

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31年度は、ミオスタチン遺伝子および、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追加検討を行った。その結果、昨年度と同様に既存のアレルゲンと相同性の高い配列は確認されなかった。また、高成長形質トラフグでのメタボロミックス解析およびゲノム解析を行なった結果、代謝産物およびゲノム配列に野生型と有意に異なる点は見つからなかった。これらのことから、高成長形質ゲノム編集トラフグの食品としての安全性は、通常トラフグと同等であると考えられた。加えて、フグ毒（TTX）体内分布検討実験を開始し、通常トラフグおよび高成長形質ゲノム編集トラフグへの TTX 投与および各組織の摘出を終えた。（結果は現在解析中である）。

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。

平成31年度は、アレルゲン性の再評価、高成長形質ゲノム編集トラフグを用いた塩基配列解析によるオフターゲット影響とゲノム編集ツール残存性の評価、および、メタボロミックス解析を行い食品安全性を評価することと目的とした。また、ゲノム編集トラフグにおけるフグ毒分布検討実験を開始した。

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3系統およびトラフグ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、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1系統について、予想される全アミノ酸配列、新生ペプチドとその直上10アミノ酸部分、および、塩基欠失部位を挟んだ両側の終止コドン内で予想されるペプチドを用い、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。31年度は通常の読み枠（フレーム）に加えて、異なる読み枠および逆鎖でのアミノ酸配列においても評価した。アレルゲンとする基準は1）全長のアミノ酸配列において E. value < 1 の相同性を示す、2）80アミノ酸のウィンドウサイズで35%以上の相同性を示す、3）8アミノ酸配列が完全に一致する、ものとした（表1参照）。昨年度からの改良点として、「FAOでの6アミノ酸の相同性評価」は過大評価をしているとの指摘があるため、Allergen Onlineの評価基準である「8アミノ酸の相同性」により評価した。また、E. value < 1.0 となったものについては、より低値での解析を行った。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（定）

lepr 破壊トラフグ第3世代の4個体、および、野生型4個体（雌雄2個体づつ）それぞれから、ゲノムDNAを抽出し全ゲノム配列を解読し、Integrative Genomics Viewer (IGV) による解析を行った。トラフグゲノム配列データベースから、*lepr* 中のターゲット配列 (CCACTGTGTGCTGTCCATCT) と欠失および挿入を含めミスマッチが2塩基以内の配列をオフターゲット候補とし、同領域におけるゲノム編集魚と野生型魚における塩基配列の変化を検討した。加えてPAM配列近傍のシード配列が完全に一致している領域については、PCRで増幅後、塩基配列解析を行い、変異の有無を検討した。

3) 可食部成分の検討：

上述のゲノム編集魚の全塩基配列データをゲノム編集時に使用したRNAの配列にマッピングを行い、そのリード数により評価した。このRNA配列には、Cas9 RNA合成に用いた pCS2+hspCas9 および guideRNA 合成に用いた pDR274+sgRNA の塩基

配列を使用した。

3) ゲノム編集ツール残存性の評価：

上述のゲノム編集魚の全塩基配列データをゲノム編集時に使用したRNAの配列にマッピングを行い、そのリード数により評価した。このRNA配列には、Cas9 RNA合成に用いた pCS2+hspCas9 および guideRNA 合成に用いた pDR274+sgRNA の塩基配列を使用した。

4) 可食部成分の検討（メタボロミクス）：

ゲノム編集により *mstn* 遺伝子を破壊したマダイ系統（14塩基欠失）および *lepr* 遺伝子を破壊したトラフグ系統（4塩基欠失）の背部骨格筋を採取し、凍結乾燥後、粉末化した。この粉末 50mg にメタノール/クロロホルム/水（2.5/1/1）を加えた後、水溶性画分を回収後、乾個・TMS誘導化を行い、GC-MS (GSMS-QP2010 Ultra) にて分析を行った。分析により得られた水溶性一次代謝物を網羅的に検出し、多変量解析ソフト SIMA により解析した。

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、全長アミノ酸配列でアレルゲン性を示す配列（グリアジンと相同性を示す）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（図2）。また、新生アミノ酸とその上流10アミノ酸配列中の8アミノ酸配列、および、別フレームではアレルゲン性が予測される配列は検出されなかった。

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3に示す。ミオスタチン遺伝子ゲノム編集トラフグの全長を解析した結果、8塩基欠失（-8b）系統においてアオカビのタンパク質と相同性を示す配列が検出されたが、その他の系統ではアレルゲン性を示す配列は検出されなかった（図4）。通常とは異なるフレームあるいは、相補鎖について検討した結果を図5に示す。その結果、各系統において、アレルゲン性を示す配列が検出されたが、いずれも E. value < 0.05 ではアレルゲン性は示されなかった。

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6に示す。通常フレームで全長アミノ酸を検討した場合、2塩基および4塩基欠失のいずれの系統においてもイネの α アミラーゼと同一性を示す配列が検出された(図7)。しかしながら、事実上アレルゲンとして有効であると考えられるE. value <0.05 で再評価した場合には同一性は検出されなかった。センス鎖の1塩基シフトしたフレームでは、いずれのゲノム編集系統でもオレオシンとの同一性が示されたが、E. value <0.05 ではアレルゲン性を示さなかった(図8)。他のフレームおよび相補鎖のすべてのフレームではアレルゲン性は検出されなかった(図8)。

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9に示す。図10に示すように、センス鎖の通常フレームではアレルゲン性は示されなかった。一方、通常ではない読枠ではアレルゲン性を示すものも有った(図11)。中でもネッタイシマカの唾液腺中アレルゲンとE. value=0.0078でアレルゲン性を示すものがあった。

2) レプチン受容体遺伝子破壊トラフグにおけるオフターゲットの検討:

全ゲノム配列解読は、各個体でゲノムサイズの30倍以上のデータを取得した。また、ターゲット配列と2塩基以下のミスマッチ(欠失・挿入を含む)を有する配列は61箇所存在した(図12)。図13に全塩基配列解析の結果をIGVで可視化した一例を示す。図13内の拡大図に示すように、他個体と比較し塩基配列に違い(欠失)が存在すれば白抜きで示される。図13ではターゲット配列領域を表示しているため、その中の同じ4塩基がゲノム編集魚でのみ欠失している。ゲノム編集魚に特異的にみられる欠失領域は、標的領域のみであった。つまり、オフターゲット影響は観察されなかった。また、異なる手法でのオフターゲットの検証として、候補領域をPCRにより増幅後、電気泳動によるバンドシフトの観察と塩基配列解析を行った(図14)。その結果、いずれの領域にも、変異は観察されなかった。

3) レプチン受容体遺伝子破壊トラフグにおけるゲノム編集ツール残存性の検討:

図15にCas9 RNA、図16にguideRNAの残存

性を示す。いずれにおいてもゲノム編集処理時に用いたRNA配列は確認されなかった。一方、プラスミドのバックボーン配列(RNAに転写しておらず、ゲノム編集処理には用いていない配列)の一部に、ゲノム編集魚および野生型魚の両方で観察された。これは、トラフグゲノム内に一般的に侵入した細菌などの断片であると思われる。

4) 可食部成分の検討:

野生型マダイと*mstn*破壊マダイのメタボロミクスを比較した結果を図17に示す。主成分分析(図17-b)の信頼性を示すQ2値が0.5以下であり(図17-a)、主成分分析解析の信頼性は低いと判断される。つまり、比較した個体間で有意な差がないと判断された。

*lepr*遺伝子破壊トラフグの結果を図18に示す。Q2値は0.5以下であったため、主成分分析の結果の信頼性は高くないが、*lepr*ゲノム編集トラフグと野生型トラフグ間で成分の差異があることが示唆された。そのため、最も差異を作り出す条件で解析を行った結果を図19に示す。*lepr*ゲノム編集魚では、グリシンが増加し、リジンが減少していることが推察された。

D. 結論

*mstn*ゲノム編集マダイ、*mstn*ゲノム編集トラフグ、*lepr*ゲノム編集トラフグ、*mc4r*ゲノム編集トラフグにおいて、通常フレームで産生されると予想されるタンパク質およびペプチドはアレルゲン性を示さないことが、アレルゲンデータベースとの比較により示された。通常フレーム以外、あるいは相補鎖では、アレルゲン性が疑われるペプチド配列が存在するが、そのペプチドが各生物内で産生されている可能性は低いと思われる。そのため、今回解析したゲノム編集魚類では、アレルゲンの産生はないものと考えられる。

今年度新たに行った*lepr*ゲノム編集トラフグでは、オフターゲット変異はされず、また、ゲノム編集ツールの残存も確認されなかった。

メタボロミクス解析においてもゲノム編集魚と非編集魚(野生型)との有意な差は観察されなかった。

以上のことから、今回解析したゲノム編集魚の食品の安全性は、非編集魚とは同等であると判断できる。

E. 業績

1) 市民向け説明会

- ・ ゲノム編集生物と社会について考える、2019年7月6日、日本学術会議講堂、約150名、日本学術会議農学委員会・食料科学委員会合同遺伝子組換え作物分科会、講演者
- ・ 農林水産省アウトリーチ事業、2019年11月13日、名古屋大学農学部、約70名、農林水産省、講師
- ・ 農林水産省アウトリーチ事業、2019年11月22日、立命館高校、約20名、農林水産省、講師
- ・ 農林水産省アウトリーチ事業、2019年11月22日、立命大学、約20名、農林水産省、講師
- ・ ステークホルダー会議、2019年12月5日、京都テルサ、約50名、京都生活協同組合、講師

2) 業界関係者向け説明会

- ・ 知的財産セミナー、2019年6月29日、京都産業会館、約30名、日本弁理士会関西会京都地区会、招待講演者
- ・ ワークショップ:「ゲノム編集食品の安全・安心」、2019年7月17日、大阪大学東京オフィス、約20名、一般社団法人ゲノム編集学会、プレゼンター、話題提供者
- ・ アクションプラン2019、2019年7月31日、大阪帝国ホテル、約300名、三菱食品、招待講演者
- ・ 第63回 滋賀県学校保健・安全研究大会、2019年10月10日、近江八幡市 男女共同参画センター、約60名、滋賀県教育委員会
- ・ トランスフォーマティブ化学生命融合研究大学院プログラムセミナー、2019年10月15日、名古屋大学農学部、約70名、名古屋大学、招待講演者
- ・ 養殖情報交換会、2019年12月10日、シンフォニアテクノロジー響ホール伊勢、約50名、国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所、招待講演者
- ・ JBA 発行と代謝講演会シンポジウム、2020年2月17日、東京大学・中島董一郎記念ホール、80名、バイオインダストリー協会、招待講演
- ・ ワークショップ「ゲノム編集食品に関する多様な意見をどう取り上げるか?」、2020年2月25日、メルパルク京都、20名、ゲノム編集

の未来を考える会 (JST 来共創イノベーション活動支援)、招待講演

3) 行政関係者向け説明会

- ・ ゲノム編集水産物に関する検討会 (非公開)、2020年2月27日、農林水産省、20名、農林水産省消費安全局、有識者

4) 学会 (招待講演)

- ・ 第4回ゲノム編集学会、2019年6月3日、タワーホール船堀
- ・ 第31回日本比較免疫学会シンポジウム、2019年9月4日、九州大学
- ・ Marine Biotechnology Conference 2019、2019年9月12日、静岡県清水市清水文化会館
- ・ 第17回食品安全フォーラム (日本薬学会)、2019年11月29日、日本薬学会長井記念ホール
- ・ 第31回日本生命倫理学会年次大会 シンポジウム、2019年11月29日、東北大学

6) 総説など

- ・ 木下政人、「養殖業へのゲノム編集技術活用のために」、月刊養殖ビジネス (緑書房)、1月号 pp61-64、2020
- ・ 木下政人、「ゲノム編集技術を使った肉厚マダいの作出と品種改良期間の短縮」、JATAFF ジャーナル (農林水産・食品産業技術振興協会)、No.2 (2月号) pp8-12、2020

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
Allergen Online	University of Nebraska-Lincoln	http://www.allergenonline.org
Allergen Database for Food Safety (ADFS)	国立医薬品食品衛生研究所	http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/

以下の基準を満たすものをアレルゲンとした。

- ・全長のアミノ酸が高い相同性 (E. value < 1 とした)
- ・ 80 aaのウィンドウサイズで35%以上の相同性
- ・ 8 aaの完全一致

WT : 1 MHPSQIVLYL SLLIVLGPVV LSDQETQQQQ QQQQQQQPSA TSPEDTEQCA
mstn^{-14/-14} : 1 MHPSQIVLYL SLLIVLGPVV LSDQETQQQQ QQQQQQQPSA TSPEDTEQCA
mstn^{-8b/-8b} : 1 MHPSQIVLYL SLLIVLGPVV LSDQETQQQQ QQQQQQQPSA TSPEDTEQCA
mstn^{-8a/-8a} : 1 MHPSQIVLYL SLLIVLGPVV LSDQETQQQQ QQQQQQQPSA TSPEDTEQCA

WT : 51 TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISRDIVKQL LPKAPPLQQL
mstn^{-14/-14} : 51 TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISRDIVKQL LPKAPPLQQL
mstn^{-8b/-8b} : 51 TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISRDIVKQL LPKAPPLQQL
mstn^{-8a/-8a} : 51 TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISREAAPAQ SAAAAAASRP

388

WT : 101 LDQYDVLGDD NRDVVMEEED EHAITETIMM MATEPESVVQ
mstn^{-14/-14} : 101 LDQYDVLGDD NRDVVMEEED EHDYDDGH*
mstn^{-8b/-8b} : 101 LDQYDVLGDD NRDVVMEEED EHGDDYDDGH*
mstn^{-8a/-8a} : 101 VRRAGRRQQG CGYGGGR*

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。

色字は新生ペプチドを示す。WT:野生型、 -14: 14 塩基欠失、 -8a および -8b: 8 塩基欠失。

配列全長の比較

	-8a (Full)	-14 (Full)	-8b (Full)	WT
Full FASTA (E.value < 1)	グリアジン グルテニン	グリアジン グルテニン	グリアジン グルテニン	グリアジン グルテニン
FAO/WHO (>35% in 80 aa)	なし	なし	なし	なし

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

	-8a (10 + new aa)	-14 (10 + new aa)	-8b (10 + new aa)
FAO/WHO (8 aa exact match)	なし	なし	なし

図2. ミオスタチン遺伝子破壊マダイのアレルゲン性の検討

別フレームおよび相補鎖でアレルゲン性は予測されなかった。

グリアジン：グルテニンは小麦のアレルゲン

WT : 1 MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI
mstn^{-8b/-8b} : 1 MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI
mstn^{-41/-41} : 1 MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI
mstn^{-8a/-8a} : 1 MQLSPSMLHF SLMISLSLVV LSGQETHQQP PVGSPEDTEQ CVTCDVRQHI

WT : 51 KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG
mstn^{-8b/-8b} : 51 KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG
mstn^{-41/-41} : 51 KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISRDTVK QLLPKAPPLQ QLLDQYDVLG
mstn^{-8a/-8a} : 51 KTMRLNAIKS QILSKLRMKE APNISR**EAAP AQSAAAAAAP RPVRRAGR***

WT : 101DDNRDVVTEE DDEHAITETI MM MATEPASVVQV . . . 376
mstn^{-8b/-8b} : 101DDNRDVVTEE DDEH**GDHDD GH***
mstn^{-41/-41} : 101DDNRD**HHDDGH***

図3. 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

色字は新生ペプチドを示す。WT:野生型、 -41: 41 塩基欠失、 -8a および -8b: 8 塩基欠失。

配列全長の比較

	-8a (Full)	-8b (Full)	-41 (Full)	WT
Full FASTA (E.value < 1)	なし	ペルオキシソーム膜タンパク (アオカビ)	なし	グルテニン
FAO/WHO (>35% in 80 aa)	なし	なし	なし	なし

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

	-8a (10+new aa)	-8b (10+new aa)	-41 (10+new aa)
FAO/WHO (8 aa exact match)	なし	なし	なし

図4. ミオスタチン遺伝子破壊トラフグのアレルゲン性の検討

センス鎖の通常フレームでの結果を示す。

センス鎖

フレーム	-8a	-41	-8b
1	グルテニン	なし	なし
2	2Sアルブミン (ピーナッツ) HLHタンパク (フザリウム属真菌) β-コングリシニン (大豆) ビシリン (マメ科植物)	なし	なし

相補鎖

フレーム	-8a	-41	-8b
0	なし	なし	脂質輸送タンパク (ナス科植物)
1	なし	なし	なし
2	なし	グリシニン (ピーナッツ)	グリシニン (ピーナッツ)

図5. ミオスタチン遺伝子破壊トラフグのアレルゲン性の検討
センス鎖の異なるフレームおよび相補鎖での結果を示す。

WT : 1MSSTMFGRV T LSVMVLGFL L SRGVL SLENS DAGGRHSGVL DLPWKDELCC
lepr^{-2/-2} : 1MSSTMFGRV T LSVMVLGFL L SRGVL SLENS DAGGRHSGVL DLPWKDELCC
lepr^{-4/-4} : 1MSSTMFGRV T LSVMVLGFL L SRGVL SLENS DAGGRHSGVL DLPWKDELCC
 ⋮
WT : 351NQWVSQVTMR PSETGMYDLL QCTKKRMIAY SQVYVEGASI SISCETNGEI
lepr^{-2/-2} : 351NQWVSQVTMR PSETGMYDLL QCTKKRMIAY SQVYVEGASI SISCETNGEI
lepr^{-4/-4} : 351NQWVSQVTMR PSETGMYDLL QCTKKRMIAY SQVYVEGASI SISCETNGEI

WT : 401DAMDCRWNST QWLNPFRTR WADLSCDVME ERERAGDNVG . . . 1117
lepr^{-2/-2} : 401DAMDCRWNST **VAEPQLQNQV G***
lepr^{-4/-4} : 401DAMDCRWNS **S G***

図6. 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から産生されるアミノ酸配列

色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。

配列全長の比較

	-2 (Full)	-4 (Full)	WT
Full FASTA (E.value < 1)	αアミラーゼ インヒビター (イネ) *	αアミラーゼ インヒビター (イネ) *	なし
FAO/WHO (>35% in 80 aa)	なし	なし	なし

* : E.value < 0.05 ではヒットしない

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 aa)	-4 (10 + new aa)
FAO/WHO (8 aa exact match)	なし	なし

図7. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグのアレルゲン性の検討

センス鎖の通常フレームでの結果を示す。

センス鎖

フレーム	-2	-4
1	オレオシン (オリーブ花粉)	オレオシン (オリーブ花粉)
2	なし	なし

相補鎖

フレーム	-2	-4
0	なし	なし
1	なし	なし
2	なし	なし

図8. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグの通常フレーム以外でデータ上で翻訳されるペプチドのアレルゲン性の検討

E.value < 1での結果を示す。

E.value < 0.05では、いずれもアレルゲン性は示されなかった。

WT : 1 MNATDPPGRV QDFSNGSQTP ETDFPNEEKE SSTGCYEQML ISTEVFLTLG
mc4r-13/-13 : 1 MNATDPPGRV QDFSNGRRTF **QTRRRNLRD** **ATSRC***

WT : 51 IISLLENILV VAAIVKNKNL HSPMYFFICS . . . 322

図9. 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から産生されるアミノ酸配列

色字は新生ペプチドを示す。WT:野生型、-13: 13塩基欠失。

配列全長の比較

	-13 (Full)	WT
Full FASTA (E.value < 1)	なし	なし
FAO/WHO (>35% in 80 aa)	なし	なし

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

	-13 (10 + new aa)
FAO/WHO (8 aa exact match)	なし

図10.メラノコルチン4型受容体遺伝子破壊トラフグのアレルゲン性の検討

センス鎖の通常フレームでの結果を示す。

センス鎖

フレーム	-13
1	β-コングリシニン (大豆)
2	グルテニン (小麦)

相補鎖

解析方法	フレーム		
	0	1	2
Full FASTA (E.value < 1)	花粉 (ニガヨモギ)	グルテニン (コムギ) ※唾腺中アレルゲン (ネッタイシマカ)	なし
FAO/WHO (>35% in 80 aa)	なし	※唾腺中アレルゲン (ネッタイシマカ)	なし
FAO/WHO (8 aa exact match)	なし	なし	なし

図 1 1. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグの通常フレーム以外でデータ上で翻訳されるペプチドのアレルゲン性の検討

※E.value = 0.0078 と高い相同性が見られた
gi|2114497|gid|1024|Allergen 30 kDa salivary gland

#	results	strand	ensemble_search	gene	feature	abjct	mismatch	mis	del	ins	seed perfect match
gnt	-	-	chr20:11315793-11315813	ENSTRUG00000018553	exon	CCACTGTGTGCTGTCCATCT	0	0	0	0	1
OT1	none	+	HE591747:303012-303031	ENSTRUG00000022625	intron	AGAT-GAACAAACACACAGGAG	2	1	0	1	0
OT2	none	+	HE591855:167082-167102	none(Genescan_prediction+)		AGATGGAACAGCACACAG	1	1	0	0	0
OT3	none	+	HE591871:145815-145834	none(refseq+)	exon	TGA-GGAACAGCACACAGGAG	2	1	0	1	1
OT4	none	+	HE592464:18756-18776	ENSTRUG00000023752	3utr	AGATGGAACAG-ACGACAGCAG	2	0	1	1	0
OT5	none	+	HE592677:14859-14880	none		AGAGGGAATCAGCACACAGCAG	2	1	1	0	0
OT6	none	+	HE593051:5086-5107	none(Genescan_prediction+)		AGAGGGAATCAGCACACAGCAG	2	1	1	0	0
OT7	none	+	HE594516:1437-1457	none		AGCTGGAACAGCACACAGAGG	2	2	0	0	0
OT8	none	+	HE594608:746-767	none		AGAGGGAATCAGCACACAGCAG	2	1	1	0	0
OT9	none	+	chr3:11677466-11677485	ENSTRUG00000013622	intron	AGATGGATCA-CACACAGAG	2	1	0	1	0
OT10	none	+	chr5:283674-283694	ENSTRUG00000007413	intron	ACATGGAACAGCAACAGAG	2	2	0	0	0
OT11	none	+	chr5:4742359-4742380	ENSTRUG00000010563	exon	AGATGGACACAGCACACAG	2	1	1	0	0
OT12	none	+	chr5:4814740-4814761	ENSTRUG00000020691	intron	AGTATGGAGACAGCACAGAGG	2	1	1	0	0
OT13	none	+	chr6:4461642-4461664	none(Genescan_prediction+)		AGATGGAGAGCAGCACAGAGG	2	0	2	0	0
OT14	none	+	chr8:8790955-8790975	none(Genescan_prediction+)		AGATGGAACAGCACACAGG	2	2	0	0	0
OT15	none	+	chr9:7332440-7332459	ENSTRUG00000010186	intron	AAATGGAACAGCAC-CAAGG	2	1	0	1	0
OT16	none	+	chr9:12360332-12360351	none(Genescan_prediction+)		AGA-GGAACAGCACACAGCAG	2	1	0	1	0
OT17	none	+	chr10:3305528-3305547	none(Genescan_prediction+)		AGATGGAGAGCAGCAC-GGAG	2	1	0	1	0
OT18	none	+	chr13:8706172-8706190	none(refseq+)	intron	AGATGC-A-AGCACACAGAGG	2	0	0	2	0
OT19	none	+	chr13:12693401-12693421	none		AGAGGGAACAGCACACAGCAG	1	1	0	0	1
OT20	none	+	chr15:3763545-3763565	ENSTRUG00000020956	3utr	AGATGGAACAGCACACAGCGG	2	2	0	0	0
OT21	none	+	chr15:4674220-4674238	none(refseq+)	exon	AGATGG-ACAGCAC-AGGAG	2	0	0	2	0
OT22	none	+	chr15:5006835-5006854	none(Genescan_prediction+)		ACAT-GAACAGCACACAGAG	2	1	0	1	1
OT23	none	+	chr20:255241-255261	ENSTRUG00000024219	intron	AGAGCAACAGCACACAGAGG	2	2	0	0	1
OT24	none	+	chr21:4993307-4993326	ENSTRUG00000014047	intron	AGTGAACAGCACACA-AG	2	1	0	1	0
OT25	none	+	chr22:8813489-8813508	none(refseq+)		AGATGCAACA-CACACAAAGG	2	1	0	1	0
OT26	none	+	chr22:9557216-9557235	ENSTRUG00000006539	3utr	AGA-GTAAACAGCACACAGAGG	2	1	0	1	1
OT27	none	-	HE591784:27700-27720	none(Genescan_prediction+)		CTCCTGTGTGAGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT28	none	-	HE591851:17313-17333	none(Genescan_prediction+)		CTTGTGTGTGCGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT29	none	-	chr1:22100674-22100693	none(refseq+)	intron	CCCCGTGTGTGAGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT30	none	-	HE592491:20092-20112	none		CCCCGTGTGTGAGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT31	none	-	HE592521:4763-4784	none(refseq+)	intron	CCTCTGTGAGTGTGTTCCATCT	2	1	1	0	0
OT32	none	-	HE592751:4904-4924	none		CCTCTGTGTGCTGTTCAGCT	2	2	0	0	0
OT33	none	-	HE593323:704-724	none		CCTCTGTGTGCTGTTCAGCT	2	2	0	0	0
OT34	none	-	HE594615:2444-2465	none		CTGCTGTGTGCTGATTCATCT	2	1	1	0	0
OT35	none	-	HE594929:1098-1118	none(refseq+)	exon	CTTTGTGTGCGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT36	none	-	HE595267:768-788	none		CCTCTGTGTGCTGTTCAGCT	2	2	0	0	1
OT37	none	-	chr1:22100674-22100693	none(refseq+)	3utr	CTACTGTG-GCTGTTTCACT	2	1	0	1	0
OT38	none	-	chr2:9987523-9987542	none(Genescan_prediction+)		CTGCT-TGTGATTCATCT	2	1	0	1	0
OT39	none	-	chr3:2687014-2687033	ENSTRUG00000014991	intron	CCAGTGTG-GCTGTTCCATCT	2	1	0	1	0
OT40	none	-	chr3:11354101-11354119	ENSTRUG00000012256	intron	CTG-TGTGTGCTGT-TCACT	2	0	0	2	0
OT41	none	-	chr4:3738304-3738323	none(Genescan_prediction+)		CTACTGTG-GCTGTTCCATCT	2	1	0	1	0
OT42	none	-	chr7:7728697-7728716	ENSTRUG00000002103	exon	CCCCGTGTGTGCTGTTC-TCCT	2	1	0	1	1
OT43	none	-	chr7:13468369-13468390	ENSTRUG00000004325	intron	CCCCGTGTGTGCTGTTCATCT	1	0	1	0	0
OT44	none	-	chr8:12117618-12117636	ENSTRUG00000015511	intron	CTCCTGT-TGCT-TTCCATCT	2	0	0	2	0
OT45	none	-	chr13:11982850-11982868	none(Genescan_prediction+)		CTCT-TGTGCT-TTCCATCT	2	0	0	2	0
OT46	none	-	chr13:12825026-12825045	none(Genescan_prediction+)		CCCCGTGTGTGCTGTTC-TCCT	2	1	0	1	0
OT47	none	-	chr13:14225756-14225776	none(Genescan_prediction+)		CCAC-GTGTGCTGTTCATCT	2	0	1	1	0
OT48	none	-	chr14:4310825-4310845	ENSTRUG00000005874	exon	CTTCTGTGTGACTTTCATCT	2	2	0	0	0
OT49	none	-	chr14:9383168-9383187	ENSTRUG00000013584	intron	CTT-TATGTGTGTTCATCT	2	1	0	1	0
OT50	none	-	chr15:5539820-5539839	ENSTRUG00000002628	intron	CCCCGTG-TGCTTCCATTT	2	1	0	1	0
OT51	none	-	chr15:9937138-9937157	ENSTRUG00000016772	intron	CTGC-GTGTGTTCATCC	2	1	0	1	0
OT52	none	-	chr17:429542-429560	none		CCTCTGT-T-CTGTTCATCT	2	0	0	2	0
OT53	none	-	chr17:5091828-5091848	ENSTRUG00000025008	exon	CCACTGTGTGCTGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT54	none	-	chr17:6271380-6271401	none(refseq+)	intron/exo	CCACTGTGTGCTGTTCAGCT	2	1	1	0	0
OT55	none	-	chr18:3986315-3986335	ENSTRUG00000013192	intron	CTTCTGTGTGCTGTTCAT-T	2	0	1	1	0
OT56	none	-	chr19:10079887-10079908	ENSTRUG00000006186	intron	CTGCTGTGTGCTTTCATCT	2	1	1	0	0
OT57	none	-	chr20:9132257-9132277	none		CCGCTGTGTGAGTTCATCT	2	2	0	0	0
OT58	none	-	chr21:4886387-4886406	none		CCACTGTGT-TGTTCATCC	2	1	0	1	0
OT59	none	-	chr21:13673735-13673756	none(Genescan_prediction+)		CTGCTGTGTGCTTTCATCT	2	1	1	0	0
OT60	none	-	chr22:5805648-5805666	none		CTGCTGTGTGCTG-TCC-TCCT	2	0	0	2	0
OT61	none	-	chr22:10306188-10306206	none(Genescan_prediction+)		CCCCGTG-GCTGTTC-TCCT	2	0	0	2	0

図 1 2. レプチン受容体ゲノム編集ターゲット配列とオフターゲット候補配列

2 塩基ミスマッチまでの、候補配列(6 1 領域) を示す。黄色はターゲット配列。
 濃青バック: シードシーケンス一致
 薄青バック: 1塩基ミスマッチ

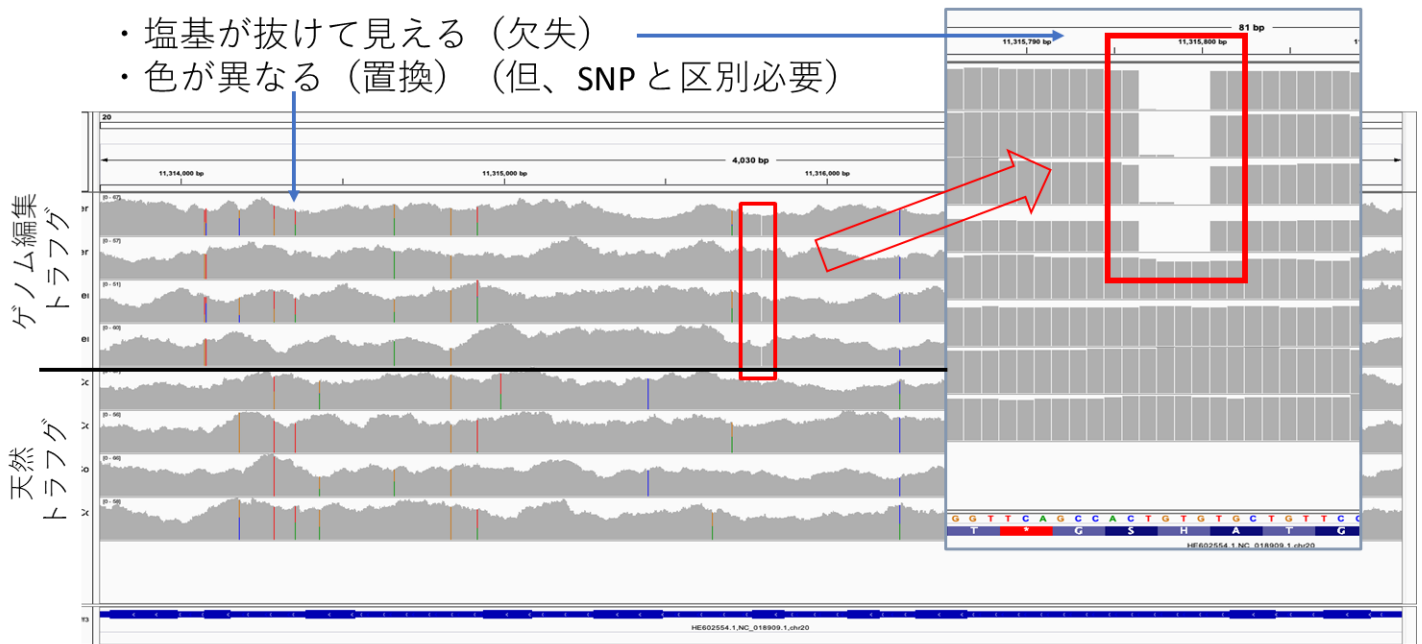


図 1 3. レプチン受容体遺伝子破壊および野生型トラフグの全塩基配列解析結果の IGV 像

ターゲット入る付近の結果を示す。縦軸はリード数を示す。横軸は塩基配列を示す。拡大図に示されるように、塩基欠失箇所は白抜きで示される。

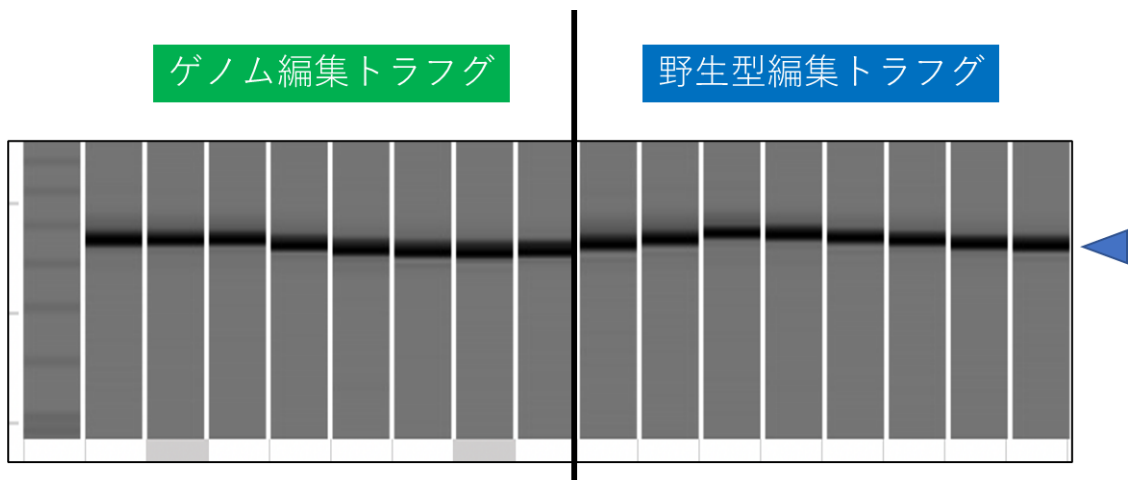


図 1 4. レプチン受容体遺伝子破壊および野生型トラフグのオフターゲット領域の PCR 産物

一例として、オフターゲット候補配列:OT#2 を示す。ゲノム編集および野生型個体それぞれ 8 個体の各 PCR 産物を自動電気泳動装置により解析した。続いて、これらの塩基配列をサンガーシーケンス法により解読した。その結果、いずれの領域にも変異は観察されなかった。

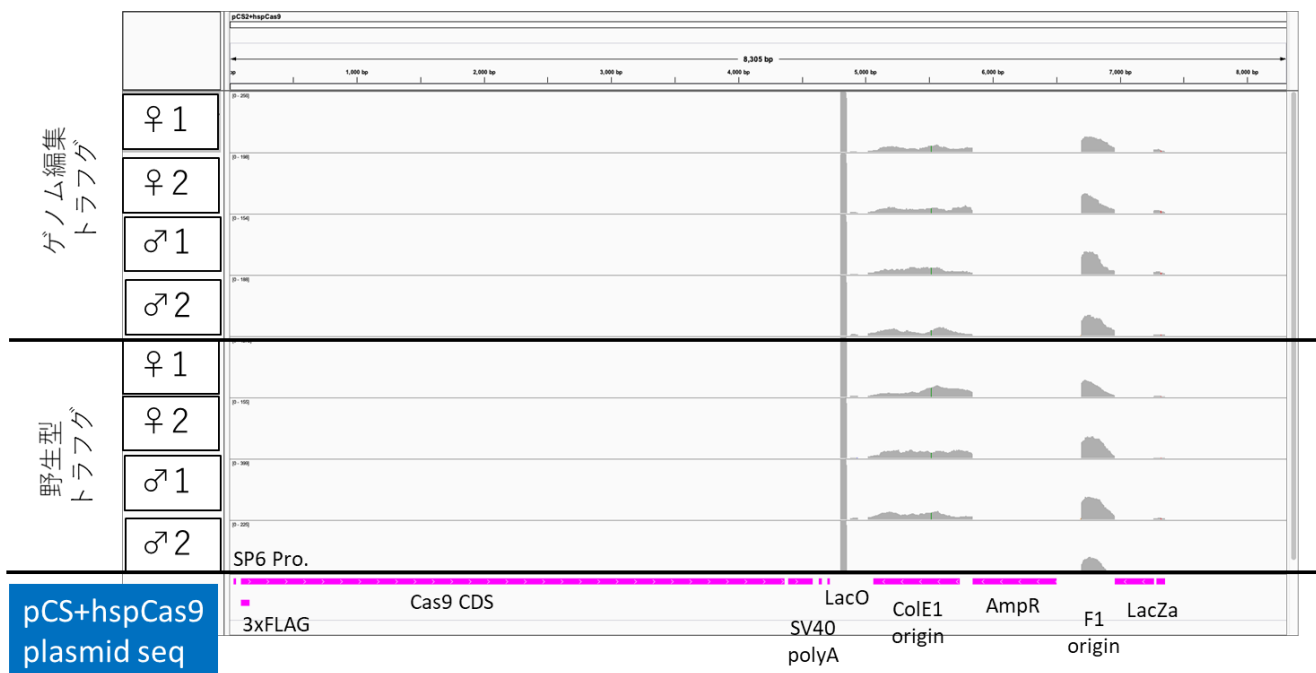


図 15. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグシステムのゲノム編集ツール残存性の評価 (pCS+hspCas9)

各個体の全塩基配列データをクエリーとしてCas9 RNA 合成時に用いたpCS+hspCas9にマッピングした。ゲノム編集個体および野生型個体ともに、プラスミドバックボーンの配列にマップされるものはあるが、Cas9 領域にはマップされなかった。

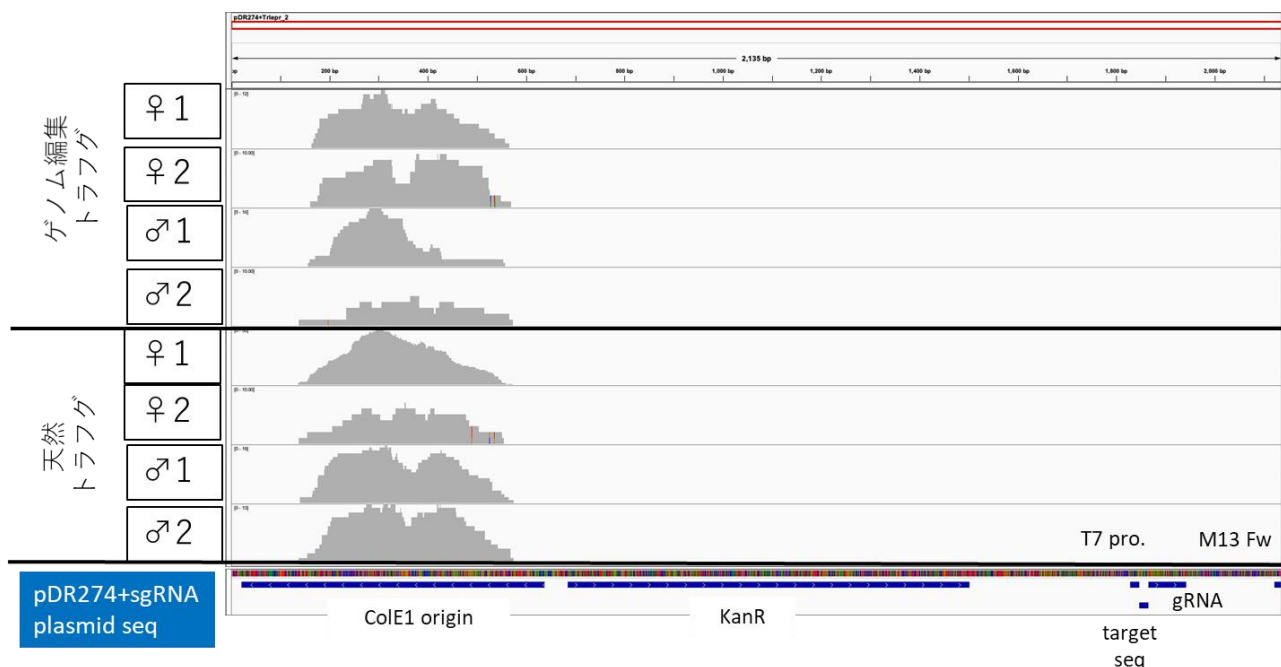


図 16. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグシステムのゲノム編集ツール残存性の評価 (pDR274+sgRNA)

各個体の全塩基配列データをクエリーとしてCas9 RNA 合成時に用いたpDR274+sgRNAにマッピングした。ゲノム編集個体および野生型個体ともに、プラスミドバックボーンの配列にマップされるものはあるが、標的配列を含む guide RNA 領域にはマップされなかった。

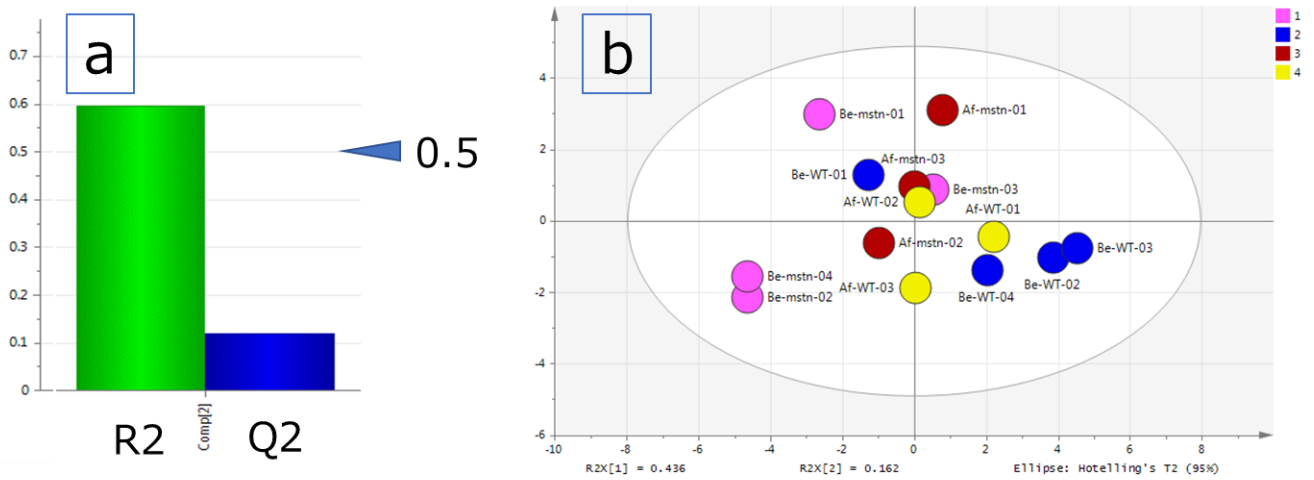


図 17. ミオスタチン遺伝子破壊マダイ系統メタボロミックス解析

a: データ解析の有意性を示す。Q2値が 0.5 以上の場合、データ解析結果が信頼される。今回のQ2値は 0.5 以下であり b に示される解析の信頼性は低いと判断される。つまり、比較した個体間で有意な差がない。b: 主成分分析の結果。mstn : mstn KO マダイ
WT: 野生型マダイ

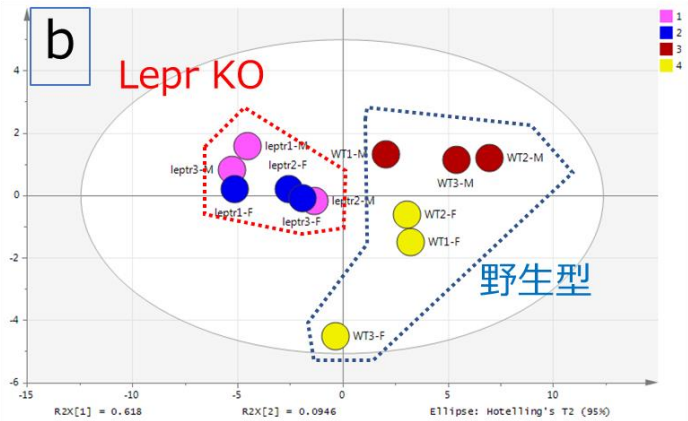
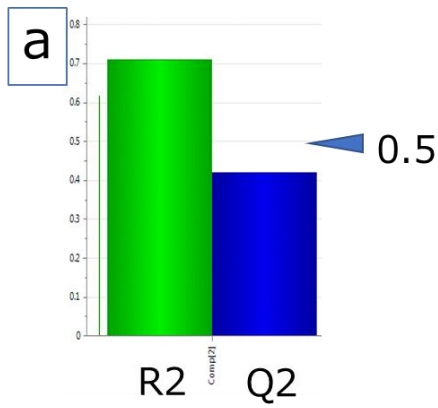


図 18. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ系統メタボロミックス解析

a: データ解析の有意性を示す。Q2値が0.5 以上の場合、データ解析結果が信頼される。今回のQ2値は0.5 以下であった。b: 主成分分析の結果。c: 主成分分析に寄与する因子の解析。lepr KO トラフグ、WT: 野生型トラフグ

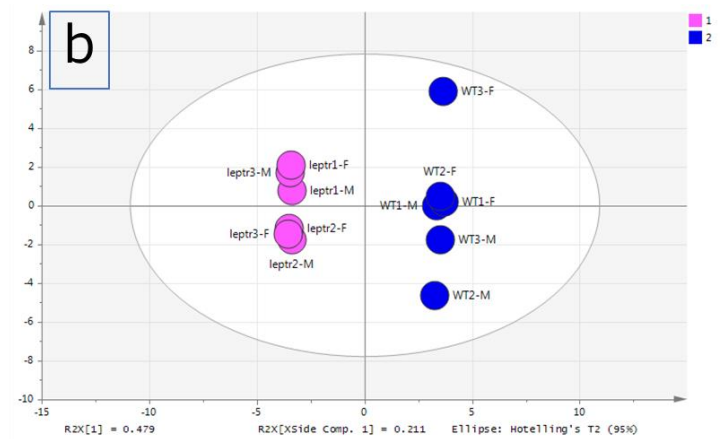
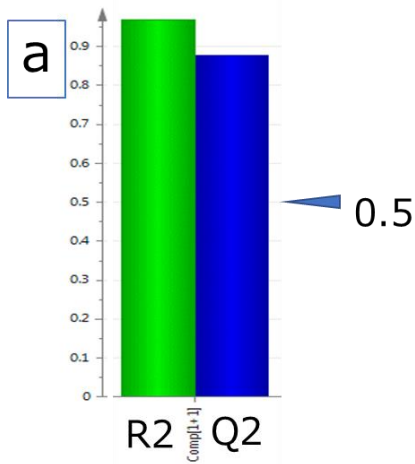
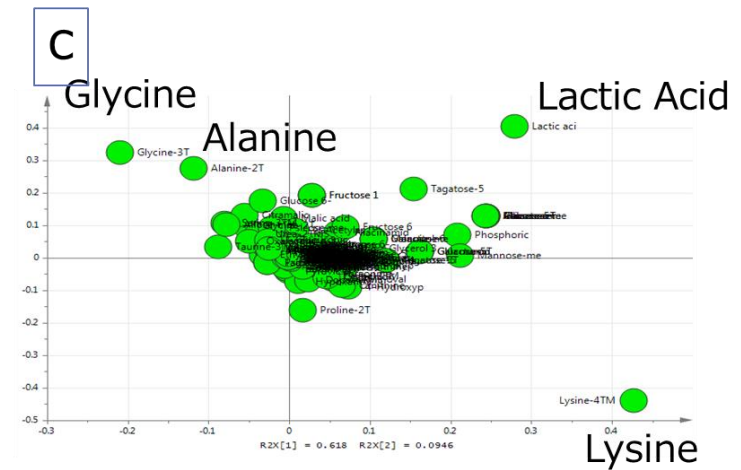


図 19. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ系統メタボロミックス解析に影響を与える因子

a: データ解析の有意性を示す。b: ゲノム編集魚と野生魚で最も差異が出るようにパラメータをせってした主成分分析の結果。c: 主成分分析に寄与する因子の解析。lepr: lepr KO トラフグ、WT: 野生型トラフグ

