

ゲノム編集技術応用食品（トマト）の事前相談に係る確認結果

「ゲノム編集技術応用食品及び添加物の食品衛生上の取扱要領」（令和元年 9 月 19 日付け生食発 0919 第 3 号）に基づき、令和元年 10 月 25 日付けでサナテックシード株式会社より事前相談のあったトマトについて、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会新開発食品調査部会遺伝子組換え食品等調査会の委員及び参考人の意見を聴き、以下の内容について確認した。

1. 提出資料の確認

(1) 開発した食品の品目・品種名及び概要（利用方法及び利用目的）

【グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の一部を改変し GABA 含有量を高めたトマト】
調理用トマト品種シシリアンルージュ CF の種子親系統を用いて、GABA を合成するグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）の活性を上昇させることで、GABA 蓄積量を向上させたものである。

(2) 利用したゲノム編集技術の方法及び改変の内容

- ①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 の親系統のゲノムに、CRISPR/Cas9 発現カセットを組み込んだベクターを移入した。
- ②CRISPR/Cas9 を導入した 57 系統のうち 17 系統について、塩基配列解析により標的配列に変異があることを確認した（T₀世代）。
- ③標的配列に変異導入が確認された T₀ 世代をそれぞれ自家受粉し、得られた T₁ 世代において形質の優れたホモ系統（#87-17）を選抜した。
- ④ゲノム編集系統#87-17 では 1 塩基の挿入によるフレームシフトにより、GAD の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 蓄積量が向上した。

(3) 外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認に関する情報

- ①ゲノム編集当代においては CRISPR/Cas9 発現カセットがゲノムに形質転換されていることを確認した。
- ②選抜した系統（#87-17）において、PCR 法及びサザンハイブリダイゼーション法を用いて、ゲノム上に組み込んだ CRISPR/Cas9 発現カセットが残存していないことを確認した。

(4) 確認された 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含有する既知の毒性物質の増加を生じないことの確認に関する情報

- ①オフターゲット候補の探索及び確認
・ CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder を用いて候補配列として検索したところ、

CRISPRDirect においては、3塩基までのミスマッチを含む配列を候補配列として検索した結果、15箇所の候補が示され、Cas-OFFinder においては、bulge size を2、ミスマッチを3塩基に絞り検索した結果、55箇所の候補が示された。

・両者で共通して検索された候補配列について、塩基配列解析によって、該当配列にオフターゲット変異がないことを確認した。

②オープンリーディングフレーム (ORF) 解析によるアレルゲン性及び毒性の確認
・アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) の検索プログラムを利用して、標的配列の変異により10アミノ酸以上で新規に発生の可能性がある ORF を抽出したところ、新規に発生の可能性のある ORF が当該遺伝子の変異を含め2つ予測された。

・上記2つの配列について、複数のアレルゲンデータベースにおいて検索したところ該当する新規にアレルゲンは存在しなかった。

③トマチンの増加の確認

・既知の毒性物質として知られている糖アルカロイドのトマチンについて、#87-17の赤熟果実において高速液体クロマトグラフィー/質量分析法で検査を実施したところ、トマチンは検出できなかった。

(5) 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を行ったものについては、**標的とする代謝系に関連する主要成分 (栄養成分に限る) の変化に関する情報**

①代謝系に影響を及ぼす改変を行った。

②GABA は GAD の働きによってグルタミン酸のカルボキシル基を除去することで合成される。#87-17のT₂世代において、GABA 及びグルタミン酸量に変化がないか野生型と比較したところ、GABA は有意に増加が認められたが、グルタミン酸量に有意差は確認できなかった。

2. 確認結果

(1) 確認結果の概要

○ 選抜した T₁ 世代 (#87-17 系統) について、PCR 法及びサザンハイブリダイゼーション法により外来遺伝子及びその一部の残存がないことが確認されたことから届出に該当するものと判断した。

(2) 確認結果の詳細 (別添参照)

○ 外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認については、選抜した T₁ 世代 (#87-17 系統) において、PCR 法及びサザンハイブリダイゼーション法を用いて、確認が行われた。これらにより、外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認が適切に行われていると判断した。

○ 確認された 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含有する既知の毒性物質の増加を生じないことの確認については、オフターゲット候補及び標的配列において実施された。複数の検索ツールを用いた

検索において共通して検索されたオフターゲット候補について、塩基配列解析によって、該当配列にオフターゲット変異がないことを確認した。加えて、標的配列の変異により新規に発生の可能性がある ORF を抽出したところ、新規に発生の可能性のある ORF が当該遺伝子の変異を含め2つ予測された。それらについて複数のアレルゲンデータベースにおいて検索したところ該当するアレルゲン及び毒性タンパク質がないことを確認した。

また、既知の毒性物質として知られている糖アルカロイドのトマチンについて、#87-17 の赤熟果実において検査を実施したところ検出限界以下であった。

これらの結果から、新たなアレルゲンの産生や既知の毒性物質の増加は生じてないと判断した。

- 標的とする代謝系に関連する主要成分（栄養成分に限る。）の変化に関する情報については、#87-17 の T₂ 世代において、GABA 及びグルタミン酸量に変化がないか野生型と比較したところ、GABA 含量は有意に増加が認められたが、グルタミン酸量に有意差は確認できなかった。このことから、代謝系への影響について適切に確認が行われていると判断した。

(表1) 確認結果の概要

確認事項	詳細
品種	調理用トマト品種シシリアンルージュ CF
ゲノム編集ツール	CRISPR/Cas9
遺伝子導入方法	アグロバクテリウム法
遺伝子ターゲット領域	グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の自己阻害領域
変更の内容	1塩基挿入によるフレームシフト
外来遺伝子有無確認方法	PCR法、サザンハイブリダイゼーション法 →外来遺伝子のないことを確認
オフターゲット候補探索に使用したツール	CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder
オフターゲット候補探索結果	○CRISPRDirect 検索条件：3塩基ミスマッチ 検索件数：15箇所 ○Cas-OFFinder 検索条件：bulge size:2、3塩基ミスマッチ 検索件数：55箇所
オフターゲット候補の確認	共通して検索された候補配列について、塩基配列解析実施 →オフターゲット変異のないことを確認
オープンリーディングフレーム (ORF) 解析	・標的遺伝子の変異について、アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) の検索プログラムを利用
アレルゲンの確認	・10アミノ酸以上で新規に発生の可能性がある ORF として2候補が検索 ・候補について、The COMprehensive Protein Allergen RESOURCE (COMPARE) 及びネブラスカ大学リンカーン校の FOOD ALLERGY RESEARCH AND RESOURCE PROGRAM (FARRP) のデータベースを利用し80アミノ酸及び8アミノ酸でアレルゲン解析 →該当するアレルゲンがないことを確認
既知の毒性の増加の確認	・トマト既知の毒性物質として知られている糖アルカロイドのトマチンについて、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法で検査を実施 →トマチンの増加がないことを確認 (検出限界以下)
主要成分 (栄養成分の確認)	高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (GABA 及びグルタミン酸含量) →野生型と比較し、 GABA 含量の有意な増加 グルタミン酸の有意差なし

(参考) 事前相談資料の確認事項の主な経緯

日付	事項	備考
令和元年 10月25日	事前相談資料を受理	
	事前相談資料の内容について、専門家の意見を聴き、指摘事項の発出及び事前相談者からの回答を確認	
令和2年 12月11日	遺伝子組換え食品等調査会	非公開(注1)
令和2年 12月11日	結果を事前相談者に連絡	
令和2年 12月11日	届出受理	

(注1) 開発企業の知的財産等が開示され特定のものに不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため。

(別添)

GABA トマト (#87-17 系統) に係る主な確認内容と方法

世代	系統の説明	標的部位の変異導入		外来遺伝子の有無の確認		オフターゲット変異の確認*1	既知毒性の増加の確認*2
		塩基配列解析 (Sanger Sequencing)	PCR 法	サザンハイブリダイゼーション法	塩基配列解析 (Sanger Sequencing)		
T ₀	6系統選抜 (#87、#88、#110、#139a、 #139b、#191)	○	-	-	-	-	
T ₁ (T ₀ 世代の自殖)	各系統から30株程度育成 (#87-17 系統を選抜)	○	○	○	○	-	
T ₂ (#87-17 系統の 自殖)	-	-	-	-	-	○	

*1 CRISPRdirect 及び Cas-OFFinder を用いてオフターゲット候補配列を検索し、塩基配列解析によって確認

*2 糖アルカロイドの一種でトマトでの含有が知られているトマチンについて実施