
ERAプロジェクト調査報告

October 2019

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

2019. 10

バイオテクノロジー研究会

2019年の調査報告書第5号（通算第46号）をお届けします。

本号では、まず遺伝子組換え技術を用いた研究として、心臓血管病や炎症性自己免疫疾患の原因とされている α -リノレン酸欠乏の解決策として α -リノレン酸を多く含む遺伝子組換えベニバナの作出を試みた事例（No.450）、ダイズの減収をもたらすダイズ茎疫病への耐性を向上させた遺伝子組換えダイズの作出を試みた事例（No.451）をご紹介します。また、ゲノム編集技術については、CRISPR/Cas9を用いたトウモロコシ・ダイズへの適用例及び将来展望（No.455）、ウドン粉病抵抗性コムギの作出を試みた事例（No.456）、TALENを用いた冷蔵耐性強化バレイショの作出を試みた事例（No.457）をご紹介します。加えて、No.459では酢酸処理によるキャッサバの乾燥耐性の強化の研究事例についてもご紹介しています。

さらに、海外での状況における報告事例として、No.452では欧州におけるGM作物の商業栽培に関してGM作物栽培先駆国であったルーマニアの経験と展望、No.453では欧州におけるGM圃場試験と品種登録圃場試験のデータ相互利用の促進や両試験の統合の可能性についてご紹介しています。

その他、No.454では細菌感染人工飼育蚊の生物農学的利用による有害ウイルス病（デング熱、西ナイル病など）の減少、抑制手法及び実績についてご紹介しています。そして、No.458でご紹介しているナノ分子を用いた植物細胞内への物質送達、形質転換における細胞内への挿入核酸の送達にも利用が可能であり、ゲノム編集やRNAiの農薬的利用等の非GM技術によるアプローチの実用化が期待されます。

なお、これまでに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.450	ベニバナの生物学的栄養強化： α -リノレン酸（ALA）の強化によるオメガ3脂肪酸強化油料種子作物の改良 Biofortification of safflower: an oil seed crop engineered for ALA-targeting better sustainability and plant based omega-3 fatty acids	1
No.451	植物病原細菌 <i>Pseudomonas syringae</i> 由来の harpin タンパク質遺伝子 <i>hrpZm</i> の過剰発現によるダイズのダイズ茎疫病耐性向上 Over-expression of the <i>Pseudomonas syringae</i> harpin-encoding gene <i>hrpZm</i> confers enhanced tolerance to Phytophthora root and stem rot in transgenic soybean	2
No.452	欧州における GM 作物の商業栽培に関するルーマニアの経験と展望 The Romanian experience and perspective on the commercial cultivation of genetically modified crops in Europe	3
No.453	世界各地の GM 圃場試験の評価と同試験の品種登録圃場試験への統合の可能性 The assessment of field trials in GMO research around the world and their possible integration in field trials for variety registration	4
No.454	Verily 社のプロジェクトによる数百万匹の施設飼育蚊の放出 Verily project releases millions of factory-reared mosquitoes	5
No.455	CRISPR/Cas9を用いたトウモロコシ及びダイズの作物特性改良 Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in Maize and Soybean.....	6
No.456	ゲノム編集に基づく <i>TaEDR1</i> 同祖 3 遺伝子の同時改変によるコムギのウドン粉病抵抗性の強化 Simultaneous modification of three homoeologs of <i>TaEDR1</i> by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat	7
No.457	標的遺伝子ノックアウトによるバレイショの冷蔵及び加工特性の改良 Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout	8
No.458	ナノキャリアが変える GM 植物の展望 How nanocarriers delivering cargos in plants can change the GMO landscape.....	9
No.459	酢酸処理によるキャッサバの乾燥耐性の強化 Acetic acid treatment enhances drought avoidance in cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	10

Biofortification of safflower: an oil seed crop engineered for ALA-targeting better sustainability and plant based omega-3 fatty acids

ベニバナの生物学的栄養強化： α -リノレン酸（ALA）の強化によるオメガ3脂肪酸強化油料種子作物の改良

Rani A *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 253-263

インドの科学研究機構研究員による原著論文である。 α -リノレン酸（ALA）欠乏は、心臓血管病や炎症性自己免疫疾患の原因とされている。オメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸の摂取はこれらの疾病の改善に効果が大きいことが認められている。オメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸は魚類に豊富であるが、インドでは、菜食主義、乱獲による魚資源不足、海洋汚染への不安などの理由から、魚類からのオメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸の摂取は限られている。このため新たな供給源が期待されている。ベニバナは、作付面積が世界7位の油料作物で、 α -リノレン酸の前駆物質であるリノール酸を豊富に含む（全脂肪酸の約80%）。また既往研究から、シロイヌナズナ由来の *FAD3* 遺伝子は、リノール酸を α -リノレン酸に変換する能力を有することが確認されている。著者らは *FAD* 発現を増強した遺伝子組換えベニバナの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えベニバナの作出：シロイヌナズナ col-0株由来の *FAD3* 遺伝子を種子特異的なプロモーター β CG の下流につなげた発現カセットをベニバナ (*Carthamus tinctorius* L.) A1系統に、アグロバクテリウム法により導入し、自殖により T₂系統を作出した。T₂系統は、生育、開花期、種子着生などの農業特性において対照と差異はなかった。
- (2) 組換えベニバナのリノレン酸含量：T₂の13系統から開花後12~14週に種子を採取し、調査した。i) リノレン酸蓄積量は1.34~18.2 mg/g 種子乾燥重；ii) 全脂肪酸に占めるリノレン酸含有率は0.48~6.50%であった。また、 α -リノレン酸含量が高い系統ほどリノール酸含量は低い傾向があった。（例：系統 TE6の α -リノレン酸含有率は6.50%、一方リノール酸含有率は51.42%に低下していた）。
- (3) 総括：*FAD3* 遺伝子の導入により種子中のリノール酸を、高栄養価の α -リノレン酸への変換した組換えベニバナが作出された。植物由来オメガ-3脂肪酸の新しい供給源への最初のステップを示すものと考えられる。

(林 健一)

Over-expression of the *Pseudomonas syringae* harpin-encoding gene *hrpZm* confers enhanced tolerance to *Phytophthora* root and stem rot in transgenic soybean

植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* 由来の harpin タンパク質遺伝子 *hrpZm* の過剰発現によるダイズのダイズ茎疫病耐性向上

Du Q *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 277-288

中国の大学・国研研究者による原著論文である。ダイズのダイズ茎疫病（PRR）は10～50%の減収をもたらす大病害であるが、慣行的対策（育種・薬剤散布・耕作法など）には限界があった。harpin タンパク質は、植物病原性細菌由来の高グリシン含有耐熱性タンパク質で、*harpin* 遺伝子の過剰発現により、植物（タバコ・イネ・ナタネ・ワタ）に耐病・耐虫性を与えることが知られている。著者らは *Pseudomonas syringae* 由来の *harpin* 遺伝子を利用し、PRR 耐性組換えダイズの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) *hrpZm* : タバコ病原細菌 *P. syringae* 由来の *harpin* 遺伝子のコドンの最適化を行った遺伝子を *hrpZm* と名付け、これを形質転換に利用した。
- (2) 組換えダイズ系統の作出 : *hrpZm* 遺伝子発現カセット（プロモーターはダイズユビキチン *Gmubi3* 遺伝子プロモーター）及び除草剤グルホシネート耐性遺伝子 *bar* 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によりダイズ品種 Williams 82 (W82) 及び Shengnong 9 (SN9) に導入し、グルホシネート耐性を選抜マーカーとして、T₁ 3系統 (HP49, HP116, HP127) を作出した。対照には、空ベクター (EV) 及び非組換え (NT) が用いられた。
- (3) 組換え系統の PRR 耐性検定 (温室) : PRR 発生圃場より採取した *P. sojae* を生育15日の胚軸に接種し、5～10日後の発病程度を調査した。i) 対照 : PRR 特徴的症状である葉の黄変・萎凋、短茎、茎腐れを発生し、枯死した。ii) T₂系統 : 致死率は6.67～17.24%と減少、対照致死率は EV : 36.26%、NT : 19.18及び33.33% ; iii) T₃系統 : 致死率は15.38～40.00%、対照は EV : 61.58%、NT : 43.33及び66.67% ; iv) T₄系統 : 14.28～35.71%、対照 : EV : 68.57%、NT : 33.33～66.67% ; v) 要約 : T₂～T₄系統は安定した有意に低い致死率を示した。
- (4) 一般農業特性 : 組換え系統は葉の形態、花色、ヘソ色、草丈、長莢節位高長、節数、100粒重等において対照と有意差を示さなかった。
- (5) 病害耐性関連要因 : 組換え系統は、病害関連遺伝子及び酵素の発現が対照より高く、全体的なダイズ茎疫病耐性発現への寄与が示された。
- (6) 総括 : harpin タンパク質遺伝子の導入により、ダイズ茎疫病耐性組換えダイズ系統が作出された。しかし、完全抵抗性は確認されなかったため、今後圃場試験による検定が必要である。

(林 健一)

The Romanian experience and perspective on the commercial cultivation of genetically modified crops in Europe

欧州における GM 作物の商業栽培に関するルーマニアの経験と展望

Ichim MC

2018

Transgenic Research 28: 1-7

ルーマニアの国研研究者のレビュー記事（単著）である。

- (1) 欧州における GM 作物の商業栽培：2011～2017年の各年の商業栽培総面積は10万 ha を超えるが、15万 ha には達していない。この間、2016年にルーマニア、2017年にチェコ及びスロバキアが、GM 作物の商業栽培を中止し、現在は EU28ヶ国中 2 国（スペイン（94.4%）及びポルトガル（5.6%））だけが害虫抵抗性 GM トウモロコシ 1 品種の栽培を継続している。
- (2) ルーマニアにおける商業栽培の消長：ルーマニアは GM 作物栽培先駆国であり、1999年に欧州で 3 番目に、世界全体では10番目に GM 作物の商業栽培を始めた。2006年には、栽培面積は13万7000ha に達したが、2007年の EU への参加とともに、除草剤耐性 GM ダイズの栽培は阻止され、代わりに害虫抵抗性 GM トウモロコシの栽培が開始され、2008年には、7146 ha に達した。しかしその後、この害虫抵抗性 GM トウモロコシの栽培は減少を続け、2016年には公式の栽培記録は消失した。
- (3) ルーマニアにおける GM 作物栽培規制制度：EC への加盟（2007）以来、各種の法的規制がルーマニアの国内法にも適用されるようになったが、農業・農村開発省の全般的指導のもと、規制の枠組みは比較的安定・定常的であった。しかし、2017年 1 月に GM 作物栽培に関する EU 指令の導入により状況は一変した。ルーマニア農家は、除草剤耐性 GM ダイズの栽培が禁止され、代わりに害虫抵抗性トウモロコシの栽培だけが可能となった。これによりルーマニア農家は決定的な栽培路線の変更を強いられた。指令2015/412は、加盟国の GM 作物の栽培を制限あるいは禁止することが可能である。市場化目的の GM 作物の栽培が法的にはまだ可能であるという少数派（28ヶ国中11ヶ国）にルーマニアは留まった。この指令は、事実上は商業栽培の禁止（1 品種だけ除外）を意味している。
- (4) GM 作物栽培の利点：積算栽培総面積は、除草剤耐性ダイズ（8 年間）が42万700ha、害虫抵抗性トウモロコシ（9 年間）が1 万3361ha であり、前者が圧倒的に多い。ルーマニアにおける 9 年間の害虫抵抗性トウモロコシの栽培による抵抗性害虫の増加は報告されていない。ルーマニアにおける2016年の GM 作物栽培の中止は、EU 指令の影響ではなく、利益不在の害虫抵抗性 GM トウモロコシに対する農家の栽培意欲の消失によるものと考えられる。
- (5) 欧州における GM 作物市場化の展望：ゲノム編集を含む NPBT の今後の発展・貢献には期待が大きい。しかし欧州では、最近の司法裁判所判定のように逆行の気配さえある。欧州の GM 作物市場化は、2つの要因（規制枠組みと公衆の意見）によって、中長期的に定められると考えられる。（林 健一）

No.453

The assessment of field trials in GMO research around the world and their possible integration in field trials for variety registration

世界各地の GM 圃場試験の評価と同試験の品種登録圃場試験への統合の可能性

Slot MM *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 321-329

オランダ・ワーゲニンゲン大学研究者によるレビューである。欧州における欧州食品安全機関 (EFSA) の枠組みでの GM 圃場試験と欧州植物品種庁 (CPSV) の枠組みでの品種登録圃場試験は、どちらも収穫物の食品成分分析を含む市場化前の食品・飼料としての安全性評価試験であるが、現在は、枠組み・試験は別個に実施されている。著者らは両試験の類似性・共通性から、試験データの相互利用の可能性をレビューした。

- (1) GM 圃場試験： i) 枠組み：EFSA (EU)、 ii) 比較対照 (各国の例)：①非 GM (近) 同質遺伝子作物、② GM 特性不在分離体 (ヌルセグリガント)、③ GM 近同質遺伝子作物 (まれに使われる)、 iii) 評価特性：食品・飼料としての安全性。
- (2) 品種登録圃場試験： i) 枠組み：CPVO (共同体植物品種機構)、 ii) 評価特性：新特徴・均一性・安定性 (出芽性、雑草耐性、害虫抵抗性、収量、収穫物品質など) (以上 EU における慣行)、
- (3) GM 圃場試験と品種登録圃場試験との相違点： i) 試験目的は、GM 圃場試験では食品安全性検定、品種登録圃場試験では新品種特性の検定、 ii) 隔離圃場試験を GM 圃場試験は必要とし、品種登録圃場試験は不必要、 iii) 供試面積は GM 圃場試験が0.5~5ha の大面積、品種登録圃場試験は100m²程度の小面積、
- (4) GM 圃場試験と品種登録圃場試験との類似・共通点： i) 市場化前の圃場試験の実施； ii) 農業特性・育種特性の記述； iii) 成分分析の記述； iv) 成分、微小変動容認； v) 対象 (比較) 系統・品種の設定； vi) 反復 (年次・場所) 試験の実施
- (5) 総括：GM 圃場試験と品種登録圃場試験とは目的は異なるが、検定データには類似性・共通性が多数存在する。労力・経費の有効利用のため、両データの相互利用の促進、さらには GM 圃場試験の品種登録圃場試験への統合の可能性が考えられる。

(注：GM 作物にはこの他に環境に対する影響評価のための GM 圃場試験が多くの国や地域で課されていることに留意が必要)

(林 健一)

Verily project releases millions of factory-reared mosquitoes

Verily 社のプロジェクトによる数百万匹の施設飼育蚊の放出

Gilbert JA & Melton L

2018

Nature Biotechnology 36: 781-782

ネイチャーバイテク誌の報道員による短報である。近年、細菌感染人工飼育蚊の生物農的利用による有害ウイルス病（デング熱、西ナイル病など）の減少・抑制手法・実績が報じられている。著者らは代表的な3つの手法についての記述を行った。

- (1) 細菌感染不妊雄蚊の大量放出：1) 手法：ネッタイシマカ (yellow fever mosquito; *Aedes aegypti*) の幼虫に細菌 *Wolbachia pipientis* を顕微接種により感染させ、蛹期に雄蛹のみを選別し（雄蛹は雌蛹より小型）、これを大量飼育して、成虫雄（不稔）のみを大量放出する。雄は野外で雌（ウイルス病媒介者）と交雑するが、雄蚊が不稔なため、卵は孵化しない。この過程を反復して野外の蚊集団を縮小させ、ウイルス病の発生を低下させる。2) 実績：i) 米国：カルフォルニア州の Debug Fresno 計画は本手法の開発者であり2017年には20週間に2千万匹の雄蚊を放出し、対象地区の雌蚊数を68%低下させた。2018年は中間結果で90%以上の減少が記録されている。2017年11月に EPA は MosquitoMate 社に同手法の実施を認可し、コロンビア特別区及び全米20州におけるヒトスジシマカ (*Asian tiger mosquito; A. albopictus*) への対抗策が発足した。同手法では、全過程が自動・機械化され、大量の雄蚊の放出が事業化されており、製品は邸宅・ゴルフコース・ホテルなどへ販売されている。ii) 中国：広州大学がミシガン州立大学と協同して、ヒトスジシマカ対策として同手法の適用を開始している。
- (2) 組換え (GM) 蚊の野外放出：1) 手法：テトラサイクリン非存在下で致死遺伝子を発現するカセットを含む OX513A 蚊は、テトラサイクリン非存在下で致死となる。実験室でテトラサイクリンを与え成長させた OX513A の雄蚊を環境中に放出することで、これと交尾した雌蚊の子は、全て致死となる。2) 実績：イギリス領ケイマン諸島やブラジル、パナマで実際に環境放出が行われ、80%以上の野生蚊の削減に成功している。
- (3) 細菌 *wMel* 株の環境放出：上記2手法同様に人工飼育蚊を環境中に放出するが、野生蚊集団に細菌感染を蔓延させることを目的とする。1) 手法：実験室で細菌 *Wolbachia wMel* 株に感染させたネッタイシマカの成虫（雌雄区別なし）を野外放出することで、野生蚊集団に *wMel* 株を感染させる手法。感染雌蚊は稔性を維持しているが、体内でヒトに対して病原を發揮するウイルスの複製・増殖を抑制する。細菌は、卵細胞質を通じて細菌が次世代へ伝達される。この反覆により、野外蚊集団全体の遺伝的構成を感染蚊優勢へと変化させ、最終的に病原ウイルス媒介雌蚊を沈圧する手法である。2) 実績：本手法の開発者である WMP は、デング熱対策として、本手法を12ヶ国でテストした。最近では、オーストラリア・ブラジル・コロンビア・インドネシア・ベトナムのデング熱の発生を抑制している。
- (4) 規制関連事項：GM 手法を用いた場合は、関係機関及び一般公衆への慎重な対応が要求されている。また、前2手法は、大量放出が必要であるのに対し、*wMel* 手法は、大量放出の必要はなく、経済的である。
- (5) 総括：有害ウイルス病抑制のための細菌感染人工飼育蚊の野外放出に関する3つの手法が展開中である。ともに一長一短はあるが、目的達成への有効手段として今後の発展が期待される。
(林 健一)

Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in Maize and Soybean

CRISPR/Cas9を用いたトウモロコシ及びダイズの作物特性改良

Chilcoat D *et al.*

2017

Progress in Molecular Biology and Translational Science 149: 27-46

デュポン パイオニア社の研究員によるレビュー論文である。著者らは CRISPR/Cas9 に関する明解な基本的記述を行い、ついで同社が実施したトウモロコシ・ダイズへの適用例及び将来展望を概説した。

- (1) CRISPR/Cas9の手法：Cas9タンパク質とガイド RNA (gRNA) により、標的 2 本鎖 DNA はゲノム上の特定の部位で切断される。切断された部位は細胞自身の機能により修復される。鋳型 DNA が導入されていない場合には、目標遺伝子の機能が消失したノックアウト突然変異が作出される。鋳型 DNA が供給される場合には、標的特定の編集が実施される。これには 1 塩基対以上の置換・挿入・除去が含まれる。以上の過程によりゲノム上の特定部位に正確・能率的に所定の変化を作出することが可能となる。実際にはこの過程に引続く植物体への再生技術が重要であり、両者が総合されてゲノム編集による作物、育種が進展している。
- (2) 試験設計：ゲノム編集を実施するためには、以下に関する知見の充実が必要である。i) 目標生物のゲノム情報、ii) 目標遺伝子の情報、iii) 再生植物体の分子生物学的特性検定手法
- (3) CRISPR/Cas9の作物育種への適用：ゲノム編集のトウモロコシ・ダイズへの適用はまだ初期段階である。しかし、すでに以下の種々の育種的適用がなされている。遺伝子機能のノックアウト；遺伝子機能変更のためのポイント突然変異の導入；遺伝子発現調節のための制御因子の除去あるいは追加；stacking のためのゲノム特定部位における遺伝子集積などである。
 - 1) トウモロコシ：①特性：雄性不稔；リグニン生合成；除草剤耐性；RNA 代謝；二次代謝物；穀粒成分；乾燥耐性など。②編集様式：鋳型不在の遺伝子ノックアウト；鋳型 DNA 存在による標的編集（小型 DNA 及び大型 DNA）；切断部位の削除によるゲノム配列の置換、遺伝子集積 stacking など。例 1) 遺伝子ノックアウトによるモチトウモロコシ；例 2) 遺伝子編集による除草剤耐性トウモロコシ；例 3) プロモーター変換による低エチレン乾燥耐性トウモロコシ；例 4) 遺伝子挿入・集積による害虫抵抗性・除草剤耐性トウモロコシ
 - 2) ダイズ：①特性：種子油・タンパク質成分；除草剤耐性。②編集様式：鋳型不在ノックアウト；2 本鎖 DNA 鋳型によるアミノ酸の標的編集；大型 2 鎖本鎖鋳型による遺伝子全体の挿入など。例 1) 遺伝子ノックアウトによる複数 null アレルの作出とその利用；例 2) 遺伝子編集による除草剤耐性ダイズ；例 3) 遺伝子挿入・集積によるスタックダイズの作出
- (4) 将来展望：CRISPR/Cas9のトウモロコシ・ダイズへの育種的適用の実効性が確認されている。今後の問題点は、公衆の受入れ、関係機関による規制、目標特性の 3 点である。開発者における根本的生物学の知識の向上及びゲノム編集の最良の適用領域の充実が求められると考えられる。

(林 健一)

Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat

ゲノム編集に基づく *TaEDR1* 同祖3遺伝子の同時改変による コムギのウドン粉病抵抗性の強化

Zhang Y *et al.*

2017

Plant Journal 91, 714-724

中国科学アカデミー・大学の研究者による論文である。パンコムギ (*Triticum aestivum*) は、各7本の染色体を有する A、B、D の3種類のゲノムからなる異質倍数体 ($2n=42$, AABBDD) である。同じ祖先から由来する2つ以上のゲノム、染色体、遺伝子は同祖性 (homoeology) と総称される。コムギの第1染色体 (1A、1B、1D) は同祖性染色体であり、後述される *TaEDR1-1A*、*TaEDR1-1B*、*TaEDR1-1C* は、同祖タンパク質をコードする同祖遺伝子である。コムギウドン粉病 (powdery mildew) は *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt* 菌) による大病害であるがその対策 (薬剤散布・抵抗性品種) は限定的である。一方、シロイヌナズナは幅広い病害抵抗性タンパク質 (EDR1) を有するが、EDR1はウドン粉病に対しては負の影響を与える。既往の研究で著者らはゲノム編集 (TALEN 法) によってコムギ *TaMLO* 遺伝子の突然変異コムギを作出したが、ウドン粉病に対しては一定の抵抗性を発揮したものの、葉緑体異常を伴い、生育不良であった。そこで著者らは以下の異なる3つの手法によるコムギ *EDR1* (*TaEDR1*) 遺伝子の発現抑制及び改変を試み、以下の結果を得た。なお、*TaEDR1* 同祖3遺伝子の単離には春播きコムギ品種 KN199を用いた。

- (1) ウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) : ウイルス感染によって誘導される RNA サイレncing機構を利用したノックダウン技術。 *TaEDR1* 遺伝子配列の一部をオオムギ縞モザイクウイルスの VIGS ウイルスベクターで発現させることで、 *TaEDR1* 遺伝子をノックダウンした植物では、 *TaEDR1* 遺伝子の発現が対照の約1/3に低下した。 *Bgt* 菌接種葉は孢子形成が対照より少なく、成熟 *Bgt* 菌糸体の形成が抑制された。葉の病原菌侵入部位では、 H_2O_2 発色程度及びカロース (グルコース重合体) の蓄積が増加し、ウドン粉病抵抗性の強化が示された。
- (2) RNAi 法 : KN199が保有する *TaEDR1* の3つの同祖遺伝子に対し、RNAi 手法を適用し、 T_0 22個体、 T_1 4系統が作出された。 T_1 世代の *TaEDR1* 発現は対照の1/2以下に減少した。 *Bgt* 菌接種葉では、菌糸体の形成が抑制され、分生子は観察されなかった。また算出された micro-colony formation index (MI) は、対照の20%に対し、RNAi 区は5%へと低下した。さらに H_2O_2 発色及びカロース蓄積は著増し、抵抗性の強化が示された。
- (3) CRISPR/Cas9法 : 単一ガイド RNA を設計し、未熟胚へのパーティクル・ボンバードメント法により、 T_0 5系統が作出されたが、2系統では標的配列への変異導入がキメラであった。207の T_1 個体からフレームシフト変異が *TaEDR1* 同祖3遺伝子全てに入り、同型接合の5つの T_1 個体を特定され、接種葉における MI が低下した。特にウドン粉病による死細胞が皆無なことが注目された。標的外突然変異は発生せず、 T_0 から T_1 への抵抗性伝達率は97~100%と安定・高率であった。
- (4) 総括 : 3種類の手法に基づく *TaEDR1* 遺伝子の発現抑制及び改変により、ウドン粉病抵抗性コムギ系統が試作された。抵抗性は完全ではなく、目下圃場試験により検証中であるが、とくに CRISPR/Cas9法は今後の検証による発展 (育種材料) が期待される。 (林 健一)

Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout

標的遺伝子ノックアウトによるバレイショの冷蔵及び加工特性の改良

Clasen BM *et al.*

2016

Plant Biotechnology Journal 14: 169-176

米国民間研究所研究者による原著論文である。米国産バレイショの61%はポテトチップス・フレンチフライなどの加工食品に供される。原料バレイショの通年安定供給のために慣行的に冷蔵されるが、これにより還元糖（果糖・ブドウ糖）が増加し、引き続き高温油揚げにより発ガン物質であるアクリルアミドが形成され、さらに産物の褐変・苦味が増加し、保健・食品上の問題となっている。この還元糖生成を抑制するために液胞型インベルターゼ遺伝子（vacuolar invertase gene, *Vlnv*）のRNAiによるノックダウンを試みた著者らの既往研究結果は不完全であった。そこで、より発現抑制効果が期待されるTALENを適用し、以下の結果を得た。

- (1) *Vlnv* ノックアウトバレイショ系統の作出：*Vlnv* が有する3種類、4アレル（A1、A2（1）、A2（2）、A3）に対応するTALENが作出され、慣行品種Ranger Russetの原形質にポリエチレングルコース法により導入された。約600の再生個体から少なくとも1アレルの変異を含む18系統が選出された。このうち6系統は1アレル変異、5系統は2アレル、2系統は3アレル、5系統は全4アレルの変異系統であった。さらに18系統のうち7系統はゲノム中に外来遺伝子配列を含まなかった。
- (2) 低温貯蔵による糖分変化：対照、St116_8（1アレルのみ変異）、St116_1（全アレル変異）の3系統を4℃ 14日間冷蔵し、糖分の変化を調査した。果糖・ブドウ糖・ショ糖の含量は、対照が1.4・1.5・1.1 mg/g、St116_8は1.2・1.2・2.0 mg/g に対し、St116_1系統は還元糖（果糖・ブドウ糖）は検出限界の0.1 mg/g 以下であり、逆に非還元糖のショ糖は3.3 mg/g へと増加した。追試した1～2アレル変異の3系統の糖分は、上記の中間値であった。
- (3) 冷蔵バレイショのアクリルアミド含量：4℃ 14日冷蔵により、対照ポテトチップスは6820 μ g/kg、St116_1は73.3%減の1820 μ g/kgであった。St116_1のポテトチップスは褐変が少なく、比色スコアは対照が24.50、St116_1は42であった。以上からノックアウト系統における加工特性の向上が確認された。
- (4) 総括：TALENの適用に基づく、液胞型インベルターゼ遺伝子（*Vlnv*）のノックアウトによる冷蔵耐性強化（還元糖及びアクリルアミドの著減）バレイショ系統が試作された。本系統は表現型特性検定（圃場）が予定されている。

（林 健一）

How nanocarriers delivering cargos in plants can change the GMO landscape

ナノキャリアが変える GM 植物の展望

Landry MP & Mitter N

2019

Nature Nanotechnology 14: 512-514

米国と豪州の大学研究者による提言論文。植物細胞を覆う硬く、厚い細胞壁により外部から内部への物質送達には動物細胞等と比較し、制限されている。著者らはナノ分子の植物への物質送達のキャリアとしての利用とバイオテクノロジーへの応用例について解説した。

- 1) 現在の植物形質転換技術：形質転換時に外来遺伝子等を細胞内に送達する方法は主としてアグロバクテリウム媒介法とバイオリスティック法（ボンバードメント法）に限定されている。バイオリスティック法では細胞壁及び細胞膜、細胞核等の物理損傷、核ゲノムへ多数の遺伝子挿入により非意図的な影響が生じることもある。アグロバクテリウム法でも、T-DNA は核ゲノム中にランダムに挿入されるため、内生遺伝子の破壊を伴う可能性がある。このため商品化にあたっては遺伝子導入の影響だけでなく、非意図的な破壊による影響についても評価が必要となる。
- 2) 植物形質転換におけるナノキャリア利用：細胞膜は約500 nm 以下の分子を通し、細胞壁は約5~20 nm 以上の粒子を排除することから、100 nm 以下のナノ分子ならば植物細胞内への物質送達のキャリアとなりうる。先駆的な研究事例としては、メソポーラスシリカのバイオリスティック法のキャリアとしての利用、ポリエチレンイミン被覆 Fe₃O₄磁性ナノ粒子（MNP）と DNA の複合体による花粉への DNA 導入、カーボンナノチューブ（CNT）利用による核ゲノム及びプラスチドゲノムへの遺伝子導入等がある。
- 3) ゲノム編集技術への利用：現状、植物では動物等で可能な mRNA やリボタンパク質の細胞への注入によるゲノム編集ツールの細胞内への送達は制限される。このため、植物では核ゲノムへの形質転換を伴う手法が一般的であり、従来の GMO と同様の規制を受ける可能性がある。CNT 利用による核酸の送達技術は、核ゲノムに遺伝子挿入なしに一過的な遺伝子発現を引き起こすため、組換えを伴わないゲノム編集ツールの細胞内送達技術として有望である。
- 4) RNAi への利用：RNAi の細胞内への送達は植物でも可能であり、噴霧により核ゲノムへの遺伝子挿入なしに局所的な遺伝子発現の調節が可能である。一方、RNAi 分子の不安定性がボトルネックである。ナノキャリアは RNAi の安定性向上に寄与する。先駆的事例としては、BioClay 技術がある（調査報告 No.309で紹介）。
- 5) 総括：ナノキャリアは、形質転換における細胞内への挿入核酸の送達にも利用可能であり、GM と非 GM の両方のアプローチに貢献できる。特に、ゲノムへの遺伝子挿入不要のゲノム編集や噴霧による RNAi の農薬的利用等の非 GM 技術によるアプローチの実用化を可能にする。

（小口 太一）

Acetic acid treatment enhances drought avoidance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) .

酢酸処理によるキャッサバの乾燥耐性の強化

Utsumi Y *et al.*

2019

Frontier in Plant Science 10: 521

理研、JST、大学研究グループによる共著論文。酢酸処理による乾燥耐性の向上は、シロイヌナズナ、ナタネ、トウモロコシ、イネ、コムギなどの草本植物で報告されているが、木本での報告例はこれまでなかった。本研究では、熱帯の木本作物であるキャッサバを用いて酢酸処理による効果を明らかとした。

- 1) 植物材料：国際熱帯農業研究所 (IITAGM) のコレクションに含まれるアフリカの栽培品種 60444。
- 2) 乾燥処理試験：茎長約15 cm の植物を鉢に移植し、温室で14日間前栽培した植物に10 mM 酢酸溶液又は水 (対照) を7日間灌水し、その後灌水制限により乾燥ストレスを与えた。
- 3) 乾燥耐性：灌水制限6日目の相対含水量は酢酸処理なしでは約60% に対し、酢酸処理では80% 以上と有意に高かった。クロロフィル含量も、処理なしでは灌水制限6日間で約2/3に低下したのに対し、酢酸処理では低下しなかった。灌水制限6日目のカロテノイド含量も、未処理区では非灌水制限の2/3程度に低下したが、酢酸処理では非灌水制限と同じ水準であった。
- 4) 気孔開度：酢酸処理区では、光合成速度、蒸散速度、気孔開度がいずれも対照よりも低かったことから、酢酸処理では気孔が閉じたと示唆された。
- 5) 植物ホルモン：酢酸処理した植物では、アブシジン酸含量が対照の1.9倍に増加した。ジャスモン酸には変化はなかった。
- 6) トランスクリプトーム解析：酢酸処理ではアブシジン酸シグナル伝達関連の遺伝子発現が上昇した一方、アブシジン酸合成に関与する遺伝子には変化がなかった。
- 7) 総括：酢酸処理による乾燥耐性向上はキャッサバでも有効であった。酢酸処理によりアブシジン酸情報伝達が活性化された結果、気孔が閉鎖したことで乾燥耐性が改善したものと示唆される。

(小口 太一)

ERA プロジェクト調査報告

2019年10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 宮澤陽夫

理事長 安川拓次

〒102-0083東京都千代田区麴町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)