

## 人工ヌクレアーゼの特異性を調べる *in vitro* アッセイツールの開発

研究分担者 中村 公亮 （国立医薬品食品衛生研究所）

### 研究要旨：

本研究では、ゲノム編集食品の安全性評価法の一つとしてオフターゲット部位を網羅的に推定する SITE-Seq 法の有用性について、イネを用いて検証を行った。本研究結果より、オフターゲット予測は、各種オンラインオフターゲット予測ツールを使った *in silico* 解析だけでは不十分であることが確認された。相同性データベースを用いた解析は高確率で生じるオフターゲットを予測することができるが、予測された候補配列は SITE-Seq の予測を完全にカバーすることができず、実際に起こったオフターゲットの切断を見落とす可能性が示唆された。したがって、ガイド RNA を設計する際には、まず *in silico* 解析により最もユニークな配列を選抜した後、そのガイド RNA の潜在的なオフターゲットを SITE-Seq 法で生化学的に検証し、ゲノム編集作物で当該箇所の変異を確認する必要がある。この一連の解析について、高い再現性を有する試験法を確立することで、ゲノム編集作物の開発や安全性評価に役立つことが期待され、また、Cas9 の特異性に関する情報集積とその制御に貢献できると考える。

協力研究者 成島 純平 （国立医薬品食品衛生研究所）  
協力研究者 木俣 真弥 （国立医薬品食品衛生研究所）  
協力研究者 秋本 智 （国立医薬品食品衛生研究所）

### A. 研究目的

2019年10月よりゲノム編集食品の届出制度が開始され、国内での流通・販売が可能となった。ゲノム編集技術を応用することで、従来の育種方法より短期間で有用品種を作出することができる一方で、意図しない切断（オフターゲット）による影響を予測することは難しく、食品としての安全性を懸念する声がある。CRISPR/Cas9 システム利用時の簡便なオフターゲット予測としては、各種オンラインツールが汎用されており、予測された箇所についてサンガーシーケンスをして変異を確認するといった事例も見られるが、オフターゲット箇所を網羅できているかは不明である。そこで本研究では、NGS を使ってオフターゲット箇所を網羅的に検知する手法として、Selective enrichment and identification of tagged genomic DNA ends by sequencing (SITE-Seq) 法<sup>1)</sup> について、ゲノム編集イネを検査対象とした場合の有効性について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. サンプル

実験に使用したイネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) は農研機構農業生物資源ジーンバンクより分与して頂いた。その種子を発芽、培養し、1 週齢の幼植物体から DNA を抽出した。

#### 幼植物体の培養法

もみ殻を除き、70%エタノールで1分間洗浄後、次亜塩素酸（有効塩素濃度6%）溶液で30分間振とうして種子表面を滅菌後、クリーンベンチ内にて滅菌済み超純水でよくすすぎ、滅菌済み丸シャーレ（中に滅菌済み超純水で湿らせた滅菌済みのキムワイプを敷く）に静置した。3日ほどして発芽した種子をMS培地<sup>2)</sup>に移植して1週間無菌培養を行った。発芽と培養条件は28℃で16時間明期、8時間暗期とした。

#### 2. DNA の抽出と精製

DNA 抽出には幼植物体のシュート部のみを使

用した。ハサミで根本付近を切断後すぐさま液体窒素にて凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

#### CTAB 法

ZAP 処理済みの乳鉢・乳棒を用いてサンプルを破砕し、1.5% CTAB 溶液を 2.5 mL/サンプル 1 g 加えて  $56^{\circ}\text{C}$  で 20 分間インキュベートした。その後、CIA (Chloroform/Isoamyl alcohol, 24:1) を等量加えて室温で 20 分間転倒混和し、スイングローターを用いて 3,000 rpm、15 分間、室温で遠心分離した。遠心分離後のサンプルを優しく取り出し、上の水層を別のチューブへ移し、0.7 倍量のイソプロパノールを加えて転倒混和後、アングルローターにて  $4^{\circ}\text{C}$ 、10,000 xg、10 分間遠心した。チューブ内壁に見えるペレットを吸わないよう上清を捨て、70%エタノールでペレットを洗浄後、超純水 100  $\mu\text{L}$  でペレットを溶解し、DNase free RNase A (10 mg/mL) を 10  $\mu\text{L}$  添加、 $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分間インキュベートして RNA を分解した。そこへ 44  $\mu\text{L}$  SPRIselect (Beckman Coulter, Inc. USA, cat. No. B23317) を添加し、優しく混和後、マグネットスタンドを用いてビーズを集めて上清のみ破棄し、85%エタノールを 180  $\mu\text{L}$  でビーズを 3 回洗浄し、風乾後に超純水を 30  $\mu\text{L}$  加えて 5 分間静置して DNA を溶解させ、マグネットスタンドを使って上清のみ回収した。そこへ RNase secure (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA, cat. NO. AM7005) を 1.2  $\mu\text{L}$  加えて  $60^{\circ}\text{C}$ 、10 分間インキュベートして RNase A を失活させた後、室温になってから Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて濃度測定を行った。また、アガロースゲル電気泳動を行い、品質を評価した。DNA の保存は  $4^{\circ}\text{C}$  で行い、調製後 24 時間以内に使用した。

#### 3. ガイド RNA の選定

ガイド RNA については、既に報告されている論文の中から選定した。Acetolactate synthase (ALS, EC2.2.1.6) については、W548L および S627I 変異によりスルホニルウレア系除草剤耐性を獲得することが報告されており<sup>3)</sup>、これら 2 か所を CRISPR/Cas9 システムにより改変した文献<sup>4)</sup>に記載されているガイド RNA を用いた。また、2017 年に発表されたジャポニカイネ (*Oryza sativa* L. subsp. japonica) を対象に

CRISPR/Cas9 で 2 本鎖切断を行っている論文の中から 4 報<sup>5-8)</sup>を選定し、それ等に用いられた 5 つのガイド RNA を試験に供した。ガイド RNA の配列は表 1 に記載した。

#### 4. ガイド RNA の合成と精製

ガイド RNA の合成と精製には、Agilent SureGuide gRNA Synthesis Kit を用いた。付属プロトコルに従い、本検討では、長鎖型の (extended backbone) シングルガイド RNA を合成した。まず、ガイド RNA 合成の鋳型となる 2 本鎖 DNA を作成するため、次のプライマーを合成した。

Primer-Forward: 5' -CG ATG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GXX XXX GTT TTA GAG CTA TGC TGA AA-3' ;  
Primer-Reverse: 5' -AAG CAC CGA CTC GGT GCC ACT TTT TCA AGT TGA TAA CGG ACT AGC CTT ATT TTA ACT TGC TAT GCT TTT CAG CAT AGC TCT AAA ACY-3'

(「X」は標的とする 20 塩基; 「X」 と 「Y」 は相補塩基とする; 下線はオーバーラップする領域)。表 1 に記載したプライマーを使用し、以下の反応液 (50  $\mu\text{L}$ /反応) を調製した: 5x Herculase II reaction buffer (10  $\mu\text{L}$ )、2.5 mM each dNTPs (4  $\mu\text{L}$ )、10  $\mu\text{M}$  primer-forward (5  $\mu\text{L}$ )、10  $\mu\text{M}$  primer-reverse (5  $\mu\text{L}$ )、Herculase II Fusion DNA polymerase (1  $\mu\text{L}$ )、DW (28  $\mu\text{L}$ )。この反応液を  $95^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、次いで  $60^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、最後に  $72^{\circ}\text{C}$  で 3 分間インキュベートした。合成された鋳型 DNA (130 bp) は、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製し、吸光度測定結果をもとに、1  $\mu\text{M}$  に再調製した。

続いて調製した 2 本鎖 DNA を鋳型にガイド RNA を合成するために、次の反応液 (20  $\mu\text{L}$ /反応) を調製した: DPEC water (7.5  $\mu\text{L}$ )、5x Transcription buffer (5  $\mu\text{L}$ )、rATP (1  $\mu\text{L}$ )、rCTP (1  $\mu\text{L}$ )、rGTP (1  $\mu\text{L}$ )、rUTP (1  $\mu\text{L}$ )、0.75 M DTT (1  $\mu\text{L}$ )、Yeast Pyrophosphatase (0.5  $\mu\text{L}$ )、RNase Block (1  $\mu\text{L}$ )、T7 RNA polymerase (1  $\mu\text{L}$ )。この反応液に 1  $\mu\text{M}$  鋳型 DNA を 5  $\mu\text{L}$  添加し、混和後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 4~16 時間インキュベートした。その後 RNase-free DNase を 1  $\mu\text{L}$  添加し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間インキュベートした。十分量のガイド RNA を得るため (50  $\mu\text{M}$  以上)、一種類のガイド RNA あたり、4 反応分 (100  $\mu\text{L}$ ) 調製し、キット付属のプロトコルに従い精製した。ただし、次の工程を改良した: 2 反応液分のガイド RNA を 1 つのカラムに吸着させ、25  $\mu\text{L}$

の nuclease-free water で溶出させた。ガイド RNA 量は、Nanodrop ND-1000 で測定し、濃度はその分子量 (108 bp) をもとに算出した。ガイド RNA は、使用するまで -80°C に保存した。

## 5. ゲノム DNA の Cas9 切断

ゲノム DNA の 2 本鎖切断は、様々な濃度のガイド RNA-Cas9 複合体 (Ribonucleoprotein, RNP) で処理した。オフターゲットの出現場所と頻度はガイド RNA の配列だけでなく、ゲノム編集の際に使用される Cas9 の添加濃度とも関連することが報告されている<sup>9)</sup>ことから、本検討では、Cas9 の終濃度を 1、64、256、1,024 nM に設定し、ガイド RNA 濃度はその 15 倍添加した。酵素反応は、1x CCB (Cas9 Cleavage buffer; 20 mM HEPES、150 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、5% glycerol、pH 7.4) で行った。まず、RNP 複合体を形成させるため、15  $\mu$ L の Cas9 (3.3x CCB に溶解) と 15  $\mu$ L のガイド RNA (DW に溶解) を 1 : 15 の濃度比となるように混合し (例 : 213 nM Cas9 : 3.2  $\mu$ M ガイド RNA)、37°C で 10 分間インキュベートした。ガイド RNA は、95°C で 2 分間加熱後、室温で 5 分間静置してから使用した。ここに、20  $\mu$ L のゲノム DNA (150 ng/ $\mu$ L) を添加し、37°C で 16 時間インキュベートすることで、十分にゲノム DNA を切断した。その後、RNA 分解溶液 6.3  $\mu$ L (10 mg/mL RNase A、4.4  $\mu$ L; 5x CCB、1.4  $\mu$ L; DW、0.5  $\mu$ L) を添加し、37°C で 20 分間インキュベートした。さらに、proteinase K (20 mg/mL) を 0.5  $\mu$ L 添加し、55°C で 20 分間インキュベートして Cas9 を失活させた。次の工程まで、氷中で一時的に保管した。

## 6. シーケンスライブラリーの調製

SITE-Seq 法でオフターゲット切断部位を特定するため、Illumina MiSeq システムに対応した DNA ライブラリーを以下の通り作成した。

上記で Cas9 処理したゲノム DNA (50  $\mu$ L 全量) は、エタノール沈殿法により精製し、25  $\mu$ L の DW で溶解させた。Cas9 切断面末端にアデニンを付加するため、DNA 溶液 (25  $\mu$ L) に 10x NEB2 (5  $\mu$ L)、10 mM dATP (5  $\mu$ L)、Klenow Exo<sup>-</sup> (3  $\mu$ L)、DW (12  $\mu$ L) を添加し、37°C で 30 分間反応させた。この A 突出末端へのビオチンアダプター (Adapter 1) の結合は、100  $\mu$ M Adapter 1 For (1  $\mu$ L)、100  $\mu$ M Adapter 1 Rev (1  $\mu$ L)、DW (8  $\mu$ L)、2x annealing

buffer (20 mM Tris、100 mM NaCl、2 mM EDTA、pH 7.5) (10  $\mu$ L) を混合し 95°C で 5 分間インキュベートした後、室温で 45 分間放置し、この 2 本鎖化した Adapter 1 (2  $\mu$ L) と dA 付加した DNA (38  $\mu$ L)、NEB 10x T4 DNA ligase buffer (5  $\mu$ L)、NEB Quick Ligase (5  $\mu$ L) を混合した溶液を 20°C で 30 分間、次いで 16°C で 16 時間インキュベートすることで完了した。

ビオチンアダプター付き DNA は、マグネットビーズ型のサイズ別 DNA 回収試薬 SPRISelect を用いて、付属のプロトコルに従い精製した。DNA 溶液 50  $\mu$ L に対して、0.5 倍量の SPRISelect 試薬 (25  $\mu$ L) を加え、よく混合した。室温で 5 分間放置した後、マグネットスタンドを用いてビーズ (DNA) と上清を分離し、上清を破棄した。ビーズを 85% エタノール 175  $\mu$ L で 30 秒間洗浄した。この洗浄は二回繰り返した。完全にエタノールを取り除き、ビーズが乾燥する前に、50  $\mu$ L の DW を加え、十分に懸濁した。室温で 10 分間静置した後、DW に溶出した DNA 45  $\mu$ L を回収した。

上記 DNA (40  $\mu$ L) と NEB 10x dsFragmentase buffer v2 (5  $\mu$ L)、NEB dsFragmentase Enzyme (1.5  $\mu$ L)、DW (3.5  $\mu$ L) を混合し、37°C で 1 時間反応させ、DNA の断片化を行った (時間厳守; 長時間のインキュベートは DNA を過度に分解させる)。12.5  $\mu$ L の 0.5 M EDTA を添加し触媒を停止させ、37.5  $\mu$ L の DW を添加した。その直後、0.9x SPRISelect 処理により、200~1000 bp の DNA 断片を 45  $\mu$ L 回収した。切断末端は、断片化 DNA (27.7  $\mu$ L) と NEB 10x End-repair reaction buffer (3.3  $\mu$ L)、NEB End-repair enzyme mix (1.5  $\mu$ L)、DW (0.5  $\mu$ L) を混合した反応液を 20°C、30 分間に次ぐ 65°C、30 分間のインキュベートで修復した。修復面へのアダプター (Adapter 2) の結合は、100  $\mu$ M Adapter 2 N7 For (1  $\mu$ L) と 100  $\mu$ M Adapter 2 N6 For (1  $\mu$ L)、100  $\mu$ M Adapter 2 N5 For (1  $\mu$ L)、100  $\mu$ M Adapter 2 Rev (3  $\mu$ L)、2x annealing buffer (6  $\mu$ L) を混合し 95°C で 5 分間インキュベートした後、室温で 45 分間放置し、この 2 本鎖化した Adapter 2 (1.25  $\mu$ L) と末端修復 DNA (32.5  $\mu$ L)、NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (7.5  $\mu$ L)、NEB Ligase enhancer (0.5  $\mu$ L) を混合した溶液を 20°C で 30 分間、次いで 16°C で 16 時間反応させることで完了した。

Cas9 で切断された DNA の選択的な回収は、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用した。

まず、1 反応あたり、25  $\mu\text{L}$  の Dynabeads (Invitrogen、ベリタス社) を 125  $\mu\text{L}$  の 1x BW buffer (5 mM Tris、1 M NaCl、0.5 mM EDTA、pH 7.5) で 5 分間、回転させながら洗浄した。これを 2 回繰り返した後、41  $\mu\text{L}$  の 2x BW buffer でビーズを再懸濁した。ここに等量の DNA 試料 (41  $\mu\text{L}$ ) を添加し、室温で 30 分間、溶液を混合した。マグネットで上清を破棄し、200  $\mu\text{L}$  の 1x BW buffer で 30 秒間洗浄した。これを 2 回繰り返し、さらに、同様の洗浄を 10 mM Tris-HCl、pH 8.5 を用いて行った。DNA が吸着したビーズは、20  $\mu\text{L}$  の 10 mM Tris-HCl で再懸濁した。

DNA ライブラリーへのインデックス付加は、リカバリー PCR 後に行った。上記で得た DNA-ビーズ混合液 (20  $\mu\text{L}$ ) と 10  $\mu\text{M}$  Recovery PCR For primer (2.5  $\mu\text{L}$ )、10  $\mu\text{M}$  Recovery PCR Rev primer (2.5  $\mu\text{L}$ )、NEB 2x Phusion Master Mix (25  $\mu\text{L}$ ) を混合し、以下の温度サイクルで DNA を増幅させた：[98°C, 30 秒] x 1、[98°C, 10 秒 ; 61°C, 30 秒 ; 72°C, 2 分] x 12、[72°C, 2 分] x 1、[4°C,  $\infty$ ] x 1。ビーズと上清とをマグネットを用いて完全に分離し、上清 30  $\mu\text{L}$  を回収した。その上清 3  $\mu\text{L}$  と DW 148.5  $\mu\text{L}$  を混合し、次のインデックス PCR の鋳型として用いた。鋳型 DNA (12  $\mu\text{L}$ ) と NEB 2x Phusion Master Mix (20  $\mu\text{L}$ )、5  $\mu\text{M}$  Index primer For (4  $\mu\text{L}$ )、5  $\mu\text{M}$  Index primer Rev (4  $\mu\text{L}$ ) を混合し、以下の温度サイクルで DNA を増幅させた：[98°C, 30 秒] x 1、[98°C, 10 秒 ; 60°C, 30 秒 ; 72°C, 2 分] x 12、[72°C, 2 分] x 1、[4°C,  $\infty$ ] x 1。

目的サイズの DNA 断片 (200~800 bp) は、複数回の SPRISelect 処理で精製した。上記と同様に 0.7x 処理で DNA を精製した後、別法により 1,000 bp 以上の断片を排除し、さらに 0.7x 処理 (1 回目と同様) により僅かに残存したプライマーダイマー (~200 bp) を完全に除去した。以下に 1,000 bp 以上の DNA 断片を排除する SPRISelect 別法を記載する。ここでは、目的外の DNA サイズ断片をビーズに吸着させ、必要な DNA サイズ断片を含む上清を回収する点に注意する。まず、DNA 溶液に 0.5 倍量の SPRISelect 試薬を混合し、室温で 5 分間静置した。マグネットを用いて上清を全量回収し、この上清に 1.3 倍量の SPRISelect 試薬を追加した (以下、通常法に準ずる)。室温で 5 分間静置した後、マグネットを用いて上清を破棄し、1 mL の 85%エタノ

ールで 2 回洗浄した。廃液を完全に取り除き、1 倍量の DW で DNA を溶出した。

調製した DNA ライブラリーの品質は、Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip を用いて評価した。プライマーダイマーが存在しないこと、また、>1,000 bp の DNA 断片が多量に含まないことを確認した。DNA 濃度を見積もるため、ライブラリーの平均サイズ値を記録した。本方法で作製されるライブラリーの平均 DNA サイズは、約 650 bp である。2 本鎖 DNA の量は Qubit HS で測定し、この数値 (ng/ $\mu\text{L}$ ) と平均 DNA 分子量値 (X-bp x 660 g/mol) から DNA ライブラリーの濃度を算出した。異なるインデックス配列が付加された各試料の DNA 濃度を同値に再調整した後、これらを等量混合し分析試料とした。

## 7. MiSeq を用いたシーケンス解析

DNA ライブラリーの変性は、サンプルと等量の 0.2 N NaOH を添加し、室温で 5 分間静置して完了した。変性後、DNA は直ちに水中に移行させた。MiSeq Reagent Kit v3 (150 サイクル) に付属の緩衝液 HT1 を用いて、ライブラリーを 10 pM に希釈した。この時、NaOH の終濃度は 0.001 N 以下とした。10 pM ライブラリー 600  $\mu\text{L}$  を試薬カートリッジ (同キット) の 17 ポートにロードし、フローセル (同キット)、PR2 試薬 (同キット) とともに MiSeq に取り付け、解析を開始した。フローセルは、取り付け前に超純水で塩を洗い流し、エタノールで汚れと曇りをふき取った。

解析のワークフローは、Illumina Experimental Manager (IEM, v1.16.1) で作成した。本ソフトは Illumina 社のサイトから無償でダウンロード可能である。

[[http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/experiment\\_manager/ddownload.html?langsel=/jp/](http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager/ddownload.html?langsel=/jp/)]

IEM を用いたサンプルシートの作成方法を以下に示す。まず、Illumina Experimental Manager を起動し、「Create Sample Sheet」を選択する。「MiSeq」をクリックし、「Next」ボタンを押す。次ページで、Select Category は「Other」、Select Application は「FASTQ Only」を選択し、「Next」を押す。ワークフローのパラメーター以下の画面の通りに設定した (UD index が選択される任意の work flow prep を選択する)。画面右の specific settings のチェックはすべて外した。

Sample selection の記入例を以下に示す（注意点：sample ID は異なる名前にする）。

「Finish」ボタンを押すと、エクセル上で内容を確認する。このファイル名はカートリッジに記載されている Cartridge Barcode として保存する。MiSeq 装置本体に解析データを保存する場合、このサンプルシートは MiSeq 装置の特定の場所に保存した（[Computer]<[Data]<[Illumina]<[MiSeq Control Software]<[Sample sheets]）。

## 8. DSB 箇所のリファレンスゲノムへのマッピングとクリフ判定

様々な DNA 断片種が収容されたライブラリーを Cas9 切断面側からシーケンスし、得られたリードは、オン・オフターゲット部位を特定する情報とした。MiSeq より得られたシーケンスファイル (Fastq) は、公開されているイネリファレンスゲノムにマッピングし、Cas9 で切断された位置候補の特定、切断位置のゲノム上の情報、切断効率の情報取得を行った。マッピングソフトウェア bowtie2 (バージョン 2.3.4.2) を使い、リファレンスゲノムは IRGSP-1.0 を用いた。[<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>] 切断位置候補は、原著論文内の切断位置検出スクリプト (Python) にて解析した。切断位置が遺伝子のコーディング領域内に位置するかは、公開されているアノテーションファイルと bedtools (バージョン 2.27.0) にて参照した。また、個々の切断された位置情報は、IGV (Integrative Genomics Viewer バージョン 2.4) を使用しマッピング状況の確認は目視で行なった。

## 9. Galaxy を使用した DSB 判定ツールの開発

上記「8. DSB 箇所のリファレンスゲノムへのマッピングとクリフ判定」の中で使用した各種ソフトウェアは、BioContainers (Docker) を用いて、データ解析プラットフォーム Galaxy (<https://galaxyproject.org/>) に実装させた SITE-Seq 解析用ワークフローを作成しツールを開発した。

## 10. リアルタイム PCR を用いた切断確認

SITE-Seq 法が示すオフターゲット切断の妥当性は、リアルタイム PCR を用いて検討した。ガイ

ド RNA および Cas9 で切断されたゲノム DNA と、未処理のゲノム DNA (ネガティブコントロール;NC) を鋳型として、後述のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、 $C_{q_{sample}} - C_{q_{NC}}$  から  $\Delta Cq$  を算出した。 $\Delta Cq = n$  の時、鋳型 DNA の量は 2n 倍であることから、ネガティブコントロールの DNA 量を 100% とし、何%の鋳型 DNA が減少したかを、切断効率 (%、推定値) とした (例:  $\Delta Cq = 1$  の場合、ネガティブコントロールの鋳型 DNA の量は、切断処理した鋳型 DNA の 2 倍であるため、切断効率は 50% である)。Cas9 による切断処理は、「5. ゲノム DNA の Cas9 切断」に準じたが、proteinase K で Cas9 を失活させた後、95°C で 10 分間加熱することで proteinase K を失活させる工程を加えた。また比較として、ガイド RNA および Cas9 無添加のネガティブコントロールを切断サンプル同様に処理し、リアルタイム PCR に供した。

## プライマーの設計

SITE-Seq 法により予測されたカットサイトにまたがるようにプライマーを設計した。その際、プライマーの 3' エンドのミスアニーリングによる増幅を避けるため、カットサイトが Fwd もしくは Rev プライマー配列の 3' エンドから 3~5nt になるように設計した。

## 反応溶液の調製

ガイド RNA および Cas9 で切断処理した DNA 溶液は、1 ng/ $\mu$ L となるように超純水で希釈を行った。PCR 反応液は一反応当たり 25  $\mu$ L とし、12.5  $\mu$ L の 2x FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)、各 0.4  $\mu$ L の 50  $\mu$ M プライマー対、6.7  $\mu$ L の超純水と 5  $\mu$ L の鋳型 DNA を含めた。

## 使用機器及び分析の設定

分析には LightCycler 480 (Roche 社) を使い、分析モードは、SYBR Green I / HRM Dye を使用した。PCR の条件は以下の通りに設定した。ステップ 1 (pre-incubate) : [95°C, 10 分間] ×1 サイクル、ステップ 2 (amplification) : [95°C, 15 秒間]、[60°C, 1 分間] ×45 サイクル、ステップ 3 (cooling) : [40°C, 30 秒間] ×1 サイクルを分析プロトコルとし、ステップ 2 の 60°C インキュベート時に蛍光シグナルを回収した。核酸増幅曲線に由来する Cq 値 (quantification cycle) は

2nd derivative max 法で算出した。試験は全て 2 ウェル併行で行い、Cq 値の比較には 2 ウェルの平均値を用いた。

## C. 研究結果

### 1. イネからの DNA 抽出

ゲノム編集で生じた 2 本鎖切断位置を解析するに当たり、ゲノム DNA をいかに物理的な切断なしにインタクトな状態で精製するかが、SITE-Seq 法の特異性を上げるため最も重要となる。本研究では、CTAB 法による幼植物体からのゲノム DNA の精製を行い、得られたゲノム DNA の品質を 1% (w/v) アガロースゲル電気泳動で評価した。0.5 ~1.0 µg DNA をアガロースゲルのウェルにロードし、観察したところ、幼植物体から抽出された高分子量 DNA に相当するバンドの他に、<500 bp のバンドが確認された (図 1)。そのため CTAB 法による DNA 抽出後に SPRISelect によるビーズ精製を行うことで 1 kbp 以下の DNA を除き、これを鋳型 DNA として SITE-Seq 解析に供試した。

### 2. ALS target1 解析結果

CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行う場合、従来の遺伝子組換えとは異なり、indel によるフレームシフトを伴うノックアウト、もしくは塩基置換は規制の対象外となる可能性がある。ALS のように塩基置換により有用形質を獲得するケースは、食品への利用が十分考えられたため、本研究では、まず ALS をターゲットとして解析を行った。

#### エクソン内オフターゲット数の傾向

ALS の W548 をターゲットとしたガイド RNA (ALS target1) を用いた結果、Cas9 濃度 64 nM および 256 nM ではオンターゲットの切断が確認された。一方で、1 nM および 1,024 nM では切断が確認されず (図 2, 5)、この傾向は昨年度ヒト・ブタ DNA を用いた場合の傾向と一致した。

各濃度でのオフターゲット数としては、1 nM では 62 か所 (エクソン内では 10 か所)、64 nM では 347 か所 (エクソン内では 50 か所)、256 nM では 535 か所 (エクソン内では 53 か所)、1,024 nM では 836 か所 (エクソン内では 106 か所) となっており、切断処理する Cas9 濃度が上がるにつれて、オフターゲット箇所も増加する傾向にあった (図 3)。また、エクソン内のオフターゲット箇

所の内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nM と 256 nM で共通して検出されたオフターゲット箇所が 4 か所、64 nM と 1,024 nM で共通して検出されたオフターゲット箇所が 1 か所、256 nM と 1,024 nM で共通して検出されたオフターゲット箇所が 7 か所で、これらの内、1 nM、64 nM、256 nM の 3 濃度で共通して検出されたオフターゲット箇所が 1 か所、64 nM、256 nM、1,024 nM で共通して検出されたオフターゲット箇所が 1 か所であった。4 濃度で共通して検出されたオフターゲット箇所は 0 か所であった (図 4)。異なる Cas9 切断処理濃度で共通して検出された 8 か所について、カットサイト付近の配列とガイド RNA 配列を比較すると (図 5)、オフターゲット②、③、⑥、⑨は近接した PAM 配列が存在し、ミスマッチ数が順番に 10、6、4、7 塩基であった。さらにオフターゲット②に関しては 1 塩基の DNA バルジ (2 本鎖の核酸において、相補的な塩基が存在しない場合に生じる二次構造で、片方の鎖が膨らむ構造) が 1 か所、オフターゲット③に関しては 1 塩基の RNA バルジが 1 か所、オフターゲット⑨に関しては 1 塩基の DNA バルジが 1 か所生じていた。オフターゲット①、④、⑤、⑦、⑧に関しては近接した PAM 配列が存在しなかった。

#### リアルタイム PCR を用いた妥当性確認

ゲノム DNA を ALS target1 ガイド RNA と Cas9 (256 nM) で 37°C 16 時間切断処理後、カットサイトにまたがるように設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、SITE-Seq 法の妥当性について検証を行った。RNP 無処理のネガティブコントロールと比較して、 $Cq_{\text{Sample}} - Cq_{\text{NC}}$  から  $\Delta Cq$  値を算出した。オフターゲットについてはリード数の多い 2 か所 (オフターゲット⑥、⑨) でリアルタイム PCR を実施した。その結果、オンターゲットにおいては  $\Delta Cq = 1.88$  (切断効率 74.09%)、オフターゲット⑥においては  $\Delta Cq = 0.20$  (切断効率 13.04%)、オフターゲット⑨においては、 $\Delta Cq = 0.08$  (切断効率 5.66%) であった (図 6)。これらの結果から、ALS target1 に関しては特異性の高いガイド RNA であることが示唆された。

### 3. ALS target2 解析結果

#### エクソン内オフターゲット数の傾向

ALSのS627をターゲットとしたガイドRNA(ALS target2)を用いた結果、Cas9濃度64 nM、256 nMおよび1,024 nMでオンターゲットの切断が確認され、1 nMでは切断が確認されなかった(図7, 10)。

各濃度でのカットサイト数としては、1 nMでは86か所(エクソン内では6か所)、64 nMでは87か所(エクソン内では10か所)、256 nMでは537か所(エクソン内では52か所)、1,024 nMでは1,065か所(エクソン内では156か所)となっており、切断処理するCas9濃度が上がるにつれて、カットサイトも増加する傾向だった(図8)。また、エクソン内のカットサイトの内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nMと256 nMで共通して検出されたオフターゲット箇所が3か所、64 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが2か所、256 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが6か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが2か所であった。4濃度で共通して検出されたカットサイトは0か所であった(図9)。異なるCas9切断処理濃度で共通して検出された7か所(オンターゲット含む)について、カットサイト付近の配列とガイドRNA配列を比較すると(図10)、オフターゲット①、③、⑤、⑥は近接したPAM配列が存在し、ミスマッチ数が順番に8、6、7、8塩基であった。さらにオフターゲット③に関しては2塩基のDNAバルジが1か所、オフターゲット⑤に関しては1塩基のDNAバルジが2か所、オフターゲット⑥に関しては1塩基のDNAバルジおよびRNAバルジが1か所ずつ生じていた。オフターゲット②、④に関しては近接したPAM配列が存在しなかった。

#### リアルタイムPCRを用いた妥当性確認

オンターゲットにおいては $\Delta Cq=1.19$ (切断効率56.14%)、オフターゲット⑥においては $\Delta Cq=0.48$ (切断効率28.06%)であった(図11)。このことから、ALS target2に関しては特異性の高いガイドRNAであることが示唆された。

#### 4. SBE1 解析結果

SBE1ガイドRNAを用いた結果、Cas9濃度64 nM、256 nMおよび1,024 nMの全ての濃度下で切断が確認されなかった(図12, 15)。

各濃度でのカットサイト数としては、64 nMでは199か所(エクソン内では4か所)、256 nMでは324か所(エクソン内では10か所)、1,024 nMでは990か所(エクソン内では137か所)となっており、切断処理するCas9濃度が上がるにつれて、カットサイトも増加する傾向だった(図13)。また、エクソン内のカットサイトの内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nMと256 nMで共通して検出されたカットサイトが4か所、64 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが3か所、256 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが7か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが3か所であった(図14)。異なるCas9切断処理濃度で共通して検出された8か所について、カットサイト付近の配列とガイドRNA配列を比較すると(図15)、オフターゲット②は近接したPAM配列が存在し、ミスマッチが6塩基(特に3'側10塩基ではミスマッチが1塩基)で比較的相性は高かった。オフターゲット⑥に関してはカットサイトから5~7塩基離れたところにPAM様配列が存在するものの、ミスマッチが13塩基で2塩基のDNAバルジが存在し、相性は低かった。オフターゲット①、③、④、⑤、⑦、⑧に関しては近接したPAM配列が存在せず、相性も低い箇所であった。

#### 5. SBE3 解析結果

SBE3をターゲットとしたガイドRNAを用いた結果、Cas9濃度64 nM、256 nMおよび1,024 nMの全ての濃度で切断が確認された(図16, 19)。

各濃度でのカットサイト数としては、64 nMでは148か所(エクソン内では5か所)、256 nMでは279か所(エクソン内では9か所)、1,024 nMでは387か所(エクソン内では9か所)であった(図17)。また、エクソン内のオフターゲット箇所の内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nMと256 nMで共通して検出されたカットサイトが4か所、64 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが2か所、256 nMと1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが4か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nMで共通して検出されたカットサイトが2か所であった(図18)。異なるCas9切断処理濃度で共通して検出された5か所(オン

ターゲット含む) について、カットサイト付近の配列とガイド RNA 配列を比較すると (図 19)、オフターゲット①は近接した PAM 配列が存在したものの、ミスマッチが 11 塩基で相同性は低かった。オフターゲット②、④に関してはカットサイトから 8~10 塩基離れたところに PAM 様配列は存在したものの、ミスマッチが 10 塩基で、2 塩基の DNA バルジが存在し、相同性は低かった。しかしオフターゲット②、④はカットサイト付近の配列が同一であり、共にクリフとして検出されたということは、ガイド RNA とゲノム DNA の相同性が低くとも切断する何らかの規則性があることが示唆された。なお、ガイド RNA および Cas9 による切断を行わないで SITE-Seq 解析に供したネガティブコントロールではオフターゲット②、④は検出されないことを確認しており、DNA 抽出やライブラリー調製時の DNA の物理的な剪断によるものではないと考えられる。

## 6. BSR1 解析結果

BSR1 をターゲットとしたガイド RNA を用いた結果、Cas9 濃度 64 nM、256 nM および 1,024 nM の全ての濃度で切断が確認されなかった (図 20, 23)。

各濃度でのカットサイト数としては、64 nM では 218 か所 (エクソン内では 3 か所)、256 nM では 433 か所 (エクソン内では 8 か所)、1,024 nM では 281 か所 (エクソン内では 9 か所) であった (図 21)。また、エクソン内のカットサイトの内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nM と 256 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所、64 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所、256 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 4 か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所であった (図 22)。異なる Cas9 切断処理濃度で共通して検出された 4 か所について、カットサイト付近の配列とガイド RNA 配列を比較すると (図 23)、オフターゲット①、③、④では近接する PAM 配列が存在し、オフターゲット①に関してはミスマッチが 6 塩基、1 塩基と 2 塩基の DNA バルジがそれぞれ 1 か所であった。オフターゲット③に関してはミスマッチが 8 塩基、1 塩基の DNA バルジが 1 か所であった。オフターゲット④に関してはミスマッチが 9 塩基、また 1

塩基の DNA バルジが 1 か所であった。オフターゲット②に関してはガイド RNA との相同性は低かった。

## 7. HAK1 解析結果

HAK1 をターゲットとしたガイド RNA を用いた結果、Cas9 濃度 64 nM、256 nM および 1,024 nM の全ての濃度で切断が確認されなかった (図 24, 27)。

各濃度でのカットサイト数としては、64 nM では 199 か所 (エクソン内では 4 か所)、256 nM では 324 か所 (エクソン内では 10 か所)、1,024 nM では 990 か所 (エクソン内では 137 か所) となっており、切断処理する Cas9 濃度が上がるにつれて、カットサイトも増加する傾向だった (図 25)。また、エクソン内のカットサイトの内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nM と 256 nM で共通して検出されたカットサイトが 4 か所、64 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 3 か所、256 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 7 か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 2 か所であった (図 26)。異なる Cas9 切断処理濃度で共通して検出された 10 か所 (オンターゲット含む) について、カットサイト付近の配列とガイド RNA 配列を比較すると (図 27)、オフターゲット①~⑨全てで近接する PAM 配列が存在し、オフターゲット①に関してはミスマッチが 6 塩基、また 3 塩基の RNA バルジおよび 2 塩基の DNA バルジがそれぞれ 1 か所であった。オフターゲット②~⑨に関しては、ミスマッチの数が順番に 9、11、9、11、9、12、9、10 塩基であった。さらにオフターゲット⑦は 1 塩基の DNA バルジが 1 か所、オフターゲット⑨に関しては 4 塩基の DNA バルジが 1 か所であった。

## 8. FH15 解析結果

### エクソン内カットサイト数の傾向

FH15 をターゲットとしたガイド RNA を用いた結果、Cas9 濃度 64 nM、256 nM および 1,024 nM の全ての濃度でオンターゲットの切断が確認された (図 28, 31)。

各濃度でのカットサイト数としては、64 nM では 219 か所 (エクソン内では 4 か所)、256 nM では 484 か所 (エクソン内では 9 か所)、1,024 nM



では 425 か所 (エクソン内では 139 か所) であった (図 29)。また、エクソン内のカットサイトの内、異なる濃度で共通して検出された箇所についても調査を行った。その結果、64 nM と 256 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所、64 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所、256 nM と 1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 7 か所で、これらの内、64 nM、256 nM、1,024 nM で共通して検出されたカットサイトが 1 か所 (オンターゲット) であった (図 30)。

#### SITE-Seq 法とオンラインオフターゲット予測ツールの比較

異なる Cas9 切断処理濃度で共通して検出された 9 か所のうち、オンターゲットを除く 8 か所のオフターゲットについて、イネのリファレンスゲノムが用意されている 5 つのオンラインオフターゲット予測ツール (Cas-OFFinder<sup>10)</sup>、CHOPCHOP<sup>11)</sup>、CRISPOR<sup>12)</sup>、CRISPRdirect<sup>13)</sup>、CRISPR-P v2.0<sup>14)</sup>) で予測されるか検証を行った (図 31)。その結果、Cas-OFFinder では 8 か所中 2 か所を予測したが、他のオンラインオフターゲット予測ツールでは全て予測されなかった。Cas-OFFinder では NGG もしくは NAG を PAM として認識し、ミスマッチが 9 塩基まで、また 2 塩基までの DNA もしくは RNA バルジを含む箇所を予測することが可能である。オフターゲット③に関しては NAG の近接した PAM 配列が存在し、ミスマッチが 3 塩基、DNA バルジが 2 塩基であり、オフターゲット④に関しては NGG の PAM が存在し、ミスマッチが 2 塩基、RNA バルジが 2 塩基と比較的相同性の高い箇所であったため、予測がなされたと考えられる。一方でオフターゲット①、⑤、⑦、⑧に関しては近接した PAM 配列が存在せず、オフターゲット②、⑥に関してはミスマッチが 12 塩基と多かったため、予測がなされなかったと考えられる。

#### SITE-Seq 法で予測されたカットサイトの妥当性確認

SITE-Seq 法で予測されたカットサイトにまたがるように設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、Cq 値をネガティブコントロールと比較することで SITE-Seq 法の妥当性評価を行った (図 32)。切断処理は SITE-Seq 解析時

と同様に、Cas9 濃度 64 nM、256 nM、1,024 nM で行った。その結果、オンターゲットでは 64 nM では  $\Delta Cq$  値が 6.48、256 nM では 6.49、1,024 nM では 6.89 であり、いずれの濃度でも切断効率 98%以上と、高い切断効率であることが推測された。オフターゲットについては、リード数の多い上位 3 か所 (オフターゲット③、④、⑦) についてリアルタイム PCR を実施した。その結果、オフターゲット③では 64 nM では  $\Delta Cq$  値が 0.03 (切断効率: 1.96%)、256 nM では 0.34 (21.26%)、1,024 nM では 1.15 (54.95%) であった。オフターゲット④では 64 nM では  $\Delta Cq$  値が 1.11 (53.70%)、256 nM では 4.53 (95.67%)、1,024 nM では 4.62 (95.93%) であった。オフターゲット⑦では 64 nM では  $\Delta Cq$  値が 0.28 (17.36%)、256 nM では 1.64 (67.95%)、1,024 nM では 3.71 (92.36%) であったことから、FH15 ガイド RNA は特異性の低いガイド RNA であることが示唆されると同時に、SITE-Seq 法によるオフターゲット予測の妥当性が確認された。

#### D. 考察

ゲノム編集技術の食品への利用において、オフターゲット作用によるタンパク質の改変に伴うアレルゲンや有害タンパク質等の生成の可能性がある以上、オフターゲットの網羅的な検知とその影響の詳細な検証は必須である。SITE-Seq 法は Cas9 で切断されたゲノム DNA を選択的に濃縮し、網羅的にシーケンスすることで、より多くのオフターゲット部位の情報を得ることができる点で、本研究の目的である新たなバイオテクノロジーを用いた場合の食の安全性確保とマッチしている。

FH15 ガイド RNA を用いた際のリアルタイム PCR による切断確認では、3 か所のオフターゲットに関して、特にオフターゲット④、⑦では 1,024 nM では切断効率 90%以上と、高い切断効率を示した。オフターゲット⑦に関しては、近接した PAM 配列 (NGG または NAG) が存在せず、Cas-OFFinder をはじめ、オンラインオフターゲット予測ツールでは予測不可能であったにも関わらず、比較的高い切断効率を示したことから SITE-Seq 法は既存のオフターゲット予測ツールでは予測できないオフターゲットを網羅的に検知するのに有効であることが示唆された。またオフターゲット③、④に関して、Cas-OFFinder を用いることで予測

はされるものの、オフターゲット③ (NAG もしくは NGG の PAM 配列、ミスマッチ 3 塩基、DNA バルジサイズ 2 塩基) で予想されるカットサイト総数は 742 か所、オフターゲット④ (NGG の PAM 配列、ミスマッチ 2 塩基、RNA バルジサイズ 2 塩基) の総数は 209 か所と膨大であり、それらの変異解析を行う手間や費用を鑑みても SITE-Seq 法は有用であると考えられる。

現在、FH15 ガイド RNA に関しては CRISPR/Cas9 ベクターに導入し、実際に日本晴イネの形質転換を実施した。SITE-Seq 法により予測されたオフターゲットに変異が導入されるかを *in vivo* モデルを用いて検証することを考えている。形質転換体の作成に成功した場合には、RNA を抽出し、逆転写して得られた cDNA を鋳型に、リアルタイム PCR を実施する予定である。

参考文献：

- 1) Cameron P, et al., *Nature Methods* 14, 600-606, 2017
- 2) Murashige T, Skoog F, *Physiologia plantarum* 15, 473-497, 1962
- 3) Kawai K, et al., *Journal of Pesticide Science* 33, 128-137, 2008
- 4) Sun Y, et al., *Molecular Plant* 9, 628-631, 2016
- 5) Sun Y, et al., *Frontiers in Plant Science* 8, 298, 2017
- 6) Kanda Y, et al., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81, 1497-1502, 2017
- 7) M N Cordones, et al., *The Plant Journal* 92, 43-56, 2017
- 8) Sun T, et al., *Scientific Reports* 7, 6538, 2017
- 9) Hsu, P. D., et al., *Nature Biotechnology* 31, 827-832, 2013
- 10) Bae S, et al., *Bioinformatics* 30, 1473-1475, 2014
- 11) Montague TG, et al., *Nucleic Acids Research* 42, 401-407, 2014
- 12) JP Concordet, et al., *Nucleic Acids Research* 46, 242-245, 2018
- 13) Naito Y, et al., *Bioinformatics* 31, 1120-1123, 2015
- 14) Liu H, et al., *Molecular Plant* 10, 530-532, 2017

## E. 結論

本研究結果より、ゲノム編集食品の安全性評価法の一つとしてオフターゲットを網羅的に推定する SITE-Seq 法について、イネにおいても有効であることを確認した。SITE-Seq 法は、オンラインオフターゲット予測ツールでは予測不可能であったオフターゲットの予測に成功し、ゲノム編集食品の安全性評価時に有用な手法の一つと考えられる。来年度は、過去 2 年間に発表された学術論文に記載されているガイド RNA について、オフターゲットの有無の検証を行う予定である。

## F. 業績

### 1. 論文発表

- 1) Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Minegishi, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K. Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84, 670-677, 2020
- 2) Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K. Data representing applicability of developed growth hormone 1 (GH1) gene detection method for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar*) at high specificity to processed salmon commodities. *Data in Brief*, 104695, 2019
- 3) Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K. Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction. *Food Chemistry*, 305, 125426, 2020

### 2. 学会発表

- 1) 中村公亮、木俣真弥、成島純平、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成：ゲノム編集生物に残留する意図せざるDNA切断の予測・検出法の評価、日本薬学会、第140年会、京都、2020年3月
- 2) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成：2017年中に発表されたゲノム編集イネのオフターゲット効果に関する評価、日本農芸化学会、2020年度福岡大会、福岡、2020年3月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

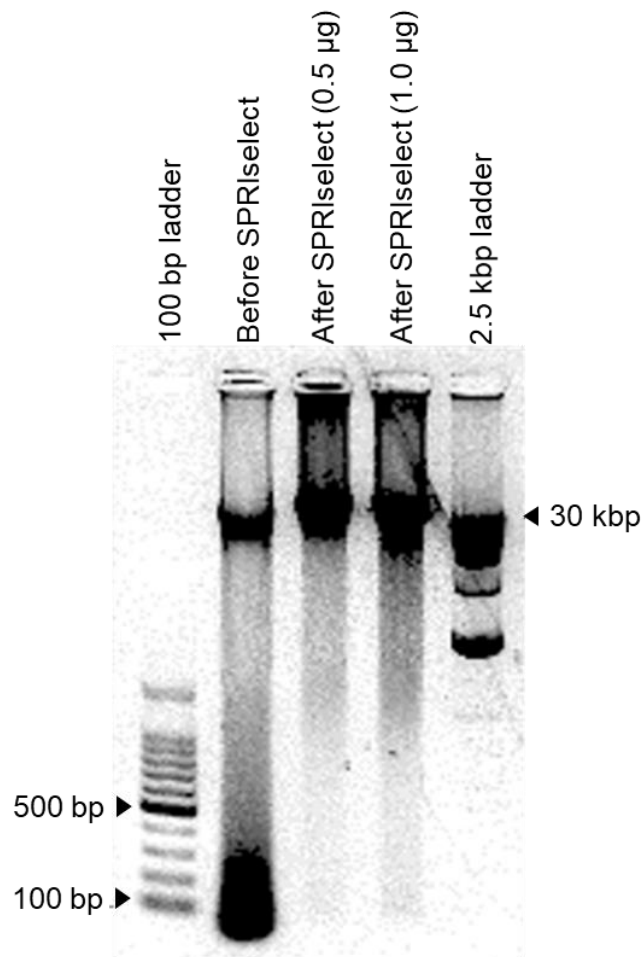
なし

##### 3. その他

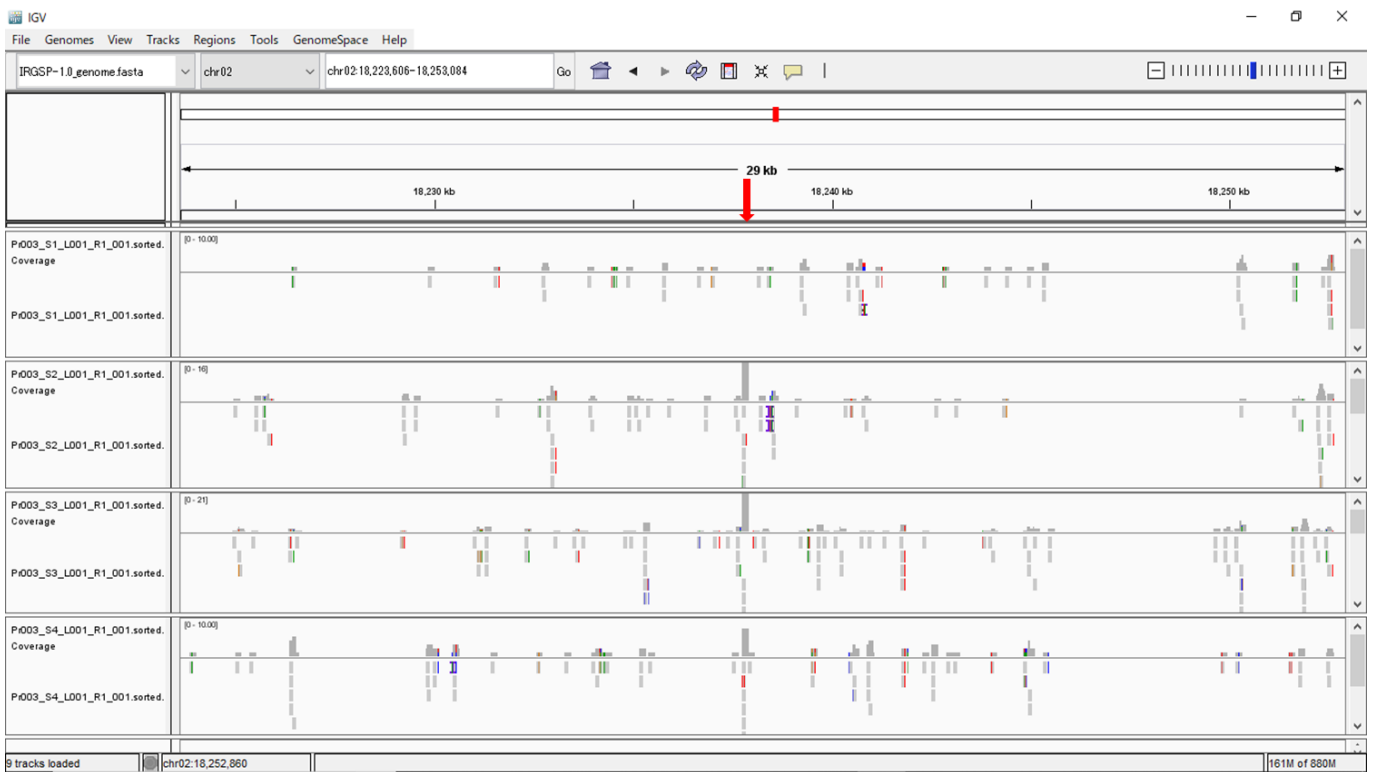
なし

表1. 本研究で使用した2016~2017年に発表されたイネにおけるCRISPR/Cas9用のガイドRNA配列、および合成に使用したオリゴヌクレオチド一覧

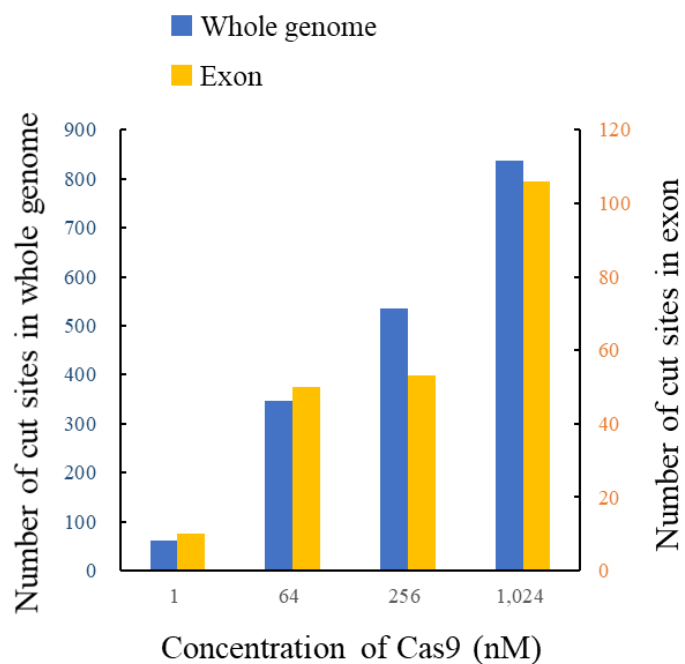
| 標的遺伝子   | ガイドRNA配列<br>(緑字はPAM配列を示す) | ガイドRNA合成に使用したヌクレオチド (5'-3')<br>(大文字は固有の配列、小文字は共通の配列を示す)   | 引用文献  |
|---|---------------------------|---|---|
| Acetolactate synthase, ALS  | GGGTATGGTGGTGAATGGGAGG    | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggGGGTATGGTGGTGAATGGGgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacC  | Sun Y, et al., <i>Molecular Plant</i> 9, 628-631, 2016                                  |
| Acetolactate synthase, ALS  | CCTATGATCCCAAGTGGGGGCGC   | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggGCGCCCCACTTGGGATCATgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacA  | Sun Y, et al., <i>Molecular Plant</i> 9, 628-631, 2016                                  |
| Starch branching enzyme 1, SBE1                                     | CCGCGCCCGCTCCGCTCCTTCCC   | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggGGAAGGAGCGGAGCGGCGGgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacC  | Sun Y, et al., <i>Frontiers in Plant Science</i> 8, 298, 2017                           |
| Starch branching enzyme 3, SBE3                                     | CCAGCCTTAGATGATGAATTAAG   | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggCTTAATTCATCATCTAAGGCgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacG | Sun Y, et al., <i>Frontiers in Plant Science</i> 8, 298, 2017                           |
| Broad-Spectrum Resistance 1, BSR1                                   | TCCAAGAGCAAGGAATCGTCGGG   | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggTCCAAGAGCAAGGAATCGTCgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacG | Kanda Y, et al., <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i> 81, 1497-1502, 2017 |
| Plant high-affinity K <sup>+</sup> -CAGAGCGTGGGCATCATCTACGG 1, HAK1 | K+CAGAGCGTGGGCATCATCTACGG | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggCAGAGCGTGGGCATCATCTAgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacT | M N Cordones, et al., <i>The Plant Journal</i> 92, 43-56, 2017                          |
| A formin class I protein, FH15                                      | AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGG   | Fwd: cgatgtaatacgactcactataggAGCATCCAAGAATGGAGTCAgttttagagctatgctgaaa<br>Rev: aagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatgctttcagcatagctctaaaacT | Sun T, et al., <i>Scientific Reports</i> 7, 6538, 2017                                  |



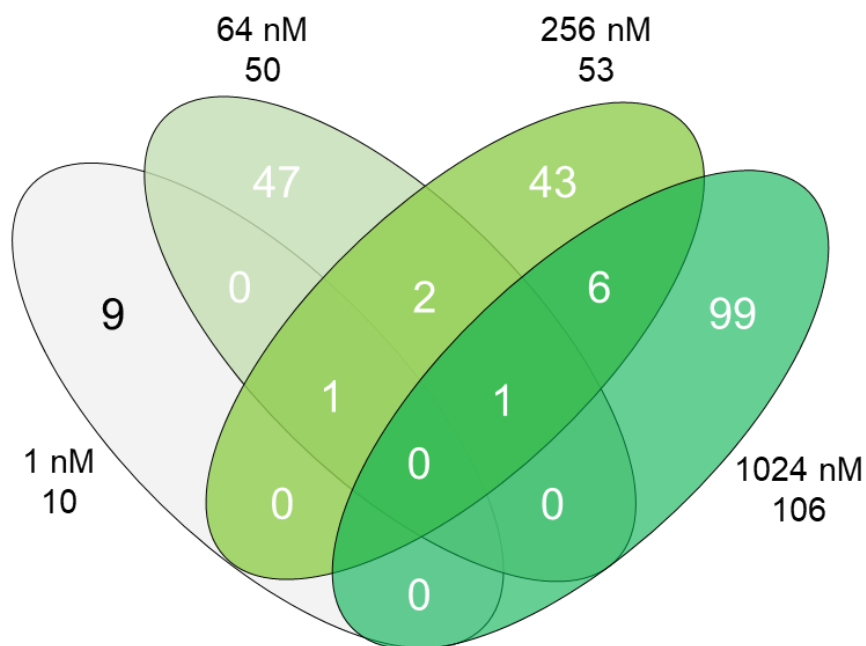
「図1」 CTAB法によるイネゲノム抽出後の1% (w/v) アガロースゲルでの電気泳動写真  
 左から、100 bp DNAラダーマーカー、ビーズ精製前のDNA、ビーズ精製後のDNA (0.5 µg)、  
 ビーズ精製後のDNA (1 µg)、2.5 kbp DNAラダーマーカー



「図2」 IGVにおけるALS target1のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
 上から、1 nM, 64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



「図3」 ALS target1ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数

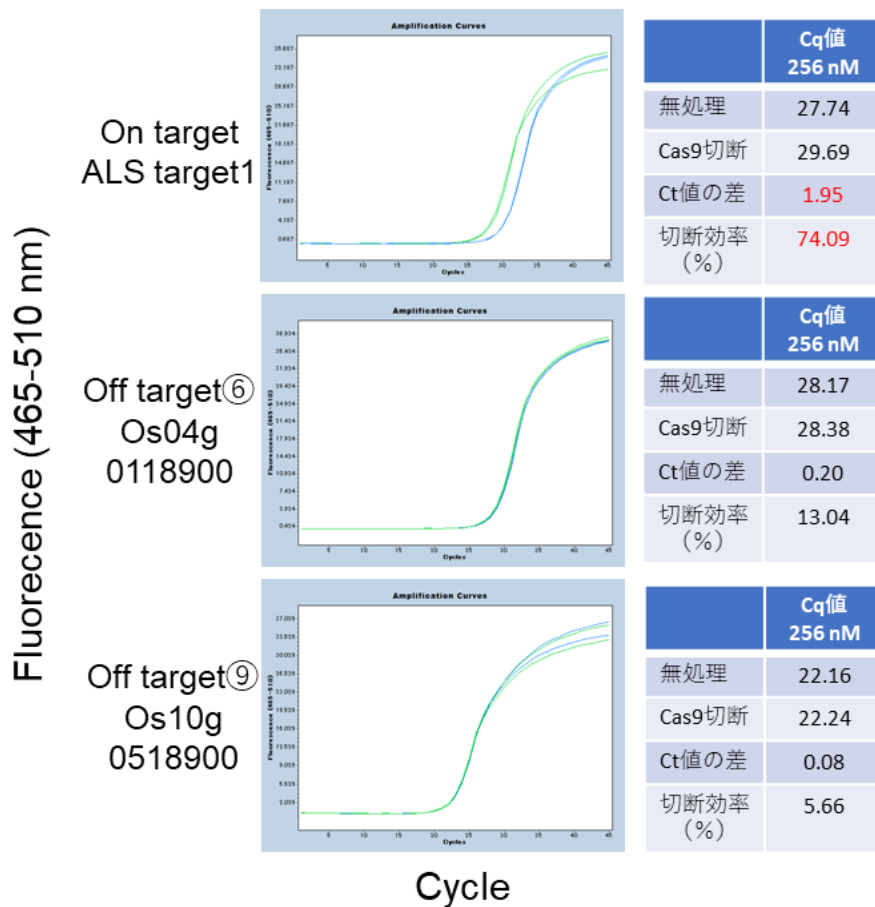


「図4」 ALS target1ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

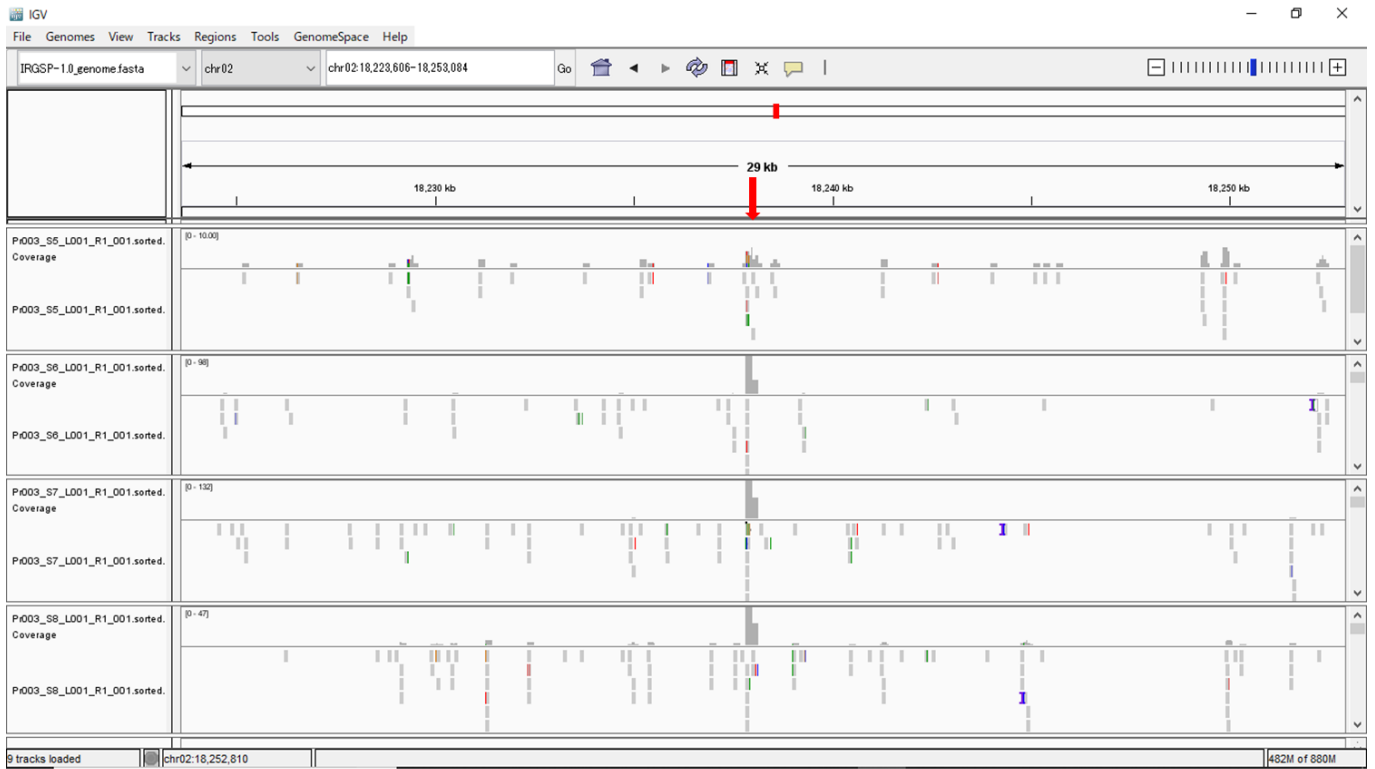
| gRNA gene name | On/Off   | Locus              | Gene ID                   | Sequence adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)  | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |    |     |       |
|----------------|----------|--------------------|---------------------------|--|--|----|-----|-------|
|                |          |                    |                           |  | 1  | 64 | 256 | 1,024 |
| ALS target1    | On       | chr02:<br>18237761 | Os02g<br>0510200<br>(ALS) | <pre> -----GGGTATGGTGGTGCAATGGG----- ATTGGGTATGGTGGTGCAA GGGAGGATAGGTTTACAAG ***** </pre>                  | -  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>① | chr01:<br>18826979 | Os01g<br>0525500          | <pre> -----GGGTATGGTGGTGCAATGGG----- GGTCGCTGGGCCACACAAGCAAATTGTTGATAAAACTCC *** * **** * </pre>           | -  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>② | chr02:<br>126032   | Os02g<br>0102300          | <pre> -----CCCATT-GCACCACCATACCC-- ATAAAAAATAACAATCCA ACTATTAGGGGTGCCAAAGCGGG * * * * * * * * * * </pre>   | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>③ | chr02:<br>28109503 | Os02g<br>0686300          | <pre> ---GGGTATGGTGGTGC-AATGGG----- ACTGAAGGTAGGGGTGCTAATGGGTGGAAATCCAATCCATT * * * * * * * * * * </pre>   | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>④ | chr03:<br>2304950  | Os03g<br>0141800          | <pre> -----CCCATTGCACCACCATACCC TTTTATAAATTTAGTCGCCT GTTTACTTAGATCATCATAT-- * * * * * </pre>               | -  | +  | +   | +     |
|                | Off<br>⑤ | chr03:<br>33540032 | Os03g<br>0803800          | <pre> -----CCCATTGCACC-ACCATACCC----- GTATAATTCCTTTAACATTTACCATGGATGCGAGCGGGACT * * * * * * * * * * </pre> | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑥ | chr04:<br>1121474  | Os04g<br>0118900          | <pre> -----CCCATTGCACCACCATACCC--- TCTCGCCTACCATAGCC ACTCTTGCACCATCATACCTGTC ** * * * * * * * * * </pre>   | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑦ | chr04:<br>24669355 | Os04g<br>0493300          | <pre> CCCATTGCACCACCATACCC----- CCCCCCTCCCGCGAAAACCAAGGCATGATTACAACAAGAG *** * * * * * * * </pre>          | +  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>⑧ | chr10:<br>10862009 | Os10g<br>0356000          | <pre> --CCCATTGCACCACCATACCC----- TTCCTATTGTAATGCATGACT ACTTAACCGGGGATTACCC * * * * * * * * * </pre>       | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑨ | chr10:<br>20071038 | Os10g<br>0518900          | <pre> ---GGGTATGGTGGTGCA-ATGGG----- AGCTGCTTGTATGGGGGACATGGAAGGATTGAAATAACAAG * * * * * * * * * * </pre>   | -  | -  | +   | +     |

「図5」 図4 に示した異なる濃度で重複して検出された10ヶ所のカットサイト付近のシーケンスとガイドRNAのホモロジーを示した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。

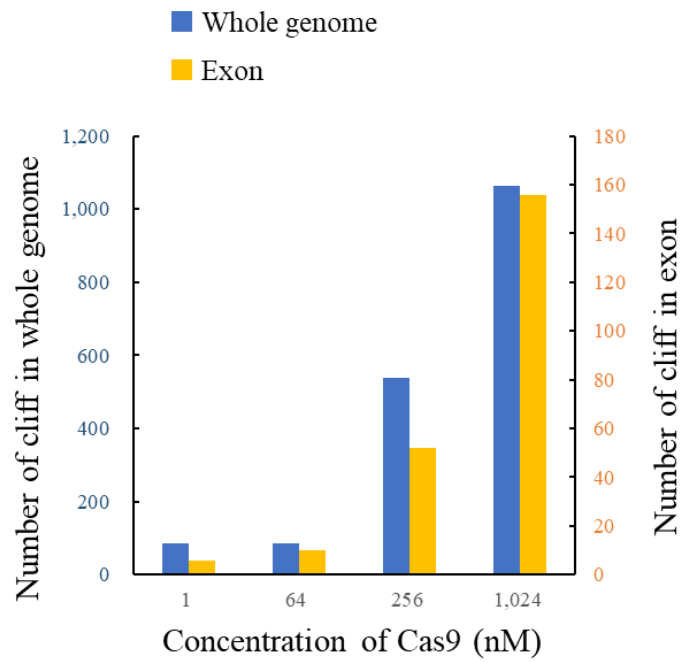




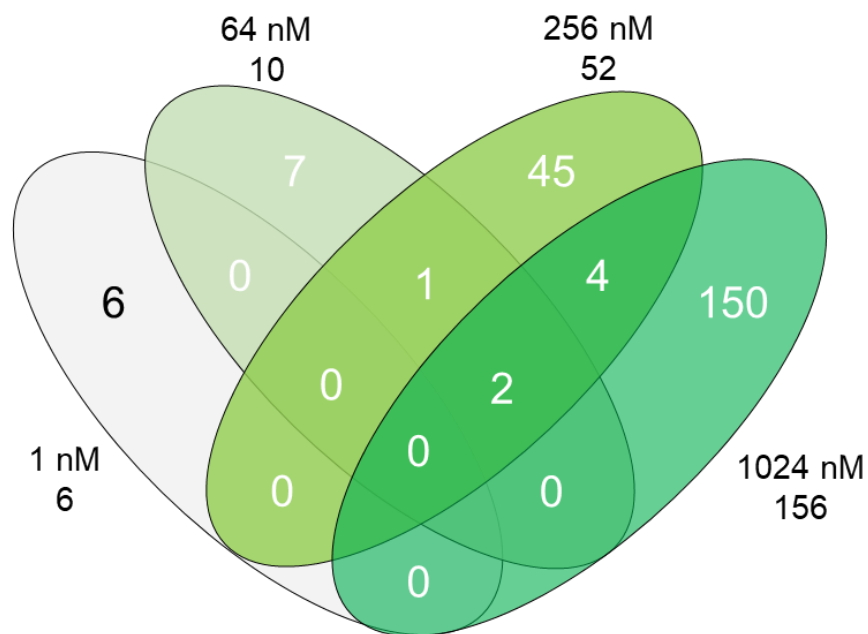
「図6」リアルタイムPCRを用いた各カットサイトの切断確認  
ゲノムDNAをALS target1ガイドRNAとCas9（64, 256, 1,024 nM）で37℃16時間切断処理後、カットサイトをまたぐように設計したプライマーを用いてリアルタイムPCRを行った。ガイドRNAとCas9無添加のネガティブコントロールとCq値を比較をし、 $\Delta Cq$ 値を求めた。また $\Delta Cq$ 値から鋳型DNA量の差を算出し、ネガティブコントロールの鋳型DNA量を100%として、何%が切断されたかを切断効率（%、推定値）として記載した。



「図7」 IGVにおけるALS target2のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
 上から、1 nM, 64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



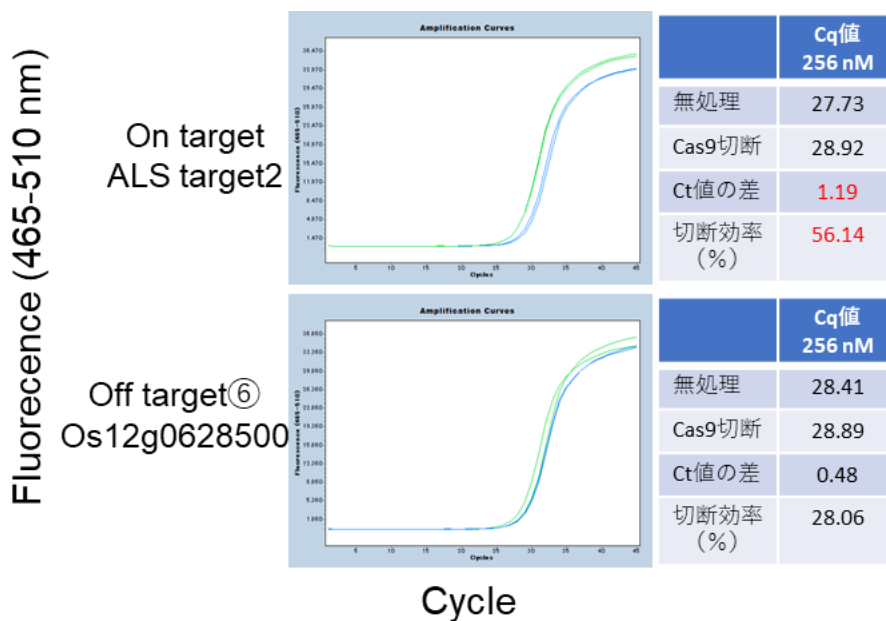
「図8」 ALS target2ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノム、またはエクソン内のカットサイト数



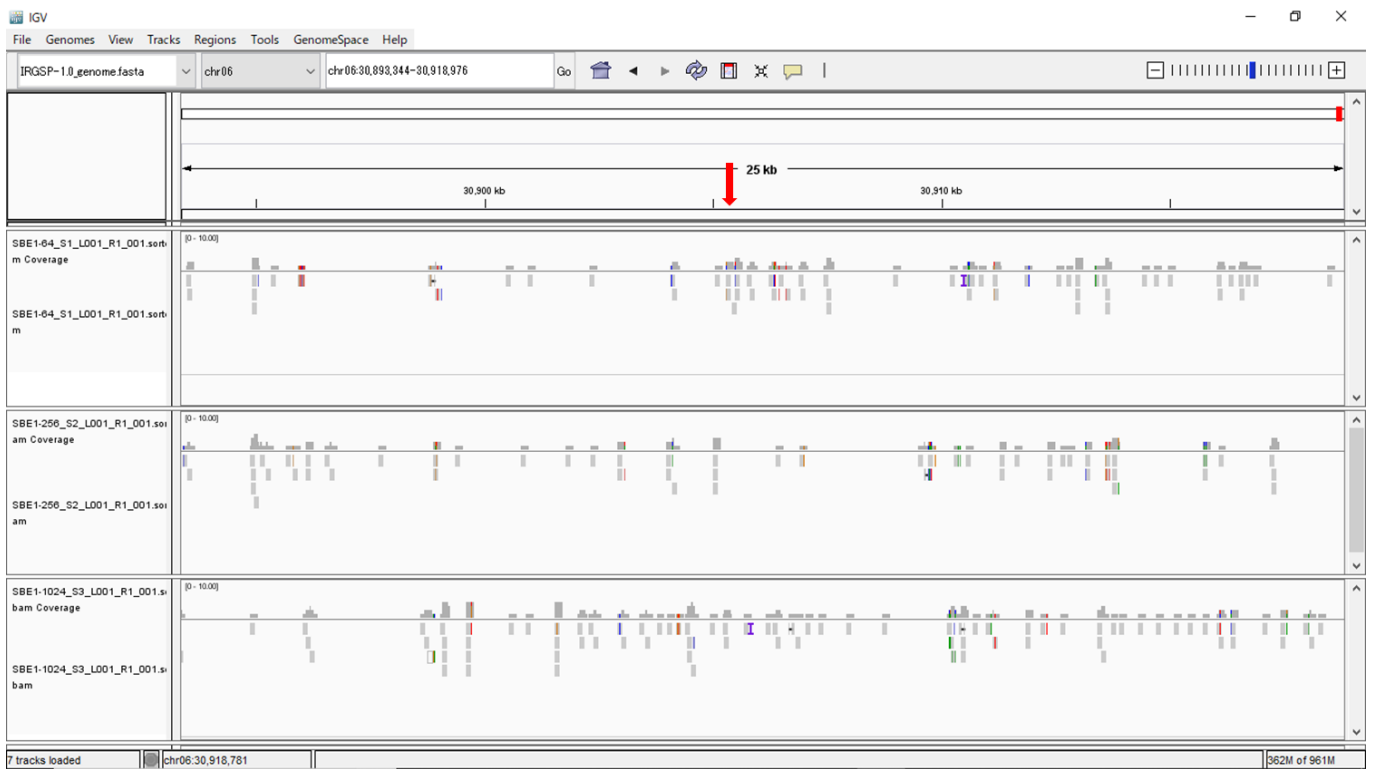
「図9」 ALS target2ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

| gRNA gene name | On/Off   | Locus              | Gene ID                   | Sequence adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)                          | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |    |     |       |
|----------------|----------|--------------------|---------------------------|--|--|----|-----|-------|
|                |          |                    |                           |  | 1  | 64 | 256 | 1,024 |
| ALS target2    | On       | chr02:<br>18237991 | Os02g<br>0510200<br>(ALS) | -----ATGATCCCAAGTGGGGCGC-----<br>CAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGCGCATT<br>*****     | -  | +  | +   | +     |
|                | Off<br>① | chr04:<br>6444455  | Os04g<br>0193950          | ---GCGCCCCACTTGGGATCAT-----<br>TGCGAAGCAACAAGCTAGGATCATAGGTGTTGGAGAAGGC<br>* * * * *   | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>② | chr04:<br>24669355 | Os04g<br>0493300          | GCGCCCCACTTGGGATCAT-----<br>-CCCCCTCCCGGAAAACCAGGCATGATTACAACAAGAG<br>* * * * *        | -  | +  | +   | +     |
|                | Off<br>③ | chr04:<br>31448732 | Os04g<br>0619200          | --GCGCCCCACT--TGGGATCAT-----<br>CTGCATTCTGACCAATGGGATCATCGGTATTACTGGTAGT<br>* * * * *  | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>④ | chr10:<br>14535611 | Os10g<br>0415600          | -----ATG-ATCCCAAGTGGGGCGC-----<br>CGAATTGATATGTATTGAACTTAGGAGCTGGTAATCACT<br>* * * * * | -  | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑤ | chr12:<br>20650092 | Os12g<br>0525300          | ---GCGCCCCACTTGG-GATCAT-----<br>TGACAGACCGCACTCAGAGACCATTTGGAAGAATAGCAGC<br>* * * * *  | -  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>⑥ | chr12:<br>26909858 | Os12g<br>0628500          | ---GCGCCCCACTTGGGATCAT-----<br>CTATCATGCTAT-GTATGGGATCATATGGCGGAATCATCAGA<br>* * * * * | -  | -  | +   | +     |

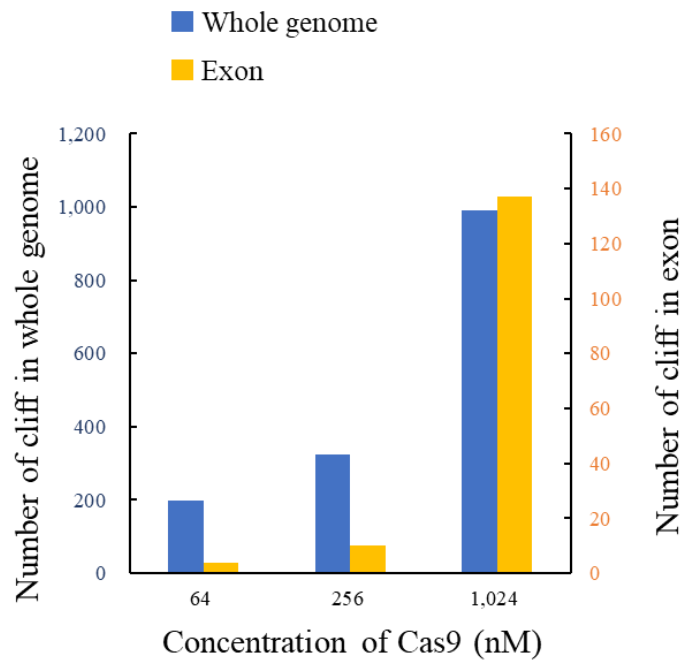
「図10」 図9に示した異なる濃度で重複して検出された7ヶ所のシーケンスとガイドRNAのホモロジーを示した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。



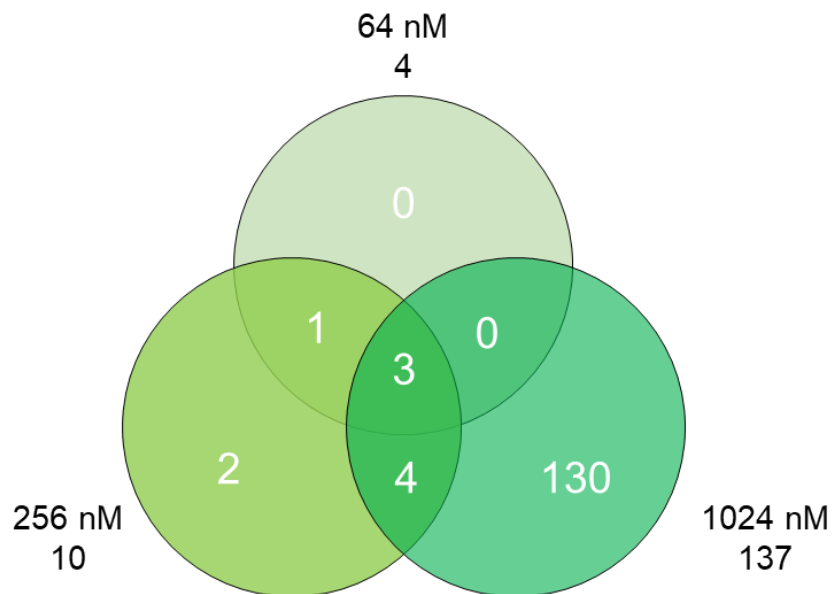
「図11」リアルタイムPCRを用いた各カットサイトの切断確認  
ゲノムDNAをALS target2ガイドRNAとCas9 (64, 256, 1,024 nM) で37°C16時間  
切断処理後、カットサイトをまたぐように設計したプライマーを用いてリアルタ  
イムPCRを行った。ガイドRNAとCas9無添加のネガティブコントロールとCq値  
を比較をし、 $\Delta Cq$ 値を求めた。また $\Delta Cq$ 値から鋳型DNA量の差を算出し、ネガ  
ティブコントロールの鋳型DNA量を100%として、何%が切断されたかを切断効率  
(%、推定値)として記載した。



「図12」 IGVにおけるSBE1のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
上から、64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



「図13」 SBE1ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数

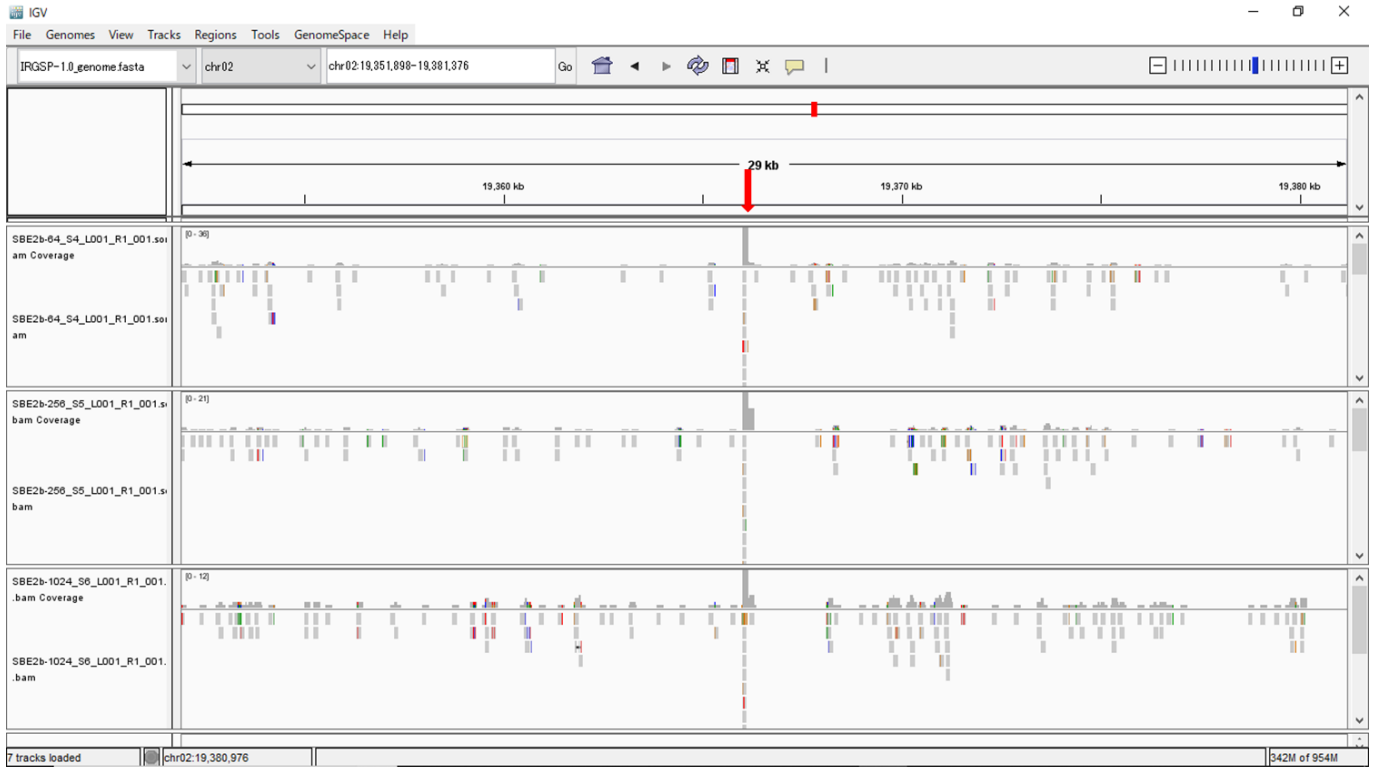


「図14」 SBE1ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

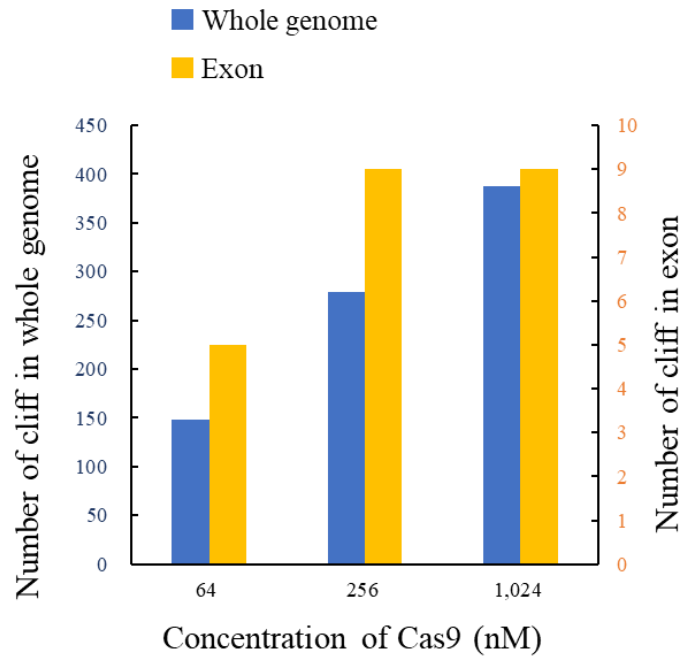
| gRNA gene name | On/Off             | Locus              | Gene ID   | Sequence adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)   | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |     |       |
|----------------|--------------------|--------------------|---|---|--|-----|-------|
|                |                    |                    |   |   | 64   | 256 | 1,024 |
| SBE1           | On                 | chr06:<br>30905652 | Os06g<br>0726400<br>(SBE1)  | <pre> -----GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- GAGAGGGAAGGAGCGGAGCGGCGCGGAGGAGGAAGAGGAG ***** </pre>            | -  | -   | -     |
|                | Off<br>①           | chr01:<br>33534133 | Os01g<br>0791033  | <pre> -----CGCCCGCTCCGCTCCTTCCC----- AATACAGAAATCATCTCCAAAGATTTCGGTCAGAGCTGGCAT * **** * * * </pre>   | +  | +   | +     |
|                | Off<br>②           | chr02:<br>35675910 | Os02g<br>0829800  | <pre> -----GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- GCGGAGAGGAGAGCGGAGAGGCGCGGTCGGAGGGCGGGGT * ***** * </pre>        | -  | +   | +     |
|                | Off<br>③           | chr03:<br>26894918 | Os03g<br>0679100  | <pre> -----CGCCCGCTCCGCTCCTTCCC----- GTACTTGAGAGTTTCTACCTCATACGGCTCAGAAATTGCT * * **** * </pre>       | +  | +   | +     |
|                | Off<br>④           | chr04:<br>19888440 | Os04g<br>0401700<br>(HAK1)  | <pre> -----CGCCCGCTCCG-CTCCTTCCC-- GTTCCAGAGCGTGGGCATCATCTACGGCGACATCGGCACGT * * * * * </pre>         | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑤           | chr09:<br>20181243 | Os09g<br>0517600<br>(FH15)  | <pre> -----GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- GGAGAGCATCCAAGAATTGGAGTCAAGGAGGCAAATGCAGCT * * **** * * * </pre> | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑥           | chr10:<br>10859498 | Os10g<br>0355800  | <pre> --GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- TTGCAAAGAACCATTCTGTACTAAGAGTAGGTTGATAAC * * * * * </pre>            | -  | +   | +     |
|                | Off<br>⑦           | chr10:<br>10859868 | Os10g<br>0355800  | <pre> --GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- TTGATTAATTCCATGATGAGTACTGTTTTACTACTCCAGC * * * * * </pre>           | +  | +   | +     |
| Off<br>⑧       | chr10:<br>10862382 | Os10g<br>0356000   | <pre> -----GGGAAGGAGCGGAGCGGGCG----- TATGCCAGCTCTGACCGAAATCTTTGGAGATGATTCTGTAT * * * * * </pre> | +   | +  | -   |       |

「図15」 図14に示した異なる濃度で重複して検出された8ヶ所のカットサイト（いずれの濃度でも検出されなかったオンターゲットも参考までに加えた）付近のシーケンスとガイドRNAのホモロジーを示した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。

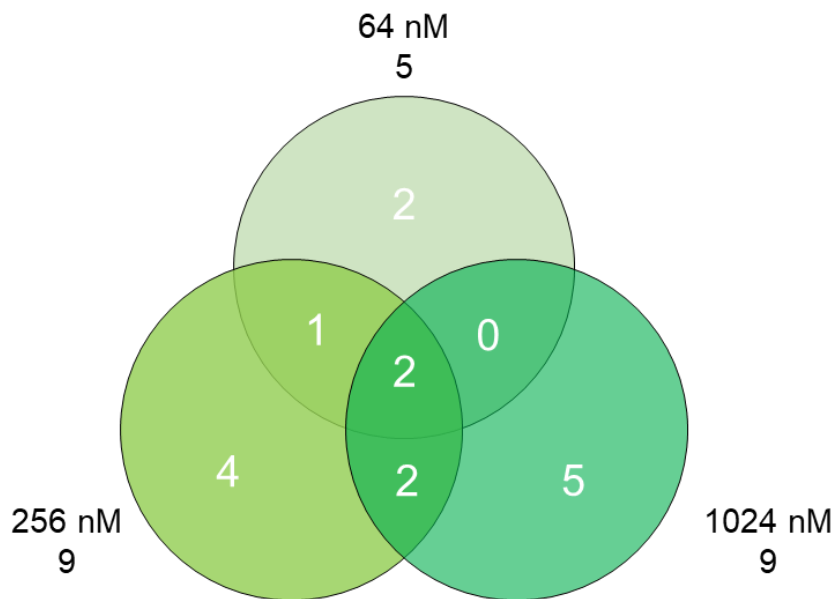




「図16」 IGVにおけるSBE3のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
上から、64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



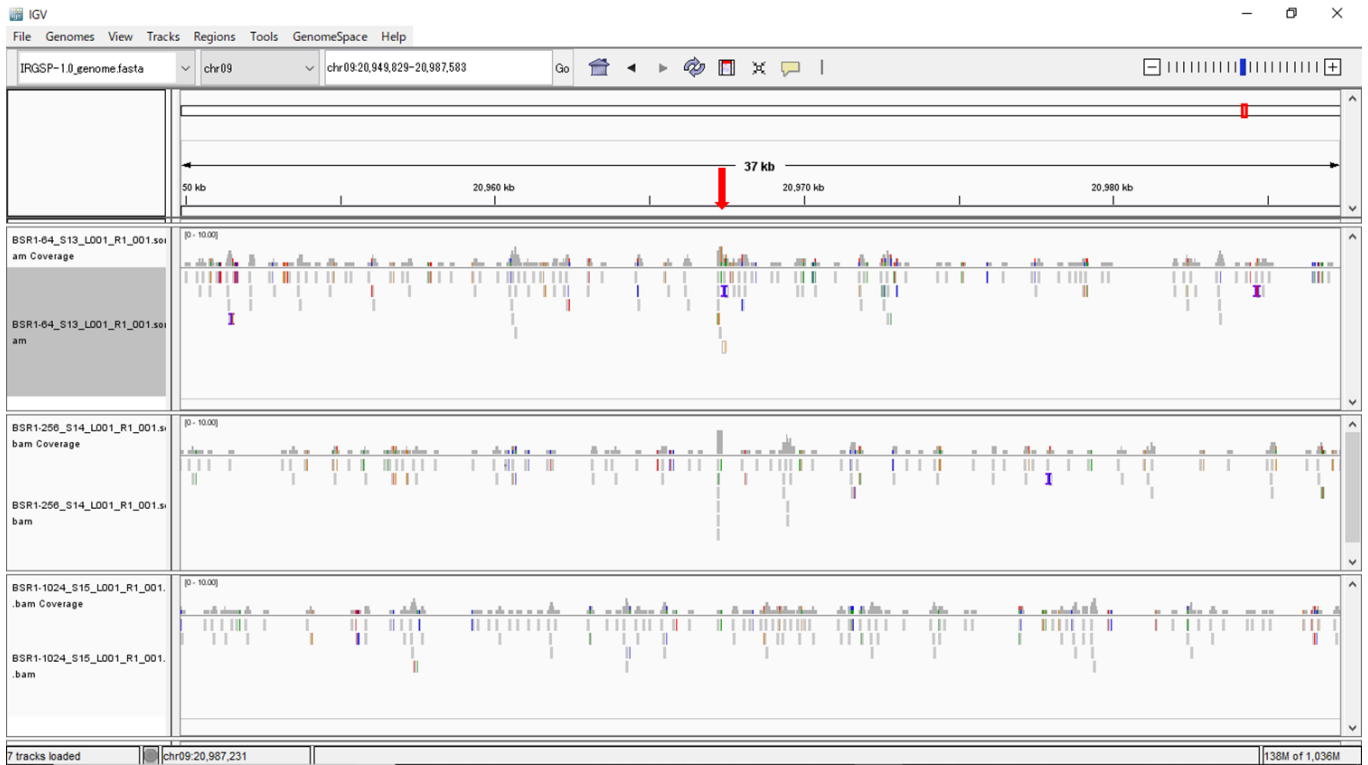
「図17」 SBE3ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数



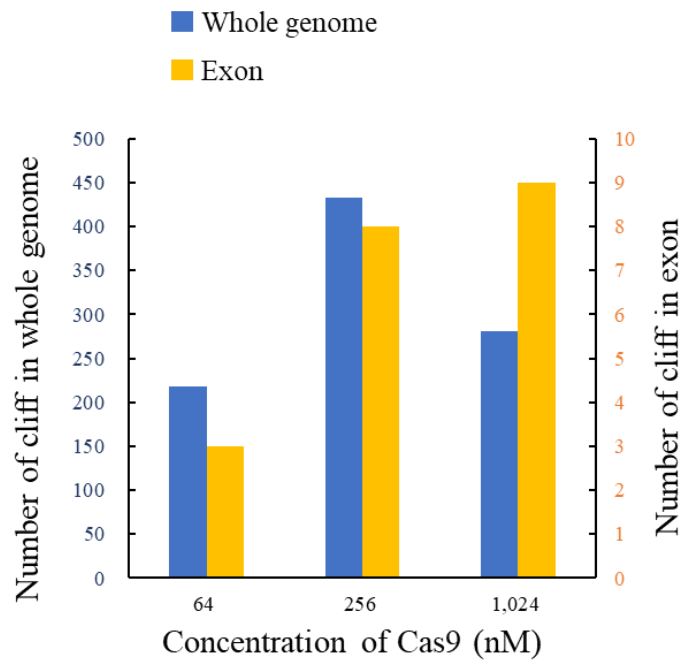
「図18」 SBE3ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

| gRNA gene name | On/Off   | Locus              | Gene ID                    | Sequence adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)                                | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |     |       |
|----------------|----------|--------------------|----------------------------|--|--|-----|-------|
|                |          |                    |                            |  | 64   | 256 | 1,024 |
| SBE3           | On       | chr02:<br>19366161 | Os02g<br>0528200<br>(SBE3) | <pre> -----CTTAATTCATCATCTAAGGC----- CGTGCTTAATTCATCATCTAAGGCTGGCAACTACAACAATG ***** </pre>  | +  | +   | +     |
|                | Off<br>① | chr03:<br>26894918 | Os03g<br>0679100           | <pre> -----GCCTTAGATGATGAATTAAG----- GTACTTGAGAGTTTCTTACCTACATACGGCTCAGAAATTGCT ***** </pre> | +  | +   | +     |
|                | Off<br>② | chr10:<br>10862196 | Os10g<br>0356000           | <pre> -----GCCTTAGATGATGAATTAAG----- TCATATCCACGCTGTACAGTACATACGGCTCAGAAATTGCT ***** </pre>  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>③ | chr10:<br>10862418 | Os10g<br>0356000           | <pre> -----CTTAATTCATCA--TCTAAGGC----- TGTATTGCAATTTGGTGGAGAACTTTAGGACATCCTTGGG ***** </pre> | -  | +   | +     |
|                | Off<br>④ | chr12:<br>5615131  | Os12g<br>0207600           | <pre> -----GCCTTAGATGATGAATTAAG----- TCATATCCACGCTGTACAGTACATACGGCTCAGAAATTGCT ***** </pre>  | -  | +   | +     |

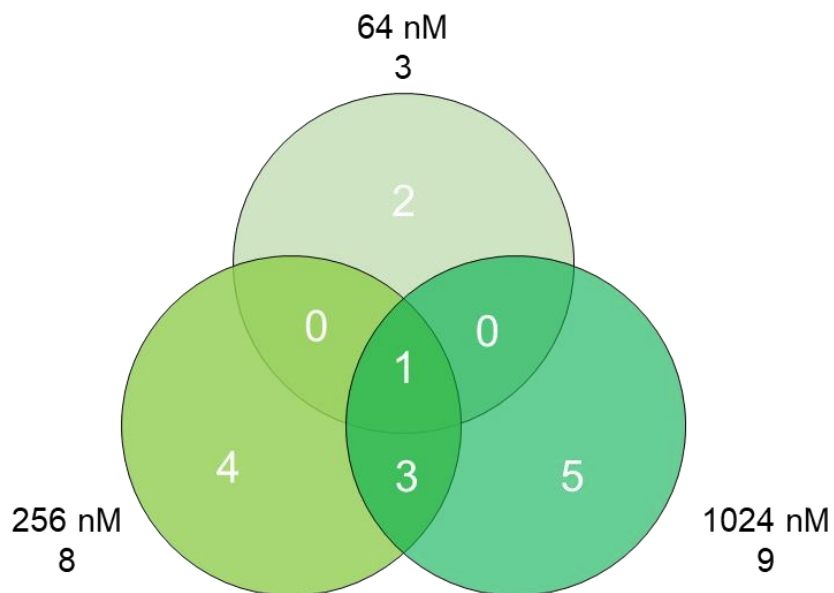
「図19」 図18に示した異なる濃度で重複して検出された5ヶ所のカットサイト付近の配列とガイドRNA配列を比較した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。



「図20」 IGVにおけるBSR1のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
上から、64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



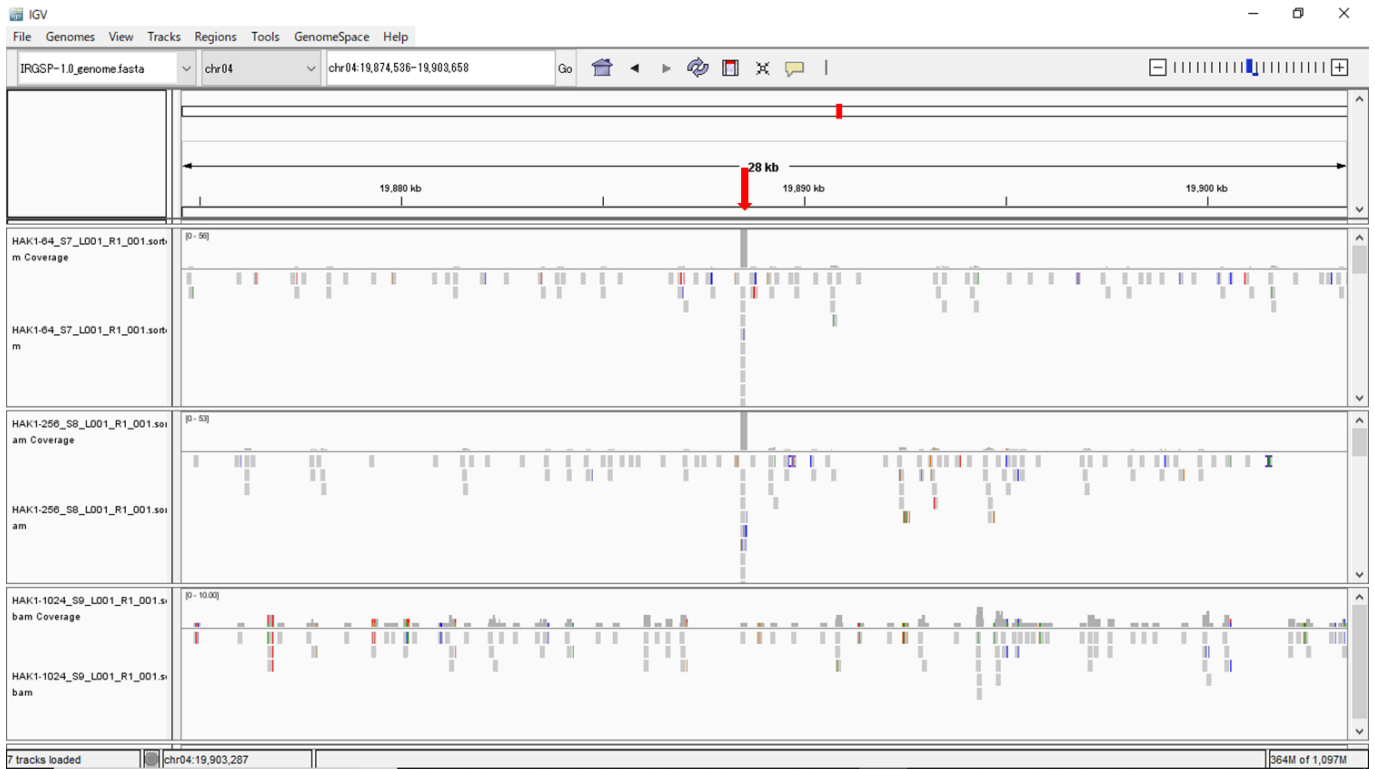
「図21」 BSR1ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数



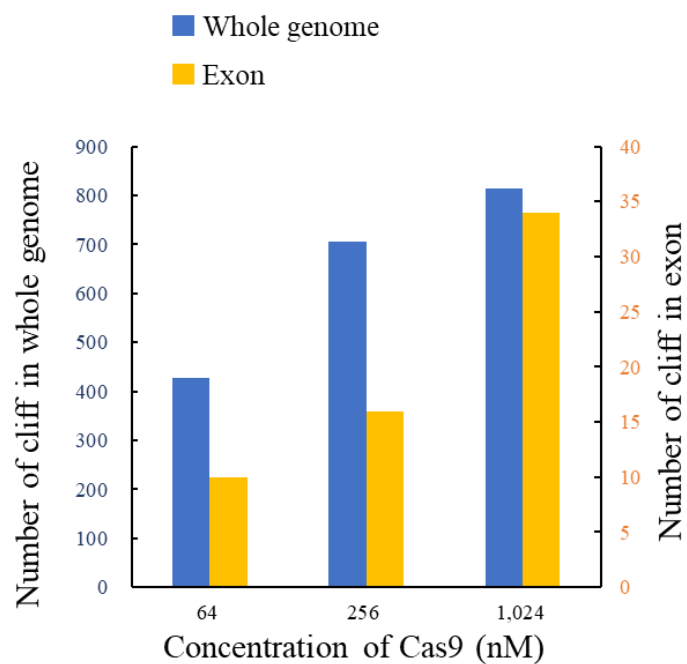
「図22」 BSR1ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

| gRNA gene name | On/Off   | Locus              | Gene ID                    | Sequence of adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)   | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |     |       |
|----------------|----------|--------------------|----------------------------|--|--|-----|-------|
|                |          |                    |                            |  | 64   | 256 | 1,024 |
| BSR1           | On       | chr09:<br>20967356 | Os09g<br>0533600<br>(BSR1) | <pre> -----TCCAAGAGCAAGGAATCGTC----- GTCGTCCAAGAGCAAGGAATCGTGGGAGGCGGGGCTCGA ***** </pre>  | -  | -   | -     |
|                | Off<br>① | chr04:<br>19888440 | Os04g<br>0401700<br>(HAK1) | <pre> -TCCAAGAGCAAGGA-ATCGTC----- GTTCCAGAGCGTGGGCATCATCTACGGGACATCGGCACGT * </pre>      | -  | +   | +     |
|                | Off<br>② | chr09:<br>20181243 | Os09g<br>0517600<br>(FH15) | <pre> -----TCCAAGAG-----CAAGGAATCGTC----- GGAGAGCATCCAAGGAATGGAGTCAAGGAGGCAAATGCAGCT ***** * </pre>                                | -  | +   | +     |
|                | Off<br>③ | chr10:<br>10859065 | Os10g<br>0355800           | <pre> -----TCCAAGAGCAAGGAATCGTC----- TAGTTTCTGCAAGACCAACATACTTTCCGGGAGAACC GGTA * </pre> | -  | +   | +     |
|                | Off<br>④ | chr12:<br>20542985 | Os12g<br>0524201           | <pre> -----GACGATTCCTTGCTCTTGGA- TACAGATTCGGCAACCTAGGAGGATTCTTTCTAAAAGGTA * </pre>       | +  | +   | +     |

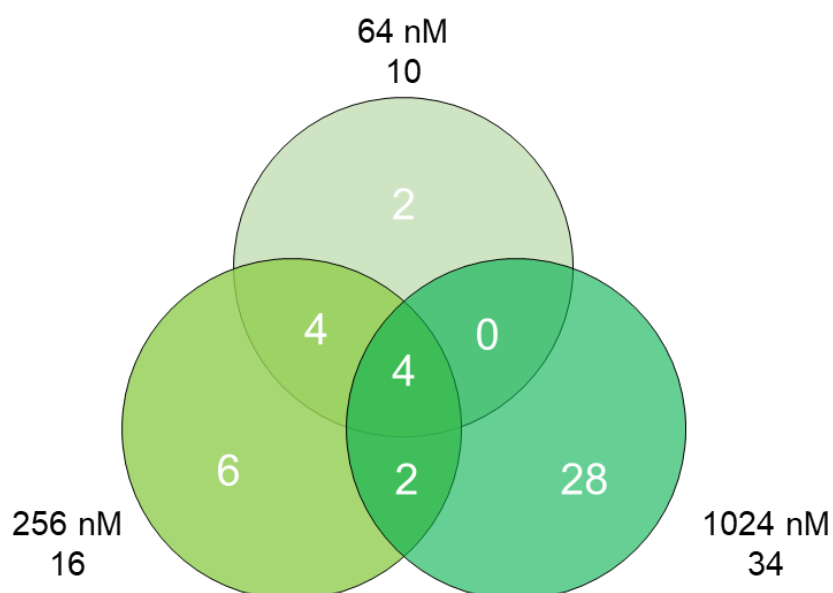
「図23」 図22に示した異なる濃度で重複して検出された4ヶ所のカットサイト（いずれの濃度でも検出されなかったオンターゲットも参考までに加えた）付近のシーケンスとガイドRNAのホモロジーを示した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。



「図24」 IGVにおけるHAK1のオンターゲット付近のマッピングの様子。  
上から、64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。



「図25」 HAK1ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数

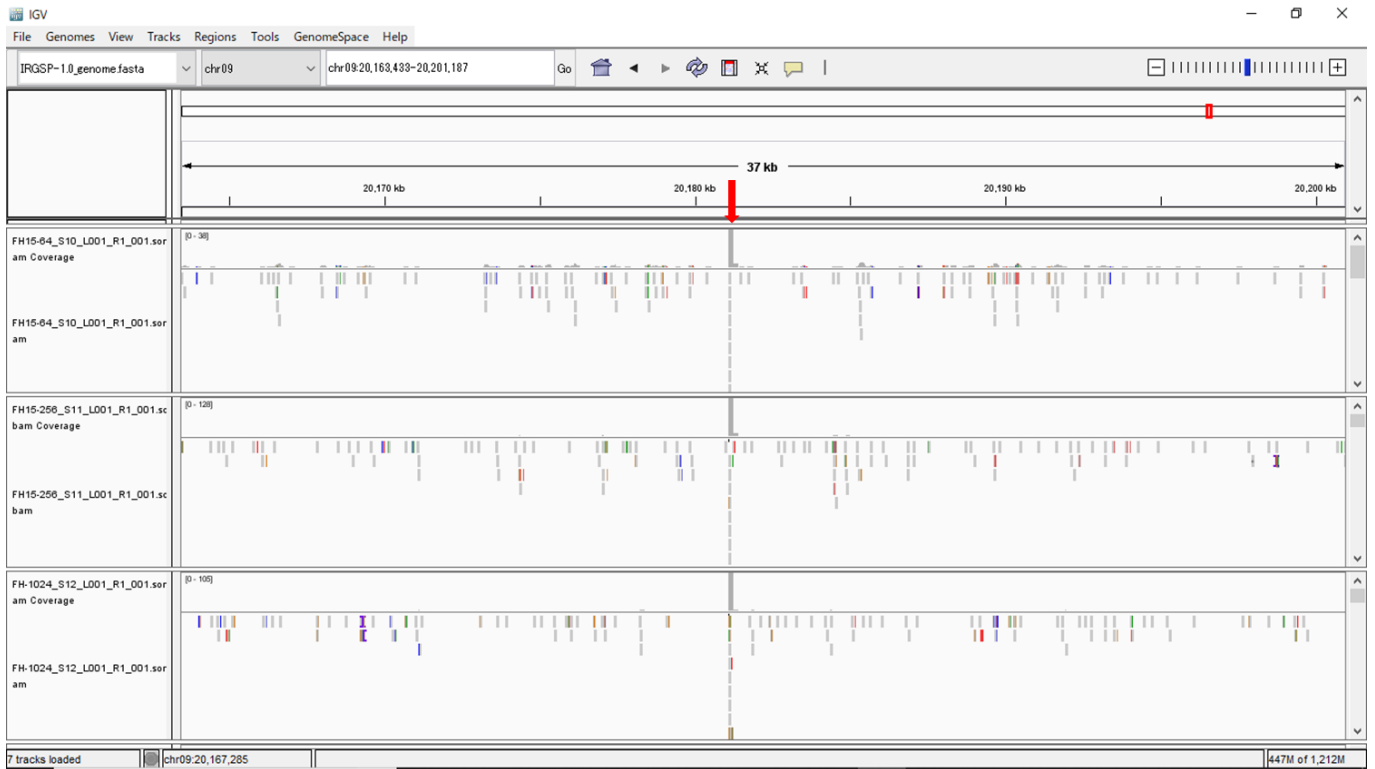


「図26」 HAK1ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較

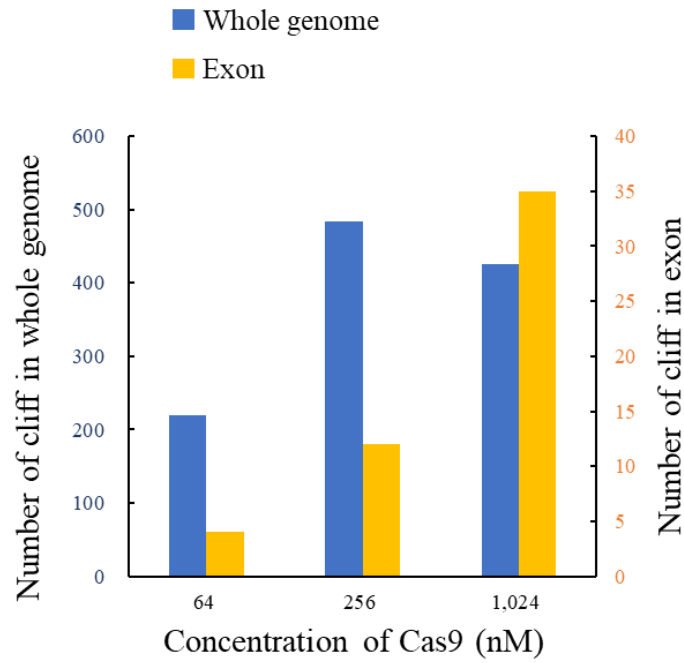


| gRNA gene name | On/Off   | Locus              | Gene ID                    | Sequence adjacent to cut sites and predicted PAM (NGG or NAG)   | Concentration of Cas9 occur the digestion (nM) |     |       |
|----------------|----------|--------------------|----------------------------|---|--|-----|-------|
|                |          |                    |                            |   | 64   | 256 | 1,024 |
| HAK1           | On       | chr04:<br>19888440 | Os04g<br>0401700<br>(HAK1) | <pre> -----CAGAGCGTGGGCATCATCTA----- GTTCCAGAGCGTGGGCATCATCTA<b>CGGC</b>GACATCGGCACGT ***** </pre>                  | +  | +   | -     |
|                | Off<br>① | chr01:<br>33534343 | Os01g<br>0791033           | <pre> -----TAGATGATGCC--ACGCTCTG----- ACCAGGTGCATT<b>CCA</b>---AGGAT<b>G</b>TCCTAAAGTTCCTCCAC * **** * * * * </pre> | -  | +   | +     |
|                | Off<br>② | chr03:<br>1131231  | Os03g<br>0120501           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- GGAGGCCCTCAATG<b>CCA</b>TAGATCGAACCTATCCTATTTTT ***** ** * * * </pre>             | -  | +   | +     |
|                | Off<br>③ | chr03:<br>25801489 | Os03g<br>0659266           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- TGAAGCTCGATCT<b>CCC</b>CAGATGAACCATAGCCAAGAG ***** * * * </pre>                   | +  | +   | -     |
|                | Off<br>④ | chr10:<br>10859302 | Os10g<br>0355800           | <pre> -----CAGAGCGTGGGCATCATCTA----- GTAACATAGTTGAGTTGAAT<b>CTA</b>AAG<b>G</b>ATCTACTGTAGGA * * * * * </pre>        | +  | +   | +     |
|                | Off<br>⑤ | chr10:<br>10859729 | Os10g<br>0355800           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- AGCTACCTTTGAT<b>CTC</b>CAGATTTTTTTCATTAATAACTC **** * * * * </pre>                | +  | +   | +     |
|                | Off<br>⑥ | chr10:<br>10861808 | Os10g<br>0356000           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- GTGGACTTGATTT<b>CCA</b>AAGATGATGAAAACGTAAACTCA ***** * * </pre>                   | +  | +   | +     |
|                | Off<br>⑦ | chr10:<br>10862621 | Os10g<br>0356000           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- AATTCGAGTTCGAG<b>CCG</b>STAGATAAACTAGATAGCTAGACT ***** * * * </pre>               | +  | +   | -     |
|                | Off<br>⑧ | chr12:<br>5614743  | Os12g<br>0207600           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG--- GTGGACTTGATTT<b>CCA</b>AAGATGATGAAAACGTAAACTCA ***** * * </pre>                   | +  | +   | +     |
|                | Off<br>⑨ | chr12:<br>13410523 | Os12g<br>0424300           | <pre> -----TAGATGATGCCACGCTCTG GCAAGTGATCTAG<b>CTC</b>TAGATATATGACATTCTTTATCC- * * * * * </pre>                     | +  | +   | -     |

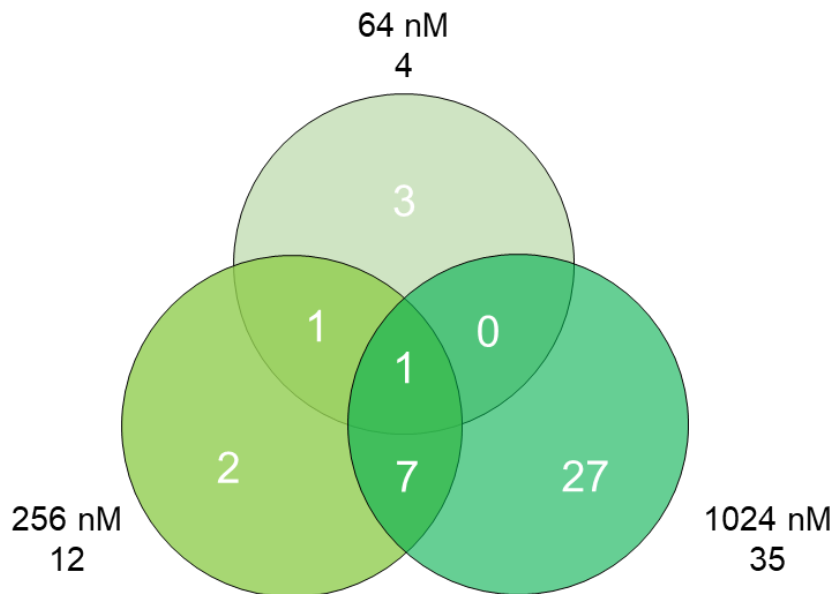
「図27」 図26に示した異なる濃度で重複して検出された10ヶ所のカットサイト付近のシーケンスとガイドRNAのホモロジーを示した。赤線はカットサイトを、緑枠は推定PAM配列を表している。



「図28」 IGVにおけるFH15のオンターゲット付近のマッピングの様子。上から、64 nM, 256 nM, 1,024 nMのCas9でゲノムDNAを切断処理した。

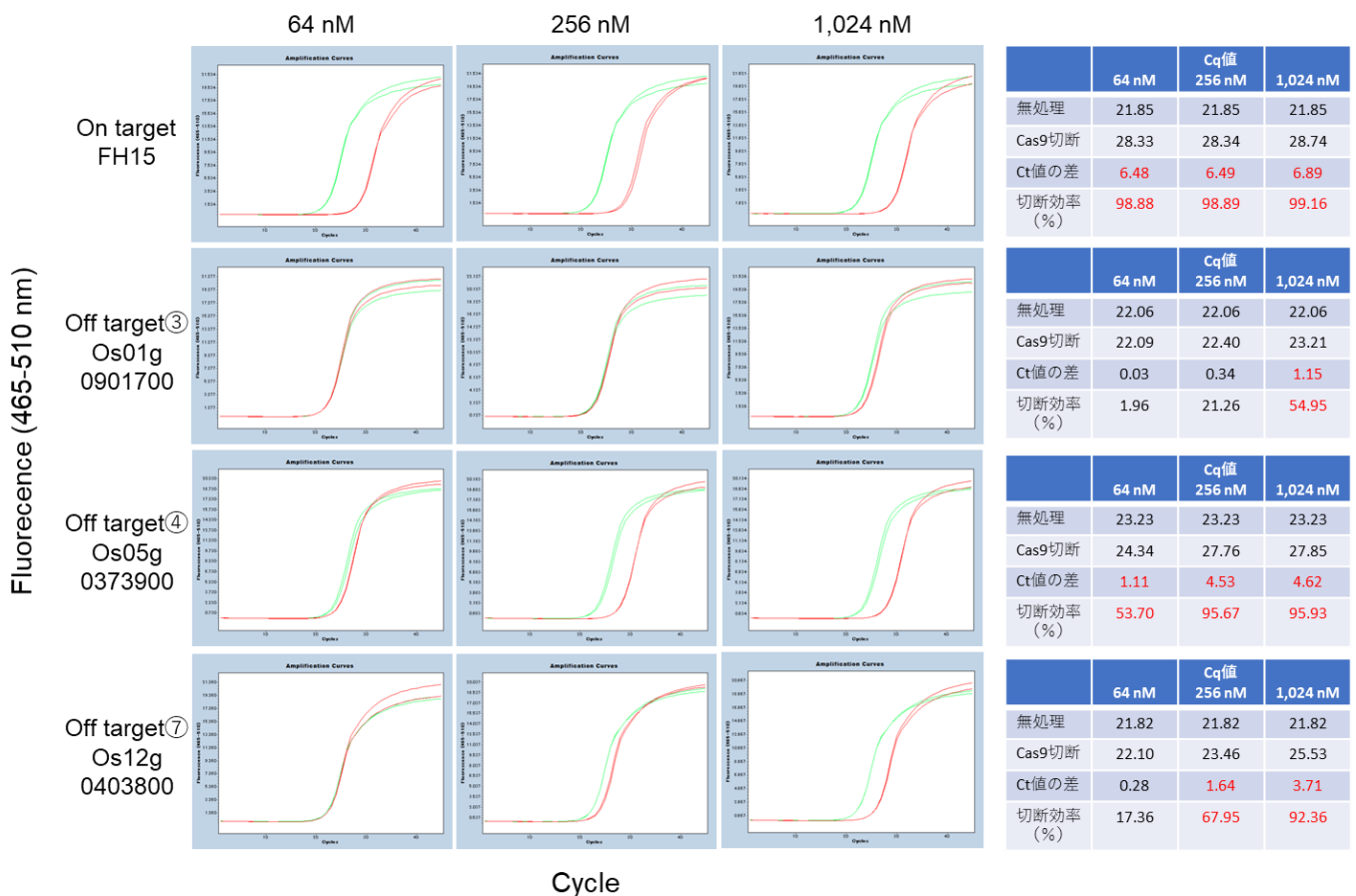


「図29」 FH15ガイドRNAを用いた際の、各Cas9濃度における全ゲノムおよびエクソン内のカットサイト数



「図30」 FH15ガイドRNAを用いた際のエクソン内カットサイトの濃度間比較





「図32」リアルタイムPCRを用いた各カットサイトの切断確認  
ゲノムDNAをFH15ガイドRNAとCas9（64, 256, 1,024 nM）で37°C16時間切断  
処理後、カットサイトをまたぐように設計したプライマーを用いてリアルタイム  
PCRを行った。ガイドRNAとCas9無添加のネガティブコントロールとCq値を比  
較をし、 $\Delta Cq$ 値を求めた。また $\Delta Cq$ 値から鋳型DNA量の差を算出し、ネガティブ  
コントロールの鋳型DNA量を100%として、何%が切断されたかを切断効率（%）  
として記載した。