

高トリプトファン含有イネ

(*OASA1D, Oryza sativa* L.) (HW5) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書..... 1

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況..... 3

(2) 使用等の歴史及び現状..... 3

(3) 生理学的及び生態学的特性..... 3

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..... 4

(2) ベクターに関する情報..... 5

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 5

(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..... 6

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 6

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容..... 8

(2) 使用等の方法..... 8

(3) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置..... 9

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..... 10

2 有害物質の産生性..... 11

3 交雑性..... 12

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 13

緊急措置計画書..... 14

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 2 月 24 日

農林水産大臣亀井善之殿
環境大臣小池百合子殿

氏名 独立行政法人
農業・生物系特定産業技術研究機構
申請者 作物研究所長 黒田 秧 印
住所 〒305-8518
茨城県つくば市観音台 2-1-18

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（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）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>OASAI</i> D、 <i>Oryza sativa</i> L.) (HW 5)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	試験ほ場における栽培、飼養試験に供するための使用、保管、加工、運搬、廃棄、及びそ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	<p>試験ほ場：茨城県つくば市観音台3-1-1 名称：中央農業総合研究センター 観音台地区畑ほ場HC-2番北東端 加工場所在地：〒305-0901茨城県つくば市池の台2名称：畜産草地研究所 飼料配合工場 加工場所在地：〒305-8518茨城県つくば市観音台2-1-18 名称：作物研究所 DNA組換え作物開発温室</p> <p>使用期間：平成16年6月1日～平成17年7月30日</p> <p>1 ほ場の施設 (1)水田面積：6アール（東西30m×南北20m）。周辺に管理作業用道路、育苗、脱穀等作業用スペースを確保。 (2)外周に柵：柵は、東西40m×南北26mとして、鉄パイプと防風網（高さ1.5m）により設置。 (3)出入口には施錠。 (4)水田には、植え付け後防鳥網設置。</p> <p>2 作業要領 (1) 遺伝子組換えイネ及び対照の「日本晴」以外の植物のほ場内における生育を最小限に抑える。 (2) 遺伝子組換えイネの栽培が終了した後、当</p>

	<p>該遺伝子組換えイネと対照のイネをほ場内において乾燥、脱穀する。</p> <p>(3) 収穫後、ワラはほ場内で堆肥化又は焼却する。</p> <p>(4) 遺伝子組換えイネの子実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子実の漏出を防止する。</p> <p>(5) 当該組換えイネを栽培したほ場で使用した機械もしくは器具又はほ場で作業に従事した者の靴等に付着した植物体の一部や土塊等はほ場内で払い落として遺伝子組換えイネがほ場の外に意図せずに持ち出されることを防止する。</p> <p>(6) (1) から (5) に掲げる事項を、使用等をする者に遵守させる。</p> <p>(7) 家畜への飼養試験を行う場合は、畜産草地研究所飼料配合工場内で運搬してきた子実を全粒粉碎後、試験に供する。</p> <p>(8) マウスへの飼養試験を行う場合は、作物研究所DNA組換え作物開発温室内で運搬してきた子実を全粒粉碎後、試験に供する。</p> <p>(9) 生物多様性影響のおそれがあると認められたときに、添付書類の「緊急措置計画書」にある生物多様性影響を効果的に防止するための措置を確実に講じる。</p>
--	---

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価にあたり収集した情報

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

宿主は、イネ科イネ属に属し、和名はイネ、英名はrice、学名は*Oryza sativa* L.である。遺伝的多様性は、インド、バングラディッシュのアッサム地方からミャンマーと北部タイにかけて、また中国雲南省にかけて栽培されているイネとその野生種に見られるが、原産地は特定されていない。我が国において、イネ栽培水田にいわゆる雑草イネが栽培イネに混じる例は知られているが、そのものだけで自生している地域はない³。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だけでなく、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、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、栽培種イネどうし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

アジアにおける栽培イネの起原は考古学的に 6,000 年以上遡るといわれている。

日本におけるイネの栽培は紀元前 300 年以降弥生時代中期までには東日本一帯から東北地方にまで広がったとされている。現在も最も重要な作物として全国で広く栽培されている。イネは、炭水化物、タンパク質、脂質、ミネラルを含む食物として広く栽培され、世界人口の半数にとって主要な食物である。また、稲わらは家畜の飼料として利用されている。

イネは、非常に広範な地域で栽培されている。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) に渡って、また、ネパール、インドの山岳地帯、パキスタン、イラン、エジプトの砂漠地帯では灌漑により、アジアの一部とアフリカ、ラテンアメリカでは灌漑せずに栽培されている。アジアのデルタ地帯では浮稲として栽培されている。また、塩害土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件：

生育最低温度は 10~12℃、開花結実には 23℃を必要とする。逆に 32~35℃以上では高温障害が発生する。元来が水生植物であるイネは要求水量の大きな作物の一つであり、灌水がなく土壌水分が表面層で水分 10%以下、下層土で 12%以下では干ばつ害が発生する。しかし、塩害土壌、アルカリや酸性土壌でも栽培されている。

ロ 繁殖又は増殖の様式：

イネは、一年生の種子繁殖植物である。熱帯に分布するインド型イネは比較的脱粒しやすいが、日本で栽培される日本型イネでは、一般に種子の脱粒性は低い。イネの休眠性には品種間差があり、一般に日本型イネはインド型イネより休眠性が浅い。通常の日本型イネ品種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ている。イネの自殖性は高度で、日本型イネの他殖率は 0.6~3.9%程度である。近縁野生種である

O.rufipogon などは栽培種の *O.sativa* との交雑は可能であるが、国内には自生していない。
イネの各穎花には6本の葯があり、各葯には約1000個の花粉が含まれている。基本的に自家受粉作物である。イネの花粉は球状で、開花期にはほぼ全ての花粉が充実している。花粉の飛散距離は20m³、寿命は3分から5分である。

へ 有害物質の産生性：

自然条件下で周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

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

発現カセットは2個である。組換え体作出の目的遺伝子は、アントラニル酸合成酵素αサブユニット遺伝子改変型 (*OASAIID*) である。このプロモーターは、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター (*Pubi*) である。さらに、組換え体作出のための選抜マーカー遺伝子として、大腸菌由来のハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (*HPT*) をカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターにつないで用いた。*OASAIID* 及び *HPT* 遺伝子ともに構造遺伝子の終止シグナルとしてアグロバクテリウム由来の *nos* 配列を用いている。各構成核酸の塩基数および塩基配列の情報は以下の通りである。

OASAIID 発現カセット；

ユビキチンプロモーター：トウモロコシ由来、2 kb、
GenBank/EMBL/DDJB S94464
Plant Mol. Biol. 18 (4), 675-689 (1992)

OASAIID 遺伝子：イネ由来、2 kb、
GenBank/EMBL/DDBJ AB022602
Plant Physiol. 126, 1493-1506 (2001)

nos 終止シグナル：アグロバクテリウム由来、0.3 kb
GenBank/EMBL/DDBJ AF485783

HPT 発現カセット；

35Sプロモーター：カリフラワーモザイクウイルス由来、0.8 kb
GenBank/EMBL/DDBJ AF485783

HPT 遺伝子：大腸菌由来、1 kb
GenBank/EMBL/DDBJ AB022602

nos 終止シグナル：アグロバクテリウム由来、0.3 kb
GenBank/EMBL/DDBJ AF485783

ロ 構成要素の機能

目的遺伝子である *OASAIID* 遺伝子は、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する。アントラニル酸合成酵素 (AS) は、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、コリスミ酸からアントラニル酸を合成する。この酵素は、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、トリプトファンが一定量に達すると不活性型となってアントラニル酸の合成を中止し、したがってトリプトファンの産生が行われなくなる。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かかわるのはαサブユ

ニットである。トリプトファン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。本酵素の改変型遺伝子 (*OASA1D*) 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 サブユニット遺伝子 (*OASA1*) の 323 番目のアスパラギン酸 (D) をアスパラギン (N) に変更して作製した。

目的遺伝子である改変型 *OASA1D* 遺伝子が産生する酵素は、トリプトファンによるフィードバック阻害に感受性が低下したアントラニル酸合成酵素である。選抜マーカーである *HPT* 遺伝子はハイグロマイシンをリン酸化する酵素ホスホトランスフェラーゼを産生する。

これらの蛋白質のうち、*OASA1D* はイネに存在する野生型遺伝子と一個のアミノ酸しか変化しておらず、イネの蛋白質が食品としてのアレルギー以外のアレルギー性を持つことが知られていないことから、新たなアレルギー性を持つとは考えられない。また、*HPT* 遺伝子の産生する酵素蛋白質については、アレルギー性の有無は知られていない。

OASA1D 遺伝子の産物による代謝系の変化については、本組換え体作出の目的である。この改変型酵素は、トリプトファンやトリプトファン類似物質の 5-メチルトリプトファンによるフィードバック阻害を受けない。そのため、改変型 *OASA1D* 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。本遺伝子により、他のアミノ酸の変動はカルスと葉においては認められていないが、トリプトファンの蓄積が起こる。必須アミノ酸であるトリプトファンは、穀類ではリジン、メチオニンなどと同様に含量が低いアミノ酸である。そのため、リジン、メチオニン、スレオニンなどと並んで家畜用飼料の添加物として、発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、改変型酵素遺伝子の導入によって栄養価を改善した飼料用イネを作出することを目的としている。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来：pUASA1D

アグロバクテリウム由来の pBIN バイナリーベクター pIG121-Hm を用いた。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

pUASA1D はバイナリーベクター pIG121-Hm から構築した。pIG121-Hm は pIG121 (14.8 kb、GenBank/EMBL/DDBJ AF485783 及び文献 15) 由来であり、pUASA1D の発現カセット以外のベクター部分 (ボーダー配列の外側) は pIG121 と共通である。

(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：

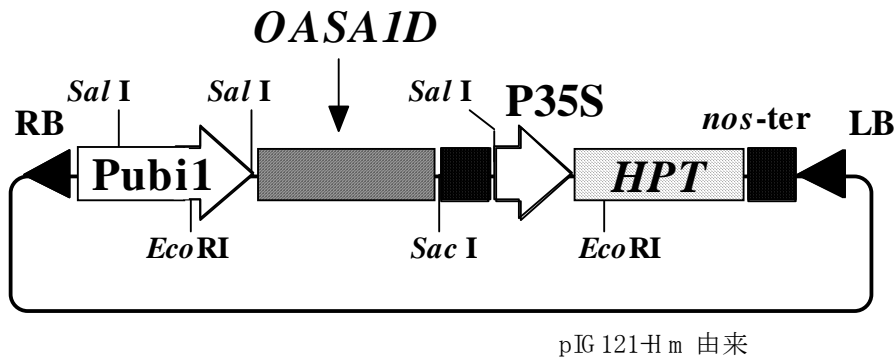


図1 *OASA1D* 遺伝子導入用バイナリーベクター (pUASA1D)

- LB レフトボーダー
- RB ライトボーダー
- Pubi1 トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター (2kb)
- P35S カリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーター (0.8kb)
- Nos-ter アグロバクテリウム Ti プラスミド由来ターミネーター (0.3kb)
- HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (1kb)
- OASA1D* 改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子 (2kb)

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感染法により移入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過：

アグロバクテリウムと共存培養したカルスを洗浄後、ハイグロマイシン 50 mg/L とカルベニシリン 500 mg/L を含む 2N6 培地に置床した。約 4 週間後に生長してきた抵抗性カルスを植物体再分化培地に移して幼植物を得た。選抜で得られた系統を D41 と名づけた (HW 5 の初期名)。作出した幼植物を作物研究所の閉鎖系温室に移植して遺伝的に固定した系統を得た。同研究所において閉鎖系、非閉鎖系温室での安全性評価試験、さらに農業環境技術研究所における隔離ほ場での安全性評価試験を実施した。ここで閉鎖系温室、非閉鎖系温室とは文部科学省「組換え DNA 実験指針」に基づく施設である。

(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

OASA1 遺伝子およびハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (*HPT*) をプローブとした複数世代におけるゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果、HW 5 では 4 コピーが安定して挿入されていると結論した。非組換え体の「日本晴」と交配して得た F1 種子の自殖後代 F2 種子におけるバンドパターンを調べた結果、バンドが分離して遺伝する個体は見られず、系統 HW 5 の導入遺伝子は同一染色体上に近接して挿入されていた。

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 導入遺伝子のうち、*OASA1D* 遺伝子はトリプトファンによるフィードバック阻害に感受性の低下した酵素 *OASA1D* を産生する。したがって、この遺伝子を過剰発現する組換えイネは遊離トリプトファンを蓄積する。HW 5 の種子におけるトリプトファンの蓄積は、蛋白質中のトリプトファンと遊離トリプトファンの合計で示した。「日本晴」と比較すると、HW 5 は閉鎖系温室と非閉鎖系温室栽培で約 2 倍、隔離ほ場栽培で 6 倍 (1 粒当り

130-174 nmol、「日本晴」は 24 nmol) に増加した。隔離ほ場では、組換えイネのトリプトファン含量は温室栽培の場合より増加したが、対照である「日本晴」ではむしろ減少したため、「日本晴」を基準とした値は高くなっている。イネの葉における遊離トリプトファン含量は、「日本晴」の $0.07 \mu \text{mol/g FW}$ (閉鎖系温室) あるいは $0.003 \mu \text{mol/g FW}$ (非閉鎖系温室) に対し、非閉鎖系温室栽培の組換え体 HW 5 は $1.25 \mu \text{mol/g FW}$ 、隔離ほ場で栽培した組換え体 HW 5 は $4.6 \mu \text{mol/g FW}$ と大きく増加した。

ロ 以下の特性について、隔離ほ場栽培した組換えイネの調査結果を示す。

① 形態及び生育の特性

閉鎖系温室、非閉鎖系温室における組換えイネの形態及び生育特性は、すべて「日本晴」と差は認められなかった。隔離ほ場における組換えイネの形態及び生育特性のうち、苗の特性、株形態、葉の特性、籾形態、蒴形態、出穂期、耐倒伏性などについては「日本晴」と差は認められなかった。しかし、HW 5 において、稈長が短い傾向が認められたが有意ではなかった。穂長は組換え体と「日本晴」で差は認められなかった。組換え体 HW 5 系統は粒着密度がやや低く、「日本晴」の「中」に対し、HW 5 は「やや疎」であった。

② 生育初期における低温耐性

催芽後 4°C で 1 1 日間生育させた組換え体の発芽種子の茎長は 1 cm 以下で、「日本晴」の 2cm 以下よりも生育が不良であった。また、播種後 1 1 日目の組換え体及び「日本晴」の幼植物体は 4°C 、7 日間の処理で枯死した。したがって、低温耐性に「日本晴」と差は認められなかった。

③ 成体の越冬性

非閉鎖系温室におけるポット栽培および隔離ほ場における栽培においても、組換え体と「日本晴」は 1 月上旬に枯死した。したがって、組換えイネ HW 5 系統の越冬性は「日本晴」と変わりなく、これらに関する新たな性質の獲得は認められなかった。

② 花粉の稔性及びサイズ

蒴の長さ、花粉の形状、大きさは組換え体と「日本晴」で差が認められなかった。花粉の稔性は、HW 5 で 99%、「日本晴」99%であり、差は認められなかった。

③ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量：

種子の生産量は種子稔性及び籾収量で評価した。閉鎖系温室、非閉鎖系温室栽培した場合の種子稔性は「日本晴」と組換え体系統で大差なかったが、隔離ほ場栽培した場合、「日本晴」92%に対して、HW 5 は 77-86%と低下した。これと粒着密度が低下したことを反映して、収量形質のうち株全体の重量は変わらないが、籾収量は「日本晴」の 845 g/30 株より低く、HW 5 で 588 g/30 株 (70%) であった。

脱粒性：

脱粒性に関する新たな性質の獲得は認められなかった。

休眠性及び発芽率：

非閉鎖系温室においてポット栽培及び隔離ほ場栽培した組換え体は、採種後に低温貯蔵した種子を用いて試験した。その結果、「日本晴」と同様に休眠打破効果が認められず、休眠性は「日本晴」と同様の“やや弱”であった。

非閉鎖系温室で栽培した組換えイネの種子の発芽率は、10日後にHW5が100%、「日本晴」100%で差は認められなかった。隔離ほ場で栽培した組換えイネから採種した種子では発芽遅延と発芽率の低下が観察された。「日本晴」が2.8日で100%発芽するのに対し、系統HW5は5.3日で93%であった。種子のトリプトファン含量の増加が関係している可能性がある。

④ 交雑率

我が国にはイネと交雑可能な近縁の野生植物は自生していないため、調査を行っていない。

⑤ 有害物質の産生性

隔離ほ場で栽培した組換えイネと非組換えイネとの間で、イネ栽培土壌に大豆、大麦、大根を播種、あるいはイネ地上部と根部に分けてすき込んだ土壌に大豆、大麦、大根を播種して、発芽率と4週間後の乾物重を測定した。いずれにおいても播種した作物の発芽率と乾物重は「日本晴」栽培土壌あるいはすき込み土壌と同じであった。また、隔離ほ場で、組換えイネを栽培した水田土壌における微生物相について調査した。対照として、同一条件で「日本晴」を栽培した土壌を用いた。その結果、土壌中に認められる細菌、放線菌、糸状菌などの微生物相に差は認められなかった。

⑥ その他

雑草への影響

隔離ほ場において、組換えイネを栽培している水田の雑草について調査した。その結果、雑草の種類と数において、「日本晴」栽培区と差は認められなかった。

「日本晴」との交雑性

隔離ほ場で組換えイネと「日本晴」を隣接して植栽した。「日本晴」から採種した種子を、ハイグロマイシン 50 mg/L を含む培地に無菌的に播種して抵抗性種子が出現するか否かを調査した。その結果、ハイグロマイシン抵抗性種子の出現は認められず、本組換えイネの花粉が飛散して交雑性を示す可能性は低いと考えられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

本組換え体の栽培によって得られる子実は、トリプトファン含量の増加したイネを家畜に与えてその効果を調査するなどの研究に用いる。

(1) 使用等の内容

試験ほ場における栽培、飼養試験に供するための使用、保管、加工、運搬、廃棄、及びそれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

試験ほ場：茨城県つくば市観音台 3-1-1

名称：中央農業総合研究センター

観音台地区畑ほ場 HC-2 番北東端

加工場所在地：〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2

名称：畜産草地研究所 飼料配合工場

加工場所在地：〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-18

名称：作物研究所 DNA 組換え作物開発温室

使用期間：平成16年6月1日～平成17年7月30日

ア ほ場の施設

- ① 水田面積：6アール（東西30m×南北20m）。周辺に管理作業用道路、育苗、脱穀等作業用スペースを確保。
- ② 外周に柵：柵は、東西40m×南北26mとして、鉄パイプと防風網（高さ1.5m）により設置。
- ③ 出入口には施錠。
- ④ 水田には、植え付け後防鳥網設置。

ロ 作業要領

- ① 遺伝子組換えイネ及び対照の「日本晴」以外の植物のほ場内における生育を最小限に抑える。
- ① 遺伝子組換えイネの栽培が終了した後、当該遺伝子組換えイネと対照のイネをほ場内において乾燥、脱穀する。
- ③ 収穫後、ワラはほ場内で堆肥化又は焼却する。
- ④ 遺伝子組換えイネの子実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子実の漏出を防止する。
- ⑤ 当該組換えイネを栽培したほ場で使用した機械もしくは器具又はほ場で作業に従事した者の靴等に付着した植物体の一部や土塊等はほ場内で払い落として遺伝子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。
- ⑥ ①から⑤に掲げる事項を、使用等をする者に遵守させる。
- ⑦ 家畜への飼養試験を行う場合は、畜産草地研究所飼料配合工場内で運搬してきた子実を全粒粉碎後、試験に供する。
- ⑧ マウスへの飼養試験を行う場合は、作物研究所 DNA 組換え作物開発温室内で運搬してきた子実を全粒粉碎後、試験に供する。
- ⑨ 生物多様性影響のおそれがあると認められたときに、添付書類の「緊急措置計画書」にある生物多様性影響を効果的に防止するための措置を確実に講じる。

栽培予定ほ場の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30m以内には栽培されない。

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

「別添の緊急措置計画書を参照」

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主が属する分類学上の種のイネは我が国において長期にわたる使用等の経験があることから、本生物多様性影響評価においては生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、宿主又は宿主の属する分類学上の種と本組換え体において相違が見られた点について考慮することとする。

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なし

理由：

野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質として、組換え体の形態及び生育特性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、花粉の特性、種子の生産量、脱粒性、発芽率、休眠性について調査した。その結果、粒着密度がやや低下し、種子稔性の低下も認められたため、結果として収量が低下した。また、種子の発芽率がやや低下した。これ以外の特性については「日本晴」と相違はなかった。

温室栽培においては、これらの形質について組換えイネHW5系統は「日本晴」と差を示さなかったが、ほ場における栽培条件によってもともとHW5の有していた変異が強調された可能性がある。これについては、今後、「日本晴」と交配して導入遺伝子の分離と粒着密度、種子稔性などの変異が分離するか否かを調査する必要がある。

組換え体HW5系統において認められた「日本晴」との差はイネの品種あるいは栽培条件による変異の中を越えていない。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可能性があることが知られており、遺伝子組換えイネを栽培した場合に雑草イネと交雑することが考えられる。しかし、競合における優位性に係わる形質について遺伝子組換えイネと対照の非組換えイネとの間に品種や栽培条件による変異の中を超える相違はみられていないことから、遺伝子組換えイネと雑草イネが交雑した場合でも、非組換えイネと雑草イネが交雑した個体による影響を上回ることはないと考えられる。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り、自然条件下で自生することは知られていないこと、これまでの知見では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、本組換え体と競合する可能性のある野生植物は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価なし

理由：

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。

(3) 影響の生じやすさの評価なし

理由：

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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、第一種使用規程に従って使用等した場合、競合における優位性についての生物多様性影響が生じるおそれはないと判断する。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定なし

理由：

本組み換えイネは、移入された核酸の複製物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、一アミノ酸が置換されているだけであるのでイネの同酵素と同じ特性をもつと考えられる。また、トリプトファンは必須アミノ酸の一種であって毒物ではない。したがって、この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。腹腔内投与したトリプトファンのLD50はトリで2,500 mg/ 体重kg、ラットで1,600 mg/ 体重kg、マウスで4,800 mg/ 体重kgである¹⁷。経口投与したラットのLD50は16 g/ 体重kg以上である¹⁷。本組換え体のトリプトファン含量は1粒当たり200 nmol以下、すなわち0.04mg以下であるので、体重1kgのトリにおけるLD50のトリプトファン量は玄米62,500粒に相当する。腹腔内投与と経口投与ではLD50に10倍程度の差があることから、野生動物がそれだけ大量の組換え体玄米を食することは考えにくい。また、本組換え体は、移入された選抜マーカーによりハイグロマイシンをリン酸化する酵素ホスホトランスフェラーゼを産生するが、本酵素は植物、酵母やヒト培養細胞の形質転換実験の選択マーカーとして使用されていることから、この物質も有害物質には該当しない。

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は、組換えイネ栽培土壤に大豆、大麦、大根を播種してこれらの発芽と生育を調査したが、対照区と差は認められなかった。根から分泌され土壤微生物に影響を与える有害物質の産生性は、組換えイネを栽培したポットの土壤、あるいは組換えイネを栽培した水田土壤における微生物相について調査した。その結果、土壤中に認められる微生物相に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、組換え植物体を地上部と根部に分けて、それぞれをすき込んだ土壤に大豆、大麦、大根を播種して発芽と生育を調査した。いずれにおいても播種した作物の生育に差は認められなかった。

イネは、日本においては長年の使用等の経験がある農作物である。宿主である「日本晴」と組換え体系統HW5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。

(2) 影響の具体的内容の評価なし

理由：

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。

- (3) 影響の生じやすさの評価
なし

理由：

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

- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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、第一種使用規程に従って使用等した場合、有害物質の産生性についての生物多様性影響が生じるおそれはないと判断する。

3 交雑性

- (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定
なし

理由：

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。

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原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どうしの交雑に由来すると考えられる。その生育域が主に農耕地及びその近傍に限られていることや、多数発生するのは直播栽培時のみであり移植栽培時にはほとんど発生がみられないことも考慮すれば、雑草イネは我が国の生物多様性の構成要素としてその遺伝的多様性を維持すべきものとはいえ、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
なし

理由：

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。

- (3) 影響の生じやすさの評価
なし

理由：

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

- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、第一種使用規程に従って使用等した場合、交雑性についての生物多様性影響が生じるおそれはないと判断する。

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、組換え体HW 1 系統において認められた「日本晴」との差はイネの品種あるいは栽培条件による変異の巾を越えていない。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り、自然条件下で自生することは知られていないこと、これまでの知見では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、本組換え体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およびハイグロマイシンホストランスフェラーゼは有害物質には該当しない。増加トリプトファン量も LD50 の価よりはるかに低い。また、産生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、根から分泌され土壌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大豆、大麦、大根の発芽と生育を調査して評価した結果、いずれにおいても播種した作物の発芽と生育に差は認められなかった。宿主である「日本晴」と組換え体系統 HW 5 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。

交雑性について、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、系統 HW 5 は生物多様性影響を生ずるおそれはないと評価した。

緊急措置計画書

平成 16 年 2 月 24 日

氏名 黒田 秧

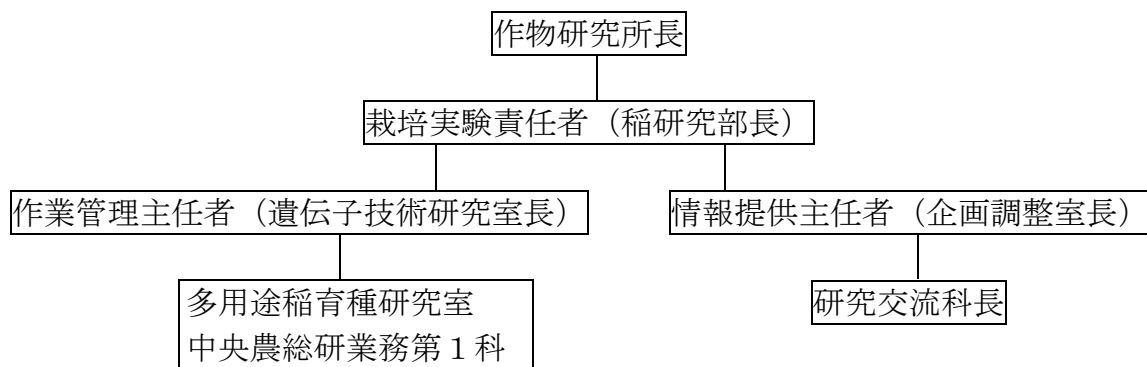
住所 茨城県つくば市観音台 2-1-18

(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構

作物研究所

第一種使用規程の承認を申請している高トリプトファン含量イネ (*OASAI*D、*Oryza sativa* L.) (系統名 HW5) 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



2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 高トリプトファン含量イネ (*OASAI*D、*Oryza sativa* L.) (系統名 HW5) (以下、本 L MHW5) については、栽培及び研究活動を通じて、共同研究先の研究者、栽培者等に関する情報を把握し、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、(1) により把握している研究実績のある研究者、栽培者等に対して、実験室の室員、作業員等に関する情報提供を依頼し、本 L MHW5 を栽培している者又は種子を保有している者の把握に努め、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

新聞に本件についての告知のための記事を掲載するとともに、2で把握した関係者に対して、電話や文書などにより連絡を取る。また、当所のホームページにおいても、本件についての告知を掲載するとともに、問い合わせ専用窓口を設置する。

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

の具体的な措置の内容

(1) 本LMHW5の栽培用種子の実験中止及び回収を行い、回収した栽培用種子は密閉容器に保管の上、焼却処分する。

(2) 研究所の圃場等で栽培されている本LMHW5については、栽培者に対して、すき込み等による不活化を行うよう要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための研究所内における組織体制及び連絡窓口を報告する。