

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 2 月 24 日

文部科学大臣 松野博一 殿
環境大臣 山本公一 殿

氏名 国立研究開発法人
申請者 農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 井邊時雄 印
住所 茨城県つくば市観音台 3-1-1

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（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	シンク能改変イネ（ <i>OsCKX2/Gn1a</i> 改変イネ系統） (<i>Oryza sativa</i> L. NIAS16-OSCas-Gn1a)
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	所在地：茨城県つくば市観音台 3-1-1 （所在エリア：観音台第 4 事業場 畑圃場 HC-2 番北西端） 名称：農業・食品産業技術総合研究機構 観音台第 4 事業場 「高機能隔離圃場」 使用期間：承認日から平成 34 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 （1）部外者の立入りの防止のため、隔離ほ場を取り囲む高さ 1.8 m の金属製フェンスを設置する。 （2）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明示した標識を正面入口の見やすい場所に掲示する。 （3）隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置すると共に、本遺伝子組換えイネの隔離ほ場外への流出を防止するための設備を有する排水系を設置している。

- (4) 野生動物等の摂食を防止するため、遅くとも出穂期までには、防鳥網を本遺伝子組換えイネの栽培水田を取り囲むように設置する。栽培は慣行法に準じ、気象等に対応して防風網の設置を行う場合がある。

2 隔離ほ場の作業要領

- (1) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネ以外の植物が隔離ほ場内の使用区画で生育することを、除草管理等により最小限に抑制する。
- (2) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に運搬又は保管する場合には、第二種使用等として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（平成15年6月18日法律第97号）第12条又は第13条で定める拡散防止措置を実施する。
- (3) 本遺伝子組換えイネの栽培終了後、当該イネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネは、隔離ほ場内において乾燥、脱穀する。
- (4) 栽培終了後、保管しない種子（もみ）は焼却処理により確実に不活化を行う。また、刈り取られた稲わらを含む地上部はオートクレーブ又は焼却炉にて不活化する。刈り取られない残りのイネ残渣及びひこばえは、ほ場内に全てすき込み又は埋設等により不活化する。
- (5) 隔離ほ場内で使用した機械、機具及び靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子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。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるよう、施設の維持及び管理を行う。
- (7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等をする者に遵守させる。
- (8) 本遺伝子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書に基づき、速やかに対処する。

生物多様性影響評価書

シンク能改変イネ (*OsCKX2/Gn1a* 改変イネ系統)

(*Oryza sativa* L. NIAS16-OSCas-Gn1a)

国立研究開発法人

農業・食品産業技術総合研究機構

目次

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1、宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
2、遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
(1) 供与核酸に関する情報	8
(2) ベクターに関する情報	15
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	16
(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	18
(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	21
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	22
3、遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	29
(1) 使用等の内容	30
(2) 使用等の方法	30
(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	31
(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	32
(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	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	33
1、競合における優位性	33
2、有害物質の産生性	35
3、交雑性	36
第三 生物多様性影響の総合的評価	38
引用文献リスト	39

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主また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

① 和名、英名及び学名

イネ、rice、*Oryza sativa* L. ¹⁾

② 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見られない。近縁野生種は世界中の熱帯・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。遺伝的多様性の中核地域は、インド東北部のアッサム地方、ラオス、中国雲南省南端のシーサンパンナ・タイ族自治州、ミャンマーと北部タイの範囲であると考えられている。これらの地域はいずれも山岳地帯、丘陵地帯であり複雑な地形を有する地域である¹⁾。

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。南アジア及び東南アジアの雑草イネの特性として栽培種イネと野生種イネの交雑のみでなく、栽培種イネどうしの交雑でも生じたことが示されていること^{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に由来するものであり、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

① 国内及び国外における栽培の歴史

O. 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¹⁾。

日本へは縄文時代晩期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⁴⁾。我が国の農耕の歴史とともに存在し、現

在も最も重要な作物として広く栽培されている。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

イネは非常に広範な地域で栽培されており、北はロシアと中国国境のアムール川の河畔（北緯53度）から南はアルゼンチン中央部（南緯40度）にわたる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、玄米の総生産量は5億トンを超える。生産量はアジア（90%以上）、中南米、アフリカ、北米、旧ソ連、ヨーロッパの順となっている。我が国でも栽培地は北緯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⁾。

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播栽培もあるが、苗を移植する栽培法が一般的である。

我が国でのコメの流通実態は、約800万トンが国内で生産され、ほとんどが国内消費向けに流通している。輸入は77万トン程度である。流通量の約92%が主に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 基本特性

本来は多年性であるが栽培上は一年生作物として扱われる。部分他殖性の風媒花であり、通常的环境下では開花と同時に高率で自家受粉が行われる。イネは茎、葉、根、穂の各器官で構成されている。根は種子根と冠根に区別される。冠根は地上部の節部から発生する。茎は地上部の骨格をなすもので、ところどころ節で区切られ、伸長した節間は中空である。葉は葉身と葉鞘からなる。穂は茎の最上節につく。穂は総状花序型の分枝を呈す⁶⁾。

ロ 生息又は生息可能な環境の条件

イネの生育時期別の限界温度、最適温度を表1に示す。

イネの生育最低温度は10～12℃、通常の栽培可能温度は20℃以上で、開花結実には22℃を必要とする。逆に34℃以上では高温障害が発生する。水稻は湛水条件(水田)で栽培する。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな植物であり、灌水がなく土壌水分が表層土で10%以下、下層土で12%以下で干ばつ害が発生する。

表1 イネの生育時期別の限界温度、最適温度(単位:℃)

生育時期	限界温度			生育時期	限界温度		
	低	高	最適		低	高	最適
発芽	10	45	20～35	幼穂分化	15	—	—
出芽・苗立ち	12～13	35	25～30	幼穂形成	15～20	38	—
活着	16	35	25～28	開花	22	35	30～33
葉の伸長	7～12	45	31	登熟	12～18	30	20～25
分けつ	9～16	33	25～31				

ハ 捕食性又は寄生性

捕食性、並びに寄生性は認められていない。

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

イネは種子繁殖であり、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、一般に脱粒性は低い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で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⁾。一方、土壌中に種子が埋蔵された場合、赤米が3年以上の寿命があるのに対し、一般の白色米の種子では一部に翌年発芽するものもあるが、大部分の種子が発芽能を失う⁶⁾。

② 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。これは、“ひこばえ”と呼ばれる新しい分けつが節から発生し生長するものであるが、我が国の露地栽培においては温暖地域（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。

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

イネは自殖性が非常に高い作物である。他殖性の程度を示す情報として、開花期間の重複する糯品種と粳品種とを用いた花粉飛散による交雑試験の結果、隔離距離が4.5 mの場合は交雑率が0.6%以下、10mでは0.04%以下であることが報告されている⁸⁾。しかし、北海道立農業試験場のデータでは、種子親の低温による雄性不稔化処理、強風、大面積の花粉源等の条件が重なった特殊な状況では、600 m程度の長距離交雑も起こりうるということが報告されている。近縁野生種である *O. nivara*、*O. rufipogon*等は、栽培イネと交雑可能である。国外では、それらが自生している地域もあるが、我が国に自生しているという報告はない。また、自家不和合性及びアポミクシスについての報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの穎花は、1葯当たり1000個以上の花粉が詰まった6本の葯を持つ。花粉の稔性はほぼ100%、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。基本的に自家受粉作物で、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⁾。花粉の飛散による交雑距離としては、上記の様に特殊な条件下では600 mまで交雑が認められた例もあるが、多くの報告では10 m程度とされている。花粉の寿命は一般に3~5分¹¹⁾、最大で10分程度とされる。

ホ 病原性

病原性は認められていない。

へ 有害物質の産生性

レタスを用いたプラントボックス法によってイネのアレロパシー(他感物質を産生することによる周囲の野生植物の生育抑制)能について検討した藤井らの報告によると、水稻の中には、アレロパシーを示すものが存在している。この性質は品種間差が大きく、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、概して日本の栽培品種のアレロパシー活性は低い¹²⁾。他感物質の残存期間は長くて数ヶ月程度と考えられている。

ト その他の情報

障害不稔が発生すると玄米の蛋白質含量が高くなる¹³⁾。

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（シンク能改変イネ（*CKX2/Gn1a* 改変イネ系統）*O. sativa* L.；NIAS16-0SCas-Gn1a）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2に示した。

表2 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
発現カセット1		
カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター(<i>P35S</i>)	1.6 kb	カリフラワーモザイクウイルス由来、35Sプロモーターを2連結した配列
<i>ADH</i> 5'UTR 翻訳エンハンサー領域	0.1 kb	イネ由来、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子5'UTR 翻訳エンハンサー領域配列
核移行シグナル(<i>NLS</i>)	15 bp	SV40（シミアンウイルス）由来、核移行シグナル配列
<i>OsCas9</i> 遺伝子 (目的遺伝子)	4.0 kb	<i>Streptococcus pyogenes</i> 由来、イネのコドンユーザーに最適化したCas9ヌクレアーゼ遺伝子
<i>rbcs</i> ターミネーター (<i>Tpea3A</i>)	0.3 kb	エンドウ由来、 <i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit</i> 遺伝子のターミネーター配列。転写終結を規定
発現カセット2		
<i>OsU6-2</i> プロモーター (<i>PosU6-2</i>)	0.3 kb	イネ由来、RNAポリメラーゼ III 依存型 <i>U6</i> 遺伝子プロモーター配列
Guide RNA (Target 配列 + Guide RNA common)	0.1 kb	サイトカイニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ： <i>OsCKX2</i> (<i>Gn1a</i> 遺伝子座) 遺伝子中の20bpと、Cas9 の足場となる80bp のキメラ分子
<i>PolyT</i>	25 bp	PolyTシグナル配列
発現カセット3		
<i>OsACT3'</i> UTR	1.0 kb	イネ由来、アクチン遺伝子3'非翻訳領域配列
カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター(<i>P35S</i>)	0.8 kb	カリフラワーモザイクウイルス由来、35Sプロモーター
<i>HPT</i> 遺伝子 (<i>HPTII</i>)	1.1 kb	大腸菌由来。抗生物質ハイグロマイシン B に耐性を示す。遺伝子組換えイネの選抜マーカー
<i>Oshsp3'</i> UTR	0.2 kb	イネ由来、ヒートショックプロテイン3'UTR配列
<i>hsp</i> ターミネーター (<i>Oshsp17.3Ter</i>)	1.0 kb	イネ由来、ヒートショックプロテインターミネーター配列。転写終結を規定

ロ 核酸供与体の性状

- ・イネ：第一章 1. 宿主または宿主の属する分類学上の種に関する情報を参照。
- ・エンドウ：マメ科の一・二年草。広く栽培され、食用となっている。古代オリエント地方や地中海地方で麦作農耕の発祥とともに栽培化された豆で、原種は近東地方に今日でも野生している *P. humile* Boiss. et Noö. と推察されている
- ・カリフラワーモザイクウイルス：植物に感染するウイルスで、カリモウウイルス科カリモウウイルス属に属す。ゲノムは環状二本鎖DNAであるが、逆転写酵素を持ち増殖過程でRNAを介して複製する（パラレトロウイルス）。
- ・大腸菌：グラム陰性の桿菌で通性嫌気性菌に属し、環境中に存在するバクテリアの主要な種の一つである。この菌は腸内細菌でもあり、温血動物（鳥類、哺乳類）の消化管内、特に大腸に生息する。
- ・*Streptococcus pyogenes*：化膿レンサ球菌は、レンサ球菌属に属するグラム陽性球菌で、顕微鏡下では連鎖状の配列をとる。鞭毛を持たないため非運動性であり、菌株によっては莢膜を有するものもある。芽胞は形成しない。通性嫌気性菌であるため、酸素の存在下でも、酸素が存在しない環境でも生育しうるが、やや嫌気性の環境を好む。
- ・シミアンウイルス40 (SV40)：アカゲザルの培養した腎臓細胞から単離されたポリオーマウイルスの一種。このウイルスは実験動物でがんの原因となることが示されているが、ヒトにおいてがんを引き起こすという証拠はない。

ハ 構成要素の機能

本遺伝子組換えイネは、表2に示した発現カセット1の働きにより、*S. pyogenes* 由来の *Cas9* 遺伝子及び Guide RNA (gRNA) が全組織で発現する。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルスに由来する全身発現プロモーターである。また、

発現カセット 2 の働きにより、*OsCKX2* (*Gn1a*) 遺伝子中の 20bp と、Cas9 の足場となる 80bp のキメラ分子 (gRNA) が *U6* プロモータの制御により発現することで、特異的 DNA 標的部位へ RNA-DNA 塩基対形成を介して Cas9 / gRNA 複合体を誘導する。

加えて、表 2 に示した発現カセット 3 から大腸菌由来 *HPT* 遺伝子を植物体全体で発現することにより、抗生物質であるハイグロマイシン B (以下「ハイグロマイシン」という。) に耐性を示す。

ニ 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

a. 発現カセット 1 (目的遺伝子発現カセット)

イ) カリフラワーモザイクウイルス *35S* プロモーター (*P35S*)

カリフラワーモザイクウイルス由来 *35S* プロモーター。目的遺伝子を構成的に発現させる。

ロ) *ADH* 5' *UTR* 翻訳エンハンサー領域

イネ由来アルコールデヒドロゲナーゼ 5' 非翻訳領域に存在する翻訳増強配列。

ハ) 核移行シグナル (*NLS*)

SV40 (シミアンウイルス) 由来、核移行シグナル配列。Cas9 蛋白質を核へ移行させる。

ニ) *OsCas9* 遺伝子 (目的遺伝子)

Streptococcus pyogenes 由来、イネのコドンユーセージに最適化した Cas9ヌクレアーゼ遺伝子。

ホ) *rbcs* ターミネーター (*Tpea3A*)

エンドウ由来、*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit* 遺伝子に由来するターミネーター配列であり、構造遺伝子である *OsCas9* 遺伝子の 3' 末端に接続して、転写を終結する機能を担う

配列である。

b. 発現カセット 2 (目的遺伝子発現カセット)

i) *OsU6-2* プロモーター (*PosU6-2*)

イネ由来、RNA ポリメラーゼ III 依存型 *U6* 遺伝子プロモーター配列。
目的遺伝子を構成的に発現させる。

ii) Guide RNA (Target 配列+ Guide RNA common)

OsCKX2/Gn1a 遺伝子 (*Gn1a* 遺伝子座) 中の 20bp (*OsCKX2/Gn1a* 全長 5583bp のうち、■■■■-■■■■bp) と、Cas9 の足場となる 80bp のキメラ分子

iii) *PolyT*

PolyT シグナル配列

c. 発現カセット 3 (選抜マーカー遺伝子発現カセット)

i) カリフラワーモザイクウイルス *35S* プロモーター (*P35S*)

カリフラワーモザイクウイルス由来 *35S* プロモーター。目的遺伝子を構成的に発現させる。

ii) *HPT* (*Hygromycin phosphotransferase*) 遺伝子

大腸菌由来、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与する。本カセットを導入した遺伝子組換えイネの選抜マーカーとして用いる。

iii) ヒートショックプロテイン 3' 非翻訳領域配列 (*Oshsp3' UTR*)

イネ由来ヒートショックプロテイン遺伝子 3' 非翻訳領域配列は、mRNA の安定性やタンパク質の翻訳を調節している幾つかの認識部位が存在している。

iv) ヒートショックプロテインターミネーター (*Oshsp17. 3Ter*)

イネ由来ヒートショックプロテイン遺伝子ターミネーター配列は、構造遺伝子である *HPT* の 3' 末端に接続して、転写を終結する機能を担う配列である。

ホ *Streptococcus pyogenes* 由来 CRISPR-Cas9 システムについて

本来、CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR Associated Proteins 9) システムは外来性ウイルスやプラスミドへの獲得免疫を与える微生物の適応免疫システムとして、細菌や古細菌において発見されたものである。近年、このシステムの発見により、植物由来のあらゆる遺伝子に対して高い効率でノックアウトすることが可能となっている¹⁴⁾。

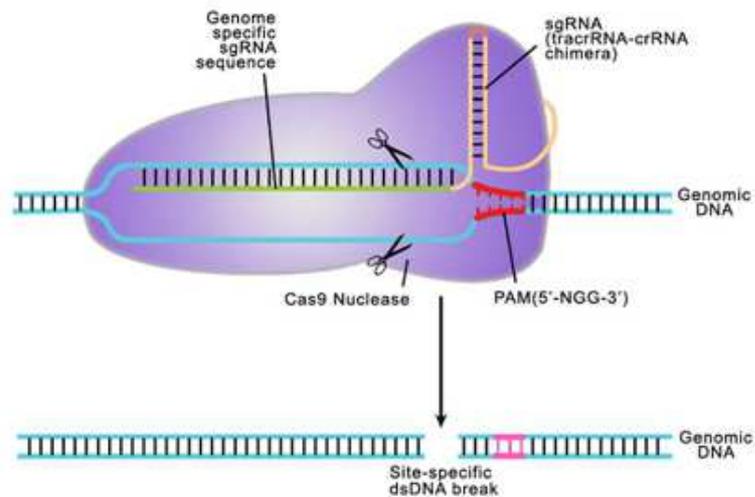
- S. pyogenes* 由来 CRISPR-Cas9 システムを利用した標的ゲノム編集は、
- 1) エンドヌクレアーゼと、短鎖 gRNA といった 2 つの要素から構成される。エンドヌクレアーゼは、*S. pyogenes* 由来の Cas9 ヌクレアーゼタンパク質で、2 つの DNA 切断ドメイン (RuvC1 と HNH 様ヌクレアーゼドメイン) を保有し、これが二本鎖の DNA を切断して二本鎖切断 (DSB) を誘導する。
 - 2) gRNA は設計された単鎖キメラ RNA であり、細菌性 tracrRNA の足場機能と細菌性 crRNA の特異性を併せ持っている。gRNA の 5' 末端側の最後の 20 塩基はホーミング装置として働き、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の直前に位置する特異的 DNA 標的部位へ RNA-DNA 塩基対形成を介して Cas9/gRNA 複合体を動員する。
 - 3) PAM 配列は、生物系統や CRISPR-Cas9 タンパク質の種によって異なり、*S. pyogenes* Cas9 に対応する配列は 5'-NGG である。そのため、現在利用可能な CRISPR-Cas9 システムは、いかなる 5'-N20-NGG DNA 配列へも配向し、精度の高い二本鎖切断 (DSB) を産生することが可能である。
 - 4) 二本鎖切断は、その後非相同性末端結合と相同組換え型修復という、ほぼ全ての細胞種や生物種に存在する 2 種の修復機能のいずれかによって修復を受ける。

本組換えイネは、上記 *S. pyogenes* 由来CRISPR/Cas9システムを利用し、gRNAとして *OsCKX2/Gn1a* 遺伝子¹⁵⁾上の20bp（第1染色体上腕部：-）の複合体を形成させることにより、*OsCKX2/Gn1a* 遺伝子のエクソン領域に対する切断・修復の過程において変異誘発を促した系統である。この変異誘発によるトリプレッドコドンの読み枠がずれることにより、ストップコドンを生ずることによって、*OsCKX2/Gn1a*が遺伝子破壊（ノックアウト）された複数の系統を作出した。これらの系統について、隔離ほ場栽培での形態特性及び収量パフォーマンス等について調査していく。

へ *OsCKX2/Gn1a* 遺伝子について

S. pyogenes 由来CRISPR/Cas9システム¹⁴⁾により特異的変異挿入ターゲットとなった *OsCKX2/Gn1a*（サイトカイニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ2遺伝子）は、サイトカイニン*の分解反応を触媒する酵素をコードしている。本酵素は側鎖を切断し、アデニンと側鎖由来ブテナール化合物を生ずる。シロイヌナズナやイネ、トウモロコシ等での研究から、CKXは多重遺伝子族を構成しており、各遺伝子で発現場所や発現様式が異なることが明らかになっている。*OsCKX2/Gn1a*はイネの花の分裂組織（幼穂原基）などで発現しており、既存品種の「ハバタキ」では、本遺伝子の変異により発現レベルが下がることで、花芽の分裂組織中のサイトカイニン分解活性が低くなるため、サイトカイニン含量が局所的に増加し、細胞分裂活性を高めたことから花の数が増加し、結果的にイネの籾数が増加したものと考えられている¹⁵⁾。またノックアウト型の変異遺伝子が中国の「5150」系統で見ついている。この系統の形態学的特性として、「ハバタキ」以上の一穂籾数や枝梗数の増加が報告されている¹⁵⁾。

* サイトカイニン：植物ホルモンの1種。細胞分裂の促進、腋芽の活性化などの生理活性を持つ。アデニンの6位の窒素原子に炭素5つのプレニル基をもつ構造が基本骨格であり、側鎖構造の違いによりトランスゼアチン、イソペンテルアデニンなどが知られている。



(コスモバイオ HP より)

図 1 CRISPR/Casシステムによる標的遺伝子切断に必要なパーツ

gRNA の末端20塩基がホーミング装置として機能し、Cas9エンドヌクレアーゼを適切な標的配列へと動員する。その後、Cas9の2つの切断ドメインによりPAM配列の3~4塩基下流に二本鎖切断が作られる。DSBはその後、誤りを生じがちな非相同性末端結合経路または鋳型依存性の相同組換え型修復により修復される。

Cas9 = Nuclease

sgRNA = GuideRNA (gRNA)ともいう。PAM配列 (NGG) の手前20bpとCas9の足場となる80bpのキメラ分子

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

pZDgRNAGn1a/Cas9ver2/HPT (由来の詳細は、次項に記載)

ロ 特性

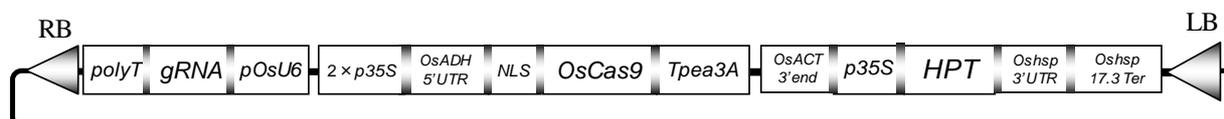


図2 本遺伝子組換えイネ作出に用いた形質転換用ベクターの
発現カセットの構造(11.2kb)

(RB : T-DNA領域ライトボーダー、LB : T-DNA領域レフトボーダー)

polyT : polyTシグナル配列 (25bp)

gRNA: Guide RNA (Target 配列+ Guide RNA common) (0.1kb)

pOsU6: *OsU6-2*プロモーター (0.3kb)

$2 \times p35S$: カリフラワーモザイクウイルス *35S*プロモーター (1.6 kb)

OsADH 5' UTR : アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子5' UTR翻訳エンハンサー領域配列 (0.1 kb)

NLS: 核移行シグナル(15bp)

OsCas9 : イネコドンユースージ最適化 *Cas9*ヌクレアーゼ遺伝子 (4.0kb)

Tpea3A : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit 遺伝子のターミネーター配列 (0.3kb)

OsACT3' UTR : イネアクチン遺伝子3' 非翻訳領域配列 (1.0kb)

p35S : カリフラワーモザイクウイルス *35S*プロモーター (0.8 kb)

HPT : ハイグロマイシン耐性遺伝子 (1.1 kb)

Oshsp3' UTR: イネヒートショックプロテイン17.3遺伝子3' 非翻訳領域配列 (0.2 kb)

Oshsp17.3Ter : イネヒートショックプロテイン17.3ターミネーター配列 (1.0 kb)

本ベクターの基となったpZD202は、pIG121-HmベクターのNPTII及びGUS発現カセット領域に対して、ポリリンカー領域を置換したベクターである。したがってベクターバックボーン領域の由来はpBR322を原体としたpBIN19プラスミドである。pBIN19は、DNA複製開始点ori配列を持つ2本鎖環状DNAであり、微生物においてカナマイシン耐性を発現し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。

ベクターを有するアグロバクテリウムの感染により、基本的には右側境界配列(RB)と左側境界配列(LB)に挟まれた領域のDNA(T-DNA領域)が宿主植物の染色体に伝達される。T-DNA領域外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入された核酸は交配によってのみ伝達される。宿主である細菌に哺乳動物等に対する病原性を付与することは知られていない。

(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

バイナリーベクターの構成要素は表2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は図2に示した。

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によった。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミドを保持したアグロバクテリウムをイネ種子胚盤由来のカルスに感染させ、ハイグロマイシン(40 μ g/ml)を含む選抜培地で耐性遺伝子が移入された細胞を選抜し、再分化させることにより、遺伝子組換えイネ再分化当代(T₀)を得た。このT₀個体群を閉鎖系温室で栽培、自殖種子(T₁系統群)を得た。これらの種子から発芽、成長した個体を栽培し、自殖後代の種子(T₂系統群)を得た。

得られたT₁あるいはそれ以降の後代については、それぞれの系統の種子から発芽した植物体について、アグロバクテリウムの残存性確認作業

を行っているため、アグロバクテリウムが残存していることはない。具体的には、後代種子から発芽した植物体を種子ごと乳鉢ですり潰し、滅菌水を 1ml 加えけん濁した後、上澄み 100ul をカナマイシン、ハイグロマイシン、クロラムフェニコールを含む LB 培地に塗布した。28 度で 3 日間培養後、アグロバクテリウム由来のコロニーの有無を調査し、残存性がないことを確認している。

本隔離ほ場栽培では、これらアグロバクテリウムが残存していないことを確認した系統の T₂ 世代以降の種子を使用する。

ニ 第一種使用等を行う系統について

本申請は、上記の手順によって *Oryza sativa* L. に属する複数の品種を原品種に用いて得られたゲノム編集系統後代を隔離ほ場で栽培し、以下のような項目について解析することを目的としている。

1. 隔離ほ場に展開した本遺伝子組換えイネ後代における CRISPR/Cas9 システムにより創生された変異挿入配列に関する調査。
2. 隔離ほ場に展開した本遺伝子組換えイネ系統後代の草丈、稈長、有効分けつ数等の生育調査。
3. 収穫後の乾物重量、一穂粒数、種子稔実率、千粒重等の収量性調査。

本遺伝子組換えイネ系統後代では、最大40程度の系統選抜を目的とした栽培を計画している。栽培個体については系統・世代が判別できる管理を行う。

以降記載する(4)～(6)の情報は、本申請で使用する全ての系統のものではなく、先行して得られた「北陸193号」を原品種とした一部の系統について示している。特に(6)については、このうち *OsCKX2/Gn1a* 遺伝子の開始コドンから [] 塩基目に [] 変異の導入によるフレームシフトによりストップコドンが導入され、*OsCKX2/Gn1a* 全長565アミノ酸残基のうち [] 番目のアミノ酸残基までと、読み枠がずれたことにより

変化した■アミノ酸残基の合計■番目のアミノ酸残基までとなることで、*OsCKX2/Gn1a*の機能が破壊されたと推定される系統である「15-23-20a」を用いるが、以下の理由から、生物多様性影響を生じさせるおそれがないと評価することは可能であると考えられる。

- ・ 交雑可能な野生植物が我が国には存在しないこと。
- ・ 本遺伝子組換えイネの栽培が管理された極めて限られた水田で行われ、隔離距離の確保や持ち出しを防止する施設・措置などにより、本遺伝子組換えイネ系統後代の、隔離ほ場からの散逸防止策を講じていること。
- ・ *OsCKX2/Gn1a* について、「15-23-20a」系統と異なった変異（欠失、挿入等）が導入された場合でも、*OsCKX2/Gn1a* 遺伝子の機能が失われている「15-23-20a」系統よりも顕著な影響を生じることは想定されないこと。

(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. 移入された核酸の複製物が存在する場所

ゲノム DNA を用いた PCR 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が示唆された。図 3 は *HPT* 配列を利用した PCR 増幅により導入遺伝子の有無を確認した結果である。導入遺伝子がオルガネラゲノム上に挿入されている場合には自殖後代 (T_1 世代等) のすべての個体が導入遺伝子を持つはずであるが、図 3 に示す様に、自殖後代で導入遺伝子を持つ個体ともたない個体が分離して出現したことから、移入した核酸が宿主の染色体上に存在していると判断された。

加えて、サザンブロットハイブリダイゼーション解析の結果、系統ごとに異なるサイズの移入核酸のバンドが検出されており(図 4)、これは、核酸が移入された宿主ゲノムの位置が系統ごとに異なることから、核酸の移入部位での、プローブ部位の外側に存在する制限酵素認識部位までの距離が様々であることを反映したものである。これは、アグロバクテリウム法により移入された T-DNA が宿主染色体の任意の位置に移入された場合の典型的なパターンである。

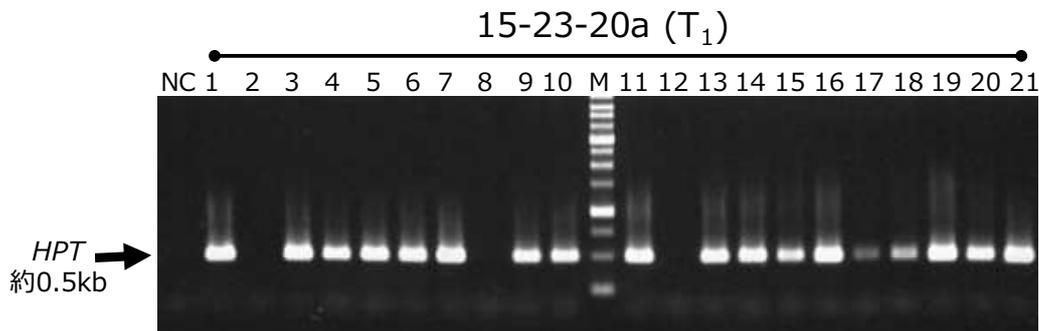


図3 先行系統(15-23-20a)の T_1 世代の種子 21 粒から発芽した個体における、*HPT* 遺伝子の移入の有無。矢印の位置のバンドが PCR 法で増幅した導入遺伝子であり、No. 2, 8 及び 12 は *HPT* 遺伝子を持たない。

増幅箇所: 導入発現カセットの *HPT* 遺伝子領域 (*HPT* 遺伝子全長 1.1kb のうち約 0.5kb)
M: サイズマーカー、NC: 原品種 (ネガティブコントロール)

以上から、移入された核酸の複製物は宿主染色体ゲノム上にあると推察される。また、以上の結果より、今後得られる系統についても、移入された核酸の複製物は宿主染色体ゲノムにのみ存在することが推察される。

ロ. 移入された核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性

先行して得られた一部の系統のサザンブロットハイブリダイゼーション (図4) から、これらの系統については、ハプロイド当たり 1~4 コピーであると推察される。一般的にアグロバクテリウム法で宿主ゲノム上に移入される核酸のコピー数は 1 コピーから数十コピーとなるものまでである。コピー数がジーンサイレンシング等の効果により、発現量等に影響を与えることは知られているため、仮にコピー数が増加しても発現量は頭打ちになることが想定される。目的遺伝子の発現量と、それに伴う表現形質が重要であることから、全系統のコピー数自体のデータがなくても生物多様性への影響がないと判断することは可能であると考えられる。



図4 サザンブロット解析を用いた移入核酸の検出による、移入コピー数の推定 (DNA プローブ配列には、*OsCas9* (4kb) 中の 1kb の断片を用いた)

なお、別途供試系統の初期世代間でのバンドパターンを調べたところ、バンドの分離が認められるものあったが、それぞれのバンドの分子量は親のバンドサイズと一致しており、新たなバンドは出現していない。このことから、移入した核酸は各世代で染色体上に安定に保持されていることが示された。

また、導入した *OsCas9* 発現カセットが分離した個体の場合 (レーン4、8)、発現カセットを示すバンドは認められない。隔離ほ場栽培試験においては、導入発現カセットが分離した後代系統を使用する予定である。

ハ. 個体間及び世代間での発現の安定性

目的遺伝子の発現安定性について、NIAS16-*OSCas-Gn1a*の T_0 及び T_1 世代の緑葉におけるノーザンブロット解析を行うことで、同一系統の世代間、個体間で安定して発現していることが確認された (図5)。また、サザンブロット解析の結果、導入した *OsCas9* 発現カセットの分離が確認された個体の場合 (レーン2、7)、*OsCas9* 遺伝子の発現は認められない。

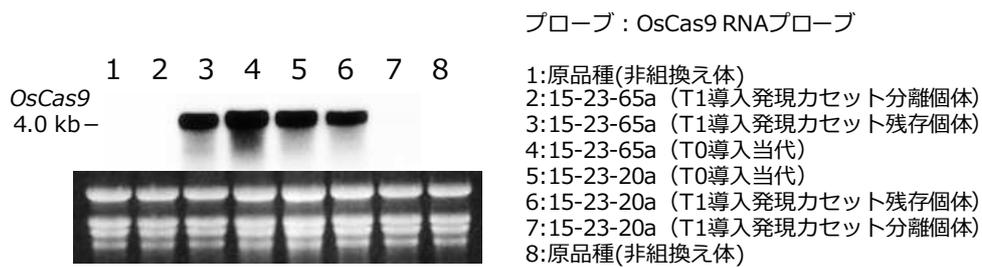


図5 ノーザンブロット解析による、本遺伝子導入系統の個体間及び世代間での転写レベルにおける発現の有無（RNAプローブ配列には、*OsCas9*（4kb）中の1kbの断片を用いた）

ニ. 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等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

我が国に交雑可能な近縁野生種が自生していないことから、該当しない。

(5) 遺伝子組換えの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

供与核酸の配列に基づいて設計したプライマー対を用い、PCRを行うことで、移入遺伝子を特異的に検出することが可能であり、その感度については、約50ngの全DNAを鋳型として供すれば、検出可能である。また、サザンブロットハイブリダイゼーションによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約1 μ gの全DNAを用いれば検出可能である。

加えて、移入遺伝子の働きによって生じた、ターゲット遺伝子に挿入された変異は、仮に移入遺伝子が分離世代で抜け落ちたとしても、挿入変異部位のシーケンス解析によりその有無を検出可能である。

(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な内容

本遺伝子組換えイネは、宿主と異なり、選抜マーカー遺伝子発現カセットの移入により、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性が付与されている。

また、gRNA発現カセットの移入により、gRNAが構成的に転写発現しているが、その産物は特異的DNA標的部局へRNA-DNA塩基対形成を介してCas9/gRNA複合体を誘導させるものであり、アミノ酸への翻訳はされない。そのため生理学的または生態学的特性は伴わないと考えられる。

加えて、*S. pyogenes*由来*OsCas9* 遺伝子発現カセットの導入により、原品種が保有しない*OsCas9* 遺伝子の転写レベルでの発現が認められている。

一方で、CRISPR/Cas9システムの働きにより、特異的ターゲットである*OsCKX2/Gn1a*遺伝子への2本鎖切断に伴う修復過程での変異挿入により*OsCKX2/Gn1a*の機能が欠損する、または機能が低下することで、花芽の分裂組織中のサイトカイニン分解活性が低くなるため、サイトカイニン含量が局所的に増加し、細胞分裂活性を高めることから花の数が増加し、結果的にイネの一穂粒数や枝梗数の増加が期待できる¹⁵⁾。なお、「15-23-20a」系統のように、1塩基挿入の変異が生じた場合には、フレームシフトが起こり、機能欠損となることが期待される。また、低頻度ではあるが塩基の置換により、アミノ酸配列が変化した場合には、機能低下となることも期待される。

なお、既存品種である「ハバタキ」においては、転写レベルでの発現低下をもたらす変異によって、*OsCKX2/Gn1a*の活性が低下しており、中国の「5150」系統では構造遺伝子上の変異によって、*OsCKX2/Gn1a*の機能が欠損している。

また、CRISPR/Cas9システムの働きによる標的座位（標的配列）以外の変異挿入（オフターゲット）について、その特異性を決定する20bpのgRNA配列のデザインにおいて、イネゲノム上で特異性を示すスコアの高い配列（オフターゲットへの変異挿入が起こりづらい配列）をCRISPR-Pソフト（<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>）¹⁶⁾で選定した。その結果、選定配列に対しオフターゲットの候補として挙げられた配列は存在するものの、それらの配列のうちオフターゲットスコアが1.0（ミスマッチが1塩基も無い場合のスコアは100）を超えるものは、構造遺伝子のアミノ酸配列に影響をおよぼさないインタージェニック領域やイントロン配列上に変異挿入をもたらす領域であることを確認している。

加えて後述の通り、申請系統の生理学的又は生態学的特性において、一穂粒数や枝梗数の増加以外の変化は、これまでに認められていない。

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がある場合はその程度

1) 形態及び生育の特性

先行して得られた系統について、温室における観察では、登熟後期の草丈(表3)、稈長(表4)、穂長(表5)、有効分げつ数(表6)に示すように、特筆すべき形態学的差異は認められなかった。一方、表7および9に示すとおり、温室で生育させた本遺伝子組換えイネの一穂当たりの1次枝梗数、粒数は、宿主のそれよりも有意に多い。

表3 草丈（登熟後期）

	草丈 (cm)
宿主	119.2 ± 5.5
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	118.4 ± 4.7

宿主（非組換え体）8個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（8個体）の草丈の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の草丈は、宿主のそれに対し有意な差は認められない（P=0.43）。

表4 稈長（登熟後期）

	稈長 (cm)
宿主	79.8 ± 4.3
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	80.3 ± 5.6

宿主（非組換え体）8個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（8個体）の稈長の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の稈長は、宿主のそれに対し有意な差は認められない（P=0.17）。

表5 穂長（登熟後期）

	穂長 (cm)
宿主	19.8 ± 1.5
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	20.2 ± 2.2

宿主（非組換え体）8個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（8個体）の穂長の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の穂長は、宿主のそれに対し有意な差は認められない（P=0.35）。

表6 有効分げつ数（登熟後期）

	有効分げつ数 (本)
宿主	14.2 ± 5.3
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	13.4 ± 7.1

宿主（非組換え体）8個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（8個体）の有効分げつ数の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の有効分げつ数は、宿主のそれよりも有意な差は認められない（P=0.67）。

表7 1次枝梗数（3穂平均）

	1次枝梗数 (本)
宿主	■ ± ■
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	■ ± ■ **

宿主（非組換え体）5個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（5個体）の1次枝梗数の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の1次枝梗数は、宿主のそれよりも有意に多い（**：有意水準 1 %、P=0.821710E-04）。

表8 2次枝梗数 (3穂平均)

		2次枝梗数(本)	
宿主		■	± ■
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a		■	± ■

宿主（非組換え体）5個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（5個体）の2次枝梗数の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の2次枝梗数は、宿主のそれに対し有意な差は認められない（P=0.32）。

表9 一穂粒数 (3穂平均)

		一穂粒数(粒)	
宿主		■	± ■
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a		■	± ■*

宿主（非組換え体）5個体、NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a系統（5個体）の一穂粒数の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の一穂粒数は、宿主のそれよりも有意に多い（*:有意水準 5 %、P= 0.034）。

出穂期、開花期、発芽特性等の生育特性について、承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

2) 生育初期における低温耐性

本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

3) 成体の越冬性又は越夏性

標的遺伝子の性質や既存品種の性質から見ても、越冬性に変化が生じるとは考えにくい。承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植

物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

4) 花粉の稔性及びサイズ

本申請は限定された隔離ほ場において、農林水産省が「第一種使用規定承認組換え作物栽培実験指針」で定める交雑防止措置やモニタリング措置等を執りつつ栽培するもので、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

5) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産性については承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。第二種使用等（屋内栽培）における栽培管理に当たっての取扱い経験からは、休眠性、発芽率に特筆すべき差異は認められなかった。また、脱粒性については、組換えイネ系統の3個体を用いて、1個体あたり4穂の成熟期の穂を握って脱粒程度を調査した。その結果、組換えイネ系統と宿主の間に相違は認められなかった（表10）。

表10 脱粒性

	脱粒性
宿主	やや難
NIAS16-0SCas-Gn1a 15-23-20a	やや難

他の系統についても、*Cas9* 遺伝子の導入により宿主の脱粒性を大きく逸脱するものは認められない。

極難-難-やや難-中-やや易-易-極易の7段階評価。「稲種苗特性分類と審査基準」に基づく。

6) 交雑率

我が国に交雑可能な近縁野生種が自生していないことから、調査は

行なっていない。

7) 有害物質の産生性

選抜マーカーである HPT タンパク質に毒性があるという報告はなく、また、同タンパク質（APH4と記載されているがHPTと同じもの）を発現する遺伝子組換え作物（ワタCOT102系統）が組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されている（平成24年7月19日厚生労働省告示第432号）ことから、同タンパク質に毒性があることは考えにくい。また、Cas9タンパク質に毒性があるという報告はなく、Cas9タンパク質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、国立医薬品食品衛生研究所が公開しているアレルゲンデータベース(ADFS)を用いてBLASTアルゴリズムによって比較したところ、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

以上のことから、本遺伝子組換えイネで有害物質が産生され、野生動植物等に影響を与えることは考えにくい。

本遺伝子組換えイネ及び宿主の産生する物質が他の植物に与える影響を比較するため、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターにより *Cas9* 遺伝子を常時発現する遺伝子組換えイネ（*Cas9* 発現イネ、*Oryza sativa* L. ; NIAS16-0SCas-Gn1a）を用い、後作土壌及び細かく刻んだ葉を混合した鋤込み土壌でのレタスの発芽及び生育の比較を行った。その結果、遺伝子組換えイネと宿主の間で有意差が認められなかった（表11及び表12）ことから、供試した遺伝子組換えイネは宿主と比較して、有害物質の産生性に変化がなく、他の系統でも同様であると推察される。

表11 イネを栽培した後の土壌に播種したレタスの発芽率、新鮮重及び下胚軸長

	発芽率 (%)	P値	新鮮重 (mg/10個体)	P値	下胚軸長 (cm)	P値
非組換え系統	86.5±0.04		396.6±14.8		1.29±0.07	
NIAS16- OSCas-Gn1a 15-23-20a	90.5±0.07	0.22	375.7±45.9	0.48	1.22±0.08	0.32

イネ 3 個体を栽培した後の土壌（ボンソル 1 号、住友化学）に播種したレタス（キングクラウン：サカタ）の、播種 5 日後（明所、気温 25 度の条件に維持）の発芽率、新鮮重及び下胚軸長の平均値（発芽率：30 粒あたりの発芽率を 3 反復、新鮮重：10 個体当たりの新鮮重を 5 反復、下胚軸長：25 個体の平均値）。宿主（非組換え体）または本遺伝子組換えイネを栽培した後の土壌のいずれを用いても、発芽率等について有意差はない（Student t-検定、 $P > 0.05$ ）。

表12 イネの葉を混合した土壌に播種したレタスの発芽率、新鮮重及び下胚軸長

	発芽率 (%)	P値	新鮮重 (mg/10個体)	P値	下胚軸長 (cm)	P値
宿主	89.0±0.04		274.0±13.06		3.43±0.13	
NIAS16-OSCas-Gn1a 15-23-20a	90.7±0.04	0.70	266.7±6.94	0.52	3.20±0.08	0.85

微粉末化したイネ 3 個体分の葉を、重量比 5% で培土（花三昧、サカタ）に混合し、同土壌に播種したレタス（キングクラウン：サカタ）の、播種 5 日後（明所、気温 27 度の条件に維持）の発芽率、新鮮重及び下胚軸長の平均値（発芽率：30 粒あたりの発芽率を 3 反復、新鮮重：10 個体当たりの新鮮重を 5 反復、下胚軸長：25 個体の平均値）。宿主または、本遺伝子組換えイネを栽培した後の土壌のいずれを用いても、発芽率等について有意差はない（Student t-検定、 $P > 0.05$ ）。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

本遺伝子組換え系統の第一種使用等隔離ほ場栽培については、T₂世代以降の後代系統（図6）を隔離ほ場で栽培し、導入遺伝子（*OsCas9*）の働きで生じた *OsCKX2/Gn1a* 遺伝子へ変異挿入により、シンクキャパシティーに対する変化の有無や、生育、収量調査を通して最終的に収量性や草型にどのような影響をもたらすかを調査し、その結果を踏まえて系統選抜を進めていく。なお、隔離ほ場での栽培に用いるものは、図3、4、5で示した手法と同様の解析を行い、バンドが確認されない後代に限定するため（図6）、一部の導入遺伝子が脱落している可能性があるが、これは通常の遺伝子組換え植物の後代でも同様に起こりうることである。

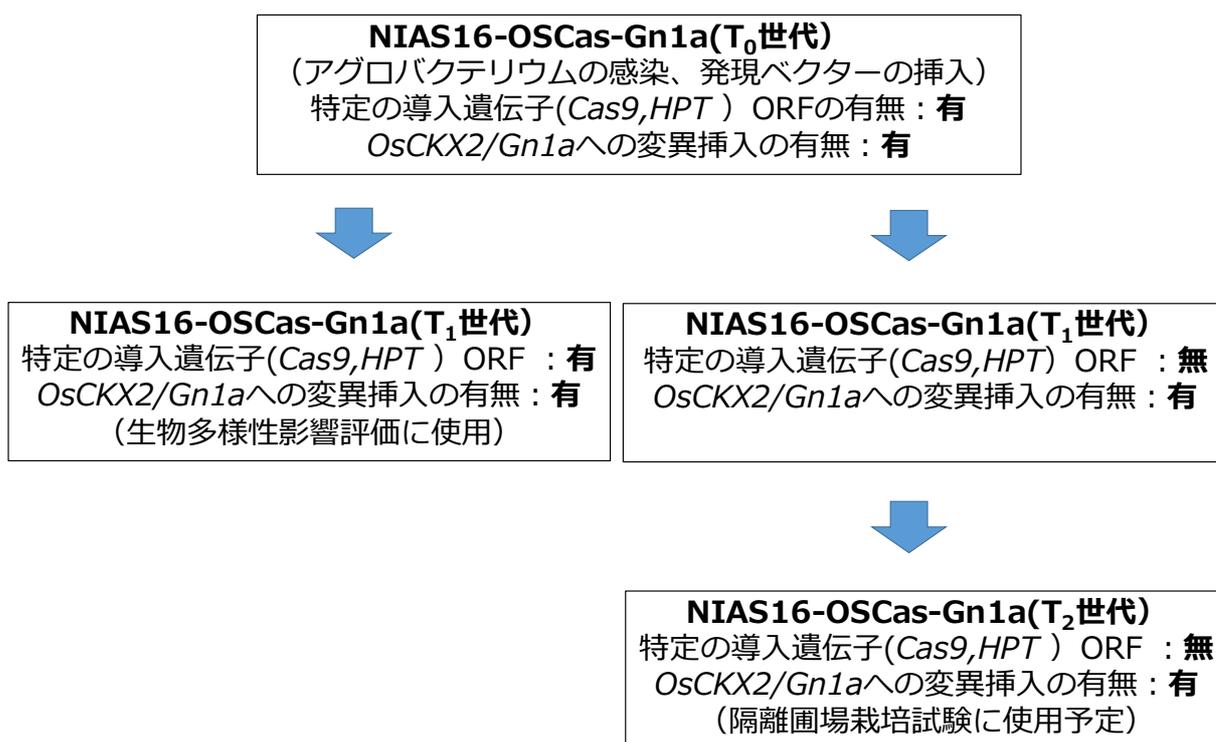


図6、NIAS16-OSCas-Gn1aの系譜図

栽培予定ほ場の配置図及び周辺環境を別紙1に示す。周辺は試験用畑ほ場と防風林、アスファルト道路で囲まれており、花粉飛散があったとしても受粉可能なイネは近隣250m以内には栽培されていない。

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、栽培、保管、運搬及び廃棄ならびにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

イ. 隔離ほ場の所在地：茨城県つくば市観音台3-1-1

(所在エリア：観音台第4事業場畑圃場HC-2番北西端)

ロ. 隔離ほ場の名称：農業・食品産業技術総合研究機構

高機能隔離圃場

ハ. 使用期間：承認日～平成34年3月31日

ニ. 隔離ほ場の施設

- ① 部外者の立入りの防止のため、隔離ほ場を取り囲む高さ1.8 mの金属製フェンスを設置する。
- ② 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明示した標識を正面入口の見やすい場所に掲示する。
- ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置すると共に、本遺伝子組換えイネの隔離ほ場外への流出を防止するための設備を有する排水系を設置している。
- ④ 野生動物等の摂食を防止するため、遅くとも出穂期までには、防鳥網を本遺伝子組換えイネの栽培水田を取り囲むように設置する。栽培は慣行法に準じ、気象等に対応して防風網の設置を行う場合がある。

ホ. 隔離ほ場の作業要領

- ① 本遺伝子組換えイネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネ以外の植物が隔離ほ場内の使用区画で生育することを、除草管理等により最小限に抑制する。
- ② 本遺伝子組換えイネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に運搬又は保管する場合には、第二種使用等として遺伝子組

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（平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号）第 12 条又は第 13 条で定める拡散防止措置を実施する。

- ③ 本遺伝子組換えイネの栽培終了後、当該イネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネは、隔離ほ場内において乾燥、脱穀する。
- ④ 栽培終了後、保管しない種子（もみ）は焼却処理により確実に不活化を行う。また、刈り取られた稲わらを含む地上部はオートクレーブ又は焼却炉にて不活化する。刈り取られない残りのイネ残渣及びひこばえは、ほ場内に全てすき込み又は埋設等により不活化する。
- ⑤ 隔離ほ場内で使用した機械、機具及び靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子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。
- ⑥ 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるよう、施設の維持及び管理を行う。
- ⑦ ①から⑥に掲げる事項を第一種使用等をする者に遵守させる。
- ⑧ 本遺伝子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書に基づき、速やかに対処する。

（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

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構のホームページを通して、栽培実験計画書、モニタリング実施計画書等の本件についての情報をお知らせすると同時に、情報収集を行う。

（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

緊急措置計画書（別紙 2）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の環境での使用等の結果

2の(6)の宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違の項に記載した情報以外に生物多様性の影響を評価する際の参考とすべき情報は特になし。

(6) 国外における使用等に関する情報

なし。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主であるイネ栽培種 (*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ことから、宿主であるイネ自身は、他の野生植物に対し競合における優位性はない。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

本遺伝子組換えイネは選抜マーカーとしてハイグロマイシン抵抗性遺伝子発現カセットを有し、抗生物質であるハイグロマイシンに耐性であるが、選抜に有効な高濃度の抗生物質が自然条件下に存在することは考えられず、本カセットの移入が、野生植物に対する競合性を付加することは考えられない。

また、gRNA発現カセットの移入により、gRNAが構成的に転写発現しているが、その産物は特異的DNA標的部局へRNA-DNA塩基対形成を介してCas9/gRNA複合体を誘導させるものであり、アミノ酸への翻訳はされない。そのため生理学的または生態学的特性は伴わないと考えられる。

一方、本遺伝子組換えイネは*S. pyogenes* 由来Cas9 発現カセットの移入により、Cas9 遺伝子の転写発現レベルが上昇し、結果としてゲノム上の特異的配列部局の2重鎖切断が期待される。実際T₀世代（遺伝子導入当代）の緑葉組織由来DNAを用いた塩基配列解析により、Cas9の2重鎖切断と修復過程に伴う変異挿入が、ターゲット切断部局である*OsCKX2/Gn1a* 遺伝子配列上で確認されている。今回の*Gn1a*への変異挿入により*Gn1a*ノックアウト型になることで、一穂粒数や枝梗数等のシンク容量が変化することが期待できるが¹⁵⁾、野生植物との競合性は、宿主イネ本来の生活サイクルや繁殖様式、形態的・生理的形質といった種固有の特性に大きく依存している。本遺伝子組換えイネは、最終的に原品種に対し温室で

のポット栽培レベルにおいて、一穂粒数や枝梗数の増加が認められているが、それらは *OsCKX2/Gn1a* がゲノム編集による変異挿入で生じる機能欠損の結果として想定される変化である。また、その値は既存の品種を越えるものではない。またその他の性質について、*OsCas9* 遺伝子発現カセットの移入によって有意差を生じる値は示さなかったことから、自然条件で、本遺伝子組換えイネまたはその後代系統の競合性が高まることは考えられない。加えて、標的遺伝子の性質や既存品種の性質から見ても越冬性が変わるとは考えにくい。

当該第一種使用等は、本遺伝子組換えイネ後代を第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用等するものである。隔離ほ場では、本遺伝子組換えイネ後代の持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていることから、隔離ほ場の外部にある野生植物と競合することはない。以上の結果、競合における優位性に起因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。

(2) 影響の具体的内容の評価

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動植物等が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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動植物等が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、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された。

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の特定

当該遺伝子組換えイネは *S. pyogenes* 由来 *Cas9* 遺伝子を発現し、*Cas9* 蛋白質の特異的配列に対する2本鎖切断活性を獲得し、結果として *OsCKX2/Gn1a* ノックアウトによるシンク容量増加を意図した組換え体である。*S. pyogenes* 由来 *Cas9* 蛋白質は gRNA との共発現により、その DNA 切断部位は極めて特異的であり、宿主への毒性（ランダムにゲノムが切断されること）もこれまでに観察されていないことから、他の生物に対する影響も認められない事が推察される。*Cas9* タンパク質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、国立医薬品食品衛生研究所が公開しているアレルゲンデータベースを用いて BLAST アルゴリズムによって比較したところ、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められず、アレルゲン性についても想定されない。

また、選抜マーカーである HPT タンパク質に毒性があるという報告はなく、また、同タンパク質が組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されている（平成24年7月19日厚生労働省告示第432号）ことから、同タンパク質に毒性があることは考えにくい。

CRISPR/*Cas9* システム¹⁴⁾により特異的変異挿入ターゲットとなった *OsCKX2/Gn1a*（サイトカイニンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ遺伝子：サイトカイニンの分解反応を触媒する酵素をコードする）に関して、すでにその発現が減少した変異型遺伝子が既存品種である「ハバタキ」で見つかっており、またノックアウト型の変異遺伝子が中国の「5150」系統で見つまっている¹⁵⁾。これら既存品種で有害物質産生の変化の報告は無く、このことから本組換えイネでも同様と考えられる。

今回、*OsCas9* 遺伝子をより多く発現する遺伝子組換えイネを用いた後作試験及び鋤込み試験を行ったが、他の植物に与える影響は宿主である原品種と同等であった。以上から、本遺伝子組換えイネ後代が他の野生動植物に影響を与える有害物質を産生することは考えにくい。

本申請は、限定された隔離ほ場において栽培を行うものである。隔離ほ場はフェンスで囲まれ、出穂期までに防鳥網を設置するから、イネ種子を摂食する比較的大型の動物や鳥類は接触できない。また、万が一イネに接触する小動物等に対して影響があったとしても、影響を受ける可能性のある小動物等は隔離ほ場に来訪するものに限定的である。さらに、イネに接触した土壌等の持ち出しを防ぐ措置が講じられていることから、栽培土壌を介して外部の動植物等に影響を与えることは考えにくい。

以上から判断して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

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が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の結果より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、生物多様性への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、これらの植物は我が国には自生しているという報告はないことから、影響を受ける野生動植物等は特定されない。

ほ場及び畦畔には栽培種イネの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源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同士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

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ため、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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ため、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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ず、本組換え体及びその後代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本遺伝子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

競合における優位性について、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る。自然条件下で自生することは知られていないことと、本申請組換え体について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、第一種使用規程に従う限りにおいては、本組換え体及びその後代と競合する可能性のある野生植物は特定されない。また、本第一種使用等は、本遺伝子組換えイネ及びその後代を第一種使用規程に従い隔離ほ場限定して使用等するものであるから、野生動植物と競合することはなく、隔離ほ場内において競合における優位性が認められた場合であっても、遺伝子組換え生物等の持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていることから、本遺伝子組換えイネ及びその後代の野生植物に対する競合における優位性には影響しない。

有害物質の産生性について、Cas9タンパク質やHPTタンパク質に毒性が報告されていないこと、既知のアレルゲンタンパク質と相同性を示さないこと、選抜マーカーである HPT タンパク質が組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されていること及び、隔離ほ場における限定的な栽培であることから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。加えて、*OsCas9* 遺伝子の過剰発現組換え植物において、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。

交雑性については、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が我が国には自生していないことから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。

競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性について、影響を受ける可能性がある野生動植物等は特定されないことから、総合的評価として、本遺伝子組換え系統及びその後代を第一種使用規程に従った隔離ほ場内での承認された範囲での限定された使用を行った場合には、生物多様性影響を生ずる恐れはないと判断した。

引用文献リスト

- 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., Yamanaka, S., Fukuta, Y., Chitrakon, S., Bounphanousay, C., Kanyavong, K., Tang, L-H., Nakamura, I., Sato, T. and Sato, Y.-I. (2004) Genetic erosion from modern varieties into traditional upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in northern Thailand. Genet. Resour. Crop Evol. 53, 245-252
- 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. 52, 395-403
- 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) 農林水産技術会議(2003) 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方. 第2回「第1種使用規程承認承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1
<http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siry>

ou5_1.pdf

- 9) 農林水産技術会議(2005) 交雑に関する新たな科学的知見 第5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1.
<http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1702/pdf/siryoul.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) 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.
- 12) 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
- 13) 北海道の米づくり (2002) 北海道・北海道米麦改良協会
- 14) Mikami M., Toki .S, Endo M. (2016) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. Plant Mol Biol. 2015 Aug;88(6):561-72
- 15) Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles ER., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005) Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. SCIENCE:309(29) 741-745
- 16) Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. (2014) CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. Mol Plant. 2014 7(9):1494-6.

別紙 1 隔離ほ場の情報および周辺地図

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

農研機構 「高機能隔離圃場」

2. 住所

茨城県つくば市観音台 3-1-1 (図 1、図 2)

(所在エリア：観音台第4事業場畑圃場HC-2番北西端)

3. 連絡先電話番号

029-838-8709

II. 試験期間

承認日から平成 34 年 3 月 31 日まで

III. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、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設置し、施設敷地内には、管理作業用道路、育苗・脱穀などの作業スペース、自然乾燥舎、機具庫、洗場及び専用焼却炉を配置している。また、周囲には高さ 10m 前後の防風林がある。

隔離ほ場施設内には、管理作業道路で分けられた 5 アールの水田が 6 面あり、総面積は 30 アール。本試験では そのうちの 2 面 (10 アール) を使用する。(図 3、4)。



図1 隔離ほ場周辺地図。実地調査で概ね1.5Kmの範囲で確認された、周辺農家の水田を緑色で示す。

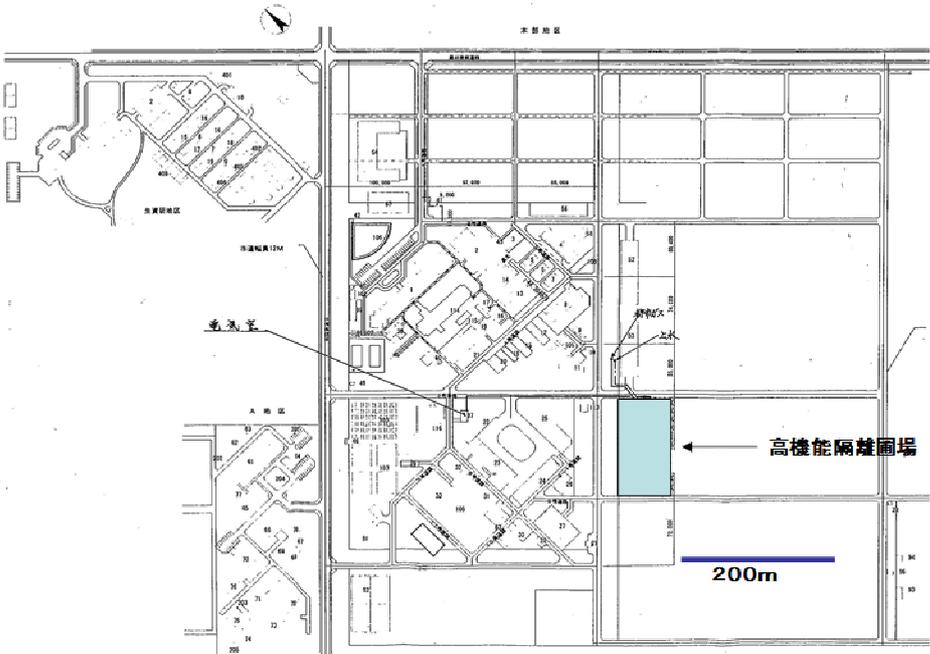


図2 「高機能隔離圃場」の構内配置図

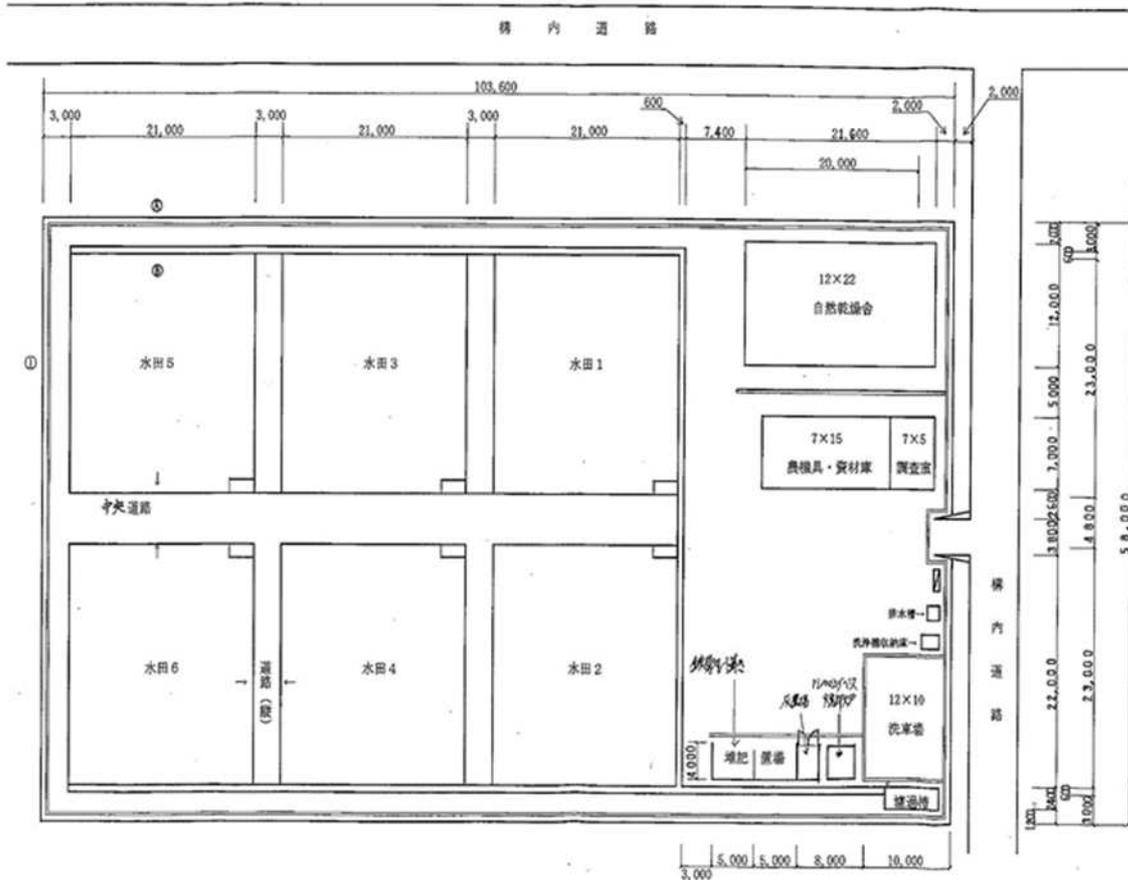


図3 施設内ほ場配置図

◎栽培計画に関する情報（隔離ほ場における試験計画）

今回申請者は、シンク能改変イネ（*Oryza sativa* L. NIAS16-0SCas-Gn1a、NIAS16-0SCas-TGW6）について、

1. 同属、同一種内の複数品種を宿主とする。
2. *Cas9* 発現ユニットの遺伝子導入後代系統を栽培に用いる。
3. *Cas9* による変異挿入のためのターゲット遺伝子は、*OsCKX2/Gn1a* または *IAA-glucose hydrolase/TGW6* の2種類である。

以上の組合せで隔離圃場栽培での栽培試験を行うことを計画している。

本遺伝子組換え系統及びその後代の第一種使用等隔離ほ場栽培については、 T_2 世代以降の後代系統を隔離ほ場で栽培し、導入遺伝子（*Cas9*）の働きで生じた *OsCKX2/Gn1a* または *IAA-glucose hydrolase/TGW6* 遺伝子への変異挿入により、シンクキャパシティーに対する変化の有無や、生育、収量調査を通して最終的により自然環境に近い隔離ほ場において、収量性や草型にどのような影響をもたらすかを調査し、その結果を踏まえて系統選抜を進めていく。

本遺伝子組換えイネは5年間の試験期間中で、一種類当たり最大で計40系統程度の栽培を計画しているが、栽培個体については系統・世代が判別できる管理を行う。

緊急措置計画書

平成 29 年 2 月 24 日

氏名 国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 井邊 時雄
住所 茨城県つくば市観音台 3-1-1

第一種使用規程の承認を申請しているシンク能改変イネ (*Oryza sativa* L. ; NIAS16-OSCas-Gn1a、NIAS16-OSCas-TGW6) 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

業務管理責任者
業務管理主任者
業務従事者
業務従事者
業務従事者
業務従事者
業務従事者



2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 本遺伝子組換えイネ（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。

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、すぐにその内容を関係者に対して、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

試験圃場で栽培されている本LMOについては、実験に用いる種子は密閉容器にて運搬、保管する。それ以外の種子およびイナワラ等その他の部位は、焼却処理あるいはすき込み等による不活化を行う。

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、文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局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に報告する。