

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）

2023年12月25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: 高成長ヒラメ （8D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、ヒラメレプチン受容体遺伝子欠損（8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ヒラメを作出した。
2 当該生物の用途	陸上の養殖施設における飼育等（従来品種との交配を含む。）
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及び成魚数としては、最大で年間300万尾程度を予定している。 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タンパク質及びヒラメレプチン受容体遺伝子の配列のエキソン9の20塩基を特異的に標的としたガイドRNA（以下「gRNA」という。）をマイクロインジェクション法によってヒラメ受精卵に導入した。 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 世代の親魚から取得した未受精卵と精子を用いて、または親魚から取得した精子と従来品種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8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	ヒラメ 英名：Olive flounder 学名： <i>Paralichthys olivaceus</i> 一般的に養殖生産されている種（以下「従来品種」という。）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	ヒラメは日本各地の沿岸域に広く分布し、樺太、千島列島から東シナ海にも生息する。生育場所の水深は0～200 m程度、生育可能な水温は3～32℃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。

		肉食性で、魚類、甲殻類、頭足類などを捕食する。魚体の体長は1年で30 cm程度、2年で40 cm程度であり、最大で1 m程度、寿命は20年程度である（文献1）。 日本における産卵場は、本州の日本海及び太平洋側、瀬戸内海、九州である。産卵時期は地域によって少しずつ異なるが、1～7月で、南で早く北で遅い。産卵水温は16～23℃。初回性成熟に達するまでの期間は雌で2～3年、雄で1～2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異なるが、約1千万粒である。 ヒラメの精子の受精能は、体内から海中に放出された後、短時間で減衰していくことが知られており、「海水中では15分間は活発に運動し、30分までは活発さを欠きながらも運動を続けるが、40分後になると運動性はほとんどなくなった」との報告がある（文献2）。 なお、魚の精子は海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。 受精卵は直径0.9 mm前後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程度である。発生様式は水温15℃で、孵化までは2～2.5日程度である。自然条件下における他種との交雑の報告はなく、有害物質の産生性もない。 1965年頃から人工孵化と養殖が行われている。明確な品種はなく、何世代か継代した系統が全国で養殖されている。養殖種苗生産に用いられる受精卵は、催熟促進剤の投与、あるいは飼育環境下での自然産卵又は人工授精によって得られる。 なお、養殖ヒラメの大部分は、陸上養殖施設で生産される。
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。

	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	ヒラメ受精卵にCas9タンパク質及び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	ヒラメレプチン受容体遺伝子に対して、8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（8塩基の欠失）によって食欲が抑制されず、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		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	無 標的配列と類似する配列（gRNA認識配列であるPAMに続く18塩基に対して2塩基までの相違）がヒラメゲノム中に存在するかについて、Cas-Offinderを用いて調査したところ、類似する配列は検出されなかった。
	(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	産卵特性については、従来品種と比べて、特記するような形質の変化はない。
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	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場合でも、レプチンは食欲抑制ホルモンであるため、その受容体の機能が欠失したとしても当該改変による精子の運動性への影響は想定されず、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ため、従来品種と同様に、精子は海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。加えて、極めて大量の海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外洋に到達し、かつ、排水路周辺の生息海域でタイミング良く排卵されたヒラメ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。

参考資料一覧

- 1 情報提供品種の飼料利用効率と魚体重
- 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 レプチン受容体遺伝子の欠損の概念
- 7 オフターゲット解析
- 8 ヒラメの繁殖特性
- 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 主要対象生物の発育段階の生態的知見の収集・整理 報告、社団法人全国豊かな海づくり推進協会、p143-148
- 2 紫外線によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起条件、Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries、1986
- 3 Leptin receptor-deficient (knockout) medaka, *Oryzias latipes*, show chronic al up-regulated levels of orexigenic neuropeptides, elevated food intake and stage specific effects on growth and fat allocation. Chisada et al. General and Comparative Endocrinology, 2014
- 4 飼料利用効率の高い魚類の養殖方法 特許出願2013-019749