

## Fe欠乏耐性遺伝子組み換えイネの環境への影響(投稿論文, 研究報告)

著者	森川 クラウジオ健治, 三枝 正彦, 山本 理恵, 中西 啓仁, 鈴木 基史, 西澤 直子, 森 敏
雑誌名	複合生態フィールド教育研究センター報告 = Bulletin of Integrated Field Science Center
巻	20
ページ	5-9
発行年	2004-12-27
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/30889">http://hdl.handle.net/10097/30889</a>

## Fe 欠乏耐性遺伝子組み換えイネの環境への影響

森川クラウジオ健治<sup>1</sup>・三枝 正彦<sup>1</sup>・山本 理恵<sup>1</sup>・中西 啓仁<sup>2</sup>・鈴木 基史<sup>2</sup>・西澤 直子<sup>2</sup>・森 敏<sup>2</sup>

### Impact of iron deficiency tolerant transgenic rice on the environment

Claudio Kendi MORIKAWA, Masahiko SAIGUSA, Rie YAMAMOTO, Hiromi NAKANISHI,  
Motofumi SUZUKI, Naoko NISHIZAWA and Satoshi MORI

キーワード : Fe 欠乏耐性, 遺伝子組み換えイネ, 環境

#### 要約

Fe 欠乏耐性遺伝子組み換えイネの環境への影響を検討するために次のように検討した。1. 組換え, 非組換えイネの生育比較。2. 組換え, 非組換えイネの交雑率の検定。3. 花粉の形状, 稔性, 飛散距離の検定。4. 土壌微生物相の検定。5. 跡地土壌での有害物質残留効果。6. 植物遺体の鋤込み試験。結果 : 1. 組換えと非組換えはほぼ同じ生育を示した。2. 組換えイネと非組換えイネとの交雑は起こらなかった。3. 花粉は組換えイネで花粉源から 0.5m, 非組換えイネで 1.0m に最も多く飛散したが, 3m まで飛散したのものもあるが, 1m 以上で急減した。4. 放線菌, 糸状菌の微生物数には, 土壌間で有意な差は認められなかった。5. 跡地土壌で有害物質の残留は認められなかった。6. 土壌へ遺伝子組み換えイネ遺体の鋤込みはレタスの生育に大きな影響を与えなかった。レタスの形態に違いも観察されなかった。

#### 緒論

遺伝子操作の目的は, 作物を改変し農業上の効率を向上させることであり, また, 無駄な手順を省略し, 作物としての収量や品質を向上させることである。現在まで除草剤耐性, 害虫およびウイルス耐性, 日持ちを長くし収穫後の品質が向上した作物などが遺伝子操作によって作られている。その一方危険性としては, 他家受粉 (cross pollination) により野生種や他の作物種と交配することで遺伝子が自然界へ伝搬して生物多様性など自然環境へ影響を及ぼす事と考えられる。例として, Losey (1999) らにより Bt コーンの花粉が, 標的外昆虫であるオオカバマダラ蝶 (*Danaus plexippus*) の幼虫に悪い影響する。

農林水産省は, 「第 1 種使用規定承認組み換え作物栽培実験指針 (案)」(農林水産省, 2003) で, 独立行政法人の研究機関において, 組み換え作物の栽培実験を行う際に, 研究所の外の一般農家が栽培する作物との交雑を防ぐこと

を目的に, 必要な措置を定めた。交雑を防止するための措置として, 同種栽培作物との間に隔離距離を設けたり, あるいは開花前に花を摘んだり, おしべを取り除いたり, 風や昆虫により花粉が媒介されないようにネットで覆うなどの方法が示され, いずれかの措置をとるように求めた。隔離距離によって交雑を防止する場合, イネは 20m, 大豆は 10m, トウモロコシと西洋ナタネは 600m 隔離すべきであるとされている。隔離距離は, 科学的な知見に基づいて, 交雑が生じないとされる距離にさらに余裕をもって設定された。例えば米国やカナダ, イギリスなどの野外試験実施基準では, トウモロコシで設定した隔離距離は約 200m であり, またイネについては, 米国の野外試験実施基準では約 3m である, 本指針は非常に厳しい基準である。委員は「非常に厳しい条件で, 実験自体ができなくなる作物があるかもしれないが, これくらい厳しい条件の下なら大丈夫という共通の認識の下で進めていくことが大切である」と述べている。

そこで, 本研究では Fe 欠乏耐性遺伝子組み換えイネと非組換えイネを栽培し, 遺伝子組み換えイネの環境への影響を調べるために次の点を検討した。1. 組換え, 非組換えイネの生育比較。2. 組換え, 非組換えイネの交雑率の検定。3. 花粉の形状, 稔性, 飛散距離の検定。4. 土壌微生物相の検定。5. 跡地土壌での有害物質残留効果。6. 植物遺体の鋤込み試験。

#### 材料と方法

##### 1. 組換え, 非組換えイネの生育比較

供試植物 : イネ (*Oriza sativa* L.)

非組換えイネ品種「月の光」と組換えイネ (鉄欠乏耐性イネ・HvNAS1 (*gHvNAS1-1*))。

供試土壌 : 非アロフェン質黒ボク土である川渡土壌と貝化石土壌である石灰質アルカリ土壌。

非アロフェン質黒ボク土を 1/5000 a ワグネルポットに入れ施肥量を速効性肥料 0.5 Ng/ポットとした。組換えイネ T3

<sup>1</sup> 東北大学大学院農学研究科

<sup>2</sup> 東京大学

世代, 非組換えイネ (中苗) をポット当たり 3 本ずつ植え, それぞれ 3 反復で栽培を行った。イネの移植は 2002 年 5 月 28 日, 出穂日は 2002 年 9 月 9 日で, 11 月 11 日に収穫を行った。また, 組換えイネ T2 世代中苗の貝化石灰土壌における生育を, 閉鎖系温室内で調査した。

## 2. 組換えイネと非組換えイネとの交雑率の検定

非閉鎖系の温室内で, 組換えイネ, 非組換えイネ (月の光) を隣接させてポットを用いて行った。組換えイネから 30, 60, 80 cm の距離に非組換えイネを配置した (図 2-1)。開花時期に扇風機で温室の天井に向けて風を送り, 温室内全体で, 配置したポットの外側から内側への空気の流れが起きるようにした。

非組換えイネから収穫した種子中に含まれるハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の検定は次のように行った。組換えイネに隣接して栽培した非組換えイネから種子を収穫し, それぞれの距離 (30, 60, 80 cm) から 4 株をランダムに選抜した。それぞれの株から 50 粒の種子を取り殺菌処理した後, 25 粒ずつ 2 枚の 50 mg/l のハイグロマイシンを含む MS 培地に播種した (図 2-2, 2-3)。ポジティブコントロールとして, ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ組換えイネの種子 50 粒を同様に播種した (図 2-2, 2-3)。ネガティブコントロールとして, 60 cm の距離で栽培した非組換えイネの種子 25 粒をハイグロマイシンを含まない MS 培地に播種した。播種後, 28 °C の気象器で 18 日間育成した。

PCR を用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の検定はハイグロマイシンを含む MS 培地で育成してきたイネのゲノム DNA を抽出し, ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF を PCR (Fw ; 5'-ATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGC GACGTC, Rv ; 5'-CTATTTCTTTGCCCTCGACGAGTGCT) で増幅した。ポジティブコントロールとして組換えイネの作製に用いたベクターを鋳型として同様に PCR を行った。また, ゲノム DNA の抽出を確認するために,  $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子の部分配列を PCR (Fw ; 5'-GTAGCCCTGCAT GACCTTGT, Rv ; 5'-TCAACTGGGAGTCGTGGAAG) で増幅した。

## 3. 花粉の形状, 稔性, 飛散距離の検定

組換えイネ, 非組換えイネ (月の光) から花粉を採取し, 顕微鏡で観察した。その稔性を DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole) で染色し確認した。

飛散距離測定実験の概要を図 3-1 に示した。花粉源から 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 m の距離にグリセリンを塗布したスライドガラスを床に置いた。花粉源の後ろ 1 m の位置に扇風機を設置し, 花粉源での風速が 1.4 m/s となるように設定した。扇風機を 24 時間連続して稼働した後, スライドガラスを回収し, 花粉数を測定した。

## 4. 土壌微生物相検定

土壌の採取は組換えイネ, 非組換えイネ (月の光) を 1/5000 a ワグネルポットで栽培し, 分けつ期に注射器を用

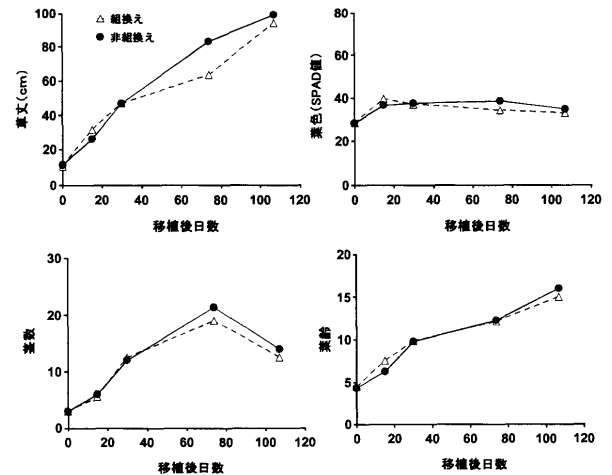


図 1-1 組換えと非組換えイネの生育の比較

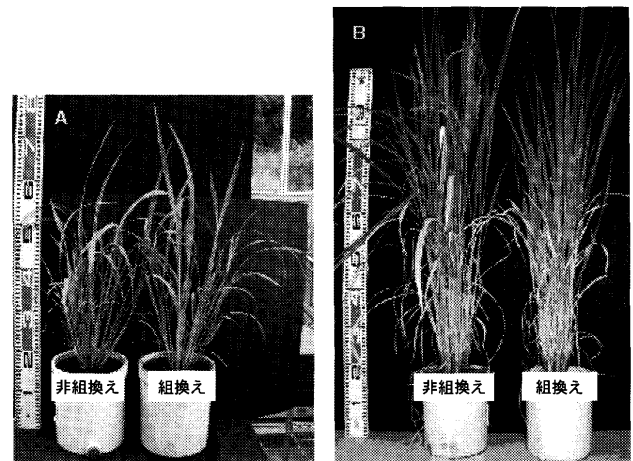


図 1-2 組換えイネと非組換えイネの (A) 分けつ期と (B) 出穂期の様子

表 1-1 植物体の乾物重

	葉	茎	穂
	g/ポット		
非組換えイネ	15.3 ± 1.6	15.0 ± 2.3	11.5 ± 1.0
組換えイネ	12.8 ± 1.1	15.1 ± 1.0	7.5 ± 1.9

\* 数値は, 平均値 ± 標準偏差

いて深さ 5 cm から行った。生土約 1 g を 100 ml 滅菌水に懸濁し 10 分間攪拌したのち, 1000 倍, 1000000 倍希釈液を作製した。10<sup>6</sup> 倍希釈液を 200 μl ずつ後述した 3 種類の培地に塗布した。

土壌微生物数の測定は次のように行った。土壌微生物相を検定するために 3 つの培地を使用した。土壌細菌の非選択的培地として YG 培地 (酵母エキス 1.0 g/l, グルコース 1.0 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l,

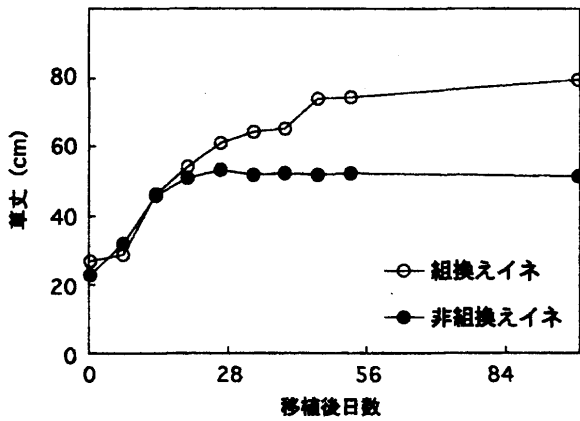


図 1-3 組換えと非組換えイネの貝化石アルカリ土壌における生育

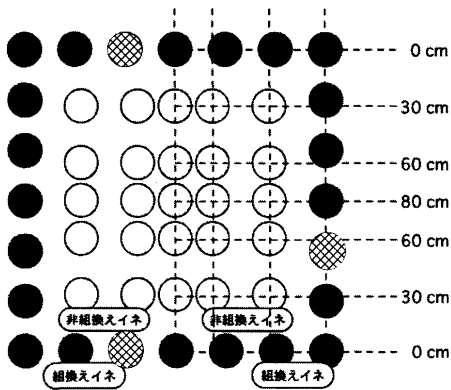


図 2-1 交雑率試験用のポットの配置図

非組換えイネ (白丸) を 5 × 5 列で配置し、その外側に非組換えイネを取り囲むように組換えイネを配置した。申請する系統を網掛丸、その他を黒丸で示した。組換えイネから 30cm, 60cm, 80cm となるように非組換えイネを配置した。

pH 6.8), 土壌放線菌の選択培地として HV 培地 (フミン酸 1.0 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/l, チアミン-HCl 0.5 g/l, KCl 1.7 g/l, リボフラビン 0.5 mg/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 50 mg/l, ナイアシン 0.5 mg/l, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/l, ピリドキシン-HCl 0.5 mg/l, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g/l, パントテン酸-Ca 0.5 mg/l, イノシトール 0.5 mg/l, p-アミノ安息香酸 0.5 mg/l, ビオチン 0.25 mg/l, シクロヘキシミド 50 mg/l, pH 7.2)。土壌糸状菌の選択培地としてローズベンガル培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mg/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, ペプトン 5 g/l, グルコース 10 g/l, ローズベンガル 33 mg/l, pH 6.8) を用い、肉眼あるいは、顕微鏡下で計数した。計数後、平均値と生土値 / 乾土値をもとに乾土 1 g 当たりのコロニー形成数 (cfu) を算出した。

#### 5. 跡地土壌での有害物質の残留効果

組換えイネ, 非組換えイネ (月の光) を栽培し、収穫を終えた黒ボク土を用いて、レタス (*Lactuca sativa* L.) を容量 300g のポットに栽培した。栽培は 10 苗 / ポットで 30 日間

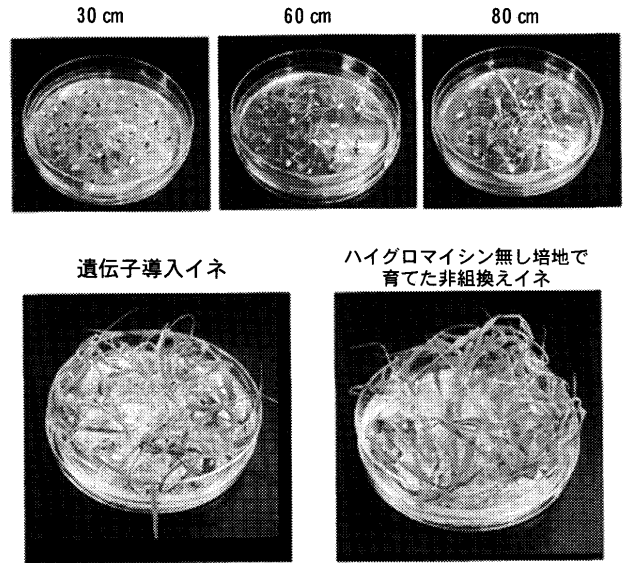


図 2-2 シャーレで 18 日間育てた植物の様子 MS 培地で 18 日間育てた時の植物の様子。写真の上の距離は非組換えイネが育てられた時の組み換えイネからの距離を示す。

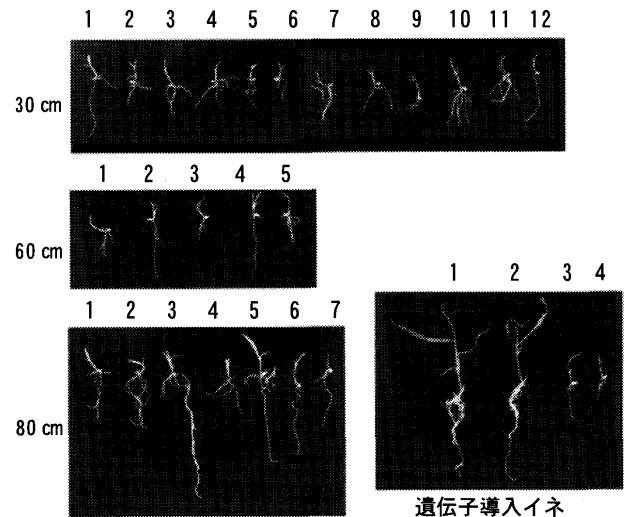


図 2-3 ハイグロマイシンを含む培地で 18 日間育てたイネの様子

組換えイネの近くで育てた非組換えイネから収穫した種子をハイグロマイシンを含んだ MS 培地で 18 日間育てた様子を示す。それぞれの距離の植物の種子から発芽させた植物の中で比較的生育の良かったものを選択した。(組換えイネに関しては、草丈の高かったものと低かったもの)。ここで示した植物からゲノム DNA を抽出し、図 2-4 で示す PCR チェックに用いた。植物の上にかかれた番号が図 2-4 の泳動図にかかれた番号に一致する。

に行い、根長、乾物重を測定した。

6. 植物遺体の鋤込み試験

黒ボク土で栽培した組換えイネ、非組換えイネ (月の光) の植物体の葉と茎を粉碎し、500 kg/10 a の比率で植物体と土壌を混合した。供試植物として、レタス (*Lactuca sativa* L.) を用い、栽培試験を行った。栽培は 10 苗/ポット 30 日間行い、ポット当たり 0.1gN を施肥した。

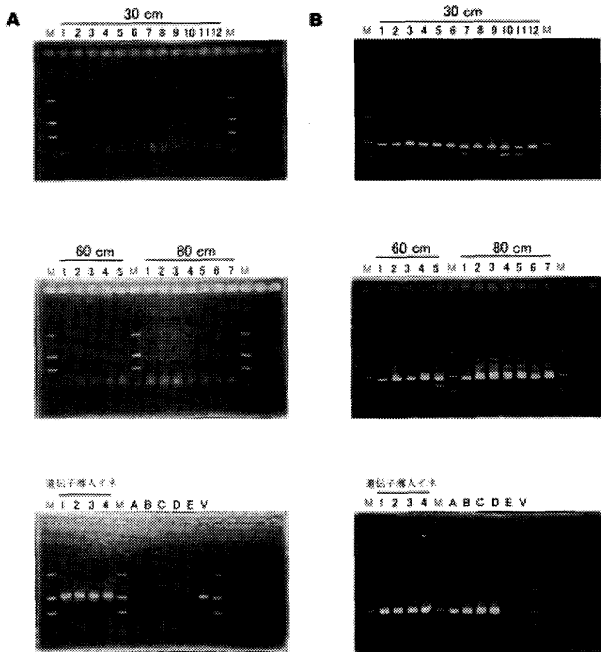


図 2-4 PCR を用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の確認

図 2-3 で示した植物からゲノムを抽出し、PCR でハイグロマイシン耐性遺伝子 (A) と  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (B) を増幅した。泳動図の上に示した数字は図 2-3 で示した植物の番号と一致している。A-V には、PCR 反応の対象区を泳動した。M: マーカー (上のバンドから 3000bp, 1000bp, 500bp を示す); A, B: 遺伝子組み換えイネを近くで育てていないイネ (品種日本晴れ) のゲノム DNA を鋳型して PCR 増幅したサンプル; C, D: 遺伝子組み換えイネを近くで育てていないイネ (品種月の光) のゲノム DNA を鋳型して PCR 増幅したサンプル; E: 鋳型なしで PCR 増幅したサンプル; V: ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつベクターとして PCR 増幅したサンプル

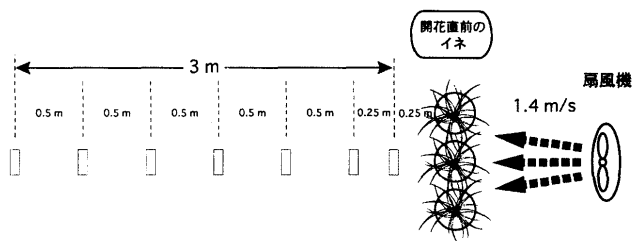


図 3-1 花粉飛散測定の様式図

結果と考察

1. 組換え、非組換えイネの生育比較

黒ボク土における生育の結果を図 1-1 と 1-2 に示した。移植後 75 日頃では組換えイネの草丈が小さく、茎数が少なくなったが、移植後 110 日では有意な差は見られなかった。茎数、葉齢はほぼ同じような変化を示した。表 1-1 に組換えイネ、非組換えイネの乾物重を示した。同時に栽培した他の組換えイネ 5 系統の結果とともにフィッシャーの LSD 法を用いて検定を行ったが、いずれの項目においても有意差はなかった。閉鎖系温室で貝化石土壌を用いて、鉄欠乏耐性能を検定したところ、組換えイネは鉄欠乏耐性を示した (図 1-3)

2. 組換え、非組換えイネの交雑率の検定

MS 培地を用いた検定の結果を図 2-1 に示す。ハイグロマイシンを含む培地を用いた検定では、非組換えイネはどの個体も葉が薄い黄緑色になり、やがて枯死した。組換えイネは 50 粒中 40 粒が生きた。また、ハイグロマイシンを含まない培地上で生育させた非組換えイネ (組換えイネから 60 cm 離れた距離で育てられたものから得られた種子) は 25 粒中 23 粒が発芽し、正常な生育を示した。

図 2-3 に植物個体の比較を示した。非組換えイネの中にもハイグロマイシン培地で生育する個体が存在したが、全て組換えイネよりも葉色が薄く、生育も遅かった。組換え

表 3-1 組換えイネと非組換えイネの花粉飛散距離の比較

	花粉源からの距離 (m)						
	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3
組換えイネ	301	510	418	217	177	148	50
非組換えイネ	245	315	596	398	278	200	32

\* 数値はスライド当たりの花粉数

表 4-1 土壌微生物 (cfu/g 乾土)

サンプル名	細菌類	放線菌	糸状菌
	( $\times 10^6$ )	( $\times 10^6$ )	( $\times 10^6$ )
非組換え	3.52 $\pm$ 0.92 (a)	1.72 $\pm$ 0.44	6.72 $\pm$ 3.37
組換え	2.19 $\pm$ 0.52	1.62 $\pm$ 0.46	4.61 $\pm$ 1.67

\* 数値は、平均  $\pm$  標準誤差

(a) 組換えと非組換えにおいて 1% 有意

表 5-1 跡地土壌で栽培したレタスの乾物重と根長

	乾物重 (g/ポット)	根長 (cm)
組換えイネ	0.324 $\pm$ 0.046	3.9 $\pm$ 1.4
非組換えイネ	0.303 $\pm$ 0.019	3.6 $\pm$ 0.4

\* 数値は、平均値  $\pm$  標準偏差

イネは成長の遅いものもあったが、葉は緑でありハイグロマイシン耐性を示した。

PCR での遺伝子増幅の結果を図 2-4 に示した。供試した全ての非組換えイネから抽出したゲノム DNA からは、ハイグロマイシン耐性遺伝子は増幅されなかった。一方、組換えイネに関しては、全てで遺伝子の存在が確認された。 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子は全ての個体において増幅されたことから、ゲノム DNA の抽出および PCR 操作には問題は無いことが示された。

一穂の中での開花順序はほぼ決まっている。穂の上部のモミから開花が始まり、一穂の開花は 1 週間以上続く。受粉は開花と同時に進行されるが、葯は開花して外に出る直前に破れて花粉が自分の雌蕊にかかるため、ほぼ自家受粉と

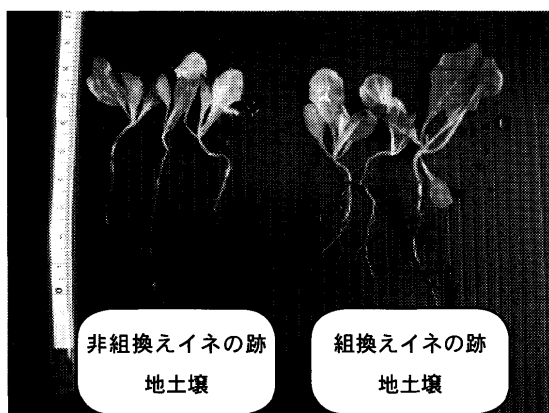


図 4-1 組換えイネあるいは非組換えイネの跡地土壤で栽培したレタスの様子

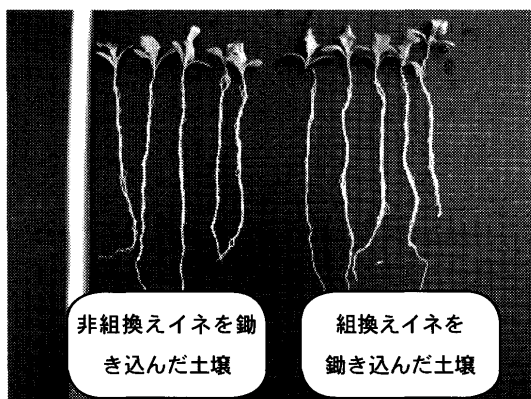


図 5-1 植物遺体を混合した土壤で栽培したレタス

表 6-1 植物遺体を混合した土壤で栽培したレタスの乾物重と根長

	乾物重 (g/ポット)	根長 (cm)
組換えイネ	0.131 ± 0.025	9.58 ± 0.82
非組換えイネ	0.127 ± 0.023	9.42 ± 1.38

\* 数値は、平均値 ± 標準偏差

なる。開花日が雨の場合には、花は開かないまま、葯がモミの天井に押しつぶされるように破れて受粉が行われるため同様にほぼ自家受粉となる。開花した花そのものの寿命は、1～2 時間であることから、イネの受粉は極めて短時間で行われる。本実験ではハイグロマイシンを含む培地で育成した非組換えイネには個体差が存在するものの 600 個体の全てにおいて葉の色が薄くなり、やがて枯死した。比較的生育の良かった個体でも、PCR 法を用いた解析では、ハイグロマイシン遺伝子の存在は確認されなかった。以上のことから、本実験では組換えイネと非組換えイネとの交雑は起こらなかったと結論された。

### 3. 花粉の形状、稔性、飛散距離の検定

花粉の形状に、組換えイネと非組換えイネとの間に有意な差異は観察されなかった。DAPI で染色したところ、組換えイネ、非組換えイネともに花粉の稔性が認められ、組換えイネと非組換えイネの間に相違はないと考えられた。

花粉の飛散距離と花粉数の変化を表 3-1 に示した。花粉は組換えイネで花粉源から 0.5m、非組換えイネで 1.0m に最も多く飛散したが、3m まで飛散したのものもあるが、1m 以上で急減した。

### 4. 土壤微生物相の検定

表 4-1 に微生物数の計数結果を示した。非選択培地 (YG 培地) 上で生育した土壤細菌数は、統計的に二つの土壤間で 1% レベルの有意差が認められた。組換えイネに比べて非組換えイネで土壤微生物数が多かったのは生育が旺盛で根分泌物が多かったからと思われる。放線菌、糸状菌の微生物数には、土壤間で有意な差は認められなかった。

### 5. 跡地土壤での有害物質残留効果

表 5-1 に栽培後のレタスの乾物重、根長を示した。乾物重、根長共に、二つの土壤間での統計的な有意な差は認められなかった。また、いずれの土壤を用いた場合でもレタスの生育に大きな差はなく、形態的にも有意な差は認められなかった (図 4-1)。

### 6. 植物遺体の鋤込み試験

栽培後のレタスの乾物重と根長を表 6-1 に示した。2つの試験区でのレタスの値に、有意な差は認められなかった。また、図 5-1 に示すように、植物の生育に大きな差は認められず、形態の違いも観察されなかった (図 6-1)。

## 文献

Losey, J. J. E., L. S. Rayor, and Carter, ME. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 20 May, 399, p. 214

農林水産省 2003 第一回「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会議事録, 28p