

フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 (*F3'5'H*, *5AT*, *Rosa hybrida*) (OECD UI : IFD-524Ø1-4) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	13
(1) 供与核酸に関する情報	13
(2) ベクターに関する情報	21
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	21
(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	22
(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	27
(1) 使用等の内容	27
(2) 使用等の方法	27
(3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法	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	29
1. 競合における優位性	29
2. 有害物質の産生性	31
3. 交雑性	32

第三 生物多様性影響の総合的評価	35
参考文献	38
モニタリング計画書	40
緊急措置計画書（栽培目的の場合）	56

第一種使用規程承認申請書

平成 17 年 8 月 31 日

農林水産大臣

岩永 峯一 殿

環境大臣

小池 百合子 殿

氏名 サントリー株式会社

代表取締役社長 佐治 信忠

申請者

印

住所 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号

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

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 (<i>F3' 5' H, 5AT, Rosa hybrida</i>) (OECD UI : IFD-52401-4)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	所在地：岡山県津山市福田下字千代芝387番地2 名称：日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場 使用期間：承認の日～平成 22 年 12 月 31 日 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。 (3) 土、遺伝子組換えバラの種子等が付着した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、遺伝子組換えバラの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を、排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風林を設置している。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 遺伝子組換えバラ及び比較対照のバラ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 遺伝子組換えバラを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えバラが漏出ししない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えバラの栽培終了後は、当該遺伝子組換えバラ及び比較対照のバラを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに遺伝子組換えバラが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。 (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

生物多様性影響評価の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ. 和名、英名及び学名

和名：バラ（バラ科バラ属）

英名：Rose

学名：*Rosa hybrida*

ロ. 宿主の品種名又は系統名

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

ハ. 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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

我が国において小規模ではあるが本格的なアメリカ式による温室の切り花バラ生産が始められたのは、大正6年ごろであり、アメリカから持ち帰られたアメリカン・ビューティー、キラニーなどが栽培されたと言われている。関東では大正7～8年頃温室栽培が開始された後、大正10年ごろから温室バラの営利栽培を始めるものが多くなり、規模拡大が進んだ。昭和20年代後半からビニール温室利用での栽培が実用化され、ガラス温室と比較して初期投資額の大幅な低減が可能となり、バラ栽培の導入を容易にした。昭和38年には温室内での養液耕としてれき耕が導入され、昭和60年にはロックウール耕へと発展していった。現在、切り花バラ生産はほぼ日本全国に拡大し、日本の切り花で第2位の生産額となっており、市場流通している品種数は200を越える（林、2002年⁴⁾）。

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

ロ. 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

切花用のバラはほぼ日本全国で生産されており、平成16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17年5月20日公表）によると、主な生産地は愛知県、静岡県を含む東海地方で全国の出荷量の約3割を占める。また、生産農家数も東海地方が最も多く、全国の約2割を占める。

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

りがあり、日本における代表的な作型は冬切り中心である(大川、1989年⁶⁾、大川、2002年⁷⁾)。また、1株当たりの総収量は栽培方法や品種により異なるが、一般に10~50本程度である。

平成16年産花きの作付(収穫)面積及び出荷量によると、平成16年度における日本での切り花バラの年間出荷量は約4億6百万本であり、このうち99.9%は施設栽培された切り花バラであった。

一方、国外において切り花バラ栽培の盛んな国はオランダ、スペイン、イタリア、米国、フランスである(大川、1989年⁶⁾)。また、イスラエル、アフリカ諸国はオランダ市場を通して世界に輸出していること、中南米諸国はアメリカ市場への輸出を増やしていることが知られている。アフリカ諸国、中南米諸国は熱帯高冷地であり、1年中安定した気温、豊富な労働力、低賃金、簡易な設備、土地の安さ等の利点を生かして年々生産量を増やしている。日本の周辺諸国では韓国が近年政府の補助金によって急激に近代的な温室を増加させるなど政府として輸出に力を入れている。また、インドも近年ヨーロッパ向けの輸出が始まり、時期によっては価格が安いため日本にも輸出している(鹿野、2002年⁸⁾)。平成16年花き卸売市場調査結果(農林水産省大臣官房統計部、平成17年5月17日公表、平成17年5月31日訂正)によると、海外からの切り花バラの輸入量は5713万本(前年比129%)であり、国内流通量の12.8%に達している。

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

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

WKS82はハイブリッド・ティー系四季咲きの品種で、花は高芯剣弁咲き、花径は11cm程度、花色は赤紫色である。また、樹形は直立性がある。ハイブリッド・ティー系はハイブリッド・パーペチュアルとティーローズの交配から生まれた系統で、WKS82はマダムビオレ(ハイブリッド・ティー系園芸品種)とシルバースター(ハイブリッド・ティー系園芸品種)を交配して、平成5年に日本で作出された。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

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

生育開花温度による形態への影響の例として、フロリバンダ系品種のマ・パーキンスを 11. 1, 16. 6, 22. 2, 27. 7, 33. 3℃で栽培すると、花径は 16. 6, 22. 2℃で最大となり、さらに花弁の長さとは花弁数は 16. 6℃で最大となり、27. 7, 33. 3℃の高温では花弁数はバラ原種の基本数の 5 枚となることが知られている。

強光は葉焼け、花色の退色及び花ぼけなどの品質低下の原因となるので、夏季に限らず光線量が多いときは遮光を行う。遮光が必要な期間はおおむね 4 月から 9 月までであり、遮光は透過する光線の強度が 7~8 万 lx 程度になるよう調整する (坂西、1989 年³⁾、酒井、2002 年¹⁰⁾。

ハ. 捕食性又は寄生性

ニ. 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

果皮 (内果皮、中果皮、外果皮) を持つバラの種子は個々が独立して着生せず、複数の種子が花托 (花床) に覆われて果実を形成している。果実は熟した後も植物に長く留まっている (Gudin, 2003¹¹⁾)。そのため、種子自体が植物体から脱粒することはなく、さらに果実が脱落する可能性もないか極めて低い。

バラの種子には休眠性があるが、その程度は種間及び品種間で大きな差異が見られる (Gudin, 2003¹¹⁾)。

バラの種子の寿命は種間及び品種間で大きな差異が見られる。野生種の種子を乾燥状態で密閉容器中に 1~4℃で保存した場合には、少なくとも 4 年間は発芽能を保持したことが確認されている (Gudin, 2003¹¹⁾)。

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

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

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

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

a. 自殖性及び他殖性の程度

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

ハイブリッド・ティー系の品種である‘White Weekend’と‘White Masterpiece’について、各々の自殖後代が人工交配によって作出されていることが報告されている(De Vries and Dubois, 1978¹²⁾)。

また、ポリアンサ系の品種である‘Meinadentel’、‘New Penny’、‘Kathleen Zeimet’、‘The Fairy’、‘Marie Pavic’、‘Yvonne Rabier’、‘Kathleen’などについても、各々の自殖後代が人工交配によって作出されていることが報告されている(Dubois and De Vries, 1987¹³⁾)。

複数回交配した場合の交雑率を調べた実験では、ハイブリッド・ティー系の‘Sonia’に品種の異なるハイブリッド・ティー系の‘Ilona’を人工交配させると1回の受粉では約50%の結実率しか示さないが、1日間隔で5回受粉させると結実率は90%近くまで上昇することが報告されている(De Vries and Dubois, 1983¹⁴⁾)。

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

b. 自家不和合性の有無

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

48種類の野生種を用いた実験では、人工交配の結果、結実率が0%(28種類)から100%(1種類)まで異なることが示されている。例えば、ツクシイバラ(*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino)、テリハノイバラ(*R. wichuraiana* Crép.)では0%、シロバナハマナス(*R. rugosa* Thunb. ex Murray f. *alba* (Ware))では13.3%であった。また、高倍数性の種に自家和合性が存在することが報告されている(Ueda and Akimoto, 2001¹⁵⁾)。ハマナス(*R. rugosa* Thunb. ex Murray)でなど野生種では自家不和合性が見られるが、配偶体型自家不和合性であると考えられており、自家不和合性を示す花粉は受粉後の花粉管伸長阻害を引き起こすために受精できない(Jacob and Ferrero, 2003¹⁶⁾)。

c. 近縁野生種との交雑性

(a) 日本に自生する近縁野生種

日本に自生する野生種は、ノイバラ(*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ(*R. wichuraiana* Crép.)、ハマナス(*R. rugosa* Thunb. ex Murray)、オオタカネバラ(*R. acicularis* Lindl.)、カラフトイバラ(*R. marretii* Lev.)、オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ(*R. luciae* Franch. et Rochebr.)、ヤマイバラ(*R. sambucina* Koidz.)、カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ(*R. bracteata* Wendl.)、ナニワイバラ(*R. laevigata* Michx.)、サンショウバラ(*R. roxburghii* Tratt.

var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.) の 10 種とタカネバラ (*R. acicularis* var. *nipponensis*(Crép.) Koehne.)、ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino)、モリイバラ (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. Et Sav.)、フジイバラ (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino)、ヤブイバラ、ニオイイバラ (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama)、ミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) の 6 変種である (上田、2002 年²⁾)。これらのうち園芸種作出のために使われた日本に自生する野生種は、ノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.)、ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray) である (Gudin, 2000¹⁷⁾, Hurst, 1941a¹⁸⁾, Hurst, 1941b¹⁹⁾, Hurst, 1941c²⁰⁾, Wylie, 1954²¹⁾, Wylie, 1955a²²⁾, Wylie, 1955b²³⁾)。それぞれの自生地及び生育環境等を下記に記す。

- ・ ノイバラ：北海道から九州までと朝鮮に分布。平地及び山地にふつうに見られるややつる性の低木。小葉は 7~9 枚で、托葉が羽状に細く裂け、くしの歯状となる。円錐花序に多数の白色の花をつける。開花期は 5~6 月。日本ではこのノイバラが主に台木として用いられ、優良な選抜系統もつくられている。フロリバンダ系園芸種の房咲きはこのノイバラから導入された。
- ・ テリハノイバラ：本州、四国、九州、沖縄、朝鮮、台湾、中国に分布。日当たりのよいところを好み、海岸から荒地、草原、山地まで生育し、茎は長く匍匐する。小葉は 5~9 枚で、厚く光沢がある。枝の先に数個の白色の花をつけ、開花期は近縁の種に比べ遅く、6~7 月。ツルバラの枝が長く伸長する形質は本種に由来する。
- ・ ハマナス：海岸の砂地に生え、北海道、本州（太平洋側は茨城県以北、日本海側は島根県以北）、東アジア（朝鮮、中国北部以北）の温帯から寒帯にかけ広く分布。枝全体に刺と刺毛を密生し、吸枝により繁殖し、群生する。葉にはしわが目立ち、種名の *rugosa*（しわのある）はそのことを意味する。枝先に 1~3 輪の大輪の花をつけ、紅紫色で芳香がある。開花期は 5~7 月で、比較的長い。変種に白い花色のものがある。
耐寒性、耐病性ともに強く、育種的に利用価値が高く、耐寒性の品種群（ハイブリッドルゴース）が育成されている。
- ・ オオタカネバラ：北海道、本州（中部、東北地方の高山）、樺太、朝鮮、中国東北、シベリア、北ヨーロッパ、北米ときわめて広い範囲に分布する種で、4 倍体から 8 倍体までである。枝には刺と刺毛を密生し、小葉は 5~7 枚。花は短枝の先端に単生し、紅色。開花期は 6~7 月。
- ・ カラフトイバラ：北海道、本州（長野県）、樺太、朝鮮、中国、東北、東シベリアに分布。小葉は 7~9 枚で、長楕円形。葉の裏面の色が淡くなり、いくぶん白色を帯びる。花は紅色で、開花期は 6~7 月。
- ・ オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ：関東、東海地方（愛知県

豊川以東) に分布。枝に鉤状の刺があり、他のものに寄りかかってのぼる。小葉は 5~7 枚で、表面に光沢がある。枝の先に円錐花序をなし、白色の花をつける。開花期は 5~6 月。

- ・ ヤマイバラ：本州（愛知県以西）、四国、九州に分布。鉤状の強い刺により他に寄りかかって高くのぼってゆく大きな低木。小葉は 5 枚（まれに 7 枚）で、大きく長楕円形となり、先は細くとがる。散房状の花序に大きく白い花を多数つける。開花期は 5~6 月。
- ・ カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ：八重山諸島、台湾、中国南部に分布。枝には綿毛があり、他のものに寄りかかるか、匍匐または直立する。小葉は 5~9 枚で、厚く光沢がある。花は枝の先に単生し、大輪で白色。開花期は長く、2~8 月。花柄に数枚の苞があり、この苞とがく片には綿毛をもつ。
- ・ ナニワイバラ：中国南部に原生する種。日本でも和歌山県南部、四国、九州で野生化。本種の最初の記載は北米南部に野生化していたものによる。茎に鉤状の刺があり、つる性で非常に強勢な生育を示す。小葉は 3 枚（まれに 5 枚）、先端のとがった長楕円形で光沢があり、常緑。小枝の先端に大輪の白い花を単生し、開花期は 5 月。小花柄とがく筒に細い刺がある。
- ・ サンショウバラ：富士、箱根地方に分布し、母種とその品種、*f. normalis* Rehd. et Wils. は中国にも自生する。樹木状になる小高木で、大きいものでは高さ数 m ぐらいになる。古くなると樹皮が落ちる。小葉は 9~15 枚ぐらいあり、複葉全体がサンショウに似ていることからサンショウバラと呼ばれる。花は枝の先に単生し、大輪で、淡紅色。がく筒には全面に強い刺がある。開花期は 6 月。八重咲きの栽培種をイザヨイバラと呼び、古く中国から渡来したものである。平成 12 年刊行のレッドデータブックで絶滅危惧Ⅱ類（絶滅の危険が増大している種）に分類されている。
- ・ タカネバラ：オオタカネバラの変種であるタカネバラ [*var. nipponensis* (Crép.) Koehne.] は、母種に比べて小葉数が多く（7~9 枚）、全体に小型となる。分布は本州（中部地方以北）及び四国。
- ・ ツクシイバラ：ノイバラの変種である。九州南部に自生し、全体に大型となる。葉に光沢があり、花は大きく、円錐花序に多数つき、淡紅色。花序や花柄に腺毛が多いのが特徴。
- ・ モリイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（関東以西）、四国、九州に分布。母種および他の変種と異なり、花が枝の先端に単生する（まれに散形に 2~3 花）のが特徴。
- ・ フジイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。富士、箱根地方、紀伊半島、四国に分布。全体に大型になり、主幹も太くなる。他の変種よりも標高の高いところに生育し、開花期もより遅く、6~7 月となる。

- ・ ヤブイバラ、ニオイイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（紀伊半島以南）、四国、九州に分布。花、果実が小型。
- ・ ミヤコイバラ：オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラの変種。本州（北陸、近畿、中国）、四国北部、九州北部に分布。円錐花序に多数の花をつける（上田、2002年²⁾）。

(b) 近縁野生種との自然条件下での交雑性

日本の自然条件下において、園芸種と日本に自生する野生種が交雑した例は報告されていない。

そこで、野生種との自然条件下での交雑の可能性について有識者から見解を得た。

【 岐阜大学応用生物科学部 福井 博一教授 】

野生種のほとんどは2倍体であり、園芸種は4倍体である。人為的な交配を行った場合には交雑種子ができる可能性は否定できない。しかし、その場合も交雑種子は3倍体となるため、正常な生育が期待できない上に、開花した場合の生殖器官（花粉や卵細胞）の減数分裂が異常となるため、正常な受精能力を持たず、次世代の交雑は不可能となる。

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

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

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

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

【 岐阜県立国際園芸アカデミー 上田 善弘教授 】

日本の自然条件下に自生する野生種は園芸種と近接した場所に通常はなく、また近接した場所にあったとしても、昆虫が園芸種の花粉を野生種に媒介することはまずないと考えられる。もし、野生種に園芸種の花粉が運ばれてきたとしても、通常は近接する他の野生種の花粉も運ばれてきており、その場合、野生種は野生種由来の花粉を優先的に

選択し、受精に用いるため、園芸種の花粉が野生種の卵細胞と受精する確率は極めて低いと考えられる。

【 岐阜大学教育学部 松本 省吾助教授 】

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

(c) 近縁野生種との人為的交雑性

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

人為的な種間交雑に関しては、フロリバンダ系品種の 'Meinadentel'、'New Penny'、'Kathleen Zeimet'、'The Fairy'、'Marie Pavic'、'Yvonne Rabier'、'Kathleen' などに矮性を示す *R. chinensis minima* (SIMS) Voss を人工交配することにより生じた F₁ 雑種の特性を調べることで、矮性が一つの優性遺伝子によって支配されていることが報告されている (Dubois and De Vries, 1987¹³⁾。

また、フロリバンダ系品種 'Goldilocks' に四季咲きのテリハノイバラと四季咲きの性質をもたないテリハノイバラを各々交配させ、さらに 'Goldilocks' を戻し交配することで四季咲きの性質が劣勢遺伝子によって支配されていることが報告されている (Semeniuk, 1971²⁴⁾。

また、白色のハイブリッド・ティー系品種 'White Weekend' (4 倍体) に 4 倍体の *R. foetida* Herrm. (南西アジア、中東アジア原産の野生種で、黄色の花を咲かせる。黄色の花を持つ園芸種の元となった品種) に属する *R. foetida* cv. Autraian Briar と *R. foetida* cv. Pecian Yellow を交配させ、さらに 'White Weekend' を戻し交配し、四季咲きの黄色品種が得られたことが報告されている (De Vries and Dubois, 1978¹²⁾。

(d) アポミクシスを生ずる特性の有無

園芸種にはアポミクシスを生じる特性はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

また、花粉の稔性の程度がどの程度次世代に遺伝するかを調べた実験では、花粉の稔性が異なる9種類のハイブリッド・ティー系品種を用いて人為的に品種間雑種が31品種作出されており、品種間種 (F1 雑種) の花粉の稔性の程度は親株の花粉の稔性の程度と相関していることが報告されている (Visser et al., 1977²⁶⁾)。

バラの花粉は三溝型 (Tricolpate, 3つの発芽溝をもつ) であり、極軸方向の長さ (長径) は約 30 μm から 60 μm まで、赤道面の幅 (短径) は約 15 μm から 35 μm である (上田、1994年²⁵⁾)。

バラは虫媒花であり、バラ属の訪花昆虫としては、ハチ目、コウチュウ目、ハエ目が主に知られている (Kevan, 2003²⁷⁾)。

花粉の寿命は数日間であり、花粉が放出されてから数日間は一定の稔性を保持しているが、花粉を通常で数週間保存している間に花粉の交雑効率は急激に低下する (Jacob and Ferrero, 2003¹⁶⁾)。

ホ. 病原性

へ. 有害物質の産生性

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

ト. その他の情報

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ. 構成及び構成要素の由来

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

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

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

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

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

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

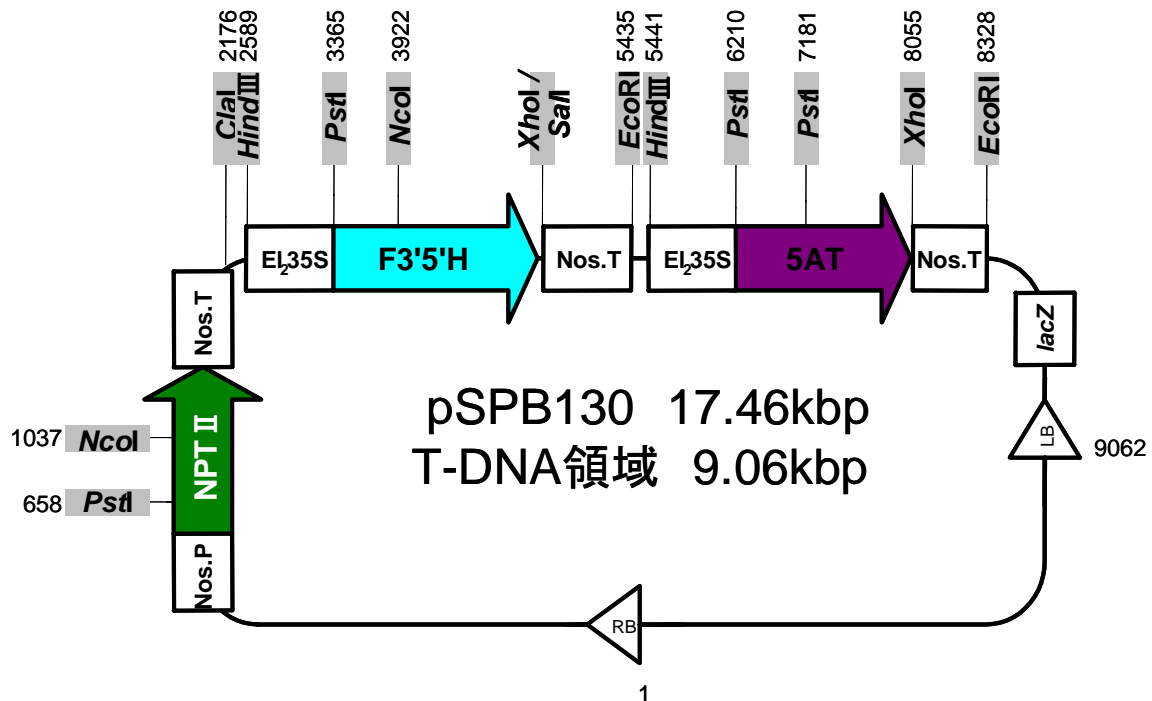


図 1. pSPB130 の構造

バイナリーベクターpBIN19 に 2 つの遺伝子を挿入したもの。

Nos. P : アグロバクテリウムツメファシエンス由来ノパリン合成酵素プロモーター又は 5' 非翻訳領域、NPT II : ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) II 遺伝子、Nos. T : アグロバクテリウムツメファシエンス由来ノパリン合成酵素 3' 非翻訳領域、El235S : カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、F3' 5' H: パンジー フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 cDNA、5AT : トレニア アントシアニン 5-アシル基転移酵素 cDNA。

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

(注 : 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ. 構成要素の機能

(イ) フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 の作出

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

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

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

フラボノイドの B 環の水酸基の数を決定する酵素がフラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3' H) とフラボノイド 3',5'-水酸化酵素 (F3' 5' H) である (図 2)。両水酸化酵素がともに発現しない場合にはペラルゴニン 3,5-ジグルコシドが、F3' H のみが存在するとシアニン 3,5-ジグルコシドが蓄積する。F3' 5' H が存在する花ではデルフィニンが合成されるが、バラ花卉には F3' 5' H が存在しないため、これらが花卉で蓄積することはない。

い。F3' 5' H 遺伝子をシアニジン、ペラルゴニジンを蓄積するバラに導入するとデルフィニジンが生産され、花の色は変化した。バラの内在性の代謝経路が存在するためシアニジン、ペラルゴニジンと混在することにより、花の色は青紫色には至らなかった。そこで、①パンジー由来の F3' 5' H 遺伝子をバラで発現させる、②アントシアニンを安定化させるためトレニア アントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子を発現させる、の2種の構成要素をバラに導入し、デルフィニジンを蓄積させ、アントシアニンを安定化させることにより青紫色のバラを得た。

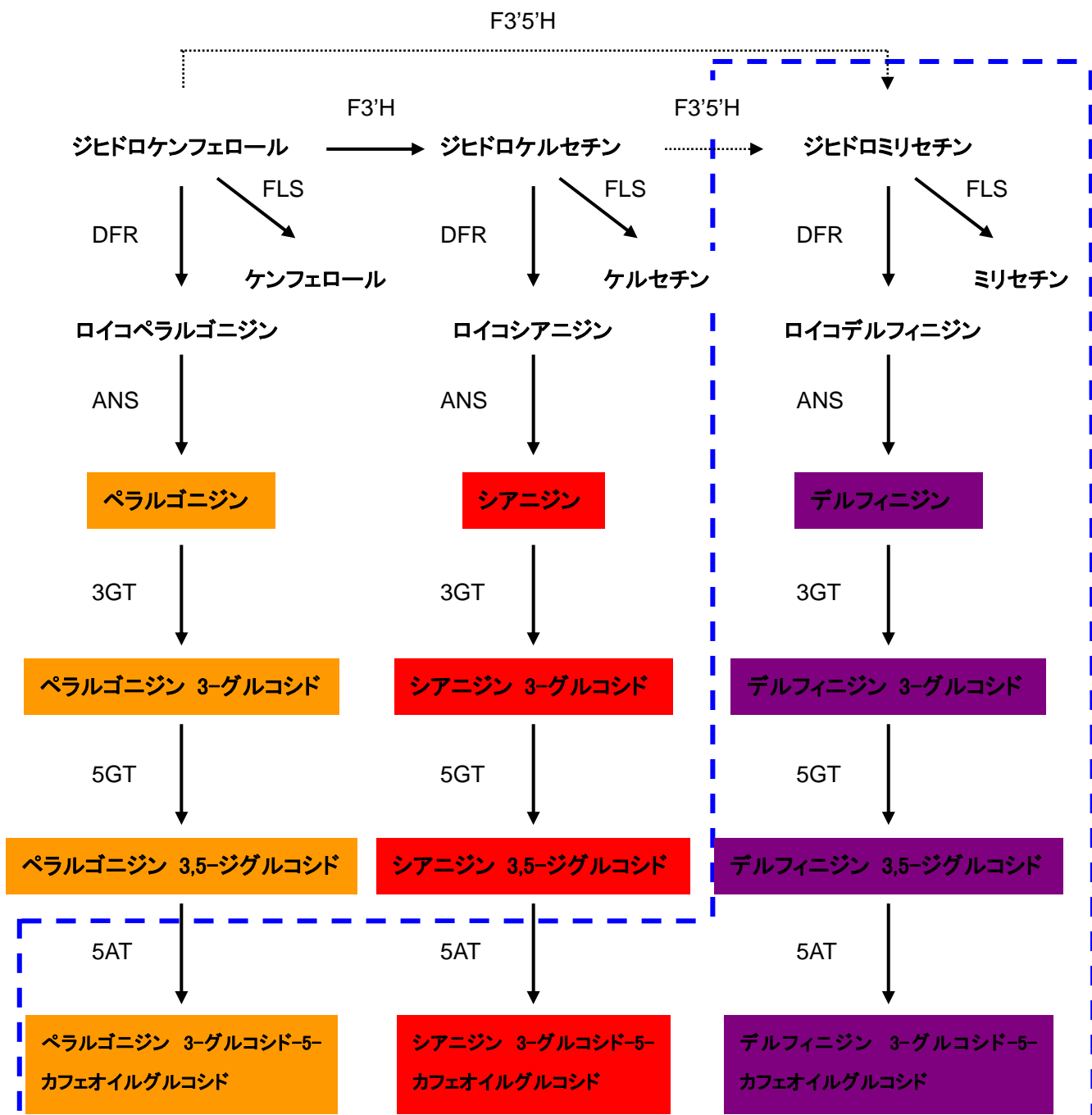


図 2. アントシアニン生合成経路の概略

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

バラには F3' 5' H が欠損しているため、破線の経路は存在しない。バンジー由来の F3' 5' H 遺伝子を導入することによりジヒドロミリセチンを生合成し、青みを帯びたデルフィニン型アントシアニンを蓄積させ、花の色を青くすることができる。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：アントシアニン 3-糖転移酵素、5GT：アントシアニン 5-糖転移酵素、5AT：アントシアニン 5-アシル基転移酵素。

※青破線で示した部分は、導入遺伝子の機能により新たに合成される経路である。

(ロ) 構成要素の機能

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

a. ノパリン合成酵素(Nos)プロモーター :

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

ノパリン合成酵素遺伝子は、Ti-, Ri-プラスミドの T-DNA 上に存在する。アグロバクテリウムが植物に感染後、植物核ゲノムに組み込まれた Ti 又は Ri プラスミドの T-DNA 上にコードされているノパリン合成酵素が植物腫瘍組織中で発現し、アミノ酸のアミノ酸残基と α -ケト酸のカルボニル基の還元的縮合によりノパリンが合成される。合成されたノパリンは感染菌に輸送され、炭素及び窒素源として利用される。このノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターは nos プロモーターと呼ばれ、植物体のほとんど全ての器官で発現する (村松、1997 年²⁸⁾、Ebert et al., 1987²⁹⁾)。

b. ネオマイシンホストランスフェラーゼ(NPT) II 遺伝子 :

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

c. ノパリン合成酵素 (Nos) 遺伝子 3' 側領域 :

a. に記載のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 側配列である。

d. 35S プロモーター :

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

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

により発現を強くした E1235S プロモーター (Mitsuhara et al., 1996³⁰) を用いている。

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

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

f. アントシアニン 5-アシル基転移酵素 (5AT) cDNA :

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

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

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

これらの蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性を有するか否かについて、データベース SWISS-PROT を用い、「Allergen sequence db」中の「Non-Food Allergen sequence」に対して検索を行ったところ、相同性は有さなかった。

③宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

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

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

大腸菌及びアグロバクテリウム由来の合成プラスミド pBIN19 (Bevan, 1984³¹⁾) をベクターとして使用した。大腸菌由来のネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子、大腸菌由来のマルチクローニングサイト、アグロバクテリウム由来の T-DNA レフトボーダー及びライトボーダー配列を含む。

ロ. 特性

pBIN19 は 11,777 bp からなるバイナリーベクターで、その塩基配列を別添資料 2-図 1 (p. 1) に示した。

②特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

③ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報 本ベクターの感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

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

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

形質転換方法はアグロバクテリウム法 (国際公開番号: W0 2005/017147³²⁾) 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

本組換え体の選抜にはカナマイシン（50mg/l）を含む選抜培地を用いた。

平成12年9月に宿主に形質転換を行った。具体的には *Agrobacterium tumefaciens* Ag10 株 (Lazo et al., 1991³³⁾) の菌液中に、無菌苗の葉から誘導したバラのカルスを5分間浸し、滅菌濾紙で余分な菌液を拭き取った後、継代用培地に移植し、2日間暗所で共存培養した。その後、カルベニシリンを400mg/l 加えたMS液体培地で洗浄し、継代用培地にカナマイシン50mg/l とカルベニシリン200mg/lを加えた選抜・除菌用培地へ移植した。選抜培地上で生育阻害を受けず、正常に増殖する部分の移植と培養を繰り返し、カナマイシン耐性カルスを選抜した。カナマイシン耐性を示した形質転換カルスを、カナマイシン50mg/l、カルベニシリン 200mg/l を添加した再分化用の培地で培養し、カナマイシン耐性シュートを得た。得られたシュートは1/2MS培地（カナマイシンを添加していない）で発根させた後、馴化を行った。馴化個体は鉢上げ後、閉鎖系温室で栽培して開花させ、平成14年9月に青紫色の本組換え体を得た。さらにHPLC分析にて、本組換え体の花卉よりデルフィニジンが検出されることを確認した。現在、栄養増殖にて維持している。

②核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

本組換え体の葉からの抽出物を培地に塗抹し、生育するコロニーを観察することによりアグロバクテリウムの残存の有無を確認した。しかし、コロニーの生育は見られなかった（別添資料 4 p. 26 参照）。

よって、本組換え体におけるアグロバクテリウムの残存はないと判断された。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ. 移入された核酸の複製物が存在する場所

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

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

遺伝子の翻訳産物である F3' 5' H の働きにより現にデルフィニジンが生成されている。よって、F3' 5' H 遺伝子を始め、T-DNA 上の遺伝子は染色体上に存在するものと考えられる。また、サザン解析の結果より、本組換え体において移入された核酸は複数コピー存在するものと考えられるが、上記のような理由から少なくとも 1 コピーは核ゲノムに存在するものと考えられる（別添資料 3 p. 4-7 参照）。さらに、アグロバクテリウム法ではオルガネラゲノムへの遺伝子導入の確率が非常に低いことを併せて考えると、大部分あるいは全ての移入された核酸は核ゲノムに存在する可能性が高いと考えられる。

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

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

なお、本組換え体の承認申請の単位は、組換えた当代の栄養繁殖に由来するもののみであるため、複数世代における伝達の安定性は調査していない。

ハ. 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

移入された核酸は染色体上に離れて存在していると考えられる。

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

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

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

また、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

定している。なお、本組換え体は全て栄養増殖によって増殖しているが、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花卉では安定して発現していると考えられる。

なお、本組換え体の承認申請の単位は、組換えた当代の栄養繁殖に由来するもののみであるため、世代間での発現の安定性は調査していない。

ホ. ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

サザン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 $20 \mu\text{g}$ の染色体 DNA を用いれば検出可能である。PCR 法を用いた検出、識別方法に関しては現在開発中である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

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

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

平成 16~17 年のサントリー株式会社構内における閉鎖系温室試験データ、特定網室試験データ並びに日本植生株式会社福田下ほ場（現美咲ほ場）内における特定網室試験データを元にした。

①形態及び生育の特性

宿主及び組換え体を特定網室内で栽培し、生育特性として草丈、節数、開花時期について、形態特性として花の直径、花卉数、葯数、葯長、葯幅について、その他特性として花の香りについて調査した。このうち、花卉数において宿主及び組換え体間で統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) が認められた。具体的には、特定網室において宿主の花卉数が平均 33.2 ± 7.1 枚であったのに対し、組換え体では平均 25.2 ± 2.9 枚であった。草丈、節数、開花時期、花の直径、葯数、葯長、葯幅、花の香りについては、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった (別添資料 4 p. 6-8 参照)。

②生育初期における低温又は高温耐性

宿主及び組換え体の幼苗を、低温あるいは高温に設定した人工気象器内で1ヶ月間栽培し、それぞれの新芽における生育速度を観察した。その結果、低温条件（5℃）下、高温条件（35℃）下ともに、宿主及び組換え体間で生育速度に差異は認められなかった（別添資料4 p.9-10 参照）。

③成体の越冬性及び越夏性

園芸種は多年生の木本植物であり、日本の自然条件下では越冬性及び越夏性を示すと考えられる。隔離ほ場試験あるいは人工気象器において成体の越冬性及び越夏性の調査を行う予定である。

④花粉の稔性及びサイズ

宿主、組換え体ともに花粉の存在が認められた。宿主及び組換え体間で花粉の充実率、発芽率に統計的有意差は認められなかった（別添資料4 p.11-12 参照）。

さらに、花粉の大きさも宿主及び組換え体間で統計的有意差（Student *t* 検定、危険率5%水準）は認められず、形態にも差異は認められなかった（別添資料4 p.13 参照）。

⑤種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

園芸種における種子の生産量は種間及び品種間で大きな差異があるが、一般には1つの果実中に数粒～数十粒の種子が生産される。しかし、種子は果皮で覆われているため、人為的手段によらなければ、自然に脱粒することはほとんどないと考えられている。種子に関する調査は隔離ほ場試験において行う予定である。

⑥交雑率

特定網室内で栽培した宿主及び組換え体の花粉はともに存在し、その充実、発芽能も確認されたが、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。

宿主及び組換え体の園芸種（クイーンエリザベス、ゴールドバニー）に対する交雑率を人工交配によって調査した。その結果、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、クイーンエリザベス（グランディ・フロラ系園芸品種）と組換え体、ゴールドバニー（フロリバンダ系園芸品種）と組換え体との交配により得られた種子からは導入遺伝子は全く検出されなかった（別添資料4 p.16-17 参照）。

宿主及び組換え体の野生種（ノイバラ）に対する交雑率を人工交配により調査した。その結果、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。しかし、得られた種子についてPCR解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されず、得られた種子はノイバラの自殖種子、

あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであることが示唆された(別添資料 4 p. 18-19 参照)。

宿主及び組換え体の野生種(ノイバラ)に対する交雑率を放蜂により調査した。その結果、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。しかし、得られた種子について PCR 解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されず、得られた種子はノイバラの自殖種子、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであることが示唆された。また、クロマルハナバチの行動観察を行ったが、香りが強く、花弁数も少ないノイバラの花に集中的に群がり、ノイバラの花間を行き来することはあっても、宿主あるいは組換え体の花とノイバラの花間を行き来する個体はほとんど認められなかった(別添資料 4 p. 20-22 参照)。

花粉は宿主及び組換え体ともに観察されたが、送風による花粉の飛散調査を行った結果、宿主及び組換え体ともに花粉の飛散は全く認められなかった(別添資料 4 p. 14-15 参照)。

⑦有害物質の産生性

園芸種はこれまでに長期間の使用等の歴史があるが、我が国を含めて園芸種が周辺の野生動植物等の生育や生息に影響を及ぼす物質を産生するという報告はない。また、導入遺伝子が組換え体の代謝に影響を及ぼし、有害物質を産生する可能性の有無を明らかにするために、鋤き込み及び後作試験においてレタス種子発芽への影響について調べたが、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった(別添資料 4 p. 23-24 参照)。さらに、土壤微生物相試験の結果、細菌、真菌、放線菌数について宿主と組換え体間に差異は認められなかった(別添資料 4 p. 25 参照)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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 : 岡山県津山市福田下字千代芝 387 番地 2

名称 : 日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場

使用期間: 承認の日～平成 22 年 12 月 31 日

1 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。
- (3) 土、遺伝子組換えバラの種子等が付着した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、遺伝子組換えバラの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を、排水系統に設置している。
- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風林を設置している。

3 隔離ほ場での作業要領

- (1) 遺伝子組換えバラ及び比較対照のバラ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 遺伝子組換えバラを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えバラが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えバラの栽培終了後は、当該遺伝子組換えバラ及び比較対照のバラを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに遺伝子組換えバラが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

(3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法
申請書に添付したモニタリング計画書を参照。

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換え体はオーストラリアにおいて、平成 15 年 6 月 23 日に栽培許可を、平成 15 年 10 月 14 日に輸入許可(別添資料 6 p. 1-2 参照)を取得した。平成 16 年 4 月 10 日に組織培養苗を日本から輸入し、馴化、鉢上げ後、平成 17 年 3 月 9 日より温室にて栽培を開始した。なお、当該温室は日本の特定網室に相当する。

また、アメリカにおいては平成 16 年 7 月 6 日に輸入許可(別添資料 6 p. 3 参照)を取得した。平成 16 年 7 月 28 日に組織培養苗を日本から輸入し、馴化、鉢上げ後、同年 8 月 23 日より通常温室(遺伝子拡散防止措置は行っていない)にて栽培を開始した。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

競合における優位性に係わる諸形質、すなわち形態及び生育特性、生育初期における低温又は高温耐性、花粉の特性について宿主と組換え体間における相違を評価した結果、花弁数においてのみ統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) が認められた (別添資料 4 p. 6-7 参照)。しかし、生育初期における低温又は高温耐性や花粉の特性には相違が認められなかったこと、花弁数以外の諸形質においては相違が認められなかったことから考えると、この相違が隔離ほ場周辺の野生植物の生育等に関わるような重大な形質であるとは考えにくい。

よって、この違いが競合における優位性を示すとは考えられない。

本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花弁及び葉においてデルフィニジン及びミリセチンを生成しているが、形態及び生育特性において宿主との相違はほとんど認められなかった (別添資料 4 p. 4-8 参照)。このことから、本組換え体におけるデルフィニジン及びミリセチンの生産は、競合における優位な形質であるとは考えにくい。

また、本組換え体では花弁に蓄積される青紫色の色素により花色が変化しているが、これまで交配育種で作出された様々な花色の園芸種において花色の変化により訪花昆虫相が変化したという報告はなく、本組換え体においても花色の変化により周辺の生物多様性に影響を及ぼすような訪花昆虫相の変化が起こる可能性は低いと考えられるが、花色の変化に伴う訪花昆虫相への影響の有無については隔離ほ場にて調査を行う。

さらに、昆虫は花色だけに基づいて花を選択するわけではなく、香りも重要な要素である。しかし、花の香りを分析した結果、宿主と組換え体間で違いは認められなかった (別添資料 4 p. 8 参照)。また、放蜂による野生種 (ノイバラ) と組換え体との交雑性を調査する中でクロマルハナバチの行動観察を行ったが、クロマルハナバチは香りが強く、花弁数も少ないノイバラの花に集中的に群がる傾向が認められ、本組換え体はノイバラに比べてクロマルハナバチの誘引性が弱いことが示された (別添資料 4 p. 20-22 参照)。これらのことより、本組換え体を隔離ほ場で栽培することにより花の香りが起因となって周辺の生物多様性に影響するような訪花昆虫相の変化が起こる可能性は極めて低いと考えられるが、昆虫は香り以外にフェロモン等にも反応するため、本組換え体の栽培に伴う訪花昆虫相への影響の有無については隔離ほ場にて調査を行う。

以上より、本組換え体におけるデルフィニジンの生産とそれに伴う花色の変化は、競合における優位な形質であるとは考えられず、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りに

おいては本組換え体には野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合し、それらの生育等に支障を及ぼす性質はないと考えられた。

従って、競合における優位性について影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

導入した 5AT、F3' 5' H 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発芽への影響について調べたところ、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった（別添資料 4 p. 23-24 参照）。さらに、土壌微生物相試験の結果、細菌、真菌、放線菌数について宿主及び組換え体間に差異は認められなかった（別添資料 4 p. 25 参照）。

よって、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては本組換え体が宿主にない有害物質を産生し、ほ場周辺の野生植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質はないと考えられた。

また、本組換え体の花粉等が訪花昆虫等に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、導入遺伝子の発現の結果、本組換え体はデルフィニジン及びミリセチンを新たに生成しているが、これらは他の植物においても生成されているものであり、有害物質であるとする報告はないことから、これらの物質が昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。なお、PCR による解析の結果、本組換え体の花粉及び根において導入遺伝子は検出されていない（別添資料 3 p. 1-3 参照）。

よって、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては本組換え体が宿主にない有害物質を産生し、訪花昆虫等に何らかの影響を与える可能性は極めて低いと考えられた。

従って、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じるおそれはないと判断された。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

さらに、隔離ほ場周辺の植生調査を実施した結果、隔離ほ場から 500m の圏内に自生するバラ属の近縁野生種として、ミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama)、ノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、ヤブイバラ (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama) の 1 種と 2 変種が特定された。隔離ほ場に近接した場所ではミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) のみ自生していることが確認された (別添資料 7 p. 1-15 参照)。

以上のことから、本組換え体を隔離ほ場で栽培した場合、これら 1 種と 2 変種が交雑の可能性のある野生植物として特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

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

(3) 影響の生じやすさの評価

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

そこで、人工交配による園芸種 (クイーンエリザベス、ゴールドバニー) あるいは野生種 (ノイバラ) に対する本組換え体との交雑率を求め、宿主との交雑率と比較した。その

結果、園芸種との人工交配試験においては宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、園芸種と組換え体との交配により得られた種子において、導入遺伝子は全く検出されなかった(別添資料4 p.16-17 参照)。

野生種との人工交配試験においては、宿主及び組換え体のいずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められた。しかし、得られた種子について解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった(別添資料4 p.18-19 参照)。

また、放蜂による宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を調査し、両者を比較した結果も同様に、いずれを花粉親とした場合でもわずかに結実が認められたが、得られた種子について解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった(別添資料4 p.20-22 参照)。

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

なお、隔離ほ場周辺に自生しているミヤコイバラ、ヤブイバラはノイバラと同じバラ属エウロサ亜属シンスティラ節に属し、いずれも2倍体であるため、本組換え体との交雑性についてはノイバラと同様であると考えられる。

本組換え体は、PCR 解析の結果、導入遺伝子が L1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示唆された(別添資料3 p.1-3 参照)。ただし、細胞分裂方向等の乱れにより、非常に低い確率で導入遺伝子を含む花粉が形成され、上記で特定した近縁野生種に何らかの影響を及ぼす可能性は否定できない。この点については、今後更に詳細な解析を行う予定であるが、本組換え体が安定なキメラ植物であることが確認されれば導入遺伝子は花粉に存在しないため、たとえ花粉飛散等により野生種と本組換え体が交雑する場合があっても導入遺伝子が隔離ほ場周辺の近縁野生種との雑種に伝達される恐れはない。

仮に細胞分裂方向の乱れにより導入遺伝子を含む花粉が形成されたとしても、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては、本組換え体の花粉が野生種の卵細胞と受精する確率は極めて低いと考えられる。なぜなら、本組換え体と近縁野生種が近接して生育することはなく、たとえ昆虫による花粉の媒介が可能な程度に近接した場所で生育することがあったとしても、昆虫は園芸種の花粉とともに他の野生種の花粉も運ぶため、野生種の雌性器官は野生種由来の花粉を優先的に選択し、受精に用いると考えられるからである。事実、園芸種の交配育種とノイバラの台木生産を行っている岐阜県内のバラ園においてもこれまでにノイバラが園芸種と交雑したという事例は得られていない。

また、組換え体と野生種(ノイバラ)との人工交配試験において、得られた種子から組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった(別添資料4 p.18-19 参照)。さらに、風媒による交雑の可能性を想定し、送風による花粉の飛散距離を調査したが、宿主、組換え体ともに花粉の飛散は全く認められなかった(別添資料4 p.14-15 参照)。

よって、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては本組換え体と隔離ほ場周辺に自生する野生種が交雑する可能性はないか、たとえ交雑したとしても導入遺伝子が交雑種に伝達されることはないと考えられる。仮に、本組換え体（4倍体）と近縁野生種（隔離ほ場周辺に自生する近縁野生種は全て2倍体）が交雑したとしても、得られる交雑種子は3倍体となるため、発芽したとしても正常な生育は期待できない。また、交雑種子が開花した場合、生殖器官（花粉や卵細胞）の減数分裂が異常となるため、稔性を持たず、それ以上の交雑は不可能となる。また、実際に2倍体の野生種を人為的に倍数化させて4倍体を作成し、園芸種（4倍体）と人工交配した場合でも、野生種と園芸種は種が異なるため、種間雑種の特性として生育が不良となることが岐阜大学応用生物科学部 福井研究室で確認されている。

以上のことから、万が一、本組換え体の花粉に導入遺伝子が存在したとしても、近縁野生種との交雑率は極めて低いと考えられ、仮に交雑したとしても交雑種の稔性も低いと考えられるため、得られた交雑種が周囲の環境に適応して隔離ほ場周辺の近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。しかしながら、本組換え体の花粉における導入遺伝子の存在の有無については今後更に詳細な解析を行い判断する必要がある。隔離ほ場から500mの圏内には上記で特定した近縁野生種が自生していることから、これらと本組換え体が交雑し、ほ場周辺に自生する近縁野生種に何らかの影響を及ぼす可能性は現時点では完全には否定できない。そこで、隔離ほ場周辺の近縁野生種との交雑を調査するためモニタリングを行うことを計画している（モニタリング計画書参照）。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換え体が近縁野生種と交雑する可能性は極めて低く、仮に交雑したとしても交雑することにより得られた交雑種が我が国の環境に適応して、隔離ほ場周辺の近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いことから、第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。なお、交雑の実態を検証するためにモニタリング調査を実施する。

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性について：

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

競合における優位性に係わる諸形質のうち、花卉数において宿主と組換え体間で相違が認められた。しかし、これ以外の諸形質においては相違が認められなかったことから、花卉数の相違が隔離ほ場周辺の野生植物の生育等に関わるような重大な形質であるとは考えにくい。

また、本組換え体は花卉及び葉においてデルフィニジン及びミリセチンを生成しているが、これらの生産とそれに伴う花色の変化により訪花昆虫相が変化する可能性が考えられた。しかし、これまで交配育種で作出された様々な花色の園芸種において花色の変化により訪花昆虫相が変化したという報告はない。また、昆虫は花色だけに基づいて花を選択するわけではなく、香りも重要な要素であるが、宿主と組換え体間で花の香りに違いは認められなかった上に、本組換え体はノイバラに比べてクロマルハナバチの誘引性が弱いことが示された。これらのことから、本組換え体を隔離ほ場で栽培することにより周辺の生物多様性に影響するような訪花昆虫相の変化が起こる可能性は極めて低いと考えられるが、本組換え体の栽培に伴う訪花昆虫相への影響の有無については隔離ほ場にて調査を行う。

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生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：

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

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

また、導入遺伝子の発現の結果、本組換え体はデルフィニジン及びミリセチンを新たに生成しているが、これらは他の植物においても生成されているものであり、有害物質であるとする報告はないことから、これらの物質が昆虫等に何らかの影響を与えるものではないと考えられる。

以上のことから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断された。

交雑性について：

日本に自生するバラ属の近縁野生種はノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ、カラフトイバラ、オオフジイバラ/アズマイバラ/ヤマテリハノイバラ、ヤマイバ

ラ、カカヤンバラ/ヤエヤマノイバラ、ナニワイバラ、サンショウバラの 10 種とタカネバラ、ツクシイバラ、モリイバラ、フジイバラ、ヤブイバラ/ニオイイバラ、ミヤコイバラの 6 変種に限られる。隔離ほ場周辺の植生調査により、これらのうちミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラの 1 種と 2 変種が本組換え体と交雑する可能性のあるものとして特定された。

そこで、人工交配による園芸種（クイーンエリザベス、ゴールドバニー）あるいは野生種（ノイバラ）に対する本組換え体との交雑率を調査した結果、園芸種との間においては宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められず、また、本組換え体と園芸種との交配により得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。野生種との間においてはわずかに結実が認められたが、得られた種子について解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。これは放蜂による宿主及び組換え体の野生種（ノイバラ）に対する交雑率を調査し、両者を比較した場合でも同様で、わずかに結実が認められたが、得られた種子について解析を行った結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。

なお、隔離ほ場周辺に自生しているミヤコイバラ、ヤブイバラはノイバラと同じバラ属エウロサ亜属シンスティラ節に属し、いずれも 2 倍体であるため、本組換え体との交雑性についてはノイバラと同様であると考えられる。

本組換え体は、解析の結果、導入遺伝子が L1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示唆された。ただし、非常に低い確率で導入遺伝子を含む花粉が形成され、上記で特定した近縁野生種に何らかの影響を及ぼす可能性は否定できない。この点については、今後更に詳細な解析を行う予定であるが、安定なキメラ植物であることが確認されれば導入遺伝子は花粉に存在しないため、たとえ花粉飛散等により野生種と本組換え体が交雑する場合があっても導入遺伝子が隔離ほ場周辺の近縁野生種との交雑種に伝達される恐れはない。

仮に細胞分裂方向の乱れにより導入遺伝子を含む花粉が形成されたとしても、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては、本組換え体の花粉が野生種の卵細胞と受精する確立は極めて低いと考えられる。なぜなら、本組換え体と近縁野生種が近接して生育することはなく、たとえ昆虫等により本組換え体の花粉が野生種に運ばれたとしても、野生種の雌性器官は野生種由来の花粉を優先的に選択し、受精に用いると考えられるからである。

また、組換え体と野生種との人工交配により得られた種子から組換え体由来の導入遺伝子が全く検出されなかったことより、隔離ほ場において第一種使用等を行う限りにおいては本組換え体と野生種が交雑する可能性はないか、たとえ交雑したとしても導入遺伝子が交雑種に伝達されることはないと考えられた。仮に、本組換え体（4 倍体）と近縁野生種（2 倍体）が交雑したとしても、得られる交雑種子は 3 倍体となるため、正常な生育が期待できず、周囲の環境に適応してほ場周辺の近縁野生種の生育等に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

また、送風による花粉の飛散距離を調査したが、宿主、組換え体ともに花粉の飛散は全く認められなかった。よって、風媒による交雑の可能性も極めて低いと考えられた。

以上のことから、万が一、本組換え体の花粉に導入遺伝子が存在したとしても、近縁野生種との交雑率は極めて低いと考えられ、仮に交雑したとしても交雑種の稔性も低いと考えられるため、交雑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るが、我が国の自然条件下で生育した場合の交雑性が不明なことからモニタリング調査を実施することとする。

従って、隔離ほ場においてフラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 を第一種使用規程に従って使用する限りにおいては、我が国において生物多様性影響を生じるおそれはないと判断した。

参考文献

- 1) 塚本 洋太郎、園芸植物大事典 4、小学館、14-15、20-43、1989 年
- 2) 上田 善弘、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、3-11、2002 年
- 3) 坂西 義洋、園芸植物大事典 4、小学館、33、1989 年
- 4) 林 勇、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、12-19、2002 年
- 5) 鶴島 久男、花卉園芸ハンドブック、養賢堂、630-646、1979 年
- 6) 大川 清、園芸植物大事典 4、小学館、34、1989 年
- 7) 大川 清、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、51-54、2002 年
- 8) 鹿野 義規、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、37-43、2002 年
- 9) 近藤 達士、週刊 花百科 バラ 1、講談社、18、2004 年
- 10) 酒井 広蔵、花卉園芸大百科 10 バラ、農山漁村文化協会、59-63、2002 年
- 11) Gudin, S., Seed propagation., Encyclopedia of rose science, 620-623, 2003
- 12) De Vries, D. P., Dubois, L. A. M., On the transmission of the yellow flower colour from *Rosa foetida* to recurrent flowering hybrid tea-roses., Euphytica 27: 205-210, 1978
- 13) Dubois, L. A. M., De Vries, D. P., On the inheritance of the dwarf character in polyantha x *Rosa chinensis minima* (SIMS) Voss F1-populations., Euphytica 36:535-539, 1987
- 14) De Vries, D. P., Dubois, L. A. M., Pollen and pollination experiments. X. the effect of repeated pollination on fruit- and seed set in crosses between the hybrid tea-rose cvs. Sonia and Ilona., Euphytica 32:685-689, 1983
- 15) Ueda, Y., Akimoto, S., Cross- and self-compatibility in various species of the genus *Rosa*, J. of Horticultural Science and Biotechnology, 76:392-395, 2001
- 16) Jacob, Y., Ferrero, F., Pollen grains and tubes., Encyclopedia of rose science, 518-523, 2003
- 17) Gudin, S., Rose:Genetics and Breeding., Plant Breeding Reviews, 17:159-189, 2000
- 18) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of Royal Horticultural Society, 66:73-82, 1941a
- 19) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of Royal Horticultural Society, 66:242-250, 1941b
- 20) Hurst, C. C., Notes on the origin and evolution of our garden roses, J. of Royal Horticultural Society, 66:282-289, 1941c

- 21) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part I., J. Royal Hort. Soc. 79:555-571, 1954
- 22) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part II., J. Royal Hort. Soc. 79:8-24, 1955a
- 23) Wylie, A. P., The history of garden roses, Part III., J. Royal Hort. Soc. 80:77-87, 1955b
- 24) Semeniuk, P., Inheritance of recurrent and nonrecurrent blooming in 'Goldilocks' X *Rosa wichuraiana* progeny., J. of Heredity, 62:319-320, 1971
- 25) 上田 善弘、バラ属植物の分類学的研究、千葉大学園芸学部学術報告、48:241-328、1994年
- 26) Visser, T., De Vries, D. P., Scheurink J. A. M., Welles G. W. H., Hybrid tea-rose pollen. II. Inheritance of pollen viability., Euphytica, 26:729-732, 1977
- 27) Kevan, P. G., Pollination., Encyclopedia of rose science, 456-460, 2003
- 28) 村松 正實、分子細胞生物学辞典、東京化学同人、155、1997年
- 29) Ebert, P. R., Ha, S.B., An, G., Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5745-5749, 1987
- 30) Mitsuhashi, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., Ohashi, Y., Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants., Plant Cell Physiol. 37:49-59, 1996
- 31) Bevan, M., Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation., Nucleic Acids Res. 12:8711-8723, 1984
- 32) Tanaka, Y., Fukui, Y., Togami, J., Katsumoto, Y., Mizutani, M., PROCESS FOR PRODUCING ROSE WITH MODIFIED COLOR., PCT/JP2004/011958, WO 2005/017147
- 33) Lazo, G. R., Stein, P. A., Ludwig R. A., A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*., Biotechnology 9: 963-967, 1991
- 34) Malone, L. A., Literature review on genetically modified plants and bee products., MAF Technical Paper (New Zealand) No:2002/05. 1-47, 2002
- 35) Kim, S. R., Lee, J., Jun, S. H., Park, S., Kang, H. G., Kwon, S., An, G., Transgene structure in T-DNA-inserted rice plants., Plant Mol. Biol. 52: 761-773, 2003

モニタリング計画書

平成17年8月31日

氏名 サントリー株式会社
代表取締役社長 佐治 信忠

住所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

第一種使用規程の承認を申請しているフラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 (*F3' 5' H, 5AT, Rosa hybrida*) (以下、本組換え体という) のモニタリングについて、遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容に基づき、次のように計画した。

1 実施体制及び責任者

個人名・所属は個人情報につき非開示

2 モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称及び項目

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

さらに、隔離ほ場周辺の植生調査を実施した結果、隔離ほ場から500mの圏内に自生するバラ属の近縁野生種としてミヤコイバラ (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama)、ノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、ヤブイバラ (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama) が特定された。

以上のことから、本組換え体を隔離ほ場で栽培した場合、これら1種と2変種が交雑の可能性のある野生植物として特定された。よって、これらと本組換え体との交雑の有無に

ついて調査を行う。

3 モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の生息又は生育状況

(1) モニタリング実施場所

日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場（岡山県津山市福田下字千代芝 387 番 2）には隣接してミヤコイバラが自生しており、交雑の可能性がある野生種として、まず、このミヤコイバラが考えられる。さらに、バラの訪花昆虫として最も考えられるハチは餌がない場合、行動範囲が数 km に及ぶこともあるが、主な行動範囲は 500m～2km までのことが多く、花が多く咲く時期には 100～200m の範囲を行動すると考えられている (Malone, 2002³⁴⁾)。野生種の開花時期は花が多く咲く時期であることからハチの行動範囲は広くても 500m 程度であると考えられた。隔離ほ場から 500m の圏内にはミヤコイバラの他にノイバラ、ヤブイバラが自生している。

以上のことから、隔離ほ場から 500m の圏内に自生するミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラを対象としてモニタリングを実施する。

(2) 対象となる野生植物の生育状況

隔離ほ場より 1km の圏内には、ミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラの 1 種 2 変種が自生している。500m 圏内にはミヤコイバラの他にノイバラ、ヤブイバラがそれぞれ一ヶ所ずつ自生しており、隔離ほ場に隣接した場所にはミヤコイバラのみが自生している（図 1）。また、隔離ほ場から 500m の圏内に自生するミヤコイバラ、ノイバラ、ヤブイバラの詳細な生育状況については表 1 に示した。なお、これらは各自生場所において複数個体存在すると考えられたが、野生種は吸枝による繁殖が可能であるためその個体数を特定することは困難である。このため、表 1 には各自生場所における平均的な株についての調査結果を示した。