

別添資料一覧

1. 別添資料 1 : 宿主内に移入された核酸全体の構成
2. 別添資料 2 : ベクターに関する情報
3. 別添資料 3 : 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
4. 別添資料 4 : 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果
5. 別添資料 5 : 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
6. 別添資料 6 : 国外における使用等により得られた情報
7. 別添資料 7 : 隔離ほ場周辺の植生調査

「宿主内に移入された核酸全体の構成」

[目次]

1. pSPB130 の T-DNA の塩基配列

1

1. pSPB130 の T-DNA の塩基配列

GGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATATC 60
Right border

CGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAAC 120

ACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGG 180

AGTCACGTTATGACCCCCGCCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGAACTGACA 240

GAACCGCAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCA 300

CATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAGTCGCCTAAGGTCACTATCAGCTAGCA 360

AATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCCTCGGTATCCAATTA 420

GAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCACCGGATCTGGATCGTTTCGCATGA 480
NPT II MetI

TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT 540
leGluGlnAspGlyLeuHisAlaGlySerProAlaAlaTrpValGluArgLeuPheGlyT

ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGC 600
yrAspTrpAlaGlnGlnThrIleGlyCysSerAspAlaAlaValPheArgLeuSerAlaG

	<i>Pst</i> I	
<u>AGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGG</u>	▼	660
<i>lnGlyArgProValLeuPheValLysThrAspLeuSerGlyAlaLeuAsnGluLeuGlnA</i>		
<u>ACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG</u>		720
<i>spGluAlaAlaArgLeuSerTrpLeuAlaThrThrGlyValProCysAlaAlaValLeuA</i>		
<u>ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATC</u>		780
<i>spValValThrGluAlaGlyArgAspTrpLeuLeuLeuGlyGluValProGlyGlnAspL</i>		
<u>TCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC</u>		840
<i>euLeuSerSerHisLeuAlaProAlaGluLysValSerIleMetAlaAspAlaMetArgA</i>		
<u>GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCG</u>		900
<i>rgLeuHisThrLeuAspProAlaThrCysProPheAspHisGlnAlaLysHisArgIleG</i>		
<u>AGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC</u>		960
<i>luArgAlaArgThrArgMetGluAlaGlyLeuValAspGlnAspAspLeuAspGluGluH</i>		
<u>ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCG</u>		1020
<i>isGlnGlyLeuAlaProAlaGluLeuPheAlaArgLeuLysAlaArgMetProAspGlyA</i>		
	<i>Nco</i> I	
<u>ATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCC</u>	▼	1080
<i>spAspLeuValValThrHisGlyAspAlaCysLeuProAsnIleMetValGluAsnGlyA</i>		
<u>GCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG</u>		1140
<i>rgPheSerGlyPheIleAspCysGlyArgLeuGlyValAlaAspArgTyrGlnAspIleA</i>		
<u>CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCG</u>		1200
<i>laLeuAlaThrArgAspIleAlaGluGluLeuGlyGlyGluTrpAlaAspArgPheLeuV</i>		

<u>TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG</u>	1260
<i>alLeuTyrGlyIleAlaAlaProAspSerGlnArgIleAlaPheTyrArgLeuLeuAspG</i>	
<u>AGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCC</u>	1320
<i>luPhePhe</i>	
<u>ATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTT</u>	1380
<u>CCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCA</u>	1440
<u>CGGGATCTCTGCGGAACAGGCGGTTCGAAGGTGCCGATATCATTACGACAGCAACGGCCGA</u>	1500
CAAGCACAACGCCACGATCCTGAGCGACAATATGATCGGGCCCCGGCGTCCACATCAACGG	1560
CGTCGGCGGGCGACTGCCCAGGCAAGACCGAGATGCACCGCGATATCTTGCTGCGTTCGGA	1620
TATTTTCGTGGAGTTCCCGCCACAGACCCGGATGATCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCA	1680
ATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCT	1740
GTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATG	1800
GGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATA	1860

GCGCGAAACTAGGATAAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGCCTC	1920
CTGTCAATGCTGGCGGGCGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCT	1980
CTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTG	2040
GTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAA	2100
ATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTG	2160
<i>Cla</i> I ATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATG	2220
GTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATA	2280
ATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAAT	2340
GTCGCCCTTTTGTCTTTGGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTC	2400
ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA	2460
TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC	2520

<u>GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG</u>	2580
<u>ATTACGCCAAGCTTGCCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCA</u>	2640
<i>EL2 35S promoter</i>	
<u>AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGG</u>	2700
<u>GAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAAGGACAGTAGAAA</u>	2760
<u>AGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATG</u>	2820
<u>CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAG</u>	2880
<u>AAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAACATGGTGGAGCACGAC</u>	2940
<u>ACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAG</u>	3000
<u>ACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGT</u>	3060
<u>CACTTCATCAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGAT</u>	3120
<u>AAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCA</u>	3180

CCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGAT 3240

TGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGAC 3300

CCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTCGGAGAGGTACGATCCCCAGCTTGCATGC 3360

*Pst*I

CTGCAGGAATTCGGCACGAGGACAACATGGCAATTCTAGTCACCGACTTCGTTGTCGCGG 3420

*BP*40

MetAlaIleLeuValThrAspPheValValAlaA

CTATAATTTTCTTGATCACTCGGTTCTTAGTTCGTTCTCTTTTCAAGAAACCAACCCGAC 3480

laIleIlePheLeuIleThrArgPheLeuValArgSerLeuPheLysLysProThrArgP

CGCTCCCCCGGGTCCTCTCGGTTGGCCCTTGGTGGGCGCCCTCCCTCTCCTAGGCGCCA 3540

roLeuProProGlyProLeuGlyTrpProLeuValGlyAlaLeuProLeuLeuGlyAlaM

TGCCTCACGTGCGACTAGCCAAACTCGCTAAGAAGTATGGTCCGATCATGCACCTAAAAA 3600

etProHisValAlaLeuAlaLysLeuAlaLysLysTyrGlyProIleMetHisLeuLysM

TGGGCACGTGCGACATGGTGGTCGCGTCCACCCCGAGTCGGCTCGAGCCTTCCTCAAAA 3660

etGlyThrCysAspMetValValAlaSerThrProGluSerAlaArgAlaPheLeuLysT

CGCTAGACCTCAACTTCTCCAACCGCCCACCCAACGCGGGCGCATCCCACCTAGCGTACG 3720

hrLeuAspLeuAsnPheSerAsnArgProProAsnAlaGlyAlaSerHisLeuAlaTyrG

GCGCGCAGGACTTAGTCTTCGCCAAGTACGGTCCGAGGTGGAAGACTTTAAGAAAATTGA 3780

lyAlaGlnAspLeuValPheAlaLysTyrGlyProArgTrpLysThrLeuArgLysLeuS

GCAACCTCCACATGCTAGGCGGGAAGGCGTTGGATGATTGGGCAAATGTGAGGGTCACCG 3840

erAsnLeuHisMetLeuGlyGlyLysAlaLeuAspAspTrpAlaAsnValArgValThrG

<u>AGCTAGGCCACATGCTTAAAGCCATGTGCGAGGCGAGCCGGTGCGGGGAGCCCGTGGTG</u>	3900
<i>luLeuGlyHisMetLeuLysAlaMetCysGluAlaSerArgCysGlyGluProValValL</i>	
NcoI ▼	
<u>TGGCCGAGATGCTCACGTACGCCATGGCGAACATGATCGGTCAAGTGATACTCAGCCGGC</u>	3960
<i>euAlaGluMetLeuThrTyrAlaMetAlaAsnMetIleGlyGlnValIleLeuSerArgA</i>	
<u>CGTGTTTCGTGACCAAAGGGACCGAGTCTAACGAGTTCAAAGACATGGTGGTCGAGTTGA</u>	4020
<i>rgValPheValThrLysGlyThrGluSerAsnGluPheLysAspMetValValGluLeuM</i>	
<u>TGACGTCCGCCGGTACTTCAACATCGGTGACTTCATACCCTCGATCGCTTGGATGGATT</u>	4080
<i>etThrSerAlaGlyTyrPheAsnIleGlyAspPheIleProSerIleAlaTrpMetAspL</i>	
<u>TGCAAGGGATCGAGCGAGGGATGAAGAAGCTGCACACGAAGTTTGATGTGTTATTGACGA</u>	4140
<i>euGlnGlyIleGluArgGlyMetLysLysLeuHisThrLysPheAspValLeuLeuThrL</i>	
<u>AGATGGTGAAGGAGCATAGAGCGACGAGTCATGAGCGCAAAGGGAAGGCAGATTTCTCTCG</u>	4200
<i>ysMetValLysGluHisArgAlaThrSerHisGluArgLysGlyLysAlaAspPheLeuA</i>	
<u>ACGTTCTCTTGAAGAATGCGACAATACAAATGGGGAGAAGCTTAGTATTACCAATATCA</u>	4260
<i>spValLeuLeuGluGluCysAspAsnThrAsnGlyGluLysLeuSerIleThrAsnIleL</i>	
<u>AAGCTGTCCTTTTGAATCTATTCACGGCGGGCACGGACACATCTTCGAGCATAATCGAAT</u>	4320
<i>ysAlaValLeuLeuAsnLeuPheThrAlaGlyThrAspThrSerSerSerIleIleGluT</i>	
<u>GGGCGTTAACGGAGATGATCAAGAATCCGACGATCTTAAAAAAGGCGCAAGAGGAGATGG</u>	4380
<i>rpAlaLeuThrGluMetIleLysAsnProThrIleLeuLysLysAlaGlnGluGluMetA</i>	
<u>ATCGAGTCATCGGTCTGATCGGAGGCTGCTCGAATCGGACATATCGAGCCTCCCGTACC</u>	4440
<i>spArgValIleGlyArgAspArgArgLeuLeuGluSerAspIleSerSerLeuProTyrL</i>	
<u>TACAAGCCATTGCTAAAGAAACGTATCGCAAACACCCGTCGACGCCTCTCAACTTGCCGA</u>	4500
<i>euGlnAlaIleAlaLysGluThrTyrArgLysHisProSerThrProLeuAsnLeuProA</i>	

GGATTGCGATCCAAGCATGTGAAGTTGATGGCTACTACATCCCTAAGGACGCGAGGCTTA 4560
rgIleAlaIleGlnAlaCysGluValAspGlyTyrTyrIleProLysAspAlaArgLeuS

CGTGAAACATTTGGGCGATCGGTCGGGACCCGAATGTTTGGGAGAATCCGTTGGAGTTCT 4620
erValAsnIleTrpAlaIleGlyArgAspProAsnValTrpGluAsnProLeuGluPheL

TGCCGAAAGATTCTTGTCTGAAGAGAATGGGAAGATCAATCCCGGTGGGAATGATTTTG 4680
euProGluArgPheLeuSerGluGluAsnGlyLysIleAsnProGlyGlyAsnAspPheG

AGCTGATTCCGTTTGGAGCCGGGAGGAGAATTTGTGCGGGGACAAGGATGGGAATGGTCC 4740
luLeuIleProPheGlyAlaGlyArgArgIleCysAlaGlyThrArgMetGlyMetValL

TTGTAAGTTATATTTTGGGCACTTTGGTCCATTCTTTTGATTGGAAATTACCAAATGGTG 4800
euValSerTyrIleLeuGlyThrLeuValHisSerPheAspTrpLysLeuProAsnGlyV

TCGCTGAGCTTAATATGGATGAAAGTTTTGGGCTTGCAATTGCAAAAGGCCGTGCCGCTCT 4860
alAlaGluLeuAsnMetAspGluSerPheGlyLeuAlaLeuGlnLysAlaValProLeuS

CGGCCTTGGTCAGCCCACGGTTGGCCTCAAACCGGTACGCAACCTGAGCTAATGGGCTGG 4920
erAlaLeuValSerProArgLeuAlaSerAsnAlaTyrAlaThr

GCCTAGTTTTGTGGGCCTTAATTTAGAGACTTTTGTGTTTTAAGGTGTGTACTTTATTA 4980

TTGGGTGCTTAAATGTGTGTTTTAATTTGTATTTATGGTTAATTATGACTTTATTGTATA 5040

ATTATTTATTTTTCCCTTCTGGGTATTTTATCCATTTAATTTTTCTTCAGAATTATGATC 5100

ATAGTTATCAGAATAAAATTGAAAATAATGAATCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 5160

<u>ACTCGACCCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAA</u>	5220
<i>NOS terminator</i>	
<u>TCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGT</u>	5280
<u>AATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCC</u>	5340
<u>GCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATT</u>	5400
<u>ATCGCGCGGGTGTTCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGCCAAC</u>	5460
<u>ATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGAC</u>	5520
<i>EL2 35S promoter</i>	
<u>CAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCAT</u>	5580
<u>TGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAA</u>	5640
<u>TGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC</u>	5700
<u>AAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCT</u>	5760
<u>TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAA</u>	5820

<u>TATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAT</u>	5880
<u>ATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAAGGACAGT</u>	5940
<u>AGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCA</u>	6000
<u>AGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGGA</u>	6060
<u>AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGA</u>	6120
<u>CGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAG</u>	6180
<i>Pst</i> I	
<u>TTCATTTTCATTTCGGAGAGGTACGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGCTTCAAAGCCAAAAA</u>	6240
TAT	
<u>GAAACAATTAATCAATGGCTGTTGAAGCCCCCAAAACAATATGTGCAGTCTCTCGAAACT</u>	6300
<i>MetAlaValGluAlaProLysThrIleCysAlaValLeuGluAsnS</i>	
<u>CTCTTATTACACCACAAAGTACCGATACAGAACAACCTCTTTCACTCACATTTCTTGACA</u>	6360
<i>erLeuIleThrProGlnSerThrAspThrGluGlnThrLeuSerLeuThrPhePheAspI</i>	
<u>TCAAATGGGTTTCATTTTCATCCAATGCAATGCCTTGTGTTGTACAACCTCCCATGTTCTA</u>	6420
<i>leLysTrpValHisPheHisProMetGlnCysLeuValLeuTyrAsnPheProCysSerL</i>	
<u>AGTCACATTTTCTCGAAGCCACAGTTCGGAGCTTCAAATCATCACTCTCCAAAACCTCTCA</u>	6480
<i>ysSerHisPheLeuGluAlaThrValProSerPheLysSerSerLeuSerLysThrLeuA</i>	

GACACTATCTTCCATTATCAGGAACTTATACTATCCAAACCCGACCCATGACATGGATG 6540
rgHisTyrLeuProLeuSerGlyAsnLeuTyrTyrProAsnProThrHisAspMetAspA

ATGATGAATCGAACATGCCCGAGATCCGTTATAAACCTGGCGACTCGGTTTCTCTAACCG 6600
spAspGluSerAsnMetProGluIleArgTyrLysProGlyAspSerValSerLeuThrV

TTGCAGAGTACTTCTCCGGTCATGAAGACAATACGACTACTGAAGAATACTTCAATTACC 6660
alAlaGluTyrPheSerGlyHisGluAspAsnThrThrThrGluGluTyrPheAsnTyrL

TCACTGGAAATTTCCAGAGAGATTGCGATCAATTCTATGATCTCTTACCCGATTTTCGAG 6720
euThrGlyAsnPheGlnArgAspCysAspGlnPheTyrAspLeuLeuProAspPheArgA

ACCCGAAACCGAATCCAATTGCACAGTAATCCCACTTATAGCAGTTCAAATCACACTCT 6780
spProGluThrGluSerAsnCysThrValIleProLeuIleAlaValGlnIleThrLeuP

TTCCAGGTGCTGGGATATGTCTGGGGTCATCAACAGTCACGTAGTTGGCGATGCGAGTT 6840
heProGlyAlaGlyIleCysLeuGlyValIleAsnSerHisValValGlyAspAlaSerS

CCATAGTGGGATTCATCAAAGCTTGGAGTAAAGTTGCAATGTATGAAGACGATGAAGAGA 6900
erIleValGlyPheIleLysAlaTrpSerLysValAlaMetTyrGluAspAspGluGluI

TTCTAGCTAACAACAATTTGATTCCATCTTATGACAGATCAGTCGTGAAAGATCCAAAAG 6960
leLeuAlaAsnAsnAsnLeuIleProSerTyrAspArgSerValValLysAspProLysG

GGATCAAATCTTTGCTCTGGAACAAGATGAAGAACGTGAAATATCAACCCCAACCCGCAA 7020
lyIleLysSerLeuLeuTrpAsnLysMetLysAsnValLysTyrGlnProGlnProAlaL

AACATCTCCAACAACAAGGTCCGAGCCACATACACCTTGAGAAAGAACGATATCGAGA 7080
ysHisLeuProThrAsnLysValArgAlaThrTyrThrLeuArgLysAsnAspIleGluA

GGCTGAAAACCCGAATCCGATCCAAGAAACCAGGCACAACCTGCTTATCATCTTTCACAA 7140
rgLeuLysThrArgIleArgSerLysLysProGlyThrThrCysLeuSerSerPheThrI

Pst I ▼	
<u>TCGCAACAGCCTATGCTTGGACATGCCTTGCAAAATCTGCAGCAGAAGCTGAAGAACAAG</u>	7200
<i>leAlaThrAlaTyrAlaTrpThrCysLeuAlaLysSerAlaAlaGluAlaGluGluGlnV</i>	
<u>TAGTCCAAGACAGTGACGACGAGCACTTGCTCATGCCCGTTGATTTGAGACCAAGAATAG</u>	7260
<i>alValGlnAspSerAspAspGluHisLeuLeuMetProValAspLeuArgProArgIleA</i>	
<u>ATCCTCCATTACCACCTTCTTACTTTGGAAACTGCGTTCTTCCATCTTTTGCGAAAACGA</u>	7320
<i>spProProLeuProProSerTyrPheGlyAsnCysValLeuProSerPheAlaLysThrT</i>	
<u>CGCATGGGCTTTTGAAGGAGAGTTAGGGCTTTTAAATGCAGTGGAAGTGATTAGTGATG</u>	7380
<i>hrHisGlyLeuLeuLysGlyGluLeuGlyLeuPheAsnAlaValGluValIleSerAspV</i>	
<u>TCATTACCGGTATCGTTAGCAAGAAATATGACTTGTTCAAAGACTTAGACAGACAAGGTG</u>	7440
<i>alIleThrGlyIleValSerLysLysTyrAspLeuPheLysAspLeuAspArgGlnGlyG</i>	
<u>AGATTTTTTCGTGCCTTGTTTCGGAAAACGAGTGTTGGCGATCATGGGTTTCGCTAAGTTCG</u>	7500
<i>luIlePheArgAlaLeuPheGlyLysArgValLeuAlaIleMetGlySerProLysPheA</i>	
<u>ATCTCTACGAAGTTGATTTTCGGGTGGGGTAAGCCGAAGAAGATTGAACCTGTGTCCATTG</u>	7560
<i>spLeuTyrGluValAspPheGlyTrpGlyLysProLysLysIleGluProValSerIleA</i>	
<u>ATAGAGAGAGGACGACTATGTGGATTAGCAAGTCTGGCGAGTTTGAGGGTGGTTTGGAGA</u>	7620
<i>spArgGluArgThrThrMetTrpIleSerLysSerGlyGluPheGluGlyGlyLeuGluI</i>	
<u>TTGGTTTTTCTTTCAATAAGAAGAAAATGGATGCTTTTGGCGAGTGTTTTAACAGCGGTT</u>	7680
<i>leGlyPheSerPheAsnLysLysLysMetAspAlaPheGlyGluCysPheAsnSerGlyL</i>	
<u>TGAAGGATATTTAATTTAAAAAATTGTTTAGCTTTGATGCATGCGTTTTATATATGTTGT</u>	7740
<i>euLysAspIle</i>	
<u>GAAATAATGTGGTGTGCAATAACTAGAGTAACTTTAGGTTAATAAATTCGGTTTTTCTGT</u>	7800

<u>TAAATCTGGATGATTTCGTGCAAGCAAACCTGTCGATGCGTTGGATGGATGTCGGGTGGTGT</u>	7860
<u>GGAGATTGTTGAAGAAGGAAATGGATGCTTTTTTTATGGTGGTTTGAAGGATTTGAATGT</u>	7920
<u>GTAGATTATTGGTTTATTGAGGTTGTTTATTTTGTGTATGTTGTTTATGCATGAAAAATA</u>	7980
<u>TTTAGATCCAACATTTTATGTATGACGTGGTTTAATATTTTCGATTTTCGATCAAAAAAAAA</u>	8040
<u>AAAAAAAAAAAAAACTCGAGGCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTT</u>	8100
<i>NOS terminator</i>	
<u>TCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATT</u>	8160
<u>ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTA</u>	8220
<u>TGATTAGAGTCCCACAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAA</u>	8280
<u>ACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTCACTGGCC</u>	8340
GTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCA	8400
GCACATCCCCCTTTCCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC	8460

CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGC 8520

CACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATT 8580

TAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGG 8640

GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAG 8700

TGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTT 8760

ATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAA 8820

ACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTG 8880

TTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCCAGTACATTAAAAACGTCCGCAATGT 8940

Left border

GTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAG 9000

CCAACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCACTCGATACAGGCAGCCCATC 9060

AG 9062

図 1. pSPB130 の T-DNA の塩基配列（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。）

「ベクターに関する情報」

[目次]

1. pBIN19 の塩基配列	1
1. pBIN19 の塩基配列	
TGAGCGTCGCAAAGGCGCTCGGTCTTGCCTTGCTCGTCGGTGATGTACTTCACCAGCTCC	60
GCGAAGTCGCTCTTCTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGCAATCACGCGCACCCCC	120
CGGCCGTTTTAGCGGCTAAAAAAGTCATGGCTCTGCCCTCGGGCGGACCACGCCCATCAT	180
GACCTTGCCAAGCTCGTCCTGCTTCTCTTCGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGC	240
ATCACCGAACC GCGCCGTGCGCGGGTCGTCGGTGAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCGCCCAG	300
GCGGCCAGGTCGCCATTGATGCGGGCCAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCC	360
CGTGATTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAGCAGGTAGGCCGACAGGCTCATGCCGGCCGC	420
CGCCGCCTTTTCCTCAATCGCTCTTCGTTGCTCTGGAAGGCAGTACACCTTGATAGGTGG	480

GCTGCCCTTCCTGGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCCGCTTGCCCTCATCTGTTACGCC	540
GGCGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATA	600
AGGGACAGTGAAGAAGGAACACCCGCTCGCGGGTGGCCTACTTCACCTATCCTGCCCGG	660
CTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTTGGCAAAATCCTGTATA	720
TCGTGCGAAAAAGGATGGATATACCGAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGGTTA	780
TGCAGCGAAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG	840
GCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTT	900
ATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG	960
GGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTT	1020
GCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA	1080
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT	1140

CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAGAAGGCCGCCAGAGAGGCCGAGCGCGGCCGTG	1200
AGGCTTGGACGCTAGGGCAGGGCATGAAAAAGCCCGTAGCGGGCTGCTACGGGCGTCTGA	1260
CGCGGTGGAAAGGGGGAGGGGATGTTGTCTACATGGCTCTGCTGTAGTGAGTGGGTTGCG	1320
CTCCGGCAGCGGTCTGATCAATCGTCACCCTTTCTCGGTCCTTCAACGTTCTTGACAAC	1380
GAGCTCCTTTTTCGCCAATCCATCGACAATCACCGCGAGTCCCTGCTCGAACGCTGCGTC	1440
CGGACCGGCTTCGTGGAAGCGTCTATCGCGGCCCGCAACAGCGGCGAGAGCGGAGCCTG	1500
TTCAACGGTGCCGCCGCGCTCGCCGGCATCGCTGTCGCCGGCCTGCTCCTCAAGCACGGC	1560
CCCAACAGTGAAGTAGCTGATTGTCATCAGCGCATTGACGGCGTCCCCGGCCGAAAAACC	1620
CGCCTCGCAGAGGAAGCGAAGCTGCGCGTCCGGCCGTTTCCATCTGCGGTGCGCCCGTCTG	1680
CGTGCCGGCATGGATGCGCGGCCATCGCGGTAGGCGAGCAGCGCCTGCCTGAAGCTGCG	1740
GGCATTCCCAGATCAGAAATGAGCGCCAGTCGTGTCGGCTCTCGGCACCGAATGCGTATG	1800

ATTCTCCGCCAGCATGGCTTCGGCCAGTGCGTCGAGCAGCGCCCGCTTGTTCCCTGAAGTG	1860
CCAGTAAAGCGCCGGCTGCTGAACCCCAACCGTTCCGCCAGTTTGCGTGTGTCAGACC	1920
GTCTACGCCGACCTCGTTCAACAGGTCCAGGGCGGCACGGATCACTGTATTCCGGCTGCAA	1980
CTTTGTCATGCTTGACACTTTATCACTGATAAACATAATATGTCCACCAACTTATCAGTG	2040
ATAAAGAATCCGCGCGTTCAATCGGACCAGCGGAGGCTGGTCCGGAGGCCAGACGTGAAA	2100
CCCAACATACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTCGACGCTGTCCGCATCGGC	2160
CTGATTATGCCGGTGCTGCCGGGCCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACC	2220
GCCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGGTGCAATTTGCCTGCGCACCTGTG	2280
CTGGGCGCGCTGTCCGATCGTTTCGGGCGGCGGCCAATCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGC	2340
GCCAGATCTGGGGAAC <u>CCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCT</u>	2400
<i>Right border</i>	
<u>TTTCACGCCCTTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACC</u>	2460

<u>CGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGA</u>	2520
<u>TCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATGACCCCCGCGATGACGCGGGACAAGCC</u>	2580
<i>NOS promoter</i>	
<u>GTTTTACGTTTGGAACTGACAGAACCGCAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTC</u>	2640
<u>TGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAGTCGCC</u>	2700
<u>TAAGGTCACTATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAA</u>	2760
<u>ATCCCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCACCG</u>	2820
<u>GATCTGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTT</u>	2880
<i>NPT II MetIleGluGlnAspGlyLeuHisAlaGlySerProAlaAlaT</i>	
<u>GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCG</u>	2940
<i>rpValGluArgLeuPheGlyTyrAspTrpAlaGlnGlnThrIleGlyCysSerAspAlaA</i>	
<u>CCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG</u>	3000
<i>laValPheArgLeuSerAlaGlnGlyArgProValLeuPheValLysThrAspLeuSerG</i>	
<i>PstI</i>	
<u>GTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCG</u>	3060
<i>lyAlaLeuAsnGluLeuGlnAspGluAlaAlaArgLeuSerTrpLeuAlaThrThrGlyV</i>	
<u>TTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGG</u>	3120

alProCysAlaAlaValLeuAspValValThrGluAlaGlyArgAspTrpLeuLeuLeuG
GCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCA 3180
lyGluValProGlyGlnAspLeuLeuSerSerHisLeuAlaProAlaGluLysValSerI
TCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACC 3240
leMetAlaAspAlaMetArgArgLeuHisThrLeuAspProAlaThrCysProPheAspH
ACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATC 3300
isGlnAlaLysHisArgIleGluArgAlaArgThrArgMetGluAlaGlyLeuValAspG
AGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCA 3360
lnAspAspLeuAspGluGluHisGlnGlyLeuAlaProAlaGluLeuPheAlaArgLeuL

NcoI
▼

AGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGA 3420
ysAlaArgMetProAspGlyAspAspLeuValValThrHisGlyAspAlaCysLeuProA
ATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGG 3480
snIleMetValGluAsnGlyArgPheSerGlyPheIleAspCysGlyArgLeuGlyValA
CGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCGGGCG 3540
laAspArgTyrGlnAspIleAlaLeuAlaThrArgAspIleAlaGluGluLeuGlyGlyG
AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCG 3600
luTrpAlaAspArgPheLeuValLeuTyrGlyIleAlaAlaProAspSerGlnArgIleA
CCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGA 3660
laPheTyrArgLeuLeuAspGluPhePhe
CCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAG 3720
GTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCT 3780

<u>CATGCTGGAGTTCTTCGCCACGGGATCTCTGCGGAACAGGCGGTCTGAAGGTGCCGATAT</u>	3840
CATTACGACAGCAACGGCCGACAAGCACAAACGCCACGATCCTGAGCGACAATATGATCGG	3900
GCCCGGCGTCCACATCAACGGCGTCGGCGGGCGACTGCCAGGCAAGACCGAGATGCACCG	3960
CGATATCTTGCTGCGTTCGGATATTTTCGTGGAGTTCCTGCCACAGACCCGGATGATCCC	4020
<u>CGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGC</u> <i>NOS terminator</i>	4080
<u>GATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATG</u>	4140
<u>CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATA</u>	4200
<u>CGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATC</u>	4260
<u>TATGTTACTAGATCGGGCCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTG</u>	4320
GCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAG	4380
GCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTA	4440

ATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCA 4500

*Cla*I

AACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTT 4560

CCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGG 4620

CTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTT 4680

CCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCCCAATACGCAAACCGCCTC 4740

TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGAAAAG 4800

CGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT 4860

TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACA 4920

lacZ

*Pst*I

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAG 4980

GATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAA 5040

AACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGT 5100

<u>AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCC</u>	5160
CGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGC	5220
TCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAA	5280
AAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCG	5340
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAAC	5400
ACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGGAACC	5460
ACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTC	5520
TCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAA	5580
<u>ACCACCCAGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT</u>	5640
<i>Left border</i>	
<u>GTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCGG</u>	5700
<u>CACAAAATCACC ACTCGATACAGGCAGCCCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGGAGAGC</u>	5760

CGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATGTTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAA	5820
GCTGCCGGGTTTGAAACACGGATGATCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGA	5880
CAGAGCGTTGCTGCCTGTGATCAAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCGAATTATCAGCC	5940
TTCTTATTCATTTCTCGCTTAACCGTGACAGGCTGTGATCTTGAGAACTATGCCGACAT	6000
AATAGGAAATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAAGCTGAGTGGCGCTATTTCTTTAGAAGT	6060
GAACGTTGACGATATCAACTCCCCTATCCATTGCTCACCGAATGGTACAGGTCGGGGACC	6120
CGAAGTTCGACTGTGCGCCTGATGCATCCCCGGCTGATCGACCCAGATCTGGGGCTGA	6180
GAAAGCCCAGTAAGGAAACAACCTGTAGGTTGAGTCGCGAGATCCCCCGGAACCAAAGGA	6240
AGTAGGTTAAACCCGCTCCGATCAGGCCGAGCCACGCCAGGCCGAGAACATTGGTTCCTG	6300
TAGGCATCGGGATTGGCGGATCAAACACTAAAGCTACTGGAACGAGCAGAAGTCCTCCGG	6360
CCGCCAGTTGCCAGGCGGTAAAGGTGAGCAGAGGCACGGGAGGTTGCCACTTGCGGGTCA	6420

*Pst*I

GCACGGTTCCGAACGCCATGGAAACCGCCCCCGCCAGGCCCGCTGCGACCCGACAGGAT 6480

CTAGCGCTGCGTTTGGTGTCAACACCAACAGCGCCACGCCCGCAGTTCCGCAAATAGCCC 6540

CCAGGACCGCCATCAATCGTATCGGGCTACCTAGCAGAGCGGCAGAGATGAACACGACCA 6600

TCAGCGGCTGCACAGCGCCTACCGTCGCCGCGACCCCGCCCGGCAGGCGGTAGACCGAAA 6660

TAAACAACAAGCTCCAGAATAGCGAAATATTAAGTGCGCCGAGGATGAAGATGCGCATCC 6720

ACCAGATTCCC GTTGAATCTGTTCGGACGATCATCACGAGCAATAAACCCGCCGGCAACG 6780

CCCGCAGCAGCATAACCGGCGACCCCTCGGCCTCGCTGTTTCGGGCTCCACGAAAACGCCGG 6840

ACAGATGCGCCTTGTGAGCGTCCTTGGGGCCGTCTCCTGTTTGAAGACCGACAGCCCAA 6900

TGATCTCGCCGTCGATGTAGGCGCCGAATGCCACGGCATCTCGCAACCGTTCAGCGAACG 6960

*Nco*I

CCTCCATGGGCTTTTTCTCCTCGTGCTCGTAAACGGACCCGAACATCTCTGGAGCTTTCT 7020

TCAGGGCCGACAATCGGATCTCGCGGAAATCCTGCACGTGCGCCGCTCCAAGCCGTCGAA 7080

TCTGAGCCTTAATCACAATTGTCAATTTTAATCCTCTGTTTATCGGCAGTTCGTAGAGCG	7140
CGCCGTGCGTCCCGAGCGATACTGAGCGAAGCAAGTGCCTCGAGCAGTGCCCGCTTGTTTC	7200
CTGAAATGCCAGTAAAGCGCTGGCTGCTGAACCCCCAGCCGGAAGTACCCCAAGGCC	7260
CTAGCGTTTGCAATGCACCAGGTCATCATTGACCCAGGCGTGTTCACCAGGCCGCTGCC	7320
TCGCAACTCTTCGCAGGCTTCGCCGACCTGCTCGCGCCACTTCTTCACGCGGGTGAATC	7380
CGATCCGCACATGAGGCGGAAGGTTTCCAGCTTGAGCGGGTACGGCTCCCGGTGCGAGCT	7440
GAAATAGTCGAACATCCGTGCGGCGGTCGGCGACAGCTTGCGGTACTTCTCCCATATGAA	7500
TTTCGTGTAGTGGTCGCCAGCAAACAGCACGACGATTTCTCGTCGATCAGGACCTGGCA	7560
ACGGGACGTTTTCTTGCCACGGTCCAGGACGCGGAAGCGGTGCAGCAGCGACACCGATTC	7620
CAGGTGCCCAACGCGGTCCGGACGTGAAGCCCATCGCCGTGCTGTAGGCGCGACAGGCA	7680
TTCTCGGCCTTCGTGTAATACCGGCCATTGATCGACCAGCCAGGTCCTGGCAAAGCTC	7740

GTAGAACGTGAAGGTGATCGGCTCGCCGATAGGGGTGCGCTTCGCGTACTCCAACACCTG	7800
CTGCCACACCAGTTCGTTCATCGTCGGCCCGCAGCTCGACGCCGGTGTAGGTGATCTTCAC	7860
GTCCTTGTTGACGTGGAAAATGACCTTGTTTTGCAGCGCCTCGCGCGGGATTTTCTTGTT	7920
GCGCGTGGTGAACAGGGCAGAGCGGGCCGTGTCGTTTGGCATCGCTCGCATCGTGTCCGG	7980
CCACGGCGCAATATCGAACAAGGAAAGCTGCATTTCCCTTGATCTGCTGCTTCGTGTGTTT	8040
CAGCAACGCGGCCTGCTTGGCCTCGCTGACCTGTTTTGCCAGGTCCTCGCCGGCGTTTTT	8100
TCGCTTCTTGGTTCGTTCATAGTTCCTCGCGTGTGATGGTCATCGACTTCGCCAAACCTGC	8160
CGCCTCCTGTTTCGAGACGACGCGAACGCTCCACGGCGGCCGATGGCGCGGGCAGGGCAGG	8220
GGGAGCCAGTTGCACGCTGTCGCGCTCGATCTTGGCCGTAGCTTGCTGGACCATCGAGCC	8280
GACGGACTGGAAGGTTTTCGCGGGGCGCACGCATGACGGTGC GGCTTGCGATGGTTTTCGGC	8340
ATCCTCGGCGGAAAACCCCGCGTCGATCAGTTCTTGCCTGTATGCCTTCCGGTCAAACGT	8400

CCGATTCATTACCCCTCCTTGCGGGATTGCCCCGACTCACGCCGGGGCAATGTGCCCTTA	8460
TTCCTGATTTGACCCGCCTGGTGCCTTGGTGTCCAGATAATCCACCTTATCGGCAATGAA	8520
GTCGGTCCCGTAGACCGTCTGGCCGTCCTTCTCGTACTTGGTATTCCGAATCTTGCCCTG	8580
CACGAATACCAGCGACCCCTTGCCCAAATACTTGCCGTGGGCCTCGGCCTGAGAGCCAAA	8640
ACACTTGATGCGGAAGAAGTCGGTGCCTCCTGCTTGTGCGCCGGCATCGTTGCGCCACAT	8700
CTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAATATAATATTTTATTTTCTCCCAATCAGGCT	8760
TGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATACTGTTCTTCCCCGATATCCTCCCTGA	8820
TCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCATAACACTTGTCCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAGAT	8880
CAATAAAGCCACTTACTTTGCCATCTTTACAAAAGATGTTGCTGTCTCCAGGTCGCCGT	8940
GGGAAAAGACAAGTTCCTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATACAGCTCGCGCG	9000
GATCTTTAAATGGAGTGTCTTCTTCCAGTTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTAT	9060

TCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCGTATAGGGACAATCCG	9120
ATATGTCGATGGAGTGAAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTCAG	9180
GGCTTTGTTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCA	9240
GATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGTGCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTT	9300
CCAGCCATAGCATCATGTCCCTTTTCCCGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTTATACCGGC	9360
TGTCGGTCATTTTTAAATATAGGTTTTTCATTTTCTCCCACCAGCTTATATACCTTAGCAG	9420
GAGACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCG	9480
GTGATATTCTCATTTTAGCCATTTATTATTTCCCTCCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGAT	9540
ACCCAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACTCCAATTCAGTTCCTTGCATTCTAAAA	9600
CCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGT	9660
ATCGACGGAGCCGATTTTGAACCACAATTATGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAG	9720

TGTATGATGGTGTGTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTGTCTATCAGCTGTCCCTCCTG 9780

TTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTATCT 9840

Pst I

CTGCTCTCACTGCCGTAAAACATGGCAACTGCA[▼]GTTCACCTTACACCGCTTCTCAACCCGG 9900

TACGCACCAGAAAATCATTGATATGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGGGCAACAGCCCG 9960

CATTATGGGCGTTGGCCTCAACACGATTTTACGTCACTTAAAAAACTCAGGCCGAGTCG 10020

GTAACCTCGCGCATAACAGCCGGGCAGTGACGTCATCGTCTGCGCGGAAATGGACGAACAG 10080

TGGGGCTATGTCGGGGCTAAATCGCGCCAGCGCTGGCTGTTTTACGCGTATGACAGTCTC 10140

CGGAAGACGGTTGTTGCGCACGTATTCGGTGAACGCACTATGGCGACGCTGGGGCGTCTT 10200

ATGAGCCTGCTGTCACCCTTTGACGTGGTGATATGGATGACGGATGGCTGGCCGCTGTAT 10260

GAATCCCGCCTGAAGGGAAAGCTGCACGTAATCAGCAAGCGATATACGCAGCGAATTGAG 10320

CGGCATAACCTGAATCTGAGGCAGCACCTGGCACGGCTGGGACGGAAGTCGCTGTCGTTC 10380

TCAAAATCGGTGGAGCTGCATGACAAAGTCATCGGGCATTATCTGAACATAAAACACTAT 10440

CAATAAGTTGGAGTCATTACCCAATTATGATAGAATTTACAAGCTATAAGGTTATTGTCC 10500

TGGGTTTCAAGCATTAGTCCATGCAAGTTTTTATGCTTTGCCATTCTATAGATATATTG 10560

ATAAGCGCGCTGCCTATGCCTTGCCCCCTGAAATCCTTACATACGGCGATATCTTCTATA 10620

TAAAAGATATATTATCTTATCAGTATTGTCAATATATTCAAGGCAATCTGCCTCCTCATC 10680

CTCTTCATCCTCTTCGTCTTGGTAGCTTTTTTAAATATGGCGCTTCATAGAGTAATTCTGT 10740

AAAGGTCCAATTCTCGTTTTTCATACCTCGGTATAATCTTACCTATCACCTCAAATGGTTC 10800

GCTGGGTTTATCGCACCCCCGAACACGAGCACGGCACCCGCGACCACTATGCCAAGAATG 10860

CCCAAGGTAAAAATTGCCGGCCCCGCCATGAAGTCCGTGAATGCCCCGACGGCCGAAGTG 10920

AAGGGCAGGCCGCCACCCAGGCCGCCGCCCTCACTGCCGGCACCTGGTCGCTGAATGTC 10980

GATGCCAGCACCTGCGGCACGTCAATGCTTCCGGGCGTCGCGCTCGGGCTGATCGCCCAT 11040

CCCGTTACTGCCCCGATCCCGGCAATGGCAAGGACTGCCAGCGCTGCCATTTTTGGGGTG 11100

AGGCCGTTTCGCGGCCGAGGGGCGCAGCCCCTGGGGGATGGGAGGCCCGCGTTAGCGGGC 11160

CGGGAGGGTTCGAGAAGGGGGGCACCCCCCTTCGGCGTGCGCGGTACGCGCACAGGGC 11220

GCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTATAAATATTGGTTTAAAAGCAGGTTAAAAGACAGG 11280

TTAGCGGTGGCCGAAAAACGGGCGGAAACCCTTGCAAATGCTGGATTTTCTGCCTGTGGA 11340

CAGCCCCTCAAATGTCAATAGGTGCGCCCCTCATCTGTCAGCACTCTGCCCCTCAAGTGT 11400

CAAGGATCGCGCCCCTCATCTGTCAGTAGTCGCGCCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGC 11460

ACTTATCCCCAGGCTTGTCCACATCATCTGTGGGAAACTCGCGTAAAATCAGGCGTTTTTC 11520

GCCGATTTGCGAGGCTGGCCAGCTCCACGTGCGCCGGCCGAAATCGAGCCTGCCCCTCATC 11580

TGTCAACGCCGCGCCGGGTGAGTCGGCCCCTCAAGTGTCAACGTCCGCCCCTCATCTGTC 11640

AGTGAGGGCCAAGTTTTCCGCGAGGTATCCACAACGCCGGCGCGCGGTGTCTCGCACA 11700

CGGCTTCGACGGCGTTTCTGGCGCGTTTGCAGGGCCATAGACGGCCGCCAGCCCAGCGGC 11760

GAGGGCAACCAGCCCGG 11777

図 1. pBIN19 の塩基配列

(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。)

「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」

[目次]

1. 各器官における細胞内に移入した核酸の存在の有無	2
2. 細胞内に移入した核酸の存在状態	5
3. 当該核酸による形質発現の安定性	11

「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. 各器官における細胞内に移入した核酸の存在の有無

WKS82/130-9-1 の各器官における導入遺伝子の存在の有無について、PCR 法によって解析した。

[実験方法]

「WKS82」(以下、宿主という)及び「WKS82/130-9-1」(以下、組換え体という)の花弁、葉、茎、根及び花粉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて製造業者推奨の方法に従ってゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として 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アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子の増幅を行った。PCR の反応条件は、熱変性が 94℃で 5 分間、続いて 94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分のサイクルを 25 回繰り返し、その後、伸長反応が 72℃で 7 分である。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 BP40-F2 と BP40-R3 を、トレニア 5AT 遺伝子の増幅には TAT7-50F と TAT7-R1 を、NPT II 遺伝子の増幅には NPT II -F と NPT II -R を、ANS 遺伝子の増幅には RhANS69-r1 と RhANS69-m1 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

BP40-F2 : 5' -GAG CTA GGC CAC ATG CTT A- 3'

BP40-R3 : 5' -CTT TGC GCT CAT GAC TCG T- 3'

トレニア 5AT 遺伝子特異的プライマー

TAT7-50F : 5' -AAC AAT ATG TGC AGT CCT CGA A- 3'

TAT7-R1 : 5' -AAC TCG CAT CGC CAA CTA C- 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'

ANS 特異的プライマー

Rh ANS 69-r1 : 5' -TTT GAT CTT CCC ATT GAG C- 3'

Rh ANS 69-m1 : 5' -TCC GCG GTG GGA AGA TCC CC- 3'

[結果と結論]

表 1 及び図 1 に結果を示した。PCR による解析の結果、本組換え体の花卉、葉、茎のゲノム中には導入遺伝子が検出されたが、根、花粉のゲノムにおいてはこれら導入遺伝子は検出されなかった。

また、花卉、葉や茎の表皮系、がく片、雄ずい、雌ずいは L1 層及び L2 層、花粉と卵細胞は L2 層、葉や茎の内部組織、根は L3 層に由来することが知られている。根及び花粉のゲノムにおいて導入遺伝子が検出されなかったことより、本組換え体は導入遺伝子が 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。

表 1. 組換え体の各器官における導入遺伝子の存在の有無

検出遺伝子	導入遺伝子存在の有無				
	花卉	葉	茎	根	花粉
パンジー F3' 5' H	+	+	+	-	-
トレニア 5AT	+	+	+	-	-
NPT II	+	+	+	-	-

(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。)

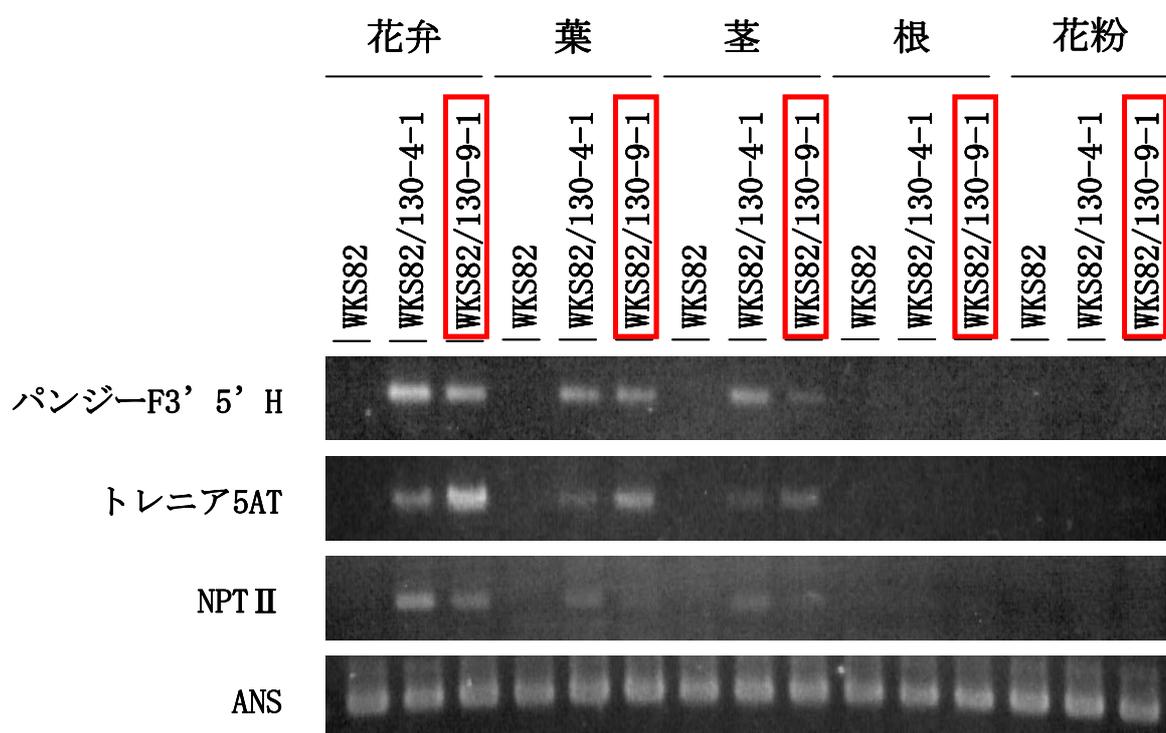


図 1. 組換え体の各器官における PCR 解析

※WKS82/130-4-1 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。)

2. 細胞内に移入した核酸の存在状態

導入遺伝子の存在状態についてサザンブ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葉より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いて染色体 DNA を抽出した。染色体 20 μ g を制限酵素 *Nco*I、*Cla*I 又は *Pst*I で切断後、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。各 DNA を変性中和後、ナイロン膜に 20 \times SSC で転写した。プローブとしてジゴキシゲニンで標識した各遺伝子（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）を用い、高 SDS 濃度ハイブリダイゼーションバッファー中、42°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を 1%(w/v)SDS を含む 2xSSC を用いて 65°C、5 分で 2 回洗浄後、1%(w/v)SDS を含む 0.2xSSC を用いて 65°C、15 分で 2 回洗浄し、2 時間露光した。

[結果と結論]

表 2 及び 図 2-1~2-3 に結果を示した。サザン解析の結果、移入された配列は本組換え体ゲノム中、4 箇所が存在すると予測される。また T-DNA は一般に LB や RB 領域、あるいは T-DNA 上の一部の配列を欠いた状態で植物ゲノムに挿入されていることが多いことが報告されている (Kim et al., 2003³⁵)。同様に、本組換え体においても使用したプローブによってゲノム中に挿入されている箇所数が異なることから、全長の T-DNA が挿入された箇所に加えて、T-DNA の一部の配列のみが挿入された箇所もあると考えられた。

表 2. 挿入された各遺伝子の挿入部位数

プローブ	挿入部位数 (WKS82/130-9-1)
パンジー-F3' 5' H	4
トレニア 5AT	4
NPT II	2

(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。)

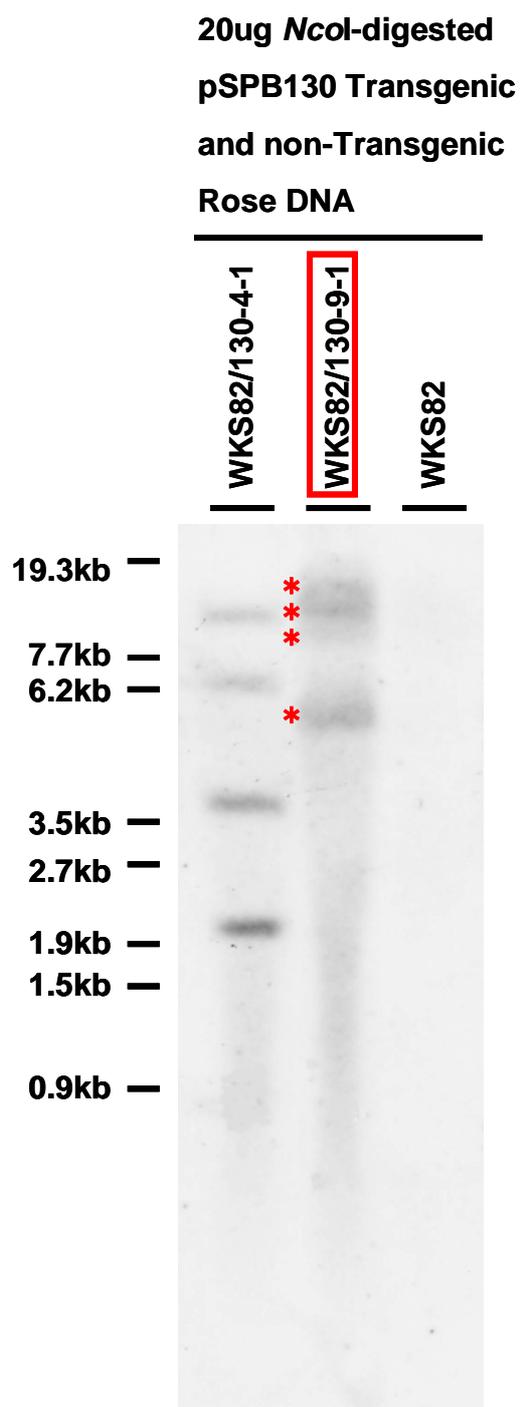


図 2-1. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82)及び組換え体(WKS82/130-9-1)の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Nco*I で消化し、パンジー-F3' 5' H 遺伝子 (本遺伝子の *Nco*I 切断部位下流から 3' 末端手前まで) をブ

ローブとしてサザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 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。)

**20ug NcoI-digested
pSPB130 Transgenic
and non-Transgenic
Rose DNA**

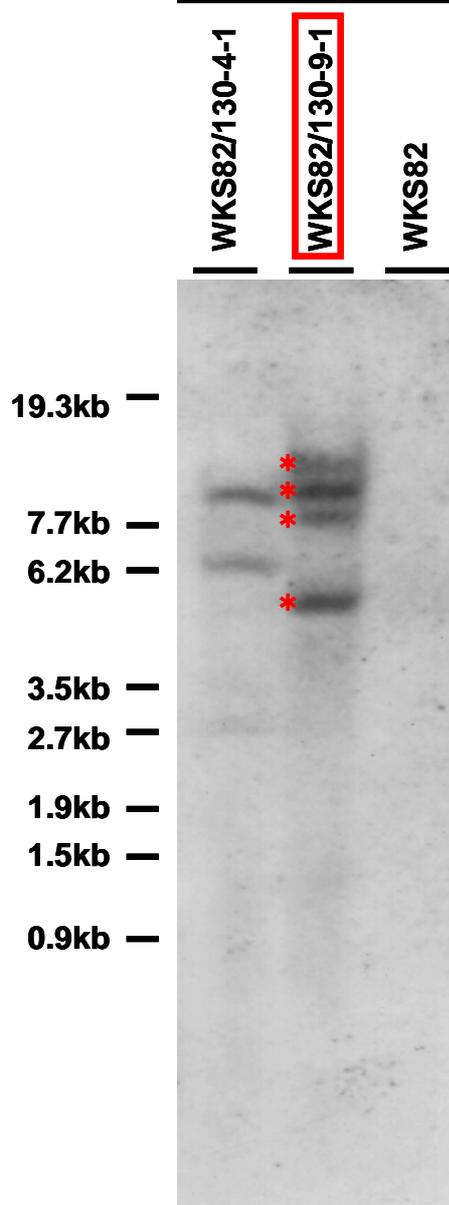


図 2-2. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体 (WKS82/130-9-1)の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Nco*I で消化し、トレニア 5AT 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 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。)

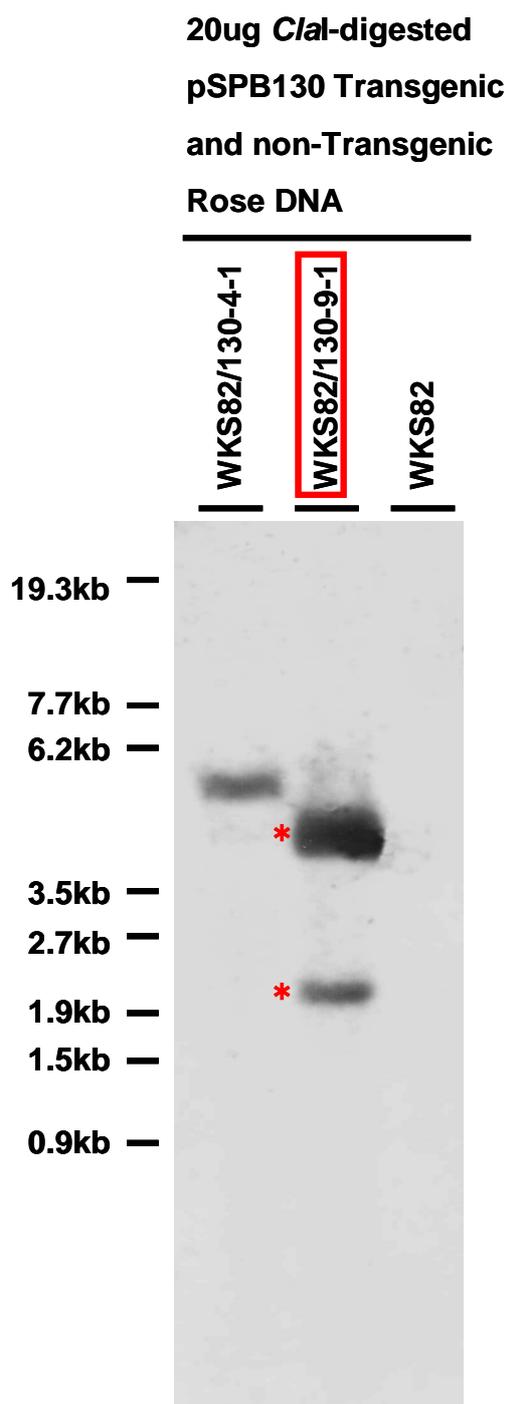


図 2-3. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体 (WKS82/130-9-1) の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Cla*I で消化し、選択マーカーとして用いたカナマイシン耐性遺伝子、NPT II 遺伝子をプローブとしてサ

ザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 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. 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ブ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 μ 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。

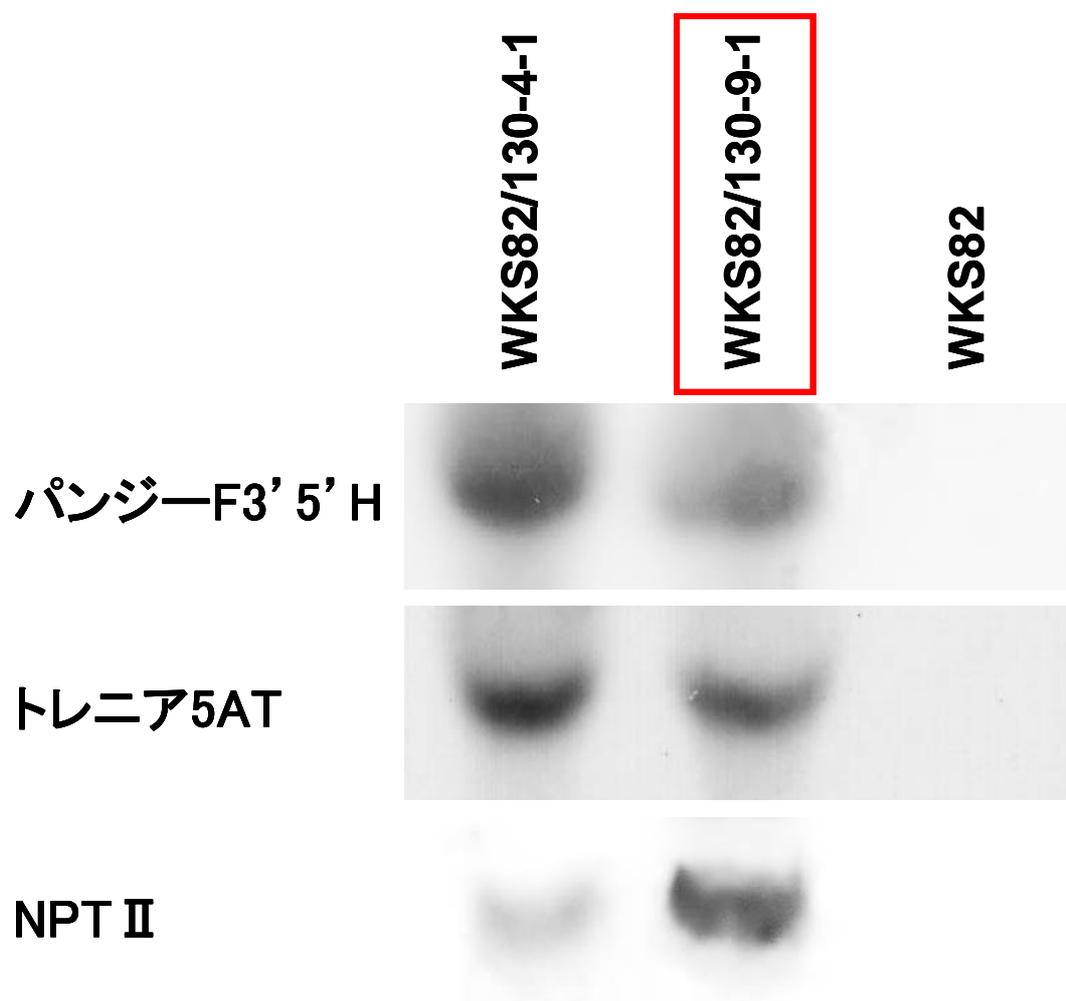


図 3. WKS82/130-9-1 のノザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体(WKS82/130-9-1)の total RNA 20 μ 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。

※WKS82/130-4-1 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 μl 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℃ で 5 分間、続いて 94℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 1 分のサイクルを 25 回繰り返し、その後、伸長反応が 72℃ 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 NPT II 遺伝子を除く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。しかし、本組換え体の葉においてはゲノム内に挿入された NPT II 遺伝子は発現していないことが確認された。

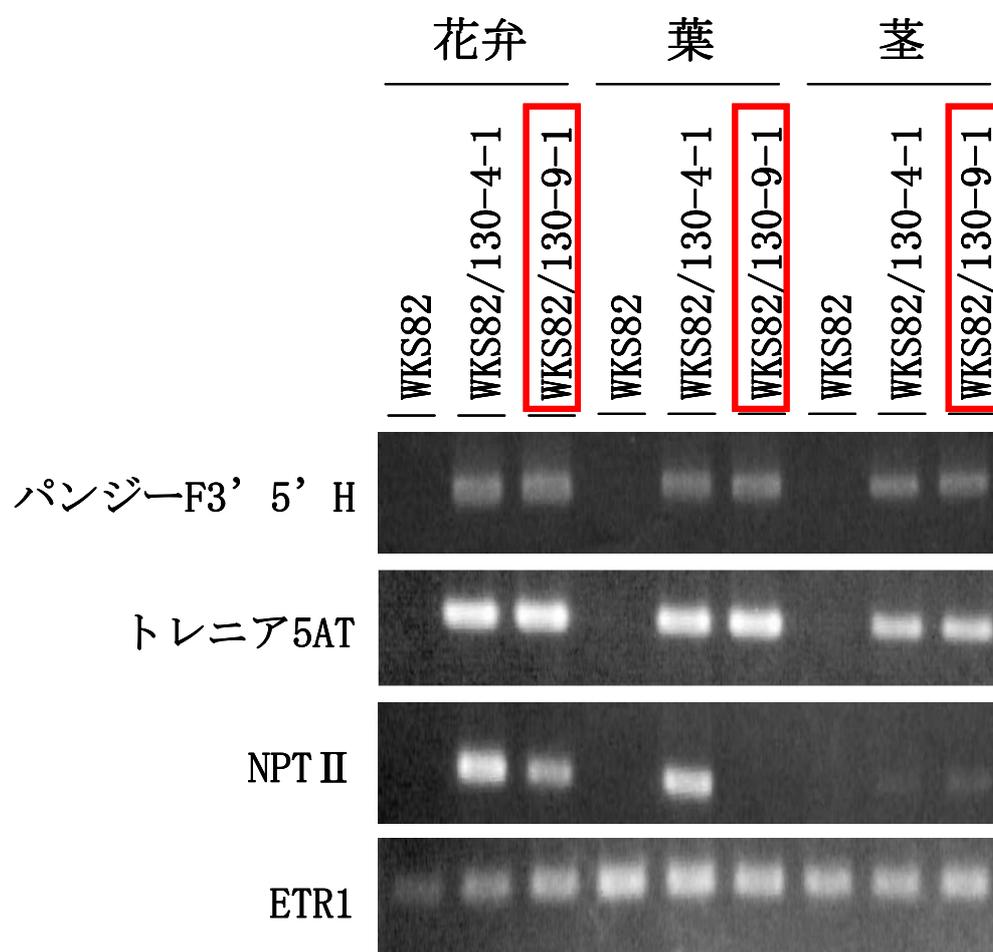


図 4. 組換え体の各器官における RT-PCR 解析

※WKS82/130-4-1 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	31
(7) アグロバクテリウムの葉における残留性	34
(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	35

「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「WKS82/130-9-1」(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 (WKS82/130-9-1)	
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-A	3 花
	 75-D	1 花	 76-B	1 花
	 186-D	4 花	 84-B	3 花
			 84-C	2 花

				85-A	1 花
--	--	--	---	------	-----

RHS : The Royal Horticultural Society



図 1-1. 宿主(WKS82)の花及び花弁



図 1-2. 組換え体(WKS82/130-9-1)の花及び花卉

次に宿主及び組換え体の花卉、葉及び根中に存在するアントシアニジン进行分析した。

[実験方法]

無作為に選んだ宿主及び組換え体の各 1 株より 0.5 g 分の花卉、葉及び根を採取し、凍結乾燥後、0.05 % TFA を含む 50 %アセトニトリルで抽出した。アントシアニジンは、前記抽出物のうち 0.025 g の花卉、葉あるいは根に相当する量を乾固し、0.2 ml の 6N 塩酸で 100℃、20 分間加水分解した後 0.2 ml の 1-ペンタノールで抽出することによって得た。得られたアントシアニジンを HPLC により分析した（分析回数は 3 回）。

[結果と結論]

結果を表 2 に示した。組換え体の花卉及び葉において宿主にはないデルフィニジンが検出された。一方、根においてデルフィニジンは検出されなかった。

表 2. 宿主及び組換え体の各部位におけるアントシアニジン分析

① 花卉におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
デルフィニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	96.0
シアニジン ($\mu\text{g/g}$)	72.6	9.1
ペラルゴニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	0.0

② 葉におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
デルフィニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	17.1
シアニジン ($\mu\text{g/g}$)	80.9	9.0
ペラルゴニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	0.0

③ 根におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
--	---------------	-------------------------

別添資料 4

デルフィニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	0.0
シアニジン ($\mu\text{g/g}$)	2.7	7.2
ペラルゴニジン ($\mu\text{g/g}$)	0.0	0.0

さらに、宿主及び組換え体の花卉、葉及び根中に存在するその他フラボノイド色素であるフラボノールを分析した。

[実験方法]

無作為に選んだ宿主及び組換え体の各 1 株より 0.5 g の花卉、葉及び根を採取し、凍結乾燥後、0.1 % TFA を含む 50 %アセトニトリルで抽出した。フラボノールは、前記抽出物のうち 0.03 g の花卉、葉あるいは根に相当する量を乾固し、 β -グルコシダーゼ及びナリゲナーゼで 30℃、一晚処理した後、等量の 0.1%TFA を含む 90%アセトニトリルで抽出することによって得た。得られたフラボノールを HPLC により分析した（分析回数は 3 回）。

[結果と結論]

結果を表 3 に示した。組換え体の花卉及び葉において宿主にはないミリセチンが検出された。一方、根においてはいずれのフラボノールも検出されなかった。

表 3. 宿主及び組換え体の各部位におけるフラボノール分析

① 花卉におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
ミリセチン (μ g/g)	0.0	1751.0
ケルセチン (μ g/g)	2791.0	310.0
ケンフェロール (μ g/g)	95.0	17.0

② 葉におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
ミリセチン (μ g/g)	0.0	380.0
ケルセチン (μ g/g)	768.0	99.0
ケンフェロール (μ g/g)	39.0	0.0

③ 根におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
--	---------------	-------------------------

ミリセチン (μ g/g)	0.0	0.0
ケルセチン (μ g/g)	0.0	0.0
ケンフェロール (μ g/g)	0.0	0.0

(2)形態及び生育特性の調査

[目的]

宿主及び組換え体の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、花弁数、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、比較する。

[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。

特定網室内に定植した宿主及び組換え体について、草丈、節数、開花時期、花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅、花の香りを調査した。

なお、1 個体につき 1 茎あるいは 1 花について上記調査を行った。

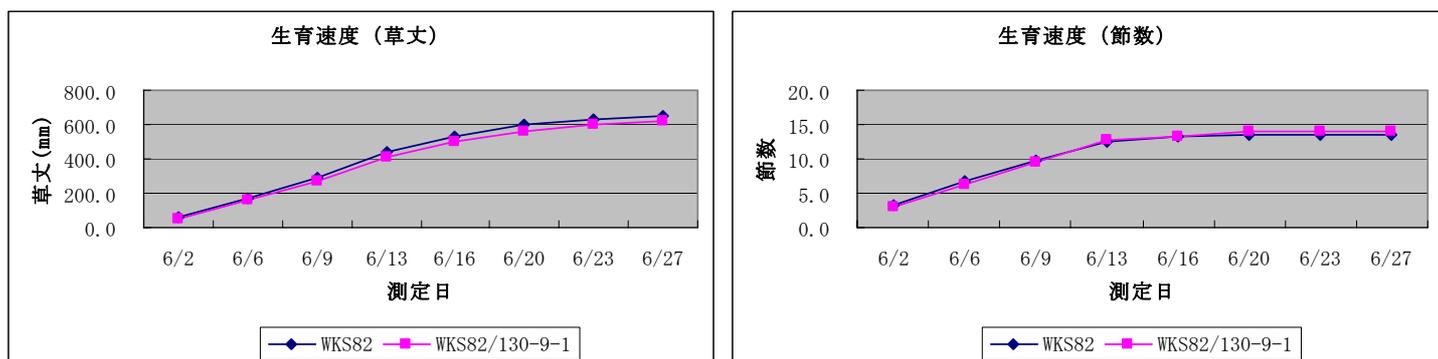
- 1) 草丈、節数:各系統 10 個体について、定植から約 3 ヶ月後に同時にピンチを行い、その後出芽した新芽について 1 週間に 2 回、草丈及び節数を測定した。
- 2) 開花時期:各系統 10 個体について、定植から約 3 ヶ月後に同時にピンチを行い、その後出芽した新芽より得られた花について開花日を測定した。なお、バラの品種登録で定められた開花状態となった日を開花日とし、最初に開花した個体の開花日を開花開始日、最後に開花した個体の開花日を開花終了日として開花時期を測定した。
- 3) 花の直径:各系統 10 個体の花の直径を測定した。
- 4) 花弁数:各系統 10 個体の花の花弁数を測定した。
- 5) 葯数:各系統 10 個体の花の葯数を測定した。
- 6) 葯長、葯幅;各系統 10 個体の花から葯を採取し、無作為に選んだ 20 個の葯の長さ と幅を測定した。
- 7) 花の香り:各系統の花 1 輪をサンプルバッグ(材質 PET)に封入して純空気を充填し、室温に 6 時間放置後のヘッドスペースガスを「におい識別装置 FF-2A(島津製作所)」にて測定し、においの違いを分析した(分析回数は 2 回)。

[結果と結論]

イ. 草丈、節数

図 2 に宿主及び組換え体の草丈及び節数の経時変化を示した。宿主と組換え体間

で草丈及び節数の経時変化に統計的有意差(Student t 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。



※いずれも 10 茎の平均値をプロットしている。

図 2. 草丈及び節数の経時変化

ロ. 開花時期

結果を表 4 に示した。宿主と組換え体間で開花時期に差異は認められなかった。

表 4. 開花時期

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
開花時期	6/28~7/3	6/29~7/4

ハ. 花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅

結果を表 5 に示した。調査した形質のうち、花の直径、葯長、葯幅については、宿主と組換え体間で統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。しかし、花弁数と葯数においては宿主と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。

表 5. 形態特性のまとめ

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
花の直径 (cm)	9.2 ± 0.8	8.6 ± 1.2
花弁数	33.2 ± 7.1	28.1 ± 2.2*
葯数	100.3 ± 24.0	120.9 ± 9.7*

葯長(mm)	3.8±0.2	3.8±0.2
葯幅(mm)	1.8±0.0	1.9±0.1

*:宿主との間に統計的有意差あり

※いずれも 10 花の平均値を示している。

二. 花の香り

結果を図 3 に示した。宿主及び組換え体間で花の香りに違いがあるかどうかについては、臭気寄与(単位:臭気指数相当値)にて判断した。なお臭気寄与とは、においの質と強度の寄与具合を示したもので、「臭気指数 10」とはそのにおいを 10 倍に薄めると匂わなくなる程度の強さを示し、「臭気指数 20」は同 100 倍、「臭気指数 30」は同 1000 倍の強さを示す。この結果より、宿主と組換え体間で花の香りの質及び強さにおいて違いは認められなかった。

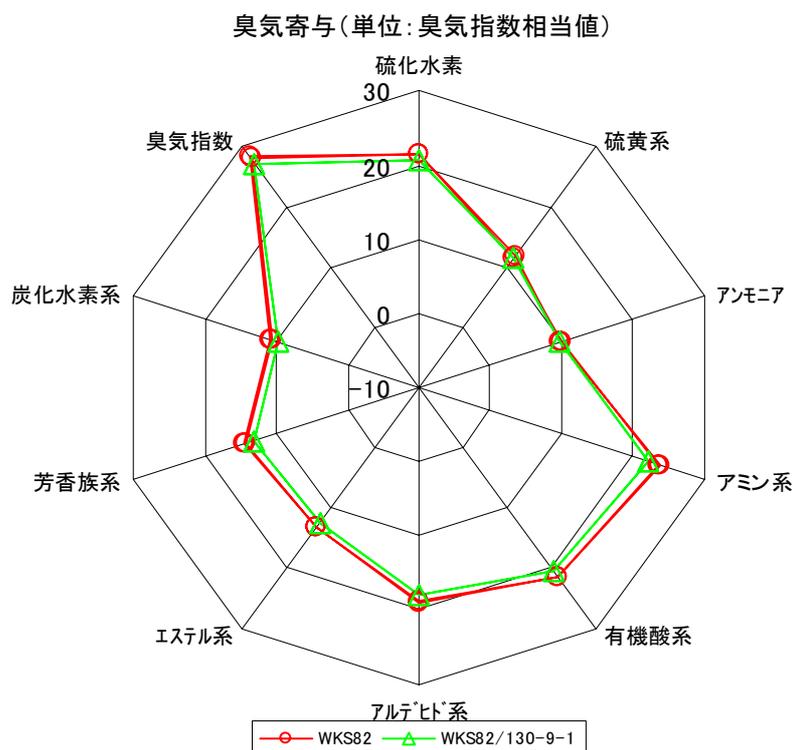
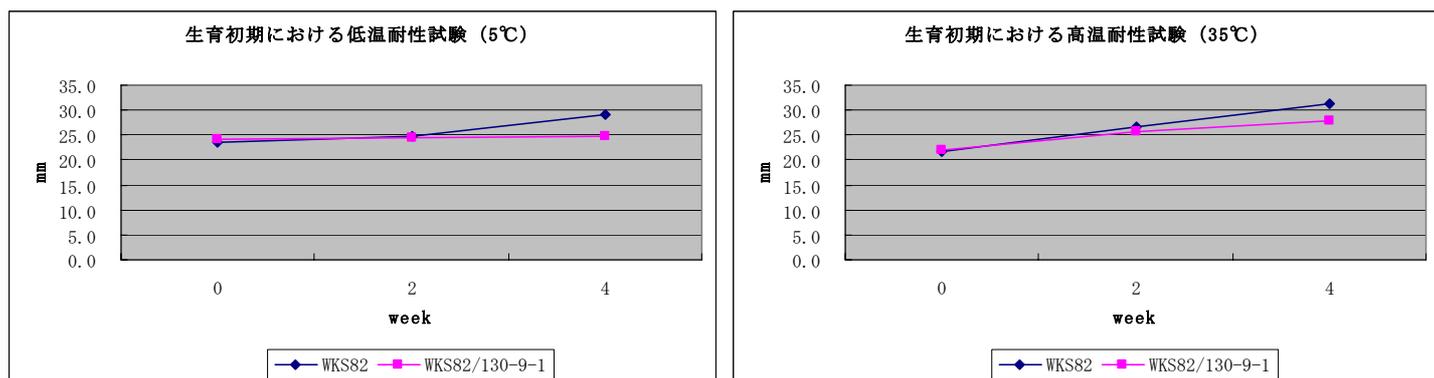


図 3. 島津におい分析装置における花の香りの比較



※いずれも 10 芽の平均値をプロットしている。

図 5. 低温あるいは高温条件下における幼苗の生育速度

(4) 生殖・繁殖特性の調査

イ. 花粉の存在及び充実率

[目的]

組換え体の花粉の有無及び充実率を調べ、宿主と比較することにより遺伝子導入による花粉形成への影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 6～7 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 個体の花について肉眼にて葯の存在を確認した。ついで葯内部の花粉を取り出し、酢酸カーミンによって染色後、各個体 300 個の花粉について実体顕微鏡 (LEICA MZFLIII) によりその充実度を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

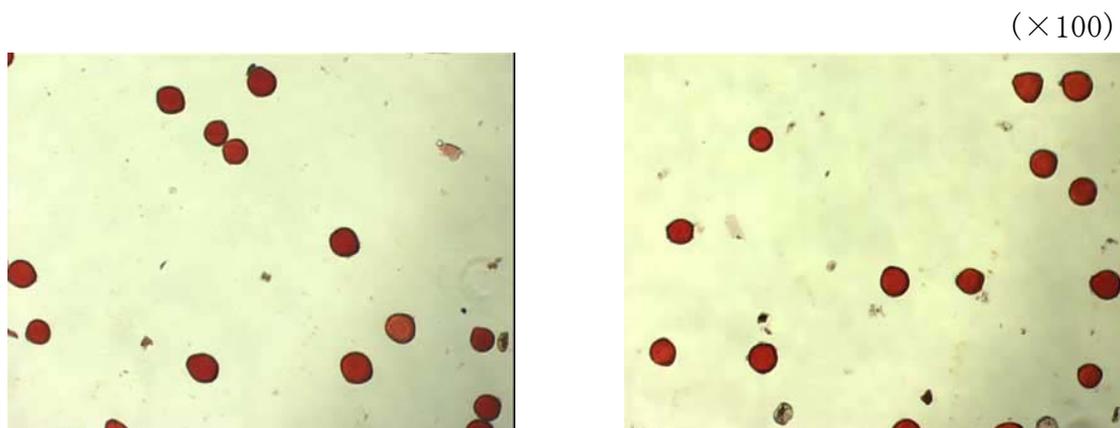
[結果と結論]

結果を表 6 及び図 6 に示した。宿主及び組換え体ともに花粉の存在が認められた。さらに、宿主及び組換え体間で花粉の充実率に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

表 6. 花粉の存在率及び充実率

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
葯の存在率 (%)	100	100
花粉の充実率 (%)	81.3 ± 4.9	83.9 ± 3.9

※いずれも 10 花の平均値を示している。



宿主(WKS82)

組換え体(WKS82/130-9-1)

図 6. 宿主及び組換え体における花粉の染色

ロ. 花粉の発芽

[目的]

前項で宿主、組換え体ともに花粉の存在及び活性が認められたので、それらの花粉の発芽について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 6～7 月にサントリー特定網室にて実施した。

花粉の発芽を調査する培地としては、ほう酸培地(ショ糖濃度 10%、ほう酸濃度 50ppm、寒天濃度 1%)を用いた。宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花より花粉を採取した。採取した花粉を培地に置床後、25℃で 2 時間培養し、各個体 100 個の花粉について実体顕微鏡(LEICA MZFLⅢ)により花粉管の伸長を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

[結果と結論]

結果を表 7 及び図 7 に示した。宿主及び組換え体ともにほう酸培地上で花粉の発芽が認められた。宿主及び組換え体間で花粉の発芽率に統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。

表 7. 花粉の発芽率

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
花粉の発芽率(%)	27.2±8.6	27.2±9.7

※いずれも 10 花の平均値を示している。

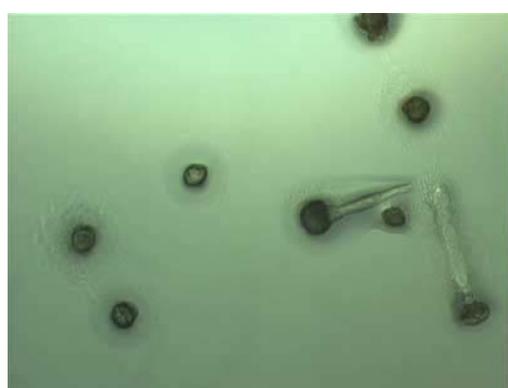




図 7. 宿主及び組換え体における花粉の発芽

ハ. 花粉の形態

[目的]

顕微鏡にて組換え体の花粉の形態を観察し、宿主と比較することにより遺伝子導入による花粉形態への影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 6～7 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 個体の花より花粉を取り出し、各個体 20 個の花粉について大きさ(直径)を計測するとともに光学顕微鏡 (LEICA DM6000 B) にてその形態を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

[結果と結論]

結果を表 8 及び図 8 に示した。宿主及び組換え体間で花粉の大きさに統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。また、形態にも違いは認められなかった。

表 8. 花粉の大きさ (計測花粉数: 各 200 個)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
花粉の直径 (μm)	47.3 \pm 2.0	48.2 \pm 0.7

※いずれも 10 花の平均値を示している。



($\times 200$)

宿主(WKS82)

組換え体(WKS82/130-9-1)

図 8. 宿主及び組換え体における花粉の形態

ニ. 切り花における送風による花粉飛散距離の測定

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在が認められたので、送風によるそれらの花粉の飛散距離について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 5 月にサントリー閉鎖系温室にて実施した。

宿主及び組換え体から開花後数日を経た、葯の開裂が確認できた花を採取し、500ml 容フラスコにいけた(各 3 本)。花粉を捕捉するためにワセリンをスライドガラスに均一に塗り、フラスコの中心から 10cm 毎に 150cm 距離まで置いた(図 9、10)。固定した扇風機(風速 4m / 秒)でフラスコの後方 50cm の距離からスライドガラスの方向に風を送り、花粉を飛ばした。15 時間送風後、スライドガラスを回収し、ワセリンに捕捉された花粉の数を顕微鏡(LEICA MZFLIII)により観測した。

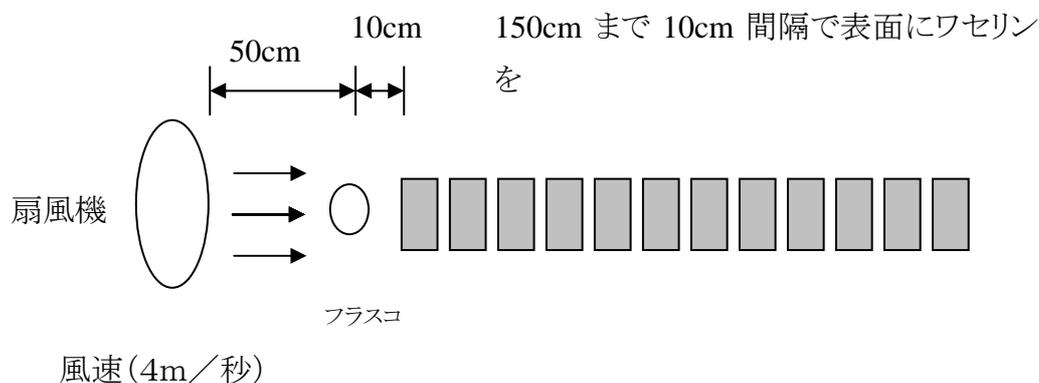


図 9. 切り花における送風による花粉飛散距離測定実験の概略図

[結果と結論]

宿主、組換え体ともにいずれの距離においても送風による花粉の飛散は観察されなかった。



宿主 (WKS82)

組換え体 (WKS82/130-9-1)

図 10. 宿主及び組換え体の切り花における花粉飛散試験

(5)交雑性の調査

イ. 花粉の稔性

(イ) 園芸種との人工交配試験

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び発芽活性が認められたので、園芸種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 3~6 月にサントリー特定網室及び日本植生特定網室にて実施した。

常法に従い、園芸種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に宿主あるいは組換え体の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した (図 11)。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で 1 日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、グランディ・フロラ系四季咲きバラ品種「クイーンエリザベス」、フロリバンダ系四季咲きバラ品種「ゴールドバニー」を用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子 (パンジー-F3' 5' H 遺伝子) を検出した。

[結果と結論]

結果を表 9 に示した。結実率は、宿主及び組換え体間でほとんど差異は認められなかった。さらに組換え体との交配により得られた種子を解析した結果、これらの種子からは導入遺伝子は全く検出されなかった。このことから、花粉の受精能力については宿主と組換え体間で差異はないものの、組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示唆された。

表 9. 人工交配による園芸種との結実率及び導入遺伝子の検出率

別添資料 4

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-9-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
クイーンエリザベス	19/20	95	20/20	100	0/94	0
ゴールドバニー	16/20	80	14/20	70	0/94	0



開花直前



除雄



受



袋 か



結

図 11. 園芸種との人工交配試験

(ロ) 野生種との人工交配試験

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び生存が認められたので、野生種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 3~5 月にサントリー特定網室にて実施した。

常法に従い、野生種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に宿主あるいは組換え体の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した(図 12)。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で 1 日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、野生種はノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb. ex Murray) を用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子 (パンジー-F3' 5' H 遺伝子) を検出した。

[結果と結論]

結果を表 10 に示した。結実率は宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体との交配により得られた種子を PCR にて解析した結果、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。今回得られた種子はノイバラの自殖によるもの、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と考えられた。よって、本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても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から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 10. 人工交配による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-9-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
ノイバラ	6/152	3.9	9/134	6.7	0/11	0



開花直前



除雄



受粉



袋 か



図 12. ノイバラとの人工交配試験

(ハ) 野生種との放蜂による交雑試験

[目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び発芽活性が認められたので、放蜂による野生種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー閉鎖系温室にて実施した。

宿主あるいは組換え体とノイバラを約 1.5m 四方の網を張ったかごの中にクロマルハナバチ約 50 頭（ナチュポール・ブラック）とともに入れ、1 週間放飼し、クロマルハナバチによる宿主あるいは組換え体とノイバラとの受粉を行った（図 13）。なお、宿主及び組換え体は 2~3 花が開花した株、ノイバラは除雄は行わず、1 株につき 3~5 割が開花した株を本実験に用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子（パンジー-F3' 5' H 遺伝子）を検出した。

また、AM10:00~PM3:00 の間ビデオ撮影を行い、クロマルハナバチの行動観察を行った。

[結果と結論]

結果を表 11 に示した。ノイバラを交雑母本とする結実の有無を調査した結果、宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体を花粉親とした掛け合わせにより得られた種子を PCR にて解析した結果、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。本試験において、クロマルハナバチの行動観察も同時に行ったが、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。このことより、得られた種子は全てこれらクロマルハナバチの行動に伴い、ノイバラ自身の花粉が受粉することにより得られた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と考えられた。これらのことより、ハチの行動に伴う本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても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

理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 11. 放蜂による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-9-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
ノイバラ	9/350	2.6	8/167	4.8	0/8	0



図 13. ノイバラとの放蜂による交雑試験
※ただし、写真は本組換え体での試験ではない。

(6) 有害物質の産生性

イ. 組換え体残渣が後作に与える影響

[目的]

組換え体残渣を土壌中に鋤き込むことによるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体残渣が種子発芽へ与える影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の葉 5g(3 個体から集めた葉をまとめた)をそれぞれ液体窒素中に置き、細かい粉末になるように粉砕した。この粉末をそれぞれ土壌(100g、赤玉土:BM-2:キングパール=4:2:1)に混ぜた。レタス(*Lactuca sativa*)の種子を、葉の粉砕物を含む土壌を入れたポットに各 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

[結果と結論]

結果を表 12 に示した。宿主及び組換え体間で、レタス種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。

よって、植物体の残渣がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 12. レタス種子の発芽に対する葉の粉末鋤き込みの影響

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
発芽率(%)	96.8±3.3	98.4±3.6
実生の平均新鮮重(mg)	51.2±5.7	51.6±4.0

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。

ロ. 組換え体栽培土壌が後作に与える影響

[目的]

組換え体栽培土壌におけるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体栽培土壌が種子発芽へ与える影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の根の周辺の土を採取した。レタス (*Lactuca sativa*) の種子をこれらの土壌を入れたポットに 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

[結果と結論]

結果を表 13 に示した。宿主及び組換え体の栽培土壌間で、種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、栽培土壌がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 13. レタス種子の発芽に対する栽培土壌の影響

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
発芽率 (%)	94.4 ± 5.4	95.2 ± 3.3
実生の平均新鮮重 (mg)	89.3 ± 6.5	95.3 ± 11.8

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。

ハ. 土壤微生物相に与える影響

[目的]

組換え体を栽培した土壤中の微生物数を宿主と比較し、組換え体栽培による土壤微生物相への影響を調査する。

[実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の栽培土壤中の微生物数を測定した。測定は常法に従い希釈塗布法を用いた。すなわち、採取土壌をよく混和した後、その 30g を秤量し、270ml の生理食塩水とともに 500ml 容三角フラスコ内で振盪した。振盪後、直ちに生理食塩水を用いて 10^1 から 10^4 倍希釈液を作成し、各希釈液 0.1ml を直径 9cm シャーレの寒天培地上に塗布した。これとは別に、30g の土壌を 80°C で 24 時間通風乾燥して土壌の含水率を測定した。細菌数測定用培地として、トリプチケースソイ寒天培地 (TSA) を使用し、 28°C 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。真菌数の測定は、ジャガイモ・グルコース寒天培地 (PDA) を使用し、 25°C 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。放線菌測定用培地として、イースト・スターチ寒天培 (YS) を使用し、 30°C 、6 日間培養後のコロニー数を計測した。いずれの測定にも各試験区培地 5 枚を使用した。得られた結果はすべて乾土 1g 当たりに換算して表示した。

[結果と結論]

結果を表 14 に示した。細菌、真菌、放線菌のいずれの微生物数についても宿主及び組み換え体栽培土壌間で統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、栽培による土壤微生物相への影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 14. 栽培土壌中の土壤微生物数 (cfu/g 乾土)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-9-1)
細菌数 ($\times 10^6$)	5.81 ± 1.46	5.39 ± 1.79
真菌数 ($\times 10^3$)	1.95 ± 0.11	1.68 ± 0.49
放線菌数 ($\times 10^4$)	2.97 ± 1.46	3.28 ± 0.78

※いずれも 5 枚の平均値を示している。

(7) アグロバクテリウムの葉における残留性

[目的]

組換え体におけるアグロバクテリウムの残留の有無を調査する。

[実験方法]

宿主及び組換え体それぞれ 3 個体より採取した 0.04~0.24 g の葉を MM300 (キアゲン) を用いて液体窒素中で軽く破碎した後、2 倍量の滅菌水を加え懸濁し、2 時間以上静置した。この液を YEB 培地に塗布し、28℃で 3 日間培養した。

YEB 培地の組成は、酵母エキス (5g/l)、ペプトン (1g/l)、シヨ糖 (1g/l)、硫酸マグネシウム (0.5 g/l)、肉エキス (5 g/l)、寒天 (20 g/l) である。バイナリーベクターを含むアグロバクテリウム以外を除くために抗生物質のリファンピシン (20 mg/l)、テトラサイクリン (20 mg/l) を加えた。

[結果と結論]

宿主及び組換え体由来の抽出物どちらにおいても YEB 培地で生育するコロニーは観察されなかった。従って、組換え体におけるアグロバクテリウムの残留はないと判断した。

(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

1. 赤紫色のバラ品種「WKS82」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、青紫色を呈するバラを作出した。この花色は栄養増殖を繰り返しても安定していた。
2. 花弁、葉及び根中の色素を分析した結果、組換え体の花弁及び葉において宿主にはないデルフィニジン及びミリセチンが検出された。
3. サザン解析及び PCR 解析の結果、導入遺伝子は花弁、葉、茎のゲノム中に組み込まれていることが確認された。
4. 草丈及び節数の経時変化を調査した結果、宿主及び組換え体間で生育速度に統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。また、開花時期についても差異は認められなかった。
5. 形態特性について調査した結果、花の直径、葯長、葯幅においては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) は認められなかった。しかし、花弁数と葯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。
6. 花の香りについて島津におい分析装置にて分析した結果、宿主及び組換え体間で花の香りの質及び強度において違いは認められなかった。
7. 生育初期における低温・高温耐性を調査した結果、宿主及び組換え体間で新芽の生育速度に統計的有意差 (Student t 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。
8. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察された。花粉の充実率、発芽率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) は認められなかった。
9. 花粉の大きさは、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) は認められなかった。また、形態にも差異は認められなかった。
10. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察されたが、風媒による花粉の飛散はともに認められなかった。
11. 宿主及び組換え体の園芸種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、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、得られた種子を解析したところ導入遺伝子は全く検出されなかった。
12. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに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。

13. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率性を放蜂により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに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。
14. 宿主及び組換え体の植物体の鋤き込み試験によるレタス種子の発芽への影響については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
15. 宿主及び組換え体の植物体の栽培土壌が後作に与える影響については、宿主及び組換え体の栽培土壌間で差異は認められなかった。
16. 土壌微生物数については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
17. 組換え体におけるアグロバクテリウムの残留は認められなかった。