結果。

サンプル 番号	T0個体名	系統名	ゲノム編集系統の概要	PCR解析に 供試した個体の世代	PCR解析での T-DNA断片の有無	サザン解析に 供試した個体の世代	サザン解析での T-DNA断片の有無	対象のgRNA領域に 変異の有無の確認	k-mer法に 供試した個体の世代	k-mer法での T-DNAの有無	野外栽培を 計画世代
1	Hd3a_2	Hd3a_2-7-10-2	<i>Hd3a</i> 遺伝子のORF中にホモ変異。機能欠損変異。 <i>RFT1</i> 遺伝子のORF中にヘテロ変異。機能欠損変異。 <i>Hd3a</i> と <i>RFT1</i> の二重変異体は、 花芽形成しないのでヘテロ個体で維持。	T3	無	T3	無	○	T3	無	T4以降
2	Hd3a_7	Hd3a_7-1-10-6	<i>Hd3a</i> 遺伝子のORF中にホモ変異。機能欠損変異。	T3	有	T3	有	○	-	-	-
3	RFT1_3	RFT1_3-7-2-2-2	<i>RFT1</i> 遺伝子のORF中にホモ変異。機能欠損変異。	T4	無	T4	無	○	T5	無	T6以降
4	RFT1_21	RFT1_21-4-7-5-3	<i>RFT1</i> 遺伝子のORF中にホモ変異。機能欠損変異。	T4	無	T4	無	○	T5	無	T6以降
5	Pro_3-3	Pro_3-3-1-4	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代	T2	有	T2	有	X	-	-	-
6	Pro_3-3	Pro_3-3-2-9	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-
7	Pro_3-3	Pro_3-3-2-10	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代	T2	無	T2	無	○	-	-	-
8	Pro_3-3	Pro_3-3-2-12	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-
9	Pro_3-3	Pro_3-3-2-13	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代 (No.8の兄弟個体)	-	-	T2	有	-	-	-	-
10	Pro_3-5	Pro_3-5-1-1	コンストラクト3を形質転換したT0系統5番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-
11	Pro_3-5	Pro_3-5-1-3	コンストラクト3を形質転換したT0系統5番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-
12	Pro_3-5	Pro_3-5-1-6	コンストラクト3を形質転換したT0系統5番の自殖後代	T2	無	T2	無	○	T3	無	T4以降
13	Pro_3-20	Pro_3-20-1-4	コンストラクト3を形質転換したT0系統20番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-
14	Pro_3-20	Pro_3-20-1-7	コンストラクト3を形質転換したT0系統20番の自殖後代	T2	無	T2	無	X	-	-	-
15	Pro_3-11	Pro_3-11-5	コンストラクト3を形質転換したT0系統11番の自殖後代	T1	無	-	-	-	-	-	-
16	Pro_3-16	Pro_3-16-2	コンストラクト3を形質転換したT0系統16番の自殖後代	T1	無	T1	無	○	T2	無	冬場の栽培で種子が収穫できず
17	Pro_3-16	Pro_3-16-3	コンストラクト3を形質転換したT0系統16番の自殖後代	T1	無	T1	無	○ (No16と同じ変異)	-	-	-
18	Pro_3-16	Pro_3-16-9	コンストラクト3を形質転換したT0系統16番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
19	Pro_3-16	Pro_3-16-11	コンストラクト3を形質転換したT0系統16番の自殖後代	T1	無	T1	無	○ (No16と同じ変異)	-	-	-
20	Pro_3-13	Pro_3-13-2	コンストラクト3を形質転換したT0系統13番の自殖後代	T1	無	-	-	-	-	-	-
21	Pro_3-13	Pro_3-13-5	コンストラクト3を形質転換したT0系統13番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
22	Pro_3-14	Pro_3-14-2	コンストラクト3を形質転換したT0系統14番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
23	Pro_3-14	Pro_3-14-3	コンストラクト3を形質転換したT0系統14番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
24	Pro_3-14	Pro_3-14-7	コンストラクト3を形質転換したT0系統14番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
25	Pro_3-25	Pro_3-25-2	コンストラクト3を形質転換したT0系統25番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
26	Pro_3-25	Pro_3-25-3	コンストラクト3を形質転換したT0系統25番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
27	Pro_3-25	Pro_3-25-6	コンストラクト3を形質転換したT0系統25番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
28	Pro_3-22	Pro_3-22-1	コンストラクト3を形質転換したT0系統22番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
29	Pro_3-22	Pro_3-22-2	コンストラクト3を形質転換したT0系統22番の自殖後代	T1	無	T1	無	○	-	-	-
30	Pro_6-15	Pro_6-15-4	コンストラクト6を形質転換したT0系統15番の自殖後代	T1	無	T1	無	X	-	-	-
31	Pro_6-15	Pro_6-15-6	コンストラクト6を形質転換したT0系統15番の自殖後代	T1	無	T1	無	○	T2	無	T3以降
32	Pro_3-3	Pro_3-3-1-4	コンストラクト3を形質転換したT0系統3番の自殖後代	T2	無	-	-	-	-	-	-

表1 外来核酸の移入・残存の有無の評価実験結果のまとめ

【総合評価】

図 1 に示したように、形質転換した DNA 断片が自殖で後代に遺伝する遺伝様式を十分に考慮した上で、ターゲットの gRNA 領域での変異の確認（実験 4）と開花期の確認（実験 5）に加え、実験 1）PCR 法、実験 2）サザンハイブリダイゼーション解析法、実験 3）NGS データ(イルミナ PE150)の k-mer 法（20mer を利用）による解析、この 3 つの解析すべてで、形質転換した外来 DNA 断片のゲノムへの挿入が確認できなかった個体、もしくは、その自殖種子由来の植物体を実験圃場における栽培に供試するという基準で、個体・系統を絞り込んだ。その結果、最後に行った実験である k-mer 法に供試した植物個体の中で、自殖種子が得られた以下の 5 個体、もしくは、その自殖後代を今回の実験に供試することとした。表 1 & 図 14 参照。（拡大用に表 1 は pdf ファイルも提出）

今回の実験で圃場栽培に供試するサンプル番号（個体名）

No1(Hd3a_2-7-10-2) 系統で k-mer 法解析に供試した個体の自殖種子

No.3(RFT1_3-7-2-2-2)-1 系統で k-mer 法解析に供試した個体の自殖種子

No.4(RFT1_21-4-7-5-3)-1 系統で k-mer 法解析に供試した個体の自殖種子

No.12(Pro_3-5-1-6) 系統で k-mer 法解析に供試した個体の自殖種子

No.31(Pro_6-15-6) 系統で k-mer 法解析に供試した個体の自殖種子

別紙 4

野外栽培を計画している系統の写真とガイド RNA の評価

まず、今回、出穂期への影響が一番大きな *Hd3a* 遺伝子と *RFT1* 遺伝子の二重変異体、*Hd3a_2-7* 系統の写真を以下に示す。左の2個体は、比較対照の品種日本晴の写真で、穂が実りつつあるのに対し、二重変異体では、開花の兆候がない。この表現型は、野外栽培においても同様な表現型を示すと期待される。その場合、開花に至らず自然交雑が生じないため、生物多様性に影響が生ずる可能性は非常に低いと考えられる。



野生型植物体 (品種 日本晴) *Hd3a_2-7*系統の後代で、*hd3a rft1*の二重変異体

次に、種子の写真を示す。比較対照の日本晴やコシヒカリの種子と比較して、大きな変化は認められなかった。

日本晴



RFT1_21-4-7-5-3



Hd3a_2-7-10-2



RFT1_3-7-2-2-2



コシヒカリ



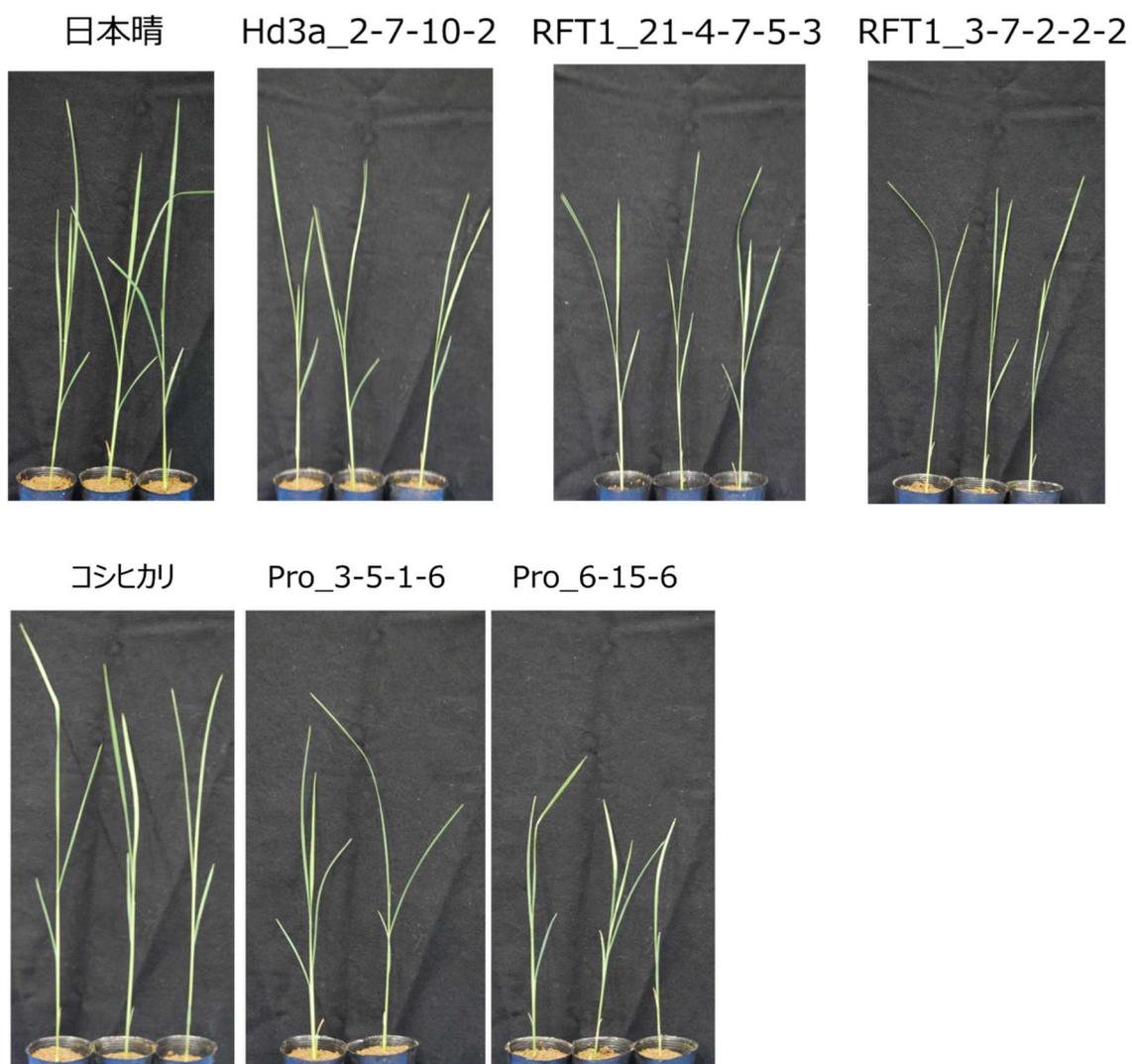
Pro_3-5-1-6



Pro_6-15-6



次に、幼苗の写真を示す。比較対照の日本晴やコシヒカリの種子と比較して、大きな変化は認められなかった。種子や幼苗に見られたこれらの表現型は、野外栽培においても同様な表現型を示すと期待され、本届出で実施する野外栽培にて検証を行う。



最後に、今回の実験で利用したガイド RNA のイネの IRGSP1.0 ゲノム配列を対象に、CRISPR-Pv2.0 の Off-target 予測を行った結果を示す。各ガイド RNA の配列の下に Off-score のスコア順に最大 20 個示した。その結果、*RFT1* 遺伝子、*Hd3a* 遺伝子に設計した 8 個すべてのガイド RNA で完全一致の Off-target 候補配列は存在せず、CRISPR/Cas9 による切断が高い確率で起こる配列(Off-score が高い配列)は、(ターゲット配列以外に) 予測されなかった。また、2~4 塩基のミスマッチが検出された領域に、生物多様性に影響を与えることが予想される遺伝子は存在しなかったため、今回の実験では、いわゆる Off-target 候補領域において生じる変異がゲノム編集技術により得られた系統に想定外の変化を生じさせる可能性はほとんどないと考えられる。

RFT1; CCTGGGCTGTTGGGTCACCATGG (TGG -PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ⑦	MMs⑧	Locus	Gene	Region
CCTG AT CTGTTGG AT CA T CA TGG	0.279	4MMs	11:-16527467		Intergenic
CA TGG CC T GT CC GGTCACCA AGG	0.175	4MMs	6:-27290806	OS06G0662000	exon
ACTGGGCTGTGGG CT CA T CA AGG	0.110	4MMs	12:-6729885	OS12G0224000	utr
CCTAGGCTG GT GGGTGACCA TGG	0.069	3MMs	6:-2940304	OS06G0157700	exon
CCTGG T CTG GT CGTCA CA CGG	0.060	4MMs	11:-8857415		Intergenic
CCTGG T CTG GT CGTCA CA CGG	0.060	4MMs	11:-8857796		Intergenic
CCTGGGCTG GT G AA CACCC CGG	0.049	4MMs	12:+2948192	OS12G0158900	exon
CA TGG CGGTTGG CT CG CA TGG	0.040	4MMs	3:+36073491	OS03G0855500	exon
G CT TGGG T GTGGG T CC CA TGG	0.028	4MMs	4:+33893488	OS04G0664400	utr
CCTGGG CA GATGGG T AG CA AGG	0.028	4MMs	8:-11591770		Intergenic
CCTGG AG TGTGGG T CA GA TGG	0.027	4MMs	3:-23461889		Intergenic
CCTGGG CG GTGGG T GT CC G GG	0.012	4MMs	6:-7669439	OS06G0247800	exon
CTGGG T GTGGG T CT CG AC GG	0.012	4MMs	5:+290621		Intergenic
CCTGGGCT CT TGG CT CC CA TA G	0.011	3MMs	3:-30672553		Intergenic
CT GT GT CT TTGG TT CA CA TA G	0.010	4MMs	9:-3421380		Intergenic
CC GG CGTGTGGG T G AC CA GGG	0.008	4MMs	7:-18662136		Intergenic
CCTGGG TT TTGGG GC CC CA GGG	0.004	4MMs	6:-6426540		Intergenic
CCTGGG TT TTGGG GC CC CA GGG	0.002	4MMs	10:-15985575	OS10G0443800	intron

Hd3a; GGCTGGTGGGTGACCATGGACGG (CGG -PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ^①	MMs ^②	Locus	Gene	Region
GGCTG TTGGGTCA CCATGGACGG	0.353	2MMs	6:-2927221	OS06G0157500	exon
GACTGGTGGATGACCA AGTACGG	0.281	4MMs	1:-17160770	OS01G0498300	exon
GACTGGTGGATGACCA AGTACGG	0.281	4MMs	7:+27678309	OS07G0657300 OS07G0657400	exon
TGCTG CTGGGTGACCAAGGTGGG	0.218	4MMs	7:+25336314	OS07G0615000	utr
GCCTGG AGGATGA ACATGGACGG	0.198	4MMs	1:+32809933		Intergenic
GGCTG TTGGTTA ACCATGGAGAG	0.131	3MMs	1:-38276625	OS01G0881900	intron
CGCT TGCGGGTGG CCATGGAGGG	0.096	4MMs	5:+29286747	OS05G0587700	exon
GGCTGGTGG TGTACCA CGGAGGG	0.088	4MMs	9:+6326097		Intergenic
GGG TAGAGGGTGC CCATGGATGG	0.080	4MMs	9:-18431565		Intergenic
GGG TAGAGGGTGC CCATGGATGG	0.080	4MMs	9:+7669511		Intergenic
GGCTG CTGGGTGACA ACGTAGGG	0.071	4MMs	9:+3127178		Intergenic
GGCTGG CTGGAGCC ATGGATGG	0.068	4MMs	7:-4920090	OS07G0191200 OS07G0191250	utr
GGG TAGGGGTGC CCATGGATGG	0.054	4MMs	6:+14599864		Intergenic
TGCTGGTGGATGGCCATGG CCAG	0.036	4MMs	8:+522819	OS08G0110000	exon
TGCTGGTGGATGGCCATGG CCAG	0.036	4MMs	2:+8999918		Intergenic
GGCCGGT TGATGAC GATGGATGG	0.019	4MMs	1:-31969220		Intergenic

Con3

gRNA2108: TTCTCTTACTGAAAACCAGA GGG (GGG - PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ^①	MMs ^②	Locus	Gene	Region
TCCT CCG ACTGAAAACCAG TCGG	0.275	4MMs	5:+9024827		Intergenic
TTA TCTT ACTCAAAAACAA AGG	0.265	4MMs	12:-19489467		Intergenic
TTCTCT TCCTG AAAGACAGAGGG	0.201	4MMs	5:+21266258		Intergenic
A TCTCT CTGAAAACCA CAAGG	0.175	4MMs	2:-25595769	OS02G0638650	utr
CTCT TTCTCT GAAAACCA AAAGG	0.167	4MMs	4:+16631519		Intergenic
TTCTCT AAA AGAAAACAGAGAG	0.167	4MMs	11:-20766454		Intergenic
TTCTCT CACAG AA TACT AGAGAGG	0.147	4MMs	11:-22760746		Intergenic
TTCTC ATACT CAAA ACTAGT TGG	0.104	4MMs	11:+4076104		Intergenic
TTCTG TTAT TTAAAACCTGATGG	0.101	4MMs	9:+20183095		Intergenic
TTCTC ATT CAGAAA T CAGAGG	0.098	4MMs	10:+21478065		Intergenic
TTG TCTTA ATAAAAACCA AGAG	0.079	4MMs	1:+5759681		Intergenic
TT TTCT TACTGAAR CCCTAA CGG	0.067	4MMs	8:+8991186		Intergenic
TT TTCT GAT TG AAAACCA AGAG	0.066	4MMs	8:-19893223		Intergenic
TT CACT TAGTGAAR TACAG ATGG	0.059	4MMs	6:+28614865		Intergenic
TTCTC ATCT GTAAAC AGA AGG	0.058	4MMs	7:+3814307	OS07G0172500	intron
TCCTCT TACGT AAA T CRAGAGG	0.051	4MMs	1:-8338945		Intergenic
GTCT CGT ACTGAAR TCTAG ACGG	0.051	4MMs	1:+23992573		Intergenic
TTCTCTTACT TATT ACCAG GAGG	0.047	4MMs	9:+18432939	OS09G0480300	utr
TTCTCTTACT TATT ACCAG GAGG	0.047	4MMs	6:-14598510	OS06G0355701	exon
TT CCCTT CTGAAAC CCGA AGG	0.038	4MMs	10:+9478023		Intergenic

gRNA2211: TGGTATCGGCTTATCTTGCC CGG (CGG - PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ^②	MMs ^②	Locus	Gene	Region
TGGT TTT TGCTTACCTTGCC AGG	0.053	4MMs	1:-5300285		Intergenic
TGGTAT TGGCTTT TAT GGCC AGG	0.006	4MMs	12:-21689349		Intergenic

gRNA4316: CCC GATTCTCTTTGCGTGCAGCA (CCC- PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ^②	MMs ^②	Locus	Gene	Region
TGCTG AGG CTAAGAAATC AGG	0.184	4MMs	7:+22561903	OS07G0563600	exon
TGCT TCAGG CAAGAAGAATC GAG	0.024	4MMs	6:-6063347		Intergenic
AGCTGCACGCAGC GAGGATC GAG	0.007	4MMs	6:+25506731		Intergenic
TGC AGC ACGCAGAGAGGAT GAGG	0.004	4MMs	6:-17006599	OS06G0492101 OS06G0492000	utr
TGC AGC ACGCAGAGAGGAT GAGG	0.004	4MMs	7:-20879229	OS07G0532600	utr
TGCTGCACGCAGAGAG GAGG CGG	0.002	4MMs	4:+11674115		Intergenic
TGATGCACGCAAA AACAAC CGGG	0.000	4MMs	6:-29143947		Intergenic
TGCTG GT CGCAAAGACAAC CAGG	0.000	4MMs	5:-29385345		Intergenic
TGTTGCATGCATAGACAATC GAG	0.000	4MMs	12:-11494258		Intergenic
TG TGG CACGCAACGCAATCT TGG	0.000	4MMs	7:+10143528	OS07G0273600	utr
TGATGCACG AGA AGATAATCT TGG	0.000	4MMs	9:+18139821		Intergenic

Con6

gRNA1060: CAACAATATTAGTAGCTATA GGG (GGG - PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score	MMs	Locus	Gene	Region
AAATAATAGTAGTAGCTATGTGG	0.379	4MMs	1:+24392120		Intergenic
TTACAATAGGAGTAGCTATAAGG	0.225	4MMs	6:+14285230	OS06G0351500	intron
CAACAATATTAGTAGACAGATGG	0.176	3MMs	6:-19455806		Intergenic
GGACAAATATTAGTAGATATAAGG	0.166	4MMs	9:-19500652	OS09G0504400	intron
CAACTAACTAGTAGCTTTAGGG	0.147	4MMs	4:+4769696		Intergenic
CTATAGTATTAGTAGTTATAAGG	0.128	4MMs	3:-15548755		Intergenic
AAACAATAATTAGTATATATATGG	0.125	4MMs	6:-30166700		Intergenic
AATCAATATTAGTAGCCATCAGG	0.113	4MMs	5:-8388838		Intergenic
CAACGAGAGTAGTAGCTATAAGG	0.068	3MMs	7:+13180231		Intergenic
CAACGATAGTAGTAGCTTAAGGG	0.064	4MMs	7:+22191065		Intergenic
CTAGAAGATTAGTAGCTACAGGG	0.059	4MMs	1:+37488478		Intergenic
CAACATTTTATTAGTTGCTAGAGGG	0.041	4MMs	12:+7622704		Intergenic
TAACAATATTGTGGATATAGAG	0.037	4MMs	4:+24466393	OS04G0489600	intron
CATCAACATTAGTAGCATTAGAG	0.034	4MMs	6:+15016892		Intergenic
TAACAATAGTATTAGCAATAGAG	0.033	4MMs	10:-15419542	OS10G0432200	utr
TAACAATAGTATTAGCAATAGAG	0.033	4MMs	10:-15415476		Intergenic
TAACAATAGTATTAGCAATAGAG	0.033	4MMs	7:-26694897		Intergenic
TAACAATAGTATTAGCAATAGAG	0.033	4MMs	7:-26698873		Intergenic
CAACAAGCTTAGGGCTATAGGG	0.031	4MMs	5:-7078761		Intergenic
CAAATAATATATGTAGCAATAGAG	0.031	4MMs	3:-395446		Intergenic

gRNA1512: CCG GCCGGGAATAATGTCTAGCC (CCG - PAM)

number of offtarget sites: 0

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence Off-score MMs Locus Gene Region

gRNA2217: CCC AAGCCGCTCTACATCATAGT (CCC - PAM)

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score	MMs	Locus	Gene	Region
ACTATAAATATAGAGCAGATTGAG	0.090	4MMs	8:+23857491		Intergenic
AATTTGATGAAGACTGGCTTTGG	0.026	4MMs	2:+19261925	OS02G0526600	utr
ACGATGATGTAGATAGGTTTGGG	0.019	4MMs	5:+5852953		Intergenic
ACTATGATGTGGATTGACTTTGG	0.011	4MMs	1:+25470476	OS01G0635400	intron
ATTATGATGTTGAGGGCATAGG	0.004	4MMs	1:-14064270		Intergenic
ACGATGATGTTGACTGGCATGAG	0.001	4MMs	1:+41269467	OS01G0939700	intron
TCTATGCTGTAGAGCTTCTTGAG	0.000	4MMs	2:-26509012	OS02G0656200	exon