

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 7 月 7 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・胚発生関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連 遺伝子・フマル酸合成酵素関連遺伝子(<i>Hd3a</i> , <i>RFT1</i> , <i>Ghd7</i> , <i>OsLUX</i> , <i>MAPK6</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsLASPO</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 コシヒカリ, 日本晴) および 準同質遺 伝子系統 NIL(<i>Hd16 Hd6</i>), および Hd3a2-7-10-2 系統 (コ シヒカリ背景、令和 3 年 6 月 2 9 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・胚発生関連遺伝 子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・フマル酸合成酵素関連遺伝子 (<i>Hd3a</i> (<i>Heading date3a</i>), <i>RFT1</i> (<i>Rice FT-like1</i>), <i>Ghd7</i> (<i>Grain number and heading date7</i>), <i>OsLUX</i> , <i>MAPK6</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsLASPO</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。
使用等をす る場所	名称	1. 東京大学 弥生キャンパス 実験圃場 実験温室 2. 岩手大学農学部附属畜産飼料総合 教育研究センター (御 明神牧場) 詳細は別紙 1 参照 (使用等をする場所等)
	所在地	1. 東京都 文京区 弥生 1-1-1 2. 岩手県岩手郡雫石町御明神大石野

宿主の名称	イネ rice <i>Oryza sativa</i> L. (品種 コシヒカリ, 日本晴, コシヒカリ背景の準同質遺伝子系統 NIL(<i>Hd16 Hd6</i>), および 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))
宿主の自然環境における 生理・生態学的特性	1) 関東では、通常品種は 5~6 月に移植、9~10 月に収穫。 2) 遺伝的に固定した品種・系統は約 1 週間以内の開花期間。 3) 開花期は、品種ごとに遺伝的に決定。 4) 葯開裂後の花粉の寿命は数分間。 5) 開花日が重ならないと品種・系統間で自然交雑はしない。 6) 栽培品種と交雑可能な野生イネは日本に自生しない。 7) ほとんどの野生イネの系統は日本では晩秋に開花し低温のため結実しない。 8) 品種は自殖性が強い。通常栽培で隣の個体との交雑率が 1%程度。 9) 20m 離れた個体との交雑率が、0.01%以下。 10)多くの日本品種 (日本晴&コシヒカリも) は脱粒性がなく、種子の自然拡散がない。 11)水稲品種は、水田栽培に適応。畑作での結実が可能だが、自然環境では雑草との競合に負け、自生できない。 12)冬期の気温によるが、ほぼ越冬しない。 詳細は別紙 2 (変異を導入した宿主種に関する情報) を参照。
使用したゲノム編集技術 の種類・導入方法	技術の種類 : a. CRISPR/Cas9 導入方法 : a. 人工ヌクレアーゼそのものを宿主の細胞内に移入
細胞外で加工した核酸の 導入・除去方法、残存の	変異導入方法 : イネ種子由来のカルスからプロトプラストを調製し、市販の Cas9 タンパク質と依頼合成した sgRNA を事前に混合した人工ヌクレアーゼ溶液を混ぜ、PEG (polyethylene glycol) 存在下で静置し、人工ヌクレアーゼ

有無の確認方法	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 や HRM 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 DNA は一切使用しておらず、外来 DNA そのものの挿入はないと考えられる。ただ、sgRNA 配列の宿主ゲノムへの挿入が起きる可能性は非常に低いと考えられるが、sgRNA の逆転写反応による cDNA 化の可能性を科学的に否定できないことから、これまでに論文等での報告はないものの、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	イネ開花期決定遺伝子・胚発生関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・フマル酸合成酵素関連遺伝子(<i>Hd3a</i> , <i>RFT1</i> , <i>Ghd7</i> , <i>OsLUX</i> , <i>MAPK6</i> , <i>CRCT</i> , <i>OsLASPO</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>Ghd7</i>: 長日条件・低温条件で開花期を遅らせる。 <i>OsLUX</i>: イネの花芽形成遺伝子 & 概日時計構成因子。機能欠損で、花が咲かなくなるとの報告あり。 <i>MAPK6</i>: 胚発生に必須な遺伝子。

		<i>CRCT</i> : でんぷん合成系酵素遺伝子の転写制御遺伝子。 <i>OsLASPO</i>: フマル酸合成酵素関連遺伝子
	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、成長速度や出穂期（開花期）の変化、結果として収穫期の変化、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。
改変生物の 形質の変化	当該改変に より生じた 変化	イネ開花期決定遺伝子・胚発生関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・フマル酸合成酵素関連遺伝子(<i>Hd3a</i>, <i>RFT1</i>, <i>Ghd7</i>, <i>OsLUX</i>, <i>MAPK6</i>, <i>OsLASPO</i>)のコード領域の機能欠損変異。 <i>CRCT</i> 変異はプロモーター上の欠失変異で、発現パタンの変化 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、詳細は別紙 3 を参照。
生物多様性影響が生ずる 可能性についての考察		競合における優位性：イネ開花期決定遺伝子・胚発生関連遺伝子・糖でんぷん代謝関連遺伝子・フマル酸合成酵素関連遺伝子 (<i>Hd3a</i>, <i>RFT1</i>, <i>Ghd7</i>, <i>OsLUX</i>, <i>MAPK6</i>, <i>OsLASPO</i>, <i>CRCT</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>LASPO</i> 遺伝子はイネでの解析が新規であるが、他の生物の解析結果の報告がある。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

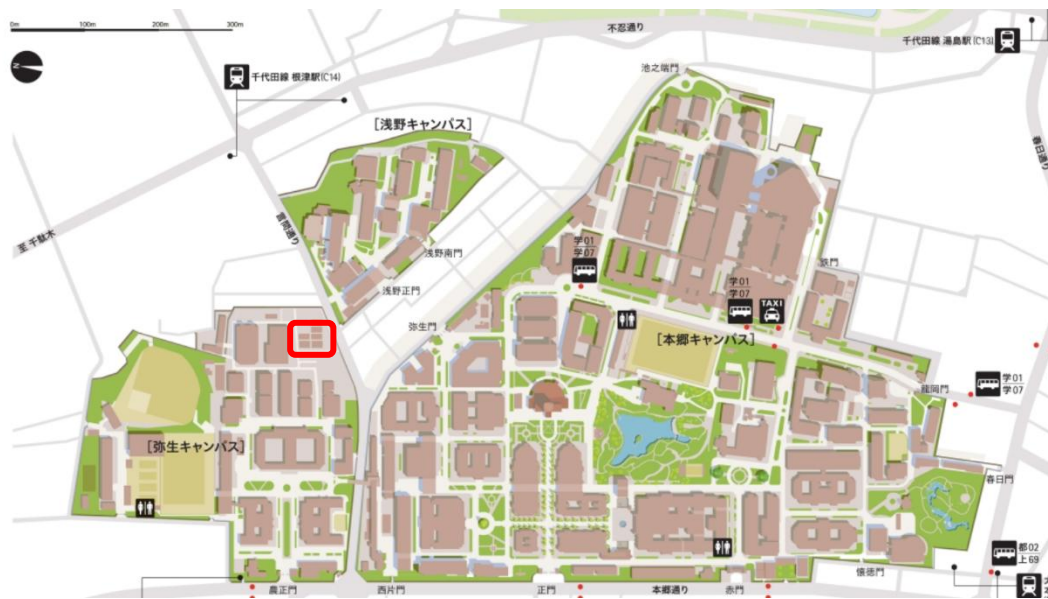
	物質の産生性が高くなることは考えにくい。また、フマル酸自体が他の植物においてアレロパシー物質として報告されている例が見受けられるが、<i>OsLASPO</i> の機能欠損によりフマル酸合成が抑制されるので、アレロパシーが高まるとは考えにくい。 交雑性：開花期決定・概日時計因子遺伝子・糖澱粉代謝遺伝子の変異によって、受粉・受精効率に変化が生じることは考えにくく、胚発生遺伝子で受粉効率が上がることも考えにくい。また、日本に野生イネは自生しておらず、交雑可能な野生植物は存在しないことから生物多様性影響が生じる可能性はないと言える。 総合的 評価：競合における優位性、有害物質の産生性、交雑性を総合的に考察して、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並びに岩手大学農学部附属畜産飼料総合教育研究センターに報告する。
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。 岩手大学長からの東大総長への本研究のために牧場の使用承認書を受領済。

	ただし、岩手大学での栽培系統に関しては、岩手大の当該委員会での承認がない場合、栽培しない。委員長名： 検討日：令和 8 年 5 月 13 日 緊急時に当該生物の不活化処理が必要になった際に、刈り取った植物体等はすべてオートクレーブによる処理後、廃棄予定。 ゲノム編集した植物からの種子等の収穫物は、人がいないときは施錠される研究室内の種子庫で保管管理する。
--	--

別紙 1

使用等をする場所 等

1) 使用等をする場所



使用予定の場所を東大キャンパスマップに赤枠で示した。また、写真を以下に示す。



2) 施設概要

東京大学 弥生キャンパスに設置された実験圃場。温室、並びに、水田は、我々が管理しているコンクリート枠人工水田(約 1m x 約 5m x 8 基)を使用予定。部外者の立入りを制限するための標識等を設置している。

3) 実験圃場の周辺の状況

道をはさんで、約 5~10 m の距離で、隣の研究室が管理する水田がある。その水田の管理者には、今回の栽培に関する情報を提供し、了解を得ている。また、使用等を予定する実験圃場から、600m 以内に一般の水田は存在しない。実験圃場からの距離 半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域）はない。また、当該実験圃場は、文京区が作製した「洪水ハザードマップ」「土砂災害ハザードマップ」

(<https://www.city.bunkyo.lg.jp/bosai/bosai/bousai/Panfu.html>) において、浸水想定区域に指定されていない。詳細は末尾に添付の図を参照

4) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

実験圃場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、鳥類による被害は報告されていない（防鳥網の設置等によってこれらの侵入を防ぐことができる）。

5) 実験圃場周辺の生物相

（１）イネを実験圃場で栽培することによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

影響を受ける可能性のある野生動植物等は存在しない。

（２）交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

交雑可能な近縁野生種は存在しない。

使用等をする場所 2 か所目

6) 使用する場所

岩手大学農学部附属畜産飼料総合
教育研究センター（御明神牧場）

岩手県岩手郡雫石町御明神大石野

右図：我が国におけるおおまかな位置

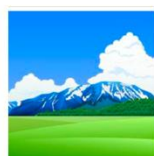
下図：試験地（雫石町御明神牧場）のおおまかな位置



7) 施設概要

主要教育・研究施設等の所在地 Location of Major Facilities

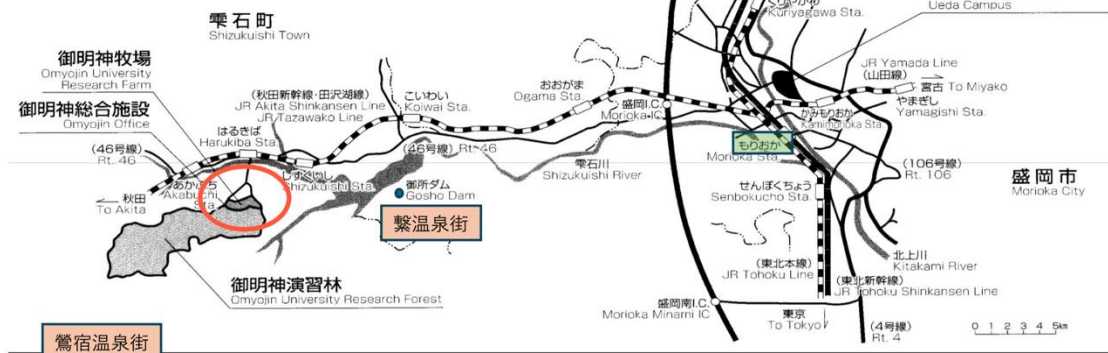
岩手大学農学部 附属畜産飼料総合
教育研究センター 御明神牧場



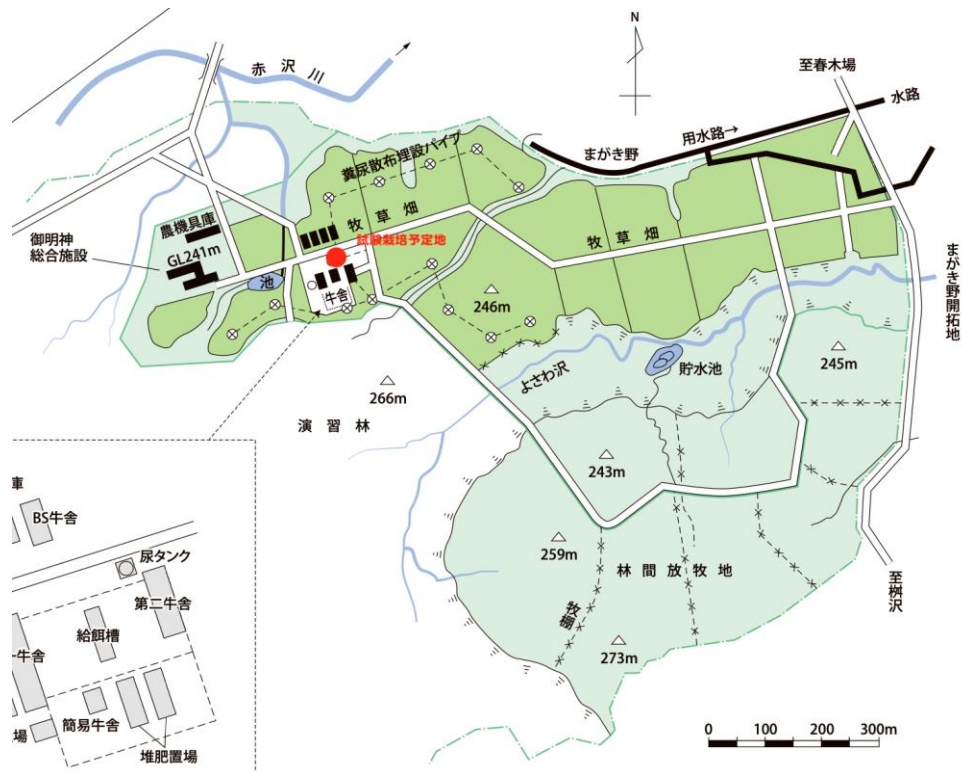
岩手山

網張温泉街

小岩井農場



岩手大学農学部附属畜産飼料総合教育研究センター御明神牧場は、主として黒毛和種牛の繁殖を教育研究する施設で、約 120 頭の動物を飼養している。ゲノム編集技術の利用により得られた系統の試験栽培は、牛舎敷地の一角を利用する。



栽培試験予定地（牛舎前、赤丸）

牛舎のエリアは部外者立入禁止区域となっており、業者等立ち入る場合は、来場者名簿に記載することとしている。



牛舎エリア（試験栽培予定地）
入り口に設置されている立ち入り禁止
の看板



試験栽培イメージ 防鳥ネットの他に電気牧柵を設置する予定（写真には未設置）

8) 実験栽培場所の周辺の状況

実験栽培場所から 300 メートル以内に一般の水田は存在しない。実験栽培場所から 1km 圏内に環境省が定める自然保護地域は存在しない。また、当該実験栽培場所は雫石町が作成した雫石町防災マップ、雫石町ハザードマップ

<https://www.town.shizukuishi.iwate.jp/docs/2014121700099/>

において、土砂災害警戒区域、洪水浸水想定区域、火山噴火による降灰予想範囲に指定されていない。



上空からの試験地の状況：御明神牧場牛舎群の周囲 300 メートル内に一般の水田は無い

9) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

実験栽培場所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（防鳥網の設置頭によってこれらの侵入を防ぐことができる）。

実験栽培場所周辺にクマ、イノシシ等による食害が見られるが、電気牧柵等の設置によりこれらの侵入を防ぐことができる。

10) 実験栽培場所周辺の生物相

(1) イネを実験栽培場所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及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

影響を受ける可能性のある野生動植物等は存在しない。

(2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

交雑可能な近縁野生種は存在しない。

突然変異を導入した宿主種に関する情報

(1)分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

イネ、rice、*Oryza sativa* L.

② 国内及び国外の自然環境における自生地域

日本国内において、イネという栽培種 *Oryza sativa* は基本的に自生しない。約 1 万年前に始まったと推定される栽培化後、長きにわたり、人の手で管理された生育、いわゆる、“栽培” が続き、自然環境においては、雑草と競合できなくなっていると推察される。

また、日本国内においては、栽培イネの近縁野生種 (*O. nivara*、*O. rufipogon* 等) も自生しないし、過去にも自生したことがないと考えられている。この近縁野生種は世界中の熱帯・亜熱帯に分布し、様々な環境、特に生育地の多様な水条件に適応分化している。多くの系統は強い光周性を持ち、日本国内で実験的に栽培すると、11 月以降の短日条件でのみ開花し、野外ではまず結実しない。遺伝的多様性の中核地域は、インド東北部のアッサム地方、ラオス、中国雲南省南端のシーサンパンナ・タイ族自治州、ミャンマーと北部タイの範囲であると考えられている。これらの地域はいずれも山岳地帯、丘陵地帯であり複雑な地形を有する地域である。

なお、水田圃場及び畦畔には栽培に伴って雑草イネが発生する場合があるが、その生育域は我が国においては主に農耕地及びその近傍に限られている。栽培種イネどうしの交雑でも雑草イネが生じることが示されていること、我が国には野生種イネが自生していないことなどから、我が国における雑草イネは栽培種イネに由来するものであり、栽培種イネ間の交雑により雑草性の形質が出てきたものと考えられる。この場合、古い品種の易脱粒性品種との交配が雑草化の大きな原因とされている。雑草イネが発生した場合、一年間、対象圃場を休耕することで雑草イネの更なる拡散は防ぐことができる。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における栽培の歴史

栽培イネ (*O. sativa*) は 1 万 5 千年から 1 万年前に栽培化されたと考えられている。水田稲作文化は、日本へは縄文時代晩期に中国から直接、ないしは、朝鮮半島を経由して伝来したと推定されている。イネは我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在も最も重要な作物として広く栽培されている。人工交配技術を使った育種は百数十年前から行われており、日本各地で、育種選抜が繰り返し行われ、品種として優れたものを選抜し、不適切な系統は排除し続けてきた歴史がある。また、約 50 年前から、ガンマー線等による突然変異育種も盛んにおこなわれており、1990 年代には、プロトプラストからの再生個体から、有用な培養変異を利用したプロトプラスト育種も行われており、“ゆめごち”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 ℃、登熟が停止する最低気温は 15 ℃と見なされている。栽培方法によってイネは陸稲と水稲に分けられる。陸稲は畑に直接播種し、畑状態で栽培する。水稲は水田へ直接播種する直播栽培もあるが、苗を移植する栽培法が一般的である。コメは、主食用として、700 万トン前後が国内で生産されていて、ほとんどが国内消費向けに流通している。また、加工用、種子用、飼料用にコメの生産も行われている。

(3) ゲノム多様性

レトロトランスポゾンの解析から、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。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。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。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。

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 °C、通常の栽培可能温度は 20 °C 以上で、開花結実には 22 °C を必要とする。逆に 34 °C 以上では高温障害が発生する。水稻は湛水条件(水田)で

栽培する。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな植物であり、灌水がなく土壌水分が表層土で 10 %以下、下層土で 12 %以下で干ばつ害が発生する。

表 1 イネの生育時期別の限界温度、最適温度（単位：℃）

生育時期	限界温度		最適	生育時期	限界温度		最適
	低	高			低	高	
発 芽	10	45	20～35	幼穂分化	15	—	—
出芽・苗立ち	12～13	35	25～30	幼穂形成	15～20	38	—
活 着	16	35	25～28	開 花	22	35	30～33
葉の伸長	7～12	45	31	登 熟	12～18	30	20～25
分けつ	9～16	33	25～31				

② 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。

③ 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

イネは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处理、強風、大面積の花粉源等の条件が重なった特殊な状況では、600 m 程度の長距離交雑も起こりうるということが非常に低い頻度ではあるが報告されている。近縁野生種である *O.nivara*、*O.rufipogon* 等は、栽培イネと交雑可能であるが、交雑後代に雑種不稔・雑種弱勢が見られることが多い。日本国外では、それらが自生している地域もあるが、我が国に自生しているという報告はない。また、自家不和合性及びアポミクシスについての報告はない。

(エ) 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの穎花は、1 葯当たり 1000 個以上の花粉が詰まった 6 本の葯を持つ。花粉の稔性はほぼ 100 %、形状は球形で、葯内では粘質で花粉塊をなしているが、葯が開裂し始めると花粉表面が乾き、粘着性が失われ、飛散しやすくなる。基本的に自家受粉作物で、受粉形式は風媒であり、葯は開花(穎)直前には開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる。すなわち、開花前に自花の葯から受粉してしまうため、他家(花)からの風媒による受粉は栽培品種においては極めて少数(1 % 以下)である。花粉の飛散による交雑距離としては、多くの報告では 10 m 程度とされている。花粉の寿命は一般に 3～5 分、最大で 10 分程度とされる。

(オ) 病原性

病原性は認められていない。

(カ) 有害物質の産生性

レタスを用いたプラントボックス (PB) 法によってイネのアレロパシー (他感物質を産生することによる周囲の野生植物の生育抑制) 能について検討すると、水稻の中には、アレロパシーを示すものが存在し、この品種間差は大きい。品種、日本晴やコシヒカリは、低いことが知られている。また、他感物質の残存期間は

長くて数ヶ月程度と考えられている。PB 法によりアレロパシー活性の強いことを見出した赤米（阿波赤米、紅血糯等）は圃場でも雑草抑制作用を示した。イネはアレロパシー物質としてモミラクトン群を合成し、根から放出することで、周囲の植物との競争で優位となること、また、ストレス条件下ではより強いアレロパシー活性を持つモミラクトンBの生合成を誘導し、根からの分泌量を増加させることなどが報告されている。

（キ） その他の情報

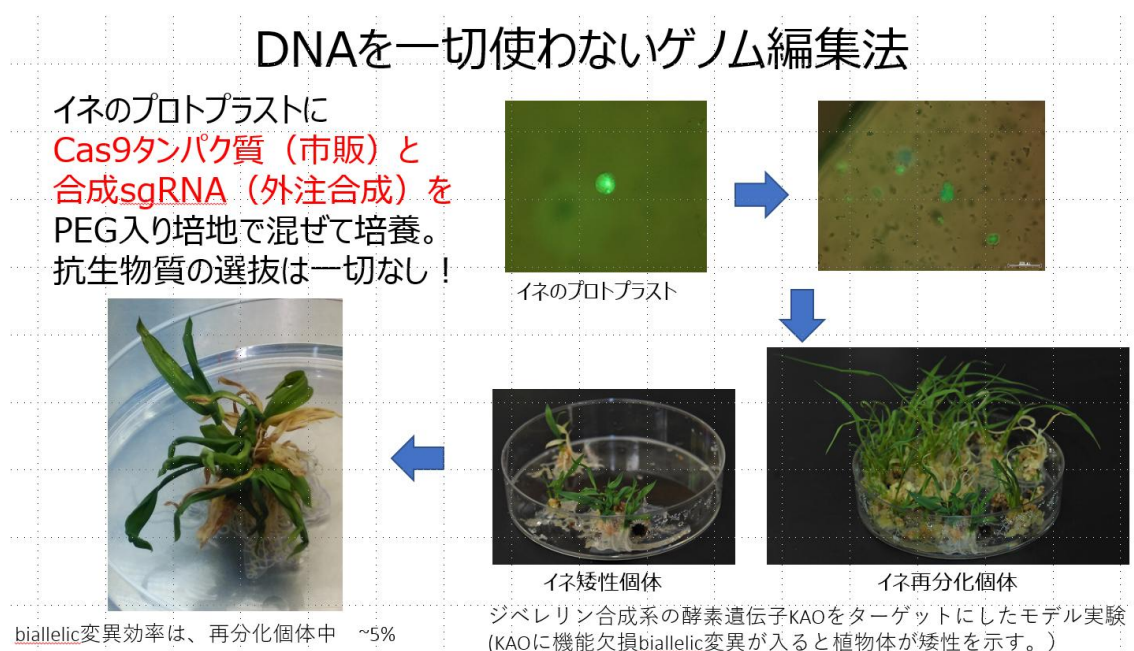
障害不稔が発生すると玄米の蛋白質含量が高くなる。

ゲノム編集実験と 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) コシヒカリ：日本のイネ主要品種

- 2) NIL(*Hd16 Hd6*): コシヒカリ背景の準同質遺伝子系統 野外でコシヒカリより一か月ほど開花遅延を起こす。*Hd16* は、品種日本晴の強機能アレルを、*Hd6* は KANTO IL5 系統の機能アレルを交配で遺伝子移入している。
- 3) 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ゲノム編集で、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。
- 4) 日本晴: 日本のかつてのイネ主要品種

【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。

(以下では、一回のプロトプラスト調整ごとに異なる実験番号を与えている)

(実験番号 ; sgRNA 名1 (と sgRNA 名2 と sgRNA 名3))

コシヒカリを使った実験 :

実験 73 ; *OsLUX* と *Ghd7*

実験 65; *MAPK6*

NIL(*Hd16 Hd6*)系統を使った実験

実験 61; *RFT1*

Hd3a2-7-10-2 系統を使った実験

実験 60; *MAPK6*

実験 s51; CRCT promoter 欠損 sgRNA F4&R4 使用

実験 49; CRCT promoter 欠損 sgRNA F2&F3 使用

実験 50; CRCT promoter 欠損 sgRNA F3&F4 使用

日本晴を使った実験

実験 150 ; *OsLASPO*

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の培養液に包埋し、アガロースビーズを作成し、液体培養を開始した。約 2 週間の培養後、一細胞だったプロトプラストが液体培養を経て分裂を繰り返し増殖したカルスを目視で確認しながら、再分化培地プレート上に個別にうつした。その後、2 週間を目安に、再分化培地上で継代し、緑化を確認後、約 1 カ月の発根培地での培養を経て、イネ再生植物体を得た。得られた再生植物体を拡散防止措置が取られた環境下で通常ポット栽培し、各個体からゲノム DNA を調製し、ゲノム編集の有無の確認を行った。

今回は、で MultiNA 電気泳動装置を用いた PRIMA 法(Kakui et al. 2021)、もしくは定量 PCR 機を用いた HRM 法(Kawauchi et al.投稿準備中)で、変異の導入を推定して、得られた候補からの PCR 増幅物をシーケンス解析に回し、波形データを個別に解析して、変異の導入を確認した。

Kakui H, Yamazaki M, Shimizu KK. (2021) PRIMA: a rapid and cost-effective genotyping method to detect single-nucleotide differences using probe-induced heteroduplexes. Sci Rep. 2021 Oct 24;11(1):20741

その結果、

コシヒカリを使った実験：

実験 65; *MAPK6* ヘテロ 6 個体

RFT1 バイアレリック 2個体（1個体はホモ相当）

表 1 実験番号・個体番号・変異情報

以下、コシ七カリに変異導入			
実験番号	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)	
実験65 変異解析 再生個体 116個体		MAPK6 ガイドRNA配列 GCCAGGTAAGGATGTGCAA	
実験65	65-26	a入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggatgtgaagggcaccttcaa	
実験65	65-51	a入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggatgtgaagggcaccttcaa	
実験65	65-89	g入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa	
実験65	65-100	gtg抜けヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggat...caagggcaccttcaa	
実験65	65-103	a入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggatgtgaagggcaccttcaa	
実験65	65-113	a入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggcaccttcaa→ gccaggtaaggatgtgaagggcaccttcaa	
実験番号	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73 変異解析 再生個体 118個体		OsLUX ガイドRNA配列 GCGTGCGCCCGGCTCCGGC	Ghd7 ガイドRNA配列 CTGCCGATGATGCATCCCGG
実験73	73-19	t入りヘテロ gcgtagcccggtccggcg→ gcgtagcccggtccgtggcg	g入りヘテロgctgccgatgatgccggcg→ gctgccgatgatgccggcg
実験73	73-32	t入りヘテロ gcgtagcccggtccggcg→ gcgtagcccggtccgtggcg gとc入りバイアレリック	g入りヘテロgctgccgatgatgccggcg→ gctgccgatgatgccggcg
実験73	73-49	gcgtagcccggtccggcg→ gcgtagcccggtccggcg gとc入りバイアレリック	c入りヘテロgctgccgatgatgccggcg→ gctgccgatgatgccggcg

以下、NIL (Hd16 Hd6)に変異を導入		
実験番号	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験61 変異解析 再生個体 31個体		RFT1 ガイドRNA配列 CCTGGGCTGTTGGGTCACCA
実験61	61-2	a入りヘテロ aagccgtccatggtgacccaacagcccagggtcgt→ aagccgtccatggatgacccaacagcccagggtcgt
実験61	61-5	g入りヘテロ aagccgtccatggtgacccaacagcccagggtcgt→ aagccgtccatgggtgacccaacagcccagggtcgt
実験61	61-17	ga抜けヘテロ aagccgtccatggtgacccaacagcccagggtcgt→ aagccgtccatggt・cccaacagcccagggtcgt
実験61	61-18	41bp抜けとt入りバイアレリック agctcaagccgtccatggtgacccaacagcccagggtcgt→ agctcaagc・・・・41bp・・・と agctcaagccgtccatgggtgacccaacagcccagggtcgt
実験61	61-23	t入りホモ aagccgtccatggtgacccaacagcccagggtcgt→ aagccgtccatgggtgacccaacagcccagggtcgt

以下、Hd3a-2-7-10-2の後代に変異を導入		
実験番号	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験60 変異解析 再生個体 56個体		MAPK6 ガイドRNA配列 GCCAGGTAAGGATGTGCAA
実験60	60-32	g入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggca→ gccaggtaaggatgtgcaagggca
実験60	60-52	a入りヘテロ gccaggtaaggatgtgcaagggca→ gccaggtaaggatgtgacaagggca

実験番号	個体名・系統名	シーケンス (緑はgRNA配列、赤は変異)
実験49 変異解析 再生個体 64個体		CRCTプロモーター ガイドRNA配列 F2側 gctattggtccgacgcattag F3側 gggaggggaatcacctgcaaag
実験49	49-4-1	F2とF3の間に大きく欠失 (片方に欠失変異が入ったヘテロ) F2側 cactctgctattggtccgacgcattag→ cactctgctattggtccgacgc… F3側 gggaaggaggggaatcacctgcaaagcgccaag→ …caagggaagcgccaagggaaagctccacaa
実験49	49-4-7	F2とF3の間に大きく欠失 (片方に欠失変異が入ったヘテロ) F2側 cactctgctattggtccgacgcattag→ cactctgctattggtccgacgc… F3側 gggaaggaggggaatcacctgcaaagcgccaag→ …caagggaagcgccaagggaaagctccacaa
実験50 変異解析 再生個体 79個体		CRCTプロモーター ガイドRNA配列 F3側 gggaggggaatcacctgcaaag F4側 ggggatgaaaagcaatccggg
実験50	50-55	バイアレリック F3側 gggaggggaatcacctgcaaag→ gggaggggaatcacctgcaaaag F4側 ggggatgaaaagcaatccggg→ ggggatgaaa--71bp欠失-- F3側 gggaggggaatcacctgcaaag→ gggaggggaatcacctgca… F4側 ggggatgaaaagcaatccgggtggaga→ …gggtggaga
実験s51 変異解析 再生個体 7個体		CRCTプロモーター ガイドRNA配列 F4側 ggggatgaaaagcaatccggg R4側 gaaggagcgcggtgacaatgaa
実験s51	s51-2	F4とR4の間の欠失変異 (ホモ) F4側 ggggatgaaaagcaatccggg→ ggggatgaaaagcaatcc… R4側 ttcatgtcacgcgctccttc→ …attgtcacacgctccttc
実験s51	s51-7	F4とR4の間の欠失変異 (バイアレリック) F4側 ggggatgaaaagcaatccggg→ ggggatgaaaagcaatcc… R4側 ttcatgtcacgcgctccttc→ …aattgtcacacgctccttc F4側 ggggatgaaaagcaatccggg→ ggggatgaaaagcaatcc… R4側 ttcatgtcacgcgctccttc→ …ttgtcacacgctccttc

以下、日本晴に変異を導入		
実験番号	個体名・系統名	シーケンス (緑はsgRNA配列、赤は変異)
実験150 変異解析 再生個体 24個体		OsLASPO ガイドRNA TGTTTCTACTTGCAAGCACG
実験150	LASPO_7	4bp欠損 ヘテロ CCTCGTGCCTTGCAAGATGAAACA → CCTCGT-----GCAAGATGAAACA
実験150	LASPO_11	4bp欠損 ヘテロ CCTCGTGCCTTGCAAGATGAAACA → CCTCGT-----GCAAGATGAAACA

【sgRNA の挿入がないことの評価実験】

上述の変異導入法から、外来 DNA は一切使用しておらず、外来 DNA そのものの挿入はないと考えられる。ただ、sgRNA 配列の宿主ゲノムへの挿入が起きる可能性は非常に低いと考えられるが、sgRNA の逆転写反応による cDNA 化の可能性を科学的に否定できないことから、これまでに論文等での報告はないものの、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

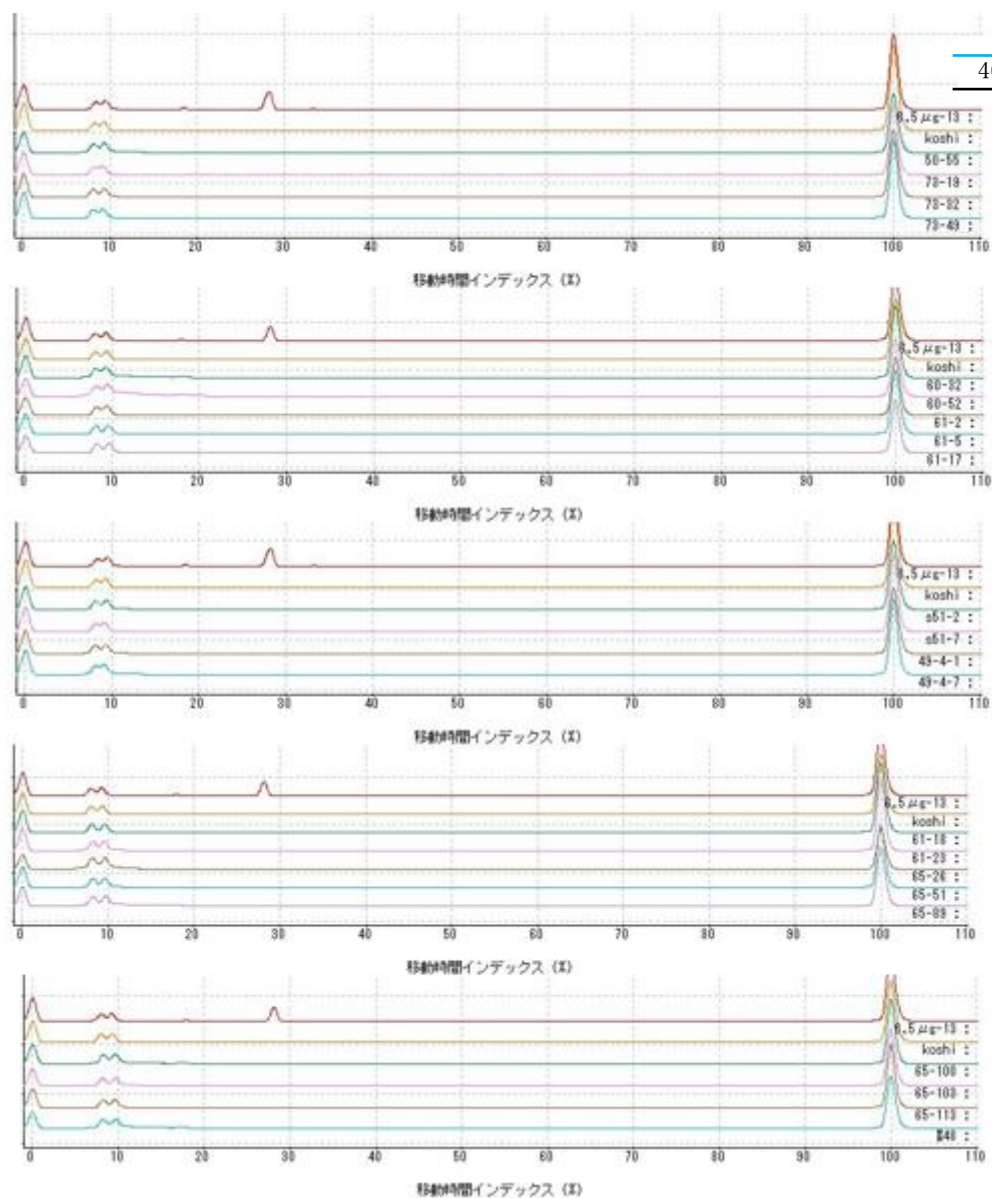
5'-TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'

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 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。Ladder のピークは、34bp, 67bp, 110bp, 147bp, 190bp, 242bp, 331bp, 404bp, 495bp を示している。ネガコンはコシヒカリの DNA を用い、koshi の名前で表記してある。最後のエレクトロフェログラムの Wildtype は日本晴で、Positive は、他のポジコンと同じサンプルを使用。

図1 MultiNA 電気泳動装置による sgRNA 非挿入の確認実験



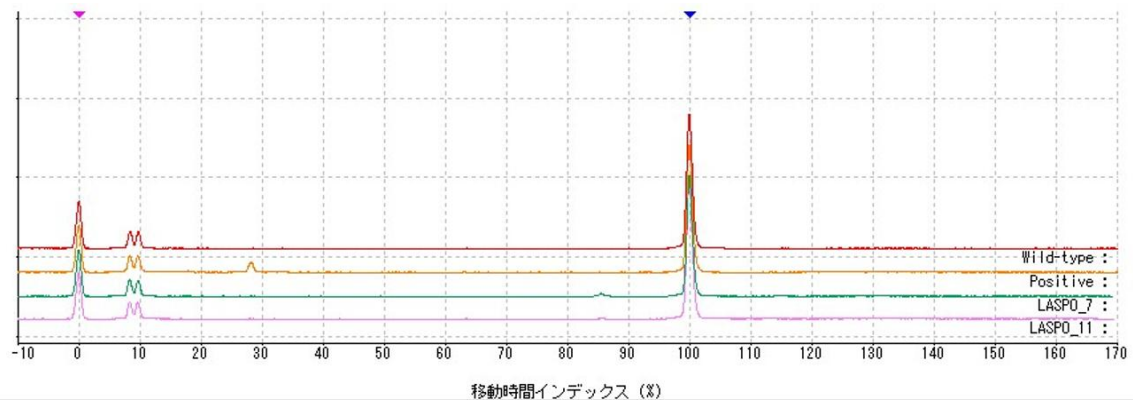


図 1 は、エレクトロフェログラム。PEG 処理した sgRNA が cDNA 化されて導入されたときは、80bp の DNA 断片が増えるようにプライマーを設計してある。

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-target 変異の影響に関する考察】

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(図 2)。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。

また、上記、23 再生個体を温室栽培して観察したところ、今のところ、明確な形態の変化は確認できなかった。

図2 sgRNA の設計と Off target 配列の調査 実例

