

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6月12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・耐ストレス性遺伝子・受精関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・基本転写制御遺伝子・ストログラクトン合成系遺伝子・窒素利用効率関連遺伝子 (<i>Hd3a</i> * ¹ , <i>RFT1</i> * ¹ , <i>MAPK6</i> , <i>se5</i> , <i>FT-L1</i> , <i>Ghd7</i> * ² , <i>Hd17</i> * ² , <i>OsELF3-2</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsGI</i> , <i>ABI5</i> , <i>bZIP23</i> , <i>bZIP46</i> , <i>bZIP72</i> , <i>OsPLT3</i> , <i>BBX19</i> , <i>Myb12</i> , <i>OsMATL</i> , <i>OsMATL2</i> , <i>OsGEX1</i> , <i>OsTRA1</i> , <i>ARE1</i> , <i>Os1900</i> , <i>Os5100</i> , <i>CAD2</i> , <i>Os07g0668100</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	複数のイネ品種 (品種 日本晴, きたあおば, ゆめぴりか) に加えて、 <i>Hd3a2-7-10-2</i> 系統 (コシヒカリ背景、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) , 39-4系統と38-82系統と38-42系統 (きたあおば背景、令和6年6月21日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載) 、および 5-39 系統 (コシヒカリ背景、令和4年9月13日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載) のイネ開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・耐ストレス性遺伝子・受精関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・基本転写制御遺伝子・ストログラクトン合成系遺伝子・窒素利用効率関連遺伝子 (<i>Hd3a</i> * ¹ , <i>RFT1</i> * ¹ , <i>MAPK6</i> , <i>se5</i> , <i>FT-L1</i> , <i>Ghd7</i> * ² , <i>Hd17</i> * ² , <i>OsELF3-2</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsGI</i> , <i>ABI5</i> , <i>bZIP23</i> , <i>bZIP46</i> , <i>bZIP72</i> , <i>OsPLT3</i> , <i>BBX19</i> , <i>Myb12</i> , <i>OsMATL</i> , <i>OsMATL2</i> , <i>OsGEX1</i> , <i>OsTRA1</i> , <i>ARE1</i> , <i>Os1900</i> , <i>Os5100</i> , <i>CAD2</i> , <i>Os07g0668100</i>)にゲノム編集技術で突然変異導入したイネ変異体群やその交配後代個体を野外や一般温室で栽培し、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環境条件で比較精査する。*1で示した <i>Hd3a</i> と <i>RFT1</i> の変異は、令和3年6月29日と令和

		6年6月21日に文部科学省に提出した実験計画報告書にある変異系統に、別の遺伝子変異を新規に追加導入した系統が含まれる。*2で示した <i>Ghd7</i> と <i>Hd17</i> の変異は令和4年9月13日に文部科学省に提出した実験計画報告書にある変異系統に、別の遺伝子変異(別紙3を参照)を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 日本晴, 品種 きたあおば, 品種 ゆめぴりか, と Hd3a2-7-10-2 系統(コシヒカリ背景, 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), 39-4 系統と 38-82 系統と 38-42 系統(きたあおば背景, 令和6年6月21日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載), および 5-39 系統(コシヒカリ背景, 令和4年9月13日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載))
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)水稻品種は、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導入・除去方法、残存		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

の有無の確認方法	クレーゼ溶液を混ぜ、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 法等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 化とそれに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 イネの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・耐ストレス性遺伝子・受精関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・基本転写制御遺伝子・ストリゴラクトン合成系遺伝子・窒素利用効率関連遺伝子 <i>(Hd3a^{*1}, RFT1^{*1}, MAPK6, se5, FT-L1, Ghd7^{*2}, Hd17^{*2}, OsELF3-2, CRCT, OsGI, ABI5, bZIP23, bZIP46, bZIP72, OsPLT3, BBX19, Myb12, OsMATL, OsMATL2, OsGEX1, OsTRA1, ARE1, Os1900, Os5100, CAD2, Os07g0668100)</i>

	機能	<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。 <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。 <i>MAPK6</i>: 胚発生に必須な遺伝子。 <i>FT-L 1</i>: イネフロリゲン様遺伝子のひとつ。 <i>Se5</i>: 赤色光・近赤外光受容体フィトクロムの発色団合成酵素の一つ。長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。 <i>Ghd7</i>: 長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。 <i>Hd17</i>: 概日時計遺伝子の一つで、出穂期調整遺伝子。 <i>OsELF3-2</i>: 概日時計構成因子のひとつ。<i>Hd17</i> と協調的に働く。 <i>CRCT</i>: でんぷん合成系酵素遺伝子の転写制御遺伝子。 <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。 <i>ABI5</i>: イネの耐ストレス bZIP 遺伝子のひとつ。ABA 信号伝達系。 <i>bZIP23</i>: イネの耐ストレス bZIP 遺伝子のひとつ。ABA 信号伝達系。 <i>bZIP46</i>: イネの耐ストレス bZIP 遺伝子のひとつ。ABA 信号伝達系。 <i>bZIP72</i>: イネの耐ストレス bZIP 遺伝子のひとつ。ABA 信号伝達系。 <i>OsPLT3</i>: イネの出穂期 QTL の原因遺伝子候補。 <i>BBX19</i>: イネの出穂期 QTL の原因遺伝子候補。 <i>Myb12</i>: イネの出穂期 QTL の原因遺伝子候補。 <i>OsMATL</i>: イネ受精卵で働く遺伝子の一つ。 <i>OsMATL 2</i>: イネ受精卵で働く遺伝子の一つ。 <i>OsGEX1</i>: イネ受精卵で働く遺伝子の一つ。 <i>Os07g0668100</i>: イネ受精卵で働く遺伝子の一つ。 <i>OsTRA1</i>: イネの開花遅延変異体の原因遺伝子候補。 <i>ARE1</i>: 窒素利用効率制御遺伝子。 <i>Os1900</i>: ストリゴラクトン合成系遺伝子の一つ。施肥に応答し、分げつを制御する。 <i>Os5100</i>: ストリゴラクトン合成系遺伝子の一つ。分げつを制御する。 <i>CAD2</i>: リグニン合成系遺伝子の一つ。変異体でリグニンが低下する。
	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、バイオマスの変化、咲かない化、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 当該改変に	イネの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・耐ストレス性遺

物の形質の変化	より生じた変化	伝子・受精関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・基本転写制御遺伝子・ストログラクトン合成系遺伝子・窒素利用効率関連遺伝子 (<i>Hd3a</i> ^{*1} , <i>RFT1</i> ^{*1} , <i>MAPK6</i> , <i>se5</i> , <i>FT-L1</i> , <i>Ghd7</i> ^{*2} , <i>Hd17</i> ^{*2} , <i>OsELF3-2</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsGI</i> , <i>ABI5</i> , <i>bZIP23</i> , <i>bZIP46</i> , <i>bZIP72</i> , <i>OsPLT3</i> , <i>BBX19</i> , <i>Myb12</i> , <i>OsMATL</i> , <i>OsMATL2</i> , <i>OsGEX1</i> , <i>OsTRA1</i> , <i>ARE1</i> , <i>Os1900</i> , <i>Os5100</i> , <i>CAD2</i> , <i>Os07g0668100</i>) のコード領域の機能欠損変異とプロモーター領域の変異。 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。
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：イネの開花期決定遺伝子・概日時計構成因子遺伝子・耐ストレス性遺伝子・受精関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・基本転写制御遺伝子・ストログラクトン合成系遺伝子・窒素利用効率関連遺伝子 (<i>Hd3a</i>^{*1}, <i>RFT1</i>^{*1}, <i>MAPK6</i>, <i>se5</i>, <i>FT-L1</i>, <i>Ghd7</i>^{*2}, <i>Hd17</i>^{*2}, <i>OsELF3-2</i>, <i>CRCT</i>, <i>OsGI</i>, <i>ABI5</i>, <i>bZIP23</i>, <i>bZIP46</i>, <i>bZIP72</i>, <i>OsPLT3</i>, <i>BBX19</i>, <i>Myb12</i>, <i>OsMATL</i>, <i>OsMATL2</i>, <i>OsGEX1</i>, <i>OsTRA1</i>, <i>ARE1</i>, <i>Os1900</i>, <i>Os5100</i>, <i>CAD2</i>, <i>Os07g0668100</i>) の、ほぼ全ての遺伝子が、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。<i>OsTRA1</i>, <i>OsPLT3</i>, <i>BBX19</i>, <i>Myb12</i>, <i>OsMATL</i>, <i>OsMATL2</i>, <i>OsGEX1</i>, <i>Os07g0668100</i> は、候補遺伝子で、新規な研究対象であるが、他の生物のホモログの解析のケースは多く報告がある。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。 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。

	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。 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	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。 委員長名： 検討日：令和 7 年 4 月 23 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、育種学研究室と作物学研究室が管理しているコンクリート枠人工水田を使用予定。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/bousaianzen/bousai/kinkyuusaigai/map/index.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 5000 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、3010 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」との間に、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			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。コシヒカリや日本晴といった日本品種のアレロパシー活性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

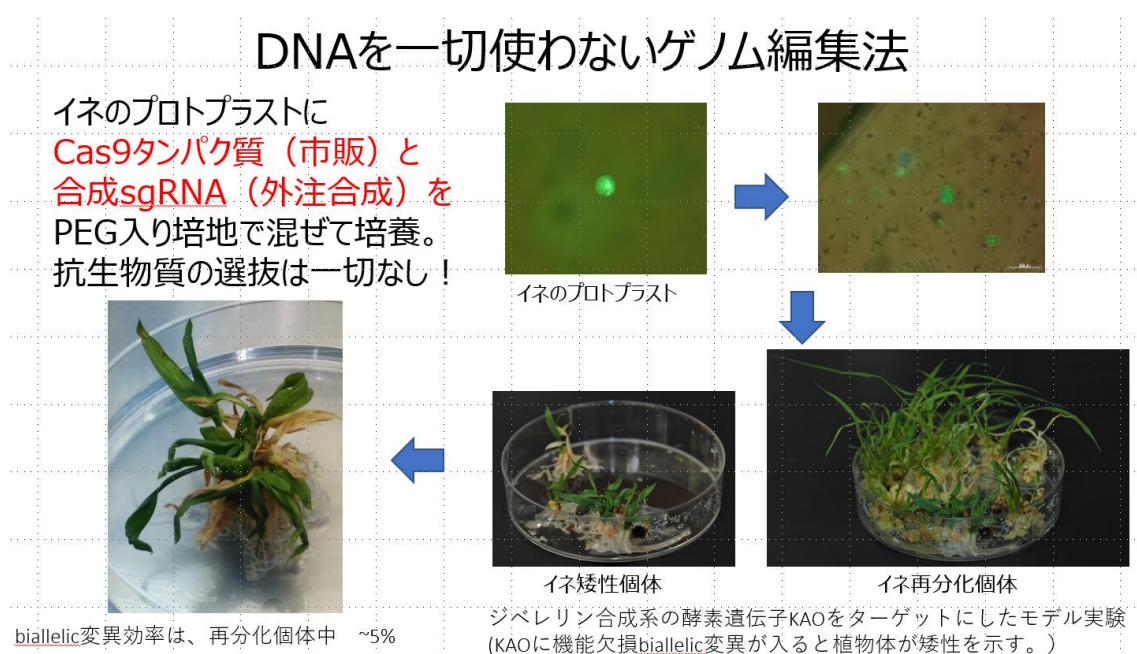
障害不稔が発生すると玄米の蛋白質含量が高くなる。

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、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 変異の環境への影響の考察、および、起きる可能性は非常に低い、sgRNA の cDNA 化が細胞内で起きたとしても、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) 日本晴：コシヒカリ以前のイネ主要品種
- 2) ゆめぴりか：北海道のイネ品種
- 3) きたあおば：北海道の飼料用イネ品種

- 4) Hd3a2-7-10-2 系統（コシヒカリ）：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系統で、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。
- 5) 39-4 系統と 38-82 系統と 38-42 系統（きたあおば）：令和6年6月21日に文科省に提出した実験計画報告書に記載の系統で、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。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。
- 6) 5-39 系統（コシヒカリ）：令和4年9月13日に文科省に提出した実験計画報告書に記載の系統で、*Ghd7* と *Hd17* に機能欠失変異を導入した個体の自殖後代。

【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、セルラーゼを洗い落とし、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以下の1~3種類の 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。まずは、HRM 法(Kawauchi et al. 投稿準備中)等を利用して、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。その結果、以下に記載した新規変異体を得た。

（以下では、一回のプロトプラスト調整で、特定のガイド RNA を使った実験ごとに異なる実験番号を与

えている)

Hd3a2-7-10-2 系統に変異を導入：

実験 23; *MAPK6* ヘテロ 2 個体 (系統) (通し番号 1-2)

実験 49; *CRCT Pro* 欠失ホモ 4 個体 (系統) (3-6)

実験 50 ;*CRCT Pro* 1bp 挿入ヘテロ 1 個体 (系統) (7)

実験 54; *Se5* バイアレリック 1 個体 (系統) (8)

実験 146; *FT-L1* バイアレリック(1 個体ホモ) 2 個体 (系統) (9-10)

日本晴に変異を導入：

実験 s26; *OsGI* ヘテロと *ABI5* ヘテロ 2 個体 (系統)

OsGI バイアレリック (ホモ) と *ABI5* バイアレリック 1 個体 (系統)

OsGI バイアレリックと *ABI5* ヘテロ 1 個体 (系統)

実験 t27;*OsGI* ヘテロと *bZIP72* ヘテロ 1 個体 (系統)

実験 f28;*OsGI* バイアレリックと *bZIP23* バイアレリック 6 個体 (系統)

bZIP23 ヘテロ 1 個体 (系統)

実験 t29;*OsGI* ヘテロと *bZIP46* ヘテロ 3 個体 (系統)

OsGI バイアレリックと *bZIP46* ヘテロ 1 個体 (系統)

実験 56;*OsPLT3* ヘテロ 1 個体 (系統)

実験 57; *BBX19* バイアレリック 1 個体 (系統)

実験 58; *Myb12* バイアレリック(1 個体ホモ) 2 個体 (系統)

実験 147; *OsMATL* バイアレリック(1 個体ホモ) 2 個体 (系統)

実験 148; *OsMATL2* ヘテロ 1 個体 (系統)

OsMATL2 バイアレリック 1 個体 (系統)

実験 149; *OsGEX1* バイアレリックと Os07g0668100 ヘテロ 1 個体 (系統)

OsGEX1 バイアレリック 1 個体 (系統)

5-39 系統に変異を導入

実験 32 ; *OsELF3-2* バイアレリック 2 個体 (系統)

ゆめぴりかに変異を導入

実験 s34 ; *OsTRA1* ヘテロ 2 個体 (系統)

実験 s37 ; *OsTRA1* ヘテロ 3 個体 (系統)

OsTRA1 バイアレリック 4 個体 (系統)

実験 53 ; *OsTRA1* ヘテロ 2 個体 (系統)

OsTRA1 バイアレリック 1 個体 (系統)

きたあおばに変異を導入

実験 141 ; *ARE1* バイアレリック 1 個体 (系統)

ARE1 ヘテロ 3 個体 (系統)

39-4 系統に変異を導入

実験 142; *Os1900* バイアレリックと *Os5100* バイアレリック 2 個体(系統)

実験 143; *CAD2* バイアレリック(ホモ 4 個体) 12 個体(系統)

CAD2 ヘテロ 1 個体(系統)

38-82 系統に変異を導入

実験 144 ; *Os1900 Pro* 欠失を含むバイアレリックと *Os5100* バイアレリック (ホモ 1 個体) 3 個体 (系統)

38-42 系統に変異を導入

実験 145; *Os1900* バイアレリックと *Os5100* バイアレリック (ホモ 1 個体) 3 個体(系統)

以上、合計 75 系統

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。再生当代を維持せず、種子で保存、また、後代個体のみが生育している系統もある。変異を同定した時点では、ヘテロ変異とバイアレリック変異（両染色体が同じ変異の時はホモと呼ぶことも）がある。

最終的に、ゲノム編集が確認できた上記の合計 75 個体のイネ再生個体および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

通し番号	実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
	実験23 変異解析再生個体 23個体			MAPK6 ガイドRNA配列 GCCAGGTAAGGATGTGCAA
1	実験23	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	23-2	c入りヘテロ taaggatgtgcaaggacaccttcaa→ taaggatgtgcaaggacaccttcaa
2	実験23	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	23-13	a入りヘテロ taaggatgtgcaaggacaccttcaa→ taaggatgtgcaaggacaccttcaa
	実験49 変異解析再生個体 59個体			CRCTプロモーター ガイドRNA配列 F2側 gctattggtccgacgcattagg F3側 ggagggaatcacctgcaaa
3	実験49	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	49-3	F2とF3の間に大きく欠失 F2側cactctgctattggtccgacgcattagg→ cactctgctattggtccg 以下欠失 F3側gggaaggagggaatcacctgcaaa→ 以前欠失 ccaagggaagctccaca
4	実験49	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	49-31	F2とF3の間に大きく欠失 F2側cactctgctattggtccgacgcattagg→ cactctgctattggtccgacgcattagg 以下欠失 F3側gggaaggagggaatcacctgcaaa→ 以前欠失 aaagcgccaagggaagctccaca
5	実験49	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	49-52	F2とF3の間に大きく欠失 F2側cactctgctattggtccgacgcattagg→ cactctgctattggtccgacgcattagg 以下欠失 F3側gggaaggagggaatcacctgcaaa→ 以前 欠失 aaagcgccaagggaagctccaca
6	実験49	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	49-59	F2とF3の間に大きく欠失 F2側cactctgctattggtccgacgcattagg→ cactctgctattggtccgacgcattagg 以下欠失 F3側gggaaggagggaatcacctgcaaa→ 以前 欠失 aaagcgccaagggaagctccaca
	実験50 変異解析再生個体 70個体			CRCTプロモーター ガイドRNA配列 F3側 ggagggaatcacctgcaaa F4側 gggaatgaaaagcaatccggg
7	実験50 変異解析再生個体 70個体	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	50-3	F3側c入りヘテロ ggagggaatcacctgcaaa→ ggagggaatcacctgcaaa
15	実験54 変異解析再生個体			se5 ガイドRNA配列 TTGCACGGAAGGAAGAGCGG
8	実験54	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	se5-4	aとt入りバイアレリック gccgcgctctctccgtgcaagaagg→ gccgcgctctctccgtgcaagaaggと gccgcgctctctccgtgcaagaagg
	実験146 変異解析再生個体 2個体			FT-L1 ガイドRNA GTACCCCTCGCCGGGGTGC
9	実験146	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	T0-1	A挿入 & C挿入バイアレリック GTACCCCTCGCCGGGGTGC→ GTACCCCTCGCCGGGGTGC GTACCCCTCGCCGGGGTGC
10	実験146	令和3年度計画書 Hd3a2-7-10-2	T0-2	A挿入ホモ GTACCCCTCGCCGGGGTGC→ GTACCCCTCGCCGGGGTGC

実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	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s26 変異解析再生個体 23個体			OsGI ガイドRNA配列 CTACTCCAAGTGCTACCCAA	AB15 ガイドRNA配列 TCTCACCTAGTGTATCCTGT
実験s26	日本晴	s26-2	t入りヘテロ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttgggtagcactggagtagcaatt	g入りヘテロ accgacagggtaaacactaggtagagtagacacttgagg→ accgacagggtaaacactaggtagagtagacacttgagg
実験s26	日本晴	s26-8	g抜けホモ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttg-gtagcactggagtagcaatt	a入りとggt抜けバイアレリック accgacaggttaaacactaggtagagtagacacttgagg→ accgacacaggttaaacactaggtagagtagacacttgagg accgacacacactaggtagagtagacacttgagg
実験s26	日本晴	s26-12	ggta抜けとt入りバイアレリック cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttg-gcacttgagtagcaatt cctttgggtagcactggagtagcaatt	16bp抜けヘテロ accgacaggttaaacactaggtagagtagacacttgagg→ accgacacacactaggtagagtagacacttgagg
実験s26	日本晴	s26-17	t入りヘテロ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttgggtagcactggagtagcaatt	g入りヘテロ accgacaggttaaacactaggtagagtagacacttgagg→ accgacagggtaaacactaggtagagtagacacttgagg
実験t27 変異解析再生個体 19個体			OsGI ガイドRNA配列 CTACTCCAAGTGCTACCCAA	bZIP72 ガイドRNA配列 GCTGGATCCCCCATGCCGAG
実験t27	日本晴	t27-1	t入りヘテロ aacctttgggtagcactggagtagcaa→ aacctttgggtagcactggagtagcaa	g入りヘテロ tttgcgcgcctcggcagggggaaccagc→ tttgcgcgcctcggcagggggaaccagc
実験f28 変異解析再生個体 16個体			OsGI ガイドRNA配列 CTACTCCAAGTGCTACCCAA	bZIP23 ガイドRNA配列 GTTGTGCGAGAGAAGACGCGG
実験f28	日本晴	f28-2	14bp抜けt入りのバイアレリック aaaaaagcaaccttgggtagcactggagtagcaa→ aaaaaagcaaccttgggtagtagcaa aaaaaagcaaccttgggtagcactggagtagcaa	c入りとtがcaになったバイアレリック atccgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgtgtctctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-3	tag抜けとg入りのバイアレリック aacctttgggtagcactggagtagcaa→ aacctttggg-gcacttgagtagcaa aacctttgggtagcactggagtagcaa	a入りとt入りバイアレリック atccgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-6	14bp抜けt入りのバイアレリック aaaaaagcaaccttgggtagcactggagtagcaa→ aaaaaagcaaccttgggtagtagcaa aaaaaagcaaccttgggtagcactggagtagcaa	c入りとt入りバイアレリック atccgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-10	なし	a入りヘテロ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-12	t入りとg抜けのバイアレリック aacctttgggtagcactggagtagcaa→ aacctttgggtagcactggagtagcaa aacctttg-gtagcactggagtagcaa	c入りとt入りバイアレリック atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-13	t入りとg抜けのバイアレリック aacctttgggtagcactggagtagcaa→ aacctttgggtagcactggagtagcaa aacctttg-gtagcactggagtagcaa	c入りとt入りバイアレリック atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験f28	日本晴	f28-15	t入りとc入りのバイアレリック aacctttgggtagcactggagtagcaa→ aacctttgggtagcactggagtagcaa aacctttg-ggtagcactggagtagcaa	t入りとc入りになったバイアレリック atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg→ atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg atccgcgcgcgtgtctctctcgacaacaccttctcgatg
実験t29 変異解析再生個体 22個体			OsGI ガイドRNA配列 CTACTCCAAGTGCTACCCAA	bZIP46 ガイドRNA配列 GCTGCTGCGCAACATCTGGA
実験t29	日本晴	t29-2	tggtgta抜けヘテロ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctt-gcacttgagtagcaatt	ct抜けヘテロ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga→ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga
実験t29	日本晴	t29-14	g抜けとa入りバイアレリック cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttggg-tagcactggagtagcaatt cctttgggtagcactggagtagcaatt	t入りヘテロ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga→ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga
実験t29	日本晴	t29-17	g入りヘテロ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttgggttagcactggagtagcaatt	t入りヘテロ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga→ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga
実験t29	日本晴	t29-18	g入りヘテロ cctttgggtagcactggagtagcaatt→ cctttgggttagcactggagtagcaatt	t入りヘテロ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga→ aacatggatgagctgctgcgaacacttggacgcgaggga
実験56 変異解析再生個体 54個体			OsPLT3 ガイドRNA配列 GCTCATGTCAAAGTTGGTGA	
実験56	日本晴	PLT3-4	t入りヘテロ caacgcgcgtccaacacttga→ caacgcgcgtccaacacttga	
実験57 変異解析再生個体 80個体			BBX19 ガイドRNA配列 GTATGCATCTCGCAAGGCTA	
実験57 変異解析再生個体 80個体	日本晴	BBX19-66	17bp抜けとcaaggc抜けバイアレリック aaaatcaggtatgcatctcgcaaggctaggg→ aaaatcaggtatgcatctcgcaaggctaggg aaaatcaggtatgcatctcgcaaggctaggg	
実験58 変異解析再生個体 38個体			Myb12 ガイドRNA配列 GTCCATCGCCGAGAAAGCTGGA	
実験58	日本晴	Myb12-16	gcctagctg抜けバイアレリック atcgccgagaagctggaggcagatc→ atcgccgagaa-tggaggcagatc atcgccgagaa-gaggcagatc	
実験58	日本晴	Myb12-19	agaagc抜けホモ atcgccgagaagctggaggcagatc→ atcgccgca-tggaggcagatc	

	実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	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147 変異解析再生個体 19個体			OsMATL ガイドRNA CGCCGATTACTTCGACTGCA	
31	実験147	日本晴	MATL_1	-7 homo CGCCGATTACTTCGACTGCA→ CCTCGC-----TTCGACTGCA	
32	実験147	日本晴	MATL_10	+1(A)/-4 biallelic CGCCGATTACTTCGACTGCA→ CCTCGCACGATTACTTCGACTGCA CCTCGC-----TACTTCGACTGCA	
	実験148 変異解析再生個体 22個体			OsMATL2 ガイドRNA TTCTAGAATCAGAGTTGCAG	
33	実験148	日本晴	MATL2_3	+1(T) hetero TTCTAGAATCAGAGTTGCAG→ CCTTTCTTAGAATCAGAGTTGCAG	
34	実験148	日本晴	MATL2_16	+1(T)/-7 biallelic TTCTAGAATCAGAGTTGCAG→ CCTTTCTTAGAATCAGAGTTGCAG CCTTTC-----AGAGTTGCAG	
	実験149 変異解析再生個体 20個体			OsGEX1 ガイドRNA CGCCCCCGGTTCCCTCGCTG	OsD7g0668100 ガイドRNA GTGGCCGAATTCTCCATCGA
35	実験149	日本晴	GEX1_3	+1(C/T) biallelic CGCCCCCGGTTCCCTCGCTG→ CGCCCCCGGTTCCCTCGCCTGCGG CGCCCCCGGTTCCCTCGTCTGCGG	なし
36	実験149	日本晴	GEX1_12	+1(C)/+50 biallelic CGCCCCCGGTTCCCTCGCTG→ CGCCCCCGGTTCCCTCGCCTGCGG CGCCCCCGGTTCCCTCG(+50)CTGCGG	+1(A) hetero GTGGCCGAATTCTCCATCGA→ CCGGTGAGCCGAATTCTCCATCGA

	実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	
	実験32 変異解析再生個体 43個体			OsELF3-2 ガイドRNA配列 GTGCGGACTGAGAGCAACAA	
37	実験32	令和4年度計画書 5-39系統	32-18	caa抜けとa抜けバイアレリック ttttgtg cgga ctgagagcaacaagggtgtt→ ttttgtg cgga ctgagagcaa・gggtgttattctcttgaaccccgcaと ttttgtg cgga ctgagagc・acaagggtgtt	
38	実験32	令和4年度計画書 5-39系統	32-30	gcaa抜けとa抜けバイアレリック ttttgtg cgga ctgagagcaacaagggtgtt→ ttttgtg cgga ctgaga・caagggtgttattctcttgaaccccgcaと ttttgtg cgga ctgagagc・acaagggtgtt	
	実験34 変異解析再生個体 25個体			OsTRA1 ガイドRNA配列 GTAAACAACAAATCAAGGAA	
39	実験s34	ゆめぴりか	s34-23	a入りヘテロ caaaatca agga acggtgcacctct→ caaaatcaaa ga acggtgcacctct	
40	実験s34	ゆめぴりか	s34-38	g抜けヘテロ caaaatca agga acggtgcacctct→ caaaatcaag・aacggtgcacctct	
	実験s37 変異解析再生個体 16個体			OsTRA1 ガイドRNA配列 GAGCAACTTCACCGCACACA	
41	実験s37	ゆめぴりか	s37-2	g抜けヘテロ ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg・tgcggtgaagttgct	
42	実験s37	ゆめぴりか	s37-11	gtg抜けとgtg cggtgaa 抜けバイアレリック ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg・cggtgaagttgctと ttctcagtgccctgtg・…gttgcct	
43	実験s37	ゆめぴりか	s37-13	gtg抜けとgtg cggtgaa 抜けバイアレリック ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg・cggtgaagttgctと ttctcagtgccctgtg・…gttgcct	
44	実験s37	ゆめぴりか	s37-14	gtg抜けとgtg cggtgaa 抜けバイアレリック ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg・cggtgaagttgctと ttctcagtgccctgtg・…gttgcct	
45	実験s37	ゆめぴりか	s37-18	g入りヘテロ ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg gtg cggtgaagttgct	
46	実験s37	ゆめぴりか	s37-20	g入りヘテロ ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg gtg cggtgaagttgct	
47	実験s37	ゆめぴりか	s37-26	g抜けとtggt→aに変わったバイアレリック ttctcagtgccctgtggtg cggtga agttgct→ ttctcagtgccctgtg・tgcggtgaagttgctと ttctcagtgccctg ag cggtgaagttgct	
	実験53 変異解析再生個体 20個体			OsTRA1 ガイドRNA配列 GCTCTCTTGTGTATTGACAC と GCAGGTCTTGCAAAAGGGT	
48	実験53	ゆめぴりか	phe-25	41bp欠とg入りバイアレリック tcctgtgt caatacacga agagagcttgag caggtcttg cacaaaggtcgagca→ tcctgtg・…ggtcgagcaと tcctgtgt caatacacga agagagcttgag caggtcttg cacaaaggtcgagca	
49	実験53	ゆめぴりか	phe-26	c入りヘテロ tcctgtgt caatacacga agagagcttgag caggtcttg cacaaaggtcgagca→ tcctgtgt caatacacga agagagcttgag caggtcttg cacaaaggtcgagca	
50	実験53	ゆめぴりか	phe-28	29bp欠ヘテロ tcctgtgt caatacacga agagagcttgag caggtcttg cacaaaggtcgagca→ tcctgtgt caatacacga ・…tcgagca	

	実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	
	実験141 変異解析再生個体 63個体			ARE1 ガイドRNA CGGTAAGCTCTGAAGGCGGC	
51	実験141	きたあおば	ARE1#22-2	T insertion と91bp deletion のバイアレリク CGGTAAGCTCTGAAGGCGGC→ CCGCGGTTAAGCTCTGAAGGCGGC GTTC------(91bp)-----GTGG	
52	実験141	きたあおば	ARE1#24-1	T insertion ヘテロ CGGTAAGCTCTGAAGGCGGC→ CCGCGGTTAAGCTCTGAAGGCGGC	
53	実験141	きたあおば	ARE1#24-2	T insertion ヘテロ CGGTAAGCTCTGAAGGCGGC→ CCGCGGTTAAGCTCTGAAGGCGGC	
54	実験141	きたあおば	ARE1#27-1	-2bp deletion ヘテロ CGGTAAGCTCTGAAGGCGGC→ CCGCGG--AGCTCTGAAGGCGGC	
	実験142 変異解析再生個体 8個体			Os1900 ガイドRNA GGAGCTTGAGGACAGTTCCA	Os5100 ガイドRNA GGCTCCCCCTCTCCACCAGAA
55	実験142	令和6年度計画書 39-4	Os1951#3	-1 bp deletion と-3 bp deletion のバイアレリク GGAGCTTGAGGACAGTTCCA→ GGAGCTTGAGGACAGT--CCAGGG GGAGCTTGAGGACA--CCAGGG	-1 bp deletion と-4 bp deletion のバイアレリク GGCTCCCCCTCTCCACCAGA→ GGCTCCCCCTCTCCACC--GAAGGG GGCTCCCCCTCTCC--GAAGGG
56	実験142	令和6年度計画書 39-4	Os1951#4	-3 bp deletion と-6 bp deletion のバイアレリク GGAGCTTGAGGACAGTTCCA→ GGAGCTTGAGGACA--CCAGGG GGAGCTTGAGGA--T-----CAGGG	-1 bp deletion と-3 bp deletion のバイアレリク GGCTCCCCCTCTCCACCAGA→ GGCTCCCCCTCTCCACC--GAAGGG GGCTCCCCCTCTCA--GAAGGG
	実験143 変異解析再生個体 145個体			CAD2 ガイドRNA CCTACAACCTACACCCTCAGG	
57	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#28	T insertion と A insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
58	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#39	T insertion ホモ CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG	
59	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#47	A insertion と-2bp deletion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCT--AACTACACCCTCAGG	
60	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#60	T insertion と A insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
61	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#61	T insertion と C insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
62	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#64	T insertion と A insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
63	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#71	T insertion と-8bp deletion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCT-----ACCCTCAGG	
64	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#73	A insertion ホモ CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
65	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#76	A insertion ホモ CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
66	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#78	T insertion と A insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
67	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#92	-6 bp deletion とWT のヘテロ CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCC-----CTACACCCTCAGG	
68	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#105	T insertion と A insertion のバイアレリク CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTTACAACCTACACCCTCAGG CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	
69	実験143	令和6年度計画書 39-4	OsCAD2#144	A insertion ホモ CCTACAACCTACACCCTCAGG→ CCCCCTACAACCTACACCCTCAGG	

	実験番号	変異導入品種・系統名	個体名・系統名	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144 変異解析再生個体 129個体			Os1900 promoter ガイドRNA ACTAATACTGATGCTGCTGC (センス鎖) → ←ACGAGTGACACATGCACATT (センス鎖)	Os5100 ガイドRNA GGCTCCCCTCTCCACCAGAA
70	実験144	令和6年度計画書 38-82	pOs1951#9	欠失アレルと、欠失アレル-4bp deletionのバイアレリク ACTAATACTGATGCTGCTGC (センス鎖) → ←ACGAGTGACACATGCACATT (センス鎖) 上記の断片が以下のように CCTACT------(463bp)-----AGTGACACATGCACATT CCTACT------(467bp)-----ACACATGCACATT	-1bp deletionと-4bp deletionのバイアレリク GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGCTCCCCTCTCCACC- GAAGGG GGCTCCCCTCTCC-----GAAGGG
71	実験144	令和6年度計画書 38-82	pOs1951#39	欠失アレルと、A insertion, -2bp deletionのバイアレリク ACTAATACTGATGCTGCTGC (センス鎖) → ←ACGAGTGACACATGCACATT (センス鎖) 上記の断片が以下のように CCTACT------(463bp)-----AGTGACACATGCACATT CCTACTAAATACTGATGCTGCTGC... CCTACG--TGACACATGCACATT	-21 bp deletion ホE GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGC------(21 bp)-----CTCTT
72	実験144	令和6年度計画書 38-82	pOs1951#93	欠失アレルと、A insertion, T insertionのバイアレリク ACTAATACTGATGCTGCTGC (センス鎖) → ←ACGAGTGACACATGCACATT (センス鎖) 上記の断片が以下のように CCTACT------(463bp)-----AGTGACACATGCACATT CCTACTAAATACTGATGCTGCTGC... CCTACGTAGTGACACATGCACATT	A insertionと-13 bp deletionのバイアレリク GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGCTCCCCTCTCCACCAAGAGGG GGCTC-----AAGGG
	実験145 変異解析再生個体 95個体			Os1900 ガイドRNA GGAGCTTGAGGACAGTTCCA	Os5100 ガイドRNA GGCTCCCCTCTCCACCAGAA
73	実験145	令和6年度計画書 38-42	Os1951#55	-3bp deletionと-4 bp deletionのバイアレリク GGAGCTTGAGGACAGTTCCA→ GGAGCTTGAGGACA---CCAGGG GGAGCTTGAGGAC---CCAGGG	-1bp deletionと-4 bp deletionのバイアレリク GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGCTCCCCTCTCCACC- GAAGGG GGCTCCCCTCTCC-----GAAGGG
74	実験145	令和6年度計画書 38-42	Os1951#67	-3bp deletionと-4 bp deletionのバイアレリク GGAGCTTGAGGACAGTTCCA→ GGAGCTTGAGGACA---CCAGGG GGAGCTTGAGGAC---CCAGGG	-1bp deletionと-5 bp deletionのバイアレリク GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGCTCCCCTCTCCACC- GAAGGG GGCTCCCCTCTC-----GAAGGG
75	実験145	令和6年度計画書 38-42	Os1951#70	-1bp deletionと-5bp deletionのバイアレリク GGAGCTTGAGGACAGTTCCA→ GGAGCTTGAGGACAGT-CCAGGG GGAGCTTGAGGA-----CCAGGG	-1 bp deletion ホE GGCTCCCCTCTCCACCAGAA→ GGCTCCCCTCTCCACC- GAAGGG

【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と考えられるが、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、

```
guuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgag  
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'

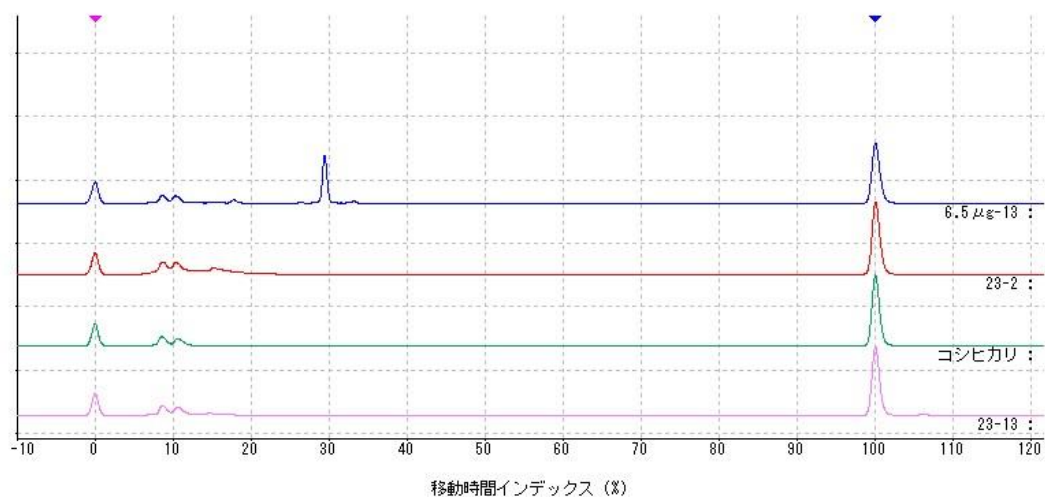
5'-AAAAGCACCGACTCGGTG-3'

を設計し、PCR 増幅を行い、MultiNA 電気泳動装置で確認した。

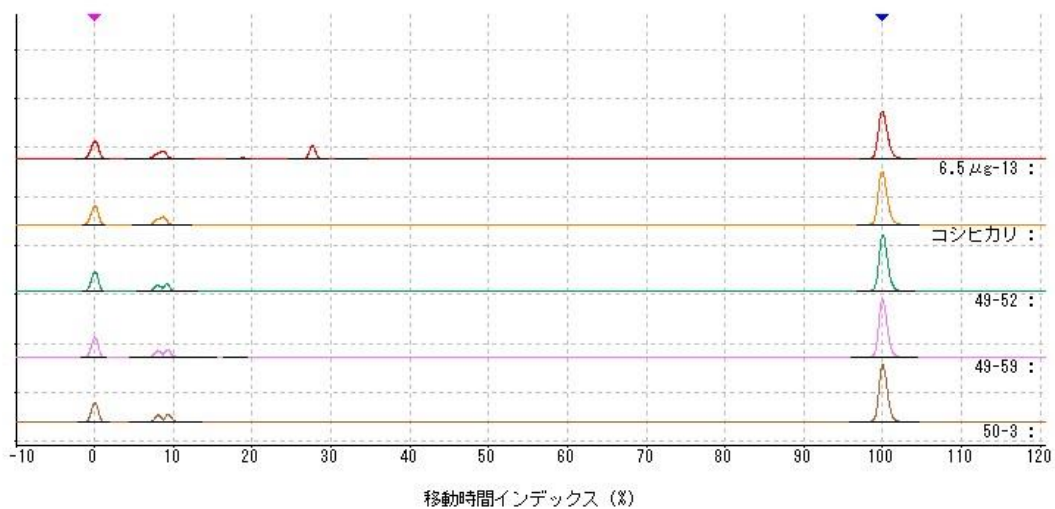
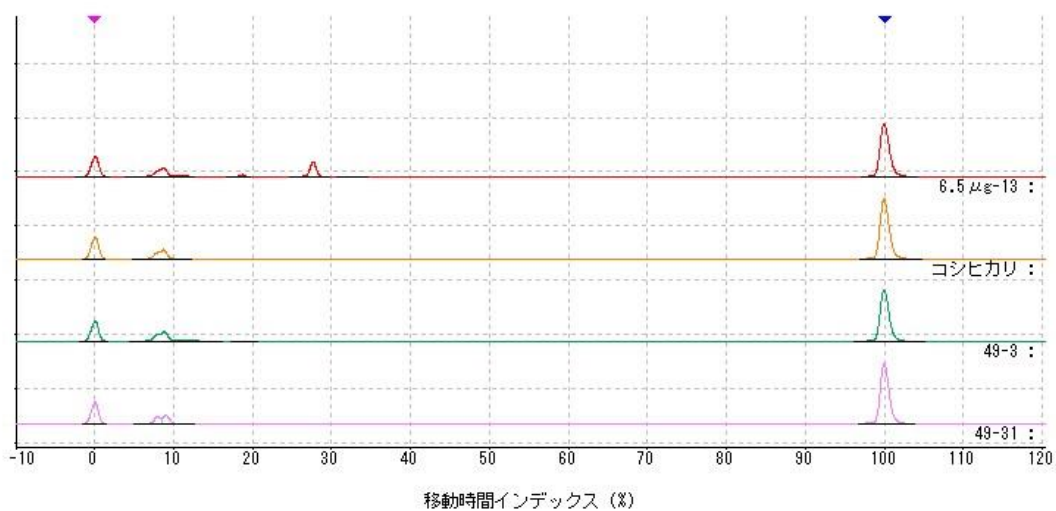
図 1 に、PCR 解析の産物を MultiNA 電気泳動装置で電気泳動した結果を示す。Cas9 タンパク質と sgRNA そのものではなく、Cas9 タンパク質と sgRNA を発現する DNA プラスミドを用いたゲノム編集を行ったことがあり、そこで得られた再生個体の中で、イネゲノムに sgRNA が導入されたものをポジコン (6.5ug-13, Posi Con, positive というサンプル名)として使った。ピークの位置に振れがあるのは、MultiNA のサンプルを流したマイクロ流路の違いによるものである。一部の結果では、Ladder を示しているが、Ladder のピークは、34bp, 67bp, 110bp, 147bp, 190bp, 242bp, 331bp, 404bp, 495bp を示している。

移動時間インデックスが 30 付近に、見えるピークが 80bp の PCR 産物で、ポジコンのみで検出された。後半は、DNA Ladder 表記の結果もある。

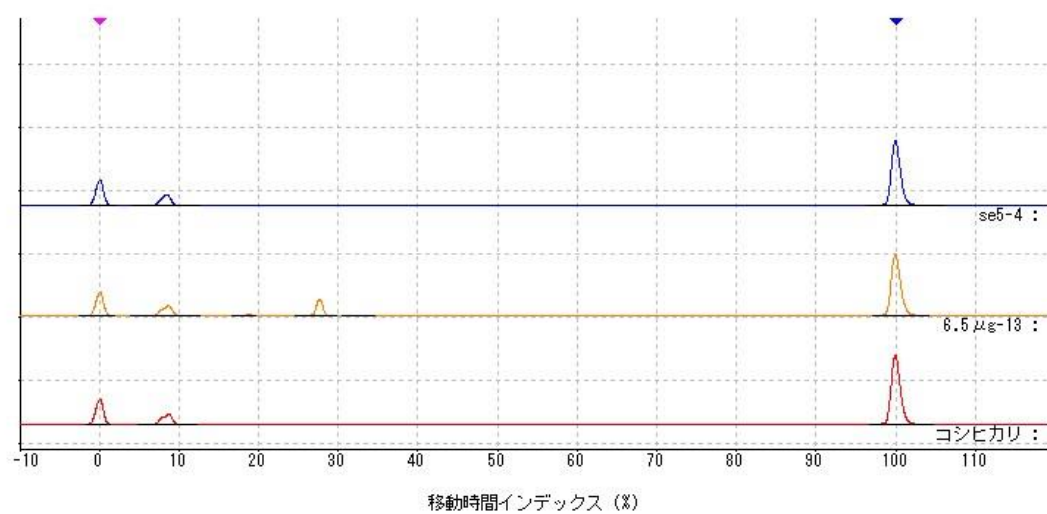
図1 MultiNA 電気泳動装置による sgRNA 非挿入の確認実験
実験 23; MAPK6



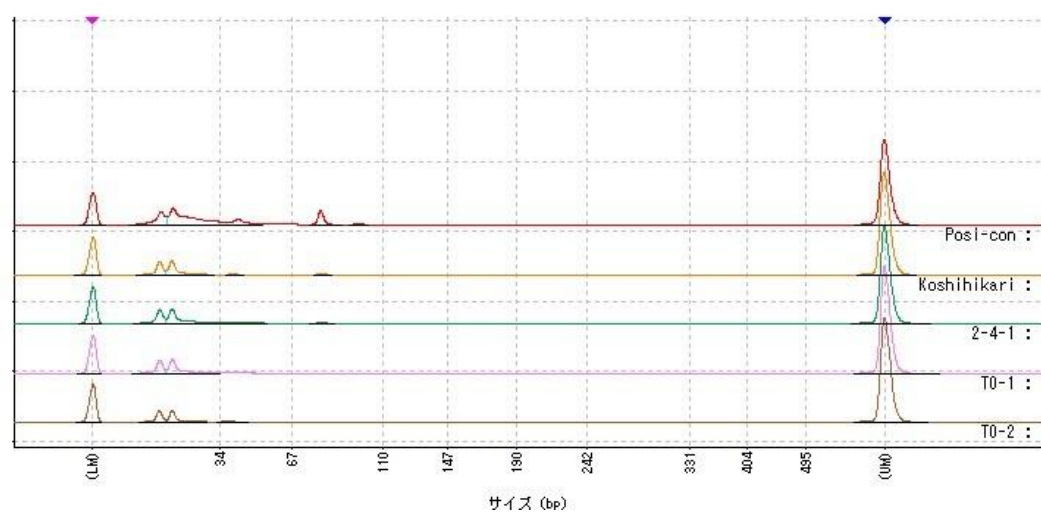
実験 49; CRCT Pro 実験 50 ;CRCT Pro



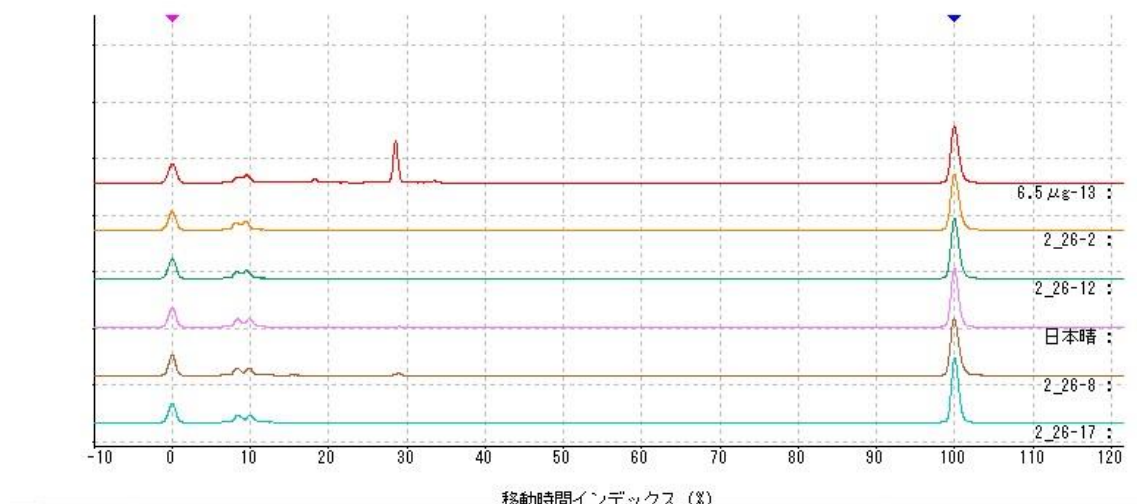
実験 54; Se5



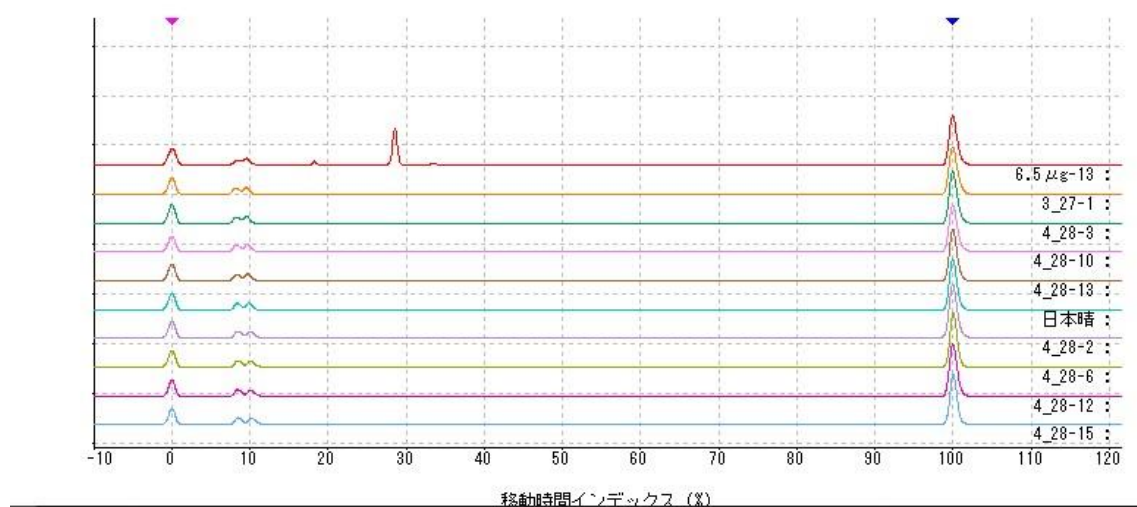
実験 146; FT-L1



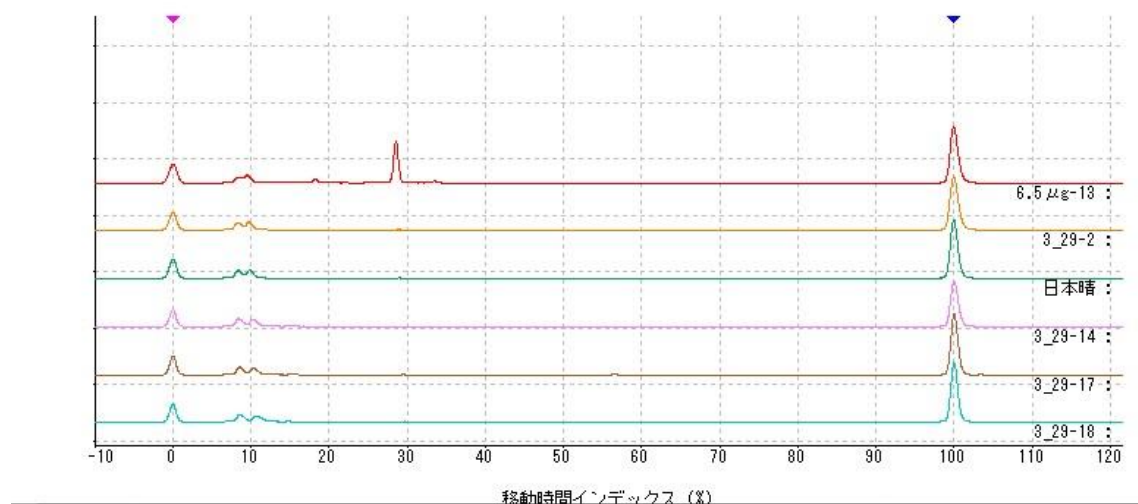
実験 s26; *OsGI* と *ABI5* ここでは、s26 を 2_26 と表記



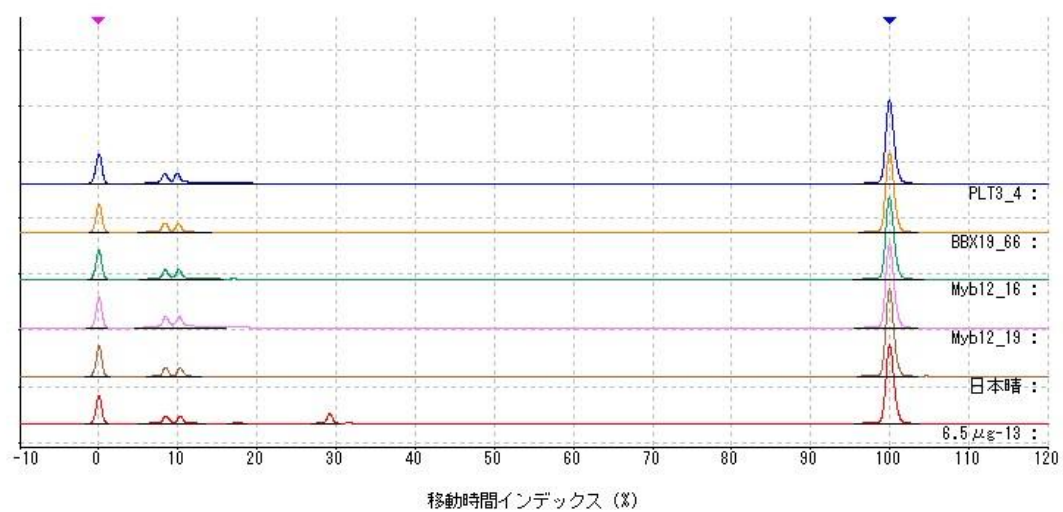
実験 t27;*OsGI* と *bZIP72* 実験 f28;*OsGI* と *bZIP23* ここでは、t27 を 3_27 と f28 を 4_28 と表記



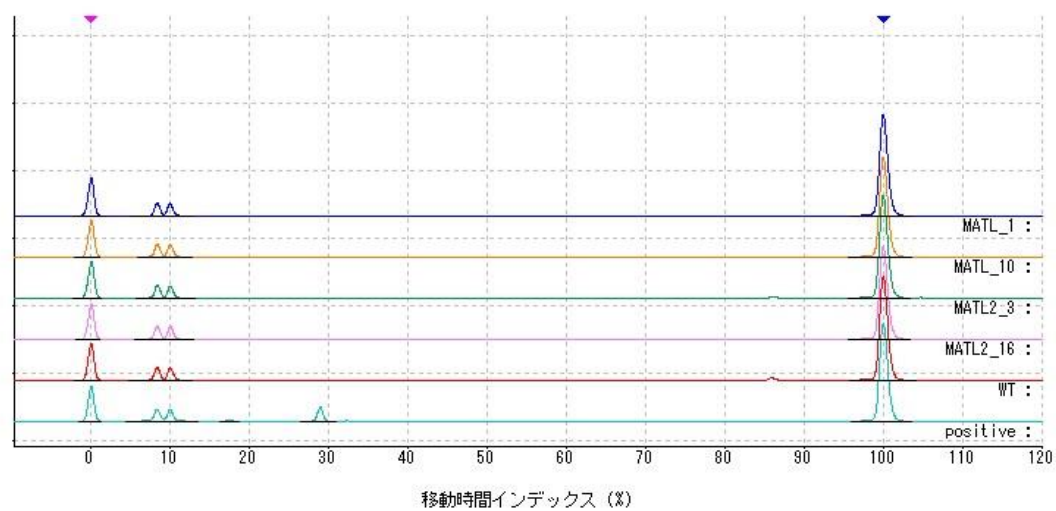
実験 t29; *OsGI* と *bZIP46* ここでは、t29 を 3-29 と表記



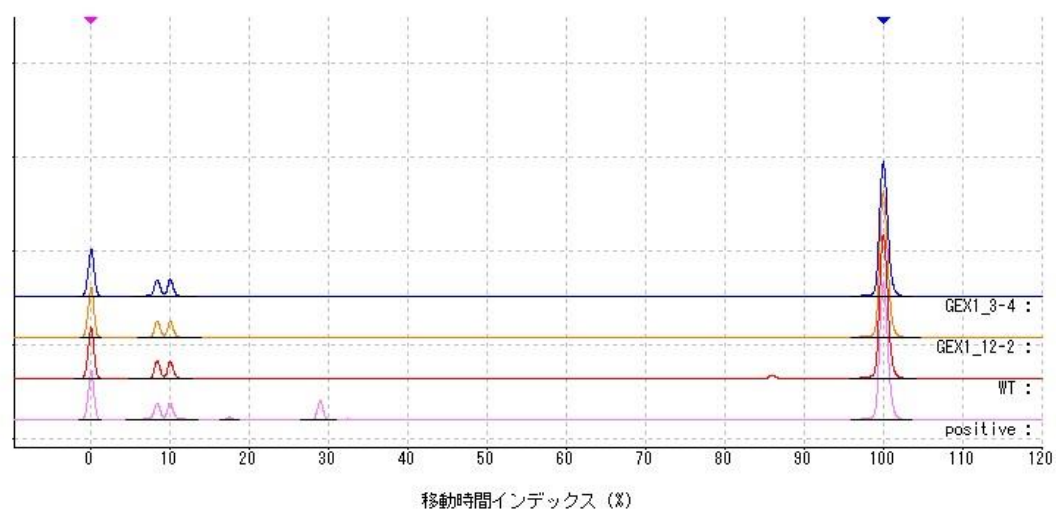
実験 56; *OsPLT3* 実験 57; *BBX19* 実験 58; *Myb12*



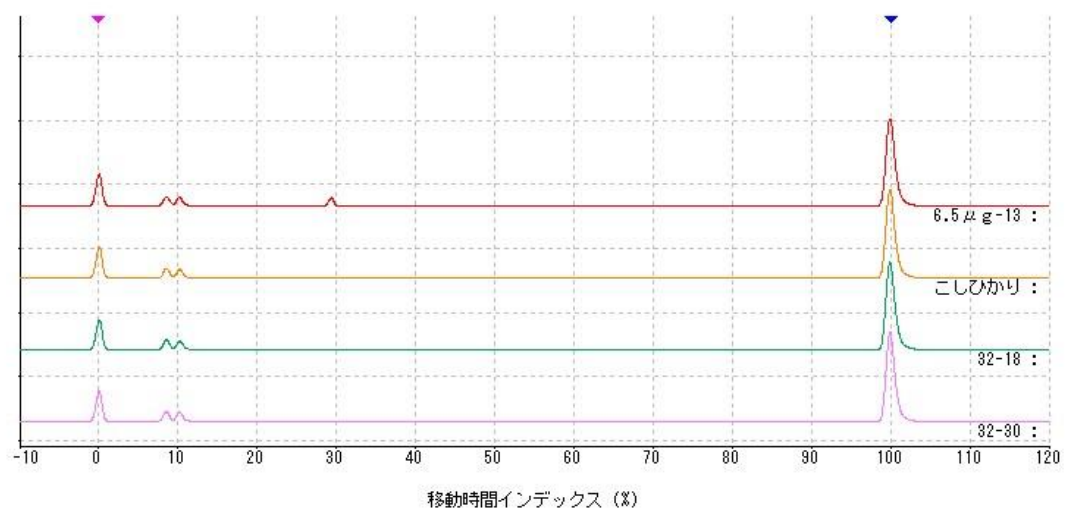
実験 147; *OsMATL* 実験 148; *OsMATL2*



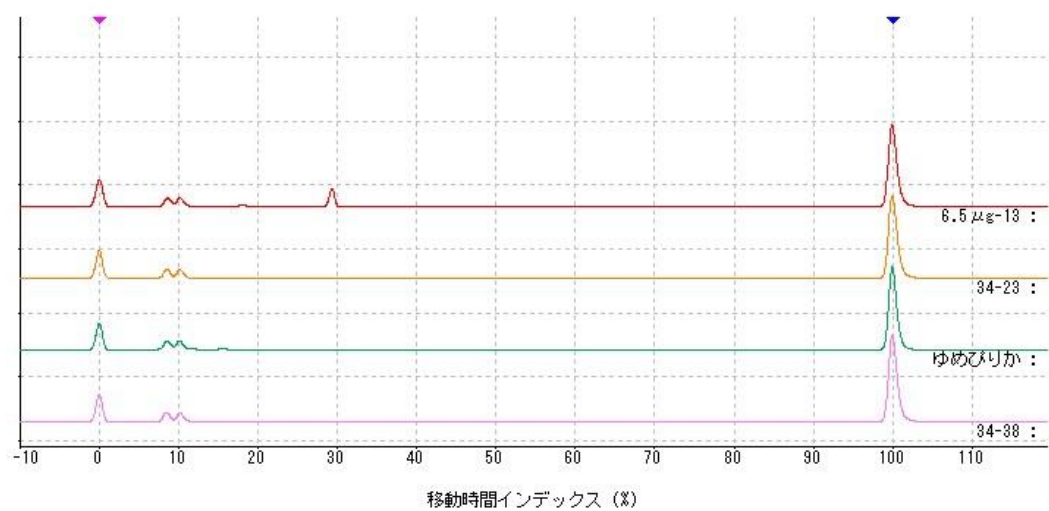
実験 149; *OsGEX1* と *Os07g0668100*



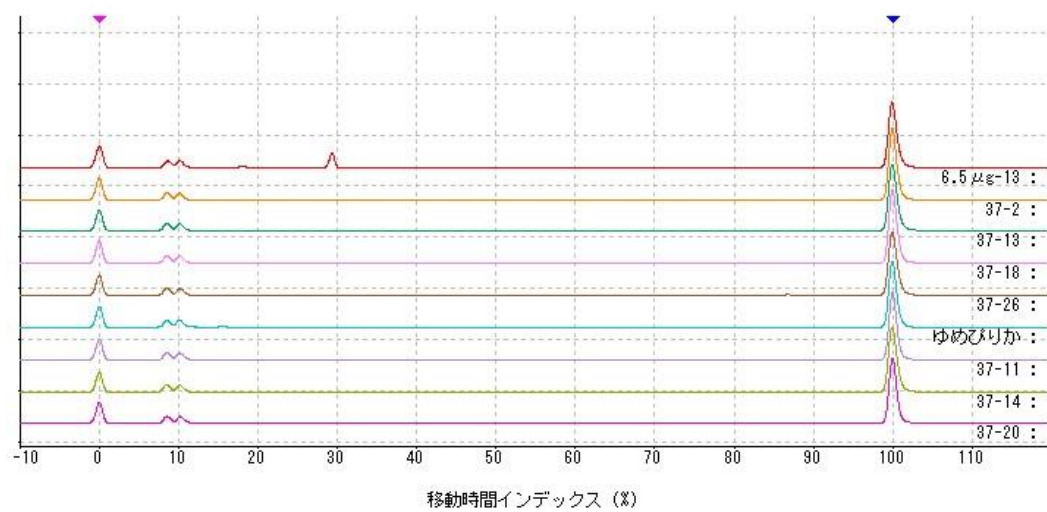
実験 32 ; *OsELF3-2*



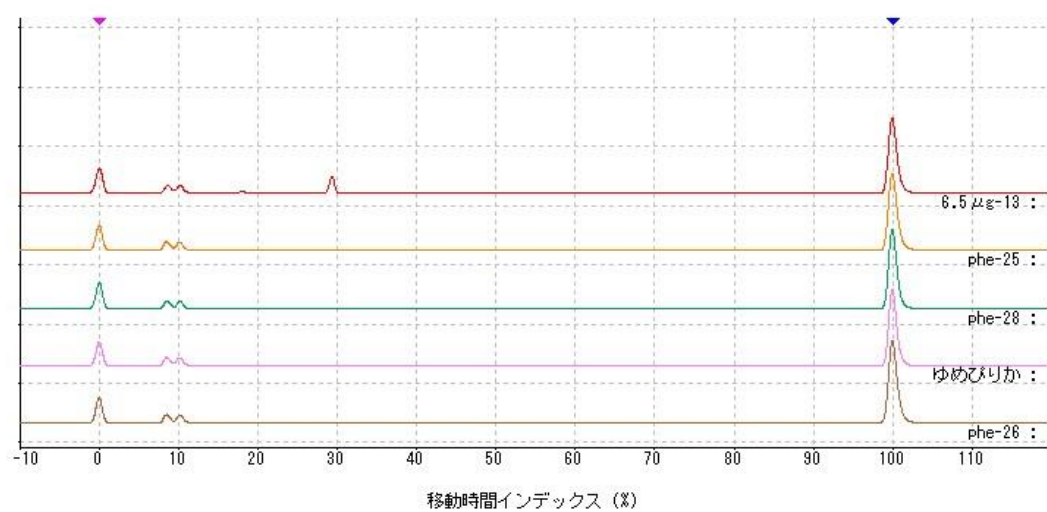
実験 s34 ; *OsTRA1* ここでは、34 と表記



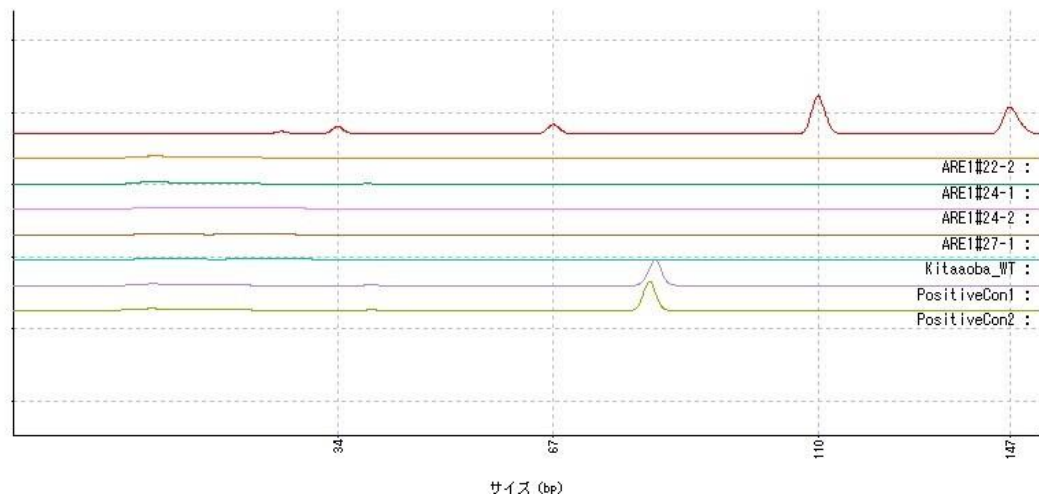
実験 s37 ; *OsTRA1* ここでは、37と表記



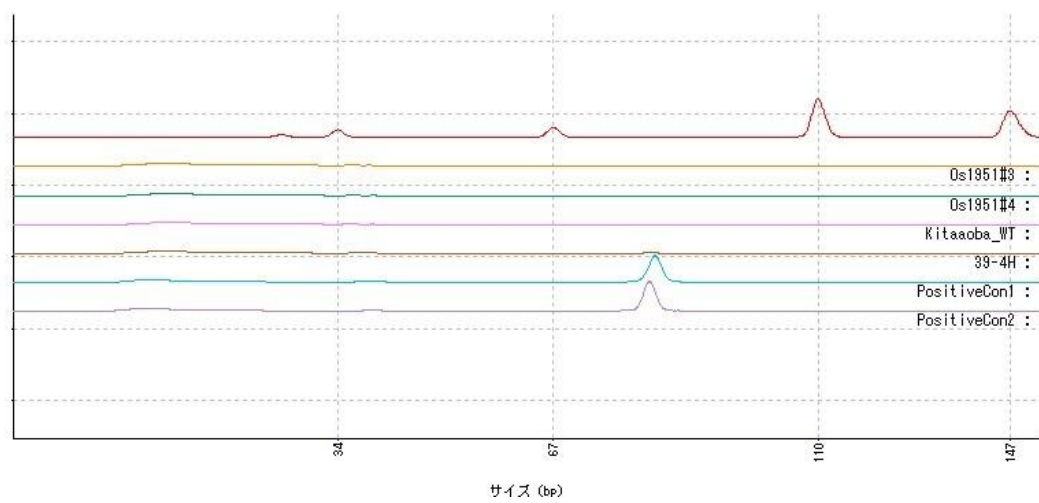
実験 53 ; *OsTRA1*



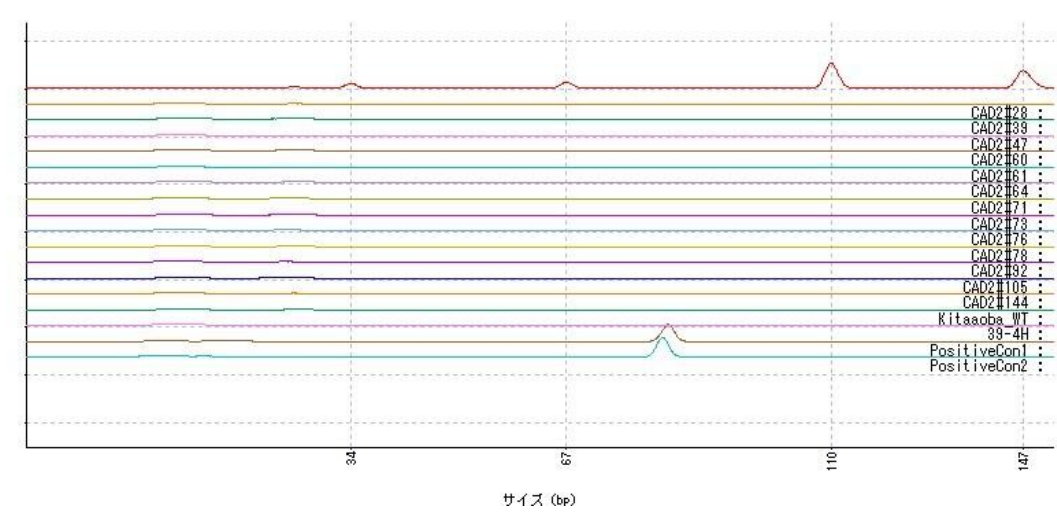
実験 141; ARE



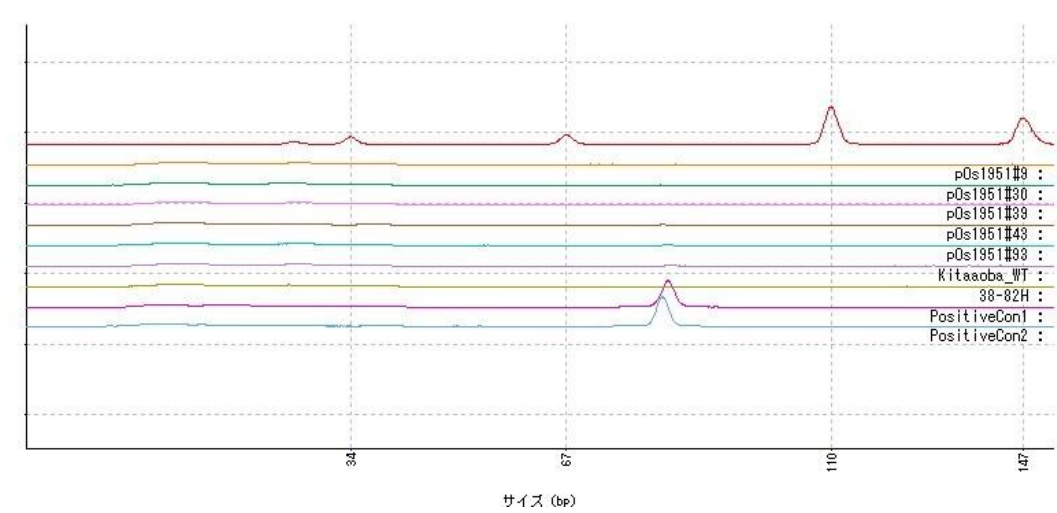
実験 142; Os1900 と Os5100



実験 143; CAD2



実験 144; Os1900 Pro と Os5100



実験 145; *Os1900* と *Os5100*

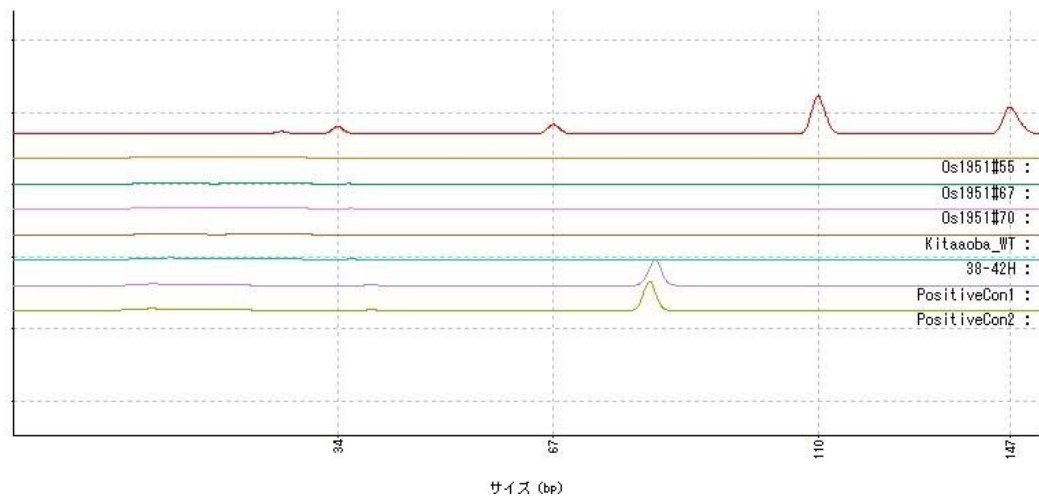


図 1 MultiNA 電気泳動装置による sgRNA 非挿入の確認実験

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。

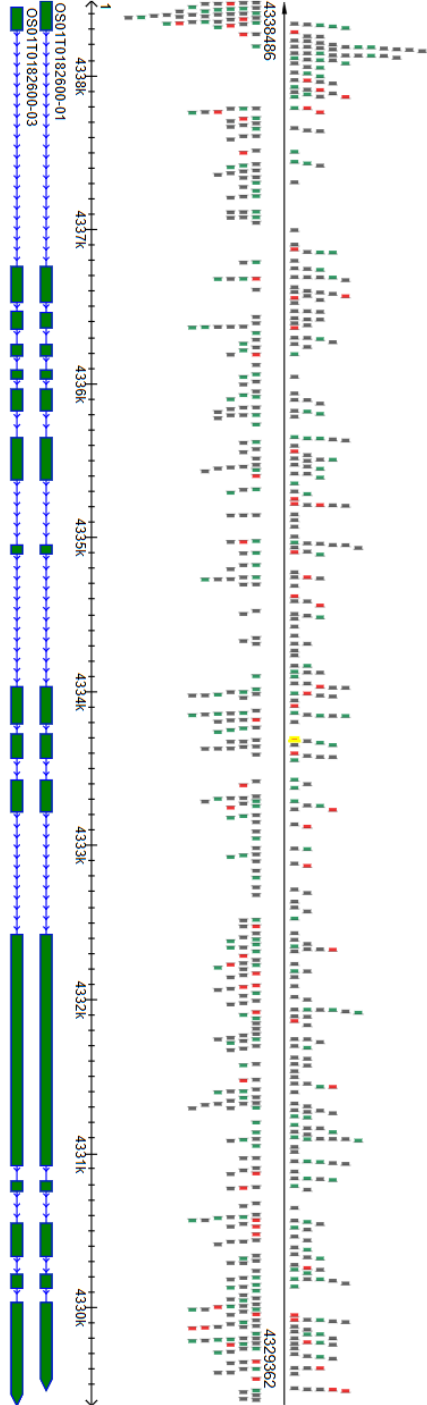
ここに示すように、80bp の DNA 断片は、変異体ゲノムからは増幅されなかった。
したがって、これらのゲノム編集変異個体には、ガイド RNA の配列は組み込まれていないと判断できた。

Off ターゲット変異の影響による考察

sgRNA の設計は、CRISPR-P v.2 を利用しているが、どの sgRNA を実験に使うかを検討する際に、その sgRNA に似ている Off target 候補配列を確認し、その切断スコア(Off score)が、On target である配列の切断スコア(On Score)より大きく下がること、また、イネゲノム上の Off target 候補箇所が少ないことを採用の条件にすることで、想定外の Off ターゲット変異による悪影響が出にくい sgRNA の利用を実践した。

Off target のスコアは、0.5 以下が主流で、ゲノム上の候補数が、20 か所以下であることを一応の目安とした。以下に、OsGI の sgRNA 設計時の予測結果の 1 例を次のページに例示する。採用した sgRNA の On-score は、0.8333 で、Off-score は、一番目が 0.534 で、二番目以降の候補のスコアが 0.289 以下で、ゲノム上に 17 か所の予想であった。すべての sgRNA に関し、このような方針で設計を行った。

ORG: Onyza sativa (RAP-DB). Position: 1:4338486..4329362. Length: 9125



Start with 'A' ☐ 'G' ☐ The current sgRNAs are G(N)20GG or A(N)20GG depending on if U6 or U3 promoters are used for transcribing the RNA molecules.

Sort by 'score' ☐ 'gc' ☐ 'position' ☐						
	On-score ^②	Sequence	Region			
guide1	0.8684	ATAGCAGCTGAACCTTGGT ^③ CG	exon			
guide2	0.8639	GCTTCAGTGGATCCACGAC ^③ GG	exon			
guide3	0.8417	TGTTGAAGCTCTTAAGACAG ^③ CG	exon			
guide4	0.8333	CTACTCAAGTGTACCCAAAG ^③ GG	exon			
guide5	0.8200	GCTTTTATTTTTCGGTG ^③ CG	utr			
guide6	0.8170	TCAACGCGTATGAATCAAG ^③ GG	exon			
guide7	0.7976	TCATCATCTGACGACTCA ^③ GG	exon			
guide8	0.7920	GCTTGAACATCTAAGTCA ^③ GG	utr			
guide9	0.7901	TATATTCGGAATTTACGAG ^③ GG	utr			
guide10	0.7891	CGAGAAAATATTTTTTCG ^③ GG	utr			
guide11	0.7848	TTACAGGCTCTCTGCTCA ^③ GG	utr			
guide12	0.7613	ACTGTTAATCGAATGAGAG ^③ GG	utr			
guide13	0.7546	TGAGACACAAATTTGACT ^③ GG	exon			
guide14	0.7533	GAGCTCCCTCTCTCCACG ^③ GG	exon			
guide15	0.7466	ACAGAAAATCTAAACGCA ^③ GG	utr			
guide16	0.7359	ATGTTCCAGACATATAC ^③ GG	utr			
guide17	0.7342	GGAATGCTAGAGTTTCTAC ^③ GG	exon			
guide18	0.7306	GAGGGGATAGACCCGCG ^③ GG	utr			
guide19	0.7136	CTAATAGGCTTGTCACTAA ^③ GG	intron			
guide4	on-score 0.8333	position 1'-433699				
guide sequence: CTACTCAAGTGTACCCAAAG ^③ GG						
snRNA primer U6						
5'-CACGCTACTCAAGTGTACCCAAAG-3'						
3'-GATAGAGTTCAAGTGGTTCCTCAA-5'						
number of off-target sites: 17						
top 20 genome-wide off-target sites						
	Sequence	Off-score ^②	YMS ^②	Locus	Gene	Region
	CAATTCAGAGCTACCAAG ^③ GG	0.534	4MMs	9:-14811515		Intergenic
	TTACTGAAATGCAACCAAG ^③ GG	0.289	4MMs	3:-7759629	OS0360246800	Intron
	GTCCTCAAGCTCAACCAAG ^③ GG	0.128	4MMs	10:+3436624	OS1050154700	exon
	GACTCAATATGTTACCAAG ^③ GG	0.125	4MMs	12:-23328483		Intergenic
	AACCTCAAGGCTTCCCAAG ^③ GG	0.089	4MMs	2:-23482866	OS0250600400	exon
	CTACGCAAGAGCTGCCCAAG ^③ GG	0.065	4MMs	2:+35875798	OS0250833900	utr
	CTACGCAATTCCTACCAAG ^③ GG	0.054	3MMs	1:-25830700	OS0505477300	Intergenic
	CTGCGCCAGAGGCTGCCAAG ^③ GG	0.053	4MMs	5:-23485501	OS0160823300	exon
	CTGCGCCAGAGGCTGCCAAG ^③ GG	0.053	4MMs	1:-3515957	OS0160170300	utr
	CTGCGCCAGAGGCTGCCAAG ^③ GG	0.050	4MMs	7:-3726975	OS0150938100	utr
	CTCTCCAGAGGCTACCAAG ^③ GG	0.049	4MMs	1:-41187056		utr