

① 開発した食品の品目・品種名及び概要 (利用方法及び利用目的)

名称

褐変低減バナナ (TRB011002 系統)

分類学的カテゴリ

褐変低減バナナ TRB011002 系統は、*Musa acuminata* 種、Cavendish (キャベンディッシュ) 亜群、Grande Naine (グランド・ナイン) 品種である。

概要

バナナ果実が損傷すると、バナナ果実廃棄の主な原因である酵素的褐変が生じる。バナナ廃棄量の約 20%が酵素的褐変によるものと報告されており (社内情報)、褐変しやすい果実の 50%以上が褐変により失われていると考えられている (Iqbal *et al.*, 2019; Shrestha *et al.*, 2020)。酵素的褐変反応はポリフェノールオキシダーゼ (PPO) により触媒される。このため、酵素的褐変による廃棄量が少ないバナナを育成する戦略として、バナナ果実の *PPO* 遺伝子発現と *PPO* 酵素活性を低下させることを目標とした。ゲノム編集技術により、標的 *PPO* 遺伝子にノックアウト変異を導入し *PPO* タンパク質の産生を減少させた。本褐変低減バナナ品種の生果実 (青バナナ) のみの日本への輸入を目的としている。輸入された生果実は、従来バナナと同様に食品として販売・消費される。

② 利用したゲノム編集技術の方法及び改変の内容

方法

CRISPR/Cas9 法 :

本褐変低減バナナの育成には CRISPR/Cas9 法を用いた。本編集技術では、Cas9 エンドヌクレアーゼタンパク質が、一本鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子によって標的塩基配列に誘導される。標的部位の正確な位置で Cas9 が機能して DNA を切断し、二本鎖切断 (DSB) を生じる。このような DSB は非相同末端結合 (NHEJ) によって修復されるが、その際に小さい挿入や欠失 (indel、インデル) 変異を生じることがある。インデルによって標的コーディング配列内にフレームシフトが生じ、遺伝子機能がノックアウトされる。

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を介したベクター構成要素の一過性発現 :

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) で処理した胚形成細胞内で、ベクター構成要素の一過性発現によって *M. acuminata* に CRISPR/Cas9 編集を実施した。使用したアグロバクテリウムは、T-DNA 領域内に Cas9 及び特異的

sgRNA のほか、選抜マーカー遺伝子をコードしたプラスミドを有する。バナナ細胞内で、Cas9 タンパク質及び特定の *PPO* 遺伝子配列に Cas9 タンパク質を結合させる sgRNA が合成されてターゲット DSB が生じ、その後バナナに内在する修復機構によって *PPO* 遺伝子に編集が導入された。

標的遺伝子とその機能：

バナナ果実が損傷すると、酵素的褐変と呼ばれるプロセスが生じ、最終的に果実の品質及び商用利用可能性が低下する。このプロセスは、ポリフェノールオキシダーゼ（PPO）により触媒される（Moon *et al.* 2020; Qin *et al.*, 2023）。核コード PPO タンパク質は、反応前の状態ではそのほとんどがプラスチドに局在する。一方、基質であるフェノール類は主に液胞に存在する。剥皮、打撲、スライスなど、バナナ果実に機械的損傷が加わると、PPO タンパク質とその基質であるフェノール類が放出されて、酸素存在下で接触する。その結果、PPO タンパク質は基質の酸化を触媒し、褐色のメラニン色素の生成を促進する（図）。*PPO* 遺伝子の発現量を減少させることにより、果物や野菜の酵素的褐変を抑制することが可能である（Chi *et al.*, 2014; Carter, 2016; González *et al.*, 2020; Maioli *et al.*, 2020）。このため、褐変低減バナナを育成する戦略として、バナナ果実における PPO タンパク質の酵素活性を低下させることとした。

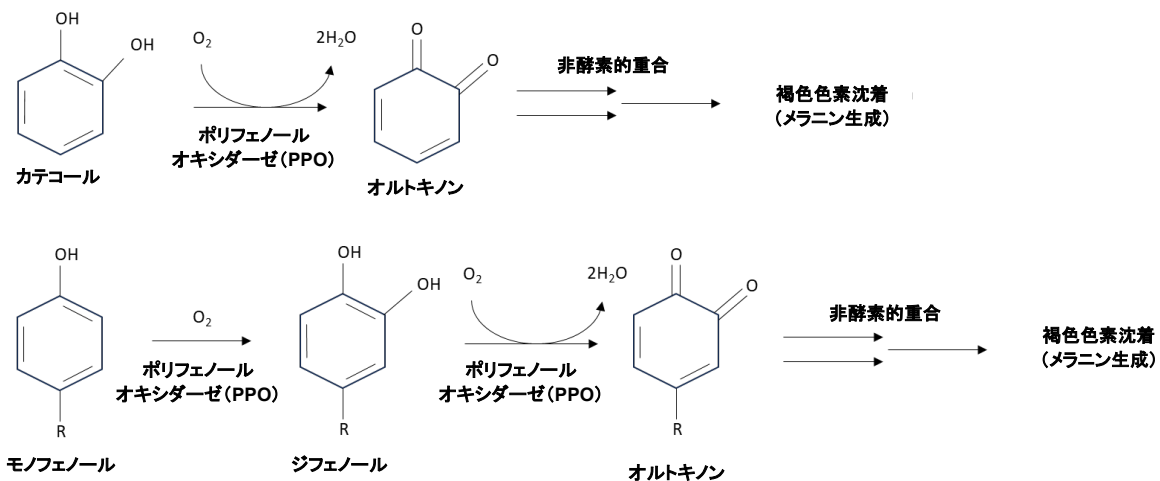


図 酵素的褐変における各種フェノール基質からのメラニン色素生成を促進する PPO タンパク質の酵素活性の潜在的メカニズム。Singh *et al.*(2018)による図を改変。

バナナには複数の *PPO* 遺伝子が存在する。本バナナでは、ゲノム編集技術により主に果実中で発現する標的 *PPO* 遺伝子にノックアウト変異を導入し、*PPO* タンパク質の産生を抑制した。本変異によりバナナ果実中の *PPO* タンパク質量が大幅に低減し、酵素的褐変が低減したバナナ品種になると考えられた。

育成経過

In vitro 繁殖、栄養繁殖及び選抜：

M. acuminata, Cavendish 亜群のような三倍体バナナ品種では、栄養繁殖による無性生殖が唯一の繁殖手段である。三倍体である *M. acuminata* の品種は、単為生殖により、肉厚、種なし、不稔の果実を生じる。そこで、栄養繁殖法により褐変低減バナナ TRB011002 系統を育成した。アグロバクテリウム処理後、バナナ胚形成細胞を *in vitro* で植物体に再生・維持し、マイクロプロパゲーションにより遺伝的に同一な個体を複数作出した。本過程において、植物体から採取したゲノム DNA (gDNA) を用いて3段階の分子解析に基づく選抜を行い、TRB011002 系統が目的とする *PPO* 遺伝子の編集を有すること及び外来のプラスミド DNA の組み込みがないことを確認した。

標的 *PPO* 遺伝子改変解析：

第一段階 - 初期スクリーニング (V0 世代)

アグロバクテリウム処理胚形成細胞から再生させたすべての植物体の葉から gDNA を採取し、初期スクリーニング解析を実施した。本スクリーニング解析により、標的遺伝子が狙い通りに編集され、T-DNA 領域が組み込まれていないと考えられる褐変低減バナナ TRB011002 系統の初代株 (initial plant) が同定された。

第二段階 - 詳細な分子解析 (V0 世代)

より詳細な分子解析を実施するため、褐変低減バナナ TRB011002 系統の本初代株からサンプルを再度採取した。本解析では、初代株の異なる2つの葉からそれぞれ gDNA サンプルを抽出し、個別に評価を行った。*PPO* 遺伝子が狙い通りに編集されていることを同定・確認するとともに、プラスミド DNA がバナナゲノム中に組み込まれていないことを確認した。確認後、本初代株を *in vitro* で2サイクルのマイクロプロパゲーションにより繁殖させて遺伝的に同一な複数の植物体を作成し、全ゲノムシーケンス (WSG) に用いた。

第三段階 - 全ゲノムシーケンス (WSG) (V2 世代)

褐変低減バナナ TRB011002 系統の複数の植物体から複数の葉を採取・プールし、gDNA を抽出して塩基配列を解析した。WGS データのバイオインフォマティック分析により、プラスミド由来の DNA の組み込みがなく、標的とした DNA の編集を有することを確認した。

以上、複数の分子解析段階を経て、褐変低減バナナ TRB011002 系統が非遺伝子組換え体であり (外来の DNA の組み込みがないことを確認)、標的とした *PPO* 遺

伝子の塩基配列にごく小さな編集があることが確認された。本編集は、タンパク質への翻訳を阻害するノックアウト編集であり、本バナナ果実中の PPO タンパク質の産生量を大幅に低減させることで酵素的褐変が抑制されると考えられた。

褐変低減バナナ TRB011002 系統を用いて形質の評価を行った。PPO 遺伝子の変異により、バナナ果実の褐変が低減されることが示された。

③ 確認された 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

バナナに対するアレルギー反応は限定的で、そのほとんどは花粉やラテックスに対するアレルギー反応によるものである (El-Sayed *et al.*, 2013; OGTR, 2023)。PPO 遺伝子の編集はバナナのアレルゲンプロファイルに影響を及ぼさないと推定される。しかし念のため、PPO 遺伝子の編集が新たなアレルゲンを産生する可能性について評価した。少なくとも一箇所の PPO 遺伝子編集と重複し、8 アミノ酸以上のペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を特定した。特定された 11 の ORF がコードするペプチド配列について COMPARE データベース (van Ree *et al.*, 2021) を用いて検索し、アレルゲン性を評価した。いずれのペプチドも、既知のアレルゲンとの連続する 8 アミノ酸以上の完全な一致及び連続する 80 アミノ酸以上について 35%以上の一致は示さなかった。本結果から、褐変低減バナナ TRB011002 系統が新たなアレルゲンリスクをもたらすことを示す証拠は得られなかった。

バナナには毒性は知られておらず (OGTR, 2023)、従って塩基配列に変化があったとしてもバナナ内で既知毒性物質が増加する可能性は考え難い。褐変低減バナナ TRB011002 系統の潜在的毒性をさらに評価するため、アレルゲン性を評価した 11 のペプチドについて、UniProtKB/Swiss-Prot データベースで blastp を用いて検索した (UniProt Consortium, 2023)。E-value の閾値 10^{-4} を下回る毒性タンパク質は検索されなかった。本結果から、褐変低減バナナ TRB011002 系統が新たな毒性タンパク質が生成されるリスクをもたらすことを示す証拠は得られなかった。

褐変低減バナナ TRB011002 系統の作出に用いた sgRNA を厳密な基準により評価し、オフターゲット編集の可能性が極めて低いことを確認した。Breaking-Cas ツール (Oliveros *et al.*, 2016) は、sgRNA の設計及びオフターゲット部位の同定に用いられる最新かつ最も完全なツールの一つである。また、Geneious Prime® 2023.2.1 (Biomatters Ltd) の Find CRISPR Sites ツールは、CRISPR 標的部位を同定し、オンターゲット及びオフターゲット活性を予測するためのマルチシーケンスデータ解析ソフトウェア Geneious を活用している。そこで、Breaking-Cas ツールバージョン 1.03 (Oliveros *et al.*, 2016) 及び Geneious Prime® 2023.2.1

(Biomatters Ltd)の Find CRISPR Sites ツールを用いて、標的配列とのミスマッチ数が2以下である潜在的オフターゲット編集部位の存在の有無を確認した。その結果、オフターゲット編集部位は同定されなかったため、褐変低減バナナ系統 TRB011002 のゲノム中 (すべての *PPO* 遺伝子を含む) にオフターゲット変異は存在しないと考えられた。

以上、褐変低減バナナ TRB011002 系統に新たなアレルゲンの生産及び既知の毒性物質の増加が生じる可能性は低いと考えられた。

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

ポリフェノールオキシダーゼ (*PPO*) は通常、剥皮、打撲、スライスなど、バナナ果実に機械的損傷が生じた時にプラスチックから放出される。放出された *PPO* タンパク質は果実組織内のフェノール化合物を酸化し、これによりメラニン色素が生成され、酵素的褐変と呼ばれる変色を生じる。褐変低減バナナ TRB011002 系統では、*PPO* 遺伝子の編集により酵素的褐変プロセスが抑制される。その結果、本改変によりバナナ非損傷時のメラニン色素量は変化していないものの、バナナ損傷時のメラニン色素量は低減する。メラニン色素量の低減に伴う褐変の抑制により、損傷を受けていない状態のバナナの栄養含有量が維持されるため、褐変低減バナナは損傷前の従来バナナと同等の栄養含有量を保持していると考えられる。

標的とした酵素的褐変プロセスは機械的損傷によって開始され、無傷細胞の非損傷条件下での活性は限定的で、かつ代謝系への明らかな寄与はない。さらに、*PPO* タンパク質の基質となるフェノール類は二次代謝産物であり、正常な成長、発育、生殖に対する明確な役割はないと考えられている (Dai and Mumper, 2010; Verpoorte R. 2000)。また、酵素的褐変により生じるメラニン生成物も、一次代謝には直接寄与しないと考えられる。詳細な特性の評価に加え、褐変低減バナナ TRB011002 系統を用いて果実の特性について観察を行った。その結果、本バナナの果実は、従来バナナと比較して褐変低減特性の評価において改善が認められたが、その他の果実特性の評価においては従来バナナとの間に差は認められなかった。したがって、本バナナ中の塩基配列の編集が他の栄養成分等の組成に変化を及ぼすとは考え難い。