
ERAプロジェクト調査報告

April 2017

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

2017. 4

バイオテクノロジー研究会

2017年の調査報告書第2号（通算第31号）をお届けします。

本号では、まず欧州で2015年4月のEU指令の改定によりEU加盟国でのGM種子の自国内での栽培を目的とする種子の販売の中止を求める（オプトアウト）申請について紹介しています（No.300）。また、No.302で紹介している論文では、栽培種ダイズと交配可能な近縁種である野生種ダイズのツルマメにおける食害の調査結果から、仮にGMダイズの害虫抵抗性遺伝子がツルマメに浸透したとしても雑草性・侵略性が高まることはない事が考察されています。その他には、セルロースバイオマスの利活用性向上のために開発されたセルラーゼ発現トウモロコシの圃場栽培評価試験（No.301）、野生種及び栽培品種のダイズ302アクセッションを用いたリシーケンシング解析による栽培化及び育種に関連する遺伝子の同定（No.303）、中国のグループによるチョウ目害虫抵抗性組換えイネの安全性評価（No.304）、欧州委員会共同研究センター傘下将来技術調査研究所（JRC/IPTS）による世界のGM作物におけるこれまでの発展および今後の展望予測（No.305）、ドイツ大学グループにより開発された微生物由来の抗菌ペプチドによるアフラトキシン産生抵抗性トウモロコシ（No.306）、GMトウモロコシの分離系統から作出されたF1トウモロコシの構成成分が組換え遺伝子の有無に係わらず同等であることを示した報告（No.307）、中国の研究グループがパンコムギ未熟胚でCas9及びガイドRNAをコードしたプラスミドDNAあるいは*in vitro*転写したRNAを一過的に発現させることで遺伝子導入フリーのゲノム編集に成功した報告（No.308）を紹介しています。また、No.309で紹介している英国の研究グループによる論文では、層状複水酸化物を取りこませた短鎖二本鎖RNA（dsRNA）は、単独よりも長期間、RNAi効果が持続することが報告されており、植物への遺伝子導入を伴わず噴霧するだけで持続的なRNAi効果が期待されることからウイルスによる病徴確認後の局所的対処法としても期待されます。

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/namazugi>

目次

No.300	オプトアウト申請の期限が迫る中、GM 作物をめぐる深まる欧州の亀裂 Europe's rifts over transgenic crops deepen at Key deadline.....	1
No.301	圃場で生育したセルラーゼ発現トウモロコシの評価 Assessment of field-grown cellulase-expressing corn	2
No.302	野生ダイズ (<i>Glycine soja</i>) に対する食害程度の観察及び摘葉試験結果を 利用した害虫抵抗性ダイズの生態リスク評価 Characterization of natural and simulated herbivory on wild soybean (<i>Glycine soja</i> Seib. et Zucc.) for use of ecological risk assessment of insect protected soybean	3
No.303	野生種及び栽培品種の302アクセッションのリシーケンシングによるダイズの栽培化 及び育種に関連する遺伝子の同定 Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean	4
No.304	<i>cry2A</i> * 遺伝子導入チョウ目害虫抵抗性組換えイネの安全性評価 Safety assessment of lepidopteran insect-protected transgenic rice with <i>cry2A</i> * gene	5
No.305	世界の GM 作物パイプラインの2020年への展望 The global pipeline of GM crops out to 2020	6
No.306	Thanatin はトウモロコシ (<i>Zea mays</i>) においてアフラトキシン産生菌に 部分的な抵抗性を付与する Thanatin confers partial resistance against aflatoxigenic fungi in maize (<i>Zea mays</i>)	7
No.307	GM トウモロコシの分離系統から作出された F1トウモロコシの構成成分は 組換え遺伝子の有無に係わらず同等である：組換え遺伝子の有無の間で観察 された構成成分の違いは、すべて戻し交配に起因するものである Maize hybrids derived from GM positive and negative segregant inbreds are compositionally equivalent : any observed differences are associated with conventional backcrossing practices	8
No.308	CRISPR/Cas9 DNA または RNA の一過的発現によるコムギの効率的かつ 遺伝子導入無しのゲノム編集 Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA	9
No.309	クレイナノシートによる局所的 RNAi 投与による植物ウイルスからの持続的な保護 Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses	10

オプトアウト申請の期限が迫る中、GM 作物をめぐる深まる欧州の亀裂

Europe's rifts over transgenic crops deepen at Key deadline

Rabesandratana T
Science 350: 18-19, 2015

欧州圏の多くの人々が拒否している GM 作物について溝がさらに深まりつつある。2015年4月のEU指令の改定により、諸国はGM作物の自国での栽培に関し、EU全域の決定事項を退け、各国独自のルールを適用することが可能となった。欧州食品安全機関（EFSA）が安全と認定し、欧州委員会（EC）がその栽培を認可したGM品種であっても、各国は自国内での栽培を拒否できることになる。実施には2種類のオプションがある。第一のオプションは、既に商品化されている又はEFSAによる審査が終了しているGM種子（トウモロコシ4品種）の自国内での栽培を目的とする種子の販売の中止を求めるもの（オプトアウト）である。このオプションの選択には、期限（2015年10月3日）が設けられており、期限が迫る中、EU加盟国間で対応が分かれている。本原稿の執筆時（编者注：本報告の掲載号の発行日は2015年10月2日）時点で、EU28ヶ国中9ヶ国（強固な反対国であるラトビアを含む）がこのオプションの採択をECに通知し、GM消極派のドイツ、イタリアもこれに追随すると見られている^{補足}。第二のオプションは、自国内の一部あるいは全域での特定GM品種の栽培を目的とする種子の流通・販売を禁止するものであるが、EFSAの科学的リスク評価の尊重が要求されており、提出期限も設定されていない。第一のオプションは単純・速効的であるが、グリーンピースは第二のオプションをすすめている。理由は農家・養蜂家などの選択肢の柔軟性をあげている。GM支持者は新ルールをEUの科学的規制への大打撃としている。しかし、「各国独自選択権」は、GM認可における全EU的合意を不要とし、研究・試験・安全性評価などの迅速化を期待する声もある。しかし、現実的には、開発企業によるEU向けGM品種の開発の中止がさらに増加することが予想される。この「各国独自選択権」は、栽培に関するものであるが、今後より大きな領域、つまり食品及び家畜飼料への拡大を意図している。EUは、主に飼料用としてではあるが、60 kg/人/年のGMダイズ産物を輸入している。もしこれが実施されればEU諸国間の亀裂はさらに深まるであろう。

補足：最終的にEU加盟国28か国中17か国（オーストリア、ブルガリア、クロアチア、キプロス、デンマーク、フランス、ドイツ、ギリシャ、ハンガリー、イタリア、ラトビア、リトアニア、ルクセンブルク、マルタ、オランダ、ポーランド、スロヴェニア）及び4つの地域（ワロニア（ベルギー）、スコットランド、ウェールズ、北アイルランド（以上英国））がオプトアウト申請を行った。

圃場で生育したセルラーゼ発現トウモロコシの評価

Assessment of field-grown cellulase-expressing corn

Grada M *et al.*

Transgenic Research 24: 185-198, 2015

米国大学研究グループによる原著論文である。工業用・医療用特性を導入した遺伝子操作作物（GE作物）に関する米国での規制は、他のGE作物よりも厳しく、小規模ほ場栽培試験の場合も、通知（notification）ではなく、作物の種類、導入特性に応じた関係機関（USDA・FDA・EPA）から許可（permission）を取得する必要がある。筆者らはトウモロコシ穀粒に含まれるセルロースバイオマスの利活用性向上のため、糸状菌由来及びバクテリア由来のセルロース分解酵素（セルラーゼ）を導入したGEトウモロコシを開発した。本研究では、セルラーゼ導入GEトウモロコシの圃場栽培評価試験を実施し、以下の結果を得た。

- (1) 供試GEトウモロコシ：糸状菌由来のエキソセルラーゼ導入1系統、バクテリア由来のエンドセルラーゼ導入2系統、計3系統のGEトウモロコシを作出し、エリート自殖系統と交雑により得たF1雑種を圃場試験に供した（導入遺伝子は各1コピー）。
- (2) 種子形質：発芽率・根長・一粒重に関して、F1雑種及び対照の間に有意差はなかった。
- (3) セルラーゼ発現：ウエスタンプロットにより、3系統のGE F1雑種は、それぞれ導入した外来セルラーゼを保有していることが確認された。
- (4) 穀粒構成成分：GE F1雑種及び対照を通じて、タンパク質含量は6.2～8.0%、炭水化物は約87%、可溶性繊維は13～14%、脂質は4.5～5.5%でいずれもGE-対照間で有意差はなかった。また、リン酸、カリ、マグネシウム、銅の含量にも有意差はなかった。
- (5) 圃場生育形質：種子収量、容積重、倒伏性、褐変葉では多少の変動があったが、有意差はなかった。
- (6) 考察：近年、デンプン原料エタノール生産用 α -アミラーゼ導入トウモロコシが工業用として、また補完用のヒト型酵素を産生する植物が医療用として、いずれも一般的規制の適用が除外されている。また、トウモロコシ穀粒には元来大量の内生セルラーゼが含まれて（乾燥重の約1%）おり、セルラーゼの健康への影響はないと考えられる。これらの結果は、本報告の工業用GEトウモロコシへの将来の商品化に向けての希望を与える。
- (7) 総括：セルラーゼ導入GEトウモロコシについて、一般生育特性・種子構成成分に関する実質的同等性が検証された。

野生ダイズ (*Glycine soja*) に対する食害程度の観察及び摘葉試験結果 を利用した害虫抵抗性ダイズの生態リスク評価

Characterization of natural and simulated herbivory on wild soybean (*Glycine soja* Seib. et Zucc.) for use of ecological risk assessment of insect protected soybean

Goto H *et al.*

PLoS ONE 11: w0151237 | DOI: 10.1371/journal.pone.0151237, 2016

モンサント社（日本・米国）・日本の大学の研究グループによる原著論文。日本の年間ダイズ消費量300万トンの90%以上は輸入品（食料・飼料）で、その70%はGMと推定される。認可されたGMダイズの導入特性は、以前は除草剤耐性が中心であったが、最近では害虫抵抗性も増えつつある。日本には、栽培種ダイズと交配可能な近縁種である野生種ダイズ（ツルマメ、*Glycine soja* Seib. et Zucc.）が自生する。このため、交配により害虫抵抗性形質の野生種への移入が昆虫生態系へ与える影響の評価が求められる。そこで、著者らはツルマメを食害する在来の加害害虫に関する基礎調査を実施し、以下の結果を得た。

- (1) ツルマメ自生集団の食害調査：茨城県・佐賀県の各3地点、3生育時期（栄養生長・開花・成熟）、3年間（2011～13）、葉の食害率を調査した。ツルマメを食害する草食虫類目は多様（バッタ・コウチュウ・チョウ・カメムシ・ヨコバイ・ハエ）であったが、全体の食害率は3.6～30.6%であった。食害する主要虫類目の内訳はバッタ目（バッタ・コオロギ）・コウチュウ目（マメコガネ・ハムシ科）・チョウ目（ハスモンヨトウ・ダイズサヤムシガ・シャクガ）で3目による合計最大食害率は7.75%、前2者が主要でチョウ目は常に2%以下であった。年次・地点・生育時期による食害率の変動には一定の傾向はなかった。
- (2) シミュレーション試験：食害が種子生産性に及ぼす影響が最大となると予想される開花期のツルマメに、0, 10, 25, 50, 100%の摘葉処理を行った（人工気象室・モンサント米国）。摘葉50%（食害率50%）までは、莢数・種子収量・成熟まで日数は無摘葉の対照と有意差がなく、無限伸長性の新葉展開による補償効果が確認された。摘葉100%では生育量が有意に低下し、成熟まで日数も10日遅延した。
- (3) 総括：自生ツルマメに対する草食虫類の食害率は最大でも30%、チョウ目は2%以下、50%までの摘葉（食害率50%）では正常な生育が維持され、仮に害虫抵抗性遺伝子が浸透したとしても雑草性・侵略性が高まることはないと考えられる。従って、害虫抵抗性ダイズが日本のツルマメへ与える影響は無視可能な程度に低いと結語される。

(訳者注：生態的実態解明に基づくリスク評価の好例と考えられる。)

野生種及び栽培品種の302アクセッションのリシーケンシングによる ダイズの栽培化及び育種に関連する遺伝子の同定

Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean

Zhou Z *et al.*

Nature Biotechnology 33: 408-414, 2015

中国の国研・大学28名チームによる原著論文である。ダイズは中国で5000年前に栽培化され、韓国・日本へは2000年前、米国へは1765年、中南米へは前世紀前半に導入された。著者らは今後のダイズ育種の重要基礎資料として、栽培化に伴うゲノム変異の態様を種々の手法で解析し、以下の結果を得た。

- (1) 供試系統品種：野生ダイズ 62、在来種 130、栽培品種 110、合計302アクセッション（既解析の93アクセッションを含む）。
- (2) ゲノム多様性解析：302全アクセッションのゲノム DNA 配列をイルミナ社の HiSeq2000を用いたリシーケンシングにより、330億 paired-end reads（平均リード長100 bp、カバレッジは11 x /アクセッション以上）解析した。全ゲノム配列が明らかとなっている Williams 82の配列をリファレンスとし、9,790,744の一塩基多型（SNPs）を特定した。
- (3) ダイズ集団の構成：系統樹及び主成分分析により、グループ0（野生ダイズ）、グループI（在来種多、改良種少）、グループII（改良種多、在来種少）の3群に群別された。塩基多様度（ π ：塩基座位あたりのヘテロ接合度）は野生ダイズ 2.94×10^{-3} 、在来種 1.40×10^{-3} 、改良種 1.05×10^{-3} へと栽培化過程で半減していた。顕著な地理的分布及び構成種からグループIは3群に、グループIIは4群に再群別された。
- (4) 栽培化の対象となった形態的形質として、草丈、茎伸長性（有限・無限）、花包、種皮色、種子重、種子のへそ（胎座痕）の着色、葉無毛性、などが特定された。油脂含量は優先的選抜対象形質であり、すでに多くの量的形質遺伝子座（QTL）が報告されているが、本研究では1個の新しい遺伝子が特定された。
- (5) 地域的育種関連特性：北部中国品種は無限伸長性・小型葉を有し、南部品種は有限伸長性・卵形葉を有する。高緯度（中国北部北東部・韓国・日本・米国・カナダ）品種は成熟期が短く（早生）有毛葉（涼湿適応）が多く、中国南部品種は成熟期が晩生で無毛葉が多い。
- (6) 総括：広域・多数ダイズ系統・品種について、栽培化・育種に伴うゲノム変異・特性変化の態様を示された。これらの結果は今後のダイズ育種への基本的情報となると結語される。

***cry2A** 遺伝子導入チョウ目害虫抵抗性組換えイネの安全性評価**

Safety assessment of lepidopteran insect-protected transgenic rice with *cry2A** gene

Zou S *et al.*

Transgenic Research 25:163-172, 2016

中国国研・大学チームによる原著論文である。コメは世界人口の半数を超える35億以上の人々の主食である。中国は世界最大のコメ生産・消費国であり、世界のコメ生産量の約30%を生産しているが、世界人口の約20%の国民の消費を賄うと、中国からのコメの輸出はわずかである。一方、イネは200種以上の害虫による加害により15~25%減収する。中国では1990年代後半より、Cry1Ab, Cry 1Ac, Cry 1Aa, Cry 2A, Cry 1B 及びこれらの組合せによる *Bt* イネを開発してきているが、まだ市場化承認品種はない。著者らは新規開発 *cry2A**導入 *Bt* イネの安全性評価を行い以下の結果を得た。

- (1) *cry2A**導入 *Bt* イネの作出：*cry2A**遺伝子をアグロバクテリウム法によりインディカ Minghui63に導入し、チョウ目（メイガ・ハマキガ）抵抗性 *Bt* イネ T2A-1を作出した。同系統の *Bt* タンパク質含量は10 $\mu\text{g/g}$ 新鮮葉と高く、「high-dose/refuge」戦略のレベルを満たしている。
- (2) 給餌試験：*cry2A**遺伝子導入組換えイネあるいは非組換えイネ（対照）含有率30, 50, 70%の餌を生後4週間のラット（Sprague-Dawley rat）に90日間給餌した。i）生育：試験区ネズミは対照区ラットと同様に健全に生育し、体重に有意差はなかった。ii）医学的形質：血液（雌雄各12項目）、血清（雌雄各13項目）、臓器（雌雄各9種類）、組織病理の全項目において、有意差は検出されなかった（若干の変動は給餌差以外に起因すると判断される）。
- (3) 考察：Cry1Ab, Cry2A などの給餌試験でも、有害影響は報告されていない。
- (4) 総括：*cry2A**遺伝子導入 *Bt* イネ T2A-1は、対照イネと同程度の食品安全性を有すると結語される。

（訳者注：世界のコメ生産、消費に影響が大きい中国の *Bt* イネの食品安全性に関する情報として注目される。）

世界の GM 作物パイプラインの2020年への展望

The global pipeline of GM crops out to 2020

Parisi C *et al.*

Nature Biotechnology 34: 31-36, 2016

欧州委員会共同研究センター傘下将来技術調査研究所 (JRC/IPTS) (在スペイン) の研究グループによる総説である。著者らは広範囲な文献・資料に基づいて、GM 作物の2008から2014年への発展及び2020年への展望を詳述した。

- (1) GM 作物の上市化：開発のステージを商業栽培 (commercial cultivation) / 前商業栽培 (precommercial stage) / 規制対応 (regulatory stage) / 後期研究開発 (advanced R&D) の4段階で評価すると、2014年時点でのイベント (品種) 数はそれぞれ、49 / 53 / 43 / 77となる。2008年時点で商業栽培ステージであったイベントの90.9%は2014年にも存続したが、3イベント (ウイルス抵抗性カボチャ・日持ちの良いトマト・除草剤耐性ナタネ) は市場から消失した。2008年時点で前商業栽培ステージのイベントの2014年におけるステージは、40.4%が商業栽培ステージ、33.3%が前商業栽培ステージのまま存続、20.2%は消失した。同様に2008年時点で規制対応ステージのイベントは2014年時点で、30.4%は商業栽培ステージへ、21.7%は前商業栽培ステージとなった。この動向から推測される2020年時点でのGM作物の上市化状況は、商業栽培96イベント、前商業栽培ステージ123となり、2014年時点で後期研究開発のイベントの20%は上位ステージへ進展するとの予測が得られる。
- (2) 作物及び特性の予測：2020年の商業栽培・前商業栽培ステージにおいても4大作物 (ワタ・トウモロコシ・ダイズ・ナタネ) が多勢であるが、イネ・バレイショの商業栽培への参入、除草剤耐性アルファルファ・害虫抵抗性ナス及びポプラの商業栽培・前商業栽培ステージへの参入、またウイルス抵抗性インゲンマメ (ブラジル)・乾燥耐性サトウキビ (インドネシア)・除草剤耐性アマ (カナダ) の前商業栽培ステージへの参入が予測される。特性では、除草剤耐性・害虫抵抗性が多勢であるが、ウイルス抵抗性・乾燥耐性・多収性が加わり、新しい作用機作の除草剤耐性・新しい *Bt* 遺伝子による害虫抵抗性などの実用化が予測される。また成分改変の分野では、構成成分・栄養価の向上に加え、工業用特性 (アルコール・工業材料など) を目的とした成分改変 GM 作物の増加も予測される。
- (3) GM 作物開発者：大規模多国籍企業の優勢が続くが、米国・インドでは新興開発企業、インド・中国・南米では、公的機関による開発の増加が予測される。アフリカでは国と先進国企業との協力による開発が進行中である。
- (4) 考慮事項：1) 承認済みイベント間の慣行交雑による多数特性集積スタックの増加、2) 非国際協調承認・ERA 制度の相異に由来する国際間種子移動の遅延・停滞、3) 承認期限が切れて再承認手続きが行われなかった GM 産物あるいは (一部のスタックや国内専用 GM イベント (特にアジア地域)) の輸入食料・飼料への微量混入、4) GM 定義の枠外となる新育種技術産物への対応。

(訳者注：本総説ではコムギに関する情報が欠落している。)

Thanatin はトウモロコシ (*Zea mays*) において アフラトキシン産生菌に部分的な抵抗性を付与する

Thanatin confers partial resistance against aflatoxigenic fungi
in maize (*Zea mays*)

Schubert M *et al.*

Transgenic Research 24: 885-895, 2015

ドイツ大学グループによる原著論文である。*Aspergillus* 属は油糧種子（トウモロコシ・ラッカセイ等）に感染し、猛毒のアフラトキシンを産生し、人畜に大きな被害を及ぼす。著者らは初めての試みとして微生物由来の抗菌ペプチドによるアフラトキシン産生抵抗性トウモロコシの育種への利用を検討し、以下の結果を得た。

- (1) 微生物由来の抗菌ペプチドの選定：既知の抗菌性ペプチド 6 種類について、アフラトキシン産生菌である *A. flavus* 及び *A. parasiticus* に対する発芽抑制を評価し、効果の高かった D4E1 及び Thanatin を選出した。その後、タバコ葉への一過的発現（アグロインフィルトレーション）により壊死を生じさせた D4E1 を除外し、最終的に Thanatin を選定した。
- (2) Thanatin 導入トウモロコシの作出：Thanatin の発現カセットを含む T-DNA を、アグロバクテリウム法でトウモロコシ Hi Type II hybrid に導入し、11 の独立した形質転換体 (T0) を得た。すべての形質転換体は、生育及び形態に異常な表現型はなかった (T0 及び T1 世代)。
- (3) 組換えトウモロコシの *Aspergillus* 抵抗性：T1 植物の穀粒（つまり T2 世代）を *A. flavus* 分生子溶液に浸漬した後に 7 日間培養して感染程度を抵抗率 R (0~100%) により評価した。対照の R は 14% であった。代表的な Thanatin 導入組換えトウモロコシの R は系統 than#9b 後代で平均 53.2%、系統 than#11b 後代で平均 44.2%、系統 than#11c 後代で平均 30.5% と抵抗性の向上が確認された。
- (4) 総括：初めての試みとして抗菌性ペプチドを導入した組換えトウモロコシは、*Aspergillus* 菌に対して対照の 1.6~3.2 倍の抵抗性を示した。これにより圃場・貯蔵中のトウモロコシのアフラトキシン汚染を抑制する方が示された。

(訳者注：組換えトウモロコシは米国アイオワ州立大学で作出された。)

GM トウモロコシの分離系統から作出された F1 トウモロコシの構成成分は組換え遺伝子の有無に係わらず同等である：組換え遺伝子の有無の間で観察された構成成分の違いは、すべて戻し交配に起因するものである

Maize hybrids derived from GM positive and negative segregant inbreds are compositionally equivalent : any observed differences are associated with conventional backcrossing practices

Venkatesh T V *et al.*
Transgenic Research 25: 83-96, 2016

モンサント社の研究者による原著論文である。著者らは表題に関し、以下の結果を得た。

- (1) 供試材料：NK603自殖系統（T8837）と非組換え反復親（R8190）の F1 雑種に対し、非組換え系統を 3 回戻し交配、その後、4 回自殖により得た BC₃F₄ 世代の準同質遺伝系統（NIL）から、導入遺伝子保持（POS）4 系統、非保持（NEG）4 系統を選定し、テスター品種（従来商業品種 2 品種）と交配、交雑種を全米 4 地点で栽培、収穫穀粒の構成成分を分析した。なお、供試した交雑種間及びその反復親との遺伝的類似性は 94% 以上であった。
- (2) 構成成分：デンプン・タンパク質・脂質・アミノ酸・脂肪酸・無機成分・カロテン・フィチン酸など 44 項目。
- (3) 構成成分（4 地点総平均）：NEG と反復親、POS と反復親を比較した場合、全比較回数それぞれ 98.55%、95.06% で有意差がなかった。POS と NEG の間でも 95.35% の比較項目で有意差がなかった。以上から、POS、NEG、反復親は構成成分において同等であると判断された。
- (4) 測定値の変動：各測定値の項目平均値からの相対偏差（%）の分布の標準偏差は、反復親 9.19、POS 9.95、NEG 9.82 であった。
- (5) 分散成分解析：分散の主な原因は栽培地点であった（全分散の 35% 以上）。ついでテスター品種の違い（既存 2 品種）による分散が約 15%、導入遺伝子の有無や NIL 系統間による分散は 1% にも及ばなかった。この結果は既往の他研究結果と一致した。
- (6) 総括：トウモロコシ種子構成成分の変動は栽培地点及び慣行育種操作（戻し交配・テスト交配）が主因であり、導入遺伝子の有無による影響は極めて小さい。導入遺伝子保持系統及び非保持系統は同等であり、準同質遺伝系統を安全性評価のための試験の対照として使用することの妥当性が示唆された。

CRISPR/Cas9 DNA または RNA の一過的発現によるコムギの効率的かつ遺伝子導入無しのゲノム編集

Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA

Zhang Y *et al.*

Nature Communication 7: 12617 | DOI: 10.1038/ncomms12617, 2016

中国の研究グループによる報文。注目を集めるゲノム編集技術だが、植物では、現状、ゲノム編集のためのコンストラクトをゲノム中に形質転換する必要がある。筆者らは、Cas9及びガイドRNAをコードしたプラスミドDNAあるいは *in vitro* 転写したRNAをパーティクルボンバードメントによってパンコムギ (*Triticum aestivum*) 未熟胚に導入し、一過的に発現させることで遺伝子導入フリーのゲノム編集に成功したことを報告した。

- (1) TECCDNA (transiently expressing CRISPR/Cas9 DNA) 法: Cas9及びガイドRNAをコードしたプラスミドDNAをパーティクルボンバードメントによってコムギ未熟胚に導入する方法。穀粒長径及び穀粒重に関連する *GASR7* 遺伝子 (A1、B1、D1ゲノムにそれぞれ1コピー存在) のエキソン中の配列を標的とする TECCDNA を品種 Bobwhite の未熟胚1600個に射込んだところ、80系統の変異体を得られた (効率5%)。このうち、変異がホモ接合であったのは10% (10系統)、TECCDNA 不在であったのは43.8% (35系統)、ホモ接合かつ TECCDNA 不在であったのは5% (4系統) であった。品種 Kenong199の未熟胚を用いた場合も、変異導入効率2.6%、変異がホモ接合かつ TECCDNA 不在は4.8% であった。
- (2) TECCRNA (transient expression of the *in vitro* transcripts (IVTs) of Cas9-coding sequence and guide RNA) 法: *in vitro* 転写用のRNAコンストラクトをパーティクルボンバードメントによって射込み、コムギカルス細胞内で一過的に Cas9及びガイドRNAを転写させる方法。穀粒短径及び穀粒重に関連する *GW2* 遺伝子 (A1、B1、D1ゲノムにそれぞれ1コピー存在) のエキソン中の配列を標的とする TECCRNA を品種 Kenong199の未熟胚1600個に射込んだところ、17変異体を得た (効率1.1%)。このうち、変異がホモ接合であったのは35.3% (6系統) であった。
- (3) ゲノム編集手法間でのオフターゲットの比較: TECCDNA 法、TECCRNA 法及び従来法 (Cas9及びガイドRNAの発現カセットをアグロバクテリウム法で形質転換した) の間でオフターゲットの出現頻度を比較した。しかし、既知のオフターゲット配列予測ツールで見つかった配列にはいずれも変異が見つからなかった。そこで、A1染色体の *GW2* 遺伝子のみ、ガイドRNA配列中に1塩基の多型があることを利用し、オフターゲット出現のモデルとした。TECCDNA 法及び従来法で同じ *GW2* 配列を標的としたゲノム編集体を新たに24及び26変異体を得、前出の TECCRNA 法で得られた17変異体との間で比較したところ、変異導入頻度はB1染色体アレル (2.6%/3.0%/1.1%) とD1染色体アレル (2.9%/2.9%/1.1%) は同程度であったが、A1染色体アレル (2.0%/2.3%/0.4%) は他2アレルと比較し低くなっていた。このことから、いずれの方法もオフターゲットの潜在的リスクは小さいと考えられる。
- (4) ゲノム編集で得られた変異体の表現型: ホモ接合かつ TECCDNA 不在の *gasr7* 変異体 (T0) の1000粒中は、いずれの品種背景でも野生型と比較し、有意に増加した。
- (5) 総括: パンコムギにおいて、遺伝子導入無しに CRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集が可能であることを示した。また、*in vitro* 発現系を利用した CRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集は植物で初めての報告である。今後は、他の作物への応用が期待される。

クレイナノシートによる局所的 RNAi 投与による 植物ウイルスからの持続的な保護

Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained
protection against plant viruses

Mitter N *et al.*

Nature Plants 3: 16207 | doi:10.1038/nplants2016.207) , 2017

豪州及び英国の研究グループによる報文。ウイルスの塩基配列の一部に相同な短鎖二本鎖 RNA (dsRNA) の局所的処理は、植物にウイルス抵抗性を付与することが以前から知られるが、効果の持続性が実用化に向けての大きな課題であった。筆者らは、dsRNA を LDH に取り込ませた複合体 (dsRNA-LDH) を用いることで、この課題を克服したことを報告した。

- (1) LDH：層状複水酸化物 (LDH) は、2 価の金属水酸化物に 3 価の金属イオンが固溶した複水酸化物で、水酸化物基本層が正電荷を持つため、層間に負の帯電する陰イオンを挟んだ積層構造の化合物で、二次元基本層を維持したまま、層空間に原子・分子・イオン (ゲスト物質) を取り込むことができる[†]。
 - (2) dsRNA：pepper mild mottle virus (PMMoV) の RNA 複製酵素 (IR54) を標的とする PMMoVIR54-dsRNA 及び cucumber mosaic virus (CMV) 2b タンパク質 (CMV2b) を標的とする CMV2b-dsRNA を用意した。また、これらの dsRNA をゲスト分子として LDH に取り込ませたものを PMMoVIR54-dsRNA-LDH、CMV2b-dsRNA-LDH と表記する。
 - (3) 植物表面での LDH の安定性：タバコの葉に噴霧した水滴中では LDH はゆっくりと分解されることを確認した。また、常 CO₂ 圧条件と高 CO₂ 圧 (5%) 条件で dsRNA を取り込ませた LDH の分解を比較させたところ、高 CO₂ 条件の方が早く分解された。
 - (4) dsRNA-LDH からの dsRNA の植物への取り込み：モデル実験系として、P35S:GUS 導入シロイヌナズナの葉に GUS dsRNA 単独及び GUS-dsRNA-LDH を処理した。P35S:GUS 導入シロイヌナズナの GUS 活性は、GUS dsRNA 及び GUS-dsRNA-LDH 処理のいずれも、対照区より有意に活性が抑えられた。このことから、dsRNA-LDH 処理によって dsRNA 処理の効果が得られることを確認した。
 - (5) LDH 中での dsRNA の安定性：CMV2b-dsRNA 及び CMV2b-dsRNA-LDH をタバコの葉に噴霧し、1~30 日後にノーザンブロットで RNA 残存量を調査したところ、dsDNA のみでは 20 日でほぼ検出できないレベルにまで分解していたが、dsRNA-LDH では 30 日目でも容易に検出可能であった。
 - (6) ウイルス耐性試験：温室で栽培したササゲ (*Vigna unguiculata* spp. *unguiculata*) に CMV2b-dsRNA 及び CMV2b-dsRNA-LDH を噴霧、その 1 または 5 日後に CMV を感染した。噴霧後 20 日目に病斑数は、いずれの接種条件でも CMV2b-dsRNA 及び CMV2b-dsRNA-LDH 処理区で対照区より有意に少なかった。同様に、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) に LDH、PMMoVIR54-dsRNA 及び PMMoVIR54-dsRNA-LDH を噴霧、その 5 または 20 日後に PMMoV を感染、感染後 10 日目に病斑数を測定した。PMMoVIR54-dsRNA-LDH 処理ではいずれの処理でも対照区と比較し、病斑数は有意に少なかったが、PMMoVIR54-dsRNA の場合、噴霧後 20 日目に感染した場合は、病斑数を抑制できなかった。
- 総括：LDH に取り込ませた dsRNA は dsRNA 単独よりも長期間、RNAi 効果が持続することが分かった。本技術は植物への遺伝子導入を伴わず、噴霧するだけで持続的に RNAi 効果を得ることから病徴確認後の局所的対処法としても期待される。

[†] 岩手大工学部無機材料科学研究室 HP より抜粋・改変

ERA プロジェクト調査報告

2017年4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)

理事長 安川拓次

〒102-0083 東京都千代田区麹町 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)