

サテライトRNA遺伝子の導入による キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第2報 組換えトマトの形態・生育特性と環境に対する安全性評価

岩崎 真人¹⁾・伊藤喜三男²⁾・河辺 邦正³⁾・杉戸 智子⁴⁾・
新田 恒雄⁵⁾・瀧川 重信⁶⁾・伊藤 清光⁷⁾・中田 唯文³⁾・
小川 恭男⁸⁾・早野由里子⁹⁾・福本 文良⁹⁾

I. 緒 言

トマトでは、*Cucumber mosaic virus* (CMV) をはじめ、*Tobacco mosaic virus* (TMV), *Potato virus X*, *Potato virus Y*, *Tomato leaf curl virus*等によるウイルス病が発生 (日本植物病理学会, 2000) している。とりわけ、CMVは宿主範囲が広く、アブラムシで伝搬されるため、野菜、花き等の多くの農作物に発生する重要なウイルスである。TMVによるモザイク病の防除は抵抗性遺伝子を持つ品種の開発によって効果をあげているが、CMVには抵抗性を示す遺伝資源がないため、これまで薬剤によるアブラムシの防除や幼苗時にCMV弱毒株を接種することによる防除等が行われてきた。

CMVには、複製機能をCMVに依存する低分子のサテライトRNAが存在することがあり、感染植物の病徴やウイルスの増殖に影響することが知られている (ROOSSINCK et al., 1992)。YOSHIDA et al. (1985) は、サテライトRNAの置換によって弱毒CMVを作出し、トマトの病徴軽減にサテライトRNAが作用することを明らかにした。さらに、野外の各種植物から分離したサテライトRNAをCMV-Pに置換し、CMVの弱毒株を改良した (吉田ら, 1992)。また、本弱毒株の予防的接種によりCMV感染によるトマト条斑病が防除できることを実証した (本田ら, 1993)。しかし、弱毒ウイルスによるウイ

ルス病の防除では、一作毎のトマトへの予防的接種には手間と時間がかかるという弱点がある。そこで、この弱点を克服するため、遺伝子組換え技術でサテライトRNAをトマトに導入することが試みられた。その結果、固定品種「秋玉」にCMV弱毒サテライトRNAsat55-1を導入した「No.4-7系統」(以下No.4-7と略記)が作出され、これがウイルス抵抗性を保持していることが証明された (河辺ら, 2002)。

1986年、POWELL-ABEL et al. (1986) は、TMVの外被タンパク質遺伝子を導入することによってTMV抵抗性タバコを作出した。遺伝子組換え技術は多くの植物に応用され、1994年に米国で日持ちの良いトマトが実用化された。同様に、除草剤抵抗性、害虫抵抗性、ウイルス抵抗性等が付与されたダイズ、トウモロコシ、ナタネ、ワタ等が商業的に生産され、それらの栽培面積は1996年から2003年の8年間で40倍に急増し、2003年には6,770万haで組換え作物が栽培されている (JAMES, 2004; 田部井, 2004)。

わが国では、2001年4月からの遺伝子組換え食品表示制度の施行を契機に、食品の安全性に関する議論が活発になった。わが国は、ダイズ、トウモロコシはアメリカに、ナタネはカナダからの輸入に依存している。輸入への依存率が高いことから、消費者の選択性、遺伝子組換え食品の表示基準、非組換え体との分別輸入、検出技術などが話題となった (日野, 2004; 大澤, 1999; 「食の科学」編集部, 2004)。また、組換え作物の栽培面での安全性では、非組換え作物との交雑による遺伝子の拡散、組換え作物の雑草化、導入遺伝子の微生物への組換え、毒素産生性などが世界的に懸念されている (BARTON and DRACUP, 2000; DALE, 1997; GUY et al., 2000; MESSEGUER JOAQUIMA, 2003; NIELSEN et al., 1997; SNOW and PALMA, 1997)。

平成16年9月16日 原稿受理

¹⁾ 元北海道農業試験場生産環境部ウイルス病研究室 (故人)

²⁾ 元作物開発部 首席研究官

³⁾ 国際農林水産業研究センター 沖縄支所

⁴⁾ 生産環境部 土壌特性研究室

⁵⁾ 東北農業研究センター 畑地利用部

⁶⁾ 畑作研究部 品質制御研究チーム

⁷⁾ 生産環境部 虫害研究室

⁸⁾ 農業環境技術研究所 生産環境安全部 植生研究グループ

⁹⁾ 生産環境部 ウイルス病研究室

わが国では食用として商品化が認められている組換えトマトはないが、2003年10月段階では一般圃場での栽培が可能なトマトは6件であり、この中には、わが国の組換え作物第1号のTMV抵抗性トマト(浅川ら, 1992)やCMV抵抗性トマト(田部井ら, 1994a, 1994b)が含まれている。

本報告は、CMV弱毒サテライトRNAsat55-1を導入したトマト「No.4-7」の安全性評価試験を文部科学省の「組換えDNA実験指針」(文部科学省, 2002)および農林水産省の「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」(農林水産省, 1996)に基づいて、北海道農業研究センターの閉鎖系温室、非閉鎖系温室および模擬的環境利用(隔離圃場)で、1993年7月から2000年3月まで行われた結果をまとめたものである。なお、これらの試験は、「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(カルタヘナ法)」が2004年2月に施行される以前に実施された。

II. 材料および方法

1. トマト品種およびサテライトRNA遺伝子導入組換えトマトとキュウリモザイクウイルス

組換えトマト系統「No.4-7」は、CMV弱毒サテライトRNAsat55-1のcDNAをカナマイシン耐性遺伝子を持つバイナリーベクターに組み込み、アグロバクテリウム法でトマト品種「秋玉」に形質転換して得られた。安全性評価試験には、CMV抵抗性の付与が確認された組換えトマト「No.4-7」の自殖後代のホモ個体と原品種「秋玉」が供試された(河辺ら, 2002)。

接種試験に供試したCMVは、サテライトRNAを保持しない、Sub-group Iに属するCMV-42CM株である。

2. トマトの栽培条件

閉鎖系温室、非閉鎖系温室および模擬的環境利用(以下隔離圃場)の実験は、それぞれ1993年7月～1997年1月、1994年9月～1998年2月および1998年5月～2000年3月に行われた。

非閉鎖系温室での試験には、セルトレイに播種後生育した幼苗を1株毎に4号ポットに移し替え、生長とともに5、6号ポットに移植して鉢栽培した。ウイルス接種区ではCMV-42CM株を常法により接種した。草丈、葉幅、葉長、開花日等の生育特性試験には、原品種と組換え系統をそれぞれ6～8株を

供試した。種苗特性分類基準(日本種苗協会)に基づいた14の形質調査には原品種および組換え系統の各5株を供試した。また、草丈、葉長、葉幅、開花日、第1花房までの節数と長さ、主枝の花房数、果実の収量等を調査した。主枝の一次側枝(主枝第1花房直下の側枝)以外の腋芽は全て摘除し、二次側枝以降の側枝は放任した。

隔離圃場での試験は、1998年と1999年の2カ年にわたって北海道農業試験場(現北海道農業研究センター)隔離圃場で行われた。トマトの栽培は、北海道における慣行法で実施された。4月中旬に非閉鎖系温室でトマトをセルトレイに播種し、本葉1～2葉期に3号ポリポットに移植し、6月10日前後に圃場に定植した。原品種と組換え系統は、2条×7株の3反復とし、調査は中央の6株で行った。交雑性試験には、これらの栽培ブロックの周囲にアントシアニン欠失トマト(ah3トマトと略記)を植え付けた。元肥には堆肥と化学肥料を、追肥には化学肥料を適宜回数施用した。主枝、一次側枝(主枝第1花房直下の側枝)、二次側枝(一次側枝の第1花房直下の側枝)はそれぞれ2花房ずつ着花させて摘心し、その他の腋芽は全て摘除して三次側枝以降の側枝は放任とした。

3. 交雑特性

1) 風媒による交雑性

組換え系統と非組換え体との風媒による交雑の程度を調べるための判別品種として、アントシアニン欠失系統ah3を供試した。非閉鎖系温室内で扇風機によって風を発生させ、風上にNo.4-7を置き、風下にah3遺伝子をホモに持つah3トマトを種子親として配置した。ah3トマトは、アントシアニン欠失遺伝子ahを劣性ホモで有し、胚軸が淡緑色であるが、一般に栽培されているトマト品種と交雑したF₁の胚軸は赤紫色となることから、交雑の有無が容易に判別できる。送風は家庭用扇風機の強度を弱にセットし、90度の角度で首振りさせた。扇風機から135cmの位置に3個体のNo.4-7を花粉親として置き、それらから30cm離れた風下側に3個体のah3トマトを配置した。対照区では、花粉親に秋玉を供試した。着花位置での風速は熱線風速計(Kanaomax社, Anemomastar Model 6071)で計測し、花粉親トマトでの最大風速は1.5～1.8m/s、ah3トマトでは0.7～1.0m/sであった。送風は9～15時までの6時間で、5日間行った。送風処理前後に開花した花は

全て除去し、処理中に開花・結実したah3トマトからのみ採種した。これらを播種し、アントシアニンの着色の有無で交雑性を3反復で評価した。

2) 虫媒による交雑性

非閉鎖系温室の網箱(幅と奥行き各90cm, 高さ120cm)内にNo.4-7とah3トマトを置き、マルハナバチ(トーマン社, ナチュポール:約50頭)を5日間放飼して交雑試験を行った。対照区では、同様にして秋玉とah3トマトを置き、2反復で試験した。交雑性の評価は、風媒による試験と同様である。

4. 有毒物質の産生性

1) 茎葉からの揮発性物質の分析

非閉鎖系温室で栽培されたNo.4-7と秋玉の茎葉部をそれぞれから3gを採取し、これらをそれぞれ35ml容量のガラスカラム(直径15mm, 長さ20cm)に入れ、窒素ガスで空気を追い出した後、三方コック付きシリコン栓およびセプタムで密封した。この状態で1時間放置後、揮発成分をガスタイトシリンジで2ml採取し、ガスクロマトグラフィー(島津GC17A, カラム:DB225キャピラリー(0.53mm, 30m))で分析した。キャリアガスはヘリウムを用い、温度条件は50~180°C, 昇温5°C/分, FIDで検出した。

2) 茎葉に含まれるフェノール物質の分析

No.4-7と秋玉の茎葉部をそれぞれから2g採取し、これに50mlの80%(v/v)エタノールを加え、4°Cで一晩静置した。乳鉢でこれらを磨砕後、低速遠心分離機で沈殿物を除き、上清を減圧濃縮した。これらに50mlの蒸留水を加えて溶解後、塩酸を用いてpH2.8に調整した。この液を分液ロートに移し、等量の酢酸エチルを加えて振とう(液液分配)し、一晩静置して液相の分離を促した。さらに、分離した酢酸エチル分画に50mlの7%重炭酸ナトリウム溶液を加え、同様に液液分配した。得られた酢酸エチル分画を減圧乾固し、1.0mlエタノールで溶解したのち0.45 μ mのフィルターを通して高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析の試料とし、フェノール酸をHPLC分析した。

3) トマト残さの鋤込み試験

非閉鎖系温室で約2ヶ月間栽培したNo.4-7と秋玉を地上部と地下部に切り分け、風乾後さらに65°Cで16時間乾燥させた。細断した茎葉部(25g)と主根(1.8g)を5リットルの黒ボク土壌にそれぞれ混合し、鋤込み土壌として試験に供試した。生育阻害の

影響は、5鉢の5号素焼鉢にダイコン(品種:ミニこまち)を20粒播種し、12日後に発芽率を調査した後、平均的な株を残して間引きした。播種20日後に茎葉と主根の生体重を測定し、トマト残さの影響を評価した。

4) トマト栽培土壌でのアレロパシーによる影響

約2ヶ月間栽培したNo.4-7と秋玉の栽培土壌を供試し、ダイコンの発芽率、茎葉と主根の生体重を測定した。

5. 環境への影響

1) 微生物相への影響

No.4-7が土壌中の微生物相に及ぼす影響を調べるため、非閉鎖系および隔離圃場でNo.4-7を栽培(1998年)した土壌中の微生物の生育数を希釈平板法で調査した(土壌微生物研究会編, 1979)。トマトを栽培した3カ所の土壌を混合し、滅菌水で懸濁後の上澄液を供試した。細菌と放線菌はYG培地、糸状菌はローズベンガル培地を用い、それぞれ25°Cで14日間、5日間培養後、計数した。

2) アグロバクテリウムの残存性

0.1gのNo.4-7あるいは秋玉の種子に35 μ g/mlストレプトマイシンを添加した2mlのYEB培養液(1L当たり1g yeast extract, 8g nutrient broth, 5g sucrose, 2ml 1M MgSO₄, pH7.0)を加えて乳鉢で磨砕し、100 μ lの磨砕液をYEB寒天培地上に塗布した。YEB培地には、50 μ g/mlストレプトマイシン添加区と無添加区を設け、30°Cで4日間培養した。対照区として、遺伝子導入に供試したアグロバクテリウム(LBA4404)の懸濁液を塗布した区を設けた。なお、本菌は、バイナリーベクターとしてストレプトマイシン耐性を有している。

3) 昆虫相の調査

1998年、隔離圃場で栽培したトマトに飛来する訪花昆虫を7月13日、7月31日、8月21日の日中の約30分間捕虫網で採集し、昆虫の種類と数を調査した。昆虫の同定は、農業環境技術研究所・昆虫分類研究室で行われた。

4) 雑草調査

1998年8月31日、No.4-7と秋玉の各区の畦間(50×50cm)の枠内に発生した雑草の種類と被度を調査した。

5) 越冬性

No.4-7の栄養体の越冬性を調べるため、1998年に作付けした隔離圃場のトマトを収穫終了後に地上5

～10cmで切除し、耕起することなく翌春の4月下旬まで放置して越冬性を調査した。同様の調査は1999年に作付けた隔離圃場でも実施した。

種子の越冬性では、隔離圃場で採種したNo.4-7と秋玉の種子を供試し、1998年11月17日に隔離圃場の地表面と地下10cmの位置に網袋に入れた種子を置き(500粒, 3カ所), 翌春4月21日に回収して非閉鎖系温室で出芽試験を行った。対照には冷蔵庫(5℃)で保管した種子を用いた。

III. 結 果

1. 形態および生態特性

1) 非閉鎖系温室での形態および生態特性

(1) 種苗特性分類基準に基づいた形質特性評価

種苗特性分類基準に基づいた心止まり性, 葉の着生角度, 葉型等の14の形質について, 原品種と組換え系統を比較し, 遺伝子組換えによる変異の有無を調査した。その結果, これらの形質に差異は認められなかった(第1表)。栽培期間を通じてこれらの形質以外で両者に特異な差異は観察されなかった。

(2) 草丈における生育特性

原品種とNo.4-7の草丈の推移を6回にわたり調査した。原品種では, CMV接種株は奇形を伴う激しいモザイク症状を呈し, 草丈は無接種区の半分以下となる萎縮症状を示した。一方, No.4-7では, 接種株は軽微なモザイク症状を呈し, 接種約一ヶ月後の7月22日までは草丈の低下は認められたが, その後はおおむね無接種区と同程度であった(第2表)。したがって, 秋玉のウイルス接種区に比べて, No.4-7ではウイルス感染が草丈に及ぼす影響は小さいものと考えられた。しかし, 無接種区の秋玉と比較すると, 常にNo.4-7の草丈は低かった。

(3) 葉幅および葉長の推移

秋玉ではCMV接種区の葉長・葉幅は無接種区と

比べて大きく低下したが, No.4-7では接種区での低下は比較的小さかった。また, 秋玉とNo.4-7の無接種区を比較すると, 草丈と同様にNo.4-7の葉長・葉幅は原品種に比べて小さく, 秋玉と比べてNo.4-7では株全体が小型化した(第3表)。

(4) 開花日および第1花房の着生位置

非閉鎖系温室で栽培された秋玉とNo.4-7の無接種区を比較すると, No.4-7の開花日は秋玉より6日早かった。秋玉のCMV接種区では, 第1花房の開花日は無接種区と比べて12日遅く, No.4-7の接種区では無接種区より2日遅かった(第4表)。

秋玉とNo.4-7の無接種区で第1花房の着生位置を比較すると, No.4-7が約1節低く, 子葉からの長さも短かった。他方, 接種区では, 秋玉とNo.4-7はともに無接種区に比べて約1節多かった。

(5) 遺伝子組換え系統の開花特性の比較

遺伝子組換えによるCMV抵抗性のNo.4-7は, 原品種の秋玉と比べて開花日が早まり, 第1花房までの葉数が少ない傾向がみられたことから, これらの

第1表 遺伝子組換えトマトの諸特性

形 質 ^{a)}	秋玉	No.4-7
心止まり性	心止まり	心止まり
葉の着生角度	水平～やや上	水平～やや上
葉型	1	1
葉色	濃緑	濃緑
葉のアントシアニン着色	普通	普通
花房	単純	単純
花卉色	黄	黄
果形	球形	球形
花落ちの形	不整形	不整形
果頂部の形	平滑	平滑
果肩部の緑色程度	中～強	中～強
完熟果色	淡赤	淡赤
完熟果表皮の色	無色	無色
果肉色	淡赤	淡赤

a) 種苗特性分類基準(トマト)による。

第2表 CMV感染が草丈に及ぼす影響

品種・系統	処理区	草丈 (cm) ^{a)}					
		7月7日	7月22日	8月3日	8月18日	9月3日	10月13日
秋玉	無接種	8.6a ^{b)}	31.7a	65.4a	98.3a	136.5a	218.3a
	接種	4.4b	10.4b	25.5b	43.7b	56.2b	74.8b
No.4-7	無接種	7.9	29.4	59.6	86.7	110.5	176.8
	接種	7.5 ^{ns}	26.6 ^{ns}	60.4 ^{ns}	91.2 ^{ns}	121.0 ^{ns}	162.2 ^{ns}

a) 播種日: 6月10日。草丈の調査: 7月7日～8月3日は8反復, 8月18日～10月13日は6反復の平均値。

b) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%) を示す。ns: 有意差がないことを示す。

変化の原因を明らかにするため、No.4-7の選抜過程で得られたホモの姉妹系統を供試し、開花特性等を比較した。

秋玉の開花は両実験ともNo.4-7およびその姉妹系統と比べて遅く、No.4-7対比では14あるいは6日間遅れた(第5表)。姉妹系統も、抵抗性と感受性に

関係なくおおむねNo.4-7と同じ傾向であった(第5表)。また、第1花房の着生節位は秋玉が高く、実験1のNo.4-25(感受性)、実験2のNo.4-34(感受性)でやや高かったものの、抵抗性と感受性の姉妹系統間に顕著な差は認められなかった(第5表)。子葉から第1花房までの長さは、No.4-7と秋玉の間では顕

第3表 CMV感染が葉長および葉幅に及ぼす影響^{a)}

品種・系統	処理区	7月7日		7月22日		8月18日	
		葉長	葉幅	葉長	葉幅	葉長	葉幅
秋玉	無接種	13.9a ^{b)}	11.7a	33.4a	27.1a	49.5a	47.7a
	接種	4.9b	3.7b	13.6b	11.1b	16.3b	12.3b
No.4-7	無接種	11.5a	10.4a	30.1	24.6	39.8a	37.7a
	接種	9.4b	7.6b	27.8 ^{ns}	22.5 ^{ns}	34.0b	30.7b

- a) 播種日：6月10日。調査：7月7日、7月22日は最大葉を8反復で計測し、8月18日は第1花房直下の葉を6反復で計測し、表中の数字はそれらの平均値(cm)。
 b) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%)を示し、同一文字間では有意差がないことを示す。ns：有意差が認められない。

第4表 開花日および第1花房の着生位置

品種・系統	処理区	開花日			第1花房の着生位置 ^{a)}	
		第1花房	第2花房	第3花房	節位	子葉からの長さ (cm)
秋玉	無接種	8月2日	8月5日	8月10日	10.5	56.6
	接種	8月14日	—	—	11.3	33.6
No.4-7	無接種	7月27日	7月31日	8月4日	9.5	42.5
	接種	7月29日	8月1日	8月5日	10.6 ^{ns^{b)}}	45.5 ^{ns}

- a) 播種日：6月10日。第1花房着生節位、子葉から第1花房までの長さを計測。8反復の平均。
 b) ns：有意差がないことを示す。

第5表 CMV感受性と抵抗性系統の開花特性の比較^{a)}

品種・系統	CMVに対する反応	播種から開花までの日数		第1花房の着生節位		子葉から第1花房までの長さ (cm)
		実験1	実験2	実験1	実験2	実験2
No.4-7	抵抗性	55	53	10.5b ^{b)}	9.0b	38.3b
秋玉	感受性	69	59	11.4a	10.5a	58.7a
No.4-7-2	抵抗性	53	56	9.4c	10.0ab	44.7ab
No.4-15		54	54	10.5b	9.8ab	42.3b
No.4-27		56	55	10.8b	10.0ab	47.2ab
No.4-41		55	53	10.3bc	9.5ab	42.8ab
抵抗性系統平均		54.5	54.5	10.3	9.8	44.3
No.4-25	感受性 ^{c)}	54	—	10.9a	—	—
No.4-34		56	57	10.6b	10.5a	53.5a
No.4-35		55	54	10.3bc	10.0ab	47.3ab
No.4-38		—	55	—	10.0ab	49.7a
感受性系統平均		55.0	55.3	10.6	10.2	50.1

- a) 実験1は9月24日播種、実験2は2月16日播種。供試個体数は各区6~8株。数値は平均。
 b) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%)を示し、同一文字間では有意差がないことを示す。
 c) PCR法で確認。

著な差が認められたが、抵抗性と感受性の姉妹系統では値に振れがあった(第5表)。

ウイルス感染による果実収量は、秋玉では無接種区を100とした場合、接種区の指数は6.5%と小さく、またNo.4-7では82.3%にとどまった(第6表)。無接種区では、No.4-7は秋玉に比べ果実収量が55%上回った(第6表)。

2) 隔離圃場での生育特性

(1) 1998年の隔離圃場試験における生育および果実収量

No.4-7は秋玉に比べて早生で、第1花房が秋玉よりも4日早く開花した(第7表)。また、No.4-7は秋玉よりもわい性で、草丈、葉長および葉幅はいずれも秋玉より小さく、果実収量はNo.4-7が秋玉よりも高かった。

第6表 CMV接種が収量に及ぼす影響^{a)}

品種・系統	処理区	果実収量 (g/株)	無接種区対比 (%)
秋玉	無接種	901.3±130.3	100
	接種	59.1±23.6	6.5
No.4-7	無接種	1396.8±414.0	100
	接種	1149.8±406.7	82.3

a) 播種日：6月10日。果実の収穫は9月14日～11月23日に行い、小玉果実を除去せずに計測。素焼き鉢(直径27cm)で栽培，6反復。

(2) 1999年の圃場試験における生育および果実収量

No.4-7は秋玉に比べて開花日が5日早く、草丈は低かった(第8表)。果実収量は、1998年の隔離圃場試験と同様にNo.4-7が秋玉に比べて多く、1果重は秋玉に比べて軽かった(第9表)。No.4-7は秋玉より株当たり果数が多く、果重の軽さをカバーして多取になった。

また、種子の200粒重を比較した結果、秋玉とNo.4-7はそれぞれ0.859g±0.039(平均±標準偏差)と0.718g±0.006となり、秋玉が重かった。

2. 交雑特性

1) 非閉鎖系温室での風媒による交雑性

遺伝子組換え系統と非組換えトマトとの風媒による交雑の程度を調べるための判別品種として、アントシアニン欠失系統ah3を供試し、扇風機によって風を発生させ、風上にNo.4-7を置き、風下にah3トマトを種子親として配置して交雑性を調べた。

その結果、No.4-7を花粉親とした場合、ah3に結実した果実からは285粒の種子が得られ、発芽した224株の全ての胚軸にはアントシアニンが着色していなかった。花粉親を秋玉にした場合も同様で、発芽した261株全ての胚軸が淡緑色であり、ah3トマトから得られた種子は全て自殖によるものであった。

2) 非閉鎖系温室での虫媒による交雑性

マルハナバチによるNo.4-7の花粉の交雑性を調べた結果、ah3に結実した果実から得られた全ての

第7表 開花、生育および果実収量(1998年隔離圃場試験)^{a)}

品種・系統	第1花房の開花	7月6日の生育 (cm)			果実収量 (g/株)
		草丈	葉長	葉幅	
No.4-7	6月6日	68.3a ^{b)}	44.0b	46.1b	1,905a
秋玉	6月10日	72.1a	50.1a	56.9a	1,458b

a) 播種：4月10日，定植：6月8日。葉幅および葉長は第1花房直下の葉を計測，表中の数字はその平均。果実の収穫は8月3日～9月18日に行い，50g未満の果実および異常果は除去した。試験区は1区6株の3回反復である。

b) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%)を示し，同一文字間では有意差がないことを示す。

第8表 定植後の生育の推移(1999年隔離圃場)^{a)}

品種・系統	7月5日		7月23日			8月26日
	草丈 (cm)	草丈 (cm)	2次側枝の葉数 (枚)	2次側枝基部までの長さ (cm)	3次側枝基部までの長さ (cm)	草丈 (cm)
No.4-7	57.4±4.9	96.8±6.5	2.1±0.5	44.9±3.9	11.7±3.2	124.9±11.9
秋玉	60.4±3.3	107.1±6.0	4.5±0.5	55.1±5.0	35.8±4.9	152.6±16.4

a) 播種：4月20日，定植：6月14日。

種子から発芽した139株の胚軸には、アントシアニンの着色はなく（第10表）、ah3トマトは自殖したものと認められた。また、秋玉を花粉親とした場合でも発芽した170株の全てに着色株は認められず、両者の間での虫媒による交雑性に差異はなかった。

3) 隔離圃場での交雑性

1998年と1999年にah3と秋玉、またah3とNo.4-7を隣接栽培し、ah3から採種した種子を播種して胚軸のアントシアニン着色の有無を調べた結果、すべての出芽個体にアントシアニンが認められなかった（第11表）。

3. 有毒物質の産生性

1) 茎葉からの揮発性物質と茎葉に含まれるフェノール物質の分析

組換えトマトが大気中に放出する揮発成分とフェノール酸の産生性をそれぞれガスクロマトグラ

フィーとHPLCで分析した。その結果、組換えトマトと非組換えトマトのガスクロマトグラムのピークと各成分の含有比率は両者で一致しており（図は省略）、揮発性成分に差異はないものと認められた。HPLC分析でもピークと各成分の含有比率は両者で一致しており、フェノール酸成分に差異はないものと認められた（図は省略）。

2) トマト残さの鋤込み試験

No.4-7と秋玉の植物残さの他作物への生育阻害を比較した結果、No.4-7を混入した土壌でのダイコンの発芽率と主根重量は、無混入土壌と比較してやや劣ったが、茎葉重量は同等であった（第12表）。秋玉と比較した場合、発芽率はほぼ同等であり、茎葉と主根の生重量はやや大きかったが、有意差は認められなかった。したがって、No.4-7の植物体残さの土壌への鋤込みは、秋玉のそれと同様で、ダイコン

第9表 果実収量（1999年隔離圃場）^{a)}

品種・系統	1区		2区		3区		平均収量 (g/株)		果数 ^{b)} A/B
	収量(g/株)	1果重 (g)	収量(g/株)	1果重 (g)	収量(g/株)	1果重 (g)	収量(A)	1果重(B)	
No.4-7	3,327	105.6±43.0	2,918	108.1±47.9	2,840	103.2±40.3	3,028	105.6	28.7
秋玉	2,409	146.0±74.9	2,860	150.5±66.1	2,421	134.4±60.8	2,563	143.6	17.8

a) 果実の収穫は8月6日～9月24日に行い、50g未満の果実および異常果は除去した。試験区は1区6株の3回反復である。1果重は平均±標準偏差。

b) 1株当たりの果数。

第10表 マルハナバチによる遺伝子組換えトマトの交雑性

花粉親	ah3の個体番号	播種数	発芽数	アントシアニン	
				着色株数	無着色株数
No.4-7	No.1	71	67	0	67
	No.2	79	72	0	72
秋玉	No.1	81	71	0	71
	No.2	105	99	0	99

第11表 隔離圃場での隣接栽培における組換えトマトの交雑性

試験年と隣接植物の種類	第1回収穫果実の種子			第2回収穫果実の種子		
	播種数	発芽数	着色個体数 ^{a)}	播種数	発芽数	着色個体数 ^{a)}
1998年						
ah3とNo.4-7	1,200	1,085	0	1,200	1,075	0
ah3と秋玉	1,200	1,141	0	1,200	1,120	0
1999年						
ah3とNo.4-7	1,200	1,076	0	1,200	866	0
ah3と秋玉	1,200	1,051	0	1,200	945	0

a) 胚軸にアントシアニンの着色（赤紫色）がみられる株。

1998年の収穫日は8月10日、9月11日。1999年の収穫日は8月16日、9月10日。

への悪影響はなかった。

3) トマト栽培土壌でのアレロパシーによる影響

No.4-7の栽培後の土壌にダイコンを栽培した結果、秋玉の栽培後の土壌と比較して、発芽率と主根の生重量はほぼ同程度であり、茎葉の生重量はやや高かった。無栽培土壌と比較すると発芽率と主根の生重量は差がなく、茎葉の生重量は高かった(第13表)。トマト栽培土壌の茎葉と主根の生重量が無栽培土壌に比べてやや高いのは、前作の施肥の残効による可能性がある。

4. 環境への影響

1) アグロバクテリウムの残存性

組換えトマトへのアグロバクテリウムの残存性をNo.4-7と秋玉の種子を供試して調べた結果、アグロバクテリウム懸濁液を塗布したシャーレには同一形状の多数の白色コロニーが検出されたが、No.4-7と秋玉の種子磨砕液からは白色コロニーは検出されなかった(第14表)。したがって、組換えトマト種子に

はアグロバクテリウムは残存していないものと判断された。

2) 土壌微生物相への影響

閉鎖系温室で栽培した遺伝子組換えトマトの土壌微生物相に及ぼす影響を調べた結果、No.4-7と秋玉を栽培した土壌および無栽培土壌の間には各微生物数に差がほとんど認められなかった。また、1998年の隔離圃場のトマト栽培土壌でも同様の結果であり(第15表)、遺伝子組換えトマトと非組換えトマトの間には土壌微生物相への影響に差異は認められなかった。

3) 昆虫相の調査

1998年7月13日、7月31日、8月21日の日中の約30分間、隔離圃場に飛来する訪花昆虫を捕虫網で採集し、種類と数を調査した。その結果、No.4-7と秋玉の間には訪花昆虫の種類と個体数には大きな差異は認められなかった(第16表)。なお、類似種であるフタホシヒラタアブとオオマメヒラタアブの識別は

第12表 トマト残さの土壌鋤込みによるダイコンの生育^{a)}

トマト残さ	発芽率 (%)	茎葉の生重量 (g)	主根の生重量 (g)
No.4-7	71a ^{b)}	10.0a	9.5a
秋玉	69a	8.3a	7.7a
無 (無鋤込み土壌)	91b	10.3a	10.4a

a) 表中の数字：平均値。

b) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%) を示し、同一文字間では有意差がないことを示す。

第13表 遺伝子組換えトマト栽培土壌でのダイコンの生育

土壌の種類	発芽率 (%)	茎葉の生重量 (g)	主根の生重量 (g)
No.4-7栽培土壌	85a ^{a)}	13.0a	13.5a
秋玉栽培土壌	83a	10.5ab	14.1a
無栽培土壌	90a	9.6b	10.5a

a) アルファベットはDuncan's M. R. Test (5%) を示し、同一文字間では有意差がないことを示す。

第14表 遺伝子組換えトマト種子からのアグロバクテリウムの検出^{a)}

試料	培地のカナマイシン 含有の有無	コロニー数		
		白色	桃色	赤黄色
No.4-7	有	0	0	0
	無	0	4	2
秋玉	有	0	1	0
	無	0	3	1
アグロバクテリウム (LBA4404) の懸濁液	有	500以上	0	0

a) 35 μ g/mlのストレプトマイシン含有YEB培地、カナマイシン濃度：50 μ g/ml。

困難であったので、一括して取り扱った。

4) 植物相への影響

(1) 雑草の種類と量

1998年8月31日、No.4-7と秋玉の各区の畦間(50×50cm)に生育する雑草の種類と被度を調査した結果、両者には出現した草種が一部で異なったが、相対被度の高い草種は一致しており、大きな差異はなかった(第17表)。

(2) 越冬性

1998年および1999年に隔離圃場で栽培したNo.4-7と秋玉の刈り株は、翌春にはともに枯死し、越冬性が認められなかった。

冬期間、網袋に入れた種子を隔離圃場の地表面と地下10cmに翌春まで放置し、回収したNo.4-7と秋玉の種子(各区とも500粒を3カ所)を非閉鎖系温室で播種した結果、いずれも全く発芽せず、越冬性が認められなかった。対照区の冷蔵庫(5℃)で保管したNo.4-7と秋玉の種子の発芽率は、それぞれ94.9%と97.9%であった。

IV. 考 察

わが国では、ウイルスの外被タンパク質遺伝子を

第15表 トマト栽培の土壌微生物相への影響

栽培条件と土壌の種類	微生物数 (cfu/g乾土)		
	細菌	放線菌	糸状菌
閉鎖系温室ポット栽培			
No.4-7栽培土壌	3.4×10 ⁷	5.3×10 ⁶	9.3×10 ⁴
秋玉栽培土壌	3.3×10 ⁷	6.3×10 ⁶	8.9×10 ⁴
無栽培土壌	3.3×10 ⁷	6.6×10 ⁶	1.1×10 ⁵
隔離圃場栽培			
No.4-7	2.6×10 ⁷	3.5×10 ⁶	1.5×10 ⁵
秋玉	2.6×10 ⁷	3.6×10 ⁶	1.0×10 ⁵

導入したウイルス抵抗性作物の安全性評価の報告は多い(浅川ら, 1992; 田部井ら, 1994a; 1994b; 小森ら, 2002)が、ウイルスのサテライトRNAを導入したウイルス抵抗性作物については本報告が初めてである。外被タンパク質遺伝子を導入した組換えトマト、メロンおよびパパイヤでは、ウイルス抵抗性を除き、原品種と特筆すべき差異がないと述べられている。CMVのサテライトRNAを導入した組換えトマトNo.4-7では、ウイルス抵抗性以外に原品種と若干異なる性質が認められたので、それらの原因や環境への影響評価等について考察した。

第17表 雑草の種類と相対被度

雑草の種	相対被度 (%) ^{a)}	
	No.4-7	秋玉
スズメノカタビラ	32.7	48.5
スカシタゴボウ	19.4	18.5
スベリヒユ	11.4	7.8
オニノゲシ	7.8	6.7
ハコベ	12.4	5.8
シロザ	3.9	4.8
ヒメジョオン	2.2	3.0
スズナ	1.7	1.6
ツユクサ	2.3	1.2
オオバコ	1.2	1.2
セイヨウタンポポ	—	0.7
イヌタデ	1.9	0.2
イヌビユ	1.6	0.0
エノキグサ	0.8	—
エゾノギシギシ	0.5	—
ヒメムカシヨモギ	0.3	—
出現種数	15	13
出現種数/総種数	0.98	0.81

a) —: 出現なし。

第16表 隔離圃場での訪花昆虫の種類と数

品種・系統	7月13日 ^{a)}		7月31日 ^{b)}		8月21日 ^{c)}
	種名	個体数	種名	個体数	個体数
No.4-7	フタホシヒラタアブ	7	フタホシヒラタアブ	2	0
	オオマメヒラタアブ		オオマメヒラタアブ		
	ホソモモブトヒラタアブ	1			
秋玉	フタホシヒラタアブ	8	フタホシヒラタアブ	2	0
	オオマメヒラタアブ		オオマメヒラタアブ		
	ホソモモブトヒラタアブ	4	フタモンカタコナハナバチ (あるいはヒラシマチビハナバチ)	1	

a) 13:15~13:35, 晴れ。 b) 11:25~11:55, 薄曇り。 c) 11:05~11:35, 晴れ。

1. 形態および生育特性

非閉鎖系温室で栽培された組換えトマトNo.4-7は、親株である秋玉とは、種苗特性分類基準に基づく14の形質に差異はなかった(第1表)が、No.4-7は草丈が低く、葉長、葉幅が短く、株全体が小型化していた(第2表、第3表)。また、第1花房の開花日が顕著に早まり、第1花房より下位部の節数が約1節少なかった(第4表)。隔離圃場試験でも同様な傾向が認められ、No.4-7は親株の秋玉に比べ小型化し、草丈が短く、開花日の早期化等が再確認された(第7表)。No.4-7が草丈の低い要因として、第1花房の着生節位と第2側枝の葉数が少なく、それに伴ってその間の長さが短いことが認められた(第8表)。すなわち、No.4-7は、非閉鎖系温室および隔離圃場試験のいずれでも早生化とわい性化の傾向を示した。また、隔離圃場では草丈の伸長が停滞する傾向が観察されたが、収量は多かった(第7表、第8表、第9表)。非閉鎖系温室での収量もNo.4-7が秋玉より多収の傾向であった(第6表)。収量の増加は、No.4-7の1果重が秋玉に比べ軽いものの、早生化によって収穫期間が長くなることや着果数が多いことに起因していると考えられた。

No.4-7におけるこれらの変化の原因として、①導入遺伝子による影響、すなわち組換えトマトの遺伝子の崩壊や導入遺伝子の高発現による影響、②形質転換過程での体細胞突然変異、が考えられる。

ウイルス抵抗性を示した形質転換当代(T_0)個体No.4の自殖第2代(T_2)で抵抗性ホモのNo.4-7が選抜された。自殖第1代(T_1)は抵抗性と感受性が3:1に分離し、導入遺伝子のsat55-1はNo.4において複数ではなく、ひとつ導入されたと考えられる(河辺ら, 2002)。No.4-7にみられた秋玉との特性の違いが、導入遺伝子による組換えトマトの遺伝子の崩壊や発現異常、または導入遺伝子そのもの高発現に起因するのであれば、No.4-7の姉妹系統において、CMVに対する抵抗性ととも遺伝していると考えられる。そこで、No.4-7の抵抗性および感受性ホモ姉妹系統群における開花日数、第1花房着生節位および子葉から第1花房までの長さを比較・検討した。開花日数については、姉妹系統群間に有意な差はなく、No.4-7と同様な傾向を示した(第5表)。第1花房着生節位および子葉から第1花房までの長さは系統群内での値に振れがみられたが、群間に顕著な差異は認められなかった。供試系統数および株数が少

ないものの、抵抗性と感受性系統群間における顕著な差異は見いだせず、No.4-7の早生化やわい性化の特性がsat55-1遺伝子の導入およびその発現に起因している可能性は低い。

新品種の育種は、一般的には優良形質を持った親同士の交雑育種であるが、組織培養や細胞培養の過程で生ずる体細胞突然変異が品種育成に利用され(LARKIN and SCOWCROFT, 1981)、トマトでも通常の変異に比べて極めて高率に、かつ多様な変異が起きることが明らかにされている(EVANS and SHARP, 1983)。また、組換え植物における特性評価の事例は少ないが、最近培養時にカルス化した組換えイネでの体細胞突然変異による形態、生育および生殖・稔性等の特性の変化が示唆されている(矢頭ら, 2003)。現段階では、No.4-7において観察された早生化やわい性化が体細胞突然変異に起因することを検証するのは困難であり、根拠となるデータもない。しかし、上述したように、No.4-7の姉妹系統は抵抗性と感受性系統群間に顕著な差異はなく、No.4-7と同様に早生化やわい性化が認められ、sat55-1遺伝子導入の形質転換時にトマト組織がカルスを経過している。これらのことから、早生化およびわい性化の特性変化は導入遺伝子によるものではなく、形質転換の際の体細胞突然変異に起因している可能性が高いと考えられる。

2. 交雑性

非閉鎖系温室では扇風機を利用した風媒およびマルハナバチを利用した虫媒による交雑性を調べた。No.4-7を花粉親とし、アントシアニン欠失トマトah3を種子親として交雑性を胚軸のアントシアニン色素の発現によって判定した結果、いずれの試験でも交雑は認められなかった。また、隔離圃場でNo.4-7と隣接して栽培した種子親から採種されたah3トマトの胚軸にも変化がなかったことから、組換えトマトと非組換えトマトの間では交雑が起きなかった。これらのことから、組換えトマトの花粉が風媒によって他の品種と交雑する可能性は極めて低いものと考えられた。また、隔離圃場で採集された訪花昆虫の受粉媒介能は不明であるが、これらの種類や数に大差がないことから、組換え体と非組換え体の間には交雑性に差異はないものと判断された。

3. 環境に対する安全性評価

文部科学省および農林水産省の指針に示された環境に対する安全性評価試験を行った。前述のように

組換えトマトNo.4-7は原品種の秋玉に比べて、明らかにわい性で、早生である。また、果重、結実数、収量および種子重でも差異が認められた。しかし、環境に直接的に影響すると考えられるNo.4-7からの揮発性物質や植物体中での有毒物質の産生は認められず、トマト残さが後作（ダイコン）の生育に影響を及ぼすことはなく、また細菌、放線菌、糸状菌の土壤微生物の生息密度にも影響しないこと、昆虫および植物相に差異がないことから、組換えトマトの栽培によって周辺の生物環境への影響はないと考えられた。

No.4-7は植物ウイルスワクチンとして利用された弱毒性CMV由来のサテライトRNAを秋玉に遺伝子導入したトマトであり、すでに、ウイルス病の防除効果は報告されている（河辺ら，2002）。しかし、サテライトRNAを利用した組換え植物では、CMVの感染によって取り込まれたサテライトRNAが強毒化するという事例がある（PALUKAITIS and ROOSINCK, 1996）ので、今後No.4-7から発現したサテライトRNAが強毒性に変異する可能性を検討する必要がある。

V. 摘 要

CMV弱毒サテライトRNA sat55-1を導入したトマト「No.4-7」の安全性評価試験が、北海道農業研究センターの閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場で実施された。No.4-7は、原品種の秋玉に比べCMV抵抗性を示すとともに、早生化とわい性化の傾向が認められ、多収性を示した。CMV抵抗性以外の特性の変化は、形質転換過程でトマト組織のカルス化による体細胞突然変異が原因と考えられた。

交雑性の試験には、閉鎖系温室では風媒およびマルハナバチによる虫媒を、隔離圃場では隣接した栽培によって行われたが、組換えトマトと非組換えトマトの間での交雑は認められなかった。

環境に対する安全性評価では、No.4-7からの有毒物質の産生は認められず、トマト残さが後作物の生育や土壤微生物の生息密度に影響しないこと、昆虫相・植物相に差異がないことから、組換えトマトの栽培によって周辺の生物環境への影響はないと考えられた。

VI. 引用文献

1) 浅川征男・福本文良・濱屋悦次・長谷部亮・市川

- 裕章・松田泉・松村雄・岡田齊夫・佐藤守・塩見正衛・鶴飼保雄・横山和成・本吉総男・大橋祐子・宇垣正志・野口勝可（1992）：遺伝子組換えによってTMV抵抗性を付与したトマトの生態系に対する安全性評価。農環研報，8，1-51。
- 2) BARTON, J. E. and M. DRACUP (2000): Genetically modified crops and the environment. *Agronomy J.*, 92, 797-803.
- 3) DALE, P. J. (1997): Potential impacts from the release of transgenic plants into the environment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19, 596-600.
- 4) 土壤微生物研究会編（1979）：土壤微生物実験法，養賢堂，p469.
- 5) EVANS, D. A. and W. R. SHARP (1983): Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science*, 221, 949-951.
- 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) 日野明寛（2004）：「遺伝子組換え農作物」の状況と将来。食の科学，312(2)，16-24.
- 8) JAMES, C. (2004) : Global status of commercialized transgenic crops:2003, Brief No30, ISAAA, Ithaca, NY USA (URL:http://www.isaaa.org.).
- 9) 本田要八郎・吉田幸二・後藤忠則（1993）：トマト条斑病常発地域における弱毒ウイルス予防接種による防除効果。北日本病虫研報，44，56-58.
- 10) 河辺邦正・岩崎真人・早野由里子・本田要八郎・吉田幸二・眞岡哲夫（2002）：サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第1報 抵抗性トマト系統の作出。北海道農研研報，177，37-53.
- 11) 小森貞男・深町浩・眞岡哲夫・日高哲志・小川一紀（2002）：パパイヤ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ヤ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.
- 12) LARKIN, P. J. and W. R. SCOWCROFT (1981): Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
- 13) MESSEGUER JOAQUIMA (2003):Gene flow

- assessment in transgenic plants. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 73(3), 201-212.
- 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) NIELSEN K. M., F. GEBHARD, K. SMALLA, A. M. BONES, T. D. van ELAS (1997) :Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinebacter calcoaceticus* BD413. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 815-821.
 - 16) 日本植物病理学会(2000)：日本植物病名目録, トマト, 250.
 - 17) 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, 9農会第2000号農林水産事務次官依命通達.
 - 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) PALUKAITIS, P. and M. J. ROOSSINCK (1996): Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology*, 14, 1264-1268.
 - 20) POWELL-ABEL, P., R. S. NELSON, B. De, N. HOFFMANN, S. G. ROGERS, R.T. FRALEY, and R. N. BEACHY (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232, 738-743.
 - 21) ROOSSINCK M. J., D. SLEAT and P. PALUKAITIS (1992): Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol. Rev.*, 56: 265-279.
 - 22) SNOW, A. A. and P. M. PALMA (1997): Commercialization of transgenic plants : Potential ecological risks. *BioScience*, 47(2), 86-96.
 - 23) 「食の科学」編集部 (2004)：賛否渦巻くなか, 広く深く浸透する「遺伝子組換え食品」. 312(2), 4-14.
 - 24) 田部井豊 (2004)：「遺伝子組換え農作物」等の開発の現状と今後の展望. *食の科学*, 312(2), 25-31.
 - 25) 田部井豊・大澤勝次・西村繁夫・花田薫・吉岡啓子・藤沢一郎・中島臯介 (1994a)：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.
 - 26) 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・中島臯介 (1994b)：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.
 - 27) 矢頭治・福本文良・樋口博也・大島正弘・山元剛・中島敏彦・森浩一・岩井孝尚・大橋祐子 (2003)：エンパク・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. *中央農研研報*, 2, 107-124.
 - 28) 吉田幸二・後藤忠則・本田要八郎 (1992)：キュウリモザイクウイルス (CMV) の弱毒ウイルスの改良. *日植病報*, 58, 116-117 (講演要旨).
 - 29) YOSHIDA K., T. GOTO and N. IIZUKA (1985): Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 51, 238-242.