

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）

2025年 10月 29日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長 宛

氏名 グランドグリーン株式会社
（法人番号：8180001127379）
提出者 代表取締役 丹羽 優喜
住所 愛知県名古屋市千種区東山通五丁目112番地
電話番号 052-753-3870

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。

〔備考〕

様式第1により作成し、事前相談を終えた「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」を添付すること。

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		<p>名称：高糖度トマト（GG-T1）</p> <p>概要：トマトのインベルターゼインヒビター遺伝子（<i>INVINH1</i>）の一部を改変し、糖度を高めた。</p>
2 当該生物の用途		<p>食用、栽培用および飼料用。</p> <p>作出した系統を食用として使用するほか、F₁品種を作出するための親系統として使用する。情報提供の対象範囲はT₁世代以降である。</p> <p>食品残渣を飼料に使用される場合も考慮し、飼料用も用途として加える。</p>
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。）	<p>有</p> <p>自社で開発した中玉系栽培系統 GG-TL（以下、WT と記載）に対してパーティクルボンバードメント法により、5つのベクターを同時に宿主細胞に移入した。5つのベクターの内訳として、植物体再生率を向上させる遺伝子を有するベクターが2種類、蛍光マーカーである <i>tdTomato</i> 遺伝子を有するベクターが1種類、Cas9 遺伝子発現カセットおよび sgRNA 発現カセットを有するベクターが2種類である（図1）。これらのベクターは上記遺伝子の一過的な発現を目的として移入した。</p> <p>自家受粉させたのち、T₁世代から GG-T1 を選抜した（図2）。</p>
	(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。）	<p>無</p> <p>パーティクルボンバードメント法により、宿主細胞に上記5種のベクターを移入し、24個体のT₀世代を得た（資料1）。</p> <p>このうち、標的配列に変異が確認できた11個体を自家受粉し、11系統のT₁種子を得た。</p> <p>これら11系統のT₁種子の一部を播種し実生をサンガーシーケンス解析した結果、1系統のみに <i>INVINH1</i> に変異が確認された。</p> <p>この1系統の残る種子を播種した個体群（T₁個体群、67個体）から、PCR法によって変異がホモ化し、WTに比べ糖度が向上した1個体を選抜し、GG-T1とした（図2）。</p>

		<p>この GG-T1 個体において、比較的長い断片を検出する PCR 法、より広範な長さの断片を検出するサザンハイブリダイゼーション法、さらに短い断片まで検出可能な次世代シーケンス解析 (NGS) 法という、特性の異なる 3 つの手法を組み合わせ、移入した 5 種のベクターの残存の有無の確認を行った。PCR 法では 5 種のベクター領域を網羅するようにプライマーセット (表 1 および図 3) を使用し、5 種のベクターの有無を確認した結果、GG-T1 において残存は確認されなかった (図 3)。サザンハイブリダイゼーション法において上記の PCR 産物をプローブとして使用し、5 種のベクターの有無を確認した結果、GG-T1 において残存は確認されなかった (図 4)。さらに、NGS 法においても、GG-T1 ではベクターの残存は確認されなかった (資料 2)。GG-T1 個体 (T₁ 世代) を自殖し、GG-T1 (T₂ 世代) を作出した。</p> <p>以上の作業は、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置の下で実施した。</p>
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	<p>和名 ; トマト 英名 ; Tomato 学名 ; <i>Solanum lycopersicum</i> L. 系統名 ; GG-TL (自社で開発した中玉栽培系統)</p>
	(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	<p>(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 [https://tgrc.ucdavis.edu/hortguidelines/wild-species-guidelines])、世界的に栽培されているトマトは <i>Solanum lycopersicum</i> 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 <i>S. pimpinellifolium</i> 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 2019)。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)。</p>

		<p>(使用等の歴史及び現状)</p> <p>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 541 万 ha、総生産量は約 1 億 9,231 万トンである（FAOSTAT 2023）。主要な生産国は、生産量の上位から中国（約 7,011 万トン）、インド（約 2,042 万トン）、トルコ（約 1,330 万トン）、アメリカ（約 1,237 万トン）、エジプト（約 621 万トン）である（FAOSTAT 2023）。我が国におけるトマトの栽培面積は約 10,900ha、生産量は約 681,400 トンである（令和 5 年産野菜生産出荷統計（農林水産省））。地域別の主な生産地は、熊本県（約 132,600 トン）、北海道（約 59,300 トン）、愛知県（約 44,500 トン）、茨城県（約 41,000 トン）、栃木県（約 31,000 トン）である（令和 5 年産野菜生産出荷統計（農林水産省））。</p> <p>(生理学的及び生態学的特性)</p> <p>ア. 基本的特性</p> <p>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、温帯地域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）。</p> <p>イ. 生育可能な環境の条件</p> <p>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℃になると生殖器官に障害が発生し、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生殖器官に異常をきたし、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</p>
--	--	--

		<p>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）。</p> <p>ウ. 繁殖又は増殖の様式</p> <p>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。</p> <p>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）。トマト是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 F₁ 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）。</p> <p>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 <i>S. lycopersicum</i> (= <i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)、<i>S. cheesmaniae</i> (= <i>L. cheesmanii</i>)、<i>S. pimpinellifolium</i>、<i>S. chmielewskii</i>、<i>S. neorickii</i> (= <i>L. paraviflorum</i>)、<i>S. habrochaites</i> (= <i>L. hirsutum</i>)、<i>S. pennellii</i> と交雑が容易ではない 2 種 <i>S. peruvianum</i>、<i>S. chilense</i> 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。</p> <p>エ. 有害物質の産生性</p> <p>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 2002; Eich 2008）。しかしながら食される赤熟期の果実には</p>
--	--	---

		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	CRISPR/Cas9 を人工ヌクレアーゼとして用いた。利用した 2 種類の人工ヌクレアーゼベクターには Cas9 遺伝子発現カセット、sgRNA 発現カセットが搭載されている。その他に 3 種類のベクターを使用しており、植物体の再生率を向上させる遺伝子が搭載されたベクターが 2 種類、宿主細胞にベクターが導入されたことを確かめるための蛍光マーカーである tdTomato 遺伝子が搭載されたベクターが 1 種類である。これら導入に使用したベクターの詳細は図 1 に記載した。
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	パーティクルボンバードメント法によって WT の宿主細胞に上記 (6 (1)) ベクターを移入した。
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部位及び当該部位に生じた変化	<i>INVINH1</i> (Solyc12g099200[chr.12:66434497..66435907; Tomato SL2.50 ITAG2.4]) を CRISPR/Cas9 の標的とした。変異導入が確認できた 1 系統に関してサンガーシーケンス解析を実施したところ、第 1 エキソンに 1bp 欠損型を持つホモ、28bp 欠損を持つホモ、あるいは両種の欠損型をヘテロで持つ個体に分離した。選抜した GG-T1 個体は 28 bp 欠損型をホモ接合で有する (図 5)。この変異によるフレームシフトによって、終止コドンの位置が変わる (図 5)。
	(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	トマトは葉で合成した光合成産物をスクロースの形で果実に転流する。果実ではスクロースがインベルターゼという酵素によりグルコースとフルクトースに加水分解され、インベルターゼの働きで果実のスクロース濃度が低く維持されることで、葉から果実へのスクロースの転流が促される (Dickinson et al. 1991; Klann et al. 1996; Veltkamp 2021; 図 6)。このインベルターゼの活性を抑制するのが、本件で標的としたインベルターゼインヒビターである (Hothorn et al. 2010)。 標的遺伝子である <i>INVINH1</i> はインベルターゼインヒビターをコードする。従って、 <i>INVINH1</i> 遺伝子をノックアウトすることで、インベルターゼ活性が上昇し、スクロースが分解されやすくなるため、果実内のスクロース濃度の低下を導く。このスクロース濃度の低下が、糖の転流を促進し、結

		<p>果として果実への糖の蓄積量が増加し、糖度の上昇をもたらすと考えられる。</p> <p>実際に、RNAiによる <i>INVINH1</i> のノックダウン系統においては、細胞壁インベルターゼ活性の上昇および果実の糖上昇が報告されている (Jin et al. 2009)。さらに、ゲノム編集による <i>INVINH1</i> のノックアウト系統でも同様に果実の糖の上昇が報告されている (Kawaguchi et al. 2021、Wang et al. 2021)。そのため、本件におけるゲノム編集系統も同様に、果実における糖の上昇が期待される。また、ゲノム編集により <i>INVINH1</i> 遺伝子を片アレルのみ機能欠損したヘテロ接合変異体では、果実糖度の上昇は観察されなかった (Wang et al. 2021)。この結果は、<i>INVINH1</i> 遺伝子の機能欠損による果実糖度の上昇が潜性形質であることを示唆している。</p> <p>本 28bp 欠損変異が新規タンパク質産生につながる可能性を評価するため、in silico 解析を実施した。まず、新たなオープンリーディングフレーム (ORF) の生成を Bioconductor ORFik (https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ORFik.html) で探索し、予測された 3 つの新規 ORF について、アミノ酸配列に基づき Uniprot (Release 2025_01; https://www.uniprot.org/) の Uniprot-Swissprot および UniProtKB を用いた BLAST 検索 (E-value < 10⁻⁴) を行った。その結果、予測された ORF のうち 2 つはコードするアミノ酸配列が極端に短く、既知の機能ドメインを形成できないため、データベース上で有意なホモロジーを持つタンパク質は同定されなかった。残る 1 つの ORF は、インベルターゼインヒビタードメインを持つタンパク質との相同性が示唆されたものの、その開始コドンは本来の位置から大きく外れ、効率的な翻訳開始に重要である Kozak 配列のコンセンサスからも外れているため、この ORF からタンパク質が翻訳される可能性は極めて低いと考えられる。次に、本欠損がスプライシングパターンを変化させる可能性を NetGene2-2.42 (https://www.healthtech.dtu.dk/services-and-products) で予測したところ、1 箇所の新たな Acceptor splice site 候補が見つかったが、その信頼度スコアは 0.00 であった。このことから、このスプライシングイベントが発生する可能性は無視できるほど低い。以上の ORF 解析およびスプライシング予測の結果から、本 28bp 欠損変異が機能的な</p>
--	--	---

		<p>新規タンパク質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。</p> <p>なお、このほかに、パーティクルボンバードメントによって、遺伝子 <i>VPE5</i> (vacuolar processing enzyme) を標的とする sgRNA を発現するプラスミドベクターを移入したが、選抜した GG-T1 において <i>VPE5</i> 遺伝子に変異は確認されなかった (資料 3)。</p> <p><i>VPE5</i> はトマト果実の糖度蓄積に関与する遺伝子 (Wang et al. 2021) で、ノックアウトした場合は果実内の糖度が上昇すると考えられるものである。</p>
8	当該改変により付与された形質の変化	<p><i>INVINHI</i> をノックアウトすることで果実糖度の上昇が期待されることから、ゲノム編集系統 GG-T1 と WT における果実糖度 (Brix) を下位の第 1 花房から上位の第 5 花房で比較した。第 1 花房から第 3 花房までは、統計的に有意な差はなかったものの、WT と比べて GG-T1 の果実糖度は同等又は高い傾向が見られた。第 4 花房および第 5 花房では GG-T1 が WT と比べ、統計的に有意に高い果実糖度を示した (図 7)。この要因としては、</p> <p>① インベルターゼはシンク側 (果実) において糖の転流に関わる酵素であり、ソース側 (葉) における光合成産物の合成と供給が十分である場合に、果実糖度の上昇により効果をもたらすこと (図 6)、</p> <p>② 果実の糖濃度への影響を及ぼす要因としては葉の形態および光合成が高い割合を占め (Rowland et al. 2020)、また、上位花房の方が植物体としてのソース能力 (1 花房当たりの葉枚数など) が高いと考えられること、</p> <p>③ トマトでは、もとより、ソース能力が高い上位花房の方が糖濃度がより上昇することが知られていること</p> <p>(https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/seika/kanto15/07/15_07_20.html)、</p> <p>から、より上位の第 4・第 5 花房で果実糖度が上昇したものと考えられる。</p> <p>また、インベルターゼはスクロースをフルクトースとグルコースに加水分解する反応を触媒する酵素であり、Brix において上位花房で WT と GG-T1 間で有意な差がみられたことから、WT と GG-T1 の上位花房でフルクトースとグルコースに差があると考え、第 5 および第 6 花房の果実を用いてフルクトースおよびグルコース含量に変化がないか調査した (あいち産業科学技術総合センターに</p>

		<p>委託)。フルクトースにおいて、WT と比べて GG-T1 の方が統計的に有意に高く、グルコースにおいては統計的に有意な差はないものの、GG-T1 の方が WT より高かった (図 7)。</p> <p>以上の調査より、GG-T1 の果実糖度は上位花房において WT より高くなることを確認できた。</p>
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)	<p>(1) 標的以外の部位が改変された可能性に関する情報</p> <p>無</p> <p>標的とした2種類の標的遺伝子配列 (<i>INVINH1</i> および <i>VPE5</i>) 以外の改変の有無について調査するため、CRISPRdirect (https://crispr.dbcls.jp/) および Cas-OFFinder (http://www.rgenome.net/cas-offinder/) の2つを用いてオフターゲット検索を実施した。モデル品種「Heinz1706」の SL2.5ver.の全ゲノムをリファレンスとして、3bp 以下の差異を検索する条件で、2種類のガイド RNA 配列との相同性を検索した。</p> <p><i>INVINH1</i> を標的としたガイド RNA 配列では、CRISPRdirect と Cas-OFFinder においてそれぞれ 30 箇所と 4 箇所のオフターゲット候補配列が検索された (表 2)。これらの候補配列のうち、遺伝子領域またはプロモーター領域についてはすべての候補、その他の領域 (ncDNA) については両ツールで共通して検索された候補の合計 7 箇所について変異の有無を調査した。</p> <p><i>VPE5</i> を標的としたガイド RNA 配列では、CRISPRdirect と Cas-OFFinder においてそれぞれ 6 箇所と 4 箇所のオフターゲット候補配列が検索された (表 3)。これらの候補配列のうち、上記と同様の条件で合計 5 箇所について変異の有無を調査した。</p> <p>この結果、GG-T1 において変異は確認されなかった (図 8, 9)。よって <i>INVINH1</i> 以外の部位が改変された可能性は低いと考えられる。変異の有無を確認するために使用したプライマー配列は表 4 にまとめた。</p>
	(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	<p>WT と GG-T1 (T₂世代) の生育特性を調査した。調査形質としては、播種後開花日数、草丈 (播種後 53 日目)、第 1 花房から第 5 花房それぞれの花芽数を調査した。全ての調査形質において WT と GG-T1 間で統計的に有意な差はなかった (図 10)。また、成葉の形態および開花から収穫までの日数 (≒果実の成熟期間) において、GG-T1 (T₁世代) と WT 間に違いはなかった (図 11)。</p>

		<p>種子の生産性および発芽能力に関しても調査した。種子の生産性においては 1 果実あたりの種子数を WT と GG-T1 間で比べたところ、統計的に有意な差はなかった（図 12）。発芽能力については、適温条件下および低温条件下の二つの環境で調査した。適温条件下では WT と GG-T1 間で統計的に有意な差はなく、低温下では両系統とも発芽個体数 0 であった（図 12）。</p> <p>また、構造解析よりインベルターゼインヒビターはインベルターゼ活性部位を直接標的とすること（Hothorn et al. 2010）、標的とした INVINH1 はインベルターゼタンパク質である LIN5 と特異的にタンパクレベルで結合すること（Jin et al. 2009）が報告されている。さらに、InterProScan（https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/）によるデータベース検索の結果、検出されたドメインはいずれもインベルターゼインヒビターに関連するものであったため、INVINH1 のドメイン構造からは、インベルターゼインヒビター以外の機能は示唆されない（図 13）。これらのことより、他酵素の働きに直接的に影響を及ぼさないことから 8 以外の形質の変化は想定されない。</p>
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	<p>日本では自然環境下で近縁野生種および栽培トマトが野生化した報告例はない（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。</p> <p>形態や生育特性等について、上記 9 (2) で示した通り WT と GG-T1 間で差は観察されなかった。また、WT と GG-T1 間で種子数並びに適温条件下及び低温下における発芽率に統計的に有意な差は観察されなかったこと、加えて、トマトの種子には休眠性がなく、果実中の糖濃度が高いトマト品種において種子の休眠性が高まる例も知られていないことから、種子の生産性、休眠性や越冬性に変化はないと考えられる。以上の結果より、GG-T1 の競合における優位性により生物多様性に影響が生ずる可能性はないと判断した。</p>
	(2) 捕食性又は寄生性	—
	(3) 有害物質の産生性	<p>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が、栽培種では果実の成熟過程においてトマチンは分解されることが知</p>

		<p>られている (Friedman 2002)。WT と GG-T1 において赤熟果実のトマチンを測定した結果、両者ともに 1ppm 以下で統計的に有意な差はなかった (資料 4)。一般的な市販トマトの赤熟果実に含まれるトマチン含有量が 0.3～2.8 ppm の範囲である (Friedman 2002) ことから、トマチンの過剰生産による生物多様性影響はないと考えられる。</p> <p>この結果に加え、9 (1) で上述したとおり、GG-T1 では標的以外の部位が改変された可能性は低く、さらに、9 (2) で記述したとおり、インベルターゼインヒビターはインベルターゼの活性を抑制する以外の機能が知られていないため、新たな有害物質の産生性が付与されるとは考えにくい。</p> <p>以上のことから、有害物質の産生性による生物多様性に影響が生じる可能性はないと判断した。</p>
	(4) 交雑性	<p>日本では交雑可能な近縁野生種が自生しているとの報告がない (トマト大事典、2015) ため、交雑性により生物多様性に影響が生ずるおそれはないと考えられる。</p>
	(5) その他の性質	—
	(6) 総合的考察	<p>GG-T1 において、競合における優位性および有害物質の産生性に関し、WT と同等と考えられる点、近縁野生種と交雑するおそれがない点を踏まえると、GG-T1 を栽培することにより生物多様性へ影響を及ぼすということは想定されない。</p>

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
資料一覧

【図表】

- 図 1 導入したベクターの構造
- 図 2 GG-T1 の育成図と情報提供の範囲
- 図 3 GG-T1 における PCR による導入ベクター及びその断片の有無の確認
- 図 4 GG-T1 におけるサザンブロット分析による導入ベクター及びその断片の有無の確認
- 図 5 ゲノム編集による INVINH1 の変異箇所および変異パターン
- 図 6 インベルターゼを介した糖転流メカニズムの概略図
- 図 7 WT と GG-T1 の果実における第 1 花房から第 5 花房までの Brix (%)、およびフルクトース、グルコース含量
- 図 8 GGv671 に搭載した guideRNA に対するオフターゲット候補の変異の確認
- 図 9 GGv672 に搭載した guideRNA に対するオフターゲット候補の変異の確認
- 図 10 WT および GG-T1 (T2 世代) の収量関連形質
- 図 11 WT と GG-T1 の成葉の形態および開花から収穫までの日数
- 図 12 WT および GG-T1 の種子数および発芽率
- 図 13 InterProScan による INVINH1 のタンパク質構造モチーフの検出結果
- 表 1 PCR およびサザンハイブリダイゼーションのプロブ作製に使用したプライマー配列
- 表 2 GGv671 に搭載した guideRNA に対するオフターゲット候補配列の一覧
- 表 3 GGv672 に搭載した guideRNA に対するオフターゲット候補配列の一覧
- 表 4 オフターゲット候補のシーケンス解析に使用したプライマー配列
- 資料 1 ゲノム編集の実施と変異検出に関する方法
- 資料 2 GG-T1 における次世代シーケンス解析法による導入ベクター及びその断片の有無の確認
- 資料 3 GGv672 に搭載した guideRNA 標的領域の変異の確認
- 資料 4 WT と GG-T1 の赤熟果実における α -トマチン含量

【引用文献】

- トマト大事典 (2015) 農山漁村文化協会編、農山漁村文化協会
- トマト オランダの多収技術と理論 (2012) E. Heuvelink 編著、中野明正・池田英男他監訳、農山漁村文化協会
- 新版日本原色雑草図鑑 (1980) 沼田真、米沢長人編、全国農村教育協会
- 日本帰化植物写真図鑑 (2008) 植村修二、勝山輝男、清水矩宏、水田光雄、森田弘彦、廣田伸七、池原直樹編、全国農村教育協会
- 日本帰化植物写真図鑑第 2 巻 (2010) 植村修二、勝山輝男、清水矩宏、水田光雄、森田弘彦、廣田伸七、池原直樹編、全国農村教育協会
- 野菜園芸学の基礎 (2014) 篠原温編、農山漁村文化協会
- 半促成トマトの側枝利用による果実糖度の向上及び摘葉と摘果の影響 (2003) 千葉農総研, https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/seika/kanto15/07/15_07_20.html
- 荒木陽一、五島康 (1985) 水分ストレスがトマトの生育と養水分吸収に及ぼす影響. 野菜試験場報告, 13, 71-84.
- 飯島陽子 (2013) 生物材料インデックス: 研究室の片隅で生き物への愛を語る 野生種トマト: その多様性と利用性. 生物工学会誌, 91 (11), 662-665.
- 芦澤正和 (1992) 野菜. 化学と生物, 30 (11), 735-742.

- 高橋和彦 (1960) 温床々土に関する研究 (第2報). 園芸學會雜誌, 29 (4) , 313-322.
- 田淵俊人、小林孝至 (2019) アンデス山地, ガラパゴス諸島に自生する野生種トマト-その栽培化に至る過程と, 野生種トマトの持つ有用性. 沙漠研究, 29 (1) , 29-43.
- 松原尚生、杉山直儀 (1965) 種子の発芽・発生に及ぼす土壤水分の影響. 園芸學會雜誌, 34 (2) , 105-112.
- Genetic Improvement of Solanaceous Crops, volume2: Tomato (2007) Edited by Razdan, M. K., Enfield, NH: Science Publishers
- Coculo, D., Lionetti, V. (2022) The Plant Invertase/Pectin Methylesterase Inhibitor Superfamily. *Front. Plant Sci.* 13: 863892
- Dickinson, C. D., Altabella, T. & Chrispeels, M. J. (1991) Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplasmic invertase. *Plant Physiol.* 95, 420–425.
- Eich, E. (2008) Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook). Springer Science & Business Media.
- Friedman, M. (2002) Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 50(21), 5751-5780.
- Hothorn, M., Van den Ende, W., Lammens, W., Rybin, V. & Scheffzek, K. (2010) Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17427–17432.
- Jin, Y., Ni, D. A. & Ruan, Y. L. (2009) Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *Plant Cell* 21, 2072–2089.
- Kawaguchi, K., Takei-Hoshi, R., Yoshikawa, I., Nishida, K., Kobayashi, M., Kusano, M., et al. (2021) Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Sci. Rep.* 11, 1–12.
- Klann, E. M., Hall, B. & Bennett, A. B. (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol.* 112, 1321–1330.
- Kozukue, N., Han, J. S., Lee, K. R., Friedman, M. (2004) Dehydrotomatine and α -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J. Agric. Food Chem.* 52(7), 2079-2083.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Lehnert, H., Sprink, T., Kohl, C., Keilwagen, J., et al. (2020). Which factors affect the occurrence of off-target effects caused by the use of CRISPR/Cas: a systematic review in plants. *Front. Plant Sci.* 11:574959.
- Peralta, I. E., Knapp, S., Spooner, D. M. (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Sys. Bot.* 30 (2), 424-434.
- Rowland, S. D., Zumstein, K., Nakayama, H., Cheng, Z., Flores, A. M., Chitwood, D.H., et al. (2020) Leaf shape is a predictor of fruit quality and cultivar performance in tomato. *New Phytol.* 226: 851–865.
- Takabatake, R., Kaneko, M., Yanagida, M., Kitta, K. (2020) Detection of 30 bp DNA fragments with a sensitive modified Southern blot analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 84: 2405–2414.
- Veltkamp, V. (2021) A sweeter tomato: cracking the Cis-regulatory code of gene regulation. [internal PhD, WU, Wageningen University]. Wageningen University.
- Wang, B., Li, N., Huang, S., Hu, J., Wang, Q., Tang, Y., et al. (2021) Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated *SlINVIN1* and *SlVPE5* gene editing. *PeerJ* 9, e12478.