

いもち病及び白葉枯病抵抗性イネ (*DEF, Oryza sativa L.*) (AD77)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..... 4

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..... 5
- (2) ベクターに関する情報..... 8
- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 9
- (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... 11
- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別方法並びにそれらの感度及び信頼性... 12
- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 12

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..... 15
- (2) 使用等の方法..... 15
- (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..... 16

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..... 17
- 2 有害物質の産生性..... 18
- 3 交雑性..... 18
- 4 その他..... 19

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 20

緊急措置計画書..... 23

第一種使用規程承認申請書

平成16年11月17日

農林水産大臣 島村 宣伸 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 理事長 三輪 睿太郎
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 | いもち病及び白葉枯病抵抗性イネ (<i>DEF, Oryza sativa L.</i>) (AD77) |
| 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：新潟県上越市稲田1の2の1 名称：中央農業総合研究センター北陸研究センター隔離ほ場 使用期間：承認日～平成18年10月31日 1 隔離ほ場の施設 (1)部外者の立入を防止するための高さ1.8メートルの金網フェンスをほ場の周囲に張り巡らせている。 (2)部外者は立入禁止であること及び管理責任者名を記載した隔離ほ場の標識を、出入り口の見やすい所に掲げている。 (3)使用した機械、器具、靴などに付着した組換えイネの種子などを洗浄するための洗場を設置している。 (4)田植え期から収穫期にわたる期間で防雀網を設置するなどの野生動物の摂食を防止する措置を執る。 (5)部外者の立入防止を徹底するために施錠管理し、フィールドサーバー（ほ場観察装置）を設置する。 2 隔離ほ場の作業要項 |

| | |
|--|--|
| | <p>(1)組換え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。</p> <p>(2)組換えイネを隔離ほ場の外に保管、運搬する場合には密封容器を用い、組換えイネの漏出を防止する。</p> <p>(3)(2)以外では栽培終了後、組換えイネの植物体は隔離ほ場内で裁断し鋤込むことによって、隔離ほ場内で不活化する。穀粒は密封容器で分別管理する。</p> <p>(4)使用した機械、器具等に付着した組換えイネは、隔離ほ場内の作業スペースで洗浄し、外に持ち出されないように防止する。排水系統には沈殿槽と網を設置し、組換え体の流出を防止する。</p> <p>(5)設備が有する機能を十分発揮されるように維持管理を行う。</p> <p>(6)(1)から(5)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)生物多様性影響のおそれがあると認められたときは別に定める「緊急措置計画書」の措置を確実に講ずる。</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当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する生物種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

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

品種名：どんとこい（日本型イネ栽培種）

品種登録番号 第 5845 号、登録年月日 1997/12/05

八 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バンナ・タイ族自治州を含む西南地域、南端はミャンマー（ビルマ）、タイのデルタと丘陵部の境界地域にある。これらの地域はいずれも山岳地帯であり、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⁾。

我が国においては、ほ場及び畦畔に雑草イネが発生する場合があるが、近縁野生種（*O. nivara*, *O. rufipogon* 等）が自生していないため、我が国における雑草イネは、栽培種イネどうしの交雑により生じたものと考えられる¹⁸⁾。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

熱帯原産のイネでは化石などの資料はきわめて乏しいが、インド、タイ、中国などの遺跡の発掘品から推定して、イネの栽培化は紀元前 7000 年ぐらいまでさかのぼることができる。日本へは縄文時代の後半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²⁾。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。

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、南緯 40° ~ 北緯 53° にわたり種々の気候条件

下で栽培されている²⁾。栽培面積は約 1 億 500 万ha、総生産量は 5 億 t (玄米) 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、ヨーロッパの順に多い。日本でも栽培地は北緯 44° にまで及び、また世界で最も生産力が高い生産地域となっている。我が国では通常、春に播種・移植して秋に収穫する。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³⁾。

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% が主食用として消費され、残りが加工用、種子用、飼料用に使用されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件

イネの栽培地域は、ロシア・中国国境のアムール河岸の北緯 53 度からアルゼンチン中央部の南緯 40 度までの水田を中心に広がっている²⁾。我が国においても、水田を中心に広範囲で栽培されている。最低温度 10~13℃ で発芽、15~18℃ で生育、20℃ 以上で登熟可能である。

ロ 繁殖又は増殖の様式

種子の散布は、植物として繁殖し生存するための能力の一つとして、籾の老化が進み枝梗から脱落することで行われる⁴⁾。しかし、現在の日本稲は栽培作物として高度に人為的に作られた作物であり、自然条件下での脱粒性はきわめて低い。イネ種子の休眠は胚自身の成熟と関連しており、籾が黄化した後水分条件が満たされると穂上でも発芽する等休眠性は浅く、発芽した個体は枯死、腐敗して越冬しない⁴⁾。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⁵⁾。しかし、土壌中に埋蔵した種子の寿命については、低頻度で冬季の間生存し翌春発芽する場合があるが、大部分は収穫年の最初の冬の間に生命力を失い、腐死する⁴⁾。

ひこばえによる栄養繁殖も行うが、我が国では通常、冬の低温のため枯死する。気候の温暖な地域では、ホールクロップの収穫を目的とする飼料用イネの場合、刈り取り後、刈り株や根元から出てくるひこばえから再生した植物体を再び収穫する多回刈り栽培も可能である。

イネは高度の自殖性種子作物であり、通常他殖率は 1% 以下であるが、条件によっては最大 5% 程度の自然交雑が起こる⁶⁾。しかし、出穂期が同じ品種を栽培する場合には、ほ場を 20m 離せば交雑を回避できる⁷⁾。国外では、栽培種イネと交雑可能な近縁野生種として野生種イネ (*O. nivara*, *O. rufipogon* 等) が自生している地域もあるが、我が国に自生しているという報告はない。

雌蕊の受粉形式は風媒花に特徴的なものである。しかし、通常、葯は開花 (穎) 直前には開裂し、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するため、他家 (花) からの風媒による受粉は栽培品種においては 1

%以下である⁸⁾。花粉生産量は、前歴期間（幼穂形成期から約 10 日間）の水温が 25 の条件で、1 葯当たり約 1,300 個となる。前述のように開花時点で葯内の花粉の殆どは失われているが、仮に全ての花粉が穎花外に放出され、穎花あたりの葯数を 6、1 穂に同時に開穎する穎花数を 10~30 として計算すると、1 日あたり 1 穂から放出される花粉の数は 78,000~234,000 個となる。また、イネの個体当たりの花粉生産量は約 900 万個ともいわれる。花粉形状は球形で、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。花粉の寿命は一般に 3~5 分⁶⁾、最大で 10 分程度である。花粉飛散距離については、交雑を避けるための実質的な距離として採取ほ場での隔離距離を参考にすると、イネの場合は 3m とされている。また、花粉源からの距離と交雑率については、距離 4.5m で交雑率は 0.6% 以下であり、10m では 0.04% 以下となり、20m を越すと 0% に至るとされている⁷⁾。

八 有害物質の産生性

イネから分泌されるモミラクトン B は、コショウソウやレタスに対してアレロパシー効果を示すように⁹⁾、イネは他の作物と同様にアレロパシー物質を産生する。モミラクトン B 以外にもイネの根から出る p-クマル酸をはじめ 15 種類の物質がアレロパシー物質の可能性があるとされているが、これらのフェノール化合物は直接的にアレロパシー効果を発揮するものではなく、アレロパシー効果に関わる機構に何らかの作用を及ぼすと考えられている¹⁰⁾。米国では、世界 66 カ国のイネ約 17,000 品種について、水田雑草に対するアレロパシー調査が行われている。その結果、*O. sativa* の中でもアレロパシー効果には強弱があり、アレロパシー効果の強いグループに日本型栽培品種は含まれていない¹¹⁾。また、日本型栽培品種のアレロパシー活性はヘアリーベッチ、ナギナタガヤ、ソバ等の他作物と比較して弱いと考えられている¹²⁾。

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と機能

「いもち病及び白葉枯病抵抗性イネ (*DEF*, *Oryza sativa* L.) (AD77)」(以下、本組換えイネという)の作出に用いた供与核酸を表 1 に示した。

表1 構成及び構成要素の由来と機能

| 構成要素(略称) | サイズ(bp) | 由来 | 機能 |
|----------|---------|---|--|
| pCS | 1725 | イネ | イネの第10番染色体に座乗し、分泌型と予測される未知のタンパク(169アミノ酸)をコードする遺伝子のプロモーターであり、下流に連結された遺伝子の組織特異的(カルス特異的)発現を誘導する(GenBank/EMBL/DDBJ BD392431) |
| mALS | 1935 | イネ | イネの第2番染色体に座乗し、イソロイシン、バリン、ロイシン合成系の酵素であり、ビスピリバックナトリウム塩に対して感受性を示すアセト乳酸合成酵素(ALS)に生じた、2カ所のアミノ酸置換により得られた2点変異型アセト乳酸合成酵素(mALS)で、ビスピリバックナトリウム塩に対して抵抗性を示すため、本組換えイネにおいては選抜マーカーとして使用する(GenBank/EMBL/DDBJ BD169500) |
| P10 | 161 | イネ | イネの第3番染色体に座乗し、イネの貯蔵蛋白質プロラミン10KDaをコードする遺伝子のターミネーターであり、上流に連結された導入遺伝子を転写終結させる(GenBank/EMBL/DDBJ AF294580) |
| pLS | 1533 | イネ | イネの第7番染色体に座乗し、光合成に関わる光化学系IのKサブユニットをコードする遺伝子のプロモーターであり、下流に連結された遺伝子の組織特異的(緑葉組織特異的)発現を誘導する(GenBank/EMBL/DDBJ BD392426) |
| DEF | 401 | カラシナ | アブラナ科や野菜などに含まれる抗菌蛋白質で、細菌や糸状菌などに対して強い抗菌活性を示し、本組換えイネにおいてはいもち病及び白葉枯病抵抗性を付与する(GenBank/EMBL/DDBJ BD285518) |
| P10 | 161 | イネ | イネの第3番染色体に座乗し、イネの貯蔵蛋白質プロラミン10KDaをコードする遺伝子のターミネーターであり、上流に連結された導入遺伝子を転写終結させる(GenBank/EMBL/DDBJ AF294580) |
| その他の領域 | 9.4Kb | 緑膿菌(RK2系プラスミド)大腸菌(<i>tet^r</i> 遺伝子)アグロバクテリウム(ボーダー配列) | ベクターバックボーン(RK2系プラスミド)、テトラサイクリン耐性遺伝子(<i>tet^r</i>)および植物の染色体に遺伝子配列が挿入される際に認識される末端領域(ライトボーダー配列、レフトボーダー配列)を有する |

「カラシナ由来ディフェンシン遺伝子（以下、「DEF」という）の機能」

食用野菜であるカラシナ由来のDEF蛋白質（以下、「DEF」という）は、アブラナ科植物の中で最も強い抗菌活性を示す群に属し、元来、種子の表層部などで発現し、大腸菌をはじめとした細菌および種々の糸状菌に対して増殖抑制効果をもつ。またそれらは 29 アミノ酸残基からなるシグナル領域と 51 アミノ酸残基からなる抗菌活性領域から構成される。抗菌活性の強度や病原菌に対する効果は、アミノ酸配列とその高次構造によって規定されると考えられる。DEFは4つのジスルフィド結合をもち、昆虫や哺乳動物等のDEF（3つのSS結合）と構造的特徴で区別され、3次元的には3つの非平行 α -ストランドと1つの α -ヘリックスがあると推定される¹³⁾。

DEFはイネ由来の pLS プロモーターに連結されることで緑葉組織のみに発現し、しかも他器官へ転流しない。またウエスタン分析の解析結果より、DEF に関して穀粒をはじめとする他器官への転流は認められない。

DEFは正の電荷を帯びており、病原菌の細胞膜に付着し、細胞膜のイオンチャンネルに影響を及ぼして抗菌活性を示すと考えられている¹⁴⁾。特に、作用機作については、細胞膜の脂質であるスフィンゴリピッドが活性に関わっていることが明らかとなっている¹⁵⁾。スフィンゴリピッドの骨格形成に参与する成分（グルコシドセラミド）の構造的特徴が糸状菌と、ヒトやダイズでは異なっており、DEFが動物や植物に対して毒性を示さない¹⁶⁾。植物を宿主とした場合の宿主代謝系には影響しないと考えられる¹⁷⁾。DEFをプローブとして用いたサザン分析及びイネゲノムデータベースの調査より、イネにはDEFと塩基配列の相同性の高い配列は存在せず、本蛋白質はイネに存在しない。いもち病菌や白葉枯病菌はイネの緑葉組織の表面に付着し、細胞内に移行し増殖して病徴を発生させる。これに対して、分泌されて作用するDEFは組換えイネの緑葉組織に蓄積され、抗菌活性により病原菌の増殖を抑制することで、いもち病や白葉枯病に対する抵抗性を示す。いもち病については、「葉いもち」に加えて「穂いもち」の抑制効果も病害抵抗性付与の面から考慮すべきであるが、「葉いもち」の発病程度と「穂いもち」の程度に相関があることが知られている。よって緑葉組織細胞に蓄積されるDEFの抗菌活性に基づく「葉いもち」の抑制効果が、「穂いもち」の抑制にも効果を及ぼすことが期待される。

「イネ由来2点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子（*mALS*）の機能」

アセト乳酸合成酵素(ALS)は植物に広く存在するイソロイシン、バリン、ロイシン合成系の酵素であり、除草剤であるビスピリバックナトリウム塩の標的酵素である（図1）。

ビスピリバックナトリウム塩はピリミジニルカルボキシ系化合物で、水稻用除草剤として1997年に農薬登録されている「ノミノール」の有効成分である¹⁷⁾。ビスピリバックナトリウム塩はALSの酵素活性を阻害し、植物の生長に不可欠な分岐アミノ酸の生産量を低下させるが、イネの培養細胞の中から自然突然変異型として見いだされた*mALS*はビスピリバックナトリウム塩の阻害を受けないことによって分岐アミノ酸の生産量に影響がなく、耐性を示す¹⁷⁾。

なお、イネ成体は 0.25 μ M のビスピリバックナトリウム塩に対して耐性を示すが、

イネカルスは耐性を示さない。しかし、*mALS*を導入した組換えイネカルスにおいては0.25 μM のビスピリバックナトリウム塩に耐性を示すため、ビスピリバックナトリウム塩を0.25 μM 含む寒天培地上で培養した際のカルス増殖が可能である。この性質を利用して、本組換えイネにおいてはそのスクリーニングのためのマーカー遺伝子をして *mALS* を用いている。*mALS* をイネ由来のカルス特異的プロモーター (pCS) に連結することで、培養操作等を行う場合のみ見られ、通常 of 自然環境下で発生することのないカルスのみに、導入遺伝子の発現を限定することができる。

ALS と AHAS (アセトヒドロキシ酢酸合成酵素) はいずれも同一酵素を指す略称であり、現在でも両方の名称が混在して使用されているが、本申請書では ALS (アセト乳酸合成酵素) に統一して記述している。

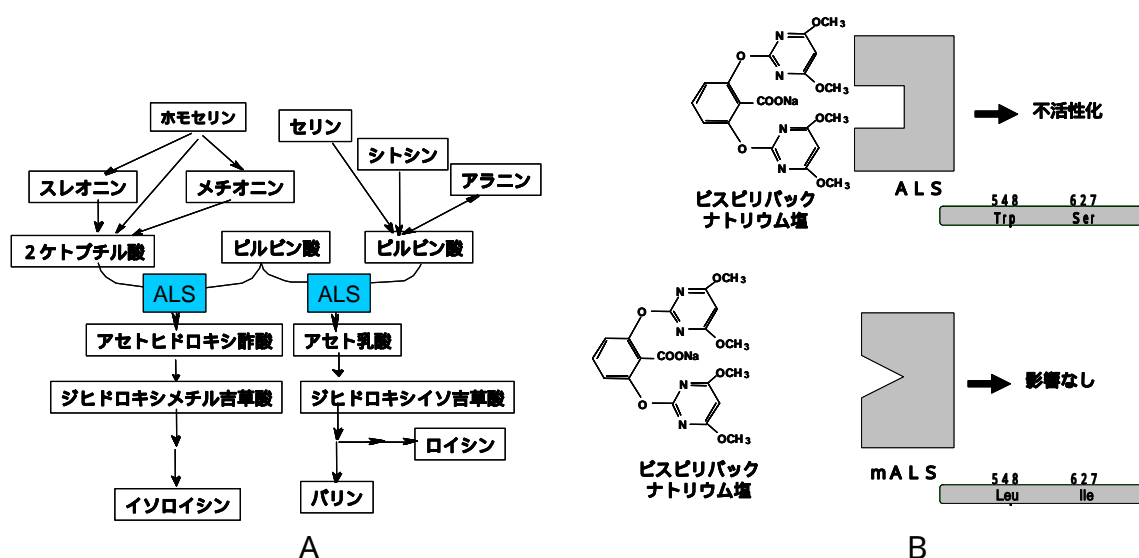


図1 ALS の代謝系とビスピリバックナトリウム塩の影響
A : ALS の代謝系
B : ALS と mALS の相違とビスピリバックナトリウム塩の影響

(2) ベクターに関する情報

本組換えイネの作出に用いたベクター-pTA-AD の構成については図2 に示した。

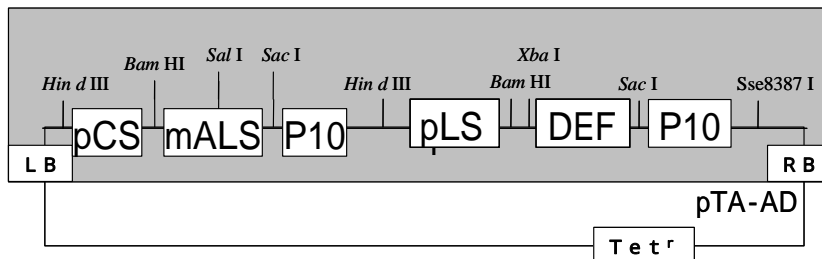


図2 ベクターに関する情報
注：宿主に移入される領域を灰色で示した。

- イ ベクターの名称及び由来
 名称：pTA-AD バイナリーベクター（9.4Kb）
 由来：緑膿菌由来の RK2 系プラスミド由来

- ロ ベクターの特性
Agrobacterium tumefaciens の Ti プラスミド (octopine 型) の T-DNA 左右境界領域をもち、植物細胞に移入される境界の外側にテトラサイクリン耐性遺伝子を有する。特殊な培養条件下ではヒトへの伝達性の報告があるが、通常条件ではヒトを含む動物細胞への感染の報告はない。

(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
 図3に示した。

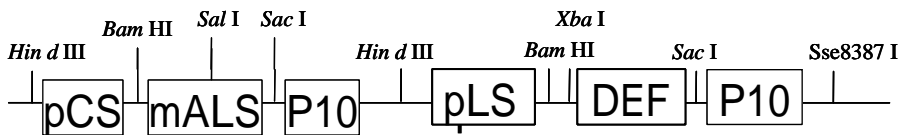


図3 宿主内に移入された核酸全体の構成

pCS: イネ由来カルス特異的プロモーター
 mALS: イネ由来2点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子
 P10: イネ由来プロラミン(10KDa)遺伝子のターミネーター
 pLS: イネ由来緑葉組織特異的プロモーター
 DEF: カラシナ由来のディフェンシン蛋白質cDNA
 pTA: バイナリーベクター
 Hind III, Bam HI, Xba I, Sal I, Sac I, Xba I, Sse 8387 I :制限酵素部位

- 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
 北陸研究センター育成の良食味品種「どんとこい」の完熟種子を供試し、アグロバクテリウム菌を用いて、イネの完熟種子に遺伝子を導入する新しい方法である超迅速形質転換法で遺伝子導入を行い作出した。超迅速形質転換法では、カルスを作成する必要のあった従来の遺伝子導入法と比較して、実験にかかる日数を大幅に短縮することができる。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

選抜の方法：

遺伝子導入実験後のカルスを 0.25 μM のビスピリバックナトリウム塩を添加した固形培地上で培養し、mALS のカルスにおける特異的な発現によりビスピリバックナトリウム塩に耐性を示し増殖した細胞から組換え細胞を選抜し、再分化した個体について、DEFの有無をPCRで確認して選抜した。

アグロバクテリウムの残存性：

組換えイネ（T2 世代）及び非組換えイネ（どんとこい）の種子をカナマイシン 100mg/L、ハイグロマイシン 50mg/L 及びリファンピシン 10mg/L を含む培地へ塗布した結果、アグロバクテリウムを塗布した培地では正常にアグロバクテリウムの増殖が認められたが、組換えイネの磨砕液を塗布した培地ではアグロバクテリウムの増殖は観察されなかった。このことから、組換え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された。

育成経過：

遺伝子組換えにより作出した大量の組換えイネ（T0 世代）を用いて病害抵抗性検定を実施し、いもち病や白葉枯病に対して複合病害抵抗性を示す系統を選抜した。さらに自殖後代（T1 および T2 世代）で同様の検定を実施し、複合病害抵抗性が安定的に遺伝する系統を選抜した。導入遺伝子の効果の検証と同時に選抜系統の特性を調査し、原品種「どんとこい」と比較して、隔離温室内における稔性や草型などで有意な差が認められない系統を選抜した。

AD77 の T0、T1 世代において導入遺伝子の存在の確認、発現の確認および病害抵抗性検定を実施し、T2 世代において導入遺伝子の存在の確認、発現の確認および病害抵抗性検定に加えて、生物多様性影響の評価に当たり必要な一連の評価試験を行った。

本組換えイネの T0 世代は AD77 であり、そこから自殖により各世代が派生している。そのうちの AD7763 は AD77-6 から育成された後代（T2 世代）であり、AD7763 の自殖後代（T3 世代）である AD7763-1 をはじめとする一連の系統を今回の隔離ほ場試験に使用する（図 4）。

| | | | |
|----|-----|-----|------------------------|
| 平成 | 14年 | 1月 | アグロバクテリウム法による遺伝子導入実験開始 |
| | 14年 | 3月 | 再分化個体の選抜 |
| | 14年 | 5月 | T0 系統の育成、選抜 |
| | 14年 | 10月 | T1 種子の採種 |
| | 15年 | 10月 | T1 系統の育成、選抜、T2 種子の採種 |
| | 16年 | 5月 | 一部の T2 世代系統の形質評価 |

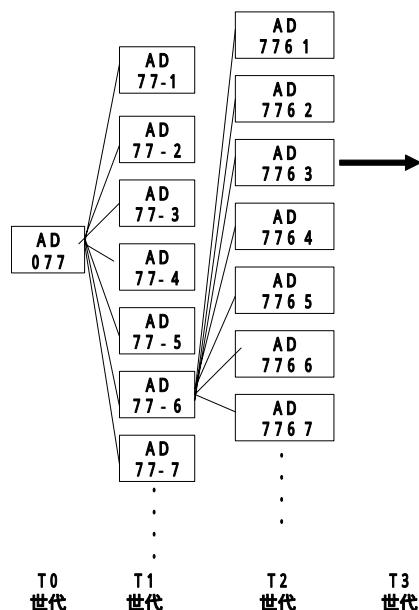


図4 組換えイネの系統樹

: 個体 AD7763 の自殖系統 (T3 世代) を隔離ほ場試験に供試する。

(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

イ 移入した核酸の存在場所: 組換えイネのゲノミック DNA を用いたサザン解析により、染色体上に存在することを確認した。

ロ 移入核酸のコピー数及び遺伝の安定性: T2 世代のサザン解析により 2 コピー導入されていることを確認した。また個体間及び世代間 (T1 世代との比較) で遺伝子導入パターンは一致していた。

ハ 複数コピー存在している場合、隣接しているか否か: ロより 2 コピー全てが 1 遺伝子座に導入され、安定して遺伝しているものと考えられる。

ニ 導入した *DEF* の存在が確認された組換えイネ AD77 系統の T2 世代を供試して茎、葉、根、穀粒から RNA を抽出し、*DEF* 断片をプローブとしてノーザン解析を行った結果、供試した全ての組換え個体において、茎および葉特異的に *DEF* に由来する RNA バンドが検出された。本組換え体の *mALS* の発現はカルス特異的であり、かつ内在性の *ALS* の発現の影響により、ノーザン解析での *mALS* の発現解析は困難であるため、カルスにおけるビスピリバックナトリウム塩耐性を調査した。*DEF* の発現により病害抵抗性の付与が世代間で安定していることを確認し、*mALS* の発現によるビスピリバックナトリウム塩耐性は T2 世代で安定して発現しているこ

とが観察された。

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別方法並びにそれらの感度及び信頼性
以下に示した何れかの方法又はこれらの併用により、ほぼ確実に検出・識別が可能。
- 1) 導入遺伝子に特異的なプライマーの組み合わせにより、PCR によって導入遺伝子から推測されるサイズのバンドを特異的に増幅・検出できる。
 - 2) 導入遺伝子の断片を用いたサザン分析により、ゲノムに挿入された導入遺伝子と塩基配列が相同な配列の有無を検出・識別できる。

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

試験系統：組換えイネ及び対照品種(非組換えイネ)はイネ品種「どんとこい」。
本組換えイネには、イネ由来の新規選抜マーカー(除草剤耐性)遺伝子である2点変異型アセト乳酸合成酵素を産生する *mALS* とカラシナ由来の抗菌蛋白質である DEF を産生する *DEF* が導入されている。それぞれの導入遺伝子には、可食部分以外の必要な組織でのみ導入遺伝子を強力に発現させるために、イネ由来の新規プロモーターを連結している。具体的には、*mALS*にはカルス特異的プロモーター(*pCS*)を、*DEF*には緑葉組織特異的プロモーター(*pLS*)を連結している。

試験地：中央農業総合研究センター北陸研究センターP1P 温室(平成16年4月～10月)

試験規模：各系統4～8個体

- 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内容

カラシナ由来 *DEF* を緑葉組織特異的に発現させた結果、当該組換えイネはいもち病及び白葉枯病抵抗性を示した。

組換えイネの各世代において、非組換えイネ(どんとこい)を対照としていもち病抵抗性と白葉枯病抵抗性検定を実施した。組換えイネのT0、T1世代については個体の評価を、組換えイネのT2世代および非組換えイネ(どんとこい)については、10個体ずつ供試して平均値を評価した。いもち病抵抗性検定には、作出した組換えイネを供試し、いもち病菌(レース007)に対する病害抵抗性反応を調査した。近年の国内主力品種であるコシヒカリ、ひとめぼれ、ヒノヒカリ等を侵し、国内での分布割合が高いいもち病菌としてレース007を供試した。P1P温室内で孢子懸濁液を 8×10^5 個/mlに調整して噴霧接種を行い、接種後15日目に病害抵抗性を、一般的に用いられる病害抵抗性指数をもとに評価した。白葉枯病抵抗性検定は、P1P温室内で白葉枯病(III群)菌を剪葉(せんよう)接種法でイネ成葉に接種し、接種後15日目に病斑長を測定した。近年の国内主力品種であるコシヒカリ等を侵し、国内での分布割合が高く、かつ接種検定前の増殖・培養時において病原力が比較的安定している白葉枯病菌としてIII群を供試した。その結果組換えイネは、非組換えイネ(どんとこい)と比較していもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示し、病害抵抗性は

後代に遺伝することが確認された。

また、当該組換えイネは、カルス特異的に発現する選抜マーカー遺伝子として導入した *mALS* を有しており、カルスにおいてビスピリバックナトリウム塩に対する耐性を示した。

- 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のある場合はその程度（イにおいて明らかにしたものは除く）

1) 形態及び生育の特性

形態的観察の結果、出穂日については、光・温度条件等の P1P 温室内での栽培環境の差異によると考えられる個体間のばらつきがあったが、組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）で差異が認められなかった。葯長、花粉稔性の一部に非組換えイネ（どんとこい）との差異が認められたがこの差異は小さく、隔離温室内での生育の環境変異の範囲と考えられる。稔実率は組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）のいずれでも低い、P1P 温室内での栽培条件による稔性の低下と考えられる。それ以外の調査項目については組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）で差異が認められなかった。

2) 生育初期における越冬性

7日の低温処理後、P1P 温室に移した組換えイネの T2 世代の幼苗および非組換えイネ（どんとこい）の幼苗はいずれもすべてが枯死した。この結果から、組換えイネ、非組換えイネ（どんとこい）ともに生育初期における越冬性がなく、差異は認められなかった。

3) 成体の越冬性

隔離ほ場試験において調査し情報を収集する。

4) 花粉の形状と稔性

組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）の花粉は、いずれも同程度の大きさの球状で、形状に差異は認められず、また、ともに I_2 -KI 溶液でよく染まった。 I_2 -KI 染色で判定した花粉稔性は組換えイネ、非組換えイネ（どんとこい）ともに高く、差異は認められなかった。

5) 花粉の発芽活性

組換えイネ、非組換えイネ（どんとこい）ともに、時間とともに発芽率が低下し、5-6 時間後には 0% となったことから、組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）とで花粉の発芽活性に差異はないと判断された。

6) 他殖性

組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）を密植しても、非 P1P 温室における実験では花粉の飛散による交雑は起こらないことを、密植条件で採種した種子が

ら誘導したカサのビスピリパックナトリウム塩に対する抵抗性の調査で確認した。これより、今回の栽培条件では花粉の飛散による自然交雑は起こっていないと考えられた。

7) 種子の休眠性、脱粒性および発芽率

組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）で種子の休眠性、脱粒性および発芽率について差は認められなかった。

8) 交雑率

我が国にはイネと交雑可能な近縁野生種は自生していないため、試験を行っていない。

9) 有害物質の産生性

植物体に含まれる物質の生物検定（植物体地上部と根部の鋤込み試験）、および植物体から分泌・発散する物質の生物検定（栽培土壌を用いた後作試験）を行ったところ、組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）との間に有意な差は認められなかった。また、プラントボックス法により組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）のアレロパシー活性を調査した結果、いずれもレタス種子の生育に対する統計的に有意な影響はみられなかった。日本型栽培品種は弱いアレロパシー活性を示すことが知られているが、組換えイネおよび非組換えイネのいずれも、レタス種子の生育に影響を及ぼす程度のアレロパシー活性を示さないと考えられた。

10) 組換えイネの栽培が土壌微生物相に与える影響

組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）栽培土壌の間で、細菌・放線菌数および糸状菌数のいずれも微生物数に相違があるが、土壌微生物数の測定では実質的に有意な変化は10倍単位で計測されることから、組換えイネの栽培による土壌微生物相への影響は非組換えイネ（どんとこい）の栽培と同程度であると判断された。また、DEFはpLSに連結されることで緑葉組織特異的に発現し、根での発現が抑制されていることから、組換えイネの栽培による土壌微生物相への影響はないと考えられる。

11) アグロバクテリウムの残存性

アグロバクテリウムを塗布した培地では正常にアグロバクテリウムの増殖が認められたが、組換えイネの磨砕液を塗布した培地ではアグロバクテリウムの増殖は観察されなかったことから、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された。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

この組換えイネは、良食味品種にいもち病及び白葉枯病抵抗性が付与されており、そ

の結果として減農薬栽培の実現や環境負荷低減による稲作の低コスト・高品質化を目指すものである。

本申請はこの組換えイネの実用化を目指しており、良食味で複合病病害抵抗性を示す育種母本としての利用を予定している。隔離ほ場試験では目的形質の安定した発現と一般ほ場に出すために必要となるデータの集積を行う。

(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：新潟県上越市稲田1の2の1

名称：中央農業総合研究センター北陸研究センター隔離ほ場

使用期間：承認日～平成18年10月31日

イ 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入を防止するための高さ1.8メートルの金網フェンスをほ場の周囲に張り巡らせている。
- (2) 部外者は立入禁止であること及び管理責任者名を記載した隔離ほ場の標識を、出入り口の見やすい所に掲げている。
- (3) 使用した機械、器具、靴などに付着した組換えイネの種子などを洗浄するための洗場を設置している。
- (4) 田植え期から収穫期にわたる期間で防雀網を設置するなどの野生動物の摂食を防止する措置を執る。
- (5) 部外者の立入防止を徹底するために施錠管理し、フィールドサーバー（ほ場観察装置）を設置する。

ロ 隔離ほ場の作業要領

- (1) 組換え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。
- (2) 組換えイネを隔離ほ場の外に保管、運搬する場合には密封容器を用い、組換えイネの漏出を防止する。
- (3) (2)以外では栽培終了後、組換えイネの植物体は隔離ほ場内で裁断し鋤込むことによって、隔離ほ場内で不活化する。穀粒は密封容器で分別管理する。
- (4) 使用した機械、器具等に付着した組換えイネは、隔離ほ場内の作業スペースで洗浄し、外に持ち出されないように防止する。排水系統には沈殿槽と網を設置し、組換え体の流出を防止する。
- (5) 設備が有する機能を十分発揮されるように維持管理を行う。
- (6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 生物多様性影響のおそれがあると認められたときは別に定める「緊急措置計画書」の措置を確実に講ずる。

(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

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

宿主であるイネ（日本型栽培種、*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、水田や畑地以外の場所で雑草化するおそれは極めて低いと考えられる。ここでは生物多様性影響評価実施要領別表第三に基づき、組換えイネと宿主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等の特定

P1P 温室における環境影響評価実験の範囲において、競合における優位性に係わると考えられる諸形質（脱粒性、発芽率、休眠性、越冬性など）について、本組換えイネと対照の非組換えイネ（どんとこい）との比較を行った。その結果、これらの形質について組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）の間で差は認められなかった。

本組換えイネは、導入された *DEF* の産生する *DEF* によりいもち病及び白葉枯病抵抗性の形質が付与されているが、上述の P1P 温室での試験結果から、休眠性は極めて浅く生育初期における越冬性はないことが確認されており、本組換えイネが自生することは考えにくく、我が国の自然環境下において競合における優位性が高まることはないと考えられた。

本組換えイネにはマーカー遺伝子として 2 点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子（*mALS*）を有している。*mALS* はイネカルスにおけるビスピリバックナトリウム塩に対する耐性を付与する。イネ成体は本来、ビスピリバックナトリウム塩に対する耐性を示すため、*mALS* を導入することでカルスの段階でビスピリバックナトリウム塩に対する耐性が付与されたとしても、自然環境下での競合において優位に作用しないと考えられる。

以上のことから、第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離ほ場に限定し、組換えイネがほ場外部へ意図せずを持ち出されることを防止する限りにおいては、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と判断された。

（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

第一種使用規程に従った使用等においては、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生植物が特定されず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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等の特定

有害物質の産生性に係る試験結果について、P1P 温室において行った本組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）との間に差異は認められない。

DEFの産する蛋白質の作用部位は細菌や糸状菌等の細胞膜に特異的であり、*mALS*の産する蛋白質はイソロイシン、バリン、ロイシンの合成系においてのみ働く酵素である。また、DEFは緑色組織でのみ発現する一方で *mALS*はカルスでのみしか発現しない。以上のことから両者は相互に影響し合うおそれはないと判断される。

DEFの効果を示す細菌や糸状菌のスペクトラムは幅広いため、細菌や糸状菌等の微生物に対する影響については、隔離ほ場試験において、本組換えイネの植物体を鋤込んだ際の土壌微生物への影響や植物体由来の本蛋白質の土壌中での残存性についての試験を行う。ただし、隔離ほ場における第一種使用規程に従った使用等においては生物多様性に影響を与えるおそれはないと考えられる。

以上のことから、第一種使用規程に従って隔離ほ場内において使用する限りにおいては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と考えられた。

(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

第一種使用規程に従った使用等においては、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された。

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

野性種イネである *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

-

(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

交雑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、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された。

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

1 競合における優位性

PIP 温室における環境影響評価実験の範囲において、競合における優位性に係わると考えられる諸形質で、組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）の間で差は認められなかった。

本組換えイネは、DEF によりいもち病及び白葉枯病抵抗性の形質が付与されているため、自然環境下における適応度が上がることが想定される。しかし、上述の試験結果から、休眠性は極めて浅く生育初期における越冬性はないことが確認されており、本組換えイネが自生することは考えにくく、自然環境下において競合における優位性が高まることはないと考えられる。

これらのことより、本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（どんとこい）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、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

よって、第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離ほ場に限定し、組換えイネがほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、競合の優位性について、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

有害物質の産生性に係る試験結果について、PIP 温室において行った本組換えイネと非組換えイネ（どんとこい）との間に差異は認められない。

DEF の産する蛋白質の作用部位は細胞膜に特異的であり、*mALS* の産する蛋白質はイソロイシン、バリン、ロイシンの合成系においてのみ働く酵素である。また、DEF は緑色組織でのみ発現する一方で *mALS* はカルスでのみしか発現しない。以上のことから両者は相互に影響し合うおそれはないと判断される。

DEF の効果を示す細菌や糸状菌のスペクトラムは幅広いため、微生物に対する影響については、隔離ほ場試験において、本組換えイネの植物体を鋤込んだ際の土壌微生物への影響や植物体由来の本蛋白質の土壌中での残存性についての試験を行う。ただし、隔離ほ場における第一種使用規程に従った使用等においては生物多様性に影響を与えるおそれはないと考えられる。

以上のことから、第一種使用規程に従った使用等においては、有害物質の産生性について、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

我が国では、交雑可能な近縁野生種の自生は見られない。従って、交雑性について生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

以上から、第一種使用規程に従って第一種使用等の場所を隔離ほ場に限定し、本組換えイネがほ場外部へ意図せずに持ち出されることを防止する限りにおいては、生物多様性影響が生ずるおそれはないと総合的に判断された。

引用及び参考文献

- 1) 松尾考嶺 (監修) . 1989 . 植物遺伝資源集成 1 , . 食用作用 , 1 . イネ . 講談社 . 東京 .
- 2) 籙原雄三 . 1990 . イネの育種学 . 東京大学出版会 . 東京 .
- 3) 栗原 浩・籙原雄三・津野幸人他 . 2000 . 作物栽培の基礎 . 農山漁村文化協会 . 東京 .
- 4) 松尾孝嶺・清水正治・角田重三郎・村田吉男・熊澤喜久雄・籙原雄三・星川清親・石原 邦・平田熙・石井龍一(編).1990.稲学大成(第 2 卷)生理編 . 農山漁村文化協会 . 東京 .
- 5) 松尾考嶺・清水正治・角田重三郎・村田吉男・熊澤喜久雄・籙原雄三・星川清親・山口彦之・菊池文雄 (編) . 1990 . 稲学大成 (第 3 卷) 遺伝編 . 農山漁村文化協会 . 東京 .
- 6) 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.
- 7) 農林水産技術会議 . 2003 . 5 - 1 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 .
http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/h1512/siryoushu_1.pdf .
- 8) 松尾孝嶺・清水正治・角田重三郎・村田吉男・熊澤喜久雄・籙原雄三・星川清親・前田英三・山崎耕宇(編).1990 . 稲学大成 (第 1 卷) 形態編 . 農山漁村文化協会 . 東京 .
- 9) H. Kato-Noguchi, T. Ino, N. Sata & S.Yamamura (2002) Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiol Plant*, 115:p401-405.
- 1 0) A.N. Seal, T. Haig & J.E. Pratley (2004) Evaluation of putative allelochemicals in rice root exudates for their role in the suppression of arrowhead root growth. *J Chem. Ecol.* 30:p1663-1678.
- 1 1) Diday et. al. (1998) Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weeds, in "Allelopathy in rice" Olofsdotter ed., IRRI, p7-26.
- 1 2) 佐藤光政 (1989) アレロパシーを持つ作物 - 普通作物 -, 「植物間相互作用に関する化学物質 - アレロパシー研究の現状と文献解題 - 」, 農業技術環境技術研究所 . 茨城 . p12-19.
- 1 3) F.Fant, W.Vranken, W.Broekaert, & F.Borremans (1998): Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by 1H NMR. *J. Mol. Biol.*, 279:p257-270.
- 1 4) M. Zasloff (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415:p389-395.
- 1 5) K.Thevissen, B.P.Cammue, K.Lemaire, J.Winderickx, R.C.Dickson, R.L.Lester , K.K.Ferket, F.Van Even, A.H.Parret & W.F.Broekaert (2000) A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:p9531-9536.
- 1 6) K.Thevissen, K.K.Ferket, I.E.J.A.Francois & B.P.Cammue (2003) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24:p1705-1712.

- 17) 宮澤武重 (2004) ビスピリバクナトリウム塩、植調, 38 巻 p163-168.
- 18) A.V. Duncan (1994) The wild relatives of rice: A genetic resources handbook, IRRI, pp137, ISBN 971-22-0054-4.

緊急措置計画書

平成16年11月17日

氏名 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
理事長 三輪 睿太郎
住所 茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1

第一種使用規程の承認を申請しているいもち病及び白葉枯病抵抗性イネ (*DEF, Oryza sativa* L.) (AD77) (以下「本組換えイネ」とする) 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、以下の措置を執ることとする。

- 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
個人名・所属は、個人情報なので非開示
- 2 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講ずべき緊急措置の内容を周知するための方法
緊急措置が必要になった場合には直ぐにその内容を第一種使用等を行っている者に対し周知するために口頭あるいは文書で伝えるとともに、ホームページ等で本件についてお知らせを掲載する。
- 3 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組換えイネは、焼却処理あるいは鋤込み等による不活化を行う。
- 4 農林水産大臣及び環境大臣への連絡の方法
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。