

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06007・19K21148

研究課題名（和文）同所性をもつ自生ナタネと遺伝子組換えナタネ間の生殖的隔離機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of reproductive isolating mechanism between rapeseed and transgenic rapeseed in sympatry

研究代表者

大嶋 雅夫（OSHIMA, Masao）

筑波大学・生命環境系・客員研究員

研究者番号：30818612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子組換えセイヨウナタネにおける生殖的隔離機構の解明するため、葉緑体SSRマーカーを使用し、自生セイヨウナタネの葉緑体情報に基づく遺伝的背景の把握を行った。

葉緑体5領域のSSRマーカーを用いた解析及びこの結果を基にした系統樹の作成により、日本に自生するセイヨウナタネ系統は27のハプロタイプに分類され、その83%が4つのクレードに分類されることを明らかとした。また、クレード内の遺伝子組換えセイヨウナタネの分布により、生殖的隔離機構存在が改めて示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年間200万t程度輸入されるセイヨウナタネの内、およそ8割が遺伝子組換えであるとされ、輸送時のこぼれ落ちにより自生が確認されている。商業利用されている遺伝子組換えセイヨウナタネは生物多様性影響評価を終了しており問題はないが、遺伝子組換え作物に対する懸念は存在している。

一方、農林水産省が行った調査により、自生する遺伝子組換えセイヨウナタネ群落は経年で増大していない事が明らかとなっている。これには、生殖的隔離機構が関係していると申請者は考えているが、本研究で生殖的隔離機構の理解を進めたことは、科学的観点のみならず遺伝子組換えセイヨウナタネに対する懸念に対する答えにも結び付くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to elucidate the reproductive isolating mechanism in transgenic oilseed rape, the chloroplast SSR marker was used to understand the genetic background based on the chloroplast information in the feral oilseed rape.

By analysis using the chloroplast SSR markers of 5 chloroplast regions and creating a phylogenetic tree, the Japanese oilseed rape strains native to Japan were classified into 27 haplotypes. Also, 83% of them were classified into 4 clades. Moreover, the distribution of transgenic oilseed rape in the clade suggested again the existence of a reproductive isolating mechanism.

研究分野：育種

キーワード：Brassica napus 葉緑体SSRマーカー コアコレクション 遺伝子組換え

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本において、セイヨウナタネは 1800 年代後期から、多くの作物とともに導入され、油糧生産のために用いられてきた。現在、多様な特性を付与した遺伝子組換え作物が開発され、年間 200 万トン程度の遺伝子組換えセイヨウナタネが日本に輸入されている。このうち、およそ 8 割が遺伝子組換えセイヨウナタネであるとされている。商業利用されている遺伝子組換えセイヨウナタネは生物多様性影響評価を終了しており、わが国には交雑可能な近縁野生種は存在しないと判断されている。しかしながら、今後導入されるであろう耐虫性などの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セイヨウナタネであれば浸透交雑をとおして、わが国の生物多様性に影響を与える可能性を考慮する必要がある。実際に生物多様性影響評価を終了している遺伝子組換えセイヨウナタネは、輸入港から搾油工場等への輸送の途中に種子がこぼれ落ち、自生しているものが確認されている。

しかし、農林水産省が行った調査により、自生する遺伝子組換えセイヨウナタネ群落は経年で増大していない事が明らかとなっている。

2. 研究の目的

自生する遺伝子組換えセイヨウナタネ群落は経年で増大していない事が明らかとなっているが、同所性をもつ自生セイヨウナタネと遺伝子組換えセイヨウナタネ間の遺伝子浸透が低い理由は明らかとされていない。申請者はこの原因は、生殖的隔離機構のようなものが遺伝子組換えセイヨウナタネの母本として用いられる近代セイヨウナタネ品種もしくは、遺伝子組換えセイヨウナタネに存在することによるものだと仮定し、この生殖的隔離機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

植物材料としたセイヨウナタネには、Chen *et al.* (2020) により日本ジーンバンク保有の栽培品種から核 SSR マーカー多型を基に作出されたコアコレクション 96 品種、2016 年に農水省により輸入港湾周辺で採取された自生系統 (非遺伝子組換え 254 系統、遺伝子組換え 99 系統)、日本に輸入されている遺伝子組換えセイヨウナタネの母品種から入手可能であった 3 系統を使用した。

葉緑体 SSR マーカーには、既報 (Allender *et al.* 2007; Flannery *et al.* 2006) の葉緑体 SSR マーカーを *Brassica napus* strain ZY036 chloroplast (HU Zhi-Yong, *et al.* 2011) の配列情報を基に改変し、使用した。葉緑体ゲノムの 5 つの領域から作成した 5 つの SSR マーカーを BS-tag 法 (Shimizu *et al.*, 2011) を用いて増幅し、DNA シークエンサー PRISM 3130x (ABI) により分離検出後、Gene Mapper (ABI) を用いて断片長を決定した。遺伝型データに基づき、Power Marker v. 3.25 及び GenAIEx 6.503 を用いて、遺伝的多様性評価、系統樹の構築を行った。

三重県の 3 カ所の河川敷 (内部川、鈴鹿川、雲出川) にて、時期を 3 回に分け (4/14~18、5/27~29、6/11~12) 生育する自生セイヨウナタネの葉及び種子のサンプリングを行った。サンプリング箇所は、GPS を用いて位置を記録した。遺伝子組換えの判定は、*cp4epsps* 遺伝子及び *bar* 遺伝子をターゲットとした PCR にて行った。

4. 研究成果

本研究では、葉緑体 SSR マーカーを使用し、自生セイヨウナタネの葉緑体情報に基づく遺伝的背景の把握を行った。5 領域の葉緑体 SSR マーカーを用いた解析により、コアコレクション 96 品種、自生系統 (非遺伝子組換え 254 系統及び遺伝子組換え 99 系統)、遺伝子組換えセイヨウナタネの母品種 3 系統は、27 のハプロタイプに分類されることが明らかとなった。また、この結果を基に系統樹 (図) の作成を行ったところ、自生系統の 83% が 4 つのクレード (, , ,) に分類されることが明らかとなった。また、このうち 2 つのクレード (,) には、日本の育成品種ならびに近代品種を含む海外系統が多く属し、遺伝子組換えセイヨウナタネの母品種 3 系統は、クレード に含まれた。一方、その他 2 つのクレードでは、1 つのクレード () にドイツの栽培品種 1 品種が属するのみであり、他のクレード () には栽培品種は属さなかった。また、この 2 つのクレードには、クレード , と比較し、少数の遺伝子組換え自生系統が含まれるのみであった。このことから、日本の自生セイヨウナタネには、輸送時のこぼれ落ち等に由来する系統と近代品種と、それとは異なる脱栽培化に

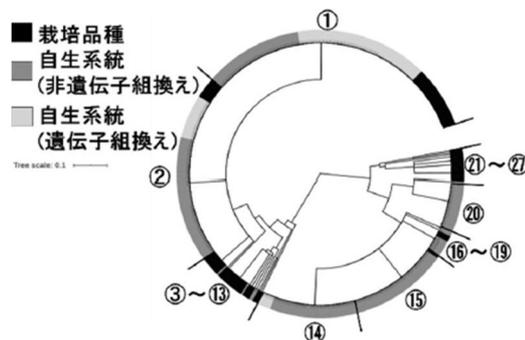


図. 葉緑体 SSR マーカーを用い作成した系統樹

より自生化したものの存在が示唆された。さらに、遺伝子組換え自生系統がクレード , に偏り含まれることは、生殖的隔離機構が存在する可能性を示唆している。このこと明確にするため、育成初期の栽培品種やより多くの海外品種について解析を今後も進めていく。

また、本研究では、三重県内の3つの河川敷(内部川、鈴鹿川、雲出川)での自生セイヨウナタネのサンプリングを行った。この試料を使い遺伝子組換えセイヨウナタネからの遺伝子流動を調べるため、自生セイヨウナタネに含まれる遺伝子組換えセイヨウナタネをPCRにて識別し、遺伝子組み換えと非遺伝子組換えセイヨウナタネの分布を明らかとした。

<引用文献>

R. Chen, A. Shimono, M. Aono, N. Nakajima, R. Ohsawa, Y. Yoshioka (2020) Genetic Diversity and Population Structure of Feral Rapeseed (*Brassica Napus* L.) in Japan. *PLoS One*. 15(1):e0227990.

C.J. Allender, J. Allainguillaume, J. Lynn, G.J. King (2007) Simple Sequence Repeats Reveal Uneven Distribution of Genetic Diversity in Chloroplast Genomes of *Brassica Oleracea* L. And (N = 9) Wild Relatives. *Theor Appl Genet*. 114(4):609-18.

M.L. Flannery, F.J.G. Mitchell, S. Coyne, T.A. Kavanagh, J.I. Burke, N. Salamin, P. Dowding, T.R. Hodgkinson (2006) Plastid Genome Characterisation in *Brassica* and *Brassicaceae* Using a New Set of Nine SSRs. *Theor Appl Genet*. 113(7):1221-31.

Z.Y. Hu, W. Hua, S.M. Huang, H.Z. Wang (2011) Complete chloroplast genome sequence of rapeseed (*Brassica napus* L.) and its evolutionary implications. *Genet. Resour. Crop Evol*. 58 (6); 875-887

T. Shimizu, K. Yano (2011) A Post-Labeling Method for Multiplexed and Multicolored Genotyping Analysis of SSR, Indel and SNP Markers in Single Tube with Bar-Coded Split Tag (BStag). *BMC Research Notes*. 4;161

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Erina Yanagi, Mai Tsuda, Shigeru Matsuyama, Yooichi Kainoh, Masao Oshima, Ryo Ohsawa
2. 発表標題 Variations in resistance to the diamondback moth of feral Brassica napus growing around the ports in Japan
3. 学会等名 15th INTERNATIONAL SOCIETY FOR BIOSAFETY RESEARCH Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳江莉那, 大嶋雅夫, Chen Ruiku, 津田麻衣, 大澤良
2. 発表標題 葉緑体マーカーに基づく日本におけるセイヨウナタネ (Brassica napus) コアコレクションの多様性解析
3. 学会等名 育種学会 第136 回講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----