

ミラクリン産生トマト (*MIR, Solanum lycopersicum* L.) (5B) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
①和名、英名及び学名	4
②宿主の品種名又は系統名	4
③国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
①国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
②主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ. 基本的特性	5
ロ. 生息又は生育可能な環境の条件	6
ハ. 捕食性又は寄生性	6
ニ. 繁殖又は増殖の様式	6
ホ. 病原性	7
ヘ. 有害物質の産生性	8
ト. その他の情報	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ. 構成及び構成要素の由来	9
ロ. 構成要素の機能	12
(2) ベクターに関する情報	16
イ. 名称及び由来	16
ロ. 特性	16
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	17
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	17
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	17
(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	22
(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	23

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	29
(1) 使用等の内容	29
(2) 使用等の方法	29
(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	30
(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	30
(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所の 環境での使用等の結果	30
(6) 国外における使用等に関する情報	30
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	31
1. 競合における優位性	31
2. 有害物質の産生性	32
3. 交雑性	35
4. その他性質	36
第三 生物多様性影響の総合的評価	37
引用文献	40
緊急措置計画書	46
隔離ほ場試験計画書	48
別添資料リスト	69

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 1 月 26 日

農林水産大臣

山本 有二 殿

環境大臣

山本 公一 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学

学長 永田 恭介

住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号

申請者

氏名 株式会社インプラントイノベーションズ

代表取締役 高根 健一

住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番地 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	ミラクリン産生トマト (<i>MIR, Solanum lycopersicum</i> L.) (5B)
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：茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号 名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場Ⅳ(隔離ほ場) 使用期間：承認日から平成 32 年 3 月 31 日 1. 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (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見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等に付着した土、本組換えトマト植物体の残渣等を洗浄によって除去するための洗浄設備を設置しているとともに、本組換えトマト植物体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している。 (4) 本組換えトマトが、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。なお、調査、作業等のため防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再度設置する。 (5) 本組換えトマトの栽培は鉢で行い、越冬性試験以外の調査はビニルハウスを設置して行う。 2. 隔離ほ場での作業要領 (1) 本組換えトマト及び比較対照の非組換えトマト以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。 (2) 本組換えトマトを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、本組換えトマトが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトマトおよび比較対照の非組換えトマトの栽培終了後、地下部は隔離ほ場内にすき込み、果実を除く地上部は裁断後、すき込み、またはオートクレーブにより不活化する。また果実および種子は、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、意図せずに本組換えトマトが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維

	持及び管理を行う。 (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) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合には、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対応する。
--	---

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

5

① 和名、英名及び学名

和名：ナス科ナス属トマト

英名：Tomato

10 学名：*Solanum lycopersicum* L.

② 宿主の品種名又は系統名

品種 Moneymaker

15

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

ナス科ナス属におけるトマトの野生種は17種が知られている (Tomato Genetics Resource Center¹)。現在、世界的に栽培されているトマトは*Solanum lycopersicum* であり、ナス科ナス属におけるトマト野生種のうち、近縁野生種としては、栽培トマトの祖先となる*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*を含む9種が知られている (Peralta et al., 2008; 飯島, 2013; トマト大事典, 2015; 田淵, 2017)。トマトの原産地は、ペルーを原産地とする説、メキシコを原産地とする説、及びペルーとメキシコのそれぞれを独立に原産地とする説がある (Taylor, 1986)。近縁野生種を含む野生種は、ガラパゴス諸島を含む南米に分布しているが、我が国において、自然環境下で近縁野生種及び栽培トマトが野生化している例は報告されていない (新版日本原色雑草図鑑, 1980; 日本帰化植物写真図鑑, 2008; 日本帰化植物写真図鑑第2巻, 2010; トマト大事典, 2015)。

(2) 使用等の歴史及び現状

30

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

栽培トマトは食品として古くから利用されており、ペルー、エクアドル圏では有史以前から栽培化され、南欧では17～18世紀に料理用として栽培が始まった (トマト大事典, 2015)。

¹ <http://tgrc.ucdavis.edu/Wild%20species%20stock%20list-2013-v2.pdf>

日本へは18世紀の初期に導入されたが、その時点では観賞用として扱われ、明治初年に食用としての再導入があった（芦澤, 1992）。

トマトは、ナス科のモデル植物として国際研究グループのもと、トマト *S. lycopersicum* の全ゲノム構造が解明されている（Tomato Genome Consortium, 2012）。

5

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トマトは世界の様々な国で栽培されており、栽培面積は 4,688,335 ha、総生産量は約 1 億 6,343 万トンである（FAOSTAT, 2013）。主要な生産国は、生産量の上位から中国（約 5,055 万 2200 トン）、インド（約 1,822 万 7,000 トン）、アメリカ（約 1,257 万 4,550 トン）、トルコ（約 1182 万トン）、エジプト（約 853 万 3,803 トン）である（FAOSTAT, 2013）。我が国におけるトマトの栽培面積は約 12,100 ha、生産量は約 74 万 8,000 トンである（FAOSTAT, 2013）。地域別の主な生産地は、熊本県（約 11 万 4,600 トン）、北海道（約 5 万 5,200 トン）、茨城県（約 4 万 5,400 トン）、愛知県（約 4 万 4,300 トン）、千葉県（約 4 万 2,400 トン）である（農林水産省統計, 2013 年）。

栽培は露地栽培から大規模なガラスハウスによる施設栽培まで、様々な方法（促成栽培、溶液栽培など）により日本各地で行われている（トマト大事典, 2015）。栽培に要する期間は、およそ 5～6 か月程度である。栽培地の気候条件によって異なるが、播種から植付けまで約 2 か月、植付けから 2 か月程度で収穫可能となる（トマト大事典, 2015）。また、着果を確実にするため、ホルモン処理や振動受粉、マルハナバチを用いた着果促進が行われている（トマト大事典, 2015）。我が国での流通形態は、出荷量が約 67 万 500 トンであり、主に生食用として消費される（農林水産省統計, 2013 年）。輸入量は約 8,630 トン、輸出量は約 5 トンである（FAOSTAT, 2013）。

25 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

トマトは、南米熱帯地方の原産で、熱帯では多年生、温帯では一年生作物として栽培され、種子によって繁殖する。各器官は、根、茎、葉の栄養成長器官、花、果実の生殖成長器官で構成され、通常環境では主に自家受粉によって種子を形成する。茎の長さは通常 1-2 m またはそれ以上の無限伸長性であり、一本仕立てにより 1 年間栽培すると茎長は 8-10 m にも達する（トマト大事典, 2015）。葉は小葉を有する不整形の羽根複葉で、長さ 15-45 cm、5-9 枚の主小葉を着生する。花房は総状花序で、数個またはそれ以上の花を着生する。花は両性花で、黄色の合弁花冠をなし、先端 5 裂を基本形とするが、しばしば多出形をとり、ときには帯化して多弁になる。がく片数にも同様の変異があり、雌ずいも多数融合している花が

同一個体内に見られることがある。果実は漿果と呼ばれ、外果皮は薄くて柔らかく、中果皮と内果皮が水分を多く含む多肉質の柔組織である。果実は球形あるいはやや扁平になり、直径 2-10 cm、果色は桃色または橙赤色の品種が多いが、カロテノイド組成の異なる橙色や黄色などの品種も利用されている。通常、5-6 個の子室を有する。

5

ロ. 生育又は生育可能な環境の条件

- トマトの生育可能な温度は 5-40℃の範囲で、最適温度は昼気温が 25-28℃、夜気温が 15℃程度である。トマトは好陽性の作物で、照度が十分だと葉数・葉面積が増加するが、日照が不足すると生育が低下し、徒長したり、花器に異常をきたし、開花、結実が不良となり、落花を誘発することが多い。トマトの種子は休眠性がなく、越冬性があるため、栽培後のほ場および廃棄物の中から芽を出すことは知られている。トマトは比較的土質を選ばないが、根の深い作物なので、排水良く、地下水位の低いほ場が望ましく、同時に水分の供給、保水力などにも配慮が必要となる。土壌酸度に対する適応性は比較的広いが、中性に近い酸性が最も適している（トマト大事典, 2015）。
- 10
- 15

ハ. 捕食性又は寄生性

—

20

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

- 25 種子は漿果のなかに形成され自然条件下で種子のみが落下しないことから種子の脱粒、飛散の可能性は極めて低いと考えられる。果実から種子を取りだした直後でも、ほとんど休眠が見られず、発芽する。トマトの種子の寿命は気温 0-10℃、種子含水率 30%で約 4-9 年といわれている（トマト大事典, 2015）。

- 30 ② 栄養繁殖の様式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

わき芽の挿し木により繁殖できる（トマト大事典, 2015）。また、地面についた茎からも発根する。ただし、自然条件下では通常、種子繁殖により植物体を再生する。

35

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

スを生ずる特性を有する場合はその程度

トマトは主に自家受粉であるが、風媒および昆虫の媒介による他花受粉は数%以下である（岡田, 1992）。異なる地域（イタリア中央部と南部）の開放系ほ場において、植物の間隔を 0.8 m として遺伝子組換えトマトと非組換えトマトの混植栽培を行い、非組換えトマトから収穫した種子のうち約 5,000 粒について、遺伝子組換え体と交雑した種子があるかを調査した結果、交雑によって出来た種子は全くなく、自然交雑は起こりにくいことが示されている（Ilardi and Barba, 2001）。栽培種トマトと交雑が可能な近縁野生種としては、*Solanum lycopersicum* (= *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*)、*S. cheesmaniae*、*S. pimpinellifolium*、*S. chmielewskii*、*S. neorickii* (= *L. paraviflorum*)、*S. habrochaites* (= *L. hirsutum*)、*S. pennellii*、と交雑がかなり困難な 2 種 *S. peruvianum*、*S. chilense* とを合わせた 9 種あるが（トマト大事典, 2015）、我が国でこれらの近縁野生種が自生している報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トマトの花粉の生産量や稔性は栽培環境で大きく変わり、花 1 つあたりの花粉数は昼温/夜温が (28°C/22°C) で約 70 万粒、32°C/26°C で約 37 万粒となり、このうち稔性のある花粉は 28°C/22°C で約 34 万粒、32°C/26°C で約 13 万粒となっている（Pressman et al., 2002）。栽培トマトは主として自家受粉であるが、風媒および昆虫の媒介による他花受粉も起こる。自然交雑率は通常 0.5-4.0%（Rick and Butler, 1951; Tigchelaar, 1986）、20 m 離れると 2%（片岡, 1967）程度と言われている。花粉の形状は球形で、直径約 20 μm 程度である。宿主品種 Moneymaker (*S. lycopersicum*) の花粉飛散距離についての報告はないが、*S. lycopersicum* と *S. cheesmaniae* の F₁ トマトの花粉は人工風（秒速 2 m 程度）により飛散距離を計測した結果、2 m 以上飛散した花粉は全花粉の 5~10% 程度であり、ほ場内での試験では、花粉の飛散距離は 2 m 前後であったとの報告がある（市川ら, 1992）。また、ほ場にて栽培したこのトマトの花より花粉を採取し、25°C、弱光条件下で貯蔵した場合、花粉の生殖能力は 1-3 時間であった（市川ら, 1992）。

ホ. 病原性

—

35

ヘ. 有害物質の産生性

①有害生理活性物質

5 トマトには、病原菌や病害虫に抵抗性を発揮するために、糖アルカロイドのトマチンが含まれている (OECD, 2008)。トマチンは多くの種類のカビやバクテリアの増殖を阻止する働きなどが示されているだけでなく、ヒトに対するコリンエステラーゼ阻害や細胞毒性など過剰摂取すると中毒症状を引き起こすことが知られている (古井, 1997)。また、ヒトに病原性のある微生物の増殖を抑える作用もあり、幅広い作用があることが報告されている (Friedman, 2002)。トマチンは、トマトの花、茎、葉、根、果実など植物体全体で発現
10 しており、トマト未熟果に含まれるトマチン含量は無視できるレベルから 1165 mg/kg (新鮮重) と幅広く報告されているが、一般的には 20~200 mg/kg (新鮮重) である (OECD, 2008)。また、トマト完熟果においても、無視できるレベルから 23 mg/kg (新鮮重) の幅で報告があるが、一般的には約 1 mg/kg (新鮮重) である (OECD, 2008)。ペルーで栽培されているトマトは、約 30-300 mg/kg (新鮮重) のトマチンを含有しているが、中毒症状
15 なく摂取されている (OECD, 2008)。

②甘味受容体

ミラクリンはそれ自体には味はないが、味受容膜に結合し、酸によって味受容膜の構造が
20 変化することで、ミラクリンの活性中心が甘味受容部位に結合し、甘味を誘導すると考えられている (栗原, 1991)。ヒトでの甘味受容体とミラクリンの結合および甘味誘導メカニズムには、甘味受容体中の複数の特定アミノ酸が重要であることが報告されている (Sanematsu et al., 2016)。一方、昆虫も味覚受容体を持っているが、脊椎動物の味覚受容体とは進化的起源が異なることが報告されている (化学受容の科学, 2012)。

25

ト. その他の情報

—

30

35

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ミラクリンは、西アフリカ原産果樹であるミラクルフルーツ (*Synsepalum dulcificum*) の果実に含まれるタンパク質で、それ自体には甘味は無いが酸味を甘味に変える味覚修飾作用がある。しかし、ミラクルフルーツは大量に安定して栽培することは難しいことから、ミラクルフルーツ由来のミラクリンタンパク質をコードする *MIR* 遺伝子をトマトに対して遺伝子組換えを行い、果実中にミラクリンを生産、蓄積する組換えトマトを作出した。本組換えトマトは、管理区域内（第二種使用等に関する拡散防止措置等）に設置した栽培施設（温室）と加工施設において、栽培、果実収穫、洗浄、冷凍処理を行った後、乾燥粉末化（ミラクリントマト粉末）する。本組換えトマト粉末は、糖分の摂取を減らすことが出来る低カロリー代替甘味料などの食品素材として利用する。

(1) 供与核酸に関する情報

イ. 構成及び構成要素の由来

ミラクリン産生トマト（以下、「本組換えトマト」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及び機能を表 1 (P7-8) に、その塩基配列を別添資料 1 (P1-4) に示した。本組換えトマト作出に供試したプラスミドの構成図は図 3 (P15) に示した。

表 1 供与拡散の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>nptII</i> カセット		
<i>NOSpro</i>	307	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i>) 由来のノパリン合成酵素のプロモーター。植物体内で恒常的な発現を誘導する (Ebert et al., 1987)。
<i>nptII</i>	795	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) のトランスポゾン Tn5 由来のネオマイシンリン酸化酵素 II 遺伝子。本酵素は、アミノグリコシド系抗生物質 (カナマイシン等) をリン酸化して不活化する。そのため、本酵素を発現する植物細胞は、アミノグリコシド系抗生物質に耐性を示す。この機能を利用することによって、 <i>nptII</i> 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている (Shaw et al., 1993)。本組換え体の選抜に利用した。
<i>NOST</i>	256	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来のノパリン合成酵素のターミネーター。転写を終結する (Bevan et al., 1983)。
<i>MIR</i> カセット		
<i>35Spro</i>	835	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA プロモーター。植物体内での恒常的な発現を誘導する (Mitsuhara et al., 1996)。本プロモーター中に orf6 遺伝子の 3' 側の配列の一部(734bp)が含まれている。
<i>MIR</i>	663	ミラクルフルーツ (<i>Synsepalum dulcificum</i>) 由来のミラクリンタンパク質をコードする遺伝子 (AB512278) の 5'末端側の 7 塩基目の塩基が G から A に置換され、シグナルペプチド内の配列に変異が生じた遺伝子 (Masuda et al., 1995; Sun et al., 2007)。

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>NOST</i>	253	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来のノ パリン合成酵素のターミネーター。転写を終結す る (Bevan et al., 1983)。
<i>RB</i>	25	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Right-border) (Barker et al., 1983)。
<i>LB</i>	26	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Left-border) (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えトマトには存在しない)		
<i>ColE1 ori</i>	379	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド複製起点 (Oka et al., 1979)。
<i>oriV</i>	618	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド複製起点 (Cross et al., 1986)。
<i>nptIII</i>	795	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来ネオ マイシンリン酸化酵素 III 遺伝子で、抗生物質カ ナマイシン耐性を獲得する (Trieu-Cuot et al., 1983)。
<i>traF</i>	784	大腸菌の PR4 プラスミド由来のプラスミド転移 に必要な遺伝子 (Chen et al., 2003)。
<i>tetA</i>	1,184	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来のテトラサイクリ ン耐性遺伝子 (Chen et al., 2003)。
<i>tetA</i>	1,043	大腸菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (Waters et al., 1983)。
<i>trfA</i>	1,482	大腸菌由来の RK2 プラスミド由来の複製開始点 が機能するために必要な遺伝子 (Smith and Thomas, 1984)。
<i>IS1</i>	770	枯草菌由来の転移因子 (Amano et al., 1991)。
<i>kilA</i>	272	<i>Enterobacter aerogenes</i> 由来の RK2Te-r、宿主 範囲決定に関わる遺伝子 (Walter et al., 1991)。

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それぞれの機能

5

本組換えトマトの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (P7-8)に示した。

- ② 目的遺伝子及び選択マーカーの発現により産出されるタンパク質の機能および当該タンパク質がアレルギー性を有することが明らかとなっているタンパク質と相同性を有する場合はその旨

10

ミラクルフルーツ由来の *MIR* 遺伝子は、ミラクリンタンパク質を翻訳産物とする。ミラクリンタンパク質はシグナルペプチドを有し、このシグナルペプチドは細胞外へ分泌される過程で切断される。ミラクリン摂取後に酢酸やクエン酸等の酸味のあるものを食べると、酸味を甘味として感じさせる甘味誘導活性を持つ (Kurihara et al., 1968)。果実中では、ミラクリンは二量体として存在するが、不純物を含まない精製ミラクリンでは、二量体が会合し四量体を形成している。単量体のミラクリンには 7 個のシステイン残基が存在し、そのうち 6 個は分子内でジスルフィド結合し、残る 1 個は分子間でジスルフィド結合して二量体を形成する (図 1, P10) (Paladino et al., 2008)。また、四量体は糖鎖の部分で会合していると考えられている (Paladino et al., 2008)。

15

20

単量体は 191 残基のアミノ酸からなるポリペプチド鎖と全分子量 24,600 の 14% を占める糖鎖から成る (Theerasilp et al., 1989; Takahashi et al., 1990)。糖鎖は、N 末端より 42 番目及び 186 番のアスパラギン残基と結合している。単糖として、グルコサミン、マンノース、フコース、ガラクトース及びキシロースを含む。糖鎖は N-アセチルラクトサミン型であり、5 種類が同定されている (栗原, 1991)。

25

ミラクリンが酸味を甘味に変換する現象は、甘味受容体に結合したミラクリンが酸性条件下で甘味受容体を活性化することで、甘味を誘導すると考えられている (栗原, 1991)。ミラクリンは、二量体もしくは四量体を形成した時に活性を持ち、単量体では甘味誘導活性を持たない (栗原, 1991; Ito et al., 2007)。ミラクリン単量体は 2 つのヒスチジン残基を持つが、ミラクリンの甘味誘導活性には二量体ミラクリンが持つ計 4 つのヒスチジン残基が酸性条件下でプロトン化し、これにより立体構造が変化することが重要であると考えられている (Ito et al., 2007; Paladino et al., 2008)。甘味受容体は、T1R2 と T1R3 と呼ばれるタンパク質がヘテロダイマーとして機能するものであるが、ミラクリンは T1R2 の N 末のアミノ末端ドメインに結合して作用していると考えられている (Koizumi et al., 2011; Sanematsu et al., 2016)。また、アミノ末端ドメインと中間部分のシステインリッチドメインにあるヒスチジン残基をアラニン残基に個別に変異させた甘味受容体では、多くの系

30

35

統でミラクリンの活性が失われており、これらの領域にあるヒスチジン残基がミラクリンの受容体への結合および作用性に重要であることが示唆されている (Sanematsu et al., 2016)。さらに、ミラクリンの甘味誘導作用をより効果的に受容するには、細胞外の酸性化により甘味受容体のアミノ末端ドメインやシステインリッチドメイン部分のヒスチジン残基のプロトン化だけでなく、細胞内の酸性化により甘味受容体の膜貫通ドメイン部分にあるヒスチジン残基のプロトン化も重要であることが示されている (Sanematsu et al., 2016)。

ミラクリンは、中性条件において舌上の受容体に不活性型で保持され、酸により活性型に変化する。そして、pH が中性になると不活性型に戻る。一度不活性型に戻った後も受容体への結合能を維持しており、pH が酸性になる度に受容体を繰り返し活性化できる (図 2, P11) (Koizumi et al., 2011; Sanematsu et al., 2016)。

ミラクリンの効果の持続時間は、ミラクリン溶液を口に含んでいた時間にも関係するが、3 分以上であれば摂取したミラクリンの量が多いほど長いことがわかっている。ヒトの場合で 5 分間 $2.3 \times 10^{-6} \text{M}$ (高濃度) のミラクリンを口に含んだ後、10~20 分間隔でクエン酸の影響を調べると、徐々に効果は弱まるが 3 時間以上効果が持続することがわかっている。一方、 $2.0 \times 10^{-8} \text{M}$ (低濃度) の溶液では、摂取直後の甘味誘導作用も弱く、20 分後にはその効果は消失する (Kurihara and Beidler, 1969)。

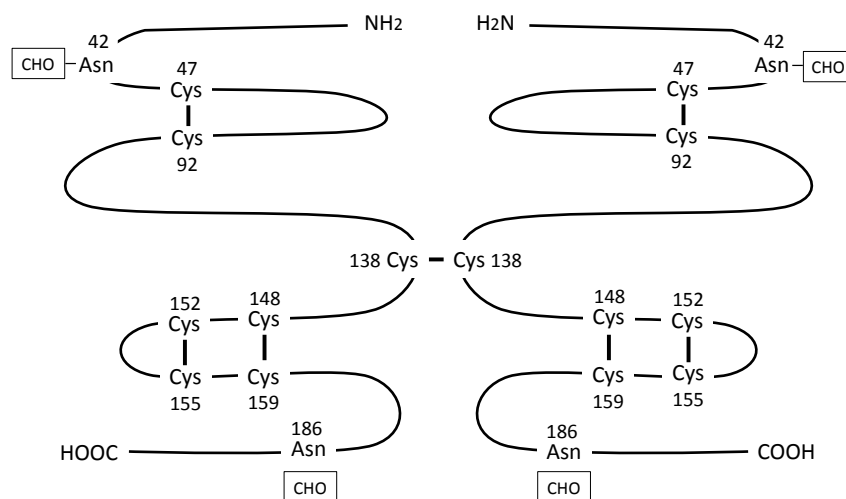


図 1. ミラクリン分子中のジスルフィド結合 (栗原, 1991)

CHO : 糖鎖

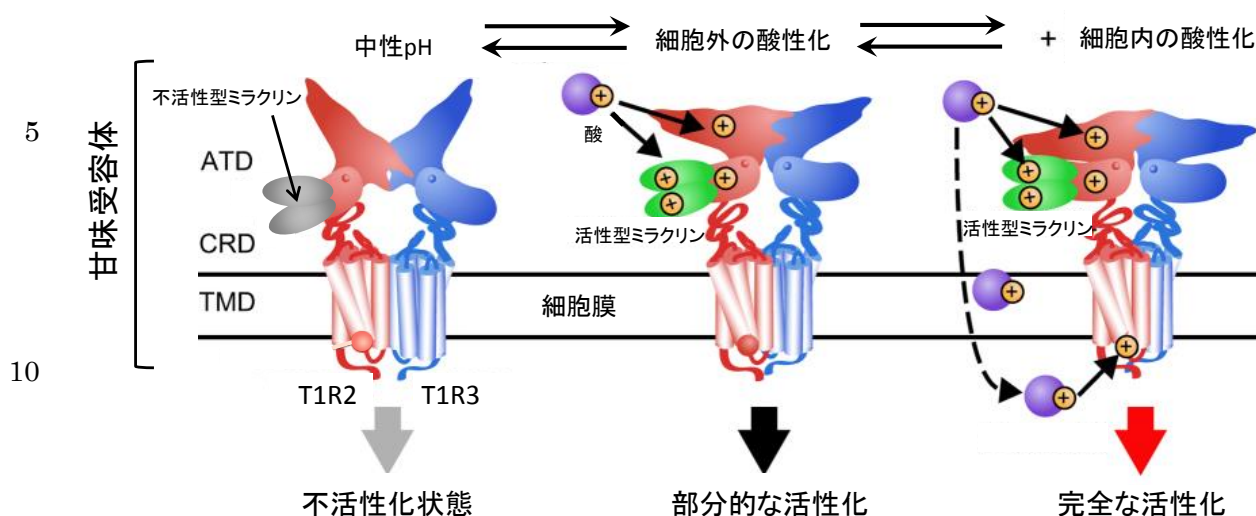


図 2. 甘味受容体とミラクリンの結合および甘味誘導作用のモデル図

(Sanematsu et al., 2016 から改変)

ATD: アミノ末端ドメイン、CRD: システインリッチドメイン、TMD: 膜貫通ドメイン

翻訳後修飾を受けたミラクリンタンパク質とアレルギー性を有するタンパク質との相同性について、Food Allergy Research and Resource Program のアレルゲン検索 version 16 (2016 年) により連続する 8 個のアミノ酸配列による相同性検索を行ったところ、成熟ミラクリンタンパク質、ミラクリンタンパク質前駆体とともに、アレルギー物質との間に構造相同性がないことが確認された。導入遺伝子供与体のミラクルフルーツによるアレルギーの報告もない。したがって、本タンパク質にアレルギー性を示す可能性は科学的な知見からは予測されない。

大腸菌由来のネオマイシンリン酸化酵素 (*nptII*) 遺伝子はカナマイシン耐性を付与するタンパク質を翻訳産物とする。アミノ酸配列を Food Allergy Research and Resource Program のアレルゲン検索データベース version 16² (2016 年) により連続する 8 個のアミノ酸配列による相同性検索を行ったところ、NPTII タンパク質はアレルギー物質との間に構造相同性がないことが確認された。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

² <http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>

ミラクリンタンパク質：

ミラクリンタンパク質を産生させた遺伝子組換えトマトと非組換えトマトを同一条件で栽培し、完熟果実（1 g）を切断した後、凍結乾燥して粉碎したサンプルを対象にして、アミノ酸（18 種類）、糖類（果糖、ブドウ糖）、脂肪酸（飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸）、ビタミン類（ β カロテン、リボフラビン、ビタミン C、葉酸など）などの一次代謝産物を GC-TOF/MS、LC-q-TOF/MS、CE-TOF/MS により網羅的に解析した。代謝解析の結果、トマトの代謝産物データベース（Lycocyc）の 84%をカバーするデータが得られ、このうちミラクリンを産生する組換えトマト（本申請組換えトマトとは別の 2 系統）は、宿主である非組換えトマトと 92%以上の代謝産物で統計学的な有意な差（有意水準 5%）が無いことが示されている（Kusano et al., 2011）。ミラクリンを産生する組換えトマトおよび同じ品種の非組換えトマトの他に、同時期に比較のため栽培した栽培品種 5 品種も同様な解析を行っており、これらのデータをまとめて代謝産物の主成分分析を行ったところ、組換えトマトと非組換えトマトの違いは、品種間の違いの差よりもはるかに小さく、一般的な栽培トマト品種間で見られる代謝産物の相違の範囲内であることが示されている（Kusano et al., 2011）。

また、ミラクリンタンパク質は、タンパク質データベース（Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank³）で解析した結果、既知酵素タンパク質との間に構造相同性が無いことが確認された。したがって、ミラクリンタンパク質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

NPTII タンパク質：

NPTII タンパク質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である（Shaw et al., 1993）。NPTII タンパク質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている（Price et al., 1974; Davies and Smith, 1978）。さらに、NPTII タンパク質の構造活性学的な検討の結果、NPTII タンパク質は基質特異性が高く、アミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化（例：水酸基を除去する、アミノ基を改変する等）により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている（Price et al., 1974）。したがって、本組換えトマト中で NPTII タンパク質が発現することにより、新規の代謝産物が生じることはないと考えられる。

³ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

(2) ベクターに関する情報

5

イ. 名称及び由来

本組換えトマトの作出に用いたプラスミドベクター (pBI-MIR) の由来は pBIN19 由来の pBI121 ベクター (クロンテック社) の GUS 遺伝子部分を *MIR* 遺伝子に置換したベクターである。pBIN19 は pBR322 を原体とし、pBR322 は、*E. coli* で汎用されるプラスミドベクターである。pBI121 の塩基配列と構成要素は別添資料 2 (P1-9) に示した。

10

ロ. 特性

15 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pBI-MIR の塩基配列は 13,531 bp であり、T-DNA 領域 (右側境界領域 RB から左側境界領域 LB) の塩基数は 4,966 bp である。T-DNA 領域の塩基配列は別添資料 1 (P 1-4) に示した。

20

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pBI-MIR は大腸菌及びアグロバクテリウムにおいてカナマイシン耐性遺伝子 (*nptIII*) を発現する。また、DNA 複製開始点 *ori* 配列を持つ 2 本鎖環状プラスミド DNA である。プラスミド全体は植物には導入されないが、LB と RB に挟まれた T-DNA 領域はアグロバクテリウムの感染により、植物のゲノム DNA 上に挿入される (図 3, P15)。

25

プラスミド pBI-MIR の CaMV35S プロモーター (*35Spro*) には *orf6* 遺伝子(完全長 1,563bp)の 3' 側一部 734bp が含まれているが、完全長の *orf6* 遺伝子は含まれていない。また、*orf6* 遺伝子は CaMV19S プロモーターから転写される 19S サブゲノム RNA から翻訳されるが、pBI-MIR には 19S プロモーターは含まれていないこと、pBI-MIR の CaMV35S プロモーターに含まれる *orf6* 遺伝子の一部は、CaMV35S プロモーターの 5' 側上流に存在することから、*orf6* 遺伝子の一部の転写及び発現は起きないと考えられる (Podevin and Jardin, 2012)。

30

35 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

本実験に供試したバイナリープラスミドベクターに感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

5

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

組換えバイナリーベクター pBI-MIR の構造を図 3 (P15) に、その塩基配列と構成要素を別添資料 1 (P1-4) に示した。そのサイズは 13,531 bp で、LB と RB に挟まれる T-DNA 領域のサイズは 4,966 bp である。宿主植物へ導入される T-DNA 領域内には、組換え体選
10 抜マーカ―を目的とした *nptII* 遺伝子と、甘味修飾タンパク質の *MIR* 遺伝子が組み込まれている。

本組換えトマトには、*MIR* 遺伝子の発現カセット及び *nptII* 遺伝子の発現カセットは完全な形で存在しているが (図 4, P16)、本組換えトマトに挿入されている配列は、LB 側から 72 bp、RB 側から 192 bp の塩基が欠損した状態で挿入されており、挿入遺伝子の全長は 4,702 bp であった。(別添資料 3, P1-4)。
15

また、挿入された *MIR* 遺伝子内の塩基配列を確認したところ、開始コドンから 3 アミノ酸残基目に 1 塩基置換が起こり、アミノ酸配列も変化していることが確認された (別添資料 3, 図 2)。本領域は、小胞体内腔へ輸送する過程で切断されるシグナルペプチドの部位
20 であることから、この 1 塩基置換によるミラクリンタンパク質の機能への影響はないと考えられる (Theerasilp et al., 1989)。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

トマト品種 MoneyMaker への *MIR* 遺伝子の導入には、Sun et al. (2006) に従いアグロバクテリウム法により行った。
25

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

30 ① 核酸が移入された細胞の選抜方法

MIR 遺伝子を含む組換えプラスミド (pBI-MIR) を保持するアグロバクテリウム GV2260 系統をトマト品種 MoneyMaker の子葉切片に感染させ、カナマイシンを含む選抜培地で培養することで選抜した (Sun et al., 2007)。組換えアグロバクテリウムが感染した子葉切片
35 をカルス誘導培地へと置床し、カナマイシンの存在下で、カルスの誘導と増殖を行った。増殖したカルスを不定芽誘導培地へと移植し、継代培養を繰返した。形成された不定芽は

カルスより切出し、発根誘導培地へと移植し、発根させた後、馴化を行った。

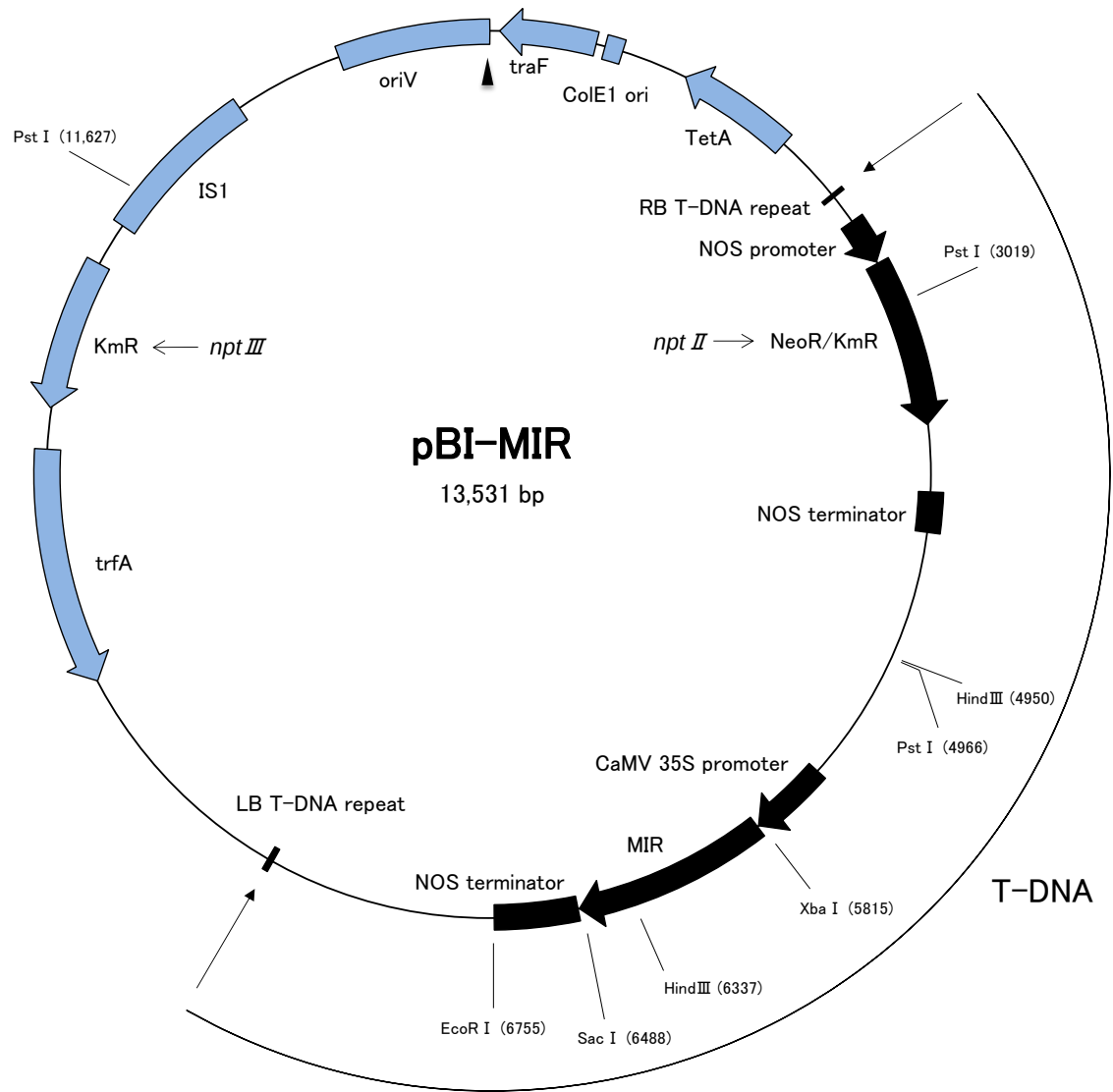


図 3. 本組換えトマト作出に用いられた pBI-MIR ベクターの構造

組換えプラスミドの T-DNA 領域は、*nptII* と *MIR* 発現カセットを含む右側境界配列 (RB) と左側境界配列 (LB) の間の配列である。構成要素の () 内の数字は、oriV の最初の塩基 (▲) を 1 とした時の位置を (bp) を表わす。

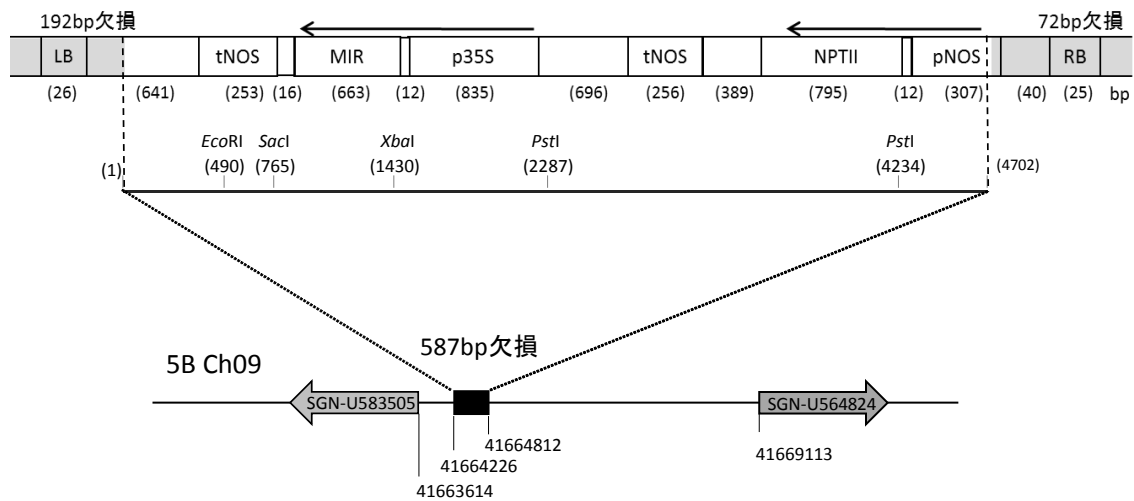


図 4. 挿入 DNA のトマトゲノム上の位置と近傍の遺伝子構造

Ch09 はトマト第 9 染色体を示す。欠損部分の数字は欠損している部分を示す。欠損しているのは、41664226 から 41664812 までとなる。tNOS は NOS terminator、p35S は CaMV 35S promoter、pNOS は NOS promoter を示す。

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の有無

除菌方法は、本組換えトマトを組織培養の選抜培地中にオーグメンチンを 375 mg/L の濃度で添加し、アグロバクテリウムの除菌を行った。その後、形質転換当代 (T_0 世代) の腋芽から栄養繁殖した無菌苗の植物体 1 株全体をすりつぶした抽出液をアグロバクテリウムの生育に影響を与えない抗生物質を含む AB 培地に塗布し、アグロバクテリウムのコロニーが形成されず増殖がないことを確認した (別添資料 5、図 3, P10)。また、本組換えトマトの展開葉からゲノム DNA を抽出し、ベクターの外側骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*nptIII* 遺伝子) を標的とした PCR 分析を行ったところ、ベクター *pBI-MIR* の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 5、図 4, P11)。また、本組換えトマト (T_2 及び T_5) の展開葉からゲノム DNA を抽出し、ベクターの外側骨格領域をカバーするように設計した 7 つのプロープによるサザンブロット解析を行った結果、いずれのプロープを用いた場合も挿入 DNA 領域由来のバンドは検出されなかった (別添資料 5、図 5-6, P12-13)。

以上の結果より、本組換えトマトには形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。

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

得られた本組換えトマトの葉から DNA を抽出し、移入された核酸の複製物の存在状態をサザンブロット法によって確認し、導入遺伝子を持つ T_0 世代の組換え植物体 14 系統を選抜した (Sun et al., 2007)。これらの植物体に導入された遺伝子の数やミラクリンの蓄積量を指標に選抜を行い本組換えトマト (5B) を選抜した。選抜した本組換えトマト (5B) を自家受粉により形質転換次世代種子 (T_1) を得た。さらに自家受粉を行い T_1 個体集団から T_2 種子を得た後、分離比により導入遺伝子のホモ、ヘテロの判定を行い本組換えトマトを得た。本組換えトマトの育成経過を図 5 (P18) に示した。承認対象の範囲は、 T_2 世代以降である。

10

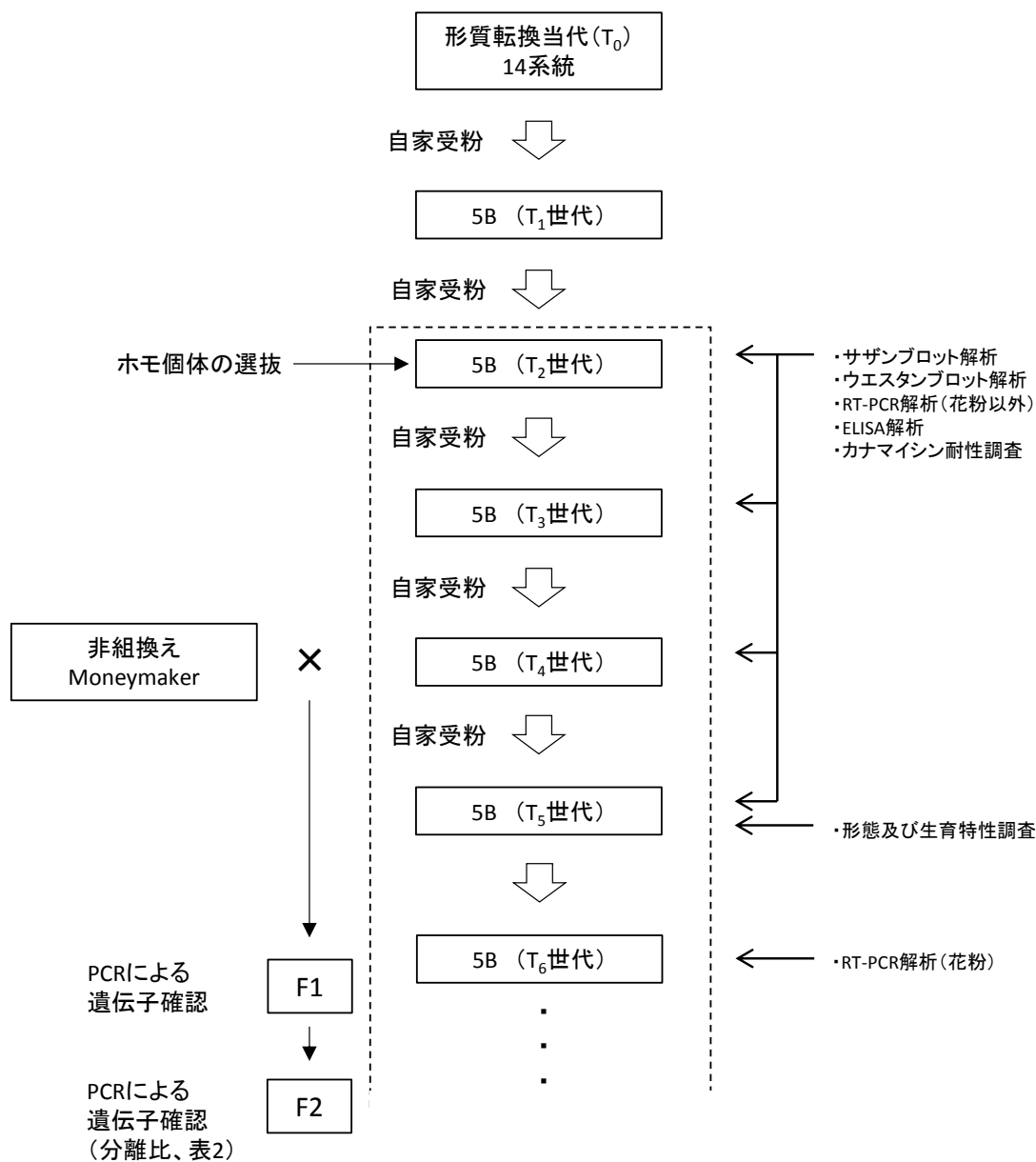


図 5. 本組換えトマトの育成過程
承認対象の範囲は T_2 世代以降であり、点線で示した

(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

① 移入した核酸の複製物が存在する場所

5 本組換えトマト (T_4 世代) を非組換えトマト品種 **MoneyMaker** と交配し、 F_1 種子を取得した。取得した F_1 個体のゲノム DNA を鋳型として PCR を行うと導入した遺伝子が全ての種子において確認された (図 5, P18)。さらに、 F_1 個体から自家受粉により F_2 種子を取得し、 F_2 個体において PCR により導入遺伝子の有無を確認すると、導入遺伝子がホモ、ヘテロで存在する個体数と、存在しない個体数について、カイ二乗検定を行うと、有意水準 5% で、観測されたデータの分布は理論値の分布 (1 : 2 : 1) と同じとする帰無仮説は棄却されなかつた (表 2, P19)。この結果から、導入遺伝子はメンデル遺伝をしているので、導入遺伝子は核ゲノム上に存在していると推察された

表 2 PCR 分析を指標とした本組換えトマトと非組換えトマト F_2 個体の導入遺伝子の分離比

調査個体数	導入遺伝子 ホモ個体	導入遺伝子 ヘテロ個体	非組換え 個体	カイ二乗値	<u>P</u> 値
212	47	100	65	3.7358	0.1544

15

また、本組換えトマトの T-DNA 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、挿入遺伝子の周辺ゲノム解析を行い、公開されているトマトゲノム配列情報との比較から、移入された核酸の複製物が第 9 染色体上の SGNU583505 と SGNU564824 の両遺伝子間の非転写領域 41,664,226 から 41,664,812 間に存在し、この挿入によって宿主のゲノム DNA が 587 bp 欠失していることを確認した (図 4, P16)。

20

② 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

25

ホモ個体を選抜した本組換えトマト (T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 世代) の芽生え植物体より、ゲノム DNA を抽出し、*MIR* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子をプローブとして、サザンブロット解析を行った。各世代間において、両遺伝子とも単一の断片として検出されたことから、挿入された *MIR* 遺伝子はゲノム上に 1 コピーであり、世代を経ても安定的に遺伝していることが明らかになった (別添資料 4, 図 1-2, P2-3)。

30

次に、挿入 DNA 領域全体をカバーするプローブを用いて、導入が確認されているトマトゲノム領域以外での挿入 DNA 領域の断片の有無について確認した (別添資料 4, 図 3-4, P4-5)。その結果、予測された以外のバンドは確認されなかった。

- ③ 染色体上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

5 —

- ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件下での個体間及び世代間での発現の安定性

10 導入した *MIR* 遺伝子の植物体内での発現について、本組換えトマト (T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 世代) の各器官 (幼葉、成熟葉、主茎、生長点、根、花全体、未熟果、緑熟果、赤熟果、過熟果、緑熟果種子及び過熟果種子) および T_6 世代の花粉をサンプルとして導入遺伝子 (*MIR* 遺伝子と *nptII* 遺伝子) に対する RT-PCR を行った。その結果、*MIR* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子は本組換えトマトの上記全世代の上記全器官で発現が確認された (別添資料 4, 図 5-7, P10-12)。

15 導入した *MIR* 遺伝子の発現について、本組換えトマト (T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 世代) の各器官のミラクリンタンパク質の蓄積量をウェスタンブロット法及び ELISA 法によって測定を行った。その結果、ミラクリンタンパク質は、果実で多く産生することが確認できた (緑熟果から過熟果で 22.2~42.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質)。さらに、世代間でミラクリン産生量に顕著な違いは認められず、安定的に *MIR* 遺伝子が発現していると考えられた (別添資料 4, 図 8-9, P12-13)。また、導入した *nptII* 遺伝子の発現について、本組換えトマトの各器官の NPTII タンパク質の蓄積量をウェスタンブロット法及び ELISA 法によって測定を行った。

20 さらに、トマト実生 (T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 世代) を用いてカナマイシン耐性評価試験を行った。その結果、世代間で蓄積量およびカナマイシン耐性に顕著な差はなく、安定的に *nptII* 遺伝子が発現していると考えられた (別添資料 4, 図 10-12, P14-16)。これらの結果から、本組換えトマトは組換え体当代から世代を経ても *MIR* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が安定していることが確認された。

- 25 ⑤ ウイルス感染その他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、当該伝達性の有無および程度

—

- (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

35

サザンブロット法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 5 µg の植物全ゲノム DNA を用いれば検出可能である（別添資料 4, 図 1-2, P2-3）。プロローブは、*MIR* 遺伝子を DIG 標識したものを、化学発光検出する。なお、PCR による検出・同定方法に関しても、10 ng 程度の植物全ゲノム DNA を用いれば検出可能である。

5 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 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または形態学的特性の具体的な内容

10 本組換えトマトはカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下で *MIR* 遺伝子を植物体全身で発現し、ミラクリントキシンタンパク質を産生する。また、選択マーカーとして導入した *nptII* 遺伝子の発現により、抗生物質カナマイシン耐性が付与されていることを、カナマイシンを添加した培地を用いて確認した。

15 ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農産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

本組換えトマトの宿主は、トマト品種 **MoneyMaker** であり、導入遺伝子は *MIR* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子である。また、第一・2・(1)・ロ・③ (P11-12) に記載のとおり、ミラクリントキシンタンパク質および NPTII タンパク質に関しては、代謝系に影響を及ぼすという報告はない。隔離ほ場試験を実施する前に、本組換えトマトの生物多様性影響に関する科学的データ等の知見を得るために、筑波大学に設置されている特定網室で、形態及び生育の特性と有害物質の産生について評価を行い、これらを含めて生物多様性影響評価を行った。

25 a 形態及び生育の特性

トマトにおける品種登録審査基準（農林水産省品種登録ホームページ）を参考に、本組換えトマトと非組換えトマトの形態調査を行った。本組換えトマト（T₅ 世代）と非組換えトマトの形態調査結果を表 3 (P22)（別添資料 5, 表 1, P1、別添資料 5, 表 2, 図 1, P3）に示した。統計解析の結果、調査した形質全てにおいて有意な差は認められなかった（種子数：*F* 検定後、Student の *t* 検定、それ以外の形質：一般化線形混合モデルで、遺伝子型を固定効果、年次を変量効果として検定、有意水準 5%）。よって、形態及び生育特性において非組換えトマトと本組換えトマト間で相違はないと考えられた。

表 3. 非組換えトマト及び本組換えトマトの形態的特性

		栽培年								
		2011年12月				2012年8月				
	単位	非組換え トマト		本組換え トマト5B		非組換え トマト		本組換え トマト5B		<i>P</i> 値 (遺伝子型の効果)
最大複葉	長さ(cm)	48.17±0.79	(n=12)	46.98±0.72	(n=20)	39.85±0.42	(n=11)	39.82±0.53	(n=12)	0.333
	幅(cm)	40.54±1.13	(n=12)	36.98±0.98	(n=20)	32.97±0.96	(n=11)	31.58±0.79	(n=12)	0.259
小葉	長さ(cm)	23.46±0.43	(n=12)	22.13±0.70	(n=20)	19.76±0.83	(n=11)	19.05±0.41	(n=12)	0.122
	幅(cm)	10.33±0.34	(n=12)	9.98±0.26	(n=20)	9.29±0.34	(n=11)	9.28±0.23	(n=12)	0.512
果実数	fruits/plant	30.00±1.77	(n=12)	29.05±1.51	(n=20)	29.57±2.94	(n=7)	33.25±1.77	(n=8)	0.805
果実重	g	91.81±2.56	(n=72)	96.19±2.89	(n=79)	73.59±2.22	(n=78)	65.96±1.96	(n=76)	0.832
果実直径	mm	56.74±0.61	(n=72)	58.42±0.63	(n=79)	51.21±0.57	(n=78)	48.72±0.55	(n=77)	0.878
種子数	seeds/fruit					63.53±4.07	(n=72)	69.24±4.40	(n=74)	0.342

各数値は平均値±標準誤差

統計解析は、種子数についてはF検定後、Studentのt検定を行い、それ以外の形質については一般化線形混合モデルで、遺伝子型を固定効果、栽培年を変量効果として行った。

5 b 生育初期における低温又は高温耐性

非組換えトマトと本組換えトマトの種子を 10・30℃の温度条件で発芽試験を行った。2012 年夏に採種し、実験開始までの約 1 ヶ月間冷蔵庫で保存した種子を、脱イオン水で湿らせた濾紙を 2 枚敷いたプラスチックシャーレに入れ実験に供した。30 種子 3 反復を各実験の供試種子数として、10℃、15℃、20℃、30℃の 4 つの一定温度条件下に置き、52 日間にわたり発芽種子数を数えた。20℃、30℃では播種後 19 日目の発芽率は、非組換えトマトでそれぞれ 100%、96%、本組換えトマトで 99%、98%であった。10℃、15℃では、播種後 19 日目の段階で全ての区で発芽が見られず、その後播種後 52 日目までの発芽率は、非組換えトマトでそれぞれ 96%、96%、本組換えトマトで 88%、91%であった。20℃、30℃での温度下での発芽率は非組換えトマトと本組換えトマトで同程度であったが、10℃、15℃では、若干本組換えトマトの発芽率が低い傾向が見られた。以上のことから、発芽適温および低温条件下での本組換えトマトの発芽特性は、非組換えトマトに対して優位性がないことが示唆された。生育初期における低温又は高温耐性試験は、本申請での隔離ほ場試験において行う予定である。

20

c 成体の越冬性又は越夏性

成体の越冬性については隔離ほ場試験において行う予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ

- 5 閉鎖系温室で生育させた、非組換えトマト及び本組換えトマトの蒴には花粉の存在が認められた。また、閉鎖系温室での栽培では花が開花する前に袋掛けを行っていたが、種子を含む果実の形成が認められたため、花粉に稔性があると考えられた。統計解析の結果、花粉の生産数、稔性及びサイズについて統計学的有意性（*F*検定後、Student の *t* 検定、有意水準 5%）は認められなかった（表 4, P23）（別添資料 5, 表 3, P4）。

10 表 4. 花粉の成熟および花粉の形態に及ぼす導入遺伝子の影響

	非組換えトマト	本組換えトマト (5 B)	<i>P</i> 値
正常花粉数 (個/μl)	1568.1 ± 186.91	1580.6 ± 168.97	0.962
正常花粉の割合 (%)	84.7 ± 3.23	80.8 ± 2.47	0.375
花粉の直径 (μm)	21.0 ± 0.47	21.3 ± 0.31	0.564

各数値は平均値±標準誤差（本組換えトマトの花粉直径n=18, その他n=16）

統計解析は*F*検定後、Studentの*t*検定で実施した。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

- 15 トマトの種子は休眠性をほとんど示さず、種子の寿命は気温 0-10℃、種子含水率 30%で約 4-9 年といわれている（第一・1・(3)・二・① (P3)）。種子の生産量について、非組換えトマト及び本組換えトマトにおいて統計学的有意差（Student *t* 検定、有意水準 5%）は認められなかった（表 3, P22）。種子の発芽率については、2012 年夏に採種し、約 1 か月間冷蔵庫で保存した種子について調査した。脱イオン水で湿らせた濾紙を 2 枚敷いたプラスチックシャーレに種子を入れ、30 種子 3 反復を供試種子数として、20℃下で 19 日間にわたり発芽種子数を数えた。その結果、種子の発芽率は非組換えトマト 100%、本組換えトマ
- 20 ト 99%であった。

f 交雑率

25

我が国には交雑可能なトマトの近縁野生種は自生していないため、本組換えトマトの交雑試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

外来遺伝子を導入することで有害物質を生産する可能性を検証するために、サンドイッチ法による試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った。サンドイッチ法による試験には、
5 2011 年 12 月に特定網室で栽培し、乾燥させた非組換えトマト及び本組換えトマトの若葉と老葉を使用した。若葉は脇芽の生長点に近い葉、老葉は完全に展開伸長した葉を利用した。葉は、乾燥後粉砕し、この粉末を 10 mL あたり 10 mg 加えた寒天培地を作製した。この培地にレタス種子を播種し、発芽率と初期の生育を調査した。レタス種子の発芽率は、非組換えトマトと本組換えトマトではともに 100%であった。発芽したレタス幼苗の生育に
10 及ぼす影響については、統計解析の結果、若葉粉末が入っている培地ではレタスの根長において非組換えトマトと本組換えトマトの間に統計学的有意差 (F 検定後、茎長は Student の t 検定、根長は Welch の t 検定、有意水準 5%) が認められた (表 5, P25) (別添資料 5, 表 4, P7)。

後作試験は、非組換えトマトと本組換えトマトを栽培した土壌を用い、レタスの発芽と
15 生育を調査した。レタス種子の発芽率は、非組換えトマト 98%と本組換えトマト 96%で同程度であった。発芽したレタス幼苗の生育に及ぼす影響について、茎長、根長を調査し、統計解析の結果、非組換えトマトと本組換えトマトの間で統計学的有意差 (F 検定後、茎長は Student の t 検定、根長は Welch の t 検定、有意水準 5%) は認められなかった (表 6, P25) (別添資料 5, 表 6, P8)。

微生物の測定は、2011 年 12 月に採集した土壌および 2012 年 8 月に採種した土壌について希釈塗布法を用いて行った。統計処理の結果、細菌数には非組換え体と本組換え体の栽培土壌の違いにおける有意差は認められなかった (F 検定後、等分散のものは Student の t 検定、非等分散のものは Welch の t 検定、有意水準 5%)。一方で、2011 年 12 月栽培土壌では放線菌、2012 年 8 月栽培土壌では糸状菌数に栽培土壌の違いにおける有意差が認めら
25 れた (それぞれ有意水準 5%、有意水準 1%)。しかし、2 回の実施の両方で有意差が見られることはなく、土壌微生物相に及ぼす影響は一致しなかった (表 7, P25) (別添資料 5, 表 7, P9)。隔離ほ場試験においても土壌微生物相について調査を行う予定である。

トマトには、病原菌や病害虫に抵抗性を発揮するために、糖アルカロイドのトマチンが含まれている (OECD, 2008)。本組換えトマトおよび非組換えトマト果実中のトマチンについてそれぞれのトマト果実を凍結乾燥処理して粉末化した後、バッファ抽出液を行い、
30 これらの抽出液 (反復 3 回) について UPLCTM-タンデム四重極型質量分析装置 (Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometer (UPLCTQS) ; Waters 社製)を用いて分析を行った。

分析した結果、非組換えトマトの未熟果では 76.2 mg/kg (新鮮重)、完熟果では 0.6 mg/kg
35 (新鮮重)、本組換えトマト未熟果では 83.4 mg/kg (新鮮重)、完熟果では 0.9 mg/kg (新鮮重)であった。この結果をトマト未熟果の文献値 20~200 mg/kg (新鮮重) 及び完熟果

の文献値約 1 mg/kg（新鮮重）（OECD, 2008）と比較すると、文献値と同等または、文献値の範囲内であった。

表 5. 寒天培地中に添加した本組換えトマトの葉がレタスの生育に及ぼす影響

葉の種類 系統	若葉			老葉		
	非組換え トマト	本組換えトマト 5B	P値	非組換え トマト	本組換えトマト 5B	P値
茎長 (mm)	5.09 ± 0.31	4.48 ± 0.21	0.095	10.23 ± 0.43	9.56 ± 0.40	0.263
根長 (mm)	3.58 ± 0.31	2.62 ± 0.12	0.001*	10.14 ± 0.31	9.55 ± 0.37	0.227

各数値は平均値±標準誤差（非組換えトマトの若葉区n=30, その他の区n=45）

統計解析はF検定後、茎長はStudentのt検定、根長はWelchのt検定で実施した。

*：有意水準1%で各測定項目の非組換えトマトと本組換えトマト間に有意差ありを示す。

5

表 6. 本組換えトマトの栽培土壌がレタスの生育に及ぼす影響

処理区		栽培した土壌に播種		
系統		非組換えトマト	本組換えトマト(5B)	P値
茎長 (mm)		11.1 ± 0.48	9.9 ± 0.57	0.095
根長 (mm)		17.2 ± 0.49	16.5 ± 0.76	0.445

各数値は平均値±標準誤差（n=45）

統計解析はF検定後、茎長はStudentのt検定、根長はWelchのt検定で実施した。

10

表 7 本組換えトマトが土壌細菌数に及ぼす影響（CFU/mg dried soil）

	2011年12月			2012年8月		
	非組換え トマト	本組換え トマト(5B)	P値	非組換え トマト	本組換え トマト(5B)	P値
糸状菌 (×10 ² CFU/mg)	3.06 ± 1.66	1.77 ± 0.06	0.175	0.08 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.007**
細菌 (×10 ⁴ CFU/mg)	9.31 ± 2.13	8.89 ± 1.55	0.862	1.34 ± 0.24	1.42 ± 0.39	0.851
放線菌 (×10 ³ CFU/mg)	6.09 ± 2.79	1.07 ± 0.62	0.016*	0.48 ± 0.05	0.38 ± 0.17	0.545

CFU: コロニーフォーミングユニット

各数値は平均値±標準誤差（n=9）

統計解析はF検定後、等分散のものはStudentのt検定、非等分散のものはWelchのt検定で実施した。

*：有意水準5%で各測定項目の非組換えトマトと本組換えトマト間に有意差ありを示す。

**：有意水準1%で各測定項目の非組換えトマトと本組換えトマト間に有意差ありを示す。

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

5 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：茨城県つくば市天王台一丁目1番1号

10

名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場Ⅳ（隔離ほ場）

使用期間：承認日から平成32年3月31日

15 イ. 隔離ほ場の施設

① 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

20 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見やすい所に掲げている。

③ 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等に付着した土、本組換えトマトの残渣等を洗浄によって除去するための洗浄設備を設置しているとともに、本組換えトマト植物体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置して
25 いる。

④ 本組換えトマトが、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。なお、調査、作業等のため防鳥網を外す場合には、できる限り短
30 時間とし、作業終了後、直ちに再度設置する。

⑤ 本組換えトマトの栽培は鉢で行い、越冬性試験以外の調査はビニルハウスを設置して行う。

35

ロ. 隔離ほ場での作業要領

- ① 本組換えトマト及び比較対照の非組換えトマト以外の植物が、隔離ほ場で生育することを、除草管理により最小限に抑える。
- 5
- ② 本組換えトマトを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、本組換えトマトが漏出しない構造の容器に入れる。
- ③ ②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトマトおよび比較対照の非組換えトマトの栽培終了後、地下部は隔離ほ場内にすき込み、果実を除く地上部は裁断後、すき込み、またはオートクレーブにより不活化する。また果実および種子は、オートクレーブにより不活化する。
- 10
- ④ 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトマトが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 15
- ⑤ 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 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。
- 20
- ⑦ 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には、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対応する。
- (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
- 25 —
- (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
- 30 緊急措置計画書を参照
- (5) 実験室等での使用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
-
- 35 (6) 国外における使用等に関する情報
-

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

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トマトは我が国において長期間の使用等の歴史があり、トマトの種子は休眠性がなく、越冬性があるため、栽培後のほ場および廃棄物の中から芽を出すことは知られている。しかし、これまで我が国において自然環境下でトマトが野生化している例は知られていない。

10

本組換えトマトと対照となる非組換えトマトの競合における優位性に関わる形質として栽培特性試験を行い、統計解析を行った結果、調査した形質全てにおいて統計学的な有意差は認められなかった（有意水準 5%）（第一・2・(6)・②・a (P21)、別添資料 5, 表 1, P1）。よって、形態及び生育特性において非組換えトマトと本組換えトマト間で相違はないと考えられた。したがって、これらの差異が競合における優位性を高めることは無いと考えられた。

15

また、本組換えトマトには形質転換体の選抜薬剤耐性遺伝子としてカナマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質に対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれているが、選抜に有効な高濃度（100 mg/L 以上）のアミノグリコシド系抗生物質が自然条件下で散布されることは想定しにくいことから、*nptII* 遺伝子の発現によるアミノグリコシド系抗生物質耐性であることが競合における優位性を高めることはないと考えられる。

20

以上のこと及び本組換えトマトが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因する生物多様性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。

25

(2) 影響の具体的内容の評価

30

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

35

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトマトは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、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考えられた。

5

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

- 10 トマトは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国も含めトマトが周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。トマトには、糖アルカロイドのトマチンが含まれている (OECD, 2008)。トマチンは病原菌や病害虫に抵抗性を発揮するだけでなく、ヒトに対するコリンエステラーゼ阻害や細胞毒性など過剰摂取すると中毒症状を引き起こすことが知られている (古井, 1997)。また、
- 15 トマチンは、トマトの花、茎、葉、根、果実など植物体全体で発現している。本組換えトマトおよび非組換えトマト果実中のトマチンについて、果実を凍結乾燥処理して粉末化した後、バッファー抽出した抽出液について UPLCTQS(Waters 社製)を用いて分析した結果、非組換えトマトの未熟果では 76.2 mg/kg (新鮮重)、完熟果では 0.6 mg/kg (新鮮重)、本組換えトマト未熟果では 83.4 mg/kg (新鮮重)、完熟果では 0.9 mg/kg (新鮮重) であった。
- 20 この結果をトマト未熟果の文献値 20~200 mg/kg (新鮮重) 及び完熟果の文献値約 1 mg/kg (新鮮重) (OECD, 2008) と比較すると、文献値と同等または、文献値の範囲内であり、通常の摂取では、これらのトマチンの含有量で中毒症状を起こす可能性はないと考えられる (第一・1・(3)・へ (P4))。

- また、本組換えトマトが産生するミラクリンタンパク質 (ミラクリンタンパク質前駆体を含む) 及び NPTII タンパク質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている (第一・2・(1)・ロ・② (P9-11))。ミラクリンタンパク質を産生させた本組換えトマトと非組換えトマトを同一条件で栽培し、一次代謝産物を網羅的に解析したところ、代謝産物に有意な差が無いことが示されている (Kusano et al., 2011)。ミラクリンタンパク質は、既知酵素タンパク質との間に構造相同性が無いことが確認されており、本タンパク質が酵素活性を示すことはないと考えられる (第一・2・(1)・ロ・③ (P11-12))。NPTII タンパク質は、基質特異性があるため、本組換えトマトの生育に影響して有害物質を生産することはないと考えられる (第一・2・(1)・ロ・③ (p11-12))。

- 35 ミラクリンを唯一含有するミラクルフルーツの果実を摂食する野生動植物に関する報告はない。同時に、ミラクリンタンパク質の野生動植物への有害性、有毒性についての報告

もないが、甘味受容体を有する動物種によって味覚を一時的に変化させる可能性はある。実際、ヒトと甘味受容体のアミノ酸配列相同性の高い（約 90%）のチンパンジー、アカゲザルはミラクリントタンパク質の作用によって酸味を好むようになることが知られている（Brouwer et al., 1993; Hellekant et al., 1998）。ミラクリンの効果の持続時間は、摂取したミラクリンの量が多いほど長いことがわかっている（Kurihara and Beidler, 1969）。ヒトの場合で 5 分間 $2.3 \times 10^{-5} \text{M}$ （高濃度）のミラクリンを口腔内に保持した後、10~20 分間隔でクエン酸の影響を調べると、徐々に効果は弱まるが 2~3 時間効果が持続することがわかっている（Kurihara and Beidler, 1969）。ただし、この結果は、積極的にミラクリンを甘味受容体に結合するよう摂食した場合であり、野生動物が摂食行動の際、トマトを数分に渡り口腔内で咀嚼するとは考えにくい。また、 $2.0 \times 10^{-8} \text{M}$ （低濃度）程度の溶液では、摂取直後の甘味誘導作用も弱く、20 分後にはその効果は消失する（Kurihara and Beidler, 1969）ことが知られている。よって、ミラクリンが甘味受容体に結合することによる甘味誘導作用は、積極的な摂取に比べ弱く、効果の持続時間も短いと考えられる。

鳥類全般および肉食や魚食の傾向が強い動物種（ネコ科、アザラシ科、アシカ科）は、甘味受容体を構成する分子を遺伝子レベルで欠損していることが知られており（Jiang et al., 2012）、ミラクリントタンパク質が味覚に作用することはない。一方で、果実なども食料とする雑食性、草食性の動物（レッサーパンダ、イヌ、フェレット、アライグマなど）は甘味受容体（ヒトの甘味受容体とのアミノ酸相同性は 75~77%）を持ち（Jiang et al., 2012）、ミラクリントタンパク質の味覚修飾作用を受ける可能性がある。しかし、上記に示したように、ミラクリンを積極的に摂食しない場合、甘味誘導作用は弱く、効果も短時間に止まる。また、甘味受容体を持っていたとしてもマウスやラットのようなげっ歯類（ヒトの甘味受容体とのアミノ酸相同性は約 70%）では、ミラクリントタンパク質によって味覚修飾作用を受けないことが知られている（Diamant et al., 1972）。これは、甘味受容体上の特定領域のアミノ酸配列の違いによってミラクリントタンパク質が結合できないためと考えられる（Koizumi et al., 2011; Sanematsu et al., 2016）。

ヒトと同じメカニズムでミラクリンの作用を受ける可能性がある動物種としては、哺乳類が最も可能性が高い。そこで、トマトを摂食する可能性があり、隔離ほ場周辺で出現する可能性のある動物種として、コウモリ目とイタチ属（環境省レッドリスト（哺乳類）より選定）の甘味受容体 T1R2 と、ヒトの T1R2 遺伝子のアミノ酸相同性を比較した結果、コウモリ目では 73~74%、イタチ属では 77%であった。また、この甘味受容体 N 末側の特定の 10 個のアミノ酸はミラクリンによる甘味誘導作用に重要であることが知られているため、これらの 10 個のアミノ酸の保存性について確認したところ、コウモリ目で 2~3 個、イタチ属で 4 個の変異が確認された。これらのアミノ酸は、1 つでも変異が生じると完全に効果を失う、もしくは変異がない場合の 30%以下に著しく効果が低下する（Sanematsu et al., 2016）。よって、ミラクリンの甘味誘導作用に重要なアミノ酸の変異が複数個存在する甘味受容体をもつコウモリやイタチ等の野生動物がミラクリンの影響を受けることはな

いと考えられる。

昆虫の味覚受容体は、脊椎動物の味覚受容体とは進化的起源が異なることから、主な花粉媒介昆虫であるセイヨウミツバチやコミツバチの味覚受容体を解析したところ、この受容体の大きさは動物の甘味受容体 **T1R2** の半分程度の大きさしかなく、相同性も認められなかった。また、トマトの主な害虫であるオオタバコガの味覚受容体でも同様に動物の甘味受容体との相同性は認められなかった。昆虫の甘味受容体と、動物の甘味受容体は、機能面では類似しているが、全く異なる遺伝子群であり、昆虫の甘味受容体には動物の甘味受容体で確認されているミラクリンの結合および甘味誘導メカニズムに必要な特定のアミノ酸の存在も確認できなかった。ミラクリンの甘味誘導メカニズムでは、ミラクリンが甘味受容体に結合することが重要であることから、昆虫の味覚受容体はミラクリンを結合することはできないと考えられる。

有害物質産生性については、サンドイッチ法による試験において本組換えトマトおよび非組換えトマトの間で統計学的有意差が認められた。本試験は、本組換え体および非組換え体のトマトの葉の乾燥粉末を培地に添加し、レタス幼苗の生育に及ぼす影響を調査したもので、茎長には有意差が認められなかったが、若葉粉末を添加している培地では根長に統計学的有意差が認められた（有意水準 5%）。老葉と比べると若葉のアレロパシー効果が高いことから、実験に供試した若葉の葉齢に影響を受けた可能性も示唆される。一方で、同時期に栽培した異なるトマト品種（桃太郎）の若葉を用いて同様なサンドイッチ法による試験を行ったところ、茎長および根長ともに、この品種と本組換えトマト（*P*値茎長 0.217、根長 0.305）、あるいは非組換えトマト（*P*値茎長 0.893、根長 0.054）の間に統計学的な有意差は認められなかった（有意水準 5%）。このため、本組換え体および非組換え体のトマトの根長で見られた有意差は、当該品種との差の範囲内であることが示された。隔離ほ場試験では、供試品種数、個体数を増やして調査する予定である。後作試験（*F*検定後、Studentの *t*検定または Welch の *t*検定、有意水準 5%）では、本組換えトマトと非組換えトマトとの間で統計学的有意差は認められなかった。

土壌微生物相試験では、本組換えトマトと非組換えトマトとの間で細菌数には有意な差は認められなかった（有意水準 5%）。一方で、2011 年 12 月栽培土壌では放線菌、2012 年 8 月栽培土壌では糸状菌数に栽培土壌の違いにおける有意差が認められた（それぞれ有意水準 5%、有意水準 1%）。しかし、2 回の試験の両方で有意差が認められることはなく、土壌微生物相に及ぼす影響は一致しなかった。土壌微生物相に及ぼす影響は、本組換えトマトと非組換えトマトとの間の違いよりも、実施時期による影響が大きいと考えられた（別添資料 5、P7-8 参照）。土壌微生物相試験については、隔離ほ場試験（ポット栽培）においての試験を予定している。

本組換えトマトは *MIR* 遺伝子が発現することにより、ミラクリントランパク質を果実及び

茎葉に産生しているが、そのことによる訪花昆虫相への影響については、隔離ほ場試験において試験を予定している。

- 5 以上のことから、本組換えトマトを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性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。

(2) 影響の具体的内容の評価

10 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

15

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

- 20 以上のことから、本組換えトマトは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

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

25

- 30 栽培種トマトと交雑が可能な近縁野生種としては、7 種 *S. lycopersicum* (= *L. esculentum* var. *cerasiforme*)、*S. cheesmaniae*、*S. pimpinellifolium*、*S. chmielewskii*、*S. neorickii* (= *L. paraviflorum*)、*S. habrochaites* (= *L. hirsutum*)、*S. pennellii*、と交雑がかなり困難な 2 種 *S. peruvianum*、*S. chilense* とを合わせた 9 種あるが、我が国でこれらの近縁野生種が自生している報告はない（トマト大事典, 2015）。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

35

(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

5

以上のことから、本組換えトマトは、交雑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された。

4. その他の性質

10

—

15

20

25

30

35

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性

5 トマトは我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国において、自然環境下でトマトが野生化している例は知られてない。

10 *MIR* 遺伝子の発現が、本組換えトマトの競合における優位性を高めるかについて、本組換えトマトと対照の非組換えトマトの競合における優位性に関わる諸形質（形態及び生育の特性；第一・2・(6)・②・a (P21)) を比較した結果、統計学的有意な差が認められた形質はなかった。

15 本組換えトマトは *NPTII* タンパク質の発現によるアミノグリコシド系抗生物質耐性を有するが、アミノグリコシド系抗生物質が散布されることが想定しにくい自然条件下において、アミノグリコシド系抗生物質耐性であることが競合における優位性を高めるとは考え難い。

20 以上のことから、本組換えトマトは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性

25 トマトは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国も含めトマトが周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。

30 また、本組換えトマトが産生するミラクリンタンパク質及び *NPTII* タンパク質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている（第一・2・(1)・ロ・② (P9-11)）。ミラクリンタンパク質を蓄積させた遺伝子組換えトマトと非組換えトマトを同一条件で栽培し、一次代謝産物を網羅的に解析したところ、代謝産物に有意な差が無いことが示されている（Kusano et al., 2011）。本組換えトマトと非組換えトマト果実に含まれる糖アルカロイドであるトマチンの含有量は、一般的なトマトの文献値の範囲内である。

35 ミラクリンを唯一含有するミラクルフルーツの果実を摂食する野生動植物に関する報告はなく、ミラクリンタンパク質の野生動植物への有害性、有毒性についての報告もない。

トマトを摂食する可能性があり、隔離ほ場周辺で出現する可能性のある動物種であるコウモリ目、イタチ属（環境省レッドリスト（哺乳類）より選定）の甘味受容体と、ヒトの受容体を比較した結果、いずれも相同性は低く（コウモリ目で 73～74%、イタチ属で 77%）、ミラクリンの甘味誘導メカニズムに重要とされる甘味受容体の特定アミノ酸が完全には保存されていないことから、コウモリやイタチ等の野生動物がミラクリンの影響を受けることはないと考えられる。また、花粉媒介昆虫であるセイヨウミツバチやコミツバチは甘味受容体を持つが、受容体のサイズは動物の甘味受容体の半分程度の大きさしかなく、相同性も認められなかったことから、昆虫の味覚受容体はミラクリンを結合することはできないと考えられる。

10

本組換えトマトは導入遺伝子の発現の結果、ミラクリンタンパク質が果実及び茎葉に産生しているが、そのことによる訪花昆虫相への影響については、隔離ほ場試験において試験を予定している。

15

有害物質産生性については、サンドイッチ法による試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、サンドイッチ法による試験において本組換えトマトおよび非組換えトマトの間で統計学的有意差が認められた。非組換えトマトおよび本組換えトマトの両方で、若葉のアレロパシー効果が高い傾向がみられることから、実験に供試した若葉の葉齢に影響を受けた可能性も示唆されたが、異なるトマト品種の若葉を用いたサンドイッチ法による試験の結果から本組換え体および非組換え体のトマトの根長で見られた有意差は、当該品種との差の範囲内であると考えられた。隔離ほ場試験では、供試個体数を増やして調査する予定である。一方で、後作試験では、本組換えトマトと非組換えトマトとの間で統計学的有意差は認められなかった。土壌微生物相試験では、本組換えトマトと非組換えトマトとの間で細菌数には有意な差は認められなかったが、2011 年 12 月栽培土壌では放線菌、2012 年 8 月栽培土壌では糸状菌数に栽培土壌の違いにおける有意差が認められた。しかし、2011 年及び 2012 年の 2 回の試験の両方で有意差が認められることはなく、土壌微生物相に及ぼす影響は一致しなかった。土壌微生物相に及ぼす影響は、本組換えトマトと非組換えトマトとの間の違いよりも、実施時期による影響が大きいと考えられた（別添資料 5, P6-8 参照）。土壌微生物相試験については、隔離ほ場試験においての試験を予定している。

30

以上のことから、本組換えトマトは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。

35 交雑性

交雑可能なトマトの近縁野生種は *S. lycopersicum* (= *L. esculentum* var. *cerasiforme*)、*S. cheesmaniae*、*S. pimpinellifolium*、*S. chmielewskii*、*S. neorickii* (= *L. paraviflorum*)、*S. habrochaites* (= *L. hirsutum*)、*S. pennellii*、*S. peruvianum*、*S. chilense* が報告されているが、これらのトマト近縁野生種が自生している例は、我が国では報告されていない。

5

以上のことから、本組換えトマトは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合評価として、本組換えトマトは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

10

引用文献

- Amano H, Sakaguchi R, Shishido K (1991) An insertion of *Escherichia coli* transposable element IS1K into the site immediately before tetracycline-resistance determinant of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA fragment in cloning in *E. coli*. FEMS Microbiol Lett 63, 5-8.
- Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Mol Biol 2, 335-350.
- Bevan M, Barnes WM, Chilton MD (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Res 11, 369-385.
- Brouwer JN (1983) The sweetness-inducing effect of miraculin – behavioral and neurophysiological experiments in the Rhesus-monkey macaca-mulatta. J Physiol 337, 221-240.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To K (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Mol Breed 11, 287-293.
- Cross MA, Warne SR, Thomas CM (1986) Analysis of the vegetative replication origin of broad-host-range plasmid RK2 by transposon mutagenesis. Plasmid 15, 132-146.
- Davies J, Smith DI (1978) Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Annu Rev Microbiol 32, 469-518.
- Diamant H, Hellekant G, Zotterman Y (1972) The effect of miraculin on the taste buds of man, monkey and rat. In: Olfaction Tast. IV, pp 241-244. Schneider D (ed) , Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MB4, Stuttgart.
- Ebert PR, Ha SB, An G (1987) Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. Proc Natl Acad Sci USA 84, 5745-5749.

- Friedman M (2002) Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem* 50, 5751-5780.
- 5 Hellekant G, Ninomiya Y, Danilova V (1998) Taste in chimpanzees. III: Labeled-line coding in sweet taste. *Physiol Behav* 65, 191-200.
- Ilardi V, Barba M (2001) Assessment of functional transgene flow in tomato fields. *Mol Breed* 8, 311-315.
- 10 Ito K, Asakura T, Morita Y, Nakajima K, Koizumi A, Shimizu-ibuka A, Masuda K, Ishiguro M, Terada T, Maruyama J, Kitamoto K, Misaka T, Abe K (2007) Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 407-411.
- 15 Jiang P, Josue J, Li X, Glaser D, Li W, Brand JG, Margolskee RF (2012) Major taste loss in carnivorous mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 4956-4961.
- Koizumi A, Tsuchiya A, Nakajima K, Ito K, Terada T, Shimizu-Ibuka A, Briand L, Asakura T, Misaka T, Abe K (2011) Human sweet taste receptor mediates
20 acid-induced sweetness of miraculin. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 16819-16824.
- Kurihara K, Beidler LM (1968) Taste-modifying protein from miracle fruit. *Science* 161, 1241-1243.
- 25 Kurihara K, Beidler LM (1969) Mechanism of the action of taste-modifying protein. *Nature* 222, 1176-1179.
- Kusano M, Redestig H, Hirai T, Oikawa A, Matsuda F, Fukushima A, Arita M, Watanabe S, Yano M, Hiwasa-Tanase K, Ezura H, Saito K (2011) Covering
30 chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. *PLOS ONE* 6, e16989.
- Masuda Y, Nirasawa S, Nakaya K, Kurihara Y (1995) Cloning and sequencing of a
35 cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. *Gene* 161, 175-177.
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Ohashi Y

- (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* 37, 49-59.
- OECD (2008) Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Tomato: Key Food and Feed Nutrients, Toxicants and Allergens. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No.17.
- Oka A, Nomura N, Morita M, Sugisaki H, Sugimoto K, Takanami M (1979) Nucleotide sequence of small ColE1 derivatives: structure of the regions essential for autonomous replication and colicin E1 immunity. *Mol Gen Genet* 172, 151-159.
- Paladino A, Costantini S, Colonna G, Facchiano AM (2008) Molecular modelling of miraculin: Structural analyses and functional hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 26-32.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S, Anderson C (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae). *Syst Bot Monogr* 84, 1-186.
- Pressman E, Peet MM, Pharr DM (2002) The effect of heat-stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann Bot* 90, 631-636.
- Podevin N, Jardin P (2012) Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. *GM Crops & Food Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 3, 296-300.
- Price KE, Godfrey JC, Kawaguchi H (1974) Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv Appl Microbiol* 18, 191-307.
- Ranc N, Munos S, Santoni S, Causse M (2008) A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (Solanaceae). *BMC Plant Biol* 8, 130.

- Rick CM, Butler L (1951) Cytogenetics of the tomato. *Adv Genet* 8, 321-322.
- Sanematsu K, Kitagawa M, Yoshida R, Nirasawa S, Shigemura N, Ninomiya Y (2016)
 5 Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor
 by miraculin. *Sci Rep*, 6:22807.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993) Molecular genetics of
 aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the
 10 aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138-163.
- Smith CA, Thomas CM (1984) Nucleotide sequence of the *trfA* gene of broad
 host-range plasmid RK2. *J Mol Biol* 175, 251-262.
- 15 Sun H-J, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation
 protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell
 Physiol* 47, 426-431.
- Sun H-J, Kataoka H, Yano M, Ezura H (2007) Genetically stable expression of
 20 functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato
 plants. *Plant Biotech J* 5, 768-777.
- Takahashi N, Hitotsuya H, Hanzawa H, Arata Y, Kurihara Y (1990) Structural study
 of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein, miraculin. *J*
 25 *Biol Chem* 265, 7793-7798.
- Taylor IB (1986) Biosystematics of the Tomato. In: *The Tomato Crop. A Scientific
 Basis for Improvement*, pp. 1-34. Atherton J, Rudich G (eds) , Chapman and Hall,
 New York.
- 30 Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajyo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y (1989)
 Complete amino acid sequence and structure characterization of the
 taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem* 264, 6655-6659.
- 35 Tigchelaar EC (1986) Tomato breeding. In: *Breeding Vegetable Crop*, pp. 135-171.
 Bassett MJ (ed) , AVI Publishing Co, New York.

- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635-641.
- 5 Trieu-Cuot P, Courvalin P (1983) Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* 23, 331-41.
- 10 Walter EG, Thomas CM, Ibbotson JP, Taylor DE (1991) Transcriptional analysis, translational analysis, and sequence of the *kilA*-tellurite resistance region of plasmid RK2Ter. *J Bacteriol* 173, 1111-1119.
- 15 Walter SH, Rogowsky P, Grinsted J, Altenbuchner J, Schmitt R (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 11, 6089-6105.
- 芦澤正和 (1992) 野菜、化学と生物 30 (11) , pp.735-742
- 飯島陽子 (2013) 野生種トマトーその多様性と利用性ー, 生物学 (91), pp.662-665.
- 20 市川裕章, 浅川征男, 鶴飼保雄 (1992) 遺伝子組換え植物の安全性評価-ウイルス抵抗性 トマトを例にして, 農林水産技術研究ジャーナル 15 (8) , pp.32-38.
- 25 岡田斉夫 (1992) 遺伝子組換えトマトの環境に対する安全性評価, 農林水産省農業環境技術研究所 解説シリーズ No.2, pp.2-14.
- 片岡節男 (1967) ナス科果菜採種の要点「蔬菜採種ハンドブック」(井上頼数 編) , 養賢堂 (東京) , pp.235-239.
- 30 栗原良枝 (1991) 甘味タンパク質および甘味誘導タンパク質, 生化学 63, pp.1340-1344.
- 新版 日本原色雑草図鑑(1980) 沼田真, 浅野貞夫, 奥田重俊, 吉沢長人, 桑原義晴, 岩瀬徹編、全国農村教育協会
- 35 田淵俊人 (2017) まるごとわかるトマト, 誠文堂新光社

古井博康, 稲熊隆博, 石黒幸雄, 木曾真 (1997) 吸光度法によるトマチンの定量, 日本農芸化学会誌, 71 (8) 777-782.

トマト大事典 (2015) 農文協編、農山漁村文化協会

5

日本帰化植物写真図鑑 (2008) 清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七 編、全国農村教育協会

日本帰化植物写真図鑑 第2巻 (2010) 植村修二, 勝山輝男, 清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七, 池原直樹 編、全国農村教育協会

10

化学受容の科学ー匂い・味・フェロモン 分子から行動までー (2012) 東原和成、化学同人

15 参考 WEB サイト

FAOSAT <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> (2016年7月5日調査)

緊急措置計画書

平成 29 年 1 月 26 日

5

氏名 国立大学法人 筑波大学
学長 永田 恭介
住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号

10

氏名 株式会社インプラントイノベーションズ
代表取締役 高根 健一
住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番地 1

15

第一種使用規程の承認を申請しているミラクリン産生トマト (*MIR, Solanum lycopersicum* L. 5B)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、科学的に認められた場合に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

(平成28年6月現在)

筑波大学	
◎	准教授
筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会 委員	
○	教授
	准教授
	教授
	教授
	准教授
	教授
	教授
	准教授
	准教授
	准教授
	教授
	教授
	教授
	准教授
	教授

	ユニット長		
株式会社インプラントイノベーションズ遺伝子組換え安全委員会 委員			
	部長	個人情報のため非開示	
	主任		
	課長		
	主任		

◎栽培試験責任者 ○管理責任者

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

- 5 管理責任者及び栽培試験責任者は、第一種使用等の状況に関し、筑波大学遺伝子実験センター及び株式会社インプラントイノベーションズ実験従事者等から常に可能な限り情報収集を行う。また、筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会は委員による査察を行う。

- 10 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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、管理責任者兼栽培試験責任者は、直ちに実験従事者に口頭で伝えるとともに、当該影響を防止するために適切な措置を講ずるものとする。

15

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

- 20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合の具体的な措置として、本組換え体の地上部および地下部は細断して隔離ほ場内にすき込み、または、細断後、オートクレーブ等で不活化する。また、果実はオートクレーブ等で確実に不活化し、隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにする。また隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を速やかに実行する。

25

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可能性が示唆された場合、弊学および弊社はそのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

30

隔離ほ場試験計画書

第一部 受容環境

- 5 1. 隔離ほ場の所在地等
- (1) 名称：筑波大学遺伝子実験センター 模擬的環境試験ほ場Ⅳ（隔離ほ場）
- (2) 住所：茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
- 10 (3) 電話番号： 029-853-6006
- (4) 地図：図 1 及び 2（p5-6）参照
2. 責任者等
- 15 (1) 隔離ほ場試験の責任者：【個人情報につき非開示】遺伝子実験センター准教授
- (2) 隔離ほ場管理責任者： 【個人情報につき非開示】遺伝子実験センター教授
3. 試験期間
- 20 承認日から平成 32 年 3 月 31 日まで
4. 施設概要
- 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、高さ 230cm のフェンス（有刺鉄線、メッシュフェンス（メッシュの大きさ、縦 110 x 横 46 mm）、コンクリート
- 25 基部）を設置している。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、見やすい所に掲げている。土、遺伝子組換え体の残渣等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、遺伝子組換え体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している（図 3、p7）。試験栽培期間中、隔離ほ場内にビニルハウスを設置
- 30 し、出入り口および側窓に防鳥網を設置する。
5. 面積
- (1) 隔離ほ場全体の面積： 851 m²
- 35 (2) 試験に使用する面積：約 18.6 m²

(3) 試験区の配置図：図 1 及び図 2 (p5-6) 参照

6. 隔離ほ場の周辺環境

(1) 隔離ほ場周辺の地形

5 隔離ほ場が位置するつくば市は、茨城県の南西部に位置し、市域の大部分は筑波・稲敷台地と呼ばれる標高 20～30 m の関東ローム層に覆われた平坦な地形であり、約 2.5 km 離れた場所には桜川があり、また南北に小貝川、谷田川、西谷田川などの河川がある。

10 (2) 土地利用状況

隔離ほ場の周辺は大学構内である。隔離ほ場の周辺構内は 6 m 以上の高さの街路樹で囲われている。また、大学の周辺は、畑、民家が散在している。隔離ほ場から半径 500 m の範囲でトマト栽培農家はなく、半径 300 m 範囲内では畑、民家もない。

15 (3) 周辺の環境保護区

隔離ほ場は、環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、自然環境保全地域等）ではない。また、最も近い自然保護地域は、水郷筑波国定公園の筑波地区および水郷地区（霞ヶ浦）であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 7 km である。

20 (4) 気象条件の平年値

① 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における気象データの平年値を表 1 (p8) に示した。

25 ② 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における過去 3 年分の気象データを表 2 (p9) に示した。

(5) 台風の襲来履歴

隔離ほ場がある関東地域への過去 10 年間の台風の接近数を表 3 (p10) に示す（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ）。

30

(6) 過去 10 年間の隔離ほ場冠水の状況

大学構内の使用予定隔離ほ場および周辺の隔離ほ場において、過去 10 年間にわたって冠水した記録はない。

35 (7) 強風による被害の状況

大学構内の使用予定隔離ほ場および周辺の隔離ほ場において、過去 10 年間にわたつ

て強風によって設備に被害を受けた記録はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

つくば市の洪水ハザードマップでは浸水が想定される区域とはなっていない。

- 5 http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/dbps_data/_material_/localhost/ken005/hazardmap-hyousi.gif
 http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/dbps_data/_material_/localhost/ken005/hazardmap-rimen.gif

- 10 つくば市の地震防災マップでは、茨城県南部を震源とするマグニチュード 7.3 の地震又はつくば市の直下を震源とするマグニチュード 6.9 の地震が起きた場合の震度は最大で震度 6 強が予想されている。

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

- 15 鳥獣の被害が考えられるが、隔離ほ場にはフェンスが設置され、ビニルハウス出入り口及び側窓には網を設置する。

7. 隔離ほ場周辺の生物相

- 20 (1) 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等
 影響を受ける可能性のある野生動物等はない

- (2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等
25 交雑可能な近縁野生種はない

8. 栽培管理

(1) 栽培履歴

- 30 新規に設置したため栽培履歴はない

(2) 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

- 35 (3) 栽培終了後の利用計画

ボランティア植物の発生を確認した場合、直ちに植物体を隔離ほ場にすき込み、またはオートクレーブ等の適切な手段で対処する。また、果実をつけている場合はオートクレーブ処理を行い確実に不活化する。なお、本遺伝子組換えトマトの栽培終了後も、本隔離ほ場では他の遺伝子組換え植物の栽培を行う予定である。

5

(4) 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

①隔離ほ場の施設

1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。隔離ほ場であること、部外者は立ち入り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見やすいところに掲げている。

10

2) 隔離ほ場で使用した、機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置するとともに、遺伝子組換え体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している。

15

3) ビニルハウスの出入り口及び側窓に防鳥網を設置する。

②隔離ほ場での作業要領

1) 組換え作物及び比較対照の作物以外の植物が隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。

20

2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬、又は保管する場合は、当該作物が漏出しない構造の容器に入れる。

25

3) 上記2)により運搬、又は保管する場合を除き、組換え作物の栽培終了後は、当該作物及び比較対照の作物を地下部は隔離ほ場内にすき込み、果実除く地上部は裁断後、すき込み、またはオートクレーブにより不活化する。また果実および種子は、オートクレーブにより不活化する。

30

4) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せず組換え作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行う。

35

6) 1) から5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

- 7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合には、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

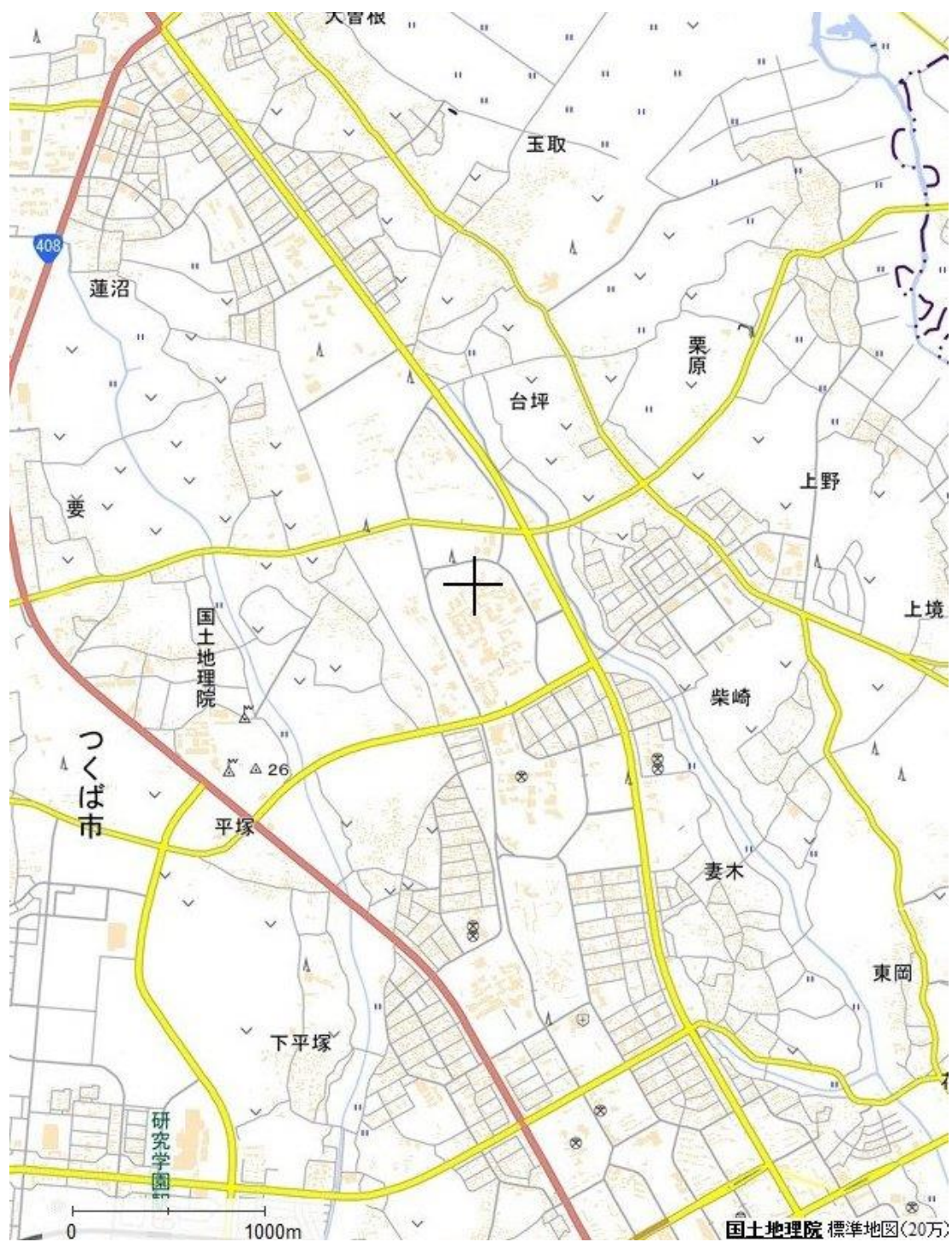


図1 隔離ほ場所在地に関する地図（国土地理院ウェブサービスより）

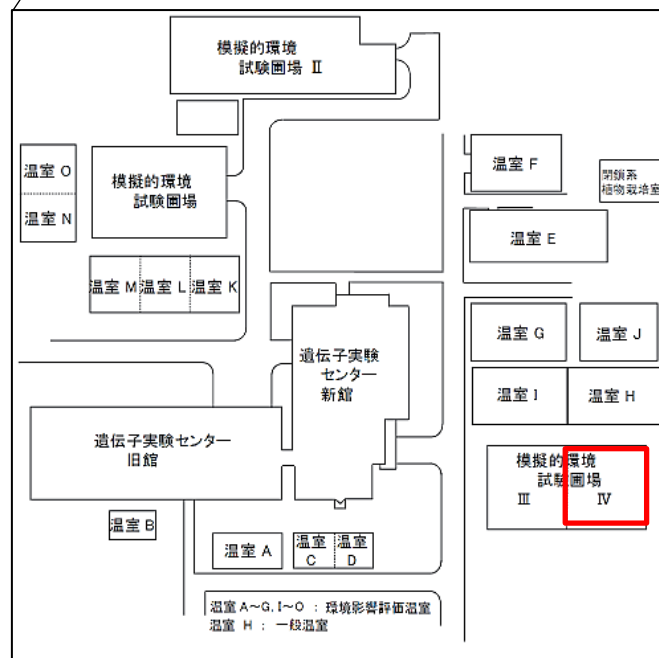


図2 遺伝子実験センターの所在および隔離ほ場の配置図



隔離ほ場外周



隔離ほ場内部



洗い場

表 1 隔離ほ場周辺における気象データの平年値

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

要素	降水量(mm)	気温(°C)			風速(m/s)・風向		日照時間(h)
	合計	平均	最高	最低	平均	最多風向	
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1990～2010	1981～2010
資料年数	30	30	30	30	30	21	30
1月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	西北西	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	西北西	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	北東	171
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	北東	173.3
5月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	東	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	東	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	東	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	東	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	北東	123.9
10月	165.9	16	20.9	11.3	2	北東	136.5
11月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	北西	146.5
12月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	西北西	181.3

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2016 年 7 月 4 日)

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&block_no=47646&year=&month=&day=&view=

表 2 隔離ほ場周辺の過去 3 年分の気象データ

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

年	月	降水量(mm)				気温(℃)					風速(m/s)					日照時間 (hr)
		合計	最大			平均			最高	最低	平均	最大		最大瞬間		
			1日	1時間	10分間	日平均	日最高	日最低				風速	風向	風速	風向	
2015	1	86	32.5	11	2.5	3.9	9.8	-1.8	16.9	-6	2.7	9.1	西北西	17.4	南西	202.6
	2	49.5	15	6.5	4	3.9	9.4	-1.3	17	-6.7	2.3	10	北西	19.7	北西	172.2
	3	81	29	7.5	2.5	8.7	14.7	2.5	22.9	-2.5	2.5	9.9	西北北西	19.2	西北北西	200.6
	4	91	21	6	3.5	13.1	18.8	7.4	28.8	1	2.6	9.8	南	18.9	南南西	161.6
	5	96.5	47	36.5	8	19.4	25.2	13.4	29.3	5.4	2.5	10.8	南南西	20.1	西南西	245.7
	6	172.5	49	41.5	15	21.1	25.8	16.9	30.7	11.4	2.1	7.7	北西	14.8	西北北西	134.6
	7	193	50.5	41.5	18.5	25.4	29.6	21.9	34.8	17.4	2.3	9.4	南	16	南	185.5
	8	100.5	58.5	57.5	20.5	25.6	29.8	22.5	36.1	18	2.3	6.2	東	12.7	北	146.1
	9	360	140	43.5	11	21.6	25.5	18.3	31.2	10.8	2.1	6.6	南南西	13.8	東南東	117.4
	10	44	15	12	4	16.7	21.8	11.7	28.1	3.4	2.3	11	南南西	21.9	南南西	199
	11	148.5	37	10	3.5	12.5	16.9	8	21.6	0.2	1.9	6.8	西北北西	13.8	西	118.7
	12	40.5	29	10.5	3	7.2	13	1.4	24.4	-4.7	1.8	9.8	南	21.7	南	174.9
2014	1	24	15.5	3.5	1	2.8	9.6	-3.6	14.9	-7.5	2	8.9	北西	17.3	西北北西	220.8
	2	163	110	23.5	8.5	3.5	9.1	-2.1	19.4	-7.7	2.3	9.3	東北東	21	北東	158
	3	86.5	24	15.5	9	8.1	14	1.8	23	-5.3	2.7	10.8	南	19.6	西	213.1
	4	146	52	10.5	3	12.8	19.1	6.6	25	0	2.5	8	北西	16.8	西北北西	227.7
	5	111.5	42.5	10.5	4.5	18.2	24.3	12.1	31.1	6.1	2.6	10.2	南	18	南	240.3
	6	332	71.5	23	14.5	21.8	26	18.3	32.3	15.2	2.3	6.5	北東	15.2	東北東	151.3
	7	97	23	12	8	25	29.8	21	35.1	17.6	2.1	8.9	南南西	15.3	南南西	188.5
	8	169.5	37	30.5	9.5	25.8	30.6	22.1	36.2	17.6	2.6	9.6	南南西	17.5	南南西	174.8
	9	88	32.5	10.5	6	20.9	25.5	16.7	30.5	10.6	2.1	5.9	東北東	10.9	東北東	166
	10	300	131.5	30	8	16.5	21.8	11.7	30.4	4.2	2.1	9.5	南	16.8	南	144.1
	11	65.5	24.5	4.5	1.5	11.3	16.6	6.3	21.4	-0.4	1.8	7.3	北北西	15.1	北北西	130.4
	12	59	15.5	6.5	1.5	4.1	10.1	-1.5	14.1	-6.9	2.1	9.7	西北北西	20.1	西	196.2
2013	1	49	40.5	6.5	1.5	2.4	8.9	-3.4	14.3	-7.3	2.2	9.6	西北北西	16.5	北西	218.7
	2	31.5	14	4.5	1	3.5	9.4	-2.3	18.5	-7.6	2.5	10.6	北西	19.5	西北北西	181.6
	3	45	11.5	9	2.5	10	16	3.7	26.6	-2.6	3.1	15.1	南南西	27.7	南南西	187.1
	4	167.5	43.5	15	10.5	12.8	18.5	6.3	24.2	-0.2	3.2	12.2	南南西	22.2	南西	202.4
	5	81.5	21	10	5	17.3	23.3	11.6	28.6	1.7	2.6	7.8	南	13.3	南	243.9
	6	138	45.5	15.5	6.5	20.9	25.3	17.5	29.6	10.8	2.3	7.7	南南西	13.8	南西	126.1
	7	45.5	25.5	22.5	12.5	24.9	29.9	21.1	36.3	17.1	2.4	7.2	南南西	15.3	北北西	170.7
	8	70.5	29.5	19	10	27.2	32.6	22.7	36.8	18.4	2.2	6.8	南南西	14.4	北東	221.4
	9	175	74	22.5	11.5	22.9	27.8	18.3	35.2	9	2.4	12.2	南南西	22.9	南南西	172.3
	10	417	124.5	27	8	17.8	22.2	13.8	30.4	5.1	2.4	14.5	北北西	28.1	北北西	122.6
	11	16	7	4.5	1.5	9.8	16.6	3.8	21.2	-1.9	1.8	8.2	南南西	19.1	南南西	185.3
	12	45.5	17.5	4	2	4.8	11.2	-1	16.2	-5.6	2.2	9.3	南南西	17.3	西	192.7

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2016 年 7 月 4 日)

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2013&month=&day=&view=p1
http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2014&month=&day=&view=p1

10

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2015&month=&day=&view=p1

表 3 関東地域への過去 10 年間の台風の接近数

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			3
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			5
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3

台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合とする。接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ、アクセス 2016 年 7 月 4 日)

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

第二部 隔離ほ場での試験計画

隔離ほ場での遺伝子組換えトマト生物多様性影響評価試験の研究調査項目として、次の 5 項目を予定している。また、特定網室における調査結果との関連は表 1 (P4・5) に記載した。

5

(1) 花の形態及び花色に関する調査

(2) 形態及び生育特性に関する調査

(3) 越冬性に関する調査

(4) 訪花昆虫相に関する調査

10 (5) 有害物質の産生性に関する調査

それぞれの項目についての実験計画は以下のとおりである。

(1) 花の形態及び花色に関する調査

目的：遺伝子組換えトマトの花の形態及び花色の安定性を調査する。

15 場所：隔離ほ場のビニルハウス

数量：宿主及び遺伝子組換えトマト、各 30 株

実施方法：宿主及び遺伝子組換えトマトを鉢に定植してビニルハウスで栽培し、目視による花卉の形態の調査及びカラーチャートとの比較による花色の調査し、比較する。

20 (2) 形態及び生育特性に関する調査

目的：遺伝子組換えトマトの形態及び生育特性（生育初期の低温・高温耐性を含む）について調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニルハウス

数量：宿主及び遺伝子組換えトマト、各 30 株。試験（1）と兼ねる。

25 実施方法：宿主及び遺伝子組換えトマトを鉢に定植してビニルハウスで栽培し、開花時期、植物体の長さ、花序の数、花序の型、葉の大きさ、花の大きさ、果実重などを調査し、比較する。

(3) 越冬性に関する調査

30 目的：遺伝子組換えトマトの越冬性を宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニルハウス及び屋外

数量：宿主及び遺伝子組換えトマトともに、各群 5 株。

実施方法：宿主及び遺伝子組換えトマトの苗を鉢に定植して隔離ほ場のビニルハウス及び屋外で栽培し、冬期間或いは夏期間における植物体地上部の状態を比較する。

35

（４）訪花昆虫相に関する調査

目的：遺伝子組換えトマトへの訪花昆虫相を調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニルハウス

数量：宿主及び遺伝子組換えトマト、各 10 株。試験（１）と兼ねる。

- 5 実施方法：晴天微風日を選び、ビニルハウスの出入り口を開放し、鉢に定植した宿主及び遺伝子組換えトマトに訪花する昆虫の採集と行動観察を行い、訪花昆虫の同定を行う。

（５）有害物質の産生性に関する調査

- 10 目的：遺伝子組換えトマトの有害物質の産生性を調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニルハウス

数量：宿主及び遺伝子組換えトマト、各 5 株。

- 15 実施方法：宿主及び組換えトマトを鉢に定植して隔離ほ場のビニルハウスで栽培し、残渣は土壌中にすき込むことによる種子の発芽への影響を調査する。また、宿主及び組換えトマトの栽培土壌が種子の発芽へ与える影響及び微生物に与える影響を調査する。

表1 組換えトマト（5B）の生物多様性影響評価における調査項目の概要

調査項目	特定網 室試験	隔離ほ 場試験	調査方法	結果の概要 (特定網室)
1. 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並びに染色体上に複数コピーが存在している場合には、隣接しているか離れているかの別	○ ○		サザンブロット法により解析した。 種子繁殖によって増殖した個体における世代間の安定性を確認した。	移入された核酸は組換え体ゲノム中に1コピー存在した。 組換え体当代と種子繁殖個体間に、差異は認められなかった。
2. 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について、自然条件下での個体間及び世代間での安定性	○ ○		RT-PCR 法及びウェスタンブロット法により解析した。 種子繁殖によって増殖した個体間におけるその安定性を確認した。	移入された遺伝子は組換え体中で安定的に発現し、種子繁殖個体でも安定して発現していた。
3. 花色の安定性	○	●	目視による観察、カラーチャートとの比較により調査した。 隔離ほ場における花色の安定性を調査予定。	組換え体の花色は黄色で安定していた。
4. 形態の特性	○	●	花序の数、花序の型、葉の大きさ、花の大きさ、果実重等を調査した。 隔離ほ場における形態特性を調査予定。	宿主と組換え体間で統計学的な有意差は認められなかった。

5. 生育の特性		●	隔離ほ場における生育特性を調査予定。	
6. 成体の越冬性		●	隔離ほ場における越冬性を調査予定。	
7. 花粉の稔性	○	●	酢酸カーミン染色により花粉の充実度を調査した。 花粉の充実度を調査予定。	稔性は認められた。
8. 花粉のサイズ	○	●	花粉サイズを調査した。 花粉サイズを調査予定。	宿主と組換え体間で統計学的有意差は認められなかった。
9. 有害物質の産生性 ・ サンドイッチ試験 ・ 後作試験 ・ 土壌微生物相試験	○ ○ ○	● ● ●	植物残渣を培地中に包埋することによる種子の発芽への影響について調査した。 隔離ほ場における植物残渣を土壌中にすき込むことによる種子の発芽への影響について調査予定。 植物栽培土壌における種子の発芽への影響について調査した。 隔離ほ場における植物栽培土壌における種子の発芽への影響について調査する。 植物栽培土壌中の土壌微生物を希釈平板法により調査した。2年間（回）。 隔離圃場における植物栽培土壌中の土壌微生物を希釈平板法により調査する。	宿主と組換え体間で若葉のサンドイッチ法による試験において統計学的有意差が認められた。 宿主と組換え体間で差異は認められなかった。 宿主と組換え体間で糸状菌数、放線菌数でそれぞれ単回試験で統計学的有意差が認められた。

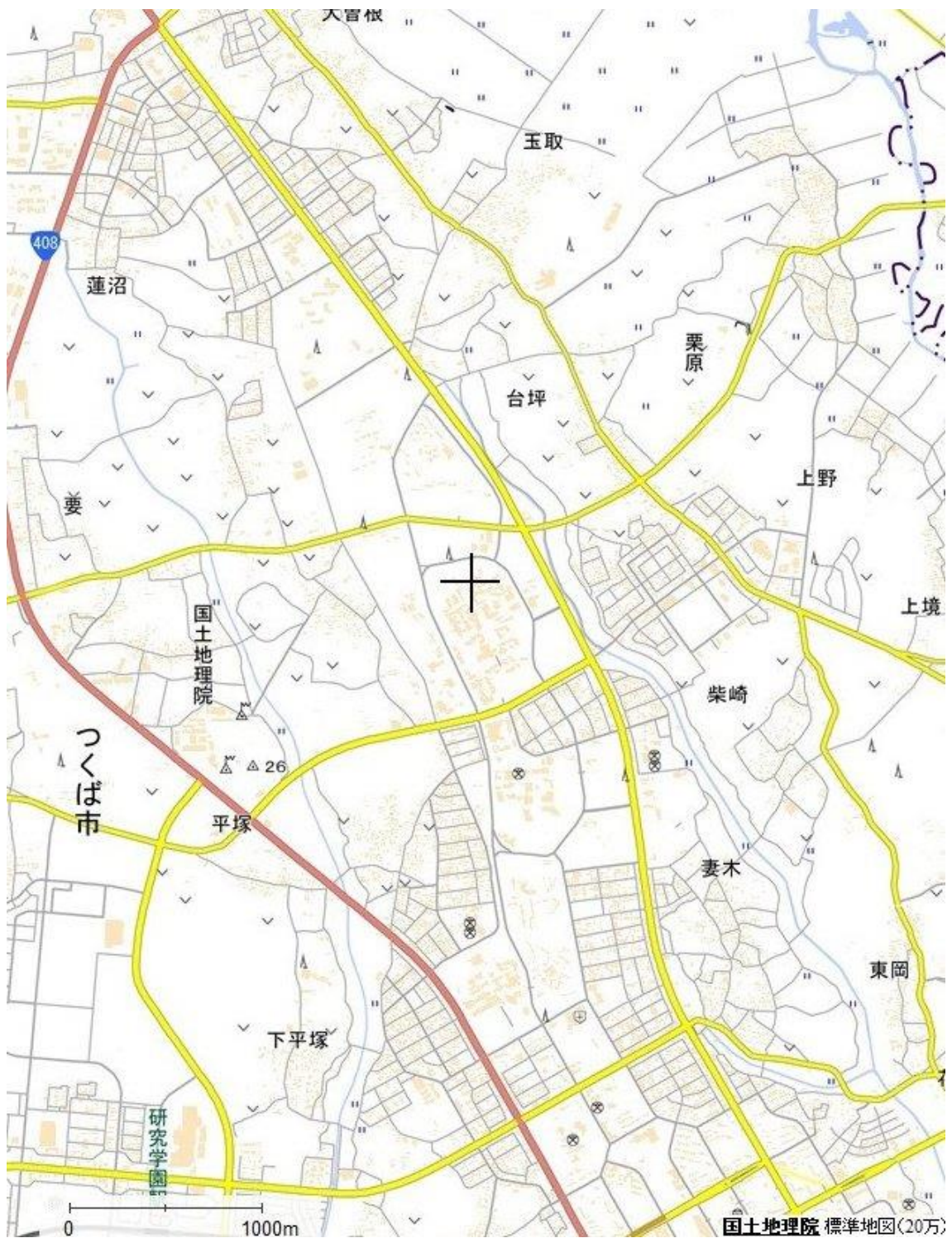


図 1. 隔離ほ場所在地に関する地図（国土地理院ウェブサービスより）
 隔離ほ場は+印に位置する

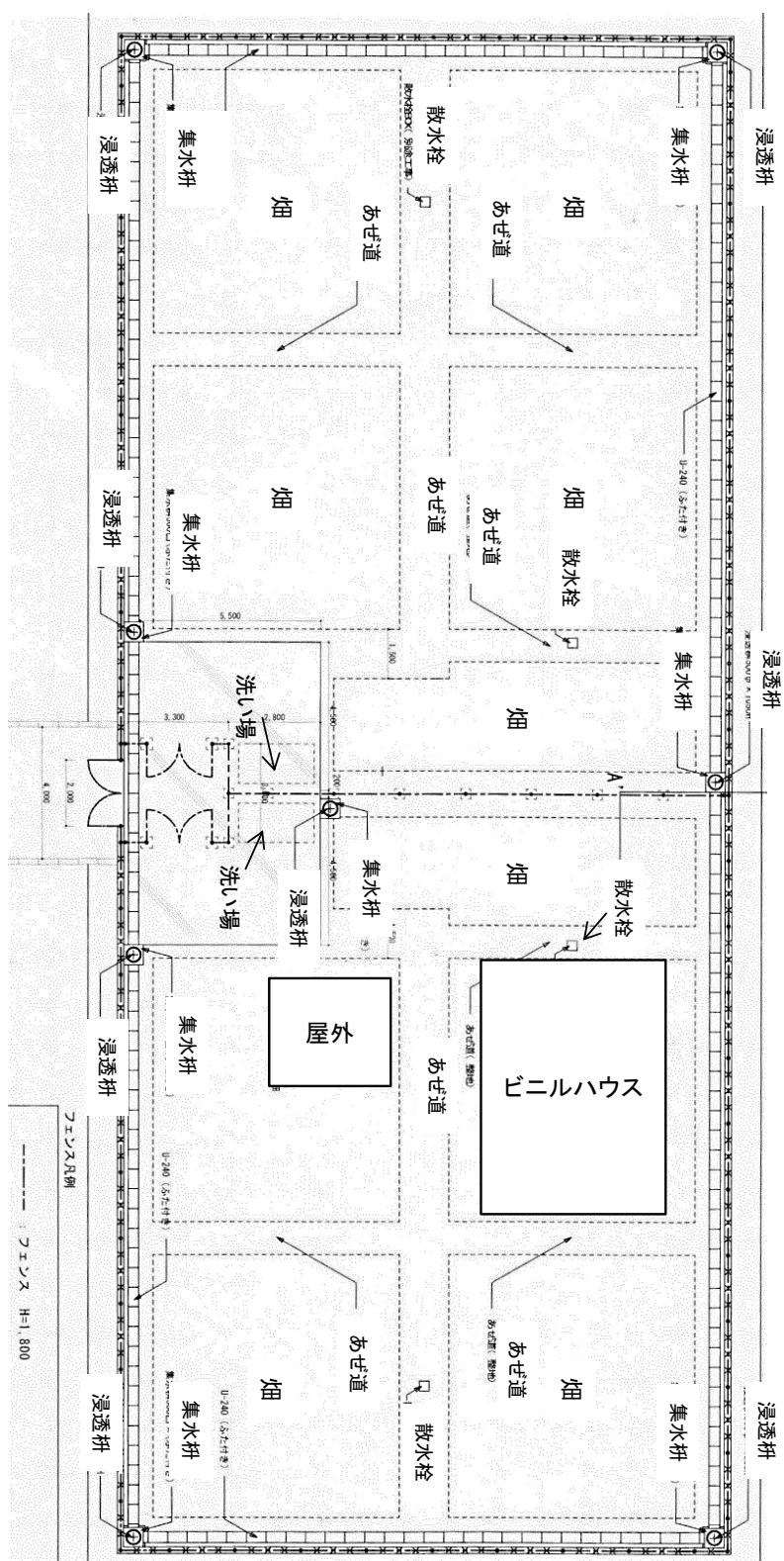


図 3. 隔離ほ場試験（ビニルハウス、屋外）の試験区図
 (□は本実験に使用する区画)

ビニルハウス

5B:本組換え体

MM:非組換え体 (Moneymaker)

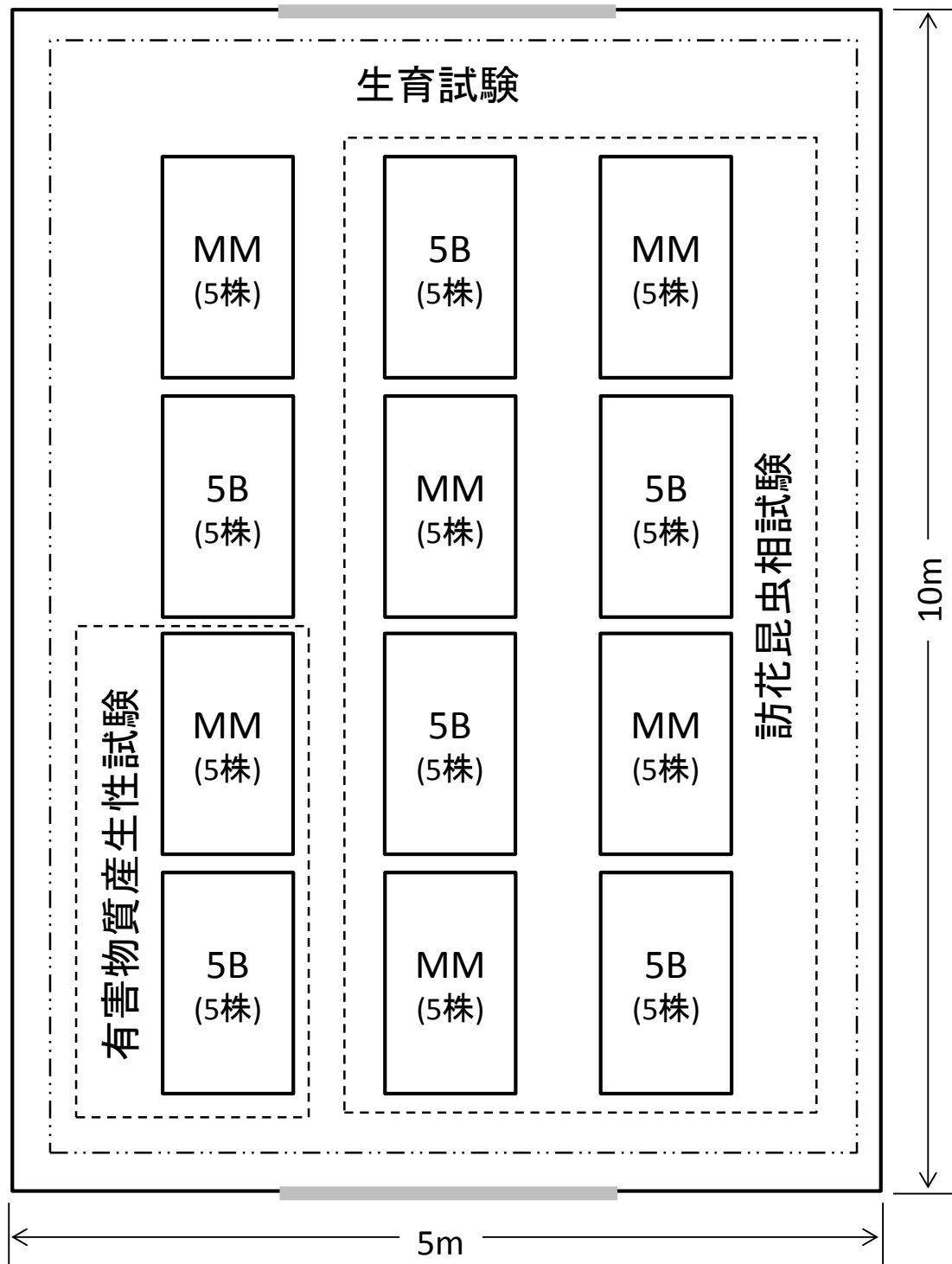
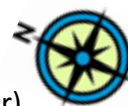


図 4. 隔離ほ場試験（ビニルハウス）の試験区図



屋外 5B : 本組換え体 MM:非組換え体 (Moneymaker)

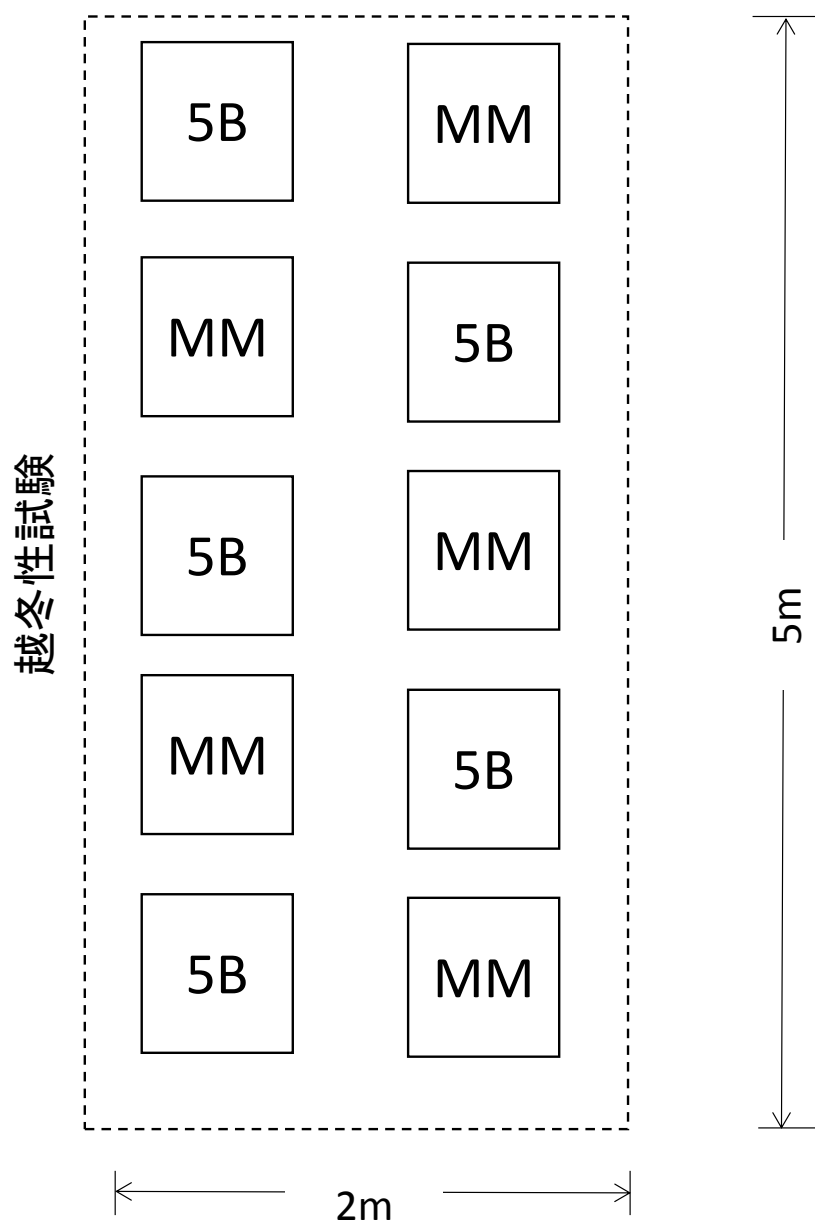


図 5. 隔離ほ場試験（屋外）の試験区図

添付資料リスト

- 5
1. 別添資料 1 : pBI-MIR の T-DNA 領域の塩基配列
社外秘情報につき非開示
2. 別添資料 2 : pBI121 の塩基配列造
社外秘情報につき非開示
- 10
3. 別添資料 3 : 細胞内に移入した核酸の解析
社外秘情報につき非開示
4. 別添資料 4 : 形質発現の安定性
社外秘情報につき非開示
- 15
5. 別添資料 5 : 特定網室における試験の結果
社外秘情報につき非開示