

委託プロジェクト研究  
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」  
平成29年度 最終年度報告書

13406462

新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター
研究開発責任者	與語 靖洋
共同研究機関	国立大学法人 北海道大学農学研究院
	国立大学法人 筑波大学生命環境系
	国立大学法人 茨城大学農学部
	国立大学法人 名古屋大学環境学研究科
	国立大学法人 九州大学大学院農学研究院
	公立大学法人 福井県立大学生物資源学部
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（北海道農業研究センター、東北農業研究センター、中央農業研究センター、西日本農業研究センター、九州沖縄農業研究センター、食品研究部門、生物機能利用研究部門）
	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 増養殖研究所
	株式会社ニッポンジーン
株式会社ファスマック	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-8251 FAX : 029-838-8199 E-mail : yogo@affrc.go.jp

別紙様式3. 最終年度報告書 1頁 ～ 111頁

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

課題名	年次計画					担当研究機関・研究室				
	25	26	27	28	29	機関	研究室			
<b>I. 遺伝子組換え生物の生物多様性影響評価手法の開発</b>										
<b>1. ツルマメの生物・生態的特性の把握およびリスク評価手法の開発</b>  (1) ツルマメ摂食昆虫の摂食量とBt感受性特性の解明(平成28年度から(A)と(B)を統合)  (A) ツルマメを摂食するチョウ目等昆虫のBt感受性に関する特性解明  (B) ツルマメを摂食する昆虫類とその発生に関する調査・解析	ツルマメの生物・生態とリスク					農業環境技術研究所 /平成28年度から農研機構農業環境変動研究センター 農研機構生物機能利用研究部門 農研機構東北農業研究センター 農研機構西日本農業研究センター 農業生物資源研究所(現在:農研機構遺伝資源センター) 農業環境技術研究所(現在:農研機構農業環境変動研究センター) 農研機構東北農業研究センター 農研機構近畿中国四国農業研究センター(現在:農研機構西日本農業研究センター) 農研機構九州沖縄農業研究センター 農研機構九州沖縄農業研究センター	生物多様性研究領域/平成28年度から外来生物影響評価ユニット 昆虫微生物機能ユニット 生産環境研究領域病害虫グループ 技術支援センター業務第1科 分類評価研究ユニット(現在:微生物分類評価チーム) 生物多様性研究領域 生産環境研究領域(現在も同じ) 研究支援センター(現在:技術支援センター業務第1科) 生産環境研究領域病害研究グループ(現在:野菜病害虫管理グループ)			
	ツルマメのBt感受性							ツルマメの摂食とBt感受性 ツルマメの摂食と昆虫の発生	農業生物資源研究所(現在:農研機構遺伝資源センター) 農業環境技術研究所(現在:農研機構農業環境変動研究センター) 農研機構東北農業研究センター 農研機構近畿中国四国農業研究センター(現在:農研機構西日本農業研究センター) 農研機構九州沖縄農業研究センター	分類評価研究ユニット(現在:微生物分類評価チーム) 生産環境研究領域病害研究グループ(現在:野菜病害虫管理グループ)
	ツルマメと病害									
(2) ツルマメの病害に関する調査・解析										
(3) 環境条件の年次変動がツルマメ個体群の存続性や開花に及ぼす影響の解明(平成28年度から(C)と(D)を統合)										



課題名	年次計画					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(2)クワコの遺伝的多様性の解明  4. 生物多様性影響評価のための魚類の生態的特性の把握  (1)大西洋サケの生育・繁殖特性及び在来サケ科魚類との競合性に関する研究  (2)メダカの交雑性、有害物質生産性に関する研究  (3)コイの交雑性に関する研究	クワコの遺伝的多様性解明					農業生物資源研究所／平成28年度から農研機構生物機能利用部門 水産総合研究センター増養殖研究所（現在：水産研究・教育機構増養殖研究所） 水産総合研究センター増養殖研究所（現在：水産研究・教育機構増養殖研究所） 水産総合研究センター増養殖研究所（現在：水産研究・教育機構増養殖研究所） 水産総合研究センター増養殖研究所（現在：水産研究・教育機構増養殖研究所）	カイコユニット／平成28年度から新特性シルク開発ユニット  育種グループ（現在：ゲノム育種グループ）  育種グループ（現在：ゲノム育種グループ）  育種グループ（現在：ゲノム育種グループ）  育種グループ（現在：ゲノム育種グループ）
魚類の生態的特性の把握							
大西洋サケの繁殖・競合性							
メダカの交雑性・有害物質							
コイの交雑性							
<b>II. 遺伝子組換え作物の管理技術の開発</b>							
5. 新規の遺伝子組換え技術に対応した検知・調査手法の開発  新規作出技術等に対応した検知手法の検討・開発  (1)新規作出技術等に対応した検知手法の検討・開発  (2)遺伝子組換え作物の国内流通を想定した簡易検知手法の開発  (3)スタック系統における遺伝子間相互作用の検知・評価手法の開発	GMの検知技術開発					農研機構食品総合研究所／平成28年度から農研機構食品研究部門  農研機構食品総合研究所（現在：農研機構食品研究部門）  ファスマック 農研機構食品総合研究所／平成28年度から農研機構食品研究部門  ニッポンジーン  北海道大学	平成28年度から信頼性評価ユニット  GMO検知解析ユニット（現在：信頼性評価ユニット）  平成28年度から信頼性評価ユニット  応用生命科学分野
GMの高度・精密検知技術開発							
GMの簡易・迅速検知技術開発							
スタック相互作用							

課題名	年次計画					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
<p>6. 新規の遺伝子組換え技術および生物に関する科学的知見の収集・解析 (1) 海外における新規育種技術等の規制・政策動向に関する情報の収集・解析(平成27年度から(I)を(J)に統合)</p> <p>(I) 国内外における遺伝子組換え生物の新規作出技術等に関する情報収集・解析</p> <p>(J) 海外におけるGM生物の社会経済学的影響評価に関する情報の収集・解析</p> <p>(2) 新規育種技術が生物多様性に及ぼす影響に関する情報の収集・解析</p>	<p>GM/NBTの科学的知見の収集・解析</p> <p>GM/NBTの社会経済・技術情報の収集・解析</p> <p>GM/NBTの技術情報の収集・解析</p> <p>GM/NBTの社会経済情報の収集・解析</p>					<p>名古屋大学</p> <p>茨城大学／平成29年度から名古屋大学</p> <p>筑波大学</p> <p>農業生物資源研究所(現在:農研機構生物機能利用研究部門)</p> <p>農研機構食品総合研究所(現在:農研機構食品研究部門)</p> <p>茨城大学</p> <p>農研機構農業環境変動研究センター 水産研究・教育機構増養殖研究所</p> <p>茨城大学／平成29年度から名古屋大学</p>	<p>環境学研究科</p> <p>農学部／平成29年度から環境学研究科</p> <p>生命環境系 遺伝子組換え研究センター・ 遺伝子組換え研究推進室(現在:有用物質生産作物開発ユニット GMO検知解析ユニット(平成28年度から信頼性評価ユニット))</p> <p>農学部</p> <p>生物多様性研究領域長 ゲノム育種グループ 農学部／平成29年度から環境学研究科</p>
<p>7. 作物の性質や耕種法を活用した封じ込め技術の開発 閉花性イネの育種および安定的利用技術の開発 (1) 鱗被形成遺伝子による閉花性イネの安定的利用技術の開発 (2) 新規変異による閉花性イネの育種技術の開発</p> <p>(3) 作物モデル及びGISデータベースを応用した水稻交雑抑制効果の評価予測</p>	<p>GM作物封じ込め技術の開発</p> <p>spw1-clsによる閉花受粉性イネの開発</p> <p>閉花受粉性イネ(H193mtTMT-C27)の開発</p> <p>時間的・空間的隔離評価技術の開発</p>					<p>農研機構・作物研究所</p> <p>農研機構作物研究所 農研機構北海道農業研究センター 農研機構中央農業総合研究センター</p> <p>農業環境技術研究所</p>	<p>稲研究領域</p> <p>稲研究領域 寒地作物研究領域 作物開発研究領域</p> <p>生態系計測研究領域</p>

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	農研機構農業環境変動研究センター	生物多様性研究領域長	◎ 與語靖洋
I. 遺伝子組換え生物の生物多様性影響評価手法の開発			
<p>1. ツルマメの生物・生態的特性の把握およびリスク評価手法の開発</p> <p>(1) ツルマメ摂食昆虫の摂食量とBt感受性特性の解明（平成28年度から(A)と(B)を統合)</p> <p>(A) ツルマメを摂食するチョウ目等昆虫のBt感受性に関する特性解明</p> <p>(B) ツルマメを摂食する昆虫類とその発生に関する調査・解析</p> <p>(2) ツルマメの病害に関する調査・解析</p> <p>(3) 環境条件の年次変動がツルマメ個体群の存続性や開花に及ぼす影響の解明（平成28年度から(C)と(D)を統合)</p> <p>(C) 遺伝子組換えダイズを評価するためのツルマメの生態的特性の把握</p> <p>(D) 遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑リスク評価手法の開発</p> <p>2. ナタネ類の遺伝的・生態的特性の把握およびリスク評価手法の開発（平成28年度から(E)と(F)を統合)</p> <p>3. 生物多様性影響評価のためのクワコの生態的特性の把握</p> <p>(1) クワコの生態的・生理的特性の把握とカイコ組換え遺伝子のモニタリング</p>	農研機構農業環境変動研究センター	外来生物影響評価ユニット	○ 芝池博幸
	農研機構生物機能利用研究部門	昆虫微生物機能ユニット	宮本和久 三橋渡 和田早苗 田中博光 榊原充隆 高橋明彦
	農研機構東北農業研究センター	生産環境研究領域 病害虫グループ 技術支援センター	榊原充隆 高橋明彦
	農研機構西日本農業研究センター 農研機構農業環境変動研究センター 農研機構九州沖縄農業研究センター	業務第1科 生物多様性研究領域	菊地淳志 安田耕司
	農研機構九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	水谷信夫
	農研機構九州沖縄農業研究センター 九州大学	野菜病害虫管理グループ 植物病理学分野	○ 大貫正俊 酒井淳一 土屋健一 古屋成人 佐藤豊三
	農研機構遺伝資源センター	微生物分類評価チーム	吉村泰幸
	農研機構農業環境変動研究センター	外来生物影響評価ユニット 統計モデル解析ユニット	○ 芝池博幸 大東健太郎
	筑波大学	生命環境系	大澤良 津田麻衣 原尚資 水口亜紀 加賀秋人
	福井県立大学 農研機構次世代作物開発研究センター	植物環境学分野 畑作物研究領域畑作物形質評価ユニット	
筑波大学	生命環境系	○ 大澤良 下野綾子 吉岡洋輔 原尚資 田部井豊 小沢憲二郎	
農研機構生物機能利用研究部門 農研機構生物機能利用部門	有用物質生産作物開発ユニット 新特性シルク開発ユニット	○ 河本夏雄	
農研機構生物機能利用部門	新特性シルク開発ユニット	○ 河本夏雄 富田秀一郎 行弘研司	

<p>(平成27年度から (G) に (H) を統合) (G) クワコの生態的・生理的特性の把握</p> <p>(H) カイコの組換え遺伝子モニタリング手法の開発</p> <p>(2) クワコの遺伝的多様性の解明</p> <p>4. 生物多様性影響評価のための魚類の生態的特性の把握</p> <p>(1) 大西洋サケの生育・繁殖特性及び在来サケ科魚類との競合性に関する研究 (H25-H27)</p> <p>(2) メダカの交雑性、有害物質生産性に関する研究 (H25-H26)</p> <p>(3) コイの交雑性に関する研究 (H25-H27)</p>	<p>農研機構本部 農研機構生物機能利用部門</p> <p>水産研究・教育機構増養殖研究所</p> <p>水産研究・教育機構増養殖研究所</p> <p>水産研究・教育機構増養殖研究所</p> <p>水産研究・教育機構増養殖研究所</p>	<p>カイコ機能改変技術開発ユニット 生体物質機能利用技術開発ユニット 昆虫相互作用ユニット</p> <p>経営戦略室 新特性シルク開発ユニット</p> <p>カイコ機能改変技術開発ユニット 先進昆虫ゲノム改変ユニット 昆虫植物相互作用ユニット ゲノム育種グループ</p> <p>ゲノム育種グループ</p> <p>ゲノム育種グループ</p> <p>ゲノム育種グループ</p>	<p>平山力 瀬筒秀樹</p> <p>志村幸子</p> <p>神村学</p> <p>石橋純</p> <p>○ 富田秀一郎 行弘研司 河本夏雄 瀬筒秀樹</p> <p>末次克行 上樂朋也 小林徹也</p> <p>○ 荒木和男</p> <p>○ 荒木和男 正岡哲治 名古屋博之 岡本裕之 内田和男 鈴木俊哉</p> <p>○ 正岡哲治 岡本裕之 荒木和男 名古屋博之 岡本裕之 名古屋博之 正岡哲治 荒木和男</p>
<b>Ⅱ. 遺伝子組換え作物の管理技術の開発</b>			
<p>5. 新規の遺伝子組換え技術に対応した検知・調査手法の開発 新規作出技術等に対応した検知手法の検討・開発</p> <p>(1) 新規作出技術等に対応した検知手法の検討・開発 (H25-H27)</p> <p>(2) 遺伝子組換え作物の国内流通を想定した簡易検知手法の開発</p>	<p>農研機構食品研究部門</p> <p>農研機構食品研究部門</p> <p>ファスマック</p> <p>農研機構食品研究部門</p> <p>ニッポンジーン</p>	<p>信頼性評価ユニット</p> <p>信頼性評価ユニット</p> <p>信頼性評価ユニット</p>	<p>○ 橘田和美</p> <p>○ 真野潤一 高畠令王奈 橘田和美 布藤聡 原口浩幸 大西真理 波田野修子</p> <p>○ 高畠令王奈 真野潤一 橘田和美 金山晋治 峯岸恭孝 土肥伸岳</p>

<p>(3) スタック系統における遺伝子間相互作用の検知・評価手法の開発(H25)</p> <p>6. 新規の遺伝子組換え技術および生物に関する科学的知見の収集・解析</p> <p>(1) 海外における新規育種技術等の規制・政策動向に関する情報の収集・解析(平成27年度から (I) を (J) に統合)</p> <p>(I) 国内外における遺伝子組換え生物の新規作出技術等に関する情報収集・解析</p> <p>(J) 海外におけるGM生物の社会経済学的影響評価に関する情報の収集・解析</p> <p>(2) 新規育種技術が生物多様性に及ぼす影響に関する情報の収集・解析</p> <p>7. 作物の性質や耕種法を活用した封じ込め技術の開発</p> <p>閉花性イネの育種および安定的利用技術の開発</p> <p>(1) 鱗被形成遺伝子による閉花性イネの安定的利用技術の開発</p> <p>(2) 新規変異による閉花性イネの育種技術の開発</p> <p>(3) 作物モデル及びGISデータベースを応用した水稻交雑抑制効果の評価予測</p>	北海道大学	応用生命科学分野	浅野眞一郎
	名古屋大学	環境学研究科	○ 立川雅司
	農研機構九州沖縄農業研究センター 農研機構食品研究部門 農研機構生物機能利用研究部門	飼料作物育種グループ 信頼性評価ユニット 有用物質生産作物開発ユニット 新特性シルク開発ユニット	桂真昭 橘田和美 ○ 田部井豊 河本夏雄
	名古屋大学	環境学研究科	立川雅司
	農研機構農業環境変動研究センター	生物多様性研究領域長 外来生物影響評価ユニット	○ 與語靖洋 芝池博幸 吉村泰幸
	水産研究・教育機構増養殖研究所	ゲノム育種グループ	正岡哲治 岡本裕之 名古屋博之 立川雅司
	名古屋大学 農研機構作物研究所	環境学研究科 稲研究領域	○ 吉田均
	農研機構作物研究所 農研機構北海道農業研究センター	稲研究領域 寒地作物研究領域	○ 吉田均 林高見 池ヶ谷智仁 清水博之
	農研機構中央農業研究センター	作物開発研究領域	○ 大森伸之介
	農業環境技術研究所	生態系計測研究領域	○ 大東健太郎 岩崎亘典

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。



中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名（契約課題名）	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	農研機構農業環境変動研究センター 生物多様性研究領域長 與語靖洋		

### I-1. 研究目的

環境ストレス耐性や病虫害抵抗性等、適応度の向上に関与する遺伝子を導入した遺伝子組換え（GM）生物を対象として、生物多様性影響評価に関する評価手法を開発し、GM作物と非GM作物の交雑を低く抑えるための圃場の時間的・空間的管理手法を確立する。New Breeding Technique（NBT）を含む新規ゲノム育種による作物や、各種新規GM作物等の検知技術を開発し、NBTを含む新しいゲノム育種技術、生物多様性影響評価、管理技術等に関する諸外国の研究開発や政策動向に関する知見の収集を行い、わが国に必要な情報を抽出し、プロジェクト関係者および行政部局に提供する。

このため、本研究では、

1. ツルマメの生物・生態的特性の把握およびリスク評価手法の開発
2. ナタネ類の遺伝的・生態的特性の把握およびリスク評価手法の開発
3. 生物多様性影響評価のためのクワコの生態的特性の把握
4. 生物多様性影響評価のための魚類の生態的特性の把握
5. 新規の遺伝子組換え技術に対応した検知・調査手法の開発
6. 新規の遺伝子組換え技術および生物に関する科学的知見の収集・解析
7. 作物の性質や耕種法を活用した封じ込め技術の開発

により、GM生物等の生物多様性影響の知見や国内外の最新の科学的情報の集積、環境ストレスに適応可能なGM生物多様性影響評価手法、GM遺伝子浸透抑制技術、GM生物の簡易・迅速検出技術、およびNBT等の交雑育種法との異同検証のための手法の開発を目標とする。

その結果、

1. Btタンパク質の在来チョウ目昆虫に及ぼす影響やツルマメの生態学的特性の解明
2. 環境ストレスや害虫に耐性を有するナタネ類のリスク評価手法の開発
3. カイコとクワとの交雑性の解明やクワコのモニタリング手法の開発
4. 大西洋サケ、メダカ、コイと野生種との交雑性や競合性の解明
5. DNAレベルの検知法の簡易迅速化による時間の短縮や低コスト化
6. NBT等の新規育種技術に関する国内外における動向に関する情報提供
7. 閉花受粉性、開花重複度、空間的隔離等による交雑率抑制手法の開発

が期待される。

## I-2. 研究結果

ツルマメについて3つの観点から取り組んだ。第1に昆虫については、わが国におけるチョウ目以外でツルマメを摂食する昆虫を併せて67種類、マメシクイガのツルマメ子実加害実態、主なコウチュウ目成虫、バッタ目および潜葉性昆虫の一日あたりのツルマメ食葉量等を明らかにするとともに、人工飼料やBtダイズ (Cry1Ac) の葉を用いて、チョウ目昆虫のBt毒素への感受性が、これまで評価書で用いてきた海外の結果と同様の傾向であることを示した (表1)。第2に病原菌について、これまでツルマメでは罹病する情報が皆無であったところ、ウイルス (4種類)、細菌 (21種類)、糸状菌 (34種類) の感染の確認や同定を行うとともに、一部については地域局在性も示した。第3に環境要因等の影響については、ツルマメの生育環境の解析から日本列島スケールで潜在分布域を示し、その自生地においては、土壤水分ストレス、植生の変化に伴う他植物による被陰、草刈りが主な死因であることを示した。野外実験においては、毎度種子の生残性から少なくとも6年間発芽力を維持すること、他植物との競合により種子生産量が減少すること、ダイズとの交雑リスクは西南日本や晩生品種で高いこと、ダイズとの雑種後代中間的な発生省庁を示すことを明らかにした。さらに、出石新党モデルを改良し、ツルマメ集団中に拡散したGM遺伝子の消失までに10年を超えることはないことを示した。

表1. 我が国に生息する昆虫のBt感受性 (人工飼料)

供試虫	供試齢	LC <sub>50</sub> (µg/g) (95%信頼区間)		
		Cry1Ac	Cry1A.105	Cry2Ab
チャノコカクモンハマキ	3	9.0 (14.1-2.5×10 <sup>10</sup> )	-	-
ハスモンヨトウ	2,3	172.0	-	-
オオタバコガ	3	0.91 (6.64-61.8)	-	-
チャノコカクモンハマキ	2	0.07	0.68	>21.2
ハスモンヨトウ	2	>7.99	>6.98	>21.2
アメリカシロヒトリ	2	0.56 (0.013-2661.0)	>6.98	6.41
アズキノメイガ	2	0.01 (0.00-0.033)	0.02 (0.002-0.048)	0.364
ハスモンヨトウ	1	>100 >1000	>100 >1000	>100 >1000
アズキノメイガ	1	0.49 (0.28-0.80) 0.40 (0.18-0.62)	4.90 (2.9-8.2) 0.56 (0.27-0.90)	>100 96.7
ウスアトキハマキ	1	5.4	870.0 (63.0-7.3×10 <sup>11</sup> )	5.4 27.0 (1.5×10 <sup>-35</sup> - 153.0)

ナタネについては、第1に環境適応度の異なる自生カラシナを選抜し、セイヨウナタネとの雑種の種子生産性が系統間で大きく異なることを示した。第2に自生セイヨウナタネに一次休眠性はないこと、自生セイヨウナタネやカラシナでは二次休眠が無い系統から80%近い休眠率を示す系統まで幅広い変異があること、遺伝子流動リスク評価に連続播種による環境適応性試験が不可欠であること等を明らかにした。第3にコナガ耐性について、生葉や人工飼料による耐性検定法、Bt抵抗性確認法、耐虫性に関するグルコシノレート含量の評価法等を開発し、

幅広い種間差があることを示した。第4に自生セイヨウナタネの遺伝的多様性について、国内自生セイヨウナタネの集団内の遺伝的多様性はそれほど高くなく、自殖による増殖が主であり、SSRマーカーによる遺伝的多様性の解析によって、自生セイヨウナタネ個体間の遺伝的関係の解析が可能であり、さらに海外品種と国内品種の分布は広く重なっていること等が推定された（図1）。

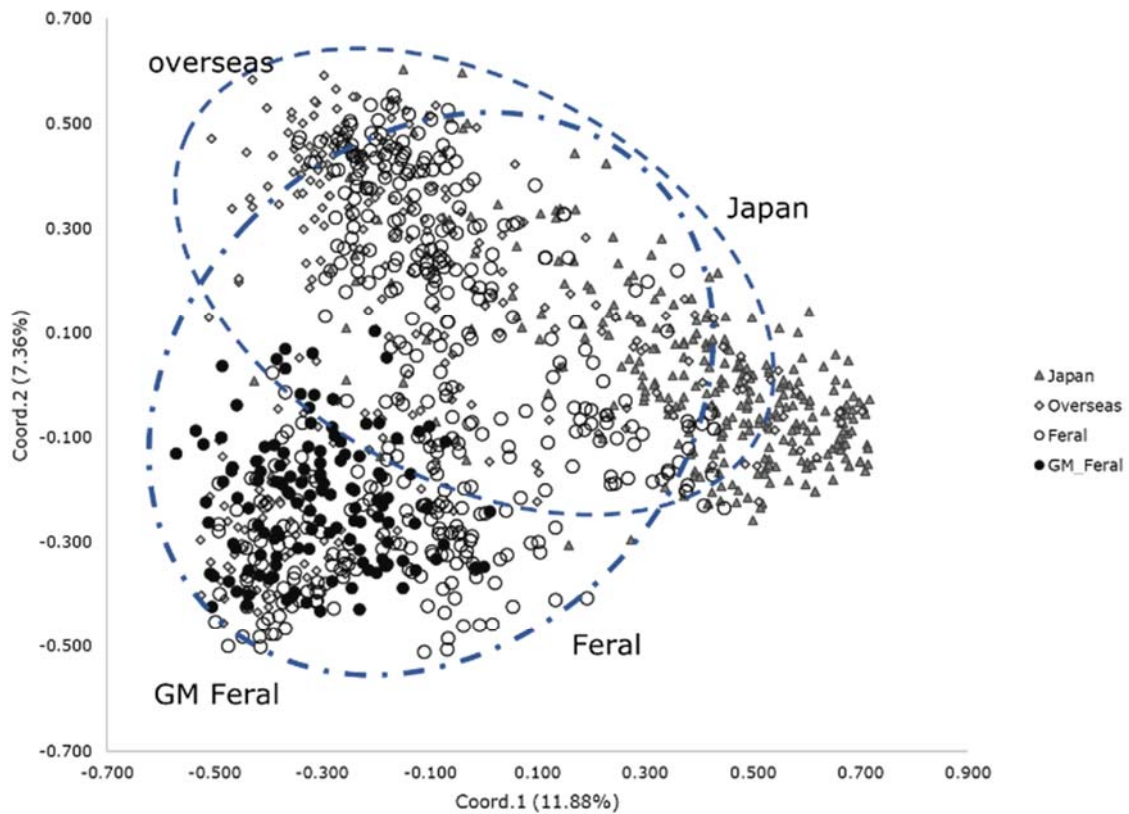


図1. PCoA解析における遺伝子組換え自生セイヨウナタネと他のセイヨウナタネとの遺伝的関係

クワコについては、その生態と遺伝的多様性の2つの観点から解析した。第1に生態については、クワコ成虫の発生時期は寒冷地では年2回、温暖地では年3回のピークがあることを示した。また、クワコやカイコとの交雑個体を捕獲する手法として、ボンビコールを誘引源として雄成虫を粘着板で捕獲するフェロモントラップを用いることが最も効率的であることを示し、交雑個体の方がより高い割合で捕獲されることが明らかとなった。さらに、カイコ雌成虫とクワコ雄成虫の交尾が観察されるものの、産下された卵をそのまま翌春まで放置したところ、すべてクワコ型であり、交雑個体の孵化幼虫を野外に放っても成虫まで生存する可能性は極めて低いことが明らかとなった。第2に遺伝的多様性については、日本産クワコからゲノム情報を取得し、既存のカイコゲノム情報等と照合してSNP等の多型が集中している領域を抽出し、全体として88%の遺伝子についてSNPを見つけた。また、抽出された候補領域から30のCDSをマーカーとして選定し、供試した48個体についてはカイコ型と考えられる配列は存在しなかった。さらに、集団遺伝学的解析により、少なくとも192個体から独立の27の遺伝子座について、カイコからの遺伝子流入がないことが確認され、ヘテロ接合度： $H$ 、 $N_e$ ：

有効集団サイズ、 $m$  : 流入率、 $N_e m$  : 一世代あたりの流入数として、以下の関係が成立し、一世代あたりの流入数は非常に小さい値であることが明らかとなった。

$$\hat{H} = \frac{4N_e m}{4N_e m + 1}$$

$$N_e m < \frac{1}{20436}$$

魚類については、大西洋サケ、メダカ、コイの3種類について検討した。第1に大西洋サケについては、水温が卵質に及ぼす影響は現場での現象を反映していた。また、アマゴ、サクラマス、ビワマスの卵を大西洋サケの精子で人工受精した場合、孵化前に死滅したものの、イワナの場合は大西洋サケとの雑種が確認された(図2)。さらに、競合性については、幼魚では、在来サケ科魚類は強い種間競合を示し、大西洋サケと混合飼育するとこれを攻撃したため、大西洋サケの成長が抑制されること、成熟前の成魚では在来サケ科魚類と棲み分けによって目立った種間競合が起こらないことを示した。第2にメダカについては、ヒメダカとの求愛行動を調べるとともに、有害物質産生性の藻類、ゼブラフィッシュおよびタマミジンコを対象とした試験法をポジティブコントロールも含めて開発し、野生メダカでは何れも生育に影響しないことを示した。第3にコイについて、室内試験ではゲンゴロウブナ、ニゴロブナおよびナガブナとの戻し交配すると、F1雄の精子や正常な形態をした仔魚が得られない等、後代の生残性が極めて低いことを示したものの、自然環境に似せた野外大型実験池では両者の雑種が確認された。さらに、コイとフナ類の雑種について、PCR-RFLPによって判別する手法を開発し、交雑を確認した。

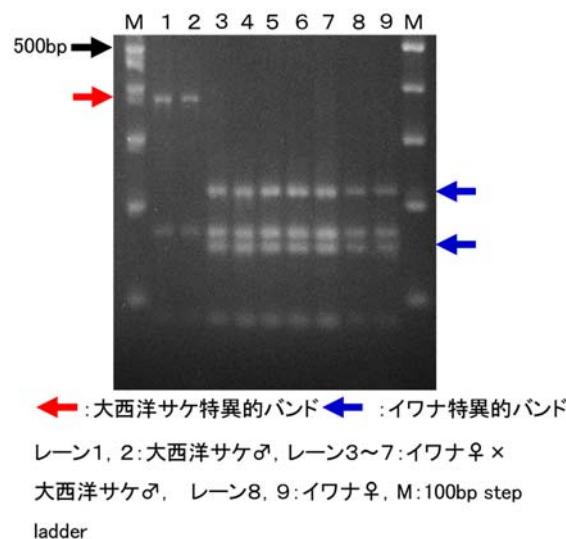


図2. 16SrRNA遺伝子のPCR-RFLPによる大西洋サケとイワナの交雑の解析

検知・調査手法の開発では、高感度検知法、簡易検知法、スタック系統の3つの観点からと取り組んだ。第一に高感度検知法については、一塩基変異及びDNAメチル化では3塩基以上連続した変異がプライマー3'末端側に存在する場合に従来法による検査が可能であること、デジタルPCRでは従来作物と1塩基しか変化していない新規作物であっても従来組換え体検査法と同様の検出・定量が可能であること、イネゲノムの既知部分は次世代シーケンス解析で網羅的に評価可能であること、これまでに構築した組換え体の塩基配列データベースとの比較で系

統まで同定できること等を示した。第2に簡易検知法については、LAMP法による簡易・迅速検知法を開発し、0.5%以下の微量混入でも30分以内に検出可能であることを確認するとともに、簡易迅速検出系と核酸クロマト法を組み合わせることにより、簡易迅速かつ低コストな検出法を開発し、多検体の同時検出が可能となった。また、GM検知用陽性コントロールプラスミドやキャリアオーバーコンタミネーションを防止する機能を備えたLAMP用マスターミックスを開発した。一方、短鎖DNAの検出技術については、Right Borderの近傍に、アグロバクテリウム法によって作出されたGM作物の多くに共通する配列を見出し、核酸クロマトを組み合わせても特異的かつ0.5%まで検出可能であることを確認した（図3）。第3にスタック系統については、チョウ目およびコウチュウ目対象のBt遺伝子をクローニングして、キメラ遺伝子も作成し、各*cry*遺伝子発現ベクターの準備とともに、その発現産物（Btトキシン）に対する特異的抗体作成のための発現システムを構築した。

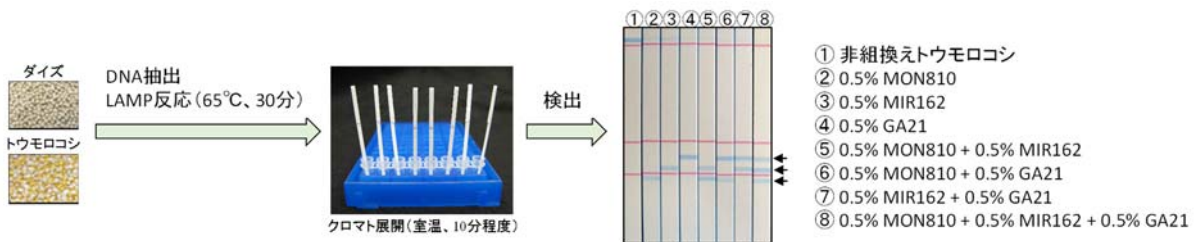


図3. 核酸クロマトによるLAMP増幅産物検出法の概要  
 右側の矢印（←）で示した青色のバンドは増幅の有無を表す。

新規育種技術等に関する海外を中心とした情報収集については、規制・政策動向と作出技術等の2つの観点から取り組んだ。第1に規制・政策の動向については、GM作物がもたらす社会経済的影響は、EUの研究プロジェクト（GRACE）の視点が有益であり、そこで分類した7つの影響（農業経営、共存方策、サプライチェーン、消費者、セクターやマクロレベル、国際貿易、政治）に関する研究の視点が重要であることを示した。また、GM作物認可への社会経済的要因は、ブラジル、アルゼンチン、豪州、ニュージーランド、EU等で考慮しているものの、各国で事情が大きく異なることを示した。さらに、ゲノム編集など新たな育種技術の規制動向についても、EU、米国、豪州、ニュージーランド、アルゼンチン等でそれぞれに大きく異なっていた。第2にNBT作出技術については、動植物におけるゲノム編集技術を中心とした育種研究と体細胞への遺伝子導入技術および、新育種技術を用いた生産物の検知法について、文献検索や国際会議出席等を通じて情報収集し、植物においてもゲノム編集技術の研究報告が多く見られること、特にCRISPR/Cas9を用いた報告が2015年以降急速に増大していること、最終産物における変異の確認や外来遺伝子の残存の有無の確認等に次世代シーケンサーの活用が目立つことなどが示された。なお、海外政策及び研究開発動向の情報に関しては、平成28年度以降ニュースレター（隔月）を作成し、行政部局及びプロジェクト関係者に送付・共有を図った（図4、2年間で12号）。また各年度の成果に関しては、年度末毎に報告書としてとりまとめた。

編集：GMO-RA 202-2 (担当：立川・津田)

## 1. アメリカ：USDAによる規制改定案の撤回

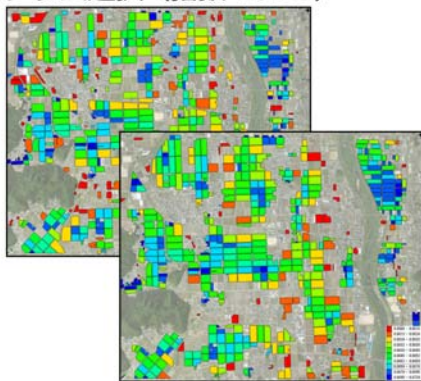
USDAは、これまでの遺伝子組換え規制の見直しを進めてきた。具体的には、2016年2月、規制改訂に向けた環境影響ステートメント（EIS）作成のための手続きを開始することを表明し、その後、2017年1月には規制改訂案を発表した（詳しくは、本ニュースレター6号（2017年2月）を参照）。規制改定案に対してはパブリックコメントも求められたものの、11月になって本提案は撤回された<sup>1</sup>。提案では、ゲノム編集をめぐる規制に関して重要な変更が提案されていたものの、ステークホルダー

図4. NBT海外規制情報の例（11号）

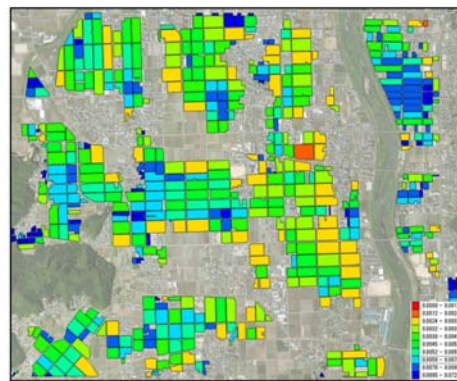
新規育種技術が生物多様性に及ぼす影響については、GM生物のリスク評価・管理に関連した農林水産省委託プロジェクトの四半世紀の情報とNBTとGM生物（主に作物）の生物多様性影響に関する情報を取りまとめ、検索可能なデータベースを構築し、国内外の有識者へのヒヤリングを行うとともに、それらの情報を取りまとめた。報告書に取りまとめた。その骨子は日本学術会議公開シンポジウムで話題提供した。

作物の性質や耕種法を活用した封じ込め技術の開発については、水稻をターゲットに閉花性作物育種と交雑抑制効果の評価の2つの観点から取り組んだ。第1に閉花性イネについては、三次メッシュ気象値ファイル（農環研）を使用し、開花予測モデルを改良し、開花時期について約90%の正答率を得た。*spw1-c1s2*の稔実率は最大でも70%台にとどまり、汎用的な育種用遺伝資源としては不十分であること、その分子機構は*spw1-c1s1*と異なり、タンパク質-DNA間相互作用の低下によることを明らかにした。さらに、TILLINGによる新規アレルの解析から閉花受粉性を付与する可能性を示唆した。第2に交雑抑制防止効果については、イネの出穂の重複程度とキセニアを利用し判定した交雑率の間に正の関係があることを確認し、出穂日予測モデルの汎用性を高めるための気象パラメータの整備を行い、時間的隔離を行うための基礎的な知見を得るとともに、水稻における距離と花粉飛散量の関係について、交雑リスクを最小にする空間配置を推定するアルゴリズムを作成した（図5）。

ランダム選択（指数：3.23）



連続的選択（指数：3.52）



最適化アルゴリズム（指数：3.70）

図5. 空間的隔離効果が高い空間配置

### I-3. 今後の課題

ツルマメに関して、第1に昆虫については、子実を食害する昆虫のBt毒素感受性試験を確立する必要がある。第2に病原菌については、ウイルスの種子伝染性や組換えダイズの抵抗性がツルマメへの水平伝播、細菌の病原性の分化（レース）や判別体系の確立、さらに糸状菌の接種方法の確立や接種病原性の有無と病原力の評価等を実施する必要がある。第3に環境要因等については、ゲノム編集等により作成された作物の普及前に、必要な生物多様性影響評価の観点を整理し、評価すべき点を明確にする必要がある。また、これまでの解析結果を取りまとめて、生物多様性影響評価検討会で活用できるツルマメが本来有する生物・生態的特性の科学的知見として取りまとめることが求められる。

ナタネに関して、自生ナタネの潜在的な大衆性把握のための耐虫性検定やより簡便な抵抗性試験法の確立、自生ナタネとGMナタネの間の遺伝子流動の解明、遺伝子浸透レベル予測手法の開発が不可欠である。

クワコに関して、新たな遺伝子組換えカイコ系統の第一種使用等や、第一種使用規程における使用等の内容や方法の検討状況に応じた行政当局からの要請等に応じて調査を進めるとともに、遺伝子組換えカイコの使用等の普及に伴って生物多様性影響に関連した新たな知見が得られた場合には随時更新する必要がある。

魚類に関して、大西洋サケの成熟のための生育環境の再現や交雑試験法の確立、モデル魚であるメダカで確立した各種試験法の大西洋サケやコイへの応用、コイとフナ類の世代を重ねた人工交雑試験や他のフナとの自然交雑試験の再確認が求められる。

検知・調査手法の開発に関して、次世代シーケンス解析による検出限界濃度の評価や、より安価で高感度に検出するための手法について検討が必要と考えられる。また、作物種によってはリファレンスとなるゲノム情報が存在しない場合もあるため、そうした情報を必要としないデータ処理方法について検討が必要である。次世代シーケンス解析は、次々と新たな手法や機器が開発されていることから、新たな技術を導入し、より安価で信頼性の高い評価手法を構築する必要がある。また、検査現場に経験者が少ないことが予想されるため、検査法を正確に実施できるよう、検査法のマニュアル化、システム化を図る必要があると考えられる。

当初の研究目標は概ね達成することができた。核酸クロマトを用いたLAMP増幅産物の検出法に関しては、論文発表後、関連機関に公定検査法としての採用を提案する予定である。さらに、短鎖DNA検出法に関しては、本プロジェクトで開発された改良PCR法は、僅か25 bpの配列を特異的に検出可能な世界的にも極めて稀な技術であることから、特許出願後、論文発表を行う予定である。

新規育種技術等に関する海外を中心とした情報収集に関しては、第1に規制・政策の動向では、従来の規制の枠内では収まらない技術の登場を想定すると、GM以外の規制との関連性も考慮する必要があるため、様々な科学的知見を蓄積するとともに、安全性の評価・管理、表示・情報提供、技術開発、知的財産権、国際的整合化など多角的な視点を考慮しつつ、多様なステークホルダーが参画してガバナンスのあり方を模索する必要がある。第2にNBT作出技術では、作出と検知の両方の技術の急速な発展が見込まれるため、規制・政策に反映させるためのタイムリーな情報提供が求められる。

新規育種技術が生物多様性に及ぼす影響に関しては、外来生物で研究が進んでいるプロセスベースとニッチベースの異なる推定モデルを組み合わせる等の取り組みや、新しいレギュラトリーサイエンスの手法や法的規制や社会的容認へのアプローチが必要である。

作物の性質や耕種法を活用した封じ込め技術の開発に関しては、第1に閉花性イネでは、開

花予測地図の信頼性の向上、*spw1-c1s2*の低稔実性に関連して東北以北でも利用可能な閉花受粉性イネの作出、準同質遺伝子系統をGMイネの母本・戻し交配親として用いた遺伝子拡散の安定的抑制技術の開発などが求められる。これらの技術は、GM品種以外に、有色素米や糯品種等での需要もあり、商業栽培のための障壁を取り除くことができると期待される。第2に交雑抑制防止効果では、イネの出穂期予測モデルの出穂期期間の予測可能性、出穂の重複程度と交雑率の関係は確率的に交雑率が許容する閾値を超えるリスクの詳細な予測、地域内での交雑リスクを可能な限り低減するための最適配置を推定するアルゴリズムは最適配置の考慮等を検討する必要がある。



中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1(1)	研究期間	平成25～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	1(1) ツルマメ摂食昆虫の摂食量とBt感受性特性の解明 (平成28年度にツルマメを摂食する昆虫類とその発生に関する調査・解析(平成25～28年度実施課題)と統合)		
小課題責任者名・研究機関	和田早苗・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域		

### 1) 研究目的

我が国への導入が予想される害虫抵抗性遺伝子組換えダイズと野生ツルマメとの交雑が起こった場合、それが生物多様性に及ぼす影響を評価するためには、害虫抵抗性遺伝子(以下、Bt遺伝子)をもつ雑種ツルマメの適応度を解明する必要がある。そのためには、ツルマメを摂食する昆虫類とその発生に関する調査・解析、およびBt遺伝子がコードしている殺虫性毒素タンパク質(以下Cry毒素)の標的となるツルマメを摂食する主要な昆虫のCry毒素感受性の程度を明らかにすることが必要となる。そこで、野生のツルマメを摂食する昆虫の種類や数、摂食量の実態を定期的に調査する。さらに、Cry毒素を塗布するなどしたツルマメを用いて、対象となる昆虫それぞれのCry毒素感受性の定量化を図る。

### 2) 研究成果

- i) 東北、関東、中国四国、九州の各地域において地域ごとに数カ所の調査地点を選定し、5月～10月にかけて1～3週間間隔でツルマメに発生している昆虫の種および個体数を調査した。チョウ目以外でツルマメを摂食することが確認された昆虫は、バッタ目13種、カメムシ目31種、コウチュウ目20種、ハエ目3種の計67種となった(表1)。
- ii) 北日本地域におけるマメシンクイガのツルマメ子実加害の実態を調査した結果、加害率は0～1.4%程度で(表2)、加害された莢ではほぼ全ての子実が食害されていた。
- iii) ツルマメを摂食する主なコウチュウ目成虫の一日あたりのツルマメ食葉量を、摂食前後の葉のデジタル写真の画像解析により算出した(表3)。
- iv) ツルマメを摂食する主なバッタ目および潜葉性昆虫についても、同様の方法でツルマメ食葉量を算出した(表4および表5)。ツマグロバッタは食葉量が抜群に大きい上に、ツルマメの周囲でよく観察されたことから、ツルマメの生育への影響がバッタ目の中で最も大きいと考えられた。
- v) ツルマメ摂食チョウ目昆虫のBt毒素への感受性を、各昆虫種に適応する人工飼料に1/10量の毒素液を混合したもの、または毒素液に浸漬したツルマメの葉を与えて調査した(表6)。この結果は、海外における近縁種で得られている感受性の報告と同じ傾向

であった。

表1 チョウ目以外のツルマメ摂食昆虫（67種）			
バッタ目	コバネヒメギス	カメムシ目	カンキツヒメヨコバイ
	ニシキリギリス		ツマグロオオヨコバイ
	セスジツユムシ		オオヨコバイ
	ツユムシ		マメノミドリヒメヨコバイ
	アオマツムシ		トビイロハゴロモ
	マツムシ		ベッコウハゴロモ
	カンタン		マメアブラムシ
	オンブバッタ		ダイズアブラムシ
	ツチイナゴ		ジャガイモヒゲナガアブラムシ
	コバネイナゴ		オンシツコナジラミ
	セグロイナゴ		ナカグロカスミカメ
	ツマグロバッタ		クロトビカスミカメ
	トノサマバッタ		オオクロトビカスミカメ
			ブチヒゲカメムシ
コウチュウ目	アオドウガネ		シラホシカメムシ
	ドウガネブイブイ		トビシラホシカメムシ
	ヒメコガネ		マルシラホシカメムシ
	コガネムシ		クサギカメムシ
	マメコガネ		アオクサカメムシ
	クズノチビタマムシ		ミナミアオカメムシ
	マメチビタマムシ		イチモンジカメムシ
	マメハンミョウ		マルカメムシ
	ホタルハムシ		イトカメムシ
	フタスジヒメハムシ		イチゴチビナガカメムシ
	アオガネヒメサルハムシ		メダカナガカメムシ
	アオバネサルハムシ		クロホシカメムシ
	ムネアカキバネサルハムシ		ホソヘリカメムシ
	ツヤキバネサルハムシ		ハラビロヘリカメムシ
	マルキバネサルハムシ		ホシハラビロヘリカメムシ
	コフキゾウムシ		アズキヘリカメムシ
	シロコブゾウムシ		ホオズキカメムシ
	アルファルファタコゾウムシ		
	オジロアシナガゾウムシ	ハエ目	ダイズサヤタマバエ
	ワモンヒョウタンゾウムシ		ダイズコンリュウバエ
			ダイズクロハモグリバエ

表2 北日本地域におけるツルマメのマメシクイガによる加害実態

調査地点		採集年月日	調査莢数	加害莢数 (加害率%)
太平洋側	岩手県盛岡市 1	2016/10/6	734	4 (0.5)
	岩手県盛岡市 2	2016/10/6	1127	2 (0.2)
	岩手県盛岡市 3	2016/9/26	680	0 (0.0)
	岩手県盛岡市 4	2016/10/18	964	2 (0.2)
	岩手県平泉町 1	2016/10/12	948	0 (0.0)
	岩手県平泉町 2	2016/10/12	1065	0 (0.0)
	岩手県平泉町 3	2016/10/12	944	2 (0.9)
	宮城県栗原市	2016/9/29	1358	0 (0.0)
	宮城県栗原市	2016/10/12	1057	15 (1.4)
日本海側	青森県弘前市	2017/10/20	1074	10 (0.93)
	秋田県鹿角市	2017/10/20	1124	2 (0.18)
	秋田県角館市 1	2017/10/15	2948	17(0.58)
	秋田県角館市 2	2017/10/15	1006	12(1.19)
	新潟県上越市 1	2017/10/21	922	4(0.43)
	新潟県上越市 2	2017/10/21	653	3(0.46)

表3 主なコウチュウ目成虫のツルマメ食葉量

種名	調査虫数	食葉量 (mm <sup>2</sup> /日) <sup>1)</sup>	体長 (mm) <sup>2)</sup>
コガネムシ	8	1157.7 ± 121.1	17-24
ヒメコガネ	10	914.9 ± 73.5	12.5-16.5
マメハンミョウ	11	598.9 ± 73.7	12-18
マメコガネ	10	266.0 ± 28.8	9-13
シロコブゾウムシ	8	239.3 ± 35.4	13-15
コフキゾウムシ(雌)	13	99.4 ± 16.6	3.6-7.5
コフキゾウムシ(雄)	3	22.8 ± 3.9	
フタスジヒメハムシ	17	30.3 ± 4.0	3.0-3.4
マメチビタマムシ	12	22.2 ± 4.7	2.4-3.0
マルキバネサルハムシ	25	5.5 ± 0.3	2.2-2.7
ドウガネブイブイ	3	1936.6 ± 492.6	17-25
ワモンヒョウタンゾウムシ	2	193.0 ± 151.0	6.8-10.0
アオバネサルハムシ	2	20.3 ± 12.2	3.0-4.5

1) 1個体当たりの平均値±標準誤差。調査は10日間。

ただし、マメコガネの半数は6日間調査。

2) 体長は原色日本甲虫図鑑Ⅱ～Ⅳ(保育社)、今坂・南(2008)によった。

表4 主なバッタ目成虫のツルマメ食葉量

供試虫	摂食量 (mm <sup>2</sup> /日) <sup>A</sup>	調査個体数
ツマクロバッタ	7087.9±1129.6	4
トノサマバッタ	3966.1	1
ツチイナゴ	3572.1±465.3	5
ニシキリギリス	2627.3	1
セグロイナゴ	1395.3±413.0	4
オンブバッタ	1723.1±624.1	4
クルマバッタ	686.5	1
アオマツムシ	640.4	1
セスジツユムシ	579.5	1
ツユムシ	497.9± 72.5	2
マツムシ	451.3± 101.4	2

A: 平均値±標準誤差、原則10日間の平均値

表5 潜葉性昆虫のツルマメ食葉量

供試虫	摂食量 <sup>A</sup> (mm <sup>2</sup> /幼虫期間)	調査個体数
ダイズクロハモグリバエ	211.0±12.1	28
ダイズギンモンハモグリ <sup>B</sup>	127.6±11.8	12
ダイズギンモンハモグリ <sup>C</sup>	234.3±28.4	12

A : 平均値±標準誤差、 B : 斑状摂食面積、 C : 線状摂食部より先の全面積

飼料	供試虫	供試齢	LC <sub>50</sub> (µg/g) (95%信頼区間)			備考
			Cry1Ac	Cry1A.105	Cry2Ab	
人工飼料	チャノコカクモンハマキ	3	9.0 (14.1-2.5×10 <sup>10</sup> )	-	-	10日後の致死率より算出
	ハスモンヨトウ	2,3	172.0	-	-	8日後の致死率より算出
	オオタバコガ	3	0.91 (6.64-61.8)	-	-	5日後の致死率より算出
	チャノコカクモンハマキ	2	0.07	0.68	>21.2	
	ハスモンヨトウ	2	>7.99	>6.98	>21.2	
	アメリカシロヒトリ	2	0.56 (0.013-2661.0)	>6.98	6.41	
	アズキノメイガ	2	0.01 (0.00-0.033)	0.02 (0.002-0.048)	0.364	
	ハスモンヨトウ	1	>100 >1000	>100 >1000	>100 >1000	5日後の致死率より算出。
	アズキノメイガ	1	0.49 (0.28-0.80) 0.40 (0.18-0.62)	4.90 (2.9-8.2) 0.56 (0.27-0.90)	>100 96.7	試験を2回行った(ウスアトキハマキのCry1AcおよびCry1A.105を除く)。
	ウスアトキハマキ	1	5.4	870.0 (63.0-7.3×10 <sup>11</sup> )	5.4 27.0 (1.5×10 <sup>-35</sup> -153.0)	
			LC <sub>50</sub> (µg/ml) (95%信頼区間)			
ツルマメ葉	ハスモンヨトウ	1	4700 (2700-11200)	-	-	7日後の致死率より算出
	チャバネキボシアツバ	4,5	25.5 (16.1-40.4)	-	-	4日後の致死率より算出
	オオウンモンクチバ	1	130.1 (88.9-195.4)	-	-	10日後の致死率より算出
	ナミスジチビヒメシャク	1	1.1 (0.39-3.32)	-	-	
	マメドクガ	1	<0.1	-	-	
	ウスアトキハマキ	1	-	0.21 (0.001-0.58)	15.9 (7.66-25.08)	8日後の致死率より算出
	ナミスジチビヒメシャク	1	-	1.4	14.2 (9.85-18.8)	

### 3) 成果活用における留意点

人工飼料および葉を用いたBt毒素への国内チョウ目昆虫の感受性調査により、これらの昆虫が海外におけるチョウ目昆虫近縁種と同じ感受性傾向を示すことが初めて明らかになった。

### 4) 今後の課題

ツルマメの子実を食害するマメシクイガのBt毒素感受性試験のための飼育方法の確立については、研究期間内に目途が立たなかった。ダイズやツルマメの莢では全く羽化しなかったが、人工飼料を用いる方法では少数の羽化が認められたので、今後は人工飼料を用いた飼育方法の改良により、同昆虫のBt毒素感受性試験方法の確立も可能と考えられた。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1(2)	研究期間	平成25～26年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	1(2) ツルマメの病害に関する調査・解析		
小課題責任者名・研究機関	大貫正俊・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域		

### 1) 研究目的

遺伝子組換えダイズにおける植物保護に関する形質は、現在除草剤耐性と害虫耐性(Bt)が商業化されているが、病害耐性の形質導入も実用化を目指した研究が進められている。我が国にはダイズの近縁野生種であるツルマメが生息しているため、将来的に我が国へ導入された場合、ツルマメと交雑する可能性がある。また、現在Btダイズが第一種使用規程承認(栽培なし)されているが、その遺伝子がツルマメに流動した際の個体群への影響(死因等)に関連して、ツルマメ個体群に対する重要な生育阻害要因と考えられる病害に関する情報は極めて少ない。そこで、様々な遺伝子組換えダイズがツルマメの生物多様性に及ぼす影響を評価する一環として、ツルマメに感染する主要な病原微生物の種類と感染程度を明らかにするとともに、その特性を解明する。

### 2) 研究成果

#### (1) 病原ウイルスの同定

実験方法：ツルマメからの病原ウイルスの検出・同定のため、東北、つくば、中国、九州地域からウイルス病様の症状を示したツルマメ葉を採取し、RNA抽出した。既報のマメ科ウイルスの塩基配列を基にウイルス属あるいは種特異的なプライマーを合成し、ツルマメから抽出したRNAを鋳型としてRT-PCRを実施した。得られた特異産物を精製し、ダイレクトシーケンスあるいは、クローニングによりDNA塩基配列を決定した後、BLAST検索により、既報のウイルス塩基配列との相同性を比較し、ウイルス種を確定した。また、ジーンバンク保存のマメ科ウイルスがツルマメに感染するか、汁液接種試験により確認した。

実験結果：これまでに確認されたウイルスは*Cucumber mosaic virus* (CMV)、*Soybean yellow common mosaic virus* (SYCMV)、*Bean common mosaic virus* (BCMV)、*Soybean mosaic virus* (SMV)である。このうち、SYCMVは、調査した4地域(東北、つくば、中国、九州)から検出され、とくにつくばおよび九州での分離頻度は高く、ツルマメの主要なウイルスであることが確認された(表1)。CMVは、平成25年度はつくばと九州で検出されたものの平成26年度はつくばでのみ確認された。BCMVは、東北のツルマメ(1株)から、SMVは、つくば(9株)および中国(1株)のツルマメからそれぞれ検出された。とくに、つくばのSMVは、栽培条件下のツルマメから検出されており、近隣で栽培されていたダイズからのウイ

表1 4地域のツルマメから検出されたウイルス

	SYCMV	CMV	BCMV	SMV
東北	2/18	0/18	1/18	0/18
つくば	25/25	5/25	0/25	9/25
中国	14/24	0/24	0/24	1/24
九州	35/35	0/35	0/35	0/35

表中の数字は検出株数/検定株数

ルス感染が疑われた。ジーンバンクに保存されたマメ科ウイルスの BCMV、*Alfalfa mosaic virus* (AMV)、*Clover yellow vein virus* (CIYVV)、*Southern bean mosaic virus* (SBMV) を汁液接

種したところ、BCMV、CIYVV、SBMVは全身感染し、とくに、CIYVVの病徴は強く現れた。また、九州で発生したSYCMV (熊本-13) も同様に全身感染した(表2)。

表2 マメ科植物に発生する既存ウイルスのツルマメへの接種試験

ウイルス(MAFF番号)	接種初生葉の病徴とウイルス検出	上位葉の病徴とウイルス検出
BCMV (MAFF105007)	無病徴, +	モザイク, +
AMV (MAFF10400)	無病徴, +	無病徴, -
SBMV (MAFF307034)	無病徴, +	モザイク, +
CIYVV (MAFF715042)	無病徴, +	モザイク, +
SYCMV (熊本-13)	無病徴, +	モザイク, +

接種葉は接種2週間後、上位葉は3週間後に病徴観察およびRT-PCRによるウイルス検出を行った。

## (2) 病原細菌の同定

実験方法：日本各地のツルマメ群落において、細菌感染の疑われる罹病葉を収集し、細菌の分離・保存を行った。分離細菌について、病原性の有無を迅速かつ簡便に検出する目的で、タバコ過敏感反応(HR)試験を実施した。HR陽性を示した菌株は、ツルマメとダイズに噴霧接種を行い、コッホの原則を満たす菌株を選抜した。また、ダイズの病原細菌である既報のダイズ葉焼病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)とダイズ斑点細菌病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)を供試し、ツルマメに噴霧接種試験を行った。接種試験により病原性が認められた分離菌株に関して、16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく相同性解析により、種の推定を行った。

実験結果：日本各地のツルマメ自生地14カ所から、罹病個体を約90検体収集・保存した。各罹病葉から細菌を100菌株以上分離・保存した。分離菌株をタバコ過敏感反応(HR)試験に供試し、HR陽性の45菌株を得ることができた。HR陽性の45菌株についてツルマメとダイズ(品種：鶴の子ダイズ)に対する病原性の有無を噴霧接種により調べた。その結果、21菌株で黄色や白色を呈する斑点性の病徴などが接種葉に形成され、両種植物に病原性を有することが明らかとなった(表3)。さらにダイズの病原細菌である*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*と*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*がツルマメに病原性を示すことも接種試験により明らかとなった。ツルマメとダイズに病原性を示した21菌株について、16S rRNA遺伝子の塩基配列を解析し、属あるいは種の推定を行った(図1)。その結果、8菌株は*X. axonopodis* pv. *glycines*と高い相同性を示し主要なクラスターを形成した。また2菌株が、ダイズ斑点細菌病菌*P. syringae* pv. *glycinea*と同一のクラスターに含まれた。その他11菌株は異なる7つのクラスターを形

成した (図1)。*X. axonopodis* pv. *glycines* と推定される病原細菌は、異なる採集地

表3 HR 陽性菌株のツルマメとダイズに対する病原性と推定される属/種との関係

採集地	菌株数		病原性を示した菌株数									
	病原性		推定される種		推定される属 <sup>a)</sup>							
	有	無	<i>Xanthomonas</i> pv. <i>glycines</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	A	B	C	D	E	F	G	
岩手県 春小谷地	3	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
岩手県 穴口	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
栃木県 さくら市	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
徳島県 吉野川市	6	4	0	0	3	0	1	0	1	0	1	
熊本県 菊池市	4	3	3	0	0	0	0	1	0	0	0	
熊本県 上益城郡	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
熊本県 五木村	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
宮崎県 小内海	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
宮崎県 宮崎大学	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
鹿児島県 鹿児島市	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
計	21	24	8	2	3	2	2	1	1	1	1	

a) A: *Pseudomonas* sp.; B: *Pantoea* sp.; C: *Acidovorax* sp.; D: *Methylobacterium* sp.; E: *Rhizobium* sp.; F: *Agrobacterium* sp.; G: *Stenotrophomonas* sp.

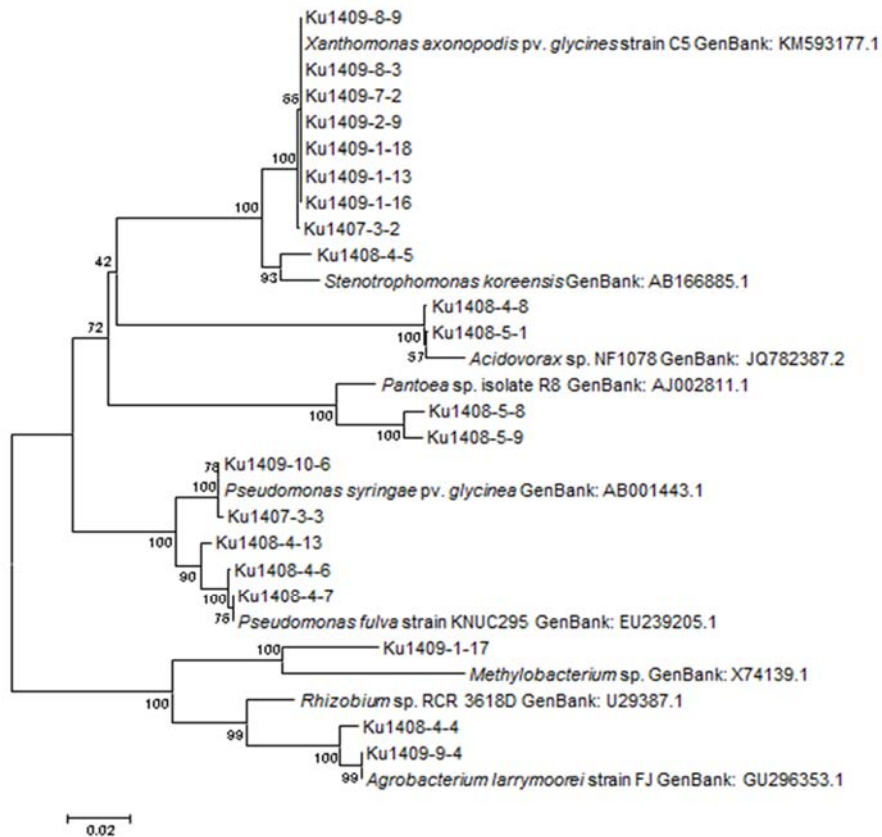


図1 ツルマメに寄生する病原細菌の16S rDNA遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹から広範に分離されたことから、ツルマメの主たる細菌病の病原である可能性が高いことが推察された。一方、*P. syringae* pv. *glycinea* と推定される菌株は九州の限られた



地域からのみ分離され、地理的局在性が示唆された（表3）。

(3) 病原糸状菌の同定

青森県つがる市、秋田県仙北市、岩手県盛岡市・滝沢市、茨城県つくば市・筑西市、広島県福山市、および熊本県菊池市・合志市・上益城郡嘉島町・熊本市において採集したツルマメの病変部から糸状菌を分離・検出・観察し、形態およびrDNA-ITS領域等の塩基配列に基づき分類学的所属を確定した。次に同定された種が植物病原菌として、また特にダイズの病原菌として報告されているか調査し、それらが採集された地域や時期から国内分布とツルマメやダイズ×ツルマメ雑種の生存に対する影響を推定した。糸状菌に関しては、これまでに表4の20属34種を検出・分離、同定した（ダイズの病原と共通種は括弧内に病名を付記）。

表4 ツルマメから検出された糸状菌とその採集地

連番	検出・分離菌	青森県		秋田県		岩手県		茨城県		広島県		熊本県	
		つがる市	仙北市	盛岡市	滝沢市	つくば市	福山市	菊池市	合志市	上益城郡嘉島町	熊本市		
1	<i>Alternaria alternata</i>	●		●	●	◎				●			
2	<i>Botrytis cinerea</i>									●			
3	<b><i>Cercospora kikuchii</i></b>				●								
4	<b><i>Cercospora sojina</i></b>		●										
5	<i>Colletotrichum aenigma</i>									●		●	
6	<i>Colletotrichum cliviae</i>									●		●	
7	<b><i>Colletotrichum destructivum</i></b>							◎		●		●	
8	<i>Colletotrichum fructicola</i>											●	
9	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>							◎					
10	<i>Colletotrichum siamense</i>									●			
11	<i>Colletotrichum</i> sp.									●			
12	<b><i>Corynespora cassiicola</i></b>									●		●	
13	<i>Curvularia geniculata</i>									●			
14	<i>Curvularia intermedia</i>									●			
15	<i>Curvularia lunata</i>												●
16	<i>Epicoccum nigrum</i>		●							●			
17	<i>Fusarium acuminatum</i>							◎					
18	<b><i>Fusarium avenaceum</i></b>							◎					
19	<i>Fusarium fujikuroi</i>									●			
20	<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>							◎					
21	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>				●					●		●	●
22	<i>Leptosphaerulina</i> sp.				●					●		●	
23	<i>Monochaetia</i> sp.									●			
24	<i>Myrothecium roridum</i>				●					●			
25	<b><i>Oidium (Reticuloidium) sp.*</i></b>									●			
26	<b><i>Peronospora manshurica*</i></b>	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●
27	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>									●			
28	<b><i>Phakopsora pachyrhizi*</i></b>							●		●			●
29	<b><i>Phoma</i> sp.</b>							◎		●		●	
30	<i>Phytophthora cryptogea</i>							◎					
31	<b><i>Phytophthora sojae</i></b>							◎					
32	<i>Pythium dissotocum</i>							◎					
33	<b><i>Rhizoctonia solani</i></b>			●								●	
34	<b><i>Septoria glycines</i></b>			●	●								

\*:既報のツルマメ寄生菌 太字:ダイズの病原菌 ◎:実生から分離

- 1) *Alternaria alternata*, 2) *Botrytis cinerea*, 3) *Cercospora kikuchii* (紫斑病), 4) *Cercospora sojina* (斑点病), 5) *Colletotrichum aenigma*, 6) *Colletotrichum cliviae*, 7) *Colletotrichum destructivum* (炭疽病), 8) *Colletotrichum fructicola*, 9) *Colletotrichum nymphaeae*, 10) *Colletotrichum siamense* 11) *Colletotrichum* sp., 12) *Corynespora cassiicola* (褐色輪紋病), 13) *Curvularia geniculata*, 14) *Curvularia*

*intermedia*, 15) *Curvularia, lunata* 16) *Epicoccum nigrum* (病名未提案), 17) *Fusarium acuminatum*, 18) *Fusarium avenaceum* (赤かび病), 19) *Fusarium fujikuroi*, 20) *Fusarium oxysporum* (赤かび病), 21) *Leptosphaerulina chartarum*, 22) *Leptosphaerulina* sp., 23) *Monochaetia* sp., 24) *Myrothecium roridum*, 25) *Oidium (Reticuloidium* 亜属) sp. (うどんこ病), 26) *Peronospora manshurica* (べと病), 27) *Pestalotiopsis neglecta*, 28) *Phakopsora pachyrhizi* (さび病), 29) *Phoma* sp (茎枯病), 30) *Phytophthora cryptogea*, 31) *Phytophthora sojae* (茎疫病), 32) *Pythium dissotocum*, 33) *Rhizoctonia solani* (葉腐病), 34) *Septoria glycines* (褐斑病)。以上、国内では、うどんこ病菌、べと病菌およびさび病菌以外は全てツルマメから初めて確認されたものである。検出分離された菌種の内、培養できるものは農業生物資源ジーンバンクに登録保存した。また、培養できない絶対寄生菌はさく葉標本にして保存した。

### 3) 成果活用における留意点

ツルマメの生物・生態的特性に関わる生育阻害要因としての主要な微生物の種を明らかにすることができた。本成果は、多くの新知見を提供するものの、病原性の確認が必要なものも含まれている。本成果に基づきツルマメのウイルス、細菌、糸状菌に関する学術論文がそれぞれ刊行されており、参照していただきたい。

### 4) 今後の課題

#### (1) 病原ウイルス

ツルマメに発生する4種ウイルス (SYCMV、CMV、BCMV、SMV) は、種子伝染すると考えられ、それらの実証が必要である。また、将来的にウイルス抵抗性組換えダイズが作出され、日本に導入された場合を想定して、組換えダイズの抵抗性がツルマメとの交雑種に付与されるか、さらには野外ツルマメの生物多様性へ影響するかについて今後検討する必要がある。

#### (2) 病原細菌

噴霧接種によりツルマメに対して病原性を示さなかったHR陽性菌株について、付傷接種など他の接種法による病原性の検討が必要である。病原性が認められた菌株は未報告の病原細菌となるため、その分類学的位置づけを解明する必要がある。本研究で明らかとなった *X. axonopodis* pv. *glycines* と *P. syringae* pv. *glycinea* の2種に関して、各種ダイズ品種に対する反応を詳細に解析することで病原性の分化 (レース) を解明し、新たな病害抵抗性遺伝子の探索に寄与するための判別体系を確立することが望まれる。

#### (3) 病原糸状菌

本研究課題で得られた保存菌株を用いてツルマメやダイズ×ツルマメの交雑種に接種を行い、各菌種の接種方法を確立するとともに、接種病原性の有無と病原力を評価する必要がある。絶対寄生菌についても、野外から再度採集して集中的に接種を行い、組換えダイズを用いた将来の研究に役立てるため、増殖した胞子を凍結保存法などにより長期保存することも重要である。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1(3)	研究期間	平成28～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	1(3) 環境条件の年次変動がツルマメ個体群の存続性や開花に及ぼす影響の解明		
小課題責任者名・研究機関	芝池博幸・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター 生物多様性研究領域		

## 1) 研究目的

主要な遺伝子組換え(GM)作物(トウモロコシ、ダイズ、ワタ、ナタネ)の栽培面積は、2016年の時点で1億8,510万haに達し、GM作物が導入された1996年と比較して約110倍に増加した。これら4作物の日本における自給率は低く、油糧用などの用途でGM作物を含む穀物原料が大量に輸入されている。このような穀物原料を陸揚げする港周辺では、こぼれ落ち種子に由来する個体が生育し、近縁種との交雑が懸念されている。特に、日本列島を含む東アジアにはダイズと交雑可能な野生種(ツルマメ)が自生しているため、GMダイズの生物多様性影響評価に関する知見の蓄積が喫緊の課題となっている。

これまでの委託プロジェクト研究では、カルタヘナ法に基づき、第一種使用規程承認申請を行う際に提出する生物多様性影響評価書の作成に資する近縁種(ナタネ類とツルマメ)の情報収集や、導入遺伝子がGMダイズとツルマメの雑種後代に浸透する可能性をシミュレーションするモデルの構築などが行われた。しかしながら、GMダイズの生物多様性影響を適切に評価するためには、ツルマメの生活史と環境条件の関係などについて、さらなる知見の蓄積が必要な状況にある。

本研究では、これまでの委託プロジェクト研究において十分な知見が蓄積されていない課題として、以下の①～⑦に取り組んだ。

- ①ツルマメの生育環境を明らかにし、日本列島スケールで潜在分布域を評価する。
- ②ツルマメの生活史と環境条件の関係を解明する。また、埋土種子の発芽特性を明らかにする。
- ③生活史特性からツルマメ個体群の存続性を評価する
- ④植生の遷移とツルマメ個体群の動態および種子生産の関係を明らかにする。
- ⑤GMダイズとツルマメの開花重複度から交雑リスクを評価する。
- ⑥GMダイズとツルマメの雑種後代の発芽特性を明らかにする。
- ⑦先行研究により開発された遺伝子浸透モデルを改良し、GMダイズとツルマメの雑種後代における導入遺伝子の動態を再評価する。

## 2) 研究成果

①ツルマメの生育環境を明らかにし、日本列島スケールで潜在分布域を評価する。

農業生物資源ジーンバンクの記録などから、ツルマメ採集地の緯度経度情報を抽出し、国土数値情報などを用いてツルマメの生育環境を評価した。その結果、ツルマメは湿性草本群落や水田雑草群落が優先する3次メッシュ（1km×1km）に生育する場合や、土地利用の面から水田（約40%）と樹林地（約25%）が大きな割合を占めるメッシュに生育するケースが多いことが明らかとなった。

「日本植生誌（至文堂）」からツルマメを含む群落の構成種を抽出し、その特性について多変量解析を行った。その結果、第1軸は正の方向に階層構造の発達した群落、負の方向に草本層のみの群落が位置づけられた。また、第2軸は正の方向に河川の上・中流域に成立する群落、負の方向に下流域で形成される群落が位置づけられた。このことから、ツルマメは主として河川中・下流域の後背湿地などに成立する群落（セリ・クサヨシ群落、低地ヤナギ林、オギ群落など）の構成種であることが明らかとなった。

最大エントロピー法（MaxEnt）を用いて、ツルマメ採集地の環境情報から、日本列島スケールでツルマメの潜在分布域を評価した。その結果、雄物川や北上川などの流域、利根川水系、濃尾平野（木曾三川）、岡山や香川などの瀬戸内地方、筑後川流域などにおいて、ツルマメの高い潜在分布確率が示された。

輸入GMダイズのこぼれ落ち個体が確認された博多港や鹿島港を含む地域において、ツルマメの生育状況を調査した。

博多港周辺地域における調査では、衛星写真から主要道路沿いの緑地を抽出した地図を作成するとともに、各3次メッシュにつき2地点（計64地点）でツルマメの有無を調査した（図1）。その結果、ツルマメの生育を確認できたのは1カ所のみであった。福岡県～佐賀県にかけて（筑後川下流域）の調査では、クリーク沿いの畦やヨシなどが繁茂した休耕田で、しばしばツルマメの生育を確認することができた。

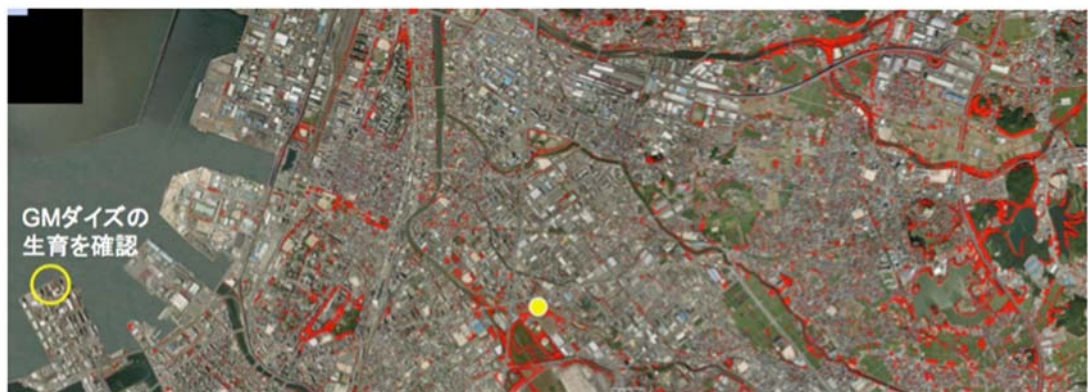


図1 福岡県福岡市の主要道路沿いの緑地（赤領域）とツルマメの生育地点（黄丸）

鹿島港周辺地域における調査では、高い潜在分布確率と対応するように、ツルマメの生育を容易に確認することができた（図2）。

これらの現地調査の結果、港湾やその周辺の幹線道路沿いにツルマメ個体群が形成されることはまれであるが、かつて後背湿地であったと考えられる地点や、ヨシなどが繁茂した休耕田においては、ツルマメの生育する可能性が高いことが明らかとなった。



図2 ツルマメの生育環境（左：茨城県鹿島港付近；右：茨城県鹿島市の休耕田）

②ツルマメの生活史と環境条件の関係を解明する。また、埋土種子の発芽特性を明らかにする。

平成25年～27年の3年間、つくば市とその周辺のツルマメの自生地（8ヵ所）において、ツルマメの発生活長を記録するとともに、個体密度と種子生産数、土壌水分量の推移、共存植物などを調査した。ツルマメは、いずれの自生地でも3月末～4月初旬に出芽し、8月の中旬～9月末に開花した。各自生地の最大密度は32～204個体/m<sup>2</sup>、平均生存率は10.4～32.4%、種子生産数は0～約165個であった。

3ヶ年の調査を通して、生育初期の土壌水分量がツルマメの生残に大きな影響を与えることが示された。平成25年は全体として非常に乾燥した年で、5月前半と6月前半の2度にわたって土壌水分量が0%に近づいたことが、初期死亡率の上昇の原因と考えられた。一方、平成26年は5月の土壌水分量が高く、7月末まで高い個体密度が維持された。平成27年は4月末～5月始めに降雨のない時期が25日間続き、死亡率が上昇した原因と考えられた。3ヶ年のツルマメの死滅要因は、年次によって変化するが、水ストレスと被陰、草刈が主たる要因であった。

ツルマメの自生地3ヵ所（若栗と手代木、東榎生）で調査した種子生産数は、全体として手代木は若栗と東榎生より有意に種子数が少なかった。また、若栗と東榎生では年次間差は認められず、手代木の平成25年が平成26年と27年より有意に種子数が少なかった。

平成23年12月に埋土したツルマメ（つくば系統）の種子について、その後の発生活長を調査した。埋土種子は翌年の3月～10月まで断続的に発芽し、平成25年以降は毎年4月頃に発芽最盛期が観察された。各年度における種子の発芽割合は、平成24年が全体の23.5%、平成25年は44.5%、平成26年は10.5%、平成27年は3%、平成28年は10.5%、平成29年は2%であった。平成29年末の時点においても1%（＝200粒中2粒）が土中で生存している可能性がある。ツルマメの埋土種子は少なくとも6年間は発芽力を維持すると考えられた。

このようなツルマメの発芽特性について集団間変異があるかどうかを、つくば市、福井市、広島市、熊本市、宮崎市から採集した系統を用いて検討した。その結果、発芽率は系統間で有意に異なり（18.4～94.8%）、つくば系統は難発芽性であることが判明した。

③生活史特性からツルマメ個体群の存続性を評価する

②の調査を行ったツルマメ自生地（6ヵ所）の個体群が拡大傾向にあるのか、あるいは縮小傾向にあるのかを評価するために、推移確率行列を用いて発芽率や種子生産量などの生活史特性を分析した。その結果、個体群存続の指標となる値（ $\lambda$ ）は個体群間で異なり（0.75～17.5）、同一個体群においても年度間で異なることが明らかとなった（ $\lambda > 1$ で個体群は拡大し、 $\lambda < 1$ で個体群は縮小する）。

$\lambda$ が1を越える値が示された個体群は、いずれも定期的な刈り取りなど人為的攪乱のある場所で、 $\lambda$ が1を下回る値が示された個体群は耕作放棄地などの人為的攪乱が弱まり、植生が遷移する環境にあることが判明した。

#### ④植生の遷移とツルマメ個体群の動態および種子生産の関係を明らかにする。

平成25年5月～平成26年1月に、ツルマメが自生する耕作地において地上部を除去（耕起）し、その後の植生の遷移とツルマメ個体群の動態で調査した。耕起後、調査区内の植生は再生を始め、5月と11月に調査した植被率と群落高は年々増加した。乗算優占度（＝植被率×群落高）が年々増加した結果からも、植生の遷移する様子が裏付けられた。

植生の遷移とともに、調査区内で観察されるツルマメの個体数は減少した。遷移の進行に伴い、年々、多年生草本の割合が増加し、調査区内が暗くなったことが推察される。結果として、調査区内から一年生草本が排除され、セイタカアワダチソウやクズなどの少数の多年生草本が優占する植生が再生した。ツルマメも、他の一年生草本と同様に、遷移の進行に伴い、調査区内から排除されたと考えられる。

平成26年と平成27年の11月の調査時には結莢したツルマメ個体（1.7～4.3莢/個体）が観察されたが、平成28年11月には結莢個体はごくわずかとなり、平成29年11月には結莢個体は皆無となった。植生が遷移すると、群落内におけるツルマメの種子生産は先細りとなり、最終的には途絶えるものと考えられる。ただし、後述するようにツルマメの埋土種子の寿命は長く、表土改変に伴って個体群が再生する可能性は残されている。

この他、ツルマメの密度を変えて栽培した場合や、ツルマメとヨモギあるいはセイタカアワダチソウ、支柱などと競合させて栽培した場合の種子生産数を調査した。その結果、ツルマメ単独（24個体/m<sup>2</sup>）とツルマメに支柱を立てた区の種子生産量に違いはなかったものの、他の植物と競合させた区ではツルマメの種子生産量は減少した。その減少量はセイタカアワダチソウよりヨモギで大きかった。また、高密度でツルマメを栽培すると（72個体/m<sup>2</sup>）、自己被陰のためツルマメの種子生産量はヨモギと競合させた区と同程度まで減少した。

#### ⑤GMダイズとツルマメの開花重複度から両種の交雑リスクを評価する。

ダイズとツルマメの交雑リスクを評価するために、両種の発育指標モデルを活用して、開花期重複度に関するシミュレーションを行った。ダイズについては、東北日本（札幌市、秋田市、つくば市）では早生品種（エンレイ）を、西南日本（つくば市、佐賀市、宮崎市）では晩生品種（アキヨシ）の栽培を想定した。各地点で生育するツルマメの開花期については、現地から野生系統を採集し、農業環境変動研究センターの精密畑圃場において栽培することにより把握した（図3）。



図3 ダイズ品種（左）と各地から採集したツルマメ系統（右）の栽培風景

気象条件については、平成8年～28年（21年間）の年次変動を考慮した。Ohigashi et. al. (2014)で定義される開花重複度は、2種の開花期が完全に一致した場合に最大値の0.5となる（図4）。

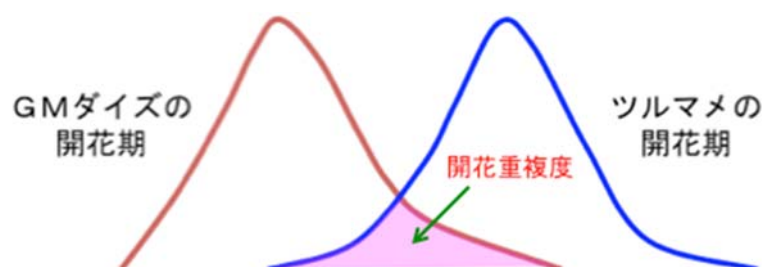


図4 それぞれの種の開花の推移から開花重複度を算出する

ダイズとツルマメの開花重複度は東北日本より西南日本で高く、ばらつきも大きくなる傾向が認められた。早生品種と晩生品種の両方を栽培したつくば市で得られた結果から、開花重複度は早生品種より晩生品種の方が高く、ばらつきも大きくなることが明らかとなった。一般に、早生品種は感温性が強く（高温条件によって開花が誘導される）、晩生品種は感光性が強い（短日条件によって開花が誘導される）。早生品種が栽培される東北日本では栄養成長期間が短く、一斉開花するために開花重複度のばらつきも小さくなったと考えられる。栄養成長期間が最も短い札幌において、やや高い開花重複度が示されたが、ツルマメは北海道にはほとんど分布せず、主として閉鎖花を形成することから、実際の交雑リスクは小さいと考えられる。

Ohigashi, K., Mizuguti, A., Yoshimura, Y., Matsuo, K. and Miwa, T. (2014) A new method for evaluating flowering synchrony to support the temporal isolation of genetically modified crops from their wild relatives. J. Plant Res. 127: 109-117.

⑥GMダイズとツルマメの雑種後代の発芽特性を明らかにする。

平成25年12月に埋土したダイズ（フクユタカ）とツルマメ、雑種の種子（合計183系統）について、その後の発消長を調査した。その結果、雑種はツルマメとダイズの間代的な

発消長を示すことが明らかとなった。雑種の大半は、ダイズと同様に、埋土種子の状態では越冬できずに枯死した。しかし、数%の種子は越冬し、翌年以降も発芽した。

⑦先行研究により開発された遺伝子浸透モデルを改良し、GMダイズとツルマメの雑種後代における導入遺伝子の動態を再評価する。

遺伝子浸透モデルとは、本研究の前身となる委託研究プロジェクト（ダイズと近縁野生種ツルマメの雑種後代の適応度に関する研究 → 末尾のリストを参照）で構築されたものである。当初の計画では、本研究で得られた知見に基づき、遺伝子浸透モデルのいくつかのパラメータを修正することを予定していた。具体的には、以下の3つのパラメータである。

1. 群落の大きさは一定 ( $\lambda=1$ ) → 遷移が進むと群落は縮小する ( $\lambda<1$ )
2.  $F_1$ が生産する種子は約1,500粒 → 野外のツルマメの種子数は約100粒
3. ツルマメ種子は休眠しない → 休眠する（積算すると休眠しないと同義）

上記の修正はいずれも、導入遺伝子のツルマメ集団における拡散を促進する要素（例えば、種子の越冬性が高まることや、種子数が増加することなど）ではなく、むしろ導入遺伝子の消失を促進する要素であることから、先行研究の結論、すなわち「ツルマメ集団中に拡散した導入遺伝子の消失までの期間は約10年」が延長されることはないと考えられた。そのため、具体的な数値計算は行わなかった。

### 3) 成果活用における留意点

カルタヘナ法においては、「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」ことが明記されている。本研究により、ツルマメの生育環境や生活史、個体群動態、さらにダイズとツルマメの開花重複や雑種種子の発芽特性など、多くの新しい知見を蓄積することができた。これらの知見は、順次、学術論文として公表することにより、第一種使用規程承認申請書に記載される「近縁野生種との交雑性」の内容をより確からしいものにするに寄与すると考えられる。

栽培が認可されているGM作物については、流通の過程でこぼれ落ちて生育する場合があっても、生物多様性に対して影響はないと評価されている。一方で、加工原料として大量にGM作物が陸揚げされる港周辺では、運搬時にこぼれ落ちた種子に由来する個体が生育範囲を拡げることが懸念されている。このような懸念に応えるために、農林水産省や環境省は、主要な港周辺において「遺伝子組換え植物実態調査」を行っている。いまのところGMダイズの生育範囲が拡がる傾向は認められず、ツルマメとの交雑も確認されていない。

このような調査結果に本研究で得られた知見を加味すると、輸入港周辺で確認されるGMダイズとツルマメが同所的に生育する可能性は低いと考えられる。ただし、港周辺におけるツルマメの生育量を比較すると、例えば、博多港よりも鹿島港の方がツルマメの潜在分布確率が高く、ツルマメの生育可能な道路沿いの休耕田などは多いと予想される。今後は、ツルマメの潜在分布域を参照し、重点的に調査する港を絞り込むことで、より効率的な実態調査が可能になると考えられる。



#### 4) 今後の課題

わが国はGM作物を含む穀物原料を大量に輸入しており、それらを陸揚げする港周辺では輸入GM作物のこぼれ落ち個体が確認されている。しかし、国内においてGM作物の開放系利用はなく、GM作物がわが国の生物多様性に対して与える影響はないと言ってもよい。

今後、ゲノム編集などの新たな植物育種技術を活用した作物が開発され、それらが国内でも普及する可能性がある。ゲノム編集により作成された作物は、導入遺伝子を持たない分離個体を選抜することが可能で、導入遺伝子が残る従来のGM作物より、生物多様性に与える影響は小さいと考えることができる。このような作物について、どのような生物多様性影響評価を行うことが適切か、各国の規制当局を中心に活発な議論が行われている。ゲノム編集により作成された作物が普及する前に、それらの生物多様性影響評価に必要な観点を整理し、評価すべき点を明確にする必要がある。

本研究は今年度で完了するが、基本的に当初計画した試験は全て実施し、想定したデータもほぼ取り終えた。今後はデータ解析を継続し、原著論文の執筆に注力する必要がある。

以下、農林水産省農林水産技術会議事務局が発行する研究成果等から、GMダイズの生物多様性影響評価に関する文献を列挙するので、本報告と併せて活用してほしい。

吉村泰幸、松尾和人、白井洋一、池田浩明、土屋健一、吉田隆延、安田耕司、松井正春、伊藤一幸 2005 組換え農作物の長期栽培による環境への影響モニタリング (ダイズ) . 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 428: 130-135.

吉村泰幸、松尾和人、池田浩明、土屋健一、吉田隆延、野口雅子、安田耕司、中谷至伸 2007 組換え農作物の長期栽培による生物相への影響モニタリング (ダイズ-1) . 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究) 447: 137-143.

高溝 正、飯村敬二、井村 治、安藤象太郎 2007 組換え農作物の長期栽培による生物相への影響モニタリング (ダイズ-2) . 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究) 447: 147-151.

吉村泰幸、水口亜樹、松尾和人、望月 淳、吉松慎一 2014 ほ場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメの自然交雑 (1) . 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 517: 181-185.

羽鹿牧太、高橋浩司、山田哲也、石本政男、湯本節三、中澤芳則、島村 聡 2014 ほ場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメの自然交雑 (2) 国内各地域におけるダイズの交雑特性の解明. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 517: 181-188.

島村 聡、羽鹿牧太、石本政男 2014 ほ場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメの自然交雑 (3) 低温による雄性不稔がダイズの交雑率に与える影響について. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 517: 188-190.

吉村泰幸、平井一男 2014 ほ場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメの自然交雑 (4) ダイズの風媒性確認試験. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 517: 190-195.

加賀秋人、大澤 良、矢野 博、加藤 信、高田吉丈、松尾和人 2014 ダイズと近縁野生種ツルマメの雑種後代の適応度に関する研究. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果 (遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究) 517: 195-201.

佐治 光、久保明弘 2014 遺伝子組換えダイズから野生種への遺伝子浸透に関する研究 - 雑種の適応度の解明 -. 農

- 林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 201-203.
- 高橋良二、阿部 淳 2014 大豆の開花受粉性に関する研究. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 307-311.
- 高溝 正、飯村敬二 2014 組換え体利用を想定した大規模ほ場における国産ダイズ間での交雑率判定. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 373-375.
- 奥村健治、陳 俊 2014 マメ科牧草における緩衝帯の花粉拡散抑制効果の評価. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 436-440.
- 羽鹿牧太、島村 聡、石本政男 2014 ダイズの自然交雑防止技術に関する研究. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 440-442.
- 玉城勝彦 2014 ダイズの収穫後における種子混入調査法開発と混入様式の解析. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 457-462.
- 安田耕司、加賀秋人、榊原充隆、菊池彰夫、菊地淳司、高田吉丈、水谷信夫、松村正哉、大木信彦 2014 遺伝子組換え Btダイズの生物多様性影響評価手法の開発. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 471-478.
- 松尾和人、吉村泰幸、加賀秋人 2014 遺伝子組換えダイズの生物多様性影響評価に必要なツルマメに関するバイオロジードキュメントの作成. 農林水産省農林水産技術会議事務局 研究成果（遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究） 517: 478-486.
- 吉村泰幸、加賀秋人、松尾和人 2016 遺伝子組換えダイズの生物多様性影響評価に必要なツルマメの生物情報集. 農業環境技術研究所報告 36: 47-69.

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	2	研究期間	平成25～29年度
中課題名（契約課題名）	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	2. ナタネ類の遺伝的・生態的特性の把握およびリスク評価手法の確立 (平成28年度遺伝子組換えセイヨウナタネを評価するための近縁種の遺伝的・生態的特性の把握(平成25～27年度実施課題)と統合)		
小課題責任者名・研究機関	大澤 良・筑波大学生命環境系		

### 1) 研究目的

現在、多様な特性を付与した遺伝子組換え農作物が開発されており、近い将来、その実用化が想定される。遺伝子組換えナタネは、年間200万トン程度が輸入され、輸入港から搾油工場等への輸送中に種子がこぼれ落ちて自生しているものも確認されている。

商業利用されている遺伝子組換えナタネは生物多様性影響評価を終了しており、我が国ではセイヨウナタネと交雑により影響を受ける野生種は存在しないと判断されている。

これまでに、特定の品種を用いてセイヨウナタネからカラシナへの遺伝子浸透や雑種後代における染色体領域の残存性に関する知見を得ているが、環境適応度に着目した研究は行われていない。今後、耐虫性や環境ストレス耐性等が付与され、環境適応度が向上した遺伝子組換えナタネが実用化されれば、近縁種との浸透交雑を通して我が国の生物多様性に影響を与える可能性、あるいはそのエスケープ個体自身、あるいは自生ナタネとの交雑による雑草化拡大の可能は否定できない。

そこで、本課題では、①我が国に存在するセイヨウナタネと交雑可能な近縁種の生態的特性の評価および環境適応度が高いと評価されたセイヨウナタネやカラシナなどを用いて交雑親和性および後代における稔性等の評価、および②適応度を向上させた遺伝子組換えセイヨウナタネの生物多様性影響評価に必要な競合性等に着目した暴露による環境リスク評価を行うための手法の開発を行う。

得られた成果は、浸透交雑を通じた生物多様性影響をどのように評価及び管理すべきかを検討するための基礎的なデータとなるばかりでなく、環境ストレス耐性あるいは耐虫性ナタネが導入される場合の多様性影響評価に必須の項目に対するデータ収集方法の基本あるいは評価基準の策定に資するデータに資するものとなる。

### 2) 研究成果

#### (1) 遺伝子組換えセイヨウナタネを評価するための近縁種の遺伝的・生態的特性の把握

我が国の各地から収集したカラシナの生態的特性を評価し、種子生産性等を指標に環境適応度の高いカラシナ等を選定する。併せて交雑親和性についても検討し、F<sub>1</sub>種子生産

性とF<sub>1</sub>世代の稔性を調査して浸透交雑の可能性や環境適応度を評価することにより、浸透交雑性を通じた生物多様性影響評価及び管理に関する基礎的なデータを集積する。

① 日本各地の自生種の生育の調査

国立環境研究所から提供いただいた自生カラシナ（9系統）、宇都宮大学から提供された1系統（永野川）平成24年度に長崎から採種した自生カラシナ（3系統）を栽培して、生育特性及び種子生産性を指標にした環境適応度を検討した。低温期の生育が旺盛な系統として、堺Bj1082、四日市Bj745、Bj832などであった。一般に気温が低いとされる東北で採種した系統（東北本線Bj935）の生育が必ずしも良いという結果ではなかった。また、長崎で採種したカラシナ系統は、採取地が近いにも関わらず異なる生育特性を示した。

② 環境適応度（種子生産性や生育特性を指標に選抜）の異なる品種の選定

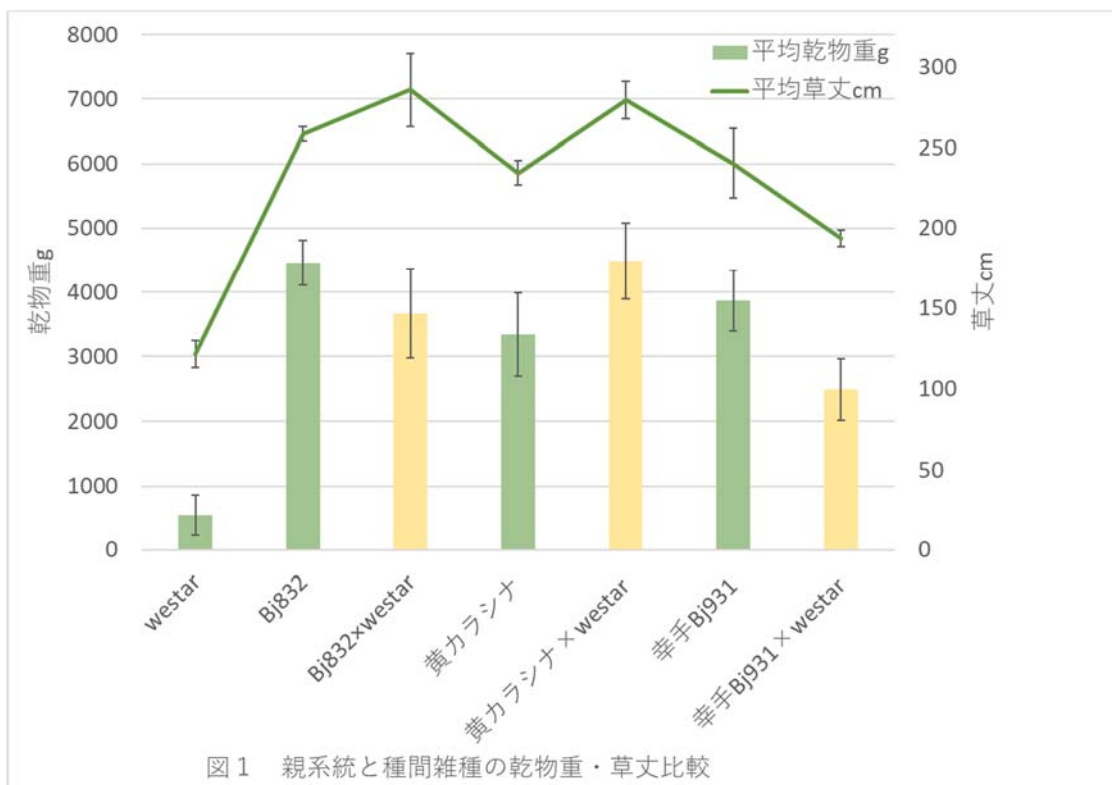
環境適応度を評価するための品種として、博多Bj573、小貝川Bj941、幸手Bj931、Bj832、堺Bj1064、永野川、東北本線Bj935、四日市港Bj745、堺Bi1082、岡山水島港Bj1090を選定し、平成26年度に栽培して、再度種子生産性の調査を行った。圃場栽培の結果、種子生産性の高い系統はBj832、堺Bj1064であり、堺Bj1064が高い種子生産性を示した。種子生産性の低い系統は幸手Bj931、堺Bj1082、博多Bj573などがあつた。特に、幸手Bj931は平均的な系統と比べて6割程度の種子生産性しか認められなかった。なお、多くの品種で一株あたり約11,000粒程度が得られた。平成27年度には自生カラシナにおける低温要求性を明らかにするために春巻きで生育させた結果、多摩川と岡山水島の低温要求性が高く、堺Bi1064や幸手Bi931、博多Bj573の要求性が低いことが明らかとなった（表1）。これまでの調査において、自生カラシナにおいては種子生産性や春化要求性に多様な変異があることが明らかになっており、今後GMナタネからの遺伝子浸透程度の予想においては、これらの変異に留意し、特定のカラシナ系統との交雑性の結果に基づくことに慎重でなければならない。

表1 春化処理しない自生カラシナの種子生産性

品種名	栽培 個体数	6月6日		7月13日		種子生産数 平均値
		抽苔	開花	抽苔	開花	
		個体数		個体数		
Bj832	6	5	3	6	6	148,498
幸手Bj931	10	9	9	10	10	72,422
岡山水島	9	5	3	9	9	99,982
博多Bj573	10	9	8	10	10	100,131
多摩川	8	2	0	7	7	89,580
堺Bj1064	18	18	18	18	18	202,544

### ③ 自生カラシナとセイヨウナタネの雑種作成

自生カラシナから博多Bj573、小貝川Bj941、幸手Bj931、Bj832を用いて、セイヨウナタネ‘Westar’との正逆交雑を行って種子生産性を比較した。栽培カラシナ‘キカラシナ’と自生カラシナ（博多Bj573、小貝川Bj941、幸手Bj931、Bj832）に対してWestarと正逆交配を行った。自生カラシナを母本に用いたときには、これまで対照区として利用してきたキカラシナに比べて、博多Bj573および幸手Bj931で高い種子生産性を示した。その結果、温室内でカラシナ品種とナタネ（Westar）の雑種の種子生産性は、親カラシナ品種の1/1000程度に低下することを明らかにした。さらに平成28年度は圃場にて種子生産性を把握したところ、ナタネの親品種Westarの生育が悪く、単純な比較はできないものの種子親のカラシナに比べ、生育量は遜色ないものの、種子生産量は1/55~2/3と減少することが明らかとなった。ただし、組み合わせによってはカラシナと同程度の種子生産性を示す雑種も生じることが分かった。このことは種間雑種の適応度が一概に低下するものではないことを示している。一方、自然環境においてはカラシナとの雑種はこれまで認められておらず、今後その要因解析が必要となろう。さらに、セイヨウナタネとカラシナの雑種が形成された後、屋外で繁殖する可能性として、雑種F<sub>1</sub>とカラシナまたはセイヨウナタネとの戻し交雑や自殖後代の形成について、種子生産能を評価した。その結果、系統における一定の傾向は見られなかった（図1）。幸手Bj931はBj×F<sub>1</sub>で最も高い種子生産能を示し、博多Bj573はBj×F<sub>1</sub>では2番目に高い種子生産能を示した。しかし、F<sub>1</sub>×Bjでは小貝川Bj941とBj832が中間的な種子生産能を示した（図2）。小貝川Bj941は、F<sub>1</sub>×セイヨウナタネ（Westar）では最も高い種子生産性を示したものの、カラシナとの戻し交雑の種子生産能は低かった。また、セイヨウナタネ及びカラシナは自家和合性で自殖性が高いため、セイヨウナタネとカラシナの雑種が屋外に放出された場合、後代種子を残す可能性が最も高いのは自殖後代（F<sub>2</sub>）であると想定される。自生カラシナのなかで博多Bj573が最も高い種子生産能を示したが、それであっても交配花あたり形成される種子は0.011であった。



上記の自生カラシナの環境適応度の変異および雑種後代の結果から、一般論としてGMナタネからカラシナへの遺伝子浸透性は低いと結論できるが、自生カラシナの系統によっては必ずしも低くなるとは言えず、モニタリングの必要性はあると言える。

(2) 遺伝子組換えセイヨウナタネの暴露によるリスク評価手法の開発

ナタネにおいてはすでに遺伝子組換え耐虫性系統が育成されており、我が国への輸入を念頭におい

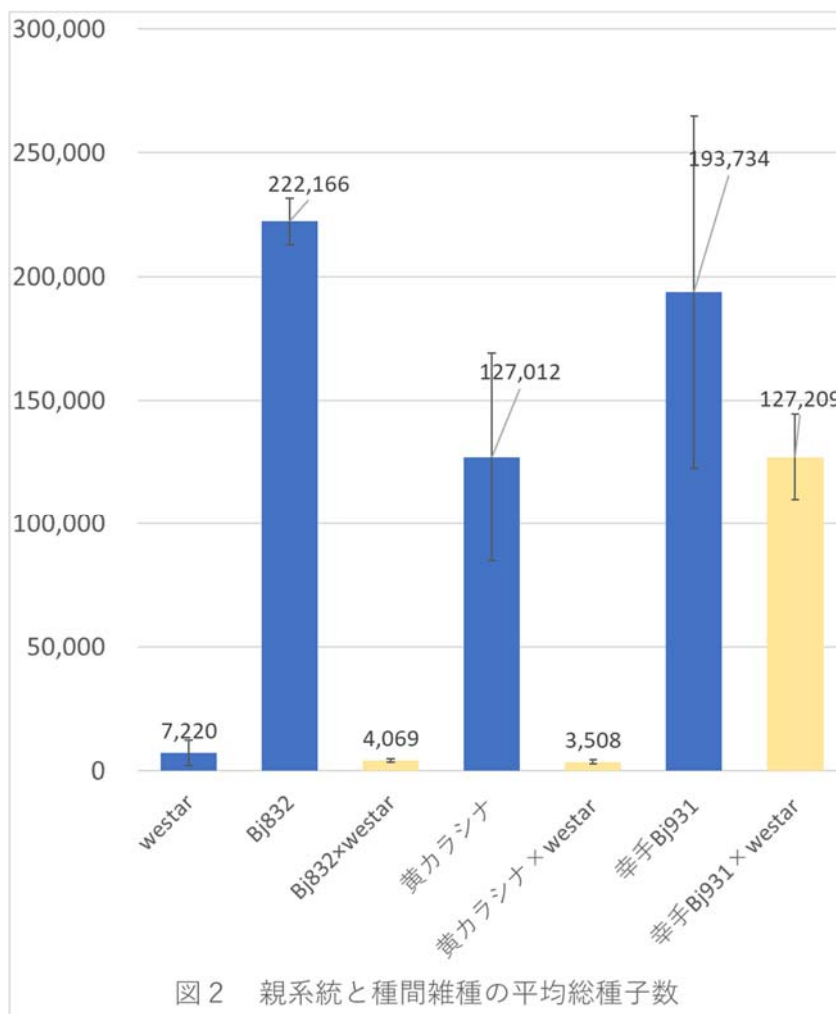


図2 親系統と種間雑種の平均総種子数

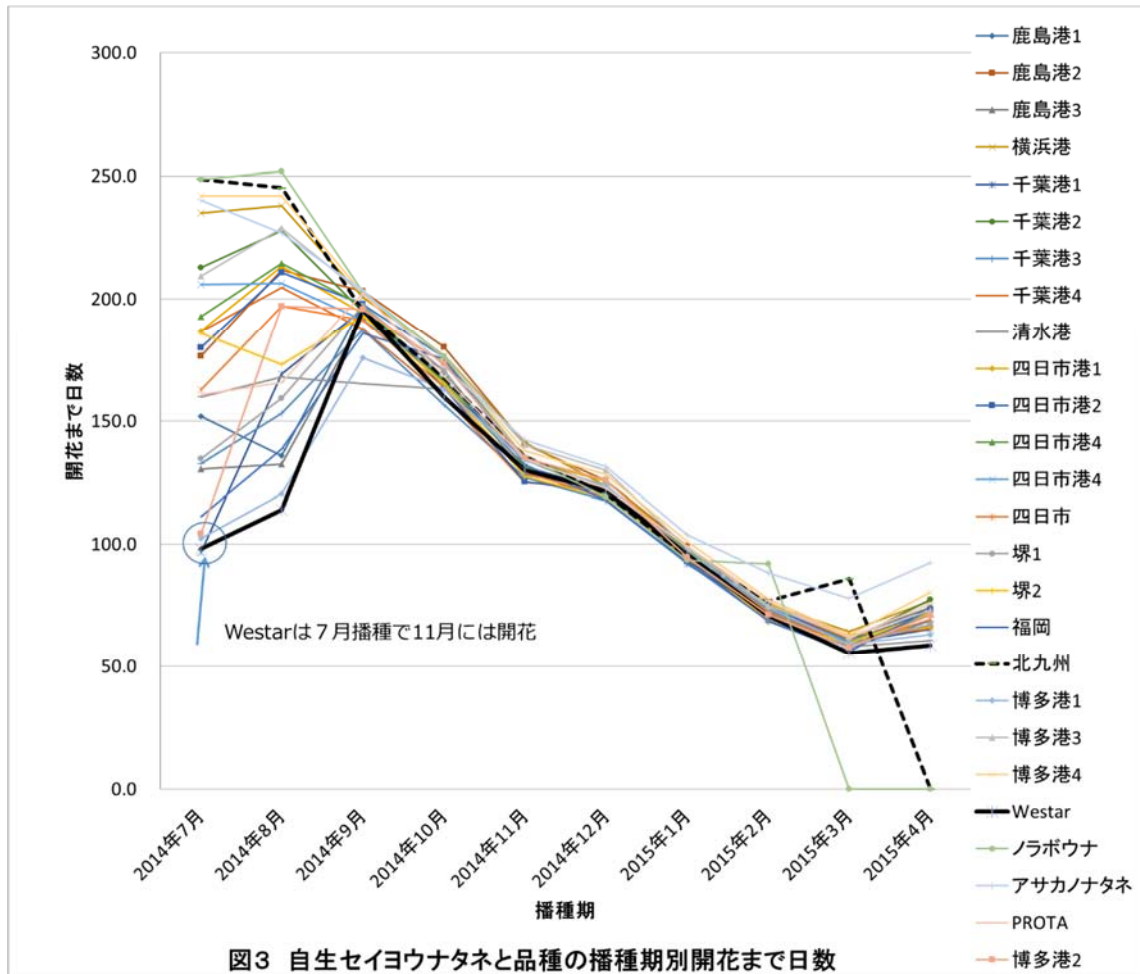
た第1種使用規程の承認申請が行われることが想定される。耐虫性など環境ストレス耐性が付与され、環境適応度が向上した遺伝子組換えナタネであれば、近縁種との浸透交雑を通して、我が国の生物多様性に影響を与える可能性、それ自身あるいは自生ナタネとの交雑による雑草性拡大の可能性などを検討する必要がある。そこで本課題においては、適応度を向上させた遺伝子組換えセイヨウナタネの生物多様性影響評価に必要な競合性等に着目した暴露による環境リスク評価を行うための手法を開発する。本成果は、耐虫性ナタネが導入される場合の生物多様性影響評価に必須の項目に対するデータ収集方法の基本あるいは評価基準の策定に資するデータとなる。

(2) - 1 ナタネの環境適応性評価手法の確立

環境適応性試験としては、休眠性程度の把握試験、環境適応性試験として播種期を異にした場合の種子生産性試験、およびコナガ耐性試験の確立を目標とした。

① 一次休眠性試験：人工気象機を用い、自生セイヨウナタネは10地点22系統、栽培品種は6品種を供試し。試験条件は25℃一定、24時間連続照明とした。各系統の試験種子数は100粒とし、3反復性とした。その結果、種子の休眠性は秋播き品種、春播き品種に関わらず比較的浅いことが知られているが、採種直後の発芽率から見る限り、供試した我国に自生するセイヨウナタネの一次休眠性はないと考えることができる。本手法で一次休眠性の

検討は可能である。



② 二次休眠性試験：二次休眠とは、一次休眠が導入されていた種子が、一定期間の後熟過程を経て発芽しうる状態になった後に、発芽に不適な環境にしばらくおかれた場合、再び休眠状態となり、発芽しなくなる。二次休眠を誘起する環境要因として、高温、低温、水分不足、水分過剰、光条件などがある。一次休眠と同様、種子の寿命を延長し、不良環境下において植物種が永続するための適応現象と考えられる。試験方法は、ポリエチレングリコール (PEG) 6000溶液処理による日本自生セイヨウナタネおよびカラシナの2次休眠性評価：15000kPa (-15bar)のPEG6000溶液を用い、種子の二次休眠を14日誘導。誘導期間内の条件は20℃で暗条件とした。誘導終了後、水で種子を洗浄し同じ条件で14日間維持した。二次休眠のない種子はこの期間に発芽するので、2, 4, 7, 14日後除去し、休眠種子について、30/5℃、光12/12hの条件で7日おき休眠を打破した。供試材料には一次休眠を調査した自生セイヨウナタネ22系統と栽培品種4系統を用いた。その結果、自生カラシナ25系統、自生セイヨウナタネやカラシナにおいて二次休眠が無い系統から80%近い休眠率を示す二次休眠性高い系統まで幅広い変異が認められた。本手法によって休眠性程度が評価できることが明らかになった。

表2 セイヨウナタネとカラシナの2次休眠程度					
セイヨウナタネ					
地点・品種名	休眠率	地点・品種名	休眠率	地点・品種名	休眠率
鹿島港1	3.3	四日市港1	86.0	博多港1	45.8
鹿島港2	3.5	四日市港2	18.3	博多港2	16.7
鹿島港3	41.7	四日市港4	0.0	博多港3	64.3
横浜港	23.3	四日市港4	65.0	博多港4	35.6
千葉港1	0.0	四日市	6.7	Westar	66.0
千葉港2	31.7	堺1	1.7	ノラボウナ	48.3
千葉港3	0.0	堺2	55.0	アサカノナタネ	28.3
千葉港4	13.3	福岡	60.0	PROTA	36.7
清水港	26.7	北九州	84.0		
カラシナ					
地点・品種名	休眠率	地点・品種名	休眠率	地点・品種名	休眠率
BJ832-1	18.4	小貝川941-2	33.3	幸手927-1	55.5
BJ832-2	14.8	堺1028-1	85.6	幸手927-2	43.0
BJN2-2	50.4	堺1049-1	2.6	幸手928-2	47.6
荒川920-1	41.9	堺1049-2	10.9	幸手Bj928-1	48.7
荒川920-2	59.9	堺1064-1	52.1	多摩川04-76-1	46.1
荒川921-1	68.5	堺1064-2	73.1	多摩川04-76-2	7.4
岡山・水島109	42.3	堺1068-1	10.4		
黄からしな1	5.3	堺1070-1	55.9		
黄からしな2	6.9	堺1071-1	75.5		
鬼怒川-1	25.4				
休眠率=2次休眠誘導後発芽数/生存種子数					

③ 環境適応性調査：一般に、セイヨウナタネは、休眠打破、抽苔の開始、花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられ、生育適温は15～20℃とされている。①で評価した自生セイヨウナタネと栽培品種4系統を用いて、7月から1ヶ月ごとの播種と生育調査を繰り返し行い、環境適応性を調査した。調査項目は、発芽率、第1花開花日、結莢数、結実率とした。その結果、(1) GMセイヨウナタネの母本に利用されるWestarは低温が不要であること(2) 7, 8月播種期の結果から、わが国の自生セイヨウナタネに春播きタイプから越冬を要し開花まで5か月かかる秋播き型(北九州系統)が存在すし、いずれのタイプでも9月以降であれば開花が同調することなどから、3か年程度の繰返しによる解析に基づく必要はあるが、連続播種による環境適応



性試験は遺伝子流動リスク評価に不可欠であることが明らかになった。

#### ④ コナガ耐性試験法の確立

④-1 生葉及び人工飼料による耐性検定：直径9cm高さ4.5cmの透明プラスチックカップに湿らせた脱脂綿を入れ、検定葉（1.5g）を入れ、2-4齢のコナガ幼虫を15頭飼育した。飼育条件は25℃、湿度50±10%、明暗周期16L-8D条件とした。検定には、対照品種とした Westar、我が国で古くから栽培されている「のらぼう菜」、自生セイヨウナタネとして清水港由来系統の3系統を供試した。実験開始後、2, 4, 6日目の生存個体数を調査し、生存率を求めた。その結果、コナガの供試個体数が少なく対照セイヨウナタネも少ないが、「のらぼう菜」などが弱い耐性を示す可能性があることがわかった(表3)。また、宮園ら(1992)の人工飼育法に基づき、人工飼料で検定した結果、再現性が低いものの生葉と同様の結果を得た。これらの結果から、今後、簡便な耐虫性検定法の確立が必要であると言える。

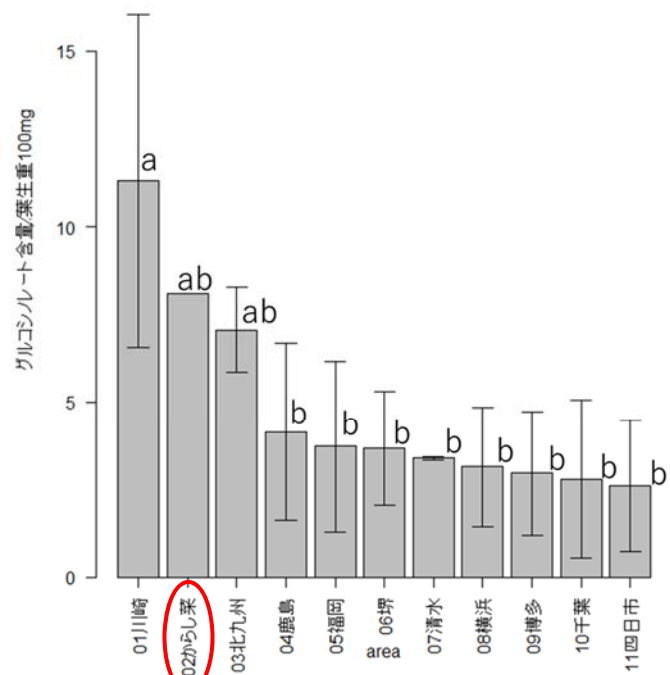
系統	系統の説明	蛹化数			平均 蛹化数	平均 蛹化率
		反復1	反復2	反復3		
コマツナ	<i>B. rapa</i> , コナガの飼育用餌として使用	13	10	14	12.3 <sup>ab</sup>	61.7
Westar	<i>B. napus</i> , GMナタネの母品種としてよく使用される	17	13	NA	15.0 <sup>ab</sup>	75.0
ノラぼう菜	<i>B. napus</i> , 日本の在来品種	11	12	10	11.0 <sup>b</sup>	55.0
鹿島1453	<i>B. napus</i> , 茨城県鹿島港近辺で採種された自生ナタネ	18	15	16	16.3 <sup>a</sup>	81.7

a,b: 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05), Tukeyの多重比較

④-2 Bt抵抗性確認予備試験：コナガBt感受性系統と抵抗性系統を供試し、Kikuchi et al (2013)に従った薬剤浸漬法を用い、飼育後7日目の生存率を求めた。その結果、Bt感受性の京都系統の利用が本試験でも可能であることが確かめられた。

#### ④-3 自生ナタネにおけるグルコシノレート含量の評価：

ナタネのBt耐性の多様性の把握とBt遺伝子の導入が適応度に及ぼす影響の評価として生葉を使用した試験を行ってきたが生育不良などの影響もあったため耐虫性に関与することが知られているグルコシノレート量の系統間変異について自生ナタネ20系統を供試して把握した。遺伝資源特性評価で使用するとされている尿



グルコシノレートを含む代表的なアブラナ科作物  
処理間で異なるアルファベットは有意差を示す (Tukeyの多重比較検定p<0.05)

図4 自生ナタネのグルコシノレート平均含量の変異

糖試験紙による簡易測定を試みたが、測定不能であった。そこで、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析を行ったところ、川崎系統群の 11.3m g/100 g DW から四日市系統群の 2.6m g/100 g DW までの変異が把握できた (図 4)。現時点では誘因あるいは忌避に作用するそれぞれのグルコシノレート類の含量は明確ではないが、自生ナタネ系統間のグルコシノレート総含量の多様性が明らかとなった。さらに、アブラナ科食害昆虫コナガのアブラナ科植物への定着因子でもあり、摂食量によっては致死率も高まるとされるアリルイソチオシアネート含量を評価し、生葉摂食試験との関連を見ることで耐虫性に関する適応度に及ぼす影響がより明確になると考えられる。今後は、遺伝子組換えナタネの耐虫性成分と自生ナタネの耐虫性関連成分の相互作用や、交雑による適応度をより詳細に検討する必要がある。

## (2) - 2 自生セイヨウナタネの遺伝的多様性の解明

国内11箇所の自生セイヨウナタネ147個体と日本と海外の栽培40品種を用いて、AゲノムとCゲノム由来のSSRプライマー10種類による多型解析を行った。その結果、国内自生セイヨウナタネの集団内の遺伝的多様性はそれほど高くなく、個体はH<sub>0</sub>が低くホモ遺伝子型に固定していることが多いことから自殖による増殖が主であることが推定できた。多様性程度からの推定では日本の自生セイヨウナタネ集団は少数の集団に由来する可能性が示唆された。また、全体として、個体間の遺伝的距離は最大値でも0.14と小さく、少なくとも供試した栽培品種と自生セイヨウナタネ集団の遺伝的多様性は低く、また、地域集団を構成しているとは言え

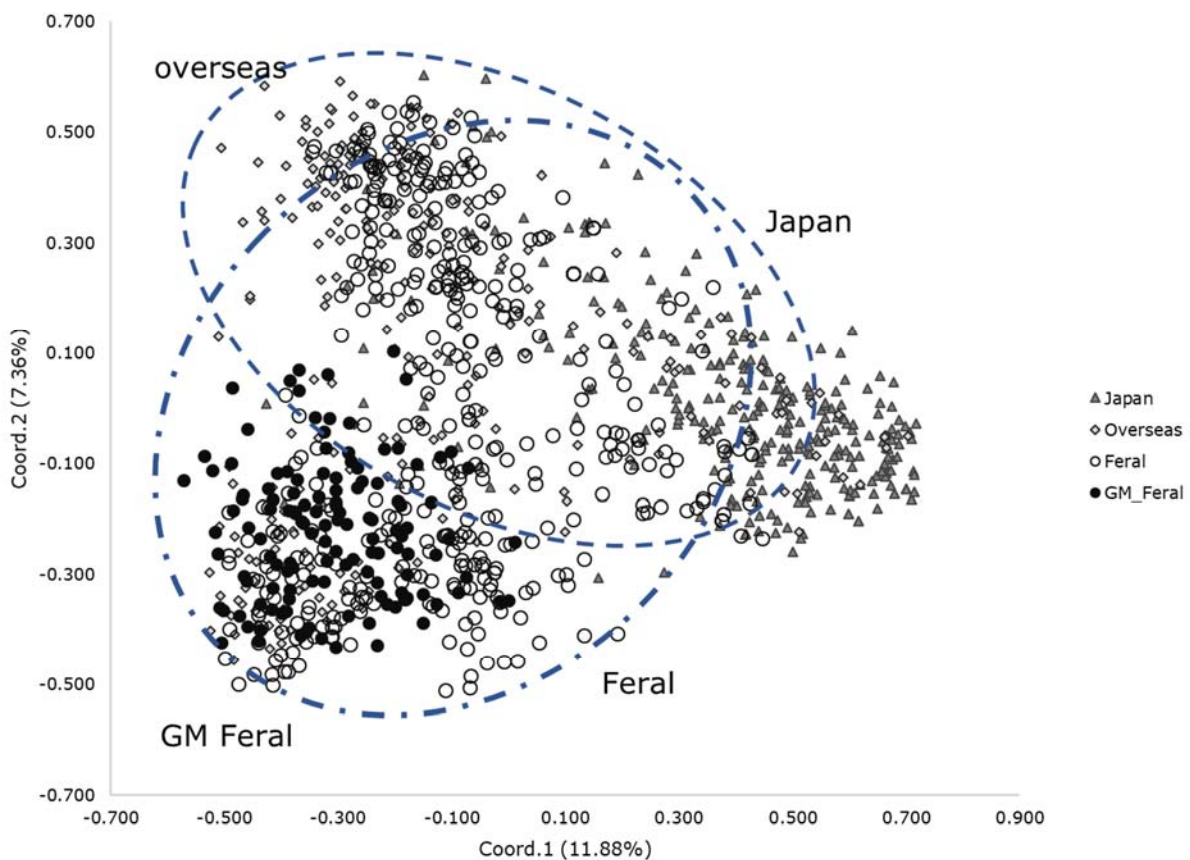


図5 PCoA解析における遺伝子組換え自生セイヨウナタネと他のセイヨウナタネの遺伝的関係

ないことが分かった。SSRマーカーによる遺伝的多様性の解析によって、自生セイヨウナタネ個体間の遺伝的関係の解析が可能であると推定できた。さらに、わが国港湾地域における自生ナタネの遺伝構造の解析を行うため、農林水産省消費・安全局農産安全管理課が収集した自生ナタネ407系統およびGM自生ナタネ130系統について30種類のSSRマーカーによる遺伝的関係の把握を行った。その結果（図5）、海外品種および国内品種の分布は広く重なっており、類似していることが見て取れる自生ナタネ系統は海外品種および国内品種、さらには独自の遺伝的背景を持つ個体から構成されていた。GM自生ナタネの遺伝的変異は相対的に小さく自生ナタネの一部となっていた。国内品種との雑種によるGM自生ナタネはほとんどないことが示唆された。一方でGM自生ナタネの変異も小さいものの認められ、これらの由来推定には現在栽培されている世界のナタネの情報が必要となってくる。

### 3) 成果活用における留意点

- (1) 遺伝子組換えセイヨウナタネを評価するための近縁種の遺伝的・生態的特性の把握に関しては、自生カラシナの組合せによってはかなりの高い種子生産性を維持することが明らかになった。しかし、結果全体からするとカラシナに対する浸透性は低いと判断できる。今後どのような場合に浸透性が高まると言えるのかを明確にすべきである。
- (2) 自生セイヨウナタネの遺伝的多様性の解明においては、自生ナタネとわが国の栽培ナタネとは遺伝的距離が認められ、自生ナタネとGMナタネとの間にもジーンフローが起きているとは考え難い結果が得られているが、葉緑体DNAによる遺伝関係および近年海外で栽培されているナタネ品種の遺伝的多様性の把握を足さなければ、自生ナタネとGMナタネの実態が明らかになったとは言えない。さらに、なぜ自生ナタネとこぼれ落ちGMナタネとの間に遺伝子流動がないのか、あるいはないように見えるのかの受粉生物学的解析が必要であろう。

### 4) 今後の課題

これまでの成果によって、遺伝子組換えセイヨウナタネの多様性影響評価リスク評価のポイントを明確にする予定であった。対象形質としては、休眠性、播き性、害虫耐性、種子生産性である。このうち休眠性、播き性、種子生産性については標準的手法といえる手法として検討対象になりえる成果が挙げられた。

今後のGMナタネ開発に伴う耐虫性導入GMナタネの環境影響評価においては、自生ナタネの潜在的大衆性を把握しなければ、GMナタネの適応度が課題に評価される。そのためには耐虫性検定が不可欠であるが、生葉法の多数検定法が未確立であり、安定評価のためのグルコシノレート定量法の確立も不十分であるため、より簡便な抵抗性試験法の確立が必要である。

自生ナタネとGMナタネの間の遺伝子流動が頻繁には生じていない傾向が認められたが、より正確にその理由を解明しておく必要がある。現在はカナダから輸入されている除草剤耐性GMナタネが主流であるが、他の改変形質の場合、カナダのような春まき性の高い品種ではない場合に、今のような遺伝子浸透レベルを保てるのかを予測できるような試験が不可欠であろう。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3(1)	研究期間	平成25～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	3(1) クワコの生態的・生理的特性の把握とカイコ組換え遺伝子のモニタリング (平成27年度にカイコの組換え遺伝子モニタリング手法の開発(平成25～27年度実施課題)と統合)		
小課題責任者名・研究機関	河本夏雄・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域		

## 1) 研究目的

遺伝子組換えカイコを養蚕農家で第一種使用として飼育することが想定されるなか、日本国内において、カイコと交雑する可能性がある唯一の野生種としてクワコが生息していることから、カイコとクワコとの交雑による生物多様性影響の適正な評価と、第一種使用開始後の効率的なモニタリング手法の開発のために、クワコの生物学的情報を収集する。特に、人為的に交尾させると妊性のある個体が生じるにもかかわらず、野外のクワコ集団にカイコから遺伝子流入が認められたとする報告がないことに着目し、養蚕農家で飼育されるカイコと野生のクワコとの間で交雑が起きなくなるような障壁の要因を詳細に解析する。そのため、クワコの生息状況や生活史などの生態学的な特性や、カイコとの間での交尾行動などの生理学的な特性を調査・解析する。

## 2) 研究成果

### ①クワコの生息状況の調査

クワコの生態学的特性として、日本国内での生息地域と成虫の発生時期を調査した。日本全国で、桑畑の周辺や、かつて桑畑があったと考えられる場所の周辺を中心にフェロモントラップを設置して調査したところ、北海道から鹿児島県(本土側)まですべての都道府県でクワコが捕獲された。なお、奄美と沖縄にはクワコが生息していないことはすでに報告されている。

クワコ成虫の発生時期を明らかにするため、日本各地で6月ころから12月ころまでフェロモントラップを定期的に交換しながら設置し続けたところ、寒冷地では年2回、温暖地では年3回の発生のピークが認められた。

### ②クワコのフェロモントラップの設置条件の検討

遺伝子組換えカイコを第一種使用等として飼育した場合に、野生のクワコとの交雑の有無を確認するモニタリングを実施することが想定されている。クワコおよびカイコとクワコの交雑個体を捕獲する手法としては、クワコとカイコに共通の性フェロモンであるボンビコールを誘引源として雄成虫を粘着板で捕獲するフェロモントラップを用いることが最も効率的である。本課題では、フェロモントラップに添加するボンビコールの量と、フェロモントラップの設置高について検討した。

まず、フェロモントラップに添加するボンビコールの量を検討するため、0.1 mg、1.0 mg、10 mgの3種類の量のボンビコールを添加したゴムキャップを作成し、それぞれを入れたフェロモントラップの場所を毎日交換しながらクワコの捕獲数を計測したところ、濃度依存的に捕獲されることが確認できた(図1)。比較のためカイコのメス成虫を誘引源として用いたフェロモントラップでも調査したところ、カイコ雌成虫はボンビコール0.1 mgと1.0 mgの間の捕獲数を示した。その上で、フェロモントラップ1個当たりの価格や、捕獲数が多すぎて粘着板の効力が減じる可能性等を考慮した結果、フェロモントラップ1個当たり、ボンビコール1.0 mgを添加するのが最も効率的であると考えられた。

次に、フェロモントラップの設置高を検討するため、ボンビコール1.0 mgを添加したフェロモントラップを0.3 m、1.3 m、2.3 mの位置で支柱に固定し、支柱の位置を毎日交換しながらクワコの捕獲数を計測したところ、どの高さでも捕獲数に違いがないことが確認できた(表1)。このことから、一般的に人間の手が届く範囲の高さであれば効率的にクワコを捕獲できると考えられた。

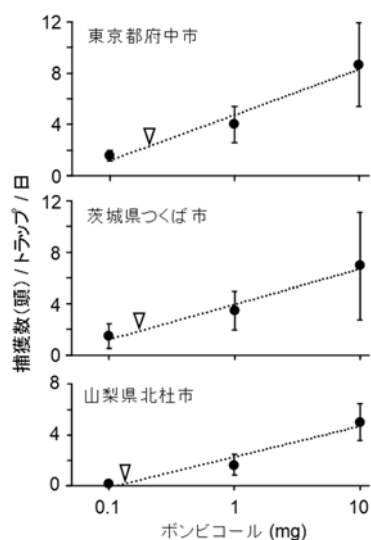


図1. ボンビコール添加量とクワコ雄成虫の捕獲数  
▽はカイコ雌成虫を誘引源とした場合の捕獲数

調査場所	トラップ設置高 (m)			$\chi^2$ 検定
	0.3	1.3	2.3	
茨城県つくば市	23	27	22	$p = 0.75$
群馬県前橋市	15	18	13	$p = 0.66$

表1. トラップ設置高とクワコ雄成虫の捕獲数

また、クワコと交雑個体それぞれの雄成虫がフェロモントラップに捕獲される割合を調べるため、野外の放飼再捕獲試験を実施した。放飼地点の四方30 mの位置にフェロモントラップを設置し、羽化当日のクワコと交雑個体の雄成虫を放飼したところ、交雑個体の方がより高い割合で捕獲されることがわかった。このことから、交雑個体の有無を確認するモニタリングとして、フェロモントラップを用いることが効果的であることが明らかになった。

### ③カイコとクワコの交尾の可能性と交雑個体の野外での生存の可能性の調査

カイコは人間が世話をしない野外で自立的に生存・繁殖することができないため、交雑個体が生じるとすれば、養蚕農家でカイコを飼育した後の残渣を屋外に廃棄した際、残渣中に残っていた繭からカイコ雌成虫が生じて野生のクワコ雄成虫と交尾した場合に限られる。

屋外に廃棄した飼育残渣中でカイコ雌成虫が生じた場合を模して、屋外の網室において、地面に置いたクワの枝にカイコ雌成虫、桑樹上にクワコ雌成虫をそれぞれ配したうえで、

クワコ雄成虫を放飼して交尾行動を観察した。その結果、カイコ雌成虫とクワコ雄成虫の交尾が先に観察され、その後、クワコ同士の交尾も観察されたが、クワコ雄成虫がカイコ雌成虫に接近してから交尾が成立するまでの時間はクワコ同士より長かったことや、カイコ雌成虫が未受精卵を産む場合が多かったことなどから、交尾に際して何らかの障壁がある可能性が考えられた。また、産下された卵をそのまま翌春まで放置して生じた次代の終齢幼虫と繭を回収してミトコンドリア*COI*遺伝子型を調査したところ、すべてクワコ型であり、交雑個体は見つからなかった。

これとは別に、屋外の残渣の中で交雑個体が孵化した場合の生存の可能性を調査するため、屋外で1本だけ独立している桑樹の周辺に交雑個体の孵化幼虫（合計2,964頭）を放って20日後に桑樹を確認したところ、成長した幼虫も繭も見つからなかった。このことから、屋外に廃棄した残渣の中で交雑個体が孵化しても、それが残渣を離れて桑樹に到達し、成虫まで生存する可能性は極めて低いと考えられた。

### 3) 成果活用における留意点

これまでの隔離飼育区画での遺伝子組換えカイコの第一種使用等による飼育試験に加えて、平成29年9月には、緑色蛍光シルクを生産する遺伝子組換えカイコを農家で飼育するための第一種使用規程が承認されている。今後、様々な遺伝子組換えカイコの第一種使用等が始まることが想定される中、この研究で得られた研究成果は、遺伝子組換えカイコの生物多様性影響評価のためのデータとして参照されるほか、交雑個体の発生の有無を確認するためのモニタリング手法としての活用が期待される。

### 4) 今後の課題

すでに遺伝子組換えカイコの養蚕農家での第一種使用等が始まっていることから、当初想定されていた研究目標は達成されたと考えられる。今後は、新たな遺伝子組換えカイコ系統の第一種使用等や、第一種使用規程における使用等の内容や方法の検討状況をもとに、規制を担当する行政当局からの要請等に応じて調査を進めることになると思われる。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3(2)	研究期間	平成25～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	3(2)クワコの遺伝的多様性の解明		
小課題責任者名・研究機関	富田秀一郎・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域		

## 1) 研究目的

日本に生理的にはカイコと交雑可能なクワコが生息しており、遺伝子組換えカイコの第一種使用にあたって適正な生物多様性影響評価を行うためには、カイコとクワコの間の変異性についての知見とともに、クワコが日本国内でどのように個体群を形成し、いかなる多様性を持って生息しているか、等の生態学的情報を蓄積することが必要である。しかしながらクワコの遺伝的多様性や野外の地域集団構造等については依然として情報がきわめて不足している。

本研究では日本産クワコゲノムの配列解読を行い、SNP等の多型が集中している領域を抽出して日本産クワコの遺伝的多様性を解明することを目的とする。同時にこれらの領域を利用して、これまで日本全国50箇所以上から集めたクワコのサンプルを元に、過去にカイコからの遺伝子流入が起こった痕跡をゲノムワイドに探索するために用いるものである。

## 2) 研究成果

### (1) 日本産クワコのゲノムデータの解析による多様性探索遺伝子領域の選定

日本産クワコからゲノム情報を取得し、既存のカイコゲノム情報等と照合してSNP等の多型が集中している領域を抽出した。

農業生物資源研究所で継代飼育されていたクワコ系統(前橋x下仁田)よりゲノムDNAを調製し、Illumina HiSeq2000用のライブラリを平均長180bpと300bpの2種類作製し、これを用いてそれぞれゲノムサイズのおよそx15の配列情報を解読し最初のドラフトシーケンスを得た。これに加えて平均長3kbおよび8kbのライブラリを用いたメイトペアリードのデータを加えて再アセンブルを行った。また、10 kb以上のscaffold配列をblastnでカイコゲノムにアライメントし、アライメント結果に基づいて、カイコの各染色体にマップされた並び順に合うように、クワコのscaffold配列を結合(染色体毎に生成⇒28の結合されたクワコ配列)したのち、28の各クワコ配列を、対応するカイコの染色体とlastzによりアライメントを行ったところ、染色体毎にバラツキはあるがおおよそカバーできており、正しいアセンブル結果であるものと思われた。N50値が目標とした50 kbに届かなかったため、さらなる精度向上を目指して第3世代シーケンサーPacBioによるゲノム配列取得のためのDNA調製・ライブラリ作製を行い、6セル解析を行い、合計6.6Gbのリードを取得した。また平均リード長は8.9kbであった。これまでに得られていたHiSeqリードによるゲノムド

ラフトにこのデータを加えて再アセンブルを行った。従来のドラフトのスキファールド中のギャップを埋めることでN50スキファールド長が約85kbpまで伸長し、目標の50kbは達成された。また新たにスキファオルディングまで行うことによりN50スキファールド長は約100kbpまで伸びた。今回の解析によって得られたゲノムドラフトを生物共通のオーソログセットのカバー率による品質評価をおこなったところカイコゲノムにやや劣る程度までの品質が確認された。

カイコのゲノムシーケンスに日本クワコのペアードエンドリードのマッピングを行った。始めに既知のカイコ繰り返し配列のデータベースを使ってカイコゲノム配列をマスクした。次に、トリミング済みの日本クワコのペアードエンドリードをbowtie2(version bowtie2-2.1.0)を使ってマッピングデータを得た。マッピングデータをsamtools(version -0.1.18)によって処理してカイコ-日本クワコ間のvariantデータを得た。見つかった1,306,741のSNP候補のうち、239,087は遺伝子領域に、残りの1,188,184SNPsは遺伝子間領域に見つかったものである。全体として88%の遺伝子について、SNPが見つかった(図1)。

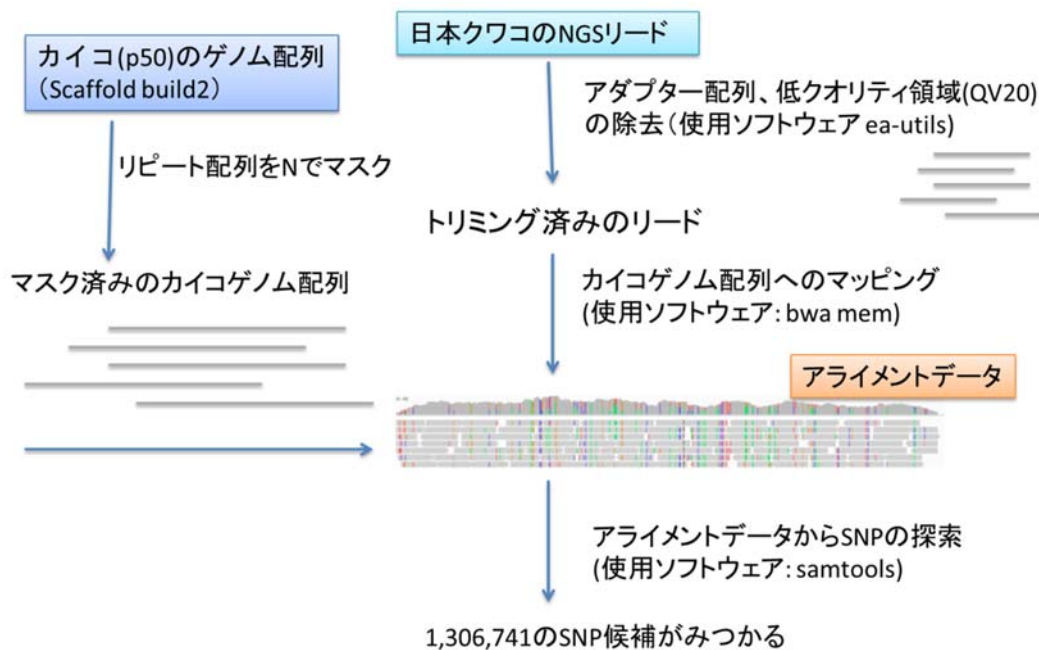


図1 候補領域設定のためのSNPの探索

このように多くの置換が見つかったため、比較解析に好適な領域として遺伝子領域、特にタンパク質をコードしている領域をターゲットとして多様性探索遺伝子領域(以下マーカーと呼ぶ)を設置することにし、そのために、クワコの遺伝子カタログを作成した。10のステージ/組織よりRNAを抽出しRNA-Seqにより20M read程度のクワコ遺伝子配列を取得し、得られたリードを全てまとめて*de novo*アセンブルを行った。アセンブルソフトウェアはTrinityを用いた。アセンブルの結果、91,229のコンティグ(転写産物)が得られた。得られたコンティグに対してORF予測を行った結果、24,234のコンティグについてはORFが予測することが出来た。

## (2) 日本産クワコに内在する多型の検出



抽出された候補領域について、日本産クワコおよびカイコから配列を取得し、クワコの遺伝的多様性を評価するための遺伝子座の全染色体をカバーするように設定した。設定された遺伝子座について、個体ごとの配列多型情報を得た。

カイコのゲノムシーケンスに日本クワコのペアードエンドリードのマッピングを行って得たSNPデータを、カイコの遺伝子領域に貼り付けることによりSNP集中度の高い候補領域識別を行った。得られた候補領域の情報を染色体ごとに整理したところ各染色体にまんべんなく存在していることが明らかとなった(図2)。そこでこれらの中から各染色体に最低1つずつ44のCDSを選択し、該当する配列のPCRによる増幅を試みた。カイコは大造(p50)系統、クワコは一個体のゲノムDNAを鋳型にし、両方で安定して増幅した37のCDSについて、カイコおよびクワコの配列決定をサンガー法によるダイレクトシーケンシングで試みた。その結果30のCDSについては問題なく配列決定が行えることが分かった。また、大造由来の配列については全てゲノムデータベースの配列と一致した。そこでこの30のCDSをマーカーとして選定した。これらのマーカーについて、クワコ48個体について個体別に配列解析を行いカイコ標準系統(p50T)の配列と比較した。その結果今回の48個体についてはカイコ型と考えられる配列は存在しなかった。カイコ型と日本産クワコ型との置換数は最小の場合でも6、最頻のハプロタイプとの間では10が最小で、この2者は全てのマーカーで明確に区別された。

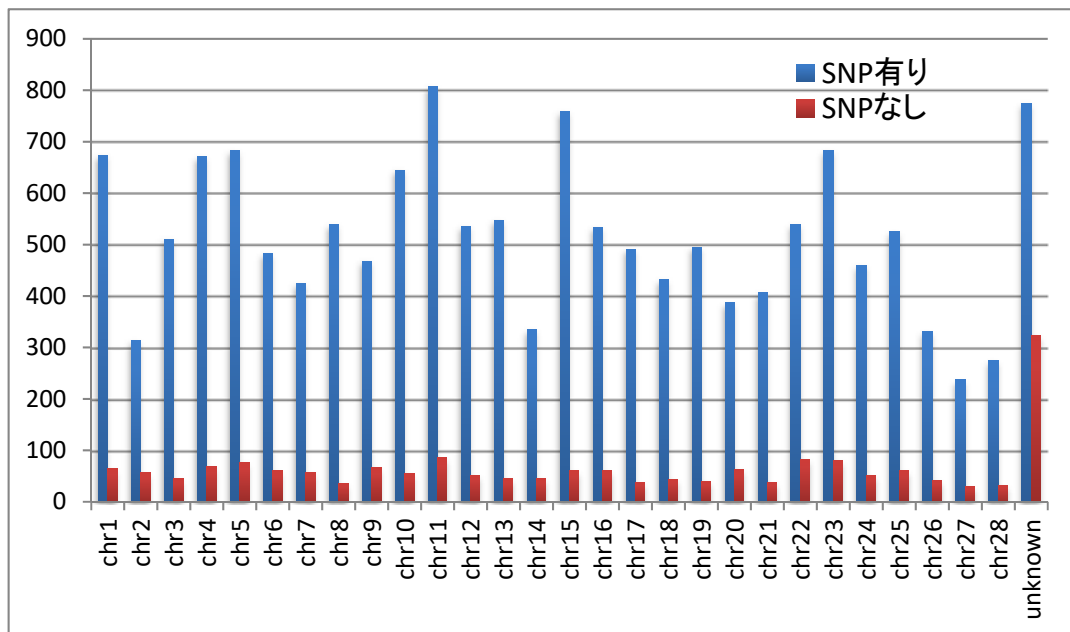


図2 遺伝子ごとのSNP有無の染色体別の分布

### (3) 日本産クワコの遺伝的多様性の集団遺伝学的解析

得られた個体ごとの配列多型情報を採集地の地理的情報と分子生態学的手法を用いて統合することにより、日本におけるクワコの個体群の分布状況や地域集団の構成を明らかにした。またそれらの情報に集団遺伝学的解析を加えて、過去における日本のクワコへのカイコからの遺伝子流入について網羅的な解析に基づく定量的な結論を得た。

日本国内の24の地域で採集したクワコの個体別のゲノムDNAを、各地域から8個体分ずつ取ってライブラリを作成し、RAD-Seq解析を行った。地域間—地域内の多様性を見るために $F_{ST}$ 値を計算したところ、全体的に多様性が比較的小さく地域間の差も小さいため、集団の

広がりが空間的に大きく、分集団化が進んでいない可能性が示唆された。RAD-SeqデータについてIGVを用いて可視化したところ、カイコの染色体を部分的に保持する個体を検出することはなく、カイコからクワコへの遺伝子流入は認められなかった。

これまでの解析結果より少なくとも192個体から独立の27の遺伝子座について、カイコからの遺伝子流入がないことが確認されている。これをカイコからクワコへの遺伝子流入が一定の頻度で起こり続ける下での平衡状態と考えると、観察されたヘテロ接合度を平衡状態でのヘテロ接合度  $\hat{H}$  とみなすことができる。

$$\hat{H} = \frac{4N_e m}{4N_e m + 1}$$

であることより

$$N_e m < \frac{1}{20436}$$

と計算される。ただし、 $N_e$ は有効集団サイズ、 $m$ は流入率である。

$N_e m$ は一世代あたりの流入数にあたり、非常に小さい値であることが分かった。

### 3) 成果活用における留意点

遺伝子組換えカイコの第一種使用規程の承認申請および審査の過程で、クワコが遺伝子組換えカイコによる交雑による生物多様性影響を受ける可能性のある生物として特定されたことより、これらの成果は上記承認申請の審査に利用された。

### 4) 今後の課題

本研究によりクワコに対する遺伝子組換えカイコによる交雑による生物多様性影響の度合いはある程度定量的に推定されたが、一方今後遺伝子組換えカイコの使用等が普及するにつれ新たな知見が得られた場合には随時更新されるべき性質のものである。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4(1)	研究期間	平成25～27年度
中課題名	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	4(1) 大西洋サケの生育・繁殖特性及び在来サケ科魚類との競合性に関する研究		
小課題責任者名・研究機関	荒木和男、正岡哲治、岡本裕之、名古屋博之・独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所育種研究センター		

### 1) 研究目的

米国では、カナダで種苗生産されパナマで出荷サイズまで陸上養殖した高成長のGM大西洋サケの市販化が、2015年11月19日にFDAによって承認された。市販化を申請した Aquabounty Technology社は、これをきっかけに飼育システムと3倍体化したGM大西洋サケの受精卵を輸出する販売戦略を立てている。しかし、我が国においては宿主の大西洋サケが実験養殖された例があるだけで、国内環境における大西洋サケの生物特性についての情報が殆どないのが現状である。そのため、GM大西洋サケの市販化申請が我が国で行われたとしても、対照となる大西洋サケの我が国における生物特性の情報が無いのが現状である。そこで、本研究では我が国における大西洋サケの生物多様性等に及ぼす影響を把握するため、我が国における育成及び自然繁殖の可能性を把握するとともに、在来のサケ科魚類との競合性及び交雑性を調べることを目的に研究を進める。

### 2) 研究成果

1年中低温の飼育水で飼育できる日光庁舎(栃木県日光市)、及び季節による水温変動が見られる玉城庁舎(三重県玉城町)で大西洋サケを飼育して人工授精した。得られた受精卵の発生様式を観察することにより、卵質と精子の受精能力を判断し、飼育水温が大西洋サケの成熟に及ぼす影響を調べた。また、2012年に玉城庁舎で大西洋サケの孵化稚魚が得られたことから、玉城庁舎の飼育施設を用いて飼育水温を調節した飼育の再現性を調べた。受精のため、大西洋サケの雌の腹を押さえて排卵状況を調べ、排卵に適正と考えられた日に採卵し、洗卵液(154.7mM NaCl, 3.2mM KCl and 2.3mM CaCl<sub>2</sub>)で洗浄した。同様に雄から得た精子と上記卵を混合して1分間放置した後、十分量の洗卵液を加え精子を活性化して受精させた。その後、30分間給水させ、これを孵化槽に設置した金属製の網カゴに収容した。受精1日目、その後は4日おきに受精卵を4%パラホルムで固定して発生状況を調べた。

日光庁舎において、年間10℃以下の低水温で大西洋サケの飼育を続けた場合(図104(1)-1)、採卵と採精は12月初旬に可能になった。しかし、人工授精で得た受精卵の孵化率が1%以下と非常に低いことから、年間低水温で飼育し続けることが、大西洋サケの良質卵を得ることに結び付かなかつた。一方、玉城庁舎では2012年のみ、孵化率4%の受精卵を得ることができた。この年の前年度の冬の水温が高く、2012年夏の水温が15℃を越え、10月から11月にかけて急激に水温が10℃まで低下していた(図104(1)-2)。そこで、玉城庁舎において2014年1月から3月にかけて水温が12℃以下に低下しないように飼育し、2015年の

夏場に15°C以上の水温となった屋外水槽で飼育した。その後、雄3個体、雌2個体を10月1日に屋内の2 t水槽に移し、人工的に水温を下げ11月中旬に10°C前後になるように水温を調節して飼育した(図104(1)-3)。これから得られた卵と、屋外で飼育し続けた個体から得られた卵について、受精後の発生を比較した。水温を調節して飼育した大西洋サケの雌から得られた卵からは孵化稚魚が得られたが(孵化率約1%)、屋外で飼育した雌から得た卵からは孵化稚魚が得られなかった。このことから、9月までの高水温と10月下旬から11月にかけての水温低下が卵質に影響する可能性が示唆された。これは、天然の大西洋サケが産卵期を迎えた時に春から初夏にかけて生まれたカナダや北欧の河川に遡上して、夏場は水温がやや高い河川で過ごし、河川の水温が急激に下がる10月から11月にかけて成熟して、産卵を迎えることを反映しているものと考えられる。

大西洋サケを玉城庁舎と日光庁舎で飼育した場合、在来サケ科魚類の多くは10月中旬に成熟する。大西洋サケ雌は11月末から12月初旬にかけて成熟したが、10月末に大西洋サケの雄から精子を得られたため、アマゴ、サクラマス、ビワマス、イワナの雌から得た卵と受精した。卵と精子を混合した後に、十分量の洗卵液を加えて1分間静置した。その後、30分間吸水させ、これを孵化槽内に設置した金属ザルに回収して、水温12°Cで発生させた。回収後1日目と、その後は4日おきに発生中の受精卵を4%パラホルムアルデヒドで固定して発生の状況を調べた。日光庁舎では、11月末でもイワナの雄から精子が得られたため、同様に大西洋サケの卵とイワナの精子を受精させ、その後の発生様式を調べた。また、24日まで発生した交雑胚からDNAを抽出し、アロマターゼ遺伝子と16S rRNA遺伝子のPCR-RFLPによる種判別を行った。

アマゴ、サクラマス、ビワマスの卵を大西洋サケの精子で受精した場合、受精卵は桑実胚期から体軸形成期にかけて形態形成異常が見られ、孵化前に死滅した(図104(1)-4)。一方、イワナの卵を大西洋サケの精子で人工授精した場合、孵化率は低いが生きた稚魚を得て2年間飼育することができた(図104(1)-5)。そこで、Aromatase遺伝子のPCR-RFLPによる発眼期の胚を種判別したところ、得られた交雑個体は大西洋サケとイワナの雑種であることが確認された(図104(1)-6)。さらに、母系遺伝する16S rRNA遺伝子のPCR-RFLPから母方はイワナであることが確認された(図104(1)-7)。また、大西洋サケの卵とイワナの精子を受精した場合も、非常に低い孵化率であるが、孵化稚魚を2個体得た。

競合性については、約30gの幼魚を長さ200cm、幅50cm、深さ30cmの屋内飼育水槽で、大西洋サケ10個体の単独飼育、在来サケ科魚類(アマゴ、ビワマス)の単独飼育、大西洋サケと在来サケ科魚類5個体ずつの混合飼育を行い、餌を取る確率と水槽の生息域のビデオ観察、2週間ごとの体重測定により種内競合、種間競合の状況を調べた。

同様に、成熟前の成魚の大西洋サケと在来サケ科魚類のアマゴ、サクラマス、ビワマスを用いて混合飼育を行った。玉城庁舎の長さ5m、幅1.5m、深さ80cmの屋外飼育池を用いて、大西洋サケ6個体の単独飼育、在来サケ科魚類6個体の単独飼育、大西洋サケ3個体と在来サケ科魚類3個体を混合飼育した。屋外水槽内の2か所に水中カメラを設置して、餌に対する競合、空間競合について調べた。また、2週間毎に体重を測定し、混合飼育による種間競合が成長に及ぼす影響を調べた。

幼魚では、在来サケ科魚類は強い種間競合を示し、大西洋サケと混合飼育するとこれを攻撃したため、大西洋サケの成長が抑制された(図104(1)-8)。成熟前の成魚では、大西洋サケは弱い種内競合を示すのに対して、在来サケ科魚類はそれより強い種内競合を示し

た。特に、ビワマスは強い種内競争を示した。また、大西洋サケは在来サケ科魚類と棲み分けて種間競争を避ける行動をとるため、目立った種間競争が起こらず、単独飼育した場合と同様の成長を示した（図104(1)-9）。

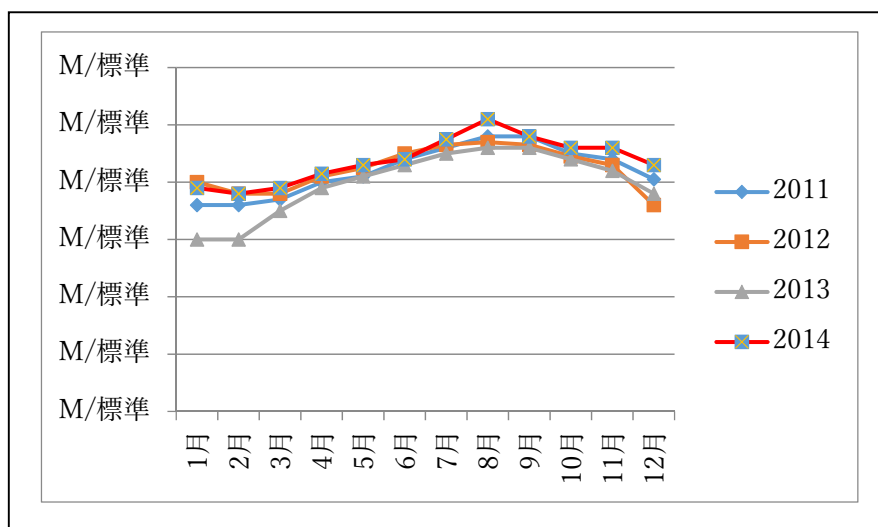


図104(1)-1. 日光庁舎における大西洋サケの各年の飼育水温

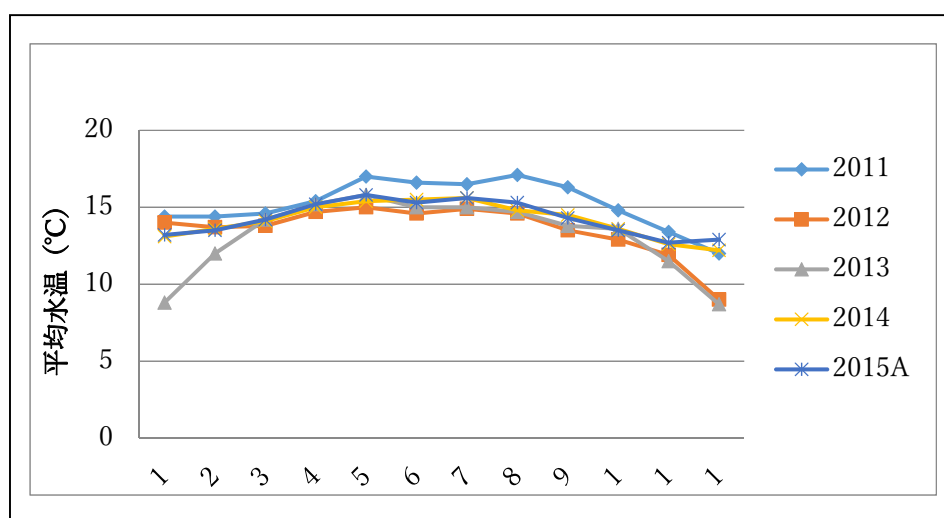


図104(1)-2. 玉城庁舎における大西洋サケの各年の飼育水温

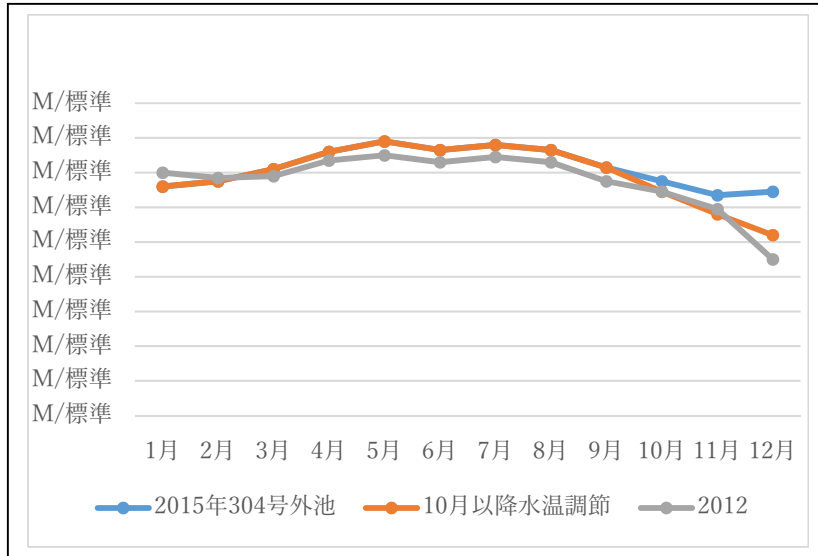


図104(1)-3. 2012年度の飼育水温と水温調整を行った時の水温の比較

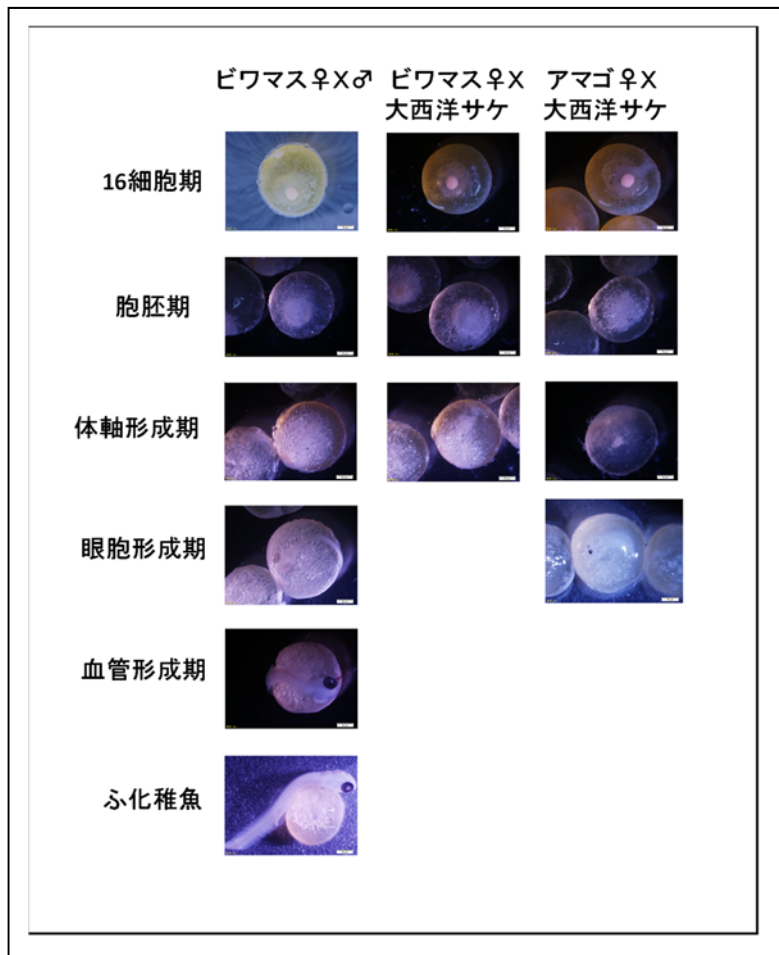


図104(1)-4. 大西洋サケ雄とピワマスおよびアマゴの雌の交配で得た胚の発生  
いずれの交雑胚も正常な体軸が形成できず発生が止まる。



図104(1)-5. イワナ雌と大西洋サケ雄の交配で得られた交雑種

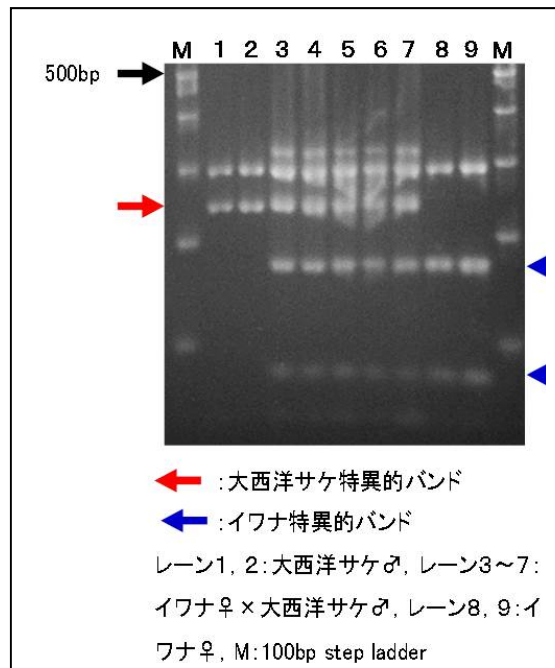


図104(1)-6. Aromatase遺伝子のPCR-RFLP

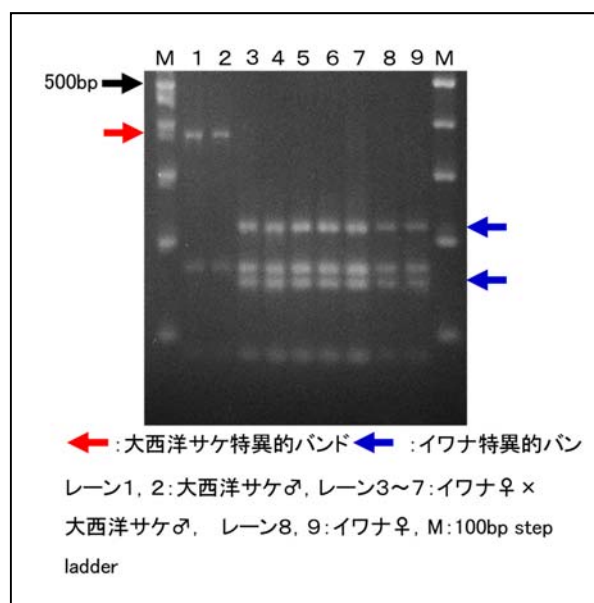


図104(1)-7. 16SrRNA遺伝子のPCR-RFLP

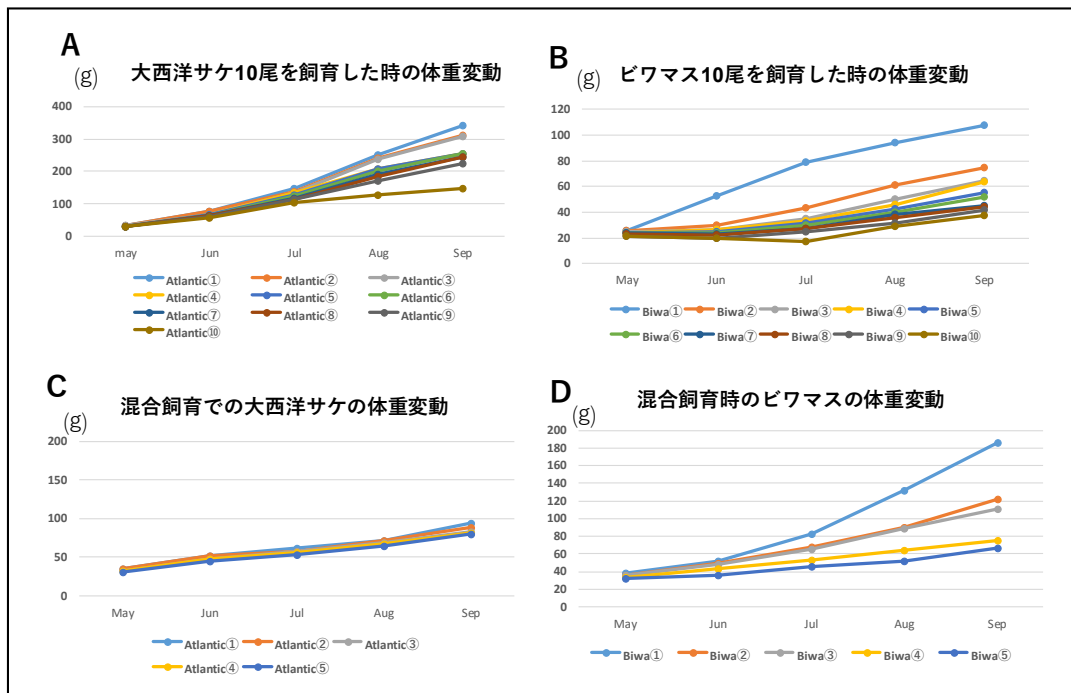


図104(1)-8. 幼魚の大西洋サケとビワマスを混合飼育した時の体重変動

A, B: 大西洋サケとビワマスをそれぞれ単独で10個体を飼育した時の体重変動

C, D: 大西洋サケ5個体とビワマス5個体を混合した時の体重変動

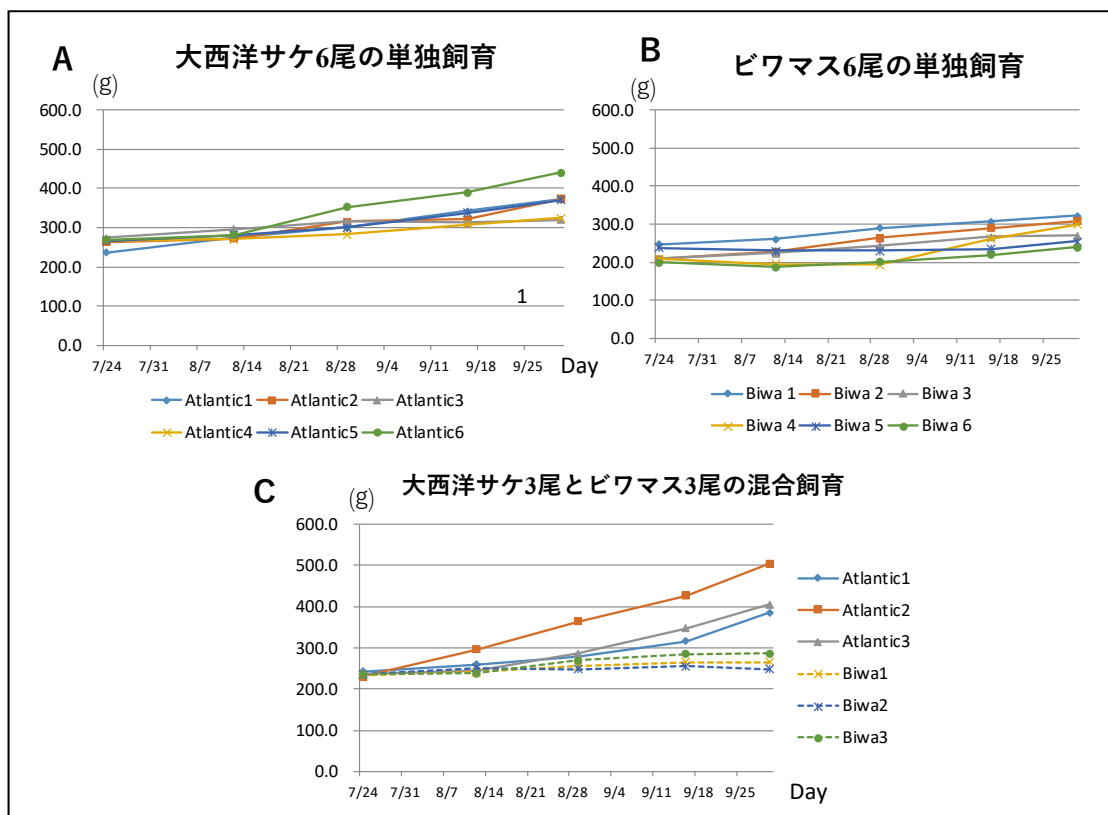


図104(1)-9. 成熟前の成魚の大西洋サケとビワマスを混合飼育した時の体重変動

A, B: 大西洋サケ6個体とビワマス6個体をそれぞれ単独飼育した時の体重変動

C: 大西洋サケ3個体とビワマス3個体を混合飼育した時の体重変動



### 3) 成果活用における留意点

大西洋サケの成熟には、水温以外に緯度（日長）、孵化してからの年齢、海水で過ごす期間が影響するとされている。このため、日本の本州で大西洋サケ雌を成熟させて孵化率の高い卵を得るには、人為的に条件をそろえる必要があると考えられた。また、大西洋サケ雌の日本における産卵期は11月下旬から12月にかけてであるが、多くの在来サケ科魚類の産卵期は10月の初旬から11月初旬にかけてであるため、産卵時期がずれている。大西洋サケの雄は10月の後半から精子を出す個体も出現するため、在来サケ科魚類の産卵期と重なるが、人工授精の結果、イワナの卵と大西洋サケの精子を受精させた場合のみ、非常に低い割合で、孵化稚魚を得て2年間飼育できた。他の在来サケ科魚類の雌と大西洋サケ雄の交雑で得た胚は、体軸形成期に発生異常を起して死滅した。これらの結果から、本州の自然環境で大西洋サケが繁殖する可能性や在来種と交雑する可能性は非常に低いと考えられた。

幼魚では大西洋サケが在来サケ科魚類（アマゴ、ビワマス、サクラマス）から種間競合の影響を強く受けた。また、成熟前の成魚では大西洋サケが在来サケ科魚類からの攻撃を避けるため、棲み分けることが観察された。カナダや北欧の天然の河川においても、大西洋サケは他のサケ科魚類からの攻撃を避けるため棲み分けることが報告されている。これらから、在来サケ科魚類に対する大西洋サケの競合性は弱いと考えられた。

これらの知見は、生物多様性影響の評価に必要な宿主生物としての大西洋サケの生物情報や、遺伝子組換え大西洋サケの交雑性や競合性の評価手法に利用できると考えられた。このため、遺伝子組換え大西洋サケを1種使用する申請があった際に、審査等の参考にできると考えられる。

### 4) 今後の課題

大西洋サケの成熟には、水温以外に緯度（長日と短日の差）、孵化してからの年齢、海水で過ごす期間が影響するとされている。日本の本州で大西洋サケ雌を成熟させて孵化率の高い卵を得るには、これらの条件の検討も必要と考えられた。

大西洋サケ雌の成熟を十分コントロールできていないため、孵化率の低い大西洋サケの卵とイワナの精子を受精していることになり、大西洋サケ雌と在来サケ科魚類雄との交雑性を正確に試験できたとは言えない。今後、大西洋サケ雌の成熟の条件について検討し、再度交雑試験を行う必要があると考えられる。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4(2)	研究期間	平成25～26年度
中課題名	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	4(2)メダカの交雑性、有害物質産生性に関する研究		
小課題責任者名・研究機関	正岡哲治、岡本裕之、荒木和男、名古屋博之・独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所育種研究センター		

### 1) 研究目的

遺伝子組換えメダカと野性メダカとの交雑がどの程度起こるか把握することは、野性メダカの生物多様性影響（遺伝子汚染）の観点から重要である。遺伝子組換えメダカは、鑑賞を目的として、遺伝子組換えにより体色に変化していることが予想される。しかし、体色の違いが、野性メダカとの交雑性に影響を及ぼすかについては知見がない。このため、野性メダカとは体色が異なるヒメダカと野性メダカとの交雑試験を実施し、体色が求愛行動や交尾行動に及ぼす影響の有無を明らかにする。

また、遺伝子組換え魚全般の生物多様性評価において、遺伝子組換え魚が未知の有害物質を体外へ産生していないか確認するための評価・検定手法を開発する。

### 2) 研究成果

野性メダカ（メダカ）の雌と雄及びヒメダカの雄の計3個体、またはメダカの雌と雄及びヒメダカの雌の計3個体をそれぞれ水槽内で飼育し、求愛行動（交叉）や交尾行動（交尾）を観察して回数を計測した。なお、交雑試験は20回ずつ行った。

求愛行動（回数）における割合は、メダカ雌とメダカ雄が13であったのに対し、メダカ雌とヒメダカ雄は4と低かった（図104(2)-1）。また、雌雄逆の組み合わせでの求愛行動（回数）における割合は、メダカ雌とメダカ雄が29であったのに対し、ヒメダカ雌とメダカ雄は6と低かった（図104(2)-2）。交尾行動（回数）における割合も、メダカ雌とメダカ雄の3に対し、メダカ雌とヒメダカ雄は1、メダカ雌とメダカ雄の8に対し、ヒメダカ雌とメダカ雄は3と低かった。

非遺伝子組換え魚の飼育水で影響がでないことを確認するため、メダカの飼育水を用いて有害物質産生性を評価する試験を検討した。OECDテストガイドラインや農林水産省農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針等を参考に、メダカの大きさは全長 $2.0 \pm 1.0$ cm、飼育密度は1Lあたり0.5～1.0g体重（1Lあたりメダカ3～4個体）とした。また、メダカはあらかじめ48～72時間餌止めして絶食させた。明期は14時間、暗期は10時間、水温 25～27℃とした。上記の条件でメダカを24時間飼育した水を、メダカの飼育水として用いた。

魚類では、上記飼育水を用いてゼブラフィッシュの成魚を飼育し、24、48、72、96時間後の死亡、行動異常、形態異常を調査した。また、ゼブラフィッシュの胚も同様に、24、48、72、96時間後の死亡、発生異常を調査した。甲殻類では、上記飼育水を用いてタマミ

ジンコを飼育し、24、48時間後の遊泳阻害を調査した。藻類では、上記飼育水を用いた培地で在来藻類であるテトラセルミスを培養し、24、48、72時間後の生長（生物量）を調査した。次に、ポジティブコントロールを検討するため、藻類では次亜塩素酸ナトリウムの濃度を変えてテトラセルミスを培養し、24、48、72時間後の生長（生物量）を測定した。また、魚類胚では蛋白分解酵素（プロナーゼ）の濃度を変えてゼブラフィッシュの各胚を培養し、24、48、72、96時間後のゼブラフィッシュ胚の死亡、発生異常を調査した。

先ず、非遺伝子組換え魚を飼育した水が及ぼす影響を確認した。魚類では、メダカ飼育水と水を用いてゼブラフィッシュの成魚を飼育し、24、48、72、96時間後の死亡、行動異常、形態異常を調査したところ、死亡した個体は見られなかった（表104(2)-1）。また、行動異常（静止や横たわり、旋回、反転、回転、ふらつき、けいれん、狂奔）や形態異常（腹部膨満、眼球突出、白化や黒化、湾曲、壊死や潰瘍、出血、腫瘍、水疱、発赤、立鱗等）を示したゼブラフィッシュも見られなかった（図104(2)-3）。ゼブラフィッシュの胚を上記飼育水と水で培養し、24、48、72、96時間後の死亡、発生異常（受精卵の凝固、体節形成の欠乏、卵黄からの尾芽の分離欠乏、心拍の欠乏）を調査したところ、両試験区とも発生異常は観察されなかった（図104(2)-4）。また、両試験区間で死亡率に差は見られなかった（表104(2)-2）。甲殻類では、上記飼育水を用いてタマミジンコを飼育し、24、48時間後の遊泳を調査したところ、遊泳を阻害された個体は観察されなかった（表104(2)-3）。藻類では、上記飼育水または水（メダカの飼育に用いた水と同じ水源の水（増養殖研玉城庁舎の地下水））を用いて作成した培地（培養液）でテトラセルミスを培養し、24、48、72時間後の生長（生物量）を調査したところ、両試験区の間で生長に差は見られなかった（図104(2)-5）。ポジティブコントロールの検討では、藻類のポジティブコントロールとして次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素約4%含有）を検討した。30ppmの濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した試験区で、テトラセルミスの生長がほぼ半減した（図104(2)-6）。また、蛋白分解酵素の一種であるプロナーゼが魚類胚のポジティブコントロールとして利用可能か検討した。プロナーゼを0.005mg/ml～1mg/mlと濃度を変えて、ゼブラフィッシュの胚を培養し、24、48、72、96時間後のゼブラフィッシュ胚の死亡、発生異常を調査した。なお、各実験区で20個の受精卵（胚）を使用した。水（コントロール）では正常に発生し、仔魚の死亡も観察されなかった（図104(2)-7）。これに対し、0.5mg/mlまたは1.0mg/mlの濃度のプロナーゼをそれぞれ添加した区は、24時間以内に全て死亡した（図104(2)-7、表104(2)-4）。また、0.05mg/mlと0.1mg/mlの濃度区では、胚は孵化したが96時間後には全て死亡した（図104(2)-7、表104(2)-4）。0.005mg/mlと0.01mg/mlの濃度区では、発生異常が一部の個体で見られ、96時間後の生残率はコントロールより低くなった（図104(2)-7、表104(2)-4）。

野外に生息しているメダカの生物量や生息密度、生息する河川と池等の水量や水流を考慮すると、今回の試験で用いたメダカ飼育水の飼育密度は高く、飼育期間も十分であると考えられた。また、糞尿の影響を抑えるための餌止め期間も十分であったと考えられた。これらから、未知の有害物質産生性を評価する試験において、今回のメダカの飼育条件で飼育水を得ることは妥当であると考えられた。

OECDのテストガイドライン等に示されている基準物質は、魚類では3、4-ジクロロアニリンで、甲殻類では二クロム酸カリウムである。メダカやゼブラフィッシュの成魚と胚及びタマミジンコのポジティブコントロールにはこれらが使用できると考えられた。

藻類の基準物質は二クロム酸カリウムであるが、テトラセルミスの場合、培地の成分と

反応して溶存濃度が安定しない可能性がある。このため、これの代わりとして次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素約4%含有）を用いることとし、72時間生長半数影響濃度（EC50）を確認した。試験結果から、テトラセルミスの次亜塩素酸ナトリウムにおける72時間生長半数影響濃度（EC50）は、約30ppmと推測された。これらから、次亜塩素酸ナトリウムは藻類（テトラセルミス）に対し、ポジティブコントロールとして利用できると考えられた。

魚類が体外に産出する物質（体表粘液等）で、他の魚類や藻類（緑藻等）、甲殻類（ミジンコ等）の生存や生育に悪影響を及ぼす物質あるいは魚類の体表から分泌される物質に構造等が似ている物質については、蛋白分解酵素が考えられた。しかし、これ以外にポジティブコントロールとして利用できそうな物質や代替物質は確認されなかった。そこで、蛋白分解酵素の一種であるプロナーゼが魚類胚のポジティブコントロールとして利用可能か検討した。試験結果から、ゼブラフィッシュ胚に対する4日間半数致死濃度（LC50）は、0.005mg/ml～0.01mg/mlと推測された。これらから、プロナーゼはゼブラフィッシュの胚に対し、ポジティブコントロールとして利用可能であると考えられた。

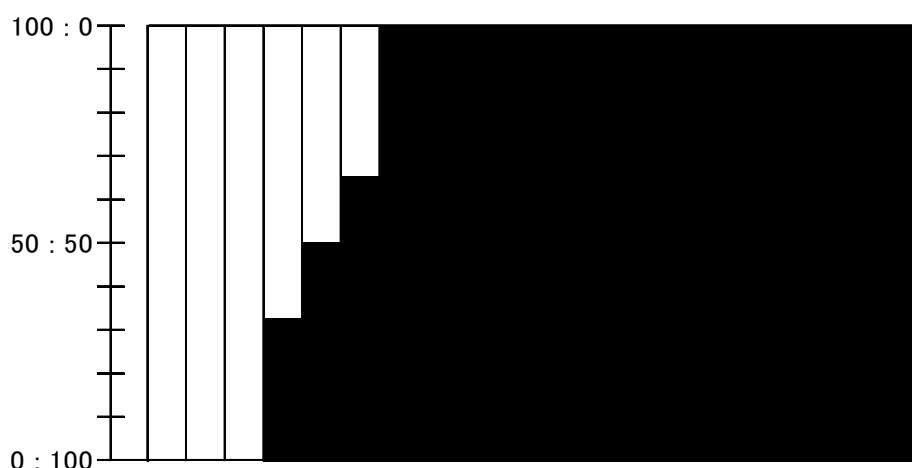


図104(2)-1 メダカ雌に対するメダカ雄とヒメダカ雄の求愛行動の割合

メダカ雄：■、ヒメダカ雄：□

- 1) 求愛行動の割合（回数）は、メダカ雌とメダカ雄：メダカ雌とヒメダカ雄=13：4
- 2) メダカ雌をめぐるメダカ雄とヒメダカ雄の競合があり、優位な雄がメダカ雌に求愛行動をとる傾向がある。
- 3) メダカ雌は競合に勝ったヒメダカ雄を受け入れることがある。

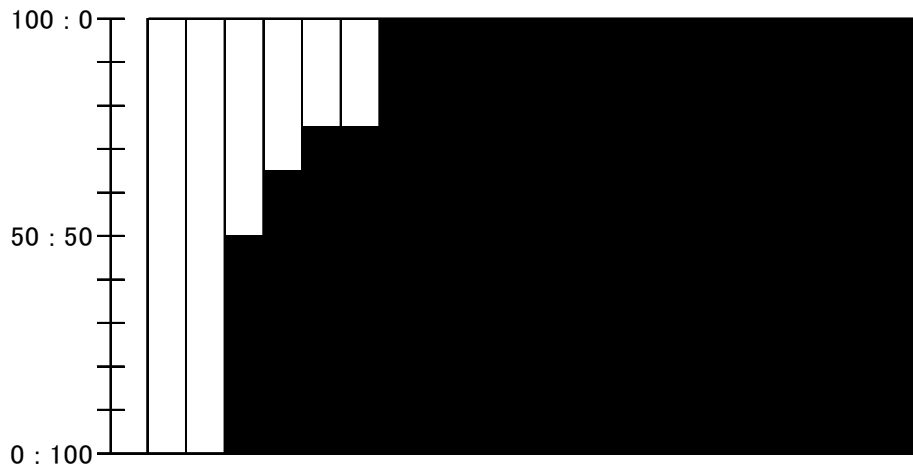


図104(2)-2 メダカ雌とヒメダカ雌に対するメダカ雄の求愛行動の割合

メダカ雌：■、ヒメダカ雌：□

- 1) 求愛行動の割合（回数）は、メダカ雌とメダカ雄：ヒメダカ雌とメダカ雄=29：6
- 2) メダカ雄はメダカ雌に求愛行動をとるが、拒絶された場合は、ヒメダカ雌にも求愛行動をとる。
- 3) メダカ雄はメダカ雌が産卵した後、ヒメダカ雌にも求愛行動をとることがある。



図104(2)-3 有害物質産生成試験終了時のゼブラフィッシュ成魚

- 1) 腹部膨満、眼球突出、白化や黒化、湾曲、壊死や潰瘍、出血、腫瘍、水疱、発赤、立鱗等の形態異常は観察されなかった。

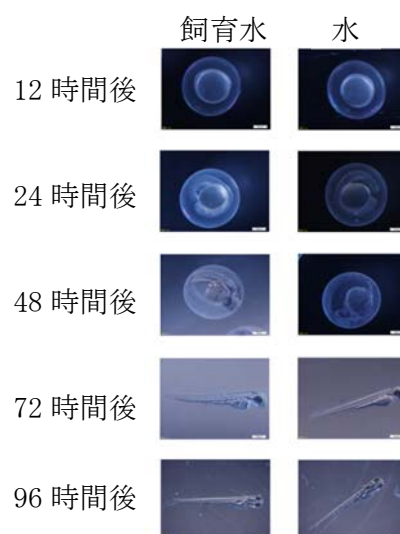


図104(2)-4 メダカ飼育水を用いたゼブラフィッシュ胚の発生

- 1) 両試験区で発生異常は観察されなかった。

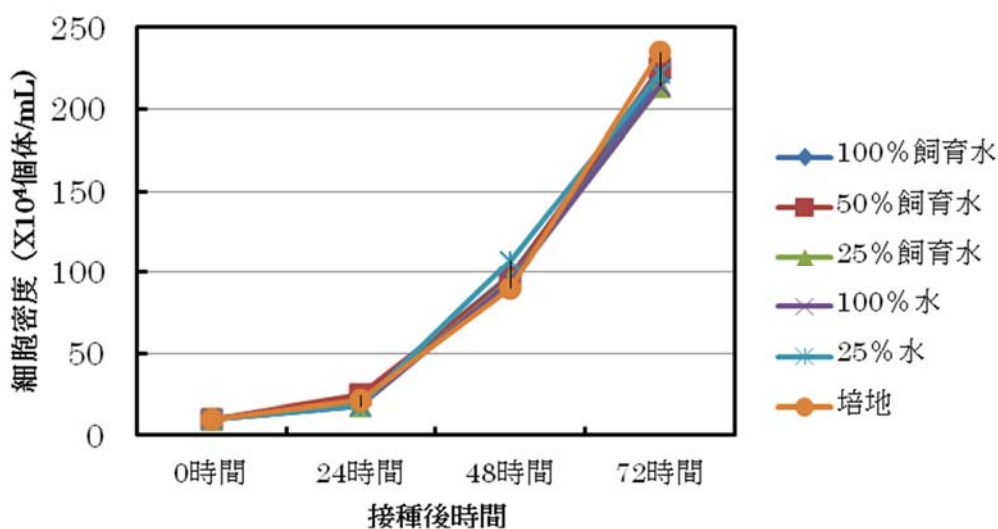


図104(2)-5 メダカ飼育水を用いた藻類の生長阻害試験の結果

1) テトラセルミスの増殖は、25～100%のメダカ飼育水や、飼育水と同じ水源の水（増養殖研玉城庁舎の地下水）を用いて作成した培地（培養液）でも、対照区（蒸留水を用いて作成した培養液（図中の培地））と変わらなかった。

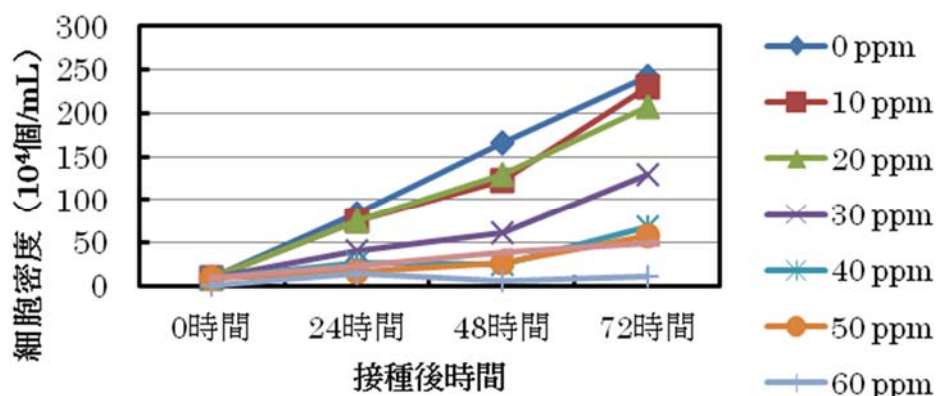


図104(2)-6 次亜塩素酸ナトリウムを用いたテトラセルミスの生長阻害試験

1) テトラセルミスは10ppmの次亜塩素酸ナトリウムを添加した試験区から、高濃度の試験区にかけて生長が阻害され、30ppmの濃度の時に成長がほぼ半減した。また、50ppm以上の試験区では、ほとんど増殖しない、または葉緑体の発達が認められなかった。

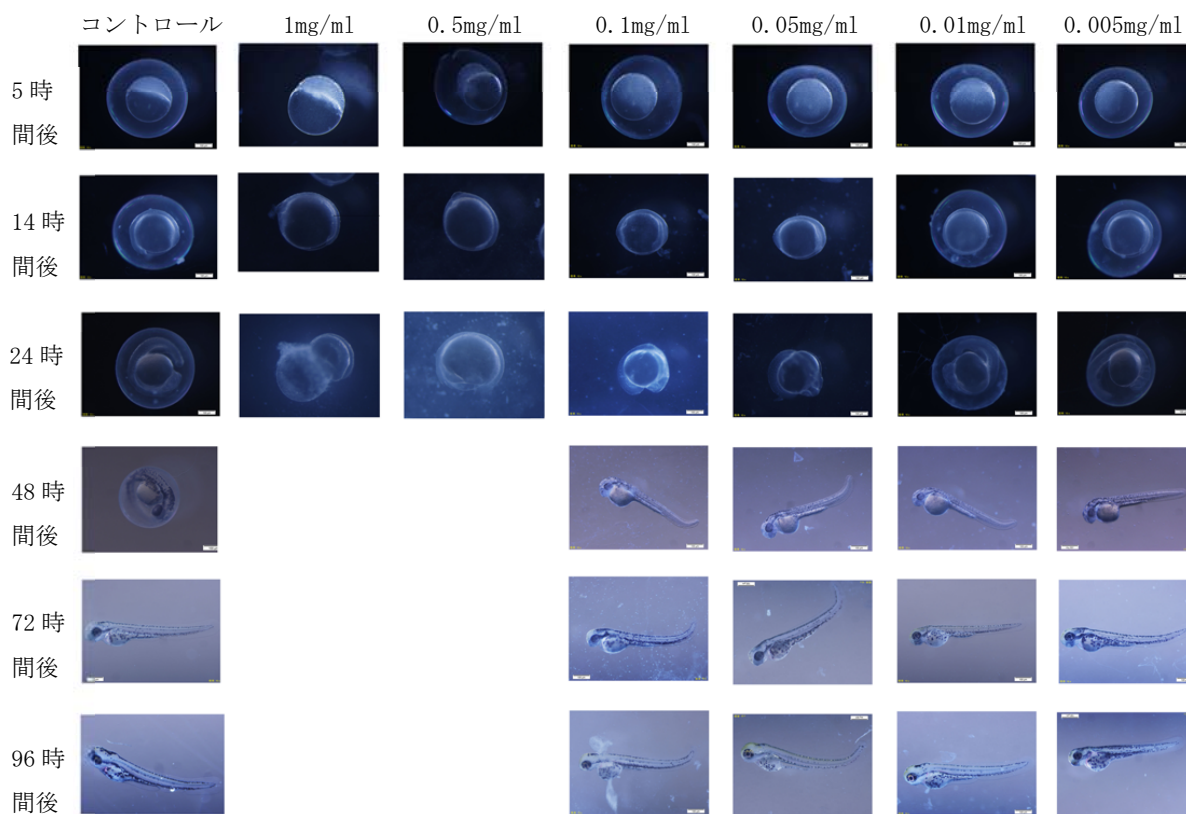


図104(2)-7 プロナーゼを用いたゼブラフィッシュの発生阻害試験

1) 0.05mg/ml以上の濃度区では、96時間以内に胚や仔魚は全て死亡した。0.005 mg/ml と 0.01mg/mlの濃度区では、発生異常が一部の個体で見られ、96時間後の死亡率はコントロールより高くなった。

表104(2)-1 メダカ飼育水によるゼブラフィッシュ（成魚）の死亡率

試験	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

表104(2)-2 メダカ飼育水を用いたゼブラフィッシュ胚の生残率

試験	試験区	受精率 (試験開始時)	発生率 (12時間後)	生残率			
				24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
1	飼育水	100	70	65	65	65	65
	コントロール	100	70	70	65	65	60
2	飼育水	100	70	70	70	65	65
	コントロール	100	70	70	70	65	65
3	飼育水	100	65	60	60	55	55
	コントロール	100	65	60	60	50	50
4	飼育水	100	95	90	90	90	90
	コントロール	100	90	85	85	85	85
5	飼育水	100	80	80	75	75	75
	コントロール	100	85	85	85	85	85

表104(2)-3 メダカ飼育水を用いたタマミジンコの遊泳阻害率

試験	24時間後	48時間後
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0

表104(2)-4 プロナーゼの濃度とゼブラフィッシュ胚の生残率

	受精率	発生率	5時間後	12時間後	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
1mg/ml	100%	85%	85%	85%	0%	0%	0%	0%
0.5mg/ml	100%	90%	90%	90%	0%	0%	0%	0%
0.1mg/ml	100%	90%	90%	90%	85%	70%	55%	0%
0.05mg/ml	100%	85%	85%	85%	80%	80%	60%	0%
0.01mg/ml	100%	90%	90%	90%	90%	75%	60%	40%
0.005mg/ml	100%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	70%
コントロール	100%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	85%

### 3) 成果活用における留意点

交雑試験の結果から、体色が異なるヒメダカと野性メダカとの間で交雑は偏ると考えられた。このため、蛍光タンパクの遺伝子等を導入し、体色を変化させた遺伝子組換えメダカにおいても、野性メダカとの間で交雑は偏る可能性があると考えられた。

在来生物は、未知の有害物質が遺伝子組換え魚から水中に放出される、あるいは遺伝子組換え魚を捕食して体内に取り込むことで、初めて未知の有害物質に暴露される。このため、試験生物への暴露の方法としては、止水で遺伝子組換え魚または非遺伝子組換え魚を飼育した水（飼育水）或いはこれを用いた培地とすることが適当と考えられた。

また、飼育水を用いた飼育・培養試験の結果から、非遺伝子組換え魚（メダカ）の飼育



水で魚類（ゼブラフィッシュの成体と胚）、甲殻類（タマミジンコ）、藻類（テトラセルミス）に影響はでないと考えられた。

これらの知見は、生物多様性影響の評価に必要な宿主生物としてのメダカの生物情報や、遺伝子組換えメダカの交雑性や有害物質産生性の評価および検定手法に利用できると考えられた。このため、蛍光蛋白遺伝子を導入した遺伝子組換えメダカを観賞魚として1種使用する申請があった際に、審査等の参考にできると考えられた。

#### 4) 今後の課題

遺伝子組換えコイや遺伝子組換え大西洋サケも想定し、非遺伝子組換え魚の飼育水で影響がでないことを確認するため、コイや大西洋サケ等の飼育水を用いて有害物質産生性を評価する試験を検討することが、今後の課題としてあげられる。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4(3)	研究期間	平成25～27年度
中課題名	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	4(3) コイの交雑性に関する研究		
小課題責任者名・研究機関	正岡哲治、名古屋博之、岡本裕之、荒木和男・独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所育種研究センター		

### 1) 研究目的

遺伝子組換えコイと交配の可能性がある在来コイ(フナ属魚種(フナ類))を用い、未だ明らかにされていないコイとフナ類の雑種について、知見を蓄積する。具体的には、コイとフナ類の雑種F<sub>1</sub>が在来魚(コイやフナ類)に及ぼす影響を把握するため、雑種F<sub>1</sub>を成熟年令まで飼育し成熟時期や妊性の有無を調査する。また、可能であればF<sub>2</sub>以降の妊性を明らかにする。さらに、自然環境に近い野外大型実験池を用いて、コイとフナ類の間で自然交配が起こるかを実験的に明らかにする。

### 2) 研究成果

コイとゲンゴロウブナ、コイとニゴロブナ及びコイとナガブナの雑種F<sub>1</sub>において、産卵期に成熟した個体が出現するか調査した。成熟した一部の雑種F<sub>1</sub>については、雑種の親魚種であるコイまたはフナ類の配偶子を用いて戻し交配し、得られた受精卵のふ化率等を調査した。ナガブナ雌とコイ雄で作出した雑種F<sub>1</sub>群で計2回全75個体の成熟を調査し、候補となる8個体に排卵を促進するためホルモンを投与した。その結果、1個体の雌より卵が得られたため、これとコイあるいはナガブナ精子を用いて戻し交配を行った。一部の個体は発生が進み、ふ化した。ふ化率は雑種F<sub>1</sub>雌×コイ雄の場合は10.3%、雑種F<sub>1</sub>雌×ナガブナ雄の場合は7.5%であり、両者に明確な差は認められなかった。コイ科魚類で成熟期の雄の鰓蓋等に現れる小突起物である追星が現れている雑種F<sub>1</sub>の雄が75個体中38個体認められたが(図104(3)-1)、1個体も精液を出さなかった(図104(3)-2)。ニゴロブナ雌とコイ雄の雑種F<sub>1</sub>群についても、同様の結果が得られた(図104(3)-3、104(3)-4)。ふ化した個体の生残性は低かったが、完全な致死性ではなかった(表104(3)-1)。ゲンゴロウブナ雌とコイ雄を人工交配して作出した雑種F<sub>1</sub>群の中から、親魚候補となる雌個体にホルモンを投与したところ、1個体の雌から卵が得られ、コイ精子を用いて戻し交配を行った。なお、ゲンゴロウブナ雄は十分量の精子が得られなかったため、交配を断念した。コイとの戻し交配により一部の個体は発生が進み、ふ化した。しかし、ふ化率は1%未満であった。一方、ゲンゴロウブナ雌とコイ雄を人工交配して作出した雑種F<sub>1</sub>群の中から、成熟雄を示す形態特徴(追い星)により雄を選抜して腹部を圧迫したが、精子は得られなかった。これまでの戻し交配の組み合わせをまとめると、ゲンゴロウブナ雌とコイ雄を人工交配して作出した雑種F<sub>1</sub>雌とゲンゴロウブナ雄との戻し交配以外の交配組み合わせは少なくとも1回は実施できた(表104(3)-1)。しかし、実施した全ての交配組み合わせにおいて、F<sub>1</sub>雄から精子は得られ

なかった(表104(3)-1)。また、コイ雌とゲンゴロウブナ雄の雑種F<sub>1</sub>雌、コイ雌とナガブナ雄の雑種F<sub>1</sub>雌を用いた戻し交雑では、正常な形態をした仔魚が得られず、後代は全滅した(表4(3)-1)。さらに、雑種F<sub>1</sub>雌を用いた戻し交雑では、正確な生残率は不明であるものの、後代の生残性は低かった(生残率1%未満)。

これまでに開発したコイとフナ属の判別用DNAマーカー3種(IL-1、IGF-1、L41)に加え、新たに6種類の遺伝子(ZP2、PA28、JAK1 kinase、Nucleolin、GH、TGF- $\beta$ )を判別マーカー候補とし、それらの特異的増幅プライマーを設計し、DNA断片の増幅を確認した。また、コイとフナ類の雑種を判別できるか検討した。さらに、野外大型実験池の自然産卵で得られたふ化仔魚(エタノール固定)の一部からDNAを抽出した。これをサンプルに用いてPCR(IGF-1遺伝子)を行い、DNAマーカーによりコイとフナ類及び両者の雑種を判別した。また、コイとフナ類の雑種については、PCR-RFLP(TGF- $\beta$ 遺伝子、16S rRNA遺伝子)を行い、フナの種(ゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、ナガブナ)を判別した。

ZP2、PA28、JAK1 kinase、Nucleolin、GH、の5種については、それぞれコイ特異的、フナ類特異的なDNAを増幅するPCR手法を開発した。また、TGF- $\beta$ については、コイ特異的なバンドパターンとフナ類特異的なバンドパターン、さらにゲンゴロウブナ特異的なバンドが得られるPCR-RFLP手法を開発した(図104(3)-5)。

H25年9月～H27年8月にかけて、自然環境に似せた野外大型実験池(9.9×2.4×1.75(水位0.75)m、41.6トン(水量17.8トン))でコイ10個体とフナ類30個体(ゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、ナガブナ各10個体)を混合飼育した。4～8月の産卵期に野外大型実験池の上流側と下流側に人工産卵藻を設置し、自然産卵するか確認した。なお、産卵は夜半から早朝にかけて行われるため、毎日午前9時頃までに人工産卵藻に受精卵が付着しているか確認した。H26年4月14日、5月2日、5月30日に上流と下流両方の人工産卵藻に受精卵が付着していることを確認した。また、H27年5月31日に両方の人工産卵藻に受精卵が付着していることを確認した。このため、野外大型実験池においても自然の水草などの代わりに人工産卵藻を入れることで、産卵を誘発することが可能であると考えられた。人工産卵藻は野外大型実験池の上流側と下流側の2カ所に設置したが、両方に卵が産み付けられたため、場所による影響はないと考えられた。また、上流側と下流側の人工産卵藻の間は5m以上離れているため、別々の個体が上流側と下流側の人工産卵藻にそれぞれ産卵したと考えられた。人工産卵藻に付着した受精卵は、コイやフナ類に食べられるため産卵後は速やかに別の水槽等に移動させる必要がある。そこで、これらの人工産卵藻を別の水槽に移し、受精卵を回収・培養した。また、仔魚の卵黄に含まれる多糖類等がDNA抽出を阻害すると考えられたため、ふ化仔魚を卵黄吸収が終了する時期まで飼育してからエタノールで固定した。

上流側と下流側の人工産卵藻に計4回ずつ産卵されていたため、計8産卵区(H26年4月14日上流、下流、5月2日上流、下流、5月30日上流、下流、H27年5月31日上流、下流)に分けてエタノール固定したふ化仔魚の一部(96または284個体)からDNAを抽出した(表104(3)-2)。これをサンプルに用いてIGF-1遺伝子を利用した判別用PCRを行い、コイ、フナ類、両者の雑種を確認した。4月14日上流、下流の産卵区は、全てフナ類であった(図104(3)-6、表104(3)-2)。逆に、5月2日上流、下流及び5月31日上流、下流の産卵区は全てコイであった(図104(3)-7、表104(3)-2)。これらに対し、5月30日上流、下流はコイとフナ類の他に雑種が3個体確認された(図104(3)-8、表104(3)-2)。

次に、4月14日と5月30日の産卵区で見られたフナ類の一部と、5月30日の産卵区で見られた雑種については、TGF- $\beta$ 遺伝子または16S rRNA遺伝子を利用した判別用PCR-RFLPを行い、

フナの種（ゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、ナガブナ）を判別した。その結果、4月14日と5月30日の産卵区で見られたフナ類はニゴロブナであると推測された（表104(3)-3）。また、5月30日の産卵区で見られた雑種3個体はコイとニゴロブナの雑種で、このうち2個体はニゴロブナ雌とコイ雄、1個体はコイ雌とニゴロブナ雄の雑種であると推測された。

得られた仔魚では、コイとゲンゴロウブナ、ニゴロブナ及びナガブナのフナ属3種のIGF-1、16S rRNA及びTGF- $\beta$  遺伝子をそれぞれ利用したコイとフナ類とを判別するPCRにおける増幅DNA断片の有無や、PCR-RFLPにおける増幅DNA切断断片の長さがこれまでの報告と一致した。このため、上記遺伝子を用いたPCR手法によるコイとフナ類との判別には問題がなかったと考えられた。また、上記遺伝子や16S rRNA及びTGF- $\beta$  遺伝子をそれぞれ用いたコイとフナ類との判別用PCRやPCR-RFLPでは、全長約5mmの仔魚をサンプルに用いても判別可能であった。コイの仔魚とフナ類の仔魚は形態が酷似するため、外部形態からは種判別が困難であるが、これらの手法は形態判別に代わる仔魚期の判別手法として有用であると考えられた。また、小型の仔魚から抽出されるDNAは少量であると考えられるが、このような仔魚のDNAサンプルでも判別できたことから、これらの手法は微量なDNAサンプルでもコイとフナ類とを判別可能と考えられた。

DNAマーカーによるコイとフナ類の種判別結果から、平成26年4月14日はニゴロブナが産卵し、同年5月2日と平成27年5月31日はコイが産卵したと考えられた。また、平成26年5月30日はコイとニゴロブナが産卵し、コイとニゴロブナの一部で交雑が起こったと考えられた。なお、雑種ふ化仔魚3個体のうち、No. 1と3は雌親がニゴロブナで雄親がコイ、No. 2は雌親がコイで雄親がニゴロブナと推測された。また、コイやフナ類の精子の受精能が短時間であるにもかかわらず雑種が存在したことから、5月30日はコイとニゴロブナが上流側と下流側の人工産卵藻でほぼ同時に産卵したと考えられた。

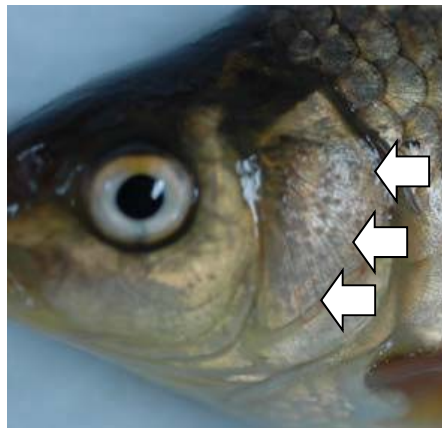


図104(3)-1 追星が出現している雑種F<sub>1</sub>雄（ナガブナ雌×コイ雄）交配区  
矢印：追星

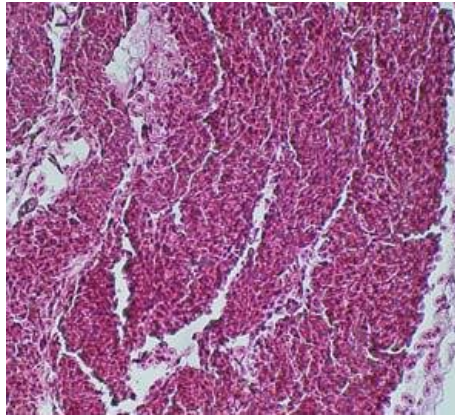


図104(3)-2 追星が出現し精子が出現しないF<sub>1</sub>雄の生殖腺組織切片像  
精巢と思われるような組織は認められない。

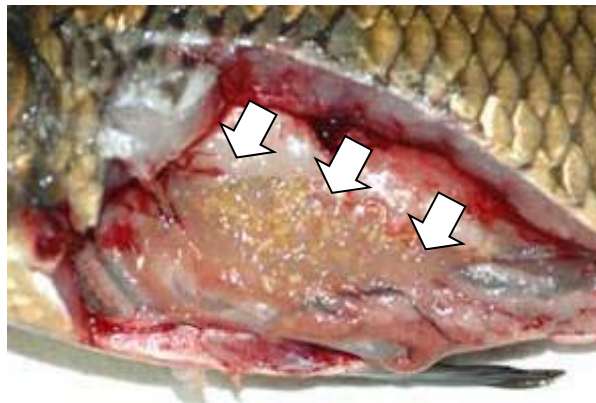


図104(3)-3 雑種F<sub>1</sub>雌の生殖腺  
(ニゴロブナ雌×コイ雄) 交配区  
矢印：ゼリー状の卵巣

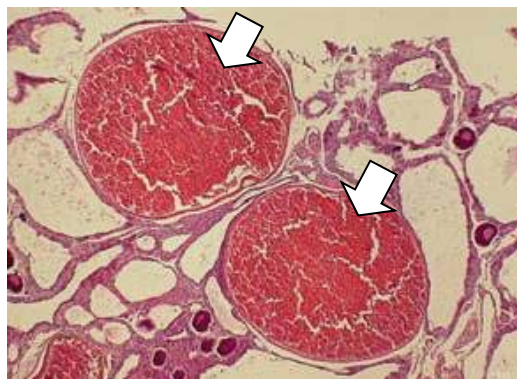
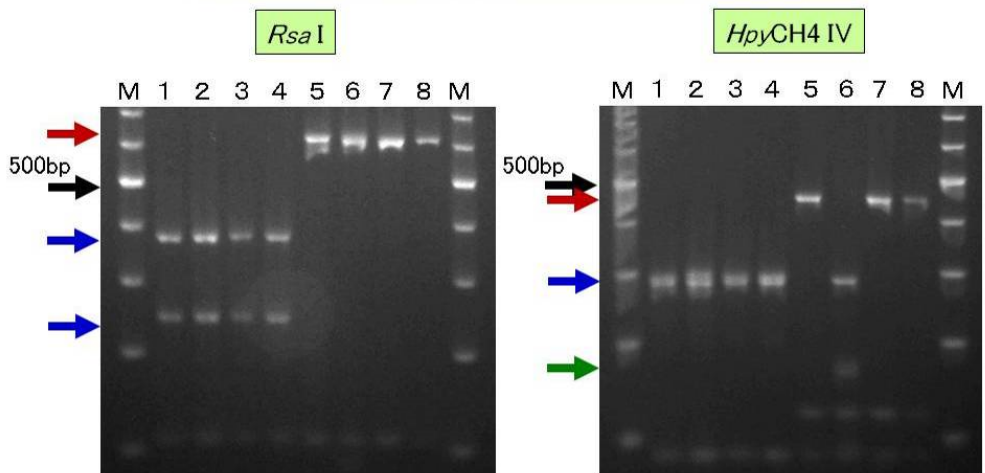
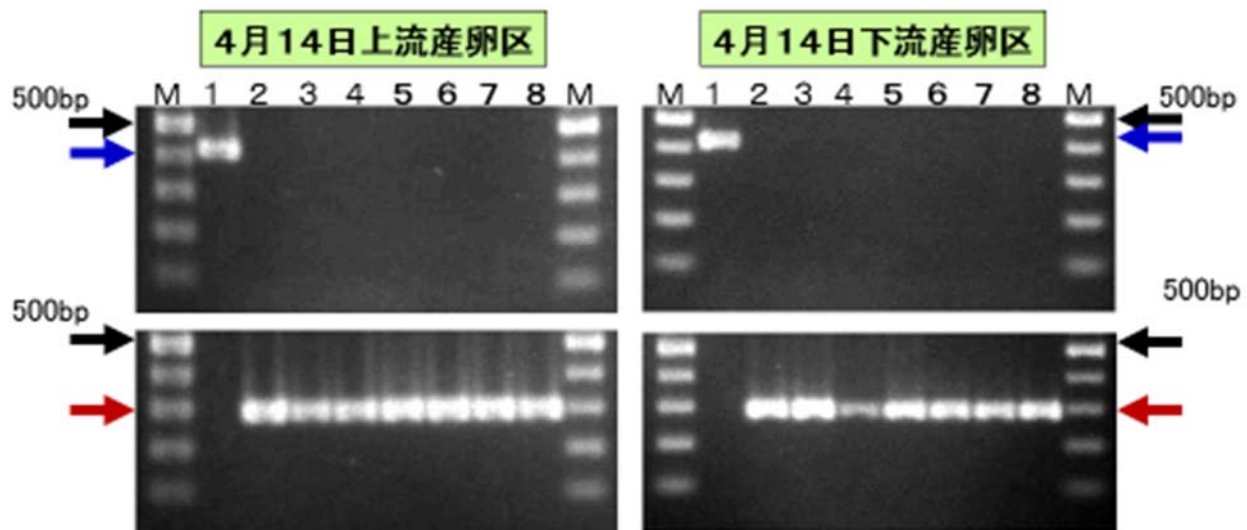


図104(3)-4 雑種F<sub>1</sub>雌の生殖腺組織切片像  
(ニゴロブナ雌×コイ雄) 交配区  
矢印：卵黄蓄積の進んだ卵



レーン1~4:コイ(ヤマトゴイ, ニシキゴイ, ノゴイ(琵琶湖, 四万十)), レーン5:ギンブナ,  
 レーン6:ゲンゴロウブナ, レーン7:ニゴロブナ, レーン8:ナガブナ, M: 100bp step ladder  
 ← :コイ特異的バンド ← :フナ類特異的バンド ← :ゲンゴロウブナ特異的バンド

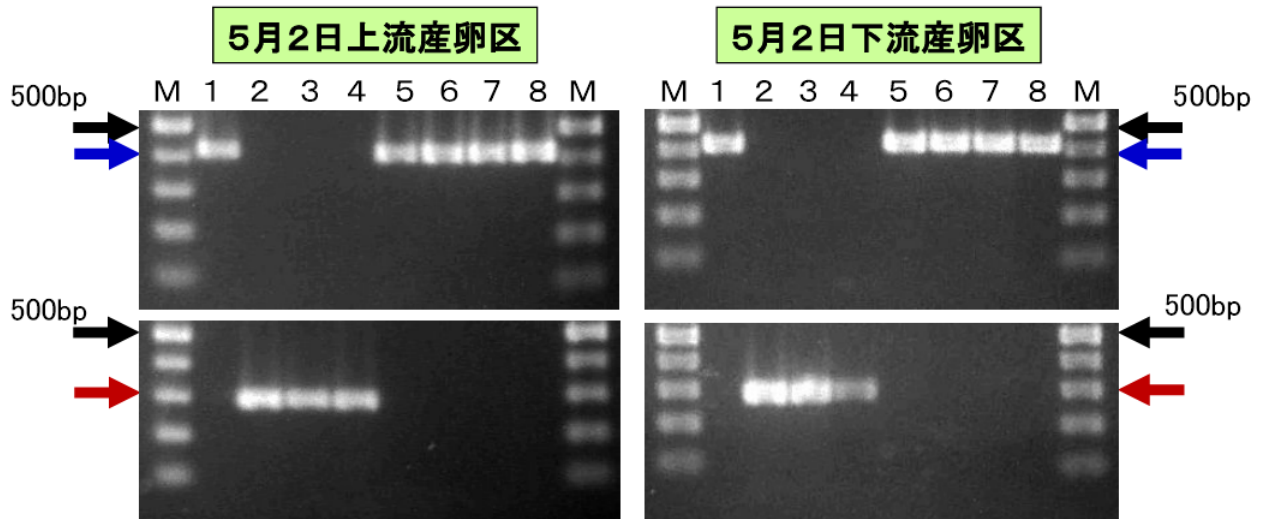
図104(3)-5 ゲンゴロウブナを判別するTGF-βのRFLPの電気泳動像  
 右図の緑矢印: ゲンゴロウブナに特異的なバンド



上段:コイ特異的PCR, 下段:フナ類特異的PCR

レーン1:コイ, レーン2::ゲンゴロウブナ, レーン3:ニゴロブナ, レーン4:ナガブナ, レーン  
 5~8: ふ化仔魚 M: 100bp step ladder  
 ← :コイ特異的バンド ← :フナ類特異的バンド

図104(3)-6 4月14日交配区におけるコイまたはフナ類特異的PCR (IGF-1) による判別

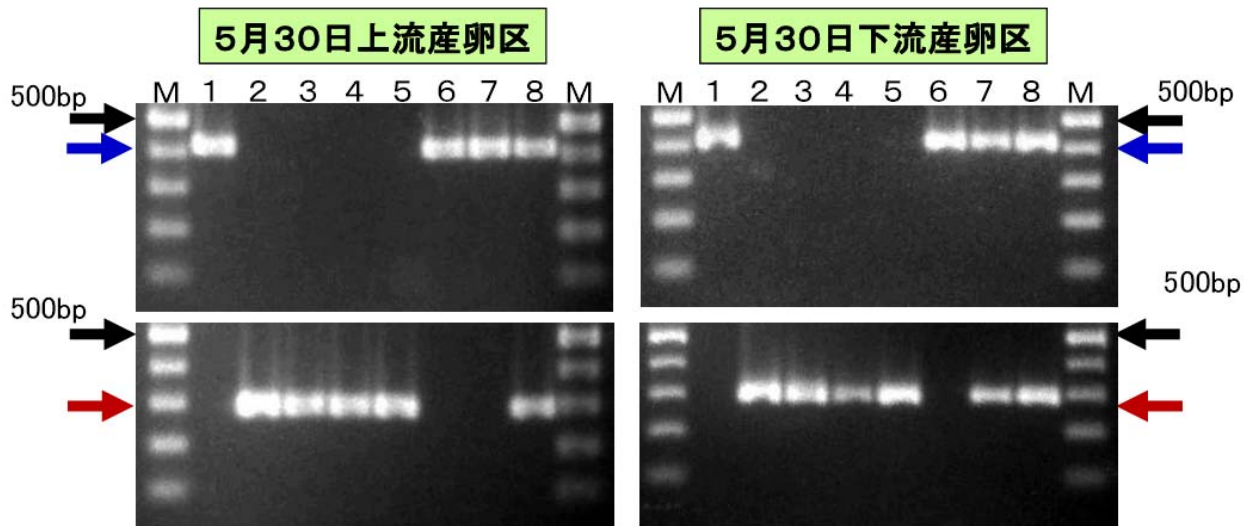


上段:コイ特異的PCR, 下段:フナ類特異的PCR

レーン1:コイ, レーン2:ゲンゴロウブナ, レーン3:ニゴロブナ, レーン4:ナガブナ, レーン5~8:孵化仔魚 M:100bp step ladder

← :コイ特異的バンド ← :フナ類特異的バンド

図104(3)-7 5月2日交配区におけるコイまたはフナ類特異的PCR (IGF-1) による判別



上段:コイ特異的PCR, 下段:フナ類特異的PCR

レーン1:コイ, レーン2:ゲンゴロウブナ, レーン3:ニゴロブナ, レーン4:ナガブナ, レーン5~8:孵化仔魚 M:100bp step ladder

← :コイ特異的バンド ← :フナ類特異的バンド

図104(3)-8 5月30日交配区におけるコイまたはフナ類特異的PCR (IGF-1) による判別

表104(3)-1 コイとフナ類の雑種F<sub>1</sub>の戻し交配

交配の組み合わせ		交配の成否 (生残個体の有無)	備考
(コイ×ゲンゴロウブナ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	○	9個体生残
(コイ×ゲンゴロウブナ)F <sub>1</sub> ♀	× ゲンゴロウブナ♂	—	未実施
コイ♀	× (コイ×ゲンゴロウブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ゲンゴロウブナ♀	× (コイ×ゲンゴロウブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
(ゲンゴロウブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	○	3個体生残
(ゲンゴロウブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× ゲンゴロウブナ♂	○	5個体生残
コイ♀	× (ゲンゴロウブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ゲンゴロウブナ♀	× (ゲンゴロウブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
(コイ×ニゴロブナ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	×	正常形態の仔魚無し
(コイ×ニゴロブナ)F <sub>1</sub> ♀	× ニゴロブナ♂	○	3個体生残
コイ♀	× (コイ×ニゴロブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ニゴロウブナ♀	× (コイ×ニゴロブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
(ニゴロブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	○	28個体生残
(ニゴロブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× ニゴロブナ♂	○	22個体生残
コイ♀	× (ニゴロブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ニゴロウブナ♀	× (ニゴロブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
(コイ×ナガブナ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	×	正常形態の仔魚無し
(コイ×ナガブナ)F <sub>1</sub> ♀	× ナガブナ♂	×	正常形態の仔魚無し
コイ♀	× (コイ×ナガブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ナガブナ♀	× (コイ×ナガブナ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
(ナガブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× コイ♂	○	8個体生残
(ナガブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♀	× ナガブナ♂	○	15個体生残
コイ♀	× (ナガブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)
ナガブナ♀	× (ナガブナ×コイ)F <sub>1</sub> ♂	×	未実施(F <sub>1</sub> ♂精子取れず)

表4(3)-2 DNAマーカー (IGF-1) による判別結果

産卵区		調査数	コイ	フナ	雑種
産卵日	産卵藻の設置場所				
平成26年 4月14日	上流側	96	0	96	0
	下流側	96	0	96	0
平成26年 5月 2日	上流側	96	96	0	0
	下流側	96	96	0	0
平成26年 5月30日	上流側	288	85	202	1
	下流側	288	232	54	2
平成27年 5月31日	上流側	96	96	0	0
	下流側	96	96	0	0



表104(3)-3 フナ類及び雑種におけるフナの種判別

産卵区		フナ or 雑種	調査数	ゲンゴロ ウブナ	ニゴロブ ナ
産卵日	産卵藻の設置場所				
平成26年 4月14日	上流側	フナ	20	0	20
	下流側	フナ	20	0	20
平成26年 5月30日	上流側	フナ	20	0	20
		雑種	1	0	1
	下流側	フナ	20	0	20
		雑種	2	0	2

### 3) 成果活用における留意点

コイとゲンゴロウブナ、コイとニゴロブナ、コイとナガブナの各雑種F<sub>1</sub>は、雌の一部が成熟して卵が得られたが、コイやフナ類と戻し交雑したところ、生残した雑種F<sub>2</sub>は少数であった。また、上記各雑種F<sub>1</sub>の雄から精子は得られなかった。このため、後代(雑種F<sub>2</sub>)の生残は低いものの雑種F<sub>1</sub>の雌は妊性を持ちうる(機能的である)が、雄については不妊の可能性が高いと考えられた。

これまでに開発したコイとフナ類の判別用DNAマーカー3種(IL-1、IGF-1、L41)に加え、新たに6種類の遺伝子(ZP2、PA28、JAK1 kinase、Nucleolin、GH、TGF-β)でコイとフナ類を判別するPCRやPCR-RFLPを利用したDNAマーカーを開発できた。これらの核遺伝子を利用したDNAマーカーと、母系遺伝するミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子を利用したDNAマーカーを用いることにより、F<sub>1</sub>雑種の雌親と雄親のどちらがコイでどちらがフナ類かを推測できると考えられた。

自然産卵試験で雑種が1回確認されたが、他の3回の産卵ではコイとフナ類がそれぞれ別々に産卵していたため、コイとフナ類が同時に産卵することは少ないと考えられた。また、人工交雑によりコイとフナ類との雑種F<sub>1</sub>の妊性は低く、後代(雑種F<sub>2</sub>)の生存性も低いと考えられることから、コイとフナ類の交雑により、後代が何世代にもわたって生存する可能性は低いと推測された。

これらの知見は、生物多様性影響の評価に必要な宿主生物としてのコイの生物情報や、遺伝子組換えコイの交雑性の評価試験に利用できると考えられた。このため、遺伝子組換えコイを1種使用する申請があった際に、審査等の参考にできると考えられる。

### 4) 今後の課題

コイとフナ類の人工交雑試験は回数が少ないため、さらに検討する必要がある。また、雑種F<sub>2</sub>の倍数性や妊性等を調査し、世代を重ねて雑種が生存していくか確認する必要がある。コイとニゴロブナで交雑が1回認められたが、さらに複数年にわたって調査し、どの程度の頻度で起こるか確認する必要がある。また、他のフナとコイが自然交雑するか確認する必要がある。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～27年度
小課題番号	5(1)	研究期間	平成25～27年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	5(1)新規作出技術等に対応した検知手法の検討・開発		
小課題責任者名・研究機関	真野潤一・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所(現・食品研究部門) 食品分析研究領域		

## 1) 研究目的

新規育種技術によって作出された作物の中には、従来の組換え体と比較して遺伝子改変の程度が小さいか、もしくは、痕跡が残らないものがあるため、遺伝子組換え生物として法的規制の対象とすべきかどうかについて世界各国で検討が行われている。将来、我が国において、こうした作物の利用に規制が必要と判断された場合や、高付加価値品種の保護、品質保証などが求められる場合には、検知技術が必要になる。新規育種技術で作出された植物体が従来の組換え体検知技術によって検知が可能かについてはこれまでも議論は行われているが、検知の限界を実験的に評価した事例はない。そこで、本研究では、新規育種技術で作出された植物体に従来の検知技術を適用し、検知の可能性と限界を明らかにする。また、従来検知技術で分析が困難と判断された場合には、より正確で高精度な新規分析手法の開発を試みる。

近年の高速塩基配列解析技術の普及に伴い、試料中のDNAの塩基配列を網羅的に解析することが可能となっている。本研究では、作出技術の種類にとらわれない組換え体汎用分析手法について開発を検討し、塩基配列が未知の未承認組換え農産物検知や新規育種技術による非意図的遺伝子導入検出への応用についても検討する。

## 2) 研究成果

### i) 新規作出技術に対する従来検知技術の適用性評価

新規育種技術によって作出される植物体が、現在、組換え体検知技術として広く利用されているリアルタイムPCRで検知可能かどうかについて検討を行った。まず、一塩基変異を含むモデルDNA試料を調製し、リアルタイムPCRによる分析を行った。変異型配列だけでなく天然型配列からも非特異的な検出が生じたことから、検知には特異的・非特異的反応の増幅効率の差を利用することが必要となった。変異型および天然型配列特異的リアルタイムPCRのサイクル閾値の差をもとに検知を行う手法を確立し、この方法を用いて幅広い濃度の擬似混入DNA試料を分析した。その結果、一塩基変異DNAの検出限界濃度、定量限界濃度は国際規格に照らしてそれぞれ5%、10%と推定された。現在の組換え体検査の検出限界および定量限界濃度はそれぞれ混入率0.1%、0.5%程度であることから、現行と同水準の検査は実施困難であると考えられた。DNAメチル化検知の可能性を評価するため、プライマー標的部位末端にメチル化を含むモデルDNA試料を作成し、バイサルファイト処理を行った後、

リアルタイムPCRによる分析を試みた。その結果、一塩基変異の場合と同様の非特異的検出が確認されたことから、現行と同様の検査は実施困難であることが確認された。

次に、複数塩基変異の場合に検知可能であるかを検証するため、標的部に相補的でない配列を含むプライマーを用いて評価を実施した。その結果、3塩基以上連続した変異がプライマーの3'末端側に存在する場合には非特異的検出は生じず、従来法による検査が可能であることが示唆された。

シスジェネシス、イントラジェネシスに対するリアルタイムPCR法の適用性についても評価を行った。モデルDNA試料として、イネゲノム上の任意の配列とイネアクチン1遺伝子プロモーター配列とを連結したDNAを3種類調製し、それをイネのゲノムDNAにコピー数比で10、5、1、0.5、0.1%混合した。このモデルDNA試料を用いて、リアルタイムPCRによる分析を実施したところ、検出感度、定量性ともに従来の組換え農産物検査と同等であることが確認された(図1)。このことから、シスジェネシス、イントラジェネシスについては、従来検知手法で検査が実施可能と判断した。

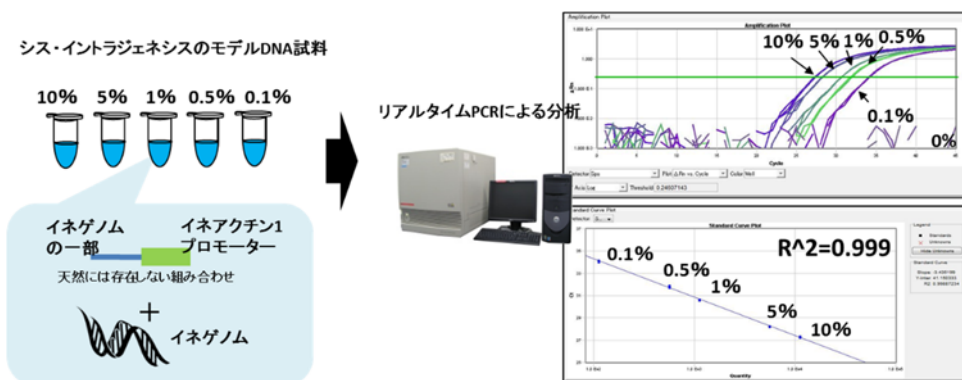


図1. リアルタイムPCRによるシス・イントラジェネシスモデル試料の分析結果の例

以上まとめると、新規育種技術による一塩基変異及びDNAメチル化については、現行と同様の検査は実施困難であるものの、複数塩基変異については3塩基以上連続した変異がプライマー3'末端側に存在する場合には、従来法による検査が可能であることが示唆された。さらに、シス・イントラジェネシスについては、従来検知手法で検査が実施可能と判断した。

## ii) 新規作出技術に対する新規検知技術の開発

上記“i) 新規作出技術に対する従来検知技術の適用性評価”における検討で、一塩基変異DNAについては、リアルタイムPCRで高感度、高精度な分析が困難であることが確認された。この問題の解決を図るため、デジタルPCR法による一塩基変異DNAの検知について検討を行った。デジタルPCR装置として、ライフテクノロジーズ社製QuantStudio 3D デジタルPCRシステムを検討に使用した。デジタルPCRによる一塩基変異の検出を行う場合にはプライマーによって識別する手法とプローブで識別する手法があるが、本課題においてはプライマーによる識別法を採用した。メーカー推奨の分析条件では、一塩基を明確に識別することができなかったことから、種々の条件検討を行い、一塩基変異の分析に適した条件を定めた。一塩基置換DNA (G塩基→T塩基) を10、5、1、0.5、0.1、0%で含むモデルDNA試料を調製し、測定を行ったところ、各濃度で理論値に近い測定結果が得られた(図2)。

このことから、デジタルPCRにより一塩基変異DNAについても高精度、高感度な分析が可能

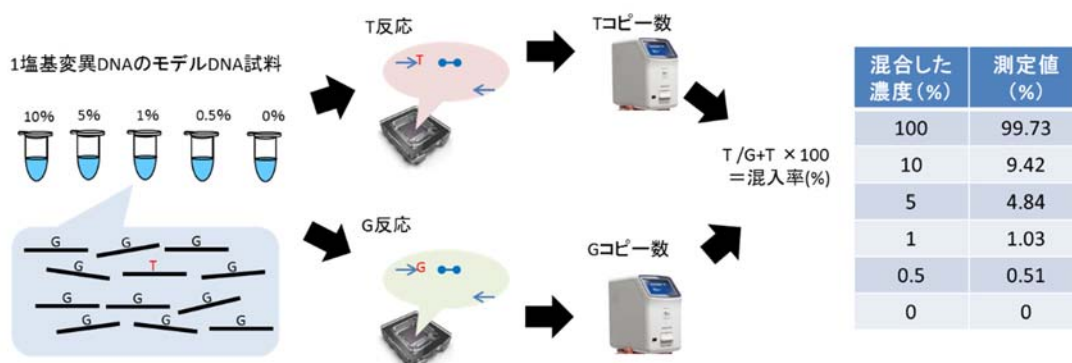


図2. デジタルPCRによる一塩基置換DNAの分析方法とその結果

であることが示唆された。

次いで、上記検討結果にもとづいて分析プロトコルを定め、その分析法の性能（検出限界濃度、定量精度）の評価を実施した。遺伝子組換え体の分析に係る国際規格ISO 24276において、検出限界濃度は偽陰性率が5%以下となる濃度（例：21回繰り返し測定を行い、20回以上検出可能な濃度）と定められている。この定義に従い、繰り返し分析を実施し、検出限界濃度が0.5%であることを確認した。続いて、定量精度を評価するために、一塩基変異が5%混入した試料を調製し、定量分析を行った。その結果、測定の平均値は5.01%で、相対標準偏差9.6%であった。現行の組換え体検査と比較を行うために、リアルタイムPCRでGMダイズが5%含まれる試料の定量分析を行ったところ、平均値が5.27%、相対標準偏差が8.0%となった（図3）。

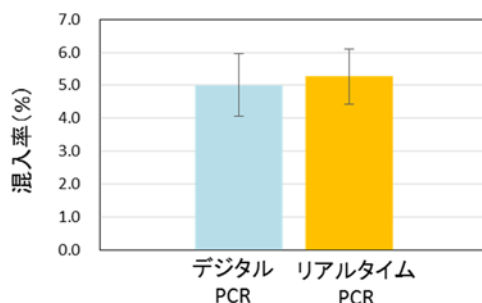


図3. デジタルPCRで一塩基変異（5%混入）を定量した結果とリアルタイムPCRでGM（5%混入）を定量した結果の比較（エラーバーは95%信頼区間を示す。）

以上の結果は、従来作物と1塩基しか変化していない新規作物であっても、デジタルPCRを用いることで、従来組換え体検査法と同様の検出・定量が可能であることを示すものである。

### iii) 作出技術に依存しない汎用分析技術の開発

作出技術によらない汎用分析手法を開発するため、次世代シーケンサーを用いた検討を行った（図4）。まず、本研究で利用する可能性が高いリシーケンス解析について調査を行った。具体的には、イルミナ社、ライフテクノロジーズ社、ロシュ社等の高速塩基配列

解析技術および国内における受託解析サービスの状況などについて情報収集を行った。そ

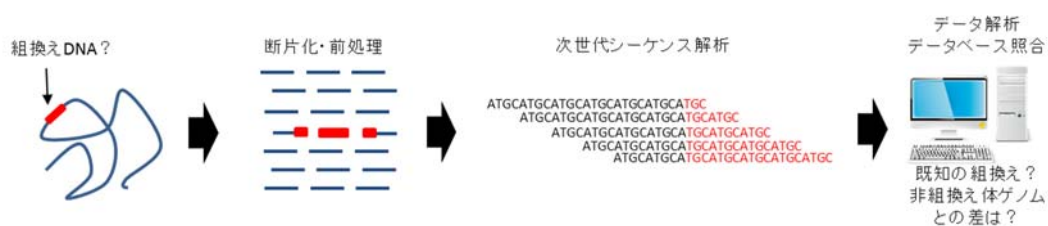


図4. 次世代シーケンス解析による汎用分析手法の検討

の結果、本課題目的にはイルミナ社およびライフテクノロジーズ社の技術が適していること、受託サービス市場においては費用対効果の面でイルミナ社技術が現時点では優位にあることを確認した。本課題における検討にはイルミナ社技術の採用が望ましいと判断した。

分析試料については、イネのゲノムDNAに、別の組換えDNAを模したPCR産物を人為的に微量混合したものを用いた。シーケンサーにはイルミナ社HiSeq2000を使用し、取得データについては、イネゲノムの既知DNA配列との照合や組換えベクターとの同一性検索を実施した。まず、イネの葉からのDNA抽出条件の検討、分析試料調製、次世代シーケンス解析、1次データ処理を実施した。その結果、イネゲノムの既知配列のうち、99.9% (1×Depth) が解読されていることを確認した。新規育種技術で作出された作物に対して非意図的な遺伝子導入の有無を検証する場合には、取得した塩基配列データがゲノム全体を網羅していることが信頼性の高い判定に必要となるが、イネゲノムの既知部分については今回実施した次世代シーケンス解析で網羅的に評価可能であることが示された(図5)。

次いで、上記データを用いて、組換え体を検知・同定するデータ処理方法について検討した。

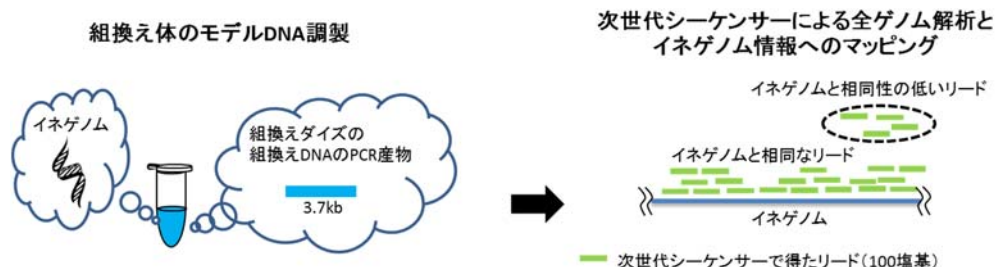


図5. モデルDNA試料の調整とデータの処理

次世代シーケンサーで得られる100塩基単位の配列データ(リード)のうち、イネゲノムと相同性の低いリードの中に組換えDNAの情報が含まれていると予想された。そこで、イネのリファレンス配列に全リードをマッピングし、マッピングされなかったリードを収集した。得られたリードのデノボアセンブル(つなぎ合わせ作業)を行い、つなぎ合わされた配列群と、イネゲノムに添加した組換えDNA配列の同一性検索を行った。その結果、添加した組換えDNA配列を検出することができた。食品研究部門内では、これまでに組換え体の塩基配列データベースを構築している。このデータベースと、アセンブルされた塩基配列の情報とを比較することで、組換えサイズの系統まで同定することができた。仮に未知の組換え体の場合でも、配列がデータベース上の配列と部分的に一致

すれば、組換えであることが判定可能であると予想された(図6)。

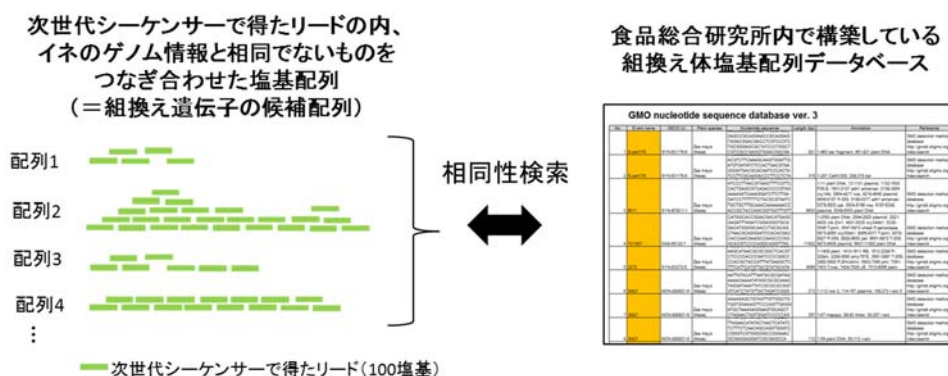


図6. 組換え体を同定するためのインフォマティクス解析手法の概要

### 3) 成果活用における留意点

新規作出技術に対する従来検知法の適用性を評価することで、現在、国際的に議論が進められている新規作出技術の規制に関連した情報を行政に提供することができる。また、新規作出技術に対する高度検知技術の開発によって、新規作出技術によって作出された高付加価値品種の保護等が可能となる。今後、高速塩基配列解析技術を活用した手法を確立することで、従来の組換え体、新規作出技術を問わず、標的を特定しない一斉分析が可能になるものと期待される。また、新規作出技術による非意図的遺伝子導入等の評価に利用することができる。

### 4) 今後の課題

次世代シーケンス解析による検出限界濃度の評価や、より安価で高感度に検出するための手法について検討が必要と考えられる。また、作物種によってはリファレンスとなるゲノム情報が存在しない場合もあるため、そうした情報を必要としないデータ処理方法について検討が必要である。次世代シーケンス解析は、次々と新たな手法や機器が開発されていることから、新たな技術を導入し、より安価で信頼性の高い評価手法を構築する必要がある。また、検査現場に経験者が少ないことが予想されるため、検査法を正確に実施できるよう、検査法のマニュアル化、システム化を図る必要があると考えられる。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	5(2)	研究期間	平成25～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	4. 新規の遺伝子組換え技術に対応した検知・調査手法の開発		
小課題責任者名・研究機関	高畠令王奈・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品分析研究領域		

### 1) 研究目的

遺伝子組換え(GM)作物の種類は年々増え続けており、その全てを系統毎に逐一検知することは実質的に困難になってきている。現在広く実施されているPCR検査は非常に有用ではあるものの、高価な機器を必要とし、検査結果が得られるまでに数時間かかってしまうということも指摘されている。従来のGM検査では、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(P35S)のような、多くのGM作物に共通に導入されている配列を標的とした効率的なスクリーニング検査が導入されているが、P35Sを有していないGM作物も急激に増えてきている。現状では、このようなP35Sを持たないGM作物に関しては、新たに系統特異的な検査法を開発し、現行法に追加することで対応せざるを得ないが、追加された検査法にかかる時間やコストはそのまま蓄積していくことから、近い将来検査法のあり方について大幅な見直しを図らざるを得ない状況である。このような背景から、GM検査の簡易迅速化あるいは効率化が強く求められている。本課題では、Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法を基盤技術として、検査所用時間の大幅な短縮を可能とする、簡易迅速なDNA検知技術の開発を行い、次いでその実用性の検証を行う。さらに、核酸クロマト法等の技術を導入して、簡易迅速に加えて低コスト化を試みる。また、現在、世界で最も広く利用されている作物の遺伝子組換え技術はアグロバクテリウム法であると考えられるが、アグロバクテリウムのT-DNAに由来するRight Borderの近傍配列は、目的の組換え遺伝子と一緒に宿主作物のゲノムに導入されることから、GM検知の際には極めて有効な共通配列となる。しかしながら、Right Border近傍のGM作物の共通配列は非常に短いため、それ単独での検出に成功した例は未だに報告されていない。そこで、従来のPCR法では検出が困難であったRight Border近傍配列のうち、保存性の高い25 bpを検出可能な技術を開発する。これにより、アグロバクテリウム法で作出した全てのGM作物が検出可能となり、スクリーニング検知における新たな選択肢の提供が図られ、検査に掛かる負担の軽減化に大幅に資すると考えられる。

### 2) 研究成果

LAMP法による簡易・迅速検知法の開発では、トウモロコシのSSIIb、ダイズのLel1等、作物内在性配列に加えて、2種類の除草剤耐性遺伝子*3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EPSPS)*および*phosphinothricin-N-acetyltransferase*

(PAT)、多くのGM作物に導入されているカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (P35S)、さらに、複数のGMダイズ及びトウモロコシに共通に導入されているマンノースリン酸イソメラーゼ *pmi* 遺伝子、*Pisum sativum* (エンドウ) のリブロース1, 5二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットに由来する3' 末端非翻訳領域 (tE9)、*Bacillus thuringiensis* 由来の害虫抵抗性遺伝子改変 *Cry1Ac* 遺伝子、さらに除草剤耐性トウモロコシ GA21 系統を特異的に検出するプライマーセットを設計した。これにより、現在流通している、あるいは今後流通する可能性の高い安全性審査済みGMダイズ及びトウモロコシの大部分を網羅することが可能となった。これらの標的配列は、等温増幅蛍光測定装置 Genie II を利用することによって、0.5%以下の微量混入であっても30分以内に検出可能であることが確認された (図1 および表)。

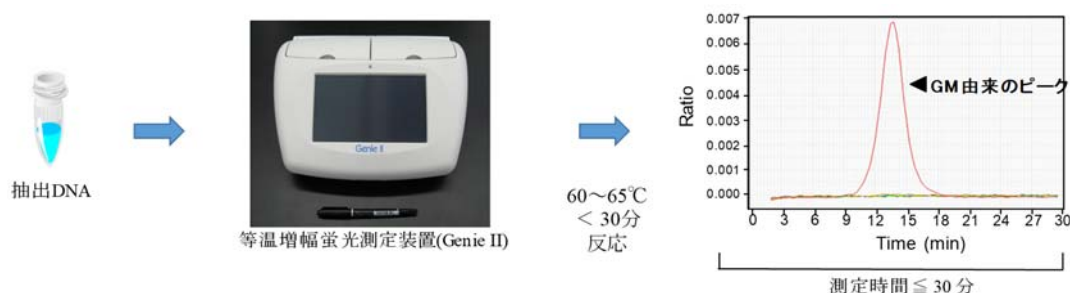


図1 Genie IIによるLAMP増幅産物検出法。

表 Genie IIによるLAMP増幅産物検出法の検出限界 (LOD) の検証

Target	GM event	LOD	Detection Time (分)	Annealing Temperature (°C)
P35S	Bt11	0.1%	18.56±3.30	86.22±0.035
	Event176	0.5%	19.17±3.19	86.21±0.099
	MON810	0.3%	18.09±1.57	86.20±0.048
	T25	0.3%	16.43±2.25	86.15±0.059
	NK603	0.3%	18.24±3.28	86.14±0.057
	MON863	0.3%	20.21±2.58	86.11±0.082
	TC1507	0.5%	16.51±2.20	86.27±0.080
	DAS59122	0.3%	17.14±2.30	86.14±0.054
	MON88017	0.3%	21.50±2.33	86.09±0.085
	MON89034	0.5%	17.22±4.09	86.30±0.077
	MON87460	0.5%	20.13±2.52	86.25±0.064
	RRS	0.05%	18.23±4.32	85.96±0.064
	A2704-12	0.05%	17.13±3.41	85.97±0.063
EPSPS	NK603	0.3%	21.28±2.43	93.63±0.158
	MON88017	0.3%	21.40±2.54	93.63±0.095
	RRS	0.1%	21.12±2.03	93.55±0.075
PAT	Bt11	0.3%	12.31±2.56	87.17±0.047
	T25	0.3%	13.21±2.56	87.16±0.050
	TC1507	0.3%	14.15±3.17	87.16±0.046
DAS59122	DAS59122	0.3%	11.09±2.04	87.15±0.070
	A2704-12	0.05%	12.59±2.28	87.07±0.097
<i>pmi</i>	MIR604	0.3%	16.32±3.13	87.03±0.046
	MIR162	0.3%	16.43±3.12	87.02±0.084
	3272	0.5%	13.36±2.02	87.12±0.040
tE9	MON89788	0.1%	20.29±2.17	80.73±0.053
	MON87705	0.5%	18.42±1.50	80.73±0.039
	MON87769	0.5%	18.42±1.15	80.79±0.043
Cry1Ab/ Cry1Ac	Bt11	0.3%	15.34±3.49	87.00±0.048
	MON87701	0.1%	11.44±1.24	86.89±0.029
GA21	GA21	0.1%	14.50±3.37	90.73±0.030

また、実際の検査を想定した場合に必要なLAMP法によるGM検知用陽性コントロールプラスミドを開発した。上述の通り、わが国で安全性が確認されたGMダイズおよびトウモロコシを網羅的に検出するために、7種類の標的組換え配列 (P35S、tE9、*pmi*、*Cry1Ac*、EPSPS、PAT、GA21) および内在性配列 *Le1* および *SSIIb* の合計9種類のLAMP標的配列をタンデムに繋いだ配列を汎用プラスミド pUC19 に導入した。さらに、塩化セシウム超遠心法による精製を行った後、コピー数を調製し、安定化のためにキャリアーDNAを添加したものを標準プラスミドとした。

さらに、LAMP法に関しては、熱処理と遠心分離のみで分析に供するまでの前処理が15分以



内に完了するGenCheck（株）ファスマック）を使用した簡易迅速検出系と核酸クロマト法を組み合わせることにより、簡易迅速かつ低コストな検出法を開発した。核酸クロマト法は、標的DNAの増幅の際に、プライマーに特異的なタグ配列を付加し、さらに、別のプライマーにビオチン分子を付加したものを用い、増幅産物がクロマト試験紙上にプリントされたタグ配列と親和性の高い配列（キャプチャー配列）によって捕捉され、検出される技術である。本技術のLAMP増幅産物検出への適用可能性について検討したところ、検出下限（LOD）付近の濃度であっても検出可能であることが示された（図2）。核酸クロマト法は高額な機器等を必要としないことから、より低コストな遺伝子検査法の開発が可能となる。タグ配列には複数の種類があり、シグナルが出てくる位置が異なることから、標的の核酸とタグ配列を組み合わせることにより、多検体の同時検出が可能である。

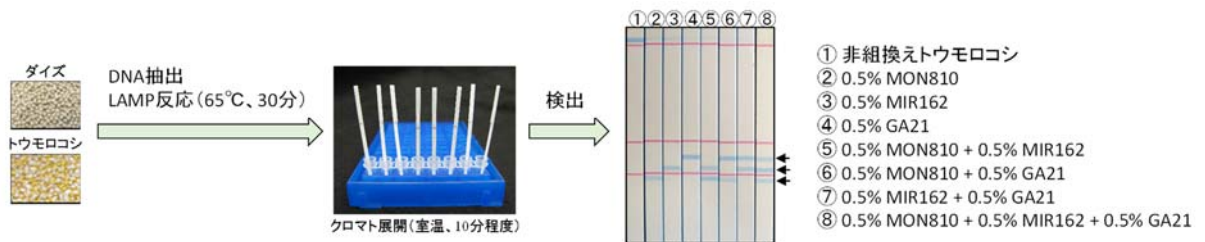


図2 核酸クロマトによるLAMP増幅産物検出法の概要。青色のバンドが増幅の有無を表す。

LAMP法は非常に高感度であることから、一般的な実験室での使用を想定した場合にはキャリアオーバーコンタミネーション等の発生が危惧された。そこで、キャリアオーバーコンタミネーションを防止する機能を備えたLAMP用マスターミックスの開発を試みた。具体的には、LAMP反応の際に、dTTP（チミン）の代わりにdUTP（ウラシル）を含む基質を用い、さらに、LAMP反応に先立ち、Uracil-*N*-Glycosylase（UNG）処理を行うことによって、混入した増幅産物が分解され、ウラシルを含まない検体由来のDNAのみが鋳型となるというUNGの系を利用した。このようなUNG処理は、既にリアルタイムPCR等で利用されているが、LAMP反応において主に用いられている鎖置換型DNAポリメラーゼは耐熱性が低いこと、ウラシルを基質として取り込む活性が低いこと等から、LAMP法では実用化に至っていない。UNGの系を取り入れるために、高温に強く、ウラシルを基質として取り込む活性を有する鎖置換型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素に関する情報収集を行い、株式会社ニッポンジーンにおいて、LAMP用マスターミックスを試作した。本マスターミックスの適用性を検討したところ、93°Cで加熱しても失活せず、チミンの代わりにウラシルを用いてもLAMPの増幅が認められた。さらに、キャリアオーバーコンタミネーションの原因と考えられるエアロゾル（粒径数 $\mu\text{m}$ ）の10倍程度の体積（5 pL）のLAMP増幅産物を添加した擬似コンタミネーション実験を実施したところ、UNG処理によって増幅が抑制されることを確認した（図3）。

一方、短鎖DNAの検出技術については、Right Borderの近傍に、アグロバクテリウム法によって作出されたGM作物の多くに共通する配列を見出した。保存領域は僅か25 bpしかないことから、極めて短いプライマーを利用した改良PCR法によって検出可能とする技術を開発した。本改良PCR法は、Right Border近傍配列に特異的であり、0.5%まで検出可能であることを確認した（図4左）。

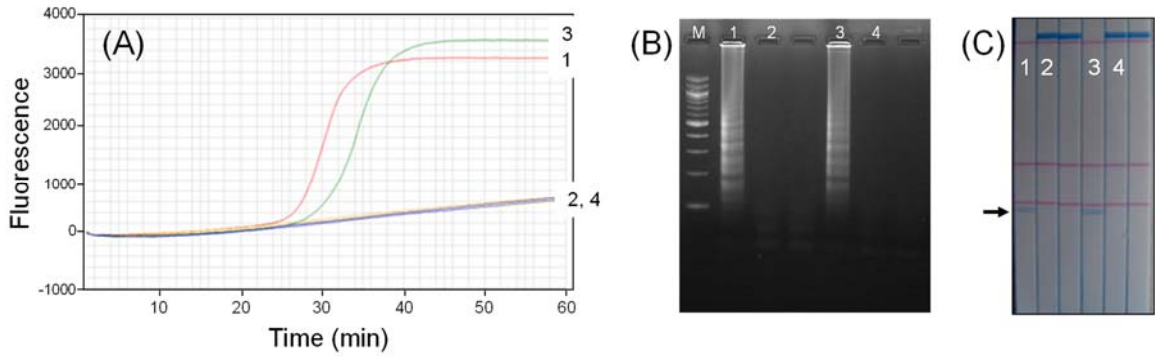


図3 新規に開発したLAMP用マスターミックスによる擬似コンタミネーション実験結果  
Genie IIによる蛍光検出(A)、電気泳動(B)、核酸クロマト(C)の結果を示す。1と2はGMトウモロコシ由来のLAMP増幅産物、3と4はGMダイズ由来の増幅産物を反応溶液に添加した。また、1と3は50 pL、2と4は5 pLの増幅産物を添加した。

さらに、より簡易な検出法として核酸クロマトが利用可能であることが示されたことから、核酸クロマトによる検出法での特異性の確認や検出下限等の性能評価を実施したところ、核酸クロマトを用いた検出法においても特異的であり、かつ0.5%まで検出可能であることを確認した(図4右)。

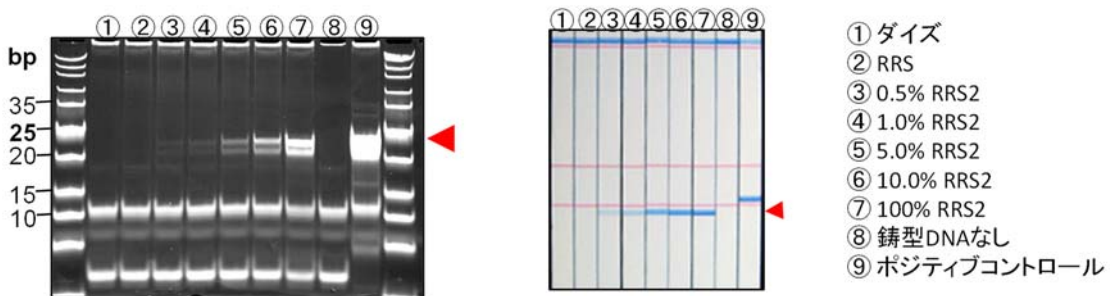


図4 Right Border近傍配列の検出結果。左側がアクリルアミド電気泳動、右側が核酸クロマト法の結果を示す。赤矢印が増幅シグナルを表す。

### 3) 成果活用における留意点

本研究課題の目標は概ね達成することができた。しかしながら、一方で、キャリアオーバーコンタミネーション防止機能を備えたLAMP用マスターミックスの開発等に関しては、時間的な制約もあり、特に、P35S以外の標的においては十分な検討ができたとは言えない状況である。

### 4) 今後の課題

当初の研究目標は概ね達成することができた。核酸クロマトを用いたLAMP増幅産物の検出法に関しては、論文発表後、関連機関に公定検査法としての採用を提案する予定である。さらに、短鎖DNA検出法に関しては、本プロジェクトで開発された改良PCR法は、僅か25 bpの配列を特異的に検出可能な世界的にも極めて稀な技術であることから、特許出願後、論文発表を行う予定である。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	5(3)	研究期間	平成25年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	5(3)スタック系統における遺伝子間相互作用の検知・評価手法の開発(平成25年度に終了)		
小課題責任者名・研究機関	浅野眞一郎・国立大学法人北海道大学大学院農学研究院		

### 1) 研究目的

従来、微生物資材*Bacillus thuringiensis* (Bt) 製剤によってチョウ目やコウチュウ目等の害虫防除が進められてきた(丸山<sup>1)</sup>)。近年、海外ではその活性成分タンパク質(Btトキシン)を産生する*cry*遺伝子を遺伝子組換え技術によって導入したトウモロコシやワタ等の作物が商業栽培されている(白井<sup>2)</sup>)。一方、Bt製剤同様に、チョウ目害虫に効果がある*cry*遺伝子を導入した作物に耐性をもつ害虫の出現が報告され、その克服のためにBtトキシンを産生する様々な*cry*、*vip*、*cyt*等の遺伝子が見いだされるとともに、それらを導入したGM作物のスタック系統が開発・実用化されている(表1)。

国内カルタヘナ法における生物多様性影響評価において、スタック系統については、我が国における生物多様性に影響する相互作用がないことを確認することで第一種使用規定を承認している。本課題では、各種Bt遺伝子のクローニングや抗体を作成することにより、*cry*および関連遺伝子のスタック系統における殺虫活性の相互作用に関する検知や評価の手法の開発(松本<sup>4)</sup>、武部ら<sup>5)</sup>)に資する。

表1. 実用化されたGM作物のスタック系統(平成25年度時点)

<i>cry</i> 遺伝子	対象害虫目	対象害虫名
<i>cry1Ac</i>	チョウ目	ボールワーム ステムボアワーム ルートカットワーム
<i>cry1A.105</i>		
<i>cry2Ab</i>		
<i>cry1Ac, cry2Ab</i>		
<i>cry1A.105, cry2Ab</i>		
<i>cry3Aa</i>	コウチュウ目	コロラドハムシ ルートワーム
<i>cry34Ab, cry35Ab</i>		
<i>cry3Aa, cry35Ab, cry35Ab</i>		
<i>cry1A.105, cry2Ab, cry34Ab, cry35Ab</i>	チョウ目 コウチュウ目	ボールワーム ステムボアワーム ルートカットワーム コロラドハムシ ルートワーム

### 2) 研究成果

#### (ア) チョウ目対象Bt遺伝子クローニングとキメラ遺伝子の作成

GM作物に導入されているチョウ目害虫に効果がある *cry1Ac*, *cry1F*, *cry2Ab* 遺伝子を検出するためのプライマー設計ならびにそれらの遺伝子のクローニングを完了した。スタック系統で導入されている *cryI* 遺伝子の一つである *cry1A.105* 遺伝子 (*cry1Ac* と *cry1F* 遺伝子のキメラ遺伝子) を作成した (表2)。

#### (イ) コウチュウ目対象Bt遺伝子クローニングのためのプライマー設計

GM作物に導入されているコウチュウ目害虫に効果がある *cry3A* 遺伝子についてクローニングおよび発現系の構築を完了した。*cry34Ab*, *cry35Ab* 遺伝子はプライマーを設計し、所蔵のBtライブラリーの中からスクリーニングにより検索を行ったが検出できなかったため、人工合成による合成およびクローニングを行った (表2)。

#### (ウ) 各 *cry* 遺伝子発現ベクターの準備と抗体作成

上記でクローニングした各 *cry* 遺伝子発現のためのベクターを準備するとともに、その発現産物 (Bt トキシン) に対する特異的抗体作成のための発現システムを構築した (表2)。

表2. 遺伝子検出のためのプライマー設計やクローニングが完了した *cry* 遺伝子

<i>cry</i> 遺伝子	対象害虫目	対象害虫名
<i>cry1Ac</i>	チョウ目	ボールワーム
<i>cry1A.105</i>		ステムボラー
<i>cry2Ab</i>		ルートカットワーム
<i>cry3Aa</i>	コウチュウ目	コロラドハムシ
<i>cry34Ab</i>		ルートワーム
<i>cry35Ab</i>		

### 3) 成果活用における留意点

クローニングした各 *cry* 遺伝子を用いた生物検定結果は、GM作物のスタック系統そのものを利用した生物検定と比べて、相互作用も含めて供試昆虫の反応 (感受性) の程度が異なる可能性があるため、比較検証が必要である。

### 4) 今後の課題

Bt トキシンをコードする *cry* 遺伝子は表で示したように各種存在するものの、その作用機構については未解明の部分も多いため、できるだけ多くの *cry* 遺伝子 (分子種) を集めることが求められる。また、今回クローニングした遺伝子から作出した抗体を利用した検知技術を構築するとともに、具体的評価手法を開発する必要がある。さらに、構築した検知技術に対して、こぼれ落ち種子など実際の材料を使った検出感度等を含む実用性の検討が求められる。

#### 【引用文献】

キ 引用文献

1. 丸山威 (2004) BT 製剤利用研究の現状と展望. 植物防疫. 58(11): 468-473.
2. 白井洋一 (2009) 海外での害虫・病害抵抗性遺伝子組換え作物の商業栽培の情勢. 植物防疫. 63(3): 152-157.
3. Sarah L Bates et al. (2005) Insect resistance management in GM crops: past,

present and future. *Nature Biotechnology*. 23. 57-62.

4. 松本信弘 (2002) BT 製剤の殺虫活性に影響を及ぼす要因の解明と生物検定法に関する研究. 筑波大学大学院農学研究科博士論文. 甲第 3004 号
5. 武部聡ら (2001) 殺虫タンパク質遺伝子 (cry) を持つ土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* の degenerate PCR を用いたスクリーニング. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 7. 34-39.

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	6(1)	研究期間	平成25～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	6(1) 海外における新規育種技術等の規制・政策動向に関する情報の収集・解析		
小課題責任者名・研究機関	立川雅司・名古屋大学環境学研究科		

### 1) 研究目的

近年、新しい育種技術(New Plant Breeding Technique; 以下NBTとする)が注目されている。NBTは植物の品種改良だけでなく動物においても利用されており、育種過程において遺伝子組換え技術を用いるものの、多くの場合、最終産物に外来遺伝子を含まない技術であり、従来の遺伝子組換え生物より社会的な受容も容易であると推定される。そのため、NBTの利用が急速に進められ、すでにNBTを用いた品種も育成され、わが国に輸入される状況にある。本課題では、わが国におけるNBTの開発と規制を適切に行うため、国内や海外諸国におけるNBTに関する研究・開発や、海外諸国におけるNBTの検知法や規制のあり方に関する情報を収集し、わが国として参考とすべき情報を抽出して行政を含む関係者に提供する。

以下では、(ア) 研究開発・検知法などの情報収集に関する成果、(イ) 規制・政策情報に関する成果、(ウ) 社会経済的影響評価の情報収集に関する成果のサブテーマに分け、順次述べる。

### 2) 研究成果

#### (ア) 新しい育種技術の研究開発・検知法に関する情報収集・解析

動植物におけるゲノム編集技術を中心とした育種研究と体細胞への遺伝子導入技術について、また新育種技術を用いた生産物の検知法について、いずれも文献検索および国際会議出席等を通じて情報収集した。主な知見は以下の通りである。

- 1) 植物においてもゲノム編集技術の研究報告が多く見られた。これまでの研究開発状況を作物別に概観すると、トウモロコシ、イネ、トマト、ジャガイモ、オオムギ、タバコ、レタス、ポプラ、キャベツなど多様な作物への適用が進んでおり、また1論文のなかに複数作物が記載される例もある。適用手法として、特にCRISPR/Cas9を用いた報告は、2015年以降急速に増大していることが明らかになった。
- 2) 農林水産省受託研究において、イネの循環選抜育種法の開発として、優性の雄性不稔性を付与した遺伝子組換えイネが開発されている。また早期開花遺伝子を導入した組換えカンキツが育成され、育種プログラムへの利用が進められている。
- 3) 動物でのゲノム編集技術について、原著論文(哺乳類、魚類、昆虫など)を収集して内容を整理した。これまでと同様に、マウスやラット等で遺伝子機能解析や病態モデルの研究に用いられる例が多いほか、いわゆる非モデル生物での新たな解析手法としてゲノム編集の有効性を実証する研究が進められている。ゲノム編集によるノック

アウトのうち実用化に向けた研究としては以下のような例がある。

- ・ デング熱を媒介するネッタイシマカで、性決定遺伝子のノックアウトによりオスを誘発する（オスは吸血せず、デング熱を媒介しない）。
- ・ ブタの免疫に関わる遺伝子のノックアウトにより、ヒトへの臓器移植に用いる。
- ・ ヤギの乳に生産した医薬品等を安全に使用するために、 $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子のノックアウトによりアレルギーを防止する。
- ・ イヌやヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタで*myostatin*遺伝子のノックアウトにより筋肉量を増やす。

4) *myostatin*遺伝子の自然突然変異により筋肉量が増加したウシ品種（ベルジャンブルー種、ピエモンテ種、草原短角牛など）が、すでに食用として利用されていることから、同じ遺伝子のノックアウトにより作出したウシとの間で、識別の可能性や規制の考え方について、検討が必要になる可能性がある。

5) マダイとトラフグについて、国内でゲノム編集による育種研究が進められており、報道や学会発表要旨等でも広く伝えられている。

6) 動物の体細胞に遺伝子を導入する技術については、遺伝子機能を解析するための基礎研究や、ヒトの遺伝子治療のモデルとして、マウスやラット等の実験動物に用いられているものがほとんどである。

7) 部位特異的ヌクレアーゼによるゲノム編集とオフターゲットに関する文献検索を行い、論文の収集を行った。またヌルセグリガントに関しても、その検証方法に関して文献収集と解析を行った。

8) NPBTにて作出された最終産物における変異の確認、或いは外来遺伝子の残存の有無の確認等には、次世代シーケンサー（NGS）等の活用が想定されるため、GMO解析に対するNGSを用いたアプローチ例の文献収集を行った。以下のような例がある：

- ・ GMサイズのmolecular characterizationのため、当該系統の宿主サイズ及びtransformation plasmidをコントロールとして使用してNGS解析
- ・ 導入遺伝子配列の検知、宿主ゲノムへの導入確認、および組換え系統の特定を行うに要するNGSリード数の予測のための統計的枠組みの構築
- ・ 昨年欧州で発生した未承認遺伝子組換え微生物（GMM）の飼料への混入事例における、NGS解析による配列情報の獲得とqPCRによる検知法開発のための配列情報の活用、等

9) 検知技術に関しては、欧州共同研究センターにおいて開催された第22回 ENGL総会に出席し、欧州におけるNBT作出作物の検知法に係る取り組みに関する情報収集を行った。

10) 海外政策及び研究開発動向の情報に関しては、平成28年度以降ニュースレター（隔月）を作成し、行政部局及びプロジェクト関係者に送付・共有を図った。また各年度の成果に関しては、年度末毎に報告書としてとりまとめた。

(イ) 新たな育種技術をめぐる規制・政策に関する情報収集・解析

以下では、ゲノム編集など新たな育種技術（NBT）をめぐる主要国の規制動向について述べる。

#### ① 欧州

2008年に、欧州委員会環境総局のもとで新技術検討ワーキンググループ（NTWG）が組織され、各国からの専門家を交えて、技術的特性やGMO規制との関連などが検討された。

またこれと並行して、欧州食品安全機関（EFSA）に対して、各技術のリスク評価が依頼された。また欧州共同研究センター・将来技術研究所（JRC-IPTS）においても、研究開発や特許取得動向の調査や、海外諸国を交えた検討ワークショップなどが実施された。2012年にはNTWGの最終レポート（非公表）がとりまとめられ、これに対して加盟国や業界団体などから、各種のコメントやポジション・ペーパーが公表された。

欧州委員会からは、EUのGM規制の基本法である環境放出指令に照らして、NBT由来製品が規制対象となるかどうか、法的解釈が示されるとされているものの、その公表は遅れている。欧州委員会からの法的解釈がなかなか明示されない背景には、環境NGOによる反対意見とこれに呼応する欧州議会議員の存在があり、すでにEU内で政治的争点になりつつあることが原因と考えられる。このような状況に対して、一部の加盟国では、国内判断として非GMOであると認めている例もある。また2016年10月には、フランス国務院が、欧州司法裁判所にNBT由来製品の法的解釈を正式に求めた。欧州司法裁判所から見解が示されれば、EU域内でのNBT由来製品の法的な位置づけが明確になると考えられる。なお、2018年1月に欧州司法裁判所の法務官意見（法的拘束力なし）が提示され、「組換え核酸分子を用いていない」限り、指令の規制対象にはならないという意見を述べており、今後示される予定である裁判所判断が注目される。

## ② 米国

2015年7月に大統領府科学技術政策局（OSTP）は、「バイオテクノロジー製品の規制システムの近代化」という声明を出し、バイテク規制の見直しを行う意向を明らかにし、省庁間にまたがるバイテクワーキンググループ（BWG）が組織された。大統領令を受けた公聴会の実施、全米科学アカデミーへの検討依頼もなされた。

その後、OSTPからは、「調和的枠組みのアップデート」および「バイテク規制近代化のための国家戦略」がとりまとめられ公表された。これらの文書は、既存のバイテク政策を洗い直し、今後の検討課題を明らかにしたものであるが、ゲノム編集などの技術を具体的にどのように規制するかという点については具体的に踏み込まず、各省庁の検討に委ねられた形になっている。

2016年2月に農務省（USDA）は、規制改訂に向けた環境影響ステートメント（EIS）作成のための手続きを開始することを表明し、2017年1月にはその改訂案を発表し、パブリック・コメントを求めた。規制改訂案のポイントには、遺伝子組換え生物の定義の限定や有害雑草規制の導入など、興味深い論点も提示されていたものの、2017年11月になって、提案自体を取り下げ、関係者との協議を再度行うことを表明した。

FDAに関しても、2017年1月に、「食用植物におけるゲノム編集利用に関する意見募集」、「動物におけるDNAの意図的改変に関する産業向けガイダンス案」、「蚊に関連した製品に関する産業ガイダンス案」の提案を公表した（これらは2018年1月時点では最終版となっていない）。

## ③ ニュージーランド

GMOの環境安全性に関してニュージーランド（NZ）では、環境保護庁（EPA）が所管し、「有害物質・新生物法」（HSNO Act）のもとで規制を行っている。NZでは、ZFN-1およびTALENを用いて作出した樹木（マツ）の規制上の位置づけをめぐる、政府と環境NGOとの間で裁判が行われ、その判決が2014年5月に出された。政府は上記の製品が規制対象外であるとの決定を行ったものの、環境NGOがこの決定に異議を申し立て、裁判となったのである。高等裁判所による判決は、原告NGOの勝訴であった。判決の主なポイントは、次



のようなものである。すなわち、HSNO法においてGMO規制から除外されている技術（化学物質による突然変異誘導技術など）は、当該法の制定時点において、すでに十分な知見と経験が蓄積されているものであると考えられ、またHSNO法の制定目的と予防原則に照らして、このような技術を規制から除外することは妥当だと裁判官は判断した。裏返して言えば、争点となったZFN-1とTALENに関しては、新規の技術であり、まだ十分な知見と経験の蓄積がなされたとはいえず、GMO規制から除外する技術とすることは妥当ではない。要するに、十分なエビデンスが蓄積されていない新技術を規制から除外することは、法律の制定目的に照らして正当化できない、と判事は裁定したのである。NZ政府はこの判決を受け入れ、2016年4月にHSNO規制の改訂について閣議決定した。これにより、1998年7月29日（HSNO規則の発効日）以降の開発技術（ゲノム編集技術を含む）によって作出された生物は、規制対象とされることが明確になった。この規制改訂により、NZは世界ではじめて、ゲノム編集技術に対して明確にGMO規制を適用する国となった。国際的な整合化は一層困難なものとなったといえる。

#### ④ アルゼンチン

上記のNZと対照的な対応をとっているのがアルゼンチンである。同国農牧水産省は、2015年5月にNBT由来作物に関して「事前相談手続き」を定めた（決定173/15）。事前相談においては、外来遺伝子が導入（残存）しているかどうかという観点から、規制対象かどうか判断される。事前相談手続きは農牧水産省が受け付け、同省よりバイオセーフティ委員会（CONABIA）に検討が依頼される。このように外来遺伝子の有無に着目して規制上の判断を行うというアルゼンチンの方式は、隣国チリなどでも採用されつつある。今後どのような形で各国政府が対応を進めていくか、注視する必要がある。

#### (ウ) 社会経済学的影響評価をめぐる情報収集・解析

GM作物がもたらす社会経済的影響に関しては、すでに様々な研究成果が存在するが、これらの先行研究を整理する枠組みとして、EUにおける研究（GRACEプロジェクト）において提示された視点が有益である。同プロジェクトでは、GM作物をめぐる社会経済的影響に関して、次の7つの研究視点から分類している。すなわち、①GM採用による農業経営上の影響、②共存方策による影響、③サプライチェーンに与える影響、④消費者に対する影響、⑤セクターおよびマクロレベルへの影響、⑥国際貿易に対する影響、⑦政治的影響である。

GM作物の栽培認可において、社会経済的要因を考慮している国も世界的にはいくつか存在する。たとえば、ブラジル、アルゼンチン、豪州、ニュージーランド（NZ）などである。豪州においては州政府が輸出市場の動向等を評価して栽培に関して最終決定する制度になっている。NZにおいては、HSNO法において、費用便益が勘案され、便益が費用を上回った時のみ認可されるとの規定がある。またEUにおいても、加盟国が社会経済的影響等を考慮して、独自に栽培禁止できるよう制度改訂がなされた。指令改訂以降、すでに個別のGM栽培認可において、多くの加盟国が栽培禁止権限を行使しつつある。

### 3) 成果活用における留意点

本研究成果は、継続的な海外情報の収集・分析を通じて得られたものであり、その内容に関しては、暫定性・流動性を伴うものである点に留意する必要がある。従って、これらの知見に関しては、常に最新の状況を踏まえて理解することが重要である。特に研究動向に関しては、新たな手法開発、他の関連分野との相互影響なども含めて、急速に展開しつつある。こうした動向を逐次把握していくことが緊要である。

#### 4) 今後の課題

今後も、これまでの規制の枠内だけでは収まり切れない技術が登場し、作物改良や食料生産に応用されていくと考えられる。これらをどのように管理すべきかが改めて問われている。場合によっては、GM以外の関連規制も組み合わせて、重層的に規制の枠組みを構築するなどの対応も必要であろう。こうした状況においては、様々な科学的知見（エビデンス）の蓄積をまずは進めることが重要となろう。その上で、安全性評価、安全性管理（認可やモニタリング等）、表示・情報提供、技術開発、知的財産権、国際的整合化など多角的な視点を考慮しつつ、NBTをめぐるガバナンスのあり方を模索していくことが課題となろう。こうしたガバナンス構築のためには、政府・国際機関だけでなく、開発者やユーザーも含めた多様なステークホルダーが参画しつつ検討していく必要がある。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	6(2)	研究期間	平成28～29年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	6(2) 新規育種技術が生物多様性に及ぼす影響に関する情報の収集・解析(平成28年度から開始)		
小課題責任者名・研究機関	與語靖洋・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター生物多様性研究領域		

### 1) 研究目的

本研究課題においては、従来の遺伝子組換え(GM)技術、新規育種技術(\*)、合成生物学等を用いて作出した動植物が生物多様性に及ぼす影響に関して、国内外の情報を収集・整理する。また、有識者へのアンケートやヒヤリングを実施し、それらを科学的知見に基づいて解析することで、新規育種技術(NBT)と国内カルタヘナ法等における規制との関連性を明らかにし、我が国における輸出入を含む実用化段階において、これらの技術が我が国の生物多様性に与えるリスクの解明を目指す。

\*新規育種技術(通称:NBT, New Breeding Techniques):人工制限酵素を利用したゲノム編集、オリゴヌクレオチド誘発突然変異導入技術、シスジェネシス/イントラジェネシス、RNA依存性DNAメチル化技術、遺伝子組換え台木を利用した接ぎ木、逆育種、アグロインフィルトレーションを活用した形質転換技術のことを示し、合成生物学やRNAiは別途扱う。DNAマーカーを利用したゲノム育種は含まない。なお、NBTの取り扱いについては、各国で違いがあった。

### 2) 研究成果

#### (1) データベース(DB)の構築

GM生物のリスク評価・管理に関連した農林水産省委託プロジェクトの四半世紀の情報(A)を収録した。収録に際しては、Excelで一覧表を作成し、個別の情報とリンクを張った。また、NBTとGM生物(主に作物)の生物多様性影響に関する情報(B)を収録した。DB検索システム「GMO文書検索システム」を構築し、上記(A)と(B)の情報を導入した(図1)。

#### 【GMO文書検索システムの仕様】

- 複数のキーワード検索:スペースで区切ることで複数のキーワードを検索できる。
- 複数のDBの構築:情報の種類別(例えば上記(A)、(B))、著作権や機密性に対応してDBの中に複数の検索用フォルダを作成できる。
- 情報の追加や更新:情報の初期入力後に、追加や更新でデータを入力できる。
- キーワードの場所の提示:検索結果の該当箇所をハイライトして表示する。
- オンライン説明書を用意した。

GMO 文庫検索システム					
検索キーワード:	ツルマメ 雑穀	検索	8295 か所が 全一致 53 件および部分一致 530 件の文庫で見つかりました。		
遺伝子組換えBtダイズの生物多様性影響評価手法の開発	農業環境技術研究所 安田耕司	平成24年度	中間報告	103	867
菊池彰夫、近畿中国の国産農産物センター・菊池淳志、高田吉丈、九州沖縄農業研究センター・水谷信夫・松村正哉、大木信彦研究期間:平成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズの					
+ 続きを読む ... 12件目より後の一覧					
中間報告/H24/H24_中間報告_word版/H24_中間報告_103.doc					
農業研究センター・藤原克隆、菊池彰夫、近畿中国の国産農産物センター・菊池淳志、高田吉丈、九州沖縄農業研究センター・水谷信夫・松村正哉、大木信彦研究期間:平成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズのツルマメに					
+ 続きを読む ... 12件目より後の一覧					
ツルマメを摂食するチョウ目等昆虫のBt感受性に関する特性解明	農業生物資源研究所 宮本和久	平成25年度	中間報告	101-1	965
伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発(平成25年度中間検討会議課題番号:101-1 課題名:新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発【101】 ツルマメの生物・生態的制御の把握およびリスク評価手法の開発【101-1】ツルマメを摂食するチョウ目等昆虫のBt感受性に関する特性解明担当課題名:ツルマメを摂食するチョウ目等昆虫のBt感受性に関する特性解明担当者名(					
+ 続きを読む ... 12件目より後の一覧					



上記を展開すると、検索したキーワードの前後の文章を表示する。

GMO 文庫検索システム					
検索キーワード:	ツルマメ 雑穀	検索	8295 か所が 全一致 53 件および部分一致 530 件の文庫で見つかりました。		
遺伝子組換えBtダイズの生物多様性影響評価手法の開発	農業環境技術研究所 安田耕司	平成24年度	中間報告	103	867
菊池彰夫、近畿中国の国産農産物センター・菊池淳志、高田吉丈、九州沖縄農業研究センター・水谷信夫・松村正哉、大木信彦研究期間:平成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズの					
+ 続きを読む ... 12件目より後の一覧					
農業研究センター・菊池淳志、高田吉丈、九州沖縄農業研究センター・水谷信夫・松村正哉、大木信彦研究期間:平成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズのツルマメに対する生物多様性					
+ 続きを読む ... 519					
究センター・水谷信夫・松村正哉、大木信彦研究期間:平成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズのツルマメに対する生物多様性影響の評価に資する知見を集積する。					
+ 続きを読む ... 548					
成23~24年 1. 研究目的害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ(Btダイズ)と野生ツルマメの交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズのツルマメに対する生物多様性影響の評価に資する知見を集積する。					
+ 続きを読む ... 577					
の交雑による雑種ツルマメが生物多様性に及ぼす影響を評価するため、国内のツルマメを寄主とする昆虫種を特定し、それらの摂食行動がツルマメの繁殖適応度及ぼす影響およびCryIIAcタンパク質に対する各昆虫の感受性など、Btダイズのツルマメに対する生物多様性影響の評価に資する知見を集積する。					
+ 続きを読む ... 629					
【研究計画】(1)ツルマメの繁殖適応度に関する知見を集積する。2.24年度達成目標および研究計画【達成目標】ツルマメの繁殖に影響を与える可能性のある昆虫種の選定に取り組む。【研究計画】(1)ツルマメの繁殖適応度に関する知見を集積する。2.24年度達成目標および研究計画【達成目標】ツルマメの繁殖に影響を与える可能性のある昆虫種の選定に取り組む。【研究計画】(1)ツルマメを摂食する昆虫種の解明と発生量の推定・23年度と同様に、ツルマメを摂食するチョウ目幼虫を採集・飼育し、同定する。・単位時間あたりに確認できたチョウ目幼虫の個体数を調査し、発生量を推定する。・主要な種について終齢幼虫期の摂食量(実生数、葉数、葉内種子数など)を調査する。(2)ツルマメの生育状況の解明・23年度と同様に、ツルマメの結実数に強い選択圧がかかる局所的な摂食を受けた個体群を広く探索し、認められた場合は食害昆虫を採集する。・23年度に選定したツルマメ個体群における発芽および結実期の個体					
+ 続きを読む ... 901					
する。・単位時間あたりに確認できたチョウ目幼虫の個体数を調査し、発生量を推定する。・主要な種について終齢幼虫期の摂食量(実生数、葉数、葉内種子数など)を調査する。(2)ツルマメの生育状況の解明・23年度と同様に、ツルマメの結実数に強い選択圧がかかる局所的な摂食を受けた個体群を広く探索し、認められた場合は食害昆虫を採集する。・23年度に選定したツルマメ個体群における発芽および結実期の個体					
+ 続きを読む ... 926					
種子数など)を調査する。(2)ツルマメの生育状況の解明・23年度と同様に、ツルマメの結実数に強い選択圧がかかる局所的な摂食を受けた個体群を広く探索し、認められた場合は食害昆虫を採集する。・23年度に選定したツルマメ個体群における発芽および結実期の個体密度、実数、虫害実数を調査し、生活史および個体群内の変動を把握する。・ツルマメの結実数およびハスモンヨトウによる加害試験により、切実量あるいは加害量とツルマメ個体あたりの種					
+ 続きを読む ... 1001					
食を受けた個体群を広く探索し、認められた場合は食害昆虫を採集する。・23年度に選定したツルマメ個体群における発芽および結実期の個体密度、実数、虫害実数を調査し、生活史および個体群内の変動を把握する。・ツルマメの結実数およびハスモンヨトウによる加害試験により、切実量あるいは加害量とツルマメ個体あたりの種					
+ 続きを読む ... 1067					

(2) 有識者へのヒヤリング

国内外の有識者(生態学、遺伝学、遺伝子工学、育種学、毒性学等)へのヒヤリングによる情報収集を行った。概括すると、以下のとおりであり、事前に無作為で実施したアンケート結果を大凡反映していた。

全般に、有識者間で認識の違いが大きかったものの、専門分野との関連性は必ずしも高くなかった。また、自然科学について、規制や社会的容認(PA)を切り離して考えない有識者が多かった。さらに、リスク分析、特にリスクコミュニケーションの必要性に関する発言もあった。個別では、Process-basedとProduct-basedに認識の違いがみられるとともに、Phenotype-basedやecology-basedの発想もあった。また、従来育種への戻し交配によって、生物多様性影響のリスクは減少するとの認識は全般に共通していた。

(3) 生物多様性に及ぼす影響の観点からの各種技術の解析

DBに収録した参考資料を30件程度に絞り込み、アンケートやヒヤリング結果も踏まえ、生態学と遺伝学の観点を中心に報告書に取りまとめた。その骨子は日本学会会議公開シンポジウム(平成29年12月2日)で話題提供した。構成は以下の通りである。

- ① 目的および背景
- ② GMOおよびNBT等の生物多様性影響に関する情報の取りまとめ
- ③ 今後の課題
- ④ 参考資料: 引用文献等、アンケート結果

3) 成果活用における留意点

DB検索システムに導入した情報には、プロジェクト報告書、Website、学術論文等、様々な種類があるため、それらの導入および利用に際しては、著作権、機密性、利便性を配慮する必要がある。

#### 4) 今後の課題

わが国における遺伝子組換え技術またはNBTを利用して作出した生物の生物多様性または境影響評価の研究は、野外における実証研究が困難であり、生態学的手法が求められるため、科学的裏付けに耐えうる成果を出すためには長期間を要することから、外来生物で研究が進んでいるプロセスベース（個体群動態モデル等）とニッチベース（MaxEnt）の異なる推定モデルを組み合わせる等の取り組みが求められる。また、有識者であっても、自然科学から規制や社会的容認（PA）を切り離して考えにくいことから、近年提案された新しいレギュラトリーサイエンスの手法（Best Available Regulatory Science）を導入すること、逆にインパクトをもたらす兆候をいち早く把握し、法的規制や社会的容認へのアプローチであるHorizon Scanning手法を導入する必要がある。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～26年度
小課題番号	7(1)	研究期間	平成25～26年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	7(1) 鱗被形成遺伝子による閉花性イネの安定的利用技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	吉田均・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 稲研究領域		

### 1) 研究目的

担当者が発見した閉花受粉性イネ突然変異体 *spw1-clsl1* は、転写因子 SPW1 の変異によって、開花を引き起こす原動力をもたらす「鱗被」という花器官の形成が阻害され閉花受粉性となるため、遺伝子組換えイネと一般品種との交雑防止への利用が期待される<sup>1,2,3)</sup>。*spw1-clsl1* は他の農業形質には影響しない有望変異であるものの、出穂前の低温によって開花するため、関東・北陸以西での利用が想定されている。

一方、類似した鱗被の形態変化を示す *spw1-clsl2* 変異体では、SPW1 に別の変異が生じており、低温条件下でも開花しない。しかし、*spw1-clsl2* 変異が農業形質に及ぼす影響の詳細は明らかとなっておらず、育種的利用の可否については慎重に検討する必要がある。

そこで本課題では、開花率と気温の関係を詳細に評価し、*spw1-clsl1* を安定的に利用するための環境条件を明らかにする。また、交配によって *spw1-clsl2* 変異の分子機構を明らかにしつつ、寒地・寒冷地・暖地向け品種に導入し、その有効性を明らかにする。また、TILLING などの分子遺伝学的手法により、さらに安定的な鱗被形成遺伝子の変異を探索する。

(引用文献)

- 1) Yoshida, H. *et al.*, (2007). *Plant Biotechnol. J.* 5: 835-846.
- 2) Ohmori, S. *et al.*, (2012). *Breeding Science* 62(2): 124-132.
- 3) 吉田均ら (2014) *育種学研究* 16(2): 61-66

### 2) 研究成果

#### (1) *spw1-clsl1* 系統の開花予測モデルの構築

(研究方法)

*spw1-clsl1* 系統を開花させる環境条件を明らかにするため、国内の複数箇所で栽培し、開花率と気象観測値を収集した。開花率と気象観測値のデータを利用し、*spw1-clsl1* 系統の開花予測モデルを構築した。さらに、栽培試験実施地点の緯度・経度情報の三次メッシュコードへの変換およびその部分の気象情報を抽出・整理し、これを使用して、開花予測モデルを改良し、早生・中生・晩生の各条件で開花予測地図を作成した。予測モデルと予測地図の作成については、農業環境技術研究所生態系計測研究領域の大東健太郎、岩崎亘典両氏のご協力により進めた。

(結果)

2012年度までに気温の実測データを使用して作成した開花予測地図では、実際の開花程度とのズレが大きかった。このことの要因として、①「栽培地において収集した気温データ」(T&D社「おんどとり」で取得したもの、試験場の観測機器で測定したもの、近隣のアメダス観測地点のもの、が混在)と「地図作成に用いた気象データ」(アメダスデータ)とのズレ、②栽培地点の「位置」のズレ、③各栽培地における圃場の水温、等の影響が考えられた。実際に2013年に、福島、長野(2か所)、上越で、「おんどとり」とアメダス相当データを比較し、気温の数値がずれることを確認した。

そこで、開花予測モデルの構築に農環研が公開している三次メッシュ気象値ファイルを使用することとし、栽培試験を行った地点の緯度・経度情報の三次メッシュコードへの変換およびその部分の気象情報の抽出・整理を行った。このデータを使用して、出穂前30日間の①平均気温が20℃以下の日数、②最低気温の平均値、③最高気温が30℃以上の日数、の3つのパラメータを計算し、開花予測モデルの改良を試みたところ、「*spw1-clsl1*」では92.7%、「*夢あおばclsl1*」では87.8%の正答率となった。

メッシュデータを用いることにより、栽培地と気象観測点が離れている場合におけるパラメータのばらつきは改善された。しかし、実際には「*夢あおばclsl1*」が開花した地点で「開花しない」と予測する場合が見られたため、パラメータの再検討を行った。予備的に、2009-2012年の「*夢あおばclsl1*」の実測データを用いて検討した結果、「最低気温の平均」に替えて「気温日較差の平均」(いずれも出穂前30日間)を用いることが適当と考えられた。これを用いて、上記の「*夢あおばclsl1*」の実測データに基づいたモデルを作成したところ、正答率は92.6%であった。

(考察)

*spw1-clsl1*変異体は実用的な開花受粉性イネ品種を育成するための遺伝資源として期待されるが、SPW 1と0sMADS2/4とのタンパク質二量体形成能の低下による弱い変異が原因であるため、研究当初より温度感受性を示す可能性が考えられた。実際、北海道や東北などでは予想どおり一定の割合で開花することが明らかとなり、*spw1-clsl1*を安定的に利用するためには、開花を引き起こす詳細な条件を明らかにする必要がある。そこで本研究では、栽培試験から得られた開花率と気温に関するデータを利用し、どのような温度条件で*spw1-clsl1*系統の開花予測モデルを作成し、これを用いて日本国内の開花予測地図の作成を試みた。

*spw1-clsl1*の開花を予測するためのパラメータとして、さまざまな気象データの中から、出穂前30日間における、①平均気温が20℃以下の日数、②最低気温の平均値、③最高気温が30℃以上の日数、の3つが選定された。これまでの人工気象器を用いた実験から、出穂前の低温(温度と処理期間)、30℃以上の高温処理などが、*spw1-clsl1*の鱗被形態と開花率に影響することがわかっていたが、上記のパラメータはこうした結果とよく一致するものであった。初期の予測地図における精度の低さを改善するため、モデル作成に三次メッシュデータを使用することにより、一定の正答率が得られたが、「開花しない」との予測にもかかわらず、実際の栽培時には開花した箇所が複数存在した。この結果は、実際に遺伝子組換えイネ栽培時のめやすとしてこのモデルを使用した場合、混乱を生じる可能性を示唆していた。さらにパラメータを再検討し、上記「②最低気温

の平均値」に替えて、「気温日較差の平均」を用いることが有効と考えられた。

## (2) *spw1-cls2*変異の有効性の解明と利用

### (研究方法)

*spw1-cls2*の後代および戻し交配系統 (M6 および BC1F2 世代) を栽培し、閉花性・稔実率・耐冷性を調査した。また、寒地、寒冷地、暖地向けの各品種に対する戻し交配を行い、*spw1-cls2*の準同質遺伝子系統 (NIL) の育成を進めた。NIL 作成に当たっては、農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター水田作研究領域の福嶋陽氏にご協力頂いた。

### (結果)

寒地向けの「きたあおば」、寒冷地向けの「ひとめぼれ」「朝紫」、暖地向けの「コシヒカリ」「日本晴」に対する戻し交配を行い、*SPW1*の遺伝子型を確認しつつ *spw1-cls2*のNIL 育成を進めた。最も世代の進んだ「ひとめぼれ *cls2*」では、研究期間内に BC2F1 種子までを得た。

一方、原品種への戻し交配系統 (BC1F3) および *spw1-cls2*の選抜系統 (M6 世代) などを用いて、稔実率、耐冷性等の農業形質を調査した。これらの材料では、稔実率は原品種「きたあおば」よりも約 30%低く (図 1)、耐冷性検定における稔実率も低かった (図 2)。今回用いた *spw1-cls2*系統においては葯胞内での花粉の発育が不良であり、葯の発育が原品種より劣ると考えられた。また、玄米収量はほぼ不稔率に比例して低下し、千粒重や粒形が異なる傾向があったが、その他の農業形質はほぼ原品種と変わらないことが明らかとなった。

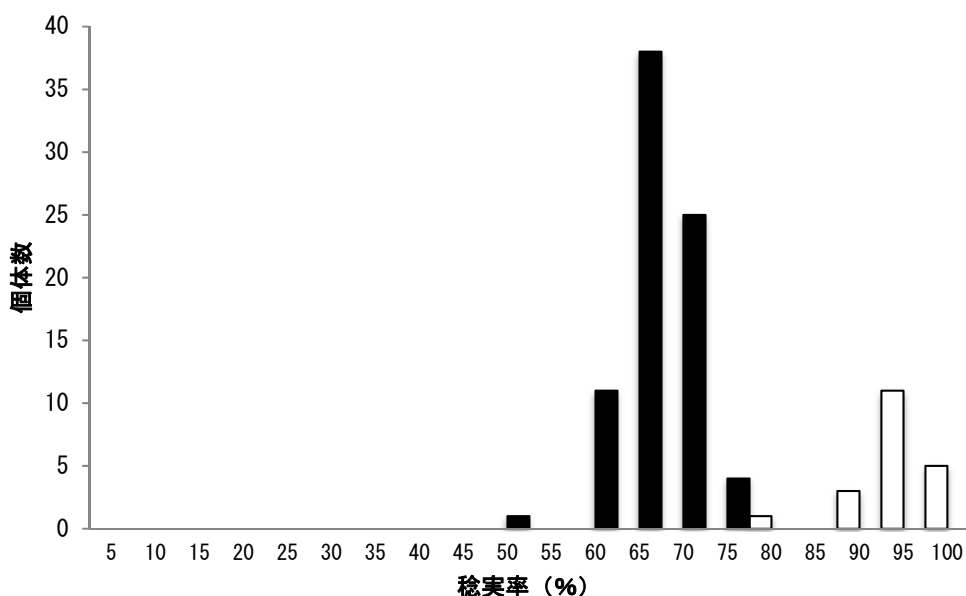


図 1 *spw1-cls2*系統の稔実率の分布

黒：*spw1-cls2*系統 (M6, BC1F3, F4)

白：原品種 (きたあおば)

供試した *spw1-cls2*では、原品種よりも稔実率が低い。



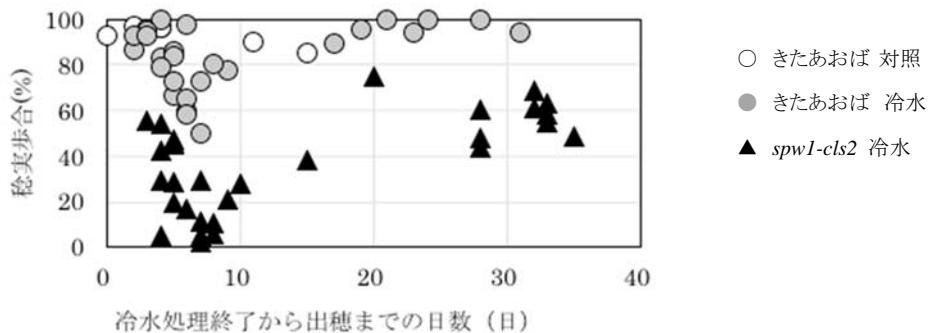


図2 冷水処理終了から出穂日までの日数と稔実歩合  
 12°C3日間水深28cmの冷水処理を行った。出穂の5日～10日前（冷害危険期）に冷水処理を終えた穂の平均稔実歩合は、「きたあおば」72.8%、「*spw1-cls2*」22.1%であった。*spw1-cls2*の低温障害を免れた穂の平均稔実歩合は50.2%であった。

(考察)

*spw1-cls2*は東北以北でも開花しない変異体として期待されたが、稔実率が低かったため、戻し交配等によって稔実率の向上を試みた。しかし、本研究の範囲では稔実率は最大でも70%台にとどまり、汎用的な育種用遺伝資源としては不十分と考えられる。きわめて高付加価値をもつ遺伝子組換えイネなどでは、*spw1-cls2*の利用場面があるかもしれないが、より稔実率が高く、かつ低温地域でも安定した閉花性を示す汎用的な変異体が望まれる。

*spw1-cls2*の低稔実性の原因として、以下の2つの可能性が考えられる。

- ① *cls2*変異自体による効果
- ② *cls2*変異に強連鎖する別遺伝子座の変異による効果

(3) *spw1-cls2*変異の分子機構の解明

(研究方法)

転写因子であるSPW1タンパク質はOsMADS2とのヘテロ二量体としてDNAに結合し、下流の花器官形成遺伝子の発現を制御すると考えられる。そこで、酵母ツーハイブリッド法により、*spw1-cls2*変異がSPW1とOsMADS2との結合を阻害するかどうかを解析した。

また、EMSA法を用い、*spw1-cls2*変異がSPW1/OsMADS2ヘテロ二量体と標的DNA配列(CArGボックスと呼ばれるシス配列)との結合を阻害するかどうかを解析した。

(結果)

酵母ツーハイブリッド法による解析の結果、*spw1-cls1*ではSPW1-OsMADS2の転写因子複合体形成能が低下するのに対し、*spw1-cls2*では複合体形成能は低下しなかった(図3)。

一方、EMSA法による解析の結果、*spw1-cls2*型のSPW1とOsMADS2とのヘテロ二量体では、*spw1-cls1*型よりもさらに標的DNAとの結合能が低下していた(図4)。

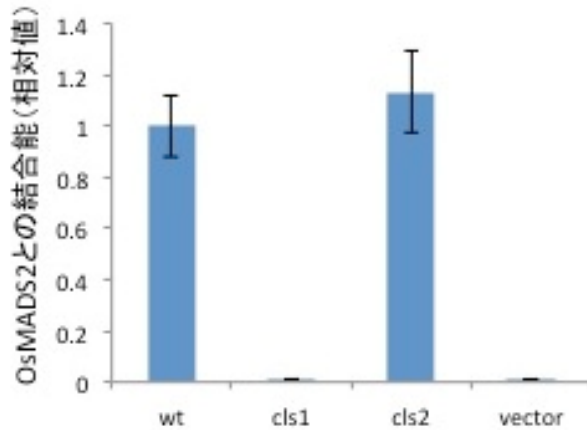


図3 *cls2*変異は SPW1 と OsMADS2 のヘテロ二量体形成を阻害しない  
SPW1+OsMADS2 複合体の形成能を、酵母ツーハイブリッド法で解析した。  
*cls1*では原品種 (WT) よりも形成能が低下するが、*cls2*では低下しない。

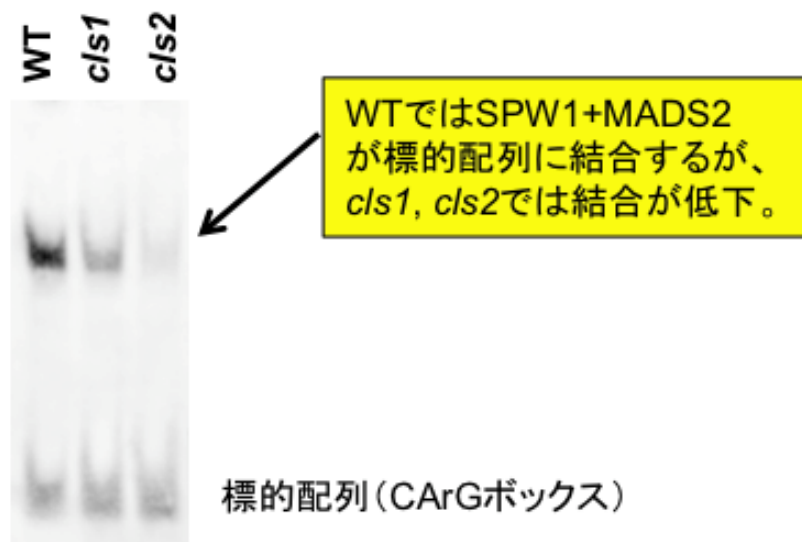


図4 *spw1-cls2*変異による DNA 結合能の低下  
SPW1+OsMADS2 複合体と標的 DNA 配列の結合能を、EMSA 法で解析した。  
*cls1*では原品種 (WT) よりも標的 DNA 配列への結合能が低下し、*cls2*ではさらに結合能が低下する。  
このことによって *cls1* と *cls2* の閉花性の安定性の違いが説明される。

(考察)

本研究により、*spw1-cls2*の分子機構は *spw1-cls1*とは異なり、タンパク質-DNA 間相互作用の低下によることが明らかとなった。EMSA による解析結果は、*spw1-cls1*よりも *spw1-cls2*の方がシビアなアレルであることを示している。*spw1-1*などの SPW1 遺伝子の機能欠損型アレルが完全不稔であることから、上記①の可能性が強く示唆される。

#### (4) TILLING による新規閉花性変異体の探索と利用

(研究方法)

TILLING 法により、九大および生物研保有の変異体集団 (合計約 4,700 系統) から *SPW1* および *OsMADS2* の新規アミノ酸置換変異をスクリーニングした。さらに、得られた変異体を栽培し、閉花性を調査した。

(結果)

TILLING 法により、九大のイネ変異体集団 (約 1,600 系統) から *SPW1* の新規アミノ酸置換を同定した (E134K 変異)。他の変異はサイレントまたはイントロン変異であった。E134K 変異では、*cls1* と同様に、*SPW1*-*OsMADS2* ヘテロ二量体の接着面に位置する第 134 位のグルタミン酸 (E) がリジン (K) に置換しており、ヘテロ二量体形成能を低下させることが期待されたが、分離世代種子を栽培したところ、別座の弱勢変異 (根の伸長阻害) の影響により、変異型またはヘテロ型の個体はすべて枯死した。残存するすべての種子を追加入手したが、すべての個体が枯死したため、同変異を利用することはできなかった。

次に、TILLING 法によって生物研の変異体集団 (約 3,100 系統) から、*SPW1* と *OsMADS2* の新規アミノ酸置換変異を同定した (図 5)。植物体を育成し、種子を増殖した。



図 5 TILLING で同定した *SPW1* と *OsMADS2* の新規変異の部位

*SPW1* については 4 個、*OsMADS2* については 5 個のアミノ酸置換変異を同定した。

(ボックスはエクソン、ラインはイントロンを示す)

これら変異のうち、6 箇所はパートナータンパクあるいは標的 DNA 配列との結合能に関与する部位であるため、閉花受粉性を付与する可能性が期待される。

(考察)

TILLING による新規アレルの解析も重要であるが、NBT によるゲノム編集技術の急速な進歩に伴い、分子機構の知見とタンパク質工学的視点を統合することにより、高稔実性と安定した閉花性を兼ね備えた新規 *SPW1* 遺伝子の創出が可能となるかもしれない。

### 3) 成果活用における留意点

*spw1-cl1s2*の低稔実性については、強連鎖する別変異によるものである可能性も棄却できない。

#### 4) 今後の課題

開花予測地図の作成については、さらに検討を重ね、*spw1-cl1s1*の利用ガイドラインとして信頼できるレベルのものとする必要がある。具体的には、メッシュデータについて「気温日較差」を計算し、モデルを作成することにより、さらなる改良を進めることが有効である。また、気温をもとにした開花予測モデルでは説明のつかない開花現象も存在する可能性があるため、さらなる解析も重要である。

*spw1-cl1s2*の低稔実性については、強連鎖する別変異によるものである可能性も棄却できないため、戻し交配系統の解析も含め、東北以北でも利用可能な閉花受粉性イネの作出を継続する必要がある。

GM作物に対する消費者・生産者の忌避感が強い現在の日本においては、遺伝子拡散を懸念する声も強く、時として1種栽培試験の実施さえも困難となる。本研究で得られる準同質遺伝子系統をGMイネの母本・戻し交配親として用い、ガイドラインに沿って栽培を行うことにより、日本全国において遺伝子拡散を安定的に抑制することが可能となる。このことにより、試験栽培・商業栽培のための大きな障壁を取り除くことができる。

なお、自然交雑抑制についてはGM品種以外にも、有色素米や糯品種等での需要があり、日本全国における非組み換えイネ品種の育成にも用いられる可能性がある。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～26年度
小課題番号	7(2)	研究期間	平成25～26年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	7(2) 新規変異による閉花性イネの育種技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	大森伸之介・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター 作物開発研究領域		

## 1) 研究目的

遺伝子組換え技術の進歩に伴い、これらをイネに適用してより望ましい形質を持つ新しい品種を作り出す研究が進められている。この遺伝子組換え品種(GM品種)には多くのメリットがあるが、一方でGM品種に導入された遺伝子が意図せず非GM品種に拡散することを懸念する声も存在する。従ってGM品種を実用化して商業栽培する際には、既存品種との十分な区分管理を行い、導入遺伝子の拡散を防ぐ手法が必要となる。

イネは自殖性の高い植物ではあるが、開花時には花粉を外部に飛散させるため、風媒による自然交雑を起こすことがある。これを抑制するには、出穂後に花を閉じたまま受粉を行う閉花受粉性の利用が有効であり、これまでに担当者らはこの性質を示すイネ突然変異体 *superwoman1-cleistogamy1 (spw1-clsl)* についてその原因遺伝子を特定し、特性解析を行ってきた<sup>1)2)</sup>。その結果、*spw1-clsl*による閉花受粉性は実用的で優れたものであったが、穎花形成時に低温に遭遇すると閉花受粉性が失われて開花するようになる温度感受性があることが示され、日本国内の寒地および寒冷地での使用は難しいことも判明した<sup>3)</sup>。

これを受けて、担当者らはこれまでに温度感受性を示さない2つの閉花受粉性イネ突然変異体を新たに選抜しており、本プロジェクトでは両変異体の原因遺伝子の詳細なマッピングを進めて遺伝子の取得を目指す。これにより、温度感受性の無いイネの閉花受粉性の遺伝資源を育種現場に供給し、国内の寒地および寒冷地におけるGMイネ品種の区分管理技術の確立に資することを目的とする。

(引用文献)

- 1) Yoshida *et al.* (2007) *Plant Biotechnology Journal* 5: 835-846
- 2) Ohmori *et al.* (2012) *Breeding Science* 62: 124-132.
- 3) Ohmori *et al.* 投稿中。

## 2) 研究成果

### (1) 閉花受粉性突然変異体H193mtの原因遺伝子探索

閉花受粉性突然変異体H193mtは「北陸193号」の放射線突然変異処理集団から選抜された。この変異体は人工気象室での *spw1-clsl* が開花する低温環境下栽培および北海道での試験栽培でも開花がほとんど観察されず、*spw1-clsl*とは異なる仕組みの温度感受性がない閉花

受粉性を持つものと判断された。

これまでに担当者らは、H193mtと「日本晴」を交配した分離集団を作成して原因遺伝子のラフマッピングを行い、原因遺伝子がある候補領域が第1染色体短腕上にあることが明らかにしてきた。本プロジェクトでは、引き続き原因遺伝子のファインマッピングと次世代シーケンサーによる原因遺伝子の候補領域の解析を行った。

#### a. 原因遺伝子のファインマッピング

(研究方法)

H193mt／日本晴のF4分離集団（2013年、480個体）およびF5分離集団（2014年、384個体）を水田に展開した。これらの集団は、いずれもそれまでに得られた遺伝子の候補領域がヘテロ型だった個体から作成した。展開した各個体について葉をサンプリングして簡易法によりDNA抽出を行うとともに、出穂後は開花／閉花のスコアリングを行った。また、候補領域内においてH193mtと「日本晴」の遺伝子型を区別できるSSRマーカーを2013年は26個、2014年は10個使用し、遺伝子のファインマッピングを行った。

(結果)

これまでのH193mt／日本晴の分離集団の解析で、原因遺伝子の候補領域は第1染色体上のSSRマーカーRM6324からRM8146の間の約2.5Mbpとなっていたが、2013年のマッピングの結果、候補領域はRM10271とRM8146の間の約250kbpと狭められた。さらに、2014年のマッピングでは候補領域はSSRマーカーOs01ssr0042200とRM10281の約230kbpとなった（図1）。日本晴ゲノムのデータベース上では、この領域には24個の遺伝子が予測されている（表1）。

#### b. 次世代シーケンサーによるゲノム解析

(研究方法)

2014年に、H193mtとその元品種である「北陸193号」の複数個体からゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーによる塩基配列解析を行った（（株）タカラバイオに委託）。得られた塩基配列のデータをH193mt、「北陸193号」および「日本晴」（公開されているデータベース）の間で比較し、塩基の挿入、欠失、置換等の変化を検索した。また、配列データを可視化するビューソフトウェアIntegrative Genomics Viewer (IGV) を使用し、得られた各変異の位置関係やDNAマーカーとしての利用可能性についての確認、検討を行った。

(結果)

ファインマッピングによって得られた約230kbpの領域内にはH193mtと北陸193号の間で93個の変異箇所候補（SNP：89個、Insertion：2個、Deletion：2個）が検出された。しかし、これらの変異はいずれも候補領域内に予測された遺伝子のコーディング領域から外れており、また各遺伝子に対しての影響も大きくないと予想されたため、この結果を持って原因遺伝子を直接特定することは出来なかった。IGVによる変異の確認では、検出された変異を利用した閉花受粉性に連鎖するDNAマーカーの作成のための情報が得られた。

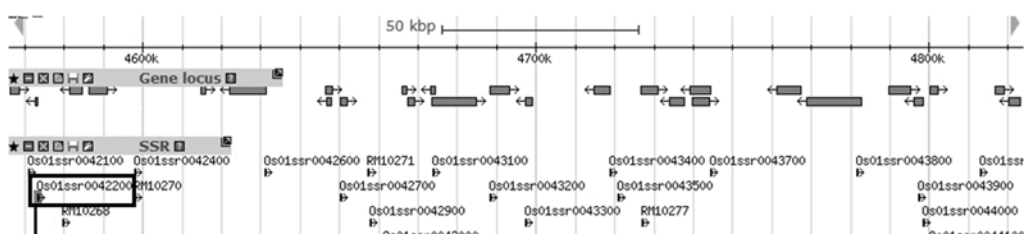


表 1 候補領域内に予測された遺伝子一覧

Name	Description	Position
<b>Os01:ssr0042200</b>		chr01:4573217..4573234 (+ strand)
Os01:g0186000	Similar to WRKY transcription factor 10. (Os01:t0186000-01)	chr01:4572565..4573271 (- strand)
Os01:g0186200	Similar to Phototropin. (Os01:t0186200-01);Hypothetical conserved gene.	chr01:4581254..4584592 (- strand)
Os01:g0186400	Hypothetical conserved gene. (Os01:t0186400-01)	chr01:4586170..4591083 (+ strand)
Os01:g0186600	Conserved hypothetical protein. (Os01:t0186600-01)	chr01:4614891..4615825 (+ strand)
Os01:g0186700	Similar to Protein kinase GhCLK1 (Fragment). (Os01:t0186700-01)	chr01:4621925..4631262 (- strand)
Os01:g0186900	Similar to cDNA clone:001-117-G12, full insert sequence. (Os01:t0186900-01);Similar to transposon protein CACTA, En/Spm sub-class. (Os01:t0186900-02);Similar to cDNA clone:001-117-G12, full insert sequence. (Os01:t0186900-03)	chr01:4646434..4648130 (+ strand)
Os01:g0186950	Hypothetical protein. (Os01:t0186950-00)	chr01:4646844..4647917 (- strand)
Os01:g0187000	Conserved hypothetical protein. (Os01:t0187000-01)	chr01:4650156..4651884 (+ strand)
Os01:g0187200	Non-protein coding transcript. (Os01:t0187200-01)	chr01:4665786..4667062 (+ strand)
Os01:g0187300	Hypothetical conserved gene. (Os01:t0187300-01)	chr01:4667309..4669037 (+ strand)
Os01:g0187350	Hypothetical gene. (Os01:t0187350-00)	chr01:4673221..4674337 (- strand)
Os01:g0187400	Similar to glycine-rich protein. (Os01:t0187400-01)	chr01:4673407..4684765 (+ strand)
Os01:g0187500	WD40 repeat domain containing protein. (Os01:t0187500-01)	chr01:4688171..4693114 (+ strand)
Os01:g0187600	Similar to Cytokinin dehydrogenase 1. (Os01:t0187600-01)	chr01:4697238..4699036 (- strand)
Os01:g0187900	Similar to Transcription factor MYBS2. (Os01:t0187900-01)	chr01:4714730..4718746 (- strand)
Os01:g0188100	Isopenicillin N synthase family protein. (Os01:t0188100-01)	chr01:4726734..4731142 (+ strand)
Os01:g0188200	Conserved hypothetical protein. (Os01:t0188200-01)	chr01:4734017..4737606 (- strand)
Os01:g0188400	NADP-dependent malic enzyme, chloroplast precursor (EC 1.1.1.40) (NADP-ME). (Os01:t0188400-01);Similar to Malic enzyme. (Os01:t0188400-02)	chr01:4739271..4744472 (- strand)
Os01:g0188525	Hypothetical gene. (Os01:t0188525-00)	chr01:4739768..4744023 (+ strand)
Os01:g0188900	Similar to Ankyrin-like protein-like protein. (Os01:t0188900-01)	chr01:4761327..4767478 (- strand)
Os01:g0189100	Ankyrin domain containing protein. (Os01:t0189100-01)	chr01:4768738..4782706 (- strand)
Os01:g0189700	Similar to cDNA clone:001-031-C06, full insert sequence. (Os01:t0189700-01);Ankyrin repeat domain containing protein. (Os01:t0189700-02);Ankyrin repeat-containing domain containing protein. (Os01:t0189700-03);Hypothetical protein. (Os01:t0189700-04)	chr01:4789656..4795346 (+ strand)
Os01:g0189800	Protein of unknown function DUF1618 domain containing protein. (Os01:t0189800-01)	chr01:4796155..4798454 (- strand)
Os01:g0190000	Similar to oxidoreductase. (Os01:t0190000-01)	chr01:4800233..4802174 (+ strand)
<b>RM1:0281</b>		chr01:4802824..4802871 (+ strand)

(考察)

マッピングの結果、H193mtの原因遺伝子の候補領域は第1染色体上の約230kbpとなった。一方で、次世代シーケンサーによる解析ではこの候補領域内の遺伝子に大きな影響を及ぼすと予想される変異は検出されておらず、H193mtの閉花受粉性の原因遺伝子を特定するには至らなかった。原因遺伝子の特定のためには、候補領域内の各遺伝子の機能解析および発現解析を行うこととなるため、対象遺伝子を減らすためにマッピングをさらに進めて候補領域を狭めることが必要となる。このことは、閉花受粉性により強く連鎖するDNAマーカー作成のためにも重要である。また候補領域内には、大規模データの自動解析では検出されにくい変異が存在する可能性は残っており、IGVを使用して領域内を再度精査することも必要である。

## (2) 閉花受粉性突然変異体TMT-C27の原因遺伝子探索

閉花受粉性突然変異体 TMT-C27 は「たちすがた」の薬剤 (EMS) 突然変異処理集団から選抜されたもので、東北地方での試験栽培でも開花がほとんど見られず、H193mt 同様に温度感受性が無いと考えられた。

### (研究方法)

2013年にTMT-C27と「Kasalath」を交配した後代のF3集団384個体を展開し、H193mtと同様の方法でDNAの抽出、開花/閉花のスコアリングを行った。併せて、各染色体にTMT-C27と「Kasalath」の遺伝子型を区別できる合計93個のSSRマーカーを選定し、原因遺伝子のラフマッピングを行った。QTL解析にはWindows QTL Cartographer ver. 2.5を使用した。また、展開した各個体の地際から最長稈の穂首節までを稈長として記録した。2014年には、F4分離集団480個体を水田に展開し、同様にDNAサンプルの収集と開花/閉花のスコアリング、稈長測定を行うとともに、前年度に得られた遺伝子の候補領域に新たにSSRマーカーを選定してマッピングを進めた。

### (結果)

TMT-C27/Kasalath F3集団を用いたQTL解析の結果、第9染色体上に単一のピークを検出した(図2)。この結果に基づいて、2014年にはF4集団を用いて第9染色体上のマッピングを集中的に行い、SSRマーカーRM23936とOs09ssr0041600の間の約220kbpが遺伝子の候補領域として得られた。

一方で、2014年の表現型調査では閉花受粉性が不安定である個体が観察された。これらの個体では、1穂内で部分的に開花が観察されたり、同一株内の穂の間で開花と閉花が観察されたりしたが、候補領域の遺伝子型は全てTMT-C27型だった。なお、このような現象はTMT-C27では観察されなかった。

稈長調査の結果では、F4分離集団の中で閉花受粉性を示す個体は稈長が短い傾向を示すことも明らかになった。展開したF4集団のうち、系統3-39-61では96個体中76個体が開花、20個体が閉花だったが、開花した個体の平均稈長は96.4cmだったのに対して閉花だった個体の平均は82.5cmだった(図3)。この傾向は他の系統でも同様だった。TMT-C27自体が元品種「たちすがた」と比べて稈長が短い傾向にある(表2)ことから、閉花受粉性と稈長の低下には関連があることが予想される。

### (考察)

TMT-C27の原因遺伝子の候補領域は、第9染色体上の約220kbpに絞ることが出来た。一方で、2014年には閉花受粉性の不安定な個体が観察された。この現象はTMT-C27では観察されていないことから、「Kasalath」との交配による遺伝的背景の変化が影響している可能性がある。TMT-C27の閉花受粉性の発現に遺伝的背景の制限がある場合、育種での利用も制約を受けると考えられる。加えて、稈長の調査で明らかになった閉花受粉性が草型に影響を与える可能性も考慮すると、TMT-C27の閉花受粉性を実用品種に使用することは難しいと考えられる。



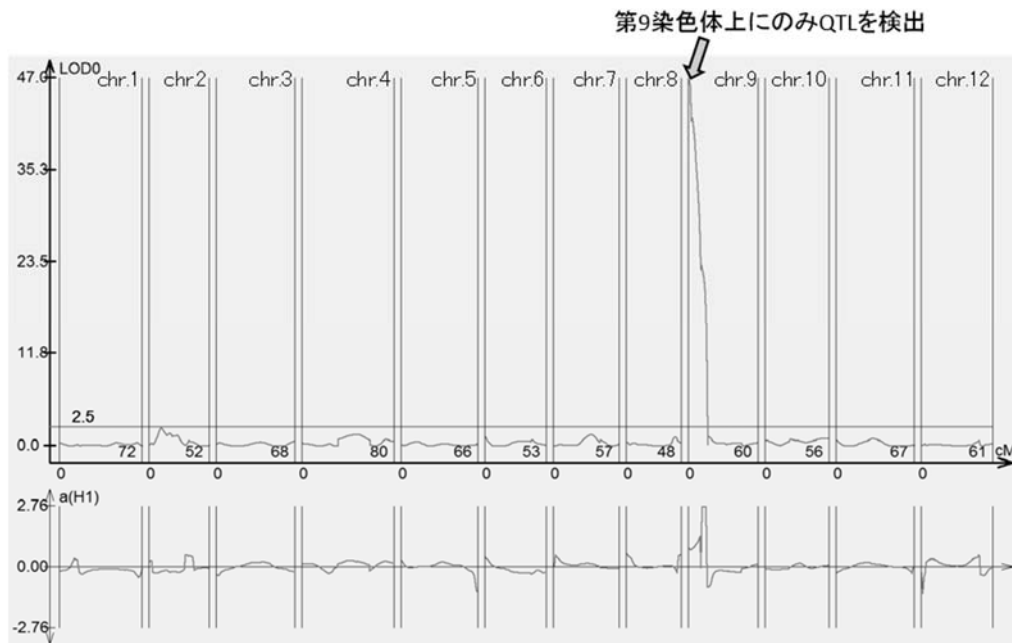


図2 TMT-C27/Kasalath F3集団のQTL解析結果  
Windows QTL Cartographer ver. 2.5にてCIM法を使用

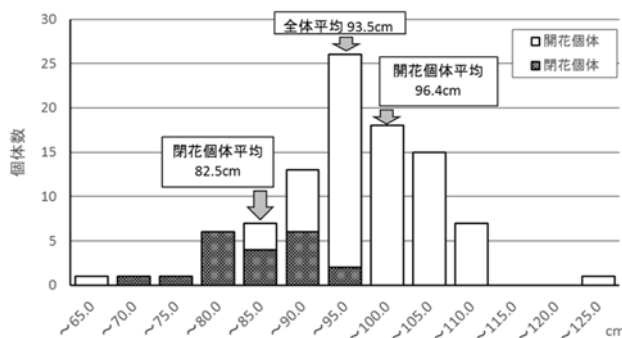


図3 TMT-C27/Kasalath F4 系統3-39-61の稈長解析

表2 TMT-C27とたちすがたの稈長の比較

系統名	n=	最長稈長 (cm)
2013		
TMT-C27	80	80.1 ± 5.13
たちすがた	40	85.4 ± 5.02
2014		
TMT-C27	80	77.9 ± 4.36
たちすがた	40	84.7 ± 4.15

### 3) 成果活用における留意点

H193mtについては、本研究で確認された候補領域内の変異情報を利用してDNAマーカーを作成し、これを利用して連続戻し交配による準同質遺伝子系統を作出して閉花受粉性の他の農業形質への影響を確認する必要がある。

### 4) 今後の課題

H193mtの候補遺伝子の取得を目指し、引き続きファインマッピングと候補領域内の遺伝子の機能解析、発現解析を行う。また併せて、次世代シーケンサー解析により得られたH193mtの塩基配列データについて再度精査を行う。

中課題番号	13406462	研究期間	平成25～26年度
小課題番号	7(3)	研究期間	平成25～26年度
中課題名(契約課題名)	新たな遺伝子組換え生物にも対応できる生物多様性影響評価・管理技術の開発		
小課題名	7(3) 作物モデル及びGISデータベースを応用した水稻の交雑抑制効果の評価・予測		
小課題責任者名・研究機関	大東健太郎・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター 環境基盤情報研究領域		

## 1) 研究目的

遺伝子組換え作物は祖先種植物や慣行栽培作物との間の交雑による遺伝子流動が懸念されている。交雑を抑制するための措置として、従来は物理的な隔離距離の設定が中心に行われてきた。しかしながら、遺伝子組み換え作物と慣行栽培作物の交雑率は、物理的な隔離以外に開花重複度制御による時間的な隔離や圃場の空間配置などによっても大きく変化する。

本課題では、水稻を対象とした作物モデルとGISデータベースを利用し多様な交雑防止措置を総合的に利用した場合の交雑抑制効果を評価する方法論を確立することを目的とし、以下の2つの手法の開発を進めた。

### (1) イネの開花重複度制御技術の開発

日本の主要作物であるイネについて、開花重複度と交雑率の関係を明らかにするとともに品種、移植日などから開花重複度を予測するための手法を開発する。

### (2) GISを利用した空間的隔離効果評価手法の開発

土地利用のGISデータベースを全国スケールで整備するとともに、隔離距離の設定や空間配置による交雑率抑制効果を市町村スケールのGISデータベースを利用し評価する。その上で、空間解像度の異なる全国スケールのGISデータベースを用いて、空間配置による交雑率抑制効果を評価する手法を開発する。

## 2) 研究成果

### (1) イネの開花重複度制御技術の開発

#### (研究方法)

文献調査ならびに既存のデータを用いて、時間的交雑抑制を評価するための開花予測モデルの水稻への適応性を検討するとともに、予測パラメータとなる気温、日長等のデータの整備を行った。またウルチ系統とモチ系統を利用した、花粉飛散量と交雑率との関係を明らかにするための実験の予備試験を行い、実験計画を調整した。

予備試験の結果から、試験区を出穂観察、花粉採集用と交雑率検定用に分離した形で

反復を設定し、交雑試験を行なった。出穂の重複程度を出穂パターンを正規分布で近似した上で、それぞれの分布同士の類似度という形で評価した(Ohigashi et al. 2014)。また花粉飛散量を写真から推定し、花粉飛散量推移の分布を調査した上で、2年分の気象条件と既存の出穂モデル等から花粉飛散の予測が可能かについて検討した。

#### (結果)

25年度は、ウルチとモチ系統のイネの出穂パターンを正規分布で近似し、交雑率の関係について調査した。出穂パターンの類似度と交雑率の関係には概ね正の関係が見られたが、出穂がほとんど重複していないブロックで雄性不稔が疑われる比較的高い交雑率が見られたサンプルがあった。

26年度は水稲4品種を用いた2時期移植のランダム化圃場試験を行い、出穂パターンデータ(図1)を蓄積するとともにイネの出穂の重複程度とキセニアを利用し判定した交雑率の間に正の関係があることを確認した(図2)。

25年度、26年度ともに花粉飛散量の調査を行ったが、日変動が大きく、出穂パターンとの間に明確な関係は見られなかった。既存の出穂日予測モデルを広範囲に対して適用するため、GISによる気象パラメータの整備を行った。

#### (考察)

今回の実験でのイネの出穂パターンは概ね正規分布的で、出穂の最盛日を中心に前後にはほぼ均等の期間において出穂がみられた。したがって、出穂の重複程度を推定する際に正規分布を用いて近似することが妥当であると考えられる。

出穂の重複程度と交雑率の間には正の相関が見られたが、重複程度の増加に伴い、交雑率の分散も大きくなる結果となった。開花・出穂の重複は交雑の前提条件であるが、実際に交雑が発生する際には、風速や風向、葯や穎の開き方など様々な条件が関与すると考えられるため、これは妥当な結果と言える。また今回外れ値の原因として雄性不稔が疑われたサンプルもあったが、雄性不稔の場合、出穂の重複程度が低くても交雑率自体は高くなる場合もあると考えられた。

イネの出穂予測に際しては堀江・中川(1990)などに代表されるように、様々な予測モデルがすでに存在する。これらを用いることで、作付け時期をコントロールした場合に、出穂時期がどの程度重複するかを評価することができれば、交雑リスクがどの程度になるかを事前に評価できるようになる。交雑を忌避したい2品種の交雑抑制技術として、時間的隔離を行うための基礎的な知見となった。

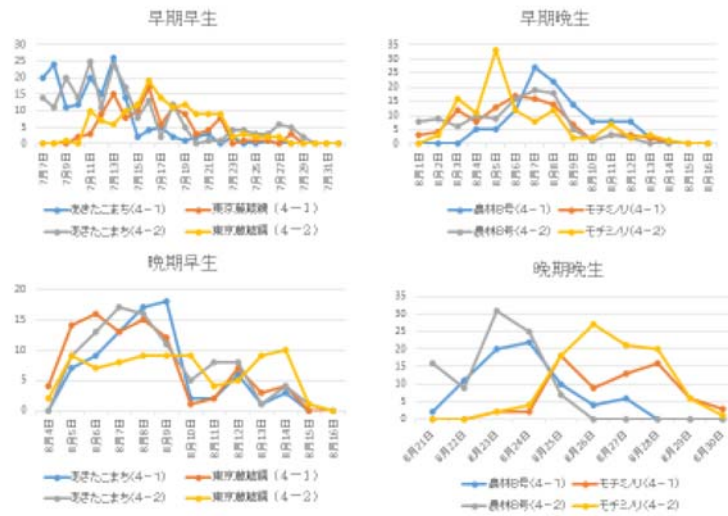


図1 ウルチ系統（あきたこまち、農林8号）とモチ系統（東京藤蔵糯、モチミノリ）を早期移植、晚期移植した場合の出穂数の推移

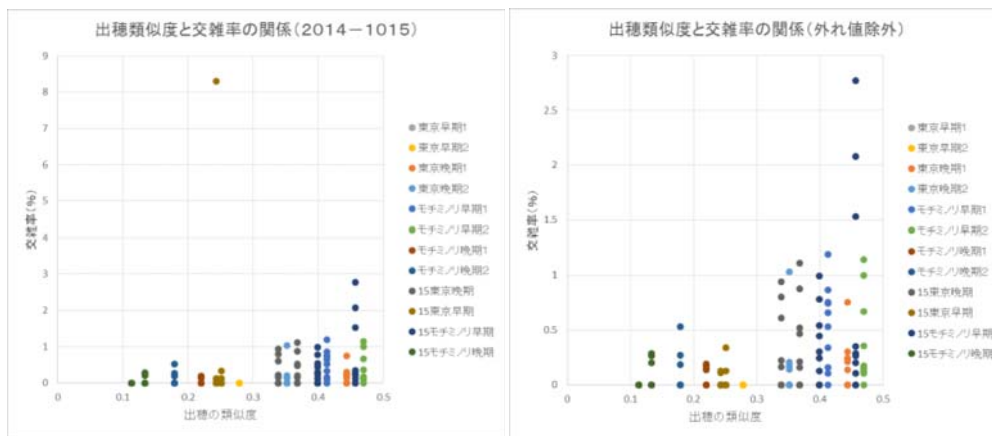


図2 出穂パターンの類似度と交雑率の関係  
 雄性不稔が疑われた外れ値を除外したものが右図

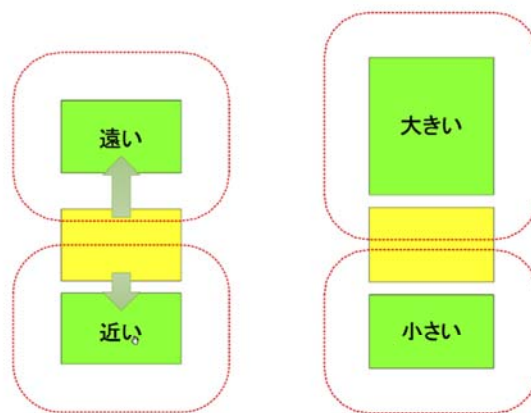
(2) GISを利用した空間的隔離効果評価手法の開発  
 (研究方法)

これまで、ほ場を単位としてGM・非GM水稲を作付けした場合の交雑率について、ほ場の面積およびほ場間の接線長を指標とした指標を開発したが、この評価法では空間的隔離効果を考慮することができない。また、我が国の水田の場合では、ほ場単位で隔離距離をとることは困難である。そこで、ほ区単位での空間配置や空間的隔離を定量的に評価する手法を検討した。詳細な空間スケールを持つ水稲ほ場のGISデータベースを用いて、個々のほ区の空間的隔離程度を評価する指標を算出した。さらに、任意のGM水稲作付け率を設定した場合の空間的隔離程度を評価する手法を開発するとともに、隔離効果

を最大にする配置についても、検討した。

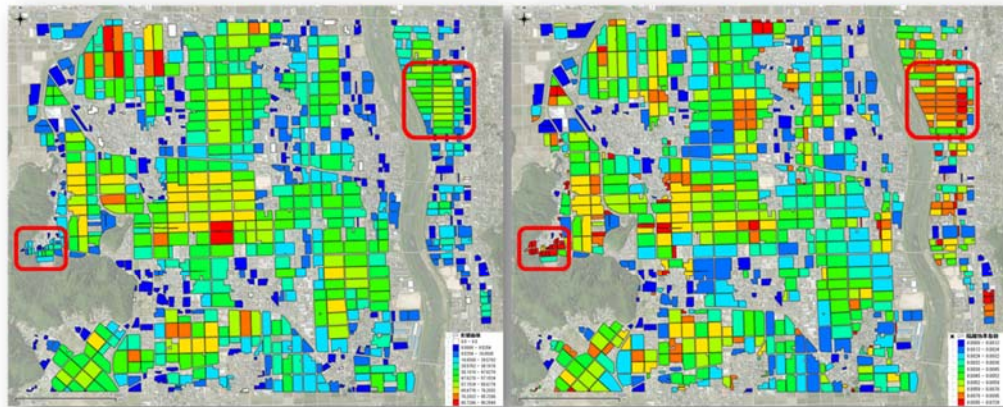
(結果)

水稻における距離と花粉飛散量の関係についての文献を調査し、確率密度関数として利用するための候補を選定した。次に、任意のほ区にGM水稻が植え付けられ花粉親となった場合に、周囲に与える影響を評価するための指標（影響面積）を算出するとともに、ほ区の配置を最適化するために、影響面積をほ場面積で除した指数を隔離効果指数と定義した。これらについて、福井県鯖江市をモデル地区として、実際のGISデータによる交雑影響の分析を行い、有効性を検証した。その結果、空間的隔離指数を用いた方が、隔離効果を効率的に評価できることが確認できた。また対象エリア内での作付け割合が一定である場合に、エリア内での交雑リスクを最小にする空間配置を推定するアルゴリズムを作成した。



影響面積と空間的隔離指数の概念図。黄色が緑がGMほ場、黄色が非GMほ場、赤い破線が花粉飛散距離とする。  
黄色のほ場と赤い破線が重複している部分が影響面積となる。左の図のようにGM・非GMほ場間の距離が遠いほど、影響面積は小さくなる。  
一方で右図のように、ほ場間距離が同じであれば、GMほ場の面積が違っても、影響面積が同じになる場合もある。そこで、影響面積をGMほ場面積で除したものを空間的隔離指数とした。この指数が小さいほど、影響面積が同じであってもGMほ場面積を大きく確保できるので、空間的隔離効果が高いと言える。

図3 影響指数と空間的隔離指数の概念図



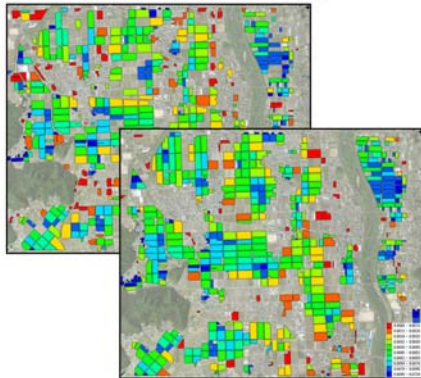
影響面積

空間的隔離指数

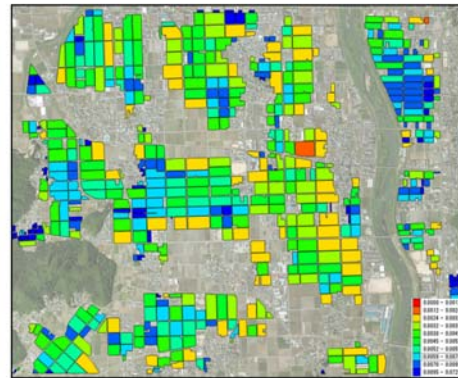
福井県鯖江市のデータを元に算出した影響面積(左図)と空間的隔離指数(右図)  
 図中で赤く囲った部分は、影響面積が小さいが、相対的に隔離効果が低くなっている。

図4 福井県鯖江市のデータを基に算出した影響面積と空間的隔離指数

ランダム選択 (指数 : 3.23)



連続的選択 (指数 : 3.52)



最適化アルゴリズム (指数 : 3.70)

図5 空間的隔離効果が高い空間配置

(考察)

日本では欧州などと比べてほ場一筆ごとの面積が小さく、空間的隔離を確実に行うことは難しいが、本研究で示唆された様に、同一区画内で同一の割合で2品種を作付けた場合でも地域全体での交雑割合は大きく異なるものとなる場合がある。遺伝子組換え品種と慣行品種が共存する上で、許容される交雑率が仮に設定されたとすると、影響面積が小さい圃場を中心に組換え作物を作付けするなどの対策をすることで、地域全体での交雑率を低く抑えることができると考えられる。

### 3) 成果活用における留意点

出穂の重複程度が低く、空間的隔離程度が高い場合でも確率的に交雑自体は起こりうるため、交雑が完全に許容されない場合には別の手段を講じるべきである。

### 4) 今後の課題

イネの出穂期を予測するモデルは、基本的に達観で50%が出穂したと判断される、出穂日を予測するものが多く、出穂パターンそのものを予測することはできない。既存のモデルを用いて出穂期の長さも予測することが可能かどうかについては検討が必要である。また出穂の重複程度と交雑率の関係については、更なるデータを蓄積することによって、確率的に交雑率が許容する閾値を超えてしまうリスクについてより詳細に予測することが可能となると考えられる。

地域内での交雑リスクを可能な限り低減するための最適配置を推定するアルゴリズムは、実際に作付け条件の変更が可能であるか、などの条件を無視しているが、現実に利用する際には、影響を与えるほ場全ての条件を指定することはできないため、条件を変更できるほ場を制限した上での最適配置を考慮する必要がある。

#### 参考文献

Ohigashi et al. (2014) A new method for evaluating flowering synchrony to support the temporal isolation of genetically modified crops from their wild relatives. *Journal of Plant Research* 127 (1). 109-117.

堀江武・中川博視 1990イネの発育過程のモデル化と予測に関する研究. 1 報 モデルの基本構造とパラメータの推定法および出穂予測への適用. 日本作物学会紀事 59.

## 成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及する成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13406462	27	15	44	22	8	0	0	0	0	2	0	8	13

## (1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	農研機構・近畿中国四国農業研究センター	中国・四国地方におけるダイズ原種ツルマメを寄主植物とする昆虫相	菊地淳志	関西病虫害研究会報	55	129-133	2013	5
2	①	茨城大学	「新しい育種技術」をめぐるガバナンス上の課題－米欧の動向からの示唆－	畠山華子・立川雅司	フードシステム研究	20(3)	193-198	2013	12
3	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	コイとフナ類における種判別用DNAマーカーの開発	正岡哲治他	DNA多型	21	94-98	####	
4	①	農業環境技術研究所	遺伝子組換え作物と生物多様性, そして私たちの生活	吉村泰幸	雑草研究	58(2)	90-96	####	
5	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	Distinction between <i>Oryzias</i> species using nuclear genes and mitochondrial gene region	正岡哲治他	DNA鑑定	5	19-31	2013	
6	①	農業環境技術研究所	A new method for evaluating flowering synchrony to support the temporal isolation of genetically modified crops from their wild relatives	Kentaro Ohigashi, Aki Mizuguti, Yasuyuki Yoshimura, Kazuhito Matsuo	JOURNAL OF PLANT RESEARCH	127(1)	109-117	2014	1
7	②	茨城大学	新しい育種技術をめぐる規制と社会的対応	立川雅司・鎌田博	生物の科学 遺伝	2014(3)	145-149	2014	3



8	①	農研機構・近畿中国四国農業研究センター	様々なマメ科植物におけるチャバネキボシアツバの発育と産卵選好性	菊地淳志	関西病虫害研究会報	56	149-151	2014	5
9		農研機構・生物研、富山県	作物の閉花受粉性～その分子機構と育種における利用	吉田均、大森伸之介、矢頭治、小松田隆夫、王寧、蛸谷武志、藤田健司、山口琢也、木谷吉則、藤田雅也、久保堅司	育種学研究	16	61-66	2014	6
10	①	農業生物資源研究所	遺伝子組換えカイコの飼育に於ける生物多様性影響の評価手法の構築	河本夏雄、津田麻衣、岡田英二、飯塚哲也、桑原伸夫、瀬筒秀樹、田部井豊	蚕糸・昆虫バイオテック	83	163-170	2014	8
11	①	農研機構・近畿中国四国農業研究センター	クズや人工飼料による蛾類5種の発育と増殖	菊地淳志	日本応用動物昆虫学会中国史部会報	56	10-15	2014	8
12	②	茨城大学	新植物育種技術をめぐる海外諸国の規制動向	立川雅司	B&I(バイオインダストリー協会)	72(6)	514-517	2014	11
13	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	Analysis of nucleotide variation of aromatase gene in Salmonid fishes and its application to species distinction.	Masaoka, T., Oku, H., Okamoto, H., Araki, K., Nagoya, H., Yanagimoto, T., Fujiwara, A., Kobayashi, T	DNA Testing	6	47-58	2014	12
14	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	DNAマーカーによるコイとフナ類の雑種判別	正岡哲治他	DNA多型	22	80-83	2014	
15	①	農業生物資源研究所	遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築	河本夏雄・津田麻衣・岡田英二・飯塚哲也・桑原伸夫・瀬筒秀樹・田部井豊	蚕糸・昆虫バイオテック	83(2)	171-179	2014	
16	②	茨城大学	新しい育種技術をめぐる海外諸国における政策動向	立川雅司	JATAFFジャーナル	2(8)	5~9	2014	
17	①	茨城大学	New Breeding Techniques in the Age of Trans-science	Masashi Tachikawa	Asian Rural Sociology	5(2)	331-336	2014	
18	①	農研機構・食品総合研究所	Development of Direct Real-Time PCR System Applicable to a Wide Range of Foods and Agricultural Products	Mano J, Hatano S, Futo S, Minegishi Y, Ninomiya K, Nakamura K, Kondo K, Teshima R, Takabatake R,	Food Hygien and Safety Science	55(1)	25-33	2014	

19	①	農業環境技術研究所	遺伝子組換え作物の栽培国および輸入国における雑草問題	松尾和人,吉村泰幸	日本作物学会紀事	84	1-8	2015	1
20	①	農研機構・食品総合研究所	Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice	Reona Takabatake et al.	Food Control誌	50	949-955	2015	4
21	①	農研機構・近畿中国四国農業研究センター	各種チョウ目幼虫によるツルマメ摂食量	菊地淳志	関西病虫害研究会報	57	117-119	2015	5
22	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	PCRを利用したコイとフナ類の判別手法の開発	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	DNA多型	23	79-83	2015	7
23	②	茨城大学	遺伝子組換え作物をめぐる政策の国際動向とその含意	立川雅司	日本農薬学会誌	40(2)	243-246	2015	8
24	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	Distinction of hybrids between <i>Salvelinus leucomaenis</i> and <i>Salmo salar</i> using aromatase gene.	Masaoka, T., Oku, H., Okamoto, H., Araki, K., Nagoya, H., Yanagimoto, T., Fujiwara, A., Kobayashi, T	DNA Testing	7	27-35	2015	12
25	①	農研機構・	Interpreting lemma and palea homologies; a point of view from rice floral mutants	Fabien Lombardo and Hitoshi Yoshida	Frontiers in Plant Science誌	6	article #61	2015	
26	①	農研機構・東北農業研究センター	Cleistogamy decreases the effect of high temperature stress at flowering in rice	Setsuo Koike, Tomoya Yamaguchi, Shinnosuke Ohmori, Takami Hayashi, Osamu Yatou and Hitoshi Yoshida	Plant Production Science誌	18(2)	111-117	2015	
27	①	農業環境技術研究所	遺伝子組換えダイズ of 生物多様性影響評価に必要なツルマメの生物情報集	吉村泰幸・加賀秋人・松尾和人	農業環境技術研究所報告	36	1-45	2016	3
28	①	農業環境技術研究所	遺伝子組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ ( <i>Brassica juncea</i> )、アブラナ ( <i>B. rapa</i> )、セイヨウアブラナ ( <i>B. napus</i> ) の生物情報集	津田麻衣・田部井豊・大澤良・下野綾子・吉田康子・吉村泰幸	農業環境技術研究所報告	36	47-69	2016	3
29	①	農研機構食品研究部門	Improvement of the group testing method to evaluate GM maize content	Mano Jら	食品総合研究所報告	80	57-68	2016	3
30	①	茨城大学	遺伝子組換え作物をめぐるフレーミングと政治的機会構造—米欧の対比から—	立川雅司	共生社会システム研究	10(1)	221-244	2016	9

31	②	茨城大学	新たな育種技術に対する海外の規制動向および今後の展望	立川雅司	イルシー ILSI Japan	127	23-29	2016	9
32	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	PCRを利用したコイとフナ類の雑種判別	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	DNA多型	24	23-26	2016	9
33	①	農研機構	Absence of hybrids between the domesticated silkworm, Bombyx mori, and the wild mulberry silkworm, B. mandarina, in natural populations around sericulture farms	Kômoto N, Kuwabara N and Yukuhiro K	Journal of Insect Biotechnology and Sericology	85	67-71	2016	12
34		農研機構	The superwoman1-cleistogamy2 mutant is a novel resource for gene containment in rice	Fabien Lombardo, Makoto Kuroki, Shan-Guo Yao, Hiroyuki Shimizu, Tomohito Ikegaya, Mayumi Kimizu, Shinnosuke Ohmori, Takashi Akiyama, Takami Hayashi, Tomoya Yamaguchi, Setsuo Koike, Osamu Yatou, Hitoshi Yoshida	Plant Biotechnology Journal	15	97-106	2017	1
35	①	農研機構	Pheromone dose and set height of pheromone traps for efficient collection	Yukuhiro K, Kuwabara N and Kômoto N	Journal of Insect Biotechnology and Sericology	86	55-57	2017	6
36	①	水産研究・教育機構増養殖研究所	産卵を誘発する人為的環境におけるコイとフナ類の自然交雑の確認	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	DNA多型	25	11-15	2017	7
37	①	筑波大学	Analysis of genetic diversity of rapeseed genetic resources in Japan and core collection construction	Chen, R., T. Hara, R. Ohsawa, Y. Yoshioka	Breeding Science	67 (3)	239-247	2017	9
38	①	農研機構	Three single nucleotide polymorphisms indicate four distinctive distributions of Japanese Bombyx mandarina populations	Yukuhiro K, Sakaguchi H, Kômoto N, Tomita S and Itoh M	Journal of Insect Biotechnology and Sericology	86	77-84	2017	10
39	②	名古屋大学	ゲノム編集など新たな育種技術の規制をめぐる国際動向	立川雅司	ソフト・ドリンク技術資料	184	未定	2018	4
40	①	農研機構・食品研究部門	Development and Evaluation of Rapid Screening Detection Methods for Genetically Modified Crops Using Loop-Mediated Isothermal Amplification	Reona Takabatake et al.	Food Chemistry誌	印刷中		2018	
41	②	名古屋大学	海外におけるゲノム編集の規制動向—各国はどのような観点からゲノム編集を規制しようとしているのか	立川雅司	化学と生物	未定	未定	2018	未定
42	②	名古屋大学	ゲノム編集技術をめぐる規制と社会動向 —農業・食品への応用を中心に—	立川雅司	科学技術社会論研究	未定	未定	2018	未定

## (2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	見えない遺伝子操作技術とガバナンス上の課題	畠山華子・立川雅司	茨城大学	日本フードシステム学会	2013	6
2	ツルマメによるモンキチョウの飼育	榊原充隆	農研機構・東北農業研究センター	昆虫学会東北支部	2013	7
3	日本列島に生息するクワコ集団の遺伝的分化	行弘研司、岩田和也、河本夏雄、富田秀一郎、木内信、伊藤雅信	農業生物資源研究所	日本遺伝学会	2013	9
4	イネの閉花受粉性の分子機構	吉田均、大森伸之介、矢頭治	農研機構	日本育種学会第124回講演会ワークショップ	2013	10
5	Transgene containment using rice cleistogamous mutation	Shinnosuke OHMORI, Hiroaki TABUCHI, Osamu YATOU, Takami HAYASHI, Tomoya YAMAGUCHI, Setsuo KOIKE, Makoto KUROKI, Hiroyuki SHIMIZU, Tomohito IKEGAYA, Hitoshi YOSHIDA	農研機構	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
6	Environmental Impacts and Management Issues of GM Crops: Science/Regulatory Interaction in Comparative Perspective	Masashi Tachikiawa	茨城大学	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
7	Biological impact assessments for genetically modified crops and their proper managements in Japan	Hiroyuki SHIBAIKE	農業環境技術研究所	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10

8	General View of Environmental Impact Assessment of Genetically Modified Crop	與語靖洋	農業環境技術研究所	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
9	The flowering similarity index for evaluating the risk of out-crossing	Kentaro Ohigashi, Aki Mizuguti, Yasuyuki Yoshimura, Kazuhito Matsuo, Tetsuhisa Miwa	農業環境技術研究所	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
10	Matrix model of population dynamics estimating fertility of genetically modified soybean ( <i>Glycine max</i> L.)	Yasuyuki Yoshimura, Kentaro Ohigashi	農業環境技術研究所	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
11	Monitoring of feral canola population affected by road maintenance along transport route around seaport in Japan.	Kazuhito Matsuo, Yasuyuki Yoshimura, Kentaro Ohigashi, Aki Mizuguti	農業環境技術研究所	MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10
12	DNAマーカーによるコイとフナ類の雑種判別	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本DNA多型学会	2013	11
13	遺伝子組換え作物を巡る最近の情勢－農薬との関連を中心に－	與語靖洋	(独)農業環境技術研究所	平成25年度かば三会	2013	11
14	サケ科魚類におけるアロマターゼ遺伝子の塩基配列の変異性－在来サケ科魚類と外来サケ科魚類の判別への応用	正岡哲治, 奥 宏海, 岡本裕之, 荒木和男, 名古屋博之, 柳本 卓, 藤原篤志, 小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	DNA鑑定学会	2013	12

15	各地で栽培したspw1-cl5変異を持つ閉花受粉性イネ系統の開花率と開花／閉花予測地図の試作	大森伸之介、大東健太郎、岩崎巨典、佐藤弘一、岡本和之、山崎周一郎、高橋利和、望月篤、藤代淳、野村研、上野直也、細井淳、新井利直、中澤伸夫、矢ヶ崎和弘、鈴木亨、佐藤秀人、加藤満、水上優子、吉田朋史、山川智大、松井崇晃、蛭谷武志、小林大樹、笹倉康弘、田野井真、矢頭治、吉田均	農研機構、農業環境技術研究所、福島県、茨城県、栃木県、群馬県、千葉県、神奈川県、山梨県、長野県、静岡県、岐阜県、愛知県、三重県、新潟県、富山県、石川県、福井県	日本作物学会第237回講演会	2014	3
16	イネの穎花の形態と閉花性の関係	吉田均、三浦孝太郎、岩崎行玄、北野英己	農研機構、福井県立大、名古屋大	日本育種学会第125回講演会	2014	3
17	「日本国内における遺伝子組換えダイズの野生化を評価するための個体群動態モデル」	吉村泰幸、大東健太郎	農業環境技術研究所	日本作物学会	2014	4
18	Development and field performance of abiotic stress tolerant products.	吉村泰幸	農業環境技術研究所	日本作物学会	2014	4
19	2つの新規閉花受粉性イネ突然変異体の原因遺伝子のマッピング	大森伸之介、吉田均	農研機構	日本育種学会第127回講演会	2015	3
20	Bクラス変異のもたらす閉花性と稔実率との trade-off	吉田均、黒木慎、姚善国、Fabien Lombardo、清水博之、池ヶ谷智仁、木水真由美、大森伸之介、秋山高、林高見、小池説、矢頭 治	農研機構	イネ遺伝学・分子生物学WS	2014	7
21	Renegotiating the Definition of GMOs: Stakeholders' Viewpoints on "New Breeding Techniques	Masashi Tachikiawa	Ibaraki University	World Congress of Sociology (ISA)	2014	7
22	Genetic variation of the wild mulberry silkmoth Bombyx mandarina in Japan	行弘研司、河本夏雄、富田秀一郎	農業生物資源研究所	鱗翅目昆虫分子生物学遺伝学国際ワークショップ	2014	8

23	Fine-tuning the floral phenotypes in rice: narrow but deep gaps between mutations and agronomic traits	吉田均	農研機構	KAAB International Symposium 2014 “Frontiers in Plant Science and Biotechnology”	2014	9
24	イネにおけるBクラス変異のもたらず閉花性と稔実率とのtrade-off	吉田均、黒木慎、姚善国、Fabien Lombardo、清水博之、池ヶ谷智仁、木水真由美、大森伸之介、秋山高、林高見、小池説、矢頭 治	農研機構	日本育種学会第126回講演会	2014	9
25	COI sequences of three island populations of Japanese Bombyx mandarina are classified into the clade different from those of the mainland populations	行弘研司、河本夏雄、富田秀一郎、瀬筒秀樹、秋月岳、伊藤雅信、中島裕美子	農業生物資源研究所	日本遺伝学会	2014	9
26	New Breeding Techniques (NBTs) in the Age of Trans-science	Masashi Tachikiawa	Ibaraki University	5th Conference of the Asian Rural Sociology Association	2014	9
27	PCRを利用したコイとフナ類の判別手法の開発	正岡哲治、名古屋博之、岡本裕之、荒木和男、藤原篤志、小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本DNA多型学会	2014	11
28	「新しい育種技術」に関する模擬的ステークホルダー討議－課題の背景と位置づけ－	立川雅司ほか	茨城大学	科学技術社会論学会	2014	11
29	アロマターゼ遺伝子(CYP19b-1)を利用したサケ科魚類の種間交雑の確認	正岡哲治、奥 宏海、岡本裕之、荒木和男、名古屋博之、柳本 卓、藤原篤志、小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	DNA鑑定学会	2014	12
30	ジーンターゲット法を利用した閉花性イネ作出の試み	大槻並枝、小松田隆夫、吉田均、土岐精一	生物研、農研機構	日本分子生物学会	2014	12
31	2つの新規閉花受粉性イネ突然変異体の原因遺伝子のマッピング	大森伸之介、吉田均	農研機構	日本育種学会第127回講演会	2015	3

32	ダイズの野生種, ツルマメにおけるウイルス病の発生調査(2) 2種の <i>Potyvirus</i> の発生確認	大貫正俊, 酒井淳一, 佐藤豊三, 芝池博幸, 水谷信夫, 榎原充隆, 菊地淳志	平成27年度日本植物病理学会大会	日本植物病理学会	2015	3
33	日本産クワコ ( <i>Bombyx mandarina</i> ) の北陸、近畿、山陰にかけての集団で観察されるミトコンドリアCOIハプロタイプの推移	行弘研司、河本夏雄、富田秀一郎、阪口洋樹、伊藤雅信	農業生物資源研究所	昆虫DNA研究会	2015	7
34	日本産クワコの北陸、近畿、山陰にかけての集団で観察されるミトコンドリアCOIハプロタイプのシフトについて	行弘研司、河本夏雄、富田秀一郎、阪口洋樹、伊藤雅信	農業生物資源研究所	日本遺伝学会	2015	9
35	SSRマーカーを用いた自生セイヨウナタネ集団の遺伝的多様性の評価	陳、蕤坤; 吉岡、洋輔; 下野、綾子; 青野、光子; 中嶋、信美; 大澤、良	筑波大学	日本育種学会第128回講演会	2015	9
36	LAMP法による安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの網羅的簡易迅速検知法の開発	高島令王奈、鍵屋ゆかり、峯岸恭孝、Sabina Yeasmin、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)和子、真野潤一、橋田和美	農研機構・食品研究部門、(株)ニッポンジーン、University of Dha-ka(ダッカ大学)、(株)ファスマック、国立医薬品食品衛生研究所	第110回日本食品衛生学会学術講演会	2015	10
37	PCRを利用したコイとフナ類の雑種判別	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本DNA多型学会	2015	11
38	傾向スコアを利用したツルマメの潜在分布域予測	芝池博幸	日本雑草学会第54回大会	日本雑草学会	2016	3
39	ツルマメを摂食する数種チョウ目昆虫の殺虫性毒素(Cry1Ac)感受性について	宮本和久・三橋渡・和田早苗	農業生物資源研究所	第60回日本応用動物昆虫学会大会	2016	3
40	クワコ成虫の発生時期	河本夏雄、富田秀一郎、木内信、桑原伸夫、金児雄、比留間潔、水谷信夫、行弘研司	農業生物資源研究所	日本蚕糸学会	2016	3
41	集団固有のCOIハプロタイプに基づくクワコの北海道から東北の自然集団の遺伝的分化の検討	行弘研司・河本夏雄・富田秀一郎・伊藤雅信	農業生物資源研究所	日本蚕糸学会	2016	3
42	潜在分布域推定におけるpsuedo-absenceデータ作成	大東健太郎、芝池博幸	日本雑草学会第55回大会	日本雑草学会	2016	4



43	LAMP法を用いた安全性審査済み遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシのスクリーニング的定性検知法の開発	高島令王奈、鍵屋ゆかり、峯岸恭孝、布藤聡、野口秋雄、近藤一成、最上(西巻)知子、真野潤一、橋田和美	農研機構・食品研究部門、(株)ニッポンジーン、(株)ファスマック、国立医薬品食品衛生研究所	日本食品化学学会第22回 総会・学術大会 プログラム	2016	6
44	カイコゲノムを用いたクワコの遺伝的解析	富田秀一郎	農研機構	昆虫デザイン研究会	2016	7
45	コイとゲンゴロウブナの交雑と戻し交雑個体について	名古屋博之、野村和晴、伊東尚史、正岡哲治、荒木和男	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本水産学会	2016	9
46	ゲノム編集技術をめぐる海外諸国の規制動向	立川雅司	茨城大学	第34回日本植物細胞分子生物学会	2016	9
47	日本産クワコのCOI遺伝子上のSNPから観た遺伝的分化	行弘研司、阪口洋樹、伊藤雅信、河本夏雄、富田秀一郎	農研機構	日本遺伝学会	2016	9
48	遺伝子組換えカイコの生物多様性影響評価と第一種使用による飼育試験	河本夏雄、津田麻衣、岡田英二、飯塚哲也、桑原伸夫、伊藤寛、池田真琴、瀬筒秀樹、田部井豊、富田秀一郎	農研機構	日本育種学会	2016	9
49	日本におけるセイヨウナタネ遺伝資源の遺伝的多様性の解析及びコアコレクションの作成	陳、蕤坤; 原, 尚資; 大澤, 良; 吉岡, 洋輔	筑波大学	日本育種学会第130回講演会/	2016	9
50	関東地方の伝統野菜「のらぼう菜」(Brassica napus L.)における遺伝的多様性の評価	柘植, 一希; 陳, 蕤坤; 吉岡, 洋輔; 大澤, 良; 元木, 悟	筑波大学	園芸学会平成28年度秋季大会	2016	9
51	産卵を誘発する人為的環境におけるコイとフナ類の自然交雑の確認	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本DNA多型学会	2016	12
52	Genetic diversity analysis and core collection formation in rapeseed genetic resources in Japan	Chen Ruikin, Hara Takashi, Ohsawa Ryo, Yosuke Yoshioka	筑波大学	International Plant & Animal Genome XXV	2017	1
53	Attempts to introduce genetically modified silkworms to sericultural farms for the production of recombinant silks in Japan	Kômoto N	農研機構	アジア太平洋蚕糸・昆虫バイテクノロジー会議	2017	2

54	Genetic and genomic analyses of Japanese population of the wild mulberry silk moth, <i>Bombyx mandarina</i>	Tomita S, Kômoto N, Yukuhiro K and Jouraku A	農研機構	アジア太平洋蚕糸・昆虫バイオテクノロジー会議	2017	2
55	カイコ×クワコ交雑第一代の羽化時期と日長の関係	河本夏雄	農研機構	日本蚕糸学会	2017	3
56	日本産クワコのゲノム解析	富田秀一郎、河本夏雄、行弘研司、上樂明也	農研機構	日本蚕糸学会	2017	3
57	Assessment for cross-pollination rate in rice, <i>Oriza sativa</i> , using long-term meteorological data collected by AMEDAS	Yonemura S., Sakukrai G., Ohigashi K., Iwasaki N., Shibaïke H. Du M.	International Symposium on Agricultural Meteorology 2016	日本農業気象学会	2016	3
58	What is allelopathy and what need to be evaluated for allelopathy	與語靖洋	農研機構農業環境変動研究センター	ILSI Workshop on Impact Assessment of GMO on Biodiversity	2016	5
59	Genome Editing: Another Round of Global Discursive Battles?	Masashi Tachikiawa	Ibaraki University	XIV World Congress of International Rural Sociological Association	2016	8
60	屋外大型飼育池におけるコイとフナ類の自然交雑の確認	正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典	水産研究・教育機構増養殖研究所	日本DNA多型学会	2017	11
61	Genetic diversity analysis and core collection formation in rapeseed genetic resources in Japan	Chen, R., T. Hara, R. Ohsawa, Y. Yoshioka	筑波大学	International Plant & Animal Genome XXV	2017	1
62	Risk Assessment of Genetically Modified Crop in Viewpoint of Environmental Impact in Japan	Yasuhiro Yogo	農研機構農業環境変動研究センター	The Seminar at Seoul National University	2017	4
63	日本食品化学学会第19回奨励賞受賞	高畠令王奈	農研機構・食品研究部門	日本食品化学学会第22回 総会・学術大会 プログラム	2017	6
64	カイコとクワコの生態・行動の比較 ～家畜化遺伝子の探索に向けて～	河本夏雄	農研機構	昆虫ポストゲノム研究会	2017	9

65	Status quo of Regulation of Genetically Modified Crops on Biodiversity in Japan	Yasuhiro Yogo	農研機構農業環境変動研究センター	Workshop on Global Agricultural Biotech Regulations Development	2017	10
66	新規育種技術で作出した作物が生物多様性に及ぼす影響	與語靖洋	農研機構農業環境変動研究センター	平成29年度日本学術会議公開シンポジウム	2017	12

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	⑤	プロジェクト研究成果シリーズ517 新農業展開ゲノムプロジェクト：GMO評価・管理領域	取りまとめ代表：與語靖洋 著者：多数	農林水産省農林水産技術会議事務局	農林水産省農林水産技術会議事務局	2014	4
2	②	雑草管理と遺伝子組換え作物	與語靖洋	(独)農業環境技術研究所	日本植物調節剤研究協会	2015	6
3	①	新しい育種技術をめぐる諸外国における政策動向	立川雅司	真下知士、城石俊彦監修『進化するゲノム編集技術』、pp.303-310	エヌ・ティー・エス(株)	2015	10
4	①	農業環境技術研究所報告36号 遺伝子組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ (Brassica juncea)、アブラナ (B. rapa)、セイヨウアブラナ (B. napus) の生物情報集	津田麻衣・田部井豊・大澤良・下野綾子・吉田康子・吉村泰幸	農業生物資源研究所、筑波大学、東邦大学、神戸大学、農業環境技術研究所	農業環境技術研究所	2016	3
5	①	新しい科学技術とその評価－遺伝子組換え・ナノテクを事例として	立川雅司	新山陽子・中嶋康博編『食の安全・信頼とフードシステム』、pp.117-131	農林統計出版	2016	6
6	①	Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia	編集：C.Geirge Kuo、與語靖洋、吉村泰幸	FFTC、農研機構農業環境変動研究センター、同左	農研機構農業環境変動研究センター	2016	9
7	②	ILSI japanバイオテクノロジー研究会主催 生物多様性影響評価の在り方に関するワークショップ	大澤 良	筑波大学	イルシー	2016	11
8	①	遺伝子組換え作物をめぐる「共存」：EUにおける政策と言説	立川雅司	名古屋大学	農林統計出版	2017	7

## (4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月 日
1	該当無し							

## (5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月 日	出願国
1	該当無し								

## (6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
②	イネの花が開くしくみ(イネの「花びら」はどこにあるの?)	常陽新聞	2014	8	2	吉田均(農研機構)	
②	ゲノム編集をめぐる海外の政策動向 2016年11月1日	デジタル農業情報誌Agrio 132号: 3-5、時事通信社	2016	11	1	立川雅司(茨城大学)	

## (7) 普及に移しうる成果

「該当無し」

## (8) 発表会の主催の状況

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者 数	機関名	備考
1	MARCO-FFTC Jpint International Workshop on Benefit and Risk of Genetically Modified Food Crops in Asia	2013	10	9	つくば国際会議場	150	農業環境技術研究所	10月9~10日
2	新植物育種技術(New Plant Breeding Techniques, NBT)を めぐる欧州の動向に関するセミ ナー	2014	2	3	農林水産省第2特別会議室		茨城大学	
3	「EUにおけるNBTに関する政策 の最新動向」に関するセミナー	2015	2	5	農業生物資源研究所		茨城大学	

4	新しい育種技術(New Breeding Technologies, NBT)に関する欧州の政策の最新動向に関するセミナー	2015	2	6	農林水産省三番町共用会議所		茨城大学	
5	ミニシンポジウム2 観察研究における統計的因果推論	2015	4	18	秋田県立大学	50	日本雑草学会第54回大会	オーガナイザー: 大東健太郎・芝池博幸(農環研)・水口亜樹(福井県立大)
6	ダイズ・ツルマメ勉強会	2015	7	28	農業環境技術研究所		農業環境技術研究所	
7	新しい育種技術(New Breeding Technologies, NBT)に関する欧州の政策と研究開発の最新動向に関するセミナー	2016	2	4	筑波大学東京キャンパス		茨城大学	
8	国際シンポジウム「食・農分野におけるゲノム編集に関する欧米の現状」	2017	2	3	東京大学本郷キャンパス・ダイウユビキタス学術研究館		茨城大学 東京大学	

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

- 区分; ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、 ②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、  
③その他(子供向け出前授業等)

整理番	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者	主な参加者	機関名	備考
1	①	「アメリカにおける規制枠組みと「新しい育種技術」」, ILSI国際ワークショップ「植物の新育種技術に関するワークショップ」	2013	10	15	東京ステーションコンファレンス				立川雅司
2	①	中央農研シンポジウム 穂・穎花を改良するイネのデザイン育種にむけて「閉花受粉性イネの開発と利用 ～イネ閉花受粉性突然変異superwoman1-cleistogamyを中心に～」	2013	11	13	滝野川会館			農研機構・中央農研	
3	①	「遺伝子組換え作物をめぐる海外規制政策の動向ーアメリカ、EU、中国を中心にー」, 北海道消費者協会主催学習会	2013	11	28	北海道消費者協会				立川雅司

4	①	「食品・農産物の遺伝子検査に利用できるサンプルダイレクトDNA分析試薬」	2013			(独)農業・食品産業技術総合研究機構の成果情報としてホームページに掲載			農研機構・食品総合研究所	
5	①	「米欧における「新しい植物育種技術」をめぐる規制動向ー海外動向調査報告ー」, 公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会(JATAFF)「新たな育種技術に関するシンポジウム」,	2014	2	28	発明会館地下ホール				立川雅司
6	①	平成26年度生物研一般公開体験・参加企画においてカイコのフェロモン誘導実験を実施	2014	4	19	茨城県つくば市生物研大わし地区			農業生物資源研究所	
7	①	平成26年度日本植物病理学会大会口頭発表	2014	6	3	札幌コンベンションセンター				
8	①	秋田県立大セミナー「イネの分子的生知見を利用した実用化への取り組み ～花器官形成遺伝子と閉花受粉性を中心に～」	2014	9	17	秋田県立大学			秋田県立大学	
9	①	新潟大学セミナー「花」の形態形成の基礎とイネにおける農業への応用」	2014	11	10	新潟大学			新潟大学	
10	①	平成26年度日本植物病理学会九州部会口頭発表	2014	11	12	鹿児島ジェイドガーデンパレス				
11	①	「リスクコミ機能教育プロジェクト」ミニフォーラム「GM作物に対する多様な考え方を知る」にて講演	2014	12	12	北海道大学				
12	①	「新しい育種技術をめぐる状況」	2015	1	13	北海道大学主催リスクコミュニケーション学習会				
13	①	次世代育種技術研究開発プラットフォーム第2回勉強会(JATAFF主催)	2018	1	16	共同通信会館				立川雅司