

高トリプトファン含量イネ (OASAIID, *Oryza sativa* L.)
(KPD722-4) に関する生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性	5
ロ 生育又は生育可能な環境の条件	5
ハ 捕食性又は寄生性	6
ニ 繁殖又は増殖の様式	6
ホ 病原性	7
ヘ 有害物質の産生性	7
ト その他の情報	8
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ 構成及び構成要素の由来	9
ロ 構成要素の機能	10
(2) ベクターに関する情報	13
イ 名称及び由来	13
ロ 特性	13
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	13
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	13

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	14
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	14
(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	16
(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	18
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	18
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	21
(2) 使用等の方法	21
(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の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評価	23
1. 競合における優位性	23
2. 有害物質の産生性	24
3. 交雑性	26
4. その他	26
第三 生物多様性影響の総合的評価	27
緊急措置計画書	28

第一種使用規程承認申請書

平成21年2月6日

農林水産大臣 石破 茂 殿

環境大臣 齊藤 鉄夫 殿

申請者 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

理事長 堀江 武 印

住 所 茨城県つくば市観音台三丁目1番地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	高トリプトファン含量イネ (<i>OASAIID</i> , <i>Oryza sativa</i> L.) (KPD722-4)
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三丁目1番地1 名称：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成23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、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) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場の外への流出を防止するため、沈殿槽、網等の設備を排水系統に設置している。 (4) 野生動物等の摂食を防止するため、遅くとも出穂期までには、防鳥網を本遺伝子組換えイネの栽培水田を取り囲むように設置する。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、当該イネの栽培水田で生育することを最小限に抑える。

- | | |
|--|---|
| | <p>(2) 本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、当該イネが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えイネの栽培終了後は、当該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。</p> <p>(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、意図せずに本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。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1) から (5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 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。</p> |
|--|---|

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.

② 宿主の品種名又は系統名

クサホナミ 農林登録番号 水稻農林378号 品種登録年月日2003年3月26日

③ 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見られず、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おり、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。

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、我が国には野生種イネ (*Oryza. nivara*、*Oryza. rufipogon* 等) が自生していないことなどから、我が国における雑草イネは栽培種イネの変異であり、栽培種イネ間の交雑により雑草性の形質が出てきたものと考えられる。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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。

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測され

ており、我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在、最も重要な農作物として国内におい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河河畔（北緯53度）から南は中央アルゼンチン（南緯40度）にわたる種々の気候条件下で栽培されている。全世界の栽培面積は約1億500万 ha、玄米の総生産量は5億tを超えており、その生産量はアジア（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。我が国の栽培地域は北緯44度にまで広がっており、また、世界で最も単位面積当たりの生産量が高い地域になっている。我が国では通常、春に播種して秋に収穫されており、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。

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

我が国の米の流通実態は、約800万tが国内生産され、77万t程度が海外からの輸入であり、そのほとんどが国内消費向けに流通している。国内消費量の約92%が主に食用として消費され、残りが加工用、種子用、飼料用に使用されている。

(3) 生理学および生態学的特性

イ 基本特性

—

ロ 生息又は生息可能な環境の条件

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℃を必要とし、34℃以上では高温障害が発生する。水稲は湛水条件（水田）で栽培する。元来水生植物であるイネは要求水量の大きな植物であり、灌水がなく土壤水分が表面層で10%以

下、下層土で12%以下で干ばつ害が発生する。

イネの生育時期別の限界温度、最適温度を表1に示す。

表1 生育時期別の温度適性 (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

—

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。

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。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。

② 栄養繁殖の様式（ひこばえ、塊茎、塊根、匍匐枝等）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）以外では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り、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。しかし、北海道立農業試験場のデータでは、種子親の低温による雄性不稔化処理、強風、大面積の花粉源等の条件が重なった特殊な状況では、600m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。海外では、栽培イネと交雑可能な近縁野生種である *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く、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本の葯を持ち、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。基本的には自家受粉作物で、受粉形式は風媒であり、葯は開花(穎)直前に開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる。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。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10m程度とされており、花粉の寿命は一般に3~5分、最大で10分程度とされる。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

レタスを用いたプラントボックス法によってイネのアレロパシー（他感物質を産生することによる周囲の野生植物の生育抑制）能について検討した報告によると、水稻の中にはアレロパシーを示すものが存在しており、その品種間差は大きく、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。

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ことが知られている。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

動物の成長に必要な必須アミノ酸であるトリプトファンは、動物の体内における合成経路がないことから、その必要量を穀物等から摂取する必要があるが、穀類に含有されるトリプトファンはリジン、メチオニンなどと同様に含量が低いアミノ酸であるため、リジン、メチオニン、スレオニンなどと同様に飼料添加物として、醗酵工業による製品が利用されている。このような背景から、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子を導入し、ブタ或いはニワトリを対象とした、トリプトファン含量を高めた飼料用イネを作出して、その米穀を飼料として利用するため、今後の栽培に向けた隔離ほ場における試験データの蓄積を目的としている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

高トリプトファン含量イネ(*OAS1D*, *Oryza sativa* L.) (KPD722-4)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。発現カセットには選抜マーカー遺伝子は含まれない。

表2 供与核酸のサイズと機能

構成要素	サイズ (kb)	由来及び機能
改変アントラニル酸合成酵素 (<i>OAS1D</i>) 発現カセット		
トウモロコシ由来 ユビキチン遺伝子 プロモーター	2.0 kb	トウモロコシ由来ユビキチン蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター。イネの全身で恒常的発現を規定する。 GenBank/EMBL/DDBJ S94464
イネ由来改変アントラ ニル酸合成酵素 α サブ ユニット遺伝子 <i>OAS1D</i> (目的遺伝子)	2.0 kb	イネ由来アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子に1塩基の置換を加えて改変し、フィードバック阻害を解除した遺伝子。改変型酵素では、323番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変更されている。
ノパリン合成酵素遺伝 子ターミネーター	0.3 kb	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。転写終結を規定する。 GenBank/EMBL/DDBJ AF485783

ロ 構成要素の機能

①目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカー、その他の供与核酸の構成要素とそれぞれの機能

目的遺伝子である *OAS1D* は、アントラニル酸合成酵素 α サブユニットの改変酵素を産生する。アントラニル酸合成酵素は、図 1 に示すステップで動物の必須アミノ酸であるトリプトファンを合成する、トリプトファン生合成系の鍵酵素である。トリプトファン生合成系は動物には存在せず、微生物と植物のみが本酵素を有する。

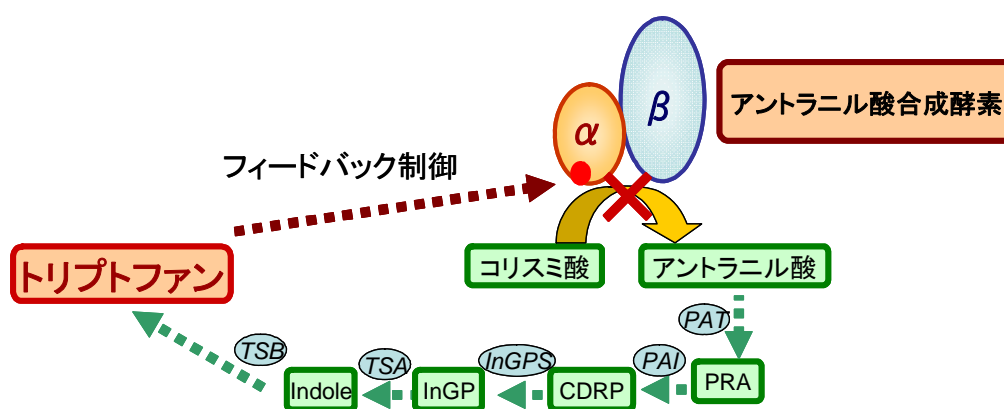


図 1 トリプトファンの合成系路とそのフィードバック制御

- PAT フォスホリボシルアントラニル酸転移酵素
- PRA 5-フォスホリボシルアントラニル酸
- PAI フォスホリボシルアントラニル酸異性化酵素
- CDRP 1-(0-カルボキシフェニルアミノ)-1-デオキシリブローズ5リン酸
- InGPS インドール3グリセロールリン酸合成酵素
- InGP インドール3グリセロールリン酸
- TSA トリプトファン合成酵素 α サブユニット
- TSB トリプトファン合成酵素 β サブユニット
- indole インドール

本酵素は、合成系の最終産物であるトリプトファンによりフィードバック制御されており、細胞内のトリプトファン含量が一定レベルに達すると不活性型になり、アントラニル酸

の合成が停止する。その結果、トリプトファンの産生が行われなくなる（図1）。本酵素は α サブユニットと β サブユニットからなるが、フィードバック制御に関わるのは α サブユニットである。本酵素の改変型遺伝子 *OAS1D* は、イネからクローニングしたアントラニル酸合成酵素 α サブユニット *OAS1* の323番目のアスパラギン酸(D)をアスパラギン(N)に変更するよう設計されており、この結果、トリプトファンの蓄積によるフィードバック阻害が解除され、イネ中のトリプトファン含有量が上昇する。

供与核酸のユビキチンプロモーター配列 (*pUbi*) は *OAS1D* の発現調節を担うプロモーターであり、発現は植物全体にわたり恒常的である。しかし、45°Cの温水による熱ショックストレスや、ピンセットなどで組織を挟むなどの物理的ストレスによって発現レベルが変動することが報告されている。

供与核酸のノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター配列(*nosT*)は、ノパリン合成酵素に由来するターミネーター配列であり、構造遺伝子である *OAS1D* の3'末端に接続して、転写を終結する機能を担う配列である。

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になっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

改変型*OAS1D*蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、国立医薬品食品衛生研究所が公開しているアレルギーデータベースADFS(2008年1月29日公開版)を用いてFASTA型アルゴリズムによって比較したところ、既知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。また、「日本晴」を宿主とし、本申請の導入遺伝子と同じ*OAS1D*遺伝子を導入したトリプトファン高含有系統、HW1及びHW5を用いたマウスによる28日間経口投与毒性試験において、毒性は示されなかったことから、改変型の*OAS1D*蛋白質が毒性を示すことも想定されない。

③宿主の持つ代謝系を変化させる場合の特性

改変型酵素は、トリプトファンや、その類似物質である5-メチルトリプトファンによるフ

インドバック制御を受けないことを確認している。そのため、*OAS1D* の導入によって、遊離トリプトファン含量の増加と 5-メチルトリプトファンに対する抵抗性が付与される。改変型酵素遺伝子の導入によりトリプトファンの蓄積量は増大するが、新たな代謝系が付加されたり、代謝系自体が変化することはなく、上記のHW1及びHW5では本遺伝子の導入によるトリプトファン以外のアミノ酸の変動はカルスと葉では認められていない。

トリプトファン生合成系並びに、その周辺の代謝系に関しては良く解明されており、トリプトファン含有量が増大することによって、これを出発物質とする一部のインドール化合物の含有量が増加することが予想される。2004年に実施された「日本晴」を宿主とする高トリプトファン含有系統HW1及びHW5の収穫種子及び実生を用いた試験で、この点について検討した結果、HW1系統では種子中の遊離トリプトファンの含量が約146倍増加したのに対し、遊離とエステル体を含めた全インドール酢酸量は宿主の26 nmol/gから39 nmol/gへ約1.5倍の増加となった。同じく、HW5系統では遊離トリプトファン含量の増加が約74倍であるのに対し、全インドール酢酸量は宿主の26 nmol/gから44 nmol/gへ約1.7倍増加した。また、芳香族化合物含有量への影響をHPLC-PDAを用いた代謝プロファイルで分析した結果、微増するものが見られたが、遊離トリプトファン含量の増大と同等のレベルで増加するものは認められなかった。以上から、本供試組換えイネにおいても通常のイネに比べてインドール-3-酢酸含量が増加する可能性が想定される。インドール-3-酢酸は植物ホルモンの一つであるオーキシンの活性を有する事から、その増加の程度によっては、形態への影響等も想定されるところである。上記HW1及びHW5では一般圃場栽培において、特段の形態異常は認められなかったが、本組換えイネではトリプトファンの蓄積量も異なると考えられるので、生育段階でのトリプトファンの蓄積量と草丈等の生育特性について本隔離ほ場栽培試験において調査すると共に、植物体中のオーキシン濃度についても隔離ほ場試験期間中に調査することとする。なお、HW1及びHW5の収穫玄米を用いたマウスにおける28日間連続経口投与毒性試験の結果、毒性は認められていない。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

ウイスカ法¹による直接導入に使用した発現カセット*pUbi::OASA1D-nosT*は、バイナリーベクターである*pUBASA1D* の発現カセット部位をPCRにより増幅、精製したDNA断片である。*pUBASA1D* は大腸菌K12株及びpBINバイナリベクターであるpIG121-Hmを用いて作製した。

ロ 特性

①ベクターの塩基数及び塩基配列

発現カセット*pUbi::OASA1D-nosT*は、間接導入に使用したバイナリーベクター、*pUBASA1D* 発現カセット部位をPCRにより増幅、精製した約4.3kbのDNA断片（図2）であり、発現カセット以外のベクター部分は含まない。

②特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

特記事項無し

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

直接導入法によるため該当しない。

(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

¹ ウイスカ法とは植物細胞をタングステン等の微細な針状結晶並びに導入しようとする発現カセットを含む水溶液と激しく混和することにより、細胞に微細な孔を開けることで遺伝子を取り込ませる方法

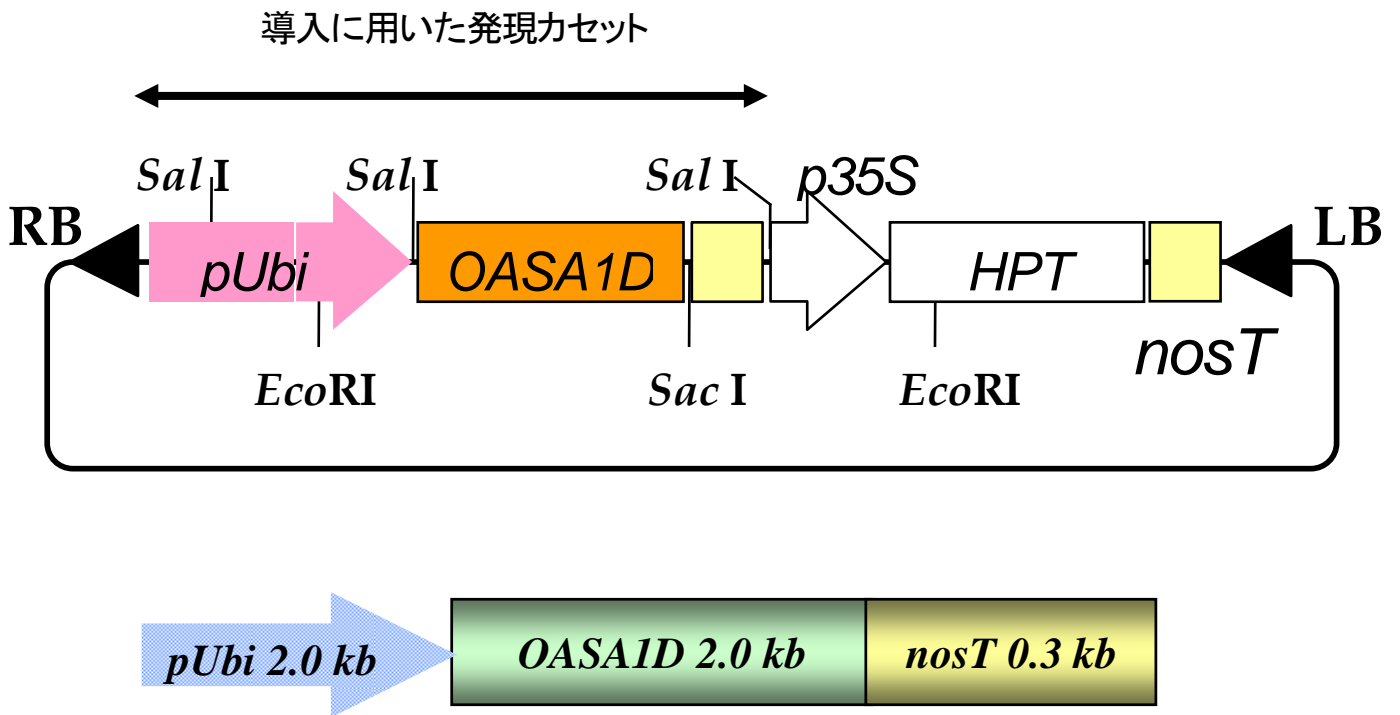


図2 ウィスカ法による直接導入に供した発現カセットの調製に用いた*pUBASA1D*

(上) と発現カセット*pUbi::OASA1D-nosT* (下)

pUbi : トウモロコシ由来ユビキチン遺伝子プロモーター

OASA1D: イネ由来改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子

nosT : アグロバクテリウム由来ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

発現カセット*pUbi::OASA1D-nosT* は、針状結晶を用いたウィスカ法により移入された。

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

ウィスカ法で発現カセット *pUbi::OASA1D-nosT* を直接導入したカルスを、5-メチルトリプトファン $150 \mu\text{M}$ を含む N6 培地に置床し、約 3 週間後に生長してきた抵抗性カルスを再分化培地へ移植し幼植物体を得た。選抜で得られた系統を KPD722-4 と名づけた。なお、5-メチルトリプトファンは図 1 に示した様にアントラニル酸合成酵素の活性を強く阻害するた

め、トリプトファン合成が停止する。そのため、非組換え細胞は死滅し、組換え細胞のみが生育する。

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

核酸の移入方法は、ウイスカ法による直接導入であるため該当しない。

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、閉鎖系及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育成図

本試験に供する組換え系統KPD722-4（以下、組換えイネと略称）は、2003年から遺伝子導入実験を開始し、閉鎖系温室（P1P）における試験の過程で、ウイスカ法による直接導入系統として選抜した3系統の1つである。この3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。

2005年から特定網室での生物多様性影響評価試験を開始し、KPD722-4が遊離トリプトファンを種子中に多く蓄積していることを確認した。育成の系譜を図3に示し、世代と実施した試験を表3に示す。なお、すべての試験において、対照品種は宿主である「クサホナミ」とした。

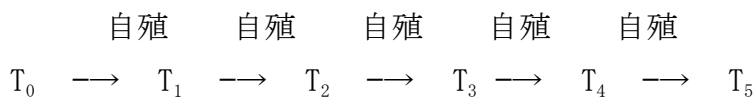


図3 自殖系統の系譜

表3 試験項目と実施年度

試験項目	系統名	KPD722					
	世代	再分化当代(T ₀)	自殖第1世代(T ₁)	自殖第2世代(T ₂)	自殖第3世代(T ₃)	自殖第4世代(T ₄)	自殖第5世代(T ₅)
	栽培年	2003	2004	2005	2006	2007	2008
	栽培施設	閉鎖系温室	閉鎖系温室	特定網室	特定網室	特定網室	特定網室
遺伝子の存在状態(PCR)		○	○	○	○	○	○
遺伝子の存在状態(サザン解析)		○	○	○	○	○	○
遺伝子の発現状態(ノーザン解析)			○	○		○	
遺伝子の発現状態(ウェスタン解析)			○	○			
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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

ゲノム DNA を用いたサザンブロット解析により、移入した核酸は染色体上に挿入されていることが示唆された。導入遺伝子が核の染色体ではなく、葉緑体或いはミトコンドリアのゲノム上に挿入されている場合には自殖後代 (T₁ 世代) のすべての個体が導入遺伝子を持つはずであるが、自殖後代で導入遺伝子を持つ個体と持たない個体が 14:10 の比率で出現したことから、統計学的に、移入した核酸が宿主の染色体上に存在していると判断された。

② 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

組換えイネの T₁ および T₄ 世代のゲノム DNA を用いたサザンブロット解析の結果から移入された核酸の複製物のコピー数は 5 と判断された。また、PCR 解析及びサザンブロット解析において世代間でのバンドパターンが一致していたことから、移入した核酸は各世代で染色体上に安定に保持されていることが示された。

③ 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

サザンブロット解析の結果、導入されたカセット遺伝子数は5コピーであるが、それぞれの導入遺伝子が同一の染色体上に隣接して挿入されているか否かは、 T_4 分離世代におけるバンドパターンの分離の有無によって調査した。その結果、組換えイネの T_4 世代において、導入遺伝子を持つすべての個体のバンドパターンは T_1 世代の組換えイネと同一であり、個体毎の遺伝分離は認められなかったことから、5コピーの導入遺伝子は同一染色体上に近接して存在することが推定された。

④ (6)の①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

目的遺伝子の発現安定性について、特定網室で採種した組換えイネの T_2 及び T_4 世代の葉におけるノーザンブロット解析及び、 T_2 世代におけるウェスタンブロット解析を行ったところ、安定して発現していることが確認された。

HPLCによる測定の結果、組換えイネで、本導入遺伝子の作用によって蓄積する玄米における遊離トリプトファン量は、実験温室で栽培した T_1 世代で約7,700 nmol/gDW、特定網室で栽培した T_2 世代で約6,500 nmol/gDWとなった。世代間の含量の変動は栽培環境が実験温室から特定網室になったことによる環境の変動等によるものと思われるが、この点は第一種使用での確認を要するものと考えられる。ちなみに各世代の含量は宿主である「クサホナミ」のそれぞれ約80倍、90倍であった。個体間差については T_2 世代の4個体の玄米種子で調査したところ、約5,700~7,400 nmol/gDWの範囲であった。

⑤ 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

OAS1D 遺伝子の部分配列を増幅するためのオリゴプライマー(5MT1、RAS4)を用いたPCR法により、導入された*OAS1D* 遺伝子及び宿主のゲノム上に存在する*OAS1* 遺伝子を異なるバンドサイズで特異的に検出可能である。このプライマーセットを用いたPCRでは、宿主のゲノム上に存在する*OAS1*遺伝子はイントロン配列をもつため2.0 kb のバンドとして検出されるのに対し、導入された*OAS1D*遺伝子はcDNA配列から作成したものであるため0.7 kb のバンドとして検出される。宿主のDNAを鋳型として用いたときには、増幅産物は宿主の*OAS1*遺伝子由来のDNA断片のみであり、組換えイネから導入遺伝子の特異的に検出することができる。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 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

導入された*OAS1D* 遺伝子は、トリプトファンによるフィードバック制御に対して感受性が低下した酵素*OAS1D*を産生することから、この遺伝子を過剰発現する組換えイネは、宿主と比較し高含量の遊離トリプトファンを蓄積することができる。

② 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

形態及び生育特性を調査するために組換えイネの T_2 世代と宿主を、特定網室内に2005年5月2日に1/10000aポットへ移植した。なお移植苗は、2005年3月24日に特定網室で播種し、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、組換えイネの T_2 世代と宿主について、特定網室でボンソル培養土を詰めた1/5000aポットに2005年4月24日に移植した。

a 形態及び生育の特性

2005年に特定網室において本組換えイネの一般的な生育特性として、出穂日、稈長、穂

数、穂長及び止葉長を調査した結果、組換えイネの T_2 世代と宿主との間で、組換え体は出穂日が2日早く、稈長が短くなり、それぞれ統計学的に有意な差であった。

b 生育初期における低温耐性又は高温耐性

2008年に特定網室において栽培した組換えイネの T_5 世代と宿主の2葉期の苗を暗所 5°C で10日間処理した後、特定網室での生育を2週間後に調査した。その結果組換えイネ及び宿主とも全ての個体が枯死した。

c 成体の越冬性又は越夏性

2005年11月～2006年1月中旬にかけて行われた非加温の特定網室におけるポット栽培試験において、組換えイネの T_2 世代及び宿主ともすべて枯死したことから、越冬性がないことが確認された。

d 花粉の稔性及びサイズ

組換えイネの T_2 世代及び宿主の花粉について顕微鏡下で調査した結果、いずれの花粉も同程度の大きさの球形で、形状に差異は認められなかった。また酢酸カーミン染色によって花粉稔性を調査した結果、統計学的に有意な低下が認められた。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

特定網室で栽培した組換えイネの T_4 世代の稔実粒数歩合は宿主とほぼ同等であることが示された。

特定網室で栽培したイネについて、成熟期の穂を握って脱粒性を調査した結果、組換えイネの T_4 世代、宿主ともに難で、両者に違いは認められなかった。休眠性（穂発芽性の調査）の試験では組換えイネの T_4 世代、宿主ともに穂発芽易で違いは認められなかった。発芽率は、収穫直後に 5°C で約3カ月保存した種子の発芽率を調査した。その結果、組換えイネの T_4 世代、宿主ともに95%以上の発芽率で、差は認められなかった。

f 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。

g 有害物質の産生性

(a)根から分泌され他の植物に影響を与えるもの

特定網室で組換えイネのT₂世代と宿主をポット栽培した後の土壌を使用した後作試験を行った。ダイコンの発芽に与える影響について調査した結果、両者間に差は検出できなかった。また、播種したダイコンの30日後の生育についても差は認められなかった。

(b)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

特定網室で栽培した組換えイネのT₂世代と宿主について、収穫・乾燥させた植物体を粉碎し、この粉末を鋤込んだ土壌にダイコンを播種して発芽率と生育を調査した。その結果、発芽率について、両者間に差は認められなかった。また、播種したダイコンの25日後の生育についても差は認められなかった。

(c)根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの

特定網室で栽培中又は栽培後の土壌の糸状菌、放線菌、細菌数を調査した結果、組換えイネと宿主の間に大きな差は認められなかった。

h その他

—

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

組換えイネの第一種使用等隔離ほ場栽培については、隔離ほ場で栽培収穫した種子のトリプトファン高含有性の確認、稔実粒数歩合調査、栽培された系統の生育などを調査する。

また、トリプトファンを高含有する系統では稔実粒数歩合に若干の低下が認められることを示唆する知見が得られている。そのため、今後、トリプトファン高含有組換えイネの開発を進め、実用化を目指すためには、隔離ほ場での自然環境下で栽培されたイネにおける上記知見をさらに集積し、その再現性を確認するとともに稔実粒数歩合の低下が改めて認められた場合には、稔性に重大な影響を与えない含有量の上限を探ることが極めて重要であることから、この点の解析も進める。さらに、本遺伝子組換えイネは、これまでに例

のないウイスカ法によって作出されたものであることに鑑み、この遺伝子導入法が隔離ほ場での自然環境下で栽培されたイネの農業形質に何らかの影響を有するものであるか否かを解析可能な範囲で調査することとする。

栽培予定ほ場は試験用畑ほ場と防風林、アスファルト道路で囲まれており、花粉飛散があったとしても受粉可能なイネは近隣250m以内には栽培されない。

(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三丁目1番地1

名称：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

作物研究所 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成23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、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) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場の外への流出を防止するため、沈殿槽、網等の設備を排水系統に設置している。
- (4) 野生動物等の摂食を防止するため、遅くとも出穂期までには、防鳥網を本遺伝子組換えイネの栽培水田を取り囲むように設置する。

2 隔離ほ場での作業要領

- (1) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、当該イネの栽培水田で生育する

ことを最小限に抑える。

- (2) 本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、当該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、本遺伝子組換えイネの栽培終了後は、当該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、意図せずに本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に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1) から (5) まで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ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

—

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

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

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

(6) 国外における使用等に関する情報

—

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

組換えイネ KPD722-4 系統は、イネ由来アントラニル酸合成酵素遺伝子を 1 塩基のみ置換した *OAS1D* を導入し、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター制御下で恒常的に発現することでトリプトファン高含有特性を示すが、トリプトファンは蛋白質を構成するアミノ酸の一つであり、それ自体として特段の生理活性を有するものではないので、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。これに加え、選抜マーカー遺伝子としての抗生物質耐性遺伝子を有していない。

イネは野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合することから、それらの生育に支障を及ぼす性質として、組換えイネの形態及び生育特性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、花粉特性、種子の生産量、脱粒性、発芽率、休眠性について調査した。得られた結果のすべてにおいて、組換えイネは宿主と比較して差がないか、あるいは弱勢を示すことから、競合における優位性を高めるものではないと判断された。

特定網室での栽培試験においては、本組換えイネと宿主である「クサホナミ」の一般形態、特性のうち、出穂日、稈長、花粉稔性について組換えイネと宿主の間で有意差が認められ、稈長、花粉稔性については組換えイネが弱勢を示した。稈長が短くなったのは出穂日が早まったことの結果と考えられた。これらの有意差は特定網室の環境下でのポット栽培で得られたデータに基づくものであり、第一種使用において確認を要するものと考えられる。これら一部の項目について有意差は認められるものの、競合における優位性を高めると考えられるものではなく、野生動植物に対する影響を評価する場合には遺伝子組換えではないイネよりも競合における優位性を高めていないとして差し支えないものと判断した。

以上のように、競合における優位性について組換えイネ KPD722-4 が宿主である「クサホナミ」よりも高まることを示す知見は得られていないことから、組換えイネ KPD722-4 の競合における優位性が宿主である「クサホナミ」よりも高まるとは考えられない。よって、本組換えイネが野生植物と競合することはなく、また影響を受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

—

(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

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考えられた。

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

本組換えイネは、導入された遺伝子の発現によりアントラニル酸合成酵素 α サブユニットの改変型酵素を産生し、トリプトファンを多量に蓄積する。この酵素遺伝子はイネ由来であり、1塩基（1アミノ酸）が置換されている。このアミノ酸は活性中心ではなく、活性の変化はないことが確認されている。また、トリプトファンは動物の生育に必要な必須アミノ酸の一つであり、LD₅₀の値（ラットの経口投与では16 g/体重kg以上:後述）から、毒物には該当しないと考えられる。したがって改変型酵素及びトリプトファンともに有害物質には該当しない。また、トリプトファンがアレロパシー物質であるとの報告もない。

公開されているデータベースによれば、経口投与したラットでのLD₅₀は16 g/体重kg以上である。トリプトファンの分子量は204.23であり、その1nmolは204.23 ngに相当する。このことから、本組換えイネで測定された最大の含量であるT₁世代における7,700 nmol/gを1粒(約

20mg) あたりに換算したトリプトファン含量である150 nmolは約0.03 mgに相当し、ラット経口でのLD₅₀は体重1 kg当たり、玄米約500,000粒(約10 kg)に相当する。野生動物がこれほど大量の組換え玄米を食することは考えにくい。

根から分泌される他の植物に影響を与える有害物質の産生性は、特定網室において、組換えイネKPD722-4及び宿主である「クサホナミ」のポット栽培土壌にダイコンを播種してこれらの発芽と生育を調査したが、両者に差は認められなかった。根から分泌され土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性については、組換えイネKPD722-4を栽培したポットの土壌における微生物相について調査した。その結果、土壌中に認められる微生物相に大きな差は認められなかった。植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性は、成熟後に収穫・乾燥させた植物体を粉碎し、鋤込んだ土壌にダイコンを播種して発芽と生育を調査した。その結果、播種したダイコンの発芽率及び生育に差は認められなかった。

以上のように後作試験、鋤き込み試験、土壌微生物相の調査を行った結果、組換えイネKPD722-4と宿主である「クサホナミ」との間に差は認められなかったことから、本組換えイネKPD722-4は宿主である「クサホナミ」と比べて有害物質の産生性に関して相違は認められないと結論された。よって、本組換えイネKPD722-4が野生動植物の種又は個体群の維持に支障を及ぼすおそれはないと判断された。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

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ない。

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。雑草イネには種々の起源があると考えられているが、我が国の雑草イネは野生種イネとの交雑に由来するのではなく栽培種イネ同士の交雑に由来すると考えられる。このため、我が国における雑草イネは影響を受ける可能性のある近縁野生植物として特定されるものではない。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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

以上から、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えイネの第一種使用等により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4. その他

上記の他に生物多様性影響の評価を行うことが適切と考えられる本遺伝子組換えイネの性質はないと考えられる。

第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主である日本型イネ栽培種 (*Oryza sativa* L.) は我が国における農耕の歴史とともに存在し、現在も主要作物として国内で広く栽培されており、これまでの経験から通常の使用法の範囲で扱う限り、日本型イネ栽培種が水田や畑地で野生化、雑草化するおそれは極めて少ないと考えられる。競合における優位性について、組換えイネKPD722-4系統は「クサホナミ」との間に稈長と花粉稔性で有意差が認められ、組換えイネが弱勢を示した。しかし、これらの値はイネの品種、あるいは栽培条件による変異の幅を超えていない。イネは我が国において長年の使用経験がある農作物である。自然条件下で自生することは知られていないことと、本申請組換え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、本組換えイネと競合する可能性のある野生植物は特定されない。

有害物質の産生性について、移入された核酸の複製物の発現により産生されるアントラニル酸合成酵素 α サブユニットの改変型酵素とトリプトファンは有害物質には該当しない。増加したトリプトファン量もLD₅₀の値よりはるかに低い。また根から分泌され他の植物に影響を与える有害物質の産生性、根から分泌される土壤微生物に影響を与える有害物質の産生性、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有害物質の産生性をダイコンの発芽と生育で調査した結果、いずれにおいても発芽と生育に差は認められなかった。結果として、宿主である「クサホナミ」と組換えイネKPD722-4の間で有害物質の産生性に差がないことから、影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

交雑について、イネと自然条件下で交雑可能な野生植物は我が国には自生していないので、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

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の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、組換えイネ KPD722-4 の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によって生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

緊急措置計画書

平成21年2月6日

氏名 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

理事長 堀江 武

住所 茨城県つくば市観音台三丁目1番地1

第一種使用規定の承認を申請している高トリプトファン含量イネ（*OASAIID*, *Oryza sativa* L.）（KPD722-4）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

業務管理責任者	個人名・所属は個人情報につき非開示
業務管理主任者	個人名・所属は個人情報につき非開示
業務従事者	個人名・所属は個人情報につき非開示
業務従事者	個人名・所属は個人情報につき非開示
業務従事者	個人名・所属は個人情報につき非開示

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 本高トリプトファン含量イネ（*OASAIID*, *Oryza sativa* L.）（KPD722-4）（以下、本LMOという）の栽培用種子については、管理を徹底し部外者が入手できないようにするとともに、その情報を整理して記録する。

(2) さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、得られた情報を整理し記録する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

緊急措置が必要となった場合には、すぐにその内容を関係者に対して、電話、電子メールや文書などにより連絡を取る。また、周知するためにホームページ等で本件についてのお知らせを掲載する。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

隔離ほ場で栽培されている本LMOについては、実験に用いる種子は密閉容器にて運搬、保管する。それ以外の種子や、その他の部位は焼却処理あるいはすき込み等による不活化を行う。

5 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に報告する。