

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8年7月17日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長 殿

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 心 平

提出者 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

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。

〔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		名称：GABA 高蓄積／色素改変トマト (#6-16) 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、<i>SIGAD3</i>) の一部を改変し GABA 含有量を高め、かつカロテノイド異性化酵素遺伝子 (<i>SICRTISO</i>) の一部を改変しシス型リコピンが蓄積するように変化させた。
2 当該生物の用途		食用、栽培用及び飼料用。 F₁ 作出のための親系統として利用する。作出した F₁ 系統を食用として使用する。情報提供の対象範囲は、T₁ 世代以降である。 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
	(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 SR2 へ CRISPR/Cas9 発現カセットを移入し T₀ 個体を 2 系統得た。これら 2 系統についてシーケンサーにて塩基配列を解読し、2 系統のいずれにおいても 2 箇所の標的配列に変異導入があることを確認した。T₀ 世代において GABA の高蓄積化およびシスリコピンの蓄積と関連が示唆される橙色の果実を形成した 1 系統について、自家受粉により得られた T₁ 世代を育成し、変異がホモ化し、かつ T-DNA が抜け外来核酸が残存していないと考えられた系統#6-16 を選抜した（図 2）。本系統を、F₁ 作出のための親系統として利用する（図 2）。 この系統#6-16 について（1）PCR 法及び（2）<i>k</i>-mer 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）が残存していないことを確認した（資料 1）。系統#6-16 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（図 3）。またアグロバクテリウムが残存していないことを、系統#6-16 の T₂ 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（図 4）。以上の作業について、遺伝子組

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

		換え生物等として拡散防止措置の下で取り扱った（資料2）。
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: <i>Solanum lycopersicum</i> L.）である。 ゲノム編集系統#6-16 は、SR2 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 Center²）、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）。 （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512万ha、総生産量は約1億8850万トンである。主要な生産国は、生産量の上位から中国（約6,170万トン）、インド（約2,132万トン）、トルコ（約1,462万トン）、アメリカ（約1,068万トン）、エジプト（約752万トン）である（FAOSTAT, 2024）。我が国におけるトマトの栽培面積は約10,600ha、収穫量は約663,600トンである。地域別の主な生産地は、熊本県（約129,400トン）、北海道（約59,200トン）、愛知県（約44,700トン）、茨城県（約41,600トン）、栃木県（約29,000トン）である（令和6年産野菜生産出荷統計（農林水産省））。 （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（体細胞染色体数 $2n=24$、基本染色体数 $x=12$）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

² <https://tgrc.ucdavis.edu/wildspecies>

		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 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）。 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。 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, 2002; Eich, 2008)。しかしながら食される赤熟期 (成熟期) の果実にはトマチンはほとんど含まれていない (Kozukue <i>et al.</i> , 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トマト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み込み導入した。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 (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部位及び当該部位に生じた変化	標的配列は、 <i>SIGAD3</i> (Soly01g005000) の C 末端領域に存在する自己阻害領域の直前および <i>SICRTISO</i> (Soly01g081650) の第 1 エキソン内の最も N 末端領域に近い PAM 配列近傍である (図 5、図 6)。ゲノム編集系統#6-16 では、 <i>SIGAD3</i> に 5 bp の欠失、 <i>SICRTISO</i> に 2 bp の欠失がそれぞれ生じており、これらの変異によりフレームシフトが生じ、 <i>SIGAD3</i> では C 末端の自己阻害領域の直前に、 <i>SICRTISO</i> では第 1 エキソン内に停止コドンが形成された (図 6、表 1、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	標的とした遺伝子の 1 つ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 (図 7)。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 (図 8)。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剰な状態では、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 (図 8)。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 <i>et al.</i>, 2009)。pH の低下においても同様に GAD が活性型になる (図 8)。トマトは 5 つの GAD 遺伝子 (<i>SIGAD1-SIGAD5</i>) を有しており、このうち <i>SIGAD3</i> が果実の GABA 蓄積に主要な役割を果たしている (Akihiro <i>et al.</i>, 2008, Takayama <i>et al.</i>, 2015, Takayama <i>et al.</i>, 2017)。 もう 1 つの標的とした遺伝子はカロテノイド異性化酵素 (CRTISO) 遺伝子である。当該遺伝子は、カロテノイド生合成経路において合成されるシス型リコピン (シスリコピン) をトランス型リコピン (トランスリコピン) へと異性化する機能を担っている (図 9)。一般的に、リコピンを含むカロテノイドの多くは、分子中の二重結合が全てトランス型の構造で天然に存在している。一方、動物の体内では、二重結合の一部がシス型に異性化したカロテノイドが豊富に存在しており (Boileau <i>et al.</i>, 1999, 2002; Clinton <i>et al.</i>, 1996)、リコピンにおいては、シス型の方がトランス型よりも体内吸収性が優れていることが知られている (Cooperstone <i>et al.</i>, 2015)。トマトには CRTISO 遺伝子が 1 つのみ存在しており (<i>SICRTISO</i>,

		Solyc10g081650, 図 5)、古くから鮮やかな橙色で知られる <i>tangerine</i> 系統 (Tomes <i>et.al.</i>, 1953) は、この遺伝子の欠損により赤色色素であるトランスリコピンへの変換が阻害され、前駆体であるシスリコピンが蓄積することで橙色の果実が形成される (Isaacson <i>et al.</i>, 2002)。 本件では、CRISPR/Cas9 による変異導入により、SIGAD3 の C 末端領域に存在する自己阻害領域を欠損させる (図 6、表 1) ことで GAD の活性を上昇させ、トマト成熟果実における GABA 蓄積量を向上させることを目的としている。同時に、SICRTISO を機能欠損することで (図 6、表 2)、シス型からトランス型へのリコピンの異性化を阻害し、シスリコピンの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 T₀ 世代において、SIGAD3 および SICRTISO の両方に変異が挿入された個体を選抜した。そのうち 1 系統を自家受粉して得た T₁ 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 #6-16 を得た (図 3)。#6-16 では、導入された変異により SIGAD3 の自己阻害領域が欠損したことで (図 6、表 1) GAD の活性が上昇し、トマト成熟果実において GABA 蓄積量が野生型と比較して統計学的に有意に向上した。変異のホモ化が確認された #6-16 (T₁ 世代) をさらに世代促進して得た後代 (T₂, T₃, T₄) では、成熟果実の GABA 含有量が野生型と比較して 2.2~2.6 倍に達していた (図 10)。加えて、SICRTISO に導入された変異により当該酵素が機能欠損し、変異をホモに有する T₂, T₃, T₄ 世代の成熟果実において、野生型よりも 2.1~2.6 倍高いシスリコピンの蓄積が確認された (図 11)。以上の形質転換後代における調査により、これら形質は遺伝的に安定であると考えられた。
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、2 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、SIGAD3 では 0 箇所、SICRTISO では 3 箇所のオフターゲット候補が検索された。Cas-OFFinder では、bulge size、ミスマッチをそれぞれ 2 に設定し検索した結果、SIGAD3 では 2 箇所、SICRTISO では 7 箇所のオフターゲット候補が示された。SIGAD3、SICRTISO のいずれにおいてもこれら両方の解析ソフトで共通したオフターゲット候補は検出されなかったが、SICRTISO のオフターゲット検索で抽出された 1 つの候補領域は遺伝子およびその発現に係る領域に該当したため、サンガーシーケンスにより変異の有無を調査した。その結果、オフターゲット変異は確認されなかった (図 12、表 3、4)。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, 2019)。 さらに、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されていることから、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 植物体に GABA が高蓄積すると、わい化や不稔になることが知られている (Koike <i>et al.</i>, 2013)。また、従来育種で獲得された既知の <i>SICRTISO</i> 遺伝子変異体トマト <i>tangerine</i> では、シスリコピンやその前駆体の蓄積により、黄色みを帯びた若葉、オレンジ色の花卉、オレンジ色の成熟果実が観察されている (Isaacson <i>et al.</i>, 2002)。そこで、ゲノム編集系統#6-16 の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) との比較調査を行った。草丈および到花日数について野生型と#6-16 の間で顕著な差は認められなかった (図 13)。 また、既知の <i>SICRTISO</i> 変異体である <i>tangerine</i> 系統では黄色みを帯びた若葉が観察されているが、ゲノム編集系統#6-16 においても、程度は低いものの同様の傾向が観察された。この形質は葉緑素の低下を伴っていたが、同一の葉において葉緑素量を 8 週間モニターした結果、2 週間後には野生型との差が小さくなる傾向が見られた (図 14)。その他の形態的な特徴として、#6-16 では、成葉の形態には顕著な変化が見られないものの、オレンジ色の花卉、オレンジ色の成熟果実が観察された (図 15)。また、野生型と比較して種子数の減少が確認された (図 19)。これらの形質はこれまでに情報提供を行った GABA 高蓄積トマトでは観察されなかったこと、既知の <i>SICRTISO</i> 変異体である <i>tangerine</i> 系統と類似点が多いことから、<i>SICRTISO</i> 遺伝子への変異導入によってもたらされた変化と考えられる。この推察は、トマトにおいて、<i>SICRTISO</i> 遺伝子が果実成熟期に発現が高まるだけでなく、葉及び花組織でも発現している事実によっても裏付けられる (図 16)。 また、GABA は SIGAD 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 (図 7) ことから、T₂ から T₄ 世代のゲノム編集系統#6-16 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 (株式会社エンザイム・センサ、酵素法)。その結果、#6-16 と野生型との比較で、T₃ 世代において統計学的に有意な増加が確認されたものの、T₂ および T₄ 世代においては有意差が認められなかった (図 17)。一般に GABA を多く生産することで、原料であるグルタミン酸の減少が予想されるが、野生型と比較して同等あるいは増加傾向であったことから、タンパク質代謝や TCA 回路からの供給が十分に維持されていると考えられる。また、グルタミン酸レベルの減少がみられないことは、これまでに情報提供書を提出した GABA 高蓄積トマト (#87-17 (2020 年 12 月提出)、#206-4 (2023 年 7 月提出)、#71a-33 (2025 年 9 月提出))、Lee らの報告 (Lee <i>et al.</i>, 2018) と同様であった。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への影

		響が小さかった理由として、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 <i>et al.</i>, 2017）、#6-16 では GABA 含有量は野生型の約 2.2～2.6 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。 その他代謝に関わる成分として、トランスリコピンは SICRTISO の働きによってシスリコピンから合成される（図 9）ことから、T₂から T₄世代のゲノム編集系統#6-16において、トランスリコピン含量の調査を行った（HPLC 法）。その結果、ゲノム編集系統#6-16 のトランスリコピン含量は野生型と比較して有意な減少を示した（図 18）。ゲノム編集系統#6-16 には、シスリコピン蓄積量を向上させることを目的として SICRTISO 酵素の機能欠損をもたらす変異が導入されているため、本結果は想定範囲内である。 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 GAD 遺伝子及び CRTISO 遺伝子の一部改変によるものと考えられる変化以外の変化は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、#6-16 と対照となる野生型の比較調査を行ったところ、#6-16 では野生型と比較して若葉の黄化、オレンジ色の花卉、オレンジ色の成熟果実といった形態変化が観察された（図 14、15）。これらは SICRTISO 遺伝子の改変によるカロテノイド組成の変化によって生じたものと考えられるが、いずれも栄養及び生殖成長を促進する変化ではなく、競合における優位性を高めるとは考えにくい。続いて、種子の生産性、休眠性、越冬性について調査した。種子生産数は、野生型と比較して#6-16 方が有意に少ないことが確認された（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、GABA やシスリコピンの蓄積によって休眠性が新たに付与されるという報告もない。実際に、同じ遺伝子を欠損している#70a-23 では、野生型と比較して発芽の遅延は観察されなかった。次に、発芽率を調査したところ、好適条件下では野生型と#6-16 との間で統計学的な有意差は認められなかった。また、低温条件下では好適条件下に比べて野生型、#6-16 とともに発芽率の低下が見られた（図 20）。 以上のことから、形態学および植物生理学的に競合における優位性はなく、#6-16 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, 2002; Eich, 2008)。本ゲノム編集系統#6-16 (T₃) の成熟果実では平均で 2 ppm のトマチンが検出されたが (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)、野生型においても平均で 2.7 ppm のトマチンが検出されており、統計学的な有意差は認められなかった (図 21)。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ギー性はない。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。 SIGAD3 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 (図 22)、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 <i>et al.</i>, 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であり、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、今回高蓄積させたシスリコピンは植物に存在するカロテノイドであり、アレルギー性はない。トマトは植物油の存在下で加熱調理すると、リコピンのトランス型からシス型への異性化が促進されることが知られている。そのため、調理後やトマト加工品には生鮮トマトよりも高い比率で含まれる (Honda <i>et al.</i>, 2017) が、これら食品の過剰摂取により中毒性が認められたという報告はない。また、従来の品種改良法により作出された <i>tangerine</i> 系統は、古くから通常のトマトと同様に生産され安全に消費されている。 さらに、項目 9 に記載のとおり、標的配列以外の変異が確認されないことから、新たに有害物質の産生性が付与される可能性は低い。 加えて、GABA とシスリコピンの相互作用は知られておらず、両者の高蓄積によって有害性が生じるとは考えにくい。 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 <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> 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おらず、#6-16 が競合する可能性のある野生植物は特定されない。また#6-16 の形態や生育等の調査から野生型と比較して <i>GAD</i> 遺伝子及び <i>CRTISO</i> 遺伝子の一部改変によるものと考えられる形質以外の有意差は見られなかったことや GABA やシスリコピン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。 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含量において、野生型と比較して有意差が見られなかったこと、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、高められた GABA 含有量の程度からの影響、そしてシスリコピンについては従来品種と同等の形質であることを踏まえると、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。 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。 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
資料等一覧

【資料】

- 資料 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
- 資料 1－図 1 CRISPR/Cas9形質転換用バイナリーベクター全長(14,949 bp)の概略図およびゲノムPCRに用いたプライマーの位置
- 資料 1－表 1 ゲノムPCRに使用したプライマーの塩基配列
- 資料 1－図 2 ゲノムPCRによるベクター断片の存在確認
- 資料 1－図 3 *k*-mer法によるベクター断片の存在確認
- 資料 2 実験方法について

【図表】

- 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 標的遺伝子 (*SIGAD3*、*SICRTISO*) の染色体上の位置
- 図 6 *SIGAD3*および*SICRTISO*遺伝子の構造と変異導入位置
- 表 1 *SIGAD3*に挿入された変異(DNA配列：上、アミノ酸配列：下)
- 表 2 *SICRTISO*に挿入された変異(DNA配列：上、アミノ酸配列：下)
- 図 7 高等植物におけるGABA代謝経路
- 図 8 GADの活性化メカニズム
- 図 9 高等植物におけるカロテノイド合成経路
- 図 10 成熟果実におけるGABA含量(T₂世代からT₄世代)
- 図 11 成熟果実におけるシスリコピン含量 (T₂世代からT₄世代)
- 表 3 CRISPR direct及びCas-OFFinderにより検出された*SIGAD3*標的配列のオフターゲット候補
- 表 4 CRISPR direct及びCas-OFFinderにより検出された*SISRTISO*標的配列のオフターゲット候補
- 図 12 *SICRTISO*標的配列で抽出されたオフターゲット候補の変異確認
- 図 13 生育特性 (草丈及び到花日数) (T₂世代)
- 図 14 葉の葉緑素量 (SPAD)の経時変化(T₂世代)
- 図 15 生育特性(T₂世代)
- 図 16 *SICRTISO*の発現パターン
- 図 17 成熟果実におけるグルタミン酸含量 (T₂からT₄世代)
- 図 18 成熟果実におけるトランスリコピン含量 (T₂からT₄世代)
- 図 19 種子の生産数
- 図 20 発芽試験
- 図 21 成熟果実におけるトマチン含量(T₃世代)
- 図 22 *SIGAD1*から*SIGAD5*の発現パターン

【引用文献】

新版日本原色雑草図鑑 (1980) 沼田真、吉沢長人編、全国農村教育協会

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

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

芦澤正和 (1992) 野菜. 化学と生物, 30 (11), 735-742.

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.

高橋和彦 (1960) 温床々土に関する研究 (第2報). 園芸學會雑誌, 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・発生に及ぼす土壌水分の影響. 園芸學會雑誌, 34(2), 105-112.

Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Asahina, H., Matsukura, C., Akama, K., Fujimura, T., Ezura, H. (2008) Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 49 (9), 1378-1389.

Boileau, A.C., Merchen, N.R., Wasson, K., Atkinson, C.A., Erdman Jr, J.W. (1999) *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *The Journal of Nutrition*, 129(6), 1176-1181.

Boileau, T.W., Boileau, A.C., Erdman Jr, J.W. (2002) Bioavailability of all-*trans* and *cis*-isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 227 (10), 914-919.

Clinton, S.K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore, B.J., Erdman Jr, J.W. (1996) *Cis-trans* lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5 (10), 823-833.

Cooperstone, J.L., Ralston, R.A., Riedl, K.M., Haufe, T.C., Schweiggert, R.M., King, S.A., Timmers, C.D., Francis, D.M., Lesinski, G.B., Schwartz, S.J. (2015) Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as *cis* - isomers from *tangerine* compared to red tomato juice, a randomized, cross - over clinical trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59 (4), 658-669.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5751-5780.

- Gut, H., Dominici, P., Pilati, S., Astegno, A., Petoukhov, M.V., Svergun, D. I., Grütter, M.G., Capitani, G. (2009) A common structural basis for pH-and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Biology*, 392 (2), 334-351.
- Honda, M., Murakami, K., Watanabe, Y., Higashiura, T., Fukaya, T., Wahyudiono, Kanda, H., Goto, M. (2017) The *E/Z* isomer ratio of lycopene in foods and effect of heating with edible oils and fats on isomerization of (all-*E*)-lycopene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119 (8), 1600389.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., Hirschberg, J. (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *The Plant Cell*, 14 (2), 333-342.
- Koike, S., Matsukura, C., Takayama, M., Asamizu, E., Ezura, H. (2013) Suppression of γ -aminobutyric acid (GABA) transaminases induces prominent GABA accumulation, dwarfism and infertility in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant and Cell Physiology*, 54 (5), 793-807.
- Kozukue, N., Han, J. S., Lee, K. R., Friedman, M. (2004) Dehydrotomatine and α -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (7), 2079-2083.
- Lee, J., Nonaka, S., Takayama, M., Ezura, H. (2018) Utilization of a genome-edited tomato (*Solanum lycopersicum*) with high gamma aminobutyric acid content in hybrid breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(4), 963-971.
- Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C., Ezura, H. (2017) Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-14.
- Peralta, I. E., Knapp, S., Spooner, D. M. (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30 (2), 424-434.
- Tabei, Y. (2019) Risk and safety considerations 2: genetic variations and potential risks—traditional breeding and genome editing. *Transgenic Research*, 28 (2), 119-124.
- Takayama, M., Koike, S., Kusano, M., Matsukura, C., Saito, K., Ariizumi, T., Ezura, H. (2015) Tomato glutamate decarboxylase genes *SIGAD2* and *SIGAD3* play key roles in regulating γ -aminobutyric acid levels in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1533-1545
- Takayama, M., Matsukura, C., Ariizumi, T., Ezura, H. (2017) Activating glutamate decarboxylase activity by removing the autoinhibitory domain leads to hyper γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in tomato fruit. *Plant Cell Reports*, 36 (1), 103-116.
- Tomes, M.L., Quackenbush, F.W., Nelson Jr, O.E., North, B. (1953) The inheritance of carotenoid pigment systems in the tomato. *Genetics*, 38 (2), 117.