

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」
総合分担研究報告書

ゲノム編集に関する情報収集解析、アレルゲンタンパク分解性検討、および
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

研究分担者 近藤 一成 （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：

本研究では、ゲノム編集技術を用いた動物・植物の開発状況調査、ケーススタディーを実施して今後の開発傾向や課題の抽出を行った。その結果、研究開発はコメやコムギなどの主要作物のほか、リンゴなど果樹でも進んでいる事がわかった。アレルゲン性評価におけるタンパク分解性の反応条件における影響の検討では、人工胃液の pH 変化が分解性に大きく影響する事がわかった。ゲノム編集技術を用いたときの意図しないゲノム上の変化を検出するための手法を検討して、簡便に全ゲノム解析を実施する事なくゲノム全体で起きる DNA 二本鎖切断を検出するツールを開発した。今後一般に公開していく。

研究協力者

中島 治 （国立医薬品食品衛生研究所）
小野 竜一 （国立医薬品食品衛生研究所）
木俣 真弥 （国立医薬品食品衛生研究所）
秋本 智 （国立医薬品食品衛生研究所）
成島 純平 （国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究の目的

ゲノム編集技術や合成生物学を応用した食品や食品素材の開発研究が活発に行われている。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。このようなゲノム編集食品の届出制度が令和元年に開始され、安全性に関する必要な情報が確認できれば遺伝子組換え食品とはみなさず安全性審査は不要となる状況となっている。しかし、ゲノム編集技術を応用した食品の安全性の確認に必要な解析手法は定まっていない。ゲノム編集技術特有の問題なども想定されることから、新たな評価手法開発と合わせて研究開発状況や規制制度の調査などを行い検討すべき課題を抽出しておくことは重要である。合成生物学を利用した場合は、大規模な遺伝子改変が行われるため遺伝子組換え食品に該当すると考えられるが、従来の組換える前後の比較による相対的評価、

いわゆる実質的同等性の確認による手法が適応できず、絶対的な評価が必要な場面も出てくると考えられる。そのためには、解析手法はどうあるべきかを検討して必要な評価手法の開発検討を行う事が重要である。このような背景から本分担研究では、以下の3つの検討、(1) データベースを用いて研究開発状況の調査、(2) 人工胃液を用いたタンパク分解性試験、(3) 意図しないゲノム上の変化を解析するためのシステム開発、を実施する。

B. 研究方法

(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ゲン分解性の検討

研究開発動向は、PubMed および有料データベース SciFinder を用いて行った。検索漏れがないようにキーワードを組合せて検索を行った後に重複を除いて整理した。欧州においては、人工胃液による分解性試験を、異なる反応条件で実施することを推奨している。そのため、分解性試験時における反応条件の違いを明らかにしておく必要がある。ここではアレルゲンタンパクのタンパク分解性試験は、人工胃液を作製して異なるペプシン酵素濃度、pH で分解性の変化と患者血清との反応性を電気泳動、ウェスタンブロットを用いて解析した。また、分解していない純度が高いタンパク試料が必要なため、アレルゲンタンパクは精製度が十分なものは市販のものを、精製度が十分でな

いものは食品より抽出精製したものをを用いた。

(2) 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

全ゲノム解析をすることなく、ゲノム全体に対して *in silico* では予測できない意図しない変化である DNA 二本鎖切断を検出するための手法と解析環境の構築を行った。

予測できない意図しない変化である DNA 二本鎖切断部位の予測を、ゲノム DNA に対して CRISPR/Cas9 を用いて切断誘導することで明らかにして (SITE-Seq 法により)、それを実際の生物で検証を行う。すなわち、まずイネ細胞から抽出したゲノム DNA を用いて潜在的な DNA 二本鎖切断部位を予測する。本方法で予測した切断候補部位が、本当に生きた生物でも検出されるかどうかを確認するために、イネをゲノム編集技術のツールである CRISPR/Cas9 で形質転換し、得られたカルスを用いて解析した。ゲノム解析は、解析用サーバーを用いて行った。

(3) 人材育成 (統計学、バイオインフォマティクス、AI 分野)

生化学部内では、定期的な実習トレーニングを行うとともに、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を目指す。

C. 研究結果および考察

(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ギー分解性の検討

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結果、動物、植物ともに技術的には CRISPR/Cas を用いたもの中心であった。国内では研究開発が盛んな魚類では、諸外国ではウナギ、ドジョウなど多様な生物に应用されていたが、論文報告件数は少ない。植物では、イネでの研究が最も多く、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、リンゴ、イチゴなど果樹への応用も進んでいることが分かった。形質は環境耐性から栄養改変まで多岐にわたる。また、合成生物学分野では、欧米を中心に研究が進んでいるが具体的に商品化へ進んでいるものは少ないと考えられた。

アレルギー分解性については、ピーナッツアレ

ルゲン Ara h1 など、pH の少しの変化、例えば pH1.2 から pH3 以上へ変更しただけで、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はあまり分解性には影響を与えなかった。今回の検討結果は、これまでアレルギー性評価のデータとして検討されてきたアレルギー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を示唆していると考えられた。アレルギータンパク分解性試験のある条件で分解性が十分でなかったときには、タンパクアレルギー性が懸念されるのか、その可能性がないのかを明らかにするための次の新たな試験が必要になってくるが、それに対する検討は諸外国においても行われていない。今後、検討を行っていくことが必要である。

(2) 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て、論文に報告されている遺伝子を標的として、ゲノム編集操作を行った場合の意図しない DNA 二本鎖切断部位 (オフターゲット) 解析手法を検討した。

ゲノム 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、7つのオフターゲット候補を得た。これらの候補部位 (オフターゲット) の多くは、Web 上で標的配列 (オンターゲット) と類似性がある配列を検索する *in silico* 検索では抽出できないことが分かった。次に、これら SITE-Seq 法を用いて得られた候補部位について、実際にイネを形質転換し、そのカルスからの DNA をアンプリコンシークエンスで解析した結果、1つのオフターゲットで実際に切断が確認された。以上の結果から、SITE-Seq 法と *in vivo* 検証を組合せたオフターゲット検証法は、*in silico* 解析だけではわからない意図しない変化も明らかにできることから、非常に有用な方法であることが示された。

さらに、ゲノム上の変化から、新たなアレルギータンパクの生成がないかを調査した。その結果、80-Mer Sliding Window FASTA Search および 8-mer FASTA Search のいずれでも既知アレルギー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ギー予測まで含めた一連の解析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。

この一連の解析作業を、web ベースで行うための解析環境（Galaxy ツール）も独自に開発した。

（3）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. 結論

ゲノム編集技術を用いた動物、植物の研究開発動向調査では、イネ、コムギのほかリンゴなどの果樹への応用も進んでいることが分かった。合成生物学分野では、欧米を中心に研究が進んでいるが商品化へ進んでいるものは少ない。

タンパクアレルギー分解性の検討は、実際の人の胃内の環境を考慮して（食事 pH は上昇する）異なる複数の反応条件で実施することが必要と考えられた。

ゲノム編集操作による意図しないゲノム上の変化を解析するための解析環境を開発した。本手法により、*in silico* 検索で明らかにできないオフターゲット候補も解析可能になると考えられた。

E. 研究発表・業績

各年度分担報告書を参照

F. 健康危険情報

各年度の分担報告書を参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

各年度の分担報告書を参照