

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）  
「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」

## 総括研究報告書

研究代表者 近藤 一成 （国立医薬品食品衛生研究所）  
研究分担者 有田 正規 （理化学研究所）  
研究分担者 今村 智明 （奈良県立医科大学）  
研究分担者 木下 政人 （京都大学）  
研究分担者 竹内 一郎 （名古屋工業大学）  
研究分担者 為広 紀正 （国立医薬品食品衛生研究所）  
研究分担者 中村 公亮 （国立医薬品食品衛生研究所）

### 研究要旨：

ゲノム編集技術を利用した作物（ゲノム編集作物）から作られる新たな食品の研究開発が国内外で活発に行なわれている。しかし、安全性審査が必要な従来の遺伝子組換え食品とは異なり、導入遺伝子は存在しないことから、食品衛生法上の取扱いと安全性確認方法の明確化が課題になっていた。本研究では、ゲノム編集作物の開発状況や規制状況の情報収集を行い、その情報をもとに考えられるモデル作物を設定したケーススタディーを行った。その結果から、安全性確認に必要な項目や問題点を明らかにした。また、ゲノム編集技術や合成生物学など新たなバイオテクノロジー技術を用いた新開発食品の安全性を確認するために必要な新たな手法の開発検討を行った。ゲノム編集ではオフターゲットが課題になっていることから、配列類似性によらない unbiased にゲノム全体の DNA 切断部位を検出する方法の開発、非アレルゲンタンパクのアミノ酸情報も加味し、既知アレルゲンタンパクとの相同性に依存しない人工知能を用いた全く新たなタンパクアレルゲン性予測アルゴリズムの開発、新開発食品試料中に出現する未知成分の質量分析インフォマティクスをもちいた同定手法の開発、の検討を行った。

その結果、ゲノム解析では、既報の Site-seq 法を出発点にしたオフターゲット検出法が確立可能であることを示すとともに、誰でも使用できる web ツールの開発へ発展可能であることが分かった。新規アレルゲン性予測では、アレルゲンタンパクにのみ出現するアミノ酸配列パターンを抽出、それを用いたアレルゲン性予測が従来よりも精度が高いことが確認できた。アレルゲン性とも関連するタンパクの分解性試験について、pH、酵素濃度について細かく設定して検討した結果、ペプシン濃度よりも pH 変化が分解性に大きく影響することが分かった。質量分析インフォマティクスでは、基になる高品質な質量分析スペクトル情報が必要なため公共データベースからスペクトル情報を入手して、精度や帰属の正確なデータを選別した。さらに、ゲノム編集作物の開発側から、安全性確認に必要な項目やデータの種類、それらのデータを得るための問題点や申請時にあたっての課題などを検討した。

### A. 研究目的

ゲノム編集技術を利用した作物（ゲノム編集作物）から作られる新たな食品の研究開発が国内外で活発に行なわれている。ゲノム編集作物では、従来の遺伝子組換え作物のような外来遺伝子を導入することはなく、内在性遺伝子の配列を数塩基欠失により機能欠失させて新たな形質（もち性向上、筋肉量増加、GABA 量増加など）を付与できる。そのため、国民受容の改善の点でも期待されている。また、合成生物学を利用した物質生産も米国

を中心に活発に研究されている。酵母などの微生物に、新たな物質生産に必要な多数の遺伝子を導入することで、その生物が元来合成できない化合物の生産が可能になっている。

ゲノム編集技術を用いた食品や添加物では、安全性評価の対象は内在性遺伝子改変に伴う塩基配列変化とゲノム編集時の意図しない変化（いわゆる、オフターゲット）となると考えられる。合成生物学利用作物では、生合成経路に関わる多数の

遺伝子を導入するため、安全性評価対象は導入した遺伝子群とその影響であるが、組換え範囲が大きいため従来の遺伝子組換え前後の比較による実質的同等性の考え方が適用できないことも想定される。

これまでの遺伝子組換え食品の安全性確認の基本的な考え方は、組換えをする前後の作物を用いた比較解析からの実質的同等性（リスクが組換え前と比較して同等かそれ以下）で判断している。すなわち、導入遺伝子または改変遺伝子に関する事項、ヒトによる長い安全な食経験に関する事項、構成成分による事項、使用方法等について、同等性を失っていないかである。しかし、現在開発されているゲノム編集作物では導入遺伝子はなく、改変されるのは内在性遺伝子の一部塩基配列の欠失のみであり、標的部位（オンターゲット）での変化が十分解析されていれば、潜在的なリスクは意図しない改変であるオフターゲットの影響である。オフターゲット部位での変化によって生じるリスクは、新たな毒性・アレルギー性タンパクの生成によるものが考えられる。しかし、ゲノム解析が進んだ現在においてもゲノム配列のみから毒性タンパクやアレルギー性タンパクが生成しないことを明らかにするのは容易ではない。また、意図しない有害成分産生の可能性があったとしても、現在の質量分析を用いた解析では未知ピークの同定や推定は困難である。さらに、タンパクアレルギー性の確認も、現在実行可能な解析は既知のアレルギータンパク質との相同性比較のみであり、相同性がない新規のアレルギー性タンパク質の予測や非天然型アミノ酸から構成されるタンパクのアレルギー性を予測することは極めて難しい。

このような状況を鑑みて、ゲノム編集作物の開発状況情報収集をもとにしたケーススタディーや開発者との連携で申請側の問題点を明らかにするとともに、上記のゲノム編集食品や合成生物学利用食品の安全性確認のために必要な評価手法の新たな開発が急務と考えられた。本研究では、手法開発において、標的配列と類似した配列のオフターゲット検索しかできない点を克服すべく、全ゲノム解析をすることなく潜在的な DNA 2 本鎖切断部位を網羅的に検出する手法、新たな成分が産生した場合の質量分析インフォマティクスを用いた

成分同定あるいは基本構造推定手法、人工知能を活用して相同性がないアレルギー性タンパクの予測や非天然型アミノ酸から構成されるタンパクのアレルギー性を予測する手法、の開発検討を行う。また、諸外国の規制・ゲノム編集・合成生物学に関する情報収集を行い、その結果から仮想的モデル生物を用いたケーススタディーを行い、安全性確認に必要なデータや問題点を明らかにすることとした。

## B. 研究方法

### (1)

- ・ゲノム編集技術と合成生物学情報収集
- ・モデル生物を用いたケーススタディー、について

ゲノム編集食品・添加物（以下、食品等とする）や合成生物学利用食品等の開発に関する情報収集は、データベースをもとに行った。ケーススタディーは、情報収集したデータをもとに商品化が近いもの、主に将来想定されるものを中心に事例を作成して解決すべき課題を抽出した。アレルギー性とも関連する、タンパク分解性試験について、EU ではヒトの実際に合わせた細かい条件での検討が推奨されている。そのため、人工胃液による分解性試験条件について、pH、酵素濃度について細かく設定して検討した。

### (2)

- ・リスクコミュニケーション手法開発と実施

リスクコミュニケーションに用いる資料として重要で、厚労省が作成するパンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」（以下、パンフレット）について、前回作成時から年数がかなり経過していたため、最近の内容を反映させた内容に更新を行なった。

### (3)

- ・ゲノム網羅的に DNA 2 本鎖切断部位を検出する手法とツールの開発検討

現在、ゲノム編集技術を用いた時のオフターゲットについては、標的部位（オンターゲット）と類似したゲノム上の場所を *in silico* に検索することしかできない。そのため、オンターゲットと配列類似性がない部位でのオフターゲットやその影響は検出把握できない。これを解決するために、既報である SITE-Seq 法を出発点に動物や植物に

適用可能で簡便かつ再現性の高い、ゲノムワイドな DNA 2 本鎖切断部位解析手法とそれを利用者が使用する環境ツールの開発検討を行った。

(4)

・メタボローム解析を活用した未知成分の同定手法の開発検討

公共データベースには、多くの質量分析データが蓄積されており、これらを活用することで新開発食品試料を分析したときの未知成分同定に活用できると考えられる。一方で公共データベース上のデータには信頼性に欠ける情報も多いことから、MassBank を中心に公開されている数十万のスペクトル情報から質の高いデータを抽出した。

(5)

・機械学習を用いた新たなタンパクアレルギー性予測手法とツールの開発検討

現在のタンパクアレルギー性の評価は、データベースをもとに既知のアレルゲンとの相同性比較を行っている。そのため、既知のアレルゲンと相同性のないタンパクや天然型アミノ酸以外の構成アミノ酸などから作られるタンパクのアレルギー性を予測評価することはできない。これを解決するために、データセットとして既知アレルゲンタンパクのほか非アレルゲンタンパク情報を加え、機械学習を用いてアレルギー性予測アルゴリズムの構築の検討を行った。本研究では、用いるデータセットの質 (quality) が最も重要であるため、データセットは十分にレビューしたもののみを用いた。

・人工胃液を用いたタンパク分解性試験条件の検討

アレルギー性とも関連する、タンパク分解性試験について、EU ではヒトの実際に合わせた細かい条件での検討が推奨されている。そのため、人工胃液による分解性試験条件について、pH、酵素濃度について細かく設定して検討した。

(6)

・ゲノム編集生物作製 (魚類) と規制の進め方検討

ゲノム編集技術を用いて作製したマダイ、フグについて、安全性を十分確認する上で必要な情報や、開発側からの問題点を抽出した。

(7)

・人材育成 (統計学、バイオインフォマティクス、AI 分野)

分担研究者および協力研究者と共同で行うことで、インフォマティクス関連技術の取得に努めた。

### C. 研究結果および考察

(1) ゲノム編集技術と合成生物学情報収集とモデル生物を用いたケーススタディーについて

2018 年途中までの新規育種技術 (NBT) を用いた動物および植物について調査した結果、動物では食品用途 (食用) は全 39 報中 20 報であった。使用技術はほとんど CRISPR/Cas9 およびその改変型であり、主な獲得形質はブタの筋肉量増大やウイルス抵抗性である。植物でも使用技術はほとんど CRISPR/Cas9 で、食用は全 122 報中 42 報、研究用は 76 報であった。食用では、トマトの保存性向上や種子がなくても果実ができるもの、コムギの光合成能向上やうどんこ病抵抗性、イネの除草剤耐性、イネでは収量の増加のほかウイルス抵抗性キュウリなどがある。詳細は分担報告書を参照のこと。ケーススタディーでは、開発直近の筋肉量増大マダイやフグ、もち性向上トウモロコシの実際の事例からとゲノム編集技術で仮定の農作物等を設定して、確認すべき事項や問題点を明らかにした。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

(2) リスクコミュニケーション手法開発と実施について

厚労省作成パンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」について、見やすさ、分かりやすさのほか最新の内容 (ゲノム編集) および表示の消費者庁改定が反映されていない点を中心に改定作業を行った。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

(3) ゲノム網羅的に DNA 2 本鎖切断部位を検出する手法とツールの開発検討について

標的部位と類似していない箇所のおフターゲットの検出が可能な unbiased な手法を、Site-Seq 法をもとに、動物および植物細胞でできるように検討した。ブタ細胞及びイネ細胞を用いて検討を行い、再現性、感度、正確性について検討した結果、動植物細胞に問題なく適用可能な検出方法であることが分かった。また、これらの手法を web 上で

行うツールの開発検討を Galaxy というシステムを用いて検討した結果、Galaxy 上で実行するシステムを構築可能であることが分かった。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

(4) メタボローム解析を活用した未知成分の同定手法の開発検討について

ゲノム編集技術など新たなバイオテクノロジー技術で作製された新開発食品の安全性確認のための手法の一つとして、食品試料分析中の未知成分同定のための質量分析インフォマティクス手法の検討を行った。本手法では、もともになる大量のマススペクトルの信頼性が最も重要であるため、MassBank 等質量分析の公共データベースにある数十万のデータについて精査した。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

(5-1) 機械学習を用いた新たなタンパクアレルギー性予測手法とツールの開発検討について

データセットとして既知アレルギータンパクのほか非アレルギータンパク情報としてアミノ酸配列を加え、機械学習を用いて新規のアレルギー性予測アルゴリズムの開発検討を行った結果、アレルギータンパクにのみ出現するアミノ酸配列パターンを抽出できた。また、ヒトが自己と判断したタンパクは非アレルギーと考えられることから、これを非アレルギー情報としたときの予測も行った。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

(5-2) 人工胃液を用いたタンパク分解性試験条件の検討について

アレルギー性とも関連するタンパク分解性試験について、pH、酵素濃度について細かく設定して検討した結果、ペプシン濃度よりも pH 変化が分解性に大きく影響することが分かった。

(6) ゲノム編集生物作製 (マダイとトラフグ) と規制の進め方検討について

ゲノム編集技術で作製したマダイの改変部位解析、読み枠のズレによる新たなタンパクの出現とアレルギー性、主要成分分析など安全性確認に必要なデータの取得を通して、申請に当たり不足するデータはあるか、データ取得する上で問題となるのは何か、などについて明らかにした。詳細は分担報告書に記載しているので参照のこと。

## D. 結論

- ・ケーススタディーからゲノム編集食品の安全性確認で考慮すべき点と問題点を抽出した。
- ・ゲノム編集技術と合成生物学利用の植物および動物について情報収集から、中国の幅広い開発研究が行われていること、対象生物は植物で柑橘類へ広がっていることが分かった。
- ・リスクコミュニケーションを進めるうえで情報の基礎となる、パンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」の改定作業を行った。
- ・全ゲノム解析せずに網羅的にゲノムワイドに DNA 切断部位を検出する方法から、CRISPR/Cas9 では標的配列と類似しない配列 (データベースからの類似性検索で出ない配列) も多数切断される可能性が分かった。
- ・公共データベースのマススペクトル情報から信頼性できるデータを選別して、スペクトル類似性から未知化合物同定・推定を行う基礎とすることができた。
- ・タンパクアレルギー性の予測に、アレルギータンパクと非アレルギータンパク配列情報を加味して機械学習から、高精度なアレルギー予測アルゴリズムのプロットタイプができた。
- ・ゲノム編集生物 (マダイ・トラフグ) 開発者とともに、安全性確認に必要なデータと取得可能なデータの検討から、如何に複数のデータから安全性を示すかが重要と考えられた。

## E. 業績

論文、学会発表、説明会、リスクミ開催などの業績詳細は、各分担報告書に記載。