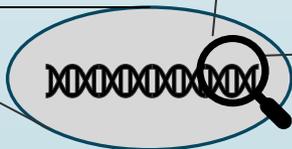


ゲノム編集食品の安全性確保 に向けた国衛研 の取り組みと今後の展望

-----ACTGTATATGCCCGACGGA-----
-----TGACATATACGGGCTGCCT-----



本日の内容

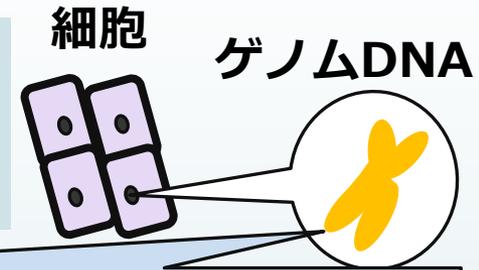
- ゲノム編集食品
- 我が国の制度について
- 国衛研での取り組みと今後の展望について

本日の内容

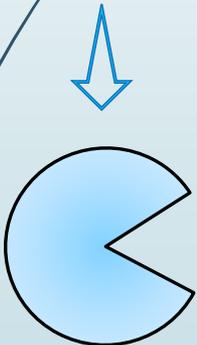
- ゲノム編集食品
- 我が国の制度について
- 国衛研での取り組みと今後の展望について

ゲノムDNA

- 生物の遺伝情報
- 4種類の塩基で構成 (A,T,G,C)
- AとT、GとCは対をなす二本鎖でらせん構造 (DNA)



遺伝子A



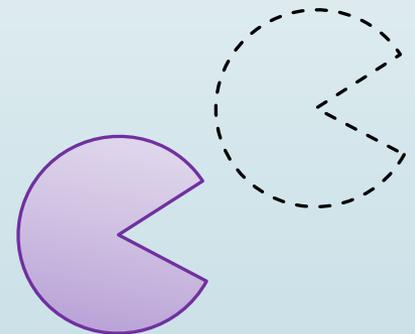
タンパク質A

違う塩基に変異

...ATAC**A**TTGCGTATGATG...
 ...TATG**T**AACGCATACTAC...

塩基欠損

...ATAC TTGCGTATGATG...
 ...TATG AACGCATACTAC...



タンパク質A'

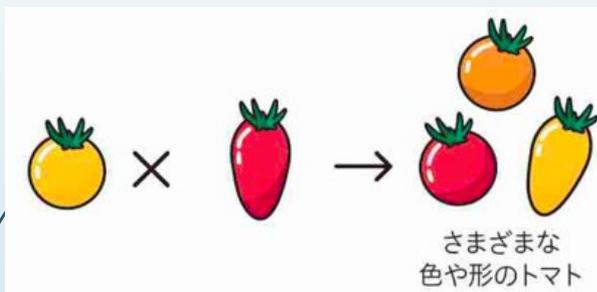
DNA配列が変わると、タンパク質の性質が変化したり、
 タンパク質が作られなくなり、**生物の性質が変わることがある**

現在の育種技術

育種

遺伝子の変化を利用して新しい性質をもつ作物（品種）を作出

交配



突然変異



遺伝子組換え技術



他の生物の有用な遺伝子を導入し、性質を変える

ゲノム編集食品

ゲノム編集技術を用いて作られた食品



DNA切断酵素を用いてDNA配列を切断して変異を導入

厚生労働省
「新しいバイオテクノロジーで作られた食品について」

ゲノム編集技術とは生物が持つゲノムDNA上の特定の配列を狙って改変させる技術



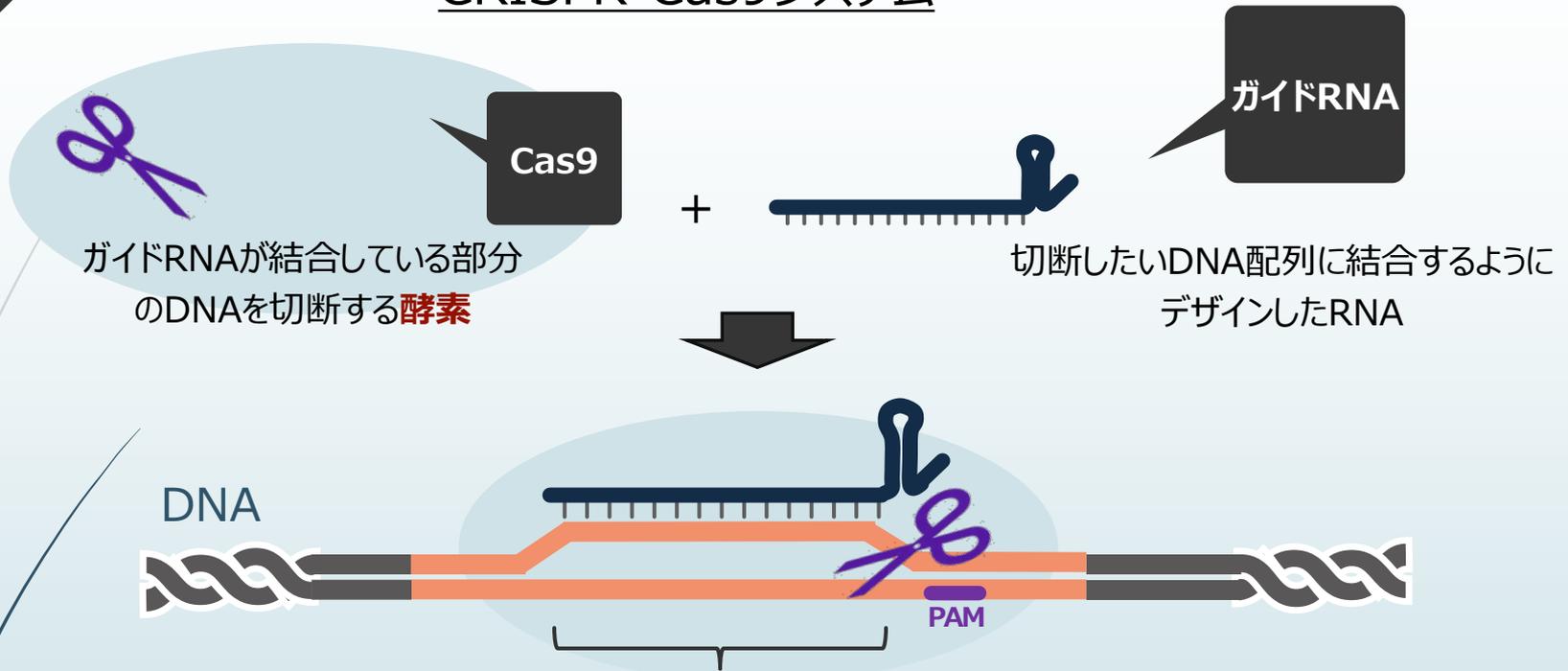
ZFN (1998年～)
TALEN (2009年～)
CRISPR-Cas9 (2012年～)

CRISPR-Cas9
2020年
ノーベル化学賞

ゲノム編集技術

CRISPR-Cas9システム

7



ガイドRNAがゲノム上の約**20塩基**を認識する

4種類の塩基 (A,T,G,C) を20個並べる並び方 : 4の20乗 ($4^{20} \approx 1,000,000,000,000$) → 約1兆通り

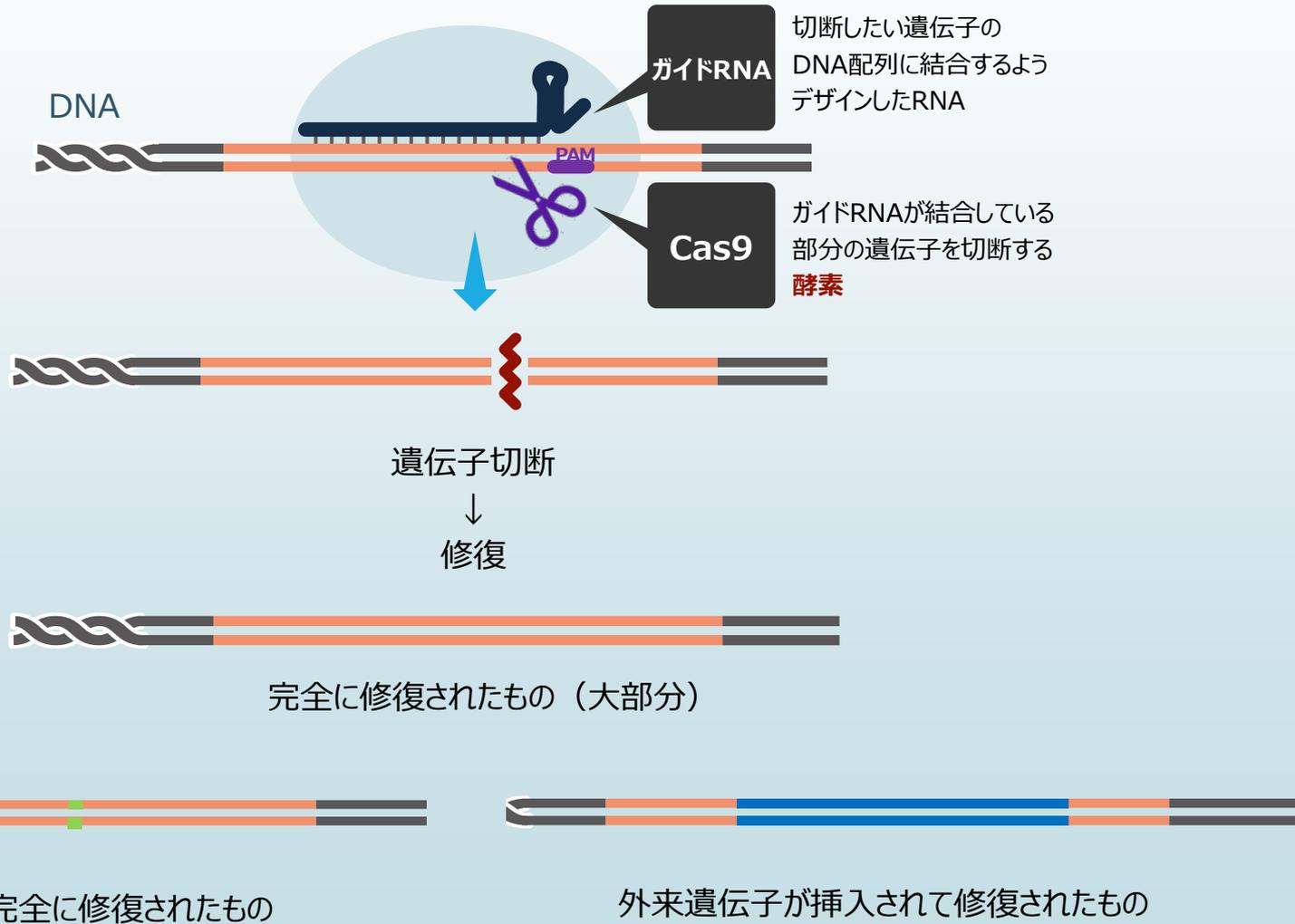
→ 20塩基の並び順が偶然に一致する確率は低い



切断する箇所を特異的に選択できる

ただし数塩基違う配列を認識することもある (オフターゲット編集) ので注意が必要

部位特異的変異導入

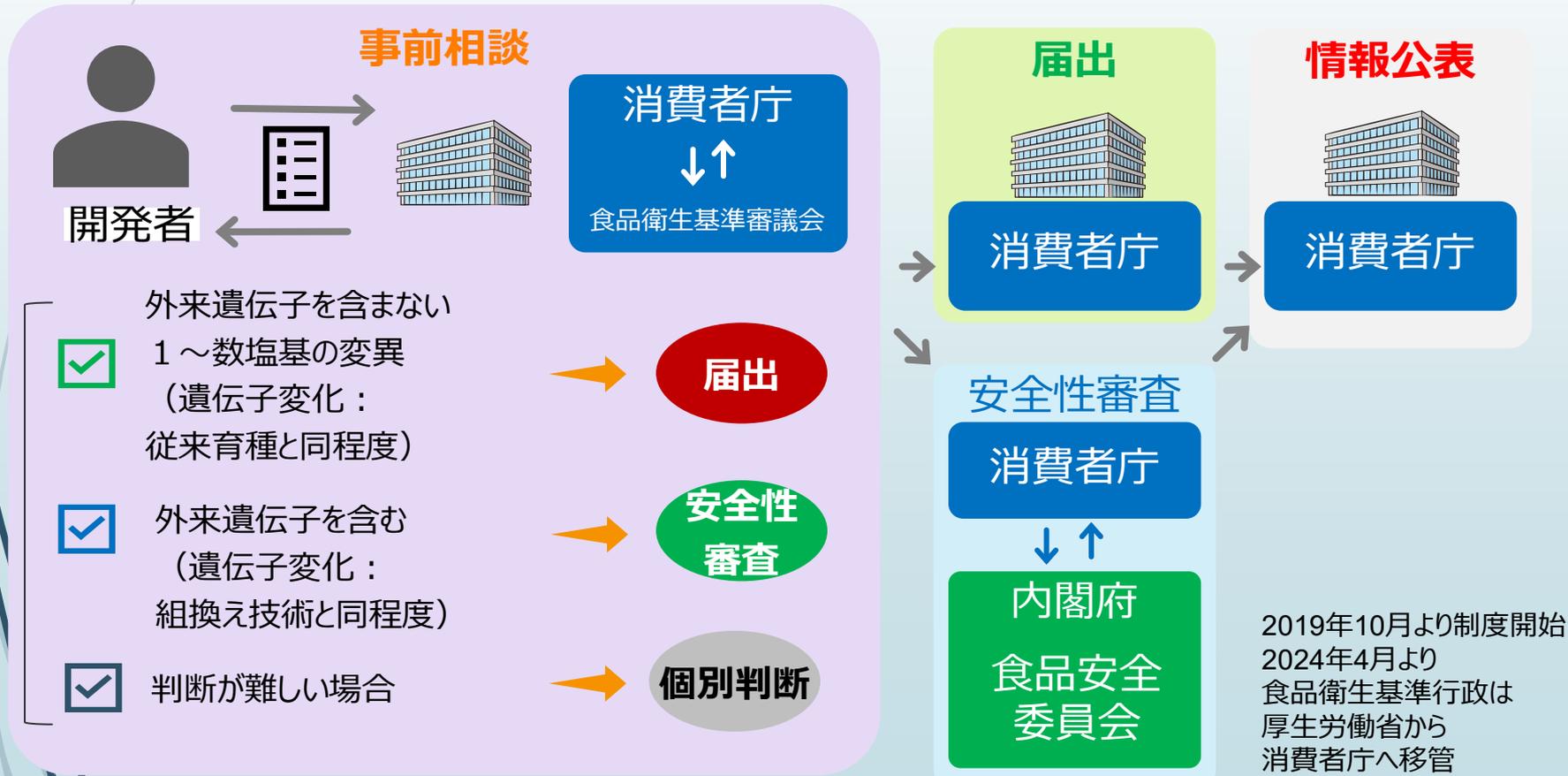


本日の内容

- ゲノム編集食品
- 我が国の制度について
- 国衛研での取り組みと今後の展望について

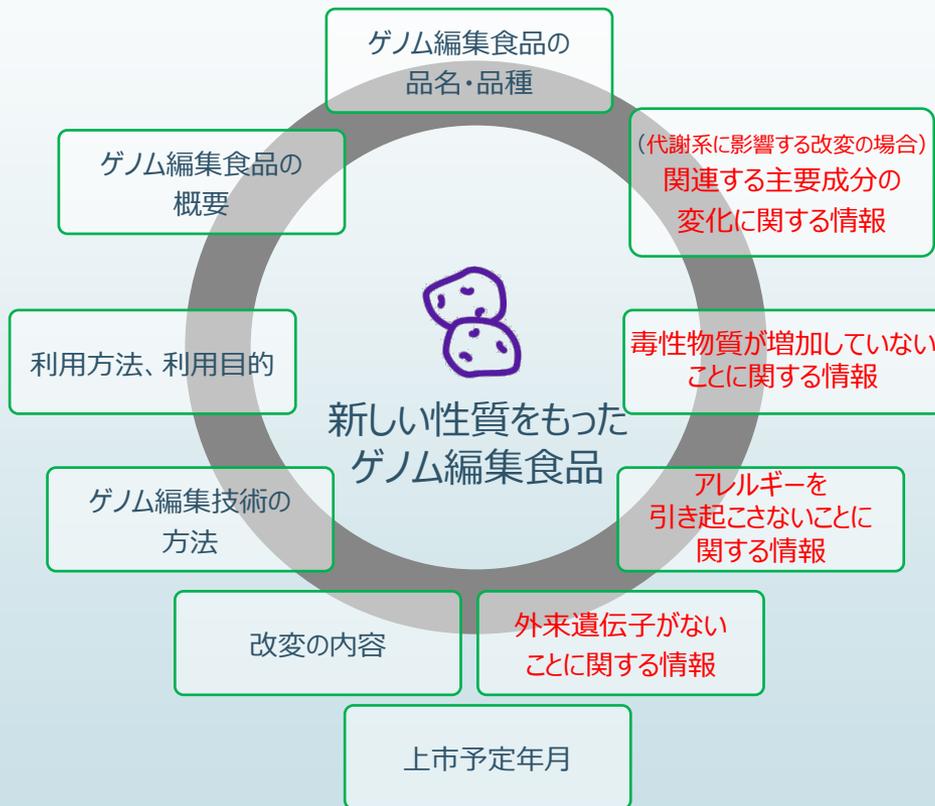
ゲノム編集食品の事前相談・届出制度

開発者が安全性の解析（外来遺伝子や毒性成分の有無の評価等）を十分に行ったか、事前相談で提出された資料を基に専門家（食品衛生基準審査会）が確認



ゲノム編集食品の安全性確保に重要なポイント

外来遺伝子を含まない
1～数塩基変異した
ゲノム編集食品

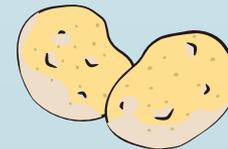
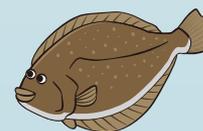


薬生食基初0919第3号
令和元年9月19日
ゲノム編集技術応用食品等の取扱いに関する留意事項

届出情報が公開されたゲノム編集食品

消費者庁HPより（2024/10/16 時点、一部改変）

| 品目名 | 届出日 | 開発者 | 上市日 |
|---|-----------------|-----------------------------|----------|
| グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の一部を改変し GABA含有量を高めたトマト | 2020年 12月11日 | サナテックシード株式会社 | 2021年9月 |
| グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の一部を改変し GABA含有量を高めたトマト | 2023年 7月27日 | サナテックライフサイエンス株 式会社 | 未定 |
| 可食部増量マダイ | 2021年 9月17日 | リージョナルフィッシュ 株式会社 | 2021年10月 |
| 可食部増量マダイ 別系統 | 2022年 12月5日 | リージョナルフィッシュ 株式会社 | 2023年1月 |
| 高成長トラフグ | 2021年 10月29日 | リージョナルフィッシュ 株式会社 | 2021年11月 |
| 高成長トラフグ 別系統 | 2022年 12月5日 | リージョナルフィッシュ 株式会社 | 2023年1月 |
| ワキシーとうもろこし | 2023年 3月20日 | パイオニア・ハイブレッド・イン ターナショナル社 | 未定 |
| 高成長ヒラメ | 2023年 10月24日 | リージョナルフィッシュ 株式会社 | 2024年4月 |
| 高小型塊茎（かいけい）数ジャガイモ | 2024年 10月16日 | J.R. Simplot Company | 未定 |



本日の内容

- ゲノム編集食品
- 我が国の制度について
- 国衛研での取り組みと今後の展望について

ゲノム編集食品の安全性確保

科学的な検証が必要

① 外来遺伝子の残存の無いことの確認

- ・ 意図しない挿入は無いか
- ・ 設計されたガイドRNAは意図しないオフターゲット編集を起こさないか

② アレルゲン性の確認

- ・ 改変した遺伝子産物は新たなアレルゲン性を有しないか

外来遺伝子確認に係るNGS解析の標準化



消費者庁
「ゲノム編集技術応用食品等の取扱いに関する留意事項」より

③外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認に関する情報

○ゲノム編集技術の利用の際に外来遺伝子の導入し、その後除去した場合は、外来遺伝子及びその一部の残存がないことを、サザンブロット、**次世代シーケンサー**、PCR等の適切な手法により確認すること

外来性遺伝子がゲノムに残存していないか
どのようにして確認するか？



取扱要領では一例として、次世代シーケンサー（NGS）
による全ゲノムシーケンス（WGS）を挙げている

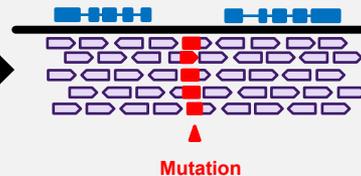
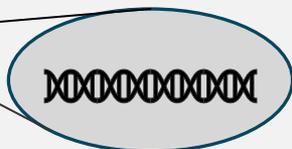


ただしNGSによるWGS解析に係る
標準的な解析手法やその必要要件は定められていない



標準的な解析手法及び必要要件を定める必要

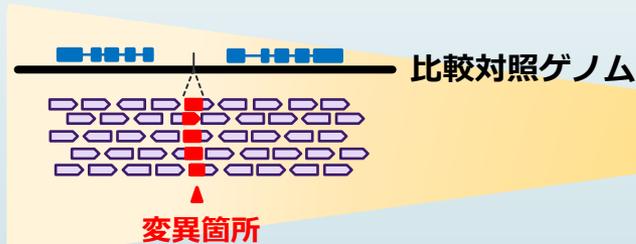
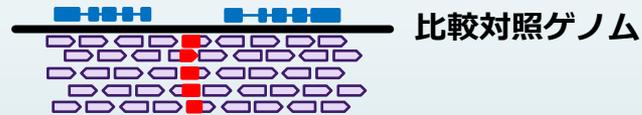
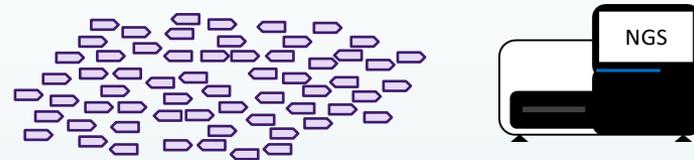
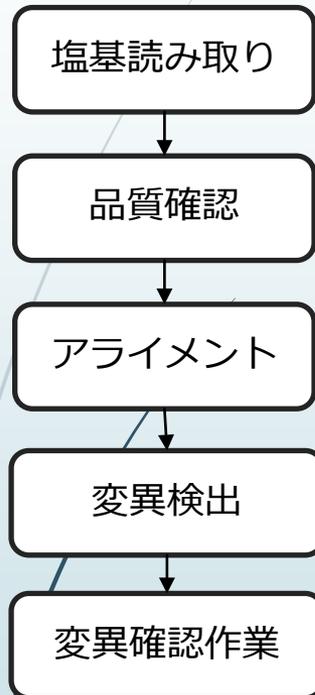
次世代シーケンサー（NGS）とは数百万～数十億もの膨大なシーケンス反応を同時並行で実行する技術



比較対照ゲノム

Mutation

WGSによる変異解析の一般的な流れ



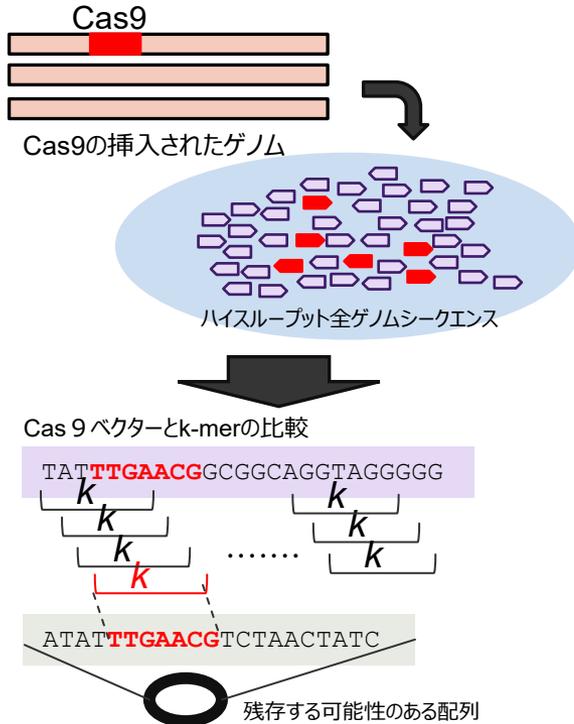
問題点

- ・参照配列が未整備の場合には解析が困難

NGSを用いた解析方法

仮に残存する可能性のある配列（Cas9等）が分かっている場合、

1. k-mer法



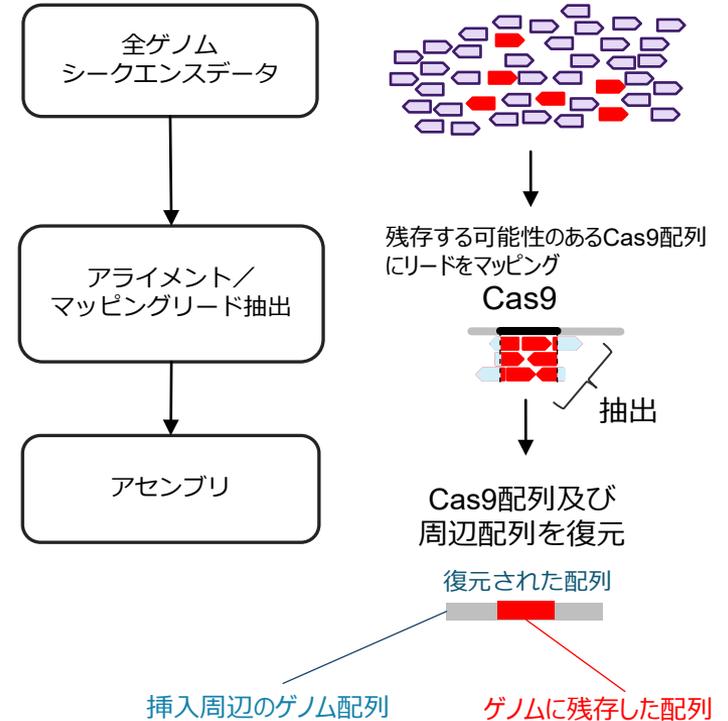
Itoh et al. *Sci Rep.* (2020) 10:4914

➡挿入の有無がわかる

2. Capture-based target enrichment



3. Assembly法



➡挿入の有無、位置、配列がわかる

オフターゲット変異部位の予測法

アレルギーや毒性物質産生に繋がりうる遺伝子の変異



オンターゲット部位での変異に加え、
オフターゲット部位での変異の可能性もある



取扱要領ではオフターゲット変異部位の予測と
その予測部位での検証を求めている



消費者庁
「ゲノム編集技術応用食品等の取扱いに関する留意事項」より

④確認されたDNAの変化がヒトの健康に悪影響を及ぼす新たなアレルギーの産生及び含有する既知の毒性物質の増加を生じないことの確認に関する情報

○オフターゲットが起こる蓋然性の高いと推定される配列についてCRISPRdirect等適切な複数の検索ツールを必要に応じて組合せて確認し、アレルギーや既知の毒性物質との相同性検索等により照合し、その結果を提出すること。また、使用した検索ツール等の名称及びバージョン等を明らかにすること。

＜オフターゲット変異部位の予測＞

in silico 解析
(コンピュータ解析)

☞利用するガイドRNA配列とゲノムDNA配列の相同性を
基にした予測

in silico
ツール

in vitro (試験管内) 解析, *in cell* 解析
☞実験ベースの解析

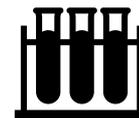
in vitro または *in cell*での切断をもとにした
先入観のない予測

標的ゲノム
シーケンス

全ゲノム
シーケンス

コスト

解析の煩雑さ



オフターゲット候補予測では*in silico*ツールが一般的



オフターゲット部位を漏れなく検出できているのか？

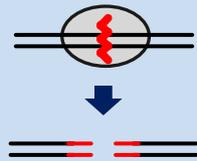


*in vitro*解析としてSITE-Seq法を検証

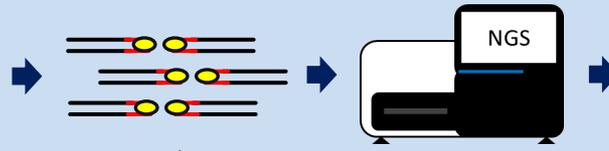
in vitro予測法の有用性

SITE-Seq法とは

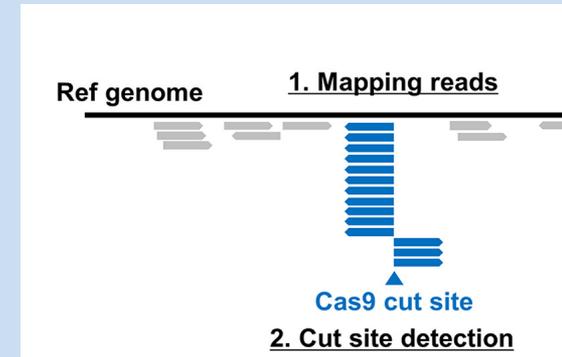
Cas9/ガイドRNA



Cas9によって切断
(オン/オフ)

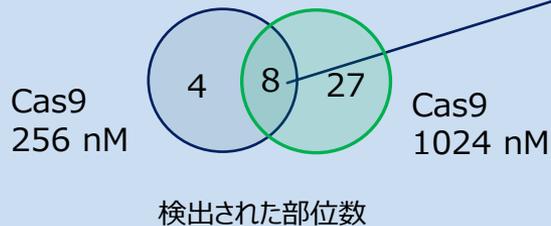


切断箇所にビオチン付加
/濃縮



イネゲノムを用いたSITE-Seq法による解析

予測部位の変異をゲノム編集イネで評価



非典型的PAM

| | |
|---|----------------------|
| A A T T T G A T A T A C A G T G A C T C C A T T C T T G A T G A T | Reference |
| A A T T T G A T A T A C A G T G A C T C C A T T C T T G A T G A T | 56.06% (25763 reads) |
| A A T T T G A T A T A C A G T G A C T C C A T T C T T G A T G A T | 13.44% (6177 reads) |
| A A T T T G A T A T A C A G T G A C T C C A T T C T T G A T G A T | 0.61% (282 reads) |
| A A T T T G A T A T A C A G T G A C T C C A T T C T T G A T G A T | 0.12% (56 reads) |

変異箇所

*in silico*ツールでこの部位を検出するには検索条件を緩くする必要があり、現実的には困難

→ オフターゲット候補部位の探索におけるSITE-Seq法の有用性を示唆

Narushima J. et al. *Genes to Cells*. (2022), 12, 706

SITE-Seq解析の標準化

in vitro解析の技術的障壁

- ゲノムデータの解析には情報処理技術の知識が必要
 - 解析環境（使用するツールやそのバージョンなど）によって解析結果が変わる可能性
- SITE-Seq解析にて、こうした障壁を解消する

Galaxy for Cut Site Detectionを開発、公開
Docker imageを配布

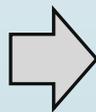
👉 (生化学部HP)

通常のゲノムデータ解析

```

1 #!/bin/bash
2 b_time=$(date +%H:%M:%S)
3
4 tmp=$(mktemp)
5 c1=0
6 c2=1
7
8 for f in $(ls *.fastq.gz); do
9   do
10    c2=$((c1+1))
11  done
12
13 for f in $(ls *.fastq.gz); do
14   do
15    g=$(echo $f | sed 's/\.fastq\.gz$//')
16    echo $c2, $(cat $f | gunzip | fold -w 80 -n 1 | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n' | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n')
17    c2=$((c2+1))
18  done
19
20 id=$(date +%H:%M:%S)
21
22 date >> $tmp/$id.log
23 echo -e "\n $(date +%H:%M:%S) - $(cat $f | gunzip | fold -w 80 -n 1 | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n' | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n') >> $tmp/$id.log" >> $tmp/$id.log
24
25 fastqc $f > $tmp/$id_fastqc.log
26
27 if [ -e reference_genome_1.txt ]; then
28   echo "Index files exist. Skip index build."
29 else
30   bowtie2-build -f reference_genome.fasta reference_genome
31 fi
32
33 bowtie2 \
34   -x reference_genome -p 8 \
35   -U $(cat $f | gunzip | fold -w 80 -n 1 | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n' | fold -w 80 -n 1 | tr -d '\n') \
36   -S sam$(id).sam >> $tmp/$id.sam
37
38 samtools sort \
39   -@ 8 \
40   -o bam \
41   -o sam$(id).bam sam$(id).sam \
42   && mv -f sam$(id).bam sam$(id).sorted.bam
43
44 samtools index sam$(id).sorted.bam
45

```

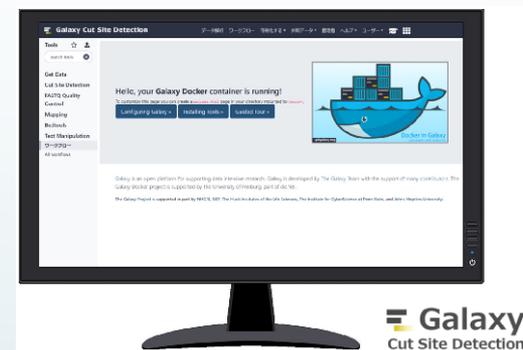


Webブラウザ画面上で必要な情報を入力するだけで解析が完了

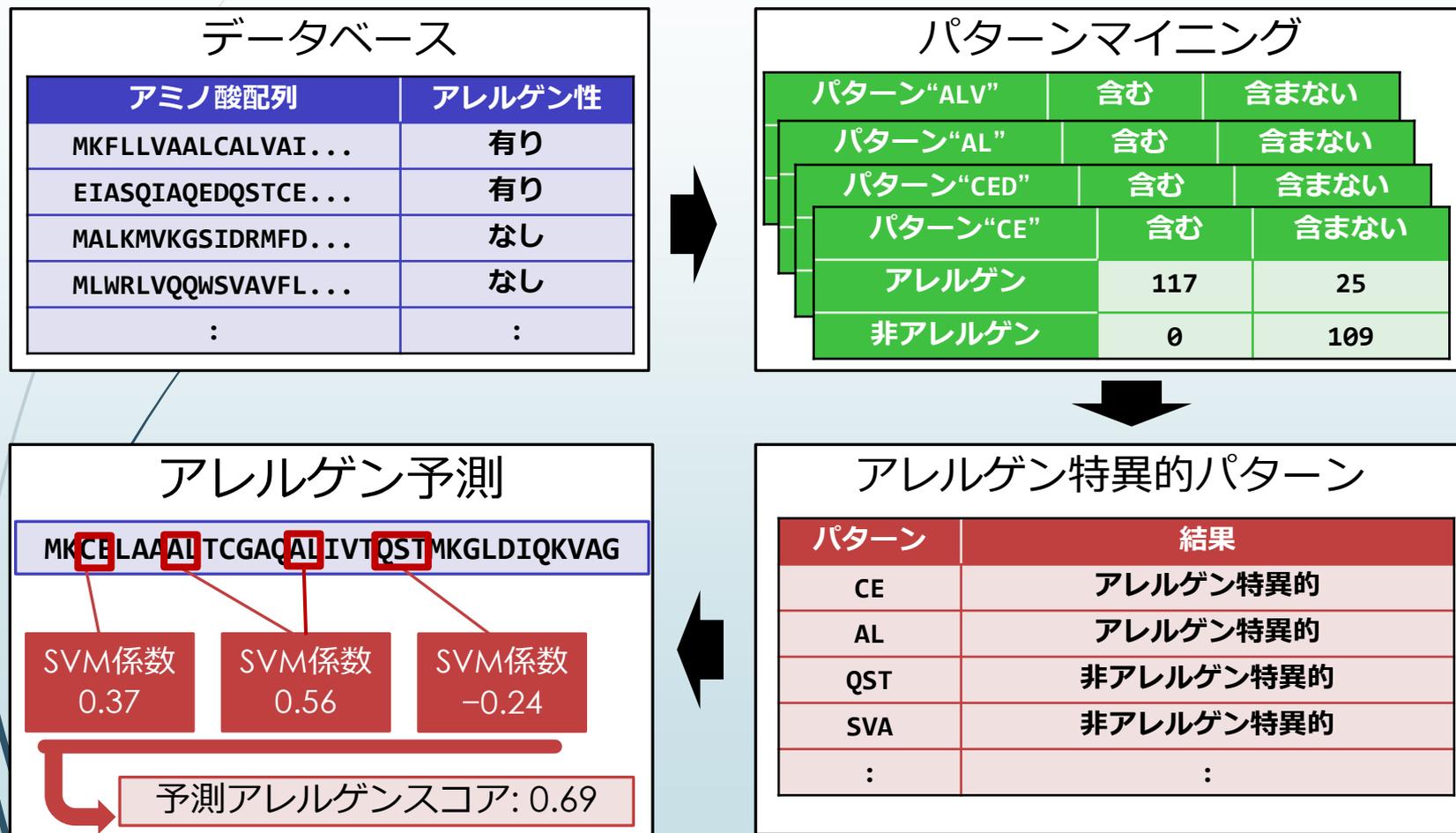
SITE-Seq解析データ

対象生物の参照配列

対象生物の遺伝子情報



allerStatの開発



安全性確保の取り組み周知と 現在の安全性確認手法に関する調査研究

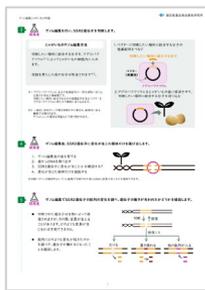


ゲノム編集食品の安全性はどのように確保されているのかを周知

安全性確保の取り組みを紹介する情報提供媒体の作成、情報発信

国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
National Institute of Health Sciences, Division of Biochemistry

リスクコミュニケーションに関する資料



生化学部HP

現在の安全性確認手法の良い点や改良の余地がある点を検討

生命科学分野の研究者から安全性確認手法に対する意見を収集

必要な確認が行われているか？

確認が不十分な
ところがある
32%

必要な確認が
行われている
68%

現在の安全性確認手法について ・ 良い点
・ 改善すべき点
・ 取り入れるべき視点 などを調査

↓ 行政にフィードバック

リスクコミュニケーション

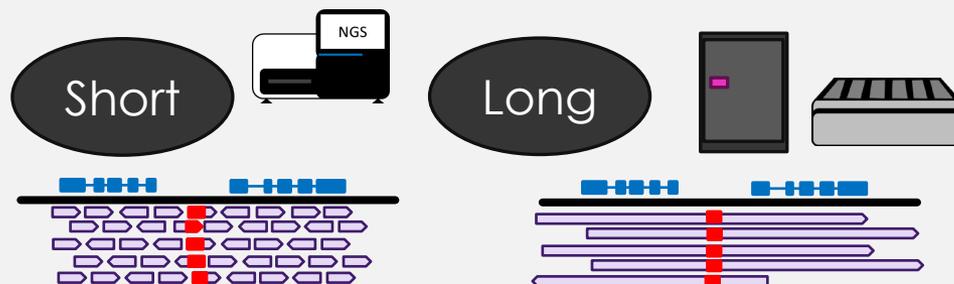
様々なステークホルダーとの議論を踏まえ、規制のあり方を更新し続ける必要性

ゲノム編集食品の規制の今後

科学

☞ 科学技術の進歩への対応

- ・ 評価方法の見直し

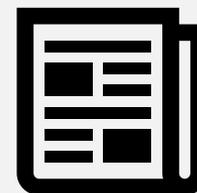


- ・ 新しい編集技術

社会

☞ 表示について

現段階では食品表示基準の対象外
(自然変異と見分けがつかない)



☞ 国際調和

各国の規制の違いと輸出入時の取扱い





国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
National Institute of Health Sciences, Division of Biochemistry

国立医薬品食品衛生研究所へのリンク

English



生化学部は、分子生物学・免疫学・分析化学を基盤としてゲノム編集技術等のバイオテクノロジー技術（遺伝子編集）を活用した新開発食品、医薬品、化粧品・医薬部外品等に含まれる物質の、免疫毒性やアレルギー性など安全性に関する生化学的試験・研究を行っている。また、放射線の安全管理、放射線照射による放射能汚染の分析・評価に関する試験・研究を実施している。これらの研究業務は、研究所内各部署および外部研究機関と協力しながら行っている。研究を通じて得られた科学的知見を応用して、厚生労働省、消費者庁、食品安全委員会等と連携して必要な行政支援活動等を行っている。

<http://www.nihs.go.jp/dnfi/>

- 1室 食品中の放射性物質に関する研究、管理
- 2室 遺伝子組換え・ゲノム編集食品に関する研究
- 3室 食品中のアレルゲンに関する研究
- 4室 業務関連物質の生態影響評価に関する研究

ご清聴ありがとうございました！
これからも一生懸命頑張ります！！

謝辞

共同研究者

東京農業大学 志波優先生
宮崎大学 権藤崇裕先生グループ
昭和女子大学 近藤一成先生
名古屋大学 竹内一郎先生グループ
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部の皆様

研究費

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」



to be continued...

200-NIHS

Since 1874

200th Anniversary

150
NIHS
Since 1874
150th Anniversary