

スギ花粉症治療イネ (OsCr11, *Oryza sativa* L.)
申請の概要

第一種使用規程承認申請書

生物多様性影響評価書

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.....	4
(1) 供与核酸に関する情報.....	4
(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.....	13
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性.....	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.....	16
3, 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	18
(1) 使用等の内容.....	18
(2) 使用等の方法.....	18
(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.....	19
(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.....	20
(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.....	20
(6) 国外における使用等に関する情報.....	20
第二, 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	20
1, 競合における優位性.....	20
2, 有害物質の産生性.....	21
3, 交雑性.....	22
第三, 生物多様性影響の総合的評価.....	22
引用文献リスト.....	24

緊急措置計画書

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 4 月 25 日

文部科学大臣 高木 義明 殿
環境大臣 松本 龍 殿

氏名 独立行政法人 農業生物資源研究所
申請者 理事長 石毛 光雄 印
住所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 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	スギ花粉症治療イネ (改変Cry j蓄積イネ, <i>Oryza sativa</i> L.) (0sCr11)
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丁目1番地2 名称：独立行政法人 農業生物資源研究所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成26 年3 月31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 隔離ほ場内の水田（東西約35.5 m x 南北約24.6 m）を利用する。 (2) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場全体の外側に、メッシュフェンスを設置している。 (3) 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記載した標識を見やすい所に掲げている。 (4) 遅くとも出穂期までには鳥類の摂食を防ぐため、隔離ほ場内の水田に防鳥網を設置する。 (5) 使用した機械、器具、靴などに付着した土、本遺伝子組換えイネの種子等を洗浄するための洗場を設置しているとともに、当該イネ

の隔離ほ場外への漏出を防止するために、沈殿槽、網等の設備を排水系統に設置している。

2 隔離ほ場の作業要領

(1) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ品種以外の植物が隔離ほ場内の栽培実験区画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外に運搬する場合は、当該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。また保管する場合には、当該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) (2) 以外の場合には隔離ほ場内の栽培実験区画で栽培したイネは、試験終了後、地上部は刈り取り焼却処分し、残りのイネの残渣及び発生した植物は速やかに水をはった隔離ほ場内にす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、オートクレーブまたは焼却炉を用い不活化する。

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具又は隔離ほ場で作業した者の靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄し、隔離ほ場内の植物残渣、土等を外に持ち出さない等により、意図せずに本遺伝子組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。

(5) 隔離ほ場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。

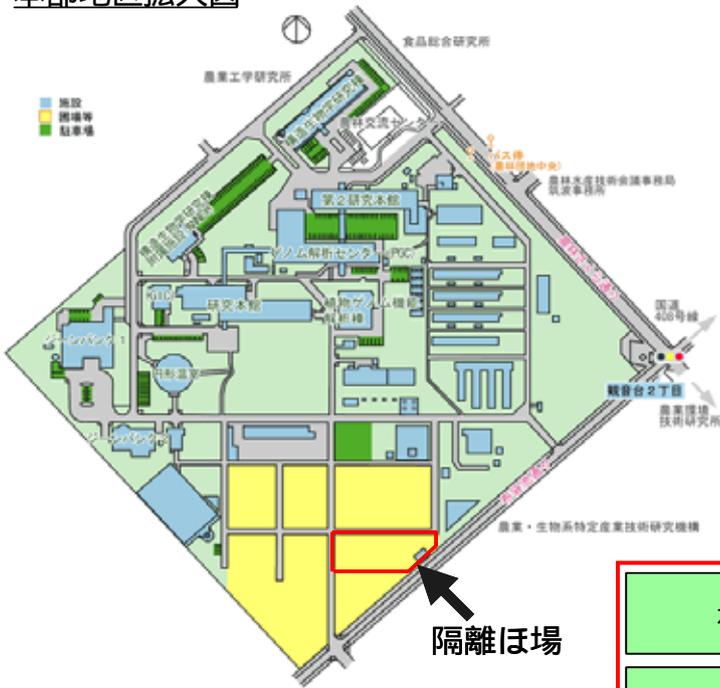
(6) (1)から(5)に掲げる事項を、第一種使用等をする者に遵守させる。

(7) 使用する本遺伝子組換えイネによる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。

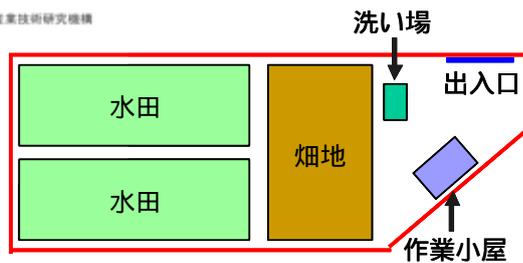
隔離ほ場の地図および隔離ほ場内における試験区の配置図



本部地区拡大図



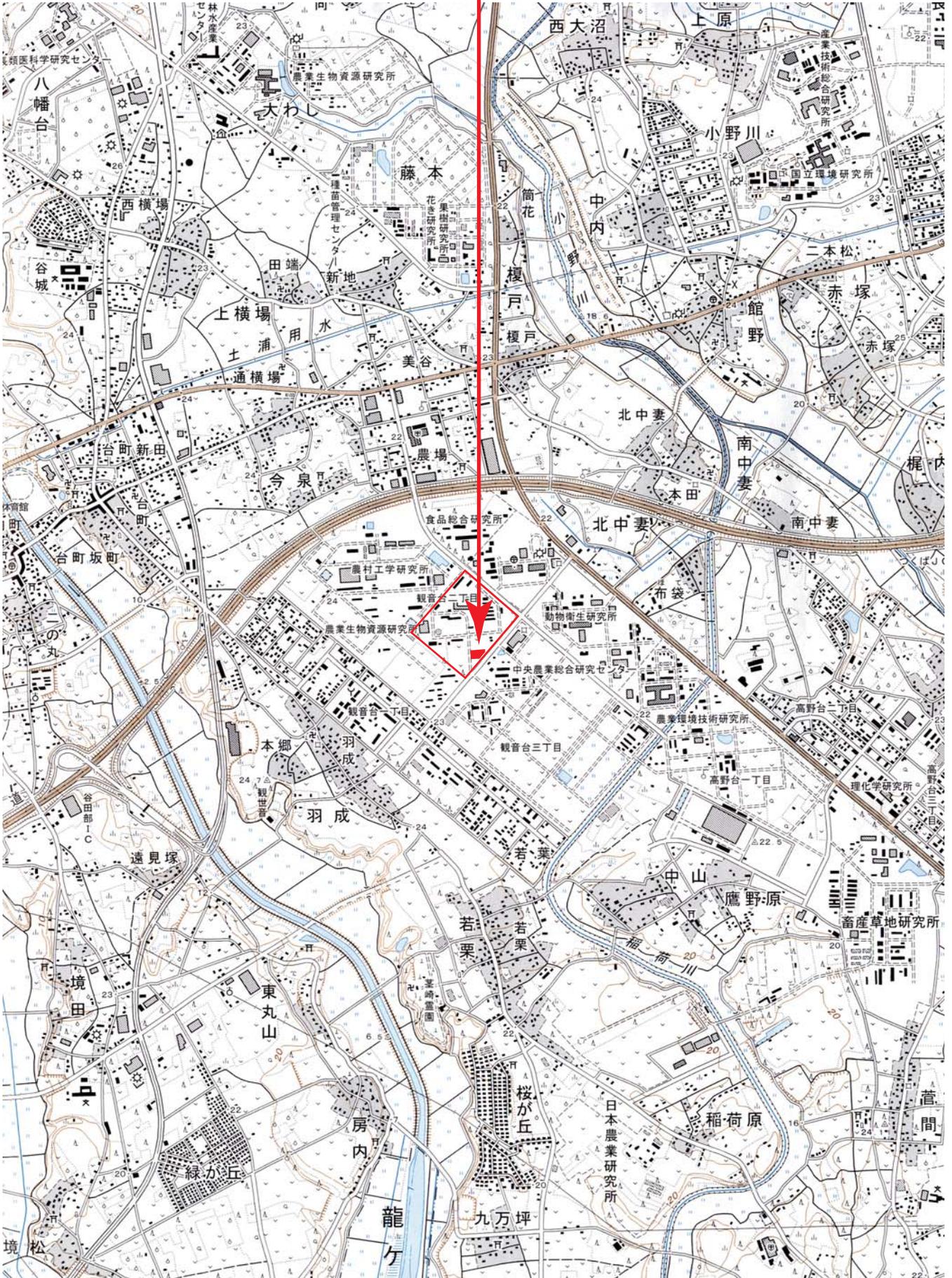
隔離ほ場拡大図



— フェンス設置位置

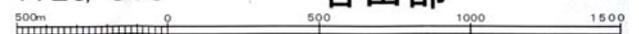
(独) 農業生物資源研究所 本部地区 隔離ほ場周辺の地形図

隔離ほ場



1:25,000

谷田部



生物多様性影響評価書

スギ花粉症治療イネ

(改変Cry j蓄積イネ、 *Oryza sativa* L.) (OsCr11)

独立行政法人

農業生物資源研究所

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	4
(1) 供与核酸に関する情報	4
(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	13
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	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	16
3, 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	18
(1) 使用等の内容	18
(2) 使用等の方法	18
(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	19
(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	20
(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	20
(6) 国外における使用等に関する情報	20
第二， 項目ごとの生物多様性影響の評価	20
1, 競合における優位性	20
2, 有害物質の産生性	21

3, 交雑性	22
第三, 生物多様性影響の総合的評価	22
引用文献リスト	24

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主または宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け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.

ロ 宿主の品種名又は系統名

コシヒカリ低グルテリン変異系統 a123 (別添1)

(以後、「コシヒカリa123」という。)

コシヒカリについては、以下の通り。

登録番号 なし (現行種苗法制定以前の農林登録のため)

農林登録番号 水稻農林100号 登録年 1956年

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パンナ・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⁾。*O. 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可能性があるが、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經由して伝来したと推定されている⁴⁾。我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在も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1億5500万 ha、総生産量は6億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地域である。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) 生理学および生態学的特性

イ 基本特性

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

ロ 生息又は生息可能な環境の条件

イネの生育時期別の限界温度、最適温度を次表に示す。

通常の栽培可能温度は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旱害を受ける⁷⁾。

表1 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 (°C)			生育時期	限界温度 (°C)		
	低	高	最適		低	高	最適
発芽	10	45	20～35	幼穂分化	15	—	—
出芽・苗立ち	12～13	35	25～30	幼穂形成	15～20	38	—
活着	16	35	25～28	開花	22	35	30～33
葉の伸長	7～12	45	31	登熟	12～18	30	20～25
分けつ	9～16	33	25～31				

ハ 捕食性又は寄生性

捕食性、並びに寄生性は認められていない。

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

イネは種子繁殖性である。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⁷⁾。イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネ品種では秋に収穫して室温に保管した場合、翌春には休眠は失われる。種子の寿命に関しては、低温・低湿条件下では長期間の保存が可能であり、室温下でも種子水分を9.7%以下にすることで95%以上の発芽率を5年間、維持することができる⁸⁾。一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⁷⁾。一方、古代米の一種の赤米の場合には、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）を除くと、“ひこばえ”は通常冬の低温のため枯死するため、越冬して成長することはない。

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⁹⁾、通常は1ないし2%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¹⁰⁾、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¹¹⁾、農林水産省の定めた「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、冷水処理により種子親に不稔（不稔率40～50%）を生じさせた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¹²⁾：花粉親から237 m離れた位置、交雑率0.024%、平成19年度試験¹³⁾：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¹⁴⁾。

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低い（1%以下）¹⁴⁾。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¹⁴⁾。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)-ニ-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^{12, 13)}。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¹⁴⁾。

ホ 病原性

病原性は認められていない。

へ 有害物質の産生性

日本で一般的に栽培されている水稲の中には、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¹⁵⁾。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

スギ花粉症治療イネ(改変Cry j蓄積イネ、*O. sativa* L.)(OsCr11)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。また目的遺伝子の塩基配列は別添2に示した。

表2 供与核酸のサイズと機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
発現カセット1		
グルテリン <i>GluB4</i> プロモーター	1.47 kb	イネ由来プロモーター。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。
改変 <i>Cry j 1-F1</i> 融合貯蔵タンパク質遺伝子(目的遺伝子)	1.67 kb	イネ及びスギ由来。翻訳産物はイネの種子貯蔵タンパク質及びスギの花粉抗原タンパク質の融合タンパク質。
グルテリン <i>GluB4</i> ターミネーター	0.65 kb	イネ由来ターミネーター。
発現カセット2		
16 kD プロラミンプロモーター	0.93 kb	イネ由来プロモーター。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。
改変 <i>Cry j 1-F2</i> 融合貯蔵タンパク質遺伝子	1.59 kb	イネ及びスギ由来。翻訳産物はイネの種子貯蔵タンパク質及びスギの花粉抗原タンパク質の融合タンパク質。

(目的遺伝子)		
16 kD プロラミンターミネーター	0.28 kb	イネ由来ターミネーター。
発現カセット 3		
10 kD プロラミンプロモーター	0.82 kb	イネ由来プロモーター。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。
改変 <i>Cry j 1-F3</i> 融合貯蔵タンパク質遺伝子 (目的遺伝子)	1.52 kb	イネ及びスギ由来。翻訳産物はイネの種子貯蔵タンパク質及びスギの花粉抗原タンパク質の融合タンパク質。
10 kD プロラミンターミネーター	0.25 kb	イネ由来ターミネーター。
発現カセット 4		
グルテリン <i>GluB1</i> プロモーター	2.30 kb	イネ由来プロモーター。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。
イネ、グルテリン <i>GluB1</i> シグナル配列	75 bp	イネ由来。導入遺伝子産物の小胞体への移行に関するシグナル配列。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリン <i>GluB1</i> 翻訳開始点から 75bp 領域。
シャッフル <i>Cry j 2</i> 遺伝子 (目的遺伝子)	1.19 kb	スギ由来。スギの花粉抗原タンパク質である <i>Cry j 2</i> の立体構造を改変することにより、スギ花粉症患者の IgE 抗体との結合性を低下させたもの。
KDEL 小胞体局在化シグナル	12 bp	イネ由来。導入遺伝子産物の小胞体係留に関するシグナル配列。
グルテリン <i>GluB1</i> ターミネーター	0.65 kb	イネ由来ターミネーター。
発現カセット 5		
カルス特異的プロモーター (CSP)	1.61 kb	イネ由来のプロモーター。カルス (脱分化状態の培養細胞) 特異的に目的遺伝子の発現を誘導する。イネ植物体では発現しないプロモーターとして、特許が公開されている。
1点変異型 <i>ALS</i> 遺伝子	1.93 kb	イネ由来。除草剤ピリミノバックに耐性を示すアセト乳酸合成酵素遺伝子のアミノ酸置換型 (S627I)。遺伝子組換えイネの選抜マーカー。
10 kD プロラミンターミネーター	0.17 kb	イネ由来のターミネーター。発現カセット 3 の 10 kD プロラミンターミネーターよりも短い。
<i>Nos</i> ターミネーター	0.26 kb	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター。

ロ 構成要素の機能

本遺伝子組換えイネは種子の胚乳部分にスギ花粉抗原を高蓄積しており、アレルギー疾患の一種であるスギ花粉症の経口減感作療法に用いる治療薬の原材料候補の一つとして作出された。

スギ花粉症は、スギ(*Cryptomeria japonica*)の花粉が異物として鼻や目の粘膜から吸収された際に、それを排除する免疫反応が過剰になった状態でありアレルギー疾患の一種である。一般的な花粉症の治療法は、アレルギー反応の発現に係わる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である。根治的治療法としては、アレルギーの原因物質であ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減感作療法が採られている。しかし、この治療法は初期には毎週 2、3 回通院して注射を打つ煩雑さや抗原の注射による痛みやかゆみを伴い、治療期間が 3-5 年と長くかかること、まれに副作用がおこる可能性がある一方で全ての患者が根治することはないことから、あまり普及していない^{16,17,18)}。これらの問題点を改善した新しいタイプの減感作療法として、抗原を舌下から取り込ませる舌下減感作療法や抗原を経口投与する経口減感作療法が考案され臨床研究が進められている^{17,18)}。

スギ花粉症では、スギ花粉に含まれる Cry j 1 (ペクテートリアーゼ) および Cry j 2 (ポリメチルガラクトナーゼ) と呼ばれる二種類の酵素タンパク質が主要な抗原 (アレルゲン) として同定されている。スギ花粉症の患者がこれらの天然型の抗原を含む花粉エキスを摂取した場合、希に急性アレルギー反応 (アナフィラキシー) を発症することが知られている。本遺伝子組換えイネでは、アナフィラキシーのリスク低減を目的として、アレルゲンの立体構造を認識するスギ花粉症患者のアレルゲン特異的 IgE 抗体との結合性を低下させるため、これら二種類のアレルゲンの立体構造を改変したタンパク質を発現させる。即ち、Cry j 1 タンパク質を 3 つの断片に分割し、それぞれ個別にイネ種子貯蔵タンパク質と融合した改変 Cry j 1-F1、-F2、-F3 融合貯蔵タンパク質および、Cry j 2 タンパク質を断片化し、順序を入れ替えたシャッフル Cry j 2 タンパク質 (これらをあわせて「改変 Cry j」という) (図 1) を、それぞれイネ種子貯蔵タンパク質遺伝子プロモーターによって種子胚乳中に特異的に発現させた本遺伝子組換えイネを作出した。この際に用いるプロモーター及びターミネータ (発現カセット 1~4 で用いるもの) については、他の遺伝子組換えイネでも使用実績があり、種子胚乳中で特異的に発現を誘導する (他の組織では検出限界未満) ことが報告¹⁹⁾ されている。したがって導入遺伝子も同様に、種子胚乳中で特異的に発現し、他の組織では発現しないと推定される。以上に掲げるタンパク質を発現させるため、以下の機能等を有する供与核酸を用いる。

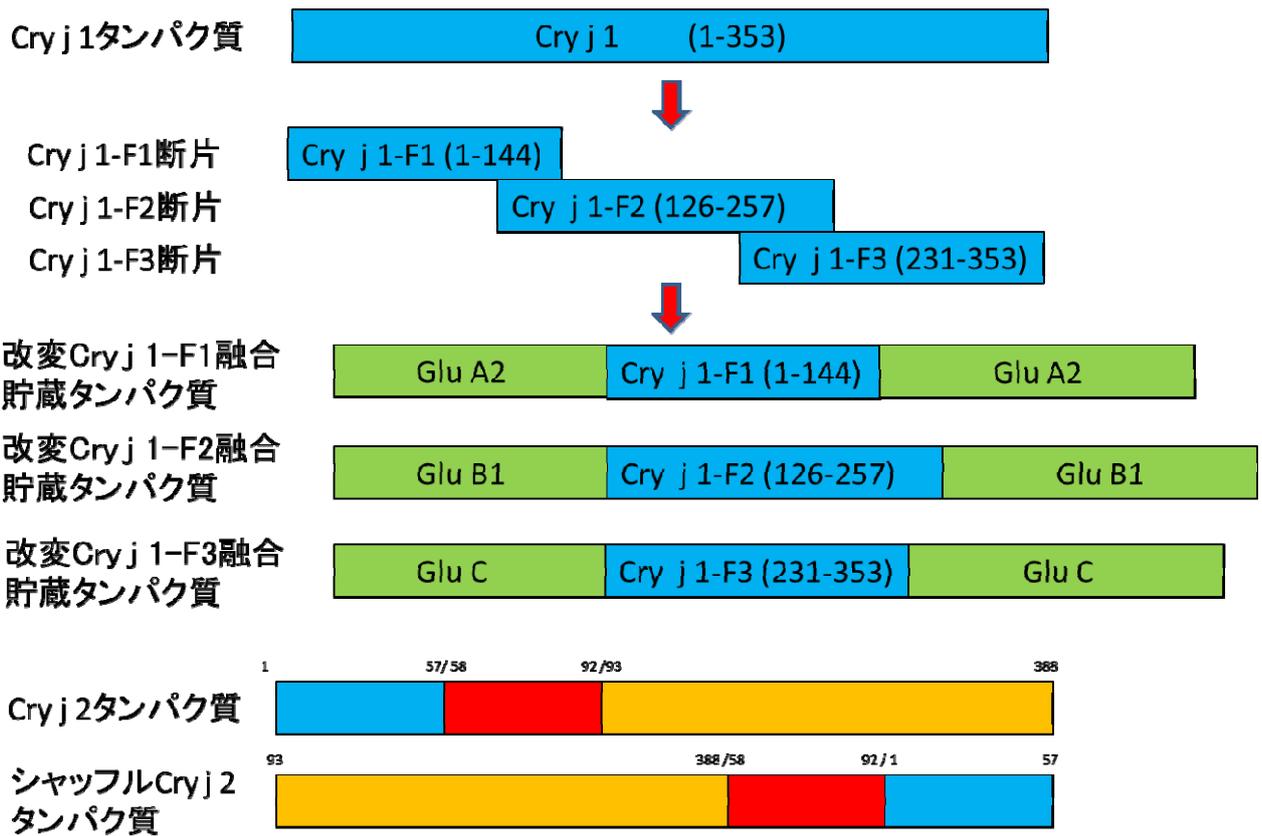


図1 改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質およびシャッフルCry j 2タンパク質

① 供与核酸の構成要素の機能

a. 発現カセット1

ア) グルテリン *GluB4* プロモーター (*GluB4pro*)

イネ由来。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリン *GluB4* をコードする遺伝子の翻訳開始点から上流1.47 kbまでのプロモーター領域。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。

イ) 改変 *Cry j 1-F1* 融合貯蔵タンパク質遺伝子 (*mGluA2-F1*)

イネ及びスギ由来。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリン *GluA2* をコードする遺伝子について塩基配列の一部（アミノ酸配列276-304の領域）を除き、同部位に *Cfr9I* サイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質 *Cry j 1* の一部（アミノ酸配列1-144の領域）をコードする塩基配列を同サイト（別添2、下線部分）に挿入付加した。種子貯蔵タンパク質との融合タンパク質は種子中で高蓄積しやすい。

ウ) *GluB4* ターミネーター (*GluB4ter*)

イネ由来。グルテリン *GluB-4* のターミネーター。ストップコドン下流0.65 kbの領域。転写終結を規定する。

b. 発現カセット2

ア) 16 kD プロラミンプロモーター (*16kpro*)

イネ由来。イネの種子貯蔵タンパク質である16 kDプロラミンをコードする遺伝

子の翻訳開始点から上流0.93 kbまでのプロモーター領域。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。

1) 改変 *Cry j 1-F2* 融合貯蔵タンパク質遺伝子 (*mGluB-F2*)

イネ及びスギ由来。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリンGluB1をコードする遺伝子について塩基配列の一部（アミノ酸配列272-301の領域）を除き、同部位に *Cfr9I* サイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質 *Cry j 1* の一部（アミノ酸配列126-257の領域）をコードする塩基配列を同サイト（別添2、下線部分）に挿入付加した。種子貯蔵タンパク質との融合タンパク質は種子中で高蓄積しやすい。

2) 16 kDプロラミンターミネーター (*16Kter*)。

イネ由来。16 kDプロラミン遺伝子のターミネーター。ストップコドン下流0.28 kbの領域。転写終結を規定する。

c. 発現カセット3

1) 10 kDプロラミンプロモーター (*10Kpro*)

イネ由来。イネの種子貯蔵タンパク質である10 kDプロラミンをコードする遺伝子の翻訳開始点から上流0.82 kbまでのプロモーター領域。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。

1) 改変 *Cry j 1-F3* 融合貯蔵タンパク質遺伝子 (*mGluC-F3*)

イネ及びスギ由来。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリンGluCをコードする遺伝子について塩基配列の一部（アミノ酸配列281-317の領域）を除き、同部位に *Cfr9I* サイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質 *Cry j 1* の一部（アミノ酸配列231-353の領域）をコードする塩基配列を同サイト（別添2、下線部分）に挿入付加した。種子貯蔵タンパク質との融合タンパク質は種子中で高蓄積しやすい。

2) 10 kDプロラミンターミネーター (*10Kter*)

イネ由来。10 kDプロラミン遺伝子のターミネーター。ストップコドン下流0.4 kbの領域。転写終結を規定する。

d. 発現カセット4

1) グルテリン *GluB1* プロモーター (*GluBpro*)

イネ由来。イネの種子貯蔵タンパク質であるグルテリンGluB1をコードする遺伝子の翻訳開始点上流から2.3 kbまでのプロモーター領域。種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させる。

1) グルテリン *GluB1* シグナル配列 (*GS*)

イネ由来。導入遺伝子産物の小胞体への移行に関するシグナル配列。目的遺伝子産物を種子貯蔵タンパク質としてタンパク質顆粒中に蓄積させる。イネ種子貯蔵タンパク質グルテリン *GluB1* 翻訳開始点から75 bpの領域。

2) シャッフル *Cry j 2* 遺伝子 (*SH-Cry j 2*)

スギ由来。スギの花粉抗原タンパク質 *Cry j 2* のアミノ酸配列をシャッフリング（3つの断片に分割し、各断片の順序を入れ替えて再結合）したもの。

3) KDEL小胞体局在化シグナル (*KDEL*)

イネ由来。導入遺伝子産物の小胞体係留に關与するシグナル配列。

わ) *GluB1*ターミネーター (*GluBter*)

イネ由来。グルテリン*GluB-1*遺伝子のターミネーター。ストップコドン下流0.65 kbの領域。転写終結を規定する。

e. 発現カセット5

ア) カルス特異的プロモーター (*CSP*)

イネ由来。カルス (脱分化状態の培養細胞) 特異的に目的遺伝子の発現を誘導するプロモーター (DDBJ ID:CG0060_1A) (特許国際公開番号; W02003079769)。カルス以外のイネ植物体では発現しないことが示されている。

イ) 1点変異型*ALS*遺伝子 (*mALS*)

イネ由来。アセト乳酸合成酵素中第627番目のアミノ酸がセリンからイソロイシンに置換した変異型酵素 (S627I) をコードする遺伝子。除草剤ピリミノバックに耐性を示す。遺伝子組換えイネの選抜マーカーとして働く。

ウ) 10 kDプロラミンターミネーター (*10Kter*)

イネ由来。10 kDプロラミン遺伝子のターミネーター。転写終結を規定する。発現カセット3の10 kDプロラミンターミネーターよりも短い。

エ) *Nos*ターミネーター (*Noster*)

*Agrobacterium tumefaciens*由来。ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター。ストップコドン下流0.3 kb領域。転写終結を規定する。

② 供与核酸の発現により産生される蛋白質の機能及びアレルギー性 (食品としてのアレルギー性を除く)

a. スギ花粉症主要抗原Cry j 1の一部断片とイネ貯蔵タンパク質との融合タンパク質 (改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質)

本遺伝子組換えイネで種子特異的に発現する改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質は、内生型のグルテリンタンパク質の一部を改変し、スギ花粉に含まれるCry j 1タンパク質を断片化して挿入した新規タンパク質である。

断片化したCry j 1タンパク質はスギ花粉症アレルギー抗原Cry j 1と相同性を持つ。しかし断片化したことによりCry j 1タンパク質本来の機能を消失し植物体内で特段の生理的機能を持たないと推定される。またグルテリン貯蔵タンパク質の立体構造および機能を維持するため、グルテリン遺伝子の酸性サブユニットC末端側の可変領域を除き、同部位に断片化したCry j 1タンパク質遺伝子を挿入していることから、改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質も植物体内では内生型のグルテリン貯蔵タンパク質と同等の貯蔵タンパク質として機能すると推定される。

グルテリンタンパク質は貯蔵タンパク質として種子の発芽の際に分解されアミノ酸態窒素の供給源として幼植物の生長に利用されるが、イネ植物体内におけるそれ以外の生物学的な機能は知られていない。本改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質は、改変によって附加されたアミノ酸配列によって新たな生物学的機能を得ることは想定されない。従って、本新規タンパク質も内在性のグルテリンタンパク質と同様

に貯蔵タンパク質として利用されることが推定される。

スギ花粉症の減感作療法においては、主要アレルゲンであるCry j 1、Cry j 2を含有するスギ花粉抗原エキスの医薬品としての安全性がすでに調べられており、注射および舌下・嚥下を通じて投与による治療が可能になっている^{17,18)}。しかし、皮下注射の際には、血中の好塩基球や組織中の肥満細胞上のスギ花粉抗原特異的IgEとの結合によるアナフィラキシー・ショックの危険性が、舌下・嚥下を通じた投与に比較して高いため、抗原エキスの投与量を高めることができない治療上の制約がある。そこで注射の際の安全性を確保するため、IgEとの結合性を低下させる目的で立体構造を改変したCry j 1/Cry j 2融合タンパク質や多糖類と複合させたCry j 1、Cry j 2、T細胞エпитープ等の人工的なアレルゲンが開発され、臨床研究が進められている^{17,18,20)}。

スギ花粉症患者の血液中に含まれるCry j 1特異的IgE抗体は、Cry j 1タンパク質の立体構造を認識して結合しアナフィラキシー・ショックを誘導することが知られているが、本遺伝子組換えイネの胚乳中に蓄積する改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質では、Cry j 1タンパク質を本来の立体構造を取らないように断片化しているためCry j 1特異的IgE抗体との結合性が失われると推定されるため、同融合タンパク質が経口経路でアナフィラキシー・ショックを誘発するリスクはCry j 1タンパク質よりも低いことが想定される。

(改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質について)

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンGluA2の酸性サブユニットC末端側の可変領域の一部を除き、同部位にCfr9Iサイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質Cry j 1のアミノ酸配列1-144の領域を同サイトに挿入したタンパク質。貯蔵タンパク質として機能すると推定される。スギ花粉症アレルギー抗原Cry j 1と相同性を持つ。

(改変Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質について)

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンGluB1の酸性サブユニットC末端側の可変領域の一部を除き、同部位にCfr9Iサイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質Cry j 1のアミノ酸配列126-257の領域を同サイトに挿入したタンパク質。貯蔵タンパク質として機能すると推定される。スギ花粉症アレルギー抗原Cry j 1と相同性を持つ。

(改変Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質について)

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンGluCの酸性サブユニットC末端側の可変領域の一部を除き、同部位にCfr9Iサイトを付加し、スギ花粉抗原タンパク質Cry j 1のアミノ酸配列126-257の領域を同サイトに挿入したタンパク質。貯蔵タンパク質として機能すると推定される。スギ花粉症アレルギー抗原Cry j 1と相同性を持つ。

b. スギ花粉症主要抗原Cry j 2の改変タンパク質 (シャッフルCry j 2タンパク質)

スギ花粉抗原タンパク質Cry j 2のアミノ酸配列を断片化して順番を変えた (即ち、シャッフルした) タンパク質。スギ花粉症アレルギー抗原Cry j 2と相同性を持つ。

スギ花粉症の減感作療法においては、すでに主要アレルゲンであるCry j 1、Cry j 2を含有する花粉エキスの毒性調査が行われ、スギ花粉エキスの注射あるいは経口投与による治療が可能になっている^{17,18,20)}。しかし、皮下注射されたアレルゲンが血流に混入した場合におこるアナフィラキシー・ショックの危険性を排除できないことから

Cry j 1、Cry j 2の投与量を高めることができないことが治療上の制約となっており、注射の際の安全性を確保するために立体構造を改変したCry j 1/ Cry j 2融合タンパク質や多糖類と複合化したCry j 1、Cry j 2、T細胞エピトープ連結ポリペプチド等の人工的なアレルゲンが開発され、臨床研究が進められている^{17, 18, 20}。

シャッフルCry j 2タンパク質は本来の立体構造を維持していないと考えられることから、アレルゲン性ならびに新たな生物学的機能や毒性を獲得することは想定されない。本遺伝子組換えイネの胚乳中に蓄積するシャッフルCry j 2タンパク質も、Cry j 2特異的IgE抗体結合性が失われることが想定されるため、同タンパク質が経口経路でアナフィラキシー・ショックを誘発するリスクはCry j 2タンパク質よりも低いことが想定される。

c. 1点変異型(S627I)のアセト乳酸合成酵素 (*mALS*遺伝子産物)

イネ由来アセト乳酸合成酵素(ALS)はイネが持つ分岐鎖アミノ酸(ロイシン、バリン、イソロイシン)生合成経路上の酵素である。アセト乳酸合成酵素阻害剤であるピリミノバックは、植物中の分岐鎖アミノ酸合成に関与する内在性アセト乳酸合成酵素の活性を特異的に阻害するため、除草剤として使用すると、植物中にバリン、ロイシン及びイソロイシンの分岐鎖アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる。本遺伝子組換えイネでカルス特異的に発現する1点変異型(S627I)アセト乳酸合成酵素は、野生型のイネALS(644アミノ酸残基)の第627番目のセリンがイソロイシンに変換されたことでアセト乳酸合成酵素阻害剤ピリミノバックの存在下でも活性を示し、分岐鎖アミノ酸合成経路が阻害されないことから、本遺伝子組換えイネのカルスにアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する。イネアセト乳酸合成酵素がアレルギー性を持つという報告はない。また、1点変異型イネアセト乳酸合成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(Allergen Database for Food Safety[ADSF]; <http://allergen.nihs.go.jp/ADSF/>)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。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称および由来

pPZP200改変バイナリーベクターpCSPmALS43GW²¹)。大腸菌由来のプラスミド pBR322及び*Pseudomonas*属細菌由来プラスミドpVS1等を基に構築された。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

塩基数は7.2 kb。塩基配列等は文献21参照。

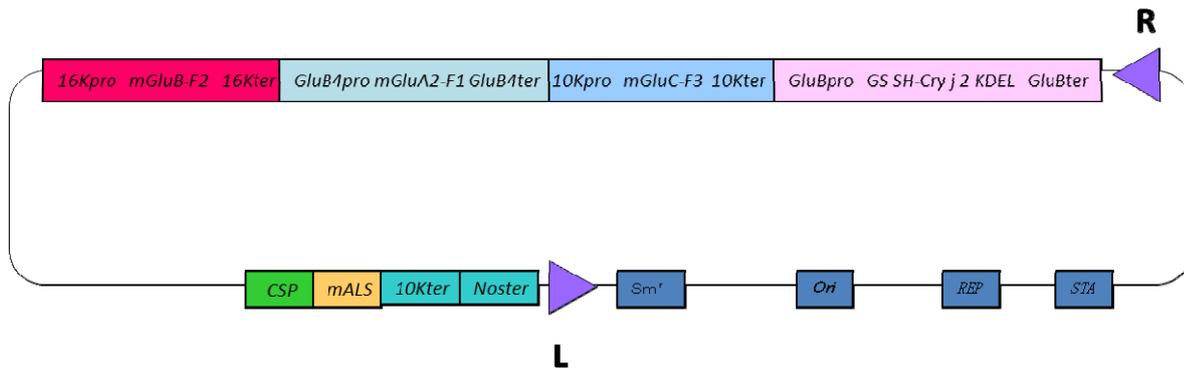


図2 本遺伝子組換えイネ作出に用いた形質転換用プラスミド（バイナリーベクター）の構造
トータルサイズ 26 kb

L: T-DNA領域レフトボーダー

R: T-DNA領域ライトボーダー

GluB4pro: グルテリン*GluB4*プロモーター

mGluA2-F1: 改変*Cry j 1-F1*融合貯蔵タンパク質遺伝子

GluB4ter: グルテリン*GluB4*ターミネーター

16Kpro: 16 kDプロラミンプロモーター

mGluB-F2: 改変*Cry j 1-F2*融合貯蔵タンパク質遺伝子

16Kter: 16 kDプロラミンターミネーター

10Kpro: 10 kDプロラミンプロモーター

mGluC-F3: 改変*Cry j 1-F3*融合貯蔵タンパク質遺伝子

10Kter: 10 kDプロラミンターミネーター

GluBpro: グルテリン*GluB1*プロモーター

GS: イネ、グルテリン*GluB1*シグナル配列

SH-Cry j 2: シャッフル *Cry j 2*遺伝子

KDEL: KDEL小胞体局在化シグナル

GluBter: グルテリン*GluB1*ターミネーター

CSP: カルス特異的プロモーター

mALS: 1点変異型 *ALS*遺伝子

Noster: *Nos*ターミネーター

Sm^r: バクテリアのストレプトマイシン耐性遺伝子

Ori: ColE1複製開始点

STA: プラスミドpVS1の安定化領域

REP: プラスミドpVS1の複製開始点

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

ベクター骨格には、大腸菌内で機能する複製開始領域である *ori* 及び、アグロバクテリウム内で機能する *REP*、その他、安定化領域である *STA* を保有する。また、バクテリアのストレプトマイシン耐性遺伝子である *S^mr* を含む。

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

バイナリーベクターの構成要素は表2に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は図2に示した。なお、宿主内に移入される核酸は、図2のLB(L)からRB(R)までの領域が想定されている。

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る。

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

プラスミドを導入したアグロバクテリウムをイネ種子胚盤由来のカルスに感染させ、ピリミノバック (1 μ M) を含む選抜培地で耐性遺伝子が導入された細胞を選抜した。

② アグロバクテリウムの菌体の残存性

遺伝子組換えイネT₃種子6粒をマルチビーズショッカー(安井器械製)で粉末状に破碎し、1 mlの滅菌水を加えて懸濁した。この懸濁液を25°C、15,000 rpmで10分間遠心して、得られた上清画分0.1 mlを、50 μ g/mlのスペクチノマイシンを含むLB培地に塗布して、暗所、28°Cで3日間培養した。対照として、遺伝子組換えイネの作製に用いたプラスミドを導入した遺伝子組換えアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105) を塗布して、暗所、28°Cで3日間培養した。3日後、観察によりアグロバクテリウムの残存性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(別添3、図1)。このことから、本遺伝子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 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するまでに用いられた系統の育成の経過

2007年から遺伝子導入実験を開始し、閉鎖系温室(P1P)で遺伝子組換え植物体を育成し、改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質、Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質、Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質、シャッフルCry j 2タンパク質を種子中に最も多く蓄積している1系統を選抜した。この1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。2009年から安全性試験を開始し、2010年9月現在、5世代目(T₅)の遺伝子組換え植物を閉鎖系温室および特定網室で

栽培している。世代と実施した試験を表3に示す。なお、全ての試験において、対象品種は宿主である非遺伝子組換えのコシヒカリa123とした。なお本申請により使用するのはT₅世代およびその後代である。また0sCr11は本系統のT₄世代以降のものを指す。

表3 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（T₀は遺伝子を導入した当代）

試験項目	系統名	遺伝子組換えイネ				
	世代	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
遺伝子の存在状態 (サザン) (PCR)				○		
				○	○	○
目的タンパク質の発現状態				○	○	○
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（別添4）。移入した核酸が核の染色体ではなく、母性遺伝する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）のすべての系統が移入遺伝子を持ち、後代種子において移入した遺伝子が発現すると想定される。しかし、ウエスタンブロット解析の結果、T₁世代20系統において、移入遺伝子発現産物由来と考えられるシグナルが検出された系統と検出されなかった系統が17:3に分離していた。また、移入した核酸では、核支配のプロモーターにより遺伝子発現が制御されており、移入遺伝子発現産物が種子に蓄積していることから移入した核酸が核ゲノムに挿入されていることが示唆された。従って移入した核酸は染色体上に存在すると判断した。

ロ 供与核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性

① 核酸のコピー数

サザンブロット解析の結果、本遺伝子組換えイネの宿主である非遺伝子組換えのコシヒカリ a123 では、内生型 *ALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナル1本が検出された(別添4、図2、実線矢印)。これに対して、本遺伝子組換えイネでは、内生型 *ALS* 遺伝子のシグナルに加えて、移入された1点変異型 *mALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナル2本が検出された(別添4、図2、点線矢印)。*mALS* 遺伝子数から推定し、遺伝子組換えイネに移入された5つの発現カセットのコピー数は2であると推定した。

② 複数世代における遺伝の安定性

PCRによる分析の結果、細胞内に移入した改変 *Cry j 1-F1*、*-F2*、*-F3* 融合貯蔵タンパク質遺伝子及び、シャッフル *Cry j 2* 各々の遺伝子について、遺伝子組換えイネ T₂ から T₄ 全ての世代において、推定分子サイズと一致する増幅シグナルが検出された(別添4、図3A)。

また、イネ内生型の *ALS* 遺伝子を増幅するプライマーを用いたPCRでは、鋳型として、コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネのどちらのDNAを用いた場合でも、内生型 *ALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナルが検出された(別添4、図3B)。一方、イネ内生型 *ALS* 遺伝子と区別して、移入された1点変異型 *mALS* 遺伝子を増幅するプライマーを用いたPCRでは、コシヒカリ a123 のDNAを鋳型とした場合に、シグナルは認められないのに対して、遺伝子組換えイネ T₂ から T₄ のDNAを鋳型とした場合は、1点変異型 *mALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナルが検出された(別添4、図3B)。

これらのことから、細胞内に移入した核酸は、遺伝子組換えイネ T₂ から T₄ 全ての世代において、ゲノム上に安定して存在することが明らかとなった。

ハ 供与核酸の複数コピーの存在状況

本遺伝子組換えイネは5種類の発現カセットを連結した10 kb以上の核酸が2コピー移入されていることが示唆されているが染色体上の導入サイト数は不明である。これはゲノムDNA切断に用いる制限酵素によるサザンブロットのバンドパターン変化から、導入サイト数を推測する実験に適切な制限酵素を選択することが技術的に困難であったためである。よって、細胞内に移入した核酸が隣接しているか離れているかは不明である。今後、医薬品開発にむけて、本遺伝子組換えイネの全塩基配列を取得する。その際に、供与核酸の存在状況を確認する。なお、本申請にある使用規程に従った、隔離ほ場での限定的な使用であれば、生物多様性影響を評価するに当たって、本データは用いない。

ニ 供与核酸の翻訳産物の個体間及び世代間での発現の安定性

(発現カセット1~4について)

ウエスタンブロット解析の結果、抗 *Cry j 1* 抗体、抗 *Cry j 2* 抗体、抗 *GluA* 抗体、抗 *GluB* 抗体、及び、抗 *GluC* 抗体のどの抗体を用いた場合でも、遺伝子組換えイネ T₂、T₃ 全ての個体において、また、遺伝子組換えイネ T₄ 世代の5個体全てにおいて、コシヒカリ a123 では

認められない移入遺伝子発現産物由来と考えられるシグナルが検出された(別添5)。これらのことから、イネの胚乳部分で改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質およびシャッフルCry j 2タンパク質が世代間及び個体間で安定して発現していることが分かった。今後、医薬品開発に向けて、本遺伝子組換えイネにおける改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質およびシャッフルCry j 2タンパク質遺伝子産物の葉、茎、根等の各組織における発現解析データを取得する。なお、本申請にある使用規程に従った、隔離ほ場での限定的な使用であれば、生物多様性影響を評価するに当たって、本データは用いない。

(発現カセット5について)

発現カセット5に含まれるカルス特異的プロモーターは発現解析の結果、プロモーター下流に連結した遺伝子がイネカルス特異的に発現し、イネ植物体、各部位(根、葉、茎、胚乳、胚)で発現が検出限界未満であることが特許公報に記載されている。また同プロモーター下流に1点変異型mALS遺伝子を連結したベクターが市販されており(クミアイ化学工業株式会社)、同プロモーター制御下のmALS遺伝子が、イネカルス特異的に発現し、根、茎、葉および種子で発現していないことが調べられている²¹⁾。このことから、mALS遺伝子発現産物は本遺伝子組換え植物体で発現していないと推定される。今後、医薬品開発に向けて、本遺伝子組換えイネにおけるmALS遺伝子産物の葉、茎、根等の各組織における発現解析データを取得する。なお、本申請にある使用規程に従った、隔離ほ場での限定的な使用であれば、生物多様性影響を評価するに当たって、本データは用いない。

ホ ウイルスの感染その他の経路による供与核酸の野生動植物等への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

別添4、(1)-イに示したPCR法により、T₂からT₄の世代全てでシグナルが得られる。コシヒカリa123では常に得られなかった事から、感度良く、かつ、科学的に信頼性の高い本PCR法により、コシヒカリa123と区別して、本遺伝子組換えイネを検出及び識別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 供与核酸の発現により付与された生理学的又は生態学的特性

イネの胚乳部分で、改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質、及びシャッフルCry j 2タンパク質の高発現を確認した(別添5)。改変Cry j 1-F1融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F2融合貯蔵タンパク質、改変Cry j 1-F3融合貯蔵タンパク質、及びシャッフルCry j 2タンパク質は種子貯蔵タンパク質以外の生理学的又は生態学的な機能を持たないと推定される。

導入遺伝子のうちmALS遺伝子は除草剤、ピリチオバックナトリウム塩(PS)およびピリミノバック(PM)耐性をカルスに付与する。mALS遺伝子はカルス特異的プロモーターで発現調

節されているため、分化した組織および再分化した個体レベルではPSおよびPM耐性は無いと考えられる。

したがって貯蔵タンパク質として改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質およびシャッフルCry j 2タンパク質が胚乳中に高蓄積する以外には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はないと考えられる。

ロ 生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え植物と宿主の属する分類学上の種との間の相違

コシヒカリa123及び遺伝子組換えイネのT₃世代について、2010年3月24日に、種子を次亜塩素酸で滅菌処理し、ホルモンフリーのムラシゲ・スクーグ固形培地に置床して、発芽を促し、生育を開始させた。2010年4月5日に、合成粒状培土ボンソル 1号(住友化学製)を詰めたテク・ユーロポット VCA 14(高さ 12.3 cm、容量 1.3 L、口径 12.8 cm)に、コシヒカリa123、遺伝子組換えイネ各10個体を、1ポットあたり1個体ずつ移植して、閉鎖系温室での栽培を開始した。出穂についてはコシヒカリa123、遺伝子組換えイネ各10個体を対象として調査し、稈長、穂長、穂数については、コシヒカリa123、遺伝子組換えイネ各5個体を対象として2010年9月8日に調査した。調査結果は以下の通り。

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。遺伝子組換えイネとコシヒカリa123との間に統計的な有意な差は認められなかった(別添6)。

② 生育初期における低温耐性

合成粒状培土ボンソル 1号を詰めた128穴セルトレイ(タキイ製、外寸 280 x 545 mm、口径 30 mm、深さ 45 mm)を用いて発芽、生育させた 2 葉期のイネを、暗所、4℃で10日間処理した。これらのイネを閉鎖系温室に移して栽培を開始し、その後4週間目の生育状況を観察した。コシヒカリa123、遺伝子組換えイネともに、30個体全てが枯死した(別添7)。よって本実験条件下では生育初期における遺伝子組換えイネの低温耐性能の変化は認められなかった。

③ 成体の越冬性又は越夏性

承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。

④ 花粉の稔性及びサイズ

花粉稔性及びサイズについて遺伝子組換えイネとコシヒカリa123に相違は認められなかった(別添8)。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

別添9に示すとおり、一株粒数、稔実率、脱粒性、休眠性、発芽率に関して、有意な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とされていることから、調査は行っ

ていない。

⑦ 有害物質の産生性

別添10に示すとおり、本遺伝子組換えイネの根から根圏土壤中に分泌され、他の植物又は土壌微生物に影響を与えるものがないか、また、本遺伝子組換えイネが枯死した後に他の植物に影響を与えることはないか、レタス種子を用いた他感作用試験を行なった。その結果、根から分泌され、他の植物又は土壌微生物に影響を与えるものに関して、コシヒカリa123と遺伝子組換えイネとの間で、有意な差は認められなかった。ま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ものに関して、コシヒカリa123と遺伝子組換えイネとの間で、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

本申請は、本遺伝子組換えイネ(0sCr11)の研究用隔離ほ場外での栽培に向けた生物多様性影響評価に資するデータを収集するために行う。また、医薬品開発(スギ花粉症治療薬)の一環として、カルタヘナ法第二種使用での改変Cry_j蓄積米の加工プロセスの開発、スギ花粉治療米の治験薬としての有効性及び安全性の評価(非臨床試験)を行うための材料確保を目的として、隔離ほ場において遺伝子組換えイネを以下の通り使用する。

(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

イ 隔離ほ場の場所：茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

ロ 隔離ほ場の名称：独立行政法人 農業生物資源研究所 隔離ほ場

ハ 使用期間：承認日から平成26年3月31日まで

ニ 隔離ほ場の施設

① 隔離ほ場内の水田(東西約35.5 m x 南北約24.6 m)を利用する。

② 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場全体の外側に、メッシュフェンスを設置している。

③ 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記載した標識を見やすい所に掲げている。

④ 遅くとも出穂期までには鳥類の摂食を防ぐため、隔離ほ場内の水田に防鳥網を設置する。

- ⑤ 使用した機械、器具、靴などに付着した土、本遺伝子組換えイネの種子等を洗浄するための洗場を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場外への漏出を防止するために、沈殿槽、網等の設備を排水系統に設置している。

ホ 隔離ほ場の作業要領

- ① 本遺伝子組換えイネ及び比較対照のイネ品種以外の植物が隔離ほ場内の栽培実験区画で生育することを最小限に抑える。イネとその対照イネ以外の植物の生育を最小限に抑えるために、慣行法により除草剤処理と中耕除草を行う。
- ② 本遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に運搬する場合は、当該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。また保管する場合には、当該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 ②以外の場合には隔離ほ場内の栽培実験区画で栽培したイネは、試験終了後、地上部は刈り取り焼却処分し、残りのイネの残渣及び発生した植物は速やかに水をはった隔離ほ場内にす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、オートクレーブまたは焼却炉を用い不活化する。
- ④ 隔離ほ場で使用した機械、器具又は隔離ほ場で作業した者の靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄し、隔離ほ場内の植物残渣、土等を外に持ち出さない等により、意図せず本遺伝子組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。
- ⑤ 隔離ほ場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、第一種使用等をする者に遵守させる。
- ⑦ 使用する本遺伝子組換えイネによる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。

へ 隔離ほ場の地図及び隔離ほ場内における試験区の配置図

別紙のとおり。なお、第一種使用等を予定している隔離ほ場周辺における栽培イネの分布については、独立行政法人農業生物資源研究所及び他の独立行政法人の試験水田は隔離ほ場からは70 m以上離れた場所にある。また、一般農家の水田は隔離ほ場からは600 m以上離れた場所にある。いずれも、農林水産省の定めた「第1種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」において規定されているイネの隔離距離は30 mを上回っている。

(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

独立行政法人農業生物資源研究所のホームページを通して、栽培実験計画書、モニタリング実施計画書等の本件に付いての情報をお知らせすると同時に、情報収集を行う。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

緊急措置計画書を参照。

(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

なし。

(6) 国外における使用等に関する情報

なし。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

閉鎖系温室での栽培試験において、本遺伝子組換えイネと宿主であるコシヒカリ a123 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、遺伝子組換えイネとコシヒカリ a123 に統計的有意な差は認められなかった。本遺伝子組換えイネは種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させるプロモーターで改変 Cry j 1-F1、-F2、-F3 融合貯蔵タンパク質、シャッフル Cry j 2 タンパク質の発現を制御していることから、生育にあたって競合における優位性が高まるとは想定されない。また、本遺伝子組換えイネは目的遺伝子に加えて、マーカー遺伝子として 1 種類の除草剤耐性遺伝子を有しているが、カルス特異のプロモーターで発現調節されているため、分化した組織および再分化した個体レベルでは除草剤耐性は無いと考えられる。

上記を踏まえ、遺伝子組換えイネの競合における優位性において、本遺伝子組換えイネ (0sCr11) 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、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動植物等が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本遺伝子組換えイネ (0sCr11) を第一種使用規程に従って使用する場合、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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

本遺伝子組換えイネ(0sCr11)は胚乳中に改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質、シャッフル Cry j 2タンパク質を高蓄積させる。Cry j 1、Cry j 2タンパク質を持つスギ花粉は最大飛散時期には空気中に大量に浮遊していることから、スギ花粉の飛散時期に我が国の自然環境下で生物はCry j 1、Cry j 2タンパク質に大量曝露していると考えられる。また、近年、風媒性の牧草や樹木の花粉症の治療法を開発するための臨床研究が行われており、治療用の抗原としてアレルゲンの立体構造を認識する抗原特異的IgEとの結合性を低下させるために天然型アレルゲンのアミノ酸配列を並べ替えた人工アレルゲンが使用されている¹⁹⁾。これらの既に安全に臨床試験が実施されてきた人工アレルゲンと同様の手法で安全性を高める改変を施した改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質およびシャッフル Cry j 2タンパク質を含む遺伝子組換えイネについて、閉鎖系温室において、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、遺伝子組換えイネとコシヒカリa123との間に有意な差は検出されなかった。以上のことから、ヒトやマウスに対する改変Cry j蓄積米自体に有害性はないと考えられる。さらに、隔離ほ場はフェンスで囲まれていること、また、出穂期以降は防鳥網で試験水田を覆うことから、第一種使用規定に従って使用した場合、イネの種子を摂食する野生の鳥類等の生物多様性に影響を与える可能性は考え難い。

一方、昆虫等への影響については、改変Cry j 1-F1、-F2、-F3融合貯蔵タンパク質、シャッフル Cry j 2タンパク質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現れる可能性は完全に否定できない。しかし、影響を受ける可能性のある昆虫類は隔離ほ場に来訪するものに限定的である。本遺伝子組換えイネは目的遺伝子に加えて、マーカー遺伝子として1種類の除草剤耐性遺伝子を有しているが、カルス特異的プロモーターで発現調節されているため、分化した組織および再分化した個体レベルでは発現していないと推定されることから生物多様性に影響を与えるとは考え難い。上記を踏まえ、本遺伝子組換えイネ(0sCr11)を第一種使用規程に従って使用する場合、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動植物等が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本遺伝子組換えイネ (0sCr11) を第一種使用規程に従って使用する場合、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) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

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

本遺伝子組換えイネ (0sCr11) を第一種使用規程に従って使用する場合、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。

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性については、閉鎖系温室での栽培において、遺伝子組換えイネとコシヒカリ a123 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、移入した除草剤耐性遺伝子は発現していないと推定されること、種子登熟期の胚乳組織で特異的に目的遺伝子を発現させるプロモーターで改変 Cry j 1-F1、-F2、-F3 融合貯蔵タンパク質、シャッフル Cry j 2 タンパク質の発現を制御していることから、自然環境下での生育にあたって競合における優位性を付与することはないと考えられる。また、仮に、隔離ほ場内において競合における優位性が認められた場合であっても、金網で囲いほ場からの持ち出しを制限しており、出穂期における防鳥網の設置等、適切な措置を講じることから、本遺伝子組換えイネの野生植物に対する競合における優位性には影響しないと判断した。

有害物質産生性については、閉鎖系温室での栽培において、遺伝子組換えイネとコシヒカリ a123 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、ヒトやマウスに対する改変 Cry j 蓄積米の有害性はないと考えられること、移入した遺伝子産物が新たな生物学的機能を得たり、毒性を持つことは科学的見地から推定されないこと、また、イネを摂食する吸汁昆虫に対して影響があったとしても、影響を受ける可能性のある昆虫は隔離ほ場に来訪するものに限定的であることから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。

交雑性については、宿主の属する分類学上の種であるイネと交雑可能な近縁野生種が我が国には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、第一種使用規程に従い本遺伝子組換えイネ(0sCr11)を隔離ほ場に限定して使用した場合には、競合における優位性、有害物質産生性または交雑性に起因する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., Chittrakon, S., Bounphanousay, C., Kanyavong, K., Tang, L.-H., Nakamura, I., Sato, T. and Sato, Y.-I. (2006) Genetic erosion from modern varieties into traditional upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in northern Thailand. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53, 245-252.
- 3) Ishikawa, R., Toki, N., Imai, K., Sato, Y.-I., Yamagishi, H., Shimamoto, Y., Ueno, K., Morishima, H. and Sato, T. (2005) Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52, 395-403.
- 4) 蓬原雄三. (1990) イネの育種学. 東京大学出版会. 東京.
- 5) 栗原 浩、蓬原雄三、津野幸人ほか. (2000) 作物栽培の基礎. 農山漁村文化協会. 東京.
- 6) 松尾孝嶺 (編) (1960) 稲の形態と機能 農業技術協会. 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、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.
- 8) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、山口彦之、菊池文雄 (編) (1990) 稲学大成 (第3巻) 遺伝編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 9) 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.
- 10) 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)
- 11) 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
- 12) 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-AADA-C5593EB167EE/0/gmbb12gmkouzatu-chousaine.pdf>
- 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/5F218264-F5FC-46AB-AADA-C5593EB167EE/0/gmbb12gmkouzatu-chousaine.pdf>
- 14) 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1巻形態編、農山漁村文化協会 東京.
- 15) 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
- 16) 斉藤洋三、村山貢司、井手武、(2006) 花粉症の科学. 化学同人. 京都.
- 17) 石井保之 (2009) アレルギー疾患の予防・治療の展望 生化学第81巻第3号, 209-217.

- 18) Okubo, K. and Gotoh, M. (2009) Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 58, 149-154.
- 19) 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.* 2, 113-125.
- 20) Fujimura, T. and Okamoto, Y. (2010) Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art. *Allergology International* 59, 21-31.
- 21) Wakasa, Y., Ozawa, K. and Takaiwa, F. (2009) Higher-level accumulation of foreign gene products in transgenic rice seeds by the callus-specific selection system. *J. Biosci. & Bioeng.* 107, 78-83.

生物多様性影響評価書
別添資料

スギ花粉症治療イネ
(改変Cry j蓄積イネ, *Oryza sativa* L.) (OsCr11)

独立行政法人
農業生物資源研究所

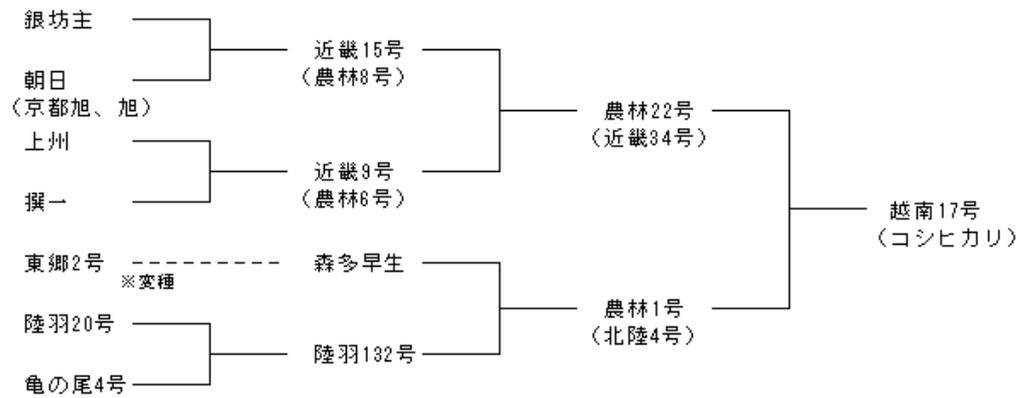
閉鎖系温室における生物多様性影響評価試験の方法及び結果

別添 1 基本特性

農林登録番号： 水稻農林 100 号

品種の名称：コシヒカリ

系統：低グルテリン変異系統 a123 [Theor. Appl. Genet. (1997) 94, 177-183]



別添 2 供与核酸の塩基配列

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの酸性サブユニット C 末端側の可変領域の一部を除き、同部位に *Cfr9I* サイトを付加した 3 種類の改変グルテリン遺伝子（改変 *GluA2*, 改変 *GluB-1*, 改変 *GluC*）の遺伝子配列、および同改変グルテリン遺伝子の *Cfr9I* サイトに挿入した *Cry j 1-F1*, *-F2*, *-F3* 遺伝子配列を示す。

塩基配列（別添資料 2-5 ページ）については
非公開とします

別添 3 アグロバクテリウムの菌体の残存性

(1) 方法

遺伝子組換えイネ T₃ 種子 6 粒をマルチビーズショッカー(安井器械製)で粉末状に破碎し、1 ml の滅菌水を加えて懸濁した。この懸濁液を 25℃、15,000 rpm で 10 分間遠心して、得られた上清画分 0.1 ml を、50 μg/ml のスペクチノマイシンを含む LB 培地に塗布して、暗所、28℃で 3 日間培養した。対照として、遺伝子組換えイネの作製に用いたプラスミドを導入した遺伝子組換えアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)を塗布して、暗所、28℃で 3 日間培養した。

(2) 結果

遺伝子組換えイネの作製に用いたプラスミドを導入した遺伝子組換えアグロバクテリウムを塗布したプレートでは、アグロバクテリウムの増殖が確認された(図 1A)。一方、遺伝子組換えイネ T₃ 種子粉末の懸濁液の上清を塗布したプレートでは、アグロバクテリウムの増殖は認められなかった(図 1B)。このことから、遺伝子組換えイネ T₃ 種子中に、アグロバクテリウムの菌体は残存していないと判断した。

[図 1]

A



B



A : 遺伝子組換えアグロバクテリウムを塗布したプレート

B : 遺伝子組換えイネ T₃ 種子粉末懸濁液上清を塗布したプレート

別添 4 細胞内に移入した核酸の存在状態

(1) 方法

ア サザンブロット解析

コシヒカリ a123 あるいは T₂ 世代の遺伝子組換えイネの緑葉から、CTAB 法によりゲノム DNA を調製し、サザンブロット解析に用いた。得られたゲノム DNA 10 μg を制限酵素 *Hind* III で消化し、0.7 % (w/v) アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した後、核酸用メンブレンへ転写した。細胞内に移入した核酸を検出するためのプローブとして、*ALS* 遺伝子の全領域を、Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE ヘルスケア製) により標識して用いた。

イ PCR 解析

コシヒカリ a123 あるいは T₂ から T₄ 各世代の遺伝子組換えイネの緑葉から、簡易抽出法 (細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 新版 植物の PCR 実験プロトコール 秀潤社) によりゲノム DNA を調製し、PCR 解析に用いた。細胞内に移入した核酸を検出するためのプライマーとして、*Cry j 1-F1* 遺伝子を増幅するためのプライマー (*Cry j 1-F1 F* 及び *Cry j 1-F1 R*)、*Cry j 1-F2* 遺伝子を増幅するためのプライマー (*Cry j 1-F2 F* 及び *Cry j 1-F2 R*)、*Cry j 1-F3* 遺伝子を増幅するためのプライマー (*Cry j 1-F3 F* 及び *Cry j 1-F3 R*)、シャッフル *Cry j 2* 遺伝子の一部を増幅するためのプライマー (*Cry j 2 F* 及び *Cry j 2 R*)、イネ内生型 *ALS* 遺伝子の一部を増幅するためのプライマー (*2mALS F2* 及び *mALS RT R2*)、及び、イネ内生型 *ALS* 遺伝子と区別して、1 点変異型 *mALS* 遺伝子の一部を増幅するためのプライマー (*2mALS F2* 及び *mALS R*) を用いた。増幅酵素として、KOD-FX (TOYOBO 製) を用い、反応サイクルとして、94 °C x 5 min の後、[98 °C x 10 sec → 55 °C x 30 sec → 68 °C x 2 min] のサイクルを 30 回繰り返した。

使用したプライマーの塩基配列

Cry j 1-F1 遺伝子増幅用プライマー (430 bp)

Cry j 1-F1 F : 5' - gat aat ccc atc gat agc tgc tg -3'

Cry j 1-F1 R : 5' - agg ctc cac gcc gaa act ctc gt -3'

Cry j1-F2 遺伝子増幅用プライマー (380 bp)

Cry j 1-F2 F : 5' - tgt agt act agt gtt ttg ggc aa -3'

Cry j 1-F2 R : 5' - gca tag ata gtc cag gga tca t -3'

Cry j 1-F3 遺伝子増幅用プライマー (365 bp)

Cry j 1-F3 F : 5' - ccc agg gca cgt tat gga ctt gt -3'

Cry j 1-F3 R : 5' - acg ctt aga gag aga gca tgt ca -3'

シャッフル *Cry j 2* 遺伝子増幅用プライマー (470 bp)

Cry j 2 F : 5' - gga atc tgg ctc caa ttc gca aag -3'

Cry j 2 R : 5' - acc tca gcc cta gag ttt tcc ct -3'

内生 ALS 遺伝子増幅用プライマー (450 bp)

2mALS F2 : 5' - ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag -3'

mALS RT R2 : 5' - cat gcc aag cac atc aaa cca g -3'

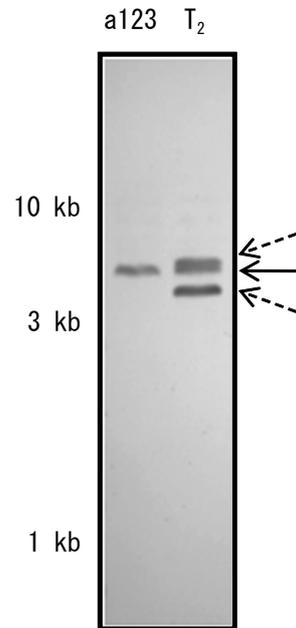
1点変異型 *mALS* 遺伝子増幅用プライマー (350 bp)

2mALS F2 : 5' - ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag -3'

mALS R : 5' - gca cac gat agt atg caa cac c -3'

(2) 結果
ア サザンブロット解析

[図 2]



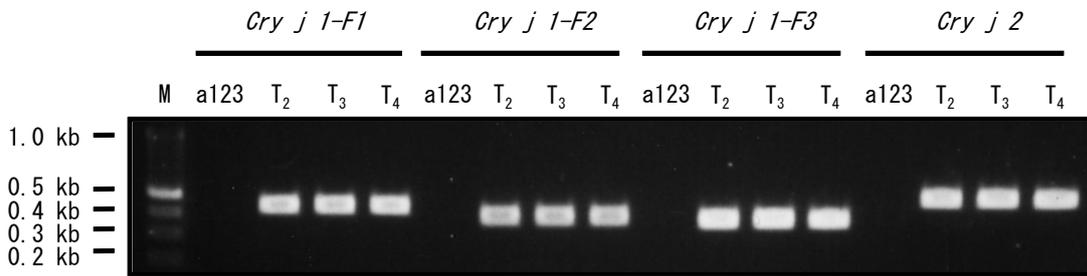
T₂ : 遺伝子組換えイネ T₂ 世代

コシヒカリ a123 では、内生型 *ALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナル 1 本が検出された (図 2 実線矢印)。これに対して、遺伝子組換えイネでは、内生型 *ALS* 遺伝子のシグナルに加えて、1 点変異型 *mALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナル 2 本が検出された (図 2 点線矢印)。これらのことから、遺伝子組換えイネに移入された核酸のコピー数は 2 であると推定した。

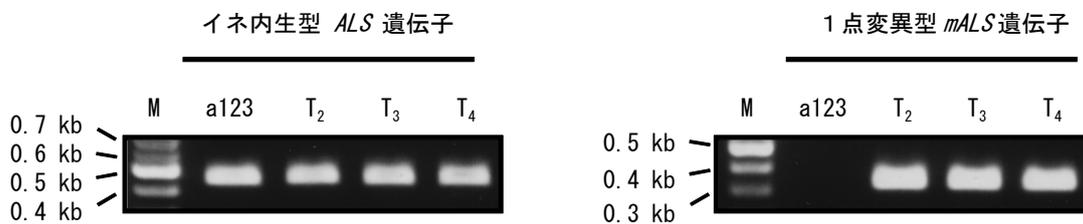
イ PCR 解析

[図 3]

A



B



M : 分子量マーカー、 T_2 : 遺伝子組換えイネ T_2 世代、 T_3 : 遺伝子組換えイネ T_3 世代、 T_4 : 遺伝子組換えイネ T_4 世代

細胞内に移入した *Cry j 1-F1*、*Cry j 1-F2*、*Cry j 1-F3*、及び、シャッフル *Cry j 2* 各々の遺伝子について、遺伝子組換えイネ T_2 から T_4 全ての世代において、推定分子サイズと一致する増幅シグナルが検出された(図 3 A)。また、イネ内生型の *ALS* 遺伝子を増幅するプライマーを用いた PCR では、鋳型として、コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネのどちらの DNA を用いた場合でも、内生型 *ALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナルが検出された(図 3B)。一方、イネ内生型 *ALS* 遺伝子と区別して、1点変異型 *mALS* 遺伝子を増幅するプライマーを用いた PCR では、a123 の DNA を鋳型とした場合に、シグナルは認められないのに対して、遺伝子組換えイネ T_2 、 T_3 、 T_4 の DNA を鋳型とした場合は、1点変異型 *mALS* 遺伝子に由来すると考えられるシグナルが検出された(図 3 B)。これらのことから、細胞内に移入した核酸は、遺伝子組換えイネ T_2 から T_4 全ての世代において、ゲノム上に安定して存在すること、及び、本 PCR 法を用いて、感度良く、

且つ、科学的に信頼性の高い方法で、コシヒカリ a123 と区別して、遺伝子組換えイネを検出及び識別することが可能であることが分かった。

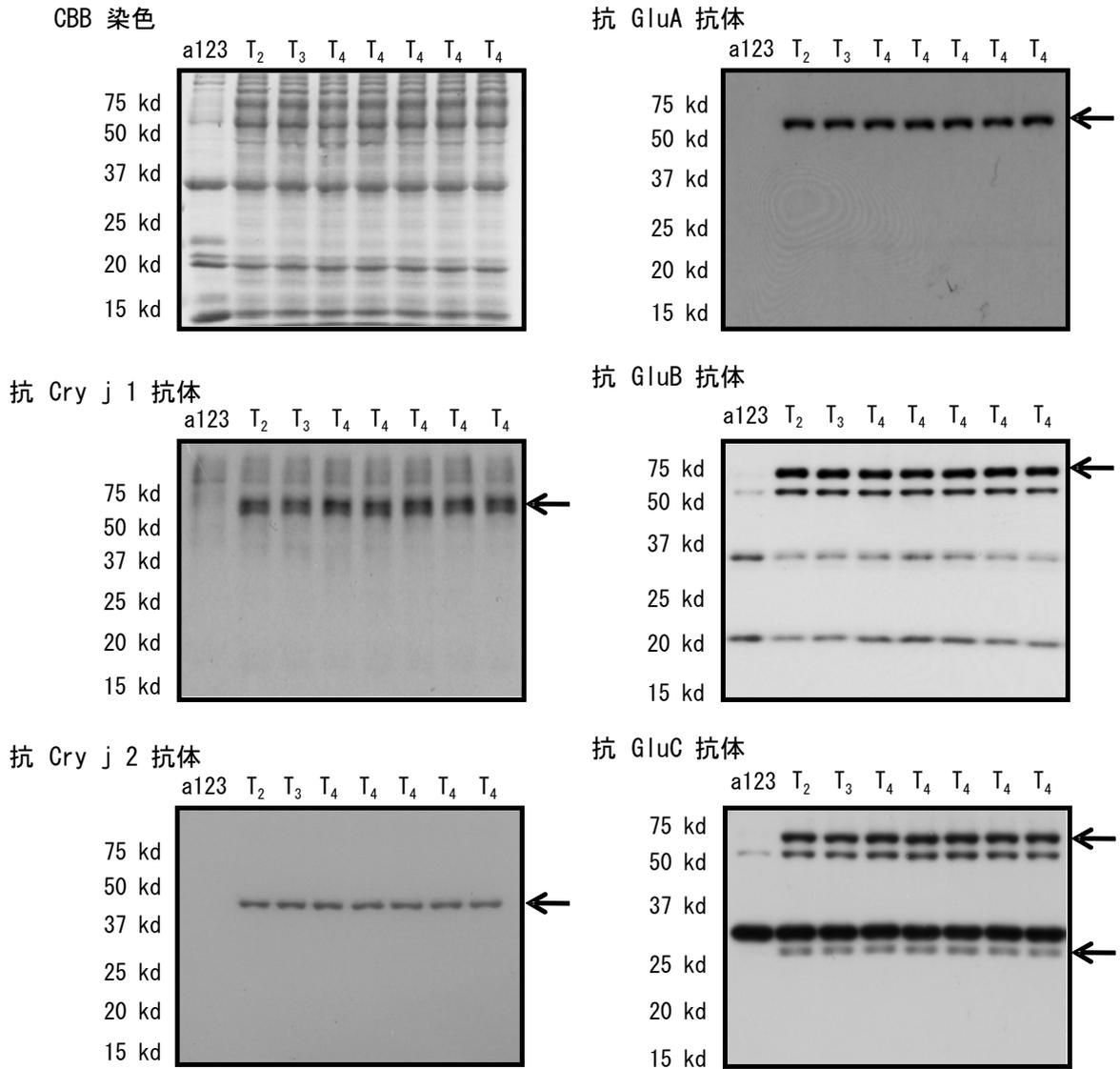
別添 5 細胞内に移入した核酸による形質発現の安定性と特性

(1) 方法

イネ種子玄米を粉末状に破碎し、粉末 20 mg あたり 0.7 ml の蛋白質抽出液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、8 M 尿素、4 % (w/v) SDS、5 % (w/v) β -メルカプトエタノール、20 % (w/v) グリセロール] を加え、室温で 15 分間激しく混合した。この混合液を 25°C、10,000 x *g* で 10 分間遠心し、得られた上清を全蛋白質画分とした。このうち、約 20 μ g の蛋白質試料を 12 % (w/v) SDS-PAGE により分離した後、蛋白質用 PVDF メンブレンへ転写した。発現産物を検出するための一次抗体として、抗 Cry j 1 抗体 (林原生物化学研究所製)、抗 Cry j 2 抗体 (林原生物化学研究所製)、抗グルテリン (Glu) A 抗体 [J Agric Food Chem (2006) 54, 9901-9905]、抗 GluB 抗体 [J Agric Food Chem (2006) 54, 9901-9905]、抗 GluC 抗体 [J Agric Food Chem (2006) 54, 9901-9905] を用い、二次抗体として、HRP で標識された抗ウサギ IgG 抗体 (プロメガ製) を用いた。

(2) 結果

[図 4]



T₂ : 遺伝子組換えイネ T₂ 世代

T₃ : 遺伝子組換えイネ T₃ 世代

T₄ : 遺伝子組換えイネ T₄ 世代

抗 Cry j 1 抗体、抗 Cry j 2 抗体、抗 GluA 抗体、抗 GluB 抗体、及び、抗 GluC 抗体のどの抗体を用いた場合でも、遺伝子組換えイネ T₂ から T₄ 全ての世代において、また、遺伝子組換えイネ T₄ 世代の 5 個体全てにおいて、コシヒカリ a123 では認められない、実線矢印で示した発現産物由来と考えられるシグナルが検

出された。これらのことから、細胞内に移入した核酸の発現について、個体間及び世代間で安定していることが分かった。

別添 6 形態及び生育の特性

(1) 方法

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各々について、2010 年 3 月 24 日に、種子を次亜塩素酸で滅菌処理し、ホルモンフリーのムラシゲ・スクーグ固形培地に置床して、発芽を促し、生育を開始した。2010 年 4 月 5 日に、合成粒状培土ボンソル 1 号(住友化学製)を詰めたテク・ユーロポット VCA 14(高さ 12.3 cm、容量 1.3 l、口径 12.8 cm)に、a123、遺伝子組換えイネ各 10 個体を、1 ポットあたり 1 個体ずつ移植して、閉鎖系温室での栽培を開始した。出穂については コシヒカリ a123、遺伝子組換えイネ各 10 個体を対象として調査し、稈長、穂長、穂数については、コシヒカリ a123、遺伝子組換えイネ各 5 個体を対象として 2010 年 9 月 8 日に調査した。

(2) 結果

出穂についての調査結果

	出穂開始日	出穂期 ^(注 1)	穂ぞろい期 ^(注 2)
コシヒカリ a123	2010 6/13	2010 6/14	2010 6/15
遺伝子組換えイネ	2010 6/13	2010 6/14	2010 6/15

(注 1) 全 10 個体のうち、40 %から 50 %の個体で出穂が確認された日

(注 2) 全 10 個体のうち、80 %以上の個体で出穂が確認された日

出穂開始日、出穂期、穂ぞろい期について、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

形態及び生育特性についての調査結果 (平均値±標準偏差)

	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本)
コシヒカリ a123	73.3±3.0	25.7±1.7	22.2±1.9
遺伝子組換えイネ	72.1±2.1	25.1±1.1	20.0±1.7

稈長、穂長、穂数に関する統計学的解析の結果、*P*値は 0.48(稈長)、0.53(穂長)、0.61(穂数)であり、有意水準 5 %のもとで、2 群の母平均には差があるとはいえないと判断された。このことから、稈長、穂長、穂数に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

別添 7 生育初期における低温耐性

(1) 方法

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各々について、合成粒状培土ボンソル 1 号を詰めた 128 穴セルトレー(タキイ製、外寸 280 x 545 mm、口径 30 mm、深さ 45 mm)を用いて発芽、生育させた 2 葉期のイネを、暗所、4°C で 10 日間処理した。これらのイネを閉鎖系温室に移して栽培を開始し、その後 4 週間目の生育状況を観察した。

(2) 結果

生育初期における低温耐性についての調査結果

	<u>調査個体数</u>	<u>枯死個体数</u>	<u>生存個体数</u>
コシヒカリ a123	30	30	0
遺伝子組換えイネ	30	30	0

コシヒカリ a123、遺伝子組換えイネともに、30 個体全てが枯死し、本実験条件下では生育初期における遺伝子組換えイネの低温耐性能の変化は認められなかった。

別添 8 花粉の形態（サイズ）及び稔性

(1) 方法

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 3 個体、各個体につき 3 穎花を開花直前に回収し、顕微鏡で観察した(接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 10 倍)。花粉の直径については、各穎花につき 20 個の花粉について、マイクロメーターを用いて測定した。花粉の稔性については、各穎花につき 100 個の花粉について、アセトカーミン液により染色される花粉の割合を調査した。

(2) 結果

花粉の形態を観察した結果、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。花粉の直径及び稔性について、統計学的解析を行った結果、*P* 値は 0.63 (花粉直径)、0.72 (花粉稔性) であり、有意水準 5 % のもとで、2 群の母平均には差があるとはいえないと判断された。これらのことから、花粉の形態や稔性について、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

花粉についての調査結果 (平均値±標準偏差)

	花粉直径 (μm)	花粉稔性 (%)
コシヒカリ a123	44.9±2.0	95.7±1.2
遺伝子組換えイネ	44.8±3.2	95.4±1.3

別添 9 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

(1) 方法

ア 種子の生産量

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体について、一株粒数及び稔実率を調査した。

イ 脱粒性

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体について、1 個体ずつ、出穂期後約 40 日目の成熟期の全穂を片手で握り、脱粒種子数を調査した。

ウ 休眠性

種子の休眠の強弱により穂発芽性の難易が決まる(イネ育種マニュアル 農林水産省農業研究センター研究資料)ことから、休眠性を調査するため、コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体について、穂発芽検定を行った。出穂期後約 30 日目に、各個体につき 1 穂を回収し、水に浸した状態で 7 日間 30℃中に静置して、穂発芽した種子の割合を調査した。なお、カビや微生物等の繁殖を防ぐため、2 日に 1 回の割合で水を交換した。

エ 発芽率

収穫後、約 5 ヶ月間、4℃で保存した種子を、水に浸した状態で 7 日間 30℃中に静置して、発芽した種子の割合を調査した。コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 30 粒についての調査を 3 回実施した。なお、カビや微生物等の繁殖を防ぐため、2 日に 1 回の割合で水を交換した。

(2) 結果

ア 種子の生産量

(平均値±標準偏差)

	<u>一株粒数 (個)</u>	<u>稔実率 (%)</u>
コシヒカリ a123	517±120	56.1±6.8
遺伝子組換えイネ	471± 95	52.3±7.3

統計学的解析を行った結果、*P* 値は 0.53(一株粒数)及び 0.41(稔実率)であり、有意水準 5%のもとで、2 群の母平均には差があるとはいえないと判断された。このことから、一株粒数及び稔実率に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

イ 脱粒性

(平均値±標準偏差)

	<u>脱粒種子 (%)</u>
コシヒカリ a123	0.33±0.20
遺伝子組換えイネ	0.31±0.13

統計学的解析を行った結果、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された(P 値:0.82)。このことから、脱粒性に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

ウ 休眠性

(平均値±標準偏差)

	<u>穂発芽率 (%)</u>
コシヒカリ a123	54.2±8.7
遺伝子組換えイネ	52.9±7.2

統計学的解析を行った結果、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された(P 値:0.79)。このことから、休眠性に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

エ 発芽率

(平均値±標準偏差)

	<u>発芽率 (%)</u>
コシヒカリ a123	91.1±5.1
遺伝子組換えイネ	88.9±5.1

統計学的解析を行った結果、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された(P 値:0.60)。このことから、発芽率に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

別添 10 有害物質の産生性

(1) 方法

ア 根から分泌され、他の植物に影響を与えるもの

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体から、閉鎖系温室でポット栽培した後の根圏土壌を回収した。乾燥重量 3 g 相当の土壌と、0.75 % (w/v) 低温ゲル化アガロース 5 ml とを混合し、細胞培養用 6 穴プレート中で固化させた後、0.75 % (w/v) 低温ゲル化アガロース 3.2 ml を重層して、固化させた。この上に、検定植物であるレタス (グレートレックス) の種子を、各穴当たり 5 粒置床し、暗所、25°C で 3 日間培養して、レタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。

イ 根から分泌され、土壌微生物に影響を与えるもの

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体から、特定網室でポット栽培した後の根圏土壌を回収し、土壌中の細菌、放線菌及び糸状菌の数について、平板希釈法を用いて測定した。培地として、細菌と放線菌については PTYG 培地^(注 1)を、糸状菌についてはローズベンガル培地^(注 2)を使用して、暗所、25°C で培養した。細菌及び放線菌については、培養開始 2 日後に、糸状菌については、培養開始 3 日後に、微生物数を調査した。別途、回収した土壌の一部を 105°C 中で 24 時間乾燥させた後、乾燥重量を測定して、乾燥土壌 1 g 当たりの微生物数を算出した。

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

コシヒカリ a123 及び遺伝子組換えイネ T₃ 各 5 個体について、乾燥させた稲わら及びもみを微粉末化し、1:1 の乾燥重量比で混合した。この粉末を、重量比 5 % となる様に培土と混合し、0.75 % (w/v) 低温ゲル化アガロース 5 ml と懸濁させ、細胞培養用 6 穴プレート中で固化させた。0.75 % (w/v) 低温ゲル化アガロース 3.2 ml を重層して固化させた後、この上に、検定植物であるレタス種子 (グレートレックス) を、各穴当たり 5 粒置床し、暗所、25°C で 3 日間培養して、発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。

(2) 結果

ア 根から分泌され、他の植物に影響を与えるもの

レタスの生育に関する調査結果 (平均値±標準偏差)

	発芽率 (%)	下胚軸長 (cm)	幼根長 (cm)
コシヒカリ a123	92.0±10.0	2.1±0.3	2.3±0.4
遺伝子組換えイネ	92.0±10.0	2.2±0.3	2.2±0.5

発芽率、下胚軸長及び幼根長に関する統計学的解析の結果、*P*値は1.0(発芽率)、0.84(下胚軸長)、0.81(幼根長)であり、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された。これらのことから、根から分泌され、他の植物に影響を与えるものに関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

イ 根から分泌され、土壤微生物に影響を与えるもの

乾燥土壌 1 g 当たりの微生物数の調査結果 (平均値±標準偏差)

	細菌 (x10 ⁶)	放線菌 (x10 ⁶)	糸状菌 (x10 ⁴)
コシヒカリ a123	2.7±0.8	1.4±0.5	4.4±1.8
遺伝子組換えイネ	2.4±0.8	1.2±0.4	4.1±1.9

細菌、放線菌及び糸状菌の数に関する統計学的解析の結果、*P*値は0.58(細菌数)、0.63(放線菌)、0.82(糸状菌)であり、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された。このことから、根から分泌され、土壤微生物に影響を与えるものに関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、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

レタスの生育に関する調査結果 (平均値±標準偏差)

	発芽率 (%)	下胚軸長 (cm)	幼根長 (cm)
コシヒカリ a123	72.0±11.0	0.9±0.3	0.3±0.1
遺伝子組換えイネ	72.0±11.0	0.9±0.2	0.3±0.1

発芽率、下胚軸長及び幼根長に関する統計学的解析の結果、*P*値は1.0(発芽率)、0.80(下胚軸長)、0.88(幼根長)であり、有意水準5%のもとで、2群の母平均には差があるとはいえないと判断された。これらのことから、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に関して、コシヒカリ a123 と遺伝子組換えイネとの間で、差は認められなかった。

(注 1) PTYG 培地組成 (1 l 当たりの含量)

Peptone	0.25 g
Tryptone	0.25 g
Yast Extract	0.5 g
Glucose	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	30 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	3.5 mg
Agar	15 g
pH 7.0	

(注 2) ローゼベンガル培地組成 (1 l 当たりの含量)

KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
Peptone	2.5 g
Tryptone	2.5 g
Glucose	10 g
1 % Rose Bengal	3.3 ml
Agar	20 g
pH 6.8	

緊急措置計画書

平成23年4月25日

氏名 独立行政法人 農業生物資源研究所
理事長 石毛 光雄 印
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治療イネ（改変Cryj蓄積イネ，*Oryza sativa* L.）（OsCr11）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

（個人情報を含むため非公開とします）

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、農業生物資源研究所業務安全委員会による視察を行う。なお、本委員会の構成は以下の通りである。

(個人情報を含むため非公開とします)

(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、隔離ほ場で試験に従事している者および隔離ほ場のある自治体に電話、ファックス、電子メール、および文書などにより連絡する。さらにホームページ等でお知らせを掲載する。

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

隔離ほ場で栽培されている本遺伝子組換えイネについては、実験に用いる種子は密閉容器にて運搬、保管する。それ以外の種子は漏出しないような容器に納め、オートクレーブまたは焼却炉を用い不活化する。栽培したイネは、地上部は刈り取り焼却処分し、残りのイネの残渣及び発生した植物は速やかに水をはった隔離

ほ場内にすき込むことにより不活化を行う。

5 文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、緊急措置対応のため直ちに農業生物資源研究所内における組織体制および連絡窓口に報告するとともに、速やかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。