

遺伝子組換え食品等（種子植物）に係るリスク評価における次世代シーケンサーの取り扱いに関する資料

1. 欧州食品安全機関（EFSA）

欧州では「遺伝子組換え植物からの食品および飼料のリスク評価に関するEFSAガイダンス」¹⁾において、遺伝子組換え植物のゲノムに挿入されたDNA配列について、分子特性解析を行う必要があると定められている。

上記DNA配列解析の要件等について、EFSAは、申請者向けの技術文書として「遺伝子組換え植物の分子の特性評価に用いるDNAシーケンスの品質に関する技術文書」²⁾を作成し、GM植物の分子的特性評価の一部として求められるDNA配列決定の技術に関する要件や推奨事項等を定めている。

このうち、次世代シーケンサー（NGS）に特有の要件として、以下のような事項（使用した技術、配列決定方法、実験デザインの詳細等）が定められている。

- ・データ品質に関して。各実験で生成されたリード（読み取り）の数および品質統計情報、データ生成に使用したシーケンスプラットフォームに関する情報。
- ・各シーケンスランの生のリード数（シーケンストリミングやクオリティフィルタリングは、トリミング戦略や破棄リード数等について申請書ですべて説明する必要）。
- ・シーケンスライブラリーの調製方法とシーケンシング化学等に関して。（各ライブラリーの構築方法の詳細な説明。配列捕捉法を用いる場合は、すべての実験手順やプローブデザインとそれらによるキャプチャー効率等がどう評価されたか説明）。
- ・リード深度に関して。使用した方法論と技術等の情報。（平均）リード深度を正当化する必要（全ゲノムシーケンス（WGS）の場合、平均リード深度とその変動に関する情報。）^{*}。

^{*} WGSが挿入DNAおよびバックボーン配列に起きている可能性のある挿入の同定に使用される場合、全ゲノムにわたる平均リード深度を推定することが必要。ゲノムリソースが存在しない場合、以下のLander-Waterman式³⁾を用いる。

$$\text{カバレッジ(平均リード深度)} = \frac{\text{リード数} \times \text{リード長}}{\text{推定ゲノムサイズ}}$$

Lander-Waterman式については、プラットフォームや配列固有のバイアスを考慮しておらず⁴⁾、リード深度は必ずしもゲノム全体で均一ではないため限界がある⁵⁾。また、使用する技術や各GM植物のゲノムが平均リード深度の計算に影響を与える可能性があるため、申請者はミトコンドリアやプラスチドDNAに対応するリード数の評価や核DNAの読み取り深度の正当化を検討する必要がある⁶⁾。

最小リード深度は、使用されるアプローチを含む様々な要因に依存する。例えば、現在のNGS技術では、挿入DNAおよびその周辺領域の配列決定にショートリード技術が使用される場合、最小リード深度は40未満であってはならない。

- ・ バイオインフォマティクスについて。NGSデータセットの様々なバイオインフォマティクス解析のために使用した方法論、ツールやパイプラインに関する情報。

2. カナダ保健省（HC）、カナダ食品検査庁（CFIA）

カナダにおいて、新規形質転換植物（PNTs）については、上市前評価を受けることが求められている。HCが作成した申請者向けガイドライン⁷⁾において要求しているデータには、そのイベント（遺伝子組換え体）に含まれる遺伝的変化の性質と安定性を明確に解釈するための証拠として、以下のデータが含まれる。

- ・ 挿入、削除、または修飾されたDNA
- ・ 挿入されたDNAの完全コピーまたは部分コピーの数
- ・ 挿入又は改変された遺伝的要素（コード領域、調節領域及びその他の非コード領域を含む）の構成；適切な場合には、挿入DNA及びその周辺領域の配列データ（例えば、部分挿入又は再配置を特徴付けるために）
- ・ 遺伝的変化の遺伝様式と安定性。

これらをWGSに基づく分析結果として提示する際に、申請者が考慮すべき事項（WGS試験のデザインと方法論、データ解析等）について、HC及びCFIAは「新規食品、新規飼料、および新規形質を持つ植物の市販前評価をサポートするための全ゲノムシーケンス（WGS）データ提出のためのガイダンス」⁸⁾として以下の通り定めている。

- ・ WGS試験のデザインに関する情報
シーケンス装置メーカー・モデル、搭載ソフトウェアのバージョン、DNA試料の調製方法（断片サイズの分布含む）、WGS試験の意図と理論的根拠の情報等。
- ・ WGSデータ解析に関する情報
データ解析パイプラインのステップごとの情報、リード出力に施されたデータクリーニングやエラー訂正等の説明、データ品質報告書（FASTQCCなど。リード長、リード数、GC含有率などを含む）、使用したプログラムやアルゴリズムに関する情報、パイプラインの各ステップの目的と結果、リードをマッピングするための参照配列に関する情報、カバレッジが結論にとって適切である理由等
- ・ WGSデータの表示方法
対象とする分子特性評価のエンドポイントによって異なる。表示する物の例としては、リード出力データの品質を示すグラフ、対象遺伝子座のカバレッジのばらつきを示すカバレッジマップ、予期せぬ配列の変異への説明、従来の分子生物学的手法が併せて用いられた場合の説明等。

【参考文献】

- 1) EFSA, 2011. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2150, 37 pp.
- 2) EFSA, 2018. Technical Note on the quality of DNA sequencing for the molecular characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal* 2018; 16(7):5345,
- 3) Lander ES and Waterman MS, 1988. Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics*, 2, 231–239.
- 4) Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, Nusbaum C, Jaffe DB, 2013. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, 14, R51.
- 5) Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A and Ponting CP, 2014. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15, 121–132.
- 6) Lutz KA, Wang W, Zdepski A and Michael TP, 2011. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnology*, 11, 54.
- 7) Health Canada, 2006. Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/nf-an/guidelines-lignesdirectrices-eng.php#a4.1.3.1>
- 8) Health Canada and the Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Guidance For Submitting Whole Genome Sequencing (WGS) Data To Support The Pre-Market Assessment Of Novel Foods, Novel Feeds, And Plants With Novel Traits. <https://inspection.canada.ca/animal-health/livestock-feeds/novel-feeds/guidance/eng/1547154845895/1547154883652>