

① 品目・品種名及び概要 (利用方法及び利用目的)

名称:

PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ

概要:

PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ (以下、「本ワキシートウモロコシ」という) は、子実デンプンのアミロペクチン含有量が増加したトウモロコシ (英名: corn 及び maize、学名: *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) である。本ワキシートウモロコシは、デントトウモロコシの近交系品種 PH1V69 系統の *Wx1* 遺伝子を、ゲノム編集技術を用いて欠失させることにより作出された。従来育種によって作出されたワキシートウモロコシは既に日本、中国及び米国等で栽培されており、子実がコーンスターチに加工され、主に食用及び工業用に利用されている。本ワキシートウモロコシの意図された用途は従来のワキシートウモロコシの用途と相違ない。

② 利用したゲノム編集技術の方法及び遺伝子改変の概要

方法:

本ワキシートウモロコシの作出には CRISPR-Cas9 法を用いた。本法においては、エンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質がガイド RNA によって標的 DNA 配列に特異的に結合し、二本鎖 DNA を切断する。切断された DNA は、植物細胞が元来有する DNA 修復機構である非相同末端修復にて修復される。

本ワキシートウモロコシの作出に用いたプラスミドは 6 種類である。そのうち

3 種類のプラスミドがそれぞれ CRISPR-Cas9 法で使用するエンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質又は 2 種類のガイド RNA をコードする遺伝子を有する。なお、残りの 3 種類のプラスミドはそれぞれ、選抜マーカーである *nptII* 遺伝子、植物体の再生率を向上させる *zm-wus2* 遺伝子又は *zm-odp2* 遺伝子を有する。

まずこれらの遺伝子を一過的に発現させることを目的として、パーティクルガン法により 6 種類のプラスミドをデントトウモロコシ PH1V69 系統の未熟胚に移入した。移入したプラスミドから産生される 2 種類のガイド RNA がそれぞれ *Wx1* 遺伝子の 5'側に位置するプロモーター領域及び 3'側に位置する非翻訳領域内の標的 DNA 配列を特異的に認識し、同様にプラスミドから産生される Cas9 タンパク質がこれら 2 ヶ所の標的 DNA 配列を切断する。続いて、切断部位同士が非相同末端修復により接合することにより、標的 DNA 配列に挟まれた *Wx1* 遺伝子を含む領域が欠失すると考えられる。実際に本ワキシートウモロコシ中の当該領域の塩基配列を解析し、2 ヶ所の切断部位の間の *Wx1* 遺伝子を含む領域が意図したとおり欠失していることを確認した。また、意図しない塩基の付加や欠失は認められなかった (図 1、3 ページ)。

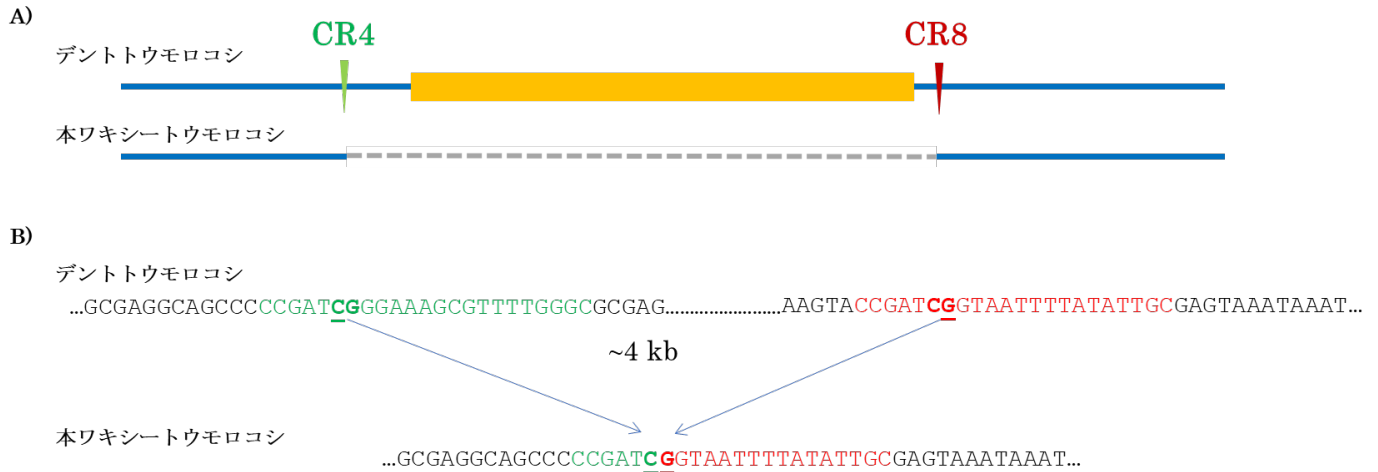


図 1 本ワキシートウモロコシにおける *Wx1* 遺伝子の欠失

A) デントトウモロコシ (PH1V69) と本ワキシートウモロコシの *Wx1* 遺伝子領域の模式図。*Wx1* 遺伝子のコーディング領域を橙で、それ以外のゲノム DNA を青で示した。また 2 種類のガイド RNA (CR4 及び CR8) の標的配列の位置をそれぞれ緑及び赤で示した。本ワキシートウモロコシにおいては CR4 と CR8 の間の約 4 kb の領域が欠失している (図中の点線)。

B) 上 : デントトウモロコシにおけるガイド RNA の標的配列の相補鎖。CR4 及び CR8 の標的配列認識部位に相当する配列をそれぞれ緑及び赤で示した。標的配列中の太字で示した CG の間で Cas9 タンパク質によって切断される。下 : 本ワキシートウモロコシにおける接合部位の配列を塩基配列解析により決定した。Cas9 タンパク質による切断で生じたゲノム DNA の末端同士が非同末端修復により接合しており、接合部位に塩基の付加や欠損は認められなかった。

標的遺伝子：

標的遺伝子である *Wx1* 遺伝子はアミロース合成酵素をコードする。アミロース合成酵素は、トウモロコシの子実におけるアミロースの生合成を触媒する。宿主であるデントトウモロコシの子実デンプンは、直鎖状多糖であるアミロース及び分枝状多糖であるアミロペクチンから成り、その割合は約 25%及び 75%である。一方、自然突然変異又は誘発突然変異により *Wx1* 遺伝子が機能を失ったトウモロコシはワキシートウモロコシとして知られており、子実デンプンのほぼ 100%がアミロペクチンから成る（以下、「ワキシー形質」という）。ゲノム編集技術により *Wx1* 遺伝子が欠失した本ワキシートウモロコシも、同様のワキシー形質を示すと考えられる。

育成経過：

上述のとおり、本ワキシートウモロコシの作出においては、エンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質及びガイド RNA 等をコードする遺伝子を含むプラスミドをデントトウモロコシ PH1V69 系統の未熟胚に移入した。プラスミドを移入した宿主細胞から植物体を再生させ、T<sub>0</sub> 世代とした。T<sub>0</sub> 世代の各個体における *Wx1* 遺伝子の塩基配列を解析し、*Wx1* 遺伝子が欠失した 1 系統を選抜した。なお、当該系統は *Wx1* 遺伝子の欠失についてヘミ接合体（*Wx1* 対立遺伝子の一方だけが欠失している）であり、以降の育種でホモ接合体にすることにより、両方の *Wx1* 対立遺伝子が同一の欠失を有する本ワキシートウモロコシを作出している。

上記の T<sub>0</sub> 世代 1 系統を PH1V69 系統と戻し交配して得られた BC<sub>0</sub> 世代において改めて塩基配列解析を行い、*Wx1* 遺伝子が欠失していることを確認した（図 1B、

3 ページ)。また、BC<sub>0</sub> 世代 9 個体について、定量 PCR 法及び Southern-by-Sequencing (SbS) 分析により、移入したプラスミド由来の核酸が宿主ゲノム中に残存していないことを確認した。まず定量 PCR 法による確認においては、各個体の葉から抽出した DNA を用い、各プラスミドに含まれる主要な遺伝子配列 (*cas9*、2 種類のガイド RNA、*nptII*、*zm-odp2* 及び *zm-wus2*) の有無を特異的なプライマーにより検出した (図 2 及び図 3、6 及び 7 ページ)。その結果、上記のいずれの遺伝子配列についても定量 PCR の結果が陰性である 9 個体が得られた。

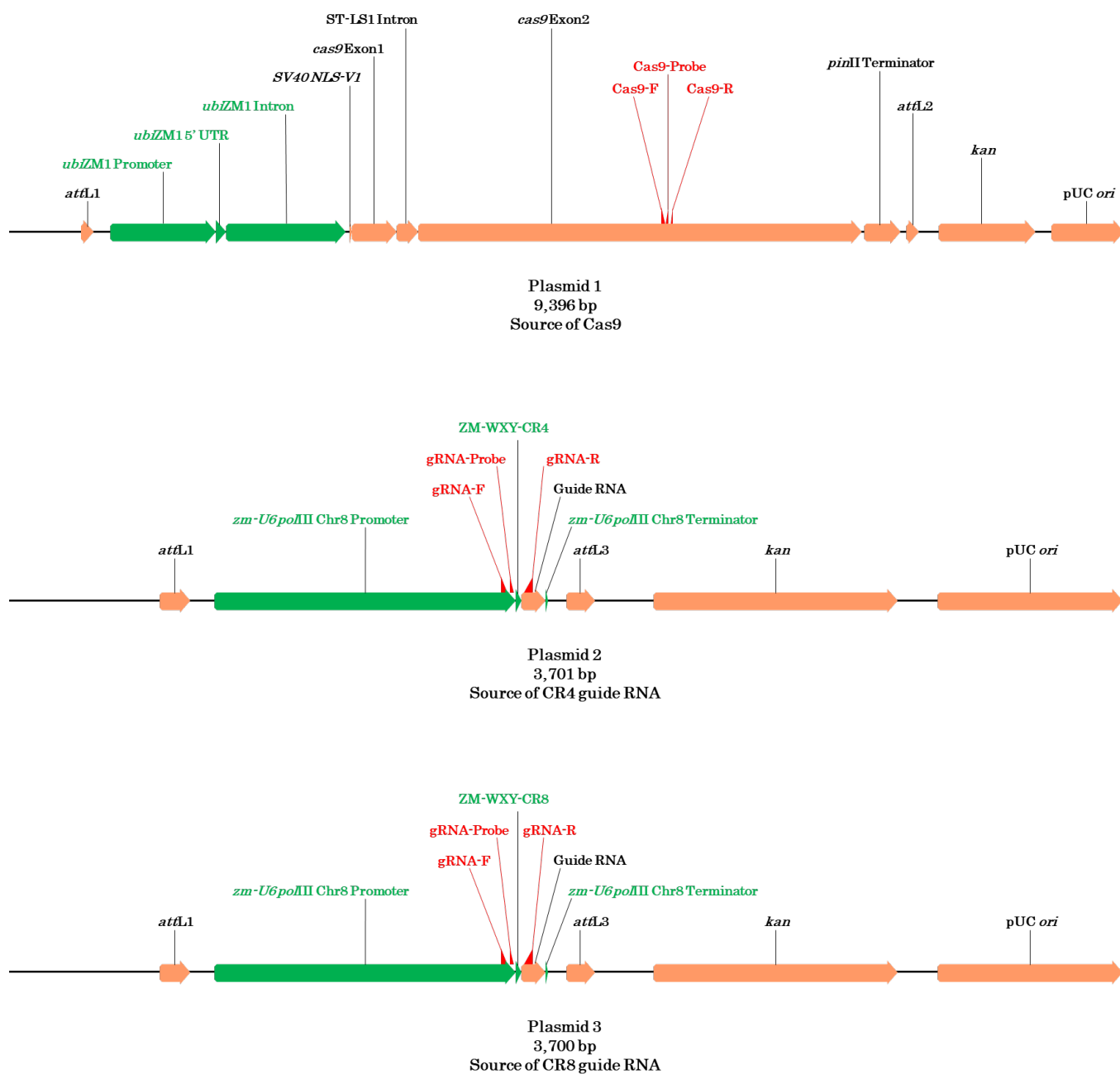


図 2 プラスミド由来の核酸の残存の定量 PCR による確認に用いたプライマー及びプローブの位置

プラスミド 1~3 のマップを示した。緑は宿主であるトウモロコシに由来する内在性の構成要素を示し、橙は他の生物に由来する構成要素を示す。定量 PCR 法による検出に用いたプライマーペア（名称の末尾が F 又は R）及び TaqMan プローブ（名称の末尾が Probe）の位置を赤で示した。

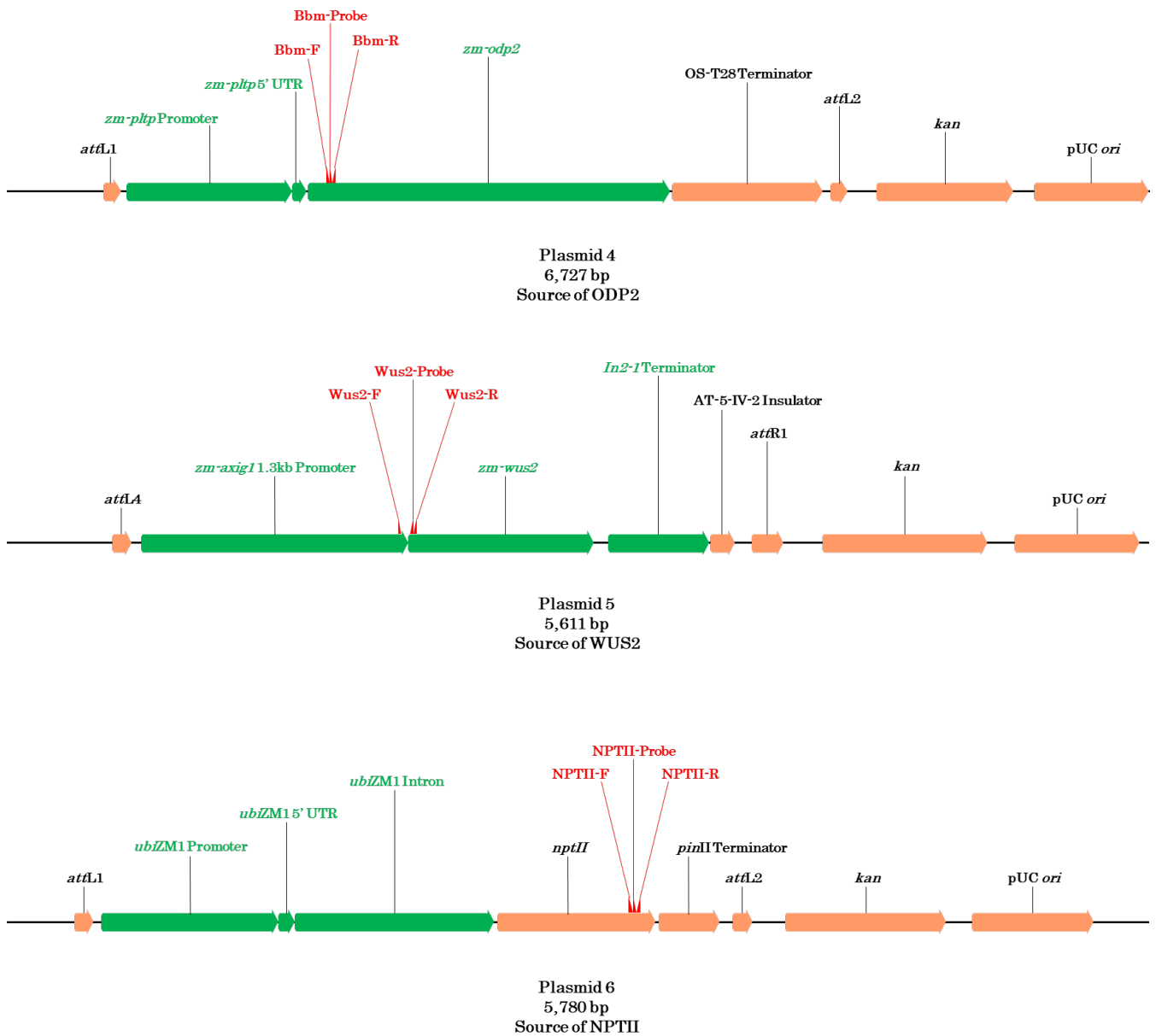


図 3 プラスミド由来の核酸の残存の定量 PCR による確認に用いたプライマー及びプローブの位置 (続き)

プラスミド 4~6 のマップを示した。緑は宿主であるトウモロコシに由来する内在性の構成要素を示し、橙は他の生物に由来する構成要素を示す。定量 PCR 法による検出に用いたプライマーペア (名称の末尾が F 又は R) 及び TaqMan プローブ (名称の末尾が Probe) の位置を赤で示した。

これらの個体について、さらに **SbS** 分析による確認を行った。**SbS** 分析はキャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた手法であり、断片化した植物ゲノム全体から、移入されたプラスミド中の構成要素の全塩基配列を網羅する特異的なプローブセットを用いて **DNA** 断片を選択的に回収 (キャプチャー) する。プローブとハイブリダイズしないゲノム **DNA** 断片は洗浄により除去され、回収された **DNA** 断片だけが濃縮される。濃縮された **DNA** 断片について、**PCR** による増幅及び品質チェックの後、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析を行う。プラスミド由来の塩基配列が宿主ゲノムに挿入されている場合には、プラスミド由来の塩基配列と宿主ゲノムとの接合部位を含む **DNA** 断片が検出される。また、本法の検出感度は従来遺伝子組換え作物の評価に用いられてきたサザンブロット分析と同等であることが示されており、**35 bp** 以上の挿入配列を再現良く検出できる。本ワキシートウモロコシについては、定量 **PCR** 法による確認を経た **BC<sub>0</sub>** 世代 **9** 個体のそれぞれの葉から抽出した **DNA** を断片化し、移入した **6** 種のプラスミド由来の塩基配列を含む **DNA** 断片の有無を **SbS** 分析を用いて調べた。その結果、これら **9** 個体はいずれもプラスミド由来の塩基配列を有していないことが確認された。なお、プラスミドに含まれるトウモロコシ由来の構成要素と同じ配列が **SbS** 分析で検出されたが、これらの塩基配列と宿主トウモロコシのゲノムとの間に新たな接合部位が検出されなかったことから、宿主トウモロコシに内在する配列を検出したものと考えられた。また、**6** 種のプラスミドを含む陽性対照における平均リード深度は **582~2,574** であり、**SbS** 分析は十分な信頼性を有していると考えられた。

これらの確認を経た **BC<sub>0</sub>** 世代 **9** 個体全てを **PH1V69** 系統と戻し交配し、**BC<sub>1</sub>** 世代を作出した。さらに **2** 回の自殖を行い、本ワキシートウモロコシを作出した。



*Wx1* 遺伝子の欠失によるワキシー形質は、ヨウ素ヨウ化カリウム染色（ヨウ素デンプン反応）によって確認できる。染色により、デンプンの約 25%がアミロースから成るデントトウモロコシの子実は暗青色を呈するが、ほぼ 100%がアミロペクチンから成るワキシートウモロコシの子実は赤褐色を呈する。本ワキシートウモロコシの BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 世代において子実の胚乳をヨウ素ヨウ化カリウムで染色した結果、想定どおり赤褐色を呈する子実が認められ、ワキシー形質が付与されたことが確認された。

- ③ ゲノム編集技術による DNA の変化がヒトの健康に悪影響を及ぼす新たなアレルゲンの産生及び既知の毒性物質の増加を生じないことの確認

確認済み     未確認

本ワキシートウモロコシに行った改変により新たなオープンリーディングフレーム（以下、「ORF」という）が生じ、アレルゲン及び毒性物質が産生される可能性を検討した。本ワキシートウモロコシにおいて意図した改変は *Wx1* 遺伝子の欠失であり、*Wx1* 遺伝子の 5'側及び 3'側の DNA 配列を特異的に標的とする 2 種類のガイド RNA を用いて行った。5'側のガイド RNA が *Wx1* 遺伝子のプロモーター領域中の推定転写開始点の上流における DNA 切断を誘導し、3'側のガイド RNA が *Wx1* 遺伝子の 3'非翻訳領域における DNA 切断を誘導することにより、これら 2 ヶ所の標的 DNA 配列に挟まれた *Wx1* 遺伝子を含む領域が欠失している。*Wx1* 遺伝子の開始コドン及びイントロン/エクソン配列全体だけでなく、転写に必要な TATA ボックス及び転写開始点も含めて欠失させていることから、改変部位に新たな ORF が生じたとしても転写されることはないと考えられた。念のため、改変部位の上流 3,632 bp から下流 2,775 bp までの領域の 6 つの読み枠すべてに対して 8 アミノ酸以上のペプチドをコードする新たな ORF の有無を確認

した結果、改変部位を含む 58 アミノ酸及び 32 アミノ酸のペプチドをコードする 2 つの推定 ORF が確認された。これらの推定 ORF について、Comprehensive Protein Allergen Resource データベース (<http://db.comparedatabase.org/>) を用い、既知のアレルゲンと連続する 8 アミノ酸以上で完全に一致する配列の検索及び連続する 80 アミノ酸以上について 35%を超えて一致する配列の検索を行った。その結果、いずれの ORF についても既知アレルゲンとの一致は認められなかった。同様に、UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されている毒性又は健康影響を生じる可能性のあるタンパク質を対象に、BLASTP を用いた相同性検索を行った。*E-value* の閾値は  $10^{-4}$  とした。その結果、いずれの ORF についても既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった。

次に、標的 DNA 配列と類似性の高い配列において意図しない変異（以下、「オフターゲット変異」という）が生じる可能性を検討した。用いた 2 種類のガイド RNA は *Wx1* 遺伝子中の標的 DNA 配列に特異的に設計されており、*Wx1* 遺伝子を除き宿主のゲノム配列中に標的 DNA 配列と同一の配列は存在しないことを確認している。また、これまでの知見から植物においてガイド RNA の標的 DNA 配列と 3 塩基以上異なる DNA 配列にオフターゲット変異が生じる可能性は低いと考えられた。このことから、オフターゲット変異が生じる可能性のある部位として、2 種類のガイド RNA の標的 DNA 配列と 1 塩基又は 2 塩基異なる DNA 配列が考えられた（以下、「潜在的オフターゲット配列」という）。潜在的オフターゲット配列を特定するため、ガイド RNA の標的 DNA 配列と参照ゲノム配列を比較した。今回実施した比較においては、届出者が独自に有する PH1V69 系統のゲノム配列情報を参照するため、自社データベースと連携したソフトウェアを用いた。当該ソフトウェアは、CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder 等のソフトウェアと同

様に、公的に利用可能なソフトウェア・パッケージ及びアルゴリズムを用いて開発されており、ガイド RNA とのミスマッチ及びバルジを有する潜在的オフターゲット配列を検出できる。なお、検索条件（参照ゲノム DNA 配列、対象の PAM モチーフ (*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質の場合は 5'-NGG-3') 及び許容する塩基配列の相違の程度) が同じ場合、CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder 等と当該ソフトウェアとの間で、得られる潜在的なオフターゲット配列に違いがないことを当該ソフトウェアの開発時に様々な配列を用いて確認した。

比較の結果、片方のガイド RNA の標的 DNA 配列と 2 塩基異なる潜在的オフターゲット配列が 1 箇所特定された (Cas-OFFinder を用いても同じ結果であった)。そこで、BC<sub>1</sub> 世代 29 個体について塩基配列解析を行い、本ワキシートウモロコシ中の当該配列にオフターゲット変異が生じていないことを確認した (表 1、11 ページ)。

表 1 PH1V69 系統におけるガイド RNA CR4 及び CR8 の標的配列及び類似配列

配列名	標的配列との塩基配列の違い (bp)	宿主 PH1V69 系統のゲノム中の配列
CR4 標的配列	-	<b>GCCCAAACGCTTCCCGATCGG</b>
-	0	なし (CR4 標的配列を除く)
-	1	なし
-	2	なし
CR8 標的配列	-	<b>GCAATATAAAATTACCGATCGG</b>
-	0	なし (CR8 標的配列を除く)
-	1	なし
CR8-1	2	<b>GCAATATAAA</b> <b>GTT</b> -CCGATAGG

ガイド RNA の標的配列である CR4 及び CR8 と類似した配列を、宿主である PH1V69 系統のゲノム DNA 配列を用いて検索した。その結果、CR8 と 2 塩基異なる配列が 1 箇所特定された (CR8-1)。表に示した配列中の PAM 配列を太字で示した。また CR8-1 の配列中で CR8 標的配列と異なる塩基を赤字で示した。シーケンス解析の結果、BC<sub>1</sub> 世代 29 個体の CR8-1 の配列はいずれも表中に示した宿主の配列と同一であった。

なお、従来の交配育種や誘発突然変異によって生じる遺伝的変異と比較するとゲノム編集によるオフターゲット変異の頻度は極めて低い。仮にオフターゲット変異が生じたとしても、望ましくない形質を有する系統は育種評価の過程で取り除かれ、商品化されることはない。

以上、CRISPR-Cas9 法による塩基配列の改変によって、本ワキシートウモロコシ中に新たなアレルゲンの産生及び既知の毒性物質の増加が生じる可能性は低い。

④ 特定の成分を増加・低減させるため代謝系に影響を及ぼす改変の有無

代謝系に影響を及ぼす改変を行った。  代謝系に影響はない。

*Wx1* 遺伝子がコードするアミロース合成酵素は、ADP グルコースからアミロースを合成する反応を特異的に触媒する。*Wx1* 遺伝子が欠失した本ワキシートウモロコシにおいては、意図したとおりの子実デンプンのアミロース含有量が減少し、アミロペクチン含有量が増加している。また、アミロース合成酵素が触媒する反応は特異的であるため、他の代謝系への影響が生じる可能性は低いと考えられる。同様のワキシール形質を有する従来のワキシートウモロコシには食品として長い利用の歴史があることから、本ワキシートウモロコシがヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低い。