

実績報告書別添資料 1

1. 飛散試験

目的

隔離圃場内の試験区で栽培している組換えイネ S-C 系統、及び AS-D 系統の開花時における花粉の飛散状況を確認するため。

方法

(1) 試験に用いた組換えイネの開花が最初に確認されたのは、S-C 系統、及び AS-D 系統ともに 8 月 4 日であった。そこで予め準備しておいた花粉トラップ（飛散した花粉が吸着できるように薄くワセリンを塗ったガラスプレート[2.5 cm x 7.5 cm]を棒に装着した装置：右写真参照）を、隔離圃場内、および隔離圃場外の近隣の研究圃場、一般圃場に設置した。この花粉トラップの設置は、開花が確認された 8 月 4 日の翌日 8 月 5 日午前 11 時から開花のピークが過ぎた 8 月 8 日午後 11 時までの期間行った。ガラスプレートを毎日午前 11 時に回収し、回収と同時に、新たにワセリンを塗ったプレートを棒に装着した。回収したプレートは、回収後直ちに密閉した容器に移し、花粉の検定を行うまで、4°C で保存した。



回収したプレートに付着した花粉の分析は、東北大学大学院生命科学研究科内の遺伝子組換え実験室（PIP 実験室）にて行った。花粉が組換えイネ由来であるか否かについての検定は、組換えイネのみが有するハイグロマイシン耐性遺伝子が花粉 DNA 中に含まれているか否かの検出方法により行った。具体的には、ガラスプレートに付着した花粉を光学顕微鏡下で注射針を用いてかき取り（1~3 粒程度）、かき取った各花粉から抽出した DNA をテンプレートに、ハイグロマイシン耐性遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いた PCR（Polymerase Chain Reaction）法により検定を行った。なお、ハイグロマイシン耐性遺伝子が検出された DNA テンプレートに関しては、そのハイグロマイシン耐性遺伝子が S-C 系統由来であるのか、または AS-D 系統由来であるのかを、それぞれの系統に特異的なプライマーを用いた PCR 法により判別を行った。以下に花粉からの DNA の抽出方法、用いたプライマーの配列、ならびに PCR の反応条件記す。

DNA 抽出条件

かき取った花粉 1~3 粒程度を、3 μ L の抽出液（10 mM Tris/HCl [pH8.0]、10 mM EDTA、0.01% SDS、0.2 mg/ml Proteinase K）に懸濁し、37°C、60 min、そして 95°C、10 min の処理を行うことで DNA 抽出を行った。

プライマー配列

①ハイグロマイシン耐性遺伝子検出用プライマー

forward; 5'-CAGCGGTCATTGACTGGAGC-3'

reverse; 5'-GCGTCGGTTTCCACTATCGG-3',

②S-C 系統判別プライマー

forward; 5'-CAAGGAATCGGTCAATACAC-3'

forward; 5'-GGCTCCACACCAGTCAATCTCCGGC-3'

③AS-D 系統判別プライマー

forward; 5'-CAAGGAATCGGTCAATACAC-3'

forward; 5'-GTTACATGAATTACGCTGGCTGCAAGA-3'

PCR 条件

1 μ l; 10 \times Ex Taq Buffer, 0.8 μ l; dNTP Mixture (各 2.5 mM), 1.2 μ l; MgCl₂ (25 mM), 0.075 μ l;
Ex Taq (Takara), 0.25 μ l; Forward primer (20 mM), 0.25 μ l; Reverse primer (20 mM), 4.925 μ l;
dH₂O, 1.5 μ l ; DNA sol. (Total 10 μ l)

PCR 反応は iCYCLER (BioRad、CA、USA) を使用し、以下のプログラムで行った。

熱変性 98 $^{\circ}$ C 3分

[熱変性 98 $^{\circ}$ C 20秒、アニーリング 50~64 $^{\circ}$ C 30秒、伸長 72 $^{\circ}$ C 2分] \times 40

伸長 72 $^{\circ}$ C 5分

結果

まず、図 1 に非組換えイネであるササニシキ、形質転換に用いた CPD 光回復酵素を含むプラスミド DNA、形質転換に用いたプラスミド DNA、そして本試験に用いた組換えイネ S-C と AS-D の DNA を抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR 反応で増幅し、泳動した結果を示した。図 1 から分かるように、非組換えイネのササニシキはハイグロマイシン耐性遺伝子を持たないので、その遺伝子（図 1 矢印の位置に見えるバンド；約 400 kb）が増幅されることが分かる。一方、組換えイネである S-C と AS-C はハイグロマイシン耐性遺伝子を有しているので、遺伝子が増幅される。この方法により、まず回収した花粉から抽出した DNA を鋳型に、ハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマーを用いて

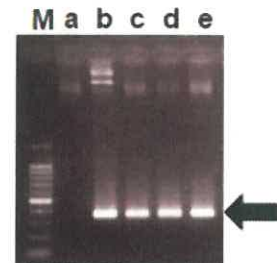


図1
M: マーカー
a: 非組換えイネササニシキ
b: CPD光回復酵素を含むプラスミド
c: 形質転換に用いたプラスミド
d: 組換えイネS-C
e: 組換えイネAS-D

PCR 反応を行い、電気泳動から、その花粉が組換えイネ由来であるか否かを検定した。組換えイネであることが想定された花粉の DNA は、その後、S-C 由来であるか、また AS-D 由来であるか否かを判定するために、それぞれの系統に特異的なプライマーを用いて PCR 法により判定した。なお、図 2 にはそれぞれの系統に特異的なプライマーを用いて、ササニシキ、S-C、及び AS-D の花粉から抽出した DNA を鋳型に PCR を行った結果を示した。

このように、S-C 系統特異的プライマーで増幅した場合、S-C 特異的な遺伝子が S-C 系統のみで検出（矢印の位置に増幅したバンド）されるが、AS-D およびササニシキでは検出されない。また同様に、AS-D 系統特異的プライマーで増幅した場合は、AS-D 特異的な遺伝子が AS-D 系統のみで検出（矢印の位置に増幅したバンド）されるが、S-C およびササニシキでは検出されない。このような方法により、回収した花粉の検定を行った。

図 3, 4 には、花粉トラップを設置した場所を示した。花粉トラップは、隔離圃場内の試験区内の防鳥網の内側（番号 1～6）、隔離圃場内の試験区外の防鳥網の外側（番号 7～15）、及び、近隣の研究圃場（図 4 の番号 4, 5）、一般圃場（図 4 の番号 1, 2, 3, 6, 7, 8）の計 22 箇所を設置し、開花時の 8 月 5 日～8 日にかけてサ

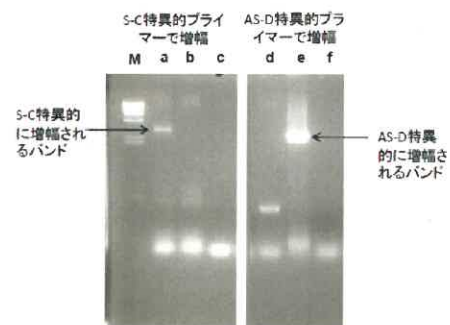


図2
M: マーカー
a: 組換えイネS-C
b: 組換えイネAS-D
c: 非組換えイネササニシキ
d: 組換えイネS-C
e: 組換えイネAS-D
f: 非組換えイネササニシキ

ンプリングを行い、検定を行った。

表1には、8月5日～8日に採取し、検定した結果の合計を示した。組換えイネを栽培した隔離圃場内の試験区の防鳥網内では、組換えイネの花粉が検出された。栽培した組換えイネからもっとも近くに設置した1.2 mでは、5～19.5%と花粉の飛散が最も多く検出された。また、防鳥網内の5.5、7.5 m地点においても、僅かではあるが検出された。しかし、防鳥網外の設置箇所では、飛散した花粉数は少なかったものの、組換えイネの花粉は検出されなかった。また、隔離圃場外の近隣の研究圃場、ならびに一般圃場付近にも花粉トラップを設置し、検定を行ったが、組換えイネの花粉は検出されなかった。なお、花粉サンプル数が設置場所によって異なるのは、設置場所によって、採取できたイネの花粉と思われた花粉数が異なっていたためである。特に、隔離圃場周辺で栽培されていたイネの開花は終了し、周囲で開花しているイネがほとんど無かったため、イネの花粉数は少なかった。また、この期間は、ほとんど風がなく（平均風速1.3 m/s以下）、花粉の飛散はあまり認められなかったためと思われる。

来年度以降も花粉飛散調査、交雑試験を行うことを計画しているが、来年度は、花粉トラップの設置場所、位置（高さ）、また調査を行う花粉がイネ由来であるのか否か？トラップした花粉の総量（単位面積当たりの花粉数）調査、また、今年度の交雑試験は0.9～1.2 mの範囲で行ったが、来年は規模を広げるなどの検討も加え、実施することを計画している。

図 3

花粉の飛散状況の確認に関する、花粉トラップ設置位置（隔離圃場内外）
 隔離圃場内設置位置

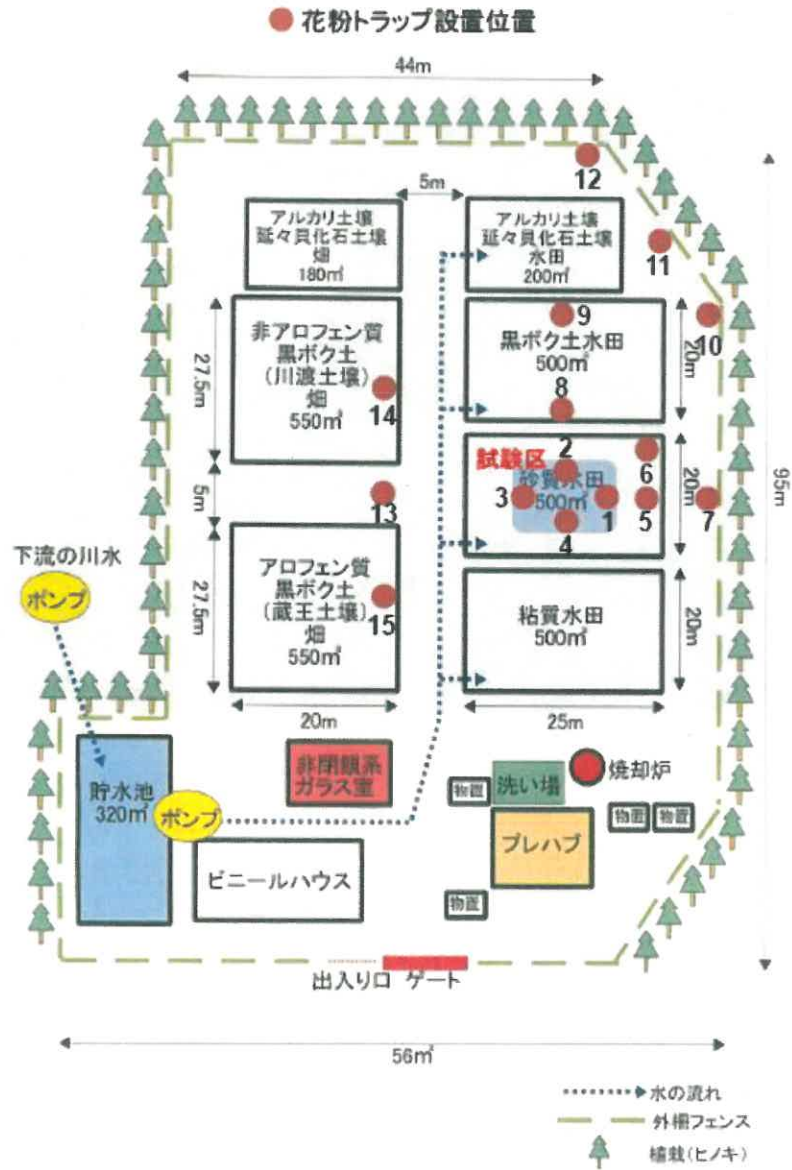


図4

隔離圃場外

設置位置は 7 箇所。図中の×1~7。隔離圃場から、花粉トラップ設置位置までの距離を左に示す。

- 1=794.7m
- 2=826.3m
- 3=861.2m
- 4=905.3m
- 5=931.6m
- 6=984.7m
- 7=438.8m



表 1

隔離圃場内での花粉飛散試験の結果				
設置番号	栽培区からの最短距離 (m)	検出された組換えイネの花粉サンプル数 ^a		%
1	1.2	12/100		12
2	1.2	23/120		19.2
3	1.2	5/100		5
4	1.2	18/92		19.5
5	5.5	1/65		1.5
6	7.5	8/80		10
7	16.5	0/50		0
8	10	0/60		0
9	30	0/40		0
10	33	0/20		0
11	35	0/17		0
12	43	0/23		0
13	15	0/11		0
14	20	0/28		0
15	20	0/8		0
隔離圃場外での花粉飛散試験の結果				
設置番号	栽培区からの最短距離 (m)	検出された組換えイネの花粉サンプル数 ^a		%
1	795	0/55		0
2	826	0/43		0
3	863	0/30		0
4	305	0/100		0
5	332	0/100		0
6	395	0/39		0
7	437	0/45		0
a: 検出された組換えイネの花粉のサンプル数/検定を行ったサンプル数				

2. 交雑試験

組換えイネを栽培した隔離圃場内の試験区で、組換えイネの周囲に野生型ササニシキを栽培し、組換えイネから飛散した花粉が、周囲のササニシキと受精して交雑したか否かを検定した。

方法

組換えイネに隣接して（組換えイネ栽培試験区から30、60、90 cmの距離）栽培した非組換えイネ・ササニシキから種子を距離毎に収穫した。収穫した種子から、距離毎にランダムに約3,500粒を抽出し、殺菌処理した後、約100粒ずつ50 mg l⁻¹のハイグロマイシンを含む MS 培地に播種した。播種後、28°Cの気象器で 18日間育成し、組換えイネと同様の生育を示したものを生存数として数えた（参考資料1参照）。

結果

交雑検定の結果を表 2 にまとめた。組換えイネから 0.3 m 離れた箇所に植えた非組換えイネから収穫した種子には、約 1.3%の割合で交雑していることが確認された。なお、距離が離れるに従って、交雑率は減少し、0.9 m の地点では 0.057%とその割合は低かった。0.3 m 地点で 1.3%という割合で検出されたのは、0.3 m の距離では開花しているイネ同士が接触していたことも交雑した原因の 1 つと考えられた。

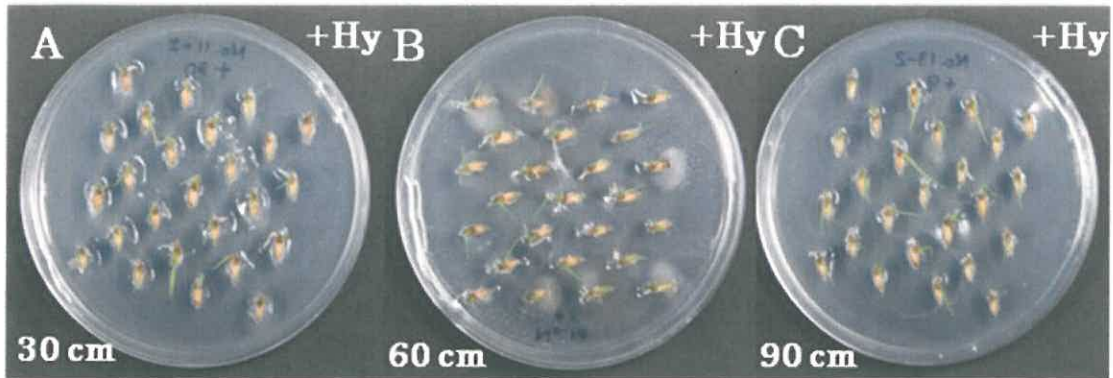
表 2

組換えイネから距離(m)	ハイグロマイシン耐性イネ/検体数	%
0.3	47/3500	1.3
0.6	12/3500	0.34
0.9	2/3500	0.057

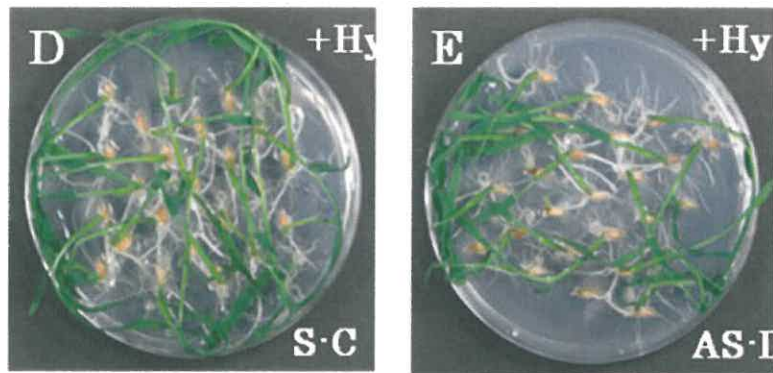
以上の結果から、隔離圃場内の試験区で栽培した組換えイネの花粉が、試験区の防鳥網の外に飛散し、周囲のイネと交雑した可能性は極めてゼロに近いと考えられた。

参考資料 1

非組換えイネの種子のハイグロマイシン添加培地での生育



組換えイネの種子のハイグロマイシン添加培地での生育



非組換えイネの種子のハイグロマイシン無添加・添加培地での生育

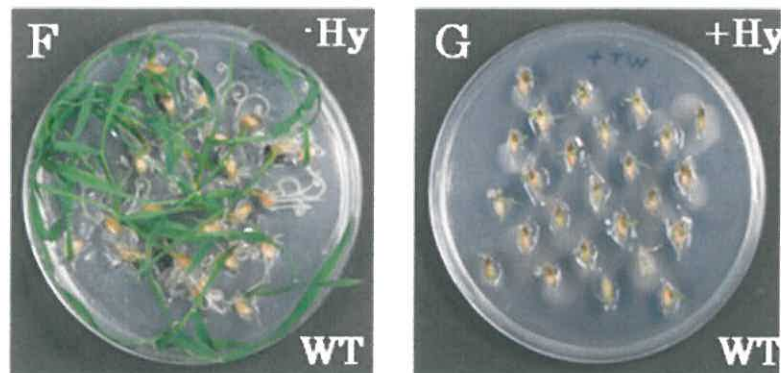


図2 組換えイネから30 (A)、60 (B)、90 cm (C)離して栽培した非組換えイネから収穫した種子を、ハイグロマイシン添加培地で栽培した生育の様子。また対照区として、組換えイネ (S-C、AS-D) を同じハイグロマイシン添加培地で栽培した様子 (D、E)、および非組

換えイネをハイグロマイシン無添加培地 (F)、添加 (G) で栽培した様子。