

様式第3（第3の1の（2）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供
（情報提供書の提出）

2022年12月6日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長 宛

氏名 リージョナルフィッシュ株式会社(7130001064314)

代表取締役社長 梅川 忠典

提出者 住所 〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1

京都大学国際科学イノベーション棟

電話番号 075-600-2963

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等をするため、「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について」（令和元年10月9日付け元消安第2743号農林水産省消費・安全局長通知）第3の1の（2）の①の規定に基づき、当該生物の使用等に関する情報提供書を提出します。

様式第 1（第 3 の 1 の（1）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書

項目	記入欄
1 ゲノム編集技術の利用により得られた生物の名称及び概要	名称: 高成長トラフグ（従来系統－4 D 系統、以下「情報提供品種」と言う。） 概要: ゲノム編集技術を用いて、トラフグレプチン受容体遺伝子欠損（4 塩基欠失）処理を行った。その結果、飼料利用効率及び成長率が改善されたトラフグを作出した。情報提供品種は、ゲノム編集当代（T₀世代）と従来品種を交配したものである。
2 当該生物の用途	陸上の養殖施設における飼育等（従来品種又は既に情報提供書を提出した高成長トラフグ（4 D－4 D 系統）との交配を含む。）
3 使用施設の概要	生産工程としては、受精卵、種苗及び養殖魚の生産である。 成魚は、使用施設内で生き締め（不活化）した後に出荷する。出荷せずに廃棄するケースとしては、死亡魚の廃棄とその他の廃棄があり、前者については、通常の死亡魚と同様に廃棄し、後者については、凍結処理や神経破壊などにより処分した後に廃棄する。 なお、生産する予定の種苗数は10,000-1,000,000尾程度、生産する予定の成魚数は1,000-10,000尾程度を見込んでいる。 施設外への個体の逸出を防ぐため、発育ステージ及び体長のばらつきを考慮し、水槽内に破損しにくい格子状の網を設置するとともに、排水系統には、破損しにくく、かつ、排水によって浮き上がらず、最小の個体を捕捉する目合いの逃避防止網を2か所以上設置する。さらに、逃避防止網が機能しない部分から個体が排水系統に逸出しないように必要な措置を講じる。 また、卵の施設外への逸出を防ぐため、産卵期と産卵特性を考慮し、時期的な余裕を持った上で、二重のトラップを設置する。

		さらに、これらの設備に異常がないか適切な頻度で点検し、問題があった場合に速やかに対応するための手順、網の清掃及び交換に関する手順、災害時の対応手順及び作業従事者に対する教育方法を記載した管理マニュアルを定める。
4 カルタヘナ法第2条第2項第1号の細胞外において核酸を加工する技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有していないことが確認された生物であること	(1) 細胞外で加工した核酸の移入の有無（移入した場合は、移入した核酸に関する情報を含む。）	有 親世代に対して、Cas9 mRNA及びトラフグレプチン受容体遺伝子の20塩基を特異的に標的としたガイドRNA（以下、gRNAと言う。）をマイクロインジェクション法によってトラフグ受精卵に導入した。 また、情報提供品種はF₁世代以降なので、この世代には使用していない。
	(2) 移入した核酸の残存の有無（選抜・育成の経過及び当該核酸の残存の有無を確認した方法に関する情報を含む。）	無 雌雄〇〇〇個体ずつから未受精卵と精子を取得し、人工授精法により、受精卵を得た。トラフグ受精卵にCas9 mRNA及びgRNAを移入後、孵化仔魚を得た。全長約10 cm時に処理個体から変異導入個体を選抜し、親魚として雄〇〇〇個体のT₀世代を育成した。 当該〇〇〇個体と従来系統の雌〇〇〇個体を親魚として、これらに対して、催熟誘起剤を用いて排卵・排精を促進し、採卵・採精後、人工交配によってF₁世代を得た。全長約10 cm時に4塩基欠失遺伝子をヘテロに持つ個体（以下「ヘテロ接合体」と言う。）を選抜した。 当該選抜個体を親魚として育成し、全ゲノム解析とPCR法により、Cas9 mRNA及びgRNAが逆転写等により複製物がゲノムに挿入されていないことを確認した。これにより、上記2種類のRNAが残存していないと証明された。 なお、以上の作業について、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等として拡散防止措置が執られた施設で行った。
5 改変した生物の分類学上の種	(1) 分類学上の種の名称及び宿主の品種名又は系統名等	トラフグ 英名：Tiger pufferfish 学名： <i>Takifugu rubripes</i> 野生種（以下「従来系統」と言う。）を使用。

	(2) 自然環境における分布状況、使用等の歴史及び現状並びに生理学的及び生態学的特性	トラフグは日本では室蘭以南の太平洋、北海道以南の日本海、瀬戸内海に広く分布する。生育場所の水深は0~200 m程度であり、生育可能な水温は4~29℃であり、塩分の変化には比較的耐性があるが、基本的には、塩分が35‰程度の海水に生息する。 稚魚期は底生性の小甲殻類を、未成魚期にはイワシ類、その他の幼魚、エビ・カニ類などを、成魚期には魚類、エビ・カニ類などを捕食する。魚体の体長は1年で20 cm程度、2年で30 cm程度であり、最大で70 cm程度、寿命は約10年である（文献1）。 日本における産卵場は、九州北岸域、瀬戸内海、若狭湾、伊勢湾など広い範囲にわたっており、産卵期は地域によって少しずつ異なるが、3~7月である。成熟までの年数は雌で約3年、雄で2年である。全長47~67 cmの雌の抱卵数は51~296万粒であり、年1回産卵である。自然環境下では、複数の雄が1尾の雌に対して追尾行動を行い産卵する。産卵水温は14~18℃、水深10~50 mで潮流の早い岩礁地帯にある砂場(粒径1~4 mm)に産卵する。受精卵は直径約1.3 mmの球形で沈性粘着卵である。卵が放出された後の受精能力の持続時間は数秒である。発生様式は水温17℃で、孵化までは7日程度である。精子は、海水に曝露した後、1分~1分半で運動性を完全に喪失し、受精能を失う。 仔稚魚は産卵場付近に生息し、成長に伴って次第に沖合へ移動する。その後は外海域で成長し、成熟すると産卵場へ回遊する。 日本近海にはトラフグ属14種が生息しており、互いに近縁種であり、交雑が発生し得るとされているが、その稔性については一部を除いては明らかとなっていない。なお、トラフグとクサフグの交雑種は稔性があり、交雑第二世代を生産する。 トラフグ自体には有害物質の産生性はないが、食物連鎖により、神経毒であるテトロドトキシンを肝臓及び卵巣に蓄積する。しかしながら、餌が管理された養殖トラフグではテトロドトキシンは蓄積しない。 1933年頃から畜養が行われ、1960年から人工孵化が始まり、1973年に完全養殖技術が確立され
--	---	--

		た。現在では選抜育種法が導入されており、遺伝的改変が進んでいる。 養殖種苗生産に用いられる受精卵は飼育環境下で、自然産卵によって得られた報告はなく、催熟促進剤の投与と人工授精法によって得られる。 なお、現在のトラフグ養殖は海面養殖が約60%で、残りの約40%が陸上養殖である。
6 改変に利用したゲノム編集の方法	(1) 利用した人工ヌクレアーゼ等に関する情報	CRISPR/Cas9 ゲノムDNAを特異的に認識するgRNAとそのgRNAを認識し、ゲノムDNAを特異的に切断するCas9 DNA切断酵素である。
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	トラフグ受精卵にCas9 mRNA及びgRNAを移入した。
7 改変した遺伝子及び当該遺伝子の機能	(1) 標的とし切断等した宿主のゲノム上の部位及び当該部位に生じた変化	トラフグレプチン受容体遺伝子に対して、4塩基を欠失させた。
	(2) 標的とした遺伝子に関する情報及び改変により生じると理論上考えられる形質の変化	標的とした遺伝子は、肝臓より産生される食欲抑制ホルモンレプチンの受容体であるレプチン受容体遺伝子である。 当該遺伝子の機能欠損（4塩基の欠失）によって、4塩基欠失遺伝子をホモに持つ個体（以下「ホモ接合体」と言う。）では、食欲が抑制されず、飼料利用効率及び成長率の改善が期待される。
8 当該改変により付与された形質の変化		F₁世代はヘテロ接合体であり、形質の変化は顕在化しなかった。 なお、ホモ接合体では、当該遺伝子の機能欠損によって食欲が抑制されなくなったため、飼料利用効率の改善及び魚体重の増加が確認され、高成長形質が付与された。 理論上考えられた形質の変化と相違なし。
9 8以外に生じた形質の変化の有無（ある場合）	(1) 標的以外の部位が改変された可能性に関する情報	無 Cas-Offinder及びGGGenomeを用いて得られた標的配列と類似する配列(gRNA認識配列であるPAMを除く18塩基に対して2塩基までの相違)について、親魚として選抜した個体の全ゲノム解析及び

合はその内容)		PCR法により、従来系統と相違がないことを確認した。
	(2) 宿主と比較して作出した生物に生じた8以外の形質の変化	ホモ接合体の産卵特性を従来系統と比較したところ、文献が示す従来系統の値の範囲内にあった。
10 当該生物の使用等をした場合に生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察	(1) 競合における優位性	上記3に示した陸上の養殖施設において個体及び卵を逸出させない拡散防止措置を執るため、これらが逸出することではなく、競合における優位性に起因する生物多様性への影響は想定し難い。 なお、従来系統とホモ接合体を同じ水槽で飼育した結果、体重の増加以外の特性に相違がみられず、両者とも順調に成長し、闘争的な行動も観察されなかった。また、ヘテロ接合体について、形質の変化は顕在化しなかった。これらのことから、情報提供品種の競合における優位性が高まる可能性は低いと考えられる。
	(2) 捕食性又は寄生性	上記3に示した陸上の養殖施設において個体及び卵を逸出させない拡散防止措置を執るため、これらが逸出することではなく、捕食性又は寄生性に起因する生物多様性への影響は想定し難い。 なお、宿主には寄生性はなく、また、当該改変により寄生性が付与されるとは想定し難い。さらに、従来系統とホモ接合体を同じ水槽で飼育した結果、体重の増加以外の特性に相違が見られず、共食い等捕食性が高まる行動は観察されなかった。また、ヘテロ接合体について、形質の変化は顕在化しなかった。これらのことから、情報提供品種の捕食性が高まる可能性は低いと考えられる。
	(3) 有害物質の産生性	宿主には有害物質の産生性が報告されていないこと、当該遺伝子がテトロドトキシンの蓄積に関係するものではないこと及び改変による代謝系への影響が想定されないことから、当該改変によって有害物質の産生性が付与されるとは想定し難い。
	(4) 交雑性	上記3に示した陸上の養殖施設において個体及び卵を逸出させない拡散防止措置を執るため、個体及び卵が外洋に逸出することではなく、交雑性に起因する生物多様性への影響は想定し難い。

		また、精子については、通常の養殖魚生産では、雄が排精するケースは一般的ではないが、仮に、養殖施設内で排精されたとしても、精子は海水に曝露された時点で急速に受精能を失うため、受精能を保った状態で外洋に到達することは想定し難い。
	(5) その他の性質	なし
	(6) 総合的考察	上述したように、本情報提供書に基づき上記 3 に示した陸上の養殖施設で使用等を行う限りにおいて、生物多様性への影響は想定されない。

参考資料

- 1 ホモ接合体の飼料利用効率（別記2 8に該当）
- 2 ホモ接合体の魚体重（別記2 8に該当）
- 3 核酸の移入方法（別記2 4(1)に該当）
- 4 移入した核酸の構成（別記2 4(1)、6(1)、7(1)に該当）
- 5 T₀世代の作製及び選抜過程
- 6 移入した核酸の残存の有無を確認した方法（別記2 4(2)に該当）
- 7 情報提供品種のゲノム編集ツール導入から育種過程
- 8 情報提供品種の育種段階から生産段階
- 9 レプチン受容体遺伝子の生体内での作用機構（別記2 7(2)に該当）
- 10 レプチン受容体遺伝子を改変した場合に生ずると理論上考えられる機能の変化及び実際に付与された生理学的又は生態学的特性（別記2 7(2)に該当）
- 11 オフターゲット変異の評価結果（別記2 9(1)に該当）
- 12 ホモ接合体（トラフグ）の精子の運動性
- 13 トラフグのホモ接合体の産卵特性
- 14 養殖魚の生産管理マニュアル
- 15 当該生物を飼育する施設及び逃避防止措置の概要

〔引用した文献〕

- 1 最新海産魚の養殖 第3章トラフグ 熊井英水編著, 2000, p140-147
- 2 Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). Gallego et al, Aquaculture, 2013
- 3 A Genetic Linkage Map for the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes*. Kai et al, Genetics, 2005