

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7年3月25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

提出者 氏名 国立大学法人大阪大学  
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	病害抵抗性ジャガイモ (系統名 <i>Solanum tuberosum</i> disrupted-DS1-1_pLC41 #4-6-13-1, <i>Solanum tuberosum</i> disrupted-DS1-1_pLC41 #7-3-12-1)	
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病害抵抗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1事業場 高機能隔離圃場 2. 観音台第2事業場 隔離ほ場 3. 観音台第3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 ( <i>potato</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> ) 加工用品種	
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、男爵やメイクインなど、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。また、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 <a href="https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/natural_toxin/potato.html">https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/natural_toxin/potato.html</a>）、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  <a href="https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815598.pdf">https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815598.pdf</a>  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：a. CRISPR-Cas9  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  CRISPR-Cas9 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 1-(1)」を参照  導入方法；  アグロバクテリウムによる一過的発現（前述）  除去方法；  宿主細胞内の分解酵素による分解により除去  残存の有無を確認した方法：a. PCR 法、c. その他（k-mer 法）  無菌培養個体から調製したゲノム DNA を用い、T-DNA 領域を対象とし、PCR を行った。さらに、NGS 解析 を行い、k-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 4-(1), (2)」を参照）。</p>
改変した遺伝子等	名称	DS1 (Disease suppression 1) , Accession; Soltu.DM.02G006340.1
	機能	DS1 は PAP (Phosphatidic Acid Phosphatase) をコードしており、PA (Phosphatidic Acid)を脱リン酸化し、DAG (diacylglycerol) と無機リン酸を生成する。
	予想される機能の変化	PA は病原体の感染を含む様々な生物的ストレス条件下で上昇し、植物の多様なストレスシグナル伝達経路におけるセカンドメッセンジャーであることが示唆されている (van der Luit AH. et al.2000, Plant Physiol. 123(4): 1507-1516)。また、本遺伝子の発現抑制により、病原体感染時の植物体内における PA 蓄積量が増加し、植物の防御機能が速やかに活性化される可能性が示唆されている (Nakano M. et al. 2013, PLOS ONE 8(9) : e75124)。また、PA は病害以外の乾燥ストレス、浸透圧ストレス等の非生物的ストレスに対する防御にも関わることが知られている (McLoughlin and Testerink 2013, Front. Plant Sci. 4: 525, Yao and Xue 2018, J. Integr. Plant Biol. 60(9): 851-863)。ゲノム編集により、PA 脱リン酸化酵素である DS1 の酵素活性が消失させることで、特に病原体感染時の PA 蓄積量が増加し、その結果、病害抵抗性が向上することが予想される。病害抵抗性が付与された DS1 編集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に繋がり、食の安全の向上が期待される。

<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： a. 挿入または b. 欠損 ゲノム編集技術により得られた系統の <i>DS1</i> 遺伝子の標的配列を解析した結果、生じた変化は欠失または挿入であった（別紙 1 5-(1)参照）。 変異が導入されなかった <i>DS1</i> 遺伝子の残存は確認できていない。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 2024 年 4 月以前に確立しプラントボックスでの挿し木によって半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 5-(3)参照)。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。 また、標的とした遺伝子配列以外の改変の有無について調査した結果、ゲノム編集系統においてオフターゲットを示す変異は確認されなかった。よって、標的以外の部位が改変された可能性は低いと考えられる(別紙 1 5-(3)参照)。</p>
<p>生物多様性影響が生ずる可能性についての考察</p>	<p>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 <i>DS1</i> は <i>PAP</i> をコードしており、<i>PA</i> を脱リン酸化し、<i>DAG</i> を生成する酵素である。<i>DS1</i> 遺伝子の破壊により、<i>PA</i> が高蓄積し、結果的に病害抵抗性に寄与する。<i>DS1</i> は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閉鎖系温室での土壌栽培に供試したところ、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。栽培等にあたっては、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</p>	

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

生体膜の構成成分がリン脂質を主要とするグリセロ脂質であることは、バクテリアからヒトに至るまで広く共通して見られている。グリセロ脂質は、解糖系から分岐して生じるグリセロール3-リン酸を出発物質として、PA となる (Kennedy, E.P. 1957 Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol., 16 : 853-855)。高等植物においても動物と同様、一部のグリセロ脂質の生合成を除いて、生成した PA は PAP により DAG に代謝され、これが主要なリン脂質、糖脂質およびトリグリセリドの生合成の共通の基質となる。PAP の不活性化により PA の蓄積が予想されるが、前述のように、PA 自体は生体内に必ず含まれるリン脂質の前駆体である。これは自然環境下で野生動物に自然に摂取されていることを意味している。また、PAP の不活性化により新たな有害物質が産生されることは報告されていない。さらに、毒性を示す可能性が示唆されているプロテイナーゼ阻害因子及びレクチンの生合成系についてもリン脂質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。これらの点を考慮すると、本ゲノム編集ジャガイモにおいて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

	<p>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。</p> <p>3. 交雑性</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定</p> <p>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 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。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。</p> <p>(2) 影響の具体的内容の評価</p> <p>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。</p> <p>(3) 影響の生じやすさの評価</p> <p>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。</p> <p>(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>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。</p> <p>生物多様性影響の総合的評価</p> <p>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、PAPの不活性化によりPAの蓄積が予想されるが、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6年11月13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

表1. pLC41 \_\_\_\_\_ベクターの発現カセットの構成要素

### (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、CRISPR-Cas9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* 遺伝子はイソペンテニルトランスフェラーゼをコードしており、ゲノムに組込まれた場合は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。

### (3) CRISPR-Cas9 システムについて

生物のゲノムを人為的に改変するゲノム編集技術の一つで、ゲノム上の改変を行おうとする標的配列と相補的な一本鎖RNA(single guide RNA: sgRNA)とDNA鎖を切断する酵素活性をもつCas9人工ヌクレアーゼ（ヌクレアーゼは核酸分解（切断）酵素の総称）を組み合わせることで特定の遺伝子に変異を導入するために用いられる技術である。RNAのデザインや作製が簡便な上に、技術的開発も進められており、さまざまな生物のゲノム編集で最も多用されている（<https://bio-sta.jp/glossary/#CRISPR-Cas9System>）。CRISPR-Cas9システムを利用した標的ゲノム編集は、Cas9とsgRNAの複合体で構成される。sgRNAを目印としてCas9が狙った配列（標的配列）を切断し、切断部分の修復ミスによる変異や鋳型DNAをお手本とした修復により、配列を変えることができる。二本鎖切断は、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CRISPR-Cas9システムを利用し、標的配列として*DS1*遺伝子（後述）の第2エキソン配列の一部を標的配列（20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、*DS1*遺伝子が破壊される。*DS1*遺伝子をゲノム編集により破壊したジャガイモを作出・評価した事例はこれまで報告がないが、同じナス科植物の*Nicotiana benthamiana*において同遺伝子抑制株を用いた病害（青枯れ病）評価が報告されている（Nakano. et al. 2013, PLOS ONE Volume 8, Issue 9, e75124）。

### (4) *DS1* 遺伝子について

生体膜の構成成分がリン脂質を主要とするグリセロ脂質であることは、バクテリアからヒトに至るまで広く共通して見られている。グリセロ脂質は、解糖系から分岐して生じるグリセロール 3-リン酸を出発物質として、PA (Phosphatidic Acid) となる (Kennedy, E.P.1957, Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol., 16,853-855)。高等植物においても動物と同様、一部のグリセロ脂質の生合成を除いて、生成した PA は PAP (PA phosphatase) により DAG (diacylglycerol) に代謝され、これが主要なリン脂質、糖脂質およびトリグリセリドの生合成の共通の基質となる。一方、PA は病原体の感染を含む様々な生物的ストレス条件下で上昇し、植物の多様なストレスシグナル伝達経路におけるセカンドメッセンジャーであることが示唆されている (Luit AH. et al.2000, Plant Physiol 123: 1507-1516)。

DS1 は PAP (PA phosphatase) をコードしており、PA を脱リン酸化し、DAG (diacylglycerol) を生成する酵素である。*Nicotiana benthamiana* における *DS1* 遺伝子抑制体を用いた先行研究により、① *DS1* 遺伝子は青枯れ病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 感染時に発現が誘導されること、② *DS1* 遺伝子抑制体では PAP 活性が低下し、生体内の PA 量が増加すること、③ 青枯れ病菌感染時に *DS1* 遺伝子抑制体では「細胞死の促進」、「ROS (reactive oxygen species) の高蓄積」、「*PR4* 遺伝子の過誘導」が見られること、等が報告されている。これらの結果より、「DS1 は PA 蓄積量の調節を介し、ROS 生成やジャスモン酸経路に関連した植物の免疫応答に関与する可能性」、および「DS1 の機能を抑制することで、青枯れ病に対して効果的な免疫応答を速やかに活性化できる可能性」が示唆されている (Nakano M. et al. 2013, PLOS ONE 8 (9) : e75124)。

## 2. ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

pLC41\_\_\_\_\_ (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 pLC41 プラスミド (NCBI アクセッション番号: LC215698) である。pLC41\_\_\_\_\_ は、この pLC41 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。pLC41 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 1 に示した。

図 1. pLC41 \_\_\_\_\_ の T-DNA 領域のマップおよび CRISPR-Cas9 標的配列

#### (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) ゲノム編集生物等の育成の経過

プラスミドを保持したアグロバクテリウムを、培養苗から切り出した葉片に感染させ、\_\_\_\_\_ 培地 ( \_\_\_\_\_ ) および \_\_\_\_\_ 培地 ( \_\_\_\_\_ ) で継代することで、再分化してきたシュートを得た。ipt 遺伝子がゲノムに組み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 ipt 遺伝子がゲノムに組み込まれていない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、アンプリコンシーケンス解析によりゲノム編集された個体を選抜した。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チメンチンを含む培地 ( \_\_\_\_\_ ) で 2 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、2つのゲノム編集システムはアグロバクテリウムが除去されていることを確認した。

#### 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 T. et al 2020, Sci. Rep. 10: 4914)。本手法では、野生型、ゲノム編集システム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、ゲノム編集システムそれぞれの 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システム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。ジャガイモでの先行研究では、x30 カバレッジのデータに対し、23-mer 以上の解析によって false positive を排除し、外来遺伝子の検出が可能であった (Yasumoto S. and Muranaka T. 2023 Sci. Rep. 13: 12246)。

ゲノム編集前の野生型株 (NT) 2 系統、ゲノム編集後の pLC41 #4-6-13-1、pLC41 #7-3-12-1、および pLC41 #3-1-16-1 (PCR 解析により T-DNA 断片の挿入が確認された株) のそれぞれの無菌培養苗からゲノム DNA を抽出し、NovaSeq\_X\_Plus により NGS データを取得した。上記 5 系統のそれぞれから約 100 Gbp のデータ (約 x30 のカバレッジ) を取得した。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、 $k=25$  で解析を行った。

以上の解析により、ゲノム編集システム pLC41 #4-6-13-1、pLC41 #7-3-12-1 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。

図 2. ゲノム編集システムの  $k$ -mer 解析結果

## (2) PCR 法

ゲノム編集前の野生型株、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株から抽出し、20 ng/ $\mu$ L に希釈したゲノム DNA を使用した。ポジティブコントロールとして、pLC41\_\_\_\_\_プラスミドを 10 pg/ $\mu$ L に希釈した DNA を使用した。サンプルとしてゲノム編集系統 pLC41 #4-6-13-1、pLC41 #7-3-12-1 から抽出し、20 ng/ $\mu$ L に希釈したゲノム DNA を使用した。PCR 酵素として KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を使用した。プライマーとして、T-DNA 領域中の約 600 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(表 2, 図 3)。全 10  $\mu$ L 中の反応液に 1  $\mu$ L の鋳型溶液 (サンプル) を加えた条件で 3 step 条件で 32 サイクル反応させた。反応後、5  $\mu$ 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。

pLC41\_\_\_\_\_プラスミドを 10 pg 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。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、③, ⑰, ⑱領域等を増幅した PCR 反応)、ゲノム編集系統のみで明確に確認された DNA バンドは検出されなかった (図 4)。

以上の解析により、pLC41#4-6-13-1, pLC41#7-3-12-1 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。

図 3. 使用したプライマー(表 2)の増幅領域

表 2. 使用したプライマーの配列

図 4. ゲノム編集系統の PCR 解析結果

## 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

CRISPR-Cas9 標的近傍を PCR により増幅し、アンプリコンシーケンスによる変異導入の確認を複数回実施し、そのうちの一度の結果を示す (図 5)。

これらの結果より、ゲノム編集系統では標的の *DSI* 遺伝子が完全に破壊されていることが確認された。

図 5. ゲノム編集系統における標的配列

### (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

上述 1-(4)の記載より、ゲノム編集系統に導入された遺伝子変異により、「生体内の PA 含量の蓄積」および「病害抵抗性の付与」が想定される。現在、両特性について閉鎖系実験室で調査を行っている。

### (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

ゲノム編集前の野生型株 (NT) および 3 種のゲノム編集系統から樹立した培養苗を、閉鎖系温室下での土壌栽培に供し、各塊茎収量および形状について比較した。その結果、NT とゲノム編集系統間で特筆すべき差異は観察されなかった (図 6)。

図 6. 温室栽培における野生型株とゲノム編集系統の塊茎

標的とした遺伝子配列以外の改変の有無について調査するため、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) 及び Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder>) の 2 つを用い、モデル品種 Phureja の全ゲノム (PGSC DM v4.03) をリファレンスに設定してオフターゲット検索を行った。CRISPRdirect では、guideRNA の配列の 20 bp との相同性において、3 bp のミスマッチまでを確認する条件で検索を行った結果、14 箇所のオフターゲット候補が検索された。Cas-OFFinder では、bulge size を 2 に、ミ

スマッチは 3 に絞り検索した結果、87 箇所のオフターゲット候補が示された。合計 89 箇所（12 箇所の重複あり）の候補の内、いずれかの解析ソフトで遺伝子およびその発現に係る領域を示したオフターゲット候補 14 箇所について、アンプリコンシーケンス解析により変異の有無を調査した（図 7，表 3）。#4-6-13-1, #7-3-12-1 において変異は確認されなかった。よって、標的以外の部位が改変された可能性は低いと考えられる。

図 7. オフターゲット候補配列の絞り込み

表 3 オフターゲット候補配列

以上

## 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ジャガイモ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（以下「農研機構」という。）が、つくば観音台地区に保有する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. 農研機構 観音台第1事業場 高機能隔離圃場
2. 農研機構 観音台第2事業場 隔離ほ場
3. 農研機構 観音台第3事業場 組換え植物隔離ほ場

##### （2）住所

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及び管理責任者の氏名を記載した標識、洗場、焼却炉を設置している。すべての隔離ほ場に水田を備えており（図3、5、7）、観音台第3事業場には、畑ほ場を備えている（図7）。なお、ゲノム編集ジャガイモの栽培は、これらの隔離ほ場内の水を抜いた水田及び畑ほ場での栽培の他、隔離ほ場内に設置した栽培ポット等で栽培を行う。

#### 3. 面積

1. 隔離ほ場全体の面積は約 60a； 水田の面積は約 30a
2. 隔離ほ場全体の面積は約 55.4a； 水田の面積は約 20.8a
3. 隔離ほ場全体の面積は約 82a； 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

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

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

(3) 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「つくば市災害ハザードマップ (<https://www.city.tsukuba.lg.jp/soshikikarasagasu/shichokoshitsukikikanrika/gyomuannai/1/3/1000602.html>)」において、浸水想定区域に指定されていない。

(4) 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。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。

(5) 隔離ほ場周辺の生物相

- 1) ゲノム編集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
2018 年	イネ*
2019 年	イネ*
2020 年	イネ*
2021 年	イネ*

2022年	イネ*
2023年	イネ

\*は遺伝子組換え植物を含む

2.

栽培年度	植物
2018年	イネ* ジャガイモ
2019年	イネ* ジャガイモ
2020年	イネ* ジャガイモ
2021年	イネ* ジャガイモ コムギ
2022年	イネ* ジャガイモ コムギ 緑肥作物としてソルガム、クロラタ リア、カラシナ
2023年	ジャガイモ コムギ 緑肥作物としてソルガム、クロラタ リア、カラシナ、ヒマワリ

\*は遺伝子組換え植物を含む

3.

栽培年度	植物
2018年	イネ* 緑肥作物としてソルガム、コマツ ナ、コムギ
2019年	イネ* 緑肥作物としてソルガム
2020年	イネ* ジャガイモ

	緑肥作物としてソルガム、コマツナ、コムギ
2021年	イネ* ジャガイモ 緑肥作物としてソルガム、コマツナ、コムギ等
2022年	イネ* ジャガイモ 緑肥作物としてソルガム、クロラタリア、カラシナ
2023年	ジャガイモ オオムギ 緑肥作物としてカラシナ、クロラタリア、ヒマワリ

\*は遺伝子組換え植物を含む

## (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。

## (4) 試験期間及び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

実験計画報告書に記載されたほ場内でのみ栽培試験を実施する。



図1 農研機構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 農研機構観音台第1事業場内配置図

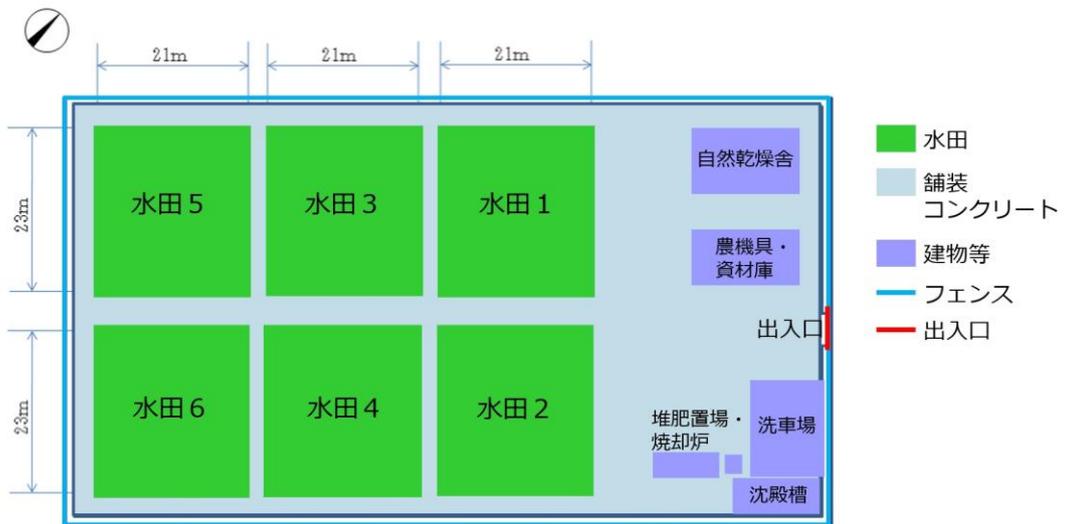


図3 農研機構観音台第1事業場高機能隔離圃場（隔離ほ場1.）内配置図



図4 農研機構観音台第2事業場内配置図

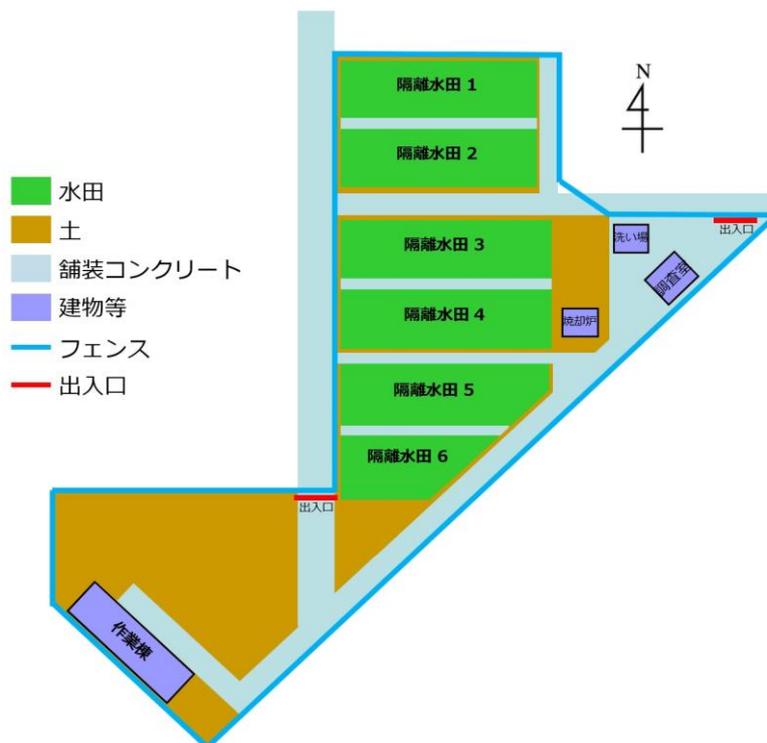


図5 農研機構観音台第2事業場隔離ほ場（隔離ほ場2.）内配置図



図6 農研機構観音台第3事業場内配置図

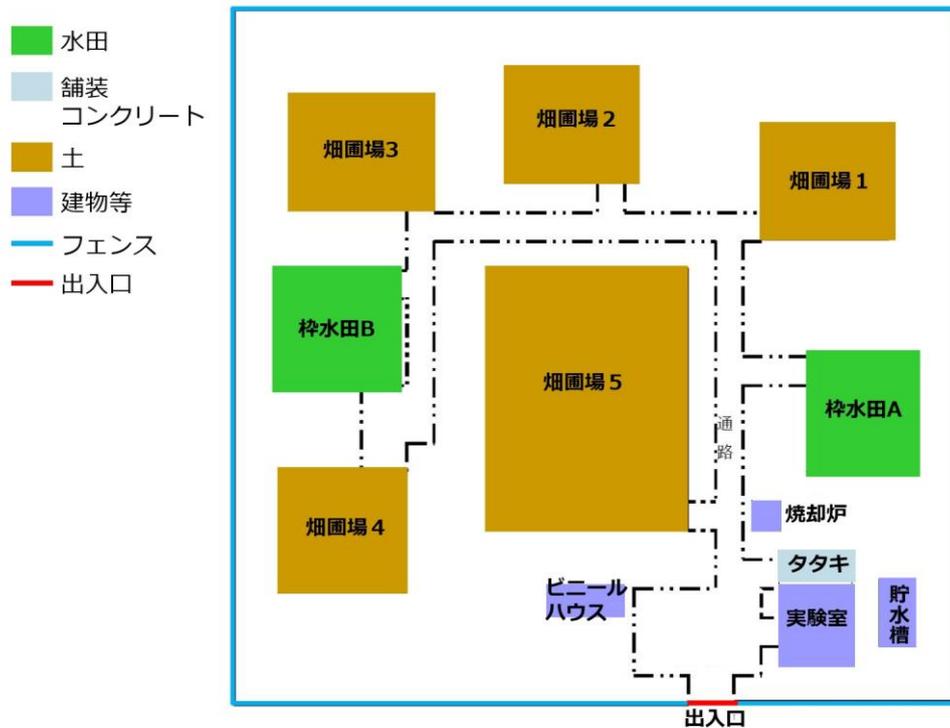


図7 農研機構観音台第3事業場 組換え植物隔離ほ場 (隔離ほ場3.) 内配置図