

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3年度）

### ゲノム編集に関する情報収集解析

研究分担者 近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨：

ゲノム編集動物、植物、マッシュルームについて研究開発状況調査から、動物ではゼブラフィッシュのほかブタや昆虫が、植物ではコメ、コムギ、トウモロコシ、トマトなどの生物種について報告が多く、形質としてはウイルス耐性など耐病性、収量増加や環境耐性などが研究されている。技術的には、大部分が CRISPR/Cas9 でオフターゲットの低減なども検討されている。合成生物学を利用した食品等の調査では、代替肉の作製や栄養素、機能性成分等の増加に関する研究が、多くの遺伝子を導入することによって実施されている。合成生物学を利用した植物について、EFSA レポートにあるケーススタディーの3つについても考察した。アレルギータンパクの幅広い pH 条件での人工胃液による分解性について検討を行うために、難消化性の卵白オボムコイドを対象としてその精製を行った。リスクコミュニケーションの一環として、ゲノム編集技術の理解を促進するためのビデオ教材を作成、公開した。

#### 研究協力者

中島 治 国立医薬品食品衛生研究所

#### A. 研究目的

遺伝子改変技術を応用した食品開発は、技術的には外来遺伝子導入による遺伝子組換え食品（GM 食品）に加えて、生物自身が持つ内在性遺伝子の改変で新たな形質を生み出すゲノム編集技術応用食品（ゲノム編集食品）が、また、その生物が持たない多数の遺伝子を導入した酵母などから新規食品機能成分を産生させる合成生物学利用が盛んに研究され、今後事例が増加すると考えられる。現行の遺伝子組換え食品等の安全性審査やゲノム編集食品事前相談で確認される取扱い要件で用いられる評価基準が、今後登場する新しい技術に対応できるかを検討する必要がある。そこで、ゲノム編集技術を用いた食品等（以下、ゲノム編集食品）に関して、技術が登場した 2012 年からの

遡って研究開発状況とその傾向を調査する。また、アレルギー性評価における項目、人工消化液によるアレルギータンパクの分解性について、通常条件の pH1.2 以外の pH による分解度の変化を検討して本試験試験結果の重要性を考察する。リスクコミュニケーションの研究として、2 段階のレベルからなる資料を作成して、その効果や課題を検討する。

#### B. 研究方法

##### 1. 研究開発に関する文献調査

データベースとして PubMed を主に用いて 2012 年 1 月から 2021 年 11 月 30 日までに出版された論文について検索した。対象は、ゲノム編集動物、ゲノム編集植物、ゲノム編集マッシュルームとした。用いた検索式は、次の通りである。

##### (1) ゲノム編集動物

((CRISPR OR Cas9 OR Cas12 OR CasX OR

Cas3 OR Cas13 OR Cas14) AND (pig OR pork OR swine OR cow OR cattle OR chicken OR fish OR zebrafish OR medaka OR tilapia OR sheep OR goat OR insect OR silkworm OR sea urchin OR mosquito)) NOT review

(2) ゲノム編集植物

((“zinc finger nuclease” OR ZFN OR TALEN OR “TAL effector” OR CRISPR OR Cas9 OR Cpf1 OR Cas12a OR Cas3 OR Cas13 OR Cas14 OR CasX OR “base editing” OR “prime editing”) AND plant) NOT review

(3) ゲノム編集マッシュルーム

(“zinc finger nuclease” OR ZFN OR TALEN OR “TAL effector” OR CRISPR OR Cas9 OR Cpf1 OR Cas12a OR Cas3 OR Cas13 OR Cas14 OR CasX OR “base editing” OR “prime editing”) AND mushroom NOT drosophila NOT review

検索によりヒットした総説を除く科学文献から、タイトル・書誌情報とアブストラクトの情報を csv ファイルに保存した後に、重複および目的外文献を手作業で削除した。次に、この得られた論文情報ファイルから、独自の R プログラムを用いて、以下の情報を抽出してファイルの右カラムに加えて情報整理を行った。

- a) ゲノム編集技術のどの技術が使用されたか
- b) オフターゲット (off-target) について調査しているか
- c) 標的遺伝子は
- d) 目的の生物種は (事例が多い生物種はなにか)

アブストラクトは日本語訳を加えて、excel ファイルにまとめた。また、2012 年から約 10 年の調査結果からその傾向を Python プログラムで tSNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) クラスタリング解析した。

次に、合成生物学に関する研究開発状況調査を行った。合成生物学は、技術の名称でもなく、一つの学問領域を示すような用語のため、ゲノム編集のような PubMed を用いたキーワード検索が容易ではない。そこで、合成生物学に関する総説にある内容から、調査に必要なキーワードを選別して開発状況調査を行った。

2. 人工消化液によるタンパク分解性試験 (酵素濃度・pH 条件の影響)

EFSA では人工胃液による消化性試験において、単一条件ではなく、pH 条件、酵素ペプシン濃度を変化させて、実際の環境に近いように幅が広い条件で試験することを検討している。日本においても、同様の方法をすぐに安全性評価の中に採用することは難しいが、そのような多様な条件下での分解性の変化を把握しておくことは重要である。代表的なアレルゲンの分解性試験には、高度に精製されたタンパクが不可欠である。これまで、アレルゲンタンパクとしてピーナッツや卵白オボムコイドなどいくつかのタンパクを自ら高度に精製したものを試料として検討を行ってきた。今年度は、OVM を人工胃液で分解させたときに得られる断片と IgE との間の結合性を調べることを目的とする。その前段階として、本年度は分解させていない OVM を用いて IgE 抗体によるウエスタンブロットティングの条件検討を行った。

3. リスクコミュニケーションのための説明資料作成

一般市民向けの、レベルの異なる資料を作成、ビデオスタイルにして国立医薬品食品衛生研究所・生化学部ホームページに公開した。今後これらを活用しながら、どのような方法が効果的のかななどを明らかにしていく。また、別途若手研究 (代表: 田口) で実施している研究内容と成果との連携をしながら進めていく。こちらでは、独自の資料を見た前後の意識の変化を追跡している。

## C. 研究結果および考察

### 1. 研究開発に関する文献調査

ゲノム編集植物については、2012年1月から2021年11月30日までで3,168の論文がヒットした。重複と不要なファイルを取り除くことで最終的に1,695件の論文が抽出された (Table 1)。クラスタリング解析結果からの全体傾向は、コメ、ダイズ、コムギ、トウモロコシ、ポテト、トマトのほか柑橘類が一つのクラスターを形成していることから独自の多くの研究が行われていることが示唆された。形質では収量増加や環境耐性がよく研究されている (Fig.1A)。技術的には、CRISPR/Casシステムが93%と最も多かった (Fig.2-1)。Casの中では、様々な改良版が開発されているものの現在でもオリジナルの Cas9 がもっと多く使用されていた (Fig.2-2)。種ごとでは基礎研究にも用いられることが多いコメやシロイヌナズナが最も報告数が多く、トマト、タバコ、コムギ、トウモロコシなどである (Fig.3)。調査した論文の中で、オフターゲット変異について検討している割合は117/137であった (Table 2)。

ゲノム編集マッシュルームでは、靈芝、ヒラタケ、シイタケ、エリンギ、スエヒロタケなどの報告があったが1から3件程度、全体で11件と少なかった。オフターゲット変異や意図しない変化の解析までしている論文はなかった (Table 3)。

ゲノム編集動物では、2012年1月から2021年11月30日までで2,981の論文がヒットした。重複と不要なファイルを取り除くことで最終的に1911件の論文が抽出された (Table 4)。技術的には、CRISPR/Casシステムが94%と最も多かった (Fig.4-1)。また、植物同様に Cas の中でも、様々な改良版が開発されているものの現在でもオリジナルの Cas9 が98%ともっと多く使用されていた (Fig.4-2)。種ごとでは基礎研究にも用いられることが多いゼブラフィッシュが最も報告数が多く、

次にブタのゲノム編集報告が多かった (Fig.5)。ブタは、ヒトの神経変性疾患の病理学的特徴をより忠実に再現できることから用いられているほか、重要な食肉として耐病性に関する研究が主である。昆虫は、基礎研究として色素やにおい、羽に関する遺伝子などの研究がされているが、クラスタ解析では分離した集団として検出されなかったことから (Fig.1B)、幅広い目的で使用されているのかもしれない。オフターゲット変異について何らかの検討している割合は少なく17であった。

以上の調査結果から、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 が発表されて約10年が経過し、その間に Cas9 の選択性や編集効率を上げる研究が精力的にされてきたが、現在においても主流は Cas9 であることが分かった。また、DNA 2本鎖切断を起こさないため安全性が高いと期待された塩基編集は実用化においてあまり利用されていない。様々な改良がされているものの予期できない変異の可能性があることや塩基編集用ツールが複雑であることも要因と考えられた。

(別添参考資料：文献調査ファイル)

合成生物学の研究開発調査では、「合成生物学」の定義はないが、次のような概念と考えられる。

「作りたい物質を作るように DNA の塩基配列を設計して合成し、その DNA を生物に導入することで目的とする物質を生物に作らせること。そのために、目的とする物質を作るための代謝経路を新たに構築する必要があり、さまざまな遺伝子を導入すること。」

合成生物学を利用して、食品分野では、どの生物を改変して、どういう製品を開発しているかをしらべたところ、以下のものであった (Table 5)。人工肉や代替肉 (植物由来) 作製時の肉の赤身成分の再現をめざすものや、リコペン、アスタキサンチン産生など健康志向に向けた製品開発が行われている。以下に詳しく記載する。

### 【代替肉の作製】

合成生物学を用いて、色、味、風味などを本物の肉に近づける。なお、このような製品の場合は、何との比較で安全性を評価すればいいのかが課題である。

#### 色：ヘムやヘモグロビンを合成

- ・ 大腸菌でグルコースから遊離ヘムを産生する
- ・ 出芽酵母でヘム合成経路を変化させる

#### 味、風味：脂肪酸を合成

- ・ アルカン資化酵母でアセチル-CoA 経路を変化させる
- ・ 油化生産酵母で脂肪酸シンターゼを変化させる
- ・ アルカン資化酵母で NADPH やアセチル-CoA の合成経路を変化させる
- ・ 大腸菌で脂肪酸合成系を変化させる

### 【栄養素、機能性成分等の増加】

リコペン、アスタキサンチン、メナキノン、ヒト母乳オリゴ糖 (2'-フコシルラクトース、ラクト-N-ネオテトラオース) 産生できるように、カロテノイド合成に必要な遺伝子群を導入する。

この場合は、多くの遺伝子 (10 以上の遺伝子など) 導入をした生物の安全性評価は、従来の考え方であれば、加えた遺伝子とその産物のタンパクの性質を個別に確認していくことになるが、相互作用などをどう確認するかが課題である。

その他では、次のような研究が行われている。

#### 【乳製品】

大腸菌や酵母にカゼインや乳清タンパク質を作らせ、これらのタンパク質からヨーグルトやアイスクリーム等を作る。

また、合成生物学を利用した植物の環境リスク評価の既存ガイドラインの妥当性評価について報告した EFSA Scientific Report から、合成生物学を利用した植物で 3 つのケーススタディーを上げている。このうち 2 つについては以下のとおりである。

#### <ケーススタディー 1>

植物では通常合成されないビタミン B12 (コバラミン) を合成できるように、バクテリアビタミン B12 生合成経路に関わる複数の組換え遺伝子挿入することによって作出された GM スイートコーン。ここでは、植物の中でこの大きな生合成経路を再構築することは、各遺伝子の発現レベルや相互作用などを考えると評価が難しい問題である。

#### <ケーススタディー 2>

ゲノム編集を用いたコムギゲノム中の複数  $\alpha$  グリアジン遺伝子の欠失による低グルテンコムギの作出である。6 倍体ゲノムの中の全てのグリアジンとグルテニンを正しく特定し、該当する非常に多くの箇所すべてを導入遺伝子なしに構築することは技術的には可能である。この場合はすべての箇所の分子特性解析と新たに生成する ORF から毒性・アレルギー性を調査解析しなければならない。

現在考えられる最も重要なことは、10 以上など非常に多くの遺伝子を導入して一つの生合成経路を構築するとき、個々の遺伝子について従来のように一つずつ評価していくことでいいのか、一つの生合成経路を構築したことによる植物の影響 (特に、その植物が持たない生合成系の導入) まで考慮すべきか、また、どのようにそれを評価すべきかのアプローチを一度検討していくことではないか。合成生物学を利用した食品や食品素材はまだ具体的な事例は少ないが、今後増加してくると考えられる。評価をする上での問題や課題の抽出を早く行っていく必要があると考えられた。

### 2. 人工消化液によるタンパク分解性試験 (酵素濃度・pH 条件の影響)

オボムコイド (OVM) は分解抵抗性のアレルゲンタンパクである。そこで、pH のわずかな差による人工消化液による影響を検討することを目的に条件検討を行った。これまで、市販 OVM での検討から、市販品は卵アレルギー患者血清と反応し

なかったため、今回の検討では独自に卵白から精製を行って両 OVM の患者血清に対する反応を比較検討した。

独自に卵白から精製したタンパク質は OVM であることが LC-MS/MS によって確認できた。自分で精製した OVM と試薬として購入した OVM を比較すると、電気泳動で分離して CBB 染色をしたときに検出される混入物が異なっていた。自分で精製した OVM の場合は、OVM よりも高分子の混入物（混入物 1）が含まれていた。試薬として購入した OVM の場合は、OVM よりも低分子の混入物（混入物 2）が含まれていた（Fig. 6A）。

ウェスタンブロッティングの様々な検出条件を試したところ、OVM のバンドをスメアとして弱く検出することができた。自分で精製した OVM と試薬として購入した OVM の両方からこのスメアが検出された（Fig.6B）。

市販品と今回抽出した精製品は、ともに IgE ウェスタンで OVM を検出している。これらを用いて今後、各 pH 条件で人工胃液による分解を行いその IgE 結合性を検討して、pH の影響を明らかにする。

### 3. リスクコミュニケーションのための説明資料作成

ゲノム編集技術の理解のために、初級編と中級編の技術説明資料をパワーポイントで作成、また、見やすいようにビデオ形式にして国立医薬品食品衛生研究所生化学部のホームページに掲載した（<http://www.nihs.go.jp/dnfi/GMO.html#13>）。

パワーポイント資料とそれをビデオ化したものを比較して見てもらったところ、後者の方が圧倒的に理解しやすいという意見が多かった。

## D. 結論

ゲノム編集動物、植物は基礎研究から応用研究まで活発に行われている。技術的には現在では非常に多くの関連手法があるものの、Cas9 が依然と

してゲノム編集技術の中心である。塩基編集やプライム編集など新しい方法も利用されており、今後応用例が増加すると考えられる。多様な技術を応用して作製した食品について、どのような点に着目して安全性の確認を行っていくのか、現在よく用いられている Cas9 での欠失導入の時とどう違うのかなどを整理しておくことが重要である。

合成生物学利用食品についても、これまでの遺伝子組換え食品の安全性評価の仕組みでどこまで対応可能で、どこから対応できないのか、また今後どのような新たな評価の仕組みが必要であるかを整理しておく必要がある。リスクコミュニケーションによる国民受容の促進のためには、より分かりやすく、かつ、理解しやすい媒体で提供することが重要である。

## E. 研究発表・業績

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 曾我慶介、中村公亮、成島純平、吉場聡子、木俣真弥、江木智宏、岸根雅宏、真野潤一、橘田和美、高島令王奈、柴田識人、近藤一成：改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えとうもろこし混入の判定に係る定性 PCR 検査法の開発、日本食品衛生学会第 117 会学術講演会、東京、2021 年 10 月 26 日
- 2) 高島令王奈、江木智宏、曾我慶介、峯岸恭孝、成島純平、吉場聡子、柴田識人、中村公亮、近藤一成、岸根雅宏、真野潤一、橘田和美：改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る定性 PCR 検査法の開発、日本食品衛生学会第 117 会学術講演会、東京、2021 年 10 月 26 日
- 3) 吉場聡子、成島純平、曾我慶介、柴田識人、近藤一成：安全性未承認の遺伝子組換えナタネの試験法開発、第 58 回全国衛生化学技術協議会年会、名古屋、2021 年 11 月 25-26 日

- 4) 柴田識人、曾我慶介、成島純平、吉場聡子、江木智宏、高畠令王奈、近藤一成：遺伝子組換えダイズ・トウモロコシ定量のための内標比の算出、第 58 回全国衛生化学技術協議会年会、名古屋、2021 年 11 月 25-26 日
- 5) 曾我慶介、成島純平、吉場聡子、江木智宏、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：「遺伝子組換え出ない」表示確認に係る新定性検査法の試験室間共同試験による妥当性評価、第 58 回全国衛生化学技術協議会年会、名古屋、2021 年 11 月 25-26 日
- 6) 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：ゲノム編集作物におけるオフターゲット予測法の検討、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021 年 12 月 2 日
- 7) 近藤一成、成島純平、曾我慶介、吉場聡子、柴田識人、坂田こずえ、田口千恵、加藤怜子：ヒト細胞 TK6 を用いた CRISPR/Cas による構造変異 (SV) 解析の検討、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021 年 12 月 3 日

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし