

① 品目・品種名及び概要（利用方法及び利用目的）

トマト（英名:tomato、学名:*Solanum lycopersicum* L.）。調理用トマト品種シシリアンルージュ CF の種子親系統を改変した。

改変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。当該酵素は、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 1）。GAD は、C 末端に自己阻害機構領域を有しており、通常状態ではこの自己阻害領域により非活性型である。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。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。トマトは 5 つの GAD 遺伝子（*SIGAD1-SIGAD5*）を有している。このうち *SIGAD3*（Solyc01g005000）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、C 末端領域に存在する自己阻害領域の切断除去を行い GAD の活性を上昇させ、トマト赤熟果実における GABA 蓄積量を向上させた。

品種改良のための親系統として利用し、作出した F₁ 系統は食用として使用する。従来の食品の利用方法と相違点はない。

② 利用したゲノム編集技術及び遺伝子改変の概要

アグロバクテリウム法により、調理用トマト品種シシリアンルージュ CF の種子親

系統のゲノムへ 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む CRISPR/Cas9 発現カセットを形質転換し、変異を導入した。標的配列は、*SIGAD3* (Solyc01g005000) の C 末端領域に存在する自己阻害領域の直前である。CRISPR/Cas9 導入 57 系統のうち 17 系統について、シーケンサーにて塩基配列を解読し、標的配列に変異導入があることを確認した。そのうち T₀ 世代の GABA 高蓄積系統をそれぞれ自家受粉し、T₁ 世代において変異のホモ化が確認され、種子数や GABA 含量等の形質の優れた系統#87-17 を選抜した。ゲノム編集系統#87-17 では 1bp の挿入によるフレームシフトにより自己阻害領域が除去され、GAD の活性が上昇し、トマト赤熟果実における GABA 蓄積量を向上させた。赤熟果実の GABA 含量は対照区の 5~6 倍に達していた (別添資料 1・図 2 ; 酵素法; Jakoby, 1962, Koike *et al*, 2013; Akihiro *et al*, 2008)。さらに世代を促進し、T₂ 世代においても対照区よりも GABA 含量が上昇していることが確認された (別添資料 1・図 2 ; 酵素法; Jakoby, 1962, Koike *et al*, 2013; Akihiro *et al*, 2008)。以上の 3 世代 (T₀, T₁, T₂) にわたる調査により、これら形質は遺伝的に安定であると考察される。

③ ゲノム編集技術による DNA の変化がヒトの健康に悪影響を及ぼす新たなアレルゲンの産生及び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>) および Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder>) の 2 つを用い、オフターゲット候補を検索した。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箇所のおフターゲット候補が示された。これらの中から両者で共通して検索されたおフターゲット候補について、変異の有無を調査したところ変異の挿入は確認されなかった。

また新たなアレルゲンの産生の有無を調査するため、標的配列およびおフターゲットにおいて変異が確認された箇所について、この変異の挿入により、10 アミノ酸以上の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、国立生物工学情報センター (NCBI) の Open Reading Frame Finder を使用して検索を行った。その結果、標的変異の挿入により発生すると予測される ORF が目的のものを含め2つ検索された。標的変異の挿入の前後と、また前述で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メリーランド大学が中心として作成された The COMprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE)

(<http://db.comparedatabase.org/>) およびネブラスカ大学リンカーン校の FOOD ALLERGY RESEARCH AND RESOURCE PROGRAM (FARRP)のデータベース

(<https://farrp.unl.edu/resources/farrp-databases>) を利用し、アレルゲン解析を行った。両者とも 80 アミノ酸および 8 アミノ酸検索について、デフォルト設定を用いた。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。

またトマトには、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)。トマチンのようなステロイドグリコアルカロイドのその窒素源は、アミノ酸ではなくアンモニアに由来している。またトマチンはコレステロールから生合成される経路で合成され、一方 GABA は TCA 回路を介して生合成されたグルタミン酸の脱炭酸によって合成される。このことからトマチンと GABA の生合成経路は直接結びつかないた

め、トマチンが増加しているとは考えられない。実際にゲノム編集技術による改変により、トマチンが増加しているかどうかを調査したところ、本ゲノム編集系統#87-17の赤熟果実において、トマチンは検出できなかった（(一財)・日本食品分析センターへ委託。検出限界 1 ppm、質量分析法液体クロマトグラフィー法）。またトマチン以外の既知有毒性物質はアルカロイドの一種が多く、赤熟果実中に数 mg/kg とかなり微量である（Romera-Torres *et al.*, 2018）。トマチンが増加していないことから、トマチンの類縁体その他アルカロイドについても同様に増加していないと推察される。

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。

※代謝系に影響を及ぼす改変を行った場合は、標的とする代謝系に関連する主要成分（栄養成分に限る）の変化の概要

機能性表示食品制度が 2015 年 4 月に施行されて以降、様々な機能性表示食品が流通し、GABA の注目度は高まっている（堀江ら、2019; 阿部、2019）。そのため、本届出で提出するトマトは、グルタミン酸脱炭酸酵素（GABA 合成酵素、GAD）遺伝子を改変し、GABA の蓄積量を増加させることを目的とした。すでに市販されている GABA 高蓄積トマトは、栽培方法の工夫によって収量性を落として高い GABA 含量を可能にしている（Saito *et al.*, 2008）のに比べて、本系統は通常の栽培でも GABA 含量が高いところに利便性がある。また、#87-17 の GABA 含有量は、T₂ 世代で平均 120.3mg/100gFW 含まれており、果実 1 つで 40~50mg 程度となる。また GABA のヒトでの摂取効果や毒性として、GABA を含む機能性表示食品の評価シートで引用されている論文を調査したところ、10~360mg の GABA を 4 週間~3 ヶ月継続して摂取していたが、いずれの報告においても健康被害は報告されていなかった。また、

GABA 1g/日を4週間摂取した際にも、臨床上問題となる変動が見られなかったことが報告されている（坂下ら、2016）。GABAは生体内で主としてアミノ酸転移反応によって、コハク酸セミアルデヒドとなり、次いでコハク酸となり、TCA回路に入り代謝される。また動物試験によると、GABA 200mg/kg 及び 213.6mg/kg を静注したところ、投与後2時間までに約40%が未変化体のまま尿中に排泄されたことから、ヒト生体内においても、半分程度は未変化のまま尿中に排泄され、残りはTCA回路にて代謝されることが考えられる（ガンマロン錠 250mg 医薬品インタビューフォーム）。上市の際は、文献等に基づく食品からの摂取量や毒性情報を踏まえて成分等の摂取目安量を確認し、一般的な当該食品の摂取量で成分等の摂取目安量を超過する場合は、当該食品の摂取目安量を表示する。

またその他代謝に関わる成分として、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1）ことから、T₂世代のゲノム編集系統#87-17において、GABA量の増加によりグルタミン酸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、ゲノム編集系統#87-17と野生型とでは、GABA量が増加していたものの、グルタミン酸量に差は見られなかった（別添資料1・図3）。糖、有機酸、必須アミノ酸、タンパク質、カロテノイドなどについては、実験品種を利用して高GABA含有量トマトを作出した際に調査したが、GABA以外有意差はなかったことから（Lee *et al*, 2018; 一部データ非公開）、本系統も同様であると推察する。

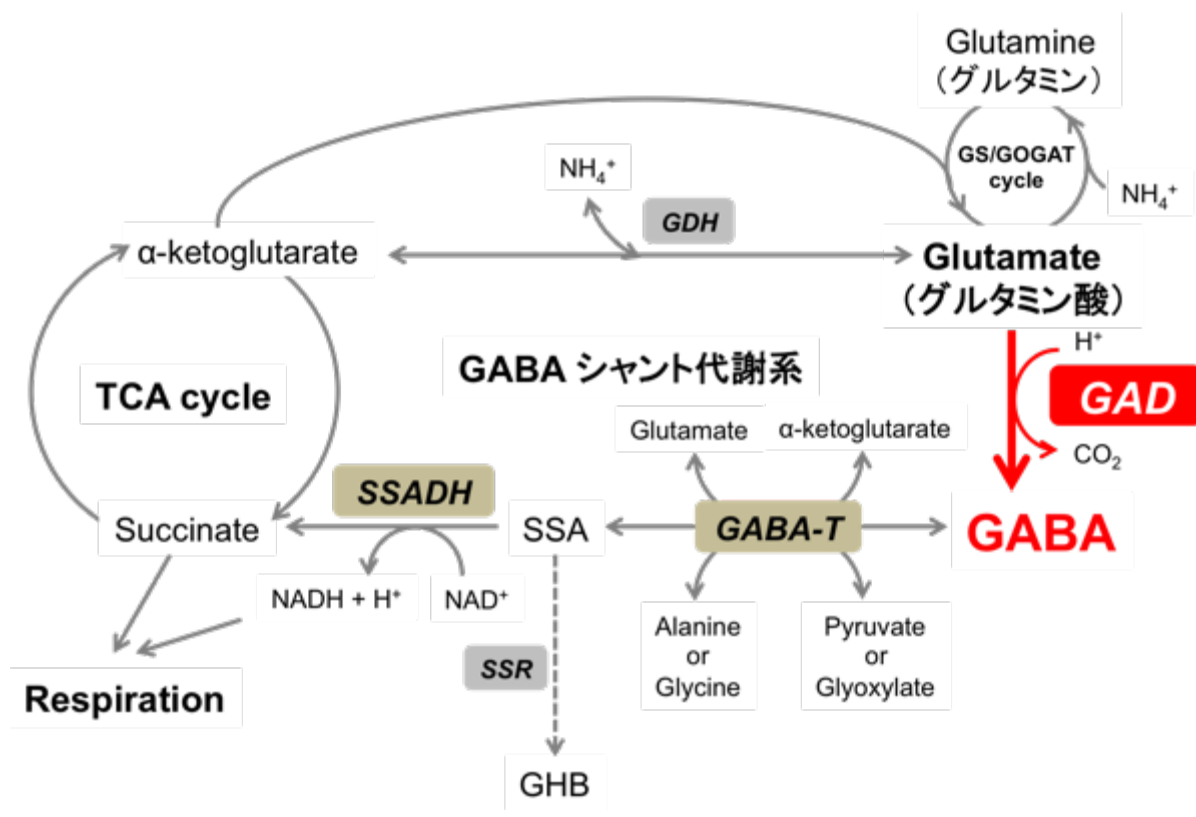


図1 高等植物におけるGABA代謝経路

グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)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。

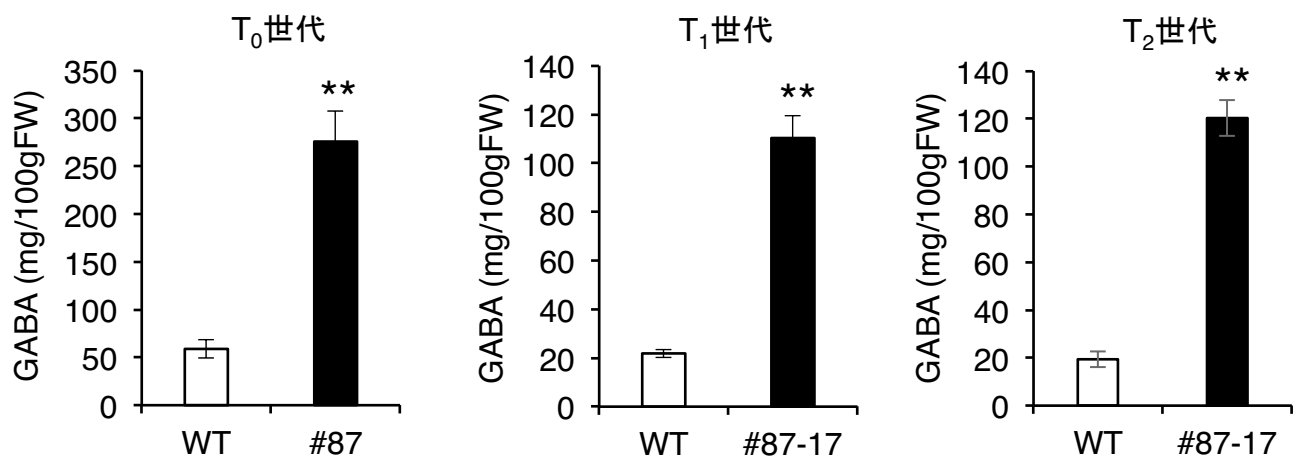


図2 赤熟果実におけるGABA含量(T₀世代からT₂世代)

GABA含量は、酵素法にて測定した。WTは調理用トマト品種の野生型、変異なしを表す。#87はゲノム編集当代(T₀世代)、#87-17はその後代(T₁世代およびT₂世代)系統を表す。#87(T₀世代)は複数の変異型をキメラに有し、#87-17(T₁世代およびT₂世代)は1塩基の挿入変異をホモで有する。エラーバーは、標準誤差を表す(n ≥ 3)。アスタリスクは対照区(WT)と比較して、有意差があることを示す(the Tukey-Kramer's test、*P < 0.05 and **P < 0.01)。

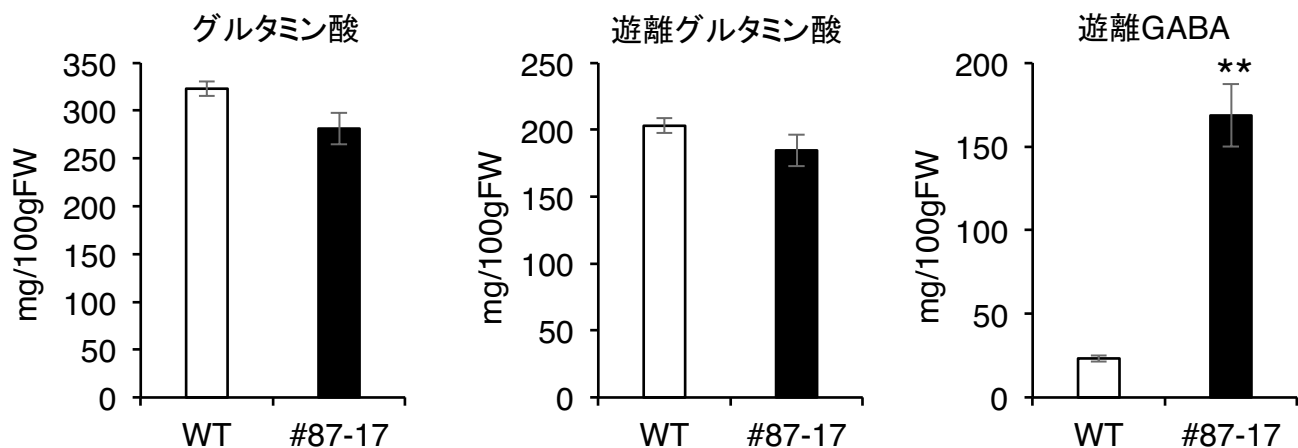


図3 赤熟果実におけるグルタミン酸、遊離グルタミン酸、GABAの含量(T_2 世代)
グルタミン酸、遊離グルタミン酸、GABAの含量は、日本食品分析センターにて測定した。
WTは野生型、変異なしを表す。#87-17はゲノム編集系統(T_2 世代)を表し、1塩基の挿入
変異をホモで有する。エラーバーは、標準誤差を表す (n = 3)。アスタリスクは対照区 (WT)
と比較して、有意差があることを示す (the Tukey-Kramer's test, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$)。