

平成 16 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 17 年 2 月

独立行政法人国立環境研究所

目 次

概要	2
目的	
調査体制	
内容と結果	
1. ナタネ類の生育地点の調査と分析用ナタネ種子のサンプリング	4
1.1 採種地点	
1.2 採種地点の詳細	8
1.2.1 港湾地区	
1.2.2 関東地方の河川敷等	13
2. 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析	23
2.1 グリホサート耐性遺伝子の流動に関する分析	
2.1.1 種子に対する免疫クロマトグラフ法による分析	
2.1.2 実生のグリホサート耐性の分析	28
2.1.3 グリホサート耐性実生のタンパク質、遺伝子分析	34
2.2 グルホシネート耐性遺伝子の流動に関する分析	35
2.2.1 実生のグルホシネート耐性分析に用いる除草剤の濃度検定	
2.2.2 実生のグルホシネート耐性の分析	37
2.2.3 グルホシネート耐性実生のタンパク質、遺伝子分析	42
3. 考察	45

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である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、リスク評価、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、昨年度(平成 15 年度)に引き続き、一般環境中での生育の現状、導入遺伝子の拡散状況等の研究・調査を行った。

調査体制

- 1) 調査の総括と報告書の作成
独立行政法人国立環境研究所 佐治光
- 2) ナタネ種子等採種地点の調査と分析用ナタネ種子等のサンプリング
財団法人自然環境研究センター 永津雅人・脇山成二・畠瀬頼子
独立行政法人国立環境研究所 中嶋信美・玉置雅紀
- 3) 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析
独立行政法人国立環境研究所 青野光子・中嶋信美

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するとともに、GM ナタネのこぼれ落ちが想定されるいくつかの港湾付近とバックグラウンドとしての関東地方の河川敷等に生育している西洋ナタネやその近縁

種の在来ナタネ (*B. rapa*)、カラシナ (*B. juncea*) の種子を採集し、実生の栽培による除草剤散布試験、除草剤耐性タンパク質や除草剤耐性遺伝子の解析を行った。

その結果、採集された種子に対する免疫クロマトグラフ法による解析と種子から得られる実生に対する除草剤 (グリホサート、グルホシネート) 耐性試験や遺伝子等の解析のいずれの方法によっても、鹿島港、千葉港、名古屋港、四日市港、神戸港において GM ナタネの生育が確認された。これらの GM ナタネは、食品加工用等に輸入されたものが輸送される過程でこぼれ落ち、発芽、生育したものであると考えられるが、これが一過的なものなのか、それとも何世代かを経て定着しつつあるのかを明らかにするには、今後も引き続いて調査する必要がある。

一方、バックグラウンドと考えられる河川敷等から採集した西洋ナタネ、在来ナタネ、カラシナでは、除草剤耐性遺伝子が全く検出されなかった。

また、今回の調査では、在来ナタネ、カラシナと GM ナタネとの交雑例は見つからなかったが、アブラナ科の異なる植物種間での交雑は起こり得ることが知られており、この点についても引き続き調査していく必要があると思われる。

1. ナタネ類の生育地点の調査と分析用ナタネ種子のサンプリング

1.1 採種地点

今年度は、主要なナタネ輸入港のうち、茨城県鹿島港、千葉県千葉港、神奈川県横浜港、愛知県名古屋港、三重県四日市港、兵庫県神戸港の6つの港湾地区及び関東地方の河川敷等におけるナタネ類の生育状況を調査し、次表の各地点（各地点2, 3個体、合計86地点）から西洋ナタネ、在来ナタネ、カラシナの種子を採取した。鹿島港付近の採種地点では西洋ナタネが最も多く、次いでカラシナで、わずかに在来ナタネが生育していた。千葉港、名古屋港、四日市港では西洋ナタネ以外は確認することが出来ず、横浜港では西洋ナタネとわずかにカラシナが見られた。神戸港周辺に生育していたのはほとんどがカラシナであり、西洋ナタネはわずかにしか見られなかった。いっぽう河川敷等では、カラシナが多い場所とカラシナと西洋ナタネがほぼ同数みられる所があり、在来ナタネは確認できなかった。

表 1-1 港湾地域の西洋ナタネ及び在来ナタネ採種地点（計 29 地点）

試料番号	採集日	種	県	区・市・町	字	備考
1-1	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	鹿嶋市	泉川	図 1.1
1-2	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	息栖	図 1.1
1-3	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	息栖	図 1.1
1-4	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	息栖	図 1.1
1-5	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	大野原1丁目	図 1.1
1-6	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	大野原1丁目	図 1.1
1-7	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	東深芝	図 1.1
1-8	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	東深芝	図 1.1
1-9	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-10	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-11	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-12	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-13	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-14	2004/6/8	西洋ナタネ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
1-15	2004/6/17	西洋ナタネ	千葉県	千葉市美浜区	新港	図 1.2
1-16	2004/6/4	西洋ナタネ	神奈川県	横浜市磯子区	磯子3	図 1.3
1-17	2004/6/4	西洋ナタネ	神奈川県	横浜市磯子区	森3	図 1.3
1-18	2004/6/4	西洋ナタネ	神奈川県	横浜市磯子区	杉田	図 1.3
1-19	2004/6/4	西洋ナタネ	神奈川県	横浜市磯子区	新中原町	図 1.3
1-20	2004/5/29	西洋ナタネ	愛知県	名古屋市	潮見町	図 1.4
1-21	2004/5/29	西洋ナタネ	愛知県	名古屋市	潮見町	図 1.4
1-22	2004/5/29	西洋ナタネ	愛知県	名古屋市	潮見町	図 1.4
1-23	2004/5/29	西洋ナタネ	愛知県	名古屋市	潮見町	図 1.4
1-24	2004/5/29	西洋ナタネ	愛知県	名古屋市	潮見町	図 1.4
1-25	2004/5/29	西洋ナタネ	三重県	四日市市	末広町3	図 1.5
1-26	2004/5/29	西洋ナタネ	三重県	四日市市	末広町4	図 1.5
1-27	2004/6/2	在来ナタネ?	兵庫県	神戸市	西出町1-2	図 1.6
1-28	2004/6/5	在来ナタネ?	兵庫県	神戸市	西出町1-2	図 1.6
1-29	2004/6/22	西洋ナタネ?	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(南埠頭)	図 1.6

表中の「？」は、種の同定が不確かなもの。

表 1-2 港湾地域のカラシナ採種地点（計 15 地点）

試料番号	採集日	種	県	区・市・町	字	備考
2-1	2004/6/8	カラシナ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
2-2	2004/6/8	カラシナ	茨城県	神栖町	深芝	図 1.1
2-3	2004/6/5	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-4	2004/6/5	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-5	2004/6/5	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-6	2004/6/5	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-7	2004/6/5	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-8	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-9	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-10	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-11	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(コンテナ第 14 バース前)	図 1.6
2-12	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(南埠頭)	図 1.6
2-13	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	ポートアイランド(南埠頭)	図 1.6
2-14	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	築地町(中央市場前)	図 1.6
2-15	2004/6/22	カラシナ	兵庫県	神戸市	築地町(中央市場前)	図 1.6

表 1-3 河川敷等の西洋ナタネ採種地点（計 20 地点）

試料番号	採集日	種	県	区・市・町	字	備考
3-1	2004/6/9	西洋ナタネ?	茨城県	谷和原村	細代	図 1.7
3-2	2004/6/9	西洋ナタネ?	茨城県	谷和原村	細代	図 1.7
3-3	2004/6/9	西洋ナタネ?	茨城県	谷和原村	細代	図 1.7
3-4	2004/6/9	西洋ナタネ	茨城県	河内町	田川	図 1.9
3-5	2004/6/9	西洋ナタネ	茨城県	河内町	田川	図 1.9
3-6	2004/6/9	西洋ナタネ	茨城県	河内町	田川	図 1.9
3-7	2004/6/9	西洋ナタネ	茨城県	河内町	田川	図 1.9
3-8	2004/6/9	西洋ナタネ	茨城県	河内町	田川	図 1.9
3-9	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	川越市		図 1.10
3-10	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	川越市		図 1.10
3-11	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	行田市	佐間	図 1.11
3-12	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	久喜市	下早見	図 1.12
3-13	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	白岡町	野牛	図 1.12
3-14	2004/6/1	西洋ナタネ	埼玉県	幸手市	高須賀	図 1.13
3-15	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	幸手市	高須賀	図 1.13
3-16	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	幸手市	権現堂	図 1.13
3-17	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	蓮田市	関山 3 丁目	図 1.15
3-18	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	蓮田市	椿山 1	図 1.15
3-19	2004/6/2	西洋ナタネ	埼玉県	蓮田市	東 2 丁目	図 1.15
3-20	2004/6/18	西洋ナタネ	千葉県	流山市	小金	図 1.17

表中の「？」は、種の同定が不確かなもの。

表 1-4 河川敷等のカラシナ採種地点（計 22 地点）

試料番号	採集日	種	県	区・市・町	字	備考
4-1	2004/6/9	カラシナ	茨城県	谷和原村	細代	図 1.7
4-2	2004/6/9	カラシナ	茨城県	谷和原村	細代	図 1.7
4-3	2004/6/9	カラシナ	茨城県	取手市	戸田井	図 1.8
4-4	2004/6/9	カラシナ	茨城県	利根町	羽根野	図 1.8
4-5	2004/6/9	カラシナ	茨城県	利根町	羽根野	図 1.8
4-6	2004/6/9	カラシナ	茨城県	利根町	羽根野	図 1.8
4-7	2004/6/9	カラシナ	茨城県	利根町	羽根野	図 1.8
4-8	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	川越市		図 1.10
4-9	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	川越市		図 1.10
4-10	2004/6/2	カラシナ	埼玉県	久喜市	下早見	図 1.12
4-11	2004/6/2	カラシナ	埼玉県	白岡町	野牛	図 1.12
4-12	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	白岡町	野牛	図 1.12
4-13	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	幸手市	高須賀	図 1.13
4-14	2004/6/2	カラシナ	埼玉県	幸手市	高須賀	図 1.13
4-15	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	幸手市	惣新田	図 1.14
4-16	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	幸手市	中島	図 1.14
4-17	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	幸手市	中島	図 1.14
4-18	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	蓮田市	関山 3 丁目	図 1.15
4-19	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	蓮田市	椿山 1 丁目	図 1.15
4-20	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	蓮田市	椿山 1 丁目	図 1.15
4-21	2004/6/1	カラシナ	埼玉県	蓮田市	東 2	図 1.15
4-22	2004/6/16	カラシナ	千葉県	佐倉市	長熊	図 1.16

1.2 採種地点の詳細

各採種地点の地図上の位置と写真を以下に示す。

1.2.1 港湾地区



1-6



図 1-1 茨城県鹿島港（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



図 1-2 千葉県千葉港（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



図 1-3 神奈川県横浜港（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



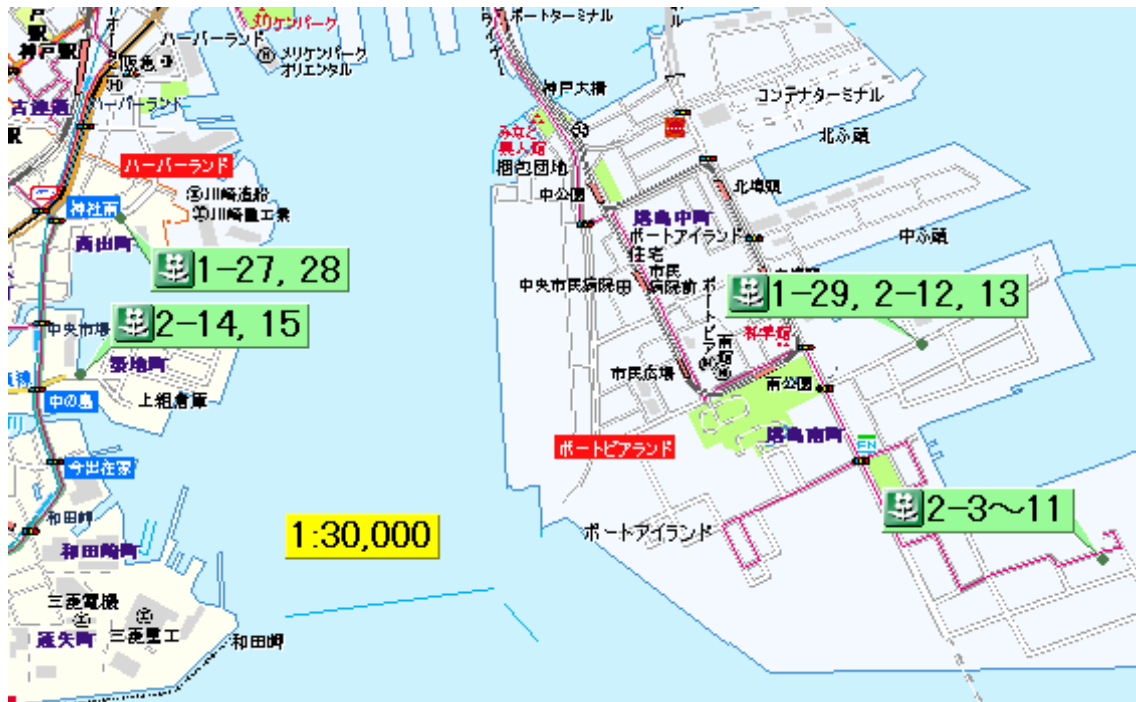
1-24

図 1-4 愛知県名古屋港（地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



1-26

図 1-5 三重県四日市港（地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



1-29



2-3



図 1-6 兵庫県神戸港（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



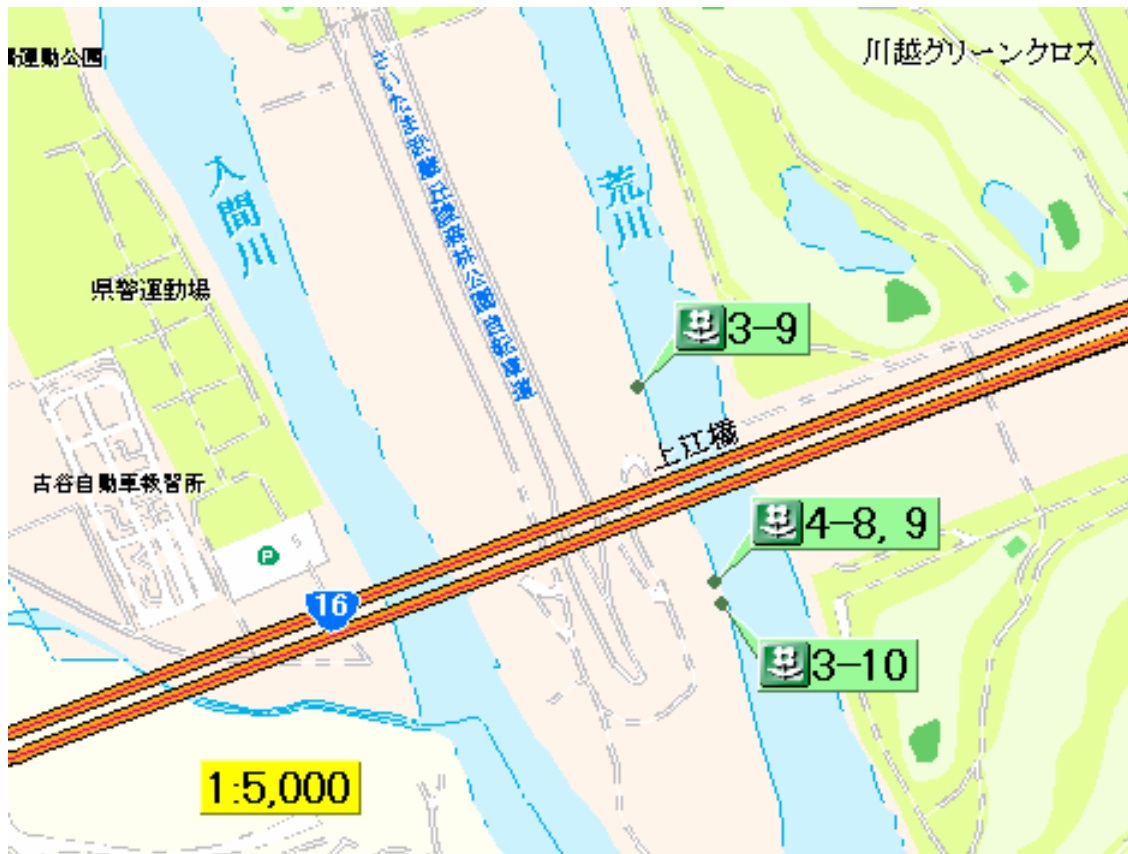
戸田井橋右岸から左岸をのぞむ

図 1-8 茨城県小貝川沿い（地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



長豊橋左岸から、利根川下流方を望む

図 1-9 茨城県河内町（地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



3-9



3-10

図 1-10 埼玉県川越市上江橋の中州（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



図 1-11 埼玉県行田市（地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号）



3-12



3-13

図 1-12 埼玉県久喜市 (地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号)



3-14

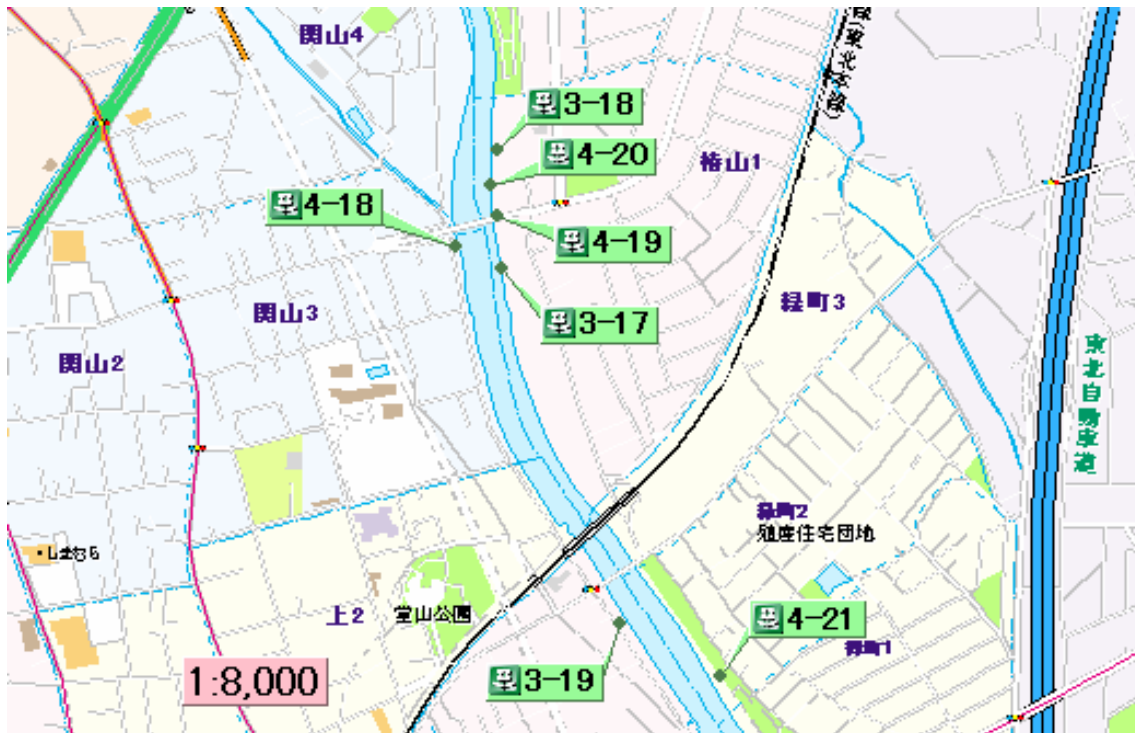


3-15



3-16

図 1-13 埼玉県幸手市中川沿い(地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号)



3-18



4-18



4-20

図 1-15 埼玉県蓮田市 (地図は、(株)昭文社スーパーマップルデジタル5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号)



図 1-16 千葉県佐倉市長熊 (地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号)



図 1-17 千葉県流山市小金 (地図は、(株)昭文社スーパーマッフルデジタル 5、全国 DVD より複製、地図使用承認 昭文社第 46 G 054 号)

2. 除草剤耐性遺伝子の流動に関する分析

2.1 グリホサート耐性遺伝子の流動に関する分析

2.1.1 種子に対する免疫クロマトグラフ法による分析

各地点より採集したナタネ種子に対して、免疫クロマトグラフ法によるグリホサート耐性タンパク質(以下「CP4 タンパク質」)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。一地点あたり約30粒の種子の重量を測定し、これに1gの種子あたり10mlの蒸留水を加え(種子数が少ない場合には更に適量の蒸留水を添加)乳鉢内ですりつぶし、抽出液を得た。検出用テスト紙Reveal[®](旧Agri-Screen[®], Neogen, MI, USA)をこの抽出液に浸し、5分後に反応バンドの出現の有無により抽出液中のCP4(5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase)タンパク質の有無を確認した(図2)。その結果を表2-1~2-4に示す。

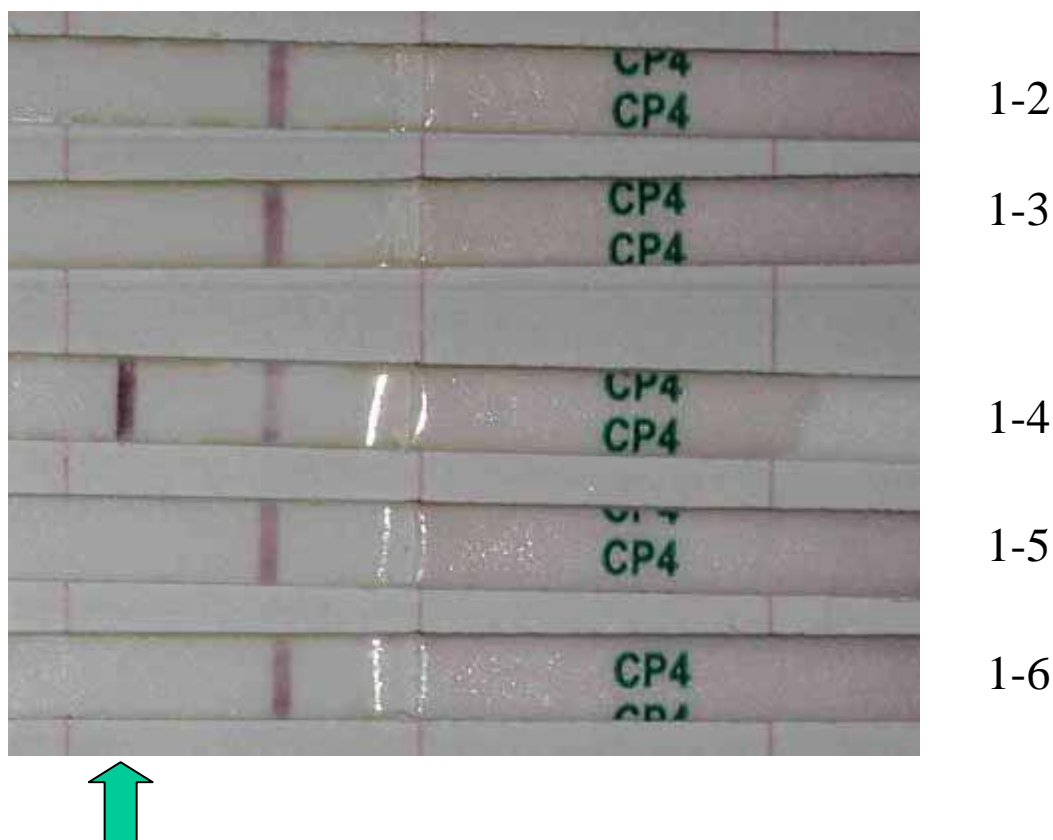


図2 免疫クロマトグラフ法によるグリホサート耐性タンパク質 CP4 の検出

採集された種子(試料番号1-2~1-6)から粗抽出液を調整し、CP4特異抗体を用いた免疫クロマトグラフ法によりCP4タンパク質の検出を行った。矢印:CP4タンパク質と反応した特異抗体のバンドの位置(1-4にバンドが認められる)。

表 2-1 港湾地域由来西洋ナタネ及び在来ナタネ種子に対する免疫クロマトグラフ法による CP4 タンパク質の分析結果

試料番号	種	採種地	種子重(mg)	蒸留水(μl)	結果*
1-1	西洋ナタネ	茨城県鹿嶋市	128	1280	-
1-2	西洋ナタネ	茨城県神栖町	100	1000	-
1-3	西洋ナタネ	茨城県神栖町	96	960	-
1-4	西洋ナタネ	茨城県神栖町	110	1100	+
1-5	西洋ナタネ	茨城県神栖町	94	940	-
1-6	西洋ナタネ	茨城県神栖町	65	650	-
1-7	西洋ナタネ	茨城県神栖町	116	1160	-
1-8	西洋ナタネ	茨城県神栖町	114	1140	-
1-9	西洋ナタネ	茨城県神栖町	60	600	-
1-10	西洋ナタネ	茨城県神栖町	117	1170	-
1-11	西洋ナタネ	茨城県神栖町	99	990	-
1-12	西洋ナタネ	茨城県神栖町	48	480	-
1-13	西洋ナタネ	茨城県神栖町	85	850	-
1-14	西洋ナタネ	茨城県神栖町	98	980	+
1-15	西洋ナタネ	千葉県千葉市	24	240	+
1-16	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	99	990	-
1-17					
1-18					
1-19					
1-20	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	種子数が少なく未実施		
1-21	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	20	300	-
1-22	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	20	300	+
1-23	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	17	270	+
1-24	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	21	310	+
1-25	西洋ナタネ	三重県四日市市	19	290	-
1-26	西洋ナタネ	三重県四日市市	18	280	+
1-27	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	51	510	-
1-28	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	38	760	-
1-29	西洋ナタネ?	兵庫県神戸市	11	440	+

* + : CP4 タンパク質有り、 - : CP4 タンパク質無し
 表中の「?」は、種の同定が不確かなもの。

表2-2 港湾地域由来カラシナ種子に対する免疫クロマトグラフ法によるCP4タンパク質の分析結果

試料番号	種	採種地	種子重(mg)	蒸留水(μl)	結果*
2-1	カラシナ	茨城県神栖町	27	540	-
2-2	カラシナ	茨城県神栖町	45	450	-
2-3	カラシナ	兵庫県神戸市	67	670	-
2-4	カラシナ	兵庫県神戸市	69	690	-
2-5	カラシナ	兵庫県神戸市	59	590	-
2-6	カラシナ	兵庫県神戸市	69	690	-
2-7	カラシナ	兵庫県神戸市	62	620	-
2-8	カラシナ	兵庫県神戸市	65	650	-
2-9	カラシナ	兵庫県神戸市	31	620	-
2-10	カラシナ	兵庫県神戸市	61	610	-
2-11	カラシナ	兵庫県神戸市	33	660	-
2-12	カラシナ	兵庫県神戸市	50	500	-
2-13	カラシナ	兵庫県神戸市	51	510	-
2-14	カラシナ	兵庫県神戸市	82	820	-
2-15	カラシナ	兵庫県神戸市	85	850	-

* - : CP4 タンパク質無し

表 2-3 河川敷等由来西洋ナタネ種子に対する免疫クロマトグラフ法による CP4 タンパク質の分析結果

試料番号	種	採種地	種子重(mg)	蒸留水(μl)	結果*
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	71	710	-
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	83	830	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	61	610	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	52	520	-
3-3	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	57	570	-
3-4	西洋ナタネ	茨城県河内町	56	560	-
3-5	西洋ナタネ	茨城県河内町	70	700	-
3-6	西洋ナタネ	茨城県河内町	68	680	-
3-7	西洋ナタネ	茨城県河内町	67	670	-
3-8	西洋ナタネ	茨城県河内町	67	670	-
3-9	西洋ナタネ	埼玉県川越市	77	770	-
3-10	西洋ナタネ	埼玉県川越市	56	560	-
3-11	西洋ナタネ	埼玉県行田市	65	650	-
3-12	西洋ナタネ	埼玉県久喜市	68	680	-
3-13	西洋ナタネ	埼玉県白岡町	73	730	-
3-14	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	66	660	-
3-15	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	66	660	-
3-16	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	73	730	-
3-17	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	61	610	-
3-18	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	97	970	-
3-19	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	68	680	-
3-20	西洋ナタネ	千葉県流山市	51	510	-

* - : CP4 タンパク質無し

表中の「？」は、種の同定が不確かなもの。

表2-4 河川敷等由来カラシナ種子に対する免疫クロマトグラフ法によるCP4タンパク質の分析結果

試料番号	種	採種地	種子重(mg)	蒸留水(μl)	結果*
4-1	カラシナ	茨城県取手市	45	450	-
4-2	カラシナ	茨城県利根町	50	500	-
4-3	カラシナ	茨城県利根町	53	530	-
4-4	カラシナ	茨城県利根町	54	540	-
4-5	カラシナ	茨城県利根町	50	500	-
4-6	カラシナ	茨城県谷和原村	54	540	-
4-7	カラシナ	茨城県谷和原村	47	470	-
4-8	カラシナ	埼玉県川越市	26	520	-
4-9	カラシナ	埼玉県川越市	28	560	-
4-10	カラシナ	埼玉県久喜市	44	440	-
4-11	カラシナ	埼玉県白岡町	38	380	-
4-12	カラシナ	埼玉県白岡町	45	450	-
4-13	カラシナ	埼玉県幸手市	39	390	-
4-14	カラシナ	埼玉県幸手市	43	430	-
4-15	カラシナ	埼玉県幸手市	49	490	-
4-16	カラシナ	埼玉県幸手市	44	440	-
4-17	カラシナ	埼玉県幸手市	41	410	-
4-18	カラシナ	埼玉県蓮田市	46	460	-
4-19	カラシナ	埼玉県蓮田市	30	600	-
4-20	カラシナ	埼玉県蓮田市	36	720	-
4-21	カラシナ	埼玉県蓮田市	43	430	-
4-22	カラシナ	千葉県佐倉市	44	440	-

* - : CP4 タンパク質無し

鹿島、名古屋、四日市、神戸の港湾地域の一部の地点及び千葉港から採集された西洋ナタネの種で CP4 タンパク質が検出された。したがってこれらの地域においては、GM ナタネが生育していると推測される。これに対し、港湾地域の在来ナタネ、カラシナと河川敷から採集された西洋ナタネ、カラシナでは、CP4 タンパク質は全く検出されなかった。

2.1.2 実生のグリホサート耐性の分析

採集された種子における遺伝子組換え体の混入率の測定や導入された遺伝子の同定等詳細な解析を行うため、種子を発芽させ実生を育てた。まず実生のグリホサート耐性を調べた。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 区画あたり各地点より採集された種子約 30 ~ 100 粒を播種し、栽培した(図 3)。ナタネの場合、発芽後 8 日目と 14 日目に水道水で 400 倍に希釈したグリホサート(ラウンドアップハイロード、Monsanto、Antwerp、Belgium) 水溶液を散布し、カラシナの場合には、発芽後 13 日目と 18 日目に、同様にグリホサート処理を行った。2 回目の除草剤処理後、ナタネの場合 27 日目に、カラシナの場合 7 日目(カラシナの感受性は高く、7 日目には全て枯死していた)に実生の生育状況を観察し、グリホサート耐性、感受性個体を識別した(図 4)。結果を表 3-1 ~ 3-4 に示す。



図 3 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

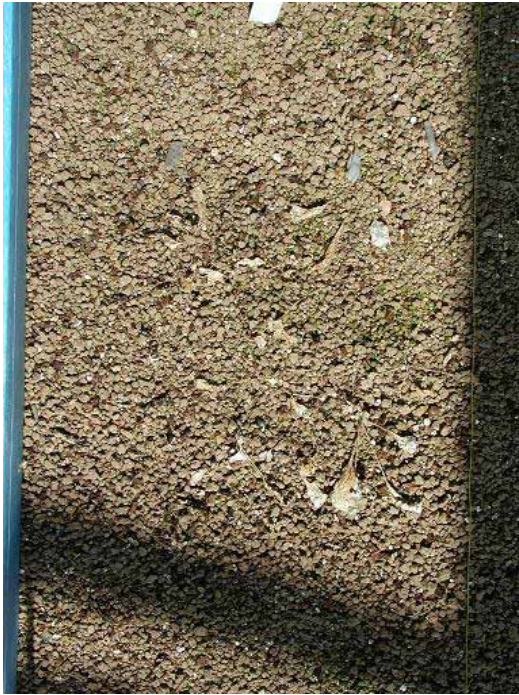


図4 グリホサート処理した西洋ナタネ（播種後34日目）
左の系統はグリホサートに感受性、右の系統は耐性を示す。

表 3-1 港湾地域由来西洋ナタネ及び在来ナタネ実生のグリホサート耐性及びその他の分析結果

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性 ^{*1}	鉢植え	その他の分析		
							A ^{*2}	B ^{*3}	C ^{*4}
1-1	西洋ナタネ	茨城県鹿嶋市	80	68	-				
1-2	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	70	-				
1-3	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	65	-				
1-4	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	63	+ (32)	1-4-1	+	+	+
						1-4-2	+	+	+
1-5	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	67	-				
1-6	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	66	-				
1-7	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	68	-				
1-8	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	63	-				
1-9	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	48	-				
1-10	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	58	-				
1-11	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	55	-				
1-12	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	57	-				
1-13	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	71	-				
1-14	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	59	+ (34)	1-14-1	+	+	+
						1-14-2	+	+	+
1-15	西洋ナタネ	千葉県千葉市	100	27	+ (19)	1-15-1	+	+	+
						1-15-2	+	ND ^{*5}	
1-16	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	77	-				
1-17	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	85	-				
1-18	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	91	-				
1-19	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	80	58	-				
1-20	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	50	0	-				
1-21	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	50	12	-				
1-22	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	50	5	+ (2)	1-22-1	+	+	+
						1-22-2	+	+	+
1-23	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	30	10	+ (4)	1-23	+	+	+
1-24	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	100	75	+ (26)	1-24-1	+	+	+
						1-24-2	+	+	+
1-25	西洋ナタネ	三重県四日市市	100	34	-				
1-26	西洋ナタネ	三重県四日市市	30	22	+ (21)	1-26-1	+	+	+
						1-26-2	+	ND ^{*5}	
1-27	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	30	22	-				
1-28	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	80	50	-				
1-29	西洋ナタネ?	兵庫県神戸市	15	6	+ (6)	1-29-1	+	+	+
						1-29-2	+	+	+

*¹ + : 耐性個体有り (耐性個体数) - : 全て感受性

*² A : 免疫クロマトグラフ、+ : CP4 タンパク質有り

*³ B : PCR、+ : cp4 遺伝子有り

*⁴C : DNAシーケンシング、+ : cp4 遺伝子配列確認

*⁵ND : DNA抽出できず

表中の「？」は、種の同定が不確かなもの。

表 3-2 港湾地域由来カラシナ実生のグリホサート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*
2-1	カラシナ	茨城県神栖町	80	66	-
2-2	カラシナ	茨城県神栖町	80	63	-
2-3	カラシナ	兵庫県神戸市	80	59	-
2-4	カラシナ	兵庫県神戸市	80	68	-
2-5	カラシナ	兵庫県神戸市	80	51	-
2-6	カラシナ	兵庫県神戸市	80	67	-
2-7	カラシナ	兵庫県神戸市	80	64	-
2-8	カラシナ	兵庫県神戸市	80	35	-
2-9	カラシナ	兵庫県神戸市	80	35	-
2-10	カラシナ	兵庫県神戸市	80	51	-
2-11	カラシナ	兵庫県神戸市	80	55	-
2-12	カラシナ	兵庫県神戸市	50	23	-
2-13	カラシナ	兵庫県神戸市	50	31	-
2-14	カラシナ	兵庫県神戸市	80	50	-
2-15	カラシナ	兵庫県神戸市	80	48	-

* - : 全て感受性

表 3-3 河川敷等由来ナタネ実生のグリホサート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	62	-
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	35	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	70	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	56	-
3-3	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	58	-
3-4	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	60	-
3-5	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	64	-
3-6	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	63	-
3-7	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	56	-
3-8	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	52	-
3-9	西洋ナタネ	埼玉県川越市	80	64	-
3-10	西洋ナタネ	埼玉県川越市	80	66	-
3-11	西洋ナタネ	埼玉県行田市	80	47	-
3-12	西洋ナタネ	埼玉県久喜市	80	60	-
3-13	西洋ナタネ	埼玉県白岡町	80	65	-
3-14	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	58	-
3-15	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	67	-
3-16	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	64	-
3-17	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	71	-
3-18	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	68	-
3-19	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	46	-
3-20	西洋ナタネ	千葉県流山市	80	50	-

* - : 全て感受性

表中の「?」は、種の同定が不確かなもの。

表 3-4 河川敷等由来カラシナ実生のグリホサート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*
4-1	カラシナ	茨城県取手市	80	57	-
4-2	カラシナ	茨城県利根町	80	66	-
4-3	カラシナ	茨城県利根町	80	60	-
4-4	カラシナ	茨城県利根町	80	65	-
4-5	カラシナ	茨城県利根町	80	68	-
4-6	カラシナ	茨城県谷和原村	80	62	-
4-7	カラシナ	茨城県谷和原村	80	61	-
4-8	カラシナ	埼玉県川越市	80	73	-
4-9	カラシナ	埼玉県川越市	80	67	-
4-10	カラシナ	埼玉県久喜市	80	56	-
4-11	カラシナ	埼玉県白岡町	80	68	-
4-12	カラシナ	埼玉県白岡町	80	66	-
4-13	カラシナ	埼玉県幸手市	80	81	-
4-14	カラシナ	埼玉県幸手市	80	72	-
4-15	カラシナ	埼玉県幸手市	80	67	-
4-16	カラシナ	埼玉県幸手市	80	70	-
4-17	カラシナ	埼玉県幸手市	80	68	-
4-18	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	71	-
4-19	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	70	-
4-20	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	67	-
4-21	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	69	-
4-22	カラシナ	千葉県佐倉市	80	67	-

* - : 全て感受性

鹿島、名古屋、四日市、神戸の港湾地域の一部の地点及び千葉から採集された西洋ナタネにおいて、グリホサート耐性個体が検出された。これに対し、港湾地域の在来ナタネ、カラシナと河川敷由来の西洋ナタネ、カラシナでは、全ての個体が感受性であった。この結果は、種子に対する免疫クロマトグラフ法による分析結果（表 2-1～2-4）と完全に一致した。

2.1.3 グリホサート耐性実生のタンパク質、遺伝子分析

グリホサート耐性を示した実生を、各試料番号につき 2 個体ずつ鉢植えし、生育させつつ、葉の組織を適宜サンプリングして CP4 タンパク質及びグリホサート耐性遺伝子 (*cp4 epsps* 遺伝子、以下「*cp4* 遺伝子」) の分析を行った。タンパク質分析は、免疫クロマトグラフ法により、種子に対して行ったのと同様に行い、遺伝子分析は、葉から抽出した DNA に対して、PCR 法による分析 (図 5) とその際増幅された DNA のシーケンス (塩基配列) を決定する方法により行った。PCR のプライマーは、Genbank に登録されている 3 つの *cp4* 遺伝子の塩基配列から共通性の高い部分を選んで設計し (5'-AAGA ACTCCGCGTCAAGGA AAGCGA-3'、5'-AGCCTTCGTATCGGAGAGTT CGAT-3')、DNA のシーケンシングは、PCR による増幅産物を精製後 DNA シーケンサー (ABI3700、Applied Biosystems, CA, USA) を用いて行った。それらの分析の結果、グリホサート耐性を示した系統のうち、DNA 抽出が可能であった個体全てにおいて、CP4 タンパク質及び *cp4* 遺伝子の存在が確認された (表 3-1)。これにより、本調査におけるグリホサート耐性試験や免疫クロマトグラフ法による解析結果が信頼できるものであることがわかるとともに、確かに *cp4* 遺伝子を持った GM ナタネがこれらの地域に生育していることが明らかになった。

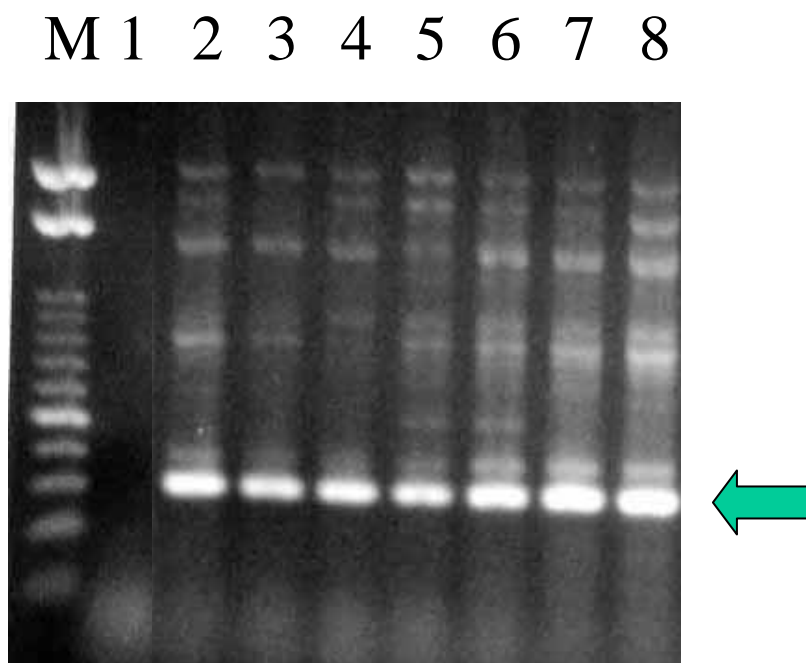


図 5 PCR によるグリホサート耐性遺伝子 (*cp4*) の検出
ナタネ実生の葉からゲノム DNA を抽出し、*cp4* 遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いて PCR を行った。M: サイズマーカー、1: 早生あぶら菜 (トキタ種苗)、2: 1-22-1、3: 1-22-2、4: 1-23、5: 1-24-1、6: 1-24-2、7: 1-15-1、8: 1-26-1、矢印: *cp4* 由来の PCR 産物のバンドの位置

2.2 グルホシネート耐性遺伝子の流動に関する分析

2.2.1 実生のグルホシネート耐性分析に用いる除草剤の濃度検定

昨年度の調査で、グルホシネートについては除草剤としての効果が速やかに現れることが確認されたことから、採集されたナタネ種子から実生を育て、グルホシネート耐性を分析するに当たり、用いる除草剤の最適濃度を明らかにするための予備実験を行った。農業生物資源研究所のジーンバンクより *Brassica* 属の様々な種、品種の種子を入手し(表4) 2.1.2 に述べた方法で実生を育てた。11 日目に除草剤グルホシネート(バスタ、Hoechst Schering AgrEvo、Frankfurt、Germany) を3つの異なる濃度(400倍、800倍、1,600倍希釈)でスプレー散布し、その10日後(播種後21日目)に実生の生育状況を観察した。その結果、400倍希釈の濃度で処理したものはほぼ全て枯死したのに対し、800倍希釈で処理したものでは4品種、1,600倍希釈で処理したものでは5品種において生存個体が観察された(図6)。800倍希釈の除草剤処理で生き残ったものについて、観察を行った日(播種後21日目)に再度800倍希釈の除草剤処理を行ったところ、その1週間後(播種後28日目)に全て枯死しているのが観察された。

以上の結果より、各地から採集されたナタネのグルホシネート耐性分析には、グルホシネート耐性遺伝子の発現が弱い個体も漏れなく検出するために、800倍希釈の除草剤(1バットあたり400ml)で2回処理を行うという処理法を用いることとした。

表4 除草剤濃度検定に用いた *Brassica* 属植物

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



400倍希釈



800倍希釈



1600倍希釈

1	5	9
2	6	10
3	7	11
4	8	12

図 6 異なる濃度のグルホシネートで一回処理した *Brassica* 属植物の生育状況（播種後 21 日目、グルホシネート散布後 10 日目）
右下図に示された各区画の番号は、表 4 の左欄の番号に対応。

2.2.2 実生のグルホシネート耐性の分析

本調査で採集されたナタネ種子から、2.1.2 に記述されたような方法で実生を育て、西洋ナタネの場合、発芽後 16 日目と 20 日目に水道水で 800 倍に希釈したグルホシネート（バスタ、Hoechst Schering AgrEvo、Frankfurt、Germany）水溶液をスプレー散布し、カラシナの場合には、発芽後 13 または 15 日目と 17 または 18 日目に、同様にグルホシネート処理を行った。2 回目の除草剤処理後 7 日目に実生の生育状況を観察し、グルホシネート耐性、感受性個体を識別した（図 7）。結果を表 5-1 ~ 5-4 に示す。



図 7 グルホシネート処理した西洋ナタネ（播種後 34 日目）
左の系統はグルホシネート耐性、右の系統は感受性を示す。

表 5-1 港湾地域由来西洋ナタネ及び在来ナタネ実生のグルホシネート耐性及びその他の分析結果

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性 ^{*1}	鉢植え	その他の分析		
							A ^{*2}	B ^{*3}	C ^{*4}
1-1	西洋ナタネ	茨城県鹿嶋市	80	66	-				
1-2	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	65	-				
1-3	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	78	-				
1-4	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	57	-				
1-5	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	68	-				
1-6	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	62	+(62)	1-6-1	+	+	+
						1-6-2	+	+	+
						1-6-3	+	+	+
1-7	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	64	-				
1-8	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	57	+(57)	1-8-1	+	+	+
						1-8-2	+	+	+
						1-8-3	+	+	+
1-9	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	62	-				
1-10	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	68	-				
1-11	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	61	-				
1-12	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	52	-				
1-13	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	65	-				
1-14	西洋ナタネ	茨城県神栖町	80	67	-				
1-15	西洋ナタネ	千葉県千葉市	30	24	-				
1-16	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	68	-				
1-17	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	81	-				
1-18	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	100	88	-				
1-19	西洋ナタネ	神奈川県横浜市	80	45	-				
1-20	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	50	0					
1-21	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	50	0					
1-22	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	30	0					
1-23	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	30	10	+(1)	1-23	+	+	+
1-24	西洋ナタネ	愛知県名古屋市	100	73	-				
1-25	西洋ナタネ	三重県四日市市	100	38	+(30)	1-25-1	+	+	+
						1-25-2	+	+	+
						1-25-3	+	ND ^{*5}	
1-26	西洋ナタネ	三重県四日市市	30	17	-	-	-		
1-27	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	80	23	-				
1-28	在来ナタネ?	兵庫県神戸市	80	43	-				
1-29	西洋ナタネ?	兵庫県神戸市	15	12	-				

*¹ + : 耐性個体有り (耐性個体数) - : 全て感受性

*² A : 免疫クロマトグラフ、+ : PATタンパク質有り

*³ B : PCR、+ : *bar*遺伝子有り

*⁴ C : DNAシーケンシング、+ : *bar*遺伝子配列確認

*⁵ND：DNA抽出できず

表中の「？」は、種の同定が不確かなもの。

表 5-2 港湾地域由来カラシナ実生のグルホシネート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*
2-1	カラシナ	茨城県神栖町	80	69	-
2-2	カラシナ	茨城県神栖町	80	72	-
2-3	カラシナ	兵庫県神戸市	80	70	-
2-4	カラシナ	兵庫県神戸市	80	69	-
2-5	カラシナ	兵庫県神戸市	80	73	-
2-6	カラシナ	兵庫県神戸市	80	67	-
2-7	カラシナ	兵庫県神戸市	80	76	-
2-8	カラシナ	兵庫県神戸市	80	29	-
2-9	カラシナ	兵庫県神戸市	80	30	-
2-10	カラシナ	兵庫県神戸市	80	65	-
2-11	カラシナ	兵庫県神戸市	80	52	-
2-12	カラシナ	兵庫県神戸市	50	25	-
2-13	カラシナ	兵庫県神戸市	50	19	-
2-14	カラシナ	兵庫県神戸市	80	46	-
2-15	カラシナ	兵庫県神戸市	80	62	-

* - : 全て感受性

表 5-3 河川敷由来西洋ナタネ実生のグルホシネート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	66	-
3-1	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	51	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	70	-
3-2	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	47	-
3-3	西洋ナタネ?	茨城県谷和原村	80	62	-
3-4	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	72	-
3-5	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	63	-
3-6	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	56	-
3-7	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	61	-
3-8	西洋ナタネ	茨城県河内町	80	62	-
3-9	西洋ナタネ	埼玉県川越市	80	71	-
3-10	西洋ナタネ	埼玉県川越市	80	71	-
3-11	西洋ナタネ	埼玉県行田市	80	50	-
3-12	西洋ナタネ	埼玉県久喜市	80	69	-
3-13	西洋ナタネ	埼玉県白岡町	80	63	-
3-14	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	72	-
3-15	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	76	-
3-16	西洋ナタネ	埼玉県幸手市	80	66	-
3-17	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	65	-
3-18	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	64	-
3-19	西洋ナタネ	埼玉県蓮田市	80	61	-
3-20	西洋ナタネ	千葉県流山市	80	57	-

* - : 全て感受性

表中の「?」は、種の同定が不確かなもの。

表 5-4 河川敷由来カラシナ実生のグルホシネート耐性

試料番号	種	採種地	播種数	発芽数	耐性*1	免疫クロマトグラフ*2
4-1	カラシナ	茨城県取手市	80	64	-	
4-2	カラシナ	茨城県利根町	80	62	-	
4-3	カラシナ	茨城県利根町	80	65	-	
4-4	カラシナ	茨城県利根町	80	62	-	
4-5	カラシナ	茨城県利根町	80	60	-	
4-6	カラシナ	茨城県谷和原村	80	63	-	
4-7	カラシナ	茨城県谷和原村	80	66	-	
4-8	カラシナ	埼玉県川越市	80	66	-	
4-9	カラシナ	埼玉県川越市	80	67	-	
4-10	カラシナ	埼玉県久喜市	80	76	-	
4-11	カラシナ	埼玉県白岡町	80	75	-	
4-12	カラシナ	埼玉県白岡町	80	69	+ (1)	-
4-13	カラシナ	埼玉県幸手市	80	73	+ (1)	-
4-14	カラシナ	埼玉県幸手市	80	78	-	
4-15	カラシナ	埼玉県幸手市	80	66	-	
4-16	カラシナ	埼玉県幸手市	80	63	-	
4-17	カラシナ	埼玉県幸手市	80	62	-	
4-18	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	61	-	
4-19	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	69	-	
4-20	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	64	-	
4-21	カラシナ	埼玉県蓮田市	80	65	-	
4-22	カラシナ	埼玉県佐倉市	80	64	+ (1)	-

*1 + : 耐性個体有り (耐性個体数) - : 全て感受性

*2 - : PATタンパク質無し

港湾地域で採取された西洋ナタネについては、鹿島、名古屋、四日市から採集されたものの一部において耐性個体が検出された。ただし名古屋由来の種子で見つかった耐性個体は 1 個体だけであった。いっぽうカラシナでも耐性を示す個体が合計 3 個体認められたが、後述の免疫クロマトグラフ法による分析結果を考慮すると、これらは遺伝子組換え体ではなく、何らかの理由でたまたま生き残ったものであると推測される。

2.2.3 グルホシネート耐性実生のタンパク質、遺伝子分析

グルホシネート耐性を示した実生を、各系統につき 3 個体ずつ鉢植えし、生育させつつ、葉の組織を適宜サンプリングしてグルホシネート耐性タンパク質 (PAT: phosphinothricin-N-acetyltransferase) 及びグルホシネート耐性遺伝子 (*bar* 遺伝子) の分析を行った。タンパク質分析は、葉の一部を切取り、チューブ内ですりつぶした後、適宜水道水を加えて、ラテラルフローテスト (TraitChek, LL Test Kit, Strategic Diagnostic Inc., Newark, DE, USA) を用いた免疫クロマトグラフ法により行った (図 8)。遺伝子分析は、葉から抽出した DNA に対して、PCR 法による分析 (図 9) とその際増幅された DNA のシーケンス (塩基配列) を決定する方法により行った。PCR のプライマーには、*bar* 遺伝子内部の配列 5'-TCGTCAACCACTACATCGAGACA-3'、5'-GAAACCCACGTCATGCCAGTT-3' を用い、DNA のシーケンシングは、PCR による増幅産物を精製後 DNA シーケンサー (ABI3700) を用いて行った。それらの分析の結果、グルホシネート耐性を示した西洋ナタネのうち、調べた個体全てにおいて、PAT タンパク質の存在が確認された。また DNA の抽出が可能であった全ての個体において *bar* 遺伝子の存在が確認された (表 5-1)。これに対しグルホシネート耐性を示したカラシナの 3 個体からは PAT タンパク質が全く検出されなかったため、これらは遺伝子組換え体ではなく、何らかの理由でたまたま生き残ったものであると推測される。以上の結果から、グルホシネート耐性遺伝子組換え体もこれらの地域に生育していることが明らかになった。

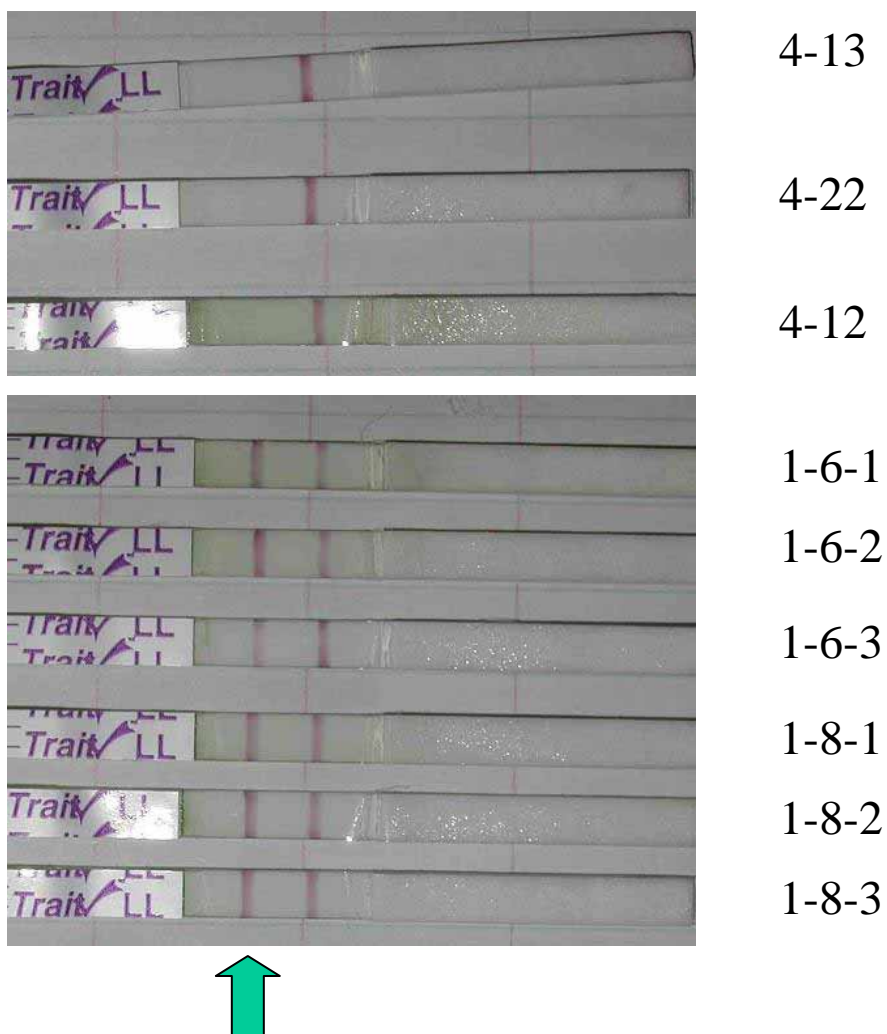


図8 免疫クロマトグラフ法によるグルホシネート耐性タンパク質 PAT の検出
 生育させた実生（試料番号 4-13、4-22、4-12、1-6-1～1-6-3、1-8-1～1-8-3）の葉から粗抽出液を調整し、PAT 特異抗体を用いた免疫クロマトグラフ法により PAT タンパク質の検出を行った。矢印：PAT タンパク質と反応した特異抗体のバンドの位置

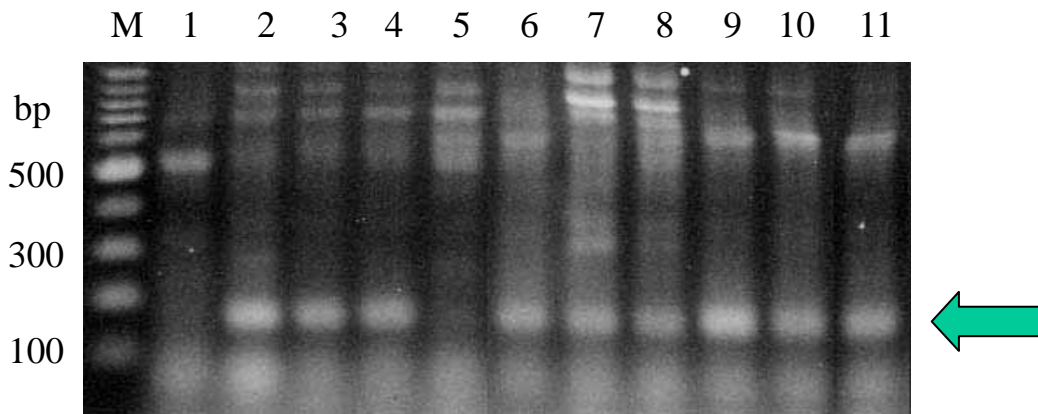


図9 PCRによるグルホシネート耐性遺伝子 (PAT) の検出
 ナタネ実生の葉からゲノム DNA を抽出し、PAT 遺伝子 を特異的に検出するプライマーを用いて PCR を行った。M : サイズマーカー、1 : 早生あぶらな、トキタ種苗、2 : 1-23、3 : 1-25-1、4 : 1-25-2、5 : 1-26、6 : 1-6-1、7 : 1-6-2、8 : 1-6-3、9 : 1-8-1、10 : 1-8-2、11 : 1-8-3、矢印 : PAT 由来の PCR 産物のバンドの位置

3. 考察

昨年度の本調査では、GMナタネは検出されなかった¹⁾が、農林水産省による調査により、鹿島港近辺においてGMナタネが検出され²⁾、その後市民団体の調査により四日市港や名古屋港付近等でも相次いで遺伝子組換え体が生育している可能性が報告された³⁾。そこで今年度は、これらの地域を含むいくつかの港湾地区からも西洋ナタネ、在来ナタネ及びカラシナの種子を採取し、調査の対象とした。その結果、調査を行った港湾地域のうち横浜港を除く鹿島港、千葉港、名古屋港、四日市港及び神戸港の周辺において除草剤耐性の組換え西洋ナタネの存在が確認された。これらの地域は、いずれもナタネの輸入港周辺であることから、食品加工用等に輸入されたGMナタネが輸送中等にこぼれ落ち、発芽、生育していたものであると考えられる。これらが一過的なものなのか何世代かを経て環境中に定着しつつあるのかは不明であり、今回生育が確認された地域を中心に今後も引き続き調査していく必要がある。

一方、バックグラウンドとして調査を行った河川敷等に生育している西洋ナタネ、在来ナタネ、カラシナには組換え遺伝子の移行は認められなかった。今後、このようなバックグラウンド地域にも組換え体が生育しているかどうか、関東周辺だけでなく範囲を広げて調査を行っていく必要があると思われる。

また、これまでの調査でナタネを含むアブラナ科の異なる植物種間での交雑は十分起こり得ることが知られており⁴⁾、今後在来ナタネやカラシナへの移入についても引き続き調査していく必要がある。

昨年度は採集されたナタネ種子から得られた実生の除草剤耐性試験を行い、その結果生き残った個体についてタンパク質または遺伝子解析を行うという方法で調査を行ったが、今年度はこれに加え、採集された種子の一部に対して直接免疫クロマトグラフ法によるグリホサート耐性タンパク質の分析も行った。これらの異なる方法によって得られた結果は完全に一致し、いずれの方法によっても調査は可能であることがわかった。種子に対する免疫クロマトグラフ法による解析の利点は、迅速、簡便に遺伝子組換え体の有無を解明できる点にあるが、組換え体の混入率を測定したり、導入遺伝子を同定するなどの詳細な解析を行うには、実生を用いる必要がある。今後これらの方法を、調査の目的や試料の形状、量などに応じて適宜使い分けて用いていくのがよいと思われる。

- 1) 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、独立行政法人国立環境研究所、平成 16 年 3 月
- 2) 農林水産技術会議事務局技術安全課「原材料用輸入セイヨウナタネのこぼれ落ち実態調査」、2004
- 3) 種子ネットワークホームページ
(<http://www007.upp.so-net.ne.jp/Seeds-Network/frame-new.htm>)
- 4) J. Messeguer, Gene flow assessment in transgenic plants, Plant Cell Tissue Organ Culture, 73, 201-212 (2003)