

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 11 月 12 日

文部科学大臣 柴山 昌彦 殿
環境大臣 原田 義昭 殿

氏名 国立大学法人 東北大学
申請者 総長 大野 英男 印

住所 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、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第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>Rubisco 生産抑制イネ (<i>RBCS2</i>-antisense, <i>Oryza sativa</i> L.) (AS-71)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：宮城県大崎市鳴子温泉字蓬田 232 番 3 号 名称：東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 34 年 3 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 隔離ほ場施設（東西約 56m×南北約 95m）内の砂質水田（東西 25m×南北 20m）を使用する。本隔離ほ場の排水は、施設内周辺の排水パイプに回収され、ため池に入り、循環する設備となっている。なお、排水路を通して循環される水の一部は、この隔離ほ場の土質は火山灰土壌であるため排水性が良く、結果として浸透する。しかし、浸透であるため、種子の隔離ほ場外への流出はない。また、二重の安全のために、隔離ほ場の周囲（フェンスの内側）に、深さ 30cm の堀を築き、時間雨量 300mm 程度でも、種子が隔離ほ場外に流れることはない設計となっている。</p> <p>(2) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場全体の外側に、メッシュフェンス（高さ 185cm の 5 cm メッシュのフェンスを 50cm 四方のブロック塊支柱に埋め込む。）を設置している。</p> <p>(3) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を記載した標識を見やすい所に掲げている。</p> <p>(4) 花粉の飛散を防止するために、隔離ほ場から東側の一般農家ほ場と西側の研究ほ場側は高さ 20m 以上の樹木（防風林）で覆われている。また花粉の飛散や小動物による種子の隔離ほ場外への流出を防ぐために、イネの最終葉である止葉の出現した時から収穫時までは、防雀網（2 cm メッシュ）を、栽培しているイネを覆うように設置する。</p> <p>(5) 本隔離ほ場には、使用した機械、器具、靴等に付着した土を洗浄するための洗場を設置している。</p> <p>(6) 本隔離ほ場は、直近の一般農家水田からおおよそ 400m、また直近の東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターの実験ほ場（水田）からおおよそ 200m 離れた場所に位置する。</p> <p>2 隔離ほ場の作業要領</p> <p>本遺伝子組換えイネ及び比較対象のイネ品種以外の交配可能な植物が隔離ほ場内の栽培実験区画で生育することを最小限に抑える。</p>

遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法

- (2) 本遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に運搬する場合は、当該イネが漏出しないような構造の容器等に納めてから運搬する。本遺伝子組換えイネを保管する場合には、当該イネが漏出しないような構造の容器内に納め、保管する。
- (3) 隔離ほ場内の栽培実験区画で栽培したイネの残さ及び発生した植物は、試験終了後速やかに隔離ほ場内に鋤き込むことにより確実に不活化する。種子は漏出しないような容器に納め、オートクレーブにより不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具又は隔離ほ場で作業した者の靴等は、作業終了後隔離ほ場内で洗浄し、隔離ほ場内の植物残さ、土等を外に持ち出さない等により、意図せずに組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場の設備が本来有する機能を発揮するよう維持、管理を行う。
- (6) (1)から(5)に掲げる事項を、使用等をする者に遵守させる。
- (7) 使用する組換えイネによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

生物多様性影響評価書

Rubisco 生産抑制イネ (*RBCS2*-antisense, *Oryza sativa* L.) (AS-71)

東北大学大学院農学研究科

目次

Page

第 1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付けおよび自然環境における分布状況	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	7
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	12
(1) 供与核酸に関する情報	12
(2) ベクターに関する情報	19
(3) 組換え植物の調製方法	21
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	26
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	30
(6) 組換え植物と宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	30
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	37
(1) 使用等の内容	38
(2) 使用等の方法	38
(3) 承認をうけようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法	41
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	42
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似している環境での使用等の結果	42
(6) 国外における使用等に関する情報	42
第 2 項目ごとの生物多様性影響の評価	43
1 競合における優位性	43
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
(2) 影響の具体的内容の評価	44
(3) 影響の生じやすさの評価	44
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44

2 有害物質の産生性	45
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の 特定	45
(2) 影響の具体的内容の評価	46
(3) 影響の生じやすさの評価	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等 の判断	46
3 交雑性	47
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の 特定	47
(2) 影響の具体的内容の評価	47
(3) 影響の生じやすさの評価	48
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等 の判断	48
4 その他	48
第3 生物多様性影響の総合的評価	48
引用文献リスト	51

第 1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付けおよび自然環境における分布状況

ア 宿主の属する分類学上の種の和名、英名および学名

和名: イネ, 英名: rice, 学名: *Oryza sativa* L.

イ 宿主の品種名または系統名(別添 1)

品種名: 能登ひかり(ノトヒカリ)

登録年月日: 1986年11月21日

登録番号: 第1199号

農林登録番号: なし

地方番号: 石川8号

ウ 国内及び国外の自然環境における自生地域

イネ(*Oryza sativa*)の近縁野生種は、生育地の水条件に適応しながら、世界中の熱帯及び亜熱帯に分布し、生育している(星川、1989; 佐藤、2008)。特に、ラオスからインドの北東地域を東西とし、さらに、ミャンマーから中国雲南省を南北とした地域は、多様なイネ(*Oryza sativa*)近縁野生種が自生している。しかし、日本では、宿主植物のイネ(*Oryza sativa*)及びその近縁野生種が自生していない(松尾、1989; 高橋、1988; 佐藤、2008)。

(2) 使用等の歴史及び現状

ア 国内及び国外における使用等の歴史

イネ(*Oryza sativa*)の祖先種は *O. nivara* と *O. rufipogon* で、インド、バングラディシュからミャンマー、タイ北部、中国雲南省にかけての帯が起源とされている(佐藤、2008)。その後、12,800年前から11,500年前のヤンガー・ドリラス期という汎ユーラシア規模で起こった寒冷期の際に、イネの栽培化が進んだと考えられている(宮本、2009)。

日本へは、縄文時代晩期(紀元前1,300年から紀元前800年頃)に、1)中国華北地方より朝鮮半島経由(岡崎、2002)、2)中国華北より山東半島、黄海経由(岡崎、2002)、3)揚子江下流域より東シナ海経由(岡崎、2002)、4)中国華南地方より台湾、南西諸島経由などの経路(佐藤、1996)で、伝来したと推定されている。さらに、近年のプラント・オパール分析により、縄文時代晩期より早い段階の中期～後期に、既に、日本に伝来したとする説もある(佐藤、2008)。福岡平野の板付遺跡や菜畑遺跡は、日本最古の水田址遺跡とされており、紀元前1,000年頃のものと考えられている。紀元前300年以降の弥生時代中期までには、東日本一帯から東北地方にまで広がったとされている(蓬原、1990)。稲作に代表される農耕は、日本の歴史、伝統・文化、及び生活習慣・風俗に大きな影響を与えると共に、現在においても、日本人の主食として、イネは全国的に栽培されている。

イ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態、及び用途

(ア) 栽培地域

北は日本の北海道や中国の東北地域から、南はオーストラリア南部までが、イネの栽培地域となっている。しかし、その栽培の中心

はアジアのモンスーン地帯であり、全世界のイネ栽培地の約 9 割を占めている。2014 年の統計によれば、世界におけるイネの栽培面積は、約 1 億 6 千万 ha、玄米の総生産量は、約 5 億トンである(United States Departments of Agriculture 「World Market and Trade」; http://www.fas.usda.gov/data/search?f%5B0%5D=field_report_type%3AWorld%20Production%2C%20Markets%2C%20and%20Trade%20Reports)。

(イ) 栽培方法

イネ(*Oryza sativa*)は、日本型、インド型、及びジャワ型の 3 型に分類される(星川、1989)。日本では、日本型イネが主たる栽培品種である。北海道から九州及び沖縄まで南北に気候変化の大きい日本では、常に品種改良が進められ、各地に適した多くの品種が栽培されている。水資源に恵まれた日本においては、水田に苗を移植する(田植え)栽培方法が一般的である(星川、1989)。しかし、近年、農作業の効率化及び経費削減を目指し、湛水した水田のみならず、乾田に対しての直接播種する方法(直播)も普及してきている(姫田、1999)。一部の二期作を行う地域を除き、日本では、通常、春に播種して秋に収穫を行う。田植えが可能となる平均気温の最低は 13°C である(星川、1989)。

(ウ) 流通実態

米の流通経路としては、JA(農業協同組合)や集荷業者が、生産者(農家及び農業生産法人)が収穫した米を集荷し、流通経路に賦与するのが、一般的である。この集荷の段階で、JA などでは、農産物検査員が米の品質等の検査を行う。集荷された米は、卸業者によって

精米され、量販店や生協などを通じ、消費者へと供給される。しかし、近年、米価下落による生産者の収入の減少、または、消費者の食に対する安全、安心を求める意識の高まりにより、JA や集荷業者を介さず生産者と消費者の直接取引も増えてきている。米の消費量については、加工・外食が全体の 53%と高い水準を占める実態にあるのが、近年の傾向である。

(エ) 用途

日本の米生産量は、平成 26 年度産で約 840 万トン(農林水産省 作況調査:

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#r)で、主食用米の他に、米粉用、餌米用、加工用米、及び備蓄米として使用されている。一方、国家貿易によって輸入している米(MA 米)は、平成 25 年度で 77 万トンである(農林水産省 米に関するマンスリーレポート:

<http://www.maff.go.jp/j/seisan/keikaku/soukatu/mr.html>)。主に、MA 米は低価格のため、国産米では価格面で対応しがたい加工食品の原材料への使用や、飼料用米、または、海外への食料援助等に活用されている(農林水産省 加工原材料用に係る政府所有ミニマム・アクセス米及び政府所有備蓄用精米の販売について:
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/syoryu/hanbai/kakou-ma-teirei.html>)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

ア 基本特性

イネは一年生で、種子で繁殖する中空の茎を持つ木本的植物である。葉は平行脈を持ち、細長く、薄いものが多い。ススキのように根出葉が多いものもあれば、ヨシのように茎葉が多いものもある。葉の基部が茎に巻き付いて葉鞘を形成する。茎には節があり、節ごとに葉が付き、根が円周上に出現する。茎は中空であることが多く、節がしきりとなっている。茎は木質化して堅くなるが、形成層が存在しないため、成長し太くなることはない。イネは、風によって花粉媒介を行うため、花は花弁を失い、雄しべは長く、毛が生えていることが多い。また、花序が変形した小穂と呼ばれる偽花を一単位とし、通常栽培条件下では 100~150 の小穂が集合して一穂を形成する。小穂内の子房が成熟した果実を穎果と呼び、これがさらに外穎と内穎に包まれた状態となっている（星川、1989）。

イ 生息又は生息可能な環境の条件

通常の栽培可能温度は、20℃以上で、イネは湛水条件(水田)で栽培される。生育最低温度は 10~12℃、開花結実には 23℃を必要とする。栽培地域、品種、栽培管理等によって異なるが、出穂、開花から登熟期前半で平均気温より高い日が続くと障害が発生する。また、逆に、この時期に低温が続くと、不稔率が高まる。元来、水生植物であるイネは要求水量が大きな作物であり、土壌水分が表面層で水分 10%以下、下層土で 12%以下では干ばつ害が発生する（松木、1940）。

ウ 捕食性又は寄生性

イネに捕食性、並びに寄生性はない。

エ 繁殖又は増殖の様式

(ア) 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

イネは種子繁殖性である。種子の散布は、籾の老化が進み枝梗から種子が脱落することで行われる。熱帯に分布するインド型イネとは異なり、日本型の脱粒性は極めて低い（松尾、1990b）。休眠性は品種間差が大きい、一般的に日本型イネは、秋に収穫して室温に保管した場合、翌春には休眠は失われる（松尾、1990b）。しかし、種子の発芽力(寿命)は、低温・低湿条件下では長期間の維持が可能である（松尾、1990b）。また、室温条件下でも種子水分を 9.7%以下にすることで 95%以上の発芽率を 5 年間維持することができる（松尾、1990b）。しかし、一般の日本型イネ品種の白色米種子を土壌中に埋蔵した場合、収穫年の最初の冬の間には大部分の種子は発芽能を失ってしまう（松尾、1990b）。

(イ) 栄養繁殖の様式(ひこばえ、塊茎、塊根、葡萄枝等)並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

イネは一年生の種子繁殖植物であるため、通常の栽培環境下においては、収穫後、個体は枯死する。特に、日本では、温暖地域(沖縄等)以外、通常、冬の低温のため枯死し、越冬することはない。しかし、人為的に適切な水分や温度条件が管理された場合は、種子収穫後も個体を維持することができる。例えば、節から発生する分枝を植え替えることによって株を増やすこともできる（松尾、1989）。また、刈株から「ひこばえ」と呼ばれる新しい分げつが発生し成長する場

合もあるが、通常は冬を迎え低温に晒されることにより枯死に至る。

(ウ) 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる性質を有する場合にはその程度

イネの自殖性は高度で、日本型イネの他殖率は 0.6～3.9%程度である (Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice), No.14, 1999: <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815658.pdf>)。

他殖性の程度を示す他の情報として、開花期間の重複する 2 品種(花粉親、種子親) を用いた花粉飛散による交雑試験が行われている。

農林水産技術会議の報告によると、東北農業研究センター及び九州沖縄農業研究センターによる試験の結果、隔離距離が 4.5 m の場合は交雑率が 0.6%以下、10 m では 0.04%以下) (農林水産技術会議、

2003)、また平成 16 年度に実施された調査では、風下側に 25.5 m 離れた位置での交雑が認められ (農林水産技術会議、2008)、「第 1

種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」においてイネの隔離距離は 30 m と定められた。一方、平成 18～19 年度の北海道立農業試験場においては、他殖する確率を高めるために、種子親を冷水処理により不稔(不稔率 40～50%)を生じさせ特殊な条件下で交雑試験を行った。

その結果、特殊な環境下では、花粉親から 237 m 離れた位置における交雑率が 0.024% (平成 19 年度試験)、また、花粉親から 600

m 離れた位置での交雑率 0.028%が確認された。しかし、これらの交雑率は極めて低い値であった。イネの自家不和合性及びアポミクシスは報告されていない。また、国外では、栽培イネと交雑可能な

近縁野生種(野生イネ：AA ゲノムを有する *O.rufipogon*、*O.nivara* 等)が自生している地域もあるが、それら野生イネが日本で自生して

いるという報告はない(松尾、1989; 高橋、1988; 佐藤、2008)。

(エ) 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの受粉形式は風媒であり、葯は開花直前には開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる。すなわち、開花前に自花の葯から受粉してしまうため、他家(花)からの風媒による受粉の確率は栽培品種においては極めて低く、1%以下である(松尾、1990a)。穎花には6本の葯があり、各葯には1,000個以上の花粉が含まれている(松尾、1990a)。稔性はほぼ100%で、形状は球形、葯内では粘質で花粉塊をなしている。しかし、葯が開裂し始めると花粉表面が乾き、粘着性が失われ、飛散しやすくなる。花粉の寿命は、一般に3~5分、最大で10分程度とされている。

オ 病原性

認められていない。

カ 有害物質の産生性

近年、イネにおいてアレロパシー作用(植物が放出する化学物質が他の生物に阻害的、または促進的作用を及ぼす現象)が、特に、雑草の生育抑制に関わる知見として報告されている。しかしながら、一般に、イネのアレロパシー活性は、近代の栽培種においては低く、野生種やインド・フィリピン・バングラデシュ起源の栽培種では、活性が高いことが報告されている(Dilday et al., 1994)。また日本型イネでは、赤米系統の一部(阿波赤米)で、アレロパシー活性(阻害活性)が、レタスに対して高いこと(Fujii et al., 1994)、また、国際イネ

研究所(IRRI)の研究によれば、イネ 115 系統のうちの 67 系統で雑草抑制効果があることが報告されている (Olofsdotter et al., 1999)。このようなアレロパシー作用を有する物質を「他感物質」というが、他感物質の候補として、フェノール物質、フタル酸類、ヒドロキシサム酸類、さらにはモミラクトンなどが挙げられている。また、他感物質の土壌中での残存期間は、長くて数ヶ月程度と考えられている。また病原体の感染に対する植物の抵抗反応として、ファイトアレキシンと総称される低分子抗菌物質の生産が知られている。イネにおいては、15 種類のファイトアレキシンが単離、同定されている (Otomo et al., 2004)。しかし、アレロパシー作用や病原体に対する植物の抵抗反応は、元来イネのみならず、植物が生存戦略のために獲得した性質であると考えられている。

キ その他の情報

なし。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

ア 構成及び構成要素の由来

RBCS2 (*Rubisco small subunit2*) (RAP-DB code: Os12g0274700) (RAP-DB: <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 構造遺伝子を逆鎖(アンチセンス)方向に過剰発現させた「Rubisco 生産抑制イネ (*RBCS2*-antisense, *Oryza sativa* L.) (AS-71)」の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 に示した。

構成要素	略称	サイズ	Acession No.	RAP-DB code	由来及び機能
イネ <i>RBCS2</i> アンチセンス(逆鎖)発現カセット					
Rubisco small subunit2 プロモーター	<i>RBCS2</i> promoter	2.8 kbp			イネ由来の <i>RBCS2</i> gene コーディング領域の上流、約2.8 kbp由来の推定プロモーター領域。イネの光合成器官において極めて高い遺伝子の発現活性を示す。
逆鎖Rubisco small subunit2 構造遺伝子	<i>Antisense RBCS2</i>	0.8 kbp	AK061611	Os12g0274700	イネ由来の <i>RBCS2</i> の翻訳領域。5種類のRubisco small subunit族の中で、最も発現量が高い遺伝子である。
ノバリン合成酵素ターミネーター	<i>NosT</i>	0.3 kbp	AF485783		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノバリン合成酵素遺伝子3'非翻訳領域で、転写ターミネーターおよびmRNAのポリアダニル化シグナルを含む。
ビアラホス耐性遺伝子発現カセット					
イネ アクチン1 プロモーター	<i>actin1</i>	1.5 kbp	S 44221	Os03g0718100	イネのアクチンをコードする遺伝子の推定プロモーター領域。全ての器官において恒常的な発現活性が期待できる。
ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ 構造遺伝子	<i>bar</i>	0.6 kbp	X 17220		<i>Stereoptomyces hygrosopicus</i> 由来。除草剤ビアラホスを分解し無毒化する。そのため、組換えイネの選抜マーカーとして働く。
ノバリン合成酵素ターミネーター	<i>NosT</i>	0.3 kb	AF485783		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノバリン合成酵素遺伝子3'非翻訳領域で、転写ターミネーターおよびmRNAのポリアダニル化シグナルを含む。

表 1 供与核酸のサイズ、構成要素、由来及び機能

イ 構成要素の機能

現在、過去 80 万年以上におよぶ大気 CO₂ 濃度の推移が明らかとなっている。この期間、数回の氷河期と間氷期が繰り返され、氷河

期には CO₂濃度が約 200 ppm、一方、間氷期には約 280 ppm で、ほぼ規則正しく推移してきた。現在は、間氷期にあたり、産業革命前の 1 万年間の CO₂濃度は、従前通り、約 280 ppm であった。しかし、産業革命以降、化石燃料の消費と森林破壊により、CO₂濃度は急激な上昇を示し、現在は 400 ppm になっており、21 世紀中には、600 ppm に達するとの予測もある。CO₂は地表から長波放射を吸収し、地表に向けて再放出する「温室効果ガス」であることより、CO₂濃度の上昇が地球の温暖化をもたらしていることに間違いはない。地球の温暖化は、海水面の上昇、砂漠の拡大、さらに、気象・気候の劇的変化をもたらす。また、植物にとっても CO₂濃度の上昇は、大きな問題となりうる。光合成の基質となる CO₂が上昇することは、光合成や成長にとって有利に働くようにも見える。しかし、実際は、現在の 2 倍の CO₂濃度で植物を栽培しても、イネの乾物生産は 10 から 20%上昇する程度で、むしろ、高 CO₂環境下では、光合成速度や成長速度の低下が観察される場合もある。これは、現生の多くの植物が、長期間に渡りほぼ 200 ppm~280 ppm だった CO₂濃度に適応してきたためとも考えられる。

今後、各国の政治的排出削減努力は続くであろうが、一方、大気 CO₂濃度の上昇は避けられないと考えられる。この現状を鑑み、高 CO₂濃度下濃度条件においても健全に育ち、かつ、高 CO₂により適応的な植物を創出することが、将来予測される世界的な食糧危機や植物による大気 CO₂濃度の上昇を抑制する有効な方法の一つであると考えている。そこで申請者らは、植物にとって現在の大気 CO₂環境下では CO₂固定の律速となるものの、高 CO₂環境下ではその量が

過剰となる酵素、Rubisco に着目し、この酵素の量を特異的に減少させたイネを作出し、異なる CO₂ 環境下におけるこの組換えイネの適応性の観察を行った。

そもそも、RbcL(Rubisco large subunit)が 8 つ、RBCS が 8 つの計 16 量体よりなり、*RbcL* 遺伝子は葉緑体ゲノムに、一方、*RBCS* 遺伝子は核ゲノムに、それぞれコードされている。葉緑体の遺伝子进行操作する形質転換技術は確立されていないため、人為的に *RbcL* 遺伝子の発現を調節することは困難である。そのため、*RBCS* 遺伝子の発現を減少させることにより、Rubisco 酵素が減少したイネを作出することとした。

本組換えイネは、*RBCS2* のプロモーター下流に *RBCS2* 構造遺伝子を逆鎖(アンチセンス)方向に接続したプラスミド(*pRAS*)を作出した (Makino et al., 1997)。この *RBCS2* アンチセンスカセットを含む *pRAS* 遺伝子が導入された個体を選抜するために、ビアラホス耐性を与えるプラスミド *pDM302* (Cao et al., 1992) と共に、パーティクルガン法により、ノトヒカリ種子胚由来のカルスに導入した。ビアラホス耐性を有したカルスの再分化を行った。得られた再分化系統は、約 50 系統であった。これらの再分化系統の Rubisco 定量を行い、最も Rubisco 量の減少が著しかった組換え *RBCS* アンチセンスイネを選抜し、AS-71 と名付けた (Makino et al., 2000)。解析の結果、バックグラウンドである非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 は、Rubisco 含量及び活性の低下が確認されている。

(7) 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカー

その他の供与核酸の構成要素とそれぞれの機能

組換え *RBCS* アンチセンス イネ AS-71 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 に示した。

ア) イネ *RBCS2* アンチセンス発現カセット (*pRAS*; Makino et al., 1997) (表 1)

i. *RBCS2* プロモーター

キヌヒカリ由来の *RBCS2* 構造遺伝子上流約 2.8 kbp の *RBCS2* の推定プロモーター領域。イネの光合成器官において極めて高い遺伝子の発現活性を示す。

ii. *RBCS2* 構造遺伝子 (*RBCS2*)

日本晴れ由来の *RBCS2* 構造遺伝子。 *RBCS2* は、5 種類の *RBCS* 遺伝子族中で、最も発現量が高い遺伝子である。

iii. ノパリン合成酵素ターミネーター (*NosI*)

Agrobacterium tumefaciens 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含み、mRNA 合成を終結させるのに必要な塩基配列である。

イ) ビアラホス耐性遺伝子発現カセット (*pDM302*; Cao et al., 1992) (表 1)

i. イネ、アクチン 1 (*rice actin1*) プロモーター

イネのアクチン構造遺伝子上流約 1.5 kbp の推定プロモーター領域。イネのどの器官においても恒常的に高い発現活性を示す (McElroy et al., 1991; Gene Bank No. S 44221)。

ii. ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ構造遺

伝子(*bar* 遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子)

Streptomyces hygroscopicus 由来のホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*bar* 遺伝子)は、通称、ビアラホス耐性遺伝子と呼ばれ、この遺伝子の翻訳産物であるビアラホス耐性酵素は、除草剤ビアラホスを分解し無毒化する。そのため、組換えイネの選抜マーカーとして働く (White et al., 1990; Gene Bank No. X 17220)。

iii. ノパリン合成酵素ターミネーター (*NosI*)

Agrobacterium tumefaciens 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアダニル化シグナルを含み、mRNA 合成を終結させるのに必要な塩基配列である。

(イ) 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産出されるタンパク質の機能及び当該タンパク質がアレルギー性（食品としてのアレルギー性を除く）を有することが明らかとなっているタンパク質と相同性を有する場合はその旨

ア) *RBCS2* 遺伝子

RBCS2 遺伝子及び Rubisco タンパク質は、イネのみならず高等植物が本来もっている遺伝子及び酵素である。しかも、導入した *RBCS2* 遺伝子は、イネ日本晴れ由来のものである。また、Rubisco タンパク質が、アレルゲンとなるという報告はない。さらに、RBCS 及び RbcL のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や既知の毒性タンパク質との相同性検索 (アレルゲンデータベース: Allergen Database for Food Safety,

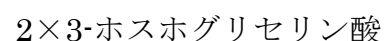
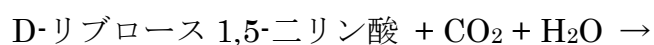
<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>) を利用し、アレルゲン性の予測を行った。しかし、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性は認められなかった。したがって、Rubisco タンパク質が、アレルギー性または毒性を示す可能性は極めて低いと考えられる。なお、今回は遺伝子発現抑制のためアンチセンス方向の遺伝子を導入したため、導入遺伝子由来のタンパク質の合成はない。

イ) **ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*bar* 遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子)**

ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*bar* 遺伝子)の翻訳産物であるビアラホス耐性酵素がアレルギー性をもつという報告はない。また、ビアラホス耐性酵素のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性検索 (アレルゲンデータベース: Allergen Database for Food Safety, <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>) を行った。しかし、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性は認められなかった。したがって、ビアラホス耐性酵素が、アレルギー性または毒性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

(ウ) **宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容**

Rubisco は生理学的に以下の反応を触媒する。



この反応の補因子としてマグネシウムイオンを要求する。この反

応はカルビン-ベンソン回路におけるカルボキシレーション反応過程であり、本代謝系の固有な反応である。カルビン-ベンソン回路における他の反応はD-リブローズ 1,5-二リン酸の再生系を除くとほとんどは、ペントースリン酸経路に見られる。したがってカルビン-ベンソン回路は Rubisco のカルボキシレーション反応とその基質再生系によって調節されている。

よって、非組換えイネと比較して、アンチセンス *RBCS2* 遺伝子が導入され Rubisco 酵素が減少した本組換えイネでは、炭素代謝系を中心に、代謝系に大きな変化が生じると予想された。実際、代謝産物の一斉解析の結果より、本組換えイネでは、カルビン-ベンソン回路の中間代謝産物である D-リブローズ 1,5-二リン酸及びフルクトース 1,6 二リン酸量が増加する一方で、3-ホスホグリセリン酸及びセドヘプツロース-7-リン酸量などは減少した。同時に、デンプン及び糖の量も減少した (Suzuki et al., 2012a, 別添補足資料)。一方で、ビアラホス耐性酵素の過剰発現に関しては、基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。

(2) ベクターに関する情報

ア 名称および由来

イネ *RBCS2* アンチセンス発現カセット (*pRAS*; Makino et al., 1997)には pUC19 (図 1)を、ビアラホス耐性遺伝子発現カセット (*pDM302*; Cho et al., 1992)には pBluescript II KS (図 2)を、基本ベクターに用いた。

イ 特性

(ア) ベクターの塩基数及び基本構造

ア) pUC19

(TaKaRa;

http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Competent_Cells/Cloning_Vectors/pUC18-19_Type_Vectors)の塩基数は2,686 bpで、アンピシリン耐性遺伝子を内在するため、目的遺伝子が導入された大腸菌を、アンピシリンを用いて選抜することができる。

イ) pBluescript II KS

(Agilent Technologies;

http://www.genomics.agilent.com/vectorGroupList.jsp?id=16&_requestid=432795)の塩基数は2,961 bpで、アンピシリン耐性遺伝子を内在するため、目的遺伝子が導入された大腸菌を、アンピシリンを用いて選抜することができる。

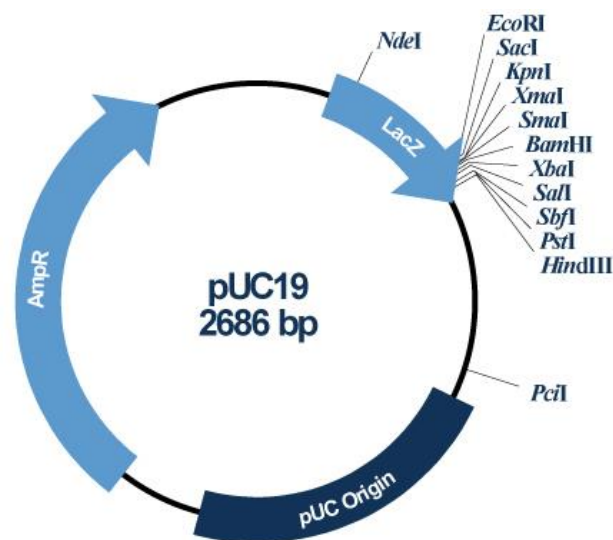


図1 pUC19の基本構造

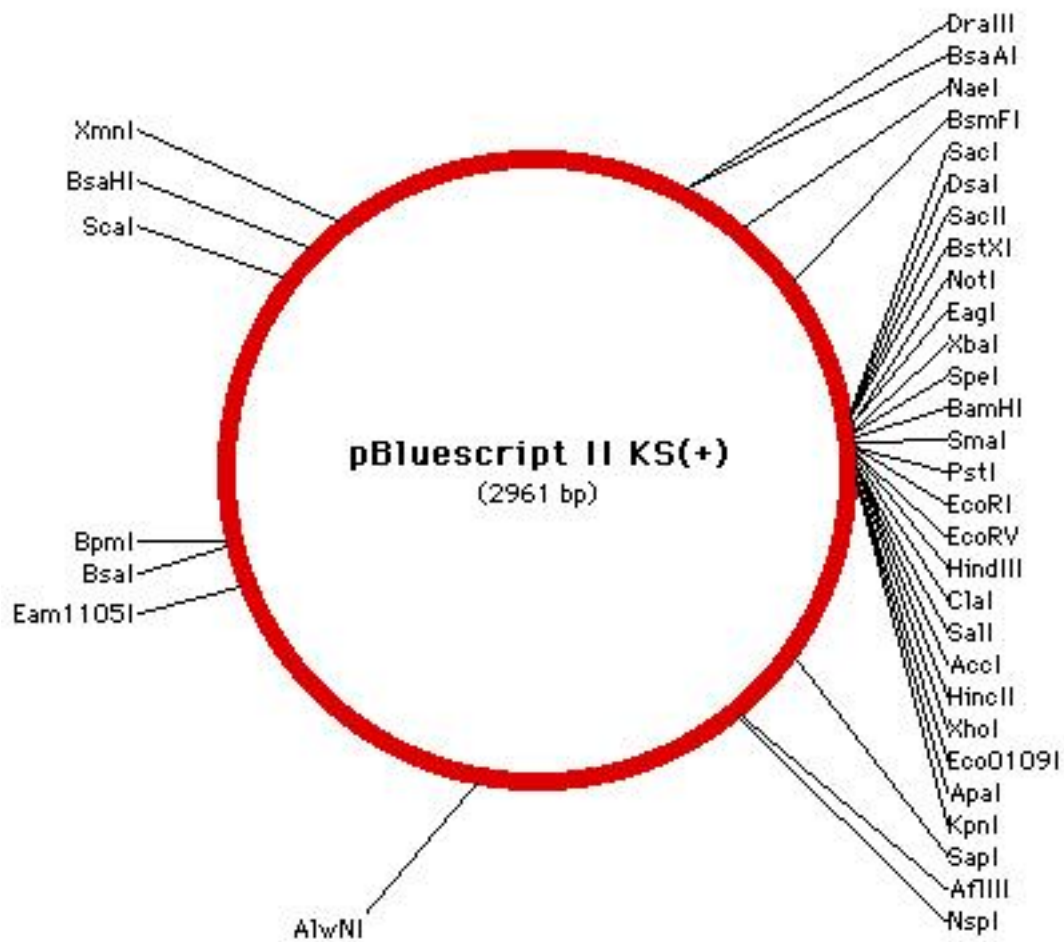


図2 pBluescript II KS の基本構造

(イ) 特定の機能を有する塩基配列

pUC19 及び pBluescript II KS ベクターともに、目的遺伝子が導入された大腸菌を、アンピシリンを用いての選抜が可能となるように、アンピシリン耐性遺伝子が組み込まれている。また、大腸菌の複製開始領域である ori が存在する。

(3) 組換え植物の調製方法

ア 宿主内に移入された核酸全体の構成

(7) ***pRAS(RBCS*プロモーター::*アンチセンス RBCS2:NosT*into pUC19)** (図 3A)

*pRAS*の構築過程は以下の通りである (Makino et al., 1997)。始めに、約 2.8 kbp の *RBCS2* プロモーター領域を、予め pUC19 の *Sac* I と *EcoR* I サイトに *NosT* が導入されたベクター、*pRNG73* (Kyojuka et al., 1993) の、*Hind* III と *Sal* I サイトに組み込みこんだ。引き続き、*RBCS2* プロモーターと *NosT* が組み込まれたベクターの *Sal* I と *Xba* I サイトに、PCR 法により増幅した 819 bp の *RBCS2* cDNA を *RBCS2* プロモーターに対してアンチセンス方向に組み込み、構築されたプラスミドを *pRAS* と名付けた。以降、この *pRAS* を、アンチセンス *RBCS2* を発現させるためのプラスミドとして、パーティクルガン法を用いて、イネ(ノトヒカリ)へと導入した。

(イ) ***pDM302(rice actin1pro::bar::NosT)*** (図 3B)

*pDM302*の構築過程は以下の通りである (Cao et al., 1992)。ビアラホス耐性遺伝子であるホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*bar* 遺伝子)は、*Streptomyces hygroscopicus* より単離された (White et al. 1990)ものを利用した。予めイネ、アクチン 1 プロモーターが組み込まれた *pCOR113* (McElroy et al. 1991)に、イネ、アクチン 1 プロモーター::*bar* 遺伝子配列となるように、*bar* 遺伝子を組み込んだ。構築されたプラスミドを *pDM301* と名付けた (Cao et al., 1992)。 *pDM301* を、*Xho* I と *Xba* I で消化し、得られた約 2 kbp のイネ、アクチン 1 プロモーター::*bar* 遺伝子カセットを、予め pBluescript II KS に *NosT* が組み込まれ、構築されていた

pNOS72 (Kyojuka et al., 1993)の *Sal I* と *Xba I* サイトに組み込み、*pDM302* とした。以降、この *pRAS* と *pDM302* を、アンチセンス *RBCS2* 遺伝子と、ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を発現させるためのプラスミドとして、パーティクルガン法を用いて、イネ(ノトヒカリ)へと導入した。

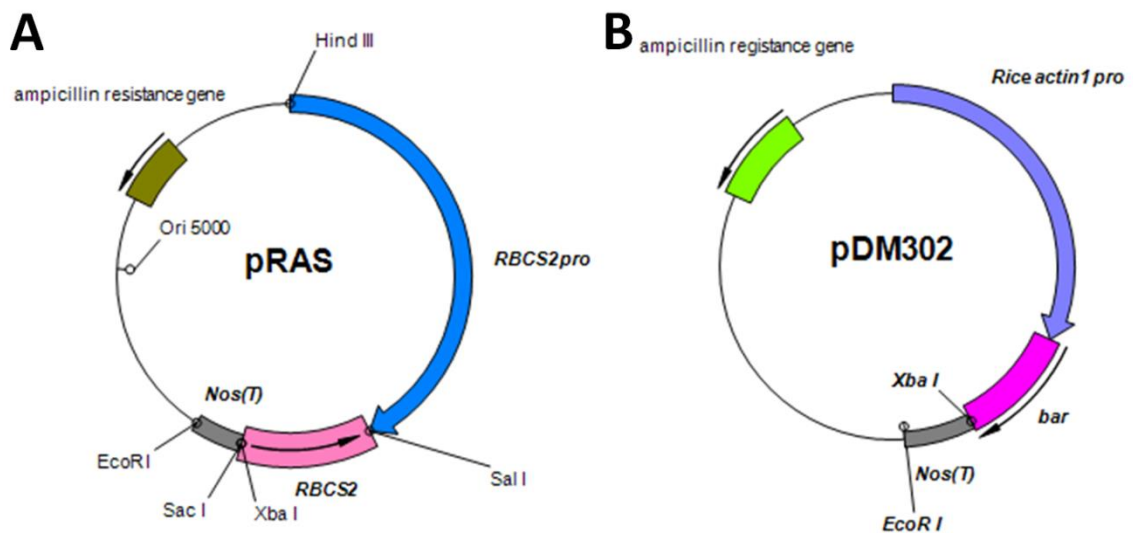


図3 A; *pRAS* (*RBCS2*プロモーター::アンチセンス *RBCS2*::*NosT*)及び
B; *pDM302* (イネアクチン1プロモーター::*bar*::*NosT*)の基本構造

イ 宿主内に移入された核酸の移入方法

パーティクルガン法により行った。

ウ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

(ア) 核酸が移入された細胞の選抜の方法

パーティクルガン法を用いて、イネ、ノトヒカリ由来の胚より誘

導されたカルスに、作製した *pRAS* (*RBCS2* プロモーター::アンチセンス *RBCS2::NosT*)及び *pDM302* (イネアクチンプロモーター::*bar::NosT*)を同時に打ち込んだ。始めに、15 μ M ビアラホスを含む選抜培地で、DNA が導入されたカルスの選抜をおこなった後に、再分化した(T 0 世代)の葉の一部よりゲノムを抽出した (Makino et al., 1997)。抽出したゲノムに対して、*RBCS2* プロモーター領域内の配列に対して設計した forward プライマー (5'-GCGGGAGCCTGTGTGCAGAG-3')と、アンチセンス *RBCS2* の内部配列に対して設計した reverse プライマー (5'-TGCATTCGTCCGTATCATCG-3')を用いて PCR を行い、導入したアンチセンス *RBCS2* 遺伝子の確認を行った (Makino et al., 1997)。

(イ) 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存性

本実験においては、パーティクルガン法により、組換えイネの作出を行った。従って、アグロバクテリウムの残存性の確認は行っていない。

(ウ) 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

平成 8 年度から遺伝子導入実験を開始し、閉鎖系実験室における組換えイネの選抜ならびに特性解析を行ってきた。得られた組換えイネ、約 50 系統より、Rubisco タンパク質含量を指標として選抜を

行った。Rubisco タンパク質が最も減少した組換えイネを AS-71 と名付け、以降の解析に使用した。導入したアンチセンス *RBCS2* 遺伝子がゲノム上にホモザイゴスに配列された個体(ホモ個体)を選抜し、選抜されたホモ個体の自殖により世代を進めた。選抜方法としては、上記「核酸が移入された細胞の選抜方法」の項で選抜したカルスから再分化させた幼植物(T 0、当代)を閉鎖系温室に移植して自殖により種子を得た(T 1)。T 0 の植物は、導入した遺伝子が相同染色体の片方に挿入されたヘミ型(+/-)である。したがって、自殖により得られた T 1 の種子の遺伝子型は、導入遺伝子が両方の染色体に挿入されているホモ導入型、ヘミ型、両方の染色体に外来遺伝子が挿入されていない野生型に分離する。この分離世代の選抜は、T 1 種子から生育させた T 1 植物を用い、サザンハイブリダイゼーション解析により行った。元来非組換えイネのノトヒカリが有している *RBCS* 遺伝子のシグナル強度 (仮に A とする) と、導入された遺伝子のシグナル強度 (仮に B とする) を比較 (B/A) し、ヘミ型である T 0 植物のシグナル強度比を 1 とする。従って、T 1 植物のシグナル強度比は、ホモ導入型は 2、ヘミ型は 1、野生型は 0 となる。このことを利用して、ホモ導入型個体の選抜を行った。T 1 植物をさらに自殖させることにより種子を得た(T 2)。自殖を繰り返すことにより、さらに後代世代の種子を得た(T 3~T 4 : 図 3)。

平成 18 年度から閉鎖系温室において、生物多様性影響評価に必要な情報を収集するための解析を行った。まず、T 3~T 4 植物を用いて、遺伝子の存在をサザンハイブリダイゼーションで確認した。

また、T 3~T 4 植物を用いて、遺伝子の存在状態 (安定性 : 遺伝

子ならびにタンパク質の発現量等)を調べた。また T 4 種子を用いて、組換えイネの有害物質生産の有無(栽培後の跡地土壌での残留効果、土壌微生物相に与える影響の有無、植物遺体のすき込みによる環境への影響の有無)を調べた。隔離ほ場での試験は T 4 世代を用いて行う。イネ育成の経過、ならびに世代と実施した試験を次図に示す。

T 0→(自殖)→T 1→(自殖)→T 2→(自殖)→T 3→(自殖)→T 4

図 3 組換えイネ育成経過

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 (別添 2)

ア 移入された核酸の複製物が存在する場所

遺伝子を導入した植物 (T 0)から自殖により得た T 1 植物 50 個体を対象に、導入した遺伝子の遺伝子型(ホモ導入型、ヘミ型、野生型)の割合をサザンハイブリダイゼーション法によって調べた。その結果、ホモ導入型、ヘミ型、野生型に持つ個体は、15:24:11 となり、 χ^2 二乗検定(5%水準)の結果より 1:2:1 に分離していた。したがって、移入した核酸は染色体上であると判断した。

イ 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性 (別添 2 図 1)

閉鎖系温室で栽培した T 3 世代及び T 4 世代の植物体からゲノム DNA を抽出し、PCR による導入遺伝子の検出を行った。*RBCS2* ア

ンチセンス遺伝子を検出するために、*RBCS2* 遺伝子のプロモーター内の forward プライマー (5'-CGCCGCATACTCCATCATGT-3') 及び *RBCS2* 遺伝子の開始コドンを含むコード領域内の reverse プライマー (5'-ATGGCCCCCTCCGTGATGGC-3') を用いた。ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*bar* 遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子) を検出するために、*bar* 遺伝子内の forward プライマー (5'-GCGGTCTGCACCATCGTCAA-3') および reverse プライマー (5'-TACCGGCAGGCTGAAGTCCA-3') を用いた。また、PCR のポジティブコントロールとして、イネのアクチン遺伝子 (GenBank accession. AB047313) を検出するために、アクチン遺伝子内の forward プライマー (5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3') および reverse プライマー (5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3') を用いた。その結果、いずれのプライマー対及びいずれの世代においても、目的とするそれぞれ 1,108 bp、459 bp 及び 235 bp の DNA 増幅断片が得られた。

引き続き、Prior et al., (2006) らの方法に従い、*RBCS* アンチセンスイネより抽出したゲノムに対して、定量的リアルタイム PCR によるコピー数の確認を行った。*RBCS2* アンチセンス遺伝子を検出するために、*NosT* に対する forward プライマー (5'-AGCGCGCAAACCTAGGATAAATTA-3') 及び *NosT* と隣接するバックボーン部分に対する reverse プライマー (5'-CGACGGCCAGTGAATTCC-3') を用いた。*bar* 遺伝子を検出するために、*NosT* に対する forward プライマー (5'-

AAAATATAGCGCGCAAAGTAGGA -3') 及び *NosT* と隣接するバックボーン部分に対する reverse プライマー (5'-TAGGGAGACCGGCAGATCTG -3') を用いた。これらのプライマーはともに *NosT* を含む DNA 断片を増幅するが、それぞれの導入遺伝子特異的な増幅が生じるように設計した。また、内生のコントロール遺伝子として、イネのゲノム中にホモ型の 1 遺伝子としての存在が明らかとなっている細胞質型グルタチオン還元酵素遺伝子 (*GR*, GenBank accession. AB009592) を用いた (Prior et al., 2006)。*RBCS2* アンチセンス遺伝子及び *bar* 遺伝子と *GR* 遺伝子由来のシグナル比率がともに世代によらず 22:1 であったことから、導入遺伝子のコピー数はすべてヘミ型とした場合 44 コピーであることが示された。先に述べたように、T 1 世代におけるホモ型、ヘミ型、野生型の分離比が 1: 2: 1 となったことや、T 3 世代及び T 4 世代において導入遺伝子のコピー数が変化していないことから、*RBCS2* アンチセンスコンストラクト及び *bar* 遺伝子はホモ型の 22 コピーで存在していると推測される。これらの結果から、導入された遺伝子が、組換えイネのゲノム DNA 中に、安定して存在し、さらに次世代へ継代されていることが考えられる。

ウ 染色体に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

上述のように、*RBCS2* アンチセンス遺伝子は複数コピー存在しているが、導入された遺伝子が互いに、また、本来の *RBCS* 遺伝子と隣接しているか、離れているかは、導入された遺伝子の発現に大きな

影響を及ぼさないと考えられるため、その確認は行ってはいない。

また、導入された複数の *bar* 遺伝子についても、同様に、互いに隣接しているか否かの検証は行っていない。

エ 自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性 (別添 2

図 2)

RBCS アンチセンスイネ AS-71 の抽出中の 12 葉身では、*RBCS* 遺伝子の *RBCS3*、*RBCS4*、*RBCS5* 遺伝子と共に、*RbcL* 遺伝子が有意に発現減少した。この結果は、*RBCS* をコードする 4 つの遺伝子は、相互にホモロジーが高く、構造遺伝子をコードする領域では、約 9 割のホモロジーである。そのため、*RBCS2* をアンチセンス方向で発現させると、他の *RBCS* 分子種 mRNA 量も同時に減少したと考えられる。しかし一方で、*RBCS4* mRNA 量は、第 10・8 葉で増加した。この結果については、現在まで、その要因は不明のままである。ただし、*RBCS4* mRNA の増加により、第 10・8 葉での全 *RBCS* 量が野生型を大きく上回ることはなかった。また、葉位別の *RBCS* mRNA の量の変化に見られるように、Rubisco の生合成は若い葉で活発である。この結果においても、第 12 葉で Rubisco の生合成は最も活発である。したがって、第 10・8 葉での *RBCS4* の発現変化が、Rubisco 量に大きな影響を及ぼしているとは考えていない。なお、*RbcL* の発現が *RBCS* に応じて変動しているのは *RBCS* タンパク質が、*RbcL* の発現変動を直接的ないし間接的に調節しているためである (Suzuki and Makino, 2012b)。

オ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動物植物に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度該当するウイルスの存在は報告されていない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

導入遺伝子のうち、選抜マーカーのホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*bar* 遺伝子)の翻訳産物であるビアラホス耐性酵素の働きにより、*bar* 遺伝子が導入された組換えイネは、ビアラホスに対して抵抗性を得る。この抵抗性はカルスだけでなく、発芽種子においても認められることを確認している。そのため、ビアラホス含有の培地で種子を発芽させることで、組換えイネの識別が可能である。また、導入したアンチセンス *RBCS2* 遺伝子は、イントロン配列を持たない cDNA 配列を用いている。そのため、*RBCS2* タンパク質をコードする領域の遺伝子内で、イントロン箇所を挟んで設計したオリゴプライマーを用いた PCR 法により、イントロン配列をもつ内在性の *RBCS2* 遺伝子と導入した *RBCS2* 遺伝子は PCR 産物のサイズが異なるため、区別して検出することが可能である。

(6) 組換え植物と、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

ア 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

導入したアンチセンス *RBCS2* 遺伝子は、*RBCS2* プロモーター

に連結し発現させている。従って本来の *RBCS2* 遺伝子が発現すべき器官及び組織で発現していると考えられる。結果、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 は、非組換えイネと比較して、個体乾燥重の顕著な減少を引き起こしている。よって、隔離ほ場試験においても、同様の表現型が顕れると考えている。導入遺伝子のうちホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*bar* 遺伝子)は、ビアラホス抵抗性を付与する。この *bar* 遺伝子の翻訳産物であるビアラホス耐性酵素の働きにより、ビアラホスを利用して組換えイネの選抜及び確認することができる。

イ 生理学的又は生態学的特性について宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

(7) 形態及び生育の特性 (別添 3)

異なる CO₂ 濃度下で栽培した非組換えイネ(ノトヒカリ)及び組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の、それぞれ T 3 世代における個体乾物重および窒素含量の測定を行った。調査は、屋内型人工気象室の CO₂ 分圧を低分圧(28 Pa)、現在の大気中の分圧(40 Pa)、高分圧(120 Pa) の3段階に設定し、生育調査を行った。サンプリングは、播種後 63 日目に行った。その結果、大気 CO₂ 濃度に関わらず非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の個体乾物重、及び個体当たりの全窒素含量の減少が観察された。

(イ) 跡地土壌での残留効果 (別添 4)

赤玉土を容積 20 L のバットに入れ、てまいらず(コープケミカル

株式会社; <http://www.co-op.co.jp/business/recommended.html>)と窒素 4 g を肥料として、*RBCS* アンチセンスイネ AS-71 を登熟完了まで栽培した。栽培後の残土をアラシシステムのポットに取り、レタス種子を 20 粒播種。各系統 4 ポットとした。栽培は人工気象室内で行い、条件は光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、昼温/夜温 $24^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ 、日長 14 時間とした。適宜 1/1000 濃度のハイポネックスを与えた。サンプリングは 20 日後に行った。地上部及び根の乾燥重、長さのポットの平均と標準誤差を算出した。別添 4、表 1 に 20 日間栽培後のレタスの地上部及び根の乾燥重、また、地上部及び根の長さを示した。非組換え体と比較して組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 栽培跡地で栽培したレタス地上部及び根の長さには、有意な差は観察されなかった。しかし、AS-71 栽培跡地のレタス根の乾燥重の有意な増加が観察された。組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 を通常条件で栽培すると、非組換えイネの個体のバイオマスが、約 20% に減少することが明らかとなっている (Makino et al., 2000)。従って、非組換えイネと比較して AS-71 の栽培跡には、消費されなかった肥料、栄養素が、多く残されていたと推測できる。多量に残された栄養素のため、レタスの地上部及び根の乾燥重が増加したと考えられる。

(ウ) 土壌微生物相検定 (別添 5)

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の土壌微生物相への影響を検定するため、希釈平板培養法を行い非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較、検討した。細菌等および放線菌の数の測定のため、完熟期に培土を個体に近接したところから採種し、採取した培土、約 2.5 g を滅菌水 50 mL に懸濁した。細菌数の測定には、さらに滅菌水で

100 培希釈した液 200 μL を YG 培地に塗布した。糸状菌数の測定では、さらに滅菌水で 10 培希釈した液 200 μL をローズベンガル培地に塗布した。放線菌数の測定のため、同様に採取した土を乾燥し、1 g を SDS-Yeast extract 法 (生物工学会誌 第 90 巻 第 8 号 493-498, 2012) に供した。同法にて処理した液 200 μL を HV 培地に塗布した。植物栽培土壌の微生物数の測定を行った結果を表 1 に示した。全ての調査項目において、非組換え体栽培土壌中の微生物数と組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の栽培土壌中の微生物数に、有意な差は認められなかった。

(エ) 植物遺体のすき込み試験 (別添 6)

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の遺体による他の植物への影響を非組み換えイネ(ノトヒカリ)遺体と比較した。各系統の植物体を 4 個体粉碎し、培土(メトロミックス 250; HYPONex; <http://www.hyponex-pro.com/SHOP/4977517018636.html>)に 0.5% (w/w) の割合でそれぞれ混合した。混合した土をアラシシステムのポットに取り、レタス種子を 20 粒播種。各系統 4 ポットとした。栽培は人工気象室内で行った(光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、昼温/夜温 $24^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ 、日長 14 時間)。適宜 1/1000 濃度のハイポネックスを与えた。サンプリングは 2 週間後に行った。地上部及び根の乾燥重、長さはポット平均を算出し、さらに 4 ポットの平均と標準誤差を算出した。別添、表 1 に 20 日間栽培後のレタスの地上部及び根の乾燥重、また、地上部及び根の長さを示した。これらの調査項目に対して、粉碎した組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 を鋤込んだ土壌のいずれでも非組換えイネを鋤込んだ土壌との間で統計的に有意

な差は認められなかった(t 検定、5%水準: $p > 0.05$)。

(オ) 花粉の形態および稔性の検定 (別添 7)

本組換えイネ AS-71、ならびに非組換えイネから花粉を採取し、顕微鏡で観察した。花粉の形状、サイズに相違は認められなかった(別添 7 図 1)。次に花粉をヨード・ヨードカリ溶液でデンプンを染色し、その稔性を確認したところ、稔性率は組換えイネ AS-71 で 96%、非組換えイネ・ノトヒカリで 98%と統計的に有意な差異は認められなかった。また、収穫時における穂の不稔率は本組換えイネ AS-71、非組換えイネともに 4%前後であった。したがって、組換えイネ AS-71 と非組換えイネの花粉の稔性率に相違はないと判断した。

(カ) 生育初期における低温耐性試験 (別添 8)

生育初期における低温耐性試験を行うため、本組換えイネ、AS-71、ならびに非組換えイネの種子を 32°C で 36 時間催芽した後、培土(メトロミックス 250)をポットに取り、各系統の種子をそれぞれ 10 粒ずつ播種した。各系統 1 ポットずつ、以下の 3 つの区に設定し、適宜 1/1000 濃度のハイポネックスを与え培養を行った。

(栽培区 1) 昼温/夜温 24°C/20°C 設定の人工気象室で 21 日間培養 (24°C 区)

(栽培区 2) 昼温/夜温 24°C/20°C 設定の人工気象室で 7 日間栽培したのち、4°C 設定の人工気象室で 14 日間培養 (24/4°C 区)

(栽培区 3) 昼温/夜温 4°C 設定の人工気象室で、21 日間培養 (4°C 区)

その結果、写真からも明らかなように(別添 8 表 1)、2)の 24/4°C 区では、組換え、非組換えイネのどれも、4°C 設定の人工気象器に入れた時の草丈から、草丈の伸長は認められず、生育は著しく抑制さ

れた。なお、14日間の低温処理終了後、1)の24℃区設定の人工気象器で栽培した植物体を、4℃の人工気象室に移したところ、全ての植物体は枯死にいたった。また、3)4℃区の区では、組換え及び非組換えイネともに、地上へ出芽することはなかった。また、処理3)において、21日間の低温処理後、昼温/夜温24℃/20℃設定の人工気象器に植物体を移した場合、7日間経過しても地上へ出芽しなかった。したがって、組換え及び非組換えイネともに、低温に対する感受性に差異は認められず、低温耐性に関して組換えイネと非組換えイネの間には差異地上部の長さはポット平均を算出し、さらに3ポットの平均と標準誤差を算出した。4℃区では生育は見られなかった。

(キ) 成体の越冬性又は越夏性 (別添9)

イネは熱帯地域では多年生植物であるが、我が国の栽培地帯では、結実後、冬季には通常自然に枯死する。今回の申請に関わる試験地がある東北地方では、イネは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死し、成熟後さらなる栄養繁殖や、再度結実して種子を生産することはない。ここでは越冬性の検討のみ行った。組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 と非組換えイネ(ノトヒカリ)の株を使用し、「ひこばえ」発生等を調べた。非組換えイネ及び組換えイネの全ての株は、枯死し、「ひこばえ」の発生は認められなかった。従って、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 においても、非組換えイネと同等に、通常自然下における越冬性はないものと考えている。特に、栽培予定の東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター・隔離ほ場がある大崎市鳴子川渡の冬期4ヶ月の平均気温は、12月 1.8℃、1月 -1.0℃、2月 -0.6℃、3月 2.3℃と、

本実験環境における 4℃を大きく下回っている。従って、隔離ほ場において栽培を行ったとしても、本組換えイネの株による越冬性はないものと判断している。

(ク) 種子の特性（脱粒性、稔実率、穎果重量及び発芽率）（別添 10）

非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の種子特性について、脱粒性、稔実率、一粒当たりの穎果重量及び発芽率について調べた。成熟期の穂を握って脱粒性を調査したが、組換えイネ AS-71、非組換えイネどちらも難で、相違は認められなかった。稔実率は、非組換えイネが 90%~95%であったの対して、組換えイネ AS-71 は 85%~90%であり、組換えイネ AS-71 において若干の稔実率の低下が観察された。このことは、組換えイネ AS-71 は、炭素固定の律速となる *Rubisco* が減少した個体であるため、非組換えイネと比較して個葉の光合成能力が、低下している。不十分な炭素固定が、稔実率を低下させる原因であると考えている。一方、稔実した穎果の種子重量に関しては、組換えイネ AS-71 と非組換えイネの間に、有意差は観察されなかった(別添 10 図 1)。さらに、発芽率は、組換えイネ AS-71、非組換えイネともに、92%以上であり、大きな差はなかった(別添 10 図 2)。

(ケ) 交雑率

我が国にイネと交雑可能な近縁の野生種は自生していないことから、調査は行っていない。

ウ 有害物質の産生性

(ア) 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える

もの（別添 6）

組換えイネ AS-71、ならびに非組換えイネについて植物体を粉碎し、土壌と混合し、レタスを栽培した(すき込み試験)。20 日後のレタスの幼根長、幼伸長、新鮮重、乾物重に有意な差は認められなかった。

(イ) 根から分泌され、土壌微生物に影響を与えるもの（別添 5）

組換えイネ AS-71 を栽培した土壌における土壌微生物相(細菌類、放線菌、糸状菌)について調査した。対照として、非組換えイネを同一条件で栽培した土壌を用いた。土壌中に認められた細菌類、放線菌、糸状菌では統計的に有意な差は認められなかった。

RBCS2 遺伝子の発現抑制により Rubisco 量が減少した組換えイネ AS-71 において、光合成産物及び糖代謝産物含量の変化が明らかになっている (Suzuki et al., 2012a)。しかし、(ア)と(イ)の結果に示された通り、レタスの成長及び土壌微生物の生息数は、非組換えイネの実験結果と比較して、それぞれに有意差はなかった。さらに、これまで、光合成産物、糖、及びデンプン代謝産物がアレロパシー物質などとの関連性を持つとの報告はない。以上のことより、組換えイネ AS-71 の体内において、ビアラホス耐性酵素を含む代謝産物量の変化が、他の野生の動植物種等に影響を与える有害物質の産出を引き起こしているとは、非常に考えにくい。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

恒常的に本酵素の発現が抑制された本組換えイネ AS-71 を、親株であるノトヒカリと共に野外環境(隔離ほ場)で栽培する。そして、

ほ場での生育及び収量の比較調査を行うことで、今日の大気 CO₂ 濃度と Rubisco 量の変化がイネの生産と収量に及ぼす影響を直接的に評価する。同時に、今後の大気 CO₂ 濃度の上昇予測から作物生産の動向を的確に予測する。すなわち「野外環境において大気 CO₂ 濃度と Rubisco 量がイネの生育に与える影響評価試験」を目的として行う。また、生物多様性影響評価に資するデータも収集する。

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 使用等の方法 (別添 11 参照)

ア 試験ほ場：宮城県大崎市鳴子温泉字蓬田 232-3

イ 名称：東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター隔離ほ場

ウ 使用期間：承認日から平成 34 年 3 月 31 日まで

エ 隔離ほ場の施設 (別添 11 図)

(ア) 隔離ほ場施設(東西約 56 m×南北約 95 m)内の砂質水田(東西 25 m×南北 20 m)を使用する。本隔離ほ場の排水は、施設内周辺の排水パイプに回収され、ため池に入り、循環する設備となっている。なお、排水路を通して循環される水の一部は、この隔離ほ場の土質

は火山灰土壌であるため排水性が良く、結果として浸透する。しかし、浸透であるため、種子の隔離ほ場外への流出はない。また、二重の安全のために、隔離ほ場の周囲(フェンスの内側)に、深さ 30 cm の掘りを築き、時間雨量 300 mm 程度でも、種子が隔離ほ場外に流れることはない設計となっている。

(イ) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場全体の外側に、メッシュフェンス(高さ 185 cm の 5 cm メッシュのフェンスを 50 cm 四方のブロック塊支柱に埋め込む)を設置している。

(ウ) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を記載した標識を見やすい所に掲げている。

(エ) 花粉の飛散を防止するために、隔離ほ場から東側の一般農家ほ場と西側の研究ほ場側は高さ 20 m 以上の樹木(防風林)で覆われている。また花粉の飛散や小動物による種子の隔離ほ場外への流出を防ぐために、イネの最終葉である止葉の出現した時から収穫時までには、防雀網(20 mm メッシュ)を栽培しているイネを覆うように設置する。

(オ) 本隔離ほ場には、使用した機械、器具、靴などに付着した土を洗浄するための洗場を設置している。

(カ) 本隔離ほ場は、直近の一般農家水田からおおよそ 400 m、また直近の東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターの実験ほ場(水田)からおおよそ 200 m 離れた場所に位置する。

(キ) 本組換えイネ AS-71 および非組換えイネ・ノトヒカリは、5 月下旬に実験ほ場(砂質水田)に移植を行う。出穂期、収穫期は年毎の天候に大きく左右されるが、出穂期は 8 月上旬、収穫期は 9 月下

旬～10月上旬が想定される。なお、周辺ほ場では、主に「ひとめぼれ」が栽培されており、移植時期はおおよそ5月上旬～中旬、開花時期は8月上旬から中旬、収穫時期は9月下旬が予測される。

オ 作業要領

以下の作業は、組換えイネの隔離ほ場外への漏出を予防するために実施する。

(ア) 承認された組換えイネ及び比較対象のイネ品種以外の交配可能な植物が、隔離ほ場内の栽培実験区画で生育することを最小限に抑えるために、慣行法による除草剤処理と中耕除草を行う。

(イ) 組換えイネを隔離ほ場外に運搬する場合は、組換えイネが漏出しないような構造の容器等に納めてから運搬する。組換えイネを保管する場合には、組換えイネが漏出しないような構造の容器内に納め、保管する。

(ウ) 隔離ほ場内の栽培実験区画で栽培したイネの残渣及び発生した植物は、試験終了後速やかに隔離ほ場内に鋤き込むことにより確実に不活化する。種子は漏出しないような容器に納め、オートクレーブにより不活化する。なお、焼却によるイネの不活化の選択もあるが、焼却はダイオキシン発生等の問題も生じるため、本隔離ほ場では焼却炉は使用しない。

(エ) 隔離ほ場で使用した機械、器具又は隔離ほ場で作業した者の靴等は、作業終了後隔離ほ場内で洗浄し、隔離ほ場内の植物残渣、土等を外に持ち出さない等により、意図せずに組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。

(オ) 隔離ほ場の設備が本来有する機能を発揮するよう維持、管理を行う。

(カ) (ア)から(オ)に掲げる事項を、使用等をする者に遵守させる。

(キ) 使用する組換えイネによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

カ 隔離ほ場の地図及び隔離ほ場内における試験区の配置図

別添 11 を参照のこと

(3) 承認をうけようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

花粉飛散の恐れまたはその可能性が発生したと判断された場合のみ以下に述べる実験を行う。隔離ほ場内の栽培箇所(防雀網内)、周囲のフェンス内側(防雀網外)、最も近い研究ほ場、一般ほ場に花粉トラップ板を開花時に設置し、花粉を採取する。採取した花粉を Single Pollen Genotyping 法 (花粉数粒からの遺伝子型決定法)により、組換えイネの花粉が飛散しているか否かを判別する。本方法により、交雑の可能性を判別する。また、栽培区画内 (防雀網内) に親株のノトヒカリを生育検定用とは別に移植・栽培し、交雑の有無を確認する。確認方法は、組換えイネには、導入遺伝子であるアンチセンス *RBCS2* 遺伝子にビアラホス耐性遺伝子 (*bar* 遺伝子) が連結された状態で導入されているため、実った種子を収穫し、約 1 万粒に対して薬剤耐性(ビアラホス耐性)の有無を、確認する。なお、以

上の花粉の飛散のモニタリング調査を行った場合はその結果を、本学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会の特定事業組織である遺伝子実験センターのホームページ (<http://www.cgr.tohoku.ac.jp/>)において、これらの情報を公開する。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

別紙の「緊急措置計画書」を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似している環境での使用等の結果。

本組換えイネ AS-71 では、Rubisco 量が野生型の 40%程度までに減少したため個葉光合成速度および個体生育が大きく抑制された。また、本組換えイネを利用した代謝産物の一斉解析では、D-リブローズ 1,5-二リン酸量が大きく増加する一方で、3-ホスホグリセリン酸、セドヘプツロース-7-リン酸量及びデンプン量は減少していた。同時にデンプン量にも減少が見られた (Makino et al., 2000a, Makino et al., 2000b, Ushio et al., 2003, Ishizuka et al., 2004, Hirotsu et al., 2004, Suzuki et al., 2009, Suzuki et al., 2012a, Suzuki et al., 2012b, Sudo et al., 2014)。

(6) 国外における使用等に関する情報

国外における使用の実績はない。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主である日本型イネ栽培種は、わが国における農耕の歴史とともに存在し、現在も最重要作物として広く栽培されている。これまでの経験から通常の使用法の範囲で取り扱う限り、自然生態系において野生化、雑草化するおそれは極めて少ないと考えられる。ここでは、生物多様性影響評価実施要領別表第三に基づき、組換えイネと宿主または宿主の属する分類学上の種との相違点を考慮して生物多様性影響評価を行う。

1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

なし

理由：

野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質として、本組換えイネ AS-71 の形態、及び生育特性、生育初期の低温耐性、生態の越冬性、花粉の特性、について調査した。その結果、本組換えイネ AS-71 を通常大気 CO₂ 濃度で生育させた場合、非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、個体乾燥重と個体当たりの全窒素含量が減少していた。しかし、その他の調査項目、生育初期の低温耐性、生態の越冬性、花粉の特性等には、有意な違いは見られなかった。よって、非組換えイネよりも、組換えイネ AS-71 は、生育が著しく劣ることが予想され、自然環境下での競合で優位に作用するとは考えがたい。

また、本組換えイネが耐性となる薬剤は、自然環境下の土壌に高濃度で存在することはないため、本組換えイネが獲得する薬剤耐性

が自然環境下での競合に有意に働くとは考え難い。

さらにイネは我が国において長年の使用経験がある農作物であり、自然条件下で自生することはあまり知られていないこと、及びこれまでの知見では競合における優位性が高まるような知見は得られていないことから、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が隔離ほ場外部へ意図せずを持ち出されることを防止する限りにおいては、本組換えイネ AS-71 と競合する可能性のある野生動植物は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

なし

理由：

競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生植物等は特定されない。

(3) 影響の生じやすさの評価

なし

理由：

競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生植物等は特定されない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことか

ら、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、競合における優位性についての生物多様性影響が生じるおそれはないと判断する。

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

なし

理由：

本組換えイネ AS-71 は、*RBCS2* 遺伝子アンチセンス方向に高発現させ、Rubisco 酵素量を減少させている。本来イネが持つ、植物体内で産出する酵素を減少させていることや、また、毒性に対する報告、アレルギー性を持つという報告はないこと、さらには、Rubisco のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や既知の毒性タンパク質との相同性検索(アレルゲンデータベース:Allergen Database for Food Safety, <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)の結果からも、有害性は科学的知見からは予測されなかった。また、栽培終了時の土壌微生物相の調査、植物遺体のすき込み実験、栽培跡地土壌での残留効果検定において、本組換えイネ AS-71 と非組換えイネの間に、すき込み実験のレタス根重を除き、統計的有意差は認められなかった。さらに、本組換えイネを用いた代謝産物の網羅解析の結果から、野生型と比較して、光合成産物関連の代謝産物量の変化は多少観察されたものの、代謝阻害や有害性を示す産物の増加は、本組換えイネ AS-71 では見出されていない (Suzuki et al., 2012a)。

本組換えイネ AS-71 は、移入された選抜マーカーとしてビアラホス耐性遺伝子を発現し、酵素タンパク質を生産するが、本酵素は植物、酵母やヒト培養細胞の形質転換(組換え)の選択マーカーとして使用されており、生物多様性に影響を与える有害物質であるという報告はない。

上記を踏まえ、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、隔離ほ場外部へ意図せずに出されることを防止する限りにおいては、有害物質の産生性において影響をうける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

なし

理由：

有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生植物等が特定されない。

(3) 影響の生じやすさの評価

なし

理由：

有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生植物等が特定されない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことか

ら、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、有害物質の産生性についての生物多様性影響が生じるおそれはないと判断する。

3. 交雑性

(1) 影響をうける可能性のある野生動植物等の特定

なし

理由：

野生イネである *Oryza nivara*、*Oryza rufipogon* 等の植物は、栽培イネ種(*Oryza sativa*)の近縁野生植物であり、国外のイネ栽培地近辺の自生地においては栽培種イネと交雑することが知られているが、これらの植物は我が国に自生しているという報告はない。したがって、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、交雑性に関して影響をうける可能性のある野生植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

なし

理由：

交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生植物は特定されない。

(3) 影響の生じやすさの評価

なし

理由：

交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生植物は特定されない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、交雑性についての生物多様性影響が生じることがないと判断する。

4. その他

上記の他に生物多様性影響の評価を行うことが適切と考えられる本組換えイネ AS-71 の性質はないと考えられる。

第3 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性について、本組換えイネ AS-71 は、1種類の抗生物質耐性遺伝子を有しているが、付与された抗生物質耐性が自然環境下での競合において優位に作用することはない。また閉鎖系の栽培において、本組換えイネ AS-71 と非組換えイネの間の生育特性の一部である個体乾燥重の減少が認められた。しかしこの性質は、競合における優位性に関わる形質とは言えず、むしろ、劣勢に作用すると考えられる。また、

種子の脱粒性は、非組換えイネと同等に「難」（脱粒しない）であることより、競合における優位性はないと判断される。仮に、想定外の理由により競合において優位に生育した場合でも、本隔離ほ場の立地条件、出穂期における防雀網の設置等、適切な措置を講じることより、本組換えイネ AS-71 が、隔離ほ場外に、非人為的に移行することない。

イネは我が国において長年の使用経験がある農作物であり、自然条件下で自生することはあまり知られていないこと、これまでの知見では競合における優位性が高まるような知見は得られていないことも踏まえ、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-71 が、隔離ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、本組換えイネ AS-71 と競合する可能性のある野生動植物は特定されない。

有害物質の産生性について、非組換えイネ・ノトヒカリの有害物質産生についての報告はない。また本組換えイネ AS-71 に逆鎖方向で導入した *RBCS2* 遺伝子、およびピアラホス耐性遺伝子産物は有害物質には該当しない。さらに、イネ AS-71 は、Rubisco 量が減少していることから、光合成及び糖代謝産物量に大きな変化が生じている (Suzuki et al., 2012a, 別添補足資料)。しかし、栽培土壌の土壌微生物相、植物遺体のすき込み試験、栽培跡地土壌での残留効果検定を実施した結果、本組換えイネ AS-71 は対象品種ノトヒカリとの間に有害物質生産性に差異が認められなかったことから、影響を受ける可能性のある野生動植物を特定することはできない。

交雑性について、宿主の属する分類学上の種であるイネと交雑可能な近縁野生種は、我が国には存在しないことから、影響を受ける可能性の

ある野生動植物は特定されなかった。

上記を総合的に評価し、本組換えイネ AS-71 を第一種使用規程に従って使用等し、本組換えイネ AS-71 が、ほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、生物多様性への影響が生ずるおそれはないと評価した。

引用文献リスト

Cao J, Duan X, McElroy D and Ray Wu R. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* **11**, 586- 59, (1992)

Consensus document on the biology of *Oryza sativa* (rice), Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 14, OECD, pp. 51 (1999)

Dilday RH, Lin J, Yan W. Identification of allelopathy in the USDA-ARS rice germplasm collection. *Aust. J. Exp. Agr.* **34**, 907-910, (1994)

藤井義晴、中谷敬子、平舘俊太郎、猪谷富雄、イネのアレロパシーの検索と抑草作用の強い「阿波赤米」の検出、雑草研究、**46** (別号)、120-121、(2001).

姫田正美、井村 光夫、今井 秀昭 コシヒカリの直播栽培、農村漁村文化協会、東京、(1999)

Hirotsu N, Makino A, Ushio A, Mae T. Changes in the thermal dissipation and the electron flow in the water-water cycle in rice grown under conditions of physiologically low temperature. *Plant Cell Physiol.* **45**, 635-644, (2004)

星川清親 解剖図説 イネの成長、農村漁村文化協会、東京、(1989)

Ishizuka M, Makino A, Suzuki Y, Mae T. Amount of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) protein and levels of mRNAs of *rbcS* and *rbcL* in the leaves at different positions at transgenic rice plants with decreased content of Rubisco. *Soil Sci. Plant Nutr.* **50**, 233-239, (2004)

Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R and Shimamoto K. Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiol.* **102**, 991-1000, (1993)

Makino A, Shimada, T, Takumi S, Kaneko K, Matsuoka M, Shimamoto K, Nakano H, Miyao-Tokutomi M, Mae T and Yamamoto N. Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂, and light in rice plants? *Plant*

Physiol. **114**, 483-491, (1997)

Makino A, Harada M, Kaneko K, Mae T, Shimada T, Yamamoto N. Whole-plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase under different CO₂ partial pressure. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**, 1-12, (2000a)

Makino A, Nakano H, Mae T, Shimada T, Yamamoto N (2000) Photosynthesis, plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased Rubisco under CO₂ enrichment. *J. Exp. Bot.* **51**, 383-389, (2000b)

松尾孝嶺（監修） 植物遺伝資源集成 1、I. 食用作物、1. イネ、講談社、東京、(1989)

松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、山口彦之、菊池文雄（編）、稲学大成 1 巻形態編、農山漁村文化協会、東京、(1990a)

松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、石原邦、平田熙、石井龍一（編）、稲学大成 2 巻生理編、農山漁村文化協会、東京、(1990b)

松木五樓、勝谷信一 旱害に対する二三の化学的考察（第一報）土壤水分と作物の生育、日本土壤肥料学雑誌、14、238-247 (1940)

McElroy D, Blowers AD, Jenes B and Wu R. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 150-160, (1991)

宮本一夫 農耕の起源を探る：イネの来た道、吉川弘文館、東京、(2009)

農林水産技術会議 「栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方」 第2回 「第1種使用規定承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1 (2003)

農林水産技術会議 「交雑に関する新たな科学的知見」 第5回 「第1種使用規定承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 1 (2008)

岡崎敬、春成 秀爾（編） 稲作の考古学、第一書房、東京、(2002)

Olofsdotter M, Navarez M, Rebulanan M, Streibig JC. Weed-suppressing rice cultivars – does allelopathy play a role? *Weed Res.* **39**, 441-454, (1999)

Ootomo K, Kenmoku H, Oikawa H, Konig WA, Toshima H, Mitsuhashi W, Yamane H, Sassa T, Toyomasu T. Biological functions of ent- and syn-copalyl diphosphate synthase in rice: key enzymes for the branch point of gibberellins and phytoalexin biosynthesis. *Plant J.* **39**, 886-893, (2004)

佐藤洋一郎 DNAが語る稲作文明、NHK BOOKS、東京、(1996)

佐藤洋一郎 イネの歴史、京都大学学術出版会、京都、(2008)

Sudo E, Suzuki Y, Makino A. Whole-plant growth and N utilization in transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content under different CO₂ partial pressures. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1905-1911, (2014)

Suzuki Y, Miyamoto T, Yoshizawa R, Mae T, Makino A. Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ.* **32**, 417–427, (2009)

Suzuki Y, Fujimori T, Kanno K, Sasaki A, Ohashi Y and Makino A. Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content. *Plant Cell Environ.* **35**, 1369–1379, (2012a)

Suzuki Y, Makino A. Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Physiol.* **160**, 533-540, (2012b)

高橋成人 イネの生物学、大月書店、東京、(1988)

Ushio A, Makino A, Yokota S, Hirotsu N, Mae T. Xanthophyll cycle pigments and water-water cycle in transgenic rice with decreased amounts of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the wild-type rice grown under different N levels. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 77-83, (2003)

White J, Chang SYP, Bibb MJ and Bibb MJ. A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygrosopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1062, (1990)

蓬原雄三 イネの育種学、東京大学出版会、東京、(1990)

生物多様性影響評価書 (別添)

Rubisco 生産抑制イネ (*RBCS2*-antisense, *Oryza sativa* L.) (AS-71)

東北大学大学院農学研究科

目次

	Page
別添1 基本的特性	3
別添2 導入遺伝子の安定性と <i>Rubisco</i> 遺伝子の発現解析	4
別添3 異なるCO ₂ 環境下の組換え及び非組換えイネの成長解析	8
別添4 跡地土壌での残留効果	9
別添5 土壌微生物相検定	10
別添6 植物遺体の鋤込み試験	12
別添7 花粉の形態および稔性の検定	13
別添8 初期生育における低温耐性試験	14
別添9 組換えイネの越冬性	16
別添10 種子の特性（脱粒性、稔実率、穎果重量及び発芽率）	17
別添11 東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター・隔離圃場所在地	19
補足資料	21

別添 1

基本的特性

登録番号: 第 1199 号

登録年月日: 1986 年 11 月 21 日

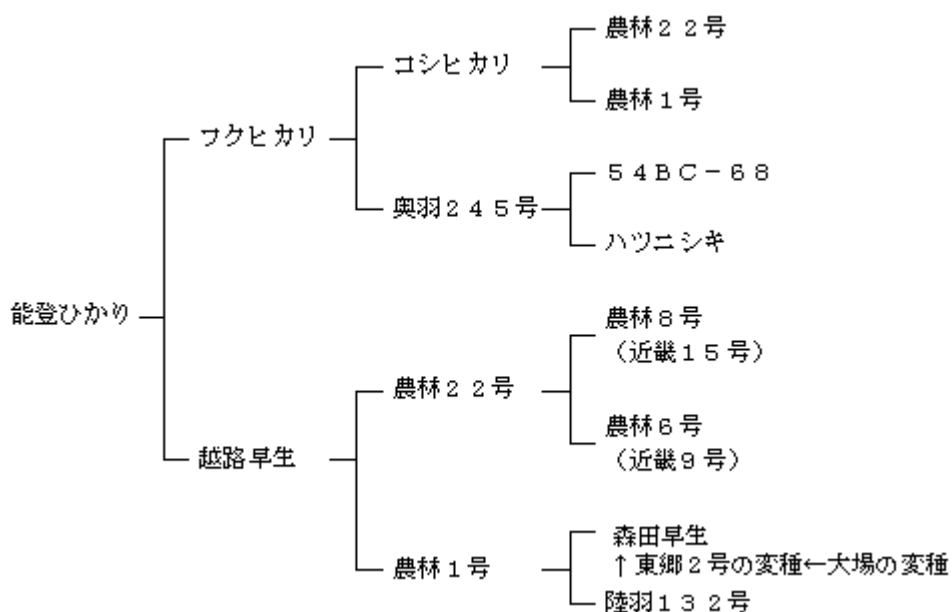
地方番号: 石川 8 号

品種名: 能登ひかり(ノトヒカリ)

銘柄	区分	食味	系統	熟成
能登ひかり	うるち	良食味	フクヒカリ/越路早生	早生

耐倒伏性	収量	粒形	適用
強	多収	大粒	石川県山間・山麓地帯

能登ひかり(ノトヒカリ)の系譜



導入遺伝子の安定性と *Rubisco* 遺伝子の発現解析

【目的】

世代を経た本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の導入遺伝子の安定性と発現の安定性を検定する。

【実験方法】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の T 3 と T 4 世代、及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の T 3 と BC₂F₂ 世代の種子、非組換えイネの種子を発芽させた後、HCl で pH5.5 に調整した水道水に浮かべたサラネット上に播種し、閉鎖系温室内で、2 週間の栽培を行った。播種後、2 週間目の各組換えイネと非組換えイネの地上部からゲノミック DNA を抽出した。まずこれに対し、PCR にて導入遺伝子の確認を行った。*RBCS* センスイネでは *RBCS2* センス遺伝子、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*HPT* 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子) 及びネオマイシンリン酸基転移酵素遺伝子 (*NPT II* 遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子) に由来する DNA 断片を増幅した。*RBCS* アンチセンスイネでは *RBCS2* アンチセンス遺伝子及びホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*bar* 遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子) に由来する DNA 断片を増幅した。また、PCR のポジティブコントロールとして、イネのアクチン遺伝子 (GenBank accession. AB047313) の増幅を行った。

さらに、定量的リアルタイム PCR 法により導入遺伝子のコピー数を確認した。このため、*RBCS* センスイネでは *RBCS2* プロモーターとバックボーンとなるベクターとの連結部分の配列を増幅した。*RBCS* アンチセンスイネでは、*RBCS2* アンチセンス遺伝子に連結したノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (*NosT*) とバックボーンとなるベクターとの連結部分の配列及び *bar* 遺伝子に連結した *NosT* とバックボーンとなるベクターとの連結部分の配列を増幅した。いずれの場合にも、内生のコントロール遺伝子として、イネのゲノム中にホモ型の 1 遺伝子としての存在が明らかとなっている細胞質型グルタチオン還元酵素遺伝子 (*GR*; GenBank accession. AB009592) を同時に増幅し、これらの間のシグナル強度比から導入遺伝子のコピー数を算出した。なお、*RBCS* アンチセンスイネでは 2 種の導入遺伝子に対し *NosT* を共通して増幅しているが、バックボーンとなるベクターが異なるため、それぞれに特異的な増幅が可能である。

また、定量的リアルタイム PCR 法により、組換えイネ及び非組換えイネの葉身の *RBCS* 及び *RbcL* 遺伝子の発現様式の検証を行った。第 12 葉身の全体が 2/3 抽出した時、第 12 葉身から第 8 葉身までをサンプリングした。バーは平均 ± 標準誤差 (n = 3)。統計処理は葉位別に Tukey の HSD 検定にて行った。異なるアルファベット間では有意差がある (p < 0.05)。

【結果】

閉鎖系温室で栽培した *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の T 3 と T 4 世代、及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の T 3 との BC₂F₂ 世代から抽出したゲノミック DNA に対する PCR により導入遺伝子の検出を行った。*RBCS* センスイネでは、いずれの世代において

も、*RBCS2*センス遺伝子、*HPT*遺伝子、*NPTII*遺伝子及びアクチン遺伝子で想定されるそれぞれ 1,223 bp、720 bp、780 bp 及び 235 bp の DNA 増幅断片が得られた。同様に *RBCS* アンチセンスイネでも、*RBCS2* アンチセンス遺伝子及び *bar* 遺伝子で想定されるそれぞれ 1,108 bp 及び 459 bp の DNA 増幅断片が得られた (図 1)。このことから、*RBCS* センスイネ及び *RBCS* アンチセンスイネのいずれの世代においても導入遺伝子は継代されていることが示された。定量的リアルタイム PCR 法を用いて導入遺伝子のコピー数の判定を行った結果、*RBCS* センスイネでは得られたシグナル強度がいずれの世代でも対照遺伝子の 8 倍であったため、導入遺伝子は全てヘミ型とした場合は 16 コピーであったことが示された。T 1 世代におけるホモ型、ヘミ型、野生型の分離比が 1:2:1 となったことや、T 3 世代及び BC₂F₂ 世代におけるコピー数に変化がないことから、導入した *RBCS2* センス遺伝子はホモ型の 8 コピーとして存在していると考えられる。同様の解析を *RBCS* アンチセンスイネで行ったところ、*RBCS2* アンチセンス遺伝子及び *bar* 遺伝子はともに全てヘミ型とした場合は世代を問わず 44 コピーが存在しており、世代を経ても変化はなかった。*RBCS* センスイネと同様の理由から、*RBCS2* アンチセンス遺伝子及び *bar* 遺伝子はホモ型の 22 コピーとして存在していると予測される。これらのことから、導入したそれぞれの遺伝子が、組換えイネのゲノム DNA 中で安定して存在するとともに、さらに、次世代へ継代されていることが考えられる。

さらに、遺伝子発現の安定性を調べる目的で、定量的リアルタイム PCR 解析を行った。その結果、非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8 では、*RBCS* 遺伝子族の内、導入した遺伝子である *RBCS2* の発現が、抽出中の 12 葉身において、約 7 倍増加していた。他の *RBCS* 遺伝子族の遺伝子発現には、*RBCS3* で統計的な有意差はみられたものの、大きな変化はみとめられなかった。さらに、12 葉身においては、Rubisco の大サブユニットをコードする *RbcL* 遺伝子の発現も増加した。

一方で、*RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の抽出中の 12 葉身では、*RBCS* 遺伝子の *RBCS3*、*RBCS4*、*RBCS5* 遺伝子と共に、*RbcL* 遺伝子が有意に発現減少した。この結果は、*RBCS2*-5 遺伝子のホモロジーが高く、コード領域では約 9 割となっている。そのため、*RBCS2* をアンチセンス方向で発現させると、他分子種の mRNA 量も同時に減少したと考えられる。また、*RbcL* の発現が *RBCS* に応じて変動しているのは *RBCS* タンパク質が、*RbcL* 遺伝子の発現変動を直接的ないし間接的に調節しているためである (Suzuki and Makino, 2012)。

第 10-8 葉では、*RBCS4* mRNA 量が増加した。この結果については、現在まで、その要因は不明のままである。ただし、*RBCS4* mRNA の増加により、第 10-8 葉での全 *RBCS* 量が野生型を大きく上回ることはなかった。また、葉位別の *RBCS* mRNA の量の変化に見られるように、Rubisco の生合成は若い葉で活発である。この結果においても、第 12 葉で Rubisco の生合成は最も活発である。したがって、第 10-8 葉での *RBCS4* の発現変化が、Rubisco 量にと大きな影響を及ぼしているとは考えていない。

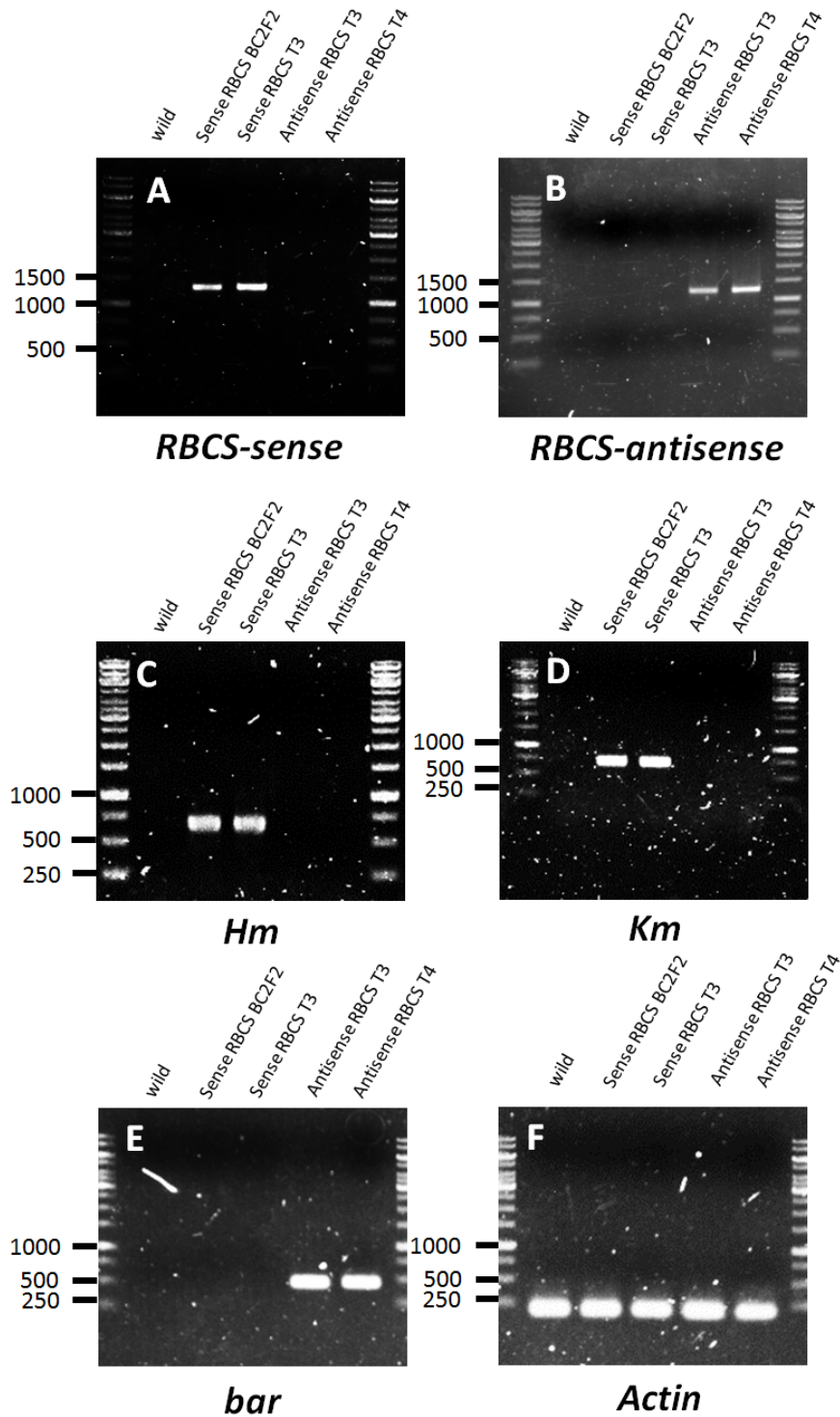


図1 PCRによる組換えイネの導入遺伝子の確認

A; *RBCS2*センス遺伝子、B; *RBCS2*アンチセンス遺伝子、C; ハイグロマイシン耐性遺伝子、D; カナマイシン耐性遺伝子、E; ビアラホス耐性遺伝子、F; アクチン遺伝子由来のDNA断片をそれぞれ増幅するプライマー対を用い、非組換えイネ(ノトヒカリ)(wild type)、組換え *RBCS*センスイネ Sr26-8 の T3 及び BC₂F₂ 世代、組換え *RBCS*アンチセンスイネ AS-71 の T3 及び T4 世代から抽出したゲノム DNA に対して PCR を行った。

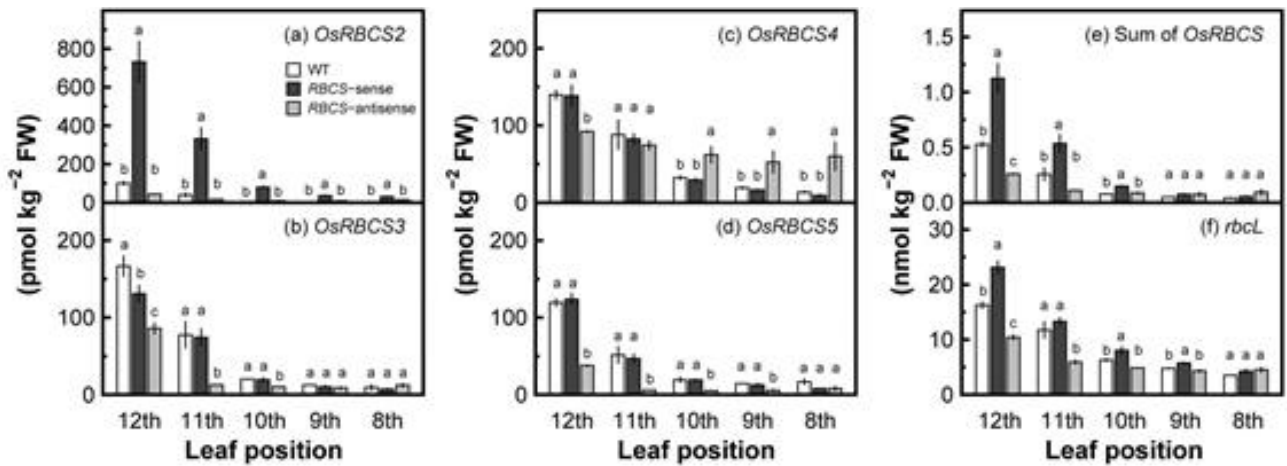


図2 定量的リアルタイム PCR を用いた、組換えイネ葉身の Rubisco 遺伝子族の発現解析

11 葉完全展開時の組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71、組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8 及び非組換えイネ (ノトヒカリ) の a: *OsRBCS2* (*RBCS2*) 遺伝子、b: *OsRBCS3* (*RBCS3*) 遺伝子、c: *OsRBCS4* (*RBCS4*) 遺伝子、d: *OsRBCS5* (*RBCS5*) 遺伝子、e: 全 *OsRBCS* (*RBCS*) 遺伝子、及び、f: *rbcL* (*RbcL*) 遺伝子の発現解析を定量的リアルタイム PCR 法にて行った。

異なる CO₂ 環境下の組換え及び非組換えイネの成長解析

【目的】

CO₂ 濃度を変化させた環境下における組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネの成長解析を行い、生育の比較調査を行う。

【実験方法】

異なる CO₂ 濃度下で栽培した非組換えイネ(ノトヒカリ)、組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8、及び組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の、それぞれ T 3 世代における個体乾物重および窒素含量の測定を行った。調査は、屋内型人工気象室の CO₂ 分圧を低分圧 (28 Pa)、現在の大気中の分圧 (40 Pa)、高分圧 (120 Pa) の 3 段階に設定し、生育調査を行った。サンプリングは、播種後 63 日目に行った。バーは平均 ± 標準誤差 (n = 3)。統計処理は CO₂ 濃度別に Tukey の HSD 検定にて行った。異なるアルファベット間では有意差がある (p < 0.05)。

【結果】

大気 CO₂ 濃度に関わらず非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較して、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 の個体乾物重、及び個体当たりの全窒素含量の減少が観察された。一方、組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8 においては、低、及び現在大気中 CO₂ 濃度において、個体乾物重量の増加が観察された。しかし、高 CO₂ 濃度においては、非組換えイネと Sr26-8 の個体乾物重に有意な差は認められなかった。また、個体当たりの全窒素含量に関しては、低 CO₂ 濃度においてのみ、非組換えイネと比較し、Sr26-8 において増加が観察された。

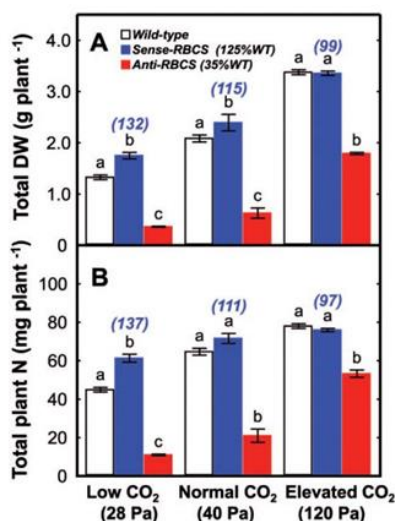


図1 異なる CO₂ 濃度において栽培した時の本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71、及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の生育と全窒素含量解析

28 Pa (Low CO₂), 40 Pa (Normal CO₂), 及び 120 Pa (Elevated CO₂) の CO₂ 濃度条件下において栽培した非組換えイネ (*Wild-type*), 組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8 (*Sense-RBCS*), 及び *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 (*Anti-RBCS*) の個体乾物材料 (A) と個体当たりの全窒素含量 (B) を測定した。

跡地土壌での残留効果

【目的】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の栽培残渣の他の植物への影響を非組換えイネ(ノトヒカリ)の場合と比較し、検討を行う。

【実験方法】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ(ノトヒカリ)を 1/5000a ワグネルポットで 3 か月間栽培した各 4 個体分の栽培直後の土壌を用いた。これらの土壌をアラシステム(ビーエム科学株式会社; http://www.bmbio.com/product_detail.php?itemid=927)のポットに詰め、供試植物として他感物質に感受性の高いレタス(*Lactuca sativa* L.)を栽培した。栽培は人工気象室内で行い、条件は光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、昼温/夜温 $24^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ 、日長 14 時間とした。20 日間の栽培を行い、各ポットに、地上部及び根の乾燥重及び長さの平均値と標準誤差を算出した。

【結果】

表 1 に 20 日間栽培後のレタスの地上部及び根の乾燥重、また、地上部及び根の長さを示した。非組換え体と比較して組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 栽培跡地で栽培したレタス地上部及び根の長さには、有意な差は観察されなかった。しかし、AS-71 栽培跡地のレタス根の乾燥重の増加が観察された(t 検定、5%水準: $p > 0.05$)。組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 を通常条件で栽培すると、バイオマスが非組換えイネの約 20% となることが明らかとなっている(Makino et al., 2000)。従って、非組換えイネと比較して AS-71 の栽培跡には、消費されなかった肥料、栄養素が、多く残されていたと推測できる。多量に残された栄養素のため、レタスの乾燥重が増加したと考えられる。一方、組換え *RBCS* センスイネ Sr26-8 に関しては、非組換えイネと比較して、地上部及び根の乾燥重または長さともに有意な差は観察されなかった(t 検定、5%水準: $p > 0.05$)。

表 1 非組換えイネ(ノトヒカリ)、及び 2 系統の組換えイネを栽培した残土を利用してレタスを栽培した時の、レタスの個体乾燥重、地上部及び根の長さ

	DW (mg)		length (cm)	
	shoot	root	shoot	root
非組換え	20.12 ± 1.01	4.22 ± 0.29	4.86 ± 0.07	6.10 ± 0.14
組換え26-8	20.05 ± 1.99	4.26 ± 0.10	4.86 ± 0.18	6.10 ± 0.16
組換えAS-71	24.63 ± 1.75	5.83 ± 0.59	4.69 ± 0.24	5.76 ± 0.18

* 数値は平均値±標準誤差

n (供試サンプル数) = 4

土壤微生物相検定

【目的】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の土壤微生物相への影響を検定するため、希釈平板培養法を行い非組換えイネ(ノトヒカリ)と比較、検討した。

【実験方法】

土壤サンプリング

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ(ノトヒカリ)を 1/5000 a ワグネルポットで栽培し、栽培開始 3 ヶ月後に 1 ポットにつき 8 カ所、深さ 5 cm の地点から土壌を採取混合し試料とした。採取した土壌、約 2.5 g を 50 mL の滅菌水に懸濁させた。100 倍希釈した懸濁液 200 μ L を YG 培地に塗布し細菌数の、また、10 倍希釈した懸濁液 200 μ L をローズベンガル培地に塗布し糸状菌数の測定に供した。また、放線菌数の測定のためには、同様に採取した土壌を乾燥させた後、1 g を SDS-Yeast extract 法 (生物工学会誌 第 90 巻 第 8 号 493-498. 2012)にて処理し、処理後の懸濁液 200 μ L を HV 培地に塗布した。

土壤微生物のカウント

土壤微生物の内、細菌類、放線菌、糸状菌について以下の 3 種の非選択、選択培地を用いて希釈平板法で微生物数の測定を行った。測定は肉眼あるいは顕微鏡下で計数した。計測後、平均値と生土重量/乾土重量を元に乾土当たりのコロニー形成数(cfu)を計算した。

- YG 培地 (酵母エキス 1.0 g/L、グルコース 1.0 g/L、 K_2HPO_4 0.3 g/L、 KH_2PO_4 0.2 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、pH 6.8)
- HV 培地 (フミン酸 1.0 g/L、 Na_2HPO_4 0.5 g/L、KCl 1.7 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L、 $CaCO_3$ 0.02 g/L、チアミン-HCl 0.5 mg/L、リボフラビン 0.5 mg/L、ナイアシン 0.5 mg/L、ピリドキシン-HCl 0.5 mg/L、パントテン酸 Ca 0.5 mg/L、イノシトール 0.5 mg/L、*p*-アミノ安息香酸 0.5 mg/L、ビオチン 0.25 mg/L、シクロヘキシミド 50.0 mg/L、pH 7.2)
- ローズベンガル培地 (K_2HPO_4 1.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、ペプトン 5.0 g/L、グルコース 10.0 g/L、ローズベンガル 0.033 g/L、pH 6.8)

【結果】

植物栽培土壌の微生物数の測定を行った結果を表 1 に示した。全ての調査項目において、非組換え体栽培土壌中の微生物数と組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 または *RBCS* センスイネ Sr26-8 栽培土壌中の微生物数には、有意な差は認められなかった。

表 1 植物栽培土壌中の微生物数

	細菌	糸状菌 ($\times 10^4$ cfu g^{-1} soil)	放線菌
非組換え	68.7 \pm 12.2	2.3 \pm 1.0	11.8 \pm 2.1
組換え 26-8	79.8 \pm 15.5	2.1 \pm 0.2	11.4 \pm 2.9
組換え AS-71	71.5 \pm 13.3	1.8 \pm 0.2	8.6 \pm 1.5

数値は平均値 \pm 標準誤差

n (供試サンプル数) = 5

植物遺体のすきこみ試験

【目的】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の遺体による他の植物への影響を非組換えイネ(ノトヒカリ)遺体の場合と比較し、検討を行う。

【実験方法】

土壌サンプリング

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ(ノトヒカリ)の植物体を各 4 個体粉碎した。粉碎試料を、メトロミックス 250 (培土: 株式会社ハイポネックス; <http://www.hyponex-pro.com/SHOP/4977517018636.html>)に、0.5% (w/v)に混合した。混合した土をアラシシステム(ビーエム科学株式会社; http://www.bmbio.com/product_detail.php?itemid=927)のポットに詰め、供試植物として他感物質に感受性の高いレタス(*Lactuca sativa* L.)を栽培した。系統毎に 4 ポットとし、レタスの種子 20 粒を播種した。栽培は人工気象室内で行い、条件は光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、昼温/夜温 $24^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ 、日長 14 時間とした。適宜 1/1000 濃度のハイポネックス(株式会社ハイポネックス; http://www.hyponex.co.jp/products/fertilizer/pr_fer_dr01.html)を与えた。20 日間の栽培を行い、各ポットに、地上部及び根の乾燥重及び長さの平均値と標準誤差を算出した。

【結果】

表 1 に 20 日間栽培後のレタスの地上部及び根の乾燥重、また、地上部及び根の長さを示した。これらの調査項目に対して、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 と *RBCS* センスイネ Sr26-8 を鋤込んだ土壌のいずれでも非組換えイネを鋤込んだ土壌との間で統計的な(t 検定、5%水準: $p > 0.05$)に有意な差は認められなかった。

表 1 植物遺体のすきこみ土壌で栽培したレタス生育状況

	DW (mg)		length (cm)	
	shoot	root	shoot	root
非組換え	28.99 ± 2.01	3.48 ± 0.16	9.49 ± 0.25	8.73 ± 0.23
組換え26-8	28.22 ± 1.32	3.08 ± 0.31	9.15 ± 0.12	8.62 ± 0.28
組換えAS-71	28.46 ± 1.72	3.35 ± 0.15	9.44 ± 0.11	8.51 ± 0.16

数値は平均値±標準誤差

n (供試サンプル数) = 4

花粉の形態および稔性の検定

【目的】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ(ノトヒカリ)から葯を採取し、花粉を顕微鏡で観察し、形状、粘性を調べる。

【実験方法】

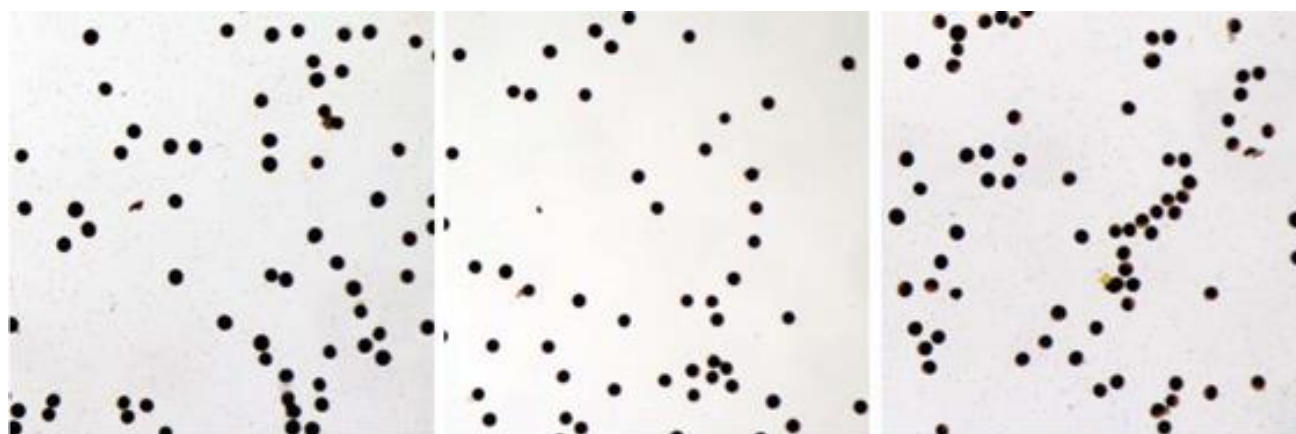
開花直前の組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8、非組換えイネ(ノトヒカリ)から葯を採取し、花粉を顕微鏡で観察した。また、花粉をヨード・ヨードカリ溶液で染色し、その稔性率を測定した。

【結果】

組換えイネと非組換えイネの花粉の顕微鏡写真を図 1 に示した。花粉の形状に、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 (図 1B) および *RBCS* センスイネ Sr26-8 (図 1C) と非組換えイネ(図 1A) との差は観察されなかった。

花粉をヨード・ヨードカリ溶液でデンプンを染色し、その稔性を確認したところ、稔性率は組換えイネ AS-71 と Sr26-8 で 96%、非組換えイネ・ノトヒカリで 98% と統計的に有意な差異は認められなかった(t 検定、5%水準: $p > 0.05$)。また、収穫時における穂の不稔率は本組換えイネ AS-71 と Sr26-8、及び非組換えイネともに 4% 前後であった。したがって、組換えイネ AS-71、Sr26-8 と非組換えイネの花粉の稔性率に相違はないと判断した。

図 1 非組換えイネ(ノトヒカリ)、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の花粉の形状と稔性
花粉が黒く染まっているのは、デンプンが蓄積しているためで、稔性があることを示している。



非組換えイネ(ノトヒカリ)

RBCS センスイネ Sr26-8*RBCS* アンチセンスイネ AS-71

n (供試サンプル数) = 5

初期生育における低温耐性試験

【目的】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 が低温耐性を獲得し、収穫前に脱粒した種子が冬に発芽し、生育しうるかどうか検定する。

【実験方法】

生育初期における低温耐性試験を行うため、本形質転換イネ、*RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 ならびに非形質転換イネの種子を 32℃で 36 時間催芽した後、作物育成培土(メトロミックス 250)をポットに取り、各系統の種子をそれぞれ 10 粒ずつ播種した。各系統 1 ポットずつ、以下の 3 つの区に設定し、適宜 1/1000 濃度のハイポネックスを与え培養を行った。

- 1) 昼温/夜温 24℃/20℃設定の人工気象室で 21 日間培養 (24℃区)
- 2) 昼温/夜温 24℃/20℃設定の人工気象室で 10 日間栽培したのち、4℃設定の人工気象室で 11 日間培養 (24/4℃区)
- 3) 昼温/夜温 4℃設定の人工気象室で、21 日間培養 (4℃区)

【結果】

その結果、写真からも明らかなように(別添 9: 表 1)、2)の 24/4℃区では、組換え、非組換えイネのどれも、4℃設定の人工気象機に入れた時の草丈 3.49~3.95 cm から、草丈の伸長は認められず、生育は著しく抑制された。なお、14 日間の低温処理終了後、1)の 24℃区設定の人工気象器で栽培した植物体を、4℃の人工気象室に移したところ、全ての植物体は枯死にいたった。また、3) 4℃区の区では、組換え、非組換えイネともに、地上へ出芽することはなかった。また、処理 3)において、21 日間の低温処理後、昼温/夜温 24℃/20℃設定の人工気象器に植物体を移した場合、7 日間経過しても地上へ出芽しなかった。したがって、組換え・非組換えイネともに、低温に対する感受性に差異は認められず、低温耐性に関して組換えイネと非組換えイネの間には差異地上部の長さはポット平均を算出し、さらに 3 ポットの平均と標準誤差を算出した。4℃区では生育は見られなかった。

表 1 植物体を各処理毎に 21 日間栽培した後の、各植物体の草丈(cm)

	Shoot length (cm)					
	処理1		処理2		処理3	
非組換え	15.65 ±	0.18	3.95 ±	0.17	N.D. *	
組換え26-8	15.12 ±	0.10	3.83 ±	0.34	N.D.	
組換えAS-71	17.04 ±	0.04	3.49 ±	0.15	N.D.	

数値は平均値±標準誤差、*: 測定不能 (not detected)

n (供試サンプル数) = 7~8

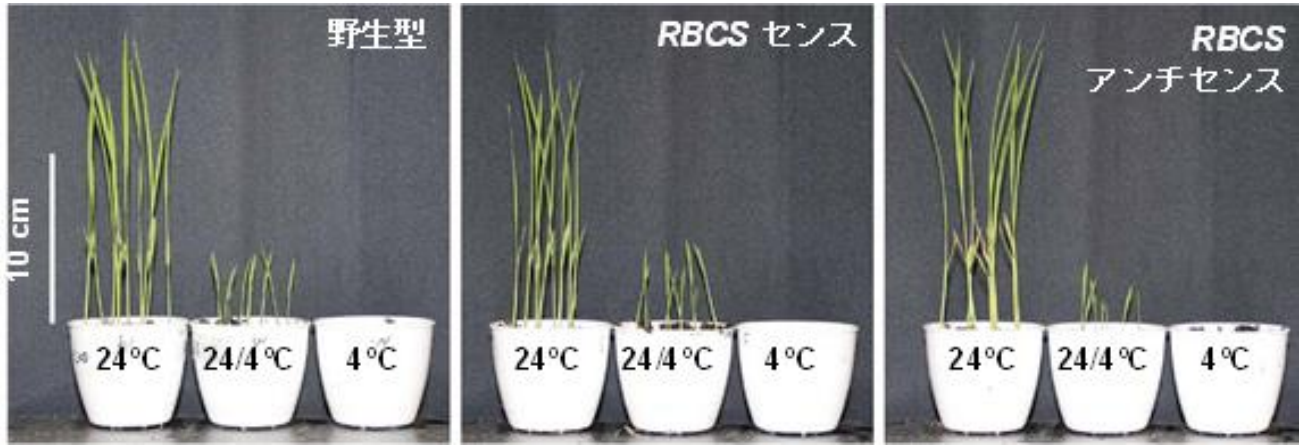


図1 各処理区で21日間培養した後の各区のイネの生育状況

組換えイネの越冬性

【目的】

組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ (ノトヒカリ) の株を使用し、「ひこばえ」等による越冬性の有無を検証する。

【実験方法】

非組換えイネ(ノトヒカリ)、*RBCS* センスイネ Sr26-8、*RBCS* アンチセンスイネ AS-71 における完熟期個体の低温下での再生育試験。個体は株元から 10 cm 程度残し切除し、切除後の株を人工気象室内(4℃)で、4 か月間栽培を継続した。4 ヶ月の栽培期間において、肥料の追加はせず、水は 10 日に一回の割合で、土壌が乾かない程度に与えた。

【実験方法】

非組換えイネ及び組換えイネの全ての株は、枯死し、「ひこばえ」の発生は認められなかった。従って、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 においても、非組換えイネと同等に、通常自然下における越冬性はないものと考えている。特に、栽培予定の東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター・隔離ほ場がある大崎市鳴子川渡の冬期 4 ヶ月の平均気温は、12 月 1.8℃、1 月 -1.0℃、2 月 -0.6℃、3 月 2.3℃と、本実験環境における 4℃を大きく下回っている。従って、隔離ほ場において栽培を行ったとしても、本組換えイネの株による越冬性はないものと判断している。

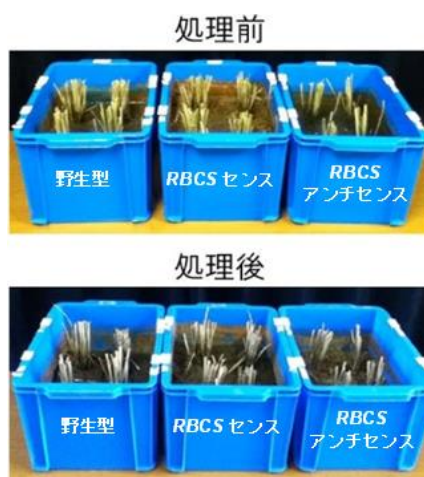


図 1 低温処理前後の切り株の状況

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年
最高気温 (°C)	2.6	3.4	7.2	14.3	19.4	22.4	25.4	27.4	23.3	17.9	11.6	5.8	15.1
平均気温 (°C)	-1	-0.6	2.3	8.4	13.6	17.5	21	22.6	18.6	12.4	6.5	1.8	10.3
最低気温 (°C)	-4.5	-4.5	-2	2.7	8.1	13.3	17.5	19	14.5	7.6	1.9	-1.8	6
降水量 (mm)	102.3	83	95.1	123.4	126.2	164.1	205.6	217.7	184.4	132.7	112.1	110.2	1661.2

表 1 東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育センターが立地する宮城県大崎市鳴子川渡地区の気温及び降水量

種子の特性（脱粒性、稔実率、穎果重量、及び発芽試験）

【目的】

組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 と非組換えイネ（ノトヒカリ）の脱粒性、稔実率、穎果重量及び発芽率についての種子の特性を比較する。

【実験方法】

本組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71、*RBCS* センスイネ Sr26-8 及び非組換えイネを閉鎖系温室内で、約 4 ヶ月間、赤玉土を容積 20 L のバットに入れ、てまいらず(コープケミカル株式会社; <http://www.co-op.co.jp/business/recommended.html>)と窒素 4 g を肥料として、アンチセンス組換えイネ AS-71 を登熟完了まで栽培した。種子収穫後、登熟歩合、穎果重量、及び発芽試験を行った。

【結果】

成熟期の穂を握って脱粒性を調査したが、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8、非組換えイネともども難で、相違は認められなかった。稔実率は、組換えイネ Sr26-8、非組換えイネともに 90%~95%であり、両者に有意な差はなかったが、組換えイネ AS-71 の稔実率は、85%~90%と非組換えイネと比較し、低下が見られた。このことは、組換えイネ AS-71 は、炭素固定の律速となる Rubisco が減少した個体であるため、非組換えイネと比較して個葉の光合成能力が、低下している。不十分な炭素固定が、稔実率を低下させる原因であると考えている。一方、稔実した穎果の種子重量(モミ重を含む)に関しても、組換えイネ AS-71 及び Sr28-6 と非組換えイネの間に、有意差は観察されなかった(別添 10: 図 1)。さらに、発芽率は、組換えイネ AS-71 及び Sr28-6、非組換えイネともに、92%以上であり、大きな差は見出されなかった(別添 10: 図 2)。

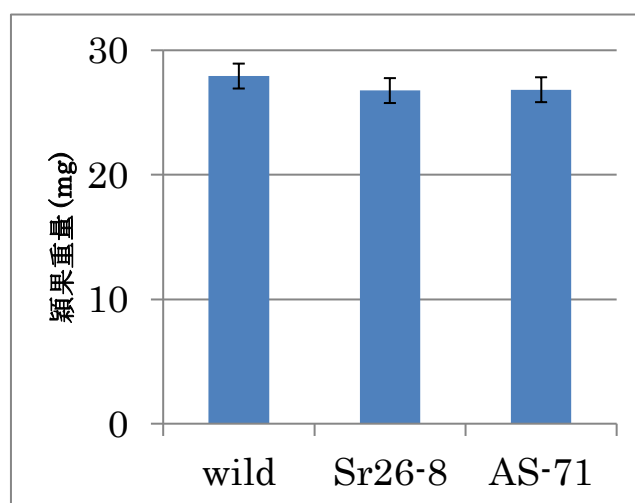
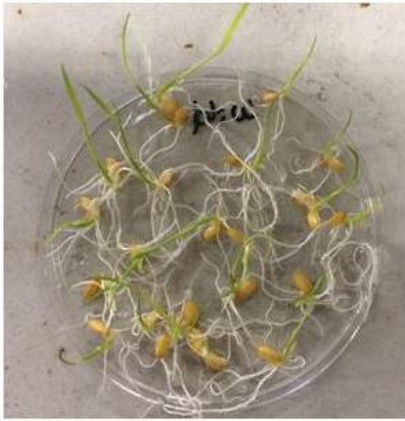


図 1 非組換えイネ、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の穎果重量

非組換えイネ



組換え26-8



組換えAS-71

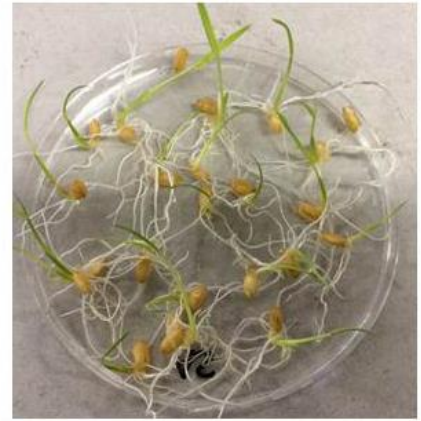


図 2 非組換えイネ、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の発芽試験

東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター・隔離ほ場所在地



図1 農場施設所在地(1)

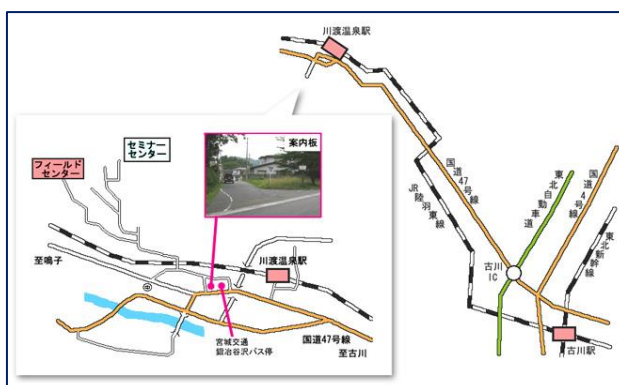


図2 農場施設所在地(2)

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/noujou/access.html>



図3 東北大学大学院農学研究センター附属複合フィールド教育研究センター周辺

隔離ほ場の試験区から、最も近い一般農家ほ場(イネ栽培水田)までの距離は、約 400 m、また、最も近いセンター内の研究ほ場は約 200 m である。赤線は附属複合フィールド教育研究センターの敷地内を示す。

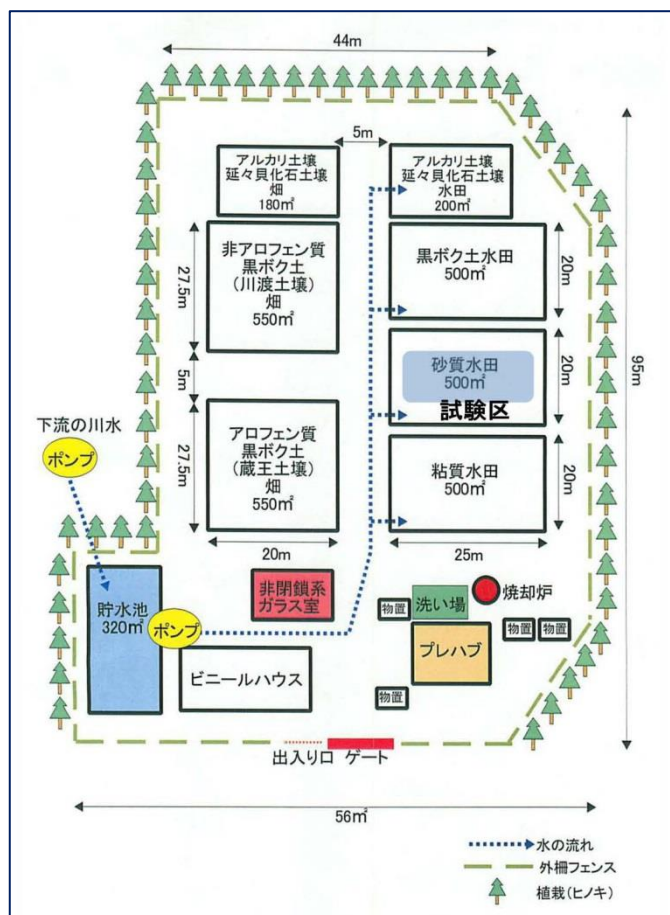


図4 組換え植物隔離ほ場の概略と栽培予定試験区



A 隔離圃場入り口



B 隔離圃場入り口の看板



C 隔離圃場を囲む強固な網状フェンス



D 隔離圃場の全景



E 隔離圃場周囲の防風林



F 水田に水を供給する貯水槽

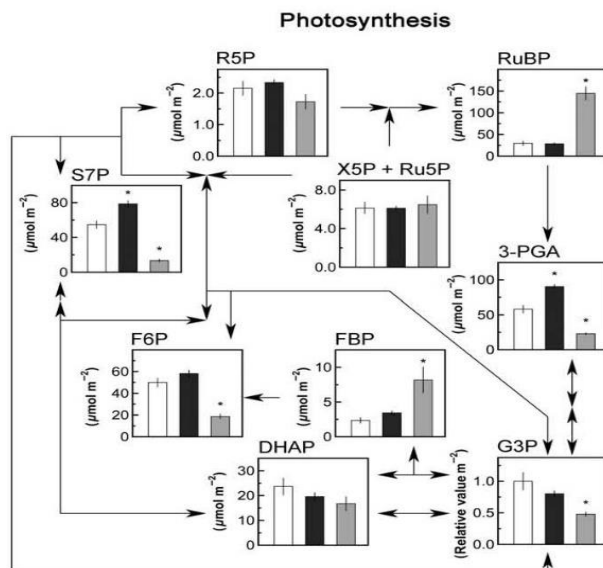


隔離圃場に設置されているプレハブ小屋(奥)とビニルハウス:プレハブ小屋では着替え, また、小屋の前には洗い場が設置されている。

図5 隔離ほ場施設内の様子

補足資料

1) 非組換えイネ(白)、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71(灰色)及び *RBCS* センスイネ Sr26-8(黒)の第 11 完全展開葉におけるカルビンサイクル関連代謝産物含量



Data are presented as means \pm SE ($n = 5$). Abbreviations: RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FBP, fructose 1,6-bisphosphate; F6P, fructose 6-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; X5P, xylulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate.

2) 非組換えイネ、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 の第 11 完全展開葉におけるデンプン及び糖含量

	($\mu\text{mol m}^{-2}$)		
	Wild-type	<i>RBCS</i> -sense	<i>RBCS</i> -antisense
Starch	4.10 \pm 0.16	4.97 \pm 1.37 (121) ^c	1.36 \pm 0.28 (33) ^{*d}
Sucrose	5.54 \pm 0.24	5.06 \pm 0.20 (91)	4.07 \pm 0.16 (73) [*]
Glucose	0.40 \pm 0.08	0.31 \pm 0.01 (76)	0.13 \pm 0.04 (32) [*]
Fructose	0.41 \pm 0.09	0.30 \pm 0.01 (75)	0.14 \pm 0.05 (35) [*]
Total	10.4 \pm 0.1	10.6 \pm 1.3 (102)	5.7 \pm 0.5 (55) [*]

^aThe leaves were sampled at 1600 h in a sunny day.

^bData are presented as means \pm SE ($n = 3-4$).

^cValues in parentheses represent those relative to the wild-type plants.

^dAn asterisk indicates a statistically significant difference in the value of wild-type plants by Dunnett's test ($P < 0.05$).

1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光条件の下、 CO_2 分圧 40 Pa、温度 25°C で栽培した非組換えイネ、組換え *RBCS* アンチセンスイネ AS-71 及び *RBCS* センスイネ Sr26-8 を、1) 及び 2) の測定に供した。

引用文献 Suzuki et al. (2012) *Plant, Cell and Environment* 35, 1369–1379

緊急措置計画書

平成 30 年 11 月 12 日

氏名 国立大学法人 東北大学

総長 大野 英男

住所 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号

第一種使用規程の承認を申請している Rubisco 生産抑制イネ(*RBCS2-antisense, Oryza sativa* L) (AS-71) (以下、組換えイネという)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者個人名・所属

業務管理責任者

金山 喜則 東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員

業務管理主任者

牧野 周 東北大学大学院農学研究科 教授

隔離ほ場管理者

梅津知之 東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター環境農林科 技術職員

業務従事者

石田 宏幸 東北大学大学院農学研究科 准教授

業務従事者

鈴木 雄二 岩手大学農学部 准教授

業務従事者

田副 雄士 東北大学大学院農学研究科 特任助教

業務従事者

石山 敬貴 岩手大学農学部 特任研究員

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 第一種使用等の状況は、業務従事者から得られた情報より把握するとともに、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会の委員による視察を行う。なお、本委員会を構成する委員は、以下の通りである。

経済学研究科 教授 川名 洋、理学研究科 教授 上田 実、医学系研究科 教授 片桐 秀樹、医学系研究科 教授 大和田 祐二、歯学研究科 教授 齋藤 正寛、薬学研究科 准教授 平塚 真弘、工学研究科 教授 魚住 信之、農学研究科 教授 金山 喜則、情報科学研究科 教授 井樋 慶一、生命科学系研究科 准教授 小川 智久、環境科学研究科 准教授 上高原 理暢、医工学研究科 准教授 村山 和隆、加齢医学研究所 教授 小椋 利彦、多元物質科学研究所 教授 永次 史、病院 教授 青木 洋子、東北メディカル・メガバンク機構 講師 齋藤 さかえ、遺伝子実験センター 教授 本橋 ほづみ、遺伝子実験センター 准教授 小林 孝安以上 18 人。

(2) 種子については管理を徹底し、部外者が入手できないようにするとともに、その情報を整理して記録する。

(3) さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、得られた情報を整理し、記録する。

- 3 **第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法**
直ちに隔離ほ場で試験に従事している者および隔離ほ場のある自治体に連絡、周知徹底する。また、広く周知するため、ホームページ等でお知らせを掲載する。
- 4 **遺伝子組換え生物等を不活化又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容**
- (1) 本組換えイネの栽培種子はオートクレーブにより不活化する。
 - (2) 隔離ほ場で栽培されている本組換えイネは隔離ほ場への鋤き込み、もしくは焼却処理によって確実に不活化する。
 - (3) 栽培種子を保存する必要があるときには密閉容器に入れ、当該容器の見やすい箇所に遺伝子組換えイネであることを表示の上、遺伝子組換え生物以外の生物等と明確に区別して保管し、保管場所の見やすい箇所に遺伝子組換えイネを保管している旨の表示を行う。
- 5 **文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制**
生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、文部科学省ライフサイエンス課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための施設内・研究科内における組織体制および連絡窓口を報告する。