
ERAプロジェクト調査報告

October 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

2020.10

バイオテクノロジー研究会

2020年の調査報告書第5号（通算第52号）をお届けします。

本号では、非遺伝子組換え手法を利用した品種改良として、No.510でうどんこ病抵抗性コムギの作出を、No.512でゲノム編集技術を利用した低グルテンコムギの作出を紹介しています。

遺伝子組換え技術を用いた報告としては、No.511で塩害及び低栄養ストレス耐性イネの作出を、No.513ではエピジェネティックな変異がダイズの収量に与える影響を、No.514ではイネにおけるもち病抵抗性発現に寄与する新しい遺伝子を、No.515ではバイオ燃料生産のための易分解性スイッチグラス作出の試みを、No.516ではシロイヌナズナにおける光合成関連遺伝子の操作が収量に与える影響を、No.517ではダイズの二次代謝産物合成関連遺伝子が線虫抵抗性発現及び食害誘因性揮発性物質合成の両方に関与していることを報告しています。

No.518では、欧州における害虫抵抗性トウモロコシ上市後10年にわたる環境モニタリング調査の結果を報告しており、予期しない悪影響は無かったと結論づけています。

また No.519では、dsRNA を発現する遺伝子組換え作物の安全性評価について、現在の EU 規制との比較検討を行っています。

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>

目次

No.510	非組換え TILLING 手法による <i>mlo</i> 遺伝子に基づくうどんこ病抵抗性コムギ系統の作出 <i>mlo</i> -based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach	1
No.511	キクイモ由来の 2 つの NHX 型トランスポーターの導入による塩害及び低栄養ストレスに対する耐性イネ系統の作出 Two NHX-type transporters from <i>Helianthus tuberosus</i> improve the tolerance of rice to salinity and nutrient deficiency stress	2
No.512	CRISPR/Cas9 手法による低グルテン・非組換えコムギの作出 Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9	3
No.513	多収・安定ダイズ作出のための後生的育種システム An epigenetic breeding system in soybean for increased yield and stability	4
No.514	イネテルペン合成遺伝子 <i>OsTPS19</i> による (S)-limonene 合成機能並びに過剰発現によるいもち病菌 (<i>Magnaporthe oryzae</i>) 抵抗性の強化 The rice terpene synthase gene <i>OsTPS19</i> functions as an (S)-limonene synthase in planta and its overexpression leads to enhanced resistance to the blast fungus <i>Magnaporthe oryzae</i>	5
No.515	生物的変換のための難分解性の低減を目標とする組換えスイッチグラス (<i>Panicum virgatum</i>) 組換え系統の作出：改変系統の 2 年間圃場試験の比較解析 Transgenic switchgrass (<i>Panicum virgatum</i> L.) targeted for reduced recalcitrance to bioconversion: a 2-year comparative analysis of field-grown lines modified for target gene or genetic element expression	6
No.516	シロイヌナズナにおける光合成に関与する 3 酵素 (SBPase、FBPA、GDC-H) の同時発現増加は、CO ₂ 同化及びバイオマス、種子収量を増加させる Simultaneous stimulation of sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase and the photorespiratory glycine decarboxylase-H protein increases CO ₂ assimilation, vegetative biomass and seed yield in Arabidopsis	7
No.517	(<i>E, E</i>)- α -farnesene 遺伝子によるダイズの線虫防御機能及び昆虫食害により誘起される揮発性物質の合成 An (<i>E, E</i>)- α -farnesene synthase gene of Soybean has a role in defense against nematodes and is involved in synthesizing insect-induced volatiles	8
No.518	欧州連合における MON810 トウモロコシ上市後 10 年間の環境モニタリングの結果 Results from ten years of post-market environmental monitoring of genetically modified MON 810 maize in the European Union	9
No.519	dsRNA を発現する GM 作物のバイオセーフティ：データ要件と EU 規制に関する考慮事項 Biosafety of GM Crop Plants Expressing dsRNA: Data Requirements and EU Regulatory Considerations	10

***mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach**

非組換え TILLING 手法による *mlo* 遺伝子に基づく うどんこ病抵抗性コムギ系統の作出

Acevedo-Garcia J *et al.*

2017

Plant Biotechnology Journal 15: 367-378

ドイツの大学・英国の民間研究所（ロザムステッド）の研究者による原著論文である。6倍体コムギ（AABBDD ゲノム）は、栽培面積ではトウモロコシ・イネについて第3位、食用では第2位の重要作物である。コムギうどんこ病は、*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Bgt 菌) による最大の病害であり、農薬・品種による防除は不完全であり、効果的抵抗性品種は市場化されていない。種々のバイテク技術のなかで特に欧州では、非組換え抵抗性コムギ品種の開発が要望されている。一方で、コムギは三倍体であるため、従来の突然変異育種では、抵抗性の育種が困難であった。そこで、著者らは突然変異誘発と TILLING 技術の組合せによる非組換えうどんこ病抵抗性コムギ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) うどんこ病抵抗性遺伝子：オオムギでは、うどんこ病抵抗性遺伝子、*Mildew resistance locus o* (*Mlo*)、の第9エキソンのミスセンス変異がうどんこ病に対して強い抵抗性を有することが知られる。コムギ (*Triticum aestivum*) には、*Mlo* の同祖遺伝子が A、B、D の各ゲノムセットにそれぞれ1つずつ (*TaMlo-A1*、*TaMlo-B1*、*TaMlo-D1*) 存在する。
- (2) *mlo* 変異体コムギ（一重変異）の単離：春コムギ品種 Cadenza の EMS 突然変異誘発集団から TILLING 手法により *Mlo* 遺伝子の第9エキソンにミスセンス変異を有する変異体を特定した。その結果、*TaMlo-A1*変異2つ、*TaMlo-B1*変異7つ、*TaMlo-C1*変異7つ、合計16変異型 *Mlo* アレルを単離した。
- (3) 各変異 *Tamlo* の抵抗性の評価：オオムギの *mlo* ヌル変異体の葉の表皮細胞に16の変異型 *Tamlo* を導入し、オオムギのうどんこ病菌 *Bgh* の細胞への侵入率によって抵抗性の強弱を評価した。取得した16の変異型 *Tamlo* は、いずれも野生型配列よりも高い抵抗性を示した。
- (4) *Tamlo* 三重変異体の作出：抵抗性アレルの集積による抵抗性の強化をはかる目的で、変異体同士を掛け合わせ、二重、三重変異体を作成した。
- (5) *Tamlo* 変異体系統のうどんこ病抵抗性：1) 菌糸侵入率（羅病性：100%、完全抵抗性：0%）：生育10日個体の展開葉における接種後72時間の侵入率（%）で示した。対照の Cadenza は高い侵入率85%を示し、A、B、D ゲノムいずれかの *Tamlo* 変異体は65~75%で対照と有意差がなかった。二重変異系統 aabbDD は40%、AAbbdd は20%；3重変異系統 aabddd は18~20%の低い侵入率（高い *Bgt* 抵抗性）を示した。2) マクロ観察：1) と同じく、1重変異体は対照と同定度に発病し、二重及び三重変異体はともに低い発病であったが、三重変異体でより強い抵抗性が観察された。
- (6) 農業形質の正常性：三重変異体は、生育全般・草丈・穂数及び種子数などの農業形質は対照と差異のない正常値を示した。
- (7) 総括：誘発突然変異と TILLING 法により、非組換えうどんこ病抵抗性 *Tamlo* 三重変異体が作出された。これら系統の抵抗性は完全ではないが、うどんこ病抵抗性非組換えコムギ系統の市場化へ向けて重要な貢献をすることが期待される。

(林 健一)

Two NHX-type transporters from *Helianthus tuberosus* improve the tolerance of rice to salinity and nutrient deficiency stress

キクイモ由来の2つの NHX 型トランスポーターの導入による
塩害及び低栄養ストレスに対する耐性イネ系統の作出

Zeng Y *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 310-321

中国の国研・大学及び米国の大学研究者による原著論文である。土壌塩害及び低栄養素は農業生産の大きな障害である。キクイモ (*Helianthus tuberosus*) は多年生草本であり、塊茎は食用となる。キクイモは高度耐塩性を有し、0.5~1.0%の塩分土壌で発芽・生育する。植物の NHX 型陽イオン/H⁺輸送系は、塩害耐性及び K⁺ホメオスタシスのための Na⁺(K⁺)/H⁺交換を媒介している。著者らはキクイモから *NHX* と同租系の 2つの遺伝子 (*HtNHX1*及び *HtNHX2*) を特定し、これらの導入による耐塩性、低栄養ストレス耐性組換えイネ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えイネ系統の作出：キクイモ由来の *HtNHX1*及び *HtNHX2*遺伝子をそれぞれ、日本型品種日本晴に導入し、得られた組換え体それぞれ 1 系統を以下の実験に供した。
- (2) 塩ストレス耐性：NaCl (100mM) 含有培養液：生育 2 週間のイネを 3 週間処理した。両系統とも根・シュートのバイオマスの低下は対照非組換え体 (日本晴) より少なかった。K⁺含量は、非組換え体に対し、*HtNHX1*は根・シュートともに増加し、*HtNHX2*はシュートのみ増加した。Na⁺含量は両系統とも増加した。
- (3) 低カリウム耐性：低 K⁺ (0.25mM) ストレス：*HtNHX1*は生育・シュートの K⁺含量に変化はなかった。*HtNHX2*の K⁺含量は、シュートで70%、根で35%、K⁺含量で25%増加した。低 K⁺土壌では、*HtNHX2*は収量で30%、収穫指数 (粒重/ワラ重：HI) 及びワラ K⁺含量が、ともに増加した。これに対し *HtNHX1*は収量及び HI が40~50%低下した。非組換え体に対して、*HtNHX2*はシュートバイオマスで45%、K⁺含量で40%、Na⁺含量で90%の増加を示したが、*HtNHX1*の増加は少なかった。
- (4) 低主要栄養素 (1/4NPK) ストレス：非組換え体及び *HtNHX1*は収量・バイオマスともに同様に低下した。しかし、*HtNHX2*では生育は減少せず、非組換え体に対しバイオマスは35%、Nは25%、Pは45%の増加を示した。*HtNHX1*の N・P 含量は非組換え体より低かった。低 N・K ストレスでは、*HtNHX2*の根の N 含量は減少せず、シュート N 含量は著増し、シュートより根への N の転流の増大を示した。さらに低肥沃度 (低 N・K) 水田では、非組換え体に対し *HtNHX1*はワラ重で20%、収量で40%減少したが、*HtNHX2*は収量で45%、Nは90%、Pは40%、Kは13%の増加を示した。
- (5) 総括：キクイモ由来の *NHX* 型遺伝子導入により、*HtNHX1*及び *HtNHX2*の 2つの耐塩性組換えイネ系統が作出された。特に *HtNHX2*系統 (*HtNHX1*系統ではない) は低 K⁺、塩類ストレス、全般的低栄養条件下で、収量、収穫指数、栄養素吸収などが非組換え体に比べて増加し、植物無機養分吸収に関する NHX の機能の新局面を提起した。

(林 健一)

Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9手法による低グルテン・非組換えコムギの作出

Sánchez-Léon S *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 902-910

スペインの大学・国研及び米国の大学研究者による原著論文である。セリアック病 (*Coeliac disease*) は、遺伝的素因を有する人々のコムギ・オオムギ・ライムギ等の麦類のグルテンの摂取より発生する自己免疫疾患であり、西側諸国の7%以上の人々が罹病者である。既往の突然変異誘発や育種法では有効な対策が得られていない。グルテンは、麦類の胚乳に含まれるグルテニンとグリアジンをこね合わせることで、吸水して絡み合ったものである。著者らは、グリアジンの一つである α -グリアジンをコードする遺伝子ファミリーへのCRISPR/Cas9手法応用による低グルテンコムギ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) α -グリアジン突然変異系統の作出： α -グリアジン遺伝子ファミリーを標的とする2種類のsgRNA (sgAlpha-1及びsgAlpha-2) を設計、これらを含むCRISPR/Cas9コンストラクトをパンコムギ2品種 (BWO28及びTHA53) 及びデュラムコムギ1品種 (DP) に導入し、 α -グリアジン抑制変異体を得た。
- (2) 突然変異系統のグリアジン含量：① α -グリアジン：ほとんどの系統 (パンコムギ及びデュラムコムギ) で大幅 (32~82%) に減少し、特にsg-Alpha-2変更系統で減少率が大；② γ -グリアジン：供試18系統中15系統で有意 (25~94%) に減少；③ ω -グリアジン：減少・増加の両傾向で一定しなかった。
- (3) グルテン含量：モノクローナル抗体R5及びG12を用いたELISA法では、sgAlpha-2使用系統において平均で66.7~61.7%の低下が、最大で85%の低下が検出された。
- (4) 低グルテン含量の遺伝性：グルテン含量のT1からT2世代及びT2からT3世代への追跡調査により、グルテン含量は安定的に次世代へ遺伝されることが確認された。
- (5) 製パン能力：一部の系統は製パン能力の向上あるいは低下がみられたが、全体的には通常コムギと同程度の能力が維持されていた。
- (6) オフターゲット：オフターゲット突然変異は検出されなかった。
- (7) CRISPR/Cas9コンストラクトの不在：T2世代での配列精査により、CRISPR/Cas9コンストラクトの不在の系統を確認した。また、すべての変異体は完全稔性で正常種子を生産し、細胞数も正常であった。
- (8) 総括：CRISPR/Cas9手法により、セリアック病の原因となる α -グリアジン遺伝子配列を変更し、非組換え・低グルテン含量のコムギ系統が作出された。CRISPR/Cas9手法は正確かつ高能率であり、本研究で作出されたコムギ変異系統は既存のエリート品種への交配材料としての貢献が期待される

(林 健一)

An epigenetic breeding system in soybean for increased yield and stability

多収・安定ダイズ作出のための後生的育種システム

Rajn SKK *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 1836-1847

米国大学研究者による原著論文である。植物は環境・変化に対して、遺伝的及び後生的 (epigenetic) 要因から由来する表現型可変性で反応している。*MutS HOMOLOG 1 (MSH1)* はバクテリア DNA 修復遺伝子 (*MutS*) と相同の植物特有の遺伝子であり、*MSH1* の抑制はミトコンドリア及びプラスチドに関連する特性の発現に影響する。RNAi による *MSH1* の抑制は植物の発育過程に種々の影響を与えることが知られている。ダイズは蓄積された育種による成果はあるが、将来の発展にむけての新しい手法の開発が要望されている。著者らは後生的育種の適用による多収・安定ダイズ系統の作出を試み以下の結果を得た。

- (1) *MSH1*-RNAi 組換えダイズ表現型の多面的発現：*MSH1*-RNAi 組換えダイズ (品種 Thorne) は、既往のシロイヌナズナ、トマト、タバコの結果と類似した、生育率低下、雄性不稔、側枝増収、葉・花の形態変化を示した。また、RNAi 系統の後代のうち、組換え遺伝子不在のヌルセグリガント系統の一部では、*MSH1* 発現レベルの回復は見られるものの、*MSH1*-RNAi 組換え体の表現型変化を維持することから、*MSH1* の表現型には、後生的な調節が関与していることが明らかとなった。本研究ではメモリー系統と命名された。メモリー系統はその表現型から、中間 (i) : iMSH1 ; 極限 (e) : eMSH1 ; 及び正常 (n) : nMSH1 ; の 3 種類に分類された。
- (2) メモリー系統と非組換え体との交配：メモリー系統を非組換え体と戻し交配した F₂ 系統の農業形質は非組換え体より幅広い変異を示した。これには 1 株莢数・種子数、100 粒重、開花回数、成熟日数が含まれた。さらに、表現型の強さごとに分けた、戻し交配 F₂ 集団の表現型は、eMSH1、iMSH1、nMSH1 の戻し交配 F₂ 集団では開花日数 (eMSH1)、1 株莢数・開花日数 (iMSH1)、草丈・1 株莢数・開花日数 (nMSH1) で非組換え体より幅広い変異 (高い分散) を示した。
- (3) 収量試験 (2014) : ① 供試集団 : 1) 3 種類の F_{2:4} (メモリー系統の戻し交雑 F₂ 集団を 4 世代自家交雑した収差段) の各トップ 50% (1 株莢数) を合わせた「トップ 50% 集団」; 2) 3 集団を全部合わせた集団「バルク集団」; 3) 非組換え体 ; ② 試験地 : ネブラスカ州内 4 地点、④ 結果 : 非組換え体収量 : 4284.65 kg/ha、「バルク集団」: 4419.82~4834.89 kg/ha ; 「トップ 50% 集団」: 4758.33~5016.7 kg/ha ; F_{2:4} R10 系統は非組換え体より有意に高い収量を示した。
- (4) 収量試験 (2015) : 結果 : 4 地点を合わせた平均収量は、非組換え体の 4400 kg/ha に対し、全ての F_{2:5} 系統 (例外 1 系統) は非組換え体より高収であり、特に F_{2:5} P37 系統は非組換え体 (4400 kg/ha) より 302 kg/ha 高収であり、非組換え体と有意差を示した。
- (5) F_{2:6} 系統 : 収量は非組換え体と差異なく、F_{2:4} 及び F_{2:5} を通じて示された高収量は、F_{2:6} 世代で消失した。(同様な結果はシロイヌナズナでも示された)。
- (6) 接ぎ木試験 : MSH1-RNAi (台木) と非組換え体 (接穂) の接穂上の稔実種子の収量は、非組換え体接穂 / nMSH1-RNAi 台木の接ぎ木体が、他の 2 系統より有意に多収であった。
- (7) *MSH1* 由来 epi 系統の安全性 : 分散分析の結果、これら系統と試験地点との間の交互作用は非組換え体に比べて小であり、相対的に高い安定性が示された。
- (8) 総括 : *MSH1*-RNAi システムによるダイズの後生的 (epigenetic) 変異系統は、1 株莢数・種子量・成熟日数などの収量関連特性の変異を増大した。さらに F_{2:4} (自殖第 4 代) 及び F_{2:5} (自殖第 5 代) は非組換え体より収量が増加し、有意な高収量 2 系統が特定された。また、環境との交互作用は低く、収量の高い安定性が示された。しかしこれらの安定・高収性は F_{2:6} (自殖第 6 代) で消失した。一般に集団の変異の増大は変化する環境への適応性の増大として受け入れられる。本研究は後生的ダイズ育種の先鞭であり、今後類以の成果の蓄積が望まれる。

(林 健一)

The rice terpene synthase gene *OsTPS19* functions as an (S)-limonene synthase in planta and its overexpression leads to enhanced resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*

イネテルペン合成遺伝子 *OsTPS19* による (S)-limonene 合成機能並びに過剰発現によるいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 抵抗性の強化

Chen X *et al.*

2018

Plant Biotechnology Journal 16: 1778-1787

中国の国研・大学及び米国の大学研究者による原著論文である。いもち病はイネ最大の病害であり、抵抗性研究の文献は多数あるが、いもち病の変異は早いため、その実効性は限定的である。一方、最近の研究により、テルペン (terpene) 合成遺伝子がいもち病抵抗性遺伝子として有望であることが示された。著者らはこの可能性を追求して幅広い研究を行い、以下の結果を得た。

- (1) いもち病感染に対する防御反応として発現するテルペン合成遺伝子：イネのテルペン合成遺伝子の一つである *OsTPS19* の発現は、生育3週間のイネ幼植物ではいもち病菌の人工接種により、約10倍に上昇した。発現には日リズムがあり、暗期で増加し、明期で減少した。発現には揮発性物質の発散を伴った。
- (2) *OsTPS19* 発現の変化に伴ういもち病抵抗性の変化：野生型イネ Zhonghua17 を用いて *OsTPS19* 過剰発現系統 (S4、S5、S11) 及び *OsTPS19* RNAi 抑制系統 (d30、d31、d57) が作出された。両系統とも形態的異常はなかった。1) *OsTPS19* 発現量：過剰発現3系統は、非組換え体の約100倍の *OsTPS19* を発現した。RNAi 3系統は、非組換え体より *OsTPS19* 発現量が低下した。2) いもち病接種試験：接種6日後の病斑面積は過剰発現系統は非組換え体より顕著に小さく、一方 RNAi 系統では非組換え体より拡大した。
- (3) *OsTPS19* 転写と揮発性物質 limonene との関係：*OsTPS19* のいもち病抵抗性の機構を知るために、その代謝解析を行った。その結果、limonene の発散量が過剰発現系統では著増し、RNAi 系統では非組換え体より減少することが示された。またテルペン合成活性の検定から *OsTPS19* タンパク質が合成するテルペンは (S)-limonene が主体であった。
- (4) (S)-limonene 処理によるいもち病胞子の発芽抑制：いもち病胞子の発芽率は非組換え体での100%に対し、(S)-limonene 処理濃度 20 mmol/L で90%、50 mmol/L で20%、80 mmol/L で10%以下、100 mmol/L で検定不能の低値となった。この結果、(S)-limonene のいもち病菌に対する直接的抑制が示された。
- (5) *OsTPS19* の生物学的機能：多くのテルペン類は微生物に対し対抗的抑制機能を有することが知られている。本研究では、*OsTPS19* が limonene 合成能力を有し、いもち病感染に対する防御反応を有することが示された。いもち病抵抗性で limonene 合成能力との密接な関係は本研究の新しい知見である。Limonene は病原菌に感染しているイネから発散される揮発性物質の一種である。いもち病胞子の発芽はモノテルペンである (S)-limonene により抑制され、これが *OsTPS19* のいもち病抵抗性の要点である。
- (6) 総括：*OsTPS19* はいもち病感染イネ体から発散されるテルペンの合成機能を有し、合成されたモノテルペン (S)-limonene はいもち病胞子の発芽を抑制し、これにより病斑の拡大を抑制する防御機能は発揮されている。本研究結果は既往のいもち病抵抗性 *Pi* 遺伝子とは異なる新しい生物学的知見である。

(林 健一)

Transgenic switchgrass (*Panicum virgatum* L.) targeted for reduced recalcitrance to bioconversion: a 2-year comparative analysis of field-grown lines modified for target gene or genetic element expression

生物学的変換のための難分解性の低減を目標とする組換え
スイッチグラス (*Panicum virgatum*) 組換え系統の作出：
改変系統の2年間圃場試験の比較解析

Dumitrache A *et al.*

2017

Plant Biotechnology Journal 15: 688-697

米国の国研・大学の研究者による原著論文である。スイッチグラスは広く北米に生育する多年性牧草であり、その多収性（3～8トン/エーカー）から特にバイオ燃料として注目されているが、スイッチグラスのバイオマスの構造は、微生物や酵素的に分解されにくい性質を有するため、バイオ燃料（エタノール）生産の原料とするには難点があった。バイオエネルギー研究センター（BERC）はスイッチグラスのバイオマスの分解性の向上を目標に予備的組換え系統を作出した。著者らはこの中から有望数系統を選出し、2年間の圃場試験を行い、以下の結果を得た。

- (1) 供試系統：1) *galacturonosyltransferase4* (*GAUT4*) 抑制系統：ペクチン生合成を抑制；2) miRNA156 過剰発現系統：植物の生育を調節；3) *MYB4* 過剰発現系統：リグニン生合成を抑制；4) *caffeic acid O-methyltransferase* (*COMT*) 抑制系統：リグニン生合成を抑制；5) *folylpolyglutamate synthase 1* (*FPGS*) 抑制系統：リグニン生合成を抑制。
- (2) グルカン及びキシラン含量：各系統の分けつ茎細胞壁バイオマス中のグルカン（グルコースの重合体、セルロースの主成分）及びキシラン（キシロースの重合体、ヘミセルロースの主成分）の含有率を調査した。グルカン含有率は1年目28～39%（平均34%）、2年目33～43%（平均38%）、特に *COMT*、*MYB4*、*FPGS* 系統が高含有率であった。キシラン含有率は1年目17～22%（平均20%）、2年目19～27%（平均23%）、特に *COMT* 系統が高含有率であった。以上全系統を通じグルカン・キシラン含有率は2年目が1年目より有意に高かった。
- (3) バイオマス量とエタノール収量との関係：酵素糖化によるエタノール収量とグルカン及びキシラン含有量との相関係数はそれぞれ-0.36、及び-0.29であり、相関を示さなかった。以上から、バイオマス高含量はエタノール高収量とは直結しないことが分かった。
- (4) 植物体の硬化とエタノール酵素糖化性：1年目と2年目のバイオマスとを比較すると、2年目は越年根からの旺盛な再生でセルロース含量は増加するが、1年目より硬化する。1年目と2年目のバイオマスの酵素糖化率を比較すると全系統を通じ2年目の方が低い傾向があるが、バイオマス生産量の増加により、エタノール収量としては、いずれの系統も2年目の方が高かった。
- (5) 総括：バイオ燃料として有望視されているスイッチグラスについて、細胞壁の構成成分に影響を与える遺伝子改変を行い、バイオマス生産量及びエタノール転換率及び生産量に与える影響を調査した。バイオマス生産量とエタノール転換率に相関関係は検出されなかったが、いずれの形質転換系統も、最終的なエタノール生産性の向上がみられた。今回得られた結果をもとに、転換効率の向上を図ることで、さらにエタノール生産効率をさらに改善することができると考えられる。

(林 健一)

Simultaneous stimulation of sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase and the photorespiratory glycine decarboxylase-H protein increases CO₂ assimilation, vegetative biomass and seed yield in Arabidopsis

シロイヌナズナにおける光合成に関与する3酵素（SBPase、FBPA、GDC-H）の同時発現増加は、CO₂同化及びバイオマス、種子収量を増加させる

Simkin A J *et al.*

2017

Plant Biotechnology Journal 15 : 805-816

英国及びドイツの大学研究者による原著論文である。世界人口を養うための農作物の増収は最重要課題となっている。このためには農作物の光合成能力の向上が必須であり、すでに種々の研究がなされているが、明確な成果が得られていない。近年、光合成のカルビン-ベンソン（CB）回路及び光呼吸回路の両者を同時に強化することによる光合成と収量の増加の可能性が示された。著者らはこの基本方向に基づいて、自己の既往成果から目標酵素（遺伝子）を特定し、これをモデル植物シロイヌナズナに導入して典型的5種類の組換えシステムを作出し、その種々の特性を調査して以下の結果を得た。

- (1) 組換えシステムの作出：既往の成果から、CB回路のSBPase (S)、FBPA (F)、光呼吸回路のGDC-H (H) の3つの酵素を光合成増強のための標的酵素として特定した。シロイヌナズナを用いて、それぞれの標的酵素遺伝子の単独（S系統、F系統、H系統）及び、SBPase及びFBPAの二遺伝子の過剰発現体（SF系統）を作成、SF系統とH系統の交配により三重特性組換え体（SFH系統）を作成し、以下の実験に供した。
- (2) 光合成能力：1) 幼植物：弱光下（通常の1/3）ではすべての系統は対照より高い光合成能力を示したが、H系統は増加が少なかった。強光下（通常光）ではS、F、SF、SFH系統は対照より有意に高い能力を示したが、系統間では差がなく、H系統は対照と差がなかった。
- (3) 葉面積及びバイオマス：1) 葉面積：全系統とも生育中～終期は対照より葉面積が大であり、特に成熟期（生育38日）ではSFH系統は他のすべての系統よりも有意に大であった。2) バイオマス：全系統とも対照より有意に多かった。特に三重特性SFH系統は、成熟期にすべての他の系統よりも高い（+70%）バイオマスを示した。
- (4) 炭水化物：デンプン含量には対照と差がなかった。ショ糖濃度は全系統とも対照より高く、特にF及びSF系統は有意に高かった。
- (5) 種子収量：1) 弱光区：S、SF、SFH系統では対照より35～53%高かった。H系統は対照と差がなかった。2) 強光区：最大能力発揮の強光区では、S、F、SF、SFH系統は対照に対し、39～62%高い種子収量を示した。特にSFH系統は他系統より有意に高く、最高収量を示した。H系統は対照と有意差がなかった。
- (6) 総括：光合成のCB回路の2酵素（SBPase及びFBPA）ならびに光呼吸回路のGDC-Hの同時発現により、バイオマス及び種子収量が顕著・有意に高い組換えシロイヌナズナ系統が作出された。本研究は作物収量増加のためには、光合成並びに光呼吸に関与する複数の遺伝子の同時操作が有効な手段となることを示す成果であり関係分野への情報提供として価値を有すると考えられる。

（林 健一）

An (*E, E*)- α -farnesene synthase gene of Soybean has a role in defense against nematodes and is involved in synthesizing insect-induced volatiles

(*E, E*)- α -farnesene 遺伝子によるダイズの線虫防御機能及び
昆虫食害により誘起される揮発性物質の合成

Lin J *et al.*

2017

Plant Biotechnology Journal 15: 510-519

米国・中国・ドイツの大学研究者による原著論文である。テルペンはテルペン合成酵素 (TPSs) により産生される二次代謝産物であり、ある種のもの種々の障害に対する天然防御機能を有する。ダイズでは20種類以上の *GmTPS* が存在し、多くは生殖器官で発現するが、12の *GmTPS* は各種の障害に対して機能している。特に *GmTPS21* は α -farnesene synthase と特定されたことから *GmAFS* と命名され、さらにダイズシスト線虫抵抗性遺伝子として注目された。従来のシスト線虫抵抗性育種成果は不十分であり、新手法の開発が要望されていた。著者らは既往の成果に基づいて *GmAFS* の研究をさらに進め、以下の結果を得た。

- (1) シスト線虫接種試験による *GmAFS* 発現：接種3日後の根における *GmAFS* 発現は、羅病性ダイズ系統 TNO2-275では変化がなかった。しかし、抵抗性系統 TNO2-226では対照の2.5倍の *GmAFS* 発現が示された。
- (2) *GmAFS* と他のテルペン合成酵素との進化的関係：*GmAFS* は同様の防御機能を有するリンゴ及びポプラの *TPS* と系統樹上の近接位置で、構造的にも高い相同性があり、同祖的關係が示された。これら遺伝子は金属イオン K^+ の結合に関与することが知られている。
- (3) 組換え毛状根システムによる *GmAFS* のシスト線虫抵抗性の確認：既往の成果として組換え毛状根システムによるシスト線虫抵抗性検定法が確立されている。羅病性系統 Williams82を用い、*GmAFS* を発現する系統と発現しない対照系統を作出し、検定用シスト線虫系統の接種による生物検定を行った。成熟線虫及びシストの数は、対照が平均17.0、*GmAFS* 発現毛状根は10.0あり、後者が前者より有意に低かった。さらに対照を100と設定した雌指数 (female index) は組換え毛状根区は60であり、約40%の羅病性の低下が示された。
- (4) 草食害虫及びメチルジャスモン酸処理によるダイズ葉における *GmAFS* の発現：*GmAFS* がシスト線虫抵抗性以外の生物的機能を知るために、ナミハダニによるダイズ食害葉の *GmAFS* 発現量を調査し、対照の12倍の発現量であることを示した。さらに害虫に食害された時に植物が産生するメチルジャスモン酸を無食害のダイズ葉に処理したところ *GmAFS* の発現量は対照の11倍であった。
- (5) 食害葉発散揮発性物質の主体をなす (*E, E*)- α -farnesene：ナミハダニ食害葉から発散された揮発性物質を調査し、*GmAFS* 由来の (*E, E*)- α -farnesene が食害時の葉の揮発性物質産生において主体的な役割を果たすことが示された。
- (6) 総括：植物が有する天然有機化合物の一種であるテルペンを合成するテルペン合成酵素 TPSs の中から、特にダイズで発現される遺伝子 *GmAFS* が特定された。*GmAFS* はダイズシスト線虫に対する抵抗性を有し、シスト線虫被害を40%低下させた。また、昆虫食害ダイズ葉からは、*GmAFS* 由来の抵抗性揮発物質が発散された。以上から、*GmAFS* はダイズの地下部のシスト線虫抵抗性及び地上部の喰葉害虫の両防御機能を有することが示された。今後、防御機能及び農業特性のテストを加え、育種情報として利用されることが期待される。

(林 健一)

Results from ten years of post-market environmental monitoring of genetically modified MON 810 maize in the European Union

欧州連合における MON810 トウモロコシ 上市後 10年間の環境モニタリングの結果

Bertho L *et al.*

2020

PLoS One 15: e0217272

モンサント社とドイツの環境コンサル会社によるによる報文。MON810トウモロコシは、1998年に欧州連合（EU）で商業栽培が認可された。EUでの商業栽培開始後、モンサント社は、自主的なモニタリングを実施してきた。本報告では、2006～2015年までの10年間にわたる農家へのアンケート調査及び文献調査に基づき、MON810トウモロコシの栽培による環境及び農業体系への影響を議論した。

- (1) 調査対象：2006年から2015年の10年間、欧州8か国（チェコ、フランス、ドイツ、ポーランド、ポルトガル、ルーマニア、スロバキア、スペイン）の1,262の農家を対象とし、延べ2,627の回答を得た。約半数が回答1回のみで、毎年回答したのは0.1%であった。
- (2) 調査対象国のMON810トウモロコシの栽培面積：10年間の合計で、チェコ 39,278 ha、フランス 26,374 ha、ドイツ 6,806 ha、ポーランド 12,320 ha、ポルトガル 62,300 ha、ルーマニア 14,047 ha、スロバキア 6,438 ha、スペイン 950,616 haであった。このうち10年間の全ての年で栽培があったのは、チェコ、ポルトガル、スロバキア、スペインの4か国である。
- (3) アンケート質問項目：各農家の農地における栽培体系に関する事柄（連作の状況、植え付け/収穫時期、雑草管理、病害虫管理、灌水管理等）、農地での生育に関する事柄（発芽勢、出穂期、成熟期、収量、ひこばえ発生状況等）、周囲の環境影響に関する事柄（罹病/害虫発生、雑草プレッシャー、節足動物/鳥/ほ乳類の訪問数等）。
- (4) 栽培体系：MON 810トウモロコシの栽培により、農薬使用の大幅な削減、標的害虫からの効率的な保護が実現し、従来のトウモロコシと比較してより健康的で高収量の作物が得られたとする、明確な傾向が示された。
- (5) 農地での生育：MON 810トウモロコシは、従来のトウモロコシと比較して、病気や害虫に対する感受性が低下したとする、明確な傾向が示された。
- (6) 環境影響：農家からのアンケート結果から、MON 810トウモロコシと従来のトウモロコシの間に有意差はなかった。欧州では、耐性害虫の発生もこれまでのところ確認されていない。
- (7) 文献調査：10年間の調査において、査読誌に掲載された375論文と48レビュー論文をMON810トウモロコシ及びCry1Abタンパク質に関連する論文として精査したが、いずれも2007年の欧州食品安全機関（EFSA）による安全性評価に修正をもたらすものではなかった。
- (8) 総括：農家を対象としたアンケート調査によるモニタリング及び文献調査の結果、MON 810の栽培に関連する予期しない悪影響は明らかにされなかった。

(小口 太一)

Biosafety of GM Crop Plants Expressing dsRNA: Data Requirements and EU Regulatory Considerations

dsRNA を発現する GM 作物のバイオセーフティ： データ要件と EU 規制に関する考慮事項

Arpaia S *et al.*

2020

Frontier in Plant Science 11: 940

欧州の規制当局や大学、バイテク企業の研究者による総説。二本鎖 RNA (dsRNA) 発現による RNA 干渉 (RNAi) による標的遺伝子の発現抑制技術は、欧州以外の地域では、既に実用化が始まっている。本稿では、dsRNA 発現 GM 作物の欧州での輸入及び加工に係る承認プロセスについて、欧州食品安全機関 (EFSA) の指針に基づく EU の GM 作物の承認プロセスと照らし、考慮事項について議論した。

- (1) 比較評価：EFSA の指針では、GM 作物のリスク評価は、適切な比較対象植物と比較し、非 GM 作物との違いを特定し、特定された相違点に対して安全性評価を行うことを原則とする。dsRNA 発現 GM 作物に関しても、この原則を適用し、比較評価によりリスク評価することが可能である。
- (2) 分子特性：分子特性については、①供与核酸及びその核酸供与生物の情報、② GM 作物に導入された新規タンパク質に関する情報、③非意図的な有害物質やアレルゲン産生性に関する情報等について、プロブレムフォーミュレーションによるリスク評価が行われる。dsRNA 発現 GM 作物については、②は dsRNA であり新規タンパク質は生成されない。また、dsRNA の標的以外の遺伝子発現に対する影響については慎重に評価する必要がある。
- (3) 食品 / 飼料安全性評価：EFSA 指針では、新規タンパク質及びそれ以外の構成成分について、毒性、アレルゲン性、飼料安全性、栄養評価等が求められる。dsRNA 発現 GM 作物については、新規タンパク質の発現は意図されていないことを考慮した簡素化が期待される。
- (4) 環境影響評価：dsRNA 発現 GM 作物についても、導入形質の dsRNA 発現レベルの分析、および非標的生物 (NTO) への観察可能な影響に関するデータは、RNAi 植物にさらされた種の安全性を確保するために必要な証拠データを提供する必要がある。
- (5) 総括：dsRNA 発現 GM 作物も、原則としては、従来の GM 作物の EFSA 指針を当てはめて評価することが可能であるが、新規タンパク質の発現がないことによるデータ提供の簡素化、標的外遺伝子発現への影響に関するバイオインフォマティックデータの提供、といった、指針の更新を提案する。

(小口 太一)

ERA プロジェクト調査報告

2020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)