

ゲノム編集技術応用食品（トウモロコシ）の事前相談に係る確認結果

「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」（令和元年 9 月 19 日付け生食発 0919 第 3 号）に基づき、令和 3 年 7 月 9 日付けでコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社より事前相談のあったトウモロコシについて、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会新開発食品調査部会遺伝子組換え食品等調査会の委員及び参考人の意見を聴き、以下の内容について確認した。

1. 提出資料の確認

(1) 開発した食品の品目・品種名及び概要（利用方法及び利用目的）

【PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ】

デントトウモロコシの近交系品種 PH1V69 系統を用いて、アミロース合成酵素遺伝子（*Wx1* 遺伝子）を欠失することで、子実デンプンのアミロース含有量が減少し、アミロペクチン含有量を増加させたものである。

(2) 利用したゲノム編集技術の方法及び改変の内容

- ①パーティクルガン法により、デントトウモロコシ PH1V69 系統の未熟胚に、プラスミドを 6 種類（3 種類は Cas9 タンパク質及び 2 種類のガイド RNA、残り 3 つは選抜マーカー及び植物体の再生向上の遺伝子配列を有する）移入した。
- ② 2 種類のガイド RNA により、*Wx1* 遺伝子の 5' 側プロモーター領域及び 3' 側非翻訳領域内の標的配列がそれぞれ切断され、*Wx1* 遺伝子を含む約 4 kb が欠失することで、アミロペクチン含有量が増加した。

(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

- ① CRISPR/Cas9 を導入した〇〇〇系統について、塩基配列解析により標的配列に欠失があることを確認した（ T_0 世代）。
- ② 標的配列に欠失が確認された T_0 世代 1 系統と従来品種（PH1V69 系統）の戻し交配により得られた世代（ BC_0 世代）において再度塩基配列解析を実施し、標的配列に欠失があることを確認した。
- ③ BC_0 世代（9 個体）において、定量 PCR 及び Southern-by-Sequencing (SbS) 分析により移入したプラスミド由来の配列が宿主ゲノム上に残存していないことを確認した。

(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ゲン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

- ① オフターゲット候補の探索及び確認

- ・ 自社ソフトウェア（CRISPRDirect 及び Cas-OFFinder と同等の検索精度）を用いて 2 種類のガイド RNA の配列に対して、候補配列として検索したところ、2 塩基までのミスマッチを含む配列を候補配列として検索した結果、1 箇所の候補が示された（Cas-OFFinder においても同様の結果が得られた）。
 - ・ 候補配列について、BC₀ 世代と従来品種（PH1V69 系統）の戻し交配により得られた世代（BC₁ 世代）29 個体で塩基配列解析を実施し当該配列にオフターゲット変異がないことを確認した
- ② オープンリーディングフレーム（ORF）解析によるアレルゲン性及び毒性の確認
- ・ 変換部位の領域に対して 6 つの読み枠すべてで新たな ORF の有無を確認した結果、2 つの ORF 候補が推定された。
 - ・ 推定された 2 つの候補について Comprehensive Protein Allergen Resource データベースを用いて検索したところ、該当するアレルゲンは認められなかった。
 - ・ さらに、UniProtKB/Swiss-Prot に登録されている毒性又は健康影響を生じる可能性のあるタンパク質を対象に、BLASTP を用いた相同性検索を行ったところ該当する毒性タンパク質は認められなかった。

（5） 特定の成分を増加・低減させるため代謝系に影響を及ぼす変換を行ったものについては、標的とする代謝系に関連する主要成分（栄養成分に限る。）の変化に関する情報

- ① 代謝系に影響を及ぼす変換を行った。
- ② *Wx1* 遺伝子がコードするアミロース合成酵素は、ADP グルコースからアミロースを合成する反応を触媒する酵素である。本品目においては、*Wx1* 遺伝子を欠失することで、子実デンプンのアミロース含有量が減少し、アミロペクチン含有量が増加した。BC₁ 世代の自殖により得られた BC₁ F₂ 世代においてヨウ素ヨウ化カリウム染色を実施したところ、赤褐色を呈する子実が認められ、ワキシー形質が付与されたことを確認した。

アミロース合成酵素の反応は特異的であり、他の代謝系への影響は低いと考えられる。

また、同様の形質を有する従来育種で作成されたワキシートウモロコシは食品として長い利用経験があり、人の健康に影響を及ぼす可能性は低い。

2. 確認結果

（1） 確認結果の概要

- 選抜した BC₀ 世代（9 個体）について、移入したプラスミド由来の配列が宿主ゲノム上に残存していないことが確認されたことから届出に該当するものと判断した。

（2） 確認結果の詳細（別添参照）

- ① 外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認については、選抜した BC₀ 世代（9 個体）において、定量 PCR 及び Southern-by-Sequencing (SbS) 分析を用いて確認が行われた。これらにより、外来遺伝子及びその一部の残存がない

この確認が適切に行われていると判断した。

- ② 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ゲン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ついては、オフターゲット候補及び標的配列において実施された。

・ オフターゲット候補

ソフトウェアを用いて2種類のガイド RNA に対して、2塩基まで異なる配列を検索した結果、候補配列として1箇所特定された。

この候補配列について、BC₁ 世代(29 個体)において塩基配列解析を実施し、該当配列にオフターゲット変異がないことを確認した。

・ 標的配列の変異

標的配列の変異の結果、新規に発生の可能性がある ORF を抽出したところ、可能性のある ORF が2つ推定された。

それらについてデータベースを用いて検索し、該当するアレルゲン及び毒性タンパク質がないことが確認された。

これらのことから、新たなアレルゲン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については適切に確認が行われていると判断した。

- ③ 標的とする代謝系に関連する主要成分（栄養成分に限る。）の変化に関する情報については、BC₁ F₂ 世代においてヨウ素ヨウ化カリウム染色を実施し、アミロース含有量が減少しアミロペクチン含有量が増加していることが確認された。アミロース合成酵素の反応は特異的であり、他の代謝系へ影響が生じる可能性は低いと考えられた。

このことから、代謝系への影響について適切に確認が行われていると判断した。

(参考) 事前相談資料の確認事項の主な経緯

日付	事項	備考
令和3年 7月9日	事前相談資料を受理	
	事前相談資料の内容について、専門家の意見を聴き、指摘事項の発出及び事前相談者からの回答を確認	
令和5年 3月7日	遺伝子組換え食品等調査会	非公開(注1)
令和5年 3月8日	結果を事前相談者に連絡	
令和5年 3月20日	届出受理	

(注1) 開発企業の知的財産等が開示され特定のものに不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため

(表) 確認結果の概要

確認事項	詳細
品種	デントトウモロコシ
ゲノム編集ツール	CRISPR/Cas9
遺伝子導入方法	パーティクルガン法
遺伝子ターゲット領域	<i>Wx1</i> 遺伝子 (アミロース合成酵素遺伝子)
変更の内容	<i>Wx1</i> 遺伝子の 5'側に位置するプロモーター領域及び 3'側に位置する非翻訳領域の約 4 kb の領域欠失による遺伝子欠失
外来遺伝子有無確認方法	定量 PCR 法、Southern-by-Sequencing (SbS) 分析法 →外来遺伝子のないことを確認
オフターゲット候補探索に使用したツール	自社ソフトウェア (CRISPRdirect 及び Cas-OFFinder と同程度の検索能)
オフターゲット候補探索結果	検索条件：2塩基ミスマッチ 検索件数：1箇所
オフターゲット候補の確認	検索された候補配列について、塩基配列解析を実施 →オフターゲット変異のないことを確認
オープンリーディングフレーム (ORF) 解析	自社ソフトウェアを使用
アレルゲンの確認	・新規に発生の可能性がある ORF として 2つ推定された ・推定された ORF について、Comprehensive Protein Allergen Resource データベースを利用し、80 アミノ酸以上について 35%を超えて一致する配列および 8 アミノ酸以上で完全に一致する配列を有する既知アレルゲンを検索 →該当するアレルゲンがないことを確認
既知の毒性の増加の確認	・推定された ORF について UniProtKB/Swiss-Prot (https://www.uniprot.org/) に登録されている毒性又は健康影響を生じる可能性のあるタンパク質を対象に、BLASTP を用いた相同性検索 →該当する既知毒性タンパク質がないことを確認
主要成分 (栄養成分の確認)	→ヨウ素ヨウ化カリウム染色法により、アミロース及びアミロペクチン含有量の確認 →アミロース含有量の減少及びアミロペクチン含有量の増加を確認

(別添)

ワキシートウモロコシに係る主な確認内容と方法

世代	系統の詳細	標的部位の変異導入	外来遺伝子の有無の確認		オフターゲット変異の確認*1	ワキシー形質の確認
		塩基配列解析 (Sanger Sequencing)	定量 PCR	Southern-by-Sequencing*2 (SbS) 法	塩基配列解析 (Sanger Sequencing)	ヨウ素ヨウ化カリウム 染色法
T ₀	1個体	○	-	-	-	-
BC ₀	9個体 (従来品種との戻し交配)	○	○	○	-	-
BC ₁	29 個体 (従来品種との戻し交配)	-	-	-	○	-
BC ₁ F ₂	BC ₁ 3個体由来の子実 33 粒 (BC ₁ 世代の自殖)	-	-	-	-	○

*1 自社データベースと連携したソフトウェアを用いて検索 (CRISPRdirect 及び Cas-OFFinder と同様の性能)

*2 キャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた手法 (サザンブロット法と同程度の感度)