
植物バイオテクノロジー報告書

June 2024

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・安全性・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。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

2024. 6

バイオテクノロジー研究会

2024年の調査報告書第1号（通算第66号）をお届けします。

本調査報告書の執筆者に関しまして、現執筆者の筑波大学の小口先生に加えて、東洋大学の津田麻衣先生にも執筆していただくことになりました。津田先生は、東洋大学食環境科学研究科で講師をされており、研究分野は、植物遺伝育種科学、アブラナ、ダイズ、バイオテクノロジー作物の環境影響評価、社会受容です。

また、近年のERA調査報告書でご紹介してきた科学論文の内容には、遺伝子組換え植物のERAにとどまらず、ゲノム編集植物を含めたバイオテクノロジー植物の開発状況や、それらの食品としての安全性評価に関する研究報告も含まれていました。こうした状況を踏まえまして、本号から「ERA調査報告書」のタイトルを、「植物バイオテクノロジー報告書」に変更させていただく旨をお知らせします。

本号では、遺伝子組換え作物に関する知見として、No.644ではメキシコにおける遺伝子組換え作物から在来品種への遺伝子浸透の可能性について、No.645ではチェコで実施された遺伝子組換え食品に対する消費者調査の解析結果について、No.646ではキノコ由来の発光酵素と発光基質合成酵素を発現させ、肉眼レベルで可視できる発光する植物の開発について、No.647ではアグロバクテリウムを使用した形質転換が植物ゲノムに及ぼす影響についての総説を紹介しています。

さらに、ゲノム編集に関連した論文として、No.648ではCRISPR/Cas9システムによるハイスループットスクリーニングを用いて新規の広域スペクトラムを持つ昆虫抵抗性遺伝子の同定について、No.649ではパーティクルボンバードメントによりCRISPR/Cas9リポタンパク質を用いてコムギのゲノムに変異を導入する手法を紹介しています。

なお、これまでの調査報告書は、以下のURLで閲覧可能です。

<http://www.ilsijapan.org/ILSIJapan/COM/Rcom-bi.php>

植物バイオテクノロジー報告書の送付方法には郵送とメール配信の2種類がございます。送付方法の変更、もしくは送付停止を希望される方はILSI事務局（ilsijapan@ilsijapan.org）までご連絡ください。

目次

No.644	導入遺伝子の有無に関するメキシコのトウモロコシ在来品種の大規模サンプリング調査 Large scale sampling of Mexican maize landraces for the presence of transgenes ……	1
No.645	遺伝子組換え食品の受容に対して健康リスクと関連して認知することの緩和的役割 The moderating role perceived health risks on the acceptance of genetically modified food ……	3
No.646	真核生物における自律的発光イメージングのための経路改善 An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes ……	5
No.647	アグロバクテリウムを介した植物の形質転換に関連するゲノム影響 Genomic consequences associated with <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of plants ……	6
No.648	ハイスループット CRISPR/Cas9 システムによる宿主植物昆虫抵抗性変異体ライブラリー の構築と広域スペクトル昆虫抵抗性遺伝子の同定 Construction of host plant insect-resistance mutant library by high-throughput CRISPR/ Cas9 system and identification of a broad-spectrum insect resistance gene ……	8
No.649	<i>In planta</i> CRISPR/Cas9導入によるコムギへのもう一つの「緑の革命」変異の導入 Introduction of a second “Green Revolution” mutation into wheat via <i>in planta</i> CRISPR/ Cas9 delivery ……	10

No.644

Large scale sampling of Mexican maize landraces for the presence of transgenes

導入遺伝子の有無に関するメキシコのトウモロコシ在来品種の 大規模サンプリング調査

Ceniceros-Ojeda EA *et al.*

2023

Transgenic Research 32: 399-409

メキシコの企業、大学、研究所による報告。

トウモロコシ在来品種において遺伝子組換えトウモロコシ由来の導入遺伝子の検出結果と、導入遺伝子の由来について、遺伝子浸透の要因として推測される背景との関係を考慮しつつ検証した研究。

- ✓ トウモロコシはメキシコが栽培起源地であり、約9000年前に初めて栽培されて以来、トルティーヤなどの特定の用途、乾燥・土壌肥沃度などの特定の環境条件に適応した品種が開発されてきた。
- ✓ メキシコにおける遺伝子組換えトウモロコシから在来品種の遺伝資源に遺伝子浸透し、影響を与える可能性についてはこれまでも研究報告や議論がなされており、遺伝資源の保護の観点から1998年以降、商業用の遺伝子組換えトウモロコシの栽培が制限されている。しかし、加工用の遺伝子組換え種子の輸入や、実験用・試験用圃場での栽培は限定的に承認されている。
- ✓ 本報告では、1995年以降に採種された栽培品種48種類を網羅する3204アクセッションを材料とした。ただし大部分は、2005年から2014年にメキシコ中・北東部の15州で採種されたものである。
- ✓ これまで、トウモロコシ在来品種への導入遺伝子の遺伝子浸透を報告した論文においては、検出方法、サンプル数・サンプル方法の確からしさなど、偽陽性・偽陰性を防ぐための議論がなされてきた。この報告では、各アクセッションにつき30個体の各個体から等量のDNAを得たのち10個体を1バルクとして3バルク作成し、35Sカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）プロモーターおよびノパリン合成酵素3'ターミネーター配列内に特異的なプライマーにより導入遺伝子の有無を検出している。また二段階的な検証として、35Sプロモーターで検出された断片についてサンガーシーケンスにより配列も確認している。これらの検出の結果、あるアクセッションの1つ以上のバルクで導入遺伝子検出が陽性であった場合、そのアクセッションは「陽性」とであると判断されている。
- ✓ 二段階の検出評価によって、偽陽性の確率は無視できる程度に小さいものの、1つのアクセッション中の30個体（60遺伝子型）以外、つまりアクセッション内のほかの個体に導入遺伝子が含まれないことの可能性（偽陰性）は排除できないと述べている。
- ✓ 在来品種から導入遺伝子が検出された場合、その由来は①加工用の遺伝子組換えトウモロコシ種子、②遺伝子組換えトウモロコシの実験圃場・パイロット圃場における栽培、③メキシコ国

外、特にアメリカへの出稼ぎ労働者による不注意なメキシコ国内への種子持ち込み、という3つの可能性が本報告では挙げられている。

- ✓ まず②について、本報告でサンプリングが行われた地域は、2008年から2012年に遺伝子組換えトウモロコシの圃場試験が限定的に実施された州が含まれていた。サンプリングしたすべての地域で在来品種から導入遺伝子が検出されたが、アクセッションあたりの検出個体数の割合は地域によって異なり、3.8%～52.9%であった。短期間、遺伝子組換えトウモロコシの実験栽培が許可されていた北部地域は遺伝子組換えトウモロコシの栽培が許可されたことのない中央部や南部と比較して導入遺伝子の検出率が有意に高かった。しかし、試験栽培がおこなわれた地域の栽培面積のデータと導入遺伝子が検出された個体数の割合の関係を評価した結果、試験栽培面積の多さと検出率の高さに相関関係はみられず、圃場試験が在来品種内への遺伝子浸透に影響していないことを示唆した。
- ✓ 次に③について、移民レベルと導入遺伝子の検出率の関係も評価したが、相関関係は有意ではなかった。
- ✓ では、①が由来であるかということ、現時点でこの点に関連する過程や要因を明らかにすることは困難である。基本的に在来品種と遺伝子組換えトウモロコシの種子形態は異なるため識別できる可能性が示唆されてはいるが、一度、在来品種に遺伝子浸透した導入遺伝子について、その品種から採種された後代では種子形態が一様であり、形態によって導入遺伝子の有無は識別できない。導入遺伝子が存在していても、農家が在来品種の形態的特性が維持されているものを選抜することで導入遺伝子は残存していく。また、導入遺伝子の特性が害虫抵抗性の場合、栽培されている間に知らず知らずのうちに選抜圧がかかり、導入遺伝子をもつ個体が残存していく可能性がある。
- ✓ このように複雑な要因がメキシコ国内での採種、種子共有の習慣、特定の形質に対する農家の嗜好にも左右されることから、今後、社会的・生態学的要因と導入遺伝子の検出を組み合わせた研究が必要である点が強調されている。

(津田麻衣)

No.645

The moderating role perceived health risks on the acceptance of genetically modified food

遺伝子組換え食品の受容に対して健康リスクと関連して認知することの緩和的役割

Cabelkova I *et al.*

2023

Frontiers in Public Health 11: 1275287

DOI: 10.3389/fpubh.2023.1275287

チェコで実施された遺伝子組換え食品に対する消費者調査において、遺伝子組換え食品の健康リスク、環境への影響、遺伝子組換え食品の情報の認知が、遺伝子組換え食品の受容におよぼす影響に関する報告である。この結果は、政策立案者、公衆衛生専門家、マーケティング研究者に有用であり、遺伝子組換え食品について一般消費者に効果的に伝えるために役立つ。

- ✓ ヨーロッパは、健康リスク、環境・生物多様性への影響、倫理的・道徳的・宗教的な背景などさまざまな要因によって、国民も政府も遺伝子組換え食品を受け入れることに懸念を示しがちである。リスク評価の研究者、科学者によって、人間や動物の健康に対して従来作物と同等に安全であるというコンセンサスが報告されても、この傾向は変わらない。
- ✓ 多くの消費者が考える遺伝子組換え食品への懸念は以下のようなものが挙げられる。健康リスク：毒性、アレルギー誘発性、組換え DNA によって摂取した人間の DNA が変化する可能性など。環境影響：生物多様性の減少、近縁野生種への遺伝子浸透、自然生態系の破壊、特定の殺虫剤の有効性の低下など。倫理的・道徳的側面：自然な食品生産の秩序から逸脱する倫理的問題、自然ではなされ得なかった特性の改変は自然の基本原理に反する、など。また、科学的な認知により受容は上がるという報告はあるものの、人口の大部分は科学的知見に基づくとは限らない遺伝子組換え食品についての悪影響に関する情報に左右されがちであり、遺伝子組換え技術の倫理的影響を認識した情報伝達が重要であることも議論されている。
- ✓ 本報告は、2つのモデルを組み合わせて受容性を形成する要因を予測している。一つ目は健康に関連する人々の行動を支配する4つの構成要素：受容性、重要度、有益性、障害性に対して、情報を提供することの効果をも推定する健康信念モデルである。二つ目は一般的な知識、意識、態度、社会人口統計などの要因によって行動結果にどのような影響を与えるかを推定する行動変容モデルである。構築されたモデルに基づき、2021年7月にチェコ人口を代表する884人（18-90歳で平均48.17歳、女性：53.4%、高等教育を受けた：18.04%）を調査対象としたアンケート調査から、健康リスク、環境影響、関連する情報伝達が遺伝子組換え食品の受容にどのように関連するか、どのような要因が推定されるか明らかにすることを目的とした。以降にその要因や、傾向を記載する。
- ✓ 遺伝子組換え食品を購入している、遺伝子組換え食品を試す、遺伝子組換え食品は回答者の倫理に反する、の選択と価格の要因の間には統計的有意性はなかったことから、消費者は遺伝子

組換え食品に対して支払い意思額に反映されるような価値を十分に認識していない可能性がある。

- ✓ 遺伝子組換え食品の健康リスクを懸念すると購入意欲は低下するが、環境への影響の有無は重要ではなかった。購入意欲に健康リスクに関する情報伝達はポジティブに働くため、信頼できる・科学的に裏付けられた情報に基づくコミュニケーションや教育は非常に重要であると強調できる。ただし、遺伝子組換え食品の受容と利点を伝達することは無関係であり、現在の利点を強調して受容を促進するというキャンペーン方法におけるギャップが明らかとなった。
- ✓ 遺伝子組換え食品に特に関心があるが道徳的に受容できないと認識している消費者は、ソーシャルネットワーク上でこうしたテーマに関心が高まると、遺伝子組換え食品に倫理的に問題があるとみなすグループに参加する可能性が高い。今後はソーシャルネットワーク上の意見の二極化の影響はさらなる調査が必要である。
- ✓ 遺伝子組換え食品の摂取がヒトのDNAに変化をもたらす可能性があると考える回答者が調査サンプルの5分の1も存在することは憂慮すべきことである。さらにソーシャルメディア・従来のメディア双方からの誤った情報によって将来的に意見がネガティブに変容しうる無回答者を含めると合わせて56%に対して今後の情報の伝え方を検討する必要がある。
- ✓ チェコ共和国は、長年遺伝子組換え食品に対して一般消費者が肯定的な認識を持つ国であると考えられてきたが、この調査で再確認された。回答者の62%が遺伝子組換え食品を食すための準備ができていると回答し、受容しない（非道徳的な食品である）という回答は15%であった。他のヨーロッパ諸国で、チェコ同様に遺伝子組換え食品に対して肯定的であるスペイン、ポルトガル、マルタにも同じ傾向や本報告で示された知見が当てはまるかもしれないが、遺伝子組換え食品・生物の種類によって異なる可能性もある。
- ✓ 遺伝子組換え食品の健康リスクに関する懸念に効果的に対処し、同時に利点も伝えられるコミュニケーション戦略を確立することが非常に重要である。

(津田麻衣)

An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes

真核生物における自律的生物発光イメージングのための経路改善

Shakhova ES *et al.*

2024

Nature Methods 21: 406-410

ロシア、米国、英国、中国の官民共同研究グループによる短報。キノコ由来の発光酵素と発光基質合成酵素の同時強化により、肉眼レベルで生物発光する植物の開発に成功した。

1) 生物発光の仕組み

生物発光は、発光酵素（ルシフェラーゼ）が発光基質（ルシフェリン）と作用する際に光を発する現象である。生物発光を示す生物は多く確認されているが、これまでに同定されている発光基質の代謝経路は、発光細菌の脂肪酸代謝経路から分岐する経路と発光キノコ（*Neonothopanus nambi*）のカフェ酸回路の2つである。細菌の経路は、真核生物に導入しても十分な生物発光が得られない。キノコの経路は、4つの代謝酵素と発光酵素の遺伝子の一過的発現により発光させることはできたが、発光はごく弱く、その検出には特殊で高価な装置が必要であった。

2) キノコ生物発光系酵素の分子改良

N. nambi の発光酵素（nnLuz）と発光基質合成に係る酵素（hispidin-3-hydroxylase nnH3H 及び nnHisps）に対して、分子改良が試みられた。nnLuz の3アミノ酸残基置換型の nnLuz v3 は、大腸菌及びヒト培養細胞（HEK293）で5倍及び2.7倍（野生型 nnLuz 比）発光強度が向上した。さらに1残基を置換した nnLuz v4 は大腸菌で発光強度がさらに3倍以上向上した。nnH3H も同様に3残基置換型 nnH3H v2 が開発され、nnHisps については、他種のキノコ（*Mycena citricolor*）の酵素（mcitHisps）と置き換える手法が採用された。

3) 培養細胞への一過的発現による生物発光の評価

改良型セット（nnLuz v4、nnH3H v2、mcitHisps、及びカフェ酸回路の他2酵素）と全て野生型のセットをベンサミアナタバコ、タバコ BY-2細胞、ヒト HEK293T 細胞、メタノール資化酵母（*Pichia pastoris*）に一過的に導入して比較したところ、いずれも改良型は野生型より1～2桁高い生物発光を示した。

4) ステイブルな形質転換植物での生物発光

野生型セットはタバコでは良好に機能したが、他の植物種では発光は殆どみられなかった。一方、改良型セットをステイブルに形質転換したシロイヌナズナ、キク、ポプラ、ペチュニア、タバコ（ベンサミアナ、タバカム）では肉眼でもわかる程度の生物発光が観察された。

5) 総括

キノコの発光酵素と発光基質合成の同時強化により、肉眼で確認できる程度の生物発光植物の作製に成功した。今後、バイオイメージングの強力なツールとなることが期待される。また、本研究の共同研究者かつ出資者でもあるスタートアップ企業である Light Bio 社は、光るペチュニアの米国での販売を準備しており、現在自社ホームページで先行予約受け付け中である。

(小口太一)

Genomic consequences associated with *Agrobacterium*-mediated transformation of plants

アグロバクテリウムを介した植物の形質転換に関連するゲノム影響

Thomson G *et al.*

2024

The Plant Journal 117: 342-363

米国イエール大学の研究者による総説。アグロバクテリウムを介した形質転換は、植物を形質転換する際の最も一般的な手段となっている。筆者らはアグロバクテリウム媒介形質転換が植物ゲノムに及ぼす影響についてこれまでの知見を総説した。

1) アグロバクテリウム媒介形質転換のメカニズム

アグロバクテリウムは植物細胞に遭遇すると、エキソ多糖類によって植物細胞壁に付着し、最大30の Vir オペロンを活性化する。なかでも、VirA、VirB、VirD、VirE、および VirG が植物への感染・形質転換に重要な役割を果たす。T-DNA は VirC1/C2, VirD1/D2のはたらきにより Ti プラスミドから産生され、VirB 等によって構成される分泌経路を介して植物細胞に伝送され、VirD2や VirE2によって核内に輸送される。核内に入った T-DNA はゲノム中にランダムに組み込まれる。しかし、T-DNA とゲノム接合配列の間に限定的な相同性 (microhomology) があることが確認されている。また、T-DNA 挿入イベントの86~89%で塩基の欠失を伴う。欠失の中央値は19~20 bp と小規模だが、まれ (2.5%) ではあるが1 kbp を超えて欠失することもある。

2) 植物ゲノムへの T-DNA の挿入

植物のゲノムへの T-DNA の挿入は、感染後6時間以内に起こる。これまでに100以上のアグロバクテリウム媒介形質転換に耐性を示すシロイヌナズナ変異体が単離されている。変異の殆どはクロマチン構造とリモデリング関連遺伝子であることから、クロマチン構造の関与が考えられている。さらに、放射線照射等ゲノムに二本鎖切断 (DSB) が生じやすい条件で T-DNA 挿入数が増加することから、DSB の発生頻度やその修復系の関与が考えられている。

3) DNA ポリメラーゼ θ の関与

近年、鋳型のありなしの両方で DNA 修復に係る酵素である DNA ポリメラーゼ θ が T-DNA の植物ゲノムへの組み込みに関与することが強く示唆されている。その一方で、DNA ポリメラーゼ θ を必要としないとする報告もあり、複数の経路の存在が示唆される。

4) T-DNA 挿入の構造

アグロバクテリウム媒介形質転換の特徴として、1コピーの無傷の T-DNA 挿入が知られている。しかし、単一の無傷の T-DNA 挿入が起こるのは2~5割程度であり、1つの遺伝子座に複数コピーの T-DNA が挿入されたり、1回の感染で複数の遺伝子座に T-DNA 挿入されたりすることも実は珍しくはない。また、まれではあるもの T-DNA 以外のベクター骨格が植物ゲノムへ挿入される現象も知られる。

5) T-DNA タンDEM連結のメカニズM

T-DNA がタンDEMで連結して植物ゲノMに組み込まれる現象もよく知られている。これは、T-DNA の植物ゲノMへの挿入時に起こると考えられ、T-DNA からの VirD2の除去に係る MRE11や DNA ポリメラーゼ θ の関与が指摘されている。

6) T-DNA 挿入によるゲノM構造変化

前述した T-DNA 挿入に伴う1 kbp の欠失は複数遺伝子に影響を及ぼす可能性がある。また、2つの独立した T-DNA 挿入イベントが同時に発生した場合、染色体レベルでの欠失や転位等が発生する可能性がある。これまでの、アグロバクテリウム感染が DSB の頻度を高めるといった報告はないものの、今後も検討を継続する必要がある。

7) 総括

アグロバクテリウム媒介法は、植物の形質転換手法として最もポピュラーな方法であるがために、意図しない結果を見落としがちである。形質転換技術を安全に利用するためには、アグロバクテリウム媒介法やその他の形質転換ツールの使用による形質転換植物の作製がもたらす潜在的な影響を正しく認識・評価する必要がある。

(小口太一)

Construction of host plant insect-resistance mutant library by high-throughput CRISPR/Cas9 system and identification of a broad-spectrum insect resistance gene

ハイスループット CRISPR/Cas9 システムによる宿主植物昆虫抵抗性変異体ライブラリーの構築と広域スペクトル昆虫抵抗性遺伝子の同定

Sun L *et al.*

2024

Advanced Science 11: e2306157

DOI: 10.1002/advs.202306157

中国の華中農業大学の研究者による報文。CRISPR/Cas9 発現カセットを含む T-DNA を含む Ti プラスミドのガイド RNA 挿入位置に、数百種類の害虫抵抗性遺伝子の候補配列をプール化して導入したライブラリーを利用した新たな害虫抵抗性遺伝子のスクリーニング法を試み、以下の結果を得た。

1) ライブラリーの構築

既存のトランスクリプトームデータから害虫抵抗性遺伝子型や感受性遺伝子型のワタにおいて、異なる発現レベルを示す遺伝子502遺伝子を抽出した。これらの配列から969の sgRNA を設計し、それらをプールして pRGEB32ベクターの gDNA 挿入位置に挿入したプラスミドライブラリーを作製した。最終的に、10,000個以上のクローンからなるアグロバクテリウムのライブラリーを得た。

2) ワタへの形質転換

アグロバクテリウムのライブラリープールをワタ茎外植片に形質転換し、2,000以上の独立した T₀植物を得た。このうち1,380の T₀植物について挿入された sgRNA の評価を行ったところ、T₀植物の94.07%が1種類の sgRNA のみを有していた。このうち369個体について、標的部位への変異導入率を調べたところ、75.61%の植物で80%以上の高効率で標的的特異的変異導入が確認された。

3) 害虫抵抗性スクリーニング

作製したゲノム編集体 (T₁世代) から133遺伝子を標的とする200の独立系統について温室及び野外ほ場でのアブラムシに対する感受性を評価した。結果、10系統で温室と野外の両方でアブラムシへの感受性に有意な変化を示した。また、200系統のうち、9系統では食害性害虫 (cotton bollworm, cabbage worm, leaf roller) による被害にも有意な変化を示した。

4) 害虫抵抗性遺伝子座の同定

スクリーニングによって害虫抵抗性の低下を示した系統のうち、2系統は同じ *GhMLP423* 遺伝子を標的としたゲノム編集体であった。この2系統は、吸汁性害虫と食害性害虫の両方に高い感受性を示すことを特徴とする。そこで、*GhMLP423* 遺伝子の過剰発現ワタを作製したところ、whitefly (吸汁性) と cotton bollworm (食害) の両方に対して、抵抗性の向上が認められ

た。*GhMLP423*遺伝子過剰発現体では、サリチル酸含量および PR 遺伝子の発現量が非組換え体より高いことから、植物全身獲得抵抗性 (SAR) が活性化されたことにより、昆虫抵抗性が高まったと示唆された。

5) 総括

新たな CRISPR/Cas9 システムによるハイスループットスクリーニングから、新規の広域スペクトル昆虫抵抗性遺伝子を同定した。この手法は、機能ゲノミクス研究のための効率的な解析手法として、他の植物にも適応可能であると考えられる。

(小口太一)

Introduction of a second “Green Revolution” mutation into wheat via *in planta* CRISPR/Cas9 delivery

In planta CRISPR/Cas9導入によるコムギへのもう一つの 「緑の革命」変異の導入

Kumagai Y *et al.*

2022

Plant Physiology 188: 1838-1842

農研機構とカネカの研究者による短報。

1) 背景

一般に、植物では細胞外からインジェクションした酵素を細胞内で機能させることは難しいとされる。このため、植物ゲノム編集においても、ゲノム編集のツールとなる酵素をコードする遺伝子を各ゲノム中に導入したステイブルな形質転換体を作成し、その後代から、標的特異的な変異を有し、ゲノム編集酵素を持たない系統（ヌルセグリガント）を分離・選抜する方法が主流である。ヌルセグリガントとなったゲノム編集体は、わが国ではカルタヘナ法の規制対象となる遺伝子組換え生物には当たらないが、他国においてはプロセスベースの観点から遺伝子組換え生物として規制対象となる可能性がある。

2) iPB 法

in plant Particle Bombardment (iPB 法) とは、遺伝子組換え操作を介さずに、ゲノム編集酵素 (DNA、タンパク質、リボタンパク質) を金粒子にコートし、パーティクルボンバードメントによって直接植物細胞中に伝送する方法である。本報告以前には、プロトプラストや受精卵、未熟胚に iPB 法が適応されている。

3) コムギ種子胚を用いた iPB 法

コムギ種子胚から茎頂を初出させ、茎頂分裂組織 (SAM) を単離する。単離した茎頂分裂組織に iPB 法を用いて、*Tasdl* 遺伝子 (コムギの *sd1* 遺伝子。 *sd1* 遺伝子はイネにおける緑の革命の原因遺伝子として知られる。) の一部をガイド RNA として含む CRISPR/Cas9 リボタンパク質 (RNP) を打ち込む。打ち込んだ当代 (E_0) 植物の葉の遺伝型を切断増幅多型配列 (CAPS) アッセイ及びサンガーシーケンスによって調査し、コムギの 3 つの *sd1* 遺伝子座全てに変異がある 1 個体を得た。さらにその後代から、3 つの *Qsd1* 遺伝子座全てに変異がある個体を得た。

4) iPB 法で得られた *sd1* 三重変異体の表現型

iPB 法で得られた *sd1* 三重変異体は、同一条件で栽培された野生型と比較し、葉の緑色が濃い、10% 低い草丈といった特徴が見られた。穀粒収量には違いがなかった。以上のように「緑の革命」品種と同様の表現型が示された。

5) オフターゲット

オフターゲット予測プログラムによって予測された潜在的なオフターゲット領域 5 つについて変異の有無を調査したが、いずれの領域にも変異はなかった。

6) 総括

遺伝子組換え操作を介さない、かつ、高度な培養技術を必要としないコムギのゲノム編集手法が開発された。ゲノム編集効率やオフターゲット変異の不在等は、既存方法と同程度であり、育種や商業化への応用が期待される。

(小口太一)

植物バイオテクノロジー報告書

2024年6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・理事長 宮澤陽夫

〒135-0004東京都江東区森下3-13-5

グローバルビル5F

TEL 03-6284-0877

FAX 03-6284-0878

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