

様式第1 (第7条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成20年10月10日

文部科学大臣 塩谷 立 殿
環境大臣 齊藤 鉄夫 殿



氏名 国立大学法人 東北大学
申請科学総長 井上 明久 印
住所 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

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>紫外線 UVB 抵抗性イネ(<i>OsPHR, Oryza sativa L.</i>) (S-C) 紫外線 UVB 感受性イネ(<i>OsPHR, Oryza sativa L.</i>) (AS-D)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離圃場における栽培、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大口字蓬田 232-3 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・隔離圃場 使用期間：承認日から平成24年3月31日まで</p> <p>1 隔離圃場の施設</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 隔離圃場施設(東西約56m×南北約95m)内の黒ボク水田および砂質水田(東西25m×南北20m)を使用する。 (2) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離圃場全体の外側に、メッシュフェンス(高さ185cmの5cm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。 (3) 隔離圃場であること、部外者は立ち入り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。 (4) 遅くとも出穂期までには防雀網を設置する。 (5) 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とともに、組換えイネの隔離圃場外への流出を防止するために、排水系には排水溝(排水ため池へ循環する装置、圃場の四方に設置)、周囲にフェンス、堤防(30cm)を設置している。 <p>2 隔離圃場の作業要領</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 承認された組換えイネ及び比較対象のイネ品種以外の植物が隔離圃場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 組換えイネを隔離圃場内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。 (3) 隔離圃場内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圃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) 隔離圃場で使用した機械、器具又は隔離圃場で作業した者の靴等は、作業終了後隔離圃場内で洗浄し、隔離圃場内の植物残渣、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圃場外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離圃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

紫外線 UVB 抵抗性イネ(*OsPHR, Oryza sativa L.*) (S-C)
紫外線 UVB 感受性イネ(*OsPHR, Oryza sativa L.*) (AS-D)

目次

第一、生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1, 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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	1
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(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	4
(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	8
(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	10
(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	12
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	12
3, 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	15
(1) 使用等の内容	16
(2) 使用等の方法	16
(3) 承認を受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	18
(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	18
(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	18
(6) 国外における使用等に関する情報	18
第二、項目ごとの生物多様性影響の評価	19
1, 競合における優位性	19
2, 有害物質の産生性	19
3, 交雑性	21
4, その他	21

第三, 生物多様性影響の総合的評価	22
引用文献リスト	23
緊急措置計画書	25

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および自然環境における分布状況

イ 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.¹⁾

ロ 宿主の品種名又は系統名

品種名「ササニシキ」(別添 1)

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

国内において、宿主植物種 (*Oryza sativa*)及び近縁野生種の自生は基本的には見られず、生息域はあくまで栽培地周辺に限られている^{2,3)}。また、近縁野生種はわが国には分布していない。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。多様性の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パンナ・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³⁾。*Oryza sativa*の祖先種は*O. nivara*と*O. rufipogon*で、遺伝的多様性の中心はアッサム(インド)、バングラディッシュからビルマ・北タイ・雲南にかけての帯と考えられている³⁾。

なお、圃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が、その生育域は我が国においては主に農耕地及びその近傍に限られている。一般的に、南アジア及び東南アジアの雑草イネは栽培種イネと野生種イネの交雑によるが、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、栽培種イネ間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

*Oryza sativa*は紀元前1万5千年から1万年の間に栽培化されたと考えられ、栽培の起源はインド説、中国説、アッサム・雲南説がある。日本におけるイネの栽培は紀元前300年以降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³⁾。現在最も重要な作物として全

国で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

イネは、非常に広範囲な地域で栽培されている。北はロシアと中国国境のアムール川河畔 (北緯 53 度) から、南はアルゼンチン (南緯 40 度) に渡って、また、ネパール、インドの山岳地帯、パキスタン、イラン、エジプトの砂漠地帯では灌漑により、アジアの一部とアフリカ、ラテンアメリカでは灌漑せずに栽培されている。アジアのデルタ地帯では浮稲として栽培されている^{4,5)}。また、塩害土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている¹⁾。

栽培方法によってイネは陸稲と水稲に分けられる。陸稲は畑に直接播種し、畑状態で栽培する。水稲は水田へ直接播種する直接栽培もあるが、苗を移植する栽培法が一般的である⁶⁾。

イネは、炭水化物、タンパク質、脂質、ミネラルを含む食物として広く栽培され、世界人口の半数にとって主要な食物である。また、稲わらは家畜の飼料として利用されている¹⁾。

水稲は主にアジアの水田で栽培されている。日本では全国で栽培されており、年に 800 万トン以上生産されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ロ 生息または生息可能な環境の条件

生育最低温度は 10-12°C、開花結実には 23°C を必要とする。逆に 35°C 以上くらいになると高温障害が発生する⁷⁾。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな作物の一つであり、灌漑がなく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⁸⁾。しかし、塩害土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている¹⁾。

ハ 捕食性又は寄生性

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 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。熱帯に分布するインド型イネは比較的脱粒しやすいが、日本で栽培される日本型イネでは、一部に脱粒性を有するものがあるが、一般に種子の脱粒性は低い^{1,3)}。

イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネはインド型イネより休眠性が浅い¹⁾。通常の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ている³⁾。

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⁹⁾。一般の日本型イネ品種の白色米の種子を圃場の土壌中に埋蔵した場合、大部分の種子では発芽能を失うが、一部に翌年発芽するものもある。一方、赤米の場合には、3年間土壌中に埋蔵された状態でも発芽可能で、寿命を保持していた。

② 栄養繁殖の様式 (ひこぼえ、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が、適切な水分や温度条件では種子収穫後も栄養体を維持できる。節から発生する分枝である「ひこぼえ」を植え替えることによって株を増やすことができる¹⁾。我が国では通常越冬することはない。

③ 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0.6-3.9%程度である¹⁾。自家不和合性、アポミクシスは報告されていない。近縁野生種であり、AAゲノムを有する*O. rufipogon*などは栽培種の*O. sativa*との交雑は可能である¹⁾。しかし、本野生種の国内における自生地域はない³⁾。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの各穎花には6本の葯があり、各葯には約1000個の花粉が含まれている¹⁾。基本的に自家受粉作物で、穎花内の葯から受粉するが、風媒によって隣接した株の花粉が低い頻度で他家受精することがある¹⁾。

花粉内の澱粉蓄積によって花粉の充実度を判定すると、開花期にはほぼ全ての花粉が充実している¹⁰⁾。イネの花粉は球状である¹¹⁾。花粉の飛散距離は20 m、寿命は3分から5分である¹⁾。

ホ 病原性

—

ヘ 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、または促進的な何らかの作用を及ぼす現象)、中でも雑草の生育抑制に関わる知見が報告されている。現段階ではまだ、アレロパシー作用に関する評価段階ではあるが、概して近代の栽培種のアレロパシー活性は低く、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、日本型イネでは赤米系統の一部にその活性が高いことが報告されている¹²⁾。また病原体の感染に対する植物の抵抗反応が知られているが、その抵抗反応の一つとして、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ある。イネにおいてもこれまでに、15種類のファイトアレキシンが単離・同定されている¹³⁾。しかし、これらアレロパシー作用を有する物質やファイトアレキシン物質は、元来イネに限らず植物が生存戦略のために獲得した特有の機能性物質であると考えられる。現在までに、これら物質が自然条件下で周囲の野生動植物等の生育又は生育に支障を及ぼし、生態系を攪乱しているという報告は知られていない。

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

本組換えイネである紫外線抵抗性イネ S-C 及び感受性イネ AS-D¹⁴⁾ (以下、「組換えイネ」という) 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は、表 1 に示したとおりである。なお、本組換えイネ S-C 及び AS-D を作製するために用いた供与核酸は同一のものである。しかし、「(2)ベクターに関する情報：イ、名称および由来」の項にも記すように、本組換えイネ S-C と AS-D は、CPD 光回復酵素遺伝子の cDNA (OsPHR) が組み込まれたマルチクローニングサイト (MCS：図 1 参照) が、プロモーターに対して異なる向きで挿入されているベクターを用いて作製されている。本組換えイネ S-C は 35S プロモーターに対して OsPHR が正常な方向で挿入されているため、35S プロモーターによって正常な CPD 光回復酵素遺伝子が恒常的に発現するため、酵素の発現が過剰となる。一方、本組換えイネ AS-D は、35S プロモーターに対して OsPHR が逆方向に挿入されるため、恒常的に逆鎖の CPD 光回復酵素遺伝子が転写される。逆鎖の CPD 光回復酵素遺伝子の転写産物は、元来イネ・ササニシキが有する光回復酵素遺伝子の転写産物に結合し、タンパク質への発現を阻害する。従って、結果として本組換えイネ AS-D の光回復酵素の発現が抑制され、光回復酵素の活性が低下する。

ロ 構成要素の機能

① 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

本組換えイネ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。

表1 組換えに用いた供与核酸の各構成要素、由来及び機能

構成要素	略称	サイズ	Accession No.	由来および機能
CPD 光回復酵素 (PHR) 発現カセット				
CaMV35S プロモーター	35S	0.8 kb	U28417	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター領域。植物の全組織にわたり恒常的に目的遺伝子を発現させる。なお、イネにおいて 35S プロモーターは、花粉においては発現しないことが報告されている ¹⁵⁾ 。
CPD 光回復酵素遺伝子コード領域	OsPHR	1.5 kb	AB096003	供与した核酸はイネ cDNA から取り出した CPD 光回復酵素遺伝子 (OsPHR) をコードする 1.5 kb の塩基配列。イネでは光照射により発現が上昇する。ここでは 35S プロモーターを用いているため、光条件に関係なく発現が誘導される ¹⁴⁾ 。
ターミネーター	Nos(t)	0.3 kb	AF485783	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 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および mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
ハイグロマイシン耐性カセット				
CaMV35S プロモーター	35S	0.8 kb	U28417	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター領域。植物の全組織にわたり恒常的に目的遺伝子を発現させる。なお、イネにおいて 35S プロモーターは、花粉においては発現しないことが報告されている ¹⁵⁾ 。
HPT 遺伝子	HPT	1.1 kb	K01193	大腸菌 K-12 株由来でハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼを生産する。組換えイネの選抜マーカーとして働く。

ターミネーター	Nos(t)	0.3 kb	AF485783	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 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および mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
---------	--------	--------	----------	---

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産出される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性 (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蛋白質と相同性を有する場合はその旨

a. CPD 光回復酵素

目的遺伝子である *OsPHR* 遺伝子によってコードされている CPD 光回復酵素は、紫外線によって誘発される DNA 損傷の1つであるシクロブタン型ピリミジン二量体 (Cyclobutane pyrimidine dimer: CPD) を元の塩基対モノマーに修復する酵素である。紫外線によるイネの生育障害の主要因は、UVB 誘発 CPD であり、本酵素は単一タンパク質で機能するため、CPD 光回復酵素の増加により植物体に UVB 抵抗性が付与される¹⁴⁾。CPD 光回復酵素はイネ科植物のみならず、様々な植物が本来もっている酵素であり、導入したイネの CPD 光回復酵素が、アレルギー性をもつという報告はない。

b. HPT 遺伝子

HPT 遺伝子によって産出されたハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼはハイグロマイシンをリン酸化し、不活性化させることにより、ハイグロマイシン耐性を付与する。この機能を利用して HPT 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている。アレルギー性の有無は知られていない。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

イネが本来持つ CPD 光回復酵素を過剰発現 (S-C)、もしくは発現抑制 (AS-D) させた形質転換体であるため、宿主のもつ代謝系は変化しない。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称および由来

pPZP2HA3+/-¹⁶⁾ 農業生物資源研究所・矢野昌祐博士より分譲していただいた。基本は植物形質転換用のベクター (pPZP200)¹⁷⁾ で、これにハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)、ORI 複製開始点を導入して作製されたベクターである¹³⁾。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び基本構造

塩基数は 10400 bps。塩基配列等は、文献 17 参照。基本構造を図 1 に示す。MCS (マルチクローニング領域) の制限酵素 *Bam*HI と *Sac*I サイトにイネ CPD 光回復酵素遺伝子の cDNA 配列を挿入した。pPZP2HA3(+)(-)の違いは、MCS のプロモーターに対する向きの違いである。本組換え体イネ S-C の作製には pPZP2HA3+を、AS-D の作製には pPZP2HA3(-)を用いた。

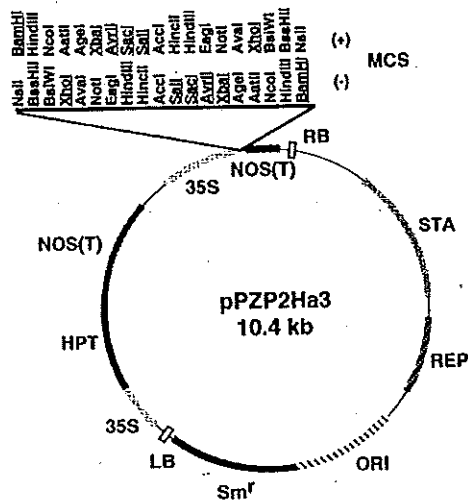


図 1 pPZP2HA3+/-の基本構造

- 35S : カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター
- NOS (T) : ノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域の転写ターミネーター
- LB : レフトボーダー
- RB : ライトボーダー
- HPT : ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子
- ORI : プラスミド pBR322 由来の ColE1 複製開始点
- REP : プラスミド pVS1 の複製領域
- STA : プラスミド pVS1 の安定化領域
- Sm^r : バクテリアストレプトマイシン耐性遺伝子

② 特定の機能を有する塩基配列

pPZP2Ha3 の骨格部分にはハイグロマイシン耐性を示すハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (HPT)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター (35S)、ノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域の転写ターミネーターである NOS(T)、大腸菌の複製開始領域である ORI、アグロバクテリウムの複製開始領域である REP 及び安

定化領域である STA、細菌のストレプトマイシン耐性遺伝子である Sm^r が含まれる。

- ③ ベクターの感染性の有無
感染性は知られていない。

(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

宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素は表 1 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては図 2 に示した。ベクター pPZP2Ha3+/- の MCS (マルチクローニング領域) の *Bam*HI と *Sac*I サイトに、イネ CPD 光回復酵素の cDNA 配列断片 1.5 kb を挿入した。pPZP2HA3(+) と (-) の違いは、MCS のプロモーターに対する向きの違いである。本組換え体イネ S-C の作製には pPZP2HA3+ を、AS-D の作製には pPZP2HA3(-) を用いた。なお、宿主内に移入される核酸は、図 2 の LB-35S-HPT-NOS(T)-35S-MCS-NOS(T)-RB のレフトボーダー (LB) からライトボーダー (RB) の領域である。

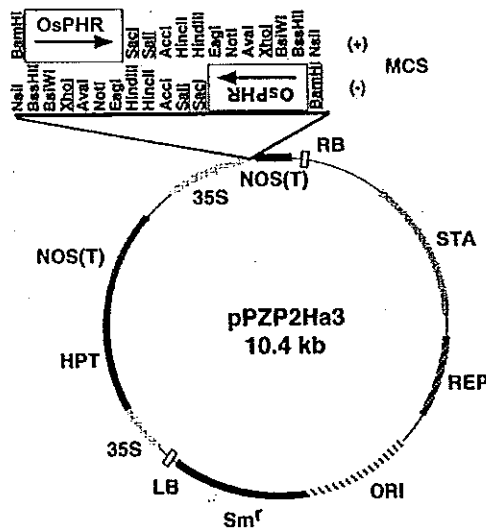


図 2 OsPHR 形質転換体用バイナリーベクターの構造

- 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によった。

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

OsPHR-pPZP2Ha3+/-を導入したアグロバクテリウム (EHA101 株 : カナマイシン耐性) をイネ (品種: ササニシキ) 種子カルスに感染させ、ハイグロマイシンを含む選抜培地で核酸が移入された細胞を選抜した。

② 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 (別添 2)

閉鎖系温室で栽培した組換えイネおよび非組換えイネの種子を破碎し、蒸留水に懸濁後、組換えに用いたプラスミドを持つアグロバクテリウのみ生育できる LB 培地(ハイグロマイシン、カナマイシン含有 : EHA101 株のみでカナマイシン耐性を有する)に塗布して、アグロバクテリウムの残存性を調査した結果、アグロバクテリウムの残存性は認められなかった。

③ 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、隔離圃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及び系統樹

本試験に供する本組換えイネ S-C および AS-D は、上記 (ロ) において作出した幼植物 (T0) を閉鎖系温室に移植して自殖により種子を得た (T1)。さらに自殖により種子を得た (T2)。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 (T3~T5 : 図 3)。T2 種子を用いて、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、T2~T4 種子を用いて、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 T3 種子を用いて、アグロバクテリウムの残存性、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、植物遺体の鋤込みによる環境への影響の有無)、花粉の飛散距離、組換えイネと非組換えイネとの交雑率を調べた。隔離圃場での試験は T4 世代を用いて行う。

T0 → (自殖) → T1 → (自殖) → T2 → (自殖) → T3 → (自殖) → T4 → (自殖) → T5

図 3 組換えイネ育成の系統樹

表2 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために行った試験

試験項目	系統名	OsPHR-pPZP2Ha3+/-			別添	温室
	世代 (T)	T2	T3	T4		
遺伝子の存在状態 (サザンハイブリダイゼーション・PCR)		○	○	○	3	閉鎖系温室
遺伝子の発現状態		○	○	○	3	閉鎖系温室
アグロバクテリウムの残存性			○		2	閉鎖系温室
形態および生態学的特性				○	4	特定網室
花粉の形態および稔性				○	9	特定網室
生育初期における低温試験				○	10	閉鎖系温室
紫外線抵抗性試験 I			○	○	11	閉鎖系温室
紫外線抵抗性試験 II				○	4	特定網室
跡地土壌での残留効果				○	5	特定網室
花粉の飛散距離				○	9	特定網室
非組換えイネとの交雑率				○	8	特定網室
土壌微生物相に与える影響				○	6	特定網室
植物遺体の鋤き込みによる影響				○	7	特定網室

(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 3)

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え手法、用いたプラスミドの性質から移入された核酸の複製物が存在する場所は染色体上である。また、LB から RB までが導入されたと考えられる。導入遺伝子の有無は、ハイグロマイシン抵抗性、PCR 法、CPD 光回復酵素遺伝子プローブを用いたゲノミック

サザンハイブリダイゼーション法により確認した。

ロ 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 3)

閉鎖系温室で栽培した T2 世代の植物体からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。導入したイネ CPD 光回復酵素遺伝子を、CPD 光回復酵素をプローブとしたサザン解析では、S-C では 2 本、AS-D では 2 本のバンドが検出されたため(別添 3 の図 1)、組換えイネ S-C では 1 コピー、AS-D では 1 コピーが挿入されていると判断した。また本組換えイネ S-C および AS-D の T2-T4 世代で、導入したハイグロマイシン耐性遺伝子が特異的に増幅される PCR 分析を行った結果、すべての世代での増幅が見られた(別添 3 の図 2)。さらに、本組換えイネ S-C および AS-D の T2~T4 世代での CPD 光回復酵素遺伝子の発現量を確認したところ、野生株(WT)と比較して本組換えイネ S-C では約 150 倍、AS-D では約 14 倍発現が高まっていた(別添 3 の図 3)。なお、AS-D においては、逆鎖で過剰発現しているため、結果としてタンパク質は合成されない。実際の酵素活性に関しては、本組換えイネ S-C および AS-D の T2-T4 世代で測定した結果、本組換えイネ S-C では、どの世代においても酵素活性は野生株と比較して約 50 倍増加し、本組換えイネ AS-D では、どの世代においても活性は認められなかった(別添 3 の図 4)。従って、複数世代において、本組換えイネ S-C および AS-D は、導入遺伝子が安定して発現していると判断した。

ハ 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

元来ササニシキが有している CPD 光回復酵素遺伝子は 1 コピーであり、組換えによって導入された CPD 光回復酵素遺伝子は S-C 系統では 1 コピー、AS-D 系統では 1 コピーであるため、染色体上のコピー数は、S-C では 2 コピー、AS-D では 2 コピーである。隣接しているか、離れているかの確認は行っていない。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子に関しては、導入された遺伝子のコピー数の確認を行っていないが、ハイグロマイシン遺伝子は、元来イネは有しておらず、導入した CPD 光回復酵素遺伝子のコピー数と同じであると考えられる。また別添 3 の図 2 より、ハイグロマイシン耐性遺伝子の増幅が本組換えイネ S-C および AS-D の T2-T4 世代で特異的に増幅され、野生株(WT)では増幅されないことから、本組換えイネ S-C および AS-D では、ハイグロマイシン耐性遺伝子が同時に挿入した CPD 光回復酵素遺伝子の隣接に 1 コピー挿入されていると考えられる。

ニ (6)のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性¹⁴⁾

上記(4)の口に記したように、閉鎖系温室で、本組換えイネ S-C および AS-D の T2 各世代を栽培し、葉から RNA を抽出した。そして、CPD 光回復酵素遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。その結果、S-C 系統では、非組換えイネと比較して約 150 倍、AS-D 系統では、逆鎖 RNA として約 14 倍発現量が増加していた (別添 3 : 図 3)。また、葉の細胞内における CPD 光回復酵素の活性は、複数世代において本組換えイネ S-C で約 50 倍増加していた一方、AS-D では活性は検出されなかった¹⁴⁾。また、閉鎖系温室内において、本組換えイネ S-C および AS-D の T3、T4 世代を材料に、紫外線付加条件下での生育検定を行った。その結果、本組換えイネ S-C においては、いずれの世代でも非組換えイネよりも紫外線付加照射による分げつ数、地上部新鮮重の低下が抑制されて、紫外線抵抗性を示した。また AS-D においては、すべての世代で著しい生育阻害を受けており、非組換えイネよりも紫外線感受性を示した (別添 11)。導入遺伝子のうち、選抜マーカーのハイグロマイシン抵抗性遺伝子による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た (別添 8)。なお、組換えイネの選抜には本特性を利用している。

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

移入した核酸の産物は酵素タンパク質であり、移入した核酸はイネ核内の染色体に存在して通常のイネ遺伝子と同様に伝達されることから、ウイルス等の感染により野生生物に伝達される恐れはない。

- (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 HPT 遺伝子はハイグロマイシン抵抗性を与える。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。組換え個体の選抜維持には本特性を利用している。(別添 8)

イネには導入遺伝子である *OsPHR* に HPT 遺伝子を連結させて導入しているため、HPT 遺伝子を検出することで、内在性の遺伝子とは区別して検出及び識別することが可能である (別添 3 および 8)。

- (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な内容

イネは CPD 光回復酵素遺伝子を過剰発現することで、より強い紫外線抵抗性を獲得する。また CPD 光回復酵素遺伝子を発現抑制することで、より強い紫外線感受性を示す (別添 4、11、参考文献 14)。導入遺伝子のうち、HPT 遺伝子はハイグロマイシン抵抗性を付与する。この遺伝子により組換え体の選抜及び確認ができる。

ロ 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と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

① 形態及び生育の特性 (別添 4)

特定網室で本組換えイネ S-C および AS-D の T4 世代、非組換えイネを紫外線非照射条件で栽培し、草丈、分けつ数、葉色、生育後の乾燥重を調査した。本組換えイネ S-C および AS-D は、非組換えイネと比較して差は認められなかった (別添 4 の図 2、3、表 1)。また特定網室にて紫外線付加照射を行い、本組換えイネ S-C および AS-D の T4 世代と非組換えイネの生育検定を行った (別添 4 の図 4、5)。その結果、本組換えイネ S-C は、草丈においては親株と差異は認められないものの、分けつ数においては、移植後 50 日目から親株よりも多く推移していた。一方、本組換えイネ AS-D においては、草丈、分けつ数ともに、紫外線付加照射によって明らかに親株よりも低く推移し、分けつ数に至っては、移植時より、増加することはなかった。以上の結果から、特定網室環境において、紫外線を照射しないコントロール区での本組換えイネ S-C および AS-D の生育はともに、非組換えイネと比較して、有意な差異は認められない一方、紫外線付加照射下では、S-C は親株と比較して UV 耐性を示す一方、AS-D は著しい UVB 感受性を示した。

② 生育初期における低温又は高温耐性 (別添 10)

生育初期における低温試験を行うため、本組換え体 S-C および AS-D、ならびに非組換え体イネの種子を 30°C で発芽させた後、イネ育苗培土の入ったポットにそれぞれ 10 粒ずつ播種した。播種されたポットを、以下の 3 つの区に設定し、培養を行った。

(1) 昼/夜の温度が 28/20°C 設定の人工気象機にて 16 日間培養 (28°C 区)

(2) 昼/夜の温度が 28/20°C 設定の人工気象機で 5 日間培養し、草丈が 5 cm 程度に生育した時点で、昼/夜 4°C 設定の人工気象機で 11 日間培養 (28°C → 4°C 区)

(3) 播種直後から、昼/夜 4°C 設定の人工気象機で 16 日間培養 (4°C 区)

その結果、写真からも明らかなように、(2)の 28°C → 4°C 区では、組換え体・非組換え体イネのどれも、4°C 設定の人工気象機に入れた時の草丈 5 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。また、(3) 4°C の区では、組換え体・非組換え体イネともに、地上へ出芽することはなかった。したがって、組換え体・非組換え体イネともに、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体と非組換え体イネの間には差異はないと判断した。

③ 成体の越冬性又は越夏性

イネは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死し、成熟後さらに栄養繁殖したり、再度結実して種子を生産することはないので、組換え体成体の越冬性については調査しなかったが、今後隔離圃場での栽培中に、調査を行う。

④ 花粉の形態（サイズ）及び稔性（別添 9）

本組換えイネ S-C および AS-D、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。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、組換えイネ、非組換えイネともに花粉の稔性は十分に認められ、また稔性率は S-C で 92.8%、AS-D で 91.3%、非組換えイネ・ササニシキで 93.1% と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体 S-C および AS-D、非組換え体ともに 4%前後であった。従って、組換えイネと非組換えイネの花粉のいわゆる「バイアビリティー」に相違はないと考えられた。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠及び発芽率（別添 4・表 1、別添 8）

穂数、地上部乾物重、穂重は非組換えイネと統計的に有意な差はなかった（別添 4・表 1）。成熟期の穂を握って脱粒性を調査したが、組換えイネ、非組換えイネどちらも難で、相違は認められなかった。発芽率に関しては、別添 8 図 2 の写真からもわかるように、シャーレーに播種した 50 粒の本組換えイネ S-C および AS-D、ならびに非組換えイネは全て発芽し（発芽率 100%）であり、有意な差は認められなかった。休眠性については特別な調査していないが、これまでの一連の解析の過程で、収穫直後の本組換えイネ S-C および AS-D、ならびに非組換えイネの種子は、発芽せず、休眠打破処理（50℃、3 日間の高温処理）を行わないと発芽しないことを見出している。従って、休眠性に関しても特別な差異はないと考えている。

⑥ 交雑率

我が国にはイネと交雑可能な近縁の野生種は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

根から分泌され、他の植物に影響を与えるもの（別添 5）

組換えイネを栽培した土壌で、レタスを栽培した。根長、草丈、新鮮重ともに非組換えイネを栽培した土壌と有意な差は認められなかった。

根から分泌され、土壤微生物に影響を与えるもの (別添 6)

組換えイネを栽培した土壤における土壤微生物相について調査した。対照として、非組換えイネを同一条件で栽培した土壤を用いた。土壤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。

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 7)

組換えイネ、非組換えイネについて植物体を粉砕し、土壤と混合し、レタスを栽培した。20 日後のレタスの根長、草丈、新鮮重に有意な差は認められなかった。

⑧ その他

非組換えイネとの交雑性 (別添 8)

非組換えイネとの交雑性について調べた。特定網室にてポット栽培にて組換えイネと非組換えイネを隣接して栽培した。組換えイネから 30、60、90 cm の距離に非組換えイネを配置し、開花後に扇風機を用いて一定の風量 (1.4 m s^{-1}) で組換えイネから非組換えイネの方向へ風を送った。非組換えイネから得られた種子 600 粒をハイグロマイシン 50 mg/L を含む培地に無菌的に播種してハイグロマイシン抵抗性種子が出現するか否か発芽検定を行った。また、PCR によりハイグロマイシン遺伝子の存在確認を行った。すべての距離においてハイグロマイシン抵抗性種子の出現および、ハイグロマイシン遺伝子の PCR による増幅は認められず、本組換えイネの花粉が飛散して交雑性を示す可能性は低いと考えられる。

なお、隔離圃場が存在する宮城県大崎市の川渡地区における過去 30 年間の夏場 (7 月から 8 月) の平均風速が $1.2 \sim 1.3 \text{ m s}^{-1}$ であったため(気象庁

HP

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_10d.php?prec_no=34&prec_ch=%8B%7B%8F%E9%8C%A7&block_no=0243&block_ch=%90%EC%93n&year=&month=&day=&elm=normal&view=)、本試験は風量を 1.4 m s^{-1} に設定して行った。

花粉飛散距離の検定 (別添 9)

組換えイネの花粉の飛散距離を測定した。イネに扇風機で 1.4 m s^{-1} の風を当て、組換えイネから 0.5 m ずつの距離においてスライドガラス上への花粉の飛散を調査した。花粉は組換えイネ、非組換えイネともに $0.5\text{-}1.0 \text{ m}$ に最も多く飛散し、組換えイネにおいて非組換えイネとの相違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

今日の地球問題に関連して、成層圏オゾン層の破壊に伴う有害紫外線

(UVB) 量の増加が、南半球、東南アジアを含む世界各地で観測されており、UVB 量の増加による植物、特に農作物への影響が世界的に危惧されている。事実、UVB の増加は、イネを含む全ての農作物の生育を阻害し、収量の減収を導くことが報告されている。このような UVB による生育傷害の要因について解析を進めたところ、主要因の1つは、UVB によって誘発される DNA 損傷 (シクロブタン型ピリミジン二量体[CPD]) であることが見出された。植物は元来 CPD を修復する酵素として、“CPD 光回復酵素”を有しているが、この酵素の活性を増強することで、UVB による生育傷害を軽減できることを閉鎖系温室内での人工光を用いた解析で実証した。本組換えイネ S-C は、紫外線抵抗性を示し、AS-D は紫外線感受性を示した。ところで、今日の自然環境においても、太陽光には UVB が含まれており、植物の DNA 上に損傷、すなわち CPD を誘発している。しかしながら、今日の環境レベルでの UVB が、植物の生育にどの程度傷害を引き起こしているのかに関しては、紫外線の存在しない自然環境を作り出すことが不可能なため、解析できていない。そこで、本隔離圃場試験では、紫外線に対する抵抗性、感受性の異なる本組換えイネ S-C および AS-D を用いて、今日の太陽紫外線がイネの生育、生産性に及ぼす影響評価を行うことを目的としている。具体的な研究計画の概要を別添 12 に示す。従って、隔離圃場試験の結果は、実際の太陽紫外線がイネの生育に及ぼす影響を直接的に知ることができると同時に、今後の環境変動の予測から作物生産の動向を的確に予測することが可能となる。

また、稲作は日本のみならず、紫外線量が多く、また今後の紫外線量増加が著しいと見込まれている東南アジア、南半球オーストラリア、南米を中心に行われている。そして世界各地で栽培されているイネ品種間には、様々な CPD 光回復酵素活性を有する遺伝子型が存在していることを確認している。従って、本試験の結果は、生育傷害が著しく低下することが予想される地域の在来品種に対して、CPD 光回復酵素活性の高い非組換えイネ品種と交雑することで、品質を変えることなく UVB 抵抗性を高めて生産性の向上が見込まれるイネ品種の育成にも貢献できると考えられる。

(1) 使用等の内容

隔離圃場における栽培、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

イ 試験圃場： 宮城県大崎市鳴子温泉大口字蓬田 232-3

ロ 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・隔離圃場

ハ 使用期間： 承認日から平成 24 年 3 月 31 日まで

ニ 隔離圃場の施設

- ① 隔離圃場施設(東西約 56 m×南北約 95 m)内の黒ボク水田および砂質水田(東西 25 m×南北 20 m)の一角、各 2.0 アール(東西 20 m×南北 10 m)を使用する(別添 13)。なお、本隔離圃場の排水に関しては、圃場の四隅に設置され、排水ため池に循環され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、川渡の土壌が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、種子の隔離圃場外への流出はない。また、2 重の安全のために、隔離圃場の周囲(フェンスの内側)を、高さ 30 cm の堤防を築き、時間雨量 300 mm 程度でも、種子が隔離圃場外に流れることはない設計となっている。
- ② 部外者の立ち入りを防止するために、隔離圃場全体の外側に、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。
- ③ 隔離圃場であること、部外者は立ち入り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。
- ④ 遅くとも出穂期までには防雀網を設置する。
- ⑤ 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と同時に、組換えイネの隔離圃場外への流出を防止するために、排水系には排水溝(排水ため池へ循環する装置、圃場の四方に設置)、周囲にフェンス、堤防(30 cm)を設置している。

ホ 作業要領

- ① 承認された組換えイネ及び比較対象のイネ品種以外の植物が水田で生育することを最小限に抑える。
- ② 組換えイネを隔離圃場内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。
- ③ 隔離圃場内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圃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、本隔離圃場では焼却炉は使用しない。
- ④ 隔離圃場で使用した機械、器具又は隔離圃場で作業した者の靴等は、作業終了後隔離圃場内で洗浄し、隔離圃場内の植物残渣、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圃場外に持ち出されることを防止する。
- ⑤ 隔離圃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。

へ 隔離圃場の地図及び隔離圃場内における試験区の配置図
別添 13の通り。

(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

(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。

なし。

(6) 国外における使用等に関する情報

中国、オーストリア、アメリカなど、日本型イネ品種（非組換えイネ：ササニシキ）の育成が可能な地域における紫外線影響評価試験を予定している。

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。

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

本組換えイネ S-C は非組換えイネよりも紫外線を含む太陽光下で生育が良くなることが予想される。そのために、非組換えイネよりも優位に生育することになるが、これは本組換えイネの目的とする形質である。また本組換えイネ AS-D は、紫外線を含む太陽光下で生育が悪くなることが予想される。そのために、非組換えイネよりも優位に生育することはないと考えられる。紫外線が存在しない条件下では、穂重、草丈、葉色、穂数、葉齢、花粉のサイズ、花粉の飛散距離については本組換えイネと非組換えイネの間に有意な差異は見られなかった。

また、本組換えイネは目的遺伝子に加えて、マーカー遺伝子として 1 種類の抗生物質耐性遺伝子を有している。抗生物質耐性遺伝子はハイグロマイシン耐性を発現する。しかしながら、一般的には自然環境に存在しないハイグロマイシンに対する耐性を獲得しても、生存上、優位性が高まるとは想定されない。

上記を踏まえ、本組換えイネを第一種使用規程に従って使用した場合に、第一種使用等の場所を隔離圃場に限定し、本組換えイネが圃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、野生植物と競合することではなく、競合における優位性において影響を受ける野生植物は特定されない。

(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

本組換えイネ S-D および AS-D を第一種使用規程に従って使用等した場合に、上記の評価から競合における優位性において、生物多様性への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

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、または促進的な何らかの作用を及ぼす現象）、中でも雑草の生育抑制に関わる知見が報告されている。現段階ではまだ、アレロパシー作用に関する評価段階ではあるが、概して近代の栽培種のアレロパシー活性は低く、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、日本型イネでは赤米系統の一部にその活性が高いことが報告されている¹²⁾。また病原体の感染に対する植物の抵抗反応が知られているが、その抵抗反応の一つとして、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ある。イネにおいてもこれまでに、15種類のファイトアレキシンが単離・同定されている¹³⁾。しかし、これらアレロパシー作用を有する物質やファイトアレキシン物質は、元来イネに限らず植物が生存戦略のために獲得した特有の機能性物質であると考えられる。現在までに、これら物質が自然条件下で周囲の野生動植物等の生育又は生育に支障を及ぼし、生態系を錯乱しているという報告は知られていない。

本組換えイネ S-C は、CPD 光回復酵素が生成されるが、この酵素は、本来イネが植物体内で産出する酵素と同様のものである。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から、有害性はないと判断される。また本組換えイネ AS-D は、本来イネが発現する CPD 光回復酵素に対する逆鎖を発現することにより、CPD 光回復酵素の酵素タンパク質となることを阻害するものである。そのため、有毒性はない。また、栽培終了時の土壤微生物相の調査、植物遺体の鋤き込み実験、栽培跡地土壌での残渣残留効果検定において、本組換えイネ S-C および AS-D と非組換えイネの間に大きな差異は見られなかった。隔離圃場はフェンスで囲まれていること、また、出穂期以降は防雀網で試験水田を覆うことから、鳥類等の生物多様性に影響があるとは考えられない。

本組換えイネ S-C および AS-D は、移入された選抜マーカーとしてハイグロマイシン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の選抜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、本組換えイネを第一種使用規程に従って使用した場合に、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

(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

本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、上記のひよかから、有害物質の産生性において、生物多様性への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

野生イネである *O. nivara*、*O. rufipogon* 等の植物は栽培イネ種 (*O. 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。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。

圃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が、その生育域は我が国においては主に農耕地及びその近傍に限られている。また、発生が多い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しない。このことより、雑草イネは我が国の自然生態系の構成要素であるとは言えない。

上記を踏まえ本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、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

本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、上記の評価から、交雑性についての生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断する。

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 競合性における優位性

本組換えイネ S-D および AS-D 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とは考えがたい。閉鎖系、並びに特定網室での栽培において、本組換えイネ S-D および AS-D と非組換えイネの間に形態や生育特性等で競合における優位性に影響を与える変化は見られなかった。これまでに得られた情報の範囲においては、本組換えイネ S-D および AS-D は競合に関わると考えられる形質に宿主品種との間に差は認められない。

2 有害物質産生性

宿主である日本型イネ栽培種・ササニシキ（非組換えイネ）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 S-D および AS-D に導入した CPD 光回復酵素遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子が生物多様性に影響を与える有害物質であるという報告もない。栽培土壌の土壌微生物相、植物遺体の鋤き込み試験、栽培跡地土壌での残渣残留効果検定を特定網室で実施した結果、本組換えイネに既存のイネを超えるような差異がないことが確認された。

3 交雑性

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。

上記を踏まえ、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、本組換えイネ S-D および AS-D が圃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判断した。

引用文献リスト

- 1) Consensus document on the biology of *Oryza sativa* (rice), series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 14, OECD, pp51 (1999).
- 2) 森島啓子、除草剤抵抗性作物を考える、植物の化学調節、35、86-94 (2000).
- 3) 高橋成人、イネの生物学、大月書店、pp214 (1988).
- 4) Ishikawa R, Yamanaka S, Fukata Y, Chitrakon S, Bounphanousay C, Kanyavong K, Tang L-H, Nakamura I, Sato T, Sato Y-I. Genetic erosion from modern varieties into traditional upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in northern Thailand. *Genet Resour Crop Evol*: 53, 245-252 (2006)
- 5) Ishikawa R, Toki N, Imai K, Sato Y-I, Yamagishi H, Shimamoto Y, Ueno K, Morishima H, Sato T. Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. *Genet Resour Crop Evol*. 52, 395-403 (2005).
- 6) 金田忠吉、熱帯の陸稲、熱帯農業シリーズ、熱帯作物要覧 No.28 (1999).
- 7) 西山岩男・佐竹徹夫、イネの高温による障害の研究、熱帯農業、25、14-19 (1999).
- 8) 松木五棲・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).
- 9) 松尾孝嶺編、稲学大成 生理編、農山漁村文化協会 (1990)
- 10) 新城長有、イネにおける細胞質雄性不稔と雑種イネ育種への利用、育種学最近の進歩 25 集、98-107 (1984).
- 11) 星川清親、イネの生育、農山漁村文化協会 (1975)
- 12) 松尾光弘、福澤功一、寺尾寛行、小川紹文、イネ品種間におけるアレロパシー活性評価のための生物検定法の検討、日本作物学会誌、72、41-46. (2006).
- 13) Otomo K et al, Biological functions of ent- and syn-copalyl diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point of gibberellins and phytoalexin biosynthesis. 39, 886-893, (2004).

- 14) Hidema J, Taguchi T, Ono T, Teranishi M, Yamamoto K, Kumagai T. Increase in CPD photolyase activity functions effectively to prevent growth inhibition caused by UVB radiation. *Plant J.* 50, 70-79 (2007).
- 15) Terada R, Shimamoto K. Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220, 389-392 (1990).
- 16) Fuse T, Sasaki T, Yano M. Ti-plasmid vectors useful for functional analysis of rice genes. *Plant Biotech.* 18, 219-222 (2001).
- 17) Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994, (1994).

緊急措置計画書

平成 20年 2月 13日

氏名 国立大学法人東北大学

総長 井上明久

住所 宮城県仙台市青葉区片平2丁目1-1

第一種使用規程の承認を申請している紫外線抵抗性・感受性イネ(S-C, AS-D) (以下、「本組換えイネ」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

※個人情報につき公開しない

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 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。

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

直ちに隔離圃場で試験に従事している者および隔離圃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

- (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) 隔離圃場で栽培されている本組換えイネは隔離圃場への鋤き込み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・生命倫理・安全対策室、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。

別添資料

目次

別添資料 1	「基本特性」	1
別添資料 2	「組換えイネ中のアグロバクテリウムの残存性」	2
別添資料 3	「遺伝子の安定性」	3
別添資料 4	「組換えイネ、非組換えイネの生育比較、ならびに UVB 抵抗性試験－紫外線抵抗性試験 II」	6
別添資料 5	「跡地土壌での残留効果」	11
別添資料 6	「土壌微生物相検定」	13
別添資料 7	「植物遺体の鋤き込み試験」	16
別添資料 8	「組換えイネと非組換えイネとの交雑率の検定」	18
別添資料 9	「花粉飛散距離の検定」	23
別添資料 10	「生育初期における低温耐性試験」	25
別添資料 11	「閉鎖系温室における組換え体イネの紫外線抵抗性試験 I」	27
別添資料 12	「研究計画概要」	29
別添資料 13	「隔離圃場施設に関する資料」	32

別添 1

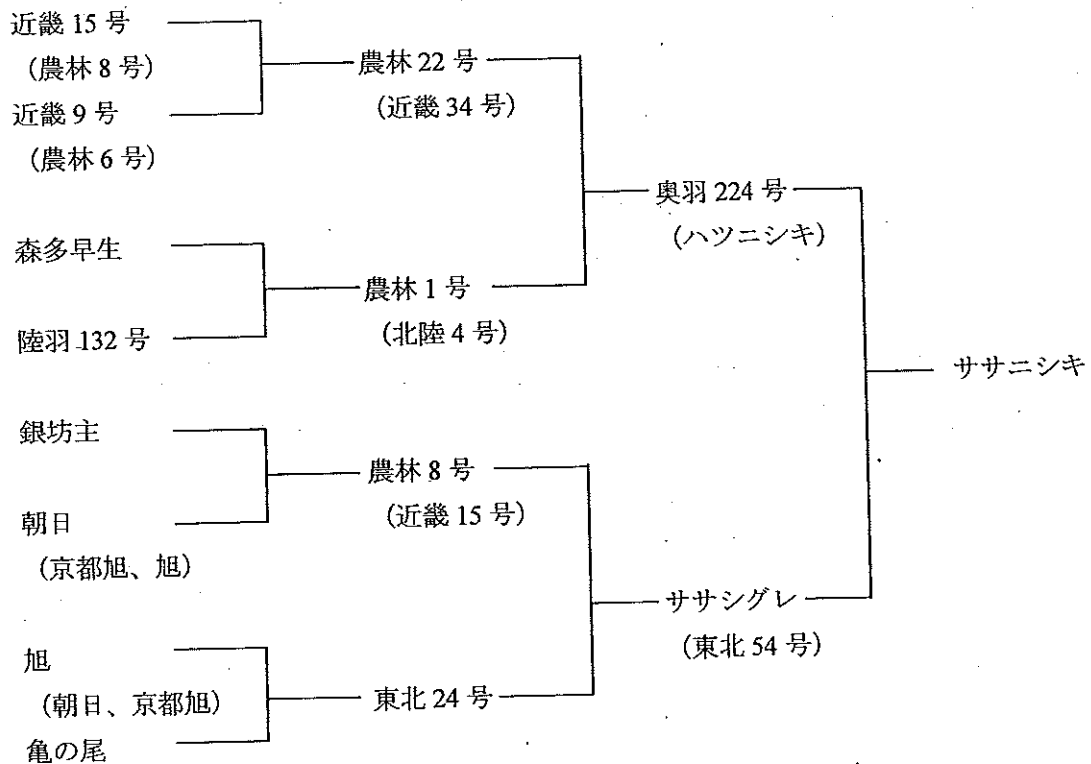
基本的特性

登録番号：水稲農林 150 号

品種の名称：ササニシキ (稲)

銘柄	区分	食味・食味値・ 粘り	系統	熟期	耐冷性
ササニシキ	うるち	良質・良食味	「ササシグレ」と「ハ ツニシキ」の交配	晩生種	弱い

耐倒伏性	収量	粒形	摘要
弱稈	多収量	中粒	青森をのぞく東北 5 県と山梨県で作付され、東北地方 の代表的な銘柄米である



別添2

組換えイネ中のアグロバクテリウムの残存性

【目的】

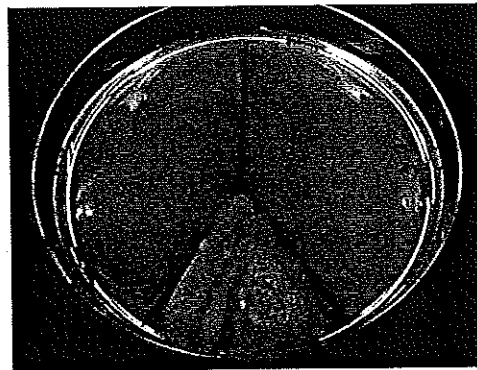
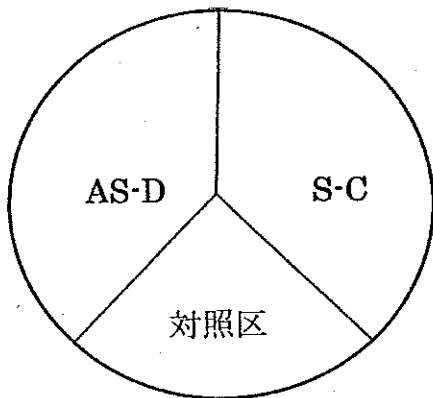
組換えイネ中にアグロバクテリウムが残存しているかを検定する。

【実験方法】

本組換えイネ S-C および AS-D の種子 (T3) をそれぞれ 6 粒、非組み換えイネの種子 6 粒を使用した。種子 6 粒を乳鉢と乳棒で粉末にし、蒸留水 1 ml に懸濁した。組換えイネは 3 連で行った。この溶液 0.2 ml をハイグロマイシン、アンピシリン、カナマイシンを含む LB 培地に塗布し、25°C で培養した。2 日後、目視によりアグロバクテリウムの残存性を確認した。培地上の対照区は、組換えイネ作製に用いたアグロバクテリウムを塗布培養した。

【結果】

本組換えイネ S-C および AS-D の種子では、アグロバクテリウムの発生が全く認められなかった (写真)。このことから、本組換えイネ S-D および AS-D の後代には、アグロバクテリウムは残存していないと判断された。



本組換えイネ S-C および AS-D の種子
におけるアグロバクテリウム残存性試験

遺伝子の安定性

【目的】

世代を経た本組換え体イネ S-D および AS-D における、導入遺伝子の安定性、発現の安定性を検定する。

【実験方法】

本組換えイネ S-C および AS-D の T2、T3、または T4 世代の種子、非組換えイネの種子を発芽させた後、パーミュキュライトとイネ育苗用合成培土をつめたポットに播種し、閉鎖系温室内で栽培した。播種後、14 日目の各組換え体イネ、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、導入遺伝子のコピー数を確認するために、本組換えイネ S-C および AS-D の T2 世代のゲノミック DNA を用いてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。方法としては、ゲノム DNA を制限酵素 *EcoRI* で処理し、イネ CPD 光回復酵素遺伝子 (OsPHR) の塩基配列をプローブとして、サザンハイブリダイゼーション解析を行い、導入された遺伝子のコピー数を確認した。また、本組換えイネ S-C および AS-D の T2~T4 世代の個体から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF に特異的なプライマー (forward; 5'-CAGCGGTCATTGACTGGAGC-3', reverse; 5'-GCGTCGGTTTCCACTATCGG-3', 増幅断片長; 363 bp) を作製し、PCR 法によって、導入遺伝子の安定性を確認した。

導入遺伝子の発現の安定性を検定するため、播種後、14 日目の本組換え体イネ S-C および AS-D の T2~T4 世代、非組換えイネの葉から抽出した RNA を用いて、cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法によって、各組換え体イネ S-C および AS-D の CPD 光回復酵素遺伝子の発現量を非組換えイネである野生型イネ・ササニシキでの CPD 光回復酵素遺伝子の発現量と比較した。なお、CPD 光回復酵素遺伝子に特異的なプライマーとして、5'-CCGTCGATGCITTTCTTGGAGG-3' (forward) と 5'-CATCTCCAACCTGCGATGCATTCCA-3' (reverse) (増幅断片長: 225 bp) を用いた。

【結果】

閉鎖系温室で栽培した T2 世代の植物体からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。導入したイネ CPD 光回復酵素遺伝子を、CPD 光回復酵素遺伝子をプローブとしたサザン解析では、本組換えイネ S-C では 2 本、AS-D では 2 本のバンドが検出された (図 1)。これら 2 本のバンドのうち、2.3 kbp 付近に見られるバンドは、元来非組換えイネのササニシキが有している CPD 光回復酵素遺伝子のシグナルを示している (図 1)。従って、本組換えイネ S-C および AS-D では、1 コピーがそれぞれ

れ組換えによって導入され、結果として2コピーが挿入されていると判断した。T2-T4 世代で、導入した CPD 光回復酵素遺伝子の安定性を検定するために、ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF に特異的なプライマーを用いて PCR 分析を行った。その結果、すべての世代での増幅が見られた (図 2)。

遺伝子発現の安定性においては、RT-PCR 解析の結果から親株・ササニシキに対して S-C では約 150 倍、AS-D では約 14 倍発現が高められていた。なお、AS-D においては、逆鎖で過剰発現しているため、結果としてタンパク質としては合成されず、細胞内の酵素活性は検出されないことを確認した。

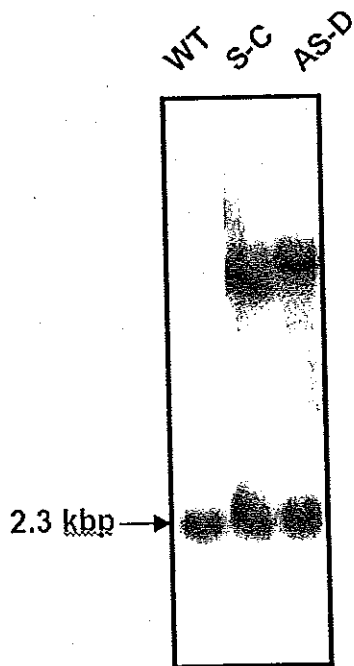


図1 組換えイネのサザン解析
 WT: 非組換えイネ (ササニシキ)
 S-C: 組換えイネ
 AS-D: 組換えイネ

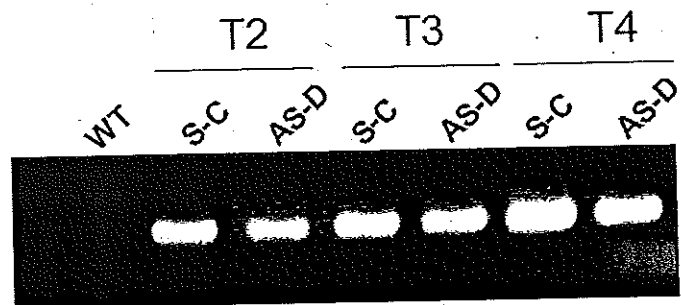


図2 組換えイネのPCR解析
 ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF に特異的なプライマーを用いて増幅した。

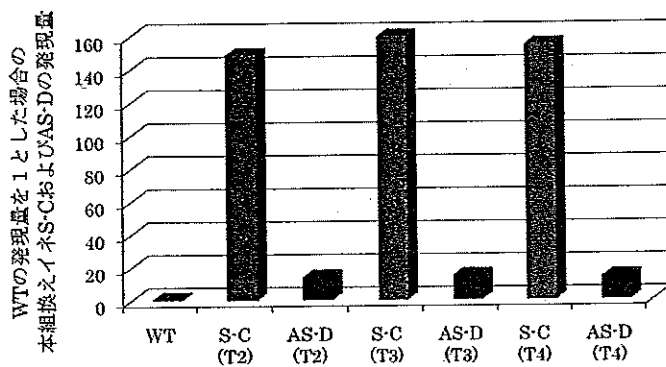


図3 組換えイネのRT-PCR解析

CPD 光回復酵素遺伝子に特異的なプライマーを用いて増幅した。

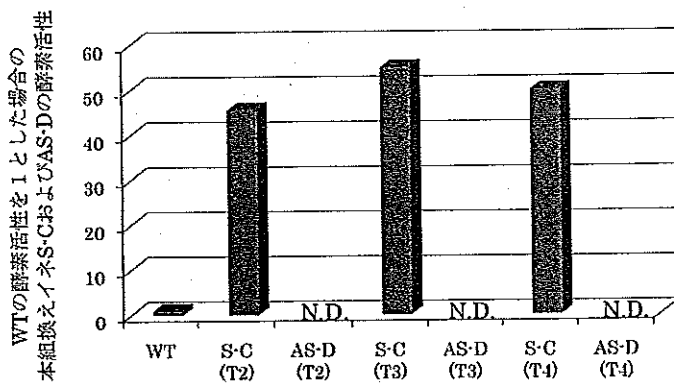


図4 本組換えイネ S-C および AS-D の T2、T3、T4 世代における CPD 光回復酵素活性の解析
N.D. : not detected (検出出来なかった)

組換えイネ、非組換えイネの生育比較、ならびに UVB 抵抗性試験

紫外線抵抗性試験 II

【目的】

組換えイネ、非組換えイネの特定網室での紫外線無照射区（コントロール区）ならびに紫外線付加照射区での生育を比較する。

【実験方法】

本組換えイネ S-C および AS-D の T4 世代、ならびに非組換えイネ（親株・ササニシキ）の発芽した種子を、苗用合成培土をつめたセルトレイに 1 粒ずつ播種し、閉鎖系温室内で栽培した（2007 年 5 月 1 日播種）。約 4 週間生育させた後、砂質土壌を詰めた 1/5000 a ワグネルポット（ポット当たりの施肥量を速効性肥料 0.5 Ng/ポット）に移植し、特定網室で栽培を行った（2007 年 5 月 31 日移植）。特定網室内には、紫外線無照射区（コントロール区）と紫外線付加照射区（ 1.2 W/m^2 の強度の UVB を 7:00～16:30 の間照射）を設置し（図 1）、各組換えイネ、非組換えイネをそれぞれ 4～6 ポット栽培した。なお、各ポット当たり 1 本ずつ植えとした。また、照射 UVB 光に関しては、光源として UVB ランプ（東芝 FL20SE）を用い、さらに UVB ランプから放射される 280 nm 以下の波長の光をセルローズアセテートフィルムによってカットした光を照射した。照射した UVB 強度は 1.2 W/m^2 で、照射時間は 7:00～16:30 の 9 時間半とした。開花日は、本組換えイネ S-C および AS-D、非組換えイネ共に、8 月 13 日であった。生育調査（草丈、分けつ数）は、2 週間おきに行った。

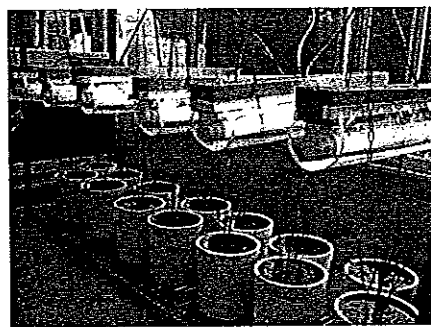


図 1 特定網室内の写真（上段：右側 UV 照射区、左側がコントロール区）、UV 照射区の様子（下段）

【結果】

コントロール区（紫外線無照射区）における分けつ期、ならびに開花期、収穫時の組換え体の写真を図 2 に、生育調査の結果を図 3 に示した。いずれの生育段階においても草丈、分けつ数の推移に組換えイネと非組換えイネの間で大きな差異は認められなかった。

また、写真から見て取れるように、組換えイネと非組換えイネの間に、形態的差異も観察されなかった。なお、葉齢の推移、葉色においても差異は認められなかった (data not shown)。

コントロール区で栽培した本組換えイネ S-C および AS-D の収穫時における穂数、草丈に関しても有意な差異は認められなかった (表 1)。また、組換えイネと非組換えイネの収穫時におけるイネ個体の地上部と地下部の乾物重は、t 検定の結果から、地上部、地下部とも乾物重に、組換えイネ、非組換えイネの間に有意な差異は認められなかった (表 1)。

特定網室において本組換えイネ S-C および AS-D、ならびに非組換えイネを紫外線付加照射条件下で栽培した。移植後 15 日目、29 日目、52 日目における各組換えイネと非組換えイネの写真 (図 4)、並びに生育調査の結果を図 5 に示した。その結果を S-C 系統は、草丈においては親株と有意な差異は認められないものの、分けつ数においては、移植後 52 日目から親株よりも多く推移していた (図 5)。



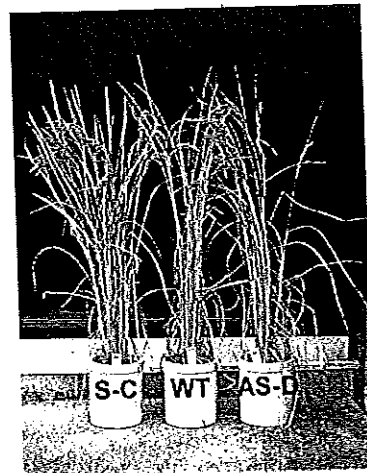
移植後 15 日目

移植後 29 日目

移植後 52 日目



移植後 78 日目 (開花日)



移植後 125 日目 (収穫時)

図 2 移植後 15、29、52、78、125 日目の組換えイネ、非組換えイネのコントロール区における生育の様子

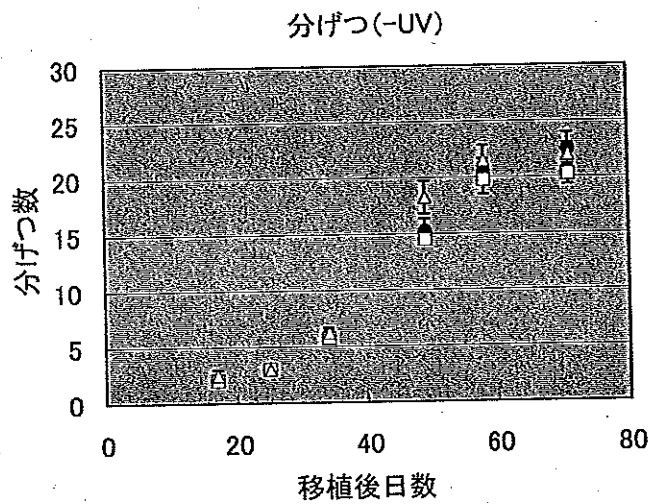
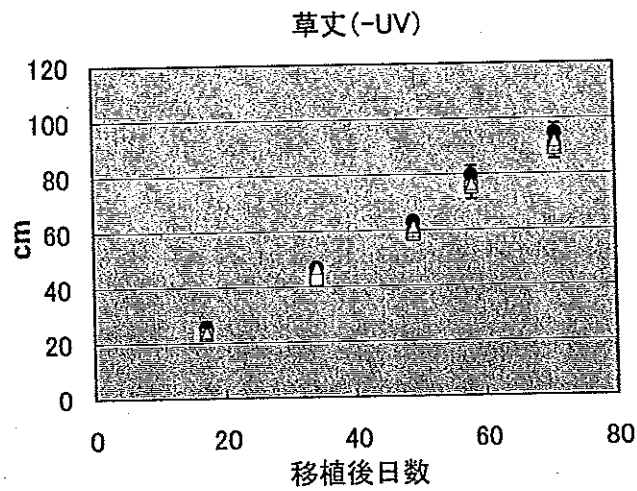
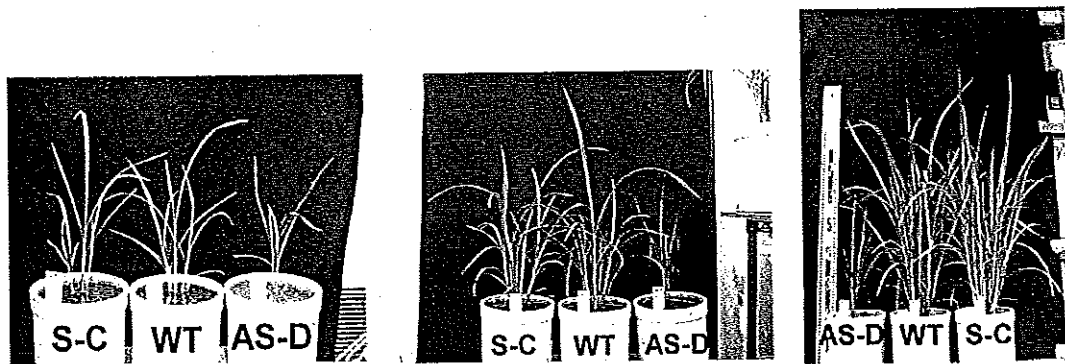


図3 移植後からの組換えイネ、非組換えイネのコントロール区における草丈、分けつ数の変化。組換えイネ：S-C (●), AS-D (□)、非組換えイネ：(△)

表1 収穫時のコントロール区における組換えイネ、非組換えイネの草丈、穂数、乾物重

	草丈 (cm)	穂数 (本)	乾物重 (g)		
			地上部	地下部	
非組換えイネ	ササニシキ	103.2±3.2	12.6±1.5	22.9±0.9	10.1±0.6
組換えイネ	S-C	100.6±2.6	12.1±2.0	25.7±0.9	12.7±0.8
	AS-D	97.3±2.8	13.4±1.5	24.5±0.6	14.4±1.5

一方、AS-D 系統においては、草丈、分けつ数ともに、明らかに親株よりも低く推移し、分けつ数に至っては、移植時より、増加することはなかった（図5）。以上の結果から、閉鎖系温室環境において、UV を照射しないコントロール区での組換えイネの生育は、S-C、AS-D 系統ともに、非組換えイネと比較して、有意な差異は認められない一方、UV 照射下では、明らかに、S-C 系統は親株と比較して UV 耐性を示し、AS-D 系統は著しい UVB 感受性を示すことが分かった。



移植後 15 日目 移植後 29 日目 移植後 52 日目
図4 移植後 15、29、52 日目の組換えイネ、非組換えイネの UV 照射区における生育の様子

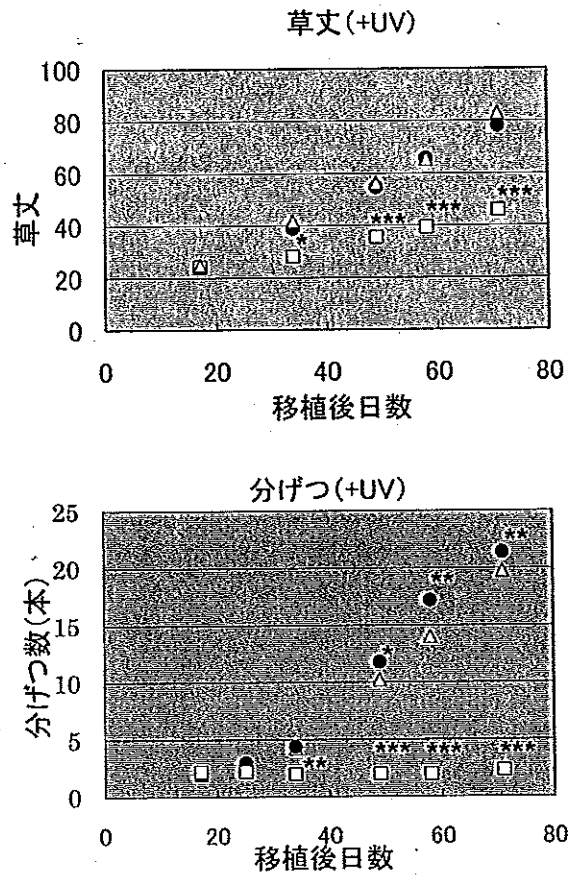


図5 移植後からの組換えイネ、非組換えイネの UV 照射区における草丈、分けつ数の変化。

組換えイネ：S-C (●) , AS-D (□) 、非組換えイネ：(△)

*, **, *** ; 有意差検定 (LSD 検定) 、*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

跡地土壌での残留効果

【目的】

本組換えイネ S-C および AS-D の栽培残渣の他の植物への影響を非組換えイネの場合と比較し、検討を行う。

【実験方法】

本組換えイネ S-C および AS-D と非組換えイネ（ササニシキ）を栽培した土壌各々5個体分を用いた。これらをポットに詰め、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。栽培密度は10苗/ポットで行い、250 mgN/kg 乾土の割合で施肥した。栽培期間は20日間で行った。

【実験結果】

表1に栽培後のレタスの根長、草丈、新鮮重を示した。これらの調査項目について組換えイネの S-C と AS-D の跡地土壌のいずれも、非組換えイネの跡地土壌との間で統計的に有意な差は認められなかった。

図1には、実際のレタスの生育状況を示した。本組換えイネの S-C と AS-D の跡地土壌のいずれでも非組換えイネの跡地土壌を用いた場合とレタスの生育に大きな差はなく、根や茎葉の形態にも違いは認められなかった。

表1 植物体を栽培した跡地土壌で栽培したレタスの生育状況

	根長 (cm/本)		草丈 (cm/本)		新鮮重 (g/10本)	
非組換え	11.8	± 0.3	7.1	± 0.3	2.4	± 0.2
組換え AS-D	11.7	± 0.6	7.1	± 0.2	2.5	± 0.1
組換え S-C	10.6	± 0.6	7.1	± 0.1	2.3	± 0.1

※数値は平均値±標準誤差

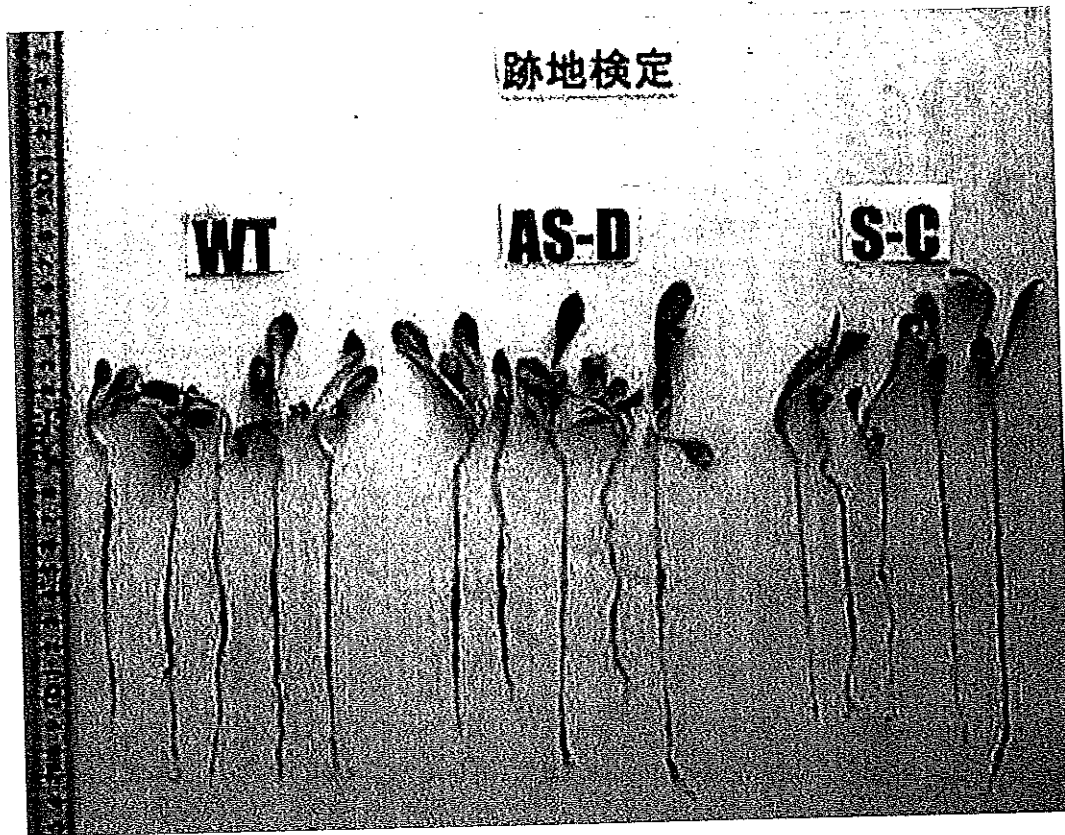


図1 植物を栽培した跡地土壌で栽培したレタス

WT: 非組換えイネ (ササニシキ) 跡地土壌使用

AS-D: 組換えイネ AS-D (アンチセンス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 跡地土壌使用

S-C: 組換えイネ S-C (センス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 跡地土壌使用

土壤微生物相検定

【目的】

本組換え体イネ S-C および AS-D 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 (ササニシキ) と比較、検討した。

【実験方法】

土壤サンプリング

本組換えイネ S-C および AS-D、ならびに非組換えイネ (WT) を 1/5000a 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箇所、深さ5cmの地点から土壤を採取混合し試料とした。生土約1gを100ml滅菌水で懸濁させ10min攪拌した後、さらに希釈し 10^3 、 10^4 倍希釈液を作成した。これらを後述する3種の培地3枚に塗布 (YG、HV培地には 10^4 倍希釈液を、ローズベンガル培地には 10^2 倍希釈液を各々200 μ l) した。S-C、AS-D、WTの各々5個体について上記の調査を行った。

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を測定した。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りのコロニー形成数 (cfu) を算出した。

YG 培地 (酵母エキス 1.0 g l⁻¹、グルコース 1.0 g l⁻¹、K₂HPO₄ 0.3 g l⁻¹、KH₂PO₄ 0.2 g l⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.2 g l⁻¹、pH 6.8)

HV 培地 (フミン酸 1.0 g l⁻¹、Na₂HPO₄ 0.5 g l⁻¹、KCl 1.7 g l⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.05 g l⁻¹、FeSO₄·7H₂O 0.01 g l⁻¹、CaCO₃ 0.02 g l⁻¹、チアミン-HCl 0.5 mg l⁻¹、リボフラビン 0.5 mg l⁻¹、ナイアシン 0.5 mg l⁻¹、ピリドキシン-HCl 0.5 mg l⁻¹、パントテン酸 Ca 0.5 mg l⁻¹、イノシトール 0.5 mg l⁻¹、p-アミノ安息香酸 0.5 mg l⁻¹、ピオチン 0.25 mg l⁻¹、シクロヘキシミド 50.0 mg l⁻¹、pH 7.2)

ローズベンガル培地

(KH₂PO₄ 1.0 g l⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.5 g l⁻¹、ペプトン 5.0 g l⁻¹、グルコース 10.0 g l⁻¹、ローズベンガル 0.033 g l⁻¹、pH 6.8)

【実験結果】

生育調査の結果を表1に示した。全ての調査項目においてS-CとWTの栽培土壌の間、及びAS-DとWTの栽培土壌の間に統計的に有意な差は認められなかった。

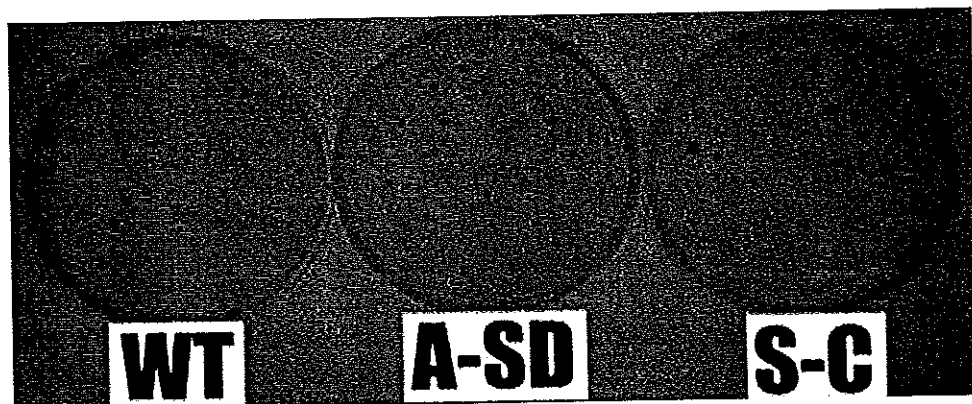
図1には、土壌細菌類、放線菌、糸状菌の培養結果の写真を示した。

表1 植物栽培土壌中の微生物数

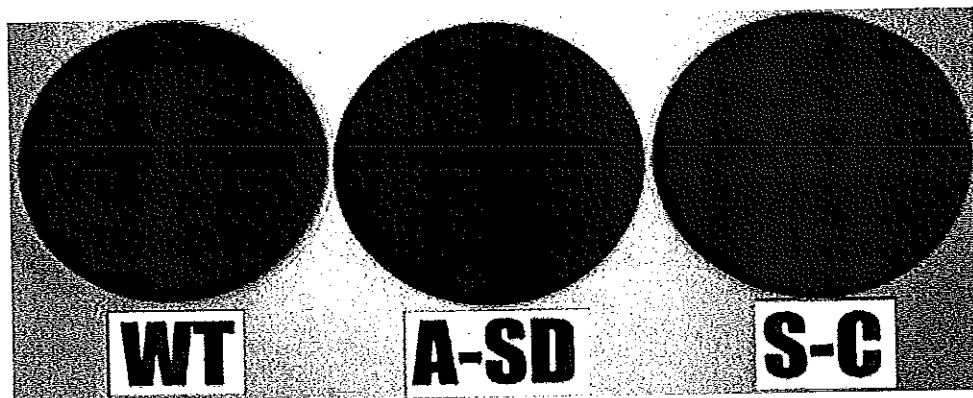
サンプル	細菌等		放線菌		糸状菌	
	($\times 10^6$ cfu/g 乾土)		($\times 10^6$ cfu/g 乾土)		($\times 10^4$ cfu/g 乾土)	
S-C	6.7 ± 1.3	1.3	18.3 ± 2.3	2.3	7.9 ± 1.5	1.5
AS-D	5.2 ± 0.6	0.6	13.8 ± 1.7	1.7	5.6 ± 0.6	0.6
WT	7.4 ± 1.2	1.2	12.7 ± 2.0	2.0	6.9 ± 1.2	1.2

数値は平均±標準誤差

YG 培地 (細菌類)



HV 培地 (放線菌)



ローズベンガル培地 (糸状菌)

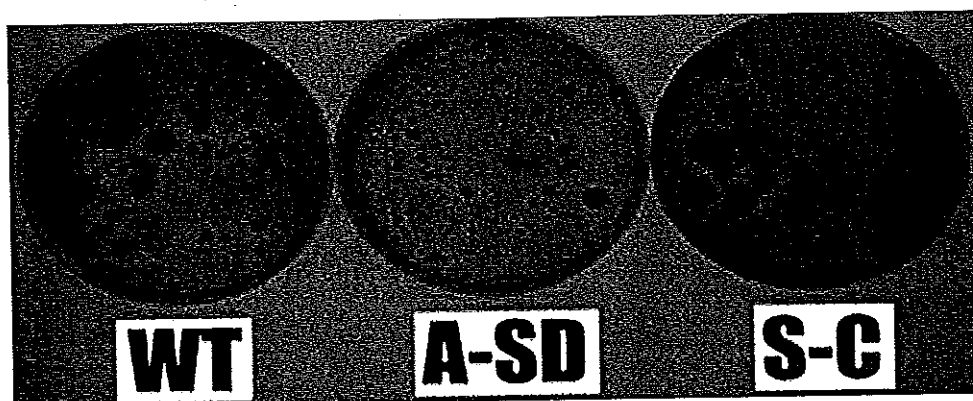


図1 土壤微生物の培養結果

WT: 非遺伝子組換え体 (ササニシキ) 栽培土壤

A-SD: AS-D (アンチセンス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 栽培土壤

S-D: S-C (センス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 栽培土壤

植物遺体の鋤き込み試験

【目的】

組換えイネ遺体による他の植物への影響を非組換えイネ遺体の場合と比較し、検討を行う。

【実験方法】

本組換えイネ S-C 及び AS-D と、非組換えイネ（ササニシキ）の植物体を各々5 個体粉砕し、500 kg/10a の比率で黒ボク土と混合した。これらをポットに詰め、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。栽培密度は 10 苗/ポットとし、250 mgN/kg 乾土の割合で施肥した。栽培期間は 20 日間で行った。

【実験結果】

表 1 に栽培後のレタスの根長、草丈、新鮮重を示した。これらの調査項目について組換えイネの AS-D と S-C を鋤き込んだ土壌のいずれでも非組換えイネを鋤き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。

表 1 植物遺体を鋤き込んだ土壌で栽培したレタスの生育状況

	根長 (cm/本)		草丈 (cm/本)		新鮮重 (g/10 本)	
非組換え	11.4	± 0.7	5.5	± 0.1	3.1	± 0.2
組換え AS-D	10.8	± 0.7	5.4	± 0.0	3.0	± 0.1
組換え S-C	10.1	± 0.5	5.0	± 0.2	2.6	± 0.2

※数値は平均値±標準誤差

図 1 に実際のレタスの生育状況を示した。組換えイネの AS-D と S-C を鋤き込んだ土壌のいずれでも非組換えイネを鋤き込んだ土壌を用いた場合とレタスの生育に大きな差はなく、根や茎葉の形態にも違いは認められなかった。



図1 植物遺体を鋤き込んだ土壌で栽培したレタス

WT: 非組換えイネ (ササニシキ) 遺体使用

AS-D: 組換えイネ AS-D (アンチセンス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 遺体使用

S-C: 組換えイネ S-C (センス光回復酵素遺伝子過剰発現体) 遺体使用

別添 8

組換えイネと非組換えイネとの交雑率の検定

【目的】

本組換えイネ S-C および AS-D の花粉の飛散量と、非組換えイネとの交雑頻度を検定した。

【実験方法】

非組換えイネの栽培

P1 隔離圃場内に建造した特定網室で、本組換えイネ S-C および AS-D、非組換えイネを隣接させて栽培した。組換えイネから 30、60、90 cm の距離に非組換えイネを配置し (図 1)、開花後に扇風機を用いて一定の風量 (1.4 m s^{-1}) で組換えイネ S-C および AS-D から非組換えイネの方向に風を送った。

非組換えイネから収穫した種子中に含まれるハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の検定

組換えイネ S-C および AS-D に隣接して栽培した非組換えイネから種子を収穫し、それぞれの距離に置かれた非組換え体個体 (30、60、90 cm) から 4 株をランダムに選抜した。それぞれの株から 50 粒の種子を取り殺菌処理した後、25 粒ずつ 2 枚の 50 mg l^{-1} のハイグロマイシンを含む MS 培地に播種した。ポジティブコントロールとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ組換えイネの種子 50 粒を同様に播種した。ネガティブコントロールとして、60 cm の距離で栽培した非組換えイネの種子 25 粒をハイグロマイシンを含まない MS 培地に播種した。播種後、 28°C の人工気象器で 18 日間育成し、組換えイネと同様の生育を示したものを生存数として数えた。

PCR を用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の検定

ハイグロマイシンを含む MS 培地で育成した非組換えイネの中で比較的生育の良かったものから、ゲノム DNA を抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF を PCR (forward; 5'-CAGCGGTCATTGACTGGAGC-3', reverse; 5'-GCGTCGGTTTCCACTATCGG-3', 増幅断片長; 363 bp) で増幅した。ポジティブコントロールとして、組換えイネの作製に用いたベクター鑄型として同様に PCR を行った。また、ゲノム DNA の抽出を確認するために、CPD 光回復酵素遺伝子の部分配列を PCR (5'-CCGTCGATGCTTTCTTGGAGG-3' (forward) と 5'-CATCTCCAACCTGCGATGCATTCCA-3' (reverse) : 増幅断片長: 225 bp) で増幅した。

【結果】

MS 培地を用いた検定の結果を図 2 に示した。ハイグロマイシンを含む培地を用いた検定において、30、60、90 cm の距離に置かれた非組換えイネから採取された種子では、どの個体も生育は著しく阻害され、やがて枯死した (図 2A, B, C)。組換えイネ S-C (図 2D) および AS-D (図 2E) は 50 粒の全ての種子が発芽し生育した。なお、ハイグロマイシンを含まない培地上で培養した非組換えイネは、50 粒の全ての種子が発芽し、正常な生育を示す一方 (図 2F)、ハイグロマイシンを含む培地上では、非組換えイネは生育できなかった (図 2G)。

図 3 には、植物個体の比較を示した。非組換えイネの中にも若干生育する個体が存在したが、全て組換えイネよりも葉の色が薄く、生育も遅かった。

PCR での遺伝子増幅の結果を図 4 に示した。供試した全ての非組換えイネから抽出したゲノム DNA からは、ハイグロマイシン遺伝子は増幅されなかった (図 4A, C, E)。一方、本組換えイネ S-C および AS-D に関しては、選抜したもの全てで遺伝子の存在が確認できた (図 4G のレーン d, e)。また CPD 光回復酵素遺伝子は全ての非組換え個体において増幅されたことから、ゲノム DNA の抽出に問題は無いことが示された。

一穂の中での開花順序はほぼ決まっている。穂の上部の枝分先のモミから開花が始まり、一穂の開花は 1 週間以上続く。受粉は開花と同時に進行されるが、葯は開花して外に出る直前に破れて花粉が自分の雌しべにかかるため、ほぼ自家受粉となる。開花日が雨の場合には、花は開かないまま、葯がモミの天井に押しつぶされるようにして破れて受粉が行われるため同様にほぼ自家受粉となる。開花した花そのものの寿命は、1~2 時間であることから、イネの受粉は極めて短時間で進行される。本実験では、ハイグロマイシンを含む培地で育成した非組換えイネには個体差が存在するものの 600 個体の全てにおいて葉の色が薄くなり、やがて枯死した。比較的生育の良かった個体でも、PCR 法を用いた解析では、ハイグロマイシン遺伝子の確認はされなかった。以上のことから、本組換えイネ S-C および AS-D と非組換えイネとの交雑は起こらなかったと結論された。

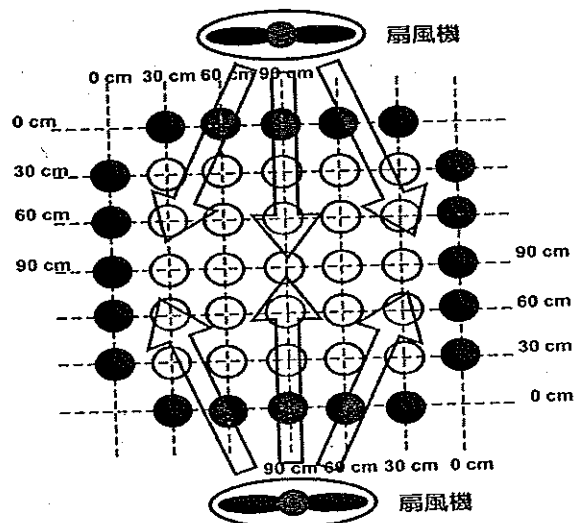
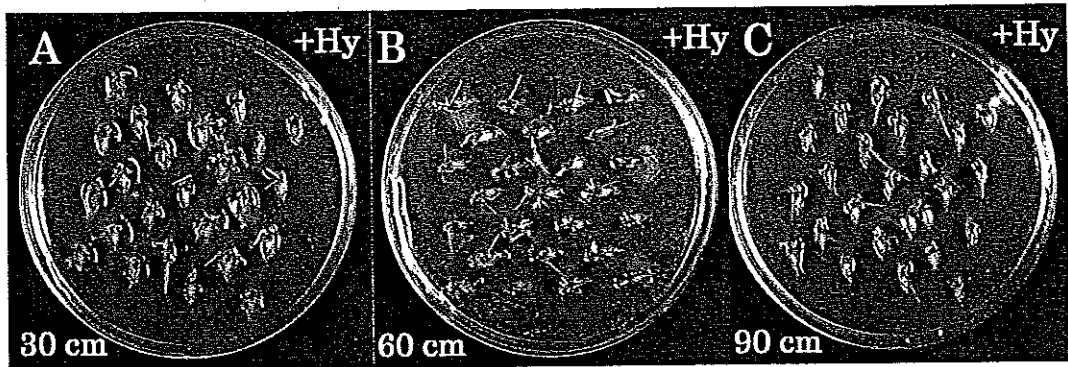


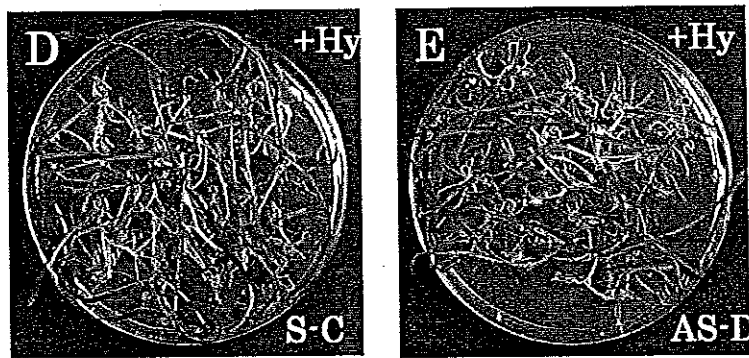
図 1 交雑試験用のポットの配置。

● : 組換え体、○ : 非組換え体

非組換えイネの種子のハイグロマイシン添加培地での生育



組換えイネの種子のハイグロマイシン添加培地での生育



非組換えイネの種子のハイグロマイシン無添加・添加培地での生育

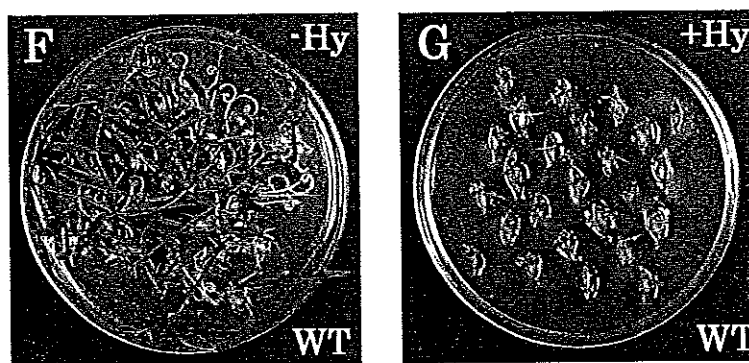


図2 組換えイネから30 (A)、60 (B)、90 cm (C)離して栽培した非組換えイネから収穫した種子を、ハイグロマイシン添加培地で栽培した生育の様子。また対照区として、組換えイネ (S-C、AS-D) を同じハイグロマイシン添加培地で栽培した様子 (D、E)、および非組換えイネをハイグロマイシン無添加培地 (F)、添加 (G) で栽培した様子。

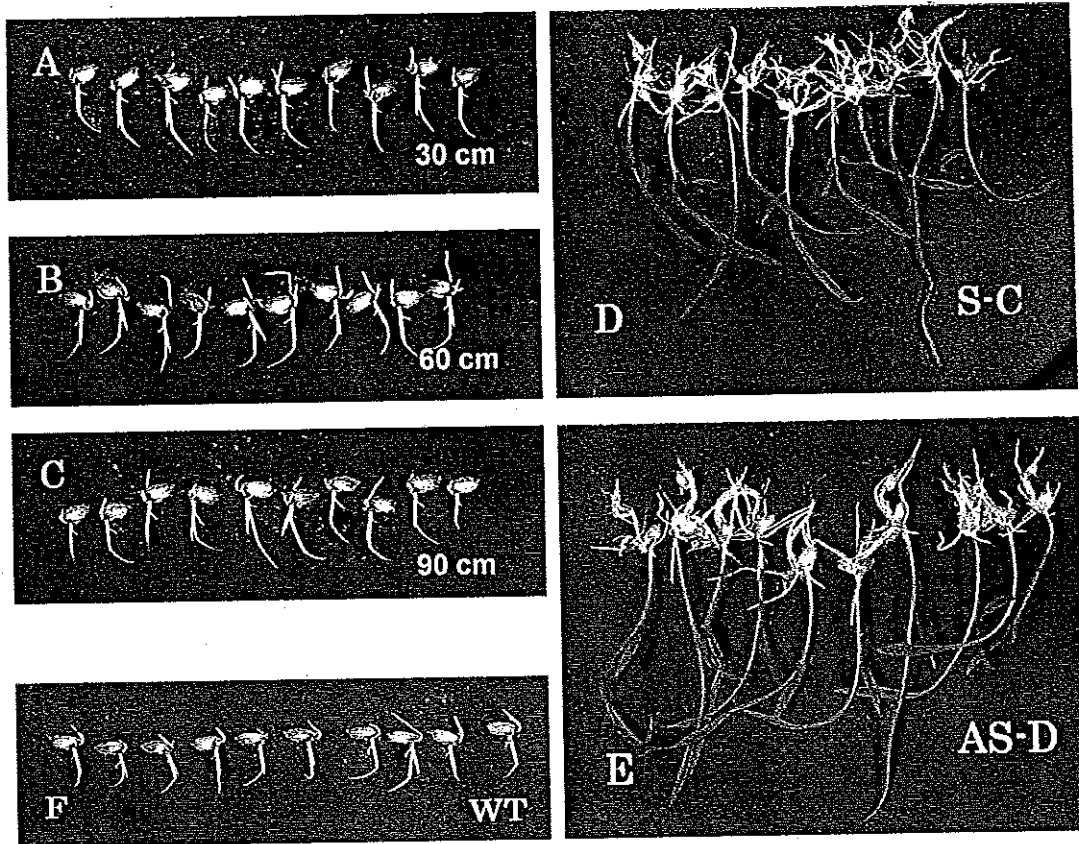


図3 ハイグロマイシンを添加した培地で18日間栽培した植物の様子

組換えイネから30 (A)、60 (B)、90 cm (C)離して栽培した非組換えイネから収穫した種子を、ハイグロマイシン添加培地で栽培した生育の様子。また対照区として、組換えイネ (S-C、AS-D) を同じハイグロマイシン添加培地で栽培した様子 (D、E)、および非組換えイネをハイグロマイシン添加培地 (F) で栽培した様子。

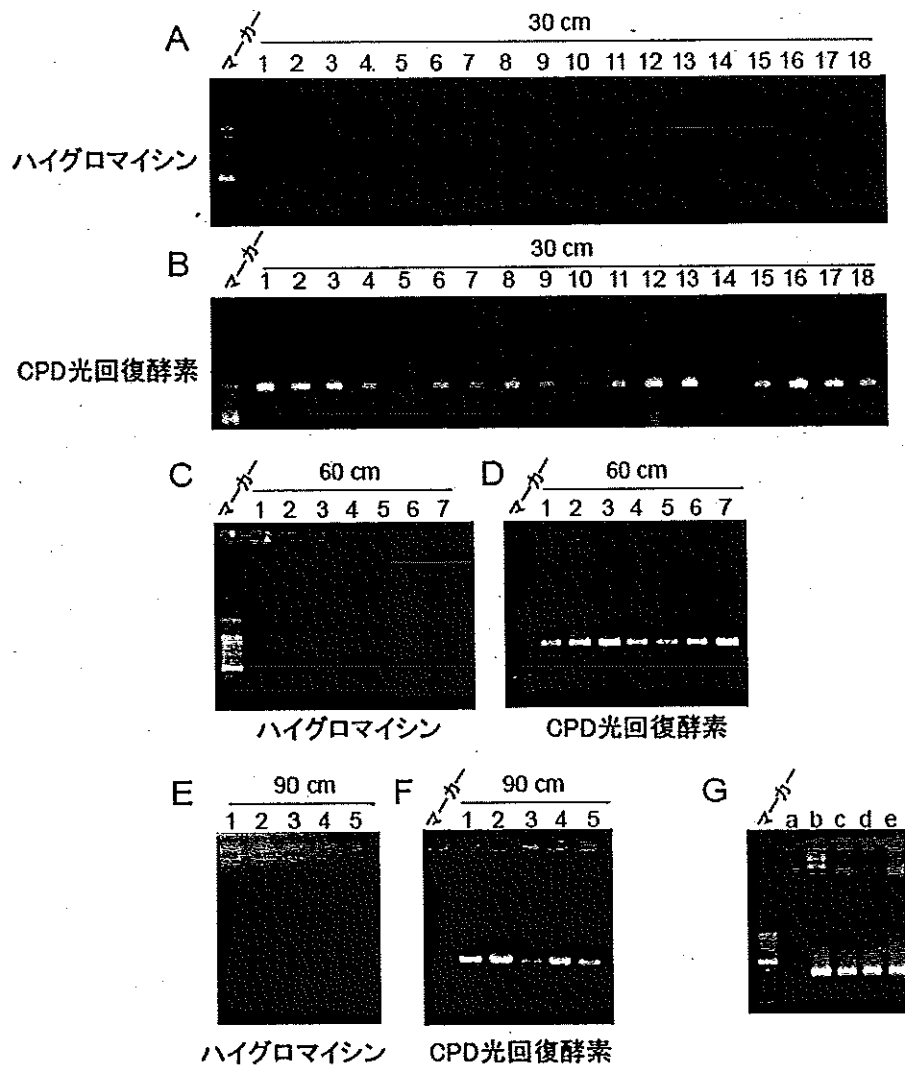


図4 PCRを用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の有無の確認

組換えイネから30 cm (A, B)、60 cm (C, D)、90 cm (E, F)の距離で生育させた非組換えイネ・ササニシキから得られた種子を生育させた植物体からDNAを抽出し、PCR法により、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (A, C, E) と光回復酵素遺伝子 (B, D, F) を増幅した。Gには、以下に示すDNAを鋳型にハイグロマイシン耐性遺伝子をPCR法によって増幅し、泳動した結果を示した (対照区)。

- a: 非組換えイネ・ササニシキ (ハイグロマイシン耐性遺伝子を持たない)
- b: 形質転換に用いたCPD光回復酵素遺伝子を含むプラスミドDNA
- c: 形質転換に用いたプラスミドDNA
- d: 組換えイネ : S-C
- e: 組換えイネ : AS-D

花粉飛散距離の検定

【目的】

組換えイネと非組換えイネの花粉(葯)を顕微鏡で観察し、形状、稔性を調べ、さらに飛散距離の検定を行う。

【実験方法】

開花直前の組換えイネ S-C および AS-D、非組換えイネから葯を採取し、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、その稔性を測定した。

飛散距離測定実験の概要を図1に示した。花粉源から0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mの距離にグリセリンを塗布したスライドガラスを床に置いた。花粉源の後方1.0 mの位置に扇風機を設置し、花粉源での風速が 1.4 m s^{-1} となるように設定した。扇風機を24時間連続して稼働させた後、スライドガラスを回収し、花粉数を計測した。本実験は、花粉源とスライドガラスの間に、障害物のない条件下で行った。

【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2に示した。花粉の形状に、組換えイネ S-C (図2B) および AS-D (図2C) と非組換えイネ (図2A) との差異は観察されなかった。ヨード・ヨードカリ溶液で染色したところ、本組換えイネ S-C および AS-D は、非組換えイネと同様に花粉の稔性が認められ、組換えイネ S-C および AS-D は非組換えイネと相違がないと考えられた。花粉の飛散距離と花粉数の変化を図3に示した。組換えイネ S-C および AS-D の花粉、非組換えイネの花粉ともに、飛散距離による花粉数に変化が認められたが、同じ傾向を示した。飛散した花粉数は、花粉源から0.5~1.0 m離れた場所で最大になり、そこから距離が離れるに従って減少していた。

また、組換えイネ S-C および AS-D と非組換えイネの花粉の形状に違いが観察されなかったことから、花粉の飛散についても同様の挙動をするものと考えられた。

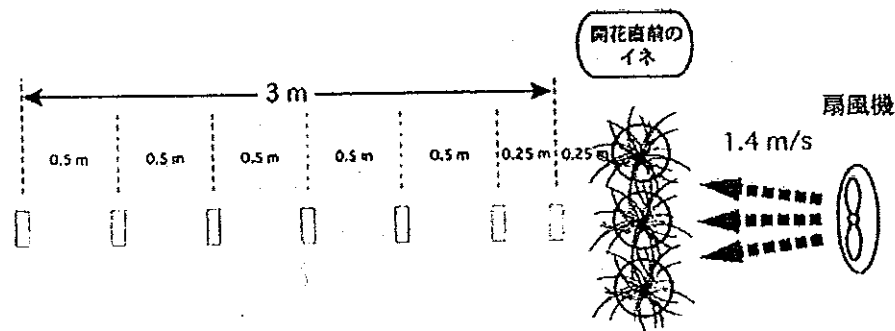


図1 花粉飛散測定の様式図

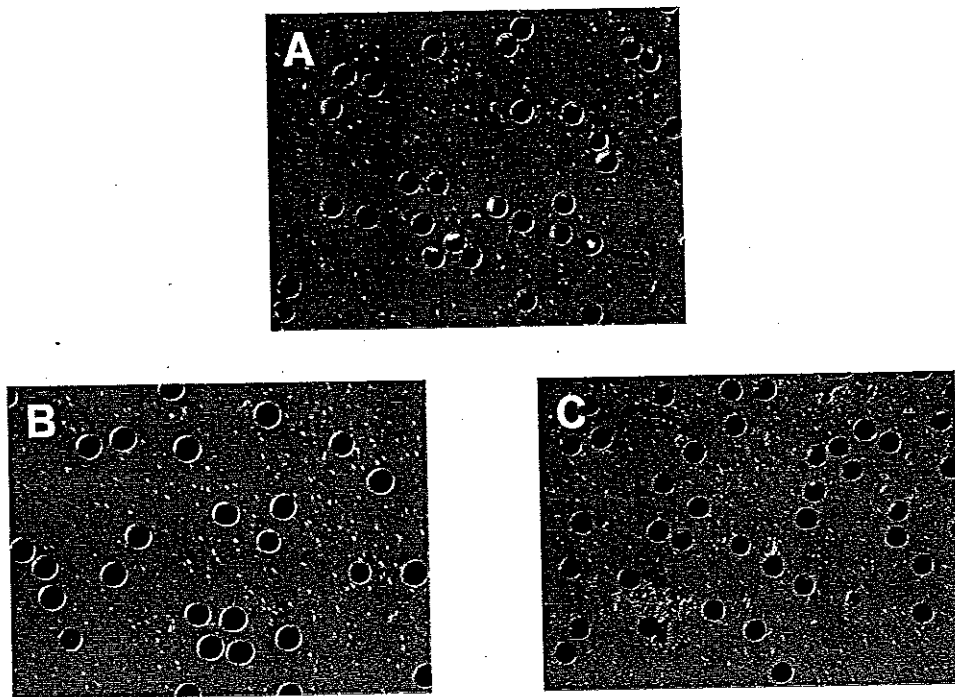


図2 非組換えイネ (A) と組換えイネ (B; S-C, C; AS-D) の花粉の形状と稔性。花粉が黒く染まっているのは、デンプンが蓄積しているためで、稔性があることを示している。

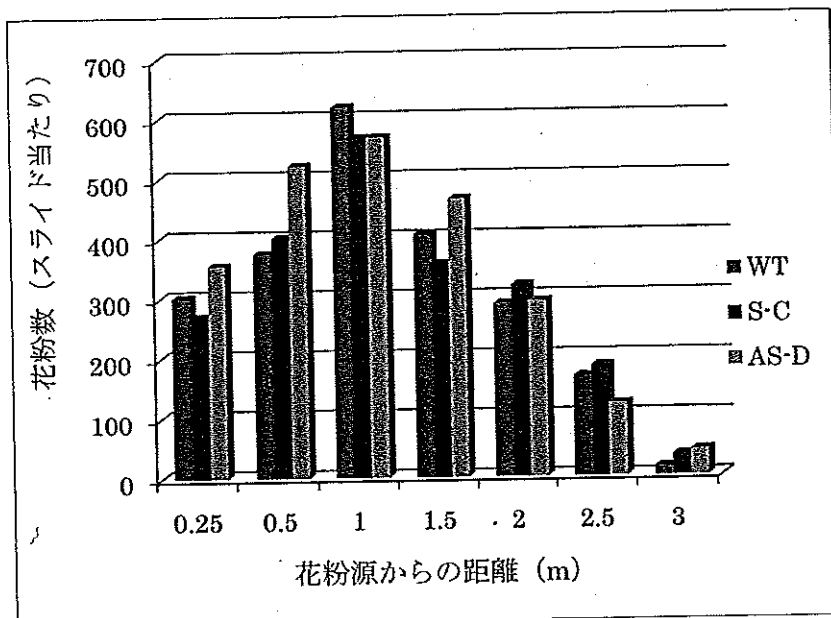


図3 組換えイネと非組換えイネの花粉飛散距離の比較

生育初期における低温耐性試験

【目的】

組換えイネ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】

本組換え体S-CおよびAS-D、ならびに非組換え体イネの種子を30°Cで発芽させた後、イネ育苗培土の入ったポットにそれぞれ10粒ずつ播種した。播種されたポットを、以下の3つの区に設定し、培養を行った。

- (1) 昼/夜の温度が28/20°C設定の人工気象機にて16日間培養(28°C区)
- (2) 昼/夜の温度が28/20°C設定の人工気象機で5日間培養し、草丈が5cm程度に生育した時点で、昼/夜4°C設定の人工気象機で11日間培養(28°C→4°C区)
- (3) 播種直後から、昼/夜4°C設定の人工気象機で16日間培養(4°C区)

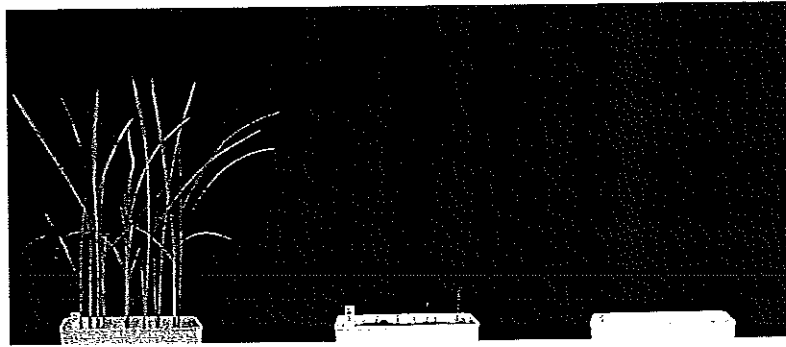
【結果】

図1には、各処理区で16日間培養した後の各区のイネの様子を写真で示した。写真からも明らかなように、(1)の28°Cの区では、組換え体、非組換え体ともに草丈は28cm程度と、正常な生育を示した。一方、(2)の28°C→4°Cの区では、組換え体・非組換え体イネのどれも、4°C設定の人工気象機に入れた時の草丈5cmから、草丈の伸長は認められず、生育は著しく抑制された。また、(3)の4°C区では、組換え体・非組換え体イネともに、発芽が抑制され、地上へ出芽することはなかった。したがって、組換え体・非組換え体イネともに、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体と非組換え体イネの間には差異はないと判断した。

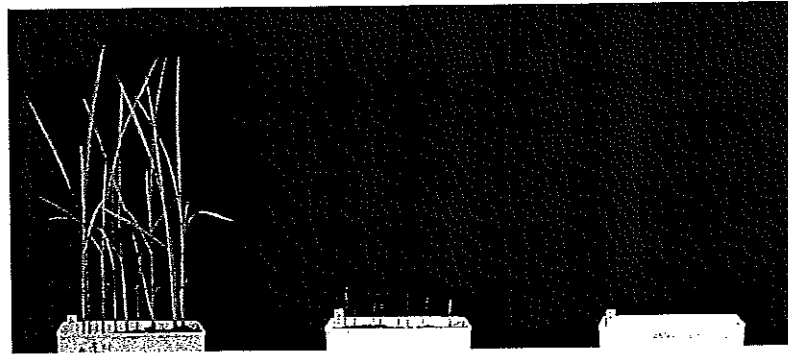
WT



S-C



AS-D



処理 1
(28°C 区)

処理 2
(28°C → 4°C 区)

処理 3
(4°C 区)

図 1 各処理区で 16 日間培養した後の各区のイネの様子

閉鎖系温室における組換え体イネの紫外線抵抗性試験 I

【目的】

組換えイネ S-C および AS-D と非組換え体イネを閉鎖系温室内に設置した紫外線無照射区（コントロール区）ならびに紫外線付加照射区で生育させ、生育を比較し、紫外線抵抗性を検定する。

【実験方法】

本組換え体 S-C および AS-D、ならびに非組換え体イネの種子を 30°C で発芽させた後、イネ育苗培土の入ったポットにそれぞれ 1 粒ずつ播種した。播種されたポットを、閉鎖系温室内（PI 対応閉鎖系温室テレバイオクライトロン）に設置した紫外線無照射区（コントロール区）ならびに紫外線付加照射区（1.2 W/m² の UVB 強度）で 30 日間育成させた¹⁴⁾。30 日後の分けつ数、地上部の新鮮重を比較した。

【結果】

図 1 には、各処理区で 30 日間生育させた後の各区のイネの様子を写真で示した。写真からも明らかなように、組換えイネ S-C は、非組換えイネと比較して明らかに紫外線による生育障害が軽減させているのが分かる。一方、組換えイネ AS-D は、生育が紫外線によって著しく阻害されたことが分かる。図 2 には、本組換え体 S-C および AS-D、ならびに非組換え体イネを、紫外線無照射区、紫外線付加照射区で 30 日間生育させた後の分けつ数、地上部新鮮重を示した。

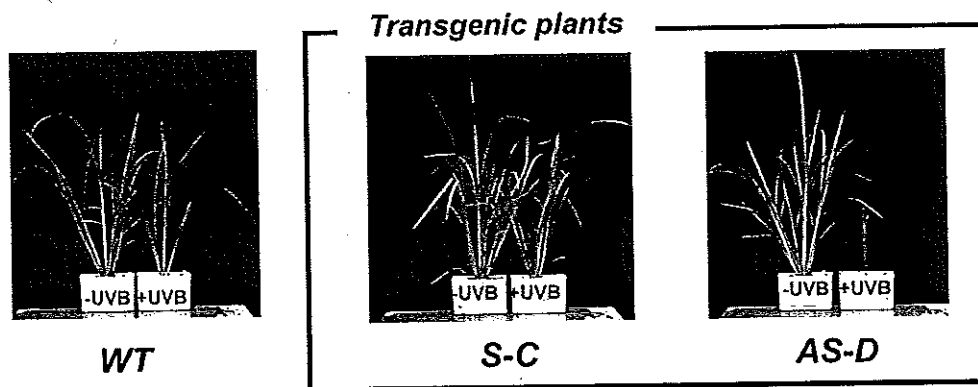


図 1 閉鎖系温室内に設置した紫外線無照射区 (-UV) と付加照射区 (+UV) で、組換え体イネ S-C と AS-D、並びに非組換えイネ (WT) を 30 日間育成した後の写真

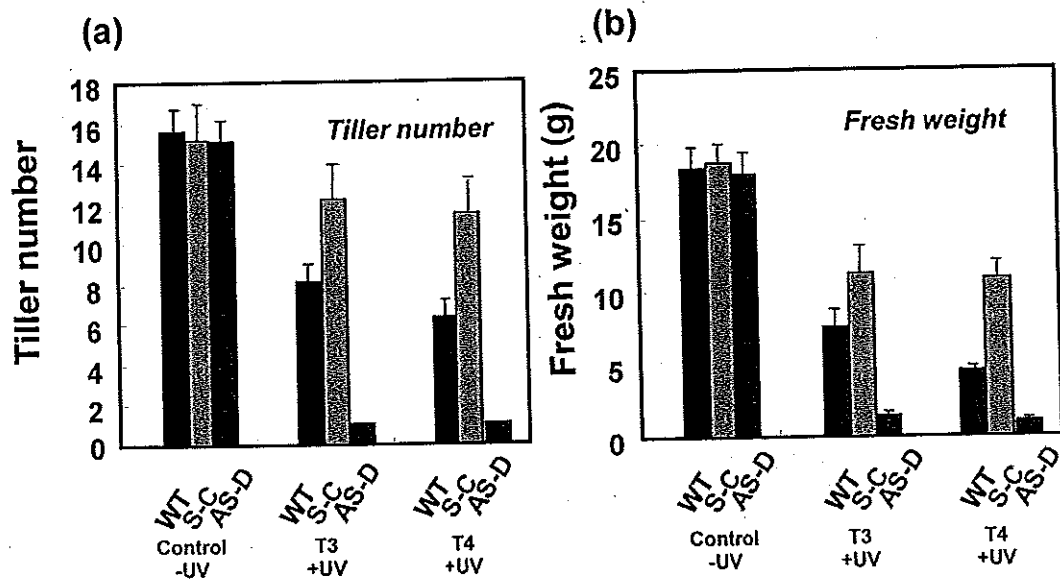


図2 閉鎖系温室内に設置した紫外線無照射区(コントロール区:-UV)と付加照射区(+UV)で、T3およびT4世代の組換え体イネ S-Cと AS-D、並びに非組換えイネ (WT) を30日間育成した後の分けつ数 (a; Tiller number) と地上部新鮮重 (b; Fresh weight)

【研究課題】イネCPD光回復酵素形質転換体を用いた隔離圃場での、太陽紫外線植物影響評価

【研究目的】

研究代表者らは、今日の地球環境問題に関連して、紫外線 UVB 量の増加がイネの生育に及ぼす影響、ならびに、高等植物の UVB 耐性機構に関する一連の解析を行ってきている。これまでに、①圃場での、野外環境試験では、UVB 量の増加はイネの減収や玄米の小粒化のみならず、玄米タンパク質含量を増加させる（食味の低下を導く）こと（*Hidema et al. J. Radiation Res. 2005*）、②UVB は、葉内の光合成関連タンパク質含量を低下させ、光合成活性を低下させるが、このような UVB による阻害効果（UVB 感受性）は品種間で大きく異なること（*Kumagai and Sato, 1992, Hidema et al. Plant Cell Physiol. 1996, Teranishi et al. Plant Cell Physiol. 2004*）、③この UVB 感受性差異の要因は、UVB によって誘発される DNA 損傷（シクロブタン型ピリミジン二量体:CPD）を修復する CPD 光回復酵素（青色光を利用して CPD を特異的に修復する酵素）遺伝子の自然突然変異による酵素活性の違いに強く依存していることなどを明らかにしてきた（*Hidema et al. Plant Physiol. 1997, Plant Cell 2000, Plant J. 2005*）。さらに、イネ CPD 光回復酵素形質転換体を作製し、酵素活性と生育レベルでの UVB 傷害との関係を調べた結果、①酵素活性を著しく低下させたアンチセンス形質転換体では、UVB 付加条件下では著しい生育傷害を受ける（下図 A 参照）、②野生株と比較して 5~50 倍酵素活性を高めた形質転換体はどれも、葉細胞内 DNA 上の CPD 蓄積量（Steady state CPD level）が低下し（親株のササニシキでは 1Mb DNA 当たり 5~7 個であるのに対して、形質転換体では 1Mb DNA 当たり 1 個以下）（下図 B 参照）、さらには生育レベルでの傷害が軽減され、抵抗性が増すことなどを見出した。これらの結果は、UVB によって誘発された DNA 損傷（CPD）自身がイネの生育傷害を引き起こしている主要因であり、CPD 光回復酵素活性を増加させることで細胞内の CPD 蓄積量が低下して、結果として UVB 傷害を軽減させることができることを示している（下図参照：*Hidema et al. Plant J. 2007*）。

また、これまでに申請者らは、現在の野外環境（仙台市5月）、すなわち自然光下で生育しているイネの葉細胞内でのCPD蓄積量を解析した結果、現在の自然光条件下でも葉細胞内にはCPDが1日を通して1Mb当たり4~6個程度存在していることを見出している（*Hidema et al. J. Photochem. Photobiol. 1999*）。この結果は、先の形質転換体イネを用いた解析結果から考察して、明らかに現在の自然光に含まれるUVBもイネの生育を阻害している可能性が予測され、CPD光回復酵素活性を増加させることで、現在の環境下でのイネの生育阻害を軽減し、収量が増加することが十分に期待される。

そこで本研究では、現在の太陽光に含まれる紫外線 UVB がイネの生育に及ぼす影響、な

らびに今日の地球環境問題に関連して、UVB量の増加がイネの生育にどのような影響を及ぼすのかを、これまでに申請者らが作製したCPD光回復酵素形質転換体イネを野外（隔離圃場）で生育させ、その生育解析、CPDの細胞内動態解析を通して、明らかにすることを目的とする。

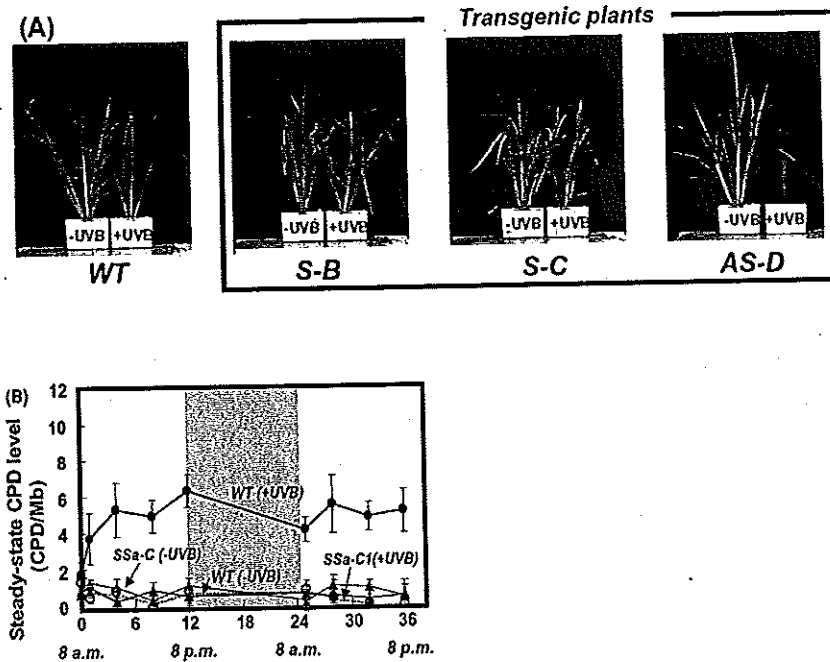


図 (A) CPD 光回復酵素活性を増加 (SSa-B, SSa-C 系統)、または抑制した (AS-D) 形質転換体イネを UVB 付加条件下で 30 日間生育させた後の植物体の写真。親株 (WT: ササニシキ) と比較して AS-D 系統は著しい生育阻害を受けるが、活性を増加させた SSa-B と SSa-C 系統は明らかに生育が軽減された。(B) は (A) の UVB 付加条件下で生育して際の、第 4 葉の細胞内 CPD の蓄積量 (Steady-state CPD level) の変化をしました。UVB 付加条件下での WT の CPD 蓄積量はおよそ 5~7CPD/Mb であるのに対して、SSa-C 系統では UVB を付加していない (-UVB) 条件での CPD 蓄積量とほぼ同程度の 1 CPD/Mb 以下であった。

【研究計画】

自然環境下における植物の UVB 影響解析は、単に UVB の影響のみならず、温度、日射量等、様々な天候の影響を受けるため、的確な太陽紫外線がイネの生育に及ぼす影響を評価するためには、単年度のみ研究ではなく、複数年（平成 21 年度～24 年度）での継続試験が必要である。

材料として、現在申請中の組換えイネ S-C および AS-D、ならびに非組換えイネ・ササニシキを隔離圃場に各 150 個体を移植し（第 4 葉完全展開時）、以下の解析を行う。

① 太陽紫外線がイネの生育および収量に及ぼす影響解析

草丈、分けつ数の推移を測定し、収穫時においては、草丈、穂数、1穂粒数、1000粒重、個体乾物重、玄米サイズ等を測定する。また、開花直前においては、花粉稔性を測定する。

② 自然光条件下で生育するイネ葉細胞内の CPD の蓄積量 (Steady state CPD level) の動態解析

自然光に含まれる紫外線 UVB によって、どの程度の CPD が細胞内に蓄積しているか？また生育の進行に伴ってどのように変化しているのかを経時的にサンプリングしてその動態を解析する。なお、本解析では、幼植物時期、分けつ数が盛んに増加する時期、幼穂が形成される時期に絞って、主に、光合成関連タンパク質をコードする遺伝子の転写活性が盛んな完全展開中の葉や、細胞分裂が盛んな葉原基や分けつ原基が存在する鞘葉節内部の細胞を対象に比較解析を行う。

③ 太陽紫外線によって誘発される葉細胞内の CPD 蓄積量の違いが、光合成反応に及ぼす影響解析

光合成関連主要タンパク質である炭酸固定酵素 (Rubisco)、電子伝達活性に関連するタンパク質の含量、活性、ならびにフラボノイド系色素、ストレス応答で代表的な因子である活性酸素消去系酵素の活性等の定量的解析を行い、DNA 損傷の蓄積量の違いがタンパク質分子に及ぼす影響を調べる。また、ポータブルガス交換・クロロフィル蛍光同時測定装置 (LI-6400、本研究科保有備品) を用いて、イネ葉の光合成活性、電子伝達活性を測定する。

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

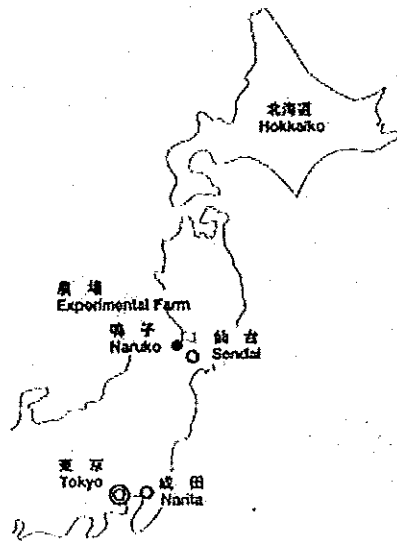


図1 農場施設所在地 (1)

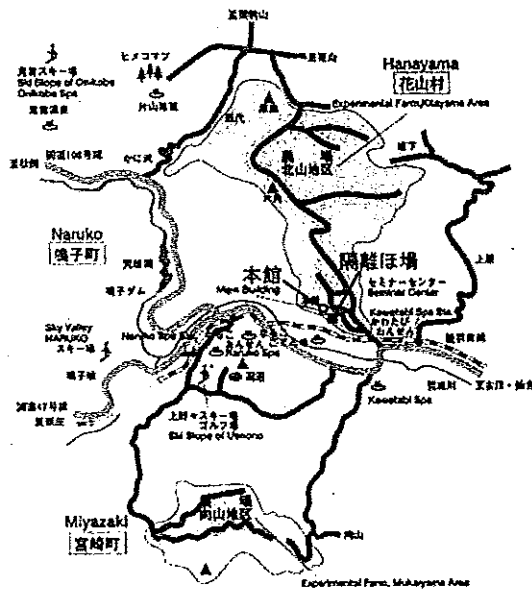


図2 農場施設所在地 (2)

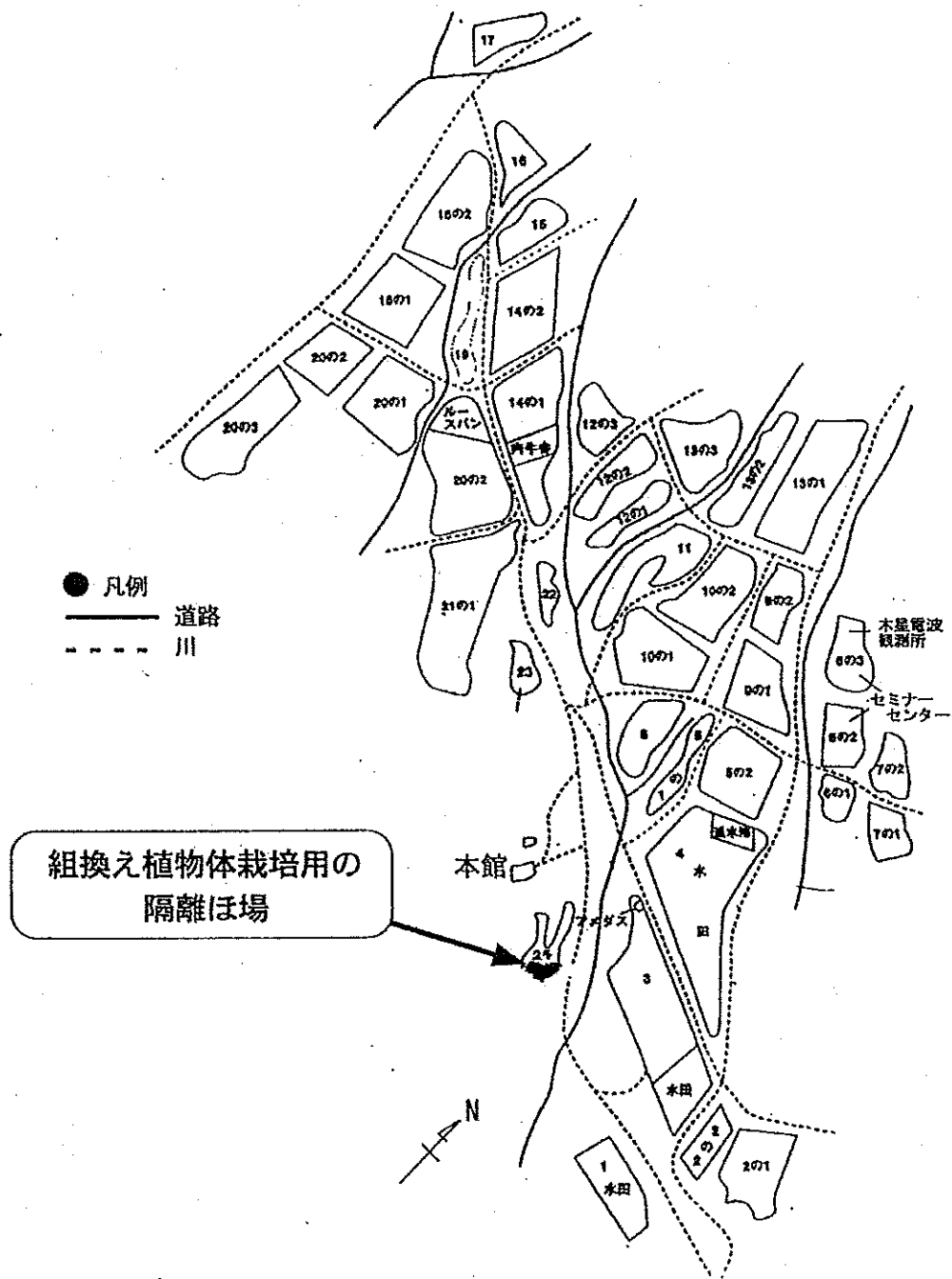


図3 東北大学大学院農学研究科付属複合フィールド教育研究センターの敷地図

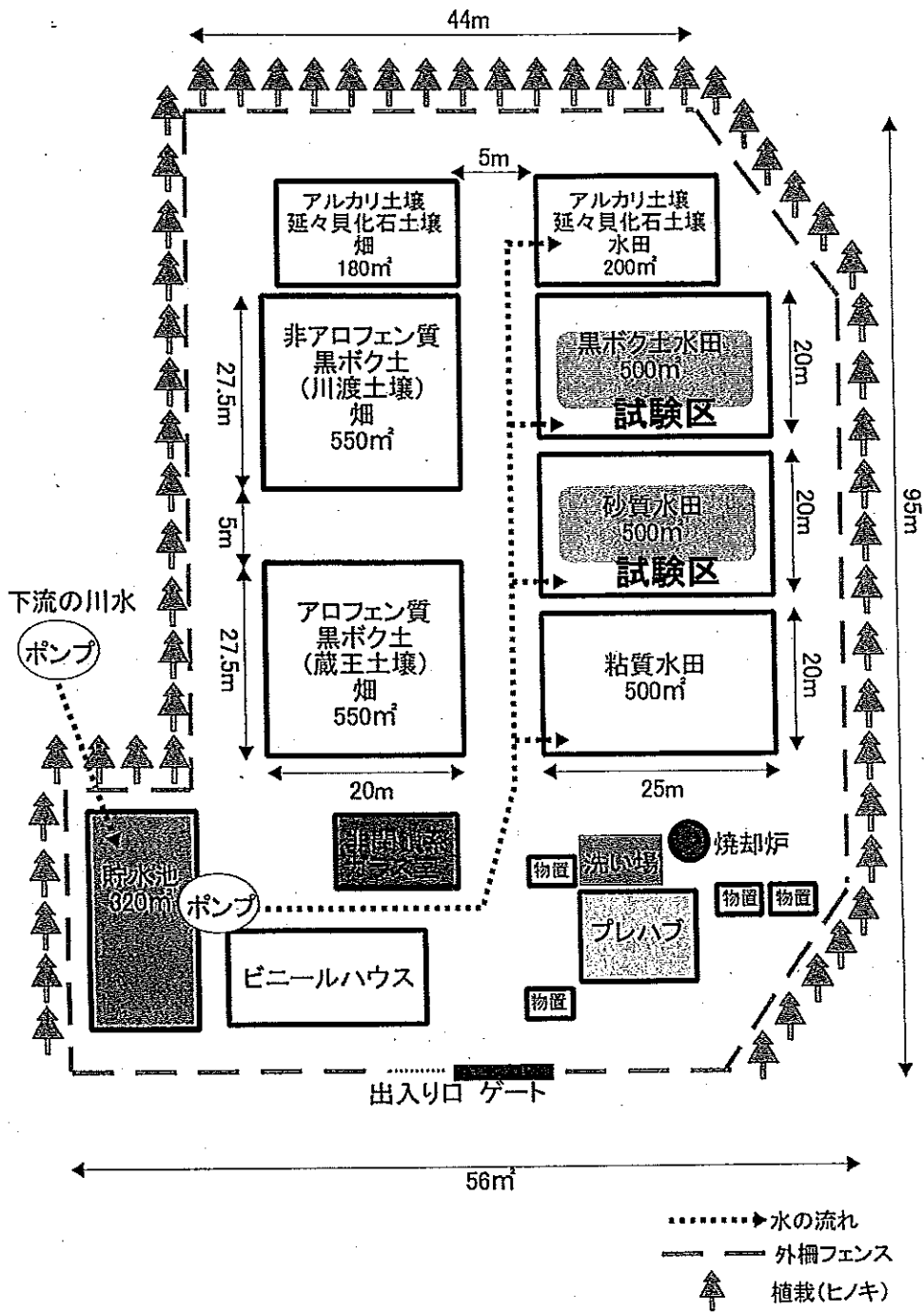


図4 組換え植物隔離圃場の概略図と試験区