
ERAプロジェクト調査報告

March 2016

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）と協力関係にあり、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

2016. 3

バイオテクノロジー研究部会

2016年の調査報告書第1号（通算第26号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え作物と従来品種との実質的同等性に関する知見として、萎凋病抵抗性遺伝子組換えバナナの農業形質、ウイルス抵抗性遺伝子組換えインゲンマメの栄養成分、除草剤耐性遺伝子組換えダイズの窒素固定能力と収量の報告を紹介しております。また、遺伝子組換え飼料が家畜・家禽・魚の代謝諸特性や畜産物に及ぼす影響に関する74報を精査したレビュー、遺伝子組換え作物による遺伝子発現及び物質生産に関する研究として、ポプラにおける導入遺伝子の長期発現の安定性や、ダイズにおける必須アミノ酸を高含有するタンパク質の生産についての研究成果を紹介しております。さらに、近年報じられている主要作物の収量低下傾向に関連する情報として、イネ・コムギ・トウモロコシの収量限界と収量の維持・増大を提言した総説を含む複数の文献を取りあげました。

なお、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/namazu.cgi>

目次

No.251	栄養構成成分における RNAi 介在ウイルス抵抗性組換えインゲンマメ (EMB-PV051-1 系統) とその非組換え対照との比較解析 Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart ...	1
No.252	遺伝子組換え飼料が食物生産動物の代謝諸特性に及ぼす影響：最近研究のレビュー Genetically modified feeds and their effect on the metabolic parameters of food-producing animals: A review of recent studies	2
No.253	遺伝子組換えポプラにおけるゲノム及び導入遺伝子長期発現の安定性 Genomic stability and long-term transgene expression in poplar	3
No.254	コーンベルトにおける収量限界 Limits on yields in the corn belt	4
No.255	作物生産の歴史的傾向における収量増加と収量限界との判別 Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends.....	5
No.256	トウモロコシ収量格差の縮小を目的とした植物栄養利用効率の世界的及び年代的な理解 Understanding global and historical nutrient use efficiencies for closing maize yield gaps	6
No.257	バイオ燃料に敵対する巨大石油業界 Big oil turns on biofuels	7
No.258	新規合成タンパク質 MB-16 の発現による組換えダイズにおけるタンパク質の質の向上 Improved protein quality in transgenic soybean expressing a <i>de novo</i> synthetic protein, MB-16	8
No.259	遺伝子組換え植物の分子特性及びリスク評価のための手法としての次世代シーケンサー：従来技術と比べての付加価値はあるのか？ Next-generation sequencing as a tool for the molecular characterization and risk assessment of genetically modified plants: Added value or not?	9
No.260	デジタル PCR 技術を用いた EU で認可を受けた遺伝子組換えトウモロコシ 12 系統の多重一斉定量分析法 Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction	10

栄養構成成分における RNAi 介在ウィルス抵抗性組換えインゲンマメ (EMB-PV051-1系統) とその非組換え対照との比較解析

Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counter part

Carvalho JLV *et al.*

Transgenic Research 24: 813-819, 2015

ブラジル農牧研究開発公社 (EMBRAPA) 研究グループによる原著論文である。インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) は最重要食用マメであり、世界、特にラテンアメリカ・サブサハラアフリカの10億の人々の栄養源となっている。マメゴールデンモザイクウィルスはタバココナジラミ (*Bemisia tabaci* Genn.) によって媒介され、アメリカ大陸のインゲンマメ栽培に最大の被害を与える。慣行育種では防除効果が上がっていないため EMBRAPA は RNAi 介在による本ウィルス完全抵抗性組換えインゲンマメを開発し、2011年に一般栽培が認可された。著者らは2008~2009年を中心に広範囲な栄養成分分析試験を実施し、以下の結果を得た。(1) 供試材料：圃場栽培成熟種子：1) EMB-PV051-1系統 (GM インゲンマメ) (3地域・2年)；2) NIL 系統 (2地域・1年)；慣行品種データバンク (5品種・6地域・5年)。(2) 栄養成分分析：37成分を主として AOAC International (注) の定める標準分析法により分析した。(3) 分析結果：GM インゲンマメ EMB-PV051-1系統は以下の成分で対照と比較して有意差が検出されなかった。i) アミノ酸18種類 (トリプトファン・システイン・メチオニン・アスパラギン酸・セリン・グルタミン酸・グリシン・ヒスチジン・アルギニン・トレオニン・アラニン・プロリン・チロシン・バリン・リジン・イソロイシン・ロイシン・フェニルアラニン)。ii) 糖 (ショ糖・ラフィノース・スタキオース)；iii) ビタミン B1及び B2)；iv) その他 (タンパク質・無機成分 (カルシウム・リン・カリウム・マグネシウム・亜鉛・鉄・銅・アルミニウム・マンガン))。NIL 系統もアミノ酸17種類・鉄・カリウム・リン・ビタミン B1及び B2において有意差は検出されなかった。GM インゲンマメ及び NIL 系統の抗栄養成分 (フィチン酸・トリプシンインヒビター) でも有意差は検出されなかった。以上を通じ、ごく少数の例外値はあったが、すべて慣行品種データバンクの範囲内であった。(4) 総括：RNAi 介在によるマメゴールデンウィルス抵抗性組換えインゲンマメ (EMB-PV051-1系統) は、37種類の栄養成分 (タンパク質・アミノ酸・糖・無機成分・ビタミン B1及び B2・抗栄養成分など) において、慣行品種データバンクの範囲内の介在値を示し、実質的同等性が確認された。これにより、初めての GM インゲンマメのブラジル国内の一般栽培の基盤が確立された。

(注) AOAC International は、食品検査法の標準化や分析手法の検証などを行っている米国の非営利団体。

遺伝子組換え飼料が食物生産動物の代謝諸特性に及ぼす影響： 最近研究のレビュー

Genetically modified feeds and their effect on the metabolic parameters of food-producing animals: A review of recent studies

Swiatkiewicz S *et al.*

Animal Feed Science and Technology 198: 1-19, 2014

ポーランド国研・大学研究グループによる総合的レビューである GM 作物の大部分は食物生産動物の飼料として利用されている。著者らは最近の74文献（レビュー文献が主体）に基づいて、GM 飼料の家畜・家禽・魚への生理的・代謝的影響を5つの領域について精査した。（1）健康状態・血液要因・免疫特性による評価（26例）；i）家禽（ニワトリ又はウズラ、4例）：除草剤耐性（HT）大豆粕（搾油後のダイズを砕いたもの）又は *Bt* トウモロコシあるいはその両方を給餌；ii）ブタ（8例）：*Bt* トウモロコシ又は HT 大豆粕又はその両方を給餌；iii）ウシ（2例）：*Bt* トウモロコシ又は *Bt* トウモロコシ / HT 大豆粕混合を給餌；iv）ヒツジ（4例）：*Bt* トウモロコシ又は *Bt* 綿実を給餌；v）ヤギ（2例）：HT 大豆粕を給餌；vi）ウサギ（1例）：HT ダイズを給餌；vii）大西洋サケ（5例）：HT ダイズ又は *Bt* トウモロコシを給餌。結果：20/26例は悪影響なし、サケ内臓に軽微な差。（2）組織病理学的解析による評価（9例）；i）ニワトリ（3例）：HT 大豆粕 / *Bt* トウモロコシ混合、HT 大豆粕 / HT トウモロコシ混合、*Bt* トウモロコシ / HT トウモロコシ混合を給餌；ii）ブタ（2例）：*Bt* トウモロコシを給餌；iii）ヒツジ（2例）：*Bt* 綿実を給餌；iv）ヤギ（1例）：HT 大豆粕を給餌；v）大西洋サケ（1例）：HT ダイズを給餌。結果：9/9例で悪影響なし。（3）組換え DNA の消長による評価（15例）；i）家禽（ニワトリ又はウズラ、3例）：HT 大豆粕 / *Bt* トウモロコシ混合又は *Bt* トウモロコシを給餌；ii）ブタ（6例）：*Bt* トウモロコシ、HT 大豆粕 / *Bt* トウモロコシ混合を給餌；iii）ウシ（1例）：HT 大豆粕 / *Bt* トウモロコシ混合を給餌；iv）ヒツジ（1例）：*Bt* トウモロコシを給餌；v）ヤギ（2例）：HT 大豆粕を給餌；vi）ウサギ（1例）：HT 大豆粕を給餌；vii）*in vitro* 試験（1例）：*Bt* トウモロコシ。結果：15/15例で DNA 検出されず、DNA・遺伝子の伝播なし。（4）胃腸経路の微生物叢による評価（5例）；i）ニワトリ（1例）：HT 大豆粕を給餌；ii）ブタ（1例）*Bt* トウモロコシを給餌；iii）ウシ（1例）：*Bt* トウモロコシを給餌；iv）ヒツジ（1例）：*Bt* トウモロコシを給餌；v）*in vitro* 試験（1例）：*Bt* トウモロコシ。結果：5/5例で悪影響なし、遺伝子伝播なし。（5）生産性・消化性・品質による評価（35例）；i）家禽（15例）；ii）ブタ（6例）；iii）ウシ（5例）；iv）ヒツジ（3例）；v）ウサギ（1例）；vi）大西洋サケ（2例）。結果：30/35例は悪影響なし、サケに軽微の差。（6）総括：GM 飼料はほとんどの試験例で食物生産動物の代謝諸特性に悪影響を与えず、肉・乳・卵などの生産物の品質にも変化なく、飼料として安全であると結語される。（注：（3）及び（5）は、よくある質問に対する安全性の解答であり、関係者の参考になると思われる）。

遺伝子組換えポプラにおけるゲノム及び導入遺伝子長期発現の安定性

Genomic stability and long-term transgene expression in popular

Fladung M *et al.*

Transgenic Research 22: 1167-1178, 2013

ドイツの公的研究所の研究者グループによる原著論文である。樹木のような長命植物における導入遺伝子の安定的発現は極めて重要であるが、組換え樹木についての研究例は極めて少ない。著者らは長期間組織培養（19年）あるいはガラス室栽培（18年）された交雑種組換えポプラについてこの問題を研究し、次の結果を得た。（1）供試材料：交雑ポプラ（*Populus tremula*×*P. tremuloides*）に *Agrobacterium rhizogenes* 由来の *rolC* 遺伝子*を2種類のプロモーター（35S及び *rbcS*）を用いてアグロバクテリウム法で導入し、12系統の組換えポプラ35S::*rolC*及び *rbcS*::*rolC*が作出された（1993年）。（2）長期保存：1）継代組織培養：35S::*rolC*4系統及び *rbcS*::*rolC*2系統を、19年間、170回以上継代組織培養した。2）ガラス室栽培：1）と同じ材料を鉢上げしてガラス室で以後8～18年間栽培を行った。（3）結果：1）ゲノム安定性：T-DNA挿入が長期間にわたる *in vitro*での継代時に宿主ゲノムに与える影響を評価するため、35S::*rolC*4系統及び非組換え対照系統のゲノムDNAを AFLP法により比較した結果、供試4系統において、非組換え対照系統との間に大きな変異がないことが確認された。2）導入遺伝子 *rolC*の発現：i）継代組織培養：35S::*rolC*4系統はいずれも *rolC* 遺伝子発現を維持し、また形態の特徴も維持されていた。*rbcS*::*rolC*2系統も葉の色はやや薄くなったものの、*rolC* 遺伝子発現は維持していた。ii）ガラス室栽培：35S::*rolC*4系統はすべて *rolC* 遺伝子発現を維持し、また形態の特性も維持されていた。より長期間保存された *rbcS*::*rolC*2系統も同様の結果であった。iii）導入 *rolC* 遺伝子の再確認：*in vitro*継代培養の全試料に対してゲノミックPCRテストを実施し、全ての系統で *rolC* 遺伝子の存在を確認した。またガラス室栽培の全試料を対象にノーザンブロットを実施し、全ての系統で *rolC* 遺伝子の発現を確認した。（4）総括：長期間保存（継代組織培養19年・ガラス室栽培最長18年）された組換えポプラにおける、ゲノム安定性、形態特性維持、導入遺伝子の安定的発現が確認された。本研究は現在、最高齢の組換え樹木における安定的遺伝子発現を報告するものである。

（訳者注：* *rolC* 遺伝子は *Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*) による不定器官（毛根）誘導に係る遺伝子。*rolC* 遺伝子の導入は植物を矮化させる。）

コーンベルトにおける収量限界

Limits on yields in the corn belt

Ort DR & Long SP
Science 344: 484-485, 2014

米国農務省・イリノイ大学の研究者による農業生産予測である。米国は中西部コーンベルトを主体に世界トウモロコシの36.5%を生産し、世界輸出量の50%を占めている。この要因は密植適応性の向上であり、同時に干ばつ感受性の増大を伴っている (Lobell *et al.*, 2014、本調査報告既報 No.225)。この報告の生理・生態的補足資料として、著者らは次の段階的過程を論述した。(1) 水蒸気圧不足 (VPD) : 気孔の開口は、光合成に必須の二酸化炭素 (CO_2) の取り入れに必須だが、同時に水分の90%を蒸散により失う。単位蒸散量当たりの同化炭素量は水利用効率 (WUE) と定義されている。蒸散率は葉内部と外気との水分勾配 (VPD) に比例し、たとえ相対湿度が高くても気温の上昇に伴って増大する。葉からの水分損失は相対湿度ではなく VPD に直接比例して増大する。(2) 2050年までの目標収量と必要な降水量 : 2013年までの平均収量10トン/ha と年間降水量940 mm との関係性を前提として、2050年の目標収量17トン/ha を達成するためには約1,270 mm の年間降水量、VPD 値では2.2から2.65 kPa への増加が必要となる。(3) 必要降水量節約の方策 : 1) 大気中 CO_2 の増加による WUE の増大 : 必要量 CO_2 呼吸のための気孔開度減少により蒸散量が減少し、WUE が12.5% 向上する (例ダイズ)。同様な WUE 増加をトウモロコシに想定すると必要な年間降水量は1,120 mm にまで減少するが、現行よりかなりの降水量が必要である。2) 上位葉の垂直化による WUE の増大 : 日光が葉層下部へ滲透し、WUE が低い下位葉の効率を向上させ、全体として WUE を13% 向上させ、必要な年間降水量を1,020 mm まで低下させる。しかし、干ばつの危険性は依然として高い。(4) 2050年以降の収量低下 : 光合成以外、例えば受粉などへの悪影響が懸念され、もし VPD が2060年に2.8 kPa に達すれば、トウモロコシは40% の減収が想定される。(5) 総括 : 想定される節水効果 ((3) の1) 及び2)) は限定的であり、唯一の真の解決策は気温上昇及び VPD を増大させる CO_2 放出の阻止に集約される。(注 : 世界最大のトウモロコシ生産・輸出国である米国における将来予測として留意すべきと考えられる)。

作物生産の歴史的傾向における収量増加と収量限界との判別

Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends

Grassini P *et al.*

Nature Communications DOI: 10.1038/ncomms 3918, 2013

米国大学研究グループによる論説である。著者らは1965年以降の主要作物生産諸国における収量の歴史的傾向を一次関数を主体とする統計的手法で解析し以下の結果を得た。(1) 栽培面積の推移：推移の傾向(70%以上)はイネ・コムギ・トウモロコシの3大主穀作物で決定され、他の主要作物(穀類、糖料作物、油糧作物、根菜、繊維作物、マメなど)の推移もこの傾向に同調している。初期(緑の革命)の増加、その後20年間の平行推移、2002年以降の急増(南米・アジア・アフリカにおける主穀類・ダイズ)の3段階の推移を示している。(2) 3大主穀作物(イネ・コムギ・トウモロコシ)収量の推移：3大作物は世界穀物生産量の85%以上、人間・家畜の必要エネルギーの大半を占めている。世界生産量の84%(イネ)、56%(コムギ)、71%(トウモロコシ)を生産する諸国・地域の36例について解析を行った。10例(28%)では、収量増加は維持されたが、後半期の相対増収率(増収量/収量傾向線:1年ごとの増収率)は低下している(インドのイネ)。後半で増収量が低下した例もある(インドネシアのイネ、中国のトウモロコシ)。一方、11例(31%)では、初期が低収、後期で品種栽培法の改善により増収している(ベトナムのイネ、ブラジルのダイズ)。しかし、この場合でも後期の相対増収率は低下している。(4) 先進的集約作物生産国における収量限界：14例(39%)では、初期の増収以降の長期間にわたり収量が高レベルで停滞し収量限界が顕著である。収量限界の状態は世界イネ作の33%、コムギ作の27%に見られる。収量限界の要因は、その作物の平均的収量が生物物理的(biophysical)収量限界に接近したことによるとされている。収量限界到達の具体例は、東アジア(中国・韓国・日本)のイネ；北西欧州(英国・フランス・ドイツ・オランダ・デンマーク)及びインドのコムギ；南欧州(イタリア・フランス)のトウモロコシなどである。他の諸要因(気候変動・土壌悪化・不適地作付け増加・研究開発への投資減少など)もある。収量限界状態が解消され増収に転じた例はまだ存在していない。(5) 総括：世界の主穀物生産の31%に相当する36例中の44%では、1990-2010年の相対的増収比率が低下し、収量限界に達していると判断される。その対策はまだ確立されていない。(注：既往の楽天的将来予測への一つの警鐘であると思われる)。

トウモロコシ収量格差の縮小を目的とした植物栄養利用効率の 世界的及び年代的理解

Understanding global and historical nutrient use efficiencies for closing maize yield gaps

Ciampitti IA and Vyn TJ
Agronomy Journal 106: 2107-2117, 2014

米国大学研究者によるレビューである。近年主要作物収量の停滞・低下傾向が報じられている。世界の食料安全保障は、収量格差（潜在収量と実収量との差）の縮小と環境維持性向上との二重の挑戦に直面している。著者らは150以上の文献（測定値2,500以上）に基づき、トウモロコシの収量及び養分（窒素；N・リン；P・カリウム；K）吸収を、地域的（米国及び世界（米国以外31ヶ国の平均））並びに年代的（1800年後半～2012年）に解析した。（1）単位面積当たりの諸量：全期間の収量は、米国平均10.2、世界平均5.6トン/ha；養分吸収量は、米国平均219（N）・29（P）・218（K）、世界平均129（N）・24（P）・120（K）kg/haであった。養分吸収量あたりの収量の効率は米国が世界より高く、特に窒素（N）において顕著である。米国は収量・養分吸収量ともに経年的に増加したが、2012年の大干ばつ害による減収から、2006～2012年の最終期には収量・養分量共に低下した。世界では、前～中期の変化は少ないが、最近30年で収量・養分量ともに増加した。栽植密度（個体数/m²）は米国では2.6から8.0へ、世界では5.8から6.7へ増加した。（2）個体当たりの諸量：収量（g）は米国148・世界91；養分吸収量の地域間差は縮小している。米国の相対的多収は遺伝的・生理的改善（葉直立性、不稔粒減少、緑葉維持、病害虫・干ばつ抵抗性、雌雄穂開花同調）が貢献している。米国では2006～2012年に養分吸収量は31%（N）・22%（P）・19%（K）低下したが収量低下は7%であり、養分吸収量あたりの収量の効率は相対的に低養分領域で向上した。（3）養分吸収効率：N 施用量は米国178・世界136 kg/ha；N 吸収量は米国216・世界121 kg/ha（施肥＋天然供給（45～60%））；P 吸収及び施用量は、米国39及び43・世界25及び53 kg/ha；K 吸収及び施肥量は、米国217及び96・世界121及び128 kg/ha。（4）N/P 比及びN/K 比：平均的にN/P 比は5:1（1.3～17.1）；N/K 比は1:1（0.3～2.5）；多収例は平均比率に近似している。（5）今後の改善及び将来研究：1）養分供給とN 施肥の時期・量の適正化、2）密植適応性向上、3）遺伝的・生理的改善：適正交雑種の選定、吸収養分の分配、収量関連形質の改良など。（6）総括：1）米国は世界より養分吸収量あたりの収量が高い、2）1）における差は個体あたりでは縮小する、3）収量効率は相対的に低濃度の個体あたり養分量で向上する、4）施肥効率は米国では変動が小さいが、世界では大幅に変動する（不良気候・土壌・水分の影響が大きい）、5）N/P 比は5:1、N/K 比は1:1が標準的である。6）収量・養分効率の向上のため、遺伝的・環境的・管理的分野の総合的調査が重要である。（注：今後のGM 対象特性が示唆されていると思われる。）

バイオ燃料に敵対する巨大石油業界

Big oil turns on biofuels

Sheridan C

Nature Biotechnology 31: 870-873, 2013

米国では政府の奨励・指令にもかかわらずバイオ燃料の市場化は容易ではない。本誌レポーターが以下の諸問題を報告した。(1) バイオ燃料事業の不振：最近、Exxon Mobil社と Synthetic Genomics社の組換え藻類バイオ燃料生産合弁事業が中止された。La Jolla社もコストと生産能力の難点から、大規模なバイオ燃料生産事業を断念した。これらは、経済的沈滞と敵対する石油業界の政治抑制策との両面から圧縮されるバイオ燃料業等を象徴している。バイオエタノール市場はバイオエタノール混合ガソリン E10 (バイオエタノール10%とガソリン90%) が基準となりトウモロコシバイオエタノールで飽和している。(2) セルロース系バイオ燃料への失望：トウモロコシバイオエタノールより温室効果ガスの発散が少ないため有望視されたが、資金不足、技術未完成、市場化リスクなどから大量生産が阻害されている。ロンドンに本社を置くBP社は、フロリダに大規模なセルロース系バイオエタノール生産施設を新設する計画を中止した。アムステルダムに本社を置くShell社は、セルロース系バイオエタノール生産事業に関して、従来の北米でのトウモロコシバイオエタノール生産に関する合弁事業に加え、新たにブラジル Raizen社と合弁事業を開始し、同社の豊富な資金・経験のサトウキビ生産事業との連携によるセルロース系バイオエタノール生産を目指している。(3) 生産体制の強化：敵対する石油業界と環境保護派との両面圧力のなかで、米国環境保護庁(EPA)はバイオ燃料(再生可能燃料)生産を推進する目的で、Renewable Fuel Standard (RFS)計画を法制化した。米国におけるバイオ燃料の基準には次の4分類がある。(i) 従来型バイオ燃料(トウモロコシスターチのバイオエタノールやバイオブタノール)；(ii) セルロース系バイオ燃料(トウモロコシ以外由来のバイオエタノール)；(iii) バイオディーゼル；(iv) 先進型バイオ燃料。2007年に示した2013年の再生可能燃料の使用義務量は、再生可能燃料全体で165億5000万ガロン(セルロース系バイオ燃料600万ガロン、バイオディーゼル12億8000万ガロン、先進型バイオ燃料27億5000万ガロン含む)としていた。この政令はガソリン精製・輸入業者に対し一定量のバイオ燃料の市場化を義務付けている。(4) 改善への方途：バイオエタノール混合ガソリン E15 (バイオエタノール15%以上の混合)が期待されるがガソリン小売業者は実施していない。セルロース原料(トウモロコシ茎葉・残渣など)を利用可能とするための既存トウモロコシエタノール施設の改装、さらにはガソリンと16%以上の混合が可能なブタノール生産への施設改装などが進行中である。(5) 藻類由来のバイオ燃料：Synthetic Genomics社の組換え藻類の開発・利用は失敗したが、なお数社が初期段階の開放あるいは閉鎖系培養の研究を進めている。(6) 復活した石油業界の対抗：例えバイオ燃料が石油と平衡価格になったとしても、米国エネルギー市場が受け入れるかは疑問である。最近のシェールオイルの成功が米国石油業界の復活を支えている。気候変動への石油燃料の悪影響は明瞭であるが、対策は取られていない。米国は石油依存症から抜け出せていないのである。

新規合成タンパク質 MB-16の発現による組換えダイズにおける タンパク質の質の向上

Improved protein quality in transgenic soybean expressing a de novo synthetic protein, MB-16

Zhang Y *et al.*

Transgenic Research 23:455-467, 2014

カナダ国研研究グループによる原著論文である。ダイズの栄養分は乳製品に匹敵するが、含硫アミノ酸、とくにメチオニンが欠乏しているのが大きな欠点である。これを改善するための慣行・バイオテク両面の努力は著効を示していない。著者らは必須アミノ酸を豊富に含む分子量11 kDaの合成タンパク質をコードする合成遺伝子を導入した組換えダイズを作出し、以下の結果を得た。(1) MB-16タンパク質：栄養価向上を目的に人工的に設計された必須アミノ酸を大量に(6割以上)含む合成タンパク質。MB-16はタンパク質の立体構造の安定性等も考慮された改良型(Simons *et al.*, 2011)。(2) 組換えダイズの作出：オリジナル MB-16bc(大腸菌コドン型)、MB-16sc(ダイズコドン型)及びMB-16scに小胞体輸送シグナルペプチドを付加したMB-16scKDELをそれぞれダイズ種子特異的に発現させる3つのコンストラクト(発現ベクター)をダイズ慣行品種(X5あるいはWe)にパーティクルガン法で導入し、T2世代までにそれぞれのコンストラクトから1系統ずつを選抜した。最終的にMB-16sc導入系統についてはT5世代まで、他2系統はT3世代まで進め、サザンブロット法で導入遺伝子の安定性を評価した(3系統とも導入遺伝子をゲノム中に5~6コピー保持)。(2) サンプリング方法：受粉後10-12日(S1; 莢長3-3.5 mm、緑色半透明)、14-16日(S2; 莢長5-6 mm、緑色)、20-24日(S3; フルサイズ、緑色)、28-31日(S4; 黄色)、31-35日(S5; 黄色から乾燥)、完熟種子の6ステージに採取した。(3) 発現解析：MB-16sc系統はS1で微量、S2・S3で高く発現、以降は発現なし。MB-16scKDEL系統はS1からS3にかけて増加、S4で減少、S6では発現なし。低下：MB-16bc系統はMB-16scとほぼ同様の様式であった。(4) MB-16タンパク質の発現：MB-16sc系統ではS1で検出不能、S2・3で増加、S4で減少、S5・S6でほとんど検出されなかった。MB-16bc系統はMB-16scと類似していたが全体的に発現は低かった。MB-16scKDELではS1より蓄積開始、S3で最高値、以降低下した。3系統とも完熟期ではMB-16の発現は低下し検出不能となった。(5) 完熟種子におけるMB-16タンパク質分解：MB-16は、非組換え未熟種子からの抽出タンパク質では2-3時間で30-50%程度が分解されたが、成熟種子(S5・S6)抽出タンパク質では10分間でほぼ完全に分解された。これが上記3系統の成熟期種子でMB-16が消失した原因である。(6) アミノ酸分析：完熟種子中のメチオニン、システイン及び総含硫アミノ酸の増加率は、MB-16sc系統で16.2%、65.9%、42%、MB-16scKDEL系統で6.0%、3.14%、19%であった。他の必須アミノ酸(トレオニン、リシン、ロイシン)も増加し、増加率はMB-16-sc系統では2.5%、18.6%、3.6%、MB-16scKDELでは1.8%、26.0%、3.9%であった。両系統とも必須アミノ酸総量の増加が明瞭であった。(7) 総括：新規合成タンパク質MB-16の導入により、含硫アミノ酸及び必須アミノ酸の総量が増加した組換えダイズ系統が作出され、ダイズの栄養特質の向上が可能なが実証された。

遺伝子組換え植物の分子特性及びリスク評価のための手法としての次世代シーケンサー：従来技術と比べての付加価値はあるのか？

Next-generation sequencing as a tool for the molecular characterization and risk assessment of genetically modified plants: Added value or not?

Pauwels K *et al.*

Trends in Food Science & Technology 45: 319-326, 2015

ベルギーの公的研究所及び大学の研究者による論説。遺伝子組換え作物の FFP 利用には、リスク評価に際して組換え作物の分子特性データの当局への提出が要求される。リスク評価は、従来、サザンブロット法、サンガーシーケンス、PCR、ウェスタンブロット法等の実績のある既存技術によって得られたデータが使用されてきた。近年、新たなシーケンシング技術として、次世代シーケンシング技術（NGS）が急速に普及している。本報告では、NGS によるデータを組換え体のリスク評価に用いることの可否及びリスク評価における付加価値について考察した。

[結果] (1) 要求されるデータ：EU を例にとると以下のデータが要求される： i) 導入核酸に関する情報（サイズ、コピー数、ベクター骨格の不在）； ii) 導入遺伝子産物の細胞内局在； iii) ゲノム中での導入遺伝子配列の状態の詳細情報； iv) 全ての挿入部位における隣接ゲノム配列； v) 新たな ORF の有無； vi) 遺伝子挿入の安定性； vii) 発現データ（RNA、タンパク質、代謝物等）等。(2) 現状の分析手法： i) サザンブロット； ii) ~ v) サンガー法によるシーケンス； vi) 世代間でのサザンブロットの比較； vii) ウェスタンブロット、ELISA、ノーザンブロット、液体及びガスクロマトグラフィーによる成分分析、キャピラリー電気泳動等。(3) 現状の NGS の適用可否： i) *de novo* ゲノムシーケンス解析により挿入配列、挿入数を決定可能。 ii) 挿入位置の近隣配列情報が得られれば、より詳細な細胞内局在性の予測が可能。 iii) 現時点の NGS は非常に短いリードのアセンブリに基づくため、反復配列等の決定は不得手。 iv) 可能。 v) 可能、だが高精度の ORF 予測にはデータの正確性の向上が必要。 vi) 世代間の隣接ゲノム配列の比較等で可能。 vii) 発現データの取得は RNA-seq 解析で可能。タンパク質、代謝物分析は不可。(4) NGS の付加的価値と課題： i) サザンブロット法と比較して格段に少ない要求試料量、データ精度が上がれば非意図的な短い挿入配列も検出可能。 ii)、 iv)、 v) 及び vi) 現状は付加的価値は無いが、分析コストが順調に下がればコスト面での優位性が期待。 iii) 現状では精度の問題から PCR 及びサンガーシーケンスによる確認分析が不可欠、リード長が長くなれば改善が期待。 vii) RNA-seq により mRNA だけでなく siRNA のプロファイリング等も可能。

[結論] NGS には植物の分子生物学的研究や分子育種におけるメリットがあることは疑いようがないが、リスク評価データとしての利用の観点からは、現時点で従来法に対する付加価値は提供していないと結論。今後、リード長の改善等の技術革新、NGS 利用によるデータ取得手順の標準化等によりリスク評価データとしての付加価値創出が期待される。

デジタル PCR 技術を用いた EU で認可を受けた遺伝子組換えトウモロコシ 12系統の多重一斉定量分析法

Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction

Dobnik D *et al.*

Analytical Chemistry 87: 8218-8226, 2015

スロベニアの公的研究所及び大学、ノルウェーの公的研究所の研究者による報文。遺伝子組換え体 (GMO) の食品及び飼料利用は多くの国で規制対象となる。加えて、多くの国では GMO の食品表示制度が定められており、EU では0.9% 以上認可 GMO が含まれる食品に表示が義務付けられる。表示制度の適切な運用には科学的検知技術の存在が不可欠である。GMO 定量検知法としては、従来、系統毎に定量 PCR 法により分析する手法が一般的であったが、認可系統数の増加により現実的でなくなっている。本報告では、鋳型 DNA を含むサンプルを多数のナノリットルサイズのドロップレット (液滴中) に分配し、ドロップレット中で個別に PCR、増殖を定性的に判定、陽性数 / 陰性数の比から鋳型 DNA 中の標的配列の存在を定量する最新の PCR 手法であるデジタル PCR 技術 (droplet digital PCR; ddPCR) を用いた新たな GM トウモロコシ多重一斉定量分析法の開発を報告している。

[結果] (1) 標的系統: 2015年4月時点でEUで食品利用が認可されたGMトウモロコシ全37系統のうちスタック系統を除く12系統; DAS1507、DAS59122、GA21、MIR162、MIR604、MON810、MON863、MON89034、NK603、T25、Bt11、MON88017。(2) 検知モジュール: 欧州GMO研究所ネットワーク(ENGL)によって各系統の単一系統検知法として妥当性検証されたモジュール(プライマー対及びプローブのセット)を利用した。(3) 多重化: 第一段階としてコンピュータ上でプライマー及びプローブ配列間の相同性を検証、相互作用する可能性がある配列について調整を図り、最終的に、12品種を9品種及び3品種の2群に分け、それぞれに内在性対照配列 *hmgA* を加えた10plex 及び 4plex の多重 ddPCR 系を設計した。各反応においては GM 特異的配列は FAM、*hmgA* は VIC/HEX で標識し検出した。(4) 単一系統に対する検出特性の評価: 各系統を単独で試料として供し、開発した多重 ddPCR と単一モジュール ddPCR での定量値 (GMO 特異的配列の検出数 / *hmgA* 配列の検出数) を比較し、2法間のバイアスがいずれの系統においても25% 以内に収まることが確認された。(5) 定量下限とダイナミックレンジ: 同一試験室で4回繰り返した際の定量値の相対標準偏差が25% 以内となる最低濃度を定量下限と定義した。その結果、4plex 系及び10plex の GM 特異的配列の定量下限は42及び29コピー / 反応、*hmgA* との相対混入率としては0.068% 及び0.058% となり、EU法の要求を満たした。(6) 検出下限: 4plex 系及び10plex の GM 特異的配列の検出下限は7及び17コピー / 反応であった(室内試験)。(7) コスト: 多重 ddPCR 法は、従来の単一モジュールの定量 PCR 法による12系統の定量分析よりも大幅に費用・検査時間を短縮できる。また、多重定量 PCR によるスクリーニング法の陽性サンプルを対象とした確定検査法として適用することでさらなるコスト削減が可能である。

[結果] 開発した2種の多重 ddPCR 法は、EUでの認可 GM トウモロコシ12系統のルーチン分析法として採用できるだけの分析能を持つ。(訳者コメント: デジタル PCR 法は低頻度の DNA 分析に適しているので GM 食品分析にも適している。ただ、スタック品種の正確な定量は定量 PCR 同様不可能。また、本報告の妥当性検証は不十分と思われる。)

ERA プロジェクト調査報告

2016年 3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 安川拓次

〒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)