

雌ずい花弁化八重咲きシクラメン(*CpAG2SRDX*, *Cyclamen persicum* Mill.) (AGM16) 新旧対照表

平成28年9月20日

	変更する項目	変更前の記述	変更後の記述
1	第一.2.(1).イ.遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報 供与核酸に関する情報 構成および構成要素の由来	外側骨格領域 (<u>本組換えシクラメンには存在しない</u>)	外側骨格領域
2	第一.2.(2).ロ.②.遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報 ベクターに関する情報 特性 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	<u>大腸菌とアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカーとして、カナマイシンに対する耐性を付与するNPTⅢ遺伝子が含まれるものの、本組換え体中に、この遺伝子は導入されていない。</u>	<u>NPTⅢ遺伝子（大腸菌とアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカーとして、カナマイシンに対する耐性を付与）が植物体に導入されているものの、発現は見られない。</u>
3	第一.2.(3).ハ.② 遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報 遺伝子組換え生物等の調製方法 遺伝子組換え生物等の育成の経過 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菌体の残存の有無	<u>組織培養は、不定芽培養法を用い、滅菌したカルベニシリン無添加の MS 培地上で継代を繰り返して行う。その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。また、本組換え体（栄養繁殖苗）の葉から DNA を抽出し、ベクターの外側骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子（NPTⅢ遺伝子）を標的とした PCR 分析を行ったところ、ベクター pCpAG2SRDX の外側骨格領域は存在しなかった。このことから、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。</u>	<u>不定芽培養時に滅菌したカルベニシリン無添加の MS 培地上で 10 代以上の継代を繰り返してもアグロバクテリウムのコロニーが形成されていない。このことから、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。</u>

4	別添資料 5.2.(4) アグロバクテリウムの葉における残存性	また、本組換え体から抽出した DNA には、ベクター pCpAG2SRDX の外側骨格領域は存在しなかった (図 5)。このことから、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。	一方で、本組換え体から抽出した DNA には、ベクター pCpAG2SRDX の外側骨格領域が存在した。しかしながら、アグロバクテリウムの核 DNA およびヘルパプラスミドは検出されなかった。さらに、抽出液を用いた培養試験から、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムが残存しないことを確認した。
---	---------------------------------	--	---

雌ずい花弁化八重咲きシクラメン (<i>CpAG2SRDX</i> , <i>Cyclamen persicum</i> Mill.) (AGM16) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	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	6
ホ. 病原性	8
ヘ. 有害物質の産生性	8
ト. その他の情報	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ. 構成及び構成要素の由来	9
ロ. 構成要素の機能	12
(2) ベクターに関する情報	19
イ. 名称及び由来	19
ロ. 特性	20
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	20
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	20
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	20
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	22
(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	24
(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	26
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	26

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	29
(1) 使用等の内容	29
(2) 使用等の方法	29
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における 情報収集の方法	30
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を 防止するための措置	30
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類所の 環境での使用等の結果	30
(6) 国外における使用等に関する情報	30
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	31
1. 競合における優位性	31
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	31
(2) 影響の具体的内容の評価	33
(3) 影響の生じやすさの評価	33
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
2. 有害物質の産生性	33
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	33
(2) 影響の具体的内容の評価	34
(3) 影響の生じやすさの評価	34
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	34
3. 交雑性	34
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
(2) 影響の具体的内容の評価	34
(3) 影響の生じやすさの評価	35
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	35
4. その他性質	35
第三 生物多様性影響の総合的評価	36
引用文献	39
緊急措置計画書	45
隔離ほ場試験計画書	47
別添資料リスト	66

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 11 月 25 日

農林水産大臣

西川 公也 殿

環境大臣

望月 義夫 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学

学長 永田 恭介 印

住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号

申請者

氏名 北興化学工業株式会社

代表取締役社長 中島 喜勝 印

住所 東京都中央区日本橋本石町四丁目 4 番 2 0 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	雌ずい花弁化八重咲きシクラメン（ <i>CpAG2SRDX</i> , <i>Cyclamen persicum</i> Mill.）（AGM16）
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する 行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	所在地：茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号 名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場） 使用期間：承認日から平成 30 年 3 月 31 日 1. 隔離ほ場の施設 (1)部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2)隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3)隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えシクラメンの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該シクラメンの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4)本組換えシクラメンの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。 2. 隔離ほ場での作業要領 (1)本組換えシクラメン及び比較対照の非遺伝子組換えシクラメン以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを必要最小限に抑える。 (2)本組換えシクラメンを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該シクラメンが漏出しない構造の容器に入れる。 (3)(2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えシクラメンの栽培終了後は、当該シクラメン及び比較対照の非遺伝子組換えシクラメンを細断して隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。 (4)隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えシクラメンが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5)隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6)(1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (7)生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の所属する分類学上の種に関する情報

5 (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

和名：サクラソウ科シクラメン属シクラメン
10 篝火花（かがりびばな）とも呼ばれる。

英名：cyclamen

学名：*Cyclamen persicum* Mill.
15

② 宿主の品種名又は系統名

本組換え体の宿主に用いたシクラメンの園芸種の品種名は GM2 で、草型は小型、花弁長は約 25mm の小輪種である。花色は鮮紫ピンクであり、芳香性を有する。GM2 は園芸種の
20 自然突然変異体である。GM2 は、シクラメンの花器官形成を制御している転写因子遺伝子群の中でも、雄ずい形成を制御している *AGAMOUS 1* 転写因子遺伝子 (*CpAG1*) に変異が
起こることで、雄ずいが花弁化した花弁数 10 枚（通常シクラメンは花弁数 5 枚）の八重咲
きである (Tanaka *et al.*, 2013)。

25 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

シクラメン属 (*Cyclamen* spp.) はサクラソウ科に属し、塊茎を持つ植物である。ギリシ
アからトルコ、キプロス島、レバノンに至る地中海沿岸に分布しており、現在、19 種の野
生種が山間部森林、岩の裂け目、傾斜面の半日陰の冷涼な環境に自生している。国内でシ
30 クラメンとして鉢花として販売されている園芸種シクラメンは、すべて野生種のシクラ
メン・ペルシカム 1 種から選抜、育種されてきたものである。一方、シクラメン・コウム (*C.
coum* Mill.)、シクラメン・ヘデリフォリウム (*C. hederifolium* Alt.)、シクラメン・グラ
エカム (*C. graecum* Link) などの野生種も輸入され、流通量は少ないながらも、我が国に
35 おいても一般に販売されているが、これら園芸種シクラメン及び野生種のシクラメンを含
め、シクラメン属が国内で自生化したとの報告はない (塚本, 1994 ; 前田, 1995 ; 鶴島,
2008 ; 金浜, 2013)。

以下、本評価書において記述する「シクラメン」とは、野生種シクラメン・ペルシカムから選抜、育種されてきた園芸種シクラメンを指すものとする。

(2) 使用等の歴史及び現状

5

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

シクラメンの我が国への渡来は 1900 年頃の明治時代で、園芸種として商業的に栽培されるようになったのは明治 37 年以降であり、東京や神奈川の一部農家が温室栽培を始め、流通するようになったと言われている。当時、種子は主にイギリスやドイツから入手していた（大野，1982；阿部，1986；不破，2001）。シクラメンの商品としての出荷が定着したのは昭和 10 年代である。国内での本格的な栽培は、第二次世界大戦後の昭和 20 年代以後である。当初、ヨーロッパで育種された品種をそのまま栽培していたが、我が国の気象条件にあった独自品種が育種されるようになり、高級鉢花として全国的に栽培が拡大した。2013 年の出荷数量は 1,920 万鉢であり、洋ラン、観葉植物と並ぶ国内の主要な鉢ものの類で、鉢花としては第一位（観葉植物、洋ランを除く）である（農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課 2014 年 10 月公表）。

国外においては、シクラメンの園芸品種の育種は 1870 年代からヨーロッパを中心に行われ、1900 年代くらい以降に育種が本格化して多くの品種が作られてきた。中でも 1910 年から 1920 年代にドイツ、イギリス、オランダで作出されたサーモンピンク系の品種は、その後の品種育成にかなり大きく影響している。花色では赤、桃、白などの原色系の品種が普通であったが、1980 年ころから世界的にパステル調の色彩の品種が栽培されるようになった。花型では 1896 年にベルギーで花卉の縁が波うちした特異な花型が発表され、さらに花卉が反転しないロココ咲きの品種も 1908 年に発表されている（塚本，1994；鶴島，2008）。

シクラメンは、耐寒性が弱く耐暑性も弱いため、基本的には温室栽培、屋内鑑賞向けの鉢花であるが、近年、“ガーデンシクラメン”と呼ばれている屋外栽培向けシクラメンが販売されている。これは、園芸種シクラメンの中から比較的耐寒性の強い個体が選抜され、育種されたものであり、花型は小輪種が多い。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

我が国のシクラメンの園芸種の商業栽培は鉢花としての施設栽培であり、北海道から本州、四国、九州（沖縄を除く）までで栽培されている。1 年 1 作の作型が基本であり、通常、前年の 11 月～12 月に播種、鉢替えを数回行い、需要期である翌年 11 月～12 月の開花盛期に出荷する。冷涼な環境を好み、生育には一般に 15℃～20℃が適する。総じて 10℃以下、30℃以上では生育の遅延、障害が出やすい。そのため我が国の気象条件では、園芸種は夏

季の高温が最も問題である。夏季の栽培には極力温度を下げるとともに、強光による障害（葉焼け）を避けるため、遮光（30～50%）を行うことが一般化している。灌水方法は、一般的な上部灌水のほか、省力化、効率化を目的とした底面灌水が普及している。施肥管理は、葉色や芽の状態を観察して行われてきたが、最近では葉柄の汁液分析結果に基づいて施肥する方法が行われている。生育に伴い、株の中心部にある成長点部に光を当て、花芽の分化を促すための“葉組み”という我が国独自の作業が行われている場合もある（生育後期、シクラメンの葉が中心から開心状に展開して整然となるよう一鉢ずつ葉を手作業で整える作業）。従来、シクラメンはほとんど市場出荷であったが、近年は流通も多様化し、大型量販チェーン店や通信販売業者との契約販売、委託生産が増加している（住井，1995；鶴島，2008）。

2013 年の出荷量は長野で 285 万鉢、次いで愛知が 213 万鉢、茨城が 103 万鉢となっている。国内の 2013 年度の収穫面積は 203ha で、総出荷量は 1,920 万鉢であった（農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課 2014 年 10 月公表）。

国外でのシクラメン栽培は、ヨーロッパやアメリカが中心で、欧米の気候条件はシクラメンの栽培に適しているため、我が国の平坦部での栽培のような夏季の高温ストレスによる生育阻害を受けることがほとんどない。そのため、栽培は日本に比べれば比較的容易である。特にヨーロッパの鉢花生産国であるベルギー、オランダ、デンマーク、ドイツなどの国では、湿度が低く、最夏期でも 25℃を上回ることがほとんどないため比較的冷涼で作業の省力化も進んでいる（鶴島，2008）。シクラメンは、種子として輸入は行われているが、鉢花として国外からの輸入は困難であり、国内での栽培生産、鉢花流通が基本である。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ．基本的特性

シクラメンは塊茎を持つ多年草であり、花は単生である。塊茎頂部から長い柄を持った葉を群生させ、一般に開花前には葉の枚数は 30～40 枚程度になる。花は、花弁数 5 枚、がく片 5 枚、雄ずい 5 個、雌ずい 1 個の形態を示す。花弁の色は多種存在し、古くは欧米で赤、桃、白系が中心であったが、近年は紫、黄、紅などが開発されている。根は塊茎の下部から発根する（鶴島，2008；金浜，2013）。シクラメンの園芸品種の開花適期は、低温期の 10 月～3 月である。

本組換え体の宿主に用いた GM2 は、草型が小型のシクラメンで、花弁長は約 25 mm の小輪種であり、花色は鮮紫ピンク、芳香性がある。GM2 は、通称でミニシクラメンと呼ばれているものの一つであるピッコロ系品種の中から自然突然変異で雄ずいが花弁化して花弁数 10 枚になった株を選抜して 1995 年に日本で作出された。通常は、雄ずいを持たないため花粉の形成および自殖による種子の形成は認められないが、5 月以降の温室内が高温に

なる時期などにおいては、花卉と融合するような不完全な形態の雄ずい（葯）を形成する奇形花が発生し、花粉形成が認められることがある。

ロ．生息又は生育可能な環境の条件

5

園芸種の前種であるシクラメン・ペルシカム種の前産地の気候から、園芸種は高温、多湿を嫌い冷涼な温度を好むが、耐寒性は極めて弱い。生育には一般に 15℃～20℃が適する。総じて 10℃以下、30℃以上では生育の遅延、障害が出やすい。また、強光も嫌うため日射量の多い日には遮光が必要となる。生産品としての歩留まりは気象条件に大きく影響され、地域によっては酷暑が続いた年には 50%以下になることも珍しくない（鶴島、2008）

10

ハ．捕食性又は寄生性

—

15

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

シクラメンの繁殖の様式は種子繁殖であり、自然条件下では自殖、他殖とも可能であるものの、国内では野生種及び園芸種ともに自生の報告はない。シクラメンは、虫媒により種子を形成するが、商業栽培では、人為的に交配を行い授粉、採種が行われている。自殖を繰り返すと形質が劣化する「近交弱勢」が生じるため、同一品種、系統の中から株を選抜して、株間またはグループ内で交配し採種する（駒形、1995）。シクラメンの採種自体は特に難しいことではないが、花粉採種や授粉などの作業が必要であり（住井、1995）、人為的にコントロールされた環境のもとで、稔性のある一部の品種でのみ可能である。種子の休眠性はほとんどないが、採種直後に播種をすると 80%の種子が発芽するまでには 1 ヶ月以上時間を要することが報告されている。また、種子発芽率は発芽適温の 17℃において 90%との報告がある（石垣、2006.；石垣、2010）。種子の寿命については、保存条件によっては約 3 年との報告がある（住井、1995）。果実は球形の蒴果で、受粉後 5 ヶ月で結実する。1 蒴果中には 20 から 40 粒の種子を有し、果実は乾燥すると弾け、種子を落とす。（阿部、1986；塚本、1994）。

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

自然条件下では栄養繁殖は行わない。シクラメンは塊茎を有しており、塊茎は年々肥大するが分球や子球が生じることはなく、自然状態のままで塊茎による増殖は行われない(苦名, 1987)。人為的には塊茎をさいの目状に分割してそれらを鉢に植え、繁殖することに成功しているものの、塊茎の分割による繁殖はシクラメン生産においては一般的には行われていない(中山, 1987)。また、組織培養技術による栄養繁殖では、塊茎切片の無菌培養(Geier, 1977)、葉芽挿し(狩野, 1967)や不定胚や不定芽を経由しての増殖(特許公開平 5-207830、特許公開平 5-260870)が可能であるが、これらはすべて無菌的な操作環境と厳密に温度コントロールされた環境が必要である。

- 10 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およびアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

シクラメンの野生種は、自然条件下で自殖、他殖とも可能である。他殖は虫媒であるが、地中海地域やイスラエルなどの調査によると、自生地で虫媒が起こる頻度は低いか、ほとんど無いとされている(Affre *et al.*, 1995 ; Schwartz-Tzachor *et al.*, 2006)。シクラメンの園芸種は自然条件下で自殖、他殖とも可能である。通常は静置した状態では、ほとんど結実しない(竹下, 1985)。人為的に自殖交配すれば自家受粉は可能であり、自家不和合性を示さない。シクラメンは自殖を繰り返すと形質の劣化が起こる近交弱勢が生じることから、採種の際は、人為的に他殖させることが一般的である。

- 20 シクラメンは、シクラメン属には 19 種の野生種(以下「近縁野生種」という。)が存在しており、日本においては交雑可能な近縁野生種の存在は確認されていない。園芸種のもととなったシクラメン・ペルシカム(*C. persicum*)の倍数性は、2 倍体で染色体数は 24 対($2n=48$)である。その他の近縁野生種では、シクラメン・ヘデリフォリウム(*C. hederifolium*)とシクラメン・アフリカナム(*C. africanum* Boiss. et Reut.)は 2 倍体と
25 4 倍体が存在するが、それ以外の近縁野生種は 2 倍体である(Grey-Wilson, 2002)。園芸種と交雑可能な野生種は、園芸種の成立のもととなったシクラメン・ペルシカム(*C. persicum*)1 種のみで、通常、近縁野生種との自然交雑は起こらない(Legro, 1959)。園芸種と野生種シクラメン・ペルシカム(*C. persicum* ($2n=48$))以外の人為的交雑は、胚珠培養法により園芸種とシクラメン・ヘデリフォリウム(*C. hederifolium* ($2n=34$))及びシクラメン・
30 プルプラセンス(*C. purpurascens* Mill. ($2n=34$))、シクラメン・グラエカム(*C. graecum* ($2n=84$))との間で種間雑種の作出に成功した例があるが、これらの人為的に交雑された種間雑種は、自殖による種子形成は認められない(Legro, 1959 ; Ishizaka and Uematsu, 1992 ; Ishizaka and Uematsu, 1995 ; Ishizaka, 1996)。

また、園芸種がアポミクシスを生じる報告はない。

35

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離および寿命

園芸種の花粉の生産量は品種間または株間で大きな差異が認められる。

宿主の GM2 は自然突然変異により、シクラメンの *CpAG1* 遺伝子の発現が認められず、雄ずいが花弁化しているために花粉を生産しない (Tanaka *et al.*, 2013)。また、GM2 は 5 月以降の高温期などにおいては稀に花弁と融合するような不完全な形態の雄ずい (葯) を形成する奇形花が発生することが認められている。その葯内には、花粉の存在が認められ、その花粉は培地上において発芽も認められるが、雄ずいは変形しており、花粉の葯外への放出が少ないことを観察している (別添資料 4、p2 参照)。

園芸種の花粉の稔性は品種間または株間で大きな差異が認められる。一般には、粒径は 13-18 μ m、稔性は 69-99%との報告があり (竹下ら, 1984)、形状は円形である。また、ショ糖 10%を添加した寒天培地上での花粉の発芽適温は 15-25℃であったとの報告がある (高村ら, 1996)。

媒介方法は虫媒による。シクラメンの花弁は大きく、鮮やかな花色を持ち雄ずいが露出しているという、虫媒花の特長を持つ (Buchmann *et al.*, 1983)。ペルシカムの野生種の自生地の一つであるイスラエルで行われた調査によれば、ペルシカムの野生種に訪れた昆虫として、アザミウマやアブ (ハナアブ類)、ガ (コバネガ類) が中心であった (Schwartz-Tzachor *et al.*, 2006)。

花粉の飛散距離及び寿命に関して、人為的に風を送った室内実験の結果では、花粉の飛散距離は 90 cm、花弁を取り外した場合は 140 cm (風速 5.8 m/s 実験) である。寿命は、湿室内で 90 日との報告がある (藤巻ら, 1992)。

ホ. 病原性

—

ヘ. 有害物質の産生性

シクラメンの園芸種はこれまでに長期間の使用等の経験があるが、わが国を含めて野生種、園芸種ともに有害物質産生の報告はない。

ト. その他情報

—

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

5 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及び機能を表 1 に、その塩基配列を別添資料 1 (p1～8) 及び別添資料 2 (p1～7) に示した。

10

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>CpAG2SRDX</i> カセット		
<i>attB1</i>	25	λファージの部位特異的な組換え配列
<i>35Spro</i>	924	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の <i>35S RNA</i> 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。CaMV のゲノムは環状二本鎖 DNA であるが、逆転写酵素を持ち、増殖過程で RNA を介して複製する。 <i>35S</i> プロモーターは強力で、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く発現することから、外来遺伝子を植物で発現させる際によく用いられる (Mitsuhara <i>et al.</i> , 1996)。
<i>TMVΩ</i>	44	タバコモザイクウイルス由来翻訳促進配列 (Gallie, 2002)。
<i>CpAG2</i>	750	シクラメン由来 <i>AGAMOUS</i> 遺伝子 (クラス C <i>MADS-box</i> 転写因子遺伝子、Accession No.: AB548890)。本遺伝子はシクラメン由来のクラス C に属する <i>MADS-box</i> 転写因子遺伝子であり、シクラメンには 2 種類存在することが分かっており、そのうちの 1 つに相当する。特に、雌ずいで強く発現している (Tanaka <i>et al.</i> , 2011)。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能のつづき

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>SRDX</i>	39	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) リプレッサードメインの配列。本配列を転写因子の C 末端に連結し、植物体内で発現させることで、宿主植物に内在する転写因子の標的遺伝子の発現を無力化することができる (Hiratsu <i>et al.</i> , 2003)。シロイヌナズナ由来 SUPERMAN タンパク質から単離された配列で、転写因子 C 末側に付加することより、転写因子が転写抑制因子に転換され、当該転写因子が転写を促進する標的遺伝子の発現が抑制された組換え植物体を作出できることが知られている (Mitsuda <i>et al.</i> , 2006 ; Ikeda and Ohme-Takagi, 2009 ; Sage-Ono <i>et al.</i> , 2011)。
<i>NOST</i>	325	リゾビウム・ラディオバクター (<i>Rhizobium radiobactor</i>) 由来ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含み、この配列により目的遺伝子 (<i>CpAG2SRDX</i>) の転写を終結させる (Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
<i>attB1</i>	25	λ ファージの部位特異的な組換え配列
<i>HPT</i> カセット		
<i>NOSpro</i>	286	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobactor</i>) 由来ノパリン合成酵素プロモーター領域。ノパリン合成酵素遺伝子は、Ti プラスミドの T-DNA 上に存在し、アグロバクテリウム (<i>Agrobacterium</i>) が植物に感染後、植物核ゲノムに組込まれた Ti 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て、ノパリンが合成され、感染菌の炭素及び窒素源として利用される。本遺伝子のプロモーターは植物体のほとんど全ての器官で発現する。本プロモーター下流に隣接する <i>HPT</i> 遺伝子を形質転換植物内で発現させる (Ebert <i>et al.</i> , 1987)。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能のつづき

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>HPT</i>	1023	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子である。ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼはハイグロマイシンをリン酸化し、不活性化させることにより、ハイグロマイシン耐性を付与する。この機能を利用して <i>HPT</i> 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている。遺伝子組換えシクラメンの選抜マーカーとして用いた (Gritz <i>et al.</i> , 1983)。
<i>G7T</i>	165	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobactor</i>) 由来の Ti プラスミドの T-DNA に存在する <i>transcript 7</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーターを含み、この配列により目的遺伝子 (<i>HPT</i>) の転写を終結させる (Marc, 1990)。
<i>RB</i>	25	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobactor</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Right-border) (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
<i>LB</i>	26	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobactor</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Left-border) (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外側骨格領域 (本組換えシクラメンには存在しない)		
<i>ColE1 ori</i>	378	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド複製起点 (Oka <i>et al.</i> , 1979)。
<i>oriV</i>	619	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド複製起点 (Cross <i>et al.</i> , 1986)。
<i>NPTIII</i>	350	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobactor</i>) 由来カナマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子で、抗生物質カナマイシン耐性を獲得する (Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1983)。

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供与核酸の構成要素それぞれの機能

5

本組換えシクラメンの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (p9~11) に示した。

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

10

【*CpAG2* 遺伝子及び *CpAG2SRDX* 遺伝子】

1. *CpAG2* 遺伝子及び *CpAG2SRDX* 遺伝子に関する情報

15

1) 花器官形成を制御する遺伝子と ABC モデルについて

花を構成する花弁や雄ずい、雌ずい、がく片など花器官の形成を決定するメカニズムは、シロイヌナズナなどの双子葉モデル植物を用いて研究が進められ、一般に ABC モデルという遺伝学的モデルによって説明されている (後藤, 2002 ; 伊藤, 2005)。このモデルは、がく片、花弁、雄ずい、雌ずいの 4 種類の花器官形成が、MADS-box の A、B、C の 3 つのクラスの調節遺伝子 (転写因子遺伝子) の組合せによって決定されているというもので、A クラス遺伝子のみが発現する領域ではがく片が形成され、A と B クラス遺伝子が共に発現する領域では花弁が形成され、B と C クラス遺伝子が共に発現する領域では雄ずいが形成され、C クラス遺伝子のみが発現する領域では雌ずいが形成される (図 1、p17)。また、がく片、花弁、雄ずい、雌ずいのいずれかの器官が、別の花器官に変化した突然変異体の解析が、シロイヌナズナ (Bowman *et al.*, 1989)、キンギョソウ (Brendan *et al.*, 1999)、アサガオ (Nitasaka, 2003)、バラ (Annick *et al.*, 2010)、イネ (Yamaguchi *et al.*, 2006) で行われ、このモデルの普遍性が確認されている。

20

25

30

35

一方で、C クラス遺伝子が関わるターゲット遺伝子の制御メカニズムについての解析が、シロイヌナズナをモデルとして進められており、シロイヌナズナの C クラス遺伝子 *AGAMOUS* (*AG*) により転写を誘導されるターゲット遺伝子は約 2,000 個と想定されている。これらの遺伝子は、*AG* と同様、花の器官形成過程にある生殖器官に分化する特異的な細胞領域において発現が誘導される。ターゲット遺伝子の例として、*SPL/NZZ* ; 雄ずいの葯となる特定の細胞でのみ発現し花粉の形成を誘導する遺伝子 (Ito *et al.*, 2004)、

DAD1; 花粉の成熟、葯の開裂、花糸の伸長を制御する遺伝子 (Ito *et al.*, 2007)、*KNU*; 花の幹細胞において発現し、その増殖と分化を制御するとともに (Sun *et al.*, 2009)、幹細胞の決定に係わる *WUS* 遺伝子の発現を抑制する遺伝子 (Lenhard *et al.*, 2001)、*SHP*; 雌しべの分化方向の決定、鞘の開裂を制御する遺伝子 (Liljegren *et al.*, 2000)、等が報告されている。これらはいずれも *AG* の発現と関連性が強く、*AG* が雄ずい、雌ずい特異的に発現していることから、同様に花器官形成の制御に関与していることが示されている (後藤, 2002; 伊藤, 2005; 伊藤, 2014)。

また、これまでの研究から、花器官形成には多くの遺伝子が転写因子として機能し、それらの遺伝子が相互に発現制御し合うネットワークにより決定されることが知られている。例えば、花発生の各ステージにおいて、*AG* は直接のターゲットである *KNU* 遺伝子の発現を誘導することにより、*KNU* 遺伝子による *WUS* 遺伝子の発現抑制を誘導する。一方で、*WUS* 遺伝子は、*AG* の発現を直接的に誘導することが報告されている (Lenhard *et al.*, 2001)。このように *AG* は、転写因子として下流にある遺伝子の発現を制御する一方で、その遺伝子又は別の遺伝子によって、発現の制御を受けている (後藤, 2002; 伊藤, 2005)。その模式図を図 2 (p17) に示した。

2) シクラメンにおける C クラス (*CpAG1*, *CpAG2*) の働きについて

シクラメンには、MADS-box の C クラス遺伝子が 2 種類 (*CpAG1*, *CpAG2*) 存在し (シロイヌナズナは *AG* の 1 種類)、*CpAG1* と *CpAG2* の配列は非常に相同性が高く、複数のシクラメン品種においても同様の配列が保存されており、*CpAG1* と *CpAG2* は雄ずいと雌ずいで発現しているが、がく片、花弁、葉身、葉柄および塊茎では発現していない。さらに、*CpAG1*, *CpAG2* の発現を比較すると、*CpAG1* は雌ずいより雄ずいで発現が強く、*CpAG2* は雄ずいより雌ずいで発現が強い (Tanaka *et al.*, 2013)。

シクラメンは、花弁 5 枚で、雌ずい 1 個、雄ずい 5 個、がく片 5 枚から成るが、突然変異体として雄ずいが花弁に変化して、花弁 10 枚で、雌ずい 1 個、がく片 5 枚のシクラメンが存在する。この変異体は、*CpAG2* は発現しているが、*CpAG1* の cDNA 領域の一部が欠失しており *CpAG1* が発現していない。このことは、*CpAG1* は雄ずい形成の制御、一方 *CpAG2* は雌ずい形成の制御に深く関与していることを示している (Tanaka *et al.*, 2013)。

3) 本組換えシクラメンにおける *CpAG2SRDX* 遺伝子の働きと花弁形成との関係について

Chimeric REpressor Gene Silencing Technology (CRES-T) 法は植物転写抑制因子に保存されている非常に短い転写抑制配列 *SRDX* を利用して、転写因子を転写抑制因子に変換する技法である (Mitsuda *et al.*, 2006)。CRES-T 法の利点は、この方法で作られた転写抑制因子 (キメラリプレッサー) を植物に導入するとそのターゲットとなる遺伝子の転写

を抑制する効果を発揮することである。その概念図を図 3 (p18) に示した。導入遺伝子の *CpAG2SRDX* 遺伝子は、シクラメンより単離された MADS-box ファミリーの転写因子で、花の形態形成（雌ずいの形成）に関与する遺伝子（*CpAG2*）に *SRDX* 配列を結合させたものである（Tanaka *et al.*, 2011 ; Tanaka *et al.*, 2013）。*CpAG2SRDX* を作製して、元々雄ずいが花弁化した *CpAG1* の機能欠損系統の突然変異シクラメン（GM2）へ導入することで、雌ずいで強く発現している *CpAG2* の機能が抑制されて、花器官の構成は雌ずいと雄ずいが無く、花弁が繰り返し形成される形質を持ち、通常 5 枚の花弁数が 50~60 枚程度に増加した組換え体を作出した（別添資料 5, p3~4）。これは、組換え体において、*CpAG1*（元々機能していない）と *CpAG2* の両方の機能が抑制されることで、ABC モデルの B と C クラス遺伝子が共に発現する領域での雄ずい形成と C クラス遺伝子のみが発現する領域での雌ずいが形成が無くなり、代わりにそれらの領域で、A と B クラス遺伝子が共に発現する花弁が形成され、この現象が花器官の発生領域で継続的に発現することにより花弁数が増加すると考えられる（図 1, p17）。このことから *CpAG2SRDX* 遺伝子はシクラメンの雌ずい形成に関連する遺伝子の転写抑制因子として作用していると考えられる。

2. 雌ずい花弁化に係わる遺伝子発現及び代謝の評価

1) 花器官形成関連遺伝子の発現解析

本組換えシクラメンの雌ずい花弁化への *CpAG2SRDX* 遺伝子の影響を解明するために、*CpAG2SRDX* 遺伝子カセットを有する 2 つの組換えシクラメン（AGM16、ASW30）及び対照の宿主（GM2、SW6）について遺伝子発現レベルでの解析を行った。

CpAG1 及び *CpAG2* の葉での発現について RT-PCR を行った結果、組換えシクラメン（AGM16、ASW30）及び宿主（GM2、SW6）とも発現は認められなかった（別添資料 3, P26~27 参照）。

次に、花器官形成関連遺伝子の発現解析を蕾を用いて行った。本試験では、*CpAG2SRDX* 遺伝子カセットを有する 2 つの組換えシクラメン（AGM16、ASW30）及び対照の宿主（GM2、SW6）を特定網室で栽培し、雄ずい及び雌ずいを含む蕾を採取して、遺伝子発現の解析に供試した。発現解析は、シクラメンから単離されて既に配列が判明している遺伝子で、*CpAG2* によって直接的に制御を受けると考えられる *CpDAD* (Ito *et al.*, 2007) 及び *CpSHP* (Savidge *et al.*, 1995, Liljegren *et al.*, 2000,)) について RT-PCR を行った。その結果、組換えシクラメンでは宿主と比較して、*CpDAD* 及び *CpSHP* の発現が減少していることが確認された（別添資料 3, P20~21 参照）。

また、花器官形成に関与する MADS-box の 9 種類の遺伝子（*CpAG2*、*CpAP1*、*CpPI*、*CpAP3a*、*CpAP3b*、*CpSTK*、*CpMADS1*、*CpMADS2*、*CpMADS3*）について RT-PCR を行った。その結果、宿主に比べて本組換えシクラメンで発現が減少した遺伝子は、*CpAG2*

及び *CpMADS3* の 2 種類であった。この 2 つの遺伝子の発現の減少は、組換えシクラメン ASW30 でも同様の傾向であった（別添資料 3, P22～25 参照）。

2) メタボローム解析

5

CpAG2SRDX タンパク質の発現がシクラメンの代謝に与える影響を調べるため、全代謝産物の網羅的なメタボローム解析を行った。

本試験では、*CpAG2SRDX* 遺伝子カセットを有する 2 つの組換えシクラメン (AGM16、ASW30) 及び対照の宿主 (GM2、SW6) を特定網室で栽培し、葉を採取し解析に供試した。

10 代謝解析の結果、合計 6,849 種の代謝産物が検出された。宿主と本組換えシクラメン間の代謝産物の比較において、本組換えシクラメンのみで検出されたものが 8 種、宿主（非組換えシクラメン）でのみ検出されたものが 22 種であった。そのうち、2 つの組換えシクラメン (AGM16、ASW30) に共通して変化した代謝産物は、組換えシクラメンのみで検出されたものは無く、宿主のみで検出されたものが 1 種であった（表 2, P16、別添資料 6, P4 参照）。この共通して変化した代謝産物の情報を別添資料 6 (P4) に記載する。これら計 30 種類の代謝産物のアノテーション情報から、6 種類の代謝産物に関する化合物情報が得られた（別添資料 6, 表 3-1, 表 3-2, P4～5 参照）。その結果、いずれの代謝産物も植物由来の成分で、有機化合物、精油及び糖類が認められた。

15 20 また、宿主及び本組換えシクラメンともに検出された代謝産物において、統計学的な有意差 ($P < 0.05$) が認められた代謝産物のうち、増加したものは 333 種で、減少したものは 33 種であった。そのうち、組換え体間 (AGM16 と ASW30) に共通して変化した代謝産物は、増加したものは 16 種で、減少したものは無く（表 3, P16、別添資料 6, P6 参照）、増加倍数比は、最も大きいもので約 5.62 倍であった（別添資料 6, 表 5, P6～7 参照）。本代謝解析で検出された 6,849 種の代謝産物のうち、組換え体 (AGM16、ASW30) で共通して変化が認められた代謝物の割合は、0.234%であった。これらの代謝産物の情報を別添資料 6 (P6～7) に記載する。

30

35

表 2. 組換え体及び宿主に特有の代謝産物

	代謝産物の数			共通して変化 した化合物ID
	AGM16（本組換え体） とGM2（宿主） との比較	ASW30（組換え体） とSW6（宿主） との比較	共通する変化	
組換え体のみで 検出された代謝産物	8	7	0	
非組換え体のみで 検出された代謝産物	22	17	1	ID 2974

※ 共通する変化：AGM16、ASW30 と GM2、SW6 間の比較において共通して検出された代謝産物の数を示す

5

表 3. 本組換え体と宿主との間で有意な差が認められた代謝産物の数

	AGM16	ASW30 （本組換え体）	共通する変化
増加	333	133	16
減少	33	203	0

※ 共通する変化：AGM16、ASW30 と GM2、SW6 間の比較において共通して増加した代謝産物の数を示す

10

CpAG2 タンパク質及び CpAG2SRDX タンパク質が、アレルギー性を有していることが明らかとなっているタンパク質と相同性を有するかについて、アレルギーデータベース（FARRP Allergen Protein Database Ver.14、2014）での解析を行ったところ、既知アレルギーとの間に構造相同性が無いことが確認された。したがって、本タンパク質にアレルギー性を示す可能性は科学的な知見からは予測されない。

15

20

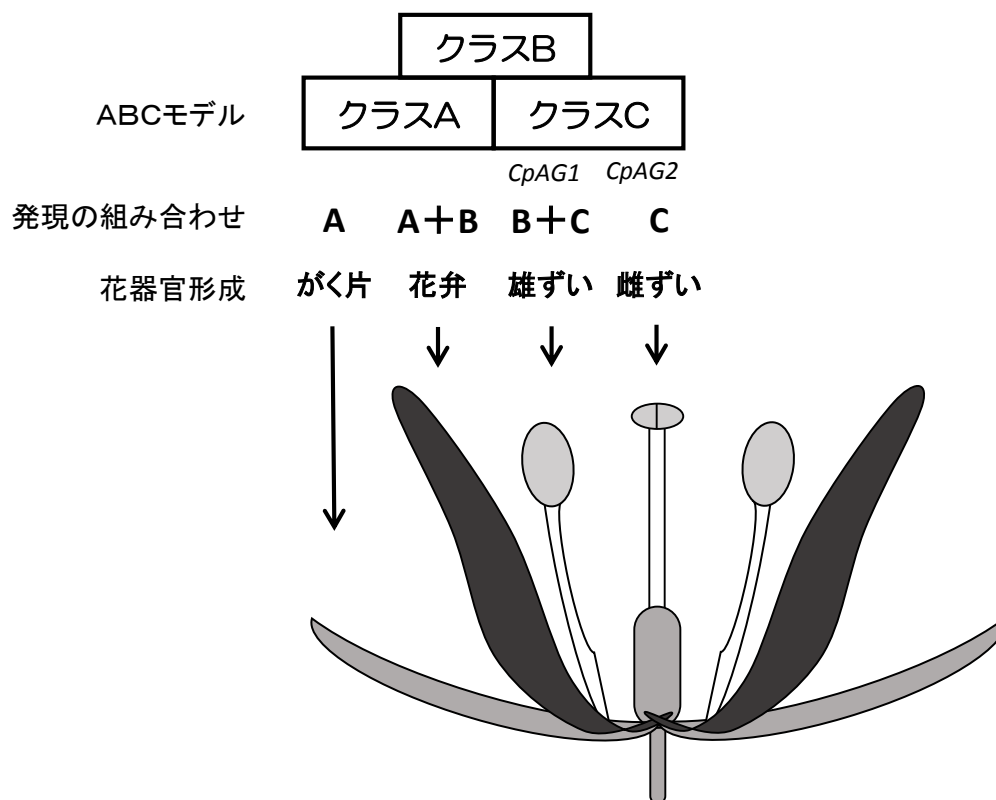


図 1. MADS-box 転写因子（クラス A、クラス B、クラス C）の組合せによる花器官形成に関する ABC モデル概念図

5

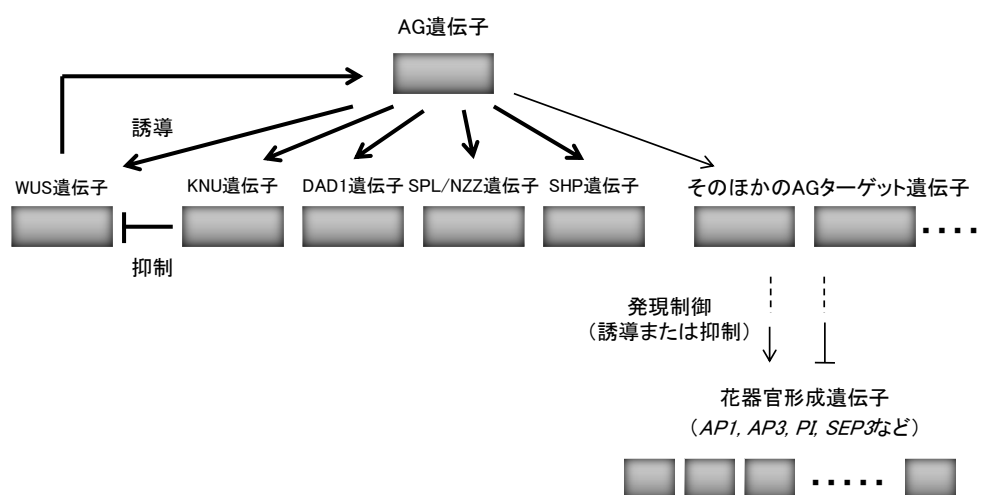


図 2. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における花器官形成を制御する遺伝子ネットワークの模式図 (Lenhard et al., 2001; 後藤, 2002; 伊藤, 2005; Ito et al., 2007)

10

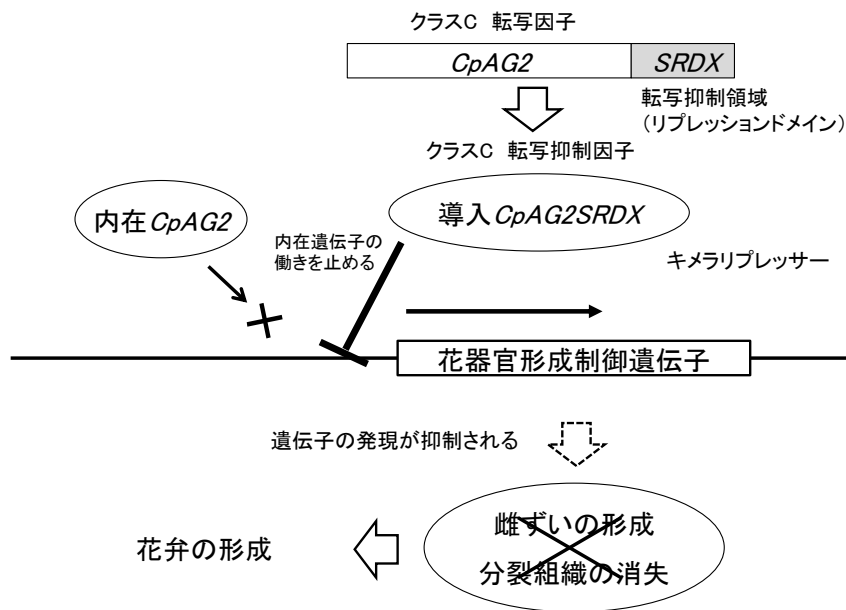


図 3. CRES-T 法による遺伝子発現制御の概念図

5

【HPT（ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ）】

- 10 大腸菌 K-12 株由来の遺伝子で、産出されたハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼは抗生物質ハイグロマイシンをリン酸化し、不活性化させることにより、ハイグロマイシン耐性を付与する。この機能を利用して *HPT* 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている。本酵素は基質特異性が高く、アミノグリコシド系抗生物質のハイグロマイシン B、ハイグロマイシン B2、さらに構造が類似したデストマイシン A、デストマイシン B をリン
- 15 酸化することが知られているが、他のアミノシクリトール系やアミノグリコシド系の抗生物質（ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、 Tobramycin、Amikacin 等）はリン酸化しない (Rao *et al.*, 1983)。

- ハイグロマイシン耐性酵素がアレルギー性をもつという報告はない。また、ハイグロマイシン耐性酵素のアミノ酸配列をもとに、アレルギー性を有していることが明らかとなっているタンパク質と相同性を有するかについて、アレルゲンデータベース (FARRP Allergen Protein Database Ver.14, 2014) を行ったところ、既知アレルゲンとの間に構造相同性が無いことが確認された。したがって、本タンパク質は、アレルギー性を示す可能性は科学的な知見からは予測されない。
- 20

③ 宿主の代謝系を変化させる場合はその内容

【CpAG2SRDX遺伝子】

5 CpAG2SRDX タンパク質は、シクラメンより単離された花器官形成を制御するクラス C の MADS-box ファミリーの AG に相同性を示す CpAG2 に、シロイヌナズナから単離されたリプレッサー配列を付加したものである。通常、転写因子は遺伝子の転写を制御する因子として機能し、なかでも AG は、花器官原基及び雄ずい、雌ずいにおいてのみ特異的に発現し、雄ずい及び雌ずいの形態形成を決定する機能を持つことが知られている（伊藤,
10 2005）。

したがって、CpAG2 タンパク質は、AG と同様の機能を持つことが分っていることから（Tanaka *et al.*, 2013）、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、CpAG2 タンパク質に関して基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。また、CpAG2SRDX タンパク質は、CpAG2 タンパク質の C 末端にリプレッサー配列が付加され
15 て、雌ずいの形態形成を抑制する転写抑制因子として機能することから、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は低いと想定される。

また、CpAG2 タンパク質及び CpAG2SRDX タンパク質は、タンパク質データベース（Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank）で解析した結果、既知酵素タンパク質との間に構造相同性が無いことが確認された。

20 したがって、CpAG2SRDX タンパク質の発現によって既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、シクラメンに新たな代謝産物を産生させる可能性は低いと考えられる。

【HPT（ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ）】

25 HPT タンパク質は、ハイグロマイシン B と一部の類縁アミノグリコシド系抗生物質をリン酸化する酵素であるが、極めて基質特異性が高く、植物体中に基質となり得る物質が存在することは知られていないことから、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、HPT タンパク質に関しては、基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。

30 (2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

本組換えシクラメンの作出に用いられた pCpAG2SRDX は、アグロバクテリウム由来の
35 pBI101などを基に構築された。詳細は、別添資料 2, p1~7 に記載した。

ロ．特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

- 5 本組換えシクラメンの作出に用いられた pCpAG2SRDX の全塩基数は 13,418 bp である。
なお、pCpAG2SRDX の塩基配列は別添資料 1 (p1～8) 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

- 10 大腸菌とアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカーとして、カナマイシンに対する耐性を付与する *NPTⅢ* 遺伝子が含まれるものの、本組換え体中に、この遺伝子は導入されていない。

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

15

本ベクターに感染性の知られている配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

20 イ．宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換えシクラメンの作出に用いたベクター pCpAG2SRDX の各構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位、本組換えシクラメンに移入された核酸の構成を図 4(p21) 及び挿入概念図を図 5 (p21) に示した。

25

ロ．宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。

30

35

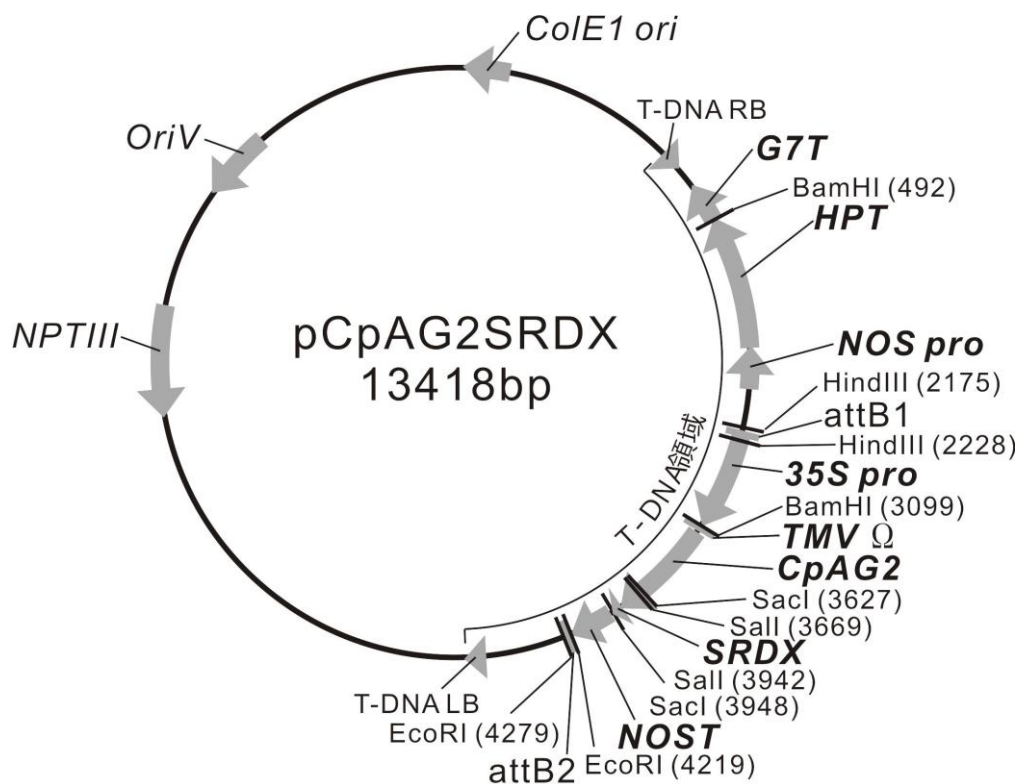


図 4 発現ベクターpCpAG2SRDX の構成図

※上段図 () 内の数字は、T-DNA RB を起点としたプラスミド上の制限酵素切断位置を示す。

5

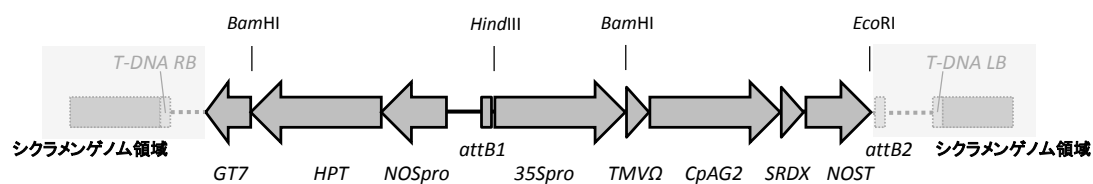


図 5 T-DNA 領域の挿入概要図

※実線はサザンブロット解析により少なくとも 1 コピーは挿入を確認済みの領域、点線は推定による領域

10

15

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

- 5 アグロバクテリウム感染後の葉柄から形成された培養細胞をハイグロマイシン (5 mg/l) を含む選抜培地で培養することにより選抜した。2007 年に宿主に形質転換を行った。具体的には *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 の菌液中に、無菌苗の葉柄を 3 分間浸し、滅菌ろ紙で余分な菌液をふき取った後、継代用培地に移植し、7 日間暗所で共存培養した。その後、カルベニシリンを 500mg/l 加えた MS 液体培地で洗浄し、継代用培地にハイグロマイシン 5 mg/l とカルベニシリンを 500mg/l 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に正常に葉柄から形成、増殖するカルスを切り出し、継代培養を繰り返して、カルスから不定芽を形成させた。ハイグロマイシン耐性を示した形質転換不定芽を発根用培地に移植して発根させた後、順化を行った。順化個体は鉢上げ後、閉鎖型恒温室内のインキュベータで栽培した (Tanaka *et al.*, 2011 ; Tanaka *et al.*, 2013)。

15

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菌体の残存の有無

- 20 本組換え体の作製に用いたアグロバクテリウムは組織培養時に培地にカルベニシリンを添加することで除菌した。なお、本組換え体 (栄養繁殖苗) のアグロバクテリウムが残存していないことは、本組換え体の複数個体の葉からの抽出物をアグロバクテリウムが生育可能なカルベニシリン無添加の LB 培地に塗布し、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した (別添資料 5、p.11 参照)。また、本組換え体は、組換えた当代からの栄養繁殖に由来するもののみであり、組織培養により維持している。組織培養は、不定芽培養法を用い、滅菌したカルベニシリン無添加の MS 培地上で継代を繰り返して行う。その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した。また、本組換え体 (栄養繁殖苗) の葉から DNA を抽出し、ベクターの外側骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*NPTIII* 遺伝子) を標的とした PCR 分析を行ったところ、ベクター pCpAG2SRDX の外側骨格領域は存在しなかった。このことから、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムは残存しないことを確認した (別添資料 5、p. 11～12 参照)。

- 35 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、特定網室試験に供した系統、その他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た系統までの育成の経過

再分化した植物体の葉から DNA を抽出し、核酸の複製物の存在を PCR 法により確認して導入遺伝子を持つ植物体 11 株を選抜した (T0 世代)。これらの植物体を閉鎖型恒温室内のインキュベータで栽培し、生育の良好であった 9 株を 1 次選抜した (2008 年)。さらに、
5 これらの植物体を特定網室で栽培した。開花評価の結果、雌雄ずいの花弁化及び八重咲き形質の評価により 3 株を 2 次選抜した (2009 年)。2 次選抜した 3 株について、それぞれ組織培養により増殖して複数個体 (No.1~8) を作出して、特定網室で栽培した。開花評価の結果、*CpAG2SRDX* の発現の安定性、雌雄ずいの花弁化及び八重咲き形質から総合的に判断し、本組換えシクラメン (AGM16) を選抜した (2010~2011 年)。

10 本組換え体は、組換えた当代からの栄養繁殖に由来するもののみであり、組織培養により維持している。組織培養は、不定芽培養法を用いて行う (神田, 1995)。具体的には、本組換え体の葉柄をカルス形成用培地に移植し、正常に増殖してきたカルスを切り出し、不定芽形成用培地に移植して不定芽を形成させる。個々に切り出した不定芽を、発根用培地に移植して発根させる。生物多様性影響評価に用いた植物体は、不定芽培養法により増殖させた不定芽を発根させ、順化の後に鉢上げした植物体である。このような組織培養で
15 は、放射線や化学物質で処理をしなくてもカルスを用いた培養過程において変異を生じることが知られているが、その頻度は植物種、培養部位、培養条件及び発生形質によって大きく異なることが知られている。

本組換え体の植物体は、フラスコ容器内で無菌状態で維持しており、本組換え体の申請
20 の単位は、組換えた当代の栄養繁殖に由来する T0 世代のものである (図 6、p24)。

(注) 本組換えシクラメン (AGM16) の申請の単位は、組換え当代 (T0 世代) に限る。

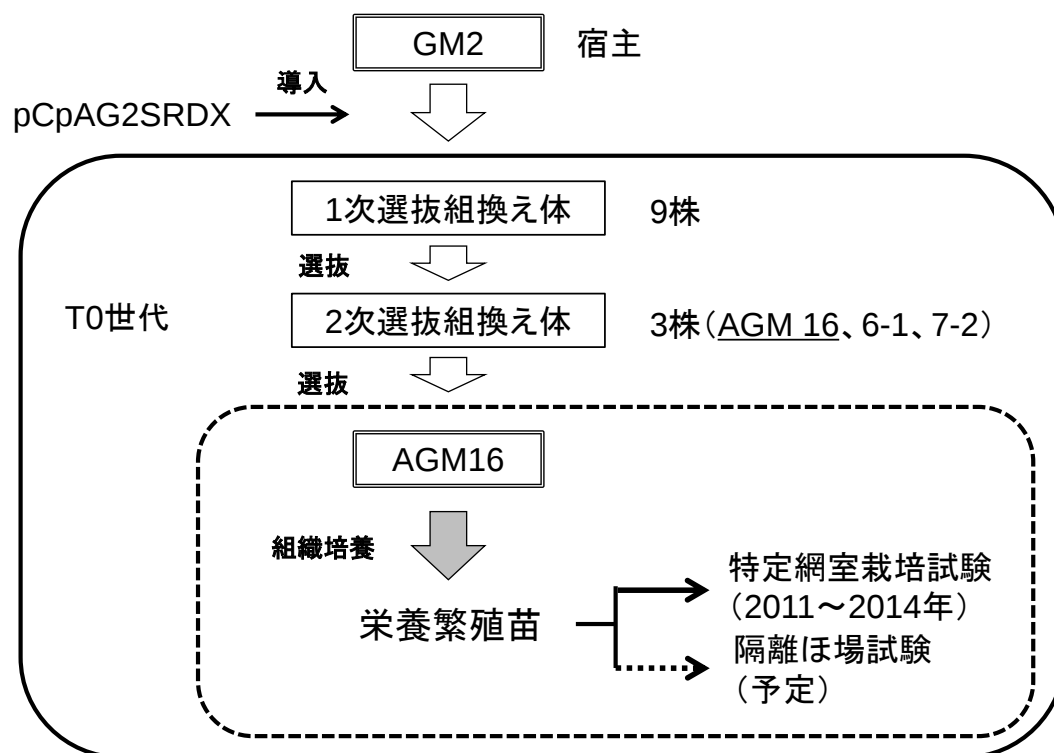


図 6 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いた系統
※実線内はすべて T0 世代、点線内は承認範囲を示す

5

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入した核酸の複製物が存在する場所

10

本組換え体 T0 世代の各器官（花卉、葉、花茎、根及び塊茎）における導入遺伝子（*CpAG2SRDX* 遺伝子、*HPT* 遺伝子）の存在の有無について、ゲノム DNA による 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、花茎、根及び塊茎で検出された（別添資料 3 p.2～3 参照）。また、アグロバク

15

テリウム法で導入したベクター pCpAG2SRDX は、葉緑体ゲノムと相同配列を持たないため葉緑体ゲノム中に挿入されることは考えにくい。よって、移入された核酸は花卉、葉、花茎、根及び塊茎の染色体上に存在すると考えられる。

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

T0 世代(組換え体作出当代)におけるサザンブロット法による解析を行い、*CpAG2SRDX* 遺伝子プローブ及び *HPT* 遺伝子プローブを用い、2 種類の制限酵素で切断した本組換え体ゲノムに対して得られたシグナルのサイズから T-DNA のゲノムへの移入モデルを作成した。その結果、移入された核酸は、本組換え体ゲノム中に T-DNA の LB から RB に至る全長及びその断片が、計 6 コピー存在することが確認された(別添資料 3, p.4~12 参照)。

本組換え体の承認申請の単位は、組換え体作出当代(T0 世代)の栄養繁殖に由来するもののみであるため、複数世代における伝達の安定性は確認していない。

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

サザンブロット法により解析を行った結果、導入した *CpAG2SRDX* 遺伝子は複数の断片にシグナルが認められ、移入された核酸は 6 コピー存在することが確認される。染色体上に移入された核酸の周辺配列の解析からは、6 コピーのうち 2 コピーは隣接している可能性があり、残り 4 コピーは隣接している可能性は低いと考えられる。

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

導入した *CpAG2SRDX* 遺伝子の宿主内での発現において、本組換え体の各器官(蕾、花弁、葉及び花茎)をサンプルとして導入遺伝子(*CpAG2SRDX* 遺伝子、*HPT* 遺伝子)に対する RT-PCR を行った。その結果、*CpAG2SRDX* 遺伝子及び *HPT* 遺伝子は本組換え体の蕾、花弁、葉及び花茎で発現が確認された(別添資料 3, p.13~14 参照)。

また、本組換え体は栄養繁殖で増殖を行っているが、本組換え体当代から栄養繁殖を行った組換え体の複数個体(No.1~8)においても *CpAG2SRDX* 遺伝子及び *HPT* 遺伝子の発現は RT-PCR による実験の結果、安定していることが確認された(別添資料 3, p.15~16 参照)。

本組換え体の承認申請の単位は、本組換え体作出当代(T0 世代)の栄養繁殖に由来するもののみであるため、複数世代における発現の安定性は確認していない。

⑤ ウイルス感染その他経路を経由して移入された核酸が野生動植物に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無および程度

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えシクラメンは、移入された DNA の周辺配列を利用した特異的なプライマーを用いて、PCR による本組換え体の特異的な検出、識別が可能である（別添資料 3, p.17～18 参照）。検出感度については約 20 ng の染色体 DNA を用いれば検出可能である。信頼性については、本 PCR の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.015% である（別添資料 3, p.19 参照）。

(6) 宿主または宿主の属する分類学上の種との相違

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的または形態学的特性の具体的な内容

本組換えシクラメンへ導入された *CpAG2SRDX* 遺伝子は、宿主内の *CpAG2* 遺伝子の機能を抑制することにより、雌ずいの形成が抑制し、代わりに花卉が形成されることで花卉数を増加させる（50～60 枚程度）。

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

本組換えシクラメンの宿主は、非組換えシクラメンの GM2 であり、導入遺伝子は *CpAG2SRDX* 遺伝子及び *HPT* 遺伝子である。また、第一・2・(1)・ロ・③ (p19) に記載のとおり、*CpAG2SRDX* タンパク質および *HPT* タンパク質に関しては、基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。

隔離ほ場試験を行うに当たって、事前に本組換えシクラメンの生物多様性影響に関する科学的データ等の知見を得るために、生理学的又は生態学的特性についてのデータについて評価を行い、これらを含めて生物多様性影響評価を行った。

a 形態及び生育の特性

宿主及び本組換え体各 10 個体を閉鎖系温室並びに特定網室において栽培し、生育特性として葉柄の長さ、葉柄の太さ、葉の縦径、葉の横径、葉の厚さ、葉の枚数、花茎の太さ、花茎の長さ、開花時期及び花卉数（種苗法に基づく品種登録出願に要する特性表の重要な形質）について、調査した（別添資料 5, p.3～6 参照）。このうち、花茎の長さとおいて、宿主と本組換え体間において統計学的有意差（Student *t* 検定、危険率 5%）が認められた。具体的には、宿主の花茎の長さが平均 6.4 cm であったのに対し、本組換え体で

は平均 8.0 cm であった。これは、シクラメンの形質転換には植物ホルモン（ベンジルアデニン及びナフタレン酢酸）を使用し、さらに脱分化した細胞培養期間が長いことから培養変異によって生じた可能性が高いと考えられる。

5 宿主の花弁数が平均 8.2 枚であったのに対し、本組換え体では平均 63.8 枚であった。また、雄ずい及び雌ずいの形成は認められなかった（別添資料 5, p.3～4 参照）。

表 4. 宿主及び本組換え体の形態調査結果

調査項目	宿主 (GM2)	本組換え体 (AGM16)	P値
葉柄の長さ(cm)	2.5±0.5	2.5±0.2	0.94
葉柄の太さ(mm)	2.1±0.2	2.1±0.2	0.37
葉の縦径(cm)	2.2±0.2	2.1±0.3	0.64
葉の横径(cm)	2.8±0.4	2.8±0.3	0.89
葉の厚さ(mm)	1.1±0.1	1.1±0.1	0.67
葉の枚数(枚)	13.2±6.1	13.3±3.7	0.96
花茎の太さ(mm)	2.6±0.2	2.6±0.1	0.24
花茎の長さ(cm)	6.4±1.7	8.0±1.3	0.0015*

10 ※ *印は統計学的有意差が認められた項目を示す

b 生育初期における低温又は高温耐性

15 宿主は自然条件下において受精し、種子を形成することはない。一方で、宿主は 6 月以降の高温期などにおいては稀に花弁と融合するような不完全な形態の雄ずい（葯）を形成する奇形花が発生することが認められ、葯内の花粉の存在が認められているが、花粉の葯外への放出は少なく、また自殖による種子形成は確認されていない（別添資料 4, p2 参照）。さらに、本組換え体に関しては雌ずい、雄ずいが共に花弁化しているため、種子を形成することはない。したがって、種子に由来する低温または高温耐性については調査を行っていない。本組換え体に関しては、特定網室内の最高気温が 30～39℃に達する高温期に生育させても雄ずい（葯）を形成する奇形花の発生は認められていない。

20

c 成体の越冬性又は越夏性

25

園芸種は 20℃前後の冷涼な温度を好むが、日本の夏季においては特定網室内の最高気温

が 30～39℃に達する。現在のところ、本組換え体における夏季の生育についての知見は得られていない。この条件での越冬性と夏季の生育については隔離ほ場試験で調査予定である。越冬性に関して、園芸種は一部の屋外向け品種を除いて施設内栽培が中心であり、宿主品種も施設栽培用品種である。そのため冬季における生育に関する知見は得られていない。越冬性、冬季の生育についても隔離ほ場試験で調査予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換え体に関しては雄ずいが形成されないため、花粉を形成することはない。宿主は 5 月以降の高温期などにおいては稀に花弁と融合するような不完全な形態の雄ずい（葯）を形成する奇形花が発生することが認められ、葯内の花粉の存在が認められているが（別添資料 4, p2 参照）、本組換え体に関しては高温期においても雄ずい（葯）を形成する奇形花の発生は認められていない。したがって、花粉の稔性及びサイズについての試験は行わなかった。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

本組換え体に関しては雄ずい、雌ずいが形成されないため、種子を形成することはない。したがって、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率についての試験は行わなかった。

f 交雑率

本組換え体に関しては雄ずい、雌ずいが形成されないため、種子を形成することはない。また、我が国には交雑可能な近縁野生種が生育していないために、交雑率の試験は行わなかった。

g 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、これまで園芸種における有害物質産生の報告はない。導入遺伝子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、鋤き込みおよ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。その結果、特定網室で生育させた宿主および本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.7～9 参照）。さらに、土壌微生物相試験の結果、糸状菌、細菌、放線菌数について、宿主と本組換え体間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5, p.10 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

5 隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県つくば市天王台一丁目1番1号

10

名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場）

使用期間：承認日から平成30年3月31日

15 イ. 隔離ほ場の施設

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

20

② 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えシクラメンの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該シクラメンの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

25

④ 本組換えシクラメンの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。

ロ. 隔離ほ場での作業要領

30

① 本組換えシクラメン及び比較対照の非遺伝子組換えシクラメン以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを必要最小限に抑える。

35

② 本組換えシクラメンを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該シクラメンが漏出しない構造の容器に入れる。

- ③ ②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えシクラメンの栽培終了後は、当該シクラメン及び比較対照の非遺伝子組換えシクラメンを細断して隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- 5 ④ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えシクラメンが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- ⑤ 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 10 ⑥ ①から⑤までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- ⑦ 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
- 15 なお、筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場）の地図を別添資料 7 の試験計画書の図 2、3（p7・8）に示した。
- (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
-
- 20 (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耐用性影響を防止するための措置
- 緊急措置計画書を参照
- 25 (5) 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用
-
- 30 (6) 国外における使用等に関する情報
-

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

シクラメンは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国においてシクラメンが自然条件下で生育している例は報告されていない。

10 本組換えシクラメンにおいて *CpAG1* 及び *CpAG2* の発現は葉では認められず、雄ずい及び雌ずいを含む蕾で発現していることから、*CpAG2SRDX* タンパク質は、雄ずい及び雌ずいで発現している内在性 *CpAG2* タンパク質のターゲットとなる花器官形成遺伝子の発現を変化させると考えられる（第一・2・(1)・ロ・②・1・1) ～3), (p12～14))。そのことから、*CpAG2SRDX* タンパク質が内在性遺伝子の発現に与える影響を遺伝子発現解析により調査した。その結果、本組換えシクラメンでは、転写抑制因子の *CpAG2SRDX* タンパク質によって内在の花器官形成制御に関連する遺伝子の転写が抑制され、少なくとも 4 種類の遺伝子の発現が変化すると考えられた（第一・2・(1)・ロ・②・2・1), (p14))。

15 そのうち、*CpDAD* 及び *CpSHP* の発現が減少したことについては、これらの遺伝子が *CpAG2* のターゲット遺伝子として知られていることから、*CpAG2SRDX* タンパク質が転写抑制因子としてこれらの遺伝子に直接的に作用し、転写が抑制され、その結果として発現が変化したと推測された。

20 一方、本組換えシクラメンで、*CpAG2* 及び *CpMADS3* の発現の減少が確認されたことについては（別添資料 3, P22～25 参照）以下に推測される。これまでの研究から、花器官形成には多くの遺伝子が転写因子として機能し、それらの遺伝子が相互に発現制御し合うネットワークにより決定することが知られている（後藤, 2002 ; 伊藤, 2005）。C クラス遺伝子の *AG* は、花発生の各ステージにおいて、転写因子として下流にある *KNU* や *WUS* の発現を抑制する一方で、*WUS* によって、発現の制御を受けている（第一・2・(1)・ロ・②・1・1), (p11))。したがって、*CpAG2SRDX* タンパク質が直接的にこれらの遺伝子の転写を抑制する可能性は低いことを考えると、*CpAG2SRDX* タンパク質が *CpAG2* の下流のシクラメン内在性遺伝子の発現を変化させ、これが *CpAG2* 及び *CpMADS3* の発現量にも影響を与えると考えられた。また、シクラメンにおける *CpAG2* の発現が、雄ずいと雌ずいに限られていることから、*CpAG2SRDX* タンパク質が影響を及ぼす遺伝子は、シクラメンの花器官形成に関与する遺伝子に限定され、雄ずい及び雌ずいのみで機能する転写抑制因子として、雌ずいの花弁化に関与していると考えられた。

35 *CpAG2SRDX* タンパク質の発現がシクラメンの代謝に与える影響を調べるため、全代謝産物の網羅的なメタボローム解析を行った結果、組換えシクラメンで複数の代謝物に変化が認められたが、これらの化合物情報はいずれも植物由来の成分であり、有機化合物、精

油及び糖類が含まれていたが、植物の生長や形態形成に影響を及ぼすと考えられるアミノ酸類や植物ホルモン類は認められなかった。また、増減した代謝産物の割合は全代謝産物の 0.234%と比較的小さいと考えられた（第一・2・(1)・ロ・②・2・2）（p15～16）。したがって、花器官形成に影響を与えると考えられる代謝産物は特定されなかった。

- 5 そこで、CpAG2SRDX タンパク質による花器官形成に関与する内在性遺伝子の発現及び代謝産物の変化が、本組換えシクラメンの競合における優位性を高めるかについて、本組換えシクラメンと対照の非組換えシクラメンの競合における優位性に関わる諸形質（形態及び生育の特性；第一・2・(6)・②（p26～28））を調査した。その結果、花卉数と花茎の長さにおいて、宿主と本組換え体間において統計学的有意差（Student *t* 検定、危険率 5%）
- 10 が認められた（別添資料 5, p5～6）。本組換えシクラメンの花卉数が増加したことは、CpAG2SRDX タンパク質により、内在性 CpAG2 タンパク質の機能が抑制された結果、雌
- 15 ずい形成に関与する遺伝子の発現が抑制され、雌ずいが形成される領域に花卉形成が繰り返
- 20 して起こったためと考えられる。また、本組換えシクラメンの花茎の長さの平均値は、本組換えシクラメンが 8.0cm であり、非組換えシクラメンが 6.4cm であり、本組換えシクラ
- 25 の方が長くなったが、シクラメンの形質転換には植物ホルモン（ベンジルアデニン及びナフタレン酢酸）を使用することから、脱分化した細胞培養期間が長いことから培養変異が生じる可能性があり、このことから花茎の長さの相違は培養変異によって生じた可能性が高いと考えられる（藤野, 1991；宮本, 2002）。この花茎の長さにおいて認められた差異は 1.6cm（本組換えシクラメン 8.0±1.3cm、非組換えシクラメン 6.4±1.7cm）と小さく、この程度の差が競合における優位性を高めることは無いと考えられた。

以上のことから、本組換えシクラメンにおいて、CpAG2SRDX タンパク質の発現によって認められた花器官形成に関与する内在性遺伝子の発現及び代謝産物量の変化は、競合における優位性に関わるほど形態及び生育特性に影響を与えるものではないと考えられた。

- また、本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉数が増加しているが、そのことにより訪花昆虫相が変化する可能性が考えられる。しかし、シクラメンの開花盛期が 11 月～3 月と冬季で、施設内の温度管理のため出入り口及び側窓等を閉じるため、外部と遮断された状況になることで、訪花昆虫は少なくなることから、本組換え体を隔離ほ場で栽培することにより周辺の生物多様性に影響を与えるような訪花昆虫相の変化が起こる可能性は極めて低い。なお、本組換え体の栽培に伴う訪花昆虫相への影響については、隔離ほ場試験
- 30 において、温室内（側窓を開放した状態）及び屋外での試験を予定している。

また、本組換え体は、HPT タンパク質の発現によるハイグロマイシン耐性を有するが、ハイグロマイシンが散布されることが想定しにくい自然条件下において、ハイグロマイシン耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

- 以上のこと及び本組換えシクラメンが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ
- 35 場で使用されることから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的評価

—

5

(3) 影響の生じやすさの評価

—

10 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えシクラメンは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

15

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

20 シクラメンは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでにシクラメンにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

本組換え体が産生する **CpAG2SRDX** タンパク質及び **HPT** タンパク質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている（第一・2・(1)・ロ・② (p16,p18)）。また、**CpAG2** タンパク質及び **CpAG2SRDX** タンパク質は、既知酵素タンパク質との間に構造相同性が無いことが確認されている。したがって、本タンパク質が酵素活性を示すことはないと考えられる（第一・2・(1)・ロ・③ (p19)）。

30 本組換え体において **CpAG2** は、雄ずいと雌ずいでのみで発現し、葉では発現していないことから、**CpAG2** タンパク質は、雄ずい及び雌ずい形成の制御に関与し、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、基本的な代謝系に影響を及ぼすという報告はない。そのため、**CpAG2SRDX** タンパク質についても、宿主の持つ代謝系を変化させることはなく、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい（第一・2・(1)・ロ・③ (p19)）。

35 また、本組換えシクラメン中で **CpAG2SRDX** タンパク質が発現することによる、代謝産物の変化についてメタボローム解析により本組換えシクラメンと非組換えシクラメンとの間で比較した結果、既存の代謝産物量に増減が認められた。そのうち、組換え体に共通し

て変化した代謝産物は、減少したものは無く、増加したものは 16 種であったが、増加倍数比は最大 5.62 倍であり、増減幅も比較的小さいと考えられた（第一・2・(1)・ロ・②・2・2) (p15~16)。

実際に、本組換えシクラメンと対照の非組換えシクラメンの有害物質の産生性の有無を、
5 鋤き込み試験及び後作試験により比較検討した結果、いずれの項目においても統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5, p7~9）。さらに、土壤微生物相試験の結果、糸状菌、細菌、放線菌に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5, p10）。したがって、上記試験において有害物質の産生性を高める形質は認められなかった。

以上のこと及び本組換えシクラメンを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ
10 場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（2）影響の具体的評価

—

（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

以上のことから、本組換えシクラメンは、限定された環境で一定の作業要領を備えた
隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、
25 有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

3. 交雑性

（1）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

シクラメンの園芸種において交雑可能な植物は、野生種のシクラメン・ペルシカムのみ
30 である。しかし、我が国の自然条件下において、シクラメンの近縁野生種の生育は報告されていない。

以上のことから、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考えられた。

（2）影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

5

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの判断

10 以上のことから、本組換えシクラメンは、交雑に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4. その他の性質

15

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

第一・2・(6)・② (p26~28) に記載したとおり、本組換えシクラメンの宿主の特性、導入遺伝子の特性及び生理学的又は生態学的特性データを考慮し、本組換えシクラメンの隔離ほ場で使用する場合の生物多様性影響を評価した。

競合における優位性：

シクラメンは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国においてシクラメンが自然条件下で生育している例は報告されていない。

CpAG2SRDX タンパク質が内在性遺伝子の発現に与える影響を遺伝子発現解析により調査した結果、本組換えシクラメンでは、転写抑制因子の CpAG2SRDX タンパク質によって内在遺伝子の転写が抑制され、CpAG2のターゲット遺伝子を含む、少なくとも4種類の遺伝子の発現が変化すると考えられた(第一・2・(1)・ロ・②・2・1), (p14))。シクラメンにおける CpAG2 の発現が、雄ずいと雌ずいに限られていることから、CpAG2SRDX タンパク質が影響を及ぼす遺伝子は、シクラメンの花器官形成に関与する遺伝子に限定されたと考えられた。CpAG2SRDX タンパク質の発現がシクラメンの代謝系に与える影響を全代謝産物の網羅的なメタボローム解析により調査した結果、組換えシクラメンで複数の代謝物に変化が認められた。これらの化合物情報はいずれも植物由来の成分であり、有機化合物、精油及び糖類が含まれていたが、植物の生長や形態形成に影響を及ぼすと考えられるアミノ酸類や植物ホルモン類は認められなかった。また、増減した代謝産物の割合は全代謝産物の0.234%と比較的小さいと考えられた(第一・2・(1)・ロ・②・2・2) (p15~16))。したがって、花器官形成に影響を与えると考えられる代謝産物は特定されなかったことから、CpAG2SRDX タンパク質は、雄ずい及び雌ずいのみで機能する転写抑制因子として、雌ずいの花卉化に関与していると考えられた。

CpAG2SRDX タンパク質による花器官形成に関与する内在性遺伝子の発現及び代謝産物の変化が、本組換えシクラメンの競合における優位性を高めるかについて、本組換えシクラメンと対照の非組換えシクラメンの競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性；第一・2・(6)・② (p26~28))を比較した結果、花茎の長さにおいて、統計学的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%) が認められたが、この相違は培養変異によって生じた可能性が高いと考えられた。この花茎の長さにおいて認められた差異は小さく、この程度の差が競合における優位性を高めることは無いと考えられた。

したがって、本組換えシクラメンの競合における優位性は高まっていないと考えられた。

本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉数が増加しているが、そのことにより訪花昆虫相が変化する可能性が考えられる。本組換え体の栽培に伴う訪花昆虫相への影響については、隔離ほ場試験において、温室内(側窓を開放した状態)及び屋外での試験を予定

している。

本組換え体は HPT タンパク質の発現によるハイグロマイシン耐性を有するが、ハイグロマイシンが散布されることが想定しにくい自然条件下において、ハイグロマイシン耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

- 5 以上のことから、本組換えシクラメンは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにそれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性：

10

シクラメンは、我が国において長期間の使用等の歴史があるが、これまでに我が国も含めシクラメン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。

- 15 また、本組換え体が産生する CpAG2SRDX タンパク質及び HPT タンパク質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている（第一・2・(1)・ロ・② (p16, p18)）。CpAG2SRDX タンパク質は、既知酵素タンパク質との間に構造相同性が無いことが確認されており、酵素活性を示すことはないと考えられる（第一・2・(1)・ロ・③ (p19)）。また、CpAG2SRDX タンパク質の作用から、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる。また、メタボ
20 ローム解析により本組換えシクラメンと非組換えシクラメンとの間で、既存の代謝産物の量に増減が認められたが、その割合は全代謝産物の 0.234%で、増減幅も比較的小さいと考えられた（第一・2・(1)・ロ・② (p15～16)）。

- 25 実際に、本組換えシクラメンと対照の非組換えシクラメンの有害物質の産生性の有無を、鋤き込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験により比較検討した結果、いずれの項目についても統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本組換えシクラメンは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにそれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。

- 30 交雑性：

シクラメンの園芸種において交雑可能な植物は、野生種のシクラメン・ペルシカムのみである。しかし、我が国の自然条件下において、シクラメンの近縁野生種の生育は報告されていない。

- 35 以上のことから、本組換えシクラメンは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合評価として、本組換えシクラメンは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

5

10

15

20

25

30

35

引用文献

- Affre, L., Thompson, J. D., Debussche, M. (1995). The reproductive biology of the mediterranean endemic *Cyclamen balearicum* Willk. (*Primulaceae*). Botanical Journal of the Linnean Society, 118(4), 309-330.
- Aida, R., Hirose, Y., Kishimoto, S., Shibata, M. (1999). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Science 148, 1-7.
- Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson, D. V., Kemp, J. D. (1983). Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Molecular Biology. 2(6), 335-350.
- Bevan, M., Barnes, W. M., Chilton, M.-D. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. Nucleic Acids Research. 11, 369-385.
- Bowman J. L., Smyth D. R., Meyerowitz E. M. (1998) Genes directing flower development in Arabidopsis. The Plant Cell. 1, 37-52.
- Buchmann, S. L., Jones, C. E., Little, R. J. (1983). Buzz pollination in angiosperms. Handbook of experimental pollination biology, 73-113.
- Cross, M. A., Warne, S. R., Thomas, C. M. (1986). Analysis of the vegetative replication origin of broad-host-range plasmid RK2 by transposon mutagenesis. Plasmid 15 (2), 132-146.
- Davies B., Motte P., Keck E., Saedler H., Sommer H., Schwarz-Sommer Z. (1999). PLENA and FARINELLI: redundancy and regulatory interactions between two Antirrhinum MADS - box factors controlling flower development. The EMBO Journal. 18, 4023-4034.
- Dubois A., Raymond O., Maene M., Baudino S., Langlade N. B., Boltz V., Vergne P., Bendahmane M. (2010) Tinkering with the C-Function: A Molecular Frame for the Selection of Double Flowers in Cultivated Roses. PLoS ONE. 5 (2), e9288
- Ebert, P.R., Ha, S. B., An, G. (1987). Identification of an essential upstream element in

the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. Proceedings of the National Academy of Sciences 84 (16), 5745-5749.

5 Frisch, D. A., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Thomas, T. L., Hardin, S.H., Hall, T.C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. Plant Molecular Biology 27 (2), 405-409.

Gallie, D. R. (2002). The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. Nucleic Acids Research 30(15), 3401-3411.

10 Geier, T. (1977). Morphogenesis and regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. Acta Horticulturae 78, 167-175.

15 Grey-Wilson, C. Cyclamen: A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists. London: B T Batsford. (2002) 47-49.

Gritz, L., Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 25 (2-3), 179-188.

20 Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., Ohme-Takagi, M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. The Plant Journal, 34(5), 733-739.

25 Ikeda, M., Ohme-Takagi, M. (2009). A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. Plant and cell physiology, 50(5), 970-975.

30 Ishizaka, H., Uematsu, J. (1992). Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture. Japan Breed, 42(2), 353-366.

Ishizaka, H., Uematsu, J. (1995). Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. Euphytica, 82(1), 31-37.

35 Ishizaka, H. (1996). Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*. Euphytica, 91(1), 109-117.

- Ito,T., Wellmer, F., Yu,H., Das,P., Ito, N., Alves-Ferreira,M., Riechmann, J. L., Meyerowitz, E.M. (2004). The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of SPOROCTELESS, *Nature*, 430, 356-360.
- 5
- Ito, T., Ng, K.H., Lima,T.S., Yu, H., Meyerowitz, E.M. (2007). The Homeotic Protein AGAMOUS Controls Late Stamen Development by Regulating a Jasmonate Biosynthetic Gene in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 19 (11), 3516-3529.
- 10
- Legro, R. A. H. (1959). The cytological background of Cyclamen breeding. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 59, 1–51.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G., Laux, T., (2001). Termination of Stem Cell Maintenance in Arabidopsis Floral Meristems by Interactions between WUSCHEL and AGAMOUS, *Cell*, 105 (6), 805–814.
- 15
- Liljegren, S.J.,Ditta,G.S., Eshed,Y., Savidge. B., Bowman. J.L., Yanofsky, M.F. (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*, *Nature*, 404, 766-770.
- 20
- Marc, D. B. (1990). Factors influencing the tissue culture and the Agrobacterium tumefaciens-Mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiology* 93. 1110-1116.
- 25
- Mitsuda, N., Hiratsu, K., Todaka, D., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M. (2006). Efficient production of male and female sterile plants by expression of a chimeric repressor in Arabidopsis and rice. *Plant Biotechnology Journal*, 4(3), 325-332.
- 30
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Ohashi, Y. (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 37(1), 49-59.
- 35
- Nitasaka E. (2003) Insertion of an En/Spm-related transposable element into a floral homeotic gene DUPLICATED causes a double flower phenotype in the Japanese

morning glory. The Plant Journal. 36, 522-531.

Oka, A., Nomura, N., Morita, M., Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M. (1979).
Nucleotide sequence of small ColE1 derivatives: structure of the regions essential
for autonomous replication and colicin E1 immunity. Molecular Genomics and
Genetics. 172 (2), 151-159.

Rao, R. N., Allen, N. E., Hobbs, J. N. Jr, Alborn, W. E., Kirst, H. A., Paschal., J. W. (1983).
Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 24, 689-695.

Sage-Ono, K., Ozeki, Y., Hiyama, S., Higuchi, Y., Kamada, H., Mitsuda, N., Ono, M.
(2011). Induction of double flowers in *Pharbitis nil* using a class-C MADS-box
transcription factor with Chimeric REpressor gene-Silencing Technology. Plant
Biotechnology, 28(2), 153-165.

Savidge, B., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F., (1995). Temporal relationship between the
transcription of two Arabidopsis MADS box genes and the floral organ identity
genes. The Plant Cell, 7, 721-733.

Schwartz-Tzachor, R., Dafni, A., Potts, S.G., Eisikowitch, S.G. (2006). D. An ancient pollinator of
a contemporary plant (*Cyclamen persicum*): When pollination syndromes break
down. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 201(5),
370-373.

Sun, B., Xu, Y., Ng, K.H., Ito, T. (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance
and differentiation in the Arabidopsis floral meristem, Genes & Development, 23,
1791-1804.

Tanaka, Y., Yamamura, T., Terakawa, T. (2011). Identification and expression analysis
of the *Cyclamen persicum* MADS-box gene family. Plant Biotechnology, 28(2),
167-172.

Tanaka, Y., Yamamura, T., Oshima, Y., Mitsuda, N., Koyama, T., Masaru, O. T.,
Terakawa, T. (2011). Creating ruffled flower petals in *Cyclamen persicum* by
expression of the chimeric cyclamen TCP repressor. Plant Biotechnology, 28(2),

141-147.

Tanaka, Y., Oshima, Y., Yamamura, T., Sugiyama, M., Mitsuda, N., Ohtsubo, N.
Terakawa, T. (2013). Multi-petal cyclamen flowers produced by AGAMOUS
5 chimeric repressor expression. Scientific Reports, 3, 1-5.

Trieu-Cuot, P. Courvalin, P. (1983) Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis*
plasmid gene encoding the 3'5'-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*
23 (3), 331-341.

10 Yamaguchi T., Dong-Yeon L., Miyao A., Hirochika H., Gynheung A., Hirano H. (2005)
Functional Diversification of the Two C-Class MADS Box Genes OSMADS3 and
OSMADS58 in *Oryza sativa*. *Plant Cell* January 18, 15-28.

15 阿部定夫、岡田正順、小西国義、樋口春三 (1986) 花卉園芸の事典 pp.270-275 朝倉書
店

石垣要吾 (2010) シクラメンの世代促進による育種年限の短縮に関する研究 岐阜県中山
間農業研究所研究報告 6, 7-12.

20 伊藤寿朗 (2005) 花の形づくりを制御する遺伝子ネットワーク - ホメオティック遺伝子に
よる生殖器官誘導. 蛋白質核酸酵素 50(3), 228-238.

大野史朗 (1978) 農業事物起源集成 26 青史社

25 金浜耕基 (2013) 観賞園芸学 pp.185-188 文永堂出版

狩野邦雄、佐藤義機 (1967) シクラメンの芽ざし繁殖法 42, 1526-1528 農及園

30 神田多 (1995) 農業技術大系、花卉編 第 5 編 育種／苗生産／バイオ活用 695-699 農
文協

後藤弘爾 (2002) 花を形づくる遺伝子 岡田清孝ら編 植物の形づくり・遺伝子から見た分
子メカニズム. 蛋白質核酸酵素 47, 1552-1556. 共立出版社

35 駒形智幸 (1995) 農業技術大系、花卉編 第 10 編 シクラメン／球根類 58 の 8-58 の

15 農文協

住井正康（1995）農業技術大系、花卉編 第 10 編 シクラメン／球根類 49 の 59 農文協

- 5 高村武二郎、中尾友美、田中道男（1996）人工培地上でのシクラメン花粉の発芽に及ぼす光および温度の影響、香川大学農学部学術報告、48(1), 39-45.

竹下繁、伴千代子、藤枝國光（1984）シクラメンの採種試験 九州大学農学部農場研究資料 7, 92-95.

10

竹下繁、伴千代子、梅谷久輝、藤枝國光（1985）シクラメンの採種試験 九州大学農学部農場研究資料 8, 32-37.

塚本洋太郎（1994）園芸植物大辞典 pp.1110-1115 小学館

15

鶴島久男（2008）最新花き園芸ハンドブック pp.572-586 養賢堂

苫名孝、浅平端（1987）園芸ハンドブック 講談社

- 20 中山昌明（1983）塊茎分球によるシクラメンの栄養繁殖についての研究 信州大学農学部紀要 20(1), 9-82.

藤野守弘（1991）花きの組織培養における変異の発生 バイオホルティ 誠文堂新光社 4, 15-18.

25

藤巻宏、山元皓二、鶴飼保雄、藤本文弘（1992）植物育種学〈上 基礎編〉pp.50-51 培風館

不破規智 （2001）牧草と園芸 第 49 巻 第 12 号

30

前田茂一 （1995）農業技術大系、花卉編 第 10 編 シクラメン／球根類 pp.1-6 農文協

宮本芳城、小畑利光、加藤一人（2002）シュッコンカスミソウの育種に関する研究、第 2 報、新品種‘紀州霞 1 号’の育成経過と特性、和歌山県農林水産技術センター研究報告 4, 33-41.

35

緊急措置計画書

平成 26 年 11 月 25 日

- 5

氏名 国立大学法人 筑波大学
学長 永田 恭介 印
住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
- 10

氏名 北興化学工業株式会社
代表取締役社長 中島 喜勝 印
住所 東京都中央区日本橋本石町四丁目 4 番 2 0 号

15 第一種使用規程の承認を申請している雌ずい花卉化八重咲きシクラメン（*CpAG2SRDX*, *Cyclamen persicum* Mill.）（AGM16）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置をとるための実施体制及び責任者

平成 27 年 9 月 1 日現在

筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会 委員	
◎	筑波大学遺伝子実験センター 准教授 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
○	筑波大学遺伝子実験センター長 教授
個人情報 のため 非開示	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学生命環境系 准教授
	筑波大学人文社会系 教授
	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学生命環境系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	食品総合研究所 ユニット長

北興化学工業株式会社組換えDNA実験安全委員会 委員	
個人情報のため 非開示	北興化学工業株式会社開発研究所 所長 神奈川県厚木市戸田 2 1 6 5
	北興化学工業株式会社開発研究所 審議役
	北興化学工業株式会社開発研究所創製研究部チームマネージャー

◎栽培試験責任者 ○管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- 5 管理責任者及び栽培試験責任者は、第一種使用等の状況に関し、筑波大学遺伝子実験センター及び北興化学工業株式会社開発研究所実験従事者等から常に可能な限り情報収集を行う。

また、筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会は委員による査察を行う。

- 10 3 第一種使用等をしている者に緊急措置に従って対処する必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

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

15

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

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

25

- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

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

30

隔離ほ場試験計画書

第一部 受容環境

5 1. 隔離ほ場の所在地等

(1) 名称：筑波大学遺伝子実験センター 模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場）

(2) 住所：茨城県つくば市天王台一丁目1番1号

10 (3) 電話番号：029-853-6006

(4) 地図：図1及び2（p51-52）参照

2. 責任者等

15 (1) 隔離ほ場試験の責任者：【個人情報につき非開示】筑波大学遺伝子実験センター

(2) 隔離ほ場管理責任者：【個人情報につき非開示】筑波大学遺伝子実験センター

3. 試験期間

20 承認日から平成30年3月31日まで

4. 施設概要

部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、高さ230cmのフェンス（有刺鉄線、メッシュフェンス（メッシュの大きさ、縦110 x 横46 mm）、コンクリート
25 基部）を設置している。隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。槌、遺伝子組換え体の残渣等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、遺伝子組換え体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している（図3、p53）。

30

5. 面積

(1) 隔離ほ場全体の面積：851 m²

(2) 試験に使用する面積：約18.6 m²

35

(3) 試験区の配置図：図1及び図2（p51-52）参照

6. 隔離ほ場の周辺環境

(1) 隔離ほ場周辺の地形

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

(2) 土地利用状況

10 隔離ほ場の周辺は大学構内である。隔離ほ場の周辺は防風林で囲われ、また、大学の周辺は、畑、民家が散在している。隔離ほ場から半径 500m の範囲でシクラメン栽培農家はない。

(3) 周辺の環境保護区

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

(4) 気象条件の平年値

20 ① 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における気象データの平年値を表 1（p54）に示した。

② 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における過去 3 年分の気象データを表 2（p55）に示した。

25

(5) 台風の襲来履歴

隔離ほ場がある関東地域への過去 10 年間の台風の接近数を表 3（p56）に示す（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ）。

(6) 過去 10 年間の隔離ほ場冠水の状況

30 隔離ほ場が位置する大学構内において、過去 10 年間にわたって冠水した記録はない。

(7) 強風による被害の状況

35 隔離ほ場が位置する大学構内において、過去 10 年間にわたって被害を受けた記録はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

つくば市の洪水ハザードマップでは浸水が想定される区域とはなっていない。

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

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

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

10

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

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

15

7. 隔離ほ場周辺の生物相

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

20 影響を受ける可能性のある野生動物等はない

(2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

交雑可能な近縁野生種はない

25 8. 栽培管理

(1) 栽培履歴

新規に設置したため栽培履歴はない

(2) 気象災害時の対応

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

(3) 栽培終了後の利用計画

35 ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場にすき込む等の適切な手段で対処する。なお、本遺伝子組換えシクラメンの栽培終了後も、本隔離ほ場では遺伝子組換え植物の栽培を行う予定である。

(4) 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

①隔離ほ場の施設

5 1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている

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

15 3) 温室の出入り口及び側窓に防鳥網を設置している。隔離ほ場周辺には、東側に防風のための街路樹がある。

②隔離ほ場での作業要領

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

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

25 3) 上記2)により運搬、又は保管する場合を除き、組換え作物の栽培終了後は、当該作物及び比較対照の作物を細断して隔離ほ場内にすき込み、または、細断後、オートクレーブ等により確実に不活化する。

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

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

6) 1) から5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

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

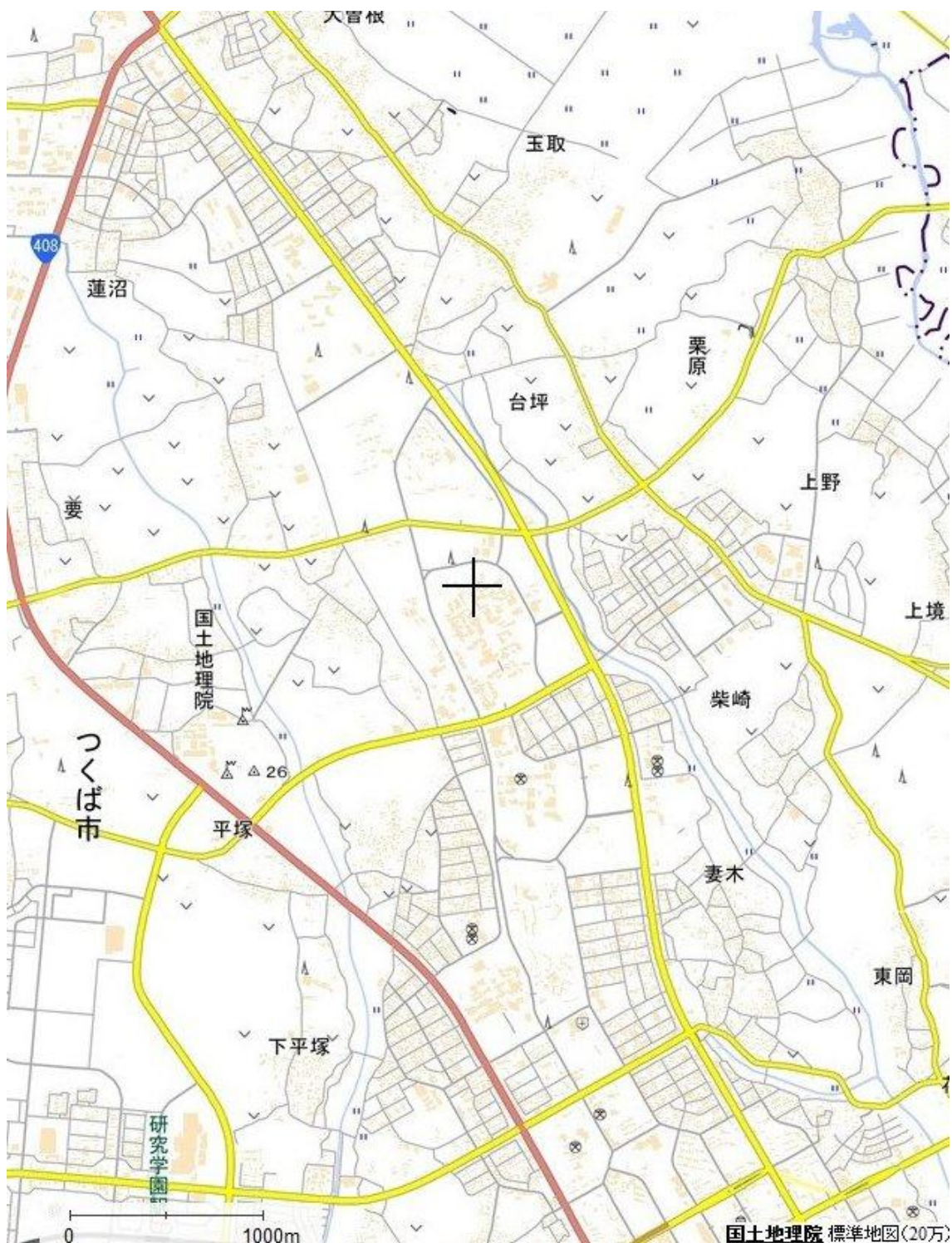
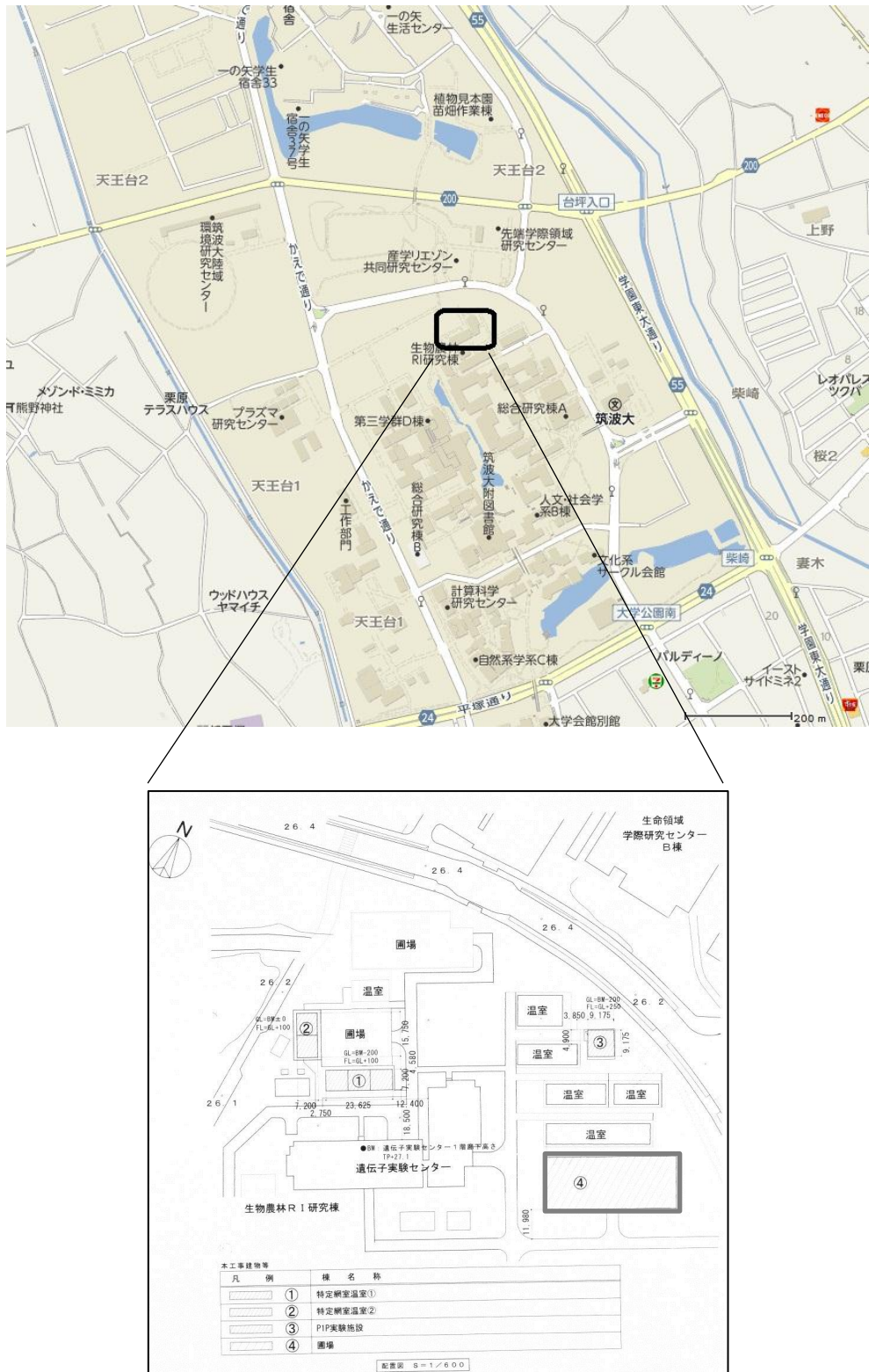


図1 隔離ほ場所在地に関する地図（国土地理院ウェブサービスより）



5

図2 遺伝子実験センターの所在および隔離ほ場の配置図



隔離ほ場外周



隔離ほ場内部

(ビニール温室 A 設置場所)



洗い場

図 3 隔離ほ場の設備

表 1 隔離ほ場周辺における気象データの平年値

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

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

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2014 年 9 月 2 日)

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

10

15

20

25

表 2 隔離ほ場周辺の過去 3 年分の気象データ

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

月	降水量(mm)				気温(℃)					風速(m/s)					日照時間 (h)
	合計	最大			平均			最高	最低	平均	最大		最大瞬間		
		1日	1時間	10分間	日平均	日最高	日最低				風速	風向	風速	風向	
2013年															
1	49	40.5	6.5	1.5	2.4	8.9	-3.4	14.3	-7.3	2.2	9.6	西北西	16.5	北西	218.7
2	31.5	14	4.5	1	3.5	9.4	-2.3	18.5	-7.6	2.5	10.6	北西	19.5	西北西	181.6
3	45	11.5	9	2.5	10	16	3.7	26.6	-2.6	3.1	15.1	南南西	27.7	南南西	187.1
4	167.5	43.5	15	10.5	12.8	18.5	6.3	24.2	-0.2	3.2	12.2	南南西	22.2	南西	202.4
5	81.5	21	10	5	17.3	23.3	11.6	28.6	1.7	2.6	7.8	南	13.3	南	243.9
6	138	45.5	15.5	6.5	20.9	25.3	17.5	29.6	10.8	2.3	7.7	南南西	13.8	南西	126.1
7	45.5	25.5	22.5	12.5	24.9	29.9	21.1	36.3	17.1	2.4	7.2	南南西	15.3	北北西	170.7
8	70.5	29.5	19	10	27.2	32.6	22.7	36.8	18.4	2.2	6.8	南南西	14.4	北東	221.4
9	175	74	22.5	11.5	22.9	27.8	18.3	35.2	9	2.4	12.2	南南西	22.9	南南西	172.3
10	417	124.5	27	8	17.8	22.2	13.8	30.4	5.1	2.4	14.5	北北西	28.1	北北西	122.6
11	16	7	4.5	1.5	9.8	16.6	3.8	21.2	-1.9	1.8	8.2	南南西	19.1	南南西	185.3
12	45.5	17.5	4	2	4.8	11.2	-1	16.2	-5.6	2.2	9.3	南南西	17.3	西	192.7
2012年															
1	36.5	14	4.5	1	1.7	7.8	-4.2	11.5	-8.1	2.3	9.1	西北西	16.4	北	206.2
2	50.0	12.5	3.5	1.0	2.9	8.2	-2.6	13.8	-8.8	2.3	8.6	西北西	17.0	西	161.1
3	127.5	32	8.5	4.5	7	12.3	1.6	19.7	-3.8	2.6	12.2	南南西	23.2	南西	155.9
4	124.5	35.5	18	6.5	12.4	18.1	6.6	27	-2.5	2.8	14.8	南	27.3	南	174
5	228.5	59	20	12.5	17.7	23.2	12.6	27.6	4.9	2.5	12.1	南	18.7	南	200.2
6	175	76	23	6.5	19.5	24	15.7	30.7	11.5	2.6	14.5	南	27.2	南南西	162.7
7	112.5	46.5	29	8.5	25	29.5	21.3	35.6	16.8	2.6	9.2	南	16.9	南	185.9
8	14.5	7.5	6.5	2.5	27.3	32.9	22.7	35.1	18.6	2.3	7	南	15.1	南	266.7
9	193.5	44.5	39	13.5	24.2	29	20.5	32.9	15	2.4	14.3	南	25.2	南	170.6
10	170.5	57	27.5	13	16.9	22.2	11.9	30.7	5.4	2.3	12.8	南南西	20.1	南	171.5
11	92	41	14	5	9.5	15.3	3.8	20.7	-1.6	2	9.9	北西	18.2	北	162.2
12	70.5	36.5	14	3.5	4	9.8	-1.6	18.1	-7.3	2.2	10.2	北北西	17.9	北西	177.3
2011年															
1	0	0	0	0	2.1	8.8	-4.2	12.9	-8.4	2.4	8.8	西北西	17.3	北北西	259.1
2	104.5	36	10.5	3	4.9	10.8	-1.1	21.5	-5.3	2.3	8.9	北西	16.6	西北西	156.6
3	74	23.5	5.5	1.5	5.8	12.2	-0.5	20.7	-5.6	2.6	9.2	西北西	18	西	224.9
4	74.5	27	7.5	4.5	12.4	18.9	5.7	26.7	-3.1	2.9	11.9	南	20.9	南	198.5
5	210	47.5	27	9	16.7	21.6	12.2	27.5	8.5	2.6	12.5	南南西	22.1	南南西	138.0
6	138.5	34	30.5	8	21.4	25.8	17.6	34	10.1	2.1	6.8	南南西	12	南西	117.2
7	184	39.5	38	15.5	25.9	30.6	21.9	35.3	14.9	2.4	8.4	南南西	16.1	北東	183.5
8	142.5	91.5	27.5	11.5	26.1	30.7	22.6	36.5	19.3	2.1	5.8	南	11	東	188.3
9	186	141	31	16	23.5	28.4	19.4	33.3	11.6	2.6	16.9	南	28.5	南南西	186.6
10	160.5	76.5	26.5	8.5	17.3	21.9	12.7	27.8	4.0	2.1	8.8	南南西	16.3	南南西	142.5
11	79	51	10.5	3	11.6	17.3	6.5	22.1	-1.1	1.7	8.2	南南西	16.6	南南西	153.2
12	41	23	6.5	1.5	4.3	10.3	-1.4	16.1	-5.2	2.2	9	西北西	17.3	北西	191.9

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2014 年 9 月 2 日)

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

10

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2012&month=&day=&view=p1
http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2011&month=&day=&view=p1

15

表 3 関東地域への過去 10 年間の台風の接近数

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ、アクセス 2014 年 9 月 2 日)

年	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	年間
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3
2004					1	1		2	1	2			7

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

10

15

20

25

第二部 隔離ほ場での試験計画

隔離ほ場での遺伝子組換えシクラメン生物多様性影響評価試験の研究調査項目として、次の5項目を予定している。また、特定網室における調査結果との関連は表1 (p4-5) に記載した。

- (1) 花器官の形態に関する調査
- (2) 形態及び生育特性に関する調査
- (3) 越冬性、越夏性に関する調査
- (4) 有害物質の産生性に関する調査
- (5) 訪花昆虫相の調査

それぞれの項目についての実験計画は以下のとおりである。

- (1) 花器官の形態に関する調査

目的：遺伝子組換えシクラメンの花器官形成の安定性を調査する。

場所：隔離ほ場のビニール温室 A

数量：宿主及び遺伝子組換えシクラメン各 20 鉢

実施方法：宿主及び遺伝子組換えシクラメンをプラスチック鉢に定植し、ビニール温室 A で栽培して、花の直径、花弁数、雄ずい及び雌ずいの形成有無について調査し、比較する。

- (2) 形態及び生育特性に関する調査

目的：遺伝子組換えシクラメンの形態及び生育特性について調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室 A

数量：宿主及び遺伝子組換えシクラメン各 20 鉢（試験（1）と兼ねる）

実施方法：宿主及び遺伝子組換えシクラメンをプラスチック鉢に定植し、ビニール温室 A で栽培して、形態に関する各項目、生育速度及び開花時期について調査し、比較する。

- (3) 越冬性、越夏性に関する調査

目的：遺伝子組換えシクラメンの越冬性、越夏性を宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室 A 及び屋外 A

数量：宿主及び遺伝子組換えシクラメン各 10 鉢

実施方法：宿主及び遺伝子組換えシクラメンをプラスチック鉢に定植し、ビニール温室 A 及び隔離ほ場の屋外 A で栽培して、冬期間あるいは夏期間における植物体地上部の状態を観察し、宿主と比較する。

(4) 有害物質の産生性に関する調査

目的：遺伝子組換えシクラメンの有害物質の産生性を調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室 A

5 数量：宿主及び遺伝子組換えシクラメン各 10 鉢

実施方法：宿主及び遺伝子組換えシクラメンをプラスチック鉢に定植し、ビニール温室 A で栽培して、残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響を調査する。宿主及び遺伝子組換えシクラメンをプラスチック鉢に定植し、ビニール温室 A で栽培して、植物栽培土壌が種子発芽へ与える影響及び微生物に与える影響を調査する。

10

(5) 訪花昆虫相の調査

目的：遺伝子組換えシクラメンへの訪花昆虫相を調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室 A

15 数量：宿主及び遺伝子組換えシクラメン各 10 鉢

実施方法：晴天微風日を選び、宿主及び遺伝子組換えシクラメン（プラスチック鉢定植）に訪花する昆虫の採集と行動観察を行い、訪花昆虫の同定を行う。ビニール温室 A での栽培区については、ビニール温室の出入り口を開放し、同様の方法で訪花昆虫相の調査を行う。

20

25

30

35

表 1. 組換えシクラメン（AGM16）の生物多様性影響評価における調査項目の概要

調査項目	特定網 室試験	隔離ほ 場試験	調査方法	結果の概要 (特定網室)
1. 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性並びに染色体上に複数コピーが存在している場合は、隣接しているか離れているかの別	○		サザン解析により解析した	移入された配列は組換え体ゲノム中に、4 箇所（可能性として 6 箇所）に存在すると予測された。コピー数 6 と予測された。
2. 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性について、自然条件下での個体間及び世代間での安定性	○		RT-PCR 法により解析した。 栄養繁殖による個体間におけるその安定性を確認した。	移入された遺伝子は組換え体ゲノム中で安定的に発現し、繁殖個体間で安定していた。
3. 花器官形態の安定性	○	●	花弁数、雄ずい、雌ずい形成について調査した。 隔離ほ場における花形の安定性を調査予定。	組換え体の花弁数は増加し、雄ずい、雌ずい形成は認められなかった。
4. その他形態の特性	○	●	隔離ほ場における花形の安定性を調査予定。	宿主と組換え体間で花柄長において統計学的有意差が認められた。
5. 生育の特性	○	●	隔離ほ場における生育特性を調査予定。	宿主と組換え体間で差は認められなかった。
6. 成体の越冬又は越夏性		●	隔離ほ場における越冬又は越夏性を調査予定。	
7. 花粉の稔性	—	—		花粉形成が認められない。
8. 花粉のサイズ	—	—		花粉形成が認められない。

9. 種子の生産量	—	—		種子の形成が認められない。
10. 種子の休眠性及び発芽率	—	—		種子の形成が認められない。
11. 交雑率	—	—		花粉の形成が認められない。
12. 有害物質の産生性 鋤き込み試験	○	●	植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査した。	宿主と組換え体間で差は認められなかった。
後作試験	○	●	隔離ほ場における植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査する。	
土壌微生物相試験	○	●	植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査した。 隔離ほ場における植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査する。	宿主と組換え体間で差は認められなかった。
13. アグロバクテリウムの残存性	○		植物体を摩砕し、PCR 法によりアグロバクテリウムの残存性を調査した。	宿主と組換え体間で差は認められなかった。
14. 訪花昆虫相		●	隔離ほ場における訪花昆虫相を観察、調査予定。	

○：実施済み、●：実施予定

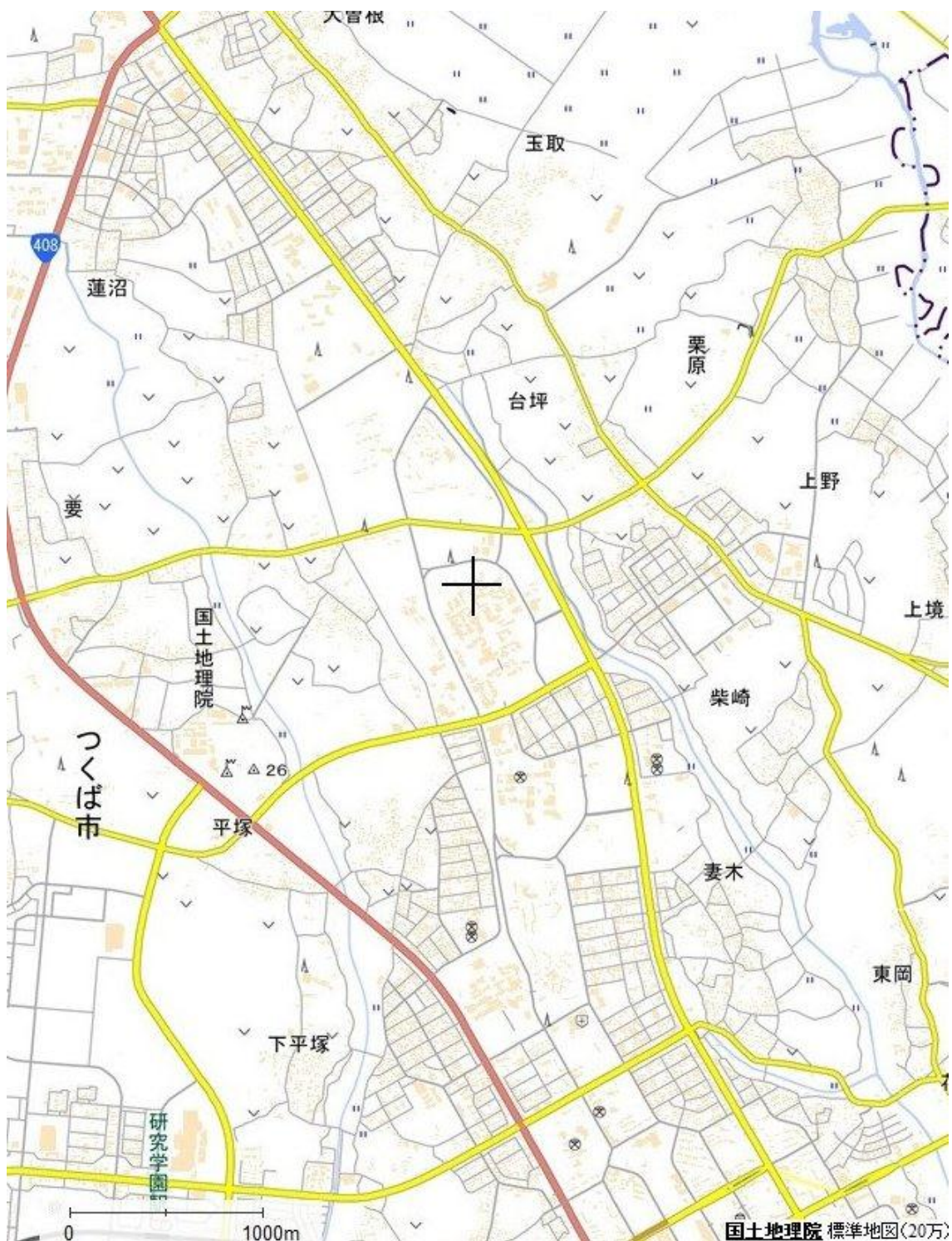


図 1. 筑波大学遺伝子実験センター周辺の地形図（国土地理院ウェブサービスより）隔離ほ場は+印に位置する

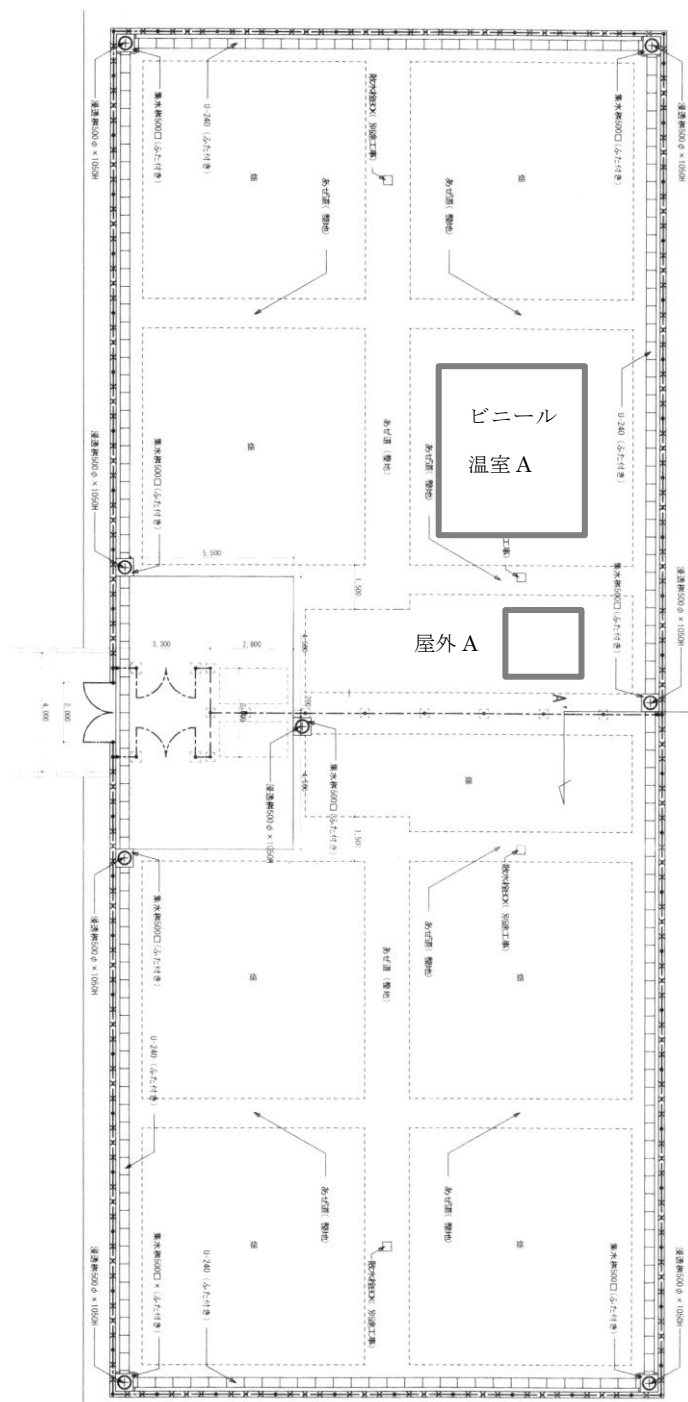


図 3. 隔離ほ場試験（ビニール温室 A、屋外 A）の試験区図
（□は本実験に使用する区画）

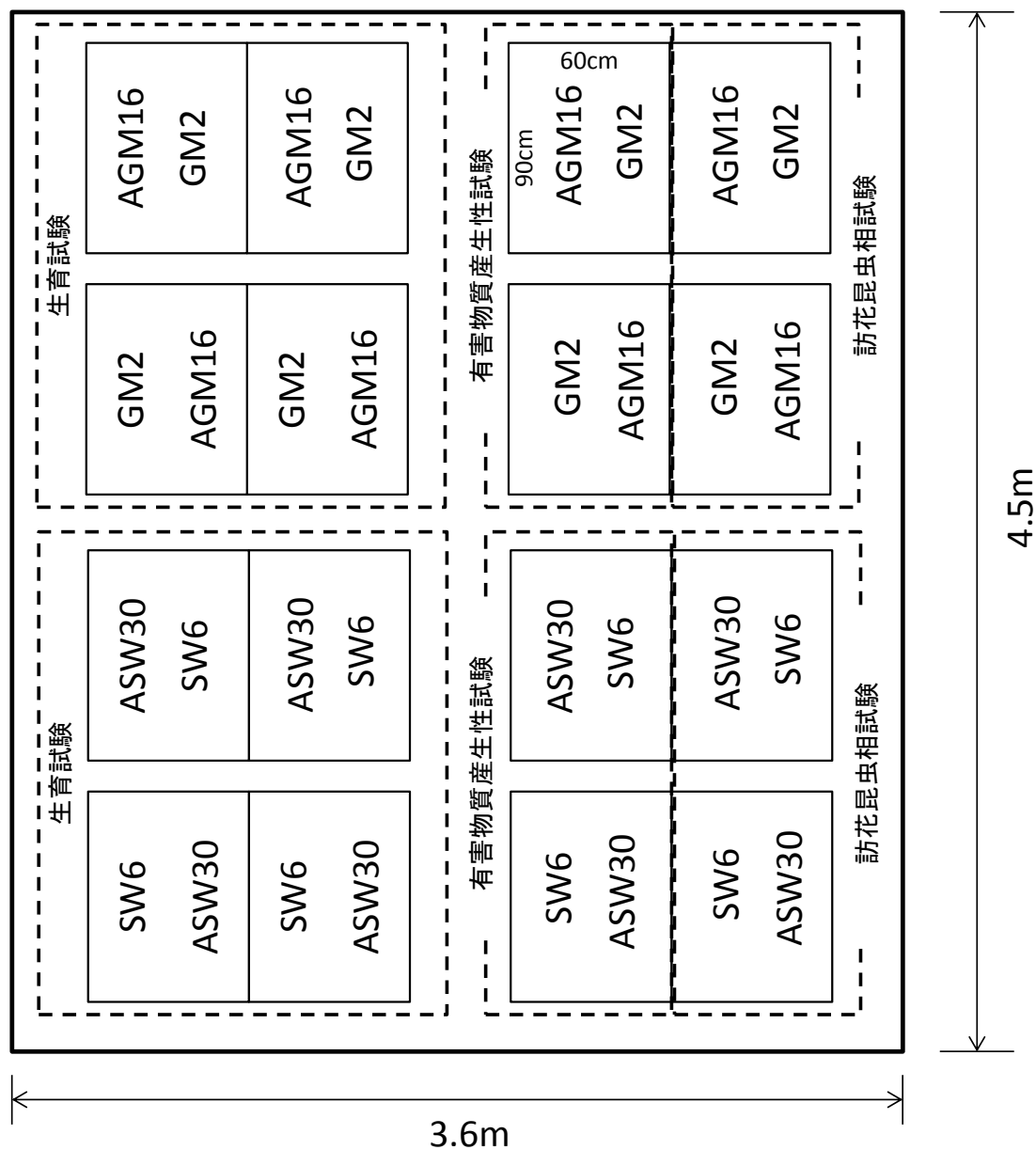


図 4. 隔離ほ場試験（ビニール温室 A）の試験区図

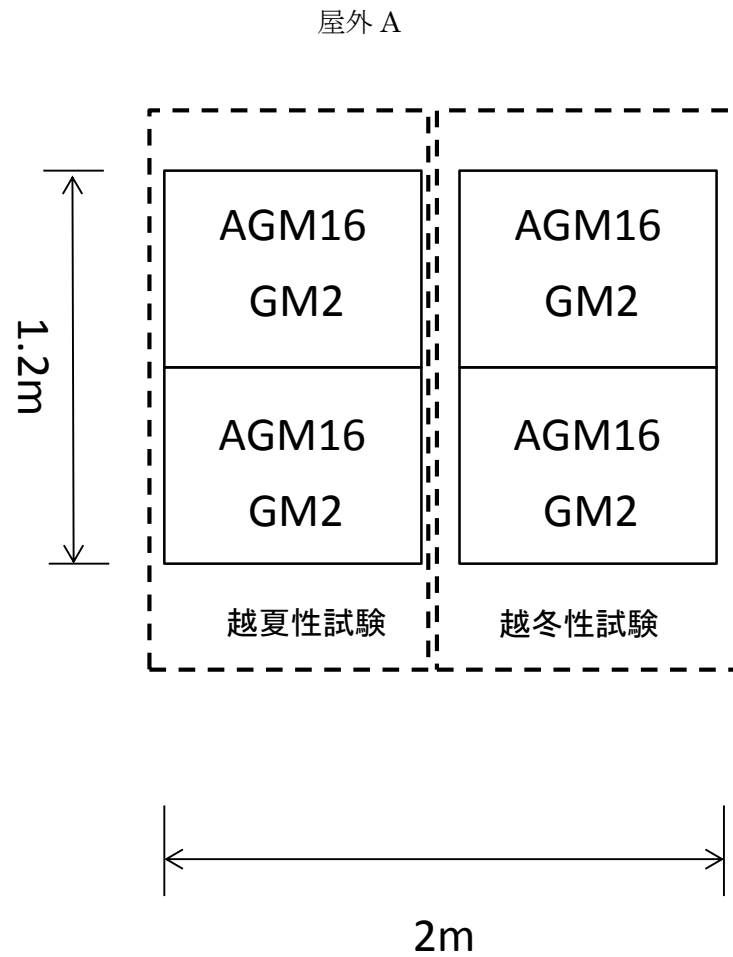


図 5. 隔離ほ場試験（屋外 A）の試験区図

添付資料リスト

- | | | |
|----|-----------|---|
| 5 | 1. 別添資料 1 | : 宿主内に移入された核酸全体の構成
社外秘情報につき非開示 |
| | 2. 別添資料 2 | : ベクターに関する情報
社外秘情報につき非開示 |
| 10 | 3. 別添資料 3 | : 細胞内に移入した核酸の存在状態、当該核酸による形質発現の安定性及び CpAG2 関連遺伝子の発現解析
社外秘情報につき非開示 |
| 15 | 4. 別添資料 4 | : 宿主における奇形花の調査
社外秘情報につき非開示 |
| | 5. 別添資料 5 | : 閉鎖系温室および特定網室における試験の結果
社外秘情報につき非開示 |
| 20 | 6. 別添資料 6 | : メタボローム解析
社外秘情報につき非開示 |