

緑色蛍光ペチュニア (*eYGFPuv, Petunia x hybrida*) (Snow4)  
申請書等の概要

[目次]

第一種使用規程承認申請書	1
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
①和名、英名及び学名	4
②宿主の品種名又は系統名	4
③国内及び国外の自然環境における自生地帯	4
(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	5
②主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	6
(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	7
ハ. 捕食性又は寄生性	7
ニ. 繁殖又は増殖の様式	7
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	13
(2) ベクターに関する情報	14
イ. 名称及び由来	14
ロ. 特性	14
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	15
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	15
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	15
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	15
(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	17

(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	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	19
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	22
(1) 使用等の内容	22
(2) 使用等の方法	23
(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	23
(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	23
(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	23
(6) 国外における使用等に関する情報	23
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	24
1. 競合における優位性	24
2. 有害物質の産生性	25
3. 交雑性	26
4. その他性質	26
第三 生物多様性影響の総合的評価	27
引用文献	29
緊急措置計画書	32
隔離ほ場試験計画書	34
添付資料リスト	46

## 第一種使用規程承認申請書

令和4年11月4日

農林水産大臣 野村 哲郎 殿  
環境大臣 西村 明宏 殿

申請者 氏名 株式会社ハクサン  
代表取締役 社長 高中 淳壮  
住所 愛知県日進市岩藤町三番割321-1

氏名 NECソリューションイノベータ株式会社  
代表取締役 執行役員社長 石井 力  
住所 東京都江東区新木場1-18-7

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>緑色蛍光ペチュニア (<i>eYGFPuv, Petunia x hybrida</i>) (Snow4)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地 : 愛知県豊田市室口町上ドウモ 8 番地          名称 : 株式会社ハクサン 足助農場 隔離ほ場          使用期間 : 承認日から令和 10 年 3 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立ち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。</p> <p>(2) 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。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えペチュニアの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該ペチュニア植物体の隔離ほ場外への流出を防ぐための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 本遺伝子組換えペチュニアの植物体が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥防虫網を設置する。なお、調査、作業等のために防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再設置する。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えペチュニア及び比較対象の非遺伝子組換えペチュニア以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えペチュニアを隔離ほ場外へ運搬、又は保管する場合は、当該ペチュニアが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) ペチュニアに自然条件下での栄養繁殖性はないため、(2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えペチュニアの栽培終了後は、当該ペチュニア及び比較対象の非遺伝子組換えペチュニアの根を含めた植物体全体を細断して隔離ほ場にすき込む等により、確実に不活化する。ただし、花については、オートクレーブで不活化後、廃棄する。</p> <p>(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、意図せずに本遺伝子組換えペチュニアが隔離ほ場外へ持ち出されることを防止する。</p> <p>(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。</p> <p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。</p>

	<p>(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。</p>
--	---

## 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

##### ① 和名及び英名・学名

和名：ペチュニア

英名：Petunia

学名：*Petunia x hybrida*

##### ② 宿主の品種名又は系統名

販売名：スーパーチュニア ビスタ スノー

品種名：BHTUN19502

品種登録番号：26812

##### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

ペチュニアは南米原産の植物であり、ブラジル、アルゼンチン、ウルグアイ、パラグアイ、チリ、ボリビアといった温暖な気候に恵まれた地域に分布している。ペチュニア属は21の種から構成されており(Plant List, 2020年;表1、5ページ)、ほとんどの種がブラジル南東部に特有のものであると考えられている(Tsukamoto *et al.*, 1998)。

日本国内においては、ペチュニアの自生は見られず、交雑可能な近縁野生種の存在についても確認されていないということが農林水産省により報告されている(農林水産省, 2017年)。

表1 ペチュニア属 21 種

No.	Name	No.	Name	No.	Name
1	<i>Petunia altiplana</i>	11	<i>Petunia interior</i>	21	<i>Petunia violacea</i>
2	<i>Petunia × atkinsiana</i>	12	<i>Petunia littoralis</i>		
3	<i>Petunia axillaris</i>	13	<i>Petunia mantiqueirensis</i>		
4	<i>Petunia bajeensis</i>	14	<i>Petunia nyctaginiflora</i>		
5	<i>Petunia bonjardinensis</i>	15	<i>Petunia occidentalis</i>		
6	<i>Petunia exserta</i>	16	<i>Petunia patagonica</i>		
7	<i>Petunia guarapuavensis</i>	17	<i>Petunia reitzii</i>		
8	<i>Petunia × hybrida</i>	18	<i>Petunia riograndensis</i>		
9	<i>Petunia inflata</i>	19	<i>Petunia saxicola</i>		
10	<i>Petunia integrifolia</i>	20	<i>Petunia scheideana</i>		

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における一種使用等の歴史

ペチュニアの育種は 1830 年代に始まり、以来 200 年近くの間、園芸植物として親しまれている。1767 年、ウルグアイで自生している *Petunia axillaris* をフランスの植物学者が発見し、その後、1823 年にフランスへ持ち込まれた。また、別の野生種である *Petunia integrifolia* についても 1831 年にブラジルからイギリスへ持ち込まれ、これら *Petunia axillaris* と *Petunia integrifolia* の 2 種間交雑によって、今日の栽培品種の元となる *Petunia x hybrida* が生まれた(農業技術大系, 2015 年)。

以降、ヨーロッパやアメリカにおいてペチュニアの栽培が急速に広がり、育種が進められ、1880 年代には大輪系育種の祖となる品種が誕生した。我が国においては 1852 年にアメリカからペチュニアが渡来しており、1931 年には坂田武雄氏による種子系完全八重系品種が、また、1980 年代には、サントリーフラワーズ・京成バラ園による開花持続性等が向上したサフィニアシリーズといった著名な品種が開発されている(農業技術大系, 2015 年)。

## ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

ペチュニアは日本を含む多くの国で園芸植物として栽培されており、最大生産国であるアメリカでは、ポット苗が約 3,654 万株と多く、植栽 921 万株、ハンギングバスケット 740 万株と続いて販売されている(アメリカ合衆国農務省, 2019 年)。

日本においては、2005 年、全国のペチュニアの総出荷量は 5700 万株と記録されている。また、栽培総面積はおよそ 116 ha であり、そのうち、施設栽培が 113ha、露地栽培が 3ha となっており、ほとんどのペチュニアは施設内で栽培されている。日本国内におけるペチュニアの総生産額 23 億円のうち、千葉県で 5 億円、埼玉県 2 億円、茨城県、栃木県、神奈川県で各 1 億円の生産額となっており、関東地方での栽培が多い。また、東海地方(愛知県、岐阜県で各 1 億円)や近畿地方(兵庫県、奈良県で各 1 億円)での栽培も盛んである(農林水産省, 2005 年)。

## (3) 生理学的及び生態学的特性

### イ 基本的特性

ペチュニアはナス科の多年草であるが、耐寒性を持たないため日本国内では通常栽培においては一年草植物として扱われる。草姿は直立性、半匍匐性、匍匐性と多様であり、葉は平らで全縁で卵型、楕円型、円型、倒円型、菱形といった種類がある。花型は左右対称の漏斗型、鐘型、高坏型の 5 数性の合弁花が一般的であるが、八重や星形の花を咲かせる品種も存在する。花冠は 5 浅裂、がくは 5 深裂、雄ずいは 5 本のうち 2 本が特に長くなる二長雄ずいが主体であり、葯は淡青色、青紫色、黄色、白色などが見られる。

相対的長日植物であるため、長日条件において開花が促進され、短日では遅延する。分枝は長日で減少し、短日で増加する(農業技術大系, 2015 年)。

## ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ペチュニアの生育における最適温度は昼温 24-28℃、夜温 13-16℃であるが、挿し木、発根、鉢上げなどのステージによって適切な気温、地温などが変化する。

南米原産の植物であるため耐暑性を有するが、反対に耐寒性は低くアメリカ合衆国農務省が定める耐寒性指標(Hardiness zone)の値は 10-11 とされており(ミズーリ州立植物園；アメリカ合衆国農務省, 2012 年)、これは沖縄等の一部の温暖な地域を除いて日本国内での越冬が困難である事を示している。

また、乾燥に強いが、高温多湿に弱く、梅雨から初夏の季節には灰色カビ病やうどんこ病、根腐れを引き起こすことが多い。土壌環境については pH5.5~6.0が適正であり、pH6.8 以上のアルカリ性よりの土で栽培すると、鉄欠乏に伴いクロロシスを引き起こす(農業技術大系, 2015 年)。

## ハ 捕食性又は寄生性

\_\_\_\_\_

## ニ 繁殖又は増殖の様式

### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ペチュニアの種子の大きさは 0.5 mm 程度で、卵型、表面に網目状の穴を持ったような形状をしている(Watanabe *et al.*, 1999)。また、ペチュニアは裂開果を形成し、重力によって種子の散布が起こり、1 個体で 1,000 粒以上の種子を生産する。種子休眠については強い光要求性を示すことが分かっており、また、種子の寿命については 25℃、湿度 30%の環境下で保存した場合、最大 12 ヶ月間生存することが報告されている(Flower Seeds, 2005)。

### 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

ペチュニアの栄養繁殖は挿し木によって行われる。挿し穂を発根させるためには温度管理(20-25℃)やミストなどを利用した適切な水分管理を長期間(2-3 週間)行う必要があるため、自然条件下においてこれらの条件が再現される可能性は極めて低いと考える。

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、他殖性の程度、自家不和合性の有無

ペチュニアを含むナス科植物は一般的に自家不和合性を有することが知られている (Kudo *et al.*, 2016)。従って、繁殖様式は主に他殖によるものだと考えられる。

b. 近縁野生種との交雑性

ペチュニアは南米原産の外来植物であり、日本において交雑可能な近縁野生種は存在しない事が報告されている (農林水産省, 2017 年)。

c. アポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

---

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

a. 花粉の生産量及び形状

ペチュニアは虫媒花であるという報告がなされている (Ando *et al.*, 2016)。ペチュニア “Super Tunia Mini Rosso 品種” について花粉観察を行った結果、粉末状の花粉が少量確認された (別添資料 1- 図 C)。

一方で、宿主である Super Tunia Vista Snow 品種では長年の観察結果から花粉が付かない品種と認知されており、実際に花粉観察を行っても花粉は確認されなかったことから、宿主は花粉を作ることができない雄性不稔の品種であると考えられる (別添資料 1- 図 A)。加えて、宿主品種の育種過程において同様に花粉ができない系統が現れることから、宿主品種は細胞質雄性不稔を有する可能性が考えられる。この細胞質雄性不稔性については本申請後の隔離ほ場試験において F<sub>1</sub> 世代の稔性を確認することで調査を行う予定である。

b. 花粉の稔性

ペチュニア “Super Tunia Mini Rosso 品種” について花粉を酢酸カーミン液で染色した後、顕微鏡により観察を行った。その結果、酢酸カーミンにより濃染され、かつ形態的に正常な形(おむすび型)をした正常な花粉が多数観察された(別添資料 1- 図 C)。一方で、宿主である “Super Tunia Vista Snow 品種” についても同様に顕微鏡を用いた観察を行ったがやはり花粉が確認されなかった(別添資料 1-図 A)。

c. 花粉の媒介方法

ペチュニアは虫媒花であり、スズメガ(*Manduca contracta* and *M. diffissa*)とハチ(*Hexanthes sp.*)が花粉媒介者として報告されている(Ando *et al.*, 2001)。

d. 花粉の飛散距離及び寿命

ペチュニアは虫媒花であるため、花粉の飛散距離は媒介する動物の移動距離に依存する。ペチュニアの花粉媒介者としては上述の通り、スズメガとハチが報告されているが、特にスズメガは多量の花蜜を消費するため、活動性が高く、およそ十数 km といった広範囲を移動すると考えられている。

花粉寿命に関しては、一般的に花粉飛散距離が長い風媒花は長命であるのに対して、虫・鳥媒花は数日から 1 週間程度と短命である。

ホ 病原性

\_\_\_\_\_

ヘ 有害物質の産生性

ペチュニアは他の植物に対して生育阻害を引き起こさせるようなアレロパシー活性を有することが知られているが、人体に対する有害物質の産生性についての報告はされていない。

ト その他の情報

\_\_\_\_\_

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ. 構成及び構成要素の由来

本組換え体の作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表 2 (10-11 ページ)に示す。また、発現ベクターの構成を図 1 (12 ページ)及び図 2 (12 ページ)に示し、その塩基配列は別添資料 2 に示した。

表 2 供与核酸の構成要素、サイズ、由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
T-DNA 領域		
NOS Promoter	280	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobacter</i> ) 由来のノパリン合成遺伝子 ( <i>nopaline synthase</i> ) 由来のプロモーター。植物体内において遺伝子の発現を誘導する (Ebert <i>et al.</i> , 1987)。本プロモーターの制御下において薬剤耐性遺伝子を発現させた。
NOS terminator	253	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobacter</i> ) 由来のノパリン合成遺伝子 ( <i>nopaline synthase</i> ) 由来の転写ターミネーター。植物細胞での転写を終結させる (Bevan <i>et al.</i> , 1983)。本ターミネーターの制御下において薬剤耐性遺伝子を発現させた。
NPT II	795	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) のトランスポゾン Tn5 由来のネオマイシンリン酸化酵素 II 遺伝子であり、アミノグリコシド系抗生物質 (カナマイシン等) をリン酸化して不活化する作用を持つ。そのため、 <i>NPT II</i> 遺伝子を発現する植物は、カナマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質に耐性を示し、 <i>NPT II</i> 遺伝子は薬剤選抜マーカー遺伝子として汎用される (Shaw <i>et al.</i> , 1993)。
LB	25	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobacter</i> ) 由来の T-DNA 境界配列 (Left-border) (Barker <i>et al.</i> , 1983)。植物染色体に組み込むための配列。

RB	25	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobactor</i> ) 由来の T-DNA 境界配列 (Right-border) (Barker <i>et al.</i> , 1983)。植物染色体に組み込むための配列。
35S Promoter (p35S)	828	カリフラワーモザイクウイルス ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> ) 由来の 35S プロモーター領域。植物体内において恒常的に目的遺伝子を発現させる (Mitsuhara <i>et al.</i> , 1996)。本プロモーターの制御下において蛍光タンパク質遺伝子 <i>eYGFPuv</i> を発現させた。
COR47-2mod	107	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来の COR47 遺伝子の 5' UTR 領域を改良したもの (Kato <i>et al.</i> , 2016)。本領域を付与することにより、 <i>eYGFPuv</i> 遺伝子の発現を安定させている。
eYGFPuv	660	海洋プランクトンのカイアシ ( <i>Chiridius poppei</i> ) 由来の緑色蛍光タンパク質遺伝子を改良し、励起波長が紫外領域にシフトした改良型蛍光タンパク質遺伝子 (Shimizu <i>et al.</i> , 2017)。
HSP-T878	885	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来の HSP (Heat shock protein) 遺伝子を改良した転写ターミネーター (Nagaya <i>et al.</i> , 2010)。蛍光タンパク質遺伝子 <i>eYGFPuv</i> を本ターミネーターの制御下におくことで発現を安定させている。
外側骨格領域 (本組換えペチュニアには存在しない)		
ColE1 ori	589	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) での複製起点。
Ri ori	4636	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium rhizogenes</i> ) の Ri プラスミド由来の複製起点。
NPT III	796	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobactor</i> ) 由来のネオマイシンリン酸化酵素 III 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)。大腸菌及びアグロバクテリウムにおける薬剤選択マーカーとして用いた。

注：供与核酸のうち、本表に記載されていない部分については、特別な機能を有する配列を含まない。

図1 eYGFPUv-x3/pRI909 の構成図

T-DNA 領域上の蛍光タンパク質発現カセットの詳細は図2 (12 ページ)に示す。

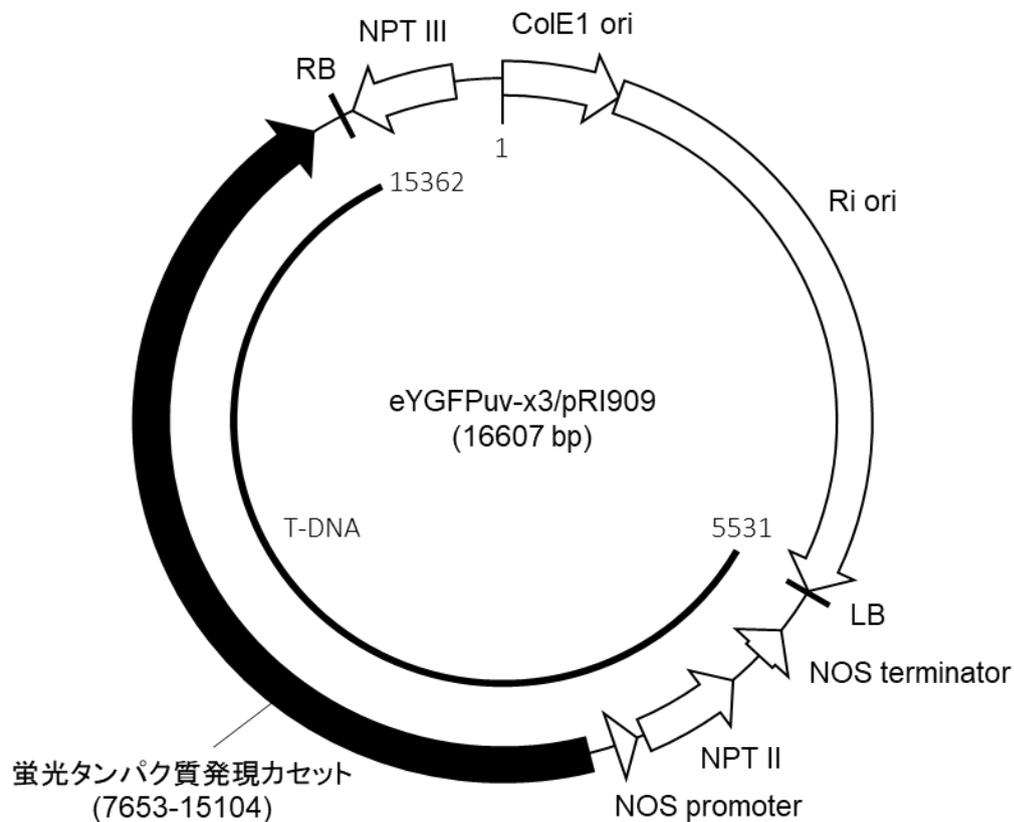
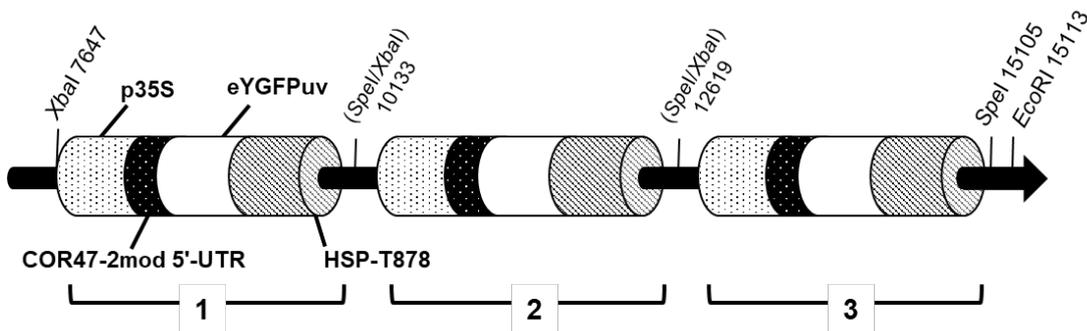


図2 蛍光タンパク質発現カセットの構造

P35S、COR47-2mod、eYGFPUv 及び HSP-T878 からなる発現カセットを 3 連結した。制限酵素 *Xba*I および *Eco*RI の認識部位を示す。



## 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

組換えペチュニアの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 (10-11 ページ) に示した。

- ② 目的遺伝子及び選抜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

### 【 *eYGFPuv* 遺伝子 】

本組換え体に導入された目的遺伝子 *eYGFPuv* は、海洋プランクトンのカイアシ (*Chiridius Poppei*) 由来の緑色蛍光タンパク質である CpYGFP (Masuda *et al.*, 2006) を改良した緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である (Shimizu *et al.*, 2017)。緑色蛍光タンパク質は励起光を受けて緑色蛍光を発するタンパク質であり、その発光メカニズムは他の因子を介さず、完全に独立している。そのため、宿主の生理機能に影響を与えないマーカーとして緑色蛍光タンパク質は幅広く利用されており、その利便性や応用性が評価され、2008 年にはノーベル化学賞を受賞している。

本組換え遺伝子 *eYGFPuv* の改良点として、元来カイアシが持つ CpYGFP 遺伝子と比較して 17 塩基が置換されており、アミノ酸レベルでは 6 アミノ酸が変化している。元来の CpYGFP では蛍光を観察する際に可視光線の照射が必要であったが、改良の結果として、*eYGFPuv* では紫外線照射により蛍光を観察することが可能となった。具体的には、塩基置換により *eYGFPuv* の励起波長が元来の 512 nm から紫外領域側 398 nm にシフトされており、一方で蛍光波長についてはほとんど変化していない (518 nm から 512nm へシフト)。

蛍光タンパク質の発現量を向上させる手段として、発現カセットを 3 連結にする方法が報告されており (Sasaki *et al.*, 2014)、図 2 (12 ページ) で示すように本組換え体に関しても p35S、COR47-2mod、*eYGFPuv* 及び HSP-T878 からなる発現カセットを 1 単位とし、それを 3 連結させている。

なお、*eYGFPuv* タンパク質のアミノ酸配列について既知のアレルゲンと比較したところ類似した配列は認められなかった (Food Allergy Research and Resource Program Database ver. 18B)。

加えて、光強度の高い特殊な機器による紫外線照射を行うことで、図4(18ページ)に示すような緑色蛍光を観察することが可能となる。

### 【 *NPTII* 遺伝子 】

*NPTII* 遺伝子はネオマイシンホストトランスフェラーゼⅡを産出し、組換え体にカナマイシン耐性を付与することで、カナマイシンを含む培地上で培養することにより組換え体を選抜することができる。アレルギー性の有無に関する報告はない。

## (2) ベクターに関する情報

### イ. 名称及び由来

eYGFPuv-x3/pRI909 ベクターは、植物形質転換用の T-DNA 領域を含むバイナリーベクターである pRI909 (Takara Bio Inc.) を骨格とする。アグロバクテリウム (*Rhizobium rhizogenes*) の Ri プラスミド由来であるが vir 領域は含まない。

### ロ. 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換え体の作出に使用された発現ベクター eYGFPuv-x3/pRI909 は、16,607bp から構成される。塩基配列は別添資料 2 に示した。

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

eYGFPuv-x3/pRI909 ベクターは pUC 系プラスミド由来の複製起点 (ColE1 ori) を含むため大腸菌では高コピー数のプラスミドとして維持される。加えて、Ri プラスミド由来の変異型複製起点 (Ri-ori) も含むのでアグロバクテリウム中でも安定に維持される。大腸菌とアグロバクテリウムでの選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 *NPTIII* を、植物での選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 *NPTII* を含む。

eYGFPuv-x3/pRI909 ベクターの 35S プロモーター内には Cauliflower mosaic virus 由来の inclusion body matrix protein 遺伝子の一部 (ORF6) が含まれて

いる。また、本組換え遺伝子はタンデム構造(図2)をとり、35S プロモーターと組換え遺伝子とが隣接しているため、リードスルーにより ORF6 が発現する可能性が考えられたが、RT-PCR による遺伝子の発現解析によって、ORF6 が検出されないことを確認している(別添資料 8)。

- ③ ベクターの伝染性・病原性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

### (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

核酸の移入に用いた eYGFpuv-x3/pRI909 ベクターの供与核酸の各構成要素の位置及び方向と制限酵素による切断部位を図1(12 ページ)及び図2(12 ページ)に示した。移入された領域は RB-LB 間の 9,831bp である。

#### ロ. 宿主に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入には、アグロバクテリウム法を用いた。

#### 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

宿主植物の葉片に eYGFpuv-x3/pRI909 を保持したアグロバクテリウムを感染させた後、カナマイシン(100 mg/l)及びメロペネム(20 mg/l、アグロバクテリウム除菌用)を含んだ培地上で培養し、カナマイシン耐性株を選抜した。

##### 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

本組換え体の作製に用いたアグロバクテリウムは、感染操作以降、組織培養の培地にメロペネムを添加することで除菌をした。また、本遺伝子組換え体(T0 世代クローン)の植物体全体よりゲノム DNA を抽出し、ベクター

の外側骨格領域に含まれる薬剤耐性マーカー *NPTIII*を標的とした PCR 分析を行ったところ、ベクター-eYGF<sub>Puv-x3</sub>/pRI909 の外側骨格領域の存在は確認されなかった。PCR 分析の詳細は別添資料 3 示す。以上の結果から、本遺伝子組換え体においてアグロバクテリウムは残存していないと判断した。

- 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

2018 年、宿主植物の葉片にアグロバクテリウムを用いて形質転換を行った。カナマイシンにより薬剤選抜を行ったのち、再分化を行い、新たに 11 株の植物体(T0 世代クローン)を得た。次に、閉鎖系栽培室及び特定網室にて栽培を行い、開花試験の結果から 3 系統を選抜した(Snow1, Snow4 及び Snow15)。その後、蛍光強度の評価を行い、最終的に Snow4 系統を選抜した。本評価書において、遺伝子組換え体とはこの「Snow4」系統を示す。また、Snow4 と非組換えである他のペチュニア品種を交配し、F<sub>1</sub> 世代の植物を得た。

### 図 3 本遺伝子組換えペチュニアの育成過程

**【社外秘につき非公開】**

#### (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（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

本組換え体についてゲノムシーケンスを行い、得られた配列情報と公開されているペチュニアゲノムデータベース (Genomics Network : *Petunia axillaris* draft genome sequence v1.6.2) を比較することで組換え遺伝子の挿入部位について調査を行った。

ペチュニアゲノムには反復配列が豊富に存在しており、ゲノムの 60-65% を反復配列が占めると報告されている (Bombarely *et al.*, 2016)。本組換え体について行ったショートリード次世代シーケンスデータを、ペチュニアゲノムデータベースと比較したところ、ペチュニアゲノム内の複数の領域の配列と一致したため、導入した遺伝子は反復配列内に挿入していることが予想された。別添資料 4 に、得られたシーケンスデータと特に類似性の高い 3 箇所の挿入候補領域について示す。これらの領域は、いずれも既存の遺伝子を含まない非コード領域であったため、本組換え遺伝子の挿入が既存のペチュニア遺伝子に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。

##### 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代における伝達の安定性

本組換え体におけるゲノムシーケンス解析の結果、組換え遺伝子に隣接するペチュニアゲノム情報として単一の配列データが得られた (別添資料 4)。組換え遺伝子がペチュニアゲノム内に複数挿入されていると仮定した場合、T-DNA がゲノム中にランダムに挿入されるという特性を考慮すると、組換え遺伝子に隣接するペチュニアゲノムの情報も複数になり、ゲノムシーケンスにより得られる解析結果は単一では無くより複雑になると予想される。しかしながら、本組換え体ではゲノムシーケンスにおいて単一の配列データが得られているため、ゲノムへの挿入箇所は 1 箇所であり、本組換え体に移入された遺伝子のコピー数はシングルコピーであると推測される。加えて、本推測を補助するものとして、隔離ほ場試験において組換え遺伝子の分離比の確認を行う予定である。

##### 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

- 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

本組換え体の各器官（花卉及び葉）における *eYGFpuv* 遺伝子の発現は、UV 照射によって目視で蛍光を発していることが確認できる（図4、18 ページ）。また *NPT II* 遺伝子の発現については、本組換え体及びクローン苗（Snow4-A 及び Snow4-B）は、カナマイシン含有培地で選抜したため、*NPT II* 耐性遺伝子を保持していると考えられる。また、本組換え体と非組換え体の他品種を交配して作出した F<sub>1</sub> 世代の植物についても同様に緑色蛍光が確認された（図5、18 ページ）。従って、*eYGFpuv* 遺伝子の発現は世代間を通して安定していると考えられる。

図4 紫外線照射による組換え体の蛍光反応（左：宿主 右：組換え体）

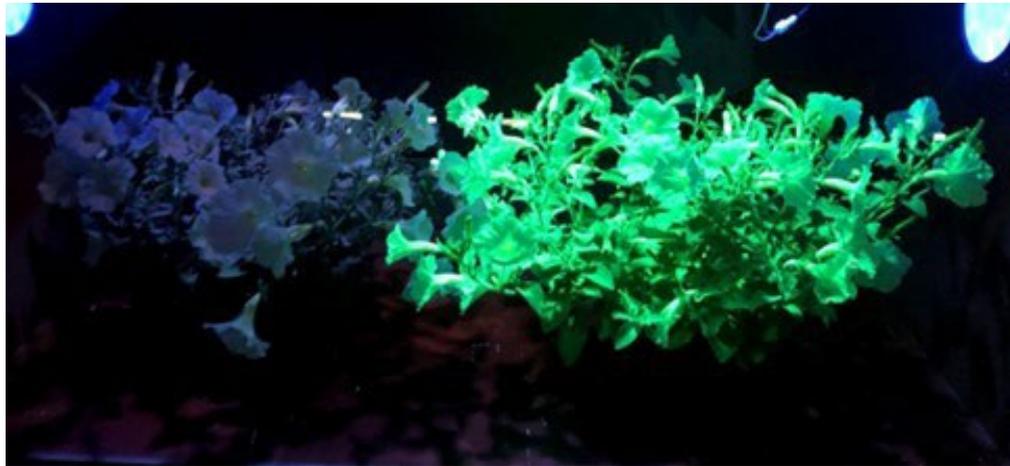


図5 紫外線照射によるF<sub>1</sub>世代の蛍光反応（左：非組換え体 右：F<sub>1</sub>世代）



- 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

- (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

*eYGFPuv* 遺伝子、*NPTII* 遺伝子は共に、ゲノム DNA 50 ng を用いることで PCR 法による特異的な検出・識別が可能である(別添資料 5)。また、*eYGFPuv* 遺伝子に限っては、蛍光タンパク質をコードしているため、光強度の高い特殊な機器が必要ではあるが、紫外線照射により簡易的に検出することも可能である。

- (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形態学的特性の具体的な内容

本遺伝子組換え体には、カイアシ(*Chiridius poppei*)由来の緑色蛍光タンパク質を改良した *eYGFPuv* をコードする遺伝子が導入されている。その結果、本組換え体では、紫外線照射を行った際に植物体全体において緑色の蛍光を呈する性質が付与されている(図 4、18 ページ)。また、本遺伝子組換えに使用した発現ベクター内には蛍光タンパク質とは別に、組換え体選抜のための薬剤マーカーであるカナマイシン耐性遺伝子 *NPTII* も含まれており、そのため、本遺伝子組換え体は抗生物質カナマイシンに対する耐性も有する。

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

a 形態及び生育の特性

本組換えに用いた改良型緑色蛍光タンパク質である *eYGFPuv* は既にペチュニアに導入された例があり、宿主と組換え植物との間で成長や形態的な差異は見られなかったと報告されている(Chin *et al.*, 2018)。実際に特定網室内での栽培過程において本組換え体と宿主植物との間に形態や生育に違いは見られなかったが、隔離ほ場試験にて統計的な解析を行う予定である。

#### b 生育初期における低温又は高温耐性

ペチュニアは南米原産の植物であるため、高温耐性を有するが、反対に、低温には弱く、日本国内においては一年生植物として扱われる。本組換え体において幼苗期における低温及び高温耐性を隔離ほ場試験で調査予定であるが、導入した遺伝子の性質から見て、一般的なペチュニアとの間で温度耐性に差異が生じる可能性は低いと予想される。

#### c 成体の越冬性又は越夏性

前述の通り、一般的なペチュニアは高温に強く低温に弱いため、日本国内において越夏性を有するが越冬は困難であるとされている。本組換え体において、隔離ほ場試験にて越夏性・越冬性を調査予定であるが、導入した遺伝子の性質から見て、一般的なペチュニアとの間で温度耐性に差異が生じる可能性は低いと予想される。

#### d 花粉の稔性及びサイズ

本組換え体について花粉観察を行ったが花粉は確認されなかった(別添資料 1-図 B)。従って、本組換え体は宿主品種の雄性不稔性を維持していると考えられる。一方で、後代においてもこの雄性不稔性が維持されるかどうかを確認する必要があるため、隔離ほ場試験において F<sub>1</sub> 世代の稔性について調査を行う予定である。

#### e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

ペチュニアは裂開果を形成し、種子散布は主に重力により引き起こされ、1 個体あたり 1000 粒以上の種子生産を行う。また、ペチュニアは自家不和合性を有するため、種子生産は他殖によって行われる(Kudo *et al.*, 2016)。本組換え体においては、他品種の花粉を用いて人為的に交配した場合は少量(30 粒程度)の種子生産が確認されたが、一方で自然条件では種子生産は全く見られなかったため、自家不和合性は維持されていると考える。我が国において交雑が可能な近縁野生種が確認されていないことから、本組換え体が自然環境下において種子生産を行う可能性は極めて低いと予想されるが、隔離ほ場試験にて受粉した場合の種子の生産量などの詳細について統計学的な調査を行う予定である。

f 交雑性

ペチュニアに関して、交雑可能な近縁野生種は日本国内には存在しないということが報告されている(農林水産省, 2017 年)。このことから、本組換え体が交雑によって生物多様性へ影響を与える可能性は極めて低いと判断した。

g 有害物質の生産性

本遺伝子組換えペチュニアの有害物質の生産性についてサンドイッチ法を用いて評価を行った。宿主及び遺伝子組換え植物の地上部残渣を寒天培地に包埋し、その上でレタス種子(グレートレーク)を 3 日間生育し、その後、根と胚軸の長さを測定した。ペチュニアはアレロパシーを有することが知られており、本実験においても、レタス苗に対して宿主ペチュニアの残渣が有意 (student's *t*-test、有意水準5%。以下本項で同じ。)に成長抑制作用を示すことが確認された(表3、21 ページ)。一方で、宿主と遺伝子組換え植物との間で、レタス苗の成長への影響力に有意差はみられなかった(表4、21 ページ)。

以上のことから、これまでの知見通り、宿主ペチュニアにおいても若干のアレロパシーを有することが確認されたが、宿主と組換え植物間においてアレロパシーの程度に差は見られないことから、本遺伝子組換えは、元来のペチュニアが持つアレロパシーに対して影響を示さないと考える。

表3 サンドイッチ法によるアレロパシー解析 ( 残渣無しと宿主残渣との比較 )

植物残渣	根の長さ (cm)	<i>p</i> 値	胚軸の長さ(mm)	<i>p</i> 値
無し	2.19 ± 0.15	0.03	5.21 ± 0.70	<0.001
宿主 (非組換え系統)	1.38 ± 0.28		3.56 ± 0.51	

表4 サンドイッチ法によるアレロパシー解析 ( 宿主残渣と組換え体残渣との比較 )

植物残渣	根の長さ (cm)	<i>p</i> 値	胚軸の長さ(mm)	<i>p</i> 値
宿主 (非組換え系統)	1.38 ± 0.28	0.24	3.56 ± 0.51	0.92
遺伝子組換え系統	1.40 ± 0.40		3.58 ± 0.62	

(根の長さ・胚軸の長さともに 15 個体の平均値±標準偏差、Student's *t*-test, 有意水準 5%)

### 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

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 : 愛知県豊田市室口町上ドウモ

名称 : 株式会社ハクサン 足助農場 隔離ほ場

使用期間 : 承認日から令和 10 年 3 月 31 日まで

#### イ 隔離ほ場の施設

- ① 部外者の立ち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。
- ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えペチュニアの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該ペチュニア植物体の隔離ほ場外への流出を防ぐための設備を排水系統に設置している。
- ④ 本遺伝子組換えペチュニアの植物体が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥防虫網を設置する。なお、調査、作業等のために防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再設置する。

#### ロ 隔離ほ場での作業要領

- ① 本遺伝子組換えペチュニア及び比較対象の非遺伝子組換えペチュニア以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。
- ② 本遺伝子組換えペチュニアを隔離ほ場外へ運搬、又は保管する場合は、当該ペチュニアが漏出しない構造の容器に入れる。
- ③ ペチュニアに自然条件下での栄養繁殖性はないため、②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えペチュニアの栽培終了後は、当該ペチュニア及び比較対象の

非遺伝子組換えペチュニアの根を含めた植物体全体を細断して隔離ほ場にすき込む等により、確実に不活化する。ただし、花については、オートクレーブで不活化後、廃棄する。

- 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、意図せずに本遺伝子組換えペチュニアが隔離ほ場外へ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までに掲げる事項について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。

(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

\_\_\_\_\_

(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

添付の緊急措置計画書を参照

(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等の結果

\_\_\_\_\_

(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

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ペチュニアはおよそ 171 年前に日本へ渡来して以来、現在まで園芸植物として親しまれており、歴史が深く、日本国内で広く栽培される植物であるが、これまでに野生化したという例は報告されていない。前述したように、ペチュニアは一部の温暖な地域を除き日本での越冬が難しい点や、自家不和合性を有し、かつ交雑可能な近縁野生種が国内に存在しないため種子形成が困難な点が、その理由として挙げられ、このことからペチュニアは他の野生植物に対する競合性を持たないと考えられる。本組換え体に導入された *eYGFPuv* は緑色蛍光タンパク質の一種であり、その蛍光機序は他の因子を介さず完全に独立しており、また、実際に *eYGFPuv* 遺伝子がペチュニアに導入された例も既に報告されており、組換えによる形態的な変化は確認されていない(Chin *et al.*, 2018)。従って、目的である緑色蛍光以外の性質に対して本組換えが影響している可能性は極めて低い。

一方で、本組換えに用いた遺伝子カセット内には蛍光タンパク質遺伝子の他に、薬剤選抜マーカーであるカナマイシン耐性遺伝子も含まれており、これにより、本組換え体は抗生物質カナマイシンに対する耐性が付与されている。しかし、この性質が有利に働くためには、当該抗生物質が高濃度に存在する条件が必要であり、このような条件は自然環境下では起こりえないため、競合における優位性の獲得には至らないと考えられる。

以上のことから、本組換え体の競合における優位性に起因して影響の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) 影響の具体的な内容

---

#### (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、本組換え体は、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を生ずるおそれはないと判断した。

## 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

ペチュニアやその近縁であるカリブラコアは周辺の植物に対して生育阻害を引き起こすことが経験的に知られており、アレロパシーを有すると考えられている。

実際に宿主である Super Tunia Vista Snow 品種について、サンドイッチ法を用いたアレロパシー解析を行った結果、レタス幼苗に対して若干の生育阻害作用を示しアレロパシーが確認された(別添資料 6)。一方で、同様の解析を組換え体において行ったが、宿主との間に統計学的有意差( student *t*-test, 有意水準 5% )は無く、本組換えによるアレロパシーに対する影響は見られなかった。

また、本組換え体が産生する緑色蛍光タンパク質 eYGFpuv 及び NPT II タンパク質が有害物質であるとの報告はこれまでに無く、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 (Food Allergy Research and Resource Program Database, Ver. 18)

以上のことから、ペチュニアは元来の性質としてアレロパシーを有する事が確認されたものの、ペチュニアは日本国内における越冬が困難であり、かつ、その自家不和合性等から自生ができないため、野生植物へ与える影響は極めて低い。また、本組換えはペチュニア元来のアレロパシーに対して影響を与えず、本組換えによって産出される緑色蛍光タンパク質 eYGFpuv 及び NPT II タンパク質自体も有害性を持たないと考えられる。従って、本遺伝子組換えペチュニアの有害物質の生産性に関して影響の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) 影響の具体的な内容

\_\_\_\_\_

### (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、本組換え体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、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した。

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

ペチュニアに関して日本における交雑可能な近縁野生種の存在は知られていないということが報告されている(農林水産省, 2017年)。従って、本組換え体の交雑性に起因して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) 影響の具体的な内容

\_\_\_\_\_

(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、本組換え体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、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した。

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

南米原産であるペチュニアは耐寒性を持たず、沖縄等の一部の温暖な地域を除き、日本国内における越冬は困難であると考えられる。また、ペチュニアを含むナス科の植物は一般的に自家不和合性を有することが知られており、加えて、ペチュニアと交雑が可能な近縁野生種は日本国内には存在しないため、種子を形成することも困難である。我が国においてはペチュニアが渡来し 71年経つが、上記の理由からこれまでにペチュニアが野生化したという例は報告されていない。

本組換え体に導入された *eYGFPuv* 遺伝子は蛍光タンパク質(GFP)をコードしている。GFPはこれまでに数多くの生物種に導入された実績があり、その発光機序は他の因子を介さず、完全に独立している。実際に、*eYGFPuv* 遺伝子をペチュニアに導入した例が既に報告されているが、組換えによる形態的な変化は確認されなかった。

また、本組換え体はマーカーとして導入した *NPT II* 遺伝子の発現に伴い、カナマイシン耐性を有するが、この特性は人為的に用意された高濃度のカナマイシン存在下でのみ機能するものであり、自然環境下において競合的優位に働くとは考えにくい。

以上のことから、本組換え体は、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を生ずるおそれはないと判断した。

#### 有害物質の産生性について

ペチュニアは周辺の植物に対して生育阻害を引き起こすようなアレロパシーを有することが経験的に知られていた。宿主ペチュニアのアレロパシーについてサンドイッチ法を用いて解析した結果、レタス苗の根及び胚軸の伸長を阻害することが確認された。

同様に本組換え体についてもアレロパシー解析を行った結果、宿主との間で統計学的有意差( student *t*-test, 有意水準 5% )は見られなかったため、本組換えはペチュニアのアレロパシーに対して影響をしていないと考えられる。

また、本組換え体が産生する緑色蛍光タンパク質 *eYGFPuv* 及び *NPT II* タンパク質が有害物質であるとの報告はこれまでになく、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。

以上、本組換え体は、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、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した。

## 交雑性について

ペチュニアに関して「日本における交雑可能な近縁野生種の存在は知られていない」ということが農林水産省によって調査されており、従って、交雑性に関して、本遺伝子組換えペチュニアは生物多様性影響を持たないと判断した。

よって、総合評価として本組換え体は、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。

## 引用文献

Ando, T., Nomura, M., Tsukahara, J., Watanabe, H., Kokubun, H., Tsukamoto, T., Hashimoto, G., Marchesi, E. & Kitching, I. J. (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany*. 88(3):403- 413.

Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, S., C...Kuhlemeier, C. (2016) Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants*. Article number:16074

Chin, P., D., Shiratori, I., Shimizu, A., Kato, K., Mii, M. & Waga, I. (2018) Generation of brilliant green fluorescent petunia plants by using a new and potent fluorescent protein transgene. *Scientific Reports*. Article number:16556

Food Allergy Research and Resource Program Database (ver. 18)  
<http://www.allergenonline.org/>

Kubo, K., Entani, T and Takayama, S. (2016) Molecular mechanism and molecular evolution of self-incompatibility in *Petunia* (Solanaceae). *Regulation of Plant Growth & Development*. 51(1):41-47.

Masuda, H., Takenaka, Y., Yamaguchi, A., Nishikawa, S. & Mizuno, H. (2006) A novel yellowish-green fluorescent protein from the marine copepod, *Chiridius poppei*, and its use as a reporter protein in HeLa cells. *Gene*. 372:18-25.

Matsui, T., Sawada, K., Takita, E. & Kato, K. (2014) The longer version of *Arabidopsis thaliana* heat shock protein 18.2 gene terminator contributes to higher expression of stably integrated transgenes in cultured tobacco cells. *Plant Biotechnology*. 31:191- 194.

Mcdonald, B., M. & Kwong, Y., F. (2005) Flower Seeds Biology and Technology. Cab Intl

Sasaki, K., Kato, K., Mishima, M., Furuichi, M., Waga, I., Takane, K., Yamaguchi, K. & Ohtsubo, N. (2014) Generation of fluorescent flowers exhibiting strong fluorescence by combination of fluorescent protein from marine plankton and recent genetic tools in *Torenia fournieri* Lind. Plant Biotechnology. 31(4):309-318.

Shimizu, A., Shiratori, I., Horii, K. & Waga, I. (2017) Molecular evolution of versatile derivatives from a GFP-like protein in the marine copepod *Chiridius poppei*. PLoS ONE. 12(7):e0181186.

The Plant list : Petunia

<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Petunia>

Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Tanaka, R., Hashimoto, G., Marchesi, E and Kao, T.H. (1998) Differentiation in the Status of Self-incompatibility among All Natural Taxa of *Petunia* (Solanaceae). Journal of Plant Research. 49(2):115-133.

Watanabe, H., Ando, T., Nishino, E., Kokubun, H., Tsukamoto, T., Hashimoto, G. & Marchesi, E. (1999) Three Groups of Species in *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) Inferred From the Intact Seed. American Journal of Botany. 86(2):302-305.

Yamasaki, S., Sanada, Y., Imase, R., Matsuura, H., Ueno, D., Demura, T. & Kato, K. (2018) *Arabidopsis thaliana* cold-regulated 47 gene 5-untranslated region enables stable high-level expression of transgenes. Journal of Bioscience and Bioengineering. 125(1):124-130.

アメリカ合衆国農務省 (USDA) : 2019 Census of Horticultural Specialties  
[https://www.nass.usda.gov/Publications/AgCensus/2017/Online\\_Resources/Census\\_of\\_Horticulture\\_Specialties/index.php](https://www.nass.usda.gov/Publications/AgCensus/2017/Online_Resources/Census_of_Horticulture_Specialties/index.php)

アメリカ合衆国農務省 (USDA) : Hardiness zone map  
<https://planthardiness.ars.usda.gov/>

タキイ種苗株式会社 広報誌 タキイ最前線 2013 年 冬春号  
植物の不思議な力で環境保全 -アレロパシーを利用したこれからの農業-  
東京農工大学 教授 藤井 義晴 (2019 年 10 月現在)

ミズーリ植物園 : Petunia  
<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=a601>

農業技術大系 花卉編 第 8 卷 1・2 年草、農山漁村文化協会 [編]

農林水産省 : 平成 17 年花木等生産状況調査  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/kaki/flower/f\\_17kaboku/index.html?mode=preview](http://www.maff.go.jp/j/seisan/kaki/flower/f_17kaboku/index.html?mode=preview)

Genomics Network : *Petunia axillaris* draft genome sequence v1.6.2  
[https://solgenomics.net/organism/Petunia\\_axillaris/genome](https://solgenomics.net/organism/Petunia_axillaris/genome)

## 緊急措置計画書

令和4年11月4日

氏名 株式会社ハクサン

代表取締役 社長 高中 淳壮

住所 愛知県日進市岩藤町三番割321-1

氏名 NECソリューションイノベータ株式会社

代表取締役 執行役員社長 石井 力

住所 東京都江東区新木場1-18-7

第一種使用規程の承認を申請している 緑色蛍光ペチュニア (*eYGFPuv*, *Petunia x hybrida*) (Snow4) 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

業務管理責任者 株式会社ハクサン 代表取締役社長 高中 淳壮

業務管理主任者 株式会社ハクサン 代表取締役 【個人情報につき非公開】

業務従事者 株式会社ハクサン 取締役部長 【個人情報につき非公開】

業務従事者 株式会社ハクサン 取締役部長 【個人情報につき非公開】

業務従事者 株式会社ハクサン 研究開発部 係長 【個人情報につき非公開】

業務従事者 株式会社ハクサン 研究開発部 係長 【個人情報につき非公開】

業務従事者 株式会社ハクサン ライセンス部 【個人情報につき非公開】

業務従事者 NECソリューションイノベータ株式会社 【個人情報につき非公開】

### 2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 本遺伝子組換えペチュニア及び隔離ほ場の管理は株式会社ハクサン業務従事者等が行うとともに、組換え体及びその栽培情報が外部へ流出しないように徹底した管理を行う。

(2) 業務管理責任者は、第一種使用等の状況に関し、株式会社ハクサン業務従事者等から常に情報収集を行うとともに、得られた情報を整理・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

生物多様性に影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、直ちにその内容を関係者に伝えるとともに、当該影響を防止するために適切な措置について講ずる。

また、本件について、ホームページ等に掲載することで周知する。

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

生物多様性に影響を生ずるおそれがあると認められた際の措置としては、隔離ほ場内において本組換え体を細断した後、オートクレーブまたは鋤き込みを行い速やかに不活化する。

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連絡するとともに、緊急措置対応のための会社内における組織体制及び連絡窓口に報告する。

## 隔離ほ場試験計画書

### 第一部 受容環境

#### 1. 隔離ほ場の所在地等

##### (1) 名称

株式会社ハクサン 足助農場 隔離ほ場

##### (2) 住所

愛知県豊田市室口町上ドウモ8番地

##### (3) 連絡先電話番号

0562-62-2324

##### (4) 地図

図6, 7 参照 (39, 40ページ)

#### 2. 責任者等

##### (1) 隔離ほ場試験の責任者

株式会社ハクサン 代表取締役社長 高中 淳壮

##### (2) 隔離ほ場試験の管理責任者

株式会社ハクサン 研究開発部 係長 【個人情報につき非公開】

#### 3. 試験期間

承認日から令和10年 3月 31日まで

#### 4. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、立入禁止であること及び管理責任者の氏名を記載した標識を設置し、施設敷地内には洗場を配置している。また、隔離ほ場東側には温室が隣接しており、西側には私道、南側には土手、北側には倉庫が面している（図6, 7, 39, 40ページ）。

## 5. 面積

### (1) 隔離ほ場全体の面積

104 m<sup>2</sup>

### (2) 試験に使用する面積

26 m<sup>2</sup>

### (3) 試験区の配置図

図8 参照 (41ページ)

## 6. 隔離ほ場の周辺環境

### (1) 地形

隔離ほ場は豊田市室口町の中央部、標高約370mの場所に位置しており、周辺は森に囲まれている。室口町の北西側には真弓山(標高307m)や飯盛山(標高254m)がある。また、それらの山の周囲に足助川と巴川が流れる。

### (2) 土地利用状況

隔離ほ場周辺には数件の民家と畑が存在するが、ペチュニアを栽培している農家は少ない。

### (3) 周辺の環境保護地区

隔離ほ場所在地は、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、最も近い自然環境保護地域は愛知高原国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約1.5kmある。

### (4) 気象条件の平均値

- ① 隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点豊田市アメダス観測所(愛知県豊田市高町東山)における気象統計情報の平年値を表5(42ページ)に示した。
- ② 隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点豊田市アメダス観測所(愛知県豊田市高町東山)における過去3年分の気象統計情報を表6(43ページ)に示した。

(5) 台風の襲来履歴

隔離ほ場がある東海地方への過去10年間の台風の接近数を表7(44ページ)に示した。

(6) 過去10年間の隔離ほ場冠水の状況

隔離ほ場の所在地において、過去10年にわたって冠水した記録は無い。

(7) 強風による被害の状況

隔離ほ場の所在地において、過去10年にわたって強風によって設備に被害を受けた記録は無い。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

隔離ほ場所在地は、豊田市が発表したハザードマップにおいて、洪水及び土砂災害が想定される区域に指定されていない。地震災害においても、南海トラフ地震が発生した際に隔離ほ場所在地では震度5強の揺れが想定されるということが豊田市により発表されている。

(<https://www.city.toyota.aichi.jp/kurashi/bousaibouhan/1031852/1029984/index.html>)

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

鳥獣による被害防止のため、隔離ほ場にはフェンスを設置するとともに、温室の側窓含め栽培期間中には防鳥網を設置する。

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

影響を受ける可能性のある野生動物等はいない。

(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

近縁野生種はいない。

## 8. 栽培管理

### (1) 栽培履歴

隔離ほ場内の温室では本遺伝子組換え体以外の植物の栽培は行われていない。

### (2) 気象災害時の対応

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

ボランティア植物の発生を確認した場合、直ちに植物体を隔離ほ場にすき込む、またはオートクレーブ処理する等の適切な手段で不活化する。また、果実をつけている場合はオートクレーブ処理を行い確実に不活化する。なお、本遺伝子組換えペチュニアの栽培終了後も、本隔離ほ場では他の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 隔離ほ場施設

- 1) 部外者の立ち入りを防止するために、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。
- 2) 隔離ほ場で使用した、機械、器具、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を設置している。
- 3) 温室の側窓含め栽培期間中には防鳥網を設置する。なお、作業等のために防鳥網を外す場合には、作業終了後直ちに再設置する。

#### ② 隔離ほ場での作業要領

- 1) 組換え植物及び比較対象の作物以外の植物が隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限で抑える。
- 2) 組換え植物を隔離ほ場の外に運搬、又は保管する場合は、当該植物が漏出しえない構造の容器に入れる。

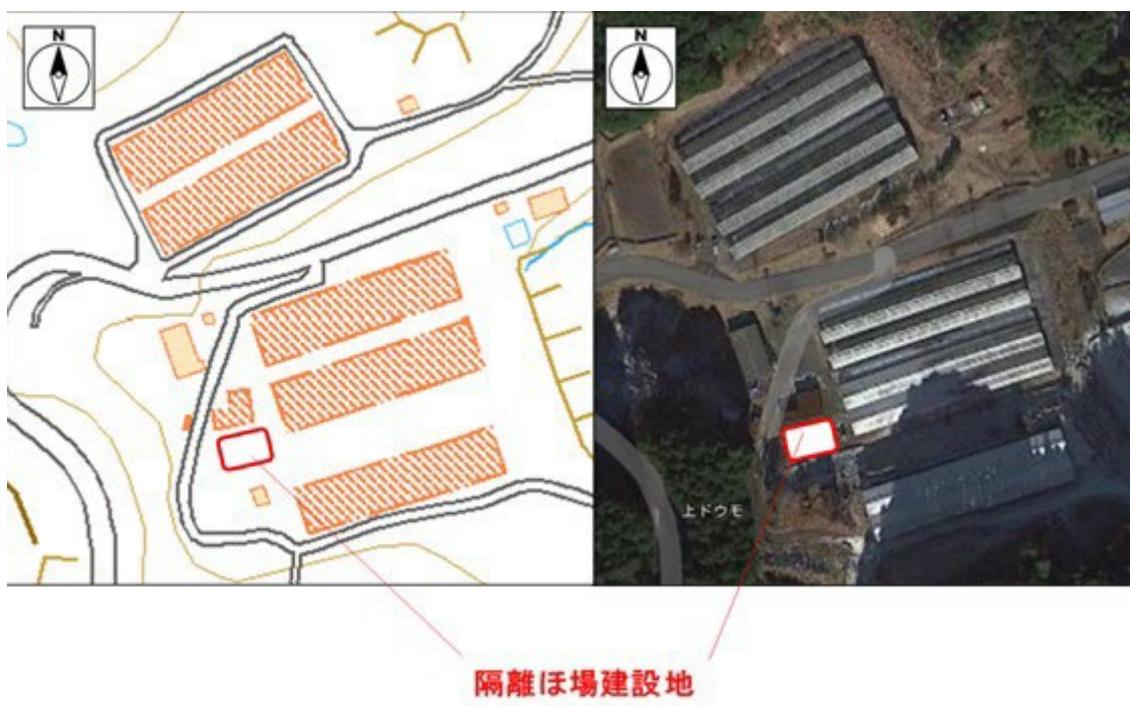
- 3) 上記 2)により運搬、又は保管する場合を除き、組換え植物の栽培終了後は、当該植物及び比較対象の植物の地下部並びに花、果実及び種子を除く地上部は、細断後隔離ほ場内に鋤き込む等により不活化する。また、花、果実及び種子は、オートクレーブにより不活化する。
- 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せず組換え植物が隔離ほ場の外へ持ち出されることを防止する。
- 5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行う。
- 6) 上記 1)から 5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 7) 生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6 愛知県豊田市室口町上ドウモ 地図



(地図：国土地理院ウェブサービス，航空写真：Google Earthより)

図7 株式会社ハクサン 足助農場 地図



(地図：国土地理院ウェブサービス, 航空写真：Google Earthより)

図8 隔離ほ場 配置図

防草シートを敷き、本組換え体以外の植物の生息を防ぐ

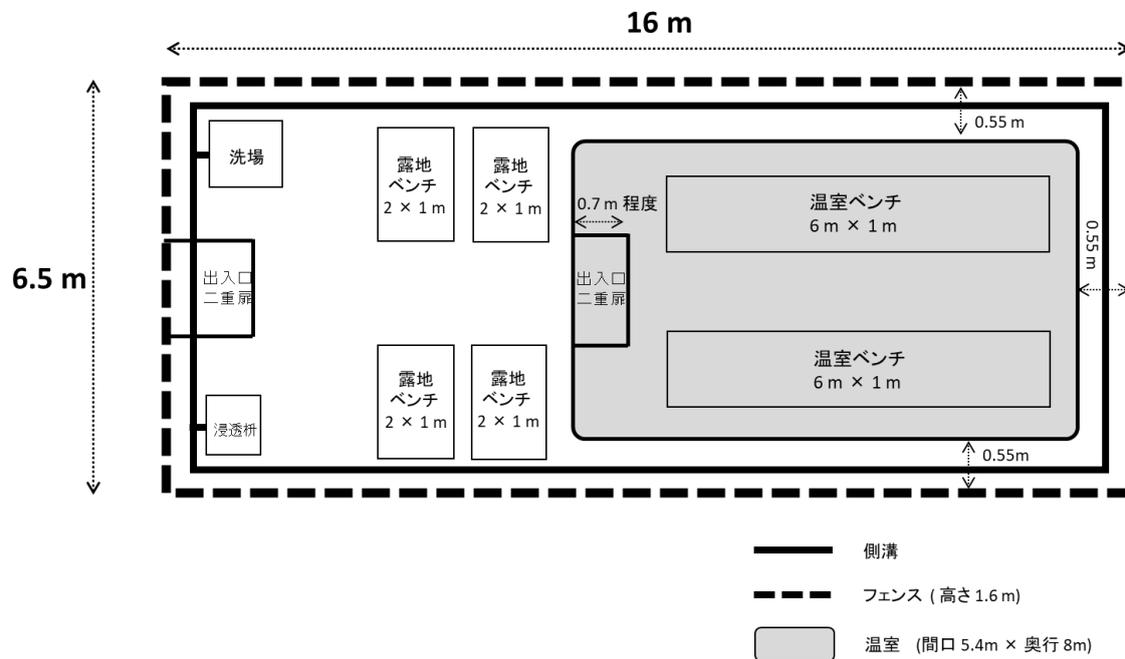


表5 隔離ほ場周辺における気象統計情報の平年値

要素	降水量(mm)	気温			風速		日照時間(h)
		平均	最高	最低	出現率	風向	
統計期間	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020
資料年数	30	30	30	30	30	30	30
1月	48	3.6	9.1	-1.3	19	北東	171.6
2月	61.2	4.5	10.3	-0.8	18	北東	175.0
3月	112	8.3	14.2	2.4	17	北東	198.7
4月	119.5	13.7	19.9	7.5	19	北東	203.0
5月	142.2	18.5	24.7	12.7	19	北東	202.6
6月	183.6	22.3	27.7	17.8	17	北東	148.5
7月	195.3	26.3	31.5	22.1	18	北東	172.1
8月	125.8	27.4	33.3	23	19	北東	209.6
9月	201.8	23.7	29.2	19.3	20	北東	161.6
10月	152.8	17.6	23.3	12.9	23	北東	168.6
11月	75.9	11.4	17.4	6.3	25	北東	166.2
12月	52.6	5.9	11.6	1	22	北東	165.9
年	1470.4	15.3	21	10.2	20	北東	2143.3

(気象庁ウェブサービスより、豊田市アメダス観測所における気象統計情報)

表6 隔離ほ場周辺における過去3年間の気象統計情報

年	月	降水量(mm)				気温(°C)					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
2021	1	49.5)	18.0)	5.5)	2.5)	4.0)	9.3)	-0.6)	15.9)	-6.8)	1.3)	5.6)	西南西	11.6)	西	153.6)
	2	33.5	23	6	1.5	6.5	12.6	1.1	20.7	-4.1	1.6	6.2	西南西	14.9	西南西	185.7
	3	174.5	53.5	16	7	11.3	17.7	5.2	24.5	0.2	1.6	5.3	西南西	12.3	西南西	186.0)
	4	169.5	65.5	11.5	4	14.2	20.4	8	27.6	1.6	1.6	5.8	西	13	西	220.5
	5	224	87	33	9	18.8	24.3	13.6	30.9	6.6	1.3	5.1	西南西	11.2	西南西	158.9
	6	138.5)	56.0)	10.0)	6.0)	22.6)	28.2)	18.0)	33.3)	14.2)	1.4)	4.5)	南西	10.0)	南南西	167
	7	280	62	59	28.5	26.7	32.3	22.8	37	19.8	1.4	4.9	南西	10	南西	176.5
	8	267.5	45.5	24.5	13	27.1	32.4	23.1	39	20.8	1.4	5.3	南	13.1	南	171.4
	9	165	42.5	17.5	4.5	23.3	28.4	19.8	31.8	16.9	1.2	3.8	東北東	8.8	東南東	124.5
	10	43	12.5	6	2.5	18.6	24.7	13.7	31.2	5.6	1.3	3.9	北西	10.2	西北西	194.8
	11	78.0)	53.0)	19.5)	4.0)	11.7)	18.5)	6.5)	23.8)	-0.2)	1.4)	5.3)	東	10.5)	西	194.6
	12	96	36.5	16.5	6.5	6.5	12.3	1.6	17.3	-1.9	1.4	6.2	西南西	13.4	西南西	168.7
2020	1	54	16.5	9.5	5	6.4	11.6	1.8	16.2	-2.2	1.2	5.6	西南西	12.2	西	139.4
	2	62	22	6.5	2	6	11.7	0.7	19.5	-4.2	1.4	4.9	南西	11.9	北西	174.8
	3	162.5	47	9.5	3.5	9.8	15.6	4.2	22.2	-2.1	1.5	4.6	西北西	14.2	西南西	201.3
	4	121.5	31	9.5	3.5	12.4	18.8	6	25.9	1.7	1.7	5.7	西南西	12.7	南	255.2
	5	97.5	47.5	7.5	2.5	19.6	26.1	13.9	31.1	8.4	1.5	4.2	西	11	西	208.7
	6	217.5	59.5	15	7.5	23.9	29.5	19.4	34.5	15.5	1.3	4.5	南南西	10.1	南	161.2
	7	414.5	60.5	30.5	13.5	25.1	29.5	22.1	35	18.8	1.2	7.4	南西	14.7	南南西	73.1
	8	41.5	23	18	10.5	29.2	36.1	24.1	38.8	21	1.4	5.4	東北東	10.8	北東	268.5
	9	202.5	54	26	15.5	24.6	30.2	20.8	36.3	13.9	1.4	5.7	東南東	12.9	南西	145.2
	10	253.5	86	17	4.5	16.8	22.6	12.2	29	2.6	1.2	4.2	東	10.3	西北西	174.5
	11	53.5	21	7	6.5	12.7	19	7	24.5	3.1	1.3	3.8	西	9.2	北	207
	12	15.5	4.5	2.5	1	5.8)	11.8)	1.0)	16.7)	-3.0)	1.3)	5.3)	西	13.3)	西南西	173.6)
2019	1	14.5	11	3.5	1	3.7	9.4	-1.7	12.9	-5	1.4	4.5	北西	11.6	北西	190.8
	2	49	24	5	1.5	6	11.8	0.6	17.6	-3.6	1.3	4.3	西南西	12.4	北	162.6
	3	66.5	16	7.5	2.5	9	15.1	3.2	20.9	-1.9	1.6	5.2	西	12.2	北西	187.5
	4	103	25.5	6.5	2	13.3	19.4	7.4	28.3	-1.3	1.6	5.8	西南西	13.1	北北西	214.4
	5	176	86.5	24.5	12	19.2	26.2	12.5	33.9	4.5	1.7	4.9	東南東	11	東南東	263.6
	6	181	53.5	30	9.5	22.4	28	17.8	33.1	14.8	1.4	5.8	東南東	11.8	東南東	172.7
	7	310	52.5	36.5	12.5	25.4	30	22.2	37.2	19.8	1.2	5.3	東南東	13.1	東南東	95.7
	8	242.5	73	22.5	14.5	28.3	34.2	24.1	38.9	19.3	1.5	5.4	東	14.5	東南東	231.7
	9	75.5	30	25	10	25.7	31.5	21.1	36.8	16	1.3	4.2	東南東	9.7	南	178.7
	10	302	92.5	25	6.5	19.5	24.6	15.7	32.2	10.3	1.2	5.1	西南西	11.2	西南西	142
	11	41	12.5	12.5	8.5	12	18.3	6.4	23.1	-0.4	1.2	4.6	西南西	10.6	北西	199.6
	12	62.5	17	5	2	7.7	13	3	18.1	-1.4	1.1	4.7	西北西	11.9	北西	142.6

(気象庁ウェブサービスより、豊田市アメダス観測所における気象統計情報)

尚、表内の片括弧の数値については、測定データが許容範囲で欠けているが、準正常値として、正常値と同等に扱った数値を示す。

表7 東海地方への過去10年間の台風接近数

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
2021								2	1				3
2020									1	1			2
2019						1	1	1	1	1			5
2018							1	2	2	1			5
2017							1	1	1	2			5
2016								2	1	1			4
2015							1		1				2
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2

(気象庁ウェブサービスより)

## 第二部 隔離ほ場における試験計画

**【社外秘につき非公開】**

## 添付資料リスト

1. 別添資料 1 : 花粉観察 (社外秘)
2. 別添資料 2 : eYGFPuv-x3 / pRI909 vector 塩基配列情報 (社外秘)
3. 別添資料 3 : PCR 法を用いたアグロバクテリウム残存性の確認 (社外秘)
4. 別添資料 4 : ゲノムシーケンス結果 (社外秘)
5. 別添資料 5 : PCR 法を用いた組換え体植物の検出 (社外秘)
6. 別添資料 6 : サンドイッチ法を用いたアレロパシー解析 (社外秘)
7. 別添資料 7 : プライマー情報 (社外秘)
8. 別添資料 8 : RT-PCR法を用いたウィルス性遺伝子の発現解析 (社外秘)