

## ゲノム編集生物作製における現象解析と規制の進め方

研究分担者 木下 政人（京都大学農学研究科）

### 研究要旨：

我々は、これまでにゲノム編集技術（CRISPR/Cas9）を用いて、増肉形質を示すミオスタチン遺伝子破壊マダイ、高成長形質を示す食欲関連遺伝子破壊トラフグ系統の作製に成功している。本研究では、これらのゲノム編集養殖魚を用いて、非ゲノム編集個体との性状の相違を検討する。平成30年度は、ミオスタチン遺伝子破壊マダイおよび、食欲関連遺伝子破壊トラフグで生産されると考えられる新規ペプチドについて、それらのアレルゲン性の検討を行った。その結果、編集様式（欠失塩基数やその位置）により、アレルゲン性が異なることが明らかとなった。また、食欲関連遺伝子破壊トラフグを用いて、筋肉に存在する代謝産物の網羅的比較を行った。その結果、エネルギー代謝に関わる物質にわずかに違いが見られたが、概ね差異は見られなかった。

これらのことから、ゲノム編集生物の食品安全性を評価するには、同一遺伝子を編集したものであっても、各編集タイプ（欠失塩基数やその位置）において個別に評価することを提案する。

### A. 研究目的

近年急速に発展してきたゲノム編集技術は、「生物種を選ばず、ゲノム上の狙った配列を改変できる」という特性から、農林水産物の育種に応用され始めている。この技術では、「短期間で狙った形質を持つ品種」を作製することが可能であるため、本技術は品種改良方法・育種方法として、今後定着していくものと考えられる。

しかしながら本技術は歴史が浅いため、この技術で作製された食品に対して、消費者が安全性に不安を持っているのが現状である。加えて、安全性を確認する機関においても安全性への具体的な評価基準の策定に至っていない。

水産物は、これまでの「とる漁業が中心」の時代から、「作る・育てる漁業」へと変わってきたものの、品種の作製や育種が、作物や畜産物に比べて大幅に遅れている。一方、世界的な人口増加と健康食志向の高まりから養殖業が発展してきており、消費者ニーズに合った水産物の作出が望まれるようになってきた。このような背景から、短期間で優良形質を固定化できるゲノム編集技術の導入が水産物育種に活用され始めた。今後、多様な水産物においてゲノム編集技術による新品種・新食品が作製されていくものと思われる。

そこで本研究分担者は、自身で作出したゲノム

編集マダイおよびゲノム編集トラフグを用い、それらの特性を検討し、食品安全性評価法策定に提言を与えるのを目的とする。

具体的には、1) ゲノム編集により誘導される新規ペプチドのアレルゲン性を *in silico* 解析により評価する、2) 第2世代または、第3世代でのオフターゲット候補配列の変異の有無を明らかにする、ターゲット配列の変異様式の伝達性を明らかにする、3) 可食部（筋肉）のメタボローム解析を行い非編集魚との相違を明らかにする、ことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) 新生ペプチドのアレルゲン性の検討：

ゲノム編集によりミオスタチン遺伝子 (*mstn*) を破壊したマダイ2系統およびトラフグ3系統、メラノコルチン4型受容体遺伝子 (*mc4r*) を破壊したトラフグ3系統、レプチン受容体遺伝子 (*lepr*) を破壊したトラフグ2系統について、塩基配列から予想される全長タンパク質、あるいは、延期が欠失した部分から作られる新生ペプチドとその直上10アミノ酸部分を用い、web上のアレルゲン検索サイト（後述）により、それらのアレルゲン性を検討した。アレルゲン検索サイト：“Allergen Online”（University of

Nebraska-Lincoln) および、” Allergen Database for Food Safety (ADFS)” (国立医薬品食品衛生研究所)。(表1参照)

### 2) オフターゲットと変異継代安定性の検討:

*mstn*破壊マダイ、*mc4r*破壊トラフグ、*lepr*破壊トラフグの第2世代を育成し、性成熟させる。これらから得られた第3世代から、ゲノムDNAを抽出し、オフターゲット、ターゲット配列をPCRで増幅後、塩基配列解析を行う。(第3世代は、2019年3-6月に取得予定)

### 3) 可食部成分の検討:

*lepr* 遺伝子破壊トラフグ (4塩基欠失系統) の第2世代と非ゲノム編集トラフグ (野生型) (それぞれ19ヶ月齢の個体を3個体ずつ) の背部骨格筋を採取し、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置 (Capillary Electrophoresis Time-of-flight Mass Spectrometry: CE-TOFMS) を用いて、低分子代謝産物を網羅的に解析した。

## C. 研究結果および考察

### 1) 新生ペプチドのアレルゲン性の検討:

野生型マダイとゲノム編集マダイのミオスタチン遺伝子から産生されるアミノ酸配列を図1に示す。マダイのミオスタチンタンパク質には、野生型においても、FAO/WHO Sliding 80 mer Window法において、アレルゲン性を示す配列 (グリアジンと同一性を示す) が存在したが、それ以外にはアレルゲン性を示唆する配列は検出されなかった。(表2)。新生アミノ酸とその上流10アミノ酸配列を検討した結果、8塩基欠失マダイから産生される新生ペプチドでは、アスペルギルスや花粉、あるいはナッツに存在するアレルゲン性ペプチドと同一性を示す配列が検出された。しかしながら、14塩基欠失マダイからはアレルゲン性配列は検出されなかった (表3)。

野生型トラフグとゲノム編集トラフグのミオスタチン遺伝子から産生されるアミノ酸配列を図2に示す。FAO/WHO Sliding 80 mer Window法においては、いずれにおいてもアレルゲン性を示唆する配列は検出されなかった (表4)。新生アミノ酸とその上流10アミノ酸配列を検討した結果、8塩基欠失a型トラフグから産生される新生ペプチドでは、マダイの8塩基欠失と同様にアスペルギルスや花粉、あるいはナッツに存在するアレルゲン性ペプチドと同一性を示す配列が検出された。しかしながら、8塩基欠失b型および41塩基欠失ト

ラフグからはアレルゲン性配列は検出されなかった (表5)。同じ8塩基欠失であっても、欠失部位により、その影響が大きく異なることが示された。

野生型トラフグとゲノム編集トラフグのメラノコルチン4型受容体遺伝子から産生されるアミノ酸配列を図3に示す。FAO/WHO Sliding 80 mer Window法においては、いずれにおいてもアレルゲン性を示唆する配列は検出されなかった (表6)。新生アミノ酸とその上流10アミノ酸配列を検討した結果、5塩基欠失トラフグから産生される新生ペプチドでは、ラテックス、モモ、あるいはウシに存在するアレルゲン性ペプチドと同一性を示す配列が検出された。しかしながら、7塩基欠失および13塩基欠失トラフグからは、カシューナッツなどのアレルゲン性配列と同一性を示す配列が検出されたが、これらは野生型にも存在する配列であった (表7)。

野生型トラフグとゲノム編集トラフグのレプチン受容体遺伝子から産生されるアミノ酸配列を図4に示す。FAO/WHO Sliding 80 mer Window法においては、いずれにおいてもアレルゲン性を示唆する配列は検出されなかった (表8)。新生アミノ酸とその上流10アミノ酸配列を検討した結果、2塩基欠失トラフグから産生される新生ペプチドでは、小麦、ヘーゼルナッツあるいはウシに存在するアレルゲン性ペプチドと同一性を示す配列が検出された。また、4塩基欠失トラフグからはピーナッツのアレルゲン性配列と同一性を示す配列が検出されたが、これらはscoreは9.3、e value 187とアレルゲン性としては非常に低い値であり、問題はないと考えられた。

### 2) オフターゲットと変異継代安定性の検討:

現在、本課題に使用するマダイ、トラフグを育成中であり、2019年春季あるいは、2020年春季の産卵に向けて順調に生育中である。

### 3) 可食部成分の検討:

レプチン受容体遺伝子破壊 (4塩基欠失) トラフグおよび野生型トラフグの背部骨格筋に含まれる低分子代謝産物の網羅的解析をCE-TOFMSを用いて行った。その主成分分析の結果を図5に、パスウェイ解析の結果を図6に示す。主成分分析では、第一主成分(PC1)により、レプチン受容体遺伝子破壊個体と野生型個体が区別された。この第1主成分の負荷因子は、正の寄与因子として寄

与率順に、Betonicine (trans-4-hydroxy-L-proline betaine)、セリン、グリシン、コハク酸があり、また、負の寄与因子として寄与率順に、5-ヒドロキシリジン、N6-メチルリジン、リジン、アミノアセトンが示された。パスウェイマップ上での、これらの因子の分布は系統だっておらず、特定のパスウェイがゲノム編集操作（レプチン受容体遺伝子破壊）によって大きく影響を受けたことはないと判断された（表9）。

#### D. 結論

同一遺伝子のゲノム編集であっても、その編集様式（欠失塩基数や部位）により、アレルゲン性が異なる可能性が示された。このことにより、ゲノム編集生物を食品として捉えた場合、作出された系統ごとに、安全性評価を行うことが妥当だと判断される。

一方で、ゲノム編集処理をされることで、その代謝産物の構成には大きな変化がないことが示された。

#### E. 業績

##### 1) 市民向け説明会

- ・ 平成 30 年度科学技術コミュニケーション推進事業 未来共創イノベーション活動支援 「共に考えるゲノム編集の未来」、2018 年 9 月 18 日、奈良市立一条高校、合計約 1,200 名、奈良市立一条高校と JST、プレゼンター
- ・ バイオカフェ in 愛知県図書館、2018 年 10 月 21 日、愛知県立図書館、合計約 30 名、愛知県図書館、プレゼンター
- ・ 河内長野市民大学 くらまる塾本部講座、2018 年 10 月 31 日、河内長野市立市民交流センター、合計約 32 名、河内長野市、プレゼンター
- ・ 平成 30 年度 広島バイオフォーラム、2018 年 11 月 15 日、サテライトキャンパスひろしま、合計約 60 名、広島バイオテクノロジー推進協議会、講演者
- ・ 元村有希子のサイエンスカフェ、2018 年 11 月 26 日、毎日メディアカフェ、合計約 30 名、毎日新聞社、講演者
- ・ シンポジウム「ゲノム編集と食の安全・安心」2019 年 2 月 10 日、日比谷コンベンションホール、合計約 200 名、たねと食とひと@フォーラム、パネリスト
- ・ 千里ライフサイエンスフォーラム、2019 年 2

月 14 日、千里ライフサイエンスセンタービル会議室、合計約 100 名、千里ライフサイエンス振興財団、講師

##### 2) 業界関係者向け説明会

- ・ 水産ジャーナリストの会、2018 年 10 月 24 日、三会堂会館、合計約 20 名、水産ジャーナリストの会、講演者
- ・ 食生活ジャーナリストの会、2018 年 11 月 17 日、東京ウィメンズプラザ、合計約 80 名、食生活ジャーナリストの会、講演者

##### 3) 行政関係者向け説明会

- ・ 農林水産省消費安全局、水産庁との意見交換会（非公開）、2018 年 12 月 17 日、水産庁会議室、合計約 13 名、水産庁、ゲノム編集魚類の現状の説明者

#### F. 知的財産権の出願と登録状況

該当なし

表 1. アレルゲン検索データベース

サイト名	発行元	URL	今回使用した方法
Allergen Online	University of Nebraska-Lincoln	http://www.allergenonline.org	Sliding 80 mer Window
			8 mer Exact Match
Allergen Database for Food Safety (ADFS)	国立医薬品食品衛生研究所	http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/	Sequence Search: Protein
			Sequence Search: Epitope
			Allergenicity Prediction: FAO/WHO

非ゲノム編集魚およびゲノム編集魚のターゲット配列により産出されるアミノ酸配列全長あるいは新生ペプチドとその上流10アミノ酸を含む配列を用い、アレルゲン性の検討を行った。

表 2. ミオスタチン遺伝子破壊マダイ配列全長のアレルゲン性の検討

	WT (1-150 a.a.)	-14 (Full)	-8a (Full)
<b>FAO/WHO (&gt;35% in 80 a.a)</b>	VL(1)GPVVLS(1)DQE(1) TQQQQQQQQQQP (グリアジン)	VL(1)GPVVLS(1)DQE(1) TQQQQQQQQQQP (グリアジン)	VL(1)GPVVLS(1)DQE(1) TQQQQQQQQQQP (グリアジン)

野生型配列の中にもアレルゲン性を示す配列が存在する。WT：野生型マダイ（150アミノ酸まで）、-14: 14塩基欠失マダイ、-8: 8塩基欠失マダイ。

表 3. ミオスタチン遺伝子破壊マダイの新生アミノ酸配列とその上流10アミノ酸をクエリとしたアレルゲン性の検討

	-14 (10+new a.a.)	-8 (10+new a.a.)
<b>FAO/WHO (6 a.a exact match)</b>	No	AAAAAAS (アスペルギルス) (花粉)
<b>Motif-based (ADFS)</b>	No	No
<b>Epitope search (ADFS)</b>	No	ISRE (カシューナッツ) (ヘーゼルナッツ)

8塩基欠失マダイの新生ペプチドにおいてアレルゲン性を示唆する配列が検出されたが、14塩基欠失マダイの新生ペプチドでは検出されなかった。WT：野生型マダイ（150アミノ酸まで）、-14: 14塩基欠失マダイ、-8: 8塩基欠失マダイ。

表 4. ミオスタチン遺伝子破壊トラフグ配列全長のアレルゲン性の検討

	WT (Full)	-8b (Full)	-41 (Full)	-8a (Full)
FAO/WHO (>35% in 80 a.a)	No	No	No	No
Motif-based (ADFS)	No	No	No	No

WT:野生型、-8b: 8 塩基欠失b型、-41: 41 塩基欠失、-8a: 8 塩基欠失a型。

表 5. ミオスタチン遺伝子破壊トラフグ新生アミノ酸配列とその上流10アミノ酸をクエリとした比較

	-8b (10 + new a.a.) DVVTEEDDEHGDHDDGH	-41 (10 + new a.a.) YDVLGDDNRDHHDDGH	-8a (10 + new a.a.) RMKEAPNISREAAPAQSAAAA AAPRPVRRAGR
FAO/WHO (6 a.a exact match)	No	No	AAAAAAP (アスペルギルス) (ライ麦花粉) (ニワトリ) (トウモロコシ)
Epitope search (ADFS)	No	No	ISRE (カシューナッツ) (ヘーゼルナッツ)

WT:野生型、-8b: 8 塩基欠失b型、-41: 41 塩基欠失、-8a: 8 塩基欠失a型。

表 6. メラノコルチン4型受容体遺伝子破壊トラフグ配列全長のアレルゲン性の検討

	WT (Full)	-5 (Full)	-7 (Full)	-13 (Full)
FAO/WHO (>35% in 80 a.a)	No	No	No	No
FAO/WHO (6 a.a exact match)	No	No	No	No
Motif-based (ADFS)	No	No	No	No

WT:野生型、-5: 5 塩基欠失、-7: 7 塩基欠失、-13: 13 塩基欠失

表7. メラノコルチン4型受容体遺伝子破壊トラフグ新生アミノ酸配列とその上流10アミノ酸をクエリとした比較

	WT PGRVQDFSNGS	- 5 (10 + new a.a.) RVQDFSNGSQRDGLSKRGEIVYGMLRADAD LHGGVPPDSGNHQPAGEHPGGRRYSEEQESPL AHVLFHLQPGRGRHARERLQLRDDRHSAHQ QRHADHPRHADQEHGQRV	- 7 (10 + new a.a.) GRVQDFSNGSRRTFQTRRRNRLRDATSR	- 13 (10 + new a.a.) PGRVQDFSNGRRTFQTRRRNRLRDATSR
Epitope search (ADFS)	PGRVQDF GRVQD (カシューナッツ) SNGS (クロカビ) (ペニシリウム)	LQPG (ラテックス) LRADA (モモ) SEEQE (ウシ)	GRVQD (カシューナッツ) SNGS (クロカビ) (ペニシリウム) 野生型と同配列部分	PGRVQDF GRVQD (カシューナッツ) 野生型と同配列部分

WT:野生型、 -5: 5 塩基欠失、 -7: 7 塩基欠失、 -13: 13 塩基欠失

表8. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ配列全長のアレルゲン性の検討

	WT (Full)	- 2 (Full)	- 4 (Full)
FAO/WHO (>35% in 80 a.a)	No	No	No
Motif-based (ADFS)	No	No	No

WT:野生型、 -2: 2 塩基欠失、 -4: 4 塩基欠失

表9. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ新生アミノ酸配列とその上流10アミノ酸をクエリとした比較

	- 2 (10 + new a.a.) DAMDCRWNSTVAEPQLQNQVG	- 4 (10 + new a.a.) IDAMDCRWNSSG
FAO/WHO (6 a.a exact match)	No	No
Epitope search (ADFS)	VAEPQLQ STVAEPQ (コムギ) RWNSTVAEP (ハーゼルナッツ) LQNQV STVA (ウシ)	AMDCRWNSSG (ピーナッツ) *score 9.3 *e value 187

WT:野生型、 -2: 2 塩基欠失、 -4: 4 塩基欠失

WT	:	MHPSQIVLYL		SLLI <u>V</u> LGPVV		<u>LSDQ</u> ETQQQQ		<u>QQQQQQQ</u> PSA		TSPEDTEQCA
-14	:	MHPSQIVLYL		SLLI <u>V</u> LGPVV		LSDQETQQQQ		QQQQQQQPSA		TSPEDTEQCA
-8a	:	MHPSQIVLYL		SLLI <u>V</u> LGPVV		LSDQETQQQQ		QQQQQQQPSA		TSPEDTEQCA
WT	:	TCEVRQQIKT		MRLNAIKSQI		LSKLRMKEAP		NISRDIVKQL		LPKAPPLQQL
-14	:	TCEVRQQIKT		MRLNAIKSQI		LSKLRMKEAP		NISRDIVKQL		LPKAPPLQQL
-8a	:	TCEVRQQIKT		MRLNAIKSQI		LSKLRMKEAP		NISR <b>EAAPAQ</b>		<b>SAAAAASRP</b>
WT	:	LDQYDVLGDD		NRDVVMEEDD		EHAITETIMM		MATEPESVVQ		VDGEPRCCFF
-14	:	LDQYDVLGDD		NRDVVMEEDD		EH <b>DYDDGH</b>				
-8a	:	<b>VRRAGRRQQG</b>		<b>CGYGGGR</b>						
WT	:	SFTQKIQANR		IVRAQLWVHL		RASDEATTVF		LQISRLMPVT		DGNGHIHIRS
		LKIDVNAGVG		SWQSIDVKQV		LSVWLRQPET		NWGIQINAFD		SRGNDLAVTS
		AEPGEDGLQP		FMEVKISEGP		KRVRRDSGLD		CDENSPESRC		CRYPLTVDFE
		DFGWDWIIAP		KRYKANYCSG		ECEYMHLQKY		PHTHLVNKAN		PRGSAGPCCT
		PTKMSPINML		YFNRKEQIIY		GKIPSMVVDR		CGCS		

**図1. ミオスタチン遺伝子破壊マダイおよび野生型マダイのミオスタチン遺伝子から産生されるアミノ酸配列**

赤字は新生ペプチドを示す

WT:野生型、 -14: 14 塩基欠失、 -8: 8 塩基欠失

WT : MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI  
-8b: MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI  
-41: MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI  
-8a: MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI

WT : KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG  
-8b: KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG  
-41: KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG  
-8a: KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISREAAP AQSAAAAAAP RPVRRAGR

WT : DDNRDVVTEE DDEHAITETI MMMATEPASV VQVNGEPKCC HFSFTQKFQV  
-8b: DDNRDVVTEEDDEHGDHHDDGH  
-41: DDNRDHHDDGH

WT : SRLVRAQLWV HLRPAAEATT VFLQISRLMP VTDGNRHIRI RSLKLDVKAG  
VSSWQSIDVK QVLSVWLRQP ETNWGIEINA FDSRGKDLAV TSTQPGEEGL  
QPFMEVKISE GPRRVRRDLG LDCDENSPES RCCRYPLTVD FEDFGWDWII  
APKRYKANYC SGECEYMHLQ KYPHTHLVNK ANPRGTAGPC CTPTKMSPIN  
MLYFNQEQQI IYGKIPSMVV DRCGCL

**図2. ミオスタチン遺伝子破壊トラフグおよび野生型トラフグのミオスタチン遺伝子から産生されるアミノ酸配列**

赤字は新生ペプチドを示す

WT:野生型、-8b: 8塩基欠失b型、-41: 41塩基欠失、-8a: 8塩基欠失a型



WT : MNATDPPGRV QDFSNGSQTP ETDFPNEEKE SSTGCYEQML ISTEVFLTLG  
 -5 : MNATDPPGRV QDFSNGSQRD GLSKRGEIV YGMLRADADL HGGVPDSGNH  
 -7 : MNATDPPGRV QDFSNGSRRR TFQTRRRNRL RDATSRC  
 -13 : MNATDPPGRV QDFSNGRRTF QTRRRNRLRD ATSRC

WT : IISLLENILV VAAIVKNKLN HSPMYFFICS LAVADMLVSV SNASETIVIA  
 -5 : QPAGEHPGGR RYSEEQESPL AHVLFHLQPG RGRHARERLQ RLRDDRHS AH

WT : LINSGLTIP ATLIKSMNV FDSMICSSLL ASICSLAIA VDRYITIF  
 -5 : QQRHADHPRH ADQEHGQRV

**図3. メラノコルチン4型受容体遺伝子破壊トラフグおよび野生型トラフグのメラノコルチン4型受容体遺伝子から産生されるアミノ酸配列**

赤字は新生ペプチドを示す

WT:野生型、 -5: 5 塩基欠失、 -7: 7 塩基欠失、 -13: 13 塩基欠失

WT : NVTVYCVFND HNFNASTALW TLNFDQELDY SLYHPINQWV SQVTMRPSET  
 -2 : NVTVYCVFND HNFNASTALW TLNFDQELDY SLYHPINQWV SQVTMRPSET  
 -4 : NVTVYCVFND HNFNASTALW TLNFDQELDY SLYHPINQWV SQVTMRPSET

WT : GMYDLLQCTK KRMIAYSQVY VEGASISISC ETNGEIDAMD CRWNSTQWLN  
 -2 : GMYDLLQCTK KRMIAYSQVY VEGASISISC ETNGEIDAMD CRWNSTVAEP  
 -4 : GMYDLLQCTK KRMIAYSQVY VEGASISISC ETNGEIDAMD CRWNS SG

WT : PNFRTRWADL SCDVMEERER AGDNVGHEGP SCLQVDSRKR (cnotinue)  
 -2 : QLQNQVG

**図4. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグおよび野生型トラフグのレプチン受容体遺伝子から産生されるアミノ酸配列**

赤字は新生ペプチドを示す

WT:野生型、 -2: 2 塩基欠失、 -4: 4 塩基欠失

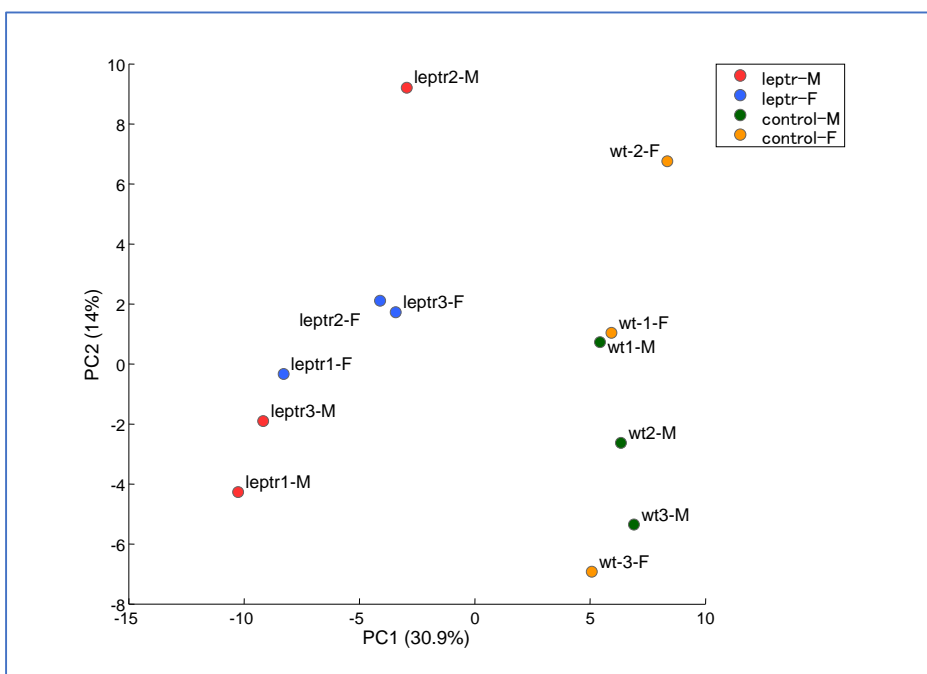


図5. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグと野生型トラフグのメタボローム解析（主成分分析）

control: 野生型トラフグ、lepr: レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ、M: 雄、F: 雌

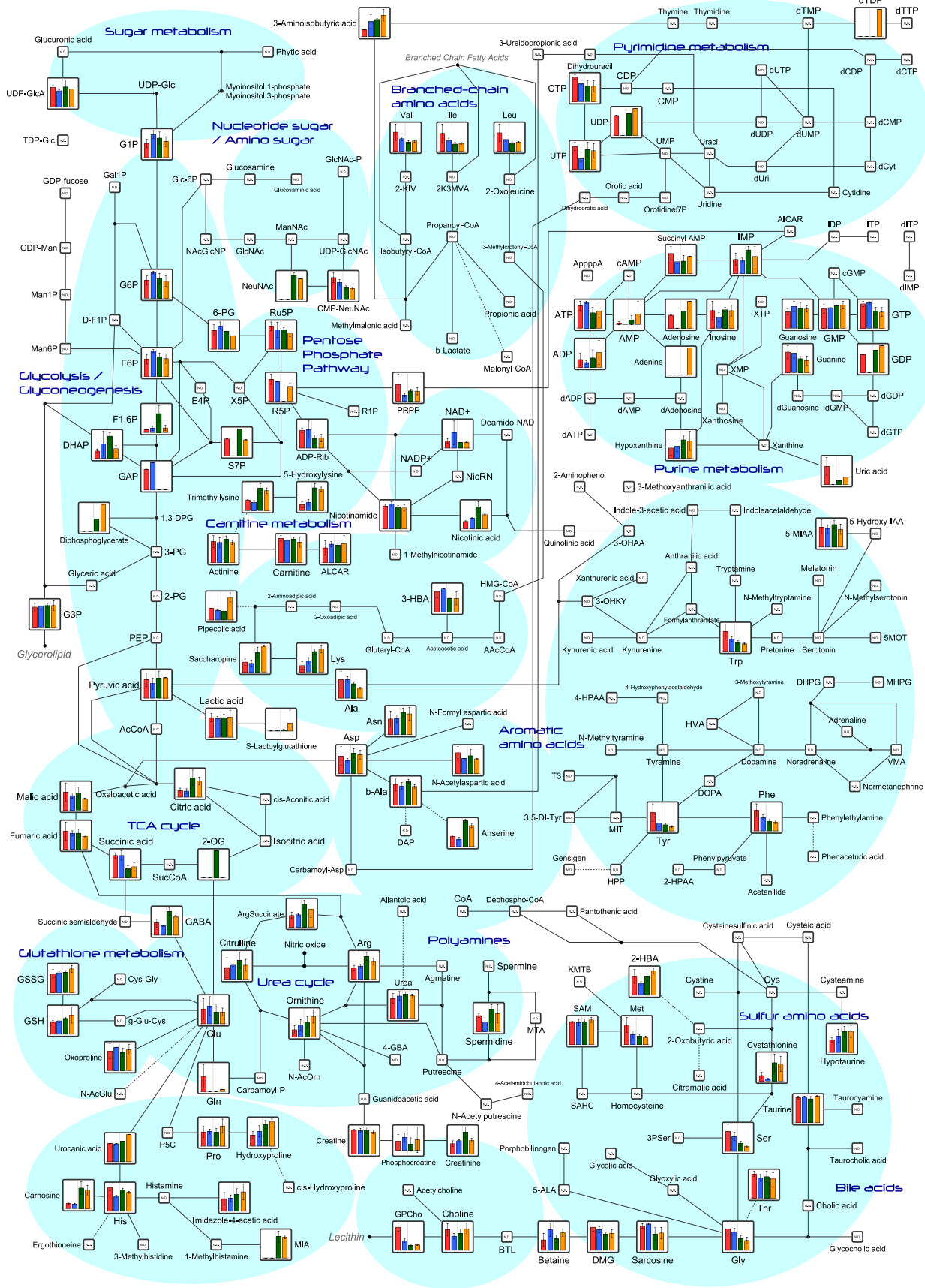


図6. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグと野生型トラフグのメタボローム解析 (各パスウェイでの変動概略図)

赤 : *lepr* KO 雄、青 : *lepr* KO 雌、緑 : 野生型雄、オレンジ : 野生型雌