

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.)。調理用トマト品種の親系統 SR2 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 F₁ 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)。

もう 1 つの改変した遺伝子はカロテノイド異性化酵素 (CRTISO) 遺伝子である。当該遺伝子の機能は、カロテノイド生合成経路において合成されるシス型のリコピンをトランス型に異性化する (図 2)。一般に、リコピンを含むカロテノイドの多くは分子中の二重構造が全てトランス型の構造で天然に存在している。一方、動物の体内では、二重結合の一部がシス型に異性化したカロテノイドが豊富に存在しており (Clinton *et al.*, 1996)、リコピンにおいては、シス型の方がトランス型よりも体内吸収性が優れていることが知られている (Cooperstone *et al.*, 2015)。トマトにおいて CRTISO 遺伝子は 1 コピーのみ存在しており (*SlCRTISO*, Solyc10g081650)、古くから鮮やかな橙色果実で知られる *tangerine* 系統 (Tomes *et al.*, 1953) では、この遺伝子の欠損により、赤色色素であるトランス型リコピンへの変換が阻害される結果、橙色の果実が形成されることが明らかとなっている (Isaacson *et al.*, 2002)。

本件では、CRISPR/Cas9による変異導入により、SIGAD3の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、トマト成熟果実におけるGABA蓄積量を向上させた。同時に、SICRTISOを機能欠損させることで、シス型からトランス型へのリコピンの異性化を抑制し、シスリコピンの蓄積量を向上させた。

当該系統は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、茎葉は飼料とはならないため処分する等、従来のトマトと同様の扱いを想定している。

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、SR2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およびSICRTISO (Solyc10g081650)の第1エキソン内である。CRISPR/Cas9が導入された2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、2系統のいずれにおいても2箇所の標的配列に変異導入があることを確認した。T₀世代においてGABAの高蓄積化およびシスリコピンの蓄積と関連が示唆される橙色の果実を形成した1系統についてT₁世代を育成し、外来遺伝子の残存が確認されず(後述)、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#6-16を選抜した。ゲノム編集系統#6-16では、SIGAD3に5 bpの欠失、SICRTISOに2 bpの欠失がそれぞれ生じている。これらの変異によりフレームシフトが生じ、SIGAD3では自己阻害領域が除去され、GADの活性が上昇し、トマト成熟果実におけるGABA蓄積量が野生型よりも有意に向上した。変異のホモ化が確認された#6-16(T₁世代)の自殖後代(T₂、T₃、T₄世代)では、成熟果実のGABA含有量が対照区と比較して2.2~2.6倍に達していた(図3; 酵素法; 株式会社エンザイム・センサ)。一方、SICRTISOでは第1エキソン内に早期終止コドンが形成され、SICRTISOたん白質を構成する大部分のアミノ酸が欠失した。これにより、当該酵素の機能欠損が生じ、変異をホモに有するT₂、T₃、T₄世代の成熟果実において、対照区よりも2.1

～2.6 倍高いシスリコピン蓄積が確認された（図 4；HPLC 法）。以上の 3 世代（T₂、T₃、T₄）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、2 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、*SIGAD3* では 0 箇所、*SICRTISO* では 3 箇所のオフターゲット候補が検索された。Cas-OFFinder では、bulge size、ミスマッチをそれぞれ 2 に設定し検索した結果、*SIGAD3* では 2 箇所、*SICRTISO* では 7 箇所のオフターゲット候補が示された。*SIGAD3*、*SICRTISO* のいずれにおいてもこれら両方の解析ソフトで共通したオフターゲット候補は検出されなかったが、*SICRTISO* のオフターゲット検索で抽出された 1 つの候補領域は遺伝子およびその発現に係る領域に該当したため、サンガーシーケンスにより変異の有無を調査した。その結果、オフターゲット変異は確認されなかった。

標的配列への変異の挿入による新たな毒性物質の有無を調査するため、変異が挿入された標的配列について、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、ゲノム編集前の配列とは異なる ORF が *SIGAD3* では 2 つ、*SICRTISO* では 1 つ新たに検索された。

この新たな ORF について、既知の毒性たん白質との類似性を見るため、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、*SIGAD3* ではいずれの 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、既知の毒性たん白質との相同性は認められなかった。*SICRTISO* で新たに検出された ORF をクエリーとした場合においても、種々のプロリコピン異性化酵素（prolycopene isomerase; CRTISO と同義）との類似性が示され、既知の毒性たん白質との相同性は抽出されなかった。

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.*, 2002; Eich 2008）。トマチンのようなステロイドグリコアルカロイドは、アミノ酸ではなくアンモニアを窒素源とし、コレステロール合成系から派生する経路で生合成される。一方、GABA は TCA 回路に由来するグルタミン酸の脱炭酸によって生成される。このように両者の生合成経路は完全に独立しているため、GABA の蓄積がトマチンの増加に直接的に影響を及ぼすとは考えにくい。一方、シスリコピンを含むテルペノイドはトマチンとは別経路で合成されるものの、いずれもイソプレノイド経路を起点とする点で関連がある。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#6-16 の成熟果実では平均で 2 ppm のトマチンが検出されたが（（一財）・日本食品分析センターへ委託。検出限界 1 ppm、液体クロマトグラフィー質量分析法）、野生型においても平均で 2.7 ppm のトマチンが検出されており、統計学的な有意差は認められなかった。トマチン以外の既知有毒性物質としてはアルカロイドが複数知られているが、成熟果実中に数 mg/kg とかなり微量である（Asano *et al.*, 1997）。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。

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、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。#6-

16のT₂からT₄世代の成熟果実には平均175 mg/100 g FWのGABAが含まれており(図3)、2,500 mg/kg体重/日に相当するGABAの摂取は一果実約13 gを109.9個/kg体重/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。なお、GABAのヒトに対するアレルギー性についての報告はない。

シスリコピンを含むリコピンの安全性については、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)による評価報告書(WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 62)にまとめられており、動物実験における急性・短期・長期の各毒性試験の結果、非有害性の色素沈着を除き、特筆すべき有害な影響は見られなかったことが示されている。この結果に基づき、リコピンの毒性は極めて低く、数値による一日摂取許容量(ADI)を設定する必要はないと結論付けられている。また、毒性試験の多くにシス型を多く含む合成リコピンが用いられていることや、体内(血漿中)にシス型が高濃度で存在すること、日常的な加工プロセスでも増加することから、リコピンの安全性においてシス型であるか否かは重要ではないとされている。以上のことから、シスリコピンによる健康への悪影響が生じるおそれはないと考えられる。また、従来技術を利用して開発された品種として、*SICRTISO* 変異体である *tangerine* を利用した商品が古くから市販されているが、通常のトマトと同様に生産され安全に消費されている。

規格外果実を飼料とする場合、ヘタが混入する可能性がある。しかし、GABAおよびシスリコピンに毒性がないこと、また果実中のトマチンが一般的なトマトと同等であることから、ヘタに含まれるトマチン量も一般的なトマトの範疇にとどまると考えられる。そのため、ヘタが混入した場合でも、その安全性は一般的なトマト果実と同等であると推察される。

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

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、また、カロテノイド異性化酵素 (CRTISO) 遺伝子を改変しカロテノイドの組成を変化させることを目的としている。従来技術を利用して開発された品種で、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 含量を可能にしている (Saito *et al.*, 2008)。一方、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について、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。#6-16 の GABA は、T₂ から T₄ 世代で平均 175 mg/100 gFW 含まれており、果実 1 粒 (平均 13g) で 23 mg 程度となるため、GABA 量による悪影響はないと考えられる (図 3)。

また、その他の代謝に関わる成分として、GABA は SIGAD の働きによってグルタミン酸のカルボキシル基の除去により合成される (図 1) ことから、T₂ から T₄ 世代のゲノム編集系統#6-16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 (酵素法; 株式会社エンザイム・センサ)。その結果、ゲノム編集系統#6-16は野生型と比較して、GABA 量が増加していたものの、グルタミン酸量に顕著な差は見られなかった (図 5)。糖、有機酸、必須アミノ酸、たん白質、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。

SICRTISO 遺伝子のゲノム編集により、#6-16 の T₂ から T₄ 世代ではシスリコピンが平均 1.2 mg/100 gFW、果実 1 粒 (平均 13 g) で 0.16 mg 程度含まれる。臨床介入試験によれば、1 日あたり 120 mg のリコピン (90-95%がトランスリコピン) を含むサプリメントを 4-10 か月摂取しても有意な毒性が認められなかったことが報告されている。(U.S. FDA, Agency Response Letter GRAS Notice, GRN No.156, GRN No.163.)。シスリコピンはトランスリコピンと比較して生物学的利用率が 8.5 倍あることが報告されていることから (Cooperstone *et al.*, 2015)、生体内での影響は、約 120 mg のリコピン (トランスリコピン) 摂取と 14.1 mg のシスリコピンの摂取で同等と推察される。このシスリコピン 14.1 mg は、果実約 88 個分 (約 1.1

kg) に相当する。また、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) の安全評価報告書においても、動物実験およびヒトでの観察報告をもとにリコピンは毒性が極めて低いことが示され、数値による一日摂取許容量 (ADI) を設定する必要はないと結論されている (WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 62)。一般的にリコピンと称されている赤色を呈するトランスリコピンは、加熱調理などにより橙黄色を呈するシスリコピンに変化することで体内に吸収されやすくなる (Unlu *et al.*, 2007)。また、ヒトや動物の生体内においては多くがシスリコピンの形で存在することも知られている (Boileau *et al.*, 1999, 2002; Clinton *et al.*, 1996)。このことから、シスリコピンもリコピンの一種であり、許容摂取量についての見解も同様であると推察される。さらに、本系統ではシスリコピン量は増加しているが、総リコピン量は減少していることから過剰摂取によるリスクは考えにくい。

また、その他の代謝に関わる成分として、トランスリコピンは *SICRTISO* の働きによってシスリコピンから合成される (図 2) ことから、T₂ から T₄ 世代のゲノム編集系統#6-16において、トランスリコピン含量の調査を行った (HPLC 法)。その結果、ゲノム編集系統#6-16 のトランスリコピン含量は野生型と比較して有意な減少を示した (図 6)。ゲノム編集系統#6-16 では *SICRTISO* 遺伝子への変異導入により *SICRTISO* 酵素の機能が低下し、シスリコピンからトランスリコピンへの異性化が抑制されたためと考えられる。本系統では *SICRTISO* の機能欠損によりカロテノイド組成が変化した。が、従来の品種改良でも同様の系統がすでに販売されていることから、カロテノイド代謝系の変化は食経験のある食品と実質的に同等の変化であると言える。また、糖、有機酸、必須アミノ酸、たん白質など他の代謝物への影響については、別経路のため影響はないと考えられるが、影響があった場合でも既存の従来の品種改良で作出された同様の系統と同等と考えられる。

規格外果実を飼料とする場合に混入する可能性があるヘタについても、代謝に関わる成分の変化が想定される。しかし、関連代謝物 (GABA、グルタミン酸、リコピン等) および各栄養成分において、果実での摂取リスクは認められていない。また、本系統は従来育種でも作出可能であることを考慮すると、ヘタが混入した場合でも、既存の従来品種と同等の影響にとどまると推察される。

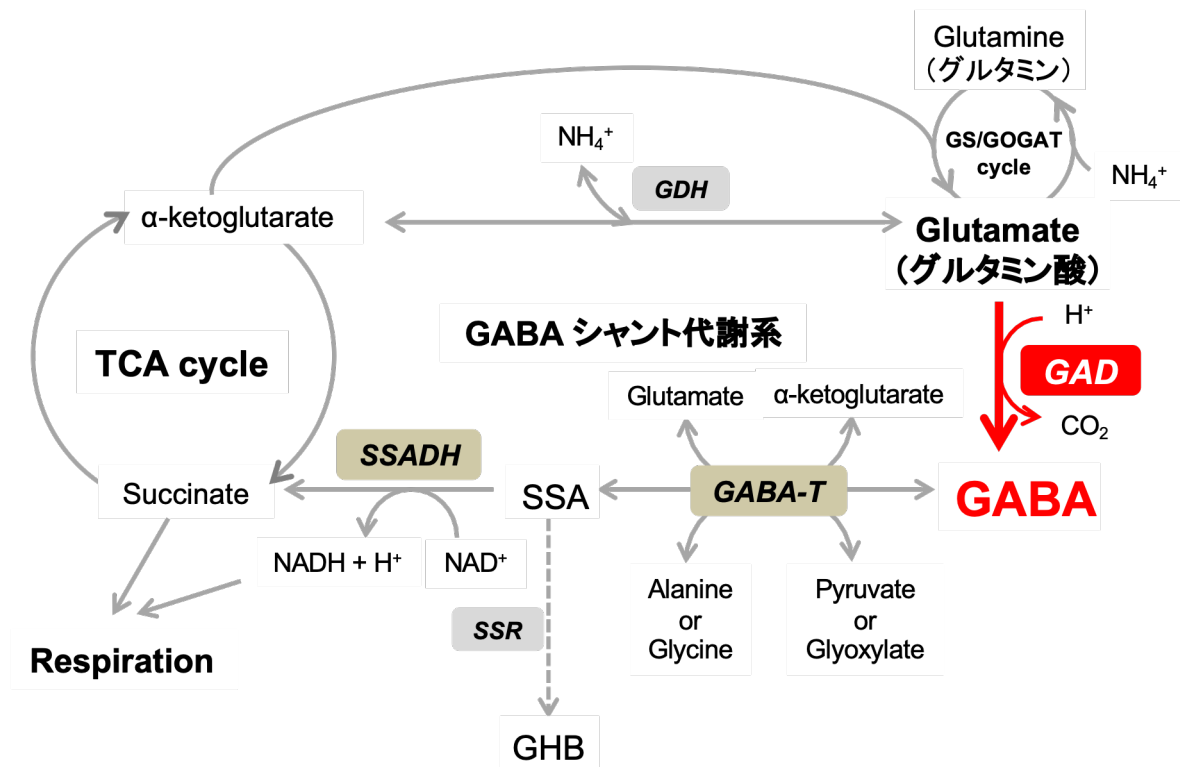


図 1 高等植物における GABA 代謝経路

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。

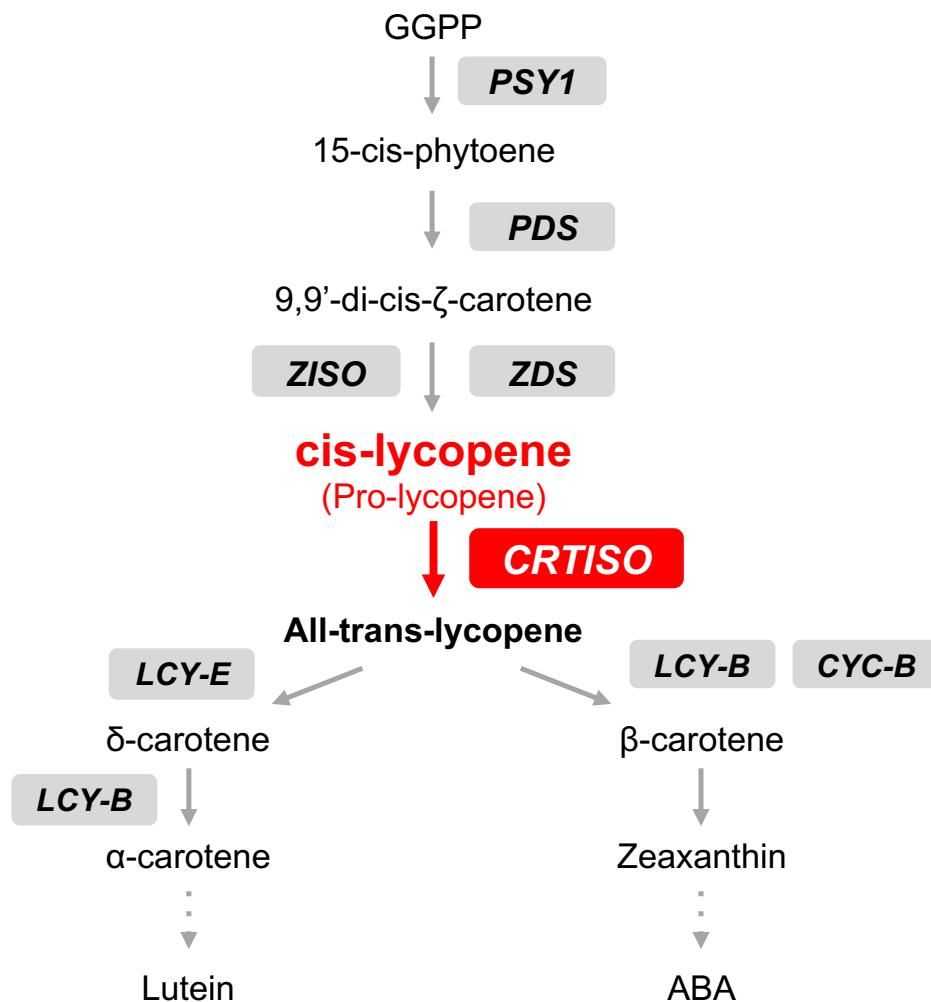


図2 高等植物におけるカロテノイド合成経路

カロテノイド異性化酵素 (CRTISO) は、シス構造のリコピンをトランス構造に異性化する。

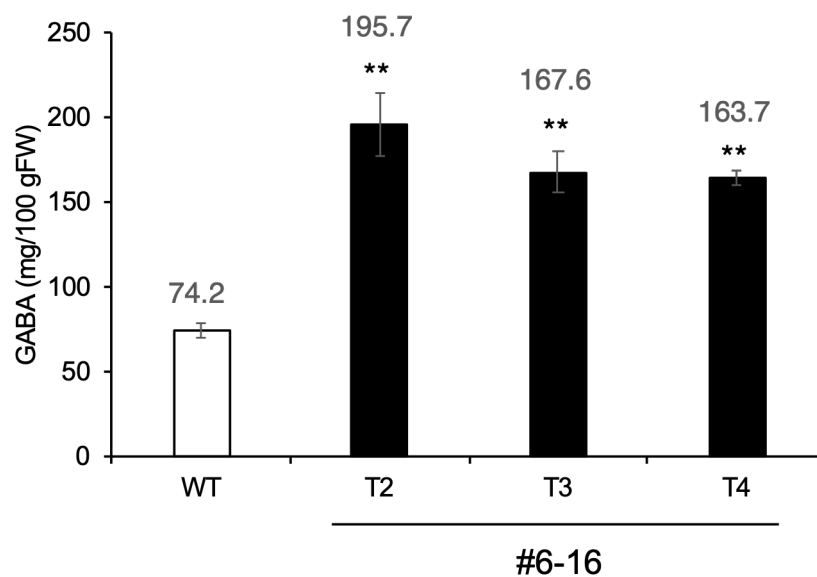


図3 成熟果実におけるGABA含量 (T₂ 世代からT₄ 世代)

T₂ 世代からT₄ 世代 を同時期に栽培した際の成熟果実におけるGABA含量。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。#6-16は#6を自殖して得られた後代 (T₂世代、T₃世代およびT₄世代) 系統を表す。エラーバーは、標準誤差を表す (n = 5)。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)。

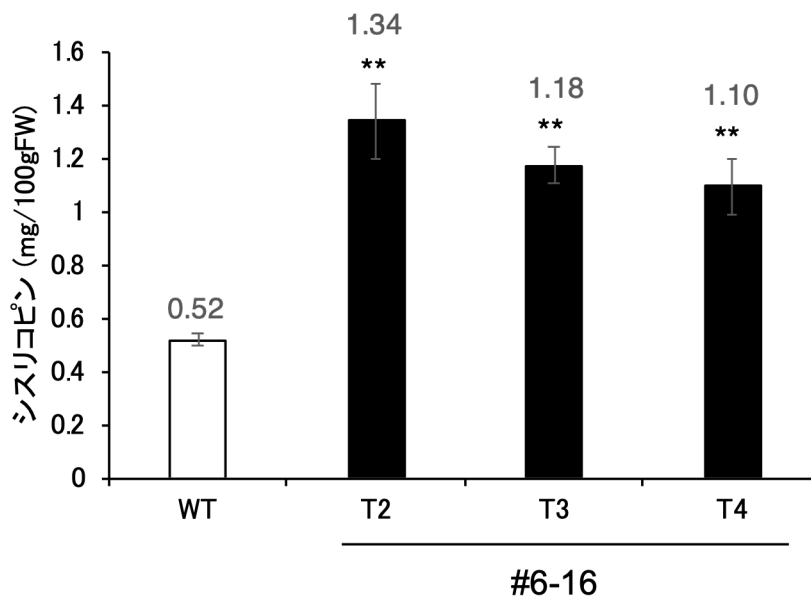


図4 成熟果実におけるシスリコピン含量 (T₂ 世代からT₄ 世代)

T₂ 世代からT₄ 世代 を同時期に栽培した際の成熟果実におけるシスリコピン含量。シスリコピンの定量は、HPLC法を用いた。WTはトマト品種の野生型、変異なしを表す。#6-16は#6を自殖して得られた後代 (T₂世代、T₃世代およびT₄世代) 系統を表す。エラーバーは、標準誤差を表す (n = 5)。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)。

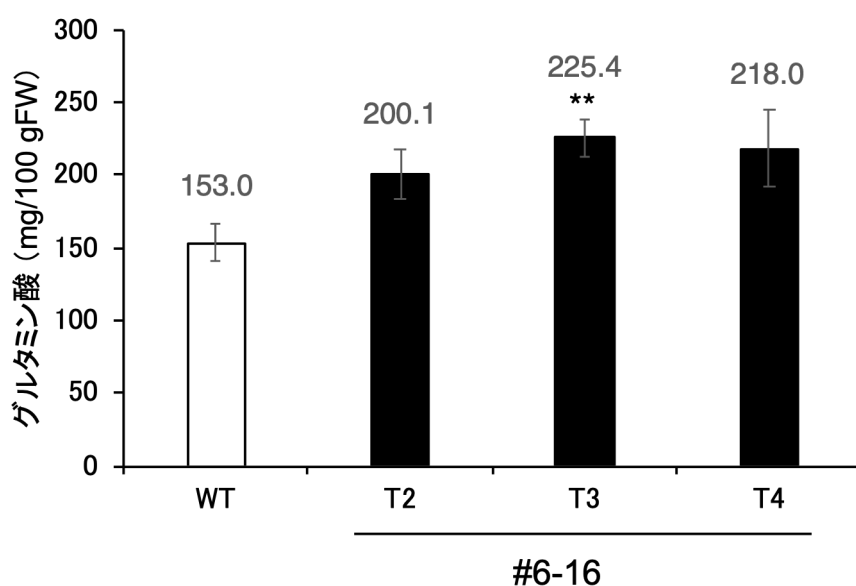


図5 成熟果実におけるグルタミン酸含量 (T₂ 世代)

T₂ 世代からT₄ 世代 を同時期に栽培した際の成熟果実におけるグルタミン酸含量。グルタミン酸の定量は、酵素法を用いた。WTはトマト品種の野生型、変異なしを表す。#6-16は#6を自殖して得られた後代 (T₂世代、T₃世代およびT₄世代) 系統を表す。エラーバーは、標準誤差を表す (n = 5)。野生株 (WT) と #6-16 (T₂世代、T₃世代およびT₄世代) の間でStudent's *t* testを行った結果、T₃世代において統計学的に有意な増加が確認されたが、T₂およびT₄世代においては有意差は認められなかった。

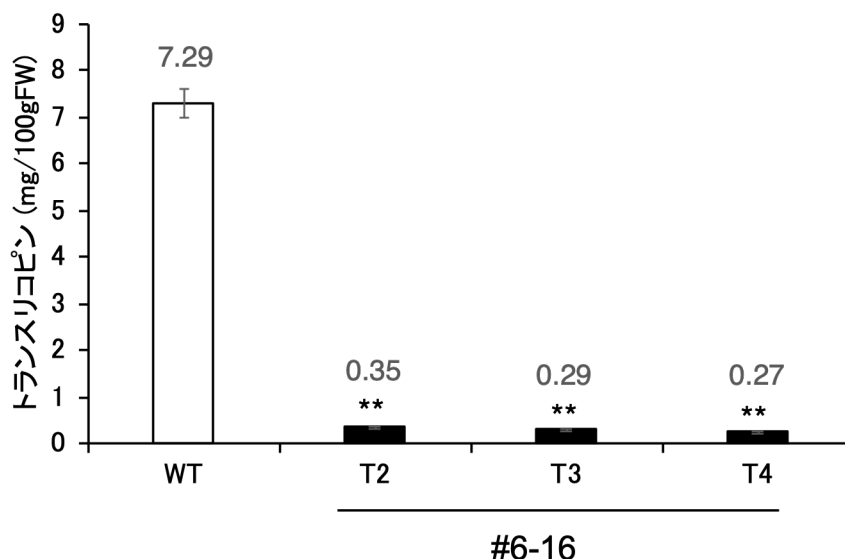


図6 成熟果実におけるトランスリコピン含量 (T₂ 世代からT₄ 世代)

T₂ 世代からT₄ 世代 を同時期に栽培した際の成熟果実におけるトランスリコピン含量。シスリコピンの定量は、HPLC法を用いた。WTはトマト品種の野生型、変異なしを表す。#6-16は#6を自殖して得られた後代 (T₂世代、T₃世代およびT₄世代) 系統を表す。エラーバーは、標準誤差を表す (n = 5)。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)。