

フラボノイド生合成経路を改変したバラ (*F3'5'H, 5AT, Rosa hybrida*)  
(WKS82/130-9-1, OECD UI: IFD-52901-9) 生物多様性影響書の概要

<b>第一種使用規程承認申請書</b>	<b>1</b>
<b>第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報</b>	<b>3</b>
<b>1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報</b>	<b>3</b>
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
<b>2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報</b>	<b>14</b>
(1) 供与核酸に関する情報	14
(2) ベクターに関する情報	23
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	23
(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	26
(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
<b>3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報</b>	<b>34</b>
(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もの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	34
(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	34
(6) 国外における使用等に関する情報	34
<b>第二 項目ごとの生物多様性影響の評価</b>	<b>35</b>
<b>1. 競合における優位性</b>	<b>35</b>
<b>2. 有害物質の産生性</b>	<b>37</b>

3. 交雑性	39
4. その他の性質	41
第三 生物多様性影響の総合的評価	42
参考文献	45
緊急措置計画書	48

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 6 月 8 日

農林水産大臣

赤城 徳彦 殿

環境大臣

若林 正俊 殿

氏名 サントリー株式会社

代表取締役社長 佐治 信忠

申請者

印

住所 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 1 番 40 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	フラボノイド生合成経路を改変したバラ ( <i>F3'5'H</i> , <i>5AT</i> , <i>Rosa hybrida</i> ) (WKS82/130-9-1, OECD UI: IFD-52901-9)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	切り花の用に供するための使用、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	—

## 生物多様性影響評価の概要

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

#### イ. 和名、英名及び学名

和名：バラ（バラ科バラ属）

英名：Rose

学名：*Rosa hybrida*

#### ロ. 宿主の品種名又は系統名

宿主に用いた園芸種の品種名はWKS82(品種登録申請中、出願日：平成16年11月22日、出願番号：第17636号、出願者：京成バラ園芸株式会社)である。園芸種はハイブリッド・ティー系、フロリバンダ系、ポリアンサ系などに分けられるが、WKS82はハイブリッド・ティー系四季咲きの大輪花で、花色は赤紫色である。

#### ハ. 国内及び国外の自然環境における自生地域

バラ科の植物は、約 100 属 3000 種に分類され、全世界に分布するが、北半球の温帯と亜熱帯で最も多様化している（塚本、1989 年<sup>1)</sup>）。バラ属植物は南はエチオピア、北はシベリアまで、北半球の亜熱帯から寒帯にかけ広く分布する。園芸種は野生のバラ属の種を人為的に交配することにより作出された種間雑種である。バラ属は 4 亜属に分けられ、園芸的にはバラ亜属が重要である。バラ属植物は、ヨーロッパとアフリカに 10 種、アジアに 93 種（うち 15 種は他の大陸にも分布）、アメリカ大陸に 20 種（うち 2 種はアジアと共通）、日本に 11 種（2～3 の変種）の計約 120 種が存在する（塚本、1989 年<sup>1)</sup>）。*Rosa* 亜属の種は新旧両大陸にまたがり広く、*Hulthemia* 亜属は西アジアから中央アジアにかけ、*Platyrhodon* 亜属は中国と日本に、*Hesperhodos* 亜属は北米のアリゾナ、テキサス、バハカリフォルニア（北アメリカ大陸西岸に南北にのびた半島で、メキシコ合衆国の領土）の限られた地域にそれぞれ分布し、森林から海岸まで非常に幅広い環境に適応する数多くの種を分化してきている（上田、2002 年<sup>2)</sup>）。野生種のうち観賞価値の高いものや、薬用、香料用、接木の台木用となるものはそのまま栽培されるが、今日の園芸種は 8 種程度の野生種（*R. multiflora* Thunb. ex Murray（ノイバラ）、*R. wichuraiana* Crép.（テリハノイバラ）、*R. rugosa* Thunb. ex Murray（ハマナス）、*R. gallica* L.、*R. foetida* Herrm.、*R. moschata* Herrm.、*R. gigantea* Collett、*R. chinensis* Jacq. f. *spontanea* Rehd. et Wils. など）が交配されてできた種間雑種である（塚本、1989 年<sup>1)</sup>）と考えられている。

## (2) 使用等の歴史及び現状

### イ. 国内及び国外における第一種使用等の歴史

現在の園芸種は園芸品種間の交配によって作出されることがほとんどである。19世紀に人為的な交配が始まって今日まで27,000もの園芸品種が作出されている。現存する園芸品種は2,000~3,000と見込まれるが、世界的に栽培されているものは比較的少ない。日本では400~500の園芸品種が市販されている(坂西、1989年<sup>3)</sup>)。

我が国において小規模ではあるが本格的なアメリカ式による温室の切り花バラ生産が始められたのは、大正6年ごろであり、アメリカから持ち帰られたアメリカン・ビューティー、キラニーなどが栽培されたと言われている。関東では大正7~8年頃温室栽培が開始された後、大正10年ごろから温室バラの営利栽培を始めるものが多くなり、規模拡大が進んだ。昭和20年代後半からビニール温室利用での栽培が実用化され、ガラス温室と比較して初期投資額の大幅な低減が可能となり、バラ栽培の導入を容易にした。昭和38年には温室内での養液耕としてれき耕が導入され、昭和60年にはロックウール耕へと発展していった。現在、切り花バラ生産はほぼ日本全国に拡大し、平成17年産花き卸売り市場調査結果の概要(農林水産省大臣官房統計部、平成18年5月24日公表)によると日本の切り花で第3位の卸売価額となっており、市場流通している品種数は200を越える(林、2002年<sup>4)</sup>)。

国外においては、バラの栽培は古くから文明が開けた中近東と中国で始まったとされている。その後バラはヨーロッパにおいて発展を遂げるのだが、バラは東西2つの古代花卉文化がヨーロッパで融合することで作り上げられた代表の花であると言える(坂西、1989年<sup>3)</sup>)。18世紀以前ではヨーロッパでは自生している原種間の交配により作出された品種が主に栽培されており、生態的な変化の幅も狭いものであった。しかし、18世紀末にアジアの原種がヨーロッパに導入されることで、19世紀以降ヨーロッパとアジアの原種の人工交配が積極的に行われ、花色や花型はもちろん、四季咲き性や開花性など生態的にも変化に富んだ品種が数多く作出されている(鶴島、1979年<sup>5)</sup>)。

### ロ. 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

切花用のバラはほぼ日本全国で生産されており、平成17年産花きの作付(収穫)面積及び出荷量(農林水産省大臣官房統計部、平成18年5月24日公表)によると、主な生産地は愛知県、静岡県を含む東海地方で全国の出荷量の約3割を占める。また、生産農家数も東海地方が最も多く、全国の約2割を占める。

その栽培方法は土耕とロックウール耕が主である。花芽は温度や日長に関係なく分化するが、その後の発育は光強度や温度に大きく左右されるので、地域の気象条件や立地条件を考慮して以下の4つの作型が導入され市場に周年出荷されている。作型には、①春先に植え付け秋口から翌年の6月中~下旬まで5~7回収穫し剪定して樹高を下げその後ピンチを行って9月から再び収穫する冬切り中心、②厳寒期から暖房を打ち切って休眠させ低温に遭遇させた後剪定して加温を始め3~4月に採花する厳寒期休眠、③簡易な施設で初夏か

ら初冬まで無暖房で採花する夏切り、④周年休まず採花する周年切りがあり、日本における代表的な作型は冬切り中心である(大川、1989年<sup>6)</sup>、大川、2002年<sup>7)</sup>)。また、1株当たりの総収量は栽培方法や品種により異なるが、一般に10～50本程度である。

平成17年産花きの作付(収穫)面積及び出荷量によると、平成17年における日本での切り花バラの年間出荷量は約3億9千万本であり、すべて施設栽培された切り花バラであった。

一方、国外において切り花バラ栽培の盛んな国はオランダ、スペイン、イタリア、米国、フランスである(大川、1989年<sup>6)</sup>)。また、イスラエル、アフリカ諸国はオランダ市場を通して世界に輸出していること、中南米諸国はアメリカ市場への輸出を増やしていることが知られている。アフリカ諸国、中南米諸国は熱帯高冷地であり、1年中安定した気温、豊富な労働力、低賃金、簡易な設備、土地の安さ等の利点を生かして年々生産量を増やしている。日本の周辺諸国では韓国が近年政府の補助金によって急激に近代的な温室を増加させるなど政府として輸出に力を入れている。また、インドも近年ヨーロッパ向けの輸出が始まり、時期によっては価格が安いいため日本にも輸出している(鹿野、2002年<sup>8)</sup>)。平成17年花き卸売市場調査結果(農林水産省大臣官房統計部、平成18年5月24日公表)によると、海外からの切り花バラの輸入量は5493万本(前年比97%)であり、国内流通量の12.6%に達している。

園芸種はほとんどが観賞用として利用されるが、この他に、香水やポプリ、ジャムなどに利用されることもある(近藤、2004年<sup>9)</sup>)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ. 基本的特性

野生種は落葉または常緑の低木で、樹形は直立またはつる性だが、時には地面に這うものもある。枝幹には多くは棘がある。葉は奇数羽状複葉で互生し、托葉が葉柄の一部合着している。小葉には鋸歯がある。花は茎頂に単生するか散房花序、または円錐花序をなし、少ないもので3個、多いもので30個程の花をつける。花色は白、黄、紅である。花卉の基本数は5枚であるが、雄蕊が花卉化して八重咲きになるものも多い(塚本、1989年<sup>1)</sup>、野村、2004年<sup>10)</sup>)。

園芸種は樹形と花の大きさにより主にハイブリッド・ティー系、フロリバンダ系、ポリアンサ系に分けられる。以下にそれぞれの特性を記す。

- ・ ハイブリッド・ティー系：四季咲き系の大輪種。花径10cm以上の花を、1枝に1花ないし少数咲かせる。通常は八重咲きである。樹形は直立または株立ち状のブッシュ形で、樹高は90cmから1.8m程度である。
- ・ フロリバンダ系：四季咲き系の中輪種。花径は5～10cmで、1枝に数輪から十数輪の花をつける房咲きである。樹形は直立または株立ち状のブッシュ形で、樹高は70cmから1.2m程度である。

- ・ ポリアンサ系：四季咲き系の小輪種。花径は 3～6cm で、房咲きであふれるように咲く。樹形は主に木立性であるが、中にはつる性、半つる性のものもある。樹高は 60cm から 1.0m 程度である。(近藤、2004 年<sup>9)</sup>、野村、2004 年<sup>10)</sup>。

宿主である WKS82 はハイブリッド・ティー系四季咲きの品種で、花は高芯剣弁咲き、花径は 11cm 程度、花色は赤紫色である。また、樹形は直立性がある。WKS82 はマダムビオレ（ハイブリッド・ティー系園芸品種）とシルバースター（ハイブリッド・ティー系園芸品種）を交配して、平成 5 年に日本で作出された。

#### ロ． 生息又は生育可能な環境の条件

生育開花の適温は 20～25℃であり、日本の自然条件下では越冬、越夏ともに可能である。30℃以上になると茎葉の成長が悪く、花が小さくなる。また、-5℃以下で凍害が起こるといわれている。バラの生育を支配する環境要因としては光の影響が最も大きいといわれている。日照は、最低 5 時間、朝日の当たる通風のよい場所を選ぶ。土壌の通気排水が不可欠であり、排水不良の土地では植付け前に排水管を設置し、砂や永続性のある有機質（ピートモスやバークたい肥など）を加えて土を柔らかくしておく。土の酸性度は pH5～6 の微酸性が至適とされる。

生育開花温度による形態への影響の例として、フロリバンダ系品種のマ・パーキンスを 11.1、16.6、22.2、27.7、33.3℃で栽培すると、花径は 16.6、22.2℃で最大となり、さらに花弁の長さや花弁数は 16.6℃で最大となり、27.7、33.3℃の高温では花弁数はバラ原種の基本数の 5 枚となることが知られている。

強光は葉焼け、花色の退色及び花ぼけなどの品質低下の原因となるので、夏季に限らず光線量が多いときは遮光を行う。遮光が必要な期間はおおむね 4 月から 9 月までであり、遮光は透過する光線の強度が 7～8 万 lx 程度になるよう調整する(坂西、1989 年<sup>3)</sup>、酒井、2002 年<sup>11)</sup>。

#### ハ． 捕食性又は寄生性

---

## ニ． 繁殖又は増殖の様式

### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

果皮（内果皮、中果皮、外果皮）を持つバラの種子は個々が独立して着生せず、複数の種子が花托（花床）に覆われて果実を形成している。果実は熟した後も植物に長く留まっている(Gudin, 2003<sup>12)</sup>。そのため、種子自体が植物体から脱粒することなく、さらに果実が脱落する可能性もないか極めて低い。

バラの種子には休眠性があるが、その程度は種間及び品種間で大きな差異が見られる



(Gudin, 2003<sup>12)</sup>)。

バラの種子の寿命は種間及び品種間で大きな差異が見られる。野生種の種子を乾燥状態で密閉容器中に 1~4°C で保存した場合には、少なくとも 4 年間は発芽能を保持したことが確認されている (Gudin, 2003<sup>12)</sup>)。

なお、園芸種において種子による繁殖も可能であるが、低温処理等による休眠打破を行うことが必要であり、自然条件下での種子繁殖の可能性はないか極めて低いと考えられる。

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

野生種は自然条件下では種子繁殖あるいはハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray) やノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray) など一部の種において見られる吸枝（地中を横に広がる枝）により繁殖することができる。一方、園芸種は吸枝による繁殖は起こらない。人為的には挿木や接木による栄養繁殖が可能である。

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

a. 自殖性及び他殖性の程度

園芸種の育種には自殖あるいは他殖が一般に行われることから、園芸種には自殖性、他殖性があると考えられるが、これらを学術的に記載した例は限られている。

ハイブリッド・ティー系の品種である ‘White Weekend’ と ‘White Masterpiece’ について、各々の自殖後代が人工交配によって作出されていることが報告されている (De Vries and Dubois, 1978<sup>13)</sup>)。

また、ポリアンサ系の品種である ‘Meinadentel’、‘New Penny’、‘Kathleen Zeimet’、‘The Fairy’、‘Marie Pavic’、‘Yvonne Rabier’、‘Kathleen’ などについても、各々の自殖後代が人工交配によって作出されていることが報告されている (Dubois and De Vries, 1987<sup>14)</sup>)。

複数回交配した場合の交雑率を調べた実験では、ハイブリッド・ティー系の ‘Sonia’ に品種の異なるハイブリッド・ティー系の ‘Ilona’ を人工交配させると 1 回の受粉では約 50% の結実率しか示さないが、1 日間隔で 5 回受粉させると結実率は 90% 近くまで上昇することが報告されている (De Vries and Dubois, 1983<sup>15)</sup>)。

以上のことから園芸種は品種によりその程度は大きく異なるが、自殖性、他殖性を示すことがわかる。本組換え体の宿主として用いた WKS82 は自殖性、他殖性を示す。

b. 自家不和合性の有無

園芸種では、種間及び品種間で大きな差異はあるものの、前項で述べたように人為的な自家受粉により自殖後代を作出している報告もあり、自家不和合性を示さないと考えられている。本組換え体の宿主として用いた WKS82 は自家不和合性を示さない。

48 種類の野生種を用いた実験では、人工交配の結果、結実率が 0% (28 種類) から 100% (1 種類) まで異なることが示されている。例えば、ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.) では 0%、シロバナハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray f. *alba* (Ware) Rehder) では 13.3% であった。また、高倍数性の種に自家和合性が存在することが報告されている (Ueda and Akimoto, 2001<sup>16)</sup>)。ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray) でなど野生種では自家不和合性が見られるが、配偶体型自家不和合性であると考えられており、自家不和合性を示す花粉は受粉後の花粉管伸長阻害を引き起こすために受精できない (Jacob and Ferrero, 2003<sup>17)</sup>)。

### c. 近縁野生種との交雑性

#### (a) 日本に自生する近縁野生種

日本に自生する野生種は、ノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.)、ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray)、オオタカネバラ (*R. acicularis* Lindl.)、カラフトイバラ (*R. marretii* Lév.)、オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ (*R. luciae* Franch. et Rochebr.)、ヤマイバラ (*R. sambucina* Koidz.)、カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ (*R. bracteata* Wendl.)、ナニワイバラ (*R. laevigata* Michx.)、サンショウバラ (*R. roxburghii* Tratt. var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.) の 10 種とタカネバラ (*R. acicularis* var. *nipponensis* (Crép.) Koehne.)、ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino)、モリイバラ (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. et Sav.)、フジイバラ (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino)、ヤブイバラ、ニオイイバラ (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama)、ミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) の 6 変種である (上田、2002 年<sup>2)</sup>)。これらのうち園芸種作出のために使われた日本に自生する野生種は、ノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.)、ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray) である (Gudin, 2000<sup>18)</sup>, Hurst, 1941a<sup>19)</sup>, Hurst, 1941b<sup>20)</sup>, Hurst, 1941c<sup>21)</sup>, Wylie, 1954<sup>22)</sup>, Wylie, 1955a<sup>23)</sup>, Wylie, 1955b<sup>24)</sup>)。それぞれの自生地及び生育環境等を下記に記す。

- ・ ノイバラ：北海道から九州までと朝鮮に分布。平地及び山地にふつうに見られるややつる性の低木。小葉は 7~9 枚で、托葉が羽状に細く裂け、くしの歯状となる。円錐花序に多数の白色の花をつける。開花期は 5~6 月。日本ではこのノイバラが主に台木として用いられ、優良な選抜系統もつくられている。フロリバンダ系園芸種の房咲きはこのノイバラから導入された。
- ・ テリハノイバラ：本州、四国、九州、沖縄、朝鮮、台湾、中国に分布。日当たりのよいところを好み、海岸から荒地、草原、山地まで生育し、茎は長く匍匐する。小葉は 5~9 枚で、厚く光沢がある。枝の先に数個の白色の花をつけ、開花期は近縁の種に比

べ遅く、6～7月。ツルバラの枝が長く伸長する形質は本種に由来する。

- ・ハマナス：海岸の砂地に生え、北海道、本州（太平洋側は茨城県以北、日本海側は島根県以北）、東アジア（朝鮮、中国北部以北）の温帯から寒帯にかけ広く分布。枝全体に刺と刺毛を密生し、吸枝により繁殖し、群生する。葉にはしわが目立ち、種名の *rugosa*（しわのある）はそのことを意味する。枝先に1～3輪の大輪の花をつけ、紅紫色で芳香がある。開花期は5～7月で、比較的長い。変種に白い花色のものがある。耐寒性、耐病性ともに強く、育種的に利用価値が高く、耐寒性の品種群（ハイブリッドルゴース）が育成されている。
- ・オオタカネバラ：北海道、本州（中部、東北地方の高山）、樺太、朝鮮、中国東北、シベリア、北ヨーロッパ、北米ときわめて広い範囲に分布する種で、4倍体から8倍体まである。枝には刺と刺毛を密生し、小葉は5～7枚。花は短枝の先端に単生し、紅色。開花期は6～7月。
- ・カラフトイバラ：北海道、本州（長野県）、樺太、朝鮮、中国、東北、東シベリアに分布。小葉は7～9枚で、長楕円形。葉の裏面の色が淡くなり、いくぶん白色を帯びる。花は紅色で、開花期は6～7月。
- ・オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ：関東、東海地方（愛知県豊川以東）に分布。枝に鉤状の刺があり、他のものに寄りかかっている。小葉は5～7枚で、表面に光沢がある。枝の先に円錐花序をなし、白色の花をつける。開花期は5～6月。
- ・ヤマイバラ：本州（愛知県以西）、四国、九州に分布。鉤状の強い刺により他に寄りかかって高くのぼってゆく大きな低木。小葉は5枚（まれに7枚）で、大きく長楕円形となり、先は細くとがる。散房状の花序に大きく白い花を多数つける。開花期は5～6月。
- ・カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ：八重山諸島、台湾、中国南部に分布。枝には綿毛があり、他のものに寄りかかるか、匍匐または直立する。小葉は5～9枚で、厚く光沢がある。花は枝の先に単生し、大輪で白色。開花期は長く、2～8月。花柄に数枚の苞があり、この苞とがく片には綿毛をもつ。
- ・ナニワイバラ：中国南部に原生する種。日本でも和歌山県南部、四国、九州で野生化。本種の最初の記載は北米南部に野生化していたものによる。茎に鉤状の刺があり、つる性で非常に強勢な生育を示す。小葉は3枚（まれに5枚）、先端のとがった長楕円形で光沢があり、常緑。小枝の先端に大輪の白い花を単生し、開花期は5月。小花柄とがく筒に細い刺がある。
- ・サンショウバラ：富士、箱根地方に分布し、母種とその品種、*f. normalis* Rehd. et Wils. は中国にも自生する。樹木状になる小高木で、大きいものでは高さ数mぐらいになる。古くなると樹皮が落ちる。小葉は9～15枚ぐらいあり、複葉全体がサンショウに似ていることからサンショウバラと呼ばれる。花は枝の先に単生し、大輪で、淡紅色。が

く筒には全面に強い刺がある。開花期は6月。八重咲きの栽培種をイザヨイバラと呼び、古く中国から渡来したものである。平成12年刊行のレッドデータブックで絶滅危惧Ⅱ類（絶滅の危険が増大している種）に分類されている。

- ・ タカネバラ：オオタカネバラの変種であるタカネバラ〔var. *nipponensis* (Crép.) Koehne.〕は、母種に比べて小葉数が多く（7～9枚）、全体に小型となる。分布は本州（中部地方以北）及び四国。
- ・ ツクシイバラ：ノイバラの変種である。九州南部に自生し、全体に大型となる。葉に光沢があり、花は大きく、円錐花序に多数つき、淡紅色。花序や花柄に腺毛が多いのが特徴。
- ・ モリイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（関東以西）、四国、九州に分布。母種および他の変種と異なり、花が枝の先端に単生する（まれに散形に2～3花）のが特徴。
- ・ フジイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。富士、箱根地方、紀伊半島、四国に分布。全体に大型になり、主幹も太くなる。他の変種よりも標高の高いところに生育し、開花期もより遅く、6～7月となる。
- ・ ヤブイバラ、ニオイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（紀伊半島以南）、四国、九州に分布。花、果実が小型。
- ・ ミヤコイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（北陸、近畿、中国）、四国北部、九州北部に分布。円錐花序に多数の花をつける（上田、2002年<sup>2)</sup>）。

#### (b) 近縁野生種との自然条件下での交雑性

日本の自然条件下における園芸種と野生種との交雑性に関しては、平成17年に、近隣に園芸種が植栽されている環境下で自生する野生種、園芸種が近接栽培されている植栽の野生種から無作為に種子を採集し、播種後、得られた実生について園芸種との交雑の有無が検証された報告がある（中村ら、2007年<sup>25)</sup>）。本報告によると、千葉県、岡山県（2カ所）、岐阜県、北海道の計5ヶ所から無作為に採集した種子より得られた実生、合計約1300個体について解析を行ったが、園芸種と野生種との交雑種は全く存在しなかった。このことから、自然条件下で野生種が園芸種と交雑する可能性はないか、あっても極めて低いと考えられる。

更に、野生種との自然条件下での交雑の可能性について有識者から見解を得た。

【 岐阜大学応用生物科学部 福井 博一教授（日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場組換え体利用に関する業務安全委員会場外委員） 】

野生種のほとんどは2倍体であり、園芸種は4倍体である。人為的な交配を行った場合には交雑種子ができる可能性は否定できない。しかし、その場合も交雑個体は3倍体となり、こ

れが開花した場合、生殖器官（花粉や卵細胞）の減数分裂が異常となって正常な受精能力を持たないため、次世代が交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

また、野生種と園芸種は種が異なるため、種間雑種の特性として生育が不良となる。実際に野生種を倍数化させて4倍体を作成し、園芸種（4倍体）を人為的に交配した場合でも、その雑種の生育が極めて悪いことを岐阜大学応用生物科学部 福井研究室で確認している（未発表データ）。したがって、2倍体の野生種と4倍体の園芸種の雑種後代の生育は不良となることが推定される。

実際の場面において、岐阜県内のバラ園では園芸種の交配育種とノイバラの台木生産を行っている。露地ほ場でノイバラ（品種K2）を開花・自然交雑による採種を行っており、施設内では栽培種の交配育種を行っている。しかし、これまでに本バラ園においてノイバラが園芸種と交雑したという事例はない。

さらに、国内で年間約5億本もの切り花バラが生産・販売され、各地にも多くのバラ園があるにも関わらず、自然条件下において園芸種が野生化したという例は報告されていない。

以上のことから、一般的な自然条件下で園芸種が野生種と交雑することはないと考えられる。人為的な交配を行った場合には低い確率で雑種が得られる可能性は完全には否定できないものの、その個体が正常に生育する可能性は低く、また正常な生殖能力を持つ可能性も低いと考えられる。

#### 【 岐阜県立国際園芸アカデミー 上田 善弘教授 】

日本の自然条件下に自生する野生種は園芸種と近接した場所に通常はなく、また近接した場所にあったとしても、昆虫が園芸種の花粉を野生種に媒介することはまずないと考えられる。もし、野生種に園芸種の花粉が運ばれてきたとしても、通常は近接する他の野生種の花粉も運ばれてきており、その場合、野生種は野生種由来の花粉を優先的に選択し、受精に用いるため、園芸種の花粉が野生種の卵細胞と受精する確率は極めて低いと考えられる。

#### 【 岐阜大学教育学部 松本 省吾助教授 】

岐阜大学のほ場では、7、8年の間、野生種であるハマナス、ノイバラを取り囲む形で園芸種を植栽している。これまでの訪花昆虫の行動観察から、訪花昆虫は香りが強く、花粉量の多いハマナスに多数群がり、ハマナス株間を移動することを確認しているが、野生種と周りの園芸種とを行き来する個体は確認していない。また、植栽してあるハマナス種子から発芽した個体に園芸種との雑種がこれまで得られていないことから、自然条件下では、園芸種と野生種との雑種の起こる確率はないかあっても極めて低いと考えられる。

#### (c) 近縁野生種との人為的交雑性

園芸種は人為的にはバラ属内での種間交雑が可能であり、他のバラ属との人工交配により育成されてきた。

人為的な種間交雑に関しては、フロリバンダ系品種の‘Meinadentel’、‘New Penny’、‘Kathleen Zeimet’、‘The Fairy’、‘Marie Pavic’、‘Yvonne Rabier’、‘Kathleen’などに矮性を示す *R. chinesis minima* (SIMS) Voss を人工交配することにより生じた F<sub>1</sub> 雑種の特性を調べることで、矮性が一つの優性遺伝子によって支配されていることが報告されている (Dubois and De Vries, 1987<sup>14)</sup>)。

また、フロリバンダ系品種 ‘Goldilocks’ に四季咲きのテリハノイバラと四季咲きの性質をもたないテリハノイバラを各々交配させ、さらに ‘Goldilocks’ を戻し交配することで四季咲きの性質が劣勢遺伝子によって支配されていることが報告されている (Semeniuk, 1971<sup>26)</sup>)。

また、白色のハイブリッド・ティー系品種 ‘White Weekend’ (4 倍体) に 4 倍体の *R. foetida* Herrm. (南西アジア、中東アジア原産の野生種で、黄色の花を咲かせる。黄色の花を持つ園芸種の元となった品種) に属する *R. foetida* cv. Autraian Briar と *R. foetida* cv. Pecian Yellow を交配させ、さらに ‘White Weekend’ を戻し交配し、四季咲きの黄色品種が得られたことが報告されている (De Vries and Dubois, 1978<sup>13)</sup>)。

#### (d) アポミクシスを生ずる特性の有無

園芸種、野生種ともにアポミクシスを生ずる特性はない。

#### ④花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

バラの花粉の稔性は種間及び品種間で大きな差異が見られるが、ほう酸 50ppm、しょ糖 10%、寒天 1%を含むほう酸培地上で 123 品種の花粉を 25°C で 2 時間インキュベートした場合、0% から 92.2% の発芽率を示したことが報告されている (上田、1994 年<sup>27)</sup>)。

また、花粉の稔性の程度がどの程度次世代に遺伝するかを調べた実験では、花粉の稔性が異なる 9 種類のハイブリッド・ティー系品種を用いて人為的に品種間雑種が 31 品種作出されており、品種間種 (F<sub>1</sub> 雑種) の花粉の稔性の程度は親株の花粉の稔性の程度と相関していることが報告されている (Visser et al., 1977<sup>28)</sup>)。

バラの花粉は三溝型 (Tricolpate, 3 つの発芽溝をもつ) であり、極軸方向の長さ (長径) は約 30 μm から 60 μm まで、赤道面の幅 (短径) は約 15 μm から 35 μm である (上田、1994 年<sup>27)</sup>)。

バラは虫媒花であり、バラ属の訪花昆虫としては、ハチ目、コウチュウ目、ハエ目が主に知られている (Kevan, 2003<sup>29)</sup>)。

花粉の寿命は数日間であり、花粉が放出されてから数日間は一定の稔性を保持しているが、花粉を通常の温度で数週間保存している間に花粉の交雑効率は急激に低下する (Jacob and Ferrero, 2003<sup>17)</sup>)。

#### ホ. 病原性

---

へ. 有害物質の産生性

園芸種はこれまでに長期間の使用等の経験があるが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。

ト. 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

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ. 構成及び構成要素の由来

供与核酸の構成及び構成要素の由来を下記に、その位置関係を図 1(p. 14)に、その塩基配列を別添資料 1 に示した。

#### (イ) 選択マーカー ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) II 発現カセット

- Nos プロモーター : アグロバクテリウムツメファシエンス  
(*Agrobacterium tumefaciens*) 由来  
ノパリン合成酵素プロモーター又は 5' 非翻訳領域  
0.3kb
- NPT II コード領域 : 大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来  
ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) II  
遺伝子  
1.0kb
- Nos 3' 非翻訳領域 : アグロバクテリウムツメファシエンス  
(*Agrobacterium tumefaciens*) 由来  
ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域  
0.3kb

#### (ロ) フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 (F3' 5' H) 発現カセット

- E1235S プロモーター : カリフラワーモザイクウイルス由来  
35S プロモーター  
0.8kb
- F3' 5' H コード領域 : パンジー (*Viola wittrockiana*) 由来  
フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 cDNA  
1.8kb
- Nos 3' 非翻訳領域 : アグロバクテリウムツメファシエンス  
(*Agrobacterium tumefaciens*) 由来  
ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域  
0.3kb



- (ハ) トレニア アントシアニン 5-アシル基転移酵素 (5AT) 発現カセット
- E1235S プロモーター : カリフラワーモザイクウイルス由来  
35S プロモーター  
0.8kb
- 5AT コード領域 : トレニア (*Torenia hybrida*) 由来  
アントシアニン 5-アシル基転移酵素 cDNA  
1.8kb
- Nos 3' 非翻訳領域 : アグロバクテリウムツメファシエンス  
(*Agrobacterium tumefaciens*) 由来  
ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域  
0.3kb

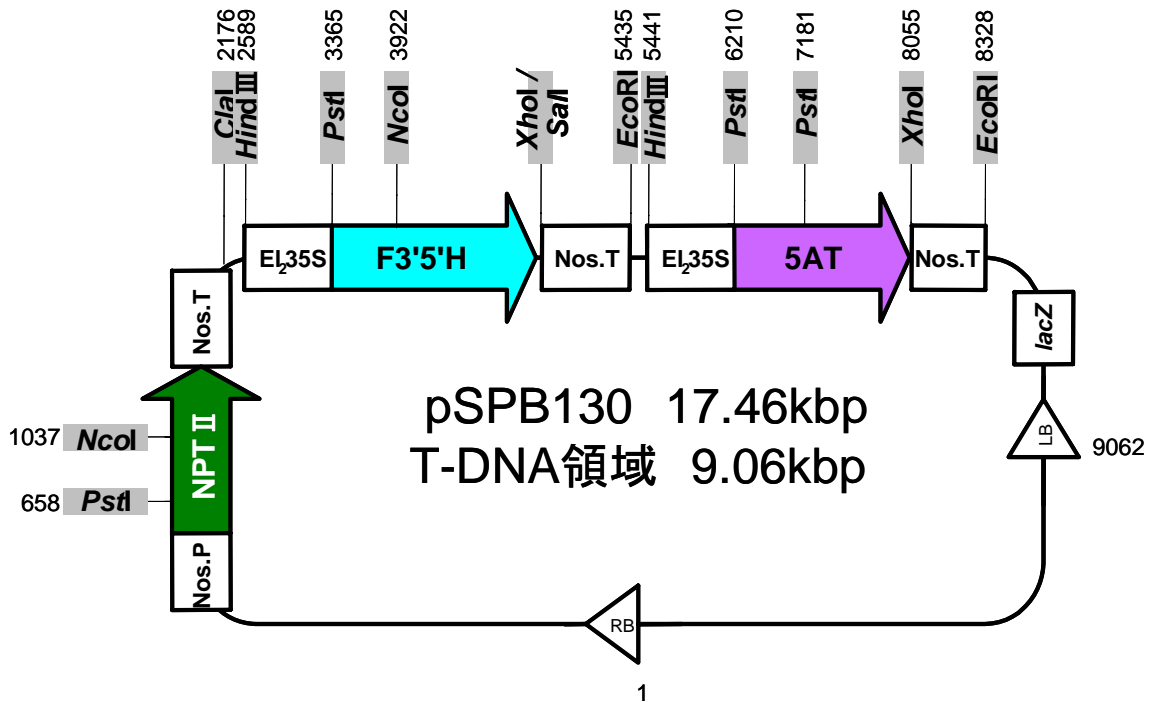


図 1. pSPB130 の構造

バイナリーベクターpBIN19 に 2 つの遺伝子を挿入したもの。

Nos. P : アグロバクテリウムツメファシエンズ由来ノパリン合成酵素プロモーター又は 5' 非翻訳領域、NPT II : ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) II 遺伝子、Nos. T : アグロバクテリウムツメファシエンズ由来ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域、E1235S : カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、F3' 5' H: パンジー フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 cDNA、5AT : トレニア アントシアニン 5-アシル基転移酵素 cDNA。

※制限酵素名と共に示した数字は、ライトボーダー末端を 1 とした時の切断部位の位置 (bp) を表す。

## ロ. 構成要素の機能

### (イ) フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-9-1 の作出

アントシアニンは、フラボノイドと総称される植物の二次代謝物の 1 グループで、骨格となる化合物（アントシアニン）に糖が結合した配糖体である。アントシアニンは B 環の水酸基の数の違いからペラルゴニン、シアニン、デルフィニンに分類される。アントシアニンはその構造により色が変化し、どのようなアントシアニンが花で合成されるか、すなわち、花が何色になるかは、種あるいは品種ごとに遺伝的に決まっている。バラは花の女王とされ古来から愛好されており、人為的な交配育種により様々な園芸種が作出されてきた。その結果、オレンジ、黄、赤、白、灰色などの多彩な花色の品種が作出された。しかしながら、紫から青色を呈する品種は存在しない。これはバラ花卉には遺伝的に紫から青のアントシアニン（デルフィニン型アントシアニン）の合成経路が存在せず、色素が存在しないためである。

アントシアニンの生合成経路の一部を図 2、3 に示した。アントシアニン 3-グルコシドにいたるアントシアニンの生合成経路は高等植物において確認されており、バラでも図 2 に示した経路によりアントシアニンが合成される。バラの花弁中のアントシアニンの多くはアントシアニン 3,5-ジグルコシドであり、アントシアニン 3-グルコシドも少量存在する。また、それ自身は無色ではあるがアントシアニンと複合体を形成することにより花色の青色化に貢献するフラボノールの合成経路も図 2 に示した。アントシアニンは細胞内では液胞に局在するため、花弁細胞の液胞の pH が花色に影響することも知られている。

アントシアニンの構造の中でも B 環の水酸基の数がその色に大きな影響を与える。アントシアニンの B 環の水酸基が 1 個（4' のみが水酸化されている）であるペラルゴニン 3-グルコシド及びその誘導体を含む花は橙がかった赤色を示し、アントシアニンの B 環の水酸基が 2 個（3' と 4' のみが水酸化されている）であるシアニン 3-グルコシド及びその誘導体を含む花はやや紫がかった赤色を示す。アントシアニンの B 環の水酸基が 3 個（3'、4'、5' が水酸化されている）であるデルフィニン 3-グルコシドならびにその誘導体を含む花は紫から青色を呈することが多い。さらに、アントシアニンが芳香族アシル基により修飾されることで液胞中での分解を受けにくくなり安定化し、かつその色がより青くなる。バラ花卉にはデルフィニン 3-グルコシド及びその誘導体が存在しないため、バラには紫から青色を呈する品種が自然界には存在しない。

フラボノイドの B 環の水酸基の数を決定する酵素がフラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3' H) とフラボノイド 3',5'-水酸化酵素 (F3' 5' H) である (図 3)。両水酸化酵素がともに発現しない場合にはペラルゴニン 3,5-ジグルコシドが、F3' H のみが存在するとシアニン 3,5-ジグルコシドが蓄積する。F3' 5' H が存在する花ではデルフィニンが合成されるが、バラ花卉には F3' 5' H が存在しないため、これらが花弁で蓄積することはない。F3' 5' H 遺伝子をシアニン、ペラルゴニンを蓄積するバラに導入するとデルフィニンが生産さ

れ、花の色は変化したが、バラの内在性の代謝経路が存在するためシアニジン、ペラルゴニジンと混在することにより、花の色は青紫色には至らなかった。

そこで、①パンジー由来の F3' 5' H 遺伝子をバラで発現させる、②アントシアニンを安定化し、より青色化させるためトレニア アントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子を発現させる、の 2 種の構成要素をバラに導入し、デルフィニジンを蓄積させ、アントシアニンを安定化させることにより青紫色のバラを得た。

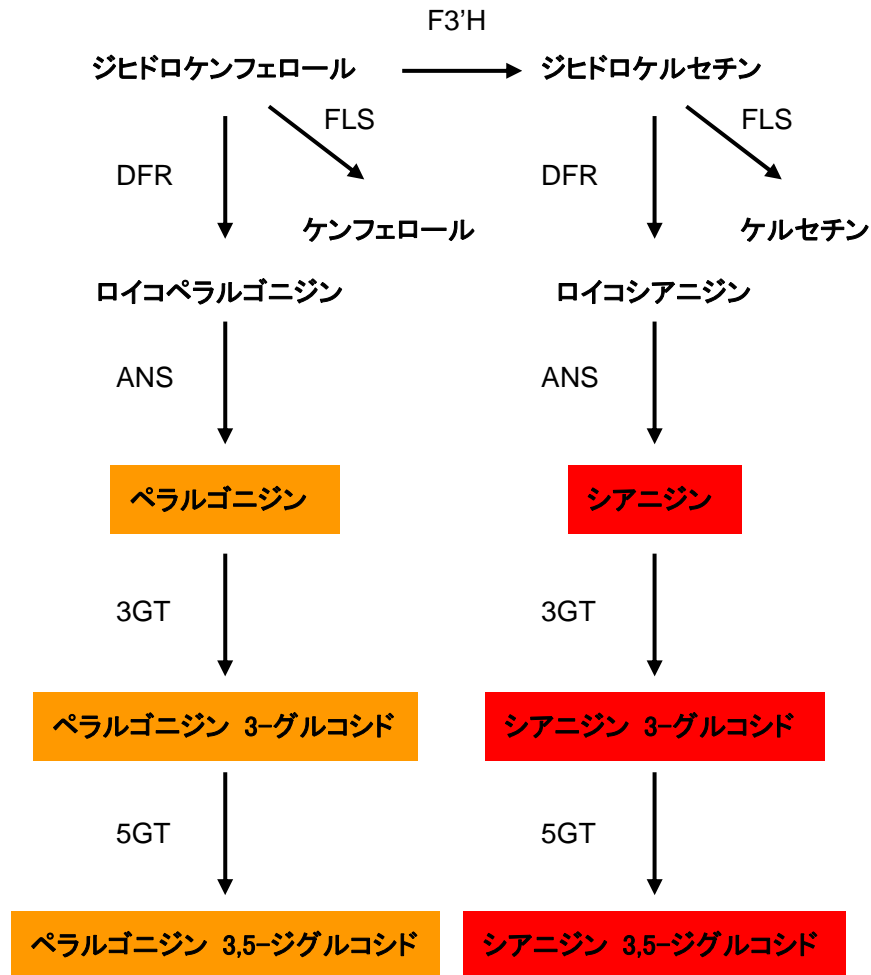


図 2. 非組換えバラにおけるアントシアニン生合成経路の概略

非組換えバラではシアニン型アントシアニンやペラルゴニン型アントシアニンを蓄積している。

(注) F3'H : フラボノイド 3'-水酸化酵素、FLS : フラボノール合成酵素、DFR : ジヒドロフラボノール 4-還元酵素、ANS : アントシアニン合成酵素、3GT : アントシアニン 3-糖転移酵素、5GT : アントシアニン 5-糖転移酵素。

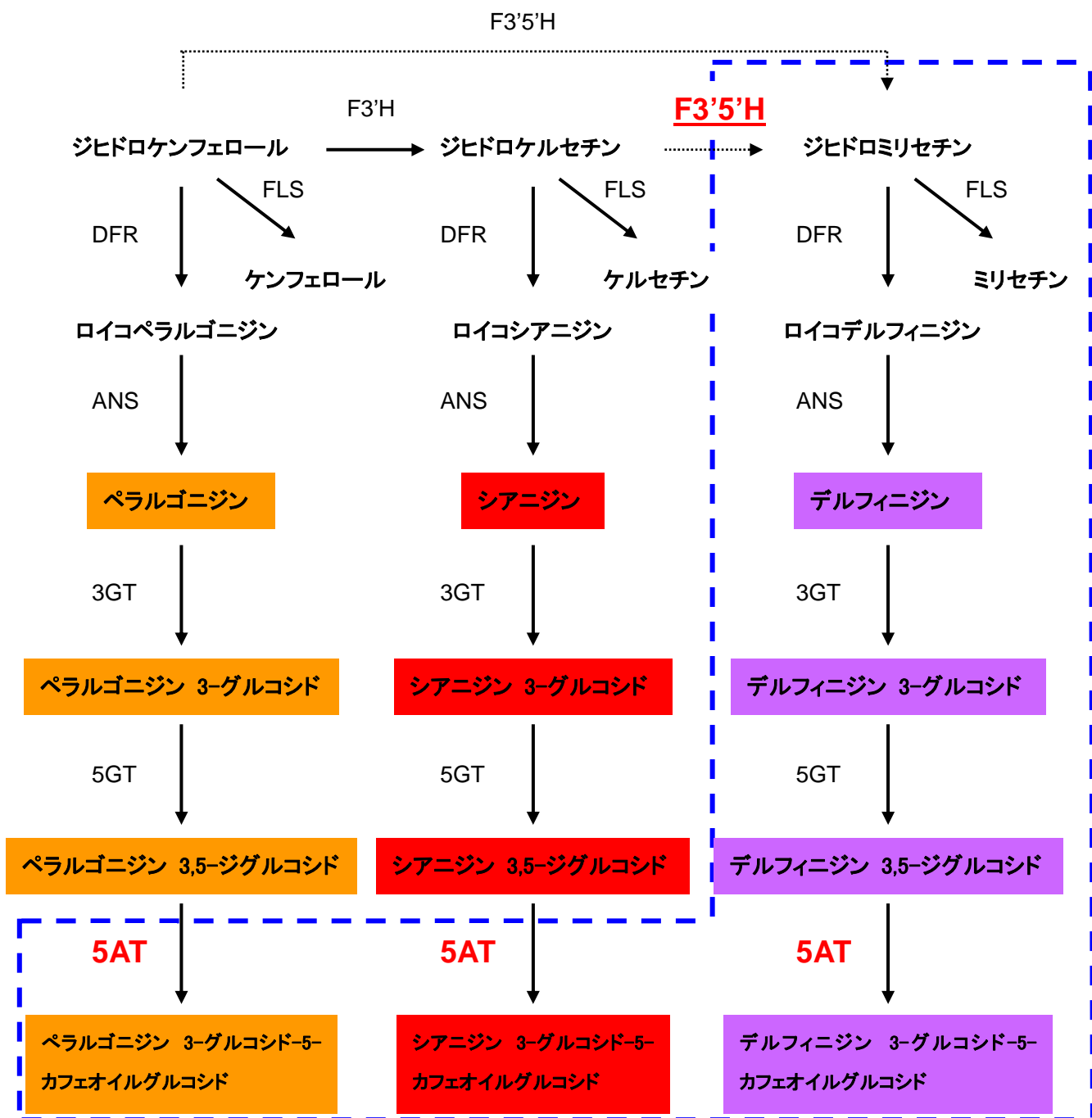


図 3. 本組換え体におけるアントシアニン生合成経路の概略

非組換え体には F3' 5' H が欠損しているため、破線の経路は存在しない。バンジー由来の F3' 5' H 遺伝子を導入することによりジドロミリセチンを生合成し、青みを帯びたデルフィニジン型アントシアニンを蓄積させ、花の色を青くすることができる。さらにトレニア由来のアントシアニン 5-アシル基転移酵素 (5AT) 遺伝子を導入することにより、アントシアニンに芳香族アシル基が付加され、アントシアニンを安定化し、かつその色をより青くすることができる。

(注) F3'H : フラボノイド 3'-水酸化酵素、F3' 5' H : フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素、FLS : フラボノール合成酵素、DFR : ジドロフラボノール 4-還元酵素、ANS : アントシアニン合成酵素、3GT : アントシアニン 3-糖転移酵素、5GT : アントシアニン 5-糖転移酵素、5AT : アントシアニン 5-アシル基転移酵素。

※破線で示した部分は、導入遺伝子の機能により新たに合成される経路である。今回導入した遺伝子は下線で印した。

(ロ) 構成要素の機能

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

a. ノパリン合成酵素(Nos)プロモーター :

*Agrobacterium tumefaciens* のノパリン合成酵素のプロモーター領域。本プロモーター下流に隣接するネオマイシンホストランスフェラーゼ (NPT) II 遺伝子を形質転換植物内で発現させるために必須の構成要素である。

ノパリン合成酵素遺伝子は、Ti-, Ri-プラスミドの T-DNA 上に存在する。アグロバクテリウムが植物に感染後、植物核ゲノムに組み込まれた Ti 又は Ri プラスミドの T-DNA 上にコードされているノパリン合成酵素が植物腫瘍組織中で発現し、アミノ酸のアミノ酸残基と  $\alpha$ -ケト酸のカルボニル基の還元的縮合によりノパリンが合成される。合成されたノパリンは感染菌に輸送され、炭素及び窒素源として利用される。このノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターは nos プロモーターと呼ばれ、植物体のほとんど全ての器官で発現する (村松、1997年<sup>30)</sup>、Ebert et al., 1987<sup>31)</sup> )。

b. ネオマイシンホストランスフェラーゼ(NPT) II 遺伝子 :

原核生物のトランスポゾン Tn5 に見出された薬剤耐性遺伝子で、ネオマイシンホストランスフェラーゼ II をコードする。カナマイシンや G418 などをリン酸化し、これらの薬剤に対する耐性を付与することから、遺伝子導入実験において、遺伝子導入された細菌、酵母、植物、動物を選抜するためのマーカー遺伝子として広く用いられる。

c. ノパリン合成酵素 (Nos) 遺伝子 3' 側領域 :

a. に記載のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 側配列である。

d. 35S プロモーター :

カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域。本プロモーター下流に隣接する遺伝子を形質転換植物内で発現させるために必須の構成要素である。

カリフラワーモザイクウイルスはゲノム DNA として環状二本鎖 DNA を持ち、宿主植物の遺伝子発現系を利用して宿主細胞の核内で自己複製し増殖するために必要な遺伝子発現調整部位を有する。このゲノム DNA 上にコードされる遺伝子の 1 つ、35S RNA 遺伝子のプロモーターは 35S プロモーターと呼ばれ、植物体のほとんど全ての器官で、いずれの成長段階においても強いレベルで発現することから、外来遺伝子を植物で発現させる際によく用いられる。ここでは、35S プロモーターのエンハンサー部分を繰り返すことにより発現を強くした El235S プロモーター (Mitsuhara et al., 1996<sup>32)</sup>) を用いている。

e. フラボノイド 3',5'-水酸化酵素 (F3' 5' H) cDNA :

パンジー由来。この酵素はジヒドロフラボノールの B 環の水酸化を行う酵素で、ジヒドロケンフェロールをジヒドロミリセチンに、あるいはジヒドロケルセチンをジヒドロミリセチンに変換する反応を触媒する。

f. アントシアニン 5-アシル基転移酵素 (5AT) cDNA :

トレニア由来。この酵素はアントシアニン 3,5-ジグルコシドの 5 位に付加されているグルコースをアシル化する酵素で、カフェオイル CoA あるいはクマロイル CoA のアシル基部分をアントシアニンのグリコシル基に転移する反応を触媒する。これによりアントシアニンを安定化させ、かつその色をより青くする。

②目的遺伝子及び選択マーカーの発現により産出される蛋白質の機能及び該当蛋白質がアレルギー性を有することが明らかになっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

パンジー由来の F3' 5' H はジヒドロケンフェロールをジヒドロミリセチンに、あるいはジヒドロケルセチンをジヒドロミリセチンに変換し、さらにトレニア由来の 5AT はデルフィニジン 3,5-ジグルコシドをデルフィニジン 3-グルコシド-5-カフェオイルグルコシドに変換する。また、大腸菌由来の NPT II はカナマイシン耐性を示す。

これらの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の相同性を有するか否かについて、データベース SWISS-PROT を用い、「Allergen sequence db」中の「Non-Food Allergen sequence」に対して検索を行ったところ、相同性は有さなかった。

③宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

パンジー由来の F3' 5' H によってジヒドロケンフェロールがジヒドロミリセチンに、あるいはジヒドロケルセチンがジヒドロミリセチンに変換される。さらにトレニア由来の 5AT によってデルフィニジン 3,5-ジグルコシドがデルフィニジン 3-グルコシド-5-カフェオイルグルコシドに変換される。また、ジヒドロミリセチンは内在性のフラボノール合成酵素の働きにより、ミリセチンに変換される。



## (2) ベクターに関する情報

### イ. 名称及び由来

大腸菌及びアグロバクテリウム由来の合成プラスミド pBIN19 (Bevan, 1984<sup>33)</sup>) をベクターとして使用した。大腸菌由来のネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子、大腸菌由来のマルチクローニングサイト、アグロバクテリウム由来の T-DNA レフトボーダー及びライトボーダー配列を含む。

### ロ. 特性

pBIN19 は 11,777 bp からなるバイナリーベクターで、その塩基配列を別添資料 2 に示した。

#### ②特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

カナマイシン耐性を示す。カナマイシン耐性を与える選択マーカー用のネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子（大腸菌由来）及び T-DNA レフトボーダー及びライトボーダー配列を含む。植物には通常レフトボーダー及びライトボーダーで囲まれた部分のみが移行する。

#### 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ない。

## (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

### イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

バイナリーベクター pSPB130 の構造の概略を図 1 (p. 14) に、その塩基配列を別添資料 1 に示した。そのサイズは約 17.46kbp で、レフトボーダーとライトボーダーに挟まれる T-DNA 領域のサイズは 9.06kbp である。pSPB130 はプラスミド pBIN19 にパンジーの F3' 5' H 遺伝子の cDNA を含む発現カセット及びトレニアの 5AT 遺伝子の cDNA を含む発現カセットを挿入することにより構築した。したがって、宿主植物へ導入される T-DNA 領域内には、形質転換植物選抜マーカーとしての NPT II 遺伝子と、花色変化を目的としたパンジー-F3' 5' H 遺伝子及びトレニア 5AT 遺伝子が組み込まれている。

### ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

形質転換方法はアグロバクテリウム法（国際公開番号:W0 2005/017147<sup>34)</sup>）を用いた。

### ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換え体は遺伝子を導入した当代を栄養繁殖によって増殖するものとして育成されて

いる。本組換え体の申請の単位は、組換え当代に限る。

#### ①核酸が移入された細胞の選抜の方法

本組換え体の選抜にはカナマイシン（50mg/l）を含む選抜培地を用いた。

平成12年9月に宿主に形質転換を行った。具体的には *Agrobacterium tumefaciens* Ag10 株 (Lazo et al., 1991<sup>35)</sup>) の菌液中に、無菌苗の葉から誘導したバラのカルスを5分間浸し、滅菌濾紙で余分な菌液を拭き取った後、継代用培地に移植し、2日間暗所で共存培養した。その後、カルベニシリンを400mg/l 加えたMS液体培地で洗浄し、継代用培地にカナマイシン50mg/l とカルベニシリン200mg/lを加えた選抜・除菌用培地へ移植した。選抜培地上で生育阻害を受けず、正常に増殖する部分の移植と培養を繰り返し、カナマイシン耐性カルスを選抜した。カナマイシン耐性を示した形質転換カルスを、カナマイシン50mg/l、カルベニシリン 200mg/l を添加した再分化用の培地で培養し、カナマイシン耐性シュートを得た。得られたシュートは1/2MS培地（カナマイシンを添加していない）で発根させた後、馴化を行った。馴化個体は鉢上げ後、閉鎖系温室で栽培して開花させ、平成14年9月に青紫色の本組換え体を得た。さらにHPLC分析にて、本組換え体の花卉よりデルフィニジンが検出されることを確認した。現在、栄養増殖にて維持している。

#### 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

本組換え体の葉からの抽出物を導入遺伝子を有するアグロバクテリウムが増殖できる選択培地に塗抹し、生育するコロニーを観察することにより導入遺伝子を有するアグロバクテリウムの残存の有無を確認した。しかし、コロニーの生育は見られなかった(別添資料 5 p. 26 参照)。

よって、本組換え体における導入遺伝子を有するアグロバクテリウムの残存はないと判断された。

③核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離  
ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いら  
れた系統までの育成の経過及び系統樹

平成 11 年  
～12 年

**組換え体の取得及び一次選抜(デルフィニジン生産株の選抜)**

- WKS82/130-3-3, 3-4, 3-5, 3-6
- WKS82/130-4-1, 4-2, 4-3, 4-5, 4-6, 4-9, 4-13
- WKS82/130-5-2, 5-3, 5-6, 5-7
- WKS82/130-6-1, 6-2, 6-4, 6-9
- WKS82/130-7-3, 7-4, 7-10, 7-11
- WKS82/130-8-1
- WKS82/130-9-1, 9-2, 9-3, 9-4, 9-5, 9-6, 9-7, 9-8, 9-9, 9-10, 9-11, 9-12
- WKS82/130-10-1, 10-2, 10-4
- WKS82/130-11-1, 11-2, 11-5
- WKS82/130-12-2, 12-3



平成 12 年  
～14 年

**二次選抜 (デルフィニジンを安定して高生産 (70%以上) する系統の選抜)**

- WKS82/130-4-1, 4-2, 4-3
- WKS82/130-6-2, 6-4, 6-9
- WKS82/130-9-1, 9-3
- WKS82/130-11-5



平成 14 年  
～15 年

**三次選抜 (デルフィニジンを安定して高生産 (90%以上) する系統の選抜)**

- WKS82/130-4-1, 4-2, 4-3
- WKS82/130-9-1, 9-3



平成 16 年  
～17 年

**閉鎖系温室及び特定網室試験**

- WKS82/130-4-1
- WKS82/130-9-1



平成 18 年  
～19 年

**隔離ほ場試験**

- WKS82/130-4-1
- WKS82/130-9-1



平成 19 年

**一般ほ場における使用の申請**

- WKS82/130-4-1
- WKS82/130-9-1

\*各系統番号について

例) WKS82 / 130 - 9 - 1

(A) (B) (C) (D)

(A) 宿主の名称

(B) 移入したバイナリーベクターの略号

(C) カナマイシン耐性カルの番号

(D) (C)のカルスより得られたカナマイシン耐性シュートの番号

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ. 移入された核酸の複製物が存在する場所

本組換え体の各器官（花卉、葉、茎、根及び花粉）における導入遺伝子（パンジーF3' 5' H 遺伝子、トレニア 5AT 遺伝子、大腸菌 NPT II 遺伝子）の存在の有無について、PCR による解析を行った。各導入遺伝子において期待される分子量のシグナルが本組換え体の花卉、葉、茎では検出されたが、花粉及び根では検出されなかった。よって、移入された核酸は本組換え体の花卉、葉、茎の染色体上に存在すると考えられる（別添資料 3 p. 1-3 参照）。

外部より移入された核酸は通常、染色体上に挿入される。しかし、極めて低い確率ではあるが葉緑体等のオルガネラゲノムへ移入される可能性もある。本組換え体において移入された核酸の 1 つ、パンジー由来の F3' 5' H 遺伝子は本来核ゲノムに存在し、その翻訳産物である F3' 5' H は細胞質内で翻訳された後、小胞体 (ER) へ移行することにより本来の酵素機能を発揮することができる。仮に F3' 5' H 遺伝子がオルガネラゲノムに移入されたとすると、翻訳産物がオルガネラ内から ER へ移行することは不可能であり、本来の機能を発揮できないものと考えられる。しかし、本組換え体においては、F3' 5' H 遺伝子の翻訳産物である F3' 5' H の働きにより現にデルフィニジンが生成されている。よって、F3' 5' H

遺伝子を始め、T-DNA 上の遺伝子は染色体上に存在するものと考えられる。また、サザンブロット解析の結果より、本組換え体において移入された核酸は複数コピー存在するものと考えられるが、上記のような理由から少なくとも 1 コピーは核ゲノムに存在するものと考えられる（別添資料 3 p.4-7 参照）。さらに、アグロバクテリウム法ではオルガネラゲノムへの遺伝子導入の確率が非常に低いことを併せて考えると、大部分あるいは全ての移入された核酸は核ゲノムに存在する可能性が高いと考えられる。

また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により花卉における導入遺伝子の発現細胞層について解析を行った結果、花卉表皮細胞層(L1 層)でのみ導入遺伝子であるパンジー F3' 5' H 遺伝子の転写物が検出された。このことから、本組換え体は導入遺伝子が L1 層にのみ存在することが示された（別添資料 3 p.16-17 参照）。

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

サザンブロット法により解析を行い、移入された核酸は本組換え体ゲノム中、4 箇所が存在すると考えられた。移入された配列は T-DNA の LB から RB に至る全長、もしくは LB から RB に至る配列の一部と考えられる（別添資料 3 p.4-7 参照）。

本組換え体と園芸種（クイーンエリザベス・ゴールドバニー）との人工交配により得られた後代(T<sub>1</sub> 世代)における導入遺伝子の伝達の有無を PCR 法により解析した。その結果、いずれの個体からも組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。このことから、本組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が存在しないため、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示唆された（別添資料 3 p.14-15 参照）。

さらに、本組換え体の自殖後代における導入遺伝子の伝達の有無を PCR 法により解析した。その結果、いずれの個体からも組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。このことから、本組換え体の花粉及び卵細胞のいずれにも導入遺伝子が存在しないため、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示された（別添資料 3 p.18-19 参照）。

ハ. 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

移入された核酸は染色体上に離れて存在していると考えられる。

サザンブロット法により解析を行った結果、比較的高分子の複数の断片にシグナルが認められ、移入された核酸は複数コピー存在するものと考えられる。1 本のシグナルとして現れる 1 断片上に複数コピーの導入遺伝子が存在する可能性も考えられるが、染色体上に移入された核酸の周辺配列の解析からは、複数コピーが隣接して存在していることを示す結果は得られていない。よって、導入遺伝子は離れて存在するものと考えられる。

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

での発現の安定性

導入したパンジーF3' 5' H 遺伝子及びトレニア 5AT 遺伝子の花卉における発現について、ノーザンブロット解析を行った。導入遺伝子に特異的で、かつ期待される分子量のシグナルが本組換え体でのみ検出され、ゲノム内に挿入された遺伝子が安定して発現していることが明らかとなった（別添資料 3 p. 8-9 参照）。さらに、導入したパンジーF3' 5' H 遺伝子及びトレニア 5AT 遺伝子の本組換え体の各器官（花卉、葉、茎）における発現について RT-PCR による解析を行った結果、花卉、葉、茎のゲノム内に挿入されたこれらの遺伝子は安定して発現していることが確認できた（別添資料 3 p. 10-11 参照）。

また、挿木により栄養繁殖を繰り返した場合の本組換え体の葉における導入遺伝子の発現の安定性についてノーザンブロット解析を行った。導入遺伝子に特異的で、かつ期待される分子量のシグナルが本組換え体でのみ検出され、さらに挿木繁殖を行った時期が異なるサンプル間での発現量にも違いは認められなかった。このことから、本組換え体を挿木により栄養繁殖を繰り返した場合でもゲノム内に挿入された遺伝子が安定して発現していることが明らかとなった（別添資料 3 p. 12-13 参照）。実際、導入遺伝子の発現の結果もたらされる花色は、本組換え体では青紫色であり安定しており、これまで挿木栽培においても接木栽培においても青紫色以外の花色を示したという事例はない。

よって、本組換え体においてゲノム内に挿入された遺伝子は花卉では安定して発現していると考えられる。

バラの商業栽培では、生育の促進を目的として主にバラ属の野生種を台木に用いた接木栽培が行われており、本組換え体認可後の商業栽培においても本組換え体を穂木とし、台木にはバラ属 (*Rosa multiflora*, *Rosa odorata*, *Rosa canina*, *Rosa 'Natal Briar'*, *Rosa 'Dr. Huey'*等) を用いて接木栽培を行う予定である。接木栽培では穂木と台木の間で様々な物質の移動が起こっていることが知られており、本組換え体を接木栽培した場合でも同様であると考えられる。

穂木から台木に与える影響については、本組換え体に導入された遺伝子由来の転写産物、蛋白質、新たに生成された色素などが台木に移行する可能性が考えられる。しかし、本組換え体において導入遺伝子の転写産物は L1 層にのみ局在しており（別添資料 3 p. 16-19 参照）、この局在性は生育時期や栽培場所の異なる個体においても維持されていた。また、一般的に蛋白質が細胞間を移動する場合は細胞外へ分泌するためのシグナル配列を有するが、PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) を用いて検索を行った結果、今回導入した遺伝子より生ずるいずれの蛋白質においてもそのような配列は存在しなかった。さらに、導入遺伝子発現の結果、細胞内で新たに生成されたデルフィニジン等のフラボノイド系色素は細胞内の液胞に集積される（小関ら、2004 年<sup>38)</sup>）。以上のことから、接木栽培において本組換え体に導入された遺伝子由来する産物が台木に移行する可能性は極めて低く、本組換え体を接木した場合でも宿主を接木した場合と比較して生物多様性影響が生じることは考えにくい。

また、穂木から台木への物質の移動だけでなく、台木から穂木へも様々な物質の移動が起こる可能性がある。バラの接木栽培では、台木に用いられるのは主にバラ属の野生種であるが、園芸種は野生種の人為的交雑によって作出されたものである。つまり、バラの接木栽培では、極めて近縁の種同士を穂木と台木に用いる。バラにおいては接木による生育の促進に伴って、切り花長や採花本数などが増すことが一般に知られている。実際、これまでも様々な園芸種において接木栽培によりこれらの形質が向上したという例が数多く報告されている（大川、1999年<sup>39)</sup>）。しかし、バラの接木栽培はこれまでに350年以上の長きに渡る歴史があるが、切り花としての品質向上の範囲を超えるような形質の変化、例えば花色や開花時期などが劇的に変化するなどといったような報告はこれまでなされておらず、接木によって穂木の遺伝的形質そのものが変化した例はない。したがって、このような近縁種の台木に本組換え体を接木したとしても、台木からの物質の移動により導入遺伝子に起因して、宿主を接木した場合にはみられないような切り花としての品質向上の範囲を超えた台木との相互作用が生じる可能性は極めて低いと考えられる。

さらに、接木栽培による穂木の生育力は穂木と台木の組み合わせによっても異なるが、一般にバラの接木株の生育力は、同一の台木に接木した場合には穂木として用いた品種本来の生育力の違いがそのまま接木株の生育力の違いとなって現れることが報告されている（de Vries, 2003<sup>37)</sup>）。特定網室試験並びに隔離ほ場試験において挿木栽培での宿主及び組換え体間の生育を調査したが、ほとんど差が認められなかった（別添資料5 p.6-8、別添資料6 p.19-24 参照）ことから、宿主及び組換え体を同一の台木を用いて接木栽培したとしても、穂木の生育力に違いは認められないものと推察される。したがって、自根による挿木栽培において、宿主と本組換え体間の生物多様性影響に差が認められなかったことから、宿主及び本組換え体を接木栽培した場合でも、生物多様性影響には差が認められないと考えられる。

また、接木によって穂木及び台木の接合部に形成された不定芽により、両細胞からなる接木雑種が生ずる可能性がある。しかし、一般的に接木雑種を得るには接木後に接合部位を切除して不定芽を形成させるなど、人為的な処理が必要であり、その場合でも接木キメラが得られる確率は極めて低いことが知られている。また、バラを含めた木本植物では不定芽形成能力が低いこと、通常の接木栽培では接合部に不定芽が形成されるのはまれであることなどから、接木栽培したとしても接木雑種が生ずる可能性は極めて低いと考えられる。仮に接木雑種が生じた場合でも、次世代に雑種性が伝達されることはないため、自然条件下及び通常の接木栽培において接木雑種が繁殖する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、本組換え体の接木栽培において接木雑種が確認された場合、接木株を焼却や鋤込み等により確実に不活化することとする。

以上のことから、本組換え体を接木栽培した場合でも、生物多様性影響は挿木栽培と同等であると考えられる。

ホ. ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達される

おそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

(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

本組換え体のゲノム中に挿入された T-DNA 周辺領域のゲノム配列を明らかにした。この配列情報に基づき PCR プライマーを作製し、これを用いた PCR 法により、本組換え体でのみ特異的に検出・同定が可能な条件を明らかにした。また、最低 10ng のゲノム DNA を反応に供すれば、本法にて本組換え体を検出できることを確認した。

遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法 — 別添資料 4 p. 2-3 参照。

それらの感度及び信頼性 — 別添資料 4 p. 4 参照。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

パンジー-F3' 5' H 遺伝子及びトレニア 5AT 遺伝子を導入することにより、デルフィニジン 3-グルコシド-5-カフェオイルグルコシドが生産され、花色が青紫色に変化した。

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

平成 16～17 年のサントリー株式会社構内における閉鎖系温室試験データ、特定網室試験データ及び日本植生株式会社美咲ほ場内における特定網室試験データ、さらに平成 18～19 年の日本植生株式会社美咲ほ場内隔離ほ場における隔離ほ場試験データを基にした。

①形態及び生育の特性

宿主及び組換え体を特定網室内で栽培し、生育特性として草丈、節数、開花時期について、形態特性として花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅について、その他特性として花の香りについて調査した。このうち、花弁数及び葯数において宿主及び組換え体間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) が認められた。具体的には、特定網室において宿主の花弁数が平均  $33.2 \pm 7.1$  枚であったのに対し、組換え体では平均  $28.1 \pm 2.2$  枚であった。また、宿主の葯数が平均  $100.3 \pm 24.0$  個であったのに対し、組換え体では平均  $120.9 \pm 9.7$  個であった。

草丈、節数、開花時期、花の直径、葯長、葯幅、花の香りについては、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった(別添資料 5 p. 6-8 参照)。

さらに、宿主及び組換え体を隔離ほ場内 (ビニール温室及び屋外) で栽培し、上記と同



様の項目について調査した。このうち、花卉数において宿主及び組換え体間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5% 水準) が認められた。具体的には、ビニール温室 C において宿主の花弁数が平均  $32.6 \pm 6.8$  枚であったのに対し、組換え体では平均  $26.5 \pm 3.9$  枚であった。屋外 A において宿主の花弁数が平均  $32.8 \pm 6.1$  枚であったのに対し、組換え体では平均  $25.3 \pm 3.3$  枚であった。

草丈、節数、開花時期、花の直径、葯数、葯長、葯幅、花の香りについては、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった (別添資料 6 p. 19-24 参照)。

#### ② 生育初期における低温又は高温耐性

宿主及び組換え体の幼苗を、低温あるいは高温に設定した人工気象器内で 1 ヶ月間栽培し、それぞれの新芽における生育速度を観察した。その結果、低温条件 (5°C) 下、高温条件 (35°C) 下ともに、宿主及び組換え体間で生育速度に差異は認められなかった (別添資料 5 p. 9-10 参照)。

#### ③ 成体の越冬性及び越夏性

成体の越冬性、越夏性について調査した結果、全個体越冬及び越夏し、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった (別添資料 6 p. 40-41 参照)。

#### ④ 花粉の稔性及びサイズ

特定網室内で栽培した宿主、組換え体ともに花粉の存在が認められた。宿主及び組換え体間で花粉の充実率、発芽率に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5 p. 11-12 参照)。

さらに、花粉の大きさも宿主及び組換え体間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5% 水準) は認められず、形態にも差異は認められなかった (別添資料 5 p. 13 参照)。

隔離ほ場 (ビニール温室及び屋外) 内で栽培した宿主、組換え体ともに花粉の存在が認められた。宿主及び組換え体間で花粉の充実率、発芽率に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 6 p. 25-28 参照)。

さらに、花粉の大きさも宿主及び組換え体間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5% 水準) は認められず、形態にも差異は認められなかった (別添資料 6 p. 29-30 参照)。

#### ⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

隔離ほ場内 (ビニール温室及び屋外) で栽培した宿主及び組換え体において、開花した花を約 2 ヶ月間放置・観察し、結実及び種子形成の有無を確認したが、宿主、組換え体ともに結実は認められず、種子は全く得られなかった (別添資料 6 p. 39 参照)。

したがって、種子の生産量、休眠性、発芽率についての調査は行っていない。

## ⑥交雑率

特定網室内、隔離ほ場内のいずれで栽培した宿主、組換え体においても花粉が存在し、その充実、発芽能も確認されたが、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった(別添資料5 p. 11-12、別添資料6 p. 25-28 参照)。

特定網室試験において宿主及び組換え体の園芸種(クイーンエリザベス、ゴールドバニー)に対する交雑性を人工交配によって調査した。その結果、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、組換え体との交配により得られた後代を解析したが、これらの個体からは組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった(別添資料5 p. 16-17 参照)。

宿主及び組換え体の野生種(ノイバラ)に対する交雑性を人工交配により調査した。その結果、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。しかし、得られた種子について PCR 解析を行ったが、組換え体由来の導入遺伝子は検出されず、得られた種子はノイバラの自殖種子、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであることが示唆された(別添資料5 p. 18-19 参照)。

宿主及び組換え体の野生種(ノイバラ)に対する交雑性を放蜂により調査した。その結果、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。しかし、得られた種子について PCR 解析を行ったが、組換え体由来の導入遺伝子は検出されず、得られた種子はノイバラの自殖種子、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであることが示唆された。また、クロマルハナバチの行動観察を行ったが、香りが強く、花卉数も少ないノイバラの花に集中的に群がり、ノイバラの花間を行き来することはあっても、宿主あるいは組換え体の花とノイバラの花間を行き来する個体はほとんど認められなかった(別添資料5 p. 20-22 参照)。

花粉は宿主、組換え体ともに観察されたが、送風による花粉の飛散調査を行った結果、宿主及び組換え体ともに花粉の飛散は全く認められなかった(別添資料5 p. 14-15 参照)。

隔離ほ場試験において宿主及び組換え体の園芸種(クイーンエリザベス、ゴールドバニー)に対する交雑性を人工交配によって調査した。その結果、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、組換え体との交配により得られた後代を解析したが、これらの得られた実生及び種子からは組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった(別添資料6 p. 31-32 参照)。

宿主及び組換え体の2倍体の野生種(ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス)に対する交雑性を人工交配により調査した。その結果、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。種子を回収後、低温処理し、播種したところ、その一部のみが発芽した。得られた実生について PCR 解析を行ったが、宿主あるいは組換え体との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。さらに、

発芽しなかった播種種子を再回収し、種子の充実について観察を行ったところ、そのほとんどが「しいな（種子の中身がないもの）」であり、正常な胚が確認できた種子はごくわずかであった。これらについて PCR 解析を行ったが、宿主あるいは組換え体との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。なお、テリハノイバラについてはいずれの種子も正常な胚が確認できなかった（別添資料 6 p. 33-34 参照）。

さらに、宿主及び組換え体の 4 倍体の野生種（オオタカネバラ）に対する交雑性を人工交配により調査した。その結果、組換え体を花粉親とした場合において結実が認められたが、結実率は極めて低かった。得られた種子を播種したが、発芽が認められなかったため、播種種子を再回収し、種子において組換え体との交雑の有無を解析した。しかし、組換え体との交雑は認められなかった（別添資料 6 p. 35-36 参照）。

隔離ほ場において宿主あるいは組換え体から 1m、5m の距離に野生種（ノイバラ）を配置し、自然条件下での野生種との交雑性について調査した。その結果、いずれの地点から採集した種子より得られた実生においても宿主あるいは組換え体との交雑は認められず、組換え体由来の導入遺伝子も検出されなかった（別添資料 6 p. 37-38 参照）。

#### ⑦有害物質の産生性

園芸種はこれまでに長期間の使用等の歴史があるが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。また、導入遺伝子が組換え体の代謝に影響を及ぼし、有害物質を産生する可能性の有無を明らかにするために、鋤込み及び後作試験においてレタス種子の発芽への影響について調べた。

特定網室試験では宿主及び組換え体間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5 p. 23-24 参照）。さらに、隔離ほ場試験でも宿主及び組換え体間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6 p. 42-43 参照）。

また、土壌微生物相試験の結果、特定網室試験、隔離ほ場試験ともに細菌、糸状菌、放線菌数について宿主及び組換え体間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5 p. 25, 別添資料 6 p. 44-45 参照）。

### 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

切り花の用に供するための使用、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

---

#### (3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法

---

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

申請書に添付した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の環境での使用等の結果

---

#### (6) 国外における使用等に関する情報

本組換え体はオーストラリアにおいて、平成 15 年 6 月 23 日に栽培許可を、平成 15 年 10 月 14 日に輸入許可(別添資料 7 p. 1-2 参照)を取得した。平成 16 年 4 月 10 日に組織培養苗を日本から輸入し、馴化、鉢上げ後、平成 17 年 3 月 9 日より温室にて栽培を開始した。なお、当該温室は日本の特定網室に相当する。さらに、平成 18 年 5 月 31 日に本組換え体の増殖及び野外試験の許可を取得し、現在、通常温室(防虫網を設置している)にて栽培を行っている(別添資料 7 p. 3-14 参照)。

アメリカにおいては平成 16 年 7 月 6 日に輸入許可(別添資料 7 p. 15 参照)を取得した。平成 16 年 7 月 28 日に組織培養苗を日本から輸入し、馴化、鉢上げ後、同年 8 月 23 日より通常温室(遺伝子拡散防止措置は行っていない)にて栽培を開始した。

コロンビアにおいては平成 17 年 12 月 16 日に栽培許可(別添資料 7 p. 16-20 参照)を、平成 18 年 11 月 14 日に輸入許可(別添資料 7 p. 21 参照)を取得した。平成 18 年 12 月 25 日にアメリカから本組換え体を輸入し、同年 12 月 26 日より通常温室(遺伝子拡散防止措置は行っていない)にて栽培を開始した。

## 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

園芸種は、我が国においても長期間使用等の歴史があるが、これまでに我が国を含めて園芸種が逸出して自然条件下で生育している例は報告されていない。

競合における優位性に係わる諸形質、すなわち形態及び生育特性、生育初期における低温又は高温耐性、越冬性、越夏性、花粉の特性、訪花昆虫相について宿主及び組換え体間における相違を評価した結果、特定網室試験では花卉数及び葯数において、隔離ほ場試験では花卉数において統計学的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) が認められた(別添資料 5 p.6-8、別添資料 6 p.19-24 参照)。しかし、生育初期における低温又は高温耐性、越冬性及越夏性、花粉の特性には有意差が認められなかったこと、訪花昆虫相について差異が認められなかったこと、花卉数及び葯数以外の諸形質においては有意差が認められなかったことから考えると、この有意差が周辺の野生植物の生育等に関わるような重大な形質であるとは考えにくい。

よって、この違いが競合における優位性を示すとは考えられない。

本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉及び葉においてデルフィニジン及びミリセチンを生成しているが、形態及び生育特性において宿主との有意差はほとんど認められず、越冬性及越夏性についても差異は認められなかった(別添資料 6 p.19-24,p.40-41 参照)。これらのことから、本組換え体におけるデルフィニジン及びミリセチンの生産は、競合における優位な形質であるとは考えにくい。

また、本組換え体では花卉に蓄積される青紫色の色素 (デルフィニジン) により花色が変化しており、これに伴う本組換え体への訪花昆虫の数の増加や種類の変化により、野生種や他の野生植物のポリネーターが減少するなどの可能性が考えられた。しかし、これまで交雑育種で作出された様々な花色の園芸種において花色の変化により訪花昆虫相が変化したという報告はない。実際に、隔離ほ場において訪花昆虫相を調査したが、青紫色に変化した花色が訪花昆虫の数や種類に影響を及ぼすことはなかった(別添資料 6 p.46-47 参照)。

よって、本組換え体のデルフィニジンの生産に伴う花色の変化が周辺の生物多様性に影響を及ぼすような訪花昆虫相の変化を起こすことは考えにくい。

さらに、昆虫は花色だけに基づいて花を選択するわけではなく、香りも重要な要素である。香りの変化により訪花昆虫の誘引性が変化し、本組換え体への訪花昆虫の数の増加や種類の変化により、野生種や他の野生植物のポリネーターが減少するなどの可能性が考えられた。しかし、花の香りを分析した結果、宿主及び組換え体間で違いは認められなかった(別添資料 6 p.23-24 参照)。また、訪花昆虫相についても宿主及び組換え体間で差異は認められなかった(別添資料 6 p.46-47 参照)。なお、特定網室試験において放蜂によ

る野生種（ノイバラ）と組換え体との交雑性を調査する中でクロマルハナバチの行動観察を行ったが、クロマルハナバチは、香りが強く、花弁数も少ないノイバラの花に集中的に群がる傾向が認められ、本組換え体はノイバラに比べてクロマルハナバチの誘引性が弱いことが示された（別添資料 5 p.20-22 参照）。これらのことから、本組換え体を栽培することにより花の香りが起因となって周辺の生物多様性に影響を及ぼすような訪花昆虫相の変化が起こることは考えにくい。

以上より、本組換え体におけるデルフィニジンの生産とそれに伴う花色の変化は、競合における優位な形質であるとは考えられず、本組換え体には野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合し、それらの生育等に支障を及ぼす性質はないと考えられた。

したがって、競合における優位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。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

\_\_\_\_\_

#### (3) 影響の生じやすさの評価

\_\_\_\_\_

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

## 2. 有害物質の産生性

### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

園芸種は我が国においても長期間使用されてきたが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。

導入した F3' 5' H、5AT 遺伝子並びにこれら遺伝子による産物が本組換え体の代謝に影響を及ぼし、有害物質を産生する可能性の有無を明らかにするために、鋤込み試験及び後作試験においてレタス種子の発芽への影響について調べたところ、宿主及び組換え体間で有意差は認められなかった（別添資料 6 p. 42-43 参照）。さらに、土壤微生物相試験の結果、細菌、糸状菌、放線菌数について宿主及び組換え体間で有意差は認められなかった（別添資料 6 p. 44-45 参照）。よって、本組換え体が宿主にない有害物質を産生し、周辺の野生植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質はないと考えられた。

また、本組換え体の花粉等が訪花昆虫等に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、導入遺伝子の発現の結果、本組換え体はデルフィニジン及びミリセチンを新たに生成しているが、これらは青みを帯びたパンジーやペチュニアなど他の青みを帯びた植物の花弁においても含まれているものであり、これらが他の野生動植物等に有害であるという報告はないことから、これらの物質が昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。なお、PCR による解析の結果、本組換え体の花粉及び根において導入遺伝子は検出されておらず、さらに園芸種や野生種との人工交配により得られた後代(T<sub>1</sub>世代)からも導入遺伝子が検出されなかった（別添資料 6 p. 31-36 参照）。これらのことから、本組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が存在しないことが示唆された。

また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により本組換え体花弁における導入遺伝子の発現細胞層を解析したところ、花弁表皮細胞層でのみ導入遺伝子の転写物が検出された（別添資料 3 p. 16-17 参照）。花弁、葉、茎、がく片、雄ずい及び雌ずいの表皮細胞層は L1 層、これらの表皮下細胞層は L2 層、花粉と卵細胞は L2 層、葉や茎の内部組織、根は L3 層に由来することが知られている（Huala and Sussex, 1993<sup>36)</sup>）。このことから、本組換え体は導入遺伝子が L1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示され、花粉などの生殖器官が由来する L2 層には導入遺伝子が存在しないことが明らかとなった（別添資料 3 p. 1-3、p. 14-15、p. 18-19 参照）。よって、本組換え体の花粉において訪花昆虫等に何らかの影響を与えるような有害物質が産生されていることは考えにくい。

よって、本組換え体が宿主にない有害物質を産生し、訪花昆虫等に何らかの影響を与えることはないと考えられた。

なお、すでに述べたように本組換え体におけるキメラの安定性については確認しており、自然条件下でキメラが容易に解消されるという可能性は極めて低いと考えられるが、何らかの理由でキメラが解消され、本組換え体の花粉細胞中で導入遺伝子由来の蛋白質が産生され、非組換え体にはないフラボノイドが生成される可能性はないとは断言できない。しかし、これらについては F3' 5' H、5AT 遺伝子を有する他の植物と同様であり、これらが

他の野生動植物等に有害であるという報告はないことから、昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。

さらに、本組換え体に導入された遺伝子の翻訳産物（F3' 5' H、5AT 及び NPTⅡ）について既知のアレルゲンのアミノ酸配列と相同性検索を行った結果、これらと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている。

また、本組換え体において導入遺伝子の発現の結果、新たに生成されるデルフィニジングルコシドやデルフィニジンアシルグルコシドは、我が国においてアズキ色素やエルダーベリー色素など着色料として食品への添加が認められている。

したがって、有害物質の産生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い。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

\_\_\_\_\_

#### (3) 影響の生じやすさの評価

\_\_\_\_\_

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記のことから、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。



### 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

園芸種はバラ属の近縁野生種と交雑可能である。近縁野生種のうち、日本で自生するのはノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.)、ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray)、オオタカネバラ (*R. acicularis* Lindl.)、カラフトイバラ (*R. marretii* Lév.)、オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ (*R. luciae* Franch. et Rochebr.)、ヤマイバラ (*R. sambucina* Koidz.)、カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ (*R. bracteata* Wendl.)、ナニワイバラ (*R. laevigata* Michx.)、サンショウバラ (*R. roxburghii* Tratt. var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.) の 10 種とタカネバラ (*R. acicularis* var. *nipponensis* (Crép.) Koehne.)、ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino)、モリイバラ (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. et Sav.)、フジイバラ (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino)、ヤブイバラ、ニオイイバラ (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama)、ミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) の 6 変種のみであり、本組換え体との交雑の可能性が考えられるのはこれら 10 種と 6 変種に限られる。

以上のことから、これら 10 種と 6 変種が交雑の可能性のある野生植物として特定された。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

本組換え体と上記で特定した近縁野生種が交雑した場合、交雑種が形成される可能性があると考えられる。本組換え体に移入された核酸が影響を受ける可能性のある野生植物として特定された近縁野生種に伝達された場合、フラボノイド生合成経路が改変され、近縁野生種の花色や葉色及び各種ストレス耐性関連形質等が変化する可能性がある。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

本組換え体と上記で特定した近縁野生種が交雑した場合、交雑種が形成される可能性は否定できない。

そこで、人工交配により園芸種 (クイーンエリザベス、ゴールドバニー) あるいは野生種 (ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ) と本組換え体との交雑性を調査し、宿主の場合と比較した。その結果、園芸種との人工交配試験においては宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、組換え体との交配により得られた後代を解析したが、これらの実生及び種子からは組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった (別添資料 6 p. 31-32 参照)。

日本に自生し、かつ今日の園芸種の作出に利用されたとされる 2 倍体の野生種 (ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス) との人工交配試験においては、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。これらを低温処理し、播種したと

ころ、その一部のみが発芽した。得られた実生について宿主あるいは組換え体との交雑の有無並びに導入遺伝子の伝達の有無を解析したが、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。さらに、発芽しなかった播種種子を再回収し、種子の充実について観察を行ったところ、そのほとんどが「しいな（種子の中身がないもの）」であり、正常な胚が確認できた種子はごくわずかであった。これらについても、宿主あるいは組換え体との交雑の有無並びに導入遺伝子の伝達の有無を解析したが、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった（別添資料 6 p. 33-34 参照）。

日本に自生し、園芸種と同じ倍数性を有する 4 倍体の野生種（オオタカネバラ）との人工交配試験においては、組換え体を花粉親とした場合でわずかに結実が認められたが、解析の結果、組換え体とは交雑していなかったことが明らかとなった（別添資料 6 p. 35-36 参照）。

以上のことから、本組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない事が示唆された。合わせて、野生種と園芸種が交雑して生じた種子の多くは「しいな」であり、交雑種子の発芽率も極めて低いことが示された。

そこで、本組換え体の花粉における導入遺伝子の存在の有無について PCR 法により解析を行った結果、本組換え体の花粉からは導入遺伝子が検出されなかった（別添資料 3 p. 1-3 参照）。

さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法により本組換え体花卉における導入遺伝子の発現細胞層について解析を行ったところ、花卉表皮細胞層でのみ導入遺伝子であるパンジー-F3' 5' H 遺伝子の転写物が検出された。花卉、葉、茎、がく片、雄ずい及び雌ずいの表皮細胞層は L1 層、これらの表皮下細胞層は L2 層、花粉と卵細胞は L2 層、葉や茎の内部組織、根は L3 層に由来することが知られている（Huala and Sussex, 1993<sup>36)</sup>）。このことから、本組換え体は導入遺伝子が L1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示され、花粉などの生殖器官が由来する L2 層には導入遺伝子が存在しないことが明らかとなった（別添資料 3 p. 16-17 参照）。

また、本組換え体の自殖後代における導入遺伝子の伝達の有無を PCR 法により解析したが、いずれの個体からも組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。このことから、本組換え体は L1 層には導入遺伝子が存在し、発現しているが、花粉及び卵細胞には導入遺伝子が存在しないキメラ植物であることが示された（別添資料 3 p. 18-19 参照）。

また、宿主あるいは組換え体から 1m、5m の距離に野生種（ノイバラ）を配置し、自然条件下での野生種との交雑性について調査したが、いずれの地点から採集した種子より得られた実生からも宿主あるいは組換え体との交雑は認めらず、組換え体由来の導入遺伝子も検出されなかった（別添資料 6 p. 37-38 参照）。

さらに、隔離ほ場から 500m の圏内に自生する野生種（ミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラ）について園芸種との交雑の有無を調査したが、解析した計約 1800 個のいずれの種子

においても、園芸種との交雑は全く認められなかった(モニタリング調査結果報告書 p. 25-29 参照)。

これらのことから、本組換え体と野生種が交雑する可能性はないか、あっても極めて低く、たとえ交雑して交雑種が得られたとしても導入遺伝子が伝達されることはないと考えられる。また、交雑種子が開花した場合、生殖器官(花粉や卵細胞)の減数分裂が異常となるため、稔性を持たず、それ以上の交雑の可能性は極めて低い。実際に2倍体の野生種を人為的に倍数化させて4倍体を作成し、園芸種(4倍体)と人工交配した場合でも、野生種と園芸種は種が異なるため、種間雑種の特性として生育が不良となることが岐阜大学応用生物科学部 福井研究室で確認されている(未発表データ)。

以上のことから、組換え体を含む園芸種と近縁野生種との交雑の可能性はないか、あっても極めて低いと考えられ、仮に交雑したとしても導入遺伝子が交雑種に伝達されることはなく、また交雑種の稔性も低いと考えられるため、得られた交雑種が周囲の環境に適応して近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

なお、すでに述べたように、本組換え体におけるキメラの安定性については確認しており、自然条件下でキメラが容易に解消されるという可能性は極めて低いと考えられるが、何らかの理由でキメラが解消され、本組換え体において導入遺伝子を有する花粉が生じる可能性はないとは断言できない。しかし、前述のように、自然条件下で園芸種と近縁野生種が交雑し、交雑種が形成される可能性はないか、あっても極めて低いと考えられ、さらに交雑種が形成されたとしても周囲の環境に適応して近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換え体が近縁野生種と交雑する可能性はないか、あっても極めて低く、また交雑することにより得られた交雑種が我が国の環境に適応して、近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いことから、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

#### 4. その他の性質

上記のほかに、生物多様性影響評価を行うことが適当であると考えられる本組換え体の性質はないと判断した。

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性について：

園芸種は、我が国においても長期間使用等の歴史があるが、これまでに我が国を含めて園芸種が逸出して自然条件下で生育している例は報告されていない。

競合における優位性に係わる諸形質のうち、花卉数及び葯数において宿主及び組換え体間で相違が認められた。しかし、これ以外の諸形質においては相違が認められなかったことから、花卉数及び葯数の有意差が野生植物の生育等に関わるような重大な形質であるとは考えにくい。

また、本組換え体は花卉及び葉においてデルフィニジン及びミリセチンを生成しているが、これらの生産とそれに伴う花色の変化により訪花昆虫相が変化する可能性が考えられた。しかし、これまで交雑育種で作出された様々な花色の園芸種において花色の変化により訪花昆虫相が変化したという報告はなく、実際、隔離ほ場において訪花昆虫相を調査したが、青紫色に変化した花色が訪花昆虫の数や種類に影響を及ぼすことはなかった。また、昆虫は花色だけに基づいて花を選択するわけではなく、香りも重要な要素であるが、宿主及び組換え体間で花の香りに違いは認められなかった上に、本組換え体はノイバラに比べてクロマルハナバチの誘引性が弱いことが示された。さらに、訪花昆虫相も宿主及び組換え体間で差異が認められなかった。

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が生ずるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性について：

園芸種は我が国においても長期間使用されてきたが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。

実際に、鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験によって有害物質産生の有無を調査したが、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。

また、導入遺伝子の発現の結果、本組換え体はデルフィニジン及びミリセチンを新たに生成しているが、これらは青みを帯びたパンジーやペチュニアなど他の青みを帯びた植物の花弁においても含まれているものであり、これらが他の野生動植物等に有害であるという報告はないことから、これらの物質が昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法や人工交配試験により、本組換え体は導入遺伝子がL1層にのみ存在するキメラ植物であることが示され、花粉などの生殖器官が由来するL2層には導入遺伝子が存在しないことが明らかとなった。よって、本組換え体の花粉において訪花昆虫等に何らかの影響を与えるような有害物質が産生されていることは考えにくい。

なお、自然条件下でキメラが容易に解消されるという可能性は極めて低いと考えられる

が、何らかの理由でキメラが解消され、本組換え体の花粉細胞中で導入遺伝子由来の蛋白質が産生され、非組換え体にはないフラボノイドが生成される可能性はないとは断言できない。しかし、これらについては F3' 5' H、5AT 遺伝子を有する他の植物と同様であり、これらが他の野生動植物等に有害であるという報告はないことから、昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。

さらに、本組換え体に導入された遺伝子の翻訳産物 (F3' 5' H、5AT 及び NPT II) について既知のアレルゲンのアミノ酸配列と相同性検索を行った結果、これらと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている。

また、本組換え体において新たに生成されるデルフィニジングルコシドやデルフィニジンアシルグルコシドは、我が国において着色料として食品への添加が認められている。

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。

交雑性について：

日本に自生するバラ属の近縁野生種はノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ、カラフトイバラ、オオフジイバラ/アズマイバラ/ヤマテリハノイバラ、ヤマイバラ、カカヤンバラ/ヤエヤマノイバラ、ナニワイバラ、サンショウバラの 10 種とタカネバラ、ツクシイバラ、モリイバラ、フジイバラ、ヤブイバラ/ニオイイバラ、ミヤコイバラの 6 変種に限られる。以上のことから、これら 10 種と 6 変種が交雑の可能性のある野生植物として特定された。

そこで、人工交配により園芸種 (クイーンエリザベス、ゴールドバニー) あるいは野生種 (ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ) と本組換え体との交雑性を調査し、宿主の場合と比較した。その結果、園芸種との人工交配試験においては、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、組換え体との交配により得られた後代を解析したが、これらの実生及び種子からは組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。

日本に自生し、かつ今日の園芸種の作出に利用されたとされる 2 倍体の野生種 (ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス) との人工交配試験においては、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。得られた実生について解析を行ったところ、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。さらに、発芽しなかった播種種子について種子の充実を観察したところ、そのほとんどが「しいな」であり、正常な胚が確認できた種子はごくわずかであった。これらについても同様の解析を行ったが、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。また、日本に自生し、園芸種と同じ倍数性を有する 4 倍体の野生種 (オオタカネバラ) との人工交配試験においては、組換え体を花粉親とした場合でわずかに結実が認められたが、解析の

結果、組換え体とは交雑していなかったことが明らかとなった。

以上のことから、本組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない事が示唆された。

そこで、本組換え体の花粉における導入遺伝子の存在の有無について PCR 法により解析を行った結果、本組換え体の花粉からは導入遺伝子が検出されなかった。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法により本組換え体は導入遺伝子が L1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示され、花粉などの生殖器官が由来する L2 層には導入遺伝子が存在しないことが明らかとなった。また、本組換え体の自殖後代を解析した結果、本組換え体は花粉及び卵細胞には導入遺伝子が存在しないキメラ植物であることが示された。

また、宿主あるいは組換え体から 1m、5m の距離に野生種（ノイバラ）を配置し、自然条件下での野生種との交雑性について調査したが、いずれの地点から採集した種子より得られた実生からも宿主あるいは組換え体との交雑は認められず、組換え体由来の導入遺伝子も検出されなかった。さらに、隔離ほ場から 500m の圏内に自生する野生種（ミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラ）について園芸種との交雑の有無を調査したが、いずれの種子においても園芸種との交雑は全く認められなかった。

以上のことから、本組換え体と近縁野生種が交雑する可能性はないか、あっても極めて低く、仮に交雑したとしても交雑種には本組換え体由来の導入遺伝子は伝達しないため、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。

なお、自然条件下でキメラが容易に解消されるという可能性は極めて低いと考えられるが、何らかの理由でキメラが解消され、本組換え体において導入遺伝子を有する花粉が生じる可能性はないとは断言できない。しかし、自然条件下で近縁野生種との交雑種が形成される可能性はないか、あっても極めて低いと考えられ、さらに交雑種が形成されたとしても周囲の環境に適応して近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

したがって、フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-9-1 を第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

#### 参考文献

- 1) 塚本 洋太郎、園芸植物大事典 4、小学館、14-15、20-43、1989 年
- 2) 上田 善弘、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、3-11、2002 年
- 3) 坂西 義洋、園芸植物大事典 4、小学館、33、1989 年
- 4) 林 勇、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、12-19、2002 年
- 5) 鶴島 久男、花卉園芸ハンドブック、養賢堂、630-646、1979 年
- 6) 大川 清、園芸植物大事典 4、小学館、34、1989 年
- 7) 大川 清、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、51-54、2002 年
- 8) 鹿野 義規、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、37-43、2002 年
- 9) 近藤 達士、週刊 花百科 バラ 1、講談社、4-20、2004 年
- 10) 野村 和子、オールド・ローズ花図譜、小学館、8-21、143-157、2004 年
- 11) 酒井 広蔵、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、59-63、2002 年
- 12) Gudin, S., Seed propagation., Encyclopedia of rose science, 620-623, 2003
- 13) De Vries, D. P., Dubois, L. A. M., On the transmission of the yellow flower colour from *Rosa foetida* to recurrent flowering hybrid tea-roses., Euphytica 27: 205-210, 1978
- 14) Dubois, L. A. M., De Vries, D. P., On the inheritance of the dwarf character in polyantha x *Rosa chinensis minima* (SIMS) Voss F1-populations., Euphytica 36:535-539, 1987
- 15) De Vries, D. P., Dubois, L. A. M., Pollen and pollination experiments. X. the effect of repeated pollination on fruit- and seed set in crosses between the hybrid tea-rose cvs. Sonia and Ilona., Euphytica 32:685-689, 1983
- 16) Ueda, Y., Akimoto, S., Cross- and self-compatibility in various species of the genus *Rosa*, J. of Horticultural Science and Biotechnology, 76:392-395, 2001
- 17) Jacob, Y., Ferrero, F., Pollen grains and tubes., Encyclopedia of rose science, 518-523, 2003
- 18) Gudin, S., Rose:Genetics and Breeding., Plant Breeding Reviews, 17:159-189, 2000
- 19) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of Royal Horticultural Society, 66:73-82, 1941a
- 20) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of Royal Horticultural Society, 66:242-250, 1941b
- 21) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of

- Royal Horticultural Society, 66:282-289, 1941c
- 22) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part I., J. Royal Hort. Soc. 79:555-571, 1954
  - 23) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part II., J. Royal Hort. Soc. 79:8-24, 1955a
  - 24) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part III., J. Royal Hort. Soc. 80:77-87, 1955b
  - 25) 中村 典子、水谷 正子、松田 吉家、武内 俊介、古市 敬治、吉本 三恵、松永 昭浩、田中 良和、自然条件下における栽培バラと野生バラとの交雑性、園芸学研究 第6巻 別冊1 園芸学会平成19年度春季大会研究発表要旨、506、2007年
  - 26) Semeniuk, P., Inheritance of recurrent and nonrecurrent blooming in 'Goldilocks' X *Rosa wichuraiana* progeny., J. of Heredity, 62:319-320, 1971
  - 27) 上田 善弘、バラ属植物の分類学的研究、千葉大学園芸学部学術報告、48:241-328、1994年
  - 28) Visser, T., De Vries, D. P., Scheurink J. A. M., Welles G. W. H., Hybrid tea-rose pollen. II. Inheritance of pollen viability., Euphytica, 26:729-732, 1977
  - 29) Kevan, P. G., Pollination., Encyclopedia of rose science, 456-460, 2003
  - 30) 村松 正實、分子細胞生物学辞典、東京化学同人、155、1997年
  - 31) Ebert, P. R., Ha, S.B., An, G., Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5745-5749, 1987
  - 32) Mitsuhashi, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., Ohashi, Y., Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants., Plant Cell Physiol. 37:49-59, 1996
  - 33) Bevan, M., Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation., Nucleic Acids Res. 12:8711-8723, 1984
  - 34) Tanaka, Y., Fukui, Y., Togami, J., Katsumoto, Y., Mizutani, M., PROCESS FOR PRODUCING ROSE WITH MODIFIED COLOR., PCT/JP2004/011958, WO 2005/017147
  - 35) Lazo, G. R., Stein, P. A., Ludwig, R. A., A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*., Biotechnology 9: 963-967, 1991
  - 36) Huala, E., Sussex, I. M., Determination and cell interactions in



- reproductive meristems., *Plant Cell* 5: 1157-1165, 1993
- 37) de Vries, P.D., Scion-Rootstock Relationships in Cut Roses., *Encyclopedia of rose science*, 634-635, 2003
- 38) 小関良宏、佐々木伸大、柳楽洋三、阿部裕、伊藤佳央、植物色素研究法、大阪公立大学共同出版会、119-130、2004年
- 39) 大川 清、バラの生産技術と流通、養賢堂、63-70、1999年

## 緊急措置計画書

平成19年6月8日

氏名 サントリー株式会社  
代表取締役社長 佐治 信忠

住所 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目1番40号

第一種使用規程の承認を申請しているフラボノイド生合成経路を改変したバラ (*F3'5'H*, *5AT*, *Rosa hybrida*) (WKS82/130-9-1, OECD UI: IFD-52901-9) (以下、本組換え体という) 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。ただし、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とは、本組換えバラに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが認められた場合のことである。

### 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

責任者であるサントリー株式会社 R&D推進部植物科学研究所課長 津田晋三は、本組換え体が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合に、サントリー株式会社研究センター遺伝子組換え実験安全委員会に報告する。同委員会は速やかに危機対策本部を設置する。危機対策本部は栽培委託契約を締結した限定された生産者と円滑な連絡を確保し、緊急措置を講ずる。危機対策本部の責任者はサントリー株式会社 R&D推進部植物科学研究所課長 津田晋三 (住所: 大阪府三島郡島本町若山台一丁目1番1号) とする。

### 2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 本組換え体の栽培状況については、栽培委託契約を締結した限定された生産者を通じて栽培状況を把握するとともにその情報を整理して記録する。

(2) さらに、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、(1)により把握している栽培委託生産者の現状の栽培状況を把握し、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

緊急措置を講ずる必要が生じた場合には、すぐにその内容を把握している栽培委託生産者に対して電話や文書などにより連絡を取る。また、周知するために弊社のホームページ等で本件についてのお知らせを掲載するとともに、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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、直ちに本組換え体の栽培を中止し、栽培中の本組換え体は鋤込み等による不活化を行うよう栽培委託生産者に対し指示する。さらに、栽培地周辺を調査し、環境中に放出された本組換え体が存在した場合、本組換え体との交雑が疑われる個体が存在した場合は、それらを回収し、鋤込み等による不活化を行う。

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農産安全管理課及び環境省野生生物課に報告する。