
ERAプロジェクト調査報告

June 2021

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

2021.6

バイオテクノロジー研究会

2021年の調査報告書第2号（通算第55号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え技術を用いた報告として、シロイヌナズナ WRINKLED 1 転写因子の発現によるダイズ種子のポリフェノール蓄積量の向上 (No.540)、bZIP73 転写因子によるイネの登熟期における耐冷性の向上 (No.541)、クロマチン相互作用因子 OsVIL2 によるバイオマス及び収量増加イネ系統の作出 (No.544)、*Osa-miR393a* の発現により生育及び複数のストレス耐性を強化したクレーピングベントグラスの作出 (No.546)、ブラジル南東部における遺伝子組換えユーカリのほ場試験による花粉流動と雑草化の現実 (No.548)、ヘアピン CP-mRNA 発現組換えオレンジ台木との接ぎ木による非組換え体穂木のカンキツソローシスウイルス耐性の付与 (No.549) について紹介しています。CRISPR/Cas システムを用いた研究が2報あり、No.543では CRISPR/Cas9 システムの適用によるコムギ萎縮病に対する抵抗性オオムギの高産率作出を、No.545では RNA ゲノム標的法によるウイルス抵抗性バレイショの作出について報告しています。

また、バイオテク作物のリスク評価に関する論文として、No.542で複数の害虫抵抗性を有する組換えスタック系統における生態的リスク評価 (ERA) の前進について、No.547で欧州司法裁判所 (European Court of Justice) のゲノム編集作物を規制対象とする裁定について紹介しています。

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>

目次

No.540	シロイヌナズナ WRINKLED 1転写因子の発現によるダイズ種子のパルミチン酸蓄積量の向上 Expression of the Arabidopsis WRINKLED 1 transcription factor leads to higher accumulation of palmitate in soybean seed	1
No.541	bZIP73転写因子によるイネの登熟期における耐冷性の向上 The bZIP73 transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage	2
No.542	複数の害虫抵抗性を有する組換えスタック系統における生態的リスク評価(ERA)の前進 Advancing ecological risk assessment on genetically engineered breeding stacks with combined insect-resistance traits	3
No.543	CRISPR/Cas9システムの適用によるコムギ萎縮病に対する抵抗性オオムギの高効率作出 Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley employing CRISPR/Cas9 system	4
No.544	クロマチン相互作用因子 OsVIL2によるバイオマス及び収量増加イネ系統の作出 Chromatin interacting factor OsVIL2 increases biomass and rice grain yield	5
No.545	RNA ゲノム標的法によるウイルス抵抗性バレイショの作出 Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting	6
No.546	<i>Osa-miR393a</i> の発現により、生育及び複数のストレス耐性を強化したクリーピングベントグラスの作出 Transgenic creeping bentgrass overexpressing <i>Osa-miR393a</i> exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance	7
No.547	欧州司法裁判所 (European Court of Justice) は、ゲノム編集作物に関して欧州に正義 (justice) をもたらさない European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops	8
No.548	ブラジル南東部における遺伝子組換えユーカリのは場試験による花粉流動と雑草化の現実 Realized pollen flow and wildling establishment from a genetically modified eucalypt field trial in Southeastern Brazil	9
No.549	ヘアピン CP-mRNA 発現組換えオレンジ台木との接ぎ木による非組換え体穂木のカンキツソローシスウイルス耐性の付与 Transgenic Sweet Orange expressing hairpin CP-mRNA in the interstock confers tolerance to citrus psorosis virus in the non-transgenic scion	10

Expression of the Arabidopsis WRINKLED 1 transcription factor leads to higher accumulation of palmitate in soybean seed

シロイヌナズナ WRINKLED 1 転写因子の発現による ダイズ種子のパルミチン酸蓄積量の向上

Vogel PA *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17 : 1369-1379

米国の大学研究者による原著論文である。ダイズはタンパク質では世界最大、植物性油脂では第2位の供給源である。米国では3,600万 ha で栽培、43億ブッシェル生産され、植物性油脂の90%を占めている。ダイズ油は14%の飽和脂肪酸、20%の一価不飽和脂肪酸、65%の多価不飽和脂肪酸から構成され、高い多価不飽和脂肪酸率が酸化抵抗性を低下させている。シロイヌナズナ由来の転写因子 WRINKLED (AtWRI1) は植物の多領域の発育・生長への関与に加えて、油脂の生成への関与が示されている。著者らは AtWRI1のダイズへの導入による油脂成分の改変を試み、以下の結果を得た。

(1) ダイズ種子における AtWRI1の発現。

- 1) 第1段階：AtWRI1の単一導入：温室栽培試験では総飽和脂肪酸含量には変化なかったが、パルミチン酸含量は36~69%増加し、一方オレイン酸（一価不飽和脂肪酸）含量は低下した。圃場試験（F₂系統 915-25系統及び917-17系統を供試；2016~2017年）では、総飽和脂肪酸含量には変化はなかった。パルミチン酸含量は、対照・915-25系統・917-17系統の順に、2016年は10.9・18.3・19.2%；2017年は10.4・19.0・18.9%と導入系統で有意に増加した。しかし、同時にオレイン酸・ステアリン酸（飽和脂肪酸）・リノール酸（二価不飽和脂肪酸）が低下した。
- 2) 第2段階：AtWRI1、マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) 由来の不飽和化酵素 GmFatA1、及びダイズ内在性 GmFad2に対するサイレンシング因子間のスタック系統の作出：前二者とのスタック系統ではパルミチン酸16~18%、ステアリン酸は8~12%増加した GmFad2サイレンシング因子と GmFatA1とのスタック系統では、ステアリン酸65%、オレイン酸6倍の増加を示したが、パルミチン酸は有意な低下を示した。
- 3) 第3段階：3重スタック系統の作出：3重スタック系統（AtWRI1×GmFatA1×GmFad2サイレンシング因子）は、ステアリン酸が18.7%（対照の約5倍）、オレイン酸が57.4%（対照の3倍）に増加し、さらに2重スタックでは4.9%にまで低下したパルミチン酸含量を対照の10.6%に近い9.6%にまで回復した。
- 4) 第4段階：単一カセットの導入による特性発現：交配によるスタック作出ではなく、複数遺伝子の単一カセットへの導入が試みられた。結果は3重スタック系統とほぼ同様であった。

(2) 脂肪酸の物理的・生化学的特性 2015年圃場生育の各系統の各種特性値が比較表示された。AtWRI1・GmFatA1・3重スタックの3者は、総飽和脂肪酸含量を非組換え体の50~80%増を示した。AtWRI1は多くの場合、パルミチン酸含量を8.5%以上に保った。GmFatA1及び3重スタックはステアリン酸を非組換え体の約4倍、GmFAD2と3重スタックは、オレイン酸を約3倍に増加した。酸化耐性値は3重スタックで約3倍増、その他は10%前後の増加を示した。融点は3重スタックで2.6℃、その他はすべて0℃以下であった。

(3) 総括：ダイズ油脂は、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸から構成されており、前二者の増加、後者の低下が品質向上の鍵となっている。シロイヌナズナ由来の AtWRI1と2種類の成分関連対立遺伝子との交配により、1重、2重及び3重スタック系統が作出され、各種特性（脂肪酸組成）が調査された。その結果3重スタックは、パルミチン酸含量の維持、全飽和脂肪酸含量の増加、ステアリン酸及びオレイン酸の増加、ポリ不飽和脂肪酸の低濃度維持、酸化耐性の著増などの諸特性の向上が顕著であった。これらの結果は今後のダイズ油の品質向上に有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

The bZIP73 transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage

bZIP73転写因子によるイネの登熟期における耐冷性の向上

Liu C *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17 : 1834-1849

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。イネは熱帯・亜熱帯原産のため、生育各期に低温障害を受けやすい。中国のイネ栽培地は広大であり、低温による減収は全体で300~500万トンに達する。このため低温耐性品種育成は長年の大課題である。著者らは低温耐性に関連する bZIP 型転写因子 bZIP73 のジャポニカ型アレル (bZIP73^{Jap}) がイネ幼苗期の耐冷性を向上させる事を報告している。今回は同因子を成熟期に導入し、その耐冷性の向上を試験して、以下の結果を得た。

(1) イネの転写因子発現系統の作出

日本型イネ品種 Zhonghus11 (ZH11) を母系統 (NT) として用い、bZIP73^{Jap} 及び bZIP71 を含む他数種の bZIP 転写因子をそれぞれ単独に導入した数系統 (単独発現系統と略記) 及び bZIP73^{Jap} と bZIP71 の 2 種を過剰発現した共発現系統を作出した。後者は両因子の結合によるヘテロダイマーを形成した。

(2) bZIP73^{Jap} と bZIP71 の発現様式

bZIP73^{Jap} は出穂期の穂に集中的に発現する。bZIP71 は殆どすべての組織器官に発現する。bZIP73^{Jap} の発現は数時間の低温処理で特に穂で強く発現するが、bZIP71 にはこのような発現の変動はない。

(3) 低温耐性圃場試験

イネの収量は出穂期に20℃以下の低温との遭遇により急激に低下する。試験地で気温が20℃以下となる時期は9月中~下旬であり、播種時期の違いにより9月13日及び9月30日に出穂した2つの試験区で各系統の低温耐性を調査した。9月13日出穂期試験区では、単独発現系統の種子着生率及び1株収量は対照に対し、40.4~52.6%及び40.8~55.9%低下した。一方共発現系統は対照に対し、12.0~20.7%及び40.8~63.2%増加した。9月30日出穂期の共発現区の着粒率及び1株収量は、対照に対し、30.7~42.0%及び37.9~52.1%増加した。以上から共発現区は成熟期の低温耐性が向上していることが示された。

(4) 葯における ABA 濃度

アブシジン酸 (ABA) は植物の各種生長機能に参与する。低温ストレスの葯の ABA 濃度は対照に対し、単独発現系統では23.1~34.5%高かったが共発現系統では22.0~27.4%低く、幼苗期と同様な結果であった。

(5) 葯内 ABA の役割

ABA は可溶性糖類の葯壁への供給を増進する。しかし、葯壁からタペート組織を経て花粉への可溶性糖類の供給は ABA により逆に抑制される。この結果、共発現系統の花粉は単独発現系統の花粉より、より多くの可溶性糖の供給を受けて充実度が増加する。

(6) 開花期における成熟花粉数

低温ストレス開花期の成熟花粉数は、単独発現系統では対照に対し、46.5~60.4%減少したが、一方、共発現系統では28.9~37.1%増加した。常温下では対照とは有意差はなかった。

(7) 種子着生率及び1株収量

単独発現系統は対照に対し、着生率及び1株収量ともに同等あるいは以下であった。共発現系統は対照に対し、両特性とも有意に高く、成熟期における低温耐性の向上が示された。

(8) 総括

イネ転写因子 bZIP73^{Jap} は及び bZIP71 の共発現系統が作出された。同系統は既報の幼苗期に加えて、葯の ABA 発現の抑制、葯から花粉への糖類の供給増加成熟、花粉の増加などにより、最終の種子着生率、1株収量が対照より増加し、耐冷性が向上していることが示された。これらの結果は、イネの耐冷性増加に対する有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

Advancing ecological risk assessment on genetically engineered breeding stacks with combined insect-resistance traits

複数の害虫抵抗性を有する組換えスタック系統における生態的リスク評価（ERA）の前進

McDonald J *et al.*

2020

Transgenic Research 29 : 135-148

米国シンジェンタ社及び英国大学（元シンジェンタ社）研究者による原著論文である。害虫による被害は世界農業生産減収の一大要因である。その対策として複数の殺虫性タンパク質を組み合わせたスタック系統が作出され、2017年には7,770万 haで栽培されている。欧米ではスタック系統の殺虫性タンパク質濃度と、スタックを形成する個々の単独組換え系統の濃度の比較をスタック系統のERAにおいて実施しており、スタックによってタンパク質濃度が生物学的に関連性のあるレベルで上昇していないという仮説を検証している。この仮説を補強し、単独組換え系統におけるERAのスタック系統におけるERAへの可搬性を検討するために著者らは大規模な圃場比較試験を実施し、以下の結果を得た。

(1) 圃場比較試験

- 1) 年度・実施国：2005～2014年、5ヶ国（米国・カナダ・アルゼンチン・スペイン・南アフリカ）28ヶ所、完全乱塊法（5反復）
- 2) 基本的単独組換え系統：Bt11、MIR162、MIR604、5307、TC1507、DAS59122-7、GA21
- 3) スタック系統：6重スタック2系統、5重スタック2系統、4重スタック3系統、3重スタック4系統、2重スタック3系統、計14系統
- 4) 殺虫性タンパク質含量測定組織：葉・根・花粉・穀粒
- 5) 測定時間：V₅～V₈及びV₉～V₁₂

(2) 比較試験結果

204の全比較例を概括すると、スタック系統と単独系統の殺虫性タンパク質含量の間で50例に有意差が認められ、うち26例ではスタック系統が単独系統より有意に高かった。

(3) 有意差を生じた26例の内訳

4種類の殺虫性タンパク質の名称及び葉・根・穀粒・花粉における有意差発現例を以下に列記する。
Cry1Ab：8・3・5・2計18例；mCry3A：2・1・0・2計5例；Vip3Aa20：0・1・0・1計2例、eCry3.1Ab：0・1・0・0計1例 合計26例、特に前2者の有意差発現は葉及び穀粒で多かった。特異的な4倍差が1例あっただけで、他の例はすべて2倍差以内であり、有意差の幅は極めて小さかった。

(4) 比較試験のまとめ

概括的にスタック系統と単独系統との間に、殺虫性タンパク質含量の差はないと結論された。これにより、1) スタック系統とそれを形成する単独系統との間には差がない、2) 単独系統のタンパク性はスタックにより変化しないで当初の濃度を維持している、の2点が確認された。さらに、3) 単独系統のERA情報はスタック系統のERA情報として可搬である（transportable）、ということが示唆された。

(5) 総括

スタック系統の生態的リスク評価（ERA）を推進するために、スタック系統とそれを構成する単独系統における殺虫性タンパク質含量の大規模（5ヶ国28地区）な圃場比較試験が実施された。その結果、1) 概括的にスタック系統と単独系統間の殺虫性タンパク質含量には差がない、2) 単独系統の殺虫性タンパク質はスタックによって変化せず、当初の濃度を維持する。3) 単独系統のERA情報は、スタック系統のERA情報として、可搬である（transportable）ことが示された。これらの結果は、今後のスタック系統の作出に有用な情報として利用されることが期待される。

（林 健一）

No.543

Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley employing CRISPR/Cas9 system

CRISPR/Cas9システムの適用によるコムギ萎縮病に対する抵抗性オオムギの高効率作出

Kis A *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17 : 1004-1006

ハンガリーの国研・大学の研究者による原著論文（短報）である。Wheat Dwarf Virus（コムギ萎縮ウイルス）はヨコバイの媒介により、コムギ・オオムギの師管部を犯し、穀粒を減収させるコムギ萎縮病の病原体であるが、抵抗性給源は乏しい。著者らはウイルスゲノム DNA を標的とした CRISPR/Cas9システムの発現による抵抗性系統の作出を試み、以下の結果を得た。

（1）標的配列の選定

コムギ及びオオムギのコムギ萎縮ウイルスのゲノム DNA 配列から4ヶ所の標的部位を選定し、対応する sgRNA として、sgRNA_WDV1~4 が選定された。

（2）組換えオオムギ系統の作出

上記 sgRNA の各々と CRISPR とを一組として、オオムギ品種 Golden Promise にアグロバクテリアウム法により導入し、組換えオオムギ系統（T1、T2、T3、T4）が作出された。

（3）組換えオオムギ系統のコムギ萎縮ウイルス抵抗性

コムギ萎縮ウイルス保有のヨコバイによる接種試験が実施された。7日後の供試葉のコムギ萎縮ウイルス DNA の存在を確認し、接種の完全実施を確認した。接種42日後には、非形質転換体はコムギ萎縮ウイルス特有の萎凋を示し、コムギ萎縮ウイルスの DNA 及び RNA も大量に蓄積された。組換え系統には異常は検出されなかった。56日後も、T1、T3、T4には異常はなかった。これらの異常なしの系統は、生育も正常で、非接種非組換え体と差異はなかった。T2も外見上の異常はなかったが、コムギ萎縮ウイルスの DNA が検出された。

（4）コムギ萎縮ウイルスの抵抗性の遺伝性（heritability）

T₀/T₁世代間の接種比較試験により、コムギ萎縮ウイルスの抵抗性の世代間の確実な伝達が認められた。

（5）総括

ウイルスゲノム DNA を標的とした CRISPR/Cas9システムの発現により、確実な遺伝力を有するコムギ萎縮ウイルス抵抗性オオムギ系統が、迅速・高効率で作出された。高能力・高発現の sgRNA の選定が、必須前提要件であった。本結果は、コムギ萎縮ウイルス抵抗性オオムギの今後の育種に、有用な情報を与えることが期待される。

（林 健一）

Chromatin interacting factor *OsVIL2* increases biomass and rice grain yield

クロマチン相互作用因子 *OsVIL2*によるバイオマス及び収量増加イネ系統の作出

Yang J *et al.*
2019

Plant Biotechnology Journal 17 : 178-187

韓国の大学・日本の研究所（理研）・中国の大学の研究者による原著論文である。イネの増収は国際的大課題であり、主として穀粒数の増加による効果が大いことが示されている。著者らはクロマチン相互作用因子であるイネ *OsVIL2*の導入による増収系統の作出をはかり、以下の結果を得た。

(1) *OsVIL2*突然変異体の表現型

*OsVIL2*の突然変異体 *OsVIL2-1*及び *OsVIL2-2*が作出された。変異体は稈長が減少し、収量が32.0%及び37.1%低下した。また花器官が異常となり稔性が低下した。以上から *OsVIL2*がイネの形態及び収量に関与していることが示された。

(2) *OsVIL2*過剰発現個体 (*OsVIL2*-OX) の表現型及び収量

*OsVIL2*を発現した組換え2系統 (*OsVIL2*-OX-#1 及び *OsVIL2*-OX-#2) が作出され、韓国内2ヶ所、2ヶ年の本格的圃場試験により各種特性が調査された。

1) 第1回試験：OX 系統 #1 及び #2 は非形質転換体 (NT) に対し、稈長は140・140・120cm、主稈直径は7.0・7.0・5.5mm、出穂期1株乾物重は90・90・60g、開花期において、OX 系統 #1 及び #2 の主稈基部細胞長はそれぞれ40・60 (µm/cell)、細胞数は35・20 (1.4mm) を示した。さらに稈基部は NT に対し、厚さが増加し、また維管束・師管木質部柔組織が増していた。さらに #1 及び #2 系統は NT に対し、一次枝梗数は20・20・15、二次枝梗数は40・40・30、1穂粒数は250・250・150、収量は NT に対し28.1~32.2%の増収を示した。農業的実数は、#1・#2・NT の順に、1株穂数：12.9・12.6・13.6；1穂粒数：120.4・125.3・92.9；1株粒数：1551.2・1574.7・1270.7；であり、穂数減少・粒数増加が明瞭であった。

2) 第2回試験：第1回試験と同様な傾向を示した。#1・#2・NT の順に、1株穂数：13.9・13.8・14.7；1穂粒数：171.6・167.8・136.7；1株粒数：2356.9・2314.3・1997.7；1穂粒重：52.1・50.7・42.4；稔実率(%)：86.0・85.6・89.3、最終収量(%)は、118.0・115.8・100.0、であった。以上から穂数減少は十分に補完され、粒数の増加による収量増加が明瞭に示された。

(3) *OsVIL2*-OX 系統の総合的特性

一般に長稈は倒伏耐性が低いとされている。しかし OX 系統は長稈から稈壁は厚く頑丈であり、倒伏耐性は向上している。1株穂数の低下は1株粒数の増加より十分に補完され、稔実粒数増加により最終収量も増加している。この様な長強稈、少分けつ、一穂粒数増加による穂重型への移行は、理想型イネ (Khush 1995) への途上と考えられ、今後のイネ収量育種への有用な情報を与えると考えられる。

(4) 総括

クロマチン相互作用イネ因子 *OsVIL2*の導入により、長強稈・少分けつ・一穂粒数増加、バイオマス及び穀実収量増加の組換えイネ系統が作出された。本系統は理想型イネへの過程にあると考えられ、今後の収量育種に有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting

RNA ゲノム標的法によるウイルス抵抗性バレイショの作出

Zhan X *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17 : 1814-1822

中国の国研・大学及びドイツの研究所（マックスプランク）の研究者による原著論文である。バレイショは1000億トン近く生産され、イネ・コムギ・トウモロコシに次ぐ重要な食用作物である。しかしバレイショは各種の病害に犯されやすく、特にジャガイモYウイルス（PVY）は頻発して大減収をもたらす、PVYは突然変異・組換えを頻発し、既往の各種の抵抗性育種は効果が低い。安定的PVY抵抗性バレイショの作出は緊急の大課題であり、著者らはRNAを標的とするCRISPR/Cas13aシステムを用いた研究を行い、以下の結果を得た。

(1) CRISPR/Cas13aによる標的領域の選定

主要3PVYのゲノム解析から14ヶ所の保存配列が認識された。このうち4配列が標的領域と特定され、対応するsgRNAが作出された。LshCas13a/sgRNAコンストラクトが構築され、アグロバクテリウム法によりバレイショに導入され、各4系列ごとに25組換え系統が作出された。

(2) CRISPR/Cas13a組換えバレイショ系統のPVY抵抗性の検定

各系列より組換え特性高発現の2系統ずつ選出し、PVY接種試験を行った。接種25日後では、WTはPVY特有のモザイク葉変を多発したが、組換え系統では病葉は観察されなかった。この抵抗性はELISA法でも確認され、葉中のPVY蓄積量は微量であった。これらの結果から組換え系統はPVYの蓄積量がWTよりはるかに低レベルであることが示された。ウイルス抵抗性はCas13a/sgRNAコンストラクトのレベルと正の相関を有していた。このPVYに対する抵抗性は他のウイルスとは無関係であった。

(3) 総括

Leptotrichia shahii Cas13a及びジャガイモYウイルスY（PVY）標的領域に対応するsgRNAを含むコンストラクト（LshCas13a/sgRNA）が構築され、アグロバクテリウム法によりバレイショに導入され、PVY抵抗性組換えバレイショが作出された。同系統はPVYに対し高度の抵抗性を有し、PVYの蓄積及び病徴の発現を抑制した。さらにsgRNAは複数のPVY系統を抑制することが可能であり、なお他のウイルスとは無関係であった。本結果は今後のウイルス抵抗性育種に有用な情報を与えることが期待される。

(林 健一)

Transgenic creeping bentgrass overexpressing *Osa-miR393a* exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance

Osa-miR393a の発現により、生育及び複数のストレス耐性を強化したクリーピングベントグラスの作出

Zhao J *et. al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 233-251

米国及び中国の大学研究者による原著論文である。世界の主要作物は幅広い環境ストレスにより、約50%の減収を生じている。2050年までに現在の2倍の農作物生産が必要とされており、幅広い環境ストレス耐性の作物の作出は世界的大課題である。牧草ではC4温地草種のストレス耐性の報告はあるが、C3冷涼向草種では報告がない。著者らはC3冷涼向草種としてクリーピングベントグラスを選定し、各種のストレス耐性を研究して以下の結果を得た。

(1) 組換えクリーピングベントグラスの作出

マイクロRNA (miR393) は、一年生作物の生育・発育・複数のストレス耐性に関連している。クリーピングベントグラス品種 PennA-4に、イネ *Osa-miR393a* 過剰発現カセットをアグロバクテリウム法により導入し、最終的にTG1、TG2、TG4の3系統が選出され、各種耐性の検定に供試された。

(2) 組換えクリーピングベントグラス系統の表現型特性

正常生育において組換え系統は非組換え体 (NT) に対し以下の特性を示した。より少ないがより長い分けつ、より長い節間長、より幅広い葉とより大きい茎、葉及び茎のより多い細管束数、などである。生育10週間の各特性値 (NT・TG1・TG4の順) を列記した。分けつ数：45・25・20；節間長 (cm)：50・60・60；葉幅 (mm)：1.6・2.3・2.6；茎直径 (μm)：350・450・500。

(3) 組換えクリーピングベントグラス系統の各種ストレス耐性

1) 塩類ストレス耐性：250 mM NaCl 処理10日間を行った。NTは顕著な生育・組織の障害を示したが、組換え系統は軽微であった。特性値：葉相対的含水率 (NT・TG2・TG4の順)：60・75・75；全葉緑素含量 ($\text{mg} \cdot \text{gDW}^{-1}$)：5・15・15。

2) 干ばつ耐性・15日間の無給水処理を行った。NTは組織の損害大であったが、組換え系統は干がいを示さなかった。6日後の再給水により組換え系統は完全に復帰したが、NTは枯死した。葉の相対的含水率 (%) (NT・TG1・TG4の順)：50・70・60。葉の表面では、気孔密度が減少し、表皮はより密となった。別途行った2ヶ月間の節水栽培における正常区：節水区の比較では、NT・TG1・TG4の順に、分けつ数：30：10、20：8、15：5；最長節間長 (cm)：50：30、90：50、70：50、であった。

3) 高熱耐性：昼25°C/夜17°Cの適温区に対し、昼40°C/夜35°Cの高温処理を13日間行った。組換え系統はNTに対し、葉の相対含水率、葉緑素含量が高く、根及び茎葉のバイオマスの減少量が低かった。葉相対含水率 (%) (NT・TG2・TG4の順)：80・100・100；葉緑素含量 (mg / DW)：8・18・19。

(4) 総括

miR393aの導入による組換えクリーピングベントグラス系統が作出された。組換え系統はmiR393aの総合的発現により塩類、干ばつ、高熱などの環境ストレスに対する耐性を発揮し、NTに対する有意差を明示した。この結果は今後のストレス耐性育種に対する有用な情報を与えることが期待される。

(林 健一)

European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops

欧州司法裁判所 (European Court of Justice) は、ゲノム編集作物に関して欧州に正義 (justice) をもたらさない

Schulman AH *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 8-10

フィンランドの大学・国研の研究者による短報である。

(1) ゲノム編集作物に対する欧州司法裁判所の裁定

欧州司法裁判所 (European Court of Justice) は2018年7月25日 GMO 規制指令2001/18に基づく新操作に対する「予防原則」の適用による「規制対象」となることを裁定した。

(2) 欧州司法裁判所裁定の矛盾

規制の基礎となる指令2001/18は、追加付録で一部の遺伝子操作、特に mutagenesis (突然変異誘発) を規則対象外としている。mutagenesis の大枠で規制外としながら、より微細、正確、高能率の mutagenesis であるゲノム編集作物を規制対象とするのは大きな矛盾である。またゲノム編集によって変異をすべて「非自然」とするのも論理的に正しくない。その他の矛盾点を総合して、欧州司法裁判所裁定は科学を無視した悪法であると結論される。

(3) ECJ 裁定に対する関係分野の反応

世界中の関係分野は同裁定を酷評した。30ヶ国・200研究所・26,000研究者を有する欧州植物科学機関 (EPSO) は失望・欧州の後退を指摘した。116の欧州研究所会合は EC 議長に対し、欧州司法裁判所裁定の非科学性を指摘した。13ヶ国会議体は2018年 WTO 会議でゲノム編集作物に対する支持を表明した。

(4) 各国 (欧州以外) におけるゲノム編集作物に対する対応の現状 (米国農務省と共有情報)

1) 北米

カナダ：プロダクトベース (最終製品での判断)

USA：非 GMO 扱い、少なくとも20種のプロダクト - 高オレイン酸ダイズ油；多センイコムギ・アルファルファ；耐冷蔵バレイショ；褐変減少バレイショ；モチ性デンプントウモロコシ；不アレルギー性コムギなど。

2) 南米

アルゼンチン：非 GMO 扱い、少なくとも10保留品種が評価中

ブラジル：非 GMO 扱い、カカオ、

チリ・コロンビア・ホンジュラス・パラグアイ・ウルグアイ：非 GMO 扱い

3) その他

オーストラリア：鋳型なしのゲノム編集は非 GMO

イスラエル：導入遺伝子なければ非 GMO

ノルウェー：在来法と同一変化は非 GMO

ロシア：新法令でゲノム編集作物は非 GMO 扱い

日本・フィリピン：非 GMO 扱い

スイス：改定 GMO 法令2019年予定

ニュージーランド：GMO 扱いを継続

(5) 今後の方途

欧州司法裁判所は、EC の科学的諮問機構 (SAM) や欧州食品安全機関 (EFSA) などの助言を無視してゲノム編集作物規制を固持している。バイテクの資本・便益・成果は欧州から避難しつつある。EC は速やかにゲノム編集作物を規制外とし、現状のプロセスベースの GMO 審査体制からプロダクトベースの審査体制へ更新すべきである。これは、2050年までに現在の2倍の農作物生産の大課題に応える一方途でもある。

(林 健一)

Realized pollen flow and wildling establishment from a genetically modified eucalypt field trial in Southeastern Brazil

ブラジル南東部における遺伝子組換えユーカリのほ場試験による花粉流動と雑草化の現実

da Silva PHM *et al.*

2017

Forest Ecology and Management 385: 161-166

ブラジルの大学、公的研究機関及び民間企業による産官学共同研究グループによる原著論文。遺伝子組換え林木の実用化に際しては、周辺環境への花粉飛散によるジーンフローが懸念される。ユーカリは世界最重要林木である。ユーカリの花粉流動は、オーストラリアでの野生林での報告はあるが、これまでに遺伝子組換えユーカリ（GM ユーカリ）を用いた報告はこれまでにない。著者らは、ブラジル南東部の GM ユーカリ試験圃場とその周囲の非組換えユーカリ植林地を利用し、GM ユーカリの花粉流動性の調査を行った。

- (1) GM ユーカリ試験区：ブラジル・サンパウロ州で2009年より GM ユーカリ (*Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*) の試験圃場を調査対象とした。試験圃場には GM ユーカリ1665本及び対照非組換えユーカリ171本が2.7×2.7m 間隔で植栽される。試験区の周囲には3 m 幅の林道及び牧草地（シグナルグラス；*Bracharia* sp.）が隣接する。
- (2) サンプリング：この試験圃場の北西端から北西方角に、3, 15, 220, 240, 260, 435, 650 m 離れた7地点に植栽される非組換えユーカリ計28本より種子を採取した。
- (3) GM ユーカリの子孫の出現率：非組換えユーカリより採取した種子から15本ずつの実生（30日齢）を選び、DNA を抽出し、PCR 法により、外来遺伝子の有無を調査した。GM 実生の割合は、15 m 以内地点で最大50%、平均16%であったが、220m 以降の地点では平均3%に急減したが、最も遠い地点（650 m）でも見られた。この傾向は、往年の野生ユーカリの結果と一致する。
- (4) 考察：ブラジルにおいてユーカリは外来種であり、交雑可能な野生種は存在しないので、交雑可能性は、植林されたユーカリのみとなる。また、これまで、ユーカリ植林地からの種子による環境放出は事実上ない。このことからブラジル政府は、GM ユーカリの植林地の選定に関して、ユーカリの種子採取圃場からの考慮を決定した。
- (5) 総括：今回、圃場条件での GM ユーカリの花粉流動に関する初めての知見を得た。240 m 以上の隔離距離によって受粉率は大幅に低下する一方、今回調査した中で最遠の650 m でも交雑は見られた。より合理的な対策としては、GM ユーカリの存在を許容する最大レベルを設定し、それを考慮した GM ユーカリの植林地と種子圃との隔離距離を設定することが考えられる。

(小口 太一)

Transgenic Sweet Orange expressing hairpin CP-mRNA in the interstock confers tolerance to citrus psorosis virus in the non-transgenic scion

ヘアピン CP-mRNA 発現組換えオレンジ台木との接ぎ木による非組換え体穂木のカンキツソローシスウイルス耐性の付与

De Francesco A *et al.*

2020

Transgenic Research 29: 215-228

アルゼンチンの大学・公的研究機関及び米国大学の研究者による原著論文。カンキツソローシスウイルス (citrus psorosis virus; CPsV) に対する抵抗遺伝子は自然界に存在しない。著者らは、組換え手法及び新しい植物育種技術の一つでもある組換え体と非組換え体の接ぎ木技術による抵抗性の付与について検討し、以下の結果を得た。

- (1) ウイルス単離株：アルゼンチンの公的研究所によって分離された CPsV 90-1-1株を用いた。
- (2) ヘアピン CP-mRNA (ihpCP) 発現組換えオレンジ：CPsV 90-1-1株のコートタンパク質の部分配列に対応したヘアピン mRNA を発現するコンストラクトをオレンジ (Pineapple Sweet Orange; *Citrus sinensis* L. Osbeck) に導入した ihpCP-10系統及び ihpCP-15系統を用いた。
- (3) 全長 CP-mRNA 発現組換えオレンジ：CPsV のコートタンパク質全長 mRNA を発現する組換え系統 CP-18系統は、ihpCP による CP-mRNA のサイレンシング効果の検証のために使用された。
- (4) 接ぎ木試験：本研究では、非組換え体接ぎ木にまず、中間台木を継ぎ、その上にさらに穂木を継いだ3段階の接ぎ木により試験を行っている。
- (5) 中間台木から穂木への ihpCP の移動：ihpCP-10系統及び ihpCP-15系統中間台木に非組換え穂木を継いで接ぎ木を介した ihpCP の移動を調べた。ihpCP-10系統及び ihpCP-15系統中間台木での ihpCP の蓄積量は葉で2.4及び2.9、茎で0.09及び0.6であった。非組換え穂木の茎での蓄積量は0.01及び0.008であり、接ぎ木面を介したトランスジーン移動が確認された。
- (6) 接ぎ木面を介して移動した ihpCP による CP-mRNA のサイレンシングの検証：ihpCP-10系統、ihpCP-15系統及び非組換え体中間台木に CP-18系統穂木を継ぎ、CP-18穂木での CP-mRNA の蓄積量を調査した。中間台木が非組換え体の場合の CP-mRNA 蓄積量が33であったのに対し、ihpCP-10系統及び ihpCP-15系統では、8及び4ととなり、接ぎ木面を介して移動した ihpCP により CP-mRNA 発現が抑制されることが確認された。
- (7) ウイルス接種試験：中間台木 ihpCP-10系統及び ihpCP-15系統に接ぎ木した非組換え穂木に CPsV 90-1-1株を接種したところ、ihpCP の存在量に応じた病徴の大幅な抑制が確認された。
- (8) 総括：ウイルスコートタンパク質を標的とした RNAi を利用した組換え技術によるウイルスへの耐性付与は以前より知られていたが、今回、新しい植物育種技術の一つ、組換え体と非組換え体間の接ぎ木技術により、RNAi 組換え体と接ぎ木した非組換え穂木にウイルス耐性を付与することを示した。

(小口 太一)

ERA プロジェクト調査報告

2021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 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)