

資料 2 - 3

「隔離ほ場試験及び栽培特性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WKS82/130-9-1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と葯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バラとの交雑性を調査した。</p> <p>人工交配による野生種バラとの交雑性を調査した。</p> <p>放蜂による野生種バラとの交雑率を調査した。</p> <p>人工交配による園芸種バラとの交雑性を調査予定。</p> <p>人工交配による野生種バラ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		●	訪花した昆虫を観察、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バ ラを特定した。

○：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。

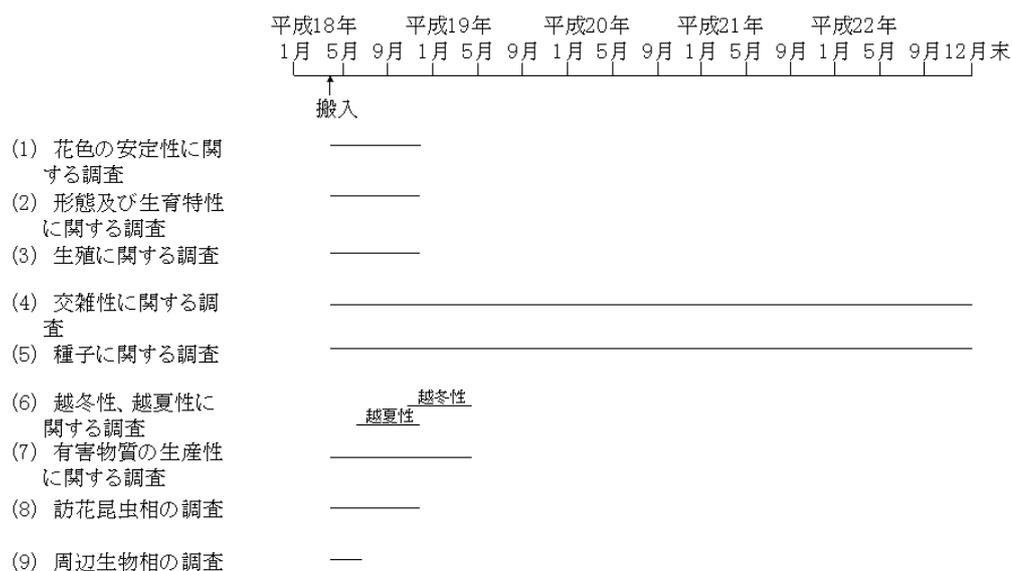


図 1. 調査項目および調査時期

(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。)

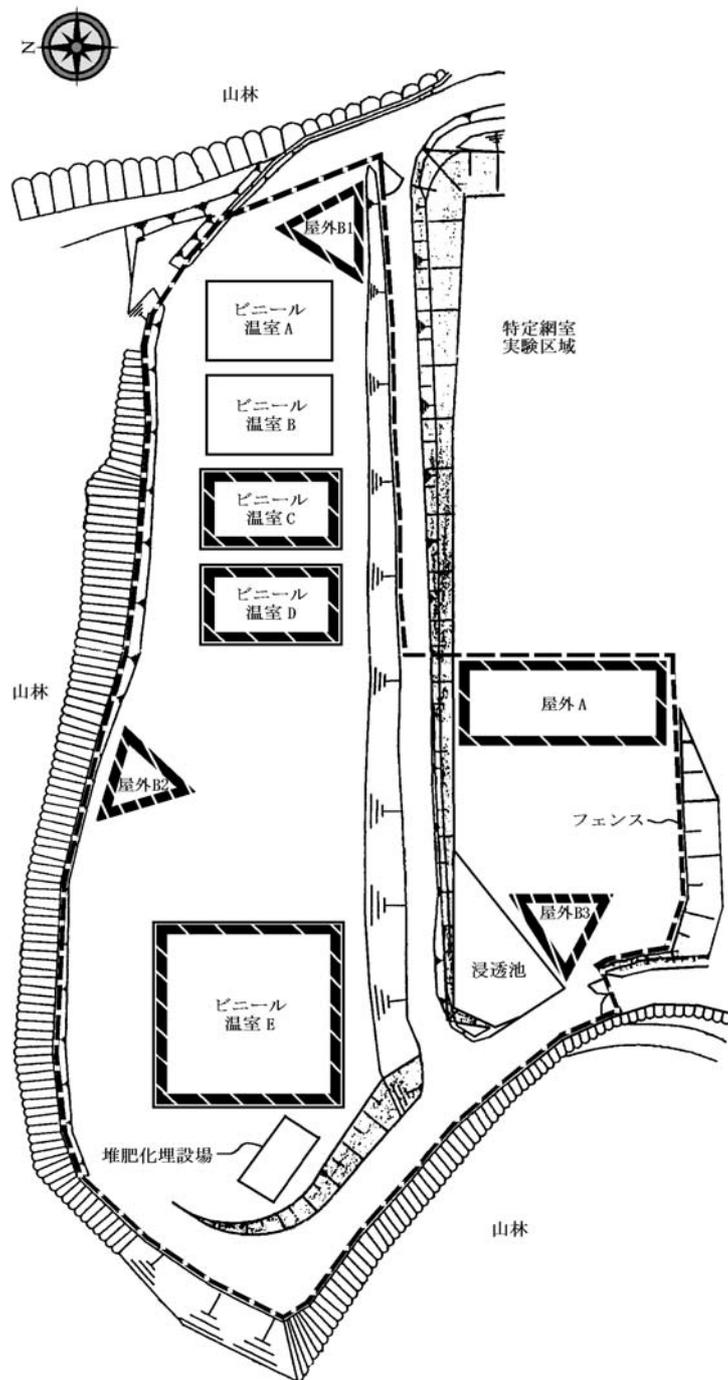


図 2. 日本植生株式会社 美咲ほ場内隔離ほ場全体図

( 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。)

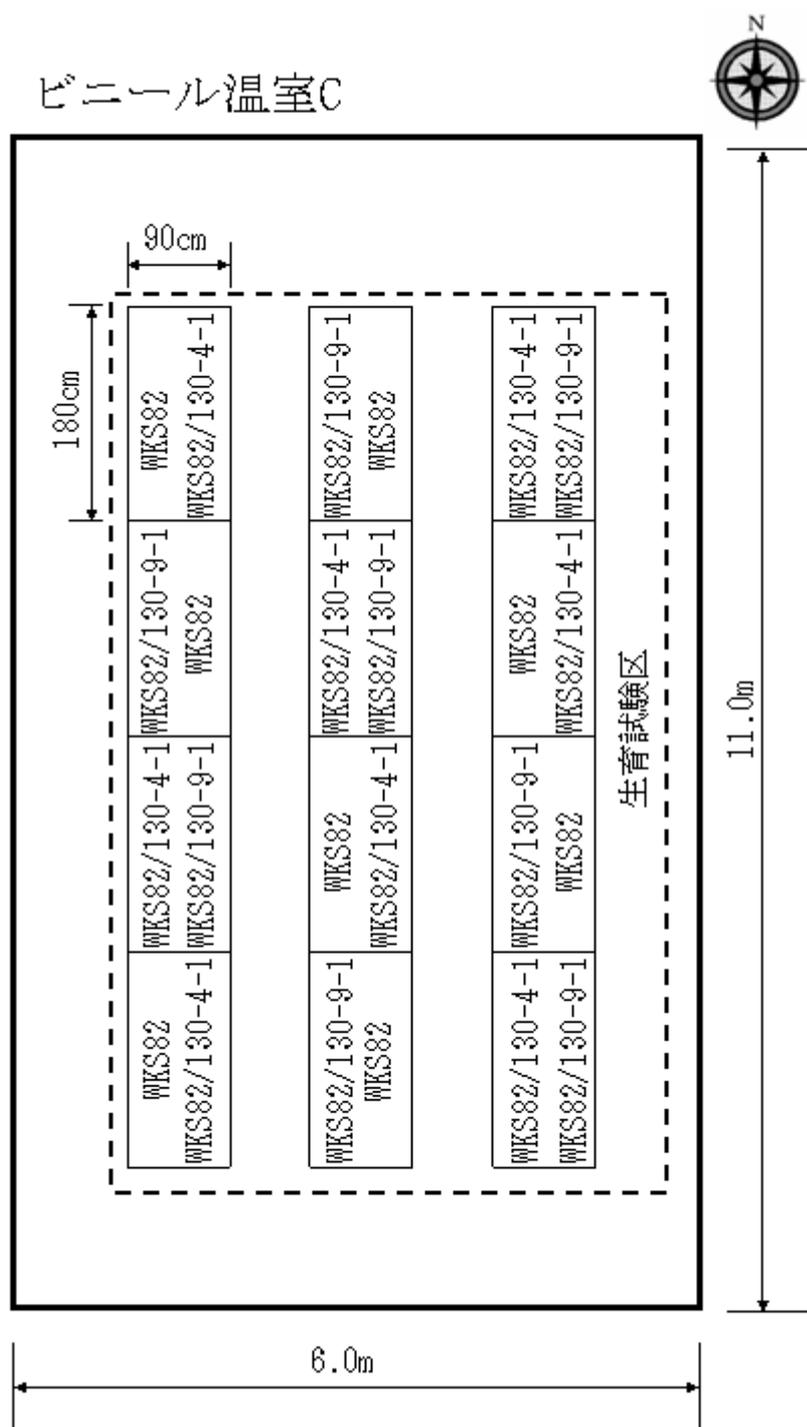


図3. 隔離ほ場試験（ビニール温室C）のバラ配置図

※WKS82/130-4-1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。）

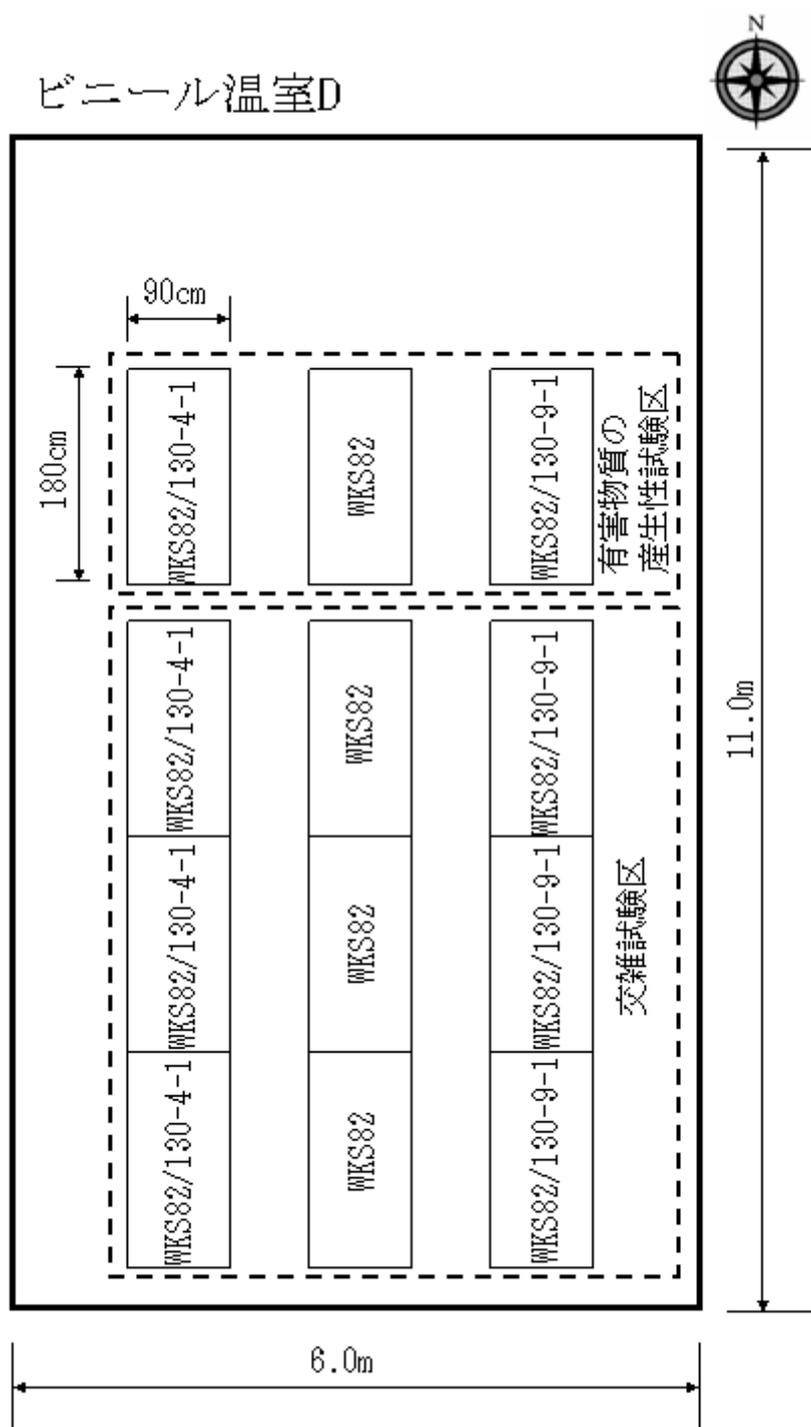


図4. 隔離ほ場試験（ビニール温室D）のバラ配置図

※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。）

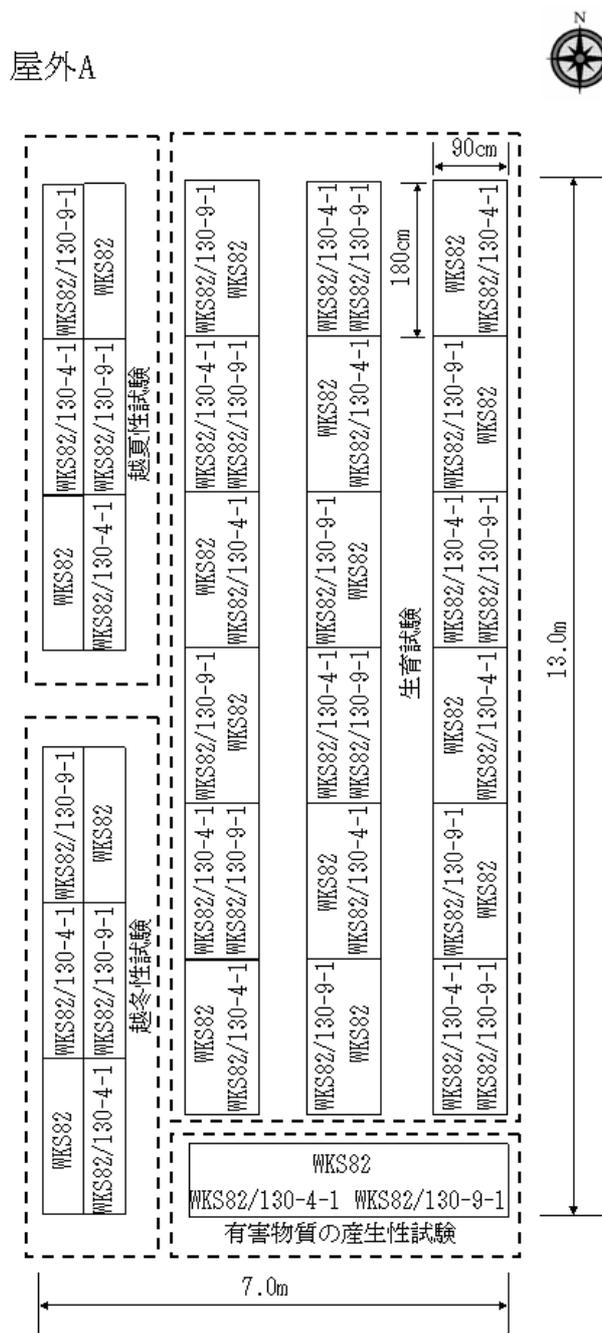


図5. 隔離ほ場試験（屋外A）のバラ配置図

※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。）

屋外B1、B2、B3

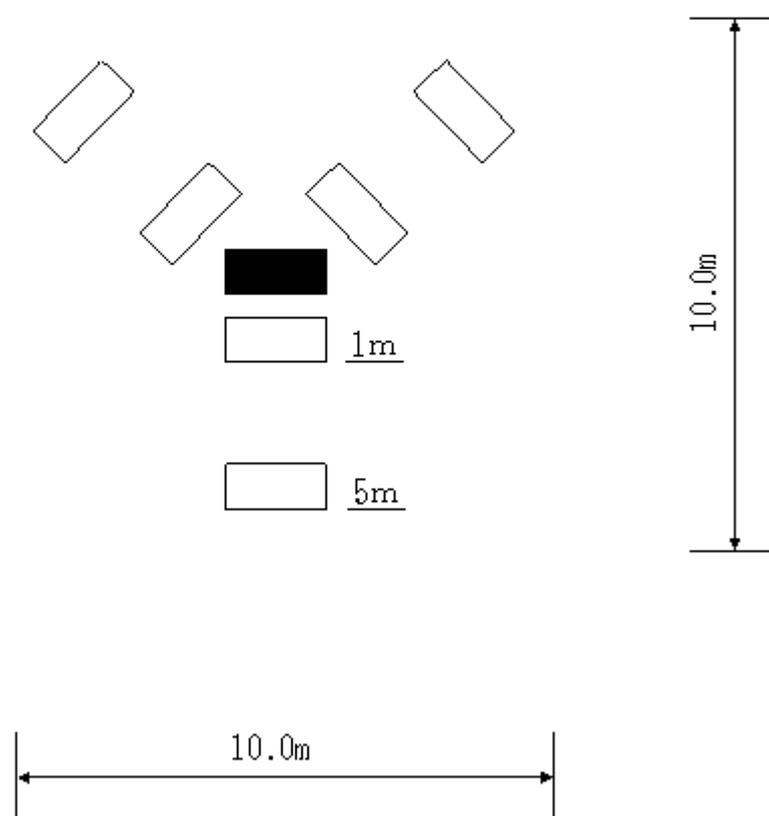
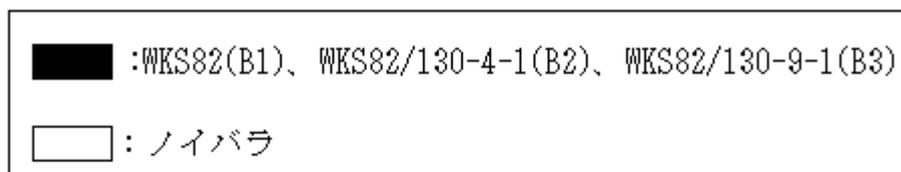


図6. 隔離ほ場試験（屋外B1、B2、B3）のバラ配置図

※WKS82/130-4-1 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。）

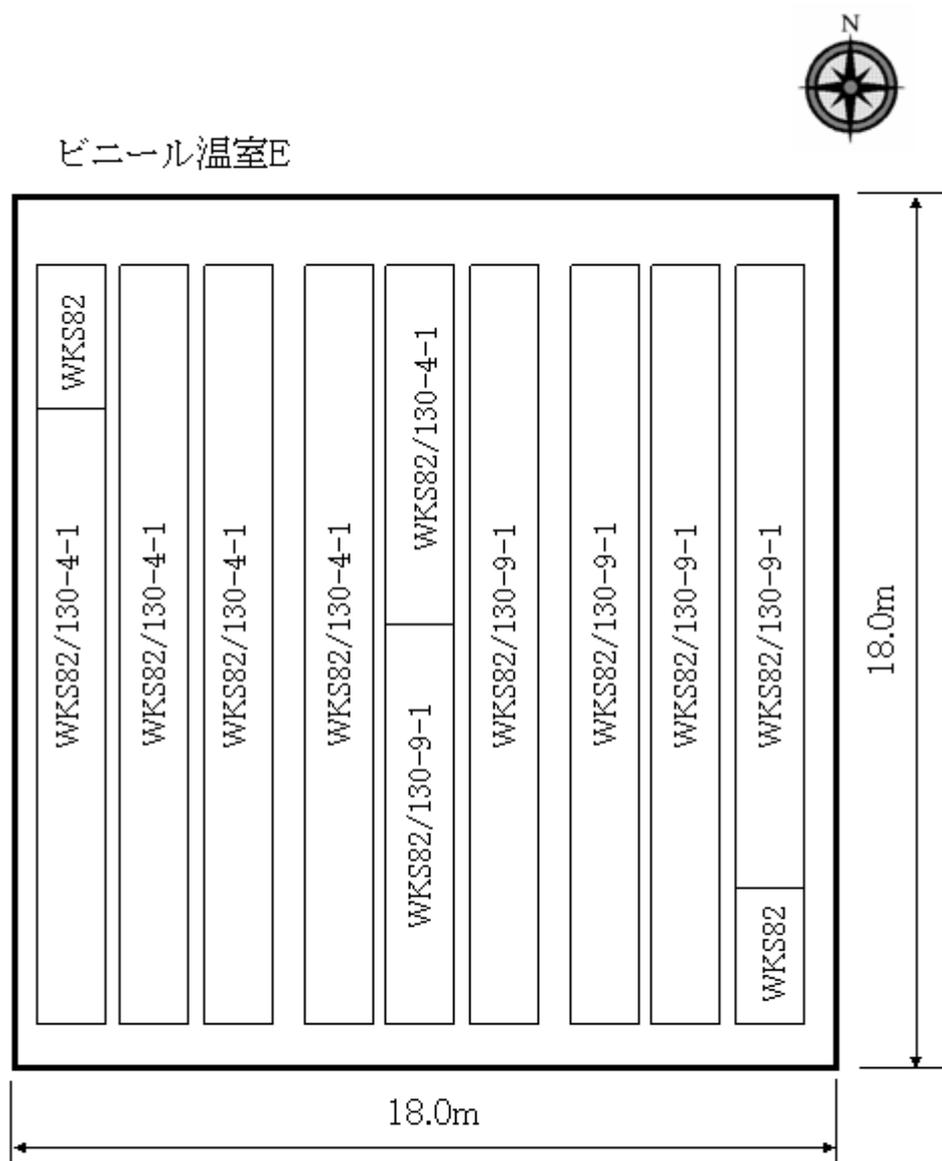


図7. 栽培条件検討試験(ビニール温室E)のバラ配置図

※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。

※WKS82/130-4-1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。)

「 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 WKS82/130-9-1 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。)

Permit: 200405067

Page 2 of 2

Condition: Condition Text

4. Transport receptacles must be sterile and rigid; and must be of a visually clear construction to allow inspection of the cultures and media.
5. Growth media must be clear, sterile and not liquid; and it must have been introduced into the containers prior to tissue implantation and growth.
6. Material and growth media must be free from disease symptoms and other extraneous contamination.
7. Growth media must not contain antibiotics or other microbial suppressants.
8. Transport receptacles must be labelled with the botanical name of the plants and the genetic modification.
9. Airfreight or mail shipments should have all documentation (eg. permit or permit number, invoice, manufacturer's declarations and certification where applicable) securely attached to the outside of the package and clearly marked "Attention Quarantine". Alternatively, necessary documentation will need to be presented to AQIS at the time of clearance.
10. All work with the imported plant material, subsequent plant material and any progeny is to be conducted in accordance with the Institutional Biosafety Committee and the OGTR's requirements for the proposed genetic manipulation work.
11. The importer is responsible for payment of all associated AQIS fees and charges.
12. Material must be presented to AQIS on arrival for inspection.
13. All cultures including their growth media must be visually inspected on arrival for signs of fungal and/or bacterial contamination.
14. Contaminated cultures are not to be released from quarantine. If the consignment is contaminated, the importer must be notified and given the option of re-export, destruction or having the contamination identified at their expense.
15. If all of the above conditions are met the material may be released from quarantine to be used in accordance with the relevant OGTR's NLRD regulations. Any proposed release of these species into the environment must also be conducted in accordance with OGTR regulations.
16. On release from quarantine all imported material must be held and used at an OGTR approved PC2 glasshouse and shall not be removed from these premises until a full risk assessment and risk management plan has been developed by OGTR in accordance with the Gene Technology Act 2001.

End of Condition Text

Authorising Officer (for Director of Quarantine)
Printed Name Margaret Allan **Date** 17 Mar 2004