

---

# ERAプロジェクト調査報告

---

December 2017

バイオテクノロジー研究会



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

2017. 12

バイオテクノロジー研究会

2017年の調査報告書第6号（通算第35号）をお届けします。

本号では、従来の遺伝子組換え作物におけるリスク評価とこれまでの経験をもとにし、米国の大学研究者や ILSI アルゼンチン会合（2014年）にて論じられたコンストラクト（プロダクト）ベースにおけるリスク評価の報告（No. 340、No. 344）をご紹介します。これらの報告では蓄積された知見をもとに、現行の規制の問題点と、コンストラクトベースによる評価法の今後の検討事項が述べられております。

また、キメラ Bt 蛋白質を導入することで複数のチョウ目害虫抵抗性を付与したイネ（No. 342）や、トレハロースの生成を促すことで乾燥耐性を付与したトウモロコシ（No. 348）、フィターゼ導入による胚乳内の利用可能な無機栄養素を増加したコムギ（No. 343）、RNAi 技術により病害抵抗性を付与したジャガイモ（No. 341）といった組換え体作出の紹介や遺伝子組換えダイズ（No. 345）並びに遺伝子組換えポプラ（No. 349）を用いた遺伝子組換えによる生態系への影響評価を検討した論文を紹介しております。加えて、組換え体スタックの有用性を評価した論文（No. 346）や、インド・米国の共同チームによる植物ゲノム編集における代表的な技術のレビュー（No. 347）の紹介も行っておりますので、ご一読ください。

なお、これまでに調査報告書において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.340	GM作物のイベントベースの規制の終息 Ending event-based regulation of GMO crops	1
No.341	羅病性6遺伝子の不活性化による疫病抵抗性ジャガイモ系統の作出 Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance	2
No.342	<i>cry2AX1</i> 遺伝子発現による複数チョウ目害虫抵抗性組換えイネの作出 Transgenic rice expressing the <i>cry2AX1</i> gene confers resistance to multiple lepidopteran pests	3
No.343	コムギ胚乳フィターゼ発現の遺伝的改変による鉄及び亜鉛の生物学的可給態の増加穀粒 Transgenic expression of phytase in wheat endosperm increases bioavailability of iron and zinc in grains	4
No.344	遺伝子組換え作物のコンストラクトベースのリスク評価枠組みの開発 Development of a construct-based risk assessment framework for genetic engineered crops	5
No.345	グリホサート耐性組換えダイズ ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) の長期作付けが 土壌微生物相に与える影響 Impact of long-term cropping of glyphosate-resistant transgenic soybean ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) on soil microbiome	6
No.346	遺伝的改変トウモロコシ交配種 MON-89034-3 × MON-88017-3、MON-89034-3 × MON-00603-6、MON-00603-3の生育特性：メキシコにおけるトウモロコシ生産へ の選択肢 Plant characterization of genetically modified maize hybrids MON-89034-3 x MON88017-3, MON89034-3 x MON-00603-6 and MON-00603-6: alternative for maize production in Mexico	7
No.347	CRISPR/Cas9：植物ゲノム編集のための進歩的手法 CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes	8
No.348	トウモロコシ雌穂におけるトレハロース-6-リン酸脱リン酸化酵素の発現は、 適正水分及び乾燥の両条件で収量を改善する Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions	9
No.349	リグニン改変した交雑ポプラ ( <i>Populus alba</i> x <i>Populus tremula</i> ) は植物の防御や 節足動物相に影響を与えない Genetic modification of lignin in hybrid poplar ( <i>Populus alba</i> x <i>Populus tremula</i> ) does not substantially alter plant defense or arthropod communities	10

## GM 作物のイベントベースの規制の終息

### Ending event-based regulation of GMO crops

Strauss S H · Sax J K

Nature Biotechnology 34: 474-477, 2016

米国大学研究者による短報（論述）である。現行の画一的・硬直的な規制枠組みは、EU では GM 作物の栽培化・市場化を妨げ、米国では規制の混乱・遅延を生じている。米国では規制 3 機関（EPA・USDA・FDA）の機能の再構築が検討されている。このような状況に基づき著者らは現行枠組みを解折し、将来展望を論述した。

- (1) 現行枠組みの欠陥：1) イベントごとに独立・反復要求される申請書作成に要する経費の増大、2) 生物化学的同一性・類似性を無視した類似データの反復要求、3) LLP に対する過大な損害賠償要求、4) 未確認の非意図的影響・産物（毒物）に対する過剰データの要求、5) 以上に起因する中小企業・公的機関の開発への不参加、6) 慣行育種（規制なし）との不均衡な厳しい規制、7) 新しい研究成果・技術への対応の遅延。
- (2) 蓄積された新知見・技術：1) オミックス解析により、遺伝子組換えに起因する有害物質の産生や慣行育種を超える変動が認められたことはなく、品種間変動よりもむしろ環境要因による変動が大きい。2) 自然界、慣行育種における、遺伝子組換えに起因する変化を超越する構造的、エピジェネティック、及び遺伝子発現の多様性の存在。3) 特異性・正確性を向上したゲノムレベルの遺伝子操作技術（RNAi、ゲノム編集など）の発展。4) 総じて、遺伝子組換えによる非意図的な有害物質産生のリスクは慣行育種を超えることはなく、多くの場合はるかに低い。
- (3) 将来展望の要件：1) 科学的リスクベース評価の徹底、2) プロダクト（コンストラクト）ベース評価の徹底、3) LLP に対する科学的適正対応の確立、4) 規制機関の責任分担の明確化、5) プロダクトベース評価によってリスクが同定されない限り、特異性・正確性を向上したゲノムレベルの遺伝子操作技術（RNAi、ゲノム編集など）の現行規制枠組みからの除外、6) 合理的な評価期間の設定と実施、7) 各国の市場化情報へのアクセス向上。
- (4) 総括：イベントベース規制の終息を中心とした論述であるが、より広い領域への適用も可能と考えられる。

## 羅病性6遺伝子の不活性化による疫病抵抗性ジャガイモ系統の作出

### Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance

Sun K *et al.*

Transgenic Res 25: 731-742, 2016

オランダ ワーゲニンゲン大学・研究所グループによる原著論文である。ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) によるジャガイモ疫病は大病害である。ジャガイモ疫病に対する既往の抵抗性遺伝子 (R 遺伝子) は優性であるが菌系特異的であるため、急速に耐性菌が出現し、育種効果が低かった。著者らは羅病性遺伝子 (S 遺伝子) の不活性化による新しい疫病抵抗の開発を試み、以下の結果を得た。

- (1) 疫病抵抗性ジャガイモ系統の作出：シロイヌナズナから11の S 遺伝子をリストアップ、そのジャガイモにおけるオーソログ遺伝子を1つずつ RNAi 手法により発現抑制した形質転換ジャガイモ (品種 Desiree：高罹病性) を作成した。
- (2) 疫病抵抗性：生育4～5週間完全展開葉片に疫病菌液を接種し、3～6日後の病徴から抵抗性を判定した。11のうち5遺伝子の発現抑制体は、非形質転換体と同程度の罹病性を示した。1遺伝子の発現抑制体は、病徴出現・展開が遅く中程度の抵抗性を示した。残る5遺伝子の発現抑制体は病徴の出現がなく、完全な抵抗性を示した。
- (3) 生育特性に及ぼす影響：抵抗性を示した6遺伝子の発現抑制体のうち、1つは著しい緑葉退色・草丈矮化、他1つは中程度の退色・矮化を示した。しかし、残りの4つは正常の生育を示した。
- (4) 育種的考慮：開発された抵抗性は劣性であるため、同質4倍体のジャガイモ育種への直接導入は困難である。ゲノム編集などとの連携が必要と思われる。
- (5) 総括：羅病性遺伝子の発現抑制により、疫病抵抗性ジャガイモ6系統が作出され、うち4系統は生育特性も正常であった。抵抗性の持続性、農業実践の場での負の影響の有無について検討が必要である。

## ***cry2AX1* 遺伝子発現による複数チョウ目害虫抵抗性組換えイネの作出**

Transgenic rice expressing the *cry2AX1* gene confers resistance to multiple lepidopteran pests

Chakraborty M *et al.*

Transgenic Research 25: 665-678, 2016

インド民間・大学グループによる原著論文である。稲作において、チョウ目 (*lepidoptera*) はイネの茎を食害する主要害虫であり、その対策として *Bt* タンパク質発現は有効である。一方で、*Bt* タンパク質はその種類ごとに殺虫スペクトル特性が異なる。そこで、筆者らはキメラ *Bt* タンパク質を発現する新たな *Bt* イネを作出し、チョウ目害虫 3 種への効果を検証した。

- (1) 標的チョウ目害虫：1) YSB (yellow stem borer; *Scirpophaga incertulas*; 和名イッテンオオメイガ)。2) RLF (rice leaf folder; *Cnaphalocrocis medinalis*; 和名コブノメイガ)。3) OAW (oriental army worm; *Mythimna separate*; 和名アワヨトウ)。
- (2) *Bt* イネの作出：Cry2Aa の N 末端側と Cry2Ac の C 末端側を融合したキメラ *Bt* タンパク質 Cry2AX1 を緑色組織特異的 *rbcS* プロモーター制御下で発現する発現カセットを含むコンストラクトを調製、アグロバクテリウム法で導入、形質転換体37個体 (T1世代) を得た。
- (3) ELISA による発現解析：成長の悪かった5個体を除外した32系統について ELISA 法で発現解析を実施し、18個体で Cry 2AX1タンパク質発現を確認した。
- (4) *in vitro* での抵抗性評価：YSB 偽茎 *in vitro* バイオアッセイにより、18個体中5個体で特に強い殺虫能 (70%が蛹で死亡) を確認した。この5個体について T2世代を得、以降の試験に供した。
- (5) *cry2AX1*タンパク質の産出：5系統の範囲は栄養生長期 (V期) で0.4~0.8  $\mu\text{g/g}$  新鮮重、生殖生長期 (R期) で 0.9~1.3  $\mu\text{g/g}$  新鮮重であった。種子 (内胚乳) では極めて微量であり、2.7~3.6 ng/g 新鮮重であった。
- (6) チョウ目害虫抵抗性：新生幼虫による生物検定を実験室・閉鎖系温室の2段階で行った。
  - 1) YSB 抵抗性：実験室試験での新生幼虫致死率は対照非組換え区 6~8% に対し、V期で64~88%、R期で72~92%であった；温室試験での喰害率は対照区17.9%に対し、V期1.4~6.0%、R期では0~0.6%であった。
  - 2) RLF 抵抗性：実験室試験での致死率は対照5%以下に対し、組換え体では最高80%であった；温室試験での喰害率は対照3.9%に対し、組換え体は0.9~1.3%であった。
  - 3) OAW 抵抗性：実験室試験での致死率は72~92%、温室試験での喰害率は5%以下であった。
- (7) 総括：*cry2AX1*遺伝子導入により、3種のチョウ目害虫に対する抵抗性イネ5系統が作出された。今後インド国内でのほ場試験を計画しており、規制許可待ちである。

## コムギ胚乳フィターゼ発現の遺伝的改変による鉄及び亜鉛の生物学的可給態の増加穀粒

Transgenic expression of phytase in wheat endosperm increases bioavailability of iron and zinc in grains

Abid N *et al.*

Transgenic Research 26: 109-122, 2016

パキスタン大学を中心とするグループによる原著論文である。主要穀物胚乳に常在するフィチン酸 (phytate) に含有される不溶性無機物 (Ca・Mg・Fe・Zn など) はフィターゼ (phytase) の作用により水溶性となり生物学的可給態が増加し、胚乳の栄養価は向上される。著者らはバイオテク手法によりフィターゼ遺伝子を導入した組換えコムギを作出し、その各種特性を調査した。

- (1) 組換えコムギの作出：慣行品種 Sahar2006及び Faisalabad2008にアグロバクテリウム法により *Aspergillus japonicas* 由来のフィターゼ遺伝子 (*phyA*) を導入し、6系統 (T2世代) を選出した。
- (2) フィターゼ活性：組換え系統コムギ粉は8,785~5,560 FTU、対照は4,222~3,965 FTU、前者は後者より40~99%高かった。
- (3) フィチン酸含量：無機物に作用して不溶性塩を作出するが、フィターゼにより代謝される。含量 (mg/100g) は、コムギ粉65~100、生パン 62~82、焼パン 58~65に対し、対照コムギ粉は112~122であり、組換え系統が対照より12~41.6%減少していた。
- (4) 生物学的可給態割合：胃腸2重酵素消化法による含量/AOAC法による全含量 (%) で示した。1) 鉄：i) 胚乳：対照に比べて38%上昇；ii) 生パン：22.59~19.46%、上昇率18~38%；iii) 焼パン：90.50~48.01%、上昇率31~218%、2) 亜鉛：i) 生パン：14.77~11.28%、上昇率29~99%、ii) 焼パン：46.99~22.72%、上昇率4~115%。
- (5) 種子栄養成分：AOAC法によるタンパク質、脂肪、デンプン、グルテン含量には、組換え系統と対照との間には有意差がなかった。
- (6) 総括：フィターゼ遺伝子 (*phyA*) 導入による組換えコムギが作出され、フィターゼ18~99%増、フィチン酸12~76%減、鉄及び亜鉛の生物学的可給態割合の明瞭な増加、などが確認された。国民栄養改善の一環として期待される。(註：国民の主食特に無機物の生物学的可給態増加は新しい知見として評価される)。

## 遺伝子組換え作物のコンストラクトベースのリスク評価枠組みの開発

### Development of a construct-based risk assessment framework for genetic engineered crops

Baker M P *et al.*

Transgenic Res 25: 597-607, 2016

25年にわたり世界的に実施されてきた遺伝子組換え作物のリスク評価の経験は、手法（プロセス）や産物（プロダクト）についての知識を総合的に向上し、その結果複数国において科学的リスク評価の根拠の再吟味・手段の簡素化の動きがある。その一環として ILSI アルゼンチンは学界・開発者・規制者の3者作業部会を2014年に開催し、論点を本報告にまとめた（著者16名）。

- (1) 討議の目的：評価が終了したあるいは市場化された遺伝子組換え作物と同様あるいは類似のコンストラクトを有する新作出遺伝子組換え作物の科学的評価手順を討議し、その効果的利用をはかる。
- (2) これまでの科学的な知見：栽培化・慣行育種（6文献）・内在的ゲノム可変性（7文献）は遺伝子組換え技術を超える遺伝的变化の原因であることが示されている。
- (3) 国際的な発行済み文書の検討：WHO ワークショップレポート（1995）；米国 EPA 連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（FIFACT; 2000）；米国 APHIS ガイダンス（2015）；ブラジル CTNBio 規範（2008）；カナダ CFIA 指示（2008）；アルゼンチンバイテク総局決定（2013）など。
- (4) コンストラクトベースのリスク評価における主な検討事項：1) 組換えによる非意図的影響、2) ファミリアリティ、3) プロブレムフォーミュレーション、4) 環境人畜への影響（含 OECD コンセンサスドキュメント）など。
- (5) 事例研究：1) 同種間：除草剤耐性サトウキビ、2) 異種間：害虫抵抗性トウモロコシから害虫抵抗性ダイズ
- (6) 類似構成概念（construct similarity concept）：新旧遺伝子組換え作物が共通・類似的に発現する生物学的機能を類似構成概念として定義した。これはさらに、環境・食品影響；ファミリアリティ；作物生物学などで構成されている。
- (7) 今後の協調・協力：機関間協力、リスク評価レビューの合同・相互認識などが重要である。
- (8) 総括：ILSI アルゼンチン会合（2014）の要点が論述された。新遺伝子組換え作物のリスク評価の科学的根拠が再吟味され、類似構成概念が定義された。

## グリホサート耐性組換えダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の 長期作付けが土壤微生物相に与える影響

Impact of long-term cropping of glyphosate-resistant transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) on soil microbiome

Bafujia L C *et al.*

Transgenic Research 25: 425-440, 2016

ブラジル大学・公社グループによる原著論文である。組換えダイズは世界のダイズ栽培面積の80%余を占めるが、その土壤微生物相に対する影響については懸念が提起されることがある。著者らは除草剤耐性ダイズの長期ほ場試験の土壤生態系への影響を精査し、以下の結果を得た。

- (1) 調査地点：ブラジル内対照的2地点：1) 肥沃地：ロンドリーナ (LD)；2) 非肥沃地：ポントグロッサ (PG)
- (2) 供試ダイズ品種：除草剤グリホサート耐性組換えダイズ (BRS24SRR) 及び対照 (BRS133)。
- (3) 結果 1) 土壤化学的・物理的特性：Ca、Mg、K、N、P、Mn、Fe、Cu、Zn、有機物、陽イオン交換能力、pH はいずれも LD が PG よりも肥沃であることを示した。組換えダイズ区は対照より pH 値だけが低かったが、それ以外は有意差がなかった。物理的特性値も LD が PG より優れていたが、組換えの有無の間には有意差がなかった。2) 種子収量：10年間平均値は LD (組換え：2,798 kg/ha、対照：2,744 kg/ha) が PG (組換え：2,397 kg/ha、対照：2,473 kg/ha) より高かったが、組換えの有無の間には有意差はなかった。3) 微生物バイオマス指標：C、N、基礎呼吸 (BR 及び BRi) はいずれも LD が PG より高かったが、組換えの有無の間には有意差はなかった。4) 微生物の多様性：プロテオバクテリア門 (Proteobacteria)、フィルミクテス門 (Firmicutes; グラム陽性細菌門)、緑藻植物門 (Chlorophyta) などは組換え区が高かったが、試験地間差に比べて微少であった。
- (4) 総括：除草剤耐性組換えダイズ 10年間ほ場試験による土壤生態系への影響は、試験地間で顕著に大であり、組換えの有無による収量差はなく、pH 値以外の諸特性にも有意差はなかった。

No.346

**遺伝的改変トウモロコシ交配種 MON-89034-3 × MON-88017-3、MON-89034-3 × MON-00603-6、MON-00603-3の生育特性：メキシコにおけるトウモロコシ生産への選択肢**

Plant characterization of genetically modified maize hybrids MON-89034-3 x MON88017-3, MON89034-3 x MON-00603-6 and MON-00603-6: alternative for maize production in Mexico

Diaz O H *et al.*

Transgenic Research 26: 135-151, 2016

モンサント社・メキシコ大学共同チームの原著論文である。トウモロコシはメキシコの最重要主食であるが、その自給不足が懸念されている。著者らはGMトウモロコシによる増産を目的に大規模ほ場試験を実施し、以下の結果を得た。

- (1) 供試 GM トウモロコシ交配種：交配種 I MON-89034-3 (Cry1A.105、Cry2Ab2) × MON-88017-3 (Cry3Bb1、EPSPS)；交配種 II MON-89034-3 (Cry1A.105、Cry2Ab2) × MON-00603-6 (EPSPS)；交配種 III MON-00603-6 (EPSPS)
- (2) 試験地域：代表的 5 農業生態地域
- (3) 試験期間：前期 (小規模2009-2011、19地点)；後期 (大規模2012-2013、17地点)、合計36地点
- (4) 結果：1) 形態・生育特性：i) 前期：交配種 I 及び II は共通的に草丈、種子含水率、種子収量の 3 形質において対照より有意に大であった。とくに種子収量差は明瞭で、交配種 I は 10.2対9.2 ton/ha、交配種 II は10.0対9.1 ton/ha、であった。ii) 後期：ほとんどの特性に有意差はなかったが、種子含水率及び種子収量は交配種 I 及び II とも有意に高かった。収量差は交配種 I 8.0対6.6 ton/ha, 交配種 II は7.9対6.5 ton/ha であった。2) 害虫抵抗性：後期：交配種 I は稈・穂・葉・根・幼苗、交配種 II は穂・幼苗への害虫被害が有意に低かった。3) 除草剤耐性：減収被害大なものとして、前期 5 種、後期13種の雑草が特定された。発生した雑草に対する防除できた雑草の割合 (%) を防除効果として測定した結果、除草剤耐性 GM 作物利用による除草管理は慣行除草管理に対して、前期で3.1%、後期で13.1%、除草効果が高かった。4) その他：農家への便益提供、データの可搬性 (transportability) における貢献も期待される。
- (5) 総括：GM (害虫抵抗性×除草剤耐性) トウモロコシ交配種の 5 年間・36地点におけるほ場試験により、交配種の生育・収量・害虫抵抗性・除草管理における有意差が確認された。特に収量は平均して 1 ton/ha の増収を示し、栽培価値が高いと思われた。

## CRISPR/Cas9 : 植物ゲノム編集のための進歩的手法

### CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes

Samanta M K *et al.*

Transgenic Research 25: 561-573, 2016

インド国研・米国大学共同チームによるレビュー文献である。世界人口増・気候変動に対応するための作物生産力向上は必須の将来課題である。このための対応策の一つとして近年急速に発展している SSNs (sequence-specific nucleases) の 3 手法—ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9—、特に CRISPR/Cas9 について詳述されている。

- (1) SSNs : 3 手法の基本的手順には共通する類似点がある。①ゲノム内の標的としての特定 DNA 配列の認識、② DNA 二重らせん構造の部分的切断、③切断からの修復 (non-homologous end joining [NHEJ] あるいは homology directed repair [HDR]) である。
- (2) ZFNs (Zinc finger nucleases) 及び TALENs (transcription activator-like effector nucleases) : ZFNs の DNA 認識は modular DNA 結合タンパク質間の合着 (fusion) による。TALENs の DNA 認識は *Xanthomonas sp.* 由来の DNA 結合ドメインの特異的結合によっている。(以下省略)
- (3) CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) : 最も最近かつ期待されている手法である。本手法はバクテリア由来の DNA endonuclease (Cas9) を用い、20bp のガイド RNA が標的 DNA 配列への特異性を決定する。CRISPR は 1987 年にはじめて大腸菌で特定され、以後飛躍的発展をとげている。
- (4) CRISPR/Cas 9 の最近の成果 : 2013-2015 年の 3 年間のシロイヌナズナ、イネ、モロコシ、トマト、ジャガイモ、コムギ、タバコ、ゼニゴケ、ダイズ、ポプラ、トウモロコシでの報告計 28 件について、種名・目標遺伝子・修復法・文献名が一覧表として表示されている。
- (5) 検定法 : Targeted knocked-in gene integration に対しては PCR あるいはサザン法 ; 標的部位への目標遺伝子の追加、除去、置換などは、制限酵素法あるいは配列解析法、などが考えられる。
- (6) CRISPR/Cas9 の利点 : CRISPR/Cas9 では、標的配列の特異性はガイド RNA によるため、標的配列ごとにタンパク質自体の設計・合成を伴う前 2 手法よりも簡便、多用途、経費減である。加えて多部位における同時ゲノム編集が可能である。
- (7) 総括 : CRISPR/Cas9 は他の手法より簡便化・経費減の明確な利点を有し、今後さらに多くの結果を作出することが期待される。

## トウモロコシ雌穂におけるトレハロース-6-リン酸脱リン酸化酵素の発現は、適正水分及び乾燥の両条件で収量を改善する

Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions

Nuccio ML *et al.*

Nature Biotechnology 33: 862-869, 2015

米国シンジェンタ社及び大学、英国ロザムステッド農業試験場による報文。トウモロコシの収量は、開花期の乾燥によって深刻な影響を受けるため、乾燥ストレスへの耐性が求められる。一方で、一般にストレス耐性と収量はトレードオフの関係にある。筆者らは、花器官特異的プロモーターを用いて、乾燥耐性遺伝子を特異的に発現する組換えトウモロコシを開発し、通常水分時及び乾燥時両方で収量が改善することをほ場試験によって確認した。

- (1) 乾燥耐性遺伝子：トレハロース-6-リン酸脱リン酸化酵素 (TPP) を用いた。TPP はトレハロースの前駆体であるトレハロース-6-リン酸 (T6P) を脱リン酸化し、トレハロースを合成する酵素である。トレハロースは非還元二糖類であり、浸透圧調節物質として機能する。
- (2) *OsMads6*：イネ *OsMads6* 転写因子は、若い発達中の花芽分裂組織、内穎及び鱗皮で特異的に発現し、胚乳の蓄積に関連する。トウモロコシにおける *OsMads6* 遺伝子プロモーターの組織特異性を確認するための GUS レポーター解析では、雌穂腋芽、雌穂維管束、雌穂小穂のみ特異的 GUS 染色が確認された。
- (3) 形質転換トウモロコシ：TPP 遺伝子に *OsMads6* プロモーター及びターミネーターを連結した TPP 発現カセットを含むコンストラクトをアグロバクテリウム法でトウモロコシに導入、形質転換体 8 系統を得た。
- (4) トレハロース代謝：通常水分及び乾燥条件のグロースチャンバーで育成した植物の雌穂小穂の T6P、ショ糖量を分析した。T6P は組換え体とも非組換え対照の 1/2 以下に有意に減少し、組換え体 / 非組換え体いずれも通常水分 / 乾燥条件で含量に違いはない。一方、T6P の減少に伴い、ショ糖は増加し、通常水分条件では、組換え体で非組換え対照よりも 20% 程度高く、また乾燥条件では非組換え体 / 組換え体ともに通常水分条件は有意に高くなり非組換え体 - 組換え体間の有意差はなくなった。
- (5) 圃場試験条件：米国カリフォルニア州、コロラド州、チリの 3 地点、2004-2006 年の 6 地点・年で実施。それぞれの地点・年で水不足条件と十分灌水条件を設定した。
- (6) 圃場試験による収量：非組換え対照と比較して組換え体では、収量を非乾燥または軽度乾燥条件下で 9% から 49%、さらに厳しい乾燥条件下では 31% から 123% に改善させたことが、複数季にわたる複数圃場のデータによって示された。
- (7) 結論：TPP 遺伝子を *OsMads6* プロモーターによって若い雌穂で特異的に発現させることで、収量を改善できることを示した。また、この組換え体では、通常灌水時でも収量に負の影響を与えない。これらは研究段階であるが、今後本技術を利用した最終製品開発の基盤となることが期待される。

## リグニン改変した交雑ポプラ (*Populus alba* x *Populus tremula*) は植物の防御や節足動物相に影響を与えない

Genetic modification of lignin in hybrid poplar (*Populus alba* x *Populus tremula*) does not substantially alter plant defense or arthropod communities

Buhl C *et al.*

J Insect Science 76: 1-8, 2017

米国大学研究グループによる原著論文。木質バイオマス中のリグニンは、バイオリファイナリーやパルプ化において阻害要因となるが、植物体にとっては害虫による食害からの防御に重要な機能を持つ。筆者らは、野外栽培試験したリグニン成分改変した組換え交雑ポプラについて、以下の結果を得た。

- (1) 植物材料：C3H RNAi (期待される表現型：総リグニン量減少)、F5HRNAi 導入 (Sリグニン比低下)、COMTRNAi 導入 (Sリグニン比低下)、F5H 過剰発現 (Gリグニン比増加) 各3～6系統及び非組換え体2系統。
- (2) 圃場試験：米国インディアナ州の圃場に～1.5 m 間隔にランダムに植栽 (2008年)。毎年地面付近で地上部を切除した (3年目 (2011年) 除く)。機械的防御評価は2012年、化学的防御評価は2010、2011、2012年に実施した。節足動物の採集は2010年と2011年に実施した。
- (3) 機械的防御：葉の物理的強度は組換え体及び非組換え体の間で有意な違いはなかった。
- (4) 化学的防御：食害虫からの防御に関連する化学物質として、タンニン量とフェノール配糖体量を評価した。タンニン量は、COMT 発現抑制組換え体で有意差が検出されたが、季節変動の範囲を超えない程度だった。フェノール配糖体量はいずれも有意な違いはなかった。
- (5) 訪問昆虫：植物材料から合計7,127個体の節足動物を採取し、数、多様性を評価した。節足動物の総数は、C3H 抑制組換え体 (総リグニン量減少) で非組換え体より25%多かったが、他の組換え体及び非組換え体を含めた分散分析で有意差は検出されなかった。種の多様性も、組換え体及び非組換え体いずれも69～86種の範囲で有意差は見られなかったが、C3H 抑制組換え体では他の組換え体や非組換え体よりも訪問節足動物の多様性が高かった。
- (6) 結論：ポプラのリグニンの改変は、草食動物の抵抗性形質や節足動物のコミュニティの反応に悪影響を及ぼさず、樹木や節足動物のコミュニティで遺伝的多様性を増加させる可能性もあることが示された。

# ERA プロジェクト調査報告

2017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)

会 長 木村修一

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)