

パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ (改変 *PRSV CP, uidA, nptII, Carica papaya L.*) (55-1, OECD UI: CUH-CP551-8) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(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	4
(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	7
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	7
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	7
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及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度	8
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
ホ 病原性	9
ヘ 有害物質の産生性	9
ト その他の情報	10
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	11
(1) 供与核酸に関する情報	11
イ 構成及び構成要素の由来	11
ロ 構成要素の機能	15
① 目的遺伝子、発現調整領域、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	15
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている	

蛋白質と相同性を有する場合はその旨	15
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	16
(2) ベクターに関する情報	17
イ 名称及び由来	17
ロ 特性	17
① ベクターの塩基数及び塩基配列	17
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	17
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	18
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	18
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	18
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	18
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	18
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	18
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	19
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	19
(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
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	22
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	22
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	27
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	27
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動物等に伝達されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度 ..	30
(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	30
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	30
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又は生態学的特性の具体的な内容	30
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	31

a	形態及び生育の特性.....	31
b	生育初期における低温又は高温耐性.....	32
c	成体の越冬性又は越夏性.....	32
d	花粉の稔性及びサイズ.....	32
e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	33
f	交雑率.....	34
g	有害物質の産生性.....	34
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	34
(1)	使用等の内容.....	34
(2)	使用等の方法.....	34
(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.....	34
(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.....	35
(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の環境での使用等の結果.....	35
(6)	国外における使用等に関する情報.....	35
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	36
1	競合における優位性.....	36
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	36
(2)	影響の具体的内容の評価.....	37
(3)	影響の生じやすさの評価.....	37
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	37
2	有害物質の産生性.....	37
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	37
(2)	影響の具体的内容の評価.....	39
(3)	影響の生じやすさの評価.....	39
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	39
3	交雑性.....	40
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	40
(2)	影響の具体的内容の評価.....	40
(3)	影響の生じやすさの評価.....	40
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	40
4	その他の性質.....	40
第三	生物多様性影響の総合的评价.....	44
	参考文献.....	47
	緊急措置計画書.....	57
	パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統の提出資料リスト.....	60

第一種使用規程承認申請書

平成16年8月18日

5

農林水産大臣 亀井 義之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

10

氏名 ハワイパパイヤ産業協会 日本事務所
申請者 代表 重園 炯
住所 東京都足立区千住関屋町 11-8
向陽ビル

15

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。

20

25

5

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ (改変 <i>PRSV CP</i> , <i>uidA</i> , <i>nptII</i> , <i>Carica papaya</i> L.) (55-1, OECD UI: CUH-CP551-8)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	食用に供するための使用、栽培、加工、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	—

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 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

① 和名、英名及び学名

10

和名: パパイヤ [別名: 木瓜 (モクカ)、乳瓜 (チチウリ)]

英名: Papaya

学名: *Carica papaya* L.

15

② 宿主の品種名又は系統名

宿主はパパイヤ科パパイヤ属のソロ型パパイヤ品種 **Sunset** である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

栽培種パパイヤは中央アメリカの小さな果実をつける種を祖先としており (Badillo, 2000)、現在では全ての熱帯地域と多くの亜熱帯地域で栽培されている。一方、野生パパイヤは起源とされる中央アメリカ (北は南部メキシコやユカタン半島、南はホンジュラスまで) のカリブ海沿岸地域に見られ、通常はある程度人の手により開拓された熱帯雨林に自生している (Paz and Vázquez-Yanes, 1998)。

30

わが国においては、小笠原諸島などでパパイヤが野生化しているとの報告があるが (www2.kankyo.metro.tokyo.jp/sizen/isan/pdf/kentou-all.pdf)、具体的な生育地域は明らかでない。しかし、海外の文献などから最適生育温度は 21~33℃であり (Nakasone and Paull, 1998)、生育に必要な最低気温は 15℃であることが分かった (Samson, 1986)。また、霜に対して非常に敏感である上、夜間数時間の気温が 12~14℃以下になると生育に大きな影響を受ける。また、生存のための最低気温は -1℃と報告されているが (Samson, 1986)、0℃では凍害を受け枯死するとも言われている。このことから日本列島でパパイヤが生育することが可能な地域は、冬日 (最低気温 0℃未満) がなく (別添資料 1, p18)、月平均の最低気温が 12℃以下にならない沖縄本島全域を含む奄美大島南部以南の島々、小笠原諸島及び南鳥島に限られると考えられた。

35

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

5 パパイヤは中央アメリカ（南部メキシコと北部ホンジュラスの間の地域）で最初に栽培種として利用された（Manshardt and Zee, 1994）。この地域は古代マヤ文明の中心で、今日の栽培種パパイヤはマヤ民族による野生パパイヤからの長期間にわたる選抜により生まれたと考えられる。「パパイヤ」とはカリブインディアン

10 の言語で甘味を意味する言葉であることから食品としての長い歴史を示している（de Mello and Spruce, 1869）。

 欧州人によるアメリカ大陸の征服以後、パパイヤはスペインとポルトガルの貿易ルートに沿って急速に熱帯地方全域に広がり、今日では熱帯地方の食生活に欠かせない食品（特にビタミンA及びCの供給源）となっている（Nakasone and Paull, 1998）。熱帯低地では庭木や玄関先の植込みとして普通に見られる植物であり、

15 年間を通じて絶えず果実を着ける性質から好まれている（Gonsalves, 1998）。最近では温帯地域の消費者にも国際商品として親しまれている（Samson, 1986）。

 パパイヤが沖縄へ伝えられたのは、フィリピンなどへ導入された16世紀半ばと同時期であるとされている（山崎ら, 2004）。その後、わが国では、国内の各地温室で標本として栽培されてきた。

20

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

 パパイヤの栽培は赤道を中心とする熱帯及び亜熱帯地域で行われており、重要な商業作物となっている。主なパパイヤの生産国はブラジル（190万トン）、メキシコ（80万トン）、ナイジェリア（77万トン）、インド（70万トン）、インドネシア（65万トン）であり、これら5カ国で全生産量の約69%を占める（FAO, 2007）。主要な輸出国にはメキシコ（9.5万トン）、マレーシア（5.1万トン）、ベリーズ（3.4万トン）、ブラジル（3.2万トン）等の国々が挙げられる（FAO, 2006）。

25

 現在の国内生産は沖縄県が中心になっており、2006年には1,420トンを生産しており、沖縄県の重要な商業用熱帯果樹となっている（沖縄県農林水産部農林水産企画課統計資料, 2006）。国内での栽培の他、2008年度には約3,817トンが海外から輸入されており、そのうち、76.5%にあたる約2,918トンがフィリピン産、23.3%にあたる約889トンがアメリカ産である（財務省貿易統計, 2008）。

30

35

 パパイヤ栽培は熱帯/亜熱帯地域ではプランテーションによる大規模栽培か家庭栽培的な小規模栽培である（田部井, 2000）。パパイヤの繁殖は主に種子が使用さ

れ、発芽には 10~21 日間を要する (OECD, 2005)。苗は双葉期に育苗箱に移植し、
5 陽光に当て硬化させる。発芽後 1.5~2 ヶ月経過し、草丈 20 cm に達すれば本畑に定
植する (Nakasone and Paull, 1998)。条件を整えば定植後約 100 日で最初の開花が見
られ、有性生殖が可能となる (Marler and Discekici, 1996 adopted in Nakasone and
Paull, 1998)。熱帯地域では、成木は年間を通じて開花し有性生殖が可能であるが、
10 亜熱帯地域では冬の間は結実しない (Nakasone and Paull, 1998)。最初の完熟果実は
最短で定植後約 7 ヶ月目に収穫をすることができる (Marler and Discekici, 1996
adopted in Nakasone and Paull, 1998)。以後、開花結実を続けるが数年で果実が小さ
くなり数量も減る。また、樹高が高くなりすぎて管理に不適切であるため、切り
戻しを行うか、若しくは新しい苗が植えられる (Samson, 1986)。

わが国では、露地栽培とハウス栽培の両方が行われているが、パパイヤは高価
15 で取引されるため、冬の低温や梅雨、台風による被害を避ける目的でハウス栽培
されていることが多い。

成熟した果実は香りが高く、カルシウム、ビタミン A 及びビタミン C が豊富で
主に生食用に利用されている。また、未熟パパイヤ (青パパイヤ) はアジア各国で
20 野菜としてサラダなどに利用されるほか、青パパイヤから乳液を抽出し、その成
分であるパパイン (蛋白質分解酵素) を食肉軟化材や消化薬として食品工業や薬
学分野で活用している (Nakasone and Paull, 1998)。わが国でもパパインは食品添加
物に指定されており、幅広い用途に利用されている (田部井, 2000)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

25 イ 基本的特性

パパイヤは種子繁殖と栄養繁殖の両方を行う常緑多年生草本の植物である。1 本
30 の直立した茎は高さ 2~10 m に達し、大きな葉により樹冠を形成する (OECD, 2005)。
通常、茎は枝分かれすることなく成長し、半木質化して中空である。外皮は平滑で
灰色であり、大きな葉痕 (葉の脱落跡) がある。常に新しい葉が茎の頂端に展開し、
古い葉は枯れて脱落する。葉は掌状に切れ込みがあり、葉脈が際立っており、直径
40~50 cm に達する (Nakasone and Paull, 1998)。

花は葉柄の基部に生じ、元来、雌雄異株性 (dioecism) であるが、近年の栽培種は
35 雌雄同株性 (monoecism) や両性花 (hermaphrodite flower) のものが多い (久保,
1987)。55-1 系統パパイヤの宿主である Sunset は雌性両全性異株 (gynodioecious) で
あり、分離によって雌株若しくは両性花株のいずれかになる (以下、『55-1 系統パ
パイヤ』を本組換えパパイヤと記す)。両性花株の Sunset を自殖することにより得られ

- た個体を本組換えパパイヤの開発に使用しており、本組換えパパイヤ R0 世代は雌株であった。雌株は、4~6cm の短い花柄に雌しべを持った雌花のみをつけ、雄しべは欠く。5 枚の花弁は離れているが、子房の基のところにつながっている。また、本組換えパパイヤの後代には両性花株も含まれる。両性花の形態は雌雄単性花タイプの中間であるが、多様である。基本的な花の形は、長く伸びた雌しべ、5 つの柱頭放射状組織、そして 2/3 の長さのところにつながっている 5 枚の花弁であり、この花弁が花冠管を形成している。この花にも 5 本×2 組から成る 10 本の雄しべがある。雌しべは通常 5 枚の心皮からなり、形は様々である (Nakasone and Paull, 1998)。
- 5
- 10 宿主である Sunset の両性花につく果実は洋ナシ形で、重さ 400g~600g、果肉の厚さ 2cm、糖度 12~17%である (Hamilton *et al.*, 1993)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

- 15 パパイヤの栽培は北緯 30 度から南緯 40 度の間で見ることが出来るが、商業栽培は南北緯 25 度の赤道近辺を中心に行われている (OECD, 2005)。各種の土壌で生育可能であるが排水性が不可欠であり、排水が悪いと根腐されを引き起こす。土壌 pH は 5.0~7.0 が栽培に適しており (Nakasone and Paull, 1998)、pH6.5~7.0 が最も好ましいと考えられている (Singh, 1990)。最低 350mm の降雨量が必要であるが、過度の水分は植物体及び果実に悪影響を及ぼすため、2,500mm を越えてはならない (Singh, 20 1990)。最適な生育に必要な相対湿度は 60%以上である (FAO, 1986)。最適生育温度は 21~33°C であり (Nakasone and Paull, 1998)、生育に必要な最低気温は 15°C である (Samson, 1986)。霜に対して非常に敏感である上、夜間数時間の気温が 12~14°C 以下になると生育に大きな影響を受ける。また、生存のための最低気温は -1°C と報告されているが (Samson, 1986)、0°C では凍害を受け枯死するとも言われている。直射日光が生育に必要で、日陰で栽培すると生育は損なわれる (Nakasone and Paull, 1998)。また、気温と直射日光は果実の成熟にも非常に重要な役割を果たしており、温度が低いと成熟までの時間が長くなり、糖度も下がることが知られている (Nakasone and Paull, 1998; Samson, 1986)。光周期の影響の報告はない (Lange, 1961b)。パパイヤの木は風に対して非常に弱く、特に雨が降って土が軟らかくなっている場合には、風速 18m/s ほどで倒伏する。また、木が倒れなくても葉に相当な損傷を与え、結果として花や若い果実の離脱を引き起こす (Nakasone and Paull, 1998)。
- 25
- 30

ハ 捕食性又は寄生性

35

—

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

5 成熟した果実の中には丸型や星型のような空洞があり (Nakasone and Paull, 1998)、その内部に数百から千個ほどの種子を形成する (土橋, 2003)。種子の色は濃い灰色から黒色で、ゼリー状の肉質種皮 (sarcotesta) で覆われている。無種子、若しくは種子の少ない果実は雌花植物に形成される (Nakasone and Paull, 1998)。種子は数センチの厚さの果肉に包まれているので脱粒の可能性は極めて低い。

10

果実中の種子は発芽抑制物質を含む肉質種皮 (sarcotesta) で覆われているため、この肉質種皮 (sarcotesta) を取り除いて播種される栽培時と比べて発芽率が劣ることが知られている (Lange, 1961a)。パパイヤの種子は空気乾燥された状態で1個当たり 50 mg 程度である (Samson, 1986)。よって、風による遠距離の種子飛散の可能性は低いが、鳥類や哺乳類が果実を食べた場合に飛散が起こる可能性はある。

15

Sunset 種子の発芽率についての報告はこれまでのところないが、種子の発芽率は品種によって大きく異なることが知られている (3~71%) (Bhattacharya and Khuspe, 2001)。

20

野生パパイヤは発芽抑制物質を含んだ肉質種皮 (sarcotesta) を取り除いた場合でも栽培種パパイヤと比べて一定期間内の発芽種子の数が少なく、発芽までの日数も長いことが報告されている。これは野生パパイヤが休眠打破や発芽時期に光など特定の環境的条件を必要としているためであり、もし土壌中に埋められた場合には休眠状態で長期間生存しうると考えられている。一方、栽培種のパパイヤは野生パパイヤほど光などの環境的条件に対して感受性が高くないため、野生パパイヤに見られるほどの休眠性は有していない (Paz and Vázquez-Yanes, 1998)。

25

種子は、相対湿度 9~12% で長期保存することができ (Teng and Hor, 1976; Ellis *et al.*, 1991)、低温で乾燥した場所では3年間は生存可能であると言われている (Malo and Campbell, 1994)。一方、室温での乾燥保存や土壌保存では3年後の発芽率は0%であったと報告されている (Orozco-Segovia and Vazquez-Yanes, 1990)。

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

35

パパイヤは種子繁殖と挿し木、接ぎ木、ヒコバエなどによる栄養繁殖の両方が可能である。しかし、栄養繁殖は経済性が劣ることを理由に栽培農家では行われ

ていない (Samson, 1986)。

- 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及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度

5

本組換えパパイヤの宿主である Sunset は雌性両全性異株 (gynodioecious) であるため、後代では分離によって雌株と両性花株の両方が出現する。Sunset と近縁にあるソロ型パパイヤ Sunrise を本組換えパパイヤと隣接して栽培したところ、その他家受粉率は雌株では 70%、両性花株では 13%であり、両性花株においては自家受粉率が高いことを示している (別添資料 2)。これは、通常の両性花は自然に自家受粉を行うような花の構造になっているためである。また、両性花株において自家不和合性は稀である (Nakasone and Paull, 1998)。

10

栽培種パパイヤと近縁にある野生パパイヤは中南米及び赤道アフリカの熱帯地域に生育しているが、近縁野生種との交雑は人間の手が加わらない限り不可能であることが知られている (Manshardt and Wenslaff, 1989a; Manshardt and Drew, 1998)。なお、わが国にはパパイヤと交雑可能な近縁野生種は自生していない。

15

これまでの研究から、もし胚培養 (embryo rescue) などを行った場合には、受粉していないパパイヤの胚珠でも種子を産生する可能性があることが明らかになっており (Tokumoto *et al.*, 2000a, b; Vegas *et al.*, 2003)、これは一倍体の卵子が倍加することによってアポミクシスの胚が発生したのではないかとされている。しかし、アポミクシスによって発生した胚珠は内胚乳を欠いているため、このような種子は発芽しないと考えられている。これまでのところ、パパイヤが発芽の可能性のあるアポミクシス種子を産生したという報告はない。

20

25

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

パパイヤは花の種類 (雄花、両性花など) や品種によって異なるが、一花当たり約 100,000~150,000 個の花粉を生産する (Lassoudiere, 1968; Parés-Martínez *et al.*, 2004)。しかし、同品種であっても果肉が黄色の Cartagena 品種は赤色の Cartagena 品種と比べて 20%ほどの花粉生産量 (~23,000 花粉粒子/花) しか無いという報告もある (Parés *et al.*, 2001)。一本の木当たりの花粉生産量は性別によって着花数が異なるため、これまで観察された一花当たりの花粉生産量に基づくと、両性花株では一日当たり 100,000~750,000 個、雄株ではこれの数倍になると推測される。

30

35

本組換えパパイヤの宿主である Sunset の花粉稔性は 95%であった (Lius, 1994)。花粉の生産量と稔性のいずれも季節によって変化することが知られている。一年

を通して平均 90%ほどの花粉稔性は、品種によっては寒い時期に 45%、低いものでは 4.5%ほどにまで減少する (Garrett, 1995)。また、花粉の発芽率も最低気温が 10℃を下回ると通常は 40~80%であるものが 10%以下にまで落ちたと報告されている (Cohen *et al.*, 1989)。

5

パパイヤの受粉は、昆虫の花粉媒介者としての役割が大きいと考えられているが、風媒によっても起こると考えられている。これまで様々な昆虫 (アザミウマ、蛾、ハエ、蚊など) がパパイヤの木を訪れている所を観察されているが、それらの花粉媒介者としての役割は未だ明確では無い (OECD, 2005)。

10

ハワイにおいて本組換えパパイヤから同じほ場内に栽培されている非組換えパパイヤへの花粉飛散及び遺伝子移動についての調査が行われた (別添資料 2)。その結果、ほとんどの交雑は本組換えパパイヤから 9m 以内の地点で確認されており、本組換えパパイヤからの距離が増大するにつれて交雑率が減少する傾向が見られた ($r=-0.32$)。この試験において試験区の最長距離である 26 m の地点でも交雑が確認されたことから、花粉は風若しくは昆虫の媒介によってこの程度の距離は飛散するものと推測される。しかし、この試験は花粉の最長飛散距離を調べるために十分な規模でなかったため、その後、400m ほど離れた場所にあるパパイヤ栽培農家の農場において補足的な試験を行った。その結果、この農場で栽培されている非組換えパパイヤからは本組換えパパイヤ由来の導入遺伝子が検出されなかったため、推定値ではあるが花粉飛散は 400m 以上の距離では起こりにくいと思われる。

15

20

25

パパイヤの花粉の寿命は比較的長く、室温に置かれたペトリ皿では、16 日後に 16%の花粉が稔性を維持していたと報告されている (Sharma and Bajpai, 1969)。また、5℃では、花粉を数ヶ月間保存することは可能であり、-18℃では、より高い発芽率を維持した状態で 6ヶ月以上の保存が可能である (Cohen *et al.*, 1989)。これまでのところ自然条件下でのパパイヤ花粉の寿命についての報告は無い。

ホ 病原性

30

—

ヘ 有害物質の産生性

35

パパイヤ種子の抽出物にはベンジルイソチオシアン酸塩 (BITC) が含まれている。これまでの研究からパパイヤ種子の抽出物は様々な哺乳類組織や器官に機能障害を引き起こす可能性があること示唆されており、これはBITCの毒性によるものであると考えられている (Adebisi *et al.*, 2003)。しかし、アジアや南アメリカの一部の地

域では、BITCを含むパパイヤ種子の抽出物を駆虫薬や墮胎剤として使用してきた歴史がある (Krishnakumari and Majumder, 1960; Quisumbing, 1951; Rao and Jamir, 1982)。例えば、アーユルベータの伝統的な療法では0.5~1gの粉末パパイヤ種子が処方される (Kapoor, 1990)。また、キューバでは駆虫薬として一日あたり最大4.5gの種子の摂取を推奨している (Roig y Mesa, 1974)。

BITCはベンジルグルコシノレートが酵素であるミロシナーゼに触媒されることにより産生されるが、主にベンジルグルコシノレートは内胚乳に、一方、ミロシナーゼは種子を覆う肉質種皮 (sarcotesta) に含まれているため (Tang, 1973)、種子が砕かれるあるいは傷を付けられない限り基質と酵素が接触することはなく、多量のBITCは産生されない (Kermanshai *et al.*, 2001)。

一方、BITC はイソチオシアン酸塩族 (ITC) のひとつであり、ITC と同様に抗癌作用があると言われている。BITC を含めた様々な ITC 族の物質は、化学発癌に対して化学保護剤として効果的であることが実験動物によって確かめられている。疫学的研究でも、ITC を含む食品を日常的に摂取することにより肺癌や乳癌、結腸癌になるリスクが減少することが示されており、その抗癌作用が示唆されている (Zhang *et al.*, 2003; Basu and Haldar, 2008; Traka and Mithen, 2009)。さらに抗癌作用以外にも、BITC には、今日の農業において重要な主要作物に被害を及ぼし、毎年、世界中で甚大な損失を与える植物寄生性の線虫を防除する働きがあると言われている (Zasada *et al.*, 2009)。

葉や未熟果実に含まれる乳液には蛋白質分解酵素であるパパインが含まれており、パパイヤ植物の草食性昆虫に対する防御として重要な役割を果たしていることが知られている (Konno *et al.*, 2004)。Konno *et al.* (2004) の試験では、パパイヤの葉あるいはパパインを含む人工餌をチョウ目昆虫の幼虫に与えたところ、パパインが幼虫に対して毒性あるいは成長の抑制作用があることを確認している。

また、妊娠中に未熟パパイヤを摂取することによる胎児への影響が懸念されているが、果実が熟すにつれてパパイン量は減少するため、完熟果実におけるパパイン濃度は極めて低く (Thomas and Beckly, 1923 cited in Traub *et al.*, 1935)、実際にマウスを使った実験から、熟した果実を摂取しても胎児への影響は無いことが報告されている (Adebisi *et al.*, 2002)。

パパイヤの重要なアルカロイドであるカルパインは、パパイヤ植物の緑色の部分全体及び種子に含まれており (Burdick, 1971)、徐脈効果などの生理活性が有るとの報告がある (Burdick, 1971; Hornick *et al.*, 1978)。

ト その他の情報

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 世界のパパイヤ生産地において、パパイヤリングスポットウイルス (以下、『PRSV』
とする) はパパイヤ生産を阻害する最重要病原として位置づけられている。PRSV
に感染することにより発症する主な病状は、果実に現れる明瞭な輪点 (リングスポ
ット)、葉のモザイク症状や白化症状の他に、生育の抑制や果実肥大の不良及び糖度
の低下などがある (Gonsalves, 1998; 田部井, 2000) (別添資料 3)。ウイルスの媒介は
感染している木からのアブラムシの移動によって起こる¹ (Gonsalves, 1998)。

10 PRSV による被害は世界中のパパイヤ栽培地域から報告されており、ハワイでも
PRSV の感染により壊滅的な被害に見舞われてきた (Gonsalves, 1998)。これまで数々
の防除法 (媒介昆虫の駆除、クロスプロテクション法、品種改良など) が試行され
てきたが何れもその効果に限度があり、PRSV の蔓延を抑えることは困難であった。
15 しかし、1986 年にタバコモザイクウイルスの外被蛋白質 (TMV CP) 遺伝子をタバコ
へ導入して TMV 抵抗性の組換えタバコが開発されたことを受け、この技術を応用
して同年に PRSV 抵抗性パパイヤの開発が始まった。

本組換えパパイヤは、PRSV 抵抗性を付与するためにソロ型品種 Sunset へ PRSV
由来の外被蛋白質 (CP) 遺伝子を導入したものである。雌株であり目的遺伝子につ
いてヘテロ接合体である本組換えパパイヤ R0 世代に、両性花株である非組換え体
20 Sunset を交配させることによって両性花株の 55-1 系統パパイヤを作り出し、その後、
数世代にわたる自殖によって目的遺伝子についてホモである個体を作出した。これ
が SunUp である (図 2, p20)。さらに、この SunUp と非組換え体である Kapoho を交
配することによって得られた F1 ハイブリッド品種が Rainbow である (図 3, p21 及
び表 7, p35)。

25 ハワイで開発された本組換えパパイヤは、PRSV に対する抵抗性により高い収量
と優れた品質を有している。現在では、ハワイにおけるパパイヤ生産量の半分以上
は、本組換えパパイヤ Rainbow である。

(1) 供与核酸に関する情報

30

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えパパイヤの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図
1 (p12) 及び表 1 (p13~14) に示したとおりである。

¹ パパイヤ果実からアブラムシ媒介によるウイルス伝播の可能性も考えられたが、文献調査など
を行った結果、その事実は確認できなかった。

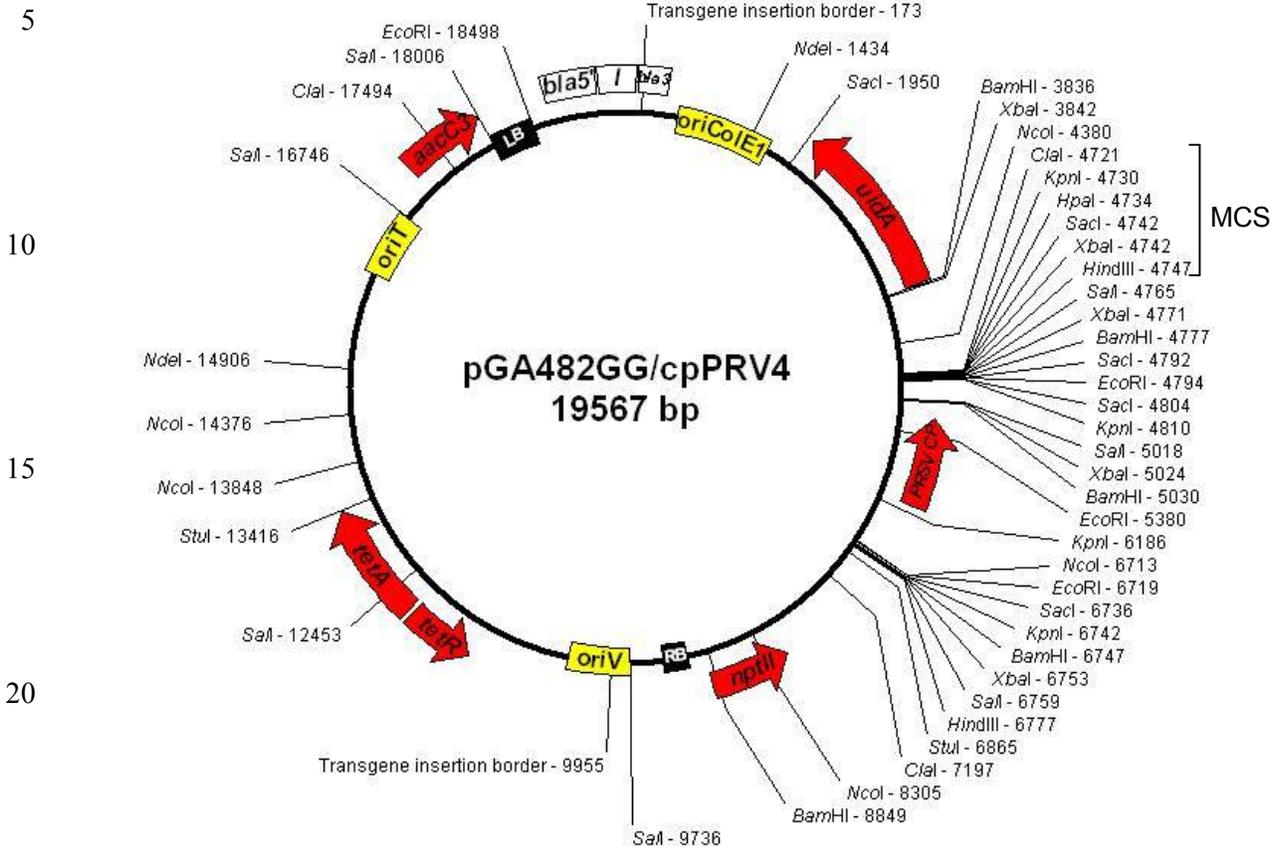


図 1 pGA482GG/cpPRV-4 のプラスミド・ベクター地図

25 赤色の矢印は目的の導入遺伝子である *uidA* 遺伝子 (GUS 蛋白質をコードしている) 及び *nptII* 遺
 伝子 (ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼをコードしている) の他、ベクターの外骨格
 配列にある *tetA* 及び *tetR* 遺伝子 (テトラサイクリン耐性を付与)、*aacC3* 遺伝子 (ゲンタマイシン
 30 耐性を付与) の ORF (オープンリーディングフレーム) を表している。プラスミドの複製開始領域
 は黄色、T-DNA 境界領域は黒色、不完全な配列 (5'及び 3'末端の *bla* 遺伝子、*cos* 部位を含む
 DNA) は白色で示した。PRSV HA5-1 株由来の *CP* 遺伝子発現カセットはプラスミド・ベクター
 pGA482GG に存在する唯一の *HindIII* 部位に組み込まれた。この図には、切断部位 4721 (*ClaI*) と
 4747 (*HindIII*) の間の多重クローニング部位 (MCS) 及び PRSV *CP* HA5-1 株由来の改変 *PRSV*
CP 遺伝子発現カセットに存在するクローニング部位を含む代表的な制限酵素切断部位の位置を
 35 示した。本組換えパライヤの導入遺伝子の解析に用いた *StuI* 部位 (解析に用いたもうひとつの制
 限酵素である *BglII* 部位は発現ベクター上には存在しない)、及びサザンブロット分析の際にポジ
 ティブコントロールとして発現ベクターの消化に用いた *NdeI* と *HpaI* 部位も記載した。

表 1 本組換えパパイヤの作出に用いた pGA482GG/cpPRV-4 の各構成要素の由来及び機能

構成DNA	サイズ* (kb)	由来及び機能
<i>npt II</i> 遺伝子発現カセット		
<i>nos</i> プロモーター	0.18	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Tiプラスミド由来のノパリン合成遺伝子のプロモーター配列で、隣接又は下流に位置する構造遺伝子の発現を制御する (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>nos::npt II</i> 遺伝子	0.82	<i>A. tumefaciens</i> Tiプラスミド由来の <i>nos</i> 遺伝子の一部と <i>Escherichia coli</i> のトランスポゾンTn5に由来する遺伝子領域との融合遺伝子。原核生物のトランスポゾンTn5より分離された <i>npt II</i> 遺伝子は、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ IIをコードしている。この遺伝子が微生物内で発現されるとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く (Beck <i>et al.</i> , 1982)。
<i>nos</i> ターミネーター	0.25	<i>A. tumefaciens</i> Tiプラスミド由来のノパリン合成遺伝子のターミネーター配列で隣接又は上流に位置する構造遺伝子の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
改変PRSV CP 遺伝子発現カセット		
CaMV 35S プロモーター	0.53	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の35Sプロモーター配列で、隣接又は下流に位置する構造遺伝子の発現を制御する (Benfey and Chua, 1990; Franck <i>et al.</i> , 1980)。
改変PRSV CP 遺伝子	0.92	パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) HA 5-1株から得られた外被蛋白質遺伝子。N末端部位にキュウリモザイクウイルス (CMV) 外被蛋白質の最初の16アミノ酸をコードする領域が融合している。
CaMV 35S ターミネーター	0.20	CaMV由来の35Sターミネーター配列で、隣接又は上流に位置する構造遺伝子の転写を終止する (Franck <i>et al.</i> , 1980)。
<i>uidA</i> 遺伝子発現カセット		
CaMV 35S プロモーター	0.83	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の35Sプロモーター配列で、隣接又は下流に位置する構造遺伝子の発現を制御する (Benfey and Chua, 1990; Franck <i>et al.</i> , 1980)。
<i>uidA</i> 遺伝子	1.81	<i>E.coli</i> 由来のβ-グルクロニダーゼ遺伝子。GUS蛋白質をコードする (Jefferson <i>et al.</i> , 1986)。
<i>nos</i> ターミネーター	0.25	<i>A. tumefaciens</i> Tiプラスミド由来のノパリン合成遺伝子のターミネーター配列で、隣接又は上流に位置する構造遺伝子の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。

構成DNA	サイズ* (kb)	由来及び機能
その他の構成要素		
<i>oriColE1</i>	1.08	pBR322よりクローンしたpColE1のプラスミド複製開始領域。
<i>bla</i> 遺伝子	0.55 & 0.32	pBR322由来のアンピシリン耐性に関与するβ-ラクタマーゼ遺伝子領域 (Sutcliffe, 1978) であるが <i>cos</i> によって分断されているため機能しない。
λ insertion	0.40	λファージの <i>cos</i> 部位を含む領域で、大きなサイズの外来DNAの導入を容易にする。
T-DNA 境界領域 (左)	0.43	<i>A. tumefaciens</i> Ti プラスミド由来のT-DNA左側境界領域で、T-DNA組込み終結点の25bpを含む (Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
<i>aacC3</i> 遺伝子 (<i>gent</i>)	0.86	<i>E. coli</i> 由来のアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシン抵抗性を付与するアミノグリコシド N3'-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (<i>aacC3</i>) (Allmansberger <i>et al.</i> , 1985)。
<i>oriT</i>	0.10	広宿主域プラスミドRK2由来のプラスミド接合伝達のための複製開始領域 (Guiney and Jakobson, 1983)。
<i>traJ</i> 遺伝子	0.37	広宿主域プラスミドRK2由来のプラスミド接合伝達に関与するリラクソソーム蛋白質のコード領域で、 <i>oriT</i> 領域の一部として組込まれている (Fürste <i>et al.</i> , 1989)。
<i>tetR</i> / <i>tetA</i>	0.65/1.20	広宿主域プラスミドRK2に由来するテトラサイクリン耐性遺伝子領域 (Schmidhauser <i>et al.</i> , 1985) で、転写調節領域である <i>tetR</i> とテトラサイクリン耐性遺伝子 <i>tetA</i> を含む。
<i>oriV</i>	0.71	広宿主域プラスミドRK2に由来する <i>Agrobacterium</i> での複製開始領域であり、ベクターに自律増殖能を付与する (Stalker <i>et al.</i> , 1981; Rogers <i>et al.</i> , 1987)。
T-DNA 境界領域 (右)	0.28	<i>A. tumefaciens</i> Tiプラスミド由来のT-DNA右側境界領域で、植物ゲノムへのT-DNAの伝達の際の開始点である 25 bp を含む。 <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへのT-DNAの導入を開始する (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。

*上記に示した DNA のサイズは各構成 DNA の大きさであり、構成 DNA 間の配列は含まれていない。

ロ 構成要素の機能

- ① 目的遺伝子、発現調整領域、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

本組換えパパイアの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (p13~14) に示した。なお、挿入遺伝子領域に含まれる改変 *PRSV CP* 遺伝子の機能については、詳細を以下に記載した。

10 **【改変 *PRSV CP* 遺伝子】**

本組換えパパイアに導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子は *PRSV* ゲノムの 9254 番目から 10120 番目の塩基に相当し、一般的な遺伝子発現の制御機能である転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) によって宿主に *PRSV* 抵抗性を付与すると考えられている (Tennant *et al.*, 2001)。この PTGS では通常どおりに転写は起こるが、その後、生成された RNA はすぐに分解されてしまう。これにより、植物体へ導入された挿入遺伝子がウイルスの相同遺伝子発現の抑制若しくは下方制御を引き起こし、結果として、ウイルス感染に対して抵抗性が付与される。

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

25 **【GUS 蛋白質 (β -グルクロニダーゼ)】**

25

uidA 遺伝子から発現する GUS 蛋白質 (β -グルクロニダーゼ) は、グルクロン酸と種々のアグリコンとの縮合体である β -グルクロニドを加水分解する酵素である。この基質は GUS 蛋白質によって加水分解を受けることで青色の色素を生成することから、植物形質転換の過程で可視定量マーカーとして利用されている。

30

30 **【NPTII 蛋白質】**

nptII 遺伝子から発現する NPTII 蛋白質は、カナマイシンやネオマイシン等の抗生物質のリン酸化を触媒する酵素であり、本組換えパパイアの作出時の選択マーカーとして利用した。カナマイシン等の抗生物質はミトコンドリアや葉緑体のリボソームサブユニットに作用することにより真核細胞において蛋白質の合成を妨げる (Davis, 1988)。NPTII 蛋白質がカナマイシンやネオマイシンをリン酸化することにより、これら抗生物質のリボソームサブユニットへの抑制作用を取り除くこ

35

とができ、抗生物質耐性が付与される (Dickie *et al.*, 1978)。

5 改変 PRSV CP 蛋白質、GUS 蛋白質及び NPTII 蛋白質を含む挿入遺伝子領域と
既知アレルゲンとの構造相同性検索については、オープンリーディングフレーム
(ORF) が形成されているかどうかを NCBI ウェブサイトの ORF finder プログラム
により検索した後、検出された ORF に関して NCBI BlastP プログラムを用いて既
知アレルゲンとの構造相同性の評価を行った (別添資料 4)。その結果、挿入遺伝子
領域と既知アレルゲンの間に構造相同性は認められなかった。

10 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 PRSV CP 蛋白質】

15 ウイルス CP 蛋白質は、PRSV を含む植物ウイルスにおいてウイルス RNA ある
いは DNA ゲノムを包み込み、保護するための構造蛋白質である (Hull, 2002; Dolja
et al., 1994)。この CP 蛋白質の構造蛋白質としての機能は、ウイルスの細胞間や遠
距離移動 (Dolja *et al.*, 1995, 1994; Andrejeva *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 1995)、及び虫媒
伝染において重要な役割を果たしていると考えられている (Hull, 2002; Briddon *et*
al., 1990; Atreya *et al.*, 1995)。本組換えパパイヤと非組換えパパイヤの成分分析を行
った結果、何れの成分についても有意な差異がなく (別添資料 5 及び別添資料 6)、
20 今まで CP 蛋白質が何らかの酵素活性を有することを示した報告もないことから
CP 蛋白質の発現によって植物の代謝に影響を及ぼすような可能性は極めて低いと
考えられる。

25 【GUS 蛋白質 (β -グルクロニダーゼ)】

GUS 蛋白質の基質であるグルクロニドは、UDP グルクロノシルトランスフェラ
ーゼ (UDP glucuronosyltransferase) の作用により合成される。植物中ではサポニン
-グルクロニド (Yamaguchi *et al.*, 1988)、クエルセチン-グルクロニド及びフラボノ
30 イド-グルクロニド (Merfort and Wendisch, 1988) などの存在が知られている。植物
におけるこれら β -グルクロニドの生理学的役割は明らかではないが、グルクロニ
ドは水に易溶性の二次代謝物として液胞やアポプラストへ排泄され一次代謝から
取り除かれることが知られていることから (Luckner, 1977)、植物の代謝に影響を
及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

35

【NPTII 蛋白質】

NPTII 蛋白質は、ATP を補助因子として、アミノグリコシド系抗生物質のアミ

ノ配糖分子の水酸基をリン酸化する反応を触媒する (Shaw *et al.*, 1993)。NPTII 蛋白質は、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, 1980)。その構造活性学的検討の結果、アミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖分子部分に存在する、ある特異的な水酸基を取り除いたりアミノ基を変える等によりわずかに構造を変化させただけで、アミノグリコシド系抗生物質が NPTII 蛋白質の基質とはなり得ないことが示されており (Price *et al.*, 1974)、NPTII 蛋白質は非常に厳密な基質特異性を持つことが示唆されている。これまでパパイヤ中にアミノグリコシド系抗生物質に構造的に類似した化合物が含まれているという報告がないため、NPTII 蛋白質が本組換えパパイヤ中の化合物あるいは分子と反応する可能性は極めて低いと結論された。

(2) ベクターに関する情報

15

イ 名称及び由来

本組換えパパイヤの作出に用いられたプラスミド・ベクターは、*A. tumefaciens* 由来のプラスミド pGA482GG の *HindIII* 部位に改変 *PRSV CP* 遺伝子発現カセットを組み込んだ pGA482GG/cpPRV-4 である (図 1, p12)。

20

ロ 特性

25

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の全塩基数は 19,567 bp であり、*nptII* 遺伝子発現カセット、改変 *PRSV CP* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットを持つ (図 1, p12)。プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の導入に用いた領域の全塩基配列は別添資料 7 に示した。

30

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 には、上述した β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*uidA*)、及び *nptII* 遺伝子以外に、ベクターを構築する際に選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子であるテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*) 及びゲンタマイシン耐性遺伝子 (*aacC3*) が存在する。

35

サザンブロット分析では *tetA* 遺伝子的一部分が本組換えパパイヤのゲノムに挿入されているという結果を得たが (別添資料 8)、ノーザンブロット分析によって

tetA 遺伝子は発現していないことが確認された (別添資料 9)。また、ゲンタマイシン耐性遺伝子 (*aacC3*) はサザンブロット分析及びノーザンブロット分析により、本組換えパパイヤには導入されなかったことが確認されている (別添資料 8 及び別添資料 10)。

5 また、プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 はアンピシリン耐性に関与する *bla* 遺伝子領域を有するが、 λ ファージの *cos* 部位を含む配列により、その配列が分断されているため本プラスミド・ベクターでは機能していない。

10 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

本ベクターの感染性は知られていない。

15 (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

20 宿主内に移入されたプラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の構成要素は表 1 (p13~14) 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と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p12) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

25 プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 をパーティクルガン法によって非組換えパパイヤ Sunset へ導入した。

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の方法

35 プラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 をパーティクルガン法を用いて宿主である Sunset の胚由来の培養細胞に導入し、形質転換カルスよりカナマイシン含有培地上で本組換えパパイヤを選抜した。植物体 (雌花株) に生育した本組換えパパイヤは GUS 活性を示し、PRSV 病原を接種しても発病しなかったことから、目的遺伝子の導入が行われたことを確認した (別添資料 11)。

- 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

5 本組換えパパイヤはパーティクルガン法によってプラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 を導入しているため、該当しない。

- 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

10

本組換えパパイヤ R0 世代は雌株で PRSV 抵抗性を付与する遺伝子についてヘテロ接合体であるため、両性花株の非組換えパパイヤ Sunset を交配させることによって両性花株の 55-1 系統パパイヤを作り出し、その後、数世代にわたる自殖によって目的遺伝子についてホモである個体を作成した。これが SunUp である (図 2, p20)。両性花株 SunUp は果肉が赤い Sunset が育成母本であるため同じく果肉が赤色で、ハワイの消費者にはあまり好まれていない。そこで、この SunUp と果肉が黄色である非組換えパパイヤ Kapoho を交配することによって、黄色の果肉を持ち、かつ PRSV 抵抗性を有する F1 ハイブリッド品種が作出された。これが Rainbow であり (図 3, p21)、ハワイではこの品種が主に生産されている。

15

1991 年、米国農務省動植物衛生検査部 (USDA/APHIS) より栽培許可を得て、ハワイ大学園芸学部で R0 世代の栽培を開始した。その後、次の規模で環境安全性試験を行った。

20

ハワイ大学ワイマナロ試験場：1992 年 3 月より R0 世代のクローン 20 樹

25

1992 年 12 月より R1 世代 23 樹

1994 年 6 月より R2 世代 145 樹

ハワイ島ボルカノアイル農場：1995 年 8 月より R1 世代 64 樹、R3 世代 64 樹

わが国における認可状況は以下のとおりである。

30

2000 年 12 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入について指針への適合性が確認された。

35

2006 年 2 月 厚生労働省に食品利用としての安全性確認の申請を行った。
2009 年 7 月に食品安全委員会による食品としての安全性評価が終了し、厚生労働省への評価結果の通知は終了している。

なお、本評価書における本組換えパパイヤ 55-1 系統とは、図 2 (p20) において目的遺伝子が導入された R0 世代及びその後代の全てを指す。

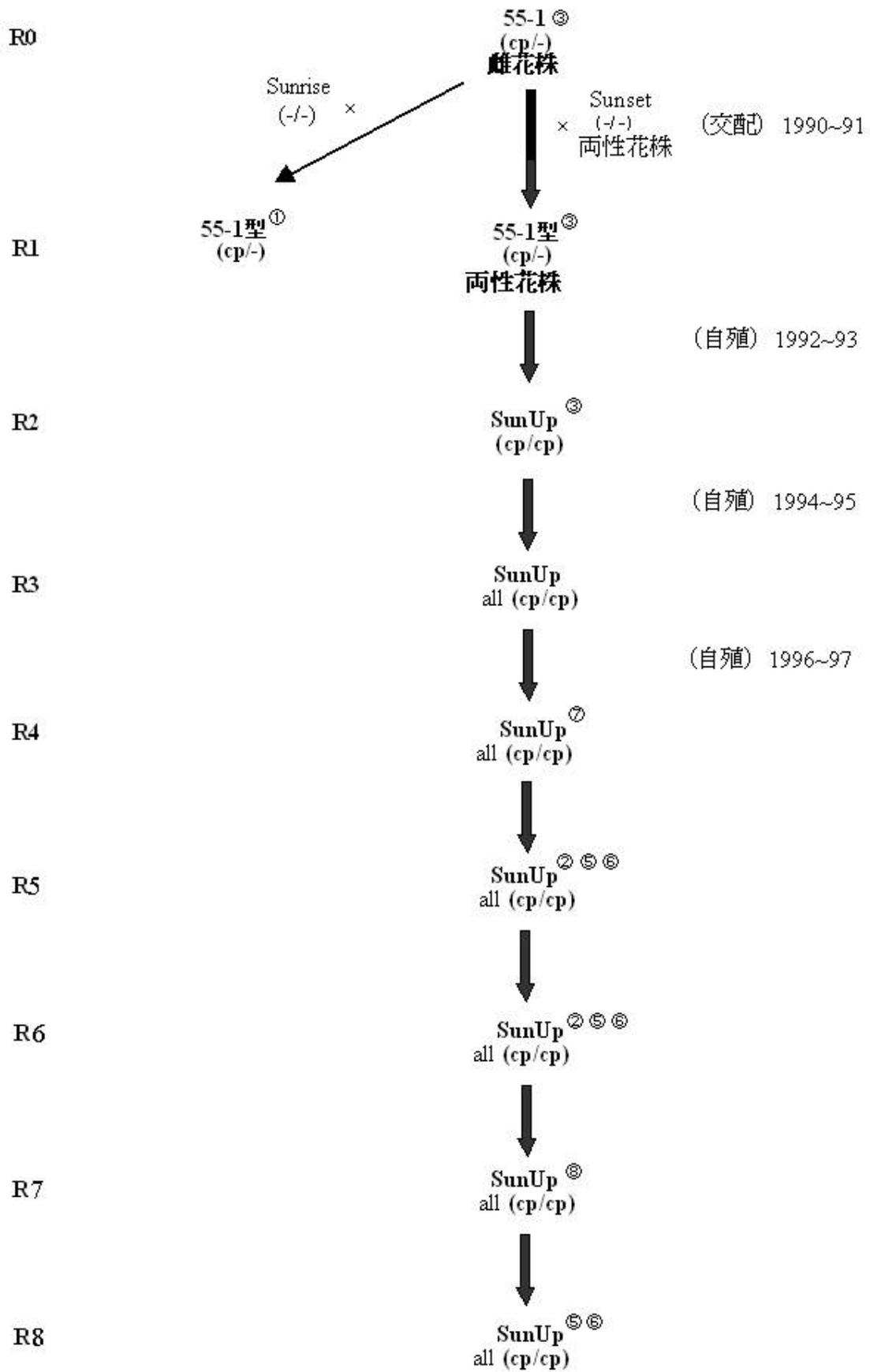


図 2 本組換えパパイアの育成図



図 3 本組換えパパイアの育成図 (“Rainbow” の作成)

- 5 ① 挿入遺伝子の解析のためのサザンブロット分析に供試した世代 (Rainbow については、R4 あるいはそれ以前の世代の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R5 あるいはそれ以前の世代) を供試した。)
- ② 挿入遺伝子及び近傍配列の解析のための PCR 分析に供試した世代 (Rainbow については、R5 の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R6) を供試した。)
- ③ 挿入遺伝子から発現される蛋白質の安定性を確認するために供試した世代
- 10 ④ 挿入遺伝子の DNA 配列を解析するために供試した世代 (Rainbow については、R4 あるいはそれ以前の世代の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R5 あるいはそれ以前の世代) を供試した。なお、SunUp については R5 あるいはそれ以前の世代 (別添資料 14) 及び R4 あるいはそれ以降の世代 (別添資料 13) を供試した。)
- 15 ⑤ サザンブロット分析の再試験に供試した世代 (Rainbow については、R6 の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R7) を供試した。)
- ⑥ 挿入遺伝子の安定性を確認した世代 (Rainbow については、R6 の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R7) を供試した。)
- ⑦ 1999 年から 2000 年に行われた日本での隔離ほ場試験に供試した世代 (R3 世代の種子から得られた個体=R4 を供試した。)
- 20 ⑧ 2006 年に日本での特定網室試験に供試した世代 (Rainbow については、R6 の SunUp に Kapoho を掛け合わせて出来た個体 (=R7) を供試した。)

(脚注は図 2 と図 3 で共通)

(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 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 前述したとおり、本組換えパパイヤの R0 世代は雌株であったため、R1 世代は
両性花株の非組換えパパイヤ **Sunset** と交配させることにより作出している。したが
10 がつて、R1 世代では導入遺伝子についてヘテロ接合体 (GUS-NPTII-CP/-) と導入
遺伝子を全く有さない個体 (-/-) が 1 : 1 の割合で出現すると予想された。394
個体の R1 世代について導入遺伝子の有無を調査したところ、予想されたとおりの
分離比で導入遺伝子についてヘテロ接合体 (GUS-NPTII-CP / -) と導入遺伝子を全
く有さない個体 (- / -) が確認されたことから、導入遺伝子は染色体上に存在して
いると結論した (別添資料 12)。

表 2 本組換えパパイヤの R1 世代における導入遺伝子の発現の分離比

R1 世代	GUS (+ :-)	NPTII (+ :-)	CP (+ :-)	期待値	X ² 値
394	193 : 201	193 : 201	193 : 201	197 : 197	0.69

15

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

20 本組換えパパイヤの挿入遺伝子の構造を明らかにするためにサザンブロット分
析、塩基配列の解析、そして挿入遺伝子の近傍配列における PCR 分析を行った。
その結果、本組換えパパイヤ中には *bla* 遺伝子断片、*oriColE1*、*uidA* 遺伝子発現カ
セット、改変 *PRSV CP* 遺伝子発現カセット、*nptII* 遺伝子発現カセット、*oriV* 断片
より構成される挿入遺伝子領域 (別添資料 8)、290bp の *nptII* 遺伝子に由来する断
25 片 (*nptII* 遺伝子断片)(別添資料 13)、及び 222bp の *tetA* 遺伝子の 3'末端がプラス
ミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の外骨格配列に挟まれた形で構成される *tetA*
遺伝子断片 (別添資料 14) がそれぞれ 1 コピーずつ存在することが明らかとなっ
た。

30 なお、改変 *PRSV CP* 遺伝子発現カセットを含む挿入遺伝子領域の *Hind III* 断片
中で 6 塩基が欠失する変異が認められたが、これらの変異は改変 *PRSV CP* 遺伝子
のコード領域中では起こっておらず、改変 *PRSV CP* 蛋白質も正常に発現している
ことから、改変 *PRSV CP* 蛋白質の発現に影響を及ぼすものではないことが確認さ
れた (別添資料 7 の Fig.2, p44~46)。

35 また、挿入遺伝子領域、*nptII* 遺伝子断片及び *tetA* 遺伝子断片の左右近傍配列は、

PCR 分析の結果から宿主である非組換えパパイヤ Sunset 由来であることが確認された (別添資料 15, 別添資料 16 及び別添資料 17)。さらに、これら導入された遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示された (別添資料 8)。

5

なお、本組換えパパイヤにおける導入遺伝子の模式図を図 4~図 6 (p24~26) に示した。

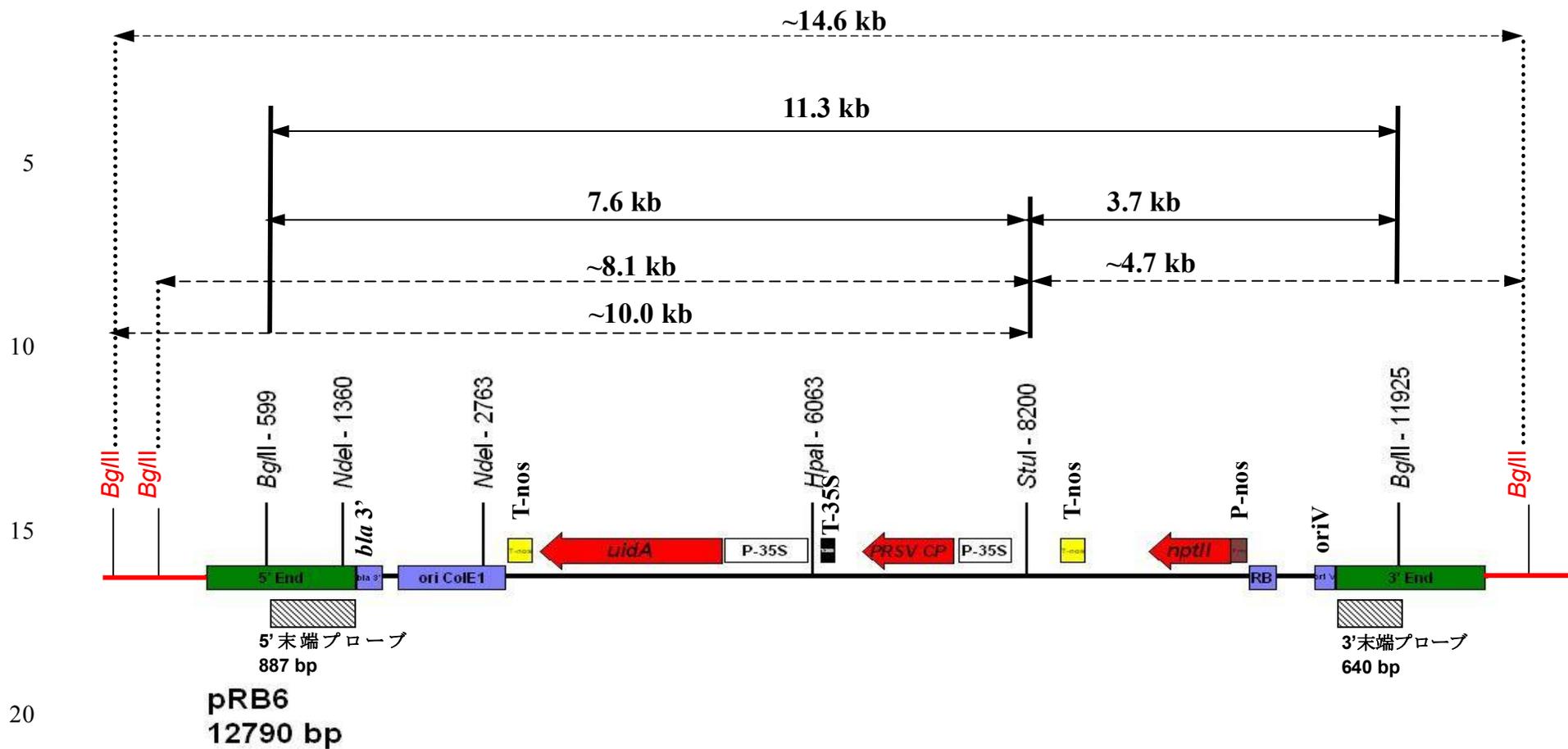


図 4 導入遺伝子及び近傍配列の *Bgl*III 及び *Bgl*III/*Stu*I 制限酵素による切断地図

*Bgl*III 切断部位のうち、実線は本来の切断部位、点線は部分消化により生じた切断部位を表す (赤字)。また、その部分消化により生じる断片を点線の矢印で示した。

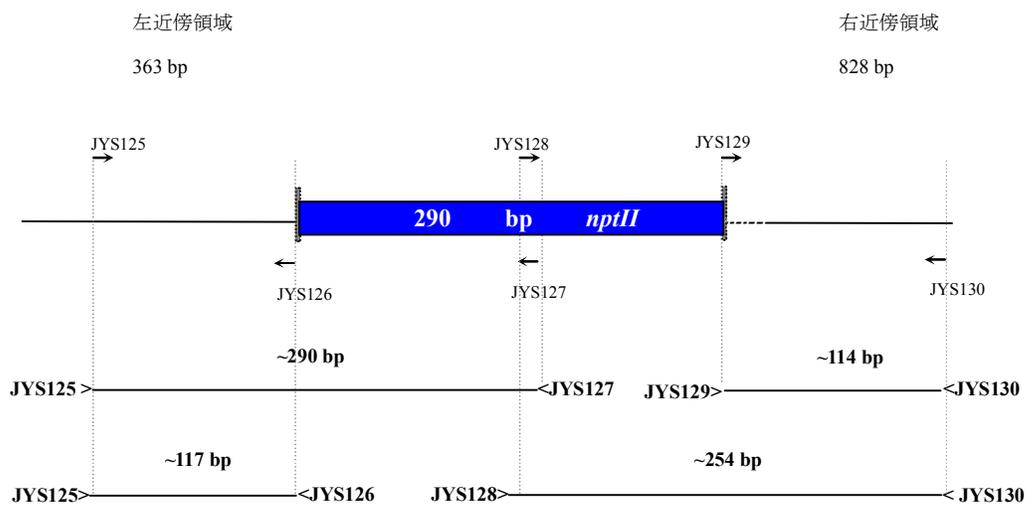


図 5 *nptII* 遺伝子断片の導入遺伝子地図

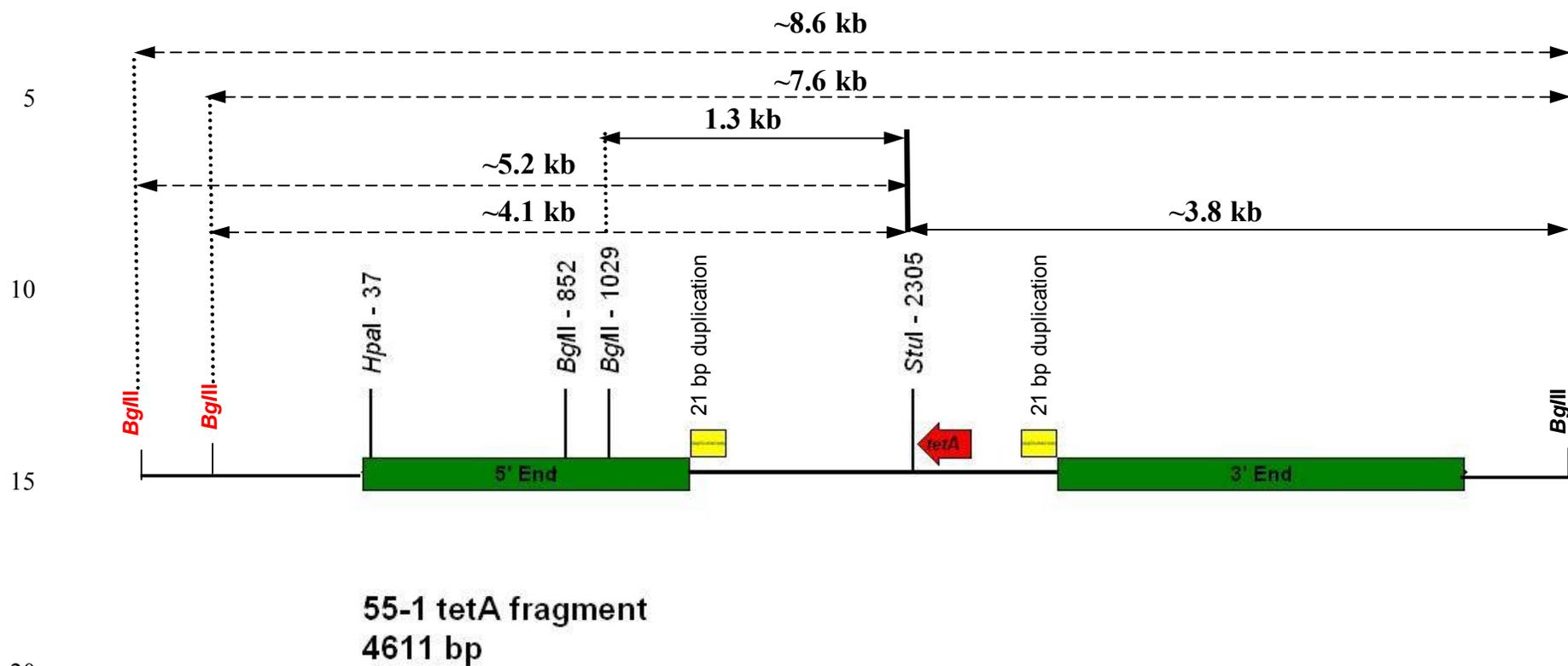


図 6 *tetA* 遺伝子断片及び近傍配列の *Bgl*III 及び *Bgl*III/*Stu*I 制限酵素による切断地図

*Bgl*III 切断部位のうち、実線は本来の切断部位を点線は部分消化により生じた切断部位を表す (赤字)。また、その部分消化により生じる断片を点線の矢印で示した。

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)の②で示したように、改変 *PRSV CP* 遺伝子を含む挿入遺伝子領域は本組換えパパイヤのゲノム DNA 中に 1 ヶ所、1 コピー挿入されているため、該当しない。

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

10 果実における改変 *PRSV CP* 蛋白質の発現量の測定には、本組換えパパイヤ Rainbow 及び SunUp と非組換えパパイヤ Sunset 及びパパイヤリングスポットウイルスに感染した Kamiya を供試した。葉における改変 *PRSV CP* 蛋白質の発現量の測定には、本組換えパパイヤ Rainbow 及び SunUp と非組換えパパイヤ Kapoho (非感染の葉と感染した葉) を供試した。これらの果実及び葉における改変 *PRSV CP*
15 蛋白質の発現量は ELISA 法により測定した (別添資料 18)。

その結果、果実における改変 *PRSV CP* 蛋白質量及び標準偏差は本組換えパパイヤ Rainbow で平均 $6.3 \pm 2.1 \mu\text{g CP/g}$ 生重、*PRSV* 感染非組換えパパイヤ Kamiya では $48.5 \pm 28.3 \mu\text{g CP/g}$ 生重であり、改変 *PRSV CP* 蛋白質発現量に約 8 倍の差が確認された。また、本組換えパパイヤ SunUp と *PRSV* 非感染非組換えパパイヤ Sunset では検出限界の $0.25 \mu\text{g CP/g}$ 生重以下であった (表 3, p28)。同様に、本組換えパパイヤの葉における改変 *PRSV CP* 蛋白質量は、*PRSV* に自然感染した葉と比較すると大幅に低くなっていた。果実と葉での蛋白質量を比較すると、本組換えパパイヤ及び非組換えパパイヤともに果実での蛋白質量が非常に低くなっていた。

25 本組換えパパイヤでは改変 *PRSV CP* 蛋白質以外に、加水分解酵素である β -グルクロニダーゼ (GUS 蛋白質) 及びカナマイシンなどの抗生物質に対する抵抗性を付与する NPTII 蛋白質が発現している。

30 β -グルクロニダーゼ (GUS 蛋白質) については、本組換えパパイヤ Rainbow から採取した果実の発現量を Indirect HRP-Sandwich ELISA 法により測定した (別添資料 19)。その結果、R7 世代及び R8 世代の Rainbow 果実サンプルにおける GUS 蛋白質の発現量及び標準偏差は、それぞれ平均 $159.39 \pm 200.763 \text{ ng/g}$ 生重と $64.74 \pm 58.497 \text{ ng/g}$ 生重であった。Rainbow における GUS 蛋白質の発現は非常に変動が大きく、その範囲は $8.43 \sim 890.30 \text{ ng/g}$ 生重であった (表 4, p29)。

35 また、NPTII 蛋白質については、本組換えパパイヤ (SunUp 及び Rainbow) から採取した果実の発現量を NPTII ELISA キット (Agdia PSP 73000, Elkhart, IN) を用いて測定した (別添資料 20 及び別添資料 21)。その結果、SunUp における発現量は、完熟果実では 396 ng/g 生重、未熟果実では $1,836 \text{ ng/g}$ 生重であった。Rainbow

における発現量は、完熟果実では 72 ng/g 生重、未熟果実では 273 ng/g 生重であった (表 5, p29)。また、これまでに SunUp の葉における NPTII 蛋白質の発現量は最大 938 ng/g 生重であることが分かっている (表 5, p29)。

5 挿入遺伝子によって獲得された PRSV 抵抗性の形質が安定して後代へ受け継がれているかを確認するために、本組換えパパイヤの R0 世代 (ヘテロ接合体)、SunUp (ホモ接合体) 及び Rainbow (ヘテロ接合体) に対して PRSV の接種試験を行った。その結果、いずれの世代も PRSV に対して抵抗性を示した (別添資料 11; 別添資料 22)。

10

また、本組換えパパイヤ中で発現する改変 PRSV CP 蛋白質、GUS 蛋白質及び NPTII 蛋白質の安定性について、ELISA 法及び呈色反応による分析を行った結果、複数世代にわたって安定した発現をしていることが確認された (表 6, p29; 別添資料 12)。

15

表 3 本組換えパパイヤと非組換えパパイヤにおける改変 PRSV CP 蛋白質の発現量

試験部位	品種及び処理	サンプル数	CP (µg/g 生重)	標準偏差
果実	本組換えパパイヤ			
	Rainbow	5	6.3	2.1
	SunUp	5	ND ^a	-
	非組換えパパイヤ			
	Sunset	5	ND	-
葉	本組換えパパイヤ			
	Rainbow	1	257.6	
	Sunup	1	137.0	
	非組換えパパイヤ			
	Kapoho (感染済み)	1	3,580.6	
	Kapoho	1	ND	

ND^a 測定値が検出限界 (0.25 µg CP/g 生重) 以下

20

表 4 本組換えパパイヤにおける β -グルクロニダーゼ (GUS 蛋白質) の発現量

	GUS発現量(ng) / g 生重	
	Rainbow-1 (GM)	Rainbow-2 (GM)
世代	R7	R8
栽培ほ場	Diamond Head Farm (Kapoho)	Ruby's Farm (Hamakua Coast)
サンプル数	22	22
平均値	159.39	64.74
S.D.	200.763	58.497
範囲	13.69 - 890.30	8.43-236.16

5

表 5 本組換えパパイヤにおける NPTII 蛋白質の発現量

	NPTII蛋白質 発現量 (ng/g 生重)
SunUp (R8世代)	
完熟果実	396
未熟果実 ^{*1}	1836
Rainbow (R8世代)	
完熟果実	72
未熟果実 ^{*1}	273
SunUp (R0世代)	
葉	938 ^{*2}

*1 完熟果実のデータは9個体の平均、未熟果実のデータは1個体のものである

*2 最大の発現量

10

表 6 改変 PRSV CP 蛋白質、GUS 蛋白質及び NPTII 蛋白質発現の安定性

検査方法	CP	GUS	NPT II
	ELISA法	呈色反応	ELISA法
世代 R0	+	+	+
R1	+	+	+
R2	+	+	試験せず
R4	試験せず	+	試験せず

+は発現が確認されたもの

15

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を經由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 本組換えパパイヤの作出に用いたプラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 は、
自律増殖可能な宿主域が *E.coli* や *A.tumefaciens* などのグラム陰性菌である。しか
10 かし、プラスミド・ベクター pGA482GG、及びこのプラスミド・ベクターの *HindIII*
部位に改変 PRSV CP 遺伝子が組み込まれたプラスミド・ベクター
pGA482GG/cpPRV-4 は接合・伝達を可能とする *trans* や *mob* といった接合因子を含
んでいないため、これらのプラスミド・ベクター単独では野生動植物に対する伝
達性を持つとは考えられない。

- (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

15 本組換えパパイヤの検出方法は「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」として
厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/kensa/tuuchi2.html>) に
記載されている。それらのうち、本組換えパパイヤに導入されている *uidA* 遺伝子の
発現を利用した呈色反応は陰性対象を誤認することがなく、通常の実験室に備えら
れた装置器具を利用し、試薬のみで容易かつ迅速に行うことが可能である (Wakui *et*
20 *al.*, 2004)。

- (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又は生態学的特
性の具体的な内容

25 本組換えパパイヤには、パパイヤリングスポットウイルス (PRSV HA 5-1 株) の
外被蛋白質遺伝子 (改変 PRSV CP 遺伝子) が導入されたことにより、同病害ウイ
ルスへの抵抗性が付与されている。しかし、その抵抗性は選択的で、隔離ほ場試
験の結果によれば、PRSV のハワイ株 (HA)、台湾株 (R175P) には抵抗性を示した
30 が、日本株 (J126P)、タイ株 (T164P)、マレーシア株 (M185P) には罹病性であっ
た (別添資料 1, p6~7)。さらに、わが国に分布するパパイヤ奇形葉モザイクウイル
スの日本株 (J56P) にも罹病性であった (別添資料 1, p6~7)。

35 また、選択マーカーとして導入した *nptII* 遺伝子によりカナマイシン耐性、*uidA*
遺伝子により β -グルクロニダーゼ活性が付与されている。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

5 本組換えパパイヤとその宿主である対照の非組換えパパイヤとの相違は、国際農林水産業研究センター沖縄支所内の隔離ほ場において1999年5月19日から2000年3月31日にわたり実施した隔離ほ場試験の結果に基づいて検討しているが、参考として2004年8月から2005年5月までハワイのKapohoとWaimanaloで行ったほ場試験の結果も用いて総合的に考察している。また、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験については、2006年に特定網室において追加試験を実施し、
10 その試験の結果に基づき考察を行った。

a 形態及び生育の特性

15 樹高、幹周、節数、葉長、葉幅、葉柄長、葉柄派出角度、初開花節位、初開花日、結実果数、雌性株・両性株の出現数及び果実形質について調査した。

一般形質：両性株と雌性株の一般形質（樹高、幹周、節数、葉長、葉幅、葉柄長、葉柄派出角度）について生育期間中に4回調査した結果、4回の調査日（9/17, 10/18, 12/24, 2/10）とも、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で、統計学的に有意な差は認められなかった（別添資料1の表3, p9）。
20

生育特性：両性株と雌性株の生育特性（初開花節位、初開花までの日数、結実果数）について調査した結果、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で統計学的に有意な差は認められなかった（別添資料1の表4及び表5, p10）。
25

性分離：両性株と雌性株の出現数比は、本組換えパパイヤで24:6、対照の非組換えパパイヤで11:6であった。本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤ2標本間の両性株と雌性株の出現数に違いがあるかどうかを調べるために、 χ^2 検定を行った。その結果、本組換えパパイヤ及び対照の非組換えパパイヤ間で両性株と雌性株の出現数には統計上有意な差は無いことが示された（別添資料1の表6, p10）。
30

果実形質：本組換えパパイヤから両性花果実21個、雌性花果実9個、対照の非組換えパパイヤから両性花果実12個、雌性花果実4個を採取した。これらの果実を用いて、果実形質（果重、果長、果径、果形指数【果長/果径、注：果実の品種ごとの形状を表す場合に用いられる最も簡便な数値】、糖度、酸含量、種子数）についての比較を行った。その結果、両性花由来の果実で糖度及び酸含量について、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で統計学的有意差が認められた
35

が、それ以外の項目については差異は認められなかった (別添資料 1 の表 7, p11)。統計学的有意差の認められた本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの両性
5 花実由来の糖度の平均値は、それぞれ 13.9%と 15.0%であった (別添資料 1 の表 7, p11)。また、統計学的有意差の認められた本組換えパパイヤと対照の非組換え
パイヤの両性花実由来の酸含量の平均値は、それぞれ 0.92%と 1.05%であった
(別添資料 1 の表 7, p11)。

b 生育初期における低温又は高温耐性

10 24℃で 71 日間生育させた本組換えパパイヤ及び対照の非組換えパパイヤを 4℃
及び 15℃の条件下に移し、低温耐性を調査した。その結果、本組換えパパイヤ及
び対照の非組換えパパイヤの幼植物体は 1 ヶ月を経過した時点で、4℃条件下では
15 両者とも全個体が根元から倒れ萎凋していたが、15℃条件下では両者とも多くの
個体が生存していた。萎凋及び枯死の判定が難しく、その日数を数値化すること
は出来なかったが、本組換えパパイヤと非組換えパパイヤの低温感受性に違いは
無いと考えられた (別添資料 1 の図 6, p19)。

c 成体の越冬性又は越夏性

20 上記の生育初期における低温耐性試験の結果、本組換えパパイヤと対照の非組
換えパパイヤとの間に違いが認められなかったこと、及びパパイヤは熱帯性植物
であり、0℃以下の気温では枯死することが知られていることから、日本では沖縄
県全域を含む奄美大島南部以南の島々、小笠原諸島及び南鳥島など亜熱帯性気候
25 の地域を除いては、幼植物の段階で通常非組換えパパイヤと同様に枯死し、成
体になるまで生育できないと判断された。

d 花粉の稔性及びサイズ

30 本組換えパパイヤ及び対照の非組換えパパイヤ各 4 株から開花直前と考えられ
る 1 花ずつを選び、それぞれの花粉を採取して酢酸カーミン染色により稔性を確
認した。その結果、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間に花粉の稔
性に統計学的に有意な差は認められなかった (別添資料 1 の表 9, p12)。

35 本隔離ほ場試験においては花粉サイズの調査は行っていないが、ハワイのほ場
で本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤから花粉を採取し、目盛り付きの
接眼マイクロメーターを用いて花粉サイズを比較したところ、それぞれ平均で 41.8
ミクロンと 42.0 ミクロンであり、統計学的有意差は認められなかった (別添資料
23 の Table 1, p1)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

5 本隔離ほ場試験では十分な種子を得ることが出来なかったため、種子の生産量に関する調査は行っていないが、ハワイのほ場で本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤから 10 個ずつ果実を採取し、得られた種子の平均重量を比較した結果、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 23 の Table 4, p3)。

10 パパイヤの種子分散は、裂果することによってではなく、哺乳類や鳥類による媒介によって起こるため、種子の脱粒性は考えにくい。よって、種子の脱粒性についての試験は行わなかった。

15 本隔離ほ場試験において収穫された本組換えパパイヤ及び対照の非組換えパパイヤの果実から得られた種子を用いて休眠性及び発芽率を比較することを計画したが、発芽率を調査するだけの種子の確保が不可能であったため、ハワイで収穫され日本に送付された成熟果実の種子を採取し発芽試験を行った。生育温度は 4、20 15、23 (あるいは 24)、35°C とした。その結果、種子の発芽特性は、24°C 条件下で約 1 ヶ月後に発芽が始まり、2 ヶ月目以降は新たな発芽は見られなかった。56 日目までの発芽は、本組換えパパイヤ 32.25/40 粒 (80.63%) 及び非組換えパパイヤ 29.25/40 粒 (73.13%) であった (別添資料 1 の表 11-1, p14)。また、35°C 条件下では、

25 早い時期から発芽が見られ、31 日目に本組換えパパイヤ及び非組換えパパイヤそれぞれ 6.25/40 粒 (15.63%) 及び 3.25/40 粒 (8.13%) が発芽していたが、それ以後の発芽数の増加はなかった (別添資料 1 の表 11-2, p14)。発芽種子数は、24°C と 30°C 条件下のどちらにおいても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 1 の表 11-1 及び 11-2, p14)。

30 さらに、ハワイで収穫された本組換えパパイヤ及び対照の非組換えパパイヤから採取された種子を 2 ヶ月間 4°C 及び 15°C の温度条件下においた後、25°C 及び 35°C の温度条件下に移した後の発芽数を調査した。その結果、4°C の温度条件下においた後に 25°C に移した種子の場合、本組換えパパイヤでは発芽が認められなかったものの対照の非組換えパパイヤにおいて 120 粒中 1 粒の種子の発芽が確認された。また、4°C の温度条件下においた後に 35°C に移した場合、いずれのパパイヤにおいても発芽は認められなかった (別添資料 1 の表 12-1 及び 12-2, p17)。一方、15°C の温度条件下においた後に 25°C 及び 35°C に移した種子の場合、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの種子の発芽率に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 1 の表 13-1 及び表 13-2, p18)。

35

f 交雑率

前述のとおり、わが国にはパパイヤと交雑可能な近縁野生種が自生していないため、交雑性の試験は行わなかった。

5

g 有害物質の産生性

2006年に特定網室において土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を実施した。試験には、ハワイより送付された本組換えパパイヤの種子 (SunUp と Rainbow) 及び対照の非組換えパパイヤの種子 (Sunset) を用いた。その結果、統計処理を行った全ての項目 (土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重及び乾燥重) について本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間に有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目 (ハツカダイコンの発芽率) についても違いは見られなかった (別添資料 24)。

また、参考として、ハワイにおいても後作試験及び土壌微生物相試験を行った。土壌微生物相試験では、パパイヤを 9 ヶ月間栽培をした土壌における細菌数及び真菌数に関して、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 23 の Table 10 及び Table 11, p11~12)。また、キュウリとトウモロコシを用いた後作試験においても、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間で、キュウリとトウモロコシの発芽率及び生育に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 23 の Fig.2~5 及び Table 6~9, p7~9)。

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

食用に供するための使用、栽培、加工、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

—

(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

35

—

- (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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照

5

- (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の環境での使用等の結果

—

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

国外における認可状況は以下のとおりである。

- 15 1996年9月 米国農務省 (USDA) より無規制裁培の認可を受けた。
 1997年8月 米国環境省 (EPA) より認可を受けた。
 1997年9月 食品医薬局 (FDA) への食品としての安全性確認を終了した。
 2003年1月 カナダ保健省 (Health Canada) より食品としての安全性認可を受けた。

- 20 ハワイにおいて1998年5月より種子の配布を行い、農家段階で栽培を開始した。これに先立ち、1996年に本組換えパパイヤの自殖品種を“SunUp”と命名した。また、SunUp と非組換えパパイヤ Kapoho との F1 交配種を“Rainbow”と命名した。これら本組換えパパイヤの収穫果実は1999年5月以降、米国内で販売されている。

- 25 本組換えパパイヤの導入以後、ハワイでのパパイヤ栽培は本組換えパパイヤ Rainbow と非組換えパパイヤ Kapoho が主な品種となっている (表 7, p35)。ハワイにおけるパパイヤの総栽培面積は2009年は878haであり、そのうち本組換えパパイヤ Rainbow の占める割合は77%となっている。なお、Rainbow 及び SunUp は契約上の理由からハワイでのみ栽培されている。

30

表 7 各品種の総栽培面積に占める割合 (%) (2000～2009年)

品種		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
組換え体	Rainbow	42	39	44	46	52	53	58	68	64	77
	Kapoho	37	43	42	38	29	30	25	17	16	9
非組換え体	Sunrise	14	11	10	10	11	9	11	8	9	9
	その他 ^{*1}	7	7	4	6	8	8	6	7	11	5
総栽培面積 (ha)		1151	1157	939	906	807	971	874	864	826	878

*1 “その他”の中には本組換えパパイヤ SunUp も含まれている。

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

わが国においては、小笠原諸島などでパパイヤが野生化しているとの報告があるが (www2.kankyo.metro.tokyo.jp/sizen/isan/pdf/kentou-all.pdf)、具体的な生育地域は明らかでない。しかし、第一の 1-(1)-③に記載したとおり、海外の文献をもとにパパイヤが生存するために必要な環境条件からパパイヤが生育し得る地域を絞ったところ、日本では冬日 (最低気温 0°C未滿) がなく (別添資料 1 の p18 を参照)、月平均最低気温が 12°C以下にならない沖縄県全域を含む奄美大島南部以南の島々、小笠原諸島及び南鳥島に限られると考えられた。

15 栽培種パパイヤは野生パパイヤと比較して、果肉が厚く、種子の休眠性が低下しているなど雑草性の形質をあまり有していないことが知られている。また、パパイヤは侵略性雑草の特徴とされている形質をあまり有していないことから (Hancock and Hokanson, 2001)、パパイヤが侵略性の高い植物であるとは考えにくい。

20 実際、わが国においてパパイヤは外来種タンポポ種群 (*Taraxacum* spp.) やセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) のような日本固有の在来種を駆逐して生物多様性影響を及ぼす侵略的外来種 (invasive alien species) としては記載されていない (日本生態学会, 2002)。また、パパイヤはハワイ農務省による有害雑草リストに記載されておらず、フロリダ、テキサス、カリフォルニアなど米国本土のパパイヤ栽培地域からもパパイヤが害を及ぼすような雑草であるという報告はこれまでのところ
25 ない。

さらに、本組換えパパイヤは 1998 年からハワイにおいて商業栽培が行われているが、自然環境下において雑草化しているなどの報告はない。

30 以上のことから、パパイヤはわが国の限られた亜熱帯性気候の地域では生育し得ると考えられるが、ヒトの手の加わっていない自然環境下では競合における優位性は低いと判断された。これらのことを踏まえて、本組換えパパイヤの競合における優位性に関する生物多様性影響評価を対照の非組換えパパイヤとの比較に基づいて行った。

35 隔離ほ場試験において、競合における優位性に関わる諸形質 (a 形態及び生育の特性、b 生育初期における低温耐性、d 花粉の稔性及びサイズ、e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) について、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤを比較調査した (第一の 2-(6)-②-a-e, p31~33)。その結果、統計処理を行った項目

5 については糖度と酸含量を除く全ての項目で本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目についても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間に大きな違いは認められなかった。なお、統計学的有意差の認められた糖度及び酸含量については、供試体の熟度が異なっていたことに起因すると推測されることから、これらの差異が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

10 本組換えパパイヤは導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子の発現により *PRSV* ハワイ株 (*HA*) および台湾株 (*R175P*) に対して *PRSV* 抵抗性を有しているが、これらのウイルス株はわが国に分布していない。さらに、本組換えパパイヤはわが国の南西諸島に分布する主要病原ウイルス *PRSV (J126P)* 及び *PLDMV (J56P)* に対して罹病性を示すため (別添資料 1, p6~7)、本組換えパパイヤの競合における優位性が従来のパパイヤの競合における優位性を超える可能性は極めて低いと考えられる。

15 以上のことから、本組換えパパイヤによって競合における優位性に影響を受け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

20 —

(3) 影響の生じやすさの評価

25 —

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

30 以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

35

第一の 1-(3)-へ (p9~10) に記載したとおり、パパイヤに含まれる有害物質として、ベンジルイソチオシアン酸塩 (*BITC*)、パパイン、及びカルパインが挙げられる。

5 パパイヤ種子の抽出物は様々な哺乳類組織や器官に機能障害を引き起こす可能性があると示唆されており、これはベンジルイソチオシアン酸塩 (BITC) の毒性によるものであると考えられている (Adebiyi *et al.*, 2003)。しかし、アジアや南アメリカの一部の地域では、BITC を含むパパイヤ種子の抽出物を駆虫薬や墮胎剤として使用してきた歴史がある (Krishnakumari and Majumder, 1960; Quisumbing, 1951; Rao and Jamir, 1982)。また、BITC を産生するために必要なベンジルグルコシノレートは内胚乳に、一方、ミロシナーゼは種子を覆う肉質種皮 (sarcotesta) に含まれているため (Tang, 1973)、種子が砕かれるあるいは傷を付けられない限りこれら基質と酵素が接触することはなく、多量の BITC は産生されない (Kermanshai *et al.*, 2001)。

10 一方、BITC はイソチオシアン酸塩族 (ITC) のひとつであり、ITC と同様に抗癌作用があると言われている。さらに抗癌作用以外にも、BITC には植物寄生性の線虫を防除する働きがあると言われている (Zasada *et al.*, 2009)。

15 葉や未熟果実に含まれる乳液には蛋白質分解酵素であるパパインが含まれており、パパイヤ植物の草食性昆虫に対する防御として重要な役割を果たしていることが知られている (Konno *et al.*, 2004)。また、妊娠中に未熟パパイヤを摂取することによる胎児への影響が懸念されているが、果実が熟すにつれてパパイン量は減少するため、完熟果実におけるパパイン濃度は極めて低く (Thomas and Beckly, 1923 cited in Traub *et al.*, 1935)、実際にマウスを使った実験から、熟した果実を摂取しても胎児への影響は無いことが報告されている (Adebiyi *et al.*, 2002)。

25 パパイヤの重要なアルカロイドであるカルパインは、パパイヤ植物の緑色の部分全体及び種子に含まれており (Burdick, 1971)、徐脈効果などの生理活性が有るとの報告がある (Burdick, 1971; Hornick *et al.*, 1978)。

30 本組換えパパイヤの構成成分を調査する過程で、上記した BITC、パパイン、カルパインについても分析が行われているが、これらの成分は対照の非組換えパパイヤと比較して遺伝子組換えに起因するような差異は認められない、あるいは検出限界以下であった (別添資料 5 及び別添資料 6)。

35 本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、いずれの試験においても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で統計処理を行った項目については統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目についても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で大きな違いは認められなかった。また、ハワイにおいても土壌微生物相試験及び後作試験を実施したが、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で統計学的有意差は認められなかった (第一の 2-(6)-②-g, p34)。

また、台湾やタイにおいて、外被蛋白質を有する PRSV 抵抗性パパイヤの環境影響評価が行われているが、いずれのほ場試験でも組換えパパイヤの栽培は土壤微生物や昆虫などに悪影響をもたらすものではないことが確認されている (Hsieh and Pan, 2006; Lin *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2005)。

5

本組換えパパイヤは PRSV 抵抗性に関与する改変 PRSV CP 蛋白質、選抜マーカーとして作用する NPTII 蛋白質及び GUS 蛋白質を有しているが、これらの蛋白質が有害物質であるとする報告は無い。

また、ウイルス CP 蛋白質は、植物ウイルスにおいてウイルス RNA あるいは DNA
10 ゲノムを包み込み、保護するための構造蛋白質である (Dolja *et al.*, 1994; Hull, 2002)。この CP 蛋白質は、ウイルスの細胞間や遠距離移動 (Andrejeva *et al.*, 1999; Dolja *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1995)、及び虫媒介伝染においても重要な役割を果たしていると考えられている (Atreya *et al.*, 1995; Briddon *et al.*, 1990; Hull, 2002)。このような CP 蛋白質の機能からは、CP 蛋白質が植物中の代謝経路に作用するとは考え難く、実際に、
15 本組換えパパイヤの食品安全性の評価の過程で構成成分を分析した結果、対照の非組換えパパイヤとの間で大きな相違は無いことが確認されている。したがって、改変 PRSV CP 蛋白質が原因で、本組換えパパイヤ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

20 以上のことから、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

25 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

30 (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、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判断された。

35

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

5

これまでわが国においてパパイヤと交雑可能な近縁野生種が自生しているという報告が無いことから、交雑性について影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(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、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された。

4 その他の性質

25

導入遺伝子 (改変 *PRSV CP* 遺伝子) はウイルスに由来するものであるため、わが国に生息し、パパイヤを宿主とするウイルスの RNA との間で組換えが起こり、新しい組換えウイルスが発生する可能性が考えられた。そこで、本組換えパパイヤへ導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子から産生される RNA とパパイヤを宿主とするウイルスの RNA 間での組換えについて、①組換えが起こる頻度、②組換えにより発生した新しい組換えウイルスが自然環境に適応し、生存する可能性、及び③新しい組換えウイルスが生態系や環境へ及ぼす影響、について以下のとおり評価した。

30

35

- ① 本組換えパパイヤにおいて挿入遺伝子から産生される RNA とパパイヤを宿主とするウイルスの RNA との間で組換えが起こる頻度

本組換えパパイヤはわが国に分布する *PRSV* 日本株及び *PLDMV* 日本株に対して抵抗性を有していないことから、わが国において商業栽培される予定はない。

しかし、生果実には発芽可能な種子が含まれているため、これら種子からの繁殖は起こりうる。パパイヤの生存可能な地域とパパイヤを宿主としているウイルスの生息地が沖縄県全域を含む奄美大島南部以南の島々、小笠原諸島など亜熱帯性気候の地域に限られていることから、パパイヤを宿主とするウイルスが本組換え
5
パパイヤに感染する機会は本組換えパパイヤの果実に含まれる種子が沖縄県などの亜熱帯性気候の地域で繁殖した場合に限られると考えられた。

また、仮に感染が起こったとしても、遺伝子組換え作物へ導入されたウイルス由来の遺伝子から産生される RNA とウイルス RNA 間で組換えが起こる頻度は、配列の類似性 (Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997) や植物細胞内の RNA 濃度 (Scholz
10
and Wintermantel, 1993) などに影響されることが知られている。

本組換えパパイヤのように抵抗性のメカニズムが転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) である場合には、導入遺伝子と相同性をもったウイルス RNA はすぐに分解され、その濃度はさらに低くなることから (Rovere *et al.*, 2002)、相同性が高い RNA 間での組換えが起こる可能性は極めて低いと考えられる。一方、一般的に相同性が低い RNA 間での組換えは相同性が高い RNA 間での組換えよりも起こりに
15
くいことが知られている。また、自然界では同じ作物に複数のウイルスが感染することは一般的に起こっている事象であるが、この場合に産生されている RNA 量よりも、遺伝子組換え作物へ導入されたウイルス由来の遺伝子から産生される RNA の量は少ないと考えられる (Allison *et al.*, 1996)。このため、遺伝子組換え作物へ導入されたウイルス由来の遺伝子から産生される RNA とウイルス RNA 間で組換えが起こる頻度は、同じ作物に感染した複数のウイルス間での組換えの頻度よりも低いと推定される。

実際、最近の文献では、導入遺伝子と感染したウイルス間での相同組換えにより新規のウイルスが生じる可能性は、複数のウイルスが非組換え作物に同時感染した場合よりも高くなることはない結論している (Marroni *et al.*, 2009; Dietrich
25
et al., 2007; Hull, 1994)。Marroni *et al.* (2009) は、キュウリモザイクウイルス・サブグループ II の RNA3 由来の外被蛋白質と 3'末端の非コーディング領域 (3'-NCR) を発現している遺伝子組換えタバコに、RNA3 の 3'-NCR に突然変異を有したキュウリモザイクウイルス・サブグループ I (I17F-CMV) を感染させて、発生した組換えウイルスについて調査をしている。検出された合計 22 種類の組換えウイルスのうち、12 種類は導入遺伝子の mRNA と突然変異を有している I17F-CMV の RNA3 の間で組換えが起こっており、残りの 10 種類は突然変異を有している I17F-CMV の RNA3 と I17F-CMV の RNA1 の間で組換えが起こっていた。これら検出された組換えウイルスは他の試験において非組換え作物上で観察されたウイルスの種類
30
と同じであったことから、この試験に供試されたような組換え作物の使用は、新規ウイルスが出現するリスクを高めるものではないと結論している。

したがって、わが国に生息し、パパイヤを宿主としているウイルスが本組換え
35
パパイヤに感染する機会は極めて少なく、仮に本組換えパパイヤの導入遺伝子が

ら産生される RNA と感染したウイルスの RNA 間で組換えが起こるとしても、その頻度は自然界で起こっているものと大差はないと考えられた。

5 ② 組換えにより発生した新しい組換えウイルスが自然環境に適応し、生存する可能性

10 遺伝子組換え植物に導入されたウイルス由来の遺伝子とその植物に感染するウイルスの間で組換えが起こり、新たな組換えウイルスが発生しうるとは、これまでの研究から明らかになっている (Borja *et al.*, 1999; Greene and Allison, 1994; Lommel and Xiong, 1991; Varrelmann *et al.*, 2000)。しかし、これらの実験はウイルス本来の機能を一部欠失したような変異を有するウイルス (defective virus) を用いているため、組換えによって新たに生じたウイルスが競合において優位となるような選択圧が高くかかった条件下で行われたものであり、選択圧が弱い、あるいは全くないような条件下、すなわち、自然環境下で起こりうる状況を反映しているものではない。実際、これまで自然条件下で行われた実験では、遺伝子組換え植物由来の遺伝子配列を有する新しい組換えウイルスは検出されていない (Thomas *et al.*, 1998; Vigne *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2003)。

20 また、これまでに本組換えパパイヤ (Fuchs and Gonsalves, 2007) をはじめ、スカッシュ (Asgrow/UpJohn Co.)、ジャガイモ (Thomas *et al.*, 1998) などウイルス由来の遺伝子が導入された遺伝子組換え作物の大規模な商業栽培が行われているにもかかわらず、ウイルス由来の導入遺伝子と野生型ウイルスの間で組換えが起こったという報告はない。

25 よって、仮にウイルスと導入遺伝子間で組換えが起こり、新しい組換えウイルスが発生したとしても、組換えウイルスが優位となる条件がないような自然環境下では、組換えウイルスが生存し、繁殖する可能性は低いと結論された。

③ 新しい組換えウイルスが生態系や環境へ及ぼす影響

30 本組換えパパイヤには、ウイルスゲノムのうち CP 蛋白質をコードしている遺伝子配列のみが導入されている。この CP 蛋白質はウイルス RNA を包み込み、保護するための構造蛋白質であるが (Dolja *et al.*, 1994; Hull, 2002)、一部、アブラムシ媒介による伝播に関わっていることが知られている (Atreya *et al.*, 1995; Briddon *et al.*, 1990; Hull, 2002)。しかし、アブラムシ媒介による伝播に関わっている遺伝子は CP 蛋白質遺伝子以外の領域にも存在しており (Blanc *et al.*, 1998; Dombrosky *et al.*, 2005; Pirone, 1996; Wang *et al.*, 1998)、PRSV の CP 蛋白質遺伝子は当該ウイルスの病原性や宿主域に関して単独の決定因子ではないと考えられている。

5 本組換えパパイヤの作出に利用された弱毒性の変異体である PRSV HA5-1 株と
その元ウイルスである強毒性の PRSV HA 株のさまざまな遺伝子領域を置き換える
ことによって組換えウイルスを作成し、それら組換えウイルスのパパイヤ及び局
所病変宿主である *C. quinoa* における感染性の調査と遺伝子解析が行われた
10 (Chiang *et al.*, 2007)。その結果、病原性に関連する領域は PRSV ハワイ株 (HA) ゲ
ノムの 950 から 3261 ヌクレオチドにあることが明らかになった。この領域にある
P1 及び HC-Pro 遺伝子の変異が PRSV ハワイ株 (HA) を弱毒化させた原因である
と同時に、同じ HC-Pro 遺伝子の変異により PRSV 変異株が *C. quinoa* において過
敏反応を引き起こすことが出来なくなることも明らかになった (Chiang *et al.*,
2007)。

同様に、強毒性と弱毒性の PRSV 株間での組換え分析により、HC-Pro 遺伝子が
ウイルスの病原性に重要な役割を果たしていることが確認されている (Tripathi *et*
al., 2003; Bau *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2005, 2006)。

15 また、PRSV-p 系統 (パパイヤとウリ科植物に感染する) と PRSV-w 系統 (ウリ
科植物にのみ感染する) ウイルス間でパパイヤへの感染に関与している遺伝的要
因を明らかにするため、PRSV-p 系統と PRSV-w 系統のウイルス間で組換えウイル
スを作成し、その宿主域を調査した。その結果、PRSV ゲノム上で NIaPro (nuclear
inclusion a protease) をコードしている領域の 27 番目のアミノ酸がアスパラギン酸
20 からリシンへ変異したことで、PRSV の宿主がウリ科植物からパパイヤへ変わった
ことが明らかになった (Chen *et al.*, 2008)。また、PRSV-w 系統の cDNA クローンか
ら HC-Pro 遺伝子の N 末端の 54 アミノ酸を除いただけで、宿主のひとつであるズ
ッキーニに感染できなくなったという報告もある (Yap *et al.*, 2009)。

25 以上の知見をまとめると、PRSV CP 蛋白質遺伝子が病原性や宿主の決定などに
関わっている可能性は否定できないが、これまでに PRSV の CP 蛋白質遺伝子が当
該ウイルスの病原性や宿主域に関して単独の決定因子として報告された例はない。
このことから、仮に組換えウイルスが生じた場合でも環境や生態系に及ぼす影響
はもとのウイルスが与える影響と何ら差はないものと考えられた。

30

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性; わが国においては、小笠原諸島などでパパイヤが野生化しているとの報告があるが、具体的な生育地域は明らかでない。しかし、海外の文献に基づくと日本列島でパパイヤが生育することが可能な地域は、亜熱帯性気候である沖縄県全域を含む奄美大島南部以南の島々、小笠原諸島及び南鳥島に限られると考えられた。さらに、栽培種パパイヤは野生パパイヤと比較して、雑草性の形質をあまり有していないことが知られている。実際、わが国においてパパイヤは日本固有の在来種を駆逐して生物多様性影響を及ぼす侵略的外来種 (invasive alien species) としては記載されていない。また、パパイヤはハワイ農務省による有害雑草リストに記載されておらず、米国本土のパパイヤ栽培地域からもパパイヤが害を及ぼすような雑草であるという報告はこれまでのところない。さらに、本組換えパパイヤについても 1998 年からハワイで商業栽培が行われているが、自然環境下において雑草化しているなどの報告はない。

以上のことから、パパイヤはわが国の限られた亜熱帯性気候の地域では生育し得るが、ヒトの手の加わっていない自然環境下では競合における優位性は低いと判断された。これらのことを踏まえて、本組換えパパイヤの競合における優位性に関する生物多様性影響評価を対照の非組換えパパイヤとの比較に基づいて行った。

隔離ほ場試験において、競合における優位性に関わる諸形質 (a 形態及び生育の特性、b 生育初期における低温耐性、d 花粉の稔性及びサイズ、e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) について、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤを比較調査した (第一の 2-(6)-②-a-e, p31~33)。その結果、統計処理を行った項目については糖度と酸含量を除く全ての項目で本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目についても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で大きな違いは認められなかった。なお、統計学的有意差の認められた糖度及び酸含量については、供試体の熟度が揃っていなかったことに起因すると考えられることから、これらの差異が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

本組換えパパイヤは導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子の発現により *PRSV* ハワイ株 (HA) および台湾株 (R175P) に対して *PRSV* 抵抗性を有しているが、これらのウイルス株はわが国に分布していない。さらに、本組換えパパイヤはわが国の南西諸島に分布する主要病原ウイルス *PRSV* (J126P) 及び *PLDMV* (J56P) に対して罹病性を示すため、本組換えパパイヤの競合における優位性が従来のパパイヤの競合における優位性を超える可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、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。よって、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性；パパイヤの種子や果実、葉にはベンジルイソチオシアン酸塩 (BITC)、パパイン、カルpainなどの成分が含まれていることが知られている。本組換えパパイヤにおける構成成分を調査する過程で、上記した BITC、パパイン、カルpainの分析も行われているが、これらの成分量は対照の非組換えパパイヤと比較して遺伝子組換えに起因するような差異は認められない、あるいは検出限界以下であった (別添資料 5 及び別添資料 6)。

本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、何れの試験においても統計処理を行った項目については本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目についても本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤの間で大きな違いは認められなかった。また、ハワイにおいても土壤微生物相試験及び後作試験を実施したが、本組換えパパイヤと対照の非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった (第一の 2-(6)-②-g, p34)。

本組換えパパイヤは PRSV 抵抗性に関与する改変 PRSV CP 蛋白質、選抜マーカーとして作用する NPTII 蛋白質及び GUS 蛋白質を有しているが、これらの蛋白質が有害物質であるとする報告は無い。また、ウイルス CP 蛋白質の機能から推測すると、CP 蛋白質が植物中の代謝経路に作用するとは考え難く、実際に、本組換えパパイヤの食品安全性の評価の過程で構成成分を分析した結果、対照の非組換えパパイヤとの間で相違の無いことが確認されている。したがって、改変 PRSV CP 蛋白質が原因で、本組換えパパイヤ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

以上のことから、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。よって、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判断された。

交雑性；わが国ではパパイヤと交雑可能な近縁野生種が自生しているという報告が無いことから、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された。

その他の性質；導入遺伝子 (改変 PRSV CP 遺伝子) はウイルスに由来するものであるため、わが国に生息し、パパイヤを宿主とするウイルスの RNA との間で組換えが

起こり、新しい組換えウイルスが発生する可能性が考えられた。そこで、本組換えパパイヤへ導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子から産生される RNA とパパイヤを宿主とするウイルスの RNA 間での組換えについて、①組換えが起こる頻度、②組換えにより発生した新しい組換えウイルスが自然環境に適応し、生存する可能性、及び③新しい組換えウイルスが生態系や環境へ及ぼす影響、について評価をおこなった。

その結果、①パパイヤが生存可能な地域及びパパイヤを宿主とするウイルスの生息地が限定されているため、これらのウイルスが本組換えパパイヤへ感染する機会は極めて少なく、仮に感染したとしても、導入遺伝子から産生される RNA とウイルス RNA 間で組換えが起こる頻度は自然界で起こっているものと大差はないと考えられる、②ウイルスと挿入遺伝子間での組換えが起こって新しい組換えウイルスが発生したとしても、組換えウイルスが優位となる条件がないような自然環境下では組換えウイルスが生存し、繁殖する可能性は低い、③仮に組換えが起きた場合でも *PRSV* の *CP* 蛋白質遺伝子は当該ウイルスの病原性や宿主域に関して単独の決定因子として報告された例がないことから、仮に組換えウイルスが生じた場合でも環境や生態系に及ぼす影響はもとのウイルスが与える影響と大差はないと考えられる、と結論された。

以上のことから、本組換えパパイヤへ導入された改変 *PRSV CP* 遺伝子とパパイヤを宿主とするウイルスとの間で組換えが起こる可能性は極めて低く、仮に組換えによって新しいウイルスが発生したとしても環境や生態系に及ぼす影響は自然界で発生している状況と変わるものではないと結論された。

よって、総合的評価として、本組換えパパイヤを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

- Adebiyi, A., P.G. Adaikan and R.N.V. Prasad. (2002) Papaya (*Carica papaya*) consumption is unsafe in pregnancy: fact or fable? Scientific evaluation of a common belief in some parts of Asia using a rat model. *British Journal of Nutrition* 88: 199-203.
- Adebiyi, A., P.G. Adaikan and R.N.V. Prasad. (2003) Tocolytic and toxic activity of papaya seed extract on isolated rat uterus. *Life Sciences* 74: 581-592.
- Allison, R.F., W.L. Schneider and A.E. Greene. (1996) Recombination in transgenic plants. *Semin Virol* 7:417-22.
- Allmansberger, R., Brau, B., and Piepersberg, W. (1985) Genes for gentamicin-(3)-N-acetyl-transferases III and IV. II. Nucleotide sequences of three AAC (3)-III genes and evolutionary aspects. *Mol. Gen. Genet.* 198:514-520.
- Andrejeva, J., U. Puurand, A. Merits, F. Rabenstein, L. Jarvekulg and J.P.T. Valkonen. (1999) Potyvirus helper component proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. *J. Gen. Virol.* 80:1133-1139.
- Atreya, P.L., J.J. Lopez-Moya, M. Chu, C.D. Atreya and T.P. Pirone. (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J. Gen. Virol.* 76:265-270.
- Badillo, V.M. (2000) *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hill. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10(2): 74-79.
- Basu, A. and S. Haldar. (2008) Dietary isothiocyanate mediated apoptosis of human cancer cells is associated with Bcl-xL phosphorylation. *Int Journal of Oncology* 33: 657-663.
- Bau, HJ, S. Tripathi, L.F. Chen, Y.H. Cheng, T.A. Yu, J.S. Yang and S.D. Yeh. (2004) Transgenic papaya for control of papaya ringspot virus and analysis of viral factors involved in resistance breakdown. In: W-21-04, 10th SCBA International Symposium, July 18-23, 2004, Beijing, China.
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss, and H. Schaller. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- Benfey, P.N. and N-H. Chua. (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
- Bhattacharya, J. and S.S. Khuspe. (2001) *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Sci. Hort.* 91:39-49.

- Blanc, S., E.D. Ammer, S. Garcia-Lampasona, V.V. Dolja, J. Braker and T.P. Pirone. (1998) Mutation in potyvirus helper component protein: effect on interactions with virions and aphids stylet. *J. Gen. Virol.* 79: 3119-3122.
- Borja, M., T. Rubio, H.B. Scholthof and A.O. Jackson. (1999) Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 153-162.
- Briddon, R.W., M.S. Pinner, J. Stanley and P.G. Markam. (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94.
- Burdick, E. (1971) Carpaine: An alkaloid of *Carica papaya* – Its chemistry and Pharmacology. *Economic Botany* 24: 363-365.
- Chen, K.C., C.H. Wang, F.L. Liu, W.C. Su and S.D. Yeh. (2003a) Analysis of host determinant genes of Papaya ringspot virus for papaya infection. Abstracts of 8th Interantional Congress of Plant Pathology. (Christchurch, New Zealand, Feb. 2-7) p. 303.
- Chen, K.C., C.H. Wang, F.L. Liu, W.C. Su and S.D. Yeh. (2003b) The NIa gene of Papaya ringspot virus is the host determinant for papaya infection. 7th International Congress of Plant Molecular Biology (Barcelona, June 23-28). Book of Abstracts. p. 362.
- Chiang, C., C.Y. Lee, C.H. Wang, F.J. Jan, S.S. Lin, T.C. Chen, J.A.J. Raja and S.D. Yeh. (2007) Genetic analysis of an attenuated *Papaya ringspot virus* strain applied for cross-protectioin. *Eur. J. Plant Pathol.* 118: 333-348.
- Chen, K.C., C.H. Chiang, J.A.J. Raja, F.L. Liu, C.H. Tai and S.D. Yeh. (2008) A single amono acid of NIaPro of Papaya ringspot virus determines host specificity for infection of papaya. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21: 1046-1057.
- Cohen, E., U. Lavi and P. Spiegel-Roy. (1989) Papaya pollen viability and storage. *Sci. Hort.* 40: 317-324.
- Davies, J. (1980) Aminoglycoside-Aminocyclitol Antibiotics and their Modifying Enzymes. *In* Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian,V.(ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, MD, p.474-489.
- Davis, B.D. (1988) The lethal action of aminoglycosides. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 1-3.
- de Mello, J.C. and R. Spruce. (1869) Notes on Papayaceae. *Journal of the Linnean Society of Botany* 10:1-15.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. (1982) Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-573.

- Dickie, P., L.E. Bryan and M.A. Pickard. (1978) Affect of enzymatic adenylation on dihydrostreptomycin accumulation in *Escherichia coli* carrying an R-factor: model explaining aminoglycoside resistance by inactivating mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 569-580.
- Dietrich, C., J. Miller, G. McKenzie, L. Palkovics, E. Balázs, P. Palukaitis and E. Maiss. (2007) No recombination detected in artificial potyvirus mixed infections and between potyvirus derived transgenes and heterologous challenging potyviruses. *Environ Biosafety Res* 6: 207-218.
- Dolja, V.V., R. Halderman, N.L. Robertson, W.G. Dougherty and J.C. Carrington. (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.*13:1482-1491.
- Dolja, V.V., R. Haldeman-Cahill, A.E. Montgomery, K.A. Vandensbosch and J.C.Carrington. (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206:1007-1016.
- Dombrovsky, A., H. Huet, N. Chejanovsky and B. Raccach. (2005) Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch. Virol.* 150(2): 287-298.
- Ellis, R.H., T.D. Hong and E.H. Roberts. (1991) Effect of storage temperature and moisture on the germination of papaya seeds. *Seed Sci. Res.* 1: 69–72.
- FAO. (1986) *Carica papaya*. Chapter 17 in *Food and Fruit-bearing Forest Species*. 3. Examples from Latin America. FAO Forestry Paper 44/3.
- Franck, A., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards and L. Hirth. (1980) Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21: 285-294.
- Fuchs, M. and D. Gonsalves. (2007) Safety of Virus-Resistant Transgenic Plants Two Decades After Their Introduction: Lessons from Realistic Field Risk Assessment Studies. *Ann Rev of Phytopathol* 45: 173-202 .
- Fuchs, M., F.E. Klas, J.R. McFerson and D. Gonsalves. (1998) Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid-borne viruses do not assist the spread of an aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field. *Transgenic Research* 7:1-14.
- Fürste, J.P., W. Pansegrau, G. Ziegelin, M. Kröger and E. Lanka. (1989) Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: Interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1771-1775.

- Garrett, A. (1995) The pollination biology of Pawpaw (*Carica papaya* L.) in Central Queensland. Ph.D. Thesis, Central Queensland University, Rockhampton.
- Gonsalves, D. (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 415-437.
- Greene, A.E. and R.F. Allison. (1994) Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263:1423–25.
- Guiney, D.G. and E. Yakobson. (1983) Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3595-3598.
- Hamilton, R.A., P.J. Ito and R.E. Paull. (1993) ‘Sunset’ solo papaya. Hawaii Cooperative Extension Service, Fruit Commodity Fact Sheet PA-3(B). University of Hawaii.
- Hancock, J.F. and K.E. Hokanson. (2001) Invasiveness of transgenic vs. exotic plant species: how useful is the analogy? *In: SH Straus and HD Bradshaw, eds., Proceedings of the 1st International Symposium on Ecology and Societal Aspects of Transgenic Plantations.* College of Forestry, Oregon State University, p. 187-192.
- Hong, Y., K. Levay, J.F. Murphy, P.G. Klein, J.G. Shaw and A.G. Hunt. (1995) A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* 214:159-166.
- Hornick, C.A., L.I. Sanders, Y.C. Lin. (1978) Effect of carpaine, a papaya alkaloid, on the circulatory function in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 22: 277-289.
- Hsieh, Y. and T. Pan. (2006) Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 130-137.
- Hull, R. (1994) Risks in using transgenic plants? *Science* 264: 1649-1650.
- Hull, R. (2002) *Matthew’s Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press. pp.1001.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8447-8451.
- Kapoor, L.D. (1990) *Handbook of Ayurvedic medical plants*. CRC Press, Boca Raton.
- Kermanshai, R., B.E. McCarry, J. Rosenfeld, P.S. Summers, E.A. Weretilnyk and G.J. Sorger. (2001) Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry* 57: 427-435.

- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori and K. Kohno. (2004) Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*. 37: 370-378.
- Krishnakumari, M.K. and S.K. Majumder. (1960) Studies on the anthelmintic activities of seeds of *Carica papaya* Linn. *Annals of Biochemistry and Experimental Medicine* 20: 551-556.
- Lai, M.M.C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56:61-79.
- Lange, A.H. (1961a) Effect of sarcotesta on germination of *Carica papaya*. *Botanical Gazette* 122: 305-311.
- Lange, A.H. (1961b) The effect of temperature and photoperiod on the growth of *Carica papaya*. *Ecology* 42: 481-486.
- Lassoudiere, A. (1968) Le papayer (Deuxieme paitie). *Fruits* 23: 585-596.
- Lin, H.X., L. Rubio, A. Smythe, M. Jiminez and B.W. Falk. (2003) Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 84 : 249-258.
- Lin, C.Y., P.C. Liou, C.L. Wang, C.Y. Chien, H.D. Shih and B.H. Cheng. (2004) Assessment of ecological and environmental safety pf transgenic papaya lines resistant to *Papaya ringspot virus*. *Journal of the Agricultural Association of China* 5: 374-392.
- Lin, F.C., C.Y. Lee, C.L. Wang, P.C. Liou and C.Y. Lin. (2006) Assessment of Environmental Risk of Transgenic Papaya Ring Spot Virus Resistant Papaya on Insects and mites. *Journal of Taiwan Agriculture and Research* 55, <http://www.tari.gov.tw/tarie/modules/icontent/index.php?page=194>.
- Lius, S. (1994) Characterization and evaluation of papayas genetically transformed with the coat protein gene of papaya ringspot virus. M.S. Thesis, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii. P.115.
- Lommel, S.A. and Z. Xiong. (1991) Reconstitution of a functional red clover necrotic mosaic virus by recombinational rescue of the cell to cell movement gene expressed in a transgenic plant. *J. Cell Biochem.* 15A: 151.
- Luckner, M. (1977) *Secondary Metabolism in Plants and Animals*. London, UK: Chapman and Hall.

- Malo, S.E., and C.W. Campbell. (1994) The Papaya. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Series of Horticultural Sciences Department, Fact Sheet HS-11.
- Manshardt, R.M. and R.A. Drew. (1998) Biotechnology of papaya. *Acta Hort.* 461:65-73.
- Manshardt, R.M. and T.F. Wenslaff. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(4):689-694.
- Manshardt, R. and F. Zee. (1994) Papaya germplasm and breeding in Hawaii. *Fruit Varieties Journal* 48(3):146-152.
- Marroni, M., J. Thompson and M. Tepfer. (2009) Analysis of recombination between viral RNAs and transgene mRNA under conditions of high selection pressure in favor of recombinants. *J Gen Virol* published online July 22, 2009; doi:10.1099/vir.0.013771-0.
- Merfort, I and D. Wendisch. (1988) Flavonoid glucuronides from *Arnica montana* flowers. *Planta Med.* 54: 247-250.
- Nagy, P.D. and A.E. Simon. (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 18: 235(1):1-9.
- Nakasone, H.Y. and R.E. Paull. (1998) *Tropical Fruits*. Cab International. Oxon, UK.
- OECD (2005) Consensus document on the biology of papaya (*Carica papaya*). ENV/JM/MONO(2005)16, Environment Directorate: Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Orozco-Segovia, A. and C. Vazquez-Yanes. (1990) Effect of moisture on longevity in seeds of some rain forest species. *Biotropia.* 22:215-216.
- Parés, J., C. Basso and D. Jáuregui. (2001) Cantidad, viabilidad y germinabilidad de granos de pollen en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena Amarilla. En X Jornadas de Investigación del Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental <<Lisandro Alvarado>>, Tarabana, estado Lara. Venezuela. P.137.
- Parés-Martínez, J., R. Linárez, M. Arizaleta and L. Meléndez. (2004) Aspectos de la biología floral en lechosa (*Carica papaya* L.) cv. <<Cartagena roja>>, en el estado Lara, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 21: 116-125.
- Paz, L. and C. Vázquez-Yanes. (1998) Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forests region in Mexico. *Tree Physiol.* 18:277-280.

- Pirone, T.P. (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 227-247.
- Price, K. E., J.C. Godfrey and H. Kawaguchi. (1974) Effect of Structural Modifications on the Biological Properties of Aminoglycoside Antibiotics Containing 2-Deoxystreptamine. *Adv. Appl. Microbiology* 18: 191-307.
- Quisumbing, E. (1951) Medicinal plants of the Philippines. Technical Bulletin 16 Reports. Philippines Department of Agriculture and Natural Resources, Manila
- Rao, R.R. and N.S. Jamir. (1982) Ethnobotanical studies in Nagaland. I. Medicinal plants. *Economic Botany* 36: 176-181.
- Rogers, S.G., H. Klee, R. Horsch and R.T. Fraley. (1987) Improved vectors for plant transformation: Expression cassette vectors and new selectable markers. *Meth. Enzymol.* 153: 253-277.
- Roig y Mesa, J.T. (1974) Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba, Ciencia y Técnica Instituto Cubano del Libro, La Habana.
- Rovere, C.V., M. del Vas and H.E. Hopp. (2002) RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotechnol* 13: 167–172.
- Sakuanrungrsirikul, S., N. Sarindu, V. Prasartsee, S. Chaikiatiyos, R. Siriyan, M. Sriwatanakul, P. Lekananon, C. Kitprasert, P. Boonsong, P. Kosiyachinda, G. Fermin and D. Gonsalves. (2005) Update on the development of virus-resistant papaya: Virus-resistant transgenic papaya for people in rural communities of Thailand. *Food and Nutrition Bulletin* 26: 422-426.
- Samson, J.A. (1986) *Tropical fruits*, 2nd edition. Longman Scientific & Technological. Essex, UK.
- Schmidhauser, T. J. and Helinski, D. R. (1985) Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164: 446-455.
- Schoelz, J.E. and W.M. Wintermantel. (1993) Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* 5: 1669-1679.
- Sharma, A. and P. Bajpai. (1969) Studies on floral biology of papaya (*C. papaya* L.). *Indian J. Soc. Hort. Sci.* 3: 9-18.

- Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Rev.* 57: 138-163.
- Singh, I.D. (1990) *Papaya*. Oxford and IBH Publishing, New Delhi. 224 pp.
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. (1981) Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genetics.* 181: 8-12.
- Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3737-3741.
- Tang, C.S. (1973) Localization of benzyl glucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit. *Phytochemistry* 12: 769-773.
- Teng, Y.T. and Y.L. Hor. (1976) Storage of tropical fruit seeds. Pp. 135-146 in H.F. Chin, I.C. Enoch and R.M. Raja Harun, eds., *Seed Technology in the Tropics*. Universiti Pertanian Malaysia, Serdang.
- Tennant, P., G. Fermin, M.M. Fitch, R.M. Manshardt, J.L. Slightom and D. Gonsalves. (2001) Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology* 107: 645-653.
- Thomas, P.E., S. Hassan, W.K. Kaniewski, E.C. Lawson and J.C. Zalewski. (1998) A search for evidence of virus/transgene interactions in potatoes transformed with the Potato leafroll virus replicase and coat protein genes. *Mol. Breed.* 4:407-17.
- Tokumoto, M., Y. Tabei, T. Kayano, H. Oku, H. Iwasaki and I. Chinen. (2000a) Adventitious embryogenesis and plantlet regeneration from ovules of unpollinated ovaries of papaya (*Carica papaya* L.). *J. of Japan Soc. Hort. Sci.* 69: 195-201.
- Tokumoto, M., Y. Tamashiro, K. Tarora, N. Urasaki, T. Yasutomi and I. Chinen. (2000b) Morphological characteristics of regenerated papaya plants and fruits from unpollinated ovules. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 69: 764-766.
- Traka, M. and R. Mithen. (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* 8: 269-282.
- Traub, H.P., T.R. Robinson and H.E. Stevens. (1935) Latex test for maturity of papaya fruits. *Science* 2137(82): 569-570.

- Tripathi, S., L.F. Chen, H.J. Bau and S.D. Yeh. (2003) In addition to transgene divergence potyviral HC-Pro gene plays an important role in breaking down coat protein gene-mediated transgenic resistance. 7th International Congress of Plant Molecular Biology (Barcelona, June 23-28). Abstracts. p. 367.
- Varrelmann, M., L. Palkovics and E. Maiss. (2000) Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum pox virus. *J. Virol.* 74:7462–69.
- Vegas, A., G. Trujillo, Y. Sandra and J. Mata. (2003) Apomixis, poliembrionia somatica y cigotica *in vivo* en lechosa. *Interciencia* 28: 715-718.
- Vigne, E., V. Komar and M. Fuchs. (2004) Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* 13: 165-179.
- Wakui, C., H. Akiyama, T. Watanabe, M.M. Fitch, S. Uchikawa, M. Ki, K. Takahashi, R. Chiba, A. Fujii, A. Hino and T. Maitani. (2004) A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 45:19-24.
- Wang, R.Y., G. Powell, J. Hardie and T.P. Pirone. (1998) Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *J. Gen. Virol.* 79: 1519-1524.
- Yamaguchi, H., H. Matsuura, R. Kasai, O. Tanaka, O. Satake, H. Kohda, H. Izumi, M. Nuno, S. Katsuki, S. Isoda, J. Shoji and K. Goto. (1988) Analysis of saponins of wild *panax ginseng*. *Chem. Pharmaceut. Bull.* 36: 4177-4181.
- Yap, Y.K, J. Duangjit and S. Panyim. (2009) N-terminal of Papaya ringspot virus type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes* 38: 461-467.
- Yeh, S.D., B.J. You, S. Tripathi, L.F. Chen and H.J. Bau. (2005) Transgenic Resistance Overcome by Potyviral Hc-Pro Gene in a Transgene Sequence-Homology Independent Manner. In: International Union of Microbiological Societies, *Microbes in changing world*, 23-28 July 2005, San Francisco, California, USA.
- Yeh, S.D., H.J. Bau, Y.J. Kung and T.A. Yu. (2006) International Symposium on Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants, December 7-8, 2006, Taiwan Agricultural Research Institute, Taiching, Taiwan.
- Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 361-370.

Zasada, I., E. Masler, S. Rogers and J. Halbrendt. (2009) Behavioural response of *Meloidogyne incognita* to benzyl isothiocyanate. *Nematology* 11: 603-610.

Zhang, Y., L. Tang and V. Gonzalez. (2003) Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2: 1045-1052.

FAO 統計資料 ウェブサイト

<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>

沖縄県農林水産部農林水産企画課統計資料 ウェブサイト

http://www3.pref.okinawa.jp/site/contents/attach/9477/059_081.pdf

久保 祐雄 (農学大辞典編集委員会) (1987) 農学大事典、養賢堂

財務省貿易統計 (検索ページ) ウェブサイト

<http://www.customs.go.jp/toukei/download/2008/12/d01/d01h08i002.pdf>

田部井 豊 (2000) 遺伝子組換え食品－新しい食材の科学、学会出版センター

土橋 豊 (2003) 熱帯の有用果実、トンボ出版

東京都環境局公式ウェブサイト

www2.kankyo.metro.tokyo.jp/sizen/isan/pdf/kentou-all.pdf

日本生態学会 編 (2002) 外来種ハンドブック、地人書館

山崎 耕宇、久保 祐雄、西尾 敏彦、石原 邦 監修 (2004) 新編 農学大事典、養賢堂

緊急措置計画書

平成16年8月18日
一部変更：平成22年2月15日

氏名 ハワイパパイヤ産業協会
日本国内連絡先
代表 スティーブ 岩村

第一種使用規程の承認を申請しているパパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ(*PRSV CP, uidA, nptII, Carica papaya L.*) (55-1, OECD UI: CUH-CP551-8)の果実の輸入販売による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および責任者

ハワイパパイヤ産業協会 (Hawaii Papaya Industry Association (HPIA) / 190 Kamehameha Ave. Room 1, Hilo, HI 96720, U.S.A) は、アメリカ合衆国ハワイ州ハワイ島に事務所を置き、ハワイ州のパパイヤ栽培者、パパイヤ集荷業者、パパイヤ販売・輸出業者、ハワイ大学及びハワイ州農務部のパパイヤ関連農業研究者により構成されている。

当協会は、本組換えパパイヤの種子を配布する独占的な権利を有しており、その種子を他者に譲渡しないことを条件に、栽培者(当協会会員)に配布している。

緊急措置を講ずる必要が生じた時は、当協会会長を責任者として協会組織全体で対応に当る。また、日本においては、当協会日本国内連絡先代表を責任者として緊急対応組織を設け、連絡、対応に努める。

平成 22 年 2 月 15 日現在 (個人名・電話番号等は個人情報のため非開示)

	名前	連絡先
1		ハワイパパイヤ産業協会 日本国内連絡先代表
2		ハワイパパイヤ産業協会 日本国内連絡先
3		ハワイパパイヤ産業協会 日本国内連絡先
4		Japan Exporter / HPIA Board Director (日本輸出業者/ハワイパパイヤ産業協会 取締役)
5		HPIA President (ハワイパパイヤ産業協会 会長)
6		HPIA Office Manager (ハワイパパイヤ産業協会 事務長)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

本組換えパパイヤの果実は、アメリカ合衆国ハワイ州において当協会員によってのみ栽培出荷され、通常の非遺伝子組換えパパイヤ果実と同様、植物防疫法の定めにより現地にてミバエ類不活化のための蒸熱処理を行い、農林水産省より派遣されている検査官による現地植物検疫を受けた後、日本に輸出される。

本組換えパパイヤの種子は当協会を通じてのみ栽培者に配布されているので、栽培者の把握は当協会の帳簿により行う。

輸出業者は全て当協会の会員であり、本組換えパパイヤの日本への輸出量は輸出業者の帳簿をもとに、定期的に報告させる。あわせて、日本の輸入業者への売り渡し実績の記録を、定期的に報告させる。

3 第一種使用等をしているもの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

日本において、本組換えパパイヤが生物多様性影響が生ずるおそれが認められた場合、日本事務所代表は、速やかにその事実を協会本部に連絡し、全ての会員（種子を配布した栽培者、集荷業

者、販売輸出業者等を含む) に対して、その事実及び、その防止のための緊急措置の内容を連絡する。

また、日本以外で本組換えパパイヤが同様の影響を生ずるおそれが認められたことを、当協会本部が知り得たときは、速やかに日本国内連絡先代表にその事実を連絡し、関係先への連絡等の必要な対応を行わせる。

日本国内においては、新聞に本件についてのお知らせのための記事を掲載するとともに、2 で把握した本組換えパパイヤ輸入業者に対して、本件について連絡する。当協会日本事務所には問い合わせ専用窓口を設置する。

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

アメリカ合衆国内において、本組換えパパイヤを日本向けに輸出している関係者が特定できているので、日本向けの輸出を自粛するよう当協会から要請する。

また、日本国内において本組換えパパイヤの輸入業者が特定されているので、在庫を確認し、当該業者に対し、本組換えパパイヤの不活化処分（磨砕、焼却等）を行うよう要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省及び環境省に連絡するとともに、緊急処置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

- 別添資料 10 Gentamycin-resistance gene (*Gent*) expression in transgenic Rainbow and SunUp papayas resistance to Papaya ringspot virus
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 11 VIRUS RESISTANT PAPAYA PLANTS DERIVED FROM TISSUES BOMBARDED WITH THE COAT PROTEIN GENE OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 12 Stability of transgenic expression in transgenic 55-1 papaya
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 13 DNA sequence determination of the nonfunctional *nptII* fragment insertion site and flanking papaya genomic DNA of 55-1 line, SunUp
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 14 DNA sequence determination of the *tetA* insertion fragment and flanking papaya genomic DNA in a hemizygous 55-1 line, Rainbow
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 15 PCR analysis for characterization of the functional transgene insertion and flanking papaya genomic DNA in homozygous and hemizygous 55-1
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 16 PCR analysis for characterization of the nonfunctional *nptII* insertion fragment and flanking papaya genomic DNA in homozygous and hemizygous 55-1
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 17 PCR analysis for characterization of the *tetA* fragment/vector insertion and flanking papaya genomic DNA in homozygous 55-1 line, SunUp
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 18 PRSV coat protein levels of homozygous and hemizygous line 55-1 transgenic papayas in Hawaii
社外秘情報につき非開示

- 別添資料 19 Quantification of expressed GUS protein in two generations (R7&R8) of 55-1 line, transgenic papaya
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 20 Expression of NPTII Transgene in Homo- and Hemizygous 55-1 Papaya
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 21 Expression of NPTII in Transgenic Papaya 55-1
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 22 Virus Coat Protein Transgenic Papaya Provides Practical Control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 23 Difference between transgenic and non-transgenic papaya plants
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 24 パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統 (*PRSV*, *uidA*, *nptII*, *Carica papaya* L.)(OECD UI: CUH-CP551-8) の特定網室における生物多様性影響評価試験結果報告書
社外秘情報につき非開示