

みどりの食料システム戦略実現技術開発・実証事業のうち
農林水産研究の推進（委託プロジェクト研究）

アグリバイオ研究

「ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発（包括）」

令和５年度 最終年度報告書

課題番号	19191192
研究実施期間	令和元年度～令和５年度（５年間）
代表機関	国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科
研究開発責任者	村中 俊哉
研究開発責任者 連絡先	TEL : 06-6879-7423
	FAX : 06-6879-7426
	E-mail : muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp
共同研究機関	国立大学法人大阪大学大学院工学研究科
	国立研究開発法人理化学研究所
	国立大学法人神戸大学
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 高度解析センター
	学校法人東京理科大学
	国立大学法人高知大学
	株式会社カネカ
	国立大学法人岡山大学
	国立大学法人金沢大学
	京都府公立大学法人
	株式会社ミヨシ
	株式会社インプラントイノベーションズ
	新潟県農業総合研究所
	国立大学法人筑波大学
	国立大学法人北海道大学
	国立大学法人京都大学
	学校法人玉川学園 玉川大学
	学校法人東京農業大学
	ハウス食品グループ本社株式会社
	国立大学法人東京大学
	カルビーポテト株式会社
普及・実用化 支援組織	株式会社カネカ
	株式会社ミヨシ
	株式会社インプラントイノベーションズ
	新潟県農業総合研究所
	サナテックシード株式会社
	カルビーポテト株式会社

<別紙様式3>最終年度報告書

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室		研究担当者 (注1)
	1	2	3	4	5	機関	研究室	
研究開発責任者	△	△	△	△	△	大阪大学	工学研究科	◎ 村中俊哉
1 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ	○	○	○	○	○	大阪大学	工学研究科	○ 村中俊哉
1-1 保存、打撲等の優良形質のゲノム編集技術の適用と育種母本の作成	○	○	○	○	○	大阪大学	工学研究科	△ 村中俊哉 關 光 安本周平
	○	○	○	○	○	理化学研究所	環境資源科学研究センター	斉藤和季 梅基直行
	○	○	○	○	○	神戸大学	農学研究科	水谷正治
	○	○	○	○	○	農研機構北海道農業研究センター	寒地畑作研究領域	浅野賢治 岡本智史(部署異動のため~2021.3) 赤井浩太郎
	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	山崎宗郎
	○	○	○	○	○	カネカ	バイオテクノロジー研究所	田岡直明 柳楽洋三 濱田晴康 山田創(2022.4~)
			○	○	○	カルビーポテト	馬鈴薯研究所	森元幸
1-2 でん粉等の品質・性状形質のゲノム編集技術の適用と育種母本の作成	○	○	○	○	○	東京理科大学	先進工学部	△ 島田浩章 高 橋 史 憲 (2021.4~) 田 村 浩 二 (2021.4~)
	○	○	○	○	○	農研機構北海道農業研究センター	寒地畑作研究領域	浅野賢治
	○	○	○	○	○	大阪大学	工学研究科	村中俊哉 關 光 安本周平
1-3 病害抵抗性形質のゲノム編集技術の適用と育種母本の作成	○	○	○	○	○	大阪大学	工学研究科	△ 關 光 村中俊哉 安本周平
	○	○	○	○	○	高知大学	教育研究部	木場章範

	○	○	○	○	○	農研機構北海道農業研究センター	寒地畑作研究領域	浅野賢治
2 赤かび病に耐性を有するコムギ	○	○	○	○	○	農研機構作物研究部門	作物デザイン研究領域	○ 安倍史高
2-1 赤かび病菌の病徴を抑制したコムギ育種素材の開発	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門	作物ゲノム編集研究領域	小川 泰一 (~2023.3) 若佐 雄也 (2023.4~) 吉田 均 黒羽 剛
	○	○	○	○	○	農研機構作物研究部門	作物デザイン研究領域	△ 安倍史高
	○	○	○	○	○	岡山大学	資源植物科学研究所	佐藤和広
	○	○	○	○	○	金沢大学	学際科学実験センター	西内 巧
2-2 かび毒蓄積を低減化したコムギ育種素材の開発	○	○	○	○	○	農研機構作物研究部門	作物デザイン研究領域	△ 安倍史高
	○	○	○	○	○	岡山大学	資源植物科学研究所	佐藤和広
	○	○	○	○	○	金沢大学	学際科学実験センター	西内 巧
					○	農研機構高度分析研究センター	ゲノム情報大規模解析ユニット	坂井 寛章
3 花持ちが良く、省力栽培に適した花き	○	○	○	○	○	京都府立大学	植物育種学研究室	○ 大坪憲弘
3-1 ユーストマ雄性不稔 F1 親系統の開発	○	○	○	○	○	京都府立大学	細胞工学研究室	武田征士
	○	○	○	○	○	(株)インプラントイノベーションズ	事業開発部	寺川輝彦 矢野 翼
	○	○	○	○	○	京都府立大学	植物育種学研究室	△ 大坪憲弘
	○	○	○	○	○	(株)ミヨシ	研究開発部	藤 田 和 義 (~2021.3) 兼松紀子 足立浩崇 坂 口 公 敏

								(2021.4~) 河西崇 (2022.4~)
3-2 日持ちの良い ユリの開発	○	○	○	○	○	農研機構野菜 花き研究部門	花き生産流通 研究領域	△ 渋谷健市 佐々木克友 (2022.4 ~ 2023.3)
	○	○	○	○	○	新潟県農業総 合研究所	アグリ・フー ズバイオ研究 部	野水利和 佐藤和人 白矢武士 (2022.4 ~ 2023.3)
4 単為結果によりタ ネのない果菜類	○	○	○	○	○	筑波大学	つくば機能植 物イノベーシ ョン研究セン ター	○ 三浦謙治
4-1 一過的タンパ ク質発現システムを用 いたピーマン、パプリ カの開発	○	○	○	○	○	筑波大学	つくば機能植 物イノベーシ ョン研究セン ター	△ 三浦謙治 康 承源
4-2 ウイルスベク ターを用いた単為結果 ピーマン、パプリカの 開発	○	○	○	○	○	農研機構生物 機能利用研究 部門	植物・微生物 機能利用研究 領域	△ 石橋和大
5 登熟・転流を高め た多収イネ	○	○	○	○	○	農研機構生物 機能利用研究 部門	作物ゲノム編 集研究領域	○ 小松 晃
5-1 糖、デンプン 代謝酵素遺伝子のノッ クアウト系統の作出と 登熟・転流能に対する 評価	○	○	○	○	○	農研機構生物 機能利用研究 部門	作物ゲノム編 集研究領域	△ 小松 晃
5-2 転流・登熟能 の維持に配慮したシン ク容量向上系統の作出 とその評価	○	○	○	○	○	農研機構生物 機能利用研究 部門	作物ゲノム編 集研究領域	△ 小松 晃
6 アレルゲン成分を 低減した作物	○	○	○	○	○	北海道大学	植物遺伝資源 学	○ 山田哲也
6-1 低アレルゲン ダイズゲノム編集個体 の作出	○	○	○	○	○	北海道大学	植物遺伝資源 学	△ 山田哲也
6-2 ダイズタンパ	○	○	○	○	○	京都大学	品質設計開発	△ 丸山伸之

ク質のアレルゲン性解析							学	
7 晩抽性ダイコンの開発	○	○	○	○	○	玉川大学	農学部	○ 肥塚信也
7-1 ダイコンのゲノム編集系の開発	○	○	○	○	○	玉川大学	農学部	△ 肥塚信也 奥崎文子
	○	○	○	○		東京農業大学	生命科学部	松本隆 (~2023.3)
	○	○	○	○	○	東京農業大学	生物資源開発学科	三井裕樹 小松憲治
7-2 ダイコンの抽台に関わる遺伝子の抽出と晩抽性個体の作出	○	○	○	○	○	玉川大学	農学部	△ 肥塚信也 奥崎文子
	○	○	○	○		東京農業大学	生命科学部	松本隆 (~2023.3)
	○	○	○	○	○	東京農業大学	生物資源開発学科	三井裕樹 小松憲治
7-3 ダイコンにおける組織培養系の改良と特性評価	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門	作物ゲノム編集研究領域	△ 高原 学 (実行課題代表 ~2023.3) △ 光原 一朗 (実行課題代表 ~2023.4~)
	○	○	○	○		東京農業大学	生命科学部	松本隆 (~2023.3)
					○	農研機構企画戦略本部	新技術対策課	高原 学 (実行課題代表 ~2023.3)
8 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発	○	○	○	○	○	ハウス食品 G 本社	基礎研究部	○ 鴨井享宏
8-1 酵素の直接導入による、タマネギゲノムの編集	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門		△ 今井亮三
	○	○	○	○	○	ハウス食品 G 本社	基礎研究部	鴨井享宏 田丸翔也 今井真介
8-2 形質転換タマネギのゲノム編集効率の改善	○	○	○	○	○	ハウス食品 G 本社	基礎研究部	△ 鴨井享宏 田丸翔也 今井真介
8-3 LFS 活性が低下したタマネギ植物体の特性把握	○	○	○	○	○	ハウス食品 G 本社	基礎研究部	△ 鴨井享宏 田丸翔也 今井真介

	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門		△ 今井亮三
9 サポートラボ	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門	作物ゲノム編集研究領域	○ 雑賀啓明
9-1 ゲノム編集技術支援	○	○	○	○	○	農研機構生物機能利用研究部門	作物ゲノム編集研究領域	△ 雑賀啓明 遠藤真咲 廣瀬咲子 土岐精一
	○	○	○	○	○	農研機構基盤技術研究本部	高度分析研究センター	加藤悦子 (~2022.3) 鈴木喜大 (2022.4~)
9-2 植物における新規ゲノム編集ツールの開発	○	○	○	○	○	大阪大学	工学研究科	△ 安本周平 村中俊哉
	○	○	○	○	○	東京大学	医科学研究所	真下知士 吉見一人

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付してください。

I-2. 研究目的

ゲノム編集技術は生物が保持するゲノム情報を狙って改変することを可能とした技術であり、特に育種分野において画期的な技術として注目されている。ゲノム編集技術を適用することで、従来の育種と比べ、短期間に精度の良い品種改良を実施することが期待されているが、未だ適用できる作物種は限られている。今後、気候変動や消費者ニーズの多様化に迅速に対応するためにはゲノム編集技術を多様な作物種に展開することが必要である。そこで本研究では、栄養繁殖性あるいは多倍数性作物、さらには、難培養の作物等を研究対象とし、現在、あるいは将来的に消費者、生産者から期待される形質を持つ農作物の育種素材の開発を目的とする。

本研究提案ではゲノム編集技術、植物組織培養、育種技術等に優れた研究開発力を有する、日本国内の20を超える大学、公立研究機関、民間企業がコンソーシアムを構成し、ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材を開発する。すなわち、ばれいしょ、コムギ、花き、ピーマン・パプリカ、イネ、ダイズ、ダイコン、タマネギ等を具体的なターゲット作物とし、従来育種技術では作出が困難な新たな形質を付与した育種素材を作出する。各研究課題間で技術情報等を共有・交換するとともに、「サポートラボ」により、これらの研究課題の技術支援や、新たなゲノム編集発現ベクターの開発等を行いコンソーシアム内の円滑な研究開発をサポートする。

さらに、本研究プロジェクトに関わるコンソーシアム間で必要な契約を締結したのち、個別提案課題とも密に連絡を行い、課題間の連携ならびに「サポートラボ」による技術支援等が共有できる体制を構築する。特に、研究代表責任者は本プロジェクトの司令塔となり、個別提案課題も含めた一体のプロジェクトとして捉え、効率的かつ効果的に事業を推進する。

個別提案課題とも連携した一体のプロジェクトとして本研究課題を実施することにより、加工・業務用品種、高付加価値品種や病害虫抵抗性品種作成を目指した育種素材を開発し、農業の競争力強化や生産者の収益向上に寄与し、日本の強い農業づくりに貢献する。また、本研究プロジェクトで作出された育種素材、育種母本は研究期間終了後、連携する民間企業と共に実用化（商品化）・普及を進めることで、日本国内におけるゲノム編集技術を利用した農作物品種の活発な開発を推進させる。

このため、本研究では、

1. 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ
2. 赤かび病に耐性を有するコムギ
3. 花持ちが良く、省力栽培に適した花き
4. 単為結果によりタネのない果菜類
5. 登熟・転流を高めた超多収イネ
6. アレルゲン成分を低減した作物
7. 晩抽性ダイコンの開発
8. 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発
9. サポートラボ

により、

1. 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ
 1. 保存性、打撲耐性等の優良形質に係る評価法を2つ以上確立し、形質遺伝子を

3 以上同定し、育種素材を 4 系統以上作出する。

2. でん粉等の品質・性状の優良形質に係る評価法を 2 つ以上確立し、形質遺伝子を 2 以上同定し、育種素材を 3 系統以上作出する。

3. 病害抵抗性形質の優良形質に係る評価法を 1 つ以上確立し、形質遺伝子を 2 以上同定し、育種素材を 2 系統以上作出する。

2. 赤かび病に耐性を有するコムギ

1. 赤かび病の病徴抑制に資するコムギの接種検定システムを 1 つ以上確立し、育種素材を 2 系統以上作出する。

2. かび毒蓄積の低減に資するコムギのかび毒評価法を 1 つ以上確立し、育種素材を 2 系統以上作出する。

3. 花持ちが良く、省力栽培に適した花き

3-1. ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発

1. ゲノム編集により雄ずいを消失させる、あるいはエチレン生成を抑制することで消費者レベルでの花持ちを 2 倍に延長したユーストマ育種素材（F1親系統）を 3 系統以上作出する。

2. F1作出に用いることができる導入遺伝子の分離除去手法を 1 つ以上開発する。

3-2. 日持ちの良いユリの開発

1. ユリにおいてゲノム編集技術を確立する。

2. ゲノム編集により日持ちが1.5倍以上に延長したユリ育種素材を 2 系統以上作出する。

3. ユリ 2 品種以上において *in planta* 遺伝子導入法を開発する。

4. 単為結果によりタネのない果菜類

1. ゲノム編集により単為結果性を付与することで、タネのないピーマン、パプリカの育種素材を 2 系統以上作出する。

5. 登熟・転流を高めた超多収イネ

登熟・転流能の維持または向上によりシンク容量を増加させても、収量増加効果認められる育種素材の作出。節間、葉鞘、種子でのNSC含量評価法を 1 つ以上、育種素材 3 系統以上を作出する。

6. アレルゲン成分を低減した作物

少なくとも 2 種類のアレルゲンタンパク質遺伝子を同時に変異誘発したダイズゲノム編集個体を 3 系統以上作出し、それらのヌルセグリガントを確保すると共に血清を用いたアレルギー性の評価を行い、低アレルギー性を示すヌルセグリガントを 2 系統以上作出する。

7. 晩抽性ダイコンの開発

1. ハツカダイコンの形質転換系を確立し、形質評価の容易な遺伝子をゲノム編集したものを1系統以上作出する。

2. 抽台を制御する遺伝子を1つ以上同定・ゲノム編集し、晩抽性が非常に高い品種と同等以上の晩抽性の育種母本を1系統以上作出する。

3. 組織培養・形質転換系を改良し、新規にゲノム編集可能なダイコンを1品種以上同定する。また、1または2で作出されたゲノム編集ダイコン2系統以上の特性評価を特定網室で行う。

8. 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発

1. 酵素の直接導入による、タマネギゲノムの編集

酵素直接導入法をタマネギ組織に適用するための実験条件を確立し、目標とするタマネギ植物体の当代ヌルセグリガントを少なくとも3系統得る。

2. 形質転換タマネギのゲノム編集効率の改善

形質転換タマネギのゲノム編集効率を改善する方法を少なくとも1つ開発し、目標とするタマネギ植物体のヌルセグリガントを少なくとも3系統得る。

3. 香味成分が増加しLFS活性が低下したタマネギ植物体の特性把握

分子生物学的、生化学的、分析化学的解析手法を用いて、得られたタマネギ植物体の特性を把握する。

9. サポートラボ

本コンソーシアムで取り組む実行課題、及び個別課題に対して、技術支援10件行い、提供可能なゲノム編集ベクターやタンパク質5セットを作製する。

の開発を目標とする。

その結果、

1. 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ

開発されたゲノム編集系統に由来する品種が実用化することにより、貯蔵コストや原料ロスを大きく削減できる。

澱粉の特性が改良、加工業務適正が向上、病害への抵抗性が向上したゲノム編集ばれいしょの実用化が期待できる。

2. 赤かび病に耐性を有するコムギの研究開発

開発されたゲノム編集系統を育種素材としてコムギ育種現場での活用を目指す。

3. 花持ちが良く、省力栽培に適した花きの研究開発

花持ちが良く、除雄作業の不要な複数のユーストマ品種を市場に供給する。

花き園芸植物全般に幅広く適用できる雄性不稔形質付与技術を提供する。

開発した日持ちの良いユリ育種素材を種苗会社に提供し、日持ちの良い新品種が複数育成されることで、ユリ切り花の消費拡大を目指す。

4. 単為結果によりタネのない果菜類

難形質転換植物であるピーマンのゲノム編集法を確立させることで、様々な品種の改良が可能となる。

単為結果性をもつ大型ピーマンの実用化により、温暖化対策および加工に適した品種の提供へとつなげる。

5. 登熟・転流を高めた多収イネ

節間・葉鞘での澱粉蓄積を回避し転流糖を増加させたゲノム編集システムを導入することで、登熟歩合5.0%の増加、またはバイオマス量の10%向上を目指す。

良食味多収米（業務用米）実用品種である「あきだわら」の玄米収量を、最大で20%増加させたゲノム編集システムを導入することで、コメ60kg当たりの生産コスト8.0%程度の削減を目指す。

6. アレルゲン成分を低減した作物

本研究で作出されたダイズ種子を民間企業（カネカもしくはダイズを扱う商社）へ移管する。

国外の含め、当該研究で作出したダイズの栽培と販売を目指す。

7. 晩抽性ダイコンの開発

辛味成分が減少したダイコン（スプラウトを含む）の育種母本が育成、新品種作成に利用が開始されている。

ダイコンに晩抽性を付与する新規アレルをもつ育種母本が育成、新品種作成に利用が開始されている。

8. 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発

香味成分が増加したタマネギは、育種母本の候補になる可能性がある。

また、開発した手法を用いれば、今後様々な目標形質のタマネギ作出が可能となる。

9. サポートラボ

CRISPR-Cas3がゲノム編集農作物の開発に利用されている。
が期待される。

I-3. 研究方法

(1) 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ

ゲノム編集による遺伝子破壊によって、ばれいしょ塊茎の萌芽抑制、デンプンの形質変化、病害抵抗性の付与がそれぞれ期待される標的遺伝子を選定し、ゲノム編集用の発現ベクターを構築した。作成したベクターを導入したアグロバクテリウムを使用し、通常の形質転換、あるいは非選抜法を行った。形質転換系統あるいは再分化系統について、ヘテロ二重鎖移動度解析(HMA)やサンガーシーケンス解析、アンプリコンシーケンス解析等を実施し、変異導入の確認を行った。標的遺伝子の破壊が確認された系統については、各種特性評価を実施した。

また、ゲノム編集により改変を目指す形質について評価を可能とする評価法を確立し、既存品種の評価、ゲノム編集系統の評価を実施した。さらに、ゲノム編集の適用可能な品種を拡大するために、iPB法や新たな組織培養法について検討を行った。

本研究プロジェクトで作出されるゲノム編集系統の野外栽培を円滑に進めるため、先行研究により作出された外来核酸を含まないゲノム編集系統について、野外栽培を実施し、栽培に必要となる知見を集積した。

(2) 赤かび病に耐性を有するコムギの研究開発

ゲノム編集技術を活用して、赤かび病に耐性を有するコムギ育種素材の開発を行う。オオムギの閉花性とイネの短葎、シロイヌナズナの植物の病原菌防御応答に関連するコムギ相同遺伝子について、アグロバクテリウム法もしくはパーティクルガンによる一過的発現系によりコムギのゲノム編集個体を作成する。コムギは異質六倍体であるため、3セットの同祖遺伝子で編集アレルがホモ固定された個体を作成する。得られたゲノム編集ホモ固定系統について、閉花性、短葎の程度など候補遺伝子毎に目的とした形質変化が得られたか評価した後、赤かび病菌を接種して、その病徴で赤かび病抵抗性を観察すると共に、菌体定量、かび毒分析によりかび毒の蓄積低減化の評価を行う。

(3) 花持ちが良く、省力栽培に適した花きの研究開発

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、市販品種「ボレロホワイト」および「ハピネスホワイト」のF1種子親系統を用いて、組織培養・形質転換条件の見直しと効率化を図った。ユーストマは花弁老化の原因が受粉後の雄ずいからのエチレン生成であることから、雄ずい形成やエチレン受容に関わる遺伝子(*PLE*, *AP2*, *EIN3*, *ETR1*)をユーストマから単離し、ゲノム編集用ベクターを構築して上記種子親系統に導入した。得られた形質転換系統のうち両アレルあるいは片アレルが完全変異となった系統を中心に生育、形態、花持ち、稔性などを評価し、F1での日持ち性向上が期待できる系統を選抜した。

日持ちの良いユリの開発では、ユリにおいて標的遺伝子に効率的に変異を導入できるCRISPR/Cas9ベクターを開発した。ユリ花被の老化制御遺伝子である*LhNAC1*を標的とするCRISPR/Cas9ベクターを構築してユリカルスに導入し、*LhNAC1*に変異が導入された植物体を作成した。作出した変異系統の花の老化特性を評価し、日持ちが延長した植物体を選抜した。また、アグロバクテリウム法による形質転換が難しいユリ品種「カサブランカ」等において、パーティクルボンバートメント法による遺伝子導入条件を明らかにした。

(4) 単為結果によりタネのない果菜類

品種「カリフォルニアワンダー」「魁」において、アグロインフィльтраーション法を用いた一過的発現系により、ゲノム編集酵素を発現させることで、ゲノム編集体を作成することを行った。この際、半分種子に対する一過的発現および葉を1枚だけ残した切り口において一過

的発現を行う *in planta* ゲノム編集法を検討した。

品種「昌介」について、アグロバクテリウムを接種した子葉を組織培養することによる形質転換法を確立し、この系を用いてゲノム編集を試みた。また、ウイルスベクターを用いたゲノム編集技術の確立に向けて、ピーマンにおいてゲノム編集酵素を発現するのに適したウイルスベクターを検討した。

(5) 登熟・転流を高めた多収イネ

1) 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価

節間(稈)・葉鞘に蓄積する澱粉を転流糖として有効利用を促す目的で、イネ多収品種である「北陸193号」「夢あおば」「モミロマン」「べこあおば」を原品種に用いて、緑色(栄養)組織での澱粉生合成関連遺伝子 *AGPL1*, *AGPS1*, *CRCT* 各遺伝子KOゲノム編集系統の作出を試みた。インド型イネ品種は未熟胚を用い、日本型イネ品種は完熟胚を用いたアグロバクテリウム感染法とCRISPR-Cas9を用いて作出を行った。これらのゲノム編集系統の改変形質として、節間(稈)・葉鞘澱粉含量の大幅な低下、および転流糖(ショ糖)の増加が予想されたため、葉身、葉鞘、節間(稈)を用いて非構造性炭水化物(NSC)である澱粉含量およびショ糖、ヘキソース含量について、酵素法を用いて測定を実施した。また、「北陸193号」を原品種として作出されたシンク容量向上イネ系統(*Gn1a-KO*)と*AGPS-KO*または*CRCT-KO*系統との交配系統についても、節間、葉鞘澱粉およびショ糖等NSC含有量の特性について、明らかにした。

2) 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価

ノックアウトではなく、アミノ酸置換によるマイルドな形質を促す試みの一環として、日本型多収品種「あきだわら」を原品種に用いて、収量性やシンク容量向上に繋がる一穂粒数を制御する *OsCKX2* (*Gn1a*) 遺伝子をターゲットに、Target-AIDシステムを用いた塩基置換ゲノム編集イネ系統について作出を行った。変異箇所については、*OsCKX2* (*Gn1a*) 遺伝子上の5箇所では酵素活性に影響を与えるアミノ酸置換(塩基置換)が誘導されるようにgRNAを設計した。これらについても全ての置換ターゲットについて、ヌルセグリガント化されたゲノム編集固定系統を作出した。これらの系統について、野外栽培試験による収量および収量構成要素の特性を調査した。尚、作出された時期には未だゲノム編集系統の届出制度が確立されていなかったため、カルタヘナ法の申請により、野外栽培試験を実施した。栽培試験は、茨城県つくば市の農研機構敷地内にある隔離圃場で行い、1系統あたり18株×2列または3列植えを2プロット配置した。施肥量は、元肥と穂肥を合わせてN:10.6kg/10aとし、通常施肥栽培を行った。収量調査については、ボーダー株を除いた12株を調査対象株として個体刈りを行い、草丈、稈長、穂数、地上部乾物重量、穂長、枝梗数、一株総粒数、一穂粒数、精粒収量、粗玄米収量、精玄米収量、千粒重、粒型、登熟歩合等を測定項目として設定した。

(6) アレルゲン成分を低減した作物

CRISPR/Cas9システムを用いてシラカバ・カバノキアレルギーと交差反応するダイズのアレルゲン *Gly m 4* を欠失させたゲノム編集ダイズ個体を作出した。また、ゲノム編集個体の特性解析を行うため、*Gly m 4* のポリクローナル抗体、*Gly m 4* の特性解析およびアレルギー性の評価試験を行った。

(7) 晩抽性ダイコンの開発

ハツカダイコン、青首ダイコンについては、本プロジェクト開始時には安定な形質転換系が確立されていないため、ゲノム編集を用いた育種が困難な状況であった。しかし、本プロジェクト中に開発した形質転換系を用いて、辛味成分と抽台特性を支配する遺伝子に標的変異を導入出来るかどうかを検討した。また、ゲノム編集系統の作出後、ヌルセグリガント系統の単離、

ターゲットに応じた形質評価を確立し、評価系を確立した。

(8) 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発

タマネギは、形質転換が難しいだけでなく、例えば形質転換体が取得できてもゲノム編集は起きにくい植物である。そこで、培養を用いずにゲノム編集が可能なiPB法をタマネギに適用するための検討を行った。またアグロバクテリウム法では、編集効率の改善に効果があるとの報告がある各種方法をタマネギに適用し、ゲノム編集効率の向上を図る。

(9) サポートラボ

① CRISPR-Cas9のガイドRNA (gRNA)・タンパク質複合体 (RNP) を直接導入する技術開発のため、大腸菌を用いて各種Casタンパク質を合成・精製した。また、シロイヌナズナのプロトプラストを材料に、CasのRNPゲノム編集技術の検証を行った。

② 国産のゲノム編集技術CRISPR-Cas3 システムが植物のゲノム編集に利用可能か検証するため、イネ・タバコを材料にCRISPR-Cas3による標的遺伝子への変異導入の可否を調べた。

I-4. 研究結果

(1) 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ

保存性に関して、ゲノム編集により塊茎の萌芽抑制が期待される *PGA2*、*PGA1*、*16DOX* 遺伝子のうち、*PGA2*、*16DOX* については標的遺伝子が改変されたゲノム編集系統の作出に成功した。ただし、*PGA2* ゲノム編集系統の多くは3の倍数のインフレームの塩基欠失が含まれるため、遺伝子機能の破壊には至っていない。*16DOX* は複数のゲノム編集候補系統を取得することができた。塊茎の保存評価法を確立し、*16DOX* についての萌芽抑制効果を検討したところ、RNAi 法を用いた先行研究と同様に、塊茎の萌芽抑制の効果を、2系統のゲノム編集系統において確認することができた。また、ゲノム編集により、塊茎の打撲黒変耐性の付与が期待される *PPO1/PPO2* 遺伝子については計2系統の形質転換系統を作出し、標的遺伝子への変異導入が確認された。少数の塊茎と鉄球により簡便に打撲黒変/割れの程度を評価可能な試験を確立した。以上、保存性と打撲耐性の形質に関して、2つの評価法を確立、形質遺伝子を4遺伝子 (*PGA1*、*PGA2*、*16DOX*、*PPO1/2*) 同定、育種素材を4系統作出できたことから目標を達成した。

でん粉の鎖状構造を変化させることによりレジスタントスターチへの変換が期待される *SBE3* 遺伝子について、80以上の形質転換ゲノム編集系統を作出した。そのうち、10系統は4アレルすべての *SBE3* 遺伝子が破壊されていると考えられた。でん粉のリン酸化に関わり、遺伝子破壊によって冷凍後の離水性が改善されることが考えられた *GWD1* 遺伝子について、60以上の形質転換ゲノム編集系統を作出した。そのうち、2系統において4アレル変異が確認された。これらのゲノム編集系統について、でん粉の鎖長評価法、および、でん粉中のリン含量とアミロース量の評価法を用いて評価したところ、*GWD1* 変異体において、でん粉中のリン含量の減少、アミロース量の増加が確認された。以上、でん粉等の品質・性状の優良形質に係る評価法を2つ確立し、形質遺伝子を2遺伝子 (*SBE1*、*GWD1*) 同定し、育種素材を3系統作出できたことから目標を達成した。

ゲノム編集により青枯病抵抗性の付与が期待される2つの代謝酵素遺伝子 (*DS1-1*、*DS1-2*) について、3系統以上のゲノム編集系統を作出した。得られたゲノム編集系統について青枯病菌への抵抗性が新たに開発した *in vitro* 評価系、ならびに、*in vivo* 評価法により確認された。病害抵抗性形質の優良形質に係る評価法を2つ確立し、形質遺伝子を2遺伝子 (*DS1-1*、*DS1-2*) 同

定し、育種素材を3系統作出できたことから目標を達成した。

iPB法によるばれいしょゲノム編集を試みたところ、低確率であるが標的遺伝子改変が確認された。また、組織培養に利用する植物材料や培養条件、感染条件を検討することにより、これまでに遺伝子導入/ゲノム編集が困難であった系統についてもこれらの技術が適用可能であることを明らかとした。

先行研究により作出された *SSR2*ゲノム編集ばれいしょについて、野外栽培試験を実施し、本プロジェクトで作出したゲノム編集系統の野外栽培試験を行うさいに参考となる情報を収集した。

(2) 赤かび病に耐性を有するコムギの研究開発

ゲノム編集技術による改変により従来技術に比べて非常に短期間で、閉花性、短葎、かび毒低減等の複数候補遺伝子をそれぞれ機能欠失させたコムギ育種素材を作出できた。

閉花性、短葎については、目的とした形質に付随してどちらも稈長と穂長の抑制が観察された。また、新たに開発した赤かび病の接種検定システムでは、一部試験で病徴抑制の傾向が見られたものの、閉鎖系環境での育成材料では接種を行う開花時期の制御が難航し、単独の目的形質だけでは赤かび病への抵抗性を明確に示すことができなかった。赤かび病の病徴抑制に資するコムギの接種検定システムを1つ確立し、目的の形質が確認された系統を2系統作出できたことから目標を達成した。

新たに開発したかび毒評価法を用いて、*TaNFXL1*遺伝子のゲノム編集個体で病徴が抑制され、赤かび病菌の菌体量や蓄積しているかび毒量も抑えられていることが確認された。また、赤かび病抵抗性が向上した要因を調べるために、編集系統で増加したタンパク質と代謝物を同定したところ、植物免疫の活性化と抗菌性物質が増加して、赤かび病の抵抗性が向上することが示唆された。かび毒蓄積の低減に資するコムギのかび毒評価法を1つ確立し、育種素材を2系統作出できたことから目標を達成した。

(3) 花持ちが良く、省力栽培に適した花きの研究開発

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、組織培養・形質転換過程での供試材料の維持・増殖方法、形質転換の各ステップで用いる培地の組成、ゲル化剤、前培養日数、アグバクテリウムの感染・選抜方法などを大幅に見直し、リーフディスクへの感染による手法で最大40%（従来法は数%）の形質転換効率を実現したほか、液体培養実生を用いた簡便な形質転換手法を確立した。「ボレロホワイト」および「ハピネスホワイト」の種子親にリーフディスク法で7種類のゲノム編集用ベクターを導入して得た385の変異導入系統のうち、先行する「ボレロホワイト」種子親の *EgAP2*両アレル変異系統の開花調査を行った結果、供試した10系統のうち7系統で導入変異の効果と思われる八重化（多弁化）が確認された。これらについて、稔性と日持ち性の調査を進めるとともに、特定網室での特性調査とF1での表現型の安定性、ヌルセグリガントの取得を進めている。最終目標である日持ちが向上した育種素材3系統の取得は達成できる見込みである。

日持ちの良いユリの開発では、CRISPR/Cas9ベクターのCas9発現用プロモーターをトウモロコシ由来の *ZmUbi1*にすることで、変異導入効率の高いゲノム編集技術を確立した。「アカプルコ」と「ティアラ」の2品種において、ユリ花被の老化制御遺伝子である *LhNAC1*の両アレル変異系統を作出した。両品種において、小花の日持ちが野生型に比べて1.5倍以上に延長した系統を複数獲得した。また、「カサブランカ」と「アカプルコ」において、パーティクルボンバメント法に適したりん片の調整方法、遺伝子導入条件および形質転換体の選抜条件を明らか

にし、パーティクルボンバーメント法を用いた*in planta*形質転換法による遺伝子導入が可能になった。ユリにおいてゲノム編集技術を確立し、日持ちが1.5倍以上に延長したユリ育種素材を2系統作出できたことから目標を達成した。*in planta*遺伝子導入法についても2品種において開発が完了し、目標を達成した。

(4) 単為結果によりタネのない果菜類

半分種子に対する一過的発現を行った個体では標的部位ではなく、オフターゲット部位に変異が入ったものが得られた。こちらについては単為結果を示す表現型をしめしており、ゲノム編集が行われたものと考えられる。

*in planta*ゲノム編集法では、成長調節因子をiptからAtPLT5に変更すること、感染後に37°C処理することで、変異導入効率が上昇することが示された。キメラ率の向上を改善することで、ゲノム編集法効率を上げることにつながることを示された。

「昌介」の形質転換系を用いてCas9を発現する形質転換個体を得ることに成功した。しかし、形質転換効率が低いために形質転換体の数を増やすことが困難だったことが主因と考えられるが、合計5種類のプロモーターを検討したものの、標的変異が導入された個体は得られなかった。

GFPを発現するウイルスベクターを接種することにより、ピーマンで遺伝子発現が可能なウイルスベクターを選定した。ゲノム編集酵素およびガイドRNAを搭載したウイルスベクターを接種した個体において、感染組織に標的変異が導入されたことを確認した。

最終目標である、ゲノム編集による単為結果性ピーマン系統の作出についてであるが、目的の形質を示すオフターゲットに変異が入った系統を1系統取得することができ、目標はほぼ達成できた。

(5) 登熟・転流を高めた多収イネ

1) 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価

アグロバクテリウムによる*Cas9*の導入により、*AGPL1*ノックアウト系統が、「日本晴」で16個体、「モミロマン」で18個体、「北陸193号」で25個体を得られた。これらの個体の、*HPT*遺伝子をプローブに用いたサザンブロット解析の結果、ほぼ全ての個体における*Cas9*/sgRNAの導入コピー数は1～3コピーで推移しており、T1世代でのヌルセグリガント化や変異領域の遺伝的固定系統が順調に得ることができた。

同様に*AGPS1*ノックアウト系統は、「日本晴」で16個体、「モミロマン」で11個体、「北陸193号」で37個体を得られた。また、*CRCT*ノックアウト系統については、第2エクソン上の2か所でgRNAの設計を行った。*CRCT* gRNA1では、「日本晴」で19個体、「モミロマン」で11個体を得られた（「北陸193号」での作出は行わなかった）。*CRCT* gRNA2をターゲットにしたノックアウト系統は、「日本晴」で14個体、「モミロマン」で8個体、「北陸193号」で27個体を得られ、育種素材のラインナップを揃えることができた。

登熟・転流能の維持または向上によりシンク容量を増加させても、収量増加効果が認められる育種素材の作出を最終目標とし、それに向けてインド型多収品種である「北陸193号」および日本型多収品種を原品種としたゲノム編集系統を作出し、変異固定系統の選抜を完了した。最終的に、節間、葉鞘においてデンプン蓄積を抑制し転流糖を増加させるゲノム編集育種素材が、複数の遺伝子ターゲットに対し、複数品種で作出することができた。また、「北陸193号」を原品種として作出されたシンク容量を増加させる*Gn1a-KO*と、今回作出された*AGPS-KO*または*CRCT-KO*系統との交配系統について、NSC含有量特性を併せ持たせることに成功した。今後、野外栽培等の機会を得て、調査を進めたいと考えている。

加えて、デンプンを含むNSC含有量測定法の改良を行い、節間、葉鞘での形質評価を安定的なものとした。

2) 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価

アグロバクテリウムによる *CDA/Cas9* の導入により、CKX2/gRNA1~5をターゲットにした変異挿入系統が、「日本晴」、「あきだわら」、「モミロマン」でそれぞれ得られた。「日本晴」および「モミロマン」におけるCKX2/gRNA1での目的通りの変異挿入効率は25.3%、28.3%であった。同様に「日本晴」におけるCKX2/gRNA2での目的とした変異挿入効率は16.8%、CKX2/gRNA3で21.1%、CKX2/gRNA4で28.2%、CKX2/gRNA5で2.3%であった。

2回の野外栽培試験によって得られた収穫物の収量構成要素について、穂の枝梗数の増加に起因する一穂粒数の増加は、*Gn1a-KO*系統で最も高く、次いで塩基置換による *Gn1a-KD* 系統が、原品種である「あきだわら」と比較して高い結果となった。一株総粒数および粗玄米収量については、原品種と比べてマイルドな *OsCKX2* 活性を持つ *Gn1a-KD* 系統で最も高く、*Gn1a-KO* および *OsCKX2* 活性を大幅に減少させた *Gn1a-KD* 系統では、原品種と比べて差がほぼ認められないか、若干の低下を示した。この原因として、一株穂数の結果が、原品種と比べて *Gn1a-KO* 系統や *CKX2* 活性を大幅に減少させた *Gn1a-KD* 系統では、大幅に数を減らしていることが認められた。また、これまでの研究で、インド型品種を用いた *Gn1a-KO* 系統では、登熟歩合の低下がみられたが、日本型品種である「あきだわら」では、一部のアミノ酸置換系統以外では、*KO* 系統も含めて大きな低下は認められなかった。

登熟・転流能の維持または向上によりシンク容量を増加させても、収量増加効果認められる育種素材、葉鞘、種子でのNSC含量評価法を1つ、育種素材3系統作出できたことから目標を達成した。

(6) アレルゲン成分を低減した作物

CRISPR/Cas9システムを用いてシラカバ・カバノキアレルギーと交差反応するダイズのアレルゲン *Gly m 4* を欠失させたゲノム編集ダイズを3系統作出した。また、*Gly m 4* タンパク質に関する特性を把握するとともに、作出したゲノム編集ダイズの評価系を構築した。作出したダイズの低アレルゲン性を例証した。ダイズ及びシラカバ・カバノキアレルギーのアレルゲンタンパク質遺伝子を変異誘発したダイズゲノム編集個体を3系統作出し、それらのヌルセグリガントを確保すると共に血清を用いたアレルギー性の評価を行い、低アレルギー性を示すヌルセグリガントを2系統作出できたことから目標を達成した。

(7) 晩抽性ダイコンの開発

辛味成分、晩抽台性を支配する遺伝子をそれぞれ1つずつ同定した。ハツカダイコンの形質転換系を確立するとともに、ゲノム編集により辛味成分、晩抽台性を支配する遺伝子に標的変異を導入することができた。また、それぞれのゲノム編集系統について、ヌルセグリガント系統の単離も成功した。ハツカダイコンの形質転換系を確立し、形質評価の容易な遺伝子をゲノム編集したものを1系統作出できたことから目標を達成した。抽台を制御する遺伝子を1つ同定し、ゲノム編集により、晩抽性が非常に高い品種と同等以上の晩抽性の育種母本を1系統作出できたことから目標を達成した。組織培養・形質転換系を改良し、新規にゲノム編集可能なダイコンを1品種同定できたことから目標をほぼ達成した。

(8) 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発

iPB法では、タマネギにおけるiPB法の最適条件を決定し、複数の品種でE0個体を獲得した。さらに、変異が遺伝したE1系統も取得し、E1個体のLFS酵素活性を測定した結果、56%にまで

活性が低下している個体が見つかった。アグロバクテリウム法では、gRNAのタンデム化がゲノム編集効率の向上に有用であることが分かった。直径30mm 程度のバルブは、T0植物で調製できたが、生育速度が遅く、しかも時間をかけて栽培しても、花芽誘導に適した大型のバルブになる前に枯死または分蘖したため、採種できなかった。そのため、アグロバクテリウム法での検討はT0バルブで終了する事にした。T1種子の取得やヌルセグリガントの取得という最終目標の達成には至らなかったが、酵素直接導入法をタマネギ組織に適用するための実験条件を確立し、目標とするタマネギE1植物体を少なくとも2系統作出することができたことから目標をほぼ達成した。

(9) サポートラボ

① RNPを用いたゲノム編集法の開発

広く利用されているSpCas9 (*Streptococcus pyogenes*由来のCas9) のRNPによる標的変異導入を高度化するため、従来の4倍の領域を標的として認識できる改良型SpCas9 (SpCas9-NG) のタンパク質を合成した。*in vitro*でのDNA切断解析実験の結果、SpCas9-NGタンパク質が野生型SpCas9タンパク質よりもDNA切断活性が低いことが分かった。そこで、Proximal-CRISPR法による変異導入の高効率化を試みた。Proximal-CRISPR法は、変異を導入したい位置の近傍にCas9を結合させてクロマチン構造を開くことにより、ゲノム編集効率を向上させる方法である。まず、Proximal-CRISPR法に用いる、DNA切断活性をなくしたdead SpCas9 (dSpCas9) 等のタンパク質を合成した。次に、dSpCas9を用いたProximal-CRISPR法による変異導入効率の改善が可能であるかを検証したところ、一部の標的配列においてはProximal-CRISPR法によりゲノム編集効率が2倍に上昇することが分かった。以上の結果から、すべての標的に適用できるとは限らないが、標的によってはProximal-CRISPR法によりRNPを用いたゲノム編集の効率を改善できることを実証した。

② CRISPR-Cas3の植物への適用

CRISPR-Cas3が植物のゲノム編集に利用できるかを検討するため、単子葉植物のモデルであるイネを材料に、CRISPR-Cas3によるゲノム編集実験を行った。まず、CRISPR-Cas3の構成要素である6種類のCasタンパク質 (Cas3、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas11) をイネカルスで高発現させるためのベクターを構築した。次に、イネ内在性遺伝子を標的としたCRISPR-Cas3発現ベクターを構築し、イネカルスに形質転換したところ、カルスや再分化個体の一部で標的遺伝子にkb単位の欠失が生じていることが明らかになった。以上の結果から、CRISPR-Cas3がイネの内在性標的遺伝子への欠失導入に利用できることを実証した。

同様に、双子葉植物のモデルであるタバコ (*Nicotiana tabacum*) を材料に、CRISPR-Cas3によるゲノム編集実験を行った。Cas3 システムに必要な全てのタンパク質コード配列を2A ペプチドで結合した合成遺伝子を恒常発現プロモーター下に導入したものにgRNA 発現カセットを導入したベクターを構築し、タバコへの導入を行ったが、現時点では内在標的遺伝子に対する変異導入は確認されていない。上記のイネにおける知見をもとに、Cas3 システムに必要なタンパク質コード配列を個別のプロモーターで発現させるベクターを再構築した。

上記の研究により、研究課題促進に資するCas発現ベクターを4セット、Casタンパク質を5セット整備した。また、上記のベクターやタンパク質を含め、のべ12課題への技術サポートを行ったことから目標を達成した。

I-5. 今後の課題

(1) 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ

ばれいしょは重要な農作物であるが、半年を超える貯蔵が難しい、冷凍によって食感が悪くなるなどの問題を抱えている。また、近年の気候変動によって、これまで見られなかった病害が広がることが危惧されている。本プロジェクトで作出したゲノム編集系統は、塊茎萌芽の抑制によって保存性が向上、冷凍による食感の変化を緩和、病害への抵抗性が付与、されることが実験室内の評価系において確認されており、ばれいしょが抱える上記の問題を解決することができる有望な育種母本となることが期待できる。しかし、本研究で実施した *SSR2*ゲノム編集ジャガイモの野外栽培試験で明らかになったように、作物の特性は野外（さらに可能であれば栽培適地）において評価する事が重要である。本プロジェクトで作出した系統の多くは外来核酸を保持する形質転換体であり、すぐに野外栽培試験を実施することは難しい。今後、非選抜法などによって外来核酸を保持しないゲノム編集系統を作出し、野外栽培試験によって評価することが重要となるが、民間企業が主導してゲノム編集生物の官庁への届出を行うことは現時点で大きなハードルがある。そのため、国主導プロジェクト等の枠組み内での学官によるゲノム編集系統の野外での評価を経た実用化を期待したい。

ばれいしょグループでは「知」の集積と活用場の産学官連携協議会 研究開発プラットフォームでジャガイモ新技術連絡協議会を設立・運営しており、上記ゲノム編集系統の実用化に向けて、協議会内での情報共有を進めていく。

（２）赤かび病に耐性を有するコムギの研究開発

我が国の小麦の育種は、農研機構、道県の公設研究機関が主に担っており、これ以外では極少数の民間企業等が行っている。実用化に関して、本事業で開発された育種素材はこれら機関が中心となって品種育成に活用することが想定される。今後、本事業で開発した育種素材を有効に活用するために、閉花性、短葯、かび毒低減等の複数形質を集積すること、またそこに付随してくる穂形態や稈長、病原菌抵抗性反応の増強によるトレードオフなどの望ましくない形質変化を、様々な品種の遺伝背景との組合せによりどこまで調節できるのかを野外栽培環境下で検証することが必要である。複数年の野外試験において赤かび病抵抗性の有用性が確認されれば、使用する場所の制限のない主務官庁への届け出を行うことで、実際の品種育成の交配母本として実用されることが考えられる。

（３）花持ちが良く、省力栽培に適した花きの研究開発

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、親系統の変異をF1で維持するために変異形質がドミナントとなる必要がある。上記4遺伝子のうち*AP2*および*ETR1*の変異はこれを前提としているが、獲得した変異系統の有用性を確認するためにはヌルセグリガントの取得と並行して親系統の稔性やF1での表現型の安定性を継続的に調査していく必要がある。これらについてはミヨシおよびインプラントイノベーションズと共同で実用化に向けた検討と交配試験を進めている。

日持ちの良いユリの開発では、実用化のためには得られた系統を育種素材として交配等により外来遺伝子を取り除く必要がある。また、本研究で開発したパーティクルボンバートメント法による遺伝子導入法を応用し、RNP（Cas9/sgRNA複合体）の直接導入等による外来遺伝子を導入しないゲノム編集方法を開発することも可能と考えられる。

（４）単為結果によりタネのない果菜類

次世代において変異を固定させることが必要なため、キメラ率を向上させることが必要と考えられる。品種による特性の違いがあるため、ほかの品種において一過的発現によるゲノム編集法が可能であるかを検討する必要がある。

形質転換が困難なピーマンにおいて、「昌介」の形質転換系を確立したことは重要な成果ではあるが、形質転換効率が低くゲノム編集には成功していない。また、他の品種では形質転換

に成功していないため、さらなる改良あるいは品種毎の最適化が必要である。

(5) 登熟・転流を高めた多収イネ

1) 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価

澱粉合成系遺伝子のKOゲノム編集イネ系統を作出することで、当初の目的であった節間、葉鞘澱粉の大幅な減少と転流糖の増加を促すことに成功した。草型は原品種と差は認められないが、北陸193号を原品種に用いた*AGPL-KO*系統では顕著な開帳性が認められた。

これらのゲノム編集系統における収量性等を調査したが、ガラス温室の植える場所による個体間差が激しく、最終的な結論は出せなかった。今後、野外栽培等の機会を得て、調査を進めたいと考えている。

2) 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価

Target-AIDシステムによる塩基置換変異の導入でアミノ酸残基置換を促すことにより、*OsCKX2*がコードする酵素の機能をコントロールした育種素材を、5か所のアミノ酸置換ターゲットに対して作出することができた。また、それらの系統を温室での特性評価に留まらずに、野外圃場における栽培試験を実施することにより、より現実的な収量および収量構成要素データを取得し、検証することができた。最終的に、原品種としてもしいた「あきだわら」に対して、粗玄米収量を最大で18.3 %向上させることができた。実際の野外栽培において、粗玄米収量を上げられることが明らかとなり、今後社会実装に向けて穀粒の品質についても、確認作業を進めていきたいと考えている。

(6) アレルゲン成分を低減した作物

作出したダイズゲノム編集個体においてアレルギー患者の血清を用いてアレルギー性試験を行うとわずかではあるが反応性が残存することが明らかになった。詳細な解析を進めると、配列が酷似するホモログがゲノム内に存在し、さらにその遺伝子が種子中でわずかではあるが発現していることが明らかになった。よって、さらに低アレルゲン化を進めるために当ホモログ遺伝子のゲノム編集が必要であると考ええる。また、先述のホモログに関してもゲノム編集によって遺伝子座を取り除いた後、カネカおよび兼松株式会社などダイズと取り扱う民間企業を交え、社会実装について検討する。

(7) 晩抽性ダイコンの開発

本プロジェクトの3年目から、アブラナ科のゲノム育種のさらなる実用化に向けてと、広く企業と研究機関の間での意見交換の活性化をめざした研究会の設立を試み、令和5年度にアブラナ科ゲノム育種研究会が設立できた。すでに、3回の研究会が実施出来実用化・事業化にむけた議論が様々な研究者、ブリーダー、経営者と可能な土台が出来たと思われる。本プロジェクトで開発されたダイコンのゲノム編集育種系統の利用については、次年度以降もこの研究会を通じて議論・発展させていきたい。形質評価には、野外試験の重要性が指摘されており、この点についても、今後、積極的に展開したいと考えている。

(8) 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発

今後の課題として、野外での栽培適性や野外で栽培した時の収量、及びその収穫物の特性把握が残っている。

(9) サポートラボ

本課題で開発した技術については、他の遺伝子座での検証や、様々な作物種での実施例を積み重ねることにより、技術の適用幅や汎用性を調べる必要がある。

小課題番号	1	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	1 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	大阪大学・工学研究科・村中俊哉		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

ばれいしょは保存中に芽が伸び、光に当たると緑化してステロイドアルカロイド(SGA)が増加することを前提として産業が形成されてきている。これまで保存中の萌芽や光によるSGAの増加を抑制するために、低温やエチレンを利用した貯蔵、SGAを増加させないような暗い貯蔵庫での作業などが行われてきた。ばれいしょでは保存中の萌芽が起こらなければ、これまで貯蔵にかけていたコストの削減、萌芽やSGAの増加による原料ロスの削減につながる可能性がある。これまでに、遺伝子組換えによる遺伝子ノックダウンの手法では、ばれいしょに含まれる有毒物質であるSGA合成酵素の一部を欠損させるとSGA含量の低下に加えて、保存中の萌芽が抑制され土に植えた時のみ萌芽する画期的な表現型が見られることが我々のグループの研究で明らかになっている。近年、加工用として育成された系統の中で打撲黒変が原因で品種にできなかったものが知られている。機械の大規模化に伴い、塊茎への打撲の発生が大きな問題となっており、高度な打撲黒変耐性を有する品種への需要が高まっている。打撲黒変耐性については遺伝子組換えによるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)の発現抑制により改変できること、遺伝子マッピングでも同オキシターゼの関与の可能性が指摘されている。保存においては低温により還元糖が増加し、それを油加工する際に生成されるアクリルアミド含量を低減させた品種についても実需者、行政からのニーズが高い。病害抵抗性は生産現場で期待される形質である。これら形質についてはゲノム編集で実現可能性について知見が見出されている。本研究では、実用的な加工用品種のSGA合成酵素遺伝子をゲノム編集技術で改変することにより、SGAが含まれず保存中に芽が出ないばれいしょ育種素材の開発を行う。ゲノム編集でPPO遺伝子を破壊した系統について打撲黒変耐性の評価や打撲黒変耐性以外の栽培特性等の実用性の評価を実施し育種母本の開発を行う。ばれいしょで有用形質を付与できるゲノム編集すべき遺伝子の同定とゲノム編集技術のばれいしょ品種への適用拡大を行う。

ばれいしょは加工用やでん粉原料用に多く消費されている農産物である。でん粉の品質・性状の改良は大きな課題であり、今までない性質のでん粉品質や特性は、新たな需要を生むと期待される。ばれいしょは栄養生殖性の強い4倍体ゲノムをもつ植物であるため、通常の育種法では新たな形質を有する品種を作出することは容易でないが、ゲノム編集技術を利用し、これらの形質をもたらす遺伝子の変異を誘導することで、比較的短時間で新たな形質をもつものを育種することが可能であると考えられる。このことで、時宜にかなった変異体の作出を目指して機動的な研究を遂行することもできる。たとえば、アミロース含量の高いでん粉はリン酸架橋されることで難消化性デンプン(レジスタントスターチ)

となる。レジスタントスターチは便通の改善効果や大腸癌のリスク低減、腸内細菌の増強などの効果が示されており、ダイエット食品としてだけでなく、新たな食材として非常に有望視されている。また、逆にリン酸含量が減少した低リン酸デンプンは練り物の加工特性に優れ、保水性向上や食味維持に繋がる。この目的で食品加工メーカーやでん粉メーカー等と密に情報交換を行い望ましい形質を有する変異体の作出と評価を行う。

病害抵抗性は生産上非常に重要な課題である。ばれいしょ生産において重要な病害としては細菌による青枯病と卵菌による疫病による被害が深刻あり、近年、タバコをモデルとしてリン脂質代謝関連酵素であるフォスファチジン酸脱リン酸化酵素 (*DSI*) 遺伝子の発現抑制を行うことで疫病、青枯病抵抗性を付与できる知見が得られた。また、リン脂質代謝酵素を標的とした解析から、遺伝子発現抑制で防御応答の活性化を導くフォスホリパーゼを複数見いだしている。また、これらリン脂質代謝酵素は植物ホルモンのジャスモン酸と密接に関連していることから、病害虫に対する抵抗性の付与も期待できる。本研究ではばれいしょにおいてタバコの相同遺伝子を探索し、これら *DSI* 遺伝子やフォスホリパーゼ遺伝子をゲノム編集によって破壊したばれいしょを作出し、疫病、青枯病を含む病害抵抗性が再現できるかどうかを確認するとともに、ばれいしょの育種素材の開発を行う。ゲノム編集個体について、病害抵抗性の評価を行うとともに農業特性の評価を行い、ゲノム編集による病害抵抗性品種開発に向けた知見を得る。

ばれいしょ G の到達目標は次の通りである。

1. 保存性、打撲耐性等の優良形質に係る評価法 2、形質遺伝子 3、育種素材 4
2. でん粉等の品質・性状の優良形質に係る評価法 2、形質遺伝子 2、育種素材 3
3. 病害抵抗性形質の優良形質に係る評価法 1、形質遺伝子 2、育種素材 2

2) 研究方法

ゲノム編集による遺伝子破壊によって、ばれいしょ塊茎の萌芽抑制 (*PGA2*、*PGA1*、*16DOX*)、デンプンの形質変化 (*SBE3*、*GWD1*)、病害抵抗性の付与 (*DSI*) がそれぞれ期待される標的遺伝子を選定し、遺伝子破壊のためのゲノム編集発現ベクターを構築した。作成したベクターを導入したアグロバクテリウムを使用し、通常の形質転換、あるいは非選抜法によるばれいしょ (品種：さやか) への導入を行った。形質転換系統あるいは再分化系統について、ヘテロ二重鎖移動度解析 (*HMA*) やサンガーシーケンス解析、アンブリコンシーケンス解析等を実施し、ゲノム編集による変異導入の確認を行った。標的遺伝子の破壊が確認された系統については、各種特性評価を実施した。

また、ゲノム編集により改変を目指す形質について評価法を確立し、既存品種を用いた評価方法の検証、ゲノム編集系統の形質評価を実施した。さらに、ゲノム編集の適用可能な品種を拡大するために、iPB 法や組織培養法について最適化を行った。

加えて、本研究プロジェクトで作出されるゲノム編集系統の野外栽培を円滑に進めるため、先行研究により作出された外来核酸を含まないゲノム編集系統について、研究目的の野外栽培に関する文部科学省への届出・栽培試験を実施し、知見を集積した。

3) 研究結果

ゲノム編集により塊茎の萌芽抑制が期待される *PGA2*、*PGA1*、*16DOX* 遺伝子のうち、*PGA2*、*16DOX* については標的遺伝子が改変されたゲノム編集形質転換系統の作出に成功した。ただし、*PGA2* ゲノム編集系統の多くは 3 の倍数のインフレームの塩基欠失が含まれ

るため、遺伝子機能の破壊には至っていない。*16DOX*は複数のゲノム編集候補系統を取得することができた。加えてゲノム編集系統について塊茎を生産し、貯蔵性試験を行い、RNAi法を用いた先行研究と同様に、塊茎の萌芽抑制の効果をゲノム編集系統においても確認できた。

ゲノム編集により、塊茎の打撲黒変耐性の付与が期待される*PPO1*、*PPO2*遺伝子については複数の形質転換系統を作出し、標的遺伝子への変異導入が確認された。予算の削減に伴う研究リソースの他課題への割り振りにより、ゲノム編集系統のその後の解析を実施することができなかったが、少数の塊茎と鉄球により簡便に打撲黒変/割れの程度を評価可能な試験を確立した。

デンプンの鎖状構造を変化させることによりレジスタントスターチへの変換が期待される*SBE3*遺伝子について、80以上の形質転換ゲノム編集系統を作出した。そのうち、10系統は4アレルすべての*SBE3*遺伝子が破壊されていると考えられた。デンプンのリン酸化に関わり、遺伝子破壊によって冷凍後の離水性が改善されると考えられた*GWD1*遺伝子について、60以上の形質転換ゲノム編集系統を作出した。そのうち、2系統において4アレル変異が確認された。これらのゲノム編集系統についてデンプン特性を評価したところ、野生型とは異なる特性が確認された。

ゲノム編集により青枯病抵抗性の付与が期待される2つの代謝酵素遺伝子について、複数のゲノム編集系統を作出した。得られたゲノム編集系統について青枯病菌への抵抗性が*in vitro*評価系により確認された。

iPB法によるばれいしょゲノム編集を試みたところ、低確率であるが標的遺伝子改変が確認された。また、組織培養に利用する植物材料や培養条件、感染条件を検討することにより、これまでに遺伝子導入/ゲノム編集が困難であった系統についてもこれらの技術が適用可能であることを明らかとした。

先行研究により作出された*SSR2*ゲノム編集ばれいしょについて、野外栽培試験を実施し、本プロジェクトで作出したゲノム編集系統の野外栽培試験を行うさいに参考となる情報を収集した。

4) 成果活用における留意点

本プロジェクトによりゲノム編集によって、保存性が向上、デンプン形質が改変、病害抵抗性が向上した育種母本の作出に成功した。これらのゲノム編集形質を実際の育種現場で役立てるためには、ゲノム編集による副次的な効果がないかなど、野外栽培試験で詳細に検証する必要がある。しかし、これらの系統は遺伝子組換え系統であり、実際に活用を目指す場合には、交配によるヌル分離系統の作出や、非選抜法による新規系統の作出が必要な点に留意が必要である。

5) 今後の課題

本プロジェクトで作出したゲノム編集系統は、塊茎萌芽の抑制によって保存性が向上(*16DOX*ゲノム編集)、冷凍による食感の変化を緩和(*GDW1*ゲノム編集)、病害への抵抗性(*DS1*ゲノム編集)が付与、されることが実験室内の評価系において確認されており、ばれいしょが抱える上記の問題を解決することができる有望な育種母本となることが期待できる。しかし、本研究で実施した*SSR2*ゲノム編集ジャガイモの野外栽培試験で明らかになったように、作物の特性は野外(さらに可能であれば栽培適地)において評価する事が重要で

ある。本プロジェクトで作出した系統の多くは外来核酸を保持する形質転換体であり、すぐに野外栽培試験を実施することは難しい。今後、非選抜法などによって外来核酸を保持しないゲノム編集系統を作出し、野外栽培試験によって評価することが重要となるが、民間企業が主導してゲノム編集生物の官庁への届出を行うことは現時点で大きなハードルがある。そのため、国主導プロジェクト等の枠組み内での産学官によるゲノム編集系統の野外での評価を経た実用化を期待したい。

ばれいしょグループでは「知」の集積と活用場 産学官連携協議会 研究開発プラットフォームでジャガイモ新技術連絡協議会を設立・運営しており、上記ゲノム編集系統の実用化に向けて、協議会内での情報共有を進めていく。

小課題番号	2	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	2 赤かび病に耐性を有するコムギ		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	農研機構作物研究部門・作物デザイン研究領域・安倍 史高		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

かび毒の低減された安心・安全な小麦食品の供給、農薬の施用量を減少させ生産コストと環境負荷を低減させることに資するため、ゲノム編集技術を活用して、赤かび病に耐性を有するコムギの育種素材を開発することが当小課題の最終目標である。

コムギでは赤かび病菌が開花時に抽出した葯に付着し感染源となるが、開花時に穎が開かず葯が抽出しない閉花性のコムギ遺伝資源は病徴が抑制されることが知られている。また、閉花性に加えて葯を短くすることで「葯がら」の穎からはみ出しを完全に防ぐことも有効と考えられる。そこで、オオムギで同定されている閉花性の遺伝子、イネで同定されている短葯の遺伝子について、コムギの相同遺伝子を抽出し、閉花性で短葯のコムギをゲノム編集技術により効率的に作出し、赤かび病の感染抵抗性をより高めることを目的とする。

また、赤かび病菌は外穎の表皮の気孔からも宿主組織内に侵入可能なので、閉花性のオオムギにおいても赤かび病の完全なる解決には至っていない。また赤かび病の病徴とかび毒の蓄積には一定の相関は見られるものの、必ずしも一致しないことが知られている。これまでに、オオムギなどにおいてRNAi法でのノックダウンによって赤かび病の病徴抑制とともにかび毒の蓄積を低減化する候補遺伝子を見出している。そこで、かび毒の蓄積を低減化する候補遺伝子について、コムギの相同遺伝子を抽出し、それらの三重変異体をゲノム編集技術により効率的に作出して、かび毒の蓄積を低減させることを目的とする。

2) 研究方法

ゲノム編集技術を活用して、赤かび病に耐性を有するコムギ育種素材の開発を行う。オオムギの閉花性とイネの短葯、シロイヌナズナの植物の病原菌防御応答に関連するコムギ相同遺伝子について、アグロバクテリウム法もしくはパーティクルガンによる一過的発現系によりコムギのゲノム編集個体を作成する。コムギは異質六倍体であるため、3つの同祖遺伝子で編集アレルがホモ固定された個体を作成する。得られたゲノム編集ホモ固定系統について、閉花性、短葯の程度など候補遺伝子毎に目的とした形質変化が得られたか評価した後、赤かび病菌を接種して、その病徴で赤かび病抵抗性を観察すると共に、菌体定量、かび毒分析によりかび毒の蓄積低減化の評価を行う。

3) 研究結果

ゲノム編集技術による改変により従来技術に比べて非常に短期間で、閉花性、短葯、かび毒低減等の複数候補遺伝子をそれぞれ機能欠失させたコムギ育種素材を作成できた。

閉花性、短蒨については、目的とした形質に付随してどちらも稈長と穂長の抑制が観察された。また、赤かび病の接種検定では、一部試験で病徴抑制の傾向が見られたものの、閉鎖系環境での育成材料では接種を行う開花時期の制御が難航し、単独の目的形質だけでは赤かび病への抵抗性を明確に示すことができなかった。

かび毒低減については、*TaNFXL1*遺伝子のゲノム編集個体で病徴が抑制され、赤かび病菌の菌体量や蓄積しているかび毒量も抑えられていることが確認された。また、赤かび病抵抗性が向上した要因を調べるために、編集系統で増加したタンパク質と代謝物を同定したところ、植物免疫の活性化と抗菌性物質が増加して、赤かび病の抵抗性が向上することが示唆された。

4) 成果活用における留意点

本事業で開発した育種素材を有効に活用するために、閉花性、短蒨、かび毒低減等の複数形質を集積すること、またそこに付随してくる穂形態や稈長、病原菌抵抗性反応の増強によるトレードオフなどの望ましくない形質変化を、様々な品種の遺伝背景との組合せによりどこまで調節できるのかを野外環境下で検証することが必要である。

5) 今後の課題

我が国の小麦の育種は、農研機構、道県の公設研究機関が主に担っており、これ以外では極少数の民間企業等が行っている。実用化に関して、本事業で開発された育種素材はこれら機関が中心となって品種育成に活用することが想定される。複数年の野外試験において赤かび病抵抗性の有用性が確認されれば、使用する場所の制限のない主務官庁への届け出を行うことで、実際の品種育成の交配母本として実用されることが考えられる。

小課題番号	3	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	3 花持ちが良く、省力栽培に適した花き		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	京都府立大学・植物育種学研究室・大坪憲弘		

II. 小課題ごとの研究目的等

(1) ユーストマ雄性不稔 F1 親系統の開発

1) 研究目的

ユーストマを含むいくつかの花弁園芸植物では、受粉・受精後に雄ずいにおけるエチレンの生合成が急激に増加し、これが老化や器官の脱離を促進するが、切り花等では商品としての寿命を短縮してしまうため、その生合成や感受性を抑制する技術開発が切望されている。ユーストマは花弁老化の原因が受精後の雄ずいからのエチレン生成であることから、雄ずい形成やエチレン感受性に関わる複数の遺伝子をターゲットとしてゲノム編集によりF1親系統の機能改変を行う。市販優良F1品種の種子親を材料に作出したこれらの系統について、花持ちの評価試験を行い、実用化にかかる行政手続き等に必要な情報を蓄積する。

2) 研究方法

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、市販品種「ボレロホワイト」および「ハピネスホワイト」のF1種子親系統を用いて、組織培養・形質転換条件の見直しと効率化を図った。ユーストマは花弁老化の原因が受粉後の雄ずいからのエチレン生成であることから、雄ずい形成やエチレン受容に関わる遺伝子 (*PLE*, *AP2*, *EIN3*, *ETR1*) をユーストマから単離し、ゲノム編集用ベクターを構築して上記種子親系統に導入した。得られた形質転換系統のうち両アレルあるいは片アレルが完全変異となった系統を中心に生育、形態、花持ち、稔性などを評価し、F1での日持ち性向上が期待できる系統を選抜した。

3) 研究結果

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、組織培養・形質転換過程での供試材料の維持・増殖方法、形質転換の各ステップで用いる培地の組成、ゲル化剤、前培養日数、アグバクテリウムの感染・選抜方法などを大幅に見直し、リーフディスクへの感染による手法で最大40%（従来法は数%）の形質転換効率を実現したほか、液体培養実生を用いた簡便な形質転換手法を確立した。「ボレロホワイト」および「ハピネスホワイト」の種子親にリーフディスク法で7種類のゲノム編集用ベクターを導入して得た1,440の形質転換系統から385の変異導入系統を取得し、片アレルまたは両アレルが100%変異した62系統を開花調査に供した。先行する「ボレロホワイト」種子親の*EgAP2*両アレル変異系統の開花調査を行った結果、供試した10系統のうち7系統で導入変異の効果と思われる八重化（多弁化）が確認された。上記を含む*EgAP2*変異の17系統については、各8-16個体を供試して特定網室での特性調査と交配試験を進めており、八重形質の安定性と日持ち性については年度内に確認する予定である。

4) 成果活用における留意点

ヌルセグリガントの取得、F1での形質安定性の確認、CRISPR/Cas9の特許実施許諾契約（あるいは他の手法の利用）について完了あるいは検討する必要がある。

5) 今後の課題

ユーストマ雄性不稔F1親系統の開発では、親系統の変異をF1で維持するために変異形質が優性となる必要がある。上記4遺伝子のうち*AP2*および*ETR1*の変異はこれを前提としているが、獲得した変異系統の有用性を確認するためにはヌルセグリガントの取得と並行して親系統の稔性やF1での表現型の安定性を継続的に調査していく必要がある。これらについてはミヨシおよびインプラントイノベーションズと共同で実用化に向けた検討と交配試験を進めている。

(2) 日持ちの良いユリの開発

1) 研究目的

切り花では、消費者および花き業界から日持ちの良さが強く求められている。カーネーションなどの、老化がエチレン（植物ホルモン）によって制御されている一部の花きでは、エチレン阻害剤を処理することで日持ちを延長することができる。一方、ユリ等の老化にエチレンが関与しない花きでは、有効な品質保持技術が開発されていない。交配に基づく従来のユリの育種では、交配から開花まで4年ほどの期間がかかるため、目的形質を付与するためには非常に長い年月を必要とし効率が悪い。このような中、ユリにおいて花卉（花被）の老化を制御する遺伝子（*LhNAC1*）を見出しており、RNAi法による発現抑制により、日持ちが延長することを明らかにしている。

本実施課題では、ユリにおいて効率的なゲノム編集技術を開発するとともに、花卉の老化制御遺伝子を標的としたゲノム編集を行うことで、日持ちが延長したユリ系統を作出することを目的とする。

2) 研究方法

日持ち向上ユリの作出法の開発では、ユリにおいて標的遺伝子に効率的に変異を導入できるCRISPR/Cas9ベクターを開発した。これまでにユリ花被の老化制御遺伝子として*LhNAC1*を特定していることから、*LhNAC1*を標的とするCRISPR/Cas9ベクターを構築した。構築したベクターをユリカルスに導入し、*LhNAC1*に変異が導入された植物体を作成した。作出した変異系統の花の老化特性を評価し、日持ちが延長した植物体を選抜した。

ゲノム編集に対応したユリの効率的遺伝子導入法の開発では、ユリ品種「カサブランカ」等において、パーティクルボンバード法に適したりん片の調整方法、遺伝子導入条件および形質転換体の選抜条件を検討した。

3) 研究結果

日持ち向上ユリの作出法の開発では、ゲノム編集用ベクターのCas9発現用プロモーターをトウモロコシ由来の*ZmUbi1*にすることで、変異体獲得効率が40%以上に向上することを見出した。これにより、ユリにおいて変異導入効率の高いゲノム編集技術を確立した。「アカプルコ」と「ティアラ」の2品種において、*LhNAC1*の両アレルに変異が導入された系統をそれぞれ20系統以上作出した。両品種において、小花の日持ちが野生型に比べて1.5倍以上に延長した系統を複数獲得した。

ゲノム編集に対応したユリの効率的遺伝子導入法の開発では、パーティクルボンバードメント法による遺伝子導入には、りん片上の再生球根から摘出した茎頂が適していることを明らかにした。「カサブランカ」では、パーティクルボンバードメント法により線状ベクターを導入後、茎頂を10日間非選抜培地で培養したあと20 mg/l ハイグロマイシンを添加した選

抜培地で選抜することで形質転換体（1系統/茎頂100個）が得られた。「アカプルコ」についても同様の条件で形質転換体（2系統/茎頂200個）が得られた。

4）成果活用における留意点

本研究で作出した日持ちが延長したユリ植物体には、ゲノム編集に用いた外来遺伝子が残存している。

5）今後の課題

作出した良日持ち性ユリの実用化のためには、得られた系統を育種素材として、交配等により外来遺伝子を取り除く必要がある。また、本研究で開発したパーティクルボンバートメント法による遺伝子導入法を応用し、RNP（Cas9/sgRNA複合体）の直接導入等による外来遺伝子を導入しないゲノム編集方法の開発も可能と考えられる。

小課題番号	4	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	4 単為結果によりタネのない果菜類		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	筑波大学・つくば機能植物イノベーション研究センター・三浦謙治		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

難形質転換植物であるピーマン、パプリカは多くのビタミンやミネラルを含む機能性野菜である。タネなしピーマン、パプリカは調理・加工工場で種を取り除く作業工程が不要となるため、作業効率の改善や人件費の抑制につながるとして、食品加工業界および種苗業界においてその作製が求められている。特にパプリカは単価が高く、スライスして使用する際に、タネの除去なしに加工できる品種開発に注目が集まっている。但し、これらの植物では形質転換がほとんど成功しておらず、従来の遺伝子組換えによるゲノム編集個体の作出は非常に困難である。近年、一過的タンパク質発現システムあるいはウイルスベクターを用いて、形質転換を経ずにゲノム編集を行う技術開発が進められている。

したがって、本研究では、

1. 一過的タンパク質発現システムを用いた単為結果ピーマン、パプリカの開発
2. ウイルスベクターを用いた単為結果ピーマン、パプリカの開発

により、一過的タンパク質発現システムあるいはウイルスベクター技術をピーマン、パプリカに適用させ、形質転換を経ずにゲノム編集を行うことで、単為結果性をもつ果菜類の育種母本を作製することを目標とする。

2) 研究方法

品種「カリフォルニアワンダー」「魁」において、アグロインフィльтраーション法を用いた一過的発現系により、ゲノム編集酵素を発現させることで、ゲノム編集体を作成することを行った。この際、半分種子に対する一過的発現および葉を一枚だけ残した切り口において一過的発現を行う *in planta* ゲノム編集法を検討した。

品種「昌介」について、アグロバクテリウムを接種した子葉を組織培養することによる形質転換法を確立し、この系を用いてゲノム編集を試みた。また、ウイルスベクターを用いたゲノム編集技術の確立に向けて、ピーマンにおいてゲノム編集酵素を発現するのに適したウイルスベクターを検討した。

3) 研究結果

半分種子に対する一過的発現を行った個体では標的部位ではなく、オフターゲット部位に変異が入ったものが得られた。こちらについては単為結果を示す表現型をしめしており、ゲノム編集が行われたものと考えられる。

In planta ゲノム編集法では、成長調節因子を *ipt* から *AtPLT5* に変更すること、感染後に 37℃ 処理することで、変異導入効率が上昇することが示された。キメラ率の向上を改善することで、ゲノム編集法効率を上げることが示された。

「昌介」の形質転換系を用いて *Cas9* を発現する形質転換個体を得ることに成功した。しかし、形質転換効率が低いために形質転換体の数を増やすことが困難だったことが主因と

考えられるが、合計5種類のプロモーターを検討したものの、標的変異が導入された個体は得られなかった。

GFPを発現するウイルスベクターを接種することにより、ピーマンで遺伝子発現が可能なウイルスベクターを選定した。ゲノム編集酵素およびガイドRNAを搭載したウイルスベクターを接種した個体において、感染組織に標的変異が導入されたことを確認した。

4) 成果活用における留意点

*In planta*ゲノム編集法については、次世代に安定して変異を遺伝させるためには、キメラ率の向上させることが必要となる。品種により、導入効率が変わってくることが予測されるため、調整が必要となる。

「昌介」の形質転換系を確立したことは重要な成果ではあるが、形質転換効率が低くゲノム編集された個体は得られていない。また、他の品種では形質転換に成功していない。

ウイルスベクター感染組織において標的変異を確認することはできたが、ゲノム編集個体は得られていない。

5) 今後の課題

一過的発現系においては、次世代において変異を固定させることが必要なため、キメラ率を向上させることが必要と考えられる。品種による特性の違いがあるため、ほかの品種において一過的発現によるゲノム編集法が可能であるかを検討する必要がある。

ウイルスベクター感染においては、ゲノム編集個体を得るためには、生長点への変異導入もしくは組織培養による再分化が必要である。

小課題番号	5	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	5 登熟・転流を高めた多収イネ		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	農研機構生物機能利用研究部門・作物ゲノム編集研究 領域・小松晃		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

- ① 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価
CRISPR/Cas9システムを用いて、登熟期の節間（茎）や葉鞘でのデンプンの蓄積を回避させる、または登熟期種子胚乳へのヘキソース供給を向上させるため、ゲノム編集技術による育種素材を創出する。
- ② 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価
Target-AIDシステムによる塩基置換変異の導入でアミノ酸残基置換を促すことにより、目的遺伝子がコードする酵素等の機能をコントロールしたゲノム編集系統を作出する。

2) 研究方法

- ① 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価
節間(稈)・葉鞘に蓄積する澱粉を転流糖として有効利用を促す目的で、イネ多収品種である「北陸193号」「夢あおば」「モミロマン」「べこあおば」を原品種に用いて、緑色（栄養）組織での澱粉合成関連遺伝子 *AGPL1*、*AGPS1*、*CRCT* 各遺伝子KOゲノム編集系統の作出を試みた。インド型イネ品種は未熟胚を用い、日本型イネ品種は完熟胚を用いたアグロバクテリウム感染法とCRISPR-Cas9を用いて作出を行った。これらのゲノム編集系統の改変形質として、節間(稈)・葉鞘澱粉含量の大幅な低下、および転流糖(ショ糖)の増加が予想されたため、葉身、葉鞘、節間(稈)を用いて非構造的炭水化物（NSC）である澱粉含量およびショ糖、ヘキソース含量について、酵素法を用いて測定を実施した。また、「北陸193号」を原品種として作出されたシンク容量向上イネ系統（*Gn1a-KO*）と *AGPS-KO* または *CRCT-KO* 系統との交配系統についても、節間、葉鞘澱粉およびショ糖等NSC含有量の特性について、明らかにした。
- ② 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価
ノックアウトではなく、アミノ酸置換によるマイルドな形質を促す試みの一環として、日本型多収品種「あきだわら」を原品種に用いて、収量性やシンク容量向上に繋がる一穂粒数を制御する *OsCKX2*（*Gn1a*）遺伝子をターゲットに、Target-AIDシステムを用いた塩基置換ゲノム編集イネ系統について作出を行った。変異箇所については、*OsCKX2*（*Gn1a*）遺伝子上の5箇所が酵素活性に影響を与えるアミノ酸置換（塩基置換）が誘導されるようにgRNAを設計した。これらについても全ての置換ターゲットについて、ヌルセグリガント化されたゲノム編集固定系統を作出した。これらの系統について、野外栽培試験による収量および収量構成要素の特性を調査した。尚、作出された時期には未だゲノム編集系統の届出制度が確立されていなかったため、カルタヘナ法の申請により、野外栽培試験を実施した。栽培試験は、茨城県つくば市の農研機構敷地内にある隔離圃場で行い、1系統あたり18株×2列

または3列植えを2プロット配置した。施肥量は、元肥と穂肥を合せてN:10.6kg/10aとし、通常施肥栽培を行った。収量調査については、ボーダー株を除いた12株を調査対象株として個体刈りを行い、草丈、稈長、穂数、地上部乾物重量、穂長、枝梗数、一株総粒数、一穂粒数、精粒収量、粗玄米収量、精玄米収量、千粒重、粒型、登熟歩合等を測定項目として設定した。

3) 研究結果

① 糖、澱粉代謝酵素遺伝子のノックアウト系統の作出と登熟・転流能に対する評価

アグロバクテリウムによる *Cas9* の導入により、*AGPL1* ノックアウト系統が、「日本晴」で16個体、「モミロマン」で18個体、「北陸193号」で25個体が得られた。これらの個体の、*HPT* 遺伝子をプローブに用いたサザンブロット解析の結果、ほぼ全ての個体における *Cas9/sgRNA* の導入コピー数は1~3コピーで推移しており、 T_1 世代でのヌルセグリガント化や変異領域の遺伝的固定系統が順調に得ることができた。

同様に *AGPS1* ノックアウト系統は、「日本晴」で16個体、「モミロマン」で11個体、「北陸193号」で37個体が得られた。また、*CRCT* ノックアウト系統については、第2エクソン上の2か所でgRNAの設計を行った。*CRCT gRNA1* では、「日本晴」で19個体、「モミロマン」で11個体得られた（「北陸193号」での作出は行わなかった）。*CRCT gRNA2* をターゲットにしたノックアウト系統は、「日本晴」で14個体、「モミロマン」で8個体、「北陸193号」で27個体得られ、育種素材のラインナップを揃えることができた。

登熟・転流能の維持または向上によりシンク容量を増加させても、収量増加効果が認められる育種素材の作出を最終目標とし、それに向けてインド型多収品種である「北陸193号」および日本型多収品種を原品種としたゲノム編集系統を作出し、変異固定系統の選抜を完了した。最終的に、節間、葉鞘においてデンプン蓄積を抑制し転流糖を増加させるゲノム編集育種素材が、複数の遺伝子ターゲットに対し、複数品種で作出することができた。また、「北陸193号」を原品種として作出されたシンク容量を増加させる *Gn1a-KO* と、今回作出された *AGPS-KO* または *CRCT-KO* 系統との交配系統について、NSC含有量特性を併せ持たせることに成功した。今後、野外栽培等の機会を得て、調査を進めたいと考えている。

加えて、デンプンを含むNSC含有量測定法の改良を行い、節間、葉鞘での形質評価を安定的なものとした。

② 転流・登熟能の維持に配慮したシンク容量向上系統の作出とその評価

アグロバクテリウムによる *CDA/Cas9* の導入により、*CKX2/gRNA1~5* をターゲットにした 変異挿入系統が、「日本晴」、「あきだわら」、「モミロマン」でそれぞれ得られた。「日本晴」および「モミロマン」における *CKX2/gRNA1* での目的通りの変異挿入効率は25.3%、28.3%であった。同様に「日本晴」における *CKX2/gRNA2* での目的とした変異挿入効率は16.8%、*CKX2/gRNA3* で21.1%、*CKX2/gRNA4* で28.2%、*CKX2/gRNA5* で2.3%であった。

2回の野外栽培試験によって得られた収穫物の収量構成要素について、穂の枝梗数の増加に起因する一穂粒数の増加は、*Gn1a-KO* 系統で最も高く、次いで塩基置換による *Gn1a-KD* 系統が、原品種である「あきだわら」と比較して高い結果となった。一株総粒数および粗玄米収量については、原品種と比べてマイルドな *OsCKX2* 活性を持つ *Gn1a-KD* 系統で最も高く、*Gn1a-KO* および *OsCKX2* 活性を大幅に減少させた *Gn1a-KD* 系統では、原品種と比べて差がほぼ認められないか、若干の低下を示した。この原因として、一株穂数の結果が、原品種と比べて *Gn1a-KO* 系統や *CKX2* 活性を大幅に減少させた *Gn1a-KD* 系統では、大幅に

数を減らしていることが認められた。また、これまでの研究で、インド型品種を用いた *Gn1a-KO* 系統では、登熟歩合の低下がみられたが、日本型品種である「あきだわら」では、一部のアミノ酸置換系統以外では、*KO* 系統も含めて大きな低下は認められなかった。

4) 成果活用における留意点

育種素材として本成果を野外等で使用する際には、事前に監督省庁と相談し、担当官の事前アドバイスをもらうこと。

5) 今後の課題

澱粉代謝系遺伝子に対するゲノム編集系統については、圃場での栽培試験で、登熟歩合が低下しないシンク容量向上系統・の作出に繋げられるか、重要なポイントのため、今後機会を得られれば、届出制度を用いて試験栽培を続けていきたいと考えている。

小課題番号	6	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	6 アレルゲン成分を低減した作物		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	北海道大学・植物遺伝資源学・山田哲也		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

ハンノキおよびシラカバ花粉症と交差反応するダイズタンパク質を低減したダイズのゲノム編集個体をCRISPR/Cas9のシステムを利用して作出する。さらに、目的とするタンパク質が低減することおよび低アレルギー性を有することを例証し、社会実装へ向けたダイズゲノム編集個体を育成する。

2) 研究方法

- ・ Gly m 4遺伝子に対する標的配列の選定
ガイドRNA(gRNA)を設計するソフトを用い、*Gly m 4*遺伝子にフレームシフト変異および遺伝子座全体の欠失が期待できるgRNAを設計した。
- ・ ゲノム編集個体の作出
アグロバクテリウムを用いた方法でカリユタカ、iPB法によりユキホマレのゲノム編集個体を作成した。
- ・ ゲノム編集ダイズ種子のアレルゲン欠損性の評価
親品種およびゲノム編集ダイズの種子抽出液に硫酸により分画し、その分画物を各種カラムに供し、抗Gly m 4血清を用いたウェスタンブロットで反応する画分を調製した。
- ・ ゲノム編集ダイズ種子のアレルギー性の評価
親品種およびゲノム編集ダイズの種子抽出液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、ダイズアレルギー患者の血清との反応性をELISA法により評価した
- ・ ダイズアレルゲンのアレルギー性に関わる構造領域
*Gly m 4*変異体およびGly m 4の部分配列の融合タンパク質に対する特異的IgE抗体価をダイズアレルギー患者の血清を用いてELISA法により測定した。

3) 研究結果

- ・ *Gly m 4*遺伝子に対する標的配列の選定
当該遺伝子は隣接する遺伝子座に酷似する配列を有する遺伝子があるため、遺伝子の発現解析および配列の特異性を考慮しながら、第2エキソンに特異的なgRNAおよび当該遺伝子座を挟み込むよう特異的なgRNAを設計した。これらのgRNAについてアグロバクテリウムを介したゲノム編集の場合はバイナリベクターへ導入した。一方、iPB法を介したゲノム編集の場合にはgRNAを受託合成しCas9タンパク質と複合体を形成させた後、ダイズへ導入した。
- ・ ゲノム編集個体の作出

カリユタカにおけるアグロバクテリウムを介したゲノム編集実験から標的領域に8塩基の欠失を有するゲノム編集個体を得た。この個体の後代において導入遺伝子を分離除去したヌルセグリガントを取得し、さらに変異アレルをホモに持つ個体を解析した。ウエスタンブロット解析を行ったところ当該タンパク質が欠失していることを明らかにした。

さらに、社会実装を考慮して現行の優良品種におけるゲノム編集実験を進めた。北海道で主力品種となっているユキホマレを対象とした。ユキホマレはアグロバクテリウムを介したゲノム編集が不可能であったこともあり、iPB法を介してゲノム編集を行った。その結果、エキソン領域に8塩基の欠失および128塩基の断片が挿入された変異アレルを持つゲノム編集個体を得た。これらは個体については後代において変異アレルをホモに持つものを取得した。結果としてフレームシフト変異を有するゲノム編集系統を2系統取得することが出来た。

また、*Gly m 4*遺伝子の両端にgRNAを設計し、同時切断を誘発することで遺伝子座全体を取り除くことを試みた。その結果、1系統のみ当該遺伝座を欠失したゲノム編集個体の作出に成功した。先述で得た2系統と併せ、ウエスタンブロット解析を行ったところ、いずれの系統においても当該タンパク質が欠失していることを明らかにした。

以上より、*Gly m 4*遺伝子に対してカリユタカにおいて1系統、ユキホマレにおいて3系統(いずれも異なる変異アレルを有する)のゲノム編集個体を作成することに成功した。

- ・ゲノム編集ダイズ種子のアレルゲン欠損性の評価

*Gly m 4*のエクソン領域について8塩基欠損させたゲノム編集ダイズの種子および*Gly m 4*を全欠損させたゲノム編集ダイズよりタンパク質を抽出し、抗血清によるウエスタンブロットにより、親品種と比較して非常に弱い反応するバンドを検出した。さらに、種子からの精製を進め、質量分析によりこれらのゲノム編集ダイズ種子において残存する*Gly m 4*様のタンパク質を同定した。

- ・ゲノム編集ダイズ種子のアレルギー性の評価

*Gly m 4*の8塩基欠損させたゲノム編集ダイズの種子および*Gly m 4*を全欠損させたゲノム編集ダイズの種子よりタンパク質を抽出し、ゲルろ過クロマトグラフィーで*Gly m 4*および*Gly m 4*様タンパク質が溶出される画分を調製した。親品種から調製した画分と比較したところ、患者血清中のIgE抗体との反応性が減少していることが示唆された。

- ・ダイズアレルゲンのアレルギー性に関わる構造領域の解析

Bet v 1と*Gly m 4*のアライメント上において共通するアミノ酸残基に着目して解析を行った。構造形成した状態で交差反応に関わる領域を同定するために、共通するアミノ酸残基をアラニン残基に置換したものを大腸菌で発現するコンストラクトを作製した。可溶性画分に見られた組換えタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。ダイズアレルギー患者の血清との反応性を測定したところ、特定の領域に存在する共通するアミノ酸残基を置換することにより、野生型と比較してIgE抗体との結合量が大きく減少することが示された。

一次構造がエпитープになる可能性があるため、5種類の*Gly m 4*断片とMBPの融合タンパク質を調製し、患者血清との反応性を解析した。*Gly m 4*と比較すると、すべての融合タンパク質での患者血清との反応性は低く、患者血清の中には一部の融合タンパク質と反応することが示唆された。

4) 成果活用における留意点

本研究課題で作出されたゲノム編集個体は現時点で社会実装は不可能ではないと考えられるがアレルギー試験においてわずかに反応がみられることから今後の課題にも記載するが改良の余地はあると考えられる。一方、試作した低アレルギーダイズについてダイズ加工を専門とする実需者との協議の上、タンパク質素材としての実装に向けての可能性も併せて検討する。

5) 今後の課題

作出したダイズゲノム編集個体においてアレルギー患者の血清を用いてアレルギー性試験を行うとわずかではあるが反応性が残存することが明らかになった。詳細な解析を進めると、配列が酷似するホモログがゲノム内に存在し、さらにその遺伝子が種子中でわずかではあるが発現していることが明らかになった。よって、さらに低アレルゲン化を進めるためには、このホモログ遺伝子のゲノム編集が必要であると考ええる。また、先述のホモログに関してもゲノム編集によって遺伝子座を取り除いた後、カネカおよび兼松株式会社などダイズと取り扱う民間企業を交え、社会実装について検討する。

小課題番号	7	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	7 晩抽性ダイコンの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	玉川大学・農学部・肥塚信也		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

効率的なダイコンのゲノム編集系を辛味成分など形質評価が容易な遺伝子をターゲットとして確立後、抽台の起こりにくい（晩抽性）ダイコンの研究開発に取り組む。ダイコンは我が国の主要な野菜で可食部である肥大根の特性が重要あり、辛味成分量や品質の良い肥大根などが重要な育種形質である。しかし、ダイコンについては、安定な形質転換系が確立されていないため、ゲノム編集を用いた育種が困難な状況である。一方、ダイコンのゲノム情報は充実しておりゲノム編集のターゲット遺伝子の選定が可能である。本小課題では、本プロジェクト中に開発した形質転換系を用い、辛味成分等に着眼して、これらを支配する遺伝子にゲノム編集を試み、効率的なゲノム編集系を確立する。次に、花芽形成と抽台を制御する遺伝子を同定後に変異を導入、晩抽性ダイコンの新たな育種母本になりうる系統を開発する。これらにより、ダイコンに新たな育種母本を作出することを目的とする。

2) 研究方法

ハツカダイコン、青首ダイコンいずれも、効率の高い形質転換系がプロジェクト開始時には開発されていなかったため、既存のアブラナ属の形質転換法を基本に、様々な条件を検討した。次に、二遺伝子同時編集や大きな欠失変異を導入可能なベクターを作成し、ゲノム編集を試みる。ゲノム編集系統単離後は、ヌルセグリガント系統を選抜し、それらの後代を用いて、実験室内で実施可能な形質評価を行う。

3) 研究結果

辛味成分は既報を基に、晩抽台性を支配する遺伝子については、本課題中に同定後（Mitsui et al. 2023）、標的遺伝子に変異を導入することが達成された。また、ヌルセグリガント系統の単離も成功した。したがって、ダイコンでのゲノム編集を利用した育種の基盤は確立したと考えられる。

4) 成果活用における留意点

変異導入系統の特許化の可能性を実験室での形質評価終了時に判断する必要があると思われる。

5) 今後の課題

形質評価については、まだ不十分であり、プロジェクト終了後も、この点については解析していきたい。本プロジェクトで開発されたダイコンのゲノム編集育種系統の利用については、民間種苗会社等を中心に議論・発展させていきたい。形質評価には、野外試験の重要性が指摘されており、この点についても、今後、積極的に展開したいと考えている。

<引用文献>

Mitsui Y, Yokoyama H, Nakaegawa W, Tanaka K, Komatsu K, Koizuka N, Okuzaki A, Matsumoto T, Takahara M, Tabei, Y (2023) Epistatic interactions among multiple copies of FLC genes with naturally occurring insertions correlate with flowering time variation in radish. *AoB Plants* 15: plac066

小課題番号	8	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	8 香味成分を増加させるために、LFS（催涙因子合成酵素）を抑制したタマネギの研究開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	ハウス食品G本社・基礎研究部・鴨井享宏		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

アグロバクテリウムを利用した方法では、たとえ定常的に発現させたカルスが得られても、ゲノム編集が起き難いことが、これまでの研究で明らかになっていた。そこで、培養を用いずにゲノム編集が可能なiPB法をタマネギに適用するための技術開発と、それを利用したLFS変異系統の作出を行う。また、アグロバクテリウム法に関しては、「編集効率の改善に効果があった」との報告がある、各種の方法（修復酵素阻害剤の利用、翻訳エンハンサーの利用、gRNAの種類など）を検討して、LFS変異系統を作出する。さらに、取得できたゲノム編集植物体については、鍵成分の質的・量的変化を解析する。

2) 研究方法

酵素直接導入法（iPB法）の研究方法

化学合成したgRNA及び、Cas9タンパク質からRNPを形成し、iPB-RNP法を用いてタマネギ茎頂に導入した。導入茎頂より成長させた個体からDNAを抽出し、変異導入の有無をCAPS解析とHMA解析により検出した。得られた変異体については、主にナノポアシーケンス解析により変異の配列を確認した。変異が確認されたE0個体は球の肥大後に春化处理を施し、E1個体となる種子を採種した。得られた種子を播種後に生育した葉部を用いて、上記と同様のステップで解析した。E1個体で変異が引き継がれた個体を対象に、LFS酵素活性測定を行った。

アグロバクテリウム法の研究方法

アグロバクテリウム法に関しては、修復酵素阻害剤としてAzidothymidine (AZT) を検討した。翻訳エンハンサーとしては、東京理科大のdMac3を検討した。gRNAの設計に関しては、同じく東京理科大からアドバイス頂いたgRNAのタンデム化を検討した。デアミナーゼを用いたゲノム編集法については、サポートラボから提供頂いたベクターをタマネギ用に改良して検討した。

3) 研究結果

酵素直接導入法（iPB法）の結果

タマネギにおけるiPB法を確立し、「シャルム」、「オホーツク222」、「もみじ3号」、「札幌黄系統」のタマネギ4品種において、LFS遺伝子をターゲットとしたCRISPR/Cas9 RNPの茎頂への導入を試みた。変異解析の結果、「シャルム」13個体、「オホーツク222」13個体、「もみじ3号」1個体、「札幌黄系統」1個体のE0個体を獲得した。

次世代種子を獲得するための春化条件を検討し、シャルム7個体とオホーツク2個体からE1種子を獲得した。得られたE1種子は主にナノポアシーケンス解析を用いて変異有無を確認し、シャルム1系統（SH-716）とオホーツク1系統（OH-113）で変異が引き継がれたことを確認した。OH-113系統のE1世代7個体について、NGS解析の結果、変異遺伝子率25%が2個体、37.5%が2個体、50%が3個体の3種のパターンが検出された。SH-716系のE1世代16個体では

変異遺伝子率50%が9個体（パターンA 7個体、パターンB 2個体）、62.5% 4個体、75% 3個体の4パターンが検出された。各パターンの代表1個体の葉を用いてLFS酵素活性測定を実施した。その結果、OH-113系統では変異率37.5%の個体で44%の活性低下が観察された（図2）。しかし、SH-716系統ではどの変異パターンの個体でも活性が低下しなかった（図3）。

今回は十分なバルブに至っていない個体の葉を試料とした測定であったため、バルブに育てた鱗茎を測定することで、LFS酵素活性が顕著に低下したデータを得られる可能性があると考えられる。そのため十分なバルブに生育させた後にLFS酵素活性を再度測定し、育種母球に相応しい個体を選定した後にE2種子獲得を予定している。仮にこれらの個体から育種母球が得られなかった場合は、現在獲得済みのE0個体よりE1を採種し、再び母球候補を選定することを想定している。

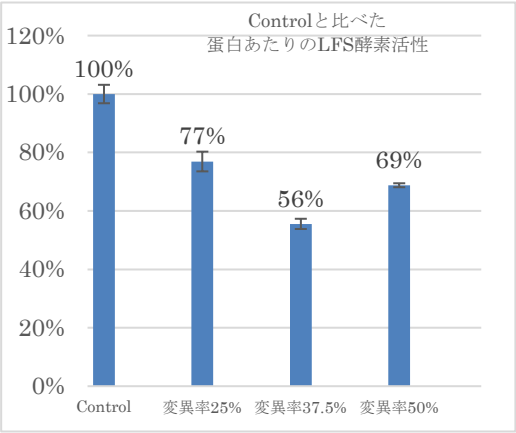


図2 OH-113 E1系統のLFS酵素活性測定

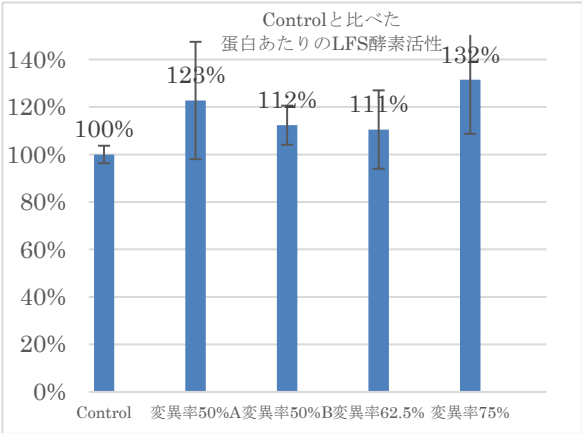


図3 SH-716 E1系統のLFS酵素活性測定

令和5年度までの打ち込み実験の処理茎頂数と解析個体数、E0変異検出個体数、さらにE1個体の解析系統数、変異検出系統数を下記に示す（表1）

表1 打ち込み実験の実績

年度	品種	処理茎頂数	E0 (個体数)			E1(系統数)	
			解析	変異検出	種子獲得	解析	変異検出
R1	シャルム	866	68	3 (枯死3)	-	-	-
R2	シャルム	1711	556	10 (枯死3)	7	7	1
R3	シャルム	439	75	0	-	-	-
	もみじ	1105	274	1(枯死1)	-	-	-
	オホーツク	793	470	8	2	2	1
R4	オホーツク	1548	108	1(枯死1)	-	-	-
	札幌黄系統雄性不稔親(Aライン)	636	43	0	-	-	-
	札幌黄系統維持花粉親(Bライン)	743	126	1	-	-	-
R5	シャルム	112	未解析	-	-	-	-
	オホーツク	1045	204	4	-	-	-
	札幌黄系統雄性不稔親(Aライン)	301	未解析	-	-	-	-
	札幌黄系統維持花粉親(Bライン)	297	未解析	-	-	-	-

アグロバクテリウム法の結果

アグロバクテリウム法におけるゲノム編集の効率化の検討では、gRNAのタンデム化が最も効果的であることが分かった。ゲノム編集が観察されたカルスから植物体を再生させ、容器内で長期間培養したり、鉢上げ後に栽培したりして、直径30mm程度のバルブを調製した。しかし、花芽誘導用にバルブを乾燥させている段階や、低温処理中に腐敗や枯死してしまったため、次世代を得るための花芽誘導は、達成することができなかった。乾燥や低温処理に耐えられる大型のバルブが調製できなかった原因は、カルスからの再分化植物体の生育が、実生苗に比べ著しく遅いためであった。酵素直接導入法で、ゲノム編集されたE1個体が得られているので、アグロバクテリウム法での検討はT0バルブの特性確認で終了する事にした。

得られたT0バルブを解析した結果、ゲノム編集の割合が高い株程、LFS活性も低下していることが分かった。LFS酵素活性以外の特性研究は引き続き行う予定である。

4) 成果活用における留意点

アグロバクテリウム法ではカルス状態での培養期間に留意する必要がある。理論上ゲノム編集ツールがT-DNAとして宿主植物体の染色体上に組み込まれている限り、細胞分裂のタイミングでツールが機能して変異が生じると期待される。当チームではゲノム編集効率が高くなるまで数年もの間、カルスの状態で維持し継代培養を繰り返してきた。しかしながら、その継代を経て再分化してきた植物体は著しく生育スピードが遅くなり、自然光の下では鱗茎が十分な大きさに肥大する前に地上部が倒伏してしまい、花芽誘導が期待できる大きさのバルブを獲得することができなかった。カルス状態の期間をできるだけ短くして再分化させ、早く次世代の種子を取得することが重要であると考ええる。

5) 今後の課題

今後の課題として、野外での栽培適性や収量、及びその収穫物の特性把握が残っている。

小課題番号	9	小課題 研究期間	令和元～5年度
小課題名	9 サポートラボ		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	農研機構生物機能利用研究部門・作物ゲノム編集研究 領域・雑賀啓明		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

当小課題では、これまでの経験を活かし、各小課題で進められているゲノム編集作物開発の技術サポートを行う。また、以下の2点に着目した技術開発を行う。

① CRISPR-Cas9のガイドRNA (gRNA)・タンパク質複合体 (RNP) を直接導入する技術の開発やその応用に対する需要が高まっていることから、RNPを用いたゲノム編集法を開発する。

② 国産のゲノム編集技術であり、動物培養細胞において特徴的なゲノム編集活性を示すCRISPR-Cas3 システム (Morisaka et al., (2019)) が植物のゲノム編集に利用可能か検証する。

2) 研究方法

① RNPを用いたゲノム編集法の開発

大腸菌で各種Casタンパク質を大量発現させるためのベクターを構築した。構築したベクターを用いて、RNPを用いたゲノム編集に必要なCasタンパク質を合成・精製した。シロイヌナズナの葉からプロトプラストを調製し、PEG法により精製したCasのRNPを導入した。導入後2日間培養したプロトプラストからDNAを抽出し、PCRやサンガーシーケンス等により変異導入の可否を調べた。

② CRISPR-Cas3の植物への適用

外来遺伝子もしくは内在性遺伝子を標的とするCas3発現ベクターを構築した。アグロバクテリウム法によりイネカルスに形質転換し、得られた形質転換カルスや再分化植物体からDNAを抽出し、PCRやサンガーシーケンス等により変異導入の可否を調べた。同様にタバコ葉切片に形質転換し、変異導入の可否を調べた。

3) 研究結果

① RNPを用いたゲノム編集法の開発

広く利用されているSpCas9 (*Streptococcus pyogenes*由来のCas9) は標的配列に隣接するPAM配列 (5'-NGG-3') を認識することから、SpCas9によって切断できる配列が制限される。これまでに、アミノ酸置換によりPAM配列認識能を改変することにより、従来の4倍の領域を標的として認識できる改良型SpCas9 (SpCas9-NG) が開発されている (Nishimasu et al., (2018))。そこで、標的配列の制限を緩和することでより多くの部位を標的にすることが可能なRNPツールとして、SpCas9-NGタンパク質を合成した。

合成したSpCas9-NGタンパク質は*in vitro*で標的DNAを切断する活性は有していたが、

野生型SpCas9タンパク質よりもDNA切断活性が低い傾向が見られた。そこで、SpCas9-NGのRNPを用いたゲノム編集の高効率化のため、Proximal-CRISPR法（Chen et al., (2017)）が適用できないか検討した。

Proximal-CRISPR法は、変異を導入したい位置の近傍にCas9を結合させ、Cas9が有するヘリカーゼ活性を利用してクロマチン構造を開くことにより、ゲノム編集効率を向上させる方法である。まず、Proximal-CRISPR法においてクロマチン構造を開くために必要なCasタンパク質として、DNA切断ドメインにアミノ酸置換を導入してDNA切断活性をなくしたdead SpCas9（dSpCas9）を合成した。次に*BRI1*遺伝子、*AAP2*遺伝子を標的とするgRNAを合成し、dSpCas9またはSpCas9のRNPを作製したのち、シロイヌナズナのプロトプラストに共導入する一過的ゲノム編集実験を行なった。その結果、SpCas9と複合体を形成させたgRNAの標的配列には変異が導入されたが、dSpCas9と複合体を形成させたgRNAの標的配列には変異が導入されなかった。この結果は、細胞内においてCas9とgRNAの乖離と結合が可逆的に生じていないことを示している。最後に、*AAP2*遺伝子を標的とするgRNAを複数合成し、dSpCas9とgRNAのRNP2種類と、SpCas9とgRNAのRNP1種類の計3種類のRNPをシロイヌナズナプロトプラストに導入した。その結果、Proximal-CRISPR法によりゲノム編集効率が低下した標的があった一方、Proximal-CRISPR法によりゲノム編集効率が2倍に上昇した標的もあった。以上の結果から、すべての標的に適用できるとは限らないが、標的によってはProximal-CRISPR法によりRNPを用いたゲノム編集の効率を改善できることを実証した。

② CRISPR-Cas3の植物への適用

CRISPR-Cas3が植物のゲノム編集に利用できるかを検討するため、単子葉植物のモデルであるイネを材料に、CRISPR-Cas3によるゲノム編集実験を行った。

CRISPR-Cas3の構成要素である6種類のCasタンパク質（Cas3、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas11）をイネカルスで高発現させるためのベクターを構築した。まず、ルシフェラーゼ遺伝子に変異が導入された細胞を可視的に区別するモデル実験システムを作出した。この実験システムのカルスに対し、ルシフェラーゼ遺伝子を標的としたCRISPR-Cas3発現ベクターを導入した結果、一部の形質転換カルスではルシフェラーゼによる発光の消失が観察された。また、シーケンス解析の結果から、発光が消失した細胞において、ルシフェラーゼ遺伝子に1kbを超える欠失が生じていることが確認された。次に、イネ内在性の*PDS*遺伝子を標的としたCRISPR-Cas3発現ベクターを構築し、イネカルスに形質転換したところ、カルスや再分化個体の一部で白色化が確認された。*PDS*遺伝子はノックアウトにより白色化することが知られていることから、CRISPR-Cas3により、*PDS*遺伝子にbiallelicな変異が導入されていることが示唆された。また、サンガーシーケンス解析やサザンブロット解析等により、イネ*PDS*遺伝子に数kbの欠失が生じていることが明らかになった。さらに、*PDS*遺伝子外のイネ内在性遺伝子を標的としたCRISPR-Cas3実験を行い、各標的遺伝子に欠失が生じたことが確認された。以上の結果から、CRISPR-Cas3がイネの内在性標的遺伝子への欠失導入に利用できることを実証した。

同様に、双子葉植物のモデルであるタバコを材料に、Cas3 によるゲノム編集実験を行った。SSAレポーターへの切断活性は確認されたが、現時点では内在遺伝子である*PDS*への変異導入の確認には至っていない。

上記の研究を含め、研究課題促進に資するCas発現ベクターを4セット、Casタンパク質を5セット整備した。また、上記のベクターやタンパク質を含め、のべ12課題への技術サポートを行った。

4) 成果活用における留意点

開発した技術の産業利用に際しては基本特許に留意する必要がある。

5) 今後の課題

本課題において、Proximal-CRISPR法によるRNPを用いたゲノム編集法やCRISPR-Cas3によるゲノム編集法について、シロイヌナズナやイネ等のモデル植物での実証例を示すことに成功した。今後は、他の遺伝子座での検証や、様々な作物種での実施例を積み重ねることにより、技術の適用幅や汎用性を調べる必要がある。

<引用文献>

Chen F, Ding X, Feng Y, Seebeck T, Jiang Y, Davis GD. (2017) Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat Commun.* 8:14958

Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y, Gee P, Kunihiro Y, Sonpho E, Xu H, Sasakawa N, Naito Y, Nakada S, Yamamoto T, Sano S, Hotta A, Takeda J, Mashimo T. (2019) CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun.* 10:5302

Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. (2018) Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science.* 361:1259-1262

Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

個別課題番号

19191192

課題名

ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発(包括)

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		PCT	報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得					
19191192	6	19	65	6	12	2	0	0	0	0	12	4	1	20

(1)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻(号)	掲載ページ
1	②	ゲノム編集を巡る最近の動き	梅基直行	理化学研究所	いも類振興情報	なし	2020	1	142号	35-41
2	②	ゲノム編集によるジャガイモの品種改良	梅基直行	理化学研究所	機能性食品と薬理栄養	なし	2020	2	13(4)	215-219
3	①	Targeted genome editing in tetraploid potato through transient TALEN expression by Agrobacterium infection	Shuhei Yasumoto, Satoru Sawai, Hyoun Jae Lee, Masaharu Mizutani, Kazuki Saito, Naoyuki Umemoto, Toshiya Muranaka	大阪大学、神戸大学、理化学研究所	Plant Biotechnology	https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0525a	2020	6	37(2)	205-211
4	②	安全で効果的な赤かび病防除剤の開発に向けて	西内巧、木村真	金沢大学、名古屋大学	JSMマイコトキシン	https://doi.org/10.2520/myco.71-1-1	2021	2	71(1)	13-19
5	①	Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme	Satoru N Takeda, Ryoya Nakagawa, Sae Okazaki, Hisato Hirano, Kan Kobayashi, Tsukasa Kusakizako, Tomohiro Nishizawa, Keitaro Yamashita, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki	東京大学	Molecular Cell	10.1016/j.molcel.2020.11.035	2021	2	81(3)	558-570
6	①	The biosynthetic pathway of potato solanidanes diverged from that of spirostanes due to evolution of a dioxygenase	Akiyama Rら	神戸大学 理化学研究所 大阪大学	Nature Communications	https://doi.org/10.1038/s41467-021-21546-0	2021	2	12	1300
7	①	Chromosome-scale genome assembly of the transformation-amenable common wheat cultivar 'Fielder'.	Sato K ら	岡山大学 農研機構	DNA Research	https://doi.org/10.1093/dnares/dsab008	2021	6	28(3)	dsab008
8	②	ジャガイモのゲノム編集の現在と未来	梅基直行	理化学研究所	いも類振興情報	なし	2021	7	148号	8-15

9	①	Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene StSBE3 that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system	Ami Takeuchi, Mariko Ohnuma, Hiroshi Teramura, Kenji Asano, Takahiro Noda, Hiroaki Kusano, Koji Tamura, Hiroaki Shimada	東京理科大学 農研機構	Plant Biotechnology	https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0727a	2021	9	38(3)	345-353
10	①	Tomato E8 encodes a C-27 hydroxylase in metabolic detoxification of α -tomatine during fruit ripening	Akiyama Rō	神戸大学 理化学研究所 大阪大学	Plant and Cell Physiology	https://doi.org/10.1093/pcp/pcab080	2021	6	62(5)	775-783
11	②	Genome editing technology and its application to metabolic engineering in rice	Satoru Sukegawa Seiichi Toki and Hiroaki Saika	農研機構	Rice	10.1186/s12284-022-00566-4	2022	4	15(1)	21
12	①	Procedure for the efficient acquisition of progeny seeds from crossed potato plants grafted onto tomato	Ami Takeuchi, Mariko Ohnuma, Hiroshi Teramura, Kenji Asano, Takahiro Noda, Hiroaki Kusano, Koji Tamura, Hiroaki Shimada	東京理科大学	Plant Biotechnology	10.5511/plantbiotechnology.21.1119a	2022	6	39(2)	195-197
13	①	Structure of the type V-C CRISPR-Cas effector enzyme	Nina Kurihara, Ryoya Nakagawa, Hisato Hirano, Sae Okazaki, Atsuhiko Tomita, Kan Kobayashi, Tsukasa Kusakizako, Tomohiro Nishizawa, Keitaro Yamashita, David A. Scott, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki,	東京大学	Molecular Cell	10.1016/j.molcel.2022.03.006	2022	5	82(10)	1865-1877
14	①	Structure of the Dicer-2-R2D2 heterodimer bound to small RNA duplex	Sonomi Yamaguchi, Masahiro Naganuma, Tomohiro Nishizawa, Tsukasa Kusakizako, Yukihide Tomari, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki	東京大学	Nature	10.1038/s41586-022-04790-2	2022	7	607(7918)	393-398
15	①	Genome editing in rice mediated by miniature size Cas nuclease SpCas12f	Satoru Sukegawa, Osamu Nureki, Seiichi Toki, Hiroaki Saika	農研機構 東京大学	Frontiers in Genome Editing	10.3389/fgeed.2023.1138843	2023	3	5	1138843
16	①	Epistatic interactions among multiple copies of FLC genes with naturally occurring insertions correlate with flowering time variation in radish	Yuki Mitsui, Hinano Yokoyama, Wataru Nakaegawa, Keisuke Tanaka, Kenji Komatsu, Nobuya Koizuka, Ayako Okuzaki, Takashi Matsumoto, Manabu Takahara, Yutaka Tabei	東京農業大学 玉川大学 農研機構 東洋大学	AoB PLANTS	10.1093/aobpla/plac066	2023	2	15(2)	plac066
17	②	ゲノム編集ジャガイモの現状と今後の展望	安本周平、村中俊哉	大阪大学	アグリバイオ	なし	2023	10	7(13)	1108-1114

18	①	Integrated gene-free potato genome editing using transient transcription activator-like effector nucleases and regeneration-promoting gene expression by Agrobacterium infection	Naoyuki Umemoto, Shuhei Yasumoto, Munee Yamazaki, Kenji Asano, Kotaro Akai, Hyoun Jae Lee, Ryota Akiyama, Masaharu Mizutani, Yozo Nagira, Kazuki Saito, Toshiya Muranaka	理研,阪大,農研機構,神戸大,カネカ	Plant Biotechnology	10.5511/plantbiotechnology.23.0530a	2023	9	40	211-218
19	①	Peculiar properties of tuber starch in a potato mutant lacking the α -glucan water dikinase 1 gene GWD1 created by targeted mutagenesis using the CRISPR-dMac3-Cas9 system.	Mariko Ohnuma, Kosuke Ito, Karin Hamada, Ami Takeuchi, Kenji Asano, Takahiro Noda, Akira Watanabe, Akiko Hokura, Hiroshi Teramura, Fuminori Takahashi, Hiromi Mutsuro, Koji Tamura, Hiroaki Shimada.	東京理科大学 農研機構 東京電機大学	Plant Biotechnology	10.5511/plantbiotechnology.23.0823a	2023	9	40	219-227
20	①	Efficiency of potato genome editing: targeted mutation on the genes involved in starch biosynthesis using the CRISPR/dMac3-Cas9 system	Hiroaki Kusano, Ami Takeuchi, Hiroaki Shimada	東京理科大学	Plant Biotechnology	10.5511/plantbiotechnology.23.0611a	2023	9	40	201-209
21	②	ムギ類の重要形質と育種	佐藤和広	岡山大学	JSMマイコトキシン	10.2520/myco.74-1-1	2023	11	74(1)	19-23
22	②	Recent advances in the improvement of soybean seed traits by genome editing.	Jaechol Sim, Chikako Kuwabara, Shota Sugano, Kohei Adachi, Tetsuya Yamada	北海道大学	Plant Biotechnology	10.5511/plantbiotechnology.23.0610a	2023	9	40	193-200
23	①	Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3	Ryoya Nakagawa, Soumya Kannan, Han Altae-Tran, Satoru N Takeda, Atsuhiko Tomita, Hisato Hirano, Tsukasa Kusakizako, Tomohiro Nishizawa, Keitaro Yamashita, Feng Zhang, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki	東京大学	Molecular Cell	10.1016/j.molcel.2022.08.001	2022	9	82(17)	3178-3192
24	①	Cryo-EM structure of the transposon-associated TnpB enzyme	Nakagawa R, Hirano H, Omura SN, Nety S, Kannan S, Altae-Tran H, Yao X, Sakaguchi Y, Ohira T, Wu WY, Nakayama H, Shuto Y, Tanaka T, Sano FK, Kusakizako T, Kise Y, Itoh Y, Dohmae N, van der Oost J, Suzuki T, Zhang F, Nureki O	東京大学	Nature	10.1038/s41586-023-05933-9	2023	4	616(7956)	390-397

25	①	An AsCas12f-based compact genome-editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis	Hino T, Omura SN, Nakagawa R, Togashi T, Takeda SN, Hiramoto T, Tasaka S, Hirano H, Tokuyama T, Uosaki H, Ishiguro S, Kagieva M, Yamano H, Ozaki Y, Motoooka D, Mori H, Kirita Y, Kise Y, Itoh Y, Matoba S, Aburatani H, Yachie N, Karvelis T, Siksnyš V, Ohmori T, Hoshino A, Nureki O	東京大学	Cell	10.1016/j.cell.2023.08.031	2023	10	186(22)	4920-4935
----	---	---	---	------	------	----------------------------	------	----	---------	-----------

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	ハツカダイコンの形質転換を目指した細胞培養系の開発に向けて	松本隆、武藤直氣、〇肥塚信也	玉川大学、東京農業大学	第37回日本植物細胞分子生物学会大会	2019	9
2	Plant Genome Engineering to Minimize Anti-Nutritional Metabolites	MURANAKA Toshiya	大阪大学	IFT20	2020	7
3	食物アレルギー診断における抗原解析	丸山 伸之	京都大学	第35回日本ゴマ科学会大会	2020	10
4	ゲノム編集ツール開発と医療への応用戦略	濡木理	東京大学	農芸化学会公開オンラインシンポジウム	2020	10
5	CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による高アミロースジャガイモ変異体の作出	竹内 亜美、大沼 万里子、寺村 浩、島田 浩章	東京理科大学	日本農芸化学会関東支部大会	2020	11
6	Redesign of terpenoid biosynthetic pathway in plant by genome editing	Toshiya MURANAKA	Osaka University	2020 International Conference of the Korean Society of Plant Biologists	2020	11
7	CRISPR-Casの分子機構と立体構造に基づく理論的な新規ゲノム編集ツールの開発	濡木理	東京大学	千里ライフサイエンスセミナー	2020	11
8	不思議の国のdMac3	島田 浩章	東京理科大学	第9回植物RNA研究ネットシンポジウム	2020	12
9	CRISPR/ Cas9法によるハツカダイコンのミロシナーゼ遺伝子への変異導入	奥崎文子、小松憲治、武藤直氣、柏木晴菜、三井裕樹、高原学、田部井豊、松本隆、肥塚信也	玉川大学、東京農業大学、農研機構	日本育種学会第139回講演会	2021	3
10	「ゲノム編集による毒をつくらないジャガイモの開発」	梅基直行	理化学研究所	フード・フォーラム・つくば フードセーフティ分科会(公社)日本分析化学会表示・起源分析技術研究懇談会 ジョイントシンポジウム	2021	3
11	モチのデンプン形質を示すジャガイモGBSSヌルセグリガント変異体の作出	島田浩章、朝日貴大、大久保雪乃、赤津優菜、浅野賢治、野田高弘	東京理科大学、農研機構	日本ゲノム編集学会第6回大会	2021	6
12	ジャガイモのアミロペクチン合成に関わるデンプン枝つけ酵素遺伝子欠損変異体の作出と形質の評価	竹内亜美、浅野賢治、野田高弘、草野博彰、大沼万里子、寺村浩、島田浩章	東京理科大学、農研機構	日本ゲノム編集学会第6回大会	2021	6

13	研究目的でのゲノム編集ジャガイモの野外栽培試験の届出(2021年4月5日)	梅基直行,安本周平,山崎宗郎,浅野賢治,赤井浩太郎,李榮宰,秋山遼太,水谷正治,柳楽洋三,斉藤和季,村中俊哉	理研, 阪大, 農研機構, 神戸大, カネカ	日本ゲノム編集学会第6回大会	2021	6
14	大豆アレルゲン Gly m 4 のエピトープ解析	田家 彩佳, 山田 哲也, 福富 友馬, 丸山 伸之	京都大学、北海道大学、国立病院機構 相模原病院	第75回日本栄養・食糧学会大会	2021	7
15	CRISPR/Cas9を用いたダイズのアレルゲンGly m 4をコードする遺伝子への変異誘発	檜原 美樹, 丸山 伸之, 阿部 純, 山田 哲也	北海道大学, 京都大学	日本育種学会第140回講演会	2021	9
16	CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による高アミロースジャガイモ変異体の作出	竹内 亜美、浅野 賢治、野田 高弘、草野 博彰、大沼 万里子、高橋 史憲、田村 浩二、島田 浩章	東京理科大学、農研機構	日本農芸化学会関東支部2021年度大会	2021	8
17	ゲノム編集によるジャガイモのデンプン合成系遺伝子の変異体作出と塊茎形質の改変	竹内亜美、朝日貴大、大久保雪乃、赤津優菜、濱田香凜、伊藤広輔、浅野賢治、野田高弘、大沼万里子、寺村浩、田村浩二、高橋史憲、島田浩章	東京理科大学、農研機構	第38回日本植物バイオテクノロジー学会	2021	9
18	ゲノム編集によるジャガイモのデンプン枝つけ酵素遺伝子StSBE3欠損変異体の作出と形質の評価	竹内亜美、浅野賢治、野田高弘、草野博彰、大沼万里子、高橋史憲、田村浩二、島田浩章	東京理科大学、農研機構	第38回日本植物バイオテクノロジー学会	2021	9
19	研究目的でのゲノム編集ジャガイモの野外栽培試験の届出(2021年4月5日)	梅基直行,安本周平,山崎宗郎,浅野賢治,赤井浩太郎,李榮宰,秋山遼太,水谷正治,柳楽洋三,斉藤和季,村中俊哉	理研, 阪大, 農研機構, 神戸大, カネカ	第38回日本植物バイオテクノロジー学会	2021	9
20	ダイコンにおける不定芽分化系の開発と遺伝子導入の試み	高原 学、奥崎 文子、小松 憲治、三井 裕、松本 隆、肥塚 信也、田部井 豊	農研機構、東京農大、玉川大学	第140回日本育種学会	2021	9
21	種子休眠性を改変したゲノム編集コムギの野外栽培実験の紹介	加星光子、安倍史高、蝶野真喜子、森山力、田部井豊、久野裕、佐藤和広	農研機構、岡山大学	2021年度穂発芽研究会	2021	11
22	グリーンイノベーションに資する植物精密ゲノム編集技術	遠藤 真咲、横井 彩子	農研機構	植物科学シンポジウム2021	2021	11
23	種子休眠性を改変したゲノム編集コムギの野外栽培実験の紹介	加星光子、安倍史高、蝶野真喜子、森山力、田部井豊、久野裕、佐藤和広	農研機構、岡山大学	第16回ムギ類研究会	2021	12
24	農作物へのゲノム編集技術の現状と今後の応用展開	村中俊哉	大阪大学	第37回食品化学シンポジウム	2021	12
25	DNAベクターの一過性発現系を用いたコムギTaAP2遺伝子miR172結合部位への標的塩基置換の導入	小川 泰一、根岸克弥、安倍史高、土岐精一	農研機構	日本育種学会	2022	3
26	イネ短葯変異体sanの原因遺伝子の同定	黒羽 剛、ロンバルド ファビエン、野坂亮仁、チェチエカ スペトラーナ、吉田均	農研機構	日本育種学会 第141回講演会	2022	3

27	ジャガイモへのゲノム編集技術の現状と今後の応用展開	村中俊哉	大阪大学	第37回資源植物科学シンポジウム・第13回植物ストレス科学研究シンポジウム	2022	2
28	小型Casタンパク質Cas12fによるイネの標的変異導入	助川 聖、濡木理、土岐 精一、雑賀 啓明	農研機構、東京大学	第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会	2022	9
29	Research and products for near-term marketability: Challenges and opportunities	村中俊哉	大阪大学	"Policy considerations for Gene editing: The Asian & Australian Perspective" workshop	2022	8
30	天然毒素を低減したジャガイモの開発と栽培試験の着手	村中俊哉	大阪大学	日本食品科学工学会 第69回大会	2022	8
31	高効率ゲノム編集技術の確立とこれを利用したジャガイモ塊茎デンプンの代謝工学	島田浩章	東京理科大学	日本ゲノム編集学会第7回大会	2022	6
32	形質転換／ゲノム編集ジャガイモ・トマト作出への新戦略。シンポジウム「成功例から学ぶ組織培養・形質転換系を自ら構築するためのキーポイント」	島田浩章	東京理科大学	第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会	2022	9
33	ジャガイモ塊茎デンプンの代謝工学に向けた高効率ゲノム編集技術の開発	竹内亜美	東京理科大学	第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会	2022	9
34	ゲノム編集による天然毒素を減らしたジャガイモの作出	安本周平	大阪大学	令和4年度 第1回「生体・バイオ工学」グループフォーラム	2022	9
35	ユーストマの組織培養・形質転換系の効率化 -効率を左右するさまざまな要因について- シンポジウム「成功例から学ぶ組織培養・形質転換系を自ら構築するためのキーポイント」	大坪憲弘	京都府立大学	第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会	2022	9
36	ゲノム編集による新規なデンプン形質を有するジャガイモ変異体の作出	島田 浩章, 竹内 亜美, 浅野 賢治, 野田 高弘, 草野 博彰, 大沼 万里子, 寺村 浩, 朝日 貴大, 大久保 雪乃, 赤津 優菜, 伊藤 広輔, 濱田 香凜, 保倉 明子	東京理科大学、農研機構	日本育種学会第142回講演会	2022	9
37	コムギTaNXFL1による赤かび病抵抗性の制御機構の解析	江畑龍太郎、ヤシール・シディク、中野正貴、玉置大介、加星光子、安倍史高、佐藤和広、西内巧	金沢大学、農研機構、岡山大学	第4回北陸線植物バイオサイエンス研究会	2022	11
38	コムギTaNXFL1変異体における赤かび病抵抗性の向上とかび毒蓄積の低減化	西内巧、ヤシール・シディク、中野正貴、玉置大介、江畑龍太郎、加星光子、安倍史高、佐藤和広	金沢大学、農研機構、岡山大学	第88回日本マイコトキシ学会	2023	1
39	ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発	村中俊哉	大阪大学	遺伝子研究安全管理協議会 安全研修会	2022	11
40	ゲノム編集技術を活用したジャガイモ育種素材の開発	村中俊哉	大阪大学	2022年度ポテトフォーラム	2022	12

41	ゲノム編集技術で作出したSGA低生性 ジャガイモに係る手続き	梅基直行	理研	遺伝子研究安全管理協議会 安全研修会	2022	11
42	穂発芽耐性コムギの開発と今後の展望	安倍史高	農研機構	植物科学シンポジウム2022	2022	12
43	ゲノム編集によって作出されたTaQsd1三重変異体の野外栽培での休眠性評価	加星光子、安倍史高、蝶野真喜子、久野裕、佐藤和広	農研機構、岡山大学	第17回ムギ類研究会	2022	12
44	ゲノム編集効率が高い標的配列を選ぶには？ ーシロイヌナズナ 網羅的変異解析で見えてきたことー	遠藤真咲、根岸克弥、孫健強、鐘ヶ江弘美、土岐精一	農研機構	第39回日本植物バイオテクノロジー学会	2022	9
45	“ゲノム編集が引き出す植物のポテンシャル ーゼロエミッション、マイナスエミッションに向けてー”	遠藤真咲	農研機構	2022年日本農学シンポジウム	2022	10
46	CRISPR/Cas3によるイネ内在性遺伝子のノックアウト	雑賀啓明、安本周平、村中俊哉、吉見一人、真下知士、土岐精一	農研機構、大阪大学、東京大学	日本育種学会第143回講演会	2023	3
47	コムギTaAP2遺伝子miR172結合部位の標的塩基置換が薬抽出に及ぼす影響	小川 泰一、根岸克弥、安倍史高、土岐精一	農研機構	日本育種学会 第143回講演会	2023	3
48	ゲノム編集で作出したTaQsd1三重変異を持つコムギの野外栽培での休眠性評価	加星光子、安倍史高、蝶野真喜子、久野裕、佐藤和広	農研機構、岡山大学	日本育種学会 第143回講演会	2023	3
49	イネ短葯変異体の原因遺伝子SAN の機能解析	黒羽 剛・野坂 亮仁・木水 真由美・チェェトカ スペトラーナ・吉田 均	農研機構	日本育種学会 第143回講演会	2023	3
50	ゲノム編集によるバレイショ育種の現状と課題	梅基直行	理研	食品新技術研究会	2023	1
51	Proxy-CRISPR法を用いたゲノム編集効率の向上	遠藤真咲ら	農研機構	第64回 日本植物生理学会	2023	3
52	iPB-RNP法を用いた低アレルゲンダイズの作出	茶谷信哉、桑原慎子、檜原美樹、丸山伸之、山田哲也	北海道大学、京都大学	日本育種学会 第143回 講演会	2023	3
53	Cas12fやCas3を用いたイネの標的変異導入	雑賀啓明、助川聖、濡木理、安本周平、村中俊哉、吉見一人、真下知士、土岐精一	農研機構、大阪大学、東京大学	日本ゲノム編集学会第8回大会	2023	6
54	ジャガイモのゲノム編集システムの開発とデンブン変異体の作出	島田浩章	東京理科大学	令和5年度日本応用糖質科学東日本支部シンポジウム	2023	6
55	CRISPR/dMac3-Cas9システムによるジャガイモ α -glucan water dikinase 1遺伝子の変異体の作出とデンブン形質の解析	島田 浩章、伊藤広輔、濱田香凜、竹内亜美、浅野賢治、野田高広、渡辺光、保倉明子、寺村浩	東京理科大学、農研機構、東京電機大学	第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会	2023	9

56	イネにおけるゲノム編集を利用した育種素材の作出	小松 晃	農研機構	令和5年度日本応用糖質科学東日本支部シンポジウム	2023	6
57	イネの稈、葉鞘での澱粉蓄積を抑制したゲノム編集系統の作出と特性解析	小松 晃、大武美樹、永田真紀、堤 浩一、谷口洋二郎、近藤始彦	農研機構、名古屋大学	第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会	2023	9
58	高濃度硫酸銅添加による <i>Eustoma grandiflorum</i> の形質転換系の効率化と液体培養実生を用いた簡便な形質転換手法の開発	大坪憲弘、片岡千佳、新保由紀子、大坪真樹、足立浩崇、大沼紀子、藤田和義、河西崇、坂口公敏	京都府立大学、ミヨシ	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会	2023	9
59	ユリ花被の老化制御遺伝子の特定とゲノム編集による花被の老化を遅延したユリの作出	渋谷健市、佐藤和人、野水利和、奥原宏明、近藤正剛、小林仁	農研機構、新潟県農総研	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会	2023	9
60	ユリにおける高効率形質転換系の開発とゲノム編集	野水利和、佐藤和人、渋谷健市	農研機構、新潟県農総研	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会 シンポジウム	2023	9
61	ステロイドグリコアルカロイド低生産性ゲノム編集バレイショ(品種さやか)の屋外栽培試験	山崎 宗郎、浅野 賢治、赤井 浩太郎、梅基 直行、斉藤 和季、安本 周平、村中 俊哉	農研機構、理研、大阪大学	日本育種学会 第144回講演会(令和5年度秋季大会)	2023	9
62	ポリアミン類を用いたコムギ赤かび病の防除とかび毒蓄積の低減化	江畑龍太郎、中野正貴、玉置大介、加星光子、安倍史高、佐藤和広、西内 巧	金沢大学、農研機構、岡山大学	第89回日本マイコキシン学会	2023	8
63	Engineering of Triterpenoid Biosynthesis Both in Plants and Yeast toward Health	村中俊哉	大阪大学	IAPB2023 The 15th International Association for Plant Biotechnology Congress (Daejeon, Korea)	2023	8
64	Field cultivation trial of <i>TaQsd1</i> genome-edited wheat	Fumitaka Abe, Mitsuko Kishi-Kaboshi, Nami Yamaji, Makiko Chono, Hiroshi Hisano, Kazuhiro Sato	農研機構、岡山大学	The 15th International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals	2023	10
65	Genome editing of <i>TaQsd1</i> in common wheat	Fumitaka Abe, Mitsuko Kishi-Kaboshi, Nami Yamaji, Makiko Chono, Hiroshi Hisano, Kazuhiro Sato	農研機構、岡山大学	The 3rd Barley Mutant Conference	2023	10
66	形質転換が難しいタマネギのキーポイント	鴨井享宏	農研機構、ハウス食品グループ本社(株)	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会 シンポジウム	2023	9
67	Plant genome editing using CRISPR/Cas3 and CRISPR/Cas12f	Hiroaki Saika, Satoru Sukegawa, Osamu Nureki, Shuhei Yasumoto, Toshiya Muranaka, Kazuto Yoshimi, Tomoji Mashimo, Seiichi Toki	農研機構、大阪大学、東京大学	第65回日本植物生理学会年会	2024	3
68	ジャガイモでのターゲット遺伝子の発見から圃場試験までの道筋	安本周平	大阪大学	第5回産学官協力セミナー「ゲノム編集を農作物に試してみようーゲノム編集研究のデザインから野外での検証ー」	2023	11
69	ゲノム編集技術を活用したジャガイモ育種素材の開発とゲノム編集ジャガイモ中の外来核酸検出法の検討	安本周平	大阪大学	第87回日本育種学会四国談話会公開シンポジウム	2023	11

70	ダイズのゲノム編集を実装するための工夫	山田哲也	北海道大学	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉) 大会 シンポジウム	2023	9
71	アブラナ科作物の核及びオルガネラ遺伝子の標的変異導入	肥塚信也	玉川大学	第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉) 大会 シンポジウム	2023	9

(3)出版図書

区分:①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	アグリバイオ(特集／多収イネの開発と将来展望／様々な技術を活用したイネの収量向上戦略【総論】)	小松 晃	農研機構	北隆館	2020	6
2	②	アグリバイオ(特集／多収イネの開発と将来展望／ゲノム編集技術によるイネの収量向上の試み【各論】)	小松 晃	農研機構	北隆館	2020	6
3	②	アグリバイオ(特集／ダイズ成分の機能と育種／ダイズ種子に含まれるアレルゲン)	丸山 伸之	京都大学	北隆館	2020	11
4	①	アブラナ科作物へのゲノム編集技術の利用(『フラワー・グリーンビジネスの最新動向と市場』内の一章)	奥崎文子、肥塚信也	玉川大学	シーエムシー出版	2021	8
5	①	3章 TALENsベクター構築法 (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	島田浩章、小野寺瞳	東京理科大学	化学同人	2022	12
6	①	ジャガイモの形質転換およびゲノム編集 (『植物バイオテクノロジー 組織培養からゲノム編集まで』内の一部)	島田浩章、竹内亜美	農研機構	化学同人	2022	3
7	①	Potato genome editing: Recent challenges and a practical procedure (『Gene editing in plants: CRISPR-Cas and its applications(仮)』内の一部)	草野博彰、竹内亜美、島田浩章	東京理科大学	Springer	2024	3
8	①	12章 ダイズの標的変異 (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	山田哲也	北海道大学	化学同人	2022	12
9	①	1章 ゲノム編集概論 (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	根岸克弥、助川 聖、廣瀬咲子、雑賀啓明	農研機構	化学同人	2022	12
10	①	2章 ゲノム編集実験をはじめる前に (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	雑賀啓明、廣瀬咲子	農研機構	化学同人	2022	12
11	①	4章 CRISPR/Cas9ベクター構築法 (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	根岸克弥、遠藤真咲、賀屋秀隆	農研機構	化学同人	2022	12
12	①	5章 変異検出法 (『植物のゲノム編集 実験プロトコール』内の一部)	原 奈穂、雑賀啓明	農研機構	化学同人	2022	12

(4)国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日
1	②	短葯形質を有するイネ、及びその製造方法	吉田均、黒羽剛、ロンバルド フェビエン	(国研)農業・食品産業技術総合研究機構	(国研)農業・食品産業技術総合研究機構	特願2023-12260	2023/1/30	

2	②	短納形質を有するムギ、及びその製造方法	吉田均、小川泰一、黒羽剛、安倍史高、加星光子	(国研)農業・食品産業技術総合研究機構	(国研)農業・食品産業技術総合研究機構	特願2023-577078	2024/3/4	
---	---	---------------------	------------------------	---------------------	---------------------	---------------	----------	--

(5)国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日	出願国
1		該当無し							

(6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載年月日	備考
1	③	ゲノム編集技術を用いた収量向上を目指したイネの開発について	農研機構	東海テレビ	2019/9/6	
2	②	ゲノム編集ジャガイモについて	農研機構北海道農業研究センター	北海道新聞	2019/12/5	
3	②	「収量の多いイネ」…ゲノム編集で「食」を革新へ	農研機構	読売新聞	2019/12/22	朝刊31面
4	④	『人類の未来年表』-人口、資源など未来の問題をデータで解き明かす- (ゲノム編集で増収へ)	農研機構	ニュートン別冊	2020/6/18	
5	④	『科学的に正しい食品の大本拠』-ゲノム編集と食糧増産-	農研機構	ニュートン別冊	2020/10/22	
6	②	無花粉スギと多収量イネ 茨城で進むゲノム編集研究	農研機構	朝日新聞	2020/12/6	
7	④	『食品の科学知識』-品種改良とゲノム編集食品-(収量アップをねらうゲノム編集イネ)	農研機構	ニュートンライト	2021/1/25	
8	②	ゲノム最前線 遺伝子改変の産業化 急加速	理化学研究所	読売新聞	2021/10/3	
9	①	Dicer-2-R2D2タンパク質複合体が二本鎖siRNAの非対称性を感知するしくみ — RNA干渉における20年来の謎を解明 —	東京大学		2022/6/30	論文14のプレスリリース https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2022/7883/
10	②	先端技術大賞 受賞者一覧	東京理科大学	産経新聞	2022/6/9	学生部門特別賞＝竹内亜美(東京理科大学大学院修士課程2年)第1面と第11面に掲載
11	①	CRISPR-Cas酵素の祖先タンパク質の立体構造を解明	東京大学		2023/4/6	論文25のプレスリリース https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/8376/
12	①	改変した『ゲノム編集のための最小のはさみ』	東京大学		2023/9/30	論文26のプレスリリース https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/8616/

(7)普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの(複数選択可)。

整理番号	区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)年月		主な利用場面	普及状況
1	②	ばれいしょにおけるゲノム編集による萌芽抑制システム 作出法	理研,阪大,農研機構,神戸大,カネカ	2025	3	ゲノム編集を用いたばれいしょの育種	大学・研究機関等で2025年3月に普及を見込む
2	②	ばれいしょにおける交配の効率化技術(トマトとの接木)	東京理科大	2022	6	ゲノム編集を用いたばれいしょの育種	大学・研究機関等で普及
3	②	コムギにおける高効率ゲノム編集技術	農研機構	2024	4	ゲノム編集を用いたコムギの育種	大学・研究機関等で普及
4	②	イネにおけるCas3等を用いたゲノム編集技術	農研機構、東大、阪大	2023	3	ゲノム編集を用いた植物(イネ)の育種	大学、研究機関等で普及

(8)発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者数	備 考
1	第 5 回産学官協力セミナー 「ゲノム編集を農作物に試してみようーゲノム編集研究のデザインから野外での検証ー」	ゲノム編集育種素材開発 コンソーシアム	大阪大学大学院 工学研究科 (zoom hybrid)	2023/11/27	250名(事前登録者)	日本植物バイオテクノロジー学会、大阪大学大学院工学研究科(テクノアリーナ インキュベーション部門「インテリジェントアグリ工学グループ」)との共催

(9)アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者数	主な参加者	備 考
1	①	ゲノム編集、遺伝子組換え農産物・食品に関する講演 (J-オイルミルズ・静岡)	J-オイルミルズ	J-オイルミルズ・静岡	2019/9/19	48	企業経営者、研究者	https://www.naro.affrc.go.jp/event/list/2019/10/132683.html
2	①	名古屋大学・GTRセミナー「品種改良とゲノム編集技術に関する講演」(名古屋大学農学部学生との双方向意見交換)	名古屋大学	名古屋大学農学部	2019/10/15	68	学部生、大学院生、教職員	
3	①	「ゲノム編集技術と食の安全を考えるシンポジウム」目黒区民、職員との双方向意見交換	目黒区保健所	めぐろパーシモンホール	2019/10/23	150	消費者、栄養士、管理栄養士、行政等	
4	①	「ゲノム編集技術を用いたイネ育種に関する講演」	住友化学	健康・農業関連事業研究所	2019/11/1	75	管理職員、研究者	
5	②	サイエンスアゴラ「ゲノム編集の未来をみんなで語る」	ゲノム編集の未来を考える会	東京テレコムセンター	2019/11/17	40	消費者、研究者、学生、行政等	
6	③	ポテトフォーラム 「育種技術のひとつ「ゲノム編集」の日本の状況及びジャガイモでの取組」	理化学研究所	ANAクラウンプラザホテル札幌	2019/12/5	400	馬鈴しょの生産者と実需者、関係機関	https://www.naro.affrc.go.jp/event/list/2019/10/132683.html
7	①	ゲノム編集技術応用食品の未来について考える」生協会員、消費者との双方向意見交換	大阪いずみ生協	生協ホール 堺東	2020/2/8	75	消費者	

8	③	ゲノム編集ジャガイモについて語る-1 「研究者から見たゲノム編集」	大阪大学	zoomによるオンライン	2020/10/27	10	ジャガイモ研究者、企業、 メディア	チャタムハウスルールによる討議
9	③	ゲノム編集ジャガイモについて語る-2 「研究者から見たゲノム編集」	大阪大学	zoomによるオンライン	2020/11/12	10	ジャガイモ研究者、企業、 メディア	チャタムハウスルールによる討議
10	①	「ゲノム編集技術応用食品」ってなんだろう？ 「ゲノム編集技術とは」	大阪大学	岐阜県図書館	2020/11/18	150	一般市民	岐阜市主催、消費者庁・厚労省共催
11	①	ゲノム編集食品が変える未来の食卓	日本経済新聞社	X-NIHONBASHI TOWER (東京・日本橋)	2021/6/17	3000	国内外のアグリテック、 フードテック専門家、技術 者、スタートアップ、各産 業の企業リーダー、政府・ 自治体、大学、学生、 VC、その他	AG/SUM 2021 (Agritech Summit 2021、アグサム) パネル ディスカッション
12	③	PRISMで行っている研究の紹介	農研機構・東京大学	オンライン	2021/12/14		種苗会社、SIPスマートバ イオ1B「精密ゲノム編集」 構成員	
13	③	植物ゲノム編集技術の現状と展望	千葉県バイオ・ライフサイ エンスネットワーク会議	オンライン	2022/6/13		バイオ・ライフサイエンス に関わる産学官関係者	
14	③	国内の作物・花卉等のゲノム編集研究の現状と今後の 展望	千葉県バイオ・ライフサイ エンスネットワーク会議	オンライン	2022/6/13		バイオ・ライフサイエンス に関わる産学官関係者	
15	①	ジャガイモゲノム編集技術講習会	東京理科大学	東京理科大学葛飾キャン パス	2022/3/7- 3/9	14	国内のジャガイモ研究者	ジャガイモの形質転換、ゲノム編集、栽培、交配法の講習と 実践
16	①	サイエンスカフェみたか5月【オンライン講座】 「分子育種技術で花の色や形を自由にデザインす る」	三鷹ネットワーク大学、暮 らしとバイオプラザ21	オンライン	2023/5/25	17	一般市民	https://www.mitaka-univ.org/kouza/A2352600
17	①	アカデミックイベントDIVE! での講義(2回)「分子育種 技術で花の色や形をデザインする」	京都光華高等学校	京都光華高等学校	2023/6/24	40	高校生・教員	https://hs.koka.ac.jp/atkoka/blog/2935/
18	①	日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム「食糧 問題を救う新技術 ～ゲノム編集技術を活用した作物 育種最前線～」	日本応用糖質科学会東 日本支部	東京大学農学部 弥生講 堂・一条ホール	2023/6/30	150	一般市民 学会員	https://isag.jp/higashinohon/4929/
19	②	研究セミナー	千葉工業大学	千葉工業大学津田沼キャン パス	2024/1/15		学生・研究者	
20	①	新しい育種技術：ゲノム編集ってなんだろう	大阪大学総合学術博物 館・豊中市立中央公民館	庄内公民館 視聴覚室 (庄内コラボセンター内)	2024/1/27		一般市民	https://www.museum.osaka-u.ac.jp/2023-12-18- 18317/ https://www.city.toyonaka.osaka.jp/shisetsu/koumin lib rary/chuo/chuo event/sciencecafe2023.html