

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

2022 年 9 月 13 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

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(<i>Ghd7</i> , <i>Hd1</i> , <i>Hd2</i> , <i>Hd17</i> , <i>OsGI</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、 <i>Ghd7</i> (<i>Grain number and heading date7</i>), <i>Hd1</i> (<i>Heading date1</i>), <i>Hd2</i> (<i>Heading date2</i>), <i>Hd17</i> (<i>Heading date17</i>), <i>OsGI</i> (<i>OsGIGANTEA</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 野外で栽培し、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。
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)

宿主の自然環境における 生理・生態学的特性	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。
使用したゲノム編集技術 の種類・導入方法	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
細胞外で加工した核酸の	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、

導入・除去方法、残存の有無の確認方法		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 断片のシークエ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>Hd1</i>, <i>Hd2</i>, <i>Hd17</i>, および <i>OsGI</i> 遺伝子
	機能	<i>Ghd7</i>：長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。 <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。 <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。

		<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。 <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
	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、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	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</i>, <i>Hd1</i>, <i>Hd2</i>, <i>Hd17</i>, <i>OsGI</i> のコード領域の機能欠損変異。 詳細は別紙 3 を参照。
	上記以外に生じた変化	再生当代での可視的な形態等の変化なし。 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 予測を行った結果を用い、Off-target 配列の候補の箇所に関して、変異の有無を確認したところ、1 個体でのみ変異を確認したが、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。
生物多様性影響が生ずる可能性についての考察		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</i>, <i>Hd1</i>, <i>Hd2</i>, <i>Hd17</i>, <i>OsGI</i> のうち、<i>OsGI</i> 以外は、品種間差としての自然変異が既に論文報告されている。人為選抜で発見された <i>OsGI</i> の突然変異体の日本の環境での野外栽培では、開花期に変化がないとの結果の論文がある。したがって、これらの遺伝子の変異によって、既存の品種を超えて、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。 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。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。 交雑性：開花期決定・概日時計因子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。 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。
緊急時の対応	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。 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。
その他	東京大学 本部遺伝子組換え生物等専門委員会 委員長 開催日 令和4年6月20日 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。 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。

別紙 1 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)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、ガンマー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 ℃、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、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 ℃、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：℃）

生育時期	限界温度		最適	生育時期	限界温度		最適
	低	高			低	高	
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

イネ是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。

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 概要

今回の野外栽培の目的：

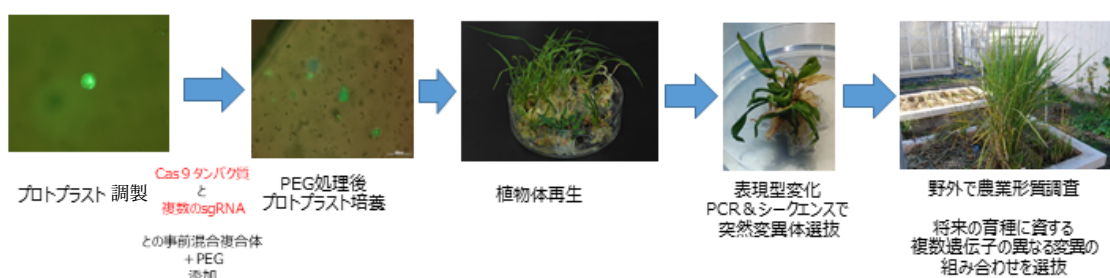
DNA-freeなゲノム編集による複数の変異を利用した
遺伝資源を野外栽培で選抜

対象作物： イネ

対象遺伝子：開花期制御遺伝子・概日時計構成遺伝子である
5 遺伝子 *Heading date1 (Hd1)*, *Hd2*, *Hd17*, *OsGI*, *Ghd7*

栽培場所： 東京大学 弥生キャンパス 実験温室・実験水田圃場
(研究担当者 東京大学 育種学研究室 教授 井澤 毅)

今回の変異導入法：イネのプロトプラストに**Cas9タンパク質**（市販）と
合成sgRNA（業者に合成を外注）を事前混合後、
PEG処理し、培養し、再生植物体を得て、導入突然変異を確認。
（以下、写真を参照。）



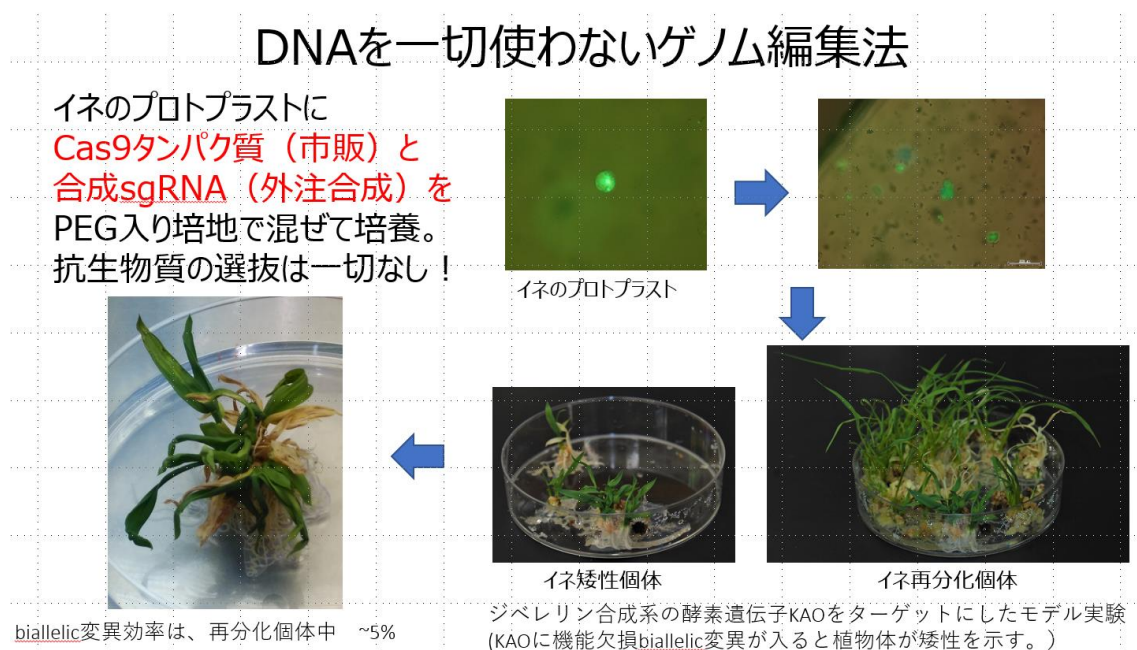
研究のポイント： 再生当代栽培で十分な種子を得、後代で得られる
様々な複数の遺伝子の変異の組み合わせのパフォーマンスを野外栽培で
評価し、将来の育種に利用できる最適な組み合わせを選抜する。

（例えば、二つの遺伝子AとBのヘテロ変異体、*AaBb*再生個体の自殖後
代には、*AABB*, *AABb*, *AAbb*, *AaBB*, *AaBb*, *Aabb*, *aaBB*, *aaBb*, *aabb*
が分離してくる。）

【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、Cas 9 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 変異の有無に関する確認、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。

【DNA free のゲノム編集技術による変異導入法】

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、コシヒカリ種子を滅菌後、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、46 個の無菌化した種子をプレート培地上に置いた。

2022 年 1 月 11 日に、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、今回は 3 等分に小分けし、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 2 種類の sgRNA（実験④では、*Hd1* と *LUX* の、実験⑤では、*Ghd7* と *Hd17* の、実験

⑥では、*OsGI* と *Hd2* の sgRNA）を混合した 3 種類の人工ヌクレアーゼ溶液を調製しておき、それぞれを 3 等分したプロトプラストに加えた。さらに、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④では、*Hd 1* 遺伝子と *LUX* 遺伝子の sgRNA を用いた人工ヌクレアーゼを用い、得られた再生個体 25 個体を解析し、4-25 の 1 個体が *Hd 1* 遺伝子のみに、ヘテロに変異を持っていることを確認した（表 1）。以下の表では、ガイド RNA に該当する箇所を小文字で、変異を赤字で表記。

表 1 実験④

実験④ (25 再生 個体を解析 したうち)	Hd1 ガイド RNA GAGCGTGGTGTACTGCCGCG	LUX ガイド RNA GCTCCCTTCGACGCGAACGC
再生個体名	同定した変異	同定した変異
4-25	hetero +1bp gagcgtggtgtactgccgcg and gagcgtggtgtactgccagcg	なし

この変異の波形データは、別紙 4 を参照。

実験⑤では、*Ghd7* 遺伝子と *Hd17* 遺伝子の sgRNA を用いた人工ヌクレアーゼを用い、得られた再生個体 61 個体を解析し、5-8, 5-14, 5-21, 5-28, 5-39, 5-49 の 6 個体がヘテロ・biallelic に変異を持っていることを確認した。うち、3 個体は、二つの遺伝子の両方に変異を確認できた（表 2）。以下の表では、ガイド RNA に該当する箇所を小文字で、変異を赤字で表記。

表 2 実験⑤

実験⑤ (61 再生個体を解析したうち)	Ghd7 ガイド RNA 配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG	Hd17 ガイド RNA 配列 GTTTCCTCTATGCCTCCTTG
再生個体名	同定した変異	同定した変異
5-8	なし	hetero -1bp gtttcctctatgcctccttg and gtttcctctatgcctc- ttg
5-14	なし	hetero -3bp gtttcctctatgcctccttg and gtttcctctatgcct- --- tg
5-21	hetero +1bp ctgccgatgatgcatcccg and ctgccgatgatgcatc ct cg	hetero +2bp gtttcctctatgcctccttg and gtttcctctatgcctc ttt g
5-28	hetero +1bp ctgccgatgatgcatcccg and ctgccgatgatgcatcc a cg	hetero -1bp gtttcctctatgcctccttg and gtttcctctatgcctc- ttg

5-39	hetero +1bp ctgccgatgatgcatcccgg and ctgccgatgatgcatccgcg	biallelic +1bp gtttcctctatgcctc ttg and gtttcctctatgcctc ctt g
5-49	なし	hetero -1bp gtttcctctatgcctc ctt g and gtttcctctatgcctc -ttg

これらの変異の波形データは、別紙 4 を参照。

実験⑥では、*OsGI* 遺伝子と *Hd2* 遺伝子の sgRNA を用いた人工ヌクレアーゼを用い、得られた再生個体 51 個体を解析し、6-1, 6-3, 6-7, 6-9, 6-12, 6-14, 6-25, 6-26, 6-27, 6-29, 6-39 の 11 個体がヘテロ・biallelic に変異を持っていることを確認した。うち、6 個体は、二つの遺伝子の両方に変異を確認できた(表 3)。以下の表ガイド RNA に該当する箇所を小文字で、変異を赤字で表記。ガイド RNA 配列以外のゲノム配列は大文字で表記。相同性のない配列の挿入は赤太字で表記。

表 3 実験⑥

実験⑥ (51 再生個体を解析したうち)	OsGI ガイド RNA 配列 CTACTCCAAGTGCTACCCAA	Hd2 ガイド RNA 配列 ATACATGCAGTGACGAAGCA
再生個体名	同定した変異	同定した変異
6-1	hetero +1bp ctactccaagtgctacccaa and ctactccaagtgctacc c aa	hetero -7bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcagtg a -----
6-3	biallelic +1bp ctactccaagtgctac t caa	なし
6-7	hetero +1bp ctactccaagtgctacccaa and ctactccaagtgctacc g caa	hetero -2bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcagtgacg--gca
6-9	biallelic +1bp ctactccaagtgctacc a caa	なし
6-12	なし	biallelic atacatgcagtgacgaagca GGGCACTGACCACCTGCCTGG -A GAGTCATC _37bp deletion_ GCAGGGC (この大文字で示した配列は、コシヒカリの配列と比べて、まず、TG の代わりに -A の変異があり、その後、37bp の欠失変異が存在した。そして、この領域のもう一方の染色体では、すべて異なる下記の配列に変化していた。) ACTGACCACCTGCCTGGTGGAG TCATCGCTATCAA and

		atacatgcagtgacgaagca GGACCCAGAGAGAGCAGGTT AATAGAGNAGTAGCAGCTATC A(赤字の大文字は DB 上の配列と 相同性がなかった。) ACTGACCACCTGCCTGGTGGAG TCATCGCTATCAA
6-14	なし	hetero -8bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcag-----ca
6 - 2 5	biallelic +1bp, -4bp 欠失 ctactccaagtg/c----caa 変異を赤字で、ガイド RNA を小文字で g/c は biallelic であることを示している。	hetero -6bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcagtg-----ca
6-26	biallelic +1bp ctactccaagtgtacct/caa 変異を赤字で、ガイド RNA を小文字で t/c は biallelic であることを示している。	bialleic +1bp atacatgcagtgacgaaagca
6-27	hetero +1bp ctactccaagtgtactccaa and ctactccaagtgtaccgcaa	hetero -6bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcagtg-----gca
6-29	hetero -1bp ctactccaagtgtactccaa and ctactccaagtgtacc-aa	hetero -5bp atacatgcagtgacgaagca and atacatgcagtga-----gca
6-39	なし	hetero - 13bp & + 13bp duplication atacatgcagtgacgaagca GGG

		CACTGACCACCTGCCTGGTGGA G TCATCGCTATCA and atacatgcag----- --- CACTGACCACCTGCCTGGTGGA G TCATCGCTATCAA TCATCGCTATCA（ここで、赤で示した配列がほぼ重複している。）
--	--	--

これらの変異の波形データは、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 18 個体のイネ再生個体を得、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た。

【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ほぼ明らかであるが、かなり低い確率とはいえ、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は否定できない。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、

```
guuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgag  
ucggugcuuuu
```

の 80bp である。(この配列自体を IRGSP1.0 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、導入されなかったものをネガコンとして使った。

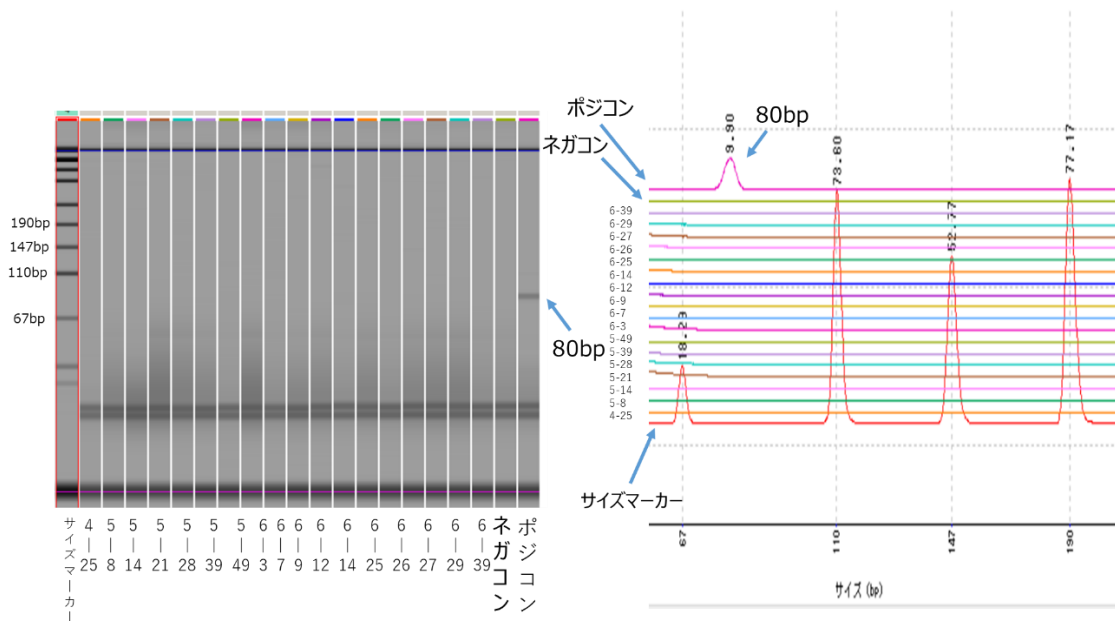


図 1 PCR 解析の産物の MultiNA 電気泳動結果

左はゲルイメージ、右はその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。

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。

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 変異の有無を確認する実験】

次に、CRISPR-P Ver2 でガイド RNA の設計時に、Off-target の候補となったサイトに変異が入っているかどうかの確認を、シーケンス解析で行った。実験④、実験⑤、実験⑥の候補配列領域を PCR 法で特定増幅し、シーケンス結果のアライメントを行ったところ、解析したゲノム編集 18 個体中、実験⑥の再生個体 6-26 にのみ、*Hd2* 遺伝子の Off target 候補配列 1（ガイド RNA 検索ソフト CRISPR-P で、各ガイド RNA に対して予測される Off target の中で、変異が起きる可能性が一番高い配列）の近傍に変異が見つかった。

ガイド RNA	ATACATGCAGTGACGAAGCA (<i>Hd2</i> 遺伝子)
Off target 候補配列 1	ATATATACATTGATGAAGCA (Os03g0186600)
	(逆鎖 TGCTTCATCAATGTATATAT)

6-26 個体に変異が見つかった箇所の配列データを以下に示す。青枠で示した ヘテロに導入された 4 か所に変異が見つかった（上がコシヒカリ、下が 6-26 の Os03g0186600 内配列）。赤線が Off target 候補配列 1。

```
CCATGCTTCATCAATGTATATATAGAAAACAAAGTTAGACAGAGTTGGATGTTTGTAGAGCT
CCATGCTTCATCAATGTATATCTAGAAAACAAAGTTAGACATAATTGGATGTTTGTAAAGCT
*****
```

そのため、この個体に関しては、変異が起きる可能性が 2 番目の Off target 候補配列 (Off target 候補配列 2) までシーケンス解析を行ったが、それ以上変異がないことを確認した。

6-26 個体で、新規に変異が導入された遺伝子 Os03g0186600 は、イネ粒サイズの品種間差の原因の一つと考えられている遺伝子なので、実験圃場での野外栽培で、生物多様性への影響が生じる恐れはないと考えられる。

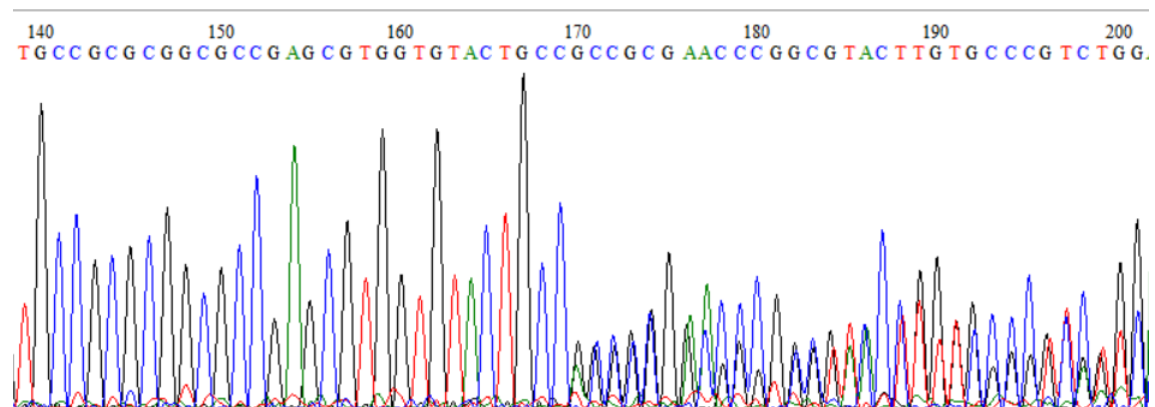
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8349016/> 参照

なお、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、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。

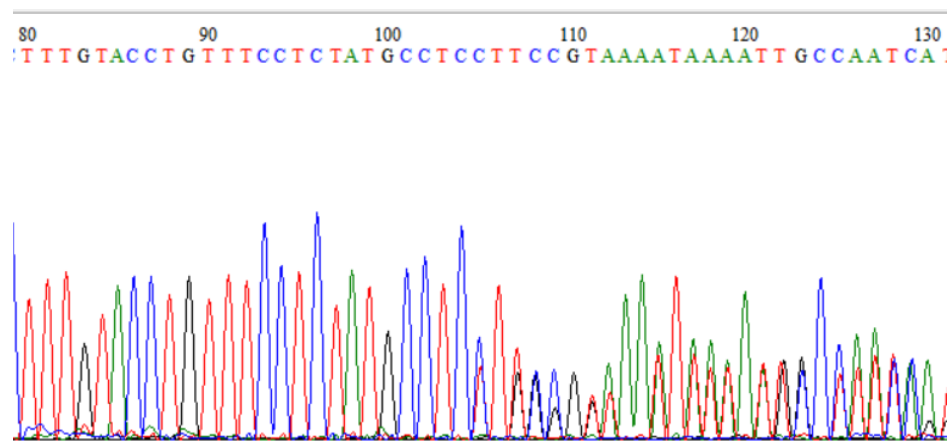
上記、18 再生個体を温室栽培して観察したところ、今のところ、明確な形態の変化は確認できなかった。

別紙 4 変異箇所近傍の波形データ

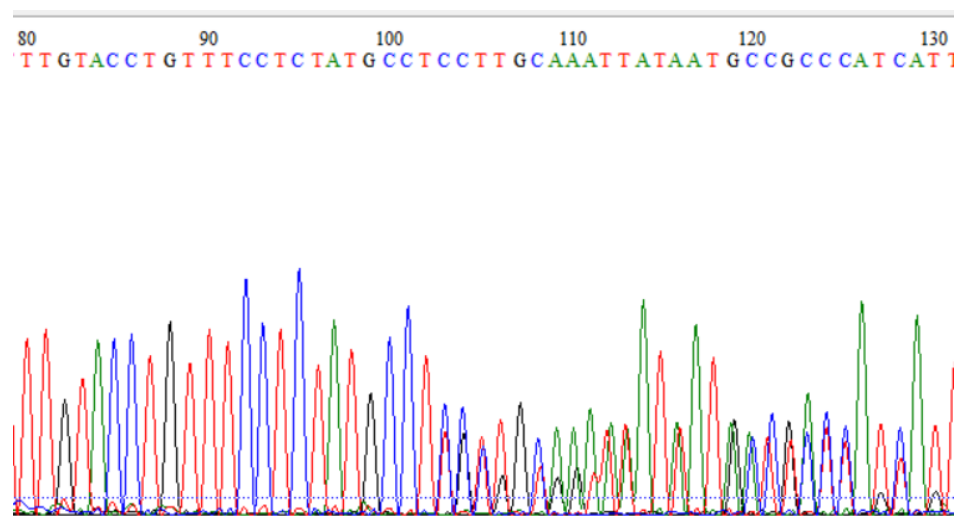
4-25 *Hd1*



5-8 *Hd17*

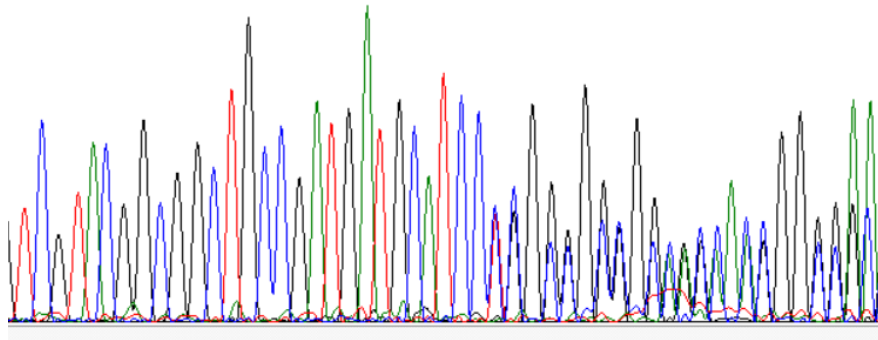


5-14 *Hd17*



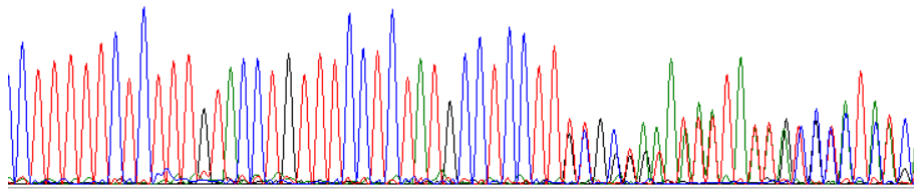
5-21 *Ghd7*

40 50 60 70 80 90
 TCGTACGGCGGTGCCGATGATGCATCCCCGGGGGCGGGCACCACCGGGGAA

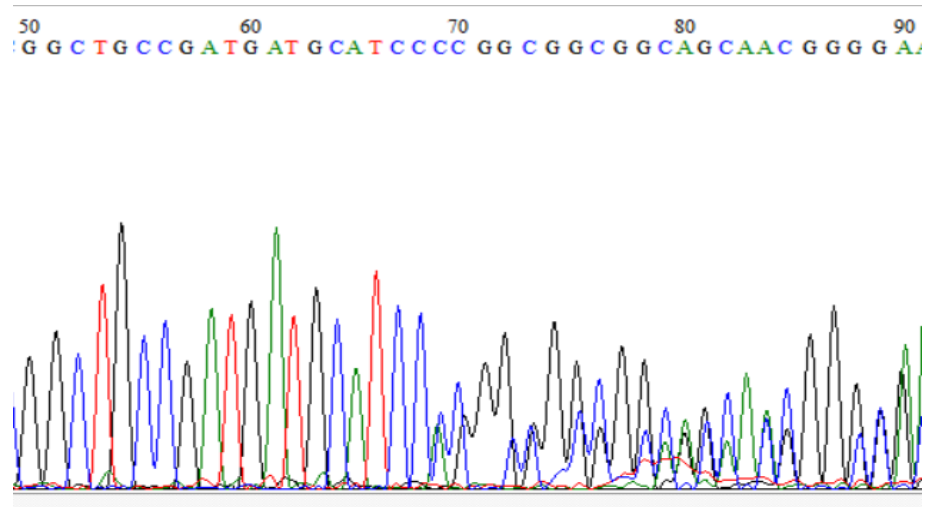


5-21 *Hd17*

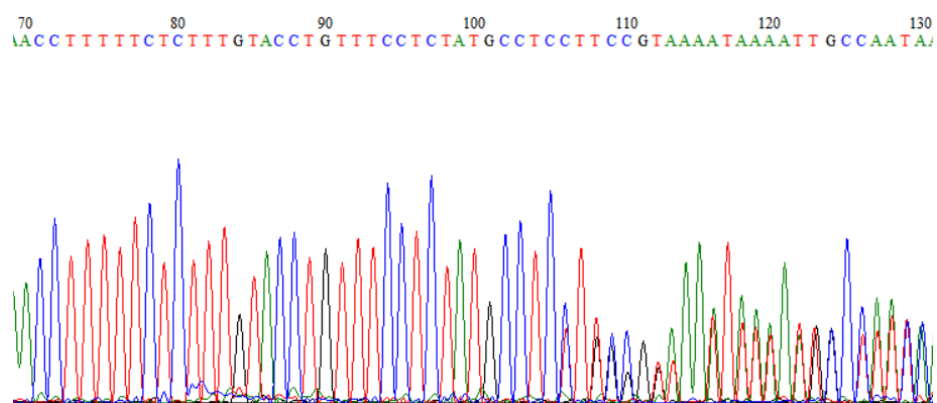
70 80 90 100 110 120 130
 CTCTTTCTCTTTGTACCTGTTTCCTCTATGCCTCCTTTTGCTAAATAATATTGCCTCTATCA



5-28 *Ghd7*

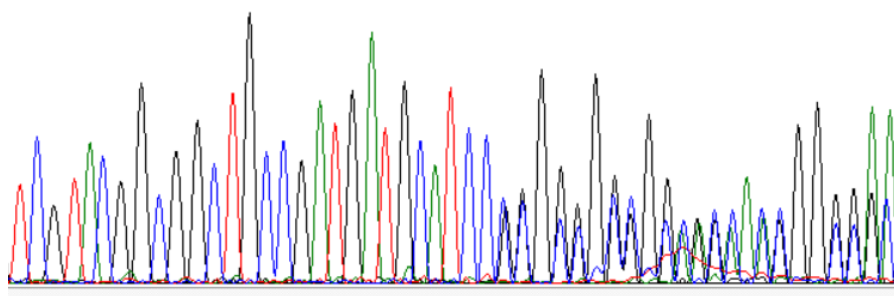


5-28 *Hd17*



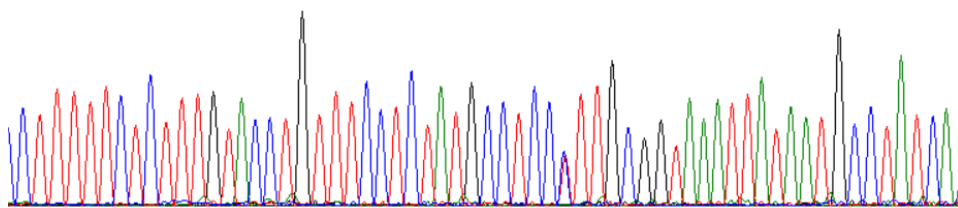
5-39 *Ghd7*

40 50 60 70 80 90
T C G T A C G G C G G C T G C C G A T G A T G C A T C C C G G G G G C G G G C A C C A A C G G G G A A



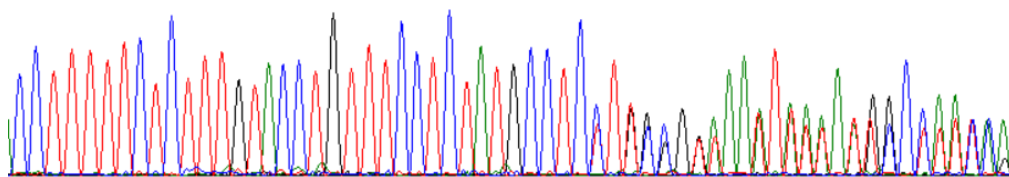
5-39 *Hd17*

70 80 90 100 110 120 130
C T T T T T C T C T T T G T A C C T G T T T C C T C T A T G C C T C C T T T G C G G T A A A T T A T A A T G C C T A T C A C



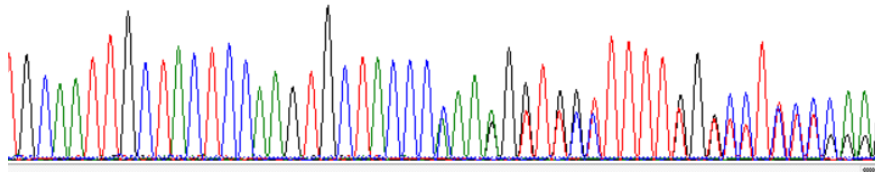
5-49 *Hd17*

70 80 90 100 110 120 130
C C T T T T T C T C T T T G T A C C T G T T T C C T C T A T G C C T C C T T T G C G T A A A A T A A A A T G G C C A A T A A



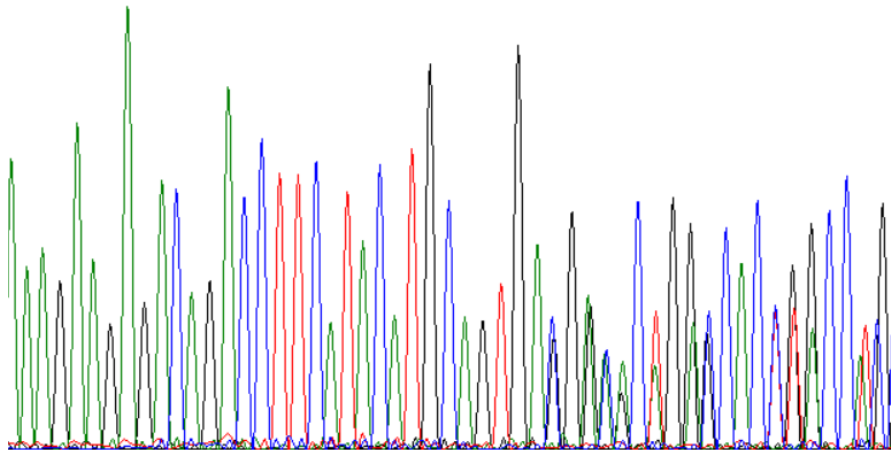
6-1 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 T G C A A T T G C T A C T C C A A G T G C T A C C C A A A A G G T G G T T T T T G G G T C T T T T G A A C



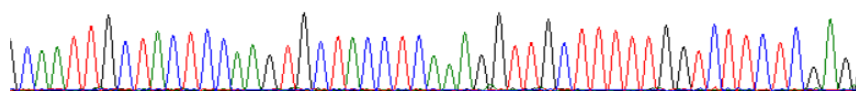
6-1 *Hd2*

120 130 140 150 160 170
 A A A G A A G A G A C A G A C C T T C A T A C A T G C A G T G A G G A A A C T G G C C A C C G G C C T G C



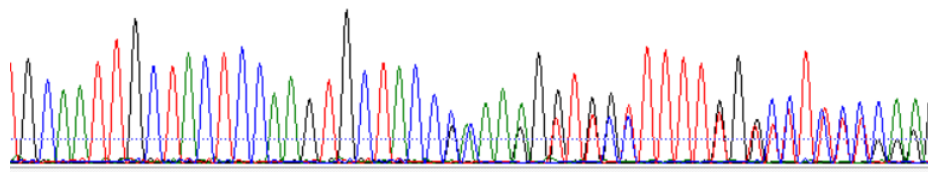
6-3 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 ;CAATTGCTACTCCAAAGTGCTACCTCAAAGGTTGCTTTTTGGTCTTCTCGAGC



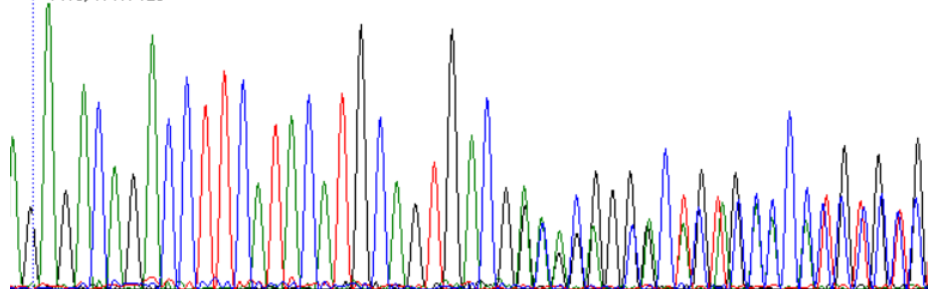
6-7 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 :GCAATTGCTACTCCAAAGTGCTACCCAAAGGTTGGCTTTTTGGGCCTCCCGGGC

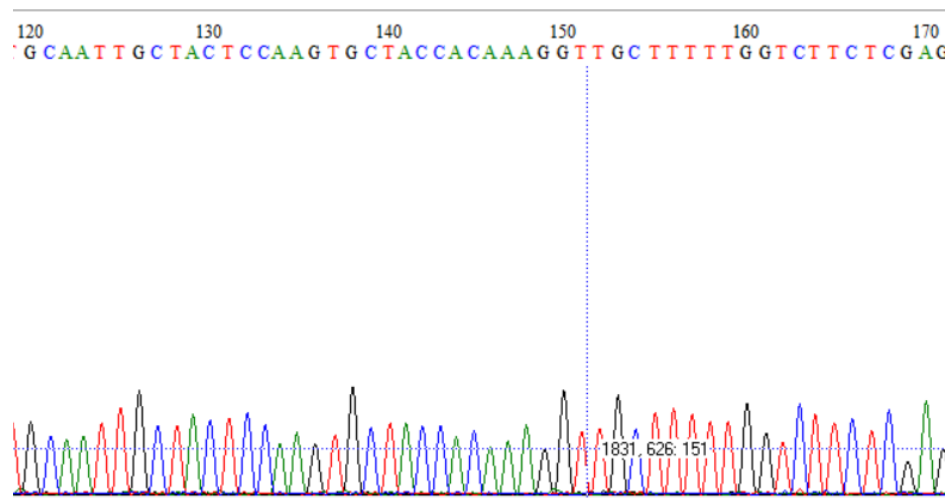


6-7 *Hd2*

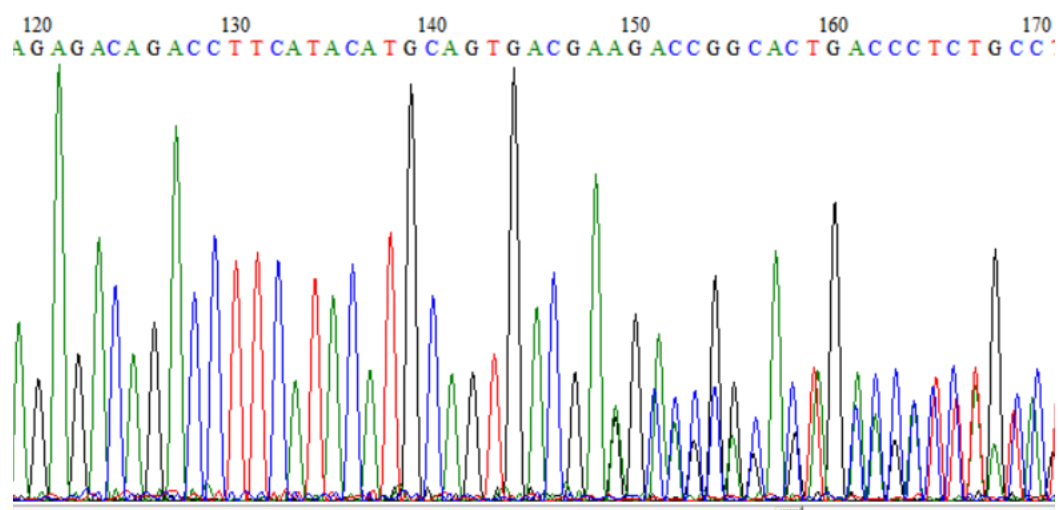
120 130 140 150 160 170
 AGAGACAGACCTTCATACATGCA GTGACGACACGGGACAGACACCCCGCGCGC
1416, 1717: 120.....



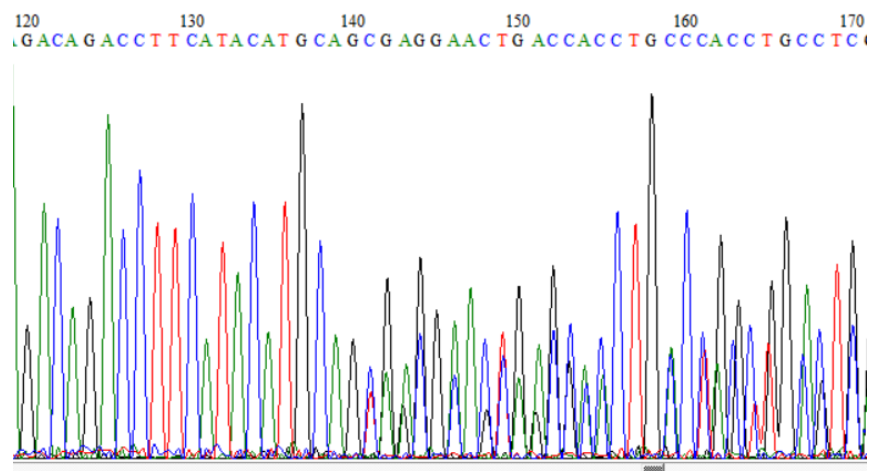
6-9 *OsGI*



6-12 *Hd2*

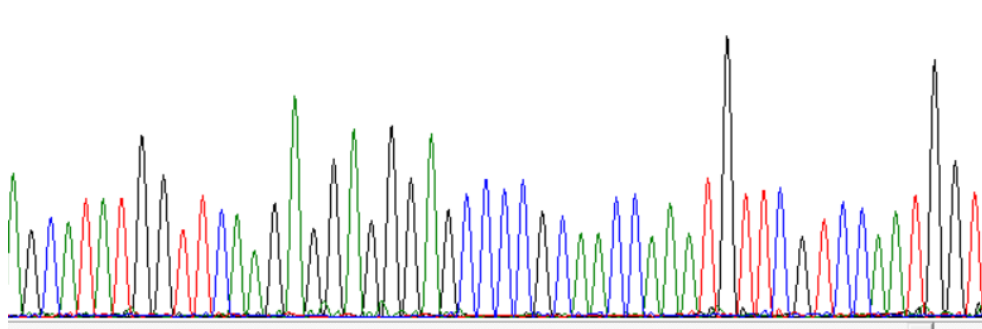


6-14 *Hd2*



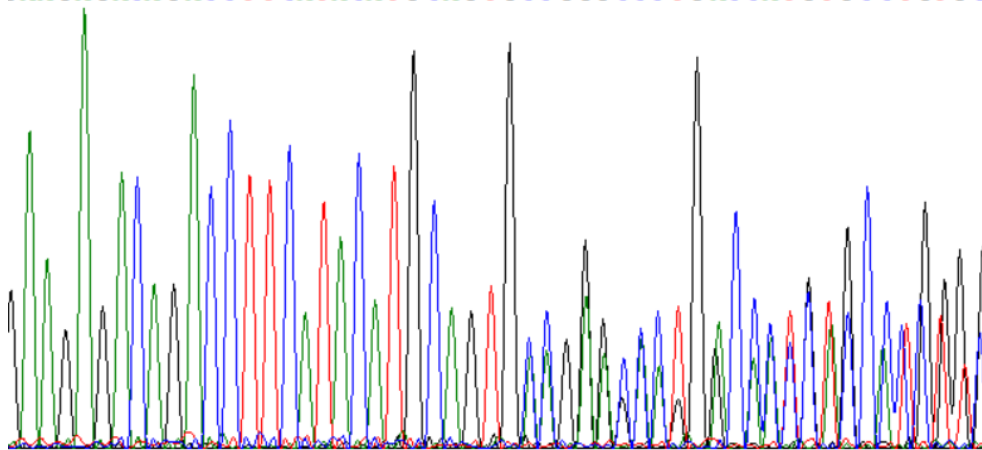
6-25 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 AGCATATG GTTCAA GAGGAGGGAGCCCCGCAACC AAAATGTTCTC CAATGGT



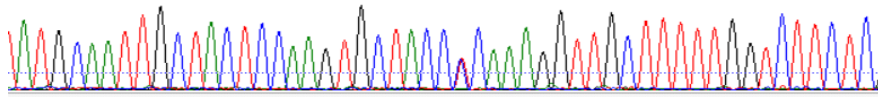
6-25 *Hd2*

120 130 140 150 160 170
 3AAGAGACA GACCTTCATACATG CAGTGCCGGGCCCTGACCATGTG CCTGTGC



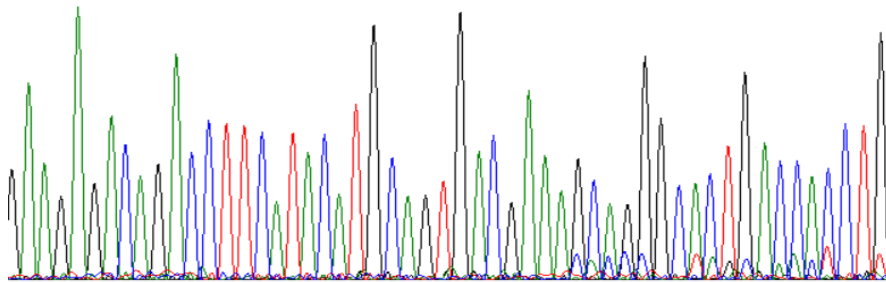
6-26 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 T A T G C A A T T G C T A C T C C A A G T G C T A C C C C A A A G G T T G C T T T T T G G T C T T C T C C



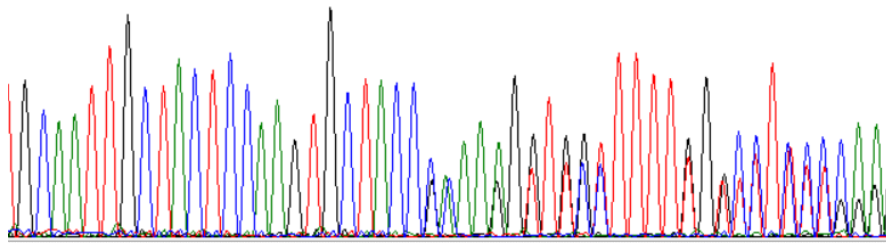
6-26 *Hd2*

120 130 140 150 160 170
 G A A G A G A C A G A C C T T C A T A C A T G C A G T G A C G A A A G C A G G G C A C T G A C C A C C T G



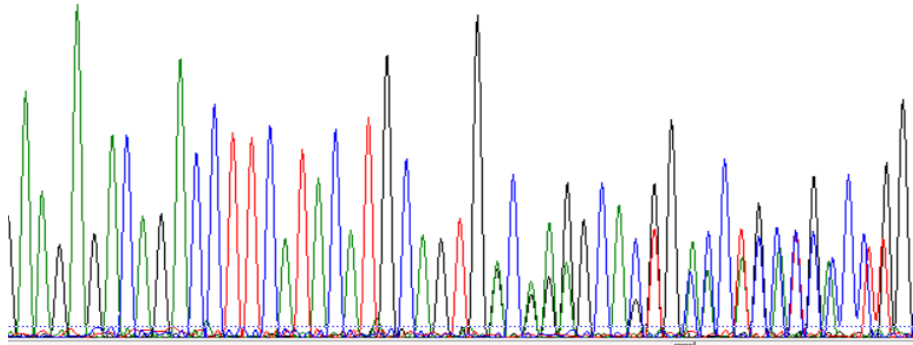
6-27 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 :G CAATT GCTACTCCAAGTGCTACCCCAAAGTTGGCTTTTGGGCCTCCCCAGC



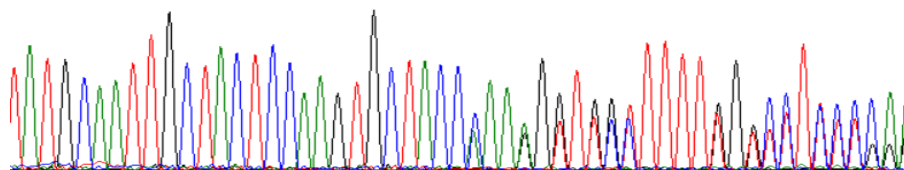
6-27 *Hd2*

120 130 140 150 160 170
 :AAGAGACAGACCTTTCATACATG CAGTGGCAAGGCACGGACCTGCCGCCCTGGC



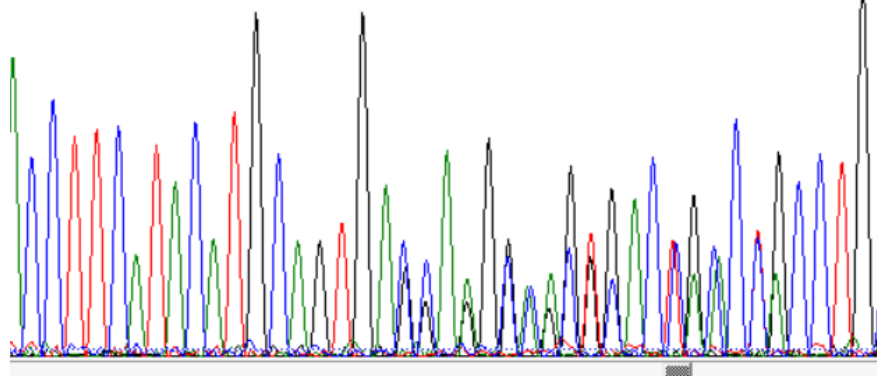
6-29 *OsGI*

120 130 140 150 160 170
 TATGCAATTGCTACTCCAAAGTGCTACCAAAAGGTGGCTTTTGGGCCTCCCGAA



6-29 *Hd2*

130 140 150 160 170
 ACCTTTCATACATG CAGTGACCAAGGCAGTGACTGCCTGCCTG (



6-39 *Hd2*

120 130 140 150 160 170
 .GAAGAGACAGACCTTTCATACATGCAGCGCTGACCCCTTGCCCTGGAGGAGTCG'

