

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.)。トマト品種エスプロッソ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。当該遺伝子の機能は、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アミノ酸配列領域の欠失を行い 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。本届出トマトは、以前ゲノム編集技術応用食品として届出を提出したトマト (#87-17)と比較し、元来リコピン量や水分量が多く生食にも適しているといった品種としての違い以外で異なる点はない。

品種改良のための親系統として利用し、作出した F<sub>1</sub> 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、トマト品種エスプロッソ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 6 系統について、サンガーシーケンス法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 4 系統について T<sub>1</sub> 世代を育成し、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#206-4 を選抜した。ゲノム編集系統#206-4 では、1 bp の塩基が挿入されている。この変異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 蓄積量を野生型と比較して有意に向上させ、T<sub>1</sub> 世代では赤熟果実の GABA 含有量は対照区と比較して 5.8 倍に達していた (図 2、酵素法; Jakoby, 1962, Koike *et al*, 2013; Akihiro *et al*, 2008)。さらに自家受粉し世代を促進し、T<sub>2</sub> および T<sub>3</sub> 世代においても対照区の 4.0~4.7 倍の GABA 含量が上昇していることが確認された (図 2 ; 酵素法; Jakoby, 1962, Koike *et al*, 2013; Akihiro *et al*, 2008)。以上の 3 世代 (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>) 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。商品化する後代交配種についても GABA 高蓄積形質の安定性を確認し販売する。

## 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箇所のオフターゲット候補が示された。これらの両方の解析ソフトで共通して検索されたオフターゲット候補及びいずれかの解析ソフトで遺伝子およびその発現に係る領域（エキソン、イントロン、非翻訳領域）を示したオフターゲット候補の計8箇所について、シーケンス解析により塩基配列を確認したところオフターゲット変異は確認されなかった。

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、この変異の挿入により、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、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。標的変異挿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、目的のものを含む新たな2つのORFが確認された。標的変異の挿入の後と、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 2019 database）（<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AllergenOnline, ver.19（<http://www.allergenonline.org/>）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 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。このようにトマチンと GABA の生合成経路は直接結びつかないことから、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#206-4 の赤熟果実において、トマチンは検出限界以下だった（(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、トマチンの類縁体や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。また、2 つの新たな ORF の毒性について調査するため、アミノ酸配列に基づき Uniprot-Swissprot および Uniprot-TrEMBL を用いた BLAST 検索を行なった。その結果、いずれの ORF をクエリーとした場合においても、種々のグルタミン酸脱炭酸酵素（Glutamate decarboxylase）のアミノ酸配列と類似性が認められた。グルタミン酸脱炭酸酵素に関する毒性は報告されておらず、既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった。

以上により、本ゲノム編集トマト中に新たなアレルゲンの産生および毒性物質の増加が生じる可能性は低いことが示された。

#### 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。従来技術を利用して開発された品種で、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、#206-4 の GABA 含有量は、T<sub>2</sub> 世代で 100 g 新鮮重あたり平均 180 mg 含まれており、果実 1 つで 60 mg 程度となる。GABA が含まれる食品の効果についての報告から、GABA の経口摂取により、血圧上昇抑制効果が得られる量が約 30~100 mg であるとする、1~2 果実のトマトを食するだけで効果が得られると考えられる。GABA 含有量が 100 g 新鮮重あたり 30-60 mg 程度と言われる通常のトマト（高田ら、2012）と比較して、無理なく摂取できる量となっている。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、10~360 mg 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 1 g/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基転移反応によって、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、体重 1kg あたり GABA 200 mg もしくは 213.6 mg 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 250 mg 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 (図 1)。そのため、T<sub>2</sub> 世代のゲノム編集系統#206-4 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 (株式会社エンザイム・センサ、酵素法)。その結果、ゲノム編集系統#206-4 と非ゲノム編集系統 (WT) 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 (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 以外の成分に有意差は見られなかったことから (Lee *et al*, 2018; 一部データ非公開)、本系統も同様であると推察される。

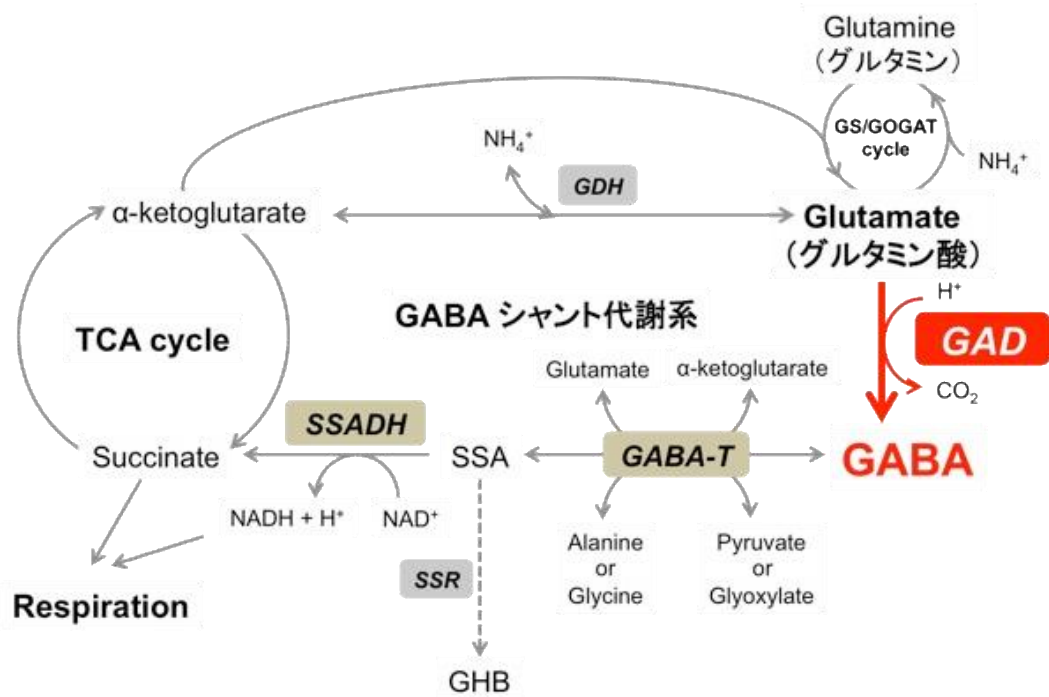


図1 高等植物におけるGABA代謝経路

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。

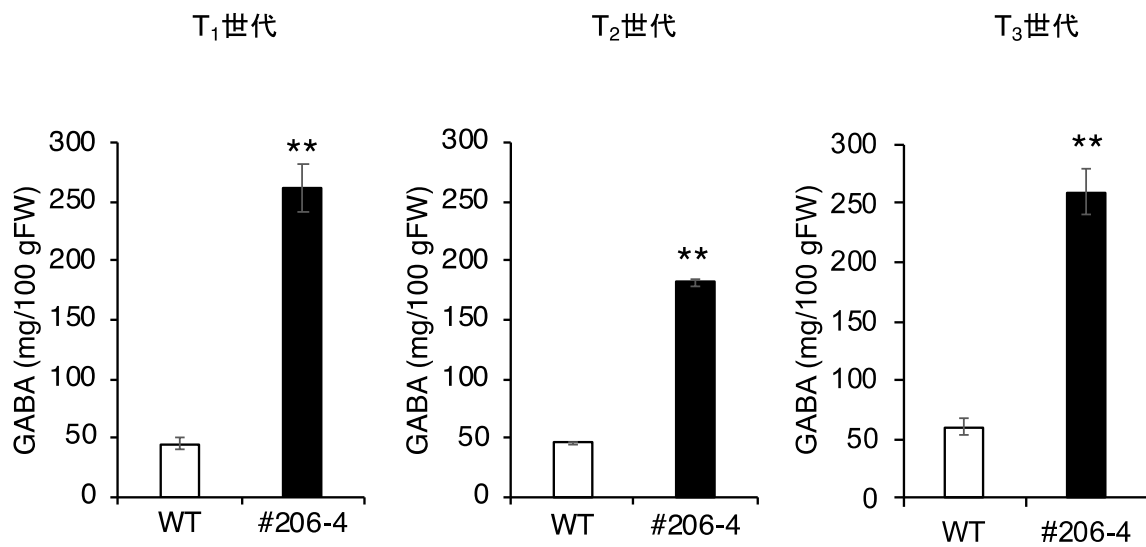
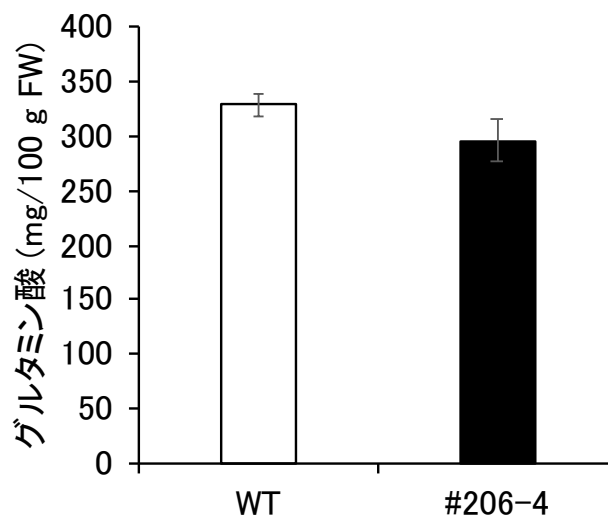


図2 赤熟果実におけるGABA含量(T<sub>1</sub>世代からT<sub>3</sub>世代)

GABA含量は、酵素法にて測定した。WTはトマト品種の野生型、変異なしを表す。#206-4は#206を自殖して得られた後代(T<sub>1</sub>世代、T<sub>2</sub>世代およびT<sub>3</sub>世代)系統を表し、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(Student's *t* test、\**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01)。





**図3 赤熟果実におけるグルタミン酸の含量( $T_2$ 世代)**

グルタミン酸含量は、酵素法にて測定した。WTは野生型、変異なしを表す。#206-4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 ( $n = 3$ )。野生株 (WT)と#206-4 ( $T_2$ ) の間でStudent's  $t$  testを行った結果、統計学的な有意差は認められなかった。