

平成 15 年度環境省請負業務

# 遺伝子組換え生物(ナタネ)による影響監視調査

## 報 告 書

平成 16 年 3 月

独立行政法人国立環境研究所

## 目 次

概要	2
目的	2
調査体制	2
内容と結果	2
1. ナタネ種子採種地点の調査と分析用ナタネ種子のサンプリング	4
2. 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析	12
2.1 栽培及び除草剤処理	12
2.2 ラウンドアップ耐性タンパク質の検出	14
2.3 バスタ耐性遺伝子の検出	14
2.4 結果	14
2.4.1 グリホサート耐性遺伝子	14
2.4.2 グルホシネート耐性遺伝子	16
2.5 考察	17
3. <i>Brassica</i> 属の種又は品種識別用分子マーカーの開発	18
3.1 利用可能な識別法の聞き取り・文献調査	18
3.2 <i>Brassica</i> 属の代表的品種の入手、栽培と DNA の抽出	18
3.3 <i>Brassica</i> 属の種間・品種間差異を識別できる DNA マーカーの開発	19
3.4 結果と考察	19

## 概要

### 目的

近年、バイオテクノロジーの進展とともに遺伝子組換え生物の利用が進んでいる一方、遺伝子組換え生物が環境に悪影響を及ぼすおそれが懸念されており、遺伝子組換え生物の利用にあたっては、適切なリスク評価及びリスク管理がなされることが求められている。

このため、生物多様性条約カルタヘナ議定書に対応した国内法においては、「国による遺伝子組換え生物の使用等により生ずる生物多様性影響に関する科学的知見の充実を図る」ことが位置づけられており、リスク管理に関し、現在使用されている遺伝子組換え生物が実際に一般の環境中に存在しているのか、存在している場合にはどのような状況でどの程度存在しているのかに関して、データの収集を継続的に行っていくことが必要とされている。

そこで現在国内で使用（加工用に輸入）されている遺伝子組換え生物のうち、野外で生育する可能性の高いナタネについて、生物多様性影響につながる現象が生じていないかどうかを監視するため、導入遺伝子の拡散状況を今後継続的に調査する上での予備的な研究・調査を行った。

### 調査体制

- 1) ナタネ種子採種地点の調査と分析用ナタネ種子のサンプリング  
財団法人自然環境研究センター（永津雅人）
- 2) 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析  
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、青野光子）
- 3) *Brassica* 属の種又は品種識別用分子マーカーの開発  
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、青野光子）

### 内容と結果

日本に輸入されている除草剤耐性遺伝子を持つ遺伝子組換えナタネ（GM ナタネ：西洋ナタネ *Brassica napus* に由来）は、主として食用油加工用とされているが、その種子が運搬、加工等に伴ってこぼれ落ち、自然環境中に侵入、定着したり、自生の *Brassica* 属と交雑したりしている可能性がある。このことについて調査するため、GM ナタネやそれ由来の除草剤耐性遺伝子の効率良い検出法を確立した。更に、関東地方の港湾付近や河川敷等の合計 77 地点に自生している西洋ナタネ（*Brassica napus*）やその近縁種のカラシナ（*B. juncea*）の種子を採取して温室内で栽培し、確立した手法を用いて除草剤耐性遺伝子の解析を行った。

その結果、採取した種子のいずれからも除草剤耐性遺伝子は検出されなかった。また *Brassica* 属の種・品種を区別するための DNA マーカーを探索し、SSR マーカーの有用性を示唆する結果を得た。

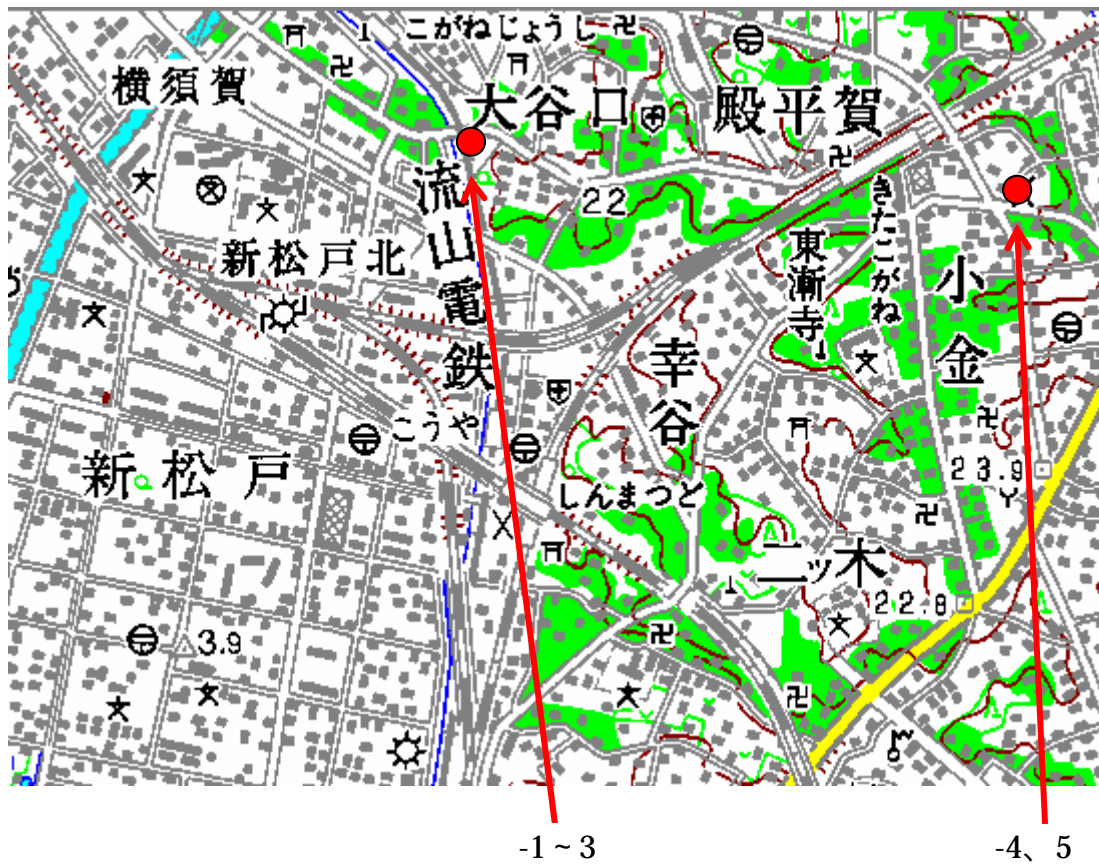
## 1. ナタネ種子採取地点の調査と分析用ナタネ種子のサンプリング

次表の各地点（各1個体）から西洋ナタネ、カラシナ種子を採取した。

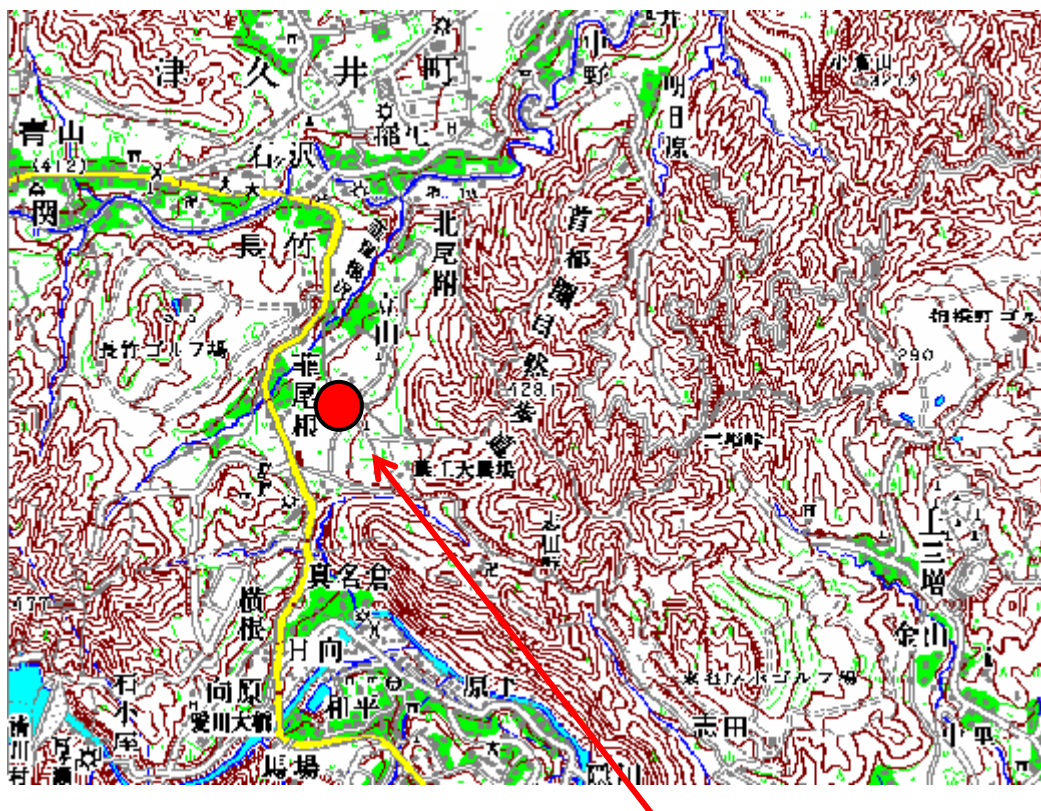
表1 西洋ナタネ、カラシナ種子の採取地点

採取地名	採取地点数	栽培用整理番号
千葉県松戸市（市街） <sup>1)</sup>	5	-1 ~ -5
神奈川県津久井町（農工大農場前） <sup>2)</sup>	3	-6 ~ -8
元荒川河川敷 <sup>3)</sup>	6	-1 ~ -6
鬼怒川河川敷 <sup>4)</sup>	14	-7 ~ -16、 -9 ~ -12
小貝川河川敷 <sup>5)</sup>	8	-1 ~ -8
鹿島港近辺 <sup>6)</sup>	41	-1 ~ -16、 -1 ~ -16、 -1 ~ -9
	（計）77	

採取は2003年6月。 -6、 -15、 -16、 -8 はカラシナ、 -9 は*Brassica* sp. これら以外は、西洋ナタネ。<sup>1)~6)</sup> 地図1~6参照。



地図1 千葉県松戸市(市街)のサンプリング地点  
 この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 )  
 を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )



地図2 神奈川県津久井町（農工大農場前）のサンプリング地点  
この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 )  
を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )

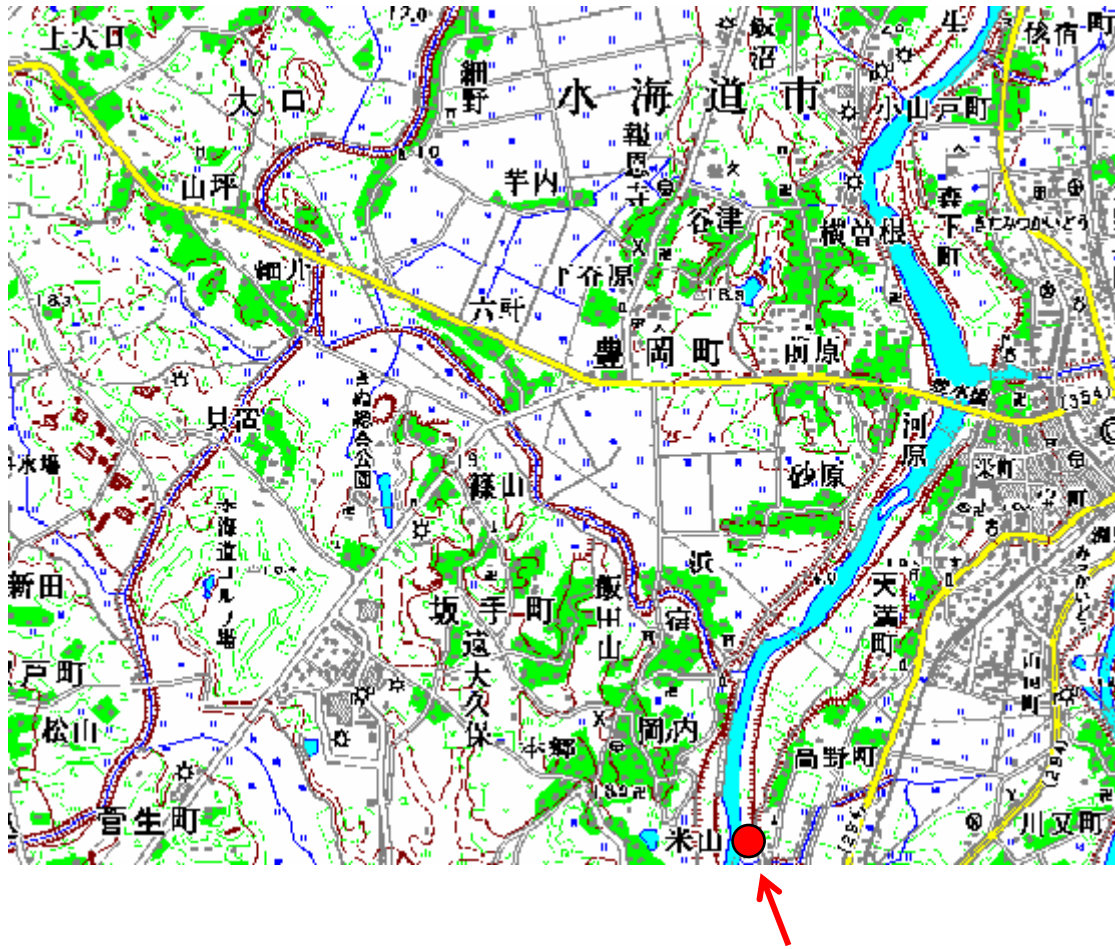


-5,6      -2,3,4      -1

地図3 元荒川河川敷のサンプリング地点

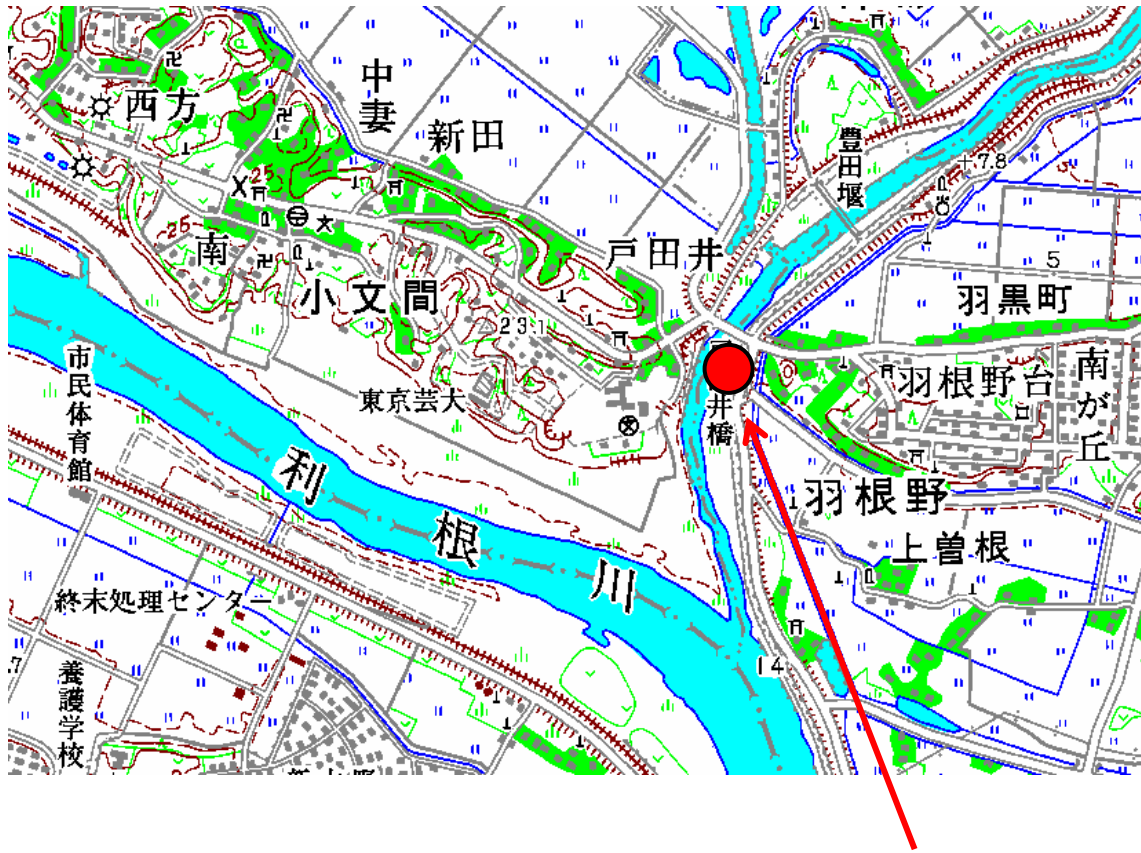
この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 ) を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )





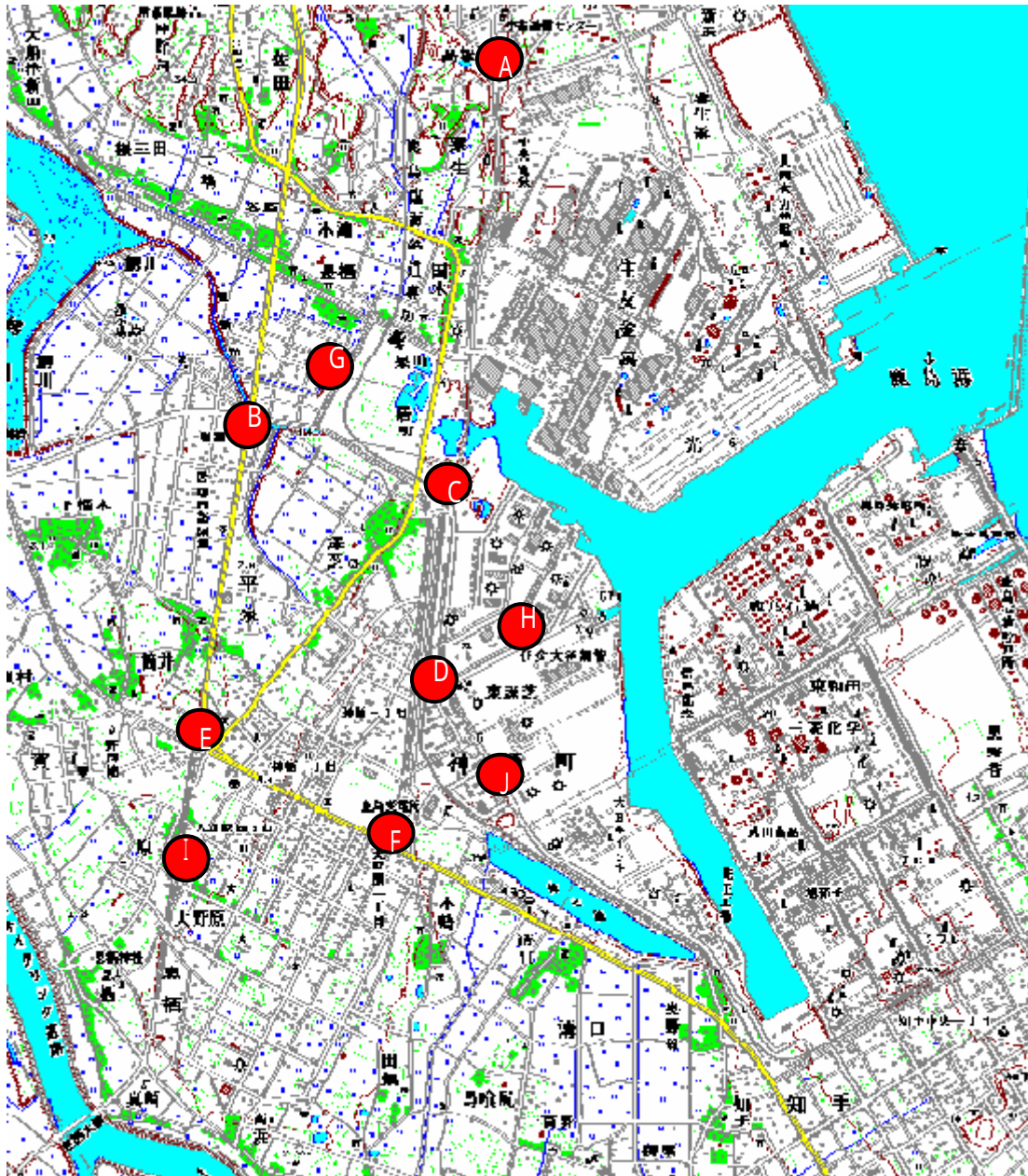
地図4 鬼怒川河川敷のサンプリング地点

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 )  
を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )



地図5 小貝川河川敷のサンプリング地点

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 )  
を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )



地図6 鹿島港近辺のサンプリング地点

A, -1.2; B, -3~7; C, -8~11; D, -12~15; E, -16;  
F, -1~3; G, -4~7; H, -9~16; I, -1~9

地点DとFについては、以下の写真参照

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の数値地図 50000( 地図画像 )  
を複製したものである。( 承認番号 平 16 総複、第 290 号 )





サンプリング地点D



サンプリング地点F

## 2. 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析

### 2.1 栽培及び除草剤処理

ガラス温室内に設置した 91 X 135cm のバットを 16 区画に分割して、1 区画あたり上記 1 地点より採取された種子約 30 ~ 100 粒を播種し、栽培した (図 1)。グリホサート (ラウンドアップハイロード、Monsanto、Antwerp、Belgium、以後ラウンドアップと表記) 処理用及びグルホシネート (バスタ、Hoechst Schering AgrEvo、Frankfurt、Germany、以後バスタと表記) 処理用に、2 セットの植物体を用意した (1 セット当たりの種子数は、表 2 参照)。発芽後 (発芽率は、おおむね 80% 以上) 12 ~ 30 日間育成した後、ラウンドアップまたはバスタ原液 0.4ml に対し 150ml の水道水で希釈した水溶液のスプレー散布、または原液 4ml に対し 1.5l の水道水で希釈した水溶液のジョウロによる散布 (各々 1 バットあたり) を行った (この散布濃度は、除草剤のびんに記載されている、一般的雑草を除去する際の濃度に相当)。散布はラウンドアップ、バスタ共に、葉の可視害や枯死の状態を観察しながら 3 回まで行った。



図 1 国立環境研究所生態系研究フィールド温室内でのナタネ栽培

表 2 採種地点ごとの 1 セット当たり種子数

採種地点	1 セット当たり種子数	採種地点	1 セット当たり種子数	採種地点	1 セット当たり種子数
-1	125	-3	20	-1	237
-2	136	-4	32	-2	181
-3	141	-5	125	-3	253
-4	324	-6	85	-4	160
-5	240	-7	26	-5	98
-6	723	-8	259	-6	485
-7	523	-9	215	-7	323
-8	11	-10	184	-8	125
-1	178	-11	41	-9	103
-2	131	-12	96	-10	81
-3	15	-1	84	-11	165
-4	98	-2	56	-12	362
-5	503	-3	228	-13	289
-6	302	-4	135	-14	116
-7	126	-5	449	-15	85
-8	186	-6	210	-16	633
-9	122	-7	341	-1	370
-10	42	-8	85	-2	233
-11	16	-9	86	-3	306
-12	222	-10	108	-4	546
-13	150	-11	136	-5	437
-14	252	-12	128	-6	258
-15	430	-13	115	-7	386
-16	486	-14	173	-8	443
-1	179	-15	270	-9	375
-2	25	-16	87		

採取地点によって種子数に違いがあるのは、生育個体数の違いによる。

## 2.2 ラウンドアップ耐性タンパク質の検出

ラウンドアップ処理後、生き残った個体について、免疫クロマトグラフ法によりラウンドアップ耐性タンパク質 (CP4) の検出を試みた。本手法は、資料からのDNA抽出などの作業が不要であり、簡単かつ迅速な検査が可能である。植物体から葉を切り取り、5倍量の蒸留水を加え、乳鉢内ですりつぶし、上清を得た。検出用テスト紙 (Agri-Screen<sup>®</sup> (Reveal<sup>®</sup>)CP4 Strip Test, Neogen, MI, USA) を上清に浸し、5分後に反応バンドの出現により上清中のCP4タンパク質の有無を確認した。このテスト紙による検出限界は、ダイズ種子あるいはトウモロコシ種子を用いた場合各々0.1%(1000粒に1粒組換え体が混入した場合)0.125%である。対照のCP4タンパク質が発現している植物体として、ラウンドアップ耐性遺伝子組換えダイズの葉を用いた。

また、採種した全77区画から各5粒の種子を用い、10~80倍量の蒸留水を加え、乳鉢内ですりつぶし、懸濁液に上記検出用テスト紙を浸してCP4タンパク質の有無を確認した。

## 2.3 バスタ耐性遺伝子の検出

バスタ処理後、生き残った個体について、PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)によりバスタ耐性遺伝子 (*bar*) の検出を試みた。

植物体から葉を切り取り、マイクロチューブ内で200 $\mu$ lのDNA抽出液(200mMTris-HCl(pH7.5), 250mMNaCl, 25mMEDTA, 0.5%SDS)を加え、すりつぶした後エタノール沈殿を行って100 $\mu$ lのゲノムDNA水溶液の調整を行った。そのうち2 $\mu$ lをPCR反応に用いた。プライマーの配列は*bar*遺伝子内部の5'-TCGTCAACCACTACATCGAGACA-3'、5'-GAAACCCACGTCATGCCAGTT-3'を用い、94 10分、(92 1分、53 1分、72 2分)を35サイクル、72 7分の条件で行った。対照のバスタ耐性遺伝子を持つ生物として、保持するベクター-pEC2内に*Streptomyces hygroscopus*由来*bar*遺伝子を有する*Rhizobium radiobactor*を用いた。

## 2.4 結果

### 2.4.1 グリホサート耐性遺伝子

ラウンドアップ処理した植物体は、約5日後には葉が黄変し、枯死したが、4区画(-3で39個体、-4で49個体、-8で1個体、-2で31個体)で生き残った個体があった(図2)。それらの区画ごとに生き残った全個体から葉を切り取り、混合して免疫クロマトグラフによるラウンドアップ耐性タンパク質CP4の検出を行ったが、どの区画の植物体からもCP4タンパク質は検出されなかった(図3)。

また、種子を砕いた懸濁液からもCP4タンパク質は検出されなかった。



図2 ラウンドアップをスプレーで2回処理した後8日目のナタネ（ -4 ）。

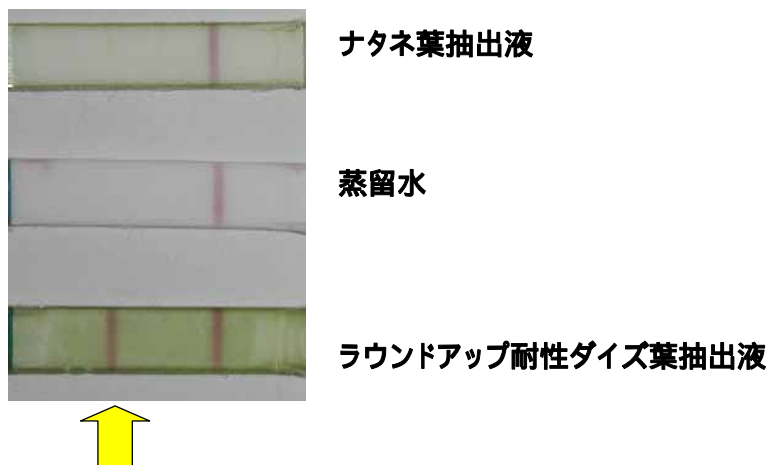


図3 免疫クロマトグラフ法によるラウンドアップ耐性タンパク質 CP4 の検出。ラウンドアップ2回処理後に生き残ったナタネの葉を混ぜて粗抽出液を調整し、CP4 特異抗体を用いた免疫クロマトグラフ法により CP4 の検出を行った。矢印；CP4 タンパク質と反応した特異抗体のバンド。



## 2.4.2 グルホシネート耐性遺伝子

バスタ処理した植物のほとんどは、約2日後には枯死したが、-6、-7、-1、-2の4区画で2回処理した後も生き残ったものが1個体ずつあった(図4)。それらについてPCRによるバスタ耐性遺伝子の検出を行ったが、遺伝子は検出されなかった(図5)。これらは、3回目の処理後には葉に傷害が現れた。



図4 バスタをスプレーで2回処理した後14日目のナタネ(-6)。

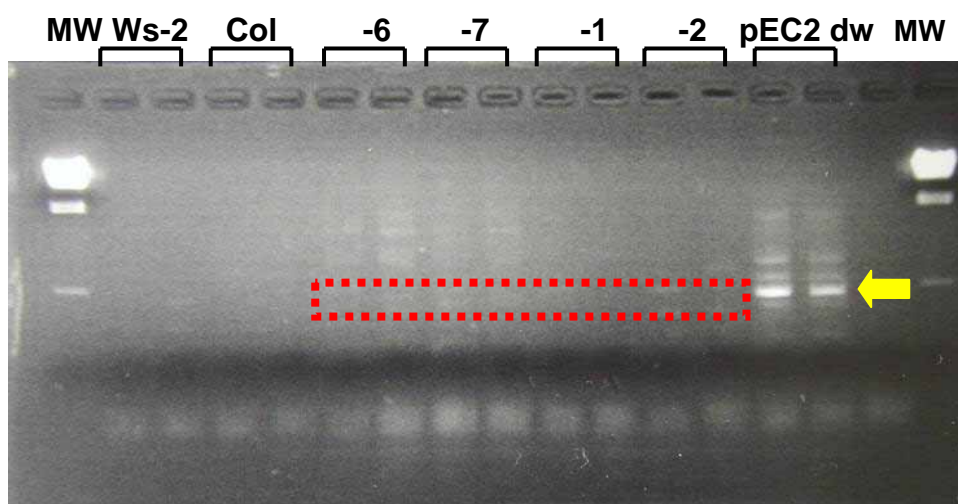


図5 PCRによるバスタ耐性遺伝子(*bar*)の検出。  
バスタ2回処理後、生き残ったナタネ4個体からゲノムDNAを抽出し、*bar*遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いてPCRを行った。MW;分子量マーカー、Ws-2, Col;シロイヌナズナDNA、-6, -7, -1, -2;ナタネDNA、pEC2;プラスミドpEC2上に*bar*遺伝子を持つ土壌細菌 *Rhizobium radiobactor* DNA、dw;蒸留水、矢印; *bar* 遺伝子由来のPCR産物(418bp)。

## 2.5 考察

ラウンドアップは薬剤の効果が現れるのが比較的遅く、枯死にいたるまで日数がかかり、耐性の判断がつきにくかった。しかし、免疫クロマトグラフ法により非常に簡便に葉中及び種子中のラウンドアップ耐性タンパク質 CP4 の有無が判定できることが明らかになった。種子と葉を用いた本検査の結果、耐性を示した個体のいずれも遺伝子組換え体ではないことがわかった。

一方、バスタは速やかに効果が現れ、耐性の判断は容易であったが、bar 遺伝子は検出されなかった。耐性と判断した個体は最初のバスタ処理時に播種後 30 日程度経過しており、さらにバスタ処理を繰り返すことで葉に傷害が現れたので、処理時に植物体が育ちすぎていることによる擬似耐性であった可能性が高い。

日本に輸入が許可されている GM ナタネは、プロモキシニル耐性、グリホサート（ラウンドアップ）耐性、グルホシネート（バスタ）耐性の各遺伝子が導入された 3 種類であるが、プロモキシニル耐性については薬剤（商品名 Buctril）が入手困難であることから、当面はラウンドアップ及びバスタ耐性についてモニタリングを行っていくのがよいと思われる。ただし、輸入される Nata の種類は今後変わる可能性があるため注意が必要である。

### 3. Brassica 属の種又は品種識別用分子マーカーの開発

#### 3.1 現在利用可能な識別法の聞き取り・文献調査

Brassica属の種又は品種の識別法について、有識者への聞き取りと文献調査を行った。その結果、植物の形態の観察によるもののほか、RAPD (任意に設定した10塩基程度の短いプライマーを用いたPCRによる多型)<sup>1)</sup>やSSR (DNAの2あるいは3塩基の繰り返し配列回数の違いによる多型)<sup>2,3)</sup>等のDNAマーカーを用いる手法の開発例がいくつも見つかった。しかしいずれの方法にも一長一短があり、これらの手法についてももっと多くのBrassica属植物を用いた実験を含む検討が更に必要であることがわかった。

- 1) Ma, C. et al. (2000) Genetic diversity of Chinese and Japanese rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties detected by RAPD markers. *Breeding Sci.* 50, 257-265.
- 2) Suwabe, K. et al. (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1092-1098.
- 3) Tommasini, L. et al. (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1091-1101.

#### 3.2 Brassica 属の代表的品種の入手、栽培とDNAの抽出

DNAマーカーの実験による検討を行うため、Brassica属の代表的品種を農業生物資源研究所ジーンバンクより入手し(表3)、国立環境研究所の温室での栽培とDNAの抽出を行った。

表3 入手したBrassica属の代表的品種

	種名	品種名	JP 番号
1	<i>Brassica rapa</i>	早生菜(東京)	JP-25846
2		早生在来(茨城)	JP-25865
3		チャボ(岐阜)	JP-25856
4		仁井田青菜(秋田)	JP-26900
5		小松菜(栃木)	JP-26901
6		野沢菜(長野)	JP-26915
7	<i>Brassica napus</i>	トワダナタネ(岩手)	JP-67870
8		東北68号(福島)	JP-67871
9		北海3号(北海道)	JP-67892
10	<i>Brassica juncea</i>	ちくし菜(福岡)	JP-26104
11		葉カラシナ(埼玉)	JP-26132
12		KAICHOY	JP-37394

栽培と DNA の抽出は、それぞれ 2 . 1 と 2 . 3 に記述した方法で行った。

### 3.3 *Brassica* 属の種間・品種間差異を識別できる DNA マーカーの開発

Suwabe et al. (2002)により開発された SSR マーカーの有用性を検討するために、表 2 の *Brassica* 属植物から抽出した DNA に対して、3 . 1 の文献 2) の Table 3 に記述されているいくつかのプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動してバンドパターンを解析した。PCR は、文献 2) の方法を一部改変して 94 10 分、(92 1 分、55 1 分、72 1 分)を 35 サイクル、72 7 分の条件で行い、その後 2.5% のアガロースゲルで電気泳動した。

### 3.4 結果と考察

2 種類のプライマー対を用いて行った PCR 解析の結果を図 6 に示す。このように同じ種に属するものでも、品種間で観察されるバンドの本数や位置が異なった。プライマー対 BRMS-046 を用いた場合には、*Brassica rapa* で 5 系統、*B. juncea* で 3 系統に 1 本のバンドが出現したが、*B. napus* では、いずれの系統からもバンドは検出されなかった(図 6A)。文献 2) では、*B. rapa* および *B. juncea* では 1 本のバンドが検出され、*B. napus* では検出されないという結果が出ており、得られた結果はこれと部分的に一致するものであった。今回 *B. rapa* の品種間でも、検出されるバンドに差異があることがわかった。

一方、プライマー対 BRMS-006 を用いた場合には、*B. rapa*, *B. napus* のすべての系統においてバンドが 2 本出現したのに対し、*B. juncea* のどの系統においても観察されたバンドは 1 本であった(図 6B)。文献 2) では、*B. rapa*, *B. napus* で 1 本のバンドが検出され、*B. juncea* では検出されないという結果が出ているが、文献 2) の PCR 条件のうちアニーリング温度が 60 であったことにより本研究の場合よりもバンドの数が少なくなっていると考えられる。*B. juncea* で他の種よりも少ないバンド数になっている点では今回得られた結果と一致している。

今後さらに多くの品種について調べる必要があるが、以上の結果は、これらの SSR マーカーの出現バンドの本数によって *Brassica* 属の種が区別できる可能性を示唆する。またプライマー対 BRMS-006 によって増幅されたバンドの位置は品種間でかなり異なっていたため、これを品種を区別するマーカーとしても利用できる可能性がある。

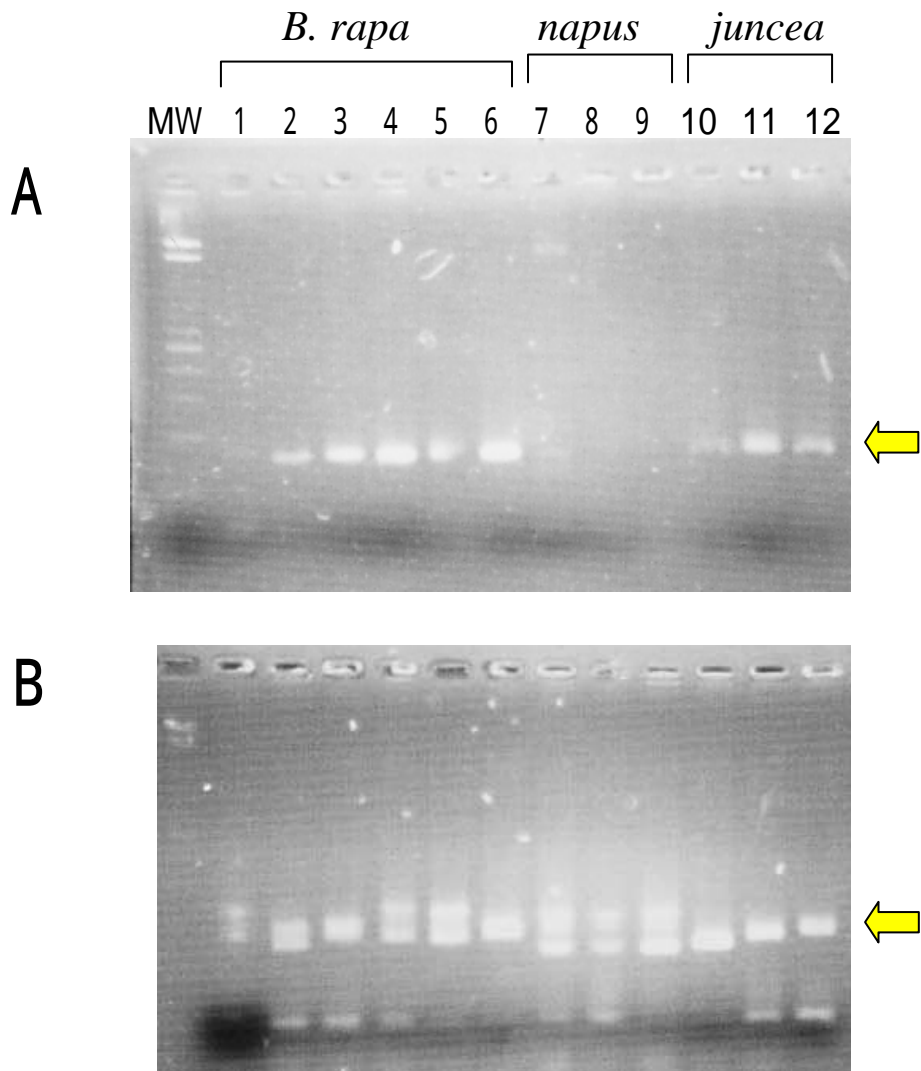


図6 SSR マーカーによる *Brassica* 属の種間・品種間差異の識別  
*Brassica* 属の異なる 12 系統の植物から DNA を抽出し、BRMS-046(A)または BRMS-006(B)をプライマー対に用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片を電気泳動した。MW、分子量マーカー； レーン 1 ~ 12 は、表 3 の左端の番号に対応。矢印、SSR マーカー由来の PCR 産物。