

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
総合分担研究報告書

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）

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システム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した。1）アレルギー性の検討：検討した結果、編集様式（欠失塩基数やその位置）により、既知のアレルゲン物質との相同性が異なることが明らかとなったが、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。2）メタボロミクス解析：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、非編集魚と有意に異なる点は見つからなかった。3）ゲノム解析：食欲関連遺伝子破壊トラフグでのゲノム解析を行なった結果、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ことから、ゲノム配列に非編集魚と有意に異なる点は見つからなかった。4）フグ毒蓄積様式の検討：食欲関連遺伝子破壊トラフグを用いて、フグ毒（テトロドトキシン：TTX）の体内分布様式を検討した結果、ゲノム編集魚および非編集魚いずれにおいても筋肉、皮、精巣には蓄積されず、肝臓と卵巣に蓄積された。この知見は従来のトラフグのフグ毒含有部位と同一であった。5）ラットを用いた投与試験：レプチン受容体遺伝子機能欠失トラフグの骨格筋ホモジネートをラットに2週間経口投与した結果、外見的所見、血液学的検査、血液生化学的検査の結果では異常は認められず、ゲノム編集トラフグの可食部である骨格筋に毒性は見られなかった。

以上の結果から、ゲノム編集魚は非編集魚と同等の安全性が示された。また、アレルギー性の検討のところで観察されたように、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）において特性が異なることから、安全性は作出された系統を個別に評価することが必要であると考えられた。

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。

そこで本研究では、自身で作出したゲノム編集マダイおよびトラフグを用い、それらの特性を検討し、得られた結果をもとに今後の食品安全性評価法策定に提言を与えるのを目的とした。

B. 研究方法

1）アレルギー性の検討：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。平成31(令和元)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、②80アミノ酸のウィンドウサイズで35%以上の相同性を示す、③8アミノ酸配列が完全に一致する、ものとした。「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)

Allergen Database for Food Safety (ADFS) (国立医薬品食品衛生研究所)

2) メタボロミクス解析：レプチン受容体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(ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に委託)。また、ゲノム編集によりミオスタチン遺伝子を破壊したマダイ系統(14塩基欠失)およびレプチン受容体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、乾留・TMS誘導化を行い、GC-MS(GSMS-QP2010 Ultra)にて解析を行った。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。

3) ゲノム解析：レプチン受容体破壊トラフグ第3世代の4個体、および、野生型4個体(雌雄2個体ずつ)それぞれから、ゲノムDNAを抽出して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、レプチン受容体中のターゲット配列(CCACTGTGTGCTGTTCCATCT:太字がPAM配列)と欠失および挿入を含め mismatches 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。

4) フグ毒蓄積様式の検討：ゲノム編集によりレプチン受容体遺伝子、メラノコルチン4型受容体遺伝子を破壊したトラフグおよび非編集トラフグに市販のテトロドトキシン(和光TTX206-11071)を0.4mg/Kgとなるように単回経口投与した。投与24時間後に即殺、解剖し、皮、筋肉、肝臓、生殖巣を摘出して使用するまで冷凍保存した。解凍後、細切したのち1gに0.1%酢酸4mLを添加し100°Cで10分間加熱後、冷却、遠心分離し、上清をフィルターろ過してTTXの抽出を行なった。抽出液をHPLC-FLDに供することでTTXを蛍光検出器(励起波長381nm、検出波長505nm)で定量した。

5) ラットを用いた投与試験：レプチン受容体を破壊したトラフグ4個体、および、非ゲノム編集トラフグ4個体(雌雄2個体ずつ)それぞれから、背部普通筋を採取し、1.5倍量のミリQ水を用いてホモジナイズした後、目開き0.42mmのメッシュを通し、筋肉ホモジネートとした。これをラット(Slc:SD系統、SPFグレード、雄、6週齢)に各トラフグホモジネートにつき2匹に、ゾンデを用いて胃内に1日1回注入した。これを14日間行なったのち、血液を採取し、血液学的検査および血液学的検査を行なった。また、試験前中後での各個体の体重、試験期間後の肝臓および腎臓の重量測定を行った。試験期間を通じて外見の観察を行った。なお、ラットへの投与試験は株式会社ケー・エー・シーに委託し実施した。

C. 結果および考察

1) アレルゲン性の検討：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。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1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2)。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、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検討した結果、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 アミラーゼと相同性を示す配列が検出された。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相同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の相同性が示されたが、E.value < 0.05 ではアレルゲン性を示さなかった。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。

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評価した結果、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。中でもネツ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) メタボロミクス解析：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3に、パスウェイ解析の結果を図4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。

また、レプチン受容体遺伝子破壊トラフグを GC-MS (GSMS-QP2010 Ultra) にて分析を行った。レプチン受容体遺伝子破壊トラフグの結果を図5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、レプチン受容体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、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。

野生型マダイとミオスタチン遺伝子破壊マダイの GC-MS (GSMS-QP2010 Ultra) 解析によるメタボロミクスを比較した結果を図6に示す。主成分分析(図6-b)の信頼性を示す Q2 値が 0.5 以下であり(図6-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。

3) ゲノム解析：レプチン受容体遺伝子破壊トラフグと非編集トラフグの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。塩基配列データ検索の結果、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7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7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7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

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8)。その結果、いずれの領域にも、変異は観察されなかった。

図9に Cas9 RNA、図1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) フグ毒蓄積様式の検討:ゲノム編集によりレプチン受容体遺伝子を破壊したトラフグ(ゲノム編集トラフグ)および非編集トラフグの各組織における TTX の蓄積量を、投与した TTX 量に対する比率(%)で示す(表1)。TTX を投与しない場合は、ゲノム編集魚および非編集魚のいずれにおいても検討した全ての組織で TTX の蓄積は認められなかった。このことからトラフグ自身が TTX を合成しないことが改めて示された。ゲノム編集魚において、皮、筋肉、雄の生殖巣(精巣)では、TTX 量は、検出限界(0.2 $\mu\text{g/g}$ 組織)以下であった。一方、個体間に大きなばらつきはあるが肝臓および雌の生殖巣(卵巣)では、顕著な TTX の蓄積が見られた。この結果は、非編集魚でも同様であった。トラフグのフグ毒蓄積には、サキシトキシン・テトロドトキシン結合タンパク質(Puffer-fish Saxitoxin Tetrodotoxin Binding Protein: PSTBP)が関与していることが報告されている。今回のゲノム編集のターゲット遺伝子は、食欲に関係する遺伝子であり、PSTBP の代謝に関与するものではない。このことから、TTX 蓄積に関与しない遺伝子をゲノム編集することでは、トラフグ体内での TTX 蓄積部位は変化せず、非編集魚と同様であることが示された。

5) ラットを用いた投与試験:試験期間中のゲノム編集トラフグホモジネート、または、非編集トラフグホモジネートを投与したラット全てにおいて一般状態、および投与試験終了後の解剖時の肝臓および腎臓を肉眼的観察に異常所見はみられなかった。

体重の増加においても、ゲノム編集トラフグホ

モジネート、または、非編集トラフグホモジネートを投与群ともに、実験開始時から 55%~69% の増加を示し、両者に差は見られなかった。

血液学的検査結果を表2に示す。赤血球数においてゲノム編集トラフグホモジネート投与群では $7.15 \times 10^6 \mu\text{L}$ 、非編集トラフグホモジネート投与群では $6.87 \times 10^6 \mu\text{L}$ となり統計的な有意差が示されたが、ヘモグロビン濃度やヘマトクリット値など関連するパラメーターに優位な差が見られなかったこと、他の試験での対照群の数値とゲノム編集トラフグホモジネート投与群の方が近いこと、などから事実上、赤血球数には差異がないと判断された。白血球数、血小板数などその他の指標では優位差は示されなかった。

血液生化学的検査において、ゲノム編集トラフグホモジネート投与群のアスパラギン酸アミノ基転移酵素(ASAT)は非編集トラフグホモジネート投与群と比較して統計学的に有意な高値を示した。しかし、ASAT の変動幅は正常の範囲内であり、その他の肝機能の指標となる酵素には変化が見られないことから、ASAT の上昇は肝機能障害を示唆する結果ではないと判断した。血液生化学的検査のその他の項目については、有意差は見られなかった。

以上の結果から、ゲノム編集トラフグ筋肉ホモジネートに毒性はないと判断した。

D. 結論

- ・ アレルゲン性の検討項目で、同じ遺伝子を編集しても、その編集の様式(欠失延期数や部位)により、新規に産生される可能性があるペプチドは異なり、かつ、そのアレルゲン性についても異なることが示された。このことより、ゲノム編集食品の安全性を評価する際、作出された系統ごとにその安全性を評価する必要があることが示された。
- ・ アレルゲン性を評価する際、基準値(E.value や評価する連続塩基数など)の設定により、結果が異なる。そのため真に有効な基準値の検討と設定が求められる。
- ・ メタボロミクス解析の結果、レプチン受容体遺伝子編集トラフグにおいて特定の代謝経路の亢進や減退が見られず、個体としての代謝経路が大きく変化することは観察されなかった。また、フグ毒(TTX)蓄積様式にも変化が見られなかった。これらのことから、編集を施した遺伝子

と直接的な因果関係のない代謝経路に及ぼすゲノム編集の影響は非常に低いと考えられた。

- ・今回用いたレプチン受容体遺伝子ゲノム編集トラフグにおいてラットへの経口投与で毒性が見られなかったこと、フグ毒投与試験でフグ毒を投与しなかったゲノム編集トラフグにフグ毒が検出されなかったこと、また、これまで分担者が作出したミオスタチン遺伝子ゲノム編集マダイでも食味試験において検査者に異常は見られなかったことなどから、ゲノム編集操作によって有害な物質が産生されるものではないことが示された。
- ・全ゲノム解析の結果、ゲノム編集ツールの残存やオフターゲットは検出されなかった。またPCR法によってもオフターゲットは観察されなかった。この様にオフターゲットの発生頻度は大変低いと考えられる。
- ・動物のゲノム編集で一般的であるRNAやタンパク質を用いたゲノム編集方法では、それらの残存せいの可能性は非常に低いと考えられる。

E. 研究発表・業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

3. 講演会・説明会等の社会貢献

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 くらまろ塾本部講座、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 広島バイオフィォーラム、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
- ・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
- ・養殖業へのゲノム編集技術の可能性、2020年8月21日、アイビーホール青山会館、参加者約50名、一般財団法人日本水産油脂協会、講演者
- ・食べる？食べない？ゲノム編集マダイ・サイエンスアゴラ 2020、2020年11月22日、Online、参加者数約100名、国立研究開発法人科学技術振興機構、講演者

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、三會堂会館、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
- ・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
 - ・ ゲノム編集マダイ・スタークホルダー会議、2020年12月3日、東海コープ事業連合 (本部)、参加者約50名、くらしとバイオ 21・東海コープ事業連合、講演者
- ・ 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

5) 総説など

- ・ 木下政人 「肉厚マダイ」の事例から考える養殖業へのゲノム編集技術の活用、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イ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
- ・ 木下政人、岸本謙太、吉浦康寿、家戸敬太郎「養殖魚でのゲノム編集—肉厚マダイ・トラフグの作出を例に」、ゲノム編集食品—農林水産分野への応用と持続的社会的実現 (株式会社エヌ・ティー・エス)、2021年1月刊行

F. 健康危険情報

各年度の分担報告書を参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

各年度の分担報告書を参照

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
- ・ 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

WT :	1	MQLSPSMLHF	SLMISLSLV	LSGQETHQQP	PVGSPEDETEQ	CVTCDVRRQHI
mstn^{-8b/-8b} :	1	MQLSPSMLHF	SLMISLSLV	LSGQETHQQP	PVGSPEDETEQ	CVTCDVRRQHI
mstn^{-41/-41} :	1	MQLSPSMLHF	SLMISLSLV	LSGQETHQQP	PVGSPEDETEQ	CVTCDVRRQHI
mstn^{-8a/-8a} :	1	MQLSPSMLHF	SLMISLSLV	LSGQETHQQP	PVGSPEDETEQ	CVTCDVRRQHI
WT :	51	KTMRINAIKS	QILSKLRMKE	APNISRDTVK	QLLPKAPPLQ	QLLDQYDVLG
mstn^{-8b/-8b} :	51	KTMRINAIKS	QILSKLRMKE	APNISRDTVK	QLLPKAPPLQ	QLLDQYDVLG
mstn^{-41/-41} :	51	KTMRINAIKS	QILSKLRMKE	APNISRDTVK	QLLPKAPPLQ	QLLDQYDVLG
mstn^{-8a/-8a} :	51	KTMRINAIKS	QILSKLRMKE	APNISREAAP	AQSAAAAAAAP	RPVRRAGR*
WT :	101	DDNRDVVTEE	DDEHAITETI	MM	MATEPASVVQV	...
mstn^{-8b/-8b} :	101	DDNRDVVTEE	DDEHGDDHDD	GH*		376
mstn^{-41/-41} :	101	DDNRDDHDDGH*				

図 1. ミオスタチン遺伝子破壊トラングおよび野生型トラン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 2. 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。

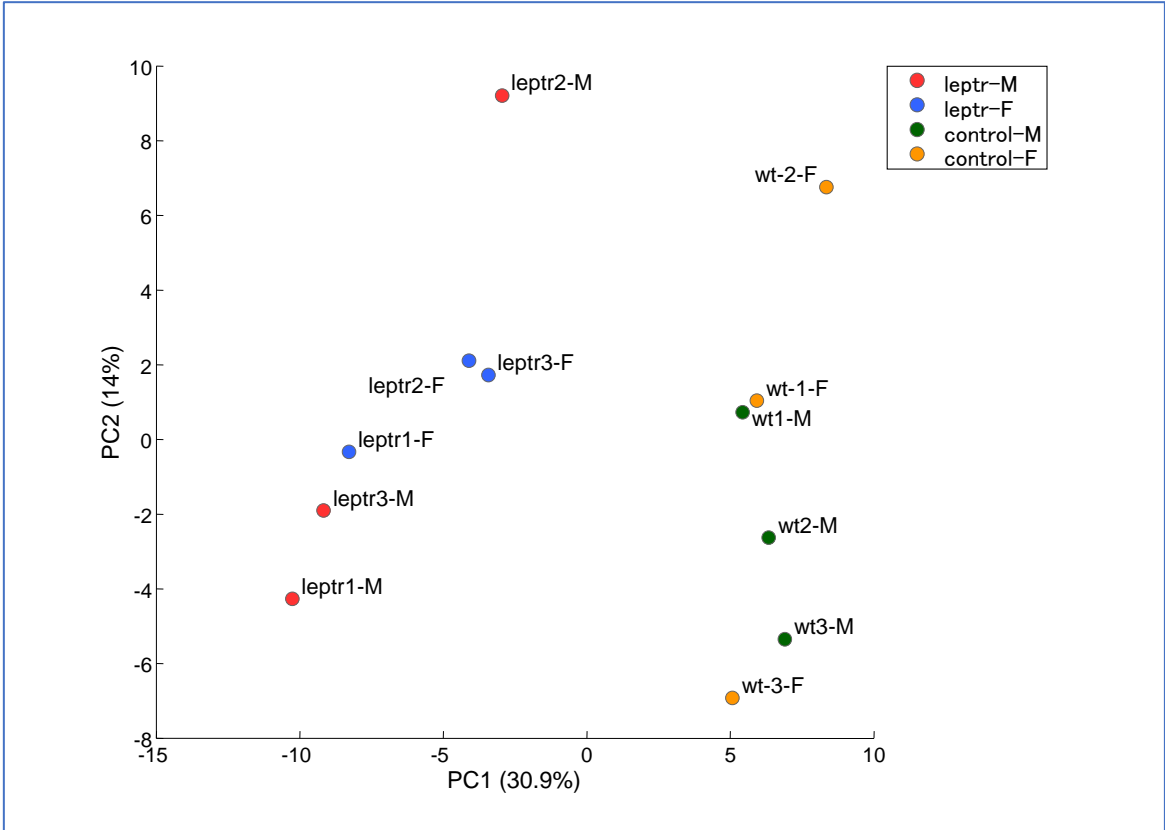


図3. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグと野生型トラフグのメタボローム解析（主成分分析）

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

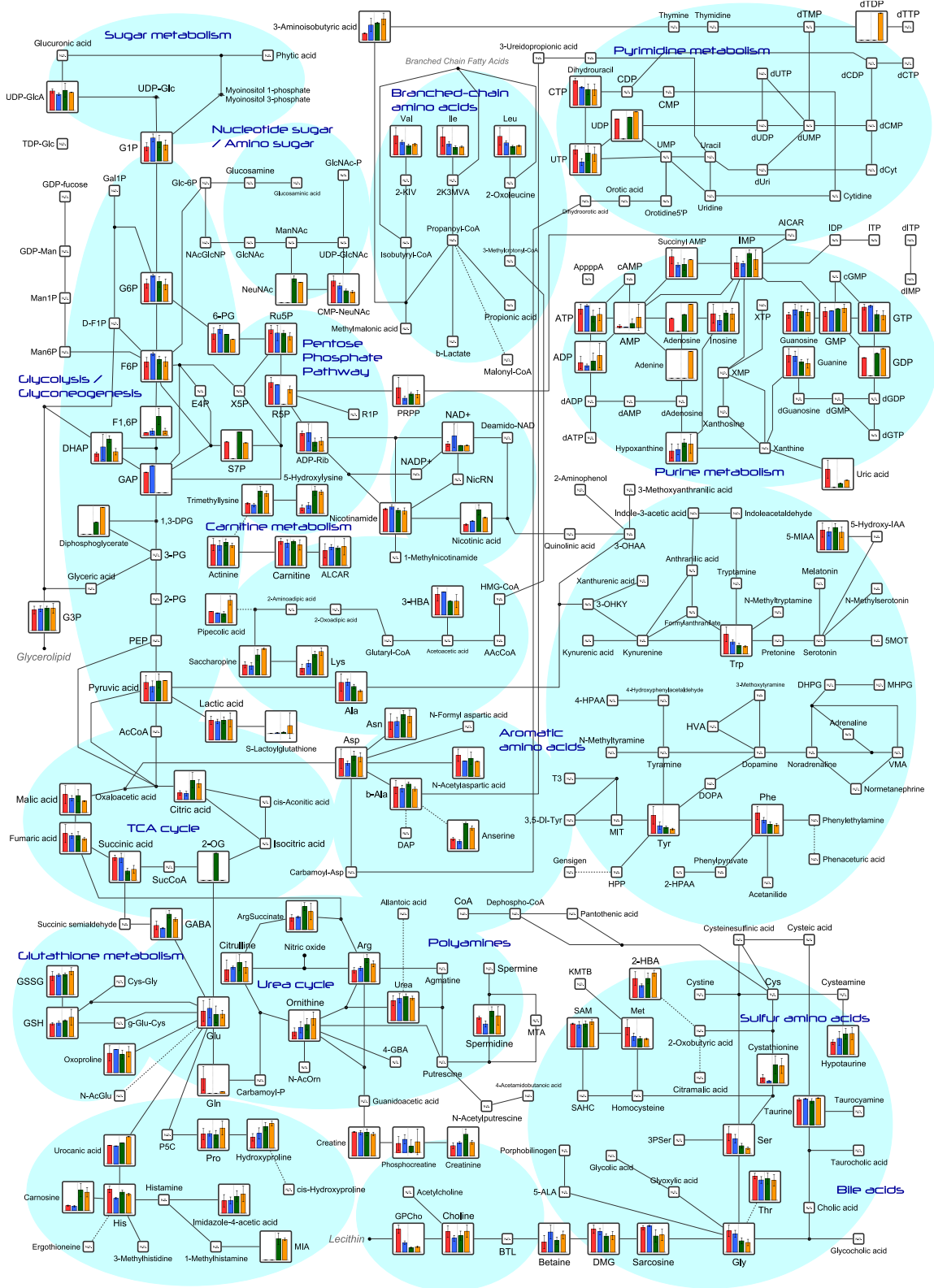
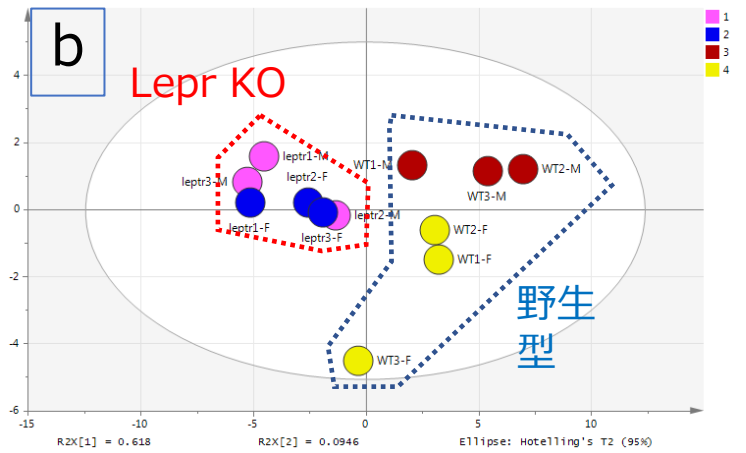
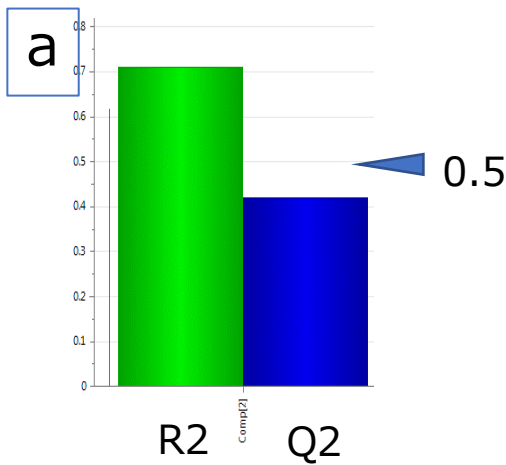


図4. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグと野生型トラフグのメタボローム解析 (各パスウェイでの変動概略図)

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



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

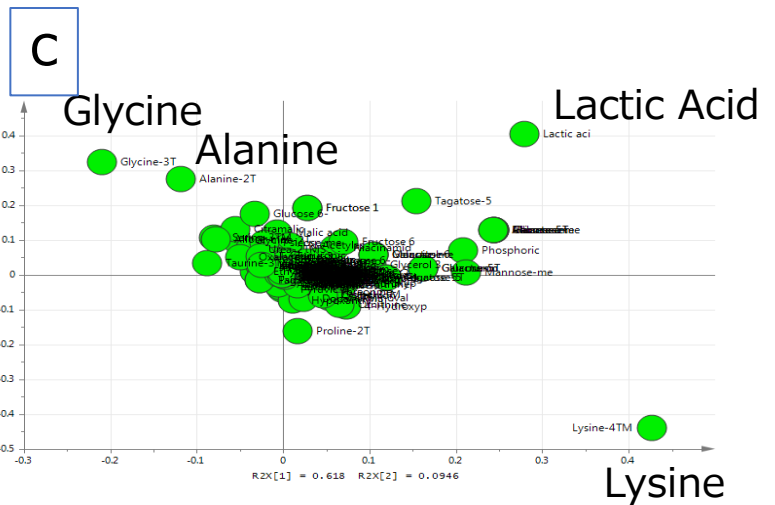


図5. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグ系統メタボロミックス解析

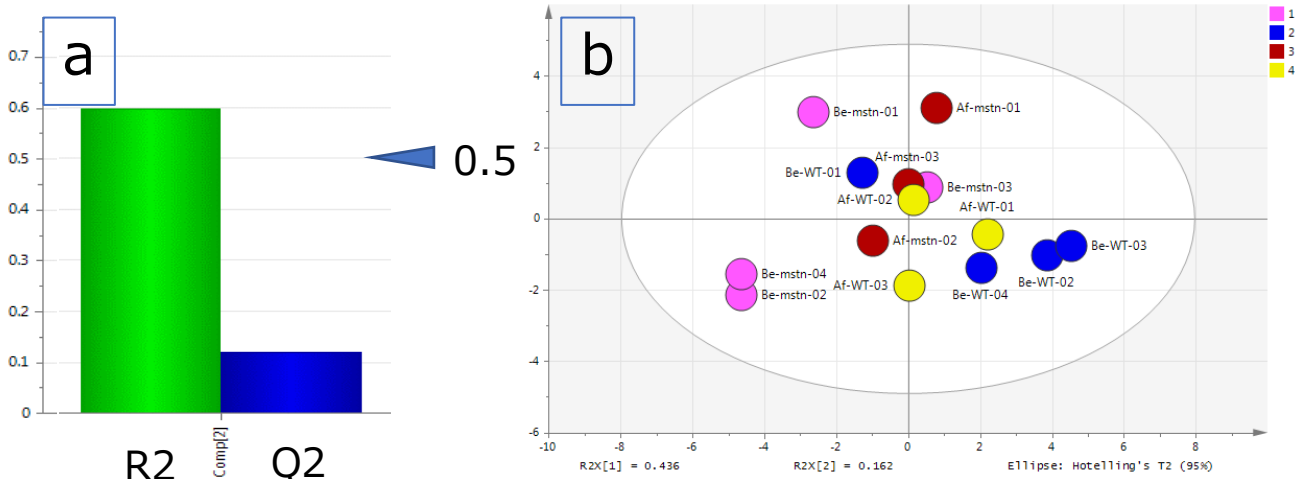


図6. ミオスタチン遺伝子破壊マダイ系統メタボロミックス解析

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

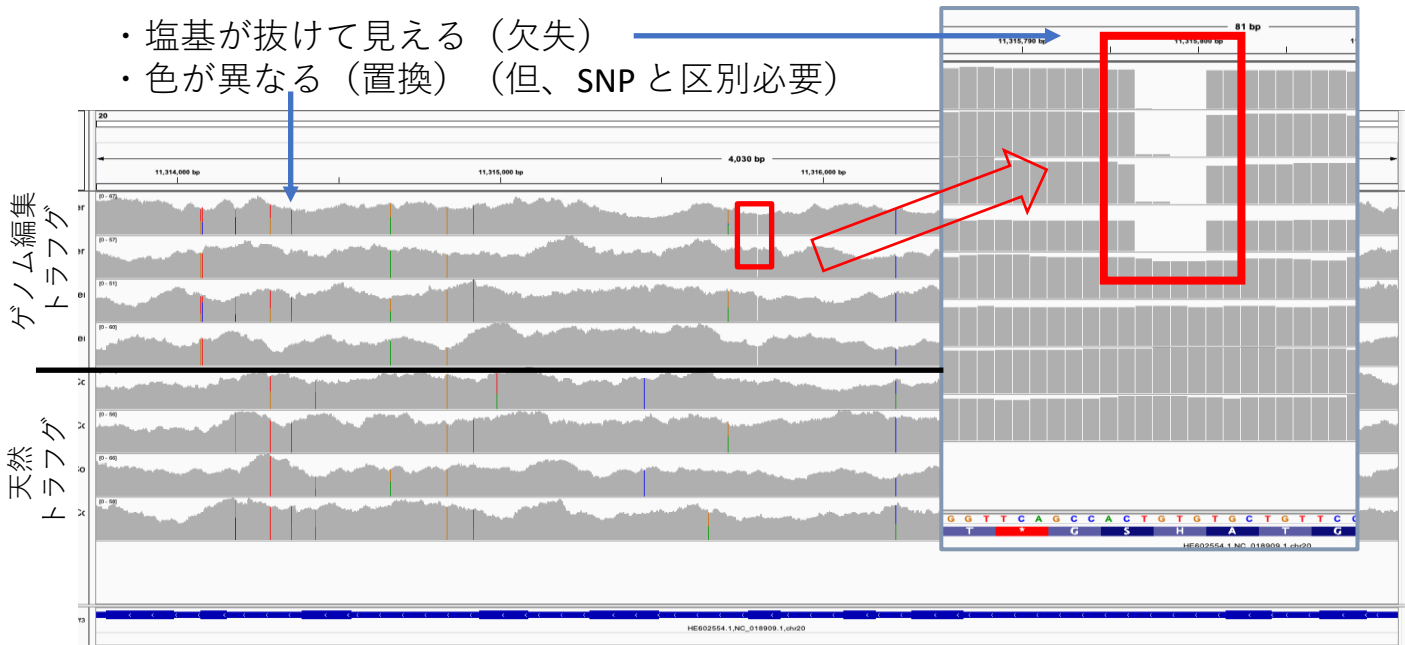


図7. レプチン受容体遺伝子破壊および野生型トラフグの全塩基配列解析結果のIGV像

ターゲット入れ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。

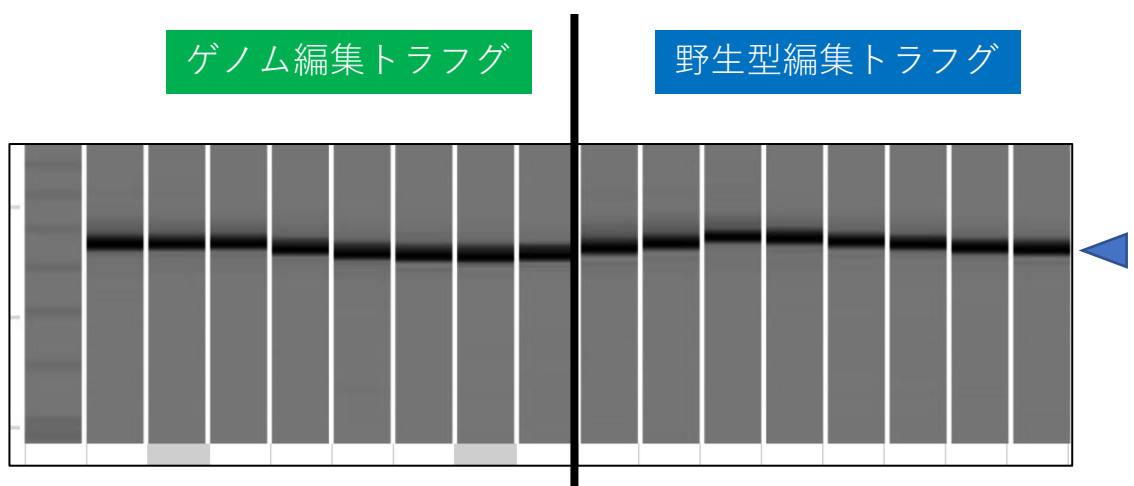


図 8. レプチン受容体遺伝子破壊および野生型トラフグのオフターゲット領域のPCR産物

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。

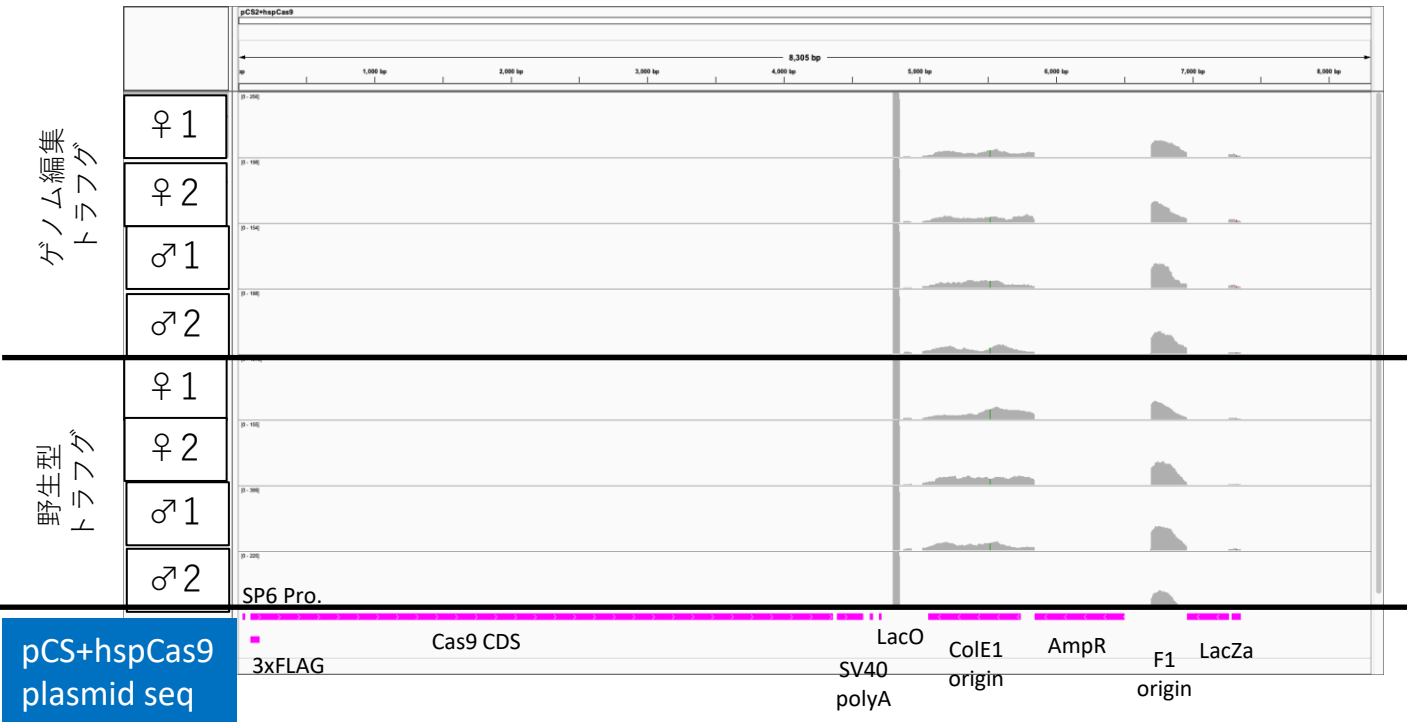


図9. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグシステムのゲノム編集ツール残存性の評価 (pCS+hspCas9)

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。

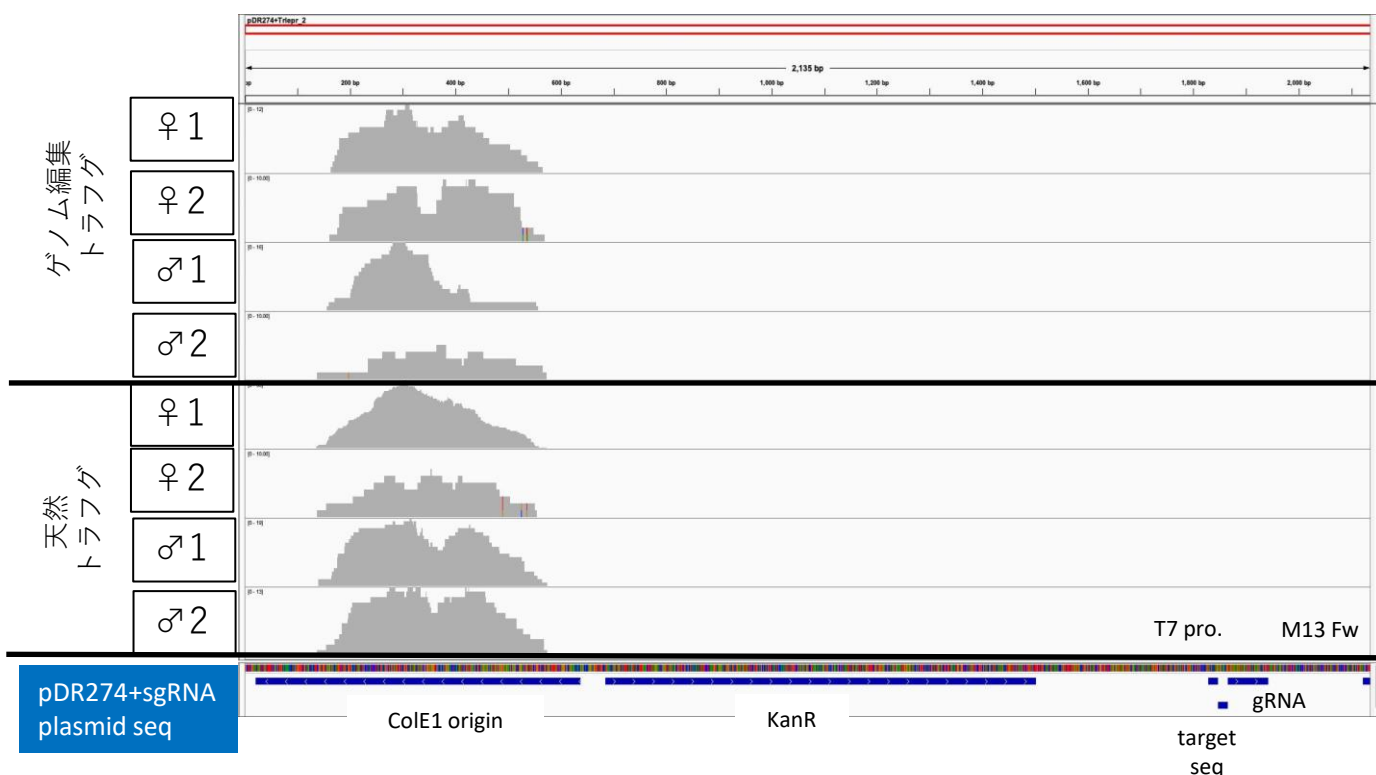


図10. レプチン受容体遺伝子破壊トラフグシステムのゲノム編集ツール残存性の評価 (pDR274+sgRNA)

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。

表1. ゲノム編集トラフグおよび非編集トラフグのTTX投与後の組織別蓄積率

サンプル ID	雌雄	TTX投与	体長 (mm)	体重 (g)	TTX蓄積量 (投量に対する割合 %)				
					皮	筋肉	肝臓	生殖巣	
ゲノム編集 トラフグ	1	♀	無	354	2040	0	0	0	0
	2	♀	無	355	1909	0	0	0	0
	3	♀	無	428	2933	0	0	0	0
	4	♂	無	425	2679	0	0	0	0
	5	♀	無	397	2953	0	0	0	0
	6	♀	有	352	2092	0	0	29.7	6.1
	7	♀	有	358	2065	0	0	30.7	1.0
	8	♀	有	390	2389	0	0	24.3	8.0
	9	♀	有	410	2696	0	0	17.3	16.4
	10	♂	有	387	2378	0	0	28.5	0
	11	♂	有	380	2381	0	0	18.7	0
非編集 トラフグ	12	♂	無	360	1590	0	0	0	0
	13	♀	無	360	1560	0	0	0	0
	14	♂	有	375	1640	0	0	60.7	0
	15	♂	有	365	1710	0	0	47.0	0
	16	♂	有	380	1600	0	0	51.2	0
	17	♂	有	380	1590	0	0	48.4	0
	18	♂	有	350	1600	0	0	61.9	0
	19	♀	有	360	1560	0	0	31.0	20.3
	20	♀	有	360	1510	0	0	36.7	10.9
	21	♀	有	395	1490	0	0	41.4	6.9
	22	♀	有	395	1640	0	0	35.6	17.6
	23	♀	有	365	1600	0	0	34.7	11.5

TTX 量が検出限界 (0.2 μg/g組織) 以下の場合は、蓄積量を“0”とした。

表2. トラフグ筋肉ホモジネート投与ラットにおける血液学的検査

試験群	動物 番号	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Reticulocyte (%)
非編集トラフグ 筋肉ホモジネート 投与群	101	6.52	12.7	40.5	62.0	19.4	31.3	4.11	1102	5.15
	102	6.93	12.9	41.7	60.3	18.7	31.0	5.21	1196	5.22
	103	7.08	13.5	43.7	61.8	19.0	30.8	8.12	1125	4.96
	104	6.85	13.2	42.3	61.8	19.2	31.1	6.07	955	5.18
	105	6.79	12.9	42.4	62.4	18.9	30.3	7.10	1017	5.14
	106	7.07	13.0	42.7	60.4	18.4	30.5	4.63	1057	4.73
	107	6.75	12.8	40.7	60.2	19.0	31.5	6.55	1103	5.79
	108	6.97	13.3	42.4	60.8	19.0	31.3	8.17	1283	5.05
Mean	6.87	13.0	42.1	61.2	19.0	31.0	6.25	1105	5.15	353.8
SD	0.19	0.3	1.1	0.9	0.3	0.4	1.53	102	0.3	17.5
ゲノム編集トラフグ 筋肉ホモジネート 投与群	201	6.98	12.8	42.0	60.2	18.4	30.6	5.92	1080	5.48
	202	7.02	13.0	42.3	60.3	18.5	30.7	4.52	981	4.65
	203	7.27	13.7	45.1	62.0	18.9	30.4	7.43	1269	5.11
	204	7.16	13.1	42.6	59.5	18.3	30.7	5.50	1088	4.79
	205	7.03	13.0	41.6	59.1	18.5	31.4	5.91	1122	4.52
	206	7.15	13.4	43.1	60.3	18.8	31.1	4.36	959	4.95
	207	7.52	14.4	45.7	60.8	19.2	31.6	6.76	1110	3.96
	208	7.07	13.5	42.5	60.1	19.1	31.8	4.98	1093	5.41
Mean	7.15**	13.4	43.1	60.3	18.7	31.0	5.67	1088	4.86	346.9
SD	0.18	0.5	1.5	0.9	0.3	0.5	1.07	95	0.50	31.4

RBC: 赤血球数、Hb: ヘモグロビン濃度、Ht: ヘマトクリット値、MCV: 平均赤血球容積、MCH: 平均赤血球色素量、MCHC: 平均赤血球色素濃度、WBC: は血球数、Platelet: 血小板数、Reticulocyte: 網状赤血球数、*: Significant difference (p<0.01) 各項目の平均値について Studentのt検定を用いた。