

---

# ERAプロジェクト調査報告

---

August 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. 8

バイオテクノロジー研究会

2018年の調査報告書第4号（通算第39号）をお届けします。

本号では、最近の遺伝子組換え技術を用いた研究事例として、重金属 ATPase 遺伝子を導入し重金属耐性を向上した組換え酵母及びタバコについて (No.381)、食用シダ由来の抵抗タンパク質遺伝子を導入しホワイトフライ（コナジラミ）抵抗性を付与した組換えワタについて (No.382)、RNAi 手法を用いて種子タンパク質含量を向上した組換えアマナズナについて (No.383)、3種類の光保護（photo protection）関連遺伝子を導入し日陰条件下の光合成能を向上した組換えタバコについて (No.384)、放線菌由来タンパク質の細胞壁結合ドメインを導入しバイオマスを増大した組換えシロイヌナズナ、タバコ及びユウカリについて (No.385) 及び RNAi 手法を用いて果肉の軟化を抑制した組換えトマトについて (No.387) 紹介しておりますのでご一読ください。また、石灰岩土壌における害虫抵抗性トウモロコシの効果に関する研究報告 (No.380)、組換えイネにおける miRNA の発現プロファイルの解析報告 (No.388)、さらに組換えアマの LLP に関する調査報告 (No.386) についても紹介いたします。

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.380	ほ場における Cry3Bb1の発現及び効果に関する石灰岩土壌の影響 Influence of calcareous soil on Cry3Bb1 expression and efficacy in the field	1
No.381	<i>Prosopis juliflora</i> 由来新規重金属 ATPase ペプチドによる酵母及びタバコの 重金属取り込み A novel heavy metal ATPase peptide from <i>Prosopis juliflora</i> is involved in metal uptake in yeast and tobacco	2
No.382	殺虫性シダタンパク質の発現によるコナジラミ抵抗性ワタの作出 Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly	3
No.383	$\beta$ -カロチン蓄積及び貯蔵タンパク質抑制に基づく組換えアマナズナにおける タンパク質系の増分と再配分 Proteome rebalancing in transgenic <i>Camelina</i> occurs within the enlarged proteome induced by $\beta$ -carotene accumulation and storage protein suppression	4
No.384	光保護からの回復促進による光合成及び作物生産力の増強 Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photo protection	5
No.385	<i>AtExpP4</i> 及び <i>CaMV35S</i> プロモーターにより発現させた <i>CBM2a</i> 遺伝子の シロイヌナズナ、タバコ、ユーカリへの生長調節効果 Growth modulation effects of <i>CBM2a</i> under the control of <i>AtExpP4</i> and <i>CaMV35S</i> promoters in <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> and <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	6
No.386	カナダ産アマにおける遺伝子組換えアマの低レベル存在状況下に対する事後評価 Ex-post assessment of genetically modified, low level presence in Canadian flax	7
No.387	果実軟化抑制を標的としたトマトの遺伝的改良 Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening	8
No.388	ゼブラフィッシュ胚毒性試験による <i>Bt</i> タンパク質 Cry1C および Cry2A の安全性評価 Safety assessment of <i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal proteins Cry1C and Cry2A with a Zebrafish Embryotoxicity Test	9
No.389	miRNA-Seq を用いた組換えおよび非組換えイネにおける miRNA 発現プロファイル の比較解析 Comparative analysis of miRNA expression profiles in transgenic and non-transgenic rice using miRNA-Seq	10

## ほ場における Cry3Bb1 の発現及び効果に関する石灰岩土壌の影響

### Influence of calcareous soil on Cry3Bb1 expression and efficacy in the field

Wangila DS *et al.*

Transgenic Research 26: 419-428, 2017

米国・コロンビアの大学研究者による原著論文である。ウエスタンコーンルートワーム (WCR) は北米のトウモロコシの主要害虫であり、これに対抗する Cry3Bb1 害虫抵抗性トウモロコシが2003年から上市されている。近年、ネブラスカ州南西部の酸性石灰岩土壌地帯で、Cry3Bb1 害虫抵抗性トウモロコシが予想以上に WCR による食害を受ける例が報告された。著者らはこの原因を WCR 及び Cry3Bb1 発現の両面から調査し、以下の結果を得た。

- (1) 供試材料：Cry3Bb1 トウモロコシ及びその対照
  - (2) 試験設計：0.4-3 ha の石灰岩土壌が点在するトウモロコシ栽培地域 (2013年 1 地点、2014年 2 地点)。各地点から、3 または 5 ほ場を設定し、各ほ場内に石灰岩土壌及び非石灰岩土壌の区画を設け、各区画に Cry3Bb1 害虫抵抗性及び対照トウモロコシを栽培し、以下の試験を行った。
  - (3) WCR の生存率：トウモロコシ 1 株あたり捕獲された WCR の個体数は、Cry3Bb1 区は 1.81、対照は 7 倍の 12.33 で明瞭な有意差が検出された。両区とも土壌の種類間には有意差がなかった。この結果から Cry3Bb1 の WCR 抑制効果は、石灰岩土壌の有無とは関係なく発現されたことが確認された。
  - (4) Cry3Bb1 発現量：年度間に差はなく、平均発現量 ( $\mu\text{g/g}$  新鮮重) は、石灰岩土壌が 18.9、非石灰岩土壌が 21.2 で両者間に有意差はなかった。この結果発現量は石灰岩土壌の有無の影響を受けないことが確認された。
  - (5) 総括：WCR の発生及び Cry3Bb1 の発現の両面の調査から、ネブラスカ州南西部酸性石灰岩土壌においても、Cry3Bb1 の WCR 抑制効果が維持されていることが確認された。減収の一因として、酸性石灰岩土壌で多発する雑草アマランスの影響が示唆された。
- (注：石灰岩土壌における Cry3Bb1 の効力維持を示す結果として評価される)。

(林 健一)

## ***Prosopis juliflora* 由来新規重金属 ATPase ペプチドによる酵母 及びタバコの重金属取り込み**

A novel heavy metal ATPase peptide from *Prosopis juliflora* is involved in metal uptake in yeast and tobacco

Keeran NS *et al.*

Transgenic Research 26: 247-261, 2017

インド国立研・大学研究者による原著論文である。重金属（鉛・カドミウム・水銀・砒素・クローム・亜鉛）やその他のアルミニウム・セシウム・銅といった金属は重大な環境汚染源である。高温・乾燥地に広く分布しているマメ科低木のメスキート (*Prosopis juliflora*) は高濃度のカドミウム・銅を蓄積すると報じられている。この特性を利用して著者らは重金属耐性組換え植物の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 重金属耐性組換え酵母及びタバコの作出：カドミウム高濃度含有土壌に生育中のメスキートから新規の重金属 ATPase (PiHMT) を単離し、これを酵母及びタバコに導入し、発現安定後代を得た。
- (2) 組換え酵母の重金属蓄積：重金属含有培地で4時間生育後の酵母細胞中の重金属蓄積量：1) カドミウム蓄積量：30~40  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>含有培地で2倍、50  $\mu\text{M}$  含有培地で8倍増（対照比）のカドミウムを蓄積した。2) 亜鉛：亜鉛100及び125  $\mu\text{M}$  含有培地で、約2倍（対照比）の亜鉛を蓄積した。

組換えタバコの重金属耐性：1) 発芽率：選抜系統 L17及び L20は50~200  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>含有培地で90%以上の高発芽率を維持したが、L2は50%であった。対照の50~200  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>含有培地における発芽率は50~10%と確認され、幼植物は3日後から葉緑素異常を示した。組換え系統は根の伸長も対照より良好であった。2) 再生力：200  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>含有培地で40日間培養後の再生個体数は、対照の約10に対し組換え系統は2倍以上であった。3) 全植物体耐性：生育2ヶ月の成体を300  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>含有培地で生育4日後のカドミウム蓄積量 (mg/g) は、対照及び L2が0.2であったのに対し、L17は1.3倍、L20は1.8倍であった。対照は3日後から様々な重金属障害を示したが、組換え系統は5日後まで障害は発症せず、その後の障害も軽度であった。

- (3) 総括：野生植物由来重金属 ATPase 導入により、重金属蓄積及び耐性（主としてカドミウム及び亜鉛）を有する組換え酵母及びタバコが作出された。本結果のファイトレメディエーション（バイオレメディエーション）への展開が希望される。

(注：長期的効果の確認が必要である)。

(林 健一)

## 殺虫性シダタンパク質の発現によるコナジラミ抵抗性ワタの作出

### Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly

Shukla A K *et al.*

Nature Biotechnology 34: 1046-1051, 2016

インドの国研・大学研究者による原著論文である。農作物に大害を与える吸汁害虫（アブラムシ・ヨコバイ・アザミウマなど）は、現在までに上市されている *Bt* 作物では防除不可能である。コナジラミ（*Bemisia tabaci*、ヨコバイ亜目（同翅類）のアブラムシの一種）は数百種の農作物に吸汁害を与え、さらに種々のウィルス病を媒介する重大害虫である。著者らはインドの重要作物であるワタについて、食用シダを利用したコナジラミ抵抗性系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えワタの作出：コナジラミ被害が少ないと云われているシダ類（38種）の葉状体及び根茎から可溶性タンパク質を抽出し、コナジラミに対する毒性を調査し、最適種として食用シダの一種（*Tectaria macrodonta*）由来のコナジラミ抵抗性タンパク質、Tma12を特定し、これをアグロバクテリウム法によりワタ品種 Coker312に導入し最終的に T<sub>1</sub> スペース 4 系統（L1、2、3、14）を選出した。
- (2) 組換えワタ系統のコナジラミ抵抗性：1) 抵抗性タンパク質（Tma12）の発現：発現は葉>茎>根であり、LC50は1.49  $\mu\text{g/ml}$ 、5.0  $\mu\text{g/ml}$  で90%以上の致死率、95°C 20分まで活性を維持した。2) 組換え系統の生育：温室試験ではコナジラミの集団を90%以上縮小させた。組換え系統の生育は正常であったが、対照は葉緑素異常・萎凋葉など種々の吸汁害を示した。3) 組換え系統の収量（隔離ほ場）：最優良系統 L14・薬剤防除非組換え品種・対照の3者の収量形質：サヤ数/個体：16.6・15.5・9.3；サヤ重/個体：31.1・29.9・14.2；種子重/個体：21.9・21.1・9.5；綿毛重/個体：9.3・8.7・4.6；対照区の平均減収は50~80%であったが、組換え系統は薬剤防除区と同等以上の収量を維持した。
- (3) 耐虫特異性：耐虫性はコナジラミに限定され、他の吸汁虫・益虫（ワタアブラムシ・ワタアザミウマ・テントウムシなど）には無害であった。
- (4) 食品安全性（ラット）：給餌試験でラットの健康、各種臓器への無影響、免疫毒性がないこと等、安全性が確認された。
- (5) 総括：食用シダ由来の Tma12タンパク質導入により、コナジラミ抵抗性ワタ系統（特に優秀 1 系統）が作出された。コナジラミ抵抗性植物育種への展開が期待される。

(林 健一)



## **$\beta$ -カロチン蓄積及び貯蔵タンパク質抑制に基づく組換えアマナズナ におけるタンパク質系の増分と再配分**

Proteome rebalancing in transgenic *Camelina* occurs within the enlarged proteome induced by  $\beta$ -carotene accumulation and storage protein suppression

Schmidt MA & Pendarvis K  
Transgenic Research 26: 171-186, 2017

米国大学研究者による原著論文である。アマナズナは自殖性、低水分・貧栄養に耐え、従来はアマナズナ油などの油料作物として利用されてきた。著者らは作物種子貯蔵タンパク質の利便性からタンパク質増加組換えアマナズナの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えアマナズナの作出：種子貯蔵タンパク質 (SSP) は22~28%であり、2S アルブミンと11S グロブリンの2種類が主成分である。2S を抑制する RNAi カセット (RNAi2S) 及び  $\beta$ -カロチンを増加するカセット (*crtB*) の両者を同時あるいは単独にアグロバクテリウム浸漬法で品種 Celine に導入し、最終的に RNAi2S/*crtB* 3 系統、*crtB* 2 系統を選抜した。
- (2) 組換え系統の  $\beta$ -カロチン含量：両グループとも、ほぼ275  $\mu\text{g/g}$ 、対照は検出不能の極少値であった。
- (3) 総タンパク質含量：対照は190.83  $\mu\text{g/g}$ 、*crtB* 系統は167.95  $\mu\text{g/g}$  (対照の88%)、RNAi2S/*crtB* 系統は有意に高い平均220.01  $\mu\text{g/g}$  (対照の115%)、最大で24%増が観察された。
- (4) 油脂含量：対照は265.07  $\mu\text{g/mg}$ 、*crtB* 系統は255.24  $\mu\text{g/mg}$  (対照の98%)、RNAi2S/*crtB* 系統は253.99 (対照の96%) であった。
- (5) 炭水化物含量：対照は236.54  $\mu\text{g/mg}$ 、*crtB* 系統は171.44及び205.72  $\mu\text{g/mg}$  (対照の72%及び87%)、RNAi2S/*crtB* 系統は3系統中1系統だけが181.18 (対照の77%)、他の2系統は減少しなかった。
- (6) 種子の大きさ (100粒重)：対照は65.7 mg、*crtB* 2 系統は、98.7 mg 及び92.8 mg (対照の約50%増)、RNAi2S/*crtB* 3 系統は、118.7 mg、116.4 mg、82.6 mg (約80%増) であり、タンパク質含量増加と相関していた。
- (7) 代謝解析：組換え系統は代謝系に  $\beta$ -カロチノイドの増加を主因とする大きな変化が見出された。
- (8) 種子色：組換え系統は非組換えの黄色とは異なる橙色の発色が顕著であり、抗生物質に代わる選抜マーカーとして利用できる。
- (9) 総括：2種類の同時組換えにより、種子タンパク質含量11~24%増、油脂及び炭水化物は微減の組換えアマナズナ系統が作出された。これはタンパク質系における増分と再配分の結果と考察される。

(注：アマナズナ種子のタンパク質原料としての新側面の報告である)。

(林 健一)



## 光保護からの回復促進による光合成及び作物生産力の増強

### Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photo protection

Kromaijk J *et al.*  
Science 354: 857-861, 2016

米・英・ポーランドの大学研究者の共同執筆である。強光下の葉は過剰な光エネルギーを、非光化学的消光 (nonphotochemical quenching; NPQ) により無害の熱として発散している。この NPQ は日陰 (雲・他葉) になっても継続され、抑制から非抑制状態への回復力が緩慢で数十分を要するため、光合成量も一時的に低下する。この低下量は終日では7.5~30.0% (平均20%) に達すると試算されている。著者らは NPQ 反応 (誘導及び回復) の迅速化により日陰の光合成能力の向上を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えタバコの作出：光保護 (photo protection) の一環である NPQ の主要 3 酵素の遺伝子 (*VDE*、*ZED*、*PsbS*) をタバコに導入し、 $T_2$  スペース 3 系統 (VPZ 系統) を得た。
  - (2) 導入酵素発現量：VPZ 系統における *VDE*、*ZED*、*PsbS* の転写量は対照の10倍、6倍、3倍、各タンパク質の蓄積量は対照の30倍、74倍、4倍であった。
  - (3) 光強度の変化に対する反応：1) 変動光 ( $200 \rightleftharpoons 2000 \mu$  光子 /  $m^2$  / 秒) での NPQ 反応速度は VPZ 系統が対照より1.5~3.5倍であった。2) 急速減光 ( $2000 \rightarrow 200$ ) では、30秒後に両方とも当初の約1/3に急落、以後150秒後までに漸増したが、VPZ 系統は対照より回復が早く、約9%高い光合成量を示した。
  - (4) 変動光強度下の光合成量：200及び2000光強度 (前出) での定常的光合成率には VPZ 系統と対照との間に有意差はなかった。しかし、4分間隔で両強度を交代変動させると VPZ 系統は対照より光量子量で14%、炭酸ガス量で11.3%高かった。
  - (5) ほ場生産力：VPZ 系統は対照より茎・葉・根重・葉面積・草丈が大きく、全乾物重で14~20%増収した。
  - (6) 総括：NPQ の強化 (迅速化) により、日陰条件下で対照により14~20%増収する組換えタバコ系統群が作出された。本結果は他作物への応用が可能と考えられる。
- (注：光合成量の増加に基づく増収及び作物収量の50%を占める日陰光合成率の増強への着目は高く評価される)。

(林 健一)

## ***AtExpP4*及び *CaMV35S* プロモーターにより発現させた *CBM2a* 遺伝子のシロイヌナズナ、タバコ、ユーカリへの生長調節効果**

Growth modulation effects of *CBM2a* under the control of *AtExpP4* and *CaMV35S* promoters in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* and *Eucalyptus camaldulensis*

Keadtidumrongkul P *et al.*

Transgenic Research 26: 447-463, 2017

タイの大学研究者による共同執筆原著論文である。Carbohydrate Binding Module (CBM) はセルロース/ヘミセルロース分解放線菌類の炭水化物加水分解酵素等に見られる細胞壁結合ドメインであるが、酵素活性部位を除いたCBMのみを発現させることで植物細胞壁の特質を変更し、生長・生育を調節する作用が知られる。著者らはCBM2aの効果を、2種類のプロモーター、3種類の植物について調査し、以下の結果を得た。

- (1) CBM：放線菌 *Cellulomonas fimi* のキシラーゼ10A から単離された結晶性セルロースに非常に高い親和性を有するCBM2aを用いた。
- (2) 組換え植物の作出：シロイヌナズナ、タバコ、ユーカリにアグロバクテリウム法により、*CBM2a* 発現カセットを導入した。プロモーターは、維管束組織特異的 *AtExpP4* プロモーターもしくは *CaMV35S* プロモーターを用いた（シロイヌナズナは *AtExpP4* プロモーターのみ）。
- (3) *CBM2a* 発現の効果
  - 1) シロイヌナズナ：*AtExpP4*プロモーター：対照に対し、根及び胚軸は長く、乾物重16%増、横断面の導管及び繊維の面積はそれぞれ11~31%、11~48%拡大した。
  - 2) タバコ：両プロモーターとも生長・生育促進効果はなかった。
  - 3) ユーカリ：*AtExpP4*プロモーター：対照との比較で草丈45~68%、乾物重8.5~23.5%、導管面積1.7~1.9%、繊維面積1.4~1.6%増加した。*CaMV35S* プロモーター：草丈、乾物重は変化なかったが、導管面積2.0~2.2%、繊維面積1.3%増加した。
- (4) 総括：シロイヌナズナ及びユーカリにおいてCBM2a タンパク質の発現によるバイオマスの増大が確認された。植物バイオマス改善に適用することが期待される。

(林 健一)

## カナダ産アマにおける遺伝子組換えアマの低レベル存在状況下 に対する事後評価

### Ex-post assessment of genetically modified, low level presence in Canadian flax

Booker HM *et al.*  
Transgenic Res 26 : 399-409, 2017

カナダの大学研究者による共同執筆である。アマ（亜麻；flax）は1年草作物で、搾油用種子品種（亜麻仁油）と繊維用の品種とがある。カナダは世界最大のアマの生産・輸出国である。

- (1) GM アマ品種の承認と抹消：カナダは自国開発の GM アマ品種（CDC Triffid）を1996年（飼料）、1998年（食用）に承認し、米国も直後に承認した。EU 承認の前提条件（EU 圏1ヶ国以上の承認）のために英国承認を要請中に、EU は GM アマの輸入を拒否し、英国承認はなされなかった。輸出市場での GM アマの影響を懸念して、カナダは2000年に GM 種子を回収し、2001年に種子販売を禁止した。
- (2) GM アマの混入程度：2009年4月、EU がカナダから輸入したアマの中に、GM アマ（CDC Triffid）が検出され、同様な検出事例がブラジル・日本でも発生した。EU は直ちに GM アマの輸入を禁止し、すべてのカナダ産輸入アマへの種子検査を義務づけた。
- (3) カナダの対応：カナダは迅速な対応策をとった。栽培：輸出の主要点で RT-PCR 及び種子検査を全面的に実施した。また2009～13年（5年間）のほ場管理制度を定め、カナダ産アマの非 GM 化を励行した。また非 GM アマ新品種の育成を促進し、2013年～14年には農家が所有している種子と新品種の種子との交換を促進し、カナダ全域の非 GM 化がさらに促進された。
- (4) GM アマ混入率事後評価：各種の実測値、推定値に基づいて混入率を6年間（2009～15年）、育種種子・農家種子・収穫種子について算出した（全18回）。混入率はすべて EU 規制の0.1%以下であり、特に2013年以降の GM アマの微量混入 LLP は極めて低率であった。
- (5) 経済的影響：EU への輸出量は2009年を境に従来の80%から30%へと急落し、代わりに中国への輸出量が増加した。近年はカザフスタン産の EU への輸出が急増し、カナダ産を超えている。
- (6) 総括：カナダ産アマの非 GM 化の励行による混入の可能性の低下に関わらず、EU は依然として種子検査を義務付けている。これを解決する機能的組織はカナダにも EU にも当面存在していない。

（注：LLP に対する合理的・具体的対策を制定する国際的枠組みの設立が望まれる）。

（林 健一）

## 果実軟化抑制を標的としたトマトの遺伝的改良

### Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening

Uluisik S *et al.*

Nature Biotechnology 34: 950-952, 2016

英国・米国の大学及びシンジェンタ社（米国・英国）の研究者（29名）による公刊短報である。トマトは5兆円以上の世界的市場価値を有する重要野菜である。その日持ち（shelf life）の延長は1990年以來のバイオテックの重要課題であるが、既存品種は色調、味覚、栄養価が不十分で成果は少なかった。著者らはトマトの果実の軟化に関連する遺伝子の一つに注目して、RNAi手法を用いて果肉軟化抑制トマトの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) ペクチン酸リアーゼ：果肉軟化はペクチンの分解に起因する。本研究では、ペクチン酸リアーゼ遺伝子（pectate lyase [PL]）に着目した。トマトには5つのPL遺伝子が存在するが、果実成熟期に高発現するのはそのうち1対立遺伝子のみであった。
- (2) PLサイレンシングトマトの作出：PL遺伝子を標的としたRNAiコンストラクトを既存品種Ailisa Craigに導入、導入遺伝子ホモ接合後代を得た。
- (3) RNAi系統の特性：1) PL発現量：相対値で対照は1.0~2.0、RNAi系統は0.005~0.015；2) PL酵素活性：対照は0.25に対しPL系統は0.005~0.015；3) 果実硬度：成熟期果実内・外層を通じてPL系統は有意（0.1%水準）に増加して1~1.5を示し、対照は0.5以下であった。4) 品質・収量：エチレン生合成、果実の色・香り・味・果実重は対照と同様、20℃14日間貯蔵でも各種の特性を維持した。
- (4) 果実細胞壁組織：果皮柔組織細胞結合部の電子顕微鏡観察の結果、ペクチンの集積が顕著であり、軟化抑制の主要因と確認された。
- (5) 総括：ペクチン酸リアーゼ遺伝子をRNAi手法でサイレンシングすることで、果実の他の諸特性を害さずに、軟化抑制改変トマトが作出された。今後、本遺伝子を標的としたゲノム編集技術による日持ちの良いトマトの開発が望まれる。

(林 健一)

## ゼブラフィッシュ胚毒性試験による *Bt* タンパク質 Cry1C および Cry2A の安全性評価

Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1C and Cry2A with a Zebrafish Embryotoxicity Test

Gao Y-J *et al.*

J. Agric. Food Chem. 66: 4336-4344, 2018

中国の研究グループによる報文。*Bt* 作物の残渣はほ場周囲の水路等を伝って周辺の水生生物にも暴露される。先行する多くの研究では、*Bt* 作物が水生生物について安全であることを示しているが、一部影響懸念する報告もある。筆者らは、2種の *Bt* タンパク質（Cry1C および Cry2A）を発現する *Bt* イネを用い、ゼブラフィッシュ胚毒性試験よりこれら *Bt* タンパク質の安全性評価試験を実施、以下の結果を得た。

- (1) 胚培養培地における *Bt* タンパク質の安定性：胚培養培地に2種の *Bt* タンパク質をそれぞれ0.1、1、10 mg/Lの濃度で混合し、ELISA法により検出された濃度は、Cry1C：0.005、0.12、1.76、Cry2A：0.008、0.015、0.226 mg/Lと有意に低かった。
- (2) ゼブラフィッシュ胚に対する *Bt* タンパク質の毒性評価：*Bt* タンパク質をそれぞれ0.1、1、10 mg/Lの濃度で混入させた胚培養培地での胚の成長・生存率は、いずれの条件でも *Bt* タンパク質無添加区と比較して、違いはなかった。
- (3) 遺伝子発現解析：Cry1C添加培地（0.1、1、10 mg）で培養した胚の酸化ストレス（*sod2*、*cat*、*cox1*）及びアポトーシス（*gstp2*、*bcl2*）に関連する遺伝子発現を調査したところ、*sod2* 及び *cat*（10 mg/Lのみ）において有意な発現の低下が見られた。他では変化がなかった。Cry2A添加培地でもほぼ同様の結果であった。
- (4) 酵素活性：ストレスの指標であるSOD、CAT及びMDAの酵素活性は、Cry1C及びCry2A添加培地においていずれも有意な変化はなかった。
- (5) 総括：Cry1CまたはCry2A曝露はゼブラフィッシュ胚の成長及び生存に影響を与えず、ゼブラフィッシュ胚はCry1CおよびCry2Aタンパク質に対して感受性ではないと結論する。

（小口 太一）



## miRNA-Seq を用いた組換えおよび非組換えイネにおける miRNA 発現プロファイルの比較解析

Comparative analysis of miRNA expression profiles in  
transgenic and non-transgenic rice using miRNA-Seq

Peng C *et al.*

Scientific Reports 8: 338, 2018

GM 作物の商業化に際しては、事前の安全性評価・承認が義務付けられる。最近では、オミクス解析の安全性評価への適用も検討されているが、miRNA 発現を網羅的に調査した事例はない。筆者らは、除草剤耐性／害虫抵抗性イネ品種と非組換えイネの miRNA 発現の網羅的解析を実施し、以下の結果を得た。

- (1) 植物材料：*cryIA* 及び *epsps* の両遺伝子発現カセットを含む T-DNA をアグロバクテリウム媒介法によって導入したイネを用いた。ホモ接合の T5 世代から 6 系統、及び非組換え対照 1 系統を試験に供した。
- (2) 発現解析：*cryIA* 及び *epsps* の発現量を確認したところ、系統間で大きな差異があることを確認した。
- (3) miRNA：イネ種子から全 RNA を抽出し、そこから miRNA を生成し、次世代シーケンサーによる解析をした。リード長のほとんどは 24 nt あるいは 21 nt で、最終的に 568 種類の miRNA 配列が同定された。
- (4) 系統間比較：同定された miRNA について発現量を系統間で比較した。組換え体では非組換え体と比較して 7 の miRNA が有意に増加しており、14 の miRNA が有意に減少していた。547 の miRNA（全体の 96%）は組換え－非組換え間で差異がなかった。組換え系統間での導入遺伝子の発現量に関しては miRNA 発現量において差はなかった。
- (5) miRNA の標的配列：データベース（miRanda）を用いて、miRNA が標的とする配列の予測を行った。予想された標的配列のジーンオントロジー（GO）の上位 3 位は、「RNA 指向性 DNA ポリメラーゼ」、「RNA 依存性 DNA 修復」、「DNA インテグレーション」であった。これらはアグロバクテリウムによる遺伝子組換えにより変化した可能性が考えられる。
- (6) 総括：導入遺伝子（*cryIA*、*epsps*）は miRNA 発現プロファイルに影響をあたえないことが示された。一方、アグロバクテリウム法による遺伝子導入が miRNA 発現プロファイルに影響を与える可能性が示された。今後、他の事例での検証が求められる。

（小口 太一）



# ERA プロジェクト調査報告

2018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)