

資料 1 - 3

「隔離ほ場試験及び栽培条件検討試験のための隔離ほ場利用計画」

日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場  
組換え体利用に関する実験従事者及び業務安全委員会委員  
(平成 17 年度)

実験従事者

個人名・所属は個人情報につき非開示

安全委員会  
(場内委員)

個人名・所属は個人情報につき非開示

(場外委員)

個人名・所属は個人情報につき非開示

(事務局)

個人名・所属は個人情報につき非開示

表 1. フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 の生物多様性影響評価における調査項目の概要

調査項目	特定網 室試験	隔離ほ 場試験	調査方法	結果の概要
1. 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並びに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	○  ●		サザン解析により解析した。  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を調査予定。	移入された配列は組換え体ゲノム中、4 箇所が存在すると予測された。
2. 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及び生態学的特性について、自然条件下での個体間及び世代間での形質発現の安定性	○  ●		ノザン解析により解析した。  移入された核酸の複製物の複数世代における形質発現の安定性を調査予定。	移入された遺伝子は組換え体ゲノム中で安定的に発現していた。
3. キメラ解析	●  ●		分子生物学的手法による移入された核酸の組換え体における挿入器官の特定及び栄養増殖による個体間におけるその安定性を調査予定。  自殖後代における移入された核酸の伝達の有無を調査予定。	
4. 花色の安定性	○	●	目視による観察、カラーチャートとの比較により調査した。  隔離ほ場における花色の安定性を調査予定。	組換え体の花色は薄青紫色で安定していた。
5. 形態の特性	○	●	花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅を調査した。  隔離ほ場における形態特性を調査予定。	宿主と組換え体間で花弁数において統計的有意差が認められた。

6. 生育の特性	○	●	草丈、節数、開花時期を調査した。 隔離ほ場における生育特性を調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
7. 生育初期における低温及び高温耐性	○		生育初期における低温及び高温耐性について人工気象器を用いて調査した。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
8. 成体の越冬性又は越夏性		●	成体の越冬性、越夏性を調査予定。	
9. 花粉の稔性	○	●	酢酸カーミン染色により花粉の生存を調査した。花粉発芽培地における花粉発芽の有無を調査した。 隔離ほ場における花粉の稔性を調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
10. 花粉のサイズ	○	●	花粉のサイズを顕微鏡下で観察した。 隔離ほ場における花粉のサイズを調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
11. 種子の生産量	●		種子の生産量を調査予定。	
12. 種子の休眠性及び発芽率	●		種子の休眠性及び発芽率を調査予定。	

<p>13. 交雑率</p>	<p>○  ○  ○  ●  ●</p>	<p>○  ○  ○  ●  ●  ●</p>	<p>人工交配による園芸種との交雑性を調査した。</p> <p>人工交配による野生種との交雑性を調査した</p> <p>放蜂による野生種との交雑性を調査した。</p> <p>人工交配による園芸種との交雑性を調査予定。</p> <p>人工交配による野生種との交雑性を調査予定。</p> <p>隔離ほ場における自然条件下での野生種との交雑性を調査予定。</p>	<p>宿主と組換え体間で結実率にほとんど差異は認められず、組換え体との交雑種子において導入遺伝子は検出されなかった。</p> <p>宿主、組換え体ともに結実率は極めて低く、交雑も認められなかった。</p> <p>宿主、組換え体ともに結実率は極めて低く、交雑も認められなかった。</p>
<p>14. 有害物質の産生性</p> <p>鋤き込み試験</p> <p>後作試験</p> <p>土壌微生物相試験</p>	<p>○  ○  ○</p>	<p>○  ●  ○  ●  ○  ●</p>	<p>植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査する。</p> <p>植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査する。</p> <p>植物栽培土壌中の土壌微生物相を希釈平板法により調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物栽培土壌中の土壌微生物相を希釈平板法により調査する。</p>	<p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p> <p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p> <p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p>

15. アグロバクテリウムの 残存性	○		植物体を摩砕し、希釈平板法によりアグロバクテリウムの残存性を調査した。	組換え体におけるアグロバクテリウムの残存は認められなかった。
16. 訪花昆虫相		●	隔離ほ場における訪花昆虫を観察、調査予定。	
17. 周辺生物相	○	●	隔離ほ場周辺の生物相を調査した。 隔離ほ場周辺の生物相を調査予定。	隔離ほ場周辺の野生種を特定した。

○：実施済み、●：未実施

(注：本表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。)

## 隔離ほ場利用計画

隔離ほ場での遺伝子組換えバラ生物多様性影響評価試験の研究調査項目として、次の9項目を検討している。

- (1) 花色の安定性に関する調査
- (2) 形態及び生育特性に関する調査
- (3) 生殖に関する調査
- (4) 交雑性に関する調査
- (5) 種子に関する調査
- (6) 越冬性、越夏性に関する調査
- (7) 有害物質の産生性に関する調査
- (8) 訪花昆虫相の調査
- (9) 周辺生物相の調査

それぞれの項目についての実験計画は以下のとおりである。

## (1) 花色の安定性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの花色の安定性を調査する。

実施時期：平成18年4月から平成18年12月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室C及び屋外A

実施方法：目視、カラーチャート、フラボノイド分析により花色の安定性を調査する。

## (2) 形態及び生育特性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの形態、生育特性について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成18年4月から平成18年12月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室C及び屋外A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラをビニール温室C及び屋外Aで栽培し、生育速度、開花時期、花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅、花の香りについて調査し、比較する。

## (3) 生殖に関する調査

## (3) - 1 花粉の充実率及び発芽率の調査

目的：遺伝子組換えバラの花粉の充実率及び発芽率について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採取し、酢酸カーミン染色により花粉の充実率を、花粉発芽培地により花粉の発芽率を調査し、比較する。

### (3) - 2 花粉の大きさ及び形態の調査

目的：遺伝子組換えバラの花粉の大きさ及び形態について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採取し、光学顕微鏡にてその大きさ及び形態を観察し、比較する。

### (4) 交雑性に関する調査

#### (4) - 1 人工交配による園芸種との交雑性の調査

目的：遺伝子組換えバラと園芸種との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採集し、特定網室において人工交配により園芸種（クイーンエリザベス、ゴールドバニー）との交雑性を調査する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて導入遺伝子の存在の有無を確かめる。さらに、導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 2 人工交配による野生種との交雑性の調査①

目的：遺伝子組換えバラと野生種（ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス）との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラ（いずれも 4 倍体）から花粉を採集し、特定網室において人工交配により野生種との交雑性を調査する。野生種は、日本に自生し、かつ今日の園芸種の作出に利用されたとされるノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス（いずれも 2 倍体）を用いる。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅する、あるいはフローサイトメトリーを用いて倍数性を調査することにより、交雑の有無を確

認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 3 人工交配による野生種との交雑性の調査②

目的：遺伝子組換えバラと野生種（オオタカネバラ）との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラ（いずれも 4 倍体）から花粉を採集し、特定網室において人工交配により野生種（オオタカネバラ）との交雑性を調査する。日本に自生する野生種のほとんどは 2 倍体であるが、オオタカネバラは 4 倍体から 8 倍体まで存在するとされ、倍数性という観点からはオオタカネバラと宿主及び遺伝子組換えバラが交雑する可能性は他の野生種に比べて高いことが考えられる。よって、本試験は野生種にオオタカネバラを用いて実施する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅し、交雑の有無を確認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 4 自然条件下における野生種との交雑性の調査

目的：自然条件下における遺伝子組換えバラと野生種との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：隔離ほ場内の屋外 B

実施方法：屋外 B において、宿主及び遺伝子組換えバラから 1m、5m の距離に野生種（ノイバラ）を配置（図 2、6 参照）し、自然条件下での野生種との交雑性を調査する。ただし、本試験はこれらが同時期に開花している条件の下で実施する。日本に自生する野生種のうち、ノイバラは国内において最も広く分布し、かつ今日の園芸種の作出に利用された。よって、本試験は野生種にノイバラを用いて実施する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅する、あるいはフローサイトメトリーを用いて倍数性を調査することにより、交雑の有無を確認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

(5) 種子に関する調査

目的：(4) の交配試験により得られた種子について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：(4) の交配試験により得られた種子を採取し、種子の生産量、休眠性、発芽率について調査し、宿主と比較する。

(6) 越冬性、越夏性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの越冬性、越夏性を、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 10 月から平成 19 年 4 月まで（越冬性）、平成 18 年 6 月から平成 18 年 12 月まで（越夏性）

場所：人工気象器内あるいは隔離ほ場の屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラを人工気象器内あるいは隔離ほ場の屋外 A で栽培し、冬期間あるいは夏期間における植物体地上部の状態を観察し、宿主と比較する。

(7) 有害物質の産生性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの有害物質の産生性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 19 年 4 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 D 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラの残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響を調査する。宿主及び遺伝子組換えバラの植物栽培土壌が種子発芽へ与える影響及び微生物に与える影響を調査する。

(8) 訪花昆虫相の調査

目的：遺伝子組換えバラへの訪花昆虫相を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：晴天微風日を選び、午前 10 時から午後 3 時までの約 5 時間、宿主及び遺伝子組換えバラに訪花する昆虫の採集と行動観察を行い、訪花昆虫の同定を行う。ビニール温室 C での栽培区については、ビニール温室の出入り口を開放し、同様の方法で訪花昆虫相の調査を行う。

(9) 周辺生物相の調査

目的：隔離ほ場周辺の生物相を調査し、遺伝子組換えバラと交雑可能な植物種の存

在を把握する。

実施期間：平成 18 年 4 月から平成 18 年 7 月まで

場所：隔離ほ場周辺

実施方法：隔離ほ場の周囲に存在する植物を採取し、分類同定する。さらに、隔離ほ場から 1km の圏内におけるバラ科の植物の存在を把握する。

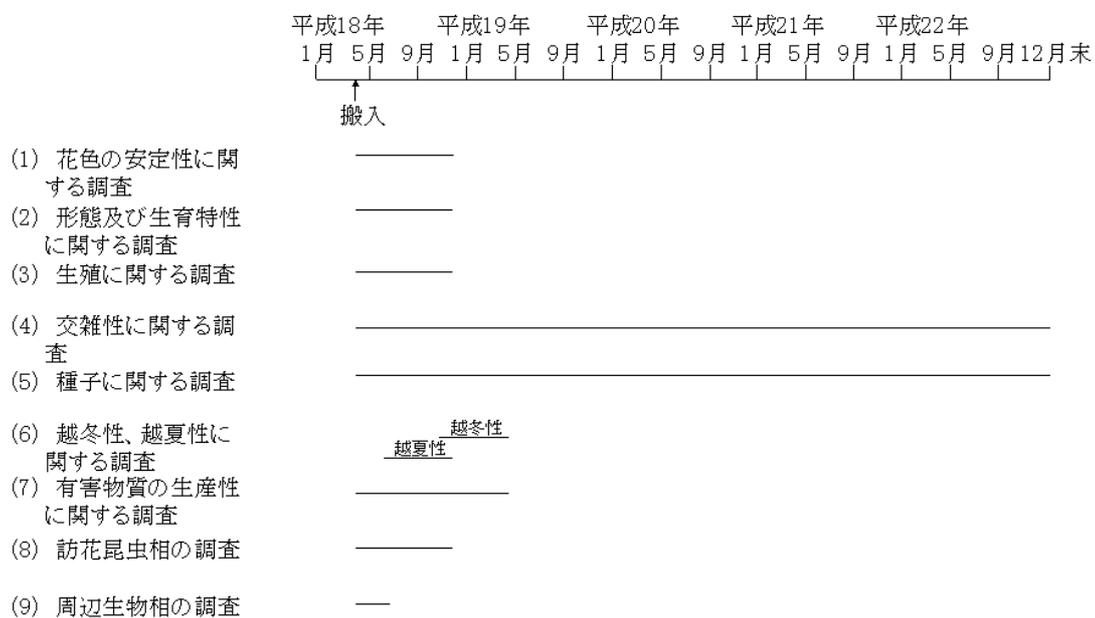


図 1. 調査項目および調査時期

(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。)

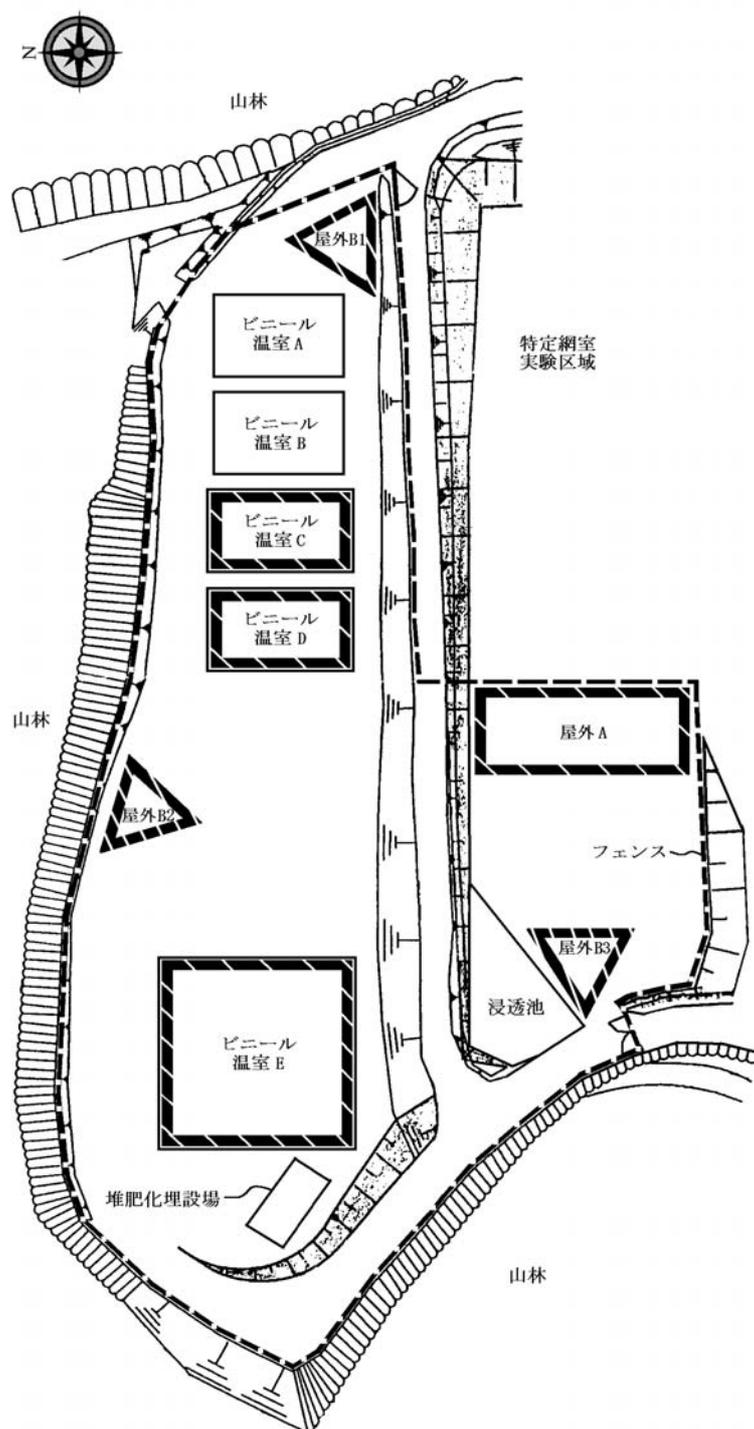


図 2. 日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場全体図

(  は本実験に使用する区画)

※ビニール温室A、Bに交雑試験に用いる園芸種を保管する。

※野外B1-B2、B2-B3、B1-B3間の距離はそれぞれ45m、35m、50mである。

(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。)

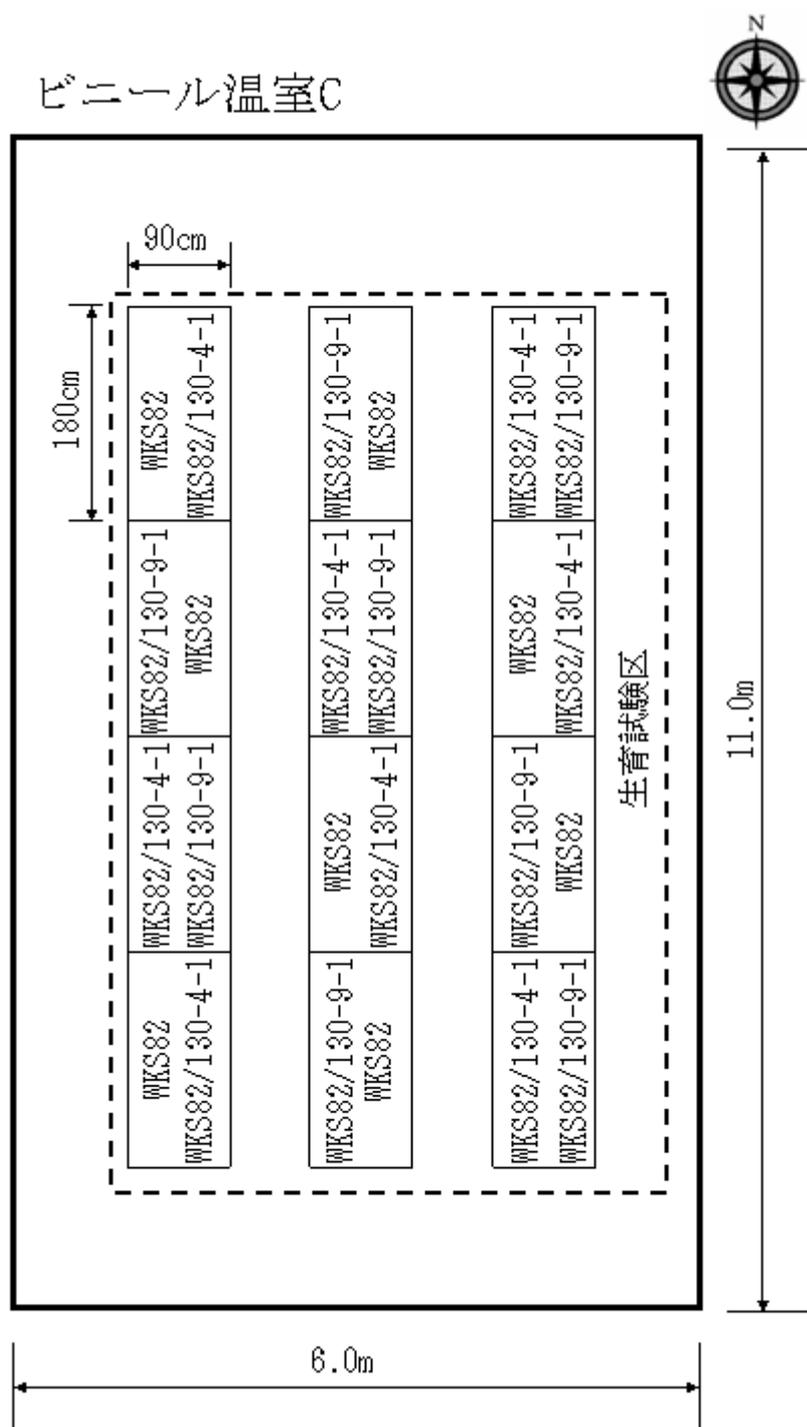


図3. 隔離ほ場試験（ビニール温室C）のバラ配置図

※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。）

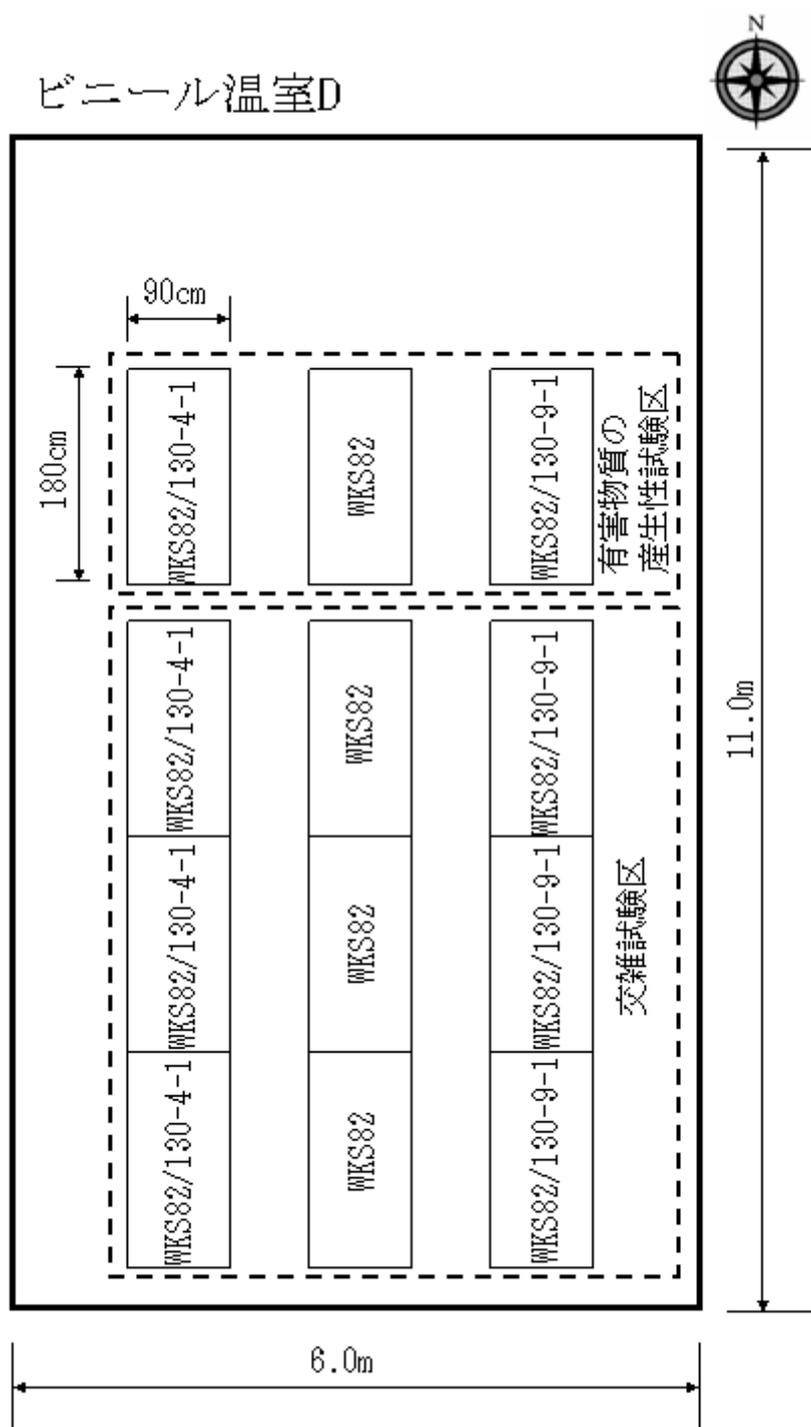


図4. 隔離ほ場試験（ビニール温室D）のバラ配置図

※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。）

屋外A

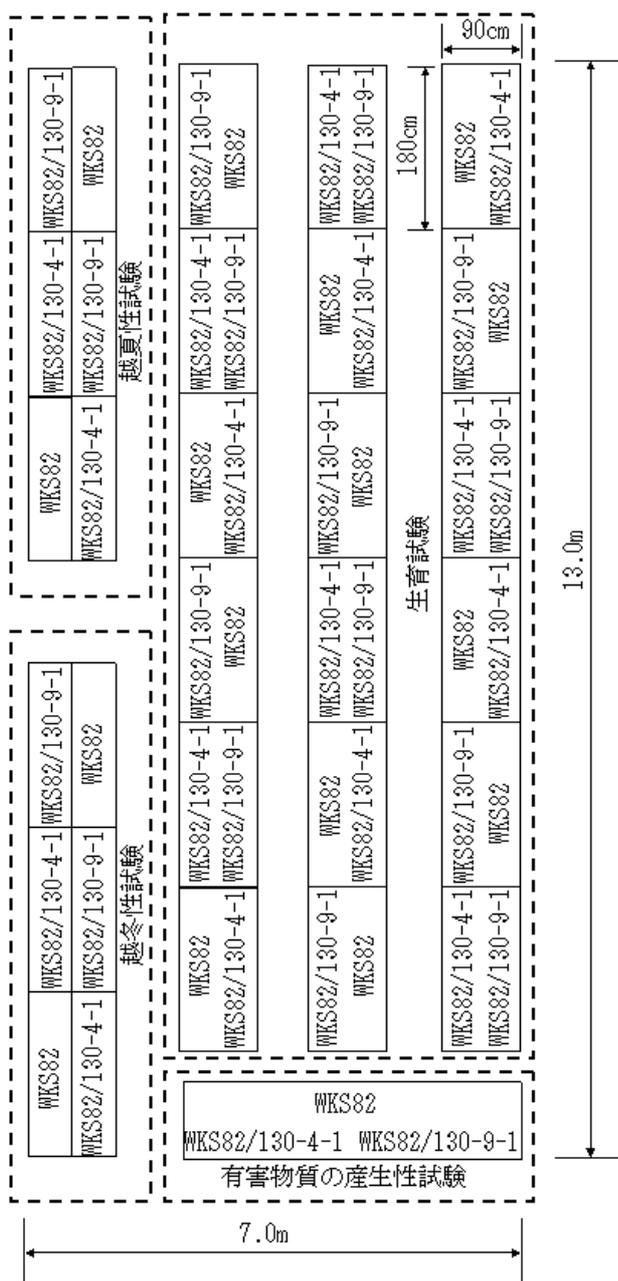


図5. 隔離ほ場試験（屋外A）のバラ配置図

※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。）

## 屋外B1、B2、B3

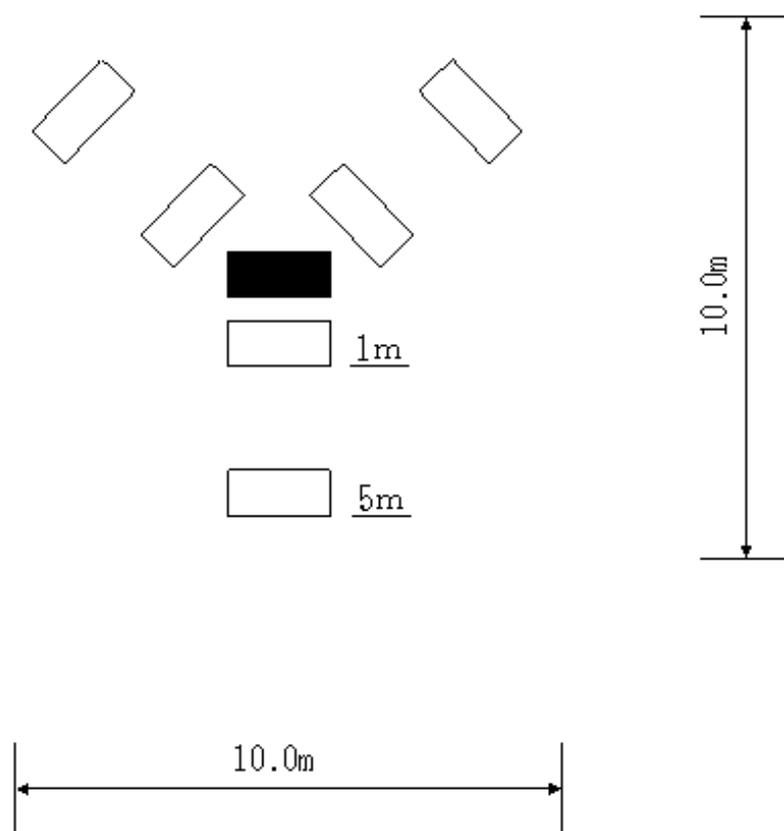
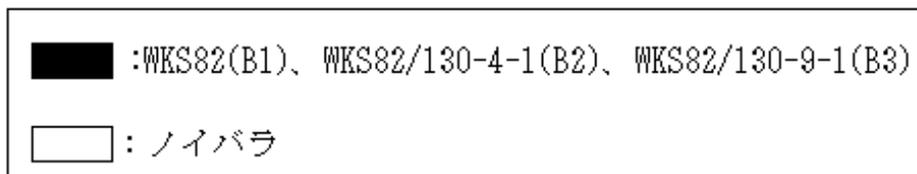


図6. 隔離ほ場試験（屋外B1、B2、B3）のバラ配置図  
 ※WKS82/130-9-1 は本申請には含まれない。  
 （注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

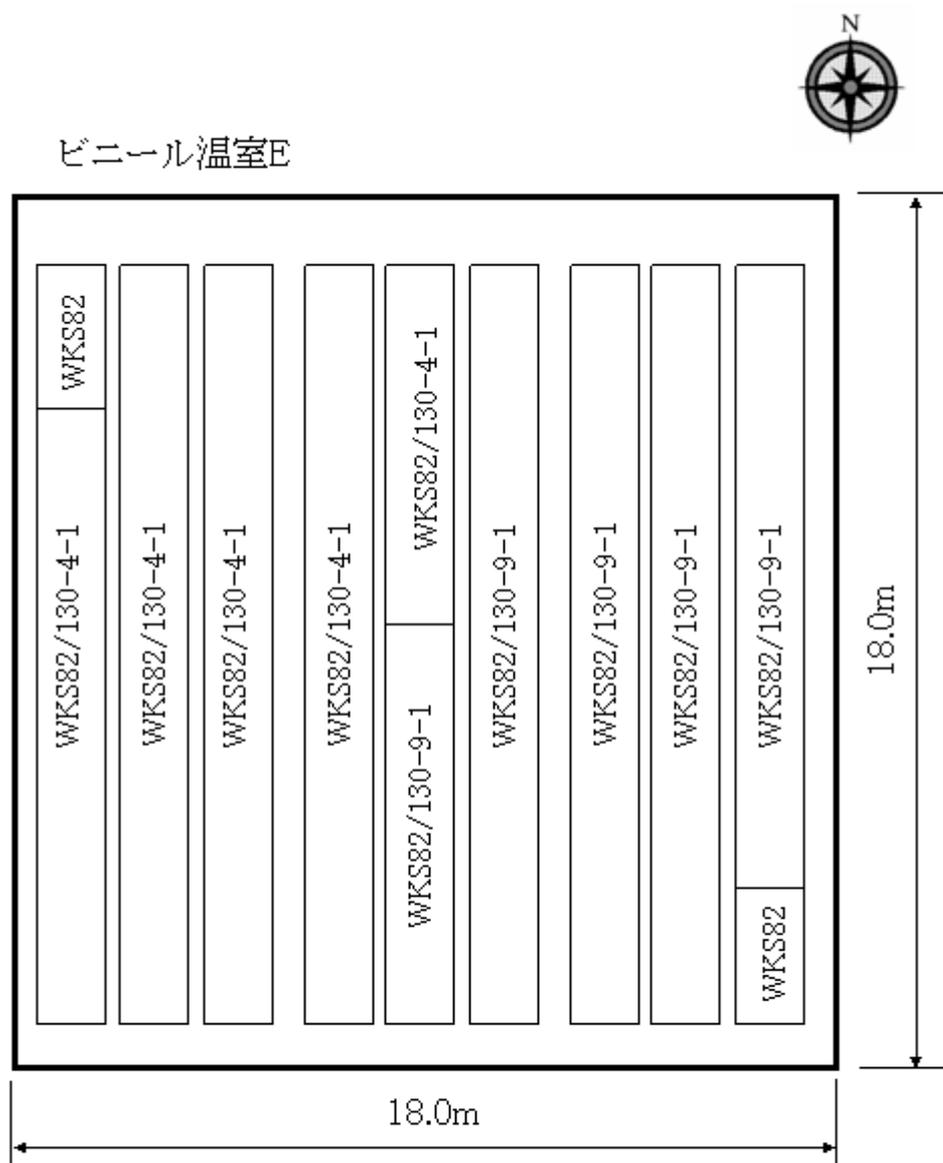


図7. 栽培条件検討試験(ビニール温室E)のバラ配置図

※遺伝子組換えバラの生産に向けて栽培方法を確立するため、当該温室にて栽培条件の検討を行う。

※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。)

「 国外における使用等により得られた情報 」

[ 目次 ]

- 1. オーストラリアにおける組換えバラ輸入許可書類 2
- 2. アメリカにおける WKS82/130-4-1 輸入許可書類 2

1. オーストラリアにおける組換えバラ輸入許可書類

(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。)

[ 19109 ON XH/XX ] 01:191 02A 90, 00/11

# AQIS

**AUSTRALIAN QUARANTINE AND INSPECTION SERVICE**  
DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY

*Quarantine Act 1908 Sect. 13*

Phone: 02 8072 5007  
Fax: 02 8072 3745  
File Ref:

## Permit to Import Quarantine Material

Permit: 200405067
Valid From: 14 Oct 2003
Valid To: 14 Oct 2005
Page 1 of 2

Importer	Exporter
Florigene Limited 16 Gipps Street Collingwood VIC 3066 Attn: <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>	Suntory Ltd 1-1-1 Wakayamadai Shimamoto-Cho Mishima-Gun Osaka 618 Japan

**You are authorised to import the following material under the listed conditions**  
*Note: This permit covers AQIS quarantine requirement only.*  
 All imports may be subject to quarantine inspection on arrival to determine compliance with the listed permit conditions and freedom from contamination. Imports not in compliance or not appropriately identified or packaged and labelled in accordance with the import conditions they represent may be subject to seizure, treatment, re-export or destruction at the importer's expense.  
 Additionally, all foods imported into Australia must comply with the provisions of the *Imported Food Control Act 1992*, and may be inspected and/or analysed against the requirements of the *Australia New Zealand Food Standards Code*.  
 All imports containing or derived from Genetically Modified material must comply with the *Gene Technology Act 2000*.

It is the importer's responsibility to identify, and to ensure it has complied with, all requirements of any other regulatory organisations and advisory bodies prior to and after importation including the Australian Customs Service, Therapeutic Goods Administration, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Department of the Environment and Heritage, Food Standards Australia New Zealand and any State agencies such as Departments of Agriculture and Health and Environmental Protection authorities.

Importers should note that this list is not exhaustive.

Import conditions are subject to change at the discretion of the Director of Quarantine. This permit may be revoked without notice.

Commodity Name	Condition Number(s)	Country	End Use
<b>Genetically modified tissue cultures (Petunia hybrida, Rosa x hybrida and Torenia fournieri tissue cultures)</b>	PC0600	Japan	In-vitro

**Condition:** PC0600

This Permit allows for the importation of *Petunia hybrida*, *Rosa x hybrida* and *Torenia fournieri* tissue cultures for in-vitro analysis to be used in accordance with the Office of the Gene Technology Regulator (OGTR) Notifiable Low Risk Dealing (NLRD) 09 - Anthocyanins.

1. The issuance of this permit does not imply compliance with the requirements of any other government organisation/s or regulatory bodies (eg OGTR, APVMA FSANZ, etc).
2. A Quarantine Entry must be lodged for all consignments.
3. The importer must confirm all arrangements with AQIS for the arrival inspections.

This permit is granted subject to the condition must be determined under Section 85E of the Quarantine Act 1908.