

図 11. 園芸種との人工交配試験

(ロ) 野生種との人工交配試験

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び発芽活性が認められたので、野生種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 3～5 月にサントリー特定網室にて実施した。

常法に従い、野生種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に宿主あるいは組換え体の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した (図 12)。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で 1 日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、野生種はノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray) を用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子 (パンジー F3' 5' H 遺伝子) を検出した。

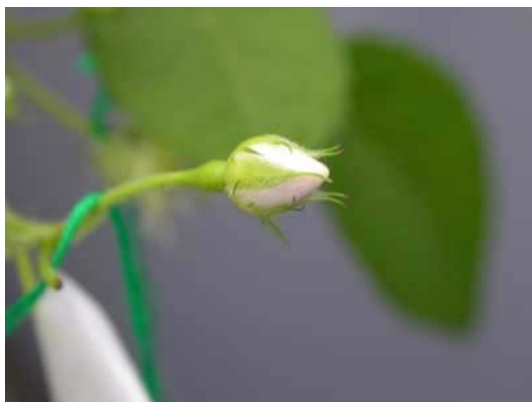
[結果と結論]

結果を表 10 に示した。結実率は宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体との交配により得られた種子を PCR にて解析した結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。今回得られた種子はノイバラの自殖によるもの、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであると考えられた。よって、本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 10. 人工交配による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

別添資料 4

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-4-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
ノイバラ	6/152	3.9	12/159	7.5	0/19	0



開花直前



除雄



受粉



袋 か



結実

図 12. ノイバラとの人工交配試験

(ハ) 野生種との放蜂による交雑試験

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び発芽活性が認められたので、放蜂による野生種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー閉鎖系温室にて実施した。

宿主あるいは組換え体とノイバラを約 1.5m 四方の網を張ったかごの中にクロマルハナバチ約 50 頭（ナチュポール・ブラック）とともに入れ、1 週間放飼し、クロマルハナバチによる宿主あるいは組換え体とノイバラとの受粉を行った（図 13）。なお、宿主及び組換え体は 2~3 花が開花した株、ノイバラは除雄は行わず、1 株につき 3~5 割が開花した株を本実験に用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子（パンジー-F3' 5' H 遺伝子）を検出した。

また、AM10:00~PM3:00 の間ビデオ撮影を行い、クロマルハナバチの行動観察を行った。

[結果と結論]

結果を表 11 に示した。ノイバラを交雑母本とする結実の有無を調査した結果、宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体を花粉親とした掛け合わせにより得られた種子を PCR にて解析した結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。本試験において、クロマルハナバチの行動観察も同時に行ったが、香りが強く、花弁数も少ないノイバラの花に集中的に群がり、ノイバラの花間を行き来することはあっても、宿主あるいは組換え体の花とノイバラの花間を行き来する個体はほとんど認められなかった。このことより、得られた種子は全てこれらクロマルハナバチの行動に伴い、ノイバラ自身の花粉が受粉することにより得られたノイバラの自殖種子、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであると考えられた。これらのことより、ハチの行動に伴う本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の

理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 11. 放蜂による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-4-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
ノイバラ	9/350	2.6	14/141	9.9	0/25	0



図 13. ノイバラとの放蜂による交雑試験

(6) 有害物質の産生性

イ. 組換え体残渣が後作に与える影響

[目的]

組換え体残渣を土壌中に鋤き込むことによるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体残渣が種子発芽へ与える影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の葉 5g (3 個体から集めた葉をまとめた) をそれぞれ液体窒素中に置き、細かい粉末になるように粉砕した。この粉末をそれぞれ土壌 (100g、赤玉土 : BM-2 : キングパール = 4 : 2 : 1) に混ぜた。レタス (*Lactuca sativa*) の種子を、葉の粉砕物を含む土壌を入れたポットに各 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

[結果と結論]

結果を表 12 に示した。宿主及び組換え体間で、レタス種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5% 水準) は認められなかった。

よって、植物体の残渣がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 12. レタス種子の発芽に対する葉の粉末鋤き込みの影響

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
発芽率 (%)	96.8 ± 3.3	100
実生の平均新鮮重 (mg)	51.2 ± 5.7	53.8 ± 7.1

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。

ロ. 組換え体栽培土壌が後作に与える影響

[目的]

組換え体栽培土壌におけるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体栽培土壌が種子発芽へ与える影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の根の周辺の土を採取した。レタス (*Lactuca sativa*) の種子をこれらの土壌を入れたポットに 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

[結果と結論]

結果を表 13 に示した。宿主及び組換え体の栽培土壌間で、種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、栽培土壌がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 13. レタス種子の発芽に対する栽培土壌の影響)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
発芽率(%)	94.4±5.4	96.8±3.3
実生の平均新鮮重(mg)	89.3±6.5	93.3±22.9

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。

ハ. 土壤微生物相に与える影響

[目的]

組換え体を栽培した土壤中の微生物数を宿主と比較し、組換え体栽培による土壤微生物相への影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の栽培土壤中の微生物数を測定した。測定は常法に従い希釈塗布法を用いた。すなわち、採取土壌をよく混和した後、その 30g を秤量し、270ml の生理食塩水とともに 500ml 容三角フラスコ内で振盪した。振盪後、直ちに生理食塩水を用いて 10^1 から 10^4 倍希釈液を作成し、各希釈液 0.1ml を直径 9cm シャーレの寒天培地上に塗布した。これとは別に、30g の土壌を 80°C で 24 時間通風乾燥して土壌の含水率を測定した。細菌数測定用培地として、トリプチケースソイ寒天培地 (TSA) を使用し、 28°C 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。真菌数の測定は、ジャガイモ・グルコース寒天培地 (PDA) を使用し、 25°C 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。放線菌測定用培地として、イースト・スターチ寒天培 (YS) を使用し、 30°C 、6 日間培養後のコロニー数を計測した。いずれの測定にも各試験区培地 5 枚を使用した。得られた結果はすべて乾土 1g 当たりに換算して表示した。

[結果と結論]

結果を表 14 に示した。細菌、真菌、放線菌のいずれの微生物数についても宿主及び組み換え体栽培土壌間で統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、栽培による土壤微生物相への影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 14. 栽培土壌中の土壤微生物数 (cfu/g 乾土)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
細菌数 ($\times 10^6$)	5.81 ± 1.46	4.94 ± 1.74
真菌数 ($\times 10^3$)	1.95 ± 0.11	1.85 ± 0.33
放線菌数 ($\times 10^4$)	2.97 ± 1.46	2.60 ± 0.74

※いずれも 5 枚の平均値を示している。

(7) アグロバクテリウムの葉における残留性

[目的]

組換え体におけるアグロバクテリウムの残留の有無を調査する。

[実験方法]

宿主及び組換え体それぞれ 3 個体より採取した 0.04~0.24 g の葉を MM300 (キアゲン) を用いて液体窒素中で軽く破碎した後、2 倍量の滅菌水を加え懸濁し、2 時間以上静置した。この液を YEB 培地に塗布し、28℃で 3 日間培養した。

YEB 培地の組成は、酵母エキス(5g/l)、ペプトン(1g/l)、シヨ糖(1g/l)、硫酸マグネシウム(0.5 g/l)、肉エキス(5 g/l)、寒天(20 g/l) である。バイナリーベクターを含むアグロバクテリウム以外を除くために抗生物質のリファンピシン(20 mg/l)、テトラサイクリン(20 mg/l)を加えた。

[結果と結論]

宿主及び組換え体由来の抽出物どちらにおいても YEB 培地で生育するコロニーは観察されなかった。従って、組換え体におけるアグロバクテリウムの残留はないと判断した。

(8)閉鎖系温室並びに特定網室における試験結果のまとめ

1. 赤紫色のバラ品種「WKS82」に、パンジー由来の F3' 5' H 遺伝子とトレニア由来のアントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子を導入することにより青紫色を呈するバラを作出した。この花色は栄養増殖を繰り返しても安定していた。
2. 花弁、葉及び根中の色素を分析した結果、組換え体の花弁及び葉において宿主にはないデルフィニジン及びミリセチンが検出された。
3. サザン解析及び PCR 解析の結果、導入遺伝子は花弁、葉、茎のゲノム中に組み込まれていることが確認された。
4. 草丈及び節数の経時変化を調査した結果、宿主及び組換え体間で生育速度に統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。また、開花時期についても差異は認められなかった。
5. 形態特性について調査した結果、花の直径、葯数、葯長、葯幅においては宿主及び組換え体間で統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。しかし、花弁数において宿主及び組換え体間で統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) が認められた。
6. 花の香りについて島津におい分析装置にて分析した結果、宿主及び組換え体間で花の香りの質及び強度において違いは認められなかった。
7. 生育初期における低温・高温耐性を調査した結果、宿主及び組換え体間で新芽の生育速度に統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。
8. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察された。花粉の充実率、発芽率において宿主及び組換え体間で統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。
9. 花粉の大きさは、宿主及び組換え体間で統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。また、形態にも差異は認められなかった。
10. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察されたが、送風による花粉の飛散はともに認められなかった。
11. 宿主及び組換え体の園芸種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、得られた種子を解析したところ導入遺伝子は全く検出されなかった。
12. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。

13. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を放蜂により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。
14. 宿主及び組換え体の植物体の鋤き込み試験によるレタス種子の発芽への影響については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
15. 宿主及び組換え体の植物体の栽培土壌が後作に与える影響については、宿主及び組換え体の栽培土壌間で差異は認められなかった。
16. 土壌微生物数については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
17. 組換え体におけるアグロバクテリウムの残留は認められなかった。