

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 8 年 3 月 23 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 熊ノ郷 淳
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	低アミロースジャガイモ (系統名 <i>Solanum tuberosum</i> disrupted-GBSSI-F1-#3, #52)				
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低アミロース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	<table border="1"> <tr> <td>名称</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>所在地</td> <td>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</td> </tr> </table>	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
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 (potato; <i>Solanum tuberosum</i>) 品種名: さやか				
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、四倍体栽培品種の稔性は低い。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 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 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 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</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：c. 人工ヌクレアーゼ遺伝子を宿主のゲノムに挿入</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</p> <p>導入方法； 無菌培養したジャガイモ植物片にアグロバクテリウムを感染させ、人工ヌクレアーゼ遺伝子を含む遺伝子カセットをゲノムに挿入。</p> <p>除去方法； アグロバクテリウム感染により作出した形質転換当代 (T0) を交配させ、外来核酸が遺伝的に分離した T-DNA 非導入個体を選抜。</p> <p>残存の有無を確認した方法：c. その他 (k-mer 法) T-DNA 非導入個体に関して、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」を参照）。</p>
改変した遺伝子等	名称	GBSS1 (granule-bound starch synthase 1), Soltu.DM.08G030230
	機能	アミロース (デンプン) の生合成
	予想される機能の変化	ジャガイモ塊茎のデンプンは 15-30% のアミロースと 70-85% のアミロペクチンから構成される。アミロースの合成に関わる GBSS1 を破壊することで、塊茎中のアミロース含量が低下する (Kusano H. et al. 2018, Sci. Rep. 8:13753)。
改変生物の形質の変化	当該改変により生じた変化	<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 GBSS1 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)。当該系統は交配によって人工ヌクレアーゼ発現カセットが遺伝的に除去されておりゲノム編集によって生じた遺伝子変異が安定的に維持していると考えられる。</p>
	上記以外に生じた変化	<p>当該系統はヘテロなゲノムをもつ 4 倍体ジャガイモを交配して得られた系統であり、一部の系統は親系統とは異なる形態を示すが、閉鎖系での土壌栽培において塊茎が形成されることが確認されている。野外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。</p> <p>また、オフターゲットの候補配列を調査した結果、1 あるいは 2 のミスマッチをもつオフターゲット候補配列はジャガイモ標準ゲノム中に存</p>

		<p>在せず、オフターゲット変異は導入されていないと推察される。</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</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定</p> <p>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。GBSSI 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、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。</p> <p>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。</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。</p> <p>2. 有害物質の産生性</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>デンプンはアミロースとアミロペクチンから構成される。GBSSI の破壊によりアミロペクチンの増加が予想されるが、アミロペクチンは有毒物質ではない。また、GBSSI 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。</p> <p>さらに、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やレクチン、及び SGA の生合成系についてもデンプン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。</p> <p>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)</p> <p>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</p>

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 (*S. nigrum*) 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。

(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

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ず、また、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

	<p>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、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8年1月15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

本ゲノム編集ジャガイモの作出には pZD-dxCas9_123 (*Scientific Reports* **8**, 13753, 2018) を用いられた。当該ベクターの構成及び構成要素の由来を表1に示した。

表1. pZD-dxCas9_123 ベクターの発現カセットの主要な構成要素

構成要素	サイズ	由来及び機能
RB	25 bp	由来；アグロバクテリウム。リゾビウム科に属する細菌。多くの双子葉植物に感染し、癌腫病を起こす。 機能； T-DNA right border (RB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を開始させる。
AtU6-26 (P)	387 bp	由来；シロイヌナズナ。アブラナ科の一年草。世界に広く分布し、モデル植物としても使用されている。 機能；短鎖 RNA の発現効率が高い RNA polymerase III (polIII) 系のプロモーターであり、ここでは sgRNA の発現を制御する。
sgRNA scaffold	78 bp	由来； <i>Streptococcus pyogenes</i> 。レンサ球菌属に属するグラム陽性球菌で、鞭毛を持たないため非運動性であり、通性嫌気性菌であるため、酸素の存在下でも、酸素が存在しない環境でも生育しうるが、やや嫌気性の環境を好む。 機能； Cas タンパク質との結合に必要な足場となる。
CaMV35S (P)	670 bp	由来；カリフラワーモザイクウイルス。カリモウイルス科に属する植物ウイルス。主にアブラナ科植物に感染し、モザイク症を起こす。 機能； <i>Cas9</i> 遺伝子のプロモーター配列。下流の遺伝子を発現させる。
dMac3	158 bp	由来；イネ。イネ科の植物。世界で広く栽培され、モデル植物としても使用されている。 機能；下流遺伝子の翻訳エンハンサーとして働き、下流 ORF の翻訳量を増強する。
SV40 NLS	27 bp	由来；simian virus 40。サルを自然宿主とする最も代表的な小型 DNA 腫瘍ウイルスの一種。 機能； <i>Cas9</i> 遺伝子の N 末端に付加し、核局在化シグナルとして機能

		させる。
SpCas9	4,167 bp (NLS 含む)	由来; <i>Streptococcus pyogenes</i> (前出) 機能; Cas9 タンパク質と sgRNA の複合体として、標的とする DNA 配列を特異的に認識して結合し、DNA の二本鎖を切断する。イネ用にコドンが最適化されているものを使用した。
Pea3A (T)	470 bp	由来; エンドウ。マメ科の一・二年草。広く栽培され、食用となっている。 機能; 前出の SpCas9 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
OsACT1 (T)	1235 bp	由来; イネ (前出) 機能; 前出の SpCas9 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
HPT	1026 bp	由来; 大腸菌 機能; 植物においてハイグロマイシンへの耐性を付与する。
OsHSP (T)	649 bp	由来; イネ (前出) 機能; 前出の HPT 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
LB	24 bp	由来; アグロバクテリウム (前出) 機能; T-DNA left border (LB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を終結させる。

(2) 構成要素の機能

表 1 に示した発現カセットがジャガイモへ導入されることによって、ハイグロマイシンへの耐性を獲得し、ハイグロマイシンを含む培地上で培養を行うことで形質転換細胞を選抜することができる。また、CRISPR-Cas9 が形質転換細胞で発現し、標的配列の切断、変異導入が行われる。

(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 *GBSS1* 遺伝子（後述）の第 1 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、3つの gRNA を発現させた。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、標的遺伝子が破壊される。*GBSS1* 遺伝子をゲノム編集により破壊したジャガイモは塊茎中のデンプンが低アミロースとなることが報告されている（*Scientific Reports* **8**, 13753, 2018）。

(4) *GBSS1* 遺伝子について

ジャガイモが生産・蓄積するデンプンはアミロースとアミロペクチンから構成される。GBSS(顆粒結合デンプン合成酵素 (EC 2.4.1.21)) はアミロース生合成に関与し、塊茎の貯蔵デンプン中のアミロースの存在を決定する。ジャガイモ塊茎デンプンにおける GBSS 活性の阻害は塊茎中のアミロース含量の減少をもたらすことが知られており、GBSS 活性が完全に抑制された場合には、アミロースを含まないデンプンを含む塊茎が生じる (Visser et al. *Mol. Gen. Genet.* 225, 289-296 (1991))。

ジャガイモの GBSS には *GBSS1* と *GBSS2* が存在するとされていたが、ジャガイモの *GBSS2* とされていた酵素は、その後の解析で可溶性デンプン合成酵素 (SS2) であることが判明し (Van Harsseelaar et al. *BMC Genomics* 18: 37 (2017))、現在では、ジャガイモの GBSS は *GBSS1* の一種類のみであると考えられている。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

pZD-dxCas9_123 (由来の詳細は、次項に記載)

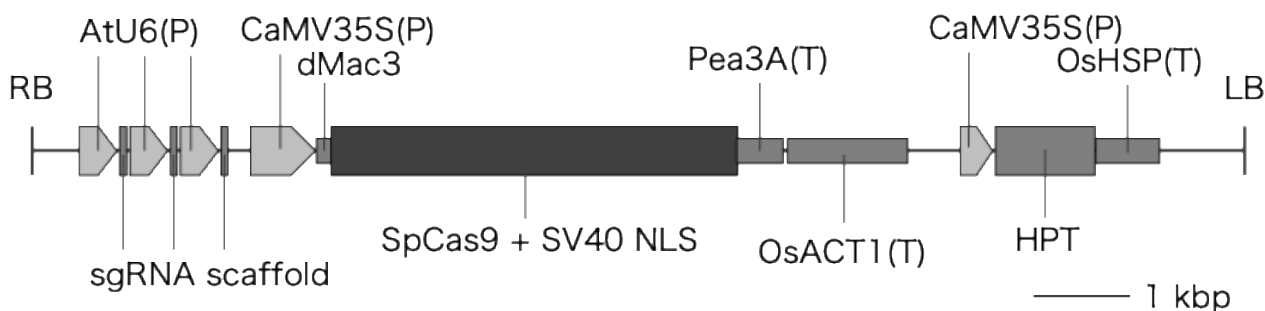
(2) 特性

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。pZD-dxCas9_123 は宿主植物細胞に移入されることで、ハイグロマイシン耐性を付与し、安定的に T-DNA が導入された形質転換細胞の選抜を可能とする。ベクターが導入された細胞では Cas9 タンパク質と *GBSS1* を標的とする sgRNA が発現し、*GBSS1* 遺伝子への DNA 二重鎖切断が誘導され、変異が導入される。T-DNA 領域外には植物で機能を発現することが期待される発現カセットは存在しない。移入され染色体ゲノムに組み込まれた核酸は、交配によって次世代に遺伝するが、分離の法則に従い、移入核酸と標的変異を遺伝的に分離することが可能である。

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。



標的配列 (5'-3') +PAM
AGGGCTGTTAACAAGCTTGA + TGG
GGGCTGTTAACAAGCTTGAT + GGG
TACTAAGGTAACACCCAAGA +TGG

図 1. pZD-dxCas9_123 の 1 T-DNA 領域のマップ及び 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形質転換法により移入を行った。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)。

(3) ゲノム編集生物等の育成の経過

既報 (*Scientific Reports* **8**, 13753, 2018) に記載の通り形質転換ジャガイモ (T0) を複数系統 (#105, #115, #156) 取得した。得られた形質転換ジャガイモについて標的配列への変異導入の確認を CAPS 法により実施し、GBSS1 変異体を取得した。GBSS1 変異体について、図 2 A に示す組み合わせで交配を行い、次世代 (真正種子) を取得し、T-DNA 上の配列について PCR により増幅の確認を行い、外来核酸を保持しないことが期待される候補系統の選抜を行った。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 法により確認を行った。

(4) アグロバクテリウムの除去

形質転換当代 (T0) の作出の際に、アグロバクテリウムを除菌できるクラフォランを含む培地で 2 ヶ月培養することで、アグロバクテリウムを除菌した。また、無菌培養苗の植え継ぎの際に、系統当たり 1 ~ 2 葉を LB 液体培地に加え、30°C で 3 日振盪、細菌の増殖は見られなかった。交配により取得した本届け出系統にはアグロバクテリウムが残存していないと推定される。

4. 細胞外で加工した核酸の残存の有無について

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、ゲノム編集系統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、ゲノム編集系統それぞれの 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系統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)、届け出系統 (#3, #52)、および届け出系統の親系統 (#105, #115, #156) のそれぞれの無菌培養苗からゲノム DNA を抽出し、NovaSeq_X_Plus により約 100 Gbp (約 x30 のカバレッジ) の NGS データを取得した。届け出系統と親系統の関係は図 2 A に示した。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。

親系統である #105、#115、#156 においてはバイナリーベクターの広い領域において、 p 値 1% 水準で 25-mer の挿入が確認された (図 2 B)。一方、交配後の届け出系統 (#3, #52) においては、バイナリーベクターの全領域において p 値 1% 水準でピークは検出されなかった (図 2 C)。以上の解析により、ゲノム編集系統 #3, #52 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、親系統で検出された外来核酸は交配によって除去されたと判断した。つまり細胞外で加工した核酸の残存は無いと判断した。

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、クローニングベクターに導入後、無作為に選択したクローンの配列の確認を行なった。下記の配列結果が得られ、標的 *GBSS1* 遺伝子への変異導入と遺伝が確認された (図 3)。確認を行った *GBSS1* の部分配列では野生型では 2 種類の配列が確認されている。親系統 (T₀) の #105 では 4 種類の、#115 では 3 種類の変異配列が検出されている。#156 では 5 種類以上の配列が確認されており、四倍体の各アリルに変異は導入されているが、細胞によって導入された変異が異なるキメラの状態となっていることが推定される。F1-#3 系統では親系統である #105、#115 で検出された 4 種類の変異配列が確認された。F1-#52 では親系統である #105、#156 に由来すると推定される 3 種類の変異配列が確認された。また、PCR の解析により #105 で検出された -250+1484 bp と思われる変異 (図 3) が遺伝していることが示唆されている。このアリルに挿入された 1484 bp の配列は BLAST 解析の結果、*Solanum* 属のドラフトゲノム配列がヒットしたことから、外来核酸ではなく、宿主内在の配列が挿入されたものであると推測される。F1 系統ではフレームシフトを起こさない 3 bp の欠失が含まれることから、これらの系統では *GBSS1* 遺伝子の機能が部分的に破壊されていると推測される。

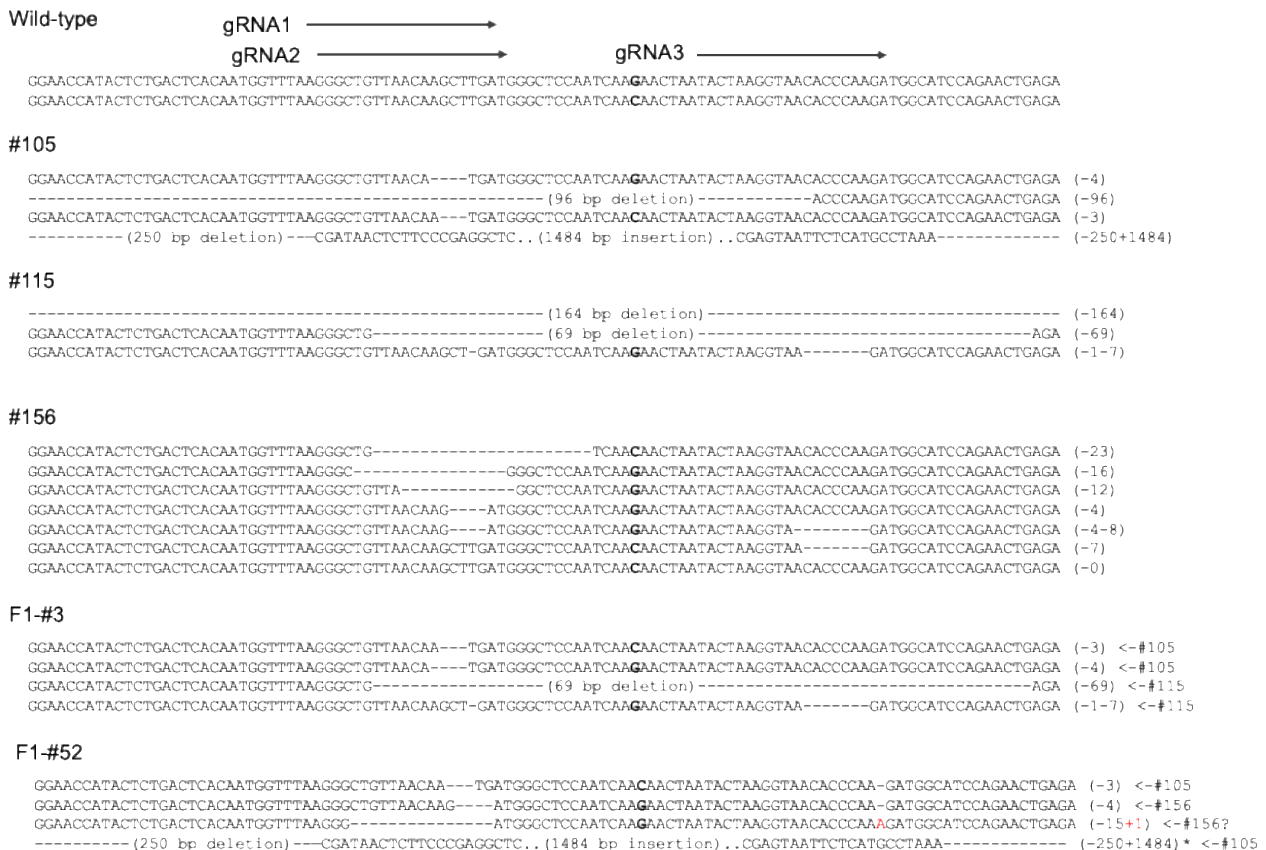


図 3. ゲノム編集システムにおける標的配列

野生型、形質転換当代（#105、#115、#156）、ヌル分離候補系統（#F1-#3、F1-#52）における、*GBSS1* 遺伝子中の Cas9 標的配列近傍の DNA 塩基配列を示す。塩基欠失を - で示し、配列の右側に欠失や挿入の長さを示した。F1-#52 の * でマークした配列は、#105 で検出された（-250+1484）の配列を特異的に増幅する PCR 反応において F1-#52 でも増幅が確認された配列である。

(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 *GBSS1* 遺伝子が部分的に欠失し、塊茎デンプン中のアミロース含量が低減していることが想定される。現在、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

届け出系統はヘテロな四倍体品種「さやか」に由来しているが、交配によって染色体の構成が変化しているため、農業形質等については「さやか」と比較することができない。ただし、届け出系統を閉鎖系温室下での土壌栽培に供したところ、少なくとも両系統とも塊茎を形成することが確認されている。

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>) を用い、ジャガイモ標準ゲノム (*Solanum tuberosum* genome, SolTub_3.0 (May, 2011)) 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、2 bp 以下のミスマッチ/ギャップを確認する条件で検索を行った結果、オフターゲット候補配列は見出されなかった。したがって、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。

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8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
2024年	イネ
2025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、クロタラリア、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、クロタラリア、カラシナ、ヒマワリ
2024年	イネ*

ジャガイモ

オオムギ

緑肥作物としてクロタラリア

2025 年

イネ*

ジャガイモ

オオムギ

緑肥作物としてクロタラリア

*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、ククロタラリア、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、クロタラリア、ヒマワリ
2024年	ジャガイモ オオムギ 緑肥作物としてヒマワリ
2025年	ジャガイモ 緑肥作物としてクロタラリア

*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）

ボランティア植物とは意図的に植えられたものではなく、以前の栽培の際のこぼれ落ち、取り残しなどにより生長してきた植物のことである。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

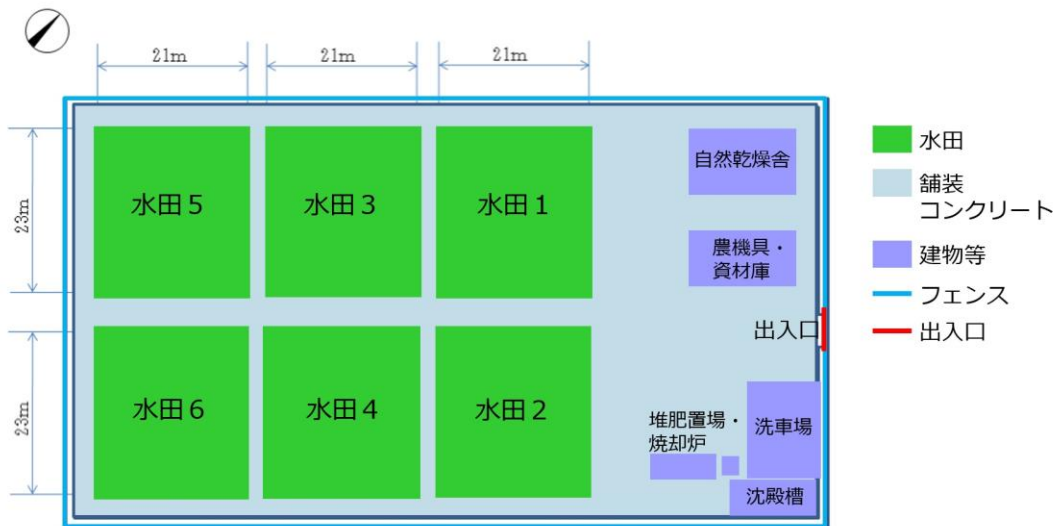


図3 農研機構観音台第1事業場高機能隔離圃場（隔離ほ場1.）内配置図



図4 農研機構観音台第2事業場内配置図

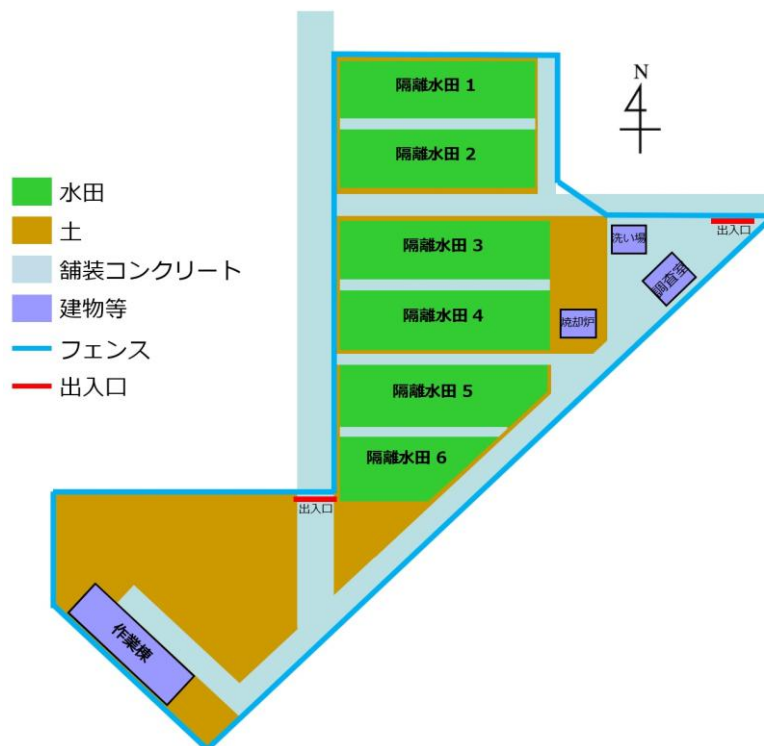


図5 農研機構観音台第2事業場隔離ほ場（隔離ほ場2.）内配置図

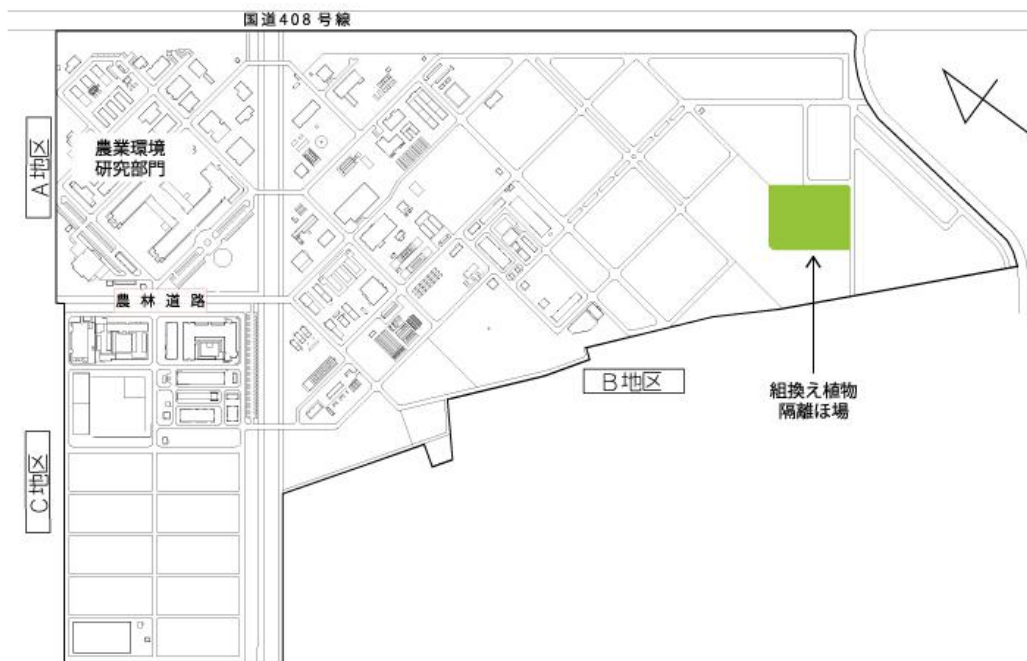


図6 農研機構観音台第3事業場内配置図

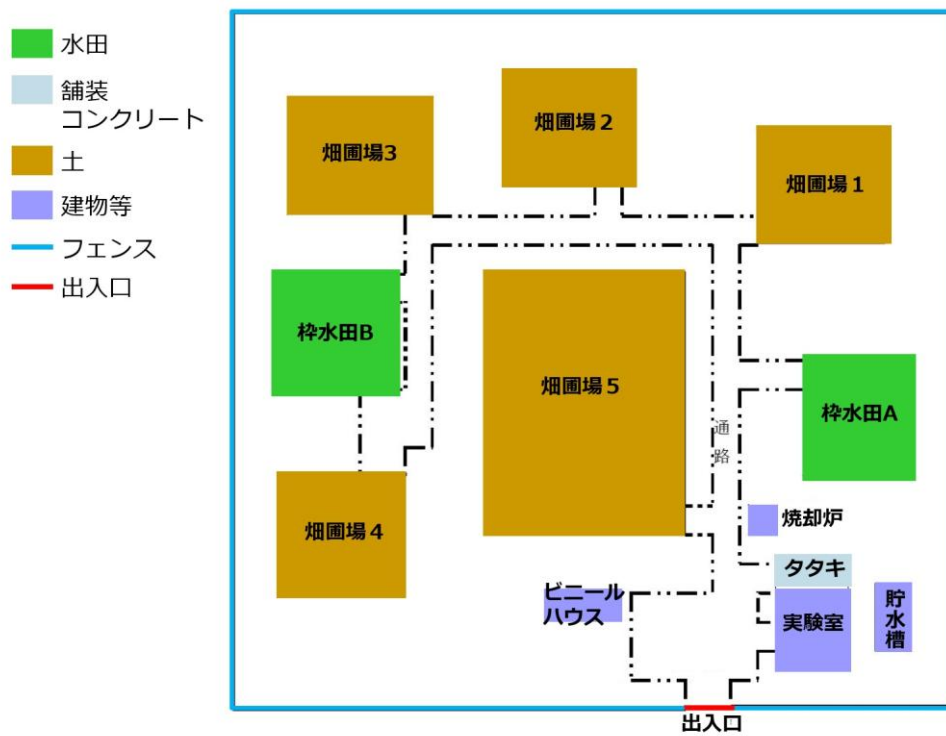


図7 農研機構観音台第3事業場 組換え植物隔離ほ場（隔離ほ場3.）内配置図