

直立葉半矮性イネ

(*OsBR11*, *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…………… 2

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…………… 3
- (2) ベクターに関する情報…………… 4
- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法…………… 4
- (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…………… 4
- (5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違…………… 5

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…………… 6
- (2) 使用等の方法…………… 6
- (3) 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…………… 6

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…………… 6
- 2 有害物質の産生性…………… 7
- 3 交雑性…………… 8

第三 生物多様性影響の総合的評価…………… 9

緊急措置計画書…………… 12

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 2 月 25 日

農林水産大臣 亀井 善之 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 岩淵 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（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）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 ($\Delta OsBR11$, <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	隔離ほ場における栽培、保管、運搬、廃棄及び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	所在地：茨城県つくば市観音台 名称：農業環境技術研究所・隔離ほ場 使用期間：平成 16 年 6 月～平成 17 年 3 月 1 隔離ほ場の施設 (1)部外者の立入を防止するためのフェンス (2)部外者は立入禁止であること、管理責任者を記載し、見やすい所に掲げられた隔離ほ場の標識 (3)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 (4)花粉の飛散を減少させるための防風林 2 隔離ほ場の作業要領 (1)組換えイネとその対照イネ以外の植物の生育を最小限に抑える。 (2)組換えイネを隔離ほ場の外に運搬、保管する場合には組換えイネの漏出を防止する。 (3)(2)以外では栽培終了後、組換えイネを隔離ほ場内で不活化する。 (4)使用した機械、器具等に付着した組換えイネが外に持ち出されないように防止する。 (5)設備が有する機能を十分発揮されるように保持する。 (6)(1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。 (7)生物多様性影響のおそれがあると認められたときは添付書類の「緊急措置計画書」に定められる措置を確実に講ずる。

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

イネの学名は Rice、*Oryza sativa* L.である。原産地は、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。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經由して伝来したと推定されている。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。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。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。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

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。しかし、出穂期が同じ品種を栽培する場合には、ほ場を 20 m 離せば離せば交雑を回避できる。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。

花粉の寿命は一般に 3 ~ 5 分、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取ほ場での隔離距離を参考にと、イネの場合は 3 m とされている。

ハ 有害物質の産生性

自然条件下で周囲の野生動植物等の生育に支障を及ぼす物質を産生することは知

られていない。

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

NPTII (カマイソ耐性遺伝子) 発現カセット:

NOS プロモーター: *Agrobacterium*・Ti プラスミド由来、0.3kb

NPTII 遺伝子: 大腸菌・プラスミド DNA 由来、1kb

NOS ターミネーター: *Agrobacterium*・Ti プラスミド由来、0.3kb

HPT (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: カワカキ-エンウイルス・ゲノム DNA 由来、0.8kb

HPT 遺伝子: 大腸菌・プラスミド DNA 由来、1.1kb

NOS ターミネーター: *Agrobacterium*・Ti プラスミド由来、0.3kb

$\Delta OsBRI1$ (体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: イネ・アクチン遺伝子ゲノム DNA 由来、1.3kb

$\Delta OsBRI1$ 遺伝子: イネ・ $\Delta OsBRI1$ 、cDNA カイネースドメイン由来、1.4kb

NOS ターミネーター: *Agrobacterium*・Ti プラスミド由来、0.3kb

構成要素それぞれの塩基配列については、別紙5を参照。

ロ 構成要素の機能

NPTII: カマイソ及びジエチルメチルシロリン耐性を付与、選抜マーカー遺伝子。

HPT: ハイグロマイシン耐性を付与、選抜マーカー遺伝子。

$\Delta OsBRI1$: 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攪乱により感受性を低下させる。

体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攪乱されて、生体内のブラシノライド情報伝達に齟齬をきたすことで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、これまでの品種より収量増大となる育種素材の育成が期待できる。

NOS プロモーター: 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。

35S プロモーター: 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。

アクチンプロモーター: 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35Sプロモーターよりも強く誘導する。

NOS ターミネーター: 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。導入遺伝子の転写集結部を規定する。

(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

本組換えイネの作出には上記のpBI101ベクターを元に、*NPTII* (カマイシン耐性遺伝子) 発現カセット $\Delta OsBR11$ (体改変型ブランチ受容体遺伝子) 発現カセット *HPT* (ハイグロマイシン耐性遺伝子) 発現カセットを連結して構築した。

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

選抜の方法 : ハイグロマイシンによる選抜。

育成経過

平成 11 年 4 月 : アグロバクテリウム法による遺伝子導入実験開始。

同 11 年 8 月 : ハイグロマイシン耐性による選抜と選抜されたカルスからの再分化植物の獲得。

同 11 年 11 月 : 組換え当代植物の育成、遺伝子導入・発現の確認。

同 12 年 4 月 : 次世代の発芽個体を用いて導入遺伝子の確認。閉鎖系温室における環境影響評価実験を行う。

同 14 年 4 月 : 組換えイネの世代促進、生育特性調査及び選抜。

同 15 年 4 月 : 文部科学省「組換え DNA 実験指針」に基づく非閉鎖系温室における環境影響評価実験を行う。

(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

サザン解析により 3 コピー導入されていることを確認。また個体間及び世代間で遺伝子導入パターンは一致していた。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の安定性はあるものと考えられる。ただし上記の通り、いずれの系統も導入形質が完全優性に近い形で現れたため、形態からのホモ個体・ヘミ個体間の区別は困難であっ

た。

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 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)と類似した強い直立葉、および第2節間非伸長型(dm型)の矮化表現型を示した。

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)

形態及び生育の特性

形態的観察の結果、イで示した以外に1穂当たりの種子数及び1株当たり穂数の30%程度の減少と籾サイズの若干の減少が観察された。それ以外、出穂日、穂長、稔実率については有意な差異が認められなかった。

生育初期における低温又は高温耐性

イネ幼苗の生育は10 ~ 30 が適していることが知られている。本組換えイネについては未調査のため現在調査中である。

成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場試験において調査し情報を収集する。

花粉の稔性及びサイズ

酢酸カーミン染色後の観察結果、有意な差異は認められなかった。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

イに示したとおり、種子生産量に関しては宿主品種の78%に低下。脱粒性、休眠性及び発芽率に関しては有意な差は認められなかった。

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。)

有害物質の産生性

植物体に含まれる物質の生物検定及び機器分析(植物体地上部と根部のHPLC分析、鋤込み試験)および植物体から分泌・発散する物質の生物検定及び機器分析(揮発性物質のGC分析、栽培土壌を用いた後作試験、根圏土壌法)を行ったところ、宿主の属する生物種の範囲を逸脱した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、有意な差は認められなかった。

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

隔離ほ場における栽培、保管、運搬、廃棄及びこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

イ 隔離ほ場の施設

部外者の立入を防止するためのフェンス

部外者は立入禁止であること、管理責任者を記載し、見やすい所に掲げられた隔離ほ場の標識

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

花粉の飛散を減少させるための防風林

ロ 隔離ほ場の作業要領

組換えイネとその対照イネ以外の植物の生育を最小限に抑える。

組換えイネを隔離ほ場の外に運搬、保管する場合には組換えイネの漏出を防止する。

以外では栽培終了後、組換えイネを隔離ほ場内で不活化する。

使用した機械、器具等に付着した組換えイネが外に持ち出されないように防止する。

設備が有する機能を十分発揮されるように保持する。

からに掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。

生物多様性影響のおそれがあると認められたときは添付書類の「緊急措置計画書」に定められる措置を確実に講ずる。

(3) 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、水田や畑地以外の場所で野生化、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の特定

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。しかしながら、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。当該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が、この改変は既存の突然変異イネに見られるメカニズムをモデルとしており、草型の変化も突然変異イネを含む既存のイネ系統・品種で観察される範囲である。

閉鎖系温室及び非閉鎖系温室における環境影響評価実験の範囲においては、当該組換えイネはその他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）に原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 及び のように、これまでのところ競合における優位性が非組換えイネと異なるような相違は見られていない。このことから、組換えイネについて原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。第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離圃場に限定し、組換えイネ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野生植物と競合することはなく、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。

なお、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ります。遺伝子組換えイネを栽培した場合に雑草イネと交雑することが考えられる。しかし、上記のように移入された核酸による形質は競合における優位性を高めるとは考えられない。また、その他競合における優位性に係わる形質について遺伝子組換えイネと対照の非組換えイネとの間に相違はみられていない。これらのことから、遺伝子組換えイネと雑草イネが交雑した場合でも、非組換えイネと雑草イネが交雑した個体による影響を上回ることはないと考えられる。

（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、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いえる。

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、後作試験、根圏土壌法によるアレロパシー能の生物検定、栽培終了時の土壌微生物相調査を行った結果、当該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（別紙5・p31-42）。

以上の結果から、当該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現段階では相違は認められない。このことから、組換えイネについて原品種と比べて有害物質の産生性が大きく異なるとは考えられない。第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離圃場に限定し、組換えイネ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、仮に影響がある場合にもその影響は隔離ほ場内に限定されることから、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い。以上から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。

(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いえる。

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。その生育域が主に農耕地及びその近傍に限られていることや、多数発生するのは直播栽培時のみであり移植栽培時にはほとんど発生がみられないことも考慮すれば、雑草イネは我が国の生物多様性の構成要素としてその遺伝的多様性を維持すべきものとはいえず、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いえる。

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

当該組換えイネは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、この変化は既に我が国において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。これまでに得られた情報の範囲においては、当該組換えイネはその他の競合に係わると考えられる形質に宿主品種との間に差異は認められない。

2 有害物質の産生性

宿主である日本型イネ栽培種の有毒物質産生についての報告はない。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、栽培終了時の土壌微生物相調査を閉鎖系及び非閉鎖系温室で実施した結果、アレロパシー能に関して当該組換えイネに既存のイネの範囲を超えるような差異がないことが確認された。

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。

よって、第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離圃場に限定し、組換えイネ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 , . 食用作物 , 1 . イネ . 講談社 . 東京 .
- 2) Ishikawa, R. S. Yamanaka Y. Fukuta S. Chittrakon 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., Naoko T., Imai K., Sato Y.-I., Ymagishi H., Shimamoto Y, Ueno K., Morishima H. and Sato T. (2004) Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. Genet. Resour. Crop Evol. Accepted.
- 4) 籙原雄三 . 1990 . イネの育種学 . 東京大学出版会 . 東京 .
- 5) 栗原 浩・籙原雄三・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・籙原雄三・星川清親・石原 邦・平田熙・石井龍一 (編). 1990 . 稻学大成 (第 2 卷) 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・籙原雄三・星川清親・山口彦之・菊池文雄 (編). 1990 . 稻学大成 (第 3 卷) 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・籙原雄三・星川清親・前田英三・山崎耕宇 (編). 1990 . 稻学大成 (第 1 卷) 形態編 . 農山漁村文化協会 . 東京 .

(添付資料1) 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

抗生物質（ハイグロマイシンもしくはジエテリシン）耐性の有無による選抜

宿主植物は抗生物質耐性を持たないため、抗生物質を含む寒天培地上などで培養すると枯死する。条件によりエスケープが出ることがあるが、その際は生存個体について草型の確認やPCR法などにより再確認することで、判別可能。

草型変化（葉の直立及び矮化程度）の目視及び計測による確認

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り、直立葉となる、さらに出穂期以降では第2節間が非組換え体の3%程度にまで短縮するので判別は比較的容易である。また、稈長等の計測平均値（個体レベルの計測でも）の検定により、少なくとも5%水準で統計的に有意な差が検出可能である。

導入遺伝子のPCR法による確認

用いるプライマーの組み合わせにより、導入遺伝子から推測されるサイズのバンドが特異的に増幅・検出できる。非常に鋭敏に特異的核酸塩基配列を識別し、約100ng程度のゲノムDNAで十分に反応に供することができる。鋭敏な検出感度を持つためにプラスミドや増幅産物等の混入で擬陽性の結果が出る可能性があるが、ネガティブコントロールにおいてクロスコンタミネーションをモニターすることで防止できる。またDNAの純度が低く、反応を阻害するような物質が混入していると擬陰性の結果が出る可能性があるが、ポジティブコントロールを置くことでモニターできる。今回の場合、アクチンプロモーターと $\Delta OsBRI1$ をまたぐようプライマーを設定することで内在性の遺伝子と区別可能。

$\Delta OsBRI1$ の検出ではフォワードプライマー（CTCGGTCTCGATCTTTGGCCTTGGT）とリバースプライマー（CAACAACCTTCCCATCCTTGAGCTG）を用いて、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。

導入遺伝子のサザン分析

サザンハイブリダイゼーション法は鋭敏に特異的核酸塩基配列を識別する。約2mg程度のゲノムDNAを用いて反応に供することができる。用いるプローブと特異的なハイブリダイゼーションをした相補的ゲノムDNAが検出される。この際に、ゲノムDNAを制限酵素で切断しているため、出現したバンドの数やバンドサイズからゲノムにおけるコピー数や内在性遺伝子と導入遺伝子の識別等ができる。PCR法でときおり問題となる擬陽性は原理的に起こりにくい。ハイブリダイゼーションメンブレンへのDNAのトランスファーが不完全なために擬陰性の結果がでる可能性があるが、ポジティブコントロールをおくことでモニターできる。

$\Delta OsBRI1$ の検出では1.4kbのXbaI-XbaI断片をプローブとして用いた。フィルターはゲノムDNAをXbaIで切断後メンブレンにトランスファーさせた。65で14時間サザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後0.1xSSS、1%SDSで洗浄した後露光した。実際の結果は別添資料p15-17に示してある。

緊急措置計画書

平成16年2月25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 ($\Delta OsBRI1$ 、*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

管理責任者 生物研 組換え体利用に関する業務安全委員会委員長
作業従事責任者 生物研
作業従事者 生物研
作業従事者 生物研
作業従事者 農環研
作業従事者 農環研
作業従事者 農環研

「個人名は個人
情報につき非
公開」

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 ($\Delta OsBRI1$ 、*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、得られた情報を整理し記録する。

2 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。

3 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

隔離圃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。

4 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。