

ゲノム編集技術を利用した製品の研究開発の現状と規制制度について

近藤一成[#]

Genome-edited foods - current status of research and development and regulatory system

Kazunari Kondo[#]

Genome editing technology is one of the very promising technologies and is being applied not only in the medical field but also in the agricultural field. This genome editing technology is being used to obtain new traits such as increased yield and resistance to plant pathogens, as well as to improve breeding methods to shorten the development time of attractive new crops. Currently, to circumvent the strict regulations on conventional genetically modified (GM) crops, genome editing (GE) technology focuses on the functional deletion of endogenous genes that have undesirable functions for the expression of new traits, without introducing foreign genes or fragments thereof. Many genome editing techniques exist, including insertion and deletion of bases by double-strand breaks in DNA (InDel), base replacement by single-strand breaks in DNA, and insertion and deletion replacement of longer sequences. The technology used should be considered in the evaluation. The handling of products derived from genome editing technologies is being considered by the MHLW, and some SDN-1 and SDN-2 products are considered exempt from the current GM regulations, which require a safety evaluation.

The prior consultation and notification system for GM-derived food products began on October 1, 2019, and three notifications have been accepted so far. It is expected that more technically complex cases will emerge in the future, but until a certain number of cases are accumulated, it is desirable to confirm GE-derived foods on an individual basis. Public understanding and acceptance of conventional genetically modified foods have not progressed. In the future, it will be necessary to promote public understanding through appropriate risk communication and to create agricultural products that are attractive to consumers.

Keywords: Genome editing technology, Ministry of Health, Labor and Welfare, prior consultation, Agricultural product

1. はじめに

ゲノム編集技術は、遺伝子改変技術の一つであり、ゲノム中の特定の塩基配列を認識する酵素を用いて標的領域の1つ以上の塩基を改変することを可能にする技術である。遺伝子改変に用いられる古典的な酵素としては、I-SceIなどのメガヌクレアーゼがある。より単純な

例が、アガロースゲル電気泳動によるPCR産物の解析やパルスフィールドゲル電気泳動による微生物ゲノムの解析など、生化学実験によく用いられる制限酵素である。例えば、制限酵素EcoRIはGAATTCを特異的に認識し、最初のG以降の配列（すなわち、G/AATTC）を切断する。従来の制限酵素は、あらかじめ決められた1つの配列（例えば、EcoRIはGAATTC、XhoIはCTCGAG）だけを切断するが、ゲノム編集技術に用いられる人工酵素は、自由にゲノム配列をターゲットにすることができ、ゲノム編集技術は、ほとんどのゲノム領域の改変に適用できるため広く普及している。

ゲノム編集技術の中心は、汎用性の高さからclustered

[#] To whom correspondence should be addressed:

Kazunari Kondo; Division of Biochemistry, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa, 210-9501, Japan; TEL: +81-44-270-6600; E-mail: kondo@nihs.go.jp

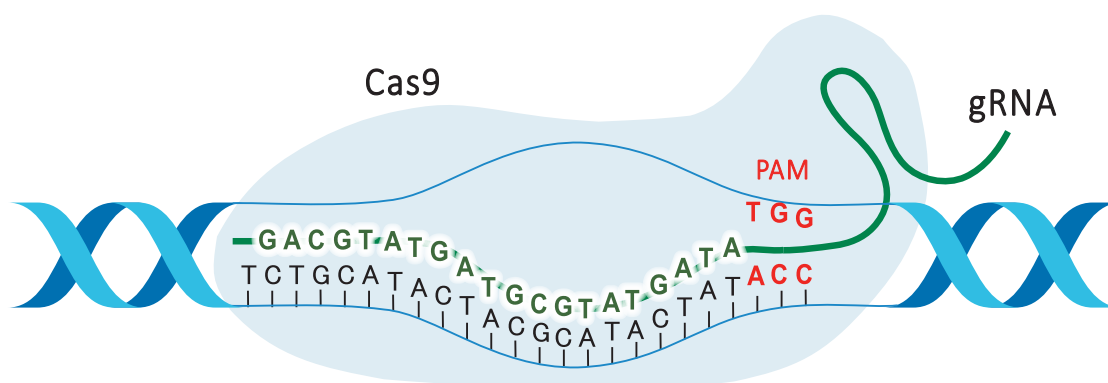


図1 CRISPR/Cas9の基本構造

regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) /CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9, 図1) であり¹⁾, 登場以来これまでに切断活性や特異性の向上, オフターゲット切断, 及び, オルトログ検索に関する膨大な研究が行われてきた. 主なCas9 オルトログには, Cas12a (以前はCpf1)²⁾やCas13a (以前はC2C2)³⁾がある. CRISPR/Cas9は, 20塩基からなるプロトスペーサー配列と3塩基からなるPAM配列によってゲノム上の特定のDNA配列を特異的に認識する.

Cas9には, DNA 2本鎖を切断するオリジナルのものの他に, DNA 2本鎖の一方のみを切断するnCas9とヌクレアーゼ活性を持たないdCas9があり, 編集目的に応じて使用される. CRISPR/Cas9システムでは, 標的とする20塩基の配列に隣接してNGGという配列 (PAM配列) を必要とするが, このPAM配列は, たとえばヒトゲノム上では頻繁に出現するため標的配列の設計自由度はそれ以前のゲノム編集ツールであるZinc-finger nuclease (ZFN) やtranscription activator-like effector nuclease (TALEN) よりも高い. しかし, 遺伝子疾患の点変異修復では, まさにその場所に設計する必要があり, PAM配列は設計上の障害になりうる. そこで, PAM配列がNGのSpCas9-NGやPAM配列がNRNのSpRYが開発されている^{4,5)}. 塩基編集 (base editor) の登場により, nCas9にシチジン, アデノシンデアミナーゼを結合させたことでCからT, AからGへDNA 2本鎖を切断することなく1塩基置換できるようになった⁶⁻⁹⁾. その後, CからGへの編集も可能となった^{10,11)}. 逆転写酵素を結合したプライム編集は, 12通りの塩基編集と40-80塩基の挿入欠失を可能にしてコメや小麦など農作物分野に応用されたが編集効率はまだ低い^{12,13)}. また, 塩基編集のCBE (cytosine base editor) にAP lyaseを用いて複数塩基除去を行うことも可能である¹⁴⁾. 現在のところ, オリジナルのCas9 (SpCas9) が標的部位での切断効率や配列特異性などが最もよく研究されているためSpCas9を中心に利用されているが, 徐々にこ

れら塩基編集やプライム編集利用した応用例が増加すると考えられる.

ゲノムDNA上の塩基配列を編集するためには, ヌクレアーゼとして機能するCas9タンパクと標的配列を認識するガイドRNA (gRNA) を用いて, DNA 2本鎖切断, DNA 1本鎖切断, あるいは, DNA切断しない方法がある. 最も汎用されるのは, DNA 2本鎖切断を介した挿入欠失誘導による標的遺伝子のノックアウトである. より大きな置換や挿入を行う時は, 鋳型DNAを併せて用いて相同組換え修復を行う. また, コムギ (6倍体) などゲノム倍数性が大きい生物種や複数のオルトログを同時にノックアウトさせる場合など多数の標的を同時編集したい場合がある. この場合, 複数のgRNAを産生させなければならない. この方法として, 複数の転写物としてgRNAを生成させるほかに, U6などPol IIIプロモーター下に自己消化性Hepatitis delta virus やHammerhead ribozymesを挟んで1つの転写物から複数のgRNAを生成させるかの方法と同様にtRNAプロセッシングを用いて方法がある (図2)^{15,16)}.

このように, ゲノム編集技術には実に多様な手法が存在し, そこから得られる変化も様でないことが想定される. このことは, ゲノム編集技術を応用した製品の評価にも影響する. 欧米ではゲノム編集技術を応用してその生物が持たない生合成経路に関する遺伝子群を導入することで全く新しい形質を持たせる, あるいは, 物質生産を行わせる合成生物学に関する研究も活発に行われている. これらの技術を用いた食品等の安全性を評価する上で, 長年の食経験がある作物に対して遺伝子改変する前のものと比較するというこれまでの相対比較による実質的同等性の考え方が成立しないケースもありうる. 次々に登場する遺伝子改変技術や手法に遅れることなく対応していくことが必要である. ここでは, ゲノム編集技術を応用して作られた農作物の応用例や事前相談・届出制度を中心に解説する.

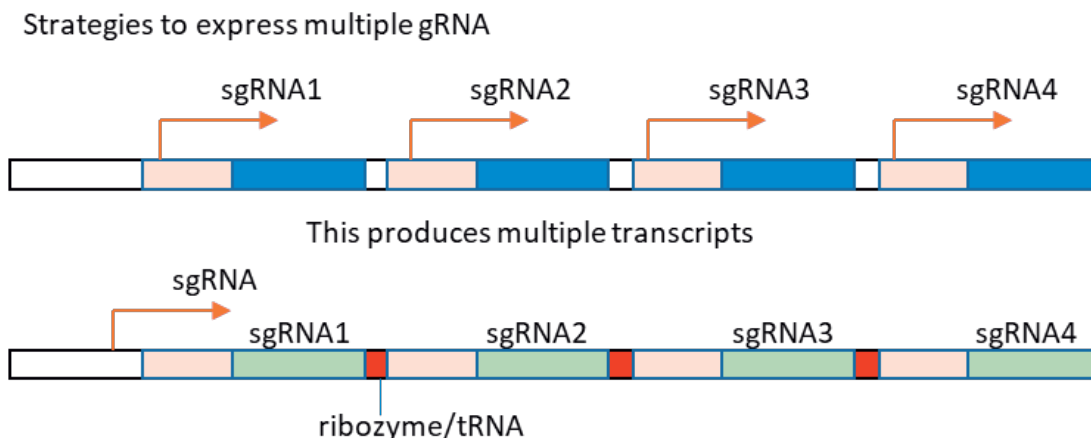


図2 複数のgRNAを生成させる方法

上段：複数の転写物として生成

下段：一つの転写物として生成させてから、個別に切断

2. ゲノム編集技術の農業分野での応用

ゲノム編集技術の農作物分野への応用では、以下の(1)から(4)の形質獲得と(5)から(8)の育種方法の改良で用いられることが多い。

- (1) 収量の向上
- (2) 品質の向上
- (3) 病原耐性獲得
- (4) 除草剤耐性獲得
- (5) ハプロイド誘導 (haploid induction)
- (6) 雄性不稔 (male sterile) の獲得
- (7) 自家不和合性 (self incompatibility) 克服
- (8) 雑種強勢F1の遺伝的背景固定

品種改良に長期間を有する植物については育種方法の改良による開発期間の短縮が大きな課題であり、この克服にゲノム編集が積極的に用いられている。たとえば、植物は野生型系統と遺伝子改変系統とのハイブリッド種子が用いられるが、遺伝的背景 (genetic background) を固定するために少なくとも6～8世代の後代育種が必要である。精子特異的なホスホリパーゼである *MATRILINEAL* (*MTL*) の変異導入によるハプロイド生成とその倍数化によりこのプロセスを大幅に短縮化できることから、トウモロコシやコメで研究されている¹⁷⁾。遺伝的背景の固定に *MiMe* (Mitosis instead of meiosis) を介した倍数体配偶子作成と *BABY BOOM1* 遺伝子の卵細胞発現によるクローン性子孫を得る研究も行われている¹⁸⁾。

望ましい形質の獲得について、収量の向上目的ではサイトカイニン活性化のための *LOGGL5* やサイトカイニン分解酵素 cytokinin oxidase/dehydrogenase (*CKX*) のノックアウトが、除草剤耐性獲得には Acetolactate

synthase (*ALS*) 遺伝子の1アミノ酸置換がよく行われる。耐病性獲得には、植物特有の病気に感受性を示す遺伝子のノックアウト戦略が用いられる。たとえば、イネ白葉枯病菌の原因菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* は、イネに感染すると *SWEET* 遺伝子の転写を活性化させることから、本遺伝子のプロモーター領域への変異導入により *SWEET* 遺伝子を機能不全にすることで病原菌抵抗性を獲得させる¹⁹⁾。同様に、うどんこ病耐性コムギの作出はうどんこ病抵抗性を負に制御する enhanced disease resistance 1 (*EDR1*) への変異導入により行われている。商業化により近いものでは、イギリスのロザムステッド研究所によるアクリルアミド産生抑制のためにアスパラギン合成酵素遺伝子 *TaASN2* をノックアウトしたコムギやコルテバアグリサイエンス社が開発しているもち性を向上させたトウモロコシなどがある^{20, 21)}。

図3では、2012年以降発表された論文検索の結果から、使用されているゲノム編集技術、植物および動物の生物種ごとの応用例を示した。ゲノム編集技術では、全体の94%がCRISPR/Casシステムであり、その中でも89%はCas9が用いられている。報告数が多い生物種としては、植物ではコメが40%を占め、トマト、コムギ、トウモロコシ、ダイズなどであり、動物ではブタやニワトリが大部分であった。

3. 日本と諸外国のゲノム編集食品に関する法制度

日本における取扱いの議論は、2018年6月15日に閣議決定された統合イノベーション戦略において、ゲノム編集技術の利用により得られた生物のカルタヘナ法上の取扱いや食品衛生法上の取扱いの明確化が織り込まれたことに始まる。2018年8月、環境省中央環境審議会自然環境部会遺伝子組換え生物等専門委員会の検討会で2回の

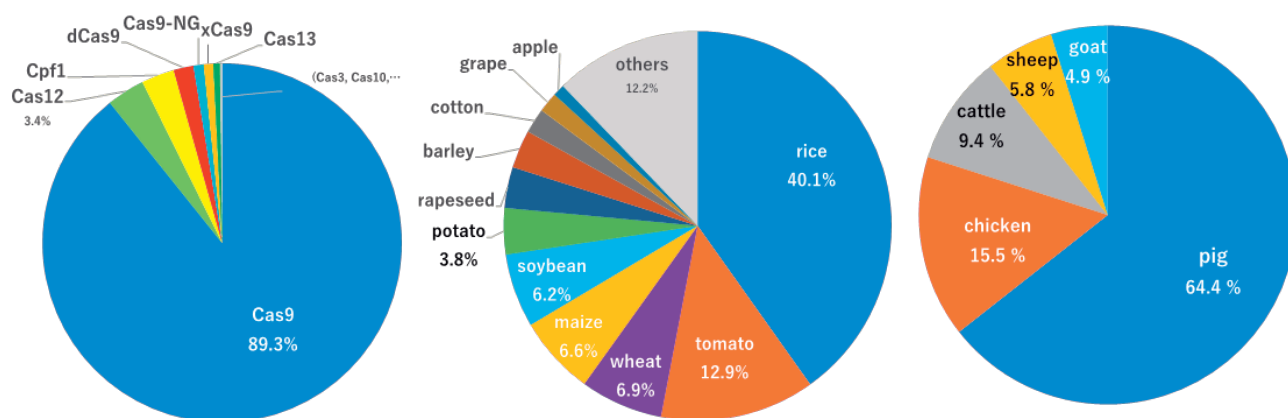


図3 ゲノム編集技術とその応用例の動向 (2012-2021年)

左：ゲノム編集技術CRISPR/Casの内訳

中：ゲノム編集植物の研究開発動向

右：ゲノム編集動物の研究開発動向

議論の後、「ゲノム編集技術の利用により得られた生物のカルタヘナ法上の整理及び取扱い方針（案）」を報告、パブリックコメントを経て2019年2月「ゲノム編集技術の利用により得られた生物であってカルタヘナ法に規定された遺伝子組換え生物等に該当しない生物の取扱いについて」（環境省通知）が公表された。ゲノム編集技術は、一般に次の3つに分類されて議論される。

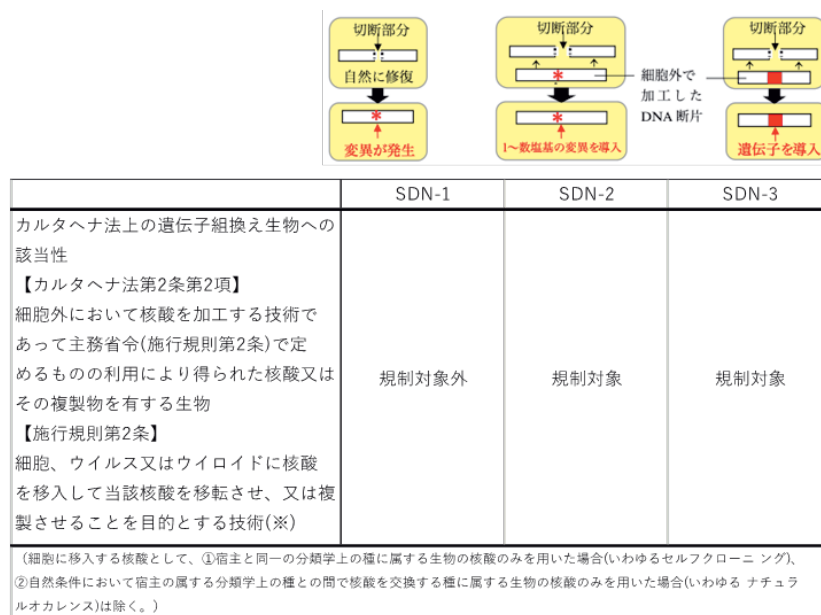
- (1) SDN-1：宿主の標的塩基配列を切断後、自然修復の際に変異（塩基の欠失、挿入又は置換）が発生する。
- (2) SDN-2：人工ヌクレアーゼを作用させる際に、宿主の標的塩基配列と相同な配列の一部を変異（1～数塩基の置換、挿入又は欠失）させたDNA断片（核酸）を宿主細胞内に移入する。標的塩基配列を切断後、移入したDNA断片を鋳型として切断部位が修復される際に、外来核酸またはその複製物が導入される。
- (3) SDN-3：人工ヌクレアーゼを作用させる際に、宿主の標的塩基配列と相同な配列の中に外来遺伝子を組み込んだDNA断片（核酸）を宿主細胞内に移入する。標的塩基配列を切断後、移入したDNA断片を鋳型として切断部位が修復される際に、外来遺伝子またはその複製物が導入される。

ここで、SDNはsite-directed nucleaseの略でOECDのレポートで初めて用いられた用語である²²⁾。

SDN-1～3について、カルタヘナ法上の遺伝子組換え生物への該当性は、SDN-1のみ規制外で、SDN-2、3は原則規制対象とされた（図4）。ただし、セルフクロニング・ナチュラルオカレンスの考えによりSDN-2で小さな変異導入の場合は対象外と考えられる。その後、

2019年10月に農林水産省は「農林水産分野におけるゲノム編集技術の利用により得られた生物の生物多様性影響に関する情報提供等の具体的な手続きについて」を公表した。

厚生労働省においても、2018年9月からゲノム編集技術を利用して得られた食品等の食品衛生法上の取扱いについて議論が開始された。現在、遺伝子組換え作物を食品として利用するためには食品衛生法に基づく安全性審査を受ける必要がある。遺伝子組換え食品は、組換えDNA技術を応用した食品であり、組換えDNA技術とは「酵素等を用いた切断及び再結合の操作によって、DNAをつなぎ合わせた組換えDNA分子を作製し、それを生細胞に移入し、かつ、増殖させる技術」をいう。これは、後述するEUの環境放出指令（Directive 2001/18/EC）における定義と基本的に同じである。ゲノム編集技術を利用して得られた食品等の取扱いに関する厚労省での議論は、薬事・食品衛生審議会の新開発食品調査部会遺伝子組換え食品等調査会を中心に最初行われた後、新開発食品調査部会でより広い見地からさらに議論が行われた。食品安全委員会の遺伝子組換え食品の安全性評価基準も参考にしながら、自然界で起きる変化と同程度の編集を行った植物について確認すべき事項やその範囲、オフターゲットの考え方、技術の分類などについて整理がされた。日本では、従来遺伝子組換え食品の安全性審査はEUのように用いた技術（プロセスベース）を中心にしながらも、最終産物の特性も考慮（プロダクトベース）して判断してきた。過去には遺伝子をコードするDNAベクターをゲノムに導入がされたものの、その後のレポーター遺伝子の巧みな利用により外来遺伝子を除いたことが確実に証明された事案については遺伝子組



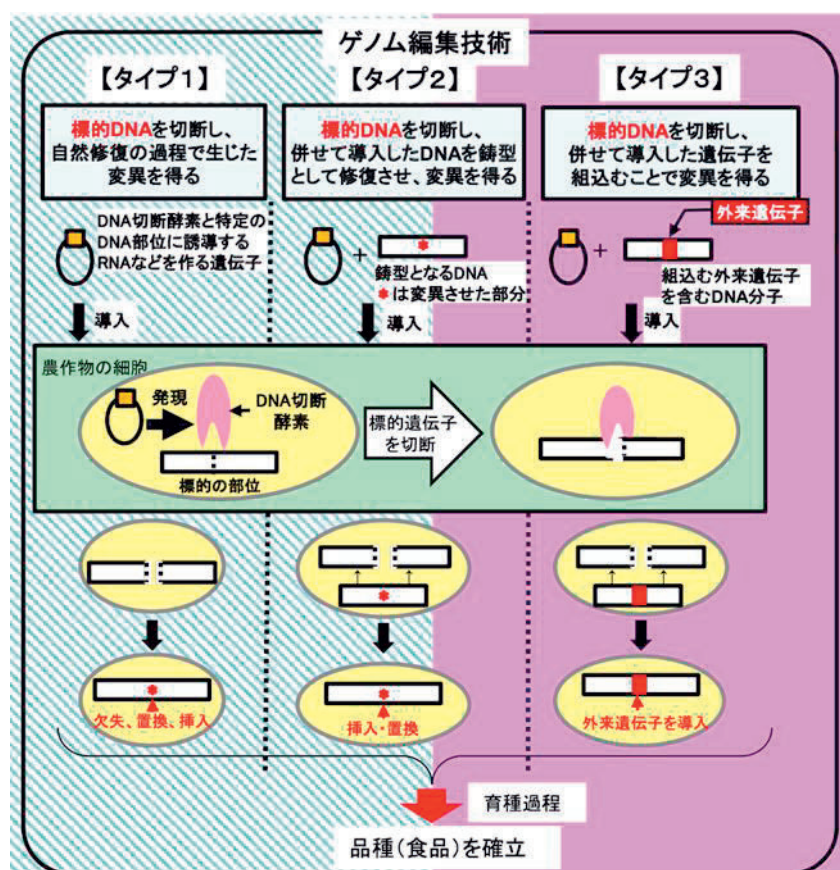
(出典) 環境省自然環境局野生生物課外来生物対策室作成「ゲノム編集技術の概念の整理について」(平成30年7月11日)を基に、筆者改変

図4 環境省におけるゲノム編集生物の取扱い

換え食品としなかった事例もある。そのため、ゲノム編集技術を利用した食品等の取扱いについては、科学的なエビデンスベースで考えていくこととされた。厚労省での議論の後、2019年に1月にパブリックコメントを実施、その結果を踏まえて再度新開発食品調査部会で議論を行い、同年3月に薬事・食品衛生審議会の新開発食品調査部会報告書「ゲノム編集技術を利用して得られた食品等の食品衛生法上の取扱いについて」を公開した。その後、ゲノム編集技術の定義や申請者に求める情報などの詳細を定めて、2019年9月「ゲノム編集技術応用食品及び添加物の食品衛生上の取扱要領」(大臣官房生活衛生・食品安全審議官決定、最終改正 2020年12月23日)が公表、同年10月1日から、ゲノム編集技術応用食品等の食品衛生上の取扱いについて事前相談・届出制度が開始された。ゲノム編集技術応用食品及び添加物の食品衛生上の取扱要領の中では、ゲノム編集技術とは、「特定の機能を付与することを目的として、染色体上の特定の塩基配列を認識する酵素を用いてその塩基配列上の特定の部位を改変する技術」と定義している。環境省での議論と同様に、ゲノム編集技術の使われ方でSDN-1からSDN-3と分類しており、SDN-2については多様なケースが想定されることからゲノム編集技術食品として扱われるかどうかはケースバイケースで判断するとされた(図5)。

これまでに、サナテックシード社が開発したg-aminobutyric acid (GABA) 産生を主に制御する遺伝子SIGAD3の1塩基挿入ノックアウトによりGABA高

含有トマトが2020年に最初に事前相談を経て届出受理されたのを皮切りに、現在までに合計3件が届出受理されている。GABA高含有トマトの場合、事前相談で出された標的遺伝子の分子特性解析のための、開発過程で使ったすべてのベクター配列すべてをカバーするPCR、サザンブロットングのデータ、異なる2種類の*in silico* ツールによるオフターゲット候補検出とPCRによる確認データ、GABA量の変化の確認、および有害成分トマチン類の分析データ、新たな読み枠(open reading frame, ORF)から生成しうるタンパク質の毒性・アレルゲン性評価データ、数世代に渡る遺伝的安定性の確認データなどを、新開発食品調査部会遺伝子組換え食品等調査会において確認ののちに届出案件であると判断された。本申請の場合、最初に事例であり、複数回の追加データの要求などもあったことから、申請から届出受理まで約1年を要した。その後、2件の魚(マダイ、トラフグ)が届出受理された。魚、すなわち動物の場合、従来の遺伝子組換え食品の安全性評価でも動物の審査を行った経験がなく、最初に考え方の整理を行う必要があることから2021年2月から5回に分けて遺伝子組換え食品等調査会で議論を行い、同年6月に「ゲノム編集技術を利用して得られた魚類の取扱いにおける留意事項」を取りまとめた。この留意事項をもとに、2件の魚が届出受理された。いずれも、リージョナルフィッシュ社によるもので、gRNAとCas9のmRNAを用いて作出され、全ゲノム解析による標的部位およびオフターゲット解析、新たなORFから生成しうるタンパク質の毒性・アレルゲン



厚生労働省・食品衛生審議会食品衛生分科会心開発食品調査部会報告書「ゲノム編集技術を利用して得られた食品等の食品衛生法上の取扱いについて」から一部抜粋

図5 厚生労働省におけるゲノム編集食品の取扱い

性評価データ、遺伝的安定性の確認データ（フグの場合は、追加で毒性物質の体内分布が変化しないことの確認データ）などが確認された。なお、ゲノム編集技術応用食品とは、「ゲノム編集技術によって得られた生物の全部又は一部である場合で、外来遺伝子及びその一部が残存せず、かつ、1から数塩基の変異が挿入されたもの」であるとしている。ここで言う「数塩基」が何塩基かは定められておらず、これより大きな欠失であっても外来遺伝子及びその一部の残存が確認され、取扱要項が求めるその他の事項について検討した結果、食品衛生上問題がないと判断されればゲノム編集食品として取扱われると考えられる。その後、2020年12月ゲノム編集技術応用食品として届出を行った旨の公表がなされた品種に、従来品種等を伝統的な育種の手法により掛け合わせた品種については、事前相談及び届出は求めないこととする後代交配種の取扱いが追記された。

諸外国でのゲノム編集食品等の取扱いについては、EUやニュージーランドを除く多くの国において、SDN-1で作製された製品は従来の遺伝子組換え食品等の規制から除外する方針である。EUにおいては、2018年欧州司法裁判所において、ゲノム編集を含む新規育種

方法について既存の環境放出指令（Directive 2001/18/EC）に照らして、ゲノム編集技術は安全に使用された十分な歴史がないことも考慮して従来の遺伝子組換え食品GMOの規制内である（Case C-528/16）、との判断がされた^{23, 24)}。これを受けて欧州委員会はゲノム編集を含む新しい遺伝子改変技術の現行制度のもとでの位置付け（適切かどうか）について調査報告を行った。本報告書の概要は以下の通りである。

新規ゲノム改変技術（New Genomic Technique, NGT）とは、「生物の遺伝物質を改変することが可能で、遺伝子組み換え生物（GMO）に関する現行法が採択された2001年以降に出現した、あるいは開発された技術」と定義され、従来の確立されたゲノム改変技術（Established Genome Technique, EGT）と対比して用いられている。そして、NGTをゲノムとの相互作用に基づき4つのグループに分類している。

1. DNA二本鎖切断を生じさせる（一般的なゲノム編集に相当するもの）
2. DNA二本鎖切断せずにゲノム編集を行うか、一本鎖のDNA切断のみを発生させる（塩基編集やプライム編集など）

Technique	History of use in plant breeding	technique exempted from Directive 2001/18/EC	Involve recombinant nucleic acid molecules ?	Out of the scope of Directive 2001/18/EC	Potentially exemptible ?
SDN1 without insertion of gene (transient transformation, RNA, RNP (ribonucleo protein), null segregant	Since 2010's	No	No	No	Yes
SDN1 with insertion of gene	Since 2010's	No	No	No	No
SDN2 without insertion of gene (transient transformation, RNA, RNP (ribonucleo protein), null segregant	Since 2010's	No	No	No	Yes
SDN2 with insertion of gene	Since 2010's	No	No	No	No
SDN3 Targeted transgenesis	Since 2010's	No	No	No	No
Gene regulation using site-directed effectors (activators/repressors /epigenetic factors)	Since 2010's	No	No	No	No
Gene regulation (SDN4) using site-directed nucleases targeting RNA	Being developed	No	No	No	No
Random mutagenesis (radiation, chemicals)	Since 1930's	No	No	Yes	exempted
Polypoidy induction	Since 1940's	Yes	No	Yes	exempted
ODM, Oligonucleotide-Directed Mutagenesis	Since 2000's	No	Yes/No	No	Yes
Cisgenesis	Since 2000's	No	No	No	No

図6 欧州委員会の報告書によるNGT各技術と既存の法制度との関係

3. エピゲノム変化を誘発する（プロモーター領域のメチル化など）

4. RNAに特異的に作用する（RNA編集による遺伝子発現調節など）

その上で、本報告の中では、欧州司法裁判所の決定はEU内での研究・イノベーションを阻害する可能性があること、NGTは持続可能な農業食品システムのための「持続可能な開発目標（SDGs）」に貢献できること、小さな変異（欠失や挿入など）はゲノム編集だけでなく従来の育種技術やシス・トランスジェネシスでも起きること、SDN技術で誘発されるオフターゲット変異は従来の育種技術でも起きること、また、現代の科学技術の進歩に法制度が追従していないことによる法的不確実性があること、将来を見据えた柔軟性のある政策を検討すべきである、と述べている。なお、NGT各技術と既存の法制度との関係について以下のように整理されている（図6）²⁵⁾。

将来的には、SDN-1、2で遺伝子やその断片の挿入がないものは遺伝子組換えの規制外になる可能性があると考えられる。一方、EUを離脱したイギリスは2021年9月独自に「遺伝子改変技術の規制に関する政府方針」を発表して、EUとは反対にゲノム編集技術を用いた植物は遺伝子組換え作物の規制対象外とする方針を示した。ゲノム編集技術で生産された生物による健康や環境へのリスクは、従来の育種技術のそれと同等であり、意図し

ない効果のオフターゲット変異の影響も、放射線などの突然変異育種と同程度の影響と考えられ、また、意図しない外来遺伝子導入や残存も改変された生物に有害な特性を与える影響は低く、その影響を出さないように制御することが可能であると結論づけた。ただし、動物については、病原菌耐性動物の作製など人間の家畜生産効率向上と消費の目的のためであり、動物福祉を犠牲にしてゲノム編集技術が使用される可能性があることから除外適用されない。アメリカやカナダは、既存の法制度の一部修正などを行っているが、ここでは割愛する。

4. 今後の展望や課題

日本においては、厚労省のゲノム編集食品の取扱いが前述のようにSDN-1からSDN-3に分類、SDN-2はさまざまなケースが想定されるためケースバイケースで届出になるものと安全性審査が必要なものに分かれると考えている。現在までに3件のゲノム編集食品の届出が行われたが、いずれも事例としては単純なものであった。今後は以下のようなより複雑なケースも想定され、それらの扱いについて不透明性がある（図7）。

- ・複数の染色体の複数箇所を同時に編集した場合もSDN-1に分類されて安全性評価は不要であるのか？
- ・大きな欠失で遺伝子全体あるいは染色体の一部を欠失させた場合もSDN-1であるのか？
- ・ある遺伝子の全配列を交換しているが、変化したのは

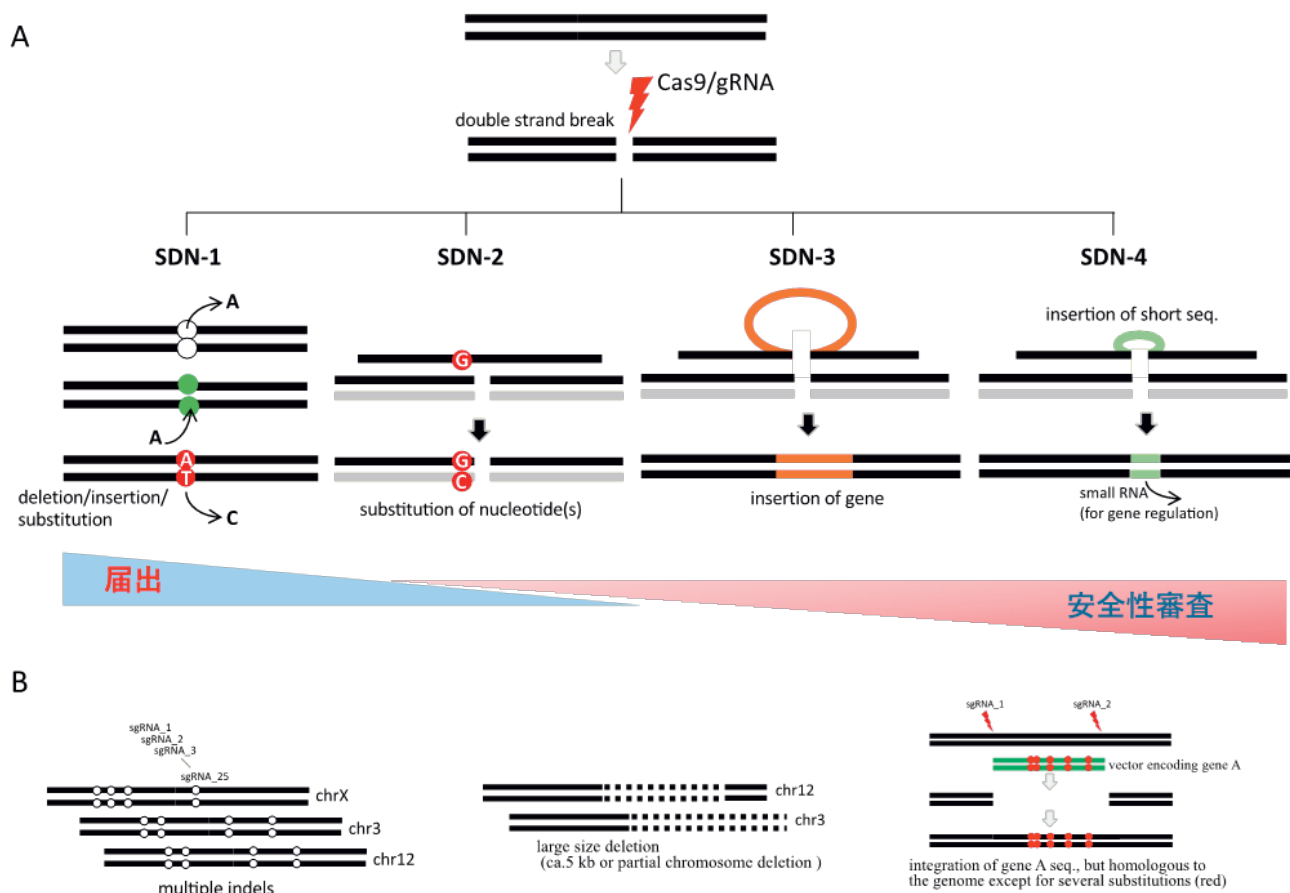


図7 ゲノム編集技術の分類

A, 現在想定可能なゲノム編集技術の分類

B, 判断が難しいと想定される技術パターン

5塩基だけとしても、SDN-3なのか？

- ・ある特定の遺伝子発現調節のためにごく短い配列を挿入した場合（SDN-4）は安全性審査必要か？

などいくつかの事例が想定される。

また、安全性の確認に必要な解析技術について、サザンブロットングに代わり分子特性解析に用いることが多くなった次世代シーケンサー（NGS）の測定技術は日々進歩しているが、取得したデータ解析段階において解決すべきハードルが存在する。塩基置換（SNV）やごく短い挿入欠失（InDels）はDRAGEN-GATKのようなゴールドスタンダードなツールを用いれば高感度かつ高精度で検出可能であるが、大きな欠失やゲノム再構成の検出能力は高くないために他のツールを併用しながら手作業（Manual inspection）に頼るところも大きい。ナノポアシーケンスは、日々精度が向上し、また、一つのリード長が非常に長く（kb～Mb）大きな欠失やゲノム再構成も検出可能であるが、ロングリード用のバリエーションコーラー（variant caller）の精度は機械学習の手法を十分に取り入れているショートリード用のそれら（eg. HaplotypeCaller）に比べて著しく低いため最

終的に手作業で確認する必要がある。想定しない領域での変化を解析ツールで自動的に検出することは容易ではない。また、植物ゲノムはゲノム倍数性が高いものも多く、ジャガイモの4倍体やパンコムギの6倍体、イチゴの8倍体など、ゲノム構造の複雑な生物について解析とその結果の解釈が適切に行うことができるのかも課題の一つである。技術進歩は著しい、近い将来ショートとロングリードのデータを併用した高感度と高精度な検出ができると考えられる。

5. 最後に

これまでの遺伝子組換え植物は、その開発から安全性審査までに100億円単位の莫大な費用と平均16.5年の歳月が必要であった。このため、遺伝子組換え作物の開発はBayerやCorteva Agriscienceなど海外の一部大手バイオテック企業のみが可能であった。ゲノム編集技術を用いた作物は、届出で流通可能となれば安全性審査にかかる時間とコストを大幅に削減できる。そのため、大学から小さなベンチャー企業まで参入可能であり、ゲノム編集技術への期待が大きい。一方で、ゲノム編集技術には非

常に多くの手法が存在し、本技術を利用して作製された製品の安全性確認も単純ではないことから、一定の事例が蓄積されるまでの間ケースバイケースでの対応が必要と考えられる。画期的な農産物の開発などイノベーション創出を後押ししながら両立させていくことが重要である。食品分野におけるゲノム編集技術の利用方法は、生物が持っている負に制御している遺伝子を破壊することで新しい形質を獲得しようという戦略である。しかし、このような内在性遺伝子ノックアウトのアプローチで、たとえば、ビタミンAやD含有など栄養強化を示す食品を作り出すことは一般には非常に難しい。ごく最近、これを打破する研究としてビタミンD3を高度に含有するトマトが開発された²⁶⁾。今後の研究展開を注視したい。国民の遺伝子組換え食品への理解は、これまで必ずしも高くなかった。ゲノム編集食品の理解は、より専門的になるため理解のハードルが上がっているが、受容度は逆に上がっているように感じる。しかしながら、国民が積極的に選択するようになるには、消費者メリットが高くないと難しいとも言える。他の代替手段がなく、かつ、消費者への明確なメリットがあるものが開発されることが望まれる。

引用文献

- 1) Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012;109:E2579-E2586.
- 2) Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015;163:759-771.
- 3) Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I.M., Cox, D.B.T., Shmakov, S., Makarova, K.S., Semenova, E., Minakhin, L., et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA targeting CRISPR effector. *Science* 2016;353, aaf5573.
- 4) Hiroshi Nishimasu, Xi Shi, Soh Ishiguro, Linyi Gao, Seiichi Hirano, Sanae Okazaki, Taichi Noda, Omar O. Abudayyeh, Jonathan S. Gootenberg, Hideto Mori, Seiya Oura, Benjamin Holmes, Mamoru Tanaka, Motoaki Seki, Hisato Hirano, Hiroyuki Aburatani, Ryuichiro Ishitani, Masahito Ikawa, Nozomu Yachie, Feng Zhang, Osamu Nureki. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 2018;361:1259-1262.
- 5) Walton, R. T., Christie, K. A., Whittaker, M. N. & Kleinstiver, B. P. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR- Cas9 variants. *Science* 2020;368:290-296.
- 6) Hess, G.T., Frésard, L., Han, K., Lee, C.H., Li, A., Cimprich, K.A., Montgomery, S.B., and Bassik, M.C. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat. Methods* 2016;13:1036-1042.
- 7) Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016;533:420-424.
- 8) Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mo-chizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., et al. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 2016;353:aaf8729.
- 9) Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A:T to G:C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017;551:64-471.
- 10) Zhao, D., Li, J., Li, S., Xin, X., Hu, M., Price, M.A., Rosser, S.J., Bi, C., and Zhang, X. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat. Biotechnol.* 2021;39:35-40.
- 11) Koblan, L.W., Arbab, M., Shen, M.W., Hussmann, J.A., Anzalone, A.V., Doman, J.L., Newby, G.A., Yang, D., Mok, B., Replogle, J.M., et al. Efficient C:G-to-G:C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning. *Nat. Biotechnol.* 2021;39:1414-1425.
- 12) Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., and Liu, D.R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019;576:149-157.
- 13) Lin, Q. et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.* 2020;38:582-585.
- 14) Wang, S. et al. Precise, predictable multi-nucleotide deletions in rice and wheat using APOBEC- Cas9. *Nat Biotechnol.* 2020;38:1460-1465.
- 15) Gao, Y. & Zhao, Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in*

- vivo* for CRISPR-mediated genome editing. J. Integr. Plant Biol. 2014;56:343-349.
- 16) Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. Boosting CRISPR/ Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2015;112:3570-3575.
- 17) Yao, L. et al. OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. Nat. Plants 2018;4:530-533.
- 18) Mieulet D., Jolivet S., Rivard M., Cromer L., Vernet A., Mayonove P., et al. . Turning rice meiosis into mitosis. Cell Res. 2016;26:1242-1254.
- 19) Oliva, R. et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. Nat. Biotechnol. 2019;37:1344-1350.
- 20) Raffan S., Sparks C., Huttly A., Hyde L., Martignago D., Mead A., Hanley S.J., et al., Plant Biotech J. 2021;19:1602-1613.
- 21) Chilcoat D., Liu Z-B., Sander J., (2017) Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;149:27-46.
- 22) OECD, (2016). Report of the OECD Workshop on Environmental Risk Assessment of Products Derived from New Plant Breeding Techniques. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 61. ENV/JM/MONO(2016)5.
- 23) European Commission, DIRECTIVE 2001/18/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC (2001). <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0018:20080321:EN:PDF>.
- 24) European Commission, COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT - Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16 (2021). https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_ngt_eu-study.pdf.
- 25) Vives-Vallés J. A., Collonnier C., The Judgment of the CJEU of 25 July 2018 on Mutagenesis: Interpretation and Interim Legislative Proposal. Frontiers in Plant Sci. 2020;10:1813.
- 26) Li J., Scarano A., Gonzalez N. M., D'Orso F., Yue Y., Nemeth K., Saalbach G., Hill L., de Oliveira M. C., Moran R., Santino A., Martin C. Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency. Nat Plants (2022). <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01154-6>.