

青紫色及び除草剤クロロスルフロロン耐性カーネーション (*F3'5'H*, *DFR*, *dsDFR*, *surB*, *Dianthus caryophyllus* L.) (25958, OECD UI: IFD-25958-3) に関する生物多様性影響評価書の概要

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	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ. 基本的特性	6
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
二. 繁殖又は増殖の様式	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	7
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑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	7
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	9
ホ. 病原性	10
ヘ. 有害物質の産生性	10
ト. その他の情報	10
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	11
(1) 供与核酸に関する情報	11
イ. 構成及び構成要素の由来	11
ロ. 構成要素の機能	15
① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構	

成要素それぞれの機能	19
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨	23
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	23
(2) ベクターに関する情報	24
イ. 名称及び由来	24
ロ. 特性	24
① ベクターの塩基数及び塩基配列	24
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	24
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	24
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	24
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	24
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	24
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	25
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	25
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	25
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	26
(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	27
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	27
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	27
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	27
④ (6) の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	27
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動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	28
(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	28
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	28
① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容	28
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属す	

る分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	29
a 形態及び生育の特性	29
b 生育初期における低温又は高温耐性	29
c 成体の越冬性又は越夏性	30
d 花粉の稔性及びサイズ	30
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	30
f 交雑率	31
g 有害物質の産生性	31
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	32
(1) 使用等の内容	32
(2) 使用等の方法	32
(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	32
(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	32
(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	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	33
1. 競合における優位性	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
2. 有害物質の産生性	35
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	35
(2) 影響の具体的内容の評価	35
(3) 影響の生じやすさの評価	35
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	35
3. 交雑性	36
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	36
(2) 影響の具体的内容の評価	36
(3) 影響の生じやすさの評価	36
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
4. その他の性質	37

第三 生物多様性影響の総合的評価	38
参考文献	40
緊急措置計画書（栽培目的の場合）	43
緊急措置計画書（切り花の用に供する場合）	45
青紫色及び除草剤クロロスルフロン耐性カーネーション(<i>F3' 5' H, DFR, DSDFR, SURB, DIANTHUS CARYOPHYLLUS L.</i>) (25958, OECD UI: IFD-25958-3)の別添資料リスト	47

第一種使用規程承認申請書

平成 24 年 6 月 8 日

農林水産大臣

郡司 彰 殿

環境大臣

細野 豪志 殿

氏名 サントリーホールディングス株式会社
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	青紫色及び除草剤クロロスルフロ ン耐性カーネーション (<i>F3'5'H</i> , <i>DFR</i> , <i>dsDFR</i> , <i>surB</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> L.) (25958, OECD UI: IFD-25958-3)
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	—

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

5 ① 和名、英名及び学名

和名：カーネーション

英名：carnation

学名：*Dianthus caryophyllus* L.

10 ② 宿主の品種名又は系統名

宿主に用いたカーネーションの園芸種の品種名は CON4 で、スプレータイプの四季咲き品種である。アントシアニン合成経路 (図 2 p. 14) のうち、ペラルゴニン及びシアニジンを生産しているため明紅色を呈している。

15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

カーネーションの園芸種はナデシコ科 (Caryophyllaceae) ナデシコ属 (*Dianthus*) に属し、野生種 (*D. caryophyllus*) から高度に人為的に育種されてきたものである。ナデシコ科の植物は約 80 属 2000 種以上が北半球の温帯を中心に熱帯から寒帯にまで広く分布し、ナデシコ属に含まれる約 300 の種はヨーロッパ、地中海沿岸地域、アジア、熱帯及び南アフリカの山地などに自生する。野生種の *D. caryophyllus* は現在目にすることはできないが、地中海沿岸地域に自生していたといわれている (武田、1996 年¹⁾)。わが国においては、エゾカワラナデシコ (*D. superbus* L.)、ヒメハマナデシコ (*D. kiusianus* Makino)、ハマナデシコ (*D. japonicus* Thunb.)、シナノナデシコ (*D. shinanensis* (Yatabe) Makino) の 4 種と、エゾカワラナデシコの変種であるカワラナデシコ (*D. superbus* var. *longicalicinus* (Maxim.) F. N. Williams) 及びタカネナデシコ (*D. superbus* var. *speciosus* Reichb.) の 2 変種の近縁野生種が北海道から沖縄まで広く自生しているものの、カーネーションについては原種は現存せず、園芸種はわが国での自生は認められていない。園芸種は 10 世紀初め頃以来、長い間世界中で栽培されてきたが、わが国を含めて園芸種が自生化したという報告はない (Tutin, 1964²⁾; Otten, 1991³⁾)。

30

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

現在のカーネーションの園芸種は交雑種であり、原種の所在や栽培起源は明確ではない。わが国への園芸種の渡来は江戸時代の初期といわれており、オランダセキチクなど
5 と呼ばれていた（小西ら、1988年⁴⁾）。

わが国における園芸種の営利生産の始まりは、明治時代の末期にまでさかのぼり、米
国からの品種や苗の導入がきっかけであった。国内各地に栽培が広がり、営利生産が成
立するようになったのは大正時代以降で、戦後になってからは、国内切り花のなかでキ
クに次ぐ位置付けを占めるようになった。昭和40年代に入ると、切片テストや茎頂培養、
10 土壌消毒、隔離ベンチなどの技術革新が進み、安定した生産が期待できるようになった
ため施設栽培による大型経営が出現した（原、1996年⁵⁾）。

現在、カーネーションはバラやキクと並ぶ三大切り花として室内での観賞用に広く使
用されており、平成22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23年11月7日公表）によると、平成22年におけるわが国での切り花カーネ
ーションの年間出荷量は約3億4330万本であった。
15

国外では、古代ギリシャ時代に既にカーネーションは鑑賞されていたといわれるが、
広く栽培されるようになったのは16世紀に入ってからである。10世紀の初め南欧に侵
攻したノルマン人が原種を故国へ持ち帰り、イギリスへ伝えたといわれる説や、13世紀に
十字軍によって欧州に持ち込まれたとする説がある。16世紀にはイギリスにおいて本格
20 的な育種が始まり、17世紀の中頃までに基本の花色が出揃い、八重の花や大輪も既に出
現していた。現在の温室で栽培される園芸種は米国での品種改良に端を発しているが、
その元になる重要な素材は1852年以降にフランスから導入された`ウイエ・ド・マオ
ン'の系統であった。1939年米国で育成された`ウイリアム・シム'の優れた特性と300
種以上の枝変わり品種群（シム系）の充実により、やがて世界中に普及した。一方、イ
25 タリア、フランス、オランダ、イギリスなどでは、1960年頃から新たに地中海系と称さ
れる交雑品種群の育成が手がけられ、耐病性や花型などシム系にない特性によって、1980
年代から急速に普及し始めた。また、従来のスタンダードタイプ（1茎1花）とは異なる
スプレータイプ（1茎多花、房咲き）の育成と栽培が行われ始め、今ではスタンダー
ドタイプをしのぐ生産比率を占めるようになった（武田、1996年¹⁾）。

30

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

わが国のカーネーションの園芸種の営利栽培はすべて施設栽培であり、その産地は、南北に長い日本列島の気象条件を生かして形成され、太平洋岸の温暖地帯が冬半期を主体とした作型、高冷地や冷涼地が夏半期を主体とした作型によってそれぞれが住み分けられてきた。その後、経営規模の拡大に伴って、施設の重装備化が図られるようになってからは、作型は各産地とも周年化の傾向を強めており、最近では作型からみた産地の住み分けは不明確な状況にある（原、1996年⁵⁾。

わが国の気象条件からみて、施設栽培される園芸種は、夏季の高温が最も問題となる。気象的な制約から6~7月には改植せざるをえなくなるため、周年生産といえども出荷期が限定された1年1作の作型となっていることが多い（原、1996年⁵⁾。平成22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23年11月7日公表）によると、平成22年の園芸種の栽培面積は390haであった。

園芸種は、潤沢な光条件を好むため、栽培施設には透光性に優れた被覆資材の利用が求められる。このため、わが国での営利栽培も当初からガラス温室が対象にされていた。最近では、骨材の軽量化が図られやすい硬質板を利用したプラスチックハウスが増加傾向にある。栽培施設と品種選択との関係は、光線の量や質によって花色の発現が影響を受ける程度の比較によって、ガラス温室が絶対必要かどうか、あるいはハウスに向くかなどを決めているが、現在も一般的にはガラス温室がその基本施設となっている。なお園芸種は、一般に卸売市場を経て専門店やホームセンターなどの小売店に流通し、主に観賞用の切り花として利用されるか、あるいは鉢植えとして利用される（原、1996年⁵⁾。

一方、国外での切り花栽培は主にコロンビア、スペイン、ケニア、オランダ、イタリア、イスラエル、米国、中国である。コロンビア及びケニアは共に赤道直下の国でありながら標高の高い高地があり、花の栽培に適した気候と安くて豊富な労働力を活用して、切り花栽培が発展した。コロンビア、ケニアからの切り花輸出により、米国の切り花生産量は激減し、欧州の切り花生産量も減少傾向にある。コロンビアはわが国の輸入カーネーションのほぼ6割を占める。コロンビアでの切り花カーネーションの栽培は標高2,600mのボゴタ平原に集中し、そのほとんどがユーカリ材の柱にポリエチレンフィルムを張った雨よけ程度の簡便な施設で行われている。栽培はほとんどが2年切りで行われ、主要な輸出先は米国であったが、近年はヨーロッパ各国やわが国への輸出が増加してきている（池田、1996年⁶⁾。財団法人日本花普及センター発行の2009-2010フラワーデータブック（平成23年3月発行⁷⁾）によると、平成21年の園芸種の切り花輸入量は2億4870万本であった。輸入された切り花は一般に輸入業者から卸売市場を経て専門店やホームセンターなどの小売店に流通される。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

カーネーションの野生種は現存しないといわれており、野生種に関し該当する情報はない。現在のカーネーションの園芸種は四季咲きの多年草である。1茎1花のスタンダード系と1茎多花のスプレー系に大別される。花の重ねは一重、半八重、八重に区別され、花の形状は上から見た形状で円形と星形、側面から見た形状で盛咲、平咲、垂咲に区別されている。花径は極小輪から大輪 (2.5 cm ~ 9 cm) まで存在する。花色は赤、桃、白、黄、橙、紫、緑などほとんどの色があり、覆輪や絞りも存在する。草型はほとんどの品種が直立である (小西ら、1988年⁴⁾)。

- 10 宿主の CON4 は四季咲きのスプレー系カーネーションで、花は八重、円形の盛咲き。花径は約 6cm 程度であり、花色は明紅色。草型は直立である。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

- 15 0~5℃ぐらいには耐え得る半耐寒性の多年草で冷涼な温度を好む。昼温 15~20℃、夜温 10℃程度が最も好適な温度である。夏季の高温下でも枯死することはないが、生育は衰え、茎が細く軟弱になる。良質な切り花を生産するためには、高くても昼温 25℃、夜温 15℃までが許容範囲である。普通は温室内で栽培されるが、冬場でも気温が 0℃以下にならないわが国の西南部であれば露地での越冬が可能である。光は強いほど良く、わずかな遮光でも生育が悪くなる。カーネーションの園芸種の根は通気を好むので、腐植が多くて孔隙の多い土壌を用い、土壌水分張力が夏は pF1.5~2.0 で、冬は pF2.0~2.5 で灌水する。夏に乾燥させると生長が抑制されて、開花が著しく遅れる (米村、1996年⁸⁾、小西ら、1988年⁴⁾)。

ハ. 捕食性又は寄生性

25

二. 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

- 30 自然条件下における自殖、他殖はともに困難であり (p.5 ③a 参照)、自然条件下において種子繁殖が起こる可能性は極めて低い。したがって、種子繁殖は人為的にコントロールされた条件のもとで、稔性のある一部の品種でのみ可能である。

- 35 種子は果実の中に包含されており、自然条件下で落果はほとんど起こらない。落果のためには花卉を除く必要がある。例え落果したとしても、人為的に果実から種子を取り出さなければ、自然条件下で種子が果実の外に出ることはない。以上のことから自然条件下における種子の脱粒、飛散の可能性は極めて低い (Sparnaaij and Beeger, 1973⁹⁾ ; Keane, 1990¹⁰⁾)。

また、種子の休眠性はない(Keane, 1990¹⁰⁾)。

種子の寿命については、保存条件は不明であるが約2年間との報告がある(鶴島、1968年¹¹⁾)。乾燥低温下で保存した場合、10年以上発芽能を保持する(私信：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所 小野崎隆博士)。

5

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

自然条件下での栄養繁殖の可能性はない。自然条件下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もない。人為的には挿し芽による栄養繁殖が可能であり、これが商業生産のための主たる方法であるが、このためには環境条件の厳密なコントロールが必要である。

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

15

a. 自殖性及び他殖性の程度

品種間差はあるが、一般に花粉の生産量は極めて少なく、また雌雄生殖器官の成熟時期に差があり花粉が雌蕊より早く成熟するため、自然条件下での自殖は極めて困難といわれている(Keane, 1990¹⁰⁾; Nimura et al., 2003¹²⁾)。また、p. 7に記載のように花粉の特性並びに虫媒の困難さから、自然条件下における他殖はほとんど起こらないと考えられている(Sparnaaij and Beeger, 1973⁹⁾; Keane, 1990¹⁰⁾)。

20

b. 自家不和合性の有無

花粉に稔性を示す一部の品種では、人為的に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。

25

c. 近縁野生種との交雑性

(a) 日本に自生する近縁野生種

わが国に自生する近縁野生種は、エゾカワラナデシコ(*D. superbus* L.)、ヒメハマナデシコ(*D. kiusianus* Makino)、ハマナデシコ(*D. japonicus* Thunb.)、シナノナデシコ(*D. shinanensis* (Yatabe) Makino)の4種と、カワラナデシコ(*D. superbus* var. *longicalicinus* (Maxim.) F. N. Williams)、タカネナデシコ(*D. superbus* var. *speciosus* Reichb.)の2変種が自生している。それぞれの自生地及び生育環境等を下記に記す。

30

- ・ エゾカワラナデシコ：日当たりの良い野原や河原に生える多年草である。本州の中部以北から北海道にかけて自生し、その分布はユーラシア大陸の比較的涼しい地域の広い範囲にわたる。

35

- ・ ヒメハマナデシコ：九州、沖縄のほか本州(和歌山県)、八丈島、四国(愛媛県)などの海岸付近で日当りのよい岩場や原野に分布する多年草であるが、個体数は極めて少ない。
 - ・ ハマナデシコ：九州、四国と、本州太平洋沿岸部に主に自生し、一部日本海側西部の沿岸部にも分布する。ナデシコの仲間では最も低温に弱い種類であり、霜が降りる地域では越冬できないため、いずれの自生地とも冬の温度が比較的高く、氷点下に下がらないところである。
 - ・ シナノナデシコ：本州の中部地方だけに自生する日本特産種。信州では全県でまれに見られる。
 - ・ カワラナデシコ：エゾカワラナデシコを基本種とする。本州から九州に分布し、日当たりの良いやや乾きぎみな河原や草原に自生する。和名も河原によく自生しているところから名づけられた。
 - ・ タカネナデシコ：カワラナデシコの高山性変種で、北海道と本州中部以北の高山帯の岩礫地や草地に生える多年草である。
- 15 (塚本、1983年¹³⁾)

(b) 近縁野生種との自然条件下での交雑性

わが国の自然条件下において、カーネーションの園芸種とわが国に自生する近縁野生種が交雑し雑種が自生した事例は報告されていない。

20

(c) 近縁野生種との人為的交雑性

カーネーションの園芸種は人為的にはナデシコ属内での種間交雑が可能であり、他のナデシコ属との人為的交配により育種されてきた。ただし、交配のためには人為的に花弁を除去して受粉する必要があり、自然条件下のプロセスとは全く異なる。

25

人為的な種間交雑に関して、園芸種とハマナデシコとの種間交配を試みた実験によれば、園芸種を花粉親に用いた場合、全く種子は得られず、胚培養を利用して種間雑種は全く得られなかった。ハマナデシコを花粉親とした場合は、母親として用いる園芸種の品種によって結果は異なり、調査した6品種のうち1品種のみから種間雑種と考えられる個体を得ることが出来た。この品種については、受粉した花のうち91%が種子を形成し、その60%が発芽したが、実際に種間雑種であったものは発芽したうちの50%であったと報告されている。残る50%はカーネーションであった(Nimura et al., 2003¹²⁾)。さらに、エゾカワラナデシコを基本種とするカワラナデシコなどを園芸種と人為的に交配し育成したとされる小輪スプレー種(ジプシー系と呼ばれる)が存在する(武田、1996年¹¹⁾)。

30

35

d. アポミクシスを生ずる特性の有無

カーネーションの園芸種にはアポミクシスを生じる特性はない(Buell, 1953¹⁴⁾)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

a. 花粉の生産量

現在のカーネーションの園芸種では、花粉は極めて少ないかあるいは全く生産しない。

5 また、品種によって雄しべの数や花粉の生産量は異なる。例えば、シムの系統では水と栄養のストレスが花粉の生産を向上させ、温度が雌しべや花粉の生産を制御することが報告されている (Kho and Baër, 1973¹⁵⁾、Mehlquist et al., 1954¹⁶⁾。花粉の生産に最適な温度は 23-26 °C であるが、17 °C 以下では雄しべの育成が完全に抑制される (Kho and Baër, 1973¹⁵⁾。

10 なお、宿主の CON4 及び本組換え体 25958 はともに葯の存在が認められ、少量の花粉を生産する。

b. 花粉の稔性、形状

15 花粉の稔性については品種間格差が大きい、稔性のある品種でもその花粉稔性は低く人工交配に深刻な障害をもたらす程度であると報告されている (Kho and Baër, 1973¹⁵⁾。カーネーションの園芸種の主流であるレッドシム系品種の花粉は他の品種よりも稔性が低いと報告されている (Kho and Baër, 1973¹⁵⁾。花粉の大きさには大きなバラツキが認められ、`ゴールドラッシュ' では直径が 12.36~67.98 μm 、`トレンディ' では直径が 15.45~93.60 μm であったとの報告がある (Tejaswini, 2002¹⁷⁾。

20

c. 花粉の媒介方法

カーネーションの園芸種は、花卉の端から蜜腺までの距離が長い(4-5cm)ため、蝶や蛾でも蜜を吸うことはできず、他の種類の訪花昆虫もほとんど認められない。ナデシコ属の野生種については虫媒による交雑の可能性はあるが、その昆虫は蝶と蛾に限定される。ナデシコ属の野生種では蜜腺が花の最下部にあり、吻の長い (2.5cm 以上) 昆虫しか蜜腺に届かないため、吻がそれより短い蝶などがナデシコ属の花を訪れることはない。

25 蟻の訪花も想定されるものの、蟻の移動距離は約数メートルであり (Armstrong, 1979¹⁸⁾、蟻の分泌物が通常花粉を不活化してしまうことが知られていること (Herrera et al., 1984¹⁹⁾、Gottsberger, 1989²⁰⁾、Harriss and Beattie, 1991²¹⁾、Gomez and Zamora, 1992²²⁾) から、蟻が花粉を媒介することはほとんどないと考えられる。

以上より、花粉の虫媒はほとんどないと考えられ、また、花粉は重く粘性があるため風媒も困難であることから、人為的交配以外の方法で花粉が媒介される可能性はほとんどない。

35 d. 花粉の飛散距離及び寿命

花粉の飛散距離については、カーネーションの園芸種の花は重く粘性があり

(Jennersten, 1983²³), 花の奥に埋もれているためほとんど飛散しない。オランダでは、園芸種の栽培が盛んであるにも関わらず、空中に園芸種の花粉は検出されなかったと報告されている (Otten, 1991³; Driessen et al., 1988²⁴)。

5 花粉の寿命は1-2日で3日目には完全に発芽が見られなくなったという報告がある(木村, 1986²⁵)。

ホ. 病原性

10 へ. 有害物質の産生性

カーネーショ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、わが国を含めて有害物質を産生するとの報告はない。

ト. その他の情報

15

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を下記に、その位置関係を図1 (p. 11) に、その塩基配列を別添資料1-図1 (p. 1-24) に示した。

(イ) 選択マーカー *surB* 発現カセット

- 10 35Ss : カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子プロモーター (通常の 35S RNA 遺伝子プロモーターよりも 5' 末端側が約 0.2kb 短い) 0.2kb
- surB* : タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子 2.0kb
- 15 *surB* 3' : タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域 1.8kb

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

- CHS : キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) 由来のカルコン合成酵素遺伝子プロモーター 1.2kb
- 20 F3' 5' H cDNA : パンジー (*Viola hortensis*) 由来のフラボノイド 3', 5' 水酸化酵素遺伝子の cDNA 1.8kb
- D8 3' : ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のリン脂質転移酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域 0.8kb

25 (ハ) ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) 発現カセット

DFR genomic DNA : ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子 (プロモーター、翻訳領域、3' 非翻訳領域を含む) 5.0kb

30 (ニ) ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) 発現抑制カセット

- 35S : カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子プロモーター 0.4kb
- dsDFR* cDNA : カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) 由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子の cDNA 0.3kb (順方向) 及び 0.3kb (逆方向)
- 35 *DFR* genomic DNA 由来 intron : ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のジヒドロフラ

t35S ボノール 4-還元酵素遺伝子のイントロン 0.2kb
 : カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子の 3' 非
 翻訳領域 0.2kb

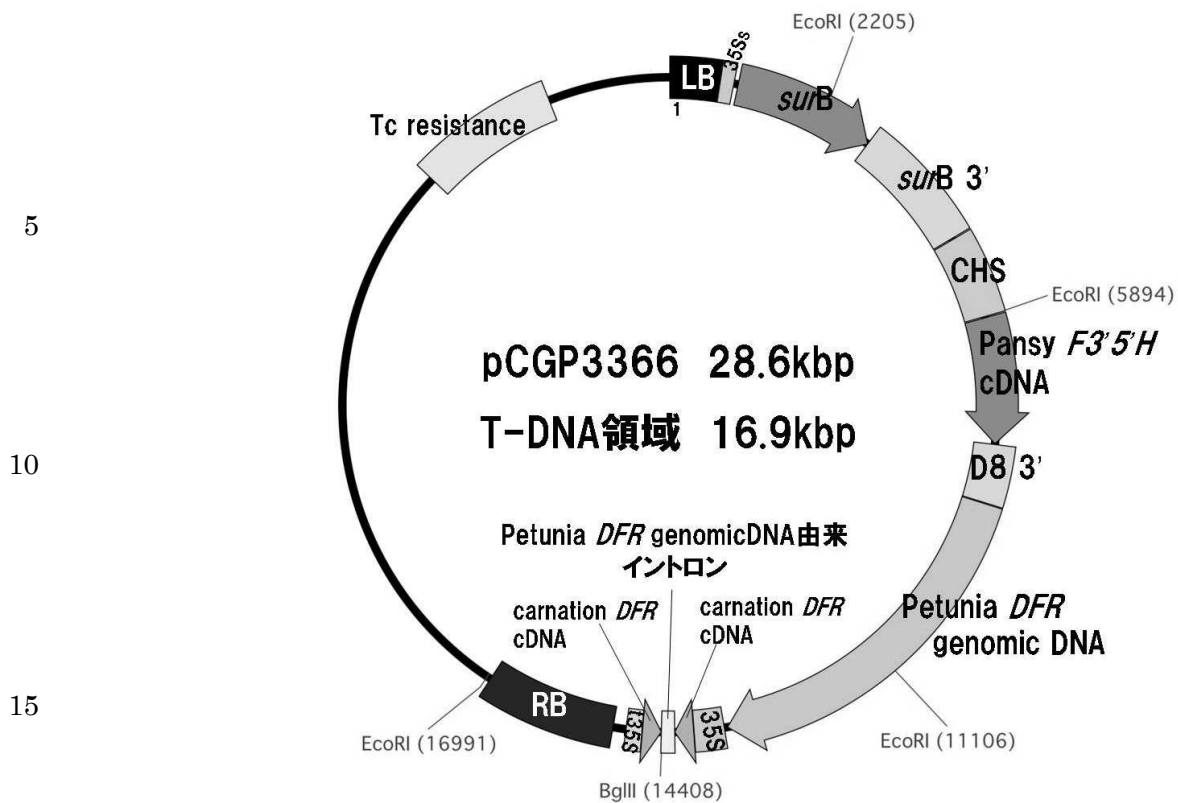


図 1. pCGP3366 の構造

バイナリーベクターpWTT2132 に 3 つの発現カセットを挿入したもの。

20

35Ss : 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 (通常の 35S RNA 遺伝子プロモーターよりも 5' 末端側が約 0.2kb 短い)

surB : タバコ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子

surB 3' : タバコ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域

25

CHS : キンギョソウ由来のカルコン合成酵素遺伝子プロモーター

Pansy *F3' 5' H* cDNA : パンジー由来のフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子の cDNA

D8 3' : ペチュニア由来のリン脂質転移酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域

Petunia *DFR* genomic DNA : ペチュニア由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子 (プロモーター、翻訳領域、3' 非翻訳領域を含む)

30

35S : カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子プロモーター

Carnation *DFR* cDNA : カーネーション由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子の cDNA

Petunia *DFR* genomic DNA 由来イントロン :

ペチュニア由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子の非翻訳領域

35

t35S : カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子の 3' 非翻訳領域

※制限酵素名とともに示した数字は、レフトボーダー末端を 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) カーネーションにおけるアントシアニンの合成経路と導入遺伝子の効果

アントシアニンの生合成経路の一部を図 2 (p. 14) に示した。アントシアニンの生合成経路は植物界において共通しており、カーネーションでも図 2 (p. 14) に示した経路によりアントシアニンが合成される。カーネーションの花弁に存在するアントシアニンは 3 位と 5 位が配糖化され、さらにその糖にマリル基が結合していることが知られている。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間接的に花色に影響するフラボノールも図 2 (p. 14) に示した経路で合成される。さらに花弁細胞の液胞の pH が花色に影響することが知られている。

10 青紫色及び除草剤クロロスルフロン耐性カーネーション (*F3'5'H*, *DFR*, *dsDFR*, *surB*, *Dianthus caryophyllus* L.) (25958, OECD UI: IFD-25958-3) (以下「本組換え体」という。) のアントシアニン生合成経路の一部を図 3 (p. 15) に示した。アントシアニンの B 環の水酸基が 1 個 (4' のみ水酸化されている) であるペラルゴニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドを含むカーネーション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' のみ水酸化されている) であるシアニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドを含むカーネーション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) であるデルフィニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドを含むカーネーションは自然界には存在しない。

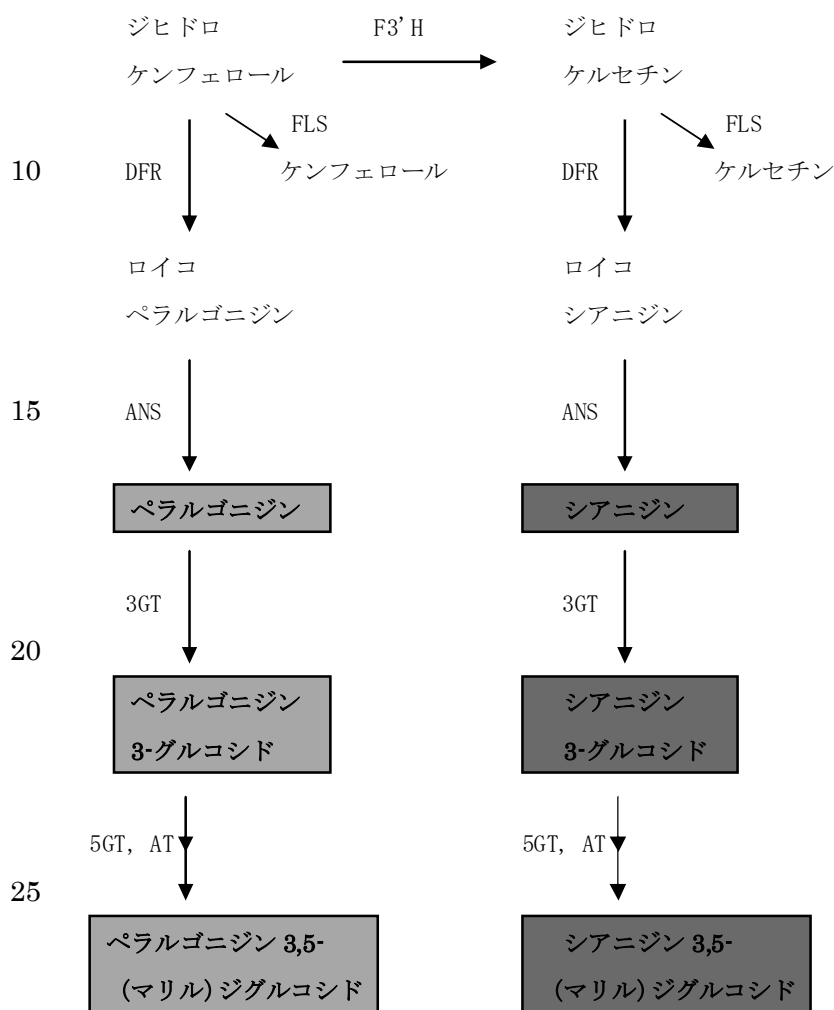
20 B 環の水酸化のパターンを決定するのがフラボノイド 3'-水酸化酵素 (*F3'H*) とフラボノイド 3',5'-水酸化酵素 (*F3'5'H*) である。これらの水酸化反応はジヒドロフラボノール (ジヒドロケンフェロール、ジヒドロケルセチン、ジヒドロミリセチンを指す (図 2、図 3 参照)) の段階で起こり、これらの酵素がジヒドロケンフェロールを水酸化する。ジヒドロフラボノールはフラボノールの前駆体でもあるため、両水酸化酵素が存在しないとペラルゴニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドとケンフェロールが蓄積する。*F3'H* が存在するとシアニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドとケルセチンが存在する。カーネーションには *F3'5'H* が存在しないため、デルフィニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドは存在しない。

30 そこで、*F3'H* 活性があるためにペラルゴニジン及びシアニジンが生産され、花色が明紅色になっているカーネーションに、パンジー由来の *F3'5'H* 遺伝子、ペチュニア由来の *DFR* 遺伝子及びカーネーション由来の *dsDFR* 遺伝子を導入したところ、花弁にてデルフィニジンが生産されることにより青紫色のカーネーションとなった。また、生産されたデルフィニジンは内在性のフラボノイド 3-配糖化酵素 (3GT) などにより、デルフィニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドに変換される。メチル基転移酵素 (MT) をもつ一部カーネーションでは、ペチュニジンが生産される。

35 植物に遺伝子を導入した場合、形質転換の系統ごとに染色体上に挿入される導入遺伝子の位置が異なり、それがどの程度機能するかは、挿入位置によって決まってくる考

えられている。さらに、導入遺伝子の由来やプロモーターによっても異なる可能性が考えられ、これらが導入遺伝子の発現レベルとその結果として合成されるアントシアニン量（花色の濃さ）に影響を与え、さまざまな花色を示す系統が得られる（別添資料 8 参照）。

5

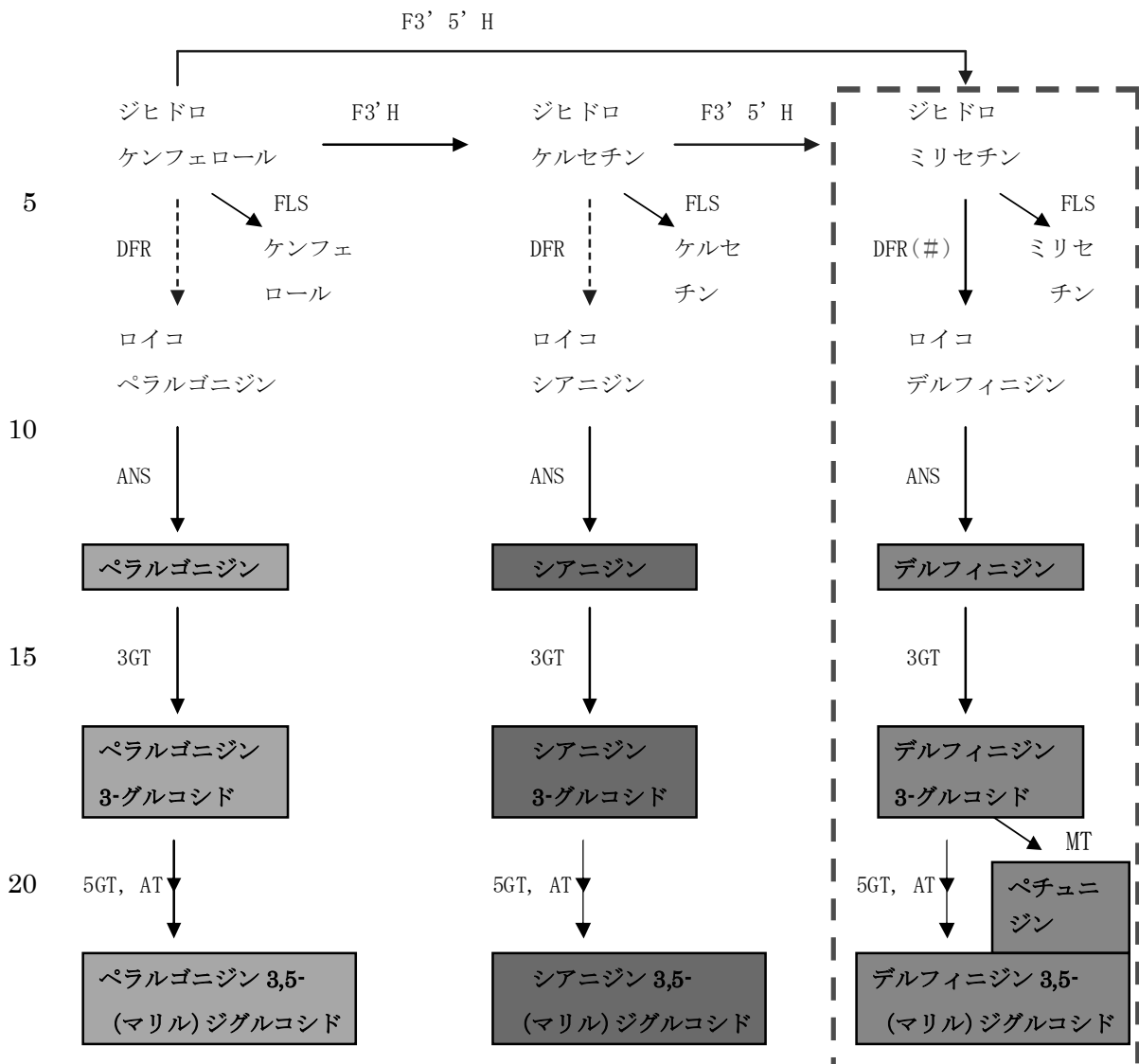


30 図 2. 非組換えカーネーションのアントシアニン生合成経路の概略

非組換えカーネーションではシアニジン型アントシアニンやペラルゴニジ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 : フラボノイド 3-配糖化酵素、5GT : フラボノイド 5-配糖化酵素、AT : アシル基転移酵素

35



25 図3. 本組換え体のアントシアニン生合成経路の概略

非組換えカーネーションには青矢印の経路は存在しない。その他の経路は組換え体、非組換え体ともに存在する。パンジー由来の *F3' 5' H* 遺伝子、ペチュニア由来の *DFR* 遺伝子及びカーネーション由来の *dsDFR* 遺伝子を導入することによりジヒドロミリセチンを生合成し、青みを帯びたアントシアニンであるデルフィニジン 3-グルコシドを花卉で蓄積させる。これは、さらに修飾され、デルフィニジン 3,5- (マリル) ジグルコシドとなる。

(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* : フラボノイド 3-配糖化酵素、*5GT* : フラボノイド 5-配糖化酵素、*AT* : アシル基転移酵素、*MT* : メチル基転移酵素。

35 ※赤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

※青破線矢印で示したステップは、カーネーションの *dsDFR* 遺伝子により抑制される。

※（#）印の DFR は導入遺伝子により新たに発現する酵素で、デルフィニジンを生産するのに適している。

(ロ) 構成要素の機能

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

a. 35S プロモーター :

5 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 (Mitsuhara et al., 1996²⁶)。

15 なお、カーネーション由来の *dsDFR* 遺伝子の発現には通常 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域 (Franck et al., 1980²⁷) を、*surB* 遺伝子の発現には上記よりも 5' 末端側が約 0.2kb 短い領域を使用した。

b. *surB* 遺伝子 :

20 タバコ培養細胞由来の変異型アセト乳酸合成酵素 (ALS) 遺伝子である。分枝アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンは構造が似ているため、同じ酵素によって生合成されることが多い。微生物ではイソロイシン及びバリンはそれぞれ L-トレオニン及びピルビン酸が前駆体となり生合成される。L-トレオニンが 2-オキシ酪酸に変換された後は、両者は 5 種類の共通の酵素によって合成される。その最初の反応を触媒する酵素は ALS と呼ばれる。ALS によって、ピルビン酸とチアミンピロリン酸 (TPP) の付加化合物の脱炭酸で生じた 1-ヒドロキシエチル-TPP が、もう 1 分子のピルビン酸と反応するとアセト酪酸が生成し、これがバリン合成の前駆体となる。一方、上記の 1-ヒドロキシエチル-TPP が 2-オキシ酪酸と反応すると、イソロイシンの前駆体である 2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸が生じる。ALS は通常、スルホニルウレア系の除草剤クロロスルフロン (chlorsulfuron) によって阻害されるが、致死レベルのクロロスルフロンの存在下で生育するタバコ培養細胞では ALS 遺伝子に変異が起こり、その結果、クロロスルフロン抵抗性を示すことが明らかとなった (US patent number 5 141 870²⁸)。そのため、形質転換植物の選抜マーカーとしても利用されている。この変異型 ALS は、酵素活性としてはもとの ALS と同じ ALS 活性を示す。この ALS 変異遺伝子は *surB* 遺伝子と命名された。なお、宿主にも ALS 活性が存在し、*surB* 遺伝子の導入による内在代謝系への影響はほとんどないと考えられる。スルホニルウレア系の除草剤としては他にメチルスルホンメチル、トリベヌロン (Tribenuron)、チフェンスルフロン (Thifensulfuron)、ベンスルフロンメチ

ル(Bensulfuron methyl)などがあり、本 *surB* 遺伝子は少なくともクロロスルフロンとベン
ンスルフロンメチルに対して抵抗性を示すことが知られている(Shimizu et al., 2011²⁹⁾)。
本組換え体の選抜にはクロロスルフロンを用いた。

5 c. カルコン合成酵素(*CHS*)遺伝子プロモーター:

金魚草由来のカルコン合成酵素(*CHS*)遺伝子のプロモーターである(Sommer, 1988³⁰⁾)。
開始コドンの5'側1.2kbの遺伝子断片を含んでいる。*CHS*遺伝子はフラボノイド合成に
関わる遺伝子の一つである。このプロモーターを用いると、花卉上皮細胞での高い発現
レベルが期待される。

10

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

パンジー由来。図3(p.15)に示したように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。

15

e. *D8* 遺伝子3'非翻訳領域:

*D8*遺伝子はペチュニアのリン脂質転移酵素をコードしている。ここで用いた配列は約
0.8kbのDNA断片で、ここには約150bpの転写はされるが翻訳はされない領域が含まれ
ている(Holton, 1992³¹⁾、国際特許出願PCT/AU/00334:公開番号W093/01290³²⁾)。今回
のように、*surB* 遺伝子、*DFR* 遺伝子、*F3' 5' H* 遺伝子を発現させるための3つの発現カ
セット(プロモーターから遺伝子コード領域を経て3'非翻訳領域に至る遺伝子発現の
ための最小単位)を1つのバイナリーベクター上に連結する場合は、導入遺伝子の安定
した発現のためにプロモーターや3'非翻訳領域は発現カセットごとに異なるものを使
用する方が望ましい。よって、*D8* 遺伝子の3'非翻訳領域を、パンジー花卉で発現して
いる*F3' 5' H* cDNAのためのターミネーターとして用いた。

25

f. ペチュニア ジヒドロフラボノール4-還元酵素(*DFR*) 遺伝子:

ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素(*DFR*) 遺伝子で、プロモーター、翻
訳領域、3'非翻訳領域を含む染色体DNA由来のDNA断片である。

30

本酵素はジヒドロフラボノール(ジヒドロケンフェロール、ジヒドロケルセチン、ジ
ヒドロミリセチンを指す(図2、図3参照))を還元して、ロイコアントシアニン(ロ
イコペラルゴニン、ロイコシアニン、ロイコデルフィニンを指す(図2、図3参
照))を生産する。ロイコアントシアニンはアントシアニン(ペラルゴニン、シア
ニン、デルフィニンを指す(図2、図3参照))の直接の前駆体である。*DFR* は基質
特異性を持ち、中でもペチュニア由来の*DFR* は、ジヒドロケルセチンとジヒドロミリセ
チンを基質として還元することができるが、ジヒドロケンフェロールを還元することは

35

できない (Beld et al., 1989³³⁾、Huits et al., 1994³⁴⁾)。そのため、ペチュニア由来 DFR はデルフィニジンを生産するのに適した DFR であると考えられる。

5 g. カーネーション ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) 遺伝子 (二本鎖 RNA 生成) :

カーネーション由来 DFR は f. と同様、ジヒドロフラボノールを還元して、ロイコアントシアニジンを生産する。DFR の中でもカーネーション由来 DFR はジヒドロケンフェロールとジヒドロケルセチンを還元するため、デルフィニジンを効率的に生産させる目的には適さない。そこで、本酵素の働きを抑制するために二本鎖 RNA が転写されるように
10 設計したカーネーション由来 DFR 遺伝子を導入し、この遺伝子の発現を抑制した。

今回カーネーション由来 DFR の遺伝子発現抑制方法として、RNAi 法を用いた。本方法は siRNA (short interfering RNA) と呼ばれる 21~23 塩基の二本鎖 RNA (double-strand RNA; dsRNA) が細胞内に存在することにより、配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、遺伝子の発現を転写産物レベルで効率的に抑制する方法として広く知られている。

15 DNA から mRNA への転写は行われるが、mRNA が切断されるため翻訳が行われなくなる。そのメカニズムは図 4 (p. 20) に示したように、まず細胞内において dsRNA が Dicer と呼ばれる dsRNA 特異的な RNase によりプロセッシングを受け、21~23 塩基の短い siRNA となる。次に siRNA が RNA ヘリカーゼにより一本鎖へと解かれ、一本鎖 RNA はタンパク質群との複合体 RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する。この RISC は siRNA の
20 配列に従って標的 mRNA を認識し、siRNA と標的 mRNA の相補的な領域の中央で標的 mRNA を切断し、発現抑制が起こる (落合ら、2005 年³⁵⁾、三木ら、2005 年³⁶⁾)。本組換え体中には、リンカーとしてペチュニア DFR 遺伝子のイントロンの一部を用い、カーネーション由来 DFR cDNA がインバーテッドリピートを形成する転写カセットが導入されている。これにより植物細胞内でカーネーション DFR 遺伝子の二本鎖 RNA が転写され、同遺伝子の
25 mRNA が分解される。

30

35

5

10

15

20

25

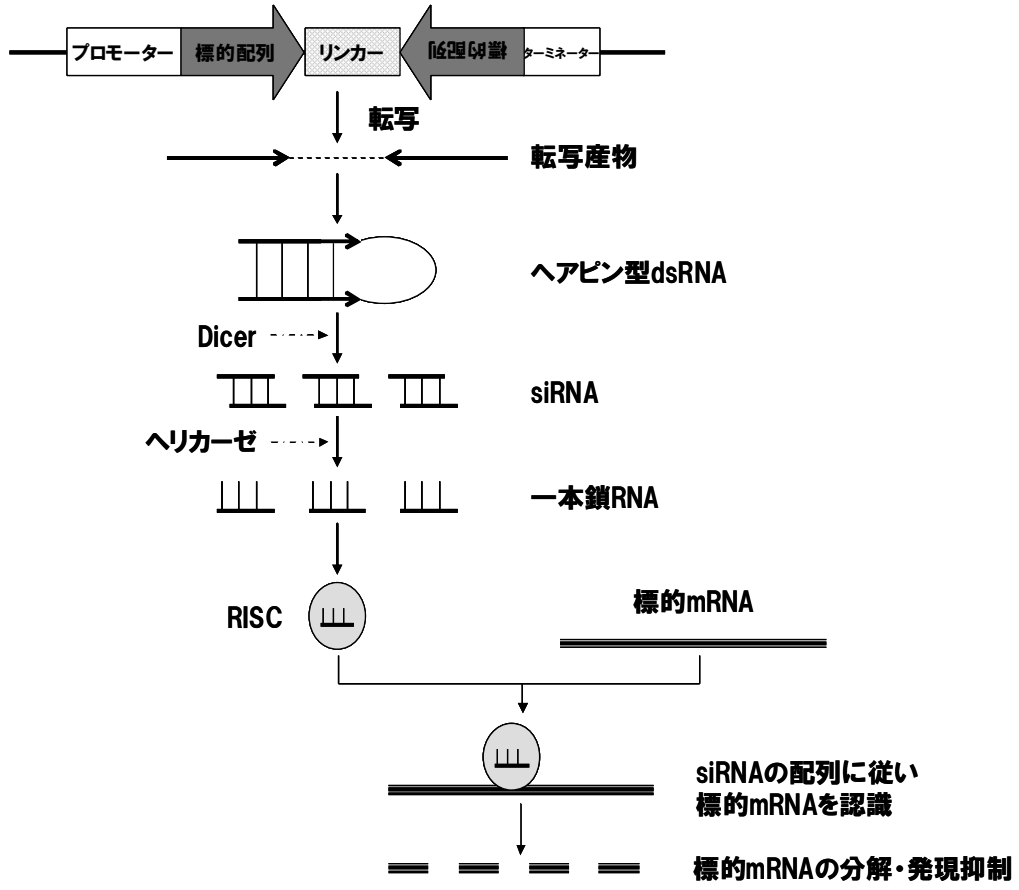


図 4. RNAi 法の原理

h. 35S ターミネーター :

カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子のターミネーター領域である。

0.2kb の遺伝子断片を含んでいる。

5

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と同一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、さらにペチュニア由来の DFR は
10 ジヒドロケルセチンとジヒドロミリセチンを、それぞれロイコシアニジンとロイコデルフィニジンに変換する。また、タバコ由来の *surB* 遺伝子がコードする ALS 蛋白質は除草剤クロロスルフロン耐性を示す。

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同一性を有するか否かについて、2012 年 5 月にネブラスカ大学アレルギーデータベース
15 Allergen Online version 12 (2012 年 2 月 7 日更新) を用いて検索を行ったところ、同一性は有さなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

導入したパンジー由来の 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、
20 導入したカーネーション由来の *dsDFR* 遺伝子によって、内在性 DFR の翻訳が抑制されるため、ジヒドロケンフェロールからロイコペラルゴニジンに、ジヒドロケルセチンからロイコシアニジンへの変換が抑制される。また、導入したペチュニア由来の DFR によって、ジヒドロミリセチンがロイコデルフィニジンに変換される。その結果、宿主カーネーションにはないデルフィニジンが生産される。また、ジヒドロミリセチンはカーネーション自身のフラボノール合成酵素 (FLS) により宿主カーネーションにはないミリセチンへと変換される。
25

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

5 本組換え体の作出に用いたベクターpCGP3366 は、大腸菌及びアグロバクテリウム由来の合成プラスミド pWTT2132 (米国 DNAP 社) をもとに構築した。大腸菌が保持するプラスミド pSC101 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子、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

10 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

pCGP3366 の塩基数は 28, 599bp で、T-DNA の塩基配列を別添資料 2-図 1 (p. 1-27) 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

15 大腸菌の選抜マーカーとして、テトラサイクリン耐性遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。さらに、組換え体の選抜マーカーとして、除草剤クロロスルフロン耐性を与える *surB* 遺伝子が存在している。

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

20 本ベクターに感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

25 バイナリーベクターpCGP3366 の構造の概略を図 1 (p. 11) に、その塩基配列を別添資料 1-図 1 (p. 1-24) に示した。そのサイズは約 28.6kbp で、レフトボーダーとライトボーダーに挟まれる T-DNA 領域のサイズは約 16.9kbp である。宿主植物へ導入される T-DNA 領域内には、組換え体選抜マーカーを目的とした *surB* 遺伝子と、花色の変化を目的としたパンジー *F3' 5' H* 遺伝子、ペチュニア *DFR* 遺伝子、カーネーション *dsDFR* 遺伝子が組み込まれている。

30

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 (US Patent number 5 589 613³⁷⁾) を用いた。

2004年10月に表面殺菌したCON4の茎片に *Agrobacterium tumefaciens* Ag10株を接種し、2005年11月に明紫色の本組換え体を得た。現在、栄養増殖にて維持している。

35

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

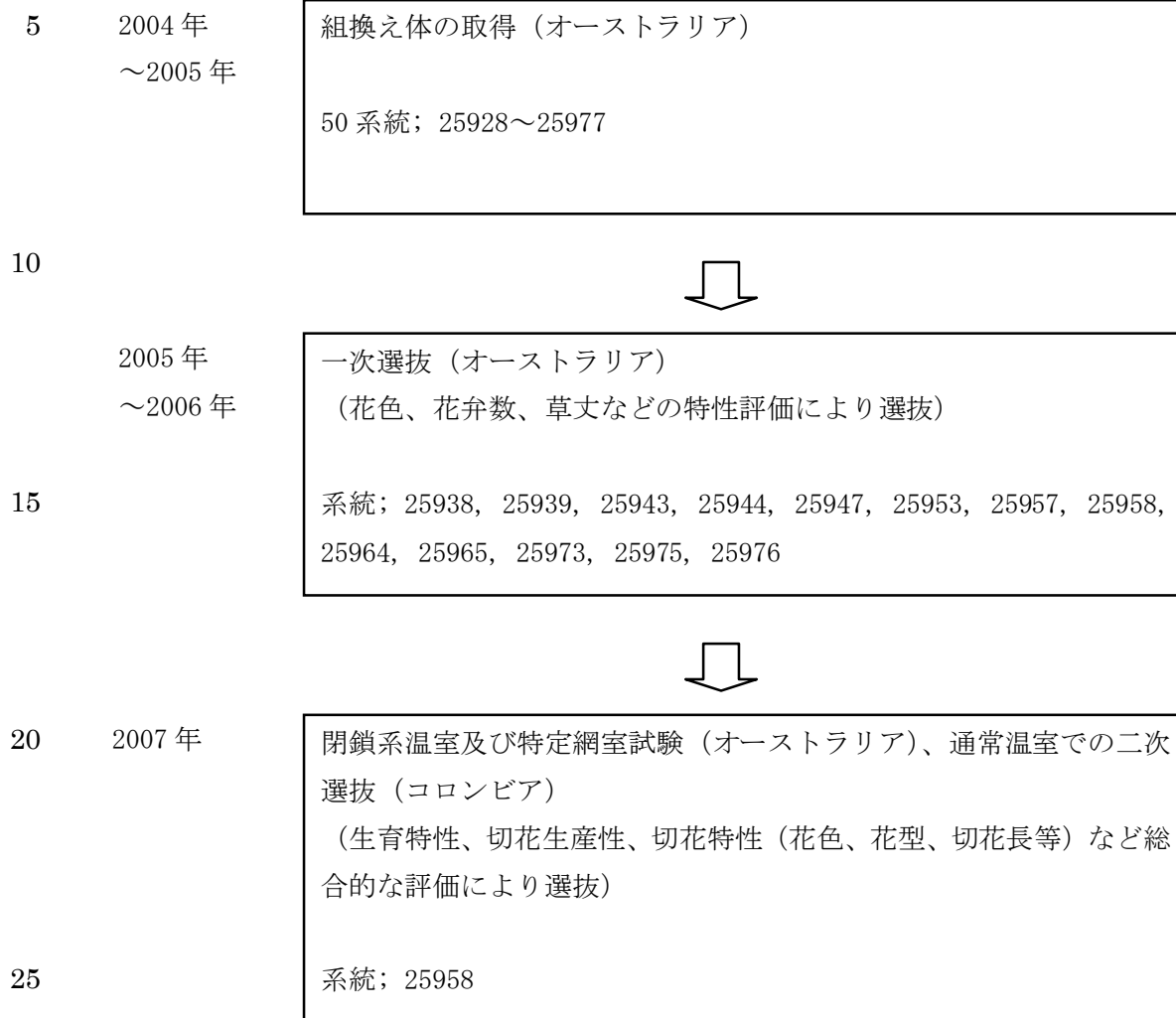
5 組換え体の選抜にはクロロスルフロン (1-5 μ g/l) を含む選抜培地を用いた。

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

10 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チカルシリンを添加し、除去した。なお、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生育可能な選択培地に塗抹し、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、アグロバクテリウムと思われるコロニーは観察されなかった。

15 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無いと判断された。

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



（注）本組換え体の申請の単位は、組換え当代に限る。

30

35

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

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* 遺伝子は本来染色体に存在し、その翻訳産物である *F3' 5' H* は細胞質内で翻訳された後、*F3' 5' H* の N 末端のシグナルペプチドが認識され、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。外部より移入された核酸は通常、染色体上に挿入されるが、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排除できない。しかし、仮に *F3' 5' H* 遺伝子がオルガネラゲノムに移入されたとしても、翻訳産物がオルガネラ内から ER へ移行することは考えにくく、本来の機能を発揮できないものと考えられる。本組換え体においてはサザンブロット解析により移入された核酸は 1 コピー存在することが示唆されており (別添資料 3 p. 1-14 参照)、また *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ことから、*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と考えられる。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ると、移入された核酸は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

サザンブロット解析により、移入された配列は本組換え体のゲノム中に 1 コピー存在すると考えられた (別添資料 3 p. 1-14 参照)。

本組換え体は全て栄養増殖によって繁殖しており、形質転換体当代しか存在しないため、複数世代における伝達の安定性については解析していない。なお、本組換え体はオーストラリアの特定網室で 2005 年から 6 年栽培しており、この間栄養増殖を繰り返してきたがこれまでに異なる花色を示した事例はない。このことから移入された核酸は本組換え体中で安定して存在していると考えられる。

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

30

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

導入したパンジー *F3' 5' H* 遺伝子、ペチュニア *DFR* 遺伝子、*surB* 遺伝子の花卉、葉、根における発現について、ノーザンブロット解析を行った。パンジー *F3' 5' H* 遺伝子およびペチュニア *DFR* 遺伝子は本組換え体の花卉のみにおいて、導入遺伝子に特異的かつ期待される分子量のシグナルが検出され、ゲノム内に挿入された遺伝子が安定して

35

発現していることが明らかとなった。一方、*surB* 遺伝子は本組換え体の花弁、葉、根のいずれの器官においても特異的で、かつ期待される分子量のシグナルが検出された（別添資料 3 p. 15-16 参照）。なお、栄養増殖により増殖した個体についても花色の均一性は保たれており、これまで明紫色以外の花色を示したという事例はない。

5 よって、ゲノム内に挿入された遺伝子は安定して発現していると考えられる。

さらに、本組換え体は組織培養を行う場合にのみ、クロロスルフロンを添加した培地を用いているが、*surB* 遺伝子の発現によって、安定してクロロスルフロン耐性を示している（別添資料 6 p. 31 参照）。

10 ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動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

本組換え体には伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換え体に導入された遺伝子が伝達されることはない。

15 (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

サザンブロット解析による本組換え体の特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については約 $5 \mu\text{g}$ の染色体 DNA を用いれば検出可能である。さらに、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情報に基づき PCR プライマーを作製し、PCR 法を用いて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。最低 1ng
20 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. 1-2 参照

それらの感度及び信頼性 — 別添資料 4 p. 3 参照

25

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

30 パンジー *F3' 5' H* 遺伝子、ペチュニア *DFR* 遺伝子を宿主において過剰発現させ、さらに内在性 *DFR* 遺伝子の発現を抑制した結果、デルフィニジンが生産され、花色が明紫色に変化した（別添資料 5 p. 2-6、別添資料 6 p. 10-14 参照）。

35 パンジー *F3' 5' H* は花弁特異的プロモーターの制御下にあるため花弁において、ペチュニア *DFR* はプロモーター領域を含む染色体 DNA 断片を導入しているため本来の発現器官である花弁において発現している。さらに、カーネーション *dsDFR* の転写には全器官で発現するプロモーターを用いているため全ての器官でその dsRNA が転写されていると考えられるが、内在性 *DFR* は花弁で特異的に発現していることから、花弁でのみ *DFR* 転写物が分解

され、発現が抑制されていることが示唆された。

また、選択マーカーとして導入した *surB* 遺伝子の発現により、除草剤クロロスルフロン耐性が付与されていることを、隔離ほ場でクロロスルフロンを幼苗に散布することにより確認した（別添資料6 p. 31 参照）。

5

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

2008～2009 年のオーストラリアの Florigene Pty. Ltd. における閉鎖系温室並びに特定
10 網室での試験データ、2008～2010 年のサントリー研究センター内閉鎖系温室での試験データ及び 2011～2012 年の日本植生株式会社津山美咲ほ場での試験データを元にした。宿主 CON4 と同様、種子繁殖での栽培は行っていない。

a 形態及び生育の特性

15 宿主及び本組換え体を特定網室で栽培し、生育特性として開花時の茎の長さ、形態特性として花弁の数、花の直径、葯の形態、葯長、葯幅について調査したところ、花の直径、葯の形態、葯長、葯幅において宿主と本組換え体間で統計的に有意な差異 (χ^2 検定あるいは t 検定、有意水準5%) が認められた。（別添資料5 p. 7, 12 参照）。花の直径については、
20 宿主の花の直径が 5.9 ± 0.5 cm であったのに対し、本組換え体の花の直径は 5.5 ± 0.4 cm であった。葯の形態については、宿主に存在した健全な葯が38個、非健全な葯が50個であったのに対し、本組換え体に存在した健全な葯は27個、非健全な葯は117個であった。葯長、
葯幅については、宿主の葯長、葯幅が 1.7 ± 0.4 mm、 0.7 ± 0.2 mm であったのに対し、本組換え体の葯長、葯幅は 1.4 ± 0.3 mm、 0.5 ± 0.2 mm であった。

さらに、宿主及び本組換え体を隔離ほ場内で栽培し、生育特性として草丈、節数の経時
25 変化、開花時期について、形態特性として葯数、葯長、葯幅、花弁の数、花の直径について調査したところ、花弁の数、葯数、葯長、葯幅において、宿主と本組換え体間で統計的に有意な差 (t 検定、有意水準5%) が認められた（別添資料6 p. 18 参照）。花弁の数については、宿主の花弁の数が 42.9 ± 5.8 枚であったのに対し、本組換え体の花弁の数は 37.9 ± 5.7 枚であった。葯数については、宿主の葯数が 4.5 ± 2.9 個であったのに対し、本組換え
30 体の葯数は 1.5 ± 1.4 個であった。葯長、葯幅については、宿主の葯長、葯幅が 3.2 ± 0.5 mm、 2.4 ± 0.5 mm であったのに対し、本組換え体の葯長、葯幅は 2.7 ± 0.5 mm、 1.8 ± 0.5 mm であった。

b 生育初期における低温又は高温耐性

35 カーネーションの園芸種は自然条件下において受精することはなく、種子を形成しない。種子繁殖は人為的手段によってのみ可能であることから、種子に由来する生育初期の植物

の低温又は高温耐性については調査を行っていない。

c 成体の越冬性又は越夏性

カーネーションの園芸種は 20℃前後の冷涼な温度を好むため、高温なわが国の夏季において5 5 には人工的に温度を制御した温室内で栽培される。しかし、夏季にビニールハウス内の最高気温が 43-45℃に達するオーストラリア・メルボルンにてこれまで6年間、宿主及び本組換え体を栽培してきたが、ともに越夏し、草丈などの生育についても目視で確認できるような違いは認められなかった。わが国の夏季最高気温は平年 35℃前後であり、メルボルンでの結果を考察すると、ともに越夏すると考えられる。しかし、最低気温が氷点下以下10 10 になるわが国の冬季条件での成体における知見は得られていないため、隔離ほ場試験において成体の越冬性を調査した結果、全個体越冬し、宿主及び本組換え体間に差異は認められなかった（別添資料 6 p. 23-24 参照）。

d 花粉の稔性及びサイズ

15 15 特定網室で生育させた、宿主及び本組換え体の葯並びにそれに含まれる花粉を目視にて観察したところ、花粉の存在が認められた。そこで、花粉の充実程度、花粉の発芽程度及び花粉の大きさについて顕微鏡下で観察したところ、統計的に有意な差（ χ^2 検定あるいは t 検定、有意水準 5%）が認められた（別添資料 5 p. 8-10 参照）。花粉の充実程度については、宿主に存在した充実した花粉が 1085 個/10 花、充実していない花粉が 148 個/10 花であ20 20 ったのに対し、本組換え体に存在した充実した花粉は 751 個/10 花、充実していない花粉は 222 個/10 花であった。花粉の発芽程度については、宿主の発芽花粉が 32 個/10 花、非発芽花粉が 968 個/10 花であったのに対し、本組換え体の発芽花粉は 10 個/10 花、非発芽花粉は 990 個/10 花であった。また、花粉の大きさについては、宿主の花粉の直径が $56.4 \pm 7.1 \mu\text{m}$ であ25 25 ったのに対し、本組換え体では $60.1 \pm 9.4 \mu\text{m}$ であった。

30 30 さらに、宿主及び本組換え体を隔離ほ場内で栽培し、宿主及び本組換え体の葯並びにそれに含まれる花粉を目視にて観察したところ、花粉の存在が認められた。花粉が認められたことから、花粉の充実程度、花粉の発芽程度及び花粉の大きさについて顕微鏡下で観察したところ、宿主と本組換え体間で花粉の大きさに統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）が認められた（別添資料 6 p. 19-21 参照）。花粉の大きさについては、宿主の花粉の直径が $49.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ であ30 30 ったのに対し、本組換え体では $45.1 \pm 4.1 \mu\text{m}$ であった。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

カーネーションの園芸種は自然条件下において受精することはなく、種子を形成しない。種子繁殖は人為的手段によってのみ可能であることから種子の生産量、脱粒性、休眠性及35 35 び発芽率については調査を行っていない。

f 交雑率

特定網室で生育させた宿主及び本組換え体ともに花粉の存在が認められた（別添資料 5 p. 7 参照）。そこで、サントリー研究センターの閉鎖系温室にて野生種との人工交配を行った。野生種には、日本の近縁野生種の中で最も分布域が広く、一部のカーネーション園芸種と交雑することが知られている、カワラナデシコ (*D. superbus* var. *longicalicinus* (Maxim.) F. N. Williams) を用いたところ、宿主及び本組換え体ともに種子を形成したが、交雑率は宿主 0.012%、本組換え体 0.018% と低かった。宿主、本組換え体ともに得られた種子を全て播種したところ、本組換え体との交雑で得られた種子は 1 粒発芽したが、宿主との交雑で得られた種子は全て発芽しなかった（別添資料 5 p. 11 参照）。したがって、人工交配しても本組換え体と野生種との雑種が得られる可能性は低いと考えられる。

さらに、隔離ほ場試験において、自然条件下での野生種（カワラナデシコ）との交雑率について調査した。結実したカワラナデシコの種子を播種し、発芽した個体に本組換え体の導入遺伝子が伝達しているか PCR 法にて調査した結果、本組換え体の導入遺伝子は検出されなかった（別添資料 6 p. 22 参照）。

15

g 有害物質の産生性

カーネーショ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、特定網室で生育させた、宿主及び本組換え体について、鋤込み及び後作試験におけるレタス種子の発芽への影響について調べたところ、宿主と本組換え体間で実生の新鮮重に統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 5 p. 14-15 参照）。さらに、土壌微生物相試験の結果、真菌、細菌、放線菌数について宿主と本組換え体間で統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 5 p. 16 参照）。

25

さらに、宿主及び本組換え体を隔離ほ場内で栽培し、鋤込み及び後作試験におけるレタス種子の発芽への影響について調べたところ、宿主と本組換え体間で実生の新鮮重に統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 6 p. 25-26 参照）。さらに、土壌微生物相試験の結果、真菌、細菌、放線菌数について宿主と本組換え体間で統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 6 p. 27 参照）。

30

また、導入した遺伝子によって本組換え体新たに産生している ALS、DFR、F3' 5' H、デルフィニジン、ペチュニジン、ミリセチンが有害であるという報告はない。

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 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

10

(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

15

(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

20

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換え体は2005年からオーストラリアの特定網室にて栽培されているが、オーストラリアでの商業生産の予定はない。

25

一方、コロンビアにおいては、本組換え体について2005年12月16日に栽培許可（別添資料7 p. 1-8参照）を、2006年2月24日に輸入許可（別添資料7 p. 9参照）を取得した。2006年8月にオーストラリアから組織培養苗を輸入し、馴化、鉢上げ後、2006年9月から通常温室にて栽培している。そして、2008年11月に商業生産許可を取得した（別添資料7 p. 10-17参照）。また、米国においては、本組換え体について2008年9月に切花の輸入許可

30

を取得している（別添資料7 p. 18-19参照）。
本組換え体は2010年からコロンビアにて商業生産を開始した。2011年度、本組換え体は（社外秘につき非開示）が生産された。生産地において、栽培地周辺に組換えカーネーションが拡がったり、廃棄された組換え体が根付いたということは全くなかった。また、コロンビアの農場周辺には近縁種であるナデシコ属の野生植物は認められていない。

35

米国に販売しているが、これまでに販売店より、一般の園芸種と同様に周辺の生物相への影響があったという報告はない。

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

- カーネーションの園芸種は、わが国においても長期間使用等の歴史があるが、これまで
5 5 でわ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る諸形質、すなわち、茎の長さ等の生育特性及び生殖・繁殖
特性について、宿主と本組換え体間における相違を評価した。生育特性については、特
定網室においては花の直径、葯長、葯幅において統計的に有意な差 (t 検定、有意水準
5%) が認められた (別添資料 5 p. 12 参照)。隔離ほ場においては花卉数、葯数及び葯長、
10 10 葯幅において統計的に有意な差 (t 検定、有意水準 5%) が認められた (別添資料 6 p. 15-18
参照)。カーネーションの園芸種は栄養増殖の過程で自然突然変異が生じやすく
(Mehlquist et al., 1954¹⁶⁾)、元品種とは異なった形質を持った多くの枝変わり品種が
生み出されてきた。これらの枝変わり品種は花色のみならず、茎の長さ、花の直径、生
長速度などの多くの形質で元の品種との間に差異を生じることが知られている。例えば
15 15 `ウイリアム・シム' からは 300 種以上の枝変わり品種が生じ、花の直径は 5~9cm の変
異がある。一方、カーネーションの形質転換では高濃度の植物ホルモンを含む培地で長
期間培養することから培養変異が生じる可能性が高い (新井、2000 年³⁸⁾)。`ノラ' の
培養変異で作出された`ユアレッド' では花卉数 (ノラ : 63.9 枚、ユアレッド : 47.2 枚)
20 20 に差異が認められたとの報告がある (新井、2001 年³⁹⁾)。特定網室においては本組換え
体の花の直径は宿主より小さく、葯長、葯幅は宿主より短くなり、隔離ほ場において
は本組換え体の花の花卉数は宿主より少なく、葯数は宿主より少なく、葯長、葯幅は宿
主より短くなったが、これら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。しかしながら、いずれの差異もカーネーションの種の範囲を逸脱するほど大きく
はない。なお、一部のカーネーションは花卉の八重化にともない葯が退化していること
25 25 が知られており、カーネーションの花の直径は 2.5cm~9cm (小西ら、1988 年⁴⁾)、花卉数は 5 枚
~70 枚といわれている (武田、1996 年¹⁾)。したがって、これらの相違が競合におけ
る優位性を示す形質であるとは考えにくい。なお、栄養繁殖で増殖を繰り返しても本
組換え体に導入された遺伝子は安定して伝達されているが、宿主と同程度の自然突
然変異は生じるものと考えられる。
- 一方、生殖・繁殖特性については、特定網室においては健全な葯が存在する頻度、花
30 30 粉の充実程度、花粉の発芽程度及び花粉の大きさを統計的に有意な差 (χ^2 検定あるいは
t 検定、有意水準 5%) が認められた (別添資料 5 p. 7-10 参照)。隔離ほ場におい
ては花粉の大きさを統計的に有意な差 (t 検定、有意水準 5%) が認められた (別添資
料 6 p. 19-21 参照)。特定網室においては本組換え体の健全な葯の数は宿主より少
なく、花粉の充実程度は宿主より低く、花粉の発芽程度は宿主より低く、花粉の直
35 35 径は宿主より大きかった。隔離ほ場においては本組換え体の花粉の直径は宿主より
小さかった。宿主と本組換え体

間で葯及び花粉に差異は認められたが、本組換え体に存在する健全な葯の数が宿主より少ないこと、本組換え体の花粉の充実程度が宿主より低いこと、本組換え体の花粉の大きさは宿主との間に差異が認められたが、花粉の外観に相違はなく、本組換え体の花粉の発芽率は宿主より低いことから、これらの相違が競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。なお、花粉特性（充実程度、発芽程度、大きさ）の結果が隔離ほ場と特定網室で異なっているが、カーネーションの花粉の発生は温度などの気候条件に大きく影響されることが知られており (Kho and Baër, 1973¹⁵⁾)、宿主及び本組換え体の開花時期における隔離ほ場と特定網室の気候条件の相違によるものと考えられる。

5
10
15
本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉においてデルフィニジン、ペチュ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る。しかし、カーネーションでは訪花昆虫はほとんど認められないこと、本組換え体を隔離ほ場で栽培し、訪花昆虫を調査したが、花色の変化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.28-29参照）ことから、本組換え体のデルフィニジン等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とは考えにくい。

以上より、宿主、本組換え体間の花の直径、花卉数、葯数、葯長、葯幅、葯の形態、花粉の充実程度、花粉の発芽程度、花粉の大きさの相違及び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、本組換え体はクロロスルフロン耐性を獲得している（別添資料6 p.31参照）が、これを有効成分とする農薬は農地でのみ使用され、自然条件下では使用されていないため、この形質は競合における優位な形質であるとは考えにくい。

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

30 (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

カーネーションの園芸種はわが国においても長期間使用されてきたが、わ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 *DFR*、*F3' 5' H* 及び *surB* 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に対する影響を調べたところ、実生の新鮮重について宿主と本組換え体との間に統計的に有意な差は認められなかった。また、レタス種子の発芽率については、宿主と本組換え体との間に大きな差異は認められなかった（別添資料 5 p.14-15、別添資料 6 p.25-26 参照）。したがって、本組換え体が宿主と比較してレタス種子に有害な物質を産生しているとは考えにくい。さらに、土壤微生物相試験を行ったところ、真菌、細菌及び放線菌数について宿主と本組換え体間に有意な差は認められなかった（別添資料 5 p.16、別添資料 6 p.27 参照）。したがって、本組換え体がレタス種子の発芽及び土壤微生物相に影響を及ぼすような有害物質を産生しているとは考えにくい。

また、導入した遺伝子によって本組換え体が新たに産生しているデルフィニジン、ペチュニジン、ミリセチンなどは、青みを帯びたパンジーやペチュニアの花弁にも含まれるものであり、他の野生動植物等へ有害であるという報告はない。さらに、本組換え体が産生する ALS、*DFR*、*F3' 5' H* は、アミノ酸配列の相同性検索の結果、既知の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。

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

一部の限られたカーネーションの園芸種はナデシコ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エゾカワラナデシコ (*D. superbus* L.)、ヒメハマナデシコ (*D. kiusianus* Makino)、ハマナデシコ (*D. japonicus* Thunb.)、シナノナデシコ (*D. shinanensis* (Yatabe) Makino) の4種と、カワラナデシコ (*D. superbus* var. *longicalicinus* (Maxim.) F. N. Williams)、タカネナデシコ (*D. superbus* var. *speciosus* Reichb.) の2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の4種及び2変種に限られる。以上のことから、これら4種及び2変種を影響を受ける可能性のある野生植物として特定した。

(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。また、クロロスルフロンを有効成分に持つ除草剤に対する耐性を獲得する可能性があることが考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

カーネーションの園芸種と上記のナデシコが交雑する可能性について、花粉の特性、虫媒、風媒の観点から評価した。

花粉の特性：園芸種の花粉は極めて少ないかあるいはまったく生産されず、花粉が存在する場合であっても、その稔性は低い。さらに花粉の寿命は1-2日と短く、3日目には完全に発芽能を失う。宿主及び本組換え体の花粉の存在と充実程度について調べたところ、いずれも花粉の存在が認められ、稔性も認められた。さらに宿主と本組換え体間で健全な葯が存在する頻度及び花粉の充実程度、花粉の発芽程度、花粉の大きさにおいて、統計的に有意な差 (χ^2 検定あるいはt検定、有意水準5%) が認められた (別添資料5 p.7-10、別添資料6 p.18-21 参照)。稔性のある花粉が宿主、本組換え体ともに認められ、健全な葯が存在する頻度及び花粉の充実程度、花粉の発芽程度、花粉の大きさについては差異が認められたが、宿主及び本組換え体ともに花粉の生産量は少ないこと、本組換え体に存在する健全な葯の数が宿主より少ないこと、本組換え体の花粉の充実程度が宿主より低いこと、本組換え体の花粉の大きさは宿主との間に差異が認められたが、花粉の外観に相違はなく、本組換え体の花粉の発芽率は宿主より低いこと、隔離ほ場における自然交雑性の調査の結果、本組換え体の導入遺伝子は種子に伝達していなかったこと (別添資料6 p.22 参照)、自然条件下において園芸種と日本に自生する近縁野生種が交雑し雑種が自生した事例は報

告されていないこと、海外においても自然条件下において園芸種と近縁野生種が交雑し雑種が自生した事例は虫媒・風媒を含め報告されていないことから、自然条件下における本組換え体の交雑の可能性は低いと考えられる。なお、仮に交雑体が形成されたとしても、導入遺伝子の *DFR*、*F3' 5' H* 及び *surB* 遺伝子によって新たに生産される色素とそれに伴う

5 花色の変化は訪花昆虫に影響を及ぼさないこと、新たに獲得されるクロロスルフロン耐性は除草剤が散布されることが考えにくい自然条件下では競合における優位な性質にはならないことから、野生植物に影響を及ぼすとは考えにくい。

虫媒による交雑の可能性：園芸種は、花卉の端から蜜腺までの距離が長い(4-5cm)ため、蝶や蛾でも蜜を吸うことはできず、他の種類の訪花昆虫もほとんど認められない。ナデシコ属の野生種については、蜜腺が花の最下部にあるものの、吻の長い (2.5cm 以上) 昆虫は蜜腺に届くため、蝶などがナデシコ属の花を訪れることが知られている。野生種には昆虫は訪花するものの、本組換え体の花の形状などの特性は園芸種と同様であるため、昆虫によって本組換え体の花粉が野生種に運ばれ交雑することはほとんどないと考えられる。

10

風媒による交雑の可能性：園芸種では、葯は花卉の中に埋もれており、花粉は極めて

15 少なく、さらに粘性が高いため、風媒によって花粉が飛散する可能性は非常に低い。本組換え体も園芸種と同様で葯は花卉に埋もれていることから、花粉が飛散する可能性は低い。オランダでは、園芸種の栽培が盛んであるにも関わらず、空中に園芸種の花粉は検出されなかったと報告されている (Otten, 1991³⁾; Driessen et al., 1988²⁴⁾。

20 以上のことから、宿主及び本組換え体とも稔性のある花粉は存在するものの、本組換え体と近縁野生種の交雑の可能性はほとんどないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25 以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれは極めて低いと判断された。

4. その他の性質

評価すべき内容はない。

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：

カーネーションの園芸種は、わが国においても長期間使用等の歴史があるが、これまでにわ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。

- 5 競合における優位性に係る諸形質のうち、茎の長さ等の生育特性については、花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅において統計的に有意な差（t 検定、有意水準 5%）が認められた。カーネーションの形質転換には高濃度の植物ホルモンを使用することから培養変異が生じる可能性が高い。本組換え体の花の直径は宿主より小さく、花弁数、葯数は宿主より少なく、葯長、葯幅は宿主より短くなったが、カーネーションの種の範囲を逸脱するほど
- 10 大きな差異ではない。したがって、これらの相違が競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。生殖・繁殖特性については、健全な葯が存在する頻度及び花粉の充実程度、花粉の発芽程度、花粉の大きさで統計的に有意な差（ χ^2 検定あるいは t 検定、有意水準 5%）が認められた。しかしながら、本組換え体に存在する健全な葯の数が宿主より少ないこと、本組換え体の花粉の充実程度が宿主より低いこと、本組換え体の花粉の大きさは
- 15 宿主との間に差異が認められたが、花粉の外観に相違はなく、本組換え体の花粉の発芽率は宿主より低いことから、これらの相違が競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花弁においてデルフィニジン、ペチュ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る。しかし、カーネーションでは訪花昆虫はほとんど
- 20 認められないこと、本組換え体を隔離ほ場で栽培し、訪花昆虫を調査したが、花色の変化が訪花昆虫の数や種類に影響を及ぼすことはなかったことから、本組換え体のデルフィニジン等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とは考えにくい。また、本組換え体はクロロスルフロロン耐性を獲得しているが、これを有効成分とする農薬は農地でのみ使用され、自然環境下では使用されていない。以上のことから、本組換え体が競合
- 25 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。

有害物質の産生性について：

- カーネーションの園芸種はわが国においても長期間使用されてきたが、わ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
- 30 はない。また、導入した遺伝子によって本組換え体が新たに産生している ALS、DFR、F3' 5' H、デルフィニジン、ペチュニジン及びミリセチンが有害であるという報告はない。

- 実際に鋤込み試験、後作試験を行ったところ、レタス実生の新鮮重について宿主と本組換え体との間に統計的に有意な差は認められなかった。また、レタス種子の発芽率について宿主と本組換え体との間に大きな差異は認められなかったことから、本組換え体が宿主と比較してレタス種子に有害な物質を産生しているとは考えにくい。さらに、土
- 35

壤微生物相試験を行ったところ、宿主と本組換え体間に差異は認められなかった。以上のことから、本組換え体は園芸種に比べ有害物質を産生することはないと判断された。

交雑性について：

- 5 宿主及び本組換え体ともに花粉の存在が認められた。しかしながら、生産される花粉は少量であること、花弁の端から蜜腺までの距離が著しく長いという花の構造上の特色のため、訪花昆虫はほとんど認められず虫媒の可能性は低いこと、さらに花粉の粘性が高いため風によって花粉が飛散することはないことを併せて考えると、花粉の拡散が起こる可能性は極めて低い。また、隔離ほ場において自然条件下での野生種（カワラナゲシ）との交雑性を調査した結果、本組換え体の導入遺伝子は種子に伝達しなかった。
- 10 さらに、自然条件下において園芸種と日本に自生する近縁野生種が交雑し雑種が自生した事例は報告されていないことを併せて考えると、本組換え体が近縁の野生種と交雑する可能性はほとんどないと考えられる。
- 15 よって、青紫色カーネーション 25958 を第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国において生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

- 1) 武田 恭明、農業技術大系 花卉編 7 カーネーション/バラ、社団法人農山漁村文化協会、5-11、1996年
- 2) Tutin, T. G., *Dianthus* L. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burgess, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (Eds). *Flora Europea*, Vol 1. Cambridge University Press, 153-157, 1964
- 3) Otten, A., Riscico-analyse voor een bloeiproef van transgene anjers (*Dianthus caryophyllus*) onder Pk2-kasomstandigheden., Risk evaluation submitted to Dutch Government, 1991
- 4) 小西 国義、武田 恭明、塚本 洋太郎、園芸植物大事典 1、相賀 徹夫編、小学館、483-492、1988年
- 5) 原 幹博、農業技術大系 花卉編 7 カーネーション/バラ、社団法人農山漁村文化協会、37-41、1996年
- 6) 池田 宗平、農業技術大系 花卉編 7 カーネーション/バラ、社団法人農山漁村文化協会、13-16、1996年
- 7) 2009-2010 フラワーデータブック、財団法人日本花普及センター、170-171、2011年
- 8) 米村 浩次、農業技術大系 花卉編 7 カーネーション/バラ、社団法人農山漁村文化協会、25-35、1996年
- 9) Sparnaaij L. D., Beeger G. W., The Improvement of seed production for breeding purposes in the glasshouse carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *Euphytica* 22: 274-278, 1973
- 10) Keane, A. T., Breeding new carnation cultivars., *Int. Plant Prop. Soc. Combined Proc.* 39: 88-89, 1990
- 11) 鶴島 久男、花き園芸ハンドブック、養賢堂、117、1986年
- 12) Nimura, M., Kato, J., Mii, M., Morioka, K., Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thumb., *Theo. Appl. Genet.* 106: 1164-1170, 2003
- 13) 塚本 洋太郎、最新園芸大辞典 4、井上 頼数、石井 林寧編、誠文堂新光社、73-80、1988年
- 14) Buell, K. M., Developmental morphology in *Dianthus* III. Seed failure following interspecific crosses., *Am. J. Botany* 40: 116-123, 1953
- 15) Kho, Y. O., Baër, J., The effect of temperature on pollen production in carnations., *Euphytica* 22: 467- 470, 1973

- 16) Mehlquist, G. A. L., Ober, D., Sagawa, Y., Somatic mutations in the carnation, *Dianthus caryophyllus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 40: 432-436, 1954
- 17) Tejaswini, Male gametophytic generation and a possible approach for selective pollination in carnation (*Dianthus*) breeding program., Rostilinna Vyroba 48: 368-375, 2002(8)
- 18) Armstrong, J. A., Biotic pollination mechanisms on the Australia flora- a review., NZJ. of Botany 17: 467-508, 1979
- 19) Herrera, C. M., Herrera, J., Espadaler, X., Nectar thievery by ants from Southern Spanish insect-pollinated flowers., Insectes Sociaux Paris 31: 142-154, 1984
- 20) Gottsberger, G., Floral ecology report on the years 1985(1984) to 1988., Progress in Botany 50: 352-361, 1989
- 21) Harriss, F. C. L., Beattie, A. J., Viability of pollen carried by *Apis mellifera* L., *Trigona carbonaria* Smith and *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Apidae, Vespidae). J. Aus. Ent. Soc. 30: 45-47, 1991
- 22) Gomez, J. M., Zamora, R., Pollination by ants: consequences of the quantitative effects on a mutualistic system., Oecologia 91: 410- 418, 1992
- 23) Jennersten, O., Butterfly visitors as vectors of *Ustilago violacea* apores between *Caryophyllaceous* plants., Oikos 40: 125-130, 1983
- 24) Driessen M.N.B.M., Derksen J.W.M., Spijksma F.T.M., Roetman E., Pollenatlas van de Nederlandse Atmosfeer, Onkenhout, Hilversum, Eerst druk., 1988
- 25) 木村 賢治、ナデシコ族植物の花粉の特性に関する研究、南九州大学園芸学部園芸学科 卒業論文、1986年
- 26) Mitsuhara, 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
- 27) Franck, A., Guillely, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L., Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA., Cell 21: 285-294, 1980
- 28) Bedbrook, J. R., Chaleff, R. S., Falco, S. C., Mazu, R. B. J., Somerville, C. R., Yadav, N., Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase., US patent number 5 141 870, 1992
- 29) Shimizu, M., Kawai, K., Kaku, K., Shimizu, T., Kobayashi, H., Application of mutated acetolactate synthase genes to herbicide resistance and plant improvement., Herbicides, Theory and Applications, 10:193-212, 2011

- 30) Sommer, H., Bonas, U., Saedler, H., Transposon-induced alterations in the promoter region affect transcription of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*., Mol. Gen. Genet. 211: 49-55, 1988
- 31) Holton, T. A., PhD Thesis, University of Melbourne, Australia, 1992,
- 32) Holton, T. A., Cornish, E. C., Kovacic, F., Tanaka, Y., Lester R. R., Genetic sequences encoding flavonoid pathway enzymes and uses therefore., PCT/AU/00334, W093/01290
- 33) Beld., Martin, C., Huits, H., Stuitje, R., Gerats, A. G. M., Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes., Plant Mol. Biol. 13: 491-502, 1989
- 34) Huits, H. S., Gerats, A. G., Kreike, M. M., Mol, J. N., Koes, R. E., Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*., Plant J. 6: 295-310, 1994
- 35) 落合孝広、青木一教、遺伝子導入なるほどQ&A、羊土社、125-126、2005年
- 36) 三木大介、岡野陽介、島本功、改訂3版モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編、秀潤社、247-248、2005年
- 37) Frioozabady, E., Lemieux, C., Moll, B. A., Robinson, K., Carnation plants and methods for their transformation and propagation., US patent number 5 589 613, 1996
- 38) 新井正善、培養変異選抜により育成したカーネーション新品種「ポーレッド」の育成経過と育成特性、東北農業研究 53, 241-242, 2000年
- 39) 新井正善、培養変異選抜により育成したカーネーション新品種「ユアレッド」の育成経過と育成特性、東北農業研究 54, 235-236, 2001年

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成24年6月8日

氏名 サントリーホールディングス株式会社
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青紫色カーネーション(*F3'5'H, DFR, dsDFR, surB, Dianthus caryophyllus* L.) (25958, OECD UI: IFD-25958-3) (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。

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

本組換え体の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については、本組換え体の実質的な生産販売者がサントリーホールディングス株式会社のグループ会社であるサントリーフラワーズ株式会社であることから、申請者であるサントリーホールディングス株式会社内に統括責任者を設置した上で、サントリーフラワーズ株式会社内に責任者及び実務責任者を設置し、緊急措置を講ずるための実施体制（以下「危機対策本部」という。）を構築することとする。

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ときは、統括責任者及び責任者は互いに連絡を密にし、統括責任者は速やかに危機対策本部を設置することとする。

個人名・所属は個人情報につき非開示

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、周知するためにサントリーフラワーズ株式会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。

緊急措置計画書（切り花の用に供する場合）

平成24年6月8日

氏名 サントリーホールディングス株式会社
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青紫色カーネーション(*F3'5'H, DFR, dsDFR, surB, Dianthus caryophyllus L.*) (25958, OECD UI: IFD-25958-3) (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。

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

本組換え体の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については、本組換え体の実質的な生産販売者がサントリーホールディングス株式会社のグループ会社であるサントリーフラワーズ株式会社であることから、申請者であるサントリーホールディングス株式会社内に統括責任者を設置した上で、サントリーフラワーズ株式会社内に責任者及び実務責任者を設置し、緊急措置を講ずるための実施体制（以下「危機対策本部」という。）を構築することとする。

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ときは、統括責任者及び責任者は互いに連絡を密にし、統括責任者は速やかに危機対策本部を設置することとする。

個人名・所属は個人情報につき非開示

2 第一種使用等の状況の把握の方法

本組換え体は、輸出国において栽培委託契約を締結した限定された生産者によって栽培され、販売契約を結んだ限定された輸出業者により日本のサントリーフラワーズ株式会社のみ輸出される。このため、生産者と輸出業者を通じて輸出国における栽培情報と日本への輸出情報を直接把握することが可能であり、収集した情報については、整理し記録する。

なお、輸入業者は契約に基づきサントリーフラワーズ株式会社だけであり、収集した情報は整理し、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、栽培委託契約を締結した限定された生産者と販売契約を結んだ限定された輸出業者に対して、本組換え体が日本において生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められたことを連絡する。また、周知するためにサントリーフラワーズ株式会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、サントリーフラワーズ株式会社のみならず日本向けの輸出をしている限定された輸出業者に日本への輸出の中止を指示する。さらに、日本国内において本組換え体の輸入業者はサントリーフラワーズ株式会社のみであるため、輸入業者としてのサントリーフラワーズ株式会社在庫についてはサントリーフラワーズ株式会社の判断で本組換え体の不活化処分（粉砕等）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。

青紫色及び除草剤クロロスルフロロン耐性カーネーション(*F3'5'H*, *DFR*, *dsDFR*, *surB*,
Dianthus caryophyllus L.) (25958, OECD UI: IFD-25958-3)の別添資料リスト

- 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)
- 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)
- 別添資料 3 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
(社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 4 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
(社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 5 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果(社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 6 隔離ほ場における試験の結果 (社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 7 国外における使用等により得られた情報 (社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 8 青紫色カーネーション系統間の花色の相違とアントシアニン組成の関係
(社外秘情報につき非開示)