

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に係る実験計画報告書

令和6年10月23日

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課
生命倫理・安全対策室安全対策官 殿

氏名 国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
提出者 理事長 久間 和生
住所 茨城県つくば市観音台 3-1-1
電話番号 029-838-7138

ゲノム編集技術により得られた生物の使用等を行いたいので、次のとおり報告します。

ゲノム編集技術により得られた生物の名称		成熟制御転写因子 <i>RIN</i> を改変した高日持ち性トマト (系統名 <i>Solanum lycopersicum</i> G27#13-15 及びその交配後代系統)
開放系における使用等の内容		ゲノム編集技術により得られた成熟制御転写因子遺伝子 <i>RIN</i> を改変した高日持ち性トマトの野外栽培で得られた果実特性の検証（限定された圃場における栽培等）
使用等をする場所	名称	カゴメ株式会社 総合研究所 圃場（詳細は別紙2に記載）
	所在地	栃木県那須塩原市西富山 17
宿主の名称		トマト (tomato, <i>Solanum lycopersicum</i> L. var. Ailsa Craig)
宿主の自然環境における生理・生態学的特性		生育・生育可能な環境の条件： 熱帯では多年生だが、日本のような温帯地域では一年生作物である。発芽可能な温度帯は 11-40℃、生育に対する最適温度は昼温 24-26℃、夜温 18℃で、40℃以上で伸長停止する。10 度以下で生育量は低下し、零下 1-2℃で凍死する（野菜園芸大百科トマト）。 繁殖又は増殖の様式： 一般に種子繁殖だが、挿し木でも容易に増殖できる。ほとんどの場合、自家受粉するが、これは花粉を含む葯が開裂面を内側にして葯同士が癒合して緊密な葯筒を形成しており、その中で花柱が伸長、柱頭が葯筒内面の花粉に接触するためである。そのため他家受粉はほとんどおこらない。ハウス栽培等風による花器の動揺が少ない環境では花粉の飛散が悪いため、人為的に花を振動させたりハチを放飼して受粉させたりすることがある（野菜園芸大百科第2版トマト、農文協 2004）。 有害物質の産生性： トマトの産生する有害成分として、糖アルカロイドであるトマチンが挙げられ、哺乳類に嘔吐、下痢、腹痛などの中毒症状を引き起こすことがある (Wang et al. Food Chem. 2024 447:138937)。トマチンは葉や茎、花、未熟果実等に含まれる。しかしながら果実内の蓄積量は果実の成長に伴い著しく低下し、食用に供する赤熟果にはほとんど含まれない (Kozukue N et al. J Agric Food Chem. 2004 52:2079-83)。 我が国における具体的な生息・生育域： トマトは全都道府県で栽培されており、年間約 70-75 万トンが生産さ

		れている。トマトの我が国への渡来は 18 世紀初期とみられる。トマトはナス科に分類され、野生種と栽培種合わせて 17 種が知られている (Tomato Genetic Resource Center; https://tgrc.ucdavis.edu/hortguidelines/wild-species-guidelines)。栽培種 (<i>Solanum lycopersicum</i>) の祖先とされる <i>S. pimpinellifolium</i> を含む近縁野生種 9 種はいずれもアンデス山地やガラパゴス諸島に分布している (田淵、まるごとわかるトマト、誠文堂新光社 2017)。これらのうち 7 種は栽培種と交配可能であるが (飯島、生物学 2013 11 662-5)、我が国においてこれらの野生種が自然環境下で野生化して自生しているという報告はない。
使用したゲノム編集技術の種類・導入方法		使用した技術：a CRISPR/Cas9 導入方法：c 人工ヌクレアーゼ遺伝子を宿主のゲノムに挿入
細胞外で加工した核酸の導入・除去方法、残存の有無の確認方法		導入した核酸の構成：別紙 1 (1. 導入した核酸の構成に関する情報) を参照 導入方法：アグロバクテリウム法 除去した方法：自殖後代において遺伝的分離により除去 残存の有無を確認した方法：a. PCR 法 及び b. サザンブロットィング法 a 及び b の手法いずれも、導入遺伝子の複数の領域を標的とした解析を行い、ポジティブコントロール植物 (導入遺伝子が残存する G27#13-15 の兄弟系統) で検出される導入遺伝子が、当該植物ではいずれも検出されなかった。別紙 1 (4. 細胞外で加工した核酸の導入・残存の有無について) を参照。
改変した遺伝子等	名称	<i>RIN</i> (<i>RIPENING INHIBITOR</i> , <i>MADS-RIN</i> とも称される)
	機能	MADS ボックスファミリーに属する転写因子。果実成熟期に特異的に発現し、成熟期前は発現がほとんどない状態から成熟開始に伴い一気に高発現化し、果実の成熟を促進する。DNA 結合機能を有するとともに、転写活性化ドメインを有し、また成熟制御に関わる他の MADS ボックス転写因子 (TAGL1, FUL1, FUL2) と複合体を形成する。
	予想される機能の変化	1 塩基挿入によるフレームシフトにより、野生型 <i>RIN</i> 遺伝子が 242 アミノ酸をコードするのに対し、199 アミノ酸をコードする遺伝子に変化する。これにより、C 末端側に位置する転写活性化ドメインを欠失したタンパク質となる。この改変タンパク質は、DNA 結合活性及び他の MADS ボックス転写因子と複合体を形成する機能は維持している。
改変生物の形質の変化	当該改変により生じた変化	標的とした遺伝子等の配列に対して生じた変化：a 挿入 (1 塩基) 上記の通り、一部ドメインを欠失したタンパク質が発現する。この改変に伴い、果実成熟の進行が緩やかになる。具体的には、通常成熟期に急増する成熟促進植物ホルモンであるエチレンの発生量が緩やかになり、果実の軟化の進行が緩やかになる。また成熟トマトの特徴的な赤色色素であるリコピンの蓄積量も減少するが、β-カロテンの量は若干増える。RIN により発現誘導される成熟に必要な遺伝子の一部が、この変

		異により発現が低下する。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照のこと。
	上記以外に生じた変化	果実成熟以外の可視的な形質等（草型、草丈、花の形態、成熟開始日）の変化は認められない。種子の形成も正常である。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照のこと。 Cas-OFFinder (http://www.rgenome.net/cas-offinder/) を利用して、変異を生じさせた標的配列と類似配列を下記の条件でトマトゲノムから抽出した。 条件 1 : Mismatch number 2 塩基以下、DNA Bulge Size 2 塩基以下 条件 2 : Mismatch number 3 塩基以下、DNA Bulge Size 1 塩基以下 上記の条件で 15 か所の領域をピックアップ、親品種 Ailsa Craig と改変植物のゲノム DNA を PCR で増幅、塩基配列解析を行った。 いずれの配列でも親品種との違いは検出されなかった。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照のこと。
生物多様性影響が生ずる可能性についての考察	1. 競合における優位性 （1）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 <i>RIN</i> は果実の成熟期に特異的に発現上昇する転写因子遺伝子である。機能ドメインを一部欠失したタンパク質が発現する変異により果実の成熟特性が変化しても、生活サイクル、繁殖様式、形態的、果実以外の器官の生理的特性が変わることはないと考えられる。実際に、本ゲノム編集トマトを閉鎖系栽培室で栽培したところ、形態学的差異は観察されなかった。また種子に関しては、通常の果実成長においては種子が完成したのちに成熟が開始するため、成熟以前に発現がほとんどない <i>RIN</i> および変異型遺伝子が種子の形成に影響することは考えにくい。以上のことから、競合に関わる特性も一般的なトマト栽培品種と同等と推定される。栽培等にあたっては、植物体の散逸を防止するために特定の圃場でのみ栽培を行い、栽培管理を厳格に行う。また一般にトマトは長年にわたって全国で広く栽培されているが、畑地外へ進出して繁茂しておらず、侵入性・雑草性が高い作物ではない。 以上から、本ゲノム編集トマトは、ほ場の外部にある野生動植物等と競合することはない、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。 （2）影響の具体的内容の評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 （3）影響の生じやすさの評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 （4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	

	本ゲノム編集トマトを限定されたほ場で栽培等を行う場合、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じる恐れはないと判断した。 2. 有害物質の産生性 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 果実に蓄積する有害物質としては、トマチンがある。トマチンは受粉後の間もないころ、果実が小さい時に重量当たりの蓄積量が最大であり、以後果実成長に伴い減少していき、果実肥大が止まって成熟が開始するころにはわずかな量が検出されるのみである。この減少期は <i>RIN</i> の発現がほとんどない時期にあたり、したがって <i>RIN</i> の改変がトマチン蓄積に与える影響はないと推定される。本ゲノム編集系統の赤熟果実から 2 mg/kg が検出され、これは市販トマトの品種間差 (0.3-2.8 mg/kg; Friedman J Agric Food Chem. 2002 50: 5751-80) の範囲内であった (別紙1 5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違)。トマチン以外の有害物質については、栽培トマト、及び成熟が完全に停止する <i>rin</i> 変異体 (<i>RIN</i> 遺伝子の自然変異体) においても報告はないため、両者の中間的性質を示す本ゲノム編集トマトにおいても同様に有害物質の産生・蓄積はないことが推定される。 トマトのアレルゲンとして (WHO/IUIS) に登録されている 7 種のタンパク質 (https://www.allergen.org/index.php) 等について有意に mRNA の発現が上昇するものではなく (別紙1)、アレルゲン性が上昇しているとは考えにくい。 以上から、本ゲノム編集トマトを限定されたほ場で栽培等を行う場合、有害物質の産生により影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。 (2) 影響の具体的内容の評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 (3) 影響の生じやすさの評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 本ゲノム編集トマトを限定されたほ場で栽培等を行う場合、有害物質の産生により影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じる恐れはないと判断した。 3. 交雑性 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 「宿主の自然環境における生理・生態学的特性」欄の「繁殖又は増殖の様式」に記載の通り、トマトは自殖性の作物である。前述の通り日本
--	---

	国内でトマトと交配可能な野生植物は自生していない。以上から、本ゲノム編集トマトから交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。 (2) 影響の具体的内容の評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 (3) 影響の生じやすさの評価 非該当：影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないため。 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 本ゲノム編集トマトを限定されたほ場で栽培等を行う場合、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じる恐れはないと判断した。 生物多様性影響の総合的評価 本ゲノム編集トマトについては、形態学的特性や栽培特性等も通常の栽培種と同等であり、さらに植物体の散逸を防止する措置を講じた限定されたほ場で栽培するものであることから、野生動植物等と競合することはないと考えられる。有害物質生産性については、本ゲノム編集トマトにおいて新たな有害物質が産生されることは想定されない。交雑性については、トマトと交雑する近縁野生種が我が国には自生していない。 以上を総合的に評価し、本ゲノム編集トマトを限定されたほ場において栽培等をした場合には、生物多様性影響が生じる恐れはないと判断した。
緊急時の対応	生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合は、緊急措置を講じた後、速やかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。
その他	当該生物の取り扱いについて検討する委員会の設置状況：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝子組換え安全委員会（ゲノム編集）にて検討を行った。 委員長名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 企画戦略本部新技術対策課 課長 検討日：2024年7月22日 当該生物の不活化処理の具体的な措置内容：不活化を行う場合は、試験終了後、地上部及び地下部を取り出し、オートクレーブ又は焼却炉等を用いて確実に不活化する。

別紙 1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報

1. 移入した核酸の構成に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本ゲノム編集トマトの作出に用いたベクターの RB と LB に挟まれた T-DNA の構成要素及び構成要素の由来を表 1 に示した。またベクターマップを図 1 に示した。

表 1 ゲノム編集に使用した核酸のサイズ、由来及び機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
RB	25 bp	由来：アグロバクテリウム。リゾビウム属に属する細菌で、多くの双子葉植物に感染して癌腫病を起こす。 機能：T-DNA の right border (RB)配列。T-DNA の切り出しと転移を開始させる。
gRNA (ガイド RNA) 発現カセット (発現カセット 1)		
AtU6-P	0.39 kb	由来：シロイヌナズナ。アブラナ科に属する一年草。植物のモデル生物として広く扱われている。 機能：RNA polymerase III (pol III)系のプロモーターとして、短い RNA の転写を誘導する。
gRNA (ガイド RNA)	100 bp	以下の二つの配列を結合したもの。 標的配列 由来：トマト。ナス科の作物。世界で最も栽培の多い果菜類。 機能：DNA の二本鎖切断を誘発する位置を特定する 20 塩基の配列。 gRNA common 由来： <i>Streptococcus pyogenes</i> 。レンサ球菌属に属する細菌。健康なヒトの咽頭や消化管、表皮にも生息する常在最近の一種。 機能：Cas9 タンパク質との複合体を形成するために必要な足場となる配列。
PolyT	7 bp	由来：合成 機能：T の繰り返し配列により polIII 系のプロモーターによる転写を終結させる。

Cas9 発現カセット（発現カセット 2）		
PcUbi-P	0.97 kb	由来：パセリ。セリ科の二年草。野菜として食用にされる。 機能：パセリのユビキチンプロモーター配列。
Cas9 (At opt. Cas9)	4.2 kb	由来： <i>Streptococcus pyogenes</i> （前出） 機能：Cas9 スクレアーゼ遺伝子。Cas9 スクレアーゼは gRNA と複合体を形成して、gRNA に含まれる標的配列を認識して DNA 二本鎖を切断する。配列を一部変更してコドンでシロイヌナズナに最適化している。
NLS	50 bp	由来：Simian virus40：ポリオーマウイルス科のウイルス。 機能：核移行シグナル配列であり、ここでは連結している Cas9 タンパク質を核へ移動する役割を果たす。
Tpea3A	0.3 kb	由来：エンドウ。マメ科の一年草。野菜として食用にされる。 機能：RuBisCO small subunit 3A 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
OsACT1-T	1.3 kb	由来：イネ。イネ科の作物で、世界三大穀物の一つ。 機能：イネのアクチン遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
NptII 発現カセット		
CaMV 35S-P	0.83 kb	由来：カリフラワーモザイクウイルス。カリモウイルス科に属する植物ウイルス。主にアブラナ科植物に感染してモザイク症を引き起こす。 機能：35SRNA のプロモーター領域。下流に配置した遺伝子を強力に発現させる。
NptII	0.8 kb	由来：大腸菌（病原性のない）。腸内細菌科に属する細菌。温血動物の消化管内に生息する。 機能：ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼⅡをコードしている。抗生物質カナマイシンを不活化する機能を持つ。選抜マーカー。
Thsp17.3	1.1 kb	由来：イネ（前出） 機能：イネのヒートショックタンパク質 17.3 遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
LB	25 bp	由来：アグロバクテリウム（前出） 機能：T-DNA の left border (LB)配列。T-DNA の切り出しと転移を終結させる。

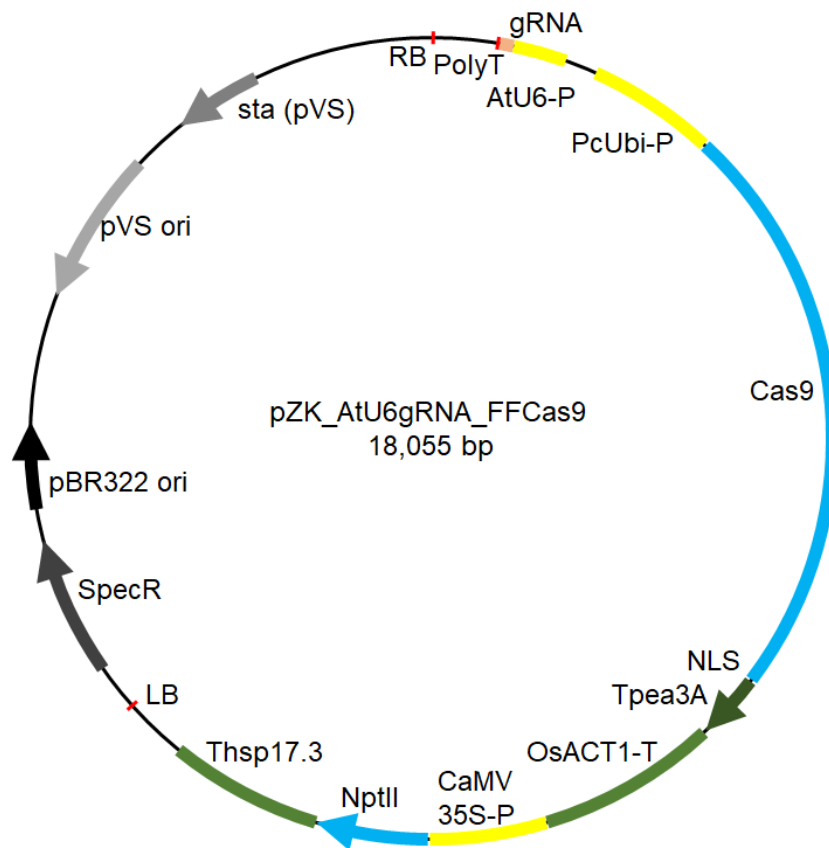


図 1 *RIN* 遺伝子の標的変異を導入するために用いたベクターのマップ

RB と LB に挟まれた T-DNA 領域の構成要素は表 1 のとおり。ベクターのバックボーンには、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) と大腸菌の複製開始点である pVS1 ori と p BR322 ori、プラスミドの安定化に寄与する sta(pVS1)、スペクチノマイシン耐性遺伝子(SpecR)を保持する。

(2) 構成要素の機能

表 1 に示した発現カセット 1 と発現カセット 2 の働きにより、gRNA と Cas9 タンパク質が産生され、その複合体がゲノム中の標的配列を切断する。切断後、細胞に内在の修復システムによる修復時のエラーにより変異が誘発される。また発現カセット 3 の働きにより、抗生物質カナマイシンに耐性となり、カナマイシンを含む培地上での T-DNA 配列を保持するカルの増殖、再分化が可能となり、遺伝子組換え植物体の選抜が可能となる。

(3) CRISPR/Cas9 システムによるトマトの変異導入について

本ゲノム編集トマトの作出には、*RIN* 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 システムを利用した。標的配列は第 7 エキソン中に設計し(図 2A)、1 塩基挿入変異の植物体を得られた (*rinG2* 変異、図 2B)。その結果、野生型遺伝子が 242 アミノ酸をコードしているのに対し、変異型タンパク質は 199 アミノ酸で構成され、そのうち 198 番目のアミノ酸までが野

生型と同じ配列である (図 2C)。抗 RIN タンパク質抗体によるイムノブロット解析により、果実内に野生型より短縮したタンパク質が蓄積していることがわかる (図 2D)。

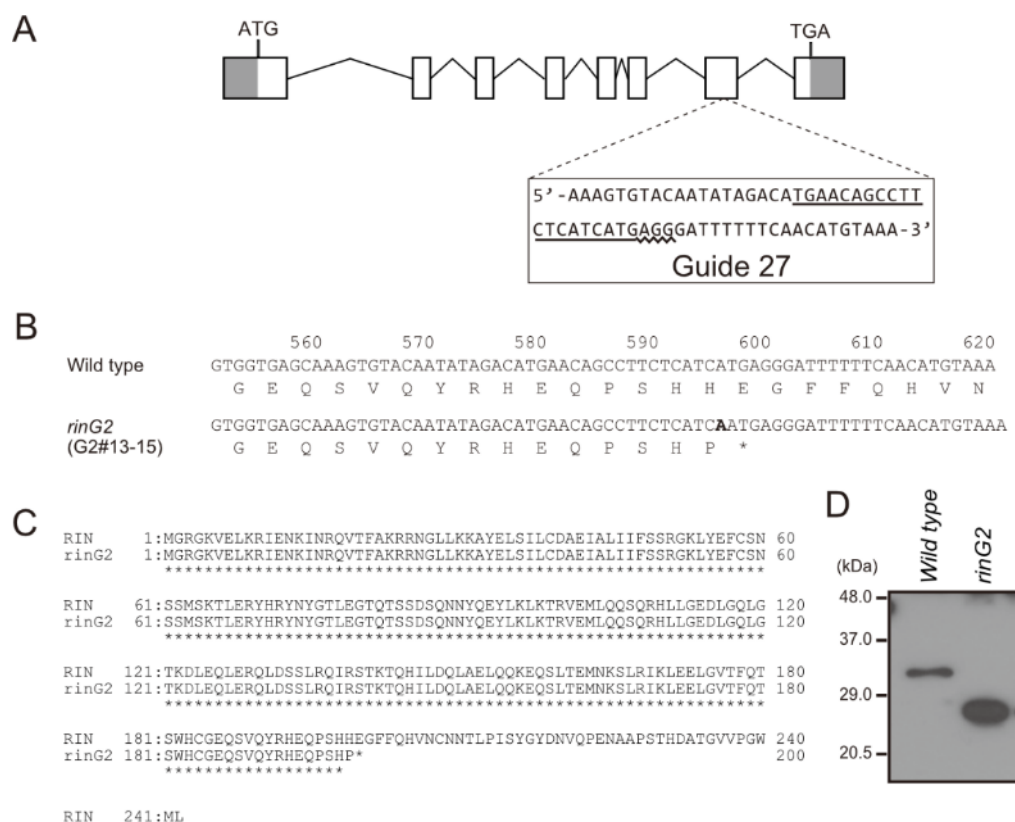


図 2 ゲノム編集で生じた *RIN* 遺伝子の新規変異

- RIN* 遺伝子のゲノム構造と標的領域。 *RIN* 遺伝子は 8 つのエキソン (箱で表示) から構成されており、第 7 エキソン中の 20 塩基を標的配列 (下線) とした。波線は PAM 配列を示す。
- ゲノム編集により生じた 1 塩基挿入変異。太字で示したアデニンの挿入が生じた。
- 野生型と *rinG2* 変異タンパク質のアミノ酸配列比較。変異により 199 アミノ酸のタンパク質となり、そのうち 198 番目のアミノ酸までが野生型と同じ配列である。
- 抗 *RIN* タンパク質抗体によるイムノブロット解析。成熟果実から核タンパク質を供試。 *rinG2* 変異タンパク質の分子量 23 kDa が検出された。

(4) *RIN* 遺伝子について

トマトにおいて自然突然変異 *ripening inhibitor (rin)* を保持すると果実の成熟が全く進行しない。その原因遺伝子は MADS ボックス転写因子をコードする *RIN* (Soly05g012020) として同定された (Vrebalov J et al. Science. 2002 296:343-6)。本遺伝子は果実の発達段階において、成熟開始前にはほとんど発現がなく、成熟開始期から強い発現が見られる。*RIN* タンパク質は転写活性化機能を有し、TAGL1 や FRUITFUL1、FRUITFUL2 といった MADS ボックス転写因子と複合体を形成して成熟期のエチレン生産上昇や赤色素リコピンの生産に関わる遺伝子の発現制御に関わっている (Fujisawa et al. Plant Cell. 2014 26:89-101)。ただし、*rin* 変異はノックアウト変異ではなく、*RIN* とゲノム上の隣に位置する *Macrocalyx (MC)* 遺伝子とが融合した mRNA を発現し、産生される融合タンパク質が転写抑制機能を

有することから、成熟関連遺伝子の発現を積極的に抑制することで、成熟が開始しない。図 2 に示す C 末端ドメインを欠く *rinG2* 変異タンパク質を発現する果実は、成熟が開始して橙色の外観を示すが、軟化が大きく遅れる。この *rinG2* 変異体は、閉鎖系栽培室における栽培で、果実以外の器官において形質の変化は観察されない。なお、前述の自然突然変異 *rin* を持つ植物では果実以外の形質にも変化が見られ、がく片が巨大化する (*Macrocalyx* 形質)、あるいは果柄の離層 (ジョイント) 形成が不十分になる、といった特徴が示される。これは *rin* 変異による 1.7 kb の欠失が、*RIN* の最終エクソンだけでなく、隣接する *MC* の発現調節領域を含んでいるために *MC* の発現の低下を引き起こしている。つまりこれらの果実以外の形質の変化は専ら *MC* の発現低下により生じた現象で、*RIN* が影響しているわけではない (Nakano et al. Plant Physiol. 2012 158:439-50)。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

pZK_AtU6gRNA_FFCas9 (由来の詳細は、次項に記載)

(2) 特性

pZK_AtU6gRNA_FFCas9 のバックボーン領域の由来は pZP202 (Hajdukiewicz et al. Plant Mol Biol. 1994 25:989-94) である。pZP202 は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の DNA 複製開始点である pVS1 ori と、大腸菌の DNA 複製開始点である pBR322 ori を持つ 2 本鎖環状 DNA であり、微生物においてスペクチノマイシン耐性を発現し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。本ベクターを有するアグロバクテリウムの感染により、基本的に右側境界配列 (RB) と左側境界配列 (LB) に挟まれた領域の DNA (T-DNA 領域) が宿主植物の染色体に伝達される。T-DNA 領域以外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入され、ゲノムに組み込まれた DNA のみが後代に遺伝して維持される。

3. ゲノム編集生物の調製方法

(1) トマト細胞内に移入された核酸全体の構成

バイナリーベクターの構成要素は表 1 に記載した。また、ベクター内での T-DNA 領域における供与核酸の構成要素の位置を図 3 に示した。



図 3 本ゲノム編集トマト作出に用いた形質転換用ベクターの T-DNA 領域にあるカセットの構造 (各構成要素は表 1 参照)

(2) 遺伝子組換え生物等の育成の過程

トマトの遺伝子組換えはアグロバクテリウム法により行った。栽培品種「Ailsa Craig」の種子を試験管内で発芽させ、子葉を用意した。組換えベクターを保持するアグロバクテリウムを子葉の切片に感染させ、3日間共存培養した。その後、カナマイシンを含む選抜培地で約1～2か月程度培養し、植物体を再生させた。なお共存培養後の選抜培地は2週間ごとに交換し、その際アグロバクテリウム除菌の目的で抗生剤であるカルベニシリンとオーグメンチンを交互に培地に添加し、アグロバクテリウムの薬剤耐性菌出現を抑制しながら除菌処理を行った。再分化した植物体からゲノムDNAを抽出し、標的配列を含むDNA領域をPCR法により増幅した。変異が生じると予測されるゲノム中の標的配列には、制限酵素 *BbsI* (認識配列: TCATGA) 認識配列が存在するため (図2A)、増幅産物を *BbsI* で処理し、切断されなかった増幅産物を生じた系統は何らかの変異が生じたものとして選抜した。選抜されたDNA断片について、塩基配列解析を行って変異を同定した。同定した変異体のうち、G27#13系統には標的領域にアデニンの1塩基挿入変異がみられた。この再分化当代 (T_0) 植物を閉鎖系栽培室にて栽培し、開花、自家受精をさせて果実を得た。果実から種子を回収する際には、次亜塩素酸ナトリウムを含む漂白剤で種子を洗浄し、除菌を行った。種子を播種して得られた T_1 植物について、葉からDNAを抽出し、遺伝子型の確認とT-DNAの保有について調査を行い、変異をホモに保有しかつT-DNAを保有しない系統の中から、開放系で栽培する候補系統として「G27#13-15」系統を選抜した (確認の方法については後述)。この変異植物系統群の観察から、ホモに変異を有する系統の果実では、成熟に伴う軟化が抑制されていることが明らかとなった (後述)。

G27#13-15の T_2 世代種子由来の実生全体からDNAを抽出し、pZK_AtU6gRNA_FFCas9のバックボーン領域に存在する *SpecR* 遺伝子を標的としたPCR反応を行った (図4)。3つの独立した実生からいずれも *SpecR* は検出されなかった。このことから、少なくともG27#13-15の T_2 世代以降の植物体には、遺伝子組換えを行った際に利用した当該ベクターを保有する組換えアグロバクテリウムは、残存しないことが確認された。

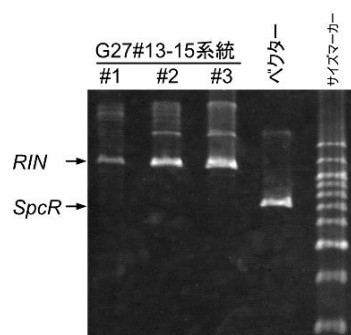


図4 ゲノム編集トマトのアグロバクテリウムは非残存の検証
G27#13-15の T_2 世代の実生3個体の全植物体からDNAを抽出、PCR反応によりベクターのバックボーン上の遺伝子 (*SpecR*) 及びPCRのポジティブコントロールとしてトマト内在の遺伝子 (*RIN*) とを同時に検出した。実生からは *SpecR* が検出されなかったため、組換えアグロバクテリウムは非残存である。

4. 細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無について

(1) PCR法によるT-DNA残存の有無の調査

導入遺伝子の残存の有無を調査するために、図5Aに示す通り、ベクター上の6か所を

増幅するプライマーを設計した。これは、gRNA 領域に 1 か所、Cas9 領域に 3 か所、NptII 領域に 1 か所、さらにベクターのバックボーン領域の SpecR 上に 1 か所である。サンプルは、ゲノム編集により得られた G27#13 (T₀) 由来の T₁ 系統である G27#13-15 (開放系で栽培する候補系統) とその兄弟系統(G27#13-2, 3, 6, 10)、ネガティブコントロールとして親品種である Ailsa Craig、ポジティブコントロールとして形質転換に用いたプラスミドベクターを供試した。また、PCR 反応が正常に行われていることを示すために、同じ反応液に *RIN* 遺伝子の一部を増幅できるプライマーを加え内在遺伝子のコントロールとした (Cas9-F2/Cas9-R2 を除く)。

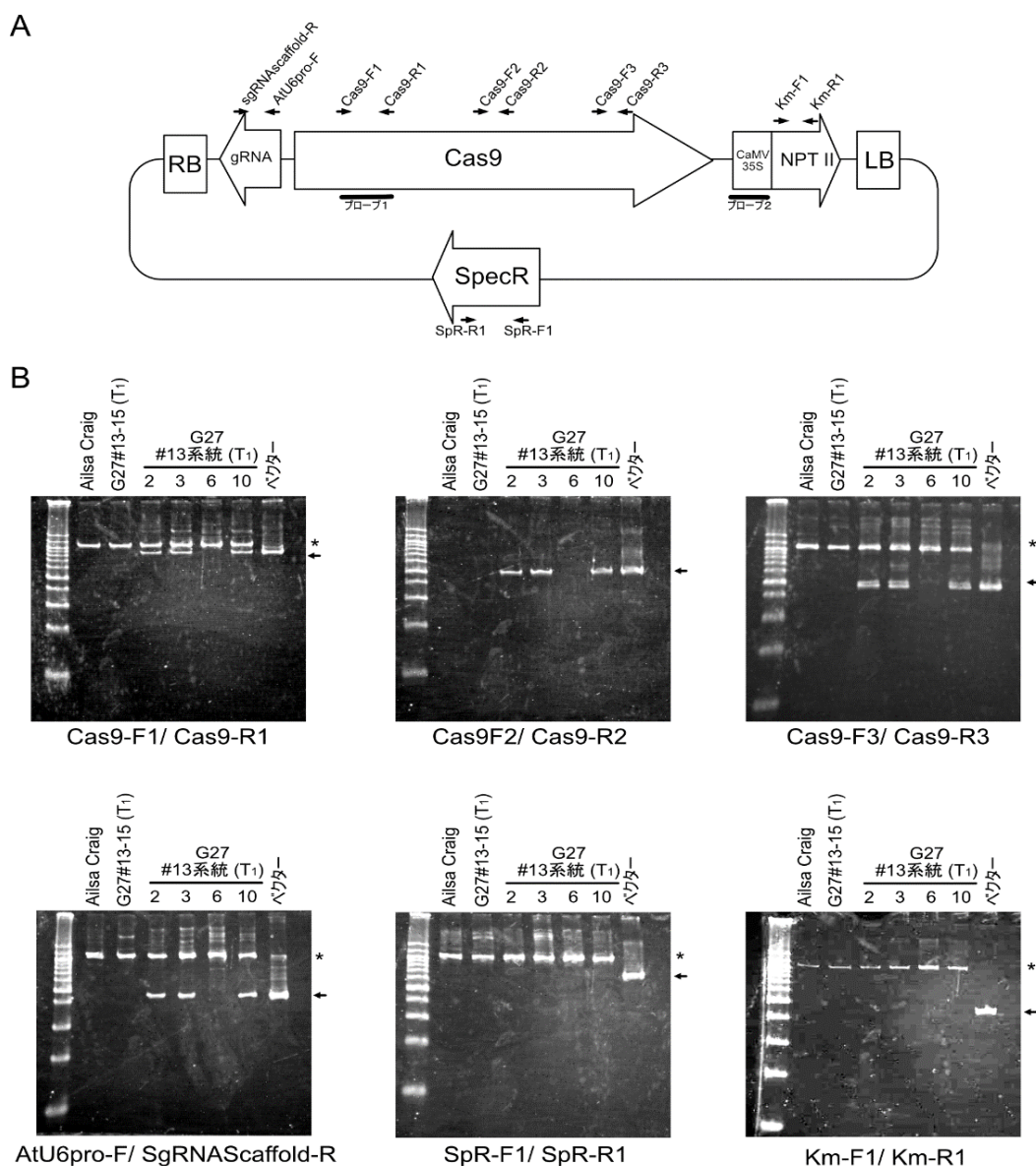


図5 PCR 解析による組換え遺伝子の検出

* : Control ← : Target

A. 検出に用いたプライマーのベクター上での位置。プライマーの配列は表2の通り。

B. PCR 解析。← : ベクター上の配列の増幅産物。* : トマトゲノム内在遺伝子の増幅産物。

図 5B に示す通り、内在遺伝子の PCR 産物が得られることから、ゲノム DNA は確かに反応液に加えられていることが分かる。G27#13-15 系統からはベクター上のいずれの配列も増幅されなかった。一方で兄弟系統では T-DNA が分離して遺伝しており、増幅産物がみられるもの、ないものがあった。しかしながら、いずれの系統も NptII 遺伝子の増幅が見られなかった（使用したベクターからは増幅産物がある）ため、この部分の欠失が疑われた。

そこで、組換えトマトゲノム中の T-DNA の挿入と部分欠失を明らかにするために、G27#13-2 系統（組換え遺伝子保有系統）を供試し、NptII の手前の CaMV35S-P からインバース PCR 法により T-DNA が挿入された境界位置のゲノム DNA を増幅、塩基配列解析を行った。その結果、T-DNA は NPTII 遺伝子の開始点付近を末端としており、直後にトマトゲノム配列が認められた。そのトマトゲノム配列は 6 番染色体の Amine Oxidase 遺伝

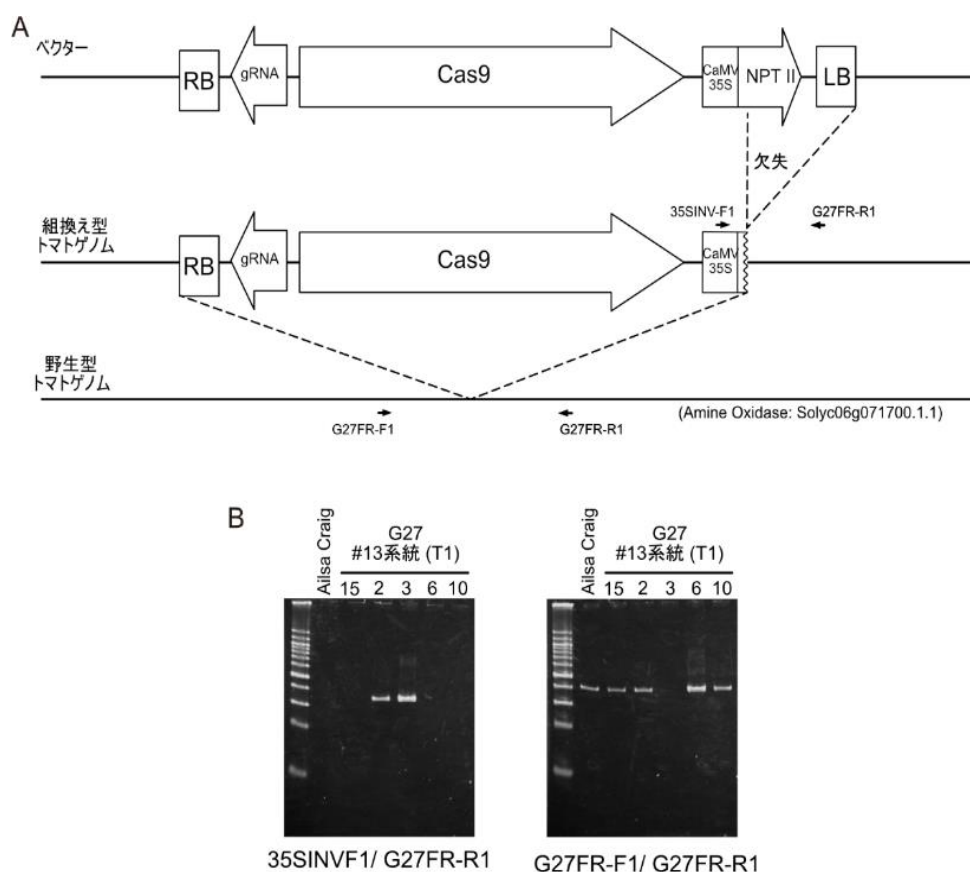


図 6 組換え遺伝子のゲノム挿入位置での PCR 解析

- A. 組換え体に生じた T-DNA の一部欠失の模式図。
- B. PCR 解析。T-DNA とトマトゲノムの境界領域でデザインしたプライマーにより、2、3 系統では PCR 産物が得られ（左図）、T-DNA 挿入が示された。野生型ゲノムを増幅する PCR 解析（右図）から、15、6 系統は野生型ホモ、2 系統はヘテロ、3 系統は組換え型ホモである。10 系統は少なくとも変異型ホモではなく、野生型を持っているが、Cas9、gRNA の増幅産物が得られるのでヌルセグリガントではない。

子(Solyc06g071700.1.1)であった。図 6A の通り、Amine Oxidase 遺伝子側にプライマーを設計し (G27FR-R1)、CaMV35S-P 領域からの PCR 反応を行ったところ、G27#13-2 および 3 系統において増幅が見られ、この位置に T-DNA が挿入されていることが確認された (図 6B)。したがって、NptII の部分を欠失した T-DNA がゲノムに挿入されたと思われる。ただし G27#13-10 系統ではこの PCR 検定で増幅が認められず、さらなる欠失 (CaMV35S の部分) がある T-DNA が挿入されている可能性がある。挿入領域付近のトマトゲノムを増幅するプライマー (G27FR-F1/G27FR-R1) で PCR 反応を行ったところ、G27#13-15 系統では親系統と同様に正常に増幅産物が得られたため、この位置の T-DNA 挿入はない。いずれにしろ、G27#13-15 系統のゲノムには上記の PCR 法で確認できる T-DNA が存在しないことが明らかである。

表2 T-DNA検出に利用したプライマー

	Primer sequence (5' to 3')
AtU6pro-F	TGTTTATCAGCTTACATTTTCTTGAACCGTAGCT
SgRNAScaffold	TAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGA
Cas9-F1	CCATGGATAAGAAGTACTCT
Cas9-R1	TTGAGAAGTGTGAGATCCTG
Cas9-F2	ATCGAGTGTCTCGATTCAAGTTGA
Cas9-R2	CTTACCAACTCATCCACAACCT
Cas9-F3	GAAGGATCTCATCATCAAGCTCC
Cas9-R3	CCTTGAATCACCACCGAGCTGTG
Km-F1	CCTGAATGAACTGCAGGACG
Km-R1	CACGGGTAGCCAACGCTATG
SpR-F1	CAGTCTATGCCTCGGGCATC
SpR-R1	GCTTCAAGTATGACGGGCTG
RIN-F2	CACAACACATTCTTGATCAACT
RIN-R3	ACTCCAAATTCAAAGCATCCATCC
35SINV-F1	TGACGTAAGGGATGACGCACAATCC
G27FR-F1	AACGCATATATAGATGAAAGTAACTTCAG
G27FR-R1	TCAACAAACCGCATGCCATCTCTGACC

(2) サザンブロッティング法による T-DNA 残存の有無の調査

G27#13-15 系統とその兄弟系統 (T₁ 世代) について、サザンブロット法で T-DNA の残存の有無を確認した (図 7)。組換え遺伝子である *Cas9* と CaMV35S プロモーターの部分でプローブを合成し (プローブの位置は図 5A の通り)、それぞれハイブリダイズさせたところ、いずれも G27#13-15 系統では親系統 (Ailsa Craig) と同様に検出されず、PCR 法で組換え遺伝子保持とされた G27#13-2、3、10 系統では組換え遺伝子が検出された。なお、サザンブロット解析のコントロール実験として、トマトゲノムに内在する遺伝子 (*Jointless*; Solyc11g010570) をプローブとしてハイブリさせたところ、G27#13-15 系統と親系統とも、十分なシグナルが検出されたため、G27#13-15 系統は十分な DNA が供試された結果、組換え遺伝子が検出されなかったと結論付けられる。

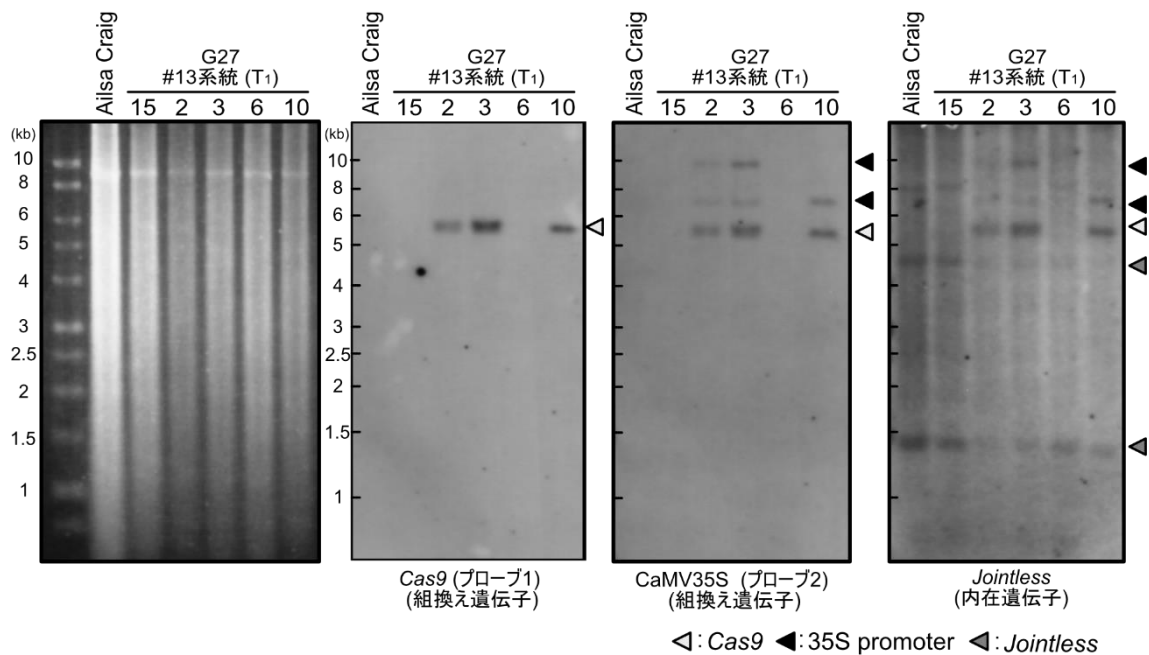


図7 サザンブロット法による組換え遺伝子の検出

T₁世代のG27#13-15系統、2系統、3系統、6系統、10系統についてゲノムDNAをBspHIで切断、組換え遺伝子 (*Cas9*遺伝子、*CaMV35S*プロモーター領域)、及び内在遺伝子 (*Jointless*) をプローブとしてサザンブロット解析を行った。プローブの位置は図4Aに示した。同じメンブレンに、リプローブ処理を行わず順にそれぞれのプローブをハイブリ処理を行った。2、3、10系統では組換え遺伝子が検出されるが、15系統、6系統では検出されない。トマトゲノムの内在遺伝子の解析から、親系統 (Ailsa Craig)、15系統とも十分な量のゲノムDNAを泳動、プロットされていることが分かる。

以上のPCR法とサザンブロット法の結果を総合的に勘案し、G27#13-15系統には細胞外で加工した核酸は残存しないと結論付けられた。

5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) 導入された遺伝子変異

G27#13-15系統における変異はアデニンの1塩基挿入であり、挿入点の直後にストップコドンが生じ、結果として野生型遺伝子のコードする242アミノ酸から199アミノ酸をコード (最後の1アミノ酸は野生型と異なる) する遺伝子に変化した (図2B)。実際に抗RIN抗体によるウェスタンブロット解析により、短絡した翻訳産物が検出される (図2D)。

G27#13-15系統のゲノムDNAについて、オフターゲット解析を行った。オフターゲットが生じる可能性のある類似配列は、Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)を利用して、以下の2種類の条件によりトマトゲノムから抽出した (表3)。

条件1: Mismatch number 2塩基以下、DNA Bulge Size 2塩基以下

条件2: Mismatch number 3塩基以下、DNA Bulge Size 1塩基以下

上記の条件で 15 か所の領域をピックアップし（表 3 実験番号 1～15）、Ailsa Craig と G27#13-15 系統のゲノム DNA を PCR 増幅、それぞれ塩基配列解析を行った。いずれの配列でも Ailsa Craig と G27#13-15 との間で塩基配列の違いは見出されなかったため、オフターゲット変異は生じていないと結論付けた。

表 3 標的配列に対してオフターゲットになりうる候補配列（Cas-OFFinderによりトマトゲノムより抽出）

実験番号	DNA	Chromosome	Position	Direction	Mismatches	Bulge Size
標的配列	TGAACAGCCTTCTCATCATGAGG	SL2.40ch05	5225964	-	0	0
1	TGAACAcCCTTCaCATTCCATGTGG	SL2.40ch01	57114745	+	2	2
2	TGAAaAGCCaTCTCtCATGGGG	SL2.40ch01	79590930	-	3	0
3	aGAACTAGCtTTCTCATCATcAGG	SL2.40ch02	1380493	+	3	1
4	TtAACgcCCATTCTCATCATGTGG	SL2.40ch03	34040169	-	3	1
5	TGGAaAaCtTTCTCATCATGGGG	SL2.40ch05	35318584	+	3	1
6	TGGAAGAGCtTgCTCATCATGGGG	SL2.40ch05	44389075	-	3	1
7	TGAACgGCCagCTCATCAATGTGG	SL2.40ch06	44287266	+	3	1
8	TGcACAGCCTTCTCAaCtTGTGG	SL2.40ch07	3073106	-	3	0
9	aGAACAaCCTTCTCAATCATaTGG	SL2.40ch07	10368473	+	3	1
10	aGAACTAGtCTTCTCATCATcAGG	SL2.40ch09	47325595	+	3	1
11	TGAAaAGCCTTCaCATtATGAGG	SL2.40ch10	21827942	+	3	1
12	TGACACAGaCtTtTgATCATGTGG	SL2.40ch10	13517061	+	3	1
13	TtAACAGCCTCaaTCATCATGGGG	SL2.40ch10	33229113	-	3	1
14	TtAACAGCCTTACTCtTcTG GGG	SL2.40ch10	44367577	+	3	1
15	TtAACAGCCTTACTCtTcTG GGG	SL2.40ch10	46209210	+	3	1

（２）導入された遺伝子変異により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容
ゲノム編集トマト G27#13-15 系統を閉鎖系栽培室内にて育成し、植物体の生育特性、果実の性状について評価した。親系統（Ailsa Craig）と比べて草型、草丈等に明確な差異は見られなかった。花についても、葯筒が開く、あるいは柱頭が葯筒から外に出る、といった他殖性が増すような変化は見られない。果実は親系統と変わりなく着果、肥大した（図 8）。

果実の成熟開始以降は G27#13-15 系統は親系統と異なる性質を示した（図 9）。まず、果皮色がオレンジ色を示し、親系統の赤色から大きく変化した。G27#13-15 系統ではリコピン蓄積量が低下し、 β -カロテンの蓄積が上昇していた（表 4）。果実の軟化の進行が遅くなり、収穫後 10 週間には親系統の果実は萎凋が著しいのに対し、G27#13-15 系統の果実は外観を維持していた（図 8 及び図 9A）。また、成熟を進行させる植物ホルモンであるエチレンに関しては、親系統では成熟期にその発生が著しく増加するのに対し、G27#13-15 系統では成熟開始後に増加は見られるもののその発生量は著しく低下していた（図 10）。

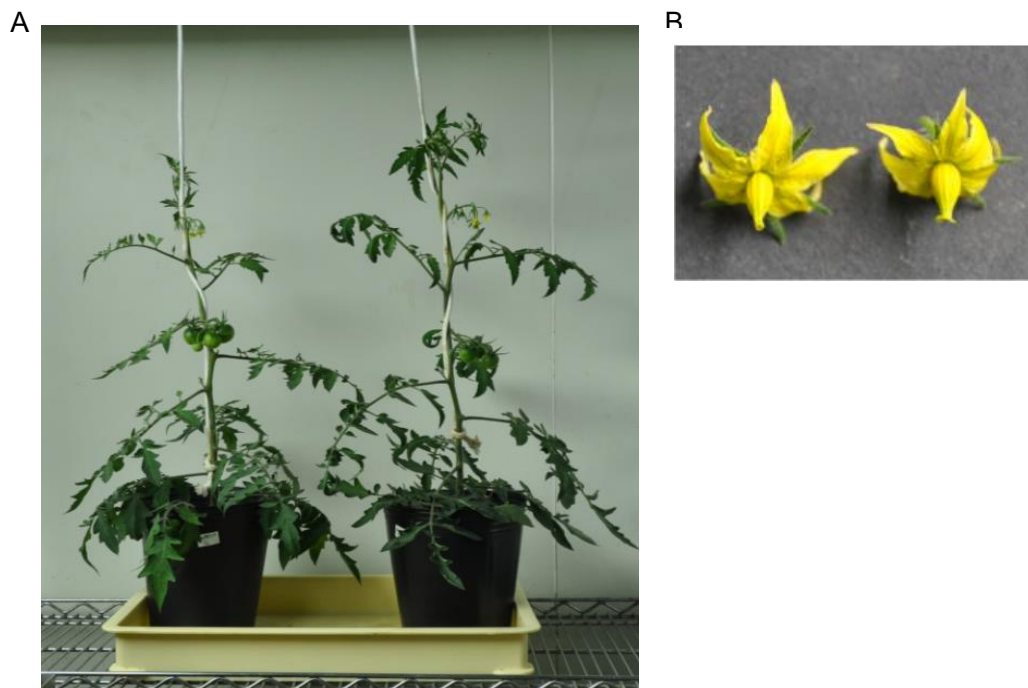


図8 ゲノム編集トマトの生育特性（左：G27#13-15 右：Ailsa Craig）

- A. 閉鎖系栽培室内での生育状況。
 B. 花の形状。G27#13-15の花に他殖性が増すような形態変化（葯筒が開いたり柱頭が葯筒から外に出たり）は見られない。

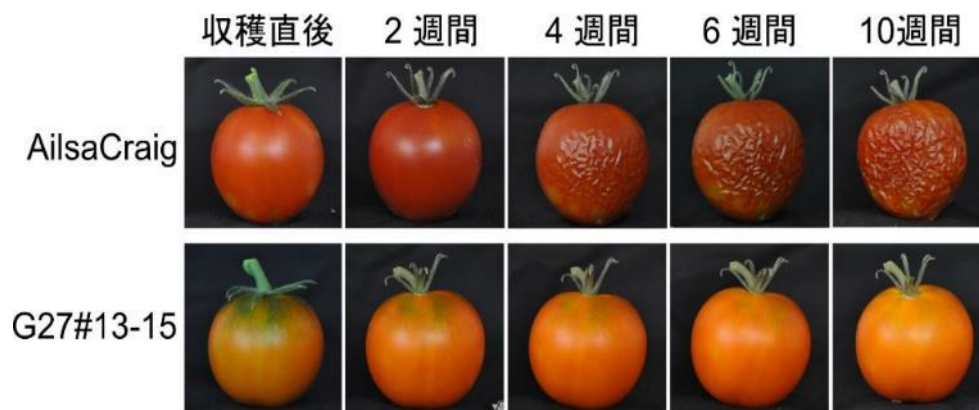


図9 ゲノム編集トマトの保存期間における変化

成熟開始から7日後の果実を収穫し、室温で保存して変化を観察した。

表4 ゲノム編集トマトのカロテノイド蓄積量

	リコピン	β -カロテン
Ailsa Craig	269.2(61.6)	23.9(3.0)
G27#13-15	29.5(20.6)	29.0(2.0)

括弧内は標準誤差を示す。単位：nmol/g（成熟開始7日後の果実）

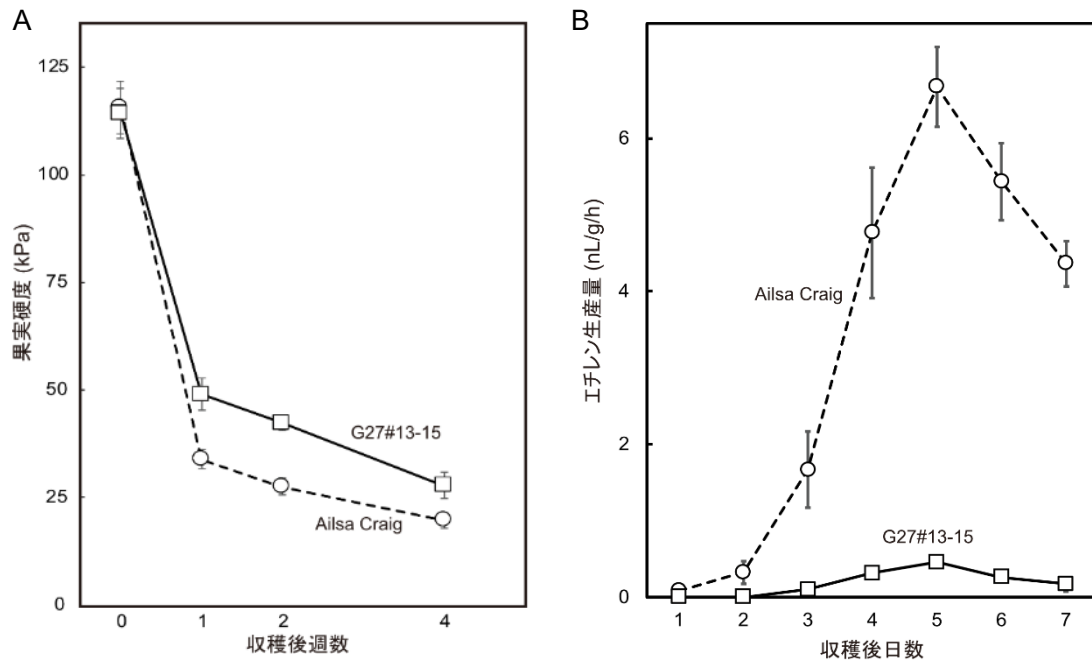


図10 ゲノム編集トマトの果実の特性

- A. 果実硬度の経時変化。成熟開始から7日後の果実を収穫し、室温で保存して変化を観察した。
 B. 果実のエチレン生産量の変化。成熟直前の果実を収穫して毎日エチレン発生量を測定した。

トマト果実のアレルゲンとして International Union of Immunological Societies にリストされている7種のタンパク質 Sola 1 1~7 (https://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Solanum+lycopersicum+%28Lycopersicon+esculentum%29)が知られており、加えて PG2a もアレルゲンの可能性が示唆される(Włodarczyk et al. Antioxidants. 2022 11: 644)。成熟果での mRNA の発現をトランスクリプトーム解析 (Ito et al. Plant Physiol. 2020 183:80-95)から比較した(図 11)。いずれのアレルゲンも親品種 (WT) と比べ、G27#13-15 系統で有意な発現増加がみられず、むしろ Sola 1 6、Sola 1 7、PG2a では発現が大きく低下しており、少なくとも変異によりアレルゲン性が高まるとは考えにくい。

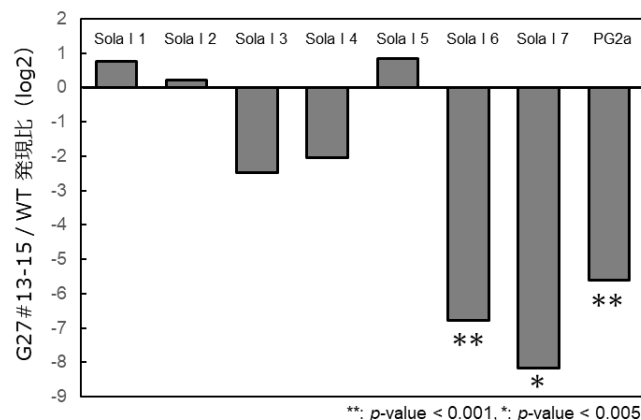


図 11 ゲノム編集トマトのアレルゲンタンパク質遺伝子の発現解析

成熟期果実のトランスクリプトーム解析の結果(Ito *et al.* 2020)から、G27#13-15 と親系統 (WT) のアレルゲンタンパク質遺伝子の発現比を抽出した。

また、トマトの有害物質であるトマチンについては、市販トマトで測定された例では赤熟果で 0.3-2.8 mg/kg が検出されている (Friedman J Agric Food Chem.2002 50: 5751-80)。本ゲノム編集トマトの完熟果におけるトマチン量を測定したところ、2 mg/kg が検出され、この範囲内であった。マウスの腹腔内にトマチンを投与した場合の半致死量は体重 1 kg 換算で 32 mg であり、50 kg のヒトに当てはめると 1600 mg (本ゲノム編集トマト 800 kg 相当) であり、本ゲノム編集トマトを現実的な食用としたときに健康に影響が出ることは考えにくい。

以上に示した G27#13-15 系統の果実特性は、トマト育種で重要視される高日持ち性改善に寄与できる可能性があり、G27#13-15 系統に既存の優良品種を交配して高日持ち性を示す実用品種が育成することが可能なのかを検証する必要がある。そのために実際の栽培環境で G27#13-15 系統と既存品種の交配で得られた後代系統を栽培し、この高日持ち性が発揮できるのかを確認するため、限定されたほ場内で栽培し、果実特性を評価する。

別紙 2 限定された圃場に関する情報

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等を予定している、カゴメ株式会社が総合研究所に保有する限定された圃場の情報を以下に示す。

◎ 受容環境（圃場）に関する情報

1. 限定された圃場の所在地等

（1）名称

総合研究所 圃場

（2）所在地

栃木県那須塩原市西富山 1 7

（図 1）

2. 施設概要

栽培試験を行う圃場は総合研究所内の圃場の一区画である（図 1 の黄色部分）。以下、圃場と表記するのはこの一区画のみを指し、その他の一般圃場として使用する区画は含まないこととする。部外者の立入りを制限するため、当該圃場の周囲全体に金属製のフェンス、立入禁止であることを記載した標識を設置している。また、総合研究所全体は金属製のフェンス及び金属製施錠付き扉で囲われている。総合研究所の要所は防犯及びモニター用のビデオカメラが設置されており、終日録画している。

3. 面積

（1）全体の面積は約 2.9a

4. 限定された圃場の周辺環境

（1）地形

栃木県那須塩原市内、市街地に位置する

（2）周辺の土地利用状況

当該圃場は総合研究所の敷地内にある。圃場の外周から総合研究所の敷地境界まで最短で約 8m である。なお、敷地境界最短の側の圃場外周及び敷地内周には植栽がなされている。

（3）周辺の環境保護区の名称と限定された圃場からの距離

半径 1km 圏内にある環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境

保全地域、自然環境保全地域)はない。

(4) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

当該圃場は、那須塩原市が作成した「防災ハザードマップ」において、浸水想定区域に指定されていない。

(5) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

当該圃場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、鳥類による被害は報告されていない。ただし、果実の成熟から収穫までの期間中、必要に応じて防鳥網の設置等を行い、被害を防ぐ。また、当該圃場周囲には金属製のフェンス及び金属製施錠付き扉が設置されており、獣害は発生していない。

(6) 圃場周辺の生物相

① 遺伝子組換え植物を圃場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

② 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
交雑可能な近縁野生種はない。

5. 栽培管理等

(1) 栽培略歴

当該圃場において過去5年間に組換え植物或いはゲノム編集植物を栽培したことはない。

(2) 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、速やかに対策を講じる。

(3) 栽培終了後の利用計画(ボランティア植物の監視を含む)

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに当該圃場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。

6. 圃場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

届出書に記載された圃場内でのみ栽培試験を実施する。

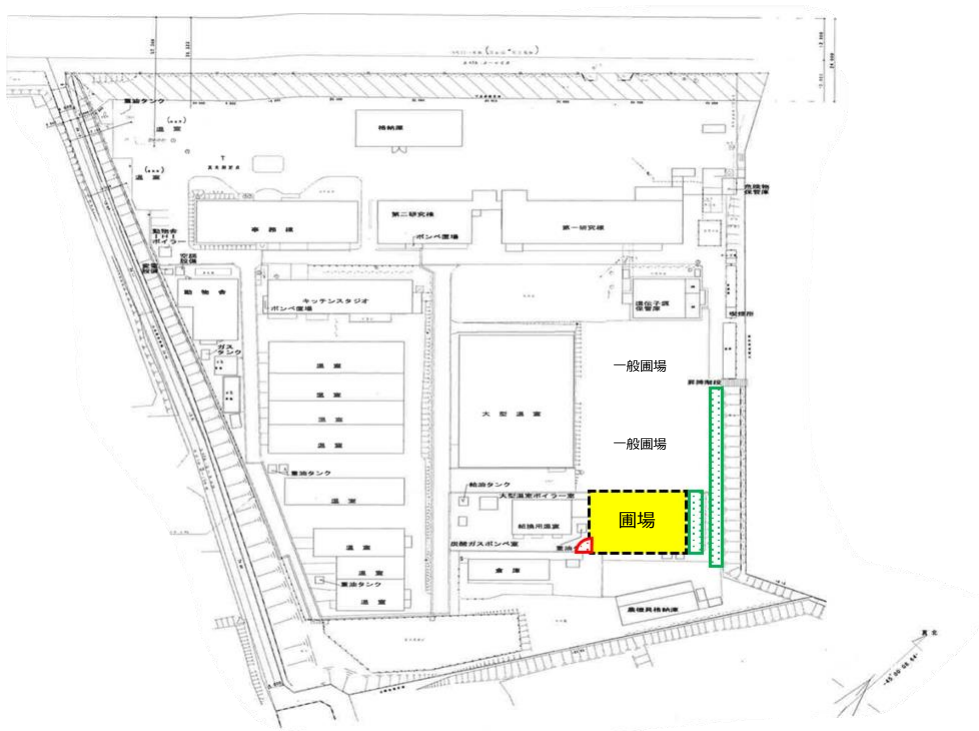


図1 総合研究所敷地内のゲノム編集トマトを栽培する圃場（黄色）の配置図及び施設写真。当該圃場周囲の点線は金属製フェンスを示す。圃場西側には金属製施錠付き扉（赤色）を設置し、立入禁止であることを記載した標識を正面に掲示している。敷地境界最短の側の圃場外周及び敷地内周には植栽がなされている（緑色）。