

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に係る実験計画報告書

2021年 4月 5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 国立研究開発法人理化学研究所 横浜事業所
提出者 所長 林 孝浩
住所 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号

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 <i>Solanum tuberosum</i> disrupted-SSR2 pSuehiro108#117, <i>Solanum tuberosum</i> disrupted-SSR2 pSuehiro108#164)
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 隔離ほ場 3. 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場 (「別紙2 限定されたほ場に関する情報」に詳細を記載)
	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>)
宿主の自然環境における生理・生態学的特性		生息・生育可能な環境の条件；生育適温は、昼間 20～24℃，夜間 8～12℃の時に地下部の発達が良好で、これよりもやや高温の場合は地上部の発達が良好となる。塊茎は-3℃、茎葉は-4℃で死滅する。 繁殖または増殖の様式；種子繁殖も行うが、四倍体栽培種の稔性は低い。塊茎による栄養繁殖を行う。 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 1973, Ann. Rev. Plant Physiol. 24:173-96)やレクチン(Allen 1978, Biochem J, 171: 665-674)を産生する。 我が国における具体的な生息・生育域；全国都道府県にわたって広く栽培され、年間約 250 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。 ジャガイモの花粉が、栽培ジャガイモと交雑する可能性については、ジャガイモの交雑距離は 10m程度で、20mの隔離により交雑を防ぐこ

		とが可能と報告されている(Conner, Dale, 1996, Theor Appl Genet 92:505-508)ことから隔離距離の設定により、ほ場外のジャガイモへの交雑は想定されない。さらに、通常ジャガイモは種子から栽培を行うことはない。 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
	使用したゲノム編集技術の種類・導入方法	使用したゲノム編集技術の種類；プラチナ TALEN（高機能型 TALEN, (Yasumoto et al. 2019, Plant Biotechnol. 36:167-173) 導入方法；人工ヌクレアーゼ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る一過的発現（梅基直行，斉藤和季，特願 2017-226643）で宿主の細胞内に移入し使用。
	細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無	細胞外で加工した核酸；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。 移入方法；アグロバクテリウムによる一過的発現（前出）。 残存の有無、除去した方法；一過的発現で発現した遺伝子は宿主のゲノムに挿入されていない。T-DNA 領域およびバイナリーベクターには植物細胞内で複製するための配列を含んでいないことから、細胞内に移入された DNA は細胞内酵素で分解、消滅する。使用したアグロバクテリウムは除菌用抗生物質で除去し、アグロバクテリウム残存試験でアグロバクテリウムが除去されていることを確認した（「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）。 細胞外で加工した核酸の残存の有無を確認した方法；PCR 法、サザンブロットティング法による外来核酸の非検出、バイナリーベクターに含まれる抗生物質抵抗性遺伝子に由来する薬剤耐性がないこと、一過的発現で利用した再分化促進遺伝子が構成的に発現することによる形態異常が認められないことにより外来遺伝子が残存していないことを確認した（「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）。
改変した遺伝子等	名称	SSR2 (Sterol side chain reductase 2, Sawai, Ohyama et al. 2014, Plant Cell 26:3763-3774)
	機能	遺伝子の発現により産生されるタンパク質の機能は 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。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。
	予想される機能の変化	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 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, Ohyama 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 DWF1/SSR1 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、若干の 24-25 位の二重結合を還元する活性を持つため、10%以下の SGA 量は残る。)
改変生物の形質の変化	当該改変により生じた変化	ゲノム編集技術により得られた系統の SSR2 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 SSR2 遺伝子の残存は確認できていない。P1P 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 2018 年 2 月に確立し試験管内での挿し木によって 3 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。
	上記以外に生じた変化	ゲノム編集技術により得られた系統は P1P 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 (栄養器官及び一部の個体で開花した花) 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片側 17 塩基で合わせて 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。
生物多様性影響が生ずる可能性についての考察		1. 競合における優位性 (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 SSR2 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。SSR2 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。SSR2 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 P1P 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は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い、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, Ohyama 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, Siddiqui, 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 (<i>S. nigrum</i>) 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, Stiekema 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。 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、限定されたほ場で栽培等するものであり、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。 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。
緊急 連絡 先	所属機関の名称 及び職名	国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター 上級研究員
	氏名	
	住所	郵便番号 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
		電話番号
		メールアドレス
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。
その他		当該生物の取扱いについて検討する委員会の設置状況：国立研究開発法人理化学研究所 横浜遺伝子組換え実験安全委員会にて検討を行った。 委員長名：谷内 一郎（国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター免疫転写制御研究チーム チームリーダー） 検討日：2021 年 4 月 2 日 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。

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。

(2) 構成要素の機能

表1に示した。

(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、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に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。近年、このシステムにより、植物のあらゆる遺伝子に対して高い効率でノックアウトすることが可能となっている。プラチナTALENシステムを利用した標的ゲノム編集は、

- ① 2種類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）が報告されている。

(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%のコレステロールを含有する。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

一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。この酵素は若干の24-25位の二重結合を還元する活性を重複して持つため、SSR2遺伝子のみの破壊では、10%以下のSGA量は残ることが報告されている。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

pSuehiro108（由来の詳細は、次項に記載）

(2) 特性

本ベクターの基となったpSuehiro108のベクターバックボーン領域の由来はpBIN19プラスミドである。pSuehiro108は、このpBIN19のT-DNA領域を除いた部分を、新たなT-DNA領域を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し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。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)が宿主植物の染色体に伝達される。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。植物に移入されゲノムに組み込まれた核酸のみが複製し、交配によってのみ染色体上で遺伝・維持される。宿主であるアグロバクテリウムに哺乳動物等に対する病原性を付与することは知られていない。

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。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

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 20:659-665)。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 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 et al. 2009, PLoS ONE, 4:e5812)。両法とも右側境界配列(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。細胞に取り込まれたT-DNAのうち、ごく一部がゲノムに組み込まれることで遺伝子組換えが成立すると考えられている。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記載している (梅基直行, 斉藤和季, 特願2017-226643)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

宿主は農研機構から種苗登録されたジャガイモ品種「さやか」（登録番号6027）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遺伝子をゲノムに組込んで形質転換さ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した。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、PCR法、サザンブロッティング法、表現型からの解析から確認を行った。2つのゲノム編集系統（pSuehiro108#117とpSuehiro108#164）を獲得した。

(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は、LB培地に茎と葉切片を入れ、アグロバクテリウムの増殖の有無を検証した。図4のとおりアグロバクテリウムの増殖はなく2つのゲノム編集系統（pSuehiro108#117とpSuehiro108#164）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。

4. 細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無について

(1) PCR法

使用したベクターの核酸の配列に基づいて設計したプライマー対を用い、PCRを行うことで、移入遺伝子の特異的に検出することが可能であり、その感度については、約50ngの全DNAを鋳型として供すれば、検出可能である。

選抜された系統において、外来遺伝子が存在するか否かについてさらに詳細な検討を進めるため、T-DNA上の配列だけでなく、発現ベクター上の全域についてPCRによる検定を実施した。無菌培養苗の葉からPlant DNAzol（Invitrogen）を使用して抽出・精製したゲノムDNAを25 ng/ μ Lに希釈したもの、あるいはそれぞれの発現ベクタープラスミドDNAを約10 fg/ μ Lに希釈したものを鋳型として使用した。反応液20 μ L中に鋳型2 μ L加えた。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, Nature 475, 189-195）、今回ゲノム編集を行った品種「さやか」は四倍体の栽培ジャガイモであることから、ゲノムサイズは約3,376 Mbpであると予想される。PCR反応液20 μ L中に加えられるゲノムDNA 50 ngは約13,500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のサイズであり、鋳型濃度として約10 fg/ μ Lを使用した。また、ゲノムDNAと同様に反応液20 μ L中に鋳型2 μ L加えた。PCR反応液20 μ L中（20 fg）には約1,010分子のプラスミドが含まれると予想される。また、増幅の特異性の確認のためのコントロールとして、非形質転換体ジャガイモから抽出したゲノムDNA、あるいは非形質転換体ジャガイモから抽出したゲノムDNAにプラスミドDNAを加えたサンプルを鋳型として使用した。つまり、コントロールとして1010分子の標的が増幅可能な状態で、ゲノムに1コピーが挿入した場合の13,500分子含有していると想定できる反応液で標的の有無を検定した。

PCR反応液（20 μ L）は1X濃度のHot Start Taq 2X Master Mix（New England BioLabs）、フォワード、リバースそれぞれ終濃度0.2 μ Mのプライマー、上で示した濃度の鋳型、滅菌水あるいは超純水を含む。プライマーは図5に示す発現ベクター上の領域を増幅させるものを使用した（表2）。コントロールとしてジャガイモ内在遺伝子SSR2遺伝子（ゲノム編集の標的）の増幅を行うプライマーを使用した（PCR0：pY365-pY366）。反応は95℃ 30秒の変性後、95℃15秒、アニーリング温度15秒、伸長反応68℃1分を34サイクルし、最終伸長68℃5分反応させた（表3）。反応後4℃で保存

した。反応液はDNA-1000 キットを使用しMultiNA (MCE-202) DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置(島津製作所)を用いてデータを取得した。この装置は蛍光試薬と同時にマイクロチップで電気泳動を行い、蛍光強度を測定し、疑似的に電気泳動像として出力することができる。結果を図6に示す。

通常の一過的移入が起こる RB と LB の間に設定したプライマー、まれにそれを越えた移入があるとされるバックボーン部分に設定したプライマーのいずれでも増幅は認められなかった。コントロールでは表3の予想される増幅断片長を示すバンドが確認できた。このことから pSuehiro108#117 と pSuehiro108#164 のゲノムには増幅される該当する配列を持たず、ゲノムに使用したベクターの挿入はなく、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。

(2) サザンブロッティング法

サザンロットハイブリダイゼーションによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、イネでは約 1 μ g の全 DNA を用いれば検出可能であるとされるが、今回実施した系は、そこまでの感度がないことから無菌培養苗の葉から Plant DNAzol (Invitrogen)を使用して抽出・精製した 30 μ g の全 DNA を使用した。

今回は検出の確認のため、先行研究において得られた 1 組の TALEN 遺伝子がゲノムに 1 コピーのみ挿入されていると推定される Sayaka/pYS_026-#1 と NT さやかとプラスミド DNA (100pg) を混合したサンプルも同時に解析した。各レーンの DNA 量は以下の通りである。制限酵素はいずれも BamHI と HindIII の二重切断を行い、pSuehiro108 が含まれる場合は 4.1kbp、3.9kbp の断片(本解像度では移動度の差は検出できない)、pYS_026 が含まれる場合は 3.9kbp の断片が検出されることが期待される。

DNA プローブは PCR DIG Probe Synthesis Kit (Sigma-Aldrich)、FokI 構造遺伝子内約 0.5 kb で合成した(図3)。DIG を認識する抗体は抗 Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche)を、抗体の検出は CDP-Star Substrate (0.25 mM ready-To-Use, Invitrogen)を用いた。生じた化学発光は LumiCube (株式会社リポニクス)で検出を行った。

サザンロットハイブリダイゼーション解析の結果、ポジティブコントロールであるさやか 形質転換体 pYS_026-#1 と、同じくポジティブコントロールである NT さやかとプラスミド DNA を混合したサンプルでは明瞭なバンドが確認された。ゲノム編集個体 pSuehiro108#117 と pSuehiro108#164 は、バンドが検出されておらず(図7)、植物細胞に移入したと考えられるアグロバクテリウムの T-DNA 上の核酸のゲノム編集に必須な FokI 領域は染色体上に挿入されていないことが示された。このことからゲノム編集が起きた pSuehiro108#117 と pSuehiro108#164 は、ゲノムにベクターが挿入されているのではなく、一過的発現でゲノム編集が起きた結果であると判断した。つまり細胞外で加工した核酸の残存は無いと判断した。

(3) 表現型からの解析

カナマイシン耐性を付与する発現カセット3を持つ植物細胞はカナマイシン耐性であることが期待できる。ゲノム編集個体 pSuehiro108#117 と pSuehiro108#164 は、カナマイシン 50 mg/L を含む MS 培地で生育できないことを確認した。一過的発現で利用した再分化促進遺伝子である ipt 遺伝子を含む発現カセットがゲノムに組込まれるとカルスなど異常な形態を示すことが期待される。ゲノム編集個体 pSuehiro108#117 と pSuehiro108#164 は、正常なジャガイモの形態を示した。

(1)～(3)より、植物細胞に移入したと考えられるアグロバクテリウムの T-DNA 上の一過的に移入され

た核酸は宿主染色体ゲノム上になく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

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16の独立クローンの塩基配列を並べ、塩基配列を確認した。ゲノム編集個体pSuehiro108#117とpSuehiro108#164のSSR2遺伝子は欠失を持ち、正常に機能しているSSR2遺伝子は持っていないことが分かった。ゲノム編集に使用したさやかは4倍体であるが、個々の染色体を分けて変異を検出する方法が確立されていない。そのため、それぞれが個々の染色体の変異であるかどうかは不明である。本系統は2018年2月に確立し試験管内で3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。野外栽培や塊茎からの栽培での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。

(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。SSR2の酵素の活性が失われ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。試験管内で培養した植物体、さらにPIPでの人工照明下での土壌栽培で収穫した塊茎のSGAが多く蓄積する塊茎表皮近傍から抽出したSGAの定量を行った。その結果、pSuehiro108#117とpSuehiro108#164はSGA含有量の大きな減少が観察できた（図9と10）。

(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

非ゲノム編集のジャガイモと比較して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で、ゲノム編集技術により得られた系統では植物体の形態（図11）、塊茎収量（図12と図13）について特筆すべき差異は観察されていない。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検証で実施する。2020年の特定網室の春作栽培では#117の一部の個体で開花が確認されたので観察を行った（図14 開花状況）。#164の系統については開花した個体はみられなかった。ジャガイモ品種は塊茎による栄養生殖により繁殖する。そのため品種によっては、ほとんど開花しないものや、北海道での栽培では開花するが関東での栽培では開花しないものが存在する。「さやか」は比較的开花が観察される品種であるが、生理状態や環境によっては着蕾しないこと、着蕾しても開花に至らない事例があることが知られている。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片側17塩基で合わせて34塩基を認識し切断するTALENである。TALENの認識配列はCRISPR/Cas9の認識配列である23塩基より長いため、オフターゲットによる変異の可能性が低く報告も知られていない。今回の標的配列について、ジャガイモデータベース (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) に登録されているgenome assembly (v6.1) に対しBLAST検索を実施した。片側だけ100%一致する配列はSSR2遺伝子の配列以外には存在しなかった。両側を含めた34塩基中27塩基が一致する配列が最も似ている配列はSSR1遺伝子の内部にあることがわかった（図15）。本配列については変異が生じていないことはゲノムDNAをPCRで増幅し、その増幅断片の塩基配列を直接シーケンスすることで確認した。本ゲノム編集技術により得られた系統はオフターゲットの変異を持たないと考えられる。

表 1 ゲノム編集に使用した核酸のサイズ、由来及び機能

表 2 使用したプライマー一覧

表 3 各プライマーペアにおけるアニーリング温度 $T_A(^{\circ}\text{C})$ と予想される増幅断片長 (bp)

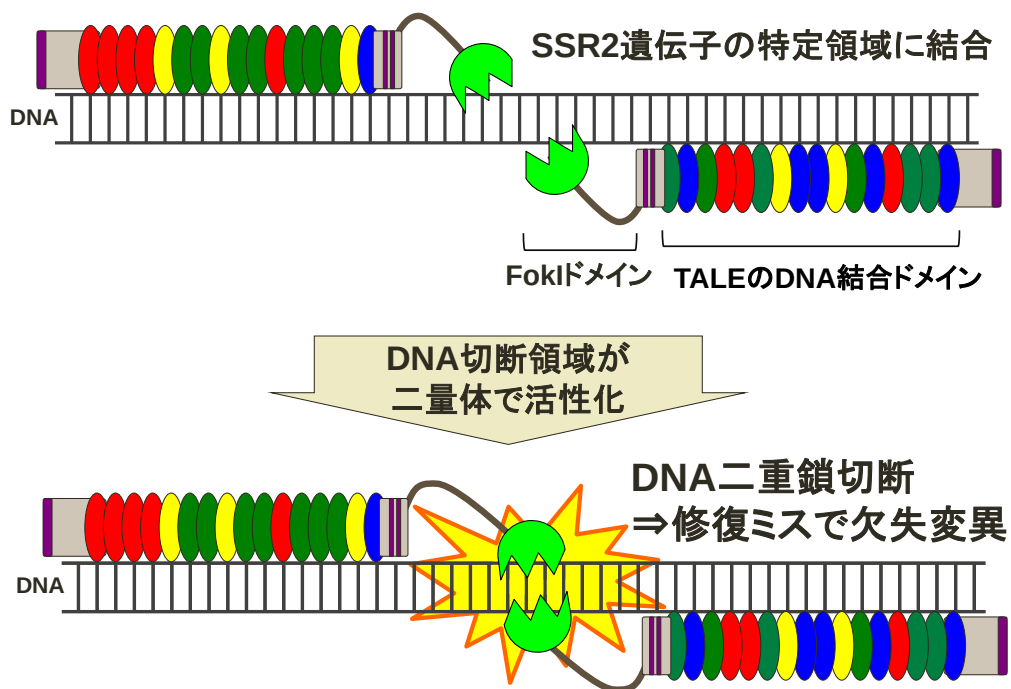


図1 プラチナ TALEN システムによる SSR2 遺伝子の切断

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。

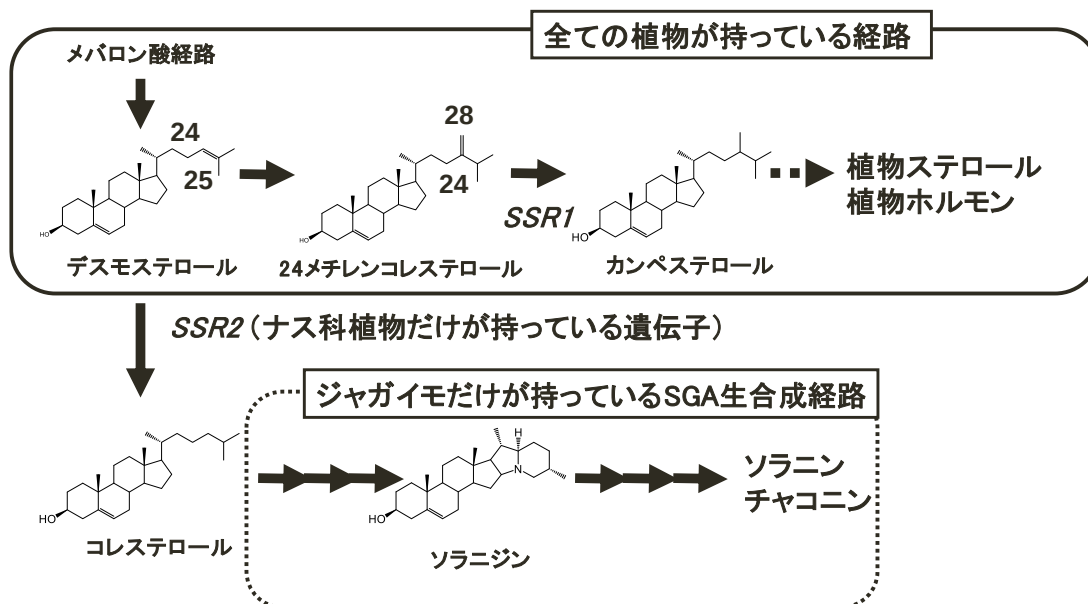


図2 SGA 生合成経路と SSR2 遺伝子産物の機能 生合成系の遺伝子の発現抑制や機能破壊をした場合には、その反応基質が蓄積することが多い。SSR2 遺伝子の抑制や破壊の場合は、基質はそのまま植物ステロール合成に使われるため、新規の蓄積産物は見られていない。

図3 本ゲノム編集ジャガイモ作出に用いた形質転換用ベクターの T-DNA 領域にある発現カセットの構造



LB 培地 2mL に植物片を入れ 3 日間 28℃ で培養した。いずれの検体からもアグロバクテリウムの増殖は確認できなかった。

図 5 アグロバクテリウムに導入した TALEN 発現ベクター全体ならびに使用したプライマーの位置

図 6 PCR 法解析による、移入した核酸の染色体上に挿入の検出

図 7 サザンブロッティング法解析による、移入した核酸が染色体上に挿入していないことの推定

図 8 標的領域の SSR2 の遺伝子変異

図 9 試験管内の植物体での SGA 含量

図 10 P1P での人工照明下での土壌栽培で収穫した塊茎の塊茎表皮近傍での SGA 含量

図 11 特定網室での植物体の形態

図 12 一株から P1P での人工照明下での土壌栽培で収穫した塊茎

図 13 P1P での人工照明下での土壌栽培で収穫した塊茎収量

図 14 特定網室での開花の状況

A

SSR2

target site:

TAL-SSR2-Left (16)

tGGGGCTTCTTGTTCAgctgaaatcaagcttATACCAGTTGATCAATa
 aCCCCGAAGAACAAAGTcgactttagttcgaaTATGGTCAACTAGTTat

← --- -15-bp --- → TAL-SSR2-Right (16)

SSR1

off-target
site:

tGGGGCTTCTTGTTCAgctgagatcaagctcATTCCAAATCAAGCAATa
 aCCCCGAAGAACAAAGTcgactctagttcgagTAAAGGTAGTTCTTATt

B

NT	517	TCTCACATTTATGGACTGTTCTCAGACACTGTTGTGTCATATGAAGTTGTTCTAGCAGAC	576
#117	1	TCTCACATTTATGGACTGTTCTCAGACACTGTTGTGTCATATGAAGTTGTTCTAGCAGAC	60
#164	1	TCTCACATTTATGGACTGTTCTCAGACACTGTTGTGTCATATGAAGTTGTTCTAGCAGAC	60
NT	577	GGGCAGGTAGTTAGAGCTACAAAGGACAATGAATATTCTGATCTTTTCTATGCTATTCCA	636
#117	61	GGGCAGGTAGTTAGAGCTACAAAGGACAATGAATATTCTGATCTTTTCTATGCTATTCCA	120
#164	61	GGGCAGGTAGTTAGAGCTACAAAGGACAATGAATATTCTGATCTTTTCTATGCTATTCCA	120
NT	637	TGGTCTCAAGGGACTCTGGGGCTTCTGGTTTCAGCTGAGATCAAGCTCATTCCAATCAAG	696
#117	121	TGGTCTCAAGGGACTCTGGGGCTTCTGGTTTCAGCTGAGATCAAGCTCATTCCAATCAAG	180
#164	121	TGGTCTCAAGGGACTCTGGGGCTTCTGGTTTCAGCTGAGATCAAGCTCATTCCAATCAAG	180
NT	697	GAATACATGAAACTTACCTACAAACCTGTAGTTGGTAATTTGAAAGAGATTGCTCAGGCT	756
#117	181	GAATACATGAAACTTACCTACAAACCTGTAGTTGGTAATTTGAAAGAGATTGCTCAGGCT	240
#164	181	GAATACATGAAACTTACCTACAAACCTGTAGTTGGTAATTTGAAAGAGATTGCTCAGGCT	240
NT	757	TATATAGATTCTTTTTCACCTAAAGATGGGGATCAGGATAACCGTGAGAAAGTTCCGGAC	816
#117	241	TATATAGATTCTTTTTCACCTAAAGATGGGGATCAGGATAACCGTGAGAAAGTTCCGGAC	300
#164	241	TATATAGATTCTTTTTCACCTAAAGATGGGGATCAGGATAACCGTGAGAAAGTTCCGGAC	300
NT	817	TTTGTAGAAACCATGGGTGACACTCCACAGAAGCTGTTGCATGACTGGTAGATATGCT	876
#117	301	TTTGTAGAAACCATGGGTGACACTCCACAGAAGCTGTTGCATGACTGGTAGATATGCT	360
#164	301	TTTGTAGAAACCATGGGTGACACTCCACAGAAGCTGTTGCATGACTGGTAGATATGCT	360

図 1 5 TALENで認識する配列に最も相同性のある配列があるSSR1遺伝子の配列（A）とゲノム編集個体のSSR1遺伝子の配列（B）

A. オレンジ線のマーキングはTALE Transcription activator-like effector (TALE)による可変結合配列、両側のtとaは固定された結合配列。青で示した塩基がSSR1遺伝子で一致しない配列。B. ゲノム編集個体pSuehiro108#117とpSuehiro108#164のSSR1遺伝子領域全体をPCRで増幅した断片について、TALENで認識する配列に最も相同性のある部位（水色）の周辺である517-876の配列を直接シーケンスし非ゲノム編集個体(NT)の配列と比較した。その結果、変異は確認されなかった。

別紙2 限定されたほ場に関する情報

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等を予定している、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構がつくば観音台地区に保有する3か所の隔離ほ場に相当する管理が可能なほ場（以下、隔離ほ場という）の情報を以下に示す。

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

1. 隔離ほ場の所在地等

（1）名称

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 隔離ほ場
3. 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場

（2）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

（図1、2、4、6）

2. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、立入禁止であることを記載した標識、洗場、焼却炉を設置している。水田を備えている。

畑ほ場を備えている（3.のみ）

（図3、5、7）

3. 面積

1. 全体の面積は約60a（うち、水田の面積は約30a）
2. 全体の面積は約55.4a（うち、水田の面積は約20.8a）
3. 全体の面積は約82a（うち、水田の面積は約5.2a、畑ほ場は約13.8a）

4. 隔離ほ場の周辺環境

（1）地形

茨城県つくば市内、筑波・稲敷台地に位置する

(2) 周辺の土地利用状況

隔離ほ場は機構の敷地内にある。隔離ほ場外周から機構の敷地境界までそれぞれ最短で

1. 約 150m である。
2. (農研機構敷地を貫く公道を除き) 約 250m である。
3. 約 50m である。

(3) 5. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域(国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域)はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 10 キロである。

(4) 気象条件

隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点である茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値を表 1 に示した（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021 年 2 月 25 日、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&block_no=47646&year=&month=&day=&view）。

表 1 茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値

つくば(館野) 平年値(年・月ごとの値) 主要要素						
要素	降水量 (mm)	気温 (°C)			風向・風速 (m/s)	日照時間 (時間)
	合計	平均	最高	最低	平均	合計
統計期間	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010
資料年数	30	30	30	30	30	30
1 月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	194.1
2 月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	174.2
3 月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	171
4 月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	173.3
5 月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	172.7
6 月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	121.2
7 月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	139.5
8 月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	178.6
9 月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	123.9
10 月	165.9	16	20.9	11.3	2	136.5
11 月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	146.5
12 月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	181.3
年	1282.9	13.8	19.1	8.8	2.4	1912.8

(5) 台風の襲来歴

隔離ほ場のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 2 に示した。

表 2 関東地方への過去 10 年間の台風の接近数

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021 年 2 月 25 日

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)

「台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）に接近した台風」としています。（注）接近は 2 か月にまたがる場合があります、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しません。」（サイトの原文のまま）

年	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	年間
2020									1	1			2
2019						1	1		1	1			4
2018						1	1	2	2	1			6
2017							1	1	1	2			5
2016								4	1	1			6
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2

(6) 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

隔離ほ場の建設（1. 2006 年、2. 2004 年、3. 1991 年）以来、冠水したことはない。

(7) 過去 10 年における強風の経験とその程度

2018 年 9 月 30 日に関東地方を通過した平成 30 年台風 24 号によるほ場外からの倒木により、観音台第三事業場組換え植物隔離ほ場外周を取り巻くフェンスが破損した（当時、栽培されていた遺伝子組換え植物はなかった）。フェンスは早急に修繕を行い、倒木の処理を行った。それ以外では、隔離ほ場を建設して以来、強風による設備・作物への被害はなく、直近の令和元年東日本台風（令和元年台風第 19 号）でも特筆すべき被害はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、つくば市が作製した「つくば市洪水ハザードマップ」において、浸水想定区域に指定されていない。

(9) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、鳥類による被害は報告されていない（防鳥網の設置等によってこれらの侵入を防ぐことができる）。また、隔離ほ場にはフェンスが設置されており、獣害は発生していない。

(10) 隔離ほ場周辺の生物相

- 1) 遺伝子組換え植物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。
- 2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
交雑可能な近縁野生種はない。

5. 栽培管理等

(1) 栽培履歴

隔離ほ場における過去5年間の栽培履歴は以下のとおりである。

1.

栽培年度	植物
2016 年	イネ*
2017 年	イネ*
2018 年	イネ*
2019 年	イネ*
2020 年	イネ

*は遺伝子組換え植物を含む

2.

栽培年度	植物
2016 年	イネ*
2017 年	イネ*
2018 年	イネ*、バレイショ
2019 年	イネ*、バレイショ
2020 年	イネ*、バレイショ

*は遺伝子組換え植物を含む

C.

栽培年度	植物
2016 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2017 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2018 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2019 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2020 年	イネ*
	コムギ

(2) 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、速やかに対策を講じる。

(3) 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。

6. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

届出書に記載されたほ場内でのみ栽培試験を実施する。



図1 つくば地区観音台事業場における隔離ほ場の配置図

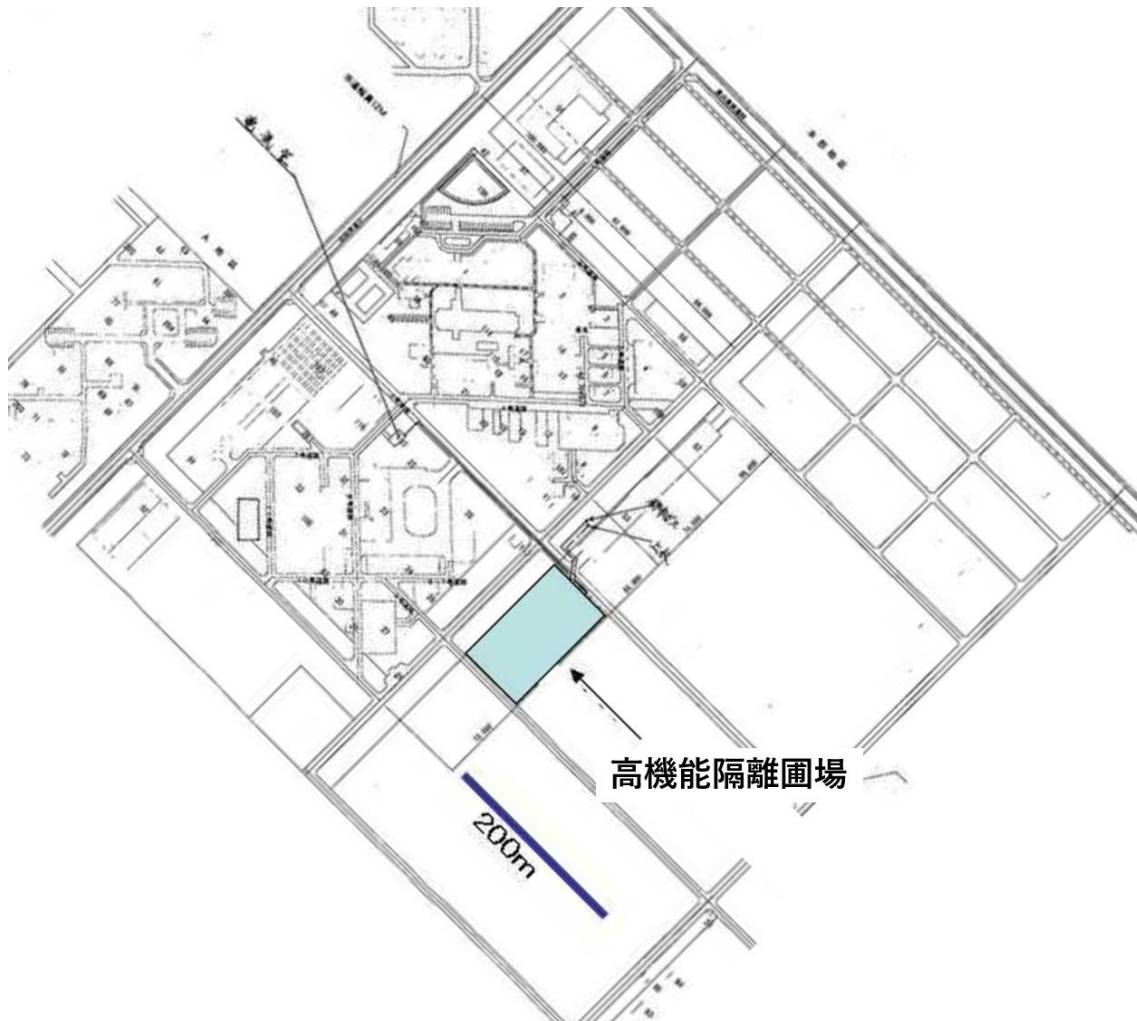


図2 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第一事業場内配置図

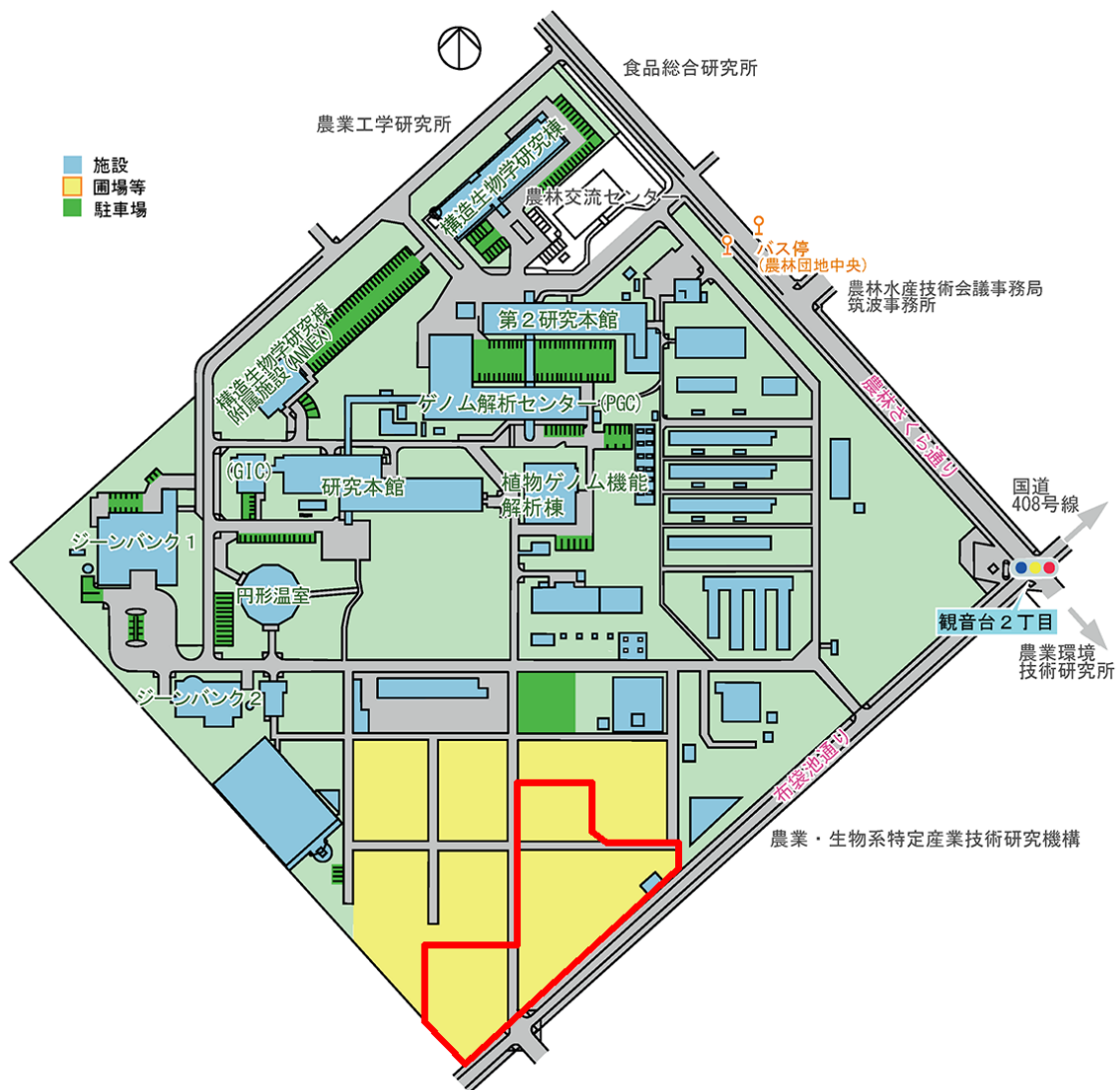


図4 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第二事業場内配置図

隔離ほ場略図

- 水田
- 畑地・土
- 舗装コンクリート
- 建物等
- フェンス
- 出入口
- 給水施設
- 浸透升
- 排水用溝 及び 流路

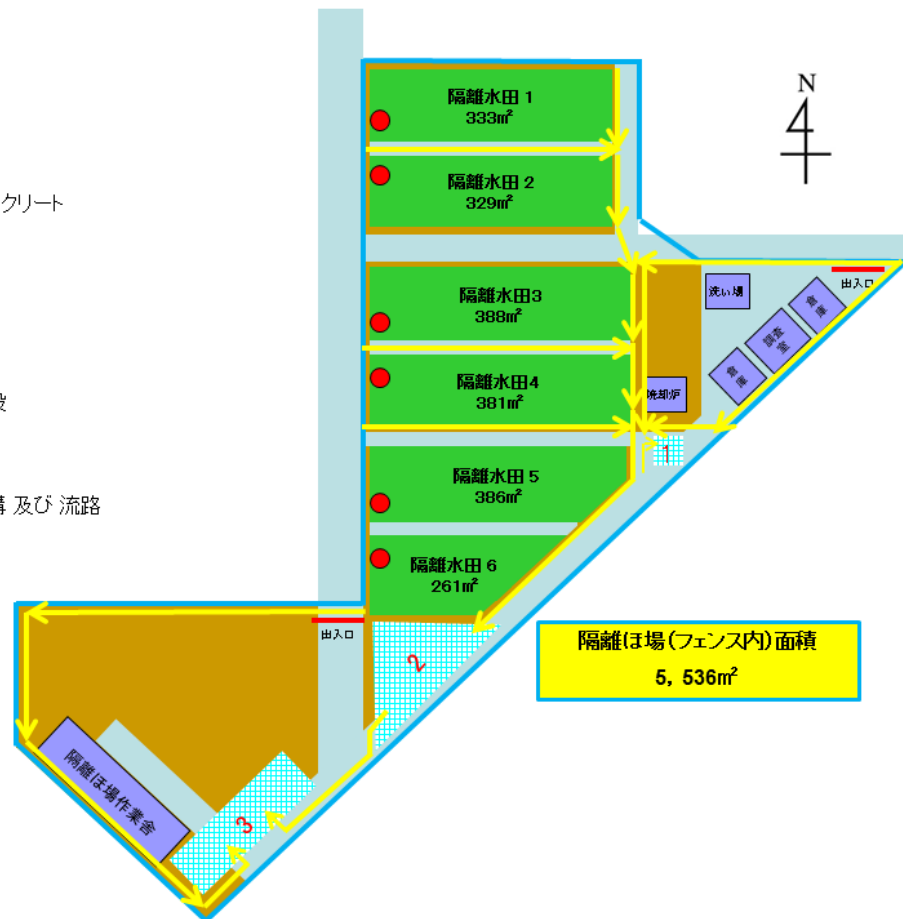
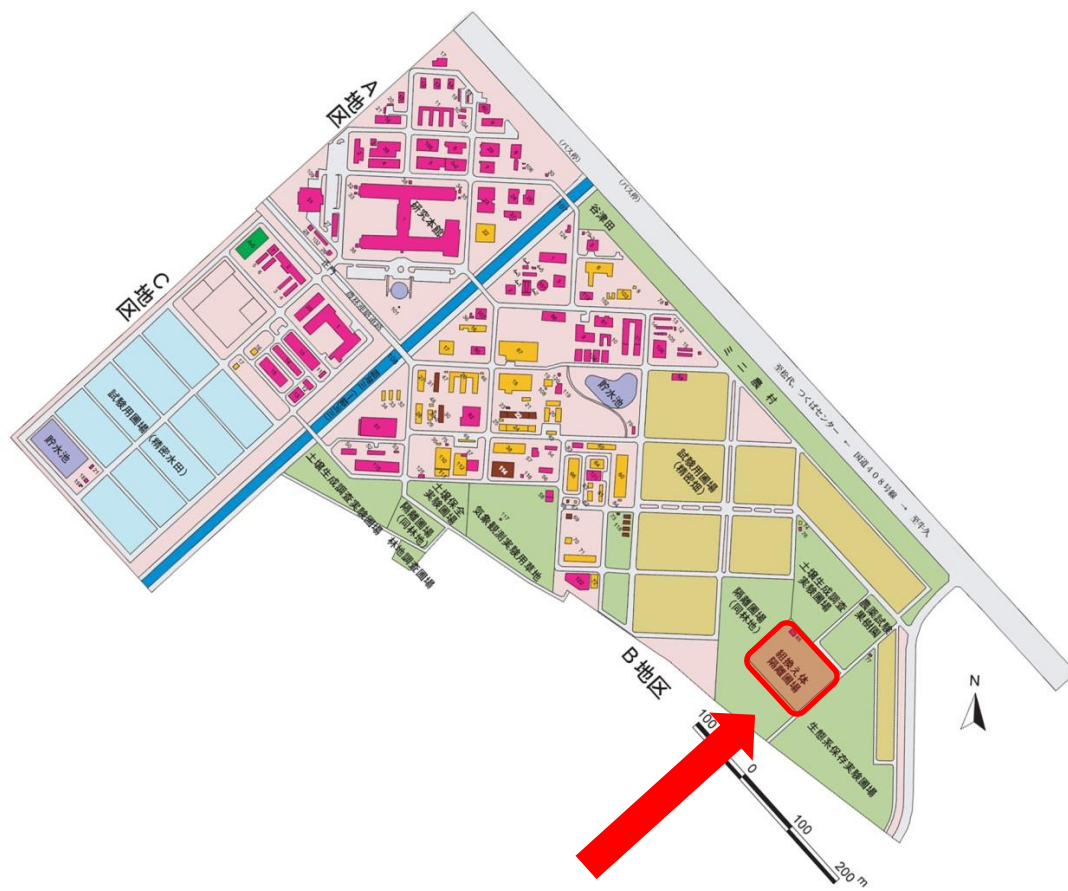


図5 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第二事業場 隔離ほ場内配置図



組換え植物隔離ほ場

図6 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第三事業場内配置図

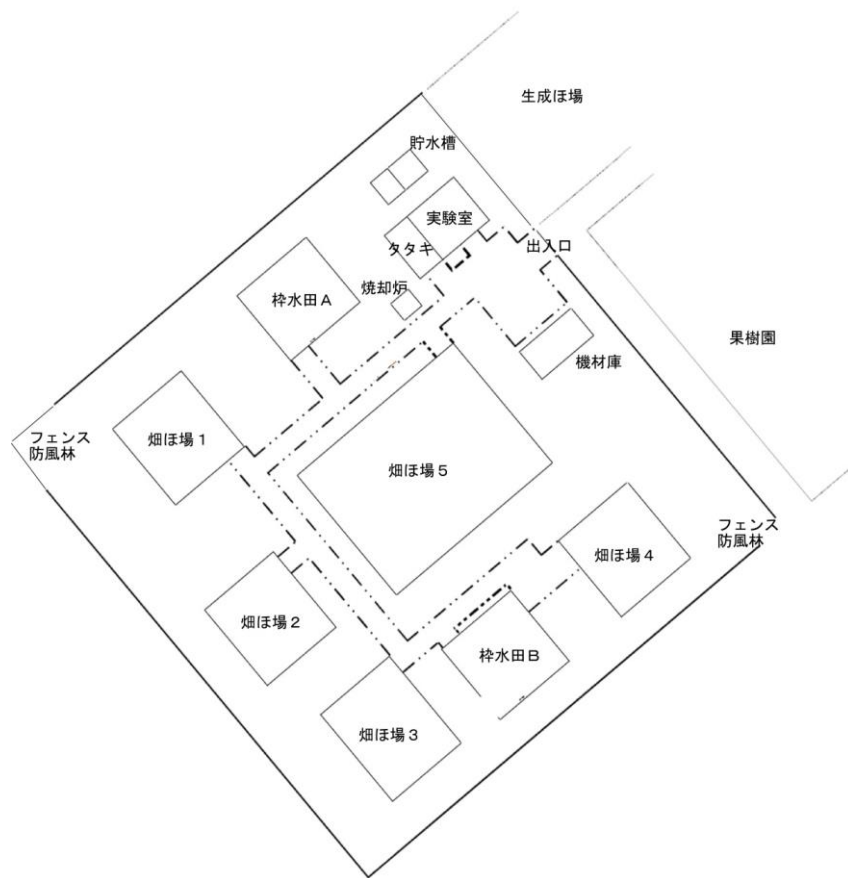


図 7 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場内配置図