

① 品目・品種名及び概要 (利用方法、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あるいは冷凍のホールポテトとして食用に用いられる。一般的にジャガイモは飼料利用のみを目的として栽培されることはないが、収穫されるジャガ

イモの一部が飼料として用いられている。我が国においても、飼料用ジャガイモの栽培はないが、規格外ジャガイモ及びジャガイモの加工副産物（ジャガイモの皮、切りくず及びデンプン粕等）が飼料として用いられている（橋本, 1957; 木村ら, 2009; 嶋澤ら, 2007; 嶋澤ら, 2009）。また、近年我が国では、食品の食べ残し、売れ残り及び調理残渣等を利用して家畜用の飼料（エコフィード）を生産する取り組みも行われていて、これらの食品残渣を通じてジャガイモが飼料として家畜に与えられる可能性がある（農林水産省, 2023）

② 利用したゲノム編集の方法及び改変の内容

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節間組織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、ビンチェのゲノム内に特異的な相補配列（crRNA¹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節間組織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。

¹ crRNA (crispr RNA) とは、ガイド RNA (gRNA) のうち、標的 DNA に相補的なヌクレオチドを持つ部分である。

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。

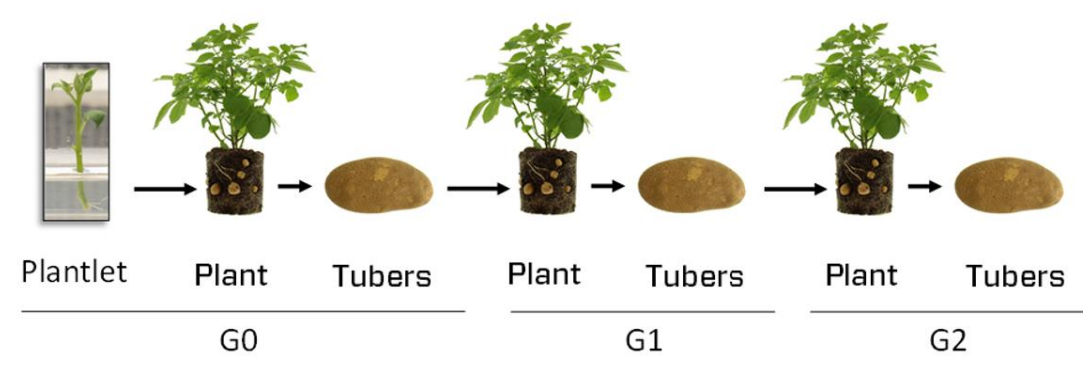


図1 ジャガイモの栄養繁殖の模式図

組織培養植物体を、塊茎を作らせるために土壌に移植した (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 の変化が畜産物を通じた人の健康又は家畜等の健康に悪影響を及ぼす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、ビ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つガイド RNA を設計し、Cas9 によるオフターゲット変異を最小限に抑えるために、*Gn2* 遺伝子配列を慎重に検討した。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、Cas-designer 及び GuideScan により、*Gn2g8* に関する 1 つのオフターゲット候補が示された。*Gn2g8* のオフターゲット候補の配列を nested PCR とシークエンスで調べた。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。

● 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。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、毒素との相同性検索に用いられた。

● 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>) 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)。

生鮮ジャガイモは反芻動物であるウシ及びヒツジに混餌して与える場合がある。グリコアルカロイドはジャガイモの芽に多く含まれるが、発芽したジャガイモであっても芽の部分を取り除いて飼料とする限りにおいて、家畜等に対する有害な影響はないとされている (OECD, 2002)。加工工場及び飲食施設から排出される調理済みのジャガイモが、ブタなどの非反芻動物に与えられる場合もある。ブタを用いた混餌投与試験では、飼料中のグリコアルカロイド含有量が 150 mg/kg fresh weight でも、有害な影響はなかったと報告されている (OECD, 2002)。

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 20 mg/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。

● 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 20 mg/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関与していることも知られていない。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

日本語文献

- 木村藤敬・大口秀司・山本るみ子・河野建夫（2009）馬鈴薯由来残渣の給与が肉豚の発育と肉質に及ぼす影響. 愛知農総試研報 41, 119-125.
<https://www.pref.aichi.jp/nososi/seika/hokoku/hokoku41/41-119.pdf>
- 嶋澤光一・本多昭幸・竹野大志・西川轍・尾野喜孝（2007）バレイショ混合サイレージ給与が肥育豚の発育および肉質に及ぼす影響. 日本畜産学会報 78(3), 355-362. <https://doi.org/10.2508/chikusan.78.355>
- 嶋澤光一・本多昭幸・尾野喜孝（2009）昼間屋外飼育およびバレイショ混合サイレージの給与が肥育豚の行動、生産性、肉質および筋線維特性に及ぼす影響. 日本畜産学会報. 80(2), 189-197. <https://doi.org/10.2508/chikusan.80.189>
- 農林水産省（2023）エコフィードについて、農林水産省畜産局飼料課、
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siryo/ecofeed.html
- 橋本 平九郎（1957）甘藷・馬鈴薯の飼料的利用方法 株式会社養賢堂
<https://iss.ndl.go.jp/books/R100000039-I000802049-00>

英語文献

- 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).
- 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>
- 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)