

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書（令和4年度）

ゲノム編集食品のトランスクリプトーム変化の検証

研究分担者 吉場 聡子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：

本分担研究では、ゲノム編集による意図しない変化について検証する上で、トランスクリプトーム（遺伝子発現）変化に着目した。RNA-seqによる遺伝子発現変化の解析を行うことで、mRNAレベルの変化を予測や先入観なく網羅的に検証し、ゲノムのオフターゲット解析やアレルゲン予測では捕捉できない変化を検出できる可能性がある。本研究ではモデルサンプルとして、届出済みゲノム編集食品から「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；GABA トマト」を対象とし、未編集トマトと GABA トマトの青果のトランスクリプトから遺伝子発現の比較解析を試みた。ゲノム編集前後の遺伝子発現の変化の検証結果及び今後の課題について報告する。

A. 研究目的

現在ゲノム編集食品の安全性評価においては、ゲノム編集による意図しない変化の影響、すなわちオフターゲット（意図しないゲノム配列の改変）リスクや新規アレルゲン産生及び毒性物質増加の可能性、代謝系への影響などが主な評価の対象となっている。これらの検証は基本的に予測に基づいており、例えばゲノムの変化は、*in silico* で予測された特定の遺伝子配列に対して、変異の有無を確認する方法が用いられており、非常に精度が高い一方で、予測されなかった箇所の変異は検証されない。アレルゲンや代謝成分に関しても同様であり、遺伝子配列の変化による新規アレルゲンタンパク質の産生や、オンターゲットの編集により想定される代謝物の変化について検証されているが、想定していない新規アレルゲンや代謝経路の変化については、評価の対象となっていない。

一方で、本研究課題（全体）の分担研究において、質量分析による網羅的な未知化合物の推定が

行われ、ゲノム編集トマト（GABA トマト；グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の一部を改変し GABA 含有率を高めたトマト）のゲノム編集前後で、未知化合物を含む複数の化合物が有意に増減していることが示されている。現在ゲノム編集技術は、オリジナルの Cas9 による二本鎖 DNA の切断と修復による変異の導入に加えて、base editing や prime editing などの塩基編集、RNA をターゲットとした RNA editing など多様化しており、今後「想定しない」変化を網羅的に検出し、その変化による影響を評価することは重要になる可能性がある。

本分担研究では、ゲノム編集による意図しない変化のうち、トランスクリプトーム変化（遺伝子発現の変化）に着目した（図1）。編集前後の遺伝子発現の変化を調べることで、mRNA レベルの変化を予測や先入観なく網羅的に検証し、ゲノム解析やアレルゲン予測では捕捉できない可能性のある変化の掘り出しとこれらの変化とのつながりについて検証しようと試みた。

モデルサンプルとして、3つの届出済みのゲノム編集食品、GABA トマト、可食部増大マダイ、高成長トラフグのうち、GABA トマトの解析を行った。その理由として、マダイとトラフグの作出方法においては、Cas9 の導入に mRNA が使用されており、ゲノムに挿入されず作用が一時的である、すなわちオフターゲットの可能性が低い一方で、GABA トマトは T-DNA による Cas9 の導入により、比較的持続的に作用している可能性があり、意図しない変化が起りやすいと考えられるためである（参考文献 1,2）。また、前述の通り GABA トマトのメタボローム解析により、ゲノム編集により未知化合物の量が変化していることが示されており、トランスクリプトーム解析によりメタボロームとのつながりについても検証できる可能性がある。

研究開始時点では、トランスクリプトーム比較解析で新たに得られる可能性のある情報として、下記を想定した。1.オンターゲット変異による代謝経路の変化に伴う間接的な遺伝子発現の変化、2.オフターゲット予測から漏れたオフターゲット変異による遺伝子発現の変化、3.Cas9 の持続的な作用による遺伝子発現の変化（DNA 損傷シグナルの不活化等）（図 1）。

本研究は、ゲノム編集食品の編集前後の想定しない変化とその影響について、トランスクリプトーム比較解析により、網羅的に検証し評価することで、ゲノム編集技術の安全性評価において新たな問題提起につながる事象を探ること、さらにゲノム編集食品のトランスクリプトーム解析に必要な要件及び課題について議論・検証することを目的とした。

B. 研究方法

概要

ゲノム編集トマト（GABA トマト）をモデルサンプルとして、野生型および GABA トマトから

total RNA を抽出し、RNA-seq による遺伝子発現比較解析を行う。

サンプル

GABA トマト青果はサナテックシード社より購入した。野生型トマト（cv. シシリアンルージュ CF）は神奈川県内のスーパーで購入した。

Total RNA の抽出

生鮮サンプルを -30°C で凍結した後、凍結乾燥機（EYELA FDU-1200; 東京理化機械株式会社）により凍結乾燥した。凍結乾燥サンプルは、液体窒素を入れた乳鉢で粉碎後、Fruit-mate for RNA purification（タカラバイオ株式会社）による前処理と NucleoSpin RNA plant（Macherey-nagel GmbH & Co.KG）を組み合わせて total RNA を回収した。回収した total RNA は分光光度計（NanoDrop; Thermo Fisher Scientific）および TapeStation（Agilent Technologies Japan, Ltd.）を用いて、濃度測定及び品質検定を行った。RNA-seq に供する total RNA の品質は、次の値を目安とした。

OD260/280: ≥ 1.6

OD260/230: ≥ 1.6

RINe (RNA integrity number): ≥ 7.0

28S/18S (rRNA ratio): ≥ 1.0

RNA-seq

シーケンスは、次世代シーケンス（NGS）解析サービス（タカラバイオ株式会社）により行った。作業内容は下記の通りである。

SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing を用いて、RNA 増幅、Nexta XT DNA Library Prep Kit を用いて DNA ライブラリ作製。ライブラリ作製は、Smart-Seq2 法（参考文献 3）を用いている。シーケンスは、NovaSeq システム（illumina）を用いて、150base 両末端解析（6Gb/4,000 万リード；2,000 万リードペア）を

野生型 (WT) トマト及び GABA トマトそれぞれ 3 サンプルずつ (合計 6 サンプル) 実施。得られたリード配列をリファレンスゲノム配列にマッピング後、遺伝子ごとに正規化された発現量、リードカウント値及び TPM (transcript per million) 値を算出している。なお、マッピングに用いたトマトのリファレンスゲノム配列および遺伝子アノテーション情報はそれぞれ、SL3.0、ITAG2.3、遺伝子数の合計は 35,825 である。結果のリード配列は FASTQ 形式、マッピング結果は bam 形式、遺伝子発現量データは csv ファイルで納品された。

遺伝子発現解析

再現性の確認 (technical replicate) 及び 3 反復 2 群間比較による遺伝子発現量変動解析を行う。発現解析スキームを図 2 で示す。A. リードカウント値からトランスクリプトームデータ分析ウェブプラットフォーム iDEP (integrated Differential Expression and Pathway analysis; iDEP.96, 参考文献 4) を用いて解析する方法と、B. TPM 値から手動で発現変動遺伝子を抽出する方法を平行して行った。

A では、遺伝子発現量データからリードカウントデータを作成し、iDEP を用いて、データの前処理と検証後、発現量変動解析、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析などを行った。iDEP のワークフローを図 3 に示す。

B では、正規化された各サンプルの TPM 値を用いて t-検定 (関連なし二群比較) を行い、下記の基準で WT トマトと GABA トマトで発現量が有意に異なる遺伝子を抽出しリスト化した。

FoldChange:

$$|\log_2 TPM_{GABA} - \log_2 TPM_{wt}| \geq 1$$

t-test p-value ≤ 0.05

t-test q-value ≤ 0.05

さらに、抽出した遺伝子リストを用いて、gProfiler (参考文献 5) による GO 解析を行った。

C. 研究結果と考察

1. total RNA の品質検定の結果

解析に供した total RNA 品質検定の結果を図 4 に示す。RNA-seq 解析サービスへのサンプル送付前と送付後に品質検定が行われ、ここでは解析サービスによるライブラリ作成直前の品質検定結果のみを示した。

2. マッピング及び遺伝子アノテーション

マッピング結果の情報を表 1 で示す。6 つすべてのサンプルにおいて、input reads に対し、ペアドリード (ペアでマッピングされたリード) の合計はそれぞれ 4,000 万リード以上 (99%以上)、また MAPQ が 10 以上のリードについても 4,000 万リード以上 (88%以上) だった。これらのリードに対して、EnsembleID を用いて 35,825 遺伝子がアノテーションされた。

3. 遺伝子発現解析の結果

3-1. リードカウント値を用いた iDEP による解析

遺伝子発現量のリードカウントデータを iDEP に入力、最小 CPM (count per million) 値を 0.5 に設定したところ、EnsembleID でアノテーションされた 35,825 遺伝子のうち、17,597 遺伝子がパスした。この 17,597 遺伝子に対して、発現量変動解析を行った。方法は DESeq2 を選択し、FDR cutoff: 0.1、fold-change (GABA/WT): ≥ 2 で発現変動遺伝子の絞り込みを行ったところ、3,210 遺伝子で発現量が上昇 (Upregulated)、3,525 遺伝子で減少 (Downregulated) していた。結果を volcano plot で示す (図 5)。FDR 値の高かった遺伝子の情報をそれぞれ上から順に 10 ずつ示す。さらに抽出された遺伝子を用いて、GO エンリッチメント解析を行った。結果を表 2 で示す。Up-regulated genes では、ribonucleoprotein の生合成や chitin の活性に関わる GO、一方 down-regulated genes では、Carbohydrate metabolic/

catabolic process, plastid, chloroplast に関わる GO などが抽出された。

3-2.TPM 値を用いた t-検定

マッピングの結果から算出された TPM 値に対して t-検定を行い、WT トマトと GABA トマトで発現量が有意に異なる遺伝子を抽出しリスト化した。結果の一部を表 3 で示す。EnsemblID でアノテーションされた 35,825 遺伝子のうち、研究方法に示した基準で、発現量が有意に上昇していた遺伝子 (up-regulated genes) は 932、減少していた遺伝子 (down-regulated genes) は 4,154、合計 5,086 遺伝子が抽出された。

3-3.gProfiler による GO 解析

上記で抽出されたそれぞれの遺伝子リストを用いて、GO 解析を行ったところ、up-regulated genes では、chitin や cell wall の代謝プロセス、ribonucleoprotein の生合成など、down-regulated genes では、catalytic activity, small molecule metabolic process, plastid に関係する GO が抽出された。結果を図 6 で示す。これらの結果は、iDEP の結果と傾向が一致する。

3-4.GAD 遺伝子の発現量変化

GABA トマトでは、グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase; GAD) をコードする遺伝子の一つ、SIGAD3 が改変されている。当該酵素は、グルタミン酸のカルボキシル基を除去することで GABA を合成する。トマトは 5 つの GAD 遺伝子を有しているが、GABA 合成に寄与するのは GAD2 と SIGAD3 であり、特に SIGAD3 が主要な働きをすることがわかっている (参考文献 6,7)。GABA トマトは、CRISPR/Cas9 による変異導入 (一塩基挿入) により、SIGAD3 の C 末端の自己阻害領域が除去されており、その結果 SIGAD3 の活性が上昇することで、GABA の蓄積量が增大する。

SIGAD3 を含む 5 つの GAD のゲノム編集前後の遺伝子発現量の変化を表 4 に示す。SIGAD3 及び GAD2, GAD4 の遺伝子発現量に有意な差は見られなかった。一方 GAD の発現量は 1/3 以下 (logFC: -1.8) を示し、有意に減少が認められた。SIGAD3 の活性の上昇により間接的に影響した可能性はあるが、関連は不明である。

なお、SIGAD3 のマッピングリードを IGV 上で確認したところ、WT と GABA どちらにおいても、3'側にリードの偏りが見られたが、その他の点において特に相違は見られなかった (図 7)。

3-5.その他 GABA 代謝系に関わる遺伝子の発現量変化

GABA はグルタミン酸を基質として GAD により合成された後、GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T) により Succinic semialdehyde (SSA) へと代謝される。SSA は SSA 脱水素酵素 (SSADH) により Succinate に代謝された後、TCA 回路へ流入する (GABA shunt, 図 8)。これらの GABA 代謝経路に関わる可能性のある分子について、遺伝子の発現量を比較した。結果を表 5 に示す。WT と比較して GABA トマトでは、GABA-TP1 の発現量が有意に増加 (logFC: 1.7)、GABA-TP3 と SSADH の発現量が有意に減少 (logFC: -4.9, -1.3) していた ($p < 0.05$)。これらに関しても、SIGAD3 の活性の上昇により遺伝子発現が間接的に影響した可能性はあるが、関連は不明である。

4. 考察と今後の課題

本研究では、ゲノム編集による意図しない変化のうち、トランスクリプトーム変化に着目し、編集前後の遺伝子発現の変化を調べることで、mRNA レベルの変化を予測や先入観なく網羅的に検証することを試みた。

GABA トマトをモデルサンプルとして、WT と GABA トマトから mRNA を抽出し、RNA-seq 及び遺伝子発現の比較を行った。2 つの方法で遺伝

子発現変動解析及びGO解析を行ったところ、WTに比べてGABAトマトで発現量が上昇していたのは、chitinやcell wallの代謝プロセス、ribonucleoproteinの生合成などに関係する遺伝子であり、一方で発現量が減少していたのは、catalytic activity, small molecule metabolic process, plastidに関係する遺伝子だった。また、GAD遺伝子やGABA代謝に関わる遺伝子についても、いくつかの遺伝子で発現量の変化が見られた。

このように、WTとGABAトマトでは、有意に遺伝子発現のパターンの違いが見られたが、その原因として、ゲノム編集による影響が考えられるが、トマトの生育環境、収穫時期、生果の保存状態の違いなどその他の影響についても可能性は無視できない。特に当初に想定した中で、オンターゲット変異による代謝経路の変化に伴う間接的な遺伝子発現の変化、オフターゲット予測から漏れたオフターゲット変異による遺伝子発現の変化を明確にするためには、今回得られた遺伝子発現の変化のデータを、遺伝子配列や発現制御領域などゲノムの変化に落とし込む必要がある。3つめに想定した、Cas9の持続的な作用による遺伝子発現の変化に関して、特にDNA損傷シグナルに関連する遺伝子は抽出されなかった。

本研究は、ゲノム編集食品の編集前後の想定しない変化とその影響について、遺伝子発現の変化に着目し、これまでと異なる切り口で検証を試みた。今後の課題としては、編集の前後で発現変化のあった遺伝子について、ゲノム変化やメタボローム変化を参照すること、その方法を含めて検証することが必要であると考えられる。

参考文献：

1) 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 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/bio/genomed/newpage_00010.html)

- 2) 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に関する届出情報 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000828873.pdf>)
- 3) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. Picelli et al., Nat Methods, 10:1096-1098, 2013 doi:10.1038/nmeth.2639.
- 4) iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. Ge SX et al., BMC Bioinformatics, 19:534, 2018 doi: 10.1186/s12859-018-2486-6
- 5) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) Nucleic Acids Research 2019; doi:10.1093/nar/gkz369
- 6) Tomato Glutamate Decarboxylase Genes SIGAD2 and SIGAD3 Play Key Roles in Regulating γ -Aminobutyric Acid Levels in Tomato (*Solanum lycopersicum*). Takayama et al., Plant Cell Physiol. 56:1533-45, 2015 doi: 10.1093/pcp/pcv075
- 7) Activating glutamate decarboxylase activity by removing the autoinhibitory domain leads to hyper γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in tomato fruit. Takayama et al., Plant Cell Rep. 36:103-116, 2017 doi: 10.1007/s00299-016-2061-4

D. 研究発表・業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 曾我慶介、江木智宏、成島純平、吉場聡子、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、中村公亮、

- 柴田識人、近藤一成：新遺伝子組み換え表示制度に向けた試験法開発 ～「遺伝子組み換えでない」表示の今後～、第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京、2022年8月26日
- 2) 近藤一成、曾我慶介、成島純平、吉場聡子、柴田識人、田口千恵、坂田こずえ、加藤怜子：ゲノム編集によって発生する意図しない変異はどこから来るのか、NGSEXPO 2022、大阪、2022年10月18日
- 3) 成島純平、木俣真弥、志波優、権藤崇裕、秋元智、曾我慶介、吉場聡子、中村公亮、柴田識人、近藤一成：ゲノム編集におけるオフターゲット予測法 SITE-Seq の Galaxy ベース新規解析パイプラインの開発とその作物への応用、NGS EXPO 2022、大阪、2022年10月18日
- 4) 吉場聡子、成島純平、曾我慶介、杉野御祐、柴田識人、近藤一成：遺伝子組換え食品の同定に資する新たなゲノム解析技術の検討、第59回全国衛生化学技術協議会年会、東京、2022年10月31日-11月1日
- 5) 柴田識人、成島純平、曾我慶介、吉場聡子、近藤一成：ゲノム編集食品における外来性遺伝子の残存を評価する全ゲノムシーケンスデータ解析の標準化に向けた取り組み、第59回全国衛生化学技術協議会年会、東京、2022年10月31日-11月1日
- 6) 成島純平、杉野御祐、曾我慶介、吉場聡子、柴田識人、近藤一成：NGSを用いた網羅的なオフターゲット変異候補部位予測法の高GABA産生ゲノム編集トマトへの適用と検証、第59回全国衛生化学技術協議会年会、東京、2022年10月31日-11月1日
- 7) 柴田識人、成島純平、曾我慶介、吉場聡子、近藤一成：ゲノム編集食品における外来性遺伝子の安全性評価における全ゲノムシーケンスデータを用いた解析の標準化に向けた課題、第118回日本食品衛生学会学術講演会、長崎、2022年11月10日-11日

E. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし