

ゲノム編集技術応用食品（トラフグ）の事前相談に係る確認結果

「ゲノム編集技術応用食品及び添加物の食品衛生上の取扱要領」（令和元年 9 月 19 日付け生食発 0919 第 3 号）に基づき、令和 2 年 8 月 18 日付けでリージョナルフィッシュ株式会社より事前相談のあったトラフグについて、令和 3 年 10 月 29 日に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会新開発食品調査部会遺伝子組換え食品等調査会（以下「調査会」という。）の委員及び参考人の意見を聴き、4D-4D 系統について届出に該当するものとしたところ。今般、標的配列が同一の欠失（塩基数、位置）である別系統（従来系統-4D 系統）について、追加データの提出があったことから、調査会の委員及び参考人の意見を聴き、以下の内容について確認した。

1. 提出資料の確認

（1） 開発した食品の品目・品種名及び概要（利用方法及び利用目的）

【高成長トラフグ（従来系統-4D 系統）】

ゲノム編集技術を用いて、食欲抑制因子であるレプチンと結合するレプチン受容体をコードする遺伝子の一部を改変することで、食欲が抑制されず、摂食促進に伴い飼料利用効率及び成長率が改善する。

（2） 利用したゲノム編集技術の方法及び改変の内容

- ①従来系統（瀬戸内海域にて捕獲）のかけ合わせによって得られた受精卵に対して、マイクロインジェクション法により、Cas9 メッセンジャー RNA (mRNA) 及びトラフグレプチン受容体遺伝子を標的としたガイド RNA (gRNA) を移入した。
- ②ゲノム編集当代 (T_0) においてトラフグレプチン受容体遺伝子のエキソン 11 に 4 塩基の欠失を持つ個体を選抜し (○○○個体)、その個体を従来系統○○○個体と交配することで後代の同一欠失の集団を得た。具体的には、雑種第 1 代 (ヘテロ接合体○○○個体) において、標的配列が同一の欠失 (塩基数、位置) であることを塩基配列解析によって確認した。

（3） 外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認に関する情報

- ①ゲノム編集当代において RNA (mRNA 及び gRNA) のみの移入である。
- ②雑種第 1 代 (○○○個体) において、トラフグゲノム上に RNA (Cas9 mRNA 及び gRNA) に相当する配列が組み込まれていないことを PCR 法及び全ゲノム配列解析 (Whole Genome Sequencing) (BWA MEM (ver. 0.7.17) と k-mer 法を用いて解析) (以下「全ゲノム配列解析」という。) によって確認した。

（4） 確認された DNA の変化がヒトの健康に悪影響を及ぼす新たなアレルゲンの産生及び含有する既知の毒性物質の増加を生じないことの確認に関する情報

① オフターゲット候補の探索及び確認

- ・ GGenome (2019-03-30) 及び Cas-OFFinder を用いて、2塩基までのミスマッチ (indel 含む) を含む配列を候補配列として検索した。
- ・ 全ての候補配列 (61箇所) について、全ゲノム配列解析 (雑種第1代 (〇〇〇 個体) の全ゲノムデータをトラフグ全ゲノムデータベース FUGU5.0 (Ensembl) にマッピング) によって、該当配列にオフターゲット変異がないことを確認した。
- ・ さらにエクソン上にある候補配列、より変異が生じやすいと思われる候補配列 (シードシーケンス一致、1塩基ミスマッチ) に対しては、塩基配列解析 によってオフターゲット変異がないことを確認した。

② オープンリーディングフレーム (ORF) 解析によるアレルゲン性及び毒性の確認

- ・ アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) の検索プログラムを利用して、標的配列の変異により新規に発生の可能性がある ORF を抽出したところ、新規に発生の可能性がある ORF が3つ検索された。
- ・ 上記3つの ORF 及び該当遺伝子の変異について、複数のアレルゲンデータベース及びタンパク質データベースにおいて検索したところ該当するアレルゲン及び毒性タンパク質は存在しなかった。

③ ふぐ毒の確認

- ・ 届出の対象集団 (雑種第1代 (F₁)) の後代交配種 (雑種第2代 (F₂)) の可食部位 (筋肉、皮、精巢) について、マウス法によるふぐ毒の検査を実施した結果、検査を実施した可食部位 (12ヶ月齢の3個体及び23ヶ月齢 3個体から得た筋肉、皮および精巢*) 全てが無毒 (検出限界 5 MU/g 未満) であった (フグ毒検査は「公益社団法人 長崎県食品衛生協会」に依頼)。

(*12ヶ月齢については、いずれも生殖腺が未発達であり食用としては利用しないため、検査実施せず)

(5) 特定の成分を増加・低減させるため代謝系に影響を及ぼす改変を行ったものについては、標的とする代謝系に関連する主要成分 (栄養成分に限る。) の変化に関する情報

- ・ 代謝系に影響を及ぼす改変ではない。

なお、一般組成 (水分、灰分、タンパク質、脂質) について、届出の対象集団 (雑種第1代 (F₁)) の後代交配種 (雑種第2代 (F₂)) 〇〇〇個体及び従来系統〇〇〇個体を分析して比較したところ、両者の間に差異は認められなかった。

2. 確認結果

(1) 確認結果の概要

- 雑種第1代 (〇〇〇個体) については、PCR法 及び 全ゲノム配列解析 により外来遺伝子及びその一部の残存がないことが確認されたことから届出に該当するものと判断した。

(2) 確認結果の詳細 (別添参照)

- 雑種第1代(○○○個体)について、標的遺伝子の変異の内容(塩基数、位置)が全く同一であることから、この集団を届出集団とすることに問題はないと判断した。

- 外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認については、雑種第1代(○○○個体)において、PCR法及び全ゲノム配列解析を用いて、確認が行われた。これらにより、外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認が適切に行われていると判断した。

- 確認されたDNAの変化がヒトの健康に悪影響を及ぼす新たなアレルゲンの産生及び含有する既知の毒性物質の増加を生じないことの確認については、オフターゲット候補及び標的配列において実施された。オフターゲット候補として検索された全ての候補配列(61箇所)について、全ゲノム配列解析(雑種第1代(○○○個体)においてトラフグ全ゲノムデータベース FUGU5.0 (Ensembl) に雑種第1代(○○○個体)の全ゲノムデータをマッピング)によって、該当配列にオフターゲット変異がないことを確認した。加えて、塩基配列解析によってオフターゲット変異がないことを確認した。また、標的配列の変異により新規に発生の可能性があるORFを抽出したところ、新規に発生の可能性のあるORFが3つ検索され、当該遺伝子の変異に加えて、それらについて複数のアレルゲンデータベース及びタンパク質データベースにおいて検索したところ該当するアレルゲン及び毒性タンパク質がないことを確認した。

ふぐ毒の確認については、届出の対象集団(雑種第1代(F_1))の後代交配種(雑種第2代(F_2))に対して、可食部位(筋肉、皮、精巢)について、マウス法による検査を実施した結果、検査を実施した可食部位においては、無毒(検出限界未満)であった。したがって、事前相談のあったゲノム編集トラフグの可食部位に関しては、食品衛生の観点において従来から可食部位として流通しているものとの差異はないと判断した。

これらの結果から、新たなアレルゲンの産生や既知の毒性物質の増加は生じてないと判断した。

(表) 確認結果の概要

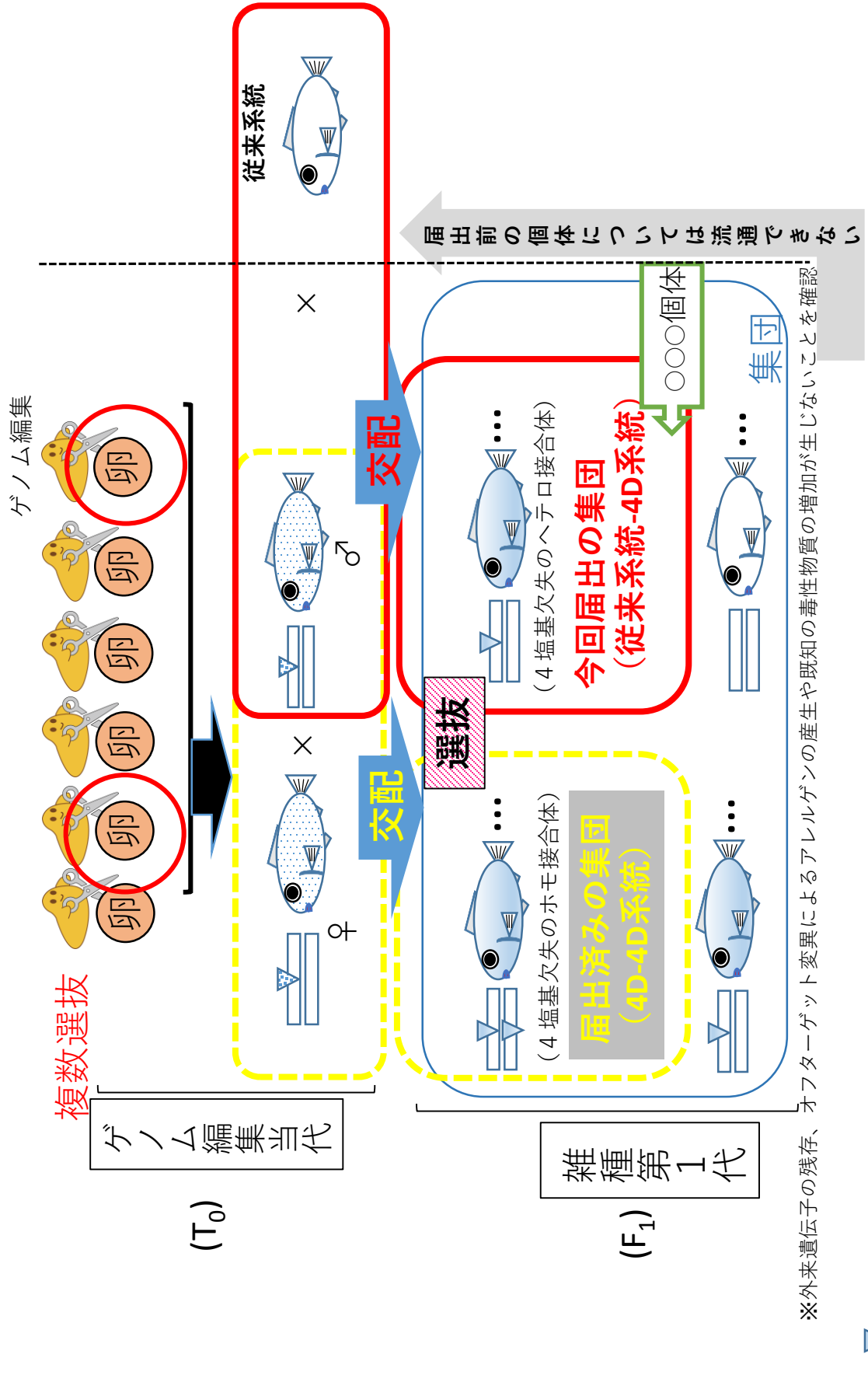
確認事項	詳細
品種	トラフグ (英名: Tiger pufferfish、学名: <i>Takifugu rubripes</i>) (瀬戸内海域採取)
ゲノム編集ツール	CRISPR/Cas9
遺伝子導入方法	マイクロインジェクション法
遺伝子ターゲット領域	食欲抑制因子であるレプチンと結合するレプチン受容体遺伝子
改変の内容	エキソン 11 に 4 塩基欠失による機能欠失
外来遺伝子有無確認方法	PCR 法、 <u>全ゲノム配列解析</u>
オフターゲット候補探索に使用したツール	GGGenome 及び Cas-OFFinder
オフターゲット候補探索結果	<p>○GGGenome 検索条件: bulge size:2、2 塩基ミスマッチ 検索性数: 61 箇所</p> <p>○Cas-OFFinder 検索条件: bulge size:2、2 塩基ミスマッチ 検索性数: 61 箇所</p>
オフターゲット候補の確認	<ul style="list-style-type: none"> ・全候補配列について、<u>全ゲノム配列解析</u> ・エキソン上にある候補配列等については併せて<u>塩基配列解析</u>を実施 <p>→オフターゲット変異のないことを確認</p>
オープンリーディングフレーム (ORF) 解析	標的遺伝子の変異について、アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) の検索プログラムを利用
アレルゲンの確認	<p>新規に発生の可能性がある ORF として<u>3つ</u>候補が検索</p> <ul style="list-style-type: none"> ・候補について、国立医薬品食品衛生研究所及びネブラスカ大学リンカーン校のデータベースを利用 ・「80 アミノ酸で 35%より高い相同性を示したもの」及び「連続する 8 アミノ酸の一致」についてアレルゲン解析 <p>→該当するアレルゲンがないことを確認</p>
既知の毒性確認	<ul style="list-style-type: none"> ・UniprotBLSAST を用いて、3つの ORF について検索 <p>→該当する毒性タンパクがないことを確認</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マウス法による可食部位 (筋肉、皮、精巣) の毒化確認 <p>→無毒 (検出限界未満) であることを確認</p>

(参考) 事前相談資料の確認事項の主な経緯

日付	事項	備考
令和2年 8月18日	事前相談資料を受理	
	事前相談資料の内容について、専門家の意見を聴き、指摘事項の発出及び事前相談者からの回答を確認	
令和3年 2月10日	遺伝子組換え食品等調査会（第1回）	魚類一般論について （公開）
令和3年 3月8日	遺伝子組換え食品等調査会（第2回）	魚類一般論について （公開）
令和3年 3月17日	遺伝子組換え食品等調査会（第3回）	魚類一般論について （公開）
令和3年 5月27日	遺伝子組換え食品等調査会（第4回）	魚類一般論について （公開）
令和3年 6月25日	遺伝子組換え食品等調査会（第5回）	魚類一般論について まとめ（公開）
令和3年 10月29日	遺伝子組換え食品等調査会	非公開（注1）
令和3年 10月29日	結果を事前相談者に連絡（4D-4D系統）	
令和3年 10月29日	届出受理（4D-4D系統）	
令和4年 3月5日	追加系統（従来系統-4D系統）について、データ受理	
令和4年 11月22日 ~30日	遺伝子組換え食品等調査会	持ち回り開催 （電子メール等）
令和4年 12月2日	結果を事前相談者に連絡（従来系統-4D系統）	
令和4年 12月5日	届出受理（従来系統-4D系統）	

（注1）開発企業の知的財産等が開示され特定のものに不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため（ただし議事概要については公開とする）。

育種図 (従来系統-4D系統)



※外来遺伝子の残存、オフターゲット変異によるアレルゲンの産生や既知の毒性物質の増加が生じないことを確認

- ▶ ... 変異遺伝子
- ◀ ... 変異遺伝子(モザイク)

高成長トラフグ(従来系統-4D 系統)に係る主な確認内容と方法 (別添 2)

○外来遺伝子の有無等に係る確認

世代	個体の説明	外来遺伝子の有無の確認		オフターゲット変異の確認*1	
		PCR 法	全ゲノム配列解析*2 (Whole Genome Sequencing)	塩基配列解析 (Sanger Sequencing)	全ゲノム配列解析*2 (Whole Genome Sequencing)
雑種第1代	(○○○個体)	実施済	実施済	実施済	実施済

*1 GGenome 及び Cas-OFFinder を用いてオフターゲット候補配列を検索し、全ゲノム配列解析における確認及び塩基配列解析 (エキソン上の配列、変異が生じやすいと思われる候補配列 (シードシーケンス一致、1塩基ミスマッチ)) によって確認

*2 BWA MEM(ver. 0.7.17) と k-mer 法を用いて解析を実施

○ふぐ毒に係る確認

世代	個体の説明	養殖期間における毒化の確認*3	
		可食部位 (皮、筋肉、精巢)	検出限界 5 MU/g 未満 〔12ヶ月齢 3個体〕 〔23ヶ月齢 3個体〕
雑種第2代	雑種第1代の 後代交配種		

*3 食品衛生検査指針 2015 理化学編 マウス検定法 (参考法) による