

ゲノム編集技術応用食品（ヒラメ）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 4 年 11 月 4 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ヒラメについて、令和 5 年 10 月 23 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、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）

【高成長ヒラメ（8D 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 従来品種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 タンパク質及びヒラメ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) においてヒラメレプチン受容体遺伝子のエキソン 9 に 8 塩基の欠失を持つ個体を選抜し (〇〇〇個体 (全て同一の欠失))、その個体を用いて、またはその個体を従来品種〇〇〇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 (ホモ接合体〇〇〇個体、ヘテロ接合体〇〇〇個体) 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タンパク質 (Cas9) 及び RNA (gRNA) のみの移入である。
- ② 雑種第 1 代 (〇〇〇個体) において、ヒラメゲノム上に RNA (gRNA) に相当する配列が組み込まれていないことを PCR 法によって確認した。

(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
 - ・ Cas-OFFinder 及び CCTop 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結果、標的配列以外に該当箇所は存在しなかった。

- 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のある ORF が3つ検索された。
 - ・ 上記3つの ORF 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、1つの ORF にてヒオウギガイのトロポミオシンと 37.5%の相同性が確認された。当該配列は、ゲノム編集前にも存在する配列であり、新規のアレルゲン及び毒性タンパク質は確認されなかった。
- (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、炭水化物) について、届出の対象集団 (雑種第1代 (F₁)) 4個体及び従来品種4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、PCR法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 (〇〇〇個体) 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 (〇〇〇個体) において、PCR法を用いて確認が行われた。これにより、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、標的配列において実施された。オフターゲット候補については、検索の結果、標的配列以外に該当箇所は存在しなかった。

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つ検索された。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、1つの ORF にてヒオウギガイのトロポミオシンと 37.5%の相同性が確認されたが、当該配列は、ゲノム編集前にも存在する配列であり、新規のアレルゲン及

び毒性タンパク質は確認されなかった。これにより、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が適切に行われていると判断した。

(表) 確認結果の概要

確認事項	詳細
品種	ヒラメ (英名: Olive flounder、学名: <i>Paralichthys olivaceus</i>)
ゲノム編集ツール	CRISPR/Cas9 (Cas9 (タンパク質) 及び gRNA の移入)
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9の8塩基欠失による機能欠失
外来遺伝子有無確認方法	PCR 法 →外来遺伝子のないことを確認
オフターゲット候補探索に使用したツール	Cas-OFFinder 及び CCTop
オフターゲット候補探索結果	<ul style="list-style-type: none"> ・ Cas-OFFinder 検索条件: 2塩基までのミスマッチ (indel 含む) 検索件数: なし ・ CCTop 検索条件: 2塩基までのミスマッチ 検索件数: なし
オフターゲット候補の確認	該当箇所なし
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 Open Reading Frame Finder 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、COMPARE 及びネブラスカ大学リンカーン校のアレルゲン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>→ 1つの ORF にてヒオウギガイのトロポミオシンと 37.5%の相同性を確認。当該配列は、ゲノム編集前にも存在する配列であり、新規のアレルゲンはないことを確認</p>
既知の毒性確認	UniProt BLAST を用いて、3つの ORF について検索 →該当する毒性タンパク質がないことを確認

(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4年 11月4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5年 10月23日	遺伝子組換え食品等調査会	非公開（注）
令和5年 10月24日	結果を事前相談者に連絡	
令和5年 10月24日	届出受理	

(注) 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（ただし議事要旨については公開とする）。

世代	系統の説明	標的部位の変異導入	外来遺伝子及びその一部の残存がないことの確認 (※1)	オフターゲット変異の確認 (※2)
		塩基配列解析 (Sanger Sequencing)	PCR 法	
雑種第1代	雑種第1代(〇〇〇個体)	○	○	該当箇所なし

※1 ゲノム編集当代においてタンパク質 (Cas9) 及び RNA (gRNA) のみの移入

※2 Cas-OFFinder 及び CCTop を用いてオフターゲット候補配列を検索