

令和 5 年 8 月 4 日
厚生労働省医薬・生活衛生局
食品基準審査課

遺伝子組換え食品等及びゲノム編集食品等の審査・届出等の状況（報告）

1. 組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続の概要（別添1）

（1）制度の概要

遺伝子組換え食品等を輸入・販売等する際には、安全性審査を行う必要があり、審査を行っていない遺伝子組換え食品等や、これを原材料に用いた食品等の製造・輸入・販売等は、食品衛生法に基づき禁止されている。

申請者から安全性審査の申請がなされると、厚生労働省は食品安全委員会に食品健康影響評価（以下「評価」という。）の諮問を行う。厚生労働省からの諮問に基づき、食品安全委員会で評価を行う。

厚生労働省はその評価結果の答申を受けて、審査品目が人の健康を損なうおそれがないとされた場合に安全性審査の手続きを経た旨を官報に掲載し公表する。

（2）審査済みの食品等

令和5年8月4日の時点で、我が国で安全性審査を経た旨が公表されている遺伝子組換え食品は9作物 333品種、遺伝子組換え添加物は 24種類 80品目である。

2. ゲノム編集技術応用食品及び添加物の届出の概要（別添2）

（1）制度の概要

ゲノム編集技術を用いて作られた食品等のうち、外来遺伝子又はその一部を含む場合は、組換えDNA技術に該当するものとして安全性審査を経ることとなる。一方、自然界又は従来品種改良でも起こり得る範囲の遺伝子変化により得られるものは、従来品種改良技術を用いた食品と比べた安全性等の観点から、開発者等から届出を求めて公表する（「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「ゲノム編集技術応用食品等の食品衛生上の取扱いについて」別添））。

（2）届出済みの食品等

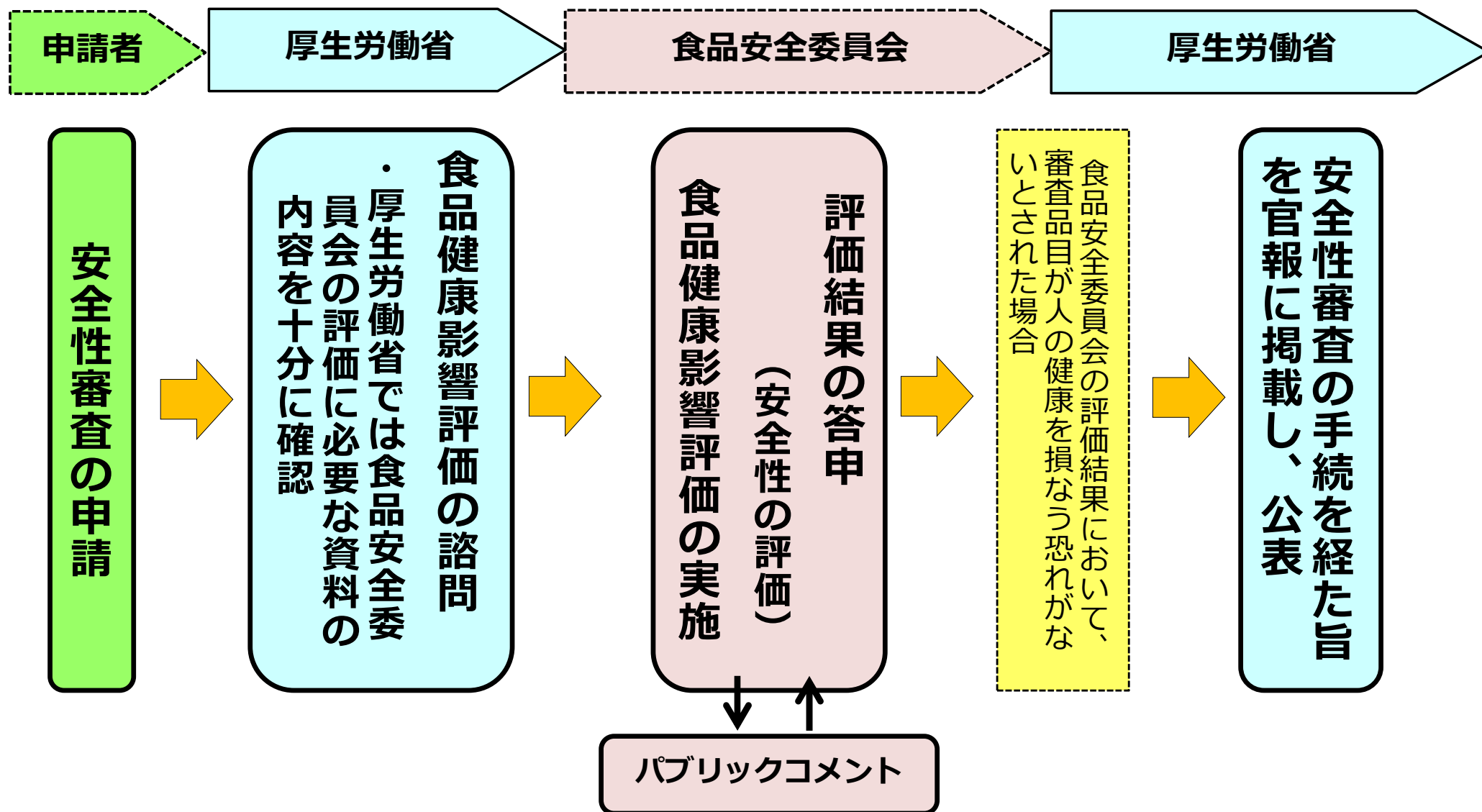
令和5年8月4日の時点で、届出がなされたゲノム編集技術応用食品は 5品種 7届出である。

（以上）

遺伝子組換え食品等の安全性審査

(別添1)

- 遺伝子組換え食品等を輸入・販売等する際には、安全性審査を行う必要があり、審査を行っていない遺伝子組換え食品等や、これを原材料に用いた食品等の製造・輸入・販売等は、食品衛生法に基づき禁止されている。
- 安全性審査は、品目ごとに厚生労働省が食品安全委員会の意見を聴いて行うこととなっている。



安全性審査を経た遺伝子組換え食品及び添加物

我が国で安全性審査を経た、遺伝子組換え食品は9作物333品種、
遺伝子組換え添加物は24種類80品目ある。（※令和5年8月4日時点）

食品（9作物333品種）

添加物（24種類80品目）

名称	数	性質
じゃがいも	12	害虫に強い ウイルス病に強い
大豆	29	特定の除草剤で枯れない 特定の成分（オレイン酸など）を多く含む
てんさい （砂糖大根）	3	特定の除草剤で枯れない
とうもろこし	210	害虫に強い 特定の除草剤で枯れない
なたね	24	特定の除草剤で枯れない 特定の成分（DHAなど）を多く含む
わた	48	害虫に強い 特定の除草剤で枯れない
アルファルファ	5	特定の除草剤で枯れない
パパイヤ	1	ウイルス病に強い
カラシナ	1	特定の除草剤で枯れない

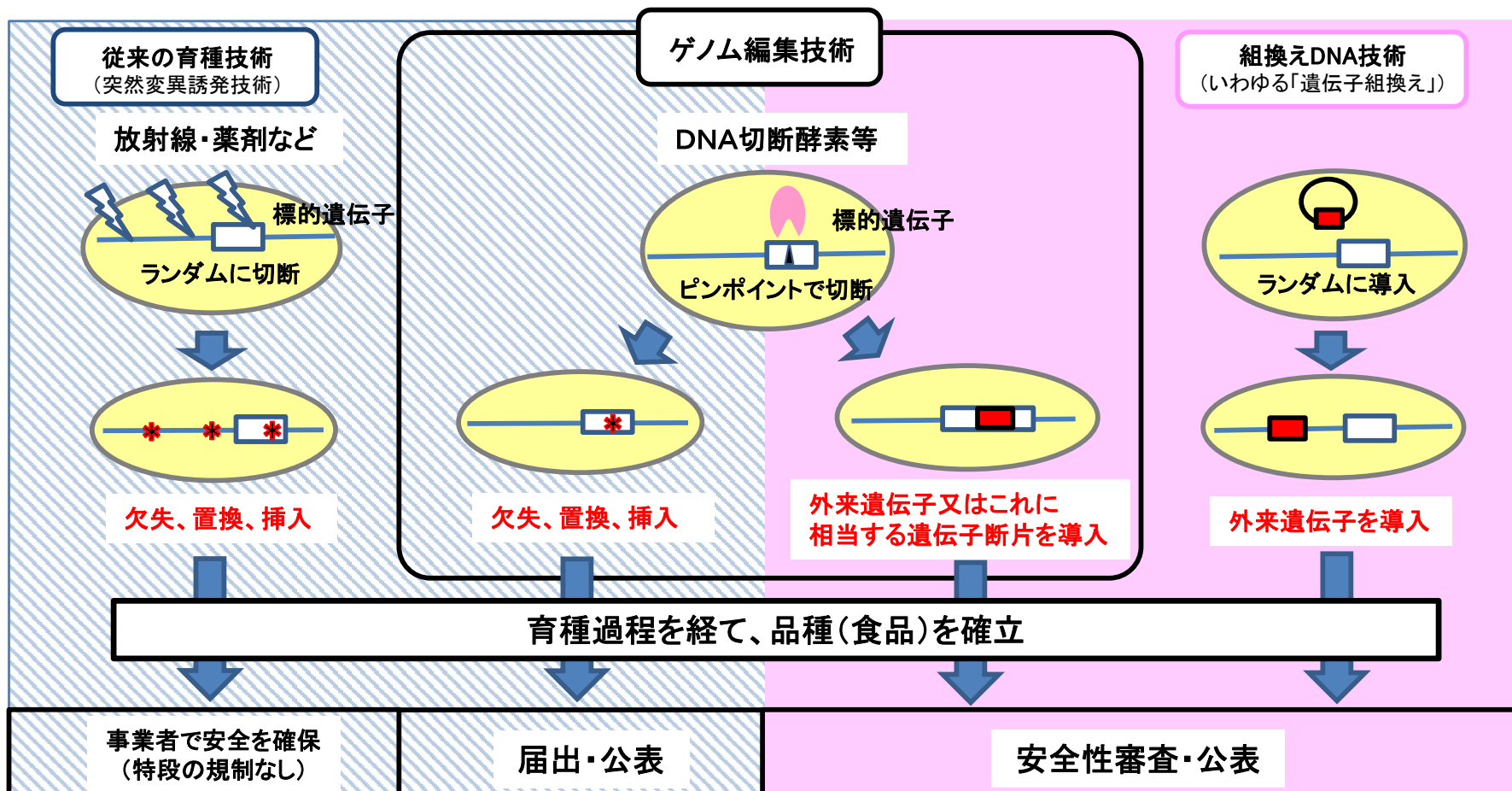
名称	数	性質
α-アミラーゼ	19	生産性向上 耐熱性向上 等
キモシン	5	
プラーナーゼ	4	
リパーゼ	6	
リボフラビン	2	
グルコアミラーゼ	5	
α-グルコシルトランスフェラーゼ	4	
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	2	
アスパラギナーゼ	1	
ホスホリパーゼ	7	
β-アミラーゼ	1	
エキソマルトテトラオヒドロラーゼ	2	
酸性ホスファターゼ	1	
グルコースオキシダーゼ	3	
プロテアーゼ	4	
ヘミセルラーゼ	2	
キシナーゼ	5	
β-ガラクトシダーゼ	1	
ブシコースエピメラーゼ	1	
テルペン系炭化水素類	1	
α-グルコシダーゼ	1	
ペクチナーゼ	1	
カルボキシペプチダーゼ	1	
アミノペプチダーゼ	1	

○ 上記の他に、一定の要件に適合するものについては安全性審査を経ずに
又は一部が簡略化された安全性審査を経て販売等が認められている。

- ・ 審査済みの遺伝子組換え作物同士を掛け合わせた品種
（大豆、とうもろこし、なたね、わた）
- ・ 最終製品が高度に精製された非タンパク質性の添加物
（L-グルタミン酸、L-アルギニン等のアミノ酸等）

ゲノム編集技術とその応用食品等の取扱い

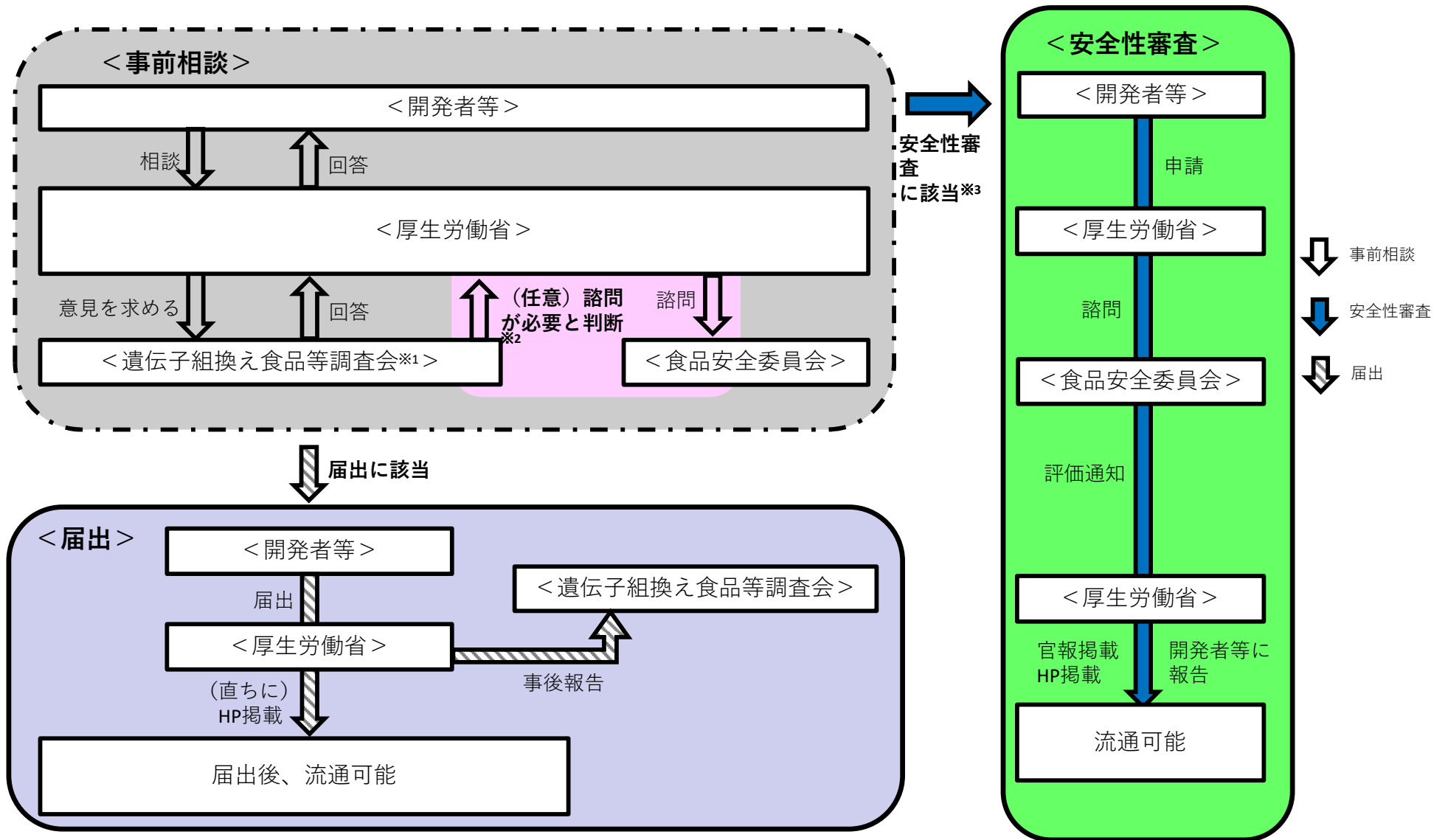
ゲノム編集技術は、特定のDNA部位を切断する酵素(ハサミ)を細胞内で発現させ、高い精度で標的DNAを切断することができる技術であり、これを応用した食品等の食品衛生上の取扱いは以下のとおり。



※ 開発者等から厚生労働省に対して事前相談を行うことを必須とし、厚生労働省は「遺伝子組換え食品等調査会」等に対して「届出」又は「安全性審査(食品安全委員会への諮問)」のどちらに該当するか、意見を求める。

※ 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0919第3号「ゲノム編集技術応用食品等の食品衛生上の取扱いについて」別添)により、令和元年10月より運用開始。

ゲノム編集技術応用食品の取扱いに係るフロー図



- ※1 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
- ※2 新食品及び新技術については、必要に応じて食品安全委員会へ諮問し、その取扱い等について新開発食品調査部会で決定
- ※3 外来遺伝子が確認された場合等は、遺伝子組換え食品等として安全性審査に該当

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に基づき届出された食品及び添加物一覧

このページでは、「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に基づき届出された食品及び添加物一覧」を掲載しています。届出があり次第、順次公開して参ります。

公開届出情報一覧

1. 食品

N o.	品目名	届出年 月日	系統	開発者等	届出者	上市 年月	公開情報	備考
1	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	2020年 12月11 日	(87-17系統)	サナテックシード株式会社	サナテックシード株式会社	2021 年9月	PDF PDF [322K B] ☐	
2	可食部増量マダイ	2021年 9月17 日	(E189-E90系 統)	リージョナルフィッシュ株式会社	リージョナルフィッシュ株式会社	2021 年10 月	PDF PDF [142K B] ☐	
	※2021年9月17日届出系統の追加系統	2022年 12月5 日	(E361-E90系 統、従来品種-B2 24系統)	リージョナルフィッシュ株式会社	リージョナルフィッシュ株式会社	2023 年1月	PDF PDF [143K B] ☐	
3	高成長トラフグ	2021年 10月29 日	(4D-4D系統)	リージョナルフィッシュ株式会社	リージョナルフィッシュ株式会社	2021 年11 月	PDF PDF [173K B] ☐	
	※2021年10月29日届出系統の追加系統	2022年 12月5 日	(従来系統-4D系 統)	リージョナルフィッシュ株式会社	リージョナルフィッシュ株式会社	2023 年1月	PDF PDF [170K B] ☐	
4	PH1V69 CRISPR-Cas9ワキシートウモロコシ	2023年 3月20 日	-	バイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社	コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社	上市 未定	PDF PDF [465K B] ☐	
5	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	2023年 7月27 日	(206-4系統)	サナテックシード株式会社	サナテックシード株式会社	上市 未定	PDF [713 KB] ☐ P DF	

① 品目・品種名及び概要 (利用方法及び利用目的)

名称:

PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ

概要:

PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ (以下、「本ワキシートウモロコシ」という) は、子実デンプンのアミロペクチン含有量が増加したトウモロコシ (英名: corn 及び maize、学名: *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) である。本ワキシートウモロコシは、デントトウモロコシの近交系品種 PH1V69 系統の *Wx1* 遺伝子を、ゲノム編集技術を用いて欠失させることにより作出された。従来育種によって作出されたワキシートウモロコシは既に日本、中国及び米国等で栽培されており、子実がコーンスターチに加工され、主に食用及び工業用に利用されている。本ワキシートウモロコシの意図された用途は従来のワキシートウモロコシの用途と相違ない。

② 利用したゲノム編集技術の方法及び遺伝子改変の概要

方法:

本ワキシートウモロコシの作出には CRISPR-Cas9 法を用いた。本法においては、エンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質がガイド RNA によって標的 DNA 配列に特異的に結合し、二本鎖 DNA を切断する。切断された DNA は、植物細胞が元来有する DNA 修復機構である非相同末端修復にて修復される。

本ワキシートウモロコシの作出に用いたプラスミドは 6 種類である。そのうち

3 種類のプラスミドがそれぞれ CRISPR-Cas9 法で使用するエンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質又は 2 種類のガイド RNA をコードする遺伝子を有する。なお、残りの 3 種類のプラスミドはそれぞれ、選抜マーカである *nptII* 遺伝子、植物体の再生率を向上させる *zm-wus2* 遺伝子又は *zm-odp2* 遺伝子を有する。

まずこれらの遺伝子を一過的に発現させることを目的として、パーティクルガン法により 6 種類のプラスミドをデントトウモロコシ PH1V69 系統の未熟胚に移入した。移入したプラスミドから産生される 2 種類のガイド RNA がそれぞれ *Wx1* 遺伝子の 5'側に位置するプロモーター領域及び 3'側に位置する非翻訳領域内の標的 DNA 配列を特異的に認識し、同様にプラスミドから産生される Cas9 タンパク質がこれら 2 ヶ所の標的 DNA 配列を切断する。続いて、切断部位同士が非相同末端修復により接合することにより、標的 DNA 配列に挟まれた *Wx1* 遺伝子を含む領域が欠失すると考えられる。実際に本ワキシートウモロコシ中の当該領域の塩基配列を解析し、2 ヶ所の切断部位の間の *Wx1* 遺伝子を含む領域が意図したとおり欠失していることを確認した。また、意図しない塩基の付加や欠失は認められなかった (図 1、3 ページ)。

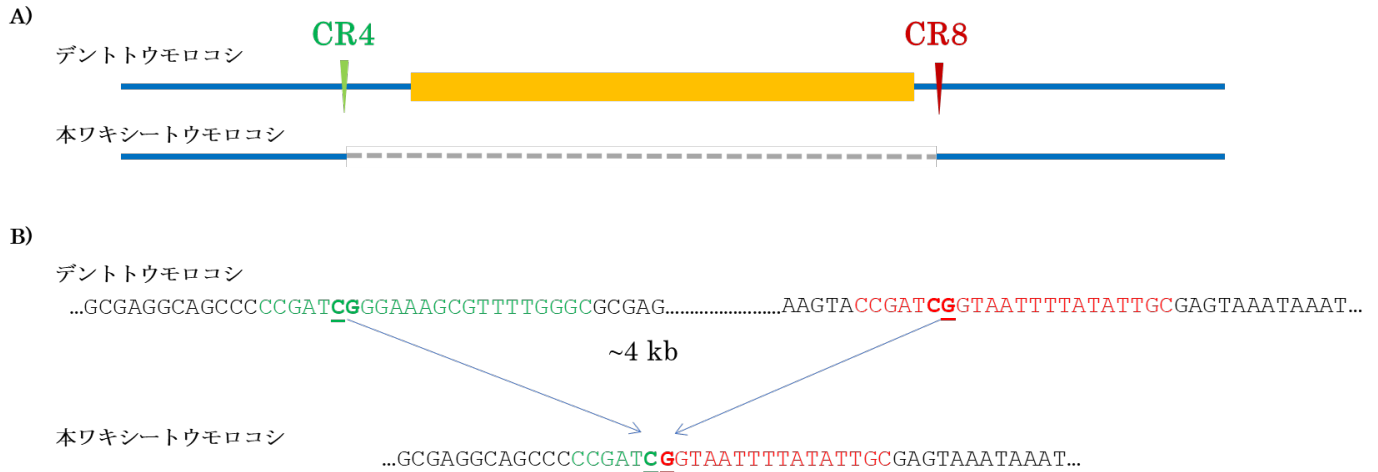


図 1 本ワキシートウモロコシにおける *Wx1* 遺伝子の欠失

A) デントトウモロコシ (PH1V69) と本ワキシートウモロコシの *Wx1* 遺伝子領域の模式図。*Wx1* 遺伝子のコーディング領域を橙で、それ以外のゲノム DNA を青で示した。また 2 種類のガイド RNA (CR4 及び CR8) の標的配列の位置をそれぞれ緑及び赤で示した。本ワキシートウモロコシにおいては CR4 と CR8 の間の約 4 kb の領域が欠失している (図中の点線)。

B) 上 : デントトウモロコシにおけるガイド RNA の標的配列の相補鎖。CR4 及び CR8 の標的配列認識部位に相当する配列をそれぞれ緑及び赤で示した。標的配列中の太字で示した CG の間で Cas9 タンパク質によって切断される。下 : 本ワキシートウモロコシにおける接合部位の配列を塩基配列解析により決定した。Cas9 タンパク質による切断で生じたゲノム DNA の末端同士が非同末端修復により接合しており、接合部位に塩基の付加や欠損は認められなかった。

標的遺伝子：

標的遺伝子である *Wx1* 遺伝子はアミロース合成酵素をコードする。アミロース合成酵素は、トウモロコシの子実におけるアミロースの生合成を触媒する。宿主であるデントトウモロコシの子実デンプンは、直鎖状多糖であるアミロース及び分枝状多糖であるアミロペクチンから成り、その割合は約 25%及び 75%である。一方、自然突然変異又は誘発突然変異により *Wx1* 遺伝子が機能を失ったトウモロコシはワキシートウモロコシとして知られており、子実デンプンのほぼ 100%がアミロペクチンから成る（以下、「ワキシー形質」という）。ゲノム編集技術により *Wx1* 遺伝子が欠失した本ワキシートウモロコシも、同様のワキシー形質を示すと考えられる。

育成経過：

上述のとおり、本ワキシートウモロコシの作出においては、エンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質及びガイド RNA 等をコードする遺伝子を含むプラスミドをデントトウモロコシ PH1V69 系統の未熟胚に移入した。プラスミドを移入した宿主細胞から植物体を再生させ、T₀ 世代とした。T₀ 世代の各個体における *Wx1* 遺伝子の塩基配列を解析し、*Wx1* 遺伝子が欠失した 1 系統を選抜した。なお、当該系統は *Wx1* 遺伝子の欠失についてヘミ接合体（*Wx1* 対立遺伝子の一方だけが欠失している）であり、以降の育種でホモ接合体にすることにより、両方の *Wx1* 対立遺伝子が同一の欠失を有する本ワキシートウモロコシを作出している。

上記の T₀ 世代 1 系統を PH1V69 系統と戻し交配して得られた BC₀ 世代において改めて塩基配列解析を行い、*Wx1* 遺伝子が欠失していることを確認した（図 1B、

3 ページ)。また、BC₀ 世代 9 個体について、定量 PCR 法及び Southern-by-Sequencing (SbS) 分析により、移入したプラスミド由来の核酸が宿主ゲノム中に残存していないことを確認した。まず定量 PCR 法による確認においては、各個体の葉から抽出した DNA を用い、各プラスミドに含まれる主要な遺伝子配列 (*cas9*、2 種類のガイド RNA、*nptII*、*zm-odp2* 及び *zm-wus2*) の有無を特異的なプライマーにより検出した (図 2 及び図 3、6 及び 7 ページ)。その結果、上記のいずれの遺伝子配列についても定量 PCR の結果が陰性である 9 個体が得られた。

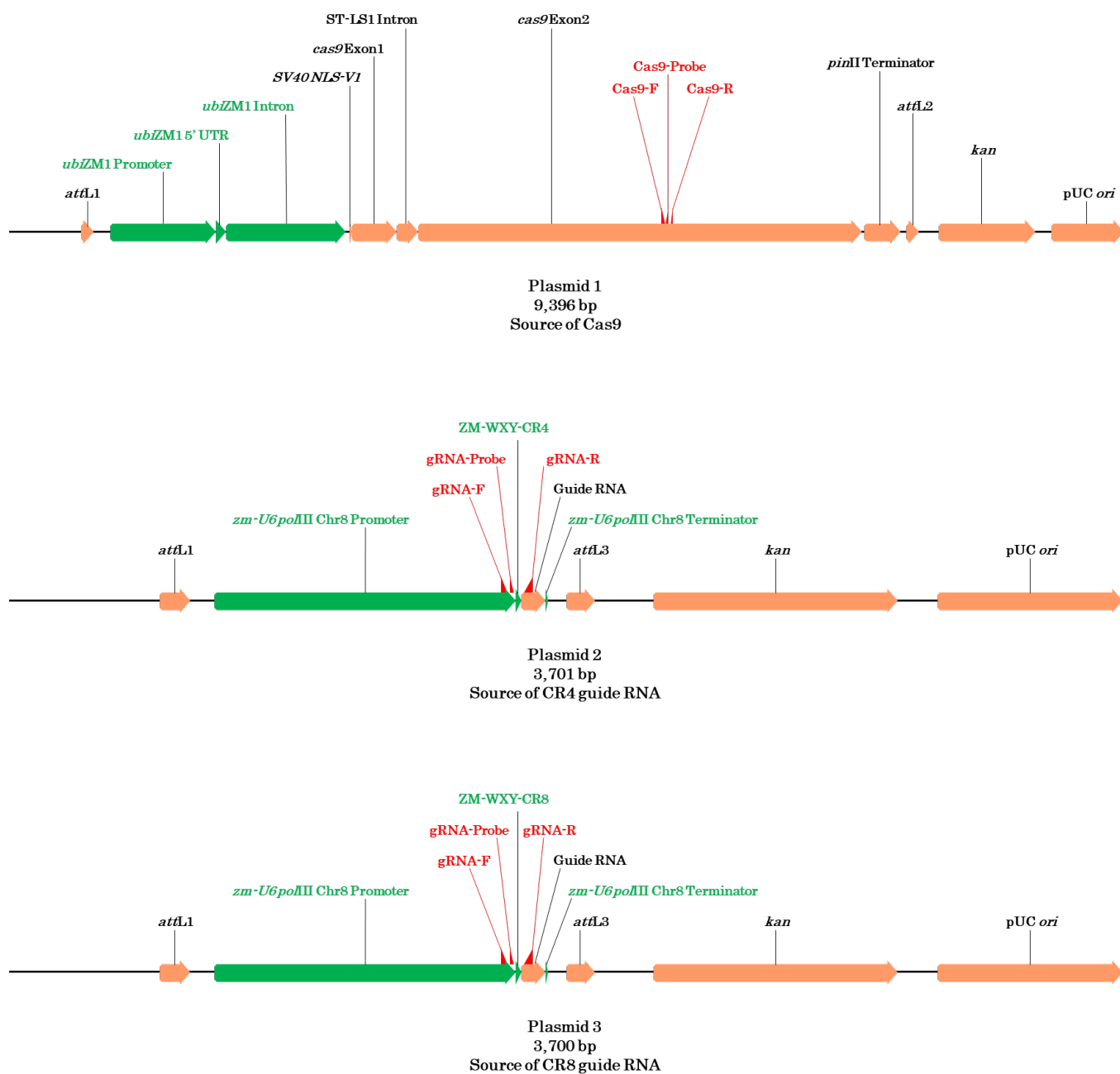


図 2 プラスミド由来の核酸の残存の定量 PCR による確認に用いたプライマー及びプローブの位置

プラスミド 1~3 のマップを示した。緑は宿主であるトウモロコシに由来する内在性の構成要素を示し、橙は他の生物に由来する構成要素を示す。定量 PCR 法による検出に用いたプライマーペア（名称の末尾が F 又は R）及び TaqMan プローブ（名称の末尾が Probe）の位置を赤で示した。

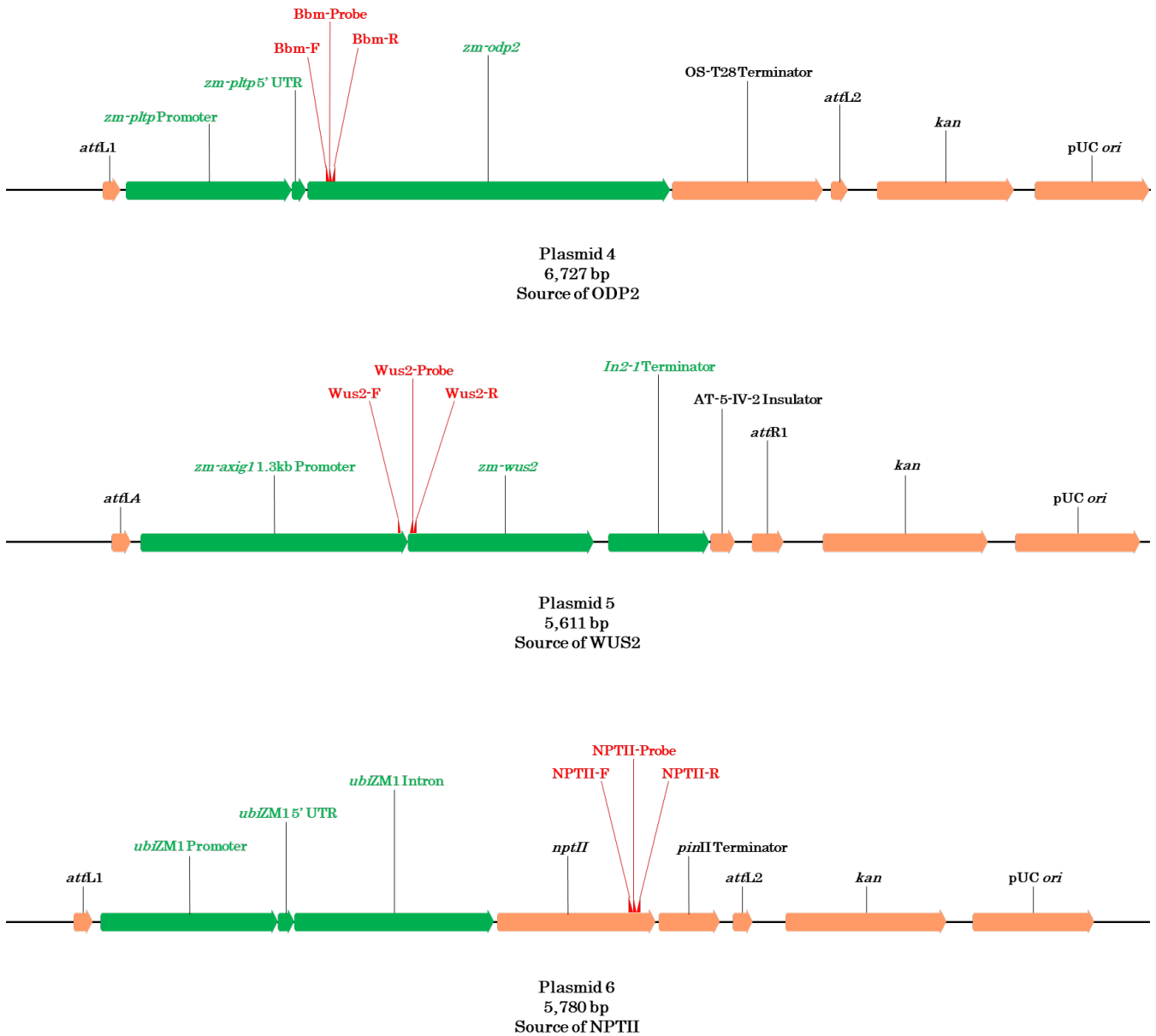


図 3 プラスミド由来の核酸の残存の定量 PCR による確認に用いたプライマー及びプローブの位置 (続き)

プラスミド 4~6 のマップを示した。緑は宿主であるトウモロコシに由来する内在性の構成要素を示し、橙は他の生物に由来する構成要素を示す。定量 PCR 法による検出に用いたプライマーペア (名称の末尾が F 又は R) 及び TaqMan プローブ (名称の末尾が Probe) の位置を赤で示した。

これらの個体について、さらに SbS 分析による確認を行った。SbS 分析はキャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた手法であり、断片化した植物ゲノム全体から、移入されたプラスミド中の構成要素の全塩基配列を網羅する特異的なプローブセットを用いて DNA 断片を選択的に回収(キャプチャー)する。プローブとハイブリダイズしないゲノム DNA 断片は洗浄により除去され、回収された DNA 断片だけが濃縮される。濃縮された DNA 断片について、PCR による増幅及び品質チェックの後、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析を行う。プラスミド由来の塩基配列が宿主ゲノムに挿入されている場合には、プラスミド由来の塩基配列と宿主ゲノムとの接合部位を含む DNA 断片が検出される。また、本法の検出感度は従来遺伝子組換え作物の評価に用いられてきたサザンブロット分析と同等であることが示されており、35 bp 以上の挿入配列を再現良く検出できる。本ワキシートウモロコシについては、定量 PCR 法による確認を経た BC₀ 世代 9 個体のそれぞれの葉から抽出した DNA を断片化し、移入した 6 種のプラスミド由来の塩基配列を含む DNA 断片の有無を SbS 分析を用いて調べた。その結果、これら 9 個体はいずれもプラスミド由来の塩基配列を有していないことが確認された。なお、プラスミドに含まれるトウモロコシ由来の構成要素と同じ配列が SbS 分析で検出されたが、これらの塩基配列と宿主トウモロコシのゲノムとの間に新たな接合部位が検出されなかったことから、宿主トウモロコシに内在する配列を検出したものと考えられた。また、6 種のプラスミドを含む陽性対照における平均リード深度は 582~2,574 であり、SbS 分析は十分な信頼性を有していると考えられた。

これらの確認を経た BC₀ 世代 9 個体全てを PH1V69 系統と戻し交配し、BC₁ 世代を作出した。さらに 2 回の自殖を行い、本ワキシートウモロコシを作出した。

Wx1 遺伝子の欠失によるワキシー形質は、ヨウ素ヨウ化カリウム染色（ヨウ素デンプン反応）によって確認できる。染色により、デンプンの約 25%がアミロースから成るデントトウモロコシの子実は暗青色を呈するが、ほぼ 100%がアミロペクチンから成るワキシートウモロコシの子実は赤褐色を呈する。本ワキシートウモロコシの BC₁F₂ 世代において子実の胚乳をヨウ素ヨウ化カリウムで染色した結果、想定どおり赤褐色を呈する子実が認められ、ワキシー形質が付与されたことが確認された。

- 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

本ワキシートウモロコシに行った改変により新たなオープンリーディングフレーム（以下、「ORF」という）が生じ、アレルゲン及び毒性物質が産生される可能性を検討した。本ワキシートウモロコシにおいて意図した改変は *Wx1* 遺伝子の欠失であり、*Wx1* 遺伝子の 5'側及び 3'側の DNA 配列を特異的に標的とする 2 種類のガイド RNA を用いて行った。5'側のガイド RNA が *Wx1* 遺伝子のプロモーター領域中の推定転写開始点の上流における DNA 切断を誘導し、3'側のガイド RNA が *Wx1* 遺伝子の 3'非翻訳領域における DNA 切断を誘導することにより、これら 2 ヶ所の標的 DNA 配列に挟まれた *Wx1* 遺伝子を含む領域が欠失している。*Wx1* 遺伝子の開始コドン及びイントロン/エクソン配列全体だけでなく、転写に必要な TATA ボックス及び転写開始点も含めて欠失させていることから、改変部位に新たな ORF が生じたとしても転写されることはないと考えられた。念のため、改変部位の上流 3,632 bp から下流 2,775 bp までの領域の 6 つの読み枠すべてに対して 8 アミノ酸以上のペプチドをコードする新たな ORF の有無を確認

した結果、改変部位を含む 58 アミノ酸及び 32 アミノ酸のペプチドをコードする 2 つの推定 ORF が確認された。これらの推定 ORF について、Comprehensive Protein Allergen Resource データベース (<http://db.comparedatabase.org/>) を用い、既知のアレルゲンと連続する 8 アミノ酸以上で完全に一致する配列の検索及び連続する 80 アミノ酸以上について 35%を超えて一致する配列の検索を行った。その結果、いずれの ORF についても既知アレルゲンとの一致は認められなかった。同様に、UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されている毒性又は健康影響を生じる可能性のあるタンパク質を対象に、BLASTP を用いた相同性検索を行った。*E-value* の閾値は 10^{-4} とした。その結果、いずれの ORF についても既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった。

次に、標的 DNA 配列と類似性の高い配列において意図しない変異（以下、「オフターゲット変異」という）が生じる可能性を検討した。用いた 2 種類のガイド RNA は *Wx1* 遺伝子中の標的 DNA 配列に特異的に設計されており、*Wx1* 遺伝子を除き宿主のゲノム配列中に標的 DNA 配列と同一の配列は存在しないことを確認している。また、これまでの知見から植物においてガイド RNA の標的 DNA 配列と 3 塩基以上異なる DNA 配列にオフターゲット変異が生じる可能性は低いと考えられた。このことから、オフターゲット変異が生じる可能性のある部位として、2 種類のガイド RNA の標的 DNA 配列と 1 塩基又は 2 塩基異なる DNA 配列が考えられた（以下、「潜在的オフターゲット配列」という）。潜在的オフターゲット配列を特定するため、ガイド RNA の標的 DNA 配列と参照ゲノム配列を比較した。今回実施した比較においては、届出者が独自に有する PH1V69 系統のゲノム配列情報を参照するため、自社データベースと連携したソフトウェアを用いた。当該ソフトウェアは、CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder 等のソフトウェアと同

様に、公的に利用可能なソフトウェア・パッケージ及びアルゴリズムを用いて開発されており、ガイド RNA とのミスマッチ及びバルジを有する潜在的オフターゲット配列を検出できる。なお、検索条件（参照ゲノム DNA 配列、対象の PAM モチーフ (*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質の場合は 5'-NGG-3') 及び許容する塩基配列の相違の程度) が同じ場合、CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder 等と当該ソフトウェアとの間で、得られる潜在的なオフターゲット配列に違いがないことを当該ソフトウェアの開発時に様々な配列を用いて確認した。

比較の結果、片方のガイド RNA の標的 DNA 配列と 2 塩基異なる潜在的オフターゲット配列が 1 箇所特定された (Cas-OFFinder を用いても同じ結果であった)。そこで、BC₁ 世代 29 個体について塩基配列解析を行い、本ワキシートウモロコシ中の当該配列にオフターゲット変異が生じていないことを確認した (表 1、11 ページ)。

表 1 PH1V69 系統におけるガイド RNA CR4 及び CR8 の標的配列及び類似配列

配列名	標的配列との塩基配列の違い (bp)	宿主 PH1V69 系統のゲノム中の配列
CR4 標的配列	-	GCCCAAACGCTTCCCGATCGG
-	0	なし (CR4 標的配列を除く)
-	1	なし
-	2	なし
CR8 標的配列	-	GCAATATAAAATTACCGATCGG
-	0	なし (CR8 標的配列を除く)
-	1	なし
CR8-1	2	GCAATATAAA GTT -CCGATAGG

ガイド RNA の標的配列である CR4 及び CR8 と類似した配列を、宿主である PH1V69 系統のゲノム DNA 配列を用いて検索した。その結果、CR8 と 2 塩基異なる配列が 1 箇所特定された (CR8-1)。表に示した配列中の PAM 配列を太字で示した。また CR8-1 の配列中で CR8 標的配列と異なる塩基を赤字で示した。シーケンス解析の結果、BC₁ 世代 29 個体の CR8-1 の配列はいずれも表中に示した宿主の配列と同一であった。

なお、従来の交配育種や誘発突然変異によって生じる遺伝的変異と比較するとゲノム編集によるオフターゲット変異の頻度は極めて低い。仮にオフターゲット変異が生じたとしても、望ましくない形質を有する系統は育種評価の過程で取り除かれ、商品化されることはない。

以上、CRISPR-Cas9 法による塩基配列の改変によって、本ワキシートウモロコシ中に新たなアレルゲンの産生及び既知の毒性物質の増加が生じる可能性は低い。

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。

Wx1 遺伝子がコードするアミロース合成酵素は、ADP グルコースからアミロースを合成する反応を特異的に触媒する。*Wx1* 遺伝子が欠失した本ワキシートウモロコシにおいては、意図したとおり子実デンプンのアミロース含有量が減少し、アミロペクチン含有量が増加している。また、アミロース合成酵素が触媒する反応は特異的であるため、他の代謝系への影響が生じる可能性は低いと考えられる。同様のワキシール形質を有する従来のワキシートウモロコシには食品として長い利用の歴史があることから、本ワキシートウモロコシがヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低い。

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 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、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 T₁ 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、T₁ 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、T₂ および T₃ 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 (T₁, T₂, T₃) 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、T₂ 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、T₂ 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。

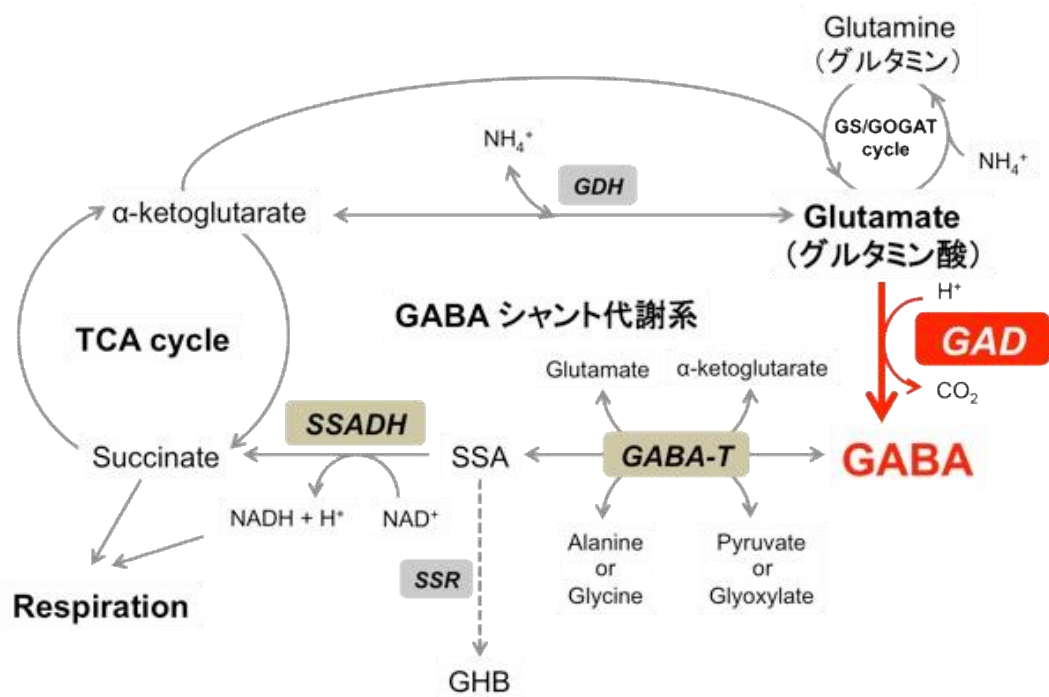


図1 高等植物におけるGABA代謝経路

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。

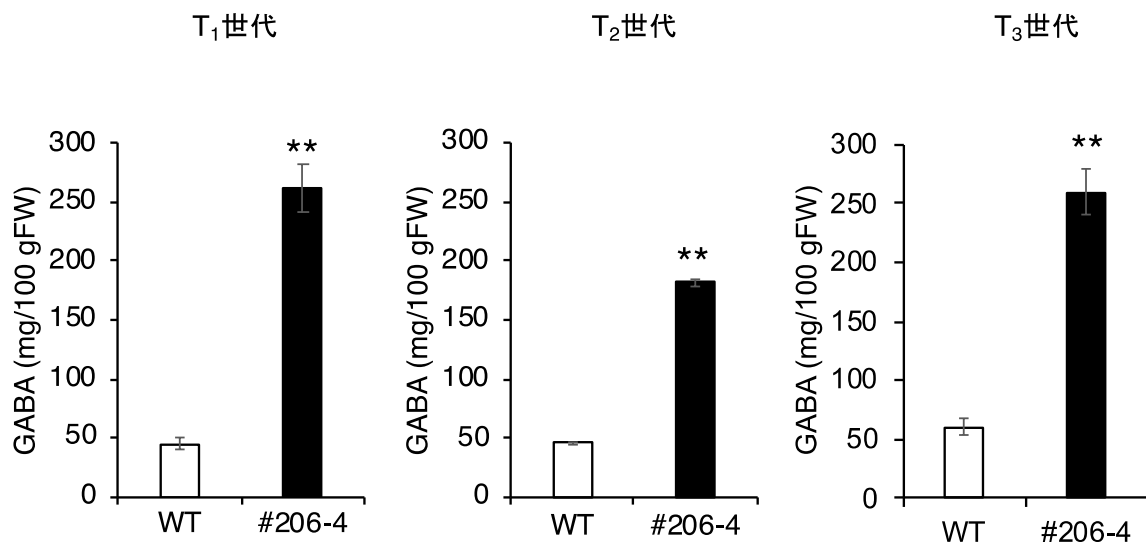


図2 赤熟果実におけるGABA含量(T₁世代からT₃世代)

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(T₁世代、T₂世代およびT₃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)。

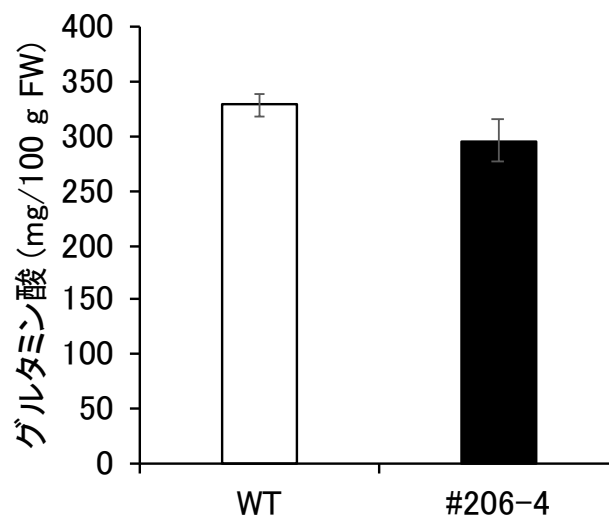


図3 赤熟果実におけるグルタミン酸の含量(T₂世代)

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(T₂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(T₂)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。