

① 品目・品種名及び概要 (利用方法及び利用目的)

高小型塊茎数ジャガイモ品種 JA36 (以下、JA36 とする) におけるゲノム編集の目的は、より多くの塊茎数を得ることである。CRISPR-Cas9 を用いて *Gn2* 遺伝子をノックアウトした結果、*Gn2* タンパク質が発現しなくなる。*Gn2* タンパク質は、株あたりの塊茎数の調節に関与しており、*Gn2* 遺伝子をノックアウトした結果、1つの植物が生産する塊茎の数が大幅に増加し、より多くの塊茎を作るために、それぞれの塊茎は小さくなる。

JA36 は、ジャガイモ品種ビンチェ (Bintje) (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) に対してゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) により作出された。多数の塊茎をつけることで、小型の塊茎をより多く得ることができる。

小型ジャガイモは、使い勝手のよいサイズであることから、家庭向けやレストラン向けのジャガイモ製品の成長分野である。小型ジャガイモ (直径約 0.64~3.80cm) は、従来の大きなラセット品種 (直径約 3.81~6.35cm) よりも短時間で調理でき、一皿の量を少なくできるので、炭水化物の摂取量を気にする人々にとって魅力的な食材である。

もともと塊茎が小さい品種もあるが、ほとんどの小型ジャガイモは、「通常サイズ」のジャガイモ品種の栽培において、密植、あるいは早期収穫など農法を改良して生産されている。

ビンチェは、ヨーロッパで広く栽培されている高収量のジャガイモ品種であるが、米国では、株間を狭くする、或いは早期に塊茎を収穫することなどで、小型ジャガイモ市場向けに栽培されている。

JA36 は、ゲノム編集技術で作出した新品種である。シンプロット社は、CRISPR/Cas9 技術を使ってビンチェの *Gn2* 遺伝子をノックアウトし、高小型塊茎数ジャガイモ品種 JA36 を開発した。

4倍体品種ビンチェにおいて *Gn2* 遺伝子の4つのアレルを全てノックアウトすることにより、塊茎数が増えるが、一定の栄養でより多くの塊茎ができるということは、塊茎はより小さくなることになる。JA36 の特徴は、ビンチェと比較して、小型ジャガイモの市場向け収穫量が約 2 倍になることである。この収穫量の増加をもたらす JA36 の栽培によって、小型ジャガイモ生産に必要な土地や資源を減らすことができ、農業の持続可能性を向上させることができる。

JA36 は米国では、他の小型ジャガイモ品種と同様に、主に家庭の料理用またはレストラン向けの生鮮或いは冷凍のホールポテトとして食用に用いられる。

② 利用したゲノム編集技術及び遺伝子改変の概要

JA36 は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術によって、ジャガイモ品種ビンチェの *Gn2* 遺伝子の 4 つのアレルをすべてノックアウトすることで作出された。なお、JA36 のゲノム編集において修復 DNA テンプレートは使用されていない。

Gn2 遺伝子を正確に標的として編集する CRISPR/Cas9 構成要素を導入するために、アグロバクテリウムを用いて、pSIM4706 プラスミドをジャガイモ細胞に一過的に導入した。

JA36 の CRISPR/Cas9 構成要素は、Cas9ヌクレアーゼ及び Cas9ヌクレアーゼと結合し、*Gn2* 遺伝子内の相補的 DNA 標的部位に誘導する 2 つのガイド RNA (*Gn2g7* 及び *Gn2g8*) からなる。4 倍体ジャガイモの *Gn2* 遺伝子の編集を確実にするために 2 つのガイド RNA を用いた。Cas9ヌクレアーゼは、*Gn2* 遺伝子内の DNA を切断し、結果として二本鎖切断をもたらす。植物自身の修復機能がこの切断を修復する。JA36 では、この結果、*Gn2* 遺伝子にフレームシフト変異と未成熟終止コドンが生じた。

Gn2g7 と *Gn2g8* はそれぞれ、ビンチェ・ゲノム内に特異的な相補配列 (crRNA 領域) を持っている。ゲノム内の標的配列は、Cas9 による認識と切断のために 3'PAM 配列 (5'-NGG-3') を含んでいる。ビンチェ・ゲノムの 1 つの配列が *Gn2g8* の crRNA と配列類似性を有しており、この配列は 3'PAM 配列 (5'-UGG-3') を持ち、2ヌクレオチドが相違していた。3'PAM 配列を含むゲノム配列で、*Gn2g7* 及び *Gn2g8* crRNA と次に近いゲノム配列は *Gn2g7* 及び *Gn2g8* の crRNA と 3ヌクレオチド以上異なっていた。

ゲノム編集の詳細

pSIM4706 プラスミドをジャガイモ細胞に移入したのち、カナマイシン耐性 (*nptII* 遺伝子) を用いてプラスミドを含む細胞を選抜した。pSIM4706 の移入により、一過的な発現または安定した形質転換のいずれかが得られる。一過的な発現の場合でも、CRISPR/Cas9 構成要素は、ゲノム編集がなされるのに十分な時間、細胞内で活性を持っている。

ゲノムに pSIM4706 が組込まれた細胞は、pSIM4706 中の選抜マーカー遺伝子、イソペンテニルトランスフェラーゼ (*ipt*) により確認が可能になる。*ipt* 遺伝子が植物細胞に存在すると、その発現により植物ホルモンのサイトカイニンの過剰生産が起こり、植物が、発育不良、葉の異常、及び発根不良の表現型を示す (Smigocki and Owens, 1988)。そのため、ゲノムに *ipt* 遺伝子が組込まれた形質転換個体は、異常な形態の植物体となる。一方、pSIM4706 の一過的発現では正常な植物体が再生される。形態学的に正常な植物体に関して、*Gn2* 遺伝子の 4 つのアレルすべてに望んだ編集が行われていること、及びジャガイモゲノムに pSIM4706 プラスミド DNA が存在しないことについて評価を行った。

JA36 を商品化系統として選抜し、PCR 解析と配列決定により、JA36 の 4 つの標的 *Gn2* アレルのそれぞれについてゲノム編集結果の確認を行った。JA36 の 1 つのアレルでは、*Gn2g7* と *Gn2g8* 標的部位間の 110 bp が欠失していたが、他の 3 つのアレルでは、*Gn2g8* 標的部位に 1-2 bp の欠失が確認され、*Gn2g7* 標的部位には編集は認められなかった。

ジャガイモは栄養繁殖植物であるので、JA36 系統の作出に際して交配などは行われなかった。ジャガイモは、同じ遺伝子を持つ個体を作り出す栄養繁殖を行う。栄養繁殖においては、種子繁殖で行われる減数分裂などの遺伝的変異の原因となる過程を経していない。このため、一つの品種のジャガイモは、遺伝的に同じであり、これは栄養繁殖植物に共通していることである。ジャガイモの栄養繁殖の模式図を図 1 に示す。遺伝的に G0、G1、G2 は同じであるので、標的である *Gn2* 遺伝子の 4 つのアレルのそれぞれの特性評価、外来 DNA の有無、プラスミドに対応する配列のターゲットキャプチャー、キャプチャーされた配列の Illumina 配列決定、及びオフターゲット変異解析には G0 を用いた。

JA36 の配列解析では、編集された 4 アレルのみが検出され、編集されていない配列は検出されなかったことから、JA36 はキメラではないことが示された。

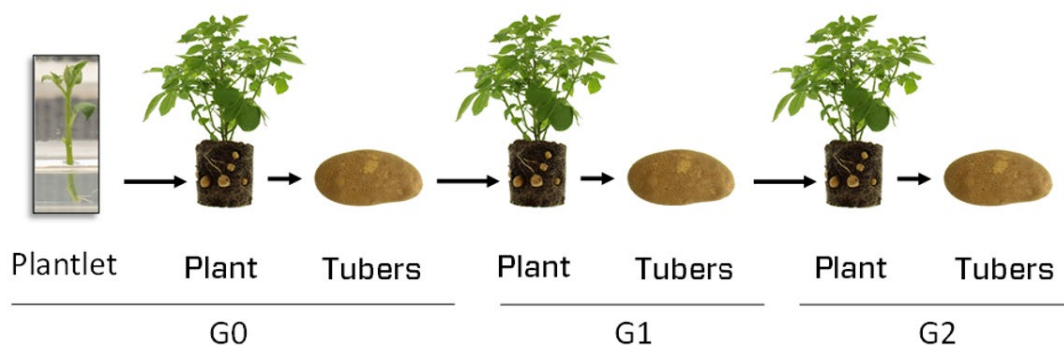


図 1 ジャガイモの栄養繁殖の模式図

組織培養植物体を、塊茎を作らせるために土壤に移植した (G0)。G0 塊茎を栽培し、G1 の植物と塊茎を作る。G1 塊茎を栽培して G2 の植物と塊茎を作る。なお、G0、G1、G2 は世代を意味するものではなく、解析などに供試したサンプルの由来を区別するために用いた。

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

● オフターゲット変異解析

Cas-Designer (v1.2) 及び GuideScan (v2.0.0) を用いて、ピンチェのゲノムにおいて

オフターゲット変異が起こる可能性が最も高い配列を評価し、JA36 のその位置で編集が行われていないことを確認した。

標的遺伝子に対する高い特異性を持ち、かつ Cas9 のオフターゲット活性を最小化するガイド RNA を設計するために、Gn2 遺伝子配列を慎重に選択した。ビンチェのアセンブリからのコンティグ（合計 2,064 個）に対し、Gn2g7 及び Gn2g8 に対する高い相同性（2 塩基以下の差異）を有する配列を検索するために、Cas-Designer 及び GuideScan を用いてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、Gn2g8 に関する 1 つのオフターゲット候補が示された。JA36 (G0) の Gn2g8 のオフターゲット候補の配列を nested PCR とシーケンスで調べた。その結果、ビンチェと JA36 の間で配列は同一であり、オフターゲット変異が生じていないことが示された。

- オフターゲット変異解析の結論

JA36 では、意図しないオフターゲット変異は生じていなかった。

- アレルゲン及び毒素の評価

JA36 の DNA の配列変化により、人体に悪影響を及ぼす新たなアレルゲンの生成、或いは既知の有害物質が増加するかどうかを評価した。

欠失部位にまたがるものを含む、編集された Gn2 アレルに関連する ORF 検索を行った。なお、ORF 検索にはシンプロット社が独自に作成したプログラムを用いた。

ORF は、4 つの Gn2 アレルそれぞれの終止コドン間の連続した 30 アミノ酸以上の配列と定義した。30 アミノ酸以上としたのは、アレルギー反応を誘発するために必要な IgE 結合部位の最小サイズからである (Huby *et al.*, 2000)。ヌクレオチド配列を、可能性のあるすべての ORF を検索するために、3 つのリーディングフレームと両方向で翻訳した。合計 15 個の ORF が検索され (表 1)、アレルゲン及び毒素との相同性検索に用いた。

表 1 JA36 の新たな ORF の数

Gn2 Allele	Stop-to-Stop ORFs
1	4
2	4
3	3
4	4

- アレルゲン検索

アレルゲンとの相同性検索は、健康・環境科学研究所（HESI; <http://db.comparedatabase.org/>）の COMPARE データベースを用いて行った。COMPARE データベース（バージョン 2022、2022 年 1 月 26 日リリース）には、2,463 のタンパク質配列が含まれている。FASTA アルゴリズムを用いて相同性検索を行った（Pearson and Lipman, 1988）。

完全長検索により、完全長 ORF と COMPARE データベースに含まれるアレルゲンとの相同性を調べた。相同性は以下の基準で判定した。(i) 配列の相同性が 50%より大きいこと、(ii) E 値が 10^{-4} 未満であること。E 値は、データベースと比較したときに、偶然に起こるヒット数を示す。E 値が低いほど、配列の相同性が偶然である可能性は低くなる。

また、80-mer sliding window search では、ORF 内の連続した 80 アミノ酸配列を COMPARE データベース内のアレルゲンと比較することにより、ORF と既知のアレルゲンとの相同性を調べた。相同性は、以下の基準で判定した。(i) 配列の相同性が 35%以上、(ii) 大きな配列ギャップを含むアラインメントをフィルタリングするために E 値 10 を用いた。相同性が 35%未満のアレルゲン配列は相同性があるとはみなさず、交差反応性の候補となりにくいため、検索結果には含まなかった（Ladics, 2008; Ladics and Selgrade, 2009）。

さらに、8-mer 完全一致検索では、ORF 配列とデータベース中の既知のアレルゲンまたはアレルゲンと疑われるタンパク質との間の相同性を調べた。

JA36 で編集された *Gn2* アレルの ORF は、全長検索、80-mer 検索、8-mer 検索のいずれにおいてもアレルゲンとはマッチしなかった。

- **毒素検索**

UniProtKB データベースを、キーワード「toxin」でフィルタリングし、BLAST ([blastp; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) を用いて毒素検索を行った。相同性の基準として E-value の cutoff 値 10^{-2} を用いた。検索は 2022 年 4 月 6 日に行った。4 つの JA36 編集 *Gn2* アレルの欠失部位にまたがる ORF は、毒素とマッチしなかった。

- **グリコアルカロイド**

グリコアルカロイドは、ジャガイモを含むナス科の作物によく見られる毒素である。ジャガイモ塊茎中の全グリコアルカロイドの 95%は、 α -ソラニンと α -チャコニンである（OECD, 2002）。塊茎中の総グリコアルカロイドの広く受け入れられている安全許容値は、20mg/100g fresh weight である（Smith *et al.*, 1996）。

Gn2 遺伝子は、グリコアルカロイドの代謝に関与すること、あるいはグリコアルカロイドと相互作用することは知られておらず、*Gn2* 遺伝子への編集が JA36 のグリコアルカロイドレベルに影響することは予想されない。

実際に、JA36 のグリコアルカロイド含量を評価した (表 2)。分析は、AOAC (2012) (997.13 ; ジャガイモ塊茎中のグリコアルカロイド (α -ソラニン及び α -チャコニン)) に基づいて行った。グリコアルカロイドを希酢酸で塊茎組織から抽出し、濃縮し、固相抽出カートリッジで精製し、 α -ソラニンと α -チャコニンの最終的な分離と測定は、202 nm での紫外線検出を備えた逆相液体クロマトグラフィーによって行った。定量限界値は、 α -ソラニンと α -チャコニンそれぞれ 2.50 mg/100 g fresh weight であった。統計解析は、線形混合モデルを用いて行った。

JA36 のグリコアルカロイドの平均濃度はビンチェのグリコアルカロイドの平均濃度と統計学的有意差がなく、食用ジャガイモの一般的に受け入れられている安全許容値 20mg/100g fresh weight を下回っていた。

表 2 JA36 及びビンチェの塊茎中のグリコアルカロイド含量

Variable	Variety	Mean (mg/100 g FW) ¹	P-Value	Standard Deviation	N ²	Range (mg/100 g FW) ¹		Combined Literature Range ³ (mg/100 g FW) ¹	
						Min	Max	Min	Max
α -Chaconine	JA36	2.99	0.4713	2.47	11 (8)	1.25	7.41	2.50	93.6
	Bintje	2.32		1.64	12 (8)	1.25	5.40		
α -Solanine	JA36	1.45	0.3993	0.591	11 (10)	1.25	3.21	2.50	90.2
	Bintje	1.25		NA	12 (12)	1.25	1.25		
Total Glycoalkaloids	JA36	4.44	0.4107	2.89	11 (8)	2.50	10.6	3.20	210
	Bintje	3.57		1.64	12 (8)	2.50	6.65		

¹FW = Fresh Weight

²括弧内の数字は定量限界未満のサンプル数。これらは定量限界値の 2.50 mg/100 g fresh weight の半数である 1.25 mg/100 g fresh weight として平均値等を算出した。

³Combined literature ranges は AFSI (2020) 及び Kozukue *et al.* (2008) から取った。

● アレルゲン及び毒素検索に関する結論

アレルゲン及び毒素検索により、JA36 の新規 ORF にはアレルゲン性または毒性に関して問題がないことが示された。また、グリコアルカロイド分析では、JA36 の塊茎のグリコアルカロイド濃度はビンチェのそれと統計学的有意差はなく、一般的に受け入れられている安全許容値 20mg/100g fresh weight 以下であることが示された。

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。

文献に基づくと、*Gn2* 遺伝子がジャガイモの栄養組成または代謝物に関連する経路

に關与していることは知られていない。したがって、*Gn2* 遺伝子の編集は、栄養組成または代謝物に影響を与えないと考えられる。

参考文献

- AOAC, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Method 997.13, AOAC International. Gaithersburg, MD.
- AFSI, 2020. Crop Composition Database, Version 8.0, Agriculture & Food Systems Institute [WWW Document]. URL <https://www.cropcomposition.org/CCDB/SelectAnalytes> (accessed 12.6.21).
- Huby, R.D.J., Dearman, R.J., Kimber, I., 2000. Why Are Some Proteins Allergens? *Toxicological Sciences* 55, 235–246. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.2.235>
- Kozukue, N., Yoon, K.-S., Byun, G.-I., Misoo, S., Levin, C.E., Friedman, M., 2008. Distribution of glycoalkaloids in potato tubers of 59 accessions of two wild and five cultivated *Solanum* species. *J Agric Food Chem* 56, 11920–8. <https://doi.org/10.1021/jf802631t>
- Ladics, G.S., 2008. Current Codex Guidelines for Assessment of Potential Protein Allergenicity. *Food and Chemical Toxicology* 46, S20–S23. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.021>
- Ladics, G.S., Selgrade, M.K., 2009. Identifying Food Proteins with Allergenic Potential: Evolution of Approaches to Safety Assessment and Research to Provide Additional Tools. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54, S2–S6. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.10.010>
- OECD, 2002. Organization for Economic Co-operation and Development. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Potatoes: Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Toxicants. <https://www.oecd.org/science/biotrack/46815167.pdf>
- Pearson, W.R., Lipman, D.J., 1988. Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *PNAS* 85, 2444–2448. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2444>
- Smigocki, A.C., Owens, L.D., 1988. Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 5131–5135. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5131>
- Smith, D.B., Roddick, J.G., Jones, J.L., 1996. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. *Trends Food Sci Technol* 7, 126–131. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10013-3](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10013-3)