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) 「新たなバイオテクノロシジーを用いて得られた食品の安全性確保と リスクコミュニケーションのための研究」 分担研究報告書(令和2年度)

ゲノム編集に関する情報収集解析およびアレルゲン分解性の検討

研究分担者 近藤 一成 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨:

ゲノム編集食品の届出制度・事前相談制度が開始されたが、ゲノム編集技術の食品への応用は経験が ないことから、安全性確認について必要な評価手法の開発整備の他に、研究開発動向調査を通じて今後 注視していくべき生物種や用いられる技術に関する情報を整理していく事は重要である。

ゲノム編集技術を用いた研究の文献調査では、2018 年から 2020 年について調査を行った。動物では、 ブタへの応用が多く、ウナギなど食用となる魚類の報告が見られた。植物では、コメが最も多く、トマト、 ダイズ、コムギの報告が多いほか、リンゴ、イチゴ、オレンジなど果樹への応用も進んでいる事がわかっ た。技術的には、CRISPR/Cas が中心であるが、Cas9、Cas12、Cas13 などを用いた多様な手法が用いら れている傾向があった。RNA 編集への動向も注視していく事が必要と考えられた。

アレルゲン評価に用いる資料の一つであるタンパク分解性について、pH 変化による影響を検討した。 市販オボムコイドは患者血清と反応しなかったため、卵白からオボムコイドの精製を行った。アレルゲ ン性評価には、より詳細な検討が必要と考えられた。

研究協力者

中島	治	(国立医薬品食品衛生研究所)
小野	竜一	(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

ゲノム編集技術を利用した作物(ゲノム編集作 物)から作られる新たな食品の研究開発が国内外 で活発に行なわれている。ゲノム編集作物では、 従来の遺伝子組換え作物のような外来遺伝子を導 入することはなく、内在性遺伝子の配列を数塩基 欠失により機能欠失させて新たな形質(もち性向 上、筋肉量増加、GABA 量増加など)を付与でき る。しかしながら、最終的に外来遺伝子が存在し ないゲノム編集作物は、規制上(食品衛生方法上) どう扱われるか、また、ゲノム編集食品の安全性 を確認するために新たに必要とされる分析手法は 何か、などは十分に議論されてきたとは言えない。 一方で、ゲノム編集技術を利用した食品(ゲノム |編集食品| の届出・事前相談制度が令和元年 10 月 から開始された。安全性審査が不要であるとする 根拠として、外来遺伝子やその断片が残存してい

ないこと、従来から安全に用いられてきた突然変 異育種(放射線など)と起きる変化が同等である ことなどとされた。ゲノム編集食品の届出制度を 運営するにあたり、突然変異育種と同等を考える 判断根拠となる科学的背景やゲノム編集技術の特 性、応用例について、十分に調査研究することが 必要である。従来技術では対応できない場合の新 たな評価手法の開発を行うことも重要となってい る。また、複数、それも 10 以上の遺伝子を導入し て大規模に生物のゲノムを改変する「合成生物学」 においては、これまでの組換える前の従来品種と の比較によるアプローチ(相対評価)では対応で きないことも想定される。そこで、バイオテクノ ロジー技術を利用して新たに作製された食品の絶 対的な評価を可能にする分析・評価手法の確立を 進めていく。

本研究では、ゲノム編集作物開発状況の情報収 集を、PubMed などデータベースを用いて文献等 調査を行い、研究が進んでいる生物種や技術的な 傾向などについて調査して、公開可能なフォーマ ットとして Excel ファイルに整理した。また、欧 米のゲノム編集に関する報告等を分析・考察した。 タンパクのアレルゲン性とも関連するタンパク 分解性試験について、EU ではヒトの実際に合わせ た細かい条件での検討が推奨されているため、国 内においてもその影響を考える必要が生じてい る。そのため、人工胃液による分解性試験条件 pH、 酵素濃度について、細かく設定・検討して分解性 に与える影響を調査した。

B. 研究方法

1. 研究開発に関する文献調査

データベースとして PubMed を主に用いて 2020年2月から2020年末までに出版された論文 について検索した。検索キーワードは、動物と植 物の場合で異なっている。キーワードは図1の A 群とB群から1つずつ選んだ物を組合せて利用し た。

検索によりヒットした文献から、タイトル・書 誌情報とアブストラクトの情報をもとに不要な文 献を除き、リストを作成する。要旨は簡単に翻訳 した。また、傾向をみるために、技術や生物種、所 属機関等に注目した分析を実施した。検索結果は、 以下の項目について、後でソートできるように用 語を可能な限り統一して Excel シートに整理した。 記入項目は、文献 ID (通し番号)、生物種(動物、 植物)、種名(ブタ、ウシ等)、用いた技術、 ター ゲット遺伝子、雑誌名、タイトル、発表年、巻・ 号・ページ、著者名、所属機関、国とした。

研究開発調査の結果は、用いられる技術、生物 種、開発国について図2に示した。また、各文献 の要旨にある用語ついて、キーワードとして集計 して、どの語句とどの語句が同じ論文に使用され ているかをネットワークとして示した(図3)。

人工消化液によるタンパク分解性試験(酵素濃度・pH条件の影響)

EFSAでは人工胃液による消化性試験において、 単一条件ではなく、pH 条件、酵素ペプシン濃度を 変化させて、実際の環境に近いように幅が広い条 件で検討している。そこで、本研究においても、 そのような多様な条件下で分解性を検討して、ア レルゲン性の判断に、どのような付加的で重要な データを与えるかを検討した。代表的なアレルゲ ンの分解性試験には、高度に精製されたタンパク が不可欠である。前年度は、分解性試験に供する 試料として、ピーナッツからの抽出によってピー ナッツアレルゲン Ara h1 の精製を行った。

今年度は、卵白オボムコイドの市販品での試験 と卵白からの精製を試みた。精製方法は以下の通 りである:鶏卵 6 個に由来する卵白 212 g に 20 mM トリエタノールアミン (pH 7.3) 220 mL を 加えて 4 ℃で一晩振盪してタンパク質を抽出し た。遠心分離とろ過によって析出した物を除去し た。得られた上清に、予め平衡化しておいた Q Sepharose FF 約 16 mL を加えて混合してタンパ ク質を吸着させバッチ方式でイオン交換を行っ た。タンパク質の溶出はステップワイズで行った。 回収したフラクションを限外ろ過によって濃縮、 透析して塩濃度を下げた。次に、HiTrapQHP 5 mL を AKTA FPLC に接続して 6 回に分けてロー ドして、バッファーA に含まれる NaCl のグラジ ェントを利用してさらに精製を進めた。試薬とし て購入したオボムコイドをスタンダードとして、 クロマトグラフィーのフラクションを SDS-PAGE と CBB 染色によって分析し、オボムコイ ドの溶出されているフラクションを調べた。得ら れたフラクションを濃縮して、ゲルろ過を2回行 った (再クロマト)。 ゲルろ過は AKTA FPLC に接 続した Superdex 75 HR 10/10 と 0.2 M NH₄CO₃ をバッファーとして使用した。タンパク質の濃度 は 280 nm の紫外吸収によって求めた。卵白から 精製したオボムコイドは、濃度を調整した後に小 分けして-80℃で保存した。

精製したタンパクは、患者血清を用いて IgE 結 合性を確認し、機能を保持したまま生成されてい るかを判断する。一定の結合性を示したタンパク について、以下の方法で分解性試験を実施した。 タンパク分解性試験は、EFSA の意見書に基づき 高濃度と低濃度のペプシン濃度および3条件の pH (2.0、3.3、5.5)で行い、ペプシン濃度の高濃 度条件として、ペプシン:テストタンパク質=10 U:1 mg とした。ペプシン濃度の低濃度条件は 1000 U/mL とした。インキュベーションの条件は 37℃で、分解の程度を電気泳動で経時的に確認し た。

C. 研究結果および考察

1. 研究開発に関する文献調査

ゲノム編集技術を用いた研究開発の文献 2020 年について調査した。その結果、動物ではゲノム 編集技術を用いたもの 191 件、植物ではゲノム編 集技術を用いたもの 310 件、きのこは1件であっ た(2021.3 集計)。

特に、最近開発が進んでいるゲノム編集技術を 利用した魚についてその内訳を見てみると、以下 のようになる。

魚の研究開発状況

- 1) Arabian killifish 1件
- 2) African cichlid fish 1件
- Salmon 2件 …1件は、Dnd デッドエンド 遺伝子破壊による3倍体不妊化、もう1件は 相同組換え効率の向上研究
- 4) Ciona (ホヤ) 1件
- 5) Fathead minnow (ファットヘッドミノー) 1件
- 6) Medaka (メダカ) 4件
- 7) Tilapia 4件
- 8) Lampery (ヤツメウナギ) 1件
- 9) Loach (ドジョウ)1件 …MSTN ミオスタチン遺伝子欠失で筋肉の脂質酸性が低下、ミトコンドリア呼吸鎖、ATP 低下を減少させるのではないか
- 10) Ciona (ホヤ) 1件
- Zebrafish 93 件 …遺伝子機能の解明など 基礎研究が中心であった

植物では研究用モデル植物であるコメが最も多 く75件、次いでArabidopsis(シロイヌナズナ) が46件、トマト32件、ダイズ21件(その他に cowpea2件)、コムギ・オオムギ13件、Brassica 属(ナタネ)13件、トウモロコシ12件、ジャガ イモ10件、グレープ4件、リンゴ3件、ストロ ベリー2件、オレンジ類1件、ピーナッツ1件、 ペッパー1件、ピーチ1件、ケール1件、バナナ 1件などであった。バナナは、食用されているも のは3倍体バナナであり、ベータカロテン強化バ ナナの開発に関するもの、イネは病害抵抗性、収 量増加、雄性不稔、高塩分、乾燥耐性の研究に関 する報告である。また、コムギでは、高アミロー ス含量のもの、オオムギではビタミンE合成に関 する研究などの報告があった。グレープ類では病 原菌耐性の研究が中心で、トマトでは環境耐性、 病原菌耐性、果実サイズの増強、雄性不稔、リコ ペン増強に関する研究報告があった。また、これ までにない傾向として、タンパクをコードする遺 伝子ではなく、それらを制御する低分子 RNA の 一つである miRNA を標的にした応用例が、研究 用生物 zebrafish などで見られた。今後、遺伝子 制御因子を標的にした事例が増加する可能性も考 えられた。

さらに研究開発動向について解析した。ゲノム 編集論文数については、令和2年度は、新型コロ ナウイルス感染症 (COVID-19)の影響のためか減 少している(整理が進むとより減少する可能性あ り)。オフターゲットに関する解析についても、ゲ ノム編集論文の総数の減少に伴い減少している。 オフターゲットの解析を行なっているかどうかの 解析率も減少している(図4)。ゲノム編集の対象 動物の推移を見ると、チキンは、論文総数が減っ ているにも関わらず、増加傾向が見られる。また、 ゲノム編集技術開発のモデル生物として利用され るゼブラフィッシュに関する論文数は年々減少し ている。植物においても、モデル植物として利用 されるシロイヌナズナに関する論文数は、2018年 に比較して 2020 年は減少傾向にある。一方、ダイ ズのゲノム編集に関する論文は、増加傾向が見ら れる。モデル生物を利用した基礎研究から、実際 の家畜、農作物にゲノム編集を行う応用研究にシ フトしている可能性が考えられる(図5)。

動物のゲノム編集においては、CRISPR/Cas9 の 他には、TALEN、ZFN が選択肢としてあったのが 2018 年だが、2020 年にはその選択肢の多様性が 進んでいる。多くは CRISPR をベースとしたテク ノロジーである。ZFN については、2020 年には論 文として報告されていない。CRISPR-ON、 CRISPRi 、 CRISPR/Cas9-shield な ど の CRISPR/Cas9 システムをベースとした新たなテ クノロジーの他に、CRISPR/Cas9 ではなく、 CRISPR/Cas12 を用いることで、ターゲット認識 部位に多様性を与えられることや、ゲノム編集に よる二重鎖切断面が粘着末端にできるなどのメリ ットがあることから、CRISPR システムの多様性 が進んでいくと考えられる。 植物においても、ゲノム編集方法の多様化が進 んでいることが確認できる(図6)。2020年には、 CRISPR/Cas13などのRNAを対象としたRNA編 集技術も使用され始めている。ゲノムではなく mRNAを改変するRNA編集は、ゲノム上のオフ ターゲットはなくなるが、mRNAのオフターゲッ トという新たなリスクも考慮する必要がある。

人工消化液によるタンパク分解性試験(酵素 濃度・pH 条件の影響)

アレルゲン性評価のためのデータとして、人工 消化液中での分解性が検討されてきた。反応条件 には、pH=1.2、高濃度のペプシン(人工胃液の場 合)が通常使用されてきたが、実際には食事摂取 時及び直後は pH の大きな上昇が見られるため、 実際を正確に反映していないとの指摘がされてき た。欧州食品安全局 EFSA では、異なった条件で 行うことを提案していることから、これまで、代 表的なアレルゲンタンパクについて、pH 値とペプ シン濃度を変えてそれらの消化性、分解性につい て検討してきた。検討にあたり、市販しているア レルゲンタンパクが非常に限られること、販売さ れていても精製度が高くない、低分子側に不純物 が見られるなどの理由から、分解性試験には適し ていない場合が多い。昨年度、ピーナッツ主要ア レルゲン Ara h1 をピーナッツより精製を行い検 討した。一方、卵白アレルゲンであるオボムコイ ドの市販品に対して、患者血清を用いてウェスタ ンブロットを実施したところ反応しなかったため、 分解性試験と、分解物の患者血清反応性を確認す る実験ができなかった。市販品の生成過程におけ る反応性喪失が考えられたため、本年度は、卵白 からオボムコイドを精製して用いることを試みた。 繰り返し精製を行い、最終的に 2.6 mg の精製オボ ムコイドが得られたが、約45 kDa、55 kDa の混 入タンパク質が完全に除去しきれなかった(図7)。 今後は、精製したタンパク質をエドマン分解と LC-MS/MS を用いて同定する。

さらに、精製したオボムコイドと試薬として購入したオボムコイドにおいて、食物アレルギー患 者に由来する IgE との反応性に違いがあるか検討 を行う。精製オボムコイドが患者血清中 IgE を認 識すれば、人工胃液中で分解させたオボムコイド を抗原として IgE ウェスタンブロット解析を行っていく。

D. 結論

ゲノム編集技術を応用した植物・動物の研究開 発動向について、モデル生物である Arabidopsis (シロイヌナズナ)や zebrafish(ゼブラフィッシ ュ)が現在でも報告数が多いものの減少傾向で、 実用化にシフトしている事が伺える。魚について は、ウナギ、ドジョウなど食用用途になりうるも のの報告がある。植物ではリンゴ、イチゴ、オレ ンジの果樹など多様な生物に応用されている。形 質としては、環境耐性、病原菌耐性が主であるが、 栄養強化を目指したものも少ないものの報告され ていた。技術的には、多様化が進んでいること、 RNA 編集も報告されて来ていることから、今後の 動向や課題も考慮していく必要がある。

タンパク分解性試験では、市販品でも血清反応 性が見られなかったことから、オボムコイドの精 製を行った。十分な精製どのものが得られたため 反応条件による分解性と血清 IgE 反応性を検討し ていく。これらの解析から、アレルゲン性評価に おける分解性試験の意義重要性について考察が必 要と考えられる。

E. 研究発表・業績

- 1. 論文発表
- Soga, K., Kimata, S., Narushima, J., Sato, S., Sato, E., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Kondo, K., Nakamura, K. Development and Testing of an Individual Kernel Detection System for Genetically Modified Soybean Events in Nonidentity-preserved Soybean Samples. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43, 1259-1266, 2020.
- Takabatake, R., Onishi, M., Minegishi, Y., Futo, S., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Mano, J., Kitta, K. Development of a Novel Detection Method Targeting an Ultrashort 25 bp Sequence Found in Agrobacterium-Mediated Transformed GM Plants.

Development of a Novel Detection Method Targeting an Ultrashort 25 bp Sequence Found in Agrobacterium-Mediated Transformed GM Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 15327-15334, 2020.

- Takabatake, R., Onishi, M., Mano, J., Kishine, M., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Kitta, K. Evaluation of Conversion Factors for Genetically Modified Maize Quantification. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **61**, 235-238, 2020. 邦文(遺伝子組換えトウ モロコシ定量のための内標比の算出:高畠令 王奈、大西真理、真野潤一、岸根雅宏、曽我 慶介、中村公亮、近藤一成、橘田和美)
- 2. 学会発表
- 曽我慶介、木俣真弥、成島純平、佐藤咲子、佐藤恵美、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、川上浩、吉場聡子、柴田識人、穐山浩、中村公亮、近藤一成:新しい遺伝子組換え表示の妥当性を確保するための外国産遺伝子組換え不分別大豆の流通実態調査、第57回全国衛生化学技術協議会年会、宮崎、2020年11月
- 2) 成島純平、吉場聡子、曽我慶介、高畠令王奈、 橘田和美、中村公亮、柴田識人、近藤一成:安 全 性 未 審 査 の 遺 伝 子 組 換 え コ ム ギ (MON71400, MON71500 及び MON71600) を対象とした系統個別検知法の評価、第 57 回 全国衛生化学技術協議会年会、宮崎、2020 年 11 月
- 近藤一成、福田のぞみ、坂田こずえ、田口千 恵、成島純平、曽我慶介:ヒト細胞を用いた CRISPR/CasによるDNA2本鎖切断から生じ る細胞周期特徴的変異解析、日本薬学会第 141 回年会、広島、2021年3月
- 4) 曽我慶介、成島純平、吉場聡子、柴田識人、近藤一成:全ゲノム配列を用いた遺伝子変異検

出におけるツール間比較、日本薬学会 第 141回年会、広島、2021年3月

5) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、志波優、秋本 智、曽我慶介、吉場聡子、権藤崇裕、明石良、 柴田識人、近藤一成:ゲノム編集技術の食品 利用におけるオフターゲット予測と解析スキ ームの確立、日本農芸化学会 2021 年度大会、 宮城、2021 年 3 月 検索に用いるキーワード

A 群から1つとB 群から1つを選んで組み合わせてキーワードとする。

i) 動物の場合(ゲノム編集のみが対象)

	キーワード	備考
A 群	zinc finger nuclease, ZFN, TALEN, TAL effector, CRISPR, Cas9, Cpf1	ゲノム編集
B 群	pig, cow, chicken, fish, sheep, goat	

※一括検索式の例: (zinc finger nuclease OR ZFN OR TALEN OR TAL effector OR CRISPR OR Cas9 OR Cpf1) AND (pig OR cow OR chicken OR fish OR sheep OR goat)

ii) 植物の場合 (ゲノム編集を含む新育種技術全体が対象)

	キーワード	備考
A 群	zinc finger nuclease, ZFN, TALEN, TAL effector, CRISPR, Cas9, Cpfl	ゲノム編集
	ODM, oligonucleotide-directed mutagenesis, targeted nucleotide exchange, TNE	オリゴヌクレオチド指 定突然変異
	Cisgenesis	シスジェネシス
	Intragenesis	イントラジェネシス
	RdDM, RNA-depending DNA methylation	RNA 依存性 DNA メチ ル化
	Transgrafting, transgraft, graft & siRNA	接ぎ木
	Reverse breeding	逆育種
	Agroinfiltration	アグロインフィルトレ ーション
B 群	Plant	

※一括検索式の例: (zinc finger nuclease OR ZFN OR TALEN OR TAL effector OR CRISPR OR Cas9 OR Cpf1 OR ODM OR oligonucleotide-directed mutagenesis OR targeted nucleotide exchange OR TNE OR Cisgenesis OR intragenesis OR RdDM OR RNA-depending DNA methylation OR Transgrafting OR transgraft OR graft & siRNA OR Reverse breeding OR Agroinfiltration) AND plant



論文総数 504件

Fig. 2 文献によるゲノム編集技術を利用した動植物の研究開発状況調査からの傾向分析(2020.12集計分)





Fig.3 文献によるゲノム編集技術を利用した動植物の研究開発状況調査からのネットワーク分析



ゲノム編集論文数 推移

off-taget解析率(%)

off-target論文数 推移



Fig.4 ゲノム編集技術を用いた研究開発論文数、オフターゲットに関する 論文数変化



Fig.5 ゲノム編集技術を用いた動物、植物の研究開発動向



Fig.6 ゲノム編集技術動物、植物の使用技術動向



Fig.7 Superdex 75 HR 10/10によるオボムコイドの精製(再クロマト)

レーン1:分子量マーカー、レーン2:試薬として購入したオボムコイド、 レーン3-6:溶出されたフラクション 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) 新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と リスクコミュニケーションのための研究 分担研究報告書(令和2年度)

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 近藤一成 (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、実際にゲノム編集を行ったイネを用いて検証を行った。SITE-Seq 法に よって予測されたオフターゲット箇所をアンプリコンシークエンスで解析したところ、実際に変異が確 認されたことから、SITE-Seq 法はイネにおいても有効であることが確認された。また、オフターゲット 予測においては NGG や NAG といった典型的な PAM 配列を持つ箇所以外についても考慮する必要があ ることが示唆された。本研究結果から、SITE-Seq 法によるオフターゲット予測とアンプリコンシークエ ンスによるオフターゲット検出を組み合わせたスキームは、ゲノム編集食品のオフターゲット解析にお いて有効な手法だと考えられる。

協力研究者

成島 純平 (国立医薬品食品衛生研究所) 権藤 崇裕 (宮崎大学)

A. 研究目的

ゲノム編集研究が世界中で進む一方で、意図せ ぬ切断(オフターゲット効果)について正確に予 測することは未だに困難である。我が国では2019 年10月にゲノム編集技術応用食品の届け出制度 が開始されているが、ゲノム編集技術の食品利用 においてはオフターゲット編集による改変タン パクの毒性等が懸念されている。そのため、オフ ターゲット箇所を網羅的に予測することは、ゲノ ム編集食品の安全性確保において非常に重要で ある。

そこで本研究では、オフターゲットを次世代シ ークエンサー (NGS)を用いて予測する手法の一 つである SITE-Seq 法¹⁾ について、作物であるイ ネにおける有効性を検討した。昨年度の検討で SITE-Seq 解析に供した OsFH15-gRNA²⁾につい て、今年度は実際にイネでゲノム編集を行い、 SITE-Seq 法によって予測されたオフターゲット サイトが実際に編集されうるのかを検証した。ま た、本研究を通してゲノム編集食品開発における オフターゲット解析のスキームについて考察した。

B. 研究方法

1. サンプル

実験に使用した日本晴イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) は農研機構農業生物資源ジーンバン クより分与された。

カルス化

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、N6D 培地に静置 した。培養条件は28℃暗所とした。

<u>形質転換に使用したベクターのコンストラクション方法</u>

ゲノム編集用のベクタープラスミドは、 Addgene より購入した pRGEB32 (Addgene plasmid # 63142)³⁾を使用した。OsFH15-gRNA カセットの作成は、2 種のオリゴオリゴヌクレオ チド (Fwd: 5'- GGC AGC ATC CAA GAA TGG AGT CA -3'と Rev: 5'- AAA CTG ACT CCA TTC TTG GAT GC -3')を用いた。2×Annealing buffer (20 mM Tris[pH7.5], 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) 10 μ L と各 50 μ M オリゴヌクレオチドを 5 μ L ずつ合わせた溶液を 95°Cで 5 分間加熱した 後、ゆるやかに室温まで戻した。上記 gRNA カセ ットと、BsaI-HF v2 (NEB) で制限酵素処理した pRGEB32 をライゲーションし、OsFH15-gRNA 配列を導入した pRGEB32^{FH15}を作成した。

また pRGEB32 を XbaI および BstBI で制限酵 素処理することで Cas9 配列を除き、AcGFP 配列 を導入した pRGEB32^{GFP} プラスミドを作成した。

イネカルスへの形質転換

コンストラクションしたゲノム編集用ベクタ ーのイネカルスへの形質転換には、Ozawa (2009)⁴⁾を参考に、アグロバクテリウム法で行っ た。使用したアグロバクテリウム株は EHA105 で、 ベクターの導入にはヒートショック法を用いた。 また、ネガティブコントロールサンプルとして、 gRNA 配列を導入していない pRGEB32^{-gRNA} も同 様に形質転換を行った。ゲノム編集ベクターを形 質転換したカルスは再分化を行わずに培養し、1 か月目と2か月目にサンプリングした。

2. CTAB 法による DNA の抽出と精製

液体窒素および ZAP 処理済みの乳鉢・乳棒を 用いてサンプルを破砕し、サンプル 1g につき 1.5% CTAB 溶液を 2.5 mL 加えて 56°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、8,000 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×vol.の氷冷イソプロパノールを加えて転倒混 和後、4℃、10,000 rpm で 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、氷冷 70%エタノールを加えて再び 4℃、 10,000 rpm で 10 分間遠心し、超純水 100 µL で ペレットを溶解した。そこへ DNase free RNase A (10 mg/mL)を10 µL 添加し、37℃、30 分間イ ンキュベートして RNA を分解した。さらに RNase secure (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA, cat. NO. AM7005)を 1.2 µL 加え、60°C で 10 分間インキュベートして RNase A を失活さ せた後、室温まで冷ましてから 44 µL SPRIselect

(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を添加 し、ピペッティングしてからマグネットスタンド を用いてビーズを集めて上清を破棄し、85%エタ ノール 180 μ L で集めたビーズを 3 回洗浄し、風 乾した。その後、超純水を 30 μ 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。回収した精製 DNA 溶 液 は、 NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)を用いて濃 度測定を行った。

3. T7 Endonuclease I アッセイ

ゲノム編集による変異導入を調べるため、ゲノ ム編集を行ったイネカルスから抽出したゲノム DNA (gDNA)を用いて、T7E1 アッセイを行っ た。標的はオンターゲットおよび SITE-Seq で検 出されたオフターゲットの中でマッピングされ たリード数の多い3か所(オフターゲット3、4、 7) とした。PCR 反応組成は以下の通り;2×KOD FX Neo Buffer (TOYOBO) 12.5 µL, 2 mM dNTPs 5 μL, 50 μM Fwd プライマー 0.1 μL, 50 μM Rev プライマー 0.1 μL, KOD FX Neo (1U/µL) 0.3 µL, 100 ng イネ gDNA を合わせて 25 µL とした。使用したプライマーは表1にまと めた。サーマルサイクリング条件は以下の通り; 94℃2分間を1サイクル、98℃10秒間、60℃30 秒間、72℃30秒間を25サイクル、72℃5分間を 1 サイクル、4℃を∞。PCR 産物は 2%アガロース ゲルで電気泳動後、目的のバンドを切り出し、 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TAKARA) で精製した。精製した DNA は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて濃度測定を行った。 T7E1 アッセイ反応組成は以下の通り; 10×NEBuffer2 2 µL, 精製 DNA 200 ng, 超純水 を加えて 19 µL とした。続いて T7E1 アッセイ反 応溶液を98℃で2分間加熱して2本鎖を解離し、 25℃までゆっくりと温度を下げ、正確にハイブリ ダイズさせた。そこへ T7E1 酵素を 0.25 µL を加 えて 25℃ 30 分間インキュベートした後、直ちに 0.25 M EDTA を 0.75 µL 加えて反応を終了した。

T7E1 アッセイ反応溶液は 2%アガロースゲル電 気泳動を行い、目視で切断バンドを確認した。

4. アンプリコンシークエンス用 DNA ライブラリ の調製方法

1st PCR

pRGEB32^{-gRNA} および pRGEB32^{FH15}の1、2か 月間培養サンプルそれぞれ3 ラインずつ計12検 体について、オンターゲットまたは SITE-Seq に より検出されたオフターゲット 8 か所周辺を PCR により増幅し、計 108 アンプリコンについて NGS に供した。PCR 反応組成は以下の通り; 2×Phusion master mix (NEB) 12.5 µL, 5 µM Fwd プライマー 2.5 μL, 5 μM Rev プライマー 2.5 µL, 100 ng イネ gDNA を合わせて 25 µL とし た。使用したプライマーは表1にまとめた。サー マルサイクリング条件は以下の通り; 98℃ 30 秒 間を1サイクル、98℃10秒間、60℃30秒間、72℃ 30秒間を25サイクル、72℃5分間を1サイクル、 4℃を∞。PCR 産物は 2% E-Gel EX アガロースゲ ルで電気泳動後、目的のバンドを切り出し、 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TAKARA) で精製した。精製した DNA は Qubit (Invitrogen) で DNA 量を測定し、100 pg/µL に希釈した。

$2^{nd} PCR$

Illumina 用インデックス配列を付加するため、 PCR を行った。PCR 組成は以下の通り; 2×Phusion master mix (NEB) 25 µL, 5 µM Fwd プライマー5 μL, 5 μM Rev プライマー5 μL, 100 pg/µL DNA 1 µL, 超純水 14 µL とした。使用し たプライマーは表1にまとめた。サーマルサイク リング条件は以下の通り;98℃ 30秒間を1サイ クル、98℃10秒間、64℃30秒間、72℃30秒間 を10 サイクル、72℃5分間を1 サイクル、4℃を ∞。PCR 産物は SPRIselect を用いてビーズ精製 を行った。40 µL PCR 溶液に 40 µL SPRIselect を 加え、ピペッティングで混和後、5 分間静置し、 ビーズに DNA を結合させた。ビーズ溶液をマグ ネットスタンドに設置し、ビーズを集めて上清を 破棄し、85%エタノールで3回洗浄した。エタノ ールを完全に除いた後、超純水 20 µL にビーズを 溶解し、5 分間静置した。マグネットスタンドを

用いてビーズを集め、上清を18 µL 回収した。

DNA ライブラリのクオリティコントロール

2nd PCR 後の DNA ライブラリは Qubit を用い て 濃 度 (ng/µL) を 定 量 し、 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) を用いて平均 DNA サイズ (bp)を求めた。それらの値からモル濃度を算出 し、1 nM になるよう超純水で希釈し、等量の各 ライブラリをプールして 1 nM DNA ライブラリ を調製した。さらにそれを 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) で 20 倍希釈し、50 pM DNA ライブラリを 調製した。

Illumina iSeq 100 によるシークエンス

iSeq 100 i1 reagent (Illumina) のカートリッジ を 25℃のウォーターバスで 6 時間かけて溶解し ておき、調製した 50 pM DNA ライブラリをロー ドし、2×151 bp のペアエンドリードでシークエ ンスを行った。

5. アンプリコンシークエンスデータの解析

アンプリコンシークエンスの解析には、 CRISPResso2⁵⁾ (https://github.com/pinellolab /CRISPResso2, ver. 2.0.31)を用いて、カットサ イト付近の変異の種類および変異を含むリード の数から変異率を解析した。変異率については、 0.1%以上の変異のみ表示している。アンプリコン の配列に関しては、IRGSP-1.0⁶⁾ (https://rapdb.dn a.affrc.go.jp/download/irgsp1.html)を参照した。

6. オンラインツールを用いたオフターゲット予 測

各種オンラインツールを用いて、 OsFH15-gRNA のオフターゲットの予測を行っ た。使用したオンラインツールは、

Cas-OFFinder⁷⁾

(http://www.rgenome.net/cas-offinder/),

CHOPCHOP⁸⁾ (https://chopchop.cbu.uib.no/), CRISPOR⁹⁾ (http://crispor.tefor.net/crispor.py), CRISPRdirect¹⁰⁾ (https://crispr.dbcls.jp/),

CRISPR-DT¹¹⁾

(http://bioinfolab.miamioh.edu/CRISPR-DT/), CRISPR-P v2.0¹²⁾

(http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/)

の6種を使用した。解析は基本的には全てウェブ ブラウザ版を用いたが、Cas-OFFinder のみコマ ンドライン版を用いて解析を行った。 Cas-OFFinder は9 ミスマッチ/2DNA バルジ /2RNA バルジまでのオフターゲットを検索でき るが、今回の解析では5 ミスマッチ/2DNA バル ジ/2 RNA バルジのオフターゲットについて解析 を行い、5 ミスマッチ/ギャップ (e.g. 5 ミスマッ チ/0 ギャップ、4 ミスマッチ/1 ギャップもしくは 3 ミスマッチ/2 ギャップ) までのオフターゲット を示した。

7. アレルゲンデータベースを用いたアレルゲン 性予測

アンプリコンシークエンス解析の結果より、オ ンターゲットのカットサイト付近で確認された 変異の内、0.1%以上の変異について OsFH15 CDS 配列に組み込み、その配列をアミノ酸配列に 変換した。そのアミノ酸配列を、アレルゲンデー タベースである COMPASS (COMPare Analysis of Sequences with Software, https://comparedata base.org/)に入力し、既知のアレルゲン配列と比 較することでアレルゲン予測を行った。アレルゲ ン予測は 80-Mer Sliding Window FASTA Search (クエリー配列を 80 アミノ酸毎にスライドしな がら、既知アレルゲンと 35%以上ホモロジーがあ るかを検索)および 8-mer FASTA Search (クエ リー配列の 8 アミノ酸が既知アレルゲンと完全一 致するかを検索)の2種の解析を行った。

C. 研究結果

1. イネへのゲノム編集カセット挿入の確認

アグロバクテリウム法によるイネカルスヘゲ ノム編集カセットの形質転換を行い、ハイグロマ イシンによる抗生物質選抜培養を行った結果、図 1のように増殖をするカルスが得られた。図1は pRGEB32^{GFP}プラスミドを導入したカルスで、励 起光を照射すると蛍光を示すことから、アグロバ クテリウム法で導入した T-DNA カセットがイネ で機能することを確認した。同様に pRGEB32^{-gRNA}および pRGEB32^{FH15}についても形 質転換を行い、1 カルスから増殖したカルスを1 ラインとして、それぞれのラインを分けて培養した。培養したカルスは1か月目と2か月目にサン プリングを行い、 pRGEB32^{-gRNA} および pRGEB32^{FH15}のそれぞれのタイムコースで12 ラ インずつサンプリングした。

得られたゲノム編集カルスから DNA を抽出し、 T-NOS 配列検知用プライマーセットで PCR を行 った結果、pRGEB32^{-gRNA} では Line1、Line2、Line3 が、pRGEB32^{FH15} では Line1、Line5、Line6 が 1、 2 か月共に T-NOS 配列が強く増幅したため、こ れらのラインを用いて解析を行うこととした(図 2)。

2. T7E1 アッセイの結果

オンターゲットについて T7E1 アッセイを行っ た結果、pRGEB32^{-gRNA}では3 ラインいずれも切 断バンドは確認されず、pRGEB32FH15ではいずれ のラインでも切断バンドを確認することができ た(図 3)。この結果から、CRISPR/Cas9 システ ムがイネ細胞内で正常に機能していることが確 認された。一方でオフターゲット 3、4、7 につい てはいずれも切断バンドを確認することはでき なかった (図 3)。T7E1 アッセイは二本鎖 DNA のミスマッチを認識して切断を行うが、1~2塩基 のミスマッチ(塩基置換もしくはインデル)を認 識することはできず、3 塩基以上のミスマッチを 認識しており、さらにアガロースゲル電気泳動に より DNA バンドを目視で確認するため、低頻度 の変異を見逃す恐れがある。よって、オフターゲ ットを詳細に解析するために NGS を用いてアン プリコンシークエンスを実施した。

3. アンプリコンシークエンスの結果

アンプリコンシークエンスを行った際のラン について、リードのクオリティを表す%Q30 が Read1 では 91.2%、Reads2 では 88.4%で、Total Yield は 1.8 Gb であったことから、良好なランが 行 われたことが示唆された。各リードを CRISPResso2 で解析を行った結果、オンターゲッ トにおいて pRGEB32^{-gRNA} サンプルではリファレ ンス配列に相同なリードが 1,2 か月培養サンプル の全てで 95%以上であったのに対し、実際にゲノ ム編集を行った pRGEB32^{FH15} サンプルでは、1 か 月培養サンプルではそれぞれ 0.79%, 10.57%もし くは 0.1%未満であり、2 か月培養サンプルではい ずれのラインでも 0.1%未満であった(図 4、5)。 リファレンス配列に相同な配列が経時的に減少 し、多数の変異が確認されたことで、本研究で用 いた OsFH15-gRNA は高い切断活性を有してい ることが示唆された。一方でオフターゲットにつ いては(図 6~21)、オフターゲット 7 のみ、5 塩 基の欠失が pRGEB32^{FH15} で確認された(図 18)。

4. オンラインツール予測との比較

各オンラインツールにて OsFH15-gRNA 配列 をクエリーとした場合のオフターゲットについ て予測を行い、SITE-Seq 法により予測されたオ フターゲットと比較した。SITE-Seq 法により予 測されたオフターゲットを表2に示す。その結果、 オフターゲット 3 について予測に成功したのは Cas-OFFinder, CRISPRdirect および CRISP-DT であった (表 3)。オフターゲット 4 については Cas-OFF inder および CRISPR direct が予測に成功 し、オフターゲット7については PAM を NGG もしくはNRG(RはAもしくはGを表す)に設 定した時は CRISPRdirect のみ予測に成功し、 PAM を NTG に設定すると Cas-OFFinder および CRISP-DT も予測に成功した。オフターゲット8 は7 ミスマッチ/2DNA バルジと全体で見るとホ モロジーが低いため (表 2)、20mer+PAM では予 測されないが、PAM 寄りのシード配列は比較的 ホモロジーが高いため、12merおよび8mer+PAM では予測に成功していた。オンラインツールでの 予測オフターゲット数はCas-OFFinderでは2199 か所 (NRG PAM とした時は 4,809 か所、NTG PAM とした時は 2,818 か所)、CRISPRdirect の 20mer+PAM では 6,080 か所 (NRG PAM とした 時は 11,834 か所)、12mer+PAM では 151,672 か 所 (NRG PAM とした時は 305,820 か所)、 8mer+PAM では 755,139 か所 (NRG PAM とし た時は1,421,806か所)、CRISP-DTでは73か所 (NRG PAM とした時は 138 か所、NTG PAM と した時は91か所)であった(表4)。

5. アレルゲンデータベースを用いたアレルゲン 性予測

OsFH15-gRNAはOsFH15の第2エキソン上に 設計されているため、ゲノム編集による変異、特 にインデルが生じることでフレームシフトが起 こり、大きなアミノ酸配列の改変が生じる。こう した改変配列がアレルゲン性を有するか予測す るため、アレルゲンデータベースを用いてアレル ゲン予測を行った。その結果、今回ゲノム編集を 行い、アンプリコンシークエンス解析で明らかに なった配列においては、80-Mer Sliding Window FASTA Search および 8-mer FASTA Search のい ずれでも既知アレルゲンとホモロジーのある配 列は検出されなかった。

D. 考察

実際にゲノム編集を行ったイネにおいて、 SITE-Seq 法で予測されたオフターゲット 7 に変 異が確認された。このオフターゲット7は PAM 配列が NTG であった (表 2)。一般に知られる PAM 配列は NGG もしくは NAG であり、NTG PAM は非常に弱い活性を持つことは報告されて いるものの、一般にあまり考慮されない PAM 配 列である ¹³⁾。しかし実際にアンプリコンシークエ ンスを行い、解析を行ったところ5塩基の欠失が 確認されたことから、オフターゲット解析におい ては NGG または NAG 以外の PAM についても 考慮する必要が示唆された。多くのオンラインツ ールでは PAM 配列を NTG に設定することはで きず、Cas-OFFinder のようにコマンドラインを 用いる等の煩雑な操作が必要になる。一方で CRISPRdirect は PAM を NGG に設定していても オフターゲット7を予測することに成功したが、 これは PAM 配列内のミスマッチについても許容 するプログラムのためである。こうしたプログラ ムは PAM による制限なくオフターゲットを予測 できるメリットがあるが、PAM に 1 ミスマッチ が含まれることでプロトスペーサー部は4ミスマ ッチまでのオフターゲットしか予測できないた め、偽陰性が増える懸念がある。また Cas-OFFinder の場合、NRG および NTG PAM で検索した際のオフターゲット総数は7,627か所 であり、全てのオフターゲット候補を解析するこ とは困難である。 同様に CRISPRdirect 20mer+PAM で PAM を NGG に設定しても予測 されたオフターゲット総数は 6,080 か所であり、 全て解析することは困難である。その点 SITE-Seq 法は実際に Cas9 によって二本鎖切断された箇所 を検出するため、PAM 配列を網羅的に解析可能 な上、切断ポテンシャルの高いオフターゲット候 補をオンラインツールよりも精度良く検出でき るため、その後の解析が容易である。

本研究結果より、SITE-Seq およびアンプリコ ンシークエンスを組み合わせた、ゲノム編集食品 開発におけるオフターゲット評価法の一例を示 す(図 22)。

①オンラインツールを用いた gRNA 設計

CRISPRdirect、またはそれと同等の PAM 配列 に制限のないオンラインツールを用いて gRNA を設計する。この際、なるべくオフターゲット の数が少なく、特異性の高い gRNA を選択する。

- ②SITE-Seq によるオフターゲット予測
 - 設計した gRNA を用いてホスト生物の gDNA を *in vitro* で切断し、SITE-Seq に供する。

③Galaxy を用いて解析

- 得られた SITE-Seq データは、当部で開発した Galaxy for SITE-Seq を用いて解析を行い、オフ ターゲット箇所を予測する。
- ④ゲノム編集

設計した gRNA を用いてゲノム編集を行い、ゲ ノム編集生物から gDNA を抽出する。

⑤アンプリコンシークエンス

ゲノム編集生物の gDNA を用いて、SITE-Seq 解析により予測されたオフターゲット箇所に ついてアンプリコンシークエンスを実施し、配 列を確認する。

⑥データベースを用いたアレルゲン性予測

オンターゲットの変異についてはアレルゲン データベースに照会し、既知のアレルゲンとホ モロジーの高い配列は避ける。オフターゲット の変異については戻し交配を行い、変異を除く のが望ましい。

上記のようなオンラインツール、SITE-Seq お よびアンプリコンシークエンスを組み合わせた スキームは、ゲノム編集食品のオフターゲット解 析に有効だと考えられる。

- 1) Cameron P, et al., *Nature Methods* 14, 600-606, 2017
- 2) Sun T, et al., Scientific Reports 7, 6538, 2017
- Xie K, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, 3570-5, 2015
- 4) Ozawa K, Plant Sci. 176, 522-527, 2009
- 5) Clement K, et al., *Nat. Biotechnol.* 37, 224-226, 2019
- 6) Kawahara Y, et al. Rice 6, 4, 2013
- Bae S, et al., *Bioinformatics* 30, 1473-1475, 2014
- 8) Montague TG, et al., *Nucleic Acids Research* 42, 401-407, 2014
- 9) JP Concordet, et al., *Nucleic Acids Research* 46, 242-245, 2018
- 10) Naito Y, et al., *Bioinformatics* 31, 1120-1123, 2015
- 11) Zhu H, et al., *Bioinformatics* 35, 2783-2789, 2019
- 12) Liu H, et al., *Molecular Plant* 10, 530-532, 2017
- 13) Lazzarotto CR, et al. *Nat. Biotechnol.* 38, 1317-1327, 2020

E. 結論

本研究結果より、SITE-Seq 法により予測され たオフターゲット箇所において、実際にゲノム編 集を行った際に変異が生じたことから、SITE-Seq 法はイネのオフターゲット予測において有効で あると確認した。また、ゲノム編集食品のオフタ ーゲット評価においては、Cas9 の PAM 配列認識 の冗長性を考慮する必要が示唆された。SITE-Seq 法とアンプリコンシークエンスを組み合わせた オフターゲット評価系は、ゲノム編集食品の安全 性評価において有効だと考えられる。

F. 研究発表・業績

- 1. 論文発表
- Soga, K., Kimata, S., Narushima, J., Sato, S., Sato, E., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kawakami, H., Akiyama, H., Kondo, K., Nakamura, K. Development and Testing of an Individual Kernel Detection System for

参考文献:

Genetically Modified Soybean Events in Non-identity-preserved Soybean Samples. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **43**, 1259-1266, 2020.

- Takabatake, R., Onishi, M., Minegishi, Y., Futo, S., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Mano, J., Kitta, K. Development of a Novel Detection Method Targeting an Ultrashort 25 bp Sequence Found in Agrobacterium-Mediated Transformed GM Plants. Development of a Novel Detection Method Targeting an Ultrashort 25 bp Sequence Found in Agrobacterium-Mediated Transformed GM Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 15327-15334, 2020.
- Takabatake, R., Onishi, M., Mano, J., Kishine, M., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Kitta, K. Evaluation of Conversion Factors for Genetically Modified Maize Quantification. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 61, 235-238, 2020. 邦文(遺伝子組換えトウモロコシ定量 のための内標比の算出:高畠令王奈、大西真 理、真野潤一、岸根雅宏、曽我慶介、中村公 亮、近藤一成、橘田和美)
- 2. 学会発表
- 曽我慶介、木俣真弥、成島純平、佐藤咲子、 佐藤恵美、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、 川上浩、吉場聡子、柴田識人、穐山浩、中村 公亮、近藤一成:新しい遺伝子組換え表示の 妥当性を確保するための外国産遺伝子組換 え不分別大豆の流通実態調査、第57回全国 衛生化学技術協議会年会、宮崎、2020年11 月
- 2) 成島純平、吉場聡子、曽我慶介、高畠令王奈、 橘田和美、中村公亮、柴田識人、近藤一成: 安全性未審査の遺伝子組換えコムギ (MON71400, MON71500及び MON71600) を対象とした系統個別検知法の評価、第56 回全国衛生化学技術協議会年会、宮崎、2020 年11月
- 3) 近藤一成、福田のぞみ、坂田こずえ、田口千

恵、成島純平、曽我慶介:ヒト細胞を用いた CRISPR/Cas による DNA2 本鎖切断から生 じる細胞周期特徴的変異解析、日本薬学会 第 141 回年会、広島、2021 年 3 月

- 4) 曽我慶介、成島純平、吉場聡子、柴田識人、 近藤一成:全ゲノム配列を用いた遺伝子変異 検出におけるツール間比較、日本薬学会 第 141 回年会、広島、2021年3月
- 5) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、志波優、秋 本智、曽我慶介、吉場聡子、権藤崇裕、明石 良、柴田識人、近藤一成:ゲノム編集技術の 食品利用におけるオフターゲット予測と解 析スキームの確立、日本農芸化学会 2021 年 度大会、宮城、2021 年 3 月



図 1. アグロバクテリウムによるイネカルスへの形質転換

pRGEB32^{GFP}プラスミドをイネカルスに形質転換後、ハイグロマイシン選抜培養中の写真。左は白色蛍光 灯下の写真で、右は励起光照射時の写真。ハイグロマイシン耐性遺伝子および GFP を含む T-DNA が導入 されたカルスは活発に分裂をしており、励起光照射時に蛍光を示している。



図2. ゲノム編集カルスのgDNAにおけるT-NOSの挿入確認

pRGEB32^{-gRNA}またはpRGEB32^{FH15}プラスミドを形質転換したゲノム編 集カルスから精製DNAを抽出し、T-NOS配列でPCRを行った際のアガ ロース電気泳動写真。



図3. ゲノム編集カルスのgDNAにおけるT7E1アッセイ

pRGEB32^{-gRNA}またはpRGEB32^{FH15}プラスミドを形質転換したゲノム編 集カルスから精製DNAを抽出し、T7E1アッセイに供した際のアガ ロース電気泳動写真。黒いマークは非切断バンドを表し、白いマー クはT7E1により切断されたバンドを表す。



図4. オンターゲットについてのアンプリコンシークエンス結果 ゲノム編集カルス(1か月)におけるアンプリコンシークエンスを行 い、カットサイト周辺の配列をクラスタリングした。(a)はpRGEB32⁻ gRNAを形質転換したカルスのgDNAを用いてPCR増幅したサンプルの結 果を示す(n=3)。(b)はpRGEB32^{FH15}を形質転換したカルスのgDNAを 用いてPCR増幅したサンプルの結果を示す(n=3)。黒い矢印は参照 配列と相同的なリードを表す。

		Protospacer PAM
a	NC2-1	A G C A T C C A A G A A T G C A C T C A A G G A C C A A A T G C A Reference A C A T C C A A G A A T G C A C T C A A G G A C C A A A T G C A Reference A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G C A C C A A A T G C A 95.35% (55869 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G C C A C A T G C A 95.35% (55869 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 95.35% (55869 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G C C A C A T G C A 0.66% (388 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.66% (388 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.66% (388 reads) A C A T C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.27% (125 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.27% (125 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G A G C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A G C A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A G C A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C C A A G A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.14% (87 reads) A C A T C C A A G C A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.11% (63 reads) A C A T C C A A G C A T G C A C T C A A G C C C A A A T G C A 0.11% (63 reads)
	NC2-2	A © C A T C C A A G A A T O C A G T C A A © C A O C C A A A T O C A 95.65% (46893 reads) A © C A T C C A A G A A T O C A G T C A A © C A O C A A A T O C A 95.65% (46893 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C A A A T O C A 95.65% (473 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C A O C A A A T O C A 95.65% (473 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C A O C C A A A T O C A 95.65% (473 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 95.65% (476 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 95.65% (476 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A C C A A A T O C A 13% (66 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A C C A A A T O C A 13% (66 reads) A © C A T C C A A G A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A © C A T C C A A G A A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A C A T C C A A G A A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A C A T C C A A G A A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A C A T C C A A G A A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A C A T C C A A G A A T O C A G T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads) A C A T C C A A G A A T O C A C T C A A O C A O C C A A A T O C A 13% (66 reads)
	NC2-3	A © C A T C C A A G A A T G G A G T C A A G C A C C C A A A T G C A 95.60% (49107 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A G T C A A G C A C G A A A T G C A 0.94% (43107 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A G T C A A G C A C G A A A T G C A 0.94% (43107 reads) A G C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C G T A A A T G C A 0.94% (43107 reads) A G C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C G T A A A T G C A 0.94% (43107 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C G T A A A T G C A 0.16% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C G C A A A T G C A 0.16% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C C C A A A T G C A 0.16% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A G C A C C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A C G C A C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A C G C A C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A C G C A C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A C G C A C C C A A A T G C A 0.15% (437 reads) A C C A T C C A A G A A T G C A G T C A A C G C A C C C A A A T G C A 0.12% (637 reads)
		Protospacer PAM
D	GE2-1	A G C A T C C A A G A A T G G A G T C A A G G C A A A T G C A Reference A G C A T C C A A G A A T G G A A G C A T C C A A G A A T G G A A G C A T C C A A G A A T G G A A G C A T C C A A G A A T G C A
	GE2-5	A G C A T C C A A C A A T G C - T C A A G G A G G C A A A T G C A 38.38% (12356 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T G G T T C A A G G A G G C A A A T G C A 33.17% (10678 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T G G A T G C A 15.68 G C A A A T G C A 33.17% (10678 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T G G A T G C A 15.68 G C A A A T G C A 35.78% (1171 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T G G A G G C A A A T G C A 34.6% (1117 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A G G C A A A T G C A 2.46% (1171 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A G G C A A A T G C A 2.46% (1171 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A G G C A A A T G C A 2.46% (1171 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T G G - A G C A T C C A A G A A T G G A G G G C A A A T G C A 0.42% (135 reads) A G C A T C C A A G A A T G G T - A G C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G T - A G C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G T - C A G G A G G T A A T G C A 0.25% (170 reads) A G C A T C C A A G A A T G G T - C A T C C A A G A A T G G A T C A G G A G G T A A T G C A 0.21% (160 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A T C A G G A G G G T A A T G C A 0.21% (160 reads)<
	GE2-6	A G C A T C C A A G A A T C A A G G A G G C A A A T G C A 30.77% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 30.77% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.7% (17572 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G C A A A T G C A 10.2% (157 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G G A A A T G C A 0.23% (154 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G G G G A A A T G C A 0.23% (154 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G G A A A T G C A 0.21% (127 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G G G A A A T G C A 0.21% (127 reads) A G C A T C C A A G A A T 0 G A - T C A A G G A G G G G A A A T G C A 0.21% (127 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A - T C A A G G A G G G G A A A T G C A 0.21% (127 reads) A G C A T C C A A G A A G G A - T C C A A G G A G G G G A A A T G C A 0.20% (114 reads) A G C A T C C A A G A A G G A - T C C A A G G A G G G G G A A A T G C A 0.20% (114 reads) A G C A T C C A A G A A G G A - T C C A A G G G G G G G G G G G G G A A T G C A 0.16% (91 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A - T C C A A G G G G G G T A A T G C A 0.16% (87 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A - T C A A G G G G G T A A T G C A 0.16% (87 reads) A G C A T C C A A G A A T G G G - T C A A G G G G T A A T G C A 0.16% (87 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A - T C A A G G G G T A A T G C A 0.16% (87 reads) A G C A T C C A A G A A T G G A - T C A A G G G G T A A T G C A 0.13% (75 reads)
		bold Substitutions Insertions Insertions Deletions Deletions Predicted cleavage position

図5. オンターゲットについてのアンプリコンシークエンス結果



図6. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット1についてのアンプリ コンシークエンス結果

_			PAM	Protospacer	
a	NC2-1	T A A G A A A T A A G A A A T A A G A A A T A A G A A A	С Т С С А А С С А С Т С С А А С С А Т Т С С А А С С А С Т С С А А С С А	G A C T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A Reference A A A C A 97.89% (59437 reads) A A A C A 0.21% (128 reads) A A A C T 0.19% (118 reads)
	NC2-2	T A A G A A A T A A G A A A	C T C C A A C C A T T C C A A C C A C T C C A A C C A C T C T A A C C A	G A C T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A 97.94% (52445 reads) A A A C A 0.20% (109 reads) A A A C T 0.18% (95 reads) A A A C A 0.11% (61 reads)
	NC2-3	T A A G A A A T A A G A A A T A A G A A A T A A G T A A T A A G T A A T A A G A A A	C T C C A A C C A C T C C A A C C A T T C C A A C C A C T C C A A C C A C T C C A A C C A C T C T A A C C A	G A C T T T T A A G G A C T T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A 97.96% (59924 reads) A A A C T 0.19% (119 reads) A A A C A 0.17% (105 reads) A A A C A 0.12% (71 reads) A A A C A 0.12% (71 reads)
b			PAM	Protospacer	
	GE2-1	T A A G A A A T A A G A A G	C T C C A A C C A C T C C A A C C A C T C C A A C C A T T C C A A C C A C T C C A A C C A	G A C T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A Reference A A A C A 97.95% (44144 reads) A A A C T 0.18% (83 reads) A A A C A 0.14% (65 reads) A A A C A 0.10% (47 reads)
	GE2-5	T A A G A A A T A A G A A G	C T C C A A C C A T T C C A A C C A C T C C A A C C A	G A C T T T A A G G A C T T T T A A G G A C T T T T A A G G A C T T T A A G G A C T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A 97.81% (46174 reads) A A A C A 0.20% (95 reads) A A A C T 0.19% (88 reads) A A A C A 0.13% (60 reads) A A A C A 0.13% (50 reads)
	GE2-6	T A A G A A A T A A G A A A	C T C C A A C C A C T C C A A C C A T T C C A A C C A C T C T A A C C A	G A C T T T A A G G A C T T T A A G	A A A C A 97.85% (51902 reads) A A A C T 0.21% (112 reads) A A A C A 0.17% (91 reads) A A A C A 0.11% (57 reads)
				b 	 Substitutions Insertions Deletions Predicted cleavage position

図7. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット1についてのアンプリ コンシークエンス結果

a								P/	M	1]	Pro	oto	osţ	pa	ce	r				
NC1	-1		3 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T C T C T C T C T C T C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C T C T C T C T C T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	0 0000000000000000000000000000000000000		C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A	A G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T			0 000000000000000		A A A A A A A A A A A A		6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	0 0000000000000			Reference 50.27% (2: 32.39% (1) 6.15% (333 3.43% (188 2.23% (122 0.26% (144 0.23% (124 0.21% (114 0.21% (114 0.11% (63 0.10% (56	7755 reads) 7881 reads) 77 reads) 44 reads) 51 reads) 5 reads) 5 reads) 5 reads) 5 reads) reads) reads) reads) reads)
NC1	-2		3 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	000000000000000000000000000000000000000		CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A T A A A A A A T A A	T T T T T T T T T T T T T T		G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	0000000000000	T C C C C T C C C C C	~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	666666666666666666666666666666666666666	666666666 6	00000000000	I G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	666666666666666666666666666666666666666	81.44% (44 5.89% (344 5.76% (34) 1.33% (790 0.36% (210 0.34% (199 0.19% (11) 0.14% (83 0.11% (67 0.10% (60 0.10% (60	3234 reads) 38 reads) 34 reads) 5 reads) 5 reads) 4 reads) 4 reads) reads) reads) reads) reads)
NC1	-3		G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	00000 0000		CCCCCCC CCCCC	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		AATTAAAAA	T T T T T T T T T T T T		GGGGGGAGGAGG	000000000000000000000000000000000000000		*******	6666666666666		00000000000	T G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	666666666666666666666666666666666666666	53,65% (22 29,06% (13 5,85% (30 3,68% (19 1,97% (10) 0,23% (16 0,25% (13 0,23% (12 0,23% (12 0,23% (12 0,23% (10) 0,14% (73	3422 reads) 5396 reads) 30 reads) 50 reads) 12 reads) 3 reads) 4 reads) 4 reads) 4 reads) 4 reads) 4 reads)
								PA	M	1				Pr	ot	os	pa	ce	r					
b		ACA	A A	TC	A T	C	C C	C A	AA	AG	A T A T	T T	TO	G	G	TC	A	GI	G	c	T G	GC	Reference	(407 reade)
GE1	-1		3 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	00000 00000		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G G A G	AATTAAAAAAA	T T T T T T T T T T T		6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	000000000000000000000000000000000000000	TCCCTTCCCTTC	~~~~~~~~~~	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	666666666666666666666666666666666666666	00000000000		666666666666666666666666666666666666666	06.05% (86 5.87% (30) 4.57% (233 1.21% (633 0.32% (163 0.27% (142 0.25% (125 0.24% (122 0.24% (122 0.24% (123) 0.19% (98 0.17% (89 0.11% (56	501 reads) 70 reads) 38 reads) 5 reads) 5 reads) 2 reads) 9 reads) 7 reads) reads) reads) reads)
GE1	-5				A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	0000 000000		CCCC CCCCCCCC	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T			000000000000000000000000000000000000000		* * * * * * * * * * *			000000000000		666666666666666666666666666666666666666	80.50% (38) 5.84% (28) 5.30% (25) 2.32% (11) 0.48% (23) 0.36% (17) 0.31% (15) 0.23% (11) 0.13% (88) 0.13% (61) 0.11% (55)	9044 reads) 81 reads) 73 reads) 77 reads) 4 reads) 4 reads) 1 reads) 1 reads) 1 reads) reads) reads) reads) reads) reads)
GE1	-6	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	3 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T C T C T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T T C C T C C T C C T C C C T C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A				A A A A A A A A A A A A		A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T		G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	000000000000000000000000000000000000000		A A A A A A A A A A A A		666666666666666666666666666666666666666	0000000000000			79.36% (33 5.83% (243 5.50% (233 2.39% (100 0.36% (233 0.37% (156 0.33% (142 0.31% (133 0.25% (100 0.17% (74 0.16% (70 0.11% (45 0.11% (45	3891 reads) 59 reads) 51 reads) 20 reads) 3 reads) 2 reads) 2 reads) 3 reads) 8 reads) reads) reads) reads) reads)
																		bol	ld]	S In D	ubs ser ele red	titu tior tion icte	tions is s d cleavag	e position

図8. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット2についてのアンプリ コンシークエンス結果



図9. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット2についてのアンプリ コンシークエンス結果





図10. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット3についてのアンプ リコンシークエンス結果

a			PAM	Protospacer	
		TGCACTTCACT	CTCTGGCTCC/	ATTCTTGGTTCAG	Reference
	NC2-1	T G C C T C A C A T C A C A T G A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C T T G C C C T T T G C T C A C T T A C A C T T C A C T T A C A C T T A C A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T C A C T T A C A C T T A C A C T T A C T T	C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C /	A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T T T T G G T T C A G A C T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G	90.60% (48061 reads) 6.02% (3192 reads) 0.86% (455 reads) 0.29% (154 reads) 0.28% (147 reads) 0.24% (126 reads) 0.11% (56 reads)
	NC2-2	T G C A C T T C A C T T G C A C A T C A C T T G C A C A T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T	C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C /	A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T T T T G G T T C A G A C T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G	90,45% (46197 reads) 6,22% (3178 reads) 0,92% (469 reads) 0,29% (150 reads) 0,26% (132 reads) 0,25% (126 reads)
	NC2-3	T G C A C T T C A C T T G C A C A T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T	C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C C C T G G C T C C / C T C T G G C T C C / C T C T G G C T C C /	A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G	90.27% (46250 reads) 6.45% (3307 reads) 0.81% (415 reads) 0.33% (167 reads) 0.29% (148 reads) 0.20% (105 reads) 0.13% (66 reads)
b			PAM	Protospacer	
	CE2 1	T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C A T C A C T T G C A C T T C A C T	CTCTGGCTCC/ CTCTGGCTCC/ CTCTGGCTCC/	A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G	Reference 90.64% (39698 reads) 6.05% (2650 reads) 0.78% (342 reads)
	GE2-1	T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T G C A C T T C A C T T A C A C T T C A C T	CTCTGGCTCC CTCTGGCTCC CTCTGGCTCC	A T T T T T G G T T C A G A C T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G A T T C T T G G T T C A G	0.28% (123 reads) 0.26% (114 reads) 0.18% (77 reads) 0.12% (53 reads)

	TACACTTCACTCTCTGGCTCCATTCTTGGTTCAG0.12% (53 reads)
GE2-5	T & C & A C T T C & A C T C T C T C & G C T C C & T T C T T & G T T C & A & 90,40% (43996 reads) T & C & A C & T C & A C T C T C T & G C & C & C & A T T C T T & G C T T C & A & 5,99% (23916 reads) S & C & A C T T C & A C T C T C T & G C T C & A T T C T T & G C T T C & A & 5,99% (231916 reads) T & C & A C T T C & A C T C T C T & G C T C T A T T C T T & G C T T C A & 6,01% (441 reads) T & C & A C T T C & A C T C T C T & G C T C C A T T C T T G C T T C A & 6,035% (1691 reads) S & C & A C T T C & A C T C T C T G C C C A T T C T T G C T T C A & 6,035% (1691 reads) T & C & A C T T C & A C T C C T C T G C C C C A T T C T T G C T T C A & 6,023% (110 reads) T & C & A C T T C & A C T C C C T C G C C A T T C T T G C T T C A & 0,23% (110 reads)
GE2-6	T G C A C T T C A C T C T C T G G C T C C A T T C T T G G T T C A G 90,41% (44797 reads) T G C A C A T C A C T C T C T G G C T C C A T T C T T G G T T C A G 6,17% (3059 reads) G C A C T T C A C T C T C T C G C T C T A T C T T G G T T C A G 9,45% (4464 reads) T G C A C T T C A C T C T C T G G C T C C A T T C T T G G T T C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C T G G C T C A T T C T T G G T T C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C C G G C T C C A T T C T T G G T T C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C G G C T C C A T T C T T G G T T C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C G G C T C C A T C C T G G T C C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C G G C T C C A T C C T G G T C C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C G G C T C C A T C C T G G T C C A G 0,24% (440 reads) G C A C T T C A C T C C C G G C T C C A T C C T G G T C C A G 0,24% (460 reads)
	bold Substitutions

Insertions

Deletions

Predicted cleavage position

図11. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット3についてのアンプ リコンシークエンス結果

		PAM Protospacer	
a		T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C	Reference
	NC1-1	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C C T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A A G C T A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A A G C T A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C	97.05% (48569 reads) 0.31% (154 reads) 0.20% (102 reads) 0.19% (93 reads) 0.15% (74 reads) 0.13% (66 reads) 0.12% (62 reads) 0.11% (56 reads)
	NC1-2	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T T C T G A T G C T C C T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T T C T G A T G C T C C T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C	97.06% (50144 reads) 0.28% (146 reads) 0.22% (115 reads) 0.17% (87 reads) 0.17% (78 reads) 0.14% (72 reads) 0.11% (56 reads) 0.11% (56 reads)
	NC1-3	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T C T T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C T C T C T A A G C A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C C C C	96.94% (50912 reads) 0.28% (147 reads) 0.22% (117 reads) 0.20% (106 reads) 0.19% (101 reads) 0.15% (78 reads) 0.14% (71 reads)

b		PAM Protospacer	
		T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G	GCTCC Reference
	GE1-1	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T	a C T C C 97.03% (44117 reads) b C T C C 0.29% (132 reads) c T C C 0.23% (104 reads) c T C C 0.23% (104 reads) c T C C 0.23% (104 reads) c T C C 0.18% (83 reads) c T C C 0.18% (87 reads) c C C C 0.15% (70 reads) c C C C 0.15% (68 reads)
	GE1-5	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T T T C T T A G G A A C C A T G G C T C C T T C T G A T T T C T T A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C T C T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T	a c T c C 97,14% (45422 reads) a c T c C 0.30% (138 reads) c T c C 0.21% (88 reads) a c T c C 0.21% (88 reads) a c T c C 0.15% (87 reads) a c T c C 0.16% (74 reads) b c T c C 0.12% (57 reads) a c C c C 0.12% (55 reads)
	GE1-6	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C T C T T C T G A T T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T C T C T C T A T C T T A G C A C C A T G G C T C C T C T C T C T C T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T C T T A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T T T T T T T A G C A C C A T G G C T C C T C T C T C T G A T	a C T C C 96 92% (48938 reads) a C T C C 0.32% (163 reads) a C T C C 0.23% (117 reads) a C T C C 0.23% (117 reads) a C T C C 0.23% (117 reads) a C T C C 0.18% (91 reads) a C T C C 0.13% (64 reads) a C T C C 0.13% (64 reads) a C T C C 0.13% (64 reads) a C T C C 0.13% (54 reads)
		bold	Substitutions Insertions Deletions Predicted cleavage position

図12. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット4についてのアンプ リコンシークエンス結果

a		T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Reference
	NC2-1	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C T C T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C O 21% (116 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C O 21% (114 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C O 17% (198 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C C C C O 17% (198 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C O 17% (198 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C O 14% (77 reads) T C T C T C A A G C A A C C A T G G C C C C T T C T G A T G C T C C O 14% (77 reads)
	NC2-2	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 97.16% (51312 reads) T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.25% (132 reads) T C C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.25% (132 reads) T C C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C 0.20% (108 reads) T C C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C 0.20% (108 reads) T C C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C 0.20% (108 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C 0.17% (09 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T C T C T G A T G C T C C 0.14% (76 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.14% (76 reads) T C T T C A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.14% (76 reads)
	NC2-3	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 97.22% (48627 reads) T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.25% (122 reads) T C C T T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.25% (122 reads) T C C T T A G C A A C C A T G G C T C C T C T T C T G A T G C T C C 0.15% (73 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T T T T G A T G C T C C 0.15% (73 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.15% (73 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C T C C 0.12% (59 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.12% (59 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.12% (59 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.11% (54 reads) T T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.11% (54 reads)
b		PAM Protospacer
	GE2-1	T C C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C P (Paterone) T C T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C P (29% (43146 reads)) T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (28% (122 reads)) T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (28% (122 reads)) T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (18% (60 reads)) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (18% (62 reads)) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C C C C Q (14% (62 reads)) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C C C C Q (14% (56 reads)) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (13% (56 reads)) T C T T C A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C Q (13% (56 reads))
	GE2-5	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 99% (48717 reads) T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 27% (137 reads) T C T T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 27% (107 reads) T C T T A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 27% (107 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 27% (107 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C G 27% (107 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C C C C 0.21% (107 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T T C T G A T G C C C C 0.15% (78 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C T C T C T G A T G C C C C 0.12% (60 reads) T C T T A A G C A C C A T G G C T C C T C T T C T G A T G C T C C 0.12% (60 reads) T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C T C T T C T G A T G C T C C 0.12% (59 reads) T T T T T A A G C A A C C A T G G C C T C T C T T C T G A T G C T C C 0.12% (59 reads)
	GE2-6	T T C T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 97.02% (49453 reads) T T T T T A A G C A A C C A T G G C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.29% (150 reads) T C T T T A G C A A C C A T G C C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.29% (150 reads) T C C T T A G C A A C C A T G C C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.19% (95 reads) T C T T A G C A A C C A T G C C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.17% (86 reads) T C T T A G C A A C C A T G C C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.17% (86 reads) T C T T A G C A A C C A T G C C C C T T C T G A T G C C C C 0.13% (65 reads) T C T T A G C A C C A T G C C C C T C C C T T C T G A T G C T C C 0.17% (86 reads) T C T T A G C A C C A T G C C C C T T C T G A T G C C C C 0.13% (65 reads) T C T T C T C A G C A A C C A T G C C C C T T C T G A T G C T C C 0.12% (60 reads)
		bold Substitutions □ Insertions □ Deletions Predicted cleavage position

PAM

Protospacer

図13. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット4についてのアンプ リコンシークエンス結果



図14. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット5についてのアンプ リコンシークエンス結果

a		Protospacer
	NC2-1	A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T Reference A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 1 95,72% (5048 reads) A T T C C A C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0,76% (399 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0,76% (399 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0,76% (285 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0,76% (285 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0,26% (150 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 1 0,19% (98 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 1 0,15% (79 reads) A T T C C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 1 0,15% (79 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0,15% (79 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0,15% (79 reads)
	NC2-2	A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T I T 95.74% (47114 reads) A T T C C A C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.82% (405 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0.53% (261 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T T T A G T T T C T T 1 0.53% (261 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0.28% (137 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0.17% (85 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0.17% (85 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 1 0.17% (85 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.12% (61 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.12% (61 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.12% (61 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.12% (58 reads)
	NC2-3	A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 95.82% (46501 reads) A T T C C A C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.45% (418 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 0.45% (219 reads) A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T 0.45% (219 reads) A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.45% (219 reads) A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.45% (219 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 10.18% (89 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 10.18% (89 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.15% (75 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.15% (75 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.14% (66 reads)
b		Protospacer
	GE2-1	A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T Reference A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 95,80% (3732 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 77% (281 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 77% (281 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 70,31% (20 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0,31% (120 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0,31% (71 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0,11% (51 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0,11% (53 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10,11% (53 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10,11% (53 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10,11% (54 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10,11% (54 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10,11% (54 reads)
	GE2-5	A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 95.67% (42354 reads) A T T C C A C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 10.76% (337 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T C T A T T A G T T T C T T 10.54% (239 reads) A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.54% (239 reads) A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T 10.31% (137 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 10.91% (137 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T 10.91% (83 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0.91% (83 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T C T T T 0.14% (64 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.14% (64 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.14% (64 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.12% (53 reads)
		A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 95.67% (47344 reads) A T T C C A C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0.80% (394 reads) A T T C C G C G T A T T C G T C T T T A G T T T C T T 10.53% (264 reads)
	GE2-6	A T T C C G C G T A T T T G A C T T C T A T T A G T T T C T T T 0,30% (146 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T C T C T T T 0,21% (106 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 0,21% (146 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 0,17% (84 reads) A T T C C C C G T A T T C G A C T T C T A T T A G T T T C T T 0,16% (78 reads) A T T C C G C G T A T T C G A C T T C T A T T T G T T T C T T 10,14% (69 reads)

図15. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット5についてのアンプ リコンシークエンス結果



図16. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット6についてのアンプ リコンシークエンス結果

а	Protospacer	PAM		
NC2-1	G C C A G C T C T C A C C G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A A T C T G C A G C T C T G A C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T G C C A G C T C T G A C G A A T C T	T T G G A G A T T G G G G A G A T T G G G G A G A T T G G G G A T T G G G G A T T G G G G A	T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T A A T - - A T T A A T T A A T	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
NC2-2	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	T T G G G G A T T G G G G A T T G G A G G A T T G G A G G A T T G G G G G A	T G A T T G A T T G A T T A A T T G A T	T C T G T 93.68% (44600 reads) T C T G T 68% (799 reads) T C T G T 68% (78 reads) T C T G T 78% (87 reads) T G T 15% (71 reads) 17% (82 reads) T G T 15% (71 reads) 17% (82 reads) T C T G 11% (50 reads)
NC2-3	G C C A G C T C T G A C C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T	T T G G G G A T T G G G G A T T G G G G A T T G G G G A	T G A T T A A T T A A T T A A T	T C T G T 54,64% (23979 reads) T C T G T 40,03% (17569 reads) T C T G T 1,11% (486 reads) T C T G T 1,11% (486 reads) T C T G T 0,77% (336 reads) T C T G T 0,25% (113 reads) T C T G T 0,25% (108 reads) T C T G T 0,15% (64 reads)
b	Protospacer	PAM		
GE2-1	G C C A G C T C T C A A C C G A A A T C T G C A G C T C T C A A C C G A A A T C T G C A G C T C T G A C C G A A A T G C A G C T C T G A C C G A A A T G C A G C T C T G A C C G A A A T G C A G C T C T G A C C A A A T G C A G C T C T G A C C A A A T G C A G C T C T G A C C A A A T G C A G C T C T G A C C A A A T G C C A G C T C T G A C C A A A T G C C A G C T C T G A C C A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T G C C A G C T C T G A C C G A A T	T T G A G A T T G C G A T T G C G A T T G C G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A T T G G G A	T G A T T G A T T G A T T G A T T A A T T A A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T T G A T	T C T G T Reference T C T G T 89,60% (37944 reads) T C T G T 89,60% (37948 reads) T C T G T 827% (1658 reads) T C T G T 122% (517 reads) T C T G T 122% (517 reads) T C T G T 122% (517 reads) T C T G T 0.18% (78 reads) T C T G T 0.18% (78 reads) T C T G T 0.16% (60 reads) T C T G T 0.16% (60 reads) T C T G T 0.13% (54 reads) T T G T 0.12% (49 reads)
GE2-5	G C C A G C T C T C T G A C C G A A T T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C A A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A T C T G C C A G C T C T G A C C G A A C T C T G C C A G C T C T G A C C G A A C T C T G C C A G C T C T G A C C G A A C T C T	T T G G G G A T T G G G A G A T T G G G A G A T T G G G A G A T T G G G G A	T G A T T G A T T G A T T G A T T A A T T A A T T A A T T G A T	I C T G T S6.95% (24420 reads) I C I G T S.76% (2279 reads) I C I G I G.7% (652 reads) I C I G.7% (652 reads) I I C I G.7% (256 reads) I C I G.7% (266 reads) I C I G.7% (268 reads) I C I G.7% (268 reads) I C I G.7% (268 reads) I C T G.7% (268 reads) I T G.7% (278 reads) G.7% (278 reads) I T G.7% (278 reads) T <td< th=""></td<>
GE2-6	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	T T G G G G A T T G G G G A T T G G G G A T T G G G G A	T G A T T T G A T T T G A T T A A T T A A T T G A T	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
			bold -	Substitutions Insertions Deletions Predicted cleavage position

図17. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット6についてのアンプ リコンシークエンス結果



図18. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット7についてのアンプ リコンシークエンス結果



図19. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット7についてのアンプ リコンシークエンス結果



図20. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット8についてのアンプ リコンシークエンス結果





図21. SITE-Seqにより予測されたオフターゲット8についてのアンプ リコンシークエンス結果



図22. ゲノム編集食品開発におけるオフターゲット評価法の一例

Oligonucleotide name	Sequence (5' - 3')
T-NOS PCR	
T-NOS Fwd	CATAGATGACACCGCG
T-NOS Rev	GATCGTTCAAACATTTGG
Introducing gRNA casset into pRGEB32	
FH15_gRNA_in_pRGEB32_Fwd	GGCAGCATCCAAGAATGGAGTCA
FH15_gRNA_in_pRGEB32_Rev	AAACTGACTCCATTCTTGGATGC
DNA Library prep for amplicon-sequencing	g
Amp_Adapter1_On_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCGCGATGTTCTGCGATTTC
Amp_Adapter1_On_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGCTCCCCACGCGATATC
Amp_Adapter1_Off1_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGACATATTCCTCCATTAACACAAAAG
Amp_Adapter1_Off1_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGAGATCCATTGGGGCAGGC
Amp_Adapter1_Off2_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTAAAGTTCCTCCACCAAATTGC
Amp_Adapter1_Off2_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATATCCACGCTGGTACAGTAG
Amp_Adapter1_Off3_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCACCAGTGGATTTGTGGAGG
Amp_Adapter1_Off3_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCATCCAGCTTCTTGAGTAAC
Amp_Adapter1_Off4_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGGCATGATAAGTCTGTTCCTC
Amp_Adapter1_Off4_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAGCAGAGCCACAGAC
Amp_Adapter1_Off5_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCAAAATTAGCACAGAGACAACC
Amp_Adapter1_Off5_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGAGTTAATTTGCCTTGAGACTATC
Amp_Adapter1_Off6_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGTGCATTACCCCAAGGATG
Amp_Adapter1_Off6_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTAAGTTAGAAGGGGAACGC
Amp_Adapter1_Off7_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGGTGGATTGGTTTGTATGC
Amp_Adapter1_Off7_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCAATTCCAAACTATAAACCGC
Amp_Adapter1_Off8_Fwd	CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTCAAAGCCCTAACCAAGTTC
Amp_Adapter1_Off8_Rev	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCGCAACCAGTTAGACCTC
Index primers	
Index-UDI0001_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGCGCTAGACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0001_Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAACCGCGGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0002_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATATCGAACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0002-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGTTATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0003_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGCAGACGACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0003-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCAAGTCCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0004_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGAGTAACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0004-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTGGACTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0005_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGTGCGTACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0005-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGTGGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0006_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACATACACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0006-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGACAAGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0007_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACATAGCGACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0007-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGCTTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0008_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTGCGATAACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0008-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGATCCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI0009_Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCAACAGAACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI0009-Rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCTGAACTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC
Index-UDI00010-Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGGTGAGACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI00011-Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGCGGTTCACACTCTTTCCCTACACGACG
Index-UDI00012-Fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAACCTACACTCTTTCCCTACACGACG
T7E1 assay	
FH15_T7E1_On_Fwd	CTTGGTGATTGGATTTAGCAGCAG
FH15_T7E1_On_Rev	CATCCAGGAGAGCCTTGCAG
FH15_T7E1_Off3_Fwd	TCCTCCTCACCAAATTCGGTAAC
FH15_Off3_Rev	CTTGTGCTGTGAGAAGTGTGC
FH15_T7E1_Off4_Fwd	TCGCGGAGAATTACCAGCAG
FH15_Off4_Rev	CAGCGCTGAAACTGGCTC
FH15_T7E1_Off7_Fwd	GCACAGGAGAGCATTAGAGTG
FH15_Off7_Rev	TCAGATCGGTGTATCCAATTCC

表1. 本研究で使用したオリゴヌクレオチド一覧

	Locus	Cut site sequence predicted by SITE-Seq analysis.						
On-target	chr9:20181243 (Exon)	AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCAAGGAGCAAATGCAGCT GGAGAGCATCCAAGAATGGAGTCAAGGAGGCAAATGCAGCT ***********						
Off-target 1	chr1:18688154 (Exon)	AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCTAAGTTTC ATTGTTGTTTCTTAAAGTCTGGTTGGAGTTTCTTAAGTTTC * ** * * * *						
Off-target 2	chr1:33534133 (Exon)	AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCAGAGATGATTCTGACCGAAATCTTTGGAGAGATGATTCTGTATT ATGCCAGCTCTGACCGAAATCTTTGGAGATGATTCTGTATT ** * ** * * *						
Off-target 3	chr1:39263530 (Exon)	-AGCATCCAAGAATGGAGTCA CAACTGAACCAAGAATGGAGCCAGAGAGTGAAGTGCAATAC * * * ********** **						
Off-target 4	chr5:18020045 (3' UTR)	AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCAAGAACATC ATAGGAGCATCAGAAGGGAGCCATGGTTGCTTAAGAACATC ****** * ** **** **						
Off-target 5	chr6:15796609 (Intron)	AGCATCCAAGAAT-GGAGTCAAGAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTAGAAGTCGAATACGCGGAATGGTAGT ** * ** ** ***						
Off-target 6	chr10:10862382 (Exon)	AGCATCCAAGAATGGAGTCA TATGCCAGCTCTGACCGAAATCTTTGGAGATGATTCTGTAT ** * ** * * *						
Off-target 7	chr12:12080780 (Intron)	AGCATCCAAGAATGGAGTCA GAAATCATACAAGAATGGAGTCACTGTATATCAAATTGTTA * *** ******						
Off-target 8	chr12:20542434 (3' UTR)	AGCATCCAAGAATGGAGTCAAGCATCCA-AGCTAGCCCTTCTGA AGCTAGCAACAAAGCGGAGTCCCAGGGTCTAGCCCTTCTGA *** ** * * * *****						

表2. SITE-Seqにより検出された9カットサイトの位置と配列

前年度実施したSITE-Seq解析により、64 nM, 256 nM, 1024 nMの複数 濃度のCas9で切断した際に、いずれかの濃度間で重複して検出され たカットサイト9か所の位置と配列を示した。各配列はオンターゲッ トのプロトスペーサー配列とClustalWを用いてマルチプルシークエ ンスアライメントを行い、隣接する典型的なPAM様配列を予測PAM 配列として緑で表した。

Locus		Con OFFinition			CHOPCHOP		CDISDOD		CRISPRdirect							CDICDD DT			CDISDD D-20	
			Cas-Of Tillder			CHOPCHOP		CRISPOR		20mer+PAM		+PAM	8mer+PAM		CRISPR-D1			CRISPR-P V2.0		
		NGG	NRG	NTG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NTG	NGG	NRG	
Off-target 1	chr1: 18688154 (Exon)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Off-target 2	chr1: 33534133 (Exon)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Off-target 3	chr1: 39263530 (Exon)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
Off-target 4	chr5: 18020045 (3' UTR)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Off-target 5	chr6: 15796609 (Intron)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Off-target 6	chr10: 10862382 (Exon)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Off-target 7	chr12: 12080780 (Intron)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	
Off-target 8	chr12: 20542434 (3' UTR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

表3. SITE-Seqにより予測された8オフターゲットについてオンライン

ツールを用いた場合の予測結果

「+」は予測可能、「-」は予測不可であったことを表す。

	Cas OFFinder			СНОРСНОР		CRISPOR				CRIS	PRdirect	- CRISPR-DT			CRISPR-P v2.0			
	Cas-Ort-Inder		uei	CHOPCHOP		URISPUK		(20mer+PAM)		(12mer+PAM)							(8mer+PAM)	
	NGG	NRG	NTG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NGG	NRG	NTG	NGG	NRG
0 mismatch /gap	1	1	0	0	0	0	-	1	1	4	7	720	1176	1	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	176	376	33349	63563	0	0	0	0	0
2	4	5	2	0	0	0	-	0	0	7755	16028	721070	1357067	0	0	2	0	0
3	6	14	15	0	0	1	-	11	21	143737	289409	-	-	0	2	1	0	0
4	112	350	157	0	0	17	-	333	681	-	-	-	-	16	33	13	20	20
5	2076	4439	2644	0	0	-	-	5735	11131	-	-	-	-	56	102	75	0	0
Total	2199	4809	2818	0	0	18	-	6080	11834	151672	305820	755139	1421806	73	138	91	20	20

表4.6種オンラインツールで予測されたオフターゲット数

各オンラインツールで予測されたオフターゲット数を示す。「-」は プログラム上、検索ができないことを示す。なお、Cas-OFFinderは Web版ではPAMにNTGを設定できないため、コマンドライン版を用い て解析を行った。