

第一種使用規程承認申請書

平成 31 年 2 月 19 日

文部科学大臣 柴山 昌彦 殿
環境大臣 原田 義昭 殿

氏名 国立研究開発法人
申請者 農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 久間 和生 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	スギ花粉ペプチド含有イネ (<i>7Crp</i> 、 <i>2mALS</i> 、 <i>Oryza sativa</i> L.) (<i>Os7Crp1</i> 、 <i>Os7Crp2</i>)
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 2-1-2 名 称：農業・食品産業技術総合研究機構 観音台第三事業場 隔離ほ場 及び 所在地：茨城県つくば市観音台 3-1-1 名 称：農業・食品産業技術総合研究機構 観音台第四事業場 高機能隔離ほ場 及び 所在地：茨城県つくば市観音台 3-1-3 名 称：農業・食品産業技術総合研究機構 観音台第七事業場 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 36 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲む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、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置すると共に、水田については、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ぐため、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又はビニルハウス等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、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の残さ及びひこばえは、ほ場内に全てすき込み又は埋設等により不活化する。
- (4) 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。
- (5) 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。
- (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等をする者に遵守させる。
- (7) 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

スギ花粉ペプチド含有イネ

(7Cp, 2mALS, *Oryza sativa* L.) (Os7Cp1, Os7Cp2)

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	12
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	13
(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	15
(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	17
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	17
3、遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	23
(1) 使用等の内容	23
(2) 使用等の方法	23
(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	23
(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	23
(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	24
(6) 国外における使用等に関する情報	24
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	25
1、競合における優位性	25
2、有害物質の産生性	26
3、交雑性	28
第三 生物多様性影響の総合的評価	29
引用文献リスト	31

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

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経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950万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90万トン程度である。流通量の約88%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⁶⁾。

(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、通常環境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⁷⁾。

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⁷⁾。

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⁸⁾。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⁷⁾。

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、10 mでは0.04 %以下であることが報告されている⁹⁾。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¹⁰⁾。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¹¹⁾。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¹²⁾、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(PB)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の報告¹³⁾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、この品種間差は大きく、また、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。PB法によりアレロパシー活性の強いことを見出した赤米(阿波赤米、紅血糯等)は圃場でも雑草抑制作用を示した¹⁴⁾。イネはアレロパシー物質としてモミラクトン群を合成し、根から放出することで、周囲の植物との競争で優位となること、また、ストレス条件下ではより強いアレロパシー活性を持つモミラクトンBの生合成を誘導し、根からの分泌量を増加させることなどが報告されている¹⁵⁾。

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¹⁶⁾。

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

本遺伝子組換えイネ[スギ花粉ペプチド含有イネ（7Crp、2mALS、*Oryza sativa* L.）（0s7Crp1, 0s7Crp2）]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、由来及び機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
7Crp遺伝子発現カセット1		
GluB-1 プロモーター (GluB1 P)	2.3 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリンB1（GluB-1）遺伝子のプロモーター領域。イネ胚乳での転写を誘導する ¹⁷⁾ 。
グルテリンシグナル ペプチド (GluB1 SP)	0.1 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリン（GluB-1）のシグナルペプチド配列をコードする。グルテリン蛋白質の小胞体膜内への輸送に関与する。
7Crp	288 bp	由来；スギ（ <i>Cryptomeria japonica</i> ）、ヒノキ科スギ亜科スギ属の常緑針葉樹。本種は日本固有種であり、北海道各地にも植林され、屋久島、九州から北海道まで広く分布している。 機能；スギ花粉中の蛋白質 Cry j I 及び Cry j II 由来で、ヒトのスギ花粉抗原特異的 T 細胞が認識する7箇所の配列を連結させた人工ペプチドをコードする配列。
KDEL 局在化 シグナル	12 bp	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；蛋白質の小胞体への係留に関与するシグナル配列。
GluB-1 ターミネーター (GluB1 T)	0.7 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリンB1（GluB-1）遺伝子のターミネーター領域。転写を終結させる ¹⁷⁾ 。
7Crp遺伝子発現カセット2		
GluB-1 プロモーター (GluB1 P)	2.3 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリンB1（GluB-1）遺伝子のプロモーター領域。イネ胚乳での転写を誘導する ¹⁷⁾ 。
グルテリンシグナル ペプチド (GluB1 SP)	0.1 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリン（GluB-1）のシグナルペプチド配列をコードする。グルテリン蛋白質の小胞体膜内への輸送に関与する。
7Crp	288 bp	由来；スギ（ <i>Cryptomeria japonica</i> ）、ヒノキ科スギ亜科スギ属の

		常緑針葉樹。本種は日本固有種であり、北海道各地にも植林され、屋久島、九州から北海道まで広く分布している。 機能；スギ花粉中の蛋白質 Cry j I 及び Cry j II 由来で、ヒトのスギ花粉抗原特異的 T 細胞が認識する7箇所の配列を連結させた人工ペプチドをコードする配列。
<i>KDEL</i> 局在化シグナル	12 bp	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；蛋白質の小胞体への係留に関与するシグナル配列。
<i>GluB-4</i> ターミネーター (<i>GluB4 T</i>)	0.66 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質グルテリンB4 (<i>GluB-4</i>) 遺伝子のターミネーター領域。転写を終結させる ¹⁸⁾ 。
2 <i>mALS</i> 遺伝子発現カセット		
カルス選抜プロモーター (<i>CSP</i>)	1.7 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能； <i>Os10g0207500</i> のプロモーター領域 (<i>CSP</i> , <i>PCT/JP02/02817</i>)。Os10g0207500はシロイヌナズナの、葯や花粉の分化に関わる蛋白質TAPETUM DETERMINANT 1と相同性を持つ。イネカルス（脱分化状態の培養細胞）において下流の遺伝子の発現を誘導する（植物体では胚でのみ発現を有する）。
2 <i>mALS</i>	1.9 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；2点変異型アセト乳酸合成酵素 (<i>ALS</i>) 遺伝子。スルホニルウレア系除草剤（ビスピリバック等）に耐性を示す様に、95番目のアミノ酸が グリシンからアラニンに、627番目のアミノ酸がセリンからイソロイシンに置換されている ¹⁹⁾ 。
10 kDa プロラミンターミネーター (<i>10 kDa T</i>)	0.2 kb	由来；イネ（宿主の記載を参照） 機能；種子貯蔵蛋白質10 kDaプロラミン遺伝子のターミネーター領域。転写を終結させる ¹⁹⁾ 。

ロ 構成要素の機能

本遺伝子組換えイネは、表 2 に示した二連結した *7Crp* 遺伝子発現カセットの働きにより、*7Crp* 蛋白質を胚乳特異的に発現する。*7Crp* 蛋白質は、スギ花粉中の花粉症の原因となる抗原蛋白質 *Cry j I* 及び *Cry j II* に含まれ、ヒトのスギ花粉抗原特異的 T 細胞により認識されるアミノ酸配列（以下“ヒト T 細胞エピトープ”と記載する）部分を発現させたペプチドである（図 1、表 3）。イネ *GluB-1* プロモーターは登熟中の胚乳で特異的に転写を誘導するプロモーターである¹⁷⁾。

表 3 挿入した *7Crp* の遺伝子配列およびアミノ酸配列

7Crp の塩基配列:

```
5'- ggc atc atc gca gct tac caa aat cca gca agc tgg aag agt atg
aag gtt aca gtt gca ttc aac caa ttc ggt cct gat atc ttt gct agc aag
aat ttc cac ctc cag aaa aat aag ctc aca agt ggc aag att gca agc
tgc ttg aac tat gga ttg gtt cat gta gct aac aat aac tat gat cca agc
ggt aag tat gag ggt ggc aac atc tac act aag aag gaa gca ttc aac
gta gag caa ttt gca aag ctc aca ggc ttc act ctc atg gga cgc - 3'
(288 bp)
```

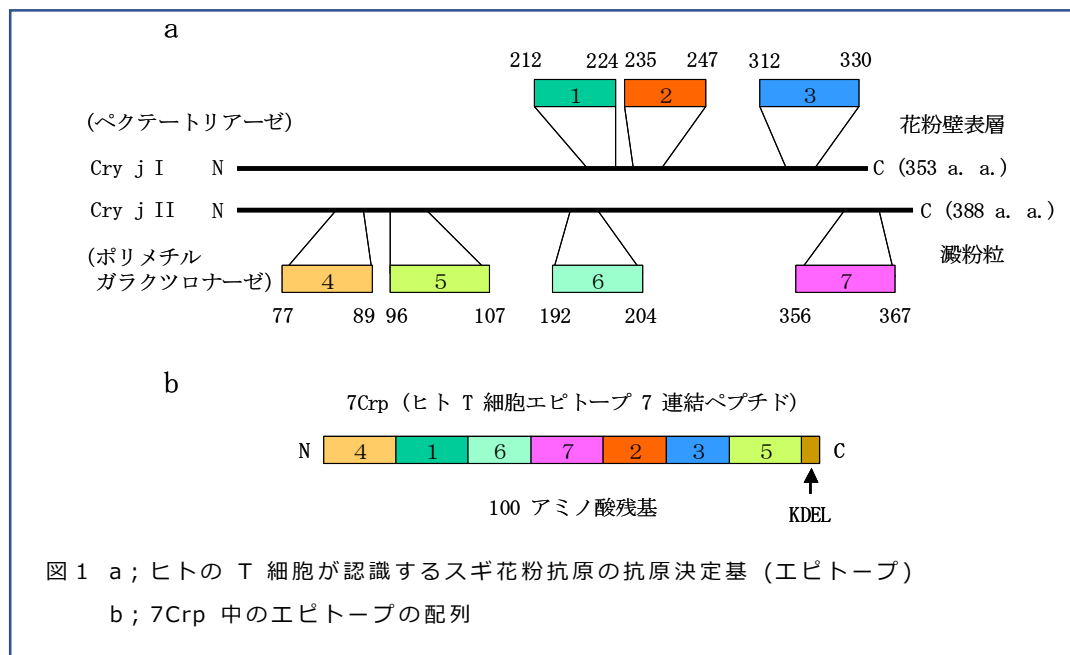
7Crp のアミノ酸配列:

```
N - GIIAAYQNPASWKSMMKVTVAFNQFGPDIFASKNFHLQKNKLTSGKIASCLNYGLVHVANNYY
DPSGKYEGGNIYTKKEAFNVEQFAKLTGFTLMGR - C (96 a.a.)
```

また、表 2 に示した *2mALS* 遺伝子発現カセットは、イネ由来のアセト乳酸合成酵素（ALS）蛋白質（644 アミノ酸残基）の第 95 番目のグリシンをアラニンに、第 627 番目のセリンをイソロイシンに変換した 2 点変異型アセト乳酸合成酵素蛋白質（*2mALS*）をカルス及び胚で発現する。使用したプロモーターは、イネ由来のカルス（脱分化状態の培養細胞）特異的選抜プロモーターで、カルスと胚で目的遺伝子の発現を誘導する²⁰⁾。本遺伝子カセットにより、イネカルスにアセト乳酸合成酵素（ALS）阻害剤である除草剤のビスピリバックナトリウム（スルホニルウレア系除草剤）耐性が付与され、同除草剤によるカルス選抜が可能となる。

ハ 7Crp について

スギ花粉アレルギーを引き起こす抗原として同定されているスギ花粉抗原蛋白質 Cry j I と Cry j II に対して、スギ花粉抗原特異的な T 細胞によって認識される T 細胞エピトープ (12-19 アミノ酸) が詳細に調べられている²¹⁾。96 アミノ酸残基からなる 7Crp は、スギ花粉抗原蛋白質 Cry j I 中の 3 箇所、Cry j II 中の 4 箇所の T 細胞エピトープを連結した人工ペプチドである。この 7Crp ペプチドは、Cry j I や Cry j II 蛋白質と同様に、スギ花粉抗原特異的な T 細胞に認識されることが報告されている²¹⁾。しかし、一連のアレルギー反応に必要なとされる抗原特異的 IgE 抗体との結合性はなく、B 細胞エピトープも含まないことから、アレルギー反応を引き起こす可能性は極めて低いと考えられている²¹⁻²³⁾。



(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本遺伝子組換えイネの作出に用いた pCSP2mALS 2x7Crp は、pZP200系バイナリーベクター pCSP2mALS-GW^{19, 24)} を基に構築された。詳細は表2、3及び図1、図2に記載した。

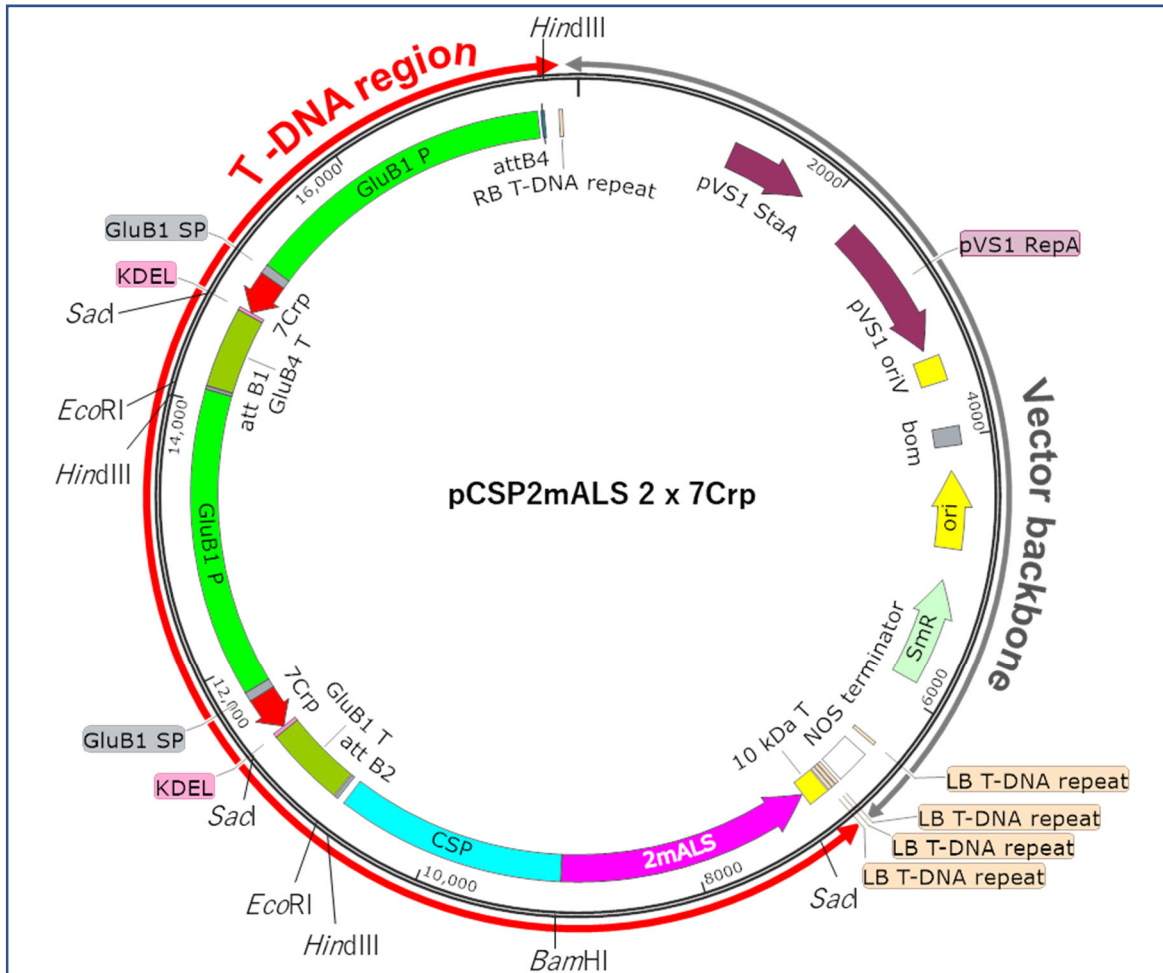


図2 本遺伝子組換えイネ作出に用いられた pCSP2mALS 2x7Crp。

RB : T-DNA 領域ライトボーダー

GluB1 T : グルテリン B1 (GluB-1) 遺伝子ターミネーター

GluB4 T : グルテリン B4 (GluB-4) 遺伝子ターミネーター

GluB1 SP : グルテリンシグナルペプチド配列

7Crp : 96 アミノ酸残基からなるスギ花粉抗原蛋白質 Cry j I 中の3箇所 Cry j II 中の4箇所の T 細胞エピトープを連結した人工ペプチド

KDEL : KDEL 局在化シグナル

GluB1 P : グルテリン B1 (GluB-1) 遺伝子プロモーター

CSP : カルス選抜プロモーター

2mALS : 2点変異型アセト乳酸合成酵素をコードする配列

10 kDa T : 10 kDa プロラミン遺伝子ターミネーター

ロ 特性

本遺伝子組換えイネの作出に用いられた pCSP2mALS 2x7Crpのサイズは約17.1 kb (T-DNA領域は約10.5 kb) である。

大腸菌及びアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として大腸菌由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*SmR*) がプラスミド外骨格領域 (ベクターバックボーン) に存在しているものの、アグロバクテリウム法では通常この領域は導入されない。

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、ビスピリバックナトリウム ($0.5 \mu\text{M}$) を含む選抜培地で *2mALS* 遺伝子が導入されたカルスを選抜し、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。T0 個体群を閉鎖系温室で育成し、途中これらの成葉由来全 DNA のサザンブロット解析により、T-DNA が 1 コピー挿入されていると推定される系統を選抜した。候補系統

は育成を続行し、自殖種子（T1 系統群）を得た。種子から全蛋白質を抽出し、抗 7Crp 抗体によるイムノブロットを行い、目的遺伝子産物（7Crp 蛋白質）が蓄積している系統を選抜した。

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、T1 種子を、5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて滅菌し、アグロバクテリウムや他の雑菌の除去後に MS 培地上に無菌播種を行った。1 週間以上育苗し、胚乳及び培地表面にバクテリアの増殖は観察されなかった。これら、アグロバクテリウムの残存していないことを確認した T1 個体から T2 種子を得、これらから導入遺伝子がホモの系統候補を選抜した。また T1 植物と原品種のどんどこいを交配し F1 種子を得た。T2 以降の種子も同様に発芽させた後閉鎖系温室で栽培し、更に後代（T3）の種子を得た。また F1 種子を自殖させ F2 種子を得た。

本隔離ほ場栽培では、これらの除菌後の後代種子を使用する。

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得られた複数の系統をほ場で栽培し、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の草丈、稈長、有効分げつ数等の生育調査。
2. 隔離ほ場で増殖したイネ種子を材料とした 7Crp 蛋白質の発現量調査及びラットを用いた安全性調査。
3. 形質転換に用いる原品種の変更、あるいは他品種との交配により遺伝的背景が変更された場合の導入遺伝子の効果の安定性の検証。

本遺伝子組換えイネでは最大 5 系統程度の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。

以下、(4)～(6)の情報は、全ての系統のものではなく、先行して得られた系統の一部について示しているが、以下の理由から、生物多様性影響評価を行う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隔離ほ場内で行われ、隔離距離の確保、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の隔離ほ場からの散逸防止策を講じていること。

(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

本遺伝子組換えイネの移入した核酸が染色体上に存在するか否かを調べるため、本遺伝子組換えイネ Os7Crp1 及び Os7Crp2 の T1 世代とどんどこいを交配し、その後代 F2 世代において、*2mALS* 遺伝子の有無を PCR 解析し、移入した核酸の有無を確認した。移入した核酸の分離比を移入した核酸の分離比について、メンデル分離に適合しているかカイ二乗検定を行った。その結果、Os7Crp1 及び Os7Crp2 系統では実測値と理論値の間に統計学的有意差は認められなかったことから、移入した核酸の分離はメンデル分離に適合していることが確認された。したがって、本系統において、移入した核酸は染色体上に存在していると考えられた。

表 4 Os7Crp 各系統 F1 後代における *2mALS* 遺伝子の分離

系統	有	無	χ^2	P
Os7Crp1	17	7	0.22	0.64
Os7Crp2	19	5	0.22	0.64
理論値	18	6	-	-

本遺伝子組換えイネ系統 Os7Crp1 及び Os7Crp2 F1 後代種子 24 粒について、全 DNA を用いた導入遺伝子の検出。*2mALS* 遺伝子のプロモーターとコード領域を挟むように設計したプライマーの PCR 増幅により、導入遺伝子の有無を判定した。割合は、有意水準 5%で、分離比は単一優性遺伝子の分離比 3:1 に適合した。

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

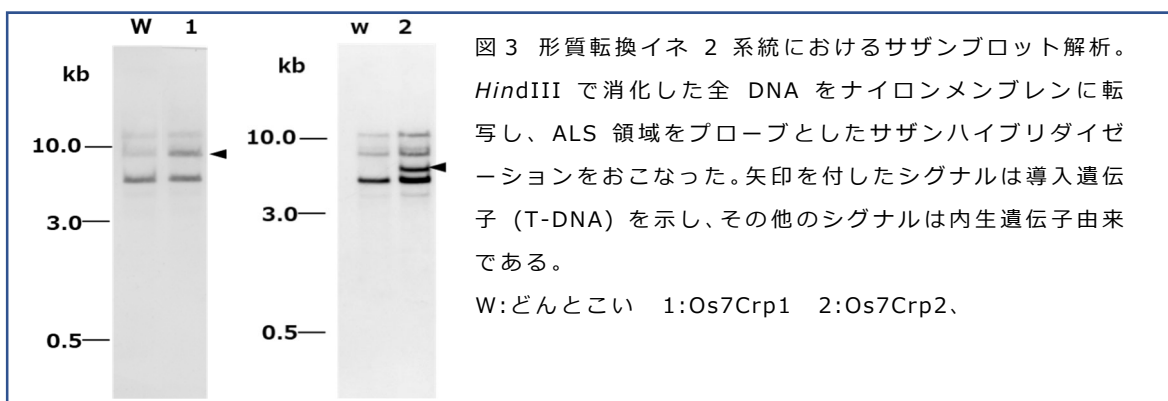
T1 系統のサザンブロット解析を実施し、目的の核酸が本遺伝子組換えイネ中に 1 コピー移入されていると推定される個体を選抜した (図 3)。系統ごとに異なるサイズの移入核酸のバンドが検出されているのは、核酸が移入された宿主ゲノム上の位置が系統ごとに異なり、核酸の移入部位でのプローブ部位の外側に存在する制限酵素認識部位までの距離が様々であることを反映したものである。これは、アグロバクテリウム法により移入された T-DNA が宿主染色体の任意の位置に移入された場合の典型的なパターンである。

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影響評価を行うことは可能であると考えられる。

また、植物宿主の染色体ゲノムに移入された核酸の複製物は、転移因子等の配列が含まれない場合には基本的に植物のゲノムには移入された核酸を排除する仕組みがないことから、交配を通じてのみ伝達される。

本遺伝子組換えイネに移入された核酸には、転移因子等、ゲノムの組換えに関わる配列を意図的に導入していないことから、安定に伝達されると考えられる。



ハ. 個体間及び世代間での発現の安定性

T1~T3 の全 DNA をテンプレートとした PCR を行い、世代間において同じ PCR 産物が得られたことから、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が確認された (図 4)。

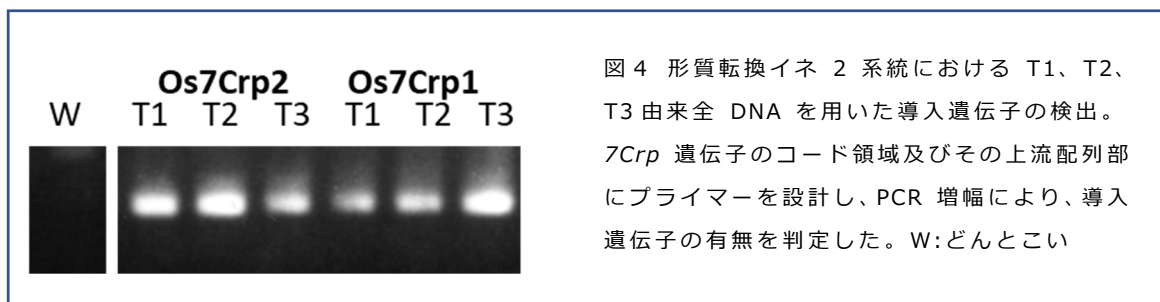


図 4 形質転換イネ 2 系統における T1、T2、T3 由来全 DNA を用いた導入遺伝子の検出。7Crp 遺伝子のコード領域及びその上流配列部にプライマーを設計し、PCR 増幅により、導入遺伝子の有無を判定した。W:どんどこい

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植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

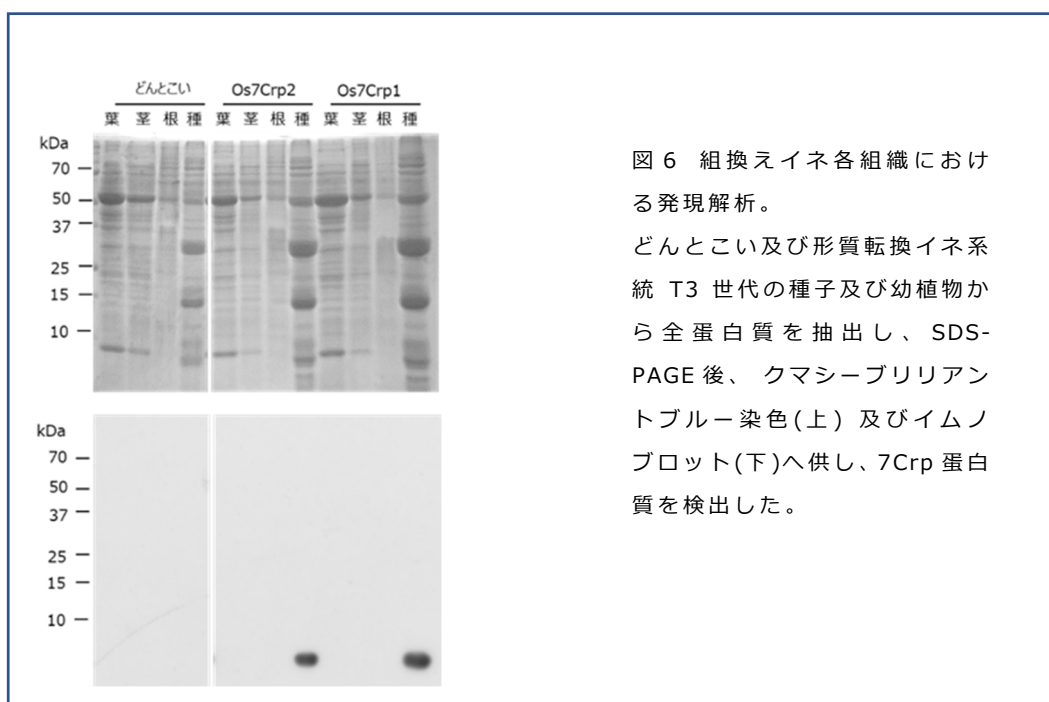
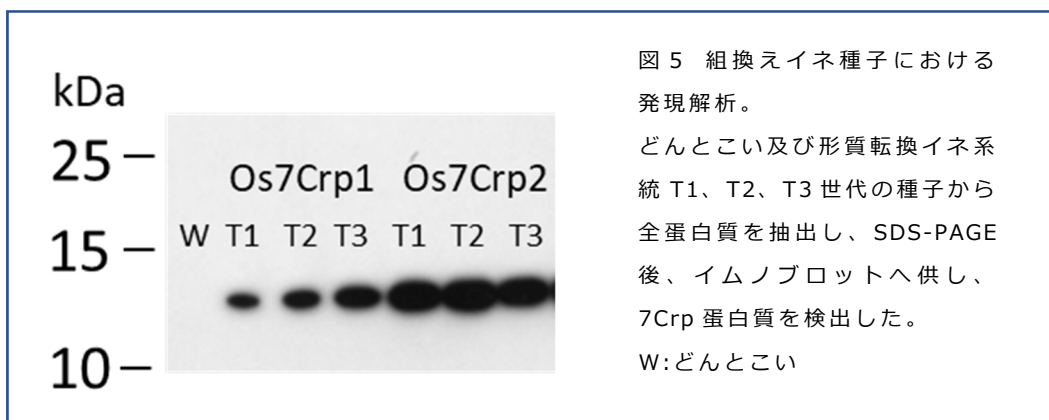
供与核酸の配列に基づいて設計したプライマー対を用いて、PCRを行うことで、移入遺伝子を特異的に検出することが可能であり、その感度については、約50 ngの全DNAを鋳型として供すれば、検出可能である。また、サザンブロット解析による特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約1 μ gの全DNAを用いれば検出可能である。

(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種子T1~T3の全蛋白質のイムノブロット解析を行ったところ、7Crp蛋白質の複数世代における種子での発現が確認された(図5)。また茎、葉、根での発現は確認されなかった(図6)。

選抜マーカー遺伝子である *2mALS* 遺伝子はカルスに 2mALS を発現することによりカルスにビスピリバックナトリウム等のスルホニルウレア系除草剤耐性を付与する。



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、閉鎖系温室における達観における観察では、特筆すべき形態学的差異は認められなかった。

かん長、穂数、草型、分けつ数等の形態形質について、また、出穂期、開花期、発芽特性等の生育特性について、本申請の承認後、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評価を行う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影響評価を行うことは可能であると考えられる。なお、これまで申請されてきた組換えイネにおいては、意図せずに低温耐性が付与された事例は知られていない。

3) 成体の越冬性又は越夏性

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影響評価を行うことは可能であると考えられる。なお、これまで申請されてきた組換えイネにおいては、意図せず越冬性が付与された事例は知られていない。

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1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評価を行う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

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率については承認後、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、遺伝子組換えイネ各系統、1個体の収穫後の穂を握って脱粒の程度を調査した。その結果、組換えイネ系統と宿主であるどんとこいの間に相違は認められず、脱粒がなかったことから、脱粒性は難と判断した（表5）。

表5 脱粒性	
脱粒性	
どんとこい	難
Os7Crp1	難
Os7Crp2	難

イネ品種・特性データベース検索システム
「<https://ineweb.narcc.affrc.go.jp/index.html>」におけるどんとこいの脱粒性は難

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、調査は行っていない。

7) 有害物質の産生性

本遺伝子組換えイネの種子中に蓄積する7Crp蛋白質は蛋白質顆粒 protein body-I中のみに難溶性の種子貯蔵蛋白質として蓄積しているため、イネのその他の代謝にかかわる酵素の基質となる事や酵素活性を有するとは考えにくい。また、7Crp蛋白質を発現させるために用いた *GluB-1*プロモーターは種子でのみ発現を誘導し、イネ植物体の他の組織（根、葉、茎）では発現を誘導しない。よって7Crp蛋白質がイネのこれらの組織の代謝系を変化させることは考えにくい。

なお、本遺伝子組換えイネで産生される7Crp蛋白質が既知のアレルゲンとの相同性がないかを調査した。相同性検索には、ネブラスカ大学 Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) の既知アレルゲンデータベースを用いた。WHOとFAOによって設置された国際食品規格委員会 (Codex Alimentarius Commission) は、新規蛋白質内の連続し

た80アミノ酸の内35 %超が既知のアレルギー性を有する蛋白質と一致した場合に、IgEとの交差性の可能性を検討するように定めている²⁵⁾。そこでOpen Reading Frame (ORF) 内の連続した80アミノ酸のうち、35 %超が既知のアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と一致する場合、相同性があると定義した。検索の結果、7Crp蛋白質はスギ花粉アレルゲンおよび類似の既知の花粉アレルゲン（各種ヒノキ科針葉樹の花粉アレルゲン）との相同性を示したが、それ以外に相同性を示すアレルゲンは認められなかった。7Crp蛋白質は、スギ花粉中の花粉症の原因となる抗原蛋白質 Cry j I 及びCry j IIに含まれスギ花粉症アレルゲン由来であることから、スギ花粉アレルゲン及び既知の花粉アレルゲンと相同性を示すが、スギ花粉アレルギー患者のIgE抗体との結合性を示さないことが明らかにされており、アレルギー反応を引き起こす可能性は極めて低いと考えられている²¹⁻²³⁾。

選抜マーカーである2mALSはイネ由来のALS蛋白質の2つのアミノ酸を置換することで、イネの自然変異体と同一の配列を導入したものであり、イネ自然変異体が産生するものと同様である。本遺伝子組換えイネで産生される2mALSが、既知のアレルゲンとの相同性の有無を7Crp蛋白質と同様に調査した結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

本遺伝子組換えイネ及び宿主（原品種）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、本遺伝子組換えイネ及び原品種（どんとこい）を用い、後作土壌および細かく刻んだ葉を混合した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6及び表7）ことから、本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いと推察される。

表6 イネを栽培した後の土壌に播種したレタスの発芽率、幼根長及び下胚軸長

系統	発芽率 (%)	幼根長 (mm)	下胚軸長 (mm)
どんとこい	96	12.6 ± 4.0	7.3 ± 4.4
Os7Crp1	100 (P=0.37)	12.0 ± 4.1 (P=0.62)	8.1 ± 3.8 (P=0.50)
Os7Crp2	100 (P=0.37)	11.0 ± 3.5 (P=0.14)	6.8 ± 3.2 (P=0.66)

どんとこい及び本遺伝子組換えイネについて、特定網室において1個体をポット栽培した後の根圏土壌を回収した。乾燥重量1.5 gに相当する土壌と0.75% (w/v) 低温ゲル化アガロース2.5 mLとを混合し、細胞培養用12穴プレート(穴直径20 mm 深さ16 mm)中で固化させた後、0.75% (w/v) 低温ゲル化アガロース1.6 mLを重ねて、固化させた。この上に、検定植物であるレタス(グレートレックス)種子を、各穴当たり5粒、合計25粒を置床し、暗所25℃で3日間培養して、レタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。レタスの発芽率については、全ての調査において、本遺伝子組換えイネとどんとこいとの間に統計学的有意差(有意水準5%のt検定)は認められなかった。レタスの下胚軸長、幼根長は、どんとこい及び各形質転換イネにおいて統計的検定(有意水準5%のt検定)の結果、両者間に統計学的有意差は認められなかった。

表7 イネの葉を混合した土壌に播種したレタスの発芽率、幼根長及び下胚軸長

系統	発芽率 (%)	幼根長 (mm)	下胚軸長 (mm)
どんとこい	100	4.3 ± 1.3	4.7 ± 2.0
Os7Crp1	100	4.8 ± 1.1 (P=0.12)	5.2 ± 1.7 (P=0.41)
Os7Crp2	100	4.5 ± 1.4 (P=0.65)	5.0 ± 2.2 (P=0.69)

どんとこい及び本遺伝子組換えイネについて、特定網室で栽培、収穫、乾燥させた稲わらを微粉末化した。この粉末を、重量比5%となる様に培土と混合し、0.75% (w/v) 低温ゲル化アガロース2.5 mLと懸濁して、細胞培養用6穴プレート中で固化させた。0.75% (w/v) 低温ゲル化アガロース1.6 mLを重ねて固化させた後、この上に、検定植物であるレタス種子(グレートレックス)を、各穴当たり5粒、合計25粒を置床し、暗所25℃で3日間培養して、発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。レタスの発芽率については全ての調査区において、100%を示し、発芽の阻害は観察されなかった。レタスの下胚軸長、幼根長は、どんとこい及び各形質転換イネにおいて統計的検定(有意水準5%のt検定)の結果、両者間に統計学的有意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

本遺伝子組換えイネの第一種使用等は、本遺伝子組換えイネを隔離ほ場で栽培し、生育、収量といった調査を行うとともに、増殖した種子を用いたモデル動物への投与による 7Crp 蛋白質を蓄積する本遺伝子組換えイネの機能性試験を行うことを目的としている。

(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

第一種使用規程のとおり。

なお、隔離ほ場の地図及び隔離ほ場内における試験区の配置図を別紙「隔離ほ場の情報」に示す。

(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

別紙「緊急措置計画書」のとおり。

(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、本遺伝子組換えイネ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に移入された 7Crp 蛋白質遺伝子は胚乳特異的プロモーターにより制御されているため、遺伝子産物である 7Crp 蛋白質は種子にのみ蓄積し、他の形態・生理形質及び代謝系に影響を与えることは考えにくく、野生植物に対する競合における優位性を高めることは考えにくい。

また、本遺伝子組換えイネは選抜マーカーとして *2mALS* 遺伝子発現カセットを有し、カルスにおいては除草剤であるビスピリバックナトリウム塩に耐性であるが、通常の植物体内では、胚以外の組織では発現せず、発芽後は耐性を示さないこと、また、ビスピリバックナトリウム塩が自然条件下に高濃度で存在することは無いため、同物質への耐性を有することが、競合において優位に働くとは考え難い。

当該第一種使用等は、本遺伝子組換えイネ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の持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、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

本遺伝子組換えイネ及び宿主について、後作試験及び鋤込み試験を行ったが、他の植物に対するアレロパシー物質生産性に有意差はみられなかった。

なお、本遺伝子組換えイネの種子には7Crp蛋白質が蓄積することから既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸を共有するかどうか、アレルゲンデータベースを用いて類似性検索及びシーケンスアライメントを行った。7Crp蛋白質はスギ花粉アレルゲンおよび類似の既知の花粉アレルゲンとの相同性を示したが、それ以外に相同性を示すアレルゲンは認められなかった。また本遺伝子組換えイネが発現する7Crp蛋白質は、ヒトT細胞が認識するエピトープのみで構成されており、スギ花粉アレルギー患者のIgE抗体との結合性を示さないことが明らかにされており、ア

レルギー反応を引き起こす可能性は極めて低いと考えられている²¹⁻²³⁾。

また、本遺伝子組換えイネカルス及び胚で、2mALSが発現しているが、2mALSはイネの自然変異体と同一の配列を導入したものであり、イネ自然変異体が産生するものと同様である。さらに、アレルゲンデータベースを用いて類似性検索及びシーケンスアライメントを行っても、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。

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されている^{2), 3)}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される²⁶⁾。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、本遺伝子組換えイネ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。

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、本遺伝子組換えイネ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、本遺伝子組換えイネ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に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、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、アレロパシー物質の産生性を検討したが、本遺伝子組換えイネと宿主である原品種の間で差はみられなかった。さらに、7Crp蛋白質について、スギ花粉アレルゲンおよび類似の既知のアレルゲンとの相同性を示したが、それ以外に相同性を示すアレルゲンは認められなかった。また本遺伝子組換えイネが発現する7Crp蛋白質は、スギ花粉アレルギー患者のIgE抗体との結合性を示さないことから、アレルギー反応を引き起こす可能性は極めて低いと考えられていること、選抜マーカーである *2mALS* 遺伝子がカルス及び胚以外で発現しないこと、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。

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., Sato, Y.-I. (2006) 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., Toki, N., Imai, K., Sato, Y.-I., Yamagishi, H., Shimamoto, Y, Ueno, K., Morishima, H., Sato, T. (2005) 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) 農林水産省(2018) 平成 29 年度食料需給表
<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/>
- 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、石原 邦、平田熙、石井龍一(編)(1990) 稲学大成(第 2 卷) 生理編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 8) 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 卷) 遺伝編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 9) 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 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料5-

1.
http://www.affrc.maff.go.jp/docs/committee/use_rule/02/pdf/siryou5_1.pdf
- 10) 農林水産技術会議(2008) 交雑に関する新たな科学的知見とその考察 第7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.affrc.maff.go.jp/docs/committee/use_rule/07/pdf/siryoul.pdf
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 荒谷博、平舘俊太郎、藤井義晴 (2004) 赤米等のアレロパシー活性とアレロケミカルの探索 雑草研究49 174-175.
- 15) 加藤尚 (2016) イネの根からのアレロパシー物質モミラクトンの分泌 根の研究 (Root Research) 25 (1) : 5-13.
- 16) 北海道の米づくり (2002) 北海道・北海道米麦改良協会
- 17) Takaiwa, F., Oono, K., Wing, D., Kato, K. (1991) Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. Plant Mol. Biol. 17, 875-885.

- 18) Masumura, T., Kidzu, K., Sugiyama, Y., Mitsukawa, N., Hibino, T., Tanaka, K., Fujii, S. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a major rice glutelin. *Plant Mol. Biol.* 12, 723-725.
- 19) Wakasa, Y., Ozawa, K., Takaiwa, F. (2012) Agrobacterium-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. *Plant Cell Rep.* 31, 075-2084.
- 20) Wakasa, Y., Ozawa, K., Takaiwa, F. (2009) Higher-level accumulation of foreign gene products in transgenic rice seeds by the callus-specific selection system. *J. Biosci. & Bioeng.* 107, 78-83.
- 21) Hirahara, K., Tatsuta, T., Takatori, T., Ohtsuki, M., Kirinaka, H., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Taniguchi, Y., Saito, S., Sakaguchi, M., Inouye, S., Shiraishi, A. (2001) Preclinical evaluation of an immunotherapeutic peptide for Japanese cedar pollinosis: a hybrid peptide comprising seven T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 94-100.
- 22) Haselden, B. M., Kay, A. B., Larche, M. (2000) Peptide-mediated immune responses in specific immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, 229-237.
- 23) Wallner, B. P., Gefter, M. L. (1994) Immunotherapy with T-cell-reactive peptides derived from allergens. *Allergy* 49, 302-308.

- 24) Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994.
- 25) CODEX (2003) Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant DNA plants. CAC/GL 45.
- 26) 牛木 純、石井 俊雄、石川 隆二 (2005) 岡山県に発生した日本型 およびインド型雑草イネの生理・形態的形質と分布の特徴 育種学研 究 7 (4) p. 179-187

【別紙】

緊急措置計画書

平成 31 年 2 月 19 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 久間 和生
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「スギ花粉ペプチド含有イネ」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

生物機能利用研究部門

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

個人情報につき非開示

(以上は現時点での体制及び責任者であり、異動や所内での業務体制の見直しによる変更の際には適切な対応を行う)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 第一種使用等の状況は、作業従事者から説明される実験計画、栽培状況報告、終了報告等により把握し、農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 遺伝子組換え実験安全委員会（作物業務安全委員会）による検討を行う。

なお、本委員会の現時点における構成は以下の通りである。

個人情報につき非開示

個人情報につき非開示

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

(3) 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

業務従事者等の間での情報共有を速やかに行う。また、生物多様性への影響が生ずるおそれが認められたことを直ちに隔離ほ場のある自治体に電話、ファックス、電子メール、および文書などにより連絡する。さらに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

隔離ほ場で栽培されているイネについて、実験に用いる場合は、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して運搬、保管する。それ以外の不要な種子及び稲わら等その他の部位は、隔離ほ場内のオートクレーブまた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可能性が示唆された場合は、緊急措置を講じた後、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報告するとともに作物業務安全委員会並びに農業・食品産業技術総合研究機構内関係部署に報告する。

別紙

隔離ほ場の情報

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構がつくば観音台地区に保有する3か所の隔離ほ場の情報を以下に示す。第一種使用等を行うほ場は第一種使用規程のとおり。

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

1. 隔離ほ場の所在地等

(1) 名称

- | | | |
|--------------------|----------|---------|
| A. 農業・食品産業技術総合研究機構 | 観音台第三事業場 | 隔離ほ場 |
| B. 農業・食品産業技術総合研究機構 | 観音台第四事業場 | 高機能隔離ほ場 |
| C. 農業・食品産業技術総合研究機構 | 観音台第七事業場 | 隔離ほ場 |

(2) 住所

- A. 茨城県つくば市観音台2-1-2
- B. 茨城県つくば市観音台3-1-1
- C. 茨城県つくば市観音台3-1-3

(図1、2、4、6)

(3) 連絡先電話番号

029-838-8709

(農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 リスク管理室)

2. 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、洗場、焼却炉を設置している。水田を備えている。

畑ほ場を備えている（C.のみ）

(図3、5、7)

3. 面積

- A. 隔離ほ場全体の面積は約 55.4a； 水田の面積は約 20.8a
- B. 隔離ほ場全体の面積は約 60a； 水田の面積は約 30a
- C. 隔離ほ場全体の面積は約 82a； 水田の面積は約 5.2a、畑ほ場は約 13.8a

4. 隔離ほ場の周辺環境

(1) 地形

茨城県つくば市内、筑波・稲敷台地に位置する

(2) 周辺の土地利用状況

隔離ほ場は機構の敷地内にある。隔離ほ場外周から機構の敷地境界までそれぞれ最短で

A. (敷地を貫く公道を除き) 約 250m である。

B. 約 150m である。

C. 約 50m である。

なお、機構内の試験水田で栽培される受粉可能なイネは、隔離ほ場からは 200m 以上離れている。

(3) 5. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域）はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 10 キロである。

(4) 気象条件

隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点である茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値を表1に示した（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2018年12月10日、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&block_no=47646&year=&month=&day=&view）。

表1 茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値

つくば(館野) 平年値(年・月ごとの値) 主要要素						
要素	降水量 (mm)	気温 (°C)			風向・風速 (m/s)	日照時間 (時間)
	合計	平均	最高	最低	平均	合計
統計期間	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010
資料年数	30	30	30	30	30	30
1月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	171
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	173.3
5月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	123.9
10月	165.9	16	20.9	11.3	2	136.5
11月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	146.5
12月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	181.3
年	1282.9	13.8	19.1	8.8	2.4	1912.8

(5) 台風の襲来歴

隔離ほ場のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 2 に示した。

表 2 関東地方への過去 10 年間の台風の接近数

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2018 年 12 月 10 日
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)

「台風が中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）に接近した台風」としています。(注) 接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しません。」(サイトの原文のまま)

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2017							1	1	1	2			5
2016								4	1	1			6
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2

(6) 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

隔離ほ場を建設して (A. 2004 年、B. 2006 年、C. 1991 年) 以来、冠水したことはない。

(7) 過去 10 年における強風の経験とその程度

2018 年 9 月 30 日に関東地方を通過した台風 24 号により、観音台第七事業場 隔離ほ場外からの倒木により、外周を取り巻くフェンスが破損し、早急に修繕を行った。当時、栽培されていた遺伝子組換え植物はなかった。それ以外では、隔離ほ場を建設して以来、強風による設備・作物への被害はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、つくば市が作製した「つくば市洪水ハザードマップ」において、浸水想定区域に指定されていない。

(9) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、イネの栄養生長期における鳥類による被害は報告されていない。出穂期以降は防鳥網によってこれらの侵入を防ぐことができる。また、隔離ほ場にはフェンスが設置されており、獣害は発生していない。

(10) 隔離ほ場周辺の生物相

- 1) 遺伝子組換え植物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。
- 2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
交雑可能な近縁野生種はない。

5. 栽培管理等

(1) 栽培履歴

隔離ほ場における過去5年間の栽培履歴は以下のとおりである。

A.

栽培年度	植物
2014年	イネ*
2015年	イネ*
2016年	イネ*
2017年	イネ*
2018年	イネ*

*は遺伝子組換え植物を含む

B.

栽培年度	植物
2014年	イネ*
2015年	イネ*
2016年	イネ*
2017年	イネ*
2018年	イネ*

*は遺伝子組換え植物を含む

C.

栽培年度	植物
2014年	イネ*
	タバコ*
	ソルガム
	コムギ
2015年	イネ*
	タバコ*
	ソルガム
	コムギ
2016年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2017年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2018年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ

(2) 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、別紙「緊急措置計画書」にしたがって速やかに対策を講じる。

(3) 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。なお、本遺伝子組換えイネの栽培終了後も、本隔離ほ場では遺伝子組換え植物の栽培を行う予定である。

4. 試験期間及び隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置
第一種使用規程のとおり



図1 つくば地区観音台事業場における隔離ほ場の配置図

上記の隔離ほ場は、直近の一般農家の水田から 500m 以上、また、農業・食品産業技術総合研究機構が有する直近の水田から 200m 以上の隔離距離を確保している。

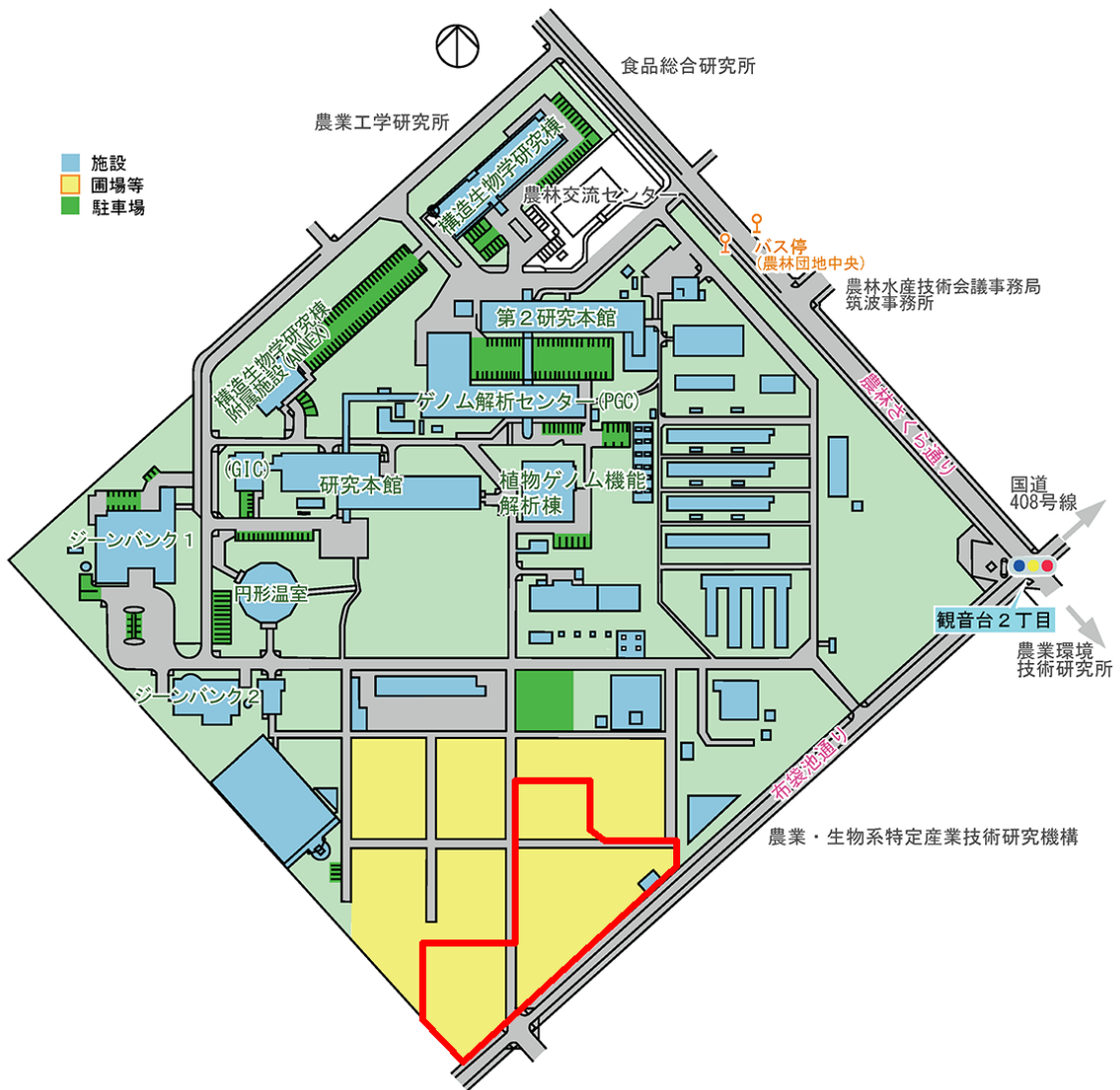


図2 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第三事業場内配置図

隔離ほ場略図

- 水田
- 畑地・土
- 舗装コンクリート
- 建物等
- フェンス
- 出入口
- 給水施設
- 浸透升
- 排水用溝 及び 流路

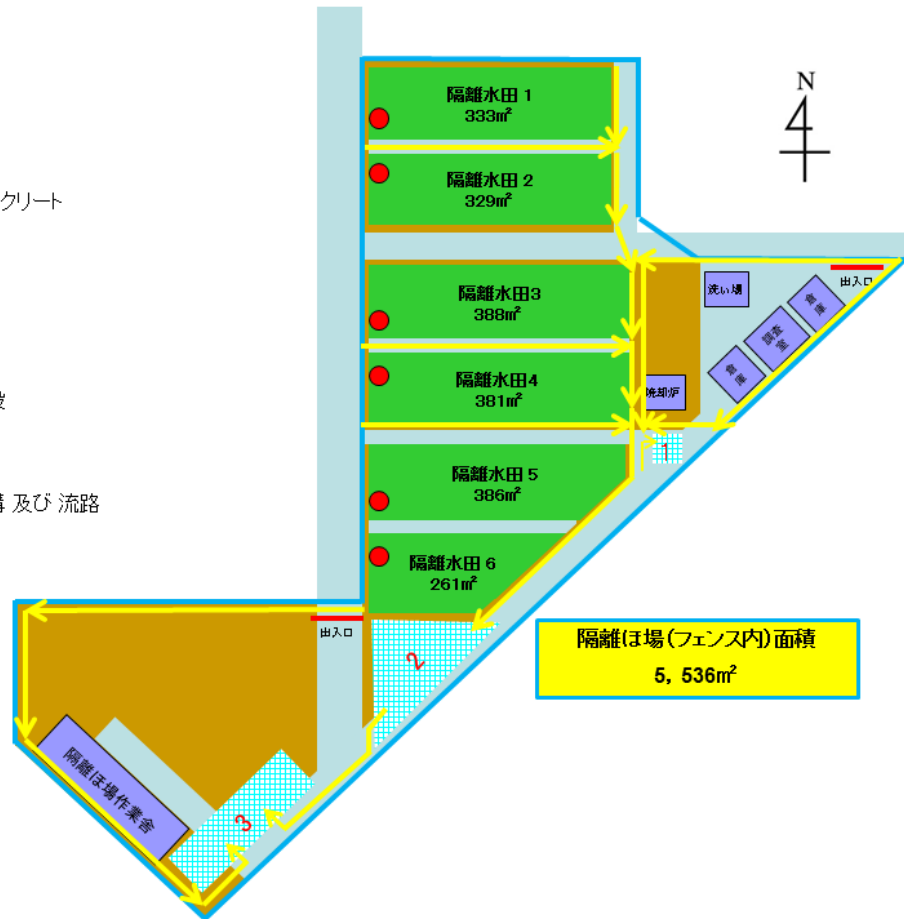


図3 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第三事業場 隔離ほ場内配置図

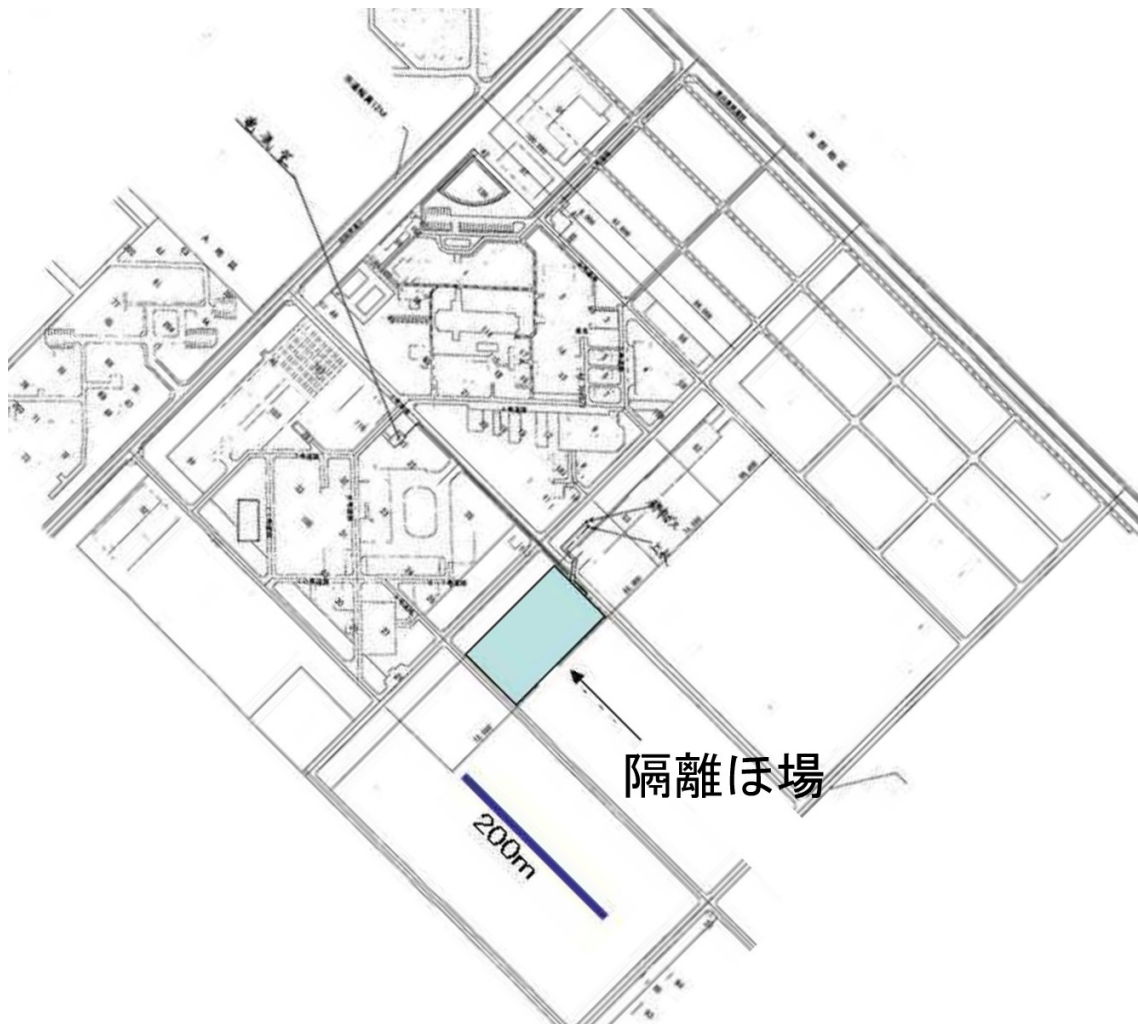


図4 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第四事業場内配置図

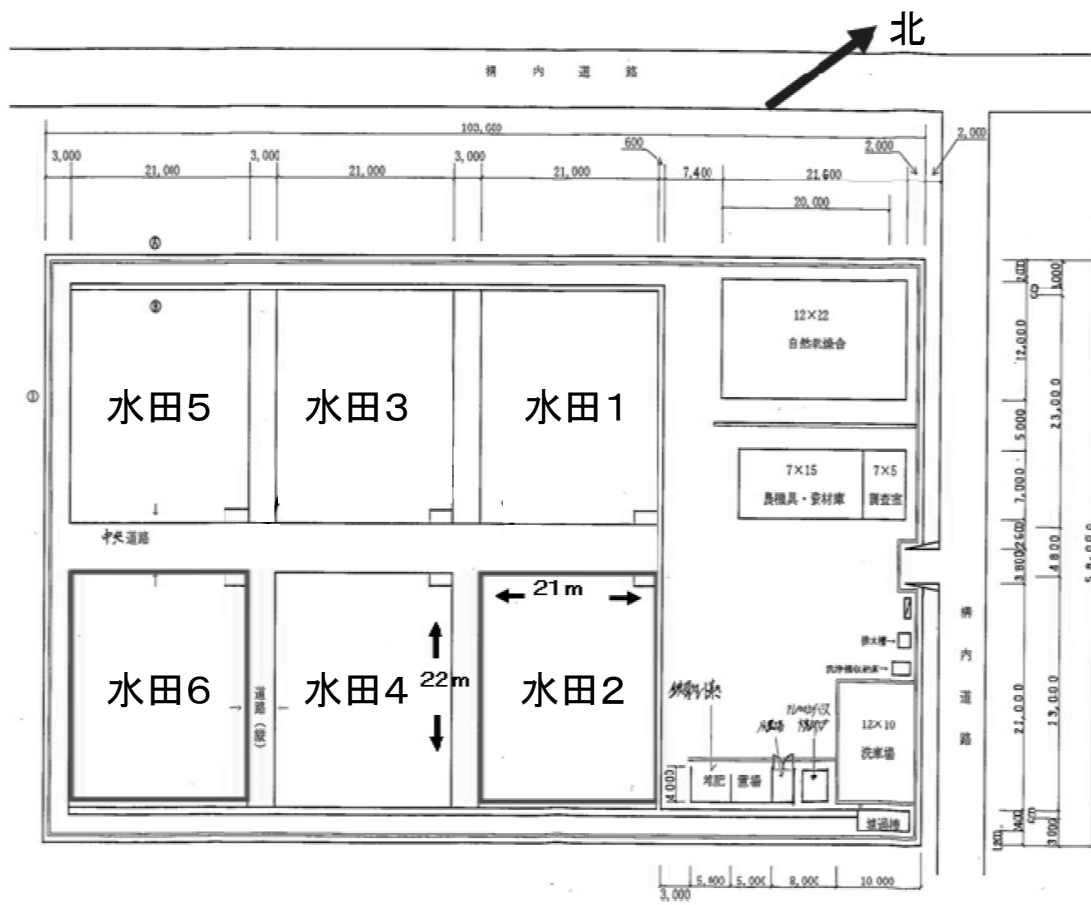


図5 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第四事業場 高機能隔離ほ場内配置図



図6 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第七事業場内配置図

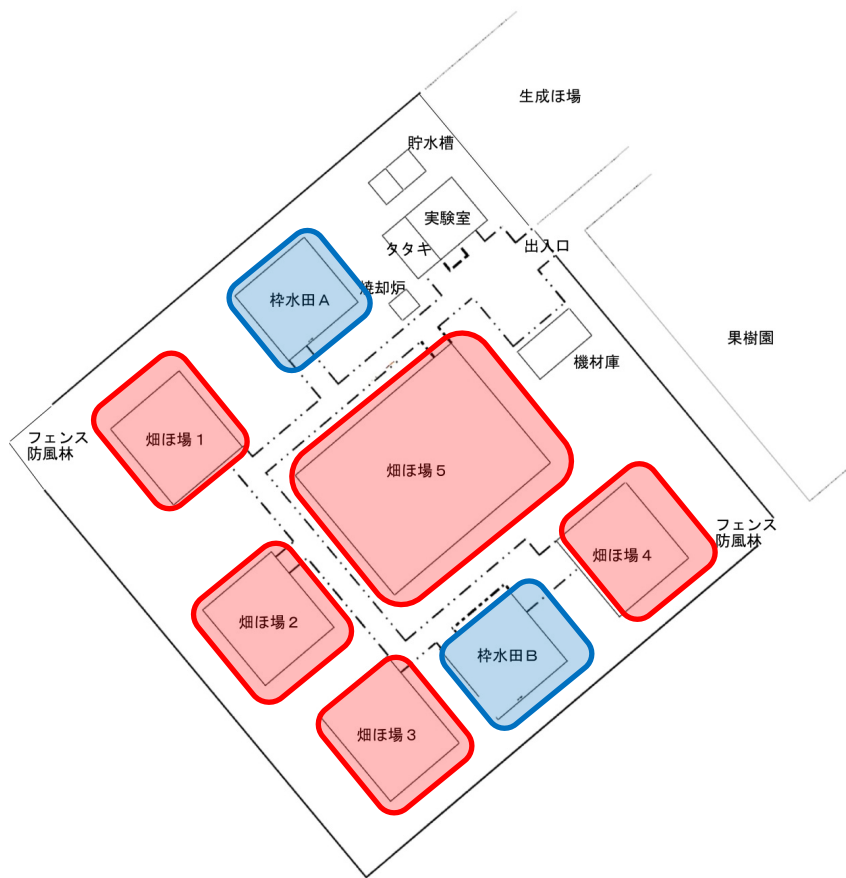


図7 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第七事業場 隔離ほ場内配置図