
ERAプロジェクト調査報告

June 2018

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

2018. 6

バイオテクノロジー研究会

2018年の調査報告書第3号（通算第38号）をお届けします。

本号では、増大する世界人口を支えるために作物の収量を増加させることの必要性、そのために遺伝子組換え技術やゲノム編集技術の重要性について解説された記事を紹介します（No.370）。遺伝子組換え作物の栽培が先進国だけでなく途上国も含めた26ヶ国に広がっており、多くの形質が利用されているという国際アグリバイオ事業団（ISAAA）の報告も紹介しています（No.377）。遺伝子組換え作物の栽培が及ぼす影響に関して、過去21年間に実施・報告されたほ場試験データを基にメタ分析を実施し、遺伝子組換えトウモロコシの農業形質、環境及び毒性学的影響に関してまとめた報告（No.379）についても紹介しておりますのでご一読ください。

開発分野では、イネにフェレドキシン様タンパク質をコードする遺伝子を導入することによる光合成関連特性の向上によってもたらされる収量増加の可能性（No.371）、イネ黒すじ萎縮ウイルス病（RBSDV）に対する抵抗性品種の作出（No.372）、カンキツツローシスウイルス病（CPSV）に対する抵抗性品種の作出（No.376）、コレステロール低減作用を持つ新規組換えイネの開発に関する報告（No.375）といった新たな形質の開発も進んでいます。

さらに、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いた耐病性カカオの作出（No.378）といった研究開発も進められています。ゲノム編集技術の安全性評価に関して、多くの知見が積み重ねられてきていますが、本号では2017年にメキシコで開催された第14回 ISBGMO におけるゲノム編集作物に関するアカデミア、開発者、審査者、規制者による技術発展に関する知識・経験の討議（No.373）、非意図的影響が安全性に及ぼす影響評価に関する討議（No.374）について紹介します。

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.370	緑の革命の推進を Greener revolutions for all	1
No.371	イネにおけるフェレドキシン様タンパク質の恒常的発現による光合成炭素同化能力の増強 Constitutive expression of a plant ferredoxin-like protein (pflp) enhances capacity of photosynthetic carbon assimilation in rice (<i>Oryza sativa</i>)	2
No.372	RNAi 手法によるイネ黒すじ萎縮ウイルス病抵抗性組換えイネの作出 RNAi mediated resistance to rice black-streaked dwarf virus in transgenic rice	3
No.373	植物ゲノム編集 - ERA と規制に関する新規考慮事項は存在するか? Plant Genome Editing - Any novel features to consider for ERA and regulation?	4
No.374	GM 植物における非意図的影響の安全性認知に必要な根拠と行為 Types of evidence and efforts necessary to inform the safety assessment of unintended effects in GM plant	5
No.375	ダイズ β - コングリシニン α' サブユニットの高レベル蓄積によるコレステロール低減作用を持つ新規組換えイネの開発 Development of a novel transgenic rice with hypo cholesterolemic activity via high-level accumulation of the α' subunit of soybean β -conglycinin	6
No.376	カンキツソローシスウイルス外被タンパク質由来のヘアピンコンストラクトによるソローシス病に対する抵抗性安定的組換えカンキツの作出 Citrus Psorosis virus coat protein-derived hairpin construct confers stable transgenic resistance in atrus against psorosis A and B syndromes	7
No.377	市場化バイテク/GM 作物の世界的状況: 2016年 Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2016	8
No.378	<i>TcNPR3</i> 遺伝子をターゲットする CRISPR/Cas9 コンストラクトの一過的導入によるカカオ (<i>Theobroma cacao</i>) の免疫機能の向上 Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting <i>TcNPR3</i> Enhances Defense Response in <i>Theobroma cacao</i>	9
No.379	21年間のほ場データのメタ分析による遺伝子組換えトウモロコシの農業形質、環境及び毒性学的影響の評価 Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data	10

緑の革命の推進を

Greener revolutions for all

Fravell RB

Nature Biotechnology 34: 1106-1110, 2016

英国 John Innes Center の元所長（現、米国 Ceres 社最高科学責任者）によるコメントである。

- (1) 世界的最重要課題：作物の単位面積当たりの収量を増加して、増大する世界人口を支えることは緊急の最重要課題である。
 - (2) 収量増加率の低下：
 - 1) 途上国：コムギ及びイネの収量増加率は、1960年代は3%及び2%、1970~80年代は緑の革命により5%及び3%へと一過的に上昇、以後漸減し、2000年初期は1%であった。トウモロコシは2%→3%→2%と推移した。2) 先進国：コムギ及びトウモロコシともに緑の革命の効果は少なく、コムギは3%から0%へ、トウモロコシは3%から2%へと低下した。この推移が継続すれば、世界的食料不足は必至と考えられる。
 - (3) 低下の要因：1) 環境的要因：気候変動（干ばつ・温暖化）、土壌劣化、病虫害の継続、副食料需要の増加など。2) 育種的要因：優良品種の上限到達、収量関連アレルの集積困難性、育種操作の経費増、優良遺伝資源の枯渇など。
 - (4) 新技術の登場：遺伝子組換え技術を用いることにより、有用な形質を、優良品種の遺伝背景を変えることなく導入することができる。さらに最近の遺伝子編集技術を用いることにより、遺伝背景を変えることなく標的遺伝子に正確な変異を導入することができるため、内在性遺伝子の有用な変異を見出すことが可能となった。GM規制：GM作物には、従来にない厳格な規制が適用されている。高額かつ複雑な規制要求により、新規あるいは小規模開発者の参入を困難にしている。ゲノム編集などの最新技術への現行規制の画一的適用についての賛否は、国際的同意が得られていない。
 - (5) 不毛のGM論議：反対派による過去20年のGM論議は、科学的根拠はなく不毛で非建設的である。これにより緊急な世界的重要案件である収量増の目標が希薄となっている。
 - (6) 提言：「収量増」への対応促進策として、以下を提言する。1) プロダクト・ベースによる食品安全性の確保、2) 食料安全供給を最終目標とする規制の実施、3) 消費者・生産者重視政策の実施、4) 革新的技術研究への支援、5) 「収量増」への国際的パネル及び支援機関の開設。
- (訳者註：基本的収量増の重要性を示す文献として評価される)。

No.371

イネにおけるフェレドキシン様タンパク質の恒常的発現による 光合成炭素同化能力の増強

Constitutive expression of a plant ferredoxin-like protein (pflp)
enhances capacity of photosynthetic carbon assimilation in rice
(*Oryza sativa*)

Chang H *et al.*

Transgenic Research 26: 279-289, 2017

台湾大学共同チームによる原著論文である。コメは世界人口の1/2以上の主食であり、2025年までにさらに70%の増産が求められている。著者らは光合成関連特性の向上による増収組換えイネの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) *pflp* 遺伝子導入イネの作出：パブリカから単離されたフェレドキシン様タンパク質をコードする遺伝子 *pflp* をイネ品種台中67号に導入し、組換え2系統 (pflp-1及び pflp2) を作出した。
- (2) 組換え系統の諸特性：組換え2系統は、非組換え対照に対し、以下の倍率で向上した：1) 炭酸ガス吸収率：1.3及び1.2倍；2) 気孔導通性：1.5及び1.4倍；3) フラクトース：2.8及び1.8倍；4) グルコース：2.4及び2.1倍；5) ショ糖：ともに1.2倍；6) デンプン：1.8及び1.5倍；7) 葉緑素含量：組換え系統と対照との間に有意差なし。
- (3) 収量形質 (対照 /pflp-1/pflp2)：一株分けつ数：14.3/19.5/21.6；一株穂数：12.9/17.6/18.9；千粒重 (g)：31.6/52.9/41.4；一株穂重 (g)：42.3、59.8、49.3。
- (4) 総括：*pflp* 遺伝子の恒常的発現により、光合成炭酸ガス同化が増加し、収量形質が向上した組換えイネ系統が作出された。

(訳者註：温室内生育単独個体の諸量であり、15~20株/m²の実際栽培の玄米収量 (トン/ha) に直結する数値ではない。しかし、酵素レベルから光合成量、収量へと一貫した脈絡における関係諸量の動向を示す数少ない論文の一つとして評価される)

RNAi 手法によるイネ黒すじ萎縮ウイルス病抵抗性組換えイネの作出

RNAi mediated resistance to rice black-streaked dwarf virus in transgenic rice

Ahmed MMS *et al.*

Transgenic Research 26: 197-207, 2017

中国・スーダンの大学研究者による原著論文である。イネ黒すじ萎縮ウイルス病 (RBSDV) は小型トビイロウンカ (small brown planthopper; SBPH, *Laodelphax striatellus*) により媒介され、中国・韓国・日本・他のアジア諸国に大害を与えるが、抵抗性遺伝資源がなく対策が遅れている。著者らは RNAi 手法の適用による抵抗性イネの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 抵抗性組換えイネの作出：RBSDV のゲノムを構成する10の dsRNA 鎖 (S1~S10) のうち、S7-2 (非構造因子、植物-ウイルス相互作用に関与) 又は S8 (中核因子、転写関与) をそれぞれ標的とする RNAi コンストラクトを設計した。2つの独立した T-DNA 領域を持つ pCAMBIA1300ベクターの一方の T-DNA にいずれかの RNAi 発現カセット、他方にハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPT*) の発現カセットを導入した Ti-plasmid ベクターをアグロバクテリウム法によりジャポニカ品種 KWYJ3及び Y8に導入した。
 - (2) T₀世代：*HPT* は T₀全個体が所有；RNAi は KWYJ3由来 S7-2系で20/32、S8系で17/33、Y8由来 S8系で13/21個体において認められた。
 - (3) T₁世代：(2) で RNAi が認められた個体の自殖次代 (T₁) を以下の調査に供試た。具体的には KWYJ3由来では、S7-2RNAi 型が 4 系統 (S7-3、-4、-7、-8)、S8-RNAi 型が 2 系統 (S8-1、-25)；Y8由来では S8-RNAi 型が 3 系統 (S8-5、-6、-2) である。
 - (4) マーカーフリー/RNAi ホモ接合系統の選抜：T₅世代まで自殖し、*HPT* が不在かつ RNAi をホモで所有する系統を (3) の 9 系統からそれぞれ選抜した。
 - (5) RBSDV ほ場抵抗性試験：*HPT* 不在かつ RNAi ホモの T₅系統の RBSDV 抵抗性を、同ウイルス病常習多発ほ場 (10~25SBPH/株) で検定した。KWYJ3由来 S7-2 RNAi 型では発病株率は0.00~6.25%、S8-RNAi 型では4.83~8.35%、対照は15.75%；Y8由来 S8RNAi 系では1.25~8.33%、対照は18.75%であった。RNAi 系統が対照より有意に低い発病率であることが確認された。
 - (6) 総括：RNAi 適用により、イネ黒すじ萎縮ウイルス病抵抗性 (*HPT* 選抜マーカーフリー) 組換えイネ 9 系統が作出され、うち 4 系統は発病率が極めて低かった。本手法の他の萎縮ウイルス病への適用が期待される。
- (訳者註：対照の発病率が20%以下の低率であり、より激しい自然感染条件下での検討が望まれる)。

植物ゲノム編集－ ERA と規制に関する新規考慮事項は存在するか？

Plant Genome Editing – Any novel features to consider for ERA and regulation?

14th ISBGMO・平行セッションV
14th ISBGMO 発表要旨集：84-88, 2017

2017年6月4～8日にメキシコ・グアダハラハラで開催された第14回 ISBGMO において、標題の平行セッションが開催された。

(1) セッションオーガナイザー：ゲノム編集技術に関し、アカデミア、開発者、審査者、規制者による技術発展に関する知識・経験の討議を行い、同技術の正しい位置づけに貢献する (Duensing N & Bartsch D：ドイツ BVL、Sprink T：ドイツ Julius-Kuehn 研究所)。

(2) 個別発表 (5編から4編を抜粋した)。

1) ゲノム編集の新規性とは？：ゲノム編集によって新たな遺伝子を挿入する場合には、従来の遺伝子組換え作物と同様の扱いとなる。しかしながらアレルの欠失や置換については通常の突然変異 (mutagenesis) による変化を超えるものではなく、従来育種と同質で新たなリスクはない (Parrott WA：米国ジョージア大学)。

2) CRISPR/Cas ゲノム編集と慣行育種との類似性—開発者の観点：ゲノム編集品種は外来遺伝子の不在により既存の遺伝子組換え品種と区別される。ゲノム編集によるオフターゲット効果は、減数分裂期における組換えや自然・誘発突然変異よりもはるかに小さい。CRISPR/Cas 法では、長い安全性の歴史をもつ慣行育種品種と区別がつかない品種の作出が可能である (Fedorova M：デュポン・パイオニア社)。

3) ゲノム編集作物の ERA 公的審査者の観点：ゲノム編集作物又は技術の規制については、各国レベルでも国際的にも規制の施行や判断はなされていない。EFSA 等のガイダンスを参考に、各ゲノム編集技術の規制における位置づけを整理したい (ドイツ Julius-Kuehn 研究所)。

4) 規制問題：プロセスベース対プロダクトベース、及びモニタリング：種々の意見があるが、プロダクト毎の規制の方が実効性が高く、また必要に応じてモニタリングにも対応が可能と考えられている (Lema M：アルゼンチン・農産省及び Quilmes 国立大学)。

(訳者註：ゲノム編集に対する新規のリスクあるいは規制は特定されていない。)

14th ISBGMO に関しては、「イルシー」No. 132：34-42 (2017) も参照されたい。

GM 植物における非意図的影響の安全性認知に必要な根拠と行為

Types of evidence and efforts necessary to inform the safety assessment of unintended effects in GM plant

14th ISBGMO・平行セッションⅡ
14th ISBGMO 発表要旨集：60-67, 2017

2017年6月4～8日にメキシコ・グアダハラで開催された第14回 ISBGMO において、標題の平行セッションが開催された。

- (1) セッションオーガナイザー：非意図的影響は、突然変異、組織培養、多面的発現などにより発現する。過去20年の規制と商業的な利用において危害・損害を与えるリスクは検出されていない。本セッションでは非意図的影響の安全性評価に必要な情報を検証する（Davis S：カナダ・食品検査庁（CFIA）、Romeis J：スイス連邦農業研究所（Agroscope））。
- (2) 個別発表（7編より重要5編を選出した）
 - 1) 予測を超えた非意図的変化の評価における経験事項：慣行育種においても DNA 自然挿入・再配列・遺伝子伝播といった非意図的な変化は想定以上に高頻度で生じており、同一種内個体間でも数千遺伝子の変異があるが、安全性懸念は生じていない。したがって DNA レベルでの変異そのものが予測を超えるような安全性懸念を生じることではなく、形質転換に伴って予測を超えた悪影響が生じる可能性はほとんどない。リスク評価の対象は導入遺伝子に関する事項に絞るべきである（Parrott WA：米国ジョージア大学）。
 - 2) 政策への科学情報：カナダ食品検査庁（CFIA）及びカナダ保険庁（HC）は共同出版（2015）を行い、新遺伝子挿入効果及びリスクは、慣行育種と同程度であると結論した。これにより申請に対する要求データの妥当性が再確認された。また適切な規制負担と審査の厳正性ととのバランスの確保にも貢献している（Shearer H：カナダ CFIA）
 - 3) 非意図的影響と市場化産物へのインパクト：各イベントの初期に発生する不適個体（不稔・低収・短茎・変色など）は選抜過程で除去される。さらに、付与された特性の効果・農業特性・分子特性が一定基準をみたすイベントについては、その農業特性及び構成成分において対照の慣行品種と同等であることが確認される。その結果、規制当局からの承認を経て商品化されることが検討されるのは、非意図的な悪影響のないイベントだけである（Privalle L：Bayer 社）。
 - 4) バイテクバレイショの評価—品種ごとの申請：4倍体・高度異型接合のバレイショでは、交雑による品種改良が困難であり品種ごとに形質転換が必要なため、既承認の特性であっても個々の品種ごとに申請が要求されている。米国・カナダでは他品種で承認済みの特性に対しては、より迅速な査定と市場化がなされている。審査はイベント毎ではなく、特性毎に行われるべきである。（Collinge S：JR Simplot 社）
 - 5) 植物体被検試験の価値：EU では、遺伝子組換え作物の植物体（全体または部分）を用いた非標的生物への影響テストを栽培申請に限り独自に実施している。しかしながら、このテストによってより確実なリスク評価ができるかは疑問である。（Romeis J：スイス Agroscope）

（訳者註：非意図的影響による新規のリスクは特定されていない）。

14th ISBGMO に関しては、「イルシー」No. 132：34-42（2017）も参照されたい。

ダイズ β -コングリシニン α' サブユニットの高レベル蓄積による コレステロール低減作用を持つ新規組換えイネの開発

Development of a novel transgenic rice with hypocholesterolemic activity via high-level accumulation of the α' subunit of soybean β -conglycinin

Cavanos C *et al.*

Transgenic Research 23: 609-620, 2014

日本の大学・国研研究者による原著論文である。人体のリポタンパク質のなかで、超低密度リポタンパク質（VLDL）及び低密度リポタンパク質（LDL）の増加は動脈硬化を促進する。一方、ダイズ β -コングリシニンの α' サブユニット（以下7S α' ）は、LDLコレステロールを低下させる。著者らは α' サブユニットの発現と並行して、同時にイネの主要な種子貯蔵タンパク質をRNAiで抑制することで、7S α' 高蓄積組換えイネの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えイネの系統の作出：低グルテリンイネ突然変異種コシヒカリ al23に、アグロバクテリウム法により以下の4種類のコンストラクトを導入した。1) 7S α' のみ（対照）、2) 7S α' +グルテリンRNAi+プロラミンRNAi、3) 7S α' +グルテリンRNAi、4) 7S α' +プロラミンRNAi。いずれも選抜マーカーとして *mALS* 遺伝子を含む。
- (2) 7S α' 含量：T₁種子（内胚乳）における含量は、グルテリン及びプロラミンの両方を抑制した系統で最も高く、ついでグルテリン抑制系統、プロラミン抑制系統、7S α' のみと続いた。各世代最高値系統の自殖 T₄種子における含量は、20 mg/g 種子以上であり、既報値より高かった。
- (3) T₄種子特性：1) 栄養成分：含水率、タンパク質、脂肪、炭水化物、灰分には有意差がなかった。2) 可消化性：パンクレアチンにより7S α' は5分間で消化されたが、グルテリンは1時間でも消化されなかった。
- (4) ラット給餌試験（高コレステロール食33日間）：1) 全体重・肝臓重量・摂食量には有意差なし。2) 血清全コレステロール及びLDL+VLDLコレステロールはともに組換え系統が対照より有意に低かった。3) 糞便中の胆汁酸及びコレステロール量は組換え区が有意に多く、コレステロールの体外への排出傾向が顕著であった。
- (5) 総括： β -コングリシニン α' サブユニット（7S α' ）発現と並行して、同時にイネの主要な種子貯蔵タンパク質をRNAiで抑制することで、食餌によりコレステロールを低下できる組換えイネが作出された。本特性はラット給餌試験により検証された。

カンキツソローシスウィルス外被タンパク質由来のヘアピンコンストラクトによるソローシス病に対する抵抗性安定的組換えカンキツの作出

Citrus Psorosis virus coat protein-derived hairpin construct confers stable transgenic resistance in citrus against psorosis A and B syndromes

Francesco A De, Costa N, Garcia M L
Transgenic Research 26: 225-235, 2017

アルゼンチンの大学・国研研究者による原著論文である。カンキツソローシスウィルス病 (CPsV) は接木伝染により、葉・枝・幹に種々の病徴を生じ大減収をもたらす世界的、特に南北米・地中海地域の大病害である。アルゼンチンでも減収をもたらすが、有効な対策は未確立である。著者らは CPsV 外被タンパク質遺伝子に対する RNAi 導入による CPsV 抵抗性系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換え系統の作出：CPsV によるソローシス病には A 型と B 型の 2 種類の症候群があり、後者がより激しい症状である。すでにパイナップルスイートオレンジを土台に A 型抵抗性が確認されている系統群から最終的に ihpCP-10 及び ihpCP-15 (系統10 及び 系統15 と略記する) を選出し、以下の調査を行った。
- (2) 組換え遺伝子発現の安定性：組換え体と無病台木接穂との間には発現に有意差がなく、栄養体繁殖系を通じた安定的伝達を確認された。
- (3) 相同形菌株 A 型接種試験：A 型感染台木に系統10、系統15 及び対照を接ぎ木し、2 年後の発症率はそれぞれ 3/7、0/7 及び 2/8；ウィルス検出率は 2/7、0/7 及び 7/8；台木再接種発症率は 4/7、0/7 及び 6/8；ウィルス検出率は 4/7、0/7 及び 8/8 であり、系統15 が安定した完全抵抗性を示した。
- (4) 非相同形菌株 B 型接種試験：(3) と同様、B 型感染台木に接ぎ木して抵抗性を評価した。
 - 1) ウィルス病発症スコア は第 1、2、3 萌芽期において、系統10 は 0、25、33 (発症は葉部のみ)；系統15 は全期 0、対照は 71、104、118 であった。
 - 2) ウィルス蓄積量 (比数)：系統10 は 1.18、2.22、2.57；系統15 は 1.02、0.89、1.49；対照は 2.63、3.35、5.25 であった。以上から、系統10 は発病の遅延あるいは軽減による耐性、系統15 は安定的完全抵抗性を有することが確認された。
- (5) 総括：外被タンパク質遺伝子に対する RNAi ヘアピン構造の導入により、カンキツソローシスウィルス病完全抵抗性系統 (系統15) が作出された。今後のほ場抵抗性検定が期待される。

市場化バイテク／GM 作物の世界的状況：2016年

Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2016

Clive James

ISAAA Briefs BRIEF 52 全 125 頁, 2017

BRIEF52の要点を以下に列記した。

- (1) バイテク作物栽培全面積・国数：1億8510万ヘクタール・26ヶ国
- (2) 途上国：先進国比率：国数17：9；面積比 54%：46%
- (3) バイテク全面積中比率（%）及び主要バイテク作物（栽培面積50万 ha 以上）：
 - 1) 米国：39% トウモロコシ・ダイズ・ワタ・カノーラ・砂糖ダイコン・アルファルファ・パパイヤ・カボチャ・バレイショ；
 - 2) ブラジル：27%、ダイズ・トウモロコシ・ワタ；
 - 3) アルゼンチン：13%、ダイズ・トウモロコシ・ワタ；
 - 4) カナダ：6% カノーラ・トウモロコシ・ダイズ・砂糖ダイコン・アルファルファ；
 - 5) インド：6%、ワタ；
 - 6) パラグアイ：2%、ダイズ・トウモロコシ・ワタ；
 - 7) パキスタン：2%、ワタ；
 - 8) 中国：2%、ワタ・パパイヤ・ポプラ；
 - 9) 南アフリカ：1%、トウモロコシ・ダイズ・ワタ；
 - 10) ウルグアイ：1%、ダイズ・トウモロコシ；
 - 11) ポリビア：1%、ダイズ；
 - 12) オーストラリア：1%以下、ワタ・カノーラ；
 - 13) フィリピン：1%以下、トウモロコシ。
- (4) バイテク作物面積比率：1) 当該作物全合計（バイテク＋非バイテク）に対する比率：ダイズ78%、ワタ64%、トウモロコシ33%、カノーラ24%；2) バイテク作物全面積に対する比率：ダイズ50%、トウモロコシ33%、ワタ12%、カノーラ5%、アルファルファ・砂糖ダイコン・パパイヤは各々1%以下。
- (5) バイテク作物特性別比率：除草剤耐性47%、スタック41%、害虫抵抗性12%、ウイルス抵抗性及びその他1%以下。

TcNPR3遺伝子をターゲットする CRISPR/Cas9コンストラクトの一過的導入によるカカオ (*Theobroma cacao*) の免疫機能の向上

Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting *TcNPR3* Enhances Defense Response in *Theobroma cacao*

Fister AS *et al.*

Froitiers in Plant Science 9: article 268, 2018

米国大学研究者による報文。カカオ (*Theobroma cacao*) はアフリカ、アジア、中南米の発展途上国において重要な現金の収入源となる作物であるが、様々な病原体の罹病により収入が不安定になるため耐病性育種が望まれる。筆者は、CRISPR/Cas9によるカカオに内在している罹病性遺伝子 *TcNPR3* の破壊による耐病性育種のアプローチを検討した。

- (1) 植物材料：ペンシルベニア州立大の温室内で栽培しているカカオ (*Theobroma cacao*) 品種 Scavina 6。
- (2) 標的配列：*NPR1* 遺伝子を介したサリチル酸依存的植物免疫機構の抑制因子である *NPR3* 遺伝子を標的配列とした。カカオ (品種 Criollo) のゲノム配列データベース解析からオーソログを検索し、ガイド RNA 設計ツールを用い、2つの sgRNA を設計した。
- (3) *in vitro* による sgRNA の活性試験：品種 Criollo から増幅した標的部位を用い、2種の sgRNA いずれも標的配列を切断することを *in vitro* 試験により確認した。
- (4) ベクター設計：2つの sgRNA 配列及び Cas9 酵素、NPTII、EGFP をコードする遺伝子の発現カセットを単一の T-DNA 配列中に含む Ti-plasmid ベクターを設計、開発した。
- (5) *in vivo* による変異率：上記ベクターをアグロバクテリウム法により一過的導入したカカオの葉からゲノム DNA を抽出し PCR により標的配列の変異の有無を評価した。結果、ベクター対照 (sgRNA なし) ではほぼ変異がなかったのに対し、sgRNA 配列ありでは27%の標的配列に変異があった。
- (6) 罹病試験：同様に一過的に CRISPR/Cas9コンストラクトを導入した葉に疫病菌 *Phytophthora tropicalis* を感染したところ、病変部位は対照より有意に減少した。更に罹病葉における感染時特異的遺伝子 *TcPR-1*~*5* の発現については、CRISPR/Cas9導入葉では *TcPR-3* 遺伝子及び *TcPR-5* 遺伝子の発現が有意に増加した。
- (7) オフターゲット効果：各標的配列に対して4又は5の類似配列について変異が無いことを確認した。
- (8) 固定系統作出の試み：同コンストラクトを子葉に導入し、その後子葉から不定胚を誘導し、2つの不定胚を得た (1つはその後枯死)。得られた不定胚では標的配列の一部に欠失が導入されていた。
- (9) 総括：カカオにおいて、CRISPR/Cas9ゲノム編集による有用形質の導入を一過的導入により示した。進行中の固定系統の作出をすすめ、さらに個体レベルでの有効性の検証が待たれる。

21年間のほ場データのメタ分析による遺伝子組換えトウモロコシの農業形質、環境及び毒性学的影響の評価

Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data

Pellegrino E *et al.*
Scientific Reports 8: 3113, 2018

イタリアの大学研究グループによる報文。遺伝子組換え（GE）トウモロコシについては、広範な栽培と農業環境への影響に関する科学的報告がかなり数多くなされているにもかかわらず、GE トウモロコシのリスクと利益は依然として議論が続いている。筆者らは、過去21年間に実施・報告されたほ場試験データを基にメタ分析を実施し、そこから明らかにされたGE トウモロコシの農業形質、環境及び毒性学的影響に関する評価結果を報告した。

- (1) メタ分析したデータ構成：6,006報の刊行物から厳選した、i) 穀物収量と品質（32報）、ii) 標的生物への影響（5報）、iii) 非標的生物（32報）、iv) 生物地球化学的循環（10報）の4カテゴリー、計79報を抽出、観点毎に観測値の抽出を行い、i) 542点、ii) 99点、iii) 813点、iv) 29点をメタ分析の対照とした。調査地の内訳は、北米202地点、欧州52地点、南米17地点、アジアとアフリカは各1地点、オーストラリアは無し。
- (2) 穀物収量と品質：対照となったのは、*Bt* イベント及び *Bt* と除草剤耐性のスタックイベントであった。収量は、*Bt* シングルイベントが同質遺伝子系統と比較し、平均効果量が0.526、10%収量増であった。二重及び三重では、シングルと効果に差が無いが、四重 *Bt* スタックイベントでは、24.5%収量増であった。雌穂の損傷への効果量は、シングルでは有意でないが、二重～四重では、73.4～84%有意に減少した。また、マイコトキシン、フモニシン及びトリコテセン量は、同質遺伝子系統と比較して -28.8%、-30.6%及び -36.5%有意に低減した。
- (3) 標的への効果：GE トウモロコシの標的鱗翅目の数への効果量は -5.007で、89.7%減であった。
- (4) 非標的生物への効果：ハナカメムシ (Anthocoridae)、アブラムシ (Aphididae)、クモ (Araneae)、オサムシ (Carabidae)、クサカゲロウ (Chrysopidae) (幼虫及び成虫)、テントウムシ (Coccinellidae) (幼虫及び成虫)、カメムシ (Nabidae)、ケシキスイムシ (Nitidulidae)、ハネカクシ (Staphylinidae) 数には影響がない一方、コマユバチ (Braconidae) 数は激減 (効果量 -0.457)、ヨコバイ (Cicadellidae) 数は増加 (効果量0.030) した。
- (5) 生物地球化学的循環：葉及び茎のリグニン含量にGE トウモロコシと非GE トウモロコシの間に有意な差は無かった。一方で、バイオマス易分解性はGE イベントで有意に5.9%向上した。
- (6) 総括：21年間に蓄積された公開ほ場データのメタ分析により、穀物の収量と品質の向上、標的昆虫被害からの防除の観点におけるGE イベントの利点を明らかにした。一方で、*Bt* イベントは非標的生物に実質的な影響が無いことが示された。加えて、害虫被害の低減によるヒトへのカビ毒暴露の低減という観点からの利点も確認され、GE トウモロコシの栽培を支持するものである。

ERA プロジェクト調査報告

2018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)