

様式第1 (第7条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成21年 4月 1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  
申請者 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 感受性イネ(<i>OsPHR</i>, <i>Oryza sativa</i> L.) (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<br/>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<br/>使用期間：承認日から平成25年3月31日まで</p> <p>1 隔離圃場の施設</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(4) 遅くとも出穂期までには防雀網を設置する。</p> <p>(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漏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> <p>2 隔離圃場の作業要領</p> <p>(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交配可能な植物が隔離圃場内の栽培実験区画で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 組換えイネを隔離圃場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。</p> <p>(3) 隔離圃場内の栽培実験区画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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> |

生物多様性影響評価書

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                           | 5  |
| (1) 供与核酸に関する情報                                   | 5  |
| (2) ベクターに関する情報                                   | 10 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法                               | 12 |
| (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             | 14 |
| (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            | 16 |
| (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                           | 20 |
| (1) 使用等の内容                                       | 20 |
| (2) 使用等の方法                                       | 20 |
| (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          | 22 |
| (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     | 22 |
| (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 | 22 |
| (6) 国外における使用等に関する情報                              | 22 |
| 第二、項目ごとの生物多様性影響の評価                               | 22 |
| 1, 競合における優位性                                     | 22 |
| 2, 有害物質の産生性                                      | 24 |
| 3, 交雑性   | 25 |
| 4, その他   | 25 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 第三, 生物多様性影響の総合的評価 | 25 |
| 引用文献リスト           | 27 |
| 緊急措置計画書           | 30 |

## 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.<sup>1)</sup>

##### ロ 宿主の品種名又は系統名 (別添 1)

品種名: ササニシキ

登録年: 1963 年 5 月

登録番号: なし (現行種苗法制定以前の登録のため)

農林登録番号: 水稻農林 150 号

##### 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*)及び近縁野生種が自生しているという報告はない<sup>1, 2)</sup>。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。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では、豊富な遺伝的多様性がみられる。なお、これらの地域はいずれも山岳地帯や丘陵地帯であり、地形が複雑で、大規模稲作には適しない地域である<sup>1, 2)</sup>。*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・雲南にかけての地域とされている<sup>1, 2)</sup>。

#### (2) 使用等の歴史及び現状

##### イ 国内及び国外における使用等の歴史

*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<sup>1)</sup>。

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、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<sup>3)</sup>。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、アジアのモンスーン地帯を中心に非常に広範囲な地域で、種々の気候条件下で栽培されている<sup>3)</sup>。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<sup>4, 5)</sup>。また、塩類集積土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている<sup>1)</sup>。栽培面積は、約 1 億 500 万 ha、玄米の総生産量は 5 億 t を超える。生産量はアジア（90%以上）、中南米、アフリカ、北米、ロシア、ヨーロッパの順である。日本でも栽培地は北緯 44 度にまで及び、世界で最も生産力が高い生産地域になっている。

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、我が国では苗を移植する（田植え）栽培法が一般的である<sup>6)</sup>。

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が可能となる最低気温が 13 度、登熟が停止する最低気温は 15 度と見なされている<sup>7)</sup>。

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<sup>1)</sup>。

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) 生理学的及び生態学的特性

### イ 生息または生息可能な環境の条件

通常栽培可能温度は、20℃ 以上で、水稲は湛水条件（水田）で栽培する。生育最低温度は 10~12℃、開花結実には 23℃ を必要とする。逆に 35℃ 以上くらいになると高温障害が発生する<sup>8)</sup>。

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、灌水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<sup>9)</sup>。しかし、塩類集積土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている<sup>1)</sup>。

### ロ 捕食性又は寄生性

イネの捕食性、並びに寄生性に関しては認められていない。

## ハ 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。熱帯に分布するインド型イネは比較的脱粒しやすいが、日本で栽培される栽培イネでは、一般に種子の脱粒性は極めて低い<sup>10)</sup>。

イネの休眠性には品種間差があるが、一般に日本型イネでは、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<sup>10)</sup>。

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<sup>10)</sup>。また、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、収穫年の最初の冬の間には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<sup>10)</sup>。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、発芽能を維持していたことが報告されている<sup>10)</sup>。

### 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。例えば、節から発生する分枝である「ひこばえ」を植え替えることによって株を増やすことができる<sup>1)</sup>。また、刈株からも「ひこばえ」と呼ばれる新しい分げ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。他殖性の程度を示す情報として、開花期間の重複する 2 品種（花粉親、種子親）を用いた花粉飛散による交雑試験が行われている。農林水産技術会議の報告によると、東北農業試験場、および九州農業試験場による試験の結果、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<sup>11)</sup>、また平成 16 年度に実施された調査では、風下側に 25.5 m 離れた位置での交雑が認められ<sup>12)</sup>、「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」においてイネの隔離距離は 30 m と定められている。一方、平成 18～19 年度の北海道立農業試験場においては、他殖する確率を高めるために、種子親を冷水処理により不稔（不稔率 40～50%）を生じさせ特殊な条件下で交雑試験を行った。その結果、特殊な環境下では、「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」で定めるイネの隔離距離（30 m）を超える距離（平成 18

年度試験<sup>13)</sup>：花粉親から 237 m 離れた位置、交雑率 0.024%、平成 19 年度試験<sup>14)</sup>：花粉親から 600 m 離れた位置、交雑率 0.028%) でも交雑することが確認された。

自家不和合性、アポミクシスは報告されていない。また、国外では、栽培イネと交雑可能な近縁野生種（野生イネ：AA ゲノムを有する *O. rufipogon*、*O. nivara* 等）が自生している地域もあるが、それら野生イネが我が国で自生しているという報告はない<sup>1,2)</sup>。

#### 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の確率は栽培品種においては極めて少数（1%以下）である<sup>15)</sup>。穎花には 6 本の葯があり、各葯には 1000 個以上の花粉が含まれている<sup>15)</sup>。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。花粉の飛散距離としては(3)-ハ-③に記したように、冷水処理といった特殊な条件下では、イネの隔離距離（30 m）を超える位置で（600 m）花粉飛散による交雑が報告されている<sup>13,14)</sup>。花粉の寿命は、一般に 3～5 分、最大で 10 分程度とされている<sup>16)</sup>。

## ニ 病原性

認められていない。

## ホ 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しては評価段階ではあるが、アレロパシー活性は品種間、系統間で差異はあるものの、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に活性が高いことが報告されている<sup>17)</sup>。また日本型イネでは、赤米系統の一部（阿波赤米）で、レタスを検定植物とした時にアレロパシー活性（阻害活性）が高いこと<sup>18)</sup>、国際イネ研究所 (IRRI) での研究によれば、イネ 115 系統のうちの 67 系統に雑草抑制効果があることが報告されている<sup>19)</sup>。このようなアレロパシー作用を有する物質を一般的に他感物質というが、候補他感物質に関しては近年多くの報告があり、フェノール物質、フタル酸類、ヒドロキサム酸類、さらにはモミラクトンなどが挙げられている。また、他感物質の土壌中での残存期間は、長くて数ヶ月



程度と考えられている。

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<sup>20)</sup>。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。

## 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

紫外線感受性を示す「本組換えイネ AS-D」<sup>21)</sup>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を表1に示した。

表1 供与核酸のサイズ、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<br>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 <sup>22)</sup> 。 |

|                              |        |        |          |  |
|------------------------------|--------|--------|----------|--|
| CPD 光回復酵素遺伝子コード領域<br>(目的遺伝子) | OsPHR  | 1.5 kb | AB096003 | イネ cDNA ライブラリーからクローニングしたイネ由来 CPD 光回復酵素 (OsPHR) をコードする遺伝子 1.5 kb の塩基配列。CPD 光回復酵素は、紫外線によって DNA 上に誘発されたピリミジン二量体 (CPD) を修復する酵素。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 <sup>23)</sup> 。 |
| ターミネーター                      | Nos(t) | 0.3 kb | AF485783 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子 3' 非翻訳領域で、転写ターミネーターおよび mRNA のポリアダ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 <sup>22)</sup> 。   |
| 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> 由来のノパリン合成酵素遺伝子 3' 非翻訳領域で、転写ターミネーターおよび mRNA のポリアダニル化シグナルを含む。   |

## ロ 構成要素の機能

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、減収を導くことが数多く報告されている<sup>24)</sup>。このような UVB による生育障害の要因、ならびに高等植物の UVB 耐性機構に関する研究が世界各地の研究機関で展開されている。そしてこれまでの解析結果から、イネの UVB による生育障害の主要因の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<sup>21,25)</sup>。植物は元来この 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 による生育障害を軽減できることが閉鎖系温室内での人工光を用いた解析で実証された<sup>21)</sup>。本組換えイネ AS-D は、この CPD 光回復酵素の cDNA (*OsPHR*) が 35S プロモーターに対して逆方向 (アンチセンス) で挿入されている。したがって、本組換えイネ AS-D は、35S プロモーターによって逆鎖 CPD 光回復酵素遺伝子が恒常的に発現し、酵素の発現が抑制されるため、生体内での酵素活性が著しく低下している。したがって、親株のササニシキと比較して、紫外線感受性を示す<sup>21)</sup>。

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、その UVB は、植物の DNA 上に CPD を誘発している。イネ (ササニシキ) の葉においては、通常の日 (宮城県仙台市の 5 月~6 月) において、ゲノム DNA 1 Mb 当たり 6 個程度 (イネゲノム当たり換算すると約 2,700 個) の CPD が常に日中存在している<sup>26)</sup>。この結果は、今日の自然環境レベルでの UVB でも、イネは恒常的に存在している CPD によって、何らかの障害を受けている可能性を示唆している。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。これまでの解析から、世界各地で栽培されているイネ品種は、全て同じ CPD 光回復酵素の遺伝子型を有している訳ではなく、様々な変異が生じ、その変異によって異なる活性を有していることを見出している<sup>27)</sup>。すなわち、イネ品種間で CPD 光回復酵素の活性が異なり、結果として UVB 抵抗性も異なっている。また、相対的に UVB が高い南方地方 (インド、インドネシア等) で栽培されている品種は、CPD 光回復酵素の活性が低く、UVB 感受性を示す<sup>28)</sup>。したがって、日本より太陽紫外線量が多い地域で栽培されているイネでは、より生育障害を受けていることが予想される。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障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技術的に不可能なため、

解析できていない。そこで、今日の太陽光紫外線 UVB がどの程度植物の生育、収量に影響を及ぼしているかを解析する手段として、本組換えイネ AS-D の利用を提案する。すなわち、今日の太陽光紫外線によって誘発される CPD がイネ（ササニシキ）の生育に障害を与えているならば、CPD の修復活性が著しく低下している、本組換えイネ AS-D は、非組換えイネ・ササニシキと比較して、生育・収量レベルで著しく阻害されることが予想される。したがって、本組換えイネ AS-D は、今日の環境紫外線 UVB が植物（イネ）の生育に及ぼしている影響を的確に評価、予測するための「紫外線環境影響評価イネ」、いわゆるバイオマーカーとして利用できることが十分に期待できる。

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 AS-D 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。

a. OsPHR 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 (CaMV) 由来の 35S 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。植物の様々な器官・組織で発現させる特徴を有する。しかし、イネの花粉においては発現しないことが報告されている<sup>20)</sup>。

イ) CPD 光回復酵素遺伝子

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、CPD 光回復酵素をコードする遺伝子の cDNA の塩基配列である。

ウ) Nos ターミネーター

*Agrobacterium tumefaciens* 由来のノパリン合成酵素遺伝子 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み、mRNA 合成を終結させるのに必要な塩基配列である。

b. 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 (CaMV) 由来の 35S 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。植物の様々な器官・組織で発現させる特徴を有する。しかし、イネの花

粉においては発現しないことが報告されている<sup>20)</sup>。

#### イ) HPT 遺伝子

大腸菌 K-12 株由来の遺伝子で、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。

### 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 光回復酵素遺伝子

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。さらに、CPD 光回復酵素のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や既知の毒性タンパク質との相同性検索（アレルゲンデータベース: Allergen Database for Food Safety [ADFS], <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>）によりアレルゲン性予測を行ったところ、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性は認められなかった。したがって、アレルギー性、毒性を示す可能性は科学的な知見からは予測されない。また、本組換えイネ AS-D は、CPD 光回復酵素の発現を抑制しているため、仮に CPD 光回復酵素にアレルギー性、毒性があったとしても、その含量は非組換えイネ以下である。

#### b HPT 遺伝子

ハイグロマイシン耐性酵素がアレルギー性をもつという報告はない。また、ハイグロマイシン耐性酵素のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性検索（アレルゲンデータベース: Allergen Database for Food Safety [ADFS], <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>）を行ったところ、既知のアレルゲンタンパク質や毒性タンパク質との相同性は認められなかった。したがって、アレルギー性、毒性を示す可能性は科学的な知見からは予測されない。

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

CPD 光回復酵素は、紫外線 UVB によって誘発される DNA 損傷(CPD)を修復する酵素である。これまでに CPD 光回復酵素の発現が、生体内の特定の代謝系を変化させるという報告はない。したがって、CPD 光回復酵素の発現を抑制した本組換えイネ AS-D を、CPD が誘発されない環

境下で生育させた場合においては、宿主の持つ基本的な代謝系を変化させる可能性は考えがたい。

一方、紫外線が存在する環境下で生育させた場合においては、UVB によって DNA 上に CPD が誘発されるが、本組換えイネ AS-D では CPD 光回復酵素の発現が抑制されて、本酵素の活性が低下しているために、本酵素による修復は著しく遅くなる。したがって、CPD によりタンパク質の合成が阻害され、種々のタンパク質の含量が低下し、結果として生育障害が引き起こされると考えられる。なお、CPD はランダムに生成されるため、CPD 光回復酵素の発現が抑制された場合に、特定のタンパク質の合成や阻害に影響を及ぼすことは考えがたい。

また、ハイグロマイシン耐性酵素の過剰発現に関しては、基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。

したがって、UVB が存在する環境下で生育する限りにおいては、結果として宿主の持つ基本的な代謝系の活性が低下することが予想される。

## (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 pPZP2HA3(-)<sup>23)</sup>。基本は植物形質転換用のベクター (pPZP200)<sup>29)</sup> で、大腸菌 RK2 株及び *Agrobacterium tumefaciens* C58 株由来。

### ロ 特性

#### ① ① ベクターの塩基数及び基本構造

塩基数は 10,400 bps。塩基配列等は、文献 23 参照。基本構造を図 1 に示す。pPZP2HA3(+) と (-) の違いは、35S プロモーターに対する MCS (マルチクローニング領域) の向きの違いである。本組換えイネ AS-D の作製には pPZP2HA3(-) を用いた。

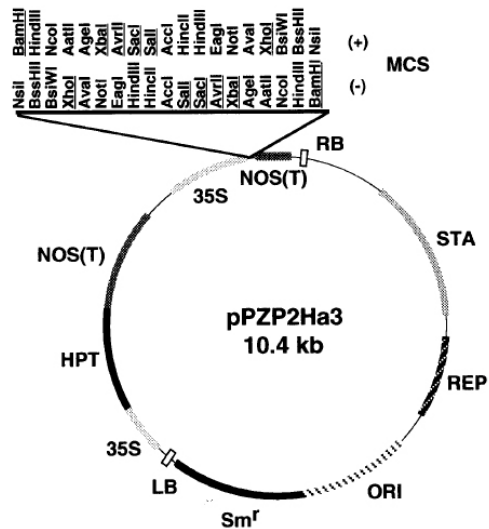


図1 pPZP2HA3<sup>+/-</sup>の基本構造

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<sup>r</sup> : 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、バクテリアのストレプトマイシン耐性遺伝子である Sm<sup>r</sup> が存在する。

## ③ ベクターの感染性の有無

ベクターの感染性は報告されていない。

### (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 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。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。

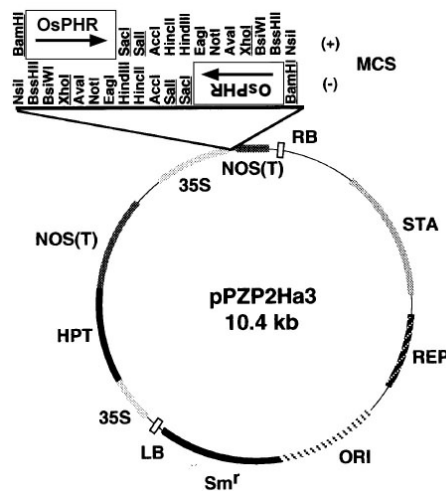


図 2 OsPHR 形質転換体用バイナリーベクターの構造

#### 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り行った。

#### 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

目的遺伝子 (*OsPHR*) をバイナリーベクターに組み込んだ *OsPHR*-pPZP2Ha3(-) (ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む) 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 (50 mg/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 (別添 2)

種子カルスに感染させたアグロバクテリウムは、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを有しているため、カナマイシンおよびハイ



グロマイシン含有の培地で選抜されたものを用いた。したがって、アグロバクテリウムの残存性試験は、組換えイネ AS-D (T3) および非組換えイネの種子を乳鉢と乳棒で破砕し、滅菌水に懸濁後、組換えに用いたプラスミドを持つアグロバクテリウムのみ生育できる 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、25°C で培養することで行った。培養 2 日後、観察により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増殖は観察されなかった。このことから、組換え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

平成 15 年度から遺伝子導入実験を開始し、閉鎖系実験室における組換えイネの選抜、ならびに特性解析を行ってきた。そして、光回復酵素活性が著しく低下した組換えイネ AS-D を選抜し、本系統を自殖により世代を進めた。選抜方法としては、上記(3)-(ハ)-①の方法で選抜したカルスから再分化させた幼植物 (T0)を閉鎖系温室に移植して自殖により種子を得た (T1)。T0 の植物は、導入した遺伝子が相同染色体の片方に挿入されたヘミ型 (+/-) である。したがって、自殖により得られた T1 の種子の遺伝子型は、導入遺伝子が両方の染色体に挿入されているホモ導入型、ヘミ型、両方の染色体に外来遺伝子が挿入されていない野生型に分離する。この分離世代の選抜は、T1 種子から生育させた T1 植物を用い、サザンハイブリダイゼーション解析により行った。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の強度 (仮に A とする) と、導入された遺伝子のシグナル強度 (仮に B とする) を比較した場合(B/A)、ヘミ型である T0 植物のシグナル強度比を 1 とすると、T1 植物のシグナル強度比が、ホモ導入型は 2、ヘミ型は 1、野生型は 0 となる。このことを利用して、ホモ導入型個体の選抜を行った。T1 植物をさらに自殖させることにより種子を得た (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)。

平成 18 年度から閉鎖系温室、ならびに特定網室において、生物多様性影響評価に必要な情報を収集するための解析を行った。まず、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)、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。イネ育成の経過、ならびに世代と実施した試験を次図に示す。

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

図 3 組換えイネ育成経過

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                    |        |                 |    | ○  | 8  | 特定網室  |
| 生育初期における低温試験                  |        |                 |    | ○  | 9  | 閉鎖系温室 |
| 紫外線抵抗性試験 I                    |        |                 | ○  | ○  | 10 | 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  |
| 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

遺伝子を導入した植物 (T0) から自殖により得た T1 植物 49 個体を対象に、導入した遺伝子の遺伝子型 (ホモ導入型、ヘミ型、野生型) の割

合を(3)-ハ-③に記したサザンハイブリダイゼーション法によって調べた。その結果、ホモ導入型、ヘミ型、野生型に持つ個体は、12:22:15 となり、 $\chi^2$  二乗検定 (5%水準) の結果より 1:2:1 に分離していた。したがって、移入した核酸は染色体上であると判断した。

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製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ブロット解析では、AS-D では 2 本のバンドが検出されたため (別添 3: 図 1 左)、組換えイネ AS-D では 1 コピー (28 kbp) が挿入されていると判断した。選抜マーカーとして CPD 光回復酵素遺伝子に連結して導入したハイグロマイシン耐性遺伝子に関しても、同じゲノム DNA を用いてサザンブロット解析を行ったところ、AS-D では 1 本のバンドが (28 kbp)、CPD 光回復酵素遺伝子をプローブとして検出したバンドと同じサイズの位置に検出された (別添 3: 図 1 右)。したがって、ハイグロマイシン耐性遺伝子は、1 コピーで、導入した CPD 光回復酵素遺伝子と連結された状態、すなわち隣接された箇所に導入されていると判断した。

また本組換えイネ 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: 図 2)。

さらに、本組換えイネ 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 AS-D では約 14 倍発現が高まっていた (別添 3: 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 AS-D の T2-T4 世代で測定した結果、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: 図 4)。

したがって、本組換えイネ AS-D は、CPD 光回復酵素遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子ともに、ゲノム上に安定に保持され、コピー数は 1 と推定した。

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 AS-D 系統では 1 コピーである。導入された遺伝子と元来有している遺伝子が隣接しているか、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

性遺伝子は、サザンブロット解析の結果から（別添 3：図 1）、導入した CPD 光回復酵素遺伝子と連結された状態、すなわち隣接された箇所に導入されていると判断した。

## 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

閉鎖系温室で、本組換えイネ 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、本組換え 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 AS-D では活性は検出されなかった。また、閉鎖系温室内において、本組換えイネ 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 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 10：表 1）。また T4 世代の組換えイネ AS-D と非組換えイネを特定網室において、紫外線無照射区と紫外線付加照射区で 58 日間栽培したところ、草丈、分けつ数の紫外線による阻害効果が AS-D 個体で著しく現れた（別添 4：図 5）。したがって、特定網室内での栽培では、安定して逆鎖の CPD 光回復酵素遺伝子が発現し、CPD 光回復酵素タンパク質の発現が抑制されていることが確認された。しかし、隔離圃場（野外自然環境下）で本組換えイネを栽培していないため、自然環境下での個体間、および世代間での発現の安定性は確認できていない。

## 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

該当するウイルスの存在は報告されていない。

## (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事を確認しているため、ハイグロマイシン含有の培地で種子を発芽させることで、識別が可能である。

イネには導入遺伝子である CPD 光回復酵素遺伝子に HPT 遺伝子が連結された状態で導入されているため、HPT 遺伝子を検出することで、内在性の CPD 光回復酵素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：図 1、2）。

さらに導入した OsPHR 遺伝子は、イントロン配列を持たない cDNA

配列を用いている。そのため、CPD 光回復酵素遺伝子をコードする領域内でイントロン箇所を挟んで設計したオリゴプライマーを用いた PCR 法により、イントロン配列をもつ内在性の CPD 光回復酵素遺伝子と導入した CPD 光回復酵素遺伝子は PCR 産物のサイズが異なることで、区別して検出することが可能である。

## (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

導入した逆鎖の CPD 光回復酵素遺伝子は、CaMV35S プロモーターに連結し発現させているため、花粉を除く植物の全組織で発現している。したがって、本組換えイネ AS-D は、花粉以外では CPD 光回復酵素タンパク質の発現が抑制されて、酵素活性が低下しているため、紫外線によって誘発された損傷 CPD は、CPD 光回復酵素による修復が著しく遅い。よって、UVB による生育障害の主要因である CPD が DNA 上に蓄積することが予想され、CPD 光回復酵素の発現が抑制された組換えイネ AS-D は著しい紫外線感受性を示す(別添 4、11、参考文献 21)。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 HTP 遺伝子により組換えイネ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 AS-D の T4 世代と非組換えイネを紫外線無照射条件で栽培し、栽培開始時から開花時までの草丈、分けつ数の推移、ならびに収穫時の草丈、穂数、乾物重(地上部・地下部)の調査を行った。別添 4 には開花直前の移植後 71 日目までの草丈の推移(図 3 上)、および分けつの推移(図 3 下)を、表 1 には、収穫時の草丈、穂数、一穂粒数、穂重、植物体の地上部・地下部の乾物重を示した。本組換えイネ AS-D は、非組換えイネと比較して、栽培開始後 52 日目において一時的に分けつ数が減少する傾向が認められた。しかし、それ以外の時期での分けつ数、また草丈ならびに収穫時における草丈、穂数、一穂粒数、穂重、地上部・地下部の乾物重には統計的に有意差は認められなかった(別添 4: 図 2、3、および表 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 AS-D の T4 世代と非組換えイネの生育検定を行った。その結果、本組換えイネ AS-D は、草丈においては親株と比較して 29 日目から、また分けつ数においても、移植後 29 日目から親株と比較して有意に低く推移し、開花直前の移植後 71 日の草丈、分けつ数の値を

見ても明らかに生育が阻害されているのが分かる（別添 4：図 4、5、および表 2）。

## ② 生育初期における低温耐性（別添 9）

生育初期における低温耐性試験を行うため、本組換えイネ AS-D、ならびに非組換えイネの種子を 30°C で発芽させた後、イネ育用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（別添 9：図 1、表 1）、(2)の 28°C →4°C 区では、組換え・非組換えイネのどれも、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。なお、11 日間の低温処理終了後、28/20°C 設定の人工気象器に植物体を移したところ、全ての植物体は枯死した。また、(3) 4°C の区では、組換え・非組換えイネともに、地上へ出芽することはなかった。なお、処理(2)、(3)において低温処理後の植物を 28°C の人工気象機に移して栽培したところ、全ての植物個体は枯死した。したがって、組換え・非組換えイネともに、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イネと非組換え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

イネは熱帯地域では多年生植物であるが、我が国の栽培地帯では、結実後、冬季には通常自然に枯死することが知られている。今回の申請に関わる試験地がある東北地方では、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。よって組換えイネ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 8）

本組換えイネ 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（別添 8：図 1）。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 AS-D の稔性率は 91.3%、非組換えイネ・ササニシキで 93.1%と統計的に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イネ AS-D、非組換えイネともに 4%前後であった。したがって、組換えイネ AS-D と非組換えイネの花粉の稔性率に相違はないと判断した。

#### ⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠及び発芽率 (別添 4)

特定網室において UVB を付加しない条件でイネを生育させ、草丈、穂数、地上部・地下部乾物重、一穂粒数、穂重を調査した。組換えイネ AS-D は非組換えイネと比較した場合、草丈、穂数、一穂粒数、穂重、地上部・地下部乾物重に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 AS-D、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、採取後 4°C にて約 5 ヶ月間保存した種子を用いて調べたところ、本組換えイネ AS-D、ならびに非組換えイネはともにほぼ全て発芽し(発芽率 95%以上)、有意な差は認められなかった。また、本組換えイネ AS-D、ならびに非組換えイネの種子は、採取後 4°C で約 5 ヶ月間保存した際の発芽率が 95%以上であることから、種子の休眠は覚めており、休眠性は変化していないと考えられた。

#### ⑥ 交雑率

我が国にイネと交雑可能な近縁の野生種は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

##### ア) 根から分泌され、他の植物に影響を与えるもの (別添 5)

特定網室でポット栽培した後の土壌を使用した後作試験の結果、組換えイネ AS-D を栽培した土壌におけるレタスの幼根長、幼伸長、新鮮重、乾物重は、ともに非組換えイネを栽培した土壌を用いた場合と比較して、統計的に有意な差は認められなかった。

##### イ) 根から分泌され、土壌微生物に影響を与えるもの (別添 6)

組換えイネ AS-D を栽培した土壌における土壌微生物相(細菌類、放線菌、糸状菌)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壌を用いた。土壌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。

##### ウ) 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 AS-D、ならびに非組換えイネについて植物体を粉碎し、土壌と混合し、レタスを栽培した（鋤込み試験）。20 日後のレタスの幼根長、幼伸長、新鮮重に有意な差は認められなかった。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

紫外線 UVB によるイネの生育障害の主要因の 1 つであるシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）を修復する酵素、「CPD 光回復酵素」の cDNA を逆方向で 35S プロモーターに連結し、逆鎖を高発現させることで、植物体内で恒常的に本酵素の発現を抑制し、著しい UVB 感受性を示す本組換えイネ AS-D を、親株であるササニシキとともに野外環境（隔離圃場）で栽培する。そして、生育・収量の比較調査を行うことで、今日の環境紫外線 UVB が、イネの生育に及ぼしている影響を直接的に評価すると同時に、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、すなわち「紫外線環境影響評価試験」を目的に行う。

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 25 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 11）。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 出穂期までには 3 重の防雀網を設置する。
- 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漏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。
- ⑥ 本隔離圃場は、直近の一般農家水田からおよそ 310 m、また直近の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の実験圃場からおよそ 140 m 離れた場所に位置する（別添 11 図 4）。

#### ホ 作業要領

以下の作業は、組換えイネの隔離圃場外への漏出を予防するために実施する。

- 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交配可能な植物が、隔離圃場内の栽培実験区画で生育することを最小限に抑えるために、慣行法による除草剤処理と中耕除草を行う。
- ② 組換えイネを隔離圃場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 隔離圃場内の栽培実験区画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 11 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

ホームページを立ち上げ、ホームページを通して、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

国外における使用の実績はない。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主である日本型イネ栽培種 (*Oryza sativa* L.) は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。これまでの経験から通常の使用法の範囲で取り扱う限り、自然生態系において野生化、雑草化する恐れは極めて少ないと考えられる。ここでは、生物多様性影響評価実施要領別表第三に基づき、組換えイネと宿主また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等の特定

- ① 本組換えイネ AS-D は、紫外線 UVB によって誘発される CPD (DNA 損傷の 1 つ) を修復する目的遺伝子産物である CPD 光回復酵素の発現が、花粉を除く全ての組織で著しく抑制されている。本組換えイネ AS-D を人為的な紫外線を照射しない環境 (特定網室) で生育させた場合、草丈に関しては有意な差異は認められなかった。一方、分けつ数の推移に関しては、非組換えイネ (ササニシキ) と比較して一時的に少ない時期 (移植後 52 日目) が認められたが、開花時にはほぼ同じとなり有意な差異は認められなかった。

また、競合において重要な諸形質である種子の生産性に関しては、穂重、草丈、穂数、花粉の稔性のいずれにおいても、非組換えイネのそれ

らと比較した場合、統計的に有意な差異は認められなかった。一方、本組換えイネ AS-D は紫外線を付加した環境下で生育させた場合は（特定網室）、草丈、分けつ数ともに、著しい UVB による阻害効果を非組換えイネより受けた。したがって、紫外線を含む太陽光下で生育した場合、紫外線 UVB による DNA 損傷（CPD）を修復できないため、CPD による生育障害を非組換えイネよりも受けることが予想される。そのために、CPD 光回復酵素の遺伝子の発現を抑制した本組換えイネ AS-D が非組換えイネよりも優位に生育することは考え難い。

本組換えイネ AS-D 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、付与された抗生物質耐性が自然環境下での競合において優位に作用することは考え難い。

- ② 閉鎖系温室、特定網室における環境影響評価実験の範囲において、本組換えイネ AS-D の競合に関わると考えられる形質（生育初期における低温耐性、脱粒性、発芽率等）は、非組換えイネ・ササニシキとの間に差異は認められていない。

上記①及び②の評価から、本組換えイネ AS-D が、栽培イネ品種ササニシキよりも競合において、優位に作用することは考え難い。よって、本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ AS-D が隔離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はなく、競合における優位性において影響を受ける野生動植物は特定されなかった。

## (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

上記の評価から、本組換えイネ AS-D が、栽培イネ品種ササニシキよりも競合において、優位に作用することは考え難かった。したがって、本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換え

イネ 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、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等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

## 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等の特定

本組換えイネ AS-D は、CPD 光回復酵素の発現を抑制しているため、その含量は非組換えイネ以下である。CPD 光回復酵素は、本来イネが植物体内で産出する酵素と同等のものである。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、さらには、CPD 光回復酵素のアミノ酸配列をもとに、既知のアレルゲンタンパク質や既知の毒性タンパク質との相同性検索（アレルゲンデータベース: Allergen Database for Food Safety [ADFS], <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>）の結果からも、有害性は科学的知見からは予測されなかった。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、栽培跡地土壤での残渣残留効果検定において、本組換えイネ AS-D と非組換えイネの間に統計的有意差は認められなかった。隔離圃場はフェンスと高い木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を与える可能性は考え難い。

本組換えイネ 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別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 AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ 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、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かった。

### (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

本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換

えイネ 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、上記の評価から、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じるおそれはないと判断した。

### 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が、これらの植物は我が国に自生していない。したがって、本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ 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、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

本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用する場合、本組換えイネ 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、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 AS-D 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 競争性における優位性

本組換えイネ 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争において優位に作用することはない。閉鎖系、並びに特定網室での栽培において、本組換えイネ AS-D と非組換えイネの間の生育特性の一部に差異が認められたが、

この差異は一時的であり開花時の分けつ数、ならびに収穫時の生育特性、さらには競合における優位性に関わる諸形質（脱粒性、休眠性、発芽率等）には差異は認められなかった。また、紫外線を含む野外自然環境下において本組換えイネ AS-D は、紫外線によって非組換えイネである栽培イネ品種ササニシキよりも生育障害を受けることが予想される。したがって、本組換えイネ AS-D が、栽培イネ品種ササニシキよりも競合において、優位に作用することは考え難い。以上の点から、形態、生育特性の差異は、本組換えイネ AS-D の競合における優位性には影響しないと判断した。

## 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 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産物の有害性はないと考えられること、さらには、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 AS-D は対象品種ササニシキとの間に有害物質生産性に差異が認められなかったことから、有害物質産生性による生物多様性への影響が生じる恐れはないと判断した。

## 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ことから、交雑による生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。

上記を総合的に評価し、本組換えイネ AS-D を第一種使用規程に従って使用等し、本組換えイネ 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) 松尾孝嶺 (監修) 植物遺伝資源集成 1、I. 食用作物、1. イネ 講談社、東京、(1989)
- 2) 高橋成人 イネの生物学、大月書店、東京、(1988)
- 3) 蓬原雄三 イネの育種学、東京大学出版会、東京、(1990)
- 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) 栗原浩、蓬原雄三、津野幸人 作物栽培の基礎、農山漁村分化協会、東京、(2000)
- 8) 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).
- 9) 松木五穂・勝谷信一、旱害に対する二三の化学的考察 (第一報) 土壌水分と作物の生育、日本土壌肥料学雑誌、14、238-247 (1940).
- 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、石原邦、平田熙、石井龍一 (編)、稲学大成第2巻生理編、農山漁村文化協会 東京、(1990)
- 11) 農林水産技術会議「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 (2003).
- 12) 農林水産技術会議「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
- 13) 北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第1

回 「平成 18 年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書  
－他家受粉による交雑に関する調査（イネ）」資料 2（2007）

<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/NR/rdonlyres/5F218264-F5FC-46AB-AAD-A-C5593EB167EE/0/gmbb12gmkouzatuchousaine.pdf>

14) 北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第 2  
回 「平成 19 年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書  
－他家受粉による交雑に関する調査（イネ）」資料 2（2008）

[http://www.pref.hokkaido.lg.jp/NR/rdonlyres/2A438B72-5464-428B-982A-676ADAAEB434/0/gmbb190202\\_ine.pdf](http://www.pref.hokkaido.lg.jp/NR/rdonlyres/2A438B72-5464-428B-982A-676ADAAEB434/0/gmbb190202_ine.pdf)

15) 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）、稲学大成第 1 巻形態編、農山  
漁村文化協会 東京、(1990).

16) OECD. Consensus document on the biology of *Oryza sativa* (rice). OECD  
Environmental Health and Safety Publication, Series on Harmonization of  
Regulatory Oversight in Biotechnology No. 14. (1999).

17) Dilday RH, Lin J, Yan W. Identification of allelopathy in the USDA-ARS  
rice germplasm collection. *Aust. J. Experimental Agriculture* 34, 907-910,  
(1994).

18) Fujii Y. The allelopathic effect of some rice varieties. *Integrated management  
of paddy and aquatic weeds in Asia. FFTC Book Series*, 45, 160-165, (1994).

19) Olofsdotter M, Navarez M, Rebulanan M, Streibig JC. Weed-suppressing  
rice cultivars – does allelopathy play a role? *Weed Research* 39, 441-454,  
(1999).

20) Otomo K, Kenmoku H, Oikawa H, Konig WA, Toshima H, Mitsunashi W,  
Yamane H, Sassa T, Toyomasu T. Biological functions of ent- and syn-copalyl  
diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point  
of gibberellins and phytoalexin biosynthesis. *Plant J.* 39, 886-893, (2004).

21) 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).



- 22) Terada R, Shimamoto K. Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220, 389-392 (1990).
- 23) Fuse T, Sasaki T, Yano M. Ti-plasmid vectors useful for functional analysis of rice genes. *Plant Biotech.* 18, 219-222 (2001).
- 24) Teramura A. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.* 58, 415-427 (1983).
- 25) Hidema J, Teranishi M, Iwamatsu Y, Hirouchi T, Ueda T, Sato T, Burr B, Sutherland BM, Yamamoto K, Kumagai T. Spontaneously occurring mutations in the cyclobutane pyrimidine dimer photolyase gene cause different sensitivities to ultraviolet-B in rice. *Plant J.* 43, 57-67 (2005).
- 26) Hidema J, Kang HS, Kumagai T. Changes in cyclobutyl pyrimidine dimer levels in rice (*Oryza sativa* L.) growing indoors and outdoors with or without supplemental UV-B radiation. *J. Photochem Photobiol.* 52, 7-13 (1999).
- 27) Iwamatsu Y, Aoki, C, Takahashi M, Teranishi M, Ding Y, Sun C, Kumagai T, Hidema J. UVB sensitivity and cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase genotypes in cultivated and wild rice species. *Photochem. & Photobiol. Sci.* 7, 311-320, (2008).
- 28) Sato T, Kumagai T. Cultivar differences in resistance to the inhibitory effects of near-UV radiation among Asian ecotype and Japanese lowland and upland cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Breeding* 43, 61-68 (1993).
- 29) 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 21 年 4 月 1 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を示す組換えイネ AS-D 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、非公開

### 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、作業従事者から得られた情報により、把握するとともに、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会の委員による視察を行う。なお、本委員会を構成する委員は以下の通りである。

個人情報につき、非公開

(2) 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。

(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

実験従事者に直接口頭で伝え、事実を記録する。また、直ちにその内容を周知するために、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電話、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

- (1) 本組換えイネ AS-D の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 AS-D（種子以外の部分）は隔離圃場への鋤き込みによって確実に不活化する。
- (3) 本組換えイネ AS-D の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施錠可能な管理責任者の管理する研究室内に保管し、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可能性が示唆された場合は、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報告するとともに、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へ報告する。

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」                                   | 12 |
| 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」                                  | 15 |
| 別添資料 8  | 「花粉の形態および稔性の検定」                                | 16 |
| 別添資料 9  | 「生育初期における低温耐性試験」                               | 18 |
| 別添資料 10 | 「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」                   | 20 |
| 別添資料 11 | 「隔離圃場施設に関する資料」                                 | 22 |

別添 1

基本的特性

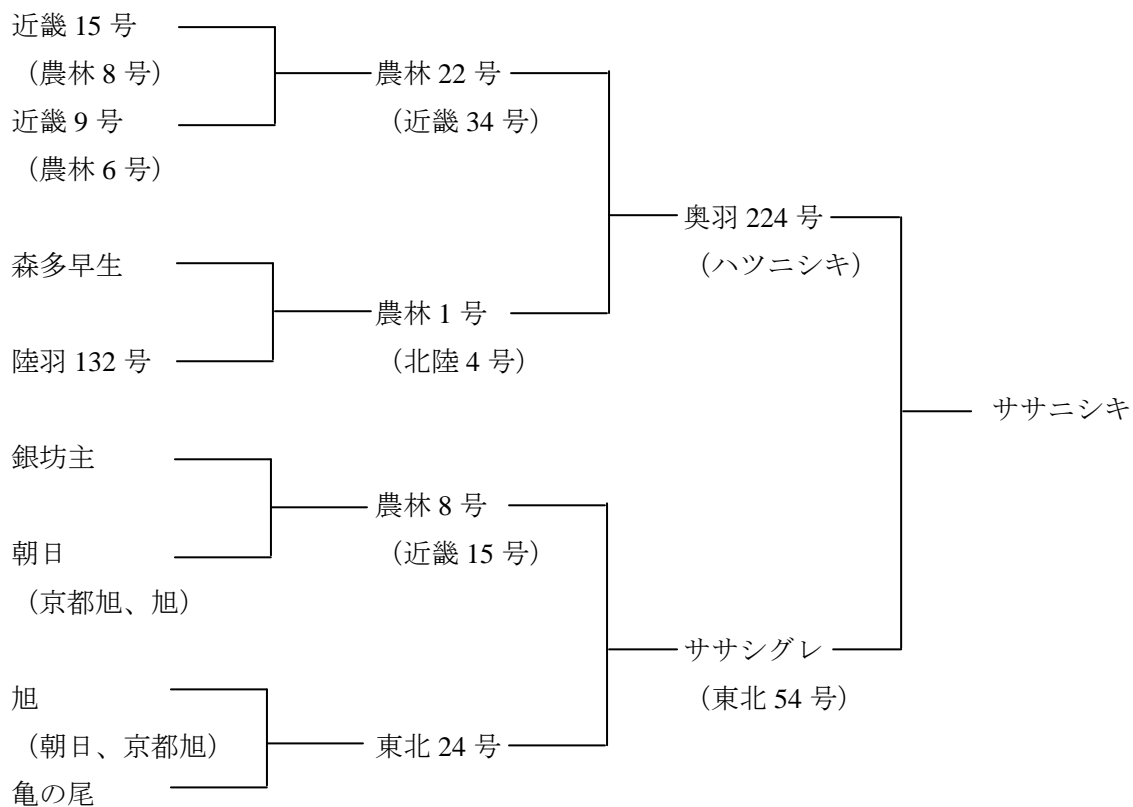
登録番号：水稲農林 150 号

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 |

【ササニシキの系譜】



## 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】

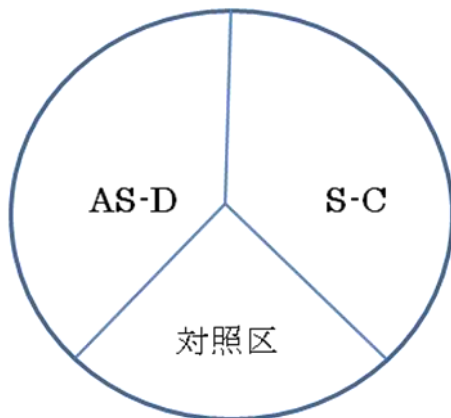
組換えイネ中にアグロバクテリウムが残存しているかを検定する。

#### 【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 (70  $\mu$ g/ml)、ストレプトマイシン (50  $\mu$ g/ml)、カナマイシン (50  $\mu$ g/ml) 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

### 別添 3

## 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 T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、または T<sub>4</sub> 世代の種子、非組換えイネの種子を発芽させた後、バ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 T<sub>2</sub> 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 *Kpn*I で処理し、イネ CPD 光回復酵素遺伝子 (*OsPHR*) の塩基配列、またはハイグロマイシン耐性遺伝子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 T<sub>2</sub>~T<sub>4</sub> 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 T<sub>2</sub>~T<sub>4</sub> 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'-CCGTCGATGCTTTCTTGGAGG-3' (forward) と 5'-CATCTCCAAGTGCATGCCA-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 T<sub>2</sub> 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 (11 kbp、16 kbp)、AS-D (16 kbp、28 kbp) 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、16 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)。また、ハイグロマイシン耐性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 1 本 (11kbp)、AS-D では 1 本 (28kbp) のバンドが検出された (図 1)。従って、本組換えイネ S-C および AS-D では、1 コピーがそれぞれ組換えによって導入されていると判断した。また、CPD 光回復酵素遺伝子をプローブとして検出したバンドと、ハイグロマイシン耐性遺伝子をプローブとして検出されたバンドは、同じサイズであったため、CPD 光回復酵素とハイグロマイシン耐性遺伝子は、連結されて導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、細胞内での酵素活性は検出されないことを確認した。

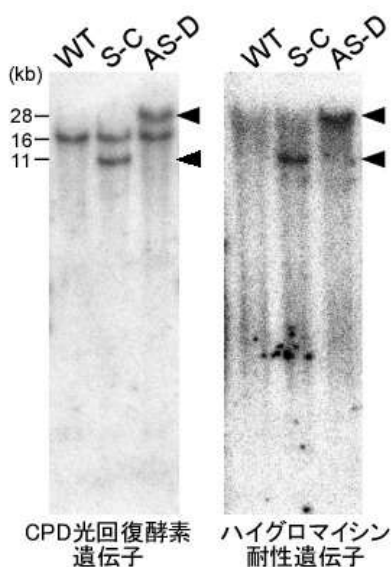


図 1 組換えイネのサザン解析

CPD 光回復酵素遺伝子 (左側)、もしくはハイグロマイシン耐性遺伝子 (右側) をプローブとしてサザン解析を行った。導入された遺伝子のバンド (28kbp, 11kbp) は矢頭で示した。なお、ゲノム DNA は制限酵素 *KpnI* で処理された。

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

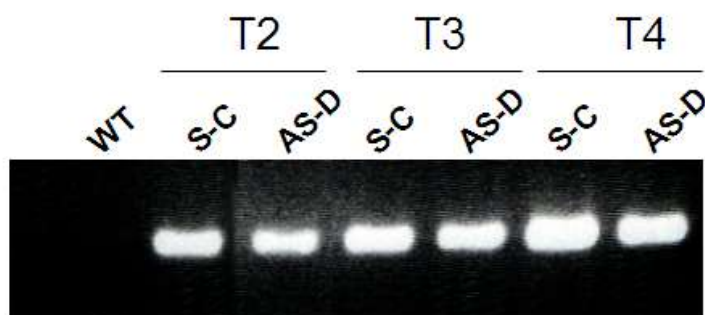


図 2 組換えイネの PCR 解析  
ハイグロマイシン耐性遺伝子の ORF に特異的なプライマーを用いて増幅した。

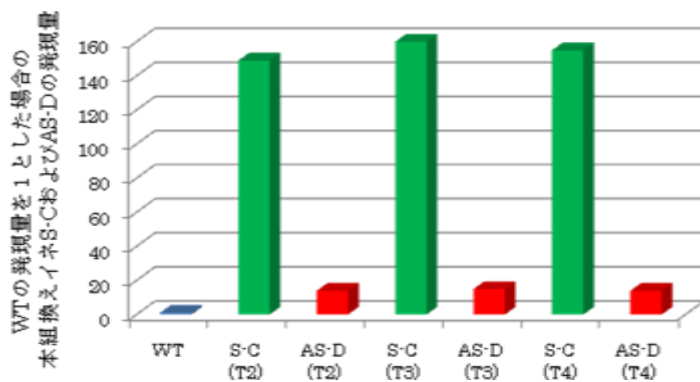


図3 組換えイネの RT-PCR 解析

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。

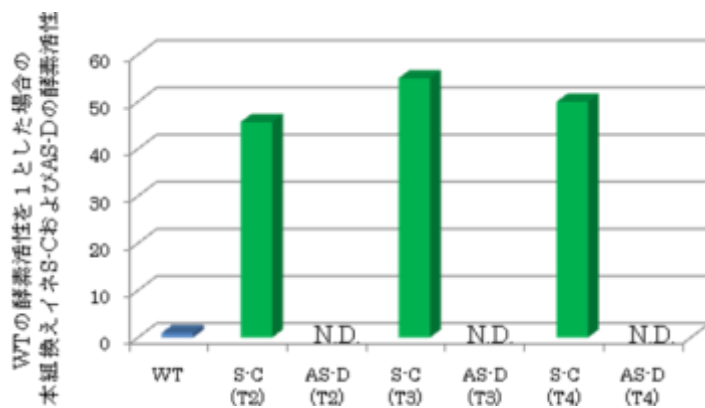


図4 本組換えイネ S-C および AS-D の T2、T3、T4 世代  
における CPD 光回復酵素活性の解析

N.D. : not detected (検出出来なかった)

#### 別添 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

##### 【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、紫外線無照射区と紫外線付加照射区（ $1.2 \text{ W/m}^2$  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  $1.2 \text{ W/m}^2$  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：右側紫外線付加照射区、左側が紫外線無照射区の様子、下段：紫外線付加照射区の様子

##### 【結果】

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。草丈に関しては、移植後から開花日、また収穫時においても組換え体イネ S-D、ならびに AS-D は、非組換え体イネと比

較して統計的に有意な差異（t 検定、5%水準での有意差： $p > 0.05$ ）は認められなかった。また、分けつ数に関しては、移植後から開花日までの期間の移植後 52 日目において、一時的に非組換え体と比較して、組換え体イネ S-D、AS-D は共に、若干低く推移した（t 検定： $p < 0.01$ ）。しかしながら、その後 60 日目の調査日においては、非組換え体とほぼ同数の分けつ数になり、その後開花日においても分けつ数は非組換え体と比較して差異は認められなかった（t 検定、5%水準での有意差： $p > 0.05$ ）。また、収穫時の穂数に関しても、組換え体 S-D、AS-D と、非組換え体との間に有意な差異は認められなかった（t 検定、5%水準での有意差： $p > 0.05$ ）。

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）。

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（5%水準）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）。

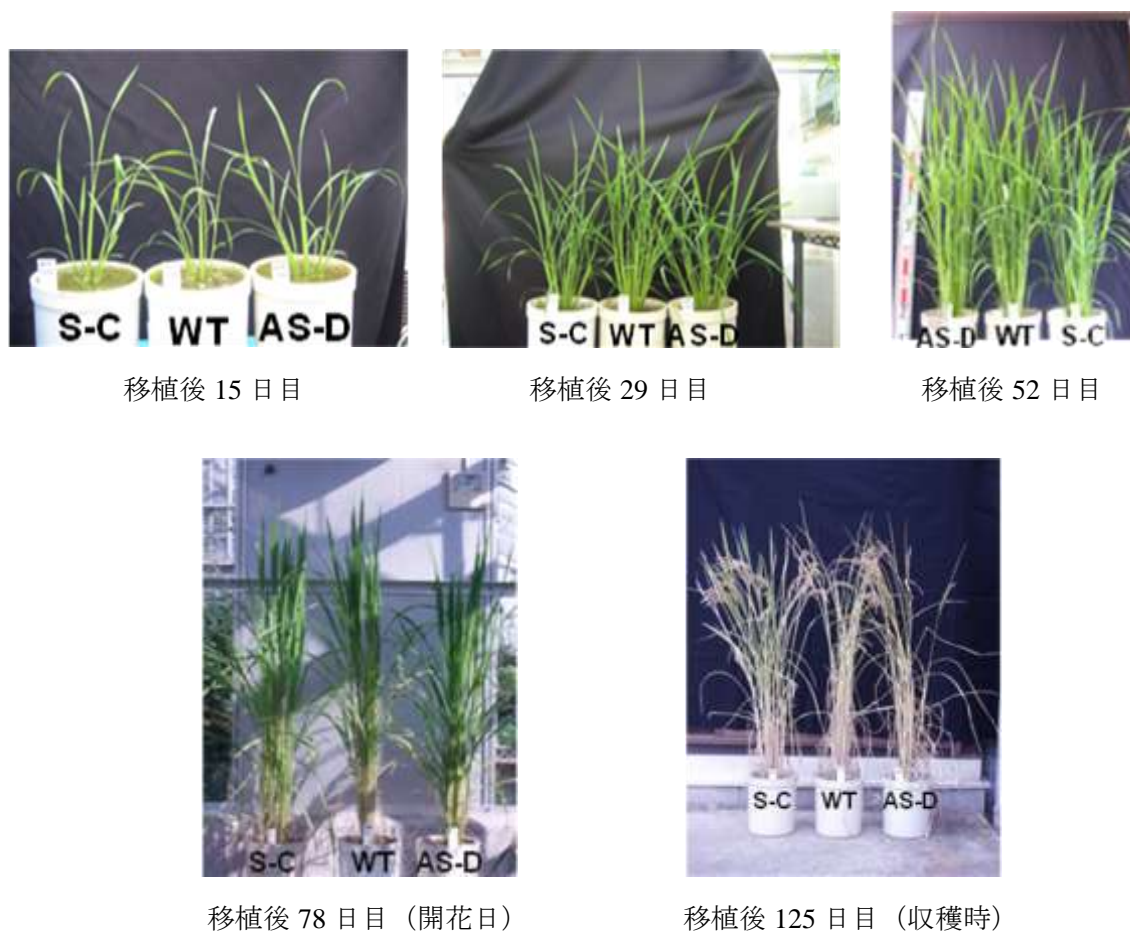


図 2 移植後 15、29、52、78、125 日目の組換えイネ、非組換えイネの紫外線無照射区における生育の様子

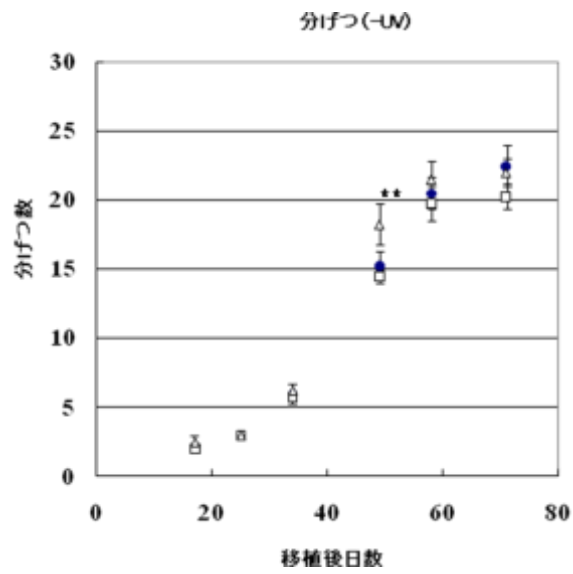
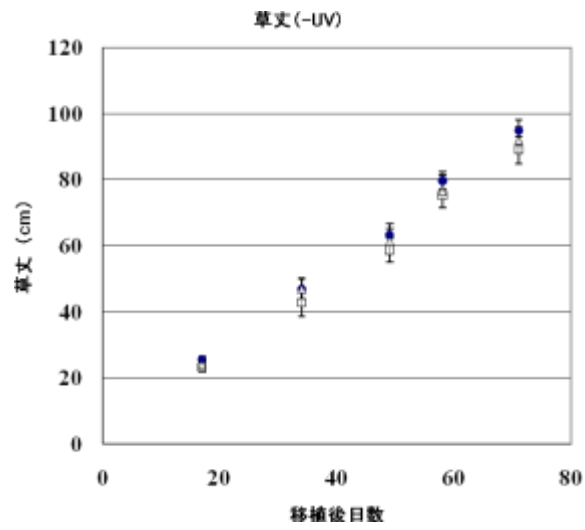


図3 移植後からの組換えイネ、非組換えイネの紫外線無照射区における草丈、分けつ数の変化。組換えイネ：S-C (●), AS-D (□)、非組換えイネ：(△)  
 \*, \*\*, \*\*\* ; 有意差検定 (t 検定)、\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

表 1 収穫時の紫外線無照射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)    | 一穂粒数     | 穂重<br>(g/plant) | 乾物重 (g)  |          |          |
|--------|---------|-----------|----------|-----------------|----------|----------|----------|
|        |         |           |          |                 | 地上部      | 地下部      |          |
| 非組換え個体 | ササニシキ   | 103.2±3.2 | 12.6±1.5 | 157.2±20.4      | 43.4±4.5 | 23.9±0.9 | 13.1±2.1 |
| 組換え個体  | S-C     | 100.6±2.6 | 12.1±2.0 | 163.2±22.3      | 42.4±5.6 | 25.7±0.9 | 12.7±0.8 |
|        | AS-D    | 97.3±2.8  | 13.4±1.5 | 155.8±17.8      | 45.1±6.7 | 24.5±0.6 | 14.4±1.5 |

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)、並びに移植後 71 日目までの生育調査の結果 (図 5) と 71 日目における草丈、分けつ数の結果を表 2 に示した。その結果 S-C 系統は、草丈においては親株と有意な差異 (t 検定、5%水準での有意差:  $p > 0.05$ ) 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、表 2)。

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 (0.1%水準での有意差) (図 5)。

以上の結果から、特定網室環境において、紫外線付加照射下では、明らかに、S-C 系統は親株と比較して UV 抵抗性を示し、AS-D 系統は著しい UVB 感受性を示すことが分かった。

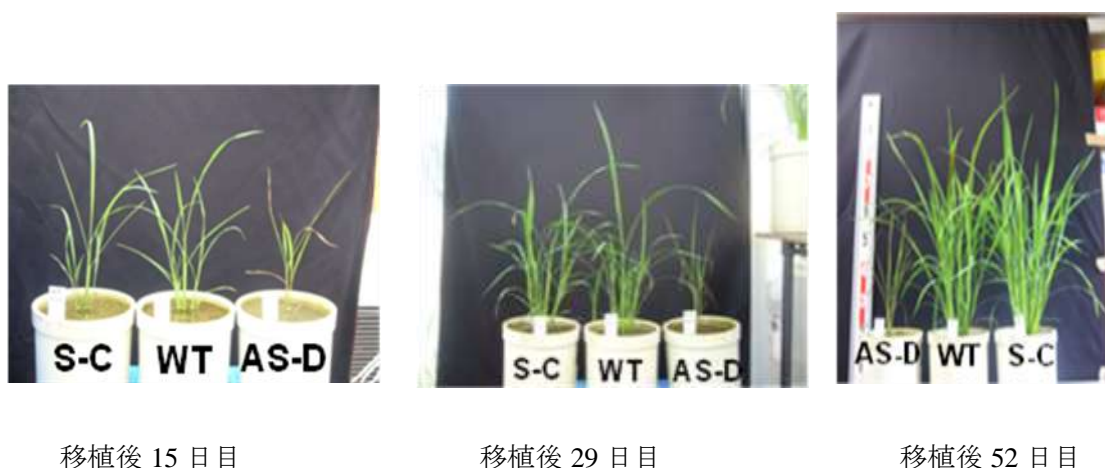


図 4 移植後 15、29、52 日目の組換えイネ、非組換えイネの紫外線付加照射区における生育の様子

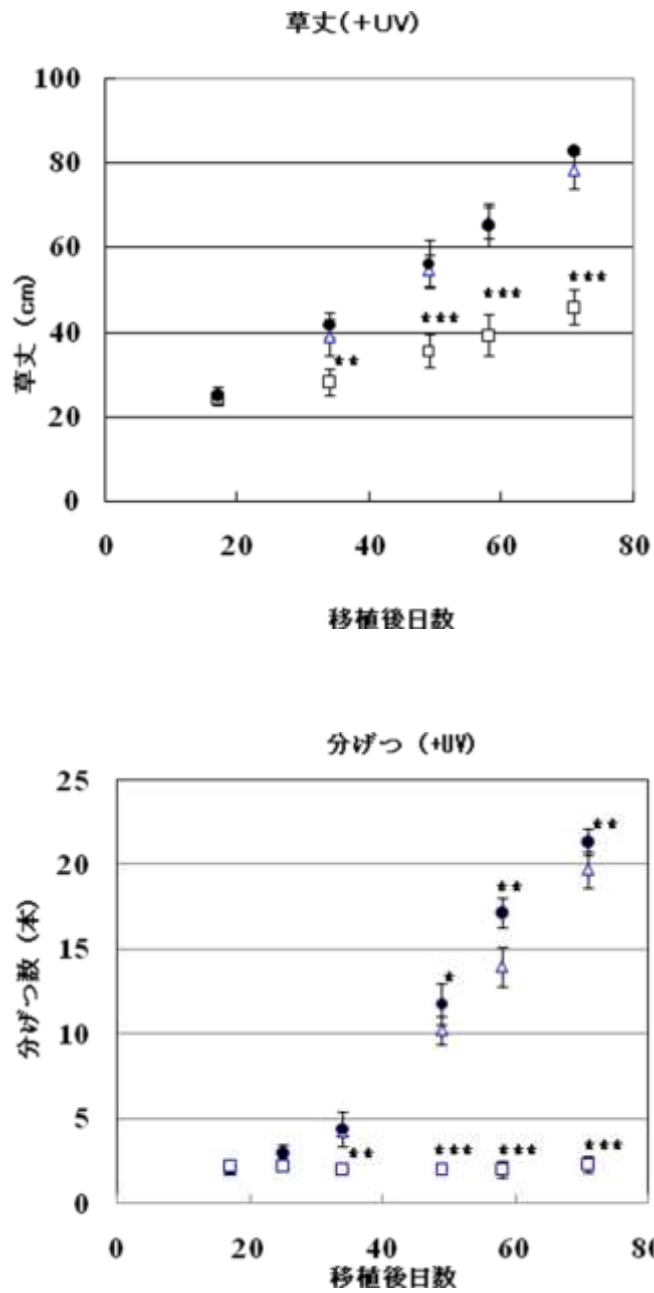


図5 移植後からの組換えイネ、非組換えイネの紫外線付加照射区における草丈、分げっ数の変化。組換えイネ：S-C (●), AS-D (□)、非組換えイネ：(△)

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

表 2 移植後 71 日目における紫外線付加照射区での草丈、分けつ数

|        |       | 草丈 (cm)  | 分けつ数 (本) |
|--------|-------|----------|----------|
| 非組換え個体 | ササニシキ | 82.1±5.1 | 19.7±1.1 |
|        | S-C   | 78.9±3.5 | 21.4±0.8 |
| 非組換え個体 | AS-D  | 46.0±3.6 | 2.3±0.3  |



## 別添 5

### 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(砂質土) 各々5 個体分を用いた。なお土壌サンプルは、採取後試験を行うまで、冷蔵（4°C）保存した。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（各個体5 ポットずつ）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幼根長、幼伸長、新鮮重、ならびに新鮮重測定後、サンプルを通風乾燥機にて80°C、3 日間乾燥させた後の乾物重を示した。これらの調査項目について組換えイネ 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（t 検定、5%水準での有意差： $p > 0.05$ ）に有意な差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

|          | 幼根長 (cm/本) | 幼伸長 (cm/本) | 新鮮重 (g/10 本) | 乾物重 (g/10 本) |
|----------|------------|------------|--------------|--------------|
| 非組換え     | 12.1 ± 0.5 | 7.3 ± 0.2  | 2.6 ± 0.2    | 0.36 ± 0.01  |
| 組換え AS-D | 12.5 ± 0.7 | 7.2 ± 0.2  | 2.6 ± 0.3    | 0.35 ± 0.02  |
| 組換え S-C  | 11.9 ± 0.7 | 7.3 ± 0.3  | 2.5 ± 0.2    | 0.35 ± 0.01  |

※数値は平均値±標準誤差

N (供試サンプル数) = 50

## 別添 6

# 土壌微生物相検定

### 【目的】

本組換え体イネ S-C および AS-D の土壌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】

#### 土壌サンプリング

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（砂質土）、栽培開始 3 ヶ月後に 1 ポットにつき 8 箇所、深さ 5 cm の地点から土壌を採取混合し試料とした。なお、本検定を行うまで、土壌サンプルは冷蔵（4°C）保存した。生土約 1 g を 100 ml 滅菌水で懸濁させ 10 min 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  $\mu$ 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。

#### 土壌微生物のカウント

土壌微生物の内、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  $\Gamma^{-1}$ 、グルコース 1.0 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $K_2HPO_4$  0.3 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $KH_2PO_4$  0.2 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g  $\Gamma^{-1}$ 、pH 6.8)

HV 培地 (フミン酸 1.0 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $Na_2HPO_4$  0.5 g  $\Gamma^{-1}$ 、KCl 1.7 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $CaCO_3$  0.02 g  $\Gamma^{-1}$ 、チアミン-HCl 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、リボフラビン 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、ナイアシン 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、ピリドキシン-HCl 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、パントテン酸 Ca 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、イノシトール 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、p-アミノ安息香酸 0.5 mg  $\Gamma^{-1}$ 、ビオチン 0.25 mg  $\Gamma^{-1}$ 、シクロヘキシミド 50.0 mg  $\Gamma^{-1}$ 、pH 7.2)

#### ローズベンガル培地

( $KH_2PO_4$  1.0 g  $\Gamma^{-1}$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g  $\Gamma^{-1}$ 、ペプトン 5.0 g  $\Gamma^{-1}$ 、グルコース 10.0 g  $\Gamma^{-1}$ 、ローズベンガル 0.033 g  $\Gamma^{-1}$ 、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（t検定、5%水準： $p > 0.05$ ）に有意な差は認められなかった。

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                       |     |
|------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|
|      | ( $\times 10^7$ cfu/g 乾土) |     | ( $\times 10^6$ cfu/g 乾土) |     | ( $\times 10^4$ cfu/g 乾土) |     |
| S-C  | 8.3 ±                     | 1.5 | 13.6 ±                    | 1.7 | 8.2 ±                     | 1.4 |
| AS-D | 8.1 ±                     | 2.1 | 14.2 ±                    | 1.9 | 8.5 ±                     | 1.7 |
| WT   | 7.8 ±                     | 1.9 | 14.1 ±                    | 2.0 | 8.1 ±                     | 1.3 |

数値は平均±標準誤差

n (供試サンプル数) = 5

## 別添 7

### 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 個体粉碎した。粉碎した試料は、試験を行うまで、冷蔵（4℃）保存した。粉碎試料を、500 kg/10a の比率（0.5%）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（各個体5 ポットずつ）、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幼根長、幼伸長、新鮮重、ならびに新鮮重測定後、サンプルを通風乾燥機にて80℃、3 日間乾燥させた後の乾物重を示した。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（t 検定、5%水準： $p > 0.05$ ）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

|          | 幼根長 (cm/本) |       | 幼伸長 (cm/本) |       | 新鮮重 (g/10 本) |       | 乾物重 (g/10 本) |        |
|----------|------------|-------|------------|-------|--------------|-------|--------------|--------|
|          | 平均         | 標準誤差  | 平均         | 標準誤差  | 平均           | 標準誤差  | 平均           | 標準誤差   |
| 非組換え     | 9.8        | ± 0.6 | 4.8        | ± 0.2 | 3.2          | ± 0.2 | 0.41         | ± 0.01 |
| 組換え AS-D | 10.1       | ± 1.0 | 4.7        | ± 0.2 | 3.3          | ± 0.3 | 0.42         | ± 0.01 |
| 組換え S-C  | 9.7        | ± 0.8 | 4.7        | ± 0.2 | 3.2          | ± 0.2 | 0.42         | ± 0.02 |

※数値は平均値±標準誤差

n (供試サンプル数) = 50

## 別添 8

### 花粉の形態および稔性の検定

#### 【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、稔性を調べる。

#### 【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、その稔性率を測定した。

#### 【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 1 に示した。花粉の形状に、組換えイネ S-C (図 1B) および AS-D (図 1C) と非組換えイネ (図 1A) 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。

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。

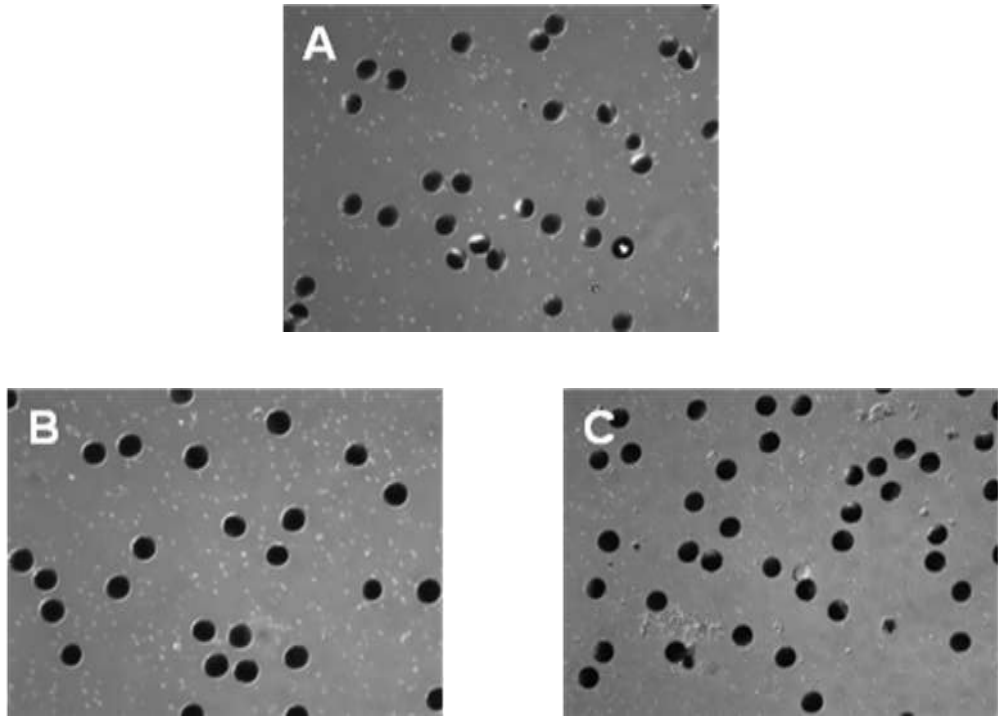


図1 非組換えイネ (A) と組換えイネ (B; S-C, C; AS-D) の花粉の形状と稔性。花粉が黒く染まっているのは、デンプンが蓄積しているためで、稔性があることを示している。

## 別添 9

### 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、イネ育用培土の入ったポットにそれぞれ 10 粒ずつ、3 ポットに播種した。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)

#### 【結果】

表 1 には、各処理区で 16 日間栽培した後の各植物体の草丈を、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。(1) の 28°C の区では、組換え体、非組換え体ともに草丈は 28 cm 程度と、正常な生育を示し、統計的 (t 検定、5% 水準 :  $p > 0.05$ ) に有意な差は認められなかった。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約 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。なお、草丈において統計的 (t 検定、5% 水準 :  $p > 0.05$ ) に有意な差は認められなかった。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。なお、処理区(2)および(3)で、4°C 処理を行った後、28°C の人工気象機に植物体を移したところ、全ての個体は枯死した。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。

表 1 植物体を各処理毎に 16 日間栽培した後の、各植物体の草丈 (cm)

|          | 処理 1 |       | 処理 2 |       | 処理 3  |
|----------|------|-------|------|-------|-------|
| 非組換え     | 27.9 | ± 2.9 | 4.9  | ± 0.6 | N.D.* |
| 組換え AS-D | 28.6 | ± 2.5 | 4.8  | ± 0.5 | N.D.  |
| 組換え S-C  | 28.2 | ± 1.7 | 4.9  | ± 0.6 | N.D.  |

数値は平均値±標準誤差、\* : 測定不能 (not detected)

n (供試サンプル数) = 30

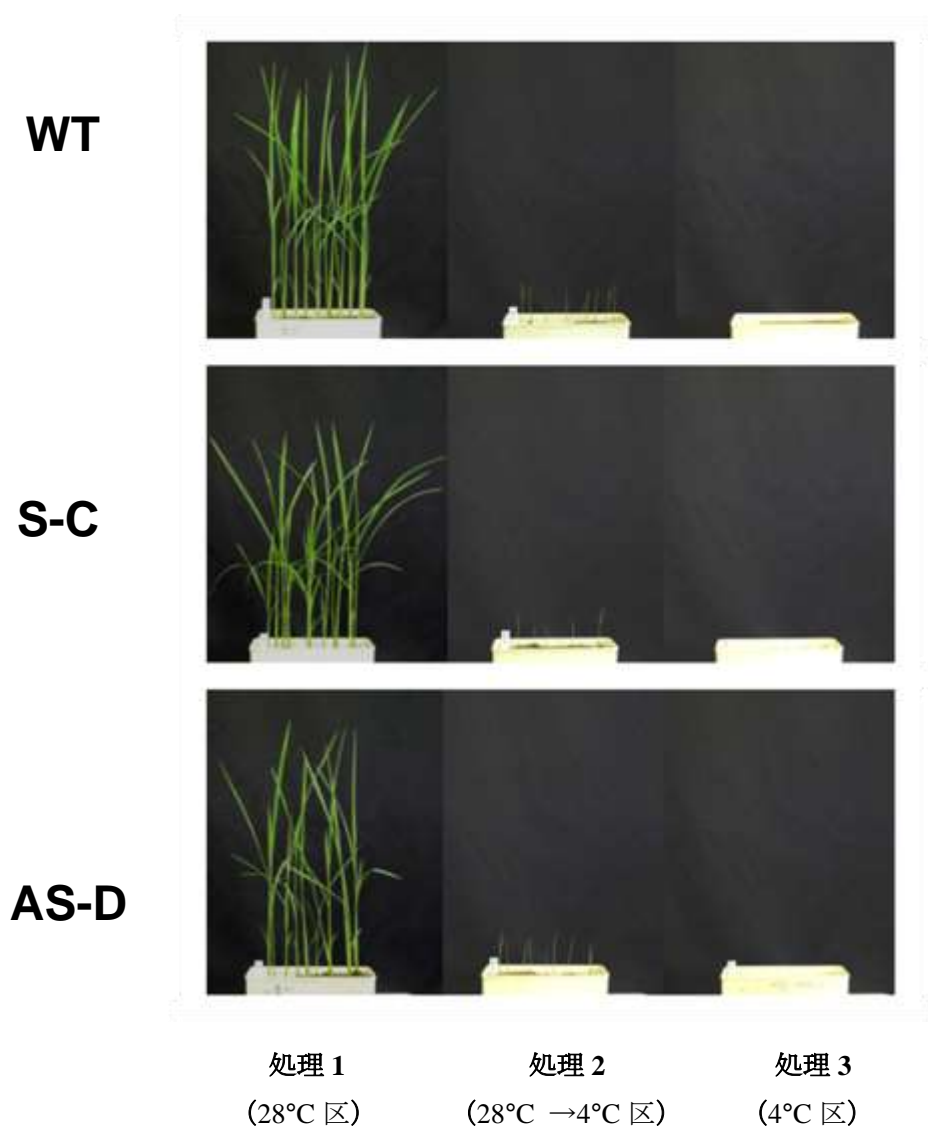


図 1 各処理区で 16 日間培養した後の各区のイネの様子



## 別添 10

### 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 の T3 世代、T4 世代、ならびに非組換え体イネの種子を 30°C で発芽させた後、イネ育用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 (P1 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ならびに紫外線付加照射区 (1.2 W/m<sup>2</sup> の UVB 強度) で 30 日間育成させた<sup>16)</sup>。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 T4 世代の組換え体イネ S-C と AS-D、および非組換えイネを 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れているのが分かる。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。その結果、T3、T4 世代の組換え体イネ S-C はともに、分けつ数、地上部新鮮重において明らかに、非組換えイネと比較して紫外線による阻害効果が軽減され、統計的にも 0.1%水準 ( $p > 0.001$ ) で有意な差異 (t 検定) が認められた。また、T3、T4 世代の組換えイネ AS-D においては、分けつ数、地上部新鮮重ともに、非組換え体イネと比較して統計的にも有意 (t 検定 : 0.1%水準での有意差 :  $p > 0.001$ ) に著しい阻害を受けた。

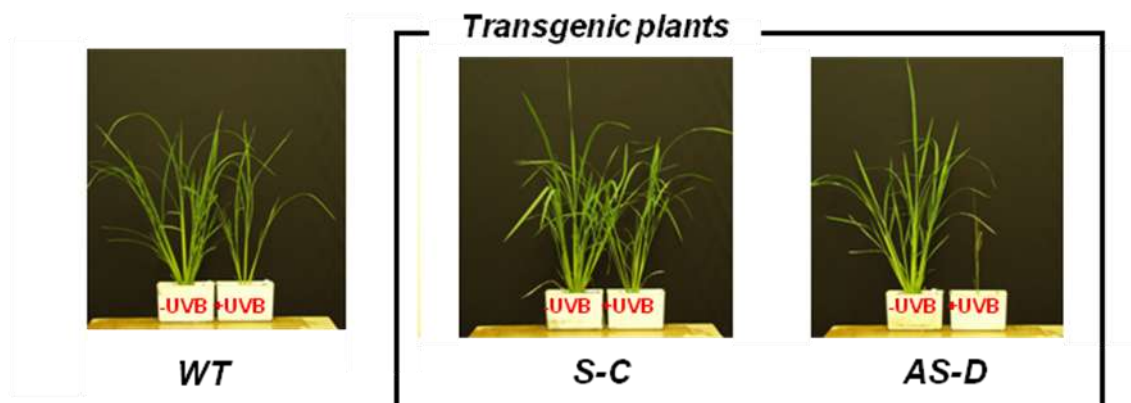


図1 閉鎖系温室内に設置した紫外線無照射区 (-UV) と紫外線付加照射区 (+UV) で、組換え体イネ S-C と AS-D、並びに非組換えイネ (WT) を 30 日間育成した後の写真

表1 紫外線無照射区、紫外線付加照射区で 30 日間生育した非組換え体 (WT)、組換え体 S-C、および AS-D の分けつ数、および新鮮重

|                  |      | 分けつ数(本)       | 新鮮重(g)        |
|------------------|------|---------------|---------------|
| 紫外線無照射区<br>(-UV) | WT   | 15.6 ± 1.9    | 18.7 ± 1.5    |
|                  | S-C  | 15.0 ± 2.4    | 19.0 ± 1.3    |
|                  | AS-D | 14.9 ± 1.7    | 18.5 ± 1.7    |
| 紫外線付加照射区<br>T3   | WT   | 8.2 ± 1.2     | 7.8 ± 1.8     |
|                  | S-C  | 12.1 ± 2.1*** | 12.1 ± 2.0*** |
|                  | AS-D | 1.0 ± 0.0***  | 1.9 ± 0.3***  |
| 紫外線付加照射区<br>T4   | WT   | 6.3 ± 1.3     | 4.8 ± 0.5     |
|                  | S-C  | 11.7 ± 2.3*** | 11.4 ± 1.2*** |
|                  | AS-D | 1.0 ± 0.0***  | 1.5 ± 0.2***  |

\*\*\*: t 検定、各区の WT に対する S-C、AS-D の値に対する 0.1% 水準での有意差  
P < 0.001

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)

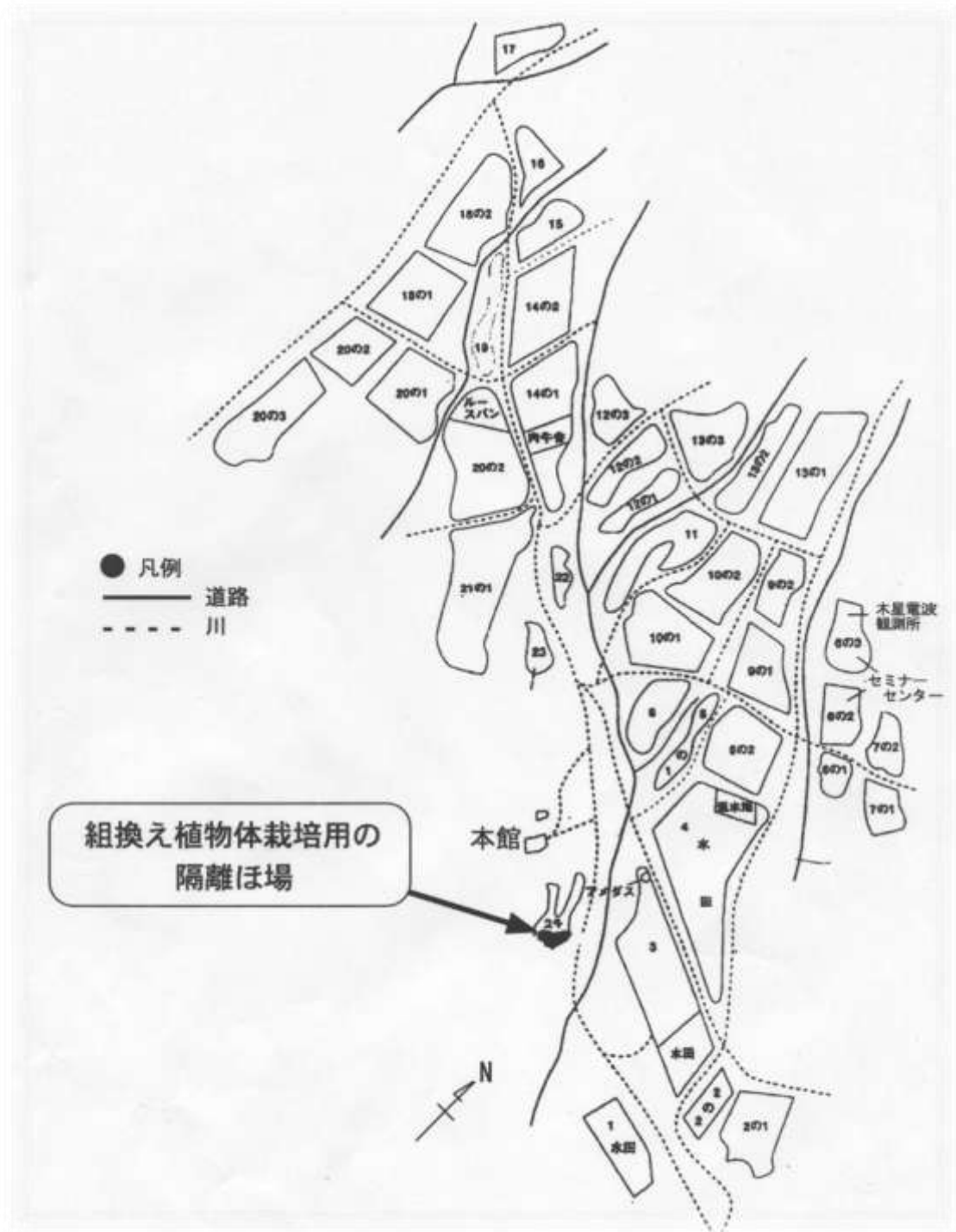


図3 東北大学大学院農学研究科附属複合フィールド教育研究センターの敷地図



図4 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周辺の航空写真

隔離圃場の試験区から、最も近い一般農家圃場（イネ栽培水田）までの距離は、約 310 m（赤線）、最も近いフィールドセンター内の研究圃場は約140 m（緑線）である。

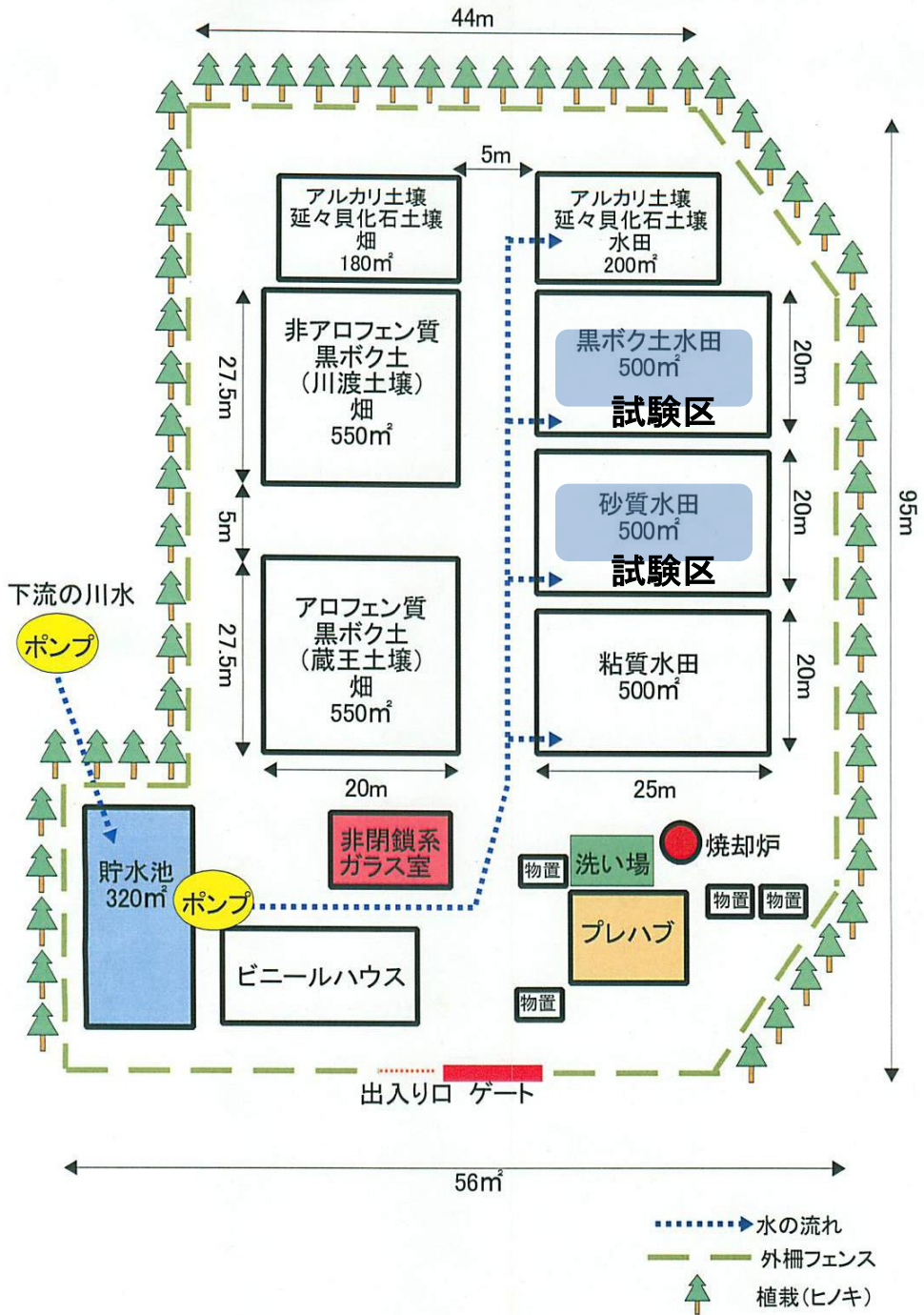


図5 組換え植物隔離圃場の概略図と試験区