

平成 29 年 8 月 1 日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

## —健康促進トマトとして期待—

### ゲノム編集技術を利用してγアミノ酪酸(GABA)高含有トマトを作出

#### 研究成果のポイント

1. ゲノム編集技術を利用して、高血圧症の予防、ストレス緩和に効果があるとされているγ-アミノ酪酸(GABA)を高蓄積するトマトの作出に成功しました。
2. ゲノム編集が新品種創出技術として有効であることを示しました。

国立大学法人筑波大学生命環境系 江面浩教授、野中聡子助教らは、ゲノム編集技術を用いて、軽度高血圧や正常高血圧の予防につながる健康機能性成分として注目されている GABA を多く蓄積するトマトを作出することに成功しました。

本研究では、トマトの GABA 合成酵素に着目し、この酵素遺伝子の一部に変異を導入するにあたりゲノム編集技術を用いました。その結果、トマトにおける GABA の高蓄積化に成功しました。本研究で得られた研究用トマト品種での遺伝的特徴を交配によって食用品種へ導入することで同程度の GABA 蓄積量が実現できれば、1 日 1 食トマトをおかずに添えるだけで、軽度高血圧や正常高血圧の予防につながることが期待できます。この成功は、食生活を通しての健康促進に貢献する可能性を示します。

本研究は、ゲノム編集技術をトマトの分子育種へ利用した活用例であるとともに、育種技術としての有用性を示すものです。

本研究の成果は、8 月 1 日(日本時間 1 日 18 時)に Scientific Reports 誌オンライン版で公開されます。

\* 本研究の一部は、平成 27 年度科研費基盤研究(C)(課題番号:15K07253「人工制限酵素 CRISPR/Cas9 を利用したγアミノ酪酸高蓄積トマトの育種」及び、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」(管理法人:生研支援センター)によって実施されました。

## 研究の背景

$\gamma$ アミノ酪酸(Gamma Amino Butyric Acid, GABA)は、4つの炭素骨格からなる、タンパク質を構成しないアミノ酸です。動物では抑制性の神経伝達物質として知られており、ストレス緩和や血圧上昇抑制など、健康機能成分として注目されています。WHOによれば、高血圧症に苦しむ人は世界中に10億人以上いるとされ、中でも高血圧症予備群とされる軽症高血圧者や通常高血圧者への予防策は喫緊の課題とされています。軽症高血圧者や通常高血圧者へは投薬治療よりも“食”を通じた予防策が有効と考えられています。GABAは食品に含まれていることが知られており、“食”を通じた血圧上昇抑制効果が期待できるため、関連する研究が数多くなされてきました。生合成経路についても詳細な研究がなされており、その経路が明らかになっています(図1)。

これまでの食品を通じたGABAの血圧上昇抑制作用に着目した研究の対象はイネ、チャ、発酵食品(発酵乳、発酵大豆、醤油)などのローカルフードが中心であり、世界で広く食される食品での研究が求められています。トマトは、世界的に生産量、消費量が多い野菜の一つであり、GABA含有量が他の食品と比較して2~50倍と高いことが知られています。しかし、健康機能効果が得られるのに十分な蓄積量に達しているとは言えません。また、栽培環境によりGABA量が2~4倍増減することも報告されており、トマトにおいてGABAを安定的に高蓄積化することが求められていました。

## 研究内容と成果

本研究では、グルタミン酸からGABAを合成する酵素GADに着目しました(図1)。この酵素は、通常状態では活性中心が“ふた”で覆われており、GABAは合成されません。植物体にストレスがかかり植物内でカルシウムイオンが過剰な状態になると、カルシウムイオンがカルモデュリンと結合してカルシウム-カルモデュリン(Ca-CMD)複合体を形成します。このCa-CMD複合体が“ふた”に結合すると、GADの活性中心を覆っていた“ふた”が変形し、活性中心がむき出しになります。この結果、GABA生合成酵素GADが活性化してGABAが合成されます。本研究では、ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9を用いて、実験トマト品種‘Micro-Tom’のGABA生合成酵素GADの活性中心を覆う“ふた”の切断除去を試みました。本研究の戦略を示した概略図(図2)で描かれているハサミがゲノム編集技術を表します。

ゲノム編集技術を用いてGABA生合成酵素GADの活性中心を覆う“ふた”を除去した結果、GABA生合成酵素は定常時でも活性中心がむき出しな状態になり、GABAの生合成が促進されました。その結果、ゲノム編集技術を利用した実験トマト品種Micro-Tomでは、GABAの蓄積量は、野生型のおよそ15倍にあたる125mg/100gFWに達していました。

GABAの経口摂取により、血圧上昇抑制効果が得られる量は、1日あたり10-20mgとされています。このことから、本研究で得られた変異遺伝子座を交配により食用品種へ導入し、同程度のGABA蓄積量を実現することができれば、大玉のトマト1個をくし形切りにして1日1食おらずに添えるだけで、軽度高血圧や正常高血圧の予防につながることを期待できます。

一般に食用に流通しているトマトの親系統へ本技術を適応し、育種技術として利用することも可です。本研究は、ゲノム編集技術をトマトの分子育種に利用した一つの事例であるとともに、育種技術としての有用性を示すものです。

参考図

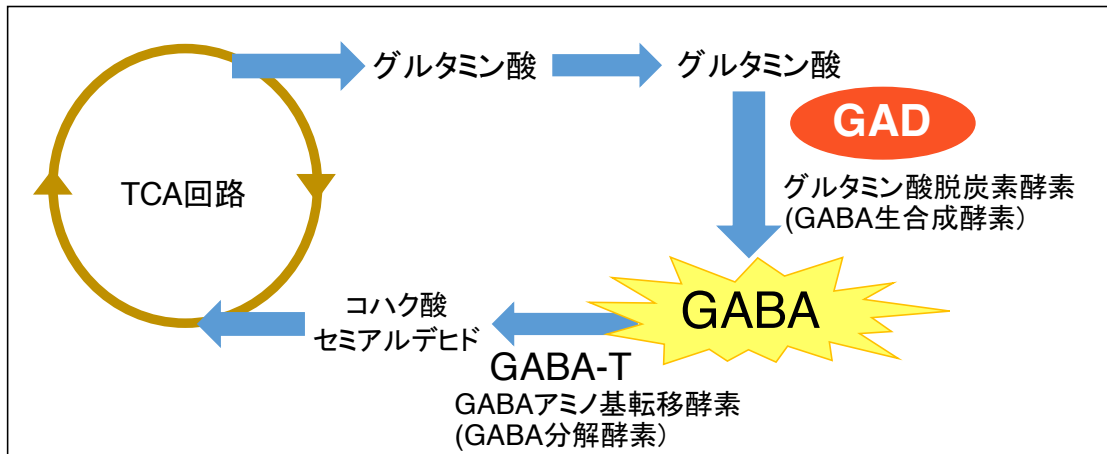


図1 GABA 代謝経路

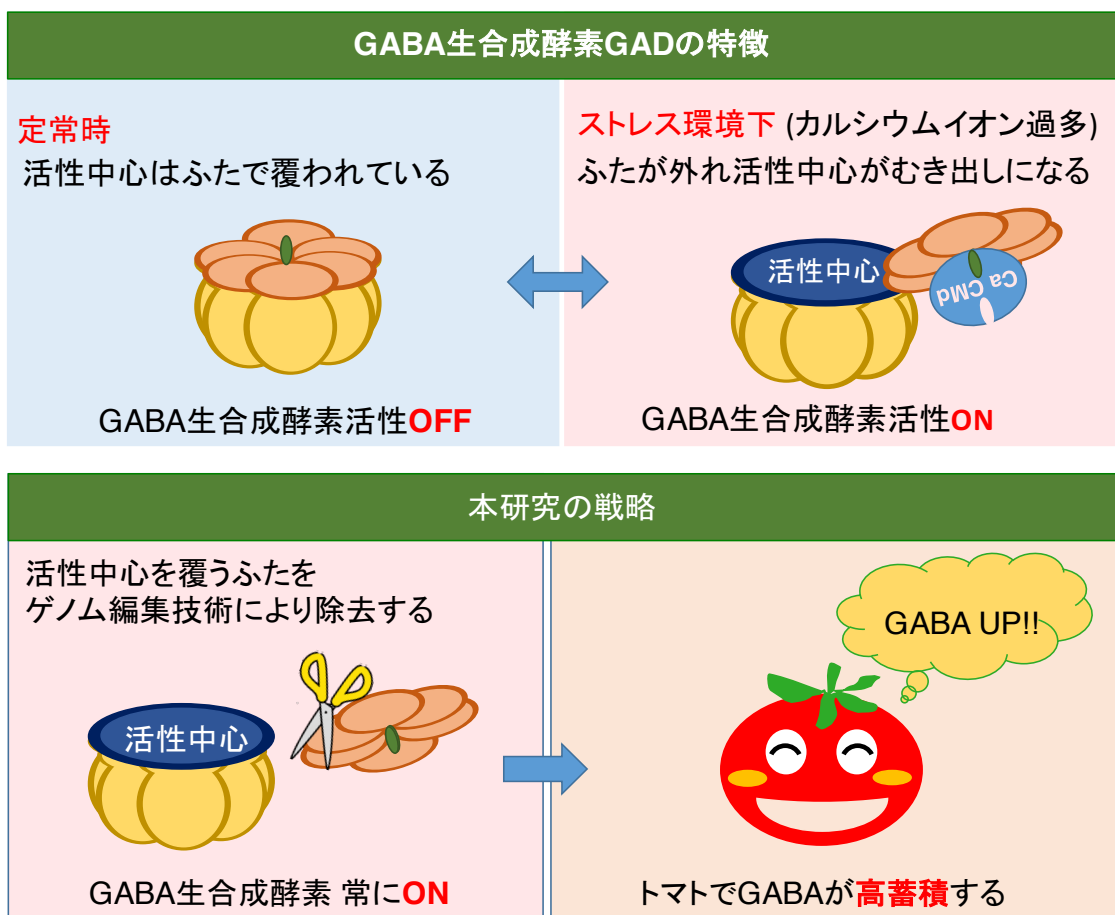


図2 GABA 合成酵素の特徴と本研究の戦略イメージ

用語解説

注1) ゲノム編集技術 : 遺伝子の集合体がゲノムであり、ゲノムの上には、いくつもの遺伝子が存在しています。ゲノム編集技術とは、ゲノム上の標的とする遺伝子のみを改変することを可能にする技術です。ゲノム編集による遺伝子の改変は、まずゲノムの標的とする部分を切断することから始まります。植物をはじめ、生物はゲノムが切断されたままだと、生命活動をうまく維持できません。そこで、生物は切断されたゲノムを修復する様々な仕組みを獲得してきました。生物は多くの場合、切断されたゲノムを素早く修復できる非相同末端結合修復機構を利用して修復します。この修復機構は、切断された

ゲノムを素早く修復できる一方で、間違いが起こりやすいため、間違いがちな修復機構とも言えます。生物がゲノムを“間違えて修復”した場合に遺伝子の改変が起きます。

これまで遺伝子へ変異を導入する際は、放射線や化学物質などを変異源としてゲノムへ変異を導入してきました。この際には、変異はゲノム上にランダムに導入されます。育種へ利用する際には数万系統を作出し、有用な形質を示す系統を選抜することが必要で、この選抜に多くの労力が割かれていました。ゲノム編集技術は理論上、ゲノム上の標的とする遺伝子のみに変異を導入することが可能な技術です。この技術を育種へ応用することができれば、従来の方法に比べ選抜に割く労力を大幅に省くことができると期待できます。この技術は遺伝子配列及び機能を直接標的とするため、利用する際には遺伝子の配列及び機能をあらかじめ明らかにする必要があります。このため、ゲノム編集技術を育種へ応用するためには、より多くの作物でのゲノム情報の整備及び遺伝子機能解析が必要となります。

注2) CRISPR/Cas9 : CRISPR/Cas9(Clustered regulated interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)は RNA とタンパク質の複合体からなる人工的に作成された部位特異的核酸分解酵素(人工制限酵素)です。ゲノム編集技術において、CRISPR/Cas9 はゲノム上の標的塩基配列を切断するハサミの役割を果たします。Zinc Finger Nuclease (ZFN)、Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)など他の人工制限酵素がタンパク質とDNA の相互作用を利用し、特定の標的塩基配列を認識しDNA の二重鎖切断を引き起こすのに対し、CRISPR/Cas9 は、ガイドRNA(gRNA)とDNA の塩基対形成で20 塩基程度の標的塩基を認識しDNA の二重鎖切断を引き起こします。標的配列には、その 3' 側に PAM と呼ばれる配列を必要とします。現在広く用いられている化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)の Cas9 が認識する PAM 配列は 5'-NGG-3' (N は任意の塩基)であり、ZFN や TALEN と比較して標的配列の選択について自由度が大きいです。このため ZFN や TALEN よりも汎用性が高いとされています。CRISPR/Cas9 は元来、真正細菌や古細菌が有する仕組みで、ファージ(細菌に感染するウイルス)感染の防御機構です。ファージは真正細菌や古細菌へ遺伝子を導入し感染します。これを防御するために、真正細菌や古細菌はファージによって導入された遺伝子を CRISPR/Cas システムにより切断します。植物でゲノム編集を行う際は、真正細菌や古細菌が持つ遺伝子を切る CRISPR/Cas を改良し使用します。

#### 掲載論文

【題名】 Increase in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis (ゲノム編集による高 GABA 含有トマトの作出)

【著者名】 Satoko Nonaka, Chikako Arai, Mariko Takayama, Chiaki Mastukura, Hiroshi Ezura

【掲載誌】 Scientific Reports

Doi: 10.1038/s41598-017-06400-y

#### 問い合わせ先

野中 聡子(のなか さとこ)

筑波大学生命環境系 助教

〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

電話: 029-853-7726

E-MAIL: nonaka.satoko.gt@u.tsukuba.ac.jp