様式第６（第３の３の（１）関係）

住所等変更報告書

令和６年１月１６日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長　宛

提出者　氏名　サナテックライフサイエンス株式会社
代表取締役　竹 下 達 夫
住所　　東京都港区虎ノ門三丁目７番１０号
ランディック虎ノ門ビル

令和２年12月11日付けで提出したゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書の氏名に変更が生じたため、「農林水産分野におけるゲノム編集技術の利用により得られた生物の生物多様性影響に関する情報提供等の具体的な手続について」（令和元年10月９日付け元消安第2743号農林水産省消費・安全局長通知）第３の３の（１）の規定に基づき、次のとおり報告します。

変更前の氏名、住所及び電話番号	氏　　名　サナテックシード株式会社 （法人番号：4010401137642） 代表取締役　竹 下 達 夫 住　　所　〒105-0001 東京都港区虎ノ門三丁目７番１０号 ランディック虎ノ門ビル 電 話 番 号　03-6432-4051
変更後の氏名、住所及び電話番号	氏　　名　サナテックライフサイエンス株式会社 （法人番号：4010401137642） 代表取締役　竹 下 達 夫 住　　所　〒105-0001 東京都港区虎ノ門三丁目７番１０号 ランディック虎ノ門ビル 電 話 番 号　03-6432-4051
変更した日	令和６年１月１日

2消安第4024号
令 -2.12.11 和
消費・安全局

様式第３（第３の１の（２）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供
（情報提供書の提出）

令和２年　１２月　１１日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長　宛

法　人　名　　サナテックシード株式会社
（法人番号：4010401137642）
提出者　代表者氏名　代表取締役　竹 下 達 夫　　印
住　　所　〒105-0001
東京都港区虎ノ門三丁目７番１０号
ランディック虎ノ門ビル
電 話 番 号　03-6432-4051

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等をするため、「農林水産分野におけるゲノム編集技術の利用により得られた生物の生物多様性影響に関する情報提供等の具体的な手続について」（令和元年10月９日付け元消安第2743号農林水産省消費・安全局長通知）第３の１の（２）の①の規定に基づき、当該生物の使用等に関する情報提供書を提出します。

接受
-2.12.11
農林水産省

様式第１（第３の１の（１）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書

項目		記入欄
１　ゲノム編集技術の利用により得られた生物の名称及び概要		名称：GABA 高蓄積トマト（#87-17） 概要：トマトのグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子(GABA 合成遺伝子、*SlGAD3*)の一部を改変し、GABA 含有量を高めた。
２　当該生物の用途		食用、栽培用及び飼料用。 F_1作出のための親系統として利用する。作出したF_1系統を食用として使用する。情報提供の対象範囲は、T_1世代以降である。 食品残渣を飼料に使用される場合を考慮し、用途として飼料用も含める。
３　使用施設の概要		－
４　カルタヘナ法第２条第２項第１号の細胞外において核酸を加工する技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有していないことが確認された生物であること	(1) 細胞外で加工した核酸の移入の有無（移入した場合は、移入した核酸に関する情報を含む。）	有 調理用トマト品種シシリアンルージュ CF の親系統（純系[1]）に、Cas9 遺伝子発現カセット、sgRNA 発現カセット、カナマイシン耐性遺伝子発現カセット（以降 CRISPR/Cas9 発現カセットと言う）を組み込んだベクターを移入し、自家受粉させたのち、後代の分離系統から#87-17 を選抜した（別添資料１・図１；Nonaka *et al.*, 2017）。
	(2) 移入した核酸の残存の有無（選抜・育成の経過及び当該核酸の残存の有無を確認した方法に関する情報を含む。）	無 アグロバクテリウム法により調理用トマト品種の親系統へ CRISPR/Cas9 発現カセットを移入しT_0個体を 57 系統得た。このうち無作為に選んだ 18 系統についてシーケンサーにて塩基配列を解読し、17 系統で標的配列に変異導入があることを確認した。そのうちT_0個体の GABA 高蓄積系統であった 6 系統をそれぞれ自家受粉し、選抜したT_1世代において、形質が揃っており、変異がホモ化した系統#87-17 を選抜した（別添資料１・図２）。さらにこの#87-17 系統を、従来の品種改良と同様、シシリアンルージュ CF のもう一方の親系統（純系、野生型）と交配し、F_1系統を獲得した（別添資料１・図２）。 この#87-17 系統について（１）PCR 法及び（２）サザンハイブリダイゼーション法の異なる２つの方法を用いて、カルタヘナ法に規定されている細胞外で加工した核酸またはその複製物(本情報提供書においては CRISPR/Cas9 発現カセット)が残存してい

[1]純系・・・自家受粉を繰り返し、遺伝子の組成をできる限り同一に近い状態にした系統

		ないことを確認した（別紙１）。#87-17 系統は分離の法則に従い、CRISPR/Cas9 発現カセットが遺伝しなかった系統である（別添資料１・図３）。以上の作業について、遺伝子組換え生物等として拡散防止措置の下で取り扱った。またアグロバクテリウムが残存していないことを、#87-17 系統の T_2実生をバルクで用い、内在遺伝子の増幅を陽性対照とした PCR を実施し、確認している（別添資料１・図４）。
５　改変した生物の分類学上の種	(1)　分類学上の種の名称及び宿主の品種名又は系統名等	改変した生物の分類学上の種は、トマト（英名:tomato、学名:*Solanum lycopersicum* L.）である。 ゲノム編集系統#87-17 は、調理用トマト品種シシリアンルージュ CF の親系統を宿主としている。
	(2)　自然環境における分布状況、使用等の歴史及び現状並びに生理学的及び生態学的特性	（自然環境における分布状況） トマトの起源地は形態学的また分子系統学的調査から、ペルー北部及びペルー中央から南部にかけての地域の２つがあると推定されている（Genetic Improvement of Solanaceous Crops, volume2: Tomato, 2007）。現在トマトはナス科に分類され、野生種と栽培種で 17 種が知られており（Tomato Genetics Resource Center[2]）、世界的に栽培されているトマトは *Solanum lycopersicum* である。ナス科ナス属におけるトマト野生種のうち、栽培トマトの祖先となる *S. pimpinellifolium* を含む 9 種が近縁野生種として知られており、南米・アンデス山地の太平洋沿岸やガラパゴス諸島に分布していることが知られている（Peralta *et al.*, 2005; 飯島, 2013; トマト大事典, 2015; 田淵・小林, 2017）。我が国においては自然環境下で近縁野生種及び栽培トマトが野生化している例は報告されていない（新版日本原色雑草図鑑, 1980; 日本帰化植物写真図鑑, 2008; 日本帰化植物写真図鑑第 2 巻, 2010; トマト大事典, 2015）。 （使用等の歴史及び現状） 栽培種トマトは食品として古くから利用されており、ペルー、エクアドル圏では有史以前から栽培化され、南欧では 17～18 世紀に料理用として栽培が始まった（トマト大事典, 2015）。我が国へは 18 世紀の初期に導入されたが、その時点では観賞用として扱われ、明治初年に食用としての再導入があり、1935 年以降広く普及した（芦澤, 1992）。 現在トマトは世界の様々な国で栽培されており、栽培面積は約 476 万 ha、総生産量は約 1 億 8,225 万トンである（FAOSTAT, 2018）。主要な生産国は、生産量の上位から中国（約 6,152 万トン）、インド（約 1,937 万トン）、アメリカ（約 1,261 万ト

[2] http://tgrc.ucdavis.edu/Wild%20species%20stock%20list-2013-v2.pdf

		ン）、トルコ（約 1,215 万トン）エジプト（約 662 万トン）である（FAOSTAT, 2018）。我が国におけるトマトの栽培面積は約 11,580 ha、生産量は約 714,600 トンである（令和元年農林水産省統計）。地域別の主な生産地は、熊本県（約 133,400 トン）、北海道（約 61,000 トン）、愛知県（約 43,900 トン）、茨城県（約 43,400 トン）、栃木県（約 34,700 トン）である（令和元年農林水産省統計）。 （生理学的及び生態学的特性） ア．基本的特性 トマトは二倍体の双子葉植物である。原産地である南米の北西部高原地帯では多年生植物であるが、温暖な気候では一年生作物として栽培される（トマト　オランダの多収技術と理論, 2012；トマト大事典, 2015）。 イ.生育可能な環境の条件 トマトの生育に適当な温度は 13℃から 28℃の範囲と考えられ、健全な生育を図るための限界温度は、高温側で 30 ℃であり、35℃から 40℃になると花器に障害が発生し、40℃以上で茎葉の成長は停止する。低温側の健全な生育を図るための限界温度は 10℃で、５℃になると茎葉の伸長は停止する。トマトは基本的に短日植物であり、近縁野生種の多くは秋にならないと花をつけないが、栽培トマトは日長と関係なく花をつける。生育には豊富な日射量を必要とするため、日照が不足すると徒長や花器に異常をきたし、開花や結実が不良となり落花を誘発することが多い。またトマトは比較的土質を選ばないが、排水がよく地下水位の低い圃場そして中性に近い酸性が最も適する（トマト大事典, 2015）。土壌の性質にもよるが、有効水分量が 25～40%程度になると、葉が萎縮しはじめ、この条件が続くと生育が著しく抑制されることが報告されている（荒木・五島,1985; 高橋,1960; 松原・杉山, 1965）。 ウ. 繁殖又は増殖の様式 種子は果実のなかに形成され自然条件下で種子のみが落下しないことから種子の脱粒、 飛散の可能性は極めて低いと考えられる。また種子は成熟した後でも果実の中では容易に発芽しないが、休眠性はなく果実から離脱後好適条件であれば発芽することが可能である。 トマトの種子の寿命は気温 0-10 ℃、種子含水率 30%で約 4-9 年といわれている（トマト大事典, 2015）。トマトは一年生作物であるため自然条件下

		では通常、種子繁殖により植物体を再生する。わき芽の挿し木により繁殖でき、地面についた茎からも発根することがあるが、現在日本で栽培されているトマトのほとんどが F_1品種であり、種子繁殖で増殖されたものである（野菜園芸学の基礎, 2014）。 栽培種トマトは基本的には自家受粉による自殖性作物である。ハウス栽培などでは花粉の飛散が悪いため機械的に花を振動させるか、放飼したハチなどの訪花昆虫によって受粉させる。風やハチなどの訪花昆虫によって他の株と交雑することがある。 栽培種トマトと交雑が可能な近縁野生種としては、交雑容易な 7 種 *S. lycopersicum* (=*L. esculentum* var. *cerasiforme*)、*S. cheesmaniae (=L.cheesmanii)*、*S. pimpinellifolium*、*S. chmielewskii*、*S. neorickii* (=*L. paraviflorum*)、*S. habrochaites* (=*L. hirsutum*)、*S. pennellii* と交雑が容易ではない 2 種 *S. peruvianum*、*S. chilense* の合計 9 種があるが、前述の通り我が国で自生しているものはない。 エ. 有害物質の産生性 葉やトマト果実の緑熟期には、糖アルカロイドのトマチンが含まれており、病原菌や病害虫に抵抗性を発揮するだけでなく、コリンエステラーゼ阻害や細胞毒性など、過剰摂取によるヒトに対する中毒症状が知られている（Friedman *et al*.,2013; Eich Eckart 2008）。しかしながら食される赤熟期の果実にはトマチンはほとんど含まれていない（Kozukue *et al*., 2004）。
6　改変に利用したゲノム編集の方法	(1) 利用した人工ヌクレアーゼ等に関する情報	人工ヌクレアーゼは CRISPR/Cas9 を用いた。利用した人工ヌクレアーゼベクターは、Cas9 遺伝子発現カセット、sgRNA 発現カセット、カナマイシン耐性遺伝子発現カセットを含んでいる。ベクターの詳細な設計については別添資料１・図１に記載した。
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	アグロバクテリウム法により調理用品種の親系統のゲノムへ人工ヌクレアーゼベクターを組込み導入した。組み込まれた人工ヌクレアーゼベクターについて、その挿入位置および塩基配列を確認したところ、CRISPR/Cas9 発現カセット領域内で切れて挿入されていることが分かった。T_0世代に変異は導入されていることから、ゲノムに組み込まれていない状態の T-DNA から一過的に発現した Cas9 によって変異が挿入された可能性が高いと考えている。後代にて挿入された CRISPR/Cas9 発現カセットは遺伝分離し除去した（別添資料１・図３）。
7　改変した遺伝子及び当該遺伝子の機能	(1) 標的とし切断等した宿主のゲノム上の	*SlGAD3*（Solyc01g005000、別添資料１・図１０）を CRISPR/Cas9 の標的とし、変異を導入したゲノム編集系統#87-17 では、1 bp の塩基の挿入が確認

	部位及び当該部位に生じた変化	され、この変異によるフレームシフトにより、C末端の自己阻害領域の直前に停止コドンが形成された(別添資料１・図１１、表２)。
	(2) 標的とした遺伝子に関する情報及び改変により生じると理論上考えられる形質の変化	標的とした遺伝子はグルタミン酸脱炭酸酵素（GABA 合成酵素、GAD）遺伝子である。当該遺伝子は、グルタミン酸のカルボキシル基を除去し、GABA を合成する（別添資料１・図１２）。GAD は、C 末端に自己阻害領域を有しており、通常状態ではこの自己阻害領域により非活性型である（別添資料１・図１３）。一方、ストレスにより植物細胞内でカルシウムイオンが過多な状態では、カルシウムイオンがカルモジュリンと結合してカルシウム-カルモジュリン(Ca-CMd)複合体が形成される（別添資料１・図１３）。この Ca-CMd 複合体が自己阻害領域に存在するカルモジュリン結合ドメインに結合し GAD の自己阻害領域が変化することによって、GAD が活性型となり GABA が合成される（Gut *et al.*, 2009）。pH の低下においても同様に GAD が活性型になる（別添資料１・図１３）。トマトは 5 つの GAD 遺伝子(*SlGAD1-SlGAD5*)を有しており、このうち *SlGAD3* が果実の GABA 蓄積に主要な役割を果たしている（Akihiro *et al.*, 2008, Takayama *et al.*, 2015, Takayama *et al.*, 2017）。 本件では、CRISPR/Cas9 による変異導入により、*SlGAD3* の C 末端領域に存在する自己阻害領域の発現を抑える（別添資料１・図１１、表２）ことで GAD の活性を上昇させ、トマト赤熟果実における GABA 蓄積量を向上させることを目的としている。
８　当該改変により付与された形質の変化		CRISPR/Cas9 ベクターを形質転換して得られた T_0 世代において、変異が挿入されている個体を選抜した。それらのうち、GABA 高蓄積系統については自家受粉し、T_1 世代において変異をホモに有しかつ CRISPR/Cas9 ベクターが遺伝分離によって抜けた系統#87-17 を得た（別添資料１・図３）。#87-17 では、この変異の結果、自己阻害領域が発現されず（別添資料１・図１１；表２）、GAD の活性が上昇し、トマト赤熟果実における GABA 蓄積量を向上させ、赤熟果実の GABA 含有量は対照区の約 5〜6 倍に達していた（別添資料１・図１４）。さらに世代を促進し（別添資料１・図２）、T_2 世代においても対照区よりも GABA 含有量が上昇していることを確認した（別添資料１・図１４）。以上の 3 世代（T_0, T_1, T_2）及び T_3 世代における調査により、GABA 含有量は、果房 1 段目及び 2 段目では安定して増加していたことから遺伝的に安定していると考えられた。一方、6 段目では GABA 含有量の平均値の低下とばらつきの

		増加が認められた。このことは、果実成長の後半で環境要因により影響を受けていると考えられた。（別添資料１・図１４補足資料１、２）
９　８以外に生じた形質の変化の有無（ある場合はその内容）	(1) 標的以外の部位が改変された可能性に関する情報	無 標的とした遺伝子配列以外の改変の有無について調査するため、CRISPRdirect（https://crispr.dbcls.jp）及び Cas-OFFinder（http://www.rgenome.net/cas-offinder）の２つを用い、モデル品種 Heinz1706 の SL2.4ver.の全ゲノムをリファレンスに設定してオフターゲット検索を行った。CRISPRdirect では、guideRNA の配列の 20 bp との相同性において、3 bp のミスマッチまでを確認する条件で検索を行った結果、15 箇所のオフターゲット候補が検索された。Cas-OFFinder では、bulge size を 2 に、ミスマッチは 3 に絞り検索した結果、55 箇所のオフターゲット候補が示された。合計 66 箇所（４箇所の重複あり）の候補の内、いずれかの解析ソフトで遺伝子およびその発現に係る領域を示したオフターゲット候補 6 箇所について、変異の有無を調査したところ、#87-17 において変異は確認されなかった（別添資料１・図１５）。よって、標的以外の部位が改変された可能性は低いと考えられる。 また、ゲノム編集技術による変異の導入頻度は、従来用いられている技術である細胞培養と比較して、同等かそれ以下であると報告されている（Tabei *et al*., 2019）。よって、標的以外の部位が改変される可能性は、従来の育種技術と同等またはそれ以下と考えられ、またそれによるリスクも同様であると考えられる。
	(2) 宿主と比較して作出した生物に生じた８以外の形質の変化	無 GABA は植物体に高蓄積すると、わい化や不稔になることが知られている（Koike *et al*. 2013）。そのため形態及び生育の特性等について、非ゲノム編集系統（野生型）と#87-17（T_2）の比較調査をした。開花日の草丈、到花日数について、非ゲノム編集系統及び#87-17 では統計学的有意差は認められなかった（別添資料１・図１６）。また成葉の形態、果実成熟の速さについても野生型と#87-17 の間で顕著な差は認められなかった（別添資料１・図１７）。 また、GABA は当該酵素の働きによってグルタミン酸のカルボキシル基を除去し合成される（別添資料１・図１２）ことから、#87-17（T_2）において、GABA 含有量の増加によりグルタミン酸含有量に変化がないかを調査した（（一財）・日本食品分析

		センターへ委託。アミノ酸自動分析法）。その結果、#87-17 と野生型とでは、統計学的に有意に GABA 含有量が増加していたものの、グルタミン酸含有量に統計学的有意差は見られなかった（別添資料１・図１８）。GABA を高蓄積させたにも関わらず、前駆体のグルタミン酸の含有量に影響が見られなかった理由として、葉などの他器官のアミノ酸プールからの補いがあったためと考えられる。生育に異常が見られるほどの GABA（対照区の 20 倍以上）を蓄積させたトマト果実では、グルタミン酸含有量が減少することが報告されているが（Takayama *et al.*, 2015; Takayama *et al.*, 2017）、#87-17 では GABA 含有量は対照区の約 5〜6 倍程度であったため、他器官のアミノ酸プールからの補いでまかなうことができ、生育に影響が見られなかったと考察している。 以上のことから、形態学的調査においても、代謝物の調査においても、野生型と比較して変化が見られなかったことから、標的以外の部位が改変された可能性は低いと判断するのが妥当である。
10　当該生物の使用等をした場合に生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察	(1) 競合における優位性	我が国においては自然環境下で近縁野生種及び栽培トマトが野生化している例は報告されていない（新版日本原色雑草図鑑, 1980; 日本帰化植物写真図鑑, 2008; 日本帰化植物写真図鑑第 2 巻, 2010; トマト大事典, 2015）ため、影響を受ける可能性のある野生植物は特定されない。 形態や生育の特性等について、#87-17 と対照となる野生型の比較調査を行ったところ、統計学的有意差や形態異常は認められなかった（別添資料１・図１６、１７）。よって、形態及び生育特性等において野生型と#87-17 間で相違はないと考えられた。#87-17 は野生型と比較して GABA 含有量が高いが、GABA が栄養及び生殖成長を促進するという報告はない。 さらに競合における優位性を判断する形質として、種子の生産性、休眠性、越冬性について調査した。種子の生産性として、#87-17 と野生型の間で種子生産数を調査したところ、両者に統計学的有意差は見られなかった（別添資料１・図１９）。またトマトの種子は休眠性がないため、自然環境下における好適条件では発芽する可能性はある。しかし従来のトマトにおいても、これまで我が国の自然環境下で、トマトが野生化している例は知られておらず、また GABA の蓄積によって休眠性が新たに付与されるという報告はない。実際に、好適条件下（25℃）および低温条件下（12.5℃）で発芽率を調査したところ、#87-17 と野生型の間で統計学的有意差は見られなかったことから、種子の休眠性や越

		冬性に変化は見られないと考えられる（別添資料１・図２０）。 以上のことから形態学および植物生理学的に競合性における優位性はなく、#87-17 の競合における優位性により生物多様性影響が生ずる可能性はないと判断した。
	(2) 捕食性又は寄生性	－
	(3) 有害物質の産生性	トマトの既知の有害物質として、糖アルカロイドのトマチンが知られている。トマチンは葉や緑熟期果実に含まれており、病原菌や病害虫に抵抗性を発揮する（Friedman *et al.*,2013; Eich Eckart 2008）。本ゲノム編集系統#87-17（T_2）の赤熟果実においてトマチンは検出されなかった（一財・日本食品分析センターへ委託、検出限界 1 ppm、液体クロマトグラフィー質量分析法）。このため既知の有害物質トマチンの過剰産生による生物多様性影響はないと言える。 今回高蓄積させた GABA は動植物に存在するアミノ酸でありアレルゲン性はない。動物では抑制性神経伝達物質であることが知られているが、過剰摂取による中毒性が認められたという報告はない。また、GABA 含有量については、果実成長の後半では環境要因により影響を受けると考えられたが、トマトの種内品種間変動の範囲内と考えられ、このことが生物多様性に影響するとは考えられない。 *SlGAD3* はその他の GAD 遺伝子と異なり、果実で強く働く遺伝子であり（別添資料１・図２１）、モデル品種にゲノム編集技術で同様の変異を導入した際には、葉のような栄養器官での GABA 含有量は野生型と比較して統計学的有意差はなかった（Nonaka *et al.*, 2017）。このため、植物体の栽培による微生物や他植物への影響は通常のトマト品種と同様と考える。よって、GABA 含有量に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。 また項目 9 に記載の通り、標的配列以外の変異の導入や GABA の前駆体であるグルタミン酸の含有量の変化が野生型と#87-17 との間で統計学的有意差が見られなかったことから、標的形質以外の形質の変化はないと推察する。このため、有害物質の産生性に起因する物質についても新たに発生する可能性は低く、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。 以上のことから、有害物質の産生性による生物多様性影響が生ずる可能性はないと判断した。
	(4) 交雑性	栽培種トマトと交雑が可能な近縁野生種として

		は、交雑可能な 7 種 *S. lycopersicum* (*=L. esculentum* var. *cerasiforme*)、*S. cheesmaniae (=L.cheesmanii)*、*S. pimpinellifolium*、*S. chmielewskii*、*S. neorickii* (*=L. paraviflorum*)、*S. habrochaites* (*=L. hirsutum*)、*S. pennellii* と交雑が容易ではない 2 種 *S. peruvianum*、*S. chilense* とを合わせた 9 種あるが、我が国でこれらの近縁野生種が自生している報告はない（トマト大事典, 2015）。したがって、本ゲノム編集トマトは、交雑に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考察される。
	(5) その他の性質	－
	(6) 総合的考察	トマトは我が国の主要園芸作物として広く栽培されており、栽培トマトが野生化している例は報告されていなく、#87-17 が競合する可能性のある野生植物は特定されない。また#87-17 の形態や生育等の調査から野生型と比較して差が見られなかったことや GABA が成長を促進する知見はないことから、競合における優位性はないと判断した。 また交雑性に関しても近縁野生種は我が国では自生していないため、交雑に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考察される。 有害物質の産生性についても、既知のアルカロイドであるトマチンが検出されなかったこと、オフターゲットによる別遺伝子への変異が見られなかったこと、そして高めた GABA 含有量の程度からの考察を踏まえると、有害物質に起因する生物多様性に影響が生ずる可能性は極めて低いと考察される。 よって、今回のゲノム編集技術により生じた変化は、競合における優位性、有害物質の産生性、交雑性に影響を与えるものとは考えられず、本トマトの使用等による生物の多様性への影響は想定されない。

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書
別添資料一覧

【別紙】

別紙１　「４．カルタヘナ法に規定される細胞外で加工した核酸又はその複製物を有していないことが確認された生物であること　(2)移入した核酸の残存の有無（選抜・育成の経過及び当該核酸の残存の有無を確認した方法に関する情報を含む。）」の詳細

別紙２　実験方法について

別紙３　引用文献

【別添資料】

図１　CRISPR/Cas9 形質転換用バイナリーベクター

図２　育成図

図３　外来遺伝子が抜けた個体の選抜過程

図４　アグロバクテリウム残存試験

図５　CRISPR/Cas9 形質転換用バイナリーベクター全長（14,455 bp）の概略図およびゲノム PCR に用いたプライマーの位置

表１　ゲノム PCR 及びサザンハイブリダイゼーション解析用のプローブ作製に使用したプライマーの塩基配列

図６　ゲノム PCR によるベクター断片の存在確認

図７　CRISPR/Cas9 形質転換用バイナリーベクター全長（14,455 bp）の概略図およびサザンハイブリダイゼーション解析に用いたプローブの位置

図８　サザンハイブリダイゼーション解析による T-DNA 断片の残存確認

図９　ゲノム編集系統 #87（T_0世代）における T-DNA の挿入位置と近傍の構造

図 10　SlGAD3 のトマト染色体上の位置

図 11　SlGAD3 の構造および変異導入位置

表２　C 末端領域に挿入された変異(DNA 配列：上、アミノ酸配列：下)

図 12　高等植物における GABA 代謝経路

図 13　GAD の活性化メカニズム

図 14　赤熟果実における GABA 含量(T_0世代から T_2世代)

図 15　オフターゲット候補の変異確認

図 16　生育特性（草丈及び到花日数）（T_2世代）

図 17　生育特性　（成葉の形態及び果実成熟の様子）（T_2世代）

図 18　赤熟果実におけるグルタミン酸、遊離グルタミン酸、GABA の含量(T_2世代)

図 19　種子の生産数

図 20　発芽試験

図 21　SlGAD1 から SlGAD5 の発現パターン