

次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の現状と問題点

近藤一成* 中村公亮

Scientific Review on Novel Genome Editing Techniques

Kazunari KONDO and Kosuke NAKAMURA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

背景

次世代遺伝子組換え技術とは、欧州のJoint Research Center (JRC) が報告して以来 novel plant breeding techniques (NPBTまたはNBTと略される) と呼ばれている新規の植物育種方法である。痕跡が残らない遺伝子組換え法としてすでに新聞報道もされている。これらの技術の一部は植物だけでなく動物にも用いられていることから、NPBTという名称は正確ではない。そのため、本総説では次世代遺伝子組換え技術（以下、次世代組換え技術とする）。

従来の遺伝子組換え作物は、優れた形質を発現させるために外来遺伝子を異なる生物種から分離してベクターへ組み込み後、細胞へ遺伝子導入 (transfection) することにより作出されてきた。このとき、ゲノム上にランダムに挿入されたものの中から、望む形質のみを示すものを選抜する。こうして得られた作物は、遺伝子組換え体 (トランスジェニック) であり、その作物を用いた食品は安全性評価を経たのちにこれまで利用されてきた。

2010年頃になり、新しい組換え技術が急速に開発されてきた。そのため、欧州ではJRCが科学文献や特許情報、開発状況などをもとに「new plant breeding techniques」として現状を報告書にまとめた^{1),2)}。JRC報告書では、次世代組換え技術として合成ゲノム (synthetic genomics) を除くとシスジェネシス、オリゴヌクレオチド指向型変異導入、接ぎ木、逆育種、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、RNA依存性DNAメチル化、アグロインフィルトレーションの7つが挙げられている。その後、European Food Safety Authority (EFSA) はシスジェネシスとジンクフィンガーヌクレアーゼ-3についての意見書を公開している^{3),4)}。イギリス、オーストリア、オランダ、ドイツ、日本、オーストラリア・ニュージーランドなど各国でも議論が始まり、その一部はポジションレポートとしてまとめ

られている^{5)~11)}。2014年2月には、経済協力開発機構 (OECD) において次世代組換え技術に関する最初のワークショップが開催されたが¹²⁾、技術の整理が中心であり規制に関する議論はされなかった。今後継続して議論することとされたため、継続して進んだ議論が各国間で行われることを期待したい。海外では次世代組換え技術に関する議論が進んでいるが、日本国内ではこれまでほとんど議論されてこなかった。今後、国内でも議論を活発にしていくためには、技術の整理をして問題点を明らかにするとともに、各国の議論の現状について十分に把握しておく必要がある。

本総説では、進歩著しい次世代組換え技術とそれを用いた作物について、2014年10月までに公開された各国の報告書や最新の科学論文をもとに整理し、技術の紹介、技術面や安全性の観点からの考慮すべき点、各国の規制状況、開発状況、検知の可能性についてまとめ、今後の動向について考察した。

1. 遺伝子組換え体に対する各国の規制に関する枠組み

日本では、遺伝子組換え食品とは、食品衛生法に基づく食品、添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号、第1の食品、A食品一般の成分規格第2項)¹³⁾ により「食品が組換えDNA技術において得られた生物の全部又は一部である場合、又は当該生物の全部または一部を含む場合」であり、該当する場合は安全性審査を経て公表されたものでなければならないとしている。ここで、組換えDNA技術とは、「試験管内で制限酵素や連結酵素などを用いて、遺伝子であるDNA断片と、細胞内で複製されるDNA分子 (=ベクター、運搬体) を結合した組換えDNA分子を作製し、この組換えDNA分子を生細胞に入れ (遺伝子導入)、増殖させる技術」である (組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続 (平成12年厚生省告示第233号) の定義第2条)¹⁴⁾。現在、遺伝子組換え体 (GMO) の規制対象になるかどうかは、これを基本にして最終産物中に外来遺伝子が残存しているかいないかを確認して判断される。遺伝子組換え食品の安全性は、組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続 (平成

* 連絡先 kondo@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501東京都世田谷区上用賀1-18-1

12年厚生省告示第233号の安全性審査第3条)¹⁴⁾により厚生労働省からの依頼に応じて食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準に従って食品健康影響評価が行われる¹⁵⁾。つまり、遺伝子組換え体に該当するかどうかは、プロセスを重視しつつ最終的には外来遺伝子がないという点をもとに総合的に判断され、遺伝子組換え体に該当する場合の食品安全性はプロダクト(最終産物の毒性、アレルギー性の有無やバクテリア由来の配列や外来遺伝子が残存していないか、遺伝子導入に伴う内在性遺伝子の欠失の影響、代謝系への影響など)をもとに審査される。遺伝子組換え体の環境影響評価に関しては、研究開発段階のものは文部科学省が、商業目的の栽培は農林水産省や厚生労働省など生産・流通を所管する省庁が管轄している。

EUでは、環境放出指令 Directive 2001/18/EC (Article 2, Definitions) において、「遺伝子組換え生物は核酸である遺伝子を自然界では起きない方法、組換えDNA技術で改変したもの」と規定している。組換えDNA技術にあたらぬものとして、Annex 1Bにおいて変異誘発(いわゆる random mutagenesis)、遺伝子交換可能な生物の細胞融合(cell fusion)が挙げられている。EUなど欧州ではこれを基本にプロセスベース(組換えDNA技術を用いたかどうか)で遺伝子組換え体かどうかの判断がなされている。次世代組換え技術に関して、オランダはThe Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM、遺伝子組換えに関する委員会)が2006年から2009年に次世代組換え技術を用いた場合の環境影響や食品安全性に関する報告書をまとめた^{5),13),16)}。その後、EU加盟28か国のいくつかは、JRCの報告書をもとに独自に見解をまとめている。イギリス規制当局 Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA、環境食糧農林省)に対して Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE、環境排出に関する諮問委員会)は次世代組換え技術に対する規制のあり方について報告した^{8),17)~19)}。また、オーストラリア Bundesministerium für Gesundheit (連邦保健省)や Umweltbundesamt (連邦環境局)も詳細な報告書をまとめた^{6),9),20)}。ドイツ規制当局 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL、連邦消費者保護・食品安全局)に対して Central Committee on Biological Safety (ZKBS、生物学的安全性に関する中央委員会)は次世代組換え技術に関して報告書をまとめた⁷⁾。アメリカでは、遺伝子組換え生物を統一的に規制する機関はなく、Environmental Protection Agency (EPA、環境保護庁)、Food and Drug Administration (FDA、食品医薬品局)、US Department of Agriculture-Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS、農務省動植物検疫局)の3つの規制当局がその内容により関与する。ほとんどの遺伝子組換え作物は、遺伝子導入法として、アグロバクテリウム法(植物病害に該当)を用いている。そのため、植物病害法(Plant Pest Act)のもとで制定された

連邦規約(7 CFR 340)により、規制対象かどうか判断される。害虫抵抗性作物や遺伝子組換えサケなど作出される作物により、EPAやFDAに許可や意見を求めることになる。

カナダでは、完全なプロダクトベース(最終産物に外来遺伝子が残存しているかどうか)で判断される。従来育種法を含めて遺伝物質である核酸を改変したものは遺伝子組換え体と考えている。遺伝子組換えのほかに従来育種法であっても新たな形質を持つものは Novel Food (新規食品)として安全性審査の対象としている(Division 28 of Part B of the Food and Drugs Regulations)。規制当局として Canadian Food Inspection Agency (CFIA、食品検査庁)と Health Canada (HC、保健省)が関与する。次世代組換え技術に関しては、現行の規制の枠組みで対応可能と考えられる。

オーストラリア・ニュージーランドでは、遺伝子組換え体かどうかの判断は主にプロダクトベースで行われている。規制当局として、食品安全に関しては Food Standard Australia New Zealand (FSANZ、食品基準機関)で、Australia New Zealand Food Standard code (the code)に基づき、組換えDNA技術を用いて生産された食品はGMO規制の対象で承認が必要である。EUと同様の除外項目があるが、そこに次世代組換え技術が含まれるかどうかの判断が難しい。次世代遺伝子組換え技術に関してワークショップでの討論結果を報告書にまとめている¹⁰⁾。環境規制に関しては、オーストラリア Office of the Gene Technology Regulator (OGTR、遺伝子組換えに関する規制機関)やニュージーランド Environmental Protection Authority (NZ EPA、環境保護庁)が関与する。

中国や韓国での次世代遺伝子組換え技術の規制のあり方について、議論されているという情報は現在のところ入手できない。

2. 次世代組換え技術

ここでは、シスジェネシス・イントラジェネシス、オリゴヌクレオチド指向型変異導入、部位特異的変異導入、RNA指向性DNAメチル化、接ぎ木(遺伝子組換え型と野生型との接ぎ木)について解説し、逆育種、Seed Production Technology (SPT) およびアグロインフィルトレーションについては簡単に触れるにとどめる。

(1) シスジェネシス・イントラジェネシス (Cisgenesis/Intragenesis)

シスジェネシスとは、同種あるいは交雑親和性のある近縁種生物から品種改良に使用する特性をコードするイントロンおよび制御配列(プロモーター、ターミネーター)を含む遺伝子(シス遺伝子)を変化させることなくセンス方向に導入したものである^{1),3),7),9),17),21),22)}。このとき、シス遺伝子は複数コピー含んでもよいがアンチセンスや外来遺伝子を含んではならない。似た技術にイントラジェネシス

Cisgenesis

Intragenesis

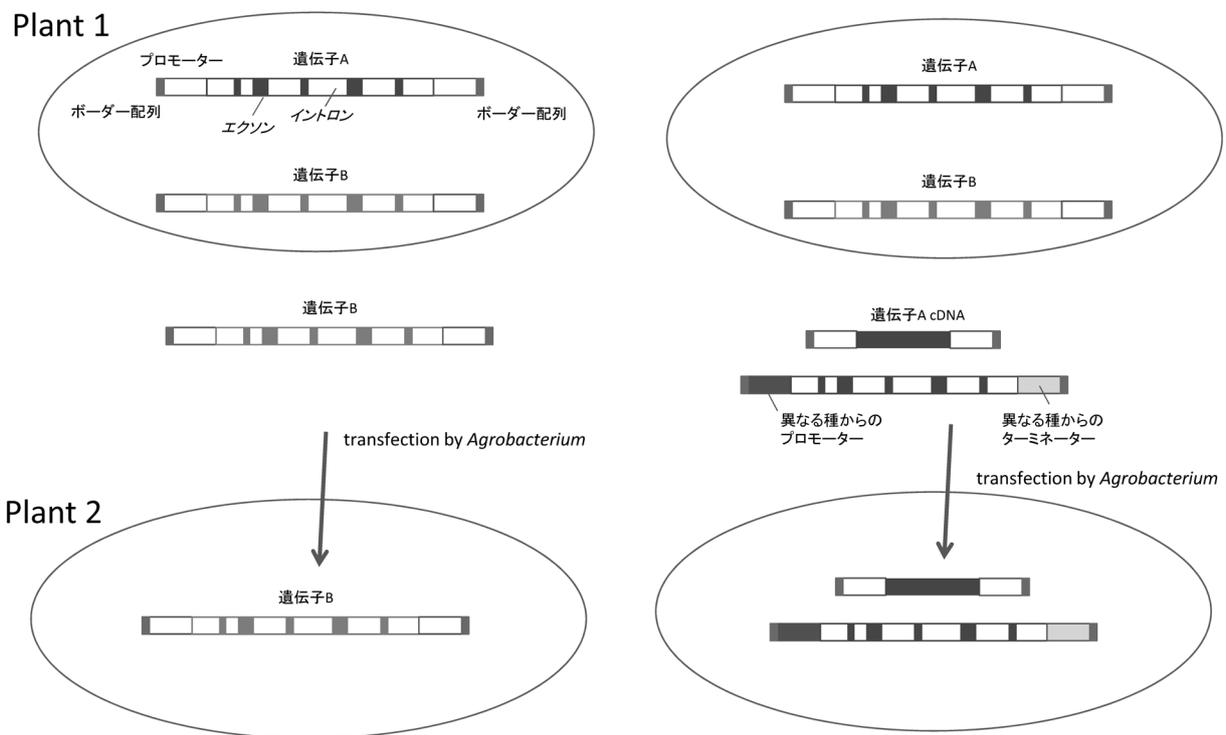


図1. シスジェネシス・イントラジェネシス

シスジェネシスでは交雑可能なPlant1から単離した遺伝子Bをアグロバクテリウム法でPlant 2へそのままセンス方向に導入する。イントラジェネシスでは、プロモーターを改変したり、再構成して導入できる。

がある。これは、遺伝子とその制御配列が元のままでなくてもよい(図1)。例えば、本来のプロモーターに代わり植物での強力な改変プロモーターや、RNAサイレンシングを誘導するコンストラクトを導入してもよいが、このイントラジェネシスは一般には遺伝子組換え体として扱われる。EFSAは、シスジェネシスは従来育種と同等のリスク程度であるが、イントラジェネシスは従来の遺伝子組換え体と同程度のリスクがあるとしている³⁾。シスジェニック作物を作成する最大の利点は、開発期間の短縮である。通常の交配では有用な形質遺伝子とともに、望まない形質遺伝子が連鎖ひきずり(linkage drag)により持ち込まれることがある。そのため戻し交配を数代行う必要があるが、シスジェネシスを用いることで、望みの形質のみを短期間に獲得できる。また、後述する部位特異的変異導入法(ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)と合わせて用いることで、シス遺伝子をゲノムの望む位置に高効率で挿入可能になる。Schoutenらは、このシスジェネシスをEUのGMO規制から除外すべきと主張している²³⁾、一方で懸念も表明されている²⁴⁾。イントラジェニック作物は、同種または交雑親和性のある近縁生物種からの遺伝子を再構成して用いた生物という点で遺伝子組換え体に分類されている。シスジェネシスとイントラジェネシスは、厳密に言えば新たな技術と

いうより、新たな概念である。

考慮すべき点

1. シスジェネシスの確固たる定義が定まっていない: 交雑可能な生物種がどこまでか、0.1%でも交配種ができれば交配可能と言えるか。交雑親和性が都合のいいように解釈されないか。
2. 遺伝子導入される側(recipient)に存在しないタンパク質が発現、または、追加発現されて場合のヒトへの安全性はどうか。多重導入(multiple insertion)による表現系の変化も起こりうる。
3. アグロバクテリウム(Agrobacterium)法に用いる25 bp程度のT-DNA Left border(LB)およびRight border(RB)やベクター由来配列(vector backbone)の有無の確認が必要であるが、ボーダー配列はそれ自身が非コード配列(non-coding)であり、自然界で植物中にも存在しうるため、制限酵素部位などベクター由来配列(vector backbone)の除去が重要である。また、新たな読み枠(open reading frame; ORF)によりタンパク質が発現しないことの確認が重要である。
4. 薬剤耐性遺伝子(*nptII*など)を開発段階で用いた場合、その除去が完全に行われている必要がある。

5. アグロバクテリウム法で遺伝子導入したときの、挿入部位近傍での内在性遺伝子の欠失などの変化を確認する必要がある。
6. 代謝物など主要な成分が有意に変化していないか、有害成分が新たに生成していないかの確認が必要。

規制について

組換えDNA技術が使われているために、現行の遺伝子組換えの枠組で考えれば、日本やEUにおいては食品衛生法に基づく食品、添加物の規格基準やDirective 2001/18/EC Article 2によりGMO規制対象と考えられる。アメリカでは、USDAによりアクリルアミド低減ジャガイモや黒変低減ジャガイモのイントラジェニック作物が、植物病害であるアグロバクテリウムを用いているもののボーダー配列以外は除かれており規制対象外とする方向で植物病害に対するリスク評価(Plant Pest Risk Assessment)およびドラフト環境影響評価(EA)についてパブリックコメント募集の段階で、最終的に規制対象外として判断される可能性がある。2013年USDAは、開発会社に対してEPA, FDAにも意見や評価を求めることを奨めている。これに対して、Center for Food Safety (CFR)は、2014年6月30日に反対意見を提出した。シスジェニック作物は、プロダクトベース(最終産物には外来遺伝子を含まない、自然界でも起こりうる現象である)という立場で、特に前者で、見れば遺伝子組換えではない。しかし、アスパラギン合成に関わる遺伝子断片の逆位反復配列(inverted repeat)を含んでいることから自然界では起こるとは言えず、また、カナダのプロダクトベース(新規形質の有無)の考え方は審査承認が必要である。オーストラリア・ニュージーランドでは、シスジェネシスもイントラジェネシスも遺伝子組換え体と考えている。イギリスも同様である。EUで開発中のシスジェニックアップル(品種名Gala)は、USDAではアグロバクテリウム法を用いているため規制対象となるだろうと2012年に通知している。

研究開発状況

シスジェニック作物は、オランダ、アメリカなど欧米で開発が進められている²⁵⁾。オランダでは、シスジェニック作物として*Rvi6*(以前は*HerVf2*)を遺伝子導入した病原菌耐性(scab resistant)リンゴ(Gala)が開発されている^{25),26)}。また、アメリカではイントラジェネシス作物としてアクリルアミド低減や黒斑生成抑制ジャガイモが開発されている。

検知の可能性について

事前情報がある場合は、目的導入遺伝子のゲノム挿入位置周辺の塩基配列の野生型との比較により違いは検出可能であるが、その違いが自然界で起きた結果なのか人為的に改変した結果かの判断は難しい。遺伝子組換えの過程で用いたベクターの配列が残存していなければ、遺伝子発現コ

ンストラクト内にアグロバクテリウム由来のボーダー配列が両側に存在することが確認されれば、遺伝子改変を行ったものと推測は可能であろう。

現在の遺伝子組換え作物においても、プロモーターやターミネーターに植物内在性遺伝子(トウモロコシ由来ユビキチンプロモーターやジャガイモ由来プロテインインヒビターのターミネーターなど)を用いる傾向にあり、従来のカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sなどによるスクリーニングでは検知が難しくなっている。導入遺伝子およびその制御配列が近縁種からの内在性のみである場合は、遺伝子組換え体との判定は難しいと考えられる。

(2) オリゴヌクレオチド指向変異導入(Oligo-Directed Mutagenesis; ODM)

オリゴヌクレオチド指向突然変異導入は、oligonucleotide-directedまたはmediated mutagenesisとも呼ばれ、1塩基または数塩基の置換または欠失させた標的特異的なオリゴヌクレオチドとして数十塩基(20~100 bp程度)の一本鎖、二本鎖DNAまたはDNA/RNAキメラ^{27)~29)}を細胞に導入することで、ゲノム上の標的配列と相補結合し、ゲノムDNAとのミスマッチ部分が細胞の修復機構により導入される(図2)。その結果、望みの塩基置換や欠失が誘導されると考えられている^{1),30),31)}。つまり、細胞内でのミスマッチ修復機構を利用して望みの位置に小さな置換や欠失を導入できる手法である。この方法の利点は、ベクターを用いていないため組換えDNA技術に当たらないこと、改変後には数塩基置換または欠失以外にはゲノム上の配列は改変前と同じであることである。欠点は、改変される効率が低い点や目的点突然変異導入箇所の前後も変異が入ることがあるため³²⁾、その後の選抜をいかに効率的に行うかである。

考慮すべき点

1. 非特異的な変異導入が起きる可能性がある。
2. オリゴヌクレオチドがゲノムに挿入される可能性があるため、目的の変異(置換や欠失)以外の改変が起きていないかの確認が必要である。
3. エクソン中の1または2塩基欠失(挿入)により機能遺伝子をノックアウトした場合は、それ以降フレームシフトにより異なる融合タンパク質が発現する可能性があるため、このタンパク質の安全性を確認する必要がある。
4. DNA/RNAキメラなど用いるオリゴヌクレオチドの安定性を増せば、効率は上がるが非特異的な影響が比例して大きくなる。点突然変異を導入する場合、その近傍も変異導入されることがあるためシーケンスの確認が不可欠である。
5. RNAを含む分子を用いた場合、生物が本来持つRNAサイレンシングの機構に影響する可能性や最終産物にどう影響するかを考える必要がある。

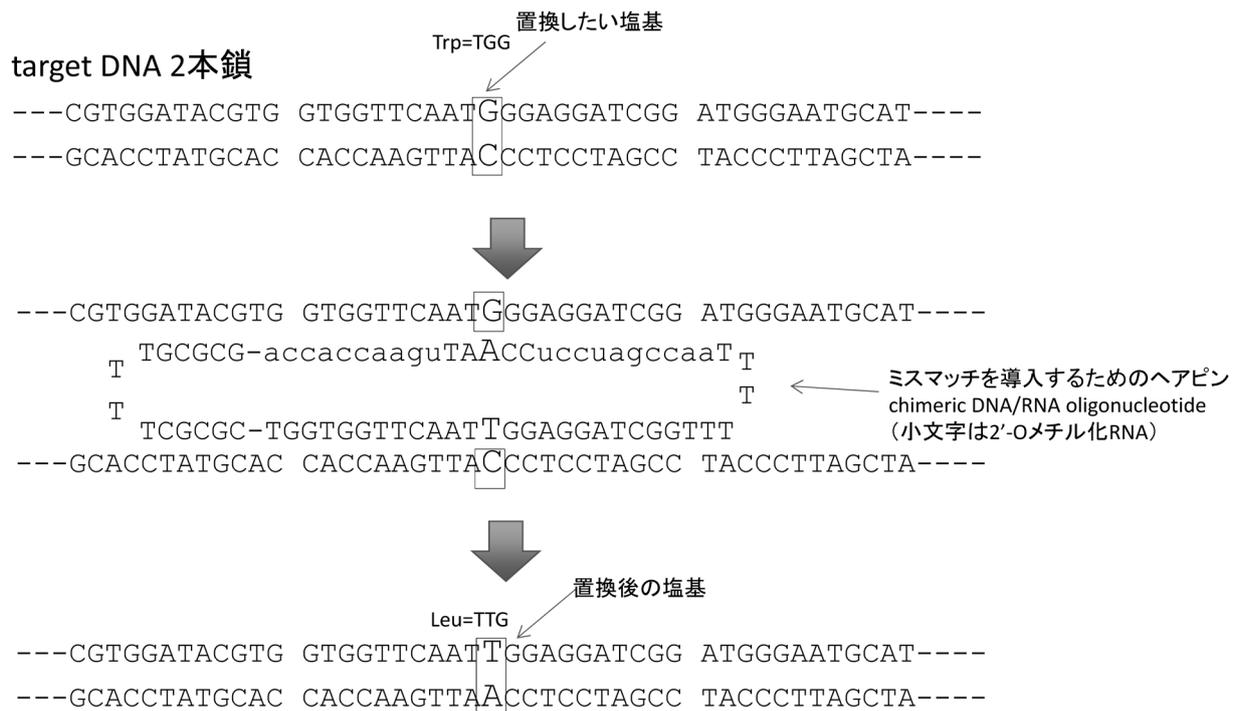


図2. オリゴヌクレオチド指向変異導入の例

キメラDNA/RNAオリゴを用いて1塩基置換を行い、TrpからLeuへアミノ酸置換。

規制について

短鎖オリゴヌクレオチドをパーティクルガンで直接遺伝子導入するODMでは、ベクターを用いていないために、日本国内では組換えDNA技術には該当しないと考えられ、EU内では生物への遺伝可能な物質の導入に該当するため、遺伝子組換え体に該当するものと解釈される可能性があるが (Directive 2001/18/EC Annex IA part1の(2))、英国Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE)は、2011年GMO規制対象外と結論している⁸⁾。オランダとベルギーも同様の結論を示している⁵⁾。ドイツのThe Central Committee on Biological Safety (ZKBS)も遺伝子組換え体に該当しないと報告している⁷⁾。アメリカでは、USDAが植物保護法により7 CFR part340に照らして2004年すでに規制対象外と報告している。オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)は、組換えDNA技術には当たらず、安全上懸念されるところもないと判断している¹⁰⁾。カナダでは、新規形質獲得の有無で判断されるために評価、承認が必要と考えられる。

研究開発状況

ODMを用いた作物で実用化に近い例として、除草剤耐性ナタネの開発が進められている。アメリカでは、すでにGMO規制対象外と判断されている。カナダでは、新規形質を持ったものは承認が必要であったが、2014年3月Canadian Food Inspection Agency (CFIA) and Health Canada (HC)により承認されたことから、今後試験栽培が開始され、2016年には販売開始されると考えられる。

それ以外の作物についても研究が行われている¹⁾。

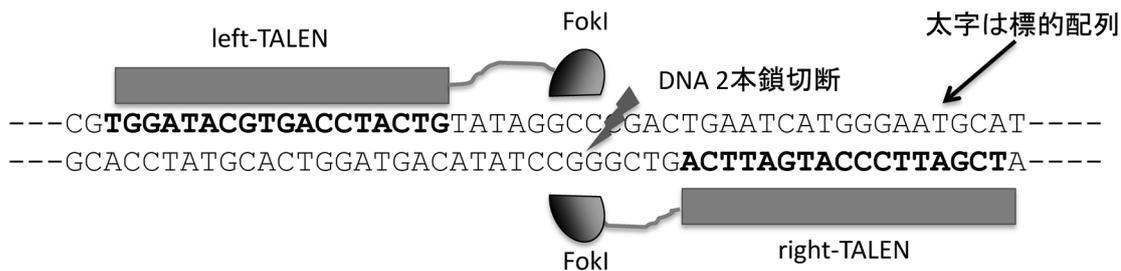
検知の可能性について

事前情報がある場合は、ゲノム上の目的位置での塩基置換 (または欠失) の存在から野生型との比較によって両者の違いは検出可能であるが、その違いが1または数塩基の置換である場合は自然界で起きた結果なのか人為的に改変した結果かの判断は難しい。また、アグロバクテリウムも用いないことから、これに由来する配列を検知することはできない。

(3) 部位特異的変異導入 (Site-Directed Nucleases; SDN)

部位特異的変異導入に使われる技術には、Zinc-Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN), Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/Cas9 (図3A) などがある^{33)~35)}。いずれの技術も、生物ゲノム上の望みの位置にDNA2本鎖切断を誘導して、欠失、置換または挿入を行うことができる。SDNには、ドナーを用いず非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) による小さな欠失または置換を誘導するもの (SDN-1), ドナーを用いて望みの位置に小さな欠失・置換を誘導するもの (SDN-2), ホモロジーアーム (片側500~700 bp程度) を含むドナーベクターを用いて、相同組換え (homologous recombination; HR) の機構により望みの位置に目的遺伝子を挿入するもの (SDN-3) がある。

(A) TALEN



左右2組のTALENの間にFokIが2量体を形成しDNA2本鎖切断を行う

(B) CRISPR/Cas9



ガイドRNAが標的配列を認識し、Cas9タンパク質がDNAを切断する

図3A. TALEN, CRISPR/Cas9システムによるDNA認識と二本鎖切断

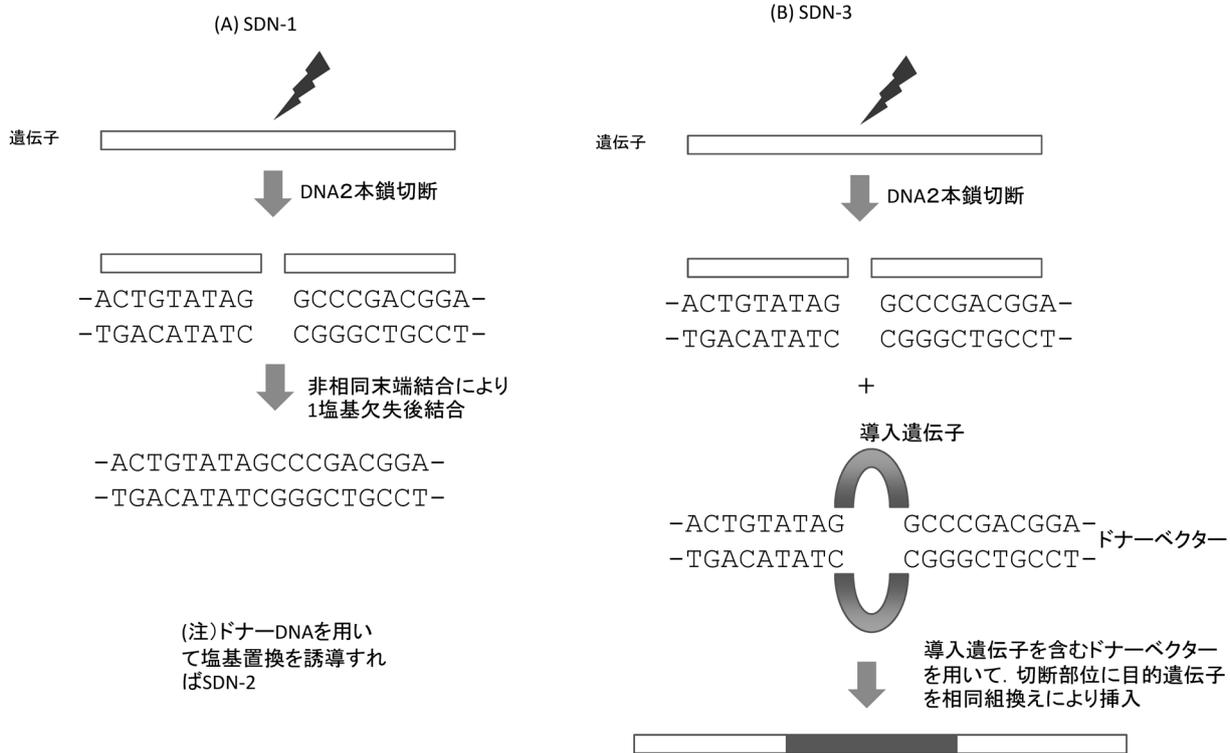


図3B. 部位特異的変異導入法による遺伝子改変.

ZFNとTALENは、特定のDNA塩基配列を認識するタンパク質に非特異的制限酵素FokI融合させたものである。FokIが2量体を形成してDNAを切断する。TALENシステムでは、左右それぞれ18塩基ずつ合計36塩基を認識するため、特異性は非常に高いと考えられている。一方、CRISPR/Cas9は、Cas9タンパク質とともにガイドRNAが20塩基のDNAを認識する。いずれの技術も、ゲノム上の特定の標的部位に対してDNA二本鎖切断を誘導する。DNA切断後は、生物の持つ修復機構により非相同末端結合（NHEJ）または、相同組換え（HR）のいずれかの機構により修復される。このときに、NHEJによる修復では数〜数十塩基の欠失や数塩基の置換や挿入が起きる。あるいは、望みの組換えや挿入を目的としたドナーベクターを共存することで、目的遺伝子挿入を行うことができる。ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9の順に登場した、望みの位置でDNA切断を行う新しい技術であるが、設計の難しさもこの順である。2013年に発表されたゲノム改変ツールとしてのCRISPR/Cas9は、設計の容易さから急速に普及しており、多くの生物種に応用されている。CRISPR/Cas9システムは、遺伝子治療目的にも用いられようとしており最も期待されている技術である。これまで、DNA修復機能が低下しているがん化培養細胞を用いた検討から非標的部位での切断（オフターゲット切断）が起きやすいと報告されてきたが^{36),37)}、植物細胞ではオフターゲット切断はあまり報告されていないことや、iPS細胞での全ゲノムシーケンスの結果から、正常細胞では特異性の高い標的部位を選定すればほとんどオフターゲット切断は避けることができると報告されている^{38),39)}。設計の容易さ、DNAメチル化に影響しないこと、特異性の高いさまざまな手法が用意されていること、RNAも標的にできることなどから、今後はCRISPR/Cas9が中心となると考えられる。本技術の最大の利点は、2倍体生物でもホモ個体を比較的容易に得ることが可能であることである。最近、異質6倍体であるパンコムギ (*Triticum aestivum*) の6倍体ゲノム同時破壊が報告された⁴⁰⁾。発現コンストラクトのゲノムへの挿入に関して、魚など動物ではmRNAを用いることでゲノムへの挿入を避けられるが、植物の場合は、従来同様にアグロバクテリウム法を用いるか、ゲノムへ挿入されない植物ウイルスを用いる。前者の場合は、改変後に後代交配で除く必要があると考えられる。

考慮すべき点

1. 非特異的DNA二本鎖切断の可能性があるため、配列選択に十分な検討が必要である。
2. TALENやCRISPR/Cas9発現プラスミドを用いるため、最終産物にその配列（または一部）が残っていないかの確認が必要である。
3. ODM同様に、エキソン上で1または2塩基欠失（挿入）によりノックアウトした場合は、それ以降フレームシフトにより異なる融合タンパク質が発現する可能性がある

あるため、タンパク質の安全性の確認が必要である。

4. RNAを含むCRISPR/Cas9を用いた場合、生物が本来持つRNAサイレンシングの機構に影響する可能性が考えられる。RNAはDNAと違ってゲノムに挿入されず分解されるが、その過程でエピジェネティックな変化を誘導しないか。

規制について

ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9いずれも、これらの発現コンストラクトがゲノム中に挿入された場合は遺伝子組換え体となる。したがって、一過的に発現させるか完全に除かれた場合の判断をどうするかがここでの問題となる。アメリカでは、ZFNを用いたフィチン酸低減トウモロコシについて、USDAが植物保護法により7 CFR part340に照らして2004年すでに規制対象外と通知している。7 CFR part340では、植物病害虫あるいは遺伝子導入法としてアグロバクテリウムを用いた場合は規制対象となるが、ゲノム中に残存しないことが示されている場合は規制対象から外されることもある。USDAは2012年本件について、開発会社に対してさらにEPAやFDAなど他の規制機関に相談することと連絡している。原則、ケースバイケースで判断するものと考えられる。EUでは、現行の規制枠組みであるDirective 2001/18/ECに従って考えると、GMO規制の対象となりうると考えられるが、次世代組換え技術に関しては外来遺伝子の残存がなければ一部の技術はGMO規制から除外される可能性が高い。EFSAは外来遺伝子を相同組換えで挿入する場合（ZFN-3）については、従来の遺伝子組換え体と同様のリスクがあると判断している⁴¹⁾。オーストラリア・ニュージーランドでは、SDN-1, -2については通常の変異導入法以上の安全上のリスクはないと判断している。SDN-3については、これまでの遺伝子組換え体と同じである。ZFNは、近年TALEN, CRISPR/Cas9でも可能になってきたが、タンパク質を直接導入する方法もある。この方法では、組換えDNA技術に当たらず、GMO規制外の化学物質や放射線による突然変異導入（random mutagenesis）と同じであるが、SDN-3でドナーベクターと一緒に用いる場合は、遺伝子組換え体（トランスジェニック）でありGMO規制対象と考えられる。2013年ニュージーランドのEPAはZFN-1, TALENをGMO規制対象外としたところ、環境団体から提訴され、結果としてGMO規制から除外できないと判断されている。

研究開発状況

ZFNはTALENやCRISPR/Cas9よりも先に開発された技術であることから、ZFNを用いた除草剤耐性トウモロコシが開発されている⁴¹⁾。これについて、アメリカUSDAはすでに規制対象外としている。TALEN, CRISPR/Cas9については、規制上の判断がされたものはないが、2013年以降になり主要な植物であるコメ、コムギ、トマトなどに適応可能と報告されたほかに^{40)~47)}、動物では、アトラ

ンティックサーモンにも適応可能と報告されている⁴⁸⁾。多様な動植物にこれらの技術が適用されつつあるが、商業化までにはもう少し時間がかかると思われる。

検知の可能性について

SDNを用いて、小さな欠失や数塩基の置換または挿入により標的遺伝子をノックアウトしたり、新たな形質を獲得させた場合は、ODM同様に野生型との比較は可能であるが自然界で起きたものか意図的に組換えたものかを判別することは困難である。ただし、SDNを発現するための遺伝子発現コンストラクトがゲノムに挿入されたままで除去されていない場合は、検出可能であるが遺伝子組換え体である。SDNを用いて、外来遺伝子を挿入した場合は、その作物とは異なる生物種の遺伝子やプロモーターまたはターミネーターなどの制御配列が存在する場合は遺伝子組換え体との同定は可能である。しかし、導入する遺伝子が交差可能な他の品種から分離した遺伝子で、かつ制御配列も導入される植物種内存在性である場合は、例えば、SDNでゲノムの目的位置でDNA二本鎖切断を誘導してシス遺伝子を挿入した場合、事前情報があれば野生型との比較は可能であるが、意図的な組み換えどうかの判別は難しいと考えられる。ただし、遺伝子発現コンストラクト内にアグロバクテリウム由来のボーダー配列が両側に存在することが確認されれば、遺伝子改変を行ったものと推測は可能であろう。アグロバクテリウム法に用いるベクター由来の配列や異なる生物種の外來遺伝子の挿入があった場合は、従来の遺伝子組換え体であり、検知をすることは容易である。

(4) 遺伝子組換え台木または穂木との接ぎ木（トランスグラフティング, *transgrafting*)

接ぎ木とは、台木と穂木のように2つ以上の植物体を接合させ新たな個体を作り出す繁殖技術である。一般に、リンゴやナシなど多くの果樹は自家不和合性のため自らの花粉で受粉できないことから、種子により同一遺伝子個体を

得ることはできない。そのため、優良品種から同一遺伝子を持つ個体を繁殖させる方法として、接ぎ木は古くから用いられてきた。接ぎ木をすることで短期間に繁殖させることができ⁴⁹⁾、リンゴ⁵⁰⁾、サクランボ⁵¹⁾、ブドウ⁵²⁾のような果樹のほかに、トマト、キュウリ、ナス、スイカなど⁵³⁾多くの作物に利用されている。同種もしくは近縁種を接ぎ木することが一般的であるが、遺伝的に異なる種の組み合わせも可能である。例えば、地下にジャガイモ、地上にトマトがなる植物も存在する。

接ぎ木を利用した新しい品種改良技術（以下、トランスグラフティングと略す）では、作物の根部にあたる台木に遺伝子組換え体を、穂木に野生型品種を使用して台木の性質を穂木に与える栽培が盛んに行われている⁴⁹⁾（図4）。例えば、ウイルスおよびカビの感染耐性^{54),55)}、塩害などの環境耐性^{56),57)}、除草剤耐性⁵⁸⁾を有する遺伝子組換え台木の使用が報告されている。接ぎ木の接合部位（活着点）では、遺伝子組換え体の台木からは、タンパク質、その他の代謝物あるいは産生される低分子RNA（mRNA, miRNA, siRNA）が穂木へ移行して、転写後遺伝子サイレンシングを誘導する^{49),59)}。最近、活着点での組織の修復に伴い、新しい原形質連絡の形成さらには台木と穂木由来の細胞の無性生殖による異質倍数体性細胞が出現し、活着点周辺へのオルガネラおよび染色体由来のDNAの移行が報告されている^{49),60),61)}。

考慮すべき点

1. 活着点から離れた部位、果実などへのDNAの移行は報告されていないが、遺伝子組換え台木由来のタンパク質や代謝物、あるいは、遺伝子組換え台木に組み込まれたRNAサイレンシングのコンストラクト由来の低分子RNAの移行が報告されており、その残存やタンパク質の安全性の確認、および代謝物の変化を確認することが必要である。これまでに、細菌由来の害虫抵抗性や除草剤耐性遺伝子産物のCryAcやCP4EPS

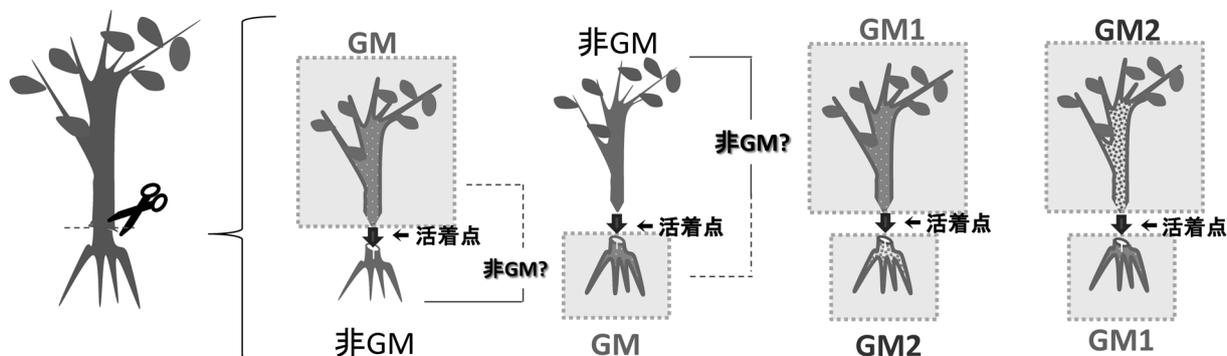


図4. 遺伝子組換え台木または穂木への接ぎ木（トランスグラフティング）技術

RNA分子（mRNA, miRNA, siRNA）、タンパク質、その他の代謝物の活着点を越えた移行は報告されている。作物体の組織の一部から再生し繁殖させることも可能である。活着点からは、異質倍数体性の新しい種の細胞が出現する。非遺伝子組換え（GM）作物部位（根、茎、葉、花、花粉、果物、種子など）は、GM作物であるかが議論の焦点である。異なる遺伝子組換え体（GH₁, GH₂）の組合せも可能である。

が穂木に移行することが報告されている。これらの遺伝子産物は検出されてはいけない（ゼロトレランス）とするのか、可食部の全タンパク質量に占める割合が微量で小さければGMO規制から除外するのかの判断が必要となる。

2. RNAサイレンシングが、後述するRdDMの機構でDNAメチル化を誘導した場合に、その形質が後代へ伝達されることがある。このような、ゲノム上の塩基配列はそのままであるが、形質が変化した穂木をどのように扱うのか。
3. 遺伝子組換え台木由来のメッセンジャーRNA (mRNA)の穂木への移行については十分な知見がない^{49),62)}。
4. 導入遺伝子による台木、特にRNAサイレンシングを誘導する台木の土壌など環境影響は、従来の遺伝子組換え体同様に考慮する必要がある。
5. 遺伝子組換え台木に、新芽ができて果実ができた場合は、活着点より下にできたものは遺伝子組換え体として扱うかどうか。または、活着点近傍のものはどう判断するのか。

規制について

遺伝子組換え台木に穂木を接ぎ木したものは、1つの植物体と考えられることからEU Commission's Working Group (NTWG) 報告書ではGMO規制の対象と結論づけている⁶³⁾。この点については、イギリス¹⁷⁾、オーストラリアとニュージーランド¹⁰⁾など他の国も同様である。食品としての安全性審査に関しては、オランダは、欧州の新開発食品規制 (Novel Food Regulation, (EC) 258/97) に基づいて判断されるとしている¹³⁾。オーストリアは、サイレンシングに用いるdsRNAなど低分子RNAの安全性については不確定の部分があり、穂木になった部分全体については毒性評価が必要ではないかと指摘している⁹⁾。ドイツでは、EUのDirective 2001/18/ECを参考にした遺伝子組換えに関する法令German Genetic Engineering Act (GenTG)を元に判断するが、穂木になった実や種子は遺伝子組換え体でないと考えている⁷⁾。オーストラリアとニュージーランドは、導入した遺伝子産物の穂木中への残存がなく、かつ野生型と比較して新たな性質を発現していない場合は、簡易的な安全性審査を求めることが望ましいとしている¹⁰⁾。アメリカでは、遺伝子組換え体を統一的に規制する機関はないため、トランスグラフィティングの申請があった場合は、植物保護法などに基づきプロダクトベースの規制をケースバイケースで判断される⁶⁴⁾。

遺伝子組換え台木を使用し、野生型穂木から得られた種子は、GMO規制対象外と考える意見もある²⁾が、各国とも規制についての最終的な結論には至っていない。トランスグラフィティングした作物の安全性評価については、環境への影響を考慮し植物体そのものを、また穂木の可食部(例えば、果実)についてはRNA分子(mRNA, miRNA, siRNA)、タンパク質、その他の代謝物の移行に伴う新た

なりリスクについて評価する必要がある。

研究開発状況

想定される用途としては、主に果樹や野菜が挙げられる。現在、トランスグラフィティングを利用して開発された作物の商業栽培は行われていない²⁰⁾。しかし、技術の特許申請または栽培実験に関しては、すでに多くの作物で報告がなされている(例: ブドウ, ジャガイモ, リンゴ, スイカ, オレンジ, キュウリ, トマト, プラム, エンドウ豆, タバコ)⁶⁵⁾。日本国内でも、リンゴやトマト, ジャガイモなどで研究開発がされており、接ぎ木による転写型および転写後遺伝子サイレンシング誘導の研究が行われている^{65)~67)}。

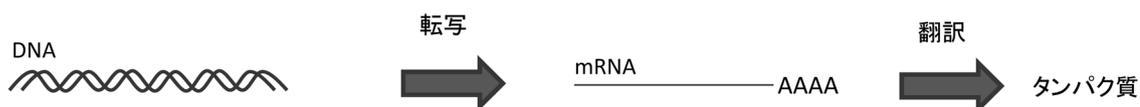
検知の可能性

DNAの活着点を超えて離れた部位までの移行については報告されていない。したがって、活着点から離れた部位にできる果実における遺伝子改変の痕跡を、DNAの配列を基に判断することは不可能と考えられる。一方で、RNAは師管を介して台木から穂木へ移行可能である。外来遺伝子mRNAが移行して検出可能であれば、RT-PCRなどの検出により遺伝子組換え体由来であるとの判断は可能である。低分子RNA (mRNA, miRNA, siRNA)、タンパク質、その他の代謝物の非遺伝子組換え穂木への移行は報告されていることから^{46),56)}、これら分子を検出することは可能である。

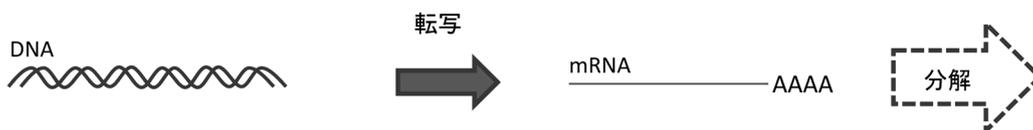
(5) RNA依存性DNAメチル化 (RNA-Dependent DNA Methylation; RdDM)

RNA依存性DNAメチル化 (RdDM) は、低分子RNAを介して遺伝子プロモーター領域など特定のゲノムDNAの塩基配列を標的にDNAシトシン塩基のメチル化を誘導し、その結果、遺伝子発現を制御する技術である^{68),69)}。この機構は、転写型遺伝子サイレンシング (Transcription Gene Silencing; TGS) (図5A) と呼ばれ、ゲノムDNAの変異である欠失や置換、挿入、配列の再編成などゲノムDNAの配列を改変しないエピジェネティックな変化を利用する。遺伝子プロモーター領域のDNAのメチル化の機構は、メチル化DNA結合タンパク質を介して転写因子の結合を阻害し、また標的配列のヒストン脱アセチル化やヒストンH3リジン残基 (H3K9) のメチル化を誘導することで染色体をヘテロクロマチン化させ、RNAポリメラーゼのアクセス性や転写因子群の複合体形成抑制する^{70)~72)}。シロイヌナズナを例に植物においては、約24 ntに分解された低分子RNA (siRNA) は、ガイドRNAとしてゲノムDNAの相補的な配列を標的にDNAメチル化修飾の変化を誘導する。一過的にdsRNAを発現させる方法、あるいは、組換え遺伝子を染色体に組み込みdsRNAを持続的に発現させる方法も同様の働きをする(図5B)。RdDMは植物のみならず、真菌類、哺乳類にも保存されている現象であることがわかってきた⁷³⁾。しかし、RdDMのメカニズムの詳細についてはいまだ解明されていない⁷⁴⁾。また、技術の

遺伝子の発現



転写後遺伝子サイレンシング



転写型遺伝子サイレンシング RdDM



図5A. 転写発現制御

転写後遺伝子サイレンシング (Post-Transcription Gene Silencing [PTGS]) と転写型遺伝子サイレンシング (Transcription Gene Silencing [TGS])

RdDMは、TGSに属する。

機能、特異性、用途については発展途上である。siRNAは、原形質連絡や維管束系組織を通して植物全体に移行する。そのため、特定の組織をDNAメチル化修飾の標的とすることはできない。標的配列のDNAメチル化の度合いは、生物種や標的配列の位置によって変化する⁷⁵⁾。また、低温培養下ではRdDMによる遺伝子サイレンシングが働きにくくなることが報告されている⁷⁶⁾。そのため、現法においては遺伝子の発現を安定的に制御し続けることを目的とした技術ではない。

考慮すべき点

1. 遺伝子プロモーターを標的にした逆位反復配列 (inverted repeat) をゲノムに挿入した場合は、従来の遺伝子組換え体と考えられる。一過的にあるいはゲノムに挿入されない植物RNAウイルスを用いてプロモーター領域のDNAメチル化を誘導した場合の扱いを考慮する必要がある。この場合は、ベクター由来配列やウイルスが完全に除去されているかの確認が重要である。
2. 標的とする配列以外にDNAのメチル化が誘導されることが報告されていることから⁷⁷⁾、標的配列以外へのオフターゲット効果を考慮する必要がある。ただし、DNAメチル化は自然界でも起こり、その位置や程度

も常に変化していることから、RdDMを用いたDNAメチル化が特異な場合のみ問題となるかもしれない。

3. RdDMにより誘導されたDNAメチル化修飾は、数世代を経て退化していく⁷⁸⁾。したがって、ゲノム中DNAメチル化修飾のパターンの安定性について考慮する必要がある。
4. エピジェネティックな修飾の変化は、ゲノムの高次構造に影響を与えることから、1次構造配列の変化のみならず多角的な評価を行い、他の遺伝子発現に与える影響も考える必要がある。
5. 低分子RNAが関与する他の技術にも共通の点であるが、作物由来の低分子RNA (miRNA, siRNAなど) を摂取した場合のヒトなど生物に与える影響については明確な研究結果はない。ヒト血中には、細菌や真菌由来のRNA断片が多く検出されることが報告されている。また、マイクロRNA (miRNA) は、消化管から吸収された後、血流中で検出され、肝臓の遺伝子の発現に影響を与えることが報告されている⁷⁹⁾。作物中にはmiRNAが存在し、また食品中には分解されたDNA, RNAが多く存在することから一般的には安全性を懸念することは少ないが、安定性向上のために修飾保護されたRNAが用いられることや、低分子RNAの有効作用量が低いこと (nMレベル)、その検出方法

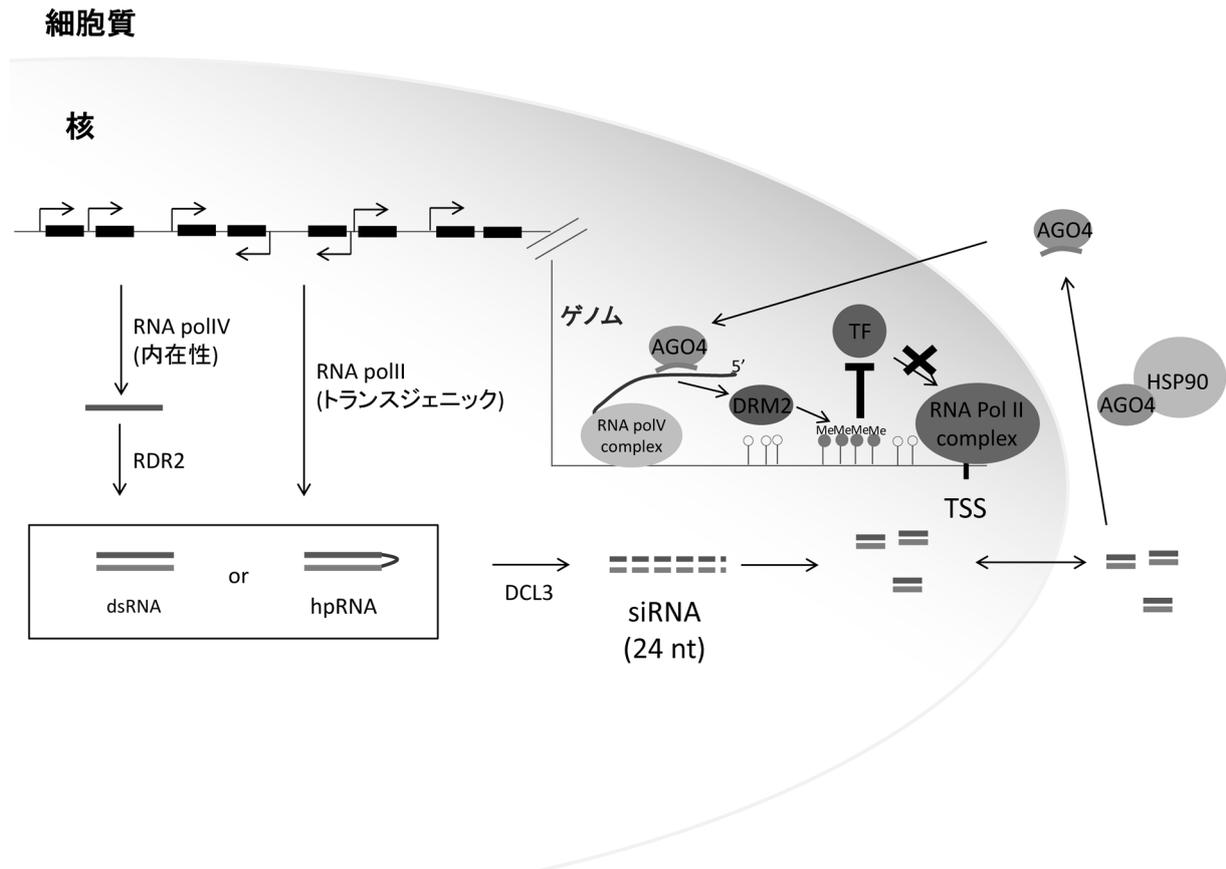


図5B. RdDMによるDNAメチル化誘導のメカニズム（シロイヌナズナを例に）

dsRNAは、RNA polymerase IV (RNA polIV) によって合成された一本鎖RNAを鋳型にRNA dependent RNA polymerase 2 (RDR2) を介して産生される。標的配列を含むdsRNAは、トランスジーンよりhairpinRNA (hpRNA) を産生させることも可能である。産生されたdsRNAは、dicer-like 3複合体 (DCL3) によって、約24 ntの短いsiRNAに分解される⁸³⁾。siRNAは、核内から細胞質へ移行し、heat shock protein 90 (HSP90) を介してArgonaute4 (AGO4) と結合する。AGO4と結合したsiRNAは核内へと移行し、RNA polVの転写産物の相補的な配列に結合する^{84),85)}。その際、*de novo*メチルトランスフェラーゼ (DRM2) を含むRdDM複合体を形成し、AGO4-siRNAの導くゲノムDNAの標的配列のシトシン (対称的: CpG/CpHpG, 非対称的: CpHpH, H=A,T,G) をメチル化させる。

転写因子 (TF), 転写開始点 (TSS), メチル化シトシン (Me)

が確立されていないこと (検出下限以下の可能性), 作用した場合も遺伝子発現抑制であれば重篤な変化として症状として現れないことから, 問題点を見逃す可能性も否定できない。したがって, RdDMに用いる低分子RNAの配列について, ヒトなどに対してデータベース (small RNA database など) で標的とならないかなど, 低分子RNAを用いた作物についてのリスクを考慮する必要がある。

規制について

現在のところ, 各国ともにRdDM技術を用いて作製された作物の明確な規制は決まっていない。欧州では, 組換えDNA配列の染色体DNAへの導入を伴わないRdDMは, 自然界に起こりうる現象であることから, 環境放出指令 Directive 2001/18/EC (Article 2, Definitions) に該当する遺伝子組換え体ではないという立場である。イギリスも独自に同様の判断を行っている¹⁷⁾。組換えDNAの導入を伴

わないRdDMにより誘導されたエピジェネティックな変化の安定性, 継承方法や技術の応用方法についてはまだ明確ではないため, オランダからは規制について慎重な意見もある¹⁶⁾。EU CommissionのNTWGは, DNAメチル化は遺伝子の改変には該当しないと結論づけている。一方, RdDMを安定的に誘導するために組換えDNAを染色体へ導入したものは, 各国ともに遺伝子組換え体であることを支持している²⁾。

研究開発状況

RdDMを使用した作物の栽培実験および特許申請の報告は存在する⁶⁴⁾。現在のところ, トウモロコシの雄性不稔⁸⁰⁾, ジャガイモのデンプン産生量の低下⁸¹⁾, ニンジン⁸²⁾の転写因子発現量の低下⁸²⁾などが報告されているが, 商業栽培の実績はない。

検知の可能性

RdDMは、欠失、置換、挿入あるいは配列の再編成などゲノムDNA配列を変化させることなく、減数・有糸分裂の際に継承されるエピジェネティックな遺伝現象を利用している。組換え遺伝子（inverted repeat配列など）を染色体に導入した場合は、検知可能であるが、一過的に発現させた、もしくは、低分子RNAそのものを直接導入した場合は、その後代から得られる可食部分からの試料から、遺伝子組換え体かどうかの判断は不可能である。事前情報があれば、目的領域でのDNAメチル化のパターンの比較から、野生型との違いを検出できるかもしれないが、その変化の差がRdDM技術で意図的に行ったものか、自然界で起きた変化かを判別することはできないと考えられる。

(6) 逆育種 (Reverse Breeding)

通常育種では、トウモロコシのように雑種強勢F1ハイブリッドの作出が重要であり、そのため親個体となる優良ホモ接合体を開発する。逆育種では、優良な形質を示すヘテロ接合体が出現した場合に、その優良なヘテロ接合体を再現できるホモ接合体を再現することができる。現在、基礎的な研究が進められている⁸⁶⁾。

(7) Seed Production Technology (SPT)

トウモロコシでは雑種強制を示すF1ハイブリッド種子が重要である。そのため、自家受粉を防ぐために多大な労力をかけて花粉産生雄穂を完全に切除しなければならなかった。SPTは、作出に複雑な工程が必要な雄性不稔雌親種子を容易に増産する技術である。USDAでは、これを規制対象外としている。オーストラリア・ニュージーランドも遺伝子組換え体として扱わないと結論づけている¹⁰⁾。日本でも、今回のケースについては遺伝子組換え体に該当しないと判断された。

いずれも、作出過程の途中で遺伝子組換え体を用いるが、最終産物には遺伝子組換え体中の遺伝子やその断片は除去されている。国内においても個別事例としてSPTトウモロコシはGMO規制対象外と判断されている。このようなnull segregantは、GMO規制対象から除外されると考えられるが、外来遺伝子が完全に除去されていることが確実に証明されることが必須である。

(8) アグロインフィルトレーション (Agroinfiltration)

アグロインフィルトレーションは、植物の葉などに針なしシリンジで目的導入遺伝子を含むプラスミドを持つアグロバクテリウム懸濁液を浸潤させて、局所的に一過性に過剰発現させる方法である。本方法は、新しい組換え技術として分類されているが、トランスフォーメーションの方法の1つである。他の組織やその子孫には、アグロバクテリウムやT-DNA配列が存在しない限り遺伝子組換え体として扱われないと考えられる。アグロインフィルトレーションは、除草剤耐性などの特性の有無を葉などで一過性発現

により確認したり、医薬成分を植物組織（葉）に一過性に過剰に産生させたりするのに利用される。

(9) その他

果樹での実ができるまでの期間が長い点を克服するために、植物RNAウイルスを用いてゲノムに挿入することなく開花促進遺伝子 (FT) の発現誘導することも期待されている技術である。規制や安全性という点では、ウイルスの残存がないことや発現遺伝子産物や代謝物の変化がないことの確認が必要である。

3. 今後の動向について

次世代遺伝子組換え技術に関して、当初は各国とも現行のGMO規制の枠組みで対応可能と判断していた。最近、欧州の政策決定を行う機関に対して、独立して科学的な助言を行うEU機関であるEuropean Academies Science Advisory Council (EASAC) が、GMO規制についてプロセスからプロダクトベースへの変換の必要性を助言している^{44),87)}。EUなど欧州では、現在現行の枠組みDirective 2001/18/ECをもとに、外来遺伝子が残存するかどうかとも考慮してGMO規制に含まれるか除外されるかの整理を慎重に行っており、除外されるものについても改定されるNovel Food Regulationにより必要に応じて承認審査制度が導入される可能性がある⁸⁸⁾。

次世代組換え技術の中で、エピジェネティック変異を誘導するRdDM、ODMやSDN-1、-2は小さな欠失または数塩基の置換や挿入を特異的に誘導することができるが、その改変はrandom mutationで自然界でも起こりうる変化である。そのため、変異は検出できるがこの両者の違いは判別できないことからGMO規制から除外される可能性が高い。また、作製の途中段階で遺伝子組換え体を含むが、最終産物には一切外来遺伝子は存在しないReverse breedingやSPTは、プロセスベースの考えでは対応できない。すでに、個別事例ではあるが、アメリカや日本ではSPTは遺伝子組換え体には該当しないと判断されている。外来遺伝子に完全な除去が証明されれば、GMO規制外と判断されると考えられる。

一方、カナダのような新規形質獲得の有無に基づく完全なプロダクトベースの考え方は、科学的でありエビデンスベースなもので次世代組換え技術を用いた作物の規制の参考になる。ただし、この考え方では組換えDNA技術を用いないもの、例えば放射線や化学物質によって作られたものも承認審査が必要である。他の多くの国ではそれらは遺伝子組換え技術から除外されており、現行の枠組みそのものを変更しなければならないため、この点について消極的立場の規制当局者もいる。

プロダクトベースを基本に考えなければならない例を以下に示す。3つの除草剤耐性作物があるとする。(1) 自然突然変異で作出されたもの、(2) ODMで1アミノ酸変異から作出されたもの、(3) 細菌由来除草剤耐性遺伝子を導

入して作出したもので、ある。いずれも、同一の形質を示すため環境に与える影響に違いはないが、現行の規制制度では、(1)はnon-GMで一切の環境影響や食品安全に関する管理・規制を免除され、(2)は国によってはnon-GM, GMかで異なる判断となる可能性があり、(3)はGMO規制対象としてさまざまな負担を強いられる。また、食品の安全性という観点で見れば、前者2つと違い(3)は細菌由来の遺伝子産物であるタンパク質が発現するため、国内では必然的に食品健康影響評価が必要である。(1)はこれまで自然突然変異で規制対象外であったため、詳しく調べられていないことから、有害物質の産生や、作物の代謝物やタンパク質が野生型と優位に差があっても分からない。また、化学物質や放射線による突然変異導入(random mutation)は、一般には自然界でも起きる事象でありGMO規制対象外と考えられているが、用いる濃度や照射量によってはゲノム全体にわたって広く変異(塩基置換)が導入されている可能性も高く、その変化は最近のゲノム編集技術を用いたものに比べて明らかに大きい。こう考えると、新技術が多く開発されている今日においては現行のGMO規制の枠組みの不備が明確になり、エビデンスベース、プロダクトベースあるいはフェノタイプベースを基本にした考え方が自然であると考えられる。

現時点でどのような規制制度が最も良いかの答えを出すのは難しいが、1つのケースとして、最終的に作製された作物が新規形質を持っている場合は承認審査が必要とすることにし、このとき遺伝子組換え体に該当しないものはGMO規制から除外し、次のステップとして食品の安全性や環境影響が必要なものについて評価を行えばよい。GMO規制からの除外だけでも、開発企業の負担は軽減される。また、ケースバイケースで事例を重ねることで、さらに審査を簡便にすることも可能である。どのようなGMO規制の枠組みを作るかを国際的に協調しながら慎重に進めていくことも重要である。アメリカは、すでにいくつかの事案について独自の判断をしているが、国際協調という点では望ましいことではない。GMO規制に関する議論を進めていくと同時に、食品の安全性確認は別途必要と考えられる。ただ1個のアミノ酸置換で除草剤耐性を獲得できる例があることは、最終的に遺伝子組換え体に該当しないと予想されるものでも予期しない新規形質を獲得することがあることを示唆している。次世代組換え技術を用いて作製された作物がGMO規制対象かどうかということと、その作物の食品安全性は必ずしも一致しない。

次世代組換え技術は、品種改良・開発を飛躍的に高め、今後の世界的な食料需要に対応できるとともに、GMO規制から一部除外されることで遺伝子組換え食品に対する国民受容が改善することも期待できる。今後は、規制当局、開発者、消費者相互のコンセンサスを得ながら慎重に進めていかなければならない課題である。日本は、遺伝子組換え作物を栽培していないが、海外で開発された多くの遺伝子組換え作物を承認⁸⁹⁾(200系統以上)輸入している。一

方で、遺伝子組換え食品に対する国民の拒否反応は極めて強い。情報提供が十分に行われていなかったことが原因の一つと考えられる。次世代遺伝子組換え技術については、どのような技術で、どのようなものが開発されていて、懸念される点は何か、など情報提供・発信を適切に行い、相互の理解を得ながら進めていく必要がある。リスクという点では、用いる技術と関係なく遺伝子改変によって作られる食品の安全性を考えるうえで根底にあるのは、従来食品のリスクは0ではないが、長年の食経験から懸念されるレベルではないという理解である。これに対して、遺伝子改変によって得られた食品のリスクがこれ以上かどうかということが安全性評価の根底にあることを忘れてはならない。

最後に、検知に関して、これまでは既知の標的配列、または未知の場合は標的配列を明らかにした後に、その標的配列に対してプライマー・プローブを設計してリアルタイムPCR法で検知してきた。次世代組換え技術を用いた作物を標的とした場合、GMO規制内のもの(イントラジェネシスや部位特異的変異導入法でのドナーベクターを用いて遺伝子導入したもの)については改変部位特異的な配列を標的としたリアルタイムPCR法で対応可能と考えられる。一方、GMO規制から除外される可能性のあるもの(ODM, RdDM, 部位特異的変異導入法での小さな欠失、挿入置換)については、工夫すれば1または数塩基の変異を野生型と区別してリアルタイムPCRでも可能である。そのほかに、野生型と改変された作物試料両方からの標的領域のPCR産物を用いたTilling法(Cel-Iアッセイ)やRFLP法でも両者の区別は可能である(意図的改変かどうかは判別できない)。そのほかに、1塩基の違いはPCR反応に用いるプライマー(例えば21塩基)から見れば僅かな差であり交差反応することもあるが、質量という視点で見れば1塩基欠失・挿入は大きな差(約660 Da)であり、塩基置換においても10 Da以上異なることからLC-MS/MS(TOF-MS)で標的部分のDNA断片を核酸分析することにより高精度で検出同定可能である(意図的改変かどうかの判別は難しい)。また、部位特異的変異導入に用いられるTALENやCRISPR/Cas9は、その高いDNA認識能力を利用して新たな検知手法が可能と考えられる。遺伝子改変過程での余分な配列が全く残っていない数塩基変異作物については、検知法自体必要ではないかもしれないが、流通後のモニタリングが可能な環境を整備することも重要である。どこまで検知法を必要とするかは、GMO規制に含まれるかどうか大きく影響するが、検知手法についてはいろんな角度から今後検討しておく必要がある。

今後、日本でも次世代組換え技術を用いて作成された作物について、十分な議論が行われることが期待される。

謝 辞

本総説は、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「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全確保に関する研究」(H25-食品一般-015)により実

施した調査研究の一部をまとめたものである。

文 献

- 1) Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodriguez-Cerezo, E. New plant breeding techniques: state-of-art and prospects for commercial development. JRC Reference Report (2011).
- 2) Lusser, M., Rodriguez-Cerezo, E. Comparative regulatory approaches for new plant breeding techniques. JRC Scientific and Technical Reports (2012).
- 3) EFSA. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. EFSA J., **10**, 2561 (2012).
- 4) EFSA. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc-finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. EFSA J., **10**, 2943 (2012).
- 5) Schaart, J. G., Visser, R. G. F. New techniques in plant biotechnology. COGEM Report (2009).
- 6) AGES. Cisgenesis-A report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding. AGES Report (2012).
- 7) ZKBS. Position statement of the ZKBS on new plant breeding techniques. ZKBS (2012).
- 8) ACRE. ACRE Report 1: Towards an evidence-based regulatory system for GMOs. ACRE Report (2013).
- 9) AGES. New plant breeding techniques—RNA-dependent DNA methylation, Reverse breeding, Grafting. AGES (2013).
- 10) FSANZ. New plant breeding techniques—Report of a Workshop hosted by Food Standard Australia New Zealand. FSANZ Report (2013).
- 11) 日本学術会議. 植物における新育種技術の現状と課題. 日本学術会議報告 (2014).
- 12) OECD. OECD Workshop on environmental risk assessment (ERA) of products derived from novel plant breeding techniques (NPBT). OECD workshop (2014).
- 13) 厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinzenbu/0000053517.pdf>
- 14) 厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinzenbu/0000053519.pdf>
- 15) 遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準(平成16年1月29日食品安全委員会決定) http://www.fsc.go.jp/senmon/idensi/gm_kijun.pdf
- 16) COGEM. New techniques in plant biotechnology. COGEM CGM/061024-02 (2006).
- 17) ACRE. ACRE advice—New techniques used in plant breeding. ACRE Report (2013).
- 18) ACRE. ACRE Report 2: Why a modern understanding of genomes demonstrates the need for a new regulatory system for GMOs. ACRE Report (2013).
- 19) ACRE. ACRE Report 3: Towards a more effective approach to environmental risk assessment of GM crops under current EU legislation. ACRE Report (2013).
- 20) Eckerstorfer, M., Miklau, M., Gaugitsch, H. New plant breeding techniques and risks associated with their application. Environment Agency Austria (2014).
- 21) FSANZ. New plant breeding techniques workshop report. FSANZ (2013).
- 22) FSANZ. New plant breeding techniques workshop report. FSANZ (2014).
- 23) Schouten, H. Reply to Cisgenesis as a golden mean. Nature biotech., **32**, 728 (2014).
- 24) Eriksson, D., Stymne, S., Schjoerring, J. K. The slippery slope of cisgenesis. Nat. Biotech., **32**, 727 (2014).
- 25) Holme, I. B., Wendt, T., Holm, P. B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. Plant Biotech. J., **11**, 395–407 (2013).
- 26) Vanblaere, T., Flachowsky, H., Gessler, C., Brogini, G. A. Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the Rvi6 scab resistance gene. Plant Biotech. J., **12**, 2–9 (2014).
- 27) Gamper, H. B., Parekh, H., Rice, M. C., Bruner, M., Youkey, H., Kmiec, E. B. The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. Nucleic Acid Res., **28**, 4332–4339 (2000).
- 28) Zhu, T., Mettenberg, K., Peterson, D. J., Tagliani, L., Baszczynski, C. L. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Nat Biotech., **18**, 555–558 (2000).
- 29) Okuzaki, A., Toriyama, K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. Plant Cell Reports, **22**, 509–512 (2004).
- 30) Breyer, D., Herman, P., Brandenburger, A., Gheysen, G., Remaut, E., Soumillion, P., Van Doorselaere, J., Custers, R., Pauwels, K., Sneyers, M., Reheul, D. Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? Environ. Biosafety Res., **8**, 57–64 (2009).
- 31) Lusser, M., Davies, H. V. Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. Nat. Biotech., **30**, 437–446 (2013).
- 32) Kochevenko, A., Willmitzer, L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. Plant Physiol., **132**, 174–184 (2003).
- 33) Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhang, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, **339**, 819–823 (2013).
- 34) Joung, J. K., Sander, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **14**, 49–55 (2013).
- 35) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Church, G. M. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. Science, **339**, 823–826 (2013).
- 36) Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., Sander, J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat. Biotech., **31**, 822–826 (2013).
- 37) Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., Zhang, F. DNA targeting specificity of RNA-guided

- Cas9 nucleases. *Nat. Biotech.*, **31**, 827–832 (2013).
- 38) Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R. A., Zhang, K., Cheng, L., Ye, Z. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, **15**, 12–13 (2014).
 - 39) Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Talkowski, M. E., Musunuru, K. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, **15**, 27–30 (2014).
 - 40) Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotech.*, **32**, 947–951 (2014).
 - 41) Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., Mitchell, J. C., Arnold, N. L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V. M., Rock, J. M., Wu, Y. Y., Katibah, G. E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M. A., Blakeslee, B., Greenwalt, S. A., Butler, H. J., Hinkley, S. J., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, **459**, 437–441 (2009).
 - 42) Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A., Tuli, R. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3*, **3**, 2233–2238 (2013).
 - 43) Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z., Van Eck, J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR/Cas9 system. *Plant Physiol.*, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.247577> (2014).
 - 44) Hartung, F., Schiemann, J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J.*, **78**, 742–752 (2014).
 - 45) Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., Gao, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genome and Genomics*, **41**, 63–68 (2014).
 - 46) Xu, R., Li, H., Qin, R., Wang, L., Li, L., Wei, P., Yang, J. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, **7**, 5 (2014).
 - 47) Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N., Zhu, J. K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotech. J.*, **12**, 797–807 (2014).
 - 48) Edvardsen, R. B., Leininger, S., Kleppe, L., Skaftnesmo, K. O., Wargelius, A. Targeted Mutagenesis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Using the CRISPR/Cas9 System Induces Complete Knockout Individuals in the F0 Generation. *PLoS ONE*, **9**, e108622 (2014).
 - 49) Haraldsen, V. M., Szczerba, M. W., Aktas, H., Lopez-Baltazar, J., Odias, M. J., Chi-Ham, C. L., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., Powell, A. L. Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. *Frontiers Plant Sci.*, **3**, 39 (2012).
 - 50) Jensen, P. J., Halbrecht, N., Fazio, G., Makalowska, I., Altman, N., Praul, C., Maximova, S. N., Ngugi, H. K., Crassweller, R. M., Travis, J. W., McNellis, T. W. Rootstock-regulated gene expression patterns associated with fire blight resistance in apple. *BMC Genomics*, **13**, 9 (2012).
 - 51) Song, G. Q., Sink, K. C., Walworth, A. E., Cook, M. A., Allison, R. F., Lang, G. A. Engineering cherry rootstocks with resistance to *Prunus* necrotic ring spot virus through RNAi-mediated silencing. *Plant Biotech. J.*, **11**, 702–708 (2013).
 - 52) Aguero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. L., Labavitch, J. M., Meredith, C. P., Dandekar, A. M. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Mol. Plant Pathol.*, **6**, 43–51 (2005).
 - 53) Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S. R., hang, X. Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, **43**, 1670–1672 (2008).
 - 54) Zhao, D., Song, G. Q. Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotech. J.*, **12**, 1319–1328 (2014).
 - 55) Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Romero, L. Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *J. Food Agric. Environ.*, **1**, 70–74 (2003).
 - 56) Santa-Cruz, A., Martinez-Rodriguez, M. M., Perez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R., Bolarin, M. C. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, **162**, 825–831 (2002).
 - 57) Ruiz, J. M., Blasco, B., Rivero, R. M., Romero, L. Nicotine-free and salt-tolerant tobacco plants obtained by grafting to salinity-resistant rootstocks of tomato. *Physiol Plantarum*, **124**, 465–475 (2005).
 - 58) Jiang, L., Xu, X., Li, Z., Doohan, D. Grafting imparts glyphosate resistance in soybean. *Weed Technol.*, **27**, 412–416 (2013).
 - 59) Harada, T. Grafting and RNA transport *via* phloem tissue in horticultural plants. *Scientia Horticulturae*, **125**, 545–550 (2010).
 - 60) Stegemann, S., Bock, R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, **324**, 649–651 (2009).
 - 61) Fuentes, I., Stegemann, S., Golczyk, H., Karcher, D., Bock, R. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature*, **511**, 232–235 (2014).
 - 62) Haraldsen, V. M., Chi-Ham, C. L., Bennett, A. B. Transgene mobilization and regulatory uncertainty for non-GE fruit products of transgenic rootstocks. *J. Biotechnol.*, **161**, 349–353 (2012).
 - 63) NTWG. Report of the Expert Working Group of the European Commission and the member States on New Techniques (2011).
 - 64) Haraldsen, V. M., Paulino, G., Chi-ham, C., Bennett, A. B. Regulatory status of transgrafted plants is unclear. *California Agriculture*, **66**, 68–69 (2012).
 - 65) Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodriguez-Cerezo, E. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat. Biotech.*, **30**, 231–239 (2012).

- 66) Kasai, A., Bai, S., Li, T., Harada, T. Graft-transmitted siRNA signal from the root induces visual manifestation of endogenous post-transcriptional gene silencing in the scion. *PLoS ONE*, **6**, e16895 (2011).
- 67) Kasai, A., Sano, T., Harada, T. Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS One*, **8**, e57736 (2013).
- 68) Castel, S. E., Martienssen, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 100–112 (2013).
- 69) Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., Sanger, H. L. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567–576 (1994).
- 70) Kanazawa, A., Inaba, J., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B. M., Goto, K., Masuta, C. Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J.*, **65**, 156–168 (2011).
- 71) Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X., Jacobsen, S. E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYP-TONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556–560 (2002).
- 72) Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 490–495 (2005).
- 73) Gent, J. I., Ellis, N. A., Guo, L., Harkess, A. E., Yao, Y., Zhang, X., Dawe, R. K. CHH islands: *de novo* DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize. *Genome Res.*, **23**, 628–637 (2013).
- 74) Matzke, M. A., Mosher, R. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 394–408 (2014).
- 75) Okano, Y., Miki, D., Shimamoto, K. Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *Plant J.*, **53**, 65–77 (2008).
- 76) Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., Burgyan, J. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.*, **22**, 633–640 (2003).
- 77) Miki, D., Shimamoto, K. *De novo* DNA methylation induced by siRNA targeted to endogenous transcribed sequences is gene-specific and OsMet1-independent in rice. *Plant J.*, **56**, 539–549 (2008).
- 78) Jones, L., Ratcliff, F., Baulcombe, D. C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.*, **11**, 747–757 (2001).
- 79) Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.*, **22**, 107–126 (2012).
- 80) Cigan, A. M., Unger-Wallace, E., Haug-Collet, K. Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant J.*, **43**, 929–940 (2005).
- 81) Heilersig, B. H., Loonen, A. E., Janssen, E. M., Wolters, A. M., Visser, R. G. Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. *Mol. Genet. Genomics*, **275**, 437–449 (2006).
- 82) Shibukawa, T., Yazawa, K., Kikuchi, A., Kamada, H. Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene*, **437**, 22–31 (2009).
- 83) Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., Zamore, P. D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, **17**, 49–63 (2003).
- 84) Qi, Y., He, X., Wang, X. J., Kohany, O., Jurka, J., Hannon, G. J. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, **443**, 1008–1012 (2006).
- 85) Zheng, Q., Rowley, M. J., Böhmendorfer, G., Sandhu, D., Gregory, B. D., Wierzbicki, A. T. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.*, **73**, 179–189 (2013).
- 86) Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C. B., Lelivelt, C. L., Keurentjes, J. J., Naharudin, N. S., Ravi, M., Chan, S. W., de Jong, H., Dirks, R. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nat. Genet.*, **44**, 467–470 (2012).
- 87) Heap, B. Europe should rethink its stance on GM crops. *Nature*, **498**, 409 (2013).
- 88) Personal communications with Maria Lusser (JRC, IPTS) and Ilaria Ciabatti (European Commission, DG SANCO).
- 89) 安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた遺伝子組換え食品及び添加物一覧(平成26年10月21日現在) <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000061843.pdf>