

## ① 品目・品種名及び概要 (利用方法、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。商業化の際は、数代に亘る自殖により自殖系統として固定し、もう一方の片親と交配をして F<sub>1</sub> 系統を作出する。

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、グルタミン酸を脱炭酸し、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 末端領域を欠損した GAD を発現させることで 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。令和 2 年 12 月に届け出た系統 (#87-17 系統) と同じ変異であり、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> 系統は食用としての使用を目的にしている。そのため、飼料としての使用方法については、規格外果実の処理や加熱調理をした際に出る残渣を飼料として利用する等、従来のトマトと同様のものを想定している。

## 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を 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 発現カセットを用いて形質転換し、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ストップコドンが生じ、自己阻害領域を欠損した GAD が発現した。これにより、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> 世代および T<sub>3</sub> 世代においても対照区よりも 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 の変化が畜産物を通じた人の健康又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を示したオフターゲット候補の計 8 箇所について、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。

今回高蓄積させた GABA は動植物に存在するアミノ酸でありアレルギー性は知られていない。動物では抑制性神経伝達物質であることが知られているが、ヒトにおいて過剰摂取による中毒性が認められたという報告はない。また雌雄のラットに対し GABA を 2,500 mg/kg/日を 13 週間反復経口投与した結果、死亡例は見られず、体重、摂餌量、尿検査、血液検査、剖検での観察にて GABA の摂取の影響は見られなかった (Takeshima *et al.*, 2014)。このため、GABA の無毒性量は 2,500 mg/kg/日以上と推察される。#206-4 の T<sub>2</sub> 世代の赤熟果実には平均 180 mg/100g FW の GABA が含まれており、2,500 mg/kg/日に相当する GABA の摂取は一果実 30g を 46 個/日程度に相当するため、人または家畜においてこれほどの量を摂取することは考えにくい。よって、GABA 量に起因する悪影響が生ずるおそれはないと考えられる。

また新たなアレルギーの産生の有無を調査するため、標的配列について、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。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、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、アレルギー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なって作成された 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、アレルギー解析を行った。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、新規アレルギー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と考えられるが、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ないかどうかを実際に調査したところ、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アルカロイド系の既知有毒性物質の赤熟果実中での量は微量である（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（別添資料 1・図 15）について、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、毒性タンパク質の産生もみられないことが示された。

#### 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

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た。すでに食用として市販されている 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 含量にしているのに比べて、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。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。また雌雄ラットでの試験により、GABA の無毒性量は 2,500 mg/kg/日以上と推察される。#206-4 の GABA 含有量は、T<sub>2</sub> 世代およ

び T<sub>3</sub> 世代で 180~250 mg/100gFW 含まれており (図 2)、果実 1 つで 54~75mg 程度となるため、GABA 量による悪影響はないと考えられる。

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を脱炭酸し合成される (図 1) ことから、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 (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。

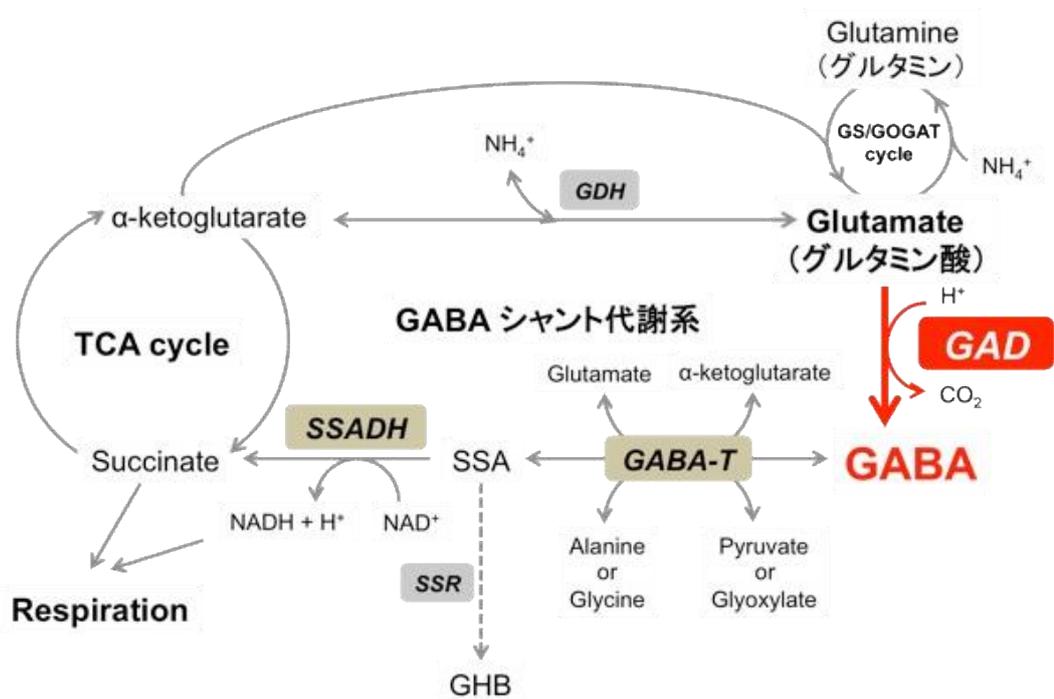


図1 高等植物におけるGABA代謝経路

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。

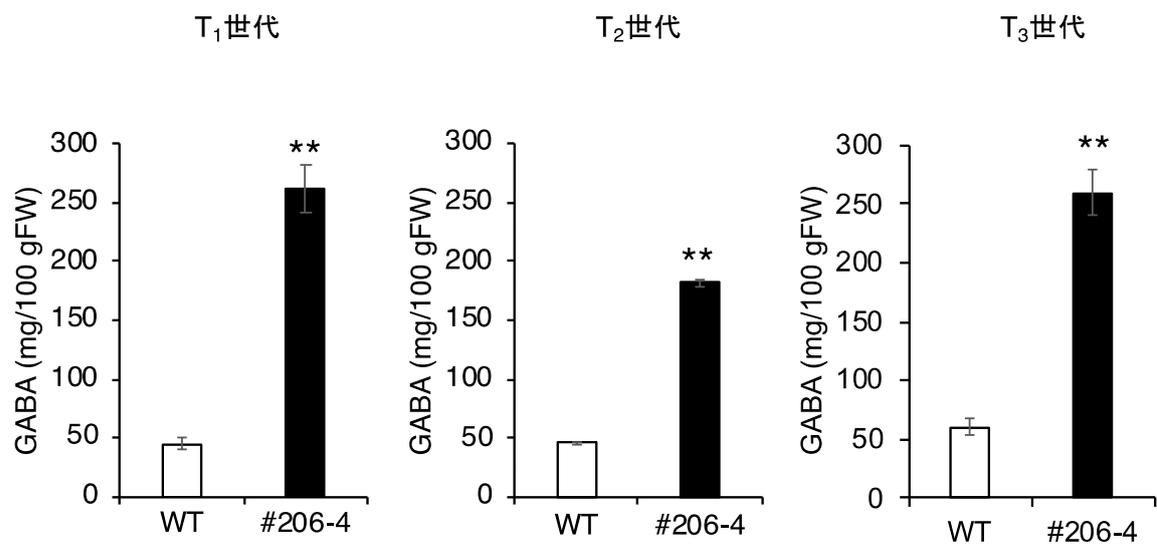
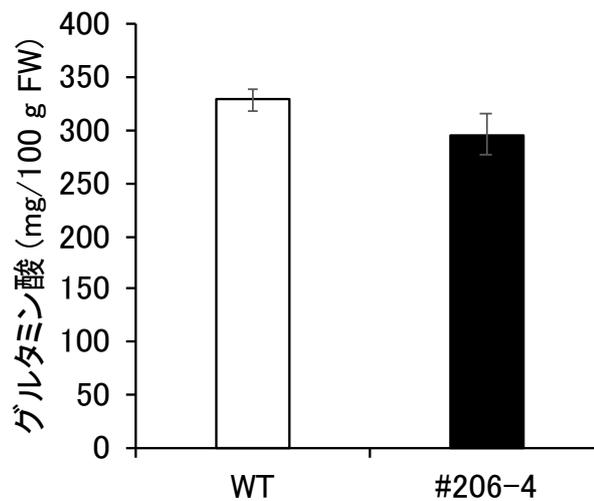


図2 赤熟果実におけるGABA含量(T<sub>1</sub>世代からT<sub>3</sub>世代)

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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>) 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。