

① 品目・品種名及び概要 (利用方法、利用目的)

名称: 高糖度トマト GG-T1

概要: トマト (英名: tomato、学名: *Solanum lycopersicum* L.) の自社で開発した中玉系栽培系統 GG-TL (以下、WT と記載) を改変した。改変した遺伝子はインベルターゼインヒビター遺伝子 (*INVINHI*) であり、インベルターゼインヒビターはインベルターゼ活性を抑制する。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、葉から果実への糖の転流に関与する。

本件では、ゲノム編集技術を用いて、インベルターゼインヒビター遺伝子を機能欠損させることで、果実糖度を向上させた。

本系統を親系統および育種素材として利用し、作出した系統を食用として使用する。飼料としては、規格外果実の処理や加熱調理をした際に出る残渣等を利用し、従来のトマトと同様のものを想定している。情報提供の対象範囲は GG-T1 の T₁ 世代以降である。

② 利用したゲノム編集の方法及び遺伝子改変の情報

WT に対して、パーティクルボンバードメント法を実施し、5 つのベクターを同時に細胞に移入した。移入後、抗生物質等での選抜は実施しておらず、ベクターからの一過的な遺伝子発現によるゲノム編集体の取得を目的としている。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、ベクターの一過的な導入と発現を確認するための蛍光マーカである *tdTomato* 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。

サンガーシーケンス解析により 2 種類の標的遺伝子配列 (*INVINHI* および *VPE5*) に変異導入が確認できた 24 個体の T₀ 世代を得た。そのうち 11 個体を自家受粉し、11 系統の T₁ 種子を得た。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 *INVINHI* に変異が確認された。変異が確認できた 1 系統においては、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。この 1 系統の残る種子を播種した個体群 (T₁ 個体群) から、PCR 法によって変異がホモ化 (28bp 欠損) し、WT に比べ果実糖度 (Brix) が向上した 1 個体を選抜し、GG-T1 とした。この 28bp 欠損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。なお、ゲノム編集により *INVINHI* 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つ

た (Wang et al. 2021)。この結果は、*INVINHI* 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。

また、GG-T1においても、もう一方の標的配列 (*VPE5*) に対してサンガーシーケンス解析を実施したが、変異は確認されなかった。*VPE5*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。

③ ゲノム編集技術による DNA の変化が畜産物を通じた人の健康または家畜等の健康に悪影響を及ぼす既知の毒性物質の増加を生じないことの確認

■ 確認済み □ 未確認

標的とした2種類の標的遺伝子配列 (*INVINHI* および *VPE5*) 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。*INVINHI* 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。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サンガーシーケンス解析により調査した。他方のガイド RNA 配列 (*VPE5*) 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。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。この結果、GG-T1 において変異は確認されなかった。よって *INVINHI* 以外の部位が改変された可能性は低いと考えられる。

次に、新たなアレルゲンの産生の有無を調査するため、標的配列において変異が確認された箇所について、変異の導入により新たなオープンリーディングフレーム (ORF) が発生していないかを、Bioconductor の ORFik (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ORFik.html>) を使用して検索を行った。標的変異の導入により発生すると予測される ORF を3つの読み枠で正負方向に検索した結果、新たな3つの ORF が確認された。標的遺伝子に変異が導入された後、新規に発生する可能性がある ORF により、アレルゲンの産生が見られるかどうかを The COMprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE 2024 database) (<https://comparefasta.comparedatabase.org/>) と AllergenOnline, ver.22 (<http://www.allergenonline.org/>) を利用し、アレルゲン解析を行った。両者とも 8 アミノ酸および 80 アミノ酸検索について、デフォルト設定 (連続する 8 アミ

ノ酸以上で完全に一致する配列、又は連続する 80 アミノ酸以上について 35%を超えて一致する配列条件) を用いた。その結果、新規アレルゲンの産生は見られないことが示された。また、新規に発生する可能性がある 3 つの ORF に対して、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 検索を行った。E-value の閾値は 10^{-4} とした。その結果、いずれの ORF についても既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった。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。

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 (定量限界 1 ppm)。このことに加え、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が低い。さらに、インベルターゼインヒビターはインベルターゼの機能を抑制し、スクロースの転流に関与するということが明らかであり、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。なお、InterProScan (version;104.0, <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。そのため、INVINH1 遺伝子の改変により、トマチンを含めたアルカロイド系に影響を与えるとは考えられない。

以上により、GG-T1 は新規アレルゲン・毒性物質の産生、および既知の毒性物質の増加を生じないと考えられる。

④ 特定の成分を増加・低減させるため代謝系に影響を及ぼす改変の有無

■代謝系に影響を及ぼす改変を行った □ 代謝系に影響はない

上述の通り、インベルターゼインヒビターは葉から果実への糖輸送に関連しており、INVINH1 遺伝子のノックダウンあるいはノックアウトすることで果実

糖度の上昇が報告されている (Jin et al. 2009, Kawaguchi et al. 2021)。 *INVINHI* 遺伝子が欠損した GG-T1 の果実において、フルクトース含有量および Brix が有意に増加していた。

また、Kawaguchi et al. (2021) の報告では、 *INVINHI* のゲノム編集ノックアウト系統および野生型の果実を使用した比較メタボローム解析 (ノンターゲット) において、ゲノム編集系統から予期しない特異的ピークが検出されなかった、すなわち特異的な代謝産物は産生されなかったことを示している。そして、Kawaguchi et al. (2021) で改変に使用しているのは食用の赤色系中玉トマト系統であり、本申請のトマトも食用の赤色系中玉トマト系統を改変しており、果実糖度の上昇も同様に生じていることから、起こりうる代謝系の変化に違いはないものと考えられる。したがって、Kawaguchi et al. (2021) におけるメタボローム解析の結果、並びに上記③で示したオフターゲット変異が検出されなかったこと、 *INVINHI* の機能から有害物質の産生に関して新規に発生する可能性は低く、従来の食用トマトと実質的に同等と考えられる。