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）

2025年5月21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	<p>名称: 可食部増量ティラピア (13D系統、以下、「情報提供品種」と言う。)</p> <p>概要: ゲノム編集技術を用いて、ティラピアミオスタチン遺伝子欠損(13塩基欠失)処理を行った。その結果、可食部が増量し、可食部に対する飼料要求率が改善されたティラピアを作出した。</p>
2 当該生物の用途	<p>陸上の養殖施設における飼育等（従来品種との交配を含む。）</p>
3 使用施設の概要	<p>生産工程としては、受精卵、種苗及び養殖魚の生産である。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>また、卵の施設外への逸出を防ぐため、性成熟する月齢や成熟水温を考慮し、時期的な余裕を持った上で、二重のトラップを設置する。</p> <p>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。</p>

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タンパク質及びティラピアミオスタチン遺伝子の配列のエキソン1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ティラピア受精卵に導入した。 また、情報提供品種はF ₁ 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 未受精卵と精子を取得し、人工授精法によって受精卵を得た。次にこの受精卵にCas9タンパク質及びgRNAを移入後、孵化仔魚を得た。稚魚時に処理個体から変異導入個体を選抜し、親魚としてT ₀ 世代を育成した。 これらT ₀ 世代の雄親魚から取得した精子と一般的に養殖生産されている種（以下、「従来品種」と言う。）の未受精卵を用いて、人工授精法によってF ₁ 世代を得た。稚魚時に13塩基欠失保有個体を親魚として選抜した。 選抜した親魚に対して、PCR法を用いて、gRNAが逆転写されゲノムに挿入されていないことを確認した。これにより、上記の系統について、上述の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は、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	ナイルティラピア 英名： Nile Tilapia 学名： <i>Oreochromis niloticus</i> 従来品種を使用。
	(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	ティラピアの自然分布はアフリカ西部（ニジェール川水系等）、アフリカ東部（タンガニカ湖以北のナイル川水系）、イスラエル（ヤルコン川）である。日本国内での自然環境における分布は、冬季の水温が低下する大部分の地域ではない。一方で、南西諸島や一部の温泉地等では生息が認められる。 適温範囲は24～32℃で、生活水温は16～37℃である（文献1）。42℃以上では死滅する。15℃以下では生育障害が発生し、13.5℃を下回ると著しく生存が

		<p>厳しくなる（当社調べ）。そのため、日本国内の河川や湖、池においては、越冬が難しく、野生状態での生息は基本的に困難である。淡水性の魚類であるが、塩分には24%までは耐性がある。</p> <p>雑食性で、稚魚期は動物プランクトンを主に摂取し、成長するに従って植物質を多く摂取する。</p> <p>魚体の体長は、最大で全長70 cm~80 cm、体重3 kgに達し（文献1）、一般の養殖での出荷サイズとしては、半年で250g程度、1年で500g程度である（当社調べ）。</p> <p>繁殖の条件としては、水温が22~28°Cの範囲である。雄は縄張りを作り、砂礫の中央部にすり鉢状の産卵床を作る。卵は雌が口腔哺育する。受精卵は静止すると死んでしまうため、口腔内で雌の呼吸運動に合わせて回転する。水温条件が良ければ何時でも産卵し一回当たりの産卵数は160~2,000粒である（文献1、2）。雌の初回成熟に達するまでの最短期間の目安は6ヶ月であり、雄の初回成熟に達するまでの最短期間の目安は5ヶ月である（文献9）。</p> <p>ティラピアの精子の受精能は、体内から淡水中に放出された後、淡水中では3分間は活発に運動し、6分後の運動性は40%、9分後の運動性は20%以下である（文献3）。</p> <p>なお、一般的に、魚の精子は環境水中に放出された後に運動を開始するが、精子中に蓄えられたエネルギーは微量であり、その運動性は急速に低下すること、また、卵には精子が通る穴（卵門）があり、運動性が低下した精子では卵内に入って受精させることができないことが知られている。</p> <p>受精卵は直径2 mm前後の分離沈性卵である。発生様式は水温28°Cで、孵化までは5~6日程度である（文献4、5）。</p> <p>ティラピアと同属の<i>Oreochromis</i>属であるモザンビークティラピア (<i>Oreochromis mossambicus</i>) やブルーティラピア (<i>Oreochromis aureus</i>) の交雑性は認められていて、同属であれば他の種でも交雑可能と推測される。日本国内の在来種には、ティラピアと同属の<i>Oreochromis</i>属や近縁種はおらず、ティラピアと在来種との交雑はない。また、有害物質の産生性はない。</p>
--	--	--

		<p>国内には1962年にエジプトから輸入され、九州を中心に養殖生産が行われてきた。日本国内では、1990年には5,800トン生産されたが、現在ではほとんど養殖されていない（文献6）。</p> <p>現在ティラピアは世界の様々な国で養殖されており、総生産量は約500万トンである。養殖方法としては、淡水性の養殖水槽、養殖池や湖・河川での生け簀網で飼育され、世界的に主要なタンパク源である（文献7）。</p>
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	<p>CRISPR-Cas9</p> <p>ゲノムDNAを特異的に認識するgRNAとそのガイドRNA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。</p>
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	<p>ティラピア受精卵にCas9タンパク質及びgRNAを移入した。</p>
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	<p>ティラピアミオスタチン遺伝子に対して、13塩基を欠失させた。</p>
	(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	<p>標的とした遺伝子は、骨格筋で発現する骨格筋肥大抑制因子のミオスタチンである。ミオスタチンはTGF-βスーパーファミリーに属するマイオカインの1種である。</p> <p>当該遺伝子の機能欠損（13塩基の欠失）によって骨格筋肥大が抑制されず、骨格筋肥大に伴う可食部の増量及び飼料要求率の改善が期待される。</p>
8 当該改変により付与された形質の変化		<p>当該遺伝子の機能欠損によって骨格筋肥大が抑制されなくなったため、骨格筋肥大に伴って可食部が増量し、飼料要求率が改善された。</p> <p>理論上考えられた形質の変化と相違なし。</p>
9 8以外に生じた形質の変化の有無（ある場合はその内容）	(1) 標的以外の部位が改変された可能性に関する情報	<p>無</p> <p>標的配列と類似する配列(ガイドRNA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)がティラピアゲノム中に存在するかについて、Cas-OFFinder及びCCTopを用いて調査した。全ての候補配列を親魚として選抜した5個体について、PCR法及</p>

		びシーケンス解析により従来品種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	弊社の飼育環境下において比較したところ、情報提供品種の繁殖特性は従来品種と同等又はそれ以下であった。
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。
	(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。
	(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、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	<p>上記3に示した陸上の養殖施設において個体、あるいは卵を逸出させない拡散防止措置を執るため、個体及び卵が野外に逸出することはなく、交雑性に起因する生物多様性への影響は想定し難い。</p> <p>また、精子については、一般的に、高密度環境下では繁殖行動が行われなため、雄が排精するケースは一般的ではない。仮に、養殖施設内で排精された場合でも、ミオスタチンは骨格筋の肥大抑制因子であるため、その機能が欠失したとしても当該改変による、生物多様性影響を及ぼす可能性のある精子の運動性への影響は想定されない。また、標的以外の部位の改変が確認されず、繁殖特性に関与する遺伝子等に意図せぬ変異が生じていない。したがって、従来品種と同様に、精子は淡水に曝露された時点から短時間で受精能を失うと考えられる。</p> <p>加えて、極めて大量の水によって急速に希釈されるため、受精能を保った状態で野外に到達し、かつ、排水路周辺の生息水域でタイミング良く排卵されたティラピアの未受精卵と遭遇して受精するようなケースは想定し難い。</p>

		<p>なお、情報提供品種の繁殖特性は従来品種と同等又はそれ以下であった。</p> <p>以上のことから、交雑に起因する生物多様性への影響は想定し難い。</p>
	(5) その他の性質	なし
	(6) 総合的考察	<p>上述したように、本情報提供書に基づき陸上の養殖施設で使用等を行う限り、生物多様性への影響は想定されない。</p>

参考資料一覧

- 1 情報提供品種の飼料要求率と可食部割合
- 2 ゲノム編集の設計と遺伝子変異
- 3 情報提供品種の育成図
- 4 情報提供品種の生産
- 5 ツールの非残存性の確認
- 6 ミオスタチン遺伝子の欠損の概念
- 7 オフターゲット解析
- 8 ティラピアの繁殖特性
- 9 当該生物を飼育する施設、逃避防止措置及び管理手順の概要

〔引用した文献〕

- 1 国立環境研究所 侵入生物データベース
<https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/50360.html>
- 2 Qiang, J., Tao, Y. F., Zhu, J. H., Lu, S. Q., Cao, Z. M., Ma, J. L., ... & Xu, P. (2022). Effects of heat stress on follicular development and atresia in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during one reproductive cycle and its potential regulation by autophagy and apoptosis. *Aquaculture*, 555, 738171.
- 3 Musa, N. (2010). Sperm activation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and the effects of environmentally relevant pollutants on sperm fitness.
- 4 Tsadik, G. G., & Bart, A. N. (2007). Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 272(1-4), 380-388.
- 5 Fujimura, K., & Okada, N. (2007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development, growth & differentiation*, 49(4), 301-324.
- 6 鹿児島県水産技術のあゆみ 第3編 増・養殖部門－3 第4章 内水面養殖

1 魚類 第5節 テラピア養殖

https://kagoshima.suigi.jp/ayumi/book/03/a03_04_01_05.pdf

- 7 FAO, 2024, The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. p11-12
- 8 Wu, Y., Yang, L., Du, Y., Su, Y., Zhao, C., Li, L., ... & Zhou, L. (2024). New insights into the role of myostatin in fish fertility based on the findings in mstnb-deficient Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, 35, 101926.
- 9 Popma, T. & Masser, M. (1999). *Tilapia: Life History and Biology*. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication No. 283.