

青紫色ファレノプシス (*CcF3'5'H*, *Phalaenopsis* Wedding Promenade) (311)

申請書等の概要

[目次]

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	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
①和名、英名及び学名	4
②宿主の品種名又は系統名	4
③国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(2) 使用等の歴史及び現状	5
①国内及び国外における第一種使用等の歴史	5
②主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	6
(3) 生理学的及び生態学的特性	7
イ. 基本的特性	7
ロ. 生息又は生育可能な環境の条件	8
ハ. 捕食性又は寄生性	8
ニ. 繁殖又は増殖の様式	8
ホ. 病原性	13
ヘ. 有害物質の産生性	13
ト. その他の情報	13
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
イ. 構成及び構成要素の由来	13
ロ. 構成要素の機能	17
(2) ベクターに関する情報	21
イ. 名称及び由来	21
ロ. 特性	21
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	22
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	22
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	22
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	22

(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	25
(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	27
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	27
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	31
(1) 使用等の内容	31
(2) 使用等の方法	31
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における 情報収集の方法	32
(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	32
(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	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	33
1. 競合における優位性	33
2. 有害物質の産生性	34
3. 交雑性	35
4. その他の性質	38
第三 生物多様性影響の総合的評価	39
引用文献	41
緊急措置計画書	46
モニタリング計画書	49
隔離ほ場試験計画書	52
添付資料リスト	74

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 3 月 2 日

農林水産大臣

山本 有二 殿

環境大臣

山本 公一 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学

学長 永田 恭介 印

住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号

氏名 株式会社インプラントイノベーションズ

申請者

代表取締役社長 高根 健一 印

住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番 1

氏名 石原産業株式会社

代表取締役社長 田中 健一 印

住所 大阪府大阪市西区江戸堀一丁目 3 番 15 号

第一種使用規程の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、次の通り申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	青紫色ファレノプシス（ <i>CcF3'5'H</i> , <i>Phalaenopsis</i> Wedding Promenade）（311）
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：茨城県つくば市天王台一丁目1番1号 名 称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場Ⅲ（隔離ほ場） 使用期間：承認日から平成35年3月31日まで 1. 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入を防止するため、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) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えファレノプシスの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該ファレノプシス植物体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) 本組換えファレノプシスの植物体が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。なお、調査、作業等のために防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再度設置する。 (5) 本組換えファレノプシスの栽培は鉢で行い、越冬性、越夏性試験以外の調査はビニール温室を設置して行う。 2. 隔離ほ場での作業要領 (1) 本組換えファレノプシス及び比較対照の非組換えファレノプシス以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。 (2) 本組換えファレノプシスを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ファレノプシスが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) ファレノプシスに自然条件下での栄養繁殖性はないため、(2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えファレノプシスの栽培終了後は、当該ファレノプシス及び比較対照の非組換え

	ファレノプシスの根を含めた植物体全体を細断して隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。ただし、花及び果実（さく果）については、オートクレーブで不活化後、廃棄する。 (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、意図せずに本組換えファレノプシス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に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (7) 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には、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
--	--

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

5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名： ファレノプシス

10 英名： *Phalaenopsis*, moth orchid

学名： *Phalaenopsis* Wedding Promenade

② 宿主の品種名又は系統名

15 宿主の *P. Wedding Promenade* (ウエディングプロムナード) 'PP3387'は、4 倍体の園芸品種 *P. Cosmetic Art* (コスメティックアート¹) と 2 倍体野生種 *P. equestris* (Schauer) Rchb.f.の交配種から選抜された 3 倍体品種である。形質は、ミディー系²で、花色は赤紫色、リップ³は濃赤紅色、花径は 6~7cm で、1 本の花茎に 10~15 輪の花を持つ (内田, 2001)。

20 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

近年、様々なラン科植物の遺伝子情報が集積したことを受け、英国王立園芸協会では、これらの情報に基づいたラン科植物の再分類が行われた。その結果、*Doritis* 属、*Kingidium* 属及び *Sedirea* 属が *Phalaenopsis* 属に編入された (Schuiteman *et al.*, 2014)。ファレノ
25 プシスの園芸品種は、この旧 *Phalaenopsis* 属と旧 *Doritis* 属に属する野生種の交雑によって作られてきた。現在の *Phalaenopsis* 属には 45~50 種が属しており、ファレノプシス野生種は、インド、中国南部、韓国、日本、タイ、インドシナ、マレーシアを含む地域から、インドネシア、フィリピン、オーストラリア北部、ニューギニアを含む地域まで広く自生

¹ コスメティックアートは 2 種のファレノプシス園芸品種 (*Phalaenopsis* Pink Parfait × *P. Abendrot*) の交配によって作出された (英国王立園芸協会「The International Orchid Register」)。この 2 種の園芸品種の交配親もファレノプシス園芸品種であり、何代にも亘って園芸品種同士の交配が繰り返されて作出されている。現在、コスメティックアートは入手困難なため倍数性を確認していないが、ファレノプシスの安定した稔性を持った大輪系園芸品種は 4 倍体であることが知られており、コスメティックアートは大輪系園芸品種の交配親として汎用されているため、4 倍体と考えられる。さらに、ウエディングプロムナードが 3 倍体であることを確認 (別添資料 5、P18~19) しており、このことからコスメティックアートは 4 倍体と考えられる。

² ファレノプシスの園芸品種は、一般的には花径が 10cm 以上の大輪系と 7~8cm より小さいミニ・ミディー系に分けられる。

³ ラン科植物の 3 枚の花弁の中で、下側にある 1 枚の花弁は媒介昆虫が着地しやすい特殊な形に進化しており、リップと呼ばれている。

している (Wood *et al.*, 2014)。

我が国には、ファレノプシスのラン科近縁野生種として、ナゴラン (*Phalaenopsis japonica* (Linden & Rchb. f.) Garay et H. R. Sweet)、フウラン (*Vanda falcata* (Thunb.) Hu)、ボウラン (*Luisia teres* (Thunb.) Blume)、ムニンボウラン (*L. occidentalis* Lindl)、

5 サガリラン (*Diploprora championii* (Lindl) Hook. f.)、カヤラン (*Thrixspermum japonicum* Rchb. f.)、マツゲカヤラン (*Gastrochilus ciliaris* F. Maek)、カシノキラン (*G. japonicus* (Makino) Schltr)、ベニカヤラン (*G. matsuran* (Makino) Schltr)、モミラン (*G. toramanus* (Makino) Schltr)、ムカデラン (*Cleisostoma scolopendrifolius* (Makino) Garay)、イリオモテラン (*Trichoglottis luchuensis* (Rolfe) Garay et H. R. Sweet)、ジン

10 ヤクラン (*Arachnis labrosa* (Lindl. et Paxt.) Rchb. f.) の 13 種が本州から四国、九州地域に自生している (中島, 2012)。また、我が国において、自然環境下で園芸品種が自生化したという報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

15

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

18 世紀の中ごろに原産地である東南アジアから欧州へ持ち込まれたのが、ファレノプシスの園芸植物としての歴史の始まりとされ、1825 年にファレノプシス属として正式に登録

20 されている。しかし、冷涼な欧州では栽培が難しく、温室を持つ一部の上流家庭でのみ観賞されていた。また、胚乳を持たないファレノプシスの種子は、発芽させることが難しく、当初は交配育種もあまり進まなかった。しかし、1920 年代、糖を含んだ寒天培地で発芽することが解り、欧州に続いて米国で育種が進み、Doris など 4 倍体で大輪・肉厚の切花に適した品種が育成され、1930 年代以降、白色大輪系を中心に切花商業生産が始まった

25 (Griesbach *et al.*, 2002)。

その後、1960 年代に入ると住宅環境の改善もあって、切花から鉢物へのシフトが起こった。また、1970 年代以降、微細増殖法によるクローン苗の調製に関する研究が進み、均一で高品質な鉢物を比較的安価に生産できる品種も出現した (Griesbach *et al.*, 2002)。さらに、様々な野生種との交配の結果、ミニ、ミディー、大輪など様々な大きさの花を持った

30 品種が揃い、花色も白色、紅色、黄色などバラエティに富む品種が開発された。現在では、オランダ、ドイツ、中国、台湾など多くの国で鉢物の大規模な商業栽培が行われている。

日本へは、明治時代の末に英国より入ってきたが、その栽培は、温室を備えた極一部の

上流家庭に限られていた。戦後、昭和 30 年代になって、米国から実生苗を輸入し、一部の

地域で商業栽培が始まった。昭和 50 年代になると切花生産が各地に広がり、白花を中心に

35 交配育種も進んだ (長友ら, 1993)。その後のバブル景気の進展と共に、高級な鉢物としての需要が増大し、鉢物生産が急速に増加した。バブルの崩壊により法人需要などは減少し

たが、個人の高級なギフトとしての用途が広がり（渡辺, 2001）、流通量は洋ランの中で最多となっている（市村, 2013）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

ファレノプシスの商業栽培は全て施設栽培で行われ、周年出荷されている。平成 18 年、全国のファレノプシス鉢物栽培施設の総面積は 70.5ha、総出荷量は 642 万鉢であった（農林水産省, 2008 年）。県別では、愛知県が 16.5ha と最も多く、全国の約 1/4 を占めている。その他、福岡（7.6ha）、宮崎（5.6ha）、徳島（3.6ha）などの九州・四国地方及び埼玉（6.7ha）、
10 栃木（4.3ha）などの東京周辺地域での栽培が多い。また、亜熱帯に属する沖縄においても、2.3ha の施設で栽培されている。他のランと同様に、ファレノプシス栽培においても、実生
15 或いは組織培養によるフラスコ苗の生産、開花可能な苗までの栽培、開花させた最終鉢物生産の各段階を異なった専門業者が行う、いわゆる「リレー栽培」が一般化している。国内のみならず、台湾を始めとする海外の生産者から、開花直前の株を購入して栽培する生
産者も多い。ファレノプシスは鉢物或いは切花として流通しているが、生産者は、農協などによる共同出荷ではなく、直接花き市場へ出荷するが多い。その後、仲卸業者を介
して、あるいは直接、生花店や量販店へ流通し、最終的に消費者へと販売される。

海外での主要な栽培地域としては、まず、台湾が挙げられる。温帯な気候の台湾は、ファレノプシスの栽培に適しており、元々、趣味家向けの育種や生産が行われていたが、1990
20 年代後半になると日本や米国向けの苗の需要が高まり、生産が拡大した。2000 年代に入ると、さらに欧州への苗の出荷も増大し、2005 年時点で、台湾全体の栽培面積は 170ha 以上となっている（新井ら, 2011）。欧州においては、他の花き同様、オランダが主要な生産国となっており、「オランダ花き輸出戦略調査報告書」（農林水産省, 2009 年）によれば、オ
25 ランダ花き卸売市場に出荷されたファレノプシスは 4,500 万鉢に達している。オランダのファレノプシス生産の特徴は、リレー栽培と大規模経営による高い生産性にある。省力化や厳格な栽培管理により生産された一定の規格の安価で大量な苗は世界中に供給されてい
る（永田, 1993）。

前述のように、初期の育種で貢献した米国においては、1990 年代前半までは一部の趣味家向けの栽培に留まっていた。しかし、1990 年代後半になると、一般消費者向けの生産も
30 始まり、台湾やオランダから苗を輸入し、ファレノプシスを含む洋ランを年間数百万鉢出荷するラン生産者も出現した（新井ら, 2011）。詳細な統計資料はないが、2000 年のファレノプシス市場は 7,500 万ドル以上と推定されている（Griesbach *et al.*, 2002）。

海外からは、苗及び切花のファレノプシスが輸入されており、中でも苗の輸入量は、年間 900 万株以上となっている。一方、上記のように、国内ファレノプシス鉢物総出荷量は、
35 平成 18 年のデータで、642 万鉢であった。鉢物としての出荷には 2 株以上を寄せ植えする
場合が多いことを考慮しても、苗の多くを輸入に頼っている状況が見える。なお、輸入苗

の8割は台湾から輸入されている（日本花き生産協会, 2013 年）。

（3）生理学的及び生態学的特性

5 イ．基本的特性

ファレノプシスは、岩生性、着生性の多年生、単茎性のラン科植物。根は円柱状又は扁平。茎は葉の一部のような状態で、何重にも重なる葉によって蔽われ、ほとんどのものは基部に集まっている。葉は、互生、二列性で多肉。落葉することもあるが、基本的に常緑。長楕円形のものから幅広の楕円形のものまである。時にはまだら模様、或いは紫色や銀色の着色が見られるものもある。花序は総状又は複総状。花茎は直立したものから垂れ下がったものまである。花茎は円柱状又は左右対称な扁平。極まれに、花柄のところが膨らんでいるものもある。花の包葉は一般的に小さくて目立たず、丈夫な多肉あるいは紙状。花は1つの花茎に1〜30個が付き、背着性⁴である。それらの花は同時あるいは順々に開花し、多くの場合、開花期間は長い。芳香を持つものもある。花の模様は無地のもの、斑点を持つもの、まだら模様のもの、縞模様のものなど様々。花は3枚の花弁と3枚のがく片から成るが、花弁は横向きの2枚の花弁（ペタル）と下側のラン科植物に特有な花弁（リップ）に分けられる。リップにはカルスと呼ばれる多肉質の1〜3個の突起があり、縦に、まれに横に並んでいる。花の中央には、ずい柱と呼ばれる雄ずいと雌ずいとが融合した器官があり、その先端には2或いは4個の花粉塊が、葯帽に蔽われ、花粉塊柄と小嘴体⁵からなるリボン状の粘着体に付着した状態で存在する。花柄の部分に子房があり、円柱状で6個の浅い溝がある（Wood *et al.*, 2014、図1）。

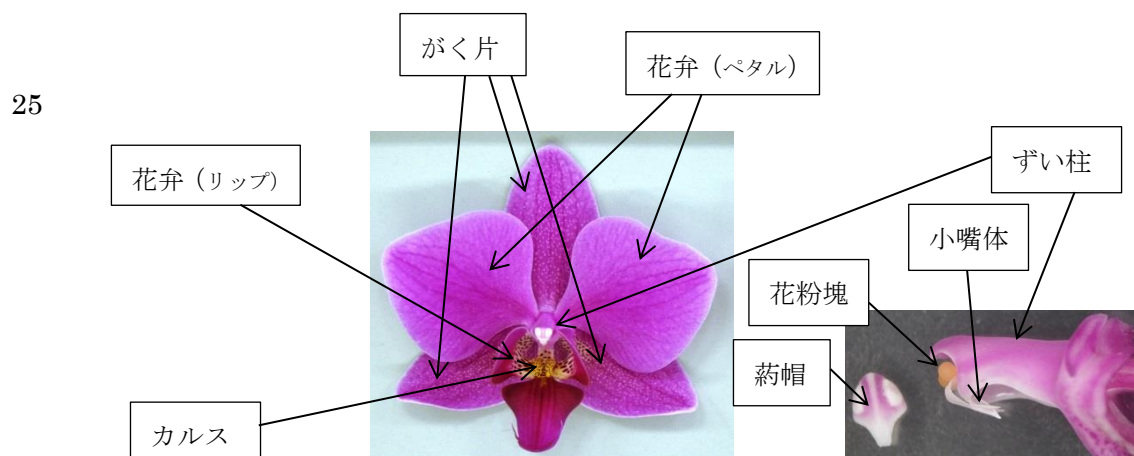


図1 ファレノプシスの花および葯帽を外したずい柱の拡大図

⁴ 開花時に花柄がねじれ、花が一定の向きになるように回転すること。

⁵ しょうしたい。ずい柱にある鳥の嘴に似た形状の小突起。

ファレノプシス園芸品種は、一般的に花径が 10cm 以上の大輪系と 7~8cm より小さなミニ・ミディー系に分けられるが、何れも 1 つの花茎に 10~15 輪の花を付ける。花色は白色が中心だが、紅色、ピンク、黄色、緑色などがあり、また、白弁赤リップと呼ばれるがく片及び花弁が白色でリップが紅色の品種などもある。さらに、無地のものだけでなく、まだら、ストライプ、斑点のあるものなど、様々な模様の品種もある。実生あるいは組織培養によるクローン増殖で生産され、初期には培養器中のフラスコ内で育てられる。その後、鉢上げされ、温室で栽培される。鉢上げ後、2 年程度で花をつけるが、一般的に、花茎は、25℃以下の温度に一定期間さらされなければ形成されない（渡辺, 2001）。

宿主のウエディングプロムナードは、ミディー系で、花色は赤紫色。花茎は 60cm 程度にまでなり、弓状に伸びる。花序は総状。花径は 6~7cm で、1 本の花序当り 10~15 輪をつける。強健種で生育が早い（内田, 2001）。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

ファレノプシス野生種の多くは、年間を通して温暖で湿潤な地域に生育しているが、*P. cornu-dervi* のようなモンスーン地域の種では季節的な乾季にも適応している。また、ファレノプシス属の亜属 *Aphyllae* や *Parishianae* のようなヒマラヤの種では、季節的な乾燥だけでなく低温にも適応している（Wood *et al.*, 2014）。

ファレノプシス園芸品種の生育適温は、21~30℃の範囲と考えられている。その中で、26~27℃前後を限界温度として、28℃以上の高温では花茎発生が抑制され、25℃以下の低温では花茎が誘導される。15℃以下では、生育障害が起こる場合がある。ファレノプシスは地上部に露出する気根を持っており乾燥には比較的強いとされているが、乾燥によって生育は著しく抑制される。特に、CAM 型光合成を行うファレノプシスでは、夜間の高湿度条件が生育を促進する。ただし、嫌気的条件下に曝された気根は根腐れを起こす危険性があり、水管理は適切に行うことが重要となる（市橋ら, 1993）。

日本に唯一自生するファレノプシスであるナゴランは、本州南部、九州、琉球列島に自生（中島, 2012）している。これらの地域では、比較的低温に対して耐性のある園芸品種のファレノプシスは生育可能と思われるが、これまでに、国内で園芸品種のファレノプシスが野生化したとの報告はない。

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

ファレノプシスは、他のラン科植物で報告されているような自家受粉を妨げる機構は知られておらず、自家及び他家受粉共に可能である。

- 5 また、種子繁殖性で、後の項で詳述するように、花との共進化が推察される特異的なハチ目昆虫によって受粉が行われる（第一・1・(3)・ニ・④・c、P12）。受粉の数ヵ月後、子房部分が生長したさく果と呼ばれる果実の中に、数万個の 1mm 以下の小さな種子ができる。成熟すると、さく果は黄変し、下部の一部が裂開し、種子が落下する。落下した種子は主として風により広く運ばれる。種子の貯蔵性は良くないが、完全に乾燥させた状態で
- 10 は 1 年間程度は保存できる（市橋ら, 2006）。休眠性については知られていない。

- 前述（第一・1・(2)・①、P5）のように、ファレノプシスの種子は胚乳を持たないため、通常の培土上で発芽させることは難しいが、糖を含んだ培地上では発芽可能であり、条件を整えば 80%以上の種子が発芽する（Balilashaki et al, 2015）。自然環境においては、着生した樹上などで、ラン菌と呼ばれる共生菌から養分を供給された場合にのみ発芽する
- 15 （市橋ら, 2006）。

- 宿主のウエディングプロムナードにおいては、3 倍体であるため種子繁殖は行われず、花茎腋芽等の組織培養によるクローン増殖によって生産されている。また、このクローン増殖の過程で、体細胞培養変異によって、花や花茎に変異を生じ易いことが報告されている（Tokuhara and Mii, 1998）。

20

② 栄養繁殖の様式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

- 人為的には、様々な組織からのクローン増殖が可能だが、自然条件下では、休眠していた葉の腋芽が芯止めによって出芽する場合や花茎の腋芽から出芽する場合など、ごく稀にしか生じないため、栄養繁殖は行わない。
- 25

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

30

a. 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無

 自動自家受粉の仕組みはなく、自家不和合性もないため、虫媒により他殖及び自殖する。

35 b. 近縁野生種との交雑性

(a) 日本に自生する近縁野生種

日本に自生する近縁野生種は以下の 13 種が知られている (中島, 2012)。それぞれの自生地及び生育環境等を下に記す。

5

- ・ナゴラン (*Phalaenopsis japonica* (Linden & Rchb. f.) Garay et H. R. Sweet)

本州南部、九州、琉球列島。暖地、亜熱帯の常緑広葉樹林内樹上に着生。

- ・フウラン (*Vanda falcata* (Thunb.) Hu)

10

本州、四国、九州 (種子島、屋久島を含む)、琉球列島。常緑広葉樹林内の樹木や岩上に着生。

- ・ボウラン (*Luisia teres* (Thunb.) Blume)

本州、四国、九州 (屋久島、種子島を含む)、琉球列島。暖かい地方や亜熱帯の樹木や岩上に着生。

- ・ムニンボウラン (*L. occidentalis* Lindl)

15

小笠原諸島。亜熱帯樹林の樹木に着生。

- ・サガリラン (*Diploprora championii* (Lindl) Hook. f.)

琉球列島 (奄美大島)。暗い湿った林内の枝に着生。

- ・カヤラン (*Thrixspermum japonicum* Rchb. f.)

本州西南部、四国、九州。山の常緑樹林内、樹上、枝や岩上に着生。

20

- ・マツゲカヤラン (*Gastrochilus ciliaris* F. Maek)

九州 (屋久島を含む)。杉林の枝に着生。

- ・カシノキラン (*G. japonicus* (Makino) Schltr)

本州、四国、九州 (屋久島を含む)、琉球列島。常緑樹林の樹上に着生。

- ・ベニカヤラン (*G. matsuran* (Makino) Schltr)

25

本州太平洋側、四国、九州。暖地、亜熱帯の常緑樹林内の樹上に着生。

- ・モミラン (*G. toramanus* (Makino) Schltr)

本州南部、四国。低山の常緑樹林内の樹上に着生。

- ・ムカデラン (*Cleisostoma scolopendrifolius* (Makino) Garay)

本州 (関東以西、南部)、四国、九州。日当たりのよい樹幹や岩上に着生。

30

- ・イリオモテラン (*Trichoglottis luchuensis* (Rolfe) Garay et H. R. Sweet)

尖閣列島、西表島、石垣島。亜熱帯樹林の樹上に着生。

- ・ジンヤクラン (*Arachnis labrosa* (Lindl. et Paxt.) Rchb. f.)

石垣島。常緑樹林内の樹木に着生。

35

(b) 近縁野生種と園芸品種との自然条件下での交雑性

我が国の自然条件下において、ファレノプシスの園芸品種と我が国に自生する近縁野生種が交雑し雑種が定着した事例は報告されていない。

(c) 近縁野生種と園芸品種との人為的交雑性

5

日本に自生する近縁野生種と *Phalaenopsis* 属園芸品種との交雑によって作出された品種を調査した（2015 年 11 月、英国王立園芸協会「The International Orchid Register⁶」検索）。その結果、近縁野生種 3 種と園芸品種との組合せによる交雑種が登録されていた（表

10 表 1 近縁野生種（ナゴラン、フウラン、ボウラン）と園芸品種を含む *Phalaenopsis* 属との人為的交雑性

種子親	花粉親
<i>Phalaenopsis japonica</i>	<i>P. Leda</i> <i>P. amabilis</i> <i>P. marriotiana</i>
<i>P. pulcherrima</i> <i>P. hygrophila</i> <i>P. schilleriana</i> <i>P. Kyoto</i>	<i>P. japonica</i>
<u><i>Vanda falcata</i></u>	<i>P. Veitchiana</i> <i>P. cornu-cervi</i> <i>P. equestris</i> <i>P. schilleriana</i> <i>P. philippinensis</i> <i>P. Siam Treasure</i> <i>P. Chieftain</i> <i>P. japonica</i>
<i>P. Tying Shin Blue Jay</i> <i>P. Purple Martin</i> <i>P. pulcherrima</i>	<i>V. falcata</i>
<i>Luisia teres</i>	<i>P. japonica</i>
<i>P. Red Coral</i> <i>P. Little One</i> <i>P. japonica</i>	<i>L. teres</i>

⁶ <http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/parentageresults.asp>

1、P11)。

その他の日本に自生する近縁野生種と *Phalaenopsis* 属との交雑品種は知られていない。

c. アポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

5

ファレノプシスの園芸種にはアポミクシスを生じる特性は知られていない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 a. 花粉の生産量及び形状

数万個以上の花粉の集合体である花粉塊を形成し、1つの花当たり通常2個、稀に4個の花粉塊を持っている。花粉塊を酸や酵素で処理しない限り、個々の花粉粒が遊離することではなく、また、酸や酵素で分離した場合でも、花粉は強固に固着した四分子の状態で観察される (Brown and Lemmon, 1991; Zhang and O'Neill, 1993)。

15

b. 花粉の稔性

初期に育種されたファレノプシス園芸品種の大輪系は、4倍体品種群で、多くが安定な稔性を持つ。一方で、本組換え体の宿主であるウエディングプロムナードのような、4倍体品種と2倍体野生種との交配で作出された中輪系品種は、3倍体品種であり、稔性は極めて低い (青山, 1993)。3倍体ファレノプシスの花粉稔性に関する詳細な研究は知られていない。

20

c. 花粉の媒介方法

25

ファレノプシス野生種の花は昆虫により媒介される。国外において、*Phalaenopsis amabilis* はクマバチによって、芳香を持つ *P. bellina* や *P. sumatrana* はクマバチよりも小型のハチによって媒介される (Wood *et al.*, 2014)。中国ハイナン島の *P. pulcherrima* の観察では、「数種の昆虫が訪花するものの、*Amegilla nigrilar* に属する特定のハチによってのみ受粉が成功した。」ことが報告されており、品種ごとに媒介する昆虫に特異性が存在し、特に媒介昆虫と花の大きさには厳密な相関があるものと考えられている (Xiaohua *et al.*, 2012)。

30

国内に唯一自生しているナゴラン (*P. japonica*) に関しても、北九州市で実施された訪花昆虫の調査では、トラマルハナバチが媒介昆虫として同定されているが、同時期に訪花した少し大きなクマバチでは、花粉媒介は観察されなかった (Suetsugu and Tanaka, 2013)。

35

このような花と昆虫の特異的な関係は、虫媒花全般で見られる現象ではないが、ラン科

植物では、共進化を示す事例として、しばしば報告されている。熱帯アメリカ（メキシコ南部からブラジルに至る地域）産のランは種毎に異なるにおい物質（odor substance）を産生するが、それらの花粉を媒介する雄のシタバチは種毎に特定のランの匂いに引きつけられるため、同じ場所に自生していても、ランの種毎に特定の種のシタバチを誘引し、ランの種間交雑が避けられている。また、カラフトアツモリソウの場合、トラップされたハチが抜け出すためにトンネルを通過する際に、花粉塊が背中に付くが、トンネルの径に適した大きさのハチにのみ花粉塊は付着し、そのハチが同じ径のトンネルを持つ同種のランを訪花した場合にのみ、受粉が成立する（バルト, 1997）。

ファレノプシスの媒介昆虫と推定されるハチ目昆虫が識別できる花色について、ミツバチは赤色を識別できないが、青色を含む黄色から紫外領域の色までを知覚できることが知られている（フリッシュ, 1975）。また、訪花昆虫の観察記録の分析から、それぞれの昆虫ごとに訪れる花の色に一定の偏りがあり、ミツバチやマルハナバチなどミツバチ科のハチは紫色の花を好んで訪れる傾向が観察されている（田中, 1993）。

15 d. 花粉の飛散距離及び寿命

ファレノプシスの花粉は花粉塊として存在しているので、風で広範囲に飛散することはない。寿命は、開花期間（1 ヶ月程度）は安定なものと思われ、シリカゲルと共に密閉した状態で、3℃で保存した場合、3 ヶ月後も 50%以上が生存していたとの報告がある（米田ら, 1993）。

ホ. 病原性

—

25

へ. 有害物質の産生性

ファレノプシスの園芸品種はこれまでに長期間の使用等の経験があるが、我が国を含めて有害物質を産生するとの報告はない。

30

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

5 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表 2 (P14～15) に示す。また、それらの位置関係を図 2、図 3 (P16) に、その塩基配列を別添資料 1 図 1-1-1 (P1～21) に示した。

10 表 2 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 (<i>CcF3'5'H</i>) 発現カセット		
<i>P35S</i>	367	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の <i>35S RNA</i> 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するために必須の構成要素である。CaMV のゲノムは環状二本鎖 DNA で、宿主植物の遺伝子発現系を利用して増殖するために必要な遺伝子を有している。このゲノムにコードされる <i>35S RNA</i> のプロモーターは強力で、植物体のほとんど全ての器官で、何れの成長段階でも強く発現するため、外来遺伝子を植物で発現させる際によく用いられる (Mitsuhara <i>et al.</i> , 1996)。
<i>TMVΩ</i>	59	タバコモザイクウイルス (TMV) ゲノムの 5'非翻訳領域の配列で、オメガ配列と呼ばれ、この配列を 5'末端に持ったキメラ mRNA は効率よく翻訳される (Gallie and Walbot, 1992)。
<i>CcF3'5'H</i>	1,524	ツユクサ (<i>Commelina communis</i> L.) 由来のフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 cDNA。この cDNA にコードされる酵素はジヒドロフラボノールの B 環の 3'及び 5' 位を水酸化する酵素で、ナリゲニンあるいはエリオジクチオールを 5, 7, 3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラバノンへ、また、ジヒドロケンフェロールあるいはジヒドロケルセチンをジヒドロミリセチンへ変換する (Holton <i>et al.</i> , 1993)。本組換え体の目的遺伝子である。
<i>T35S</i>	557	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の <i>35S RNA</i> の 3'非翻訳領域で、転写終結及び mRNA のポリ A 付加配列を含み、上流の遺伝子の転写を終結させる (Pietrzak <i>et al.</i> , 1980)。

<i>HPT</i> 発現カセット		
<i>P35S</i>	423	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の <i>35S RNA</i> のプロモーター領域。 <i>CcF3'5'H</i> 発現カセットの <i>P35S</i> よりも 50bp 程度長い配列となっている。
<i>HPT</i>	1026	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来のハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子。本酵素はハイグロマイシン B をリン酸化し、不活化する。そのため、本酵素を発現する植物細胞はハイグロマイシン B 耐性となる (Gritz and Davies, 1983)。この機能を利用して、 <i>HPT</i> 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として汎用されている。本組換え体の選抜に利用した。
<i>TNOS</i>	1125	リゾビウム・ラディオバクター (アグロバクテリウム、 <i>Rhizobium radiobacter</i>) 由来の Ti プラスミドのノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写終結及び mRNA のポリ A 付加配列を含み、上流の遺伝子の転写を終結させる (Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
<i>RB</i>	162	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobacter</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Right-border)。一部は組換え体に挿入されていない (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
<i>LB</i>	148	リゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobacter</i>) 由来の T-DNA 境界配列 (Left-border)。一部は組換え体に挿入されていない (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外側骨格領域 (本組換えファレノプシスには存在しない) (Frisch <i>et al.</i> , 1995)		
<i>traF</i>	784	RK2 プラスミド由来。プラスミド転移に必要な配列。
<i>ori V</i>	618	RK2 プラスミド由来の複製開始点。宿主域が広く、大腸菌 (<i>E. coli</i>) 及びリゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobacter</i>) 中でのプラスミドの複製・維持に働く。
<i>APHIII</i> 5' non-coding	351	乳酸菌 (<i>Streptococcus faecalis</i>) 由来のアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子の 5'非翻訳領域。
<i>IS1</i>	770	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来の転移性因子 1。
<i>APHIII</i> coding	993	乳酸菌 (<i>S. faecalis</i>) 由来のアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子のコーディング領域。本酵素はカナマイシンをリン酸化し、不活化する。大腸菌 (<i>E. coli</i>) 及びリゾビウム・ラディオバクター (<i>R. radiobacter</i>) で選抜マーカーとして使用される。
<i>trfA</i>	1482	RK2 プラスミド由来。 <i>ori V</i> が機能するために必要な遺伝子。

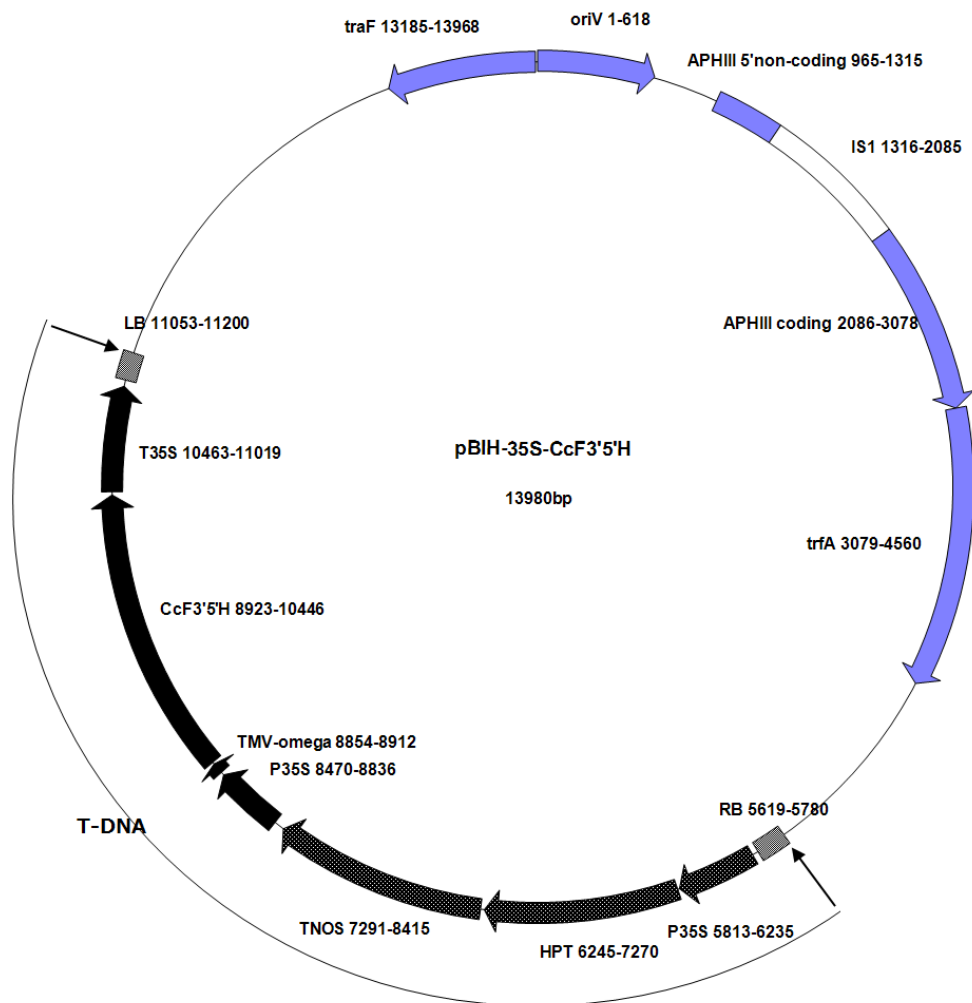


図 2 発現ベクターpBIH-35S-CcF3'5'H の構成図

構成要素の右側の数字は、oriVの最初の塩基を1とした時の各構成要素の位置 (bp) を表わす。

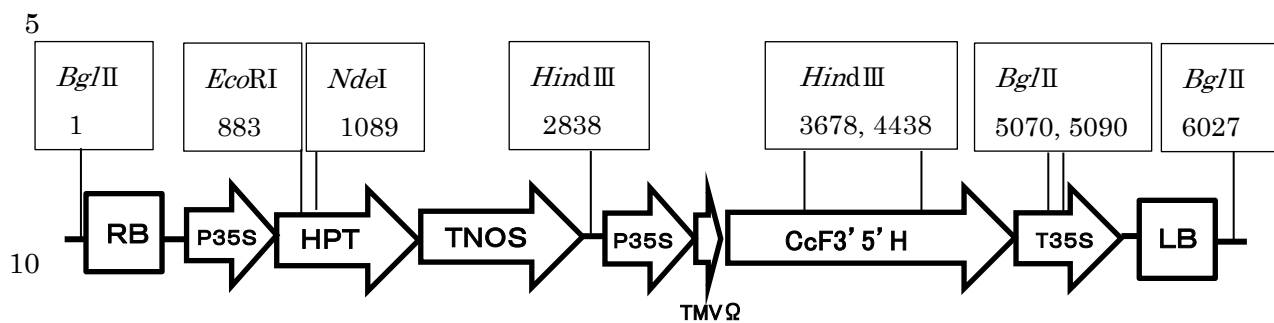


図 3 pBIH-35S-CcF3'5'H の T-DNA 領域の構造

制限酵素名の下に数字は、T-DNA 境界領域の右側配列近傍の *Bgl*II 認識配列の最初の塩基を1とした時の各制限酵素認識配列の位置 (bp) を表わす。

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、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

5

本組換えファレノプシスの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 (P14～15) に示した。

- ② 目的遺伝子及び選伐マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性（食品としてのアレルギー性を除く。）を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

10

【ツクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素蛋白質】

- 15 花色を決定する色素の一つであるアントシアニンは、フラボノイドの配糖体で、そのアグリコン（アントシアニジン）の構造によって、橙がかった赤色から青味がかった紫色までの幅広い色を発色する。つまり、アントシアニジンが、B 環の水酸基が 1 個であるペラルゴニジンであれば橙がかった赤色を呈し、B 環の水酸基が 2 個であるシアニジンであれば紫がかった赤色となり、B 環の水酸基が 3 個であるデルフィニジンであれば青味がかった紫色となる。したがって、花卉に含まれるアントシアニン中のアントシアニジンの種類と量が花色の重要な決定要因となる。

20

このアントシアニンの生合成経路の多くは高等植物に共通で、その一部を図 4 (P19) に示す (Holton and Cornish, 1995)。この図から明らかなように、アントシアニジンの種類は、花卉中のフラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3'H) 及びフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 (F3' 5'H) 活性の有無によって決定される。つまり、両酵素が共に無ければペラルゴニジンのみが蓄積し、F3'H のみがあればシアニジンも生合成され、F3' 5'H が存在すればデルフィニジンも産生されることとなる。図 4 (P19) では、アントシアニジン 3'-グルコシドまでしか記載していないが、このアントシアニジン 3'-グルコシドは液胞に運ばれた後、配糖化酵素やアシル化酵素によって修飾され、それぞれの植物に特有なアントシアニンとなる。

25

- 30 本組換え体の宿主であるウエディングプロムナードと同様に赤紫色の花を咲かせるファレノプシスでは、アシル化されたシアニジントリグルコシドのみがアントシアニンとして検出されている (Tatsuzawa *et al.*, 1997)。申請者らの分析においても、ウエディングプロムナードのアントシアニジンとしてはシアニジンのみが検出された。したがって、これらのファレノプシスの花卉中には F3'H のみが存在し、F3' 5'H 活性はないものと推察される。
- 35 また、シンビジウムでは、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) がジヒドロケンフェロールを基質として利用できないため、ペラルゴニジンが蓄積されないことが報告されて

おり (Johnson *et al.*, 1999)、これらのファレノプシスにおいても、DFR よりも下流の酵素の基質特異性の結果、ペラルゴニジンを発色基とするアントシアニジンが蓄積されていないことが考えられる。

このようなファレノプシスの花卉中に F3' 5'H 活性を発現させるとシアニジンの一部がデルフィニジンへ変換され、花色が青味がかった紫色へ変化することが期待される。実際、赤紫色の花色を持ったウエディングブロムナードヘツユクサ由来 F3' 5'H 遺伝子を導入することにより、青紫色の花色を持ったファレノプシスが作出された。

ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素について、アレルゲンデータベース (FARRP Allergen Protein Database⁷ Ver.16, 2016) での解析を行ったところ、既知アレルゲンとの間に相同性はなかった。

【ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素蛋白質】

アミノグリコシド系抗生物質であるハイグロマイシン B は、原核生物及び真核生物において、リボソーム上でのアミノアシル tRNA の認識やペプチジル tRNA の転座を妨害し、mRNA の誤読や蛋白合成の阻害を惹き起こし、生育を阻害する (Cavanas *et al.*, 1978)。ファレノプシスを含む多くの植物もハイグロマイシン B に対して感受性を示す。ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素は、ATP のリン酸基をハイグロマイシン B へ転移する反応を触媒するキナーゼで、リン酸化されたハイグロマイシン B は生育阻害活性を失う (Rao *et al.*, 1983)。

本組換え体の宿主であるウエディングブロムナードの PLB (プロトコーム様体と呼ばれる組織培養体) もハイグロマイシン B に感受性を示し、一方、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素を発現する組換え体の PLB はハイグロマイシン B に抵抗性となるため、ハイグロマイシン B を含む培地上で培養することにより組換え体 PLB を選抜できる。

ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素について、アレルゲンデータベース (FARRP Allergen Protein Database Ver.16, 2016) での解析を行ったところ、既知アレルゲンとの間に相同性はなかった。

⁷ <http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその旨

5 ツュクサフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素は、新たに 5, 7, 3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラバノン及びジヒドロミリセチンを産生させ、デルフィニジンをアグリコンとするアントシアニンを蓄積させる。また、5, 7, 3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラバノン及びジヒドロミリセチンはフラボン合成酵素やフラボノール合成酵素の基質でもあり、トリセチンやミリセチンが新たに生成すると考えられる。

10 ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素は、ハイグロマイシン B をリン酸化する酵素であるが、基質特異性が高く、ハイグロマイシン B 類似のアミノグリコシド系抗生物質の一部の化合物のみをリン酸化することが報告されており、宿主の代謝系を変化させることはないものと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

5 本組換え体の作出に用いられた pBIH-35S-CcF3'5'H はバイナリーベクターpBI121 (Chen *et al.*, 2003) を基に構築されており、図 2 (P16) に示した T-DNA 領域以外の部分は、pBI121 の非 T-DNA 領域、つまりバイナリーベクターBin 19 (Frisch *et al.*, 1995) の非 T-DNA 領域から成っている。ただし、T-DNA 領域近傍の 2 箇所の *Bgl*II サイト(図 3、P16) で逆位しており、pBIH-35S-CcF3'5'H の T-DNA 領域の相対的な方向は、pBI121 や
10 Bin 19 のものと逆向きになっている (図 2、P16)。Bin 19 の非 T-DNA 領域は、グラム陰性細菌に広く宿主域を持つ RK2 プラスミド由来の pRK252 と乳酸菌 (*Streptococcus faecalis*) 由来のアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子 (*APHⅢ*) を基に構築された (Bevan, 1984)。なお、RK2 プラスミドは種々のグラム陰性細菌から単離されているが、最初のも
15 のは肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) から単離された。

ロ. 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

20 本組換え体の作出に用いられた pBIH-35S-CcF3'5'H の全塩基数は 13,980bp で、その塩基配列は別添資料 1 図 1-1-1 (P1~21) に示した。

② 特定の機能を有する配列がある場合には、その機能

25 RK2 プラスミド由来の複製開始点 (*ori V*) 及び複製開始点が機能するために必要な遺伝子 (*trf4*) は、大腸菌及びアグロバクテリウムでのプラスミドの複製・維持に寄与している。さらに、RK2 プラスミド由来の機能を有する配列としては、プラスミド転移に必要な遺伝子 (*traF*) があるが、実際の使用においては、本機能は利用されていない。

30 乳酸菌 (*Streptococcus faecalis*) 由来のアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子 (*APHⅢ*) は、カナマイシンを不活化する酵素をコードしており、大腸菌及びアグロバクテリウムにおいて選抜マーカーとして利用される。なお、本ベクターのアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子には、5'非翻訳領域とコーディング領域の間に転移性因子 1 (*IS1*) が挿入されていることが知られている。

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

本ベクターに感染性の知られている配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

5 イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換え体の作出に用いられた **pBIH-35S-CcF3'5'H** の T-DNA 領域の各構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位を図 3 (P16) に示した。実際に移入された領域は、RB の半ばから LB の半ばまでの **5,375bp** で、その塩基配列は別添資料 1 図 1-1-1 (P1~21) の **5,742** 番目の A から **11,116** 番目の C までである。

ロ. 宿主に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入には、アグロバクテリウム法を用いた。

15

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

20 宿主であるウエディングプロムナード'PP3387'のプロトコーム様体 (PLB) 約 8g を **pBIH-35S-CcF3'5'H** を保持したアグロバクテリウムに感染させた後、ハイグロマイシン B (20mg/l) 及びメロペネム (20mg/l、アグロバクテリウム除菌用) を含んだ選抜培地上で培養し、独立した 45 株のハイグロマイシン耐性 PLB を得た。

25 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

本組換え体の作製に用いたアグロバクテリウムは、感染操作以降、組織培養の培地にメロペネムを添加することで除菌した。なお、得られた組換え体 (初代) の花、葉及び根から DNA を抽出し、ベクターの非 T-DNA 領域に含まれるアミノグリコシドリン酸基転移酵素Ⅲ遺伝子 (*APHⅢ*) を標的とした PCR 分析を行ったが、*APHⅢ* 遺伝子は存在しなかった。このことから、本組換え体には形質転換に用いたアグロバクテリウムが残存しないことを確認した (別添資料 2、P1~2 参照)。また、本組換え体のクローン苗の調製に際しては、アグロバクテリウムが増殖可能な寒天培地を使用して PLB の誘導・増殖を行なったが、アグロバクテリウムの増殖は観察されなかった。さらに、得られたクローン苗の複数個体の葉の抽出物を LB 培地へ塗布し、その培地上にアグロバクテリウムのコロニーが形成され

ていないことを確認した（別添資料 2、P3 参照）。

- ③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

2008 年に宿主であるウエディングプロムナード'PP3387'のプロトコーム様体（PLB）の形質転換を行なった。形質転換された PLB（45 株）を再分化し、得られた植物体 32 株を閉鎖系栽培室及び特定網室で栽培したところ、2012 年に 2 系統の青紫色ファレノプシス（系統「311」及び系統「164」）が開花した。この 2 系統ともに pBIH-35S-CcF3'5'H の T-DNA 領域の存在を確認した。また、両系統とも培養変異のため、花卉に変異が認められた。ウエディングプロムナードでは、このような培養変異が生じることが報告されている（Tokuhara and Mii, 1998）。より軽い変異（ペタルがわずかにリップ化）であった系統「311」を選抜した。

なお、本評価書において、本組換え体とは系統「311」を示す。また、系統「311」として最初に得られた個体を系統「311」初代、この系統「311」初代から調製した 3 タイプのクローン苗を 311WL、311TL 及び 311NR と表記した。これらの初代及びクローン苗を含め、本評価書で試験に使用した組換え体は何れも系統「311」の T_0 世代であり、承認の範囲も系統「311」の T_0 世代である。

育成の経過を図 5（P24）に示した。

2012 年から系統「311」初代の花茎腋芽から組織培養によりクローン苗を調製し、鉢上げした苗 37 個体を特定網室にて栽培したところ、2015 年に 3 タイプの花が開花した。系統「311」初代と同様なペタルがわずかにリップ化した変異を持つもの（311WL）が 19 個体、ペタルが完全にリップ化したもの（311TL）が 10 個体及び正常な花卉に復帰したもの（311NR）が 2 個体であった。特定網室において、これら 3 タイプのクローン苗を用いて生物多様性影響評価に必要な情報を収集した。

これら 31 個体は、花形は 3 タイプに分かれるものの、何れも系統「311」初代の同一花茎のシュートから調製した PLB に由来する。また、3 タイプのクローン苗のゲノム DNA を調製し、移入された遺伝子及びその周辺遺伝子についてサザンブロット解析を行った結果、何れも系統「311」初代と一致していた（別添資料 3、P6～7）。さらに、移入遺伝子とその周辺遺伝子配列を基に設計したプライマーを用いた PCR 分析においても、系統「311」初代と一致した（別添資料 4、P7～8）。したがって、評価に用いた 31 個体は、何れも系統「311」初代由来のクローンであり、3 タイプの花形は、培養変異によって生じたものと考えられる。

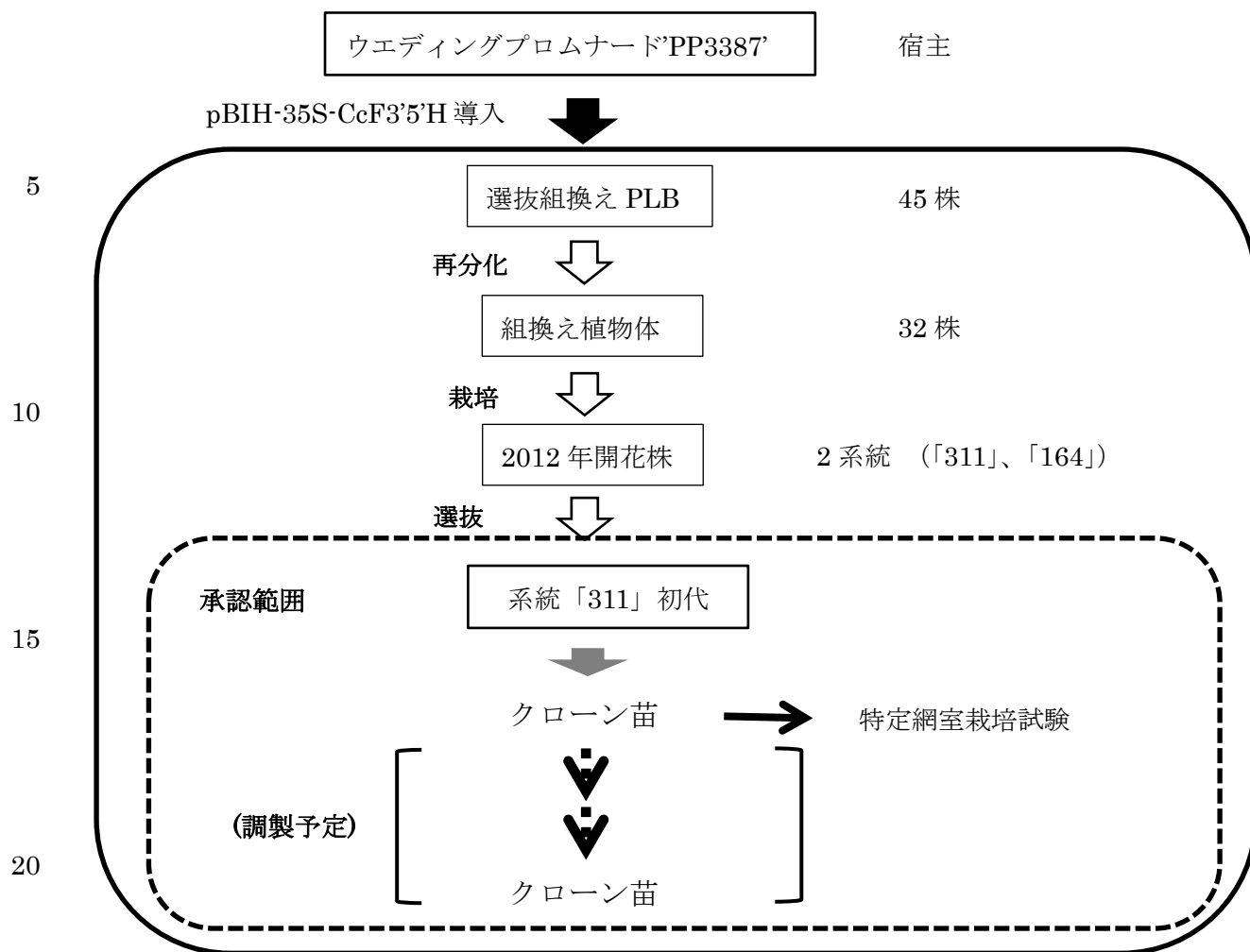


図 5 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いた系統

* 実線内は全て T₀ 世代、点線内は承認範囲を示す

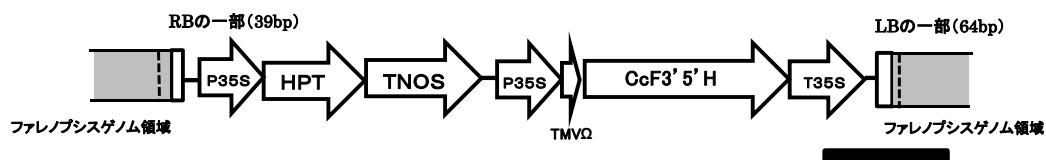


図 6 T-DNA 領域の挿入概要図

*  はファレノプシスのゲノム領域を示す

 は本組換え体の検出のために PCR で増幅した領域

(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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

5 本組換え体初代の各器官（花、葉及び根）における導入遺伝子（ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子）の存在の有無について、ゲノム DNA の 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、葉及び根で検出された（別添資料 3、P1～3）。

さらに、本組換え体初代の葉から調製した DNA のサザンブロット解析（別添資料 3、P4
10 ～5）の結果から、PCR で検出された 2 つの遺伝子（ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子）が、元のベクター（pBIH-35S-CcF3'5'H）の構成と同様に、ごく近傍に存在することが確認された。したがって、本組換え体には、T-DNA 領域の RB から LB に至る全長が元の構成のまま挿入されていることが期待された（図 6、P24）。

15 そこで、TAIL(thermal asymmetric interlaced)-PCR 法により、導入遺伝子と内在配列の境界領域の DNA のクローニングを試みた。期待したとおり、得られた RB を含むクローンには、pBIH-35S-CcF3'5'H の配列と完全に一致する RB の一部と P35S の配列と共に、内在配列に由来すると思われる 74 塩基が含まれていた。一方、LB を含むクローンには、pBIH-35S-CcF3'5'H の配列と完全に一致する LB の一部と T35S の配列と共に、内在配列
20 に由来すると思われる 358 塩基が含まれていた。これら内在配列を用いて、宿主の花粉親である *Phalaenopsis equestris* のゲノム配列データベース (OrchidBase⁸) に対して BLAST 検索したところ、それぞれ、特定の DNA 領域の互いに隣接する配列に 90% 以上の相同性が見られた（別添資料 1 図 1-2-1、P23～25）。したがって、移入された核酸は、宿主の *P. equestris* 由来の染色体中の対応する領域へ挿入されたものと推定された。

25 なお、*P. equestris* ゲノム配列との比較において、RB 近傍の内在配列 74bp 中には、2 塩基の挿入と 1 塩基の置換があり、相同性は 96% (71/74) だった。一方、LB 近傍の内在配列 358bp 中には、挿入位置から約 60bp 離れたところに 16 塩基の欠失、さらに約 60bp 離れたところに 1 塩基の欠失、全体にわたって 11 塩基の置換があり、相同性は 93% (347/375) だった（別添資料 1 図 1-2-1、P23～25）。

② 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

サザンブロット解析により、本組換え体初代へ移入された核酸は、ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子を含む T-DNA
35

⁸ <http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/home2012.aspx>

のLBからRBに至る全長が、本組換え体ゲノム中に1コピー存在することが推察された(別添資料3、P4～5)。

また、本組換え体初代から調製した3タイプのクローン苗(311WL、311NR及び311TL)について、サザンブロット解析を実施した結果、3タイプのクローン苗は、異なった花形を持つものの、導入遺伝子及びその近傍の内在遺伝子は系統「311」初代と同様な構成及びコピー数を保持しており、導入遺伝子は組織培養によるクローン増殖を経ても安定して伝達されていると考えられた(別添資料3、P6～7)。

③ 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

④ (6)の①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

本組換え体初代の各器官(花弁及び葉)における導入遺伝子(ツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシンBリン酸基転移酵素遺伝子)の発現について、RT-PCRで解析した。その結果、ツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシンBリン酸基転移酵素遺伝子は、本組換え体の花弁及び葉での発現が確認された。また、本組換え体初代から調製した3タイプのクローン苗(311WL、311TL及び311NR)の花弁及び葉においても、同様に、ツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシンBリン酸基転移酵素遺伝子が発現していることをRT-PCRによって確認した(別添資料3、P8～11)。

ツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子の発現によって、本組換え体初代の花色は青紫色となったが、本組換え体初代から調製した3タイプのクローン苗(311WL、311TL及び311NR)においても、花色は全て青紫色であった(別添資料5、P1～5)。

本組換え体初代は、ハイグロマイシンB含有培地で選抜されたが、本組換え体のクローン苗から調製したプロトコーム様体(PLB)もハイグロマイシンB耐性を保っていた(別添資料3、P12)。

したがって、導入された遺伝子は、組織培養によるクローン増殖を経ても、ツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシンBリン酸基転移酵素遺伝子共に安定して発現していると考えられた。

⑤ 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

5

本組換え体は、導入遺伝子及びその周辺配列を利用した特異的なプライマーを用いて、PCR による特異的な検出並びに識別が可能である。検出感度については、1ng のゲノム DNA を用いれば検出可能であった（別添資料 4、P1～4）。なお、検出に用いた PCR の領域は導入遺伝子の LB と内在配列の境界領域（図 6、P24）で、その領域の配列とプライマーは別添資料 4 の図 4-1-1 に示した。

10

また、本組換え体初代から調製した 3 タイプのクローン苗（311WL、311TL 及び 311NR）においても、本法によって同様に検出できた（別添資料 4、P7～8）。

なお、サザンブロット解析によっても、本組換え体の特異的な検出及び識別は可能であり、その検出感度については、15～20 μ g のゲノム DNA を用いれば検出可能である。また、本組換え体初代から調製した 3 タイプのクローン苗（311WL、311TL 及び 311NR）においても、本法によって同様に検出できた（別添資料 3、P4～7）。

15

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 20 ① 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または形態学的特性の具体的な内容

宿主の花色は赤紫色だったが、ツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子を過剰発現させた結果、デルフィニジンが生成（別添資料 5、P6～7）し、花色が青紫色に変化した（別添資料 5、P1～5）。

25

また、宿主から調製した PLB は、ハイグロマイシン B に対して感受性を示すが、本組換え体由来の PLB は、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素発現の結果、ハイグロマイシン B 抵抗性となった（別添資料 3、P12）。

- 30 ② 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相違の有無及び相違がある場合にはその程度

a 形態及び生育の特性

- 35 2015 年 3～4 月に開花した、本組換え体（系統「311」）初代から調製したクローン苗 31 個体について花形を調査したところ、系統「311」初代と同様なペタルがわずかにリップ化

した変異を持つもの（311WL）が 19 個体、ペタルが完全にリップ化したもの（311TL）が 10 個体及び正常な花弁に復帰したもの（311NR）が 2 個体であった。宿主のウエディングプロムナードでは、クローン苗の調製の際に、このような様々な花形の変異が生じることが報告されている（Tokuhara and Mii, 1998）。

- 5 そこで、特定網室において、宿主及び本組換え体由来の 3 タイプ（311WL、311NR、311TL）のクローン苗について、形態及び生育の特性として、開花時期、植物体の長さ（地際から花序の先端までの長さ）、花序の数、花序の型、花序 1 本当りの花数、最大葉の長さ、最大葉の幅、花の横径及び縦径を調査した（別添資料 5、P8～10）。これらの中で、花序 1 本当りの花数において、宿主と本組換え体間で統計学的有意差（Student *t* 検定、有意水準 5%）
- 10 が認められた。また、植物体の長さ、花の横径及び縦径において、宿主と本組換え体由来の 2 タイプのクローン苗（311WL 及び 311TL）間で統計学的有意差（Student *t* 検定、有意水準 5%）が認められた。311NR もサンプル数が少ないが、これらの項目の実測値（植物体の長さ：42.5 および 57.0cm、花の横径：5.4 および 6.2cm、花の縦径：5.4 および 5.7cm）
- 15 はいずれも宿主の値（植物体の長さ：70.0～87.0cm、花の横径：6.7～7.1cm、花の縦径：6.0～6.5cm）よりも小さい値をとった。さらに、最大葉の長さ及び幅において、宿主と 311TL の間で統計学的有意差（Student *t* 検定、有意水準 5%）が認められた（別添資料 5、P8～10 及び表 3（P28））。

- これらの花形を含めた形態及び生育の特性の相違は、ファレノプシスの形質転換時及びクローン苗の調製時に、植物ホルモンを加えて脱分化させた状態での培養期間が長いこと
- 20 から、培養変異によって生じた可能性が高いと考えられる。宿主であるウエディングプロムナードは、このような培養変異が生じ易いことが報告されている（Tokuhara and Mii, 1998）。

表 3 宿主及び組換え体間で統計学的有意差のあった項目の調査結果

	宿主（ウエディングプロムナード）	本組換え体		
		311WL	311NR	311TL
植物体の長さ(cm)	80.0±5.6	54.4±6.1*	49.8 (42.5～57.0)	43.7±2.8*
花序 1 本当りの花数（個）	32.7±6.9	21.8±6.4*	21.0±6.5*	15.2±5.3*
花の横径(cm)	6.9±0.1	6.1±0.2*	5.8 (5.4～ 6.2)	6.0±0.4*
花の縦径(cm)	6.2±0.2	5.7±0.2*	5.6 (5.4～ 5.7)	5.0±0.5*
最大葉の長さ(cm)	17.3±1.4	17.6±1.0	16.8 (16.0～17.5)	13.9±0.7*
最大葉の幅(cm)	7.6±1.4	7.2±0.5	7.1 (7.0～ 7.2)	5.9±0.4*

- 25 *： 宿主との間に統計学的有意差あり（Student *t* 検定、有意水準 5%）

※ 花序 1 本当りの花数については、311NR は 4 本、宿主は 7 本、311WL および 311TL は 9 本の花序の花数の平均値±SD。

それ以外の項目については、311NR は 2 個体の平均値（最小値～最大値）。311NR 以外の群は、6 個体の平均値±SD。

b 生育初期における低温又は高温耐性

5

本組換え体は宿主と同様に 3 倍体（別添資料 5、P18～19）であり、増殖は組織培養のみで行い、生育初期は培養器内の寒天培地上で培養され、通常自然条件下にさらされることはない。なお、寒天培地から鉢上げした直後の幼苗期の低温または高温耐性は、本申請での隔離ほ場試験で調査予定である。

10

c 成体の越冬性又は越夏性

15

ファレノプシス園芸品種の生育適温は 21～30℃の範囲と考えられている。現在のところ、本組換え体における夏季の生育についての知見は得られていない。自然条件での越夏性と夏季の生育については隔離ほ場試験で調査予定である。また、越冬性に関して園芸品種は 15℃以下では生育障害の起こることが知られているが、冬季における本組換え体の生育に関する知見は得られていない。越冬性、冬季の生育についても隔離ほ場試験で調査予定である。

20

d 花粉の稔性及びサイズ

25

宿主、本組換え体初代及びそのクローン苗（311WL、311NR 及び 311TL）の花粉塊を目視にて観察した。311TL では、ずい柱自体の発達が悪く、花粉塊の数の少ないものが観察され、存在する花粉塊の大きさも小さいものが多く認められた。一方、本組換え体初代及びクローン苗 311WL、311NR では、宿主と同様に全ての花に、花粉塊は 2 個ずつ存在し、大きさにも差は認められなかった（別添資料 5、P11）。

30

そこで、クローン苗 311WL 及び 311NR の花粉塊を酸処理後、オルセインで染色し、顕微鏡下で観察した。何れの花粉塊からも、ファレノプシスに特有な花粉四分子像が観察され、細胞質も染色されており、何れも充実しているものと判定された。また、花粉四分子の分割パターンから正常な大きさ及び形態を保持していると判定された花粉の割合及び花粉四分子の大きさに宿主との間で差はなかった（別添資料 5、P12～13）。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

35

本組換え体は宿主と同様 3 倍体（別添資料 5、P18～19）であり、自殖による種子の生産はできない。そのため、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率の調査を行っていない

い。

なお、隔離ほ場において、自殖によって種子が生産されないことを確認する予定である。

f 交雑率

5

本組換え体（3倍体）と近縁野生種との交雑

花粉塊の存在が認められた（第一・2・(6)・②・d、P29）宿主及び本組換え体初代由来の2タイプのクローン苗（311WL及び311NR）の花粉塊を採取し、国内に自生する近縁野生種2種、ナゴラン（*Phalaenopsis japonica*）及びフウラン（*Vanda falcata*）、との交雑試験を行った。宿主及び本組換え体の花粉塊を人為的に受粉したナゴランのさく果（宿主16個、組換え体34個）は完熟する前に全て枯死し、発芽能力のある種子は全く得られなかった。また、宿主及び本組換え体の花粉塊を人為的に受粉したフウランのさく果（宿主13個、組換え体26個）も完熟する前に全て枯死し、発芽能力のある種子は全く得られなかった（別添資料5、P14～16）。

本組換え体（3倍体）と園芸品種（4倍体）との交雑

人為的な交配による本組換え体のファレノプシス園芸品種（アマビリス；4倍体）に対する交雑性を調査した。宿主及び本組換え体（311WL及び311NR）の花粉塊を人為的に受粉したアマビリスのさく果（宿主20個、本組換え体40個）は全て完熟前に枯死し、種子は全く得られなかった（別添資料5、P16～17）。

よって、宿主及び組換え体ともに、近縁野生種及び園芸品種との交雑性は極めて低いと考えられた。

g 有害物質の産生性

ファレノプシスの園芸品種における有害物質産生の報告はない。

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、鋤き込み試験においてレタス種子の発芽への影響を調査した。その結果、宿主及び組換え体間で統計学的有意差（Student *t*検定、有意水準5%）はなかった（別添資料5、P21）。さらに、プラントボックス法（藤井, 1991）で、根からの産生物質が他の植物へ与える影響について調査したが、宿主及び組換え体間で統計学的有意差（Student *t*検定、有意水準5%）はなかった（別添資料5、P20）。

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

5 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

10 所在地 : 茨城県つくば市天王台一丁目1番1号
名称 : 筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場Ⅲ (隔離ほ場)
使用期間 : 承認日から平成33年3月31日

イ. 隔離ほ場の施設

- 15 ① 部外者の立入りを防止するため、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。
- 20 ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えファレノプシスの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該ファレノプシス植物体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。
- 25 ④ 本組換えファレノプシスの植物体が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。なお、調査、作業等のために防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再度設置する。
- 30 ⑤ 本組換えファレノプシスの栽培は鉢で行い、越冬性、越夏性試験以外の調査はビニール温室を設置して行う。

ロ. 隔離ほ場での作業要領

- 35 ① 本組換えファレノプシス及び比較対照の非組換えファレノプシス以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。

- ② 本組換えファレノプシスを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ファレノプシスが漏出しない構造の容器に入れる。
- 5 ③ ファレノプシスに自然条件下での栄養繁殖性はないため、②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えファレノプシスの栽培終了後は、当該ファレノプシス及び比較対照の非組換えファレノプシスの根を含めた植物体全体を細断して隔離ほ場にすき込む等により、確実に不活化する。ただし、花及び果実（さく果）については、オートクレーブで不活化後、廃棄する。
- 10 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、意図せずに本組換えファレノプシスが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 15 ⑤ 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行なう。
- ⑥ ①から⑤までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 20 ⑦ 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には、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
- (3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法
—
- 25 (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
- 30 (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
35 —

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

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ファレノプシスの園芸品種は、国内においても100年以上栽培されてきた歴史があるが、これまでに野外に逸出して自然条件下で定着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る諸形質、すなわち、生育特性及び生殖・繁殖特性について、
- 10 宿主と組換え体間における相違を評価した。生育特性については、植物体の長さ、花序1本当たりの花数、花の横径及び縦径において差異が認められた(第一・2・(6)・②・a、P27)。また、花卉(ペタル)の形態にも、相違が認められた(第一・2・(6)・②・a、P27)。ファレノプシスの園芸品種は組織培養によるクローン苗の生産の過程で体細胞培養変異に基づく変異が生じ易いことが報告(Tokuhara and Mii, 1998)されていること、また、ファ
- 15 レノプシスの形質転換の際には高濃度の植物ホルモンを使用して長期間培養していること、さらに、単一の組換え体(系統「311」初代)から培養によって増殖したクローン苗間でも花形に3タイプの変異がみられることから、これらの相違は、培養変異によって生じた可能性が高いと思われる。しかしながら、これらの相違が隔離ほ場周辺の野生動植物の生育に係るような重大な形質であるとは考えにくい。なお、組織培養によるクローン増殖を行
- 20 っても本組換え体に導入された遺伝子は安定して伝達されている。

- 一方、生殖・繁殖特性に関する調査において、本組換え体初代由来の3タイプのクローン苗の中で、クローン苗311TLでは、ずい柱自体の発達が悪く、花粉塊の数の少ないものが観察され、存在する花粉塊の大きさも小さいものが多く認められたが、残り2タイプのクローン苗311WL及び311NRでは、宿主と同様に全ての花に、花粉塊は2個ずつ存在し、
- 25 大きさにも差は認められなかった(第一・2・(6)・②・d、P29)。また、311WL及び311NRの花粉塊を酸処理後、オルセインで染色して顕微鏡下で観察したところ、ファレノプシスに特有な花粉四分子像が観察され、花粉四分子の分割パターンから正常な大きさ及び形態を保持していると判定された花粉の割合及び花粉四分子の大きさに宿主との間で差はなかった(第一・2・(6)・②・d、P29)。311TLの宿主との相違は、生殖・繁殖において不
- 30 利な形質であり、この相違が隔離ほ場周辺の野生動植物の生育に係るような重大な形質であるとは考えにくい。

- 本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉においてデルフィニジンを生成し、花色が赤紫色から青紫色へ変化している。ミツバチなど、多くの昆虫は、赤色を識別できない一方で、青色を含む黄色から紫外線までの光を知覚できる。また、ミツバチやマルハナバチ
- 35 などミツバチ科のハチが紫色の花を好んで訪れるなど、それぞれの昆虫には好みの花色があることが推察されている(田中, 1993)。そのため、花色の変化によって訪花昆虫相に影響

響することが考えられる。しかし、国内においては、園芸品種のファレノプシスへの訪花昆虫はほとんど認められないことから、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を与え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。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予定している。

また、本組換え体はハイグロマイシン B 耐性を獲得しているが、ハイグロマイシン B の散布が想定されない自然環境下において、この形質が競合における優位な形質であるとは考えにくい。

以上のこと及び本組換えファレノプシスが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的な内容

—

(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

以上のことから、本組換えファレノプシスは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

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

ファレノプシスの園芸品種は、国内においても 100 年以上栽培されてきた歴史があるが、海外を含めて園芸品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生産するという報告はない。

導入したツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素遺伝子及びハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子並びにこれらの遺伝子による産物が、組換え体の代謝に影響して有害

物質を産生する可能性の有無を明らかにするために、鋤き込み試験においてレタス種子の発芽に対する影響を調査した。その結果、レタス種子の発芽率並びに実生の新鮮重量について、本組換えファレノプシスと宿主の間に統計学的有意差(Student *t*検定、有意水準5%)は認められなかった(第一・2・(6)・②・g、P30)。さらに、プラントボックス法で、組換え体の根から産生される物質がレタス実生の根の生育に与える影響を調査したが、宿主との間に統計学的有意差(Student *t*検定、有意水準5%)は認められなかった(第一・2・(6)・②・g、P30)。

また、導入遺伝子によって本組換えファレノプシスが産生しているデルフィニジン、ミリセチン、トリセチン、ジヒドロミリセチンなどは、青みを帯びたパンジーやペチュニアなどの花卉にも含まれるものであり、他の野生動植物等へ有害であるという報告はない。さらに、本組換え体が産生するツユクサフラボノイド3',5'-水酸化酵素及びハイグロマイシンBリン酸基転移酵素は、アミノ酸配列の相同性検索の結果、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている。

以上のこと及び本組換えファレノプシスが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的な内容

—

(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

以上のことから、本組換えファレノプシスは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

稔性のあるファレノプシス園芸品種はラン科の近縁野生種と交雑可能である。日本に自生する近縁野生種としては、ナゴラン (*Phalaenopsis japonica* (Linden & Rchb. f.) Garay et H. R. Sweet)、フウラン (*Vanda falcata* (Thunb.) Hu)、ボウラン (*Luisia teres* (Thunb.) Blume)、ムニンボウラン (*L. occidentalis* Lindl)、サガリラン (*Diploprora championii* (Lindl) Hook. f.)、カヤラン (*Thrixspermum japonicum* Rchb. f.)、マツゲカヤラン (*Gastrochilus ciliaris* F. Maek)、カシノキラン (*G. japonicus* (Makino) Schltr)、ベニカヤラン (*G. matsuran* (Makino) Schltr)、モミラン (*G. toramanus* (Makino) Schltr)、ムカデラン (*Cleisostoma scolopendrifolius* (Makino) Garay)、イリオモテラン (*Trichoglottis luchuensis* (Rolfe) Garay et H. R. Sweet)、ジンヤクラン (*Arachnis labrosa* (Lindl. et Paxt.) Rchb. f.) が知られている。また、これらの中で、ナゴラン、フウラン及びボウランの3種に関しては、具体的な交雑品種が、「The International Orchid Register (英国王立園芸協会)」に登録されている。

以上のことから、これら13種、特にナゴラン、フウラン及びボウランの3種に影響を受ける可能性のある野生動植物とした。

(2) 影響の具体的内容の評価

本組換えファレノプシスと上記で特定した近縁野生種が交雑した場合、交雑種を形成す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。また、ハイグロマイシン耐性を獲得する可能性があるが、自然条件下ではハイグロマイシンが散布される可能性はなく、影響は低いと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

本組換えファレノプシスと上記の近縁野生種が交雑する可能性について、花粉の基本特性、虫媒、風媒、花粉稔性、隔離ほ場周辺の植物相の観点から考察した。

花粉の基本特性：

一般的なファレノプシスの園芸品種においては、多数の花粉の集合体である花粉塊がずい柱の先端に2個ずつ存在する。本組換え体由来の3タイプのクローン苗の中で、クローン苗311TLでは、ずい柱自体の発達が悪く、花粉塊の数の少ないものが観察され、存在する花粉塊の大きさも小さいものが多く認められたが、残り2タイプのクローン苗311WL及び311NRでは、宿主と同様に全ての花に、花粉塊は2個ずつ存在し、大きさにも差は認められなかった(第一・2・(6)・②・d、P29)。また、311WL及び311NRの花粉塊を酸

処理後、オルセインで染色して顕微鏡下で観察したところ、ファレノプシスに特有な花粉四分子像が観察され、各花粉についても正常な花粉と区別できない染色像を示すものが多く存在していた（第一・2・(6)・②・d、P29）。したがって、311TL 以外の組換え体では、花粉の特性では近縁野生種との交雑の可能性について否定できなかった。

5

虫媒による交雑の可能性：

ファレノプシスは昆虫により花粉を媒花されるが、国内において園芸品種のファレノプシスを媒介する昆虫についての報告はない。また、ファレノプシスにおいては、品種ごとに媒介する昆虫に特異性があるとされ、特に、媒介昆虫と花の大きさには厳密な相関があるものと考えられている（Xiaohua *et al.*, 2012）。国内に自生する近縁野生種の花の横径が 0.3～3.5cm 程度であるのに対して、宿主及び組換え体の花の横径は 5.3～7.1cm であり、本組換えファレノプシスと近縁野生種が虫媒によって交雑する可能性は低いと考えられる。この点に関して、隔離ほ場試験期間中に、ナゴランの媒介昆虫であるトラマルハナバチ（Suetsugu and Tanaka, 2013）が組換え体の花粉を媒介する可能性について検証する予定である。また、隔離ほ場試験において、組換え体へ訪花する昆虫の調査も実施し、虫媒による交雑の可能性を精査する予定である。

風媒による交雑の可能性：

本組換えファレノプシスの花粉は、ファレノプシス園芸品種と同様に花粉塊として存在している。さらに、葯帽に蔽われ、花粉塊柄と小嘴体からなるリボン状の粘着体に付着した状態で存在しており、風媒花の花粉（長径 10～50μm）のように、風によって本組換えファレノプシスの花粉塊（直径～1 mm）が遠方まで飛散する可能性は極めて低いと考えられる。また、風媒は無駄になる花粉も多いため、非常に多くの花粉を飛散させる必要があり、1つの花に 2 個の花粉塊しかない本組換えファレノプシスの花粉が風媒によって近縁野生種と交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

花粉稔性：

染色像では正常な花粉と区別できない花粉が観察されたが、本組換え体の宿主であるウエディングプロムナードのような、4倍体品種と2倍体野生種との交配で作出された中輪系品種は、3倍体品種群であり、稔性は極めて低いことが知られている。そこで、宿主及び組換え体と国内に自生する近縁野生種の中でファレノプシスの園芸品種を花粉親とする雑種が登録されているナゴラン及びフウランと的人為的交配を行ったが、何れの場合も、さく果が十分に生育せず、中身の充実した種子は得られなかった（第一・2・(6)・②・f、P30）。また、宿主及び組換え体の花粉をファレノプシス園芸品種に人為的に交配した場合でも、種子は全く得られなかった。したがって、組換え体の花粉稔性は無いが極めて低く、人為的交配でも組換え体と近縁野生種との雑種が得られる可能性は極めて低いと考えられ

る。

隔離ほ場周辺の植物相：

2002年3月より2004年10月までの間に隔離ほ場のある筑波大学構内の植物相調査が実施されているが、特定されたナゴラン、フウラン、ボウラン、ムニンボウラン、サガリラン、カヤラン、マツゲカヤラン、カシノキラン、ベニカヤラン、モミラン、ムカデラン、イリオモテラン、ジンヤクランは自生していなかった（路川ら，2005）。なお、隔離ほ場試験の開始前には、再度、隔離ほ場周辺の近縁野生種の調査を実施する予定である。

- 10 以上のように、本組換えファレノプシスの花粉は、花粉塊であるため、風によって媒介される可能性は極めて低く、花の大きさの違いから、本組換えファレノプシスと近縁野生種が虫媒によって交雑する可能性も低い。また、隔離ほ場周辺で近縁野生種の自生も認められていない。さらに、本組換えファレノプシスは3倍体であり、近縁野生種と人為的に交配した場合でも種子は得られなかった。国内において、自然条件下でファレノプシス園芸品種と日本に自生する近縁野生種が交雑した事例が報告されていないことも併せて総合的に判断すると、本組換えファレノプシスが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用される場合、本組換え体と近縁野生種が交雑し、導入遺伝子が近縁野生種集団内に浸透していくことはないと考えられた。

- 20 （4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えファレノプシスは、交雑に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

- 25 4. その他の性質

—

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：

ファレノプシスの園芸品種は、国内においても 100 年以上栽培されてきた歴史があるが、
5 これまでに野外に逸出して自然条件下で定着したとの報告はない。

競合における優位性に係る諸形質のうち、生育特性については、植物体の長さ、花序 1
本当りの花数、花の横径及び縦径において差異が認められ、花卉（ペタル）の形態にも相
違が認められた。ファレノプシスの園芸品種は組織培養によるクローン苗の生産の際に体
細胞培養変異に基づく変異が生じ易く、また、ファレノプシスの形質転換の際には高濃度
10 の植物ホルモンを使用して長期間培養しており、これらの相違は、培養変異によって生じ
た可能性が高い。しかしながら、これらの相違が隔離ほ場周辺の野生動植物の生育に係る
ような重大な形質であるとは考えにくい。生殖・繁殖特性に関する調査において、本組換
え体由来の 3 タイプのクローン苗の中で、クローン苗 311TL では、ずい柱自体の発達が悪
く、花粉塊の数の少ないものが観察され、存在する花粉塊の大きさも小さいものが多く認
15 められたが、残り 2 タイプのクローン苗 311WL 及び 311NR では、宿主と同様に全ての花
に、花粉塊は 2 個ずつ存在し、大きさにも差は認められなかった。また、311WL 及び 311NR
の花粉塊を、オルセイン染色して顕微鏡下で観察したところ、ファレノプシスに特有な花
粉四分子像が観察され、花粉四分子の分割パターンから正常な大きさ及び形態を保持して
いると判定された花粉の割合及び花粉四分子の大きさに宿主との間で統計学的有意差
20 （Student t 検定、有意水準 5%）は認められなかった。311TL の宿主との相違は、生殖・
繁殖において不利な形質であり、この相違が隔離ほ場周辺の野生動植物の生育に係るよう
な重大な形質であるとは考えにくい。本組換え体は導入遺伝子の発現の結果、花卉におい
てデルフィニジンを生成し、花色が変化しており、訪花昆虫相に影響することが考えられ
る。しかし、国内においては、園芸品種のファレノプシスへの訪花昆虫はほとんど認めら
25 れないことから、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を
与え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。なお、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予定している。
また、本組換え体はハイグロマイシン B 耐性を獲得しているが、ハイグロマイシン B の散
布が想定されない自然環境下において、この形質が競合における優位な形質であるとは考
30 えにくい。

以上のことから、本組換え体が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：

35 ファレノプシスの園芸品種は、国内においても 100 年以上栽培されてきた歴史があるが、
我が国を含めて園芸品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生産す

るという報告はない。また、導入した遺伝子によって本組換え体が新たに産生しているフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素、デルフィニジン、ミリセチン、トリセチン及びジヒドロミリセチンが有害であるという報告はない。

- 5 実際に本組換え体の鋤き込み試験を行ったが、レタス種子の発芽率並びに実生の新鮮重量について、本組換えファレノプシスと宿主の間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、有意水準 5%) は認められなかった。さらに、プラントボックス法で、組換え体の根から産生される物質がレタス実生の根の生育に与える影響を調査したが、宿主との間で統計学的有意差 (Student *t* 検定、有意水準 5%) は認められなかった。

- 10 また、本組換え体が産生するツユクサ フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素及びハイグロマイシン B リン酸基転移酵素は、アミノ酸配列の相同性検索の結果、既知のアレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている。

以上のことから、本組換え体は有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

- 15 交雑性について：

稔性のあるファレノプシス園芸品種はラン科の近縁野生種と交雑可能であり、日本に自生する近縁野生種 13 種 (第二・3・(1)、P35) を、影響を受ける可能性のある野生動植物として特定した。

- 20 宿主及び本組換え体由来の 2 タイプのクローン苗では花粉塊の存在が認められた。しかしながら、国内においてファレノプシス園芸品種の花粉を媒介する昆虫について報告がないこと、また、花粉塊であるため風による飛散は想定されないことから、花粉が拡散する可能性は極めて低い。また、近縁野生種との人為的交配を行ったが、宿主及び組換え体共に 3 倍体であり、中身の充実した種子は全く得られなかった。したがって、仮に花粉の拡散が生じたとしても組換え体と近縁野生種の雑種が得られる可能性は極めて低いと考えられる。さらに、自然条件下において園芸品種と国内に自生する近縁野生種が交雑した事例は報告されていないことを考え併せると、本組換え体と近縁野生種が自然条件下で交雑する可能性はないと考えられた。
- 25

- よって、総合評価として、本組換えファレノプシスは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。
- 30

引用文献

Balilashaki, K., Gantait, S., Naderi, R., and Vahedi, M. (2015) Capsule formation and
asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by
5 pollination season and maturity. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21, 341-347.

Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson, D. V. and Kemp, J. D. (1983) Nucleotide sequence
of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumifaciens* octopine Ti plasmid
pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2, 335-350.

10 Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids
Res.* 12, 8711-8721.

15 Bevan, M., Barnes, W. M., and Chilton, M.-D. (1983) Structure and transcription of the
nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 369-385.

Brown, R. C. and Lemmon, B. E. (1991) Pollen development in orchid. 3. A novel
generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. *J. Cell Sci.* 99,
273-281.

20 Burnham, C. R. (1962) Chapter 7 Autopolyploidy. In: *Discussion in Cytogenetics*,
pp.168-202. Burgess Pub. Co.

25 Cavanas, M. J., Vazquez, D. and Modolell, J. (1978) Dual interference of hygromycin B
with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur. J.
Biochem.* 87, 21-27.

30 Chen, P.-Y., Wang, C.-K., Soong, S.-C. and To, K.-Y. (2003) Complete sequence of the
binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from
transgenic plants. *Mol. Breed.* 11, 287-293.

Frisch, D. A., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Thomas, T. L., Hardin, S. H. and
Hall, T. C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.*
27, 405-409.

35 Gallie, D. G. and Walbot, V. (1992) Identification of the motifs within the tobacco mosaic

virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.* *20*, 4631-4638.

5 Griesbach, R. J. (2002). Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. In: Trends in new crops and new uses, pp.458-464. Janick, J. and Whipkey, A. (eds.), ASHS Press.

10 Gritz, L. and Davies, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *25*, 179-188.

15 Holton, T. A., Brugliera, F., Lester, D. R., Tanaka, Y., Hyland, C. D., Menting, J. G. T., Lu, C.-Y., Farcy, E., Stevenson, T. W. and Cornish, E. C. (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* *366*, 276-279.

Holton, T. A. and Cornish, E. C. (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* *7*, 1071-1083.

20 Johnson, E. T., Yi, H., Shin, B., Oh, B.-J., Cheong, H. and Choi, G. (1999) Cymbidium hybrid dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J.* *19*, 81-85.

25 Mitsuhashi, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. and Ohashi, Y. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* *37*, 49-59.

30 Pietrzak, M., Shillito, R. D., Hohn, T. and Potrykus, I. (1980) Expression in plants of two bacterial antibiotics resistance gene after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Res.* *14*, 5857-5868.

35 Rao, R. N., Allen, N. E. Hobbs, J.N. Jr., Alborn, W.E. Jr., Kirst, H. A. and Paschal, J. W. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *24*, 689-695.

- Schuiteman, A., Carlswald, B. S., Pridgeon, A. M., Kocyan, A., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. and Motes, M. (2014) Subtribe Aeridinae. In: Genera Orchidacearum Vol 6, pp.111-123. Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds.), Oxford University Express.
- Suetsugu, K. and Tanaka, K. (2013) Pollination of *Sedirea japonica* (Orchidaceae) by *Bombus diversus diversus* (Hymenoptera: Apidae). Eur. J. Entomol. *110*, 545-548.
- Tatsuzawa, F., Saito, N., Seki, H., Hara, R., Yokoi, M. and Honda, T. (1997) Acylated cyaniding glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. Phytochemistry *45*, 173-177.
- Tokuhara, K. and Mii, M. (1998) Somaclonal variations in flower and inflorescence axis in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Plant Biotechnol. *15*, 23-28.
- Wood, J., Carlswald, B. S., Pridgeon, A. M., Veitch, N. C., Grayer, R. J., Schuiteman, A., Kocyan, A., Chase, M. W. and Motes, M. (2014) Phalaenopsis. In: Genera Orchidacearum Vol 6, pp.233-241. Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. and Rasmussen, F. N. (eds). Oxford University Express.
- Xiaohua, J., Dezhu, L., Zongxin, R. and Xiaoguo, X. (2012) A generalized deceptive pollination system of *Doritis pulcherrima* (Aeridinae: Orchidaceae) with non-reconfigured pollinaria. BMC Plant Biol. *12*, 67.
- Zhang, X. S. and O'Neill, S. D. (1993) Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. Plant Cell *2*, 403-418.
- 青山幹男 (1993) ファレノプシス交雑種の倍数性, 広島県立農業技術センター研究報告 *57*, 55-62.
- 新井祥穂、大呂興平、古関喜之、永田淳嗣 (2011) 台湾のコチョウラン産業の動態と国際リー栽培, E-journal GEO *6*, 16-32.

- 市橋正一、榎山彬彦、山下俊宏、吉田義信 (1993) V 栽培マニュアル, pp.137-148, 花専科
* 育種と栽培 ファレノプシス, 市橋正一編, 誠文堂新光社
- 5 市橋正一、三位正洋 (2006) 第 3 章 ファレノプシスの無菌培養, pp.75-142, 実践花き園芸
技術 ファレノプシス 栽培と生産, 誠文堂新光社
- 市村一雄 (2013) 花き流通最新の動向, Bull. Natl. Inst. Flor. Sci., 13, 1-15.
- 10 内田一仁 (2001) 育成品種の栽培特性一堂ヶ島洋らんセンターー, pp.253-254, 花卉園芸
大百科 15 ラン, 農文協編, 社団法人農山漁村文化協会
- カール フォン フリッシュ (1975) ミツバチの色感と花の色, pp.156-161, あなたの
生物学 上巻, 図鑑の北隆館
- 15 田中肇 (1993) 花の色と昆虫ー昆虫への信号, pp.69-75, 花に秘められたなぞを解くた
めに・花生態学入門・, 農村文化社
- 中島睦子 (2012) 日本ラン科植物図譜 文一総合出版
- 20 永田治彦 (1993) VII 海外の生産動向 [3] オランダの大規模・高生産効率経営, pp.201-204,
花専科* 育種と栽培 ファレノプシス, 市橋正一編、誠文堂新光社
- 日本花き生産協会 (2013) 第 15 回全国胡蝶蘭部門総会 添付資料④
- 25 農林水産省 (2008) 品目別作付け面積及び出荷量累年統計
- 農林水産省 (2009) オランダ花き輸出戦略調査報告書
- 30 長友宏明、樋口茂四郎、前田浩典、原幹博、林弘旦、福田輝明、遠藤宗男 (1993) VI 各地
の事例, pp.149-184. 花専科* 育種と栽培 ファレノプシス, 市橋正一編, 誠文堂新光
社
- フリードリッヒ G. バルト (1997) 23 章 香水集めとランの花のトリック, pp.214-224.
昆虫と花 共生と共進化, 渋谷達明監訳, 八坂書房
- 35 藤井義晴 (1991) 根から出る物質によるアレロパシーの検定手法、農業環境研究情報、8,

31-32.

路川宗男、今井清太、野水美奈、宮田佳奈、鎌田博（2005） 筑波大学構内の植物相 2004,
筑波大農林研報 18, 15-35

5

米田和夫、百瀬博文、窪田聡（1993）コチョウランの花粉塊貯蔵と種子形成ならびに発芽に
およぼす有機溶媒の影響, 熱帯農業 37, 259-263.

10

渡辺尚一（2001）栽培特性と経営上の課題, pp.250-252, 花卉園芸大百科 15 ラン, 農文協
編, 社団法人農山漁村文化協会

緊急措置計画書

平成 29 年 3 月 2 日

5 氏名 国立大学法人 筑波大学
学長 永田 恭介
住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号

10 氏名 株式会社インプラントイノベーションズ
代表取締役社長 高根 健一
住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番 1

15 氏名 石原産業株式会社
代表取締役社長 田中 健一
住所 大阪府大阪市西区江戸堀一丁目 3 番 15 号

第一種使用規程の承認を申請している青紫色ファレノプシス (*CcF3'5'H, Phalaenopsis Wedding Promenade*) (311) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に判断された場合に、以下の措置をとることとする。

20

1. 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

(平成29年1月現在)

筑波大学	
◎	筑波大学遺伝子実験センター 准教授 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会 委員	
○	筑波大学遺伝子実験センター長 教授
	筑波大学生命環境系 准教授
	筑波大学生命環境系 教授
個人情報のため非開示	筑波大学生命環境系 教授 遺伝子組換え実験安全委員会委員長
	筑波大学生命環境系 准教授
	筑波大学人文社会系 教授
	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学医学医療系 准教授

	筑波大学生命環境系 教授
	筑波大学生命環境系 教授
個人情報の ため非開示	筑波大学医学医療系 教授
	筑波大学医学医療系 准教授
	筑波大学生命環境系 教授
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品安全研究領域 食品安全性解析ユニット長

株式会社インプラントイノベーションズ 遺伝子組換え安全委員会 委員	
個人情報の ため非開示	株式会社インプラントイノベーションズ研究開発部 部長 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番地 1
	株式会社インプラントイノベーションズ研究開発部 安全主任
	株式会社インプラントイノベーションズ研究開発部 課長
	株式会社インプラントイノベーションズ研究開発部 主任研究員

石原産業株式会社 組換え DNA 実験安全性審査委員会 委員	
	石原産業株式会社中央研究所生物科学研究室 室長 滋賀県草津市西渋川 2 丁目 3-1
個人情報の ため非開示	石原産業株式会社中央研究所総務部 部長
	石原産業株式会社中央研究所研究管理部 部長
	石原産業株式会社アニマルヘルス事業本部研究部 部長補佐
	石原産業株式会社アニマルヘルス事業本部研究部 主任
	石原産業株式会社中央研究所生物科学研究室 研究主管
	石原産業株式会社中央研究所安全性研究室

◎栽培試験責任者 ○管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5

管理責任者及び栽培試験責任者は、第一種使用等の状況に関し、筑波大学遺伝子実験センター、(株)インプラントイノベーションズ及び石原産業株式会社中央研究所実験従事者等から常に可能な限り情報収集を行う。また、筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会は委員による査察を行う。

10

3 第一種使用等をしている者に緊急措置に従って対処する必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、管理責任者及び栽培責任者は、直ちに実験従事者に口頭で伝えるとともに、当該影響を防止するために適切な措置を講ずるものとする。

5 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

10 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合の具体的措置としては、本組換え体を細断して隔離ほ場内に鋤き込み、または、細断後、オートクレーブ等で不活化し、隔離ほ場の外への本組換え体の放出が行われないようにする。また、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場の外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を速やかに実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

15

生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合、弊学及び弊社はそのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

モニタリング計画書

平成 29 年 3 月 2 日

- 5 氏名 国立大学法人 筑波大学
学長 永田 恭介
住所 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
- 10 氏名 株式会社インプラントイノベーションズ
代表取締役社長 高根 健一
住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番 1
- 15 氏名 石原産業株式会社
代表取締役社長 田中 健一
住所 大阪府大阪市西区江戸堀一丁目 3 番 15 号

第一種使用規程の承認を申請している青紫色ファレノプシス (*CcF3'5'H*, *Phalaenopsis* Wedding Promenade) (311) 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。

20

1 実施体制及び責任者

◎ 個人情報の ため非開示	筑波大学遺伝子実験センター 准教授 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 号
	筑波大学生命環境系 教授
	株式会社インプラントイノベーションズ 研究企画部

◎ 実施責任者

25 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

- 日本に自生する近縁野生種としては、ナゴラン (*Phalaenopsis japonica* (Linden & Rehb. f) Garay et H. R. Sweet)、フウラン (*Vanda falcata* (Thunb.) Hu)、ボウラン (*Luisia teres* (Thunb.) Blume)、ムニンボウラン (*L. occidentalis* Lindl)、サガリラン (*Diploprora championii* (Lindl) Hook. f.)、カヤラン (*Thrixspermum japonicum* Rehb. f.)、マツゲカヤラン (*Gastrochilus ciliaris* F. Maek)、カシノキラン (*G. japonicus* (Makino) Schltr)、ベニカヤラン (*G. matsuurae* (Makino) Schltr)、モミラン (*G. toramanus* (Makino) Schltr)、
- 30

ムカデラン (*Cleisostoma scolopendrifolius* (Makino) Garay)、イリオモテラン (*Trichoglottis luchuensis* (Rolfe) Garay et H. R. Sweet)、ジンヤ克蘭 (*Arachnis labrosa* (Lindl. et Paxt.) Rchb. f.) が知られているが、本組換え体との交雑のリスクの高いものとしては、ナゴラン、フウラン及びボウランが挙げられる。

5

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息状況

(1) モニタリング実施場所

10 筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場Ⅲ(茨城県つくば市天王台一丁目1番1号)及びその周囲100mの範囲。

(2) 対象となる野生植物の生育状況

15 2002年3月より2004年10月までに、筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場(茨城県つくば市天王台一丁目1番1号)のある筑波大学構内の植物相の調査が実施されているが、特定された近縁野生種は認められていない(路川ら、2005)。なお、隔離ほ場試験実施前に、再度、隔離ほ場周辺の近縁野生種を調査する予定である。

4 モニタリングの期間

20

本組換えファレノプシスの隔離ほ場試験開始時から試験終了時までの間とする。

5 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

25 モニタリング実施時期は、モニタリング対象とした上記近縁野生種の開花時期並びに果実(さく果)成熟期とする。

30 近縁野生種の開花時期(4~7月)に隔離ほ場から周囲100mの近縁野生種の生育の有無を確認する。近縁野生種の生育が確認された場合には、さく果成熟期(7月~11月)に結実の有無を確認する。結実が認められた場合には、位置情報を記録すると共に、結実株からさく果を回収し、種子を採取する。採取した種子からゲノムDNAを抽出し、PCR法により本組換えファレノプシスに特有な遺伝子を増幅することにより、交雑の有無を確認する。

6 モニタリングの結果の解析方法

35

PCR法による調査で本組換えファレノプシス由来の遺伝子が検出された場合には、本組

換えファレノプシスと本モニタリング対象とした野生植物の間に交雑が起こったものと判断する。

7 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

5

モニタリング及びその解析結果は、「切花及び鉢物の用に供するための使用、栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為」における第一種使用の最終申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

10 8 その他必要事項

モニタリング期間中に採取された近縁野生種中に本組換えファレノプシスに特有な遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行なうものとする。

15

引用文献

路川宗男、今井清太、野水美奈、宮田佳奈、鎌田博（2005）. 筑波大学構内の植物相 2004 筑波大農林研報、18, 15-35.

20

隔離ほ場試験計画書

第一部 受容環境

5 1. 隔離ほ場の所在地等

(1) 名称：筑波大学遺伝子実験センター 模擬的環境試験ほ場Ⅲ（隔離ほ場）

(2) 住所：茨城県つくば市天王台一丁目1番1号

10 (3) 電話番号：029-853-6006

(4) 地図：図1及び2（P57～57）参照

2. 責任者等

15 (1) 隔離ほ場試験の責任者：【個人情報につき非開示】

(2) 隔離ほ場管理責任者：【個人情報につき非開示】

3. 試験期間

20 承認日から平成35年3月31日まで

4. 施設概要

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、高さ230 cmのフェンス（有刺鉄線、メッシュフェンス（メッシュの大きさ、縦110 x 横46 mm）、コンクリート
25 基部）を設置している。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。土、遺伝子組換え体の残渣等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置していると
30 ともに、遺伝子組換え体の隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している（図3、P59）。試験栽培期間中、隔離ほ場内にビニール温室を設置し、出入り口および側窓に防鳥網を設置する。

5. 面積

(1) 隔離ほ場全体の面積：851 m²

35 (2) 試験に使用する面積：約18.6 m²

(3) 試験区の配置図：図 1 及び図 2 (P57～58) 参照

6. 隔離ほ場の周辺環境

(1) 隔離ほ場周辺の地形

- 5 隔離ほ場があるつくば市は、茨城県の南西部に位置し、市域の大部分は筑波・稲敷台地と呼ばれる標高 20～30 m の関東ローム層に覆われた平坦な地形であり、約 2.5 km 離れた場所には桜川があり、また南北に小貝川、谷田川、西谷田川などの河川がある。

(2) 土地利用状況

- 10 隔離ほ場の周辺は大学構内である。隔離ほ場の周辺構内は 6 m 以上の高さの街路樹で囲まれている。また、大学の周辺は、畑、民家が散在している。隔離ほ場から半径 500 m の範囲でファレノプシス（コチョウラン）栽培農家はない。

(3) 周辺の環境保護区

- 15 隔離ほ場は、環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、自然環境保全地域等）ではない。また、最も近い自然保護地域は、水郷筑波国定公園の筑波地区および水郷地区（霞ヶ浦）であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 7 km である。

(4) 気象条件の平年値

- 20 ① 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における気象データの平年値を表 1 (P60) に示した。
- ② 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点つくばアメダス観測所（茨城県つくば市）における過去 3 年分の気象データを表 2 (P61) に示した。

25

(5) 台風の襲来履歴

隔離ほ場がある関東地域への過去 10 年間の台風の接近数を表 3 (P62) に示す（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ）。

(6) 過去 10 年間の隔離ほ場冠水の状況

大学構内の使用予定隔離ほ場および周辺の隔離ほ場において、過去 10 年間にわたって冠水した記録はない。

(7) 強風による被害の状況

- 35 大学構内の使用予定隔離ほ場および周辺の隔離ほ場施設は、過去 10 年間にわたって被害を受けた記録はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

つくば市の洪水ハザードマップでは浸水が想定される区域とはなっていない。

http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/dbps_data/_material/_localhost/ken005/hazardmap-hyousi.gif

http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/dbps_data/_material/_localhost/ken005/hazardmap-rimen.gif

つくば市の地震防災マップでは、茨城県南部を震源とするマグニチュード 7.3 の地震又はつくば市の直下を震源とするマグニチュード 6.9 の地震が起きた場合の震度は最大で震度 6 強が予想されている。

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

鳥獣の被害が考えられるが、隔離ほ場にはフェンスが設置され、温室出入り口及び側窓には網を設置する。

7. 隔離ほ場周辺の生物相

(1) 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等影響を受ける可能性のある野生動物等はない

(2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

日本に自生する近縁野生種としては、ナゴラン (*Phalaenopsis japonica* (Linden & Rchb. f.) Garay et H. R. Sweet)、フウラン (*Vanda falcata* (Thunb.) Hu)、ボウラン (*Luisia teres* (Thunb.) Blume)、ムニンボウラン (*L. occidentalis* Lindl)、サガリラン (*Diploprora championii* (Lindl) Hook. f.)、カヤラン (*Thrixspermum japonicum* Rchb. f.)、マツゲカヤラン (*Gastrochilus ciliaris* F. Maek)、カシノキラ (*G. japonicus* (Makino) Schltr)、ベニカヤラン (*G. matsuran* (Makino) Schltr)、モミラン (*G. toramanus* (Makino) Schltr)、ムカデラン (*Cleisostoma scolopendrifolius* (Makino) Garay)、イリオモテラン (*Trichoglottis luchuensis* (Rolfe) Garay et H. R. Sweet)、ジンヤクラン (*Arachnis labrosa* (Lindl. et Paxt.) Rchb. f.) が知られている。しかし、隔離ほ場のある筑波大学構内では、交雑可能な近縁野生種の自生は認められていない(路川、2005)。また、隔離ほ場試験開始前に、再度、隔離ほ場周辺の近縁野生種の調査を実施する。

8. 栽培管理

(1) 栽培履歴

新規に設置したため栽培履歴はない

5

(2) 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

10 (3) 栽培終了後の利用計画

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに植物体を隔離ほ場にすき込む、またはオートクレーブ等の適切な手段で対処する。なお、本遺伝子組換えファレノプシスの栽培終了後も、本隔離ほ場では他の遺伝子組換え植物の栽培を行う予定である。

15 (4) 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

①隔離ほ場の施設

1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

20 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。

25 3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えファレノプシスの残渣等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該ファレノプシス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。

30 4) 本組換えファレノプシスの植物体が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、栽培期間中は防鳥網を設置する。なお、調査、作業のために防鳥網を外す場合には、できる限り短時間とし、作業終了後、直ちに再度設置する。

5) 本組換えファレノプシスの栽培は鉢で行い、越冬性、越夏性試験以外の調査はビニール温室を設置して行う。

②隔離ほ場での作業要領

35 1) 本組換えファレノプシス及び比較対照の非遺伝子組換えファレノプシス以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを、除草管理により最小限に抑える。

2) 本組換えファレノプシスを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ファレノプシスが漏出しない構造の容器に入れる。

5 3) ファレノプシスに自然条件下での栄養繁殖性はないため、2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えファレノプシスの栽培終了後は、当該ファレノプシス及び比較対照の非組換えファレノプシスの根を含めた植物体全体を細断して隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。ただし、花及び果実（さく果）については、オートクレーブで不活化後、廃棄する。

10

4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場で洗浄すること等により、意図せずに本組換えファレノプシスが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

15

5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

6) 1) から 5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

20

7) 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書に基づき、速やかに対処する。

引用文献

路川宗男、今井清太、野水美奈、宮田佳奈、鎌田博（2005）. 筑波大学構内の植物相 2004 筑波大農林研報、18, 15-35.

25

30

35

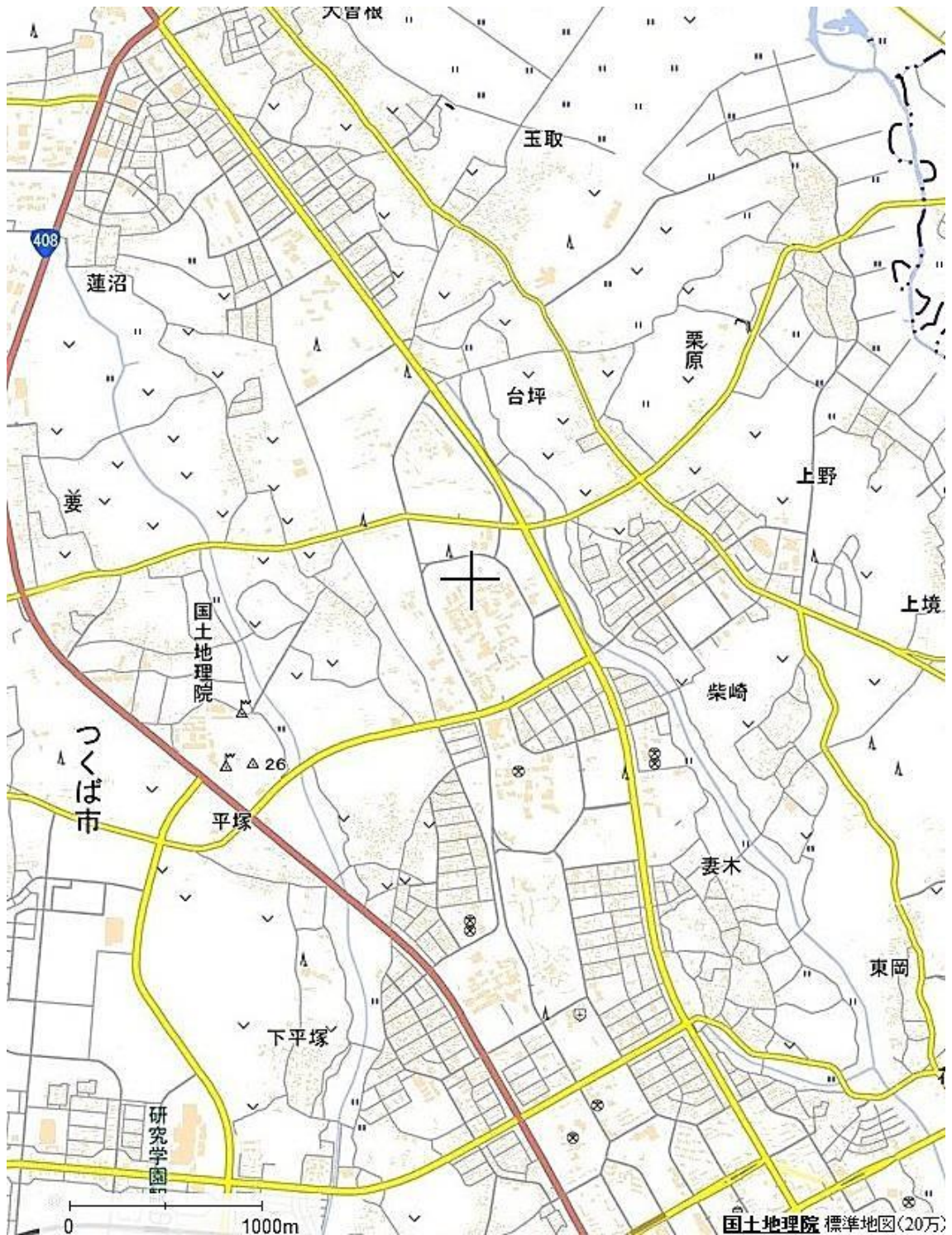


図1 隔離ほ場所在地に関する地図（国土地理院ウェブサービスより）

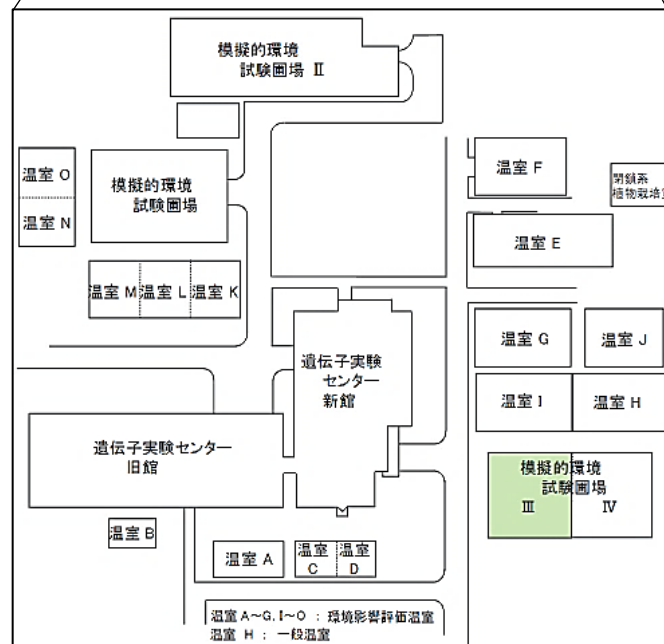


図2 遺伝子実験センターの所在および隔離ほ場の配置図



隔離ほ場外周



隔離ほ場内部（温室設置場所）



洗い場

5

図 3 隔離ほ場の設備

表 1 隔離ほ場周辺における気象データの平年値

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

要素	降水量(mm)	気温(°C)			風速(m/s)・風向		日照時間(h)
	合計	平均	最高	最低	平均	最多風向	
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1990～2010	1981～2010
資料年数	30	30	30	30	30	21	30
1月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	西北西	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	西北西	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	北東	171
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	北東	173.3
5月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	東	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	東	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	東	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	東	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	北東	123.9
10月	165.9	16	20.9	11.3	2	北東	136.5
11月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	北西	146.5
12月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	西北西	181.3

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2016 年 7 月 4 日)

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&block_no=47646&year=&month=&day=&view=

表 2 隔離ほ場周辺の過去 3 年分の気象データ

(つくばアメダス観測所 (茨城県つくば市) における気象データの平年値)

年	月	降水量(mm)				気温(℃)					風速(m/s)					日照 時間 (hr)
		合計	最大			平均			最高	最低	平均	最大		最大瞬間		
			1日	1時間	10分間	日平均	日最高	日最低				風速	風向	風速	風向	
2015	1	86	32.5	11	2.5	3.9	9.8	-1.8	16.9	-6	2.7	9.1	西北西	17.4	南西	202.6
	2	49.5	15	6.5	4	3.9	9.4	-1.3	17	-6.7	2.3	10	北西	19.7	北西	172.2
	3	81	29	7.5	2.5	8.7	14.7	2.5	22.9	-2.5	2.5	9.9	西北北西	19.2	西北北西	200.6
	4	91	21	6	3.5	13.1	18.8	7.4	28.8	1	2.6	9.8	南	18.9	南南西	161.6
	5	96.5	47	36.5	8	19.4	25.2	13.4	29.3	5.4	2.5	10.8	南南西	20.1	西南西	245.7
	6	172.5	49	41.5	15	21.1	25.8	16.9	30.7	11.4	2.1	7.7	北西	14.8	西北北西	134.6
	7	193	50.5	41.5	18.5	25.4	29.6	21.9	34.8	17.4	2.3	9.4	南	16	南	185.5
	8	100.5	58.5	57.5	20.5	25.6	29.8	22.5	36.1	18	2.3	6.2	東	12.7	北	146.1
	9	360	140	43.5	11	21.6	25.5	18.3	31.2	10.8	2.1	6.6	南南西	13.8	東南東	117.4
	10	44	15	12	4	16.7	21.8	11.7	28.1	3.4	2.3	11	南南西	21.9	南南西	199
	11	148.5	37	10	3.5	12.5	16.9	8	21.6	0.2	1.9	6.8	西北北西	13.8	西	118.7
	12	40.5	29	10.5	3	7.2	13	1.4	24.4	-4.7	1.8	9.8	南	21.7	南	174.9
2014	1	24	15.5	3.5	1	2.8	9.6	-3.6	14.9	-7.5	2	8.9	北西	17.3	西北北西	220.8
	2	163	110	23.5	8.5	3.5	9.1	-2.1	19.4	-7.7	2.3	9.3	東北東	21	北東	158
	3	86.5	24	15.5	9	8.1	14	1.8	23	-5.3	2.7	10.8	南	19.6	西	213.1
	4	146	52	10.5	3	12.8	19.1	6.6	25	0	2.5	8	北西	16.8	西北北西	227.7
	5	111.5	42.5	10.5	4.5	18.2	24.3	12.1	31.1	6.1	2.6	10.2	南	18	南	240.3
	6	332	71.5	23	14.5	21.8	26	18.3	32.3	15.2	2.3	6.5	北東	15.2	東北東	151.3
	7	97	23	12	8	25	29.8	21	35.1	17.6	2.1	8.9	南南西	15.3	南南西	188.5
	8	169.5	37	30.5	9.5	25.8	30.6	22.1	36.2	17.6	2.6	9.6	南南西	17.5	南南西	174.8
	9	88	32.5	10.5	6	20.9	25.5	16.7	30.5	10.6	2.1	5.9	東北東	10.9	東北東	166
	10	300	131.5	30	8	16.5	21.8	11.7	30.4	4.2	2.1	9.5	南	16.8	南	144.1
	11	65.5	24.5	4.5	1.5	11.3	16.6	6.3	21.4	-0.4	1.8	7.3	北北西	15.1	北北西	130.4
	12	59	15.5	6.5	1.5	4.1	10.1	-1.5	14.1	-6.9	2.1	9.7	西北北西	20.1	西	196.2
2013	1	49	40.5	6.5	1.5	2.4	8.9	-3.4	14.3	-7.3	2.2	9.6	西北北西	16.5	北西	218.7
	2	31.5	14	4.5	1	3.5	9.4	-2.3	18.5	-7.6	2.5	10.6	北西	19.5	西北北西	181.6
	3	45	11.5	9	2.5	10	16	3.7	26.6	-2.6	3.1	15.1	南南西	27.7	南南西	187.1
	4	167.5	43.5	15	10.5	12.8	18.5	6.3	24.2	-0.2	3.2	12.2	南南西	22.2	南西	202.4
	5	81.5	21	10	5	17.3	23.3	11.6	28.6	1.7	2.6	7.8	南	13.3	南	243.9
	6	138	45.5	15.5	6.5	20.9	25.3	17.5	29.6	10.8	2.3	7.7	南南西	13.8	南西	126.1
	7	45.5	25.5	22.5	12.5	24.9	29.9	21.1	36.3	17.1	2.4	7.2	南南西	15.3	北北西	170.7
	8	70.5	29.5	19	10	27.2	32.6	22.7	36.8	18.4	2.2	6.8	南南西	14.4	北東	221.4
	9	175	74	22.5	11.5	22.9	27.8	18.3	35.2	9	2.4	12.2	南南西	22.9	南南西	172.3
	10	417	124.5	27	8	17.8	22.2	13.8	30.4	5.1	2.4	14.5	北北西	28.1	北北西	122.6
	11	16	7	4.5	1.5	9.8	16.6	3.8	21.2	-1.9	1.8	8.2	南南西	19.1	南南西	185.3
	12	45.5	17.5	4	2	4.8	11.2	-1	16.2	-5.6	2.2	9.3	南南西	17.3	西	192.7

5

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス 2016 年 7 月 4 日)

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2013&month=&day=&view=p1
http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2014&month=&day=&view=p1

10

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=40&block_no=47646&year=2015&month=&day=&view=p1

表 3 関東地域への過去 10 年間の台風の接近数

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			3
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			5
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3

- 5 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合とする。接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

- 10 (気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ、アクセス 2016 年 7 月 4 日)
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

第二部 隔離ほ場での試験計画

隔離ほ場での遺伝子組換えファレノプシス生物多様性影響評価試験の研究調査項目として、次の 7 項目を予定している。また、特定網室における調査結果との関連は表 4 (P65) に記載した。

- (1) 花の形態及び花色に関する調査
- (2) 形態及び生育特性に関する調査
- (3) 自殖による種子産生不能の確認調査
- (4) 生育初期における低温または高温耐性に関する調査
- (5) 越冬性、越夏性に関する調査
- (6) 訪花昆虫相に関する調査
- (7) 有害物質の産生性に関する調査

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) 花の形態及び花色に関する調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスの花の形態及び花色の安定性を調査する。

場所：隔離ほ場のビニール温室

数量：宿主及び組換えファレノプシス、各 10 鉢。

実施方法：宿主及び組換えファレノプシスをプラスチック鉢に定植してビニール温室で栽培し、目視による花卉（ペタル）の形態の調査及びカラーチャートとの比較による花色の調査を行う。

- (2) 形態及び生育特性に関する調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスの形態及び生育特性について調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室

数量：宿主及び組換えファレノプシス、各 10 鉢。試験（1）と兼ねる。

実施方法：宿主及び組換えファレノプシスをプラスチック鉢に定植してビニール温室で栽培し、開花時期、植物体の長さ、花序の数、花序の型や花数、葉の大きさ、花の大きさなどを調査し、比較する。

- (3) 自殖による種子産生不能の確認調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスが自殖によって種子を産生できないことを確認する。

場所：隔離ほ場のビニール温室

数量：宿主及び組換えファレノプシスともに、各 5 鉢。

実施方法：宿主及び組換えファレノプシスをプラスチック鉢に定植して隔離ほ場のビニー

ル温室で栽培し、開花期に自殖し、さく果の形成や種子の有無等を調査し、比較する。

(4) 生育初期における低温または高温耐性に関する調査

5 目的：遺伝子組換えファレノプシス幼苗の低温または高温耐性を宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室及び屋外

数量：宿主及び組換えファレノプシス幼苗ともに、各群 5 鉢。

実施方法：宿主及び組換えファレノプシス幼苗をプラスチック鉢に定植して隔離ほ場の屋外で栽培し、冬期間或いは夏期間における植物体地上部の状態を比較する。

10

(5) 越冬性、越夏性に関する調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスの越冬性、越夏性を宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室及び屋外

数量：宿主及び組換えファレノプシスともに、各群 5 鉢。

15 実施方法：宿主及び組換えファレノプシスをプラスチック鉢に定植して隔離ほ場の屋外で栽培し、冬期間或いは夏期間における植物体地上部の状態を比較する。

(6) 訪花昆虫相に関する調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスへの訪花昆虫相を調査し、宿主と比較する。

20 場所：隔離ほ場のビニール温室

数量：宿主及び組換えファレノプシス、各 10 鉢。試験(1)と兼ねる。

実施方法：晴天微風日を選び、ビニール温室の出入り口を開放し、プラスチック鉢に定植した宿主及び遺伝子組換えファレノプシス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。

25

(7) 有害物質の産生性に関する調査

目的：遺伝子組換えファレノプシスの有害物質の産生性を調査し、宿主と比較する。

場所：隔離ほ場のビニール温室

数量：宿主及び組換えファレノプシス、各 5 鉢。

30 実施方法：宿主及び組換えファレノプシスをプラスチック鉢に定植して隔離ほ場のビニール温室で栽培し、栽培後のミズゴケを採取し、根圏土壌法(ミズゴケで代替)で根からの分泌物の種子発芽への影響を調査する。また、ミズゴケ中の微生物を調査する。さらに、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を調査し、比較する。

35

表 4 組換えファレノプシス系統「311」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 (特定網室)
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には、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。 栄養繁殖によって増殖した個体における安定性を確認した。 目的の移入された核酸及び周辺配列をクローニングし、解析する。 目的以外の核酸の移入の有無をサザン解析により解析する。	移入された核酸は組換え体ゲノム中に1コピー存在した。 組換え体当代と栄養繁殖個体間に、差異は見られなかった。
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又は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安定性	○ ○		RT-PCR法により解析した。 栄養繁殖によって増殖した個体間におけるその安定性を確認した。	移入された遺伝子は組換え体中で安定的に発現し、栄養繁殖個体でも安定して発現していた。
3. 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。	組換え体の花色は青紫色で安定していた。
4. 形態の特性	○	●	花序の数、花序の型、花序の花数、葉の大きさ、花の大きさを調査した。 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序の花数及び花の大きさに統計的有意差が見られた。

5. 生育の特性	○	●	植物体の長さ、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植物体の長さに統計的有意差が見られた。
6. 種子の生産量等		●	隔離ほ場での開花期に自殖し、さく果の形成や種子の有無等を調査し、種子が生産できないことを確認する。	
7. 幼苗の低温又は高温耐性		●	隔離ほ場における冬季又は夏季の幼苗の生育を調査予定。	
8. 成体の越冬又は越夏性		●	隔離ほ場における越冬又は越夏性を調査予定。	
9. 花粉の稔性	○ ● ●		酢酸オルセイン染色により花粉の充実度を調査した。 花粉の核 DNA 量を分析する。 花粉管の発芽／伸長試験を行う。	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	○		酢酸オルセイン染色した花粉四分子の大きさを調査した。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
11. 交雑率	○ ○ ●		人工交配による野生種 2 種との交雑性を調査した。 人工交配による園芸種との交雑性を調査した。 人工交配による野生種 1 種との交雑性を追加調査する。	宿主及び組換え体ともに交雑性はなかった。 宿主及び組換え体ともに交雑性はなかった。
12. 有害物質の産生性				

鋤き込み試験	○	●	植物残渣を土壤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。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性	○	●	隔離ほ場における植物残渣を土壤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予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性		●	プラントボックス法により根からの分泌物による実生の幼根長への影響について調査した。	
		●	根圏土壌法（土の代わりにミズゴケを代替）により根からの分泌物による種子の発芽への影響について調査予定。	
		●	成体となるまで栽培した鉢のミズゴケを採取し、希釈平板法を用いて調査予定。	
13. アグロバクテリウムの残存性	○		組換え植物体から DNA を抽出し、アグロバクテリウムに由来する核酸の有無を調査した。	アグロバクテリウムに由来する核酸は検出されなかった。
	○		組換え植物体の磨砕液を寒天培地へ塗布し、コロニー形成の有無で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性は認められなかった。
14. 訪花昆虫相	●	●	隔離ほ場における訪花昆虫相を調査予定	
			ケージ中の開花した組換え体へハチを放飼し、花粉媒介の有無を調査する。	

○：実施済み、●：実施予定

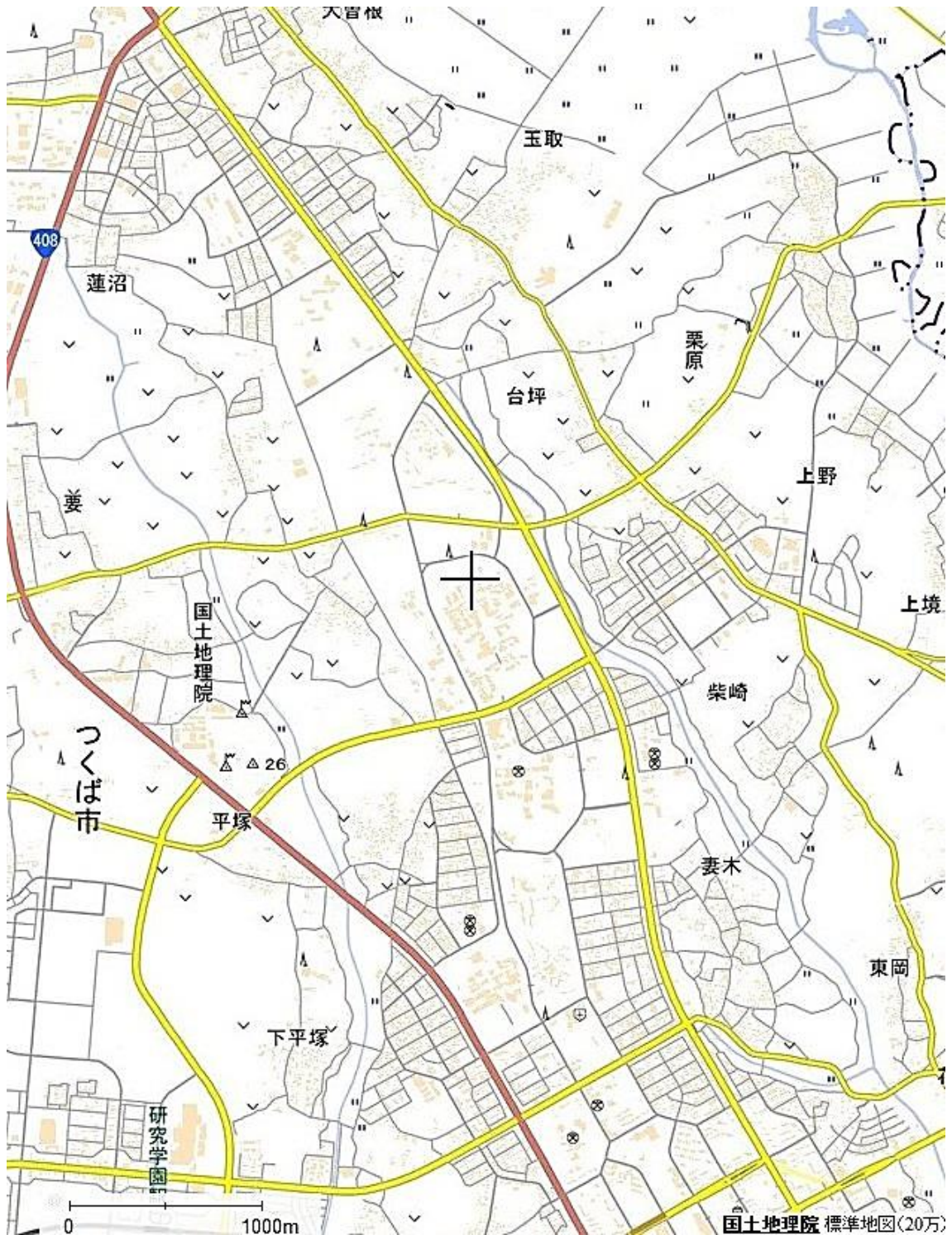
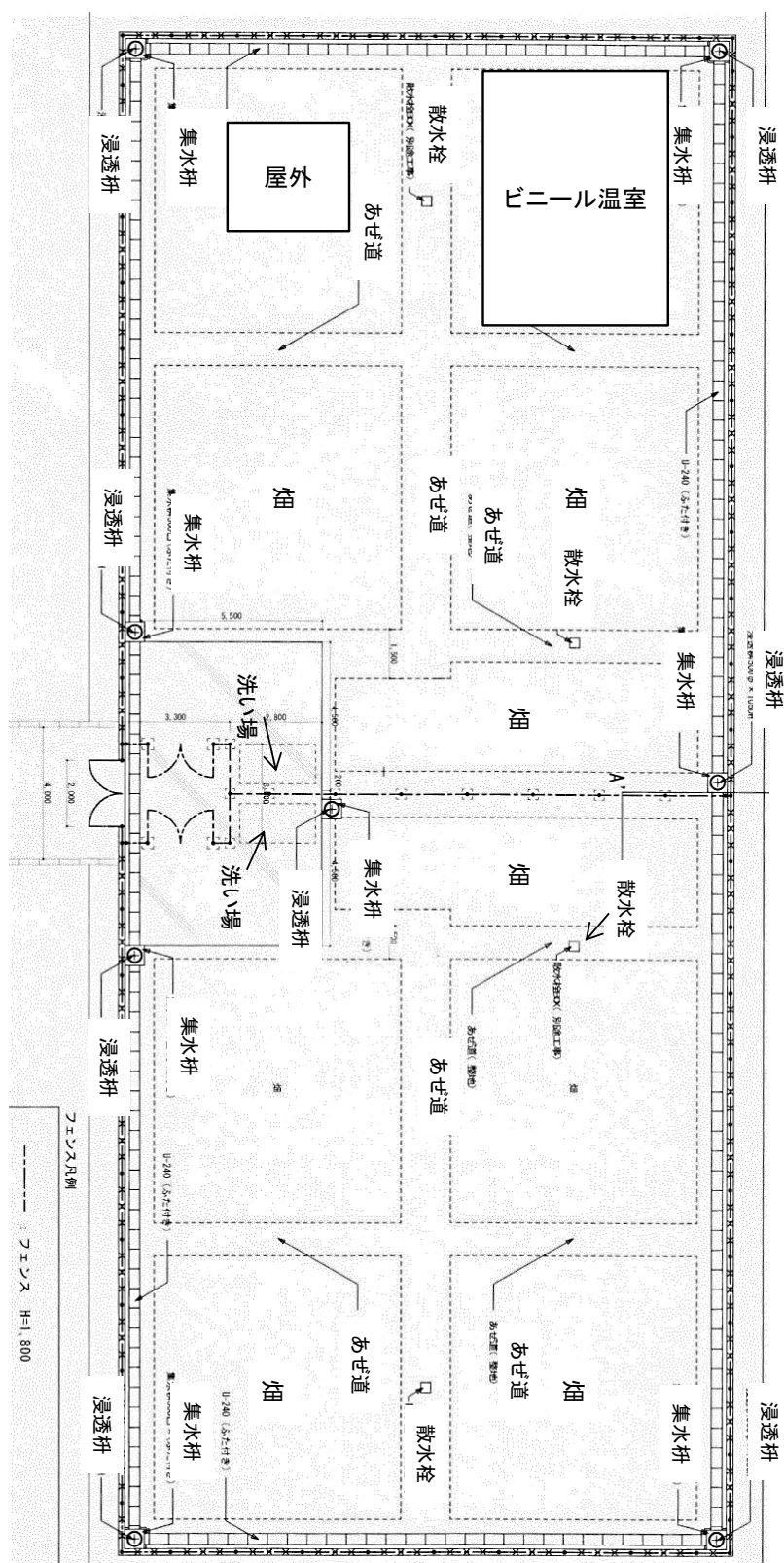


図4 隔離ほ場所在地に関する地図（国土地理院ウェブサービスより）

隔離ほ場は+印に位置する



図5 筑波大学遺伝子実験センター 隔離ほ場の全体図
(赤枠④本実験に使用する隔離ほ場)



5
10
15
20
25
30



ビニール温室

311: 本組換え体

WP: 非組換え体 (Wedding Promenade)

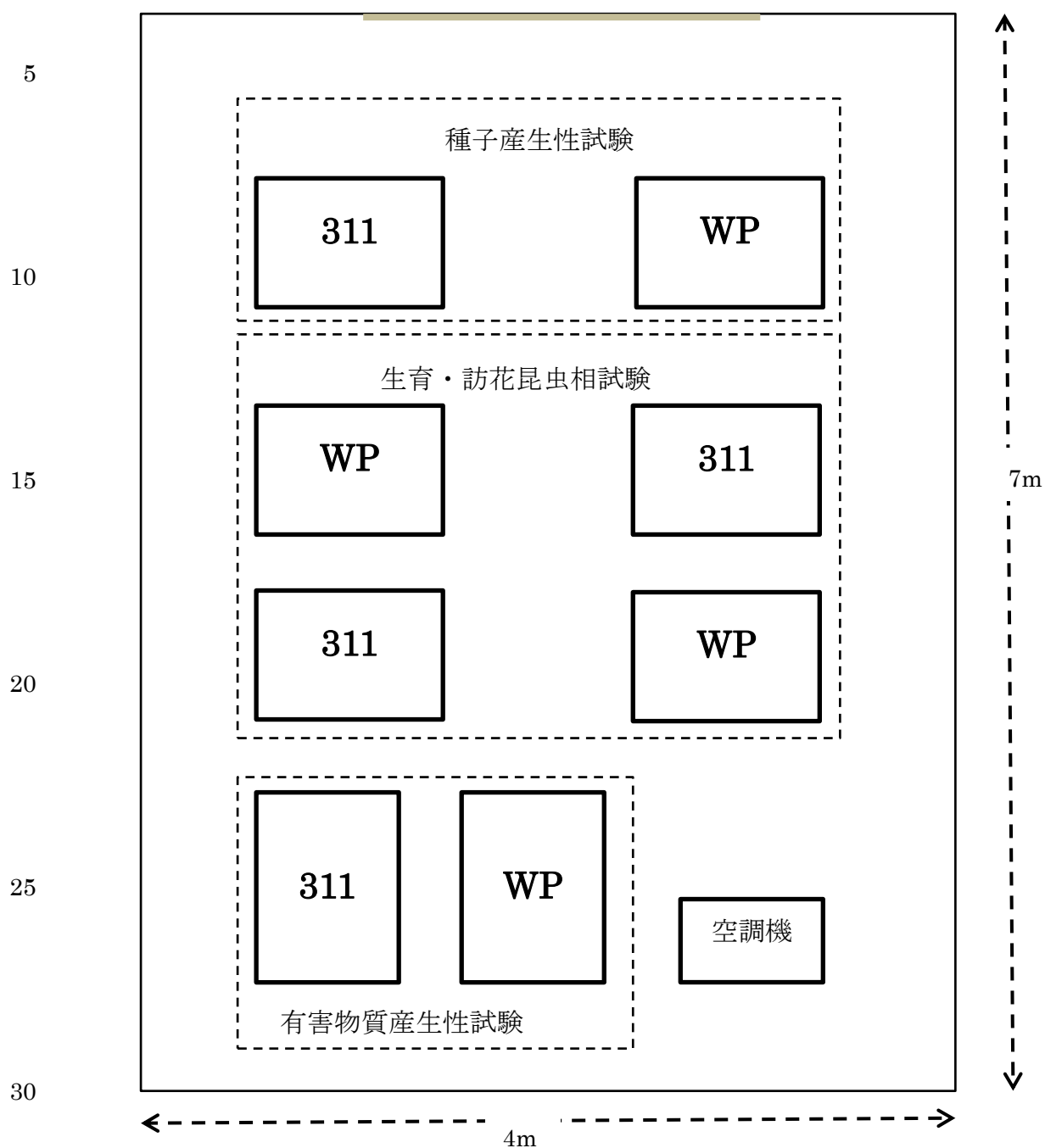


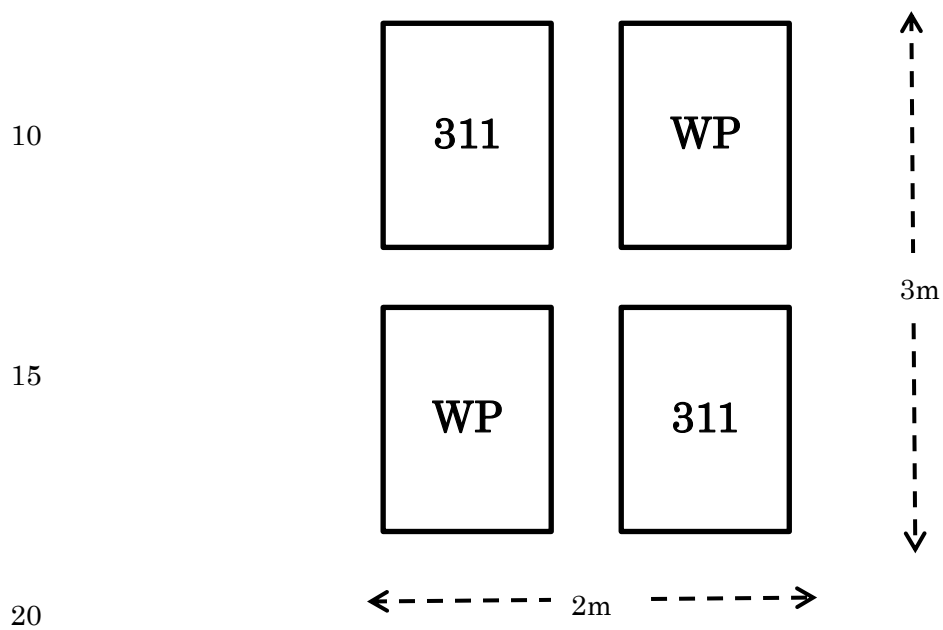
図 7 隔離ほ場試験（ビニール温室）の試験区図



屋外 311：本組換え体 WP:非組換え体（Wedding Promenade）

5

越冬性、越夏性（低温、高温耐性）試験



25

図 8 隔離ほ場試験（屋外）の試験区図

第三部 隔離ほ場試験期間中に特定網室等で実施する追加試験

隔離ほ場試験期間中に、特定網室等で以下の試験を追加実施する。

- 5 (1) 移入された核酸に関する調査
 - ① 移入された核酸及び周辺配列をクローニングした後、解析し、コピー数を確定する。
 - ② 本組換えファレノプシスにおける、作出に利用したベクターの T-DNA 領域以外の核酸の有無について、サザンブロット解析で調査する。
- 10 (2) 宿主及び本組換え体の花粉の特性に関する調査
 - ① 宿主及び組換え体の花粉の核 DNA 量を分析し、減数分裂時の不等分離の有無／程度を調査する。
 - ② 宿主及び組換え体の花粉管発芽／伸長試験を実施し、花粉の機能不全の有無／程度を調査する。
 - 15 ③ 宿主及び組換え体の花粉塊をナゴランの花（～100 個）に人為的に交配し、交雑性の有無／程度を追加調査する。
- (3) 虫媒に関する調査
 - ① ケージ中の開花した組換えファレノプシスに、ナゴランの媒介昆虫であるトラマルハナバチを放飼し、本マルハナバチによる花粉媒介の有無を調査する。

20

添付資料リスト

- 5 別添資料 1 「宿主内へ移入された核酸の構成、ベクター及び挿入部位に関する情報」
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 2 「アグロバクテリウムの残存性」
社外秘情報につき非開示
- 10 別添資料 3 「細胞内へ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」
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 4 「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」
社外秘情報につき非開示
- 15 別添資料 5 「宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」
社外秘情報につき非開示