

第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 4 月 1 日

文部科学大臣 下村 博文 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
申請者 理事長 堀江 武
住所 茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	カルビンサイクル強化イネ（FBP/SBPase発現イネ） （ <i>Oryza sativa</i> L.）（NICS12-OSKH-RbcAcFBP/SBP）
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 3 - 1 - 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 高機能隔離圃場 使用期間：承認日～平成29年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 （1）部外者の立入りの防止のため、隔離ほ場を取り囲む高さ 1.8 m の金属製フェンスを設置する。 （2）隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を正面入口の見やすい場所に掲示する。 （3）隔離ほ場で使用した機械、機具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置すると共に、本遺伝子組換えイネの隔離ほ場外への流出を防止するための設備を有する排水系を設置する。 （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。 （5）栽培は慣行法に準じ、気象等に対応して防風網の設置を行う場合がある。

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非遺伝子組換えイネ以外の植物が隔離ほ場内の使用区画で生育することを、除草管理等により最小限に抑制する。
- (2) 本遺伝子組換えイネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に運搬又は保管する場合には、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）第 12 条又は第 13 条で定める拡散防止措置を実施する。
- (3) 本遺伝子組換えイネの栽培終了後、当該イネ及び比較対照の非遺伝子組換えイネは、隔離ほ場内において乾燥、脱穀する。
- (4) 栽培終了後、保管しない種子（もみ）は焼却処理により確実に不活化を行う。また、刈り取られた稲わらを含む地上部はオートクレーブ又は焼却炉にて不活化する。刈り取られない残りのイネ残さ及びひこばえは、ほ場内に全てすき込み又は埋設等により不活化する。
- (5) 隔離ほ場内で使用した機械、機具及び靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるよう、施設の維持及び管理を行う。
- (7) (1) から (6) に掲げる事項を第一種使用等をする者に遵守させる。
- (8) 本遺伝子組換えイネによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

5

生物多様性影響評価書

カルビンサイクル強化イネ（FBP/SBPase発現イネ）
（*Oryza sativa* L. ; NICS12-OSKH-RbcAcFBP/SBP）

10

15

独立行政法人

農業・食品産業技術総合研究機構

20

目次

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1、宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
2、遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
(1) 供与核酸に関する情報	8
(2) ベクターに関する情報	13
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	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	19
3、遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	25
(1) 使用等の内容	25
(2) 使用等の方法	25
(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	27
(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	27
(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	27
(6) 国外における使用等に関する情報	27
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	28
1、競合における優位性	28
2、有害物質の産生性	29
3、交雑性	31
第三 生物多様性影響の総合的評価	33
引用文献リスト	34

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及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

5 イネ、rice、*Oryza sativa* L. ¹⁾

② 宿主の品種名又は系統名

水稻品種「クサホナミ」

10 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基本的に見られない。近縁野生種は世界中の熱帯・亜熱帯に分布し、様々な環境、特に生育地の多様な水条件に適応分化している。遺伝的多様性の中核地域は、インド東北部のアッサム地方、ラオス、中国雲南省南端のシーサンパンナ・タイ族自治州、ミャンマーと北部タイの範囲であると考えられている。これらの地域はいずれも山岳地帯、丘陵地帯であり複雑な地形を有する地域である¹⁾。

15

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所があるが、その生育域は我が国においては主に農耕地及びその近傍に限られている。南アジア及び東南アジアの雑草イネの特性として栽培種イネと野生種イネの交雑のみでなく、栽培種イネどうしの交雑でも生じたことが示されていること^{2), 3)}、我が国には野生種イネ (*O. nivara*, *O. rufipogon* 等) が自生していないことなどから、我が国における雑草イネは栽培種イネに由来するものであり、栽培種イネ間の交雑により雑草性の形質が出てきたものと考えられる。

20

25

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における栽培の歴史

*O. sativa*は、紀元前1万5千年から1万年の間に栽培化されたと考え

られ、栽培の起源はインド説、中国説、アッサム・雲南説がある¹⁾。

日本へは縄文時代晩期に中国から直接ないしは朝鮮半島を経由して伝来したと推定されている⁴⁾。我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在も最も重要な作物として広く栽培されている。

5

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

イネは非常に広範な地域で栽培されており、北はロシアと中国国境のアムール川の河畔（北緯53度）から南はアルゼンチン中央部（南緯40度）にわたる種々の気候条件下で栽培されている⁴⁾。栽培面積は約1億500万 ha、
10 玄米の総生産量は5億トンを超える。生産量はアジア（90 %以上）、中南米、
アフリカ、北米、旧ソ連、ヨーロッパの順となっている。我が国でも栽培
地は北緯44度にまでおよび、また世界で最も生産力が高い生産地域になっ
ている。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。この期間内で、田
15 植え可能となる最低気温が13 °C、登熟が停止する最低気温は15 °Cと見な
されている⁵⁾。

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

我が国でのコメの流通実態は、約800万トンが国内で生産され、ほとん
20 どが国内消費向けに流通している。輸入は77万トン程度である。流通量の
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) 生理学的及び生態学的特性

25 イ 基本特性

本来は多年性であるが栽培上は一年生作物として扱われる。部分他殖性の風媒花であり、通常的环境下では開花と同時に高率で自家受粉が行われる。イネは茎、葉、根、穂の各器官で構成されている。根は種子根と冠根に区別される。冠根は地上部の節部から発生する。茎は地上部の骨格をな

すもので、ところどころ節で区切られ、伸長した節間は中空である。葉は葉身と葉鞘からなる。穂は茎の最上節につく。穂は総状花序型の分枝を呈す⁶⁾。

5 ロ 生息又は生息可能な環境の条件

イネの生育時期別の限界温度、最適温度を表1に示す。

イネの生育最低温度は10～12℃、通常の栽培可能温度は20℃以上で、開花結実には22℃を必要とする。逆に34℃以上では高温障害が発生する。水稻は湛水条件(水田)で栽培する。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな植物であり、灌水がなく土壌水分が表層土で10%以下、下層土で12%以下で干ばつ害が発生する。

表1 イネの生育時期別の限界温度、最適温度(単位:℃)

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

15 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

20 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⁶⁾。

イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネ品種では秋に収

5 穫して室温に保管した場合、翌春には休眠は失われる。種子の寿命に関しては、低温・低湿条件下では長期間の保存が可能であり、室温下でも種子水分を9.7 %以下にすることで95%以上の発芽率を5年間、維持することができる⁷⁾。一方、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⁶⁾。

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

10 イネは一年生の種子繁殖植物であるが、適切な水分や温度条件では種子収穫後も栄養体を維持できる。これは、“ひこばえ”と呼ばれる新しい分けつが節から発生し生長するものであるが、我が国の露地栽培においては温暖地域（沖縄等）以外、通常冬の低温のため枯死し、越冬することはない。

15

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

20 イネは自殖性が非常に高い作物である。他殖性の程度を示す情報として、開花期間の重複する糯品種と粳品種とを用いた花粉飛散による交雑試験の結果、隔離距離が4.5 mの場合は交雑率が0.6%以下、10mでは0.04%以下であることが報告されている⁸⁾。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、600 m程度の長距離交雑も起こりうるということが報告されている。国外では、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い。また、自家不和合性及びアポミクシスについての報告はない。

25

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの穎花は、1 葯当たり1000個以上の花粉が詰まった6本の葯を持つ。花粉の稔性はほぼ100 %、形状は球形で、葯内では粘質で花粉塊をなしているが、葯が開裂し始めると花粉表面が乾き、粘着性が失われ、飛散しやすくなる。基本的に自家受粉作物で、受粉形式は風媒であり、葯は開花(穎)直前には開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる。すなわち、開花前に自花の葯から受粉してしまうため、他家(花)からの風媒による受粉は栽培品種においては極めて少数(1%以下)である¹⁰⁾。花粉の飛散による交雑距離としては、上記の様に特殊な条件下では600 mまで交雑が認められた例もあるが、多くの報告では10 m程度とされている。花粉の寿命は一般に3~5分¹¹⁾、最大で10分程度とされる。

ホ 病原性

病原性は認められていない。

15

ヘ 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藤井らの報告によると、水稻の中には、アレロパシーを示すものが存在している。この性質は品種間差が大きく、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¹²⁾。他感物質の残存期間は長くて数ヶ月程度と考えられている。

20

25 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¹³⁾。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えイネ（カルビンサイクル強化イネ（FBP/SBPase発現イネ）（*O. sativa* L. ; NICS12-OSKH-RbcAcFBP/ SBP)の作出に用いられた、供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表2に示した。

表2 供与核酸のサイズと機能

構成要素	サイズ (kb)	由来(核酸供与体)及び機能
発現カセット1		
イネ由来ルビスコアキチベースプロモーター(Prbcac)	2.0 kb	イネ由来。ルビスコアキチベースをコードする遺伝子のプロモーター。イネの緑色組織で高発現を規定する。
イネ由来アントラニル酸合成酵素αサブユニット1葉緑体移行シグナル配列(TP-asal)	0.17 kb	イネ由来。アントラニル酸合成酵素αサブユニット1遺伝子内の葉緑体移行シグナル配列。
ラン藻由来FBP/SBPase遺伝子(目的遺伝子:FBP/SBP)	2.0 kb	ラン藻(<i>Cynechococcus</i> PCC7942)由来。フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼの2つの酵素をコードする遺伝子。
Nosターミネーター(nosT)	0.29 kb	<i>Rhizobium radiobacter</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。
発現カセット2		
カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(P35S)	0.8 kb	カリフラワーモザイクウイルス由来。35Sプロモーター。
HPT遺伝子(HPT)	1.1 kb	大腸菌由来。抗生物質ハイグロマイシンに耐性を示す。遺伝子組換えイネの選抜マーカー
Nosターミネーター(nosT)	0.29 kb	<i>Rhizobium radiobacter</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。

10 ロ 核酸供与体の性状

- ・イネ：第一章1. 宿主または宿主の属する分類学上の種に関する情報を参照
- ・ラン藻：シアノバクテリア（藍色細菌）とも呼ばれる真正細菌の1群であり、光合成によって酸素を生み出すという特徴を持つ。単細胞で浮遊するもの、少数細胞の集団を作るもの、糸状に細胞が並んだ構造を持つもの

のなどがある。

- 5 • *Rhizobium radiobacter* : グラム陰性菌に属する土壤細菌であり、リゾビウム属 (*Rhizobium*) の内、植物に対する病原性を持つものをアグロバクテリウムと総称する。特にその中で根頭癌腫病に関連する *Agrobacterium tumefaciens* を指すことが多い。
- カリフラワーモザイクウイルス : 植物に感染するウイルスで、カリモウウイルス科カリモウウイルス属に属す。ゲノムは環状二本鎖DNAであるが、逆転写酵素を持ち増殖過程でRNAを介して複製する (パラレトロウイルス)。
- 10 • 大腸菌 : グラム陰性の桿菌で通性嫌気性菌に属し、環境中に存在するバクテリアの主要な種の一つである。この菌は腸内細菌でもあり、温血動物 (鳥類、哺乳類) の消化管内、特に大腸に生息する。

ハ ラン藻由来 *FBP/SBPase* 遺伝子について

- 15 光合成反応はいくつかの酵素によって構成されているが、なかでも葉緑体においてカルビンサイクルの 1 酵素として働くフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (*FBPase* : フルクトース-1,6-二リン酸の 1 位リン酸エステルを加水分解して、フルクトース-6-リン酸と無機リン酸を生じる酵素) と、セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (*SBPase* : セドヘプツロース-1,7-
- 20 ビスリン酸のリン酸を加水分解して、セドヘプツロース-7-リン酸を生じる酵素) は、他の酵素と比較して比活性が低いことが明らかになっている (図 1)。そのため、これらの酵素が光合成の律速因子の可能性もある。ラン藻 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 由来 *FBP/SBPase* は、*FBPase*、*SBPase* の両方の活性を有し、光による活性調節を受けない特徴を有する。また本酵素は、
- 25 片方の基質のみが存在する場合より両基質が同時に存在する方が、活性が高くなるという、異種基質間での相乗的なアロステリック効果を有する。結晶構造の非対称単位は、ホモ四量体で構成されている。

本組換えイネは、律速因子の可能性のある *FBPase* 及び *SBPase* 遺伝子を過剰発現させることにより、これらの酵素量及び酵素活性を上昇させ、結果と

してカルビンサイクルがより円滑に回ることによる光合成活性の上昇を想定したものである。またイネ科由来や同種由来の遺伝子を用いることによる、フィードバック制御やレドックス制御による影響を回避するために、本研究ではラン藻由来の遺伝子に着目した。

5

ニ 構成要素の機能

本遺伝子組換えイネは、表2に示した発現カセット1より、ラン藻由来の *FBP/SBPase* 遺伝子は緑色組織で高発現する。ルビスコアクチベース (*RbcAc*) プロモーターはイネに由来する緑色組織高発現プロモーターであり、他のプロモーターと比較して緑色組織で高い活性を有する。本組換えイネでは特定網室において、ノーザンブロット解析による *FBP/SBPase* 遺伝子の発現上昇、ウェスタンブロット解析による *FBP/SBPase* タンパク質量の上昇及び、*FBPase* の活性上昇が見られている。また、表2に示した発現カセット2より、大腸菌由来 *HPT* 遺伝子を植物体全体で発現することにより抗生物質であるハイグロマイシンに耐性を示す。

10

15

ホ 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

20 a. 発現カセット1 (目的遺伝子発現カセット)

ア) イネ由来ルビスコアクチベースプロモーター配列 (*Prbcac*)

本プロモーターは *FBP/SBPase* の発現調節を担うプロモーターである。発現は緑色組織で高い。

25 イ) イネ由来アントラニル酸合成酵素 α サブユニット1葉緑体移行シグナル配列 (*TP-asa1*)

翻訳された *FBP/SBPase* を葉緑体内へ移行させる為のトランジットペプチド配列をコードする。

30 ウ) ラン藻由来 *FBP/SBPase* 遺伝子 (*FBP/SBP*)

目的遺伝子であるラン藻由来 *FBP/SBPase* 遺伝子は、カルビンサイク

ル内または細胞質で機能するフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ及びカルビンサイクル内でのみで機能するセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼの両酵素を産生する。

5 エ) *nos* ターミネーター (*nosT*)

ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター配列 (*nosT*) は、*Rhizobium radiobacter* の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 *HPT* 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。

10

b. 発現カセット 2 (選抜マーカー遺伝子発現カセット)

ア) カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S)

カリフラワーモザイクウイルス由来。35S プロモーター。目的遺伝子を構成的に強力に発現させる。

15

イ) *HPT* 遺伝子 (*HPT*)

大腸菌由来。抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与する。遺伝子組換えイネの選抜マーカーとして用いる。

20

ウ) *nos* ターミネーター (*nosT*)

ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター配列 (*nosT*) は、*Rhizobium radiobacter* の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 *HPT* 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。

25

30

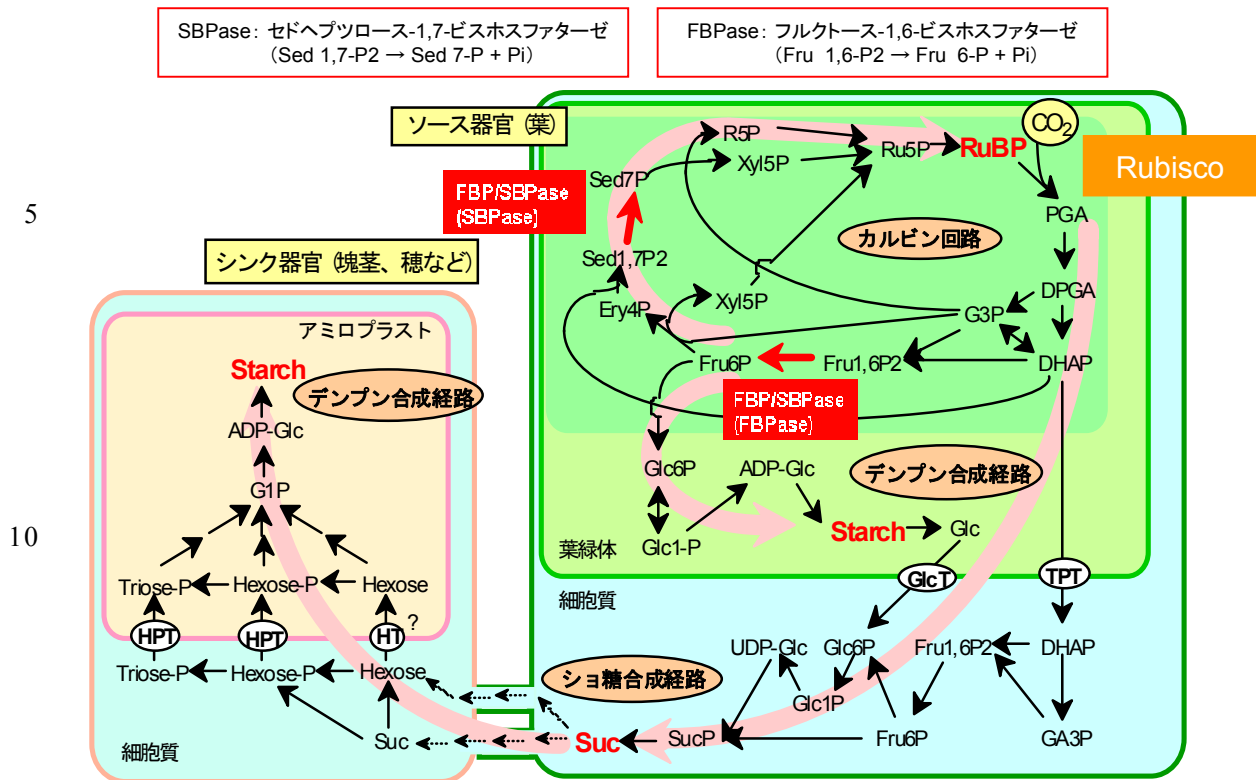


図1 カルビンサイクル及び糖代謝、デンプン代謝図

赤い矢印が、カルビンサイクル内のFBPase及びSBPaseが関わる代謝部位。
 本遺伝子組換えイネは、ラン藻由来 FBP/SBPase 遺伝子を導入することにより、
 この赤い矢印部分の発現を強化している。
 黒い矢印は、個々の糖およびデンプンの代謝を示している。
 薄いピンクの矢印は、植物の葉（ソース器官）から穂、種子（シンク器官）への、
 糖の流れを示している。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

Prbcac::FBP/SBPase/Hm (由来の詳細は、次項(ロ)に記載)

5 ロ 特性

①ベクターの塩基数及び塩基配列

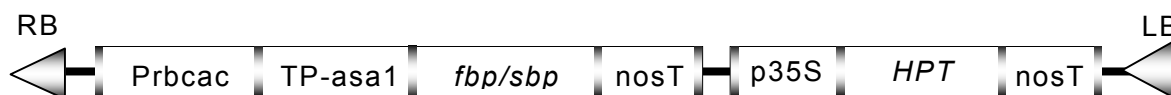


図2 本遺伝子組換えイネ作出に用いた形質転換用ベクターの
発現カセットの構造(5.6kb)

10

RB : T-DNA領域ライトボーダー

LB : T-DNA領域レフトボーダー

Prbcac:イネ由来ルビスコアクチベースプロモーター (2.0 kb)

15

TP-asa1: イネ由来アントラニル酸合成酵素 α サブユニット1
葉緑体移行シグナル配列(168bp)

FBP/SBP: ラン藻由来 *FBP/SBPase* 遺伝子(1.1kb)

nosT : アグロバクテリウム由来 *nos*ターミネーター(0.3 kb)

20

P35S : CaMV35Sプロモーター (0.5 kb)

HPT : ハイグロマイシン耐性遺伝子(1.2 kb)

nosT : アグロバクテリウム由来 *nos*ターミネーター(0.3 kb)

25

本ベクターの基となったp8C-Hmは、pIG121-HmベクターのNPTII及びGUS
発現カセット領域に対して、6つの制限酵素サイトを含むポリリンカー領
域を置換したベクターである。したがってベクターバックボーン領域の由
来はpBR322 を原体としたpBIN19プラスミドである。pBIN19は、DNA 複製
開始点ori 配列を持つ2本鎖環状DNAであり、微生物においてカナマイシ
ン耐性を発現し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。

30

ベクターを有するアグロバクテリウムの感染により、基本的には右側境
界配列(RB)と左側境界配列(LB) に挟まれた領域のDNA (T-DNA 領域) が宿

主植物の染色体に伝達される。T-DNA領域外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入された核酸は交配によってのみ伝達される。宿主である細菌に哺乳動物等に対する病原性を付与することは知られていない。

5

(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。

10

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法によった。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

15

プラスミドを保持したアグロバクテリウムをイネ種子胚盤由来のカルスに感染させ、ハイグロマイシン ($40 \mu\text{g/ml}$) を含む選抜培地で耐性遺伝子に移入された細胞を選抜し、再分化させることにより、遺伝子組換えイネ再分化当代 (T_0) を得た。この T_0 個体群を閉鎖系隔離温室で栽培、自殖種子 (T_1 系統群) を得た。これらの種子から発芽、成長した個

20

体を得た。得られた T_1 あるいはそれ以降の後代については、特定網室での栽培を行うための機関内承認申請の際に、それぞれの系統の種子から発芽した植物体について、アグロバクテリウムの残存性確認作業を行っているため、アグロバクテリウムが残存していることはない。具体的には、後代

25 種子から発芽した植物体を種子ごと乳鉢ですり潰し、滅菌水を 1ml 加えけん濁した後、上澄み 100ul をカナマイシン、ハイグロマイシン、クロラムフェニコールを含む LB 培地に塗布した。28 度で 3 日間培養後、アグロバクテリウム由来のコロニーの有無を調査し、残存性がないことを確認している。

本隔離ほ場栽培では、これらアグロバクテリウムが残存していないことを確認した系統の、T₂世代以降の種子を使用する。

ニ 第一種使用等を行う系統について

5 本申請は、上記の手順によって得られた複数の系統を隔離ほ場で栽培し、以下のような項目について解析することを目的としている。

1. 隔離ほ場に展開した本遺伝子組換えイネの緑葉におけるFBP/SBPase遺伝子の転写レベル、翻訳レベルの発現量、FBPase及びSBPase酵素活性レベル及び光合成活性レベルの調査。
10
2. 隔離ほ場に展開した本遺伝子組換えイネ系統の草丈、稈長、有効分げつ数などの生育調査。
- 15 3. 収穫後の乾物重量、一穂粒数、種子稔実率、1000粒重等の収量性調査。

本遺伝子組換えイネでは、最大20程度の系統選抜を目的とした栽培を計画している。栽培個体については系統・世代が判別できる管理を行う。

以降記載する(4)～(6)の情報は、本申請で使用する全ての系統のものではなく、先行して得られた系統の一部について示しているが、以下の理由から、生物多様性影響を生じさせるおそれがないと評価することは可能であると考えられる。

- ・交雑可能な野生植物が我が国には存在しないこと。
- 25 ・本遺伝子組換えイネの栽培が管理された極めて限られた粹水田で行われ、隔離距離の確保や持ち出しを防止する施設・措置などにより、本遺伝子組換えイネの隔離ほ場からの散逸防止策を講じていること。
- ・本遺伝子組換えイネに導入した発現カセットは、選抜マーカーとして多くの遺伝子組換え植物での使用実績のあるハイグロマイシン抵抗性遺伝子、及び
30 緑色組織のカルビンサイクル内で働くことが知られているFBPase及び

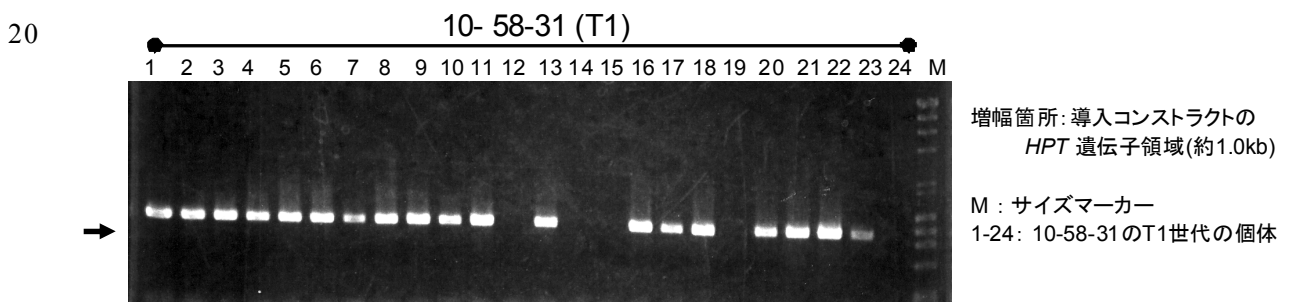
SBPaseの2つの酵素タンパク質をコードする遺伝子を発現させるものであること。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

5 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 PCR 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。図 3 は HPT 配列を利用した PCR 増幅により導入遺伝子の有無を確認した結果である。導入遺伝子がオルガネラゲノム上に挿入されている場合には自殖後代 (T_1 世代等) のすべての個体が導入遺
10 伝子を持つはずであるが、図 3 に示す様に、自殖後代で導入遺伝子を持つ
個体ともたない個体が分離して出現したことから、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。

加えて、サザンブロットハイブリダイゼーション解析の結果、系統ごと
に異なるサイズの移入核酸のバンドが検出されており(図 4)、これは、核
15 酸が移入された宿主ゲノムの位置が系統ごとに異なることから、核酸の移
入部位での、プローブ部位の外側に存在する制限酵素認識部位までの距離
が様々であることを反映したものである。これは、アグロバクテリウム法
により移入された T-DNA が宿主染色体の任意の位置に移入された場合の
典型的なパターンである。



25 図 3 先行系統 (08-14-16) の T_1 世代の種子 24 粒から発芽した個体における、移入遺伝子の有無。HPT 遺伝子配列を利用した PCR 増幅により、導入遺伝子の有無を確認した。

以上から、移入された核酸の複製物は宿主染色体ゲノム上にあると推察
される。また、今後得られる系統についても、移入された核酸の複製物は
30 宿主染色体ゲノムにのみ存在することが推察される。

ロ. 移入された核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性

先行して得られた一部の系統のサザンブロットハイブリダイゼーション（図4）から、これらの系統については、ハプロイド当たり2～5コピーであると推察される。一般的にアグロバクテリウム法で宿主ゲノム上に移入される核酸のコピー数は1コピーから数十コピーとなるものである。発現ユニットのコピー数がジーンサイレンシング等の効果により、発現量等に影響を与えることは知られているため、仮にコピー数が増加しても発現量は頭打ちになることが想定される。目的遺伝子の発現量と、それに伴う表現形質が重要であることから、全系統のコピー数自体のデータがなくても生物多様性への影響がないと判断することは可能であると考えられる。

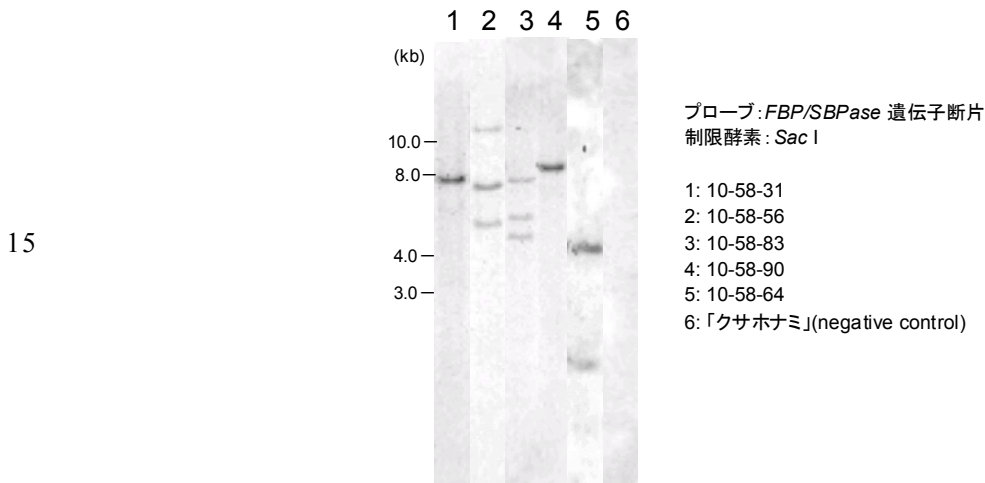


図4 サザンブロット解析を用いた移入核酸の検出による、移入コピー数の推定

また、供試系統の初期世代間でのバンドパターンは分離が認められるものの、それぞれのバンドの分子量は一致していた。また世代を重ねた供し系統では、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。

ハ. 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10-58-31系統

(T₀世代) とその後代である10-58-31-2 (T₁世代) と10-58-31-3 (T₁世代) および原品種「クサホナミ」の緑葉におけるノーザンブロット解析を行うことで、世代を重ねても、原品種「クサホナミ」(レーン4) のように発現が見られないような個体はなく、またT₁世代の個体間においても安定して発現していることが確認された(図5)。

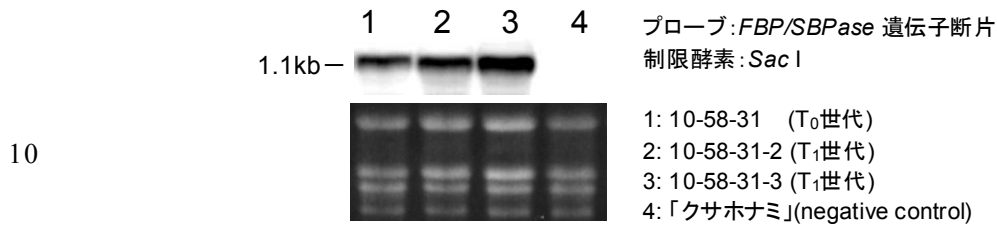


図5 ノーザンブロット解析による、本遺伝子導入系統の個体間及び世代間での、転写レベルにおける発現の有無

ニ. ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動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。

20 (5) 遺伝子組換えの生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

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

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

30 イ. 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本遺伝子組換えイネは、宿主と異なり、選抜マーカー遺伝子発現ユニッ

トの移入により、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性が付与されている。また、ラン藻由来FBP/SBPase 遺伝子の導入により、特定網室内において原品種に比べ、FBPase活性の増加、光合成活性の増加、有効分げつ数の増加が認められている。

5

ロ. 生理学的又は生態学的特性について、宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

1) 生理学的特性

10 先行して得られた系統について表3に示すとおり、特定網室で生育させた本遺伝子組換えイネの展開葉でのFBPase比活性が、宿主のそれよりも有意に高い。表4に示す光合成活性についても、宿主のそれよりも高い値が出ている。

表3 FBPase比活性

	比活性 (nmol/min/mg protein)
宿主「クサホナミ」	20.0 ± 7.1
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	342.5 ± 35.6

15 宿主（非組換え体）、Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31系統の緑葉でのFBPase比活性の平均値（各3反復）。Student t-検定の結果、組換えイネ系統のFBPase比活性は、宿主のそれよりも有意に高い（有意水準1%、P=0.477189E-05）。

20 表4 光合成活性

	C02 fixation (μmol C02/m2/s)
宿主「クサホナミ」	19.6 ± 0.8
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	20.6 ± 0.2

宿主（非組換え体）、Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31系統の緑葉（止葉展開葉）での光合成活性の平均値（各4個体）。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の光合成活性は、宿主のそれに対し有意な差は認められない。（測定条件：380 ppm C02, 1000 μmol photons/m2/s, 25 °C）

25

2) 形態及び生育の特性

先行して得られた系統について、特定網室における観察では、登熟後期の草丈(表5)、稈長(表6)は宿主のそれよりも有意に高い。一方、穂長(表7)、有効分げつ数(表8)に示すとおり、特筆すべき形態学的差異は認められなかった

表5 草丈(登熟後期)

	草丈(cm)
宿主「クサホナミ」	124.4±3.2
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	135.4±4.6

宿主(非組換え体)4個体、Posrbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31(4個体)の草丈の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の草丈は、宿主のそれよりも有意に高い(有意水準5%、P=0.029)。

表6 稈長(登熟後期)

	稈長(cm)
宿主「クサホナミ」	81.2±2.3
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	91.0±3.7

宿主(非組換え体)4個体、Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31(4個体)の稈長の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の稈長は、宿主のそれよりも有意に高い(有意水準5%、P=0.019)。

表7 穂長(登熟後期)

	穂長(cm)
宿主「クサホナミ」	16.3±1.2
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	18.1±1.3

宿主(非組換え体)4個体、Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31(4個体)の穂長の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の穂長は、宿主のそれに対し有意な差は認められない。

表8 有効分げつ数（登熟後期）

	有効分げつ数(本)
宿主「クサホナミ」	6.3±0.5
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	6.0±1.4

宿主（非組換え体）7個体、Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31（4個体）の有効分げつ数の平均値。Student t-検定の結果、組換えイネ系統の有効分げつ数は、宿主のそれに対し有意な差は認められない。

5

出穂期、開花期、発芽特性等の生育特性について、承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

10

3) 生育初期における低温耐性

本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

15

4) 成体の越冬性又は越夏性

承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離圃場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

20

5) 花粉の稔性及びサイズ

本申請は限定された隔離ほ場において、農林水産省が「第一種使用規定承認組換え作物栽培実験指針」で定める交雑防止措置やモニタリング

25

措置等を執りつつ栽培するもので、野生動植物と競合・交雑させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

5 6) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

生産性については承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。第二種使用等（屋内栽培）における栽培管理に当たっての取扱い経験からは休眠性、発芽率に特筆すべき差異は認められなかった。また、脱粒性については、組換えイネ系統の3個体を用いて、1個体あたり4穂の成熟期の穂を握って脱粒程度を調査した。その結果、組換えイネ系統と宿主の間に相違は認められなかった（表9）。

表9 脱粒性

	脱粒性
宿主「クサホナミ」	難
Prbcac::FBP/SBPase/Hm 10-58-31	難

極難-難-やや難-中-やや易-易-極易の7段階評価。「稲種苗特性分類と審査基準」に基づく。

7) 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、調査は行なっていない。

8) 有害物質の産生性

選抜マーカーである HPT タンパク質に毒性あるという報告はなく、また、同タンパク質（APH4と記載されているがHPTと同じもの）を発現する遺伝子組換え作物（ワタCOT102系統）が組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されている（平成24年7月19日厚生労働省告示第432号）ことから、同タンパク質に毒性が

あることは考えにくい。また、FBPase タンパク質及びSBPaseタンパク質に毒性があるという報告はなく、FBP/SBPase タンパク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ゲンデータベース (ADFS) を用いてBLASTアルゴリズムによって比較したところ、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

加えて、FBPase及びSBPase 遺伝子の過剰発現組換え植物において、光合成産物及び糖代謝産物組成への変動をもたらすことが報告されているが^{14), 15)}、仮に増加傾向を示したとしても、これまでに光合成産物及び糖、デンプン代謝産物がアレロパシー物質などとの関連性を持つとの報告はない。以上のことから、本遺伝子組換えイネで有害物質が産生され、野生動植物等に影響を与えることは考えにくい。

本遺伝子組換えイネ及び宿主の産生する物質が他の植物に与える影響を比較するため、イネ由来のルビスコアクチベースプロモーターにより FBP/SBPase遺伝子を緑色組織で強く発現する遺伝子組換えイネ (FBP/SBPase発現イネ、*Oryza sativa* L. ; NICS12-OSKH-RbcAcFBP/SBP) を用い、後作土壌及び細かく刻んだ葉を混合した鋤込み土壌でのレタスの発芽及び生育の比較を行った。その結果、遺伝子組換えイネと宿主の間で有意差が認められなかった (表10及び表11) ことから、供試した遺伝子組換えイネは宿主と比較して、有害物質の産生性に変化がなく、本遺伝子組換えイネでも同様であると推察される。

表10 イネを栽培した後の土壌に播種したレタスの発芽率、新鮮重及び下胚軸長

	発芽率 (%)	P値	新鮮重 (mg/10個体)	P値	下胚軸長 (cm)	P値
宿主「クサホナミ」	93.3±0.02		282.0±13.74		3.26±0.40	
Prbcac::FBP/SBP/Hm 10-58-31	92.0±0.03	0.64	270.0±8.22	0.17	3.28±0.39	0.84

イネ 3 個体を栽培した後の土壌 (ボンソル 1 号、住友化学) に播種した

レタス（キングクラウン：サカタ）の、播種 5 日後（明所、気温 25 度の条件に維持）の発芽率、新鮮重及び下胚軸長の平均値（発芽率：25 粒あたりの発芽率を 3 反復、新鮮重：10 個体当たりの新鮮重を 5 反復、下胚軸長：25 個体の平均値）。宿主（クサホナミ）または、Prbcac::FBP/SBPase/Hm10-58-31 系統を栽培した後の土壌のいずれを用いても、発芽率等について有意差はない（Student t-検定、 $P > 0.05$ ）。

表11 イネの葉を混合した土壌に播種したレタスの発芽率、新鮮重及び下胚軸長

	発芽率 (%)	P値	新鮮重 (mg/10個体)	P値	下胚軸長 (cm)	P値
宿主「クサホナミ」	92.0±0.03		416.0±4.05		1.90±0.42	
Prbcac::FBP/SBP/Hm10-58-31	94.7±0.04	0.49	420.4±16.2	0.61	1.92±0.35	0.86

微粉末化したイネ 3 個体分の葉を、重量比 5% で培土に混合し、同土壌に播種したレタス（キングクラウン：サカタ）の、播種 5 日後（明所、気温 27 度の条件に維持）の発芽率、新鮮重及び下胚軸長の平均値（発芽率：25 粒あたりの発芽率を 3 反復、新鮮重：10 個体当たりの新鮮重を 5 反復、下胚軸長：25 個体の平均値）。宿主（クサホナミ）または Prbcac::FBP/SBPase/Hm10-58-31 系統の葉を混合した土壌のいずれを用いても、発芽率等について有意差はない（Student t-検定、 $P > 0.05$ ）。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

5 本遺伝子組換え系統の第一種使用等隔離ほ場栽培については、隔離ほ場で栽培中に緑葉における、導入遺伝子（*FBP/SBPase*）の転写レベル、翻訳レベルでの発現解析及び酵素活性測定を行うことで、導入による発現特性がほ場レベルで維持されているか否かを把握しつつ、光合成活性測定や生育、収量調査を通して最終的に草型や収量性にどのような影響をもたらすかを調査し、その結果を踏まえて系統選抜を進めていく。

10 栽培予定ほ場の配置図及び周辺環境を別紙1に示す。周辺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250 m以内には栽培されていない。

(1) 使用等の内容

15 隔離ほ場における栽培、栽培、保管、運搬及び廃棄ならびにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

イ. 隔離ほ場の所在地：茨城県つくば市観音台3-1-1

(所在エリア：観音台地区畑圃場HC-2番北西端)

20 ロ. 隔離ほ場の名称：作物研究所高機能隔離圃場

ハ. 使用期間：承認日～平成29年3月31日

ニ. 隔離ほ場の施設

25 ①周辺に管理作業用道路、育苗、脱穀などの作業スペース、自然乾燥舎、機具庫及び専用焼却炉を配置している。

②外周に柵：柵は東西103 m×南北58 mとして、鉄製パイプと金網で設置している。

③出入り口には施錠。

30 ④鳥類の摂食を防ぐ為、試験水田には植え付け後防鳥ネットを設置する。

⑤使用した機械、機具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えイネの種子等を洗浄するための洗い場を設置している。

⑥本遺伝子組換えイネの隔離ほ場外への漏出を防止するために、沈殿槽等の設備を排水系統に設置している。

5 ⑦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る。

⑧花粉の飛散を減少させるため、隔離ほ場の北側（北西辺）に防風林を備えている。

10 ホ. 隔離ほ場の作業要領

①本遺伝子組換えイネ及び対照の非遺伝子組換えイネ以外の植物のほ場内における生育を、除草管理等により最小限に抑える。

15 ②本遺伝子組換えイネの種子（モミ）をほ場の外に運搬し又は保管する場合は、密閉できる容器に入れて種子の漏出を防止する等、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）第 12 条又は第 13 条で定める拡散防止措置を実施する。

③本遺伝子組換えイネの栽培が終了し収穫した後、本遺伝子組換えイネと対照の非遺伝子組換えイネは、隔離ほ場内において乾燥、脱穀する。

20 ④収穫後、保管しない種子（モミ）及びイナワラは隔離ほ場内で焼却処理またはすき込み等による不活化を行う。残りのイネの残さ及び発生した植物は隔離ほ場内に埋設又はすき込み処理により不活化する。

25 ⑤本遺伝子組換えイネを栽培したほ場で使用した機械もしくは機具又はほ場で作業に従事した者の靴などに付着した植物体の一部や土塊等はほ場内で洗浄すること等により、組換えイネがほ場の外に意図せず持ち出されることを防止する。

⑥①から⑤に掲げる事項を、使用等をする者に遵守させる。

30 ⑦生物多様性影響の恐れがあると認められたときには、緊急措置計画書（別紙 2）にある生物多様性影響を効果的に防止する為の措置を確実に講じる。

(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

5 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（別紙2）を参照。

10

(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

15 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
ない。

(6) 国外における使用等に関する情報

なし。

20

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.) は我が国における農耕の歴史とともに存在し、現在も最重要作物として広く栽培されている。これまでの経験から通常の使用法の範囲で扱う限り、水田や畑地で野生化、雑草化するおそれは極めて少ないことから、宿主であるイネ自身は、他の野生植物に対し競合における優位性はない。ここでは生物多様性影響評価実施要領別表第三に基づき、組換え体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。

10 1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換えイネは選抜マーカーとしてハイグロマイシン抵抗性遺伝子発現カセットを有し、抗生物質であるハイグロマイシンに耐性であるが、選抜に有効な高濃度の抗生物質が自然条件下に存在することは考えられず、本カセットの移入が、野生植物に対する競合性を付加することは考えられない。

一方、本遺伝子組換えイネはラン藻由来 *FBP/SBPase* 遺伝子発現カセットの移入により、*FBPase* 及び *SBPase* の酵素活性レベルが上昇し、結果として光合成能の上昇が期待される。光合成能が高いことで、適応度が若干高まることは否定できないが、野生植物との競合性は、宿主イネ本来の生活サイクルや繁殖様式、形態的・生理的形質といった種固有の特性に大きく依存している。本遺伝子組換えイネは、最終的に非組換え体に対し有効分げつ数の有意な増加が認められているが、それらの値は品種間差を越えるものではない。またその他の性質について、*FBP/SBPase* 遺伝子発現カセットの移入によって大きく影響を受けていないことから、自然条件で、本遺伝子組換えイネの競合性が高まることは考えられない。

当該第一種使用等は、本遺伝子組換えイネを第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用等するものである。隔離ほ場では、本遺伝子組換えイネの持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていること

から、隔離ほ場の外部にある野生植物と競合することはない。以上の結果、競合における優位性に起因して影響を受ける可能性のある野生植物等は特定されない。

5 (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。

10 (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。

15 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生植物などが特定されなかったことから、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

20 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

当該遺伝子組換えイネはラン藻由来*FBP/SBPase* 遺伝子を発現し、カルビンサイクル内の*FBPase*活性、*SBPase*活性を上昇させ、結果として光合成能の上昇を意図した組換え体である。ラン藻由来*FBP/SBPase*タンパク質に毒性があるという報告はこれまでにない。*FBP/SBPase* 遺伝子の配列から想定される翻訳産物について、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ゲンデータベースを用いてBLASTアルゴリズムによって比較したところ、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められず、アレルゲン性についても想定されない。加えて、*FBPase*及び*SBPase* 遺伝子の過剰発現組換え植物において、光合成産物及び糖代謝産物組成への変動をも

たらずことが報告されているが、仮に増加傾向を示したとしても、これまでに光合成産物及び糖、デンプン代謝産物がアレロパシー物質などとの関連性を持つとの報告はない。

5 また、選抜マーカーであるHPT タンパク質に毒性あるという報告はなく、また、同タンパク質が組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されている（平成24年7月19日厚生労働省告示第432号）ことから、同タンパク質に毒性があることは考えにくい。

10 今回、*FBP/SBPase* 遺伝子をより多く発現する遺伝子組換えイネを用いた後作試験及び鋤込み試験を行ったが、他の植物に与える影響は宿主である原品種と同等であった。以上から、本遺伝子組換えイネが他の野生動植物に影響を与える有害物質を産生することは考えにくい。

15 本申請は限定された隔離ほ場において栽培を行うものである。隔離ほ場はフェンスで囲まれ、出穂期までに防鳥網を設置するから、イネ種子を摂食する比較的大型の動物や鳥類は接触できない。また、万が一イネに接触する小動物等に対して影響があったとしても、影響を受ける可能性のある小動物等は隔離ほ場に来訪するものに限定的である。さらに、イネに接触した土壌等の持ち出しを防ぐ措置が講じられていることから、栽培土壌を介して外部の動植物等に影響を与えることは考えにくい。

20 以上から判断して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

25 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

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の結果より有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生ずるおそれはないと判断した。

5

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10 には栽培種イネと交雑することが知られている。しかし、これらの植物は我が国には自生しているという報告はないことから、影響を受ける野生動植物等は特定されない。

ほ場及び畦畔には栽培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15 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。

20

(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15 ので、影響の具体的内容の評価は実施していない。

25 (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20 ので、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

30 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

換え体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

- 5 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

競合における優位性について、イネは我が国において長年の使用経験がある農作物である。自然条件下で自生することは知られていないことと、本申請
5 組換え体について競合における優位性が極端に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、本組換え体と競合する可能性のある野生植物は特定されない。また、本第一種使用等は、本遺伝子組換えイネを第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用等するものであるから、野生動植物と競合することはなく、隔離ほ場内において競合における
10 優位性が認められた場合であっても、遺伝子組換え生物等の持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていることから、本遺伝子組換えイネの野生植物に対する競合における優位性には影響しない。

有害物質の産生性について、FBP/SBPaseタンパク質やHPTタンパク質に毒性
15 が報告されていないこと、既知のアレルゲンタンパク質と相同性を示さないこと、選抜マーカーである HPT タンパク質が組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経た生物として公表されていることおよび、隔離ほ場における限定的な栽培であることから、生物多様性影響は生じるおそれはないと判断した。加えて、*FBPase*及び*SBPase* 遺伝子の過剰発現組換え植物において、
20 光合成産物及び糖代謝産物組成への変動をもたらすことが報告されているが、仮に増加傾向を示したとしても、これまでに光合成産物及び糖、デンプン代謝産物がアレロパシー物質などとの関連性を持つとの報告はない。

交雑性については、宿主の属する分類学上の種であるイネと交雑可能な近縁野生種が我が国には自生していないことから、生物多様性影響は生じるおそ
25 れはないと判断した。

競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性について、影響を受ける可能性がある野生動植物等は特定されないことから、総合的評価として、本遺伝子組換え系統を第一種使用規程に従った隔離ほ場内での承認された範囲での限定された使用を行った場合には、生物多様性影響を生ずる恐れはないと
30 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.
- 5 2) Ishikawa, R., Yamanaka, S., Fukuta, Y., Chitrakon, S.,
Bounphanousay, C., Kanyavong, K., Tang, L-H., Nakamura, I., Sato,
T. and Sato, Y.-I. (2004) Genetic erosion from modern varieties
into traditional upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in
northern Thailand. Genet. Resour. Crop Evol. 53, 245-252
- 10 3) Ishikawa, R., Naoko, T., Imai, K., Sato, Y.-I., Ymagishi, H.,
Shimamoto, Y, Ueno, K., Morishima, H. and Sato, T. (2004) Origin
of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity.
Genet. Resour. Crop Evol. 52, 395-403
- 4) 蓬原雄三(1990) イネの育種学. 東京大学出版会. 東京.
- 15 5) 栗原 浩、蓬原雄三、津野幸人ほか(2000) 作物栽培の基礎. 農山漁村文
化協会. 東京.
- 6) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、
星川清親、石原 邦、平田熙、石井龍一(編)(1990) 稲学大成(第2巻)
生理編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 20 7) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、
星川清親、山口彦之、菊池文雄(編)(1990) 稲学大成(第3巻) 遺伝編.
農山漁村文化協会. 東京.
- 8) 農林水産技術会議(2003) 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方. 第2
回「第1種使用規程承認承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料5-1.
25 [http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siry
ou5_1.pdf](http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siry
ou5_1.pdf)

- 9) 農林水産技術会議(2005) 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.
<http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1702/pdf/siryoul.pdf>
- 5 10) 松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、前田英三、山崎耕宇(編)(1990) 稲学大成(第1巻)形態編. 農山漁村文化協会. 東京.
- 11) OECD. (1999) Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice), OECD Environmental Health and Safety Publications, Series
10 on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.14.
- 12) Fujii, Y., (1993) I. The Allelopathic Effect of Some Rice Varieties, in Allelopathy in the Control of Paddy Weeds, Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin No. 134, 1-6
- 13) 北海道の米づくり (2002) 北海道・北海道米麦改良協会
- 15 14) Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S. (2002) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. Nat Biotechnol. 19(10):965-9.
- 20 15) Tamoi M, Nagaoka M, Miyagawa Y, Shigeoka S. (2006) Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. Plant Cell Physiol. 2006 Mar;47(3):380-90.

別紙1 隔離ほ場の情報および周辺地図

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

作物研究所「高機能隔離圃場」

2. 住所

茨城県つくば市観音台3-1-1（図1、図2）

3. 連絡先電話番号

029-838-8563（作物研究所 企画管理室）

II. 試験期間

承認日から平成29年3月31日まで

III. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、立入禁止であること及び管理責任者の氏名を記載した標識設置し、施設敷地内には、管理作業用道路、育苗・脱穀などの作業スペース、自然乾燥舎、機具庫、洗場及び専用焼却炉を配置している。また、周囲には高さ10m前後の防風林がある。

隔離ほ場施設内には、管理作業道路で区分けされた5アールの水田が6面あり、総面積は30アール。本試験ではそのうちの2面（10アール）を使用予定。（図3、4）。



図1 隔離ほ場周辺地図。実地調査で概ね1.5Kmの範囲で確認された、周辺農家の水田を緑色で示す。

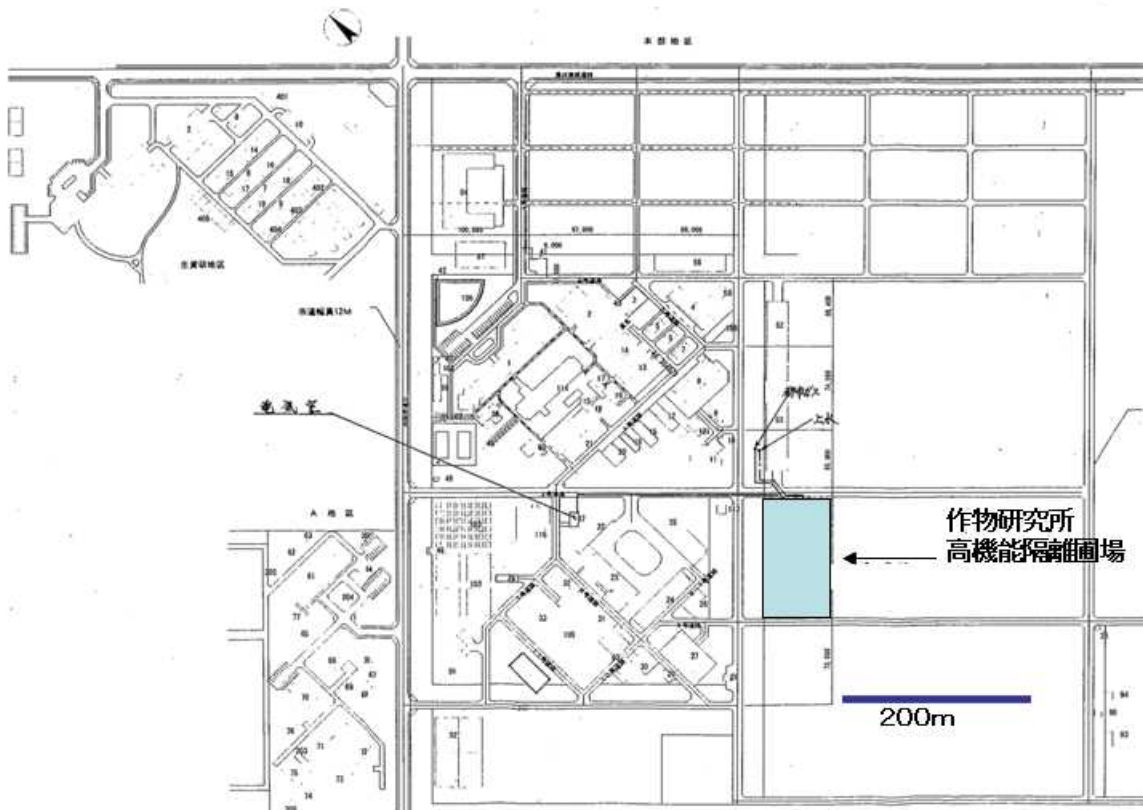


図2 「高機能隔離圃場」の構内配置図

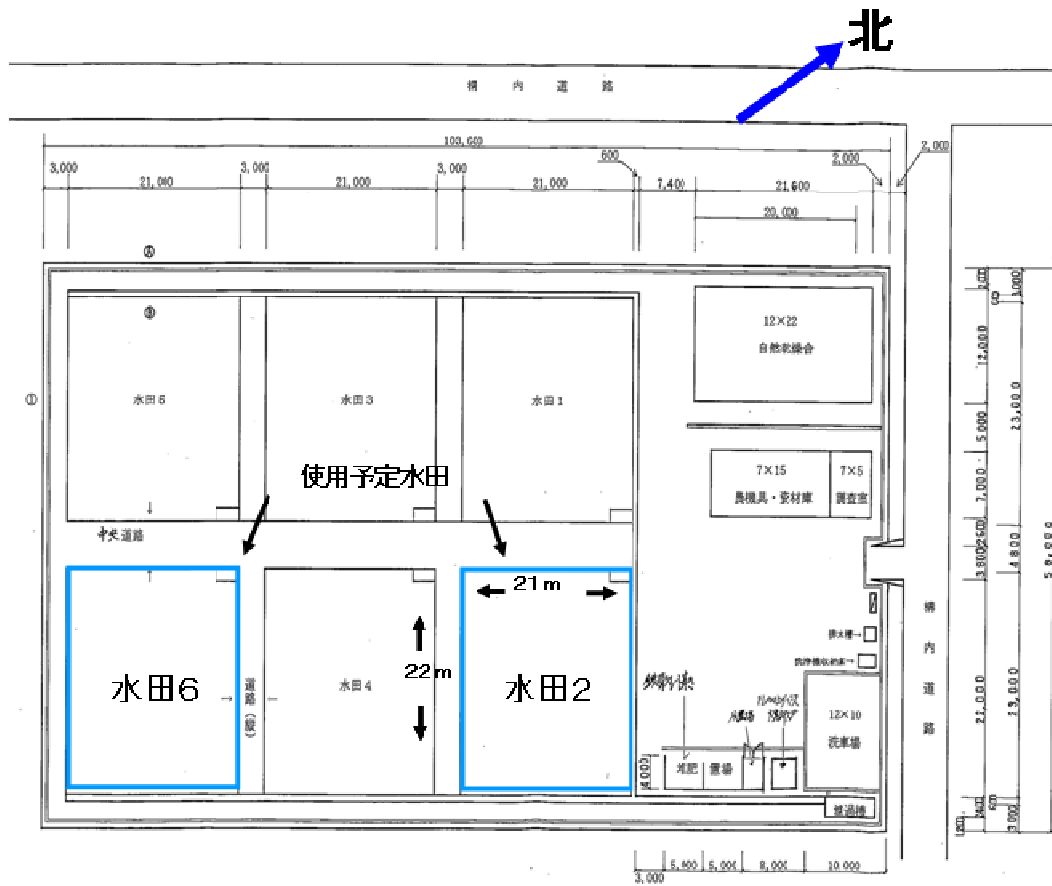


図3 施設内ほ場配置図

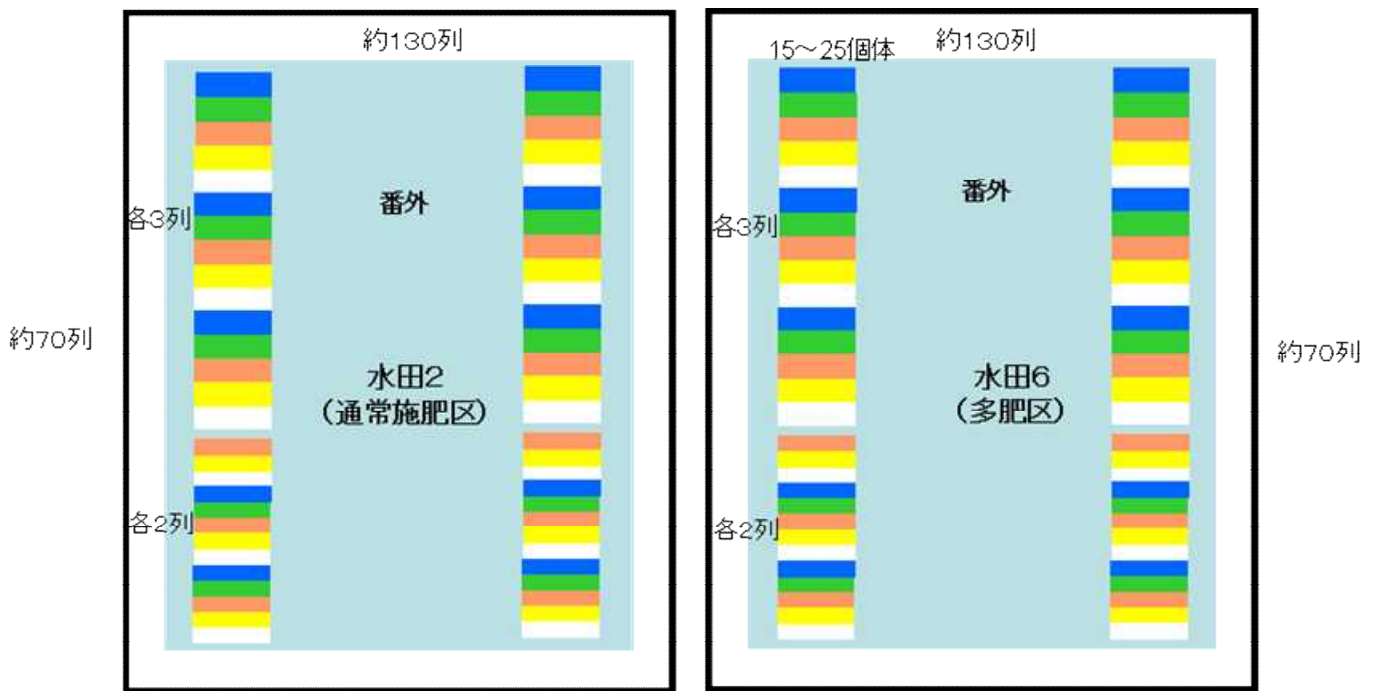


図4 試験区の配置例 (参考)

(参考)

- 株間15cm (上図横方向)、うね間30cm (同縦方向) 間隔で移植する。全体で横約130列、縦約70列とする。
- 水田枠から1mは管理のため移植しない (組換えイネ及び対照品種は、1m内側に移植する)。
- 水田2番と6番は、通常肥料区と多肥区にわけて使用する。
- 試験区の配置については、今後の種苗の準備状況等に応じて変更もあり得る。

◎栽培計画に関する情報（隔離ほ場における試験計画）

今回申請者は、カルビンサイクル強化イネ（FBP/SBPase発現イネ）（*Oryza sativa* L. NICS12-OSNB-UBFBP/SBP、NICS12-OSNB-RbcAcFBP/SBP、NICS12-OSKH-RbcAcFBP/SBPおよびNICS12-OSMR-RbcAcFBP/SBP）について、

1. 同属、同一種内の3品種を宿主とする。
2. ラン藻FBP/SBPase発現ユニットについて、異なる2種類のプロモーターを用いる。
3. ユビキチンプロモーターを使用したものは、「日本晴」のみ。
4. ルビスコアクチベースプロモーターを使用したバイナリーベクターは3品種（「日本晴」、「クサホナミ」「モミロマン」）に導入され、バイナリープラスミドは全て同一。

以上の組合せにおける遺伝子組換えイネを隔離ほ場栽培での栽培試験を行うことを計画している。

本遺伝子組換えイネの第一種使用等隔離ほ場栽培については、隔離ほ場で栽培中に緑葉における、導入遺伝子（FBP/SBPase）の転写レベル、翻訳レベルでの発現解析及び酵素活性測定を行うことで、第二種使用等（特定網室栽培）で観察された導入による発現特性がほ場レベルで維持されているか否かを把握しつつ、光合成活性測定や生育、収量調査等を通して、最終的により自然環境に近い隔離ほ場において、草型や収量性にどのような影響をもたらすか、また導入遺伝子の効果について品種間差は見られるかを明らかにすることを目的とする。また、その調査結果を踏まえて系統選抜を進めていく。

本遺伝子組換えイネは4年間の試験期間中で、各申請当たり最大で計20系統程度の栽培を計画しているが、栽培個体については系統・世代が判別できる管理を行う。

緊急措置計画書

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カルビンサイクル強化イネ (*Oryza sativa* L. ; NICS12-OSKH-RbcAcFBP/SBP)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

業務管理主任者

業務従事者

業務従事者

業務従事者

業務従事者

業務従事者

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) 本遺伝子組換えイネ（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

試験圃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。それ以外の種子およびイナワラ等その他の部位は、焼却処理あるいはすき込み等による不活化を行う。

5 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おそれがあると認められた場合は、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連絡するとともに、緊急措置対応のための研究所内における組織体制及び連絡窓口を報告する。