

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 2 月 26 日

文部科学大臣 下村 博文 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 独立行政法人 農業生物資源研究所
申請者 理事長 廣近 洋彦 印
住所 茨城県つくば市観音台 2-1-2

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	<i>Cry43Aa1</i> 発現葉緑体形質転換タバコ（ <i>Cry43Aa1</i> 遺伝子発現タバコ、 <i>Nicotiana tabacum</i> L. SR-1 ; NT-001）
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	<p>所在地：茨城県つくば市観音台 3-1-3 名称：独立行政法人 農業環境技術研究所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 30 年 3 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1)部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場の周囲に、メッシュフェンスを設置している。</p> <p>(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記載した標識を見やすい所に掲げる。</p> <p>(3)栽培は慣行法に準じ、気象等に対応して防風網又はビニルハウス等の設置を行う場合がある。</p> <p>(4)使用した機械、器具及び靴等に付着した土、本遺伝子組換えタバコの種子等を洗浄するための洗場を設置している。</p> <p>(5)本遺伝子組換えタバコの隔離ほ場外への漏出を防止するために、浸透ます等の設備を排水系統に設置している。</p> <p>(6)花粉の飛散を減少させるため、隔離ほ場の周りに防風林を備えている。</p> <p>2 隔離ほ場の作業要領</p> <p>(1)適切な除草管理等を行う。</p> <p>(2)タバコ種子は蒴果に形成されることから、蒴果が開裂する前に収穫することで種子の拡散を防ぐ。</p> <p>(3)本遺伝子組換えタバコ及び同時に栽培した非遺伝子組換えタバコを隔離ほ場外に持ち出す場合には、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する</p>

	<p>る法律（平成 15 年法律第 97 号）第 12 条又は第 13 条で定める拡散防止措置を実施する。</p> <p>(4)(3)以外で、隔離ほ場内で本遺伝子組換えタバコ及び同時に栽培した非遺伝子組換えタバコの不活化を行う場合は、試験終了後、地上部は刈り取り、オートクレーブ又は焼却炉を用いた焼却処理、すき込み処理等により確実に不活化する。</p> <p>(5)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、意図せずに本遺伝子組換えタバコが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(6)隔離ほ場の設備が有する機能が発揮されるよう維持及び管理を行う。</p> <p>(7)(1)から(6)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。</p> <p>(8)本遺伝子組換えタバコによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

生物多様性影響評価書

Cry43Aa1 発現葉緑体形質転換タバコ

[*Cry43Aa1* 遺伝子発現タバコ、
Nicotiana tabacum L. SR-1 ; NT-001]

独立行政法人
農業生物資源研究所

目次

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理学的及び生態学的特性	3
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(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	10
(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の方法並びにそれらの感度及び信頼性	14
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	15
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	21
(1) 使用等の内容	21
(2) 使用等の方法	21
(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	22
(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	22
(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	22
(6) 国外における使用等に関する情報	22
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	23
1. 競合における優位性	23
2. 有害物質の産生性	24
3. 交雑性	25
第三 生物多様性影響の総合的評価	27
引用文献リスト	28

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

イ 和名、英名及び学名

タバコ、tobacco、*Nicotiana tabacum* L.

ロ 宿主の品種名又は系統名

品種 SR-1

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

タバコはナス科タバコ属 (*Nicotiana*) に属する一年生植物であり、タバコ属には 66 種が知られている¹⁾。我が国では、約 400 年前に海外から導入され栽培が開始された。タバコは北海道を除く全域で栽培されているが、タバコが導入種であることや、葉たばこ生産がたばこ事業法により管理されていることから、我が国に自生している *N. tabacum* の報告はない。

タバコ属植物はルスチカ亜属の 3 節 9 種、タバカム亜属の 2 節 7 種、ペテュニオイデス亜属の 9 節 50 種に分類されている。その多くは南北アメリカ大陸に分布するものの、オーストラリア大陸や南太平洋諸島、アフリカ大陸でも野生種を確認することができる。しかし、南アメリカ大陸において、前述の 3 亜属 36 種が確認されていることから、南アメリカがタバコ属植物の起源地とされている¹⁾。

N. tabacum はボリビア以南の南アメリカ大陸に広がっており、*Nicotiana rusutica* は五大湖周辺からペルーにかけて分布している。野生種はシアトル以南から太平洋側に沿って南アメリカ大陸の南端まで広がっている。*N. tabacum* は祖先系野生種が見つかってないことから、種の成立について様々な研究が行われてきた。現在は、種子親が *N. sylvestris* で、花粉親が *N. tomentosa* の複二倍体とされている。この両親種は、アンデス山脈の東斜面に当たるボリビアからアルゼンチン北部にかけて分布しており、*N. tabacum* の起源と推定されている¹⁾。葉たばこ等の原料として大規模に栽培されるのは、*N. tabacum* と *N. rusutica* (マルバタバコ) の 2 種類であり、園芸種として利用されている種を除く 64 種を野生種としている。*N. rusutica* は、ニコチン含量が高く嗜好性に劣ることから、現在、世界的に栽培されている葉たばこの多くは、*N. tabacum* である¹⁾。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における栽培の歴史

日本への伝来については、天正年間 (1573~92) とするものや慶長年間 (1596~1615) とするものなど諸説あるが、イギリス商館長リチャード・コックスの 1615 年 8 月 7 日の日記から、伝来して 10 年に満たないにも関わらず、タバコが広く普及しているとする記載がある²⁾。

慶長 12 年 (1607) に徳川幕府から喫煙に対する禁止令が公布され、17 年 (1612) にはタバコ栽培の禁止令も出たが、タバコ栽培地の各藩は庇護する方向で地域毎の独自の品種 (在来種) が形成された。明治 30 年 (1897) に大蔵省葉煙草専売課の調査によれば、全国で 70 品種程度のタバコ品種が成立していたとのことである²⁾。

タバコは、北海道を除く全ての地域で栽培が見られる。日本のタバコ栽培面積は昭和 41 年 (1966) の 87,000ha をピークとして、その後生産量が減少している。平成 17 年 (2005) には、栽培農家数 14,878 戸、栽培面積 19,701ha、葉たばこ生産量は 46,828 トンである²⁾。

明治 37 年から昭和 60 年までは専売制度のもとで、タバコ属植物は全て厳重な管理下でのみ栽培されていた。現在はタバコ事業法に基づき葉たばこ等の生産に用いるタバコについては日本たばこ産業株式会社との契約栽培となっているが、それ以外のタバコ栽培に規制はない。

タバコは、当初はアンデスから南北アメリカ大陸で栽培されていたものが、コロンブスの新大陸発見の第 2 航海以降にヨーロッパに持ち込まれた。その後、トルコから陸路でアジアや、アラビアからアフリカへ広がり、海路で日本を含む極東の国々へ広がり、17 世紀のうちには世界的に生産されるようになった³⁾。

また、タバコは嗜好品としての重要性に加えて、実験植物として植物病理やバイオテクノロジー研究の黎明期から利用されており、学問の発展に大きく貢献してきた。

タバコモザイクウイルス (TMV) やキュウリモザイクウイルス (CMV)、ジャガイモ X ウイルスなど多くのウイルスがタバコに感染する。1886 年に Mayer により淡緑色の斑紋を呈する葉の絞り汁を健全なタバコに付けることで病気が転移することが発見され、「タバコモザイク病」と命名された。この研究がウイルス研究の端緒を開き、次いで Beijerinck がこの病原因子は細菌とは異なる濾過性の病原体であることを確認し、これがウイルスの発見とされている⁴⁾。

植物バイオテクノロジーの分野では、組織培養しやすい特性を持つタバコは、植物細胞の分化と全能性の研究に利用されている。植物ホルモンの研究において、Miller と Skoog (1957) はオーキシンとサイトカイニンの量比でカルスの増殖や不定根と不定芽の分化を制御できることを示した⁵⁾。Vasil と Hildebrandt (1965) はタバコの遊離単細胞から稔性のある完全な植物体を得ている^{6), 7)}。1972 年に Takebe らは、タバコのプロトプラストから植物体を再生させて、プロトプラストにも全能性があることを示し⁸⁾、1972 年には Carlson がタバコ属のプロトプラストの融合により体細胞雑種を作出している⁹⁾。半数体育種に利用する薬培養については、チョウセンアサガオの成功に次いで、1968 年にタバコでも成功することで、遺伝的固定を早めて育種年限を短縮することが可能となった¹⁰⁾。1984 年には、De Block¹¹⁾ら及び Horsch¹²⁾らによりアグロバクテリウムを用いた遺伝子組換えが報告された。高等植物における初めての葉緑体形質転換体として、タバコの葉緑体形質転換体の作出が、1990 年 Svab らによって報告されている¹³⁾。タバコで得られた成果を他の植物に応用することで、様々な植物種で培養系や形質転換系が開発されている。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

タバコは、冷涼な地域を除いて全ての地域で栽培可能である。世界的に見た生産では、1996～1997 年に 731 万トンと最も多くのタバコが生産されたが、2004 年では 574 万トンと、世界的に減少傾向にある³⁾。我が国では、2005 年に 46,828 トンが国内で生産され、全てがたばこ生産に用いられている。1994～1998 年の統計によれば、葉たばこ生産量の約 6 割が黄色種で、バーレー種が 1 割強、オリエント種が 1 割弱、その他に、在来種、葉巻種、暗色火干葉などとなっている。黄色種の産地として中国、米国、ブラジル、ジンバブエがあげら

れ、そのうちの 6 割近くが中国である。バーレー種の主な産地は米国、マラウイ、ブラジル、中国などがあげられ、米国が全体の 3 割を占めている。オリエン特種は寡雨地帯で広く栽培される種で、主な生産国はトルコ、ギリシャ、ブルガリアなどで、トルコが 4 割を占める³⁾。

栽培に要する期間は、およそ 5~6 ヶ月である。栽培地の気候条件によって異なるが、播種から定植までの育苗期間が 2~2.5 ヶ月、移植から芯止めまでの成長期が 1.5~2.5 ヶ月、芯止めから乾燥までの成熟期間が約 1.5 ヶ月かかる。我が国では通常、春に播種して秋に収穫する。外気温が 15~16℃程度になると、タバコの苗は本畑に移植される。頂上花の開花が始まり、順次下位の花の開花へ移っていくので、頂上花が咲いたら芯止めが行われる。タバコの葉は収穫した後乾燥され、たばこの味や香りを発現させる¹⁴⁾。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本特性

タバコは 1 年生草本性で、通常環境では自家受粉によって種子を形成するが、ときには虫媒または風媒で自然交雑することもある。タバコは根、茎、葉の各器官で構成されている。光周性は長日性のものと短日性のものがあり両親種の特徴を引き継いでいる。タバコは、ニコチン、ノルニコチン、アナバシンなどの多くのアルカロイドを含むことが特徴で、ニコチンは根で生成され、ノルニコチンは葉中のニコチンから生成される¹⁵⁾。

ロ 生息又は生息可能な環境の条件

生育可能な温度は 15~35℃で、畑地で栽培される。10℃くらいになると生育が停止し、40℃になると障害が現れる¹⁶⁾。

主要産地が、中国、米国、ブラジル、インド、イタリア、ジンバブエ、トルコ、マラウイ、ギリシャ、インドネシアであり、オリエン特種は地中海・黒海沿岸の寡雨地帯に広く栽培される品種で乾燥気候を好む。タバコは嗜好品であり品質が重要になるため、熱帯から温帯地方で栽培されており、冷涼な気候帯での栽培は少ない。

日本では、北海道でもタバコ栽培が行われていたが、品質と収量性の問題から、昭和 48 年以降に商業栽培は行われていない。商業的に栽培可能な地域として東北以南となる。

表 1 生育時期別の生育適温と限界温度

生育時期	限界温度 (°C)		生育適温
	低	高	
発芽	12	30	20~28
移植	15~16	35	25~30
葉の伸長	18	35	25~30

ハ 捕食性又は寄生性

捕食性、並びに寄生性は認められていない。

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

種子は結実後自然落下するが、風や動物等の接触により拡散する可能性がある。休眠性は弱い。タバコ種子は 30%程度の脂肪を含むため吸湿性が弱く、比較的寿命が長いと考えられるが、日本のような高温多湿条件では 2~3 年程度で発芽しなくなる。種子の水分含量を 4%程度として低温で保存することで 20 年程度たっても発芽率はほとんど低下しない。

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

自然条件下において植物体を再生しうる組織及び器官は知られていない。

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

タバコは自殖性が高い作物であるが、ときにはハチ等による虫媒や風媒による他殖を行うこともある。また、国外でも自然交雑に関する報告はないが、久保らによってアサガオタバコ (*Salpiglossis sinuate*) と *N. tabacum* を交配した胚珠培養によって 1 個体の雑種が得られている。なお、野生タバコとして 64 種が分類されており、31 種 (表 2) の近縁野生種との交雑可能性が報告されているが、我が国で野生種が自生しているという報告はない。野生種ではないが、観賞用として育てられた花タバコ (主に *N. alata*) の種子がこぼれ、野外で生育していることが知られている。それらと本遺伝子組換えタバコが交雑する可能性は否定できないが、本組換えタバコは葉緑体形質転換体のため、花粉を介した遺伝子拡散の心配はない。

表 2 タバコ (*N. tabacum*) と交雑可能と報告されている種

<i>N. glauca</i> , <i>N. paniculata</i> , <i>N. knightiana</i> , <i>N. benavidesii</i> , <i>N. raimondii</i>
<i>N. rustica</i> , <i>N. tomentosa</i> , <i>N. tomentosiformis</i> , <i>N. glutinosa</i> , <i>N. undulata</i>
<i>N. trigonophylla</i> , <i>N. sylvestris</i> , <i>N. langsdorffii</i> , <i>N. alata</i> , <i>N. longiflora</i>
<i>N. plumbaginifolia</i> , <i>N. repanda</i> , <i>N. acuminata</i> , <i>N. bigelovii</i> , <i>N. nudicaulis</i>
<i>N. debheyi</i> , <i>N. gossei</i> , <i>N. amplexicaulis</i> , <i>N. maritima</i> , <i>N. velutina</i>
<i>N. hesperis</i> , <i>N. simulans</i> , <i>N. megalosiphon</i> , <i>N. excelsior</i> , <i>N. suaveolens</i>
<i>N. goodspeedii</i>

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

タバコは一つの蒴果に 1,300~1,500 粒の種子を形成する。通常的环境下において不稔種子が少ないことから、これに十分量の花粉が形成されていると推察され、一般に稔性は高いとされている。*N. tabacum* の一般的な特性として、自殖性が高いものの虫媒又は風媒により他殖することもあると報告されている¹⁵⁾。

ホ 病原性

病原性は認められていない。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

Cry43Aa1 発現葉緑体形質転換タバコ (*N. tabacum* L. SR1 ; NT-001) 作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表 3 に示した。

表 3 供与核酸のサイズと機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
発現カセット 1		
<i>rrn</i> プロモーター	0.3 kb	由来 ; タバコ (宿主の記載を参照) 機能 ; 葉緑体にコードされている <i>rRNA</i> 遺伝子の 5' 上流配列。
<i>aadA</i> 遺伝子	0.8 kb	由来 ; 大腸菌 腸内細菌科に属する細菌。温血動物の消化管内に生息する。 機能 ; 翻訳産物が抗生物質スペクチノマイシンを解毒する。組換えタバコの選抜マーカー
<i>psbA</i> ターミネーター	0.2 kb	由来 ; タバコ 機能 ; 葉緑体にコードされている <i>psbA</i> 遺伝子の転写ターミネーター。転写を終結させる。
発現カセット 2		
<i>psbA</i> プロモーター	0.2 kb	由来 ; タバコ 機能 ; 葉緑体にコードされている <i>psbA</i> 遺伝子の 5' 上流配列。
<i>mGFP</i> 遺伝子	0.7 kb	由来 ; オワンクラゲ 太平洋や日本海に広く生息するクラゲ 機能 ; 緑色蛍光タンパク質をコードする。葉緑体での翻訳効率が高まるように、コドンを最適化してある。
<i>rsp16</i> ターミネーター	0.2 kb	由来 ; タバコ 機能 ; 葉緑体にコードされている <i>ribosomal</i>

		<i>protein S16 (rsp16)</i> 遺伝子の転写ターミネーター。転写を終結させる。
発現カセット 3		
<i>rrn</i> プロモーター	0.3 kb	由来；タバコ 機能；葉緑体にコードされている <i>rRNA</i> 遺伝子の 5' 上流配列。
<i>T7g10</i>	80 b	由来；バクテリオファージ 細菌に感染するウイルス 機能；バクテリオファージ T7 由来の <i>gene10</i> の 5' 非翻訳領域。下流に接続した遺伝子の葉緑体での発現を増幅させる。
<i>Cry43Aa1</i> 遺伝子	4.3 kb	由来； <i>Paenibacillus popilliae Semadara</i> 株 グラム陽性桿菌の一種。コガネムシ乳化病の原因菌。 機能； <i>Cry43Aa1</i> 遺伝子の翻訳産物はコガネムシ（コウチュウ目）に対する殺虫タンパク質である。
<i>rbcL</i> ターミネーター	0.2 kb	由来；タバコ 機能；葉緑体にコードされている <i>rbcL</i> 遺伝子の転写ターミネーター。転写を終結させる。

ロ *Cry43Aa1* 遺伝子について

Paenibacillus popilliae Semadara 株が生産する *Cry43Aa1* はサツマイモの害虫であるコガネムシ（コウチュウ目）に対して殺虫性を示すことが報告されている^{17), 18)}。この菌から単離した *Cry43Aa1* 遺伝子を大腸菌に導入し生産させた *Cry43Aa1* タンパク質も同様にコガネムシに対して殺虫性を示しており、*Cry43Aa1* は一般的にコウチュウ目昆虫への殺虫性を有すると考えられている。

ハ 構成要素の機能

本組換えタバコは、表 2 に示した発現カセット 1 より、大腸菌由来 *aadA* 遺伝子を葉緑体で発現することにより抗生物質であるスペクチノマイシンに耐性を示す。

また、表 2 に示した発現カセット 2 より、緑色蛍光タンパク質（mGFP）を葉緑体で蓄積させることにより、蛍光を観察することで遺伝子導入効率を確かめることができる。

さらに、表 2 に示した発現カセット 3 より、殺虫タンパク質 *Cry43Aa1* を葉緑体に高蓄積させる。*rrn* プロモーターは下流に接続した遺伝子の葉緑体内での発現を高くする。また、バクテリオファージ由来の *gene10* の 5'非翻訳領域を *rrn* プロモーターと *Cry43Aa1* 遺伝子の間に配置することで、*Cry43Aa1* の発現量がさらに高くなる。

ニ 供与核酸の構成要素の機能

a. 発現カセット 1

ア) タバコ *ribosomal RNA* プロモーター (P_{rrn})

タバコ葉緑体にコードされている *ribosomal RNA* 遺伝子の 5'上流配列。下流に接続した遺伝子を葉緑体で高発現させる。

イ) *aadA* 遺伝子 (*aadA*)

大腸菌由来。抗生物質スペクチノマイシンに対する耐性を付与する。組換えタバコの選抜マーカーとして用いる。

ウ) タバコ *psbA* ターミネーター (T_{psbA})

タバコ葉緑体にコードされている *psbA* 遺伝子のターミネーター。

b. 発現カセット 2

ア) タバコ *psbA* プロモーター (P_{psbA})

タバコ葉緑体にコードされている *psbA* 遺伝子の 5'上流配列。下流に接続した遺伝子を葉緑体で高発現させる。

イ) 改変型 *GFP* (*mGFP*)

オワンクラゲ由来。遺伝子導入した組織を蛍光観察することで確認できる。葉緑体でタンパク質が高蓄積できるようにコドン葉緑体用に最適化してある。

ウ) タバコ *rps16* ターミネーター (T_{rps16})

タバコ葉緑体にコードされている *rps16* 遺伝子のターミネーター。

c. 発現カセット 3

ア) タバコ *rrn* プロモーター (P_{rrn})

タバコ葉緑体にコードされている *ribosomal RNA* 遺伝子の 5'上流配列。下流に接続した遺伝子を葉緑体で高発現させる。

イ) バクテリオファージ T7 *gene10* 5'非翻訳領域 ($T7g10$)

バクテリオファージ T7 由来。*gene10* の 5'非翻訳領域。下流につないだ遺伝子発現を増強する配列。

ウ) 殺虫タンパク質 *Cry43Aa1* 遺伝子 (*Cry43Aa1*)

Paenibacillus popilliae *Semadara* 株由来。*Cry43Aa1* 遺伝子。

エ) タバコ *rbcL* ターミネーター (T_{rbcL})

タバコ葉緑体にコードされている *rbcL* 遺伝子のターミネーター。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

pNtCry (*pBluescript II* 改変ベクター)

ロ 特性

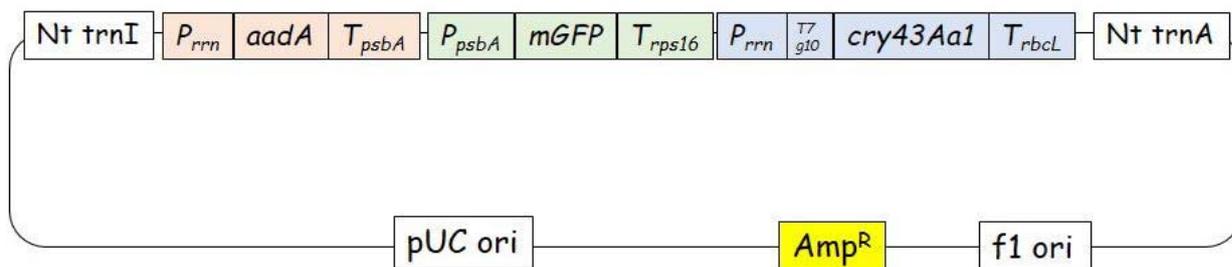


図1 本組換えタバコ作出に用いた形質転換用プラスミドの構造（全長 14kb）

NttrnI:タバコ葉緑体 DNA の *trnI* 遺伝子領域
NttrnA:タバコ葉緑体 DNA の *trnA* 遺伝子領域

P_rrn: ribosomal RNA プロモーター
aadA:スペクチノマイシン分解酵素遺伝子
T_psbA: *psbA* ターミネーター

P_psbA: *psbA* プロモーター
mGFP: 緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードした塩基配列
 (葉緑体での発現に最適になるように、塩基配列を変更。)
T_rps16: *rps16* ターミネーター

P_rrn: ribosomal RNA プロモーター
T7g10: バクテリオファージ T7 由来 *gene 10* の 5'非翻訳領域
Cry43Aa1: *Cry43Aa1* cDNA
T_rbcL: *rbcL* ターミネーター

AmpR: アンピシリン耐性遺伝子
pUC ori: プラスミドの複製開始点
f1 ori: プラスミドの複製開始点 (ヘルパーファージとの共感染時のみ)

ベクター *pNtCry* の塩基数は 14kb であり、図 1 に示すような構成となっている。

本ベクターの基となった *pBluescript II (pBSII)* は、DNA 複製開始点 *pUC ori* と *f1 ori* を持つ 2 本鎖環状 DNA であり、大腸菌を含む広範囲等の細菌を宿主としてアンピシリン耐性を付与する。*pBSII* は、宿主菌の分裂増殖によって伝達されるが、プラスミドの他菌体への伝達性は別因子により支配されているため、*pBSII* 自体の伝達性は無い。宿主である細菌に哺乳動物等に対する病原性を付与することは知られていない。

パーティクルガン法で導入する際には、基本的には *NttrnI* と *NttrnA* に挟まれた領域の DNA が宿主植物の葉緑体 DNA の同領域と組み換わる。*NttrnI* と *NttrnA* に挟まれた領域外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入された核酸は交配によってのみ伝達される。

(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

ベクターの構成要素は表 3 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は図 1 に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

パーティクルガン法によった。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

葉緑体への遺伝子導入は、OkuzakiとTabei (2012) に従った¹⁹⁾。

具体的には、展開する前の若いタバコの葉を約5 mm角に細断して培地に置床して、16～24時間程度培養した後に、パーティクルガン法で遺伝子導入を行った。遺伝子導入は、プラスミド*pNtCry*を1 µg/µlになるように調整し、0.6µmの金粒子にコーティングした。打ち込みの圧力は1,100psi、ストップングプレートとサンプルの距離を約9 cmとして打ち込んだ。打ち込み後2～3日間は無選抜で培養して、組織のダメージの回復を図った後に、スペクチノマイシン (500 mg/l) を含む再分化培地で選抜しながら不定芽分化を促すことで、組換えタバコ個体 (T₀) を得た。再分化した個体はヘテロプラズミックな状態の細胞が多いため、再分化した個体の葉を、再度、約5 mm角に細断してスペクチノマイシンを含む再分化培地に置床して、不定芽を誘導することで、ホモプラズミック化を進め、抗生物質への高い耐性を有する個体を選抜した。GFP観察の結果、ホモプラズミック化したと思われるT₀個体を閉鎖系温室で栽培し、自殖種子 (T₁系統群) を得た。

得られた T₁ 種子は、活性塩素濃度 1 %の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて滅菌し、無菌的にスペクチノマイシン (500 mg/l) を含む MS 培地に播種して、T₁ 植物を育成している。

隔離ほ場で栽培する後代種子は閉鎖系温室で苗床に播種し、育苗した後に隔離ほ場へ定植する予定としている。

ニ 第一種使用等を行う系統について

本申請は、上記の手順によって得られた複数の系統をほ場で栽培し、

1. 第二種使用等の段階で観察された生育特性と導入遺伝子の発現を、自然な栽培環境である隔離ほ場栽培で確認すること。
2. 葉緑体形質転換体では、葉緑体の特定の領域に遺伝子を導入するため、導入遺伝子の位置効果がないはずであるが、同一領域に導入された系統間で *Cry43Aa1* の発現量に差異が生じるかについて評価する。
3. 葉緑体の遺伝子発現は核の遺伝型により影響される場合があることから、本葉緑体形質転換タバコにおいて、核の遺伝子型と遺伝子発現の関連を明らかにする。本系統に非遺伝子組換えタバコから、実験系統として再分化能力も高く比較的大型の‘キサンチ’や晩生で大型の‘遠州’、その他大型品種との雑種を作出する。さらに本申請期間において連続戻し交雑を行い、核置換を進めることで核の遺伝子型の変化による *Cry43Aa1* の発現の変化や生育特性、草型の変化を観察し、遺伝的背景の違いによる葉緑体へ導入された遺伝子の発現に及ぼす影響を評価する。

以上のような項目についての解析等を目的としている。本組換えタバコでは最大 10 系統程度の栽培を計画している。葉緑体形質転換では、葉緑体 DNA の同一の領域に導入することから、ホモプラズミック化された植物では、異なるイベント（再分化個体）由来であっても、DNA 分析では区別できなくなる。なお、隔離ほ場における栽培試験では、来歴による違いを明確に区別して栽培する予定である。

以下、(4)～(6)の情報は、全ての系統のものではなく、先行して得られた系統の一部について示しているが、

- ・交雑可能な野生植物が我が国には存在しないこと。
- ・葉緑体に遺伝子を導入しているため、花粉を介した遺伝子拡散がないこと。
- ・開裂する前に蒴果を収穫することで、種子が拡散しないように管理すること。
- ・本組換えタバコの栽培が管理された隔離ほ場内で行われ、防風林の設置や隔離距離の確保、持ち出しを防止する施設・措置などにより本組換えタバコの隔離ほ場からの散逸防止策を講じていること。
- ・本組換えタバコに導入した発現カセットは、多くの遺伝子組換え植物での使用実績のある *GFP*、薬剤抵抗性遺伝子、及び土壌中に存在する微生物が有する *Cry43Aa1* 遺伝子を発現させるものであること。
- ・葉緑体形質転換体では、葉緑体 DNA の同一箇所にも相同組換えで導入されるため、核への遺伝子導入で問題になる位置効果が生じないと考えられる。

以上から、生物多様性影響を生じさせるおそれがないと評価することは可能であると考えられる。

(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の存在

閉鎖系温室で継代、生育させた本組換えタバコの葉から、常法に従い、全 DNA を抽出し、*SmaI* で消化した後に、*trnA* 断片をプローブとしてサザン解析を行い、移入した核酸の検出を行った結果を示す（図 2）。

サザン解析の結果、葉緑体形質転換体は相同組換えで外来遺伝子が導入され、同一箇所にターゲティングするため同一サイズのバンドが確認された。なお、ヘテロプラズミックな状態であれば、野生型から検出されるサイズのバンドが組換えタバコからも検出されるはずであるが、今回供試した組換えタバコからは野生型のバンドが検出されなかったことから、ほぼ全ての葉緑体 DNA に移入された核酸が存在するホモプラズミックな状態になっていると考えられた。

なお、本葉緑体形質転換タバコに非遺伝子組換えタバコを花粉親とし、連続戻し交雑を行っても、変化するのは核の遺伝型であって、連続戻し交雑した後代の葉緑体に導入された遺伝子に変化を及ぼすことは想定されない。

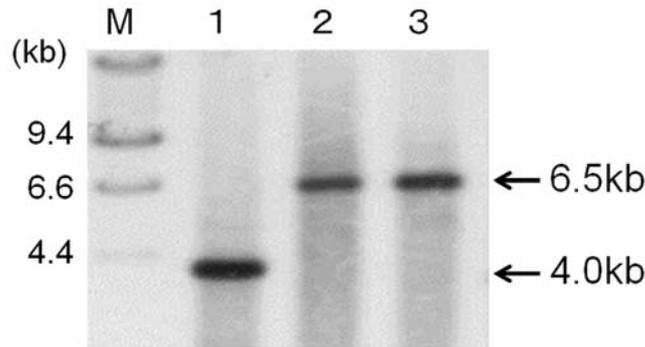


図 2 導入遺伝子の確認

M:分子マーカー、1:野生型 (SR-1)、2:pNtCry#A、3:pNtCry#E

ロ. 供与核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性

1) 核酸のコピー数

2系統のサザン解析 (図 2) から、これらの系統については、移入された核酸が葉緑体の目的とする部位に導入されていることが確認された。

一般的にパーティクルガン法で核染色体に遺伝子導入した場合、複数コピーが導入される傾向にあるが、葉緑体形質転換では相同組換えにより目的の場所に導入されるため、一つの葉緑体 DNA に複数コピーが導入される可能性は極めて少ない。また、核ゲノムに導入される可能性は否定できないが、本ベクターで用いているスペクチノマイシン分解酵素遺伝子は原核生物型のプロモーターで駆動されており、植物核ゲノムにおける転写はないか極少なく、抗生物質耐性は示さないと考えられている。

ホモプラズミック化の確認は、まず緑色蛍光タンパク質 (GFP) の観察で行い、葉面全体で同様の強さで GFP の蛍光が確認されることにより、ホモプラズミック化が進んだと判断された植物のサザン解析を行ったところ、目的とする 6.5kb のバンド以外検出されず (図 2)、移入された核酸は目的の箇所のみ導入されたと考えられた。

2) 複数世代における遺伝の安定性

①サザン解析による確認

閉鎖系温室で生育させた T₀ 世代の組換えタバコ (pNtCry#E) を自殖させ、得られた後代 (T₁ 世代) における導入遺伝子の遺伝を確認した。図 2 と同様に、本組換えタバコの葉から全 DNA を抽出し、*Sma*I で消化した後に、導入遺伝子の一部である *Cry43Aa1* をプローブとしてサザン解析を行った。

導入遺伝子の存在を示す 6.5kb のバンドが T₀ 及び T₁ 個体で確認され、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが示された (図 3)。また、導入遺伝子を示すバンドが 6.5kb のサイズだけで確認されたことから、核など目的以外のゲノムに導入されていないことも示された。

本申請で用いる葉緑体形質転換タバコはホモプラズミックな状態であり、連続戻し交雑を行ったとしても、葉緑体ゲノムの状態を変化させるものとは想定されない。また、本試験において自殖後代を確認しているが、T₀ と T₁ で同じサイズのバンドが検出された。葉緑体形質転換タバコでは自殖であって

も花粉を介して外来遺伝子は伝達されないことから、すなわち、非組換えタバコの花粉を交雑したと同じことである。これらのことから、核の遺伝子型の変化を伴わない非組換えタバコとの交雑では葉緑体形質転換タバコの存在様式に影響を及ぼさないと推定される。

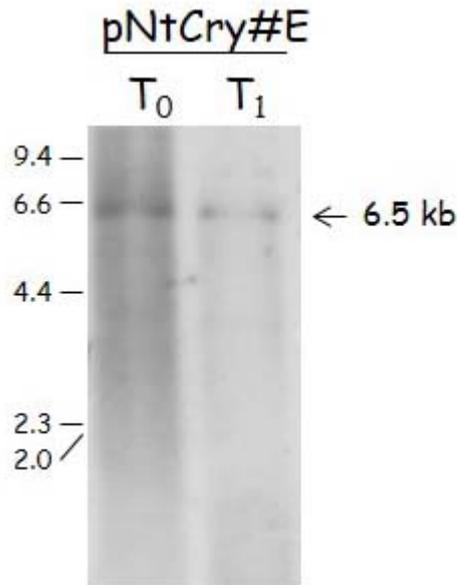


図3 世代間における導入遺伝子の遺伝の安定性

② CBB染色による後代における *Cry43Aa1* タンパク質蓄積の確認

閉鎖系温室で生育させた T_0 世代の組換えタバコ (pNtCry#E) を自殖させ、得られた後代 (T_1 世代) における植物体の葉 0.1g を凍結粉碎し、200 μ l のタンパク質抽出バッファーで懸濁した後遠心して上清と沈殿物を分けた。さらに沈殿物に 50 mM NaOH 200 μ l を添加してアルカリ処理した後に、遠心して上清と沈殿物を分けた。アルカリ処理した上清を SDS-PAGE にかけて CBB 染色を行った。その結果、 T_0 世代、 T_1 世代ともに、*Cry43Aa1* タンパク質を示すバンドが検出され、当該タンパク質の蓄積は継代後でも安定であることが示された (図 4)。

本試験は、①サザン解析による確認と同様に、非組換えタバコを交雑した事と同義であり、少なくとも同じ核の遺伝子型である非組換えタバコを交雑しても導入遺伝子の発現に影響しないことが示された。一方、核の遺伝子型が異なれば葉緑体における遺伝子発現に影響を与える可能性は否定できないため、本研究において明らかにする必要があると考えており、承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。なお、仮に戻し交雑により核の遺伝子型が変わることで *Cry43Aa1* の発現量が上昇しても、本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであることから、*Cry43Aa1* の発現量のデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。



図4 T₀とT₁世代におけるCry3Aa1タンパク質量の確認

③ 後代種子へのスペクチノマイシン抵抗性の遺伝分離

核への遺伝子導入ではメンデル遺伝するため、発現ユニットのコピー数により後代に出現する遺伝子組換え体の比率は異なる。一方、葉緑体に移入された核酸の複製物は母性遺伝することから、花粉を介した遺伝子移行はできない。組換えタバコの自殖、または組換えタバコ×非組換えタバコで得られた後代では、種子親がホモプラスミック植物であれば、全ての後代に導入遺伝子が伝達される。

組換えタバコの2系統（pNtCry#BとpNtCry#E）及び非組換えタバコの後代種子、それぞれ100粒を滅菌処理後に、500 mg/l スペクチノマイシンを含むMS培地に無菌的に播種し、14日後に発芽個体数及び薬剤抵抗性を調査した。

その結果、組換えタバコの後代は全て薬剤抵抗性を示し、安定して母性遺伝を示ることが示された（表4）。

表4 自殖後代種子の発芽率とスペクチノマイシン抵抗性の遺伝性

	播種数	発芽数	発芽率 (%)	薬剤抵抗性 個体数	感受性 個体数
pNtCry#B	100	100	100	100	0
pNtCry#E	100	100	100	100	0
SR-1	100	100	100	0	100

ハ. ウイルス等を核酸の移入に利用する場合、野生動植物に対する伝達性
該当しない

(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

供与核酸の配列に基づいて設計したプライマー対を用い、PCRを行うことで、移入遺伝子を特異的に検出することが可能であり、その感度については、約1 ngの全DNAを鋳型として供すれば、検出可能である。また、サザンブロットハイブリダイゼーションによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約2 µgの全DNAを用いれば検出可能である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. 移入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

本組換えタバコは、宿主と異なり、選抜マーカー遺伝子発現ユニットの移入により、抗生物質スペクチノマイシンに対する耐性が付与されている。

また、*Paenibacillus popilliae* Semadara 株由来の *Cry43Aa1* 遺伝子発現カセットの移入により、コウチュウ目昆虫に対する殺虫性タンパク質を蓄積する。図 5 は閉鎖系温室で栽培した組換えタバコで発現する *Cry43Aa1* を CBB 染色で確認した。実験方法は、ロー 1) -②で示したとおりである。

組換えタバコでは、目的とする *Cry43Aa1* の約 150 kDa のバンドが確認されたが、非組換えタバコでは確認されない。

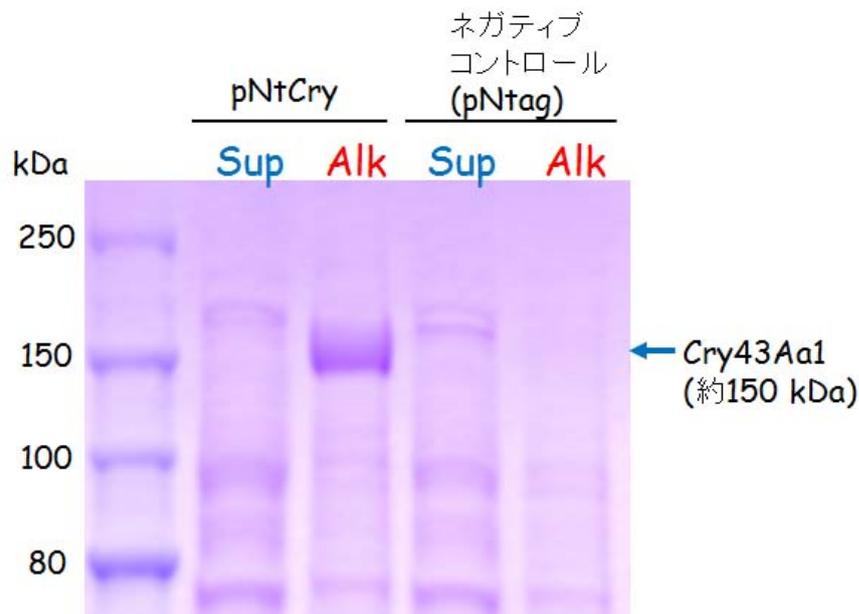


図 5 CBB 染色による *Cry43Aa1* の検出

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

a) 形態及び生育の特性

先行して得られた系統について、閉鎖系温室において草型を観察したところ、 T_0 各個体において、培養中のホルモンの影響や順化した際の影響で生育がそろいにくいものの、形態学的に大きな差異は認められなかった。表 5 及び図 6 に示すとおり、隔離温室で生育させた本組換えタバコの 4 系統の草丈は、宿主の草丈よりもやや変動するものの大きな差異は見られなかった。

表 5 草丈

	草丈 (cm)
pNtCry#A	78
pNtCry#B	67
pNtCry#E	71
pNtCry#F	85
SR-1	79

宿主 (SR-1) と pNtCry#A、pNtCry#B、pNtCry#E、pNtCry#F の草丈を計測した。



図 6 pNtCry#E、pNtCry#F と野生型 (SR-1) の草型

なお、本葉緑体形質転換タバコの開花期、発芽特性等の生育特性及び本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代の開花期、発芽特性等の生育特性については、承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行うとともに、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであるから、これらのデータがなくても生物多様性への影響評価は可能であると考えられる。

b) 生育初期における低温又は高温耐性

本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであるから、本葉緑体形質転換タバコ及び本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代におけるデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

c) 成体の越冬性及び越夏性

承認後、隔離ほ場試験において調査を行う。本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであるから、本葉緑体形質転換タバコ及び本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代におけるデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

d) 花粉の形態及び稔性

本申請は限定された隔離ほ場において栽培するもので、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであることから、本葉緑体形質転換タバコ及び本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代におけるデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

e) 種子の生産量、休眠性及び発芽率、脱粒性

①種子の生産性

開花 2 ヶ月後、収穫した蒴果から種子を回収して種子数を計測した。各系統毎に 3 花分の種子を採取した。種子 500 粒の重さを 5 回計測したところ、平均 46mg であったことから、種子 1 粒は 0.092mg として、採種した種子の重さより種子数を推定した。

その結果を統計分析したところ、有意差はなかった。

表 6 種子生産性

	種子数	P 値 (t 値)
pNtCry#B	1036 ± 349	0.80 (0.27)
pNtCry#E	855 ± 166	0.62 (0.31)
野生型 (SR-1)	964 ± 314	

タバコの花は筒状花で、星形から円鋸歯状をした約 5cm の花で、花筒は漏斗形である (図 7)。タバコの実は蒴果で約 1,300~1,500 粒の種子を有するとされている (図 7)。今回の結果は、野生型も含め文献の記載よりやや種子数が少なかった。この理由として、SR-1 が実験系統として小型化されたことで種子形成数は少ないことが推定される。さらに、閉鎖系温室において 6 号鉢で栽培したことで根圏が制限されたことで、さらに植物体が小型になったことなどから、種子が少なくなったと考えられた。

しかし、野生型と組換えタバコとの間に有意な差異はなく、組換えタバコで種子生産性が高まったとはいえないと考えられる。



図7 タバコの花と実の写真

②休眠性及び発芽率

タバコは弱休眠性と言われており、また光発芽性を有する。タバコ種子を *in vitro* で無菌播種した経験から、休眠性、発芽率に特筆すべき差異は認められなかった。

③脱粒性

蒴果が植物体から脱落や開裂する前に採集するため、形質評価は行っていない。

f) 交雑率

我が国にタバコと交雑可能な野生植物が存在しないとされていることから調査は行っていない。

g) 有害物質の産生性

①導入遺伝子の作るタンパク質の安全性

選抜マーカーである *aadA* タンパク質及び *GFP* タンパク質を用いている。

aadA タンパク質を蓄積する遺伝子組換えトウモロコシ (MON87460) があり、遺伝子組換えワタ (MON-01445-2、MON-00531-6、MON-00787-7) には *Aad* と記載されているが、*aadA* と同じものが導入されている。これらの遺伝子組換えワタは、組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経て、平成 13 年 3 月 31 日に遺伝子組換え食品としての安全性が確認されたことが公表されており、同タンパク質に毒性があることは考えにくい。

GFP 遺伝子は蛍光タンパク質をコードしており、顕微鏡で蛍光を観察することで遺伝子導入を確認できる。様々な組換え植物に導入されており、安全性が高いことが確認されている (15 文科振第 946 号)。

Cry43Aa1 タンパク質は、*Paenibacillus popilliae Semadara* 株に由来し、土壌微生物が本来有しているものである。当該タンパク質がコウチュウ目昆虫への殺虫性を示すことがあっても、ヒトに対する毒性があるという報告はない。

本組換えタバコで発現する *aadA*、*GFP*、*Cry43Aa1* タンパク質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸を共有するかどうかを、国立医薬品食品衛生研究所アレルゲンデータベース (ADFS) を用いて既知のアレルゲンとの類似性検索及びシーケンスアライメントを行ったところ、

全てのタンパク質で、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

上記 3 種類のタンパク質は、隔離ほ場で栽培されるタバコの葉緑体で発現して、葉緑体内で蓄積・保持されるものであり、当該組換えタバコから野外に拡散することが想定されない。また、本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代においても同様に、野生動植物等に影響を与えることは考えにくい。

②土壌中に残存する有害物質の評価

pNtCry#E と非組換えタバコ (SR-1) の各 1 個体を栽培した土壌 (花三昧、サカタのタネ) を用いて、根から分泌される他感物質の影響を比較した。地上部の植物を刈り取った後、細かく崩して根を除いた栽培土壌を、カネロンビーポット B-25 (鉢サイズ 50×50×52mm (縦×横×高)) に充填し、そこにブロッコリー (緑嶺、サカタのタネ) を各鉢に 25 粒播種した。4 ポット (100 粒) を 1 区 3 反復とした。播種 2 週間後に、発芽率及び地上部の新鮮重を計測して、t 検定を行って土壌の影響を比較した。

その結果、発芽率及び生重量において統計的有意差は認められなかった (Student t-検定、P>0.05)。

なお、本申請は限定された隔離ほ場において栽培するもので、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであることから、本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代におけるこれらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

表 7 組換えタバコの根から分泌される他感物質のブロッコリーの種子の発芽に及ぼす影響

	発芽率 (%)	P 値 (t 値)	生重量 (g)	P 値 (t 値)
野生型 (SR-1)	81.0±10.2		7.54±0.43	
pNtCry#E	90.0±5.0	0.16 (1.58)	6.64±0.42	0.23 (1.34)

③植物体内で産生される有害物質の評価

pNtCry#E と非組換えタバコ (SR-1) の成葉 3 枚を通風乾燥 (42℃、3 日間) した後に粉碎して、重量比で 0.2%になるように土壌 (無肥料培土) に混和した。アグリポット (6.5cm×5.0cm (直径×高さ)) に混和した土壌 50ml を充填し、ブロッコリー (緑嶺、サカタのタネ) の種子を 50 粒播種した。各区 3 反復とし、播種 2 週間後に、発芽率及び地上部の新鮮重を計測して、t 検定を行って評価した。

その結果、発芽率及び生重量において統計的有意差は認められなかった (Student t-検定、P>0.05)。

表 8 土壌中の他感物質の影響評価

	発芽率 (%)	P 値 (t 値)	生重量 (g)	P 値 (t 値)
野生型 (SR-1)	68.0±8.5		1.43±0.32	
pNtCry#E	77.0±9.9	0.43 (0.98)	1.64±0.22	0.40 (0.95)

有害物質の産生性について、組換えタバコと宿主の間で有意差が認められなかった（表 7 及び表 8）ことから、当該組換えタバコを栽培した場合の、土壌等における生物多様性への影響は、宿主である非組換えタバコと同様であると推察された。

なお、本申請は限定された隔離ほ場において栽培するもので、野生動植物と競合させずに栽培試験を行うものであることから、本葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの戻し交雑後代におけるこれらのデータがなくても生物多様性への影響は生じないと判断することは可能であると考えられる。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

本申請は、*Cry43Aa1* 発現葉緑体形質転換タバコの *Cry43Aa1* タンパク質の生産性などをより詳細な解析するために、本組換えタバコを隔離ほ場で栽培し、生育、形態、*Cry43Aa1* の発現量や *Cry43Aa1* の蓄積量などを調査するものである。また、葉緑体の遺伝子発現は核の遺伝型により影響される場合もあることから、本葉緑体形質転換タバコにおいて、核遺伝子型と遺伝子発現の関連を明らかにするために、本系統に非遺伝子組換えタバコから、実験系統として再分化能力も高く比較的大型の‘キサランチ’や、晩生で大型の‘遠州’、その他大型品種と雑種を作出する。さらに本申請期間において連続戻し交雑を行い、核置換を進めることで核遺伝子型の変化による *Cry43Aa1* の発現の変化や生育特性、草型の変化を観察し、遺伝的背景の違いによる葉緑体へ導入された遺伝子の発現に及ぼす影響を評価する。

施設の所在、配置図等については別紙「隔離ほ場の情報」に記した。周辺は試験用畑ほ場と防風林で囲まれており、研究所の敷地境界までは 50 メートル以上離れている。また、研究所内において野外でタバコが栽培されていることはなく、近隣のタバコ栽培畑地まで 5 キロメートル以上離れている。

(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 隔離ほ場の所在地：茨城県つくば市観音台 3-1-3

ロ 隔離ほ場の名称：独立行政法人 農業環境技術研究所 隔離ほ場

ハ 使用期間：承認日から平成 30 年 3 月 31 日まで

ニ 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場の周囲に、メッシュ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記載した標識を見やすい所に掲げる。
- (3) 栽培は慣行法に準じ、気象等に対応して防風網又はビニルハウス等の設置を行う場合がある。
- (4) 使用した機械、器具及び靴等に付着した土、本組換えタバコの種子等を洗浄するための洗場を設置している。
- (5) 畑地で栽培された本組換えタバコが、隔離ほ場外への漏出することを防止するため、周囲を高さ 10cm のコンクリートの土台で囲んであり、その上にフェンスが設置されている。ほ場からの排水系統から流出する種子等をトラップするための浸透柵を設置している。
- (6) 花粉の飛散を減少させるため、隔離ほ場の周りに防風林を備えている。

ホ 隔離ほ場の作業要領

- (1)適切な除草管理等を行う。
- (2)タバコ種子は蒴果に形成されることから、蒴果が開裂する前に収穫することで種子の拡散を防ぐ。
- (3)本組換えタバコ及び同時に栽培した非組換えタバコを隔離ほ場外に持ち出す場合には、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）第12条又は第13条で定める拡散防止措置を実施する。
- (4)(3)以外で、隔離ほ場内で本組換えタバコ及び同時に栽培した非組換えタバコの不活化を行う場合は、試験終了後、地上部は刈り取り、オートクレーブ又は焼却炉を用い確実に不活化する。登熟期前のものについてはすき込み処理を行い確実に不活化する場合もある。残りのタバコの残さ及び発生した植物は隔離ほ場内に埋設又はすき込み処理により確実に不活化する。
- (5)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、意図せずに本組換えタバコが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。
- (6)隔離ほ場の設備が有する機能が発揮されるよう維持及び管理を行う。
- (7)(1)から(6)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。
- (8)本組換えタバコによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

(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

隔離ほ場での栽培中、観察等を通して情報収集を行う。また、世界的な状況を把握するために、研究論文や海外における野外栽培試験等の情報をインターネット等で収集する

(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「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

なし。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本組換えタバコと対照となる非組換えタバコの競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、種子の生産量や発芽率の調査を行い、その結果、本組換えタバコと非組換えタバコとの間に有意差又は相違は認められなかった。

本組換えタバコでは、Cry43Aa1タンパク質の蓄積を目的としており、結果としてコウチュウ目害虫へ抵抗性が付与されている¹⁷⁾。タバコのコウチュウ目害虫として、我が国において、タバコシバンムシやドウガネブイブイ、マルクビクシコメツキ、ヤサイゾウムシなど10種類が報告されている^{20), 21)}。しかしながら、本試験では隔離ほ場という限られたほ場で本組換えタバコを栽培することと、これら害虫に対しては一般的な防除を行うことから、害虫を含め、その他のコウチュウ目昆虫に暴露する機会は少なくなるため、本組換えタバコを栽培する場合の昆虫に対する影響は、非組換えタバコを栽培する場合と同等と考えられる。したがって、本組換えタバコでCry43Aa1タンパク質を蓄積することが自然条件下でタバコを栽培した際に競合の優位性を高めることにはならない。

また、本組換えタバコは選抜マーカーとしてスペクチノマイシン分解酵素遺伝子発現カセットを有し、抗生物質であるスペクチノマイシンに耐性である。しかし、選抜に有効な高濃度（500 mg/l）の抗生物質が自然条件下に存在することは考えられず、本カセットの移入が、野生植物に対する競合性を向上させるとは考えられない。

さらに、可視化マーカーとして緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子を導入しているが、タバコの生育に影響を及ぼすものではなく、*GFP*遺伝子の導入により、本組換えタバコの競合性が高まったとする結果は得られていない。

さらに、本第一種使用等は、組換えタバコを第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用等するものである。隔離ほ場では、当該組換えタバコの持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていることから、隔離ほ場の外部にある野生植物と競合することはない。

以上のことから、本組換えタバコについて競合における優位性に起因する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。また、本申請において、葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの雑種後代を作出して栽培することとしており、草型やCry43Aa1の蓄積量に変化する可能性も否定できないが、本申請は、隔離ほ場に限定して使用等するものであり隔離ほ場の外部にある野生植物と競合することはないため、競合における優位性に起因する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

競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えタバコを第一種使用規程に従って使用する場合、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

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

宿主の属する分類学上の種であるタバコは、我が国において長期にわたる使用等の実績がある。タバコはニコチンを始め多くのアルカロイドを蓄積し、ニコチンは、かつては殺虫剤として利用されたこともあるが、一般の栽培において、野生動植物等に対して影響を及ぼすことは報告されていない。

有害物質の産生性については、すき込み試験、後作試験を行った結果、本組換えタバコと非組換えタバコとの間で有意差又は相違は認められなかった。従って本組換えタバコの有害物質の産生性は非組換えタバコと同等であると考えられる。

本組換えタバコの植物体では、Cry43Aa1 が蓄積されることから、コウチュウ目昆虫に対して毒性を持つことが推察される。しかしながら、コウチュウ目昆虫が本組換えタバコ由来の Cry43Aa1 タンパク質に曝露される可能性を考察すると、①本組換えタバコを直接食害される場合と、②飛散した本組換えタバコの花粉が付着した植物等とともに食餌される場合、が考えられる。本申請は限定された隔離ほ場において栽培すること、一般的な防除を行うことから、害虫を含め、その他のコウチュウ目昆虫に暴露する機会は少なくなるため、本組換えタバコを栽培する場合の昆虫に対する影響は、非組換えタバコを栽培する場合と同等と考えられる。

花粉は花粉管細胞と精細胞からなる。受粉に関わる花粉精細胞には葉緑体は存在しないが、花粉管細胞には葉緑体等の細胞小器官が存在する。そのため、飛散した花粉を摂食することによる影響を考慮する必要がある。しかし、タバコは基本的に自殖性であり花粉飛散が極めて小さいことから、本組換えタバコから花粉が周囲に拡散することによるコウチュウ目昆虫への影響はないと考えられる。

なお、Cry43Aa1 はコウチュウ目以外の昆虫種に対する殺虫活性は報告されていないことから、本組換えタバコのチョウ目昆虫への影響は考えられない。

また、本組換えタバコでは、Cry43Aa1 タンパク質の他に、GFP 及びスペクチノマイシン分解酵素が発現しているが、これらについて毒性があるという報告はない。さらに、これら全てのタンパク質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸を共有するかどうかを、国立医薬品食品衛生研究所アレルゲンデータベースを用いて類似性検索及びシーケンスアライメントを行ったが、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

なお、本申請は限定された隔離ほ場において栽培を行うものである。タバコはニコチン等のアルカロイドを蓄積するため、タバコを摂食する動物や鳥類は知られていない。また、葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの雑種後代を作出して試験に供するが、その後代を摂食する動物や鳥類が発生するとは考えにくい。タバコを摂食する害虫としてタバコガ等がいるが²⁰⁾、Cry43Aa1 タンパク質がそれらの害虫を殺虫することは報告されていない。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

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

(3) 影響の生じやすさの評価

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えタバコを第一種使用規程に従って使用する場合、上記の評価から、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

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

Nicotiana 属の野生種タバコは 64 種類が報告されており、31 種の野生種と交雑すると報告されているものの、国内にはタバコの近縁野生種の自生は確認されていない。なお、観賞用に栽培された花タバコ（主に *N. alata*）の自生が確認されているが、生物多様性として存在するものではなく栽培されたもののエスケープであることと、仮に雑種が形成されたとしても、本組換えタバコは葉緑体に遺伝子を導入していることから、花粉を介した遺伝子拡散は生じない。野生植物ではないが、国内では葉たばこ生産のためにタバコが栽培されている。しかしながら、葉たばこ生産の栽培では葉の品質向上のため、開花させないで摘心を行うか、数花を開花させた後に摘花されることから交雑相手とはならない。仮に交雑しても、前述のように花粉を介した遺伝子拡散は生じない。

本第一種使用等では、隔離ほ場外部で栽培されているタバコほ場までは 5 km 以上離れていることや、隔離ほ場外周には花粉の飛散を低減するための防風林

を設置していること、タバコの自殖性が高いことから、花粉が外部に飛散して隔離ほ場外部に栽培されているタバコと交雑することは考えにくい。

さらに、本組換えタバコは葉緑体形質転換体であり、導入遺伝子が母性遺伝をすることから、他のタバコと交雑しても、交雑種子には導入遺伝子は伝達されない。葉緑体形質転換タバコと非組換えタバコの雑種後代においても葉緑体に導入した遺伝子が増殖するとは考えにくい。

以上のことから、本第一種使用等では交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生植物は特定されなかったため、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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ため、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えタバコを第一種使用規程に従い使用等する場合、上記の評価から、交雑性についての生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

本第一種使用等は、本組換えタバコ及び本組換えタバコと非組換えタバコの雑種後代を第一種使用規程に従い隔離ほ場に限定して使用等するものであるから、野生動植物と競合することはない、仮に隔離ほ場内において競合における優位性が認められた場合であっても、遺伝子組換え生物等の持ち出しを防止する施設・措置を講じていること、防風林の設置、十分な隔離距離の確保といった、種子・花粉の散逸防止策を講じていることから、組換えタバコは、野生植物に対して競合における優位性による影響は生じないと考えられた。

有害物質産生性については、ブロッコリーを用いた試験で、本遺伝子組換えタバコと非遺伝子組換えタバコとの間に有害物質生産性に差が認められなかった。スペクチノマイシン分解酵素や GFP に毒性が報告されていないこと、Cry43Aa1 タンパク質は、コウチュウ目昆虫にのみ毒性を発揮するが、その他の生物種には毒性が報告されていないこと、上記 3 種類のタンパク質が既知のアレルゲンタンパク質と相同性を示さないこと、さらに隔離ほ場における限定的な栽培であることから、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

交雑性については、宿主の属する分類学上の種であるタバコと交雑可能な近縁野生種が我が国には存在しないことから、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

以上を総合的に評価し、第一種使用規程に従い本組換えタバコを隔離ほ場に限定して使用した場合には、競合における優位性、有害物質産生性又は交雑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。

引用文献リスト

- 1) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. II 葉たばこのできるまで S1-1 起源 (p58-60)、山愛書院. 東京.
- 2) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. II 葉たばこのできるまで S2-2 日本のタバコ (p66-70)、山愛書院. 東京.
- 3) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. II 葉たばこのできるまで S2-1 世界のタバコ (p64-66)、山愛書院. 東京.
- 4) 岡田吉美 (2000) タバコモザイクウイルス：先駆的役割を果たした 100 年の歴史. 蛋白質核酸酵素 45(10), 1757-1765
- 5) Skoog F and Miller CO. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.
- 6) Vasil, V. and Hildebrandt, A.C. (1965a) Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. *Science* 147, 1454-1455.
- 7) Vasil, V., and Hildebrandt, A.C. (1965b). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science* 150, 889-892.
- 8) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. IV タバコの科学 S2-3 タバコ植物細胞の全能性 (p192)、山愛書院. 東京.
- 9) Carlson P. S. et al. (1972) Parasexual Interspecific Plant Hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69(8), 2292-2294.
- 10) Nakata K. and Tanaka M. (1968) Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. *Jap. J. Genet.* 43, 65-71
- 11) De Block M. et al. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.* 3(8), 1681-1689.
- 12) Horsch R.B. et al. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science.* 3:223(4635), 496-498.
- 13) Svab Z. et al. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(21), 8526-8530.
- 14) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. II 葉たばこのできるまで S3-1 タバコ栽培の特徴 (p70-78)、山愛書院. 東京.
- 15) 新實和也 (編集) (2011) たばこの事典. II 葉たばこのできるまで S1-2 諸特性 (p60-61)、山愛書院. 東京.
- 16) 作間宏彦 タバコの栽培法 植物細胞工学 5(5), 74-77.
- 17) Yokoyama T. et al. (2004) Novel cry gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain Semadara inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. *J Invertebr Pathol.* 85(1), 25-32.
- 18) Yokoyama T. et al. (2003) A new of *Paenibacillus lentimorbus* isolated from larvae of the oriental beetle, *Blitopertha orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae), in Chiba Prefecture, Japan. *Appl Entomol Zool* 38(4), 523-528
- 19) Okuzaki A. and Tabei Y. (2012) Improvement of the plastid transformation protocol by modifying tissue treatment at pre- and post-bombardment in tobacco. *Plant Biotechnology.* 29, 307-310
- 20) 日本応用動物昆虫学会 (編集・発行) (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑、国際文献印刷社、東京.
- 21) 梶原敏宏、梅谷献二、浅川勝 (編著) (1986) 作物病虫害ハンドブック. 養賢堂. 東京.

平成 26年 2月 26日

氏名 独立行政法人 農業生物資源研究所
 理事長 廣近 洋彦 印
 住所 茨城県つくば市観音台2-1-2

第一種使用規程の承認を申請している Cry43Aa1 発現葉緑体形質転換タバコの第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

業務管理責任者	河瀬 眞琴	遺伝資源センター長 (Tel: 029-838- <input type="text"/>)
業務管理主任者	古賀 保徳	安全管理室 主任研究員 (Tel: 029-838-7927)
業務従事者	田部井 豊	遺伝子組換え研究センター 遺伝子組換え研究推進室 室長 (Tel: 029-838- <input type="text"/>)
業務従事者	<input type="text"/>	遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット 研究支援者 (Tel: 029-838- <input type="text"/>)

(以上は現時点での体制及び責任者であり、異動や所内での業務体制の見直しによる変更の際には適切な対応を行う)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 第一種使用等の状況は、作業従事者から得られた情報により把握するとともに、農業生物資源研究所遺伝子組換え実験安全委員会（作物業務安全委員会）による視察を行う。なお、本委員会の現時点における構成は以下の通りである。

河瀬 眞琴	遺伝資源センター長 (委員長)
古賀 保徳	安全管理室 主任研究員
飯 哲夫	植物科学研究領域長
土岐 精一	農業生物先端ゲノム研究センター ゲノム機能改変研究ユニット長
山崎 宗郎	遺伝子組換え研究センター 耐病性作物研究開発ユニット 主任研究員
大竹 祐子	遺伝子組換え研究センター 耐病性作物研究開発ユニット 研究員 (兼)知的財産室
土門 英司	遺伝資源センター 遺伝資源国際連携室 主任研究員
友岡 憲彦	遺伝資源センター 多様性活用研究ユニット長

西村 宜之	遺伝資源センター 放射線育種場 主任研究員
秋本 千春	植物科学研究領域 植物・微生物間相互作用研究ユニット 主任研究員
小松 晃	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 稲研究領域 主任研究員 (稲遺伝子技術研究分野)
岡本 晋	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能解析ユニット長
松尾 和人	(独) 農業環境技術研究所 生物多様性研究領域 上級研究員
井濃内 順	広報室長
小山 朗夫	技術支援室長
田部井 豊	遺伝子組換え研究センター遺伝子組換え研究推進室長
立石 剣	安全管理室長

(2) 当該タバコについては管理を徹底し、部外者が入手できないようにするとともに、その情報を整理して記録する。

(3) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、得られた情報を整理し、記録する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

業務従事者等の間での情報共有を速やかに行う。また、生物多様性が生ずるおそれが認められたことを直ちに隔離ほ場のある自治体に電話、ファックス、電子メール、および文書などにより連絡する。さらにホームページ等でお知らせを掲載する。

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

隔離ほ場で栽培されているタバコを当該隔離ほ場外へ持ち出す場合には、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）第12条又は第13条で定める拡散防止措置を実施する。不要な種子は漏出しないような容器に納め、隔離ほ場内のオートクレーブまたは焼却炉を用い不活化する。栽培したタバコは、地上部は刈り取りオートクレーブ又は焼却炉を用い不活化する。残りのタバコの残さ及び発生した植物は速やかに隔離ほ場内に埋設又はすき込み処理により確実に不活化する。

5 文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、緊急措置を講じた後、速やかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

【別紙2】 隔離ほ場の情報

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

独立行政法人 農業環境技術研究所 隔離ほ場

2. 住所

茨城県つくば市観音台3-1-3（図1、2）

3. 連絡先電話番号

029-838-7927（農業生物資源研究所 安全管理室）

II. 試験期間

承認日から 平成30年3月31日

III. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、立入禁止であること及び管理責任者の氏名を記載した標識、洗場、焼却炉を設置している。また、周囲には高さ10m前後の防風林がある。

枠水田や畑ほ場を備えている（図3、4、5）。

IV. 面積

隔離ほ場全体の面積約82a（うち、現状で、水田約5.2a、畑ほ場約13.8a）

V. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

茨城県つくば市内、筑波・稲敷台地に位置する

2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は防風林で囲われ、また、防風林を含めた隔離ほ場は、研究機関の敷地内にある。隔離ほ場外周から研究機関の敷地境界まで最短で約50mである。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

半径1km圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域）はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約10キロである。

4. 気象条件

隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点である茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値を表1に示した（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス日 2014年1月23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1 茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値

つくば(館野) 平年値(年・月ごとの値) 主要要素						
要素	降水量 (mm)	気温 (°C)			風向・風速 (m/s)	日照時間 (時間)
	合計	平均	最高	最低	平均	合計
統計期間	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010
資料年数	30	30	30	30	30	30
1月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	171
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	173.3
5月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	123.9
10月	165.9	16	20.9	11.3	2	136.5
11月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	146.5
12月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	181.3
年	1282.9	13.8	19.1	8.8	2.4	1912.8

5. 台風の襲来歴

隔離ほ場のある関東地方への過去10年間の台風の接近数を表2に示した（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス日 2014年1月23日、http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html）。

表2 関東地方への過去10年間の台風の接近数（台風が茨城県、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以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）に接近した台風」としています。）

（注）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ません。

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
2013									1	2			3
2012									1	2			3
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3
2004					1	1		2	1	2			7

6. 過去10年におけるほ場冠水の経験とその程度

1991年に隔離ほ場を建設して以来、冠水したことはない。

7. 過去10年における強風の経験とその程度

1991年に隔離ほ場を建設して以来、強風による設備・作物への被害はない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、つくば市が作製した「つくば市洪水ハザードマップ」において、浸水想定区域に指定されていない。

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、イネの栄養生長期における鳥類による被害は報告されていない。出穂期以降は防鳥網によってこれらの侵入を防ぐことができる。また、隔離ほ場にはフェンスが設置されており、獣害は発生していない。

VI. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え植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植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。
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
交雑可能な近縁野生種はない。

VII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は以下のとおりである。

栽培年月		植物
2009年	1月－2月	ワタ*
	1月－2月	ダイコン
	1月－4月	コムギ
	6月－8月	ソルガム
	10月－12月	コムギ
2010年	1月－4月	コムギ
	6月－8月	ソルガム
	10月－12月	コムギ
2011年	1月－4月	コムギ
	6月－8月	ソルガム
	11月－12月	コムギ
2012年	1月－4月	コムギ
	6月－12月	イネ*
	6月－8月	ソルガム
	11月－12月	コムギ
2013年	1月－6月	コムギ
	1月－1月	イネ*
	7月－9月	ソルガム
	6月－12月	イネ*
	10月－12月	コムギ

2012年のイネは水田区域における栽培。その他は畑ほ場における栽培
色づけした履歴は、越年で栽培をしたもの

*は遺伝子組換え植物を含む

2. 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培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、緊急措置計画書にしたがって速やかに対策を講じる。

3. 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。なお、本遺伝子組換えイネの栽培終了後も、本隔離ほ場では遺伝子組換え植物の栽培を行う予定である。

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)適切な除草管理等を行う。

(2)本遺伝子組換えイネ及び同時に栽培した非遺伝子組換えイネを隔離ほ場外に持ち出す場合には、第二種使用等として遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）第 12 条又は第 13 条で定める拡散防止措置を実施する。

(3)(2) 以外で、隔離ほ場内で本遺伝子組換えイネ及び同時に栽培した非遺伝子組換えイネの不活化を行う場合は、試験終了後、地上部は刈り取り、オートクレーブ又は焼却炉を用い確実に不活化する。登熟期前のもについてはすき込み処理を行い確実に不活化する場合もある。刈り取られない残りのイネの残さ及び発生した植物は隔離ほ場内に埋設又はすき込み処理により確実に不活化する。

(4) 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、意図せずに本遺伝子組換えイネが隔離ほ場外に持ち出されることを防止する。

(5)隔離ほ場の設備が有する機能が発揮されるよう維持及び管理を行う。

(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)本遺伝子組換えイネによる生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。



図1 農業生物資源研究所・農業環境技術研究所周辺の地形図（国土地理院のウェブサービスより）隔離ほ場は星印の場所に位置する

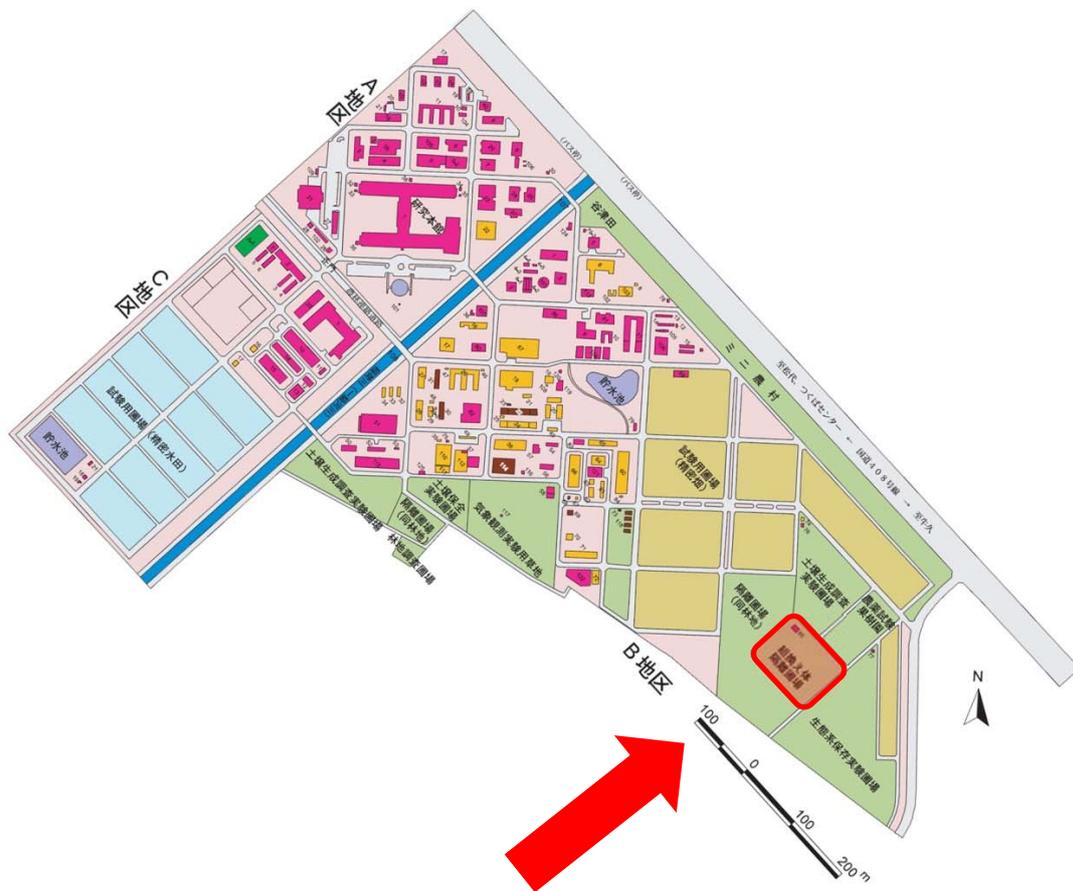
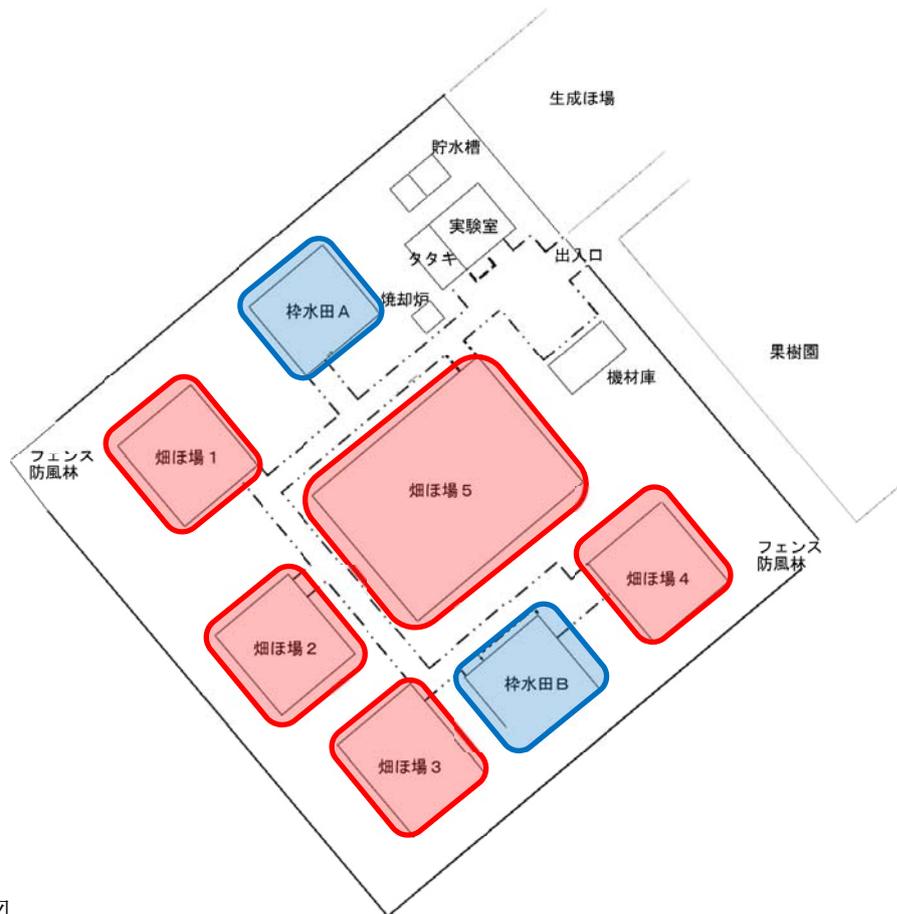


図2 農業環境技術研究所所内配置図



A.航空写真（グーグルより）



B.配置図

図3 隔離ほ場内の配置の現状。梓水田（青）や畑ほ場（赤）がある。



図4 粹水田の例 (図3Bの「粹水田A」)



図5 畑ほ場の例 (図3Bの「畑ほ場2」)

【別紙 3】栽培計画に関する情報

(隔離ほ場における試験計画)

今回、申請者は

遺伝子導入は1品種 (SR-1) に対して、1 コンストラクションのベクターを用いて遺伝子導入を行った葉緑体形質転換タバコを、隔離ほ場栽培で栽培試験を行うことを計画している。

具体的には、第二種使用等 (閉鎖系温室栽培) で確認された Cry43Aa1 タンパク質の生産と生育といった表現型について、屋外環境で以下の項目をさらに調査するとともに、葉緑体の遺伝子発現は核の遺伝型により影響される場合があることから、本葉緑体形質転換タバコにおいて、核型と遺伝子発現の関連を明らかにすることにより、物質生産系として葉緑体形質転換体について基礎的知見を得ることを目的とする。

1. 第二種使用等 (閉鎖系温室栽培) で確認された Cry43Aa1 タンパク質の生産性や生育特性を、より自然な環境であるほ場栽培で評価する。
2. 核型と葉緑体における遺伝子発現の関連を評価するために、品種‘キサンチ’及び‘遠州’を交配及び連続戻し交雑を行い、核型の変化が葉緑体へ導入した遺伝子の発現に及ぼす影響を評価する。
3. なお、現在のところ、入手しているタバコ品種は上記 2 品種であるが、今後、特性の異なるタバコ品種が入手可能となり、その品種が核と葉緑体との相互作用に何らかの影響を及ぼすとする知見があれば、それらの品種も供試する予定としている。

以上のような項目について解析することを目的としている。

遺伝子組換えタバコは、独立した再分化個体を最大で 10 系統を用いることを検討しているが、葉緑体形質転換体の場合、相同組換えで目的の箇所に外来遺伝子を導入するため、ホモプラズミックな状態になれば、イベントの違いが明確でなくなる。現在、ホモプラズミックな後代を最大で 800 株程度を栽培し、Cry43Aa1 生産性や生育特性等の評価に供試する予定としている。