

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）

平成 29 年度 分担研究報告書

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び
国民受容に関する研究

分担課題： バイオテクノロジーを用いて得られた食品のメタボローム解析

研究分担者	太田 大策	(大阪府立大学生命環境学研究科・教授)
研究協力者	小川 拓水	(大阪府立大学生命環境学研究科・助教)
	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

本研究は、食品や医薬品開発を目的として、ゲノム編集技術によって内生代謝活性を改変したジャガイモ塊茎モデルに、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスによる統合オミクス解析を実施し、安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。本分担課題では、メタボロミクスによって、ゲノム編集によって代謝機能が改変された作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを最終目的としている。今年度は、ゲノム編集技術の一種である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法によってステロール側鎖還元酵素の遺伝子破壊を導入したジャガイモおよび母本品種の代謝プロファイル比較解析を行い、両者間での代謝物蓄積傾向の類似点と相違点を明らかにするとともに、蓄積代謝物の差異を同定した。

A. 研究目的

食品安全は利用可能な科学技術の進歩に合わせて時代とともに変化が求められる分野である。バイオテクノロジーによる生物機能の改変技術は急激な進歩を続けており、現在では、動物、植物、微生物といったあ

らゆる生物の遺伝子機能を多面的に改変することが可能となりつつある。特に、ゲノム編集による生物機能改変が農作物や家畜などにも適用され、急速に実用化されつつある。一方で、人為的に遺伝子機能を改変した生物を食用に利用する際には、安全性

に関わる品質管理や、生産段階での環境保全、社会受容の問題など、依然として多くの課題が残されている。生体成分の総体を解析対象とするオミクス解析は、遺伝子改変体を食用利用する上で懸念される生体成分の含量変化を調査するための強力なアプローチである。世界的にも、オミクス解析は食用利用を想定して開発された遺伝子改変体の安全性評価の第一歩として位置づけられており、各種の遺伝子改変体を対象とした実証データの蓄積が求められている。本研究は、メタボロミクスによって、ゲノム編集によって代謝機能が改変された作物の代謝プロファイル解析を実施し、安全性評価のための基礎データを取得・公開することを目的としている。

今年度は、ゲノム編集技術の一種である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法によってステロール側鎖還元酵素 (sterol side chain reductase 2; SSR2) の遺伝子破壊を導入したジャガイモおよび母本品種の代謝プロファイル比較解析を行い、両者間での代謝物蓄積傾向の類似点と相違点を明らかにするとともに、蓄積代謝物の差異を同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試試料

ジャガイモ試料は理化学研究所環境資源科学研究センター（梅基直行博士）から提供された。実験デザインは、ゲノム編集試料 (GE) と対照試料 (Cont) の 2 群間での比較とした。GE 群は、栽培品種サッシ

ーを pYS026_SSR2-TALEN-C で形質転換した系統 (#71) の独立 3 個体とした (GE-1, GE-2, および GE-3)。Cont 群は、栽培品種サッシーの独立 3 個体とした (Cont-1, Cont-2, および Cont-3)。

試料の調整、輸送、および保存は以下のようにした。各個体から成熟した塊茎を採取し、2-3 mm の厚さで剥皮し、皮の部分を回収して速やかに液体窒素中で急速凍結させた。凍結試料をドライアイスで冷凍保存し、理化学研究所から大阪府立大学へと輸送した。試料を凍結乾燥させ、液体窒素で十分に冷却した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素で冷却しながら磨砕した。磨砕した凍結乾燥試料は超低温フリーザー (-80°C) で保存した。

2. 溶媒抽出

凍結乾燥試料からの低分子化合物の抽出は Shepherd et al. (2007) の方法¹⁾ に準じて行なった。抽出の試行回数は 1 試料につき 3 回とした。磨砕試料 50 mg を硬質ガラス製のねじ口試験管に移し、メタノール (1.5 mL) を加え、蓋をしてボルテックスミキサーを用いて内容物を混合した後、30°C で 30 分間保温しながら震盪抽出した。そこに超純水 (375 µL) とクロロホルム (3 mL) を加え、同様にして震盪抽出した。さらに超純水 (750 µL) を加え、蓋をして手で試験管を激しく振ることで内容物を混合し、室温で 10 分間遠心し (3000 rpm; RT3S3 スイングローターを使用), 2 層に分離した。上層 (2 mL) をガラス製パスツールピペッ

トでポリプロピレン製のセーフロック付きチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、これを極性フラクションとした。下層（3 mL）を同様にして別のチューブに移し、これを非極性フラクションとした。

非極性フラクションに含まれる不飽和脂肪酸の酸化を防ぐため、以下のようにして抗酸化剤ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）を加えた。非極性フラクション全量を遠心濃縮機で乾固させた後、そこに BHT を含有するヘキサン（100 mg/L）1 mL を加え、再溶解させた。

極性フラクションおよび BHT を含む非極性フラクションは低温フリーザー（-30°C）で保存した。

3. 誘導体化

各フラクションに含まれる低分子化合物の誘導体化は Shepherd et al. (2007) の方法りに準じて行なった。

非極性フラクションの誘導体化は次のように進めた。BHT を含む非極性フラクション全量を遠心濃縮機で乾固させ、そこに 1% (v/v) 硫酸メタノール溶液 1 mL を加え、攪拌しながら（1,000 rpm）、50°C で 16 時間反応させ、脂肪酸をメチルエステル体に誘導体化した。別の試験管に反応液全量に移し、そこに 5% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 2.5 mL とクロロホルム 1.5 mL を加え、蓋をして手で試験管を激しく振り内容を混合し、静置して 2 層に分離した。下層（1.5 mL）をガラス製パストゥールピペットで別の試験管に移し、そこに 2% (w/v)

炭酸水素カリウム水溶液 1.5 mL を加え、蓋をして手で試験管を激しく振ることで内容を混合し、静置して 2 層に分離した。下層（1.5 mL）を同様にして新しいチューブに移し、遠心濃縮機で乾固させた。乾固試料にクロロホルム 50 μ L とピリジン 10 μ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌することで再溶解させた。続いて、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）80 μ L を加え、トリメチルシリル化を行った。反応液を室温で 3 分間遠心し（14,000 rpm）、上清をポリテトラフルオロエチレン製のメンブレンフィルターで濾過し、回収した濾液を分析用試料とした。

極性フラクションの誘導体化は次のように進めた。極性フラクション 50 μ L をチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、遠心濃縮機で乾固させ、そこにピリジンに溶解させたメトキシアミン塩酸塩（20 mg/mL）80 μ L を加え、攪拌しながら（1,000 rpm）、50°C で 4 時間反応させオキシム化を行なった。続いて、非極性フラクションと同様にしてトリメチルシリル化および反応液の濾過を行い、分析用試料を調製した。

5. 機器分析

分析用試料をガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計（GC-TOF/MS）に注入し、GC 部では試料中化合物の分離を行い、MS 部では分離した化合物のイオン化と質量情報の取得を行なった。GC の試料注入口の温度は 230°C（cold trap splitless mode）に設

定した。GC カラムは HP-5ms キャピラリーカラム（長さ 30 m× 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm ）を使用した。GC キャリアガスはヘリウムを用いた（流量 1.0 mL/min）。GC オープンの昇温条件は, 70°C (1 min), 1°C/min, 76°C (0 min), 6°C/min, 350°C (1 min) とした。トランスファーラインの温度は 250°C, イオン源の温度は 250°C とした。イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行った。検出器の電圧は 2850 V とした。スキャン範囲は m/z 40-650 とした。試料注入量は 1 μL とした。

6. データ処理

データ処理は既報の手順²⁾に従った。

GC-TOF/MS トータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムからの全イオン抽出とサンプル間でのピークアライメントには MetAlign³⁾ を, ピークデコンボリューションとピーク自動同定には AIoutput⁴⁾ を使用した。AIoutput によるピーク自動同定のためのマススペクトルライブラリは, 標準品の実測データを格納したインハウスのマススペクトルライブラリを用いた。また, Shepherd et al. (2007) に記載されている化合物の保持指標と主要イオンピーク情報⁵⁾を基にしてピーク自動同定結果のキュレーションを行なった。

7. 統計解析

主成分分析および Student's *t*-test は, MetaboAnalyst(ver. 3.5)⁵⁾ を用いて行った。主成分分析のデータ標準化方法は auto

scaling を選択した。

Student's *t*-test は, 危険率 5% 水準で有意性の判定を行った。GE と Cont の群間で, 個々のピークについて, 主要イオンの相対ピーク強度値の平均値の差の有無を検定した。検定の多重性に起因する問題を考慮して, Benjamini-Hochberg 法⁶⁾により有意差が認められたピーク群の偽陽性率 (False Discovery Rate; FDR) を推定した。

C. 研究結果

1. 検出ピーク数

非極性フラクションでは 92 個の代謝物候補ピークを得た。このうち 27 個は代謝物として同定することができた。残り 65 個のうち 16 個には注釈情報を付記することができた。

極性フラクションでは 126 個の代謝物候補ピークを得た。このうち 31 個は代謝物として同定することができた。残り 95 個のうち 45 個には注釈情報を付記することができた。

2. 主成分分析

非極性フラクションの 92 個のピークについて, 主要イオンの相対ピーク強度値を変数にして主成分分析を実施した (Fig. 1A)。第一主成分 (寄与率 29.4%) と第二主成分 (寄与率 25.1%) の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第一主成分軸に沿ってゲノム編集 (GE) 試料の 1 個体 (GE-2) が他の 5 個体と明確に区別された。第二主成分軸に沿って, GE 群と Cont

群の間での不明確なクラスター分離が認められた。

極性フラクションの 126 個のピークについて、同様にして主成分分析を実施した (Fig. 1B)。第一主成分 (寄与率 24.0%) と第二主成分 (寄与率 18.9%) の主成分スコアを基にして二次元プロット図を作成した。第二主成分軸に沿って、GE 群と Cont 群の間でのクラスター分離の傾向が認められた。特に、GE 群の 2 個体 (GE1, GE-3) が他の 4 個体と明確に区別された。

3. 平均値の差の検定

非極性フラクションでは、7 個のピークにおいて群間での有意差が認められた

(Table 1)。7 個目のピークの q 値より、これらのうち偽陽性の割合は 31.4% (2.2 個) と見積もられた。これら 7 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 3 個あった。これらのうち、GE 群で高いレベルであったのは、カンペステロール ($p = 0.0003$, $GE/Cont = 10.1$) のみであった。一方、GE 群で低いレベルであったのは、コレステロール ($p = 0.0006$, $Cont/GE = 4.1$)、およびソラニジン ($p = 0.0016$, $Cont/GE = 52.3$) であった。なお、q 値より、これら 3 個のピークのうち偽陽性の割合は 5% (0.15 個) と見積もられた。非極性フラクション誘導体化試料の TIC クロマトグラムを群間で比較したところ、これら 3 個のピークについて、明確なレベル差を確認できた (Fig. 2)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満の 4 個のピーク (N079, N085,

N086, N087) は、いずれも GE 群で低いレベルであった ($Cont/GE = 1.4-1.5$)。

一方、極性フラクションでは、16 個のピークにおいて群間での有意差が認められた (Table 2)。16 個目のピークの q 値より、これらのうち偽陽性の割合は 35.8% (5.7 個) と見積もられた。これら 16 個のピークのうち、ピーク強度比が群間で 2 倍以上のピークは 4 個あり (イソロイシン, フェニルアラニン, トリプトファン, およびチロシン様化合物 1), いずれも GE 群で高いレベルであった ($GE/Cont = 2.0-2.7$)。ピーク強度比が群間で 2 倍未満であった 12 個のピークのうち 10 個 (P056, グリシン, ロイシン, P036, P026, P055, バリン, P060, コハク酸様化合物 1, P059) は GE 群で高いレベルであった ($GE/Cont = 1.2-1.8$)。残りの 2 個 (1-ケストース様化合物 1, キナ酸) は GE 群で低いレベルであった ($Cont/GE = 1.4-1.9$)。

D. 考察

GE ジャガイモを特徴付ける 3 種類の代謝物 (カンペステロール, コレステロール, およびソラニジン) のうち、コレステロールとソラニジンについては、ともに遺伝子操作と蓄積量減少との因果関係を代謝生化学の視点から説明できる。一方、カンペステロールの増加については、原因として考えられるいくつかの可能性を列挙する。

コレステロールとソラニジンは、標的遺伝子 (SSR2) がコードする酵素が触媒する代謝反応の下流で生合成される代謝物であ

る⁷⁾。SSR2 を欠損させた GE ジャガイモにおいて、コレステロールとソラニジンの蓄積レベルが低いという結果は、ジャガイモの SGA 生合成経路に関する知識と矛盾しない。

GE ジャガイモにおけるカンペステロール増加の原因として複数の要因が考えられる。一つ目は、遺伝子改変により SGAs 生合成経路が遮断されたことによって植物ステロール生合成経路への前駆体物質供給量が増加した可能性である (Fig. 3)。二つ目は、SSR2 の欠損がそのパラログ遺伝子 SSR1 の機能発現に影響を及ぼした可能性である。GE ジャガイモでは SSR1 が触媒する代謝反応の基質であるイソフコステロールが減少しており、その反応産物であるβ-シトステロールが増加傾向にあった (Fig. 3)。上記の 2 つの可能性については、並行して進められているトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析の結果と合わせて総合的に考察する必要がある。三つ目は、野生型 SSR2 とは異なる触媒活性を持つ変異型 SSR2 が発現している可能性がある。GE ジャガイモの母本品種サッシーは 4 倍体であるため、4 個の SSR2 対立遺伝子が存在する。TALEN 法を適用してこれらの対立遺伝子の同時編集を試みた場合、個々の対立遺伝子が独立したイベントによって編集を受けるため、変異には多様性が生じる可能性がある。一方、編集を受けた遺伝子の発現制御を司るプロモーター領域は保存されるため、本来の SSR2 発現条件下で、変異型 SSR2 が発現する可能性があ

る。現在、#71 系統における SSR2 遺伝子の欠失状況の解析が進められている (梅基ら)。

引用・参考文献リスト

¹⁾ Shepherd et al. *Metabolomics* **3**, 475 (2007).

DOI: 10.1007/s11306-007-0058-2

²⁾ Ogawa et al. *Protoc. Exch.* (2017). DOI:

10.1038/protex.2017.151

³⁾ De Vos et al. *Nat. Protoc.* **2**, 778–91 (2007).

DOI: 10.1038/nprot.2007.95

⁴⁾ Tsugawa et al. *BMC Bioinform.* **12**, 131

(2011). DOI: 10.1186/1471-2105-12-131

⁵⁾ Xia et al. *Nucleic Acids Res.* **43**, W251–7

(2015). DOI: 10.1093/nar/gkv380

⁶⁾ Benjamini & Hochberg *J. R. Stat. Soc. Series*

B Stat. Methodol. **57**, 289–300 (1995). DOI:

doi:10.2307/2346101

⁷⁾ Sawai and Ohshima et al. *Plant Cell* **26**, 3763

–74 (2014). DOI: 10.1105/tpc.114.130096

E. 結論

本研究では、植物の代謝改変を目的として実施されたゲノム編集操作が、目的以外の代謝機能に及ぼす影響をメタボロミクスによって包括的に評価することが目的である。実験には、毒性ステロイドアルカロイド (ソラニジン) 含量の減少を目的として、TALEN 法によるゲノム編集でステロール側鎖還元酵素をコードする SSR2 遺伝子を破壊し、ステロイドアルカロイド生合成を遮断したジャガイモ塊茎、および母本品種塊茎を供試し、代謝物蓄積の類似性と相違性を明ら

かにすることを目的とした。主成分分析および個々のピーク平均値の差の検定から、このゲノム編集による *SSR2* 遺伝子破壊では、目的としたステロール生合成経路以外の代謝機能に与える影響は限定的であることを明らかにした。ゲノム編集ジャガイモでは、ゲノム編集を反映して *SSR2* が触媒する代謝反応の下流の代謝物（コレステロール、ソラニジン）が減少していた。一方、植物主要ステロールの一種であるカンペステロール含量の顕著な増加を確認した。カンペステロールは作物を含む広範な植物種に普遍的に存在する化合物であり、これまでに毒性に関する報告はない。一方、極性画分の代謝物にも差異が認められたが、ステロール生合成とアミノ酸代謝の関連は明らかではない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takumi Ogawa, Atsushi Okazawa, Daisaku Ohta: A protocol for GC-

MS-based metabolomic analysis in mature seed of rice (*Oryza sativa* L.). *Protocol Exchange* (2017), DOI: 10.1038/protex.2017.151

- 2) Takumi Ogawa, Koji Kashima, Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Shiho Kurokawa, Masaharu Kuroda, Atsushi Okazawa, Hiroshi Kiyono, Daisaku Ohta: Seed Metabolome Analysis of a Transgenic Rice Line Expressing Cholera Toxin B-subunit. *Scientific Reports* **7**, 5196 (2017), DOI: 10.1038/s41598-017-04701-w

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

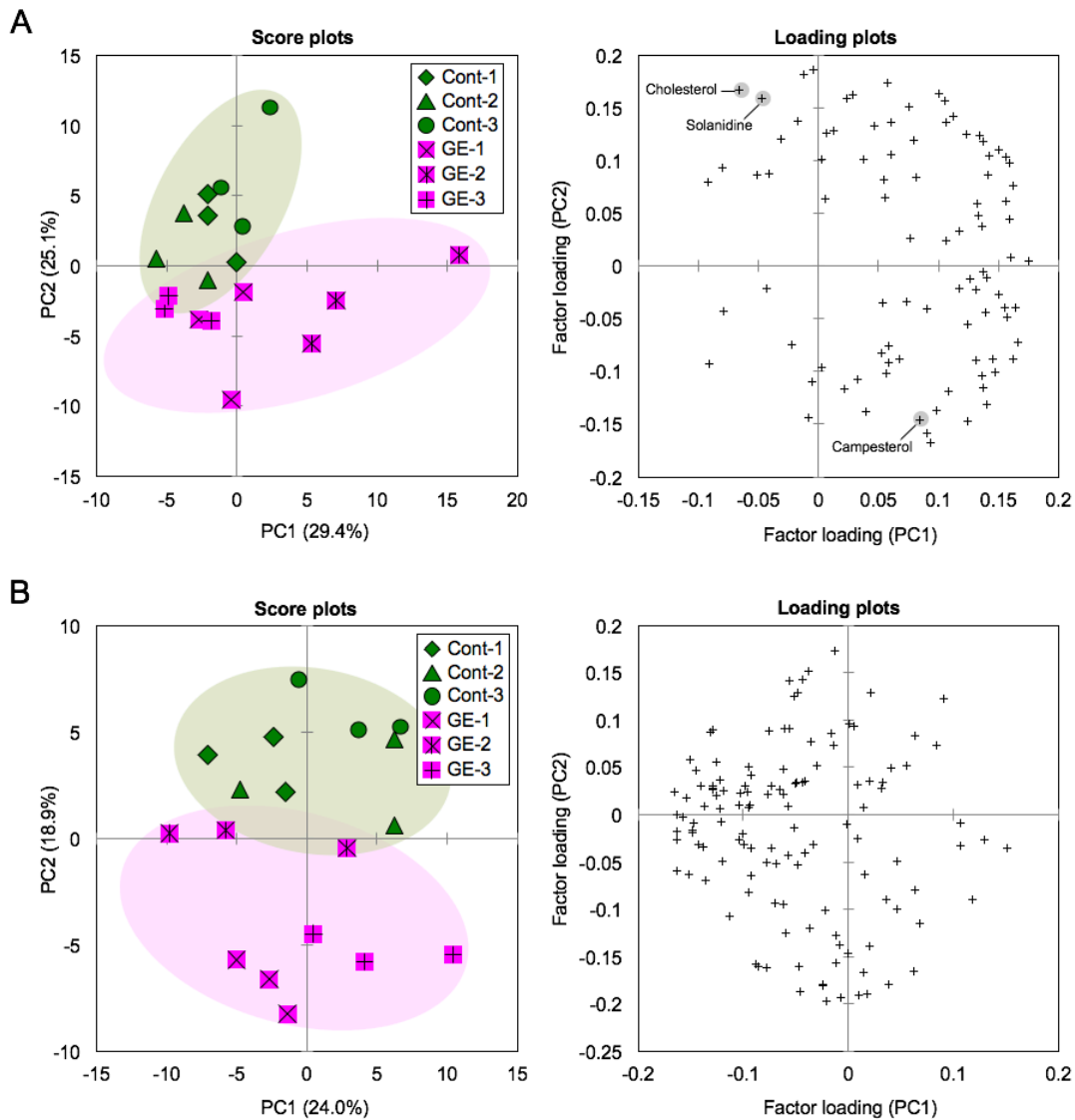


Fig. 1. 主成分分析

ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1, GE-2, GE-3) と対照ジャガイモ試料 (Cont-1, Cont-2, Cont-3) の分析結果の主成分分析は web ツール MetaboAnalyst 3.0 を用いた。データ標準化方法は auto scaling を選択した。A および B にはそれぞれ非極性フラクションおよび極性フラクション由来の代謝物候補ピークの検出強度値をもとにした主成分分析の結果を示した。左側パネル：第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) の主成分スコアをもとにして作成した二次元プロット図。各主成分の寄与率は図中の括弧内に記し、個々のプロットの注釈を図中に記した。右側のパネル：PC1 と PC2 のローディングスコアをもとにして作成した二次元プロット図。個々のプロットは検出された代謝物候補ピークに対応する。

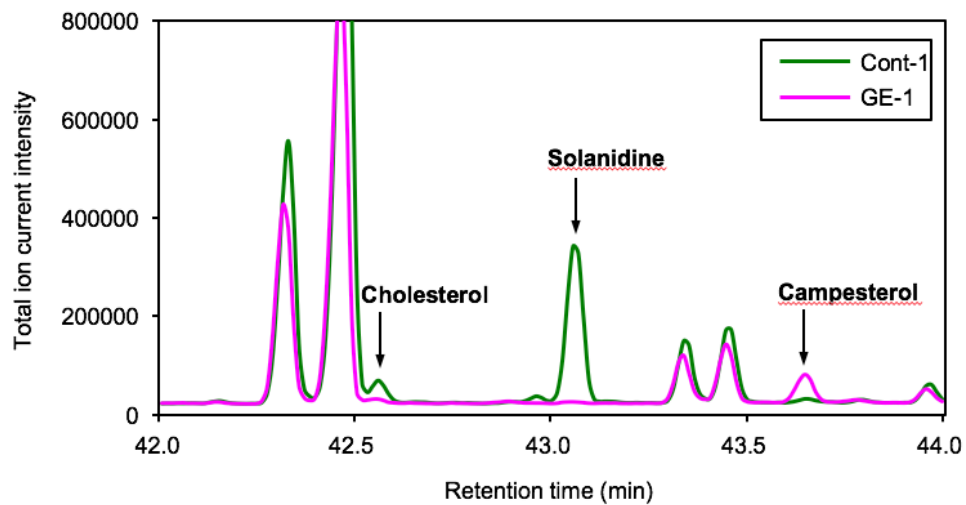


Fig. 2. GC-MS トータルイオンカレントクロマトグラムの群間比較

対照試料およびゲノム編集ジャガイモの各群の特徴を反映する平均的なクロマトグラムを重ね、カラム保持時間 42 分から 44 分の部分を拡大して表示した。対照ジャガイモ試料 (Cont-1) および ゲノム編集ジャガイモ試料 (GE-1) のクロマトグラムはそれぞれ緑色およびマゼンダで示した。ゲノム編集ジャガイモを特徴付けるコレステロール、ソラニジン、およびカンペステロールを矢印で示した。

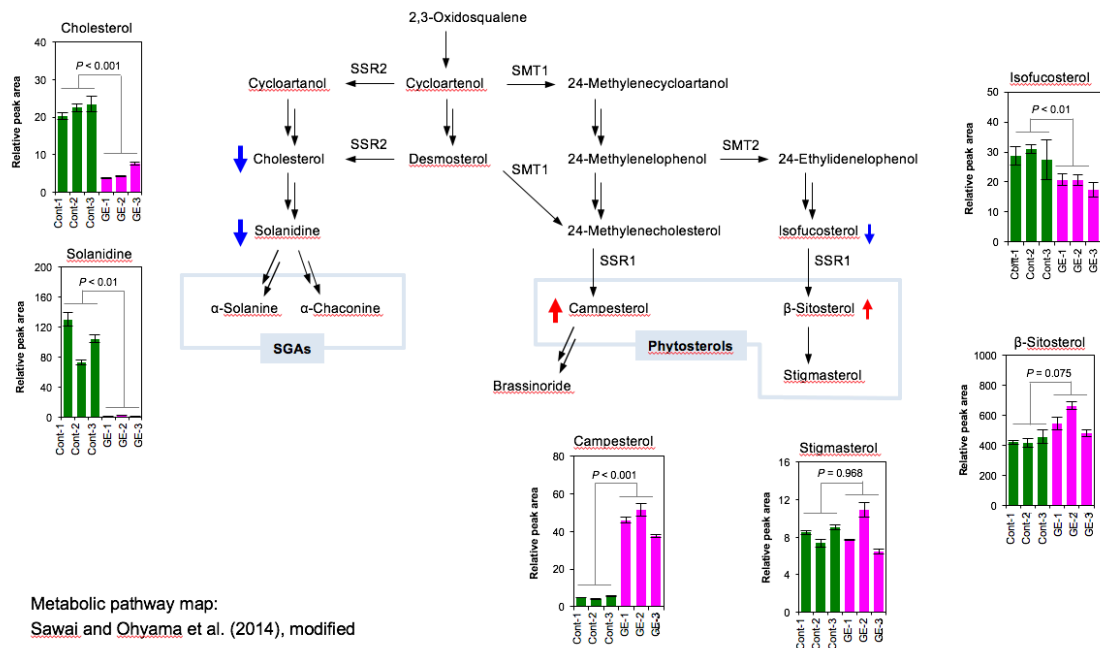


Fig. 3. ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド生合成および植物ステロール生合成に関わる代謝経路地図。代謝経路地図は、Sawai and Ohyama et al. (2014)⁷⁾を参考にして一部を改変して作成した。Shepherd et al. (2007)に記載されていたカラム保持指標情報および検出 m/z 情報⁹⁾をもとにして同定した各成分について、内部標準物質との比較により得られた相対ピーク面積値の平均値を棒グラフで示した（エラーバーは3回の独立した抽出実験の標準偏差を示す）。群間の平均値の差の検定は Student's t-test を用い、検定結果は図中に記入した。ゲノム編集ジャガイモ試料（GE-1, GE-2, GE-3）と対照ジャガイモ試料（Cont-1, Cont-2, Cont-3）を比較し、5%水準で有意差がみられた場合は、代謝経路地図中の成分名の脇に上向きの赤矢印（ゲノム編集ジャガイモ > 対照ジャガイモ試料）あるいは下向きの青矢印（ゲノム編集ジャガイモ < 対照ジャガイモ試料）を記入した。SGAs；ステロイドグリコアルカロイド。

Supplementary Table S1. List of the metabolite-candidate peaks detected from non-polar fractions.

Notes:

^{a)} N; non-polar fraction

^{b)} RI; retention index, these values are obtained by normalizing the retention time of the peak to those of *n*-alkanes.

^{c)} QuantMS; the representative *m/z* value used for peak quantification.

^{d)} The approach used for peak identification is described in the Methods section.

^{e)} The accuracy scores returned by Aloutput2 peak identification process are shown. Identification score; calculated by Delta-RI and PPMCC values, Delta-RI; calculated by subtracting the retention index value of each peak from that of a library compound, PPMCC; Pearson's product-moment correlation coefficient.

^{f)} HMDB; The Human Metabolome Database (version 4.0) , KEGG COMPOUND; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) COMPOUND database

Peak ID ^{a)}	Peak detection		Peak identification ^{d)}		Aloutput2 score ^{e)}			Database ID ^{f)}	
	RI ^{b)}	Quant MS ^{c)}	Metabolite name	Method	Identificati on score	Delta-RI	PPMCC	HMDB	KEGG
N001	1230.8	228	N001	-	-	-	-	-	-
N002	1291.3	299	Glucose-1-phosphate	Aloutput	0.974	0.3	0.961	HMDB0001586	C00103
N003	1312.0	199	N003	-	-	-	-	-	-
N004	1499.8	73	Malate-like 1	Aloutput	0.714	7.2	0.623	-	-
N005	1725.6	74	C14:0FAME-like 1	Aloutput	0.798	0.6	0.713	-	-
N006	1800.9	71	Octadecane-like 1	Aloutput	0.727	0.9	0.621	-	-
N007	1926.3	74	C16:0FAME-like 1	Aloutput	0.783	0.8	0.693	-	-
N008	2010.5	74	C17:0FAME-like 1	Aloutput	0.711	16.5	0.712	-	-
N009	2026.6	74	C17:0FAME	Aloutput	0.937	0.4	0.908	No entry found	No entry found
N010	2050.7	313	C16:0FA	Aloutput	0.993	1.7	0.991	HMDB0000220	C00249
N011	2096.3	69	N011	-	-	-	-	-	-
N012	2097.2	81	C18:2FAME	Aloutput	0.981	2.2	0.975	No entry found	No entry found
N013	2098.0	151	N013	-	-	-	-	-	-
N014	2102.6	79	C18:2FAME-like 1	Aloutput	0.785	7.6	0.722	-	-
N015	2107.3	97	C18:1FAME-like 1	Aloutput	0.799	5.3	0.726	-	-
N016	2127.7	87	N016	-	-	-	-	-	-
N017	2128.7	74	C18:0FAME-like 1	Aloutput	0.872	1.7	0.816	-	-
N018	2135.1	299	N018	-	-	-	-	-	-
N019	2153.7	91	N019	-	-	-	-	-	-
N020	2162.1	327	C17:0FA-like 1	Aloutput	0.796	14.1	0.805	-	-
N021	2214.8	337	C18:2FA-like 1	Aloutput	0.890	0.2	0.839	-	-
N022	2247.8	341	C18:0FA	Aloutput	0.951	1.2	0.928	HMDB0000827	C01530
N023	2260.4	341	N023	-	-	-	-	-	-
N024	2295.3	81	C20:2FAME-like 1	Aloutput	0.73	2.7	0.626	-	-
N025	2300.1	71	Tricosane-like 1	Aloutput	0.858	0.1	0.795	-	-
N026	2328.3	74	C20:0FAME	Aloutput	0.992	0.7	0.988	No entry found	No entry found
N027	2358.5	355	C19:0FA-like 1	Aloutput	0.729	10.5	0.666	-	-
N028	2428.3	74	C21:0FAME	Aloutput	0.966	1.7	0.951	No entry found	No entry found
N029	2457.9	369	C21:0FAlc	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N030	2483.3	259	N030	-	-	-	-	-	-
N031	2488.6	173	N031	-	-	-	-	-	-
N032	2490.7	88	N032	-	-	-	-	-	-
N033	2492.9	259	N033	-	-	-	-	-	-
N034	2500.3	71	Pentacosane-like 1	Aloutput	0.793	0.3	0.706	-	-
N035	2502.5	173	N035	-	-	-	-	-	-
N036	2503.6	320	C22:1FAME-like 1	Aloutput	0.746	1.4	0.645	-	-
N037	2530.7	74	C22:0FAME	Aloutput	0.979	0.3	0.969	No entry found	No entry found
N038	2537.2	259	N038	-	-	-	-	-	-
N039	2542.6	259	N039	-	-	-	-	-	-
N040	2545.9	149	N040	-	-	-	-	-	-
N041	2555.7	385	N041	-	-	-	-	-	-
N042	2556.7	383	C22:0FAlc	Manually cu	-	-	-	HMDB0014770	No entry found
N043	2630.3	74	C23:0FAME	Aloutput	0.982	0.7	0.974	No entry found	No entry found
N044	2653.8	397	N044	-	-	-	-	-	-
N045	2698.8	71	Heptacosane-like 1	Aloutput	0.856	1.2	0.793	-	-
N046	2730.5	74	C24:0FAME	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N047	2752.9	411	C24:0FAlc	Manually cu	-	-	-	No entry found	No entry found
N048	2803.5	433	N048	-	-	-	-	-	-

N049	2841.2	460	N049	-	-	-	-	-	-	-
N050	2852.1	425	C25:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N051	2882.3	395	N051	-	-	-	-	-	-	-
N052	2915.3	283	N052	-	-	-	-	-	-	-
N053	2921.5	411	N053	-	-	-	-	-	-	-
N054	2932.7	74	C26:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N055	2950.2	439	C26:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	C08381
N056	2978.6	239	N056	-	-	-	-	-	-	-
N057	2998.6	193	N057	-	-	-	-	-	-	-
N058	3021.5	239	N058	-	-	-	-	-	-	-
N059	3043.3	239	N059	-	-	-	-	-	-	-
N060	3048.4	453	C27:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N061	3053.4	239	N061	-	-	-	-	-	-	-
N062	3080.4	423	N062	-	-	-	-	-	-	-
N063	3091.7	239	N063	-	-	-	-	-	-	-
N064	3102.1	239	N064	-	-	-	-	-	-	-
N065	3136.9	438	C28:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N066	3150.3	470	N066	-	-	-	-	-	-	-
N067	3151.8	467	C28:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	HMDB0034380	C08387
N068	3153.1	468	N068	-	-	-	-	-	-	-
N069	3157.0	329	Cholesterol	Aloutput, M	0.783	16.0	0.813	HMDB0000067	C00187	
N070	3190.5	239	N070	-	-	-	-	-	-	-
N071	3206.8	150	Solanidine	Manually cu	-	-	-	-	HMDB0003236	C06543
N072	3236.8	452	C29:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N073	3245.0	239	C29:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N074	3247.8	75	N074	-	-	-	-	-	-	-
N075	3249.2	481	N075	-	-	-	-	-	-	-
N076	3267.0	343	Campesterol	Aloutput, M	0.879	16.0	0.967	HMDB0002869	C01789	
N077	3280.7	452	N077	-	-	-	-	-	-	-
N078	3282.0	451	N078	-	-	-	-	-	-	-
N079	3334.7	283	N079	-	-	-	-	-	-	-
N080	3338.8	466	C30:0FAME	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	No entry found
N081	3345.7	495	C30:0FAlc	Manually cu	-	-	-	-	No entry found	C08392
N082	3359.7	357	β -Sitosterol	Aloutput	0.928	12.3	0.982	HMDB0000852	C01753	
N083	3361.1	133	N083	-	-	-	-	-	-	-
N084	3369.6	215	N084	-	-	-	-	-	-	-
N085	3373.6	296	N085	-	-	-	-	-	-	-
N086	3375.0	386	N086	-	-	-	-	-	-	-
N087	3398.8	386	N087	-	-	-	-	-	-	-
N088	3426.1	209	N088	-	-	-	-	-	-	-
N089	3434.7	441	N089	-	-	-	-	-	-	-
N090	3477.9	479	N090	-	-	-	-	-	-	-
N091	3603.1	189	N091	-	-	-	-	-	-	-
N092	3616.9	647	N092	-	-	-	-	-	-	-

Supplementary Table S2. List of the metabolite-candidate peaks detected from polar fractions.

a) P; polar fraction

b) RI; retention index, these values are obtained by normalizing the retention time of the peak to those of *n*-alkanesc) QuantMS; the representative *m/z* value used for peak quantification

d) The approach used for peak identification is described in the Methods section.

e) The accuracy scores returned by Aloutput2 peak identification process are shown. Identification score; calculated by Delta-RI and PPMCC values, Delta-RI; calculated by subtracting the retention index value of each peak from that of a library compound, PPMCC; Pearson's product-moment correlation coefficient.

f) HMDB; The Human Metabolome Database (version 4.0) , KEGG COMPOUND; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) COMPOUND database

Peak ID ^{a)}	Peak detection		Peak identification ^{d)}		Aloutput2 score ^{e)}			Database ID ^{f)}	
	RI ^{b)}	QuantMS ^{c)}	Metabolite name	Method	Identification score	Delta-RI	PPMCC	HMDB	KEGG
P001	1111.6	85	Undecane-like 1	Aloutput	0.730	11.6	0.679	-	-
P002	1155.2	147	P002	-	-	-	-	-	-
P003	1194.9	281	P003	-	-	-	-	-	-
P004	1230.6	228	P004	-	-	-	-	-	-
P005	1231.1	144	Valine	Aloutput	0.998	0.1	0.996	HMDB0000883	C00183
P006	1279.7	299	Glucose-1-phosphate-like 2	Aloutput	0.942	11.3	0.990	-	-
P007	1287.8	158	Leucine	Aloutput	0.999	0.2	0.999	HMDB0000687	C00123
P008	1288.8	299	Glucose-1-phosphate-like 1	Aloutput	0.993	2.2	0.992	-	-
P009	1292.8	299	Glucose-1-phosphate	Aloutput	0.998	1.8	1.000	HMDB0001586	C00103
P010	1294.4	180	Nicotinate-like 1	Aloutput	0.895	1.6	0.848	-	-
P011	1296.4	147	Glycerol-like 1	Aloutput	0.814	2.4	0.737	-	-
P012	1296.9	73	Threonine-like 1	Aloutput	0.738	10.1	0.676	-	-
P013	1306.2	142	P013	-	-	-	-	-	-
P014	1308.5	158	Isoleucine	Aloutput	0.980	1.5	0.972	HMDB0000172	C00407
P015	1312.5	199	P015	-	-	-	-	-	-
P016	1318.2	147	Succinate-like 1	Aloutput	0.822	6.8	0.768	-	-
P017	1318.8	174	Glycine	Aloutput	0.970	0.2	0.955	HMDB0000123	C00037
P018	1326.2	147	Succinate	Aloutput	0.962	1.2	0.944	HMDB0000254	C00042
P019	1340.0	147	Succinate-like 2	Aloutput	0.807	15.0	0.834	-	-
P020	1345.1	245	Fumarate-like 2	Aloutput	0.904	11.9	0.940	-	-
P021	1353.1	147	Itaconate	Aloutput	0.967	1.9	0.952	HMDB0002092	C00490
P022	1355.4	245	Fumarate-like 1	Aloutput	0.958	1.6	0.940	-	-
P023	1357.1	147	Itaconate-like 2	Aloutput	0.936	2.1	0.908	-	-
P024	1359.4	147	Itaconate-like 1	Aloutput	0.962	4.4	0.955	-	-
P025	1360.0	245	Fumarate	Aloutput	0.963	3.0	0.951	HMDB0000134	C00122
P026	1381.7	204	P026	-	-	-	-	-	-
P027	1385.7	141	β -Cyanoolanine	Aloutput	0.972	0.7	0.958	HMDB0060245	C02512
P028	1401.3	71	Tetradecane-like 1	Aloutput	0.870	1.3	0.813	-	-
P029	1408.3	218	P029	-	-	-	-	-	-
P030	1470.3	174	P030	-	-	-	-	-	-
P031	1489.3	73	Malate-like 2	Aloutput	0.838	17.7	0.933	-	-
P032	1493.1	147	Malate-like 4	Aloutput	0.732	12.9	0.695	-	-
P033	1496.8	147	Malate-like 3	Aloutput	0.763	9.2	0.702	-	-
P034	1497.5	73	Malate-like 5	Aloutput	0.708	9.5	0.631	-	-
P035	1507.5	73	Malate-like 1	Aloutput	0.922	0.5	0.886	-	-
P036	1509.5	243	P036	-	-	-	-	-	-
P037	1510.9	75	P037	-	-	-	-	-	-
P038	1511.6	73	Malate	Aloutput	0.987	4.6	0.993	HMDB0000156	C00149
P039	1519.1	156	5-Oxoproline-like 2	Aloutput	0.876	13.9	0.926	-	-
P040	1521.1	232	Aspartic acid-like 2	Aloutput	0.809	17.9	0.887	-	-
P041	1522.5	174	γ -Aminobutyrate-like 2	Aloutput	0.737	19.5	0.803	-	-
P042	1525.2	156	5-Oxoproline-like 1	Aloutput	0.952	7.8	0.964	-	-
P043	1532.0	176	P043	-	-	-	-	-	-
P044	1532.7	156	5-Oxoproline	Aloutput	0.998	0.3	0.997	HMDB0000267	C01879
P045	1535.4	232	Aspartic acid-like 1	Aloutput	0.927	3.6	0.900	-	-
P046	1537.4	174	γ -Aminobutyrate-like 1	Aloutput	0.955	4.6	0.946	-	-
P047	1541.5	234	P047	-	-	-	-	-	-
P048	1542.2	232	Aspartate	Aloutput	0.984	3.2	0.983	HMDB0000191	C00049
P049	1542.9	147	P049	-	-	-	-	-	-
P050	1543.5	174	γ -Aminobutyrate	Aloutput	0.964	1.5	0.948	HMDB0000112	C00334
P051	1583.0	73	α -Ketoglutaric acid-like 2	Aloutput	0.726	9.0	0.651	-	-
P052	1592.5	218	P052	-	-	-	-	-	-
P053	1600.0	71	Hexadecane	Aloutput	0.962	0.0	0.944	HMDB0033792	No entry found
P054	1606.6	73	α -Ketoglutaric acid-like 1	Aloutput	0.758	14.6	0.754	-	-
P055	1612.4	218	P055	-	-	-	-	-	-
P056	1613.2	262	P056	-	-	-	-	-	-

P057	1627.8	75	C13:0FAME-like 1	Aloutput	0.724	2.8	0.619	-	-
P058	1629.2	218	Phenylalanine-like 1	Aloutput	0.714	9.8	0.640	-	-
P059	1632.2	189	P059	-	-	-	-	-	-
P060	1632.9	73	P060	-	-	-	-	-	-
P061	1638.1	218	Phenylalanine	Aloutput	0.953	0.9	0.931	HMDB0000159	C00079
P062	1640.2	246	P062	-	-	-	-	-	-
P063	1649.7	230	P063	-	-	-	-	-	-
P064	1650.4	229	P064	-	-	-	-	-	-
P065	1693.6	73	P065	-	-	-	-	-	-
P066	1694.3	231	P066	-	-	-	-	-	-
P067	1711.8	85	Heptadecane-like 1	Aloutput	0.707	11.8	0.648	-	-
P068	1751.9	174	Putrescine	Aloutput	0.968	0.9	0.953	HMDB0001414	C00134
P069	1764.2	217	Ribitol	Aloutput	0.984	5.2	0.993	HMDB0000508	C00474
P070	1770.4	147	Aconitic acid-like 1	Aloutput	0.735	4.4	0.638	-	-
P071	1777.4	216	P071	-	-	-	-	-	-
P072	1792.1	156	Glutamine	Aloutput	0.969	1.1	0.954	HMDB0000641	C00064
P073	1840.2	142	Ornithine-like 1	Aloutput	0.896	1.2	0.849	-	-
P074	1847.5	461	P074	-	-	-	-	-	-
P075	1852.4	273	Citrate-like 1	Aloutput	0.859	2.4	0.799	-	-
P076	1853.2	350	P076	-	-	-	-	-	-
P077	1893.6	345	Quinate-like 1	Aloutput	0.884	3.4	0.837	-	-
P078	1900.1	345	Quinate	Aloutput	0.991	3.1	0.993	HMDB0003072	C00296
P079	1913.8	331	P079	-	-	-	-	-	-
P080	1916.4	217	Fructose	Aloutput	0.990	3.4	0.992	HMDB0000660	C00095
P081	1917.2	129	P081	-	-	-	-	-	-
P082	1927.4	217	Fructose-like 1	Aloutput	0.911	14.4	0.990	-	-
P083	1935.1	319	Glucose-like 1	Aloutput	0.915	3.9	0.884	-	-
P084	1939.4	154	P084	-	-	-	-	-	-
P085	1942.0	518	P085	-	-	-	-	-	-
P086	1942.8	319	Glucose	Aloutput	0.989	3.8	0.992	HMDB0000122	C00031
P087	1943.6	230	P087	-	-	-	-	-	-
P088	1944.5	317	Lysine	Aloutput	0.955	2.5	0.938	HMDB0000182	C00047
P089	1950.5	218	Tyrosine	Aloutput	0.953	7.5	0.964	HMDB0000158	C00082
P090	1959.1	218	Tyrosine-like 1	Aloutput	0.812	1.1	0.732	-	-
P091	1974.4	319	Mannitol	Aloutput	0.989	3.4	0.990	HMDB0000765	C00392
P092	1999.2	396	P092	-	-	-	-	-	-
P093	2042.9	313	C16:0FA-like1	Aloutput	0.812	6.1	0.749	-	-
P094	2051.0	313	C16:0FA	Aloutput	0.996	2.0	0.997	HMDB0000220	C00249
P095	2077.8	204	P095	-	-	-	-	-	-
P096	2096.5	259	P096	-	-	-	-	-	-
P097	2130.6	305	myo-Inositol	Aloutput	0.985	1.6	0.979	HMDB0000211	C00137
P098	2131.5	306	P098	-	-	-	-	-	-
P099	2152.7	396	P099	-	-	-	-	-	-
P100	2161.0	245	P100	-	-	-	-	-	-
P101	2225.1	202	Tryptophan-like 1	Aloutput	0.864	15.9	0.941	-	-
P102	2236.6	202	Tryptophan	Aloutput	0.988	4.4	0.994	HMDB0000929	C00078
P103	2247.4	341	C18:0FA	Aloutput	0.960	1.6	0.942	HMDB0000827	C01530
P104	2367.5	387	Glucose-6-phosphate-like 1	Aloutput	0.841	10.5	0.826	-	-
P105	2368.5	315	Fructose 6-phosphate-like 1	Aloutput	0.875	2.5	0.822	-	-
P106	2379.8	387	Glucose-6-phosphate	Aloutput	0.980	1.8	0.972	HMDB0001401	C00092
P107	2395.9	387	Glucose-6-phosphate-like 2	Aloutput	0.755	17.9	0.802	-	-
P108	2431.5	204	P108	-	-	-	-	-	-
P109	2497.7	73	P109	-	-	-	-	-	-
P110	2703.7	361	Sucrose-like 2	Aloutput	0.862	7.3	0.827	-	-
P111	2713.2	131	P111	-	-	-	-	-	-
P112	2714.4	361	Sucrose	Aloutput	0.932	3.4	0.906	HMDB0000258	C00089
P113	2715.5	437	P113	-	-	-	-	-	-
P114	2718.0	73	P114	-	-	-	-	-	-
P115	2719.1	361	Sucrose-like 1	Aloutput	0.876	8.1	0.854	-	-
P116	2817.3	361	Maltose	Aloutput	0.900	0.3	0.854	HMDB0000163	C00208
P117	3057.8	345	P117	-	-	-	-	-	-
P118	3071.8	204	P118	-	-	-	-	-	-
P119	3075.7	307	P119	-	-	-	-	-	-
P120	3180.4	345	P120	-	-	-	-	-	-
P121	3240.0	307	P121	-	-	-	-	-	-
P122	3413.0	267	P122	-	-	-	-	-	-
P123	3434.4	441	P123	-	-	-	-	-	-
P124	3504.4	361	1-Kestose-like 1	Aloutput	0.865	10.6	0.863	-	-

Supplementary Table S3. Comparison of non-polar metabolite levels between GE and Cont samples.

Notes:

^{a)} N; non-polar fraction

^{b)} GE; Gene edited samples, Cont; Control samples, SD; standard deviation

^{c)} The ratios of relative peak intensities in GE against those in Cont are calculated. When the GE/Cont ratio was below 1, Cont/GE ratio was calculated and the value is shown with - (minus). Bold letter; >2 or <-2

^{d)} Significant differences of relative peak intensities in GE against those of Cont are analyzed by Student's t-test using MetaboAnalyst (version 3.5), a web-based statistical analysis tool of metabolomics data. Bold letter; <0.05

Peak ID ^{a)}	Metabolite name	Relative peak intensity ^{b)}				Ratio ^{c)} (GE/Cont)	Student's t-test ^{d)}	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
N076	Campesterol	11286	1469	1123	152	10.1	0.0003	0.0258
N069	Cholesterol	1292	469	5357	564	-4.1	0.0006	0.0258
N071	Solanidine	1950	657	102032	20199	-52.3	0.0016	0.0500
N079	N079	4579	601	6649	356	-1.5	0.0044	0.1021
N087	N087	5347	627	7577	409	-1.4	0.0063	0.1158
N086	N086	20508	2812	28354	2341	-1.4	0.0183	0.2805
N085	N085	17527	2530	23979	1903	-1.4	0.0244	0.3144
N045	Heptacosane-like 1	2655	619	1947	348	1.4	0.0515	0.3144
N090	N090	6040	1087	4325	645	1.4	0.0522	0.3144
N020	C17:0FA-like 1	6203	1338	9028	1112	-1.5	0.0529	0.3144
N077	N077	4028	556	3193	259	1.3	0.0535	0.3144
N058	N058	3971	480	5066	864	-1.3	0.0577	0.3144
N007	C16:0FAME-like 1	72594	10026	57418	8911	1.3	0.0599	0.3144
N056	N056	5184	702	6667	1342	-1.3	0.0599	0.3144
N082	β -Sitosterol	112932	14688	90025	7438	1.3	0.0619	0.3144
N060	C27:0FAIc	31645	3281	37244	2319	-1.2	0.0635	0.3144
N026	C20:0FAME	19864	1283	22692	1772	-1.1	0.0659	0.3144
N015	C18:1FAME-like 1	1327	262	873	404	1.5	0.0664	0.3144
N084	N084	3801	928	2426	179	1.6	0.0682	0.3144
N075	N075	237900	21314	208841	14512	1.1	0.0684	0.3144
N053	N053	8489	1429	11331	1265	-1.3	0.0736	0.3223
N044	N044	27757	5849	19719	1365	1.4	0.0944	0.3592
N050	C25:0FAIc	13941	3097	9554	823	1.5	0.0955	0.3592
N081	C30:0FAIc	142878	21120	113447	13845	1.3	0.0977	0.3592
N089	N089	14971	3590	13055	2389	1.1	0.1016	0.3592
N016	N016	43674	3057	47749	3340	-1.1	0.1041	0.3592
N078	N078	11587	1595	9381	634	1.2	0.1054	0.3592
N040	N040	3343	336	3581	351	-1.1	0.1128	0.3705
N017	C18:0FAME-like 1	51058	3616	55754	4542	-1.1	0.1313	0.4166
N029	C21:0FAIc	91383	14524	75177	4243	1.2	0.1529	0.4688
N080	C30:0FAME	101667	13469	89491	9404	1.1	0.1616	0.4796
N057	N057	3933	1240	3301	555	1.2	0.1755	0.5046
N009	C17:0FAME	1473	388	1092	137	1.3	0.1835	0.5117
N027	C19:0FA-like 1	5725	961	6739	582	-1.2	0.1981	0.5260
N021	C18:2FA-like 1	1563	349	1287	159	1.2	0.2001	0.5260
N074	N074	18088	1764	16606	733	1.1	0.2219	0.5670
N065	C28:0FAME	107275	13958	119715	6613	-1.1	0.2389	0.5845
N022	C18:0FA	9650	1216	10130	1024	-1.0	0.2495	0.5845
N008	C17:0FAME-like 1	650	207	514	132	1.3	0.2512	0.5845
N036	C22:1FAME-like 1	562	149	680	370	-1.2	0.2541	0.5845
N083	N083	12497	1481	11641	1097	1.1	0.2967	0.6501
N034	Pentacosane-like 1	4455	999	3772	1042	1.2	0.3008	0.6501
N054	C26:0FAME	16464	1992	17408	1196	-1.1	0.3038	0.6501
N037	C22:0FAME	9099	1673	10236	1562	-1.1	0.3247	0.6698
N025	Tricosane-like 1	2957	478	2556	579	1.2	0.3276	0.6698
N061	N061	4172	1153	4449	946	-1.1	0.3441	0.6807
N047	C24:0FAIc	42560	5941	38879	2025	1.1	0.3488	0.6807
N011	N011	12200	1893	10929	4135	1.1	0.3603	0.6807
N038	N038	17716	1887	20018	3253	-1.1	0.3640	0.6807
N010	C16:0FA	28852	5367	27593	3131	1.0	0.3699	0.6807
N046	C24:0FAME	15607	2099	17022	2015	-1.1	0.3963	0.7085

N039	N039	18297	1533	20893	4126	-1.1	0.4053	0.7085
N052	N052	32154	1292	31679	862	1.0	0.4155	0.7085
N001	N001	22514	6271	20817	4751	1.1	0.4158	0.7085
N019	N019	3532	817	3920	475	-1.1	0.4336	0.7252
N063	N063	6029	1415	6811	1625	-1.1	0.4853	0.7568
N002	Glucose-1-phosphate	859	524	731	336	1.2	0.4880	0.7568
N070	N070	10904	1428	10091	1813	1.1	0.4926	0.7568
N088	N088	62588	19255	52677	9428	1.2	0.4932	0.7568
N051	N051	12127	1998	13036	1053	-1.1	0.4936	0.7568
N030	N030	3752	1107	4417	937	-1.2	0.5045	0.7609
N033	N033	4933	1494	5785	1161	-1.2	0.5175	0.7679
N048	N048	3777	1429	3292	853	1.1	0.5270	0.7696
N062	N062	18548	2957	17317	874	1.1	0.5370	0.7719
N049	N049	4729	1147	4534	623	1.0	0.5631	0.7929
N003	N003	6997	1972	6590	1931	1.1	0.5695	0.7929
N073	C29:0FAIc	6516	1314	6095	1038	1.1	0.5774	0.7929
N031	N031	3184	1081	3559	498	-1.1	0.6293	0.8414
N035	N035	3434	1140	3847	629	-1.1	0.6311	0.8414
N059	N059	8854	2331	9605	2340	-1.1	0.6527	0.8458
N041	N041	2955	512	3107	259	-1.1	0.6617	0.8458
N068	N068	267175	28972	274459	19263	-1.0	0.6619	0.8458
N091	N091	5516	2971	4642	1415	1.2	0.6996	0.8817
N064	N064	4482	934	4614	654	-1.0	0.7177	0.8898
N005	C14:0FAME-like 1	556	112	535	121	1.0	0.7354	0.8898
N028	C21:0FAME	2336	482	2430	359	-1.0	0.7470	0.8898
N014	C18:2FAME-like 1	42452	4511	43549	3648	-1.0	0.7542	0.8898
N043	C23:0FAME	4806	1490	5113	1123	-1.1	0.7544	0.8898
N004	Malate-like 1	538	123	519	144	1.0	0.8166	0.9488
N042	C22:0FAIc	36759	5374	37428	2269	-1.0	0.8539	0.9488
N072	C29:0FAME	38917	2426	38638	3227	1.0	0.8647	0.9488
N066	N066	7544	1173	7616	1085	-1.0	0.8655	0.9488
N023	N023	3767	539	3726	268	1.0	0.8842	0.9488
N006	Octadecane-like 1	514	132	509	130	1.0	0.8944	0.9488
N055	C26:0FAIc	141264	19493	139660	6388	1.0	0.8960	0.9488
N012	C18:2FAME	55165	6385	55524	5593	-1.0	0.9000	0.9488
N013	N013	7026	1593	7128	1828	-1.0	0.9037	0.9488
N018	N018	25912	6905	25492	3421	1.0	0.9189	0.9488
N032	N032	3534	1357	3432	953	1.0	0.9251	0.9488
N067	C28:0FAIc	671457	105905	668179	89049	1.0	0.9310	0.9488
N092	N092	26507	7119	26199	6207	1.0	0.9469	0.9488
N024	C20:2FAME-like 1	548	131	546	144	1.0	0.9488	0.9488

Supplementary Table S4. Comparison of non-polar metabolite levels between GE and Cont samples.

Notes:

a) P; polar fraction

b) GE; Gene edited samples, Cont; Control samples, SD; standard deviation

c) The ratios of relative peak intensities in GE against those in Cont are calculated. When the GE/Cont ratio was below 1, Cont/GE ratio was calculated and the value is shown with - (minus). Bold letter; >2 or <-2

d) Significant differences of relative peak intensities in GE against those of Cont are analyzed by Student's t-test using MetaboAnalyst (version 3.5), a web-based statistical analysis tool of metabolomics data. Bold letter; <0.05

Peak ID ^{a)}	Metabolite name	Relative peak intensity ^{b)}				Ratio ^{c)} (GE/Cont)	Student's t-test ^{d)}	
		GE (n = 3)		Cont (n = 3)			p-value	q-value
		Mean	SD	Mean	SD			
P056	P056	19015	3660	12365	2715	1.5	0.0029	0.2438
P017	Glycine	4593	312	3643	506	1.3	0.0050	0.2438
P007	Leucine	41845	6171	23013	4755	1.8	0.0070	0.2438
P125	1-Kestose-like 2	486	132	681	93	-1.4	0.0090	0.2438
P036	P036	107781	23150	77126	19468	1.4	0.0128	0.2438
P026	P026	31968	5677	21755	3261	1.5	0.0144	0.2438
P055	P055	124600	21890	83068	20978	1.5	0.0145	0.2438
P005	Valine	91723	17793	50893	7553	1.8	0.0168	0.2438
P014	Isoleucine	66301	14917	33400	5492	2.0	0.0200	0.2438
P060	P060	55534	11598	40300	8407	1.4	0.0214	0.2438
P016	Succinate-like 1	1197	44	1006	124	1.2	0.0216	0.2438
P059	P059	10797	2641	7131	1625	1.5	0.0239	0.2438
P061	Phenylalanine	41073	10375	15873	3936	2.6	0.0252	0.2438
P102	Tryptophan	32954	10250	12456	4115	2.6	0.0337	0.3037
P078	Quinate	135156	21638	251428	56039	-1.9	0.0404	0.3390
P090	Tyrosine-like 1	76671	28297	28534	9449	2.7	0.0455	0.3580
P088	Lysine	23223	2827	16488	2822	1.4	0.0523	0.3604
P069	Ribitol	60352	1220	59821	1525	1.0	0.0524	0.3604
P118	P118	13604	3935	25741	6700	-1.9	0.0543	0.3604
P010	Nicotinate-like 1	823	92	1032	144	-1.3	0.0634	0.3995
P063	P063	20359	4654	13368	2401	1.5	0.0798	0.4424
P050	γ -Aminobutyrate	69847	4668	77028	5112	-1.1	0.0803	0.4424
P052	P052	87936	28608	48359	3241	1.8	0.0855	0.4424
P084	P084	22416	6696	12835	2722	1.7	0.0901	0.4424
P029	P029	6591	1295	5385	743	1.2	0.0909	0.4424
P064	P064	103139	25866	66928	12352	1.5	0.0913	0.4424
P076	P076	3270	387	3682	196	-1.1	0.1158	0.5222
P075	Citrate-like 1	358618	42057	407053	25504	-1.1	0.1166	0.5222
P077	Quinate-like 1	6805	12631	486	132	14.0	0.1243	0.5222
P046	γ -Aminobutyrate-like 1	486	132	5206	9486	-10.7	0.1287	0.5222
P066	P066	165106	29922	132908	23838	1.2	0.1294	0.5222
P043	P043	13736	2717	9386	2811	1.5	0.1326	0.5222
P027	β -Cyanoolanine	2536	738	1831	615	1.4	0.1533	0.5854
P085	P085	6220	947	5130	1179	1.2	0.1733	0.6423
P111	P111	3573	1285	4327	983	-1.2	0.1925	0.6929
P024	Itaconate-like 1	737	302	998	266	-1.4	0.2047	0.7164
P072	Glutamine	1012	222	1354	571	-1.3	0.2146	0.7184
P109	P109	4749	884	5486	1128	-1.2	0.2167	0.7184
P091	Mannitol	6106	634	7462	1483	-1.2	0.2274	0.7307
P089	Tyrosine	3100	1633	1674	1309	1.9	0.2320	0.7307
P079	P079	24658	5415	20388	3643	1.2	0.2435	0.7482
P022	Fumarate-like 1	582	126	516	133	1.1	0.2505	0.7508
P053	Hexadecane	542	178	665	207	-1.2	0.2562	0.7508
P106	Glucose-6-phosphate	2400	644	2939	714	-1.2	0.2987	0.8338
P087	P087	5985	2043	4247	1212	1.4	0.3103	0.8338
P013	P013	83037	19061	58812	29714	1.4	0.3180	0.8338
P018	Succinate	528	147	623	105	-1.2	0.3282	0.8338
P012	Threonine-like 1	919	736	1422	1173	-1.5	0.3343	0.8338
P119	P119	3844	1313	3059	873	1.3	0.3433	0.8338
P105	Fructose 6-phosphate-like 1	970	256	1154	285	-1.2	0.3461	0.8338
P124	1-Kestose-like 1	737	333	1101	444	-1.5	0.3522	0.8338
P104	Glucose-6-phosphate-like 1	826	198	964	247	-1.2	0.3585	0.8338
P108	P108	9063	1943	7632	1977	1.2	0.3689	0.8338
P065	P065	89406	11279	82862	11168	1.1	0.3788	0.8338

P073	Ornithine-like 1	5270	1107	4515	1307	1.2	0.3803	0.8338
P058	Phenylalanine-like 1	2372	3835	514	132	4.6	0.3866	0.8338
P054	α -Ketoglutaric acid-like 1	9865	11192	4381	6658	2.3	0.3877	0.8338
P030	P030	3940	105	3887	193	1.0	0.3965	0.8338
P051	α -Ketoglutaric acid-like 2	19162	15742	9463	10899	2.0	0.4048	0.8338
P096	P096	7002	1565	5845	1547	1.2	0.4091	0.8338
P040	Aspartic acid-like 2	5280	2600	3864	2307	1.4	0.4194	0.8338
P057	C13:0FAME-like 1	2179	1681	1355	1570	1.6	0.4199	0.8338
P068	Putrescine	555	106	523	116	1.1	0.4222	0.8338
P070	Aconitic acid-like 1	486	132	526	147	-1.1	0.4280	0.8338
P098	P098	4054	829	4918	1421	-1.2	0.4322	0.8338
P009	Glucose-1-phosphate	485323	48154	508970	54985	-1.0	0.4368	0.8338
P071	P071	3263	1478	4940	2620	-1.5	0.4470	0.8407
P002	P002	21592	6549	19406	6766	1.1	0.4606	0.8534
P121	P121	3798	1066	3068	1140	1.2	0.4923	0.8685
P011	Glycerol-like 1	2273	579	1965	549	1.2	0.4963	0.8685
P097	myo-Inositol	14208	3009	16898	5170	-1.2	0.4981	0.8685
P001	Undecane-like 1	1080	309	956	394	1.1	0.5038	0.8685
P074	P074	4441	2056	6176	2925	-1.4	0.5045	0.8685
P110	Sucrose-like 2	552	135	526	147	1.0	0.5203	0.8685
P100	P100	4025	816	4415	801	-1.1	0.5206	0.8685
P083	Glucose-like 1	9387	20845	4384	7082	2.1	0.5284	0.8685
P080	Fructose	96948	91164	59595	21372	1.6	0.5590	0.8685
P037	P037	8315	1520	7744	753	1.1	0.5608	0.8685
P095	P095	4805	4499	2929	924	1.6	0.5660	0.8685
P019	Succinate-like 2	523	143	545	132	-1.0	0.5663	0.8685
P031	Malate-like 2	7157	9483	4321	4542	1.7	0.5685	0.8685
P107	Glucose-6-phosphate-like 2	536	122	567	119	-1.1	0.5726	0.8685
P033	Malate-like 3	3195	5145	1863	1984	1.7	0.5788	0.8685
P116	Maltose	602	251	514	132	1.2	0.5790	0.8685
P047	P047	7732	936	7301	866	1.1	0.5894	0.8713
P122	P122	4079	2333	3229	980	1.3	0.5947	0.8713
P035	Malate-like 1	19183	19659	14436	19291	1.3	0.6131	0.8880
P094	C16:0FA	23525	2151	22994	2530	1.0	0.6264	0.8969
P086	Glucose	133491	108935	95923	31550	1.4	0.6410	0.9007
P003	P003	3880	1008	4205	1272	-1.1	0.6474	0.9007
P115	Sucrose-like 1	374962	363038	302488	375314	1.2	0.6505	0.9007
P081	P081	3935	3369	2851	1029	1.4	0.6626	0.9069
P082	Fructose-like 1	53192	40145	40439	14744	1.3	0.6724	0.9069
P062	P062	74690	11659	78158	18673	-1.0	0.6766	0.9069
P067	Heptadecane-like 1	578	117	546	128	1.1	0.6942	0.9101
P004	P004	4459	1461	4179	965	1.1	0.7068	0.9101
P126	P126	6314	796	6576	1323	-1.0	0.7085	0.9101
P123	P123	10946	1741	10460	2722	1.0	0.7132	0.9101
P034	Malate-like 5	3409	5226	2589	2448	1.3	0.7151	0.9101
P093	C16:0FA-like 1	857	612	961	719	-1.1	0.7291	0.9187
P113	P113	98723	17584	103154	24401	-1.0	0.7422	0.9259
P044	5-Oxoproline	196279	27893	206076	35896	-1.0	0.7521	0.9290
P048	Aspartate	88729	11133	85756	12196	1.0	0.7747	0.9331
P101	Tryptophan-like 1	503	125	514	132	-1.0	0.7781	0.9331
P015	P015	4305	843	4178	665	1.0	0.7811	0.9331
P008	Glucose-1-phosphate-like 1	68141	31523	73430	37177	-1.1	0.7850	0.9331
P049	P049	27453	1872	27792	1366	-1.0	0.8000	0.9420
P103	C18:0FA	17644	2922	17188	3836	1.0	0.8224	0.9552
P028	Tetradecane-like 1	758	92	749	134	1.0	0.8380	0.9552
P025	Fumarate	2902	757	3060	988	-1.1	0.8424	0.9552
P041	γ -Aminobutyrate-like 2	1094	434	1036	388	1.1	0.8520	0.9552
P020	Fumarate-like 2	583	261	560	161	1.0	0.8540	0.9552
P117	P117	19587	5998	20413	6023	-1.0	0.8567	0.9552
P039	5-Oxoproline-like 2	5950	5013	5427	5238	1.1	0.8756	0.9678
P032	Malate-like 4	4895	5954	4331	4800	1.1	0.8922	0.9735
P092	P092	14197	2887	13977	2358	1.0	0.9025	0.9735
P023	Itaconate-like 2	538	123	531	156	1.0	0.9206	0.9735
P038	Malate	66311	19812	65146	6874	1.0	0.9358	0.9735
P045	Aspartic acid-like 1	10290	8013	9833	6744	1.0	0.9387	0.9735
P021	Itaconate	541	125	547	129	-1.0	0.9418	0.9735
P120	P120	24581	6506	25088	9490	-1.0	0.9453	0.9735
P042	5-Oxoproline-like 1	14807	6716	15079	8549	-1.0	0.9458	0.9735
P112	Sucrose	608138	250718	618184	276920	-1.0	0.9503	0.9735

P099	P099	17164	2261	17240	2945	-1.0	0.9698	0.9854
P006	Glucose-1-phosphate-like 2	339567	158098	337371	207440	1.0	0.9813	0.9885
P114	P114	66320	15979	66417	15469	-1.0	0.9885	0.9885