

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580006

研究課題名(和文) イネの新規除草剤抵抗性遺伝子を利用したGM作物に関する教育キットの作成

研究課題名(英文) Production of the 'teaching materials kit' about the GM crops using a novel herbicide resistance gene of rice

研究代表者

中崎 鉄也 (Nakazaki, Tetsuya)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60217693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え(GM)作物に対する合理的判断を促すためには具体的教材の活用が有効であるとの視点から、新規除草剤抵抗性遺伝子を用いた教材キットの作成のための基礎的知見の集積を目指して遺伝学的研究を行った。連鎖解析によって新規除草剤抵抗性遺伝子の有力な候補遺伝子座を特定する等の成果を得た。また、NBTを含めた最新知見についてGM作物に関する講義を行った後に、GM作物に対する意識調査を実施した。その結果、GM作物について合理的判断を促すための教材キットの重要性が確認されるなどの成果が得られ、さらに、NBTに関する最新の知見を考慮に入れて教材キットの内容を再検討する必要があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study I aimed at the accumulation of the basic knowledge for making of the 'teaching materials kit' using a novel herbicide resistance gene from a viewpoint that the making of the concrete teaching materials was effective to deepen the scientific understanding about the genetically-modified (GM) crops and to promote the rational judgment for the GM crops. To achieve the purpose I accomplished genetic analysis and valuable results such as identifying a single promising candidate gene of the new herbicide resistance gene were obtained. Attitude surveys relating to the reception of GM crops after the lecture about the GM crops for university undergraduates was carried out. By this survey, the importance of the kit to promote a rational judgment about the GM crops was confirmed. It was also revealed the necessity to reexamine the contents of the kit with regard to the latest knowledge about NBT (New plant Breeding Techniques).

研究分野：育種学

キーワード：除草剤抵抗性 GM作物 イネ (*Oryza sativa* L.) 遺伝子単離

1. 研究開始当初の背景

(1) GM作物の栽培面積は年々増加し、2010年には世界全体の耕地面積の1割に相当する約1.5億haに達し、栽培国は29カ国に及ぶとされている (ISAAA 2011)。一方、わが国では、安定した食糧供給を達成するための方法としてGM作物の活用が期待される反面、その栽培が消費者の大きな反発を誘発する現状にある。この反発の原因の一つに、未知なものに対する本能的な不安感に由来する拒絶反応が挙げられる。しかし、科学的な安全性評価や環境影響評価を経たGM作物を我が国で栽培することの是非の判断は、科学的知見に基づく冷静な議論の結果なされることが社会全体にとっての利益となる。したがって、GM作物に関する研究は、消費者心理に応えるための更なる技術革新を目的とすることも重要であるが、GM作物の利用に関するリスクコミュニケーションにおいても研究者が積極的に関与して関連研究を進めることが肝要である。GM作物利用に関するリスクコミュニケーションを行う際には、遺伝子や遺伝子機能あるいは育種操作一般についての基礎的事項を解説することが基本的なステップとして重要となる。しかし、そのような概説よりも、生活の中で関わりの深い事項、例えば、普段食べているお米の違い、イネ品種間の差異や水田での稲作に関わる事項を題材とした直感的に把握できる教材を用いることの効果は極めて大きいと考えられる。

(2) 研究代表者は、研究開始前に、イネ品種間において、ある種の除草剤に対する抵抗性程度に遺伝的差異があり、その差異がこれまでに知られていない1遺伝子によって支配されていることを強く示唆する結果を得た (未発表)。この遺伝子の有無による表現型の差異は容易に検出でき、質的形質として取り扱うことができる。したがって、この遺伝子は、遺伝子組換え操作の際の選抜マーカーとして利用しうる可能性があり、新たな遺伝子組換えツールとして確立することを目的として研究を進めていた。一方で、上記のGM作物に関するリスクコミュニケーションを考えた場合、一般的イネ品種が保有する除草剤抵抗性遺伝子は有用な教材の基本材料となりうる。即ち、一般的イネ品種間で除草剤抵抗性が異なることを観察した後に、その差異が1遺伝子の違いに起因することを解説することによって、抵抗性遺伝子によって除草剤耐性形質が付与されるという現象についての直感的理解を促すことが可能になると考えられる。そこで、品種間比較だけでなく、本課題の除草剤抵抗性遺伝子を形質転換によって導入して抵抗性が增强された系統や Arabidopsis 等の他の植物種に本課題で取り扱う遺伝子を導入した事例等を含め、展示キットを作成し、リスクコミュニケーションを行う際のツールとなるGM作物教育キット

を構築することを着想した。

2. 研究の目的

(1) 世界的にみると遺伝子組換え作物 (GM作物) の栽培面積は急速に拡大しているが (ISAAA 2014) わが国の農業現場においては未だ全く利用されていない。この状況を生じさせている原因の一つは、社会全般において“分子遺伝学的技術を用いて導入された、作物には本来存在しない『遺伝子』”に対する漠然とした不安感が払拭されず、議論の土台となるべき科学的理解が進んでいないことにある。この問題を克服するためには、一般市民へのリスクコミュニケーションを進めることが不可欠であり、その際には、教材の適切な選定が重要となる。すなわち、「GM作物教育キット」(展示用系統群：展示キット)の活用が有用であると考えられる。

(2) 上記の点を踏まえ、本研究課題では、「GM作物教育キット」に利用する遺伝子として、一般的なイネ品種が保有する除草剤抵抗性遺伝子を新規に単離し、それを利用することを目指した。また、大学学部学生のGM作物に対する意識の有様について調査を行い、展示用系統群の利用にあたって考慮すべき事項に関する情報の収集を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規除草剤抵抗性遺伝子の単離を進めるにあたって必要な除草剤抵抗性の表現型調査方法について検証を行った。本課題で扱う除草剤抵抗性の品種間差異は、生育のごく初期に特定濃度の薬剤を処理した場合、抵抗性型品種は正常に生育するのに対して、感受性型品種は伸長を停止して枯死するという形で表れる。薬剤濃度がその特定濃度より低い場合にはいずれの品種も正常に生育し、より高い場合にはいずれの品種も枯死する (図1)。従前の研究結果から、これまでの解析に用いたチオカ・バメ・ト系除草剤の薬剤 (Sigma-Aldrich 社) の $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 濃度の処理区において、品種間の反応の差異が顕著であり、分離集団においてもこの処理区の表現型によって抵抗性、感受性が判定できることが示唆されている。この状況を踏まえ、抵抗性形質の有無を判定する処理濃度について、詳細な検討を行った。

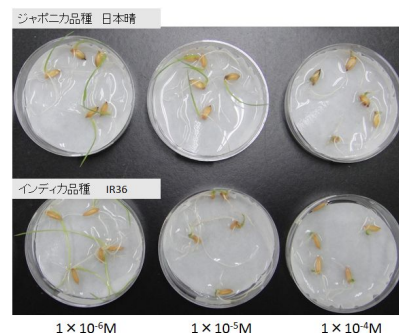


図1. 除草剤処理後の植物体..

(2) 新規除草剤抵抗性遺伝子の単離に向けて連鎖分析を行った。供試材料として、IR36 と熱研 1 号の交雑後代から作成された RIL (組換え自殖系統、Recombinant inbred line) 間の交雑 F₂ 個体およびそれらに由来する個体別 F_{2:3} 系統を用いた。この分離集団は、初期の解析に用いた RIL の中から感受性型親品種と似た外観形質を示し、かつ、抵抗性型である系統を選び、これを感受性型の親品種に戻し交配して得たものである。従前の結果では、本実験で N2 と名付けた染色体 1 上の SSR 座が最近傍であるとされていることから、IR36 と熱研 1 号間で多型を示す、N2 近傍の SSR 座マーカー N4、N22、N3、N8 および N12 を主対象として調査を行った(図 4)。さらに、分離集団による調査結果に基づいて目的とする新規除草剤抵抗性遺伝子領域の絞り込みを行い、多型調査によって候補遺伝子の特定作業を実施した。また、極最近、Saika et al. (2014)によって報告された染色体 1 に座乗する除草剤抵抗性遺伝子、Cytochrome P450 (CYP72A31) 遺伝子との異同を調査した。

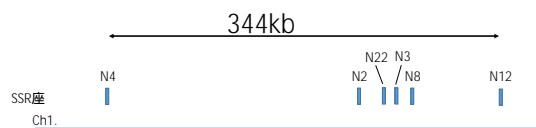


図 2. 従前の研究から予想される除草剤抵抗性遺伝子周辺の SSR 座および推定遺伝子。

(3) 京都大学大学院附属農場において 2014 年度に実施された大学コンソーシアム京都授業「食卓の栽培学と実習」および京都大学農学部授業「栽培技術論と実習 II」内の講義において GM 作物の栽培・利用の現状、GM 作物の導入遺伝子の由来・機能および NBT (New plant Breeding Techniques) の技術的進展について概説し、その後 GM 作物に対する各人の受け止め方に関する調査を授業のレポートの形で実施した。その結果から、「GM 作物教育キット」の利用にあたっての留意すべき点の抽出を試みた。

4. 研究成果

(1) 従前の解析結果から、10⁻⁵M 処理区において抵抗性と感受性の表現型が明瞭に区別できると考えられたことから F₂ 世代を用いた解析を進めたところ、供試系統によっては 10⁻⁵M 処理区において、無処理と同程度の生育状況、あるいは、ほぼ生育が阻害される状況のいずれかに分類することのできない中間的な生育阻害程度を示すものが散見された。遺伝子の単離には、供試個体が抵抗性か感受性かを識別することが必要であるので、この表現型の識別を可能とするより詳細な処理条件の検討を行うことが必要であることが判明した。そこで、IR36 と熱研 1 号を供試して、処理による生育障害の程度の達観

調査の妥当性について確認を行った。すなわち 1×10⁻⁶M から 1×10⁻⁴M の濃度範囲における生育状況を調査すると共に、草丈を調査した。その結果、期待される通り 2 品種間で除草剤に対する反応に差異が検出されたが、従前の調査に用いた 1×10⁻⁵M 処理区よりもその 2 倍濃度の処理区において顕著な品種間差異が観察された。その差異が認められる範囲は 0.2×10⁻⁴M から 0.5×10⁻⁴M であった。これらの結果を基に、以降は 0.2×10⁻⁴M 処理区の達観調査によって行うことができることが明らかになった。また、0.5×10⁻⁴M 処理区の状態を勘案することでより精度が上がる事が判明した。これらの結果は、抵抗性遺伝子の作用が質的形質として取り扱えることを示しており、適切な選択培地上においてこの遺伝子の有無を区別することが可能であることが示唆された。結果の一例を図 3、図 4 に示す。

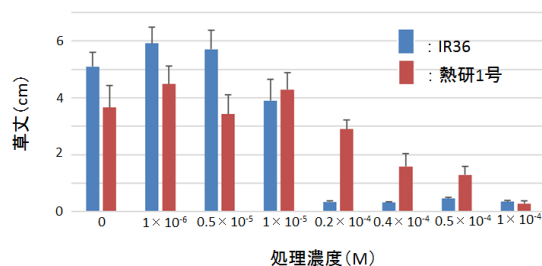
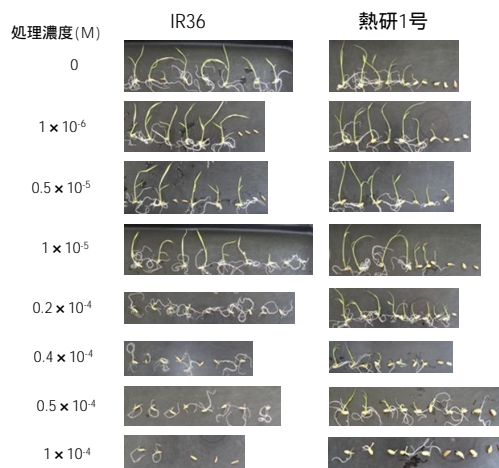


図 3. 除草剤処理の濃度に対する草丈の品種間



の反応の差異。

図 4. 各除草剤処理濃度反応の検証における植物体生育状況の事例。

(2) 分離集団を用いて抵抗性表現型形質と SSR マーカー座との連鎖分析を行った。その結果、調査した種子親の表現型が抵抗性強および抵抗性弱で固定していると判定されたものがそれぞれ 51 個体および 48 個体検出された。それら個体において、N2 を除く SSR 座の遺伝子型が表現型と対応しないものがいくつか見いだされたのに対して、抵抗性強および抵抗性弱それぞれの個体において N2 の遺伝子型が IR36 型および熱研 1 号型であるものは観察されなかったことから、目的とする新規除草剤抵抗性遺伝子は N2 の座乗置

の極近傍に座乗するものと推察された。この結果を踏まえ、該当染色体領域がヘテロの個体 2 個体の次代を用いて遺伝子型と抵抗性表現型を示した個体の遺伝子型を調査したところ、N4 と N2 の遺伝子型が IR ホモ型であるものが 2 個体見いだされた。これらの観察結果から、目的とする遺伝子座は、N2 と N22 の間に座乗すると推定された。さらに、イネのゲノム情報から、N2 と N22 の間に推定される遺伝子は 1 遺伝子のみであることから (図 5) この遺伝子が有力な候補遺伝子であると考えられた。

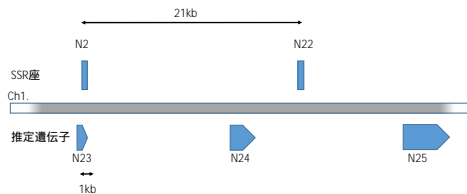


図 5 . N2 と N22 近傍の推定遺伝子の座乗位置の概略.

(3) N2 と N22 近傍の 3 座の推定遺伝子 (図 5) について日本晴と Kasalath の配列を比較したところ、いずれの座においても塩基長多型が見いだされたのでそれらを検出するプライマーを用いて IR36 と熱研 1 号間での多型を調査した。その結果、N25 では日本晴-Kasalath 間と同様の多型が観察され、N23 では期待される増幅断片長とは異なるものの塩基長多型が観察されたのに対して、N24 では IR36、熱研 1 号とも Kasalath に類似の泳動シグナルを示し、明瞭な多型性は観察されなかった。また、該当染色体領域がヘテロの個体の次代における N23 と N25 の遺伝子型は、SSR 座の遺伝子型に対応していた。すなわち、N24 で認識される日本晴-Kasalath 間多型は、除草剤抵抗性に関連しないことが判明した。

(4) 多様なイネ品種を用いて、N2、N22 の遺伝子型を調査したところ、これら SSR 座は複数のアレルが存在していたことから (図 6) 多様な品種間の比較に両 SSR 座を用いることは適切ではないことが明らかになった。一方、N25 の調査では、除草剤抵抗性弱と判定できた 10 品種は例外なく Kasalath 型と考えられる泳動シグナルを示し、除草剤抵抗性強と判定できた 19 品種では、NS27 (KetanNangka) と NS29 (Bamten) を除く 17 品種はいずれも日本晴型の泳動シグナルを示した。NS27 と NS29 の除草剤抵抗性程度と N24 の泳動シグナルは、熱研 1 号と同様の関係であった。これらのことから、N24 の染色体領域にある遺伝子が目的とする除草剤抵抗性遺伝子であれば、抵抗性アレルとして、少なくとも熱研 1 号型と日本晴型の 2 種のアレルが存在するものと考えられた。

(5) 本研究で目的とする除草剤抵抗性遺伝子が座乗する染色体 1 には、極最近、Saika et

al. (2014) によって除草剤、ピスピリバックの抵抗性遺伝子、Cytochrome P450 (CYP72A31) 遺伝子が報告された。この遺伝子は、本実験で取り扱う抵抗性とは逆に、インディカ型アレルが抵抗性を示すが、その点のみでは遺伝子座の異同は判定できないため、日本晴と Kasalath の配列情報を基に多型領域を増幅するプライマーを作成し (N26)、分離分析に供試した系統を用いて、遺伝子型を調査し、本研究の抵抗性表現型との対応を解析した。その結果、分離集団においては、N26 によって判別される遺伝子型と抵抗性の表現型との間に共分離は認められず、本研究で目的とする除草剤抵抗性遺伝子と CYP72A31 遺伝子は異なることが明らかとなった。本研究の結果、日本型イネ品種が保有するチオカ - パメ - ト系除草剤に対する抵抗性の有力な候補遺伝子を特定することができた。この研究成果については本研究で行った残余の成果および引き続き行う今後の解析データと合わせ、しかるべき時期に詳細に公表することとした。

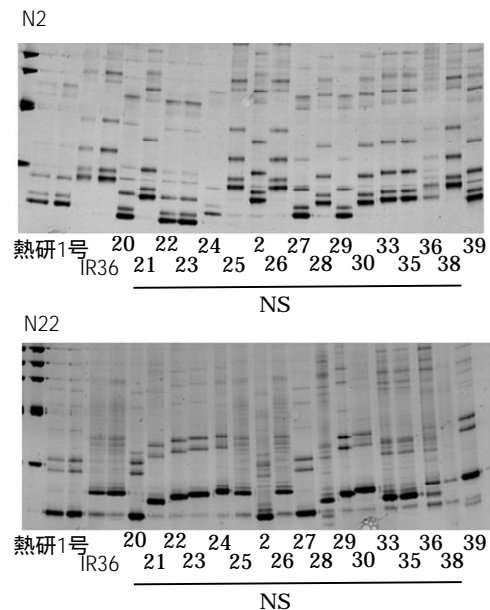


図 6 . 多様なイネ品種における N2 (上) と N22 (下) の増幅産物の泳動像。各図の下の数字は本研究で供試した系統記号 NS の系統番号である。熱研 1 号と IR36 はそれぞれ 2 レーンずつ泳動されている。

(6) GM 作物の栽培・利用の現状、GM 作物の導入遺伝子の由来・機能および NBT の技術的進展について概説したのちに、GM 作物一般に対する受け止め、および、NBT の一つであるシスジェネシスによって育成される仮想のイネについて設問を設け、複数大学の学部学生に回答を求めてその傾向について考察した。シスジェネシスによる品種育成に関しては文系学生 (30 人) が農学部学生 (21 人) に比べてより抵抗感をもつ傾向が確認できた。つまり、遺伝子組換え技術への理解度

が高ければ、遺伝子組み換え作物に対する抵抗性が低下することが伺える結果が得られた。また、文系学生は遺伝子組換え技術に関して学んだ後も、遺伝子組換え作物に抵抗があると答える場合が多く、その理由は「何となく」や、食品としての安全性が完全に保証されないことであった。また、農学部学生は遺伝子組換え技術に対する理解度は高いが、遺伝子組換え作物の栽培方法や食品としての安全性に関する検証は十分でないと考えていた。これらのことは、講義による概説では理解を深めるには十分ではないことを裏付けるものであると同時に、本研究の開始以降に知られるようになった NBT の適用によって作出された植物体の理解を促すためには、「GM作物教育キット」の内容について再検討する必要があるものと考えられた。

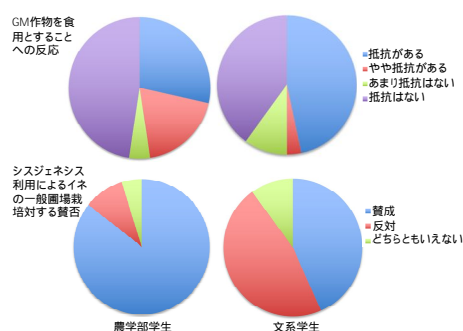


図 7. GM 作物に関する講義を行った後の GM 作物に対する複数の大学の学部学生の反応調査の結果.

< 引用文献 >

一前宣正、イネとタイヌビエの Benthocarb に対する感受性差異ならびに生育反応に関する研究、京都大学博士学位論文、1979

ISAAA、Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011.
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/>

ISAAA、Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014、
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/>

Saika, H., J. Horita, F. Taguchi-Shiobara, S. Nonaka, A. Nishizawa-Yokoi, S. Iwakami, K. Hori, T. Matsumoto, T. Tanaka, T. Itoh, M. Yano, K. Kaku, T. Shimizu and S. Toki, A novel rice cytochrome P450 gene, CYP72A31, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and Arabidopsis, *Plant Physiol*, 166, 2014, 1232-1240

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

浦丸公猛・築山拓司・井上國世・寺石政

義・中崎鉄也・谷坂隆俊・奥本裕、イネの成長・生育における ABA 応答性キチナーゼ CHT11 の役割. 2013 年 3 月 27 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中崎 鉄也 (NAKAZAKI, Tetsuya)
 京都大学大学院・農学研究科・准教授
 研究者番号: 60217693

(2) 研究協力者

山岡 香 (YAMAOKA, Kaoru)
 中崎 淳子 (NAKAZAKI, Akiko)