

---

# ERAプロジェクト調査報告

---

December 2015

バイオテクノロジー研究部会



特定非営利活動法人

国際生命科学研究機構

International Life Sciences Institute Japan

International Life Sciences Institute, ILSI は、1978年にアメリカで設立された非営利の団体です。

ILSI は、科学的な視点で、健康・栄養・安全・環境に関わる問題の解決および正しい理解を目指すとともに、今後発生する恐れのある問題を事前に予測して対応していくなど、活発な活動を行っています。現在、世界中の400社以上の企業が会員となって、その活動を支えています。

多くの人々にとって重大な関心事であるこれらの問題の解決には、しっかりとした科学的アプローチが不可欠です。ILSI はこれらに関連する科学研究を行い、あるいは支援し、その成果を会合や出版物を通じて公表しています。そしてその活動の内容は世界の各方面から高く評価されています。

また、ILSI は、非政府機関（NGO）の一つとして、世界保健機関（WHO）とも密接な関係にあり、国連食糧農業機関（FAO）に対しては特別アドバイザーの立場にあります。アメリカ、ヨーロッパをはじめ各国で、国際協調を目指した政策を決定する際には、科学的データの提供者としても国際的に高い信頼を得ています。

特定非営利活動法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan）は、ILSI の日本支部として1981年に設立されました。ILSI の一員として世界的な活動の一翼を担うとともに、日本独自の問題にも積極的に取り組んでいます。

# まえがき

2015. 12

バイオテクノロジー研究部会

2015年の調査報告書第6号（通算第25号）をお届けします。

本号では、総説として過去15年間の主要文献に基づいた農業バイオテクノロジーにおける経済性、環境、倫理、将来に関するレビュー及びカナダ食品検査庁（CFIA）の科学者グループによる遺伝子組換え作物における遺伝子挿入効果の比較解析に関するレビューを紹介しております。また、2014年にカナダで開催された「組換え植物における非意図的効果の遺伝学的根拠」に関する国際会合から組織委員会の報告書及び米国ジョージア大学教授の報告書を紹介しております。さらに、原著論文として乾燥耐性トウモロコシの子実収量増加に関する生理学的反応、生態的リスク評価に関する除草剤耐性ダイズの植物学的特性、除草剤耐性遺伝子 *ahas* がダイズの生物学的窒素固定能力及び収量に与える影響、*Xanthomonas* 萎縮病抵抗性バナナのは場試験、CRISPR-Cas を用いた DNA フリーゲノム編集及び Cry 1 タンパク質の交差抵抗性獲得がブラジルでの *Bt* トウモロコシの持続的利用へ与える影響を紹介しております。

なお、本号で文献抄訳は250となりました。これまでの調査報告でご紹介した文献抄訳は、以下の URL で閲覧可能です。

<https://ilsijapan.sakura.ne.jp/pnamazu/namazuzu.cgi>

## 目次

No.241	農業バイオテクノロジー：経済性、環境、倫理、将来 Agricultural biotechnology: economics, environment, ethics and the future	1
No.242	最初のバイテク由来乾燥耐性トウモロコシの乾燥下における子実収量増加に関連する生理学的反応 Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize	2
No.243	組換え植物における非意図的効果の遺伝学的背景（概要） Genetic basis of unintended effects in modified plants	3
No.244	植物のゲノム変化の分子生物学 The molecular biology of plant genomic changes	4
No.245	遺伝子組換え作物における遺伝子挿入効果の比較解析：市場化前評価に関する熟考 A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments	5
No.246	生態的リスク評価に関する Roundup Ready 2 Yield <sup>®</sup> ダイズ MON89788の植物学的特性 Plant characterization of Roundup Ready 2 Yield <sup>®</sup> soybean, MON89788, for use in ecological risk assessment	6
No.247	除草剤耐性遺伝子 <i>ahas</i> がダイズの生物学的窒素固定能力及び収量に与える影響 Impact of the <i>ahas</i> transgene for herbicides resistance on biological nitrogen fixation and yield of soybean	7
No.248	東アフリカにおける <i>Xanthomonas</i> 萎縮病抵抗性バナナの作出に関するほ場試験 Field trial of <i>Xanthomonas</i> wilt disease-resistant bananas in East Africa.	8
No.249	試験管内でアSEMBルさせた CRISPR-Cas9リボ核タンパク質を用いたDNAフリー植物ゲノム編集 DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins	9
No.250	ツマジロクサヨトウ ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) における Cry1タンパク質の交差抵抗性獲得がブラジルでの <i>Bt</i> トウモロコシの持続的利用へ与える影響 Cross-resistance between Cry1 proteins in Fall Armyworm ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) may affect the durability of current pyramided <i>Bt</i> Maize hybrids in Brazil	10

## 農業バイオテクノロジー：経済性、環境、倫理、将来

Agricultural biotechnology: economics, environment, ethics and the future

Bennett AB *et al.*

Anun. Rev. Environ. Resour. 38: 249-279, 2013

米国大学研究グループが過去15年間の主要文献（137編）に基づいて表題のレビューを公表した。（1）GM作物の発展：2013年時点で、世界的市場化済み11種45品種（アルファルファ・カーネーション・ワタ・トウモロコシ・パパイヤ・ナタネ・ダイズ・スクワッシュ・てんさい・ピーマン・トマト）及び限定的市場化・市場化前17種55品種（リンゴ・インゲンマメ・ビート・ワタ・カノーラ・ベントグラス・ユーカリ・トウモロコシ・ラッカセイ・プラム・バレイショ・ナタネ・イネ・バラ・ダイズ・タバコ・コムギ）につき、それぞれの宿主作物名・開発者名・商品名・イベント名・付与特性についてリストにまとめてある。全体の傾向としては、付与特性はいわゆる第1世代（害虫抵抗性、除草剤耐性）が主体であるが、近年では品質向上や環境ストレス耐性、生長特性改変等の第2世代と呼ばれる特性の付与の暫増やスタック系統の顕著な増加が見られる。開発者は、企業が主体であった。（2）GM作物の経済性：全般的にGMワタ・トウモロコシは収量増・病害虫被害及び農薬使用量の減少により、農家の収入増をもたらした。GMダイズは収量増は少ないが、除草剤耐性により作付面積が増加した。これらの経済効果は一様ではなく、*Bt*ワタの増収/減農薬/労力減の割合では、アルゼンチン33%/46%/5%；米国11%/30%/2%；中国7%/67%/6%；南アフリカ40%/49%/25%と試算されている。農家収益（ドル/ha）は*Bt*ワタでは、アルゼンチン23、米国58、南アフリカ91、インド135；*Bt*トウモロコシでは米国12、アルゼンチン20、フィリピン53、スペイン70、であった。1996-2007年のGM作物による総収入は441億ドルと試算されている。（3）健康：毒性化学物質への依存減少、健康増進、就農者の事故死減少などのインパクトがある。GM食品摂取による健康及びアレルギー性への危害は実証されていない。（4）温室効果ガス（GHG）：増収による必要作付面積減少によりGHGは減少し、また除草剤耐性GM作物による不耕起あるいは低耕起栽培もGHG排出を減少させている。（5）生物多様性：農業全体が与える影響のなかで、GM作物独自の特異的・普遍的影響を与えることはないと判断されている。（6）抵抗性出現：少なくとも7種の害虫、16種の雑草に抵抗性が出現している。前者はrefuge（緩衝区）の設置あるいはスタック系統、後者は新規除草剤開発などで対応している。（7）倫理：GM作物への不安・偏見；規制制度；知的所有権などの総合であり、科学的分野だけによる対応は困難である。（8）将来への提言：i）知的所有権の選択的履行、ii）企業・公共機関の協力による小規模作物へのバイオテク技術の普及、iii）普通農業・有機農業とバイオテク技術の相互補完による総合農業の発展；iv）規制の合理化・国際化。（注：EU, 2010（本調査報告No.1）、Carpenter, 2011（同No.151）、Nicolia *et al.*, 2013（同No.176）に次ぐ4番目の総合解析論文である。）

No.242

## 最初のバイテク由来乾燥耐性トウモロコシの乾燥下における子実収量増加に関連する生理学的反応

Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize

Nemali K *et al.*

Plant, Cell and Environment 38: 1866-1880, 2015

モンサント社・米国大学グループによる原著論文である。モンサント社はBASF社と共同で、バクテリア由来の *cold shock protein B* 遺伝子 (*CspB*) をアグロバクテリウム法で導入した乾燥耐性トウモロコシ MON87460を開発した。著者らは乾燥耐性の生理学的反応を理解するために、栄養生長中期から生殖生長中期において、灌漑を制限したほ場試験を2009~11年に実施し、MON87460及び対照従来品種の生育特性を調査した。(1) 灌漑制限期間：葉面積・葉身乾物重・土壌からの吸水率は減少、葉身光合成能率・気孔コンダクタンスには有意差はなく、土壌含水率(50cm深)、穂直径は増加した。(2) 絹糸抽出期：葉面積は減少(-1.3%/2009、-3.5%/2010)、植物体乾物重には有意差なく、穂乾物重は有意に増加した(+8.3%/2009、+20.4%/2010)。(3) 収穫期：1粒重は有意差無(2009)あるいは減少(-4.0%/2010)；1穂粒数は増加(+9.1%/2009、+9.7%/2010)；単位面積当たり穂数は有意差無；植物体乾物重は増加(+3.3%/2009)あるいは有意差無(2010)；収穫指数(粒重/全重)は増加(+8.1%/2009、+6.8%/2010)；子実収量(トン/ha)は増加(+11.7%/2009、+7.3%/2010)。(4) MON87460の耐性発現機作の考察：乾燥ストレス下でMON87460は対照と比較して葉の生長が抑制される。イネの研究において、植物内生CSPはストレス下で細胞分裂が盛んな組織で高蓄積することが知られる。MON87460においてもCspBタンパク質は、細胞分裂が盛んな組織により多く蓄積することが明らかとなっている。以上のことからMON87460において高蓄積したCspBタンパク質は乾燥ストレス下では、内生CSPと同様に細胞分裂が盛んな組織での細胞分裂の抑制によって過度な水利用を抑制することで、耐性を付与すると推察される。MON87460は、実際に4年間安定した増収を与えている(+9.3%/2007；+7.0%/2008；+11.7%/2009；+7.3%/2010)。

(注：本研究では絹糸抽出期の幼穂上の分化雌頭花数(受粉+未授粉)調査を行っていないが、作物生理学的解析を着実に積み上げてMON87460の乾燥耐性を明解に記述している。MON87460は米国西部諸州で急速に栽培シェアを増加しているだけでなく、アフリカのWEMAでの基盤材料としても重要な役割を果たしつつある〔ISAAA 2013〕(本調査報告No. 177)。

## 組換え植物における非意図的効果の遺伝学的背景（概要）

### Genetic basis of unintended effects in modified plants

Meeting on the Genetic Basis of Unintended Effects in Modified Plants,  
Ottawa, 14-16 Jan. 2014

2014年1月にカナダ食品検査庁（CFIA）など5機関の共催で表題の国際会合が開催された。組織委員会がまとめた会合（3部会）の集約（発表・討議）は以下の通りである。（1）第1部会：組換え植物ゲノムにおける非意図的効果（Unintended Effects；UE）の分子生物学的背景について。1）UEの誘因としての遺伝子構造・機能、事例研究（コムギ耐塩性品種）；2）従来育種におけるUE例、変異は組換え植物より従来の植物の方が大きい（次報で紹介）；3）組換え・従来作物育種における最終産物の開発と選出；4）組換え・従来作物のハザードに対する特定の・集中的評価の重要性、従来食品でのUEによる大きな変異の存在の認識について発表があり、必要・不必要データの峻別；植物・特性情報収集の適正レベルについて討議がかわされた。（2）第2部会：UEの事例と背景：1）double strand break（2本鎖切断）・修復よりもトランスポゾンによる影響の方が大きい；2）従来リンゴ・ニンジンのアレルゲン発現は、品種間よりも環境（年次間差）の方が大きい；3）ゲノム変化への影響は組換え作物が従来作物よりも相対的に小さい（事例研究：乾燥耐性トウモロコシ・改変デンプンバレイショ）；4）組換え作物の想定危害経路（Plausible Passway to Harm）及び有効データ作製のための科学的仮説設定の重要性について発表があり、従来食品の成分・アレルゲンにおける組換え食品より大きな自然変異の存在や申請に要求されるデータの過剰要求の急増への対処（申請・規制双方）；安全性評価における構成成分解析の相対的メリットについて討議がかわされた。（3）第3部会：UEの結末に対する安全性評価：食品・飼料の安全性：発表：1）アレルゲン検出法とタンパク質検出法との対比；2）メタボロミクスによるメタボリックマッピング；3）“組換え”対“従来作物”の比較に対するオミクスの適用（GRACEプログラムの一環）。第1分科会：安全性評価へのオミクス手法適用の非妥当性を討議。第2分科会：1）適正な保護目標（protection goal；政治的判断）とリスク仮説設定のためのproblemformulationの適用；2）雑草リスク評価手法（表現型影響）のUE評価への適用；3）既知要因による非標的生物への影響評価における正確な室内実験の優位についての発表があり、非効率・不必要試験及びデータ過剰要求の是正の必要性について討議がかわされた。（注：要点は従来作物が組換え作物よりもより大きいUEを保有していることの認識にあると思われる。）

会議のweb site：<http://www.hesiglobal.org/i44a/pages/index.cfm?pageid=3654>

（Meeting Summaryだけでなく、発表要旨等も閲覧できる（2015年10月時点））

## 植物のゲノム変化の分子生物学

### The molecular biology of plant genomic changes

Parrott W

Meeting on Genetic Basis of Unintended Effects in Modified Plants,  
Ottawa, 14-16 Jan. 2014

前出の会議における米国ジョージア大学教授の発表。要点は、ゲノム変化の態様と頻度、未知有害物質の産生の有無、従来育種における変異の相対的増加などである。(1) 栽培化・従来育種における変異の発現：1) トランスポゾン起因：i) ダイズ全ゲノムのトランスポゾン総数は25,628 (Tian *et al.*, 2012)；ii) トマト第10染色体複製断片 (24.7 kb) の第7染色体への挿入による果実の長大化 (Xiao *et al.*, 2008)。2) パラレトロウイルス介在：イネ (インディカ・ジャポニカ) へのイネツングロ病ウイルスの挿入 (Liu *et al.*, 2012)。3) 一塩基多型 (SNP) 由来：i) シロイヌナズナにおける175 SNPs/100個体 (Ossowski *et al.*, 2010)；ii) トウモロコシタンパク質のSNPsによる変異 (Tenaillon *et al.*, 2001)；iii) トウモロコシ104系統 (60近交系、25地方種、19近縁野生種) の全ゲノムにおける5500万 SNPs の存在 (Michael *et al.*, 2009)；iv) イネ栽培化に伴う種子脱粒性の喪失 (Koniski *et al.*, 2006)；v) 緑の革命イネにおける短稈化 (Pang *et al.*, 1999)。4) 遺伝子の存在・欠落起因：i) トウモロコシ品種 B73と Mo17との間の1000遺伝子の相異 (Lai *et al.*, 2010)；ii) バレイショ 2 遺伝子型間の275遺伝子の相異 (Potato Genome Sequence Consortium, 2011)；iii) 野生ダイズ856遺伝子の栽培ダイズにおける不在；iv) バレイショ 4 品種だけが保有する133遺伝子 (McHale *et al.*, 2012)；v) サビ病抵抗性ダイズ独自の8遺伝子の存在；vi) トウモロコシ・ソルガムにおける遺伝子欠失による不整稈長の出現 (Dilbag *et al.*, 2003)。5) 突然変異育種：i) 合計2543品種の作出 (FAO/IAEA)；ii) DNA レベルの変化：4～8 kb の欠落・15 kb までの逆位・200 bp の挿入など (農業生物学研究所放射線育種場)；(2) 有害物質の産出：作物固有既存毒性の発現レベルの変化はあるが、従来育種において新しい毒性の発現は報告されていない。(3) 遺伝的変異の手法間の比較：ダイズ染色体上の遺伝子変異の大きさは、従来育種>>突然変異育種>遺伝子組換え育種の傾向が顕著である。変異がより大きい従来育種が非意図的毒性を生じていないことから、変異がより小さい遺伝子組換え育種が非意図的毒性を生じる可能性を増大する理由は存在しない (ミネソタ大学 R. Stupar 提供グラフ)。(4) 総括：ゲノムにおける非意図的変化は遺伝子組換え育種より従来育種においてはるかに多発しているが、新規の毒性などの危害は生じていない。従って遺伝子組換え育種が新規の危害を発現するという懸念の根拠は存在しないと結論される。

発表要旨：<http://www.hesiglobal.org/files/7-Speaker%20Abstracts.pdf>



**遺伝子組換え作物における遺伝子挿入効果の比較解析：  
市場化前評価に関する熟考**

A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments

Schnell J *et al.*

Transgenic Research 24:1-17, 2015

GE産物の安全性を統括しているカナダ食品検査庁（CFIA）の科学者グループによる総説である（OECD・WGカナダ代表のP. McDonaldが代表者となっている）。遺伝子組換えにおける供与DNAの目的ゲノムへの挿入においては、追加的DNAの挿入、遺伝子の削除・再配列などを伴う挿入効果により、意図しない特性が発現する可能性がある。著者らはこの可能性を多数の文献（137編）により検証し、現行の市場化前評価システムとの関連を解析した。（1）挿入効果と非意図的特性：遺伝子発現はその遺伝的構造と環境との相互作用であり、一般的には通常の変異内にとどまる。挿入効果は不可避としても必ずしも生物学的に有意な変異に基づくものではない（イネ・トウモロコシ・シロイヌナズナ・ダイズなど20検証文献）。（2）植物における挿入効果類似の遺伝的变化：1）トランスポゾン由来（シロイヌナズナ・トウモロコシ・イネ・ブドウ・オレンジなど23検証文献）。2）2重らせん切断の修復（non-homologous end-joining（NHEJ）を中心に、遺伝子組換え・従来育種・放射線照射など22検証文献）。3）細胞器DNAの細胞間移動（イネ・シロイヌナズナ・タバコなど6検証文献）。4）ウイルス・バクテリアなどによる導入（イネ・タバコ・トマト・バレイショ・バナナ・ペチュニアなど8検証文献）。（3）他の要因による遺伝的变化：1）偶発性遺伝的变化：突然変異・相同組換え・染色体内組換え・染色体異常・ゲノム再編集（genome rearrangement）など（シロイヌナズナ・ダイズ・コムギ・トウモロコシ・イネ・ソルガム・オオムギ・バレイショ・トマトなど24検証文献）。2）従来育種：種内・種間交雑による遺伝子移入・突然変異誘発・体細胞変異などのゲノム単位の変化（イネ・コムギ・トマトなど19主要作物32検証文献）。（4）遺伝的変異とリスク：以上（1）（2）（3）から、非意図特性が食品・飼料及び環境に有害影響を与えることは科学的に立証されていない。従来育種産物は、その長年の安全使用の経験・実績から、市場化前安全性評価が要求されていない。（5）総括：1）挿入効果は不可避であるが、これに伴う非意図特性の発現による有害影響は確認されていない；2）挿入効果と類似の遺伝的变化が偶発突然変異あるいは従来育種でも発生している；3）これらの変化と比較して、挿入効果が遺伝的構成に与える影響は相対的に小さい；4）挿入効果に伴うリスクは従来育種に伴うリスクと同程度と想定される；5）以上から、GE産物の市場化前評価に要求される情報は過剰な要求であり、要求項目の再検討が妥当と思われる。

## 生態的リスク評価に関する Roundup Ready 2 Yield<sup>®</sup> ダイズ MON89788の植物学的特性

### Plant characterization of Roundup Ready 2 Yield<sup>®</sup> soybean, MON89788, for use in ecological risk assessment

Horak MJ *et al.*

Transgenic Research 24: 213-225, 2014

モンサント社研究グループによる原著論文である。除草剤耐性組換えダイズ MON89788の環境影響に関して、特に生態的リスク評価を中心に、ほ場試験を実施し、次の結果を得た。(1) 供試材料：アグロバクテリウム由来の *cp4 epsps* 遺伝子により Roundup に耐性を有する組換えダイズ MON89788、対照は類似の遺伝的背景で非耐性品種 A3244。(2) 場所及び期間：米国3州（アーカンソー、イリノイ、オハイオ）の17ヶ所及びアルゼンチン5ヶ所、2004-2006年。(3) 結果：1) 発芽特性：10、20、30、10(夜)/20(昼)、10/30、20/30℃（全25区）の発芽率、生存種子数（休眠）、死亡種子数には有意差が検出されず、発芽特性及び休眠性（不在）に変化はなかった。2) 生育特性：i) 米国例1（全114区）：初期株数・初期生育勢・50%開花日数・草丈・倒伏・裂莢性・最終株数・種子水分率・100粒重・収量には有意差がなく、また花色にも変化はなかった。例外は MON89788の草丈が有意に低かったが、従来品種間差の範囲内であった。ii) 米国例2（全39区）：i) の諸項目において有意差は検出されなかった。iii) アルゼンチン（全35区）：i) の諸項目において有意差は検出されなかった。例外的に MON89788の初期及び最終株数に12%及び10%の有意な増加があったが、従来品種間差の範囲内であった。iv) まとめ：i)、ii)、iii) における例外値は場所特異的で一貫性はなく、すべて従来品種間の範囲内であり、組換えによる変異の増大ではない。主要生育特性における有意差の不在から、MON89788の雑草性も従来品種の範囲内であると考えられる。3) 花粉形態：直径、花粉生存率、花粉形態の目視観察において有意差は検出されなかった。4) 生態的リスク評価：i) 発芽・生育特性における有意差の不在、種子・休眠性・莢裂開性・倒伏・種子収量における有意差の不在、などにに基づき、MON89788には雑草性・侵入性などの生態的リスクを増加する遺伝的変異は生じていないと考えられる。5) データトランスポータビリティ：地理的・環境的差異にかかわらず2国間で類似の結果と結論が得られたことから、他国間のデータ相互利用の可能性が示された。(4) 総括：MON89788が従来ダイズ品種より、雑草性あるいは生態的リスクを増大することはないと総括される。

## 除草剤耐性遺伝子 *ahas* がダイズの生物学的窒素固定能力及び収量に与える影響

Impact of the *ahas* transgene for herbicides resistance on biological nitrogen fixation and yield of soybean

Hungria M *et al.*

Transgenic Research 24:155-165, 2015

ブラジル研究グループによる原著論文である。ブラジルは世界最大のダイズ輸出国であり、その90%以上は除草剤耐性組換えダイズである。ダイズの生育・収量は根の生物学的窒素固定能力(BNF)により大きく影響される。著者らは除草剤耐性遺伝子のBNFに対する影響を調べる目的で3作期のは場試験を実施し、次の結果を得た。(1) 供試材料: イミダゾリノン系除草剤耐性遺伝子 *ahas* (*Arabidopsis thaliana* 由来) を導入した組換えダイズ CV127 を供試。(2) 場所・期間: ブラジル国内9地点・3作期、計20地点。(3) 処理区: 1) CV127 + イミダゾリノン系除草剤、2) CV127 + 慣行除草剤; 3) 非組換え対照品種 + 慣行除草剤; 4) 従来2品種 + 慣行除草剤。(4) 生物学的窒素固定能力: R2期(生殖生長盛期)に根及び茎(含葉柄)を採取し、以下の7項目を測定した: 根粒数/株; 根粒乾物重(mg/株); 茎乾物重; 茎窒素含量(mgN/g株重); 茎窒素全量(mgN/株); ウレイド態(転流態)窒素比率; ウレイド態窒素全量。(5) 結果: 1) BNFに対する *ahas* 遺伝子の影響: 3作期(2006/2007年及び2007/2008年通常作ならびに2007年短期作)を通じて、全般的に導入遺伝子によるBNFの変化は測定されなかった(例外あり)。2) 除草剤の影響: 3作期を通じて全般的に除草剤によるBNFの変化は測定されなかった(例外あり)。3) 作期及び地点の影響: BNFに若干の変動があったが、一定の傾向は示さなかった。4) ダイズ収量に対する *ahas* 遺伝子及び除草剤の影響: 全般的に *ahas* 及び除草剤による変化は測定されなかった。作期間には収量差があり、通常作は短期作より多収であった。収量は地点間で変動したが、各作期内の全地点の合計には差異がなかった。(6) 総括: ブラジル国内9地点3作期計20試験区において、除草剤耐性遺伝子 *ahas* 及びイミダゾリノン系除草剤は、ダイズの生物学的窒素固定能力及び収量に対し変化を与えなかったと結論される。

## 東アフリカにおける *Xanthomonas* 萎縮病抵抗性バナナの作出に関するほ場試験

Field trial of *Xanthomonas* wilt disease-resistant bananas in East Africa.

Tripathil L *et al.*

Nature Biotechnology 32: 868-870, 2014

国際農業研究協議グループ (CGIAR) 傘下の国際熱帯農業研究所 (IITA)・ウガンダ国研・米国大学の研究グループによる成果公表である。バナナはアフリカの主要作物であり、ウガンダは世界第2の生産国、1人当たり1日に0.6-1.6kgを摂食している。バナナ *Xanthomonas* 萎縮病 (BXW) はバナナ植物体を萎縮・枯死させて収量を皆無とする東及び中央アフリカにおける大病害であるが、有効な対抗策はなかった。著者らは BXW 抵抗性バナナの作出を目的に、ほ場試験を実施し、以下の結果を得た。(1) BXW 抵抗性の機作：既存研究により2つの抵抗性遺伝子が特定されている。*Hrap* 遺伝子は過敏反応性 (hyper sensitive) 誘発タンパク質をコードし、*Pflp* 遺伝子はフェレドキシン (ferredoxin) 類似タンパク質をコードしている。どちらも病原菌を侵入細胞の局所に閉じこめて他所へ拡散させず死滅させる機作を有する。(2) BXW 抵抗性バナナの作出：*Hrap* (タバコ・シロイヌナズナ) 及び *Pfep* (タバコ・トマト・イネなど) の導入成功例 (どちらも温室試験) に基づいて、従来品種 (Sukalindiizi が主体) に両遺伝子のどちらかを導入し、65抵抗性系統 (*Hrap* 導入40系統、*Pflp* 導入25系統) が既に温室検定により選出されていた。(3) BXW 抵抗性のほ場での検定：前出の65系統にウガンダ国研研究所ほ場で開花直前に人工接種試験を実施し、収穫期に調査した。1) 一般特性：生葉数・株高・茎径・開花日数・果房全量・一果重・果実数・果肉色などに対照との有意差は検出されなかった。2) BXW 抵抗性：対照区はすべて発病し、萎縮・枯死した。組換え区の大半は優位に高い抵抗性を示し、とくに11系統 (*Hrap* 導入7系統、*Pflp* 導入4系統) は100%の抵抗性を示した。若木 (3ヶ月) 供試の温室検定とは異なり、生育盛期～収穫期供試のほ場検定では、*Hrap* 導入20%、*Pflp* 導入16% が100%の強い抵抗性を示した。また抵抗性は母樹からヒコバエ (ratoon) に完全に受け継がれていた。現在、これら11抵抗性系統についてより広域なほ場試験を実施中である。(4) 総括：*Hrap* 遺伝子及び *Pflp* 遺伝子を導入した組換えバナナの初めての BXW 抵抗性ほ場検定を実施し、100%抵抗性を示す11系統を選出した。今後、環境及び食品安全性評価を経て一般農家栽培の許可が期待される。また本手法は他地域のバナナ細菌病対策としての適用も可能と考えられる。

## 試験管内でアSEMBルさせた CRISPR-Cas9リボ核タンパク質を用いた DNA フリー植物ゲノム編集

### DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins

Wo J-W *et al.*

Nature Biotech doi:10.1038/nbt.3389, 2015

韓国の研究グループによる原著論文。人工ヌクレアーゼを用い、ゲノム中の特定に部位に特異的に DNA 損傷を与えてその修復過程で変異を導入する技術は、ゲノム編集技術と称され、植物を含め新たな育種技術として注目を集めている。人工ヌクレアーゼとしては、zinc-finger nucleases (ZFNs) や transcription activator-like effector nucleases (TALENs)、RNA-guided endonucleases (RGENs) 等が知られる。中でも RGENs では、ガイド RNA と呼ばれる短鎖の RNA によって切断特異性が決定されるため、標的 DNA 配列に併せて酵素自体の改変が必要な ZFNs や TALENs と比較し、カスタマイズが容易であることから急速に利用が進んでいる。これまで植物でゲノム編集を行う場合、人工ヌクレアーゼをコードする遺伝子及びガイド RNA をコードする DNA コンストラクトを一度植物のゲノム中に挿入する必要があった。このため、植物のゲノム編集による育種は、遺伝子組換え操作を経ることとなり、植物のゲノム編集産物利用の規制を検討する上で大きな懸案となっている。そこで筆者らは、試験管内で構築した Cas9タンパク質とガイド RNA 複合体（リボ核タンパク質）を直接植物細胞に導入させることで、核ゲノムへの外来 DNA 導入を経ずにゲノム編集する技術を今回報告した。[方法] 試験管内で Cas9タンパク質と 2～10倍量のガイド RNA 分子を試験管内で混合することでリボ核タンパク質を調製した。調製したリボ核タンパク質は、PEG 存在下でプロトプラストと共培養することでプロトプラストに導入させた。変異導入効率は、T7エンドヌクレアーゼ I (T7E1) アッセイ及び導入箇所のシーケンス解析により評価した。[結果] (1) プロトプラストにおける変異導入効率：タバコ、シロイヌナズナ、イネ及びレタスのプロトプラストに対してリボ核タンパク質を導入させた。リボ核タンパク質に含まれるガイド RNA の標的は、\*AOC (タバコ)、\*\*PHYB (シロイヌナズナ)、\*\*\*P450及び\*\*\*\*DWD1 (イネ)、\*\*\*\*\*BINI (レタス) である。その後、プロトプラストよりゲノム DNA を抽出し、T7E1アッセイにより変異導入効率を算出した結果、標的サイトの8.4% (イネ)～46% (レタス) と高率で変異が導入されていた。更に変異導入箇所のシーケンス解析により、1塩基挿入～9塩基欠失程度の範囲で塩基の挿入/欠失が認められた。(2) 2種類のリボ核タンパク質による長鎖欠失：シロイヌナズナ BRI 遺伝子中の201bp 離れた部位を標的とする2種のガイド RNA によるリボ核タンパク質を同時にシロイヌナズナプロトプラストに導入させることで223 bp の欠失導入も可能であった。(3) 変異導入プロトプラストからの植物体の再分化：レタスについては、変異導入が確認された3カルスより植物体 (T0) を再分化させ、種子を得、後代 (T1) においても、導入した変異が保持されることを確認した。[結論] 試験管内でアSEMBルした Cas9タンパク質-ガイド RNA リボ核タンパク質をプロトプラストに直接摂取する方法で、4種の植物のべ6種の遺伝子でゲノム編集が可能であることを示した。本法で得られた変異は遺伝的にも安定であった。これは、核ゲノムへの外来遺伝子の導入を経ない植物のゲノム編集技術として広く利用されることが期待できる。

\*AOC : ジャスモン酸生合成酵素の一つアレンオキシドシクラーゼをコードする遺伝子

\*\*PHYB : フィトクローム B 遺伝子

\*\*\*P450 : シトクローム P450をコードする遺伝子

\*\*\*\*DWD1 : ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解に関与する DWD タンパク質をコードする遺伝子

\*\*\*\*\*BINI : ブラシノステロイドシグナリング関連遺伝子

## ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) における Cry1 タンパク質の交差抵抗性獲得がブラジルでの *Bt* トウモロコシの持続的利用へ与える影響

Cross-resistance between Cry1 proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided *Bt* Maize hybrids in Brazil

Bernardi D *et al.*

PLoS ONE 10 (10) : e0140130. doi:10.1371/journal.pone.0140130, 2015

サンパウロ大学とモンサント社による原著論文。*Bt* 作物は生産性向上だけでなく、従来の農薬による管理に比べて環境への影響も少ない農作物の害虫管理技術として世界中に広く利用されている。ブラジルでも2008年以降、*Bt* トウモロコシの栽培が開始され、2013-14作期では全トウモロコシ耕作地の8割に達し、その大半はTC1507 (Cry1F 発現) である。一方で、*Bt* 作物の利用に関しては、抵抗性害虫の出現が問題となっており、ブラジルでもトウモロコシの主要害虫であるツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) においてCry1F 抵抗性系統発現が報告されている。近年、Cry1タンパク質の抵抗性獲得に関しては、Cry1タンパク質間での交差抵抗性に関して複数の報告がある。本報告では、筆者らが以前にブラジル国内のTC1507トウモロコシ栽培ほ場から採取したCry1F 抵抗性ヨトウの後代について、他のCry タンパク質への抵抗性の有無を調査した。[方法]

(1) Cry1タンパク質交差抵抗性ヨトウの単離：2012年にブラジル国内のトウモロコシ栽培地 (Cry1F トウモロコシ栽培1地点、non-*Bt* トウモロコシ栽培10地点) から採取したヨトウの後代F2世代計552系統にMON89034 (Cry1A.105及びCry2Ab2発現) 給餌スクリーニング試験を実施した。その結果、Cry1F トウモロコシ栽培地由来の99系統中41系統が抵抗性を示したのに対し、non-*Bt* トウモロコシ栽培地由来は、453系統中34系統と低頻度であった。更にCry1F トウモロコシ栽培地由来の抵抗性系統の中から15世代にわたって調査し、安定して交差抵抗性を示す1系統をRR系統とした。(2) RR系統の交差抵抗性の範囲：Cry1A.105及びCry2Ab2精製タンパク質をそれぞれ別々にRR及び感受性系統(SS)に給餌試験した。RRのCry1A.105に対する生育阻害濃度(MIC50)は、SSの3,300倍以上と非常に高い抵抗性を示したのに対し、Cry2Ab2に対してはSSの10倍程度と弱い抵抗性であった。(3) 交差抵抗性ヨトウの適応コスト：*Bt* 抵抗性獲得による生態学的コストを試算するため、RR、SS、及びその交雑系統(SR)についてnon-*Bt* トウモロコシ給餌下での生活史を通じて観察を行った。RRは生殖生長期の生存率及び生殖能力の低下が見られ、純繁殖率はSSと比べ32.2%減、SRと比べ28.4%減であった。[結論] Cry1タンパク質間では、交差抵抗性発現は確認できたが、Cry2Ab2への有意な交差抵抗性発現は確認されなかったことから、クラス異なるCryタンパク質発現*Bt* トウモロコシの組み合わせによる抵抗性害虫発現の抑制管理は適当であると考えられる。しかしながら、ブラジルで栽培される*Bt* トウモロコシイベントの再検討や緩衝区(refuge)活用等の更なる抵抗性発現抑制のための方策が必要である。

# ERA プロジェクト調査報告

2015年12月 印刷発行

特定非営利活動法人  
国際生命科学研究機構 (ILSI JAPAN)

理事長 西山徹

〒102-0083東京都千代田区麹町 3-5-19

にしかわビル 5F

TEL 03-5215-3535

FAX 03-5215-3537

[http:// www.ilsijapan.org](http://www.ilsijapan.org)