

図4. CRIS-PITCh 法によるヒト *FBL* 遺伝子座への遺伝子ノックイン(Nakade et al., 2014)

a. CRIS-PITCh ベクターと標的遺伝子座へのノックイン、b. 配列解析、c. 蛍光観察

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者 中島 治 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
坂田こずえ 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
福田のぞみ 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

研究要旨

遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、植物での開花を促進して品種改良の期間短縮を目的とした植物 RNA ウイルスを用いた方法、遺伝子組換え台木の接ぎ木による穂木への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動物・植物への TALEN, CRISPR/Cas9 技術の応用など進んでいる。今後これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているものの、こうして作出された GM 生物の安全性についての検討は十分されていない。そこで、安全面から科学的な検討を行い、その結果をもとに規制の在り方や検知方法に関する検討が必要となっている。本研究では、急速に普及しているゲノム編集技術 TALEN, CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる改変や off-target の頻度やパターン、ゲノム上に与える変化について、哺乳類細胞を用いて検討した。これら技術の潜在的ポテンシャルを明らかにするために *TK1* 遺伝子を指標にしたアッセイおよび全ゲノムシーケンス解析を行った結果、大きな欠失により *TK1* 遺伝子第 5 エキソン以降が機能喪失する確率は、メガヌクレアーゼ I-SceI および CRISPR/Cas9 では 10^{-4} から 10^{-5} であった。また、CRISPR/Cas9 処理では I-SceI 同様に数 kb から 10 数 kb の大きな欠失が観察された。コントロール細胞、I-SceI, CRISPR/Cas9 処理細胞およびゲノム配列との比較から、バックグラウンドで起きる変化、処理および細胞培養時にゲノム上の塩基配列の変化について検討した。また、文献調査を行うとともに、各国の次世代遺伝子組換え技術を用いた生物の研究開発状況や規制状況について調査を行った。

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え (GM) 技術が急速に発展し、ZFN (Zinc-Finger Nuclease) に始まり 2010 年頃に登場した TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)、さらに、2013 年に報告された CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) などの次世代遺伝子組換え技術が、疾患研究などの基礎研究のみならず食品分野でも応用されるようになってきた。また、接ぎ木や RdDM (RNA-directed DNA Methylation)

の機構を用いた遺伝子サイレンシングにより、ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた。TALEN や CRISPR とともに、遺伝子上の塩基配列を人工的かつ意図的に改変した痕跡を残すことなく組換え生物、作物が作成可能であることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

これらの次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼである ZFN, TALEN, CRISPR 法のほか、RdDM や接ぎ木による RNA 輸送に

よる遺伝子サイレンシングを用いたもの、植物 RNA ウイルスを用いたものなどが存在し、それらについて、技術ごとに整理し、その原理や作用機構、実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体 (GM) として扱うか、GM として扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要である。

ゲノム編集技術がゲノムに与える影響については、標的配列で起きる切断の程度 (長さ) やパターン、そして、非特異的な改変 (off-target 効果) がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について検討する必要がある。

本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しいゲノム編集技術である CRISPR を中心に標的配列領域 (on-target) の解析を行うとともに、制限酵素である I-SceI の結果と比較検討した。一般に、ゲノム構造や DNA 切断修復機構は酵母から哺乳類まで比較的よく保存されている。そのため、本実験ではゲノム関連情報が豊富で他のデータとの比較も容易であり、解析手法も多く用意されているヒト細胞を中心として用いることにした。

ゲノム編集技術を用いて改変を行った場合に、最も懸念されることは off-target 切断である。そのため、これまでに精力的な検討がされてきた。標的配列 (on-target) から数塩基ミスマッチがある配列など on-target 配列から推測される off-target 配列のほかに、

on-target 配列とは関連性のない、いわゆるバイアスのない off-target 解析が報告されている。いずれも、DNA2 本鎖切断が起きた箇所などの特定領域を濃縮して次世代シーケンサーでその領域のみを解析するものである。これらの手法を用いた時に検出できる頻度は、概ね 1% (最小 0,1%) またはそれ以上の頻度で起きる変化である。これまでに、高頻度では、通常細胞では 1 から数塩基、または 10 数塩基程度の欠失および数塩基の挿入が主たる変化であることが報告されている (高頻度で起きる変化)。

しかしながら、用いる細胞や標的領域のゲノム環境 (構造) による大きく影響することが考えられる。そのため、ゲノム環境が異なると考えられる領域 (転写が弱い領域と転写活性が高い領域など) に対して、標的部位を設定して高頻度で起きる変異パターンの解析を行った。また、これまでに低頻度で起きる変異については解析されることがない。標的部位であれば解析可能であるが、想定できない領域で発生した場合は、全ゲノムシーケンス解析以外に検出は困難であるが、検出感度は高くない。そのため、ゲノム編集技術の潜在的な能力を明らかにするために、低頻度で起きる変化についても明らかにすることを目的に行った。

さらに、Cas9 検知法や毒性・アレルゲン性評価のためのタンパク分解性試験を行うために、リコンビナントタンパクを調整し、Cas9 の人工胃液中での分解実験を行った。

情報収集では、最近開発された食用トランスジェニック生物の文献調査を行った。

B. 研究方法

1. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

(1) ニワトリ、ヒト、ラット由来の細胞(DT40, TK6, PC12)を用いて、標的配列に対して3塩基以内のミスマッチ配列が該当生物ゲノム上に存在しないか、少なくともエキソン領域に存在しないように設計したCRISPR/Cas9を用いてDNA2本鎖切断のパターン解析を行った。GGgenome (<https://gggenome.dbcls.jp/ja/>)とCRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>)を参考に設計した。

標的配列は、DT40細胞では*AIFM1*遺伝子エキソン1、PC12細胞では*Rosa26*領域、TK6細胞では*TK1*遺伝子を標的として、それぞれ2種類のCRISPR/Cas9用のgRNAを作製した。CRISPR/Cas9用のプラスミドはaddgeneから購入したもの(pX330, pX458, pX459)にガイドRNA(gRNA)標的配列を組み込んだ。遺伝子導入は、PC12細胞にはリポフェクション法(Lipofectamine 2000)で行った。DT40およびTK6細胞は、2種のエレクトロポレーション法(Amaxa nucleofector II, Lonza AGまたはNEPA21、ネッパジーン)を比較して、最終的に導入効率の優れたAmaxaを用いた。導入効率はGFPベクターをコントロールに用いて確認した。解析をより容易にするために、DT40およびPC12細胞では、遺伝子導入24時間後にピューリマイシンにより遺伝子導入細胞の選択を行い、72時間後に細胞を回収した。細胞からDNeasyBlood and Tissue kit (Qiagen)を用いて抽出したゲノムDNAを鋳型にして、標的配列含む領域をHighFidelityポリメラーゼでPCR増幅、コロニー化した後にillustra TempliPhi DNA Amplification Kit

(GEヘルスケア)を用いてシーケンス解析を行った。また、細胞のクローン化したもののシーケンス解析は、各クローンをQuickExtract (Epicentre)でDNA抽出したものをシーケンス解析した。

(2) *TK1*遺伝子エキソン4の片側アレル(allele A)に変異を持つヒトTK6細胞に、もう一方のアレル(allele B)エキソン5上流約80bpにI-SceIサイトを含む31bpを導入したTSCE5細胞を実験に用いた。I-SceIサイトとほぼ同一の領域にCRISPR/Cas9の標的サイトを設計し、I-SceIとともにDNA2本鎖切断実験を行った。TKアッセイに用いる細胞中のエキソン5欠失を持つ細胞を最大限除去してバックグラウンド変異検出を抑えるために、あらかじめ2日以上HAT処理を行った。Mutation frequency (MF)を算出するために、1処理群あたり96穴プレート最大約30枚を用いてトリフルオロチミジン薬剤選抜(TFT)を行いエキソン5の欠失した細胞を分離した。

(3) (2)の実験で分離した細胞から、ゲノムDNAを抽出して、Nanodropで総核酸量と精製度を確認した後(260/280, 260/230値が2以上)、Quant-iT dsDNA assay kitで2本鎖DNAの濃度を蛍光法により定量した。切断パターンを分析するために、標的配列を含む7kbを含む領域をPCR増幅して、そのバンドを高分子DNA分離用チップを用いてAgilent 2100 Bioanalyzerで解析した。また、ゲノムDNAは、次世代シーケンサーIllumina Hiseq2000で全ゲノム解析を行った。サンプルあたり11億リード(1100億塩基)が得られた。得られたシーケンスデータは、Illumina

Isaac 解析ソフト (Issac aligner および caller) でマッピングおよび変異コール (SNV, Indel, SV, CNV) を行った。CLC genomicworkbench (ver8.0.1) の clc mapper を用いてもヒトゲノムへマッピングと変異検出を行い比較した。また、HumanOmni2.5-8 v1.2 を用いた BeadChip によるビーズアレイ解析でジェノタイプングを行い、SNP や CNV (copy number variation) の検出を行った。マッピングデータは IGV または Tablet を用いて比較解析した。

(4) アレルゲン性および毒性についての知見を得るために、大腸菌から作製した組換え Cas9 を用いて、人工胃液処理による分解性試験を行った。また、Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測を行った。

1) 組換え Cas9 の作製と活性測定

組換えタンパクの発現、精製及び活性測定は参考文献 1) の方法に基づいて行った。

Cas9 (25 nM) とガイド RNA (gRNA、25 nM) を切断バッファー中で 37 度、15 分プレインキュベートした。標的としてのプロトスペーサー 2 プラスミド (5 nM) を加えて反応を開始した。30 分、60 分後にサンプリングしてアガロースゲル電気泳動によって分析した。LAS4000mini と Image Quant TL (GE ヘルスケア・ジャパン) を使ってスーパーコイル型、リニア型プラスミドの割合を求めた。gRNA の配列は：5' -AUA ACU CAA UUU GUA AAA AAG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CG-3'。プロトスペーサー 2 プラスミドは以下の配列を pUC19 の Sma I サイトに組み込んだ：5'-TTA TAT GAA CAT AAC TCA ATT TGT AAA AAA GGG TAT TGG GGA ATT

CAT TA-3'。ネガティブコントロールの実験には、プロトスペーサー 2 プラスミドの代わりに pUC19 を使った。

2) Cas9 の人工胃液中での分解性試験を以下のように行った。崩壊試験第 1 液、pH1.2 (関東化学 Cat. No. 11500-76) に 0.32% ペプシンブタ胃粘膜由来 (シグマアルドリッチ Cat. No. P6887-250MG) を添加して人工胃液とした。ここに Cas9 を加えて 50 μ l の反応液を調製した。これを 37 度でインキュベートした。1, 3, 7, 15, 30, 60 分後にサンプリングし、Na₂CO₃ に加えて反応を止めた。0 分については人工胃液と Na₂CO₃ 後に Cas9 を加えた。これらを CBB 染色で分析した。また、コントロール実験として、ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ) と β -ラクトグロブリン (シグマ) を用いて同様な実験を行った。

3) データベースを用いたアレルゲン性の検索を行った。ヒト用にコドン最適化した Cas9 スクレオチド配列は参考文献 2) から得た。この配列を GENETYX Ver. 12 を用いてアミノ酸配列に翻訳した。翻訳の枠をずらして、センス鎖からオープンリーディングフレーム (ORF) 1-3 を得た。Cas9 は ORF1 に相当する。アンチセンス鎖から ORF4-6 を得た。アレルゲンになりうるペプチドとしてアミノ酸残基 20 mer 以上の長さの物を選んだ。なお、開始コドン ATG がなくてもよいとした。Sliding 80 mer window search は Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP、https://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.htm) を利用してホモロジー 35% 以上を陽性とした。8 mer exact search は Allergen Database

(<http://www.allergenonline.org/databasefastas.shtml>) を利用した。6 mer exact search は SDAP を利用した。これらの検索で陽性となった配列が食物アレルギーに由来する配列とホモロジーがある場合を選択した。

参考文献

- 1) Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (2012) 337, 816-821
- 2) Mali P., Yang L., Esvelt KM., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* (2013) 339, 823-826

(5) 文献調査 (組換え動物)

- ・ 調査に用いたデータベース
3つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用した。本年度は 2011 年に発表された論文や特許などを調査した。

- ・ キーワードについて

PubMed : transgenic animal、GMO
SciFinder、Google Scholar : transgenic または GM プラス個別の動物名 (pig, cow or cattle, chicken, fish, goat, sheep, rabbit, quail, horse, shrimp, prawn, octopus, devil fish, squid, crab, soft-shell turtle, shellfish)。

- ・ タイトルと要旨から該当する論文や特許などを選抜した。導入あるいは改変遺伝子、研究内容、開発国、遺伝子改変法などの情報をまとめて一覧表を作成した。

- ・ ジンクフィンガーヌクレアーゼ (以下 ZFN)、TALEN、CRISPR が利用されて作成

された組換え動物についての論文や特許を SciFinder、PubMed を利用して調べた。2010 年以降に発表の論文や特許を対象とした。

(6) 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

次世代組換え技術の規制に関する情報を収集するために、EU 報告書の他に、ドイツ (Central Committee on Biological Safety (ZKBS, 生物学的安全性に関する中央委員会))、オーストリア (Bundesministerium für Gesundheit (連邦保健省) および Umweltbundesamt (連邦環境局))、オランダ (The Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM, 遺伝子組換えに関する委員会))、イギリス (Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE, 環境排出に関する諮問委員会))、オーストラリアーニュージーランド (Food Standard Australia New Zealand (FSANZ, 食品基準機関)) のポジションレポート、およびカナダ (Canadian Food Inspection Agency (CFIA, 食品検査庁) と Health Canada (HC, 保健省))、アメリカ (Environmental Protection Agency (EPA, 環境保護庁), Food and Drug Administration (FDA, 食品医薬品局), US Department of Agriculture-Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS, 農務省動植物検疫局)) の情報を調査するとともに、2014 年 10 月までの *Nature*, *Science* などの科学雑誌から次世代組換え技術に関する論文を調査して技術的な整理と問題点を明らかにした。また、各次世代組換え技術を用いた作物等の開発状況について調べた。

C. 研究結果および考察

1. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

1) 変異パターンの解析

次世代遺伝子組換え技術の中で、急速に利用されてきているゲノム編集 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) について、その活性やオフターゲット切断についてこれまでに多くの報告があり、バイアスのないオフターゲット解析の報告から、標的配列からは推測できない切断も見られている。そこで、ゲノム編集技術のポテンシャルを解明するための検討を行った。

DT40 細胞 *AIFM1* 遺伝子第一エクソンを標的にデザインしたガイド RNA (gRNA#3, #7) の中で、切断活性を示した gRNA#7 は、CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、220 箇所存在し、そのうち遺伝子上には 39 箇所存在するが 1 つを除き 4 塩基ミスマッチのため標的配列から予測される範囲では特異性は高いと考えられた (Fig. 1 and Table 1)。変異パターンの解析から、32 個中 3 塩基欠失が 26 個、4 塩基欠失が 1 個、置換が 1 個であった。欠失体は、いずれも ATG 開始コドンの破壊またはフレームシフトにより目的遺伝子のノックダウンが誘導できた (Fig.2)。次に、PC12 細胞を用いて遺伝子ノックインのターゲットとして知られるマウス *Rosa26* 相同領域を標的配列にして同様の実験を行った。gRNA を 2 箇所設計し (Figs.3 and 4)、活性を示した gRNA#21 について CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、理論上の off-target サイトは全ゲノム上に 323 箇所存在するが、そのうち遺伝子上にあるものはなかった (Table 2)。変異パターン解析から野生型以

外には 7 および 103 塩基の欠失のほか、1 または 2 塩基の挿入が見られた (Fig.5)。TK6 細胞については、*TK1* 遺伝子の標的配列周辺に変異が観察された。なお、TK6 細胞を用いた解析は、以下の TK アッセイと関連するため解析中である。以上の結果から、正常な DNA 修復機構を保持した細胞を用いた場合は、CRISPR/Cas9 によって誘導される切断パターンは主に 2~4 塩基欠失が中心であり、ゲノム改変しやすい (あるいはオープンクロマチン) 領域では、やや大きな欠失 (100 塩基程度) や 1 または 2 塩基挿入も一定の頻度見られた。

2) TK アッセイ

TK6 細胞の片側アレルのエクソン 5 上流に I-SceI サイトを挿入した TSCE5 細胞に対して、I-SceI とほぼ同じ位置に CRISPR/Cas9 用の gRNA を 2 種設計した (gRNA#8, #17, in Figs.6 and 7)。切断活性が認められた gRNA#8 は、CRISPR design Tool を用いてゲノム上の off-target を検索したところ、全ゲノム上に 131 箇所、そのうち遺伝子上に 11 箇所 off-target サイトが存在し、ほとんどが 4 塩基のミスマッチで切断される可能性が低いものであった (Table 3)。

ゲノム編集用プラスミド (pmaxGFP, I-SceI, gRNA#8, #17) を導入、48 時間以上培養した後、96 穴培養プレートに 20,000 cells/well になるように播き、トリフルオロチミジン (TFT) 選抜しながら 10 から 12 日間培養してコロニー形成させた。コントロール (無処理)、GFP、I-SceI, CRISPR 処理群のコロニー形成ウェル数、空ウェル数をカウントして変異発生率

(MF) を算出した。本アッセイでは、非相同末端結合 (NHEJ) により 80bp 以上の欠失に

よりエクソン 5 が non-functional になったもの (*TK1* (-/-)) のみが検出される。その結果、自然界でこの標的部位にこのような変異が起きる確立は 10^{-7} レベルであり、I-SceI 処理による DNA 切断で誘導される場合は最大 10^{-4} レベルと大きく増加した。また、CRISPR/Cas9 処理では、 4×10^{-5} レベルで NHEJ により 80 bp 以上の欠失 が起きることが示された (Fig.8)。また、Fig.9 には I-SceI および CRISPR/Cas9 による標的部位での切断パターンを示した。10 kb 以上の欠失も見られた。これまでの研究で、on-target 配列から数塩基ミスマッチのあるような、予測できる off-target サイトであれば問題ないが、それ以外の場所でこのような大きな off-target 切断が起きた場合に、見つけ出すことは困難であると考えられる。

3) TK アッセイにより得られた、control、I-SceI、CRISPR/Cas9 処理で *TK1* (-/-) になった細胞を集めて、次世代シーケンサーにより全ゲノム解析を行い解析中であるが、ビーズアレイ解析結果から、I-SceI 処理細胞では 1.9 Mb の LOH (ヘテロ接合性喪失) が、CRISPR/Cas9 処理細胞では 3.4 kb (loss) のコピー数変異 CNV が観察された。

2. Cas9 の毒性・アレルゲン性の検討および調査

1) Cas9 の分解性試験

ゲノム編集である CRISPR/Cas9 システムに用いる Cas9 タンパク質の毒性やアレルゲン性を検討するために、リコンビナント Cas9 を作製して活性を測定した。プロトスペーサー 2 プラスミドを使った場合、30 分で DNA 2 本鎖切断されてリニア型バンドが 0.8%ア

ガロースゲル電気泳動によって検出された。コントロールとして pUC19 を使った場合には 60 分でリニア型が検出されず、スーパーコイル型のみが検出された (Fig.10)。この結果から、作成した Cas9 が活性を保持していることが確認された。Cas9 の人工胃液で処理したところ、Cas9 は 1 分未満で分解されて、断片も検出されなかったコントロール実験として、BSA は 0.5 分未満で分解されて、 β -ラクトグロブリンは 16 分でも分解されなかった (Fig.11)。Cas9 は容易に消化液中で分解されることが判明した。

2) Cas9 遺伝子がコードするペプチドのアレルゲン性の予測

Cas9 のアレルゲン性をアレルゲンデータベースを用いて調査した。条件として、既知アレルゲンとの 8 アミノ酸完全一致や 80 アミノ酸をウィンドウとした検索 (8 mer exact match と sliding 80 mer window search) したところ、該当するものは存在しなかった。そこで、条件を緩くして 6 アミノ酸完全一致で検索したところ、他の読み枠と合わせて 17 個ヒットした (Table 4)。

3) 文献調査 (トランスジェニック動物)

- ① 2011 年度の該当する論文、特許などの数は以下の通り。ウシ 24 報、魚 20 報、ブタ 17 報、ヤギ 8 報、ニワトリ 8 報、ヒツジ 7 報、ウサギ 3 報。合計 87 報 (Table 5)。
- ② 開発国は圧倒的に中国が多かった。87 報中 61 報を占めた。
- ③ 導入遺伝子としては以下の物が多く使われていた: ミオスタチン、*fat-1*、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモン。

④ ゲノム編集技術を利用した食用トランスジェニック動物について昨年度の報告書以降の論文、特許が 8 報あった。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 が利用されていた。(Table 6)。Table 6 中の文献 6 では、TALEN を利用してオボアルブミン遺伝子の 6・29ヌクレオチドを欠失でノックアウトしており、このニワトリに由来する肉を従来の PCR 法やリアルタイム PCR 法を適用して検知することは困難であると考えられる。

3. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

EU 各国、オーストラリアーニュージーランド、カナダなどの次世代遺伝子組換え技術に関する報告を調査した。EU は、現在の GMO の枠組みの中でどの技術が遺伝子組換え体として規制対象になるのかを議論しているところである。各国ともオリゴヌクレオチド指向型変異導入 (ODM) は、1 または 2 塩基程度の変異を入れた短い一本鎖 DNA (ssDNA) のみを用いた場合は、ゲノム編集のような DNA2 本鎖切断誘導しない限りは自然界で起きる現象を差はない。また 1 塩基変異導入による新規形質獲得も自然界で認められることから GM 規制対象外になると考えられる。シスジェネシスは、微生物におけるセルフクローニング/ナチュラルオカレンスと同様であるが、微生物以外では GM という考え方が多いと考えられる。アメリカでは、交雑可能な品種由来の配列のみからなっている、自然界には存在しない配列 (逆位繰返し配列) をもつイントラジェネシスも規制対象外としているが、それ以外の国では GM 規制内と考えられる。もっとも判断が難しいのは、現在急速に普及しているゲノム編集技

術である TALEN、CRISPR/Cas9 である。小さな改変、1~3 塩基程度の欠失によるノックアウトは ODM に似ているが、TALEN、CRISPR/Cas9 は自然界で起きるよりはるかに高頻度で目的部位に DNA2 本鎖切断を誘導し、また、目的外領域にも低頻度ながら変異が導入される可能性があることから、目的領域の改変部分のみでの判断はできないと考えられる。いずれも、継続して多くの情報を収集するとともに実験結果から科学的な知見をもとに判断することが重要である。次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の安全性については、これまでの研究調査結果を総説にまとめた。

D. 結論

次世代遺伝子組換え技術を用いた食品の安全性に関して、技術的には TALEN、CRISPR/Cas9 が重要であると考えられる。ただし、この技術を用いて行われた変異導入の程度や意図しない領域での改変は、対象生物にも大きく依存するために、当面は各国とも個別に判断することになると考えられる。

本研究では、ゲノム編集技術を用いた時に起きる変異のパターンや頻度を解析して、主に数塩基から 100 塩基程度の欠失が起きること、低頻度では 10 kb を超える欠失も起きることが分かった。このような変化がゲノム上の予測できない位置に生じた場合は、検出は全ゲノムシーケンスのような網羅的な解析が必要である。その他のシスジェネシスや接ぎ木などは、概ね判断の方向は GM 規制外と考える場合が多いと思われるが、当面は個別のケースバイケースでその内容の判断がされると考えられる。次世代遺伝子組換え技術の開発は、特にゲノム編集技術は、アメリカの他に中国が様々な生物

に対して行っており、今後の動向を継続して調査する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015
2. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
3. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
4. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
5. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R.,

Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014

6. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014

学会発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月.
2. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：標的 DNA のメチル化の頻度およびパターン解析による新規 GM 検知法確立の試み、第 108 回 日本食品衛生学会 学術講演会、金沢、2014 年 12 月
3. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子：CaNCED 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年 12 月
4. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹：加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しい DNA抽出精製法の検討、第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014 年

- 12月
5. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵：食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 6. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 7. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
 8. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子: 成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 9. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 10. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
 11. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美: 遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2014年6月
 12. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内の遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
 13. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパパイヤのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
 14. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月
 15. 中島治、近藤一成、最上(西巻)知子 食用遺伝子組換え動物の最近の開発状況についての調査 日本薬学会第135年会、2015年3月
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

CRISPR design for disruption of *AIFM1* exon1

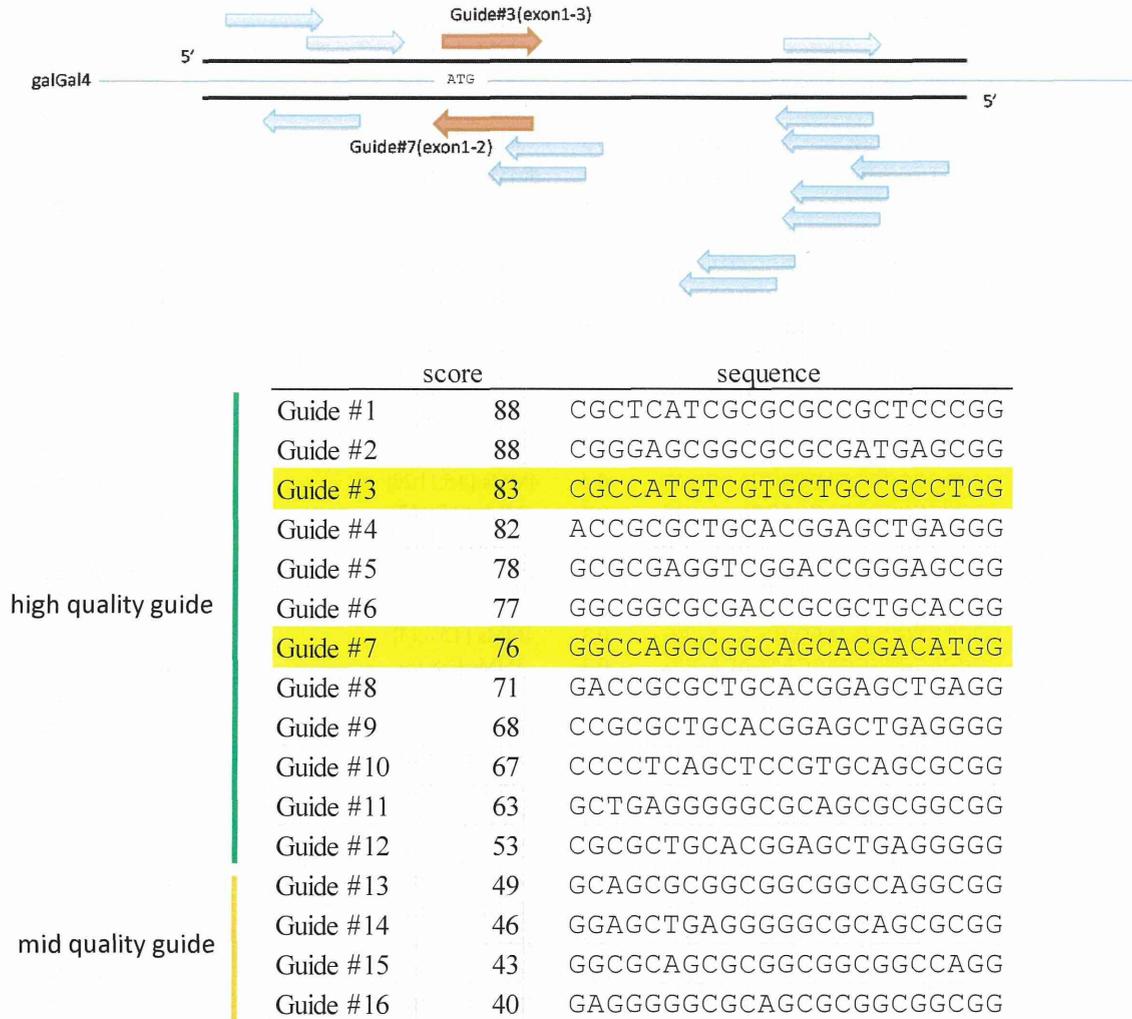


Fig.1. CRISPR design of guideRNA for disruption of *AIFM1* gene by CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>). Guides 3 and 7 were used in this experiments.

sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
GGCAAGGCGGCAGCAGGACATGG	1.7	2MMs [4:16]		chr11:+60961248
GGGCAGGTGGCAGCACGACGCAG	1.4	3MMs [3:8:20]		chr7:+155748768
GGGCAGGAGGCAGCACAAACAGGG	1.2	3MMs [3:8:17]		chr3:+134337027
GCCAGTCTGCAGCACGACAGGG	1.1	3MMs [2:7:9]		chr5:-77828788
GACCAGGCCGAGCACCCACAGAG	0.8	3MMs [2:9:17]	NM_000875	chr15:+99478446
GTCCAGGAGGCAGCACGGCACAG	0.7	3MMs [2:8:18]		chr17:-78700065
GGCTGGGCGTCAGCACACATGG	0.5	4MMs [4:5:10:17]		chr2:-31189620
GCCCAGGAGGCAGCAGGACAAAG	0.5	3MMs [2:8:16]		chr18:+22379255
GGCTGGGGACAGCACCCACAGGG	0.5	4MMs [5:8:10:17]		chr9:+137258402
GGAACGGCGGCAGCACGAAAGGG	0.5	4MMs [3:4:5:19]		chr6:-170863670
GCCCAGGGAGGAGCACGACAAGG	0.5	4MMs [2:8:9:11]		chr17:+72228080
GGCGAGCTGGCTGCACGACACGG	0.5	4MMs [4:7:8:12]		chr15:+88800357
GGCTTGTGGGAGCACGACAAGG	0.5	4MMs [5:6:8:11]		chr8:+8307434
GGCCAGACAGCAGCACCCACAGGG	0.5	3MMs [7:9:17]		chr10:+133783921
AGCTAGACGGCAGCACAAACAGAG	0.4	4MMs [1:4:7:17]		chr2:-121304402
TGCCAGAGGGCAGCACCCACACAG	0.4	4MMs [1:7:8:17]		chr9:-134102664
GGCAAGATGGCAGCACCCACATGG	0.4	4MMs [4:7:8:17]		chr11:-75996432
TGCCAGTCGGCAGCATGACAGGG	0.4	3MMs [1:7:16]		chr10:+126073227
GGCAGGGCGGAGCACGACGGGG	0.4	4MMs [4:5:11:20]		chr16:-88937064
GACCGGCTGCAGCACCCACAGGG	0.4	4MMs [2:5:9:17]		chr3:-42747491
GGCCAGAGGCAGCACGGCACGG	0.4	3MMs [6:8:18]		chr15:+91493993
AGCCAGGAGGAAGCACTACAGGG	0.3	4MMs [1:8:11:17]	NM_001007231	chr2:-69044936
GGCCGGTCGGCAGCAAGACAGAG	0.3	3MMs [5:7:16]		chr21:+34524988
GGCTTTCGGGCAACACGACACAG	0.3	4MMs [4:5:6:13]		chr17:+5497128
GGCCAGCTGGCAGCATGACAGGG	0.3	3MMs [7:8:16]		chr8:-140803424
GGCCAGCAGGCAGCAAGACAGAG	0.3	3MMs [7:8:16]		chr17:+37376233
AGAGAGGGCGGCAGCACGTCACAG	0.3	4MMs [1:3:4:18]		chr17:-79694680
GGGGCGGGCGGCAGCACGTCAGGG	0.3	4MMs [3:4:5:18]		chr5:+175874447
TACCAGGGCGCTGCACCACACAG	0.3	4MMs [1:2:12:17]		chr5:+1322689
GGCCAGGCCCCAGCACGGCATAG	0.3	3MMs [9:10:18]		chr18:-19821565
GGCCAAGGGGCAGCAGGACATGG	0.3	3MMs [6:8:16]		chr6:-915829
GGCCAGCCGGCATCACAAACACAG	0.3	3MMs [7:13:17]		chr16:-16070849
GGCCAGGTGAAAGCACAAACAGGG	0.3	4MMs [8:10:11:17]		chr5:+105993014
AGCTTGGGGGCAGCAGGACAGAG	0.3	4MMs [1:5:8:16]		chr7:+25261446
ATCCAGGGGGCAGCAGGACAGAG	0.3	4MMs [1:2:8:16]		chr18:-44777024
TGGCAGGGGGCAGCAGGACAAGG	0.3	4MMs [1:3:8:16]		chr1:-53928889
GGCCAGGCACCAGCAAGACAGAG	0.3	3MMs [9:10:16]		chr15:+90458307
GGGCAGCCTGCAGCACCCACACGG	0.2	4MMs [3:7:9:17]		chr4:+8820152
GCCCAGGTGACAGCAGGACAAGG	0.2	4MMs [2:8:10:16]		chr3:-152148444
GCTCAGGGCAGCAGGACAAGG	0.2	4MMs [2:3:10:16]		chr7:+150967346
GGAGAGGGCAGCAGGACAGAG	0.2	4MMs [3:4:10:16]		chr6:+34510087
GCCAAGGGCGCATCACCCACATGG	0.2	4MMs [2:4:13:17]		chr6:-158061065
GGCAAGGCTGAGGCACGACACAG	0.2	4MMs [4:9:11:12]		chr11:-126727819
GGCTGGTGGCAGGACGACAAAG	0.2	4MMs [4:5:8:14]		chr20:+35509443
GCCCAGTGGGCAGCACGGCAGAG	0.2	4MMs [2:7:8:18]		chr4:-1311698
GGTCAGCGGCAGCACGTCAGAG	0.2	4MMs [3:7:8:18]	NM_001012994	chr9:+115632626
GCCCAGGAGGCAGCACAAAAAAG	0.2	4MMs [2:8:17:19]	NM_001130004	chr14:+69387635
GGCCAGCCAGCAGCAGGACATAG	0.2	3MMs [7:9:16]		chr17:+37799847
GGCCGGCGGCAGCACGGGAGAG	0.2	3MMs [5:18:19]		chr4:-146403582
GTCCAGCTGGCAGCAGGACATGG	0.2	4MMs [2:7:8:16]		chr15:+67213794

Table 1. Top 20 genome-wide off-target sites of guide#7. There are total 220 off-target sites (39 in genes, all >4 mismatches).

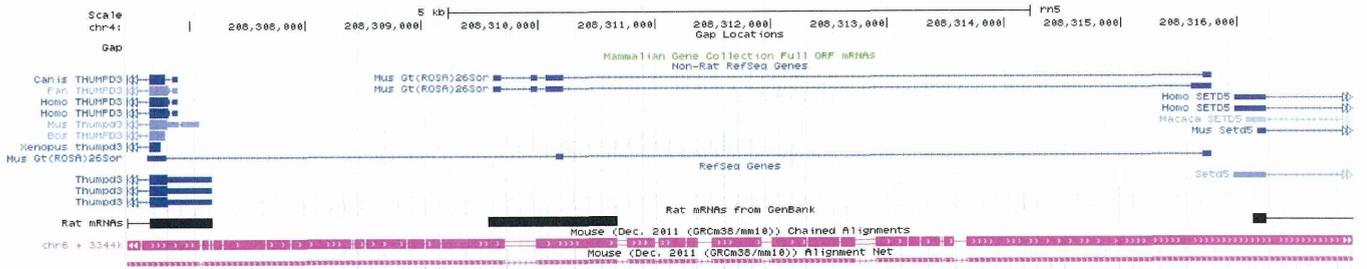


32コロニー中28コロニーに変異(deletion/mutation)

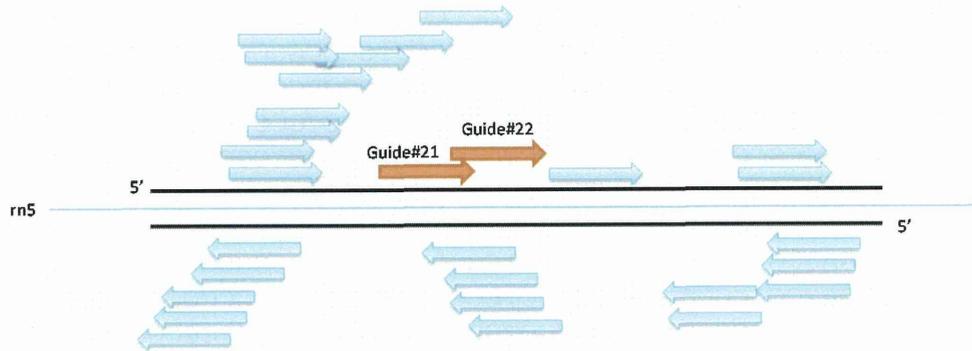
deletion patterns:

CGGCGCCATGTCGTGCTGCCGCCT	× 4
CGGCGCCATGTCGTGCTGCCGCCT	× 1 (mu 1)
CGGCGCCA***CGTGCTGCCGCCT	× 23 [Δ3]
CGGCGCCATGT***GCTGCCGCCT	× 3 [Δ3]
CGGCGCC***CGTGCTGCCGCCT	× 1 [Δ4]

Fig.2. DNA double strand breaks by CRISPR/Cas9 (guide#7).



rat Rosa26 locus (chr4: 208,311,500-208,312,000附近)



	score	sequence
Guide #1	88	ACTCCAGTTGCAGATCACGAGGG
Guide #2	80	CACCCTTCTCAGGACGGGGGAGG
Guide #3	80	TGTCTTCTGAGGACCGCCCTGGG
Guide #4	79	CTGTCTTCTGAGGACCGCCCTGG
Guide #5	79	GGAGTGTTCGAATACCTTTCTGG
Guide #6	77	ACCCTTCTCAGGACGGGGGAGGG
Guide #7	75	GACTCCAGTTGCAGATCACGAGG
Guide #8	72	CTTCCCTCGTGATCTGCAACTGG
Guide #9	69	GAGTGTTCGAATACCTTTCTGGG
Guide #10	66	CCCTTCTCAGGACGGGGGAGGGG
Guide #11	62	CAGGGCGGTCTCAGAAGACAGG
Guide #12	61	TCTGAGGACCGCCCTGGGCCTGG
Guide #13	59	ATCTGCAACTGGAGTCTTTCTGG
Guide #14	59	TTGCAGATCACGAGGGAAGAAGG
Guide #15	58	AGTCTTCTGGAAGATAGGCGGG
Guide #16	57	TCCCCTCCCCCGTCTGAGAAGG
Guide #17	56	GAAGGAATCTTCCAGGCCCAGG
Guide #18	55	AAGGAATCTTCCAGGCCCAGGG
Guide #19	55	GCAGATCACGAGGGAAGAAGGGG
Guide #20	53	GAGTCTTCTGGAAGATAGGCGG
Guide #21	51	GGAATCTTCCAGGCCCAGGGCGG
Guide #22	50	GGCGGTCTCAGAAGACAGGAGG
Guide #23	49	CCCCTCCCCCGTCTGAGAAGGG
Guide #24	49	CTGGAGTCTTCTGGAAGATAGG
Guide #25	48	GCAGCAGAGAACTCCAGAAAGG
Guide #26	44	TGCAGATCACGAGGGAAGAAGGG
Guide #27	37	CAGATCACGAGGGAAGAAGGGGG
Guide #28	35	AAGGGGAAGGGAATCTTCCAGG
Guide #29	35	TCAGGAGGAAGAAGGGGGAAGG
Guide #30	30	CTGCTGCCTCCTGTCTTCTGAGG
Guide #31	28	CACGAGGGAAGAAGGGGGAAGGG

high quality guide

mid quality guide

Fig.3. CRISPR design of guiderNA targeting rat *Rosa26* locus by CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>). Guides 21 and 22 were used in this experiments.

specificit Rat (*Rattus norvegicus*) genome, RGSC 5.0/m5 (Mar, 2012)

#	start	end strand	sequence	GC	Tm	hit_20mer	hit_12mer	hit_8mer
5	27	-	CCCGCCTATCTTCCAGAAAGACT	45	70.2	1	25	4602
6	28	-	CCGCCTATCTTCCAGAAAGACTC	45	68.02	1	16	4002
9	31	-	CCTATCTTCCAGAAAGACTCCAG	45	69.07	1	43	6325
17	39	-	CCAGAAAGACTCCAGTTGCAGAT	45	69.42	1	46	6179
24	46	+	GACTCCAGTTGCAGATCACGAGG	55	72.48	1	5	1187
25	47	+	ACTCCAGTTGCAGATCACGAGGG	50	72.48	1	9	840
28	50	-	CCAGTTGCAGATCACGAGGGAG	55	72.93	1	6	3568
32	54	+	TTGCAGATCACGAGGGAAGAAGG	50	72.42	1	14	24451
33	55	+	TGCAGATCACGAGGGAAGAAGGG	50	72.42	1	16	22093
34	56	+	GAGATCACGAGGGAAGAAGGGG	55	72.83	1	22	30064
35	57	+	CAGATCACGAGGGAAGAAGGGG	55	72.61	1	355	21126
39	61	+	TCACGAGGGAAGAAGGGGAAGG	60	78.3	1	1728	23674
40	62	+	CACGAGGGAAGAAGGGGAAGGG	60	77.55	1	435	21914
51	73	+	AAGGGGAAGGGAATCTTCCAGG	55	76.41	1	21	4870
57	79	+	GAAGGGAATCTTCCAGGCCAGG	60	77.43	1	67	10552
58	80	+	AAGGGAATCTTCCAGGCCAGGG	55	77.48	1	42	8136
61	83	+	GGAATCTTCCAGGCCAGGGCGG	65	80.14	1	83	7215
69	91	-	CCAGGCCAGGGCGGTCTCAGAGA	75	85.47	1	23	8993
74	96	-	CCCAGGGCGGTCTCAGAAGACA	60	78.51	1	3	720
75	97	-	CCAGGGCGGTCTCAGAAGACAG	65	78.51	1	6	631
76	98	+	CAGGGCGGTCTCAGAAGACAGG	65	78.51	1	78	10927
79	101	+	GGCGGTCTCAGAAGACAGGAGG	65	78.51	1	71	9759
85	107	-	CCTCAGAAGACAGGAGGCAGCAG	60	76.23	1	106	8620
101	123	+	GCAGCAGAGAACTCCCAGAAAGG	55	74.9	1	18	9005
114	136	-	CCCAGAAAGGTATTGCAACTC	40	67.34	1	25	6067
115	137	-	CCAGAAAGGTATTGCAACTCC	45	69.01	1	5	3789
135	157	+	TCCCCTCCCCCGTCTGAGAAGG	70	83.29	1	9	9700
136	158	+	CCCCTCCCCCGTCTGAGAAGGG	70	82.72	1	13	10219
136	158	-	CCCCTCCCCCGTCTGAGAAGGG	70	81.46	1	53	6034
137	159	-	CCCTCCCCCGTCTGAGAAGGGT	65	81.47	1	21	2710
138	160	-	CCTCCCCCGTCTGAGAAGGGTG	70	81.57	1	14	3263

Fig.4. CRISPR design of guideRNA targeting rat Rosa26 locus by CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/>). Guides 21 were highlighted in yellow.

sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
GGAGTGTTCAGGCCCCAGGGCAG	3.3	2MMs [4:6]		chr16:-3669120
GCCCTCTTCCAGGCCCCAGGGTGG	2.3	3MMs [2:3:4]		chr8:-62026765
GCAATCATCAAGGCCCCAGGGCAG	1.7	3MMs [2:7:10]		chr4:+42277661
AGAATCTGGCAGGCCCCAGGGTGG	1.6	3MMs [1:8:9]		chrX:-34719637
GGCTTCTTTCAGGCCCCAGGGTAG	1.5	3MMs [3:4:9]		chr5:+149692756
GCACTCTTCCGGGCCCCAGGGTAG	1.5	3MMs [2:4:11]		chr13:+57002062
GGAGTCTGCCAGGCCCCAGGAGGG	1.4	3MMs [4:8:20]		chr1:-81052654
TCACTCTACCAGGCCCCAGGGAGG	1.4	4MMs [1:2:4:8]		chr7:-12891626
AAAAGCTCCCAGGCCCCAGGGGAG	1.4	4MMs [1:2:5:8]		chr20:-11779959
AGCATCTCCGAGGCCCCAGGGAGG	1.3	4MMs [1:3:8:10]		chr1:-105875132
GCAGTCTCCAAGGCCCCAGGGCAG	1.3	4MMs [2:4:8:10]		chr2:-222692585
GATATCTCCAAGGCCCCAGGGAAG	1.3	4MMs [2:3:8:10]		chr2:-113818525
TGAGTCTTCCAGGCCCCAGGGCAG	1.2	3MMs [1:4:13]		chr8:+93714492
GGAAACTCCCAGGCCCTGGGAGG	1.1	3MMs [5:8:17]		chr18:+59174220
GTAAACTTCCAGGCCCCAGAGAAG	1.1	3MMs [2:5:19]		chrX:-39658190
CGATTCCCCCAGGCCCCAGGGAAG	0.9	4MMs [1:4:7:8]		chr12:+50745771
GGAAATGCTCAAGGCCCCAGGGAAG	0.9	3MMs [6:7:10]		chr19:+65423564
AATATCATCCAGGCCCCAGGGAAG	0.9	4MMs [1:2:3:7]		chr15:-11556081
GCATCCATCCAGGCCCCAGGGCAG	0.9	4MMs [2:4:5:7]		chr16:+82610884
GAGTTCCTCCAGGCCCCAGGGTGG	0.9	4MMs [2:3:4:7]		chr19:+30398533
GGAGTACCAAGGCCCCAGGGGGG	0.9	4MMs [4:7:8:10]		chr7:+128055030
TGATTGTGCCAGGCCCCAGGGAAG	0.8	4MMs [1:4:6:8]		chr1:-171221514
GGAATTTTAAAGGCCCCAGGGTAG	0.8	3MMs [6:9:10]		chr12:-25922373
GGGAACTGGCAGGCCCCAGGGAAG	0.8	4MMs [3:5:8:9]		chr7:+135307125
TAATTTGTCCAGGCCCCAGGGCAG	0.8	4MMs [1:2:4:6]		chrX:+153741637
CGAGGCTTCCGGGCCCCAGGGAAG	0.8	4MMs [1:4:5:11]		chr10:+81799839
AGATGCTTCCGGGCCCCAGGGGAG	0.8	4MMs [1:4:5:11]		chr13:+41363540
AGAATTTGCAAGGCCCCAGGGTAG	0.8	4MMs [1:6:8:10]		chr16:-87209693
TACATCTTCCGGGCCCCAGGGCAG	0.8	4MMs [1:2:3:11]		chr12:-52632230
AGTATCTTTAAGGCCCCAGGGAAG	0.8	4MMs [1:3:9:10]		chr5:-118477529
GGCATCTCCAGGCTCAGGGAGG	0.8	3MMs [3:8:15]		chr3:-62091741
TGATTCTTCATGGGCCCCAGGGCAG	0.7	4MMs [1:4:10:11]		chr1:-17605345
TGAGTCTCCAAGGCCCCAGGGGAG	0.7	4MMs [1:4:8:12]		chr1:+49258443
TGAGTCTCCAAGGCCCCAGGGGAG	0.7	4MMs [1:4:8:12]		chr1:+49258921
GTAAACTCCCATGCCCCAGGGCAG	0.7	4MMs [2:5:8:12]		chr3:-132084083
ATAATCTACCAGGCCCCAGGCTGG	0.7	4MMs [1:2:8:20]		chr1:+225713244
TGTCTCTTCCAGGCCCCAGGCAGG	0.7	4MMs [1:3:4:20]		chr18:+32650681
AGGATCTGCCAGGCCCCAGGAGGG	0.7	4MMs [1:3:8:20]		chr10:-64057218
GGAACCTCCTGGGCCCCAGGGGAG	0.7	4MMs [5:8:10:11]		chr1:+227829047
GGTACCTCCCAGGCCCCAGGATAG	0.7	4MMs [3:5:8:20]		chr1:+171119260
GGCATATTCAGGCCCCAGAGAAG	0.6	3MMs [3:6:19]		chr17:+53628022
GGCATCTCTAGGCCCCAGGTGGG	0.6	4MMs [3:8:10:20]		chr11:-35309879
TCACTCTTCCAGACCCAGGGGAAG	0.6	4MMs [1:2:4:13]		chr13:-118104055
CCACTCTTCCAGACCCAGGGGAG	0.6	4MMs [1:2:4:13]		chr10:-86863108
CGCAGCTTCCAGACCCAGGGTAG	0.6	4MMs [1:3:5:13]		chr3:+63556086
GGATTCCCGCAGGCCCCAGGGTAG	0.6	4MMs [4:7:8:9]		chr2:+44444903
GGAACCTTCTAGGCCCATGGAAG	0.6	3MMs [5:10:18]		chr14:+81410726
GGAGCCTTCTAGGCCCTGGGTAG	0.5	4MMs [4:5:10:17]		chr14:-84339927
GCAACCTTCCAGGCCAAGGGAGG	0.5	3MMs [2:5:16]		chr5:+173667523

Table 2. Top 20 genome-wide off-target sites of guide#21. There are total 323 off-target sites (0 in genes).

31	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-67	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-37	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-82	GGGGAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
12	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	A GGG CGG TCCT	(+1)
52	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-103	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-101	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-9	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-92	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-99	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-116	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-19	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
44	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
13	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	C-	-----	(Δ103)
1-24	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
32	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-56	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-68	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-108	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-46	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	(+2)
1-16	GGGAAGGGA	ATCTT-----	CA	GGG CGG TCCT	(Δ7)
1-76	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-22	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
41	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-89	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
37	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-4	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-12	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	C GGG CGG TCCT	(+1)
1-115	GGGA-GGGA A	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	(Δ1, +1)
1-73	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
1-109	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	
WT	GGGAAGGGA	ATCTTCCAGGCC	CA	GGG CGG TCCT	

27コロニー中6コロニーに変異(deletion/mutation) WT
× 21
deletion × 2 [Δ7], [Δ103]
insertion × 4
Deletion/insertion × 1 [Δ1/+1]

Fig.5. Effect of DNA double strand breaks by CRISPR/Cas9 (guide#21).

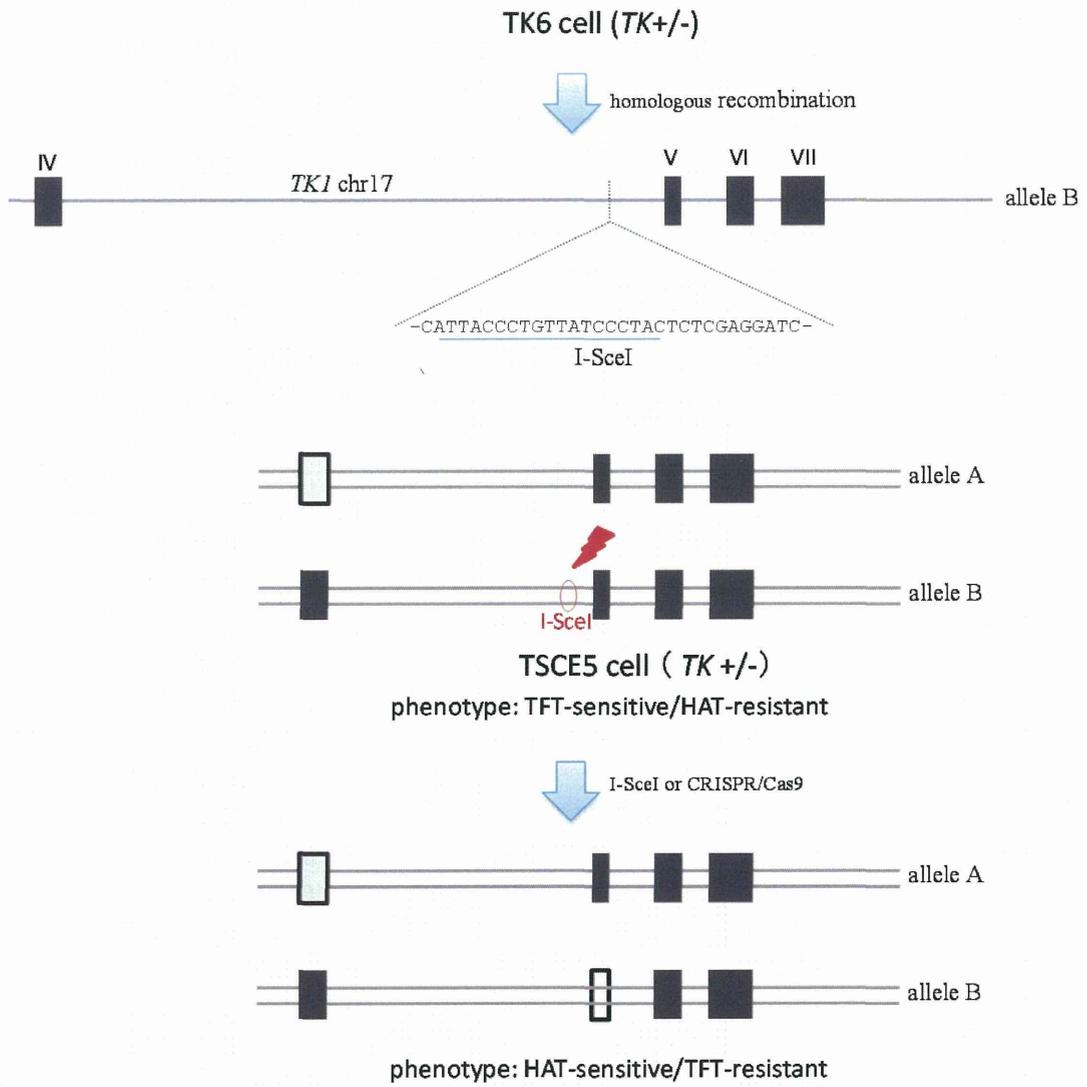
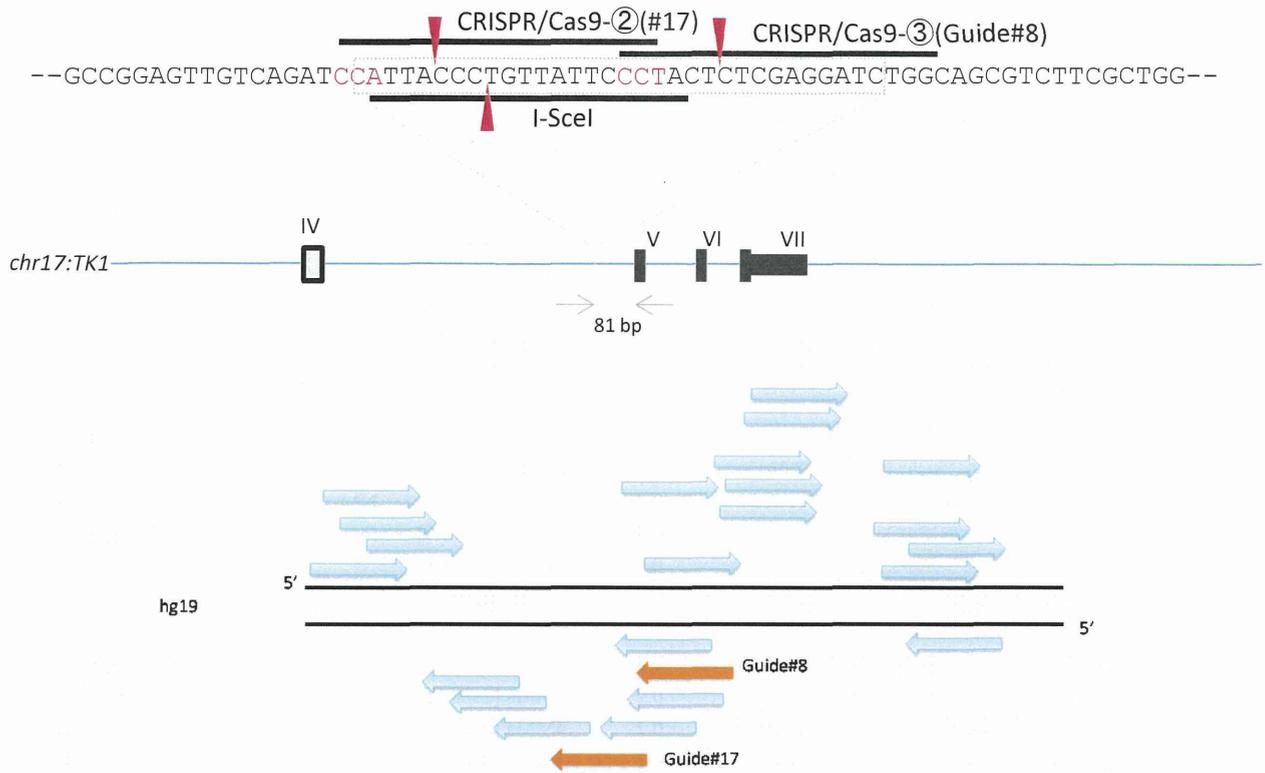


Fig.6. Scheme of TK1 assay.



	score	sequence
high quality guide	Guide #1	92 TATCCCTACTCTCGAGGATCTGG
	Guide #2	91 ATCTGACAACCTCCGGCCATTTGG
	Guide #3	89 GATCTGGCAGCGTCTTCGCTGGG
	Guide #4	88 TCCTCGAGAGTAGGGATAACAGG
	Guide #5	87 AAGAGTTACTCCGGGCCAAATGG
	Guide #6	86 CTGCCAGATCCTCGAGAGTAGGG
	Guide #7	86 CCCTGTTATCCCTACTCTCGAGG
	Guide #8	85 GCTGCCAGATCCTCGAGAGTAGG
	Guide #9	85 GTTACTCCGGGCCAAATGGCCGG
	Guide #10	81 ATCTGGCAGCGTCTTCGCTGGGG
	Guide #11	80 GGTAATGGATCTGACAACCTCCGG
	Guide #12	79 ACAACTCCGGCCATTTGGCCCGG
	Guide #13	76 CCTCGAGAGTAGGGATAACAGGG
	Guide #14	72 GGAGAATTAAGAGTTACTCCGGG
	Guide #15	69 GGGAGAATTAAGAGTTACTCCGG
	Guide #16	66 GCGTCTTCGCTGGGGCTCCAGGG
	Guide #17	60 GAGTAGGGATAACAGGGTAATGG
mid quality guide	Guide #18	58 AGCGTCTTCGCTGGGGCTCCAGG
	Guide #19	46 GGATCTGGCAGCGTCTTCGCTGG
	Guide #20	34 GGCTCCAGGGAGCTGCTGCTGGG
	Guide #21	28 CCACCCAGCAGCAGCTCCCTGG
	Guide #22	26 CCAGGGAGCTGCTGCTGGGGTGG
	Guide #23	25 GGGCTCCAGGGAGCTGCTGCTGG
	Guide #24	16 GCTCCAGGGAGCTGCTGCTGGGG
low quality guide		

Fig.7. CRISPR design of guideRNA targeting *TK1* locus by CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>). Guides 8 and 17 were used in this experiments.