

### 3. 当該核酸による形質発現の安定性

#### 3-1. 花卉における当該遺伝子による形質発現の安定性

本組換え体の花卉における導入遺伝子の発現についてノザンプロット法によって解析した。

#### [実験方法]

宿主及び組換え体の花卉より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。total RNA 20  $\mu$ g を 1.2%ホルムアミド含有アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロン膜に転写した。DIG Northern Starter Kit (Roche) に従い、導入遺伝子であるパンジー-F3' 5' H 遺伝子、トレニア 5AT 遺伝子及び大腸菌 NPT II 遺伝子の RNA プローブを作製し、これらを用いて 68°C、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を 0.1% SDS を含む 2xSSC を用いて室温、5 分で 2 回洗浄後、0.1% SDS を含む 0.1xSSC を用いて 68°C、30 分で 2 回洗浄し、当該キット製造業者推奨の方法にてハイブリダイズしたシグナルの検出を行った。

#### [結果と結論]

図 3 に結果を示した。ノザン解析の結果、T-DNA 上の遺伝子のいずれをプローブとした場合でも、組換え体でのみ特異的なシグナルが検出された。よって、組換え体において、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。

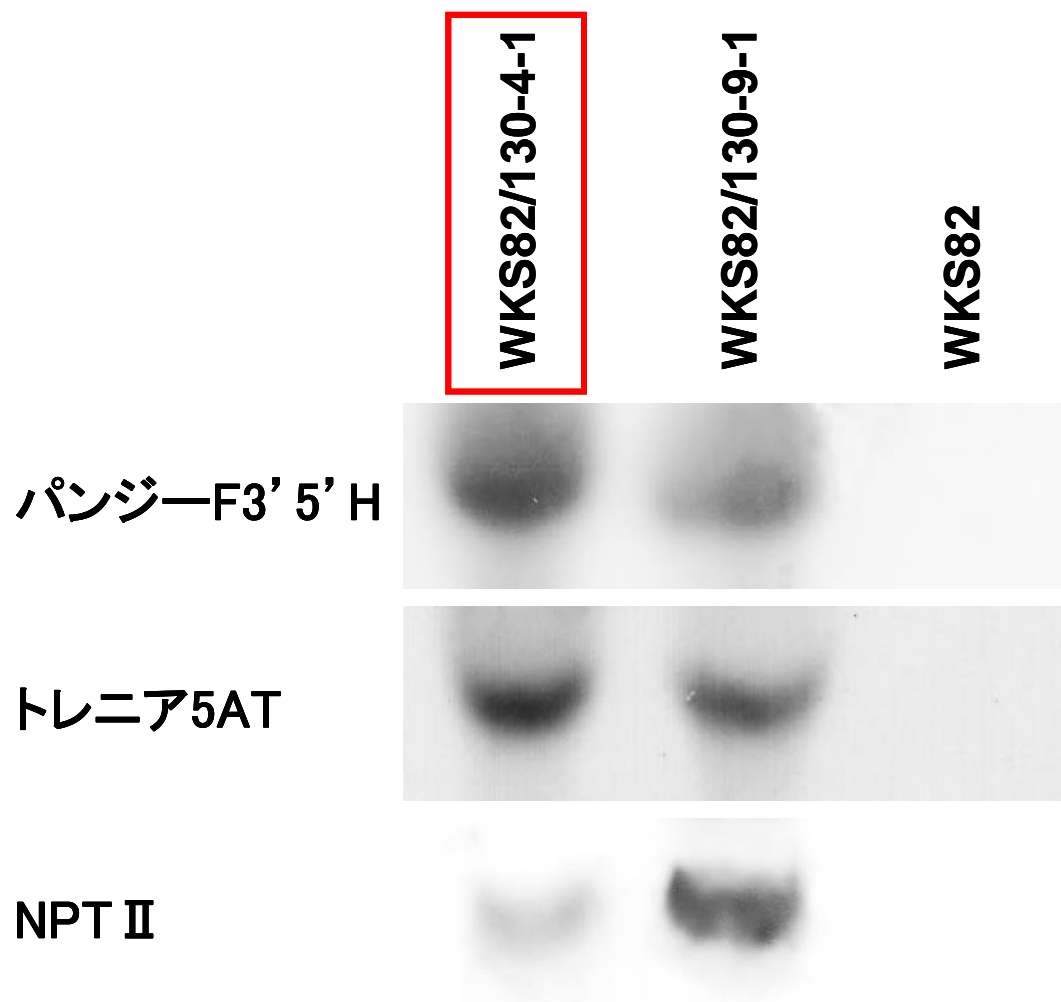


図 3. WKS82/130-4-1 のノザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体(WKS82/130-4-1)の total RNA 20 $\mu$ g を導入遺伝子 (パンジー F3' 5' H 遺伝子、トレニア 5AT 遺伝子及び大腸菌 NTP II 遺伝子) をプローブとしてノザン解析を行った。

※WKS82/130-9-1 は本申請には含まれない。

(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。)

## 3-2. 各器官における当該遺伝子による形質発現の安定性

本組換え体の花卉、葉、茎における導入遺伝子の発現について RT-PCR 法によって解析した。なお、PCR による解析にて根及び花粉においては導入遺伝子の存在が確認できなかったため、これらの器官における発現については解析していない。

## [実験方法]

宿主及び組換え体の花卉、葉、茎より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 330ng より SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) にて製造業者推奨の方法に従い cDNA を合成した。得られた cDNA のうち 3  $\mu$ l を用いて、TaKaRa Ex Taq™ (TaKaRa) により PCR 法にて導入遺伝子 (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) の増幅を行った。さらに、内在性コントロールとしてバラのエチレンレセプター1 (ETR1) 遺伝子の増幅を行った。PCR の反応条件は、熱変性が 94°C で 5 分間、続いて 94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 25 回繰り返し、その後、伸長反応が 72°C である。得られた増幅産物をアガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって増幅断片の検出を行った。

なお、パンジー F3' 5' H 遺伝子の増幅には pBG66 (40)-F と pBG66 (40)-R を、トレニア 5AT 遺伝子の増幅には TAT7-F2 と TAT7-1469R を、NPT II 遺伝子の増幅には NPT II-F と NPT II-R を、ETR1 遺伝子の増幅には ETR-F1 と ETR-R1 をプライマーとして用いた。

パンジー F3' 5' H 特異的プライマー

pBG66 (40)-F : 5' -GGC AGA TTT CCT CGA CGT TCT C- 3'

pBG66 (40)-R : 5' -CCT TGT CCC CGC ACA AAT TC- 3'

トレニア 5AT 遺伝子特異的プライマー

TAT7-F : 5' -CCA ATG CAA TGC CTT GTG TTG TAC AAC TT - 3'

TAT7-1469R : 5' -TTA AAT ATC CTT CAA ACC GCT GT - 3'

NPT II 遺伝子特異的プライマー

NPT II-F : 5' -GAT TGA ACA AGA TGG ATT GCA CGC- 3'

NPT II-R : 5' -CGA AGA ACT CCA GCA TGA GAT CCC- 3'

ETR1 遺伝子特異的プライマー

ETR-F1 : 5' -TGT GGA GCG ACA CAT CTT AT- 3'

ETR-R1 : 5' -GCA GCA TGT GAA AGA GCA AC- 3'

## [結果と結論]

図 4 に結果を示した。RT-PCR による解析の結果、花卉、葉、茎のゲノム内に挿入された各遺伝子は安定して発現していることが明らかとなった。

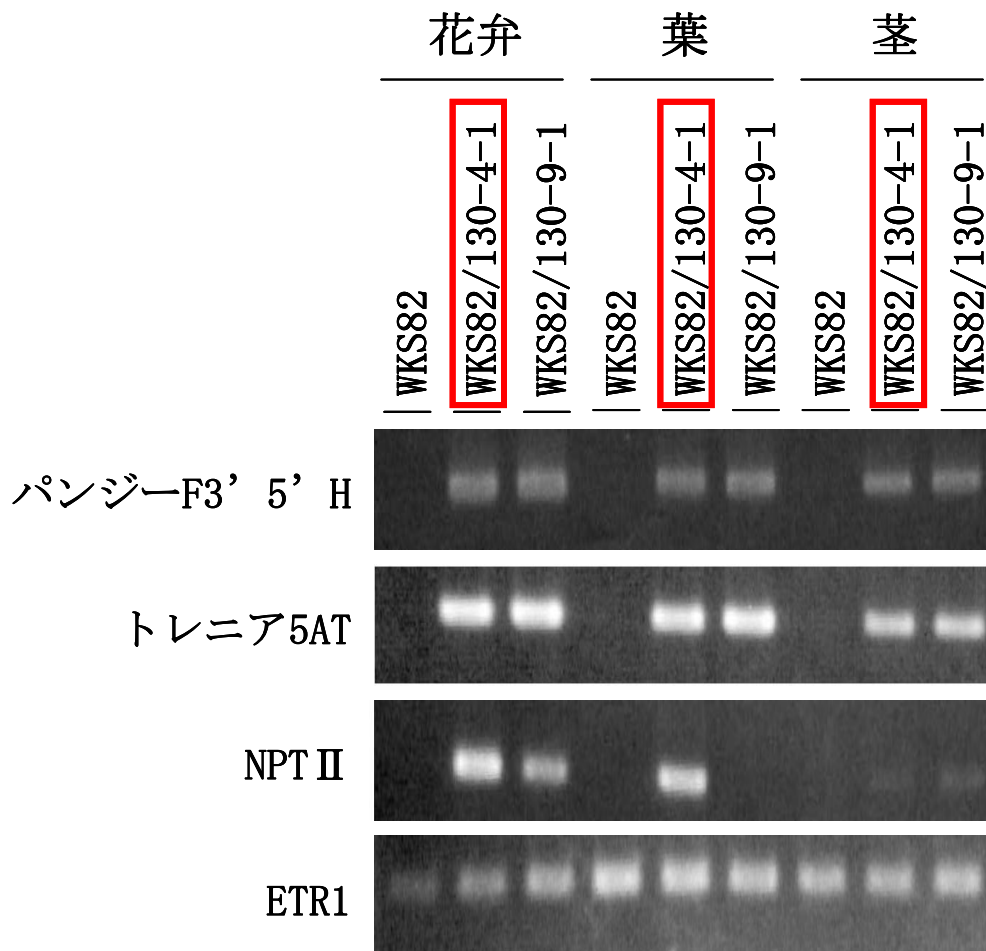


図 4. 組換え体の各器官における RT-PCR 解析

※WKS82/130-9-1 は本申請には含まれない。

(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。)

## 「閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果」

## [ 目次 ]

1. 概要	2
2. 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果	3
(1) 花色の調査	3
(2) 形態及び生育特性の調査	10
(3) 生育初期における低温又は高温耐性の調査	14
(4) 生殖・繁殖特性の調査	16
(5) 交雑性の調査	22
(6) 有害物質の産生性	34
(7) アグロバクテリウムの葉における残留性	37
(8) 閉鎖系温室並びに特定網室における試験結果のまとめ	38

## 「閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果」

## 1. 概要

花の色のうち、赤から青、時には黄から橙の色は花卉細胞に含まれるアントシアニンと呼ばれるフラボノイドの配糖体に由来する場合がほとんどである。アントシアニンから糖を取り除いた基本骨格（アントシアニン）にはペラルゴニン、シアニン、デルフィニジンの3種が知られている。花の色は、その花がどのアントシアニンを含むかでおおむね決定される。ペラルゴニンを含む花は橙色、シアニンを含む花は赤色、デルフィニニンを含む花は紫から青色となることが多い。

バラには、ペラルゴニンを含む品種とシアニンを含む品種があるが、デルフィニニンを含む品種は存在しない。これは、バラにはデルフィニニンを生合成するために必要なフラボノイドのB環の5'位を水酸化するフラボノイド3',5'-水酸化酵素 (F3'5'H) の遺伝子が存在しないためである。従って、バラには紫ないし青色の花色の品種は存在しない。

そこで、バラ (*Rosa hybrida*) にパンジー由来の F3'5'H 遺伝子とトレニア由来のアントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子を導入することにより、花卉でデルフィニニンを蓄積

する、フラボノイド生合成経路を改変したバラを分子育種した。

今回はこれらの遺伝子を赤紫色のバラ品種「WKS82」(以下、宿主という)へ導入し、青紫色の花色をもつバラ「WKS82/130-4-1」(以下、組換え体という)が得られたので、平成 16～17 年にサントリー株式会社構内の閉鎖系温室(以下、サントリー閉鎖系温室という)及び特定網室(以下、サントリー特定網室という)、並びに日本植生株式会社福田下ほ場(現美咲ほ場)内の特定網室(以下、日本植生特定網室という)にて本組換え体について生物多様性影響評価を行った。

なお、今回得られた実験結果はすべて自根栽培によるものである。

(注:本資料の図表に記載された全ての情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

## 2. 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果

## (1) 花色の調査

## [目的]

宿主及び組換え体の花卉の色について調査する。

## [実験方法]







平成 17 年 2～5 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花（各個体につき 1 花）から無作為に 2 枚（各個体より 2 枚ずつで合計 20 枚）の花弁を選んで、目視にて RHS カラーチャート番号を特定した。

## [結果と結論]

結果を表 1 に示した。これらの花色は栄養繁殖を繰り返しても青紫色で、安定的に保持されていた（図 1-2）。

表 1. 花卉の色

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-4-1)	
プラスミド	—		pSPB130	
花の色	赤紫		薄青紫	
色グループ名	Purple group Greyed-Purple group		Purple group Violet group	
RHS カラーチャートの色番号	 75-B	5 花	 76-C	1 花
	 75-D	1 花	 84-B	4 花
	 186-D	4 花	 84-C	5 花

RHS : The Royal Horticultural Society





図 1-1. 宿主(WKS82)の花及び花弁

