
ERAプロジェクト調査報告

December 2022

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

2022. 12

バイオテクノロジー研究会

2022年の調査報告書第4号（通算第61号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え作物の開発に関する基礎的な知見として、No.597でキャッサバ根圏微生物相と病害抵抗性の関連解析を、No.598で干ばつ耐性に関与する遺伝子を導入した組換えイネの実証試験を、No.600で干ばつ耐性に関与する遺伝子を導入した組換えラッカセイの実証試験を紹介します。

ゲノム編集技術を利用した開発事例として、No.599で *Agrobacterium rhizogenes* を利用したゲノム編集ジャガイモの作出を、No.601で塩基編集による除草剤耐性ナタネの作出を、No.604で部位特異的変異をダイズに導入した我が国の研究を紹介しています。

また環境影響評価に関連する論文として、No.602で *Bt* 作物の土壌無脊椎動物への影響についての系統的レビューを、No.603で中国の野生ダイズと遺伝子組換えダイズの人為的 F1雑種の適応度について紹介しています。

さらに、No.605では南米のサトウキビ害虫に対する新規 *Bt* トウモロコシの効果について、No.606では種子混合リフュージ戦略における種子間交雑が緩衝効果に与える影響について論じています。

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.597	広範マイクロバイーム関連解析によるキャッサバ根圏バイオームの構造及び代謝と病害抵抗性の相関の解明 Microbiome-wide association studies reveal correlations between the structure and metabolism of the rhizosphere microbiome and disease resistance in cassava	1
No.598	ストレス誘導プロモーター下での CCCH タンデム型 Zinc finger タンパク質遺伝子 (<i>OsTZF5</i>) の発現による圃場条件下でのイネ穀物収量に対する干ばつストレス影響の緩和 Expression of the CCCH-tandem zinc finger protein gene <i>OsTZF5</i> under a stress inducible promoter mitigates the effect of drought stress on rice grain yield under field conditions	2
No.599	毛状根形質変換系を用いたゲノム編集ジャガイモの作出 First-generation genome editing in potato using hairy root transformation	4
No.600	MYB 転写抑制因子 <i>GmMYB3a</i> の異所的発現による水欠乏条件におけるラッカセイ (<i>Arachis hypogaea</i> L.) の乾燥耐性及び生産性の向上 Ectopic expression of MYB repressor <i>GmMYB3a</i> improves drought tolerance and productivity of transgenic peanuts (<i>Arachis hypogaea</i> L.) under conditions of water deficit	5
No.601	CRISPR/Cas9媒介のシトシン塩基編集手法による除草剤抵抗性ナタネの作出 Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing	6
No.602	<i>Bt</i> 作物の土壌無脊椎動物に対する影響：系統的レビュー及び定量的メタ解析 The effect of <i>Bt</i> crops on soil invertebrates : a systematic review and quantitative meta-analysis	7
No.603	母性野生ダイズ10集団と組換えダイズとの F ₁ 交雑種の適応度 Fitness of F ₁ hybrids between 10 maternal wild soybean populations and transgenic soybean	8
No.604	ダイズ不定胚への biolistic 形質変換による標的的特異的突然変異導入及び外来遺伝子不在 T ₁ 系統の作出 Site-directed mutagenesis by biolistic transformation efficiently generates inheritable mutations in a targeted locus in soybean somatic embryos and transgene-free descendants in the T ₁ generation	9
No.605	南米におけるサトウキビメイガ (<i>Diatraea saccharalis</i>) の新たな防除手段としての MON95379 <i>Bt</i> トウモロコシ MON 95379 <i>Bt</i> maize as a new tool to manage sugarcane borer (<i>Diatraea saccharalis</i>) in South America	11
No.606	混合種子戦略における非 <i>Bt</i> トウモロコシと多種類の Cry タンパク質を有する <i>Bt</i> トウモロコシの間での交雑が二遺伝子耐性アメリカタバコガ (<i>Helicoverpa zea</i>) の抵抗性出現に及ぼす影響 Effects of cross-pollination among non- <i>Bt</i> and pyramided <i>Bt</i> corn expressing cry proteins in seed mixtures on resistance development of dual-gene resistant <i>Helicoverpa zea</i>	12

Microbiome-wide association studies reveal correlations between the structure and metabolism of the rhizosphere microbiome and disease resistance in cassava

広範マイクロバイオーム関連解析によるキャッサバ根圏バイオームの構造及び代謝と病害抵抗性の相関の解明

Zhang L *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 689-701

中国の大学・国研の研究者による原著論文である。キャッサバは差し芽 (stem cutting) による栄養繁殖でアフリカ・アジア・南米に広く栽培され、7億5000万人の主食となる重要作物である。キャッサバは、乾燥・高温・やせ地などの不良環境に耐えるが、各種の病害に弱い。特に *Xanthomonas* 菌 (*Xam*) によるキャッサバ白葉枯病 (cassava bacterial blight: CBB) は最大の病害であり、抵抗性育種・輪作・薬剤散布などの対策が行われているが、強力な対抗策とはなっていない。キャッサバの *Xam* 抵抗性強化のためには、自己の微生物相が有する抵抗性機能の解析が重要と考えられる。著者らはキャッサバ根圏のバイオームと *Xam* 抵抗性に関する関連分析を実施し、以下の結果を得た。

(1) 供試品種の選択及びその表現型指標

中国南部に栽培される10品種 (R01~R10) が選出された。品種の *Xam* 抵抗性6段階 (5:最強; 4:強; 3:抵抗性中; 2:抵抗性やや弱; 1:抵抗性弱; 0:抵抗性極弱) では、R01~R10の順に、2、2、4、2、3、2、2、1、1、2であった。

(2) 葉・茎・根のマイクロバイオーム及び宿主遺伝子型とマイクロバイオームとの関係

微生物総数では菌類が細菌類より多かったが、種の数では細菌類の方が多かった。微生物集団は組織間に有意差があり、根は葉・茎とは異なる微生物相を示した。

(3) 宿主表現型と根圏マイクロバイオームとの相互依存関係

クラスター調査では、茎・葉の分布には大差はなかった。しかし、根は茎葉と異なる分布を示し、R02及びR03は1つの独立・分布を示し、表現型指標の *Xam* 抵抗性と一致した傾向を示した。これにより表現型と根圏マイクロバイオームとの密接な関係が示された。

(4) 表現型と根圏微生物相との同調発現

10品種の根圏微生物相では4種の微生物が主要であった。一方、病害抵抗性と密接な相関を示した微生物として *Lactococcus* 種が見出され、*Lactococcus* 種と *Xam* 抵抗性との関係がさらに追及された。

(5) *Lactococcus* 種の *Xam* 抵抗性

Lactococcus 種は Lantibiotic としてよく研究されている抗菌性ペプチドであるナイシンを産生することが知られている。さらに10品種中では、R03においてナイシン含量が顕著に高いことが分かった。

(6) ナイシン生合成遺伝子

6遺伝子を特定し、10品種中の含有量を調査した結果、*Xam* 抵抗性の R03の根におけるナイシン含量が顕著に高かったことから、ナイシンが *Xam* 抵抗性の主要因子であることが確認された。

(7) 総括

キャッサバのキャッサバ白葉枯病抵抗性強化のために、実用10品種を用いて表現型と根圏マイクロバイオームとの広範囲な研究が実施された。その結果、両者の間には密接な相互依存関係が存在した。特に、抵抗性には *Lactococcus* 種が産生するナイシンが中核的主要因子であることが確認された。これらの結果は今後のキャッサバのキャッサバ白葉枯病抵抗性育種に有用な情報を提供することが期待される。

(林 健一)

Expression of the CCCH-tandem zinc finger protein gene *OsTZF5* under a stress inducible promoter mitigates the effect of drought stress on rice grain yield under field conditions

ストレス誘導プロモーター下での CCCH タンデム型 Zinc finger タンパク質遺伝子 (*OsTZF5*) の発現による圃場条件下でのイネ穀物収量に対する干ばつストレス影響の緩和

Selvaraj MG *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 1711-1721

国際熱帯農業センター (CIAT・在コロンビア)、日本の国研 (JIRCAS 石垣支所) 及び大学の研究者による原著論文である。イネは7億3,800万トン/年生産され、世界禾穀類の27%を占める重要作物である。人口増に備えて、イネは2035年までに26%増産が必要とされているが、干ばつによる水不足が最大の障害となっている。干ばつ被害は天水依存稲作の23%に影響し、1,800万トンの減収となっている。従来の耐乾燥性育種はガラス温室における単一特性改良試験の主体であり、実効性ある成果は得られていない。著者らは特定した乾燥ストレス耐性遺伝子の導入による耐旱性イネ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 乾燥ストレス耐性組換えイネの作出

トランスクリプトーム解析から、乾燥ストレス耐性遺伝子として、CCCH タンデム型 zinc finger タンパク質 (*OsTZF5*) が特定された。この遺伝子をアグロバクテリウム法により日本型品種日本晴に導入した組換え日本晴、またラテンアメリカ品種 Curinga 及びアフリカ品種 NERICA4に導入した組換え Curinga 及び組換え NERICA4が作出された。組換え日本晴は主として基礎的室内試験に、後2者は主に実際の圃場試験 (於 CIAT) に供試された。

(2) 非組換えイネにおける *OsTZF5* の発現

ガラス温室生育の日本晴を用い、*OsTZF5* の発現の器官特異性及びストレス応答性が調査された。

- 1) 器官特異性：最大の発現は若葉及び成熟葉、中程度発現は、根・稈基部・開花穂、低発現は開花前の穂であった。
- 2) ストレス応答性：干ばつ処理により1時間以内に発現が増加した。ストレスによる発現誘導は根で顕著であった。

(3) 組換え体の乾燥耐性検定 (組換え日本晴)

組換え日本晴2系統 (#3及び#5) について検定した。生育中期の灌水停止に対しては対照でも顕著な影響を示さないが、対照にバイオマス減少、生育不良穂などの症状を示す成熟期での灌水停止では、組換え日本晴2系統ともに、症状の緩和が観察された。この時の生存率は#3が63.6%、#5が59.1%、対照は16.7%であった。

(4) 組換え Curinga 及び組換え NERICA4の乾燥耐性検定

- 1) 温室試験：供試した組換え NERICA4の 5 系統中 2 系統は、干ばつ処理による生存率が対照より有意に高かった。
- 2) 灌水制限試験 (CIAT 施設)：供試した組換え Curinga の13系統中 6 系統は栄養生長期の灌水制限処理において、対照より高いバイオマス量を示した。さらにそれら 6 系統は、再灌水による回復率が対照より高いことが示された。

(5) 農業特性

組換え Curinga4系統は、対照より高い 1 株収量を示した。また 6 系統中 5 系統は対照より開花期が促進され、干ばつ害の回避の特性が示された。

(6) 組換え NERICA4の干ばつストレス耐性

対照との収量差は少なかったが、2 系統は有意に高い子実収量を示した。

(7) 生理的特性

組換え Curinga について調査され、相対的含水率及び葉緑素含量がともに対照より高いことが示された。

(8) 総括

CCCH タンデム型 Zinc finger タンパク質遺伝子 (*OsTZF5*) の導入により、実用イネ 2 品種—Curinga (ラテンアメリカ) 及び NERICA4 (アフリカ)—について、乾燥ストレス耐性系統が作出された。これら 2 系統群は、乾燥ストレス耐性及び回避性の 2 面の特性を有し、これらの成果は実用的価値を有する情報として今後利用されることが期待される。

(林 健一)

First-generation genome editing in potato using hairy root transformation

毛状根形質変換系を用いたゲノム編集ジャガイモの作出

Butler NM *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 2201-2209

米国の国研・大学の研究者による原著論文である。現在の栽培ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の殆どは同質四倍体 ($2n=4X=48$) 且つ他殖性のため、異型接合・高度不稔などの特性を有する。また慣行のアグロバクテリウムによる組換え法に不適合なものが多く、全面的適用はなされていない。このためジャガイモの遺伝子組換え育種は低調である。しかし、近年自殖和合性の二倍体ジャガイモ近縁野生種 (*S. chacoense*, $2n=2X=24$) が発見され、アグロバクテリウム・リゾジェネスによる新たな組換え手法が開発された。著者らは同手法の安定的適用・利用を目的に研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 形質転換に供する宿主植物

形質転換には、二倍体野生種 (*S. chacoense* M6系統) と、栽培ジャガイモの二倍性半数体 (DM) を交配した雑種第一代 (DMF1) を供試する。DMF1は自家不和合性であり、ジャガイモにおける最初の近交系由来の F2集団の開発に利用される。

(2) アグロバクテリウム・リゾジェネス媒介形質転換

旧来のアグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) は、二倍体ジャガイモには不適合であり、組換え体は作出されなかった。しかし、アグロバクテリウム・リゾジェネス (*A. rhizogenes*) MSU440系統を用いると、効率的に形質転換毛状根の作出が可能であった。

(3) ゲノム編集ジャガイモの作出

アグロバクテリウム・リゾジェネスを用い、DMF1への CRISPR/Cas9コンストラクトの形質転換が試みられた (標的は *PDS* 遺伝子)。その結果、得られた毛状根の64%–98%が標的変異を持ち、キメラ変異は14%–30%に過ぎなかった。

(4) 導入 CRISPR/Cas9コンストラクトの遺伝性

得られた毛状根から完全な個体を再分化し、導入遺伝子の後代への遺伝性を調べたところ、再生系統の平均38%で安定な変異として後代に維持された。

(5) 総括

二倍体野生種と栽培ジャガイモの二倍性半数体 (DM) の雑種第一代 (DMF1) に対し、アグロバクテリウム・リゾジェネスを用いた形質転換手法を適用することで、ジャガイモのゲノム編集技術の適用性を示した。今後のジャガイモ育種に新しい情報を提供することが期待される。

(林 健一)

Ectopic expression of MYB repressor *GmMYB3a* improves drought tolerance and productivity of transgenic peanuts (*Arachis hypogaea* L.) under conditions of water deficit

MYB 転写抑制因子 *GmMYB3a* の異所的発現による水欠乏条件における
ラッカセイ (*Arachis hypogaea* L.) の乾燥耐性及び生産性の向上

He Y *et al.*

2020

Transgenic Research 29: 563-574

中国の国研研究者による原著論文である。ラッカセイは、食用油・ビタミン・タンパク質を生産する重要作物であり、アジア・アフリカ・中・南米の半乾燥地域に広く栽培されている。干ばつ害が最大の障害であり、減収は600万トン/年に達する。慣行法による干ばつ耐性育種は遺伝子源が少なく、成果は乏しい。干ばつ耐性バイオテク育種は、他作物では成果が上がっているが、ラッカセイでは本格的適用はされていない。著者らは、遺伝子組換え手法による MYB 転写抑制因子の異所的発現による干ばつ耐性ラッカセイの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 組換えラッカセイ系統の作出

既往の研究から干ばつ耐性遺伝子としてダイズの MYB 転写抑制因子遺伝子 *GmMYB3a* を特定し、アグロバクテリウム法によりラッカセイ品種 Jihua 5 に導入し、2 種類 (OE-1、OE-2) の安定的系統が作出され、各種の検定に供試された。

(2) 組換え系統の干ばつ耐性

7 日間の断水処理により対照は明らかな萎れと生育遅延を示したが、組換え系統は生育を続け対照より高い干ばつ耐性を示した。再灌水による生育回復率は、対照の76%に対し、組換え系統は90~92%に達した。

(3) 組換え系統の生理的特性

7 日間の断水処理により、光合成率の低下は対照では47.15%に達したが、組換え系統の低下は6.63%であった。同様に、蒸散率、細胞内 CO₂濃度、葉緑素含量、水利用効率などは、すべて組換え系統が対照より有意に高かった。

(4) 酸化ストレス耐性

干ばつによる酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド (MDA) 含量は対照が組換え系統に対し、44.4~50%高かった。またプロリン及び可溶性糖の含量は、組換え系統が対照よりそれぞれ20~23%及び65%高かった。

(5) 収量関連特性

干ばつ (断水処理) により、100粒重の減少は、対照が40%減、組換え系統は19~21%減であった。莢収量・茎葉及び根の乾物重の変動は組換え系統では比較的安定していたが、対照では大きく減少した。以上から、組換え系統は生理的特性の向上により、干ばつ条件下の収量を向上する能力を有することが示された。

(6) 総括

アグロバクテリウム法により、ダイズの MYB 転写抑制因子遺伝子 *GmMYB3a* が導入された。干ばつ耐性向上組換えラッカセイ系統が作出された。同系統は干ばつ条件下で対照より有意に高い生育・収量を示し、干ばつ耐性の向上が示された。今後の育種的利用が期待される。

(林 健一)

Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/ Cas9-mediated cytosine base-editing

CRISPR/Cas9媒介のシトシン塩基編集手法による 除草剤抵抗性ナタネの作出

Wu J *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 1857-1859

中国の国研及び大学の研究者による短報である。CRISPR/Cas9技術の延長である塩基編集 (base editing) 手法は、イネ・コムギ・トウモロコシ・トマト・ワタなどで適用成功例があるが、異質4倍体であるナタネ (*Brassica napus*) への適用の成否は未報告である。ナタネ栽培の最大の課題は雑草対策であり、除草剤抵抗性ナタネは最も経済的・効果的対策である。著者らは塩基編集手法による除草剤抵抗性ナタネの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 塩基編集適用品種・部位の選定

ナタネ品種 Darmor-bzh 及び ZS11が選定された。ALS 阻害型除草剤への耐性付与を目的とし、ナタネの *BnALS1* 及び *BnALS3* を標的とした塩基編集が試みられた。本手法では、Cas9 をヌクレアーゼ活性がない dCas9 あるいは nCas9 とシトシンデアミナーゼを融合した酵素に置き換えることで、標的ゲノム DNA 部位に二本鎖切断を導入する代わりに、シトシン塩基をチミン塩基に置換した点突然変異を導入する。

(2) 塩基編集の実施

一次的結果として217の T₀ 個体が選出され、さらに精査の結果、4つの T₀ 個体 (#10、#127、#130、#144) が最終的に *BnALS1* の標的部位に目的の塩基置換がなされた個体として選定された。最終的効率は1.8% (4/217) であった。

(3) 塩基編集系統の除草剤抵抗性検定

得られた塩基編集系統に対して、ALS 阻害型除草剤である tribenuron-methyl に対する抵抗性を5~6葉期の撒布試験で検定した。散布20日後では、対照は最低濃度 (2.5mg/L) でも明瞭な被害を示したが、塩基編集体は10~15 mg ai/L でも被害を示さなかった。さらにホモ接合体では30 mg/L でも被害を示さなかった。さらに10 mg/L (慣行濃度の3倍) への抵抗性は大規模圃場試験でも検証された。

(4) 編集された塩基置換の遺伝

#10個体 (T₀) の自殖により、WT42、ヘテロ型76、ホモ型56の T₁ 個体を得た。これにより T₀ から T₁ への確実な特性の遺伝が確認された。

(5) 総括

塩基編集手法により、ナタネの標的部位にシトシン塩基からチミン塩基への変換 (点突然変異) を的確に行うことにより、ALS 阻害型除草剤抵抗性ナタネが作出された。編集塩基置換の安定した遺伝性も確認され、今後の除草剤抵抗性ナタネの育種に利用されることが期待される。

(林 健一)

The effect of *Bt* crops on soil invertebrates : a systematic review and quantitative meta-analysis

Bt 作物の土壌無脊椎動物に対する影響：系統的レビュー 及び定量的メタ解析

Krogh PH et al.

2020

Transgenic Research 29: 487-498

デンマークの大学及びブルガリアの研究所の研究者による原著論文である。*Bt* 作物の標的害虫に対する防除効果は多数報告されている。しかし、土壌有機物の分解、作物への養分供給に重要な役割を果たす土壌無脊椎動物についての報告は少ない。著者らは厳選された科学的文献について、正確・広範囲・組織的解析を行い、以下の結果を得た。

(1) 文献の選別

調査・解析の対象として収集した6110文献の中から、十分な内容を有する38文献（2002～2014年）が選出され、さらに厳選の結果、22文献が最終的に選出された。20文献は定期的科学出版物、2文献は国際的科学集会の報告書であった。総計36研究の研究実施箇所は、米国14・ドイツ6・中国5・デンマーク3、チェコ2、フランス2、コロンビア・南アフリカ・スイス・イタリア各1であった。

(2) 選別文献の研究対象

1) 対象 Cry タンパク質

- ①チョウ目：Cry1Ab（10論文）・Cry1Ac（6論文）・Cry1Ab・Ac（fusion）（2論文）
- ②コウチュウ目：Cry3Bb1（6論文）・Cry3Aa（1論文）・スタック（4論文）

2) 対象無脊椎動物

トビムシ類（13論文）・ダニ類（9論文）・線虫類（9論文）・ミミズ類（6論文）・コムシ類（2論文）・原生動物及び微小節足動物（各1論文）

3) 対象作物

トウモロコシ：15・ワタ：6・ナタネ：2・バレイショ及びイネ：各1

4) Cry タンパク質の無脊椎動物への影響の判定（エンドポイント）

生物集団の大きさ（abundance）及びバイオマス量で判定した。

(3) 総括

6110文献の中から厳選された22論文について、*Bt* 作物の Cry タンパク質が土壌無脊椎動物に対する影響に関する広範囲・組織的調査・解析が行われた。トビムシ・ダニ・ミミズ・線虫・原生動物などすべての土壌無脊椎動物分類群を総合すると、*Bt* 作物が土壌無脊椎動物に及ぼす有意な影響は検出されなかった。本解析は、初めての広範囲・組織的な実施結果であり、関係分野に有用な情報を与えることが期待される。

（林 健一）

Fitness of F₁ hybrids between 10 maternal wild soybean populations and transgenic soybean

母性野生ダイズ10集団と組換えダイズとの F₁ 交雑種の適応度

Liu JY *et al.*

2021

Transgenic Research 30: 105-119

中国の大学研究者による原著論文である。2018年における組換えダイズ (*Glycine max*) の世界栽培面積は約9600万 ha、世界バイオテク作物栽培面積の50%、世界ダイズ面積の78%に達している。中国では全体の80%が輸入ダイズ、その主体は除草剤グリフォサート抵抗性ダイズである。近年は政府の支援により、国産の除草剤抵抗性ダイズの栽培が増加してきている。組換えダイズの栽培増加につれて、その野生ダイズ (*Glycine soja*) への影響 (交雑による F₁ 交雑種の形成・増加) が懸念されている。野生ダイズは中国各地に存在しており、学術・生態・育種的に重要な役割を有している。著者らは野生ダイズを保護するために、組換えダイズとの F₁ 交雑種との大規模な実態研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 各種供試材料の作出

- 1) 除草剤抵抗性・組換えダイズの選出：エリート品種 NJR44-1 にグリフォサート抵抗性遺伝子 *cp4-epsps* が1コピー導入された組換えダイズ T14R-1251-70 が選出された。
- 2) 野生ダイズ集団の採取：中国6省 (吉林・遼寧・河南・江蘇・モンゴルなど) より、10の野生ダイズ集団が採取された。
- 3) F₁ 交雑種の作出：組換えダイズを父親、野生10集団を母親とする人工交配により F₁ 交雑種が作出された。
- 4) 試験区：①雑草と競合がない条件：組換え体・野生ダイズ10集団・両者の交雑 F₁10集団の3者を1セットとし、温室 (予備試験) 及び網室 (本試験) を5~9反覆で実施、各集団の各種特性値を調査・比較した。②雑草との競合がある条件：JLBC-1 F₁ 集団吉林省野生ダイズとの F₁ が代表として4種類の雑草と混植され、各種特性が調査された。

(2) 試験結果

- 1) 雑草との競合がない条件：出芽率・子葉及び本葉の大きさ・草丈・地上部バイオマス量・花粉活性・1株莢数・1株種子数・100粒重・総合的適応度 (fitness) において、F₁ 交雑種集団は野生ダイズ集団より有意に低かった。しかし、すべての F₁ 集団は70~500粒/株の種子を生産した。唯一の例外は、IMBT F₁ 集団 (モンゴル野生ダイズとの F₁) であり、殆どの形質において野生種集団と同程度であり、100粒重は有意に大であった。
- 2) 雑草との競合がある条件：組換え体・野生集団・F₁ 集団の3者とも、生育・fitness とともに激減した。F₁ 集団の1/3は枯死したが、2/3は生存し、約60種子/株を生産した。

(3) 総括

組換えダイズの市場化に伴う各地の野生ダイズ集団への遺伝子伝播の影響を知るために、人工交配による両者の F₁ 交雑種を用いた大規模な実態調査が実施された。グリフォサート抵抗性組換えダイズを父方とし、野生ダイズ集団を母方として両者の F₁ 集団は、雑草との無競合条件下では、各種生育特性及び適応度 (fitness) において野生ダイズ集団より低下した。しかし F₁ 個体は70~500粒/株の種子を生産した。雑草との競合条件下では、生育量及び fitness は激減し、1/3の個体は枯死した。しかし、なお2/3は生存し、約60粒/株の種子を生産した。以上から野生ダイズ集団への遺伝子伝播の可能性の認識の必要性が示された。

(林 健一)

Site-directed mutagenesis by biolistic transformation efficiently generates inheritable mutations in a targeted locus in soybean somatic embryos and transgene-free descendants in the T₁ generation

ダイズ不定胚への biolistic 形質変換による標的特異的突然変異導入及び
外来遺伝子不在 T₁ 系統の作出

Adachi K *et al.*

2021

Transgenic Research 30: 77-89

日本の大学及び国研の研究者による原著論文である。ダイズは良質なタンパク質及び脂質を生産する重要な作物であり、現在のダイズ栽培世界面積の約78%は GM ダイズである。CRISPR/Cas9系を利用した形質変換では、安定した遺伝的変異の作出と後代における Cas9 遺伝子の除去が必要である。著者らはダイズのアレルギー因子の除去を目標とした標的突然変異の作出によるアレルギー除去ダイズ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 組換えダイズ系統の作出

不定胚誘導が容易かつ、未成熟子葉からの再生能力が高い栽培品種「Jack」が組換え対象品種として選定された。同品種の不定胚に対して、ダイズの主要アレルゲンタンパク質をコードする *Gly m Bd 30K* 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 コンストラクトの biolistic 形質変換による導入が実施され、5 系統 (30K-1~30K-5) が選出された。

(2) 標的突然変異体の選抜

PCR 解析により、選抜された 5 系統はいずれも CRISPR/Cas9 コンストラクトを有することが確認された。また、CAPS 解析及びシーケンス解析により、全 5 系統の標的部位に突然変異が確認された。

(3) オフターゲット不在の確認

in silico 解析により推定されたオフターゲットとなりうる 3 部位のシーケンス解析を行い、5 系統いずれもオフターゲット候補部位に変異がないことを確認した。

(4) 組換え不定胚から再生

すべての 5 組換え不定胚系統は、7 ヶ月後でも増殖機能を有していた。形質転換不定胚から再分化誘導を行ったところ、うち 2 系統 (30K-3 及び 30K-5) より、それぞれ 10 及び 20 の再分化用植物体 (T₀ 個体) を得た。他の 3 系統からは再分化個体は得られなかった。

(5) T₁ 世代への突然変異及び外来遺伝子の伝達

再分化個体 (T₀ 個体) から種子を得、後代 T₁ 世代の実生からゲノム DNA を抽出し、遺伝型解析を行った。30K-3、30K-5 いずれの T₁ 個体も T₀ 不定胚から伝達された標的部位変異を有していた。一方、Cas9 遺伝子の有無の分離比は、30K-3 では 3 : 1 であったが、30K-5 では Cas9 無しの個体の比率が 1/4 よりも有意に高かった。

(6) 同型接合突然変異遺伝子の選抜

T₂後代において、同型接合・Cas9不在の個体が選抜され、*del-7*、*ins-133* (30K-3由来)、*del-1*、*del-9* (30K-5由来) と命名された。

(7) 突然変異個体成熟種子のアレルギータンパク質レベル

T₃種子からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 解析を行った結果、選抜された同型接合・Cas9不在の4系統の種子からは、いずれも Gly m Bd 30K タンパク質のバンドは検出されなかった。他のダイズ種子主要貯蔵タンパク質には両者の間に差異はなかった。

(8) *Gly m Bd 30K* 遺伝子の転写量

T₃種子から RNA を抽出し、RT-PCR により *Gly m Bd 30K* 遺伝子の発現解析をおこなった。その結果、*del-1*、*del-7*、*ins-133*系統では *Gly m Bd 30K* 遺伝子の転写物は検出されなかったが、*del-9*系統では *Gly m Bd 30K* 遺伝子の転写物が検出された。

(9) 突然変異系統の形態的特性及び有機元素分析

選抜された T₃世代4系統は、形態的特性に対照との差異はなかった。さらに有機元素分析の結果、窒素・炭素・水素の含量に対象品種 Jack との差はなかった。

(10) 総括

ダイズ不定胚への CRISPR/Cas9コンストラクトの biolistic 形質変換により、ダイズアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子へ標的的特異的変異を導入し、再分化体の自家交雑後代 T₃世代で、アレルゲンフリーかつ外来遺伝子不在の突然変異系統が作出された。導入した変異は安定して後代へ伝達され、また農業的特性・各種成分には対照との差異は存在しなかった。本突然変異系統の作出は、アレルギータンパク質除去のダイズ系統の作出に有用な情報を与えることが期待される。

(林 健一)

No.605

MON 95379 *Bt* maize as a new tool to manage sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in South America

南米におけるサトウキビメイガ (*Diatraea saccharalis*) の新たな防除手段としての MON95379 *Bt* トウモロコシ

Horikoshi RJ *et al.*

2022

Pest Management Science 78: 3456-3466

バイエルクロップサイエンス（ブラジル、アルゼンチン、米国）の研究グループによる報文。サトウキビメイガ (*Diatraea saccharalis*) は、アルゼンチンのトウモロコシの主要害虫である。サトウキビメイガに対して、*Bt* トウモロコシによる防除が期待されているが、アルゼンチンでは、既存の *Bt* トウモロコシに対する圃場進化型抵抗性が観察されている。そこで、著者らは、新たな *Bt* トウモロコシ MON95379のサトウキビメイガに対する有効性を評価した。

1) 植物材料

MON95379トウモロコシは、鱗翅目を標的とする2種類の *Bt* タンパク質、Cry1B.868とCry1Da_7を発現する。Cry1B.868またはCry1Da_7のいずれかのみを発現する *Bt* トウモロコシ、MON89034トウモロコシ (Cry1A.105/Cry2Ab2) 及び非 *Bt* トウモロコシを対照とした。

2) リーフディスク給餌試験

MON95379トウモロコシ及びCry1B.868のみ発現のトウモロコシを給餌したサトウキビメイガ幼虫の死亡率は100%であった。一方、Cry1Da_7のみ発現のトウモロコシでの死亡率は、20%未満であった。

3) 葉組織希釈アッセイ

凍結乾燥したCry1B.868トウモロコシ葉の凍結乾燥粉砕物を非 *Bt* トウモロコシ葉の凍結乾燥粉砕物で希釈した飼料 (1/64~1/8) を調製してサトウキビメイガ幼虫に給餌しところ、最も低濃度 (1/64) でも、100%の脱皮阻害が示された。

4) 既存の *Bt* トウモロコシ抵抗性サトウキビメイガへの効果

既存のMON89034 *Bt* トウモロコシに対して、抵抗性及び感受性のサトウキビメイガにそれぞれ精製したCry1B.868タンパク質を給餌したところ、半数致死濃度 (LC₅₀) は、両者の間で同程度であり、Cry1B.868タンパク質は既存 *Bt* トウモロコシ抵抗性昆虫にも作用することが示された。

5) 圃場試験

アルゼンチンの5か所で行われた圃場試験のうち、サトウキビメイガの被害が大きかった2か所の圃場において、食害数や昆虫 (蛹) 数の数は、MON95379トウモロコシで非 *Bt* トウモロコシよりも有意に少なかった (例外1)。

6) 総括

MON95379トウモロコシは、既存の *Bt* トウモロコシに対する抵抗性を獲得したサトウキビメイガに対しても殺虫効果を示し、抵抗性サトウキビメイガ出現地域での生産性向上に寄与するものと期待される。

(小口太一)

Effects of cross-pollination among non-*Bt* and pyramided *Bt* corn expressing cry proteins in seed mixtures on resistance development of dual-gene resistant *Helicoverpa zea*

混合種子戦略における非 *Bt* トウモロコシと多種類の Cry タンパク質を有する *Bt* トウモロコシの間での交雑が二遺伝子耐性アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) の抵抗性出現に及ぼす影響

Yang F *et al.*

2022

Pest Management Science 78: 3260-3265

米国テキサス A&M 大学の研究グループによる原著論文。*Bt* トウモロコシ種子に一定の非 *Bt* トウモロコシの種子を混合することによる種子混合リフュージ戦略は、抵抗性害虫の出現の抑制に有効である。しかし、この場合、非 *Bt* トウモロコシの雌穂に隣接する *Bt* トウモロコシの花粉が交差受粉することで、非 *Bt* トウモロコシの雌穂にモザイク状に *Bt* 種子が出現し、雌穂を食害する害虫に対する緩衝効果が低下することが懸念されているが、これを評価した研究は殆どない。筆者らは、VT Double Pro (MON89034 x NK603) トウモロコシと非 *Bt* トウモロコシの混合植栽における非 *Bt* トウモロコシ雌穂がアメリカタバコガの生存及び成長に与える影響を調査した。

1) 圃場試験

2020年4月、米国テキサス A&M 大学の試験圃場に、VT Double Pro (MON89034 x NK603) トウモロコシ (以下 *Bt* トウモロコシ) 及び非 *Bt* トウモロコシをそれぞれ100% (PBt 及び PNBt)、非 *Bt* トウモロコシを5%、20%含む混合種子を播種した。各実験区1500~5000株のトウモロコシを栽培し、実験区間は150m以上の隔離距離を設けた。

2) 種子混合区の非 *Bt* トウモロコシ雌穂の *Bt* 陽性率

非 *Bt* 混入率5%及び20%の実験区の非 *Bt* トウモロコシの雌穂上の種子の *Bt* 陽性率をストリップテストによって調査したところ、それぞれ68%及び54%であり、交差受粉が普通に起こることが確認された。

3) 給餌試験によるタバコガの生存率

R1 (絹糸抽出) -R2 (水熟) ステージの若い雌穂を採取し、実験室にて、感受性 (SS)、抵抗性 (RR) のアメリカタバコガ集団及びその F₁ 集団 (RS) に給餌した (種子混合区からは、非 *Bt* 個体から採取)。SS、RS、RR の生存率は、PNBt 給餌区で18~24.2%に対して、PBt 給餌区では、0、5.0、10%であった。種子混合雌穂給餌区では、RS は18.3-20.0%、RR は20.0-22.5%であったが、SS は0.8-2.5%にとどまった。

4) 給餌試験によるタバコガの成長への影響

給餌開始から14日目のタバコガの発生段階で評価した。SS は、2種類の種子混合区では、PNBt 給餌区よりも有意に遅延した (PBt 給餌区は成長なし)。RS は、PBt 給餌区でのみ有意な遅延が見られ、PNBt 給餌区、2種類の種子混合区では有意差はなかった。RR は、4種類の給餌区で有意差はなかった。

5) 総括

種子混合区中では、非組換え体の雌穂では、周囲の *Bt* トウモロコシ花粉との交差受粉がみられ、その雌穂を給餌したアメリカタバコガの生育に有意な影響がみられた。このことから、雌穂を食害する害虫に対するリフュージとしての効果が低下し、抵抗性害虫の出現が高まることが懸念される。

(小口太一)

ERA プロジェクト調査報告

2022年12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 児島宏之

〒135-0004東京都江東区森下3-13-5

グローバルビル5F

TEL 03-6284-0877

FAX 03-6284-0878

[http:// www.ilsijapan.org](http://www.ilsijapan.org)