

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「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」  
分担研究報告書（平成 27-29 年度）

**未承認遺伝子組換え作物検知法、新育種法を用いた作物の検出のための  
未知領域解析手法の検討と規制および安全性に関する情報収集情報収集**

研究分担者 近藤 一成（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 中村公亮、野口秋雄、中島 治、坂田こずえ  
（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：未承認遺伝子組換え作物のための検知法としては、EU でよく検出されるコメおよびパパイヤが重要である。国内侵入の可能性のある様々な GM パパイヤ及びコメ系統を網羅的に検出する手法を検討した。その結果、パパイヤでは P35S と T-nos を標的にして承認済 GM パパイヤと未承認 GM パパイヤが混入した食品を検知可能なスクリーニング法を開発した。コメにおいては P35S, TNOS, cry1Ab/Ac を標的とした検査法を開発した。僅かな既知配列から周辺未知配列を解明する手法の検討として LAM (Linear-Amplified Mediated)-PCR 法を、ゲノム情報が公開されている GM パパイヤ 55-1 系統をモデル作物として検討を行った。既知 DNA 配列として、異なる染色体に 2 コピー導入されている *nptII* 部分配列を用いた。*nptII* 部分配列をもとにプライマーを設計し LAM-PCR を実施した結果、2 つの増幅産物が検出され、ゲノム中のコピー数が 2 であることを示すことができた。次に、内在性プロモーターが既知で周辺配列が未知の場合を想定して、*nptII* のような細菌由来外来遺伝子ではなく、ジャガイモ GBSS プロモーターを用いた遺伝子組換えジャガイモをモデルに用いた。ジャガイモの内在性プロモーター-pGBSS の配列をもとにプライマーを設計し、LAM-PCR を実施した結果、予想される断片長の増幅産物が得られた。シーケンス解析の結果、元々ジャガイモゲノム上に存在する配列と一致する配列、組換え導入された PHL 遺伝子の一部と一致する配列および導入された ASN 遺伝子の一部と一致する配列が確認された。以上の結果から、LAM-PCR は内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。

諸外国（特に、米国、EU、オーストラリア・ニュージーランド、カナダ）の GM 生物の規制に関する法律等について整理した。親育種法を用いて作製された生物では、米国においてイントラジェネシスのジャガイモ、ゲノム編集のマッシュルーム、トウモロコシが承認されている。EU では、ゲノム編集を含む親育種法を用いた生物に対する規制上の取り扱いの判断はされていない

近年のバイオテクノロジー技術の著しい進歩により、ゲノム編集技術等これまでにない正確な改変が可能ツールを用いた新品種開発が盛んに行われている。一方で、ゲノム編集技術が規制の枠組みの中でどのように扱われるべきかの議論は進んでいない。ゲノム編集技術を用いた場合は、その改変の痕跡が残りにくいことから従来の方法では検出は難しい。しかし、汎用される既知配列があればそこから未知配列の解析も可能になるため、その手法の一つとして、Genome-walking または LAM-PCR と次世代シーケンサーを組合せた解析手法が欧州で検討されている。ゲノム編集をはじめとする新育種技術（NBT）は、欧州 JRC 分類を再検討して、遺伝子操作で起きる変化による新たな分類を行い、潜在的懸念事項やリスクを考える上で有用であることが示唆された。欧州では、遺伝子組換え食品の承認に係る規則（regulation）が幾つか改定された。遺伝子組換え作物を用いた 90 日間反復投与毒性試験では、作物の実質的同等性で確認した以上の付加的な毒性・アレルゲン情報は得られなかったが、小腸などのトランスクリプトーム解析を行うことで従来の毒性実験で得られない情報が得られる可能性が示された。EFSA は、遺伝子組換え作物のアレルゲン性評価についてより具体的に検討行うようになった。Non-IgE 反応であるセリアック病のための配列類似性検索や新規発現タンパクの胃消化性試験の条件を実際の生理学的条件に合わせたより幅広い条件での検討、および内在性アレルゲンの変化の解析が求められる。国内においてもゲノム編集技術の取扱いを考える時に考慮する必要がある。NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などの調査の結果、食用については動物の報告が 28 報、植物については 33 報あった。用いた技術では圧倒的に CRISPR/Cas9 が多かった。開発国を見ると、食用の動物については中国が圧倒

的に多く 21 報あった。植物については中国からの 17 報、米国からの 8 報が多かった。ゲノム編集技術を用いた農作物開発が活発で報告も多いが、ゲノム編集を用いることで生じるフレームシフト（読み枠のズレ）によって新規に生産されるペプチド・タンパクについて検討している報告は皆無であり、この点に開発者は注意を払っていない。食用の新しい生物を開発するときにはこのような新規に生産されるペプチドの安全性も含めて評価することを我々は提案する。

## A. 研究目的

安全性が未確認の食品が国内に侵入しないように、未承認遺伝子組換え食品をもれなく検出するためのスクリーニング検査について、パパイヤとコメを対象に検討した。

遺伝子組換え体の同定と導入遺伝子の解明を行うために、限定された既知配列から周辺未知配列を明らかにする LAM-PCR 法の検討を行った。

ゲノム編集技術を用いた動物・植物の開発状況の調査、および規制情報、ゲノム編集技術を用いた場合の安全性確認方法のあり方について調査検討した。

## B. 研究方法

分担報告書を参照

## C. 研究結果および考察

### (1) スクリーニング法開発(パパイヤ)

・各種 GM パパイヤ系統をサンプルとしたリアルタイム PCR 反応性についてリアルタイム PCR にて各種 GM パパイヤ系統の増幅曲線の特徴を調べたものを図 1 に示した。パパイヤの内在性遺伝子 Chymopapain 遺伝子 (Chy) を検出するリアルタイム PCR 法 (Chy)、カリフラワーモザイクウィルス由来 35SRNA プロモーターを検出するリアルタイム PCR 法 (P35S)、ノパリンシンテターゼプロモーターを検出するリアルタイム PCR 法 (T-nos)、パパイヤ 55-1 系統遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法 (55-1) を用いて、非 GM (Sunset)、承認済 55-1 系統のホモ型 (SunUp) とヘテロ型 (Rainbow)、未承認のパパイヤの DNA を検体としてリアルタイム PCR を行った。GM パパイヤの標的配列の特徴から新規スクリーニング法を考案した。Chy のみが検出された場合は非 GM パパイヤであり、Chy と 55-1 が検出された場合は承認済 55-1 系統パパイヤとなる。55-1 以外の Chy、P35S、T-nos が検出された場合は未承認 GM パパイヤと判定される可能性が考えられた。

本研究で構築した新規 GM パパイヤスクリーニング法の妥当性の確認を行った。その結果、PRSV-

YK, PRSV-SC, Huanong No.1 はスクリーニング陽性と適切に判定され、また、調査を行ったすべての非パパイヤ加工食品検体において、パパイヤ内在性遺伝子である Chy のみ検出され、試験法の妥当性が確認された。

### (2) LAM-PCR を用いた周辺未知配列の解析

・ LAM-PCR による nptII 周辺配列の増幅

GM パパイヤ 55-1 系統には、nptII 部分配列が異なる染色体に導入されている。そのため、LAM-PCR によって nptII の周辺配列を増幅させた場合、適切な制限酵素を選択すれば 2 つの増幅断片が形成されると考えられる。その結果、HpyCH4IV 反応系の 1st Nested PCR において、予想される 2 本のバンドが検出された。さらに、2nd Nested PCR においても、非特異的なバンドが若干検出されたものの予想される 2 本のバンドが検出された。一方、MseI 反応系の 1st Nested PCR においても、予想される 2 本のバンドが検出された。また、2nd Nested PCR においては、予想される短鎖のバンドは検出された。一方で、non-GM パパイヤから抽出した DNA 溶液に対して LAM-PCR を実施した際には、1st Nested PCR、2nd Nested PCR とともに主要なバンドは検出されなかった。増幅産物をクローニングし、シーケンス解析を行った結果、PCR エラーによる数塩基の変異が観察されたものも存在したが、ゲノム配列とほぼ一致していた。

内在性プロモーターの使用や NBT によって開発された GM 作物は、従来のスクリーニング検査では GMO であることを迅速に確認することは極めて困難である。これらの問題を解決する手法の一つである LAM-PCR 法について本研究で GM パパイヤ 55-1 系統を対象に検討を行った。LAM-PCR 法は小さい既知 DNA 配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数および挿入位置を迅速に明らかにできることが示された。

### (3) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

・LAM-PCR による内在性プロモーター-pGBSS 下流領域

## 域の増幅

GM ジャガイモ Innate™ event-1 の導入配列中にはジャガイモ内在性プロモーター-pGBSS が 2 コピー存在している。そのため、LAM-PCR によって pGBSS 下流領域を増幅させた場合、元々ジャガイモゲノム中に存在する pGBSS 由来のものを含めて少なくとも 3 つの増幅断片が形成されると予想され、LAM-PCR の結果、非組換えジャガイモから抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp の 1 本のバンドが検出された。一方で、GM ジャガイモ Innate™ event-1 から抽出した DNA 溶液を鋳型にした場合に、2nd Nested PCR において、約 300 bp と約 250 bp の 2 本のバンドが検出された。元々の pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 297 bp、GM ジャガイモ Innate™ event-1 に導入した pGBSS 由来の配列は予想増幅断片長が 254 bp と 297 bp であり、LAM-PCR の結果はこれに一致した。GM ジャガイモ Innate™ event-1 を対象に LAM-PCR の検討を行った結果、内在性配列をもとに導入遺伝子の情報やコピー数を迅速に明らかにできることが示された。本方法は、スクリーニング検査などで陽性と判定された検体について迅速に GM 品種を特定することが可能になると期待される。

### (4) GMO 規制と開発に関する情報収集

#### NPBT 作物・動物の承認状況

米国では、(1) Dupont Pioneer's waxy gene knockout corn USDA approved on April 2016  
理由：7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため。

(2) PPO knockout Mushroom to prevent browning (Pennsylvania Univ) on April 2016  
理由：7CFR340 に基づき、PPA (Plant Protection Act) に該当しないため、の 2 例があった。

欧州では、承認したものは無い。ゲノム編集（小さな改変）作物の GMO 規制からの除外に前向きな国は、英国、ドイツ、スウェーデン、イタリア、フランス、オランダ。ただし、ドイツは ZKBS、BVL が ODM とゲノム編集による小さな改変を GMO 規制外としたが、EU の現在の枠組みである Directive 2001/18/EC に基づいた NPBT 技術の判断について、多くの技術が GMO の規制の枠内とされるのではないかと考えられる。フランスは、現在欧州司法裁判所にゲノム編集作物の扱いについて判断を求めており、その判断は 2018 年と言われているため、

それまでは EU の正式な判断はない。ゲノム編集での塩基の変異や ODM について、2015 年 EASAC (欧州科学アカデミー) は、技術ではなく形質 (trait) やプロダクトで判断すべきと指摘した。

日本では、ゲノム編集生物は京都大学と近畿大学による筋肉量増強マダイを始め、マグロ、ニワトリトマトなどで研究されている。接ぎ木を利用したジャガイモ（穂木として GM タバコを非 GM ジャガイモ台木に接木して GBSS 遺伝子抑制）は、産生した siRNA は非 GM 体へ移行して機能する（もち性上昇）もので、ゲノム編集イネとともに国内での隔離圃場試験が承認される予定である（すでに開始されている）。

### (5) 未承認遺伝子組換え作物検知法に関する情報収集

LAM-PCR 法の代わりに DNA walking 法を用いて僅かな既知配列からその両側未知配列を増幅したのち、それぞれにタグ標識を結合した試料を調製する。同様に調整した多検体を同時に次世代シーケンズ解析し、データ解析時にタグ情報をもとにそれぞれの試料ごとに結果を分離するものが報告された。本手法は、未承認遺伝子作物に対する検知法を作製する上で極めて強力な方法と考えられた。

### (2) ゲノム編集生物に関する調査と安全性確認のためのアプローチ検討

EU の JRC が 2012 年に示した分類では、その分け方があるものは技術（ゲノム編集）で、あるものは現象であり（RdDM、RNA 依存性 DNA メチル化）で統一されていない。そこで、「起きる現象」で分類するとどうなるのか整理を行った。

DNA 2 本鎖を切断するかどうかで区別する。DNA 2 本鎖切断される場合は、標的配列と類似したゲノム上の配列（類似配列）でのオフターゲット切断のほかに、標的配列と全く類似性のない配列でのオフターゲット切断を考慮しなくてはならない。前者は、事前に各種データベースを参考に予測可能であるが後者は事前に予測できないため、それを解析する手段が必要である。一方、DNA メチル化や非活性化 Cas9 を用いた塩基置換など DNA 2 本鎖切断しない場合は、類似配列での置換、メチル化の可能性をデータベースから予測して解析することで対応が可能と考えられる。つまり、

DNA 切断起きる場合＝全ゲノム領域の解析

DNA 切断起きない時＝類似配列の解析

が必要である。

接ぎ木では、低分子 RNA を台木から穂木または穂木から台木に移行させて、移行先で形質誘導（例えば、顆粒デンプン合成酵素遺伝子抑制によるもち性向上）が行われる。懸念事項は、移行先の台木又は穂木、最終果実への低分子 RNA の残存性があるが、接ぎ木を切り離れた後は移行しないため低分子 RNA は速やかに分解され残存しないことが報告されている例もある（厚労科研費「次世代バイオ研究班 27 年度報告書」参照）。

### (3) 諸外国での安全性評価に関する調査

欧州食品安全局 EFSA の遺伝子組換え生物の安全性に関する科学的意見書、規則および毒性に関する研究報告に関する最近の情報を整理した。The GRACE (GMO Risk Assessment and Communication of Evidence; [www.grace-fp7.eu](http://www.grace-fp7.eu), Arch Toxicol (2016) 90:2531-2562, Arch Toxicol (2014) 88:2289-2314) project では、モンサント社の害虫抵抗性遺伝子組換えトウモロコシ MON810 (承認済) を用いて、90 日反復投与試験および 1 年間反復投与試験を行い、既にトウモロコシ MON810 と組換え前のトウモロコシとの間について同等性が確認された製品を用いた動物実験で毒性に関わる付加的情報が得られるか検討した。その結果、動物実験では、比較解析から得られた製品の同等性に追加される毒性情報は得られないことが報告された。ただし、組織トランスクリプトーム解析では付加的な情報が得られる可能性が示唆された。

遺伝子組換え体のアレルゲン性評価について EFSA の科学的意見書 (EFSA J, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4862) を検討した。内容は 3 点から構成される— (1) non-IgE 型の免疫反応、(2) タンパク消化性、(3) 内在性アレルゲンの変化、である。Non-IgE 型の好ましくない免疫反応は、小麦グルテンなどが原因となるセリアック病に対するもので、新規に発現するタンパクについて原因となる E/Q-X1-P-X2 モチーフの存在や類似性を確認して、一致又は類似性が認められた場合は HLA 結合実験を行っていくものである。タンパク消化性は、現在胃酸モデルとして pH1 前後の強酸性条件で胃消化性試験を行っているが、空腹時ではそうであるものの、満腹時や胃に食物が入っ

ている場合は、胃酸 pH は 4 程度まで上昇するため、胃酸中の消化酵素であるトリプシンおよび酸性度 pH の条件を振ってタンパク消化性試験を行うことが望ましいとしている。

### (4) ゲノム編集生物の開発状況調査

1) 2016 年に報告された、NBT を利用して作成された動物、植物の論文や特許などの調査の結果を表 3、4 にまとめた。食用については、動物の報告が 28 報、植物については 33 報あった。用いた技術では圧倒的に CRISPR/Cas9 が多かった。開発国を見ると、食用の動物については中国が圧倒的に多く 21 報あった。植物については中国からの 17 報、米国からの 8 報が多かった。

2) ゲノム編集後にフレームシフトを起こしたペプチドを生産する動植物の調査の結果を調べた。その結果、ターゲット遺伝子がコードする元のタンパク質の N 末端が食物アレルゲンと同一性があり、新規ペプチドも同じくその食物アレルゲンと同一性があるケースがあった。新規ペプチドが元のタンパク質よりもアップレギュレートされると食物アレルギーを起こす可能性がある。これらの新規ペプチドが電気泳動やオミックスの手法によって実験的に調べられている例は皆無だった。

## **D. 結論**

### (1) パパイアおよびコメ未承認遺伝子組換え食品スクリーニング法の検討

p35S, tNOS, Cry 遺伝子を標的にして可能な限り網羅的に検出する方法を幾つか検討、検証した。今後、監視対策にスクリーニング法を導入する際に参考にすることができる。

### (2) LAM-PCR を用いた内在性プロモーターから周辺未知配列の解析

LAM-PCR を用いた未知配列の解析は、有用な手法であることが確認できた。多検体処理など網羅性と迅速性のために次世代シーケンサーの活用が有効であると考えられた。

### (3) ゲノム編集生物等の開発状況調査・NBT の規制の考え方検討

植物はゲノム編集の応用が遅れていたが、ここ 2 年程前から急速に報告が増加している。大きな変化は、果樹への応用が始まったことである。また、ゲノム編集によって誘発されるフレームシフ

トによって新規に生産されるペプチドについて、開発者は注意をほとんど払っていないことが明確になった。

ゲノム編集を含む新育種法（NBT）について、最初に分類を行った欧州 JRC 分類を見直し、変化の種類で分類して、潜在的リスクやそのためのアプローチの検討を行った結果、分類を再検討して整理することが、懸念される事項を整理しやすく規制を考える上で必要と考えられた。

#### （4）諸外国での安全性評価に関する調査

遺伝子組換え作物の実質的同等性に加えて、動物実験で付加的な毒性関連情報が得られるか 90 日あるいは 1 年間投与試験で検討した結果、付加的な情報は与えないが、組織トランスクリプトーム解析などで追加の情報が得られる可能性を示した。