

---

# ERAプロジェクト調査報告

---

August 2020

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

2020.08

バイオテクノロジー研究会

2020年の調査報告書第4号（通算第51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、脱皮関連遺伝子の発現抑制によるコロラドハムシ抵抗性バレイショの作出（No.500）、高温下でもアミロース含量の高い遺伝子組換えイネの作出（No.501）、フィターゼ活性が向上した遺伝子組換えオオムギの作出（No.502）、オオムギでの複数病害抵抗性の発現と農業形質の維持（No.503）、パルミチン酸を含むC16脂肪酸含量が増加した遺伝子組換えワタの作出（No.504）、シュウ酸オキシダーゼ導入による菌核病抵抗性ダイズの作出（No.506）、*Bt*ワタにおけるワタミハナゾウムシ抵抗性の発現（No.507）をご紹介します。

また、遺伝子組換え作物の評価に関する基礎的な知見として、イネのセルロース合成酵素変異株における農業形質及びバイオマス収量の向上とセルロースの結晶性及び重合度の解析（No.505）、ブラジルの圃場試験で評価されたダイズ、トウモロコシ、ワタの害虫抵抗性や除草剤耐性を特性とする単一イベント及びそれらを掛け合わせたスタック品種間での農業形質の比較（No.508）をご紹介します。

さらに、海外での状況の報告事例として、アルゼンチンにおけるゲノム編集のような新たな育種技術に対する規制方針と承認状況に関する総説（No.509）についてご紹介致します。

なお、これまでに調査報告書でご紹介した文献抄訳は、以下のURLで閲覧可能です。

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

# 目次

No.500	ヘアピン RNAi コンストラクトによる脱皮関連 <i>EcR</i> 遺伝子の発現抑制に基づく コロラドハムシ抵抗性組換えバレイショの作出 Transgenic potato lines expressing hairpin RNAi construct of molting-associated <i>EcR</i> gene exhibit enhanced resistance against Colorado potato beetle ( <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> , Say) .....	1
No.501	イネ胚乳における <i>OsMADS7</i> 遺伝子の発現抑制による高温ストレスにおける アミロース含量の安定化 Suppression of <i>OsMADS7</i> in rice endosperm stabilizes amylose content under high temperature stress .....	2
No.502	<i>HvPAPhy_a</i> 遺伝子導入による組換えオオムギの成熟植物体及び 穀粒における高度・安定的フィターゼ活性の達成 Barley <i>HvPAPhy_a</i> as transgene provides high and stable phytase activities in mature barley Straw and in grains .....	3
No.503	病原菌誘発 <i>Ta-Lr34res</i> 遺伝子の導入による負の多面的発現を伴わない 病害抵抗性非相同オオムギの作出 Pathogen-inducible <i>Ta-Lr34res</i> expression in heterologous barley confers disease resistance without negative pleiotropic effects .....	4
No.504	$\beta$ -ケトアシル-ACP シンターゼ II (KASII) をコードする <i>ghKAS2</i> 遺伝子の RNAi 発現抑制による綿実油中のパルミチン酸蓄積の遺伝的増強 Genetic enhancement of palmitic acid accumulation in cotton seed oil through RNAi down-regulation of <i>ghKAS2</i> encoding $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II (KASII) .....	5
No.505	イネセルロース合成酵素 <i>OsCESA9</i> の保存領域の突然変異体によるセルロース重合度 (DP) 及び結晶性の低下に基づく植物倒伏耐性及びバイオマス糖化性の向上 <i>OsCESA9</i> conserved-site mutation leads to largely enhanced plant lodging resistance and biomass enzymatic saccharification by reducing cellulose DP and crystallinity in rice .....	6
No.506	コムギ由来のシュウ酸オキシダーゼの過剰発現による 菌核病 (Sclerotinia stem rot) 抵抗性ダイズ系統の作出 Enhanced resistance to sclerotinia stem rot in transgenic soybean that overexpresses a wheat oxalate oxidase .....	7
No.507	Cry10Aa 毒素の発現によるワタミハナゾウムシ高度抵抗性組換えワタの作出 Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton ball weevil .....	8
No.508	ダイズ、トウモロコシ、およびワタにおける単一 イベントとスタックイベントの間の農業特性および表現型の比較 Comparing agronomic and phenotypic plant characteristics between single and stacked events in soybean, maize, and cotton .....	9
No.509	遺伝子編集規制とイノベーション経済学 Gene Editing Regulation and Innovation Economics .....	10

**Transgenic potato lines expressing hairpin RNAi construct of molting-associated *EcR* gene exhibit enhanced resistance against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say)**

ヘアピン RNAi コンストラクトによる脱皮関連 *EcR* 遺伝子の発現抑制に基づくコロラドハムシ抵抗性組換えバレイシヨの作出

Hussain T *et al.*

2019

Transgenic Res 28: 151-164

トルコの大学研究者による原著論文である。バレイシヨは、コムギ・イネ・トウモロコシに次ぐ4番目の重要作物であるが、害虫被害が34%に達し、特にコロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*, Say; コロラドポテトビートル) は世界各地における最悪の害虫である。近年は *Bt* 作物抵抗性害虫も発生し、代替の効果的防除法の開発は緊急課題であった。著者らは RNAi 手法による脱皮関連遺伝子の抑制によるコロラドハムシの防除を目標とし、以下の結果を得た。

- (1) 組換えバレイシヨの作出：コロラドハムシの脱皮誘導ホルモン受容体をコードする *EcR* 遺伝子を標的とする RNAi 分子を作成、これを発現するコンストラクトをアグロバクテリウム法により、バレイシヨ慣行品種 Agria 及び Lady Olympia に導入し、各品種とも4個体ずつの組換え体 (T<sub>0</sub>世代) を得た。
- (2) 組換えバレイシヨ葉の標的害虫に対する毒性検定：コロラドハムシの幼虫 (1齢・2齢・3齢) に組換えバレイシヨの葉を24・48・72時間給餌し、致死率を調査した。品種 Agria 組換え体における致死率 (% ; 24・48・72時間の順に列記) は、1齢虫 (5~20・15~30・20~40)、2齢虫 (0・15~20・15~30)、3齢虫 (0・0~15・25~40) であった。品種 Lady Olympia 組換え体では、1齢虫 (10~20・20~30・40~80)、2齢虫 (0・10~20・15~30)、3齢虫 (0・10~20・30~60) であった。
- (3) 供試害虫の体重変化：対照区では1齢虫が6.45~6.53倍の体重増であった。組換え葉では、1齢虫が1.83~2.44倍、2齢虫が1.35~2.65倍、3齢虫では0.87~1.13倍であり、体重の増加率の低下が顕著であった。
- (4) 供試害虫における *EcR* 転写物量：組換えバレイシヨ葉を摂食したコロラドハムシは、組換え体中の RNAi 分子により内生 *EcR* 転写物量が抑制される。各発達段階での対照区の *EcR* 転写物量を1.0とすると、組換えバレイシヨ葉摂食区の *EcR* 転写物量は、1齢虫で0.2~0.8、2齢虫で0.2~0.8、3齢虫で0.3~0.8であり、全てで減少がみられた。
- (5) 総括：コロラドハムシの脱皮を阻害する RNAi 手法の適用により、新規の害虫抵抗性組換えバレイシヨが作出された。組換え葉によるコロラドハムシの致死率の最高値は若齢虫で~80% (72時間給餌) に達した。本手法は *Bt* 作物に代る新しい害虫防除法として期待された。

(林 健一)

## Suppression of *OsMADS7* in rice endosperm stabilizes amylose content under high temperature stress

### イネ胚乳における *OsMADS7* 遺伝子の発現抑制による 高温ストレスにおけるアミロース含量の安定化

Zhang H *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 18-26

中国の国研研究者による原著論文である。地球の平均気温の上昇は多くの負の効果を生じている。イネ、特に日本型イネは高温感受性が高く、高温になると種子のアミロース含量が減少し、品質の低下を生じる。著者らは花器官のアイデンティティ決定に係る転写因子の遺伝子の一つである *OsMADS7* がイネの種子のアミラーゼ含量の安定化に関係していることを調査し、以下の結果を得た。

- (1) イネの胚乳 *OsMADS7* 転写量の温度反応：1) 高温による *OsMADS7* の転写量増加：日本型品種 日本晴の乳熟期（登熟初期）に高温処理（35°C/28°C）を行い、*OsMADS7* 転写量の変化を調べた。対照区である室温（RT：28°C/22°C）では、授粉後6、9、12、15日後の *OsMADS7* の転写量は、それぞれ1.0、0.5、0.2、0.1に対し、高温処理区では、それぞれ6.0、6.5、4.0、1.0でありいずれも高い転写量であった。
- (2) *OsMADS7* の恒常的抑制組換えイネ：先行研究で作出された、日本型品種 Zhonghua11 に対し RNAi 手法により恒常的に *OsMADS7* の発現を抑制した3系統（M714、M721、M734）を選抜して本研究で用いた（注：*OsMADS7* 単独の転写抑制は、花成や花器官形態に影響を与えないようだ）。
- (3) *OsMADS7* の恒常的抑制組換えイネのアミロース含量：高温処理により胚乳のアミロース含量は、非組換え体でも RNAi 系統でも大きく減少した。2系統（M721、M734）では、高温処理時のアミロース含量が非組換え体よりもわずかに高かった。
- (4) *OsMADS7* の恒常的抑制組換えイネの稔性への悪影響：高温処理により、非組換え体の稔性率は対照条件の76%から42.7%へ減少した。一方、RNAi 系統の稔性率は、対照条件で56~60%程度、高温処理で13.8~34.9%であり、いずれも非組換え対照よりも低率となった。
- (5) 胚乳特異的 *OsMADS7* 抑制組換えイネの作出：*OsMADS7* の恒常的抑制が稔性に悪影響を及ぼしたことから、胚乳特異的に発現するグルテリンプロモーター（*GluC* プロモーター）の利用により、胚乳特異的に RNAi 分子を発現する組換え体を新たに作成した（M7134、M7138、M7140、M7142、M7145、日本晴背景）。高温処理による対照処理からのアミロース減少率を調査したところ、非組換え体では35.6%であったが、調査した組換え体（T2世代）5系統では13.7~26.6%であり、非組換え体と比べて高温処理によるアミロース含量の減少が抑えられた。特に、うち1系統（M7134）では、高温処理と対照処理との間にアミロース含量の有意差がなかった。加えて、小穂の稔性は非組換え日本晴の76.9%に対し、組換え体のうち1系統（M7142）では69.1%と有意差がないことが確かめられた。以上から、胚乳特異的な *OsMADS7* 抑制により、高温処理での稔性問題がなく、アミロース含量の安定性を維持する品質向上イネの作出が可能となった。
- (6) 総括：花器官のアイデンティティ決定に係る *OsMADS7* の高温による発現誘導は、イネ種子のアミロース含量を低下させ、品質劣化を生じさせる。これを是正するための胚乳特異的な *OsMADS7* 抑制は、稔性低下がなく、高温下のアミロース含量を安定化する特性を有した。本手法は育種上有効であり、特に稔性の低下がない M7142 系統は有望な遺伝資源として期待された。

(林 健一)

## Barley *HvPAPhy\_a* as transgene provides high and stable phytase activities in mature barley Straw and in grains

### *HvPAPhy\_a* 遺伝子導入による組換えオオムギの成熟植物体及び穀粒における高度・安定的フィターゼ活性の達成

Holme I B *et al.*  
2017

Plant Biotechnology Journal 15: 415-422

デンマークの大学研究者による原著論文である。フィターゼ (phytase) は、フィチン酸を加水分解するフォスファターゼの一種である。フィチン酸は作物種子の最も重要な貯蔵リン化合物であり、種子の全リン化合物の40~80%を占める。フィチン酸は貯蔵形態で生物が利用するには、フィターゼによる加水分解が必要である。*Triticum* 属のコムギ・オオムギ・ライムギは登熟過程でフィターゼを糊粉層及び盤状体に蓄積する。非 *Triticum* 属のイネ・トウモロコシ種子のフィターゼ含量は極めて低い。また、非反芻動物の消化過程のフィターゼ活性も低い。このため、オオムギのフィターゼ活性の向上は極めて望ましい。著者らは、i) 成熟オオムギ種子のフィターゼ活性の向上、ii) 緑葉のフィターゼ活性の向上、iii) フィターゼ蓄積の成熟植物体の副産物としての利用の3つの目的の研究を実施し、以下の結果を得た。

- (1) 組換えオオムギの作出：春播きオオムギ品種 Golden Promise にオオムギ内生の穀粒で発現するフィターゼ遺伝子 *HvPAPhy\_a* を恒常的に発現させる発現カセット (*35S:PAPhy\_a*) を含むコンストラクトをアグロバクテリウム法により導入し、稔性のある T<sub>0</sub>17個体を得た。T<sub>0</sub>個体の穀粒におけるフィターゼ活性 (単位：フィターゼユニット；FTU/kg) は、対照の1,863に対し、1系統を除き有意に増加した (3,672~42,700)。
- (2) T<sub>2</sub>系統のフィターゼ活性：1) 止め葉 (最高活性葉)：対照の5,000 FTU/kg に対し、*35S:PAPhy\_a* 6.3.1、同6.3.2、同28.4.1系統は52,000 FTU/kg、同28.4.2は26,000と非常に高い活性を示した。2) 収穫直後成熟植物体：穀粒・穂軸・茎・葉・籾及び芒の5部分のフィターゼ活性 (FTU/kg) の範囲 (28.4.1,28.4.2,6.3.1系統を含む) は、穀粒：15,000~30,000；穂軸：8,000~21,000；茎：11,000~26,000；葉：8,000~50,000；籾及び芒：23,000~35,000であり、いずれも対照に対して非常に高い活性を示した。
- (3) 3年間貯蔵組換えオオムギ乾燥植物体のフィターゼ活性 (FTU/kg)：対照の1,000以下に対し、穀粒・穂軸・籾及び芒は、28.4.3系統では14,000・4,800・4,800；28.4.5系統では27,000・6,100・14,800；6.3.2系統では16,000・10,000・9,000であった。3年貯蔵の乾燥組換えオオムギにおいても高いフィターゼ活性が維持されていることは最初の知見として注目された。
- (4) 総括：*PAPhy\_a* の恒常的な発現により、収穫直後成熟植物体の全ての器官で対照の10~100倍の高いフィターゼ活性を有する組換えオオムギが作出された。特に3年貯蔵の乾燥組換えオオムギ植物体でもかなりのフィターゼ活性が維持されていることが初めての知見として注目された。本研究による従来の飼料・食餌に加えてオオムギの副産物 (粉末・肥料) として新しい利用価値が期待される。

(林 健一)

## Pathogen-inducible *Ta-Lr34res* expression in heterologous barley confers disease resistance without negative pleiotropic effects

病原菌誘発 *Ta-Lr34res* 遺伝子の導入による負の多面的発現を伴わない  
病害抵抗性非相同オオムギの作出

Boni R *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 245-253

スイスの大学研究者による原著論文である。うどん粉病 (powdery mildew) 及び赤さび病 (leaf rust) は、オオムギの主要病害である。いくつかの病害抵抗性遺伝子は、複数の病害に対して抵抗性を発揮するものがある。一方、ある種の抵抗性遺伝子の直接的・網羅的発現を適当なプロモーターにより、緩和・抑制することにより効果的抵抗性を発揮する場合がある。著者らは、これらの既往の成果を用いる複数病害 (うどん粉病・赤さび病) 抵抗性オオムギの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 最適コンストラクトの作成：コムギ *Ta-Lr34res* 遺伝子はコムギでは複数耐病性を発現する。これをオオムギに適用すると過剰発現し、幼苗で既に生育阻害を生じた。必要なのは病原菌の感染に即応じて発現する—pathogen inducible—抵抗性遺伝子であり、さらに *Ta-Lr34res* の発現を緩和する作用を有するプロモーターである。これに最適なプロモーターとしてオオムギ由来の *Hv-Ger4C* プロモーターが選定された。この結果両者が結合した *Hv-Ger4C* :: *Ta-Lr34res* コンストラクトが作成された。
- (2) 組換えオオムギの作出：オオムギ品種 Golden Promise に上記コンストラクトをアグロバクテリウム法により導入し、T<sub>0</sub>19個体を得た。T<sub>1</sub>16系統からうどん粉病罹病性8系統、Leaf Tip Necrosis 発症6系統を除去し、系統8及び11の2系統を選出した。
- (3) 組換えオオムギ T<sub>2</sub>系統の耐病性検定：1) 赤さび病：非組換え対照系統は病菌孢子が全面的に発生した。これに対して系統8では孢子発生は極微、さらに周縁のクチクラ的構造により明瞭な抵抗性を示した。系統11は系統8には及ばないが、孢子発生は軽度であった。2) うどん粉病：系統8及び11ともに軽微の孢子堆の発生にとどまり高い抵抗性を示した。同様な結果は圃場類似条件でも得られた。以上の結果から、系統8及び11の複数病害抵抗性が確認された。
- (4) 病原菌細胞壁キチン質量：ガラス室及び圃場類似条件下で、組換えオオムギ系統8及び11の影響下にあるキチン質量は有意に低下し、組換えオオムギによる抑制効果が明示された。
- (5) 組換えオオムギの農業形質 (収穫期)：ガラス温室及び圃場類似条件で調査を行った。1株穂数及び粒重、総乾物重、1穂粒数、1000粒重などには組換え系統と対照との間に有意差はなく、農業形質への負の影響は検出されなかった。
- (6) 総括：最適コンストラクトの導入により、2病害 (赤さび病・うどん粉病) への複数病害抵抗性及び正常な農業形質を有する組換えオオムギ系統が作出された。本手法の他オオムギの品種への適用による育種材料の増強が期待される。

(林 健一)



## Genetic enhancement of palmitic acid accumulation in cotton seed oil through RNAi down-regulation of *ghKAS2* encoding $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II (KASII)

$\beta$ -ケトアシル-ACP シンターゼ II (KASII) をコードする *ghKAS2* 遺伝子の RNAi 発現抑制による綿実油中のパルミチン酸蓄積の遺伝的増強

Lu Q *et al.*

2017

Plant Biotechnology Journal 15: 132-143

オーストラリア及び中国の国研研究者による原著論文である。綿実油の50%以上はリノール酸 (C18不飽和脂肪酸)、25%はパルミチン酸 (C16飽和脂肪酸) である。リノール酸は酸化に不安定であり食用には不適である。このため、綿実油のリノール酸を減少し、パルミチン酸を増加することが望ましい。これにより酸化安定性を増加し、またマーガリン・菓子類の製造に必要な融点の上昇が期待される。著者らはパルミチン酸がC16、リノール酸がC18であるのに着目し、脂肪酸合成の伸長にかかわる酵素である  $\beta$ -ケトアシル-ACP シンターゼに着目し、RNAi 手法により、 $\beta$ -ケトアシル-ACP シンターゼの発現を抑制することで、パルミチン酸高含量綿実油の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 抑制標的 cDNA の分離：ワタ種子 cDNA ライブラリーより2つの *KAS2* cDNA を分離し、*ghKAS2-1* 及び *ghKAS2-2* と命名した。両者は78.7%のアミノ酸相同性を有した。
- (2) RNAi コンストラクト構築：*ghKAS2-1* に対して逆位反復配列構造の RNAi カセットが構築された。これをアグロバクテリウム法によりワタ品種 Coker315 に導入し、T<sub>0</sub>6 個体を得た。
- (3) 組換えワタ系統の選別：T<sub>0</sub>6 個体中4個体は雄性不稔のため除去し、残った2個体から KIR-1 及び KIR-10 の2系統を展開した。
- (4) 組換えワタ系統の脂肪酸組成：世代ごとに、Null・KIR-1・KIR-10 の順に組成を列記した。  
T<sub>2</sub> 世代：C16:0 (24.1・54.1・48.0)、C16:1 (0.9・9.7・11.2)、C16:2 (0.0・2.2・2.2)；T<sub>3</sub> 世代：C16:0 (24.1・51.0・49.5)、C16:1 (0.9・11.2・10.7)、C16:2 (0.0・2.8・2.1)；T<sub>4</sub> 世代：C16:0 (24.1・50.2・48.9)、C16:1 (0.9・10.9・11.8)、C16:2 (0.0・2.2・2.6)、以上から、1) パルミチン酸 (C16:0) は突出して50%前後の高い含量を示した。2) 他のC16の不飽和脂肪酸 (16:1 及び 16:2) も null 系統より高い含量を示した。3) C18 系統はすべて5%以下 (例外18:2)、4) パルミチン酸の高含量は T<sub>1</sub>~T<sub>4</sub> 世代を通じて安定して遺伝された、などが示された。
- (5) 各脂質中のパルミチン酸含量：4種類の脂質 (総脂質・TAG・その他2種類) の中でも (4) と類似したパルミチン酸の高含量が示された。
- (6) 油含量 (Oil content) の減少：対照 (Coker315)・KIR-1・KIR-10 の油含量は、T<sub>4</sub> で 22.8・21.3・21.3 (%)；T<sub>5</sub> で 23.6・22.0・21.5 (%) と、いずれも T<sub>4</sub>~T<sub>5</sub> 世代で、僅かながら有意に低下した。
- (7) 発芽率：T<sub>4</sub> 世代発芽率は高温区 (28℃) が低温区 (18℃) より有意に高かった。また系統・生育・活性・収量は正常であった。
- (8) 他系統との交配：高パルミチン酸系統と高オレイン酸系統との交配では、両特性の同時的向上が可能であった。
- (9) 総括：*KAS2* の発現抑制を目標とした RNAi コンストラクトの発現により、C16脂肪酸 (パルミチン酸及びパルミチン酸より合成されるC16不飽和脂肪酸) の含量が突出して増加し、逆にC18脂肪酸が低下した組換え綿実油が作出された。本綿実油は温帯全般、一年生、などの特性を有し、ヤシ油の代替として期待されると考えられる。

(林 健一)

## OsCESA9 conserved-site mutation leads to largely enhanced plant lodging resistance and biomass enzymatic saccharification by reducing cellulose DP and crystallinity in rice

イネセルロース合成酵素 OsCESA9の保存領域の突然変異体によるセルロース重合度 (DP) 及び結晶性の低下に基づく植物倒伏耐性及びバイオマス糖化性の向上

Li F *et al.*  
2017

Plant Biotechnology Journal 15: 1093-1104

中国の大学・国研及び米国の大学研究者による原著論文である。イネは世界的食用作物であるとともに、その膨大なバイオマスは、バイオ燃料及び化学製品の原料となっている。セルロースは植物細胞の主要成分として機械的強度と形態形成の主要素となっている。著者らは2008年に日本型イネ品種日本晴の突然変異誘発圃に既往の変異とは異なる変異体を見出し、セルロース特性を中心に幅広い調査を行い、以下の結果を得た。

- (1) *Osfc16*変異体の特性：セルロースはセルロース合成酵素 (CESA) により生成される。突然変異 *Osfc16*は劣性突然変異で、CESA9タンパク質中で植物間で高く保存される領域である P-CR 領域 (plant-conserved region) のアミノ酸置換により、野生型 (日本晴) に比べ25%~41%高いバイオマス収量を示す。
- (2) *Osfc16*変異体の農業形質：各形質における日本晴と *Osfc16*変異体の特性値を列記した。1) 穂乾物重 (g/株) : 42.42 ; 2) 草丈 (cm) : 100.88 (-12%) ; 3) 倒伏指標 (小なほど倒伏難) : 75.58 (-23%) ; 4) バイオマス乾物重 (g/株) : 38.55 (+41%) ; 5) 分けつ数 (本/株) : *Osfc16*変異体は日本晴に対し59~68%増。以上から *Osfc16*変異体は日本晴に対し、同等収量・短稈・多げつ化・倒伏耐性・バイオマス増、などの特性向上が示された。
- (3) バイオマス糖化量及びエタノール生産の増加：1) 糖化量：アルカリ前処理 (NaOH 0.5, 1.4%) によるヘキソース (六単糖) 放出量を日本晴と *Osfc16*変異体で対比した (%セルロース) : アルカリ0.5%区 (25:50) ; 1%区 (45:75) ; 4%区 (75:95)。2) 糖化量：酸前処理 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.5, 1, 2%) : 0.5%区 (35:50) ; 1%区 (40:55) ; 2%区 (45:60)。以上から、糖化量は処理濃度の上昇により増加し、また同じ処理濃度ではすべて *Osfc16*変異体が日本晴より多量であった。類似の他の2種類の前処理によるヘキソース放出量も同様な傾向を示した。3) エタノール生産量 (%ヘキソース) : 前処理7.5% CaO 区 (24:33) ; 前処理1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>区 (30:40)。いずれも *Osfc16*変異体では、日本晴より34~42%多いエタノールを生産した。
- (4) 細胞壁の組成と構造：*Osfc16*変異体は日本晴に対し、セルロースは18%減、ヘミセルロースは16%増、リグニンは同等であった。*Osfc16*変異体は茎直径がやや小、二次細胞壁がやや薄かった。
- (5) セルロース結晶性 (crystallinity) に低下：*Osfc16*変異体の出穂期における結晶性指標 (Crl) は日本晴と比較して、第2節間で39%減、第3節間で7.8%減、第4節間で23.4%、第2次細胞壁が多い成熟茎では36%減であった。
- (6) セルロース重合度 (Degree of Polymerization: DP) の低下：籾がら及び茎の DP は *Osfc16*変異体が日本晴より28~30%低下していた。以上の Crl 及び DP の *Osfc16*変異体における低下は、倒伏耐性及びバイオマス糖化性の向上に貢献していると考えられる。
- (7) 総括：イネセルロース合成酵素 CESA9の保存領域中の2アミノ酸が置換した *Osfc16*変異体の各種特性が調査された。*Osfc16*変異系は日本晴に対し、同等収量、農業特性向上、バイオマスの25~41%増収を示した。またセルロースの重要特性である結晶性及び重合度がともに低下し、倒伏耐性・バイオマス糖化性及びエタノール生産量の増加を示した。*Osfc16*変異体のバイオマス産業への適用が期待される。

(林 健一)

## Enhanced resistance to sclerotinia stem rot in transgenic soybean that overexpresses a wheat oxalate oxidase

### コムギ由来のシュウ酸オキシダーゼの過剰発現による菌核病 (Sclerotinia stem rot) 抵抗性ダイズ系統の作出

Yang *et al.*

2019

Transgenic Res 28: 103-114

中国国研研究者による原著論文である。菌核病 (Sclerotinia stem rot) は糸状菌 *Sclerotinia sclerotiorum* による非宿主特異的の壊死性の病害であり、ダイズではシスト線虫に次ぐ2番目の大病害である。しかし、抵抗性品種はまだ育成されていない。著者らは、コムギ由来の抵抗性遺伝子の導入による抵抗性ダイズ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 抵抗性遺伝子の特定: *S. sclerotiorum* は、ダイズの茎・葉・種子などに接触感染し、感染部位にシュウ酸などの病原生理物質を分泌する。シュウ酸は細胞壁破壊酵素の活動を助長し、さらに内在する過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) (細胞壁防御機能を有す) を分解する。このため、シュウ酸が *S. sclerotiorum* の病原性発現の元凶であると理解されている。これに対して、コムギの胚珠由来のシュウ酸オキシダーゼは、シュウ酸を  $H_2O_2$  に分解する機能を有する。このためシュウ酸オキシダーゼが *S. sclerotiorum* に対する抵抗性遺伝子と特定された。
- (2) 組換えダイズの作出: 前出のシュウ酸オキシダーゼ遺伝子を、ダイズ品種 Williams82 にアグロバクテリウム法で導入し、65の  $T_0$  個体を得た。以後、シュウ酸オキシダーゼ発現が高い2系統 (L15及びL35) を選出し、 $T_3 \sim T_4$  世代 (同型接合体) を供試した。
- (3) 組換えダイズ系統の *S. sclerotiorum* 抵抗性: 1) 主茎 (生育6週間ダイズの分離主茎の接種試験): *S. sclerotiorum* による感染は軽度であり感染領域の長さの非組換え体に対する減少率は58.71~82.73%であった。2) 葉 (生育6週間ダイズの分離完全展開葉の接種試験): 主茎と同様に感染程度は軽度であり、非組換え体に対する感染面積の減少率は、76.67~82.0%であった。以上、茎及び葉は高度の *S. sclerotiorum* 抵抗性を示した。
- (4) 外部投与シュウ酸に対する反応: 50mM のシュウ酸を組換えダイズの葉に投与して5日後の反応を調査した。葉の病徴は無~軽微であったが、非組換え体は顕著な褐斑を示した。
- (5) 農業形質 (収穫期): 組換えダイズの草丈・分枝数・莢数・種子数・種子重・100粒重は非組換え体と差異はなく、生育・農業形質は正常であった。
- (6) 組換えダイズのシュウ酸及び  $H_2O_2$  含量: シュウ酸オキシダーゼの活性は、シュウ酸の分解により生成する  $H_2O_2$  量に関連している。*S. sclerotiorum* 接種後のシュウ酸濃度の非組換え体に対する低下は44.36~51.58%、 $H_2O_2$  の増加は30.58~47.47%であった。以上から、組換えダイズの *S. sclerotiorum* に対する抵抗性の増強は、シュウ酸の低下及び  $H_2O_2$  の増加に起因すると考えられる。
- (7) 総括: コムギ由来のシュウ酸オキシダーゼ遺伝子の導入により、*S. sclerotiorum* による菌核病に対する抵抗性ダイズ系統が作出された。本抵抗性は、シュウ酸オキシダーゼによるシュウ酸濃度の低下及び同時進行の  $H_2O_2$  (過酸化水素) 濃度の増加に基づくものであった。

(林 健一)

## Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton ball weevil

### Cry10Aa 毒素の発現によるワタミハナゾウムシ 高度抵抗性組換えワタの作出

Rebeiro T P *et al.*  
2017

Plant Biotechnology Journal 15: 997-1009

ブラジルの国研・大学研究者による原著論文である。ワタミハナゾウムシ (*Anthonomus grandis*; cotton ball weevil) は南米のワタの最大害虫であり、収量・品質に多大の損害を与えている。CBW 防除対策は不十分であり、有効な抵抗性 *Bt* 品種はまだ開発されていない。著者らは新しい *Bt* タンパク質 Cry10Aa の導入による CBW 抵抗性ワタの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えワタの作出：ワタユビキチン化関連プロモーター (*uceA1.7*) の制御下で *Cry10Aa* を発現させるコンストラクトを慣行ワタ品種 BRS372に bombard 法により導入し、稔性・表現型ともに正常な T<sub>0</sub>11個体を得た。
- (2) 組換えワタにおける *Cry10Aa* 発現量：1) 転写物：11個体のうち最も高い発現量を示した4個体 (P#004, P#005, P#008, P#014) の qRT-PCR による *Cry10Aa* 転写量は、最も低い発現量を示した P#040に対し、葉では3.5~11.0倍、花芽では4.2~5.6倍の発現量であった。2) タンパク質量：ELISA 法による組換えワタにおける *Cry10Aa* タンパク質蓄積量は、葉では3.1~14 $\mu$ g/g 葉新鮮重；花芽では3.1~13.9 $\mu$ g/g 花芽新鮮重であった。
- (3) 組換え T<sub>0</sub>個体の標的害虫に対する抵抗性 (生物検定)：1) ワタミハナゾウムシ成虫に対する致死率：成熟葉15日間飼育では60~100%の致死率であり、特に p#006は80%、p#008は100%、p#082は90%の高い致死率を発現した。2) 幼虫に対する致死率：花芽20日間飼育では60~100%の致死率、特に p#005は95%、p#008は100%、p#068・p#082は90%の高い致死率を発揮した。
- (4) 標的害虫抵抗性の世代間伝達：1) *Cry10Aa* タンパク質量：11T<sub>1</sub>系統の含量は、葉で4.05~16.81 $\mu$ g/g 新鮮重、花芽で4.62~19.57 $\mu$ g/g 新鮮花芽であり、T<sub>1</sub>世代においても高い含量が確認された。2) 致死率は組換え葉による生物検定では、p#008の2系統は100%、それ以外の系統すべて90%以上の高い致死率を発揮した。以上、*Cry10Aa* タンパク質量及び致死率において、世代間の高い伝達率が示された。
- (5) 総括：新しい *Bt* タンパク質である *Cry10Aa* の導入により、ワタミハナゾウムシに対する高度の抵抗性を有する組換えワタ系統が作出された。特に p#008は、T<sub>0</sub>及び T<sub>1</sub>世代を通じ、致死率100%の完全抵抗性を発揮した。本結果はワタミハナゾウムシに対する高度な抵抗性系統の作出に関する初めての報告であり、今後の諸形質の検定を経て、市場化され、ワタ栽培の安定化への適用が期待されている。

(林 健一)

## Comparing agronomic and phenotypic plant characteristics between single and stacked events in soybean, maize, and cotton

### ダイズ、トウモロコシ、およびワタにおける単一イベントとスタックイベントの間の農業特性および表現型の比較

Jose M *et al.*

2020

PLoS One 15: e0231733

バイエルクロップサイエンス社ブラジル支社の規制担当部局による報文。新たな組換えイベントの開発は非常にコストがかかるが、既に特性やバイオセーフティ評価を経た既存のイベント同士の交雑と選抜により、複数の有用特性を併せもつ新イベント（スタックイベント）を得ることができると。筆者らは、ブラジル国内でこれまでに実施した単一イベント及びスタックイベントに関する圃場試験による農業特性及び表現型評価のデータの横断的な再評価を実施し、以下の結果を得た。

- (1) 対象圃場試験：ブラジル国内6地点（海拔：360～825m、緯度：南緯11°43'38"～南緯28°24'20"、気候帯：熱帯5及び亜熱帯1、土壌：酸性赤色ラトソル、赤色ラトソル、エンティソル、黄赤色ラトソル）で、2008-2017年の間に実施された圃場試験。
- (2) ダイズ：供試イベントは、単一イベント4（害虫抵抗性2、除草剤耐性2）、2重スタック2、4重スタック1の7イベント。比較農業形質は、生育初期株数、収穫期株数、開花期、倒伏率、草丈、穀粒重、1000粒重の7形質。成熟度グループ（MG）5（南部州）と8（北部州）に分けて複合フィールドサイト分析を実施した。単一イベント及びスタックの農業特性の大部分は、MG5間及びMG8間で対照と大きな違いはなかった。また、二重スタック（MON87708×MON89788）及び単一イベント（MON87708、MON89788）の3者間の特性値の比較では、いずれも有意差がなかった（例外1例）。4重スタック（MON87751×MON87708×MON87701×MON89788）も非組換え対照及び単一及び2重スタックと同様であり、有意差が発生した場合も従来品種の参照範囲内に収まることが確認された。
- (3) トウモロコシ：供試イベントは、単一イベント4（害虫抵抗性1、除草剤耐性1、害虫抵抗性+除草剤耐性2）、2重スタック1、4重スタック1の6イベント。比較農業形質は、生育初期株数、収穫期株数、出穂期、stay-green、着雌穂高、草丈、収量、1000粒重の8形質。全ての試験データを一括して複合フィールドサイト分析を実施した。2重スタック（MON89034×MON88017）及びその片親である単一イベント（MON88017）との比較では、いずれの特性値にも有意な違いはなかった（例外1）。4重スタック（MON87427×MON89034×MIR162×MON87411）についても単一イベント（MON87427、MON89034及びMON87411）や非組換えシステムとの間で有意な差はないか、有意差が見つかった場合でも従来品種の参照範囲内に収まることが確認された。
- (4) ワタ：供試イベントは、単一イベント2（害虫抵抗性1、除草剤耐性1）、2スタック1、3スタック1、4スタック1の6イベント。比較農業形質は、生育初期株数、収穫期株数、開花期、草丈、成熟期、収量の6形質。全ての試験データを一括して複合フィールドサイト分析を実施した。2重スタック（MON15985×MON88913）の特性値は、その交配親である単一イベント（MON15985及びMON88913）及び、従来品種との間で有意差はなかった。他の2重スタック及び4重スタックについても、単一イベントや非組換えシステムとの間で有意な差はないか、有意差が見つかった場合でも従来品種の参照範囲内に収まることが確認された。
- (5) 総括：ダイズ、トウモロコシ、ワタについて、害虫抵抗性や除草剤耐性を特性とする単一イベントの掛け合わせによるスタック品種の農業特性値は、単一イベントや従来品種と類似あるいは無視できる違いであることが確認された。

（小口 太一）

## Gene Editing Regulation and Innovation Economics

### 遺伝子編集規制とイノベーション経済学

Whelan AI *et al.*

2020

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8: 303

アルゼンチンの大学・規制当局による総説。アルゼンチンは、2015年5月に新しい育種技術(NBT)に起因する生物について、いち早く規制方針を発表し、最終製品において外来遺伝子が除去されていれば、LMOとして扱わないことを決定した。本稿では、それから4年間、この規制方針の運用とその経済に及ぼす影響について検討している。

- (1) アルゼンチンの規制方針：2015年5月にアルゼンチン農牧水産省は、NBT由来の作物に対して事前手続きを定め、バイオセーフティ委員会(CONABIA)が最終製品における外来遺伝子が残存しているかという観点から判断し、外来遺伝子が不在の場合にはGMOの規制対象外となる。ただし、非GMO扱いと判断された場合もバイオセーフティ委員会が何かしらの追加的措置が必要と判断した場合には、関連する政府部局に最終判断を要請する制度となっている。
- (2) 開発件数：アルゼンチンにおける2006年以來のGMO承認件数のトレンドは年によってばらつきがあるが、着実に増加する傾向にある。ここ4年間の非GMOに区分されるNBT承認件数はGMO承認件数のトレンドの8倍程度の傾きで安定的に急増している。
- (3) 開発者プロフィール：GMO開発者は海外多国籍企業が7法人(医薬品(ワクチン)3法人、種苗4法人)と大半を占め、国内企業・公的研究機関は2法人、海外中小企業は1法人であった。一方、非GMO NBT開発者は国内の企業と公的研究機関が併せて6法人、海外中小企業が6法人であり、海外多国籍企業の参入はわずか1企業であった。
- (4) 付与特性：GMO製品では、除草剤耐性作物が約5割、害虫抵抗性作物が約2割、ワクチン関連が約1割。対して、非GMO NBT製品では、健康機能性向上、収量性向上、工業的付加価値等の作物への付与特性の多様化に加え、動物製品(生産性向上、健康機能性向上)の開発も盛んにおこなわれている。
- (5) 生物種別分布：GMO製品では、作物(穀物、油糧作物、繊維作物)が約8割及びワクチン1割強。対して、非GMO NBT製品では、油糧作物は依然として多い(約3割)が、家畜が2割、野菜・果樹が1割程度に増加し、その他、水産魚類、鑑賞花き、牧草、微生物肥料等、多様な開発が行われている。
- (6) 遺伝子編集：非GMO NBTのうち86%はいわゆるゲノム編集技術によるものである。
- (7) 総括：ここ4年間の動向評価によると、アルゼンチンのNBTに対する規制判断(最終製品に外来遺伝子が不在の場合はGMOの規制対象としない)は、アルゼンチン国内の農業セクターのイノベーションを活発化したと考えられ、評価される。

(小口 太一)

# ERA プロジェクト調査報告

2020年 8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)