

## 供試材料

*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey. (EP-13)の種子を用いた。種子は、平成16年7月7日に筑波試験場内の圃場(2箇所)及び標本園に植栽された株から成熟果実のみを収穫し、果肉を除去して調製した。

種子の採取場所は、マオウ園に隣接した15番畑(ここで採取した種子を便宜的に圃場Aとする)、マオウ園から約50m離れた10番畑(圃場B)、本館を挟み約400m離れた場所にある標本園(標本園)であった。なお、親株試料は、15番畑(親株・圃場A)及び標本園(親株・標本園)から生植物を採取した。

## 発芽試験

蓋付きプラスチック製容器に蒸留水で湿らせたろ紙を敷き、種子を配置した。発芽条件は、20℃で12時間明暗条件に設定された恒温器内で養生した。

## 鋳型DNAの調製

発芽、展開した子葉または親株から採取した生植物をDNAの抽出材料とした。DNAの抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い、鋳型DNAを調製した。

## RAPD分析

RAPD分析に用いたプライマーは、現存する必須タンパク質のアミノ酸配列を逆翻訳する方法(アルファ法)でデザインされたコモンプライマーからプライマーセットA00-A09(BEX Co. Ltd.)を選び使用した。PCRの条件は、*Ex Taq* HS (TaKaRa)を用い、PCR法の反応条件は、(94℃で2min)×1(94℃で20sec, 37℃で30sec, 72℃で1min)×40, (72℃で7min)×1であった。アガロースゲル電気泳動の条件は、1%アガ

ロースゲル, 1×TBE緩衝液を用いて100V, 45分間泳動した。

## C. 研究結果

表1ではEP-13系統果実の収穫概要と発芽率を示した。マオウ園に隣接した圃場Aでは、成熟した果実は、圃場B及び標本園に比べ明らかに多かった。圃場B及び標本園では、開花後、果実の形成は見られたが成熟過程で落果するものが大半であった。

発芽試験では、圃場Aについては、50粒2反復、圃場Bが46粒1回、標本園では27粒1回の条件で測定した。発芽率は、圃場Aが68.0%, 圃場Bが40.7%, 標本園が52.2%であり、これらの種子は概ね50%前後の発芽率を有することが明らかになった。

発芽試験で得られた子葉から鋳型DNAを調製し、RAPD法によるF1種子の雑種検定を行った。検体は、各区2検体ずつ無作為に選んだ。

分析条件を決定するために10種のプライマーA00からA09を用いてPCR法を行いプライマーの検索をした。

その結果、プライマーA06が本実験の条件に適合することが示された。図ではそのアガロースゲル電気泳動によるRAPDマーカの泳動像を示した。この泳動像についてNIH Imageを用いて画像解析を行った結果、再現性が高いRAPDマーカとしてFR-01-08の8種が得られ、さらにEP-13系統とそのF1種子についてDNAタイピングができることが示された(表2)。

レーン1は圃場Aに植栽されたEP-13系統、レーン2は標本園のEP-13系統の泳動パターンである。これら親株のDNAタイプは、共通

した RAPD マーカー FR-05 及び 07 が確認され、親株が同一系統であることを再確認し、さらにこの RAPD 分析は再現性があることを示した。

レーン 3-8 は、F1 種子の泳動像である。これらには、親株である EP-13 系統には存在しない RAPD マーカー FR-01-04, 06 及び 06 を見出し、親株とは明らかに異なる DNA タイプを示した。検体 5-8 では、親株で見出した FR-05 または 07 の RAPD マーカーが含まれていた。

#### D. 考察

筑波試験場に保存される EP-13 系統は雌株であるが、これに対応する同系統の雄株は保存されていない。しかし、圃場 A, 圃場 B 及び標本園の株から採取した成熟果実の種子には高い発芽能力が確認され、発芽率は概ね 50% 程度であった。この結果は、(1) マオウ属植物は単為結果する可能性、(2) 同属他系統の雄株由来の花粉が受粉した可能性の 2 通りが考えられる。

マオウ属植物が単為結果するならば植栽位置に関係なく、同程度の成熟果実が得られると思われる。しかし、実際は、マオウ園に隣接した圃場 A では成熟果実が多く観察され、一方、マオウ園から離れた圃場 B や標本園では多くの果実が未成熟のうちに落果している。従って、マオウ属植物が単為結果する可能性は極めて低く、むしろマオウ園に隣接する圃場 A では成熟果実の割合が高いことから、他系統の花粉が受粉した可能性が高いと思われた。

RAPD マーカーを指標とした解析では、親株由来の FR-05 及び 07 のマーカーに着目す

ると、各検体にはいずれかのマーカーが含まれている。例外的に圃場 A の検体には、FR-05 及び 07 を見出せなかったが、圃場 A の検体では特徴的な FR-06 マーカーが存在した。

FR-05 マーカーと FR-06 マーカーは、非常に近接したバンドであることから、生殖成長期の交雑過程で DNA に何らかの欠損、縮合が生じ、結果的に FR-05 マーカーの代わりに特異的な FR-06 マーカーが出現したと推定できる。従って、親株である EP-13 系統の FR-05 及び 07 マーカーのいずれかは、F1 世代（種子）に引き継がれることが強く示唆された。さらに F1 種子において多様な DNA タイプを示したことは、EP-13 系統と外来 DNA との交雑があったことを示唆した。

#### E. 結論

圃場及び標本園で見出した EP-13 系統雌株に生じた成熟果の種子は、50% 程度の発芽能力があることが明らかになった。RAPD 分析による F1 種子の雑種検定を行った結果、F1 種子には外来 DNA の存在が確認され、マオウは同属他系統の植物と交雑することが示唆された。

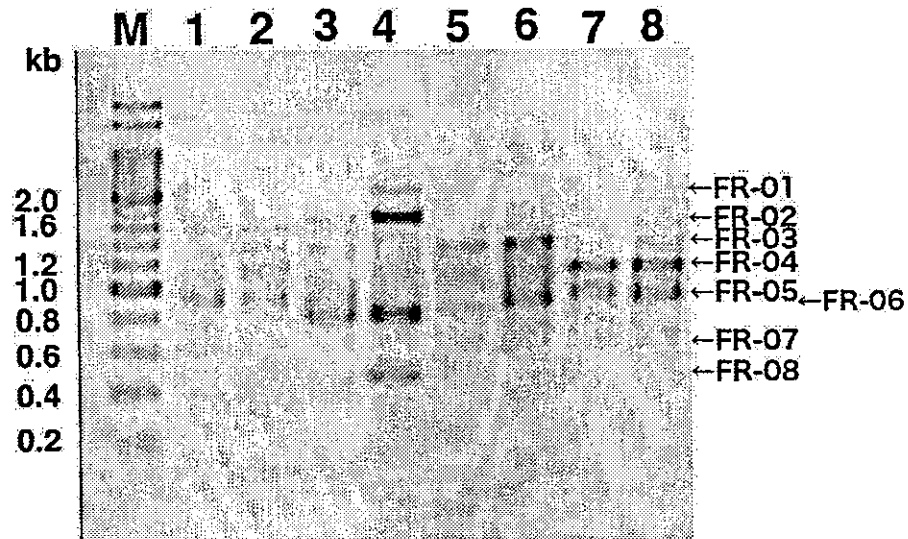


図 プライマーA06を用いたRAPDマーカの検出  
 Lane 1 : 親株 (圃場A) , 2 : 親株 (標本園) , 3&4 : F1種子 (圃場A) , 5&6 : F1種子 (圃場B) , 7&8 : F1種子 (標本園)

表1 マオウ (Ep-13) 由来の果実収穫概要と種子の発芽率

	採取した場所		
	圃場A	圃場B	標本園
採取株数	112	3	2
果実数	1120	18	29
1株当たりの平均果実数	10.0	6.0	14.5
1株当たりの最大果実数	42	10	22
成熟果実の割合	++	+	+
発芽率 (%)	68.0	40.7	52.2

成熟果実の割合:

「+」・・・大半の果実は成熟しないが、一部に成熟果実が認められた。

「++」・・・成熟果実は多いが、一部に成熟しない果実がある。

「+++」・・・成熟果実が非常に多い。

表2 RAPDマーカーによるマオウ (EP-13) 由来F<sub>1</sub>種子のDNAタイピング

RAPDマーカー	親株		F <sub>1</sub> 種子					
	A	G	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8
FR-01	-	-	-	+	-	-	-	-
FR-02	-	-	+	+	-	-	-	-
FR-03	-	-	+	-	+	+	-	-
FR-04	-	-	-	-	+	-	+	+
FR-05	+	+	-	-	-	+	+	+
FR-06	-	-	+	+	+	-	-	-
FR-07	+	+	-	-	+	-	+	+
FR-08	-	-	+	+	-	-	-	-

+ : RAPDマーカーあり, - : なし.

上段のA, B及びGは, サンプルの採取場所を示し, 添字は検体番号. A : 圃場A, B : 圃場B, G : 標本園. 数字は, 電気泳動像のレーン番号に対応する.

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

組換え植物の作出に関する研究及び生態系に及ぼす影響解析

分担研究者 鎌田 博

所属・職 筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授

研究要旨

有用2次代謝物の生産性の効率化あるいは新規2次代謝物の生産を目指す遺伝子組換え薬用植物の育成が進められていることから、その実用化に際して避けて通ることができないカルタヘナ担保法に基づく環境影響評価を実施するための方策を検討するため、ベラドンナをモデル材料とし、日本産毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) を用いた形質転換を行い、多数の毛状根クローンを誘導するとともに、この毛状根から多数の再分化個体（遺伝子組換え体）を育成した。現在、この植物体を鉢に植えだして順化しており、次年度には、特定網室での栽培、隔離圃場栽培を行い、花粉飛散性、交雑性、他植物への影響、土壌微生物への影響等の環境影響評価を実施する予定である。また、環境影響評価項目の設定とデータの取得・解析方法を検討するため、ベラドンナおよびニンジンモデル材料とし、生態特性や遺伝子多様性について調査を行った。ベラドンナにおいては、花粉の寿命、花粉を媒介する主たる昆虫の同定、自殖性の程度、AFLP法に基づく遺伝子多様性の解析を行った。また、ノラニンジンについて、生態特性（生息域、繁殖特性等）や虫媒性・交雑性・集団間での遺伝子多様度の相違等に関するデータを取得・解析した。

A. 研究目的

1970年代半ばに開発された遺伝子操作技術の発展に伴い、高等植物においても、自然の遺伝子組換え現象である *Agrobacterium* 菌を活用した遺伝子導入法が一般化し、各種植物において有用遺伝子組換え体が育成され、その商業栽培が世界規模で急拡大するとともに、食品や医薬品生産への利用も増大している。このような状況の中で、各種薬用植物が生産する多様な有用2次代謝物の合成酵素遺伝子が単離されつつあり、当該遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物の育

成が進められており、2次代謝物生合成経路の解明ばかりでなく、有用2次代謝物の効率的生産や新規化合物の生産を目指した研究も活発に行われるようになってきた。

一方、多種多様な遺伝子組換え生物の開発・利用に伴い、食品・医薬品としての安全性ばかりでなく、環境への影響についてもさまざまな議論・検討がなされるようになり、有用生物資源の維持および持続的な活用を目的とした生物多様性条約の中で、遺伝子組換え生物の国境を越える移動に関する国際条約（カルタヘ

ナバイオセーフティ議定書)が締結され、我が国においても平成15年3月にその担保法としての遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(通称、カルタヘナ担保法)が制定され、平成16年2月に施行された。

このような国内外の情勢に鑑み、開発が進められつつある遺伝子組換え薬用植物についても、効率的かつ安全性の高い育成技術の開発ばかりでなく、環境への影響を調査・検討する研究を実施する必要性が生じた。そこで、本研究では、ベラドンナを中心に、*Agrobacterium* 菌を用いた遺伝子組換え植物育成技術の開発を進めつつ、環境への影響評価を実施する際に必要となる評価項目の検討・設定ならびにデータの取得方法・解析方法を検討することとした。

## B. 研究方法

### 1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

ベラドンナを主な材料とし、毛根病菌(*Agrobacterium rhizogenes*)を感染させて毛状根を発生させ、個々の毛状根クローンから組織培養技術を用いて植物個体を再生させ、遺伝子組換え薬用植物(ベラドンナ)を得る。この遺伝子組換え体は自然界でも生じるものであるため、カルタヘナ担保法上の規制は受けないが、モデルケースとして取り扱うため、同法上の取り扱いに則って実験室内で栽培し、生理特性解析や2次代謝物(トロパンアルカロイド)の定性・定量分析等を行う。その後、カルタヘナ担保法で定められている特定網室における自然光下での栽培試験を行い、その特性解析、土壤微生物

相への影響、花粉飛散性・虫媒性、他植物との交雑の可能性、他植物の生育への影響(アレロパシー試験)等、カルタヘナ担保法上の第1種使用(封じ込め措置を取らずに行う使用)の申請の際に求められる環境影響評価項目について、データの取得とデータ解析手法を検討する。最終的には、自然界でも生じうるものであることから、大臣承認は必要としないものの、環境影響試験圃場において隔離圃場栽培試験を行い、法律上定められている項目について環境影響評価試験をモデルケースとして実施する。なお、実験室内試験、特定網室試験、隔離圃場試験は段階を追って実施する必要があるため、各試験の実施状況により、次の段階の試験を実施する時期を随時調整する。

### 2. 環境影響評価項目の検討

3年の限定された期間内に、有用遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物を実際に作出し、特定網室試験を経て隔離圃場試験を実施し、環境影響評価を実施することは不可能なことから、生態特性解析や遺伝子多様性解析を以前より進めているニンジン(*Daucus carota*)および薬用植物のモデルとして栽培が容易なベラドンナを材料とし、非遺伝子組換え植物の生態特性(生息地や生育特性、繁殖特性、他種植物との競合性等)、花粉飛散性(風媒性、虫媒性等)、交雑特性、遺伝子多様性等、環境影響評価を実施する際に必要となる各種項目について調査し、基盤となるデータの蓄積およびデータ解析手法の検討を行う。なお、このような環境影響評価に必要な項目については単

年度でのデータ取得は不可能であることから、年度毎に取得できる項目から順次データを蓄積・解析する。

## C. 研究結果

### 1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

昨年度の研究により作成したベラドンナ無菌植物体の葉切片を用い、日本産および外国産の*A. rhizogenes* (1724株、2659株、8196株、15834株、A4株、R1000株)を感染させ、MS固形培地上で毛状根を多数発生させた。この毛状根を抗生物質(クラホラン)を含むMS固形培地上で培養し、無菌の毛状根クローンを多数得た。この毛状根について、BA (0.5 mg/L)とIAA (1 mg/L)を含むMS固形培地で培養し、不定芽を得た。この不定芽を植物ホルモン無添加のMS固形培地に移植し、不定根を誘導しつつ再分化植物体を得た。現在までに、189の毛状根クローンのうち18クローンにおいて再分化植物体が得られている。この再分化植物体については、T-DNA上に存在するオピシン合成酵素遺伝子の導入の有無を特異的プライマーを用いるPCR法によって検討し、全ての再分化植物体に外来遺伝子(T-DNA)が導入されていることが確認された。現在、この再分化植物体については、土を用いた鉢栽培を行うために順化中である。

### 2. 環境影響評価項目の検討

ベラドンナについては、上述したように、現在実験室内で複数の植物個体を鉢で栽培中であり、次年度以降、特定網室栽培および隔離圃場栽培における特性解析を実施する予定である。

実験室内栽培中の非組換えベラドンナ個体を用い、自殖による種子形成の程度を検討したところ、他株(花)受粉に比較して果実あたりの種子形成数は少ないものの、他株(花)受粉時と同程度の結

実率が得られ、ベラドンナにおいては、他株(花)受粉が主であるが、自株(花)受粉も行うことが明らかとなった。一方、ベラドンナにおいては、花の構造から虫媒花であると考えられる。そこで、2004年5-6月に筑波薬用植物栽培試験場の野外栽培圃場において訪花昆虫の調査を行った。その結果、3種類のハナバチの訪花が確認され、最も訪花頻度が高いものはコマルハナバチ(*Bombus ardens*)であり、これが主たる花粉媒介昆虫と予想された。訪花昆虫調査は次年度以降も実施する予定である。

花粉を介した遺伝子拡散距離を推定するためには、媒介昆虫の行動パターンと花粉寿命を明らかにする必要がある。そこで、FDA (fluorescein diacetate)とPI (propidium iodide)を用いた2重染色法により、長日条件、25°Cで栽培したベラドンナの花粉をスライドガラス上、25°C、湿度60%の条件下で花粉の寿命(生存率)を測定した。その結果、開葯から5日目までは生存率はゆっくりと低下し、最終的に130時間後に0%となった。次年度には訪花昆虫の行動パターンを解析する予定であり、両パラメーターをもとに花粉飛散距離を推定する予定である。

ベラドンナの遺伝子多様性の解析手法として、昨年度までのニンジンを用いた研究により確立したAFLP (amplified fragment length polymorphism)法を活用することとし、はじめに、ベラドンナ本葉からのDNA抽出法を検討した。植物からのDNA抽出法として一般的によく利用されているNucleon PhytopureとDNeasy Plant Mini Kitを比較したところ、後者で純度の高いDNAが得られたことから、後者の方法を採用することとした。次に、多型的なフラグメントを検出するための2次選択プライマー対を決定するため、64対のプライマー対を検討し、検出されたフラグメントの多い順に5組を選択した。欧州6カ所および国内2カ所の

研究所から分譲していただいたベラドンナ種子から無菌発芽個体を育成し、各分譲種子集団につき16個体ずつについて、若い本葉から上述の方法でDNAを抽出し、上述した5組のプライマー対を用いてAFLP分析を行い、ヘテロ接合度を調査したところ、各集団のヘテロ接合度は0.099から0.169と集団によって若干異なり、全体としての平均は0.133であった。今後は、この数値を基準とし、毛状根からの再分化個体との交雑後代集団におけるヘテロ接合度の変化を調査することで、遺伝子多様性への影響を明らかにする予定である。

ニンジンについては、種子を介した拡散を調査し、風やヒトの移動の影響が強いこと、また、裸地への侵入に際し、事前に裸地に侵入・発芽した他の植物(種)の根本で発芽したニンジン個体とその後の定着の基礎となることが予想された。また、主たる花粉媒介昆虫がナミハナアブであることが明らかとなり、その行動パターンの実測値をもとにしたコンピュータシミュレーション解析(1日あたりの最大行動範囲は約60mと推定された)および花粉寿命(約10日)の解析結果により、昆虫を介した花粉による遺伝子拡散は600m程度であることが明らかとなった。さらに、AFLP法による遺伝子多様性の解析により、北海道松前町のノラニンジン集団におけるヘテロ接合度は0.250と算出され、直接の比較はできないものの、ベラドンナよりも遺伝子多様性が高いことが示された。

一方、毛状根からの再分化植物体(遺伝子組換えベラドンナ)の隔離圃場試験に際し、栽培に伴う周辺環境への長期影響をモニタリングすることが必要となることから、対象区となる栽培前の圃場周辺の生物相(特に、植物相)について2年がかりの調査を実施し、そのとりまとめを行った。今後、遺伝子組換えベラドンナの栽培開始後一定期間(数年程度)

の後に、類似の調査を実施し、遺伝子組換え体の栽培による影響の有無や程度を明らかにする予定である。

#### D. 考察

昨年度および本年度の研究により、日本産および外国産の毛根病菌によって形質転換した多数の毛状根クローンを得ることができ、この毛状根から再分化した植物体を鉢上げすることに成功した。外来遺伝子が導入されていることはT-DNA上に存在するオピン合成酵素遺伝子の存在で確認することができた。形質転換効率(毛状根の出現率)は菌の系統によって大きく異なったものの、日本産の菌株を用いた場合であっても多数の毛状根クローンを得ることができ、さらに、このクローンからの再分化植物体を多数得ることができたため、次年度はこの日本産の菌株で形質転換したベラドンナ形質転換体を用い、特定網室栽培および隔離圃場栽培を実施することが可能となった。

一方、ベラドンナについて、好適なDNA抽出方法を決定することができ、AFLP法による遺伝子多様性の解析手法を決定することができた。類似の方法で決定したノラニンジンの遺伝子多様性と比較したところ、ベラドンナの遺伝子多様性はノラニンジンより低い結果となったが、これは、ノラニンジンが極めて強い他殖性を示すのとは異なり、ベラドンナは他殖性ばかりでなく、一定の頻度で自殖をすることによるものではないかと考えられる。この点については、ベラドンナおよびノラニンジンの双方について、さらに多くの集団における遺伝子多様性を決定することで明確な解答が得られるものと期待される。

また、本年度の研究により、ベラドンナおよびニンジン両者について、花粉の寿命を決定する方法が確立されるとともに、花粉媒介昆虫を同定することがで



き、さらに、ノラニンジンにおいては花粉媒介昆虫の行動パターンを実測値からコンピュータシミュレーションする解析手法を決定することができた。次年度は、ベラドンナについて、さらに詳細に訪花昆虫を調査するとともに、本年度の研究によって明らかとなった主たる花粉媒介昆虫であるコマルハナバチについて、その活動時期の決定、コンピュータシミュレーションを用いた行動パターン解析等を実施することで、花粉を介した遺伝子拡散距離を推定する予定である。

遺伝子組換え生物の環境影響評価については、国際条約である生物多様性条約カルタヘナ議定書が締結されたことに伴い、その国内担保法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）が制定され、平成16年2月19日より施行された。この法律に基づく環境影響評価については、概念的な評価項目は設定されているものの、具体的な評価項目やデータの取得・解析方法が定まっておらず、具体的な事例をもとにした検討が待たれている。本研究では、ベラドンナをモデル薬用植物とし、上述した花粉を介した遺伝子拡散や遺伝子多様性の解析手法の検討を進めているが、花粉飛散以外にも、他植物への影響（アレロパシー試験）や土壌微生物相への影響評価等についても検討することが求められており、この点については、遺伝子組換え農作物の環境影響評価手法が適用できるものと考えられることから、現在、遺伝子組換え農作物に適用されている試験方法について検討しており、次年度は、毛状根からの再分化植物体（形質転換ベラドンナ）の特定網室試験、隔離圃場試験の中で、実際のデータを取得し、解析する予定である。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

・K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F.

Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada and K. Shimomura (2004) Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides* - *D. leichhardtii* hybrid. Biol. Pharm. Bull., 27(8); 1261-1265.

・I. Eguchi, M. Umehara, M. Ono and H. Kamada (2004) Proposal to investigate gene flow and gene diversity using carrot (*Daucus carota* L.). In Proceedings of Korea Conference on Innovative Science and technology 2004 - GM Crops and Foods - Potential, Safety & Environmental Impact. pp. 69-82.

・路川宗夫、今井清太、野水美奈、宮田佳奈、鎌田博 (2004) 筑波大学構内の植物層 2004. 筑波大学農林技術センター研究報告、印刷中

・鎌田博 (2004) 遺伝子組換え植物の現状と今後. FFI (Food and Food Ingredient) ジャーナル、投稿中

## 2. 学会発表

・鎌田博：遺伝子組換え農作物・食品の安全性の考え方と課題。日本農芸化学会 2004 年度大会シンポジウム「食の質的改善をもたらす 21 世紀型遺伝子組換え作物」(広島大学) 2004 年 3 月 31 日 (招待講演)

・H. Kamada: An update on regulating genetically modified plants (including foods/food additives) in Japan --- Assessment of food safety and environmental effects. 4<sup>th</sup> ASEAN-ILSI Training Workshop on Safety and Risk Assessment of Agriculture-Related GMOs, Aug. 31-Sept. 2, 2003, Jakarta, Indonesia (invited speech)

・江口郁恵、梅原三貴久、小野道之、鎌田博：野生ニンジンおよび栽培ニンジンにおける遺伝子多様性の解析。日本植物学会第 68 回大会 (日大藤沢) 2004 年 9 月 12 日

・H. Kamada: Genetically modified organisms (including foods/food additives) -Detection methods of GMO and its internationally harmonized use-. International Workshop on Detection

Methods for Genetically Modified Organisms, Yokohama, Nov., 25-26, 2004 (invited opening speech)

・I. Eguchi, M. Umehara, M. Ono and H. Kamada: Proposal to investigate gene flow and gene diversity using carrot (*Daucus carota* L.). Korea Conference on Innovative Science and Technology 2004 - GM Crops and Foods -Potential, Safety & Environmental Impact. -Potential, Safety & Environmental Impact-. Gyeongju, Korea, Nov. 9-12, 2004 (invited speech)

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
協力研究報告書

遺伝子組み換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究  
植物園が管理する局方生薬基原植物の逸出に関する諸問題

協力研究者 後藤勝実 京都薬科大学附属薬用植物園 講師

要旨

京都薬科大学附属薬用植物園は、京都市東南部にある醍醐山に連なる山系の裾野に位置している。園の北側は水田、西側と南側は住宅地に隣接し、東側は竹林（モウソウチク）とアラカシが優先する典型的な京都府南部の植生である。数年前に、東側に隣接する竹林内で、日本で自生が確認されていない *Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae) を発見し、本園からの逸出であると結論付けた。この事実を踏まえて、他にも本園栽培種の逸出した植物がないかを調査した結果、本園近隣での自生が確認されていない種である、テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* (Lauraceae) やクチナシ *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae) が確認された。

A. 研究目的

近年、ブラックバス、ブルーギルのように外来の生物種の問題が取り上げられている状況下で、植物も決して問題外ではない。帰化植物という植物群ではなく、明らかに人為的に導入し、人が介在しない種子の伝播によって、本来の植生に何らかの影響を及ぼす可能性が判明している。植物園からの逸出もその一因と考え、本園周辺の逸出植物の調査を行った。

B. 研究方法

京都薬科大学附属薬用植物園（京都市伏見区日野林39番地）を中心に、隣接する地域（本園を中心に直径 150 m の区域）を調査する。生育が確認された場所の位置確認には、GPS（EMPEX ポケナビ65EX）を用いた。なお、本園

の東側は竹林（モウソウチク）とアラカシが優先する山林で、北側は水田、西側と南側は住宅地に隣接する。

C. 研究結果

本園東側に隣接する竹林（モウソウチク）内で、本園内で以前栽培していた（園内で栽培していた親株はすでに枯死している）場所から、距離にして約78 m の位置に、花椒 *Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae) を確認した（写真1、図1）。

同じく、本園東側の竹林内で、テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* (Lauraceae) を確認した。本園内での栽培地から確認した場所までは約 60 m で、そこからさらに南東に約 60 m の山林内でも確認した（写真2、図2）。

本園東側の竹林及び、竹林に隣接する山林内で、クチナシ *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae) を確認した (写真3、図3)。

各植物の生育状況として、写真 1 ~ 3 を添付する。また、図 1 ~ 3 では、調査対象となった植物3 種の本園内で展示植栽場所と、今回の調査で確認された位置を示した。図 4 は、図 1 ~ 3 をまとめたものである。(別紙参照)

#### D. 考察

*Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae) は、中国原産の灌木あるいは、小高木で、日本では自生が知られていない種であり、本園で栽培していたものが逸出したものと考えられる。テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* (Lauraceae) は、中国南部原産の常緑小高木であり、日本では和歌山県に自生または栽培され、刈り込みに強いことから、本園では生垣に利用しているが、近隣では自生の報告はない種である。クチナシ *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae) は、京都府には自生が知られているが、本園近隣にはその自生を見ないことから、薬用植物標本区に多数植栽しているものの逸出と考えられる。

また、*Zanthoxylum bungeanum* は、秋季から初冬にかけて、赤褐色の果実を結ぶ。テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* の楕円形の果実は、秋期に黒熟し、鳥 (ムクドリ) の格好の餌となっている。さらに、クチナシ *Gardenia jasminoides* は、鳥の餌が少ない冬期の格好の

餌となっていることから、鳥による伝播で園外に逸出したと考えられる。

#### E. 結論

本園近隣を調査した結果、本園で過去に栽培していたことのある植物、或いは現在栽培中の植物で、尚且つ本園近隣に自生が報告されていない植物 3 種が生育していることが確認された。これらは、園内の元の展示植栽位置から直径約 150 m の枠内で逸出しており、それぞれの果実は鳥の餌となる植物であることから、本園から鳥による伝播で逸出した可能性が高い。今回の調査結果は、今後展開されるであろう、遺伝子組み換え薬用植物の管理などの問題を考えるに当たって、検討を要する事実であると考えられる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙

今回の調査で、京都薬科大学附属薬用植物園の東側に隣接する竹林内で確認された植物 3 種の代表株の生育状況を写真 1 ～ 3 に、各植物の園内展示植栽場所と園外で確認された位置を図 1 ～ 3 に示す。

写真 1：花椒 *Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae)

図 1：園内展示植栽場所  
及び  
園外での確認位置

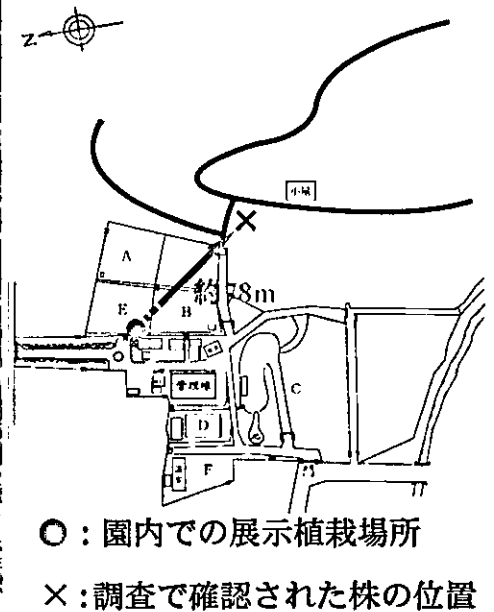


写真 2：テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* (Lauraceae)

図 2：園内展示植栽場所  
及び園外での確認位置

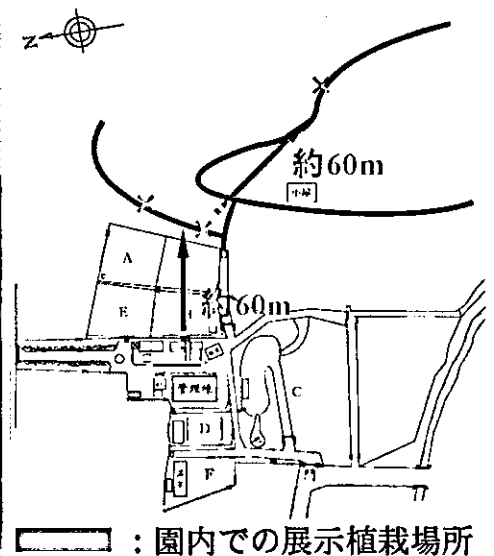


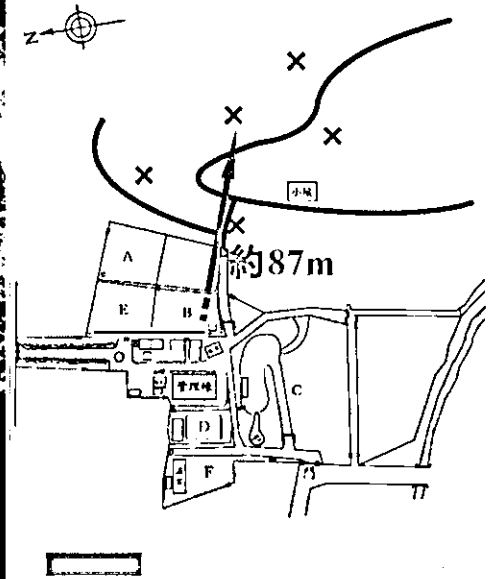
写真3：クチナシ *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae)



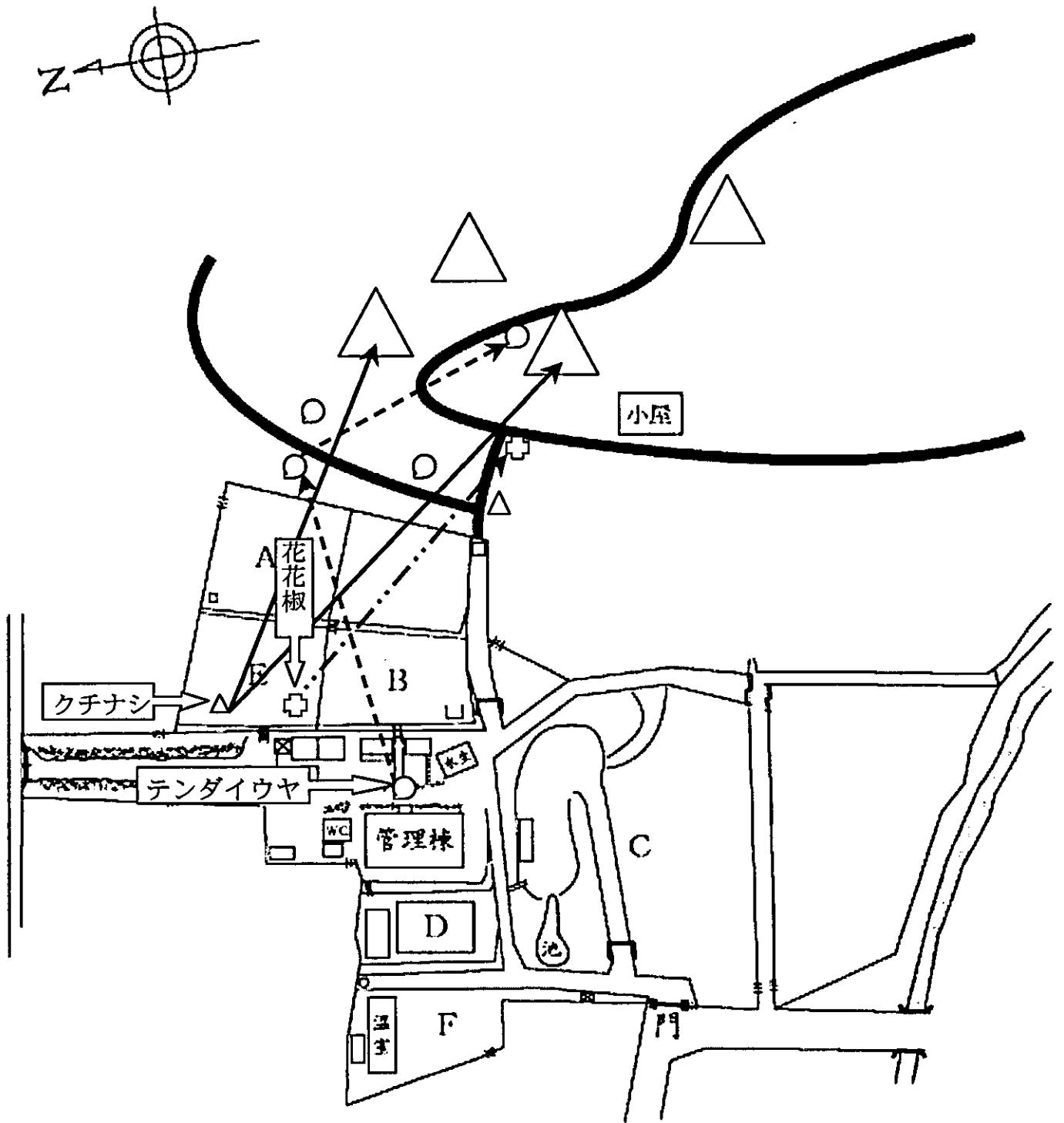
：園内での展示植栽場所

×：調査で確認された株の位置

図3：園内展示植栽場所  
及び園外での確認位置



×：調査で確認された株の位置



- ⊕ . . . 花椒 *Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae)
- . . . テンダイウヤク *Lindera strychnifolia* (Lauraceae)
- △ . . . クチナシ *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae)
- → . . . 元の展示植栽位置

図4 逸出図

薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析

分担研究者 佐藤 文彦 京都大学生命科学研究科・教授

**要旨** 薬用植物における花芽形成遺伝子の単離を行ない、同遺伝子を用いて薬用植物に不稔性を付与することを目的に花芽形成遺伝子の単離と解析を試みた。本年度は、まず、薬用植物のモデルとして、タバコの開花においてエチレンシグナルの関与が報告されていることから、エチレンシグナル系転写因子 ERF の発現を抑制した形質転換体を作製し、その発現抑制体における花芽形成、花粉形成の異常を解析した。ERF 遺伝子群のうち、ERF3 と ERF4 の発現抑制体が確立され、これら形質転換タバコにおける表現型を解析した結果、ERF3 の発現抑制においては、全く異常が認められない一方、ERF4 の発現抑制体においては、ある一定の割合で、開花した花芽における葯の開裂が遅延することを認めた。また、この現象は次世代でも観察され、ERF4 が花粉形成に関与していることが示唆された。

A. 目的

薬用植物の多くは、育種が十分にされておらず、その特性の安定性に不安があり、近縁種との交雑により、特性が変化していくことが危惧されている。従って、栄養繁殖することにより、特性の維持管理が計られることが多い。栄養繁殖できることは、遺伝子組換えした場合にも、容易に繁殖でき、その普及を計るうえで有利である。一方、このことは、薬用植物が比較的高い交雑性を持つということの意味している。従って、薬用植物の稔性を制御し、均質な植物体を作製管理する技術を開発することは、単に遺伝子組み換え体における導入遺伝子の拡散のリスクに対して予防する観点からのみならず、薬用植物の品質管理という観点からも重要である。

さらに、ある種の薬用植物では、開花にともない成分の低下が生じることが知られており、こうした場合には、積極的に開花／あるいは、稔性を抑制することにより、より高品質な薬用植物の育成が期待できる。また、

雄性不稔性を導入することにより、均一性が高く、かつ、収量性、耐病性などの農業形質が優れた一代雑種（F1）種子を生産するシステムを構築することも期待できる。

このように、不稔性、特に、雄性不稔性の導入は、遺伝子組み換え薬用植物の安全性の担保とともに、薬用植物の特性の向上に貢献することが期待できるものである。

本研究では、このように薬用植物に（雄性）不稔性を導入するために有用な遺伝子の探索を行なうとともに、その遺伝子の特性を解析し、応用への展開を図ることを目的としている。

B. 研究方法

不稔性の制御に関してはいくつかの方法が考えられる。1つは、雄性配偶子である花粉の不稔性であり、花粉母細胞から花粉へと発達する段階において、花粉の発達を抑制または破壊してしまう方法が考えられる。一方、このような花粉の不稔に限定せず、植物



体において花成を阻害することにより、個体レベルでの不稔性を与えることも可能であり、より一般的な手法となると考えられる。

本研究では、薬用植物のモデルとして、形質転換系が確立されるとともに、ESTの解析が進んでいるケシ科のハナビシソウ、あるいは、ナス科のタバコを材料とし、これらにおける花芽形成、あるいは、花粉形成に関わる因子の単離を試みた。

すでに、多くの植物において花器官の発達に植物ホルモンであるジャスモン酸やエチレンなどが深く関わっていることが知られているが、近年、タバコにおいてエチレンが胚珠成熟に関わっているという報告 [Martinis et al., 1999] や、エチレンレセプター阻害剤で処理された花芽では葯の開裂と開花が同調しないとの報告があった [Rieu et al., 2003] ことより、図1に示すように、エチレンシグナル伝達の下流で機能する転写因子ERFが花器の発達において果たす役割を解析することとした。具体的には、転写因子であるERFのうち、ERF3あるいは、ERF4の発現抑制体を作製し、その効果を解析した。

まず、ERF3ならびに4遺伝子の発現を抑制するために、RNAi発現抑制ベクターであるpKANNIBALおよびバイナリーベクターpART27 [Wesley et al. 2001] を用いてpART-ERF3ir、pART-ERF4irベクターを作製した。

まず、各ERF遺伝子間において、相同性の低い領域をRNAiの標的配列として選択し、それぞれの領域に対して高い相同性をもつ遺伝子が存在しないことをBLAST検索により確認した。これらの標的配列を末端にXho I、Kpn Iサイトをもつプライマーで増幅し、pKANNIBALに導入してpKAN-ERF3ir、pKAN-ERF4irを作製した。これらのプラスミドをそれぞれNot I処理し、目的遺伝子を調製した後、pART27バイナリーベクターのNot Iサイトに挿入し、pART-ERF3ir、pART-ERF4irを完成させた。

続いて、作製した2種類のバイナリーベクターをエレクトロポレーション法によって *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) に導入し、同 *A. tumefaciens* を用いてタバコを形質転換した。常法により形質転換体を選抜したのち、単離したゲノムDNAを用いたゲノムPCRにより、導入遺伝子の確認を行った。なお、確認には、以下のプライマーを用いた。

1st arm

35S-FD1 (ERF3ir, ERF4ir共通)

5'-GATATCTCCACTGACGTAAGG-3'

ERF3 rv-Kpn I (ERF3ir用)

5' CAGGTACCTCAATTCCTCTTTTCCCATCA-3'

ERF4 rv-Kpn I (ERF4ir用)

5' CTGGTACCAGTCTCGGTTGGAAGTACTTCC-3'

2nd arm

OCS ter-rv (ERF3ir, ERF4ir共通)

5'-ATCTGAGCTACACATGCTCAGG-3'

ERF3 rv-Hind III (ERF3ir用)

5' GCAAGCTTTCAATTCCTCTTTTCCCATCA-3'

ERF4 rv-Cla I (ERF4ir用)

5' CTATCGATCCTCTCGGTTGGAAGTACTTCC-3'

得られた形質転換体における標的遺伝子の発現抑制はノザン法、もしくは、RT-PCR法を用いて確認を行なった。

RNAiによるERF3もしくはERF4の発現抑制が期待されるpART-ERF3ir-3, 4, pART-ERF4ir-9, 17, ならびにコントロールとしてのpART27形質転換タバコ植物体を鉢上げし、花芽形成を観察した。栽培は、スミリン (住友林業) にパーミキュライトを1/3量混合した土壌において、温度25℃、照度100 μmol/m<sup>2</sup>・sで、約2ヶ月行なった。

### C. 結果・考察

形質転換により作成したERF3ir, ERF4ir導入株の全ラインにおいて導入したRNAiベクターの配列が存在することを確認した。

さらに、ノザン解析した結果、解析した全てのpART-ERF3ir導入株においてERF3の発現抑制が生じていることを認めた。一方、pART-ERF4irを導入した場合は、ERF4ir-17

において十分なERF4発現抑制を認めたが、ERF4ir-9とERF4ir-28においては発現抑制はわずかであった(図2)。

以上のように、形質転換体間で発現抑制効果に差がみとめられたが、発現抑制に伴う効果を観察できると考え、これらの形質転換体を鉢上げし、その開花に及ぼすERFの発現抑制の効果を観察した。

その結果、図3に示すように、ベクターコントロールとしてのpARTを導入したタバコにおいては、いずれの花においても開花直後(図3-1)ですでに葯が完全に解裂していたのに対し、ERF4ir-17では、葯が解裂する前に開花している花が複数観察された。その中には、葯が緑色をしており、葯が成熟途中であるにもかかわらず開花したと思われるもの(図3-3)、葯が茶色になっても開かないもの(図3-4)が含まれていた。しかし全体の7割程度の花器は正常な発達をしていたことより、それら正常な花から種子を採取した。

一方、ERF3ir導入株においてはこの異常は観察されなかった。

さらに、自殖により得られたT1世代の植物体について、同様に葯の観察を行った結果、ERF4ir-17のT1植物体でT0世代と同様に一部の花器における葯の開裂異常が起こることが観察された。なお、ERF4の発現抑制効果が弱いERF4ir-9とERF4ir-28の花器ではこの異常が全く見られなかったことから、この表現型はERF4発現量の変化による効果であることが示唆された。

#### D. 結論と今後の課題

以上のように、エチレンシグナルの最下流に存在すると考えられる転写因子 ERFのうち、ERF4の発現を抑制することにより、開花には影響しないものの、葯の解裂を部分的に阻害することが可能であることが判明した。このことは、エチレンシグナル伝達系が花粉の発達に関与しているとする Rieu らの報告を支持するものであるが、その効果は部分的であった。このことは、エチレンシグナ

ル伝達において ERF が重複して機能している可能性、あるいは、全く別のシグナル伝達系が ERF4 の機能を相補している可能性が考えられる。現時点で得られている葯の解裂抑制の効果は限られていることから、本遺伝子とともに、新たに開花あるいは花粉形成に関与する遺伝子の単離が必要と考えられる。

すでに、シロイヌナズナでは幾つかの開花制御遺伝子が単離されていることから、これらの制御因子をもちいた開花の制御が有効ではないかと考えている。こうした視点のもと、現在シロイヌナズナのFT遺伝子を単離し、過剰発現ベクターの作製を行なっている。既にベクターの構築は完了しており、タバコならびにハナビシソウを材料に、その開花制御を検討したいと考えている。もし、FT遺伝子による開花促進が可能であれば、同遺伝子のドミナント-ネガティブ型遺伝子による開花抑制をさらに検討していきたいと考えている。

#### E. References

- De Martinis D, Mariani C. (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants *Plant Cell*. 11(6):1061-72.
- Rieu I, Wolters-Arts M, Derksen J, Mariani C, Weterings K. (2003) Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta*. 217(1):131-7.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*. 27(6):581-90.

#### F. 研究発表

夏地智之、中元志穂、伊福健太郎、佐藤文彦、  
RNAi法を用いたエチレン応答性転写因子  
(ERF)の発現抑制、第27回日本分子生物学会  
会年会、神戸ポートピアランド、2004年12  
月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

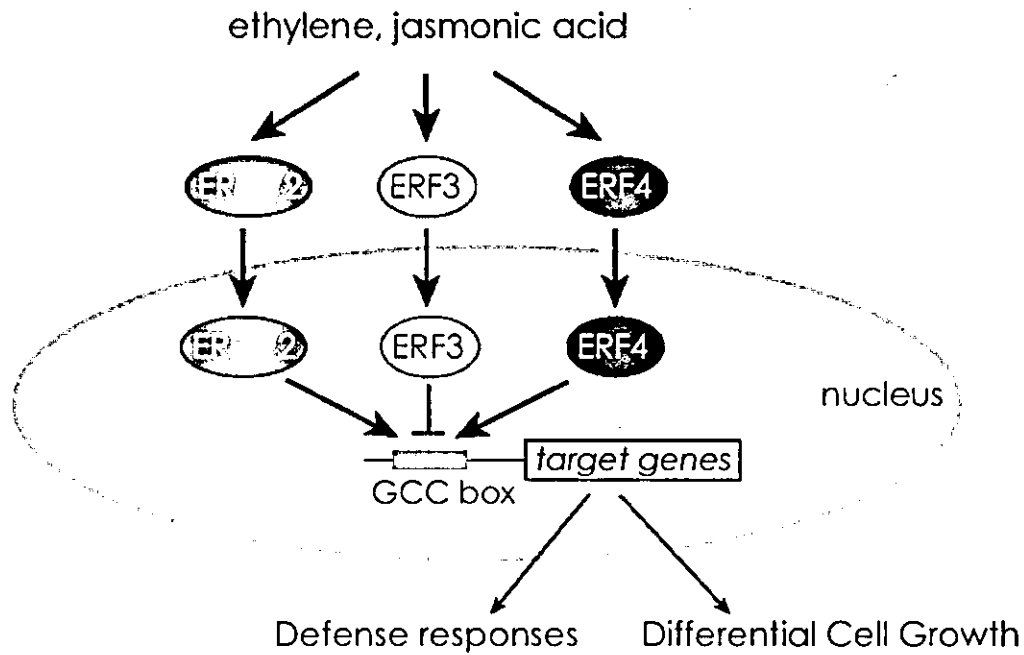


図1 エチレンシグナル伝達系と転写因子ERFの関係

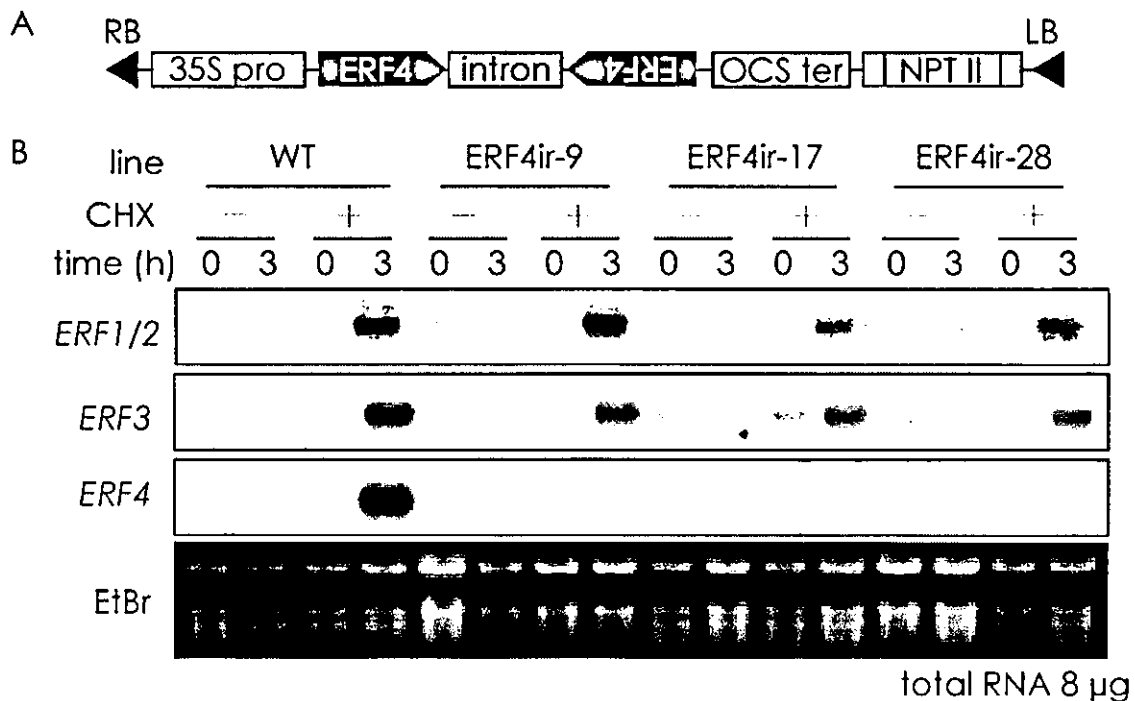


図2 ERF4に対するRNAiベクター(A)とERF4の発現抑制の確認(B)  
シクロヘキシミド (CHX) 処理によって誘導されるERFの発現のうち、ERF4の発現がERF4ir導入株、特にERF4ir-17株において顕著に抑制されていることが確認された。この結果から、他のERF因子に対しては抑制が生じていないことも明らかとなった。