

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」

総合総括研究報告書

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	木下 政人	(京都大学)
研究分担者	今村 知明	(奈良県立医科大学)
研究分担者	有田 正規	(理化学研究所)
研究分担者	小泉 望	(大阪府立大学)
研究分担者	竹内 一郎	(名古屋工業大学)
研究分担者	早川 英介	(沖縄科学技術大学院大学)
研究分担者	爲廣 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)
研究分担者	吉場 聡子	(国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨：

本研究では、種々の手法による遺伝子改変の影響、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施策に反映するとともに、安全性確認で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バイアスのないゲノム全体の 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用いた同定手法の開発、の検討を行った。

ゲノム解析では、SITE-seq 法を出発点にしたオフターゲット検出法を *in vivo* において検証して、その有用性を確認できた。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、特に非アレルゲンタンパクデータセットの改良を行いながら検討して、アレルゲン性予測が既報のどの方法よりも精度が高いことが確認できた。EFSA においても検討されている、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。その結果、分解されやすいタンパクにおいても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、食用、毒性を有する試料を用いた解析、公共データベース、および標品測定からスペクトル情報を取得することでデータベース化するとともに、結果をネットワーク化して可視化するシステムを構築できた。さらに、ゲノム編集トラフグについて、テトロドトキシンの蓄積、分布変化、およびゲノム編集トラフグのラットへの毒性試験を実施した。その結果、毒の分布に変化はなく、また、ゲノム編集トラフグの毒性もないことが確認できた。一方で、強い毒性を持った生物については、検体数を増やした詳細な検討もまた必要であると考えられる。ゲノム編集食品に対する国民理解の促進のためにリスクコミュニケーション、パンフレット作製を行った。また、近年 RNA 編集に関する論文が増えていることからその動向調査を行った結果、現在の研究の中心は疾患に関わる研究であり植物における RNA 編集に関する応用例はほとんどなかった。

A. 研究の目的

ゲノム編集技術を応用した新たな食品（ゲノム編集食品）の研究開発が国内外で活発に行なわれている。ゲノム編集食品では、従来の遺伝子組換

え食品のような外来遺伝子を導入することはなく、生物自身が本来持っている内在性遺伝子の配列を数塩基欠失により機能欠失させることで新たな形質（もち性向上、筋肉量増加、GABA 量増

加など)を付与することが期待されている。別の生物種から外来遺伝子を導入することがないため、国民受容の改善の点でも大きく期待されている。もう一つの重要な技術、合成生物学を利用した物質生産も欧米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。

ゲノム編集食品では、安全性評価において重要な点は、内在性遺伝子改変に伴う塩基配列変化(オンターゲット)とそれに起因する新たな毒性やアレルギー性を有するタンパクや有害物質の出現または増加であり、加えて意図しない変化(オフターゲット)も考慮すべき点である。一方で、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。従来、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とから、絶対的な評価手法の開発なども必要と考えられる。

従来の遺伝子組換え食品における安全性確認の基本的な考え方は、十分な食経験がある組換え前の生物(の品種)に対して、新たに追加した遺伝子に対する安全性評価を行い、組換え前と実質的に同等か、リスクの程度が同定かそれ以下であることの確認、いわゆる実質的同等性確認、である。そこでは、導入遺伝子に関する分子生物学的特性、ベクターなど外来遺伝子とその断片の有無と安全性、新たなアレルギー性タンパクの有無、主要成分の変化について確認される。しかし、ゲノム編集食品では、外来遺伝子とその断片がないと仮定すると、改変されるのは内在性遺伝子上における塩基の挿入・欠失であり、標的部位(オンターゲット)での変化が十分解析されていることが重要で、その上で潜在的なリスクの一つは意図しない改変であるオフターゲットの影響(ゲノム状の塩基配列の変化と代謝産物の変化など)である。オン・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である。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な現状がある。さらに、タンパクアレルギー性の確認も、現在実行可能な*in silico*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。加えて、合成生物学のような、従来の安全性評価の考え方が適用できないことも考えられる。

このような状況を鑑みて、ゲノム編集・合成生物学を利用した食品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、安全性確認のための新たな手法開発において、*in silico*解析では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DNA2本鎖切断部位を網羅的に検出する手法、意図しない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、ゲノム編集技術を用いた動物、植物の研究開発動向、技術動向の調査を行い、注視すべき生物種や技術動向から課題点抽出をする。また、ゲノム編集食品を対象としてリスクコミュニケーションを適切に行うために、Webアンケート調査からの詳細な統計的解析、国内外におけるリスクコミュニケーション事例の包括的調査、多様なステークホルダーによる座談会に基づく冊子の作成を目的とした。

B. 研究の実施

(1) ゲノム編集技術を用いた動植物の研究開発動向調査およびアレルギー分解性の検討

本課題は、国立医薬品食品衛生研究所・近藤一成が分担して実施した。植物・動物を主な対象に、ゲノム編集技術(ZFN、TALEN、CRISPR/Cas)を用いた動物、植物の研究動向について、PubMedを中心にキーワードを組合せて検索を行い、整理

した。増加している生物種、技術の動向などを図式化した。アレルギー解析について、モデルタンパクとして代表的なアレルギータンパクとして、ピーナッツアレルギーや卵白アレルギーについて、pH や分解酵素の濃度を変化させてその分解性の変化と抗原性の保持状況について、非アレルギータンパクの変化とも比較しながら解析した。

人工ヌクレアーゼの特異性を調べる *in vitro* アッセイツールの開発

本課題は、国立医薬品食品衛生研究所・中村公介 (H30~R1) および近藤一成 (R2) が分担して実施した。細胞から抽出した DNA を用いて、潜在的な DNA 二本鎖切断部位を予測する手法として SITE-Seq 法を検討した。本方法で予測した、切断候補部位について、*in vivo* 条件で検証するためにイネカルスを用いて検討し、SITE-Seq 法で予測した候補部位は、実際の生物においても確認できるかどうか確かめた。本アプローチが、ゲノム編集食品の開発において、非意図的な切断の影響評価に役立つことが期待される。

(2) リスクコミュニケーションに関する研究

本課題は、奈良県立大学・今村知明、および、大阪府立大学・小泉望が分担して実施した。GM 食品のリスクコミュニケーションのキーファクターを盛り込んだ有効な説明手法を活用し、厚生労働省の GM に関するパンフレットについて提案した。また、NBT に関する正しい理解と判断を促すための新たなコンテンツについても検討した。

また、一般モニターと専門家を対象にした Web アンケートを実施してそれを解析した。また、リスクコミュニケーションの手法について検討する為、諸外国におけるリスクコミュニケーション事例 (38 事例) を調査行った。情報提供のための資料として、消費者、事業者、開発者、行政などの多様なステークホルダーが参加する座談会を元にした冊子の作成を行った。

(3) 質量分析インフォマティクスによる化合物同定

本課題は、理化学研究所・有田正規、および、沖縄科学技術大学院大学・早川英介が分担して実施した。実測スペクトルを収集し、そこに含まれる MS/MS フラグメント・ライブラリを構築した。

マススペクトルを入手できない物質について、フラグメンテーション予測によるフラグメント・ライブラリを構築するための検討を行った。これまで、遺伝子改変など何らかの改変によって生じた意図しない成分変化とその化合物同定は、特に複雑な食品抽出試料からは非常に困難であると考えられてきた。そのため、通常は限られた標品のある成分においてメタボローム解析を実施してその変化を解析している。本研究では、ゲノム編集操作で、想定しない成分の変化を捉え、その化合物の同定または推定を行い、毒性についても考察できるシステムの構築を検討した。

(4) アレルギーデータベース ADFS のアップデート、および、人工知能を用いたアレルギー性評価のためのアルゴリズム開発

本課題は、名古屋工業大学・竹内一郎および国立医薬品食品衛生研究所・爲廣紀正が協力連携分担して実施した。

アレルギー情報について、アレルギーデータベース (AllergenOnline) を参考にアレルギーデータベース (ADFS) を更新した。エピトープ情報について、NCBI PubMed に掲載された論文を査読して必要なエピトープ情報を含む場合はその情報を整理し、ADFS にデータを追加した。

新規アレルギー予測手法の検討のために、アレルギーデータベース COMPARE からアレルギータンパク情報を、非アレルギータンパク情報は、UniProt からアレルギー情報を除くことによって構築したものについて、再度精査を行い更新した。

得られた上記データセット (アレルギーデータと非アレルギーデータ) を用いてアレルギーにのみ出現し、非アレルギーには一度も出現しないアミノ酸のモチーフ配列を抽出した。このモチーフデータを利用して、アレルギー性判定・予測システムを検討した。さまざまな数理技術、情報技術を活用することで高精度・高信頼性かつ汎用性のあるアレルギー性判定・予測システムを開発するために、データセットの組み合わせ等を試行錯誤しながら検討を行った。

(5) ゲノム編集生物作製における現象解析と規制の進め方

本課題は、京都大学・木下政人が分担して実施した。ゲノム編集技術により、ミオスタチン遺伝

子を破壊したマダイ、レプチン受容体遺伝子 (*lepr*)、メラノコルチン4型受容体遺伝子 (*mc4r*) を破壊したトラフグについて特性を解析した。ゲノム解析、アレルゲン性、メタボローム解析、ラット短期毒性試験を行って、総合的に解析を実施して、そのデータについて食品安全性の評価法への提言となることを念頭に考察した。

(6) ゲノム編集技術の特性、安全性について

PubMed (NCBI) を用いて、DNA 編集および RNA 編集に関するキーワードを用いて論文検索及び情報取得・解析を行った。RNA 編集技術に関する文献調査から、論文の PMID、Journal、Title、Doi、Abstract、Year、Month、Status、MeSH、Keyword の情報を csv 形式で取得した。さらに、ファイルの統合と重複除去を行った後 (1,753 報)、項目の整理及び技術に関する論文の抽出を行い、重要と思われる論文 18 報を詳細に調べた。RNA 編集技術の食用となりうる生物、特に植物への応用においてその実態と傾向を考察した。

(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. 研究の成果

(1) ゲノム編集に関する情報収集解析、ケーススタディーおよびアレルゲン分解性の検討

ゲノム編集技術を中心に研究開発の文献を 2018 年～2020 年について調査した。動物、植物においてゲノム編集技術特に CRISPR/Cas を用いたもの中心であり、技術的には CRISPR/Cas が今後も中核技術でこれに様々な工夫を加えた手法が今後も中心となると考えられた。国内では研究開発が盛んな魚類では、ウナギ、ドジョウなど多様な生物に応用されているが論文報告件数は少ない。植物では、イネでの研究が中国を筆頭に活発で、トマト、コムギ・オオムギ、ダイズが多く研究されている。また、イチゴなど果樹への応用も進んでいる。形質は環境耐性から栄養改変まで多岐にわたる。モデル生物から実際の目的生物での研究が進んでいると考えられた。

アレルゲン分解性については、pH の少しの変化、例えば pH1.2 から pH3 へ変更しただけで完

全に分解していたものが、ほとんど分解されなくなるタンパク (アレルゲン) があることが確認できた。一方、消化酵素であるペプシンの濃度条件ではあまり分解性には影響を与えなかった。今回は、患者血清を用いた検討を十分行えなかったが、反応性が示されれば、これまでアレルゲン性評価のデータとして検討されてきたアレルゲンタンパク分解性試験のあり方を再検討する必要があるかもしれないことが示唆された。

ゲノム網羅的に DNA 二本鎖切断部位を検出する手法とツールの開発検討

イネをモデル生物種とし、論文に報告されている遺伝子を標的として、ゲノム編集を行った場合の潜在的 DNA 二本鎖切断部位 (オフターゲット) 解析手法を検討した。

細胞から抽出精製した DNA を利用する *in vitro* 法である SITE-Seq 法を用いて、信頼性のある潜在的な切断部位候補を抽出した。その候補部位について、実際にイネを形質転換して個体を生育し、カルスから DNA を抽出精製してその候補部位が切断されているかを、NGS を用いたアンプリコンシーケンスで解析した結果、1 つのオフターゲットで切断が確認された。また、このオフターゲット部位は標的部位とは配列類似性が高くなく、殆どの *in silico* 解析法において検索できなかった。以上の結果から、SITE-Seq 法と *in vivo* 検証を組み合わせたオフターゲット検出法は、非常に有用な方法であることが示された。フレームシフトによりアミノ酸配列の変化が生じる。こうしてできる可能性があるタンパクのアレルゲン性を予測するため、アレルゲンデータベースを用いてアレルゲン予測を行った。その結果、今回ゲノム編集を行い、アンプリコンシーケンス解析で明らかになった配列においては、80-Mer Sliding Window FASTA Search および 8-mer FASTA Search のいずれでも既知アレルゲンとホモロジーのある配列は検出されなかった。オフターゲット検索からアレルゲン予測まで含めたスキームを確立することで、一つの安全性評価法として有効であると考えられる。

(2) リスクコミュニケーションに関する研究

リスクコミュニケーションのための資料として、厚労省で提供するパンフレット「新しいバイオテクノロジーで作られた食品について」を作成

した。また、ゲノム編集技術の理解促進のために、パンフレット「ゲノム編集技術応用食品を適切に理解するための6つのポイント」を作成した。

また、一般モニター4,000人、専門家398人を対象としたゲノム編集食品に対するWebアンケートについて、統計処理を含めて詳細に解析した（R2年度分担報告書、添付資料1）。現状では様子見的な態度を示す回答者が多いが、否定的な傾向にあるわけではない。科学リテラシーが高いと専門家信頼・社会受容ともにポジティブな態度が高まる。にリスクとベネフィットに関する情報共有への関心が強いこと、などが明らかになった。

また、海外におけるリスクコミュニケーション事例の包括的調査について、過去5年以内の国内外の遺伝子組換え食品あるいはゲノム編集食品に関するリスクコミュニケーション、サイエンスコミュニケーションの38実施例をWeb検索により抽出した（R2年度分担報告書、添付資料2）。さらに、消費者、事業者、開発者、行政などの多様なステークホルダーが参加する座談会を実施し、そこで出た意見・質問を参考に、頻出する疑問を整理した。

(3) 質量分析インフォマティクスによる化合物同定

本研究の目的はゲノム編集作物等で想定外の質・構造的変化を生じる化合物の迅速な検出と構造の推定である。従来の質量分析のデータ解析では困難だった未知化合物の検出と構造推定を、スペクトル類似性に着目した独自の手法で可能にするために、スペクトルライブラリの構築をまず行った。フラグメントスペクトルライブラリは、公共データベースMassBankに加え、天然化合物を多く含むデータベース群であるGNPSやRespectも追加して、特に植物二次代謝物に対応できるように整備した。また、独自で500種類の低分子化合物を分析し、ライブラリに追加した。さらに代表的な食品・モデル植物等（ダイズ、トマト、ジャガイモなど）50種類以上から抽出した低分子化合物に関してもスペクトルライブラリに追加した。ゲノム編集ジャガイモに本手法を適用して手法の有用性について検討した。データ解析システムをWebブラウザベースの実行環境で動作させる目的でプログラミングなどの専門知識がない一般的な研究者でも容易にデータ解析とデータ可視化ができるように構築した。

(4) アレルゲンデータベース ADFS のアップデート、および新規タンパクアレルゲン性子測に必要な情報の作製

生化学部で管理運営するアレルゲンデータベース ADFS について、AllergenOnline のアレルゲン情報アップデートに伴って ADFS 登録アレルゲンのアップデート作業を定期的実施した。エピソード情報は、論文レビューを行った。

次の(5)に用いるアレルゲンおよび非アレルゲン情報の構築について、アレルゲン情報は Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) のサイトから最新情報(2,248)に更新、非アレルゲンデータは、UniProt のサイトからどこまでデータを入れ込むかについて試行錯誤しながら、アレルゲン表示対象の食品10品目に相当するタンパクアミノ酸情報(17,372)とした。

また、ADFS サイトの脆弱性に関する対策を行った。

(5) 人工知能を用いたアレルゲン性評価のためのアルゴリズム開発

(4)で構築したデータセットを活用、精度を確認しながら再度データセットの見直しを行い最適化していった。このとき、False Negative を除くためにアレルゲン特異的パターンの定義を整理し、その解釈を明確化して、データ構築を行った。近年のAI研究では、データ駆動型AIシステムの説明性・信頼性が重要であることが要請されるが、本研究で作成したシステムは、統計的信頼性が担保されたパターンのみを用いており、これらの要請を満たしている。最終的に、これまでに論文報告されているシステムの Alledictor、MEME、Allertop と比較を行い、本研究で作成した方法の予測精度がよりよいことが確認できた。

(6) ゲノム編集生物作製における現象解析と規制の進め方

ゲノム編集技術により、ミオスタチン遺伝子を破壊したマダイ、レプチン受容体遺伝子 (*lepr*)、メラノコルチン4型受容体遺伝子 (*mc4r*) を破壊したトラフグについてゲノム解析、メタボローム、アレルゲン性に関する解析データを評価した。外来遺伝子の残存やオフターゲット切断、および、アレルゲン性がないことを確認した。

トラフグについて、フグ毒の体内分布と可食部

(骨格筋)の毒性について検討を行った結果、非ゲノム編集体とゲノム編集体では毒の分布に差はなく、可食部を摂取したラットにおける体重変化や生化学的数値に優位な差は認められなかったことから、明らかな毒性はないものと考えられた。

以上から、ゲノム編集操作したマダイやトラフグについて、食品としての安全性に明確な懸念点は存在しないものと考えられた。これまでに実施した解析で、安全性確認について必要な解析データは得られていると考えられるが、一方で、フグについてはその毒の毒性が極めて強いことから十分な評価が必要と考えられた。

(7) ゲノム編集技術の特性、安全性に関する研究

1) ゲノム編集技術に関する論文調査

ゲノム編集に関する文献 17,499 報 (2010.1.1-2020.10.8) 取得した後、クラスター分析により、ランダムに選んだ 4,000 の文献を 60 のクラスターに分類した。その結果、RNA 編集に関するキーワードを含むクラスターに多くの論文が含まれることが判った。RNA 編集に関するキーワードを含むクラスターの近くに mitochondria、plant、transcriptome、histone、chromatin などのキーワードを含むクラスターが見られた。また、plant(12)は、crop(2)、breeding(2)などと合わせて、ゲノム編集に関わる多くのクラスターに含まれており、広い分野に渡って研究されていることが推察された。

2) RNA 編集技術に関する論文調査

RNA 編集技術に関する文献 (2017.1.1-2020.10.13) 1,753 報を取得した。その中で、RNA 編集技術を用いた研究の数は予想より少なく、多くはゲノムの一塩基編集 (base editing) に関する研究であった。ゲノム編集技術に比べると RNA 編集技術はまだ開発途上であること、応用分野が限られることなどが考えられた。

3) 作物等への応用について

中心的な役割をする分子である ADAR は、それを持たない植物では作動しないので、RNA 編集を作物に利用するためには、外から酵素を導入する必要があり、さらに効果を持続させるために、酵素をゲノムに組み込む必要がある。現時点では

RNA 編集は、作物の品種改良に利用するメリットはなさそうに考えられた。

(8) 人材育成 (統計学、バイオインフォマティクス、AI 分野)

本研究班では、バイオ系 (ウェット) の実験者と情報科学 (ドライ) を専門とする研究者がお互いに連携して、理解して研究を進めていく事が研究開始当初より何よりも重要な点であった。また、近年のビッグデータの取り扱いに関するスキルも分野関係なく求められている現状から、生化学部では、定期的にゲノム解析に関する実習演習を行いドライ解析のスキルの取得に努めた結果、現在では十分な解析が実行できる環境を構築できた。また、その他データ解析に必要なプログラミング等について分担研究者との打ち合わせの中で取得に努めてきた結果、基本的な手法についての理解ができた。

今後はさらにビッグデータの複雑な処理が実行可能な環境と人材育成に努める。

D. その他

内容の詳細については各分担報告書を参照。