

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7月7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
提出者 総長 藤井 輝夫
住所 東京都文京区本郷 7-3-1
電話番号 03-3812-2111

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	イネ開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・糖&澱粉代謝遺伝子(<i>Ghd7</i> , <i>phyB</i> , <i>se5</i> , <i>Hd1</i> , <i>Hd2</i> , <i>Hd3a*</i> , <i>Hd16</i> , <i>Hd17</i> , <i>RFT1*</i> , <i>Ehd1</i> , <i>OsGI</i> , <i>OsLUX</i> , <i>OsELF3-2</i> , <i>GWD1</i> , <i>AGPL3</i> , <i>OsAGPL1</i>)をゲノム編集したイネ個体群	
開放系における使用等の内容	イネ品種コシヒカリの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・糖&澱粉代謝遺伝子、 <i>Ghd7</i> (<i>Grain number and heading date7</i>), <i>phyB</i> (<i>phytochrome B</i>), <i>se5</i> (<i>Photosensitivity 5</i>), <i>Hd1</i> (<i>Heading date1</i>), <i>Hd2</i> (<i>Heading date2</i>), <i>Hd3a*</i> (<i>Heading date3a</i>), <i>Hd16</i> (<i>Heading date16</i>), <i>Hd17</i> (<i>Heading date17</i>), <i>RFT1*</i> (<i>Rice FT</i>), <i>Ehd1</i> (<i>Early heading date 1</i>), <i>OsGI</i> (<i>Os GIGANTEA</i>), <i>OsLUX</i> , <i>OsELF3-2</i> (<i>Os Early Flowering 3 -2</i>), <i>GWD1</i> (<i>Glucan Water Dikinase1</i>), <i>AGPL3</i> (<i>AGP Large subunit 3</i>), <i>OsAGPL1</i> (<i>AGP Large subunit 1</i>) をゲノム編集したイネ変異体群やその交配後代個体を栽培し、導入した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野外栽培条件で比較精査する。*で示した <i>Hd3a</i> と <i>RFT1</i> の変異は、令和3年6月29日に文部科学省に提出した実験計画報告書にある変異と同一。今回は、その <i>Hd3a</i> & <i>RFT1</i> の変異系統に、 <i>GWD1</i> , <i>AGPL3</i> , <i>OsAGPL1</i> の変異を新規に追加導入した系統が含まれる。	
使用等をする場所	名称	東京大学 弥生キャンパス 実験圃場 実験温室 詳細は別紙1参照(使用等をする場所等)
	所在地	東京都 文京区 弥生 1-1-1
宿主の名称	イネ rice <i>Oryza sativa</i> L. (品種 コシヒカリ) (<i>Hd3a2-7-10-2</i> 系統、令和3年6月29日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載)	

<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。 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。 3) 開花期は、品種ごとに遺伝的に決定。 4) 葯開裂後の花粉の寿命は数分間。 5) 開花日が重ならないと品種・系統間で自然交雑はしない。 6) 栽培品種と交雑可能な野生イネは日本に自生しない。 7) ほとんどの野生イネの系統は日本では晩秋に開花し低温のため結実しない。 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。 9) 20m離れた個体との交雑率が、0.01%以下。 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。 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。 12)冬期の気温によるが、ほぼ越冬しない。 詳細は別紙2（変異を導入した宿主種に関する情報）を参照。</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 導入方法：a. 人工ヌクレアーゼそのものを宿主の細胞内に移入</p>
<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>	<p>変異導入方法：イネ種子由来のカルスからプロトプラストを調製し、市販の Cas9 タンパク質と依頼合成した sgRNA を事前に混合した人工ヌクレアーゼ溶液を混ぜ、PEG (polyethylene glycol) 存在下で静置し、人工ヌクレアーゼをプロトプラスト内に導入した。PEG を洗浄後、プロトプラストをアガロースに包埋し、液体培養を行った。約2週間の培養後、カルス再分化培地に移し、植物体を再分化させた。 この際、プロトプラスト内で、導入された Cas 9 酵素によりゲノム編集が起こり、ある頻度で変異が導入される。ゲノム編集領域を PCR で増幅し、PRIMA 法でゲノム編集個体を選抜後、PCR 断片のシーケンスで変異の有無を確認した。 除去方法：無し 残存の有無の確認方法：変異の導入法から、外来の核酸の移入は起きないと考えられるが、念のため、解析対象の再生個体から調製したゲノム DNA を用い、PCR 法で、sgRNA の cDNA 化と付随するゲノム挿入がおきていないことを確認した。その結果、sgRNA の cDNA 化・ゲ</p>

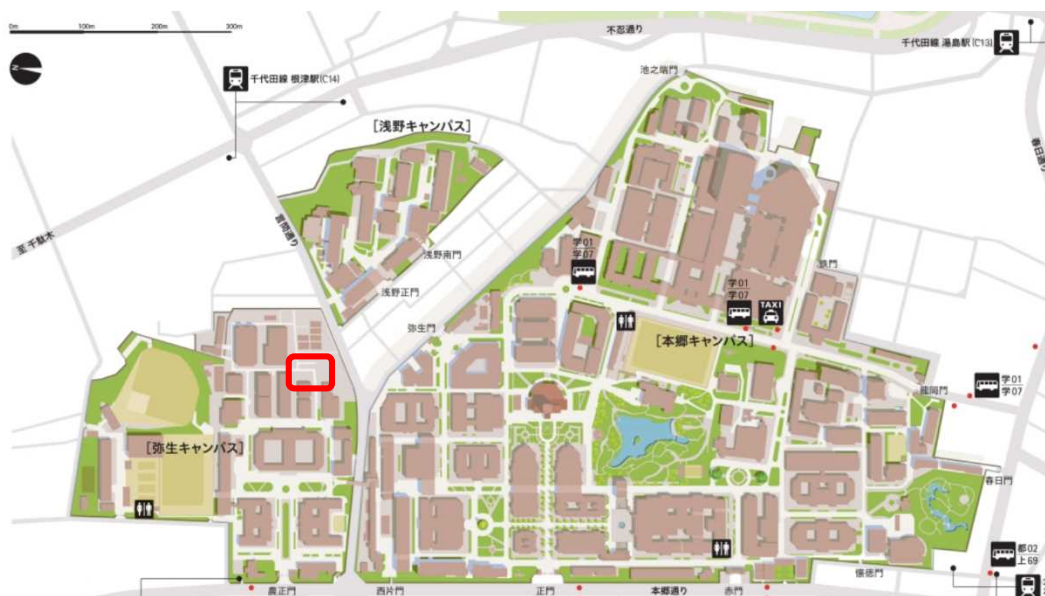
		ノム挿入は認められなかった。別紙 3 を参照。
改変した 遺伝子等	名称	イネ品種コシヒカリの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子である、 <i>Ghd7</i> , <i>phyB</i> , <i>se5</i> , <i>Hd1</i> , <i>Hd2</i> , <i>Hd3a</i> , <i>Hd16</i> , <i>Hd17</i> , <i>RFT1</i> , <i>Ehd1</i> , <i>OsGI</i> , <i>OsLUX</i> , <i>OsELF3-2</i> , <i>GWD1</i> , <i>AGPL3</i> , <i>OsAGPL1</i> 遺伝子
	機能	<p><i>Ghd7</i>: 長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。</p> <p><i>phyB</i>: 赤色光・近赤外光受容体・気温センサー遺伝子 長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。</p> <p><i>se5</i>: フィトクロム光受容体の発色団の合成酵素 変異体は早生で光周性がなくなる。</p> <p><i>Hd1</i>: 長日条件で開花期を遅らせ、短日条件で開花期を早める。</p> <p><i>Hd2</i>: 概日時計構成因子で、かつ、長日条件で開花期を遅らせる。</p> <p><i>Hd3a</i>: 花芽形成ホルモン遺伝子 主として、短日条件下の葉で mRNA が発現する。遺伝子産物は茎の先端に移動し、作用し、花芽形成を促進する。</p> <p><i>Hd16</i>: タンパク質リン酸化酵素の一種。かつ、長日条件で開花期を遅らせる。</p> <p><i>Hd17</i>: 概日時計構成因子で、かつ、長日条件で開花期を遅らせる。</p> <p><i>RFT1</i>: <i>Hd3a</i> と非常に似た花芽形成ホルモン遺伝子 茎の先端で作用し、花芽形成を促進する。<i>Hd3a</i> との二重変異体は花が咲かないイネになるとの論文あり。</p> <p><i>Ehd1</i>: 短日条件で開花期を早める。</p> <p><i>OsGI</i>: 概日時計構成因子で、かつ、短日条件で開花期を早める。</p> <p><i>OsLUX</i>: 概日時計構成因子。機能欠損で、花が咲かなくなるとの報告あり。</p> <p><i>OsELF3-2</i>: 概日時計構成因子。単独変異の明確な表現型は報告されていない。<i>Hd17</i> との二重変異体で、花が咲かなくなるとの報告あり。</p> <p><i>GWD1</i>: 葉での澱粉の分解を行う。機能欠損で澱粉蓄積。</p> <p><i>AGPL3</i>: 葉鞘での糖代謝酵素。機能欠損で糖蓄積。</p> <p><i>OsAGPL1</i>: 葉身での糖代謝酵素。機能欠損で糖蓄積。</p>
	予想される 機能の変化	これらの遺伝子の機能が変化することで、出穂期（開花期）の変化、結果として収穫期の変化、葉での糖・澱粉代謝の変化、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	当該改変により生じた変化	イネ品種コシヒカリの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・糖・澱粉代謝遺伝子、 <i>Ghd7</i> , <i>phyB</i> , <i>se5</i> , <i>Hd1</i> , <i>Hd2</i> , <i>Hd3a</i> *, <i>Hd16</i> ,

変化		<p><i>Hd17, RFT1*, Ehd1, OsGI, OsLUX, OsELF3-2, GWD1, AGPL3, OsAGPL1</i> のコード領域の機能欠損変異。</p> <p>詳細は別紙 3 を参照。</p>
	上記以外に生じた変化	<p>再生当代での可視的な形態等の変化なし。</p> <p>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 予測を行ったが、Off-target 候補配列に、高い変異導入スコアを持つものはなく、また、予測遺伝子の推定機能から判断しても、生物多様性に影響を与える変異とは考えられなかった。詳細は別紙 3 を参照。</p>
生物多様性影響が生ずる可能性についての考察		<p>競合における優位性：イネ品種コシヒカリの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子、<i>Ghd7, phyB, se5, Hd1, Hd2, Hd3a*, Hd16, Hd17, RFT1*, Ehd1, OsGI, OsLUX, OsELF3-2, GWD1, AGPL3, OsAGPL1</i> の、全ての遺伝子が、突然変異体の原因遺伝子か品種間差としての自然変異が既に論文報告されている。これらの論文の記述から、これらの遺伝子の変異によって、現存する野生イネを超えて、自然界でのこれらイネ系統の競合性が高まることは考えにくいことから、生物多様性に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、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、開花期決定・概日時計因子遺伝子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>交雑性：開花期決定・概日時計因子遺伝子・糖澱粉代謝遺伝子の変異によって、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</p>

	<p>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>
<p>その他</p>	<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：東京大学遺伝子組換え生物等専門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5月15日</p> <p>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。</p> <p>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。</p>

使用等をする場所 等

1) 使用等をする場所



使用予定の場所を東大キャンパ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、並びに、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)を使用予定。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。実験圃場からの距離 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、当該実験圃場は、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。詳細は末尾に添付の図を参照

4) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

実験圃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) 実験圃場周辺の生物相

（1）イネを実験圃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存在しない。

（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存在しない。

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、インド東北部のアッサム地方、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 1 万 5 千年から 1 万年前に栽培化されたと考えられている。水田稲作文化は、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、ガンマ線等による突然変異育種も盛んにおこなわれており、1990 年代には、プロトプラストからの再生個体から、有用な培養変異を利用したプロトプラスト育種も行われており、“ゆめごこち”などの良食味品種が育成されている。これら、突然変異育種は、人工交配育種と同様、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。

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 億トンを超える。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 °C、登熟が停止する最低気温は 15 °C 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、700万トン前後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、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 10 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 °C、通常の栽培可能温度は 20 °C以上で、

開花結実には 22 °Cを必要とする。逆に 34 °C以上では高温障害が発生する。水稻は湛水

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：°C）

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处理、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。

(工) 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

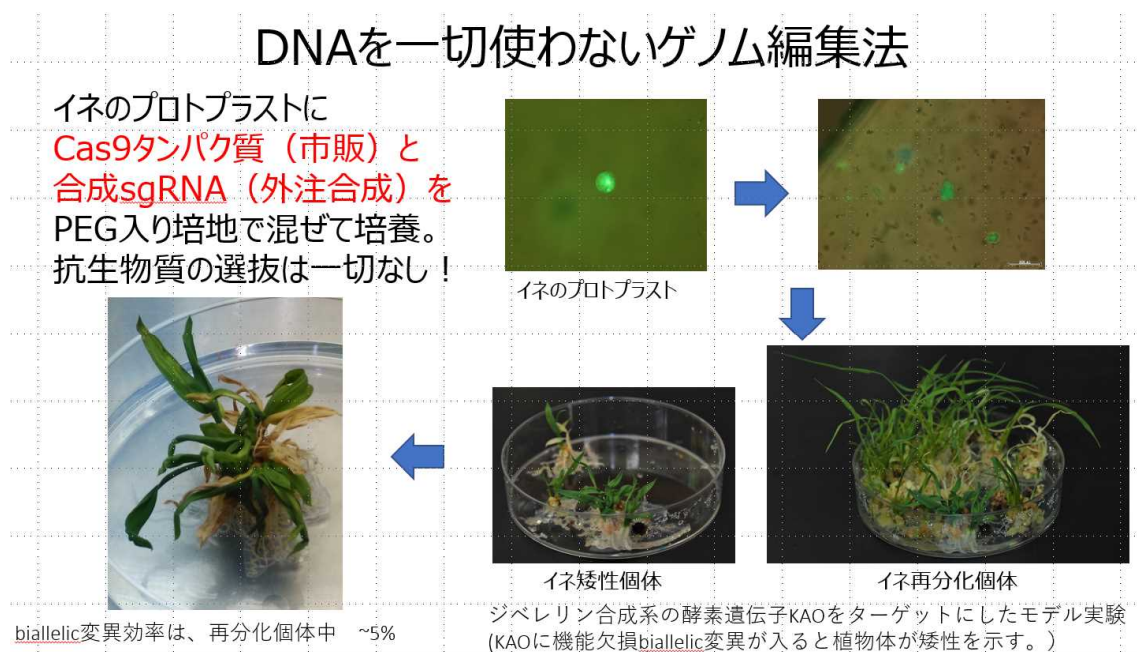
障害不稔が発生すると玄米の蛋白質含量が高くなる。

ゲノム編集実験と sgRNA の非移入確認実験等の報告

【今回用いたゲノム編集技術について】

今回、以下の Woo et al. (2015)を参照して、独自に、イネプロトプラストを利用した DNA-free の CRISPR/Cas9 を使ったゲノム編集による変異導入法を開発した。

Woo JW et al. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol. 33(11):1162-1164.



この方法では、Cas9 遺伝子を用いず、使用する核酸も 100bp 長の sgRNA だけなので、得られた植物体が遺伝子組換え体になる可能性はほとんどないと考えられる。そのため、対象遺伝子に導入された変異の確認と、Off target 変異の環境への影響の考察、および、起きる可能性は非常に低いが、sgRNA の cDNA 化 & イネゲノムへの挿入の有無の確認で、実験計画書として必要な情報を網羅できると考えられる。

【変異を導入したイネ系統】

- 1) コシヒカリ：日本のイネ主要品種
- 2) Hd3a2-7-10-2 系統：令和3年6月29日に文科省に提出した実験計画報告書に記載のゲノム編集で、フロリゲン遺伝子 Hd3a と RFT1 に機能欠失変異を導入した個体の自殖後代、一度コシヒカリと戻し交配をしているが、二重変異は花がさかず種子が得られないので、ヘテロ個体に着いた種子を実験に用いた。

【DNA free のゲノム編集技術による変異導入法の詳細】

本実験計画書で野外栽培予定のゲノム編集変異体は、上記の DNA free の系でのゲノム編集によるものである。その詳細を以下に記述する。

まず、イネ種子を滅菌後、カルス誘導培地の上で約1カ月静置し、カルスを誘導した。

今回のプロトプラストの調製では、各実験ごとに、約50個の無菌化した種子をプレート培

地上に置いた。

カルス誘導開始から約一か月後、誘導したカルスをあつめ、セルラーゼ酵素液に数時間つけて、酵素作用によるプロトプラストの遊離を起こしたあと、無菌操作下で、ナイロンメッシュで、プロトプラストを濾過してカルス残渣を除き、その後、遠心機を使って、プロトプラストを沈殿・再懸濁を繰り返すことで、酵素液を洗い落とし、イネプロトプラストを調製した。遠心後のプロトプラストの沈殿の量で簡易的に定量し、毎回等量になるように調整して、実験を行った。事前に、市販の Cas9 タンパク質（ニッポンジーン社製）とファスマック社に依頼合成した 1~3 種類の sgRNA（コシヒカリを使った実験： 実験 1 *Ghd7 phyB*; 実験 2 *Ghd7 Hd16*; 実験 3 *Ghd7 Hd1 Ehd1*; 実験 7 *OsLUX OsGI Hd2*; 実験 9 *OsGI Ehd1*; 実験 20 *Ghd7 OsELF3-2*; 実験 21 *Ghd7 OsELF3-2 Hd17* Hd3a2-7-10-2 系統を使った実験：実験 11 *phyB*; 実験 12 *GWD1*; 実験 13 *AGPL3*; 実験 14 *OsAGPL1*; 実験 15 *se5* の sgRNA) を混合した人工ヌクレアーゼ溶液を調製しておき、それぞれを分注したプロトプラスト液に加えた。その上で、プロトプラスト液と等量の PEG 液を混合し、プロトプラスト内へ人工ヌクレアーゼの取り込みを行った。約 40 分間の静置後、遠心で PEG を除いた後、プロトプラストを、低温融解したアガロース入りの培養液に包埋し、アガロースビーズを作成し、液体培養を開始した。約 2 週間の培養後、一細胞だったプロトプラストが液体培養を経て分裂を繰り返し増殖したカルスを目視で確

認しながら、再分化培地プレート上に個別にうつした。その後、2週間を目安に、再分化培地上で継代し、緑化を確認後、約1カ月の発根培地での培養を経て、イネ再生植物体を得た。得られた再生植物体を拡散防止措置が取られた環境下で通常ポット栽培し、各個体からゲノムDNAを調製し、ゲノム編集の有無の確認を行った。

今回は、まずは、PRIMA法(Kakui et al. 2021)を利用して、MultiNA電気泳動装置で、変異の導入を推定し、得られた候補からのPCR増幅物をシーケンス解析に回し、波形データを個別に解析して、変異の導入を確認した。

Kakui H, Yamazaki M, Shimizu KK. (2021) PRIMA: a rapid and cost-effective genotyping method to detect single-nucleotide differences using probe-induced heteroduplexes. Sci Rep. 2021 Oct 24;11(1):20741

その結果、

実験1では、*Ghd7*と*phyB*のうち、*phyB*変異体を3個体

実験2では、*Ghd7*と*Hd16*のうち、二重変異体を1個体

実験3では、*Ghd7*と*Hd1*と*Ehd1*のうち、*Ehd1*変異体を2個体、*Hd1*と*Ehd1*の二重変異体を2個体（うち、一個体は自殖後代で変異を確認） 自殖後代を合わせ、解析個体は

7 個体 (3-8-6,3-8-7,-3-8-11,3-8-15 は、3-8 の単独個体の自殖後代)

実験 7 では、*OsLUX* と *OsGI* と *Hd2* のうち、*OsGI* 変異体を 2 個体、*Hd2* 変異体を 1 個体

実験 9 では、*OsGI* と *Ehd1* のうち、*OsGI* 変異体を 1 個体と二重変異体を 1 個体

実験 20 では、*Ghd7* と *OsELF3-2* のうち、*OsELF3-2* 変異体を 2 個体と二重変異体を 3 個体

実験 21 では、*Ghd7* と *OsELF3-2* と *Hd17* のうち *OsELF3-2* 変異体が 2 個体、*OsELF3-2* と *Hd17* の二重変異体が 3 個体

(以下、Hd3a2-7-10-2 系統に変異を導入)

実験 11 では、*phyB* 変異体を 4 個体

実験 12 では、*GWD1* 変異体を 5 個体

実験 13 では、*AGPL3* 変異体を 2 個体

実験 14 では *OsAGPL1* 変異体を 4 個体

実験 15 では *se5* 変異体を 1 個体

合計 42 系統の突然変異体を同定した (表 1)。

このリストからは、相同性の確認できない DNA 断片が挿入した変異体やシーケンス解析で変異が明確でないものを除いている。

以下の表 1 では、ガイド RNA に該当する箇所を緑色で、シーケンス解析で明らかになっ

た変異を赤字で表記。実験3の3-8個体は当代個体が枯死したため、自殖種子で変異の有無を確認した。それ以外は、再生当代を2023年5月の時点では維持している。変異を同定した時点で、ヘテロ変異とバイアレリック変異がある。これらの変異のシーケンス波形データは、別紙4を参照。

最終的に、ゲノム編集が確認できた上記の合計42個体のイネ再生個体・自殖後代の種子を得、その自殖・交配後代を含め、野外栽培による形質調査を計画している。

表1 実験番号・個体番号・変異情報等

以下、コシヒカリに変異を導入

実験番号	変異導入系統	個体名・系統名 (実験番号-R0番号) (実験番号-R0番号-R1番号)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験1 変異確認再生個体 80個体			Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	phyB ガイドRNA GGAACCTGTACACCATAACG
実験1	コシヒカリ	1-6	なし	ヘテロ ttatgaccgcttatggttacaggtccatgagg→ ttatgaccgct*****caggtccatgagg 9bp抜け
実験1	コシヒカリ	1-8	なし	ヘテロ ttatgaccgcttatggttacaggtccatgagg→ ttatgaccgct*****acaggtccatgagg tatggtgがcに
実験1	コシヒカリ	1-12	なし	ヘテロ ttatgaccgcttatggttacaggtccatgagg→ ttatgaccgct*****gtacaggtccatgagg 5bp抜け
実験2 変異確認再生個体 80個体			Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	Hd16 ガイドRNA TGAAGTATTGCTAGAAAGG
実験2	コシヒカリ	2-25	バイアレリック atgatgcatccccgagcgccgagcagcaacggcg→ atgatg*****ggcgccgagcaacggcg 6bp抜け atgatcat*****ggcgccgagcagcaacggcg c入り3bp抜け	ヘテロ ttgctgaaaggcggtacc→ ttgctgaa*ggcggtacc 1bp抜け

実験番号	変異導入系統	個体名・系統名 (実験番号・R0番号) (実験番号・R0番号・R1番号)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験3 変異確認再生個体 65個体			Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	Hd1 ガイドRNA GAGCGTGGTACTGCCCGG	Ehd1 ガイドRNA AGGTCAGCCTGGACTTTCCG
実験3	コシヒカリ	3-8-6	なし	なし	ホE ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt 5bp挿け
実験3	コシヒカリ	3-8-7	なし	ホE gccgcg-ggcgccggagcgggtagctgcgcgggagcggcg→ gccgcgcaccccaacctagc*****gaccaacccccc 9bp挿け	なし
実験3	コシヒカリ	3-8-11	なし	ホE gccgcg-ggcgccggagcgggtagctgcgcgggagcggcg→ gccgcgcaccccaacctagc*****gaccaacccccc 9bp挿け	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt 5bp挿け
実験3	コシヒカリ	3-8-15	なし	ヘF0 gccgcg-ggcgccggagcgggtagctgcgcgggagcggcg→ gccgcgcaccccaacctagc*****gaccaacccccc 9bp挿け	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt 5bp挿け
実験3	コシヒカリ	3-16	なし	なし	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt t入り
実験3	コシヒカリ	3-31	なし	なし	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt ttt/a(変異)
実験3	コシヒカリ	3-39	なし	バイアリック gccgcg-ggcgccggagcgggtagctgcgcgggagcggcg→ gccgcgcaccccaacctagc*****gaccaacccccc 4bp挿け gccgcgcaccccaacctagc*****gaccaacccccc 1bp挿け	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaoccttcccaactctctatgt 5bp挿け
実験7 変異確認再生個体 70個体			OsLUX ガイドRNA GCTCCCTTCGACGCGAAGCC	OsGI ガイドRNA CTACTCCAAGTGCTACCCAA	Hd2 ガイドRNA ATACATGCAGTGACGAAGCA
実験7	コシヒカリ	7-12	なし	バイアリック aaaaagc:aacctttggtagcacttgagtagcaaa→ aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa g挿け aaaaagc:aacctttg*****cttgaactcaaa 7bp挿け	なし
実験7	コシヒカリ	7-14	なし	バイアリック aaaaagc:aacctttggtagcacttgagtagcaaa→ aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa g挿け aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa g7挿け(a入り)	なし
実験7	コシヒカリ	7-42	なし	なし	ヘF0 aggctcaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ aggctcaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt 19bp挿け
実験9 変異確認再生個体 40個体			OsGI ガイドRNA CTACTCCAAGTGCTACCCAA	Ehd1 ガイドRNA AGGTCAGCCTGGACTTTCCG	
実験9	コシヒカリ	9-6	ヘF0 aaaaagc:aacctttggtagcacttgagtagcaaa→ aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa 1bp 挿け	ヘF0 ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt→ ccaggctcaggctgacttcaggctcgtatgt 5bp挿け	
実験9	コシヒカリ	9-11	ヘF0 aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa→ aaaaagc:aacctttgtagcacttgagtagcaaa t入り	なし	
実験20 変異確認再生個体 72個体			Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	OsELF3-2 ガイドRNA GTGCCGACTGAGAGCAACAA	
実験20	コシヒカリ	20-2	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt t入り	
実験20	コシヒカリ	20-4	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt t入り	
実験20	コシヒカリ	20-17	ヘF0 ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa→ ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa 2bp挿け	バイアリック ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt t入り ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt 3bp挿け	
実験20	コシヒカリ	20-49	ヘF0 ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa→ ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa c 入り	バイアリック ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt a入り ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt 3bp挿け	
実験20	コシヒカリ	20-50	ヘF0 ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa→ ggctgc-cgatgatgatcctccggcggcggcagcaaa t入り	バイアリック ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt c入り ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt a入り3bp挿け	
実験番号	変異導入系統	個体名・系統名 (実験番号・R0番号) (実験番号・R0番号・R1番号)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験21 変異確認再生個体 60個体			Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	OsELF3-2 ガイドRNA GTGCCGACTGAGAGCAACAA	Hd17 ガイドRNA GTTTCCCTCTATGCCTCCTTG
実験21	コシヒカリ	21-5	なし	ホE ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt a入り	バイアリック atgcctccttcgctaaitta→ atgcctccttcgctaaitta 1bp挿け atgcctccttcgctaaitta 4bp挿け
実験21	コシヒカリ	21-10	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt 5bp挿け	なし
実験21	コシヒカリ	21-20	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt 5bp挿け	なし
実験21	コシヒカリ	21-23	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt t入り	ヘF0 atgcctccttcgctaaitta→ atgcctccttcgctaaitta 1bp挿け
実験21	コシヒカリ	21-26	なし	ヘF0 ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt→ ttttgtgc-ggactgagagcaaccaaaggggtgtt a入り	バイアリック atgcctccttcgctaaitta→ atgcctccttcgctaaitta 1bp挿け atgcctccttcgctaaitta 3bp挿け

以下、Hd3a2-7-10-2 系統に変異を導入

実験番号	変異導入系統	個体名・系統名 (実験番号-R0番号) (実験番号-R0番号-R1番号)	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験11 変異確認再生個体 31個体			phyB ガイドRNA GGAACCTGTACACCATAACG
実験11	Hd3a2-7-10-2自殖後代	11-2	バイアレリック accg cg ttatgggtacaggtccatgaggat→ accg cg t•atgggtacaggtccatgaggat 1bp抜け accg cg t•••gtacaggtccatgaggat 6bp抜け
実験11	Hd3a2-7-10-2自殖後代	11-3	ヘテロ accg cg ttatgggtacaggtccatgaggat→ accg cg t•••gggtacaggtccatgaggat 3bp抜け
実験11	Hd3a2-7-10-2自殖後代	11-16	バイアレリック accg cg ttatgggtacaggtccatgaggat→ accg cg t•atgggtacaggtccatgaggat 1bp抜け accg cg t•••••gtacaggtccatgaggat 6bp抜け
実験11	Hd3a2-7-10-2自殖後代	11-25	バイアレリック accg cg ttatgggtacaggtccatgaggat→ accg cg t••••gtgtacaggtccatgaggat 4bp抜け accg cg t• g tggtacaggtccatgaggat ta抜け/g入り
実験12 変異確認再生個体 24個体			GWD1 ガイドRNA CTACCATCCCGAAACCAGA
実験12	Hd3a2-7-10-2自殖後代	12-6	ヘテロ ccc g gaaaccagatggcagcagactg→ ccc g gaaac•agatggcagcagactg 1bp抜け
実験12	Hd3a2-7-10-2自殖後代	12-10	バイアレリック ccc g gaaacc•agatggcagcagactg→ ccc g gaaaccagatggcagcagactg c入り ccc g gaaac••agatggcagcagactg 1bp抜け
実験12	Hd3a2-7-10-2自殖後代	12-19	バイアレリック ccc g gaaaccagatggcagcagactg→ ccc g gaaa•••gatggcagcagactg 3bp抜け ccc g gaaa•aagatggcagcagactg 1bp抜け cがaに
実験12	Hd3a2-7-10-2自殖後代	12-22	バイアレリック ccc g gaaaccagatggcagcagactg→ ccc g gaaac•agatggcagcagactg 1bp抜け ccc g gaaa•••gatggcagcagactg 3bp抜け
実験12	Hd3a2-7-10-2自殖後代	12-23	バイアレリック ccc g gaaaccagatggcagcagactg→ ccc g gaa••••gatggcagcagactg 4bp抜け ccc g g••••gatggcagcagactg 6bp抜け

実験13 変異確認再生個体 12個体			AGPL3 ガイドRNA ATGAGCAACTGCATAAACAG
実験13	Hd3a2-7-10-2自殖後代	13-1	バイアレリック gttgatgccgctg•tttatgcagttgctcat→ gttgatgccgctgatttatgcagttgctcat a入り gttgatgccgctg•t••••••••••tcac 12bp抜け
実験13	Hd3a2-7-10-2自殖後代	13-7	バイアレリック gttgatgccgctg•tttatgcagttgctcat→ gttgatgccgctgttttatgcagttgctcat t入り gttgatgccgctgaatttatgcagttgctcat a入り
実験14 変異確認再生個体 63個体			OsAGPL1 ガイドRNA GCTCATGTAAAGCTCTTGGG
実験14	Hd3a2-7-10-2自殖後代	14-10	ヘテロ attgtgctcatgtaaagctctgggaggattt→ attgtgctcatgtaaagctc•••••aggattt 5bp抜け
実験14	Hd3a2-7-10-2自殖後代	14-28	ヘテロ attgtgctcatgtaaagctctgggaggattt→ attgtgctcatgtaaagctctgggaggattt t入り
実験14	Hd3a2-7-10-2自殖後代	14-40	バイアレリック attgtgctcatgtaaagctctgggaggattt→ attgtgctcatgtaaagc•••••gggaggattt 4bp抜け attgtgctcatgtaaagctc••gggaggattt 2bp抜け
実験14	Hd3a2-7-10-2自殖後代	14-52	ヘテロ attgtgctcatgtaaagctctgggaggattt→ attgtgctcatgtaaagctc•gggaggattt 2bp抜け
実験15 変異確認再生個体 14個体			se5 ガイドRNA TTGCACGGAAGGAAGACGG
実験15	Hd3a2-7-10-2自殖後代	15-14	ヘテロ gccgccgccgc•ctctcctccgtg→ gccgccgccgcctctcctccgtg c入り

【sgRNA の移入がないことの評価実験】

上述の変異導入法から、今回得られた変異体は、遺伝子組換え体でないことは明らかであるが、かなり低い確率であっても、sgRNA がイネ細胞内で、cDNA 化され、その配列がゲノムに取り込まれる可能性を科学的に否定できない。そこで、得られた変異体のゲノム DNA を用いた PCR 法で、sgRNA の DNA 変化とゲノム挿入が起こっていないことを確認する実験を行った。

(株) ファスマックに依頼合成した sgRNA は 100bp 長で、

20bp の各遺伝子特異的ガイド RNA 配列と 80bp の共通 Scaffold RNA 配列からなる。

うち、Scaffold 配列は、

```
guuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgag  
ucggugcuuuu
```

の 80bp である。(この配列自体を IRGSOP1.0 のリファレンスゲノム配列 * に対し、Blast 解析しても、ヒットはない)

* 注釈 IRGSP1.0 のリファレンスゲノム配列とは、国際共同研究としてゲノム解読され、世界標準として利用されている日本イネ品種「日本晴」のゲノム配列を指し、公開されている。

そこで、確認用 PCR プライマー配列

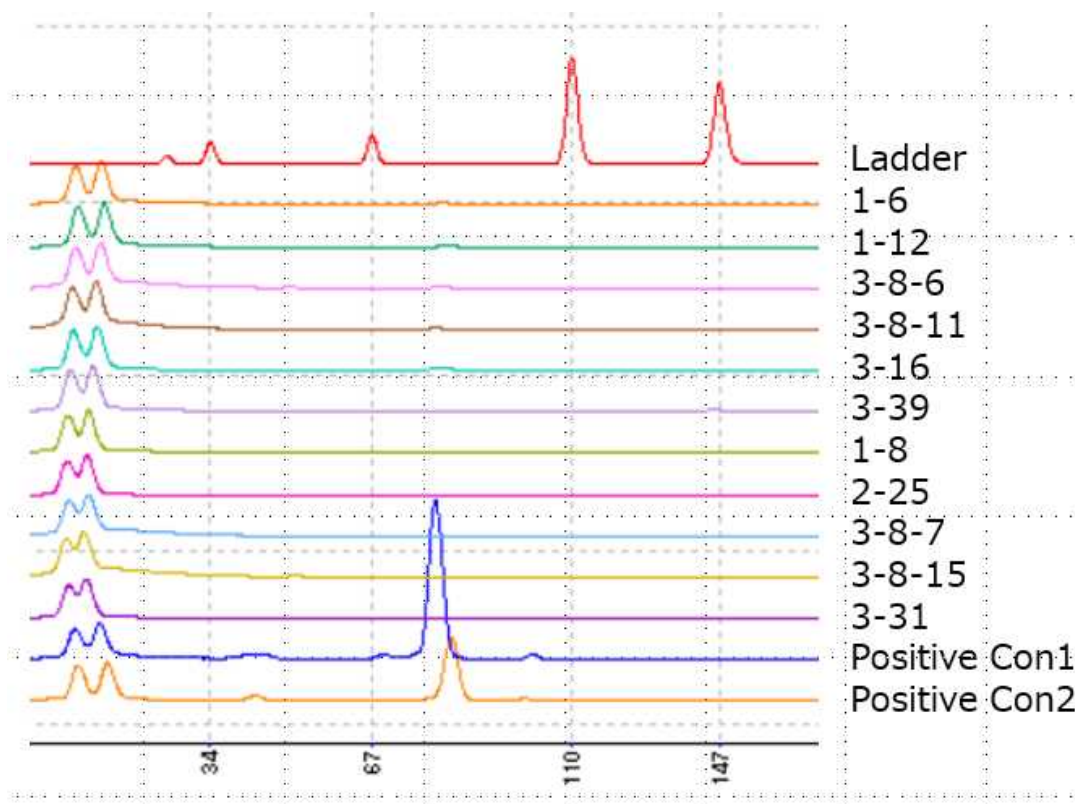
5'-TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'

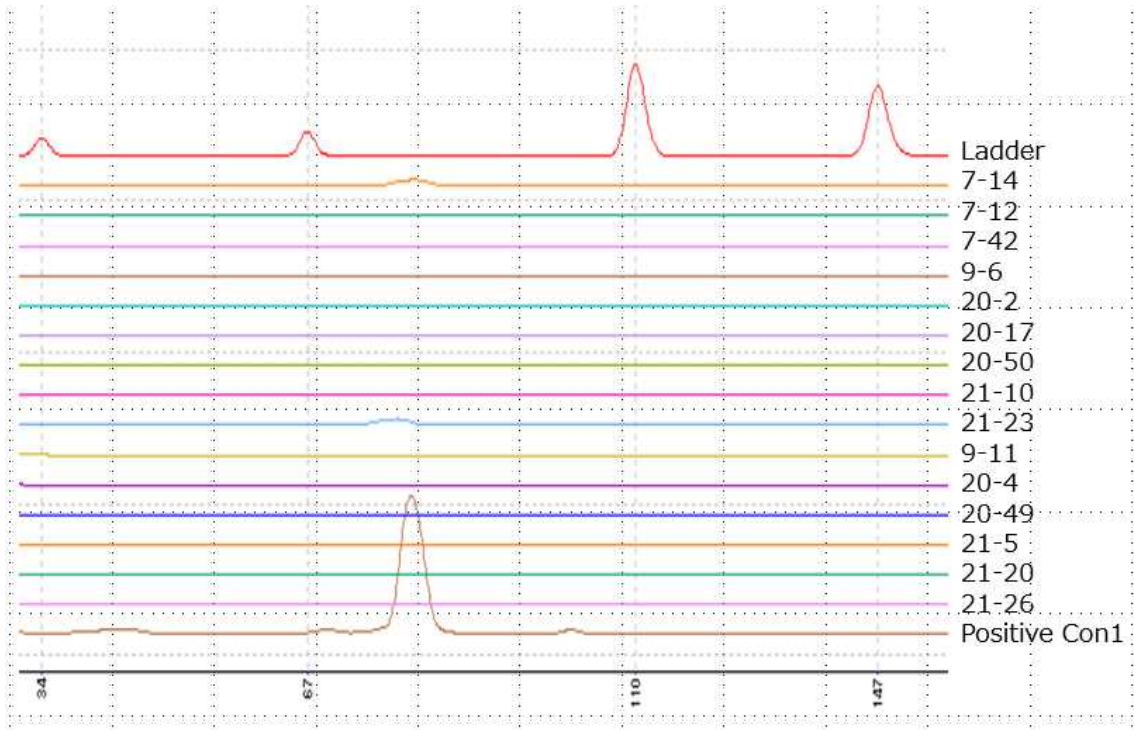
5'-AAAAGCACCGACTCGGTG-3'

を設計し、PCR 増幅を行い、MultiNA 電気泳動装置で確認した。

図1に、PCR解析の産物を MultiNA 電気泳動装置で電気泳動した結果を示す。Cas9 タンパク質と sgRNA そのものではなく、Cas9 タンパク質と sgRNA を発現する DNA プラスミドを用いたゲノム編集を行ったことがあり、そこで得られた再生個体の中で、イネゲノムに sgRNA が導入されたものをポジコン(PositiveCon1, PositiveCon2)として使った。ポジコンの位置に振れがあるのは、MultiNA のサンプルを流したマイクロ流路の違いによるものである。Ladder のピークは、34bp, 67bp, 110bp,147bp を示している。なお、用いた DNA のクオリティは、電気泳動で分解等をしていないことを確認してあるので、PCR に使用して問題ないと考えている。

図1 MultiNA 電気泳動装置による sgRNA 非挿入の確認実験





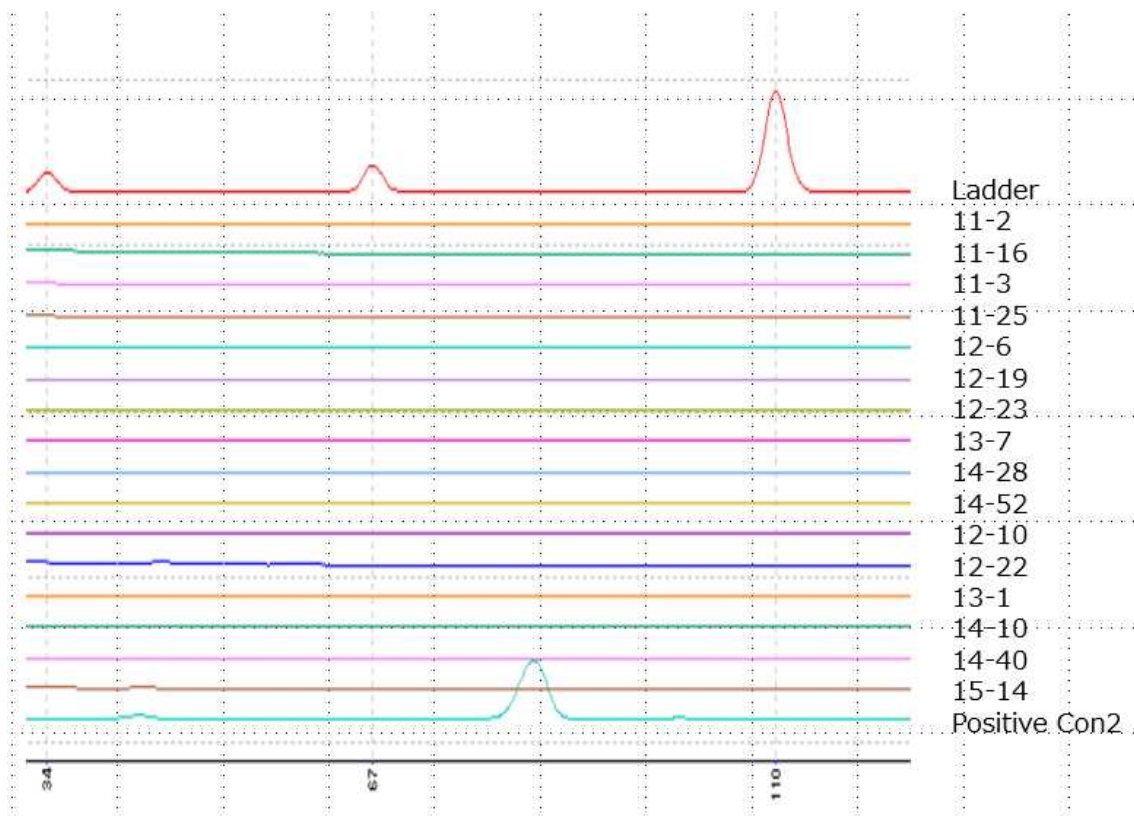


図1は、エレクトロフェログラム。PEG 処理した sgRNA が cDNA 化されて導入されたときは、80bp の DNA 断片が増えるようにプライマーを設計してある。なお、図1に示された個体名・系統名は表1と同一。

ここに示すように、80bp の DNA 断片は、変異体ゲノムからは増幅されなかった。7-14 と 21-23 に少量の低いピークが見えているが、同じ実験を繰り返したところ、完璧に無くなったので、RNA の cDNA 化が起きたわけではなかったと考えている。

そこで、これらのゲノム編集個体には、ガイド RNA の配列は組み込まれていないと判断した。

【Off-target 変異の影響に関する考察】

次に、CRISPR-P Ver2 でガイド RNA の設計時に、CRISPR-P ver 2 ソフトでの Off-target の第一候補となったサイトに関して、ゲノム解析を行い、そのサイトに突然変異が起きた時に、生物多様性に与える影響があるかどうかについて考察した（表 2 を参照）。

14 か所の Off-target 候補に対し、7 か所は Intergenic 領域で、突然変異が生物多様性へ与える影響はないと考えられる。また、1 か所は、今回の実験で変異を導入したい遺伝子のサイトであり、変異がはいても、研究対象になるので問題はない。それ以外の 6 か所に関しては、下記の OsID 遺伝子領域に存在するが、アノテーション情報を考慮して、これらの遺伝子の変異が生物多様性に影響を与える可能性は非常に低いと考察できる。

- 1) Os05g0524600: Leucine-rich repeat domain containing protein
- 2) Os06g0478600: Leucine-rich repeat, N-terminal domain containing protein.
- 3) Os07g0188800: Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
- 4) Os04g0209300: intron 領域 Similar to Glutathione-conjugate transporter AtMRP4.
- 5) Os07g0209800: OsbZIP59, BRI1-interacting protein 125

6) Os03g0186600: OsMDP1, OsMADS47 転写因子

ちなみに、イネでは、ガンマ線を利用した変異育種が約 60 年前に、また、培養過程での変異を利用したプロトプラスト育種技術等が約 30 年前に技術的に確立していて、人為的に誘導したランダムな多くの突然変異の中から多くの変異体が品種として既に一般栽培されている。育種選抜が行われる研究においては、品種として不適切な変異をもつ個体・系統は、廃棄されることになるので、Off-target 変異を特別危険視する必要性はないと考えられる。

また、上記、42 再生個体を温室栽培して観察したところ、培養開始から 2 か月時点において、明確な形態の変化は確認できなかった。

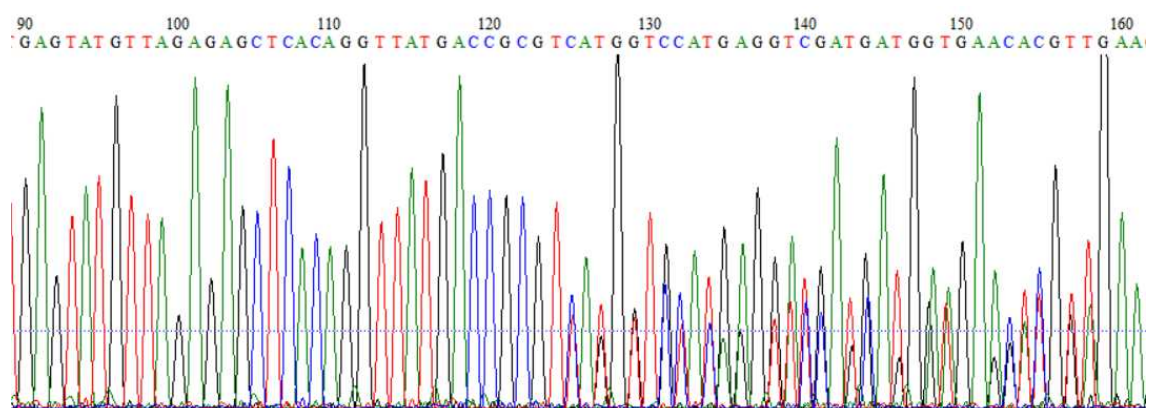
表2 Off-target 候補サイトの情報

遺伝子名	遺伝子ID	gRNA配列	On-score	Off-target シーケンス	Off-score	候補遺伝子	メジャーシグナル情報	多様性変化 による 影響の推定	関連実験
OsgI	Os01g0182500	CTACTCCAAGTGTCTACCCAA	0.83	CAAAATCCAAGAGAGCTTAACCA	0.53	Intergenic	Intergenic	無し	実験7, 9
OSELF3-2	Os01g0566100	GTGGGGACTGAGAGCAACAA	0.73	ATGGGCGACTGAGAGCCCAACAA	0.20	Os05g0524600	Leucine-rich repeat domain containing protein	無し	実験20, 21
LUX	Os01g0971800	GCTCCCTTCGACGGCAACGC	0.73	GCAAGCTCCGATGGCAACGC	0.23	Os06g0478600	Leucine-rich repeat, N-terminal domain containing protein.	無し	実験7
phyB	Os03g0309200	GGAACCTGTACACCATTAACG	0.92	TGAACCTGACAGCAGCAACCC	0.02	Intergenic	Intergenic	無し	実験1, 11
AGPL3	Os03g073500	ATGAGGCACTGCATTAACAAG	0.77	ATGAACAACCTGATATAAAAA	0.24	Intergenic	Intergenic	無し	実験13
Hd16	Os03g0793500	TGAAGTATTGGCTAGAAAAGG	0.64	TGAACATATTGCTAATAAAGA	0.60	Intergenic	Intergenic	無し	実験2
OsAGPL1	Os05g0580000	GCTCATGTAAAGCTCTTGGG	0.82	GATTCCTGTAAAGCTCTTTGT	0.17	Intergenic	Intergenic	無し	実験14
Hd17	Os06g0142500	GTTTTCTCTATGCTCTCTTGG	0.81	GCTTTCTCTTAAAGCTCTCTTGG	0.56	Os01g0566100	OSELF3-2 (γ-アミノ遺伝子の一)	無し	実験21
Hd1	Os06g0275000	GAGCGTGTGTACTGCCCGG	0.95	GAGCATGATGCGGCTGCCCGG	0.42	Os07g0189800	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	無し	実験3
GWD1	Os06g0498400	CTACCATCCCGGAAACCCAGA	0.82	CTACCATGCCGAAAGCCAGA	0.39	Intergenic	Intergenic	無し	実験12
se5	Os06g0603000	TTGCACGSAAGGAAAGAGCGG	0.70	GTGCGAAGGAAAGGAGAGCGG	0.42	Os04g0209300	intron	無し	実験15
Ghd7	Os07g0261200	CTGCCGATGATGCATCCCGG	0.77	CTGGGGATATGCAATCCCGG	0.30	Os07g0209800	OstZIP59, BRI1-interacting protein 125	無し	実験1, 2, 3, 20, 21
Hd2	Os07g0695100	ATAACATGCAGTAGCAGAAAGCA	0.81	ATATATACATTTGATGAAAGCA	0.48	Os03g0185600	OsmDP1, OsmADS47	無し	実験7
Ehd1	Os10g0463400	AGGTCAAGCCTGAGACTTTCCG	0.66	ATGTCAACCTTGGACTTTCCG	0.38	Intergenic	Intergenic	無し	実験9, 9

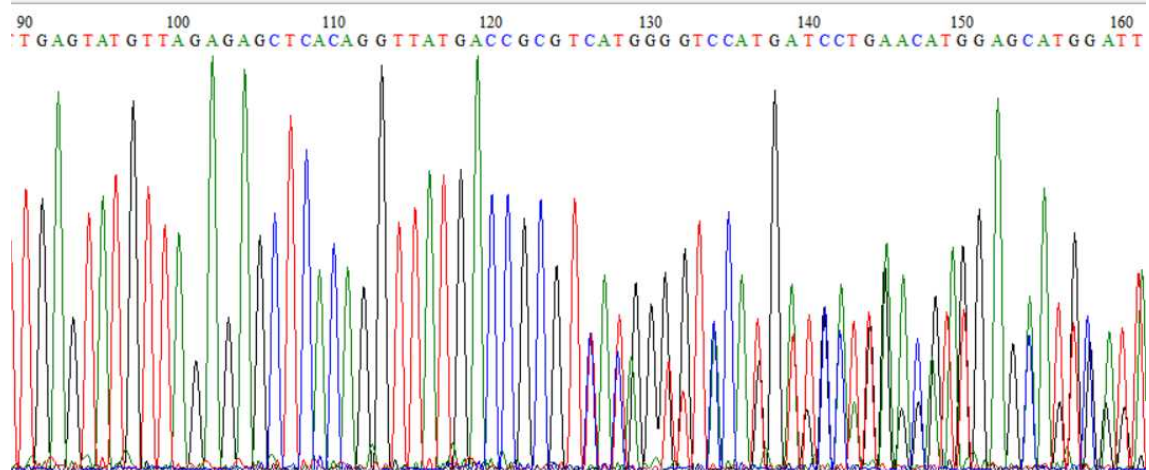
別紙4 変異確認シーケンス波形データ

実験1

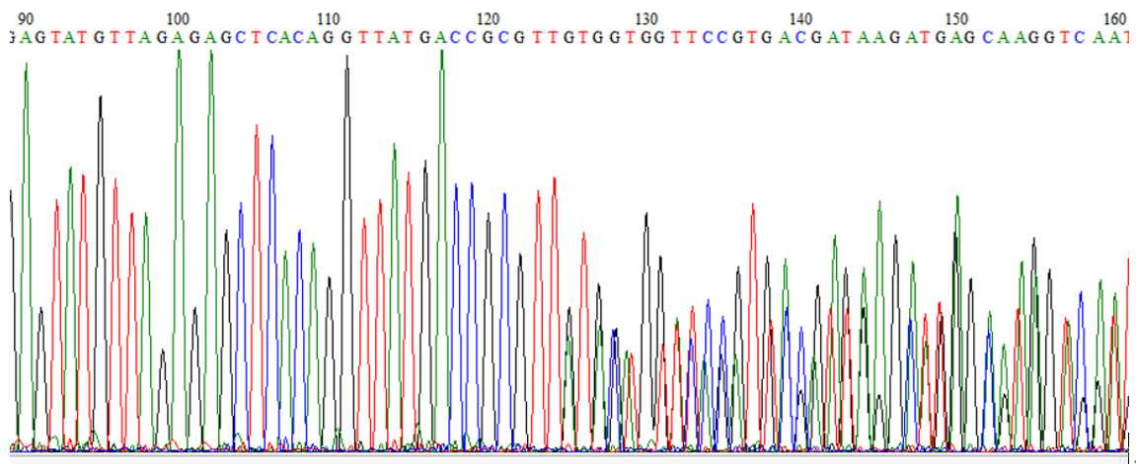
1-6 phyB



1-8 phyB

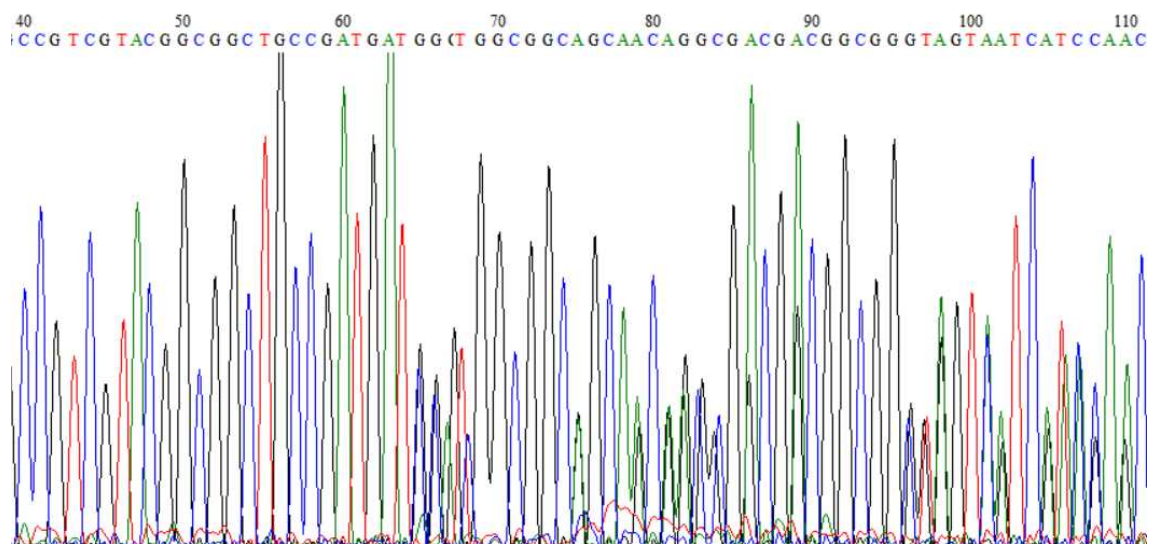


1-12 phyB

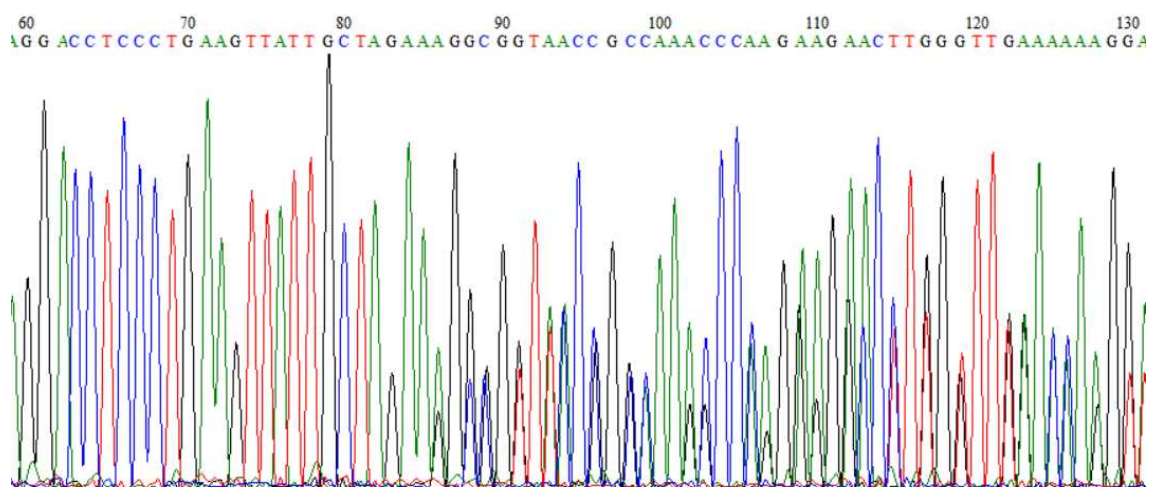


実験 2

2-25 Ghd7



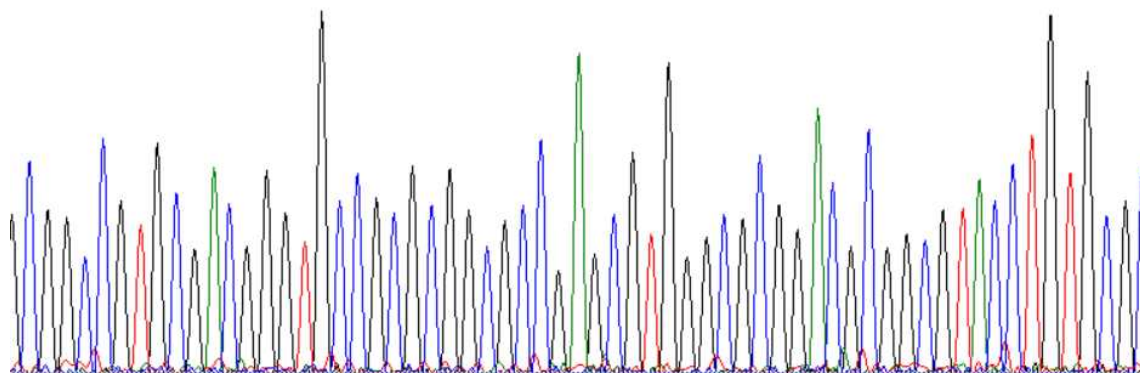
2-25 Hd16



実験 3

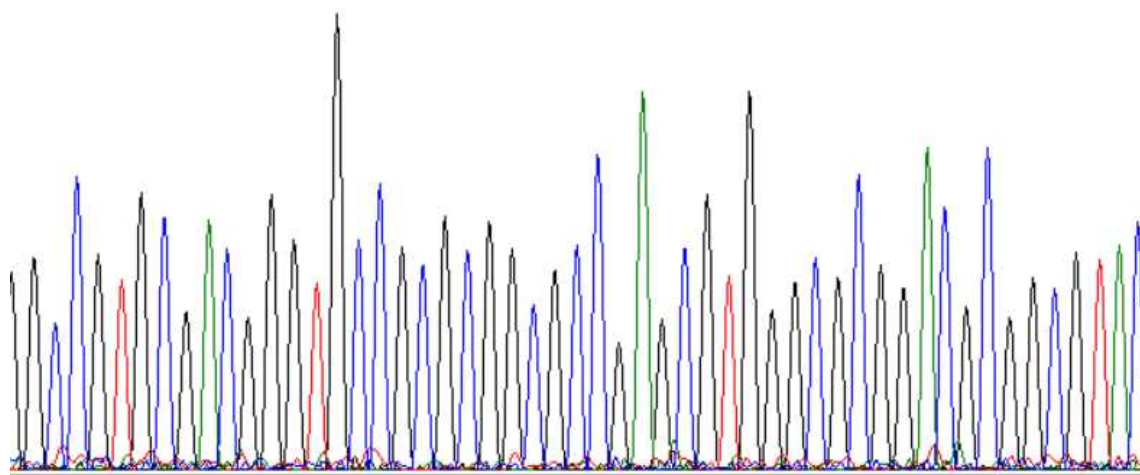
3-8-7 Hd1

120 130 140 150 160 170 180
3CGGCCGTGCGACGGGTGCCGCGCGCCGAGCGTGGCGCGACGGCGGTACCTGTGCGC

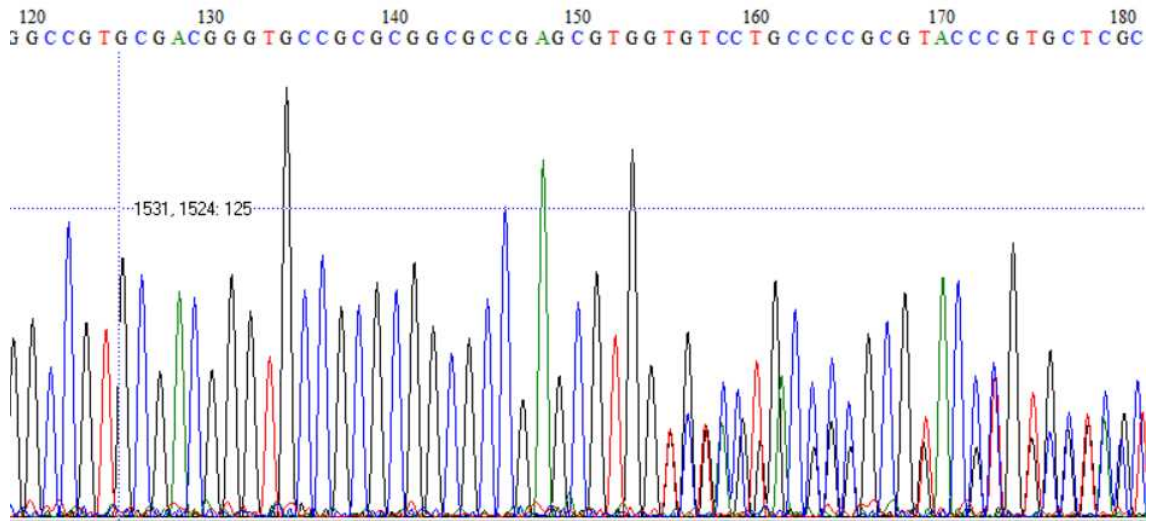


3-8-11 Hd1

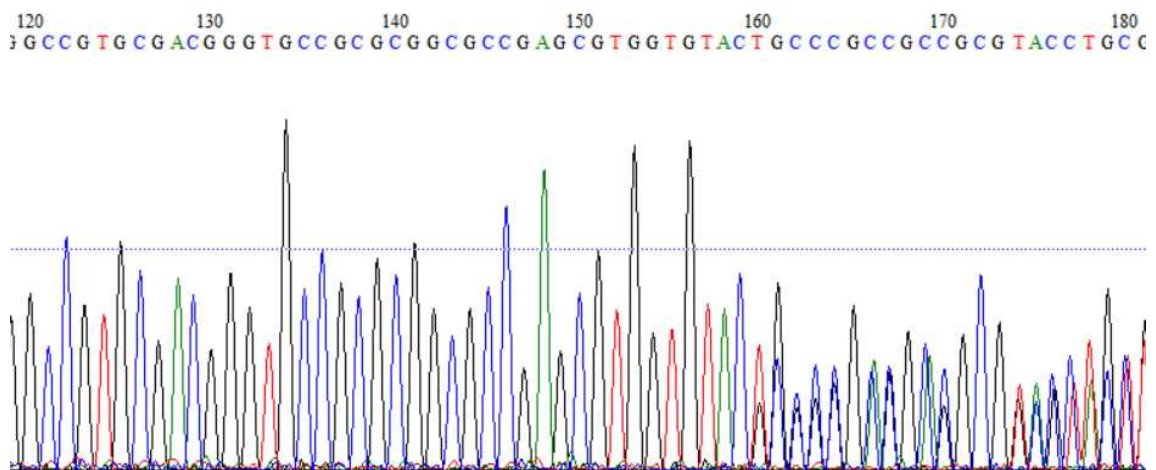
120 130 140 150 160 170
3GCCGTGCGACGGGTGCCGCGCGCCGAGCGTGGCGCGACGGCGGTAC



3-8-15 Hd1

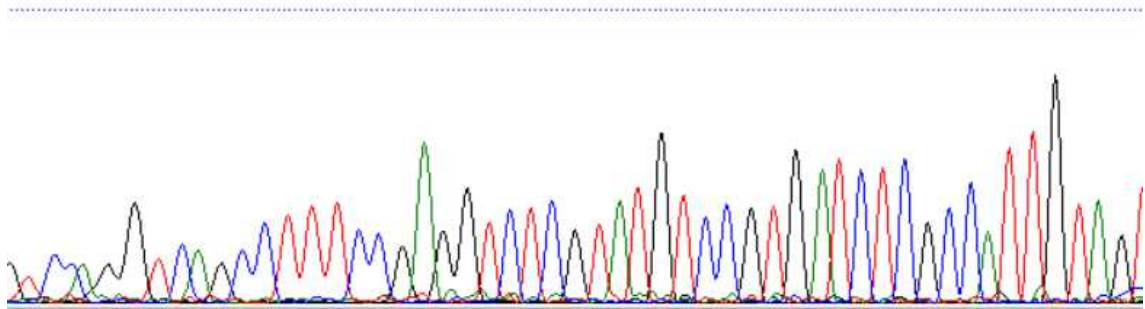


3-39 Hd1



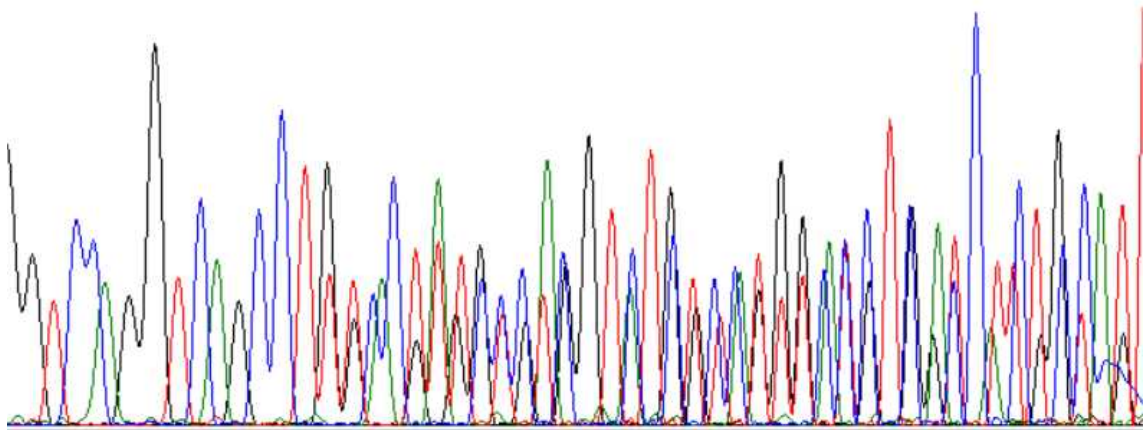
3-8-6 Ehd1

20 30 40 50 60 70
3T CCAG GTCAGCC TTTCCGAG GTCTCG TATGTCCGTG ATCTCGCCATT GTAGT

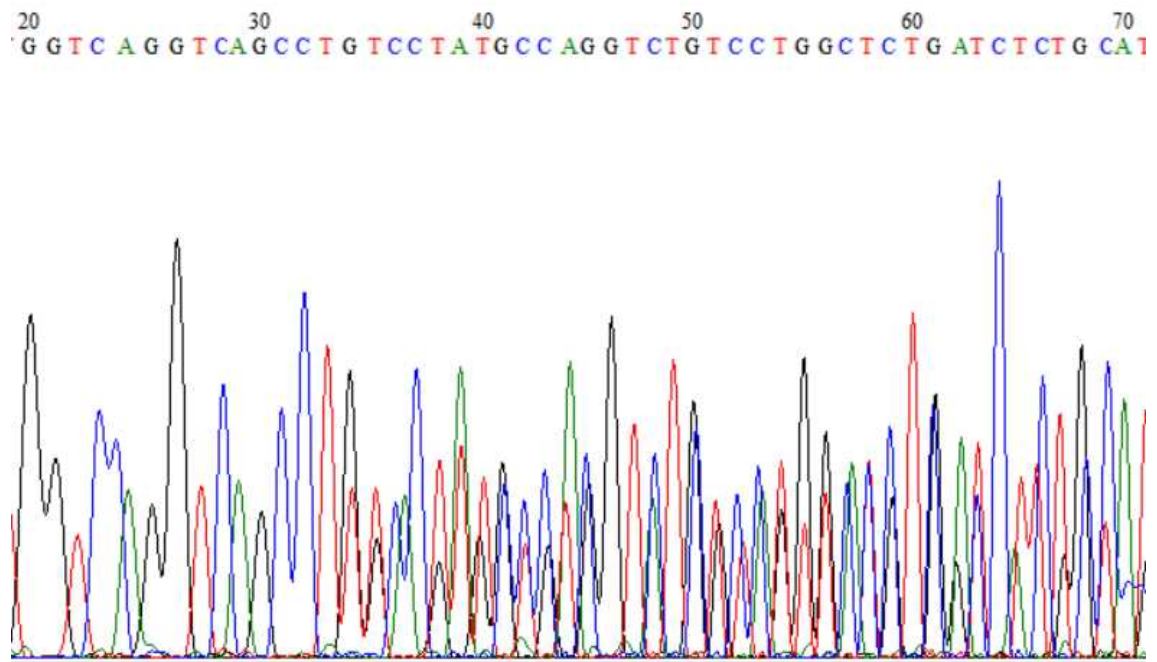


3-8-11 Ehd1

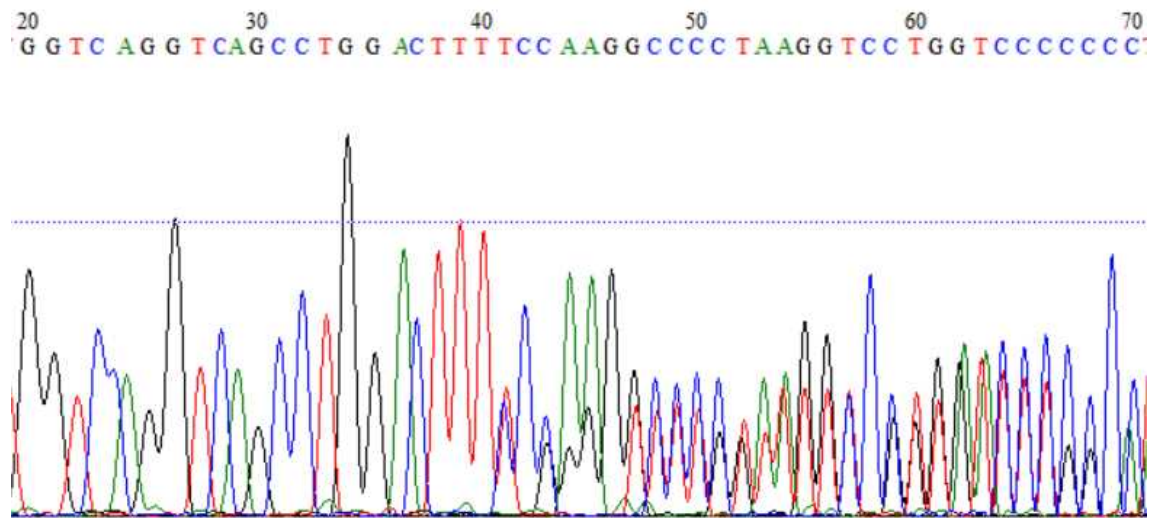
20 30 40 50 60 70
TGT CAGGT CAGCCTG TCCTATGCCAGG TCTGTCC TGGCCCTG ATCTCTG CAT



3-8-15 Ehd1

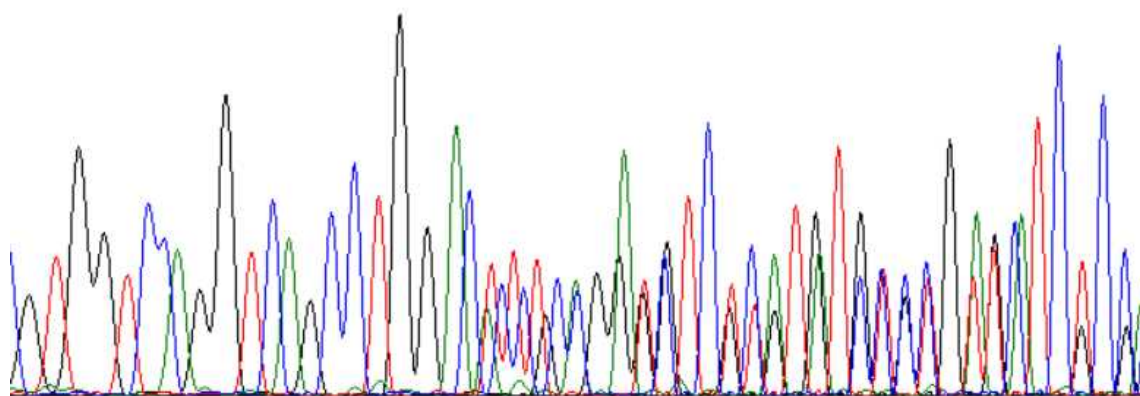


3-16 Ehd1



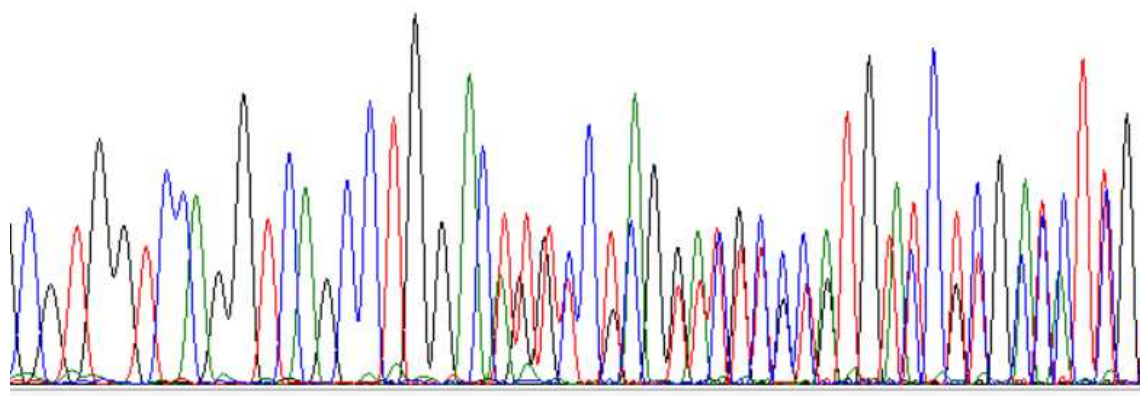
3-31 Ehd1

20 30 40 50 60 70
:G T G G T C C A G G T C A G C C T G G A C T T T C A G A T G T C T C A T G T G C C C G A G C T C T C C C



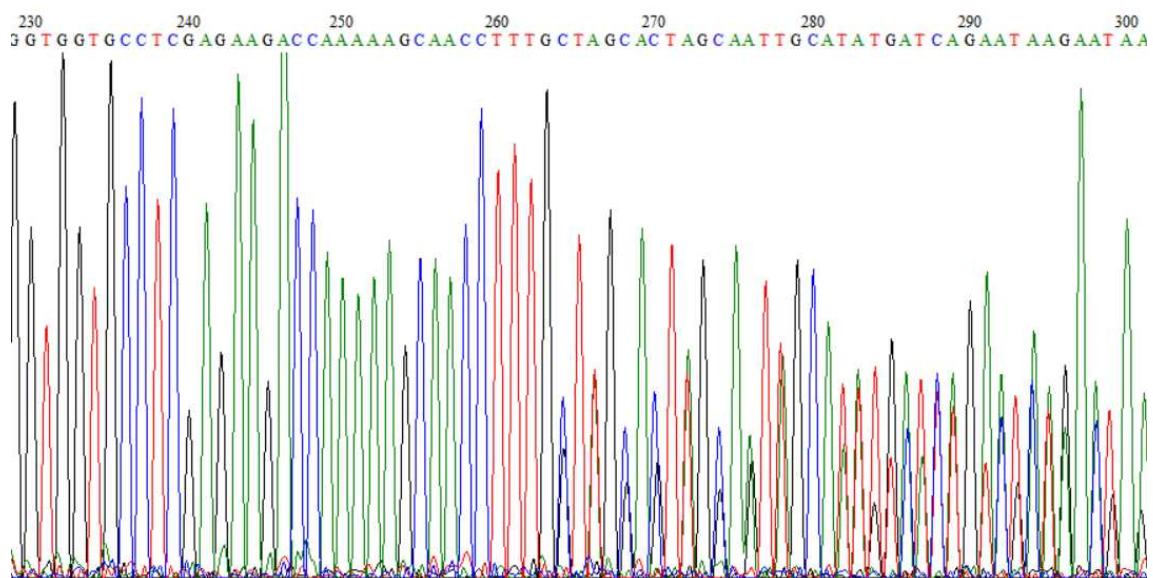
3-39 Ehd1

20 30 40 50 60 70
C G T G G T C A G G T C A G C C T G G A C T T T C C T A G G A T G C C C A T G A T C T C G A T C T T G C

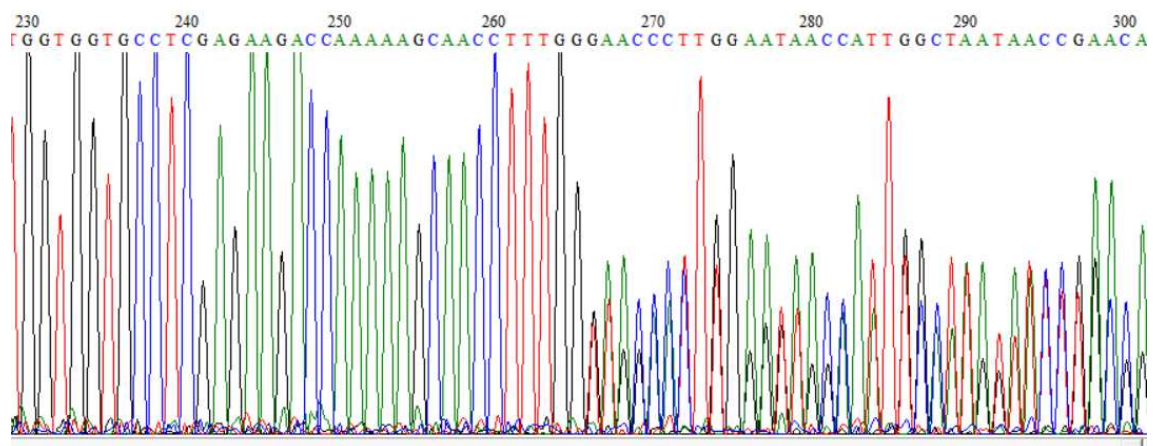


実験 7

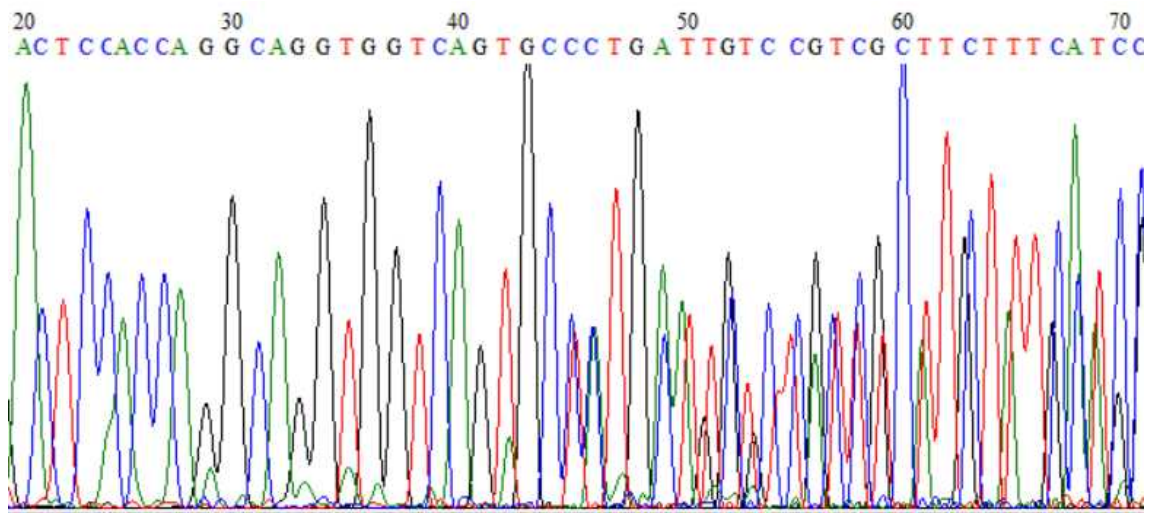
7-12 OsGI



7-14 OsGI

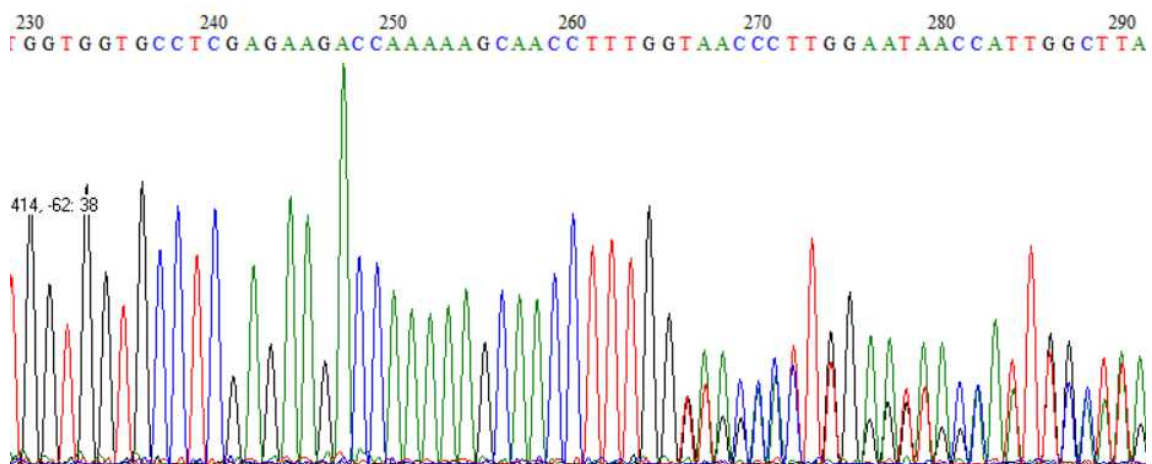


7-42 Hd2

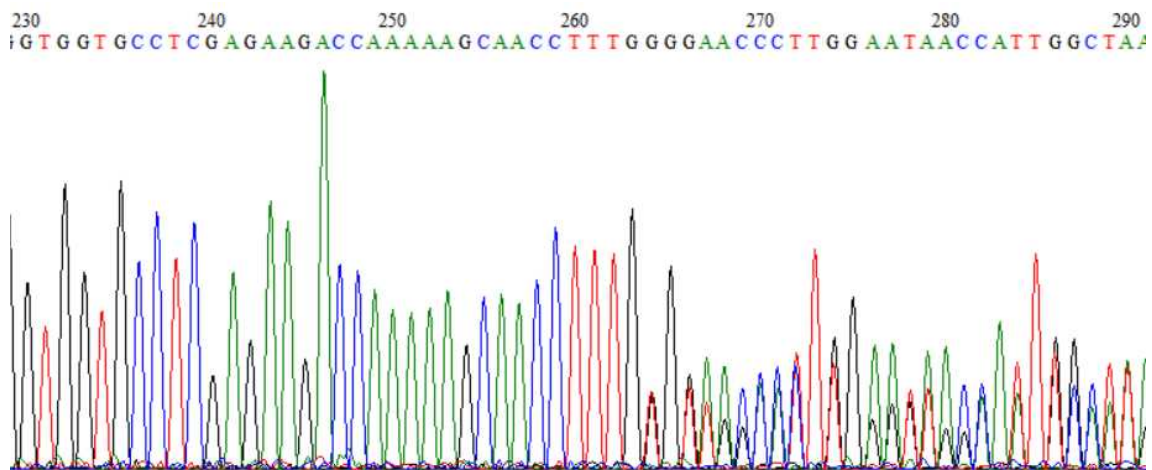


実験 9

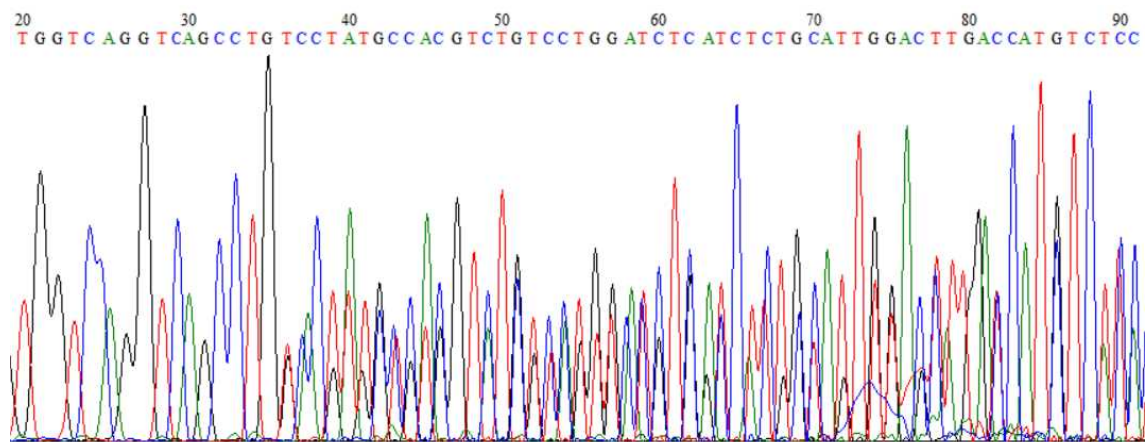
9-6 OsGI



9-11 OsGI

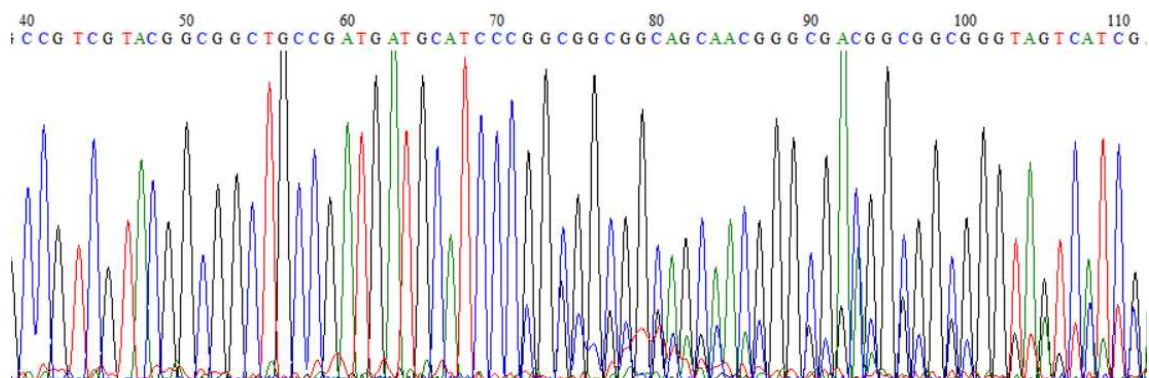


9-6 Ehd1

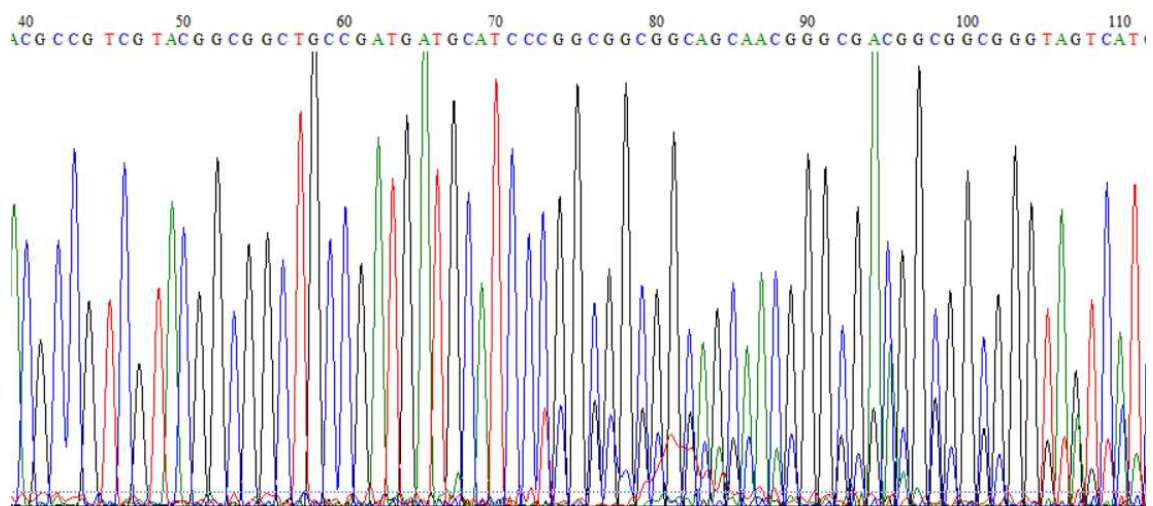


実験 20

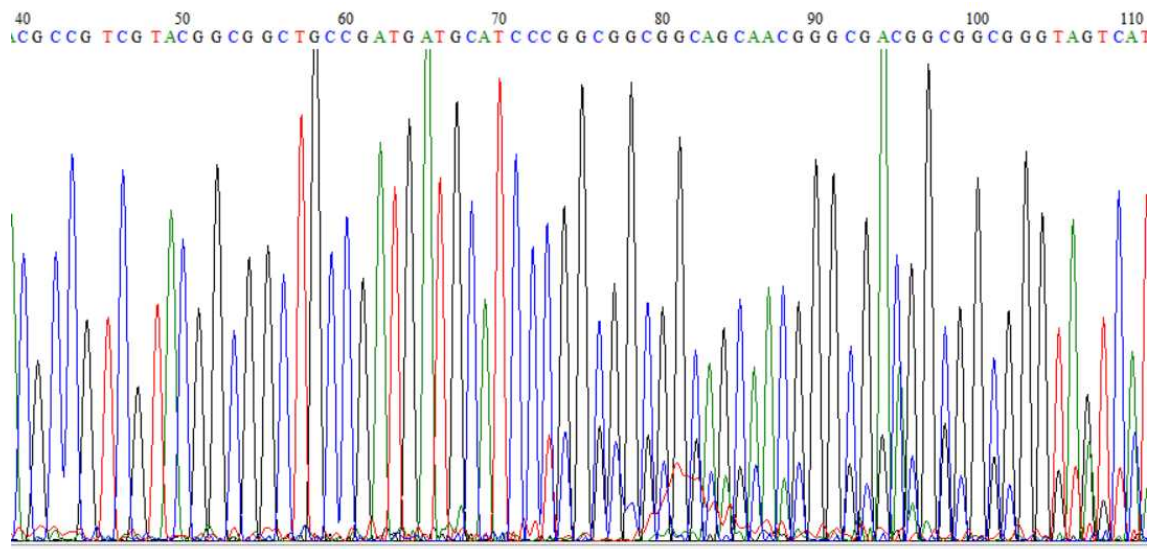
20-17 Ghd7



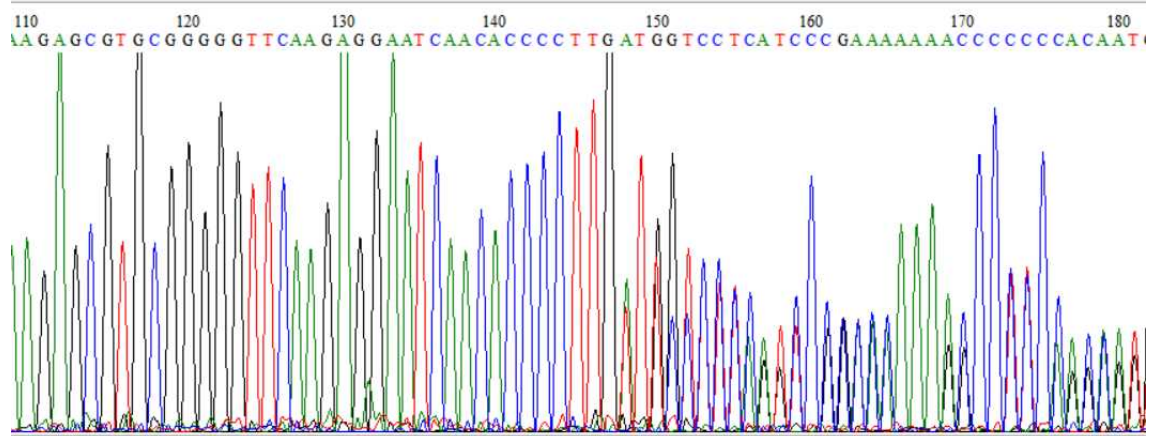
20-49 Ghd7



20-50 Ghd7

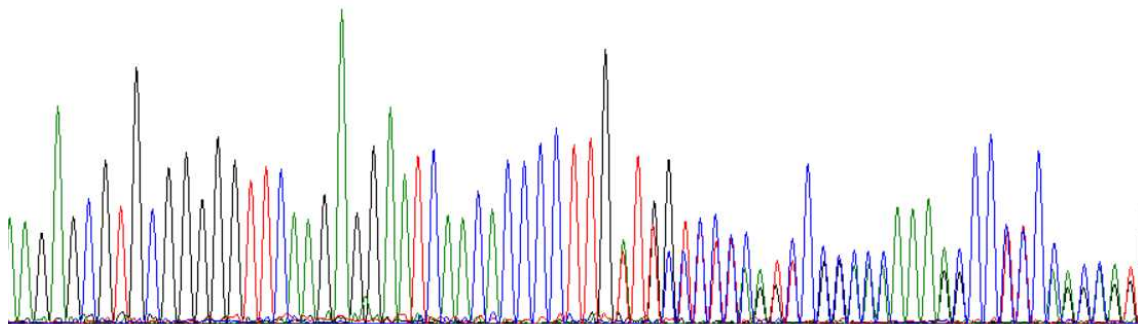


20-2 OsELF3-2



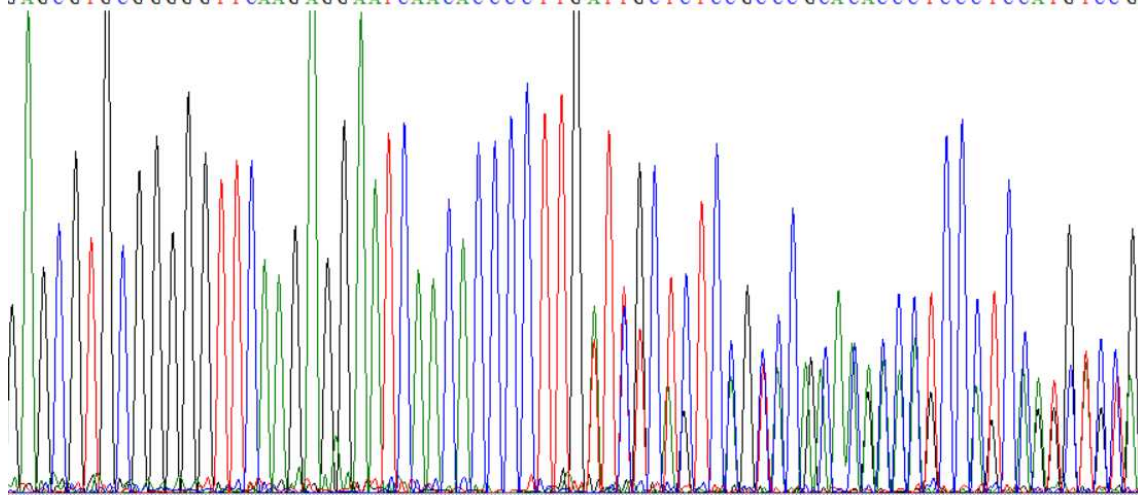
20-4 OsELF3-2

110 120 130 140 150 160 170 180
AAGAGCGTGCGGGGGTTCAAGAGGAATCAACACCCCTTGTGGTCCCAATCCCCCAAACCCCTCCACAATC



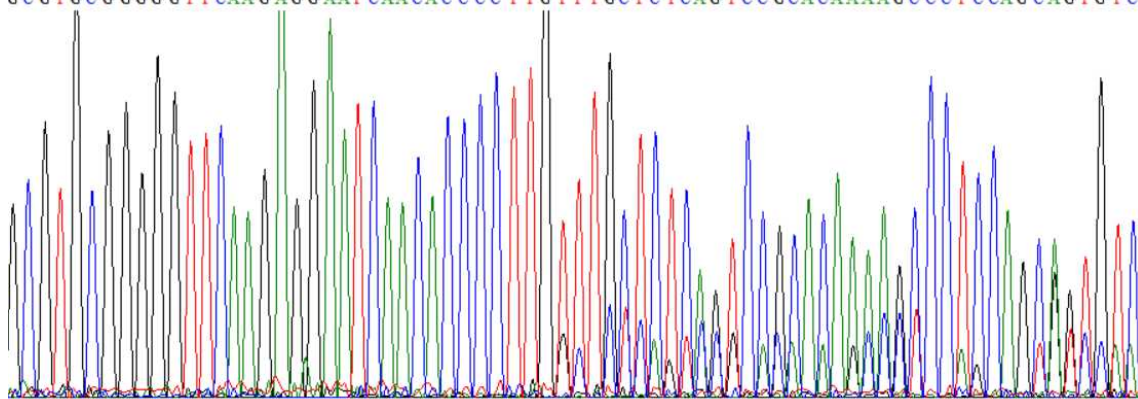
20-17 OsELF3-2

110 120 130 140 150 160 170 180
GAGCGTGCGGGGGTTCAAGAGGAATCAACACCCCTTGATTGCTCCGCCCGCACACCCCTCCCTCCATGTCCG

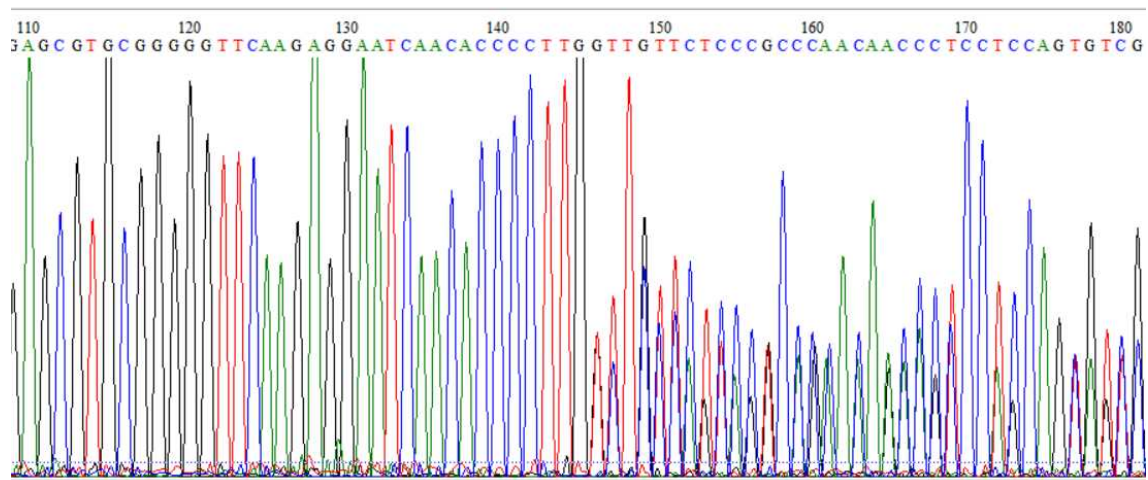


20-49 OsELF3-2

110 120 130 140 150 160 170 180
GCGTGCGGGGGTTCAAGAGGAATCAACACCCCTTGTGGTCTCAGTCCGCACAAAAGCCCTCCAGCAGTGTCT

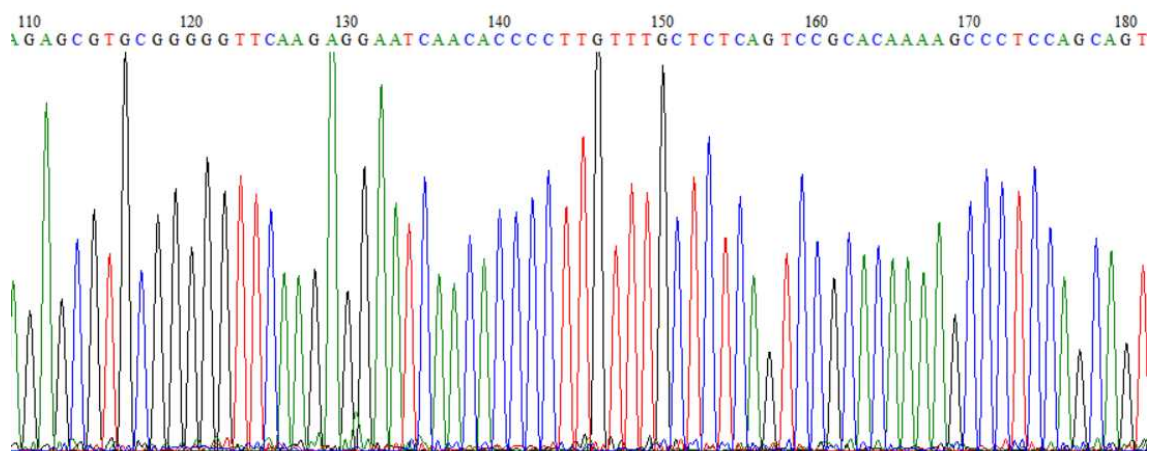


20-50 OsELF3-2

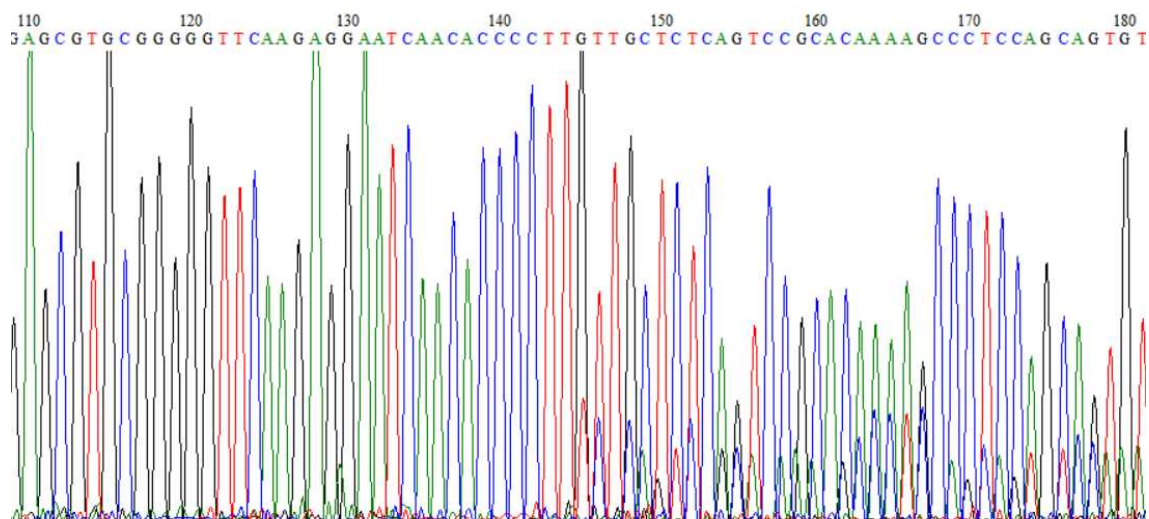


実験 21

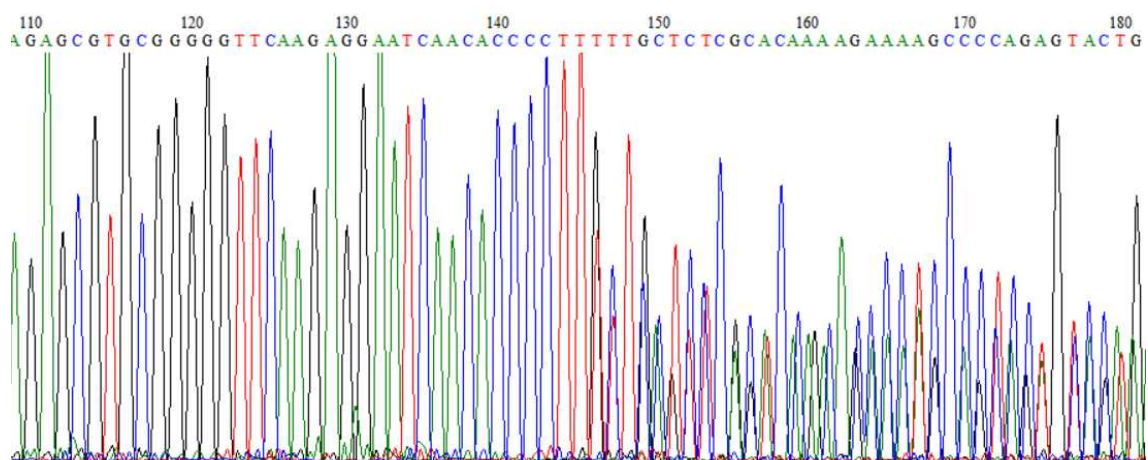
21-5 OsELF3-2



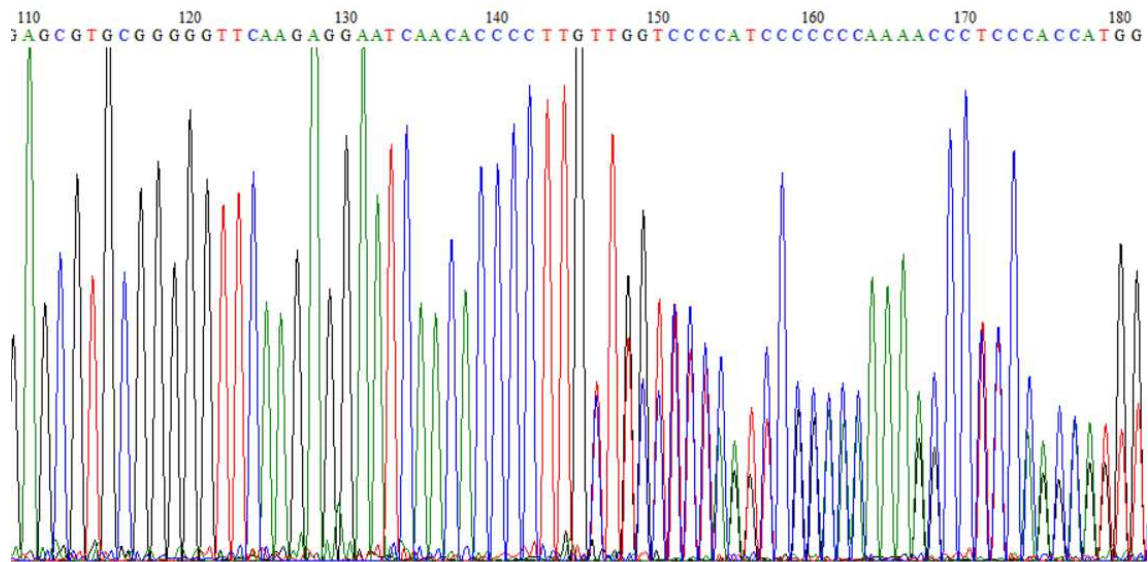
21-10 OsELF3-2



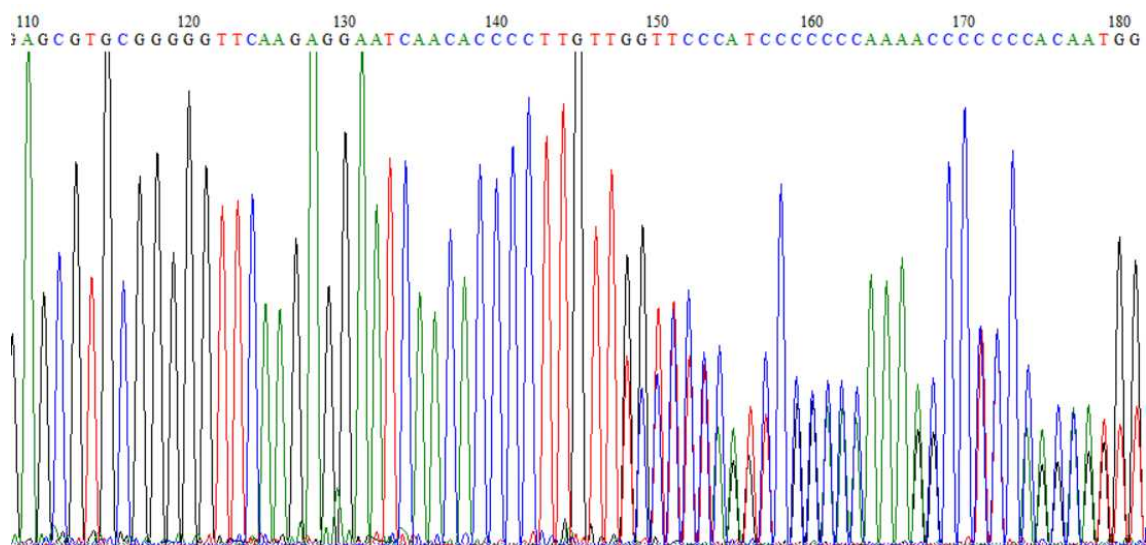
21-20 OsELF3-2



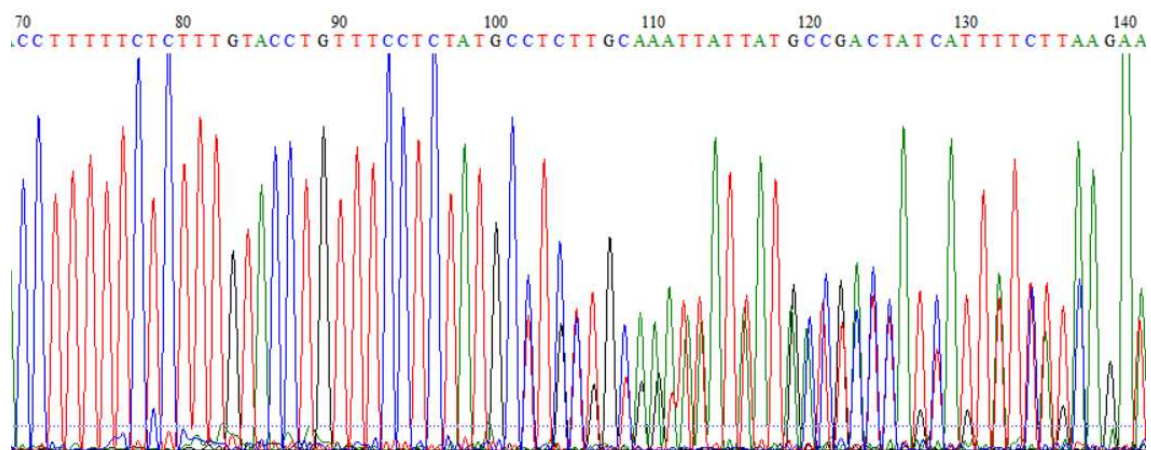
21-23 OsELF3-2



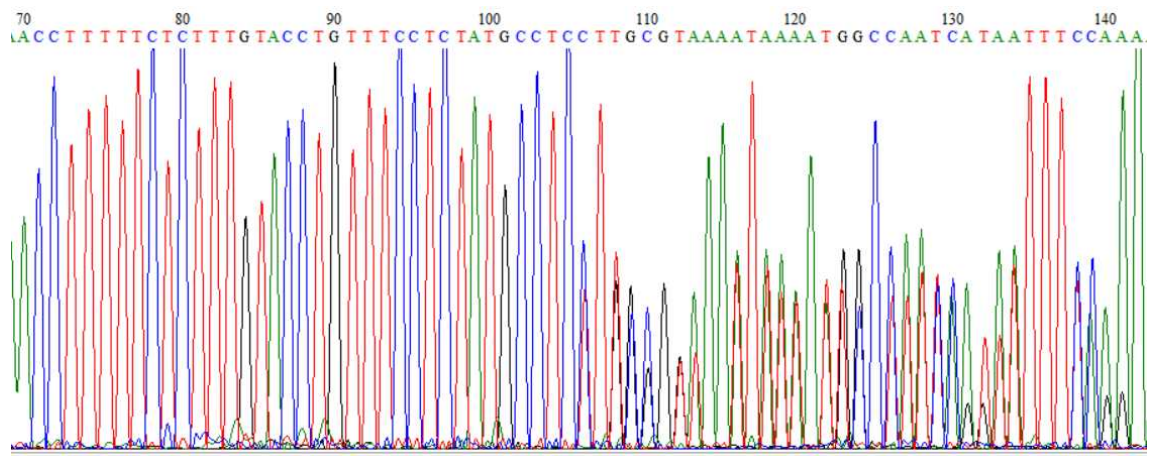
21-26 OsELF3-2



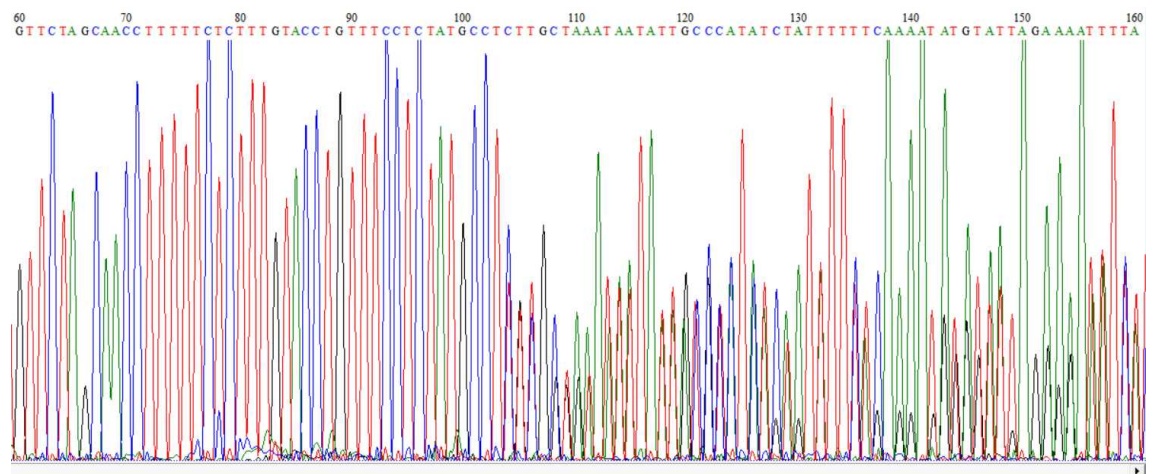
21-5 Hd17



21-23 Hd17



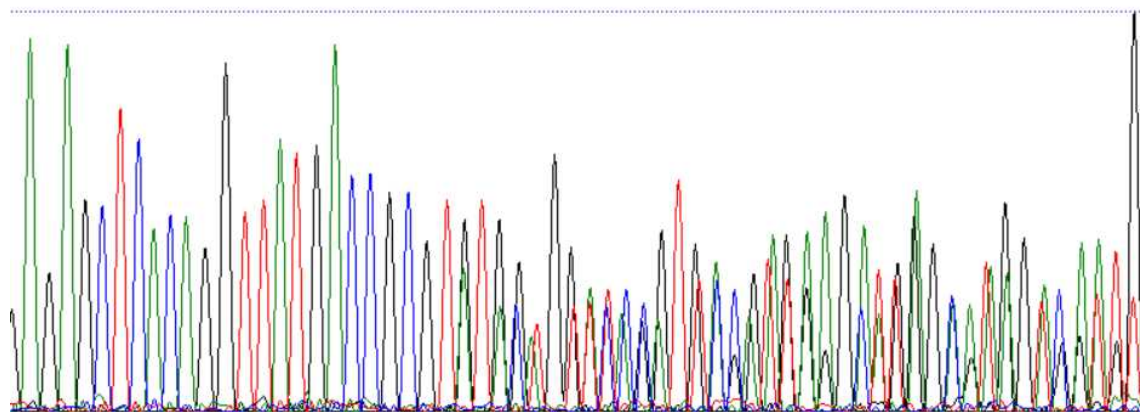
21-26 Hd17



実験 11

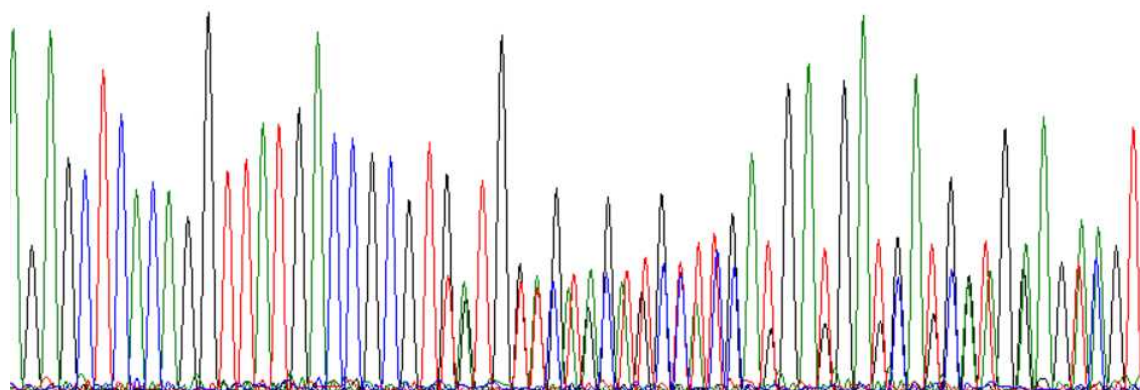
11-2 phyB

100 110 120 130 140 150 160
TAGAGCTCACAGGTTATGACCGCGTGTGGTGGATCCGTGACGTGAAGATGAGCATGGTCAATG



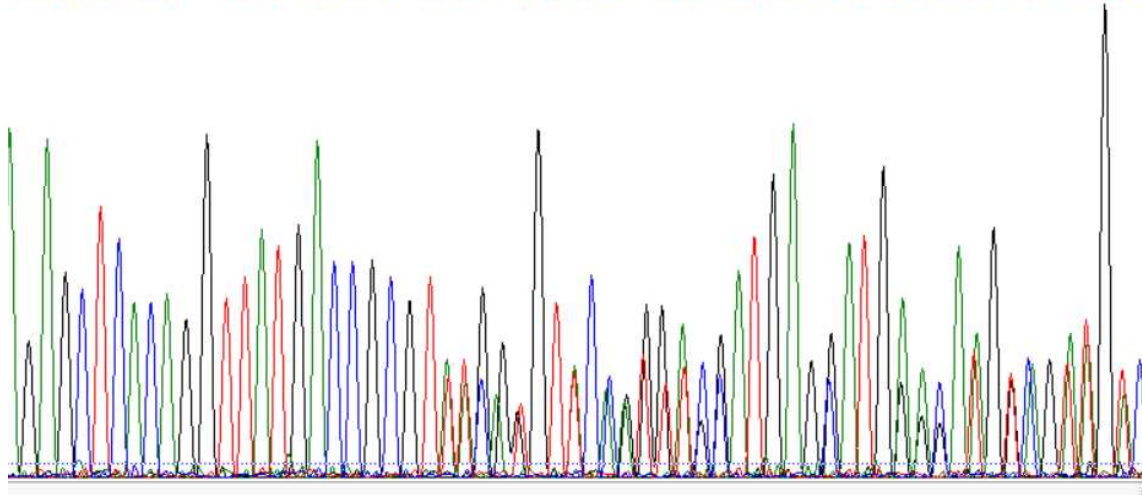
11-3 phyB

100 110 120 130 140 150 160
AGAGCTCACAGGTTATGACCGCGTGATGGAGTAGTTGTTTGATGATGATGATGATGAAGAAAT



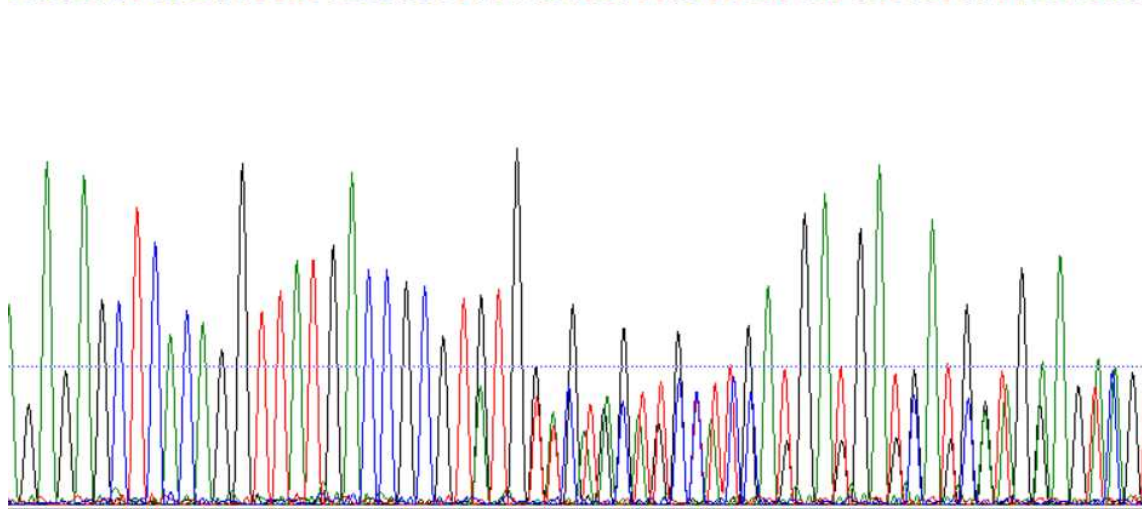
11-16 phyB

100 110 120 130 140 150 160
AGAGCTCACAGGTTATGACCGCGTATGGTGTACCGGTTTCGATGAGGATGAACAAGGAG AAGTC



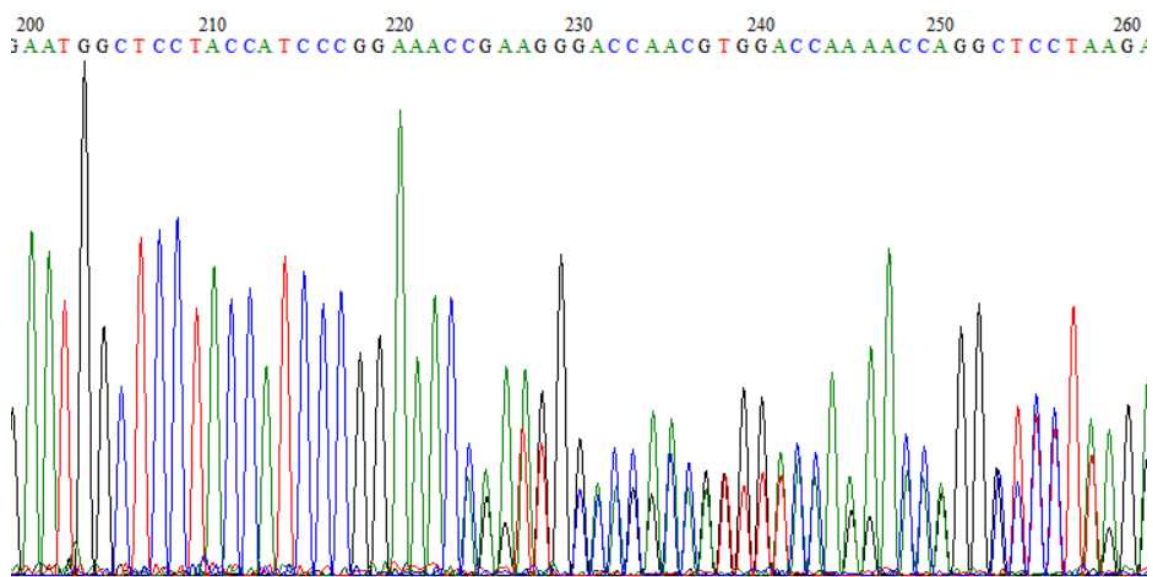
11-25 phyB

100 110 120 130 140 150 160
AGAGAGCTCACAGGTTATGACCGCGTGTGGA GTAGTTGCTTGATGATGATGATGGTGAAG AAGTC

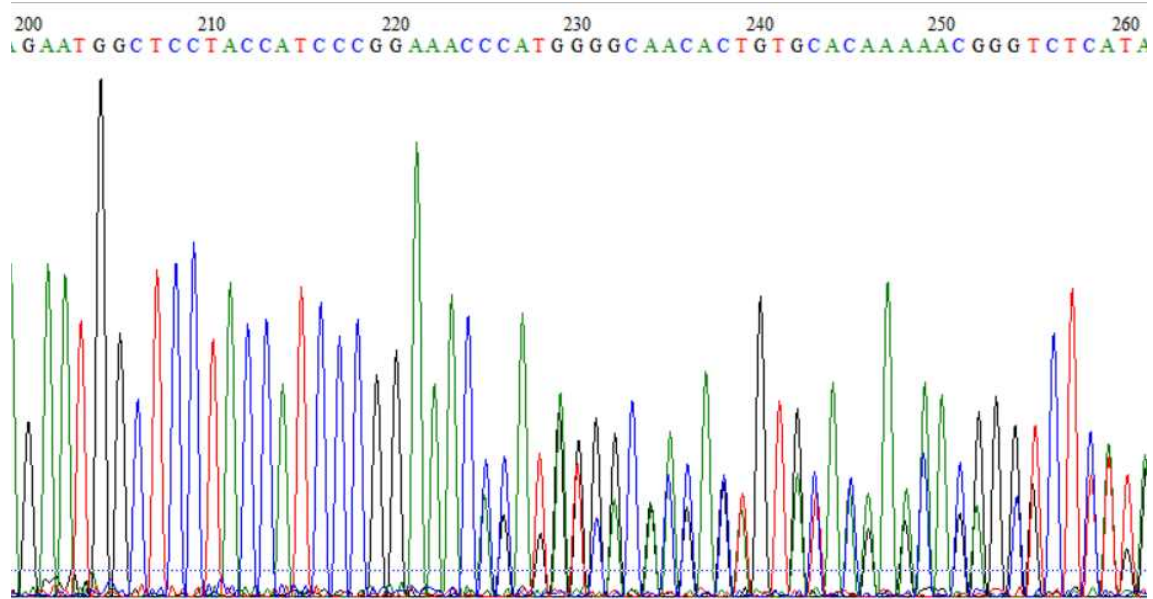


実験 12

12-6 GWD1

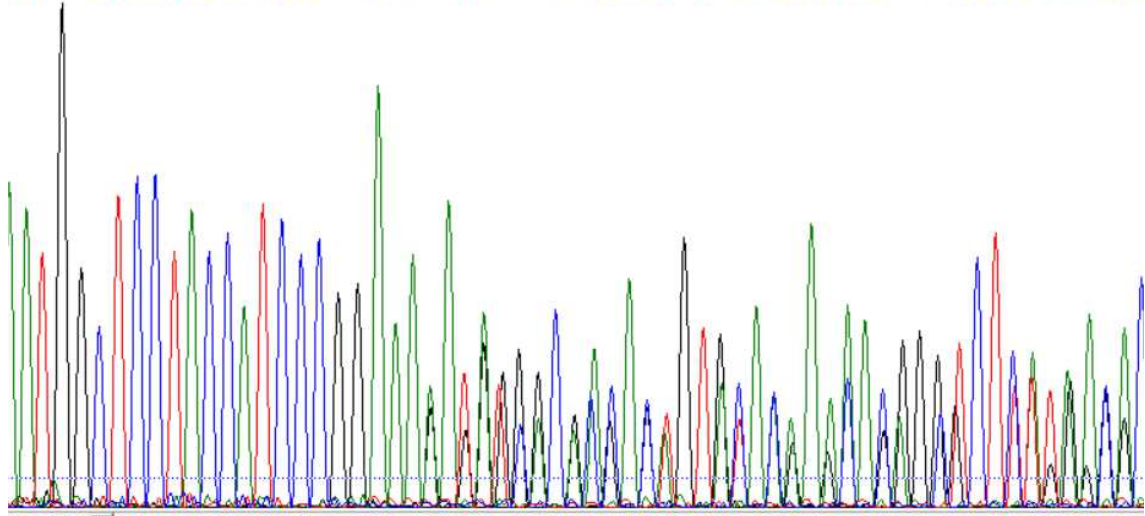


12-10 GWD1



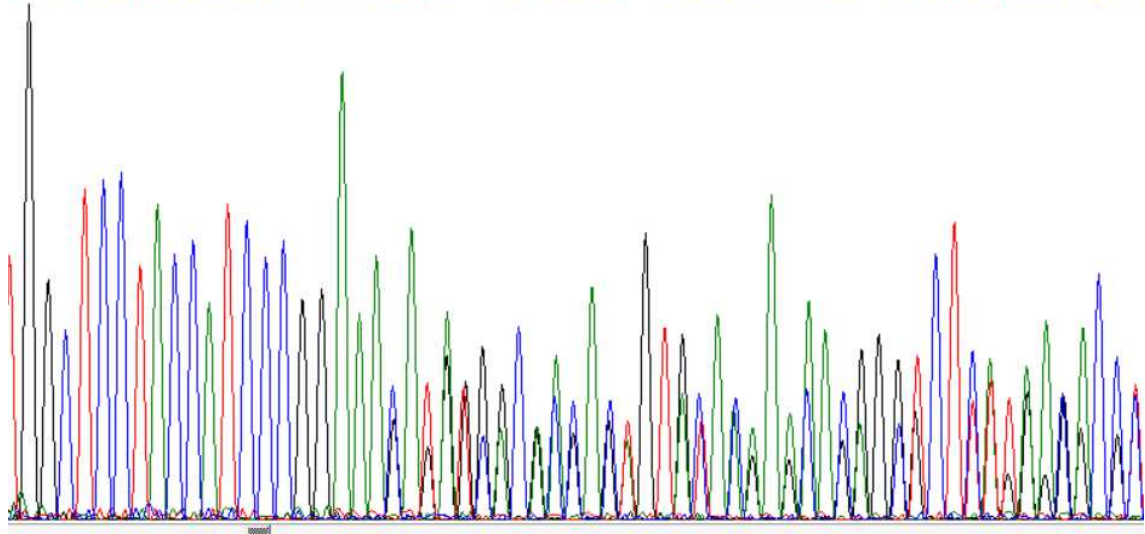
12-19 GWD1

200 210 220 230 240 250 260
AATGGCTCCTACCATCCCGGAAAGATGGGGCGACACTGTGCACAAAAACGGGTCTCATGACAC



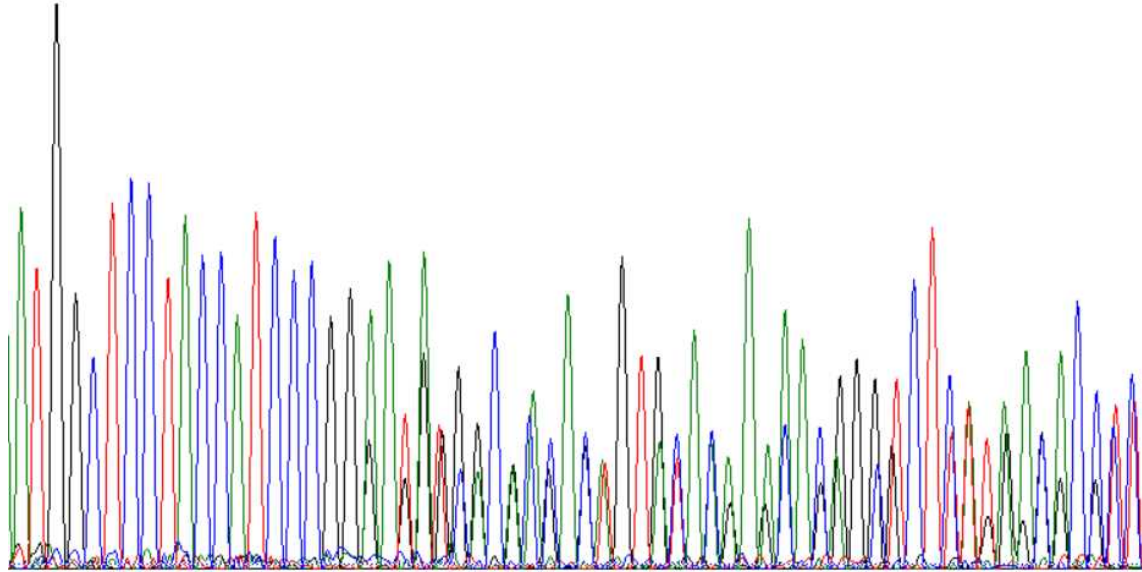
12-22 GWD1

200 210 220 230 240 250 260
TGGCTCCTACCATCCCGGAAACATAGGGCGACACTGTGCACAAAAACGGGTCTCATAAGACCT



12-23 GWD1

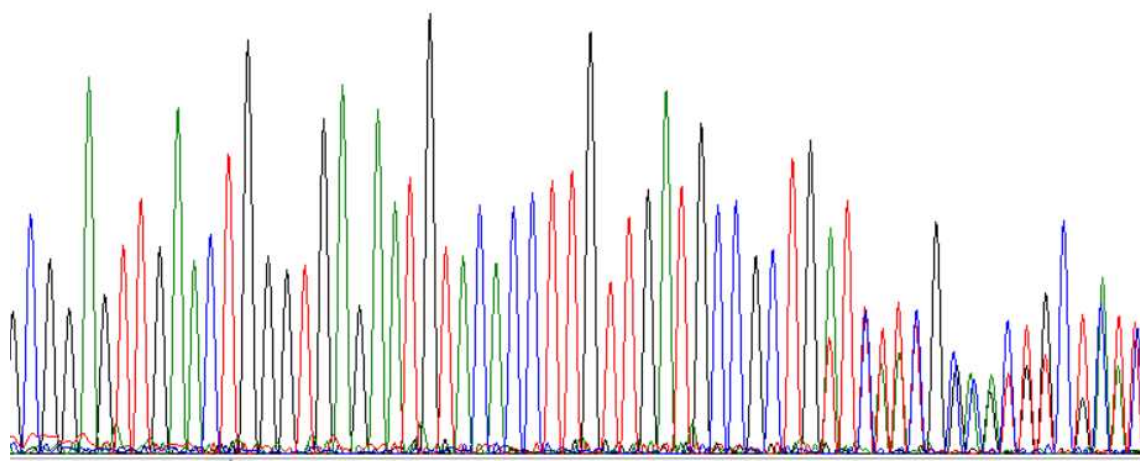
200 210 220 230 240 250 260
.ATGGCTCCTACCATCCCGGAATAGGGCGACAGTGTGCACAAAACGGGTCCTCTAAGACCCTT



実験 13

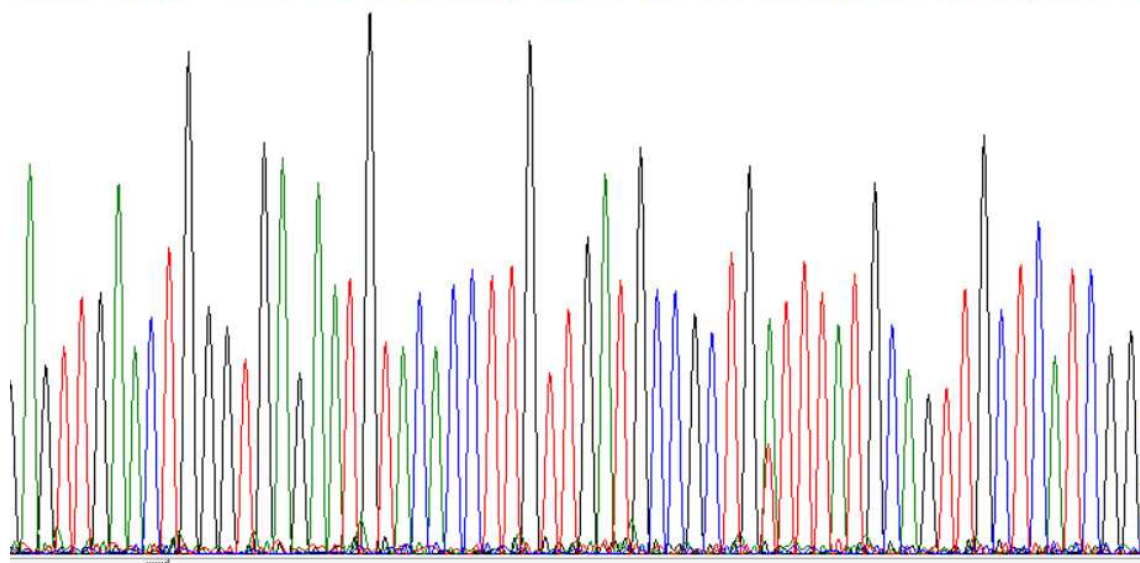
13-1 AGPL3

120 130 140 150 160 170 180
3CGGAGTTGAACTGGGTGAGAATGTACACCTTTGTTGATGCCGCTGATTTTCGCAACTGCTATT



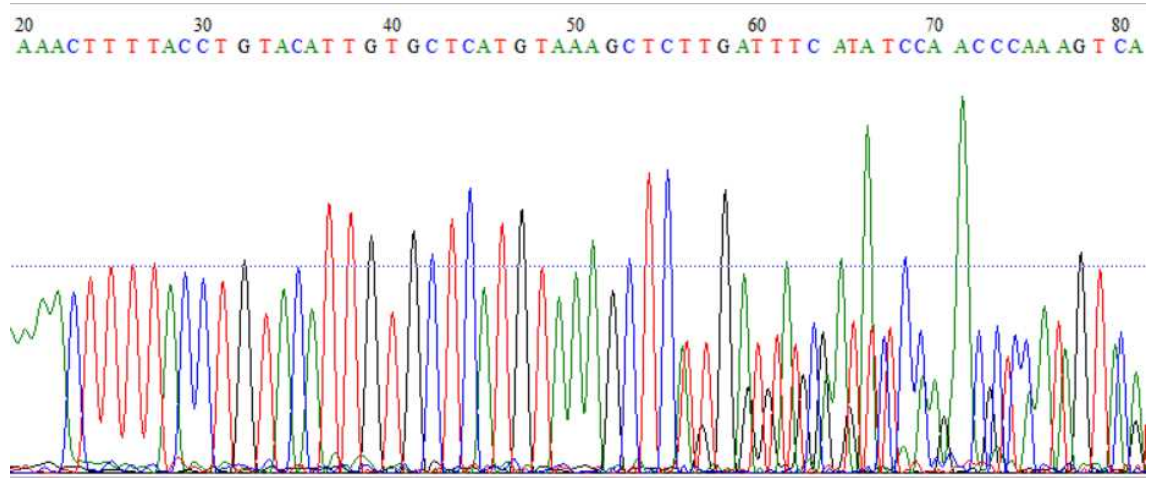
13-7 AGPL3

120 130 140 150 160 170 180
3AGTTGAACTGGGTGAGAATGTACACCTTTGTTGATGCCGCTGTTTTATGCAAGTTGCTCATCGGC

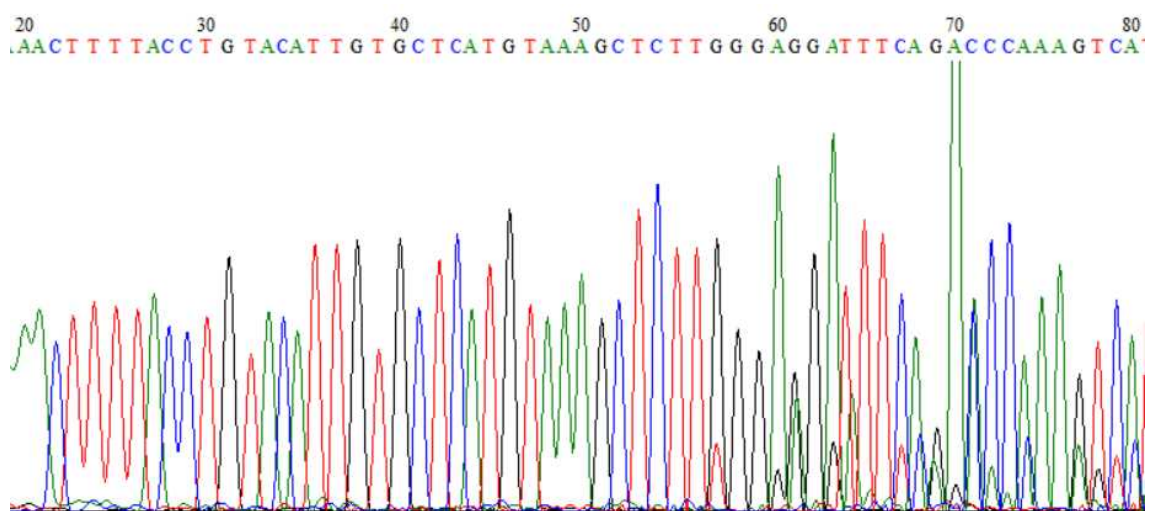


実験 14

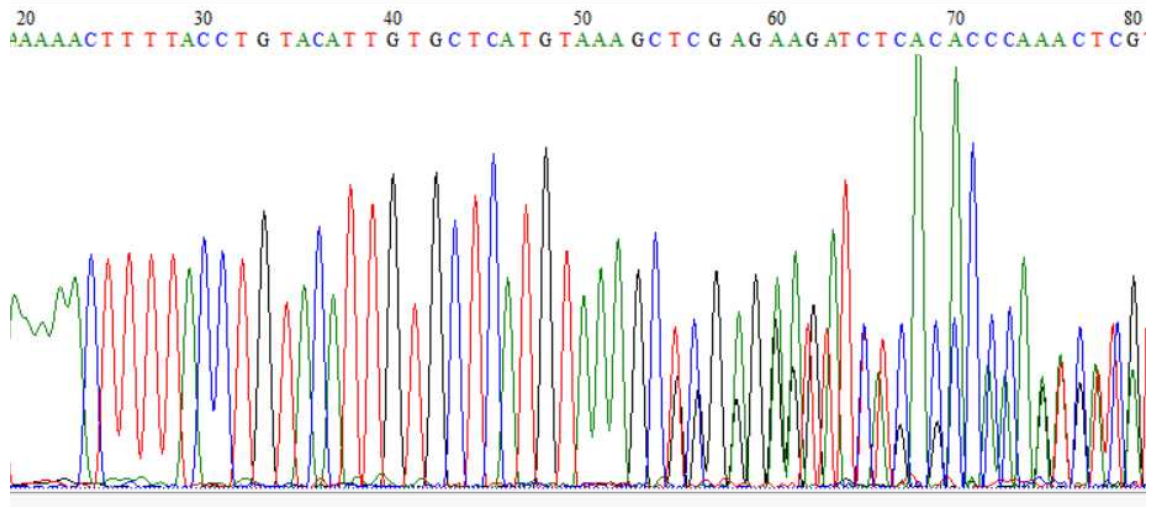
14-10 OsAGPL1



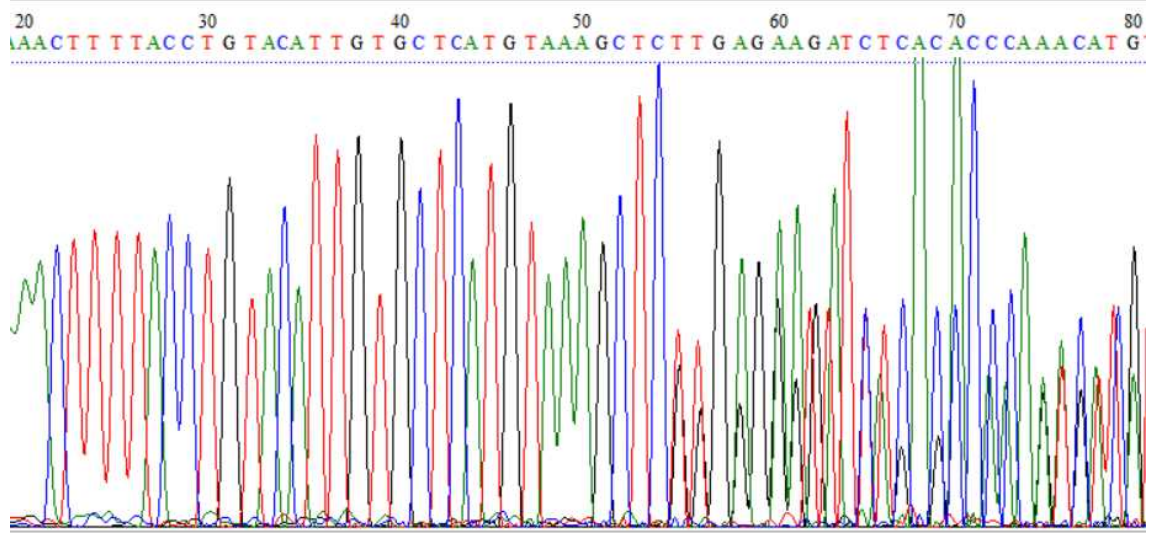
14-28 OsAGPL1



14-40 OsAGPL1



14-52 OsAGPL1



実験 15
15-14 se5

