

エンバク・チオニン遺伝子を導入した組換えイネ系統CT2の 隔離圃場における特性調査および安全性評価試験

矢頭 治*¹・福本文良*^{1,2}・樋口博也*¹・大島正弘*¹・山元 剛*¹・
中島敏彦*¹・森 浩一*¹・岩井孝尚*^{3,4}・大橋祐子*³

目 次

I はしがき	107	5. 有毒物質産生性	116
II 材料と方法	109	6. 環境（生態系）への影響	117
1. 導入遺伝子	109	IV 考察	118
2. 隔離圃場での栽培	109	1. CT2とチヨホナミとの差異	118
3. 特性調査方法	110	2. 環境に対する安全性評価	119
III 結果	112	3. 病害抵抗性	119
1. 組換えイネの特性	112	4. 遺伝子変異および生理障害の除去	120
2. 形態特性および生育特性	113	摘 要	120
3. 生殖および稔性特性	115	引用文献	121
4. 雑草性	115	Summary	123

I はしがき

世界で最初に実用化された遺伝子組換え作物は、1994年に米国で実用化されたポリガラクツロナーゼ遺伝子アンチセンス配列を導入した日持ちのよいトマトで、その後、組換え作物の種類と栽培は急速に増加し、現在、ダイズ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ等で組換え品種が栽培されている。JamesによるISAAAのとりまとめ⁽⁵⁾によれば、商業的に栽培されている遺伝子組換え作物の栽培面積は、世界全体で2000年から2001年にかけて19%の増加があり、2001年に5,000万haに達した。2001年に栽培された遺伝子組換え作物の63%はダイズであり、トウモロコシが19%でこれに次いだ。

これらの組換え作物は海外ではすでに国際市場で取り引きされるようになり、食品の安全性、非組換え食品との分別、食品の表示、検出技術の高度化等が議論になっている。また、組換え作物の栽培による環境に対する影響についても国際的な問題となっており、組換え作物の栽培上での安全性問題は解決

したとはいえない。P. J. Dale⁽⁶⁾、A. A. Snow and P. M. Palma⁽¹⁰⁾、T. Midoro-Horiuti *et al.*⁽¹¹⁾、大澤⁽¹⁸⁾、R. Guy *et al.*⁽⁶⁾は、組換え作物の雑草化、他の作物との交雑による遺伝子の拡散または微生物との遺伝子の組換え、病虫害耐性の喪失、毒素産生性、アレルギー性等の問題を指摘している。わが国での組換え作物の食品としての商品化には、文部科学省の「組換えDNA実験指針」⁽¹⁴⁾、農林水産省の「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」⁽¹⁶⁾および厚生労働省の「食品衛生法」に基づく「食品、添加物等の規格基準」等において安全性の確認が義務づけられ、各種の安全性評価を行うことになっている。商業的栽培を目指した組換え体の育成にあたってはこのような安全性評価を適切に行うことは当然として、さらに導入遺伝子の発現が作物や環境に及ぼす種々の影響を把握する必要がある。

農林水産省農林水産技術会議事務局技術安全課の取りまとめによれば、これまでに国内に一般栽培の

平成14年10月4日受付 平成14年12月20日受理

*¹中央農業総合研究センター・北陸研究センター

*²北海道農業研究センター

*³農業生物資源研究所

*⁴宮城県農業・園芸総合研究所

ための安全性評価試験を終了した組換え作物は66系統である(2002年7月8日現在)。イネで一般栽培のための安全性評価試験を終了した系統は17系統あり、このうち除草剤耐性組換え系統が最も多く9系統あり、ウィルス病抵抗性組換え系統が4系統でこれに次いでいる。しかし、イネでは実際の商業的栽培が行われている系統はまだ無い。JamesによるISAAAのとりまとめ⁸⁾によれば、全世界で2000年に栽培された組換え作物の特性は除草剤耐性が77%であり、Bt遺伝子を利用した耐虫性が15%、除草剤耐性とBt遺伝子の組み合わせが8%、ウィルス耐性等のその他が1%以下となっている。このように、世界的には組換えイネの栽培は主要な統計に出ないほど少なく、日本国内でも組換えイネの栽培は行われていない。また、イネを始め、全ての作物で主要な育種課題となっている耐病性に関する組換え作物は、耐病性品種の育種・導入と同様に、農薬使用量の低減化、残留農薬の危険性の低下、環境負荷の低減化、低コスト化の効果等が期待されるもの

の、これまでに作成されて商業的栽培に供された組換え作物は少ない。しかし日本で最も重要な作物であるイネにおいて耐病性の特性を組換え技術によって導入することは、農薬散布による環境への負荷および農薬とその散布作業コストの軽減の観点から重要な課題である。

国内の水稲栽培では機械移植が導入されて以来、箱育苗が行われるようになった。これに伴い、催芽は加湿条件下で加温して行われるようになり、また育苗も健苗の育成をめざして高温・高湿度条件下で行われることになった。このため、1970年代半ば以降に、栽培現場で苗に感染する細菌病の発生が認められるようになってきた。この結果、イネもみ枯細菌病菌(*Bulkholderia gulumae*)によるもみ枯細菌病やイネ苗立枯細菌病菌(*Bulkholderia plantarii*)によるイネ苗立枯細菌病等が同定され、現在では育苗期の重要病害となっている。しかしながらイネには十分な抵抗性をもった品種は知られていない。一方、これらの細菌病の防除に有効な薬剤は少なく、薬剤処

表1 文部科学省および農林水産省の指針にもとづく安全性評価項目

調 査 項 目	閉鎖系温室	非閉鎖系温室	模擬的環境(隔離圃場)
I. 組換えイネの特性			
1. 導入遺伝子の存在様式、発現および遺伝			
1) エンバク・チオニン遺伝子の存在確認	○		
2) エンバク・チオニン遺伝子の発現確認	○		
2. 細菌病抵抗性	○	○	○
II. 形態特性および生育特性			
1. 形態特性	○	○	○
2. 生育特性	○	○	○
III. 生殖および総性特性			
1. 雌雄器官の形状			○
2. 花粉の形状	○		○
3. 花粉の飛散性・他家受粉性	○		○
4. 種子の総性	○		○
5. 種子の発芽率	○		○
IV. 雑草性			
1. 越冬性			○
2. 種子の休眠性・発芽性			○
V. 有毒物質産生性			
1. 産生物質の分析			
1) 生体内での有毒物質産生	○		
2) 大気中への有毒物質の放出	○		
2. 生育阻害効果			
1) 植物遺体の鋤込み試験		○	○
2) 栽培土壌での残留効果		○	○
VI. 環境(生態系)への影響			
1. 微生物相への影響(土壌微生物フローラ)		○	○
2. 昆虫相への影響			○
3. 雑草への影響			○
4. 周辺生物相			○
VII. 組換えイネにおけるアグロバクテリウム残留性	○		

理による完全な防除はできない。また使用される薬剤は育苗期に問題となっている糸状菌病防除剤と混用して用いるため薬害が発生しやすい。加えてこれら細菌病は発生が日和見であることも、対策を難しいものとしている。

Bohlmann, H. and K. Apel⁽⁹⁾はチオニン遺伝子が麦類をはじめ多くの植物種に存在し、抗菌活性をもつタンパク質を生産していることを確認した。そこで著者ら (T. Iwai *et al.*⁽⁷⁾) はエンバクから単離したチオニン遺伝子をイネに導入し高発現させたところ、隔離温室および非閉鎖系温室内での接種検定においてイネ苗立枯細菌病とイネもみ枯細菌病に対する抵抗性が向上したことを確認し、有望系統 (CT2) を選抜した。本試験ではこの組換え体系統 CT2 の安全性評価試験を中央農業総合研究センター北陸研究センターの隔離圃場で行った。この安全性

評価試験は農林水産省の「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」⁽¹⁰⁾にもとづき、表 1 に示す項目について行った。組換え作物の安全性評価結果は国内でこれまでも報告があり⁽¹⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾本試験でも安全性評価を主たる研究目的としたが、これに加えて CT2 の特性を詳細に検討することによって外来遺伝子の発現がイネに及ぼす影響を検討した。一方、遺伝子導入操作では必ずカルス培養操作が含まれているが、一般にカルス培養操作には突然変異誘発効果がある。また遺伝子導入操作中のアグロバクテリウムの感染、核内への遺伝子挿入、カルベニシリンによる除菌、ハイグロマイシン等の処理による組換え細胞の選抜手法等においては、いずれも細胞にストレスをかけ、結果として突然変異誘発効果をもつことが予想される。そこで、CT2 の遺伝子変異の可能性についても検討した。

II 材料と方法

1. 導入遺伝子

供試系統 (CT2) に導入されたエンバク・チオニン遺伝子は Iwai, T. *et al.*⁽⁷⁾ によってクローニングされた。Iwai, T. *et al.*⁽⁷⁾ はこの遺伝子の上流にプロモーターとして Mitsuhara, I. *et al.*⁽¹²⁾ が作成したカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターのエンハンサー領域を 7 反復とタバコモザイクウイルス (TMV) の Ω 配列およびファセオリン遺伝子のイントロンを含む高発現プロモーターを用い、下流には Nos ターミネーターを接続した。また選抜マーカーとして Mochizuki, A. *et al.*⁽¹³⁾ によるハイグロマイシン抵抗性遺伝子を有する形質転換ベクターを用いた。これをアグロバクテリウム法でイネ品種「チヨホナミ」に導入した。さらに Iwai, T. *et al.*⁽⁷⁾ は形質転換処理後に再分化させた組換え植物の T₀ 世代から T₂ 世代を用いて隔離温室および非閉鎖系温室内で細菌病に関する耐病性検定、個体評価・選抜、安全性試験を行った。これらの結果から組換え系統 CT2 を選抜し、T₂ 世代の 1 個体を自殖させて得られた T₃ 世代集団を、北陸研究センター隔離圃場での栽培特性試験および安全性評価試験に供試した。

2. 隔離圃場での栽培

北陸研究センターの隔離圃場はイネ組換え体の安

全性審査で求められる模擬的環境下での栽培を行うことを目的とした専用の圃場で、周囲は 1.8m のフェンスで囲まれ、南北 20m、東西 40m で面積 8a の 2 面の水田がある。

供試種子は風選および目視によって不稔種子と不良種子を除いた。殺菌剤溶液 (ベンレート T の 500 倍液) で室温 1 昼夜の殺菌処理を行った後、蒸留水に浸漬し、2 日間の室温での催芽処理を行った。発芽種子を 2001 年 4 月 16 日に系統播種用の条播き用苗箱 (共立社製) に播種した。播種後発芽器で出芽させ、播種 4 日後に、隔離圃場内のコンクリート床の上にビニールシートで保温した苗床に置床した。その後、移植までプール式育苗を行った。

本試験は隔離圃場の 2 面の水田のうち南側水田で行った。移植は 5 月 17 日に手植えて、18cm (南北列) × 30cm (東西行) の間隔での 1 本植えとした。生育調査区および雑草調査区として 10 本 × 10 本の 100 個体を 1 区画とし、「チヨホナミ」区と CT2 区を 1 対として各 3 対、計 6 対の調査区を設けた。他の調査区も同様に 18cm (列) × 30cm (行) の間隔での 1 本植えで行った。CT2 および「チヨホナミ」以外の水田部分は出穂期の大きく異なる水稻品種「日本晴」を栽培した。栽培は北陸研究センター高田圃場の慣行法にしたがい、基肥 4kg N/10a、追肥 2kg N/10a を施用した。

3. 特性調査方法

1) 組換えイネの特性

(1) イネ苗立枯細菌病, イネもみ枯細菌病, イネ褐条病抵抗性試験

イネ苗立枯細菌病, イネもみ枯細菌病およびイネ褐条病に対する組換え体の抵抗性検定は, 隔離圃場内のコンクリート上にブロックで仕切った苗床(約2×4m)を作り, ピニールで被覆した。日中は30℃を越えないように管理した。細菌による汚染もみは, 検定用種子を高濃度(10⁶~10⁸cfu/ml)のイネ苗立枯細菌 *Barkhorderia plantarii* (MAFF301723), イネもみ枯細菌 *B. glumae* (MAFF302554), イネ褐条細菌 *Acidovorax avenae* spp. *avenae* (MAFF301755) の各懸濁液に浸漬後, 風乾して作成した。抵抗性検定には, 汚染もみを1日間31℃で浸漬し, 園芸用の培上を詰めたプラスチック容器(10cm×20cm, 深さ5cm)に播種後, 31℃に保った陽光定温器に入れて3日間暗条件下で出芽させた。その後, 隔離圃場内の苗代で育苗し, 約3週間後までに数回の調査を行った。プラスチック容器には「チヨホナミ」とCT2のそれぞれ20粒×4条で各80粒を播種し, 両者が接した2条の40株は調査から除いた。1回の試験には3つの容器を用いて3反復とした。抵抗性の指標として発病株率と発病度を用いた。発病株率は感染率を評価するものとして, 発芽個体のうちの発病個体の割合を計算した。発病度は感染個体の病徴の程度を示すために用いた。イネ褐条病の病徴には葉鞘のわん曲(腰曲がり症)と中胚軸の異常伸長もあるが, これらの病徴からは個体別の適切な発病の判定が困難であったため, 本実験でのイネ褐条病の発病度としては同病の顕著な症状である褐色条斑と枯死株についてその発生割合で表した。またイネ苗立枯細菌病とイネもみ枯細菌病の発病度は, 腐敗枯死株の発病指数を5, 白化苗と葉鞘褐変苗を3, 無発病苗を0として, 以下の式で算出した。

$$\text{発病度} = \Sigma(\text{発病指数} \times \text{苗数}) \times 100 / (\text{供試苗数} \times 5)$$

(2) イネ白葉枯病抵抗性試験

イネ白葉枯病抵抗性検定のために, イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) の懸濁液を供試して噴霧接種検定と剪葉接種検定を行った。噴霧接種区では「チヨホナミ」およびCT2を18cm(個体間隔)×30cm(列間隔)の間隔で10個体×5列を

1区として2反復での栽培を行った。剪葉接種区では, 「チヨホナミ」, CT2およびイネ白葉枯病抵抗性遺伝子を持たない比較品種として「コシヒカリ」と「日本晴」を同様の間隔で10個体×1列の栽培を行った。噴霧接種は6月21日から7月16日の間に, 25℃で2日間培養したⅢA群菌(T7133)の懸濁液(約10⁶cfu)を2~3日おきに10回の日没後の噴霧を行った。発病調査は接種開始56日後と63日後に各区24株の各株の任意の止葉5枚の病斑面積割合を調査して病斑面積率を算出した。剪葉接種は, 7月23日に各区10株の各株の分けつを5つに分け, I A群菌(T7174), II群菌(T7147), III A群菌(T7133), IV群菌(H75373), V群菌(H75304)を各分けつ上位2葉に菌濃度約10⁷cfuの菌液を剪葉接種し, 接種21日後に病斑長を測定した。

2) 形態特性および生育特性

(1) 形態特性および生育特性

育苗期および移植後から登熟期まで生育特性および形態等を目視によって調査した。出穂期は各個体の最初の穂が出た個体が各区の概ね50%に達した日を目視で確認した。成熟期には稈長, 穂長, 穂数の調査を行った。生育調査区の全3区について各区100個体のうちの中央部の36個体について, 各個体の最長稈の地表面から穂首までを稈長, 穂首から穂の先端までを穂長として測定した。雑草調査区の個体から穂を採取し, CT2および「チヨホナミ」のそれぞれ20穂について一穂粒数, 種子稔性および穂長を測定した。

(2) 収量調査

生育調査区ではすべての個体を地表面から刈り取り, 収量調査に供した。刈り取った個体は, 風乾の後, 脱穀し, 藁重と籾重を測定した。籾は脱ふして粗玄米重を測定した後, 1.6~2.0mm目のふるいを通して, 玄米の粒厚別の玄米重を測定した。収量調査の結果は, 他のデータとの比較のために10a当たりの数値に換算した。

3) 生殖および稔性特性

(1) 生殖特性の調査

生殖特性を評価するために, 花粉の形状, 花粉稔性, 生殖器の形状, 他花受粉性, 種子稔性, 種子の発芽率を測定した。「チヨホナミ」とCT2の開花時に各3穂を採種し, 実体顕微鏡で花粉の形態および雌雄花器の形態を調査した。またこの葯から花粉を採

種しI₂-KIによる染色を行い、花粉内の澱粉が発色した花粉を稔性花粉として花粉稔性を調査した。種子稔性調査と種子の発芽率調査のために成熟種子を採種した。種子稔性の測定にあたっては玄米が概ね完熟している種子を稔実種子とした。また採取した種子およびこの種子の玄米を1.8mm目のふるいにかけて玄米のそれぞれ80粒について縦と横の長さを実顕微鏡で測定した。

(2)他花受粉性

隔離圃場の中にCT2を1株1本植えとして18cm(列)×30cm(行)の間隔で10列×10行の100個体を1区画として移植し、この区画の東西南北の四周を「チヨホナミ」個体で囲った。登熟後に四周の中央部の5個体の「チヨホナミ」から個別別に採種した。上記の種子を殺菌剤(1/500 w/w濃度ベンレート)溶液に室温で1昼夜の浸漬し、これを水道水で水洗いした後、蒸留水で湿潤状態に保ち室温で1昼夜の催芽処理を行った。この催芽種子を20cm×10cmの角型プラスチックシャーレにプラスチックメッシュを敷き、各シャーレ当たり200粒置いた。この角型シャーレに液体肥料溶液(1/500濃度ハイポネックス)と30 μg/mlハイグロマイシンを加えた培養液をシャーレ当たり50mlを入れ、27°Cで培養した。培養液を毎日交換し、約一週間の培養後に幼芽と根、または幼芽のみが伸長してきた個体を隔離温室内に移し、培養土を入れた栽培容器で栽培を続けた。この後、生存した苗の葉から核DNAを抽出し、チオニン遺伝子の塩基配列の一部(5'-ATGGGAAGTATCAAAGG-3'および5'-CAACTGATGCACGGACGATG-3')をプライマーとするPCRを行って、生存個体でのエンバク・チオニン遺伝子の有無を確認した。

4)雑草性

(1)越冬性

収穫後に刈株の残ったままの圃場を耕起しないで放置した。春の融雪後、雨水を利用した落水管理によって圃場を湿潤状態に保ち、刈株からの再生芽の出現を5月22日まで観察した。

(2)発芽・休眠性

休眠性の調査は、風乾させた収穫後2週間の種子を1昼夜室温で吸水させ、水をきった後にろ紙を敷いたシャーレに播種し、これを6日間室温で暗黒下に置き、発芽した種子の幼鞘の長さで階級に分けて

行った。発芽特性の調査は、収穫後約半年の種子に45°C 1週間の休眠打破処理をした後、1昼夜室温で水に浸漬し、ろ紙を敷いたシャーレに播種し、9日後に発芽種子数を計数した。

5)有毒物質産生性

(1)植物遺体の鋤込み試験

収穫直前の止葉を主に採取し、約1週間室温で乾燥後、1~3mmに裁断した葉を園芸培土に5%(W/W)の割合で混和し、鋤込み土壌として試験に供試した。生育阻害物質の影響は、プラスチック容器に50粒のプロッコリー(品種:ドシコ)を播種し、2~3週間後の根長、および地上部と地下部の乾物重を比較して判定した。

(2)イネ栽培土壌でのアレロパシーによる影響

「チヨホナミ」とCT2の栽培土壌を最高分けつ期(6月25日)、出穂期(7月27日)および収穫後(10月20日)にそれぞれ2箇所から採土し、風乾後砕土した土壌を2mmのふるいにかけて試験に供試した。発芽試験には、覆土がプロッコリーの発芽に及ぼす影響を回避するため、12cmシャーレに約40gの土壌を入れ、35mlの水を注ぎ、2枚の濾紙をのせた上に100粒のプロッコリーを播種し、5日後の発芽率で阻害を判定した。各試験は2反復で行った。生育阻害試験には鋤込み試験と同じ土壌サンプルを用い、また同様の設計でプロッコリー種子を播種し、播種14~18日後の根長を測定した。

6)環境(生態系)への影響

(1)微生物相(土壌微生物フローラ)への影響

CT2を栽培した時の土壌中の微生物相に及ぼす影響を調べるため、細菌・放線菌および糸状菌の生息数を調査した。微生物の測定は希釈平板法⁴⁾にもとづいて行った。20gの土壌に滅菌水を180ml加えて、500mlのフラスコで10分間、比較的強く振とうした上澄み液を10倍希釈液とし、糸状菌の調査ではローズベンガルとストレプトマイシンを添加した寒天培地に、細菌・放線菌の調査ではPTYG寒天培地を用いて段階希釈した液を塗布して菌数を定量した。一方、圃場から採集した土壌を105°Cで24時間乾熱処理後、飛散した水分量により補正し、菌数をcfu/g乾土で表示した。

(2)昆虫相の調査

「チヨホナミ」およびCT2の生育調査区で、最高分けつ期(6月25日)および開花期(7月28日)に直

径36cm, 柄90cmの捕虫網を用い, 各区で往復5回振ってすくい取り調査を行った. すくい取り後, 網をフリーザーに入れて捕獲した昆虫を殺し, 昆虫の個体数を目ごとに分けて計数した.

(3)雑草調査

「チヨホナミ」およびCT2についてそれぞれ1株1本植で18cm(列)×30cm(行)の間隔で移植した10列

×10行の100個体の区を対にして3区設け, 雑草調査区とした. 移植前の代掻き時に慣行栽培法に従い除草剤の撒布を行って移植前の雑草を駆除した. 移植後は無除草で栽培し7月13日に雑草をサンプリングし, 草種ごとに個体数の計数および乾物重の測定を行った.

Ⅲ 結 果

1. 組換えイネの特性

1) イネ苗立枯細菌病, イネもみ枯細菌病, イネ褐条病抵抗性試験

イネ苗立枯細菌病, イネもみ枯細菌病およびイネ褐条病に対するCT2の抵抗性検定試験をそれぞれ2回行い, 播種14日後の発病株率の平均を図1に示した. イネ苗立枯細菌病の場合, 「チヨホナミ」では88.6%, CT2では10.5%であった. 病徴の程度を示す発病度は「チヨホナミ」で71.1, CT2では8.6であった. 発病株率と発病度のいずれでもCT2にはイネ苗立枯細菌病に対する顕著な抵抗性が認められた. イネもみ枯細菌病では, 発病株率は「チヨホナミ」では62.5%, CT2では26.5%であった. 発病度は「チヨホナミ」で50.5, CT2で18.1であった. イネもみ枯細菌病に対するCT2の発病抑制の程度はイネ苗立枯細菌病の場合に比べて劣るものの, 明らかな効果が認められた. 一方, イネ褐条病の発病率は, 「チヨホナミ」では7.8%であり, CT2では7.0%であった. この試験では発病率が2回の試験でともに低かったが, この原因は, 個体別の判定が難しい病徴である葉軸のわん曲(腰曲がり症)と中胚軸の異常

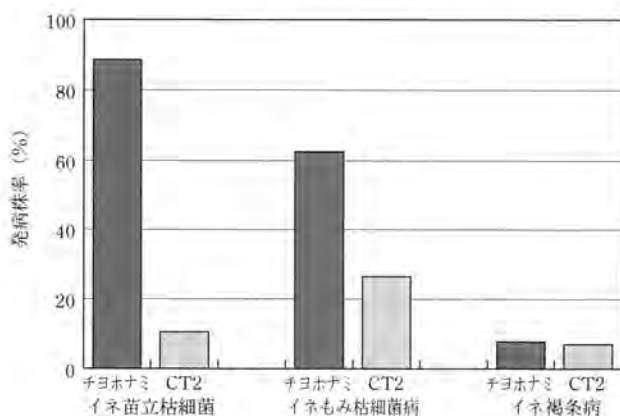


図1 チヨホナミおよびCT2の細菌病抵抗性

伸長を示す個体を除き, 褐色条斑を示す個体と枯死株のみ計数したことにある. 「チヨホナミ」とCT2の発病株率には差異がなく, CT2の発病抑制効果は認められなかった.

2) イネ白葉枯病抵抗性試験

イネ白葉枯病抵抗性検定について噴霧接種および剪葉接種の結果を図2に示した. 自然感染に近い噴霧接種法による検定では, 接種56日後および63日後で, 2反復区ともに, CT2が「チヨホナミ」に比べてやや高い病斑面積率を示した. 「チヨホナミ」は反復区間での差異はほとんど見られなかったが, CT2では反復区間での差異が大きかった. 噴霧接種では均一な接種は難しいため, 今回の検定においても再現性の高い結果を得るためには接種検定をさらに繰り返す必要があるが, CT2に抵抗性の向上は認

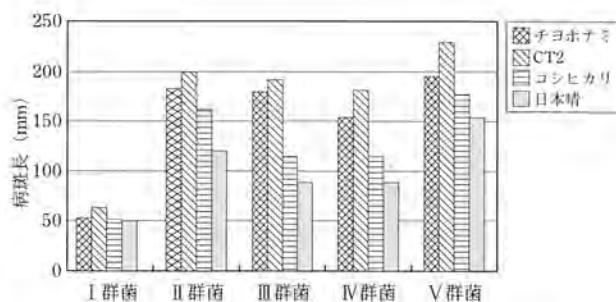
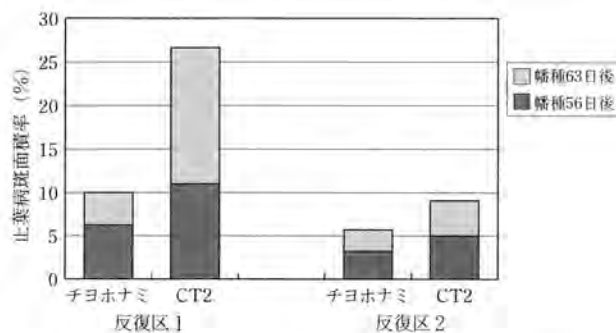


図2 チヨホナミおよびCT2のイネ白葉枯病抵抗性

められなかったと考えられる。菌系に対する効果を検討するために5種の菌群を用いて剪葉接種を行った。供試した基準品種の中ではいずれの菌群に対しても「チヨホナミ」が最も感受性が高く、「コシヒカリ」がこれに次ぎ、「日本晴」が最も感受性が低かった。CT2の場合、他の供試品種と同様に各菌群に対する特異的な抵抗性はみられず、すべての菌群で「チヨホナミ」よりやや長い病斑長を示した。

2. 形態特性および生育特性

1) 形態特性および生育特性

発芽は「チヨホナミ」およびCT2共に良好であった。幼苗は草型等にCT2と「チヨホナミ」で特段の差異は認められなかったものの、CT2では、やや色が濃く旺盛な生育の傾向がみられた。移植後から最高分け時期を経過し出穂期に到るまでは、草型や葉色等についてCT2は「チヨホナミ」と特段の差異は見られず、順調な生育を示した。

出穂期を観察したところ、生育特性調査区以外にもイネ白葉枯病抵抗性検定区等を含め、「チヨホナミ」と比較可能であった8区のうち、圃場条件にやや問題のあった1区を除いて「チヨホナミ」が7月27日、CT2がこれより2日早い7月25日であった。圃場条件に問題のあった1区は「チヨホナミ」と同じ7月27日が出穂期であったが、この区は圃場土面がやや低く、この区の個体の葉が濃緑色を呈していたことから、多肥条件になっていて出穂が遅れたと推定された。

成熟期の草型等の測定結果を表2に示した。CT2

表2 チヨホナミおよびCT2の圃場成熟期調査、収量調査の概要

項目	チヨホナミ	CT2	CT2矮性個体
	7月27日	7月25日	
稈長(cm)	79.8	76.9	61.9
穂長(cm)	20.2	20.1	18.5
穂数(本/個体)	17.4	18.9	10.2
一穂粒数	135.9	119.6	
種子稔性(%)	94.6	87.4	
籾長(mm)	7.39	7.47	
籾幅(mm)	3.42	3.28	
玄米長(mm)	5.23	5.42	
玄米幅(mm)	2.90	2.85	
千粒重(g)	20.4	21.1	
全重(kg/a)	147.2 (100%)	143.0 (97.1%)	
藁重(kg/a)	67.0 (100%)	67.8 (101.1%)	
籾重(kg/a)	70.9 (100%)	66.2 (93.4%)	
粗玄米重(kg/a)	55.9 (100%)	52.0 (93.0%)	
精玄米重(kg/a)	51.9 (100%)	47.1 (90.8%)	

の稈長は「チヨホナミ」と比較して3区の平均で76.9cmであり、「チヨホナミ」の79.8cmと比較して2.9cm低かった。穂長および穂数には差異は認められなかった。調査した3区のうち1区ではCT2の穂数が「チヨホナミ」の穂数よりやや多かったが、この区は前述の出穂が遅れた区であり、この区の圃場がやや多肥の傾向であったことが原因であると推定された。

出穂後のCT2の草型は穂揃いがやや悪いことが観察で判定できた。図3に示したとおり、CT2では個体内の稈長の揃いがやや悪かったが、これらの穂とは別にすべての個体で遅れ穂の様な稈長の短い穂があった。これらの穂の出穂期は遅れていなかったため、いわゆる「遅れ穂」ではない。これらの穂は穂長もやや短かく、短穂であったため、上記の稈長、穂長の測定では計測していないが、種子稔性が他の穂とくらべて低下が認められなかったため穂数には含めた。



チヨホナミ



CT2

図3 チヨホナミおよびCT2の登熟期の草姿

出穂後の登熟期後半には図4に示したようにCT2では葉に褐変が広がった。これらの褐変はその形状と色から判断して同時期の「チヨホナミ」の葉でも小さな斑点として見られ、成熟期以降の枯上がりの時期に大きくなっていく褐変と同質のものと考えられたが、CT2ではこの褐変は登熟期後半で葉全体に広がっていた。

CT2集団の中で矮性で不稔の個体が分離した。その個体の稈長、穂長および穂数を表2に、また草姿を図5に示した。これらの個体は草丈は61.9cm、穂長は18.5cm、穂数は10であり、いずれも「チヨホナミ」および他のCT2個体と顕著な差異があった。この個体の穂についての種子はほとんどが不稔種子であった。生育調査区以外の区も含めて7区で合計700個体を調査した結果、各区で0～3個体、全区の合計で12個体が見つかり、その出現率は1.71%で

あった。区間で出現頻度に明確な差異は無く、また他の個体との中間的な表現型の個体が無かったため、遺伝的な原因で出現した突然変異個体と考えられる。

2) 収量調査

生育調査区の個体を成熟後に刈り取り、収量調査を行い、その結果を表2に示した。脱穀後の藁重はCT2と「チヨホナミ」ではほぼ同じであったため、出穂までの生育量はCT2と「チヨホナミ」ではほぼ等しいと考えられる。籾重および粗玄米重では、CT2が「チヨホナミ」のそれぞれ93.4%および93.0%であり、「チヨホナミ」に対して6.7%から7.0%の低下がみられた。

玄米を1.6～2.0mmの縦目ふるいにかけて粒厚別の収量を調査した結果を表3に示した。「チヨホナミ」では2.0mm以上の粒厚の玄米が最も多かった



チヨホナミ



CT2

図4 チヨホナミおよびCT2の登熟期の葉



チヨホナミ

CT2



チヨホナミ

CT2 (矯正)

図5 チヨホナミ、CT2およびCT2から分離した矮性不稔個体の草姿

表3 チヨホナミおよびCT2の粒厚分布

ふるい目 (mm)	チヨホナミ(kg/a)	CT2(kg/a)
>2.0	31.1(55.8%)	11.7(22.6%)
2.0~1.8	21.4(38.3%)	35.4(68.1%)
1.8~1.7	1.4(2.4%)	2.5(4.9%)
1.7~1.6	0.9(1.7%)	1.1(2.1%)
1.6>	1.0(1.8%)	1.2(2.4%)
合計	55.7(100%)	52.0(100%)

が、CT2では1.8~2.0mmの粒厚の玄米が最も多かった。粒厚1.8mm以上の玄米を精玄米として精玄米収量を計算したところ、表2に示したとおり「チヨホナミ」では51.9kg/aで、CT2ではこれより9.2%少ない47.1 kg/aであった。

一穂粒数を表2に示した。「チヨホナミ」では135.9粒であったがCT2では119.6粒であり、CT2がやや少なかった。穂長はCT2と「チヨホナミ」とでほぼ同様であるので、「チヨホナミ」よりCT2は粒着密度がやや低いと考えられた。

種子と玄米の形状を比較するためにそれぞれの縦長および横幅を測定した結果を表2に示した。CT2では「チヨホナミ」の場合と比較して種子と玄米のいずれも縦長ではCT2がやや長く、横幅はやや短かった。縦横比を計算すると籾ではCT2で2.28、「チヨホナミ」で2.16、玄米ではCT2で1.90、「チヨホナミ」で1.80と、籾と玄米で共にCT2に長粒の傾向が見られた。

粒厚1.8以上の玄米を精玄米とし、これについて千粒重を測定した結果を表2に示した。「チヨホナミ」は20.4g、CT2は21.1gで、「チヨホナミ」よりやや大きかった。CT2では玄米長がやや長かったことが原因である他に、CT2では出穂期までの生産性は「チヨホナミ」と同じであったにもかかわらず穂数が「チヨホナミ」と差異が無い一方で1穂粒数がやや少なく、単位面積あたりの粒数が少なかったために千粒重がやや大きくなったものと考えられる。

3. 生殖および稔性特性

1) 生殖特性

穎花をサンプリングし、雄蕊、雌蕊、子房の外観を観察したところ、CT2と「チヨホナミ」の間で差異はみられず、CT2に異常形態は確認できなかった。葯長を測定したところ、CT2では1.97mm、「チヨホナミ」では2.04mmと、CT2の葯はやや小さかった。また、花粉をI₂-KI溶液で染色し澱粉が蓄積し

た花粉を稔性花粉として花粉稔性を測定したところ、CT2では96.48%、「チヨホナミ」では99.13%であり、CT2の花粉稔性はやや低かった。ただしCT2の花粉の外見に視認できるような特段の異常は認められず、この花粉稔性の低下の原因は不明である。

2) 他花受粉性

100個体のCT2を囲んで栽培した「チヨホナミ」について、CT2の東西南北に隣接する各5個体からそれぞれ5721、4424、5099および5085の種子を採種し、CT2の花粉を受粉して稔った交雑種子の検出を試みた。ハイグロマイシン抵抗性遺伝子をもたない「チヨホナミ」種子はハイグロマイシンを含有する培養液中では発根できず、幼芽も第1葉を出葉させる段階での幼芽長約1cmで成長が止まった。しかし予備試験では30 μg/mlのハイグロマイシン濃度では一部の「チヨホナミ」種子が幼芽を伸長させてくる場合もあったので、本試験ではこのようなエスケープ個体を除くために概ね第2葉以上まで成長の進んだ23個体の幼苗を選抜し、培養液を洗い流した後に、育苗用の培養土を入れたプラスチックポットに移植して隔離温室内で栽培を続けた。移植直後に枯死せず生存した個体から核DNAを抽出し、PCRでエンバク・チオニン遺伝子の存在を確認した。この結果、東、西、南に隣接する個体の種子中からそれぞれ、2、5、13個体のエンバク・チオニン遺伝子を持つ幼苗が見つかった。北に隣接する個体からは見つからなかった。この結果から、CT2から東、西、南および北で隣接する「チヨホナミ」への自然交雑率はそれぞれ、0.035%、0.158%、0.275%および0.000%と計算された。

4. 雑草性

1) 越冬性

3月の融雪後に前年の刈株からの再生芽の出現の観察を数回行い、最後の観察は5月22日であった。北陸研究センターでのイネの水田直播栽培は5月中旬から行われ、最後の観察日の5月下旬は気温、水温および地温もイネの発芽には充分である。隔離圃場内ではCT2とともに「チヨホナミ」「コシヒカリ」「日本晴」等の品種の栽培を行ったが、CT2を含めていずれの品種でも刈株からの再生芽は見られなかった。

2) 発芽・休眠性

収穫2週後の種子を吸水させ発芽処理をして休眠性の調査を行った結果を表4に示した。CT2もチヨホナミも他のイネ品種と同様に一定の休眠性があるため齊一な発芽はみられなかった。そこで発芽遅延も含めて計測するために、発芽処理開始約1週間後に幼芽の伸長で種子を区分して計数した。CT2での不発芽は4.8%、「チヨホナミ」での不発芽は4.0%と差異は認められなかった。最も発芽が早く幼芽が1cm以上まで伸長した区分の種子はCT2で41.5%、「チヨホナミ」で32.4%でややCT2が多かったが、5mm以上の伸長を示した種子を加えるとCT2で59.2%、「チヨホナミ」で60.5%であったため、発芽種子の数に大きな差異はないと考えられる。

表4 チヨホナミおよびCT2種子の休眠性

幼芽長	種子数	
	チヨホナミ (%)	CT2 (%)
1cm以上	81 (32.4)	103 (41.5)
5mm以上	67 (26.8)	47 (19.0)
5mm以下	92 (36.8)	86 (34.7)
不発芽	10 (4.0)	12 (4.8)
合計	250 (100.0)	248 (100.0)

収穫後約半年の種子に休眠打破処理を行い、発芽試験を行った結果を表5に示した。この試験ではCT2および「チヨホナミ」ともに休眠が認められず齊一な発芽がみられた。発芽処理開始後9日後では、不発芽種子はCT2で4.7%、「チヨホナミ」で3.0%、芽のみ出現した種子がCT2で1.5%、「チヨホナミ」で0.8%、芽と根が出現した健全な発芽種子はCT2で93.8%、「チヨホナミ」96.2%で、この結果から発芽率に差異は認められなかった。

表5 チヨホナミおよびCT2の発芽性

	種子数	
	チヨホナミ (%)	CT2 (%)
芽 + 根	577 (96.2)	578 (93.8)
芽のみ	5 (0.8)	9 (1.5)
不発芽	18 (3.0)	29 (4.7)
合計	600 (100.0)	616 (100.0)

5. 有毒物質産生性

1) 植物遺体の鋤込み試験

「チヨホナミ」およびCT2の乾燥葉を園芸培土に鋤込み、ブロッコリーの生育を比較した結果を表6に示した。鋤込み区でのブロッコリーの根長は、「チヨホナミ」とCT2ではそれぞれ49.2mmと45.0mmで

あり、差異は認められなかった。ブロッコリー1株当たりの地下部と地上部の乾物重の平均値は1.7gと1.6gおよび6.0gと5.5gであり、差異は認められなかった。

表6 チヨホナミおよびCT2植物遺体の鋤込みによるブロッコリーの生育阻害

鋤込み植物	根長(mm)	乾物重	
		地下部(mg)	地上部(mg)
チヨホナミ	4.9	1.7	6.0
CT2	4.5	1.6	5.5
鋤込み無し	5.6	1.5	5.2

2) イネ栽培土壌でのアレロパシーによる影響

イネ栽培土壌でのアレロパシーによる影響を評価するため組換え体栽培土壌でブロッコリー種子を発芽させた結果を表7に示した。最高分けつ期、出穂期および収穫後の土壌に播種したブロッコリーの発芽率は「チヨホナミ」では90.5%から97.0%であり、CT2区でも93.0%から97.0%であった。土壌を用いていない対照区では93.5%から98.0%の発芽率であり、いずれの処理区でも発芽率には差異がなく、CT2の栽培による影響はないと判断された。また、ブロッコリーの根長の調査結果を表8に示した。土壌の採取の時期によってブロッコリーの栽培期間が14日から18日の範囲で異なったため土壌採取時期ごとに根の伸長に差異があったが、各土壌採取時期での「チヨホナミ」区とのCT2との比較では、根の伸長に差異は認められなかった。

表7 チヨホナミおよびCT2栽培土壌でのブロッコリー種子の発芽率

土壌採取地区		6月25日 (最高分けつ期)	7月27日 (出穂期)	10月20日 (収穫期)
チヨホナミ	地点A	96.5	95.5	93.5
	地点B	90.5	97.0	95.5
CT2	地点A	93.0	97.0	97.0
	地点B	96.5	93.0	95.5
対照試験(土壌なし)		98.0	94.5	93.5

注) 数値はブロッコリー種子の発芽率を%で示す。

表8 チヨホナミおよびCT2栽培土壌でのブロッコリー幼苗の根長

土壌採取地区		6月25日 (最高分けつ期)	7月27日 (出穂期)	10月20日 (収穫期)
チヨホナミ	地点A	112	84	69
	地点B	117	109	81
CT2	地点A	108	102	74
	地点B	128	84	90

注) 数値はブロッコリー幼苗の根長を示す(mm)。

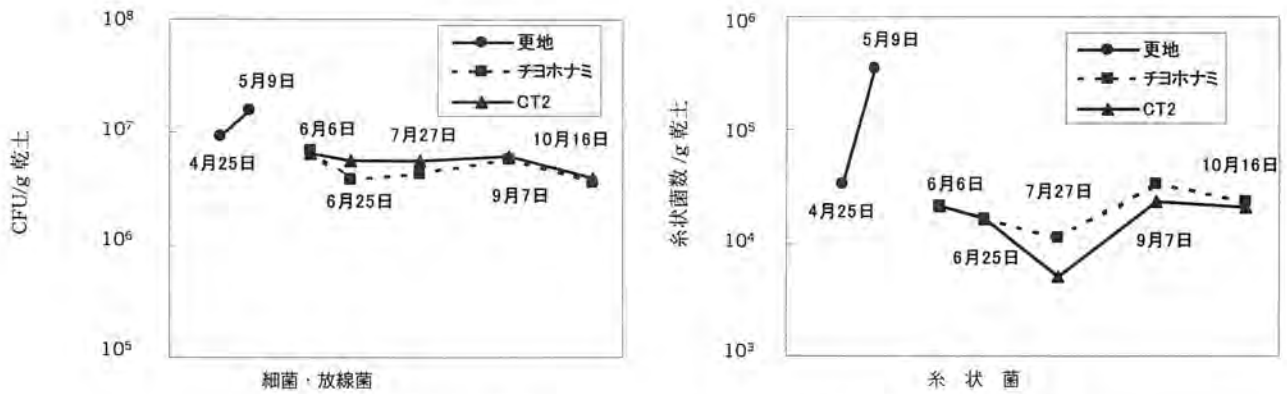


図6 チヨホナミおよびCT2の微生物相（土壌微生物フローラ）への影響

6. 環境（生態系）への影響

1) 微生物相（土壌微生物フローラ）への影響

田植え前に2回、田植え後に5回の採土をそれぞれ2地点で行い、細菌、放線菌、糸状菌の数を測定した結果を図6に示した。2地点のサンプルで放線菌および糸状菌の生息数にほとんど差がなかったため2地点の平均値を示した。田植え前には、気温と地温の上昇に伴って、菌密度が上昇した。その後、田植えのため湛水状態にすると、6月6日の調査結果が示すように菌密度は急激に低下した。田植え後の6月6日から収穫後の10月16日までの「チヨホナミ」とCT2での調査では、採土した時期による生息数の変化はあるものの、「チヨホナミ」とCT2の栽培土壌での微生物数に差異は認められなかった。

2) 昆虫相の調査

捕獲した昆虫数を目別に表9に示した。個体数は幼虫と成虫の合計値を示した。最高分げつ期では双翅目に属する昆虫の数が最も多く、半翅目がこれに次いだ。開花期では双翅目と半翅目に属する昆虫

表9 チヨホナミおよびCT2栽培区の昆虫相

目	最高分げつ期		開花期	
	チヨホナミ	CT2	チヨホナミ	CT2
カゲロウ目	0	0	0	1
トンボ目	1	6	0	0
直翅目	0	0	1	0
半翅目	31	30	164	164
アザミウマ目	3	1	3	2
鞘翅目	3	0	0	0
双翅目	332	295	133	156
膜翅目	1	4	8	3

注) 数値は各区で観察された昆虫の頭数を示す。

表10 チヨホナミおよびCT2栽培区の雑草

A. 発生個体数

反復区	I		II		III	
	チヨホナミ 本 (%)	CT2 本 (%)	チヨホナミ 本 (%)	CT2 本 (%)	チヨホナミ 本 (%)	CT2 本 (%)
タイヌヒエ	15 (100.0)	4 (26.7)	5 (100.0)	7 (140.0)	36 (100.0)	41 (113.9)
カヤツリグサ類	15 (100.0)	7 (46.7)	2 (100.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
コナギ	23 (100.0)	5 (21.7)	3 (100.0)	2 (66.7)	20 (100.0)	26 (130.0)
ホタルイ	3 (100.0)	1 (33.3)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
オモダカ	14 (100.0)	17 (121.4)	35 (100.0)	37 (105.7)	75 (100.0)	54 (72.0)
その他広葉雑草	249 (100.0)	352 (141.4)	86 (100.0)	99 (115.1)	248 (100.0)	363 (146.4)

B. 発生雑草乾物重

反復区	I		II		III	
	チヨホナミ g (%)	CT2 g (%)	チヨホナミ g (%)	CT2 g (%)	チヨホナミ g (%)	CT2 g (%)
タイヌヒエ	101.1 (100.0)	10.2 (10.1)	23.8 (100.0)	14.6 (61.3)	121.0 (100.0)	154.4 (127.5)
カヤツリグサ類	7.0 (100.0)	2.3 (32.7)	1.0 (100.0)	0.7 (69.4)	1.0 (100.0)	0.7 (69.4)
コナギ	7.6 (100.0)	2.4 (31.4)	3.2 (100.0)	0.5 (15.1)	12.1 (100.0)	11.4 (94.2)
ホタルイ	3.2 (100.0)	0.0 (0.0)	0.4 (100.0)	0.0 (0.0)	0.9 (100.0)	1.3 (145.5)
オモダカ	33.7 (100.0)	34.2 (101.4)	58.1 (100.0)	48.2 (83.1)	98.1 (100.0)	97.0 (98.9)
その他広葉雑草	21.0 (100.0)	8.1 (38.5)	2.9 (100.0)	3.3 (115.1)	8.4 (100.0)	6.8 (80.9)

の数がほぼ同数で最も多かった。最高分けつ期と開花期の両期において「チヨホナミ」区とCT2区での目別に分けた昆虫数に差異は認められず、両区に生息する昆虫相には差異は無いと考えられる。

3) 雑草調査

雑草調査区では移植後に無除草とし、発生する雑草を調査した結果を表10に示した。試験圃場は前年まではほぼ完全な除草を行っていた圃場だったため、土壌中の雑草種子は少なかった。このため、わずかに残存した種子から雑草が発生し、各種雑草の

発生は均一でなく、調査圃場内で偏りがみられた。特に発生数の少ない雑草では、調査区間での発生数の偏りが大きかった。「チヨホナミ」区とCT2区で雑草の発生に個体数および乾物重ともに差異がみられる区もあったが、圃場設計から判断して圃場の端に近い区（I区の「チヨホナミ」、III区のCT2）で雑草の発生が多いという傾向がみられた。これらの結果を判断して、CT2と「チヨホナミ」各栽培区では、雑草の発生には明確な差異は認められないと考えられた。

IV 考 察

1. CT2とチヨホナミとの差異

幼苗期にはCT2は「チヨホナミ」よりやや旺盛な生育を示した。CT2では後述のように幼苗期での細菌病抵抗性を示すため、苗箱での病原菌の自然感染が抑制されていた可能性も考えられるが、この他に遺伝的変異の可能性もあり、本実験の範囲ではCT2の幼苗期でのやや旺盛な生育の原因は特定できない。

移植から出穂までの生育期間にはCT2と「チヨホナミ」に差異は認められなかったが、出穂期はCT2で2日早かった。外来遺伝子の恒常的高発現の影響としては外来タンパク質を多量に産生することによる生育遅延や生育抑制等が予想される。また、外来タンパク質が抗菌性等の生物細胞に対する抑制的な生理活性を持っている場合、イネ細胞に対しても生理活性障害等による抑制的な効果をもつ可能性も考えられる。このような生育の抑制や生理障害が発生していたと仮定すると、出穂期前にも種々の障害が観察されると考えられるが本試験ではそのような発現は観察されなかった。また、このような障害による出穂期の早期化であれば、その障害の発生が個体内での量的な反応であるため、集団内での出穂期の個体差が増大すると考えられるが、今回の圃場での観察ではそのような傾向も認められなかった。したがってこの出穂期の早期化は導入遺伝子による生理障害ではなく、遺伝子導入操作に伴う突然変異に起因する可能性が高い。しかしこれを明らかにするためには戻し交配等によって導入遺伝子と出穂期の変異の遺伝的な関連を調査する必要がある。

CT2の穂揃いはやや悪く、また遅れ穂のような程

が短くまた穂長の短い穂がみられた。このような現象は穂の形成または出穂を抑制する方向の変異であるため外来タンパク質の高発現の影響である可能性も考えられるが、今回の隔離圃場試験の結果のみでは判定できない。この判定にも戻し交配等による導入遺伝子と穂揃い変異の遺伝的な関連を調査する必要がある。

CT2では1.7%という低い分離比で矮性・不稔の個体が分離した。今回の隔離圃場試験では100個体の栽培区を7区設けたが、そのすべての区でこの種の個体の出現が観察された。このような個体は隣接して出現せず、隔離圃場内に離れて配置した全ての区で比較的一様に出現し、また同じ圃場の他品種では認められなかった。この種の個体と通常型の個体との中間型の個体は無かった。このため、この個体の出現は環境変異による表現型変異や病原菌等の感染による病徴ではないと考えられる。このような出現の様式を考慮するとこの変異は突然変異に由来する遺伝変異と考えられる。前世代の1個体に由来する集団で劣性ホモ突然変異個体の分離比が1.7%であることは通常のメンデル遺伝からは説明ができないが、この個体が不稔であること、CT2の花粉総性が「チヨホナミ」よりやや低いこと、CT2の種子総性が「チヨホナミ」よりやや低いこと等を考慮すると、この突然変異遺伝子をもつ配偶子が授精競争等で排除されるような機構が考えられる。これについては、今後、個体選抜を継続し遺伝の状況を観察することで確認する予定である。

登熟期の後半でCT2個体では葉に褐色斑点が多量に発生した。同様の斑点は同時期の「チヨホナミ」

にもわずかに見られたがCT2ではその量が多かった。この斑点はCT2の全個体に見られた。この原因は本試験だけでは判断できないが、CT2の全個体に一樣に見られたこと、またCT2と同様に恒常的高発現プロモーターで発現させたイネ・キチナーゼ遺伝子を導入したイネを隔離圃場で栽培したところ類似した褐色斑点が栽培終期の登熟期に見られた(矢頭ら、未発表)ことから、この現象は遺伝変異ではなく外来遺伝子の高発現の影響である可能性が高いと考えられる。

CT2の玄米収量は「チヨホナミ」より約1割少なかった。特に、充実した玄米が減少していた。一方、成長期間の生育量を示す成熟期での藁重はCT2と「チヨホナミ」では差異が見られなかったため、登熟期まではCT2の生育は「チヨホナミ」と差異がなかったものと考えられる。したがってCT2の玄米収量の減少は玄米が充実する登熟期に植物体の同化活性が低下したことを示している。これは登熟期後半に葉に褐色斑点が発生したことと一致するため、褐色斑点の発生による葉の活性低下に伴って植物体の全体の活性が低下し、玄米の充実が劣ることになったと考えられる。

CT2に導入したエンバク・チオニン遺伝子は改変した35Sプロモーターを用いて恒常的に高発現となるように形質転換ベクターを構築しており、Iwai, T. *et al.*⁽⁶⁾らの調査ではエンバク・チオニン遺伝子導入系統での導入遺伝子産物は子葉鞘で生体重1gあたり最大で100 μ gにもなっていた。外来タンパク質を細胞内で大量に産生することは、そのタンパク質の抗菌性の生理活性を別としても、細胞に少なからぬ負荷をかけると考えられる。しかしながらCT2では植物体の乾物生産量は減少せず、充実した玄米の収量が約1割の減少となったにとどまった。したがってこのチオニン遺伝子の高発現自体は植物体に大きな影響を与えていないと推定される。しかし導入遺伝子によるタンパク質の発現を、恒常的高発現ではなく組織特異的または誘導的な発現となるように、また発現量も病害抵抗性を発揮するのに必要最低量となるように制御することによって、導入遺伝子の発現が組換え植物の生産性に影響をほとんど与えないようにすることが可能であると考えられる。

2. 環境に対する安全性評価

今回の隔離圃場試験では、農林水産省の指針⁽¹⁶⁾に示された環境に対する一連の安全性試験を行った。「チヨホナミ」との比較において、前述のとおり出穂期、穂揃い、収量、登熟期に出現する褐色斑点、玄米重・形態等で差異が認められたが、これらを除くと花粉稔性と種子稔性にわずかな差異が認められたのみであり、直接的に環境に影響のある特性の調査として行った有毒物質の産生性、土壌微生物相、雑草の調査、昆虫相の調査等では「チヨホナミ」との差異は認められなかった。

CT2の花粉による自然交雑率は出穂期がほぼ同じである「チヨホナミ」の隣接個体で0%~0.28%であった。一般に*japonica*品種である国内品種の自然交雑率はイネ近縁野生種の*Oryza glabberima*, *indica*型イネ、熱帯型*japonica*イネ品種と比べて低いといわれている。OECDのイネに関するコンセンサス文書⁽¹⁷⁾に記載されている*Oryza*属の自然交雑率は0~55.9%であり、また*Oryza sativa*の自然交雑率は0~3.6%である。本試験で得られた自然交雑率は、開花期と稈長がほぼ同じ品種に対する交雑という自然交雑に好適な条件下にあったにもかかわらず、*Oryza*属の中で、また*Oryza sativa*の中でも、最も低いグループに属するものであった。

3. 病害抵抗性

本試験で供試したCT2系統は、細菌病抵抗性イネ系統を作出する目的で細菌病に対する抗菌性タンパク質であるチオニンタンパク質をコードする遺伝子をイネに導入したものである。Iwai, T. *et al.*⁽⁷⁾は温室内でCT2の細菌病抵抗性検定を行い、幼苗段階でのイネもみ枯細菌病およびイネ苗立枯細菌病に対する抵抗性を確認した。本試験では隔離圃場内に設置した苗代で通常の育苗に近い状況で検定を行ったところ、温室内検定と同様にイネもみ枯細菌病およびイネ立枯細菌病に明確な抵抗性が確認できた。しかし、これらと同様に細菌による育苗期の病害であるイネ褐条病菌に対する抵抗性は認められなかった。また本試験ではイネ白葉枯病抵抗性検定試験を自然感染に近い噴霧接種検定と抵抗性検定の定法である剪葉接種検定によって行ったが、いずれの場合にも調査の範囲では病徴が原品種よりやや多い傾向が見られた。この結果がCT2の抵抗性の低下を示すもの

であるかどうかは今回の検定の範囲では確認できないが、少なくとも抵抗性の向上は認められないと考えられる。

Iwai, T. *et al.*⁽⁷⁾は、イネ苗立枯細菌が種子伝染によって苗が感染するとまずイネの子葉鞘の細胞壁に接するが、CT2では細胞壁に塩基性タンパク質であるチオニン蛋白質が吸着しているためCT2の幼苗が抵抗性を発揮すると推定した。

田部井⁽⁸⁾はイネ白葉枯病は、種子伝染はせず、本田の灌漑水系によって水媒伝染し、葉の排水組織の水孔からイネの体内に侵入し導管を經由して体内に広まることを報告した。CT2がイネ白葉枯病に対して抵抗性をもたなかったことの原因としては、チオニン遺伝子の抗菌性特性の差異の可能性の他に、菌のこのような感染機構が要因である可能性も推定される。

一方、イネ褐条病菌の感染経路はイネもみ枯細菌病およびイネ立枯細菌病と同じと考えられるため、CT2で抵抗性が認められなかったことは菌の感染や病原性の特徴と抗菌タンパク質であるチオニンとの相互関係の結果と考えられるが、詳細な原因は不明である。

4. 遺伝子変異および生理障害の除去

供試したCT2では低い頻度で不稔で矮性の個体が分離した。前述のとおり、これは導入遺伝子とは関係のない培養突然変異であると推定されるため、今

後の系統選抜で容易に除去できると考えられる。出穂日、穂揃い等の変異については、培養突然変異の可能性が推察されるものの、戻し交配等の方法によって導入遺伝子との関連を調査する必要がある。これらの目的で、現在、戻し交配と後代検定を進めている。

CT2が抵抗性を示したイネ苗立枯細菌病およびイネもみ枯細菌病は種子伝染性であり、保温した育苗床では汚染種子からの2次感染で被害が助長されることを門田⁽⁹⁾、畔上⁽¹⁾、内藤⁽¹⁵⁾および後藤⁽⁶⁾が確認している。このため、これらの防除の目的ではエンバク・チオニン遺伝子を発芽時の子葉鞘でのみ特異的に高発現するプロモーターの支配下このエンバク・チオニン遺伝子を接続し、幼苗期のみ抵抗性を発現させるような導入ベクターの設計が効果的だと考えられる。本試験でみられたCT2の登熟期後半の葉の褐変、収量低下は導入遺伝子の本田での高発現の影響である可能性が高いため、生育段階特異的に発現させることで、このような障害をさけることができると期待できる。これらの病原菌は、苗箱で感染した苗の移植ともなって水田に運ばれた菌が、水田で他の様に感染し増殖し、開花期にもみに侵入することによって種子伝染する。このため、幼苗期に十分な抵抗性を与えることで水田での感染も十分に抑制できると考えられる。このような目的で、エンバク・チオニン遺伝子を新たな形質転換ベクターに組み込み、組換え体の育成を行っている。

摘 要

エンバク・チオニン遺伝子を導入した組換えイネ系統 (CT2) について、隔離圃場で特性調査および環境に対する安全性評価試験を行った。チオニンは細菌に対する抗菌活性をもつタンパク質で、組換え系統CT2は水稻品種「チヨホナミ」に恒常的高発現プロモーターの支配下にエンバク由来のチオニン遺伝子を高発現するようにした系統である。これまでの温室内試験と同様にCT2は隔離圃場でイネ苗立枯細菌病に対する抵抗性が顕著であり、イネもみ枯細菌病にも効果が認められたが、イネ褐条病とイネ白葉枯病には効果はなかった。農林水産省が定めた指針に基づく環境に対する安全性評価項目のうち、有毒物質産生性、雑草性および環境 (生態系) への影

響に関する試験項目では、CT2は「チヨホナミ」と差異は認められなかった。したがってCT2の栽培が環境に与える影響は原品種を栽培した場合と同様と考えられる。一方、CT2は「チヨホナミ」に比べて出穂期が2日早く、稈長がやや短く、玄米がやや長粒、千粒重はやや重く、種子稔性がやや低く、玄米収量がやや低下する等、形態特性、生育特性および生殖・稔性特性の一部にわずかな差異が認められた。各特性の調査からこれらの差異の一部は形質転換操作に伴う突然変異と考えられ、また導入遺伝子の効果と考えられた。これらの差異は環境へ影響を及ぼすものではないので、安全性評価結果には影響はないと考えられる。

引用文献

1. 畔上耕児 (1999) イネ苗立枯細菌病. 種子伝染病の生態と防除. 日本植物防疫協会, 133-135
2. Bohlmann, H. and K. Apel (1991) Thionins, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Brigs, W. R., R. L. Jones, and V. Walbot, eds., Annual Reviews Inc. USA, 227-240
3. Dale, P. J. (1997) Potential impacts from the release of transgenic plants into the environment. Acta Physiologiae Plantarum, 19(5), 596-600
4. 土壤微生物研究会編 (1979) 土壤微生物実験法, 養賢堂, 469p.
5. 後藤孝雄 (1991) イネもみ枯細菌病. 作物の細菌病. 日本植物防疫協会, 118-120
6. Guy, R., D. Yvette. and C. Yvonne (2000) Transgenic crops and environment. Comptes Rendus de L'Academie D'Agriculture de France, 86(7), 57-65
7. Takayoshi, Iwai, H. Kaku, R. Honkura, S. Nakamura, H. Ochiai, T. Sasaki and Y. Ohashi (2002) Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall bound thionin, Molecular Plant-Microbe Interaction 15, 515-521
8. James, Clive (2001) Global review of commercialized transgenic crops : 2001 (Preview), ISAAA, Ithaca, NY USA, 1-20
9. 門田育生 (1999) イネ褐条病. 種子伝染病の生態と防除. 日本植物防疫協会, 131-133
10. 小森貞男・深町浩・真岡哲夫・日高哲志・小川一紀 (2002) パパイアリングスポットウイルス外被タンパク遺伝子を導入した組換えパパイアの隔離圃場における環境に対する安全性評価. 育種学研究 4, 137-145
11. Midoro-Horiuti, T., E. G. Brooks and R. M. Goldbulm (2001) Pathogenesis-related protein of plants as allergens. Annals of allergy, Asthma and Immunology, 87, 261-271
12. Mitsuhashi, I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki and Y. Ohashi (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Plant Cell Physiology 37, 49-59
13. Mochizuki, A., Y. Nishizawa, H. Onodera, Y. Tabei, S. Toki, Y. Habu, M. Ugaki and Y. Ohashi (1999) Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl. 93, 173-178
14. 文部科学省 (2002) 組換えDNA実験指針, 文部科学省, 平成14年1月31日文部科学省告示第5号
15. 内藤秀樹 (1999) イネもみ枯細菌病. 種子伝染病の生態と防除. 日本植物防疫協会, 135-138
16. 農林水産省 (1996) 農林水産分野における組換え体利用のための指針, 農林水産省, 平成9年11月5日付け9農会第2000号農林水産事務次官依命通達.
17. OECD (1999) Consensus document on the biology of *Oryza sativa* (rice), Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 14, 1-52
18. 大澤勝次 (1999) 遺伝子組換え食品の安全性論議. 育種学研究, 1, 249-255
19. Snow, A. A. and P. M. Palma (1997) Commercialization of transgenic plants : Potential ecological risks. BioScience, 47(2), 86-96
20. 田部井英夫 (1991) イネ白葉枯病. 作物の細菌病. 日本植物防疫協会, 114-118
21. 田部井豊・大澤勝次・西村繁夫・花田薫・吉岡啓子・藤沢一郎・中島卓介 (1994) CMV外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの閉

- 鎖系温室及び非閉鎖系温室における環境に対する安全性評価(I) *Breeding Sci.* 44, 101-105
22. 田部井豊・大澤勝次・西村繁夫・藤沢一郎・渡辺紳一郎・土屋健一・吉岡啓子・中島阜介 (1994) CMV外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの閉鎖系温室及び非閉鎖系温室における環境に対する安全性評価(II) *Breeding Sci.* 44, 207-211
23. 多田雄一・山田実・澤田倫平・佐本四郎・松田幹・安達貴弘・中村良・高橋正昌・藤村達人・島田浩章 (1996) 16kアルブミンに対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネの環境に対する安全性評価(I) *育雑*46, 403-407
24. 多田雄一・原田二郎・松村雄・山田実・松田幹・安達貴弘・中村良・高橋正昌・藤村達人・島田浩章 (1997) 16kアルブミンに対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネの環境に対する安全性評価(II) *育雑*47, 77-81

Evaluation of Agronomic Traits and Environmental Risk of a Transgenic Rice Line, CT2, with an Oat Thionin Gene in an Isolated Paddy Field.

Osamu Yatou^{*1}, Fumiyooshi Fukumoto^{*1*2}, Hiroya Higuchi^{*1},
Masahiro Oshima^{*1}, Tsuyoshi Yamamoto^{*1}, Toshihiko Nakajima^{*1},
Koichi Mori^{*1}, Takayoshi Iwai^{*3*4} and Yuko Ohashi^{*3}

Summary

A transgenic rice line, CT2, was evaluated for its agronomic traits and environmental risk in the isolated paddy field of Hokuriku Research Center, National Agricultural Research Center. CT2 was a transgenic rice line with an oat thionin gene which encodes an anti-bacterial protein, thionin. The cloned thionin gene was connected with a constitutive high-expression modified CaMV 35S promoter and introduced to a rice cultivar "Chiyohonami" by Iwai T. *et al*⁽⁷⁾. The transformants had been evaluated for their resistance to bacterial disease in an isolated green house, and were shown to contain improved resistance against *Burkholderia glumae* and *Burkholderia plantarii*. A transgenic line, CT2, was selected among the resistant transformants based on its normal growth in the isolated green house for the field performance test of this report.

In this evaluation in the isolated paddy field, CT2 showed the obvious resistance against *B. glumae* and *B. plantarii*, as the previous evaluation in the isolated green house. However, the resistance against another bacteria, *Acidovorax avenae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, was the same degree as in the original cultivar.

In the risk evaluation, there were not any difference between CT2 and the original cultivar in traits, whose alteration could affect the possibility of escape to natural environment and the effect to surrounding ecosystem. Therefore the environmental effect resulted from the cultivation of CT2 would be the same as of the original cultivar.

In some agronomic traits, CT2 showed several slight differences to the original cultivar. The heading date was 2 days earlier than the original cultivar, the plant height was slightly lower, grains had slightly longer shape, grain weight was slightly larger, seed fertility was slightly lower, and grain yield was 10 % lower. Based on the analysis of the observation of these traits, some of these differences were considered to be the results of mutations which were induced during the transformation procedure and the other differences might be caused by the intensive expression of the introduced gene. However, these difference found here might not lead to the difference in the environmental effect of CT2 and the original cultivar, because the differences were small and in every traits CT2 had lesser biological activity. Therefore, even with these slight differences, the environmental effect of CT2 would

Received : 20 December, 2002

*1Hokuriku Research Center, National Agricultural Research Center

*2National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

*3National Institute of Agrobiological Sciences

*4Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center

not be different to the original cultivar.

To remove the disadvantage of constitutive high-expression of an alien protein, thionin, in rice cell, use of a promoter which confers coleoptile specific high-expression would be ideal, resulting a high level of resistance in the coleoptile whichh is the target organ of the bacteria.