

特 集 記 事

耐塩性ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. codA 12-5B, 12-5C, 20-C) の形質安定性と環境影響評価試験菊池 彰¹⁾・河岡明義²⁾・島崎孝嘉¹⁾・于 翔¹⁾・海老沼宏安²⁾・渡邊和男¹⁾¹⁾筑波大学遺伝子実験センター, つくば市, 〒305-8572²⁾日本製紙(株)森林科学研究所, 東京都北区, 〒114-0002Trait stability and environmental biosafety assessments on three transgenic *Eucalyptus* lines (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. codA 12-5B, codA 12-5C, codA 20-C) conferring salt toleranceAkira Kikuchi¹⁾, Akiyoshi Kawaoka²⁾, Takayoshi Shimazaki¹⁾, Yu Xiang¹⁾, Hiroyasu Ebinuma²⁾ and Kazuo N. Watanabe¹⁾¹⁾ Gene Research Center, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan²⁾ Forest Science Laboratory, Nippon Paper Industries Co., Ltd., Tokyo 114-0002, Japan

キーワード

Eucalyptus camaldulensis, *codA*, 遺伝子組換え, 環境影響評価, 耐塩性, 耐乾燥性

摘 要

地球規模での環境悪化や食糧問題を改善するための手段として、遺伝子組換え植物を効率的に利用する研究が進められている。本研究では、閉鎖系温室、特定網室、隔離ほ場と段階を追って有用遺伝子組換え植物を実際に育成し、さまざまな科学的知見に基づいて環境安全性評価を確立することを目的の1つとしている。適合溶質の産生に関わる土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* の *codA* 遺伝子を導入した耐塩性ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. codA 12-5B, codA 12-5C, codA 20-C) が塩ストレス培養条件下で選抜され、その導入形質の安定性と環境影響評価を閉鎖系温室・開放形温室にて実施した。各遺伝子組換え体の遺伝子発現は非耐塩ストレス環境下で18ヶ月間安定していることが明らかとなり、耐塩性も維持されていることが明らかとなった。一方、環境影響評価については、有害物質の生産を発芽アレロパシー試験・土壌微生物相の調査・液体クロマトグラフィー・ガスクロマトグラフィーのいずれの試験においても組換え体と非組換え体との間に有意な差が認められなかった。また、生長性・形態についても顕著な差異が認められず、組換え体と非組換え体との間の違いは耐塩・耐乾燥性以外には認められなかった。一方、非組換えユーカリの野外栽培の結果から、競合における優位性、食害等も認められなかった。また、本邦に交配可能な近縁野生種の自然分布はなく、近隣の栽培ユーカリに対する交雑も、既知の交

雑性から極めて低いことが考えられた。以上の点から、本遺伝子組換えユーカリは耐塩性を除き、非組換えユーカリと相違点は認められず、隔離ほ場における栽培に際して、生物多様性影響が生じるおそれは無いと判断された。

緒 言

1992年のリオデジャネイロで開催された地球サミットに続き、生物多様性条約や昨今の京都議定書の採択及び実施に有るように、世界的な人間活動の増大による地球環境の悪化(温暖化・乾燥化)とこれに対する多様な対応は、国際的重要事項である。そして、2002年のWSSD会議(WORLD SUMMIT ON SUSTAINABLE DEVELOPMENT)や京都議定書の具体的実施事項では、環境植林は、地球環境の保全と持続的利用に必須の課題である。

日本政府の政策としても、国際的な植林の支援は重要事項となっており、樹木植林に関わり、基盤研究及び試用のため、RITE(財団法人地球環境産業技術研究機構)やNEDO((独)新エネルギー・産業技術総合開発機構)などの政府関連機関が国内外での研究を支援している。

地球環境の砂漠化や半乾燥地の土壌における塩類の集積については、対処の一つとして遺伝子組換え体樹木の貢献が考えられている。ユーカリは耐乾性が強いいため、半乾燥地域で成長が速く、二酸化炭素削減の効果が高く期待できる地球温暖化対策の目的にかなった植物として知られている。そしてユーカリの耐塩性機能を強化することで上記の目的に沿った植物を構築できると期待される。そこで、環境植林を目指す基礎研究として、*Eucalyptus camaldulensis* を材料に、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis*

2005年12月26日受領

Correspondence: kikuie@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

に由来する, コリンからグリシンベタインを生産する酵素をコードする *codA* 遺伝子 (Hayashi *et al.* 1997) を導入し, 耐塩性を強化した遺伝子組換えユーカリを作出した (河岡ら 2003).

我国では遺伝子組換え植物については, 閉鎖系温室, 特定網室, 隔離ほ場と段階を追って栽培し, 環境影響評価を実施することが規定されている (http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/kumikae.htm). 閉鎖系温室は外部環境へ花粉, 種子, 胞子などの飛散を完全に遮断した構造になっている. 特定網室は, 窓にメッシュのある通常の植物の栽培室であるが, 昆虫などの侵入は防ぎ花粉の飛散を最小限に抑える施設である. 隔離ほ場では, 限定された条件で組換え体の栽培に関して周辺への環境影響を評価する. しかしながら, 評価項目は世界的な統一基準はなく, 環境あるいは生物多様性への影響を真に評価できる基準の作成が急務となっている. 本研究では, 閉鎖系温室, 特定網室, 隔離ほ場と段階を追って有用遺伝子組換え植物を実際に育成し, さまざまな科学的知見に基づいて環境安全性評価を確立することを目的の1つとしている. 樹木は永年性で樹高が大きくなることから, 環境への安全性を注意深く評価する必要がある. 耐塩性遺伝子を導入したユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) を材料として, 閉鎖系温室, 特定網室での栽培試験を行って生育特性を解析し, 環境影響評価を実施した.

研究材料

1. ユーカリの特性

ユーカリ・カマルドレンシス (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) は, オーストラリア名をリパーレッド・ガムの名称で呼ばれる, フトモモ科 (Myrtaceae) ユーカリ属 (*Eucalyptus*) に属する (http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Eucalyptus_camaldulensis.html) 2 倍体 ($2n=2x=22$) (Boland *et al.* 1980) の木本植物である.

ユーカリ属は硬葉樹に属する常緑広葉樹であり (プライオー 1981), 雌雄同花で花色は白から淡黄色である (Eldridge *et al.* 1993). *E. camaldulensis* の成木は高さ 20 ~ 50 m, 胸高直径 90 ~ 210 cm (Brooker and Kleinig 1983) にまで成長する. 材は赤色, 光沢, 耐久性があり, パルプ用にはおよそ 5 ~ 8 年で収穫できる (西村 1987). 海外の原生地や適正栽培地では, 樹高 40 m, 樹幅 15 m 及び胸高直径 2 m の大木も存在する (Brooker and Kleinig 1983). 日本では, 公園緑地に樹高 10 m 程度のものが見られる (西村 1987). 日本における開花時期, 結実時期については詳細に調べられた記述はないが, 夏場 (7-9 月) に開花し, 秋から冬 (9-1 月) にかけて結実する (西村 1987) と考えられる.

生育環境は, 平均気温 25°C を最適とし 15 ~ 29°C, 種によっては, 氷点下でも冬場生存できるが低温には適していない (http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/

[Eucalyptus_camaldulensis.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Eucalyptus_camaldulensis.html)). 乾燥, 季節的冠水, 多少の塩類土壌にも耐え, 萌芽更新も可能であり, 世界に広く植林されている (西村 1987). 降雨量は, 年 500 ~ 1,000 mm が適しており, 生育期には相当量の降雨を必要とする (Attiwill and Adams 1996, Brooker and Kleinig 1983).

種子繁殖及び栄養繁殖が可能な多年生木本植物である (プライオー 1981). 種子繁殖の場合, 自殖, 他殖共に可能であり, 果実は種子が完熟すると破裂して種子を放出する (Eldridge *et al.* 1993). 虫媒により花粉が伝達され, その際の媒介昆虫は, 双翅目の昆虫が幅広く媒介する (Boland *et al.* 1980, Eldridge *et al.* 1993). 一方, 栄養繁殖も可能であり, 挿し木及び取り木増殖ができる (プライオー 1981).

2. ユーカリの自然分布と栽培

ユーカリが初めて世に紹介されたのは, 1777 年 Cook の第 3 回航海の時に採取された標本からである. ここで, 多くの植物を採集し, イギリスに持ち帰った. 当時ロンドンに滞在していたフランスの植物学者 C.L.B. L'Heritier はこの標本を検索し, 1788 年フトモモ科 (Myrtaceae) にユーカリ属 (*Eucalyptus*) を設け, 種名を与えた (西村 1987). ユーカリ属は約 600 種存在するといわれているが, その大半はオーストラリア本土およびタスマニア島に自生し, ごく少数の種が本土北部に隣接するアジア太平洋地域の特定諸島に自生している.

ユーカリは日本原産の種ではなく, 宿主植物である *E. camaldulensis* と交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布, 及び近縁野生種の存在は報告されていない (プライオー 1981, 前川 1999).

日本国内への導入は明治時代に始まった. 記念植樹として植えられることが多く, 主に緑化木として栽培管理されている. 茨城, 群馬, 石川県を北限とし, 関東以南の温暖地, とくに静岡, 兵庫, 高知, 福岡の諸県に多い (西村 1987). 鹿児島市では *E. camaldulensis* と *E. robusta* を街路樹に植栽している. また, 鹿児島市平川動物園では, コアラ飼料用に *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. microcorys*, *E. moluccana*, *E. propinqua*, *E. punctata*, *E. robusta*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* が植栽されている. 沖縄では, *E. camaldulensis* と *E. robusta*, *E. viminalis* などの植栽が知られている.

つくば地区におけるユーカリ属の栽培は, 個別の工場敷地などの緑化に限られている. *E. camaldulensis* については, 私用地での栽培などを含めて数件程度で, 体系的な栽培はみられない.

3. ユーカリの使用

19 世紀以降, ヨーロッパ, インド, アフリカ, アメリカ, 最近では東南アジアでも多く植林されている. 建材, パルプ材あるいはユーカリオイルの材料などとして 19 世紀から盛んに海外で栽培されている (プライオー 1981,

西村 1987). 葉からのエッセンシャルオイルは, 0.8% 程度の濃度で, ダニ類 (*Pyroglyphidae*) への防除効果があることが知られており, 葉からの粗抽出液をノミや家庭害虫の殺虫剤として用いる場合もある (Ross 2001). また, いくつかの種は, 薬用植物としても原産地や海外の発展途上国で伝承的利用がされている (Lewis and Elvin-Lewis 1977).

一方, 日本では, 沖縄や奄美大島の諸島などで茶やあめなどの原料として利用されている. テルペノイドを主体とする芳香性物質が産生され, ユーカリエッセンシャルオイルとして, これはアロマセラピーなどの民間療法に幅広く用いられている (Ross 2001).

評価過程と結果

1. 耐塩性ユーカリ (*codA*, *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) (12-5B, 12-5C 及び 20-C) (以下, 本組換えユーカリとする) の作出

導入遺伝子である *codA* 遺伝子は, 土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* に由来する, コリンからグリシンベタインを生産する酵素をコードする遺伝子である (Deshnium *et al.* 1995). グリシンベタインは, 細胞の浸透圧を制御する物質であり, 植物における塩や乾燥による成長阻害は, 浸透圧ストレスで誘導されることが知られている. いくつかの細菌や植物はベタインを適合溶質として利用して, 浸透圧ストレスを緩和すると考えられている. また, *codA* 遺伝子の導入により植物に耐塩性が付与出来ることが知られている (Hayashi *et al.* 1997).

codA 遺伝子をマーカーフリー形質転換体作出系である MAT ベクター (Ebinuma and Komamine 2001) のプラスミドに連結し (図 1), アグロバクテリウム法によりユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) に導入した. 再生個体は組織培養の培地中にカルベニシリン (500 mg/L) の濃度で含有させ除菌後, 無菌苗をカルベニシリンなどの抗生物質を含まない MS 培地に移植し, 再生個体を得た. その後, アグロバクテリウムの増殖を確認したところ, 組換え体, 非組換え体のいずれからもアグロバクテリウムは検出されなかった.

得られた再生個体について挿入遺伝子 *codA* タンパクの発現解析と実際の耐塩性によりさらに選抜をすすめ, 人工気象室, 温室試験を経て, 耐塩性及び植物体諸形質などから総合的に判断して本組換えユーカリ, 12-5B, 12-5C 及び 20-C が選抜された (河岡ら 2003). 第一次選抜までは組織培養個体を用い, 組換え体の茎葉が分化してきた際に, 200 mM NaCl を含有させた培地に移植した. 本実験に関わる遺伝子組換えユーカリは形質転換当代である.

2. 導入遺伝子の存在状態

発根個体の葉の一部を採取し FAST DNA KIT (Q-BIO) によりゲノム DNA を抽出した. *codA* 遺伝子の存在の有

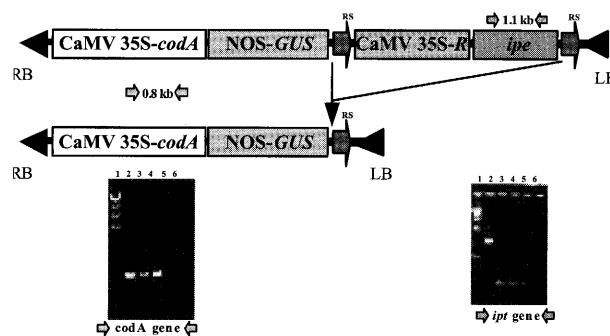


図 1. 導入遺伝子の確認

発根個体の葉の一部を採取し FAST DNA KIT (Q-BIO) によりゲノム DNA を抽出した. *codA* 遺伝子の存在の有無を確認するために, 抽出した DNA を鋳型とし PCR 分析 [94°C (1 分), 55°C (1 分), 72°C (1 分), 35 サイクル] を行った. レーン 1: 分子量マーカー, 2: 多芽体, 3: 12-5B, 4: 12-5C, 5: 20-C, 6: 非組換え体. *codA* 遺伝子を検出するプライマー (黄) と *ipt* 遺伝子を検出するプライマー (緑) を用いた. その結果, 正常に発根した組換え体は目的の *codA* 遺伝子 (左下図) は検出されたが, 標識遺伝子である *ipt* (右下図) の存在は認められなかった. 従って, 今回作成した形質転換体は RS 配列で挟まれた標識遺伝子部分を欠くマーカーフリー個体であると推測された (上図).

無を確認するために, *codA*: TCCAGCTCGGTCTCCTACA TCCACCCGA, CGGTGTTG TCGTCTTGCGGATGTAGT; *ipt*: ATGGATCTGCGTCTA ATTTTCGG, GACTTTTTCGCGGAAAATAATGGA プライマーを用い, 抽出した DNA を鋳型として PCR 分析を行った. その結果, 正常に発根した組換え体は目的の *codA* 遺伝子は検出されたが, 標識遺伝子である *ipt* の存在は認められなかった. 従って, 今回作成した組換え体は RS 配列で挟まれた標識遺伝子部分を欠くマーカーフリー個体であると推測された (図 1).

閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉から, ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った. ゲノム DNA は制限酵素 *EcoRI* で切断し, 0.8% アガロースで電気泳動した. プローブは, *codA* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものを用い, 化学発光検出した. その結果, 導入遺伝子は染色体に安定に組込まれたことが確認された. コピー数は 12-5B と 12-5C が 1, 20-C が 2 と考えられた (図 2).

3. *codA* 遺伝子の発現

遺伝子組換えユーカリにおける導入遺伝子の発現を確認するため, 環境影響評価温室 (特定網室) で生育させた組換え体と非組換え体を用い, RNA の確認をノーザンハイブリダイゼーション法で, タンパク質の確認をウェスタンブロットにより行った.

ノーザンハイブリダイゼーション法は葉から抽出した, 20 µg の全 RNA を変性 1.2% アガロースで電気泳動後, ナイロンフィルター Hybond N+ (Amersham Pharmacia

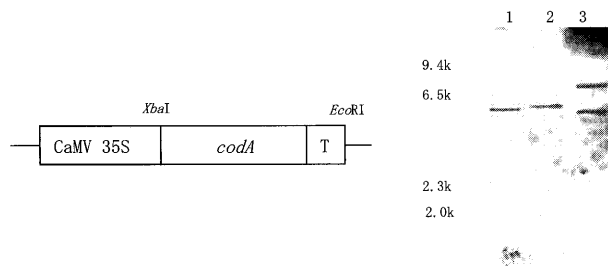


図2. 遺伝子組換えユーカリのサザンハイブリダイゼーション解析

閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉から、ゲノムDNAを抽出した後、制限酵素 *EcoRI* で切断し、0.8% アガロースで電気泳動した。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。左図のように、導入遺伝子中に *EcoRI* は1つしか存在しないため、出現したバンド数が導入遺伝子コピー数と推測される。レーン1: 12-5B, 2: 12-5C, 3: 20-C。導入遺伝子は染色体に安定に組込まれ、コピー数は12-5Bと12-5Cが1、20-Cが2と考えられた。

Biotech 社)にブロットングし行った。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子と、内部標準として *ubiquitin* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。その結果、導入遺伝子は発現していると考えられた (図3)。

ウエスタンブロットは葉からタンパク質を抽出して行った。各1gの葉を採取し、マイクロ遠心管中、氷上ですりつぶした。抽出緩衝液1mLを加え攪拌した後、10,000×gで10分間遠心することによって、可溶性画分を調製して行った。可溶画分に含まれる可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分離し、セミドライプロッターを用いてナイロン膜 (Immobilon PVDF; Millipore 社) に転写した。この膜をコリンオキシダーゼに対する抗体とともにインキュベートし、ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社) で検出した。コリンオキシダーゼに対する抗体は基礎生物学研究所の村田教授より譲り受けた。ウエスタンブロットによるタンパク質解析を行った結果、コリンオキシダーゼに対応する64kDaの免疫応答性タンパク質の存在が確認された。これらの結果は、導入した *codA* 遺伝子が正常にタンパクを生産していることが明らかになった (図4)。

4. 耐塩・耐乾燥試験

閉鎖系温室では、耐塩性と相関の高い耐乾燥性の試験を実施した。毎日100mLの灌水を3ヶ月間行い生育させた個体に対して、2週間水切りを行った。組換え体12-5B, 12-5C及び20-Cは高い乾燥耐性を示した。

環境影響評価温室において、毎日100mLの水やりを3ヶ月間行い生育させた個体を、2MのNaCl溶液を100mL各植物体に1度与えた。その後1日おきに、100mLの灌水を1週間行い、経過を観察した。組換え体12-5B, 12-5C及び20-Cは耐性で、顕著な影響は認められなかったが、非組換え体は著しく乾燥萎枯した (図5)。

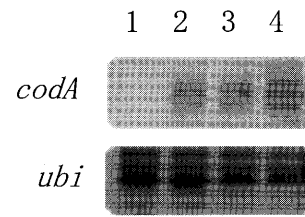


図3. 導入遺伝子 *codA* 遺伝子の発現

環境影響評価温室で生育させた若い苗木を形質転換体と非形質転換体の葉から、全RNAを抽出しノーザンハイブリダイゼーションを行った。全RNA 20 µgを変性1.2%アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルター Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロットングした。プローブは、*codA* cDNA と、内部標準としてユビキチン cDNA (*ubi*) を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。レーン1: 非組換え体, 2: 12-5B, 3: 12-5C, 4: 20-C。導入遺伝子は安定に発現していると考えられた。

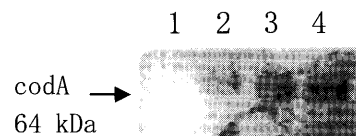


図4. *codA* タンパク質の発現

環境影響評価温室で生育させた非組換え体及び組換え体の葉1gを採取し、マイクロ遠心管中、氷上ですりつぶした。抽出緩衝液1mLを加え攪拌した後、10,000×gで10分間遠心することによって、可溶性画分を調製した。可溶画分に含まれる可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分離し、セミドライプロッターを用いてナイロン膜 (Immobilon PVDF; Millipore 社) に転写した。この膜をコリンオキシダーゼに対する抗体とともにインキュベートし、ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社) で検出した。コリンオキシダーゼに対する抗体は基礎生物学研究所の村田教授より譲り受けた。レーン1: 非組換え体, 2: 12-5B, 3: 12-5C, 4: 20-C。ウエスタンブロットによるタンパク質解析を行った結果、コリンオキシダーゼに対応する64kDaの免疫応答性タンパク質の存在が確認された。これらの結果は、導入した *codA* 遺伝子が正常にタンパクを生産していることが明らかになった。

5. 遺伝子発現・発現形質の安定性

苗木を環境影響評価温室に移植後18ヶ月目に、新規に展開している木化していない1年生枝について、フローサイトメトリーによりゲノムサイズについて非組換え体と組換え体の比較を行ったが、差異は認められなかった (表1)。また、葉における *codA* 遺伝子の発現の安定性をノーザン解析により確認したところ、安定した遺伝子発現が認められた。

発現形質についても、環境影響評価温室に移植後約18ヶ月目の植物体について、200mM NaCl 溶液400mLを、20日間に渡り一日おきに計10回与え、耐塩性の検定を行った。遺伝子組換えユーカリでは、枝先の若葉の萎みはあったものの顕著な影響は見られなかった (B) が、非組換え体葉が著しく乾燥萎枯 (C) した。



図 5. 環境影響評価温室における耐性試験
毎日約 100 mL の灌水を 3 ヶ月間行い生育させた個体を、2 M の NaCl 溶液を 100 mL 各植物体に 1 度与えた。その後 1 日おきに、100 mL の灌水を 1 週間行い、経過を観察した。左：非組換え体ユーカリ，右：組換え体ユーカリ 12-5C。耐性ユーカリでは、顕著な影響は見られなかったが、非組換え体は著しく乾燥萎枯した。同様な耐塩性は、組換え体 12-5B 及び 20-C にも認められた。

表 1. 環境影響評価温室に移植後 18 ヶ月目の植物体における倍数性の検定

系統	ゲノムサイズ (Mbp/1C)	CV(%)
非組換え体ユーカリ 下位枝の成熟葉	678.2	9.50
非組換え体ユーカリ 上位枝の若葉	647.3	8.32
12-5B 下位枝の成熟葉	657.5	8.01
12-5B 上位枝の若葉	625.4	7.12
12-5B C 下位枝の成熟葉	658.9	5.92
12-5B C 上位枝の若葉	657.9	6.79
20-C 下位枝の成熟葉	641.4	7.93
20-C 上位枝の若葉	667.3	9.95
イネ (T65)	430.0	4.85

フローサイトメトリーを用いイネのゲノムサイズを 430 Mbp/1C として推定した。3 葉/株，3 株の平均を示す。

6. 形態及び生育の特性

樹高及び胸高直径について、組換え体と非組換え体の間で、統計学的な差異は認められなかった。葉型についても大きさや外観に差異はなかった。樹形や葉色などの

形態外観についても、組換え体と非組換え体の間で顕著な差異はみられない（図 6）。

7. 有害物質の産生

I フェノール性物質の検証

閉鎖系温室及び環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉から農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って（文献 15），フェノール性の酸性物質を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを行った。その結果、組換え体と非組換え体で定性的な差異は認められなかった（図 7）。

II 閉鎖系温室サンプルでのガスクロマトグラフィー

閉鎖系温室及び環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体から、農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って（塩見ら 1992），揮発性物質を捕集し、ガスクロマトグラフィーを行った。その結果、組換え体と非組換え体で定性的な差異は認められなかった（図 8）。

III サンドイッチ法によるアレロパシー物質の検定

閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉を用いて農業環境研究成果報告第 14 号の方法に従って（藤井 1998），サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス（Great Lakes 366）を用いた。その結果、形質転換体と非組換え体で差異は認められなかった（表 2，3）。

環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉を用いて農業環境研究成果第 14 号の方法に従って、鍼込み試験による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス（Great Lakes 366）を用いた。10 個体を 1 反復とし、4 反復試験を行い、幼根及び上胚軸の長さについて測定した。これらの結果について分散分析を行ったところ、組換え体と非組換え体で差異は認められなかった（表 4）。

IV 栽培土壌における微生物相への影響評価

本組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響評価について、環境影響評価温室で、遺伝子組換えユーカリを 6 ヶ月間（温室移植後 8 ヶ月目）30 リットルの園芸用土にてポット栽培し、根圏土壌 30 g をサンプルした。採取土壌を、滅菌水 270 mL と共に 500 mL 容量の三角フラスコにて、10 分間震盪したのち、滅菌水で希釈して寒天平板培地に塗布した。土壌 1 g あたりの糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数（CFU/g）を比較した。組換え体と非組換え体の間で差は認められず、本組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響はないと考えられた（表 5）。

8. 競合に関する優位性

影響を受ける可能性のある野生植物の特定

環境影響評価試験温室においては、本組換えユーカリと非組換えユーカリとの間に生育特性に顕著な差異は認められていない（図 6）。また、非組換え体ユーカリ



図 6. 非ストレス環境下における生長性

環境影響評価温室に移植後、3ヶ月目の生育状況。濃色ポットは非組換え体、他のポットは組換え体、両者に顕著な形態や成長の差異は認められない。(平成15年12月9日撮影)

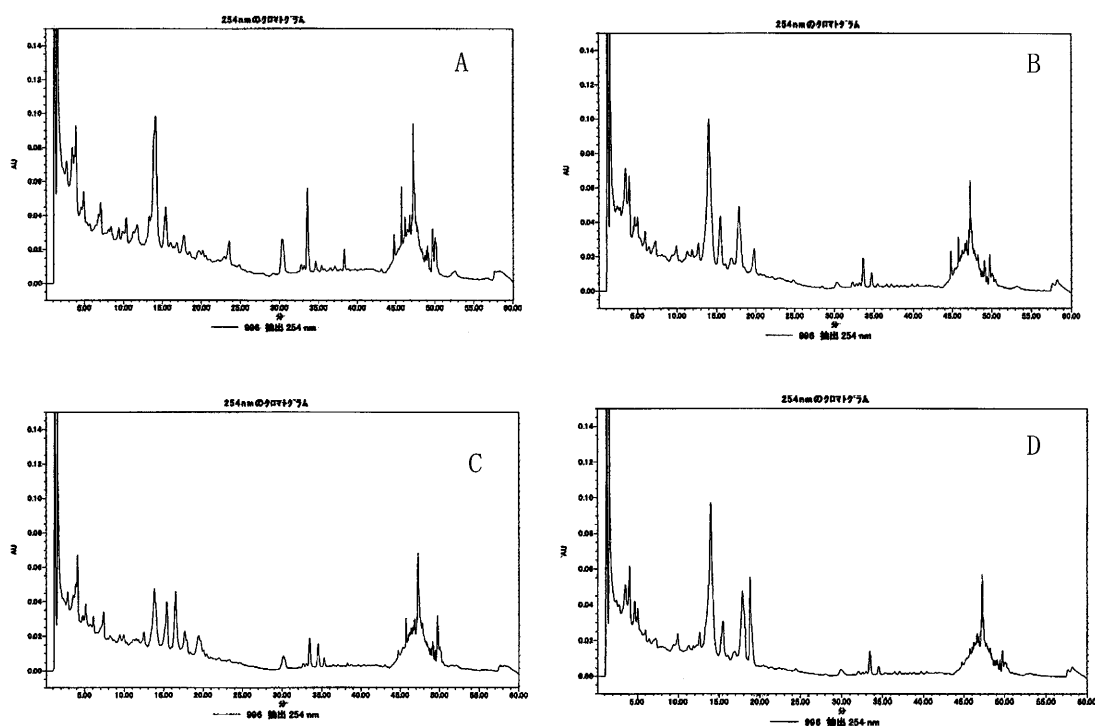


図 7. フェノール系物質の高速液体クロマトグラフィーによる成分の分析

閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉から農業環境研究所報告第8号の方法に従って、フェノール性酸性物質を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを行った。図A：非組換え体，B：12-5B，C：12-5C，D：20-C。形質転換体と非形質転換体で定性的差異は認められなかった。

E. camaldulensis の苗木（30 cm 高で越冬）は成長が緩慢で、周辺の1年生草本に席卷されている（図9）。

考 察

1. 耐塩・耐乾燥性

ユーカリに *codA* 遺伝子を導入した組換え体ユーカリは、非形質転換体に比べ明確な耐塩性・耐乾燥性を獲得した（図5）。また、この組換え体ユーカリは導入遺伝子の存在が生育に対し有利に作用しない通常環境下における栽培においても、遺伝子の安定した発現が確認されて

いる。つまり、バラ科木本などで観察される枝変わり現象は栽培期間の18ヶ月では認められず、導入遺伝子が安定して娘細胞へ伝播していることを示している。木本植物ユーカリにおいて導入遺伝子が通常環境下で安定して維持されることが示唆された。

2. 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

I 有害物質の産生性

オーストラリアにおける摂食昆虫としては、コガネムシ類、ハムシ類、ゾウムシ類、ハバチ類のような葉を食するもの、キジラミ類、ヨコバイ類やカタカイガラムシ

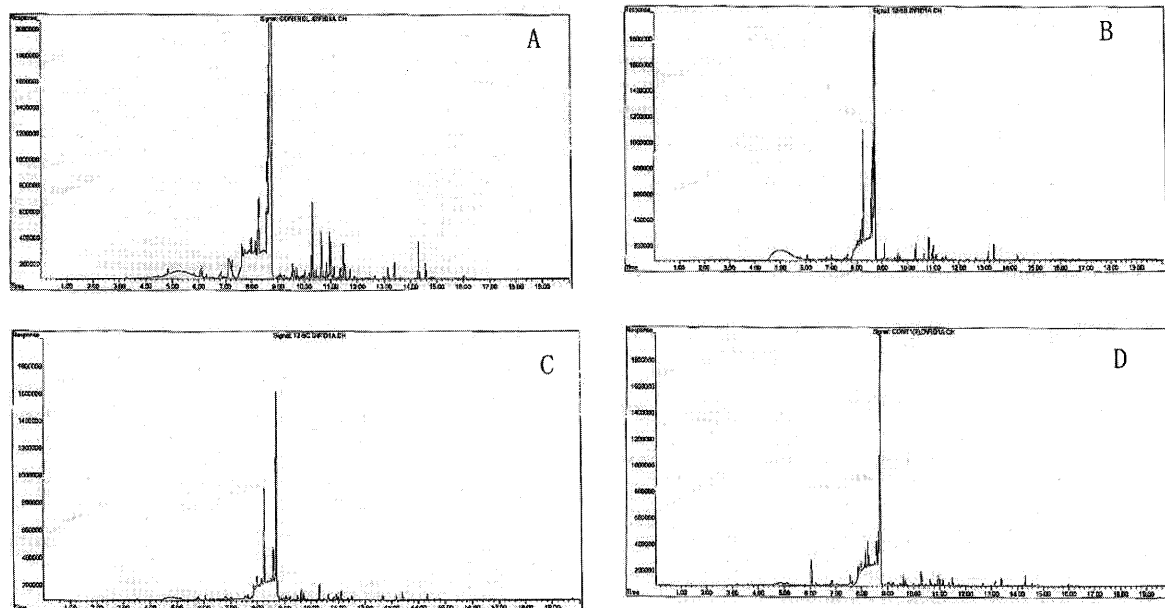


図 8. 揮発性物質のガスクロマトグラフィーによる成分の分析

閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体から、農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って、揮発性物質を捕集し、ガスクロマトグラフィーを行った。図 A: 非組換え体, B: 12-5B, C: 12-5C, D: 20-C. 形質転換体と非形質転換体で定性的差異は認められなかった。

表 2. サンドイッチ法による他感物質の検定

	個体数	幼根長 (mm)	上胚軸 (mm)
非形質転換体	10	4.0	9.2
形質転換体 12-5B	10	4.3	9.3
形質転換体 12-5C	10	3.9	9.7
形質転換体 20-C	10	4.2	9.3

閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉を用いて農業環境研究成果第14集の方法に従って、サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス (Great Lakes 366) を用いた。形質転換体と非形質転換体で差異は認められなかった。

類のような樹液を吸う昆虫, ならびにカミキリムシ類や大型のボクトウガ類のような, その幼虫が樹木の本質部に穴を開けるいわゆる木食い虫が挙げられる (プライオー 1981)。日本では, 名古屋市のユーカリ類栽培温室のユーカリ類を加害している鱗翅類の調査から, ハマキガ科のチャノコカクモンハマキ, ホソバチビヒメハマキとバンジロウツノエグリヒメハマキが確認された (那須ら 2004)。しかし, 非組換え体 *E. camaldulensis* の隔離ほ場での事前栽培では, これら鱗翅類のほ場での存在やこれらの食害と考えられる状況はこれまでは認められなかった。よって, ユーカリを特定として摂取する昆虫への影響のおそれはない判断された。

これまでにユーカリが, 日本における自然生態系に対して生物多様性に著しく影響を生じさせるような有害物質を産生させる報告はされていない。また, *E. camaldulensis* のアレロパシー物質は 1,8-cineole, α -pinene, β -pinene 及び α -phellandrene のモノテルペノイドが主成分であり, その

表 3. サンドイッチ法による検定の分散分析

I) 胚軸

要因	d.f.	S.S.	M.S.	F	P	判定
系統	3	1.475	0.4917	0.0942	0.9628	ns
誤差	36	187.900	5.2194			
全体	39	189.375				

II) 根

要因	d.f.	S.S.	M.S.	F	P	判定
系統	3	1.0	0.333	0.2198	0.8820	ns
誤差	36	54.6	1.517			
全体	39	55.6				

サンドイッチ法による有害物質検定結果 (表2) について, 分散分析を行った。その結果, 胚軸伸長 (I), 根の伸長 (II) のいずれについても組換え体と非組換え体間で, 差異は認められなかった。

他 gallic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid などが同定されている (西村 1987)。これら有害物質のアレロパシー性は, 日本で栽培できるユーカリ種間で, 弱い部類に属することが知られている。

本組換えユーカリは, 耐塩性を choline oxydase の機能により付与されているが, 当該酵素は有害物質に該当しない。また, 本組換えユーカリと対象の非組換えユーカリとの間で, 液体クロマトグラフィー (図 7) 及びガスクロマトグラフィー (図 8) により比較を行ったが, それぞれの溶出パターンに定性的差異はなく, 新たな物質 (ピーク) は認められなかった。加えて, サンドイッチ法の定性試験 (表 2 及び 3), 鋤き込み試験 (表 4), 土壌の

表 4. 鉢込み試験による他感物質検定の結果

I) 胚軸

要因	d.f.	S.S.	M.S.	F	P	判定
系統	3	26.6186	8.8729	1.5671	0.1999	ns
反復	3	17.9186	5.9729	1.0549	0.3703	ns
系統×反復	9	7.7563	0.8618	0.1522	0.9978	ns
誤差	144	815.3000	5.6618			
全体	159	867.5938				

II) 根

要因	d.f.	S.S.	M.S.	F	P	判定
系統	3	4.725	1.5750	0.7431	0.5280	ns
反復	3	17.825	5.9420	2.8034	0.0420	*
系統×反復	9	2.225	0.2472	0.1166	0.9993	ns
誤差	144	305.200	2.1190			
全体	159	329.975				

環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉を用いて農業環境研究成果第14集の方法に従って、鉢込み試験による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス (Great Lakes 366) を用いた。10個体を1反復とし、4反復試験した。上胚軸 (I) 及び根 (II) の伸長について測定し分散分析を行った。その結果、組換え体と非組換え体間で、差異は認められなかった。

表 5. 遺伝子組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響評価

系統	糸状菌	放線菌	細菌
非組換え体ユーカリ	1.95×10^5	4.92×10^5	9.64×10^6
組換え体 12-5B	1.92×10^5	4.77×10^5	9.66×10^6
組換え体 12-5C	2.21×10^5	4.31×10^5	1.11×10^7
組換え体 20-C	1.81×10^5	6.47×10^5	1.02×10^7

環境影響評価温室で、本組換えユーカリを6ヶ月間 (温室移植後8ヶ月目) 30リットルの園芸用土にてポット栽培し、根圏土壌30gをサンプルした。当土壌を、滅菌水270 mLと共に500 mL容量の三角フラスコにて、10分間震盪したのち、滅菌水で希釈して寒天平板培地に塗布した。土壌1gあたりの糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数 (CFU/g) を比較した。組換え体と非組換え体の間で差は認められず、本組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響はないと考えられた。

主要微生物の集団頻度 (表 5) においても統計学的に顕著な差異は認められなかった。これらの結果より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

II 交雑による影響

E. camaldulensis の虫媒による花粉飛散距離の報告はないが、他種のユーカリ花粉の飛散距離は外国において詳細に調べられている。オーストラリア・ビクトリア州東部での13年生 *E. regnans* でアイソザイム分析による花粉飛散距離は42 mであった (Sedgley and Griffin 1989)。さらに、ブラジルの採種園ではリン酸の放射性同位元素でラベルした花粉を用いて測定した結果、最長300 mの飛散が認められたが、大部分は100 m以内であった (Barvour *et al.* 2003)。

花粉の飛散の結果として、雑種種子の形成が考えられるが、オーストラリアの植林では、開放受粉による雑種

種子の形成率は、*E. nitens* と *E. ovata* の間では、0.4% と報告されている (Barvour *et al.* 2003)。オーストラリアのユーカリ林 (*E. macrorhyncha*) において、ここから最大5 km離れたところで、*E. regnans* との雑種樹木が報告されている例がある。これは蜜を摂取する鳥類による種子飛散と考えられている (Eldridge *et al.* 1993)。

E. camaldulensis の開花は、日本の中部で通常樹木年齢10年くらいから開花がみられる。育種利用の際に、温室等で多様な操作を行うことにより、人為的に開花を促進させることが可能であるが、4-5 年齢の樹木における開花は、極めて困難である (Eldridge *et al.* 1993)。*E. camaldulensis* の場合は、虫媒が主体であるため他殖率が、70% 程度と報告されている (Eldridge *et al.* 1993)。日本においては、*E. camaldulensis* を好んで訪花する昆虫は特定されていない。海外では、同種の樹木が同所的に存在し、開花期がそろわないと他殖はおこりにくいと報告されている (Eldridge *et al.* 1993)。よって、地理的に隔離されている個別の樹木について、開花期がたとえそろっても、距離的隔離があるため、他殖が起こりにくいと考えられる。Eucalyptus 属内における種間の自然交雑は、生理的、遺伝的及び物理的要因によって影響を受けることが知られている (Potts and Dungey 2004)。自然での近縁種間交雑の例は報告されているが、一般的に亜属内であっても分類節が変わると雑種弱性や致死性が認められている。*E. camaldulensis* についても同様であり、日本でも公園などで鑑賞栽培がみられる *E. globulus* との自然交雑は非常に起こりにくいことが認知されている (Meddings *et al.* 2003)。これは花器の構造、生理的様態及び遺伝的因子に起因し、多様な要素を配慮し技術的に操作されないと人工交配は成功しないことが知られている (Patterson *et al.* 2004)。

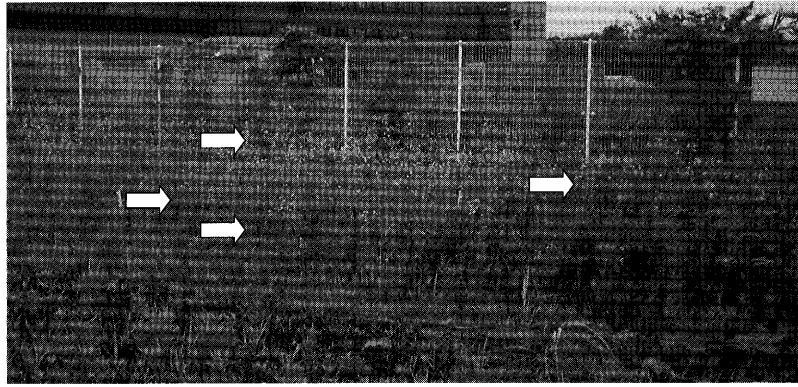


図9. 非組換え体ユーカリの野外栽培による競合性の確認

非組換え体ユーカリを前年野外に8本定植したが、4本は越冬できず、4本のみに生き残った。矢印は非組換え体ユーカリ。1年生草本の生育が旺盛で競合できない。

種子について、日本列島においては、冬期以前に発芽したものの、多くは冬期の低温で枯死する。また関東以北では、霜柱等の凍害も有り、発芽苗が越冬することはほとんどないことが試験研究機関等で認められている。春期に発芽した苗は、在来の草本などに対して競合がないため（図9）、生存の優位性がないことも RITE 等試験研究機関で報告されている。加えて、本邦においては、*E. camaldulensis* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されておらず、仮に本組換えユーカリの野外漏出が起こったとしても交雑等による環境影響の可能性は極めて低いと考えられる。

3. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

codA 遺伝子によってコードされる choline oxydase は本組換えユーカリで恒常的に発現していることにより耐塩性が付与されている。一方、環境影響評価温室における、形態及び生育の特性（図6）と有害物質の産生（図7, 8）について調査した結果、組換え体と非組換え体の間で顕著な差異は認められなかった。このため、塩類濃度の高い土壌での栽培や塩水灌漑が行われない限り耐塩性による競合における優位性はないと考えられる。

結 論

本組換えユーカリと対照の非組換えユーカリとの間では、有害物質の生産性などで有意な差が認められなかったことから、塩類濃度の高い土壌での栽培や塩水灌漑が行われない限り競合における優位性はないと考えられる。また、ユーカリ自体の雑草性は低く、本邦においては、*E. camaldulensis* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されておらず、本組換えユーカリは外部生態系への生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。また、本組換え体に対し、栽培管理を行い、花芽形成が認められたら切除する

措置を行えば、交雑の可能性はなく、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。以上のことから、本組換えユーカリによって、我が国の生物多様性に影響が生じる恐れがないと結論された。なお、当該評価に基づき、平成17年10月12日に、本組換えユーカリは筑波大学遺伝子実験センター隔離ほ場での第一種使用規定承認が、主務省である文部科学省及び環境省によってなされた（<https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenList.do>）。

謝 辞

研究にあたり、材料の維持等に多大なご協力を頂いた、独立行政法人農業生物資源研究所山中慎介博士、筑波大学生命環境科学研究科 池田成志博士に謝意を表させていただきます。なお、本研究は、財団法人 地球環境産業技術研究機構「二酸化炭素固定化・有効利用技術等対策事業（二酸化炭素大規模固定化技術開発）」及び筑波大学学内プロジェクト S の支援を一部受けて推進されたものである。

引用文献

- Attiwill, P.M. and M.A. Adams (1996) Nutrition of *Eucalyptus*, CSIRO Publishing, Sidney.
- Barvour, R.C., B.M. Pott and R.E. Vaillancourt (2003) Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: Exotic hybrids are establishing in the wild. *Australian J. Bot.* 51 (4): 429-439.
- Boland, D.J., M.I.H. Brooker and J.W. Turnbull (1980) *Eucalyptus* seed. CSIRO, Canberra.
- Brooker, M.I.H. and D.A. Kleinig (1983) Field guide to *Eucalypts* South-eastern Australia, Inkata Press, Sydney.
- Deshnium, P., D.A. Los, H. Hayashi, L. Mustardy and N. Murata (1995) Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 29 (5):

- 897-907.
- Ebinuma, H. and A. Komamine (2001) MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:103-113.
- Eldridge, K., J. Davidson, C. Harwood and G. van Wyk (1993) *Eucalypt* domestication and breeding. Oxford University Press, London.
- 藤井義晴 (1998) 寒天を使用した「サンドイッチ法」による植物の葉から出る他感物質の検定. 農業環境技術研究所成果報告, 第 14 集, p. 35-36.
- Hayashi, H., L. Mustardy, P. Deshnum, M. Ida and N. Murata (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12: 133-142.
- 河岡明義・渡邊恵子・南藤和也・杉田耕一・遠藤さおり・松永悦子・海老沼宏安 (2003) 植林事業のための遺伝子組換えユーカリの開発. 第 70 回紙パルプ研究発表会, p. 2-7.
- Lewis, W.H. and M.P.F. Elvin-Lewis (1977) *Medical Botany*, Wiley, NY.
- 前川文夫 監修 (1999) 日本野生植物図鑑. 八坂書房, 東京.
- Meddings, R.A., J.A. McComb, M.C. Calver, S.R. Thomas and R.A. Mazanec (2003) *Eucalyptus camadulensis* × *globulus* hybrids. *Australian J. Bot.* 51: 319-331.
- 那須義次・有田 豊・木村正明・尾形綾子 (2004) 日本においてユーカリ類を加害する鱗翅類. *日本応用動物昆虫学会雑誌* 48: 123-133.
- 西村弘行 編 (1987) 未来の生物資源ユーカリ —そのバイオテクノロジーとバイオサイエンス—. 内田老鶴圃.
- Potts, B.M. and H.S. Dungey (2004) Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New Forests* 27: 115-138.
- Patterson, B., R.E. Valliancourt, D.J. Pilbeam and B.M. Pott (2004) Factors affecting variation in outcrossing rate in *Eucalyptus globulus*. *Australian J. Bot.* 52 (6): 773-780.
- プライオー, L.O. (1981) ユーカリの生物学, 石倉成行訳, 朝倉書店.
- Ross, I.A. (2001) *Eucalyptus globulus*. *MEDICINAL PLANTS OF THE WORLD*. Vol. 2. Humana Press, New Jersey.
- Sedgley, M. and A.R. Griffin (1989) *Sexual Reproduction of Tree Crops*. Academic Press, London.
- 塩見正衛・浅川征男・福本文良・濱屋悦次・長谷部亮・市川裕章・松田 泉・松村 雄・岡田斉男・佐藤 守・鶴飼保雄・本吉徳男・大橋祐子・宇垣正志・野口勝可 (1992) 遺伝子組換えによって TMV 抵抗性を付与したトマトの生態系に対する安全性評価. 農業環境技術研究所報告, 第 8 号, p. 1-51.