

# 「ゲノム編集養殖魚の開発と意義」

京都大学大学院 農学研究科

木下政人

令和3年3月17日

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

# 本日本話しすること

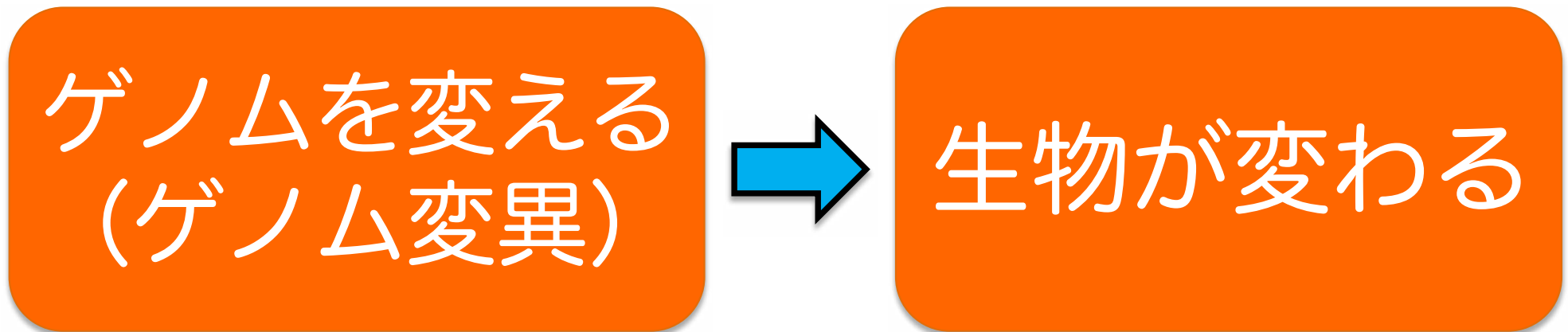
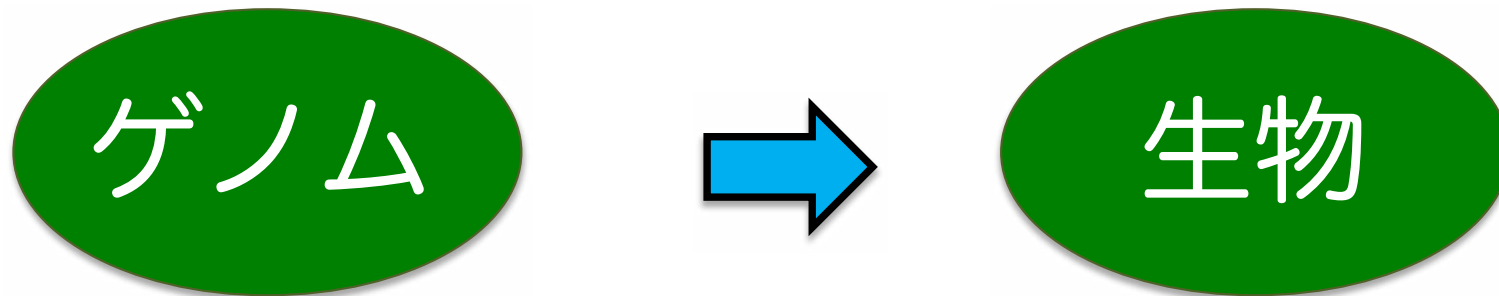
- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

それぞれの生物は、独自のゲノムを持っている。

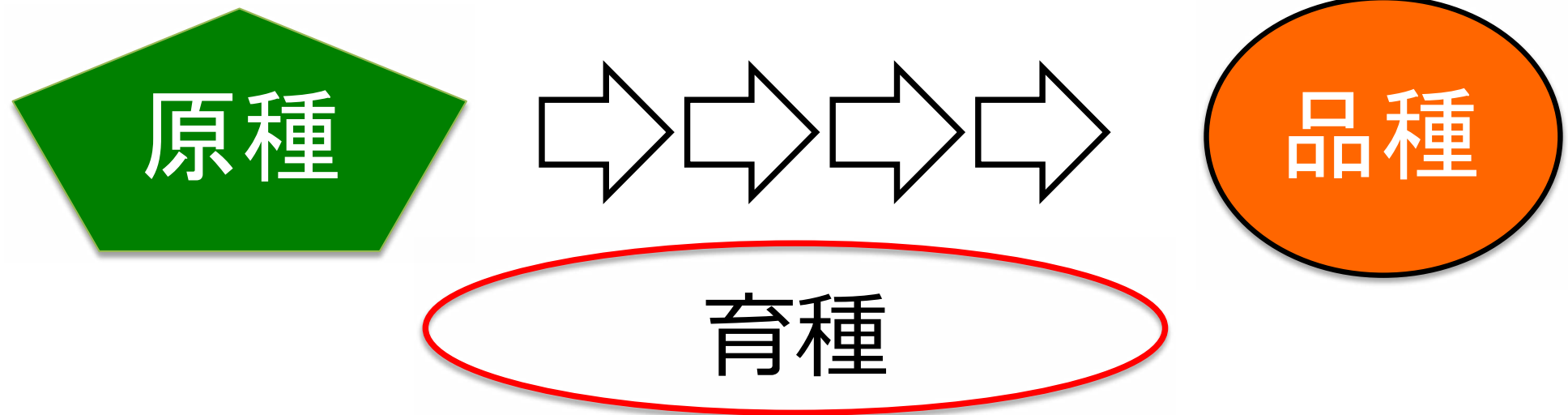
= ゲノムは生物の設計図



人類は、生物の

ゲノムの変異を

集めて、利用してきました



# 品種改良(育種)の歴史(1/2)

---

1.2万年前

## 原始農耕の開始、経験的に分離育種法を導入

在来種から特定の好ましい遺伝形質を持つ均一な個体(群)を選抜し、望まれない遺伝形質を除いて新品種を作る

1700年頃

## 交雑育種法の成功

人工交配によって優れた品種同士の交配により新品種を作る  
日本では1898年にイネで成功

1950年代

## 突然育種法(放射線育種)の導入

放射線照射やエチレンイミンなどの化学物質により変異を誘発し有用な形質を持つ個体を選抜

2012年

## ゲノム編集育種の開発

(カイコの育種は、5000年以上の歴史)

# 品種改良(育種)の歴史(2/2)

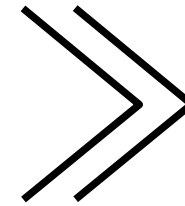
作物

家畜

養殖魚

期間

1.2万年



50年

原種

テオシント



ノラニンジン



イノシシ



マダイ (天然)



市場魚貝類図鑑より

品種改良

トウモロコシ



ニンジン



大ヨークシャー

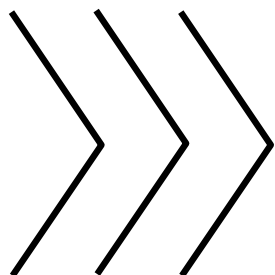


マダイ (養殖系統)



市場魚貝類図鑑より

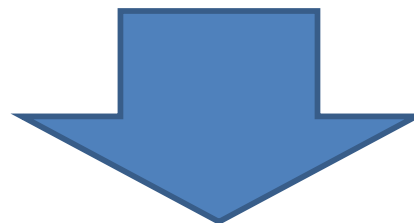
農耕の  
歴史



養殖魚の  
歴史

1.2万年

50年



育種が進んでいない  
改良された品種がない



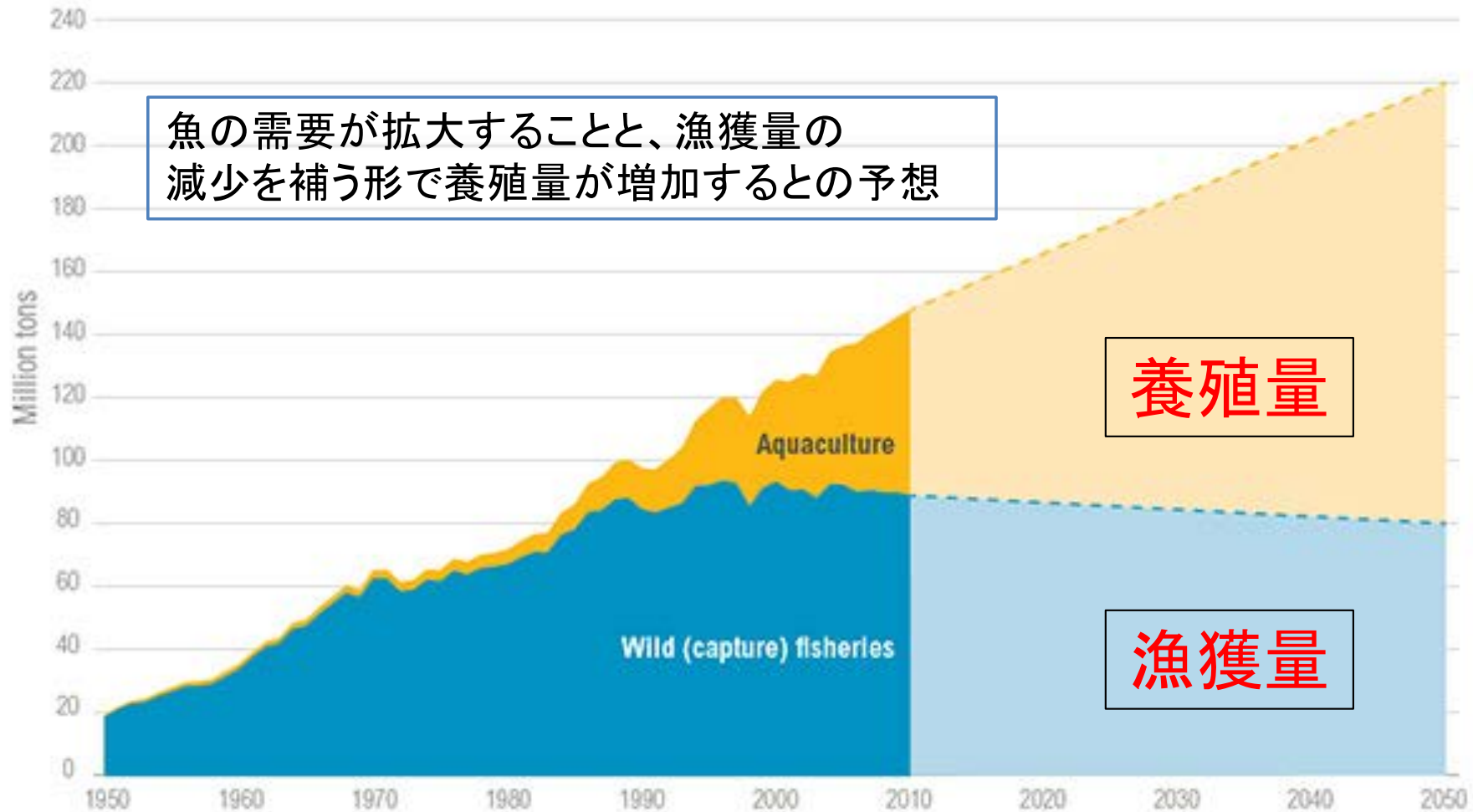
## 世界的な

- ・健康志向の高まり
- ・ヘルシーな魚食の人気上昇
- ・人口増加による食料不足  
(特に、タンパク質)
- ・天然資源保護意識の高まり



**養殖業が急成長**

## Aquaculture Is Expanding to Meet World Fish Demand



Source: Historical data 1950–2010: FAO. 2014. "FishStatJ." Rome: FAO. Projections 2011–2050: Calculated at WRI, assumes 10 percent reduction in wild fish catch between 2010 and 2050, and linear growth of aquaculture production at an additional 2 million tons per year between 2010 and 2050.

See [www.wri.org/publication/improving-aquaculture](http://www.wri.org/publication/improving-aquaculture) for full paper.

 WORLD RESOURCES INSTITUTE

日本の水産業(養殖業)は、世界に太刀打ちできるのか？

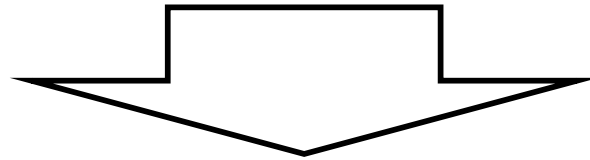
---

小規模経営・高齢化・魚粉など餌料の高騰

日本の水産業(養殖業)は、世界に太刀打ちできるのか？

---

小規模経営・高齢化・魚粉など餌料の高騰



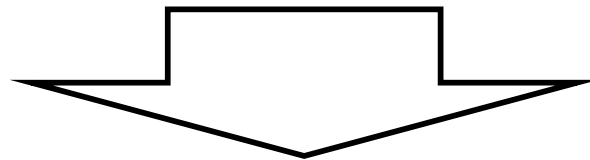
解決策

高品質による差別化・生産性向上で対抗

日本の水産業(養殖業)は、世界に太刀打ちできるのか？

---

小規模経営・高齢化・魚粉など餌料の高騰



解決策

高品質による差別化・生産性向上で対抗

ゲノム編集技術が  
短期間での品種作製に貢献！

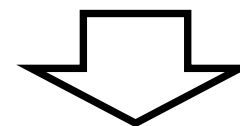
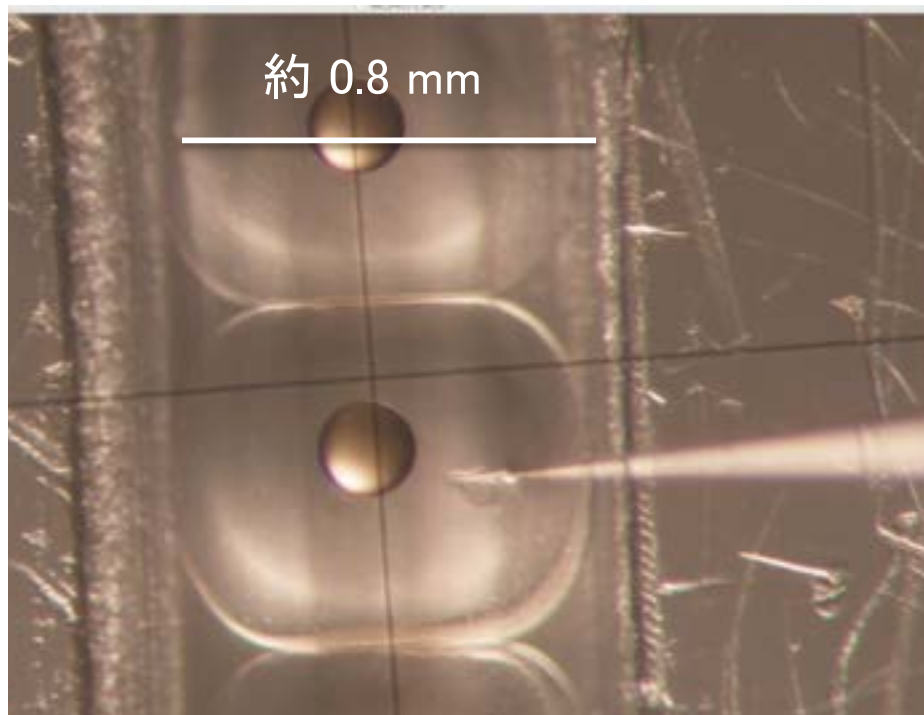
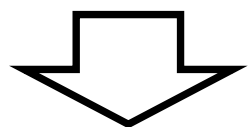
# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

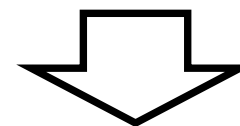
# ゲノム編集の手順

受精卵へマイクロインジェクションにより、ゲノム編集ツールを導入

(顕微注入)



RNA  
又は  
タンパク質

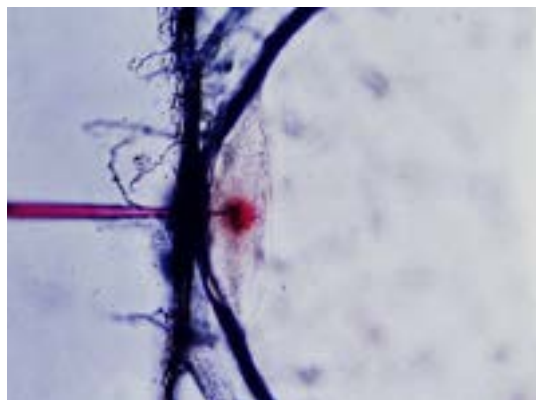


導入した後は、  
分解されてなくなる

# 魚種による卵性状の違い

---

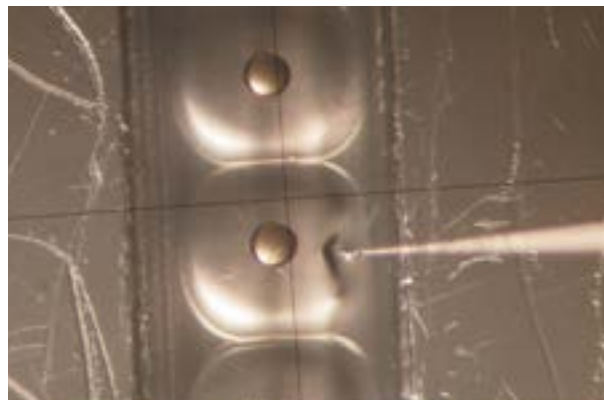
メダカ



透明

分離卵 & 付着糸

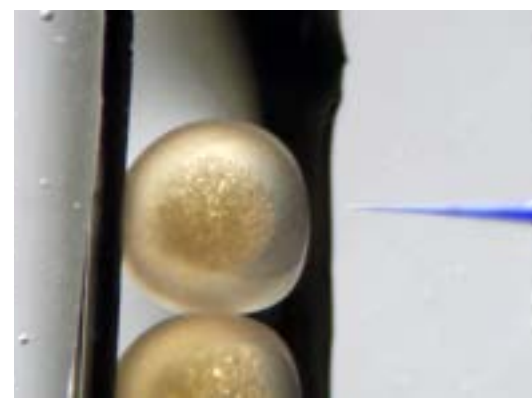
マダイ



透明

分離卵

トラフグ



不透明

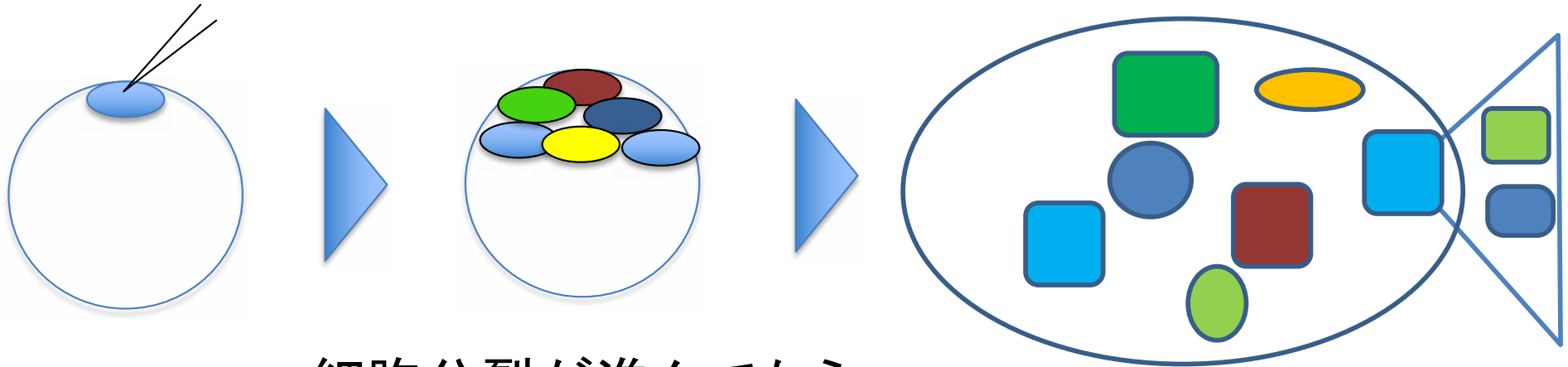
粘着卵

様々な性状の卵があるが、いずれも受精後10分ほどで、卵膜が硬くなる



# 1個体内に複数の編集タイプが存在

---



細胞分裂が進んでから  
編集が固定される

第1世代では、1個体内に

「編集された細胞」や「編集されなかった細胞」が、

入り混じった形で存在する

# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

# ゲノム編集の手順: マダイ編

採卵・採精



人工授精



1分間静置後、洗浄



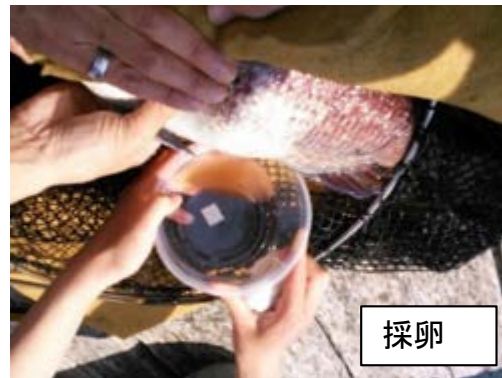
受精卵の整列



マイクロインジェクション

授精後10分まで

6,000 eggs / day



採卵

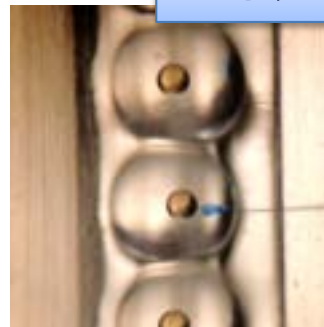


採精

10,000 < eggs < 1,000,000



マイクロインジェクション

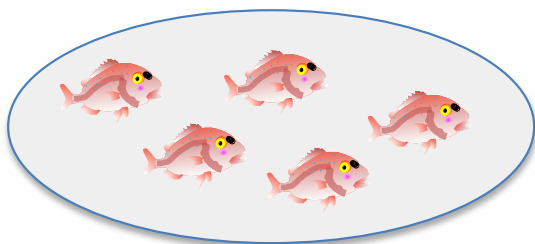


飼育

# ゲノム編集養殖魚の作出過程(1/3)



育成



## 受精卵へのマイクロインジェクション

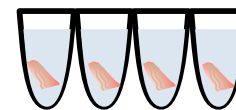
ゲノム編集ツールは

**RNA** 又は **タンパク質** で注入

## 個体の同定とゲノタイピング



PIT タグを注入し個体識別

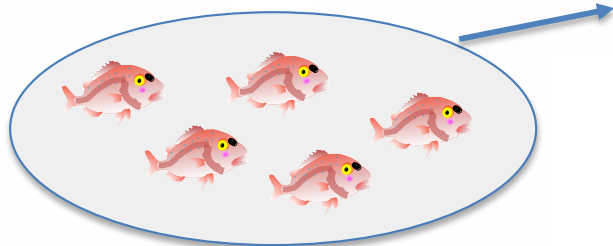


ヒレの一部から  
gDNA を抽出し  
変異解析

# ゲノム編集養殖魚の作出過程(2/3)



育成



いろいろなタイプの変異がある

ATCAG**CCGGGACATCGTGAAGCAGCTCC** 元の配列  
ATCAGCCGGGA-----AGCAGCTCC -8  
ATCAGCCGGGA-ATCGTGAAGCAGCTCC -1  
ATCAGCCG-----TCGTGAAGCAGCTCC -5  
ATCA-----TCGTGAAGCAGCTCC -9

注意:

これは「オフターゲット（標的**外**配列）」ではなく、  
オンターゲット（標的配列）でDNAの抜け方が色々あるということ。

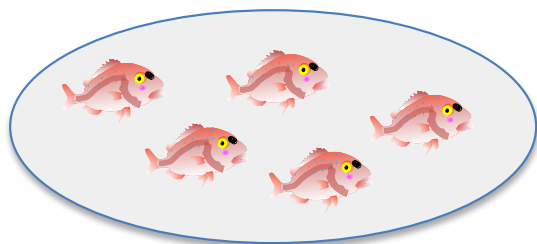
目的にあう変異の個体を選ぶ

ATCAG**CCGGGACATCGTGAAGCAGCTCC** 元の配列  
ATCAGCCGGGA-----AGCAGCTCC -8

# ゲノム編集養殖魚の作出過程(3/3)



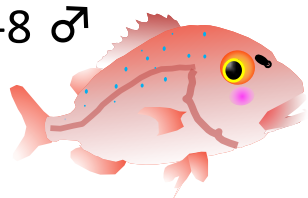
育成



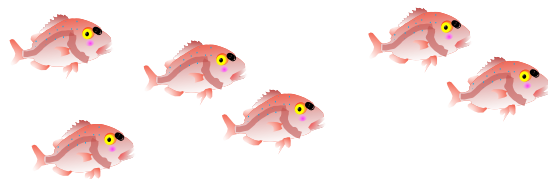
選抜

交配

-8 ♂



-8 ♀



高率変異個体の選抜

例えば、8塩基欠失を持つ個体を選抜

ATCAG**CCGGG**ACATCGTGAAGCAGCTCC 元の配列  
ATCAGCCGGGA-----AGCAGCTCC -8

第2世代の取得

8塩基欠失個体の雌雄を選抜



系統化

# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

ゲノム編集技術を使って、  
筋肉（可食部）の多い  
**マダイ** を作る！

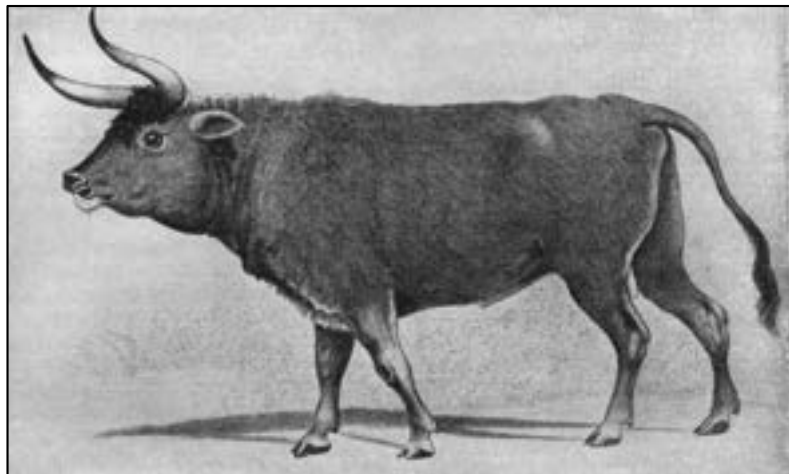




# ターゲットはミオスタチン遺伝子(1/3)

---

家牛の原種：オーロックス



ミオスタチン遺伝子内のDNAが  
11塩基なくなっていた！

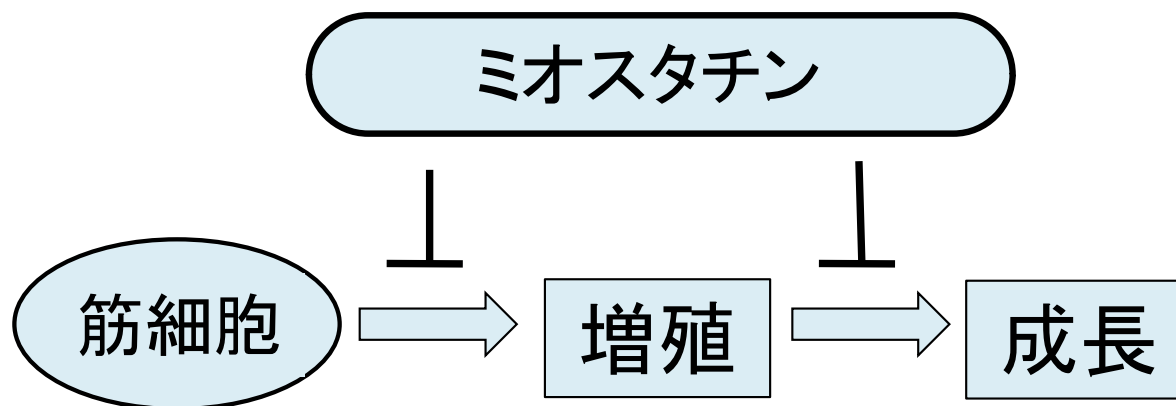
ベルジアンブルー



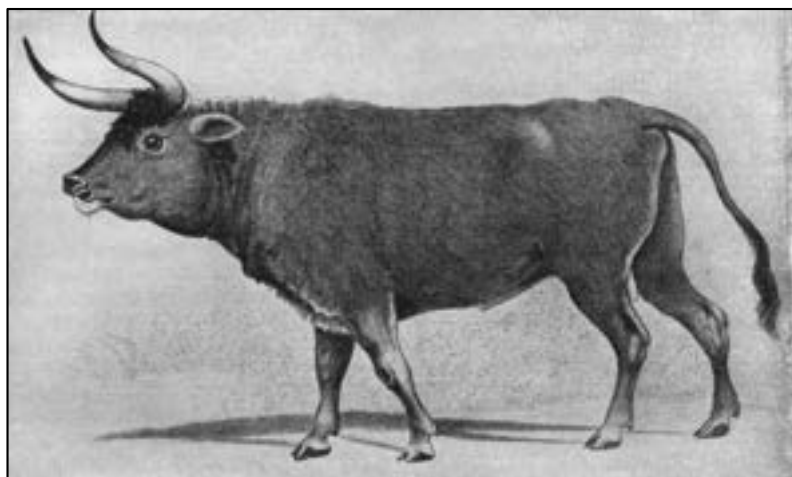
自然に  
出来た

# ターゲットはミオスタチン遺伝子(2/3)

ミオスタチンは  
筋肉量を調節し  
ている遺伝子

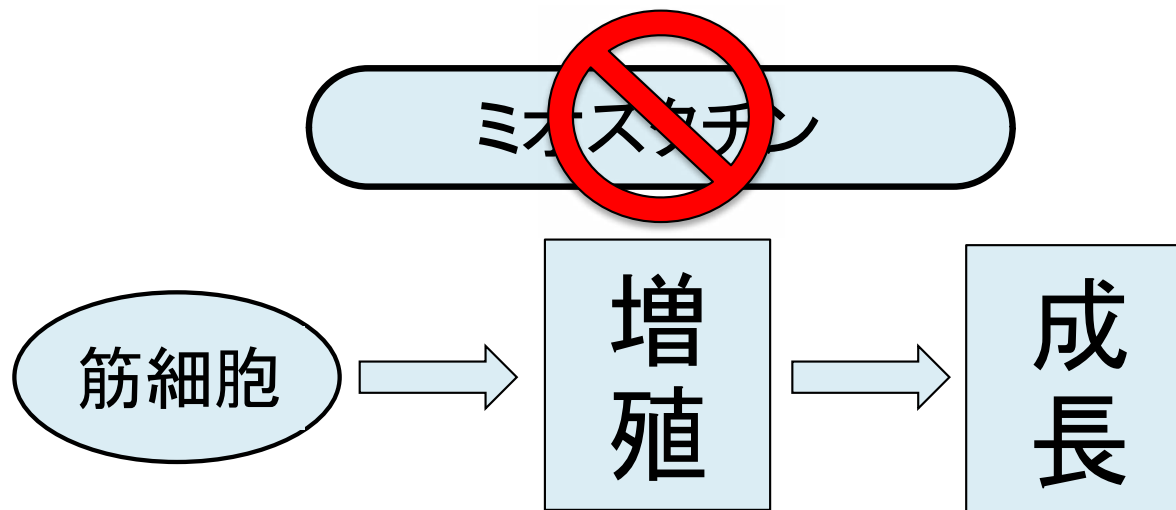


家牛の原種：オーロックス

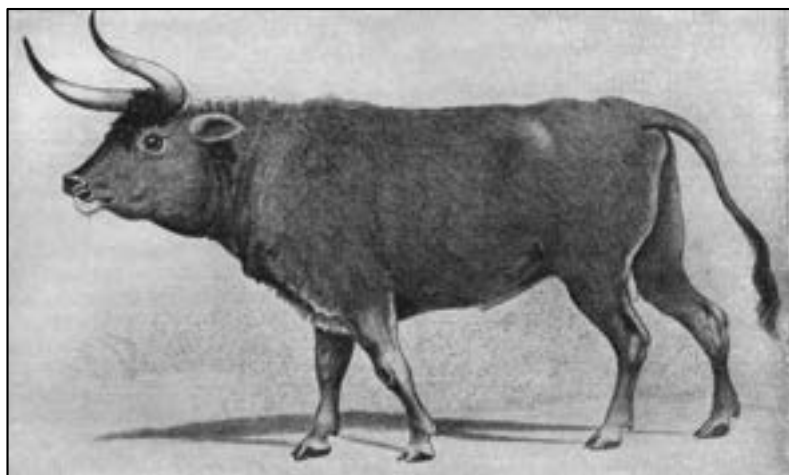


# ターゲットはミオスタチン遺伝子(3/3)

ミオスタチンは  
筋肉量を調節し  
ている遺伝子



家牛の原種：オーロックス



ベルジアンブルー

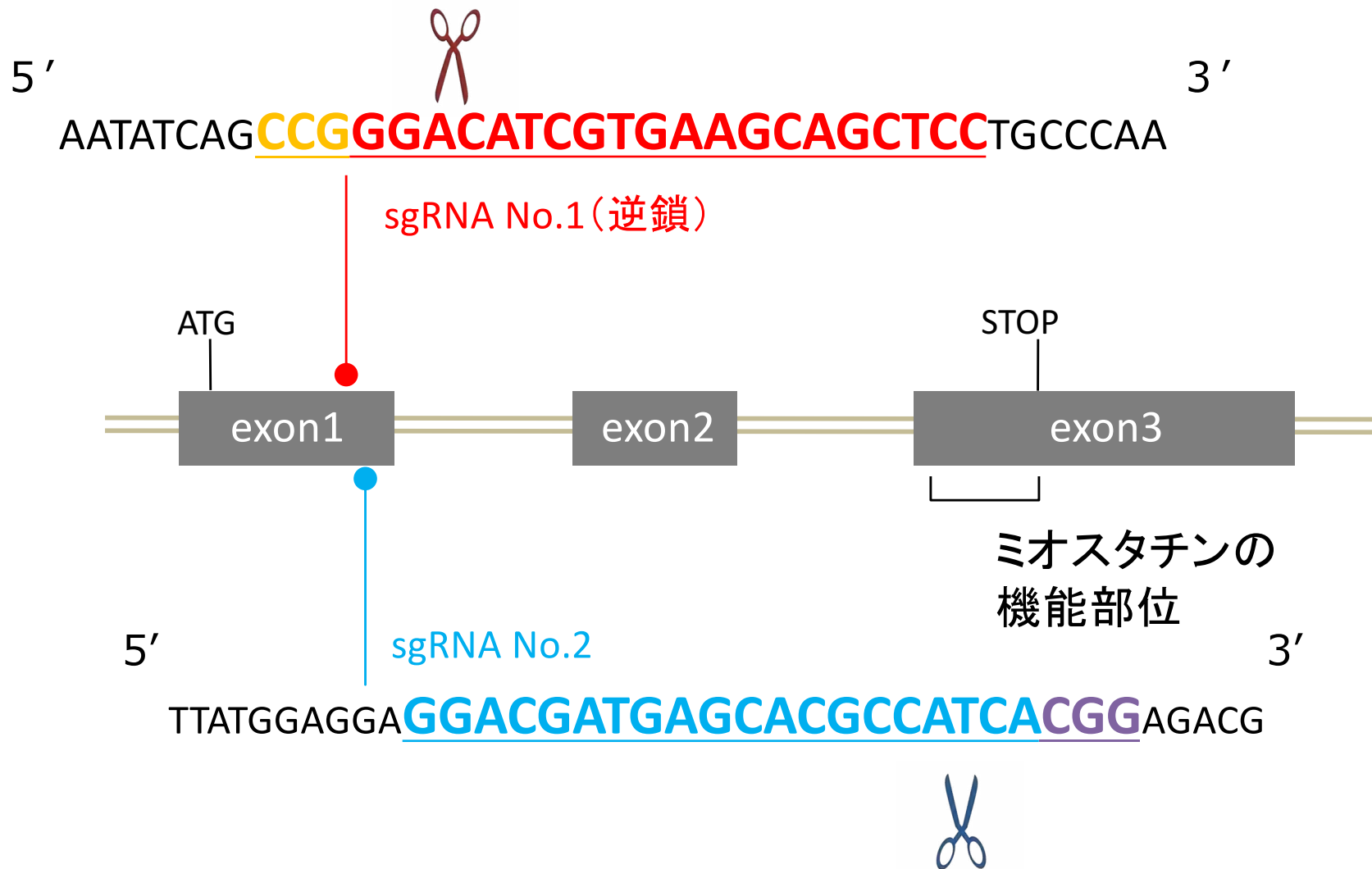


自然に  
出来た

DNA が 11 塩基なくなっていた！

# マダイでの ミオスタチン機能欠失 - CRISPR/Cas9 -

## マダイの ミオスタチン遺伝子構造



「ゲノム編集」技術で

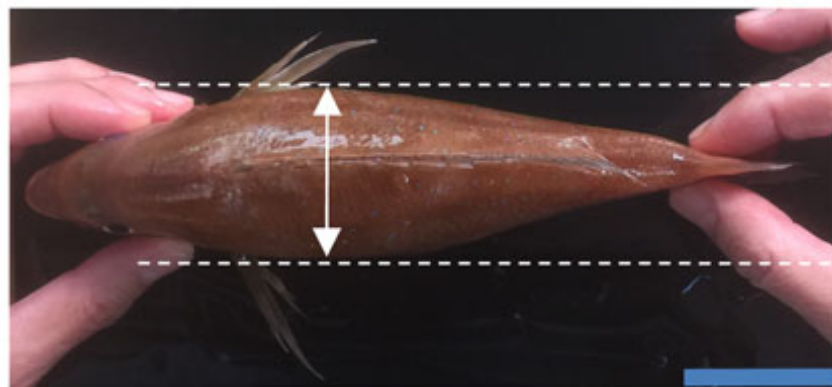
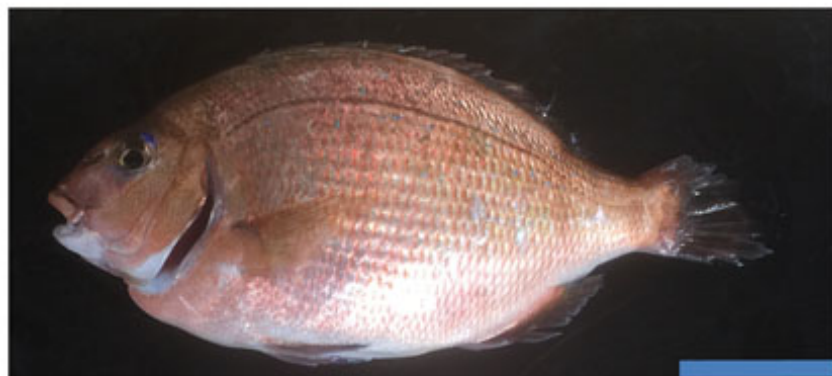
**8億個**あるマダいの DNA の内、

ミオスタチン遺伝子の **8** または **14 個**  
だけ取り除いて……

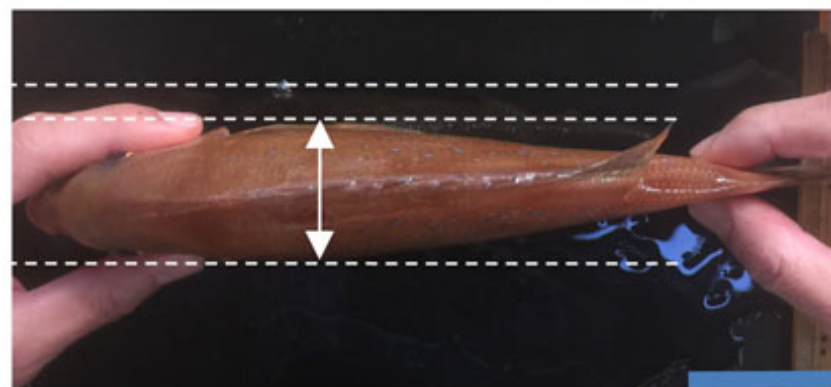
すると...肉が分厚くなった！！

---

ゲノム編集マダイ



通常マダイ

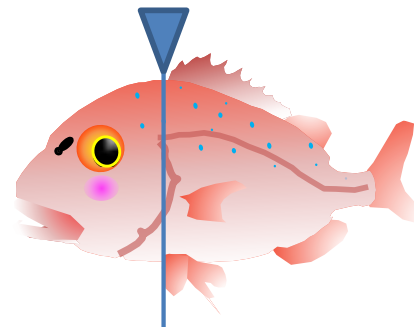


# 1歳魚の切り身(断面図)

---

ゲノム編集マダイ

通常マダイ



## 増体性と筋肉量の改良

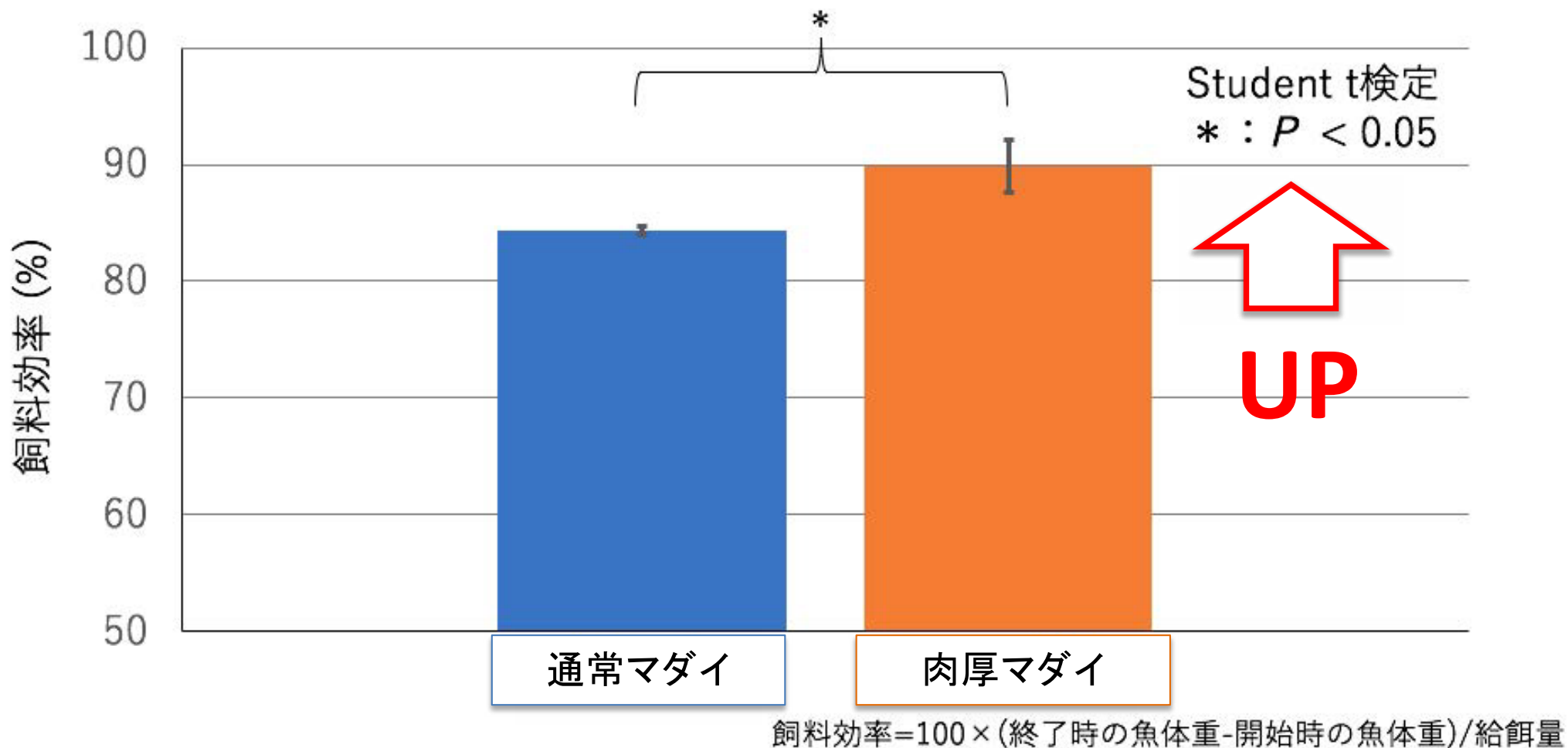
マダイの歩留まり(筋肉量)が40%とすると

	体重		筋肉量	
通常マダイ	1,000g	体重は	400g	可食部は
ゲノム編集マダイ	1,200g	1.2倍	600g	1.5倍

通常マダイと比べると、同じ飼料を与えても増体が2割、筋肉(可食部)は5割改善



# 飼料利用効率の改善



通常マダイと比較すると、飼料利用効率は  
体重ベースで**1割弱**、可食部ベースでは**2割強**の改善

# 短期間で確実に品種が作れる

---

ゲノム編集で  
品種を作製

**2**年

望む形質を  
計画的に作製

---

従来の方法で  
品種を作製  
(選抜育種)

**30**年以上

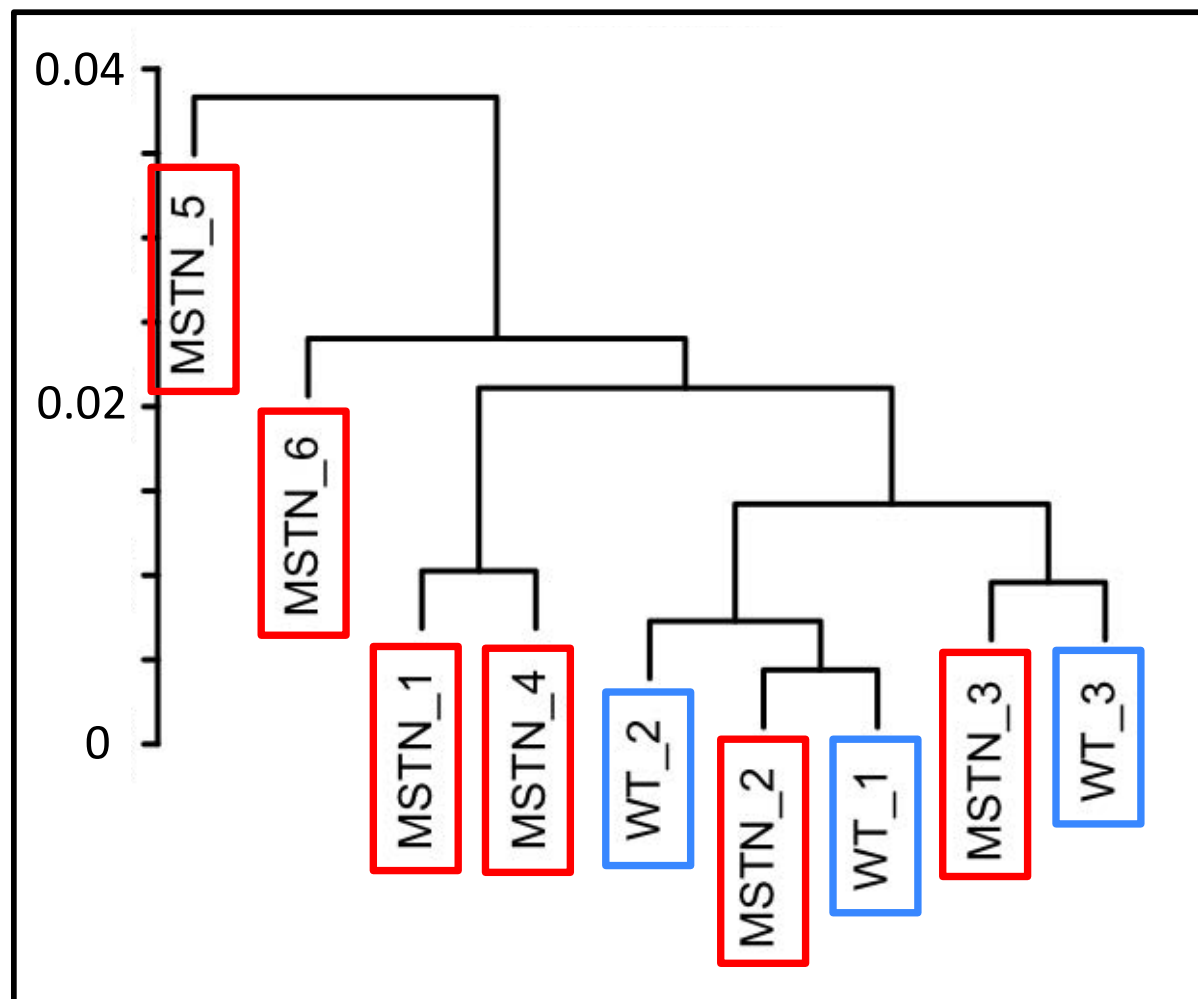
固定できる  
形質は不確定

# 体の成分は変化しているの？

ーゲノム編集マダイと通常マダイの比較ー  
428 種類の物質について調査

## Hierarchical clustering

Using R; Spearman's rank correlation coefficient and ward's method



個体間で組成の  
類似度を調べる



同じ枝に入っている  
ものほど近い



ゲノム編集魚と  
通常育種魚で  
グループを作らない



両者に差は無い

# 狙った遺伝子以外は、変化してないの？

変化していない

name	annotation	配列	ミスマッチ	変異
		8765432109876543210123		
ONT	mstn	AGCTGCTTCACGATGTCCCGG	0	
OT#1	intron camsap2	AGgTGCTTCACGcTGTCCtGG	2	none
OT#2	-	AGCTGCTTCAgGATGTCaTGG	2	none
OT#3	CDS caskin1	AaCTGgTTCACGATGTCCAGG	2	none
OT#4	intron asns	AGCTGCTTCAtGATGaCCtGG	2	none
OT#5	intron immp21	AtCTGCcTCACGATGTCCcAG	2	none
OT#6	intron_tmemb145	AGC-GCTTCACGgTGTCCAGG	2	none
OT#7	CDS_mesdc2	AGCTGC-TCAaGATGTCCAAG	2	none
OT#8	intron_col4a6	AtCTGCTTCACG-TGTCCCGG	2	none
OT#9	CDS_chst8-like	AGCaGCTTCACGATGTC-CAG	2	none
OT#10	intron_flcn	AGCTGCTTCA-G-TGTCCtGG	2	none
OT#11	intron_megf6	AGC--CTTCACGATGTCCAGG	2	none
OT#12	intron_dlgap1	AGCTGCTTCAC-A-GTCCAGG	2	none
OT#13	-	AGCTGCtTTCA-GATGTCCtAG	2	none
OT#14	-	AGCTGCTGTCACGA-GTCCGGG	2	none

## 8個 または 14個の DNA がなくなった系統の例

WT:	MHPSQIVLYL	SLLIVLGPVV	LSDQETQQQQ	QQQQQQQPSA	TSPEDTEQCA
-14:	MHPSQIVLYL	SLLIVLGPVV	LSDQETQQQQ	QQQQQQQPSA	TSPEDTEQCA
-8a:	MHPSQIVLYL	SLLIVLGPVV	LSDQETQQQQ	QQQQQQQPSA	TSPEDTEQCA
WT:	TCEVRQQIKT	MRLNAIKSQI	LSKLRMKEAP	NISRDIVKQL	LPKAPPLQQL
-14:	TCEVRQQIKT	MRLNAIKSQI	LSKLRMKEAP	NISRDIVKQL	LPKAPPLQQL
-8a:	TCEVRQQIKT	MRLNAIKSQI	LSKLRMKEAP	NISREAAPAQ	<u>SAAAAASRP</u>
WT:	LDQYDVLGDD	NRDVVMEEDD	EHAITETIMM	MATEPESVVQ	VDGEPRCCFF
-14:	LDQYDVLGDD	NRDVVMEEDD	<u>EHDYDDGH</u>		
-8a:	<u>VRRAGRRQQG</u>	<u>CGYGGGR</u>			
WT:	SFTQKIQANR	IVRAQLWVHL	RASDEATTVF	LQISRLMPVT	DGNGHIHIRS
	LKIDVNAGVG	SWQSIDVKQV	LSVWLRQPET	NWGIQINAFD	SRGNDLAVTS
	AEPGEDGLQP	FMEVKISEGP	KRVRRDSGLD	CDENSPESRC	CRYPLTVDFE
	DFGWDWIIAP	KRYKANYCSG	ECEYMHLOKY	PHTHLVNKAN	PRGSAGPCCT
	PTKMSPINML	YFNRKEQIIY	GKIPSMVVDR	CGCS	

## 新規に作られるタンパク質 (ペプチド)

赤色、緑色の部分

# 食品としてどうなの？ (2/2)

人の体に害を及ぼしうるものはないの？  
人の体に良いものが増えてないの？

これは、他の品種改良、  
進化でも起こること。

個々の系統で  
検討必要。

WT: TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISRDIVKQL LPKAPPLQQL  
-14: TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISRDIVKQL LPKAPPLQQL  
-8a: TCEVRQQIKT MRLNAIKSQI LSKLRMKEAP NISREEAAPAQ SAAAAASRP

WT: LDQYDVLGDD NRDVVMEEEDD EHAITETIMM MATEPESVVO VDGEPRCCFF  
-14: LDQYDVLGDD NRDVVMEEEDD EHDYDDGH  
-8a: VRRAGRRQQG CGYGGGR

新規に作られる部分

食品としての  
安全性、特性は？

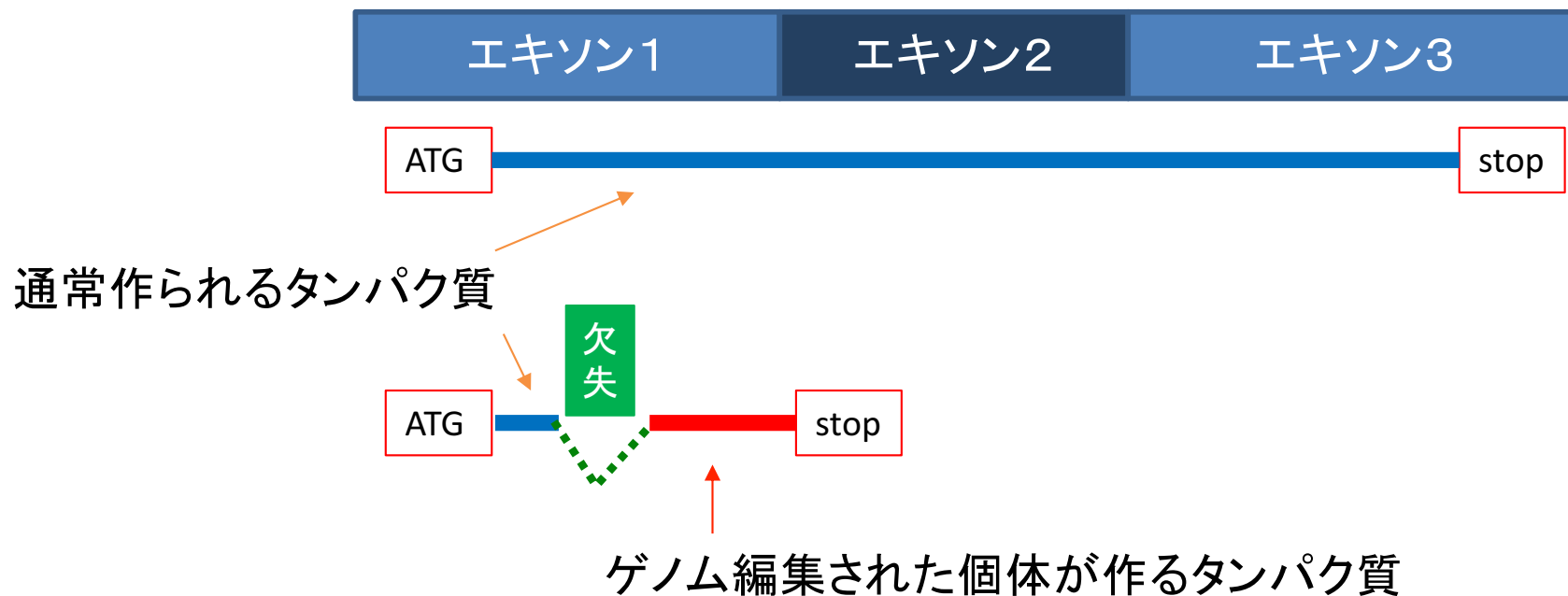
- アレルゲン性？
- 有効（機能性）成分？
- 毒性？

データベースで  
詳細に確認

→ 外部から遺伝子を導入していないため、  
極めて低い可能性だが、成分や遺伝子型の  
分析等によって、慎重に確認

# !"#\$%&'アレルゲン検索方法

サイト名	発行元	!"#	今回使用した方法
Allergen Online	University of Nebraska-Lincoln	<a href="http://www.allergenonline.org">http://www.allergenonline.org</a>	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	<a href="http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/">http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/</a>	Sequence Search: Protein
			Sequence Search: Epitope
			Allergenicity Prediction: FAO/WHO



# アレルゲン解析

通常マダイと同様に、ゲノム編集マダイでもヒトのアレルゲンは確認されなかった

	通常マダイ	ゲノム編集マダイ
FAO/WHO (6 a.a exact match)	No	No
Motif-based(ADFS)	No	No



# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

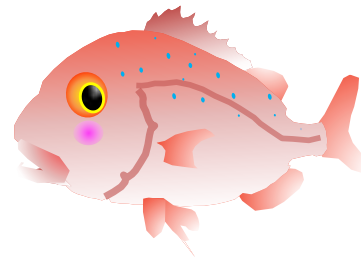
# そもそもゲノムが変化することは大丈夫なの？

---

## DNA の比較！

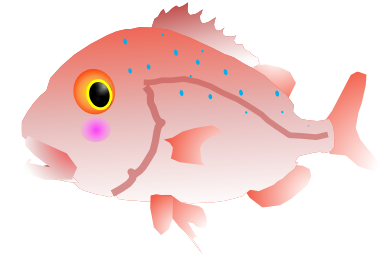
DNAがなくなるのは  
自然でも起こる？

野生型マダイ



VS

野生型マダイ

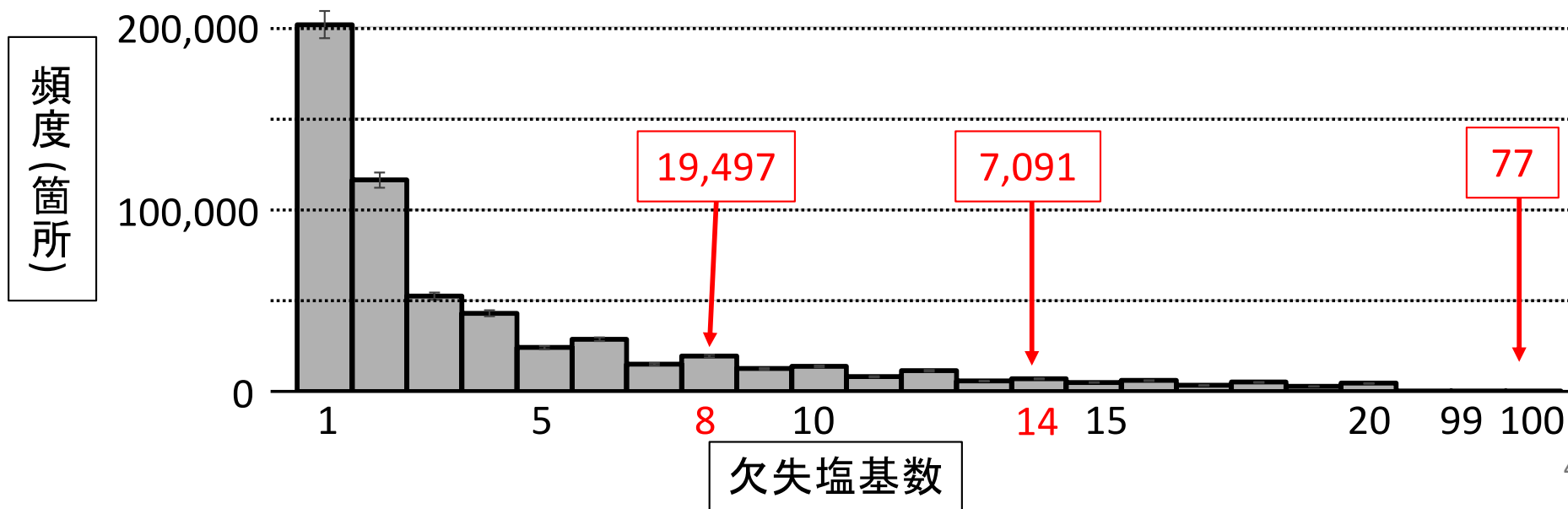
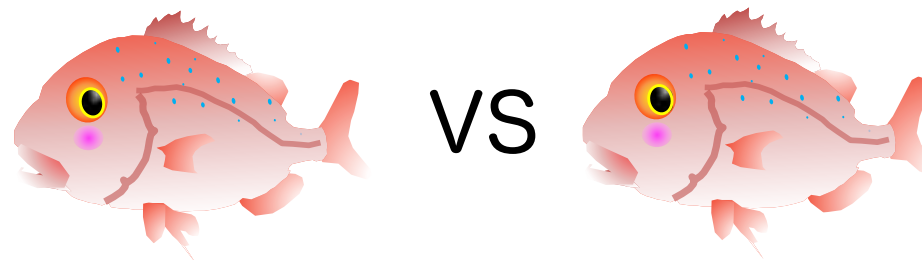


# 自然界でも生じる変化である(1/2)

## DNA の比較！

野生型マダイ

野生型マダイ



# 自然界でも生じる変化である(2/2)

DNAがなくなるのは  
自然でも起こる？

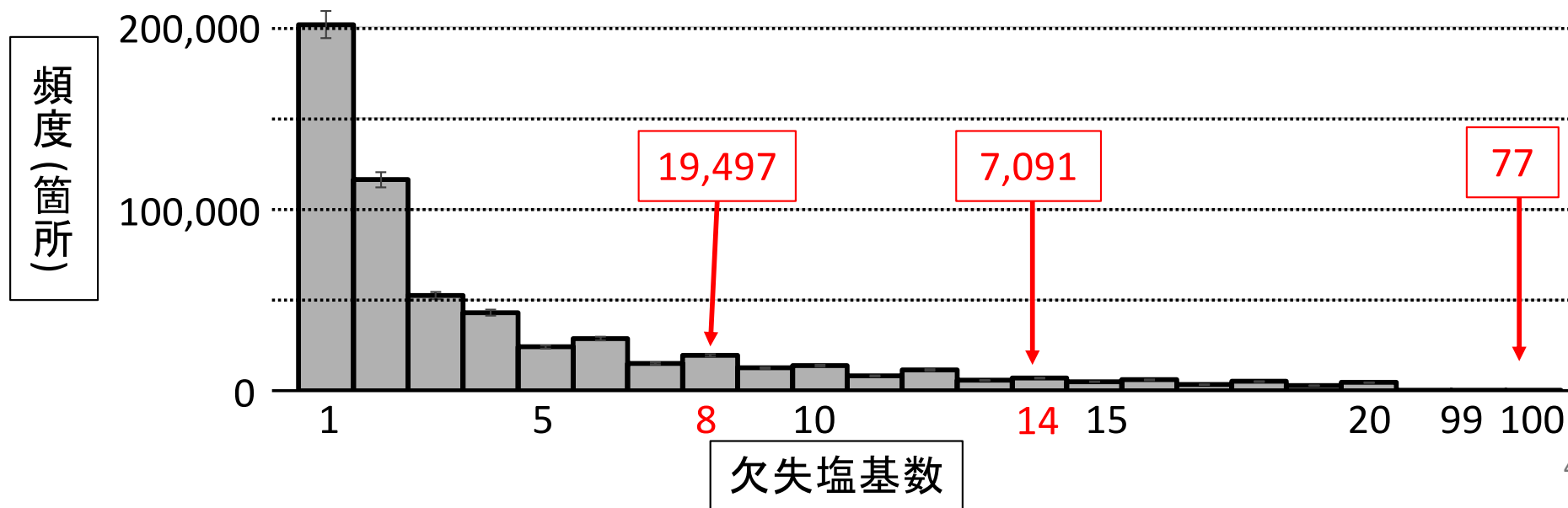


自然のマダイでも  
色々な形でDNAが  
なくなっている！

野生型の養殖マダイのゲノムを調べると.....

野生型マダイ

野生型マダイ



# 生態系への配慮

---

養殖魚で考慮しないといけないこと

育種が  
進んでいない



野生種に  
近い

イネや野菜と  
大きく違う点

ゲノム編集マダイは、強健性があるとは言い難く、  
農作物と同様に人が育ててあげなければ、生存は難しい  
⇒ 生態系を悪影響を及ぼすとは考えにくい

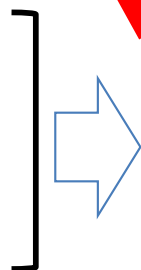
# 本日本話しすること

- 1) 養殖魚の育種の現状
- 2) 魚類でのゲノム編集の方法
- 3) ゲノム編集魚の系統化までの流れ
- 4) 活用した事例：肉厚マダイ
- 5) 天然魚でのゲノム中の塩基欠失の頻度
- 6) 養殖魚におけるゲノム編集の展望

# 陸上養殖の効率化

## ゲノム編集で

生産性が優れた魚  
品質面で差別化  
できる魚



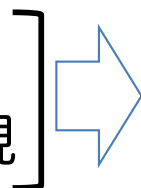
新品種

市場価値  
の創出

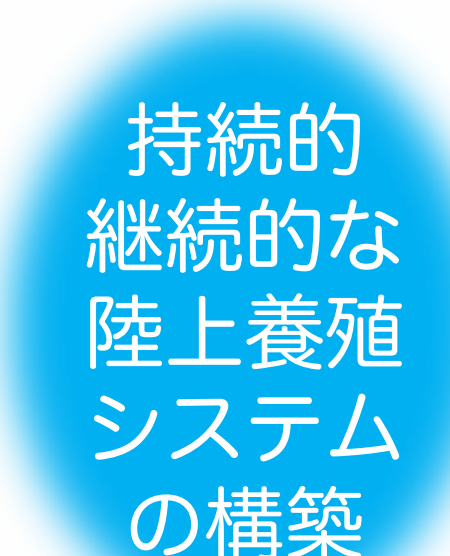


## 新技術の開発で

飼料利用効率の改善  
省力化・自動化技術の実現



コスト低減と  
生産性の向上

- 
- 持続的  
継続的な  
陸上養殖  
システムの  
構築
- ||
- 養殖業の新たな可能性
  - 地域の産業振興

# 現状におけるメリットと今後のチャレンジ

---

## 現状におけるメリット

- ✓ 生産コストの節減
- ✓ 自動化技術の導入による省力化
- ✓ 飼料利用効率の改善

- タンパク源の確保
- 天然資源の保護

## 国内産業としての高付加価値化

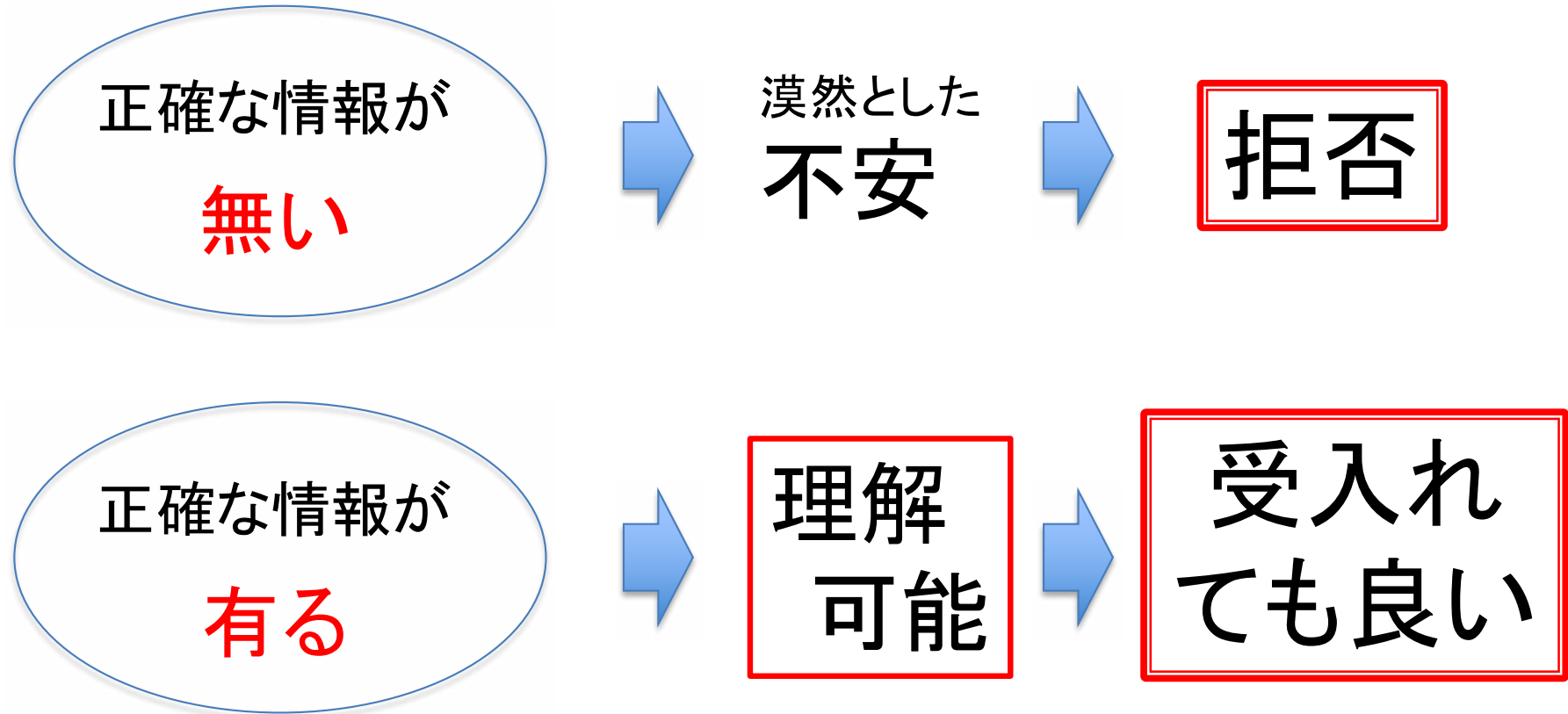
- ✓ 疾病への抵抗性
- ✓ 機能的物質に富む
- ✓ 低アレルギーな魚
- ✓ 飼いやすい魚

- 生産性向上へのさらなる貢献
- 高品質化と輸入物との差別化



消費者の安心のためには ...

# 正確な情報の発信

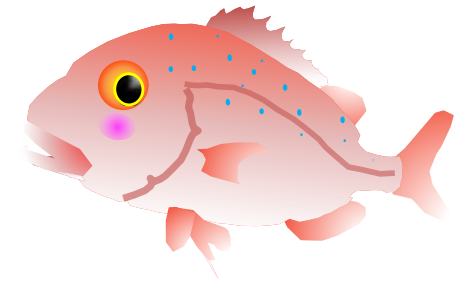
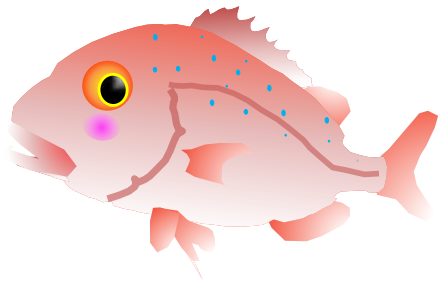


# 消費者の安心のためには ... 正確な情報の伝達

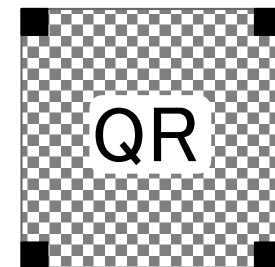
生産者

加工場・流通事業者

消費者



- どの遺伝子が
- どのように編集されたか



情報の開示

情報の獲得

# 養殖でゲノム編集技術を活用する意義

---

短期間で優良な品種を作ることによって...

1) 地域の養殖産業に貢献



2) 良質なタンパク源を確保するとともに、天然資源としての魚を保護