

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

令和 5 年 4 月 26 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 国立大学法人大阪大学
提出者 学長 西尾 章治郎
住所 大阪府吹田市山田丘 1-1
電話番号 06-6879-4740

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	ステロイドグリコアルカロイド低生産性ジャガイモ (系統名 Solanum tuberosum disrupted-SSR2 MayQueen_pSuehiro121 #680, Solanum tuberosum disrupted-SSR2 MayQueen_pSuehiro123 #84, Solanum tuberosum disrupted-SSR2 MayQueen_pSuehiro130 #342)
開放系における使用等の内容	ゲノム編集技術により得られたステロイドグリコアルカロイド低生産性ジャガイモの野外栽培での検証（限定されたほ場による栽培等）
使用等をする場所	名称 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 1. 観音台第一事業場 高機能隔離圃場 2. 観音台第二事業場 隔離圃場 3. 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場
	所在地 1. 茨城県つくば市観音台 3-1-1 2. 茨城県つくば市観音台 2-1-2 3. 茨城県つくば市観音台 3-1-3
宿主の名称	ジャガイモ (potato; <i>Solanum tuberosum</i>) (品種 メーカーイン)
宿主の自然環境における生理・生態学的特性	<p>生息・栽培可能な環境の条件；生育適温は、10℃～23℃（昼温 20℃、夜温 10℃～14℃）であり、地上部茎葉は 15℃～20℃、塊茎は 15℃～18℃で成長が良好となる。気温が 30℃を越えると塊茎の形成が低下する。茎葉は-4℃で枯死し、塊茎は-2℃で 25hr あるいは-10℃で 10hr の凍結で細胞凍結死する。</p> <p>繁殖または増殖の様式；種子繁殖も行うが、男爵やメーカーインなど、一部の四倍体栽培品種では雄性不稔形質を持つものがあり、自殖後代が取れない場合がある。そのため、生産現場などでは、品種特性を維持するため、塊茎による栄養繁殖で増殖を行う。</p> <p>有害物質の産生性；毒性または有毒の可能性のある成分としてステロイドグリコアルカロイド（SGA）（農水省消費・安全局食品安全政策課ジャガイモによる食中毒を予防するために https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/natural_toxin/potato.html）、プロティナーゼ阻害因子（Ryan CA. 1973, Ann. Rev. Plant Physiol. 24:173-96）やレクチン（Allen AK. et al. 1978, Biochem J. 171:665-674）を生産する。</p> <p>我が国における具体的な生息・生育域；全国各地にわたって広く栽培さ</p>

		<p>れ、年間約 230 万トンの塊茎が生産されている。しかしながら、ジャガイモ <i>S. tuberosum</i> 及び交雑可能な近縁野生種は自生していない。</p> <p>OECD コンセンサス文書は以下の通り https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815598.pdf 国内の情報はジャガイモ辞典 2012 財団法人いも類振興会</p>
使用したゲノム編集技術の種類・導入方法		<p>人工ヌクレアーゼの種類：b. TALEN プラチナ TALEN (高機能型 TALEN, Yasumoto et al. 2019, Plant Biotechnol. 36:167-173) 導入方法：b. 人工ヌクレアーゼ遺伝子を組み込んだベクターを宿主の細胞内に移入 プラチナ TALEN 遺伝子を組み込んだベクター-DNA をアグロバクテリウムにより宿主細胞内に移入し、一過的に発現させた。</p>
細胞外で加工した核酸の導入・除去方法、残存の有無の確認方法		<p>導入した核酸の構成； 構成は「別紙 1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報」のとおり。</p> <p>導入方法； アグロバクテリウムによる一過的発現（前述）</p> <p>除去方法； 宿主細胞内の分解酵素による分解により除去。</p> <p>残存の有無を確認した方法：a. PCR 法、および c. その他 (<i>k</i>-mer 法) 無菌培養個体から調製したゲノム DNA を用い、T-DNA の部分的な領域を対象とし、PCR を行った。さらに、NGS 解析を行い、<i>k</i>-mer 法により、導入断片の残存の無いことを確認した（「別紙 1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報」のとおり）。</p>
改変した遺伝子等	名称	SSR2 (Sterol side chain reductase 2) (Sawai S. et al. 2014, Plant Cell 26:3763-3774)
	機能	<p>遺伝子の発現により生産されるタンパク質はステロイドの側鎖の 24-25 位の二重結合を還元する活性をもつ。本酵素によりデスモステロールからコレステロールが生成される。SGA はコレステロールを初発化合物として生合成されることから、本酵素は SGA 生合成の鍵酵素であることが示されている。</p>
	予想される機能の変化	<p>SGA は太陽光にさらされることで多く蓄積する。SGA はジャガイモの「えぐみ」をもたらす不良味覚成分で、多く蓄積することで食中毒の原因となる。多くの植物では微量のコレステロールしか含んでいないが、ナス科植物はステロール全体の約 10%と比較的多くのコレステロールを含んでいる (Itoh T. et al. 1977, Steroid 30: 425-433)。コレステロールが原料となり SGA が生成される。ゲノム編集により、コレステロール合成酵素である SSR2 の酵素の活性が失われることでコレステロールの生</p>

		<p>成量が減少し、さらにその代謝産物である SGA の含有量が減少する（前出 Sawai S. et al. 2014）。SGA が減少したジャガイモが実用化されることで、ジャガイモの品質向上と食中毒事象が減少し食の安全の向上が期待される。（植物に共通に存在する <i>DWF1/SSR1</i> 遺伝子により産生されるタンパク質は 24-28 位の二重結合を還元する酵素であるが、24-25 位の二重結合を還元する活性も若干持つため、<i>SSR2</i> 遺伝子破壊前の 10%以下の SGA 量は残存する。）</p>
<p>改変生物の形質の変化</p>	<p>当該改変により生じた変化</p>	<p>標的とした遺伝子等の配列に対して生じた変化： b. 欠損</p> <p>ゲノム編集技術により得られた系統の <i>SSR2</i> 遺伝子の標的配列を解析した結果、生じた変化は欠失であった。変異が導入されなかった <i>SSR2</i> 遺伝子の残存は確認できていない。PIP での人工照明下の土壌栽培での茎、葉や塊茎において SGA の含有量が減少していた。なお、ジャガイモの品種・系統は通常、種子による有性生殖ではなく、種イモなどの栄養体を介した無性生殖で行われることで遺伝的に安定して継代される。本系統は 2022 年 1 月以前に確立し試験管内での挿し木によって 1 年以上継代しており、遺伝子変異と形質を安定的に維持している。野外栽培における形質の安定性については本届出で実施する栽培試験でさらなる検証を行う。</p>
	<p>上記以外に生じた変化</p>	<p>ゲノム編集技術により得られた系統は閉鎖系での土壌栽培において対照の非ゲノム編集のジャガイモとの比較から植物体の形態、塊茎収量について特筆すべき差異は観察されていない（「別紙 1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報」）。野外栽培や塊茎からの栽培での形質の差異については本届出で実施する栽培試験でさらなる検証を行う。使用した人工ヌクレアーゼは 2 量体で作用するため、片側 17 塩基、両側で合わせて 34 塩基を認識し切断する TALEN である。ジャガイモデータベースに登録されている genome assembly (v6.1) を調査した結果、34 塩基中 27 塩基が一致する配列が最も似ている配列であったが、当該配列について変異が生じていないことを確認したことから、ゲノム編集技術により得られた系統がオフターゲットの変異を持つ可能性は低いことが推察される。</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>1. 競合における優位性</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定</p> <p>ジャガイモは侵入性・雑草性が高い作物ではないため、畑地外へ進出して繁茂することは想定されない。ゲノム編集した遺伝子がコードする <i>SSR2</i> はステロイドの側鎖の 24-25 位の二重結合を還元する活性を示す酵素である。<i>SSR2</i> 遺伝子の破壊により、コレステロールの合成が抑制され、結果的に SGA 含有量が減少する。<i>SSR2</i> は特化代謝産物（二次代謝産物）に関わるものであり、その遺伝子破壊によって競合性に関わる生活サイクル、繁殖様式、形態的、生理的特性を変えることはないと考えられる。なお、本ゲノム編集ジャガイモを PIP での人工照明下での土壌栽培及び特定網室での土壌栽培をしたところ、特筆すべき形態学的差異は観</p>

察されなかったことから、自然条件で本ゲノム編集ジャガイモの競合性が元品種より高まることは考えられない。栽培等に当たっては、植物体の散逸を防止するために特定のほ場内での栽培等に限定し、栽培管理や塊茎の取り扱いを厳格に行う。

以上から、本ゲノム編集ジャガイモは、ほ場の外部にある野生動植物等と競合することはなく、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場で栽培等する場合、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ジャガイモ塊茎については、芽や緑化した皮の近辺に食中毒の原因となるソラニンやチャコニンなどのSGAが含まれていることから、これらの部位を摂食しないように調理する必要があることは古くから知られている。SSR2はSGAの生成に関わる鍵遺伝子であり、その生合成経路がゲノム編集で遺伝子破壊された場合には、もともと植物が通常含有する別のステロール類やステロール合成の中間産物の増加が報告されている(前出 Sawai et al. 2014)が、新たな有害物質が産生されることは知られていない。また、毒性を示す可能性が示唆されているプロティナーゼ阻害因子及びレクチンの生合成系についてもSGA生合成経路との関わりを示す知見は見受けられず、本ゲノム編集ジャガイモにおいてこれら有害物質の産生性が高まることは想定されない。

植物には他感物質と呼ばれる、他の植物の生育に影響を与える物質を生産することが知られているが、ジャガイモではこのような他感物質は知られていない。(Mushtaq W. and Siddiqui MB. 2018 J. Plant Protect. Res. 58, 1-7)

限定されたほ場での栽培等のため、ジャガイモを摂食・食害する動物への影響も制限されている。ほ場はフェンスで囲まれ、ジャガイモの塊茎を摂食する比較的大型の動物は接触できない。また、万が一ジャガイモに接触する小動物等に対して影響があったとしても、影響を受ける可能性のある小動物等はほ場に来訪するものに限定的である。

以上から、本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場で栽培等する場合、有害物質の産生により影響を受ける可能性のある野生動植物等は特

定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場で栽培等する場合、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ジャガイモの受粉はマルハナバチ等による虫媒により行われ、風媒は知られていない。日本国内では、同属の野生植物としてイヌホウズキ (*S. nigrum*) が自生するが、ジャガイモとの雑種は得られなかったことが報告されている (Eijlander R. and Stiekema W. 1994, Sexual Plant Reproduction 7: 29-40)。その他に交雑可能な近縁野生植物は国内に存在しない。加えて、原品種メークインは細胞質雄性不稔を示すことが示唆される T 型細胞質ゲノムを持つことから (Hosaka K. and Sanetomo R. 2012, Theoretical and Applied Genetics 125: 1237-1251)、花粉を介した遺伝子の拡散は想定されず、ゲノム編集系統においても同様であると推察される。

以上のことから、本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場で使用する場合、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないことから、該当しない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場で使用等する場合、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

生物多様性影響の総合的評価

本ゲノム編集ジャガイモについては、限定されたほ場で適切な栽培管理等するものであり、持出しを防止する施設・措置を講じることから、本ゲノム編集ジャガイモの野生動植物等に対する競合において優位性に

	<p>は影響しないと考えられる。有害物質産生性については、本ゲノム編集ジャガイモでは、SGA 生成が減少するが、これにより新たな有害物質が産生されることは想定されない。さらに、限定されたほ場における栽培等であることから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。交雑性については、ジャガイモと交雑する近縁種が我が国には存在しないことから、交雑による生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。</p> <p>以上を総合的に評価し、本ゲノム編集ジャガイモを限定されたほ場において栽培等した場合には、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。</p>
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場合は、緊急措置を講じた後、速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・安全対策室に報告する。</p>
その他	<p>当該生物の取扱いについて検討する委員会の設置状況：国立大学法人大阪大学 遺伝子組換え実験安全委員会にて検討を行った。</p> <p>委員長名：</p> <p>検討日：令和5年3月8日</p> <p>当該生物の不活化処理の具体的な措置内容：不活化を行う場合は、試験終了後、地上部及び地下茎を取り出し、オートクレーブ又は焼却炉等を用い確実に不活化する。</p>

別紙1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報

1. 移入した核酸の構成に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本ゲノム編集ジャガイモの作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表1に示した。

表1. pSuehiro121、pSuehiro123、pSuehiro130 ベクターの発現カセットの構成要素

構成要素	サイズ	由来及び機能
RB	0.3 kb	由来；アグロバクテリウム、リゾビウム科に属する細菌。多くの双子葉植物に感染し、癌腫病を起こす。 機能； T-DNA right border (RB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を開始させる
35SP-ADH5'	0.9 kb	以下の2つの配列を結合したもの 35S プロモーター (35SP) 由来；カリフラワーモザイクウイルス、カリモウイルス科に属する植物ウイルス。主にアブラナ科植物に感染し、モザイク症を起こす。 機能；35S RNA のプロモーター領域。下流の遺伝子を強力に発現させる。 アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 5'非翻訳領域 (ADH5') 由来；シロイヌナズナ、アブラナ科の一年草。世界に広く分布し、モデル植物としても使用されている。 機能；アルコールデヒドロゲナーゼ 5'非翻訳領域に存在する。下流の遺伝子の翻訳効率を増強する。
プラチナ TALEN (TALE-Fok I)	2.9 kb	以下の2つの配列を結合したもの TALE 構造遺伝子の DNA 結合ドメイン 由来； <i>Xanthomonas</i> 、キサントモナス科で、グラム陰性の極鞭毛を持ち運動性を有する非芽胞形成偏性好気性桿菌。黒腐病や萎凋などの植物の病原菌として知られる。 機能； Transcription activator-like effector (TALE) タンパク質の DNA 結合ドメインをもとに設計した配列特異的 DNA 結合タンパク Fok I 構造遺伝子の DNA 切断ドメイン

		<p>由来； <i>Flavobacterium</i>、フラボバクテリウム科で、グラム陰性の非運動性または運動性の桿菌である。多様な土壌及び淡水環境で発見される。</p> <p>機能； IIS 型制限酵素 Fok I の C 末端にある非特異的 DNA 切断ドメイン。二量体となると DNA 二本鎖切断活性を発揮する。</p>
HSP-T	0.3 kb	<p>由来；シロイヌナズナ（前出）</p> <p>機能； <i>heat shock protein 18.2</i> 遺伝子（HSP）のターミネーター配列。転写を終結させる。</p>
iptP	0.7 kb	<p>由来；アグロバクテリウム（前出）</p> <p>機能； <i>isopentenyltransferase (ipt)</i> 遺伝子のプロモーター配列。下流の遺伝子を発現させる。</p> <p>（全長の遺伝子のプロモーター部分）</p>
ipt	0.7 kb	<p>由来；アグロバクテリウム（前出）</p> <p>機能；前出の <i>ipt</i> 構造遺伝子。植物ホルモンであるサイトカイニンの合成に関与し、一過的に働くことで植物組織から再分化個体を発生させる再分化促進遺伝子である。本カセットを導入した遺伝子組換えジャガイモはカルス形成を誘導し異常な形態になることから、導入遺伝子が残存していないことの確認にも利用した。</p> <p>（全長の遺伝子の構造遺伝子部分）</p>
ipt-T	0.4 kb	<p>由来；アグロバクテリウム（前出）</p> <p>機能；前出の <i>ipt</i> 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。</p> <p>（全長の遺伝子のターミネーター部分）</p>
LB	0.2 kb	<p>由来；アグロバクテリウム（前出）</p> <p>機能； T-DNA left border (LB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を終結させる。</p>
Short Intergenic Region (SIR)	0.2 kb	<p>由来；ジェミニウイルス、植物に感染する一本鎖の環状 DNA をゲノムとして持つ。</p> <p>機能； SIR：短い遺伝子間領域、ウイルスの複製に関与していると推定される；</p>
Replication-associated protein	1.1 kb	<p>Replication-associated protein：ウイルスの複製に関わるタンパク質；</p> <p>LIR：長い遺伝子間領域、ウイルスの複製に関与していると推定される。</p>
Long Intergenic region (LIR)	0.4 kb	<p>今回のゲノム編集ではゲノム編集ツールである TALEN の一過的発現を強化するために用いた。ジェミニウイルスの複製は観察されなかった。</p>

NOST	0.3 kb	由来；アグロバクテリウム（前出） 機能； <i>nopaline synthase</i> 遺伝子（ <i>NOS</i> ）のターミネーター配列。転写を終結させる。
NPTII	0.8 kb	由来；大腸菌 機能；植物においてカナマイシンへの耐性を付与する。
p19	0.5 kb	由来；Tomato bushy stunt virus (TBSV) 機能；植物内の RNA サイレンシングを抑制させる。
NOSP	0.2 kb	由来；アグロバクテリウム（前出） 機能； <i>nopaline synthase</i> 遺伝子（ <i>NOS</i> ）のプロモーター配列。転写を終結させる。

(2) 構成要素の機能

表 1 に示した発現カセットの働きにより、プラチナ TALEN がアグロバクテリウム感染組織で一過的に発現し、標的配列の切断（ゲノム編集）を行う。また、*ipt* 遺伝子がコードするイソペンテニルトランスフェラーゼによってサイトカイニンがアグロバクテリウム感染組織で一過的に適量合成されることでホルモンがない培地上で植物体の再分化を誘導する。一方、*ipt* 遺伝子がゲノムに組込まれた場合は *ipt* 遺伝子が構成的に発現することにより過剰量のサイトカイニンが合成されることで、カルス形成・奇形化を誘導し、組換え植物体の再分化を阻害する。ジェミニウイルス SIR、Replication-associated protein、LIR はウイルスの複製に関与していると推定されており、T-DNA が導入された植物細胞内でプラチナ TALEN の一過的な発現の強化に寄与することが期待される。

(3) プラチナ TALEN システムについて

TALEN は植物病原菌である *Xanthomonas* が感染時に植物細胞内に分泌する TALE タンパク質の DNA 結合ドメインを改変し、IIS 型制限酵素 FokI の DNA 切断ドメインと融合することで、標的配列を特異的に切断できるようしたゲノム編集酵素である。プラチナ TALEN はこれを高活性化したものである。プラチナ TALEN システムを利用した標的ゲノム編集は、

① 2 分子のエンドヌクレアーゼ（TALE-FokI（TALE（DNA 結合ドメイン）と FokI（DNA 切断ドメイン）を結合したもの）で構成される。これらのエンドヌクレアーゼは、2 量体を構成し、DNA の二本鎖切断を誘発する。そのため、DNA の結合領域（各 15 – 18 塩基）は 2 量体を形成するエンドヌクレアーゼ標的領域を跨ぎ 15 – 16 塩基離れた逆方向でデザインする。結合配列が 30 – 36 塩基であることから、精度の高い二本鎖切断を誘発することが可能となっている。

② 二本鎖切断は、その後、非相同性末端結合と相同組換え型修復という、ほぼ全ての生物種に存在する

2 種の修復機能のいずれかによって修復を受ける。

本ゲノム編集ジャガイモは、このプラチナ TALEN システムを利用し、標的配列として *SSR2* 遺伝子（後述）の FAD/FMN 含有デヒドロゲナーゼの活性に必須の配列部分（15 塩基）の両側の逆方向を DNA の結合領域（各 17 塩基）としてデザインした（図 1）。この変異誘発による欠失で、アミノ酸の欠落や、トリプレッドコドンの読み枠がずれることによりストップコドンを生じ、*SSR2* 遺伝子が破壊される。*SSR2* 遺伝子を TALEN で破壊したジャガイモを作出・評価したこと（Sawai, Ohyama et al. 2014, Plant Cell 26:3763-3774）、さらにプラチナ TALEN で効果的に同遺伝子を破壊したこと（Yasumoto et al. 2019, Plant Biotechnol. 36:167-173）、アグロバクテリウムを使った一過的発現によるゲノム編集（Yasumoto et al. 2020, Plant Biotechnol. 37:205-211）が報告されている。

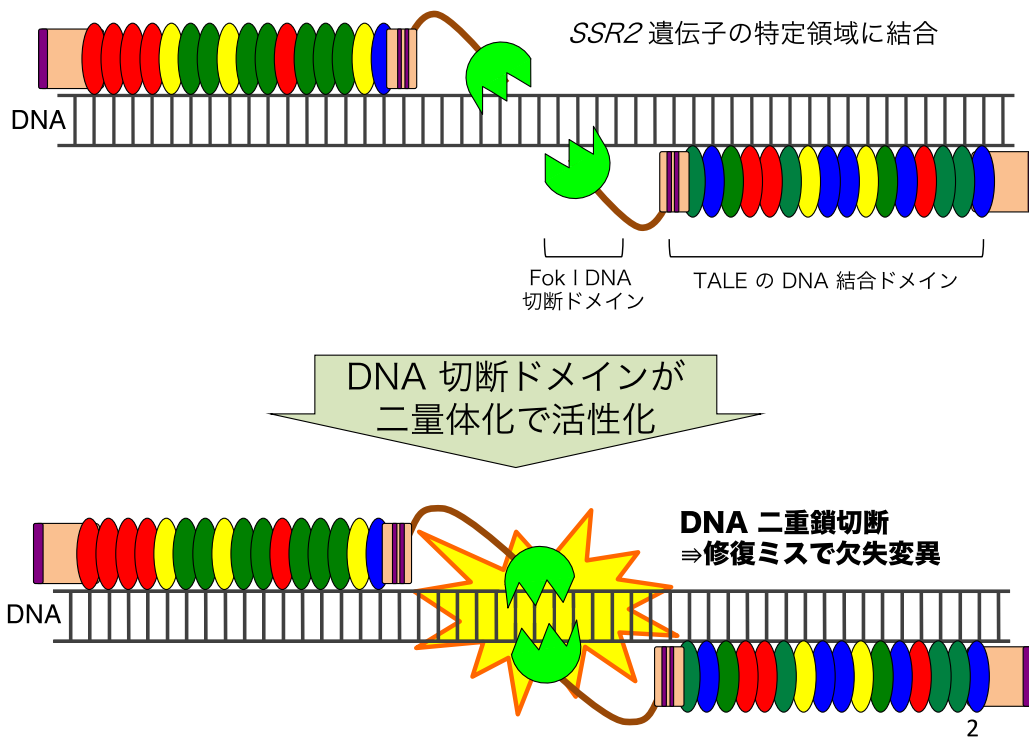


図 1 プラチナ TALEN システムによる *SSR2* 遺伝子の切断

2 つの TALE 配列が、2 量体で活性化する FokI エンドヌクレアーゼを適切な標的配列へと動員し二本鎖切断が作られる。二本鎖切断はその後、誤りを生じがちな非相同性末端結合経路または鋳型依存性の相同組換え型修復により修復される。

(4) *SSR2* 遺伝子について

Sterol sidechain reductase 2 (SSR2) 遺伝子が生成するタンパク質はステロイドの側鎖の 24-25 位の二

重結合を還元する活性を持つ。本酵素はコレステロール合成酵素とも呼称される。SGA は初発化合物 (starting material) であるコレステロールから生合成されることから、本酵素は、ジャガイモの毒性物質ソラニンやチャコニンであるステロイドグリコアルカロイド(SGA) 生合成の鍵酵素であることが示されている (図2)。我々は、遺伝子発現抑制とゲノム編集による遺伝子破壊による作成されたジャガイモを用いて、*SSR2* 遺伝子の機能を報告している (Sawai et al 上述)。多くの植物はコレステロールをほとんど合成しないがナス科植物は全ステロールの約 10% をコレステロールとして含有する。その原因が *SSR2* 遺伝子の存在である。*SSR2* の酵素の活性が失われるとコレステロールの生成量が減少し、その結果、SGA の含有量が減少する。澤井らの論文 (Sawai et al 上述) では、人工ヌクレアーゼ遺伝子を含んだ遺伝子組換え体であるが、ゲノム編集によって *SSR2* 遺伝子破壊ジャガイモについて詳細な解析を行い報告している。ゲノム編集による遺伝子破壊により作成されたジャガイモは、試験管内培養及び特定網室での土壌栽培で収穫した塊茎とも SGA が大きく減少した。特定網室での土壌栽培では形態の違い、塊茎収量に大きな違い、開花状況の違いについては観察されていないことが報告されている。植物ステロールや植物ホルモンを生産するために生育に必須である *DWF1/SSR1* 遺伝子が植物には共通に存在する。この遺伝子によって産生されるタンパク質は 24-28 位の二重結合を還元する酵素である。しかし、この酵素は 24-25 位の二重結合を還元する活性も若干持つため、*SSR2* 遺伝子のみの破壊では SGA を完全に無くすことはできず、遺伝子破壊前の 10% 以下の SGA 量は残存することが報告されている。

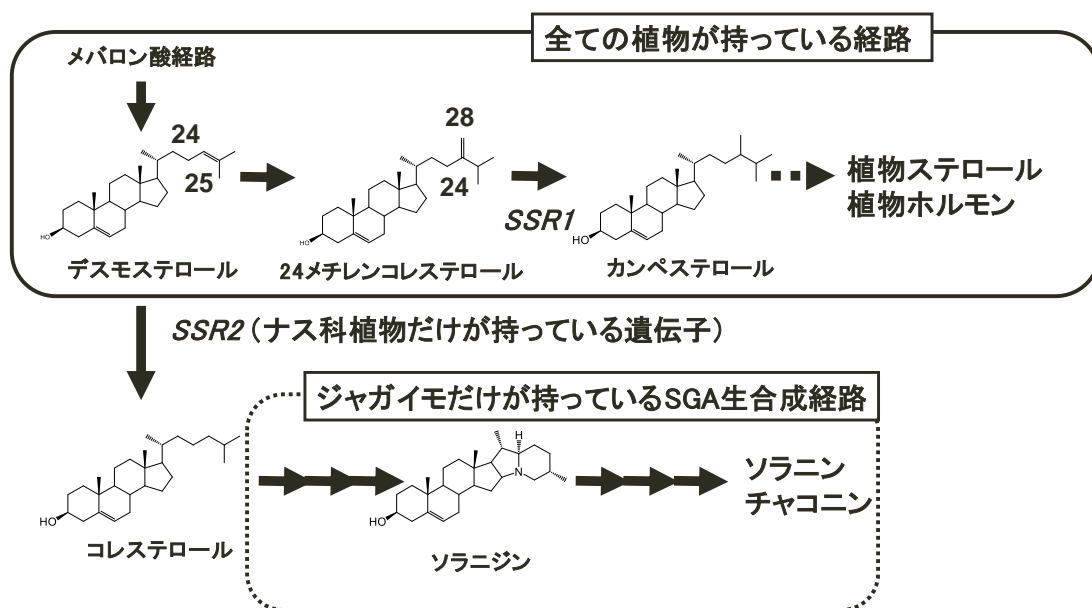


図2 SGA 生合成経路と *SSR2* 遺伝子産物の機能 生合成系の遺伝子の発現抑制や機能破壊をした場合には、その反応基質が蓄積することが多い。しかし、*SSR2* 遺伝子の抑制や破壊の場合は、基質はそのまま植物ステロール合成に使われるため、新規の蓄積産物は見られていない。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

pSuehiro121, pSuehiro123, pSuehiro130 (由来の詳細は、次項に記載)

(2) 特性

ベクターの基となったバックボーン領域の由来は pBIN19 プラスミドである。pSuehiro121、pSuehiro123、及び、pSuehiro130 は、この pBIN19 の T-DNA 領域を除いた部分を、新たな T-DNA 領域で置換し作成したバイナリーベクターである。pBIN19 は、DNA 複製開始点 RK2 ori 配列を持つ 2 本鎖環状 DNA であり、微生物においてカナマイシン耐性を発現する。ベクターを有するアグロバクテリウムの感染により、基本的には右側境界配列(RB)と左側境界配列(LB) に挟まれた領域の DNA (T-DNA 領域) が宿主植物細胞に移入される。T-DNA 領域外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入され染色体ゲノムに組込まれた核酸は、交配によってのみ次世代に遺伝する。

3. ゲノム編集生物の調製方法

(1) ジャガイモ細胞内に移入された核酸全体の構成

バイナリーベクターの構成要素は表 1 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は図 3 に示した。

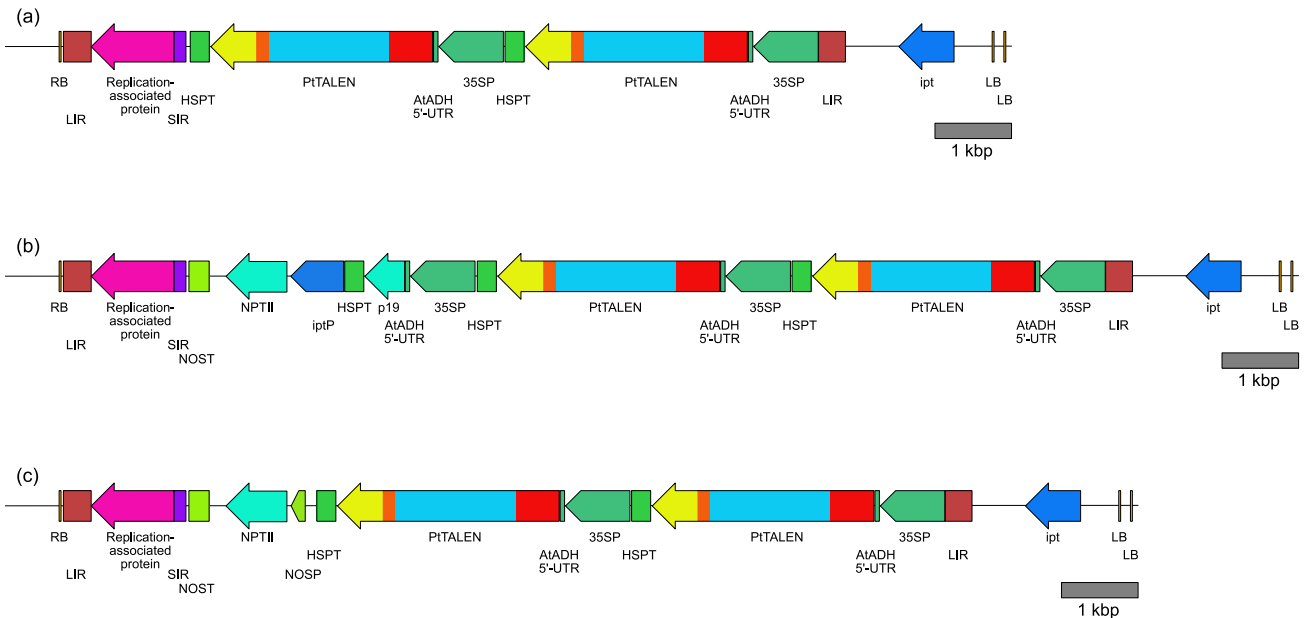


図 3. プラスミド DNA の T-DNA 領域のマップ

(a) pSuehiro121、(b) pSuehiro123、(c) pSuehiro130 の T-DNA 領域のマップを示す。

(2) 宿主内への核酸の移入方法

アグロバクテリウムによる一過的発現法によった。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) は植物の染色体に目的遺伝子配列を導入し、遺伝子組換え植物の作製の際に頻繁に用いられる (磯原、鎌田 1991, 化学と生物 29:659-665)。一方、アグロバクテリウムの感染により、植物の染色体への配列導入を伴わない、一過的な目的タンパク質の発現を行うことができることも知られている (Kapila J. et al 1997, Plant Sci. 122:101-108)。このアグロバクテリウムによる一過的発現法は、タバコの葉で効率よく行うことができることがよく知られている。遺伝子組換え体を取得することが困難な植物を含む多種の植物で行うことができるとされ、ジャガイモでも報告されている (Bhaskar PB. et al. 2009, PLoS ONE, 4:e5812)。両報告とも右側境界配列(RB)と左側境界配列(LB) に挟まれた領域の DNA(T-DNA 領域)が宿主植物の細胞に移入され、T-DNA 領域の発現カセットが転写されることでタンパク質の一過的発現が起きる。再分化促進遺伝子を用いたアグロバクテリウムによる一過的発現法でのゲノム編集は出願特許に報告されている (梅基直行, 齊藤和季, 特願 2017-226643)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

宿主はジャガイモ品種「メークイン」の無菌苗を用いた。プラスミドを保持したアグロバクテリウムを、節を含まない茎に感染させ、植物ホルモンを含まない 3% 蔗糖を含む MS 培地で、再分化してきたシュートを得た。*ipt* 遺伝子がゲノムに組込まれた個体はカルス化など奇形を生じることから、正常な形態を示すシュートを選抜することで一過的発現個体を選んだ。シュートより DNA を抽出し標的領域を含む部位を PCR で増幅した後、ヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA: Heteroduplex Mobility Assay) によりゲノム編集された個体を選抜した。ゲノム編集された *SSR2* の遺伝子変異は、標的領域を含む部位を PCR で増幅した後、大腸菌にクローニングして塩基配列を確認した。細胞外で加工した核酸の残存がないことは、後述するように、*k*-mer 法および PCR 法により確認を行った。

(4) アグロバクテリウムの除去

継代の際にアグロバクテリウムを除菌できるカルベニシリンを含む培地で一か月以上培養することで、アグロバクテリウムを除菌した。アグロバクテリウム残存試験として、LB 液体培地に無菌培養の茎と葉切片を入れ、3 日間 28°C で培養し、アグロバクテリウムの増殖の有無を検証した。アグロバクテリウムの増殖はなく (図 4)、3 つのゲノム編集系統はアグロバクテリウムが除去されていることが確認できた。

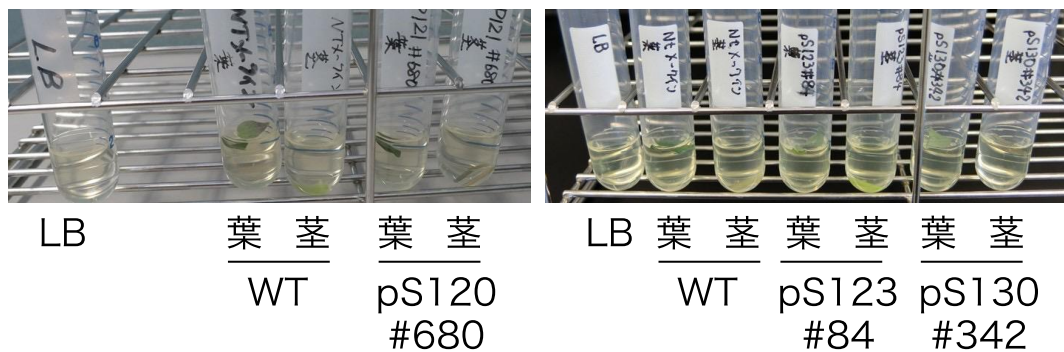


図 4. アグロバクテリウム残存試験結果

無菌培養苗から切り出した葉、茎を LB 培地へ加え、28°C 3 日間培養後の様子を示す。WT; 野生型、pS120#680; pSuehiro120-#680、pS123#84; pSuehiro123-#84、pS130#342; pSuehiro130-#342 の結果を示す。

4. 細胞外で加工した核酸の残存の有無について

(1) k -mer 法

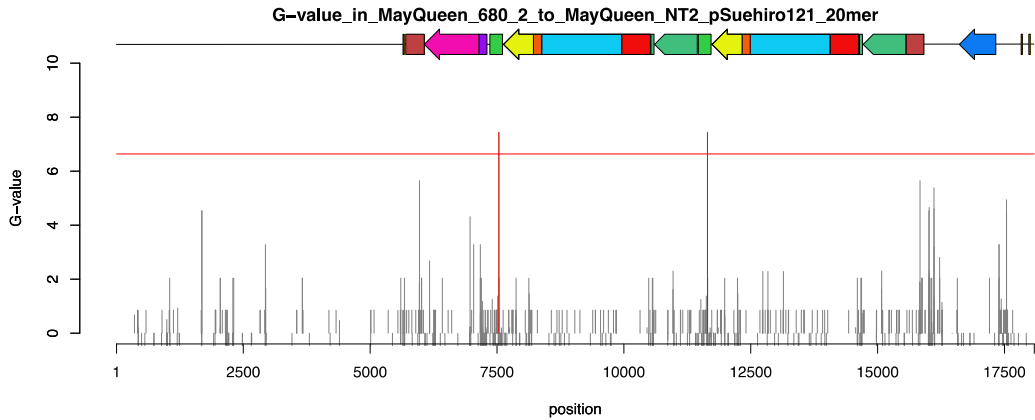
ゲノム編集個体の全ゲノムから取得した大量の塩基配列データを、ゲノム編集に使用したベクター配列と比較照合することで、ゲノム編集個体中の外来遺伝子を高精度に検出することが可能である (Itoh et al., Sci. Rep. 10, 4914)。本手法では、野生型、ゲノム編集系統それぞれについて次世代シーケンス (NGS) データを取得し、野生型、ゲノム編集系統それぞれの NGS データ中に見いだされる長さ k のベクターの全断片配列の数をカウント、野生型とゲノム編集系統間のカウント数について有意水準 1% の G -検定を実施し、ベクター断片配列の残存性の評価を実施する。先行研究におけるシミュレーションではゲノムサイズの $\times 30$ カバレッジのデータを取得することで、20-nt の挿入を 20-mer 解析によって 100% 検出することに成功するとされている。ジャガイモにおいても同様のシミュレーション解析により、 $\times 30$ カバレッジのデータを取得することで、20-nt の挿入を 20-mer 解析によって 100% 検出可能であることが示されている。また、形質転換ジャガイモ中の 150 bp 程度の外来遺伝子の検出に成功している (安本ら 第 39 回日本植物バイオテクノロジー学会 (堺) 大会)。

ゲノム編集前のメーカーイン、ゲノム編集後の pSuehiro121 #680、pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 無菌培養苗からゲノム DNA を抽出し、NovaSeq 6000 により NGS データを取得した。メーカーイン、#680、#84、#342 それぞれについて約 109 Gbp, 122 Gbp、117 Gbp、118 Gbp のデータを取得した。これは、それぞれ約 $\times 32.3$ 、 $\times 36.1$ 、 $\times 34.7$ 、 $\times 35.0$ のカバレッジである。Github (<https://github.com/taitoh1970/kmer>) に寄託されている k -mer 解析プログラムを使用し、 $k=20$ で解析を行った。

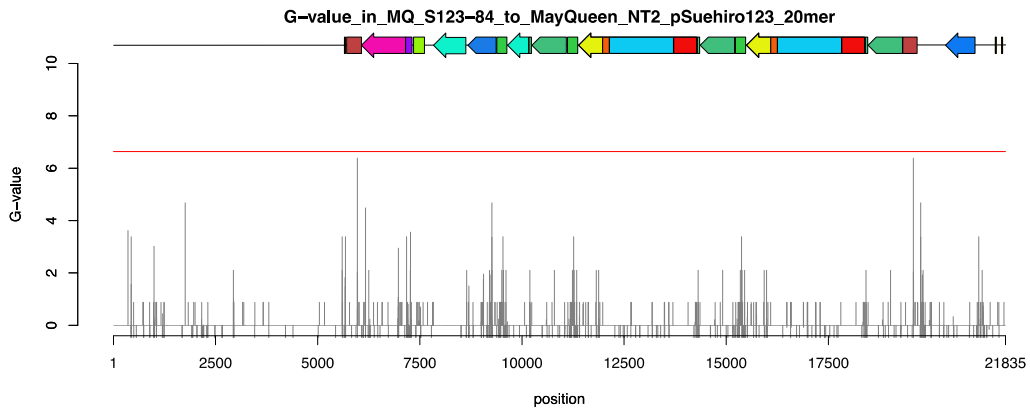
pSuehiro121 #680 では、pSuehiro121 ベクター上の 2 箇所において、 G 検定で p 値 1%水準のピークが検出された (図 5 (a))。pSuehiro123 #84 においては、pSuehiro123 ベクター上に p 値 1%水準のピークは検出されなかった(図 5 (b))。pSuehiro130 #342 については、pSuehiro130 ベクター上の 3 箇所において、 p 値 1%水準のピークが検出された (図 5 (c))。 k -mer 解析において p 値 1%水準のピークとして検出された配列情報を表 1、表 2 にまとめた。解析で p 値 1%水準のピークとして検出された配列はゲノム編集系統だけでなく、野生型の NGS データからも検出されており、多重比較検定によって生じた偽陽性であり、ベクター配列がゲノム上に挿入されて検出されたものではないと考えられる。

以上の解析により、ゲノム編集系統 pSuehiro121 #680、pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 のゲノムはゲノム編集に使用したベクター上の配列が挿入されておらず、一過的発現でゲノム編集が起きたと判断した。つまり細胞外で加工した核酸の残存は無いと判断した。

(a) pSuehiro121 #680



(b) pSuehiro123 #84



(c) pSuehiro130 #342

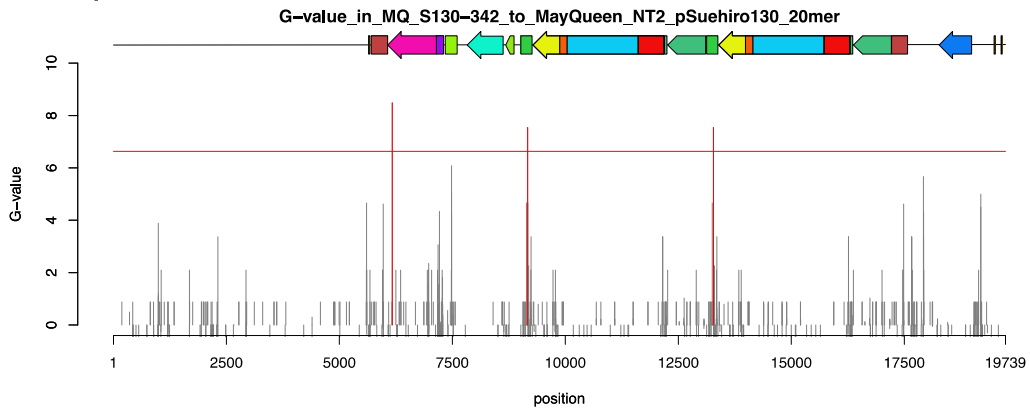


図5. ゲノム編集系統の k -mer 解析結果

(a) pSuehiro121 #680, (b) pSuehiro123 #84, (c) pSuehiro130 #342 の $k=20$ における、ベクター上の位置 (position) に対する G 検定量のプロットを示した。 $G>6.634$ ($p<0.01$) のピークを赤で示した。ベクターマップ (詳細は図3を参照) についても表示した。

表1. k -mer 解析により pSuehiro121 #680 において p 値 1%水準で検出された配列

Position in pSuehiro121	k-mer (20-mer) sequence	Counts		G-value	Note
		#680	NT2		
7537	AAGAAAAAACACAAACTTA	77	41	7.4371	HSP-T
11648	AAGAAAAAACACAAACTTA	77	41	7.4371	HSP-T, 7537 と同じ

表2. *k*-mer 解析により pSuehiro130 #342 において *p* 値 1%水準で検出された配列

Position in pSuehiro130	k-mer (20-mer) sequence	Counts		G-value	Note
		#342	NT2		
6171	TTTTCTTATTTTCTTCCTTG	49	22	8.4889	Replication-associated protein
9167	ACAAATTCATAACACAACAA	90	52	7.5418	HSP-T
13278	ACAAATTCATAACACAACAA	90	52	7.5418	HSP-T, 9167 と同じ

k-mer 解析により検出された配列と、各サンプル（ゲノム編集系統[#680, #342]、野生型[NT2]）における検出数、*G*-検定量、配列に関する情報を示した。

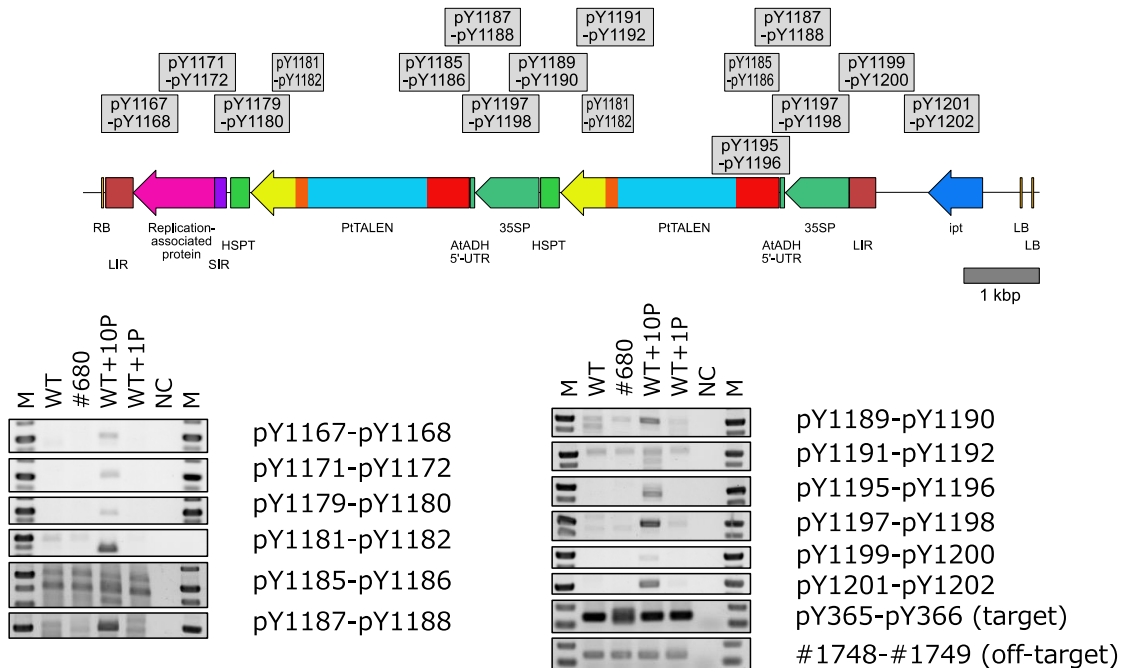
(2) PCR 法

ゲノム編集前のメークイン、ゲノム編集後の無菌培養苗から抽出・精製したゲノム DNA を鋳型とし、PCR により T-DNA 上の配列の増幅を確認することで、外来遺伝子残存の検定を行った。ネガティブコントロールとして野生型メークインから抽出し、20 ng/ μ L に希釈したゲノム DNA、水を使用した。ポジティブコントロールとして、野生型メークインから抽出し、20 ng/ μ L に希釈したゲノム DNA に 1 fg/ μ L あるいは 10 fg/ μ L のゲノム編集に利用したプラスミド DNA を加えた溶液を使用した。サンプルとしてゲノム編集系統 pSuehiro121 #680、pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 から抽出し、20 ng/ μ L に希釈したゲノム DNA を使用した。PCR 酵素として TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用した。プライマーとして、プラスミド T-DNA 領域中の約 1,000 bp の領域を増幅することが期待されるプライマーペアを複数使用した。コントロールとして、ゲノム編集の標的近傍、潜在的なオフターゲット標的配列についても増幅を行った (表3)。全 25 μ L 中の反応液に 5 μ L の鋳型溶液 (サンプル) を加えた条件で 2 step 条件で 35 サイクル反応させた。反応後、5 μ L の反応液、あるいは DNA ラダー溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、GelRed 染色液による染色後、DNA の泳動パターンの撮影を行なった。

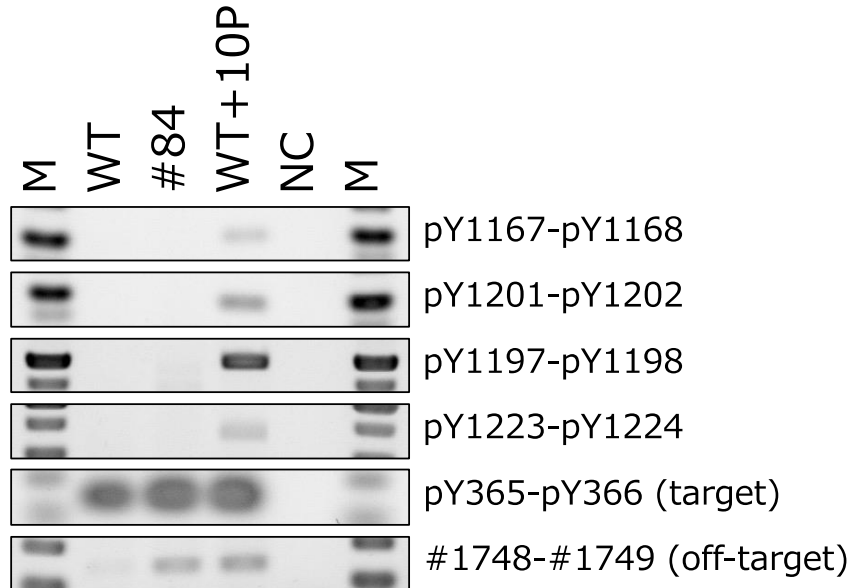
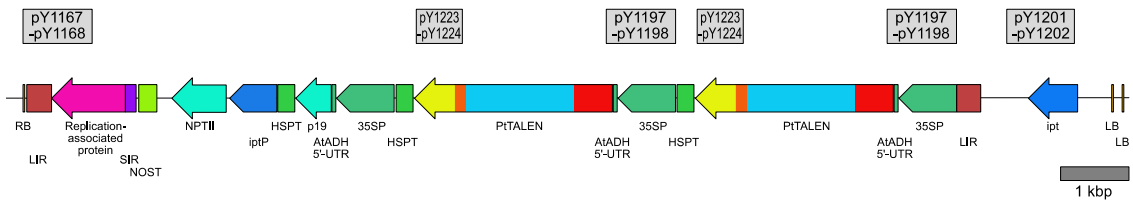
表3. 使用したプライマーの配列

Name	Sequence(5' to 3')	アニーリング配列	増幅サイズ (bp)
pY1167/pSuehiro121-F5654	ATTGACACCCCAATATATCCTGCCA	プラスミド_RB	1,012
pY1168/pSuehiro121-R6665	GCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGG	プラスミド_Replication-associated protein	
pY1171/pSuehiro121-F6418	AAATCTGACGCACGATGGAGAACT	プラスミド_Replication-associated protein	1,012
pY1172/pSuehiro121-R7429	CTTCTGCAGCATATACTACTGTATGTGC	プラスミド_HSPT	
pY1179/pSuehiro121-F7154	GTGCCTCTCCTCATACGAGTTTATCTAAAG	プラスミド_SIR	991
pY1180/pSuehiro121-R8144	TGATTGAAATCGCAAGAAATTCAACTCAGG	プラスミド_TALEN (Fok I)	
pY1181/pSuehiro121-F7919	TGCATTTTCATCTGCTTGACCAATTGGA	プラスミド_TALEN (Fok I)	678
pY1182/pSuehiro121-R8902	AGGCAAACAGCGCTGGAAACAGTTCAG	プラスミド_TALEN (TALE repeat)	
pY1185/pSuehiro121-F9605	GCTTGTTTGCCTCCGTTGTTGCTTG	プラスミド_TALEN (TALE repeat)	720, 924
pY1186/pSuehiro121-R10528	GGCTTCTCCCCTCCAAAGAAAAGAG	プラスミド_TALEN (TAL-N)	
pY1187/pSuehiro121-F10210	GACGGTCCCTAACGCTGCCGGGTGTTG	プラスミド_TALEN (TAL-N)	1,000
pY1188/pSuehiro121-R11209	CACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGG	プラスミド_35SP	
pY1189/pSuehiro121-F11062	GTCGTAAGAGACTCTGTATGAAGTGTTCG	プラスミド_35SP	1,033
pY1190/pSuehiro121-R12086	ATCGTTGATACTAAGGCATATTCAGGAGG	プラスミド_TALEN (Fok I)	
pY1191/pSuehiro121-F11949	AGATGGATAGACTTTCCACCATTCAATAGG	プラスミド_TALEN (Fok I)	1,018
pY1192/pSuehiro121-R12966	TGTGCTGTGCCAAGCCCACGGCCTGACC	プラスミド_TALEN (TALE repeat)	
pY1195/pSuehiro121-F13745	CTTGGCTGGGGTCAAGCCGCTGGGCTT	プラスミド_TALEN (TALE repeat)	1,027
pY1196/pSuehiro121-R14771	CTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGG	プラスミド_35SP	
pY1197/pSuehiro121-F14545	CCACTTGCCTCCTTCCAACCTTTTATCG	プラスミド_TALEN (TAL-N)	1,014
pY1198/pSuehiro121-R15501	GGTCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTCA	プラスミド_35SP	
pY1199/pSuehiro121-F15428	TTGGGAAGGTATTTGATTTCTGGAGA	プラスミド_35SP	995
pY1200/pSuehiro121-R16422	GGGCACCCTTAAGTCAAATAAAGCTGAC	プラスミド_ iptP?	
pY1201/pSuehiro121-F16295	CTGTCCGCAGCAATGATGTAATAACCG	プラスミド_ iptP?	990
pY1202/pSuehiro121-R17284	CACCAAAGGGAATTTCTGTTCCCTGTGC	プラスミド_ ipt	
pY1223/pSuehiro123-F11404	AATTTCTTCTCACTTCCTCAAGTGTC	プラスミド_TALEN (Fok I)	675
pY1224/pSuehiro123-R12078	GGCCGCACTCACTAATGATCATCTTGT	プラスミド_TALEN (TAL-C)	
pY365/1682/check-for	TGTTCTCTGACACTGTTGTAGCACT	ジャガイモゲノム_SSR2	348
pY366/1683/check-rev	TCGAAGCATACATACCGGTCATCAT	ジャガイモゲノム_SSR2	
1748/StdWF1_C-Forward	TGTTCTCAGACACTGTTGTGTCATA	ジャガイモゲノム_SSR1	348
1749/StdWF1_C-Reverse	TTGAAGCATATCTACCAGTCATGCA	ジャガイモゲノム_SSR1	

(a) pSuehiro121 #680



(b) pSuehiro123 #84



(c) pSuehiro130 #342

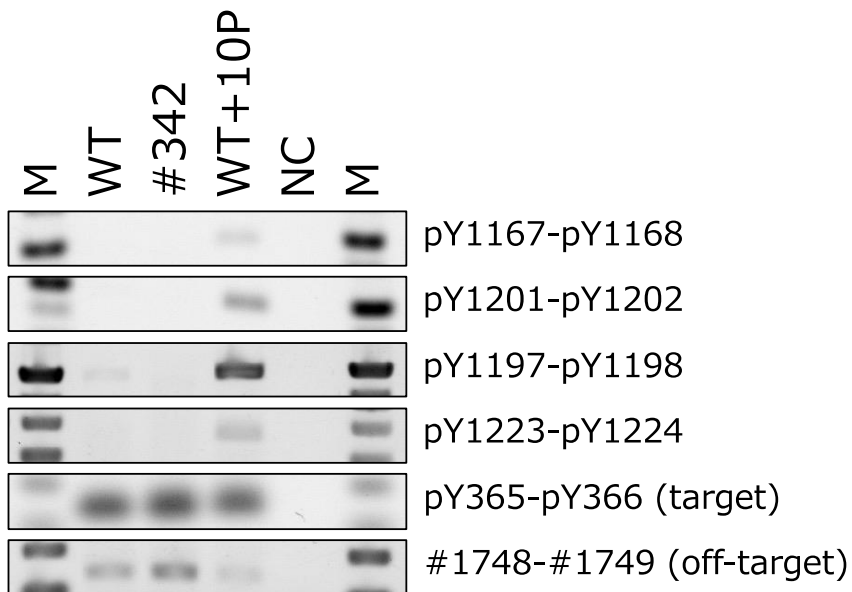
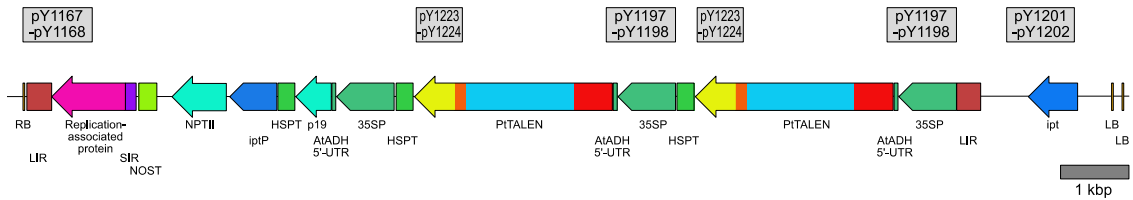


図6. ゲノム編集系統の PCR 解析結果

(a) pSuehiro121 #680, (b) pSuehiro123 #84, (c) pSuehiro130 #342 について、T-DNA 上の配列を増幅した際の電気泳動結果を示した。ベクターマップ上のグレー長方形が PCR により増幅される DNA 断片長と場所を示す。ベクター上の複数部位の増幅が予想される場合は、想定される主要な増幅部位 2 箇所を示した。M; ExcelBand 1KB (0.25-10 kb) DNA Ladder, WT; 野生型メークイン gDNA (20 ng/ μ L), #680; pSuehiro121 #680 gDNA (20 ng/ μ L), WT+10P; 野生型メークイン gDNA (20 ng/ μ L)+プラスミド DNA (10 fg/ μ L), NC; water

ジャガイモのゲノムサイズは約 844 Mbp であり (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011)、四倍体の栽培ジャガイモのゲノムサイズは約 3,376 Mbp であると予想される。PCR 反応液 25 μ L 中に加えられるゲノム DNA 100 ng は約 27,000 細胞分のゲノム DNA であると予想される。同様にプラスミド DNA は約 18 kbp (pSuehiro121)、約 22 kbp (pSuehiro123)、約 20 kbp (pSuehiro130) のサイズであり、25 μ L 中に加えられる 50 fg には約 2,500 (pSuehiro121)、約 2,100 (pSuehiro123)、約 2,300 (pSuehiro130) 分子のプラスミドが含まれると予想される。

野生型ゲノム DNA にプラスミド DNA を 10 fg/ μ L 添加したサンプルでは理論的に予想される DNA サイズとほぼ一致する特異的な増幅が見られた。また、ゲノム編集の標的配列や潜在的オフターゲット配列の近傍については PCR による増幅が確認されたことから、使用したサンプルに含まれるゲノム DNA の質と量は PCR 反応に必要な水準であったと考えられる。一部の PCR 反応では野生型、ゲノム編集系統において、非特異的な増幅が見られたが (例えば、#680 の pY1185-pY1186、pY1189-pY1190 等)、ゲノム編集系統のみで確認された DNA バンドは検出されなかった (図6)。

以上の解析により、MayQueen pSuehiro121 #680、pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 のゲノムはゲノム編集に使用したプラスミドベクター DNA 上の T-DNA 配列が挿入されておらず、一過的発現でゲノム編集が起きたと判断した。つまり細胞外で加工した核酸の残存は無いと判断した。

5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) 導入された遺伝子変異

TALEN 標的近傍を PCR により増幅し、クローニングベクターに導入後、無作為に選択したクローンの配列の確認を行なった。下記の配列結果が得られ、標的 *SSR2* 遺伝子への変異導入が確認された (図 7)。ゲノム編集系統 pSuehiro121 #680、pSuehiro130 #342 ではそれぞれ確認した 14、16 クローンにおいて、ゲノム編集前の配列 (intact) は見られなかったことから、標的の *SSR2* 遺伝子が完全に破壊されていることが確認された。pSuehiro121 #680 では 3 種類の配列のみが確認されているが、これは、*SSR2* の 4 アリルのうち、1 アリルにおいてゲノム編集によって大きな欠失 (プライマーのアニーリングサイト) が起こったか、検出された 3 種の配列のうち、1 種の変異配列が 2 アリルに導入されたためと推測される。ゲノム編集系統 pSuehiro123 #84 においては、変異配列に加えて、intact の配列も検出されたことから、*SSR2* 遺伝子の完全な遺伝子機能欠損体ではないと推測される。

(a)pSuehiro121 #680		(b)pSuehiro123 #84	
tGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA		tGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----GCTTATACCAGTTGATCAATA	#3 7 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#3 intact
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----GCTTATACCAGTTGATCAATA	#8 7 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#5 intact
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----GCTTATACCAGTTGATCAATA	#11 7 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#6 intact
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----GCTTATACCAGTTGATCAATA	#12 7 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#7 intact
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAA-----CCAGTTGATCAATA	#5 11 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#9 intact
TGGGG-----	#1 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#11 intact
TGGGG-----	#2 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#13 intact
TGGGG-----	#6 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#15 intact
TGGGG-----	#7 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#16 intact
TGGGG-----	#9 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#2 1 bp del
TGGGG-----	#10 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#8 1 bp del
TGGGG-----	#13 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#14 1 bp del
TGGGG-----	#14 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#1 3 bp del
TGGGG-----	#16 46 bp del	TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#4 3 bp del
		TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#10 3 bp del
		TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#12 3 bp del
(c)pSuehiro130 #342			
tGGGGCTTCTTGTTTCAGCTGAAATCAAGCTTATACCAGTTGATCAATA			
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG--AT-----TTATACCAGTTGATCAATA	#10 7 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG--AT-----TTATACCAGTTGATCAATA	#16 7 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#1 8 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#4 8 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#8 8 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#5 11 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#11 11 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#12 11 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----TTATACCAGTTGATCAATA	#14 11 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#2 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#3 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#6 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#7 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#9 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#13 13 bp del		
TGGGGCTTCTTGTTTCAGCTG-----AAGCTTATACCAGTTGATCAATA	#15 13 bp del		

図 7. ゲノム編集系統における標的配列

(a) pSuehiro121 #680、(b) pSuehiro123 #84、(c) pSuehiro130 #342 における *SSR2* 遺伝子中の TALEN 標的配列近傍の DNA 塩基配列を示す。各アライメントの上段はゲノム編集前の配列を示し、水色マーカ一の部分が TALEN の結合標的配列を示す。

(2) 導入された遺伝子変異により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

SSR2 遺伝子が生成するタンパク質はステロイドの側鎖の 24-25 位の二重結合を還元する活性を持つ。本酵素によりコレステロールが生成される。ゲノム編集によって SSR2 の酵素活性が失われるとコレステロールの生成量が減少し、その結果、SGA の含有量が減少すると予測される。ゲノム編集系統 pSuehiro121 #680 について、P1P での人工照明下での土壌栽培で収穫した塊茎の表皮近傍から抽出した SGA の定量を行った (図 8)。その結果、pSuehiro121#680 は SGA 含有量の大きな減少が観察できた。pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 については、SGA 含量の測定を行っていない。これまでに作出した SSR2 ゲノム編集ジャガイモ系統の解析から、当該 SSR2 遺伝子の部位が完全に破壊され、無傷の配列が確認できなかった場合には、SGA の減少が一致して観察されている。そのためゲノム編集されていない SSR2 を保持する pSuehiro123 #84 については、SGA が顕著に減少しない、SSR2 遺伝子が完全に破壊された pSuehiro130 #342 では SGA の大幅な減少が予想される。SGA 含量については、本検証で実施する。

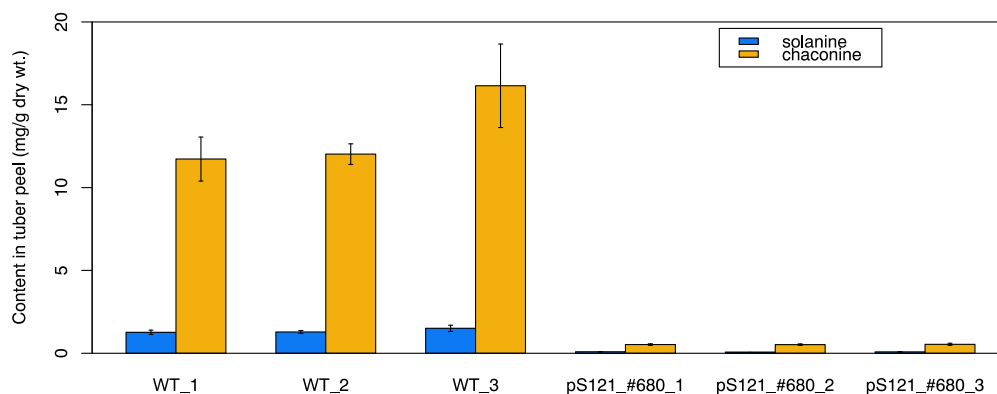


図 8. pSuehiro121#680 中のステロイドグリコアルカロイド量

野生型メークイン (WT) とゲノム編集系統 (pS121_#680) における塊茎表皮中の α -ソラニン (solanine)、 α -チャコニン (chaconine) の含量 (mg/g-乾燥重量)。3つの異なる塊茎のデータを示す。平均 \pm SE (n=3, technical replicates) を示す。

(3) その他の生理学的又は生態学的特性について、宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

ゲノム編集前メークインと比較して、P1P での人工照明下での土壌栽培で、ゲノム編集系統 pSuehiro121 #680 の塊茎収量について、特筆すべき差異は観察されていない (図 9)。pSuehiro123 #84、pSuehiro130 #342 についての塊茎収量やその他の生理学的・生態学的な特性については、本検証で実施する。

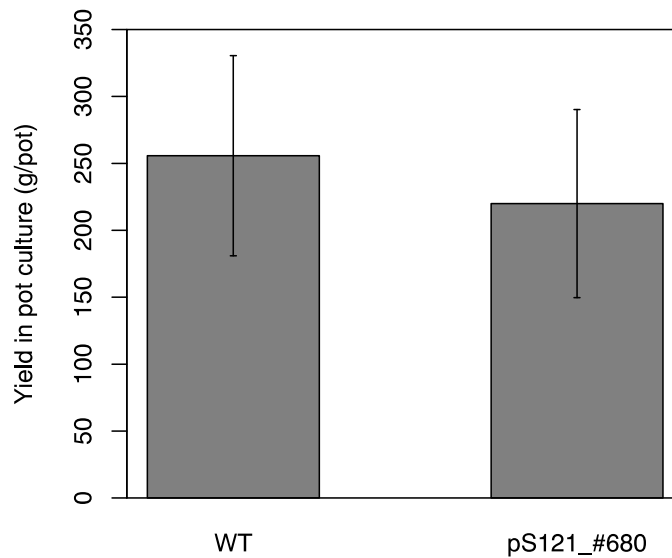


図9. 人工照明下での栽培における pSuehiro121#680 中の塊茎収量

野生型メークイン (WT) とゲノム編集系統 (pS121_#680) におけるポット栽培時の塊茎収量を示す。3つのポットの平均±SE (n=3) を示す。

ジャガイモは TALEN 標的遺伝子である *SSR2* のパラログ遺伝子として、*SSR1* と呼ばれる高い相同性を持つ一次代謝酵素遺伝子を持つ (図10(a))。 *SSR1* 遺伝子中の潜在的な TALEN オフターゲット配列近傍を PCR により増幅し、ダイレクトシーケンス解析に供した。ゲノム編集系統では、*SSR2* 標的配列の近傍ではゲノム編集による欠失のため、波形の重なりが確認されるが、*SSR1* 配列では標的配列の様な波形の重なりは確認されず、この領域での変異は観察されなかった (図10(b))。

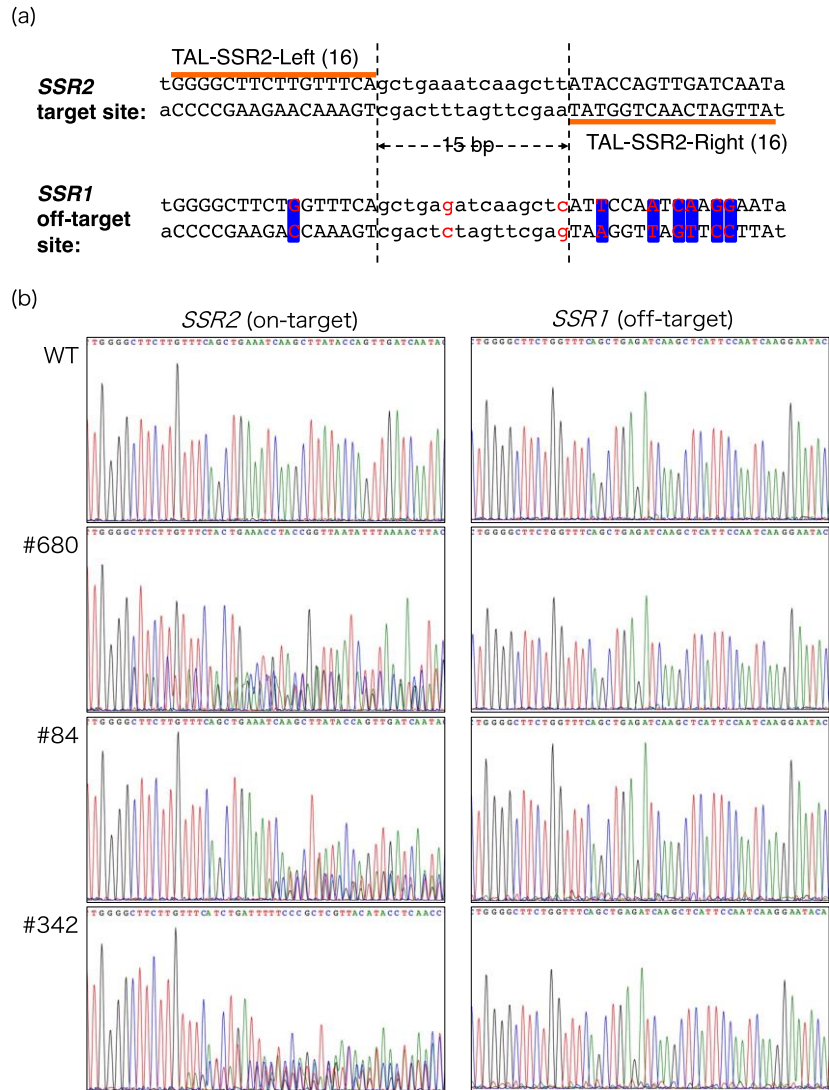


図10. ゲノム編集系统中的オフターゲット配列の解析

(a) *SSR2* 遺伝子上の TALEN 標的配列と、*SSR1* 遺伝子上の潜在的なオフターゲット配列の比較。TALEN の標的配列をオレンジ色の直線で示した。*SSR1* 遺伝子上の潜在的なオフターゲット配列中のミスマッチ配列を赤字/青マーカーで示した。(b) *SSR2* (標的配列)、*SSR1* (潜在的オフターゲット配列) についてのダイレクトシーケンス結果。