

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, surB, Dianthus caryophyllus* L.) (11363, OECD UI: FLO-11363-2) 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
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	12
(1) 供与核酸に関する情報	12
(2) ベクターに関する情報	20
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	20
(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	23
(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	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
(1) 使用等の内容	28
(2) 使用等の方法	28
(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	28
(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	28
(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	28
(6) 国外における使用等に関する情報	28
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	32
(3) 影響の生じやすさの評価	32
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
2 有害物質の産生性	32
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
(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
3 交雑性	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	33
(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	35
4 その他の性質	35
第三 生物多様性影響の総合的評価	36
参考文献	38
緊急措置計画書（栽培目的の場合）	41
緊急措置計画書（観賞1の用に供する場合）	43
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>surB</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> L.）（11363, OECD UI: FLO-11363-2）の別添資料リスト	46

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 2 月 3 日

5 農林水産大臣

西川 公也 殿

環境大臣

望月 義夫 殿

10

氏名 サントリーホールディングス株式会社
申請者 代表取締役社長 新浪 剛史 印
住所 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号

15

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

20

25

30

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>surB</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> L.) (11363, OECD UI: FLO-11363-2)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	観賞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

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：カーネーション

10 英名：carnation

学名：*Dianthus caryophyllus* L.

② 宿主の品種名又は系統名

15 宿主に用いたカーネーションの園芸種の品種名はユネスコで、スプレータイプの四季咲き品種である。花は八重、円形の盛咲き。花径は約4 cm程度であり、草型は直立である。アントシアニン生合成経路(図2 P18)のうち、ジヒドロフラボノール4-還元酵素を自然突然変異により欠損しているため白色を呈している。

20 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)。我が国においては、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、カーネーションの原種は現存せず、園芸種は我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、我が国を含めて園芸種が自生化したという報告はない(Tutin, 1964; Otten, 1991)。

35

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

5 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。我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と呼ばれていた（小西ら、1988年）。

我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
10 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、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）。

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
15 されており、平成25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26年5月27日公表）によると、平成25年における我が国での切り花カーネーションの年間出荷量は約3億470万本であった。国内では、カーネーションは主に切り花として利用されるが、母の日を中心に鉢物としても利用される。

国外では、古代ギリシャ時代には、既にカーネーションは観賞されていたといわれるが、
20 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
25 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
30 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）。

遺伝子組換えの手法を用いて花色を青紫色に変化させたカーネーションは、1996年に最
35 初の品種がオーストラリアで販売された。その後、延べ10品種が、主にコロンビア、エクアドルで生産され、オーストラリア、日本、米国、ヨーロッパなどで主として切り花として販売された。うち、4品種がオーストラリアで2001年から鉢物として販売されたが、現

在では販売されていない。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

- 5 我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、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となっている。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とともに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）。
- 10 我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）。平成25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26年5月27日公表）によると、平成25年の園芸種の栽培面積は348ha、切り花出荷本数は3億740万本であった。
- 15 鉢物の流通量は、平成20年花き流通統計調査報告（農林水産省大臣官房統計部、平成22年3月10日公表）によると、193万鉢であった。鉢物の流通量の調査は現在は行われていないが、ほぼ同水準と推定される。
- 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、我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
- 25 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）。
- 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
- 30 減し、欧州の切り花生産量も減少傾向にある。コロンビアは我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我が国への輸出が増加してきている（池田、1996
- 35 年）。東京税関発行の「特集カーネーションの輸入」（平成26年4月28日発行）によると、平成24年の園芸種の切り花輸入量は約3億5000万本で、本数では国内産を上回っている。

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。

青紫色の遺伝子組換えカーネーションは 1997 年から切り花として国内に輸入が始まり、現在では年間約 160 万本がコロンビアとエクアドルから切り花として輸入されている。

5 2001 年に国内で生産されたことがあるが、その後は生産されていない。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

10

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り、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。

15

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)。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

20

0~5℃ぐらいの気温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℃以下にならない我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、小西ら、1988 年)。

30

ハ. 捕食性又は寄生性

35

ニ. 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

自然条件下における自殖、他殖はともに困難であり(第一 1 (3) 二③a P7参照)、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。そのため、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。

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, 1973; Keane, 1990)。

また、種子の休眠性はないことが知られている(Keane, 1990)。

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)。乾燥低温下で保存した場合、10年以上発芽能を保持する(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、私信)。

② 栄養繁殖の様式並びに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

自然条件下での栄養繁殖の可能性はなく、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となる。

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

a. 自殖性及び他殖性の程度

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, 1990; Nimura et al., 2003)。また、第一 1 (3) 二 ④ (P9) に、記載している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, 1973; Keane, 1990)。

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。

c. 近縁野生種との交雑性

(a) 日本に自生する近縁野生種

5

我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 (塚本、1983年)。それぞれの自生地及び生育環境等を下記に記す。

10

- ・ 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。
- 15 ・ 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た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。
- 20 ・ 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
- 25 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。

30

(b) 近縁野生種との自然条件下での交雑性

我が国の自然条件下において、カーネーションの園芸種と我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。

35

(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卉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。

- 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、
- 5 園芸種を花粉親に用いた場合、全く種子は得られず、胚培養を利用しても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おり、残る 50%はカーネーションであった (Nimura et al., 2003)。さらに、エゾカワラ
- 10 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)。

d. アポミクシスを生ずる特性の有無

15

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, 1953)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

20 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 (元第一園芸株式会社のカーネーションなどの育種家である佐藤和規氏、私信)。また、品種によって雄蕊の数や花粉の生産量は異なる。例えば、シム系 (第一 1 (2)①P4 に記載) では水

25 と栄養のストレスが花粉の生産を向上させ、温度が雌蕊や花粉の生産を制御することが報告されている (Mehlquist et al., 1954; Kho and Baër, 1973)。花粉の生産に最適な温度は 23-26 °C であるが、17 °C 以下では雄蕊の成育が完全に抑制される (Kho and Baër, 1973)。

なお、宿主のユネスコ及び青紫色及び除草剤クロルスルフロロン耐性カーネーション (F3'5'H, DFR, surB, *Dianthus caryophyllus* L.) (11363, OECD UI: IFD-11363-2) (以下

30 「本組換えカーネーション」という。) は、ともに蒴の存在が認められ、少量の花粉を生産するが、ともに発芽培地で発芽しない (別添資料 5 P7、別添資料 6 P15-16)。

b. 花粉の稔性、形状

35 花粉の稔性については品種間格差が大きいですが、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, 1973)。カ

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, 1973)。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, 2002)。

5

c. 花粉の媒介方法

カーネーションの園芸種は、花弁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 (Bloch et al. 2006)。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。

10 15 20 25 30 35

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, 1979)、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., 1984; Gottsberger, 1989; Harriss and Beattie, 1991; Gomez and Zamora, 1992) 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 (Jennersten, 1983) 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。

d. 花粉の飛散距離及び寿命

25 30 35

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粉は重く粘性があり (Jennersten, 1983)、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、園芸種カーネーション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, 1991; Driessen et al., 1988)。

花粉の寿命は 1-2 日であり、3 日目には完全に発芽が認められなくなったという報告がある (木村, 1986)。

30

ホ. 病原性

35 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、我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

5

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の表 1 に、その位置関係を図 1 (P14) に、その塩基配列を別添資料 1-図 1 (P1-26)、別添資料 2-図 1 (P1-26) に示した。

10

表 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNA領域		
Left Border 領域	1-689	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のTiプラスミド由来のLeft Border領域で、T-DNAとして切断される。 Tinland 1996; Zupan et al. 2000
Intervening Sequence	690-695	クローニングに利用された配列。 Sambrook et al. 1989
35S プロモーター	696-889	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) Franck et al.1980
Intervening Sequence	890-957	クローニングに利用された配列
<i>surB</i>	958-2949	タバコ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子。クロロスルフロン耐性を付与する。Lee et al.1988
<i>surB</i> 3'	2950-4713	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、 Lee et al.1988
Intervening Sequence	4714-4834	クローニングに利用された配列
<i>Lac Z promoter</i>	4835-4956	大腸菌由来クローニングベクター由来の <i>LacZ</i> プロモーター配列
<i>DFR</i> genomic DNA	4957-9943	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)、 Beld et al. 1989

Intervening Sequence	9944-10006	クローニングに利用された配列
CHS	10007-11142	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、Sommer H and Saedler H, 1986.
Intervening Sequence	11143-11186	クローニングに利用された配列
<i>F3' 5' H</i> cDNA	11187-12960	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、Katsumoto et al. 2007
Intervening Sequence	12961-12981	クローニングに利用された配列
D8 3'	12982-13793	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、Holton 1992
Intervening Sequence	13794-13811	クローニングに利用された配列
<i>lacZ</i>	13812-13947	大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の一部。クローニングに利用された配列
Intervening Sequence	13948-13981	クローニングに利用された配列
Right border 領域	13982-15825	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のTi ⁺ プラスミド由来のRight Border領域で、T-DNAとして切断される。Tinland, B, 1996; Zupan et al. 2000
外骨格領域 (本組換えカーネーションには存在しない)		
Intervening Sequence	15826-15835	クローニングに利用された配列
pVS1 replicon	15836-23721	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来の <i>A. tumefaciens</i> 中でのレプリコン, Ito et al. 1988; Lazo et al. 1991
Tc resistance	23722-25768	大腸菌由来のテトラサイクリン抵抗性を付与する蛋白質をコードする遺伝子 (<i>TetA</i> (24550-25749) と <i>TetR</i> (24444-23794) を含む領域、Backman and Boyer, 1983.
Modified pACYC184 replicon	25769-27296	大腸菌中におけるプラスミドのレプリコン、Chang ACY and Cohen SN, 1978 ; Rose 1988
Intervening Sequence	27297-27488	クローニングに利用された配列

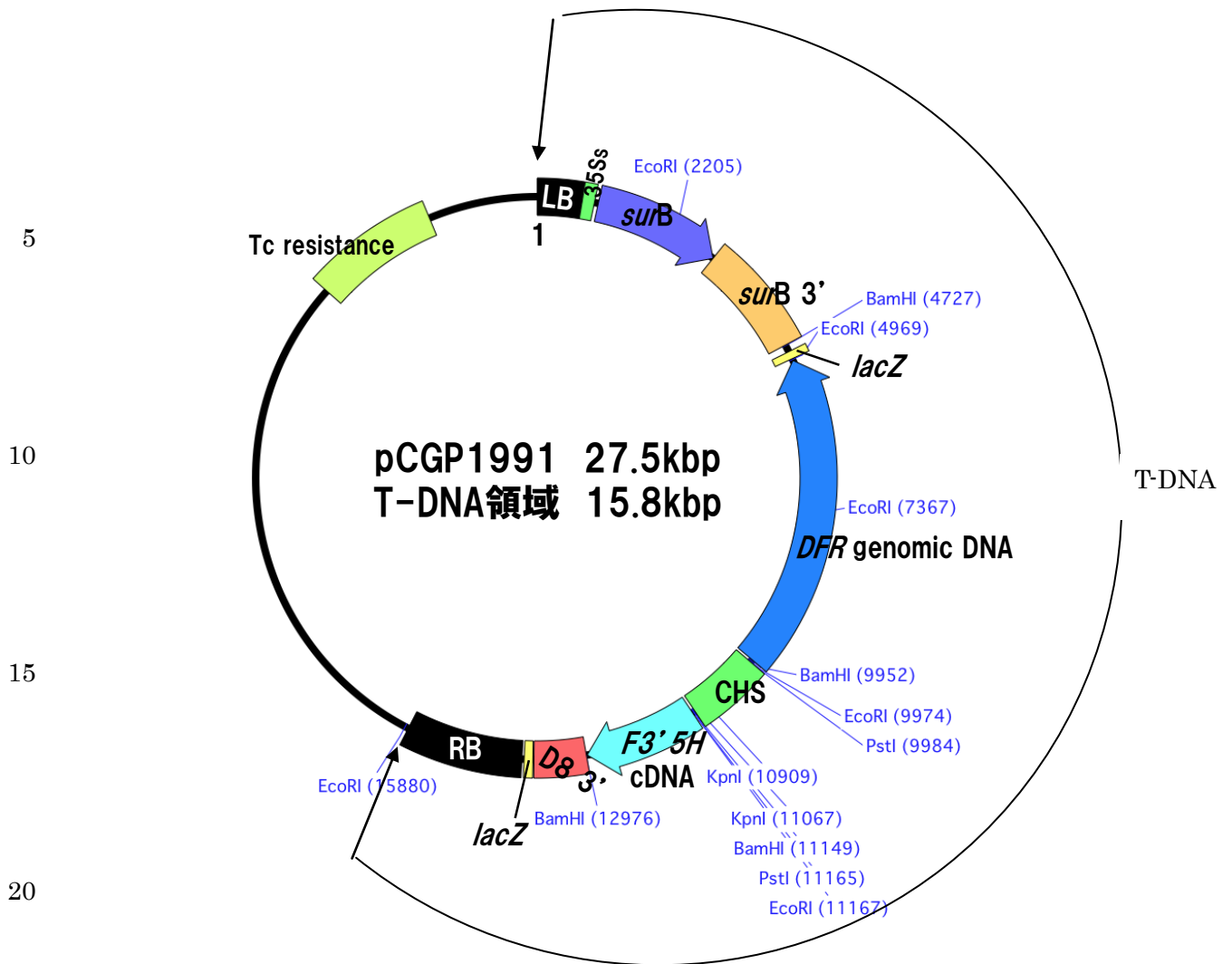


図1. 本組換えカーネーションの作出に用いられた pCGP1991 のプラスミドマップ

25 本組換えカーネーションの作出過程で、上図の T-DNA 領域がゲノム中に挿入される。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

- 5 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

本組換えカーネーショ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。

- 10 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

【*surB* 蛋白質】

- 15 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。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の(chlorsulfuron)によって阻害されるが、致死
- 20 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、クロロスルフロンの抵抗性を示すことが明らかとなった (US patent number 5 141 870)。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の (Thifensulfuron)、
- 25 ベンスルフロンのメチル (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のとベンスルフロンの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., 2011)。本組換えカーネーションの選抜にはクロロスルフロンのを用いた。

35

【フラボノイド 3',5'-水酸化酵素蛋白質】

パンジー由来。図 3 (P19) 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反応を触媒する。

5 【ジヒドロフラボノール 4-還元酵素蛋白質】

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できない (Beld et al., 1989、Huits et al., 1994)。そのため、ペチュニア由来 DFR はデルフィニンを生産するのに適した DFR であると考えられる。

15

これらの蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性を有するか否かについて、2014 年 11 月にネブラスカ大学アレルギーデータベース Allergen Online version 14 (2014 年 1 月 20 日更新) を用いて検索を行ったところ、既知アレルギーと 6 アミノ酸以上マッチする配列は認められなかった。

20

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【フラボノイド 3',5'-水酸化酵素蛋白質】

導入したパンジー由来のフラボノイド 3',5'-水酸化酵素 (F3' 5' H、図 3) 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。F3' 5' H はフラボノイドを特異的に水酸化する反応を触媒する酵素であり、他の経路が改変されることはない。

25

【ジヒドロフラボノール 4-還元酵素蛋白質】

導入したペチュニア由来のジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR、図 2) によって、ジヒドロミリセチンがロイコデルフィニンに変換される。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。DFR はジヒドロフラボノールに特異的な酵素であり、他の代謝経路が改変されることはない。

35

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について述べる。

アントシアニンの生合成経路の一部を図 2 (P18) 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 (P18) 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 (P18) 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。

本組換えカーネーションのアントシアニン生合成経路の一部を図 3 (P19) に示した。アントシアニンの B 環の水酸基が 1 個 (4' のみが水酸化されている) であるペラルゴニジン 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' のみが水酸化されている) 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。

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。

そこで、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) 活性がないためにアントシアニジンの合成が起こらず、花色が白くなっているカーネーションにペチュニア由来の *DFR* 遺伝子とパンジー由来の *F3' 5' H* 遺伝子を導入し、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る。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。メチル基転移酵素活性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。

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と考えられている。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)。

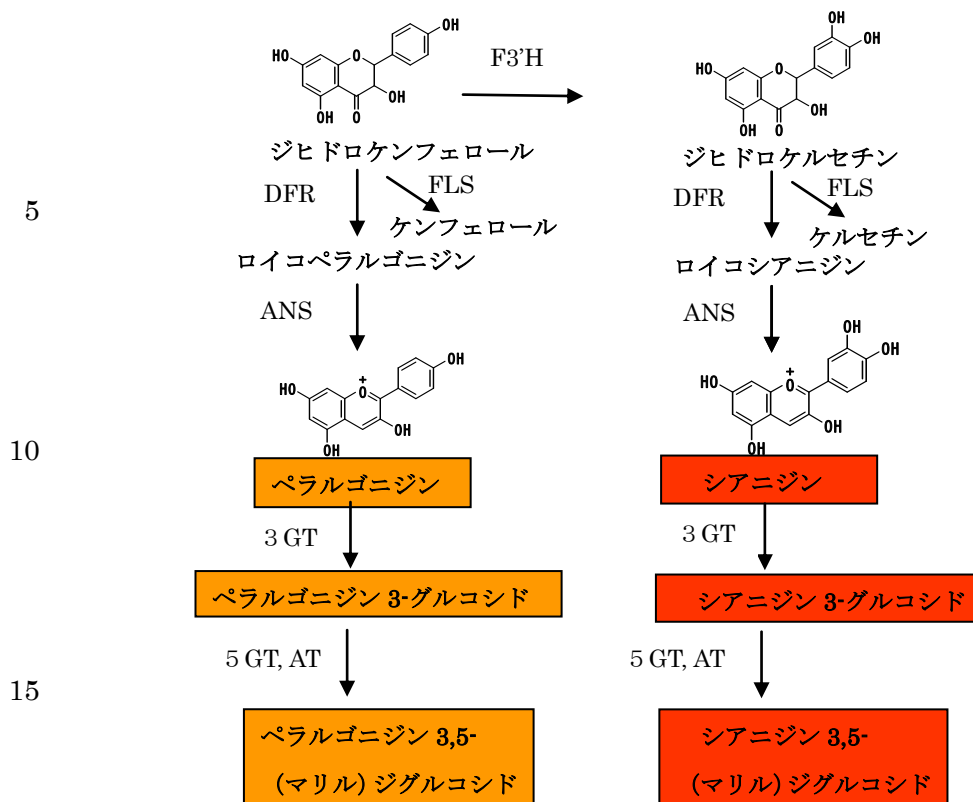


図2. 非組換えカーネーションのアントシアニン生合成経路の概略

20 非組換えカーネーションではシアニン型アントシアニンやペラルゴニン型アントシアニンを蓄積している。

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

25

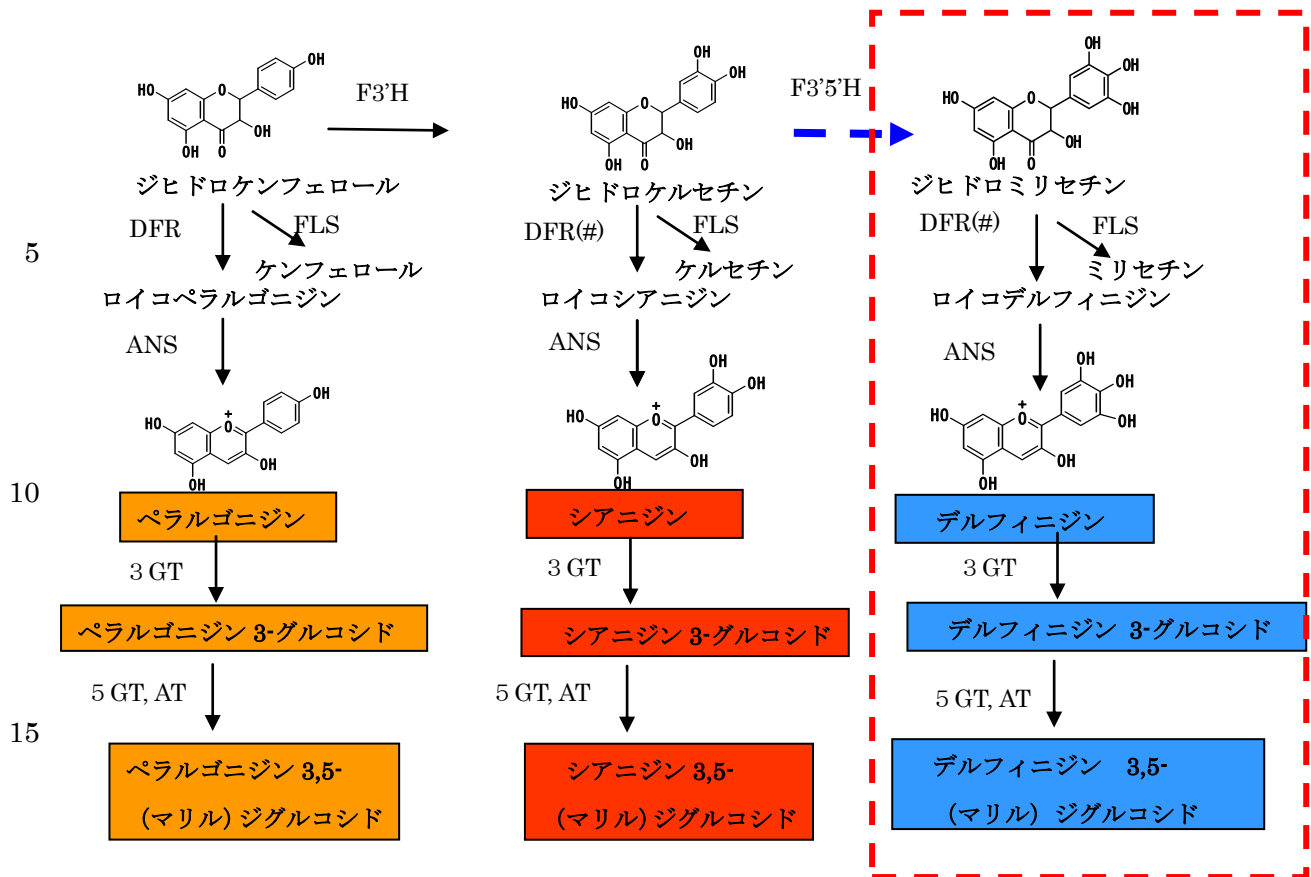


図3. 本組換えカーネーションのアントシアニン生合成経路の概略

20 非組換えカーネーションには青破線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。カーネーションにおいては、さらに修飾され、デルフィニジン 3,5-

25 (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。

※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

30 ※ (#) 印の DFR は導入遺伝子により新たに発現する酵素で、ジヒドロミリセチンを効率よく還元するので、デルフィニジンを生産するのに適している。この DFR はジヒドロケルセチンも還元できる。

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

5

本組換えカーネーションの作出に用いたベクターpCGP1991 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。

10

ロ. 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15

pCGP1991 の塩基数は 27,488 bp で、T-DNA の塩基配列を別添資料 1-図 1 (p. 1-21) 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

20

大腸菌における構築ベクターの選抜マーカーとして、テトラサイクリン耐性を付与するテトラサイクリン抵抗性遺伝子が含まれるが、本組換えカーネーション中に本遺伝子は導入されていない。また、本組換え体の選抜マーカーとして、除草剤クロロスルフロロン耐性を付与する *surB* 遺伝子が本組換え体に導入されている。

25

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

本ベクターに感染性の知られている配列は含まれていない。

30 (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

本組換えカーネーションの作出に用いたベクターpCGP1991 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をそれぞれ図 1 (P14) に示した。

35

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を用いた。

- 5 1995年10月から11月にかけて、表面殺菌したユネスコの茎片に *Agrobacterium tumefaciens* Ag10株を接種し、1996年7月から11月にかけて青紫色の組換え体を得た。現在、栄養増殖にて維持している。

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- 10 本組換えカーネーション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。

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

- 15 本組換えカーネーション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

20

本組換えカーネーション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

25

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。
また、本組換えカーネーションからは、プラスミドの外側骨格領域の一部であるテトラサイクリン遺伝子はPCR法でもサザン法でも検出されなかった(別添資料10)。アグロバクテリウムがTiプラスミド上に持つ*VirG*遺伝子は刺し穂の様々な部位から得たゲノムDNAを用いたPCR法によって検出されなかった(別添資料9、P1-3)。さらに、本組換え体は

30

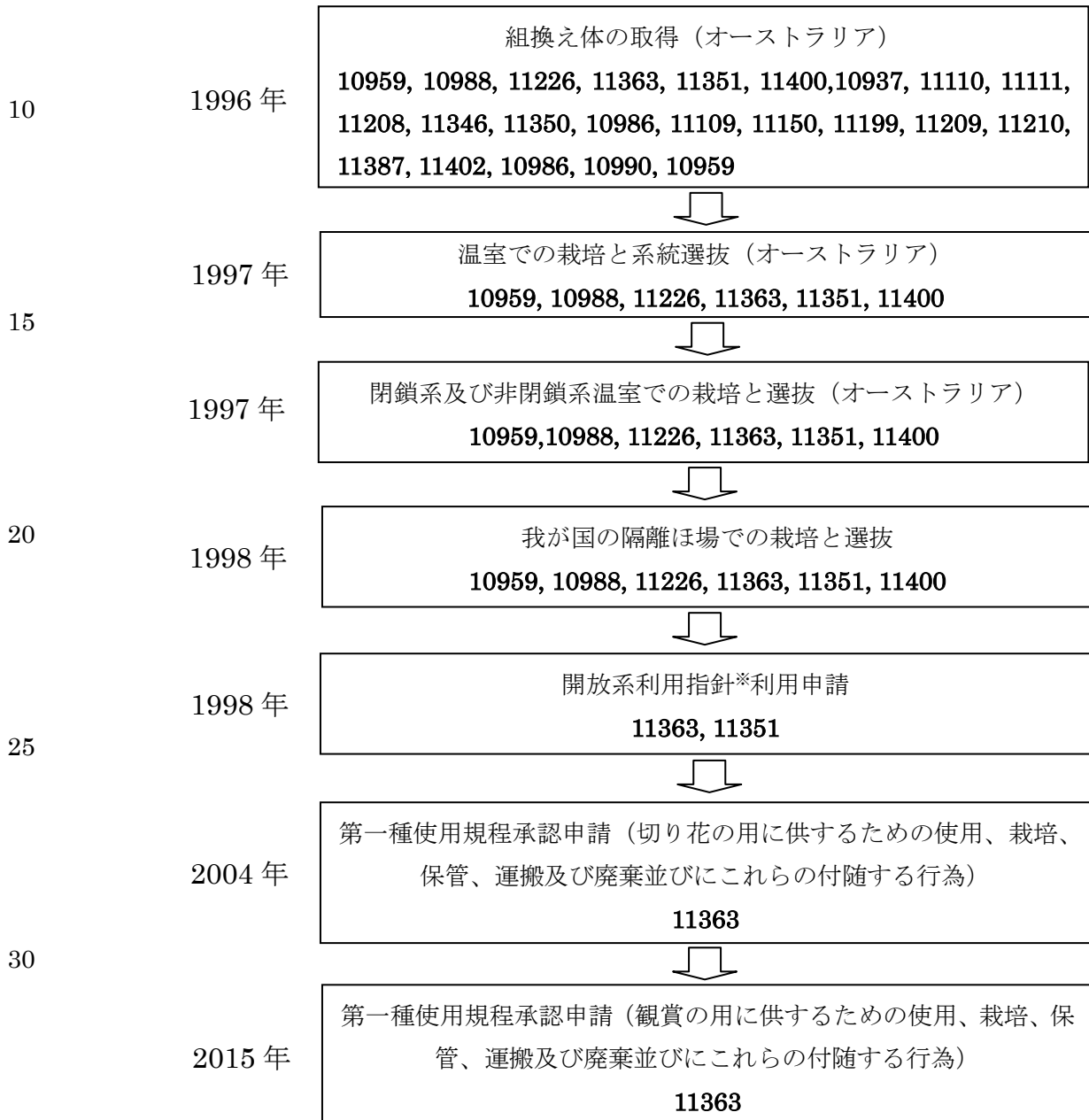
栄養的に増殖するため、本組換え体の元株は組織培養で15年以上維持しているが、培地中にアグロバクテリウムの増殖は観察されなかった。
よって、本組換えカーネーションにおける導入遺伝子を有するアグロバクテリウムの残存は無いと判断された。

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、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

5

カーネーションは栄養体繁殖で増殖するため、本組換えカーネーションは形質転換当代である。独立した多数の組換え体系統から優良な系統を選抜した。



35 ※「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」（平成元年～平成16年）

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

サザンブロット解析の結果より、本組換えカーネーションにおいて移入された核酸は 3 箇所に存在するものと考えられた。導入された遺伝子の隣接する配列はいずれもカーネーションゲノムの配列と一致したことから、移入された核酸は染色体上に存在すると考えられる。(別添資料 3-1 P3-6 参照、別添資料 3-2 P9)。

10

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

15

サザンブロット法による解析を行い、移入された配列は本組換えカーネーションゲノム中、3 箇所に存在すると考えられた。移入された配列は T-DNA の LB から RB に至る全長、もしくは、LB から RB に至る配列の一部と考えられる (別添資料 3 P2 参照)。なお、本組換え体は全て栄養増殖によって生産しており、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。

20

なお、本組換えカーネーションは 1996 年の作出から栄養繁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。

25

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

移入された核酸はカーネーションドラフトゲノム配列の異なる scaffold に存在すること (別添資料 3-2 P9 表 1) から、離れて存在すること考えられた。

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

35

導入したパンジー *F3' 5' H* 遺伝子及びペチュニア *DFR* 遺伝子の花卉における発現について、ノーザンブロット法による解析を行った。導入遺伝子に特異的なシグナルが本組換えカーネーションでのみ検出され、ゲノム内に挿入された遺伝子が発現していることが明らかとなった (別添資料 3-1 P7 参照)。また導入遺伝子の発現の結果もたらされる花色は、本組換え体では青紫色であり、安定して発現している。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、これまで青紫色以外の花色を示したという事例はない。

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。

5 さらに、本組換えカーネーション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。

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

10

—

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

15 サザンブロット解析による本組換えカーネーションの特異的な検出、識別が可能である(別添資料 3-1 P3-6)。その検出感度については約 20 μ g の染色体 DNA を用いれば検出可能である(別添資料 3-1 P3-6)。

さらに、本組換えカーネーション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(別添資料 4 P4-6)。検出感度は 10 ng であった(別添資料 4 P6)。

20

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

25 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

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た結果、デルフィニジンが生産され、花色が青紫色に変化した(別添資料 5 P3-5、別添資料 6 P 9-10 参照)。

30

パンジー *F3' 5' H* は花卉特異的プロモーターの制御下にあるため花卉において、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卉において発現している。

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クロロスルフロンを添加した培地を用いて確認した。

35

- 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

1997年から1998年に、サントリー研究センター内の特定網室及び隔離ほ場内のビニール温室において隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えカーネーションを供試した。対照の非組換えカーネーションとしては、品種ユネスコを用いた。なお、宿主と同様、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

10

宿主及び本組換えカーネーションを特定網室で栽培し、生育特性として開花時の茎の長さ、形態特性として花卉の数、花の直径、葯長、葯幅について調査したところ、花卉の数、花の直径、葯長、葯幅において宿主と本組換え体間で統計学的有意差(t検定、有意水準5%)が認められた。(別添資料5 P8 参照)。花卉の数については、宿主が 46.0 ± 4.2 枚であったのに対し、本組換え体は 39.0 ± 8.5 枚であった。花の直径については、宿主の花の直径が 3.2 ± 4.4 cmであったのに対し、本組換え体の花の直径は 3.97 ± 5.5 cmであった。葯長、葯幅については、宿主の葯長、葯幅が 2.2 ± 0.9 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 3.00 ± 1.1 mm、 1.00 ± 0.4 mmであった。園芸種カーネーションの花の大きさや形態は多様であり、本組換え体の花は園芸種カーネーションの範囲に入ること、花粉には発芽能がないことから、これらの有意差は見られても、生物多様性に影響はないと考えられる。

15

宿主及び本組換えカーネーションを隔離ほ場内のビニール温室で栽培し、形態及び生育特性、すなわち、草丈、節数、開花時期、葯長、葯幅について調査したが宿主と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6 P11 参照)。よって、形態及び生育特性において宿主と本組換え体間で相違はないと考えられた。

25

b 生育初期における低温又は高温耐性

園芸種カーネーションは自然条件下において受精することなく、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。挿し芽に由来する生育初期植物の低温耐性については、隔離ほ場で草丈10-15cm、節数1程度の幼苗を野外定殖した越冬性試験において、宿主と組換え体間で生育の違いは認められなかったことから宿主と組換え体間で相違はないと考えられる(別添資料6 P19 参照)。また、通常のカーネーション栽培においては春に挿し芽を行い、夏には成熟した植物体となっていること、夏や冬に挿し芽を行う際には、温室内で人工的な条件下で行うことから生育初期における高温耐性は調査してい

30

35

ない。

c 成体の越冬性又は越夏性

- 5 宿主及び本組換えカーネーションを隔離ほ場で野外栽培したところ、全個体越冬するとともに、生育にも違いは認められなかった（別添資料 5 P19 参照）。よって、越冬性において宿主と本組換え体間で相違はないと考えられた。成体の越夏性については、園芸種カーネーションは 20℃前後の冷涼な温度を好むため、高温な日本の夏季においては人工的に温度を制御した温室内で栽培されることから調査していない。しかし、夏季にビニールハウ
- 10 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 7 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。日本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た。

15 d 花粉の稔性及びサイズ

特定網室で生育させた、宿主及び本組換えカーネーション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、ともに花粉の存在が認められた（別添資料 5 P6 参照）。そこで、花粉の発芽試験を行ったが、発芽は認められなかった（別添資料 5 P7 参照）。

- 20 さらに、宿主及び本組換えカーネーション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、花粉の大きさについて顕微鏡下で観察したところ、差は認められなかった（別添資料 6 P14 参照）。そこで、花粉の発芽試験を行ったが、発芽は認められなかった（別添資料 6 P15-16 参照）。

25

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。
- 30 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、休眠性及び発芽率については調査を行っていない。

f 交雑率

- 35 花粉は、宿主及び本組換えカーネーションのいずれにも存在したが、ともに花粉管の発芽は認められなかった（別添資料 6 P15-16 参照）。宿主及び本組換え体の花粉を園芸種カー

ネーションとナデシコに人為的に交配したが、種子の形成は認められなかった。

一方、人為的交配の結果、雌蕊の稔性は認められ、少数の種子も形成したが、宿主と本組換えカーネーション間で相違は認められず、他の園芸種カーネーションを用いた場合と比べると、種子数は少なかった（別添資料 6 P18 参照）。開花時期を含めた生育特性においても、宿主と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 6 P11-12 参照）。よって、宿主と本組換え体間で交雑率に相違はないと考えられた。

g 有害物質の産生性

10 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、我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カーネーション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、宿主及び本組換え体について、鋤込み試験及び後作試験を、特定網室ではハクサイ、隔離ほ場ではレタスの種子を用いて行った。いずれの場合も、宿主と本組換え体間で発芽率、実生の新鮮重に統計学的有意差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 5 P10-11、別添資料 6 P20-21 参照）。

また、特定網室と隔離ほ場での土壌微生物相試験の結果、いずれの場合も、細菌、放線菌及び糸状菌数について宿主と本組換えカーネーション間で統計学的有意差（t 検定、有意水準 5%）は認められなかった（別添資料 5 P12、別添資料 6 P22 参照）。

20

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

観賞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。

20

(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

本組換えカーネーションは、平成 16 年 12 月 10 日に「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」に関する第一種使用等が認められた。本組換え体は 2000 年に、佐賀県で 60 m²、長野県で 10 m²栽培し、約 1 万 1 千本を国内で販売した。エクアドルまたはコロンビアで栽培された本組換え体の切り花は、2005 年から 2011 年の間に約 67 万本が国内で販売された。一般の園芸種カーネーションと比較して環境及び人体へ悪影響を及ぼしたというような報告は受けていない。

30

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えカーネーションの海外の主要栽培国及び輸入国における申請状況は以下の通りである。

35

表2 海外での認可及び生産の状況

国/地域	許可 (書類、日付)	生産期間	販売期間
オーストラリア	GR-2 19950925; Register 001/2004 27 March 2007	切り花 1996- 現在	1997- 現在
		鉢物 2001年	鉢物 2001年
EU (オランダ)	C/NL/97/13/01-1363A Oct 20 1998	1997年5月から 1999年9月	1998年5月から 2011年11月
North America	許可不要 (USDA-APHIS が切り花カーネーションの輸入は規制する必要がないと判断)	生産歴なし	1999年から2011 年11月
コロンビア	Resolution 1219 of 18 May 2000	2010年7月 から 2011年10月	販売歴なし
エクアドル	1997年に Instituto Ecuatoriano Forestal y de Areas Naturales y Vida Silvestre, Ministerio de Agricultura から許可	1998年7月から 2010年11月	販売歴なし

- 2005年から2011年の販売本数は海外では約1000万本、日本では約67万本を販売した。これら生産地において、栽培している畝周辺に組換え体が拡がったり、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、エクアドル、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。

本組換えカーネーションの我が国における申請、生産、販売状況は以下の通りである。

10 表3 我が国における申請、生産及び販売状況

許可 (書類、日付)	生産期間	販売期間
開放系利用指針適合確認、平成10年1259号 第一種使用規程承認、平成16年12月10日	2000年	1999年から2011年4月

本組換えカーネーションと同じく、ペチュニア由来の *DFR* 遺伝子とパンジー由来の

F3' 5' H遺伝子を導入した青紫色カーネーションは、オーストラリアにおいては1996年9月24日に general release の承認を受けている（別添資料7 P2 参照）。オランダにおいても、EC での温室栽培許可の承認を1997年2月に受けている（別添資料7 P6 参照）。さらにオーストラリアにおいては1998年2月より、ECにおいては1999年7月より一般に販売

5

本系統並びに、青紫色カーネーション123.2.2 (FL0-40619-8)、青紫色カーネーション123.2.38 (FL0-40644-6)及び青紫色カーネーション123.8.8 (FL0-40685-2)に関しては、2001年にオーストリアのTessellar社から鉢物として販売されたことがある。

10

2013年のムーンダストシリーズ販売本数（合計）を表4に示した。一般の園芸種カーネーションと比較して環境及び人体へ悪影響を及ぼしたというような報告は受けていない。

表4 ムーンダストシリーズの2013年国別販売本数

販売国/地域	本数 (万本)
北米	2,240
欧州	350
日本	160
ロシア	126
オーストラリア	31
ドバイ	6
合計	2,920万本

15

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

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

10 競合における優位性に関する項目として、茎の長さ等の生育特性及び生殖・繁殖特性について、本組換えカーネーションと非組換えカーネーションとの間における相違を非閉鎖系温室にて評価した。その結果、生育特性については、花卉の数、花の直径、葯長、葯幅において本組換え体と非組換え体との間で統計学的有意差(t検定、有意水準5%)が認められた。(別添資料5 p.8参照)。これらの差異は、通常のカーネーションの変化の幅に入ること、花粉が発芽しないことから、生物多様性に影響するとは考えられなかった。

15

宿主及び組換え体を隔離ほ場内のビニール温室で栽培し、形態及び生育特性、すなわち、草丈、節数、開花時期、葯長、葯幅について調査したが本組換えカーネーションと非組換えカーネーションとの間で統計学的有意差は認められなかった。(別添資料6 P11-13 参照)。

20

本組換えカーネーション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を生成しているが、生育特性において宿主と組換え体間で相違は認められなかった(別添資料6 P11-12 参照)。また花粉に発芽能はなく、人為的交配によっても花粉の稔性は示さなかった(別添資料6 P17 参照)。また、本組換え体では評価していないが同様に花色が青紫色に変化したカーネーションには訪花昆虫はほとんど認められず、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11)。また、本組換え体と同様の色の園芸植物は広く栽培されている。よって、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言えない。

25

30 本組換えカーネーションは、クロロスルフロン耐性を有するが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において、除草剤耐性であることが、本組換えカーネーションの競合における優位性を高めるとは考え難い。

35

以上のことから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 (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

10

以上のことから、本組換えカーネーションは、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判断された。

2 有害物質の産生性

15

(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我が国においても長期間使用されてきたが、これまでにカーネーションにおいて、有害物質の産生性は報告されていない。

20

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、本組換えカーネーション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ハクサイと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本組換え体と非組換え体との間に統計学的有意差は認められなかった。また、ハクサイ、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統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5 P10-11、別添資料 6 P20-21 参照）。したがって、本組換え体が宿主と比較してハクサイ、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。

25

さらに、土壌微生物相試験を行ったところ、細菌、放線菌及び糸状菌数において本組換えカーネーションと非組換えカーネーションとの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 5 P12、別添資料 6 P22 参照）。

30

以上のことから、本組換えカーネーションにおいて、有害物質の産生性が高まっているとは考え難い。

35

また、導入した遺伝子によって本組換えカーネーションが新たに産生しているデルフィニジン、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。(Chandler et al. 2013)。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 (Chandler et al. 2013)。

5

以上のことから、有害物質の産生性に起因し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

10

—————

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—————

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記のことから、本組換えカーネーションは、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。

20

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

25

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、本組換えカーネーション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。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等として、これら 4 種及び 2 変種が特定された。

30

(2) 影響の具体的内容の評価

35

本組換えカーネーション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。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、

5 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。

(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

10 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。宿主及び本組換えカーネーションの花粉の存在と充実度について調べた

15 ところ、いずれも花粉の存在が認められたが、その発芽は全く認められなかった（別添資料5 P6-7、別添資料6 P15-16 参照）。人為的交配によっても園芸種カーネーションやナデシコに種子を形成させることはできなかった（別添資料6 P17 参照）。以上のことから、自然条件下における交雑は極めて困難であると考えられる。

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、本組換えカーネーションの花の形状などの特性は園芸種と同様である

20

25 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。

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。本組換えカーネーション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, 1991; Driessen et al., 1988)。

30

以上のことから、本組換えカーネーションと近縁野生種が交雑し、導入遺伝子が近縁野生種集団内に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

35

(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、本組換えカーネーションは、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

5

4 その他の性質

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：

- 5 カーネーションの園芸種は、我が国においても長期間使用等の歴史があるが、これまでに我が国を含めて園芸種が逸出して自然条件下で生育している例は報告されていない。
- 競合における優位性に係る諸形質のうち、本組換えカーネーション及び非組換えカーネーションを非閉鎖系温室で栽培して形態及び生育特性、すなわち、茎の長さ、花卉の数、花の直径、葯長、葯幅について調査したところ、花卉の数、花の直径、葯長、葯幅について統計学的有意差が認められた（別添資料 5、P8）。これらは多様な園芸種カーネーションの範囲内であること、花粉に発芽能が認められなかったことから、周辺の生物多様性に影響を及ぼすとは考えにくい。本遺伝子組換え体及び非組換え体を隔離ほ場内のビニール温室で栽培し、形態及び生育特性、すなわち、草丈、節数、開花時期、葯長、葯幅について調査したが本遺伝子組換え体及び非組換え体間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6 P11-13 参照）。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
- 10 ジ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。本組換え体と同様に花の色を青紫色に改変したカーネーション（25958（IFD-25958-3）、26407（IFD-26407-2）など）を用いた訪花昆虫調査では、訪花昆虫はほとんど認められないこと、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 11）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難い。
- 15 また、本組換えカーネーションはクロロスルフロン耐性を有するが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において、除草剤耐性であることが、本組換えカーネーションの競合における優位性を高めるとは考え難い。
- 20 以上のことから、本組換えカーネーションが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。
- 25

有害物質の産生性について：

- 30 カーネーションの園芸種は我が国においても長期間使用されてきたが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告は無い。
- また、導入した遺伝子によって本組換えカーネーションが新たに産生している ALS、DFR、F3' 5' H、デルフィニジンが有害であるという報告も無い。
- 35 実際に鋤込み試験、後作試験を行ったところ、ハクサイ、レタス実生の新鮮重について本組換えカーネーションと非組換えカーネーションとの間に統計学的有意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難い。さらに、土壤微生物相試験を行ったところ、細菌、放線菌及び糸状菌数に本組換え体と非組換え体との間に差異は認められなかった。

5 以上のことから、本組換えカーネーションは有害物質の産生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。

交雑性について：

10 宿主及び本組換えカーネーションともに花粉の存在が認められた。しかしながら、花粉が発芽しないこと、宿主と本組換え体の花粉を人為的に交配してもナデシコ及び園芸種カーネーションに種子を形成できなかったこと、花卉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。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、
15 本組換え体が近縁の野生種と交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、本組換えカーネーションは、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。

20 よって、総合的評価として、本組換えカーネーションを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の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

- Armstrong, J. A., Biotic pollination mechanisms on the Australia flora- a review., NZJ. of Botany 17: 467-508, 1979
- Backman K and Boyer HW, 1983. Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide. Gene 26, 197-203.
- Bedbrook, J. R., Chaleff, R. S., Falco, S. C., Mazu, R. B. J., Somerville, C. R., Yadav, N., Nucleic acid fragment encoding herbicide resisitant plant acetolactate synthase., US patent number 5 141 870, 1992
- 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
- Buell, K. M., Developmental morphology in *Dianthus* III. Seed failure following interspecific crosses., Am. J. Botany 40: 116-123, 1953
- Chang ACY and Cohen SN, 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. Journal of Bacteriology 134, 1141-1156.
- Chandler, S., F., Senior, M., Nakamura, N., Tsuda, S., Tanaka, Y. Expression of flavonoid 3',5'-hydroxylase and acetolactate synthase genes in transgenic carnation: assessing the safety of a nonfood plant., J. Agri. Food. Chem. 61:11711-11720, 2013
- Driessen M. N. B. M., Derksen J. W. M., Spieksma F. T. M., Roetman E., Pollenatlas van de Nederlandse Atmosfeer, Onkenhout, Hilversum, Eerst druk., 1988
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L., Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA., Cell 21: 285-294, 1980
- Gomez, J. M., Zamora, R., Pollination by ants: consequences of the quantitative effects on a mutualistic system., Oecologia 91: 410- 418, 1992
- Gottsberger, G., Floral ecology report on the years 1985(1984) to 1988., Progress in Botany 50: 352-361, 1989
- 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
- Herrera, C. M., Herrera, J., Espadaler, X., Nectar thievery by ants from Southern Spanish insect-pollinated flowers., Insectes Sociaux Paris 31: 142-154, 1984
- Holton, T. A., PhD Thesis, University of Melbourne, Australia, 1992,
- 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

- 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
- Itoh, Y., Soldati, T., Leisinger, T. and Haas, D., 1988. Low- and intermediate-copy number cloning vectors based on the *Pseudomonas* plasmid pVS1., *Antonie Van Leeuwenhoek* 54:567-573. 1988
- Jennersten, O., Butterfly visitors as vectors of *Ustilago violacea* apores between *Caryophyllaceae* plants., *Oikos* 40: 125-130, 1983
- Keane, A. T., Breeding new carnation cultivars., *Int. Plant Prop. Soc. Combined Proc.* 39: 88-89, 1990
- Kho, Y. O., Baër, J., The effect of temperature on pollen production in carnations., *Euphytica* 22: 467- 470, 1973
- Lazo, G. R., Stein, P. A. and Ludwig, R. A., A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*, *BioTechnology* 9: 963-967, 1991
- Lee, K. Y., Townsend, J., Tepperman, J., Black, M., Chui, C. F., Mazur, B., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J.,. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco., *The EMBO Journal* 7:1241-1248, 1988
- Mehlquist, G. A. L., Ober, D., Sagawa, Y., Somatic mutations in the carnation, *Dianthus caryophyllus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40: 432-436, 1954
- 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
- 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
- Otten, A., Riscico-analyse voor een bloeioproef van transgene anjers (*Dianthus caryophyllus*) onder Pk2-kasomstandigheden., Risk evaluation submitted to Dutch Government, 1991
- Rose, R. E.,. The nucleotide sequence of pACYC184., *Nucleic Acids Research.* 16: 355. 1988
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1989
- 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
- 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
- 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
- Tejaswini, Male gametophytic generation and a possible approach for selective pollination in carnation (*Dianthus*) breeding program., Rostlinna Vyroba 48: 368-375, 2002
- Tinland, B., The integration of T-DNA into plant genomes., Trends in Plant Science 1:178-184, 1996
- 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
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. and Zambryski, P., The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal 23, 11-28, 2000
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 鶴島 久男、花き園芸ハンドブック、養賢堂、117、1986年
- 東京税関、特集カーネーションの輸入、
<http://www.customs.go.jp/tokyo/content/koku2603.pdf> 2014年
- 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
- 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

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成27年10月5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 新浪 剛史

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 surB*, *Dianthus caryophyllus* L.) (11363, OECD UI: FLO-11363-2) (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、科学的に判断された場合、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は以下に示すとおりである。

平成27年10月現在

委員	
*	サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社 研究部 上席 研究員 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 (電話番号 050-3182-0451)
	サントリーフラワーズ株式会社 常務取締役海外事業部長 東京都港区芝4-17-5 田町プレイス4階 (電話番号 03-5419-1386)
	サントリーフラワーズ株式会社 海外事業部長シニアマネージャー 東京都港区芝4-17-5 田町プレイス4階 (電話番号 03-5419-1386)
	サントリーフラワーズ株式会社 近江開発センター所長 滋賀県東近江市大森町字池谷863-1 (電話番号 0748-25-0221)

* : 管理責任者

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（以下「栽培委託生産者」という。）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（観賞の用に供する場合）

平成27年10月5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 新浪 剛史

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 surB*, *Dianthus caryophyllus* L.) (11363, OECD UI: FLO-11363-2) (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、科学的に判断された場合、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

平成27年2月現在

委員	
*	サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社 研究部 上席 研究員 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 (電話番号 075-962-9132)
	サントリーフラワーズ株式会社 常務取締役海外事業部長 東京都港区芝4-17-5 田町プレイス4階 (電話番号 03-5419-1386)
	サントリーフラワーズ株式会社 海外事業部シニアマネージャー 東京都港区芝4-17-5 田町プレイス4階 (電話番号 03-5419-1386)
	サントリーフラワーズ株式会社 近江開発センター所長 滋賀県東近江市大森町字池谷863-1 (電話番号 0748-25-0221)

*：管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

本組換え体は、切り花の場合は、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、輸入業者はサントリーホールディングスとの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。

鉢物の場合も、サントリーフラワーズ株式会社だけが独占的に事業を行う。栽培委託契約を締結した限定された生産者によって生産される。栽培状況と出荷量（鉢数）を把握するとともにその情報を整理して記録する。

いずれの場合でも、想定される生産・流通量を超える本組換え体の流通や栽培等の情報が得られた場合には、都道府県名、そのおおよその量などについて、把握しうる限りの情報を記録する。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、切り花の輸入・流通・販売業者、並びに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、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（粉碎等）を行う。鉢物についても、生産や流通、販売に関わる業者に取扱の中止と不活化処分（漉き込み等）を指示する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに農林水産省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ン耐性カーネーション (*F3'5'H*, *DFR*, *surB*, *Dianthus caryophyllus* L.) (11363, OECD UI: FLO-11363-2) 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 3-1 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 3-2 ゲノム上に挿入された遺伝子構造の解析 (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・非閉鎖系温室における結果 (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)
- 別添資料 9 アグロバクテリウムの残存性についての検証 (社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 10 テトラサイクリン抵抗性遺伝子の存在の有無の検証 (社外秘情報につき非開示)
- 別添資料 11 青紫色カーネーションの訪花昆虫の調査 (社外秘情報につき非開示)