資料７－２

鉄欠乏耐性イネ(*APRT*, *Oryza sativa* L.)（I3pAPRT1)の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　宿主の属する分類学上の種の和名、英名および学名

和名：イネ、英名：rice、学名：*Oryza sativa* L.[1)]

ロ　宿主の品種名又は系統名

品種名「月の光」

ハ　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、宿主種(*Oryza sativa*)の自生は基本的には見られず、生息域はあくまで栽培地周辺に限られている[2,3)]。また、近縁野生種はわが国には分布していない。なお、栽培地周辺にいわゆる雑草イネの発生が見られるが、これは栽培イネの変異型であり、栽培種同士の交雑から雑草性の形質が現れたものと考えられる。

（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

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。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[3)]。現在最も重要な作物として全国で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

イネは、非常に広範囲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、塩類集積土壌、アルカリ土壌や酸性土壌でも栽培されている[1)]。

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接栽培と苗を移植する栽培法がある[6)]。

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[1)]。

水稲は主にアジアの水田で栽培されている。日本では全国で栽培されており、生産量はおおよそ1000万トン/年、主に食用として利用されている。

（３）生理学的及び生態学的特性

イ　基本的特性

－

ロ　生息または生息可能な環境の条件

生育最低温度は10-12℃、開花結実には23℃を必要とする[3)]。逆に35℃以上になると高温障害が発生する[4)]。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[5)]。しかし、塩類集積土壌、アルカリ土壌や酸性土壌でも栽培されている[1)]。

ハ　捕食性又は寄生性

－

ニ　繁殖又は増殖の様式

①　種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

種子繁殖し、熱帯に分布するインド型イネ（subsp. *indica*）は比較的脱粒しやすいが、日本で栽培される日本型イネ（subsp. *japonica*）では、一部に脱粒性を有するものがあるが、一般に種子の脱粒性は低い[1,3)]。

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[1)]。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、翌春には休眠性は失われている[3)]。

イネ種子の寿命について、室温で１年間保管された種子のほとんどは発芽力を失う[9)]。土壌中に埋蔵された場合は冬季の間生存し、翌春発芽、生育するものもある。

②　栄養繁殖の様式（ひこばえ、塊茎、塊根、匍匐枝等）並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

イネは一年生の種子繁殖植物であるが、適切な水分や温度条件では種子収穫後も栄養体を維持できる。節から発生する分枝である「ひこばえ」を植え替えることによって株を増やすことができる[1)]。我が国では通常越冬することはない。

③　自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる性質を有する場合にはその程度

イネの自殖性は高度で、日本型イネの他殖率は0.6－3.9%程度である[1)]。自家不和合性、アポミクシスは報告されていない。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[1)]。しかし、本野生種の国内における自生地域はない[3)]。

④　花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの各頴花には６本の葯があり、各葯には約 1000 個の花粉が含まれている[1)]。基本的に自家受粉作物で、頴花内の葯から受粉するが、風媒によって隣接した株の花粉が低い頻度で他家受精することがある[1)]。

花粉内の澱粉蓄積によって花粉の充実度を判定すると、開花期にはほぼ全ての花粉が充実している[6)]。イネの花粉は球状である[7)]。花粉の飛散距離は最大で20m、寿命は３分から５分である[1)]。

ホ　病原性

－

ヘ　有害物質の産生性

イネからはモミラクトン、オリザレキシンなどのファイトアレキシン物質が報告されている。プラントボックス法を用いたイネのアレロパシー活性の測定を行った報告によれば、インド型、日本型及び中国型とされるイネ系統の活性はほぼ等しく、ジャワ型のものはこれらよりも強い活性を有しており、概して改良型の栽培品種よりも在来種に強いものが多いとされている。また、我が国で現在栽培されている品種の活性は、概ね弱いことが報告されている[8,9,15)]。

なお、プラントボックス法でアレロパシー活性の強いとされる品種ほど、成長途中のイネ植物体の根、茎及び葉の水溶性抽出物を用いた試験においても、レタスに対する成長阻害効果が大きいことが明らかとなっている[10)]。

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

鉄欠乏耐性イネ(*APRT*, *Oryza sativa* L.）(I3pAPRT1)(以下組換えイネという、また組換えを行っていない月の光を非組換えイネという)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は表１に示したとおりである。

ロ　構成要素の機能

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

本組換えイネの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表１に示した。

表１　組換えに用いた供与核酸の各構成要素、由来及び機能

構成要素	略称	サイズ	Accession No.	由来及び機能
アデニンリボースリン酸転移酵素酵素(APRT)発現カセット				
HvIDS3 プロモーター	I3p	2.2 kb	AB024007	ムギネ酸生合成の 2'-デオキシムギネ酸からムギネ酸を合成する酵素遺伝子 *IDS3* のプロモーター領域。発現は鉄欠乏の根特異的で、非常に強い。また、イネに導入された場合でも鉄欠乏の根で強い発現を引き起こす[13,14]。
APRT コード領域	APRT	0.9 kb	AB012046	供与した核酸はオオムギから取り出したアデニンリボースリン酸転移酵素をコードする塩基配列。オオムギでは鉄欠乏時に根でムギネ酸生合成のために特異的に発現が上昇する[12]。ムギネ酸生合成のはじめのステップである S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンの生合成に伴って出てくるアデニンを回収し、AMP を合成する。
nos 終止シグナル	NT	0.3 kb	AF485783	*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
ハイグロマイシン耐性カセット				
CaMV35S プロモーター	35P	0.8 kb	U28417	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の 35S プロモーター領域。植物の全組織にわたり恒常的に目的遺伝子を発現させる。
HPT 遺伝子	HPT	1.1 kb	K01193	大腸菌 K-12 株由来でハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼを生産する。組換えイネの選択マーカーとして働く。
nos 終止シグナル	NT	0.3 kb	AF485783	*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
β-グルクロニダーゼ遺伝子発現カセット				
CaMV35S プロモーター	35P	0.8 kb	U28417	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の 35S プロモーター領域。植物の全組織にわたり恒常的に目的遺伝子を発現させる。
β-グルクロニダ	GUS	1.8 kb	AF485783	大腸菌由来の *uidA* 遺伝子のコードするβ-グルクロニダーゼは、グルクロン酸と種々

ーゼ遺伝子				のアグリコンとの縮合体であるβ-グルクロニドを加水分解する酵素である。組織化学的検定には、５-ブロモ-４-クロロ-３-インドリル-β-グルクロニドを基質として用い、この基質がGUSにより加水分解され青色を呈することから、組換えイネの可視定量マーカーとして使用される。
CAT-1 イントロン	i	190 bp	D21161	*Ricinus communis* 由来カタラーゼ遺伝子の第一イントロン。アグロバクテリウム等の原核生物での発現を抑える。
nos 終止シグナル	NT	0.3 kb	AF485783	*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
カナマイシン耐性発現カセット				
nos プロモーター	NP	0.3 kb	AF485783	*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターで、発現調節を担う。発現は植物の全組織にわたり恒常的である。
NPTII 遺伝子	NPTII	0.8 kb	AF485783	原核生物のトランスポゾンTn5から分離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする。カナマイシン耐性を付与し、組換えイネの選択マーカーとして働く。
nos 終止シグナル	NT	0.3 kb	AF485783	*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産出される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性（食品としてのアレルギー性を除く）を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

組換えイネで新たに産出されるタンパク質の相同性検索によるアレルギー性の可能性の判断は、「Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22-25 January 2001」に従った。１）既知のアレルギー性を持つタンパク質とタンパク質全体に渡っての高い相同性があるかどうか、２)連続する80アミノ酸残基のうち28個(35%)以上既知のアレルギー性タンパク質と同じアミノ酸残基を含むかどうか、３）連続する６アミノ酸残基が既知のアレルギー性タンパク質内に含まれるかどうか、の３点について検索を行った。いずれかの検索で陽性であったものについ

てのみ、相同性検索の結果のみからはアレルギー性を示す可能性があるとした。相同性検索は、SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins, The University of Texas Medical Branch, http://fermi.utmb.edu/SDAP/)で行った。

a. オオムギアデニンリボースリン酸転移酵素 (APRT)

イネ科植物の根からの鉄吸収には、ムギネ酸類が重要な役割を担っている。ムギネ酸類はメチオニンから S-アデノシルメチオニンを経て生合成されるが、S-アデノシルメチオニン３分子からニコチアナミン１分子が合成される際にメチルチオアデノシンが３分子放出される。このメチルチオアデノシンからアデニンを回収し、AMP(アデノシン一リン酸)を合成するのがアデニンリボースリン酸転移酵素(APRT)である。AMP はさらに ADP、ATP となって生体内でのエネルギーとして利用される。メチオニンから S-アデノシルメチオニンの生合成にも ATP が必要である。また、メチルチオアデノシンからアデニンがはずれたメチルチオリボースはメチオニンサイクルによって再びメチオニンへと合成される。APRT は(動物、植物、微生物など)すべての生物に存在する。アレルギー性の有無に関する報告はない。

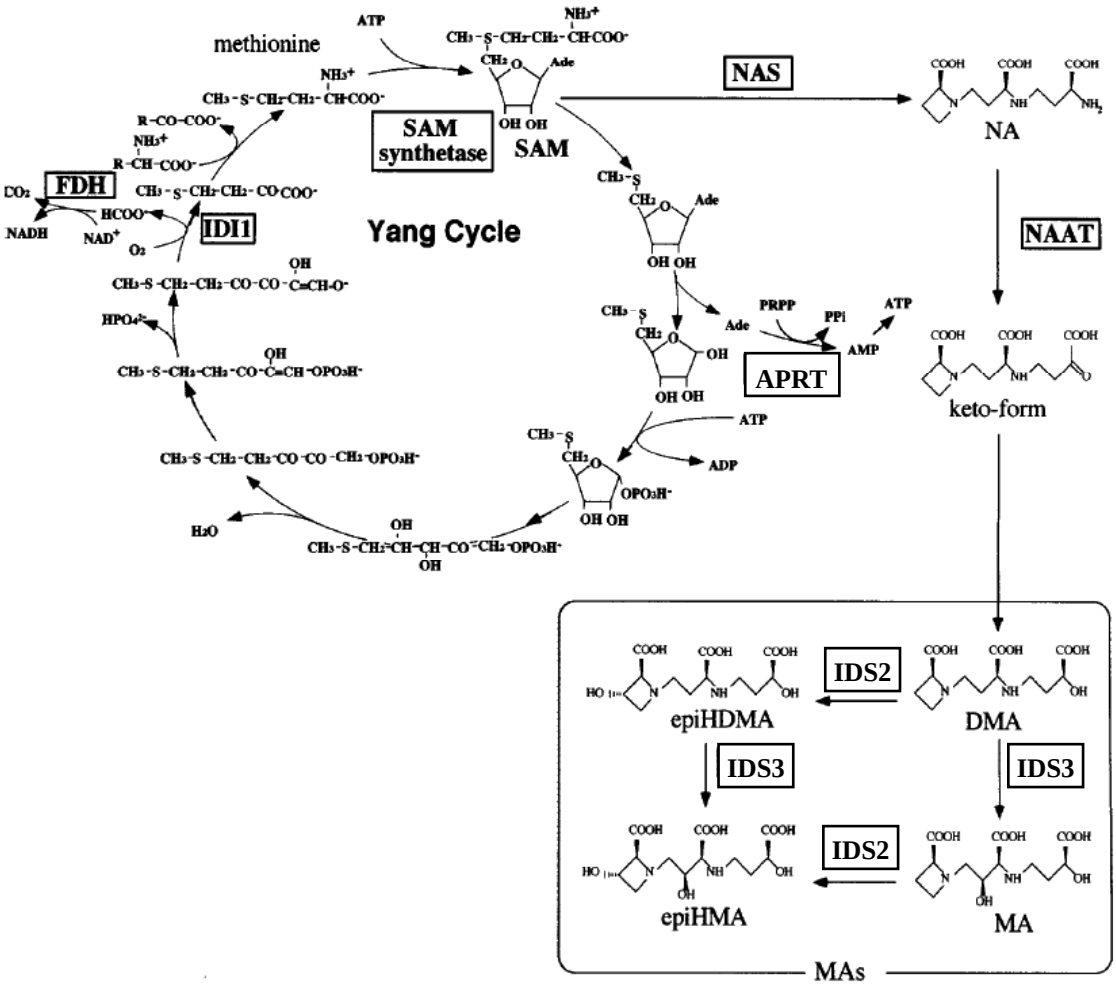

図１　ムギネ酸類の生合成経路

b.　HPT 遺伝子

HPT 遺伝子によって産出されたハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼはハイグロマイシンをリン酸化し、不活性化させることにより、ハイグロマイシン耐性を付与する。この機能を利用して HPT 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている。アレルギー性の有無に関する報告はない。

c.　β-グルクロニダーゼ遺伝子

β-グルクロニダーゼは X-GLUC (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)を加水分解し、青色に発色させる。

既知のアレルギー性タンパク質との相同性検索では、蚊(*Aedes aegyptii*)の'Allergen Aed a 2'(Accession No. AAA29348)タンパク質の連続する６アミノ酸配列'KQSYFH'と一致する部分があったが、他の検索基準において相同性は認められていない。なお、この蚊のタンパク質は雌の蚊の唾液腺に含まれており、ヒトを刺したときにヒトの血液中に分泌され、アレルギー反応を起こすと考えられている。β-グルクロニダーゼ遺伝子は、その活性を利用してレポーター遺伝子として極めて広く利用されているが、これまでにアレルギー性に関する報告はない。

d.　NPTII 遺伝子

NPTII 遺伝子はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II を産出する。カナマイシン耐性を付与する。アレルギー性の有無に関する報告はない。

③　宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

イネはムギネ酸類のうち 2'-デオキシムギネ酸のみを根圏に放出するが、鉄欠乏時でも放出量は少なく、そのためイネは鉄欠乏に弱い。オオムギは石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に対し、大量のムギネ酸類(2'-デオキシムギネ酸、ムギネ酸、3-エピヒドロキシ-2'-デオキシムギネ酸、3-ヒドロキシムギネ酸、3-エピヒドロキシムギネ酸)を根圏へと放出することで、強い鉄欠乏耐性をもつ。*APRT*遺伝子の産物による代謝系の変化は、本組換えイネ作出の目的である。一般に植物の良好な生育のためには土壌溶液中に鉄が 0.1μM から 10μM の濃度で存在する必要があり、この値以下になると植物は鉄欠乏となり、鉄欠乏に対応する遺伝子を発現させると考えられる。導入したオオムギのリボースリン酸転移酵素遺伝子(*APRT*)は *HvIDS3* プロモーターによって鉄欠乏条件下で強く発現すると考えられるので、鉄欠乏条件下で根でのムギネ酸生合成に利用された S-アデノシルメチオニンのムギネ酸類骨格へ入らなかった部分の回収を促進し、メチオニンサイクルを活発にし、基質であるメチオニンをより供給するようになると考

えられる。そのため、メチオニンから S-アデノシルメチオニン、ニコチアナミンそして 2'-デオキシムギネ酸への代謝がより大きくなり、より多くの 2'-デオキシムギネ酸を生合成し、根圏へ放出するようになると予想される。その結果、より多くの鉄を可溶化し、吸収できるようになるので、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に耐性をもつと考えられる。

（２）ベクターに関する情報

イ　名称および由来

pBIGRZ1(川崎ら BRAIN ニュース 60 号、 pp10-13、 1997)。農業生物資源研究所川崎信二博士より分譲していただいた。MCS(マルチクローニング領域)の制限酵素 *Not* I サイトにオオムギのアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子発現カセットを挿入した。

ロ　特性

①　ベクターの塩基数及び塩基配列

pBIGRZ1(川崎ら BRAIN ニュース 60 号、 pp10-13、 1997)。23,071bp。

基本は市販の植物形質転換用のベクターpBI121。これにハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)、イントロン入り β-グルクロニダーゼ遺伝子(iGUS)、Ri 複製開始点、RK2 複製開始点を導入して作成されたもの。カナマイシン、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む。比較的大きな DNA 断片(100kb を超えるようなもの)でも安定的に導入できる。

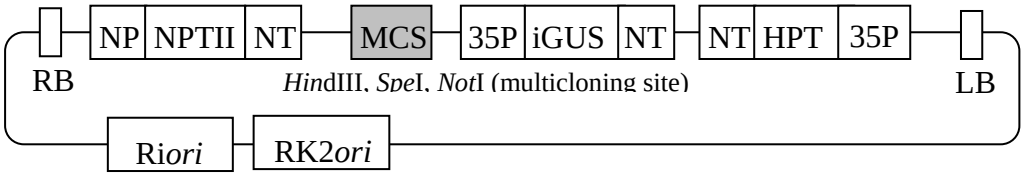

図２　pBIGRZ1 の模式図

②　特定の機能を有する塩基配列

pBIGRZ1 の骨格部分には大腸菌の複製開始領域である Ri *ori*、アグロバクテリウムの複製開始領域である RK2 *ori* が含まれる。

③　ベクターの感染性の有無

感染性は知られていない。

（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

ベクターpBIGRZ1(図２)の MCS（マルチクローニング領域）の *Not* I サイトにオオ

ムギのアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子発現カセット 3.4kb を導入したもの。

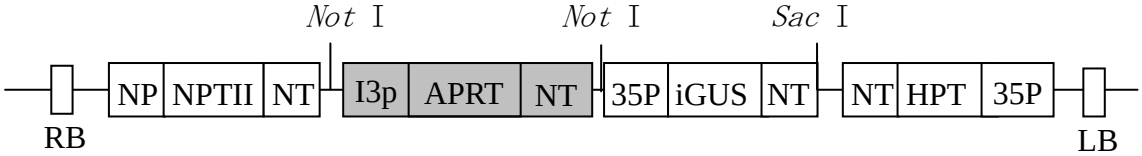

図３　I3pAPRT 用バイナリーベクター(pI3pAPRT)

LB　　レフトボーダー

RB　　ライトボーダー

NP　　nos プロモーター(0.3kb)

NPTII　ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(0.8kb)

NT　　nos 終止シグナル(0.3kb)

I3p　　オオムギ 2'-デオキシムギネ酸水酸化酵素遺伝子(*HvIDS3*)プロモーター領域(2.2kb)

APRT　オオムギアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子(0.9kb)

35P　　CaMV35S プロモーター(0.8kb)

iGUS　*Ricinus communis* カタラーゼ遺伝子第一イントロン入り GUS 遺伝子(2.0kb)

HPT　　ハイグロマイシン耐性遺伝子(1.1kb)

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

①核酸が移入された細胞の選抜の方法

pI3pAPRT を導入したアグロバクテリウム(C58 株)をイネ(品種:月の光)種子カルスに感染させ、ハイグロマイシンを含む選抜培地で核酸が移入された細胞を選抜した。

②核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存性

閉鎖系温室で栽培した組換えイネおよび非組換えイネの種子を破砕し、蒸留水に懸濁後、組換えに用いたプラスミドを持つアグロバクテリウムのみ生育できる(ハイグロマイシン、カナマイシン、リファンピシン含有)LB 培地に塗布して、アグロバクテリウムの残存性を調査した結果、アグロバクテリウムの残存性は認められなかった。

③核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収

集するために用いられた系統までの育成の経過及び系統樹

本試験に供する組換えイネ系統は、上記ロにおいて作出した幼植物(T0)を閉鎖系温室に移植して自殖により種子を得た(T1)。その種子を用いて閉鎖系温室において石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌で鉄欠乏耐性の生育検定をし、さらに自殖により種子を得た(T2)。その中で生育の良かったラインを選抜し、翌年に閉鎖系で同じく貝化石土壌で検定して自殖により種子を得た(T3)。遺伝子の存在をサザンハイブリダイゼーションで確認し、遺伝子の発現パターンをノーザン解析で調べた。T3 種子を用いてアグロバクテリウムの残存性を調べた。また T3 種子を用いて、発芽率、低温耐性、栽培後の跡地土壌での残留効果、組換えイネの有害物質生産の有無、花粉の飛散距離、組換えイネと非組換えイネとの交雑率、土壌微生物相に与える影響の有無、植物遺体の鋤込みによる環境への影響の有無を調べた。隔離ほ場での試験は T3 世代を用いて行う。

T0　→(自殖)→　T1　→(自殖)→　T2　→(自殖)→　T3

図４　組換えイネ育成の系統樹

表２　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

試験項目	系統名	I3pAPRT1			温室
	世代(T)	T1	T2	T3	
遺伝子の存在状態(サザン)		○	○	○	閉鎖系温室
(PCR)		○	○	○	
遺伝子の鉄欠乏の根での発現状態		○	○	○	閉鎖系温室
アグロバクテリウムの残存性				○	閉鎖系温室
形態および生態学的特性				○	非閉鎖系温室
花粉の稔性および直径				○	非閉鎖系温室
貝化石土壌での鉄欠乏耐性試験		○	○		閉鎖系温室
跡地土壌での残留効果				○	非閉鎖系温室
花粉の飛散距離				○	非閉鎖系温室
非組換えイネとの交雑率				○	非閉鎖系温室
生育初期における低温耐性				○	閉鎖系温室
種子の発芽率				○	閉鎖系温室
土壌微生物相に与える影響				○	非閉鎖系温室
植物遺体の鋤き込みによる影響				○	非閉鎖系温室

（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

アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え手法、用いたプラスミドの性質から移入された核酸の複製物が存在する場所は染色体上である。また、LB から RB までが導入されたと考えられる。導入遺伝子の有無は、ハイグロマイシン抵抗性、PCR 法、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子プローブを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーション法により確認した。

ロ　移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

閉鎖系温室で栽培した植物体からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。導入した遺伝子が 10kb 以上と大きいことから、*APRT* 遺伝子をプローブとした場合には正確なコピー数がわからないため、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子(HPT)をプローブとした。サザン解析では鮮明な２本のバンドが検出され、組換えイネでは２コピーが挿入されていると判断した。T1-T3 世代で、導入したオオムギのアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子(*APRT*)が特異的に増幅される PCR 分析を行った結果、すべての世代での増幅が見られた。非組換えイネでは増幅は見られなかった。

ハ　染色体に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

２コピーである。隣接しているか、離れているかの確認は行っていない。

ニ　（６）のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

自然光下で明期が 14 時間になるように補光した閉鎖系温室で、T1-T3 各世代を水耕法により鉄欠乏条件で栽培し、根から RNA を抽出して導入したオオムギのアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子(*APRT*)の cDNA をプローブとしてノーザン解析をした。すべての世代で鉄欠乏の根での遺伝子発現が観察された。また、石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌を用いて鉄欠乏耐性試験を行ったが、組換えイネは非組換えイネよりも強い鉄欠乏耐性を示した。導入遺伝子のうち、選抜マーカーのハイグロマイシン抵抗性遺伝子による抵抗性はカルスだけでなく、発芽種子においても認められた。組換えイネの選抜には本特性を利用している。カナマイシン抵抗性遺伝子、β-グルクロニダーゼ遺伝子についての発現の安定性に関しては検討していない。

ホ　ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物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

移入した核酸の産物は酵素タンパク質であり、移入した核酸はイネ核内の染色

体に存在して通常のイネ遺伝子と同様に伝達されることから、ウィルス等の感染により野生生物に伝達される恐れはない。

（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

導入遺伝子のうち、選抜マーカーの HPT 遺伝子はハイグロマイシン抵抗性を与える。この抵抗性はカルスだけでなく、発芽種子においても認められる。組換え個体の選抜維持には本特性を利用している。

導入したオオムギの *APRT* に特異的な部分配列を増幅するプライマーセットを用いて PCR 法により *APRT* 遺伝子特異的に検出及び識別可能である。

（６）宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ　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

イネはムギネ酸の分泌量が少ないために鉄欠乏に弱い。オオムギはムギネ酸類の分泌量が多く鉄欠乏に強い。アデニンリボースリン酸転移酵素は、ムギネ酸の生合成のはじめのステップである、S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する際に放出されるメチルチオアデノシンからアデニンを回収し AMP を合成する。また、メチルチオアデノシンからアデニンを回収した残りのメチルチオリボースはメチオニンサイクルによってメチオニンへと変換される。アデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子をオオムギから単離し [12]、イネに導入した。導入の際には鉄欠乏の根での発現を強化するためにオオムギの 2'-デオキシムギネ酸水酸化酵素遺伝子である *HvIDS3* のプロモーターを用いた [13,14]。導入したアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子（*APRT*）は鉄欠乏状態の根で発現した。ムギネ酸類生合成の始めのステップで出てくるメチルチオアデノシンの回収を活発にすることで、ニコチアナミンの合成量また、ムギネ酸類の基質であるメチオニンが多く作られることになり、最終的には 2'-デオキシムギネ酸の生合成量が増加すると考えられる。そして、鉄欠乏時の 2'-デオキシムギネ酸の分泌量が増加すると考えられる。また、これにより、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に対して非組換えイネよりも強い鉄欠乏耐性を示す。導入遺伝子のうち、HPT 遺伝子、NPTII 遺伝子はそれぞれハイグロマイシン抵抗性、カナマイシン抵抗性を付与する。また、GUS 遺伝子はβ-グルクロニダーゼ酵素を産生する。これらの遺伝子により組換え体の選抜及び確認ができる。

ロ　以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

①　形態及び生育の特性

非閉鎖系温室で鉄が十分にある通常の土壌(非アロフェン質黒ボク土)を用いて組換えイネ、非組換えイネを栽培し、草丈、茎数、葉色、葉齢、生育後の乾燥重を調査した。草丈、葉色、葉齢は非組換えイネと大きな差は認められなかった。移植後 75 日後に茎数の減少が見られた。同時に申請中の組換えイネ計 6 系統と非組換えイネの結果についてフィッシャーの LSD 法を用いて検定を行ったが、生育後の葉、茎及び穂の乾燥重において有意差は検出されなかった。本組換えイネの葉の乾燥重は非組換えイネに比べて減少している傾向が認められたが、本試験では反復数が少なく、統計的な有意差を検出できなかったことも考えられた。

一方、閉鎖系温室にて石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌での鉄欠乏耐性の生育検定を行った結果、草丈で非組換えイネが 50cm ほどであったのに対して、組換えイネは 80cm となり、鉄欠乏耐性を示した。

② 生育初期における低温又は高温耐性

室温(約２５℃)で発芽させ、１週間後４℃の冷蔵庫に移し，１４時間光を当てて栽培し、１ヶ月後、２８℃で栽培した。組換えイネ、非組換えイネともにすべての個体が２週間以内に枯死した。

③ 成体の越冬性又は越夏性

調査していない。

④ 花粉の稔性及びサイズ

組換えイネ、非組換えイネから花粉を採取し、顕微鏡で観察した。花粉の形状、サイズに相違は認められなかった。次に花粉を DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole)で染色し、その稔性を確認したところ、組換えイネ、非組換えイネともにほぼ 100%の花粉の稔性が認められ、組換えイネと非組換えイネで相違はないと考えられた。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠及び発芽率

穂重に統計的な有意差は認められなかった。成熟期の穂を握って脱粒性を調査したが、組換えイネ、非組換えイネどちらも難で、相違は認められなかった。発芽率は、組換えイネは播種した１０粒のうち９粒が、非組換えイネは播種した１０粒すべてが発芽した。休眠性については調査していない。

⑥ 交雑率

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

⑦ 有害物質の産生性

根から分泌され、他の植物に影響を与えるもの

組換えイネを栽培した土壌で、レタスを栽培した。根長においては、非組換えイネを栽培した土壌と有意な差は認められなかった。一方、乾物重において

は、反復数が少なく有意差は検出できなかったことが考えられた。

根から分泌され、土壌微生物に影響を与えるもの

組換えイネを栽培した土壌における土壌微生物相について調査した。対照として、非組換えイネを同一条件で栽培した土壌を用いた。土壌中に認められた細菌類、放線菌、糸状菌では統計的に有意な差は認められなかった。

植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるもの

組換えイネ、非組換えイネについて植物体を粉砕し、土壌と混合し、レタスを栽培した。30 日後のレタスの根長においては有意な差は認められなかった。一方、乾物重においては、反復数が少なく有意差は検出できなかったことが考えられた。

⑧その他

非組換えイネとの交雑性

非組換えイネとの交雑性について調べた。非閉鎖系温室にてポット栽培にて組換えイネと非組換えイネを隣接して栽培した。組換えイネから 30、60、80cm の距離に非組換えイネを配置した。扇風機を用いて空気が対流するようにした。非組換えイネから得られた種子 600 粒を、ハイグロマイシン 50mg/L を含む培地に無菌的に播種してハイグロマイシン抵抗性種子が出現するか否か発芽検定を行った。また、PCR によりハイグロマイシン遺伝子の存在確認を行った。すべての距離においてハイグロマイシン抵抗性種子の出現および、ハイグロマイシン遺伝子の PCR による増幅は認められず、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。

花粉飛散距離の検定

組換えイネの花粉の飛散距離を測定した。イネに扇風機で初速 1.4m/s の風を当て、組換えイネから 0.25、0.5、1.0、1.5, 2.0, 2.5, 3.0m の距離にスライドグラスをおいて、その上への花粉の飛散を調査した。Kolmogorov-Smirnov 検定により、組換えイネと非組換えイネの花粉の飛散距離の分布は、1%で有意に異なることがわかった。花粉は組換えイネで花粉源から 0.25m、非組換えイネで 1.0m に最も多く飛散し、3m 飛散したものもあり、最大飛散距離は 3m 以上であると考えられた。

３　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

一般にアルカリ性土壌では、植物が鉄を吸収できないために鉄欠乏に陥り、収量が非常に制限される。イネは世界の主要な穀物であるが、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に弱い。イネ科植物の鉄の吸収には「ムギネ酸類」という三価鉄のキレーターが重要な役割を担っている。鉄欠乏に強いオオムギはムギネ酸類を多量に分泌する能力を

持つ。オオムギから単離したムギネ酸類の生合成に関わる遺伝子をイネに導入することによって、ムギネ酸類分泌能力を増強し、鉄欠乏に強いイネを作る試みを行ってきた[11)]。本組換えイネも、石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌で鉄欠乏耐性を示した。そこで、隔離ほ場において、本組換えイネの石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌水田での鉄欠乏耐性検定を行う。アルカリ性の不良土壌は世界の耕地可能な土壌の約３分の１を占める。イネは石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に非常に弱いので、現在、石灰質アルカリ土壌でイネを栽培している地帯は非常に少ない。中国、オーストラリア、アメリカには広大な石灰質アルカリ土壌地帯が広がる(図５)。隔離ほ場試験の結果等を踏まえて、本組換えイネを育種母本とし、そのような石灰質アルカリ土壌が広く分布する国・地帯でも栽培可能な日本型栽培種(ジャポニカ)の品種を育成することが期待できる。

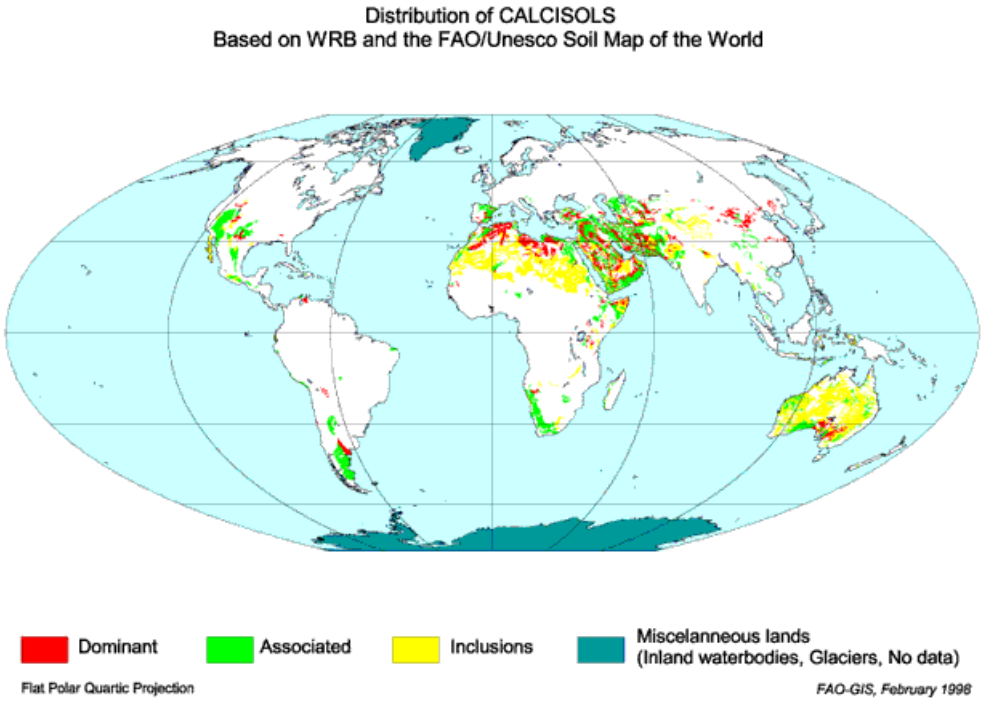

図５　世界の石灰質アルカリ土壌の分布

（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　試験ほ場：宮城県玉造郡鳴子町大口字蓬田 232-3

ロ　名称：東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター・隔離ほ場

ハ　使用期間：承認日から平成１９年３月３１日まで

ニ　隔離ほ場の施設

① 隔離ほ場施設(東西約 56m×南北約 95m)内に貝化石土壌の石灰質アルカリ土壌水田(東西 12m×南北 6m)を設定した。また、同隔離ほ場施設内に生育比較用の黒ボク土水田を設定した。

② 部外者の立ち入りを防止するために隔離ほ場全体を取り囲むように、185cm の高さで張り巡らされた 5cm メッシュのフェンスを設置している。

③ 部外者は立ち入り禁止であること、管理責任者を記載し、見やすい所に隔離ほ場の標識を掲げている。

④ 遅くとも出穂期までには防雀網を組換えイネの栽培水田を取り囲むように設置する。

⑤ 使用した機械、器具、靴などに付着した土を洗浄するための洗場を設置している。

ホ　作業要領

① 承認された組換えイネ及び比較対象のイネ品種以外の植物が石灰質アルカリ土壌水田および生育比較用の黒ボク土水田で生育することを最小限に抑える。

② 組換えイネを隔離ほ場内外に運搬する場合は、組換え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。組換えイネを保管する場合には、組換え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 隔離ほ場内で栽培したイネの残さ及び発生した植物は、試験終了後速やかに隔離ほ場内に鋤き込む、もしくは焼却することにより確実に不活化する。隔離ほ場内で栽培したイネの種子は漏出しないような容器に納め、オートクレーブにより不活化する。

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さ、土等を外に持ち出さない等により、意図せずに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に掲げる事項を使用等をする者に遵守させる。

⑦ 使用する組換えイネに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に基づき、速やかに対処する。

ヘ　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

別添の通り。

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

－

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

ための措置

別紙の「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している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

中国、オーストラリア、アメリカ等には広大な石灰質アルカリ土壌地帯が広がる。隔離ほ場試験の結果等を踏まえて、本組換えイネを育種母本とし、日本型栽培種（ジャポニカ）を育成することが期待できる。

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はわ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。

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

アデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子を導入した本組換えイネは、根から根圏に分泌される 2'-デオキシムギネ酸の量を増加させ、鉄吸収能を高めることを目的として作出されたものである。2'-デオキシムギネ酸は非組換えイネにおいても、もともと根から根圏に分泌される物質である。生育試験において用いる石灰質アルカリ土壌の一つである貝化石土壌は pH が高いため、鉄が水酸化第二鉄となって沈殿し、植物が生育しにくい土壌である。本組換えイネにおいては、導入遺伝子の発現を鉄欠乏条件で強くなるようにしてあるため、鉄欠乏条件下では、メチオニンサイクルが活発に回転するようになり、2'-デオキシムギネ酸の分泌量が増加することによって鉄の吸収能が高まり、非組換えイネよりも生育が良くなることが予想される。そのために窒素、カリウムなどの養分吸収も増え、隣接する植物の生育が阻害される可能性がある。従って、石灰質アルカリ土壌で生育させた場合には、非組換えイネよりも優位に生育することになるが、これは本組換えイネの目的とする形質である。鉄が十分に存在する黒ボク土を用いた試験では、草丈、葉色、茎数、葉齢、花粉のサイズ並びに生育後の葉、茎、及び穂の乾燥重については本組換えイネと非組換えイネとの間に大きな差異は見られなかった。また、鉄栄養が十分に存在する条件では、イネではムギネ酸類の分泌はほとんど観察されないこと、また、導入に使用した *HvIDS3* プロモーターが鉄欠乏条件のみで遺伝子発現誘導を引き起こすことから、pH が低く鉄が十分にある通常の日本の土壌環境では導入した遺伝子の発現は起こらない。従って、鉄が十分に供給される日本の通常の土壌における栽培では組換えイネは非組換えイネに対して優位性は持たないと考えられる。また、他の野生動植物に対しても、非組換えイネ以上の優位性は持たないと考えられる。

また、本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２種類の抗生物質耐性遺伝子と１種類の発現確認遺伝子を有している。抗生物質耐性遺伝子はそれぞれハイグロマイシン、カナマイシンに対する耐性を付与し、発現確認遺伝子はβ-グルクロニダーゼを発現する。しかしながら、ここで付与された抗生物質耐性等が自然環境下での競合性において優位に作用するとは考え難い。

上記を踏まえ、本組換えイネを第一種使用規程に従って使用した場合に、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、野生植物と競合することはなく、競合における優位性

において影響を受ける野生植物は特定されない。

（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

本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、競合における優位性について影響を受ける野生植物が特定されなかったことから、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

本組換えイネは、導入されたアデニンリボースリン酸転移酵素(APRT)によりニコチアナミン合成時のメチルチオアデノシンからのアデニンの回収が高まり、結果としてニコチアナミン合成量が増加するものと考えられる。ニコチアナミンは本来イネが植物体内で産出するものである。また、ニコチアナミンはイネが内在的に有しているニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)とデオキシムギネ酸合成酵素(DMAS)により 2'-デオキシムギネ酸に変換され、根から分泌される。石灰質アルカリ土壌において、本組換えイネがより多くの 2'-デオキシムギネ酸を分泌することが予想されるが、イネを含めオオムギやトウモロコシなど、イネ科植物は 2'-デオキシムギネ酸を分泌することが知られており有害性は報告されていない。イネ科植物の中でも、イネは 2'-デオキシムギネ酸の分泌量が非常に少なく、その分泌が組換えによって鉄欠乏に強いオオムギが分泌する量程度にまで増加したとしても有害性をもつとは考えにくい。

また、有害物質の産生性に係る試験について、植物体の鋤き込み実験、栽培跡地土壌での残渣残留効果試験、栽培終了時の土壌微生物相の調査において他の植物や微生物に与える影響には、本組換えイネと非組換えイネの間に大きな差異は見られなかった。本申請は隔離ほ場での栽培であり、生物多様性に影響はない。

ムギネ酸類およびその生合成系の酵素はすべてのイネ科植物に含まれており、有害性は報告されていないこと、隔離ほ場はフェンスで囲まれていること、また、出穂期以降は防雀網で試験水田を覆うことから、鳥類等の生物多様性に影響があるとは考えられない。

本組換えイネは、移入された選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子、カ

ナマイシン耐性遺伝子、β-グルクロニダーゼ遺伝子を発現し、それぞれの酵素タンパク質を生産するが、本酵素は植物、酵母やヒト培養細胞の形質転換の選択マーカーとして使用されており、生物多様性に影響を与える有害物質であるという報告はない。

上記を踏まえ、本組換えイネを第一種使用規程に従って使用した場合に、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

－

（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

本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、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、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）影響をう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。

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ず、影響を受ける可能性のある近縁野生植物として特定されるものではない。

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

（２）影響の具体的内容の評価

－

（３）影響の生じやすさの評価

－

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、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、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。

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　競合性における優位性

導入されたアデニンリボースリン酸転移酵素遺伝子によって、本組換えイネは、石灰質アルカリ土壌においては 2’-デオキシムギネ酸の分泌量が増加し、生育が優位になることが予想される。しかし、鉄が十分に存在する黒ボク土での栽培においては、本組換えイネと非組換えイネの間に競合における優位性に影響を与える形質の差異は見られなかった。従って、本組換えイネを第一種使用規程に従って使用等した場合に、競合における優位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。

２　有害物質産生性

本組換えイネに導入されたアデニンリボースリン酸転移酵素は全てのイネ科作物が有しており、有害性は報告されていない。また、導入遺伝子によって本組換えイネは、根から根圏へと 2’-デオキシムギネ酸の分泌量の増加が予想されるが、2’-デオキシムギネ酸を含めたムギネ酸類は多くのイネ科植物が分泌する物質であり、有害性は報告されていない。

本組換えイネの有害性物質の産生性に係る試験について、植物体の鋤き込み試験、栽培跡地土壌での残渣残留効果試験、栽培土壌の土壌微生物調査を閉鎖系及び非閉鎖系温室でポット試験を実施した結果、他の植物および微生物に与える影響において本組換えイネに既存のイネを超えるような差異がないことが確認された。

３　交雑性

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は、我が国には存在しない。

上記を踏まえ、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、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断する。

引用文献リスト

1) Consensus document on the biology of Oryza sativa (rice), Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 14, OECD, pp51 (1999).

2) 森島啓子、除草剤抵抗性作物を考える、植物の化学調節、35、86-94 (2000).

3) 高橋成人、イネの生物学、大月書店、pp214 (1988).

4) 西山岩男・佐竹徹夫、イネの高温による障害の研究、熱帯農業、25, 14-19 (1981).

5) 松木五樓・勝谷信一、旱害に対する二三の化学的考察（第一報）土壌水分と作物の生育、日本土壌肥料学雑誌、14、238-247 (1940).

6) 新城長有、イネにおける細胞質雄性不稔と雑種イネ育種への利用、育種学最近の進歩 25 集、98-107 (1984).

7) 星川清親、イネの生長、農山漁村文化協会 (1975).

8) 藤井義晴・澁谷知子・奥野員敏、イネ(*Oryza sativa*)のアレロパシー。-プラントボックス法によるアレロパシーを持つ可能性のあるイネの検索-、雑草研究、37(別号 1)、158-159 (1992).

9) 西田端彦・小川紹文・田中福代・藤井義晴、アレロパシー活性の高いイネの検索。-プラントボックス法に供するイネの根重の検討と品種間差の検討結果-、雑草研究、40(別号 1)、206-207 (1995).

10) Ebana K, Yan W, Dilday RH, Namai H, Okuno K (2001) Variation in the allelopathic effect of rice with water soluble extracts. *Agron J* 93: 12-16.

11) Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnol* 19: 466-469.

12) Itai R, Suzuki K, Yamaguchi H, Nakanishi H, Nishizawa NK, Yoshimura E, Mori S (2000) Induced activity of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) in iron-deficient barley roots: a possible role for phytosiderophore production. *J Exp Bot* 51: 1179-1188.

13) Nakanishi H, Yamaguchi H, Sasakuma T, Nishizawa NK, Mori S (2000) Two dioxygenase, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Mol Biol* 44: 199-207.

14) Kobayashi T, Nakanishi H, Takahashi M, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001) In vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta* 212: 864-871.

15) 藤井義晴・中谷敬子・平舘俊太郎・猪谷富雄、イネのアレロパシーの検索と抑草作用の強い「阿波赤米」の検出、雑草研究、46(別号)、120-121 (2001).