

スギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ（7Crp, *Oryza sativa* L.）（7Crp#10）申請書
等の概要

第一種使用規程承認申請書..... 1

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	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	
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
(2) ベクターに関する情報.....	11
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	11
(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.....	12
(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.....	13
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	13
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	
(1) 使用等の内容.....	15
(2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響 を防止するための措置.....	15
(3) 国外における使用等に関する情報.....	16
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	
1 競合における優位性.....	17
2 有害物質の産生性.....	17
3 交雑性.....	18
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	20
緊急措置計画書.....	23

第一種使用規程承認申請書

平成16年10月25日

農林水産大臣 島村 宜伸 殿
環境大臣 小池 百合子殿

申請者 氏名 独立行政法人
農業生物資源研究所
理事長 岩淵 雅樹
住所 つくば市観音台2-1-2

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	スギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ (7Crp, <i>Oryza sativa</i> L.) (7Crp#10)
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：農業生物資源研究所隔離ほ場 使用期間：承認日から平成19年12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ように、フェンスを設置している。 (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、見やすい所に掲げている。 (3) 土、遺伝子組換えイネの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗淨するための洗い場を設置しているとともに、遺伝子組換えイネの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽、網等を設置している。 (4) 野生動物等の摂食を防止するために、遅くとも出穂期までに

は、防雀網を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。

2 隔離ほ場での作業要領

- (1) 遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、遺伝子組換えイネの栽培水田で生育することを最小限に抑える。
- (2) 遺伝子組換えイネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えイネが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えイネの栽培終了後は、当該遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに遺伝子組換えイネが隔離ほ場の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に、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 生物多様性影響が生じ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の概要

第1 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および自然環境における分布状況

イ 和名、英名及び学名

イネ、Rice、*Oryza sativa* L.¹⁾

ロ 宿主の品種名又は系統名

キタアケ 品種登録番号 第594号 品種登録年月日1984年9月5日

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

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。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のみでなく、栽培種イネどうしの遠縁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) 使用等の歴史および現状

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、現在も我が国の最も重要な作物として広く栽培されている。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

アジアのモンスーン地帯を中心に、北緯53度～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tを越える。生産量はアジア(90%以上)、中南米、アフリカ、北米、旧ソ連、ヨーロッパの順。日本でも栽培地は北緯44度にまで及び、また世界で最も生産力が高い生産地域になっている。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。この期間内で、田植え可能となる最低気温が13℃、登熟が停止する最低気温は15℃と見なされている⁵⁾。

我が国での流通実態は、約800万tが国内で生産され、ほとんどが国内消費向けに流通している。輸入は60～70万t程度である。これらのうち、約92%が主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) 生理学的小および生態学的特性

イ 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、最適温度を次表に示す。

通常栽培可能温度は20℃以上で、水稻は湛水条件(水田)で栽培する。栽培土壌が常時湛水され、強度の還元土壌になった場合は根腐れを起こし、養分吸収、生育が阻害される。逆に、栽培土壌の乾燥が進行し、土壌水分が萎凋点以下になった場合には、生育は抑制され、はなはだしいときは早害を受ける⁶⁾。

表 生育時期別の温度変化に対するイネの反応³⁾

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				

ロ 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。種子の散布は、籾の老化が進み枝梗から種子が脱落す

ることで行われる。しかし、現在の日本における栽培稲では、一般に脱粒性は極めて小さい⁶⁾。イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネ品種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⁾。一般の日本型イネ品種の白色米の種子をほ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⁶⁾。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
刈株から“ひこばえ”と呼ばれる新しい分けつが発生し生長するが、我が国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
イネは極めて自殖性が高い作物である。同種の作物を近隣で栽培すると、条件によっては5%程度の自然交雑が起こりうるが⁸⁾、通常は1ないし2%である。また、出穂期が同じ品種を栽培する場合には交雑率が高まる可能性が想定されるが、イネの花粉飛散距離は短く、寿命も短いことから20m以上ほ場を離せば交雑を回避できる⁹⁾。国外では、栽培イネと交雑可能な近縁野生種として野生イネと呼ばれている植物（*O. nivara*、*O. rufipogon*等）が自生している地域もあるが、それらが我が国に自生しているという報告はない。

④ 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⁾。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。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。花粉の寿命は一般に3～5分⁸⁾、最大で10分程度とされる。

花粉の飛散距離は、糯品種への粳品種の混入試験では、両者の距離が15mまでは混入が見られたが（ちなみに距離4.5mで交雑率は0.6%以下、10mでは0.04%以下）、20m以上では混入が見られなかった¹¹⁾。

ハ 有害物質の産生性

日本で一般的に栽培されている水稻の中には、周囲の野生植物の生育を抑制する他感物質を産生するものが存在している。品種間差は大きく、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

活性は低いことが報告されている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。

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 構成および構成要素の由来

- a. スギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ(7Crp, *O. sativa* L.) (7Crp#10)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に示した。

表 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
花粉症予防効果ペプチド(7Crp)発現カセット		
グルテリン GluB-1 プロモーター	2.3kb	イネ種子貯蔵蛋白質グルテリンGluB-1をコードする遺伝子のプロモーター。種子登熟期の胚乳組織特異的に発現を規定する。イネ由来。
グルテリン GluB-1 シグナルペプチド	0.072kb	イネ貯蔵蛋白質グルテリンGluB-1のシグナルペプチド配列。グルテリン貯蔵タンパク質の小胞体膜内への輸送に関与する。イネ由来。
7Crp (目的遺伝子)	0.288kb	スギ花粉 Cryj I 及び Cryj II アレルゲン蛋白質由来で、ヒトのスギアレルゲン特異的 T 細胞が認識する 7 箇所の前配列を連結させた人工ペプチドをコードする遺伝子。スギ由来。
KDEL 局在化シグナル	0.012kb	導入遺伝子産物を小胞体へ係留に関与するシグナル配列。真核生物由来。
グルテリン GluB-1 ターミネーター	0.65kb	グルテリン GluB-1 遺伝子のターミネーター。転写終結を規定する。イネ由来。
ハイグロマイシン耐性発現カセット		
CaMV35S プロモーター	0.8kb	恒常的発現プロモーター。下流につないだ遺伝子を植物体全体で発現させる。カリフラワーモザイクウイルスゲノム DNA 由来。
hpt	1.1kb	ハイグロマイシン耐性を付与する選抜マーカー遺伝子。大腸菌由来。
Ag7 ターミネーター	0.3kb	アグロバクテリウム Ti プラスミド上の Ag7 遺伝子のターミネーター。導入遺伝子の転写集結を規定する。アグロバクテリウム・Ti プラスミド由来。

用語解説

T細胞：胸腺由来で、ヘルパーT細胞として抗原刺激により活性化されたB細胞の分化・増殖、そしてIgE抗体産生を助ける。

ロ 構成要素の機能

花粉が鼻や目から吸入されると、花粉を異物として認識し、異物を排除する防御反応が生体に備わっている。この反応を免疫反応といい、異物を抗原（アレルゲン）、抗原と結びついて、抗原を排除する物質を抗体と呼んでいる。この免疫反応が過剰になった状態がアレルギー症状で、花粉症などのアレルギー疾患としてあらわれる。

スギ花粉症では、花粉中のCryj I およびCryj II と呼ばれる蛋白質が主要な抗原として同定されている。アレルギー特異抗体としてIgEと呼ばれる抗体が、抗原に反応して血液中のB細胞リンパ球（白血球の成分の一つ）で生産され、肥満細胞に結合し、待機した状態になっている。スギ花粉が飛散する時期に、花粉抗原が来ると、抗原は肥満細胞の持っている抗体にくっついて、肥満細胞からさまざまな炎症を起こす化学伝達物質を出す。この化学伝達物質が花粉抗原を鼻の外に押し出そうとして、鼻に働いて、くしゃみ、鼻水、鼻づまりなどアレルギー炎症を引き起こす¹³⁾。

花粉症の治療には、化学伝達物質の作用や合成・放出を抑える薬物や免疫抑制剤を利用した対症療法的な治療法が一般的である。唯一の根治的治療法は減感作療法と呼ばれるもので、アレルギーの原因となっている花粉抗原を少しずつ増やしながら注射していき、抗原に対する過敏性を減弱させることを目的とする方法である。しかし、減感作療法は、毎週医者に通って注射を打つという煩雑さや、抗原を注射することによる痛みやかゆみを伴い、治療期間が長くなること、まれに副作用がおこる可能性がありながら、全ての患者が根治することはないことから、さほど普及していない¹³⁾。

一方、抗原や抗原由来のT細胞抗原決定基（T細胞エピトープ）を注射や経鼻、経口により投与すると、アレルギー反応が軽減することが報告されている。その機構として、スギ花粉抗原特異的T細胞の不応答化や、T細胞自身の欠失、制御性T細胞が誘導されることが示唆されている^{14), 15)}。

そこで、この現象を利用しT細胞エピトープを用いたペプチド免疫療法が提案されている。この療法は、アレルゲン自体を用いず、T細胞エピトープ部分にIgE抗体やB細胞抗原決定基を含まないようにして投与するもので副作用がなく、簡便に適用できるという特徴をもっており、第2世代の抗原特異的免疫療法として注目されている。

さらに、腸管には経口免疫寛容現象と呼ばれる有効な免疫機構が腸管に備わっていることから、一般に食べ物に対して免疫反応が見られないように、経口でスギ抗原が投与された場合には、スギ花粉抗原に対するアレルギー反応を効率的に抑制させる（経口免疫寛容の誘導）ことができる可能性も高い。

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、スギアレルゲン特異的な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¹⁶⁾。そこで、スギアレルゲンのT細胞エピトープを毎日食べるコメの中に蓄積させることができれば、経口免疫寛容現象を利用して、“食べることでスギ花粉症の緩和や治療効果の期待できる米”を開発

できるのではないかというアイデアに基づき、エピトープペプチド集積米が開発された。

図1 aに示されるように、米の中で発現させるT細胞エピトープとして、Cryj I から3箇所、Cryj IIから4箇所の計7個が多くの人々のスギアレルゲン特異的T細胞が認識する主要なエピトープとして同定されてきた。そこでこれら7個のエピトープを図1 bのように連結した7連続ペプチド（7Crp；96 アミノ酸の長さ）を構築し、さらにこの7Crpの蓄積量を高めるKDEL配列を7Crp配列の下流に連結した100アミノ酸のペプチドを米の胚乳中に蓄積することとした^{17), 18)}。同じアレルゲンから複数のエピトープを用いるのは、ヒトの遺伝子型によって認識されるエピトープが異なることから、それぞれのアレルゲンに対して、複数個用いることで、エピトープとして認識される確率を高め、治療できるスギ花粉症患者の幅を増やす効果が期待できるからである。

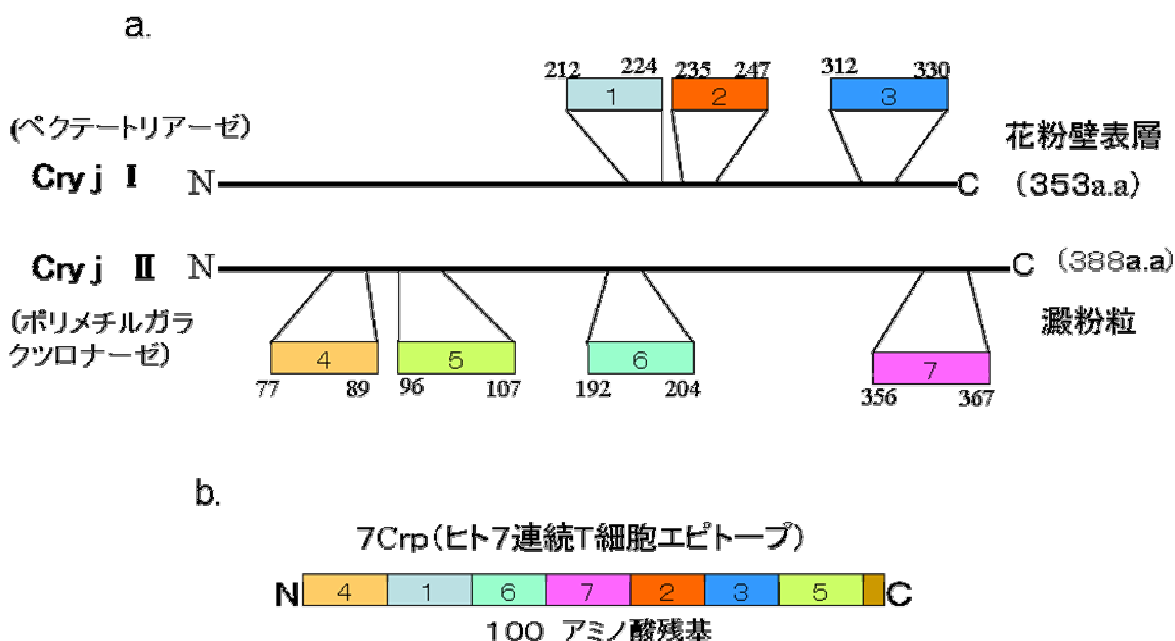


図1. ヒトのT細胞が認識するスギアレルゲンの抗原決定基（エピトープ）と7Crp中の7個のエピトープの配列順序

こうした7連続ペプチド（7Crp）は、もともとのCryj IやCryj IIと同様90%以上の患者で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¹⁶⁾。またスギ花粉アレルギー特異的なIgE抗体との結合性がないことも明らかになっており、安全に経口免疫寛容を起こすためには、アレルゲンそのものを用いるよりはるかに適切といえる。

有効性を調べる試験の一つとして、コメに集積させたエピトープペプチドを抽出し、マウスに対してT細胞増殖反応性を調べた結果、本来のアレルゲンと同様な反応性を示した。さらに7個のエピトープの1個をエピトープとして認識する特別なマウスに、このエピトープ集積米を毎日5,6粒ずつ1ヶ月食べさせ、その後スギアレルゲンを1日おきに9回鼻から感作させたところ、普通のコメを食べさせたマウスに比べてIgE抗体のレベルが約30%程度に低下することを確認した^{19), 20)}。

用語解説

エピトープ：抗原提示細胞（マクロファージ）細胞内で消化・修飾され抗原性を強調された抗原蛋白質から由来する 10～20 アミノ酸残基からなる抗原ペプチド。このペプチドは抗原情報として、細胞膜表面に露呈され、T 細胞へと伝えられる。

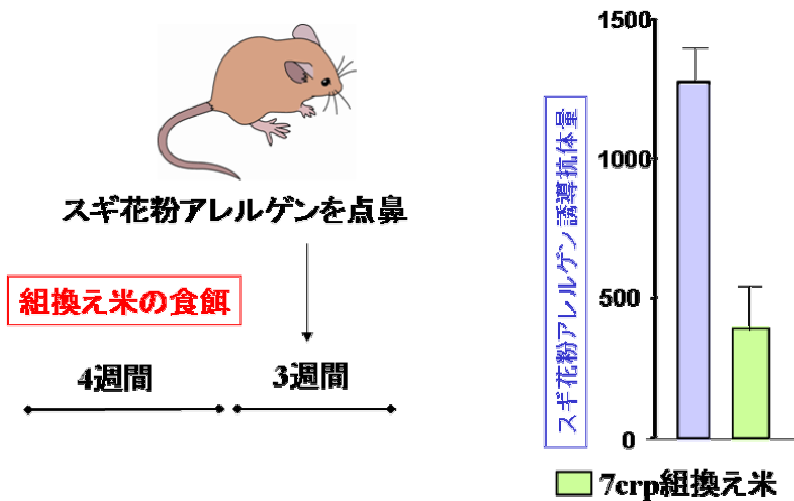


図 2. 7Crp エピトープペプチド集積米経口投与による免疫寛容誘導能

さらに、通常の炊飯による摂取形態を考慮して、このコメに蓄積されたエピトープペプチドの高温安定性を、100℃、20 分沸騰水中で処理して調べたところ、安定であることが明らかになった。また、このエピトープペプチドを発現することで、米に本来含まれている米アレルギーの原因となっている米アレルゲン蛋白質遺伝子の発現にも影響がないことも確かめた。

- 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それぞれの機能
 - a. 7Crp発現カセット
 - ア) GluB-1 プロモーター
イネ由来種子貯蔵蛋白質グルテリンのプロモーターで、DNAを鋳型にmRNA合成を開始するDNA上の特定の塩基配列である。種子登熟期の胚乳に特異的に発現する。
 - イ) GluB-1 シグナルペプチド
イネ由来種子貯蔵蛋白質グルテリンのシグナルペプチドの塩基配列。シグナルペプチドは合成された蛋白質の小胞体への付着および膜通過の先導役を努め、膜通過後にシグナルペプチターゼで切断される。
 - ウ) 7Crp
スギ花粉中の花粉症の原因となる抗原蛋白質Cry j I および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”）部分を発現させる塩基配列（図 1 参照）。

Cry j I から3箇所、Cry j II から4箇所の合計7箇所より、それぞれの長さが12から19個アミノ酸残基数からなるヒトT細胞エピトープが同定されている。この7箇所のエピトープ（アミノ酸配列）を連結させ、96アミノ酸残基からなる人工ペプチド(7Crp)を発現させるため、T細胞エピトープのアミノ酸配列に従って人工遺伝子を合成した（図1参照）。合成の際、イネ種子の主要な貯蔵蛋白質をコードする遺伝子群のなかで使用頻度の高いコドンを選択した^{17),18)}。

エ) KDEL

蛋白質を小胞体へ局在化させる役割を果たす4つのアミノ酸の塩基配列。C末端にKDEL配列(アミノ酸)をもつ蛋白質は小胞体に局在化する。KDEL配列を付加することで、KDEL配列がない場合と比較して7Crpの蓄積量が4～5倍量に高まることが明らかになっている。KDEL配列の付加は7Crpの蓄積部位を変化させなかった。7Crpの蓄積部位は貯蔵蛋白質が蓄積している蛋白質顆粒IとIIに集中して蓄積していた。

オ) GluB-1 ターミネーター

イネ由来蛋白質グルテリンのターミネーターで、mRNAの合成を終結させるのに必要な塩基配列。

б. ハイグロマイシン耐性発現カセット

ア) CaMV35S プロモーター

カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターで、DNAを鋳型にmRNA合成を開始するDNA上の特定の塩基配列である。植物の全組織で発現する。

イ) hpt

大腸菌K-12株由来の遺伝子で抗生物質ハイグロマイシン耐性を示す。

ウ) Ag7 ターミネーター

Agrobacterium tumefaciens C58株由来のターミネーターで、mRNAの合成を終結させるのに必要な塩基配列。

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

a. 7Crp

7Crpはスギ花粉抗原蛋白質、Cry j I 及びCry j II のヒトT細胞エピトープ部分であり、スギアレルギー患者のIgE抗体との結合性がなく、B細胞エピトープも含まないことから、アレルギーを引き起こす可能性は極めて少ないと考えられる。

b. hpt

ハイグロマイシンをリン酸化させる酵素を産生する。この酵素の働きによりハイグロマイシンがリン酸化され不活化する。ハイグロマイシン耐性酵素については、アレルゲンタンパク質との相同性は認められず、アレルギー反応を引き起こす可能性は極めて低い。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称および由来

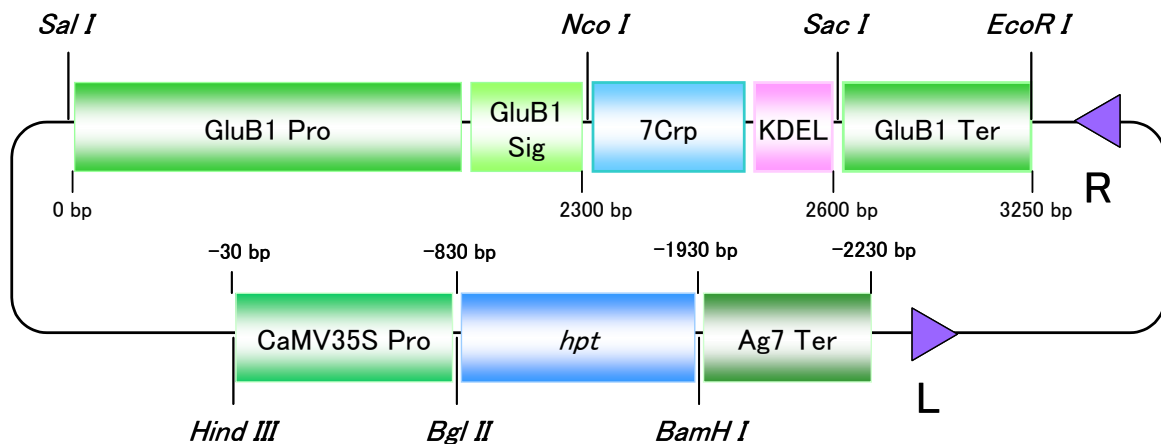
バイナリーベクター pGTV-35S-HPT²¹⁾。大腸菌 K12 株および *Agrobacterium tumefaciens* C58 株由来。

ロ 特性

- ① ベクターの塩基数及び塩基配列
塩基数は13900bps。塩基配列等は文献 21 参照。
- ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能
薬剤耐性遺伝子としてハイグロマイシンB耐性遺伝子 (hpt) と、hpt 遺伝子の発現調節因子として、カリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV 35Sプロモーター及び、*Agrobacterium tumefaciens* C58 株由来のAg7ターミネーターが存在する。
- ③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報
ベクターの感染性はない。

(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



ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法
目的遺伝子を導入したアグロバクテリウムをイネ種子カルスに感染させ、ハイグロマイシン (50mg/l) 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
組換えイネ (T₁世代) の種子をマルチビーズショッカーで粉末状に粉碎し、滅菌

水を加えて混合後、遠心後の上清をリファンピシン(20mg/l)を含むYEB培地へ塗布し、28℃で培養した。3日後、観察によりアグロバクテリウムの確認を行った結果、アグロバクテリウムの増殖は観察されなかった。このことから、組換えイネ後代には遺伝子導入に用いたアグロバクテリウムは残存していないと判断した。

- ③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の副生物の存在状態を確認した系統、閉鎖系および非閉鎖系温室での試験に供した系統、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

平成13年から遺伝子導入実験を開始し、閉鎖系(文部科学省旧「組換えDNA実験指針」に基づく分類)における安全性試験の過程で4系統を選抜した。この4系統について自殖により世代を進めるとともに、生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために更に解析を進めた。

平成15年から非閉鎖系区画(文部科学省旧「組換えDNA実験指針」に基づく分類)での安全性試験を開始し、「スギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ(7Crp、*Oryza sativa*L.) (7Crp#10)(以下「7Crp#10」という)」が7Crpペプチドを種子中に最も多く蓄積していることから選抜した。現在、非閉鎖系温室でT₅植物を栽培している。世代と実施した試験を次図に示す。

なお、全ての試験において、対象品種は宿主であるキタアケとした。

試験項目	系統名 世代	7Crp#10					
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
遺伝子の存在状態(サザン) (PCR)				○			○
			○	○	○	○	
遺伝子の発現状態 部位特異的発現			○	○	○	○	○
				○			
アグロバクテリウムの残存性		○					
形態および生態学的特性					○		
生育初期における低温耐性						○	
花粉の稔性および直径					○		
種子の生産性、発芽率、休眠性および脱粒性					○	○	
有害物質産生性					○		

(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を用いたサザン解析により、移入した核酸は染色体上に挿入されていることを確認した。また、世代間でサザン解析のバンドパターンが一致していた事か

ら移入した核酸は染色体上に存在すると判断した。

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

① 核酸のコピー数

T₂およびT₅世代のゲノムDNAのサザン分析により7Crp、hpt遺伝子ともにゲノム上に安定に保持され、コピー数は4と判断された。

② 複数世代における遺伝の安定性

T₁~T₄世代のPCR分析の結果、T₂およびT₅世代のゲノムDNAのサザン分析の結果、各世代で安定して遺伝子が保持されていた。

ハ 染色体上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

遺伝子数は4コピーであるが、それぞれ4個のうち2個ずつ遺伝子は隣接して位置していた。導入された遺伝子座は2個と推定した。

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

7Crp#10の閉鎖系で採種したT₂~T₄種子および非閉鎖系温室で採種したT₅種子についてウエスタン解析を行った結果、安定した発現が確認された。

ホ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物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
該当するウイルスは存在しない。

(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

7Crp遺伝子全長を増幅するためのオリゴプライマー(7Crp-F、7Crp-2R)を用いたPCR法により、7Crp遺伝子の特異的に検出及び識別が可能である。このプライマーセットを用いたPCRでは非形質転換体であるキタアケのDNAを鋳型として用いた時には増幅されるバンドはなく、組換えイネから導入遺伝子の特異的に検出する。

(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

イネの胚乳部分で、スギ花粉抗原蛋白質、Cry j I 及びCry j II から由来する12~19アミノ酸残基からなるヒトT細胞エピトープ7個を連結した7連続ペプチドの発現を確認した。

また、7Crp#10のT1植物の穎及び葉、T2種子の胚及び胚乳のウエスタン解析を行ったところ、登熟期以降の胚乳で特異的に発現していることが確認された²²⁾。

ロ 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

形態及び生育特性を調査するためにT₄世代の7Crp#10と宿主であるキタアケを、非閉鎖系温室内有底水田（内寸7.2×1.1m）に、栽植密度25×15cmで、2003年5月2日に移植した。施肥量はNPK各4kg/10aとした。なお移植苗は、2003年3月24日に播種し、閉鎖系温室で200育苗したものを使用した。

有害物質の産生性を調査するために、T₄世代の7Crp#10とキタアケについて、非閉鎖系温室で、水田土壌を詰めた1/5000aポットに2003年4月24日に移植した。

① 形態及び生育の特性

出穂期と稈長、穂長、穂数については成熟期に調査した。7Crp#10とキタアケとの間に統計的な有意差は認められなかった。

② 生育初期における低温耐性

2葉期の苗を暗所5℃で10日間処理した後、非閉鎖系温室での生育を2週間後に調査した。7Crp#10、キタアケとも約80%の個体が生存した。生存した個体はすべて主茎が枯死し、分けつが主茎の他に平均1.1本発生した。7Crp#10とキタアケとの間に統計的な有意差は認められなかった。

③ 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場試験において調査を行う。

④ 花粉の稔性及びサイズ

花粉稔性及びサイズについて7Crp#10とキタアケに相違は認められなかった。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

一穂粒数を調査した結果、7Crp#10とキタアケに相違は認められなかった。

成熟期の穂を握って脱粒性を調査した結果、7Crp#10、キタアケともに難で、相違は認められなかった。

休眠性（穂発芽性の調査）の試験を行った結果、7Crp#10、キタアケともに穂発芽易で、相違は認められなかった。

収穫後5℃で約3ヶ月保存した種子の発芽率を調査した結果、7Crp#10、キタアケともに90%以上の発芽率で、統計的な有意差は認められなかった。

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

非閉鎖系温室でポット栽培した後の土壌を使用した後作試験、成熟期の植物体を使用した鋤き込み試験を行った結果、7Crp#10とキタアケとの間に、ダイコンの発芽について差を検出できなかった。

栽培後の土壌の糸状菌、放線菌、細菌数を調査した結果、7Crp#10とキタアケの間に統計的な有意差は認められなかった。

また、閉鎖系で栽培したT₃世代の7Crp#10とキタアケについて揮発性成分のガスクロマトグラフィー分析、植物体内成分の高速液体クロマトグラフィー分析を行っ

た結果、7Crp#10とキタアケの間に差異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

スギ花粉症の原因となっている2種類の抗原蛋白質（アレルゲン）のうち、スギ花粉アレルゲン特異的なヒトのT細胞が認識するエピトープと呼ばれる領域（12～19個のアミノ酸の長さ）7つを連結した人工ペプチドをイネの種子の胚乳中に特異的に蓄積させ、エピトープペプチドを集積させた米を食べることで、体内でスギ花粉アレルゲンに対して生産されるIgE抗体の産生量を低下させる機能を通じて、スギ花粉症を緩和する米の開発を行う。

本申請は、花粉症緩和等についての有効性評価試験（動物試験およびヒト等）を行うための材料確保を目的として行う。また、生物多様性影響評価に資するデータも収集する。

(1) 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

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県つくば市観音台2-1-2

名称：農業生物資源研究所隔離ほ場

使用期間：承認日から平成19年12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ように、フェンスを設置している。
- (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、見やすい所に掲げている。
- (3) 土、遺伝子組換えイネの種子等が付着した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しているとともに、遺伝子組換えイネの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽、網等を設置している。
- (4) 野生動物等の摂食を防止するために、遅くとも出穂期までには、防雀網を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。

2 隔離ほ場での作業要領

- (1) 遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、遺伝子組換えイネの栽培水田で生育することを最小限に抑える。
- (2) 遺伝子組換えイネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えイネが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えイネの栽培終了後は、当

該遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。

- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに遺伝子組換えイネが隔離ほ場の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に、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1) から (5) に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 生物多様性影響が生じ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。

- (3) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置
緊急措置計画書を参照。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定

温室での栽培試験において、7Crp#10と宿主であるキタアケの形態および生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率における相違について調査した結果、7Crp#10とキタアケに統計的有意差は認められなかった。

7Crp#10は胚乳において7Crpペプチドを発現しているが、この形質により競合における優位性が高まるとは想定されない。

7Crp#10の競合における優位性において、我が国の自然環境下で生育した場合の特性が十分に明らかにされていないが、7Crp#10を第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用する場合、7Crp#10がほ場外へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、野生植物と競合することはなく、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

上記の評価から競合における優位性において、生物多様性影響が生ず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植物等の特定

非閉鎖系温室までに、揮発性成分、植物体内成分の分析、後作試験、鋤き込み試験、土壌微生物相の調査を行った結果、7Crp#10とキタアケとの間に差は検出されなかった。

7Crp#10が発現するペプチドは、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いる¹⁵⁾。また、7Crp発現米をマウスに経口投与した実験においても、悪影響は認められて

いない¹⁶⁾。これらの結果から、ヒトやマウスに対する7Crp発現米の有害性は低いと考えられる。

ヒトT細胞エピトープは他の動物、鳥類との反応の可能性は極めて少ないこと、隔離ほ場はフェンスの設置、防雀網の設置をしているため、他の動物、鳥類の食害を防ぐことが可能であることから、これらの野生生物へ、影響を及ぼすおそれはないと判断した。

一方、昆虫等への影響については、7Crpの発現部位が胚乳のみであることから、種子形成期以降に米を食べる（吸汁する）カメムシ（クモヘリカメムシ、アカヒゲホソミドリカスミカメ等）やウンカ等の昆虫に影響が出る可能性は完全に否定できない。

よって、7Crp#10により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、種子形成期以降に米を食べる（吸汁する）カメムシやウンカ等の昆虫類が挙げられる。

（2）影響の具体的内容の評価

7Crpペプチドがマウスに悪影響を与えないことは、経口投与実験で確認されている。しかし、7Crpペプチドが登熟期の種子を摂食・吸汁するカメムシやウンカ等の昆虫類にどのような影響を及ぼすかは、現時点では不明であるので、本隔離ほ場に訪れる昆虫の生態相、7Crpペプチド蓄積種子をカメムシやウンカに摂食・吸汁させた時の影響を調査する。

（3）影響の生じやすさの評価

カメムシやウンカ等が7Crpペプチドにより影響を受ける可能性を完全に否定できないが、これらの昆虫が7Crpペプチドを蓄積している種子を摂食・吸汁する時期が限られていること、7Crpペプチドが他の生物に与える影響が小さいと考えられる点、また使用場所が隔離ほ場と限定される点などから、仮に影響が出るにしてもその可能性は無視できるほど低いと判断した。

（4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記の評価から有害物質産生性について、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断する。

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、これらの植物が我が国に自生しているという報告はない。

以上のことから、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記の評価から交雑性について、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断する。

第3 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は、非閉鎖系温室での栽培において、7Crp#10とキタアケに形態や生育的特性等に有意な統計的差異が認められなかったこと、7Crp#10の第一種使用等の内容及び方法により生物多様性影響を防止することが可能なことから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。

有害物質産生性については、非閉鎖系温室での栽培において、7Crp#10とキタアケとの間に有害物質の産生性に相違が認められなかったこと、7Crp#10が発現するペプチドにも有害性はないと考えられること、7Crp#10の第一種使用等の内容及び方法により生物多様性影響を防止することが可能なことから、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存在しないことから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。

以上を総合的に評価し、7Crp#10を第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用した場合、生物多様性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) 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. Accepted.
- 3) Ishikawa R., Naoko T., Imai K., Sato Y.-I., Ymagishi H., Shimamoto Y, Ueno K., Morishima H. and Sato T. (2004) Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. Genet. Resour. Crop Evol. Accepted.
- 4) 蓬原雄三. (1990) イネの育種学. 東京大学出版会. 東京.
- 5) 栗原 浩、蓬原雄三、津野幸人ほか. (2000) 作物栽培の基礎. 農山漁村文化協会. 東京.
- 6) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、石原 邦、平田熙、石井龍一 (編) (1990) 稲学大成 (第2巻) 生理編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 7) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、山口彦之、菊池文雄 (編) (1990) 稲学大成 (第3巻) 遺伝編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 8) OECD. (1999) Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice), OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.14.
- 9) 農林水産技術会議 (2003) 5-1 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方. 第2回「第1種使用規程承認承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料.
http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siryous_1.pdf
- 10) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、前田英三、山崎耕宇 (編) (1990) 稲学大成 (第1巻) 形態編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 11) 阿部吉雄、清水信夫、大河浩一 (1978) イネのもち品種種子へのうるち粒の混入防止について(第1報)、愛知県農業総合試験場研究報告A第10号別刷, 37-48.
- 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) 齊藤洋三、井手武 (1994) 花粉症の科学. 化学同人. 京都.
- 14) Haselden B.M., Kay A.B. and Larche M. (2000) Peptide-mediated immune responses in specific immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 122, 229-237.
- 15) Wallner B.P. and Geftter M.L. (1994) Immunotherapy with T-cell-reactive peptides derived from allergens. Allergy, 49, 302-308.
- 16) Hirahara K., Tatsuta T., Takatori T., Ohtsuki M., Kirinaka H., Kawaguchi J., Serizawa N., Taniguchi Y., Saito S., Sakaguchi M., Inouye S. and Shiraishi A.

- (2001) Preclinical evaluation of an immunotherapeutic peptide for Japanese cedar pollinosis: a hybrid peptide comprising seven T-cell determinants of Cry j1 and Cry j2, the major Japanese cedar pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 94-100.
- 17) 高岩文雄、高木英典、楊麗軍 (2003) スギ花粉アレルゲンヒト T 細胞エпитープをコメ胚乳中に集積させたスギ花粉症緩和米の開発 — 原理と導入遺伝子の構築、第 21 回日本植物細胞分子生物学会、 196.
- 18) 高木英典、楊麗軍、高岩文雄 (2003) スギ花粉アレルゲンヒト T 細胞エピトープをコメ胚乳中に集積させたスギ花粉症緩和米の開発 — 形質転換イネの作出と解析、第 21 回日本植物細胞分子生物学会、 197.
- 19) 高岩文雄 (2004) スギ花粉症緩和米の開発、*食の科学*, 312, 32-38.
- 20) 農業生物資源研究所ホームページ、<http://www.nias.affrc.go.jp/gmo/basic.html>
- 21) Becker D., Kemper E., Schell J. and Masterson R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.*, 20, 1195-1197.
- 22) Qu L. Q. and Takaiwa F. (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotech. J.*, 2, 113-125.

緊急措置計画書

平成16年10月25日

氏名 独立行政法人 農業生物資源研究所
理事長 岩淵 雅樹
住所 茨城県つくば市観音台2-1-2

第一種使用規程の承認を申請しているスギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ（7Crp、*Oryza sativa* L.）（7Crp#10）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者
個人名・所属は、個人情報なので非開示
- 2 第一種使用等の状況の把握の方法
 - (1) 第一種使用規程の承認を申請しているスギ花粉症予防効果ペプチド含有イネ（7Crp、*Oryza sativa* L.）（7Crp#10）（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、直ぐにその内容を周知するために電話、電子メール及び文書などにより連絡を取る。また、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
隔離圃場で栽培されている本LMOは、焼却処理あるいはすき込み等による不活化を行う。
- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制
生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための研究所内における組織体制及び連絡窓口を報告する。