

直立葉半矮性イネ(*ΔOsBR11*, *Oryza sativa* L.) (B-4-1-18) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書..... 1

生物多様性影響評価書の概要

第一 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及び自然環境における分布状況..... 2
- (2) 使用等の歴史及び現状..... 2
- (3) 生理学的及び生態学的特性..... 3

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..... 4
- (2) ベクターに関する情報..... 6
- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 6
- (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... 7
- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別方法並びにそれらの感度及び信頼性... 7
- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 8

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

- (1) 使用等の内容..... 10
- (2) 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..... 10

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

- 1 競合における優位性..... 11
- 2 有害物質の産生性..... 12
- 3 交雑性..... 12
- 4 その他..... 13

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 14

緊急措置計画書..... 16

第一種使用規程承認申請書

平成16年12月 1日

農林水産大臣 島村 宜伸 殿
環境大臣 小池 百合子殿

氏 名 独立行政法人 農業生物資源研究所
申請者 理事長 岩渕 雅樹 印
住 所 茨城県つくば市観音台2-1-2

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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	直立葉半矮性イネ(<i>ΔOsBR11</i> , <i>Oryza sativa</i> L.) (B-4-1-18)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	栽培（独立行政法人農業生物資源研究所（茨城県つくば市観音台2-1-2）内のほ場における栽培に限る。）、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に先立ち収集した情報

1 宿主又は宿主の属する生物種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 和名、英名及び学名

イネ、rice、*Oryza sativa* L.

ロ 宿主の品種名又は系統名

品種名：どんとこい（日本型イネ栽培種）

品種登録番号 第 5845 号、登録年月日 1997/12/05

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

我が国において宿主植物種 *Oryza sativa* 及び近縁野生種の自生は基本的に見られない。近縁野生種については世界中の熱帯・亜熱帯に分布し、様々な環境、特に生育地の多様な水条件に適応分化している。多様性中心あるいは多様性の中核地域は、インドの北東諸州（マニプール、メガラヤ、ナガランド州など）を西端とし、ラオスを東端とする東西に延びる地域にあり、北端は中国雲南省のシーサンバンナ・タイ族自治州を含む西南地域、南端はミャンマー（ビルマ）、タイのデルタと丘陵部の境界地域にある。これらの地域はいずれも山岳地帯。丘陵地帯を背景とする地域で、現在では地形が複雑で、むしろ大規模稲作には適しない地域である¹⁾。

なお、我が国においてほ場及び畦畔には栽培に伴って雑草イネが発生する場合がある。しかし、その生育域は主に農耕地及びその近傍に限られており、そこから広がって自生することはない。南及び東南アジアにおける雑草イネの特性から、栽培種イネどうしの遠縁交雑で生じたことが示されていることや^{2,3)}、我が国には野生種イネ（*O. nivara*、*O. rufipogon* 等）が自生していないことなどから、我が国における雑草イネは栽培種イネの変異であり、栽培種イネどうしの交雑により雑草性の形質が出てきたものと考えられる。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

熱帯原産のイネでは化石などの資料はきわめて乏しいが、インド、タイ、中国などの遺跡の発掘品から推定して、イネの栽培化は紀元前 7000 年ぐらいまでさかのぼることができる。日本へは縄文時代の後半に中国から直接ないしは朝鮮半島を経由して伝来したと推定されている⁴⁾。我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。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

アジアのモンスーン地帯を中心に、南緯 40 度～北緯 53 度にわたり種々の気候条件下で栽培されている⁴⁾。栽培面積は約 1 億 500 万 ha、総生産量は 5 億 t を超える。生産量はアジア（90%以上）、中南米、アフリカ、北米、旧ソ連、ヨーロッパの順。日本でも栽培地は北緯 44 度にまで及び、また世界で最も生産力が高い生産地域と

なっている。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。この期間内で、田植え可能となる最低気温が 13℃、登熟が停止する最低気温は 15℃と見なされている⁵⁾。

我が国での流通実態は、約 800 万 t が国内で生産され、ほとんどが国内消費向けに流通している。輸入は 60～70 万 t 程度である。これらのうち、約 92% が主食用として消費され、残りが加工用、種子用、飼料用に使用されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件

イネの栽培地域は、ロシア・中国国境のアムール河岸の北緯 53 度からアルゼンチン中央部の南緯 40 度まで広がっている⁴⁾。我が国においても、水田及び畑地において広範囲で栽培されている。最低温度 10～13℃で発芽、15～18℃で生育、20℃以上で登熟可能。

ロ 繁殖又は増殖の様式

- ① 種子の散布は、籾の老化が進み枝梗から脱落することで行われる。しかし、現在の日本における栽培稲では、脱粒性は極めて小さい⁶⁾。イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネ品種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。種子の寿命に関しては、低温・低湿条件下では長期間の保存が可能であり、室温下でも種子水分を 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⁷⁾。しかし、ほ場土壌中に埋没した種子は、最初の冬の間発芽力を失い、大部分が腐死すると報告されている。土壌中に埋没した種子の極一部は冬季の間生存し、翌春発芽するものもある⁶⁾。
- ② ひこばえによる栄養繁殖も行うが、我が国では通常、冬の低温のため枯死する。気候の温暖な地域では、ホールクワの収穫を目的とする飼料用イネの場合、刈り取り後、刈り株や根元から出てくるひこばえから再生した植物体を再び収穫する多回刈り栽培も可能である。
- ③ イネは高度の自殖性種子作物であり、通常他殖率は 1%以下であるが、条件によっては最大 5%程度の自然交雑が起こる⁸⁾。また、出穂期が同じ品種を栽培する場合には交雑率が高まる可能性が想定されるが、イネの花粉飛散距離は短く、寿命も短いことからほ場を離せば交雑を回避できる⁹⁾。国外では、栽培種イネと交雑可能な近縁野生種として野生種イネ (*O. nivara*, *O. rufipogon* 等) が自生している地域もあるが、それらが我が国に自生しているという報告はない。
- ④ イネの受粉形式は風媒であり、葯は開花(穎)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は栽培品種においては極めて少数(1%以下)である¹⁰⁾。花粉生産量は、前歴期間(幼穂形成期から約 10 日間)の水温が 25℃の条件で、1 葯当たり約 1,300 個となるとされる。前述のように開花時点で葯内の花粉の殆どは失われているが、仮に全ての花粉が穎花外に放出されるとし、穎花あたりの葯数を 6、1 穂に同時に開穎する穎花数を 10～30 として単純計算すると、1 日あたり 1 穂から放出される花粉の数は 78,000～234,000 個となる。また、イネの個体当たりの花粉生産量は約 900 万個ともいわれる。花粉形状は球形で、葯内では粘質で花粉塊をなしているが、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⁸⁾、最大で 10 分程度とされる。花粉飛散距離については、交雑を避けるための実質的な距離として採種ほ場での隔離距離を参考にすると、イネの場合は 3 m とされている。また、花粉源からの距離と交雑率について、いくつか報告がなされているが、それらによると、距離 4.5m で交雑率は 0.6%以下、10m では 0.04%以下と

なり、20m を越すと 0 %に至るとされている⁹⁾。

ハ 有害物質の産生性

プラントボックス法を用いたアレロパシー検定法により、世界各地のイネ品種、イネ近縁種について、アレロパシー活性を測定した報告がある。検定植物としてレタスを用いた場合、イネ品種間には顕著な違いがあり、特にジャワ型の在来品種と赤米において強い活性を示すものがあるが、概して日本での栽培品種のアレロパシー活性は弱いことが報告されている¹¹⁾。

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

イ 構成及び構成要素の由来

直立葉半矮性イネ ($\Delta OsBR11$ 、*Oryza sativa* L.) (B-4-1-18) の作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表 1 に示した。

表1 供与核酸のサイズと機能

構成要素	サイズ (kb)	由来及び機能
<i>ΔOsBR11</i> (イネ改変型ブラシノライド受容体遺伝子) 発現カセット		
アクチンプロモーター	1.3kb	イネアクチン由来プロモーター。構成的強発現プロモーター。イネ・ゲノム DNA 由来。
<i>ΔOsBR11</i>	1.4kb	イネブラシノライド受容体遺伝子のカイネースドメイン、ブラシノステロイド情報伝達の阻害により感受性を低下させる。イネ・cDNA 由来。
<i>NOS</i> ターミネーター	0.3kb	アグロバクテリウム Ti プラスミド上のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター。導入遺伝子の転写終結を規定する。アグロバクテリウム・Ti プラスミド由来。
<i>NPTII</i> (カナマイシン耐性遺伝子) 発現カセット		
<i>NOS</i> プロモーター	0.3kb	アグロバクテリウム Ti プラスミド上のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター。下流につないだ遺伝子の発現を誘導する。アグロバクテリウム・Ti プラスミド由来。
<i>NPTII</i> 遺伝子	1kb	カナマイシン及びジェネティシン耐性を付与、選抜マーカー遺伝子。大腸菌・プラスミド DNA 由来。
<i>NOS</i> ターミネーター	0.3kb	アグロバクテリウム Ti プラスミド上のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター。導入遺伝子の転写終結を規定する。アグロバクテリウム・Ti プラスミド由来。
<i>HPT</i> (ハイグロマイシン耐性遺伝子) 発現カセット		
35S プロモーター	0.8kb	構成的強発現プロモーター。下流につないだ遺伝子の植物体全身での発現を強く誘導する。カリフラワーモザイクウイルス・ゲノム DNA 由来。
<i>HPT</i> 遺伝子	1.1kb	ハイグロマイシン耐性を付与、選抜マーカー遺伝子。大腸菌・プラスミド DNA 由来。
<i>NOS</i> ターミネーター	0.3kb	アグロバクテリウム Ti プラスミド上のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター。導入遺伝子の転写終結を規定する。アグロバクテリウム・Ti プラスミド由来。

ロ 構成要素の機能

直立葉半矮性イネ (*ΔOsBR11*, *Oryza sativa* L.) (B-4-1-18) 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。以下には *ΔOsBR11* 遺伝子の作用機構について、詳しく述べる。

改変型ブラシノライド受容体遺伝子 (*ΔOsBR11*) はイネブラシノライド受容体遺

伝子のカイネースドメインである。この改変型ブラシノライド受容体遺伝子の導入により、宿主植物においてブラシノライド受容シグナルの正常な伝達が阻害される。その結果として生体内のブラシノライド情報伝達を阻害することでブラシノステロイドに対する感受性が低下する。ここではブラシノライド受容体変異株と同様に直立葉と矮性化をおこすことを目的として $\Delta OsBR11$ 遺伝子を使用した。直立葉の植物体は受光態勢が良くなることから密植での栽培が可能となり、収量を増大させるための育種素材として期待できる。本遺伝子を導入した組換えイネは変異形質が優性に発現するドミナントネガティブとなった。

(2) ベクターに関する情報

イ ベクターの名称及び由来

pBI101
C58 (Ti プラスミド) 由来

ロ ベクターの特性

pBI101 (ACCESSION U12639) は多くの植物で遺伝子導入用バイナリーベクターとして広く用いられており、カナマイシン耐性遺伝子を持つ。自然条件では、イネに対して感染性を示さない。また、野生株 (C58) の持つ腫瘍形成能は除去されている。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

以下に示したとおり。

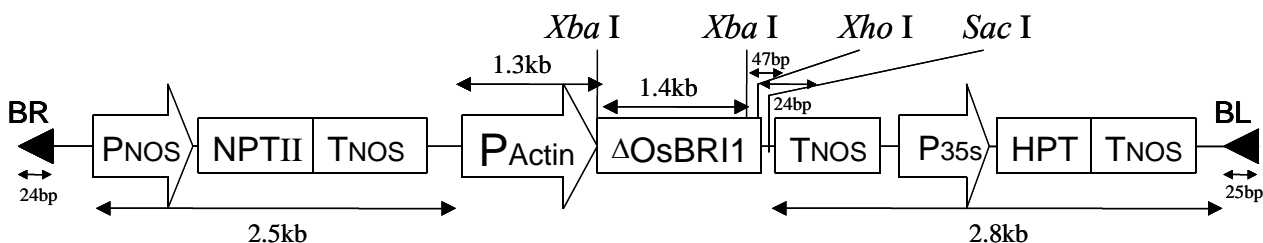


図1 宿主内に移入された核酸全体の構成
BR はライトボーダー配列を示す、BL はレフトボーダー配列を示す。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法
組換え体の選抜にはハイグロマイシン (50 μ g/l) を含む選抜培地を用いた。
- ② アグロバクテリウム菌体の残存の有無
組換えイネ (T_1 世代) の種子をリン酸緩衝液中で磨砕し、これをカナマイシン 100mg/L、ハイグロマイシン 50mg/L およびリファンピシン 10mg/L を含む LB 培地へ塗布し、25 $^{\circ}$ C で培養した。3 日後、観察によりアグロバクテリウムの確認を行った結果、アグロバクテリウムの増殖は観察されなかった。このことから、組換えイネ後代には遺伝子導入に用いたアグロバクテリウムは残存していないと

判断された。

(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

イ 移入した核酸の存在場所

ゲノムDNAを用いたサザン解析により、移入した核酸は染色体上に挿入されていることを確認した。また、世代間でサザン解析のバンドパターンが一致していた事と、分離世代において導入遺伝子を保持している個体と保持していない個体の分離比がメンデル遺伝を示した事から、移入した核酸は染色体上に存在することが確認された。

ロ 移入核酸のコピー数及び遺伝の安定性

T₃ 世代のサザン解析により3コピー導入されていると判断した。また、個体間及び世代間 (T₂ 世代との比較) で遺伝子導入パターンは一致していた。さらに、T₁ 世代 (分離世代) 以降、ヘミ個体の後代において、導入遺伝子を保持している個体と保持していない個体の分離比はカイ二乗検定の結果3:1を示しているとして判断された (表2)。以上の結果は染色体上に移入した核酸が安定的に次世代に遺伝していることを示している。

表2 分離世代におけるハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) の検出

系統名	バンドの有無		個体数
	有(+)	無(-)	
どんとこいAΔBNH4-1	22	9	31
どんとこいAΔBNH4-4	27	6	33
AΔBNH (+:- = 3:1; $\chi^2 = 0.145$, $P = 0.7035$)			
AΔBNH (+:- = 3:1; $\chi^2 = 0.491$, $P = 0.4834$)			

ハ 複数コピー存在している場合、隣接しているか否か

ロよりヘミ個体の後代における分離比が3:1であることから、移入した複数コピー全てが1遺伝子座に導入されていると考えられる。

ニ 自然条件下での形質発現の安定性及び意図した特異的発現の安定性

T₂ 世代以降、導入遺伝子の存在が確認された個体間の表現型 (直立葉及び矮化の程度) は揃っており、個体間、世代間での形質発現は同じ傾向を示してしていた。ノーザン解析を行った結果から予想されるサイズの mRNA がラミナジョイント部分を含む組織で発現しており、意図しない発現は検出されなかった。

ホ 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 該当するウイルスは存在しない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別方法並びにそれらの感度及び信頼性

組換え直立葉半矮性イネ (B-4-1-18) に導入されている遺伝子配列に基づき PCRプライマーとしてフォワードプライマーとリバースプライマーを用いて PCR を行うことにより、本組換え体で特異的に検出・同定が可能である。PCR 条件としては95℃30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを25回繰り返すことで PCR バンドが増幅される。100ng 程度のゲノム DNA を反応に供すれば、本法により本組換え体を検出できることを確認した。

PCR 以外にも、抗生物質（ハイグロマイシンもしくはジェネティシン（カナマイシン））耐性の有無による判別、草型変化（矮化程度）の目視及び計測による識別、導入遺伝子のサザン解析による識別も可能である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 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内容

本組換えイネ及び対照として本組換えイネの宿主であるイネ品種「どんとこい」（以降「対照品種」と呼ぶ）を用いて閉鎖系、非閉鎖系温室においてポット（1/5000a ワグネルポット）栽培を行った。さらに隔離ほ場において、異なる栽植密度条件及び施肥条件下での栽培実験を行った。

イネ改変型ブラシノライド受容体遺伝子（ブラシノライド受容体遺伝子のカイネースドメイン）を構成的に過剰発現させた結果、*d61* 突然変異イネ（ブラシノライド受容体遺伝子の変異系統）と類似した草型を示した。すなわち、ラミナジョイント部における葉身の背軸側への屈曲が見られなくなることによる強い直立葉、第2節間非伸長型（*dm* 型）の矮化を示した。*d61* 突然変異イネと直立葉組換えイネ間において、各節間比が完全に比例しているわけではないが、5種類に分類されている矮性の型としては共に第2節間非伸長型（*dm* 型）に最も近い形質を示した。隔離ほ場での栽培結果においては、強い直立葉の形態を示し、第2節間は温室での栽培ほどではないが、統計的に有意に短縮していた。また本組換えイネは、選抜マーカー遺伝子として導入した2種類の抗生物質耐性遺伝子を有しており、ハイグロマイシン及びジェネティシンに対する耐性を示した。

ロ 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のある場合はその程度（イにおいて明らかにしたものは除く）

① 形態及び生育の特性

非閉鎖系温室において穂長、出穂日数、籾長、籾幅、籾厚を調査した。本組換えイネの穂長、出穂日数、籾厚について対照品種との間に有意な差は認められなかった。籾長、籾幅は有意に対照品種より小さかった。

隔離ほ場において止葉の長さ、分げつ数、器官別乾物重、籾長、籾幅、籾厚を調査し、止葉の長さ、分げつ数、器官別乾物重は対照品種との間に有意な差は認められなかった。籾長、籾幅、籾厚は有意に対照品種より小さかった。

② 生育初期における低温又は高温耐性

組換えイネと対照品種の2~3葉期の幼苗における低温感受性を比較した結果、2℃ 24時間光条件 15日間の処理でいずれも100%枯死し、本組換えイネの低温感受性は対照品種と同程度であると判断された。

③ 成体の越冬性又は越夏性

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ことが知られている。実際に収穫後の隔離ほ場において、本組換えイネは対照品種と同程度に生長が停止し、枯死が始まっている様子が観察されたので、越冬性は対照品種と同様に極めて低いと判断した。

④ 花粉の稔性及びサイズ

組換えイネ及び対照品種の穎花を5個採取し、葯から花粉粒をプレパラートに

採り、アセトカーミンで染色した後、花粉粒の様相を光学顕微鏡で観察し、稔性を判定した。本組換えイネと対照品種の花粉は、いずれも同程度の大きさの球形で、形状に差異は認められず、また、ともに花粉稔実率に差は認められなかった。本組換えイネの花粉稔性は、対照品種と同程度であると判断された。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

非閉鎖温室における種子の生産量は1株当たりの穂数、1穂当たりの1次枝梗数、1穂当たりの穎花数、稔実率で評価した。本組換えイネの1穂当たりの1次枝梗数、稔実率には対照品種との有意差は認められなかった。1株当たりの穂数、1穂当たりの穎花数は対照品種より有意に少なかった。

隔離ほ場における種子の生産量は1穂重、1穂当たりの精籾数、精籾重、個体当たりの穂数を調査し、個体当たりの精籾数、精籾重、単位面積当たりの穂数、精籾数、精籾重、及び精籾千粒重、稔実率を算出し、評価した。本組換えイネの1穂重、1穂当たりの精籾数、精籾重には対照品種との有意差が認められなかった。個体当たりの穂数は統計的に有意ではないものの多い傾向を示し、単位面積当たりの穂数は有意に多かった。個体当たりの精籾数と精籾重、単位面積当たりの精籾数、精籾重には有意な差は認められなかった。異なる栽植密度条件下の密区において、組換えイネの単位面積当たりの精籾数は対照品種より有意に多かったが、組換えイネの精籾千粒重、稔実率が有意に小さかったため、単位面積当たりの精籾重では有意な差は認められなかった。休眠性については、非閉鎖系実験における収穫直後の発芽検定では発芽率が組換えイネと対照品種ともに高く、両者間で有意差はみられなかったため、本組換えイネと対照品種いずれも休眠性は極めて浅いと考えられる。また脱粒性及び発芽率に関しては有意な差は認められなかった。

⑥ 交雑率

交雑可能な近縁野生植物は我が国に自生していないため調査を行っていない。

⑦ 有害物質の産生性

温室で栽培した植物体内の物質に関する生物検定（鋤込み試験）と機器分析（植物体地上部と根部の HPLC 分析）、及び植物体から分泌・発散する物質の生物検定（栽培土壌を用いた後作試験、根圏土壌法）及び機器分析（揮発性物質の GC 分析）を行ったところ、宿主の属する生物種の範囲を超える結果は認められなかった。また、根から分泌する物質が土壌微生物相に及ぼす影響を希釈平板法で調査したところ、対照品種と同程度であると判断された。

隔離ほ場において根から分泌する物質の土壌微生物相に及ぼす影響を希釈平板法で調査したところ、有意差は認められなかった。

⑧ その他

「マンゲツモチ」との交雑性

隔離ほ場において、組換えイネと「マンゲツモチ」を隣接して植栽した。「マンゲツモチ」から採取した種子をキセニアの有無によってウルチとの交配を調査した。その結果、組換えイネの花粉飛散の程度は対照品種と同程度であると判断された。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

本直立葉半矮性イネは、直立葉にすることで密植栽培を可能とし、半矮性にすること

で強風等による倒伏を防止することにより、収量の増大を目指すものである。

作物の草型や収量特性は栽培環境に強く影響を受けるため、温室等におけるポット栽培とほ場栽培ではレスポンスが違うと考えられる。これまで閉鎖系温室、非閉鎖系温室及び隔離ほ場において、本直立葉半矮性イネの特性を調査してきたが、形態の一部及び収量等の特性について温室栽培とほ場栽培で異なる結果を得た。温室では、本直立葉半矮性組換えイネは対照品種と比較して収量が少なかったが、隔離ほ場における栽植密度が高い栽培条件下では、対照品種と比較して単位面積当たりの精籾数が7%程度多い結果を得た。このことは、本組換えイネが対照品種と比較してより直立葉になったことで、密植条件でも光資源の有効利用が可能になった結果、対照品種より多くの収量を得たことを示していると考えられる。直立葉半矮性の性質を生かした栽培法（特に栽植密度条件）の最適化で対照品種より優れた性質を持つ組換えイネの開発が今後期待できるようになる。平成16年の度栽培に用いた農業環境技術研究所の隔離ほ場は1つが12.5㎡の枠水田6枠分の面積しかないために、試験栽培に十分な面積を確保するには至らず、栽植密度の設定は2水準のみであった。また密度試験では、各試験区中央の4分の1の面積内にある個体のみが調査対象となるので、今回の隔離ほ場における試験栽培では調査個体が6個体しか確保できなかった。そこで、より広い面積の試験ほ場で栽培することで、一般水田環境と近い条件下で、かつ栽植密度条件を複数水準設定し、各試験区の面積を広く設定して草型等の一般形態や収量特性を評価することが可能となる。その結果として、本直立葉半矮性イネの育種母本としての利用の可能性をより明確にすることができると考えられる。

(1) 使用等の内容

栽培（独立行政法人農業生物資源研究所（茨城県つくば市観音台 2-1-2）内のほ場における栽培に限る。）、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 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

別添の緊急措置計画書を参照。

第二 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 (*Oryza sativa* L.) は我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扱う限り、水田や畑地で野生化、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、組換え体と宿主又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

- ① イネ改変型ブラシノライド受容体遺伝子を導入した組換え直立葉イネ (B-4-1-18) は目的遺伝子に加えて、マーカー遺伝子として2種類の抗生物質耐性遺伝子を有している。これら抗生物質耐性遺伝子はそれぞれハイグロマイシン、ジェネティシン（もしくはカナマイシン）に対する耐性を付与する。しかし、ここで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考え難い。本組換えイネの競合に関わる差異としては草型改変による受光体勢の変化が考えられる。本組換え直立葉イネにおいて変化した草型に関連する特性としては、矮化、葉身の直立が挙げられる。これらの形質は対照品種と比較して差異は10%程度であった。また、草型の変化に付随して収量に関する特性にも変化があった。組換え体の個体当たりの穂数は多い傾向を示し、単位面積当たりの穂数は有意に多かったが、一方で精籾千粒重、稔実率は有意に低かった。しかしながら、草型の変化、収量の変化とともにその差は品種や栽培条件による変異の幅を超える相違はみられなかった。
- ② 閉鎖系温室、非閉鎖系温室及び隔離ほ場における環境影響評価実験の範囲において、本組換えイネの競合に係わると考えられる形質（脱粒性、発芽率、休眠性など）は対照品種及びモデルとなった既存の突然変異系統との間に差異が認められていない。

以上より、本組換えイネにおいて対照品種と比較して、競合における優位性が高まったような知見は得られていない。このことから、組換えイネについて対照品種と比べて競合における優位性が大きく異なるとは考えられない。よって、本組換えイネが野生植物と競合することはなく、また影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断した。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に従った使用等において、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などが特定されなかったことから生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

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

改変型ブラシノライド受容体遺伝子を導入した組換え直立葉半矮性イネ (B-4-1-18) は、多様な作用を持つ植物ホルモンの情報伝達系に改変を加えていることから、目的のブラシノステロイド以外の2次代謝産物の生合成や代謝に何らかの変化を及ぼしている可能性は否定できないが、閉鎖系温室及び非閉鎖系温室において、葉から放出される揮発性成分、茎葉及び根に含まれるフェノール性酸の機器分析、鋤込み試験や後作試験、根圏土壌法によるアレロパシー物質産生能の生物検定、栽培終了時の土壌微生物相調査を行った結果、本組換えイネには既存のイネの範囲を超えるような差異は認められなかった。さらに、隔離ほ場において、土壌微生物相調査を行った結果からも、本組換えイネには既存のイネの範囲を超えるような差異は認められなかった。

以上の結果から、本組換えイネは宿主又は宿主の属する分類学上の種と比べて有害物質の産生性に関して相違は認められない。よって、本組換えイネが野生動植物の種又は個体群の維持に支障を及ぼすおそれはなく、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断した。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に従った使用等においては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動植物等は特定されず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

野生種イネである *O. nivara*、*O. rufipogon* 等の植物は栽培種イネ (*O. sativa* L.) 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。しかし、これらの植物が我が国に自生しているという報告はない。

ほ場及び畦畔には栽培に伴って雑草イネが発生する場合がある。雑草イネには種々の起原があると考えられているが、我が国の雑草イネは野生種イネとの交雑に由来するのではなく栽培種イネどうしの交雑に由来すると考えられる。このため、我が国における雑草イネは影響を受ける可能性のある近縁野生植物として特定されるものではない。

以上のことから、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かった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(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等が特定されなかったことから、本組換え体の第一種使用等により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

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組換えイネの性質はないと考えられる。

第三 生物多様性影響の総合的評価

1 競合における優位性

本組換えイネは2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考え難い。競合に関わる差異としては草型改変による受光体勢の変化が考えられるが、この変化は我が国において従来栽培されているイネの範囲を逸脱したものではないと考えられる。以上より、本組換えイネと競合する野生植物は特定されず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

2 有害物質の産生性

宿主である日本型イネ栽培種において有害物質産生（アレロパシー物質の産生）について報告されており、品種間差は大きく、我が国で栽培されている品種はアレロパシー活性が低いと報告されている¹¹⁾。本組換えイネと対照品種について、葉から放出される揮発性成分、茎葉及び根に含まれるフェノール性酸の機器分析、また鋤込み試験、後作試験、根圏土壌法による生物検定、土壌微生物相調査を閉鎖系、非閉鎖系温室及び隔離ほ場で実施した結果、アレロパシー物質産生能に関して差異がないことが確認された。以上より、本組換えイネの有害物質産生により影響を受ける野生植物は特定されず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

3 交雑性

我が国では、交雑可能な近縁野生種の自生は見られないので、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ず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上より、本組換えイネの栽培を行うことで生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

引用及び参考文献

- 1) 松尾孝嶺 (監修). 1989. 植物遺伝資源集成 1, I. 食用作物, 1. イネ. 講談社. 東京.
- 2) Ishikawa R., S. Yamanaka, Y. Fukuta, S. Chitrakon, C. Bounphanousay, K. Kanyavong, L-H. Tang, I. Nakamura, T. Sato and Y-I. Sato. (2004) Genetic erosion from modern varieties into traditional upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in northern Thailand. *Genet. Resour. Crop Evol.* Accepted
- 3) Ishikawa R., T. Naoko, K. Imai, Y.-I. Sato, H. Yamagishi, Y. Shimamoto, K. Ueno, H. Morishima and T. Sato. (2004) Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.* Accepted.
- 4) 蓬原雄三. 1990. イネの育種学. 東京大学出版会. 東京.
- 5) 栗原 浩・蓬原雄三・津野幸人ほか. 2000. 作物栽培の基礎. 農山漁村文化協会. 東京.
- 6) 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). 1990. 稲学大成 (第2巻) 生理編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 7) 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). 1990. 稲学大成 (第3巻) 遺伝編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 8) OECD. 1999. Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice), OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.14.
- 9) 農林水産技術会議. 2003. 5-1 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方. 第2回「第1種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料. http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siryous5_1.pdf
- 10) 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・前田英三・山崎耕宇 (編). 1990. 稲学大成 (第1巻) 形態編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 11) Fujii Y. (1993) I. The Allelopathic Effect of Some Rice Varieties, in Allelopathy in the Control of Paddy Weeds, Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin No. 134, 1-6.

緊急措置計画書

平成16年12月 1日

氏名 岩淵 雅樹
住所 茨城県つくば市観音台 2-1-2
農業生物資源研究所

第一種使用規程の承認を申請している 直立葉半矮性イネ($\Delta OsBR11$, *Oryza sativa* L.) (B-4-1-18) 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・所属は、個人情報なので非開示
- 2 第一種使用等の状況の把握の方法
 - (1) 本直立葉半矮性イネ（イネ改変型ブラシのライド受容体遺伝子 ($\Delta OsBR11$)、*Oryza sativa* L.) (B-4-1-18) (以下、本LMOという) の栽培用種子については、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。
 - (2) 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、本LMOを栽培している者又は種子を保有している者の把握に努め、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
緊急措置が必要となった場合には直ぐにその内容を2で把握した関係者に対して、電話、電子メールや文書などにより連絡を取る。また、周知するためにホームページ等で本件についてのお知らせを掲載する。
- 4 遺伝子組換え生物等を不活化し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
試験ほ場で栽培されている本LMOは、焼却処理あるいはすき込み等による不活化を行う。
- 5 農林水産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、農林水産省農産安全管理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研究所内における組織体制及び連絡窓口を報告する。