

---

# ERAプロジェクト調査報告

---

December 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

2019.12

バイオテクノロジー研究会

2019年の調査報告書第6号（通算第47号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え技術を用いた研究のうち、*Bt*タンパク質を導入した害虫抵抗性バレイシヨの作出（No.465）、飼料作物の収量増加、栄養価向上のための研究（No.466、467）及び工業用に用いられる耐熱性アミラーゼを産生する組換えタバコに関する研究（No.468）をご紹介します。また、害虫抵抗性品種開発の基礎的知見として、アブラムシ抵抗性を持つ突然変異系統に関する研究を紹介します（No.461）。

さらに、遺伝子組換え作物の評価のための基礎的知見として、栽培環境や品種が導入遺伝子より発現するタンパク質や内在性タンパク質の発現量に及ぼす影響を調査した論文（No.460及び462）をご紹介します。

テクノロジーを用いた社会的な課題解決策に関して、途上国で多発する $\beta$ カロチン（ビタミンAの前駆体）の不足欠乏による幼児の失明の防止・減少を目的として開発されたゴールデンライスの開発の経緯や食品としての安全性（No.463）及び世界中のバナナに猛威を振るっている新パナマ病に対する耐性をゲノム編集により付与しようとする取り組み（No.469）、さらにはビッグデータ、ドローン、センサーを用いた「*in silico* 農業」に関する記事を紹介します（No.464）。

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/namazu.cgi>

## 目次

No.460	組換えダイズ ( <i>Glycine max</i> L. Merrill) における CP4 EPSPS 発現量の変動性 Variability of CP4 EPSPS expression in genetically engineered soybean ( <i>Glycine max</i> L. Merrill) .....	1
No.461	シロイヌナズナのアブラムシ ( <i>Myzus persicae</i> ) 抵抗性に主要な役割を有する <i>OXII</i> キナーゼ遺伝子 <i>OXII</i> kinase plays a key role in resistance of Arabidopsis towards aphids ( <i>Myzus persicae</i> ) .....	2
No.462	インド国内の複数試験地における圃場試験によるトウモロコシ内在タンパク質の 発現の評価 Expression of endogenous proteins in maize hybrids in a multi-location field trial in India .....	3
No.463	FDA 宣言「ゴールデンライスは食用として安全」 Golden Rice is safe to eat, says FDA .....	4
No.464	農業の新しい波—「 <i>In silico</i> 農業」の台頭 <i>In silico</i> farming drives next wave in agriculture .....	5
No.465	ジャガイモキバガ (PTM) 抵抗性組換えバレイショとその対照非組換えバレイショの 成分比較解析 Comparative compositional analysis of transgenic potato resistant to potato tuber moth (PTM) and its non-transformed counterpart. ....	6
No.466	改変 fructosyltransferase 発現組換え多年生ライグラス ( <i>Lolium perenne</i> L.) における 内在エンドファイトの毒素作出と親作物との交互作用の評価 Evaluation of endophyte toxin production and its interaction with transgenic perennial ryegrass ( <i>Lolium perenne</i> L.) with altered expression of fructosyltransferases .....	7
No.467	シアノフィシン産生タバコにおける CphB 型及び CphE 型シアノフィシン分解酵素の 発現と両酵素の分解能力の比較 Expression of CphB- and CphE-type cyanophycinases in cyanophycin-producing tobacco and comparison of their ability to degradate cyanophycin in plant and plant extracts .....	8
No.468	実験室及びほ場における超耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ組換えタバコの非標的影響 Non-target effects of hyperthermostable $\alpha$ -amylase transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> in the laboratory and the field .....	9
No.469	CRISPR はバナナを死のカビから救う唯一の希望 CRISPR might be the banana's only hope against a deadly fungus .....	10

## Variability of CP4 EPSPS expression in genetically engineered soybean (*Glycine max* L. Merrill)

### 組換えダイズ (*Glycine max* L. Merrill) における CP4 EPSPS 発現量の変動性

Chinnadurai P *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 511-524

バイエルクロップサイエンス社の研究者による原著論文である。組換えダイズは、世界ダイズの約80%、その約35%はスタック系統品種である。著者らは除草剤グリホサート耐性タンパク質 CP4 EPSPS の発現量 ( $\mu\text{g/g}$  乾物重) の変化を広範囲 (3ヶ国・22地域9作期、計74環境) に調査し、以下の結果を得た。

- (1) 遺伝子型要因：1) 挿入遺伝子座数：CP4 EPSPS 発現量は挿入遺伝子座数により有意に変化し、2座系統は1座系統の約2倍の発現量を示した。2) 植物体組織：組織間に有意差があり、平均値は葉：254.4~290.7；地上部：157.4、根：54.4；種子：123.5 ( $\mu\text{g/g}$ )。3) 成熟期：早期~晩期の成熟期の差は CP4 EPSPS 発現量に有意差を生じなかった。4) スタック系統品種：同種特性あるいは異種特性間のスタックは、いずれも CP4 EPSPS 発現量に有意差を生じなかった。
- (2) 環境要因：1) 各地域内：CP4 EPSPS 発現量は大幅に変動した。2) 国別：第3葉以外の組織には国の相異は CP4 EPSPS 発現量の有意差を生じなかった。3) 作期別：第1葉・第3葉・地上部には有意差を生じたが、根及び種子には有意差を生じなかった。
- (3) 食品安全性：本研究における種子の CP4 EPSPS 発現量の最大値は343.5、平均値は124.0 ( $\mu\text{g/g}$ ) である。MOE (Margin Of Exposure：無毒性量 (NOAEL) の推定摂取量に対する比。ただし、CP4 EPSPS には毒性は認められていないので、無毒性量として毒性試験における最大投与濃度が使用されている) は最大値で4,000、平均値で11,000と、十分に安全とされる MOE である1000のそれぞれ4倍、11倍であり、十分な食品安全性を示した。
- (4) 総括：以上から、現代の規制制度における要求データの簡素化合理化が可能と考えられる。

(林 健一)

## ***OX11* kinase plays a key role in resistance of *Arabidopsis* towards aphids (*Myzus persicae*)**

### シロイヌナズナのアブラムシ (*Myzus persicae*) 抵抗性に 主要な役割を有する *OX11* キナーゼ遺伝子

Shoala T *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 355-366

エジプト及び英国の大学研究者による原著論文である。アブラムシは植物に対する吸汁害に加えて、各種のウイルス病を媒介する世界的大害虫である。著者らはアブラムシ食害に対する植物の応答の一つである酸化バーストシグナルの下流への伝達に關与するキナーゼ遺伝子 (*OX11*) について、変異体を用い、アブラムシ抵抗性ととの關連を調査し、以下の結果を得た。

- (1) *oxil*突然変異系統：① *oxil-1*変異体 (Ws 背景)：null 変異体。② *oxil-2*変異体 (Col-0背景)：*OX11*の発現が野生型の5%以下となる。
- (2) 供試植物及び害虫：実験室生育25~30日 (5~10葉) のシロイヌナズナ突然変異系統を供試、アブラムシは1株当たり2匹の若虫由来の若虫数、成虫数を2日ごとに調査した (吸汁試験)。
- (3) アブラムシ数：野生型 (Col-0) では若虫数は17日目にピーク (120匹/植物) に達し、以降減少した。*oxil-2*変異体では若虫数のピークは4日間遅れたことから、アブラムシの吸汁に対する抵抗性が強化されていることが確認された。
- (4) カロース生成遺伝子 *GSL1*及び *GSL5*の発現：1) *GSL1*発現は、野生型及び *oxil-2*変異体において摂食3時間後で14.6倍及び8.4倍、*GSL5*発現は12時間後でそれぞれ1.8倍及び6.6倍となり、カロース生合成遺伝子発現の増加とアブラムシ吸汁抵抗性との間の相関が示唆された。2) *oxil-1*変異体：*GSL1*の発現は12時間で11.2倍であったものの、*GSL5*の発現は負の発現調節がみられた。
- (5)  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ遺伝子 *GNS2*の発現：1) 野生型での発現：*GNS2*発現はアブラムシによる食害により、Col-0では最大26.4倍 (12時間後) に増加したのに対し、Wsでは有意な発現変動はなかった。一方、他の *GNS1*、*GNS3*、*GNS5*は定量限界以下であった。2) *oxil-2*変異体 (Col-0背景) の *GNS2*発現：定量限界以下であった。3) *oxil-1*変異体 (Ws 背景) での *GNS2*発現：食害により最大14.2倍 (6時間後) に増加した。
- (6) 総括：酸化バーストシグナル伝達に關与するキナーゼ遺伝子 (*OX11*) の極低発現変異体 *oxil-2*は、アブラムシ数の低下及び關連遺伝子の高発現により、顕著な抵抗性を示した。また、*GNS2*遺伝子は宿主の吸汁害感受性の指標となることを示した。本研究結果は、アブラムシを含む吸汁害虫抵抗性育種の基礎資料となると考えられる。

(林 健一)

## Expression of endogenous proteins in maize hybrids in a multi-location field trial in India

### インド国内の複数試験地における圃場試験による トウモロコシ内在タンパク質の発現の評価

Gutha LR *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 331-342

デュポン パイオニア社（インド・米国）研究者による原著論文である。GM 作物における挿入遺伝子由来タンパク質の発現量は、種々の要因により変動すると報じられている。著者らは、トウモロコシハイブリッドを対象に内生的タンパク質の濃度の変動に影響を及ぼす要因を広範囲に調査し、以下の結果を得た。

- (1) 圃場試験：1) 年数：2 (2013・2014)；2) 供試材料：合計12種類の交雑種；3) 試験地：8；4) 採取時期：3 (生育初期・生育盛期・成熟期)；5) 調査部位：植物体の頂点から2, 3番目の葉；6) 調査タンパク質：3種類 (actin・GAPDH・EF1-alpha)
- (2) タンパク質濃度 (units/ml) の変動 (変動係数 (%))：1) 交雑種 (遺伝型) による変動 (2013年 /2014年)：① actin：5～22%/5～24%；② GAPDH：4～25%/2～26%；③ EF1-alpha：4～21%/5～25%、2) 試験地 (環境) による変動 (2013年 /2014年)：① actin：22～36%/31～51%；② GAPDH：20～42%/15～49%；③ EF1-alpha：13～31%/12～64%。全体を通じ、試験地は交雑種よりも大きな変動を与えることが示された。3) 採取時期 (growth stage) による変動 (2013年 /2014年)：① actin：19/12%；② GAPDH：35/55%；③ EF1-alpha：15/11%。
- (3) 変動要因分析 (variance component analysis)：全変動の中で、各要因による変動が占める割合 (タンパク質・年度・採取時期 [初・盛・熟])：1) 試験地要因：① actin：2013年 /47・75・74%；2014年 /79・85・74%；② GAPDH：2013年 /51・65・40%；2014年 /31・84・25%；③ EF1-alpha：2013年 /47・62・40%；2014年 /40・74・63%。2) 交雑種要因：3種類のタンパク質とも極めて低く、2013年は0～8%；2014年は1～7%。3) その他：試験地×交雑種の交互作用、試験の反覆、などの要因の割合は極めて小さい。
- (4) 総括：インド国内での8試験地・12交雑種・2年間の圃場試験において、トウモロコシの内在的3種類のタンパク質濃度の変動は比較的安定していた。変動係数は、交雑種要因が2～26%、試験地要因が12～64%で、後者による変動の方が大であった。本研究は十分な要因範囲を含んでおり、これにより GM トウモロコシで想定される主要変動はすべて包含されると判断される。

(林 健一)



## Golden Rice is safe to eat, says FDA

### FDA 宣言「ゴールデンライスは食用として安全」

Owens B

2018

Nature Biotechnology 36: 559-560

ネイチャーバイテク誌の報道員による短報である。

- (1) FDA の食用安全宣言：米国 FDA（食品医薬品局）は本年 5 月にゴールデンライスの食用安全性を認める書簡を公表した。これにより食用安全宣言を公表した国は、ニュージーランド・オーストラリア・カナダ・米国の 4 ヶ国となった。これらの宣言はいずれも正式の認可ではない。しかし、一般に安全性の認め印とみなされている。また米輸入国における輸入米へのゴールデンライスの偶発的混入による混乱の防止の効果も考えられる。
- (2) 苦難の開発・発展：ゴールデンライスは1990年後半に、スイス及びドイツの研究者により開始された。目的は、途上国に多発する  $\beta$  カロチン（ビタミン A の前駆体）の不足欠乏による幼児の失明の防止・減少であった。このため、 $\beta$  カロチン合成能力付与の目的をもって、ラッパスイセン及び土壌細菌由来の 2 種類の遺伝子導入がなされた。組換えイネ穀粒は黄金色を呈し、ゴールデンライスと名命された。2001年に在スイス シンジェンタ社は、途上国農家への無償配布を了解の上、ゴールデンライス計画を継続した。その後、ラッパスイセンの代替としてトウモロコシ由来遺伝子の挿入など種々の改良がなされ、新系統は  $37\mu\text{g/g}$  米粒の高い  $\beta$  カロチン含量を達成し、この濃度は 1 回の食事で 1 日の必要ビタミン A 量の半分以上をみたすとされた。「人道的栄養改善」が目標であったにもかかわらず、ゴールデンライスは GM であるために幾多の試練・障害に関係者の労苦は多大であった。2004年にゴールデンライス計画は、シンジェンタ社から非営利国際研究・教育機関である国際イネ研究所 IRRI（在フィリピン）へ移管された。中国では、2012年に児童に対するビタミン A の供給源として  $\beta$  カロチン油と同等の効果があるとする研究が発表されたが、両親への事前承認の遺漏や偽倫理文書などで、2015年に撤回された。インドでは、2017年にゴールデンライスと地方品種との交雑種の作出を試み、当初は失敗したが、別の形質転換体である E イベントでは地方種に類似した農業特性を有する交雑種が作出された。
- (3) 課題と展望：IRRI が FDA へ提出したゴールデンライスのデータは E イベント由来のもので、 $1.1\mu\text{g/g}$  の低  $\beta$  カロチン含量であった。FDA も安全宣言は「食用」としてであり、ビタミン A の栄養補強は含まないとしている。IRRI は、FDA の見解は米飯低摂取の米国が背景であり、1 日必要カロリーの 70% を米飯に依存するアジアでは、必要ビタミン A の半分をゴールデンライスは供給できるとしている。グリーンピースは、ゴールデンライス計画ではなく、育成中の高  $\beta$  カロチン-カンショの摂取及び多様な食事への改良に期待を示している。重要なのはバングラデシュ及びフィリピンのゴールデンライスの承認であり、IRRI は両国への承認申請を提出している。問題が規制面だけであれば道筋は見えている。しかし、政治・社会面が関与すれば長期化すると危惧されている。しかし IRRI 及びゴールデンライスの支持者は、「getting closer（目標接近中）」として努力を継続している。（林 健一）



## ***In silico* farming drives next wave in agriculture**

### 農業の新しい波—「*In silico* 農業」の台頭

Smalley E

2018

Nature Biotechnology 36: 783-784

ネイチャーバイテク誌報道員による短報である。近年、農業の新しい波—「*in silico* 農業」—が台頭してきている。

- (1) 各種要因への個別対応 1) 米国：農家のデジタル技術採用推進法案を下院が可決。これにより95%の農地を含む広域インターネットサービスを推進する；2) カナダ：Nutrien社（肥料会社）は農家の作業立案を支援するための気候・農業予測情報の提供を計画；3) 英国：食料農業会議（於ノーウィック市）で、新技術及びデータ収集システムの集中展示会が開催された。ドローンが中心であったが、なお、経済性の向上が必要とされた。4) 英国：ハミングバード社（在ロンドン）は、ドローンと多数データ給源（含人工衛星）との結合により、作物モニタリングと管理サービスの支援を計画している。5) スイス：ガマヤ社は、可視・赤外部の電磁放射線とドローンを結合し、作物の病害、水、栄養状態のデータ収集を目指している；6) フランス・スイス：国立研は、地下の根の生育とミミズの動きをとらえる音響センサーを開発し、土壌構造との関係をしらべている。7) 英国：ロザムステッド研究所は、圃場上空の空気を採取して、飛来する病害菌胞子の種類を特定し、農家へ通報するシステムを開発した。これにより、バレイショ疫病や砂糖ダイコン疫病などに対する早期警告を可能としている。8) デンマーク：ファウナフォトニクス社は、レーザー光線を用いて、害虫の種や集団の大きさを特定する技術を開発しようとしている。
- (2) 総合的効果：農業の有効変異をすべて収集し、機械学習によりモデル化して、総合的な評価を行う。まず、ドローンやセンサーによる、有効変異の十分な量と多様な収集地域の確保が必要であるが、現実的には容易ではない。米国ミシガン州立大学は、より現実的対応として、SALUS (System Approach to Land Use Sustainability) を開発した。これは不完全ではあるが、速効性のある新情報により目的を達成しようとするものである。実際には、土壌、気候、品種、農業管理が作物収量、品質、環境に与える影響の収集・解析を実施する。すでに、FAO、世銀、EU、USAID、USDA、Gates財団などからの資金支援を得ている。米国ケンブリッジ市のCiBOテクノロジー社は、SALUSを規模拡大し、商業化を行った。これは、個々の農家ではなく、国際機関・政府・国際協力組織への貢献を目指している。このシステムは、衛星・農業経営・気候の広範なデータを膨大な植物土壌生物学を結合し、植物の環境反応を再構築するものであるとされている。以上を通じ、圃場規模を超えた広域の*in silico* 農業の発展を目指している。

(林 健一)

## Comparative compositional analysis of transgenic potato resistant to potato tuber moth (PTM) and its non-transformed counterpart.

### ジャガイモキバガ (PTM) 抵抗性組換えバレイショとその対照非組換えバレイショの成分比較解析

Rahnama H *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 301-313

イランの国研研究者による原著論文である。バレイショはコムギ、トウモロコシ、イネに次ぐ第4番目の主要作物であり、世界人口が摂取するカロリーの5~15%を供給しているが、ジャガイモキバガ (*Phthorimaea operculella*) (PTM) による被害が大きい。著者らは *Bt* タンパク質 (Cry1Ab) 導入による PTM 抵抗性バレイショを作出し、その主要成分について広範囲な解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) PTM 抵抗性組換えバレイショの作出: *cry1Ab* 遺伝子 (*PEPC* プロモーター制御) を慣行品種 Marfona に導入し、形質転換体4イベント (B2、B8、B11、B12) を得た。温室生育90日後に塊茎を採取し、2群に分けた。1群は Cry1Ab を発現させるために、7日間の光処理 ( $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) を行い、他の1群は光処理を行わない暗所に保存し、その後両群とも、 $-70^\circ\text{C}$  に保存した。
- (2) 主要成分: ①組換え区と非組換え対照区との間に有意差無し: 水分・灰分・乾物重・デンプン・食物繊維・アスコルビン酸・可溶性タンパク質・炭水化物 (含還元糖); ②光処理区は無処理区よりアスコルビン酸が増加した。
- (3) 無機成分: B8のナトリウムについて、無処理区において非組換え対照区と有意差が認められたことを除き、組換え区と対照間に有意差はなかった。
- (4) 脂肪酸: ①組換え区と対照区との有意差無し: バレイショにおける主要脂肪酸であるリノール酸・パルミチン酸・リノレン酸・オレイン酸; ②光処理区では無処理区より有意に多い: パルミチン酸・ステアリン酸; ③無処理区では光処理区より有意に多い: リノレン酸 (多重不飽和脂肪酸)。
- (5) アミノ酸: 組換え・対照の両区ともすべてのアミノ酸を含有していた。光処理によるアミノ酸の増減はあったが、組換え区と対照間には明瞭な質的・量的関係は見出せなかった。
- (6) グリコアルカロイド: 主要毒素として  $\alpha$ -chaconine 及び  $\alpha$ -solanine があるが、組換え・対照間に有意差はなかった。
- (7) 総括: ジャガイモキバガ抵抗性組換えバレイショは塊茎成分において、非組換え対照と有意差を生じなかった (例外アミノ酸)。これにより、本組換えバレイショの実質的・栄養的同等性が確認された。

(林 健一)

## Evaluation of endophyte toxin production and its interaction with transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) with altered expression of fructosyltransferases

### 改変 fructosyltransferase 発現組換え多年生ライグラス (*Lolium perenne* L.) における内在エンドファイトの毒素作出と親作物との交互作用の評価

Giraldo PA *et al.*

2018

Transgenic Research 27: 397-407

オーストラリアの大学及び民間の研究者による原著論文である。多年生ライグラス (*Lolium perenne* L.、和名ホソムギ) は、多収・良質・良食味・放牧持続性など優れた特性を有し、温帯の最重要牧草の一つである。近年は富栄養飼料による増産のために、高カロリー（高可溶性炭水化物）多年生ライグラスの育種が進められ、すでに代謝エネルギー換算で乾物1kgあたり0.6~1.7 MJ増加した高エネルギー多年生ライグラスが作出されている（後述）。一方、多年生ライグラスはエンドファイト（内生菌）としてエピクロエ属を有する。多年生ライグラスとエピクロエは相互受益関係にあり、後者は外敵保護・棲息・養水分補給を受け、前者は生物的（草食害虫・線虫）及び非生物的（乾燥・低栄養）ストレスの軽減をうけている。草食害虫抵抗性はエピクロエが含有する4種類のアルカロイドに依存しアルカロイドの過剰発現は牛に対し毒性を示す。アルカロイド含量にはエンドファイトの種及び系統が関与し、さらに環境条件とくに高カロリー栄養分（高可溶性炭水化物）との関与が報告されている。従って、多年生ライグラスに対してはプラス、牛に対しては毒性を示さないという適正濃度のアルカロイド発現は極めて重要課題であり、また規制上のリスク評価の一環として、極めて重要な課題である。著者らは最近作出した高カロリー多収遺伝子が、内在するアルカロイド含量に与る影響を調査して、以下の結果を得た。

- (1) 供試多収品種（遺伝型）：既往研究により、フルクタン合成系の2酵素（*sucrose: sucrose 1-fructosyl transferase (1-SST)* 遺伝子及び*6-glucose fructosyltransferase (6G-FFT)*）の融合分子 *SST-FFT* を設計し、これをルビスコプロモーター制御で発現する発現カセットを多年生ライグラス品種 FLp418-20 にバイオリスティック法により導入し、フルクタン生合成能力が増大した高エネルギー多収組換え品種が作出された。T<sub>0</sub>世代で高エネルギー・高栄養性が顕著な系統（event 10）が選抜され、以後の交配試験における花粉親として使用された。
- (2) 供試多年生ライグラス品種：慣行3品種が種子親として供試された。
- (3) エンドファイト：供試多年生ライグラス各品種は、以下のエンドファイトのなかのいずれか1種類ずつを含有していた。①共通標準種：1；②市販種：2；③未市販種：4；計7種類。
- (4) 交配試験（温室）：エンドファイトは母性遺伝のため、(2)×(3)の組合せが受粉親となり、(1)の *SST-FFT* 組換え系統が花粉親になり、総当たり交配が実施された。299の T<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> 個体（生育6週間）の茎葉が採取され、アルカロイド含量が検定された。
- (5) アルカロイド含量：遺伝子導入×品種×エンドファイトの総組合せにおけるアルカロイド含量は、若干の変動はあったが、全般的には組換え区と非組換え区との間には有意差はなく、新しいリスクは検出されなかった。
- (6) 総括：高カロリー（高可溶性炭水化物）・高バイオマス多年生ライグラスの作出のために導入された融合フルクタン合成遺伝子の導入は、エンドファイトの存在及びアルカロイド濃度に有意差を生じず、新しいリスクは検出されなかった。本結果は、バイオテクノロジーの作物育種への適用の参考になると考えられる。 (林 健一)

## Expression of CphB-and CphE-type cyanophycinases in cyanophycin-producing tobacco and comparison of their ability to degradate cyanophycin in plant and plant extracts

### シアノフィシン産生タバコにおける CphB 型及び CphE 型シアノフィシン分解酵素の発現と両酵素の分解能力の比較

Ponndorf D *et al.*

2017

Transgenic Research 26: 491-499

ドイツの大学研究者による原著論文である。アルギニンは塩基性アミノ酸の一種であり、飼料作物のアルギニン含量増加は、家畜への安価・簡便・豊富なアルギニン供給となると考えられている。多くの藍色細菌及び一部の非光合成細菌が産生するシアノフィシンは、アルギニンとアスパラギン酸からなるポリペプチドでアルギニンを豊富に含む。これまでに古細菌由来のシアノフィシン合成酵素遺伝子 (*cphA*) を植物に導入することで、シアノフィシン産生組換え植物の作出がいくつかの植物で報告されている。シアノフィシンはプロテアーゼでは分解されないが、細菌が有するシアノフィシン分解酵素 (cyanophycinases) によって、 $\beta$ -Asp-Arg-ジペプチドに分解される。 $\beta$ -Asp-Arg-ジペプチドは、遊離アミノ酸よりも吸収され易く栄養価が高い。著者らは、シアノフィシン合成酵素遺伝子とシアノフィシン分解酵素遺伝子の共発現により、飼料としての利用価値の向上を目指し、モデル植物であるタバコで検証を行い、以下の結果を得た。

- (1) 供試組換えタバコ品種：シアノフィシン合成酵素遺伝子をアグロバクテリウム法によりタバコ品種 BG に導入したシアノフィシン産生形質転換タバコ (イベント BG176) を作出し、シアノフィシン産生植物材料とした。これにアグロバクテリウムを用いた減圧浸潤法により細胞内型シアノフィシン分解酵素 (CPHB) あるいは細胞外型シアノフィシン分解酵素 (CPHE) を発現するコンストラクトを導入し、シアノフィシン合成酵素と分解酵素が共存する植物を作出した。
- (2) 均質化 (homogenization)：哺乳類動物の消化作用の代替として、葉緑体膜を破壊して細胞内を均質化する処理を行い、シアノフィシン合成酵素と分解酵素との直接接触効果を調査した。
- (3) *in vitro* 試験：精製 CPHB 5 $\mu$ g、CPHE 0.5 $\mu$ g、可溶性タンパク質100 $\mu$ g (イベント BG176粗抽出物) の培養試験を行った。CPHE の活性は CPHB より顕著に高く、10倍量の CPHB を加えた区と比べて約1/2の時間で分解した。精製シアノフィシン20 $\mu$ gとの *in vitro* 試験でも CPHE の活性は CPHB よりはるかに高かった。
- (4) 植物体 (成熟葉) 試験：1) CPHB 活性：均質化前の葉緑体内あるいは均質化後の細胞ゾル内のシアノフィシンに対して、分解活性を示さなかった。2) CPHE 活性：均質化前の葉緑体内シアノフィシンに対しては、葉緑体膜による隔離により分解活性を示さなかった。しかし均質化後は高い分解活性を示し、均質化直後のシアノフィシン濃度21 $\mu$ g/mg 乾燥重が24時間後には1 $\mu$ g/mg 乾燥重へと激減した。
- (5) 総括：アルギニン含有ポリペプチドシアノフィシン (葉緑体内存在) と CPHE 型シアノフィシン分解酵素との植物体内の共存は可能であり、細胞均質化 (哺乳類消化作用に相当) 後は、より栄養価が高いジペプチドが直ちに産生されることが示された。タバコを用いた本結果は、飼料作物の栄養価向上の基礎資料と位置づけられる。 (林 健一)



## Non-target effects of hyperthermostable $\alpha$ -amylase transgenic *Nicotiana tabacum* in the laboratory and the field

### 実験室及びほ場における超耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ組換えタバコの非標的影響

Scott IM *et al*

2019

Frontiers in Plant Science 10: 878

カナダの公的研究機関研究者による報告。耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼは多くの工業プロセスで利用される重要な酵素である。先行研究により、古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (PFA) をタバコに導入することで、PFA タンパク質の高蓄積を可能とした。著者は、本組換えタバコの実用化に向け、実験室及びほ場栽培による環境リスク評価試験を実施した。

- (1) 植物材料: 4品種のタバコで PFA 産生組換えタバコを作成し、4 品種から各 1 系統、合計 4 系統を実験用いた。
- (2) ニコチン蓄積量: 非組換え体での葉新鮮重あたりのニコチン生産量は、品種 Con Havana (8.68/4.45) と品種 Little Crittenden (3.66/5.39) で高く、次いで品種 TI95 (0.97/0.72)、品種 81V9 (0.30/0.27) が最低であった (2 栽培期それぞれの平均値、単位は mg/g)。この傾向は、温室栽培での試験結果と同様であった。また、組換え体のニコチン量も、それぞれの背景品種とほぼ同様であったことから遺伝子導入による影響はないと評価された。
- (3) PFA 蓄積量: ほ場栽培下での PFA 生産量は、TI95組換え体 (2.47)、Little Crittenden 組換え体 (2.09)、Con Havana 組換え体 (1.97) で高く、81V9組換え体 (0.21) は低かった (平均値、単位は mg/g)。ニコチンと PFA 蓄積量の間には、ある程度相関があった。
- (4) アブラムシ数: ほ場栽培での非組換え体の葉あたりのアブラムシの数は、品種 Little Crittenden (平均62.0)、品種 TI95 (53.7)、品種81V9 (30.2)、品種 Con Havana (16.0) の順で、ニコチンや PFA の蓄積量と (負の) 相関はない。
- (5) アブラムシの成長への影響: PFA 産生組換え体を摂食したアブラムシの短期的 (5日後) 生存率及び繁殖力は、非組換え体摂食個体と相違なかった。
- (6) 非標的昆虫への影響: タバコスズメガの幼虫の生存、最終令幼虫の体重、及び成虫に至るまでの時間は、温室での試験結果では PFA 産生組換え体摂食及び非組換え体摂食の間で有意な差がみられたものの、ほ場環境での試験結果では有意差はなかった (例外あり)。
- (7) 総括: PFA 産生組換えタバコの生物多様性影響について、実験室での試験結果がほ場試験によって確認された。ほ場試験により、非標的生物 (アブラムシ及びタバコスズメガ) への無影響が確認された。

(小口 太一)

## CRISPR might be the banana's only hope against a deadly fungus

### CRISPR はバナナを死のカビから救う唯一の希望

Maxmen A

2019

Nature 574: 15

Nature 誌リポーターによる短報。

- (1) バナナ危機：コロンビア政府は先月（2019年8月）、Fusarium wilt tropical race 4 (TR4) のアメリカ大陸への侵入を確認した。世界のバナナの出荷量の99%を占める最重要品種であるキャベンディッシュはTR4に対して抵抗性を持たないため、緊急な対応が求められている。
- (2) 組換え手法による試み：オーストラリア・クイーンズランド工科大学のJames DaleらのチームはTR4抵抗性の野生バナナ *Musa acuminata malaccensis* に着目し、単離したTR4耐性遺伝子を組換え手法にてキャベンディッシュに導入する耐病性育種を進めている。2017年に小規模なほ場試験により有望な結果を発表した後、2018年からはオーストラリア北部のTR4感染地域で半ヘクタールの組換えキャベンディッシュのほ場試験を展開している。対照の非組換えキャベンディッシュの約3分の1が罹病しているの対し、組換えバナナは順調に機能しているという。
- (3) 規制障壁：2021年のほ場試験終了後、Daleらは組換えキャベンディッシュバナナの販売承認をオーストラリアの規制当局に申請する予定だが、当局が承認するかどうか、または承認にかかる期間を予測することは困難である。
- (4) ゲノム編集手法による取り組み（1）：Deleらのチームは、CRISPRを使用したゲノム編集手法によるTR4耐病性育種を進めている。ゲノム編集手法では、キャベンディッシュで休眠している遺伝子をオンにすることで、*Musa acuminata malaccensis* で同定されたTR4抵抗性遺伝子の活性を狙っている。ただし、研究は初期段階で、「これらが試験のためにフィールドに入るまでに数年かかるでしょう」とDaleらは言っている。
- (5) ゲノム編集手法による取り組み（2）：ケニアのナイロビにある国際熱帯農業研究所の分子生物学者であるLeena Tripathiは、遺伝子編集ツールを使用して、植物をTR4に対して脆弱にしていると思われるキャベンディッシュの遺伝子を抑制している。研究はまだ組織培養段階であり実用化には時間を要す。
- (6) ゲノム編集手法による取り組み（3）：英国のノーリッチにあるバイオテクノロジーの新興企業Tropic Biosciencesは、miRNAによる病原体遺伝子の発現抑制機構に着目し、CRISPRを使用して、キャベンディッシュのRNA鎖を編集し、TR4の遺伝子のサイレンシング技術の開発を目指している。
- (7) ゲノム編集は規制されないのか？：2016年、米国農務省は、CRISPRを使用してゲノムが編集されたキノコを規制しないことを決定し、ゲノム編集バナナも同様に処理されるであろうことを示唆した。また、コロンビア、チリ、ブラジル、日本、イスラエルの政府は、ゲノム編集作物に対して寛容な対応をとることを公式に示している。しかし、欧州連合は、ゲノム編集作物を他のGM食品と同様に厳密に評価すると述べている。
- (8) バイテク以外のアプローチも重要：スウェーデン大学のRodomiro Ortizは、バイオテクノロジーソリューションにのみに期待をかけることに警鐘をならし、キャベンディッシュ以外に1000種類以上あるとされるバナナの遺伝資源の中から、キャベンディッシュの代替となる品種を市場に送り出す試みも必要だと主張する。（小口 太一）



# ERA プロジェクト調査報告

2019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 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)