

F-7 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究

(2) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の環境拡散リスクと植物多様性影響評価に関する研究

③ 導入遺伝子の近縁野生種への移行頻度に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

生物圏環境研究領域

分子生態毒性研究室

佐治 光・久保明弘・青野光子

生物多様性研究プロジェクト

分子生態影響評価研究チーム

中嶋信美・玉置雅紀

平成15～17年度合計予算額

23,707千円

(うち、平成17年度予算額

7,340千円)

※上記の予算額には、間接経費

5,471千円を含む

[要旨]

遺伝子組換え植物が生物多様性に及ぼし得る影響の一つとして考えられる、導入された遺伝子が、近縁野生種に移行し、野生種集団内で拡散する可能性を解明するため、ダイズとその近縁野生種であるツルマメを材料に用いて以下のような研究を行った。まず人工交配により遺伝子組換えダイズ(GMダイズ)とツルマメの雑種を作成し、その生理的性質を調べたところ、 F_1 雑種は、成育や形態に関して両親の中間的性質を示した。また F_1 、 F_2 雑種には除草剤耐性遺伝子が受け継がれ、除草剤耐性になっていることが確認された。

次に、ダイズとツルマメの間での自然交雑率について以下のような研究を行った。平成16年度は、2品種の在来ダイズ(リュウホウ、フクユタカ)とツルマメ(那須-5)を温室内で育苗後、ほ場の2区画に以下のように定植した。各区画の中心となる直径2mの円内にダイズの各々の品種を18個体ずつ移植し、その周囲1m間隔で直径10mになるまで円を描き、その円上の8方向にツルマメを1個体ずつ移植し、その後は通常管理で栽培した。これらのダイズ2品種とツルマメの開花時期はかなり重なった。ダイズから1及び2m離れたツルマメ由来の種子2,500粒に対し、SSRマーカーを用いて分析を行った結果、ダイズ由来の花粉で受精したと思われるものは全く検出されなかった。平成17年度には、ダイズ(フクユタカ)、ツルマメ(那須-5)とそれらの間で作成された F_2 雑種を温室内で育苗後、ほ場の2区画に以下のように定植した。一方の区画(A)ではダイズ24個体とツルマメ20個体を、また別の区画(B)では F_2 雑種24個体とツルマメ20個体を0.8または1m間隔に交互に隣接させた。その後通常管理で栽培したところ、これらの植物の開花時期はほぼ完全に一致したが、A区画から収穫した476粒およびB区画から収穫した343粒のツルマメのいずれにおいてもダイズや F_2 雑種と交雑したと思われる個体はまったく検出されなかった。以上の結果から本研究で使用した条件下では、ダイズとツルマメ間の交雑率は非常に低いことが示唆された。

[キーワード]

遺伝子組換え、遺伝子浸透、交雑、除草剤耐性、ダイズ

1. はじめに

遺伝子組換え植物が生物多様性に及ぼし得る影響の一つに、組換え植物とその近縁野生種との交配に伴う、導入された遺伝子の野生種への移行と野生種集団内での拡散、さらにその結果として起こる野生種の形質の変化や生態系のかく乱がある。これまでにわが国でそのような事例が生じたという報告は無く、その理由の一つとして栽培または輸入された遺伝子組換え植物のいくつかについてはそれと交配し得る近縁野生種がわが国には存在しないということがあげられている。しかしなかには交配可能な近縁種が存在する例があり、たとえばダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) と交配し得る野生種のツルマメ (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) などが知られている¹⁾。わが国における遺伝子組換えダイズの栽培はまだ試験的なものに限られており、輸入されているもののほとんど全ては食品加工用であるが、それらが運搬に伴ってこぼれ落ち、野外で生育していた例が報告されている²⁾。したがって、遺伝子組換えダイズに導入された遺伝子が自然界に侵入、拡散する可能性やそれによる生態系への影響を事前に把握しておくことは重要である。

2. 研究目的

遺伝子組換え植物に導入された遺伝子が、近縁野生種に移行し、野生種集団内で拡散する可能性を解明するため、ダイズとその近縁野生種であるツルマメを材料に用いて以下のような研究を行う。まず人工交配により遺伝子組換え (GM) ダイズとツルマメの雑種を作成し、その除草剤耐性や生育を調べ、野外での生存能に関する知見を得る。また在来ダイズとツルマメを野外で栽培し、ツルマメを収穫してダイズとの雑種の形成率を測定し、自然交雑率を明らかにする。

3. 研究方法

(1) 雑種の作成とその性質の解明

① 雑種の作成

GMダイズとツルマメを温室内でポットに栽培し、ツルマメに適宜短日処理を施して開花期を調節しながら、実体顕微鏡下で蕾を除雄後、GMダイズの花粉を用いて人工授粉を行った。そして成熟した莢を採取して乾燥させ、裂莢後、F₁雑種の種子を得た。更に、温室内でF₁雑種を播種・栽培し、F₂雑種を作成した。

② 雑種の性質の調査

得られた雑種の種子の形態を親植物のダイズやツルマメと比較した後、それらを温室内でポットに播種・栽培し、生育や形態を互いに比較した。また雑種に除草剤耐性遺伝子が存在するかどうかを調べるため、F₁雑種の葉からDNAを抽出し、除草剤耐性遺伝子の部分配列をプライマーに用いてPCRを行い、電気泳動により解析した。更に、雑種が除草剤耐性を示すかどうかを調べるために、F₁雑種とその親植物をポットに播種・栽培し、第2本葉が出始めるころに除草剤グリホサートの異なる率に希釈された溶液を散布し、1週間後に可視障害の程度を観察した。また、除草剤耐性遺伝子の更に後代への継承や遺伝様式を調べるために、F₂雑種についても除草剤耐性試験を行い、耐性と感受性の分離比を算出した。

(2) 自然交雑率の測定

①ダイズとツルマメの栽培

ダイズとツルマメの間での自然交雑率を明らかにするため、平成16年度の5月下旬から6月上旬にかけて、開花特性の異なる2品種（主に東北地方で栽培されているリュウホウと西日本で栽培されているフクユタカ）のダイズとツルマメ（那須-5）を温室内で播種し、育苗した。これらを適宜6月中旬から7月中旬には場の2区画に以下のように定植した。各区画の中心となる直径2mの円内にダイズの各々の品種を18個体ずつ移植し、その周囲1m間隔で直径10mになるまで円を描き、その円上の8方向にツルマメを1個体ずつ移植した(図1)。その後、これらの植物の生育や開花状況を観察しながら、適宜施肥や農薬散布を行い、11月にツルマメから莢をまとめて採取し、種子を得た。

平成17年度には、5月下旬にダイズ（フクユタカ）、ツルマメ（那須-5）とそれらの間で作成されたF₂雑種を温室内で播種し、育苗した。これらを6月下旬には場の2区画に以下のように定植した。一方の区画（A）ではダイズ24個体とツルマメ20個体を、また別の区画（B）ではF₂雑種24個体とツルマメ20個体を0.8または1m間隔に交互に隣接させた(図2)。その後は平成16年度と同様にこれらの植物の生育や開花状況を観察しながら、適宜施肥や農薬散布を行い、11月にツルマメから莢を採取し、種子を得た。

②除草剤耐性遺伝子の検出と交雑率の測定

収穫したツルマメ8～50粒の種子から胚乳を一部削り取り、これをひとまとめにしてDNAを抽出した。それに対してSATT264のプライマーセットを用いてPCRを行った後、電気泳動し、ダイズ由来のバンドを指標に交雑種の有無を調べた。

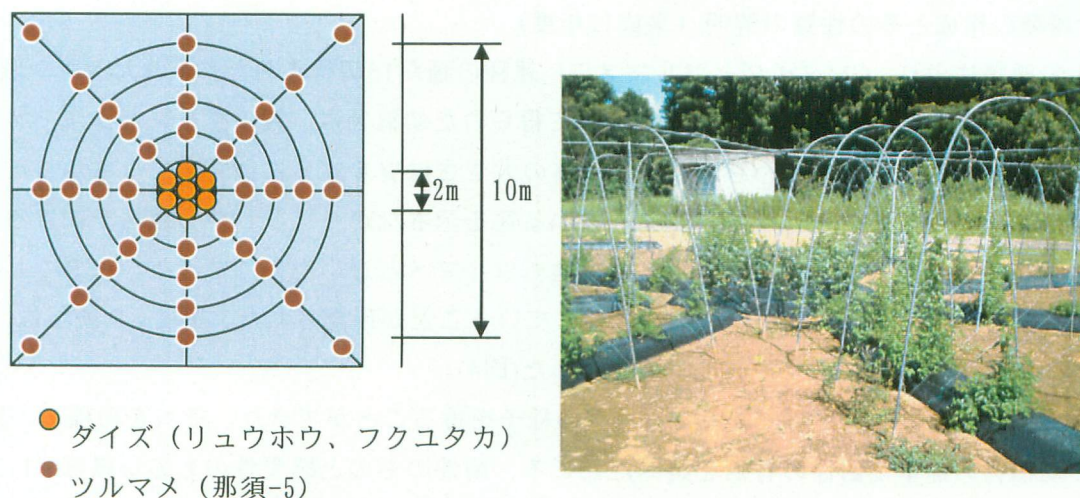


図1 自然交雑率試験のためのダイズとツルマメの配置と栽培風景（平成16年度）

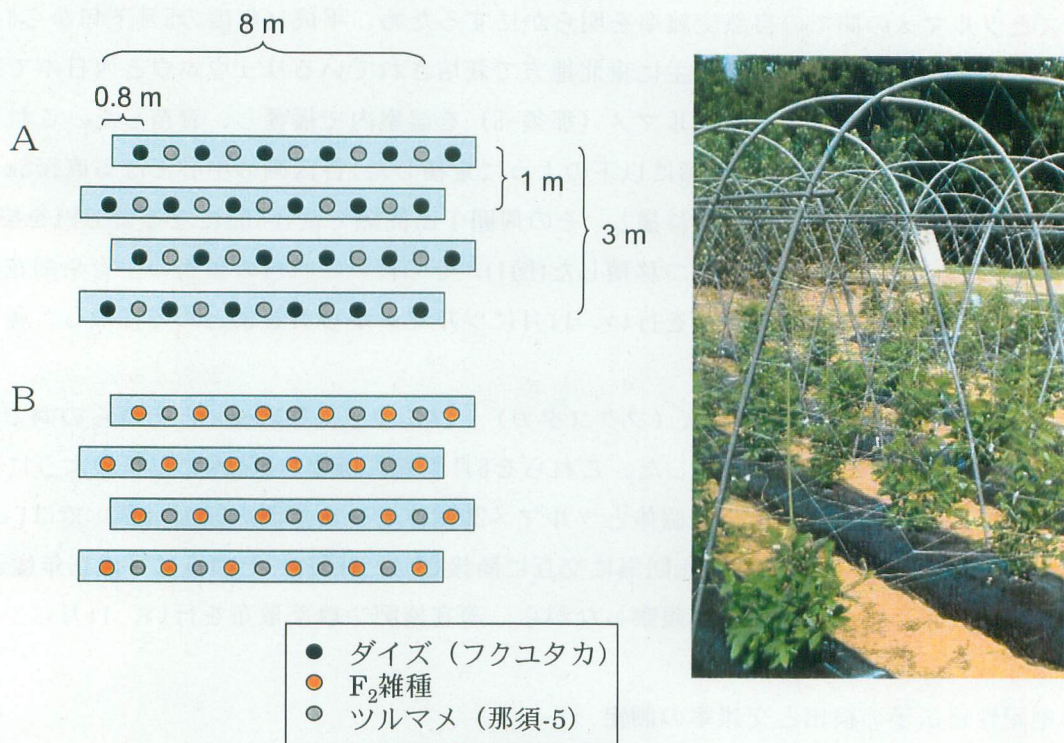


図2 自然交雑率試験のためのダイズとツルマメの配置と栽培風景 (平成17年度)

4. 結果・考察

(1) 雑種の作成とその性質の解明 (平成15年度)

人工授精により、GMダイズとツルマメの F_1 雑種の種が15個得られた。その大きさや形態は、ツルマメと酷似していた(図3)。それを播種して得られた幼植物は、親のダイズとツルマメの各々の形態的特長を示した。すなわち、葉や植物体の大きさはツルマメに似ていて小さかったが、植物体の形態はダイズと似ていて茎が直立し、つる性を示さなかった。しかし栽培を続けると、途中からつる性を示すようになり、植物体の形態もツルマメと近いものになった。PCRによる解析の結果、この雑種に除草剤耐性遺伝子が存在していることが確認された。更に、 F_1 雑種は、GMダイズと同様に除草剤グリホサートに耐性を示した(図4)。

次に、 F_1 雑種の自家受粉により、 F_2 雑種の種子を得ることができた。それを播種し、同様の方法で幼植物の除草剤耐性の有無を調べたところ、耐性のものと感受性のものがほぼ3:1に出現し、除草剤耐性の形質は優性でメンデル遺伝することがわかった(表1)。以上の結果から、GMダイズに導入された除草剤耐性遺伝子が、ツルマメとの交配を通じて F_2 世代にまで受け継がれ、雑種に除草剤耐性を付与し得ることがわかった。

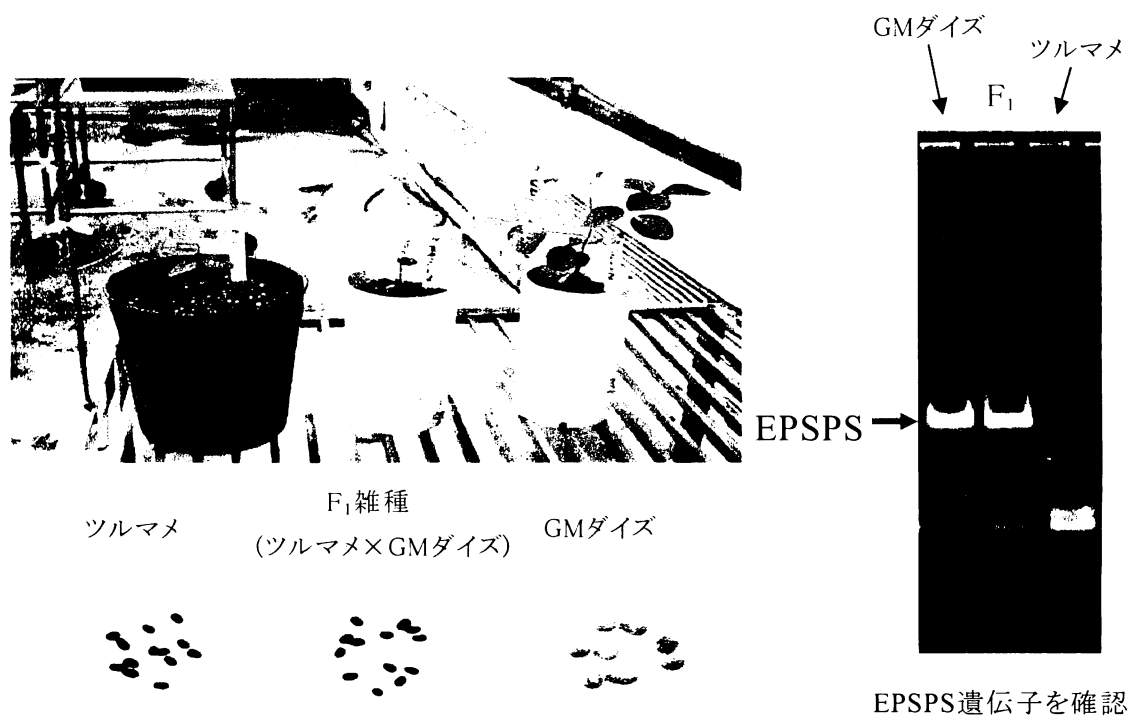


図3 ツルマメとGMダイズのF₁雑種

右図は、除草剤耐性遺伝子(*EPSPS*)のPCRによる増幅と電気泳動による解析結果。

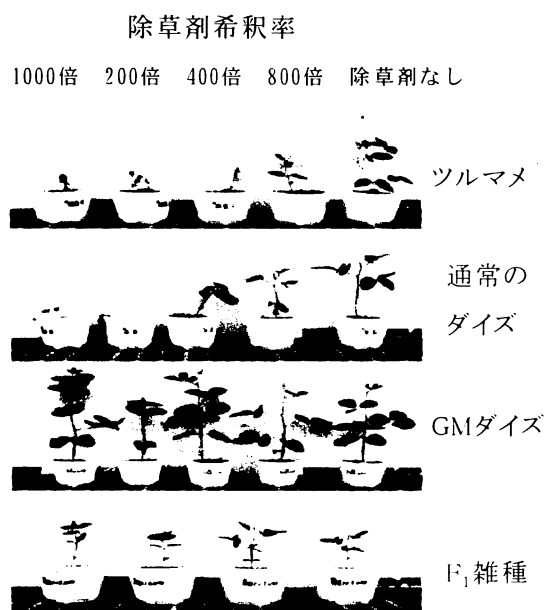


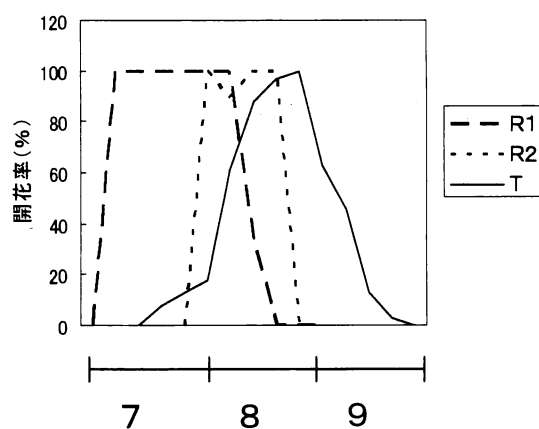
図4 F₁雑種の除草剤耐性

表1 F₂雑種における除草剤耐性の遺伝様式

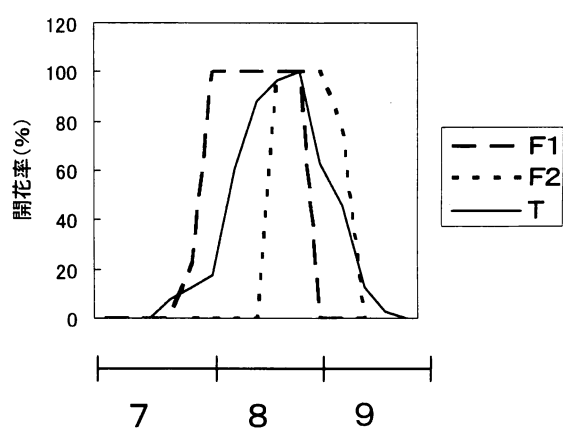
系統名	表現型	観測値	分離比 (仮説)	理論値
F ₂ 雑種	グリホサート耐性	79	3	78.75
(ツルマメ×GMダイズ)	グリホサート感受性	26	1	26.25
	合計	105		105
カイ二乗テストによる確率				0.955
仮説の採否 (有意水準5%)				採択

(2) 自然交雑率 (平成16年度)

ほ場で栽培したダイズは、播種時期によって異なる時期に開花したが、ツルマメとの間でかなり開花時期が重なった (図5)。しかし、ダイズの植えられた中心部から1m及び2m離れたところにあったツルマメから収穫した種子2,500粒についてSSRマーカーによる分析を行った結果、ダイズ由来の花粉で受精したと思われるものは全く検出されなかった (図6)。



R1: ダイズ(リュウホウ)、5月21日は種
R2: ダイズ(リュウホウ)、6月11日は種
T: ツルマメ(那須-5)、5月21日は種



F1: ダイズ(フクユタカ)、5月21日は種
F2: ダイズ(フクユタカ)、6月11日は種
T: ツルマメ(那須-5)、5月21日は種

図5 ダイズとツルマメの開花時期

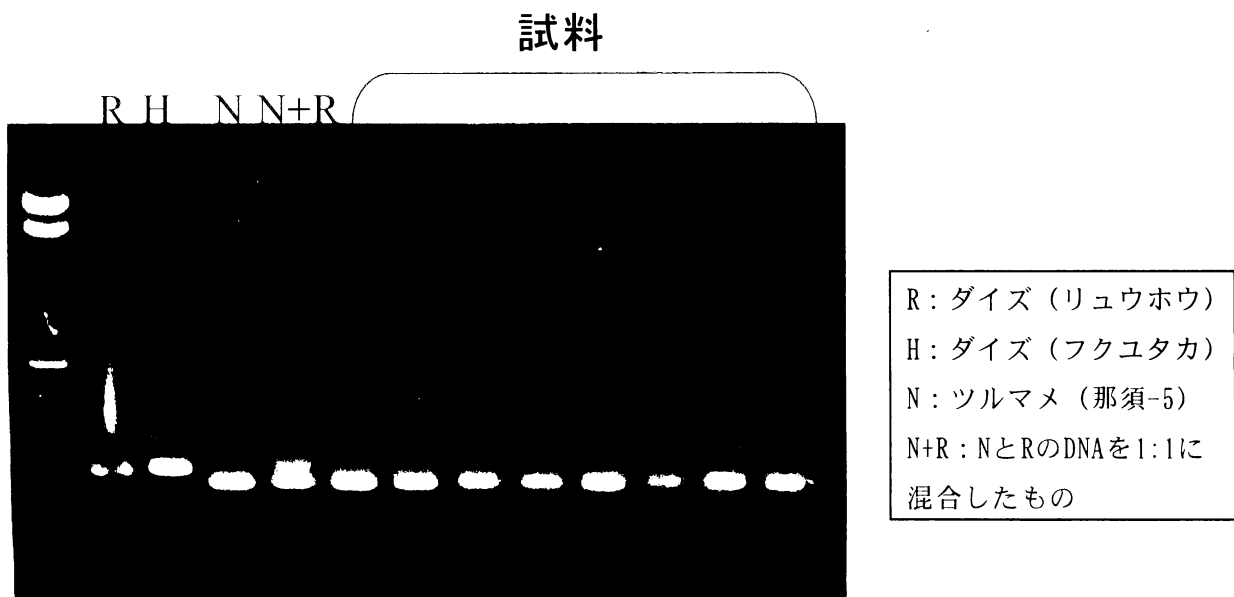


図6 SSRマーカーによる分析例

(2) 自然交雑率(平成17年度)

ほ場で栽培したダイズの草丈はほぼ揃っていたが、 F_2 雑種とツルマメの草丈は、個体間でのばらつきが大きく、ダイズよりも大きいものが多数観察された(図7)。一方それらの植物の開花時期はほぼ完全に一致した(図8)。しかし、ツルマメに形成された鞘を採集し、得られた種子に対し、SSRマーカーを用いて花粉親を同定した結果、A区画から収穫した343粒およびB区画から収穫した476粒のツルマメのいずれにおいてもダイズや F_2 雑種と交雑したと思われる個体はまったく検出されなかった(図9)。

中山と山口¹⁾は、ダイズの品種タンバグロとツルマメの系統GIs/98-J-01を近接させて栽培した際、0.73%の率で交雑が起こったと報告している。それに対し本研究においてダイズとツルマメの間で交雑が全く検出されなかった理由は不明であるが、訪花昆虫があまり観察されず、それが原因となっている可能性が考えられる。したがって、このような実験による交雑率の評価を行う際には、昆虫が多く存在するような実験場所を選ぶか、それが不明の場合には、複数の場所で行うことが必要であると思われる。

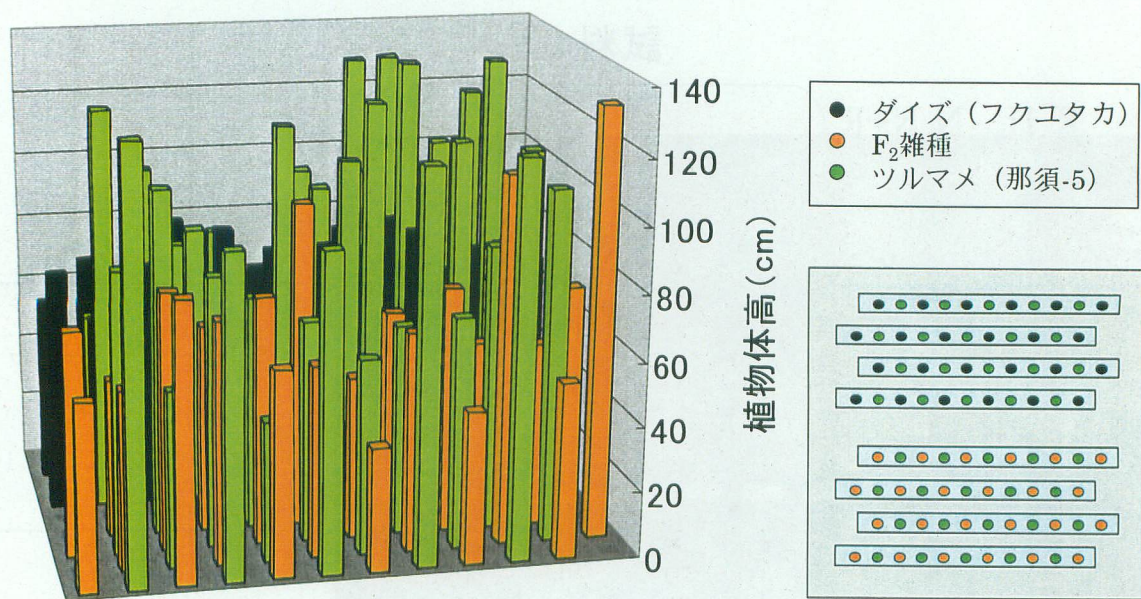


図7 8月12日時点でのダイズ、F₂雑種、ツルマメの草丈

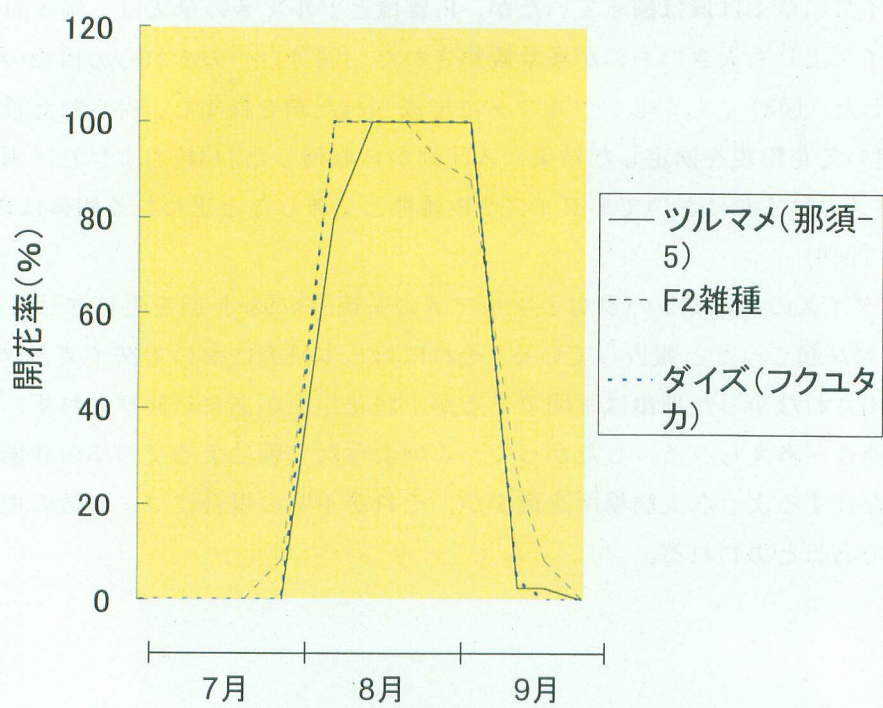


図8 ダイズ、F₂雑種、ツルマメの開花時期

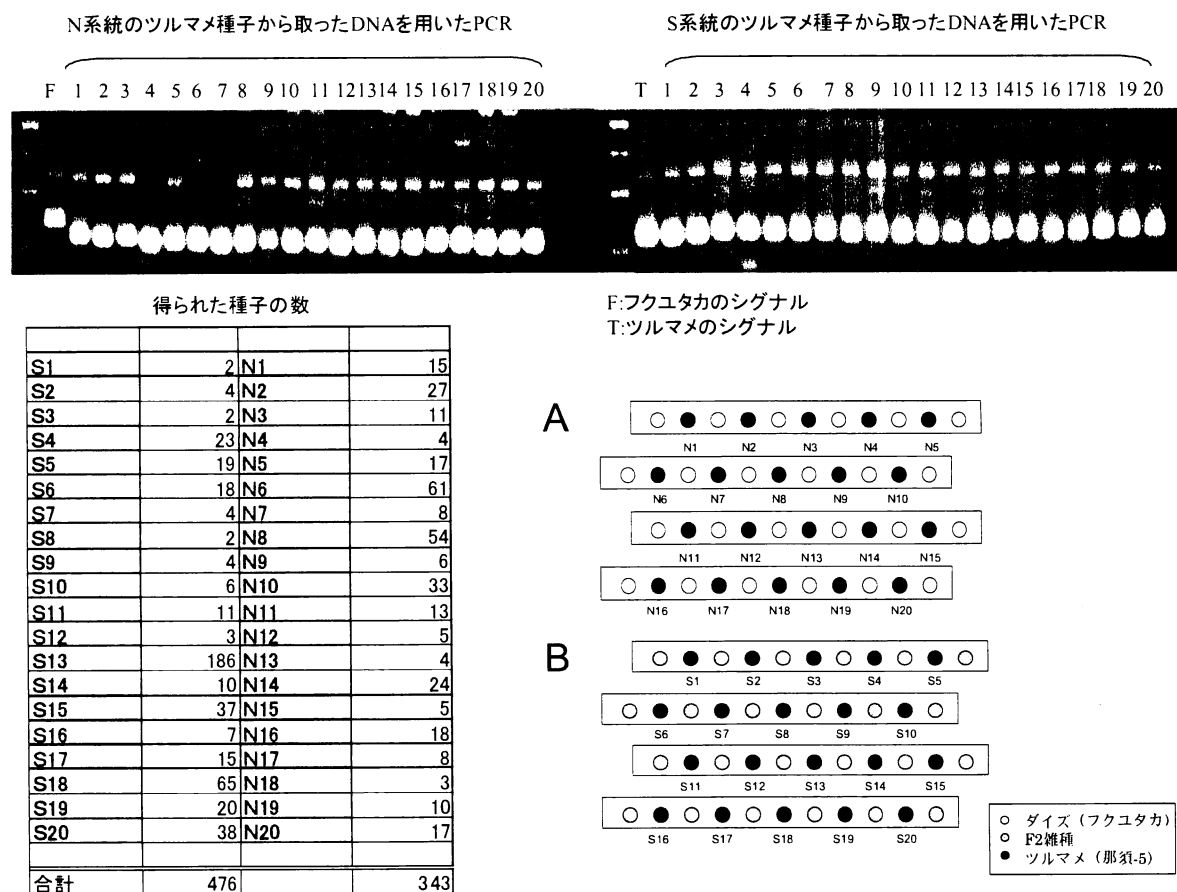


図9 ツルマメより採集した種子のSSRマーカーによる解析

5. 本研究により得られた成果

本研究で得られた成果をまとめると以下ようになる。

- (1) 人工交配によりGMダイズとツルマメのF₁雑種の種が得られ、さらにその自家受精によりF₂雑種が得られた。F₁雑種は、成育や形態に関して両親の中間的性質を示した。またF₁、F₂雑種には除草剤耐性遺伝子が受け継がれ、除草剤耐性になっていることが確認された。
- (2) 野外でダイズとツルマメを近接させて栽培し、ツルマメを収穫して自然交雑率を測定したところ、両者の開花期はかなり重なったにもかかわらず受粉によるダイズからツルマメへの遺伝子移行は全く検出されず、条件により交雑率はこれまでに報告されている値よりもかなり低くなることが示唆された。

6. 引用文献

- 1) Y. Nakayama and H. Yamaguchi: Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed

population, Weed Biol. Manage, 2, 25-30 (2002)

2) 「大豆、トウモロコシも自生ー“遺伝子組換え”、初確認」、毎日新聞2004年12月16日朝刊

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

〈論文(査読あり)〉

なし

〈その他誌上発表(査読なし)〉

① 生物多様性の減少機構の解明と保全プロジェクト(中間報告)、28-30(2003)

「2.4.3 既存の組換え植物(ダイズ)から野生種(ツルマメ)への遺伝子移行の可能性の検討
(中嶋信美)」

② 玉置雅紀：科学、75(1), 18-26(2005)

「インタビュー：遺伝子組換え作物の何が問題か」

③ 佐治光：FFIジャーナル, 210(7), 640-646 (2005)

「遺伝子組換え植物の環境影響」

(2) 口頭発表(学会)

なし

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

現在遺伝子組換え作物の開放系での利用が行われる際には、その生物多様性への影響が「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて評価されている。しかし、生態系への長期的影響の評価は難しく、現在利用できる評価法も十分とはいえない。本研究はそのような、生態系への長期的影響の評価法の不足を補うための新規手法の開発を目的としており、遺伝子組換え作物と野生種の雑種を作成し、その性質をいくつか解明できたことで、その取っ掛かりを掴むことができた。また、野外での実験で自然光雑率を測定する際には送粉昆虫が十分いる場所で実験を行うか、複数の異なる場所で行うべきであるという、今後の評価を行う際に参考となるような重要な知見が得られた。