

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：可食部増量マダイ（E361-E90系統、従来品種-B224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、マダイミオスタチン遺伝子欠損（14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利用効率が改善されたマダイを作出した。
2 当該生物の用途	陸上の養殖施設における飼育等（E361-E90系統、従来品種-B224系統、従来品種及び既に情報提供書を提出した可食部増量マダイ（E189-E90系統）の組合せによる交配を含む。）
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、生産する予定の成魚数は1,000-10,000尾である。 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 RNA及びマダイミオスタチン遺伝子(DDBJ accession number: AY965686)の配列のエキソン1の23塩基を特異的に標的としたガイドRNAをマイクロインジェクション法によってマダイ受精卵に導入した。 また、情報提供品種はF₂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。〇〇〇粒のマダイ受精卵にCas9 RNA及びガイドRNAを移入後、孵化仔魚〇〇〇個体を得た。全長約10 cm時に〇〇〇の処理個体から〇〇〇の変異導入個体を選抜し、親魚としてT₀世代を育成した。 これらの親魚から水量〇〇〇トンの陸上水槽内で集団交配によって、F₁世代を得た。全長約10 cm時に〇〇〇個体から〇〇〇個体の14塩基欠失保有個体を親魚として選抜した。そのうち〇〇〇個体（E361とE90）を親魚とし、F₂世代を得た。また、B224の個体は、近交弱勢を防ぐ観点から従来品種と交配させ、F₂世代を得た。 選抜した親魚〇〇〇個体に対して、PCR法を用いて、Cas9 RNA及びガイドRNA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。さらに、F₁世代の交配によって得られたF₂（E361-E90系統、従来品種-B224系統）に対して、全ゲノム解析を行い、Cas9 RNA及びガイドRNA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、上記の系統について、上述の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	マダイ、英名：Red sea bream 学名：<i>Pagrus major</i> 近畿大学にて、野生種から選抜された育種系統（近畿大学は「近大マダイ」として商標登録。以下「従来品種」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	マダイは北海道東・北部及び沖縄を除く日本各地に分布し、その中でも九州近海や瀬戸内海に多く、太平洋沿岸にはやや少ない。また、朝鮮半島南部、中国及び東南アジアにかけて広く分布する。生育場所の水深は0-200 m程度であり、生育可能な水温は6-32℃であり、塩分が35‰程度の海水に生息する。肉食性で、小魚、甲殻類、頭足類、貝類など底生生物を捕食する。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50 cm程度、寿命は15年～20年である（文献1）。 日本における産卵場は、日本海、太平洋、瀬戸内海及び九州西海域である。回遊範囲は狭く、同一の生育場所に留まるとされる。産卵時期は地域によって少しずつ異なるが、3月から6月である。産卵水温は16℃から23℃。初回性成熟に達するまでの期間は2年から3年、親魚1尾当たりの1シーズンの産卵数は年齢や魚体の大きさによりことなるが、250万～1,000万粒である。受精卵は直径0.8～1 mm程度の分離浮性卵である。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19℃で、孵化までは40時間程度である。 人工授精法を用いた場合は、ヘダイ、チダイ、クロダイといったタイ科の近縁種と交雑可能であるが、自然界での交雑種は確認されておらず、産卵様式が異なるためであるとされている。なお、マダイ×クロダイ、マダイ×ヘダイ交雑種の生殖能力はなく、不稔である（文献2）。マダイとチダイは自然界では産卵期が異なる（マダイは春、チダイは秋）ため、交雑は認められていない。 有害物質の産生性はなし。 1950年頃から人工孵化と養殖が行われ、1964年から近畿大学で選抜育種が始まり、現在ではこの選抜系統、あるいはこの系統から派生した育種系統が全国で養殖されている。選抜系統は野生種より成長が

		優れている。養殖種苗生産に用いられる受精卵は飼育環境下での自然産卵によって得られる。 選抜系統の自然界における生存・繁殖能力は野生種と同程度であると想定される。なお、現在のマダイ養殖の大部分95%以上は開放環境（すなわち、海面小割生簀）で育成される。
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ガイドRNA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。
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	マダイ受精卵にCas9 RNA及びガイドRNAを移入した。Cas9 RNAは〇〇〇 ng/μl及び、ガイドRNAは〇〇〇 ng/μlに調製した。
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	マダイミオスタチン遺伝子エキソン1に対して、開始コドンから〇〇〇塩基目から〇〇〇塩基目の14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、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。 当該遺伝子の機能欠損（14塩基の欠失）によって、14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、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利用効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		ホモ接合体では、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、骨格筋肥大に伴う15%の可食部の増量、稚魚期が6.5%、若魚期が13.7%の飼料利用効率の改善が付与された。 14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。）では、形質の変化は顕在化しなかった。 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	(1) 標的以外の部位が改変された	無 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）に対

無（ある場合はその内容）	可能性に関する情報	して、親魚として選抜した〇〇〇個体について、PCR法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	ホモ接合体の産卵特性を宿主と比較したところ、差異は認められなかった。
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。
	(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。
	(3) 有害物質の産生性	宿主に有害物質の産生性が報告されていないこと、繁殖特性について宿主との差異が認められ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ことに加えて、大量の海水によって希釈されるため、受精能を保った状態で外洋に到達し、かつ、排水路周辺の海域でタイミング良く排卵されたマダイ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。 以上のことから、交雑に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。
	(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く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 情報提供品種の飼料利用効率（別記2 8に該当）
- 2 情報提供品種の可食部増量（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 ミオスタチンの生体内での作用機構（別記2 7(2)に該当）
- 10 ミオスタチン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 情報提供品種（マダイ）の精子の運動性
- 13 マダイの情報提供品種の産卵特性
- 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章マダイ 熊井英水編著, 2000, p89-108
- 2 交雑種マダイ×クロダイおよびマダイ×ヘダイの生殖腺成熟 村田ら, 水産増殖、1997