

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 8 日

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課
生命倫理・安全対策室安全対策官 殿

氏名 国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
提出者 理事長 千葉 一裕
住所 茨城県つくば市観音台 3-1-1
電話番号 029-838-7138

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		種子貯蔵タンパク質遺伝子 <i>D-Hordein</i> をゲノム編集したオオムギ系統（系統名：Ex#18-32-1）
開放系における使用等の内容		<i>D-Hordein</i> 遺伝子をゲノム編集技術で改変したオオムギ系統の野外環境下での形質評価等（限定されたほ場における栽培等）
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 別紙 1 に詳細を記載。
	所在地	1. 茨城県つくば市観音台 3-1-1 2. 茨城県つくば市観音台 2-1-2 3. 茨城県つくば市観音台 3-1-3
宿主の名称		オオムギ (Barley; <i>Hordeum vulgare</i>)
宿主の自然環境における生理・生態学的特性		【生息・生育可能な環境の条件】越冬性の作物であり至適生育温度は 20℃ 以下である。出穂期に-4℃ 以下あるいは 35℃ 以上に晒されると顕著な不稔を生じる。 【繁殖または増殖の様式】自殖性が強く自家受粉で繁殖する。自然交雑率は植物体同士が接触している場合で約 0.8%、株間を 60 cm 離した場合で約 0.1% である（Wagner and Allard, 1991）。 【有害物質の産生性】有害物質の産生性は報告されていない。 【我が国における具体的な生息・生育域】全国的に栽培され年間 22-23 万トンが生産される。稀に畑地の周辺に自生するが、野生化するほどの繁殖力は持たない。 OECD コンセンサス文書は以下の通り。 https://read.oecd-ilibrary.org/environment/safety-assessment-of-foods-and-feeds-derived-from-transgenic-crops-volume-1/barley-hordeum-vulgare_9789264180147-11-en
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. 人工ヌクレアーゼタンパク質を宿主の細胞内に移入
細胞外で加工した核酸の		【核酸の導入方法】外来 DNA を用いないゲノム編集手法 (<i>in planta</i>)

導入・除去方法、残存の有無の確認方法		Particle Bombardment 法) を用い、Cas9 タンパク質及びガイド RNA を生長点の細胞に導入した。 【核酸の除去方法】染色体への意図的な核酸挿入を行わないため、実施していない。 【残存の有無の確認】iPB 法の特徴から宿主ゲノムに外来核酸は移入しないと考えられるが、念のためゲノム編集系統から調製したゲノム DNA を用いた a. PCR 法により、cDNA 化したガイド RNA の染色体挿入が起きていないことを確認した。 上記項目の詳細は別紙 2 に記載した。
改変した遺伝子等	名称	<i>D-Hordein</i> 遺伝子
	機能	種子貯蔵タンパク質のひとつである D-ホルデインをコードする遺伝子。D-ホルデインはオオムギ粉の生地物性の決定に関わるタンパク質である。
	予想される機能の変化	D-ホルデイン分子同士の重合様式が変化することで、オオムギ粉生地の粘弾性が向上すると予想される。
改変生物の形質の変化	当該改変により生じた変化	D-ホルデイン分子の重合には、アミノ酸配列中の複数のシステインが関与すると予想された。ゲノム編集の元系統は令和 6 年 10 月 23 日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載の HK11-29N 系統 (D-ホルデインタンパク質のアミノ酸長が当該システインの一部を含む 84 残基分短い) の兄弟系統とした。ゲノム編集により <i>D-Hordein</i> 遺伝子のエキソンに新たに 54 塩基のインフレーム欠失が生じたことで、D-ホルデインタンパク質のアミノ酸長が当該システイン残基を含む 102 残基分短くなった (元からの欠失 84 残基と新たに生じた欠失 18 残基の合計)。ゲノム編集系統の胚乳に、分子量の低下した改変型 D-ホルデインが蓄積した。
	上記以外に生じた変化	D-ホルデインの分子量の低下以外に可視的な形質の変化は観察されていない。オフターゲット変異については、ウェブツールによる候補配列の探索とサンガーシークエンス法による配列解析を実施した。オフターゲット変異が生じていないことを確認した。詳細を別紙 2 (4. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違) に記載した。
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】 本ゲノム編集オオムギは、閉鎖系温室において原品種と形態的差異を示さない。このことから本ゲノム編集オオムギの競合における優位性は通常のオオムギ品種と同等と考えられる。オオムギは元来、侵入性・雑草性が低く畑地外へ進出しても野生化するほどの繁殖力を持たない。以上のことから、本ゲノム編集オオムギは、野生植物との競合において特段の優位性を持つおそれはないと判断した。 【有害物質の産生性】 <i>D-Hordein</i> 遺伝子は胚乳貯蔵タンパク質をコードする遺伝子であり、生物多様性に影響を与える有害物質の産生に関わるという報告はない。またゲノム編集オオムギでは種子タンパク質の組成に若干の変化が生じる可能性も考えられるが、オオムギが産生する有害物質が知られていない

	ことから、有害物質が増強されることは想定されない。同様に、他感作用のある物質についても、種子で発現する遺伝子の改変によって新たに産生または増強されることは想定されない。以上のことから、本ゲノム編集オオムギが野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすおそれはないと判断した。 【交雑性】 オオムギは自殖性であり、日本国内には同属の野生植物は自生しておらず、そのほかに自然環境で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、本ゲノム編集オオムギが交雑により近縁野生植物の形質に関して、いずれの影響も与えるおそれはないと判断した。 【総合考察】 本ゲノム編集オオムギは限定されたほ場で栽培等するものであり、持出しを防止する措置も講じるため、ほ場外部にある野生動植物等と競合することはないと考えられる。有害物質生産性については、本ゲノム編集オオムギにおいて新たな有害物質が産生されることは想定されない。また交雑性についても、オオムギと交雑する近縁野生種が我が国に存在しない。以上を総合的に考察し、本ゲノム編集オオムギ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じるおそれはないと判断した。
緊急時の対応	生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、緊急措置を講じた後、速やかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。
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：農研機構遺伝子組換え安全委員会にて検討を行った。 委員長名： 検討日： 令和8年5月7日 当該生物の不活化処理の具体的な措置内容：試験終了後の種子は、オートクレーブ又は焼却炉等を用いて確実に不活化する。残りの地上部及び地下部は畑地へ鋤き混みを行い不活化する。

別紙1 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オオムギ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、ゲノム編集オオムギの栽培は、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。

なお、農研機構内の試験ほ場で栽培される受粉可能なオオムギは、各隔離ほ場からは 170m 以上離れている。

(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。ただし、播種後から収穫までの期間中、必要に応じて防鳥網の設置等を行い、被害を防ぐ。

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
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* バレイショ
2019 年	イネ* バレイショ
2020 年	イネ* バレイショ
2021 年	イネ* バレイショ コムギ
2022 年	イネ* バレイショ 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	バレイショ 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*

	バレイショ オオムギ 緑肥作物としてクロタラリア
2025 年	イネ* バレイショ 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* バレイショ 緑肥作物としてソルガム、コマツナ、コムギ
2021 年	イネ* バレイショ 緑肥作物としてソルガム、コマツナ、コムギ等
2022 年	イネ* バレイショ 緑肥作物としてソルガム、ククロタラリア、カラシナ
2023 年	バレイショ 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	バレイショ オオムギ 緑肥作物としてヒマワリ
2025 年	バレイショ 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

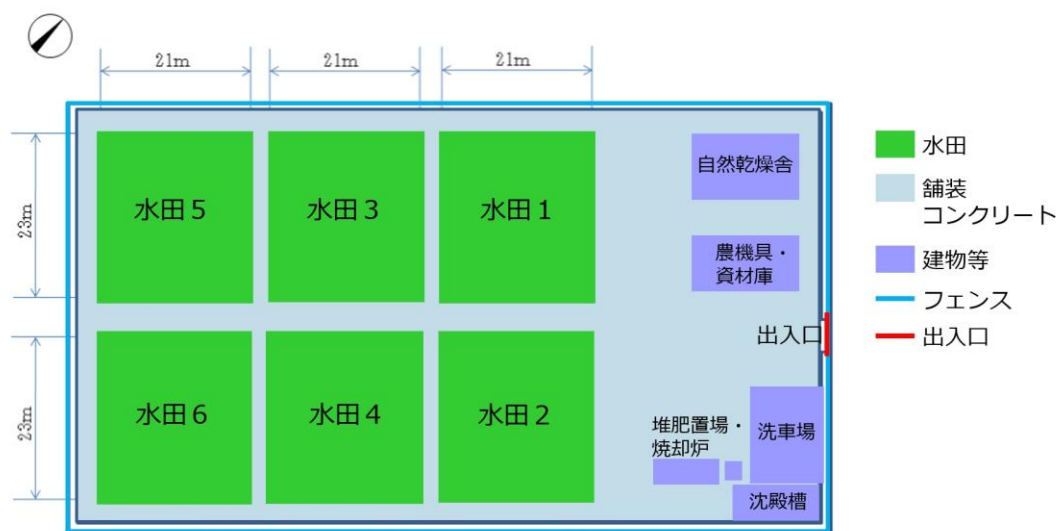


図3 農研機構観音台第1事業場高機能隔離圃場（隔離ほ場1.）内配置図



図4 農研機構観音台第2事業場内配置図

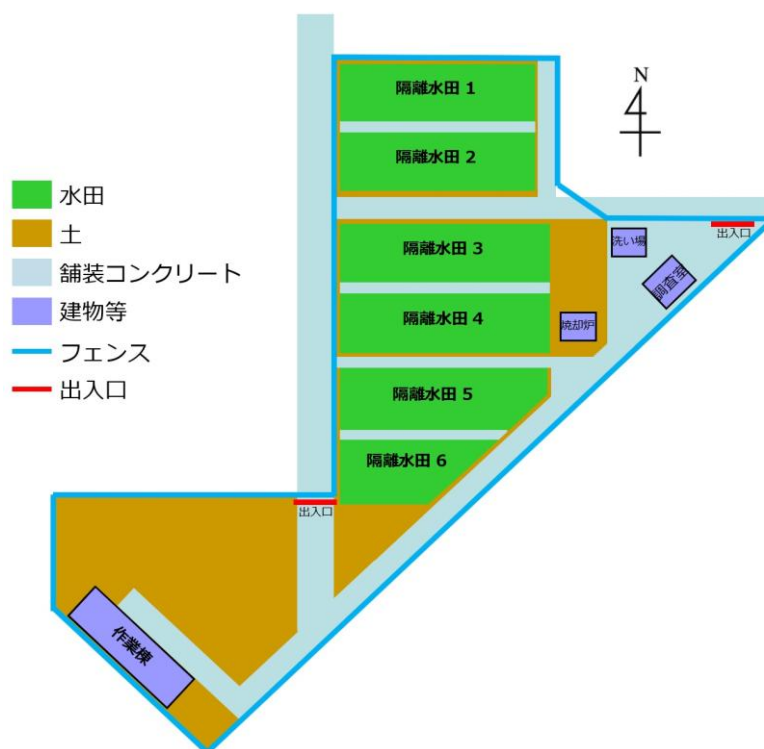


図5 農研機構観音台第2事業場隔離ほ場（隔離ほ場2.）内配置図



図6 農研機構観音台第3事業場内配置図

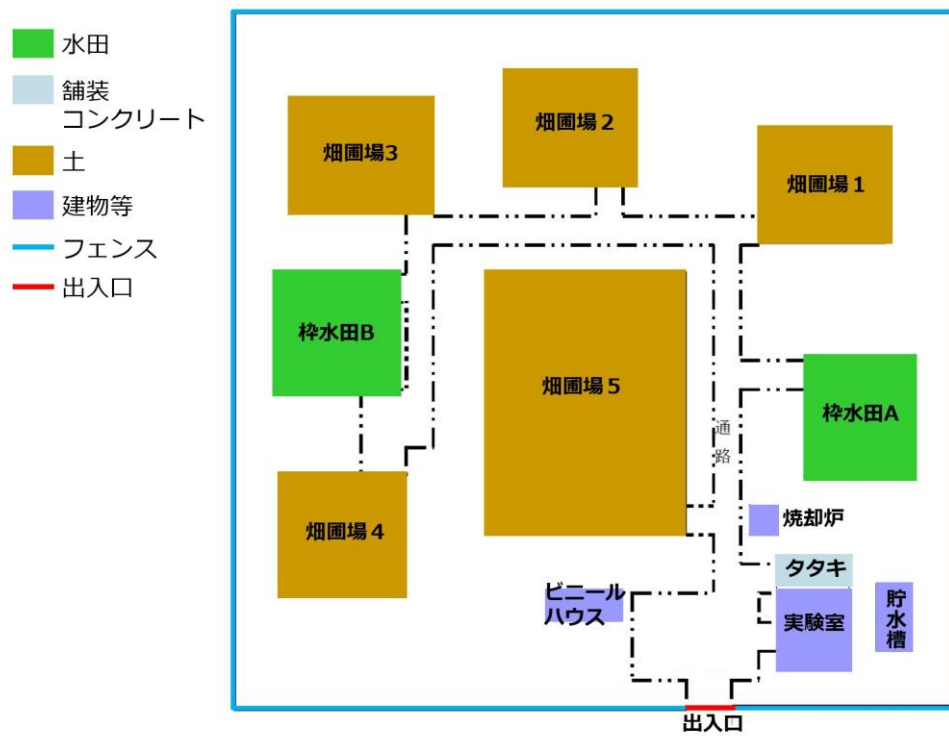


図7 農研機構観音台第3事業場 組換え植物隔離ほ場（隔離ほ場3.）内配置図

別紙2 細胞外で加工した核酸の導入・除去方法、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. 核酸の導入方法および核酸の構成

種子貯蔵タンパク質 D-ホルデインを改変したゲノム編集オオムギ（以下、本ゲノム編集オオムギ）の作出には、*in planta* Particle Bombardment (iPB)法を用いた（Kumagai et al., 2022, Tezuka et al., 2024）。これは、パーティクルガンにより加速させた数百 nm 径の金粒子を、植物の生長点の細胞に打ち込み、核酸やタンパク質をはじめとした物質を導入する手法である。金粒子に付着させる物質は自由に変更することができ、試験管内で調製した Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体（RNP）を導入することで、外来 DNA を使わないゲノム編集が可能である。

本実験計画書に記載の Ex#18-32-1 系統は、HK11-29N 系統（令和 6 年 10 月 23 日に文部科学省に提出した実験計画報告書に記載）の兄弟株（以下 HK11-29 兄弟系統と記述）に対して、2 種類の RNP を iPB 法により導入することで作出した（図 1）。ガイド RNA には化学合成品の sgRNA を用いた。各 sgRNA の標的配列情報を図 2 に示す。

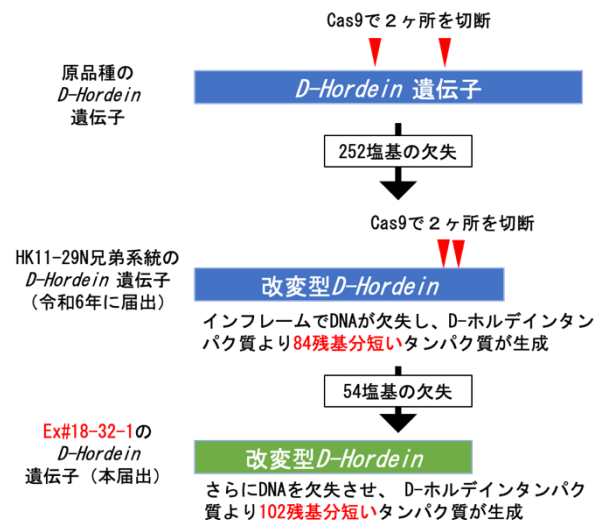


図 1. ゲノム編集による Ex#18-32-1 系統作出の概要

iPB 法により HK11-29N 系統がもつ改変型 *D-Hordein* 遺伝子をさらに改変し、当該遺伝子のタンパク質コード領域の一部を欠失した遺伝子を創出する。

名称	配列(5'→3')	長さ(nt)
sgRNA#1	CCTCATCAGGGTCAGCAGCC	20
sgRNA#2	ACCACCGTGTCTCTGCACCA	20

図 2. ゲノム編集に用いた sgRNA の標的配列

Ex#18-32-1 は 2 種の RNA と Cas9 タンパク質を同時に細胞導入することで作出された。

2. ゲノム編集システムの作出過程

HK11-29 兄弟系統を実験材料に用いた。iPB 法の定法に従い、吸水種子を切開し生長点を露出させた。生長点を含む胚組織を切り出し培地上に置床した。Cas9 タンパク質及び 2 種類の sgRNA を 1.5 mL チューブ内で混合し RNP を調製した。これを金粒子に吸着し、iPB 法の定法に従って HK11-29 兄弟系統の生長点に導入した。導入後の生長点（を含む胚組織）は培地上で 2 週間程度養生したのち、土に移植した。第 5 葉以降の葉から DNA を抽出し、標的遺伝子の部分配列を PCR 法により増幅した。Cas9 RNP 処理により増幅産物の配列差を検出する Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)法を用いて、ゲノム編集の成否を判定した。

ゲノム編集が確認された個体から次世代種子を採種し発芽させた。この幼苗から DNA を抽出し、CAPS 法によりゲノム編集変異が遺伝しているかを判定した。

変異の遺伝が確認された個体（1 個体）を親とする系統を Ex#18-32-1 と命名した。Ex#18-32-1 に導入されたゲノム編集変異を図 3 に示す。

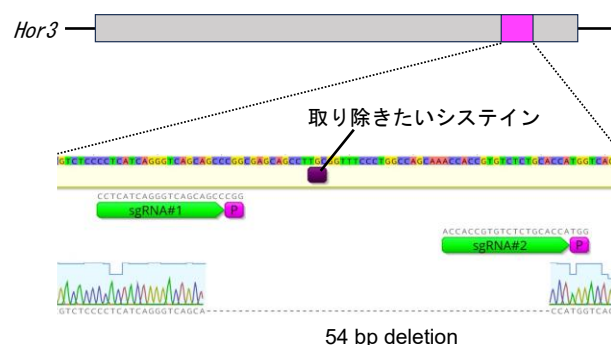


図 3. Ex#18-32-1 に導入されたゲノム編集変異

HK11-29N 系統の改変型 *D-Hordein* 遺伝子を 2 つの RNP で切断した。切断部位に挟まれた 54 塩基が欠失した。

3. 核酸の除去方法及び残存の有無を確認した方法

上述のゲノム編集手法は、染色体への意図的な遺伝子挿入を行わず、得られる変異系統は遺伝子組換え体でない可能性が極めて高い。しかし低い確率であ

っても、sgRNA がオオムギ細胞内で cDNA 化され、これが染色体に取り込まれる可能性を科学的には否定できない。そこで、得られた変異系統からゲノム DNA を抽出し、PCR 法で意図しない核酸の挿入が起こっていないかを検討した。

Ex#18-32-1 作出の母本に用いた HK11-29 兄弟系統は、HK11-29N 系統と親を同じくする系統である。そのため、HK11-29N 系統では検出されなかった意図しない核酸の挿入が起きている可能性は低い。しかし、HK11-29N 系統と HK11-29 兄弟系統の親であるゲノム編集個体に外来核酸の挿入が起きていた場合、遺伝的分離によって HK11-29N 系統では外来核酸が失われていた可能性を否定できない。そこで、HK11-29N 系統で実施した外来核酸の非存在性を確認する実験を Ex#18-32-1 系統で行った。

HK11-29N および HK11-29 兄弟系統の親系統の作出に用いた RNA は図 4 に示した 3 種である。それぞれの RNA に対応する DNA 配列を増幅するプライマー（図 5）を使用して PCR を行い、増副産物をマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）により解析した。ポジティブコントロールには化学合成したオリゴ DNA を用いた。図 6 に示すように、Ex#18-32-1 では crRNA#1、crRNA#2、及び tracrRNA の染色体挿入に由来する増幅産物（それぞれ 42、42、69 塩基対）は、PCR サイクル数を 40 回まで増やしても観察されなかった。なお PCR に用いたゲノムについては、*D-Hordein* 遺伝子の増幅に問題がないことから、分解のおそれはないと考えられた。

名称	配列 (5' → 3')	長さ(nt)
crRNA#1	UCUUCACAGGGGUCGGUGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG	42
crRNA#2	AGACAGUGGUUUGCUGGCAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG	42
tracrRNA	AAACAGCAUAGCAAGUUAUUUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU	69

図 4. HK11-29 系統のゲノム編集に用いた crRNA 及び tracrRNA の配列

crRNA と tracrRNA は 2 分子でガイド RNA として振る舞う。tracrRNA の配列はいずれの標的遺伝子に対しても共通であり、HK11-29 系統は 3 種の RNA と Cas9 タンパク質を同時に細胞導入することで作出された。

名称	配列 (5' → 3')	備考
crRNA#1_Fw	TCTTCACAGGGGTCGGTG	-
crRNA#1_Rv	CAAAACAGCATAGCTCTAAA	-
crRNA#2_Fw	AGACAGTGGTTTGCTGGC	-
crRNA#2_Rv	CAAAACAGCATAGCTCTAAA	crRNA#1_Rv と同じ。crRNA の 3' 側は共通配列のため。
tracrRNA_Fw	AAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGG	-
tracrRNA_Rv	AGCACCGACTCGGTGCC	-

図 5. ゲノム挿入を検出するプライマー配列

ゲノム編集に用いた RNA に対応する DNA 配列を増幅するプライマーを設計した。

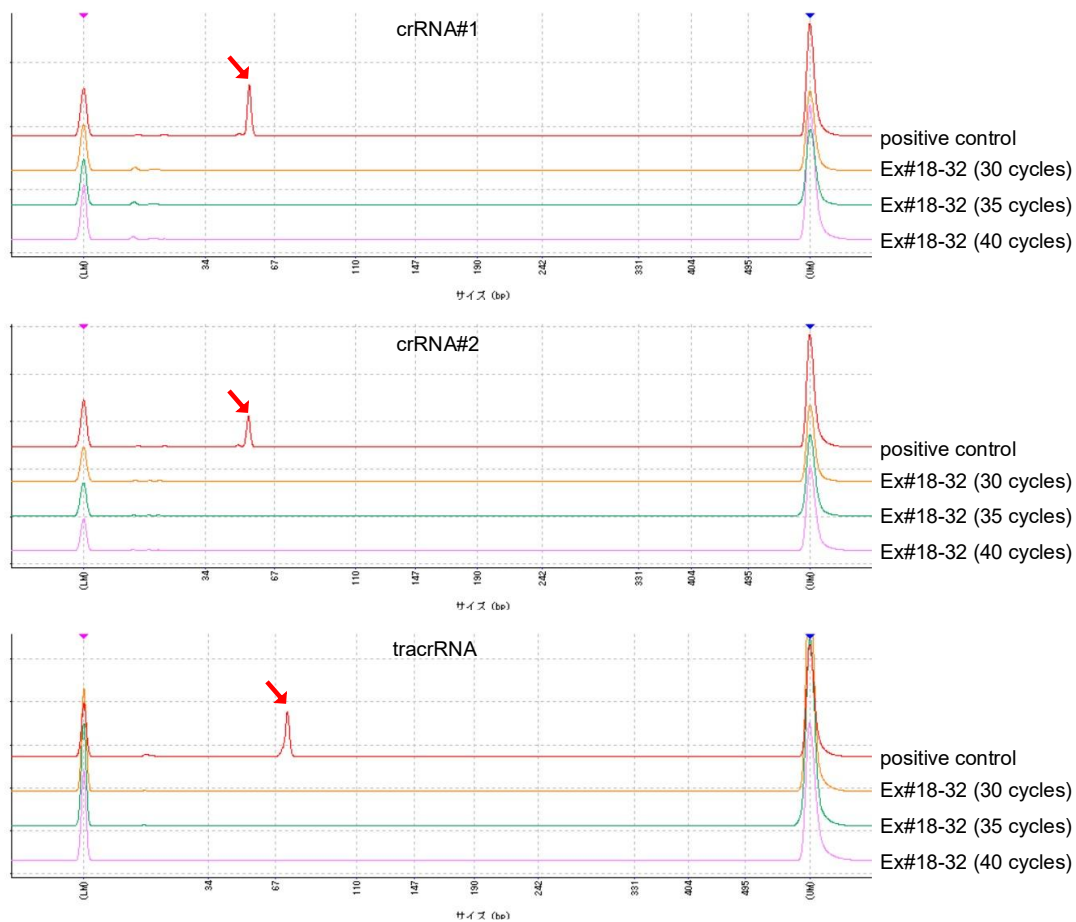


図 6. PCR 法によるゲノム挿入の有無の解析

Ex#18-32-1 からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により crRNA#1、crRNA#2、および tracrRNA 配列のゲノム挿入を解析した。ポジティブコントロールで増幅された予想挿入断片（赤矢印）は、Ex#18-32-1 ではいずれの PCR サイクル数でも検出されなかった。

続いて Ex#18-32-1 の作出に用いた RNA は、図 2 に示した 2 種の gRNA 配列の 3' 側に以下の scaffold RNA 配列が続く sgRNA である。

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA
CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

それぞれの RNA に対応する DNA 配列を増幅するプライマーを設計し（図 7）、PCR による増副産物をマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）により解析した。ポジティブコントロールには、Thermo Fisher Scientific 社の GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit を用いて合成したテンプレート DNA を用いた。このテンプレート DNA には sgRNA の全長配列が含まれている。図 8 に示すように、Ex#18-32-1 では sgRNA#1 及び sgRNA#2 の染色体挿入に由来する増幅産物（両者ともに 100 塩基対）は、PCR サイクル数を 40 回まで増やしても観察されなかった。

以上のことから、本実験計画書に記載の Ex#18-32-1 系統について、作出に用いた RNA の逆転写産物の染色体挿入は起こっていないと判断した。

図 7. ゲノム挿入を検出するプライマー配列

名称	配列 (5' → 3')	備考
sgRNA#1-check-F	CCTCATCAGGGTCAGCAGCC	
sgRNA#1-check-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	
sgRNA#2-check-F	ACCACCGTGTCTCTGCACCA	
sgRNA#2-check-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	sgRNA#1-check-R と同じ。sgRNA の 3' 側は共通配列のため。

ゲノム編集に用いた RNA に対応する DNA 配列を増幅するプライマーを設計した。

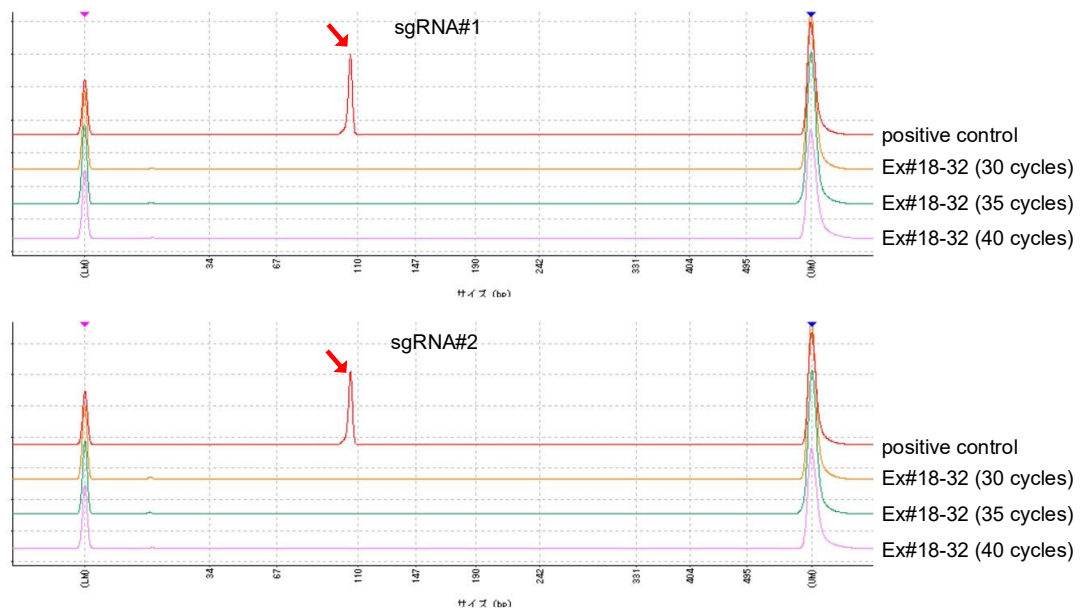


図 8. PCR 法によるゲノム挿入の有無の解析

Ex#18-32-1 からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により sgRNA#1 及び sgRNA#2 の配列のゲノム挿入を解析した。ポジティブコントロールで増幅された予想挿入断片（赤矢印）は、Ex#18-32-1 ではいずれの PCR サイクル数でも検出されなかった。

4. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本ゲノム編集オオムギについて、作出過程で標的遺伝子以外への変異（オフターゲット変異）が生じたかを検討した。

前項に続き、HK11-29N 系統の届出の際に解析した crRNA#1、crRNA#2 のオフターゲット候補配列（図 9）について、PCR 法とサンガーシーケンス法による配列解析を実施した。Ex#18-32-1 と原品種（北陸皮 71 号）からゲノム DNA を抽出し、各オフターゲット候補の配列を解析したところ、オフターゲット変異は確認されなかった。

候補配列名	塩基配列	染色体	遺伝子-	備考
crRNA#1-off1	TCTTCGCAGTGGTCGGAGCACGG	Chr.7	-	遺伝子間領域
crRNA#1-off2	TGTTCAATAAGGGTCGGTGCATGG	Chr.7	-	遺伝子間領域
crRNA#2-off1	AGACTGAGGTTTGCTGGTAAGGG	Chr.1	HORVU.MOREX.r3.1HG0063870	キネシン様タンパク質をコードする
crRNA#2-off2	AGACAGGGGTTTCATGGCAACGG	Chr.1	HORVU.MOREX.r3.1HG0068400	機能未知タンパク質をコードする
crRNA#2-off3	AGCCAGTGGTTGGCTGGCATTTGG	Chr.1	-	遺伝子間領域
crRNA#2-off4	AGACTGTAAGTTTGC CGGCAAAGG	Chr.3	-	遺伝子間領域

図 9. ウェブツール検索で見つかったオフターゲット候補配列の一覧

塩基配列中の赤字は標的配列とのミスマッチを示す。

さらに、Ex#18-32-1 の作出に用いた 2 つの sgRNA（sgRNA#1、sgRNA#2）について、ウェブツール（Cas-OFFinder; <http://www.rgenome.net/cas-offfinder/>）を用いてオフターゲット候補配列を検索した。検索範囲は標的配列に対して完全一致する配列、及び標的配列に 1～3 塩基のミスマッチを持つ配列とした。

sgRNA#1 については、ゲノム中に標的配列と完全一致、あるいは 1～2 塩基ミスマッチする配列は見つからず、標的配列に 3 塩基のミスマッチを持つオフターゲット候補配列が 8 つ見つかった。sgRNA#2 についても、ゲノム中に標的配列と完全一致、あるいは 1～2 塩基ミスマッチする配列は見つからず、標的配列に 3 塩基のミスマッチを持つオフターゲット候補配列が 5 つ見つかった。

得られたオフターゲット候補配列を図10に示す。これら候補配列のうち sgRNA#1-off3は2-oxoglutarate dehydrogenase、sgRNA#2-off3はalpha-1,3-arabinosyltransferaseをコードする遺伝子領域中に存在していた。また、sgRNA#1-off1およびsgRNA#1-off2は機能未知タンパク質をコードする遺伝子領域中に存在していた。

これらの Ex#18-32-1 系統の各オフターゲット候補配列について、PCR 法とサンガーシーケンス法による配列解析を実施した。Ex#18-32-1 と原品種（北陸皮 71 号）からゲノム DNA を抽出し、各オフターゲット候補の配列を解析したところ、オフターゲット変異は確認されなかった。

以上の結果より、本ゲノム編集系統がオフターゲット変異により生物多様性に影響を与える可能性は極めて低いと考えられた。

候補配列名	塩基配列	染色体	遺伝子-	備考
sgRNA#1-off1	CCTCATCAGGATCAGAGCAAGG	Chr.1	HORVU.MOREX.r3.1HG0069850	機能未知タンパク質をコードする
sgRNA#1-off2	CCTCATCAAGGTCGGCAGCCAGG	Chr.2	HORVU.MOREX.r3.2HG0108540	機能未知タンパク質をコードする
sgRNA#1-off3	CCTCATCGCGGTCAGCAGCCGGG	Chr.2	HORVU.MOREX.r3.2HG0163050	2-oxoglutarate dehydrogenase
sgRNA#1-off4	CCACTTCAGGCTCAGCAGCCGGG	Chr.4	-	遺伝子間領域
sgRNA#1-off5	CCTCAACAGGGTCAGCTTCCAGG	Chr.4	-	遺伝子間領域
sgRNA#1-off6	CCACATCAGGAGCAGCAGCCGGG	Chr.5	-	遺伝子間領域
sgRNA#1-off7	CCACTTCAGGATCAGCAGCCGGG	Chr.6	-	遺伝子間領域
sgRNA#1-off8	CCTCATTCGGGTCAGCAGCTCGG	Chr.6	-	遺伝子間領域
sgRNA#2-off1	TCCACCGTGTGTCTGCCACCGG	Chr.1	-	遺伝子間領域
sgRNA#2-off2	ACCACCGTGTCTCTAAAGCAAGG	Chr.4	-	遺伝子間領域
sgRNA#2-off3	ACTACCGTTTCTCTGCACAACGG	Chr.4	HORVU.MOREX.r3.4HG0410210	alpha-1,3-arabinoxylan transferase
sgRNA#2-off4	ACCACCGCGTGTCTGCACCGGGG	Chr.5	-	遺伝子間領域
sgRNA#2-off5	ACCACCGTGTCTCTCAAGCAAGG	Chr.6	-	遺伝子間領域

図 10. ウェブツール検索で見つかったオフターゲット候補配列の一覧
塩基配列中の赤字は標的配列とのミスマッチを示す。