

青紫色ファレノブシス (*CcF3'5'H, Phalaenopsis Wedding Promenade*) (311NR)

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	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
①和名、英名及び学名	3
②宿主の品種名又は系統名	3
③国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(2) 使用等の歴史及び現状	4
①国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
②主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ. 基本的特性	6
ロ. 生息又は生育可能な環境の条件	7
ハ. 捕食性又は寄生性	7
ニ. 繁殖又は増殖の様式	7
ホ. 病原性	12
ヘ. 有害物質の産生性	12
ト. その他の情報	12
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	16
(2) ベクターに関する情報	20
イ. 名称及び由来	20
ロ. 特性	20
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	21
イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成	21
ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法	21
ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過	21

(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	24
(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	25
(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	33
(1) 使用等の内容	33
(2) 使用等の方法	33
(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	33
(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	33
(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	33
(6) 国外における使用等に関する情報	33
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	34
1. 競合における優位性	34
2. 有害物質の産生性	36
3. 交雑性	37
4. その他の性質	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
引用文献	44
緊急措置計画書	49
資料リスト	53

第一種使用規程承認申請書

令和 2年 5月 13日

5 農林水産大臣

江藤 拓 殿

環境大臣

小泉 進次郎 殿

10

氏名 石原産業株式会社

申請者

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

15

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。

20

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, Phalaenopsis Wedding Promenade</i> ) (311NR, OECD UI: ISK-311NR-4)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	観賞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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

## 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<sup>1</sup>) 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 (1989年、英国王立園芸協会「The International Orchid Register」登録)。形質は、ミディー系<sup>2</sup>で、花色は赤紫色、リップ<sup>3</sup>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、

25

---

<sup>1</sup> 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。

<sup>2</sup> 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。

<sup>3</sup> 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。

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 & 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. 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.) Rehb. 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・肉厚の切り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り花商業生産が始まった (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、切り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 年代になると切り花生産が各地に広がり、白花を中心に交配育種も進んだ (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  
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  
15 多い。ファレノプシスは鉢物或いは切り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場合が多い。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、先ず、台湾が挙げられる。温和な気候の台湾は、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、オランダ  
25 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、平  
35 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<sup>4</sup>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。花の様様は無地のもの、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

10

15

20

25

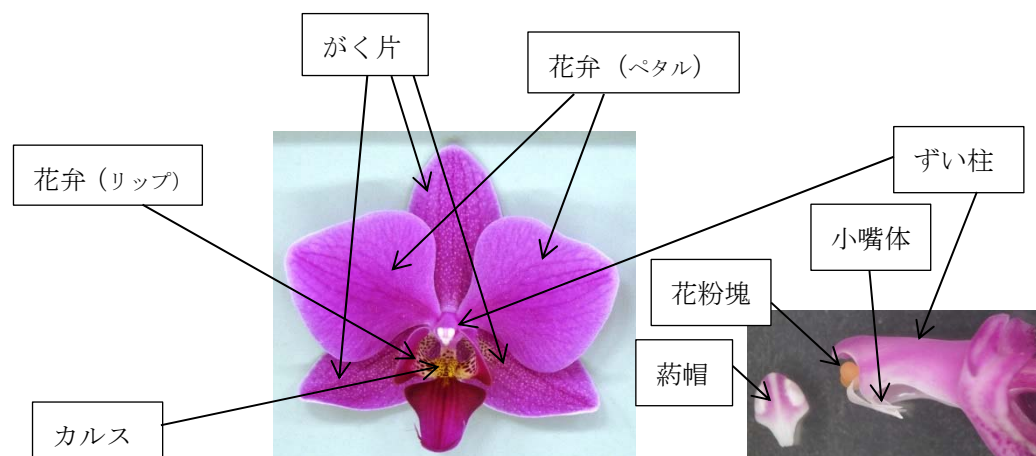


図1 ファレノプシスの花および葯帽を外したずい柱の拡大図

<sup>4</sup> 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。

<sup>5</sup> 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、

5 ストライプ、斑点のあるものなど、様々な模様の子種もある。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）。

10

#### ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

15 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、

20 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、

25 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。

30

#### ハ. 捕食性又は寄生性

—

35 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、P11）。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は 10 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。

- 15 前述（第一・1・(2)・①、P4）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（市橋ら, 2006）。

- 20 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）。

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

- 25 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。

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)

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。

10

- ・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 Register<sup>6</sup>」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> (ナゴラン)	<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> (ナゴラン)
<i>Vanda falcate</i> (フウラン)	<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> (ナゴラン)
<i>P. Tying Shin Blue Jay</i> <i>P. Purple Martin</i> <i>P. pulcherrima</i>	<i>V. falcate</i> (フウラン)
<i>Luisia teres</i> (ボウラン)	<i>P. japonica</i> (ナゴラン)
<i>P. Red Coral</i> <i>P. Little One</i> <i>P. japonica</i> (ナゴラン)	<i>L. teres</i> (ボウラン)

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

1、P10)。

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品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見られる (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、本組換えファレノプシス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

25 c. 花粉の媒介方法

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る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）。

10 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°C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）。

20

#### ホ. 病原性

25

#### へ. 有害物質の産生性

30 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。

#### ト. その他の情報

35

## 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

青紫色ファレノプシス 311NR (以下、「本組換えファレノプシス」という) の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 2 (P13~14) に示す。また、それらの位置関係を図 2、図 3 (P15) に、その塩基配列を別添資料 1 図 1-1-1 (P1~22) 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'-水酸化酵素遺伝子 ( <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転写するため、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、ナリン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)。本組換えファレノプシス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)。
ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子 ( <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>	1,026	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。組換え体 (系統「311」初代) の選抜に利用した。
<i>TNOS</i>	1,125	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>aphA-3</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 ( <i>aphA-3</i> ) 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>aphA-3</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>	1,482	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。



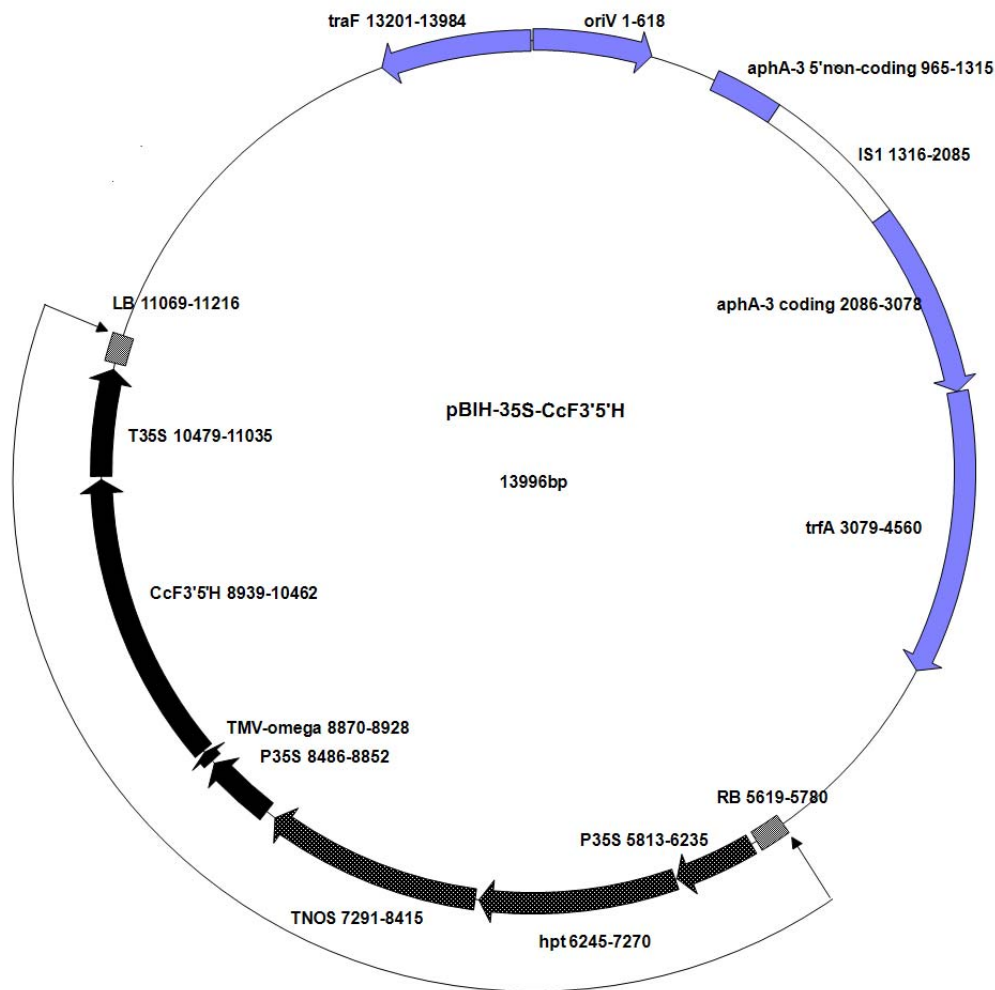


図 2 発現ベクターpBIH-35S-CcF3'5'H の構成図

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。

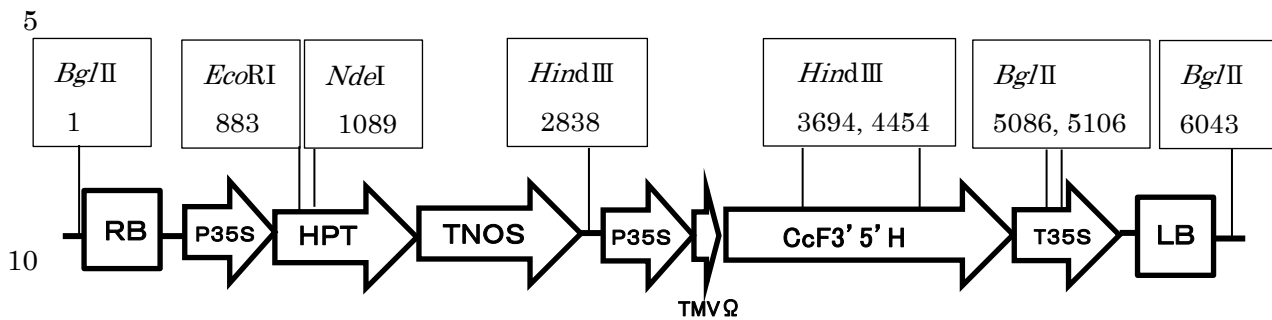


図 3 pBIH-35S-CcF3'5'H の T-DNA 領域の構造

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。

15

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 (P13~14) に示した。

- ② 目的遺伝子及び選抜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

【ツユクサ 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、アントシアニンが、B 環の水酸基が 1 個であるペラルゴニ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 (P18) 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ンのみが蓄積し、F3'H のみが有ればシアニンも生合成され、F3' 5'H が存在すればデルフィニンも産生されることとなる。図 4 (P18) では、アントシアニン 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 本組換えファレノプシス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ンとしてはシアニ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。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、ペラルゴニンが蓄積されないこ

35

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。

5      このようなファレノプシスの花弁中に 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プ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。

## 10      【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)。

15      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)。

20      本組換えファレノプシスの宿主であるウエディングプロムナードの 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。

25      これら 2 種の蛋白質が、アレルギー性を有することが明らかになっている蛋白質と相同性を有するか否かについて、令和元年 9 月にアレルゲンデータベース (FARRP Allergen Protein Database Ver.19, 2019) を用いて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。

30

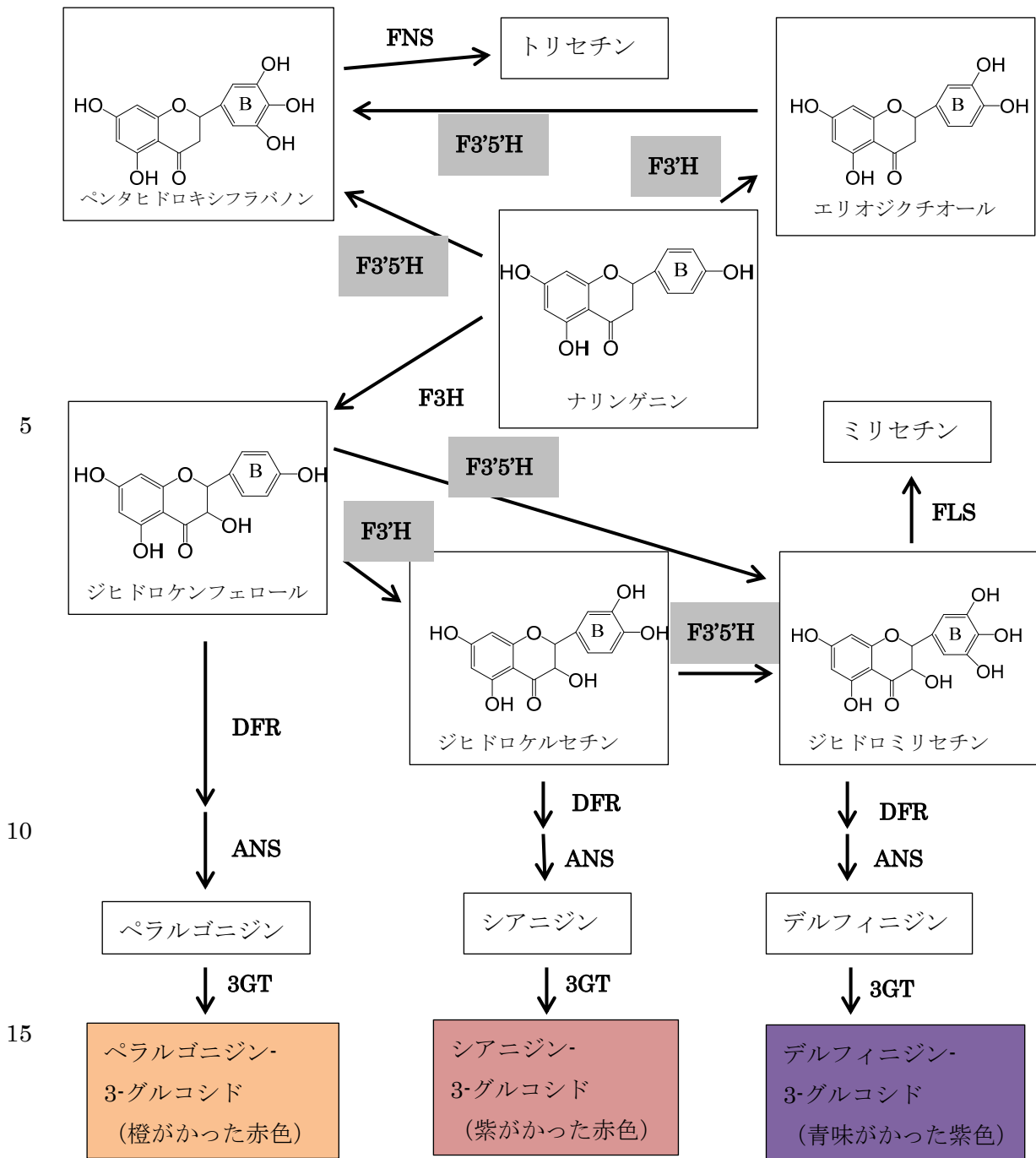


図4 高等植物におけるフラボノイド生合成経路の概略 (Holton and Cornish, 1995)

- 20  
 25
- F3'H : フラボノイド 3'-水酸化酵素
  - F3'5'H : フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素
  - FLS : フラボノール合成酵素
  - FNS : フラボン合成酵素
  - DFR : ジヒドロフラボノール 4-還元酵素
  - ANS : アントシアニン合成酵素
  - 3GT : フラボノイド 3-配糖化酵素

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその旨

5 ツユクサ 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 本組換えファレノプシス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 (P15) 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, P15) 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、  
10 pBI121 や Bin 19 のものと逆向きになっている (図 2, P15)。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 (*aphA-3*) 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、最初のものは肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) から単離された。

15

### ロ. 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

20 本組換えファレノプシスの作出に用いられた pBIH-35S-CcF3'5'H の全塩基数は 13,996bp<sup>7</sup>で、その塩基配列は別添資料 1 図 1-1-1 (P1~22) 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 (*trfA*) 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 (*aphA-3*) 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。

<sup>7</sup> 平成 29 年 3 月 2 日付申請書添付の評価書 (18 頁 20 行目) では 13,980bp としていたが、再解析の結果、13,996bp であることが判明した (別添資料 1 図 1-1-1)。新たな 16bp は、HPT 発現カセットと F3'5'H 発現カセットとの間に制限酵素認識サイトを導入するために挿入したリンカーの配列であり、本リンカー配列の挿入による生物多様性への影響は想定されない。

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。

5 (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

10 本組換えファレノプシス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 (P15) 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 5,391bp で、その塩基配列は別添資料 1 図 1-1-1 (P1~22) の 5,742 番目の A から 11,132 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

15

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。

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

20 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

15 宿主であるウエディングブロムナード'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。

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

30 本組換えファレノプシス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(系統「311」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 (*aphA-3*) を標的とした PCR 分析を行ったが、本遺伝子 (*aphA-3*) は存在しなかった。このことから、本組換えファレノプシス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、  
35 本組換えファレノプシス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）。

5

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

10 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。

15 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、移入された遺伝子の存在状態を確認した。

20 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。

25 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 を抽出し、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

30 「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。

次に、3 タイプの中から正常な花に復帰した 311NR を選抜し、そのクローン苗を調製し、隔離ほ場及び特定網室において生物多様性影響評価に必要な情報を収集した<sup>8</sup>。

35 なお、本評価書において、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 311NR、311WL 及び 311TL と

<sup>8</sup> 隔離ほ場試験は、筑波大学、(株)インプラントイノベーションズ及び石原産業(株)の共同研究で実施した。



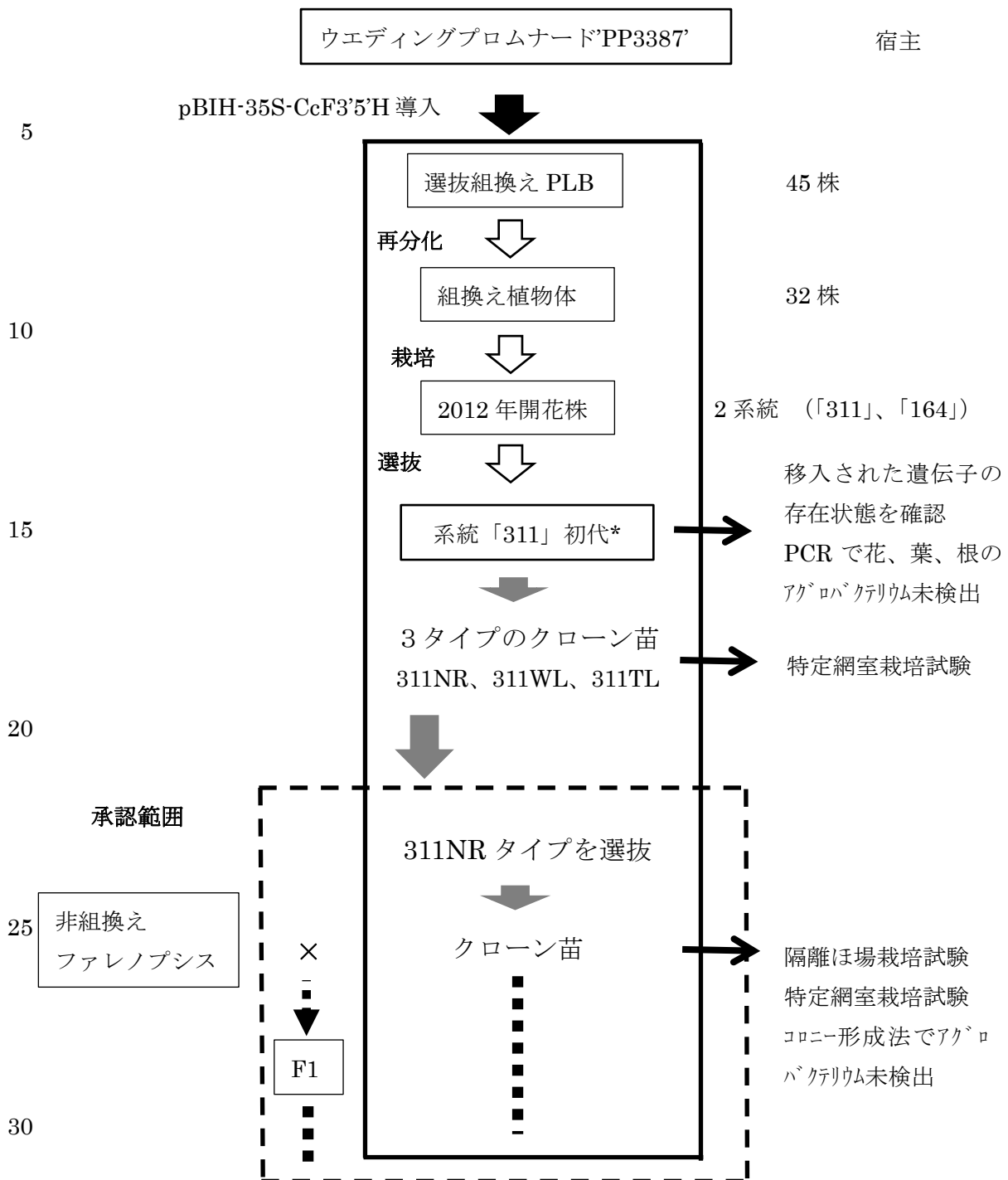


図5 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いた系統

\* 移入された遺伝子の存在状態を確認した株

※ 実線内は全て T<sub>0</sub> 世代、点線内は承認範囲を示す

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<sub>0</sub> 世代である。本評価書において、本組換えファレノプシスとは、系統「311」初代由来のクローン苗 311NR を示し、承認の範囲は 311NR、311NR 由来クローン苗及び本クローン苗と非組換えファレノプシスとの交配後代である。

5 育成の経過を図 5 (P23) に示した。

(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)

10

系統「311」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、花、葉及び根で検出された (別添資料 3、P1~3)。

15

さらに、系統「311」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、P4~5) 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、系統「311」初代には、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

20

ことが期待された (図 6、P24)。

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、

25

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

30

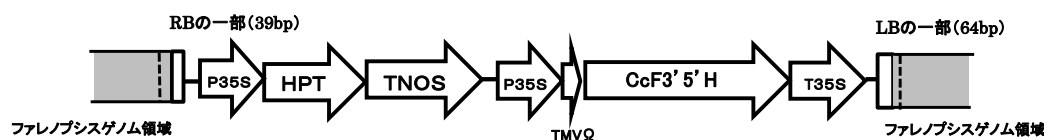




図 6 T-DNA 領域の挿入概要図

\*  はファレノプシスのゲノム領域を示す

 は本組換えファレノプシスの検出のために PCR で増幅した領域

35

である *Phalaenopsis equestris* のゲノム配列データベース (OrchidBase<sup>9</sup>) 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。

5     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)。

10     また、系統「311」初代の葉から調製した DNA のサザンロット解析 (別添資料 6 図 6-2-2、P19) によって、T-DNA 領域以外のベクター由来遺伝子が存在しないことを確認した。

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

15

サザンロット解析 (別添資料 3、P4~5) 及び TAIL-PCR を用いた解析 (別添資料 1 図 1-2-1、P23~25) により、系統「311」初代には、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 の LB から RB に至る全長が、ゲノム中に 1 コピー存在することが推察された。さらに、Semi-nested PCR を用いて、この導入遺伝子全長及び LB 側内在配列 1.1 kbp を含むと想定される領域をクローニングし、解析した (別添資料 6、P1~17)。この約 6.5 kbp の DNA には、pBIH-35S-CcF3'5'H の LB の中途から RB の中途までの配列と完全に一致する DNA 5391 bp (別添資料 6 図 6-1-3、P4~14) 及び *P. equestris* のゲノム配列と 94.9%の相同性を示す 1034 bp (別添資料 6 図 6-1-4、P15~17) が含まれていた。また、この DNA には、3 カ所の *EcoRI* サイト (別添資料 6 図 6-1-3 及び 4、P4~17) があり、サザン解析で検出された 5~6 kbp のバンド (別添資料 3 図 3-2-1、P5) には、大腸菌 HPT 遺伝子及び F3' 5'H 遺伝子共に 1 コピーのみ含まれていることも確認された。したがって、系統「311」初代には、pBIH-35S-CcF3'5'H の LB の中途から RB の中途までの T-DNA 領域全長 1 コピーが存在する。

25     また、系統「311」初代から調製した本組換えファレノプシス (311NR) について、サザンロット解析を実施した結果、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)。

35     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

<sup>9</sup> <http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/home2012.aspx>

- 
- 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  
5 間での発現の安定性

系統「311」初代の各器官（花卉及び葉）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  
10 グロマイシンBリン酸基転移酵素遺伝子の花卉及び葉での発現が確認された。また、本組  
換えファレノプシス(311NR)の花卉及び葉においても、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、系統「311」初代の花  
15 色は青紫色となったが、本組換えファレノプシス(311NR)においても、花色は青紫色であ  
った（別添資料5、P1～5）。さらに、本組換えファレノプシス(311NR)から調製したクロ  
ーン苗を隔離ほ場で栽培し、開花した植物においても、全て青紫色の花色を保持していた  
（別添資料7、P1～2）。

系統「311」初代は、ハイグロマイシンB含有培地で選抜されたが、本組換えファレノプ  
20 シス(311NR)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。

25

- 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

—

30

- (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

本組換えファレノプシスは、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  
35 のゲノムDNAを用いれば検出可能であった（別添資料4、P1～8）。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。

なお、サザンブロット解析によっても、本組換えファレノプシス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、 $20\mu\text{g}$  のゲノム DNA を用いれば検出可能である（別添資料 3、P4～7）。

5

#### (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

##### 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

10

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、別添資料 7、P1～2）。

15

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、本組換えファレノプシス由来の 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）。

##### 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

20

##### a 形態及び生育の特性

25

系統「311」初代の花はペタルがわずかにリップ化した変異を持っていたが、平成 27 年 4 月に開花した本組換えファレノプシス (311NR) の 2 個体では正常なペタルに復帰し、宿主と同じ花形であった。また、特定網室において、宿主及び本組換えファレノプシス (311NR) 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、宿主と本組換えファレノプシス間で統計学的有意差（Student  $t$  検定、有意水準 5%）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、サンプル数が少ないが、本組換えファレノプシスの実測値（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）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、最大葉の長さおよび幅において、宿主よりも小さい傾向が認められた（表 3、別添資料 5、P8～10）。

35

さらに、宿主及び本組換えファレノプシスを隔離ほ場内で栽培し、形態及び生育の特性と

して、ペタルの形態、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、第一花序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7、P3～5）。これらの中で、植物体の長さ、花序の数、最大葉の大きさ、花の横径において、宿主と本組換えファレノプシス間で統計学的有意差（Student *t* 検定或いは Welch *t* 検定、有意水準 5%）が認められた（表4）。

表3 特定網室において宿主及び本組換えファレノプシス間で差のあった項目の調査結果

調査項目	宿主（ウエディングプロムナード）	本組換えファレノプシス
植物体の長さ(cm)	80.0±5.6	49.8 (42.5～57.0)
花序1本当りの花数(個)	32.7±6.9	21.0±6.5*
花の横径(cm)	6.9±0.1	5.8 (5.4～ 6.2)
花の縦径(cm)	6.2±0.2	5.6 (5.4～ 5.7)
最大葉の長さ(cm)	17.3±1.4	16.8 (16.0～17.5)
最大葉の幅(cm)	7.6±1.4	7.1 (7.0～ 7.2)

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

10 ※ 花序1本当りの花数については、311NRは4本、宿主は7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）。宿主は、6個体の平均値±SD。

15

表4 隔離ほ場において宿主と本組換えファレノプシスの間で統計学的有意差のあった項目の調査結果

調査項目	宿主（ウエディングプロムナード）	本組換えファレノプシス
植物体の長さ (cm)	52.2±8.6	39.3±11.7*
花序の数 (個)	1.8±0.5	1.1± 0.2*
花の横径 (cm)	6.1±0.3	6.5± 0.5*
最大葉の長さ (cm)	20.7±2.3	19.0± 1.2*
最大葉の幅 (cm)	7.1±0.4	6.7± 0.5*

\*： 宿主との間に統計学的有意差あり（Student *t* 検定或いは Welch *t* 検定、有意水準 5%）

※ 宿主は24個体、組換え体は17個体の平均値±SD。

20

これらの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（数ヶ月間）が長いことから、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)。

- 5 特定網室と隔離ほ場での相違した項目を比較した場合でも、植物体の長さ、花の縦径、葉の大きさは同様な傾向が見られるが、花序 1 本当りの花数は特定網室のみで、花序の数は隔離ほ場のみで観察され、また、花の横径の相違では両者が逆転しており、これらの相違が培養変異によって生じたことを示唆している。

#### 10 b 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えファレノプシスは宿主と同様に 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、生育の最も初期の段階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。

- 15 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について、隔離ほ場で調査した。冬季、鉢上げ直後の幼苗を屋外ほ場で栽培したところ、宿主及び本組換えファレノプシスともに全て枯死し（別添資料 7、P7～9）、越冬性は観察されなかった。

- 20 夏季、鉢上げ直後の幼苗を屋外ほ場で栽培したところ、宿主は強く障害されたものの全て生き残ったが、本組換えファレノプシスは全て枯死した（別添資料 7、P10～13）。宿主の幼苗には越夏性が認められたが、本組換えファレノプシスの幼苗に、越夏性は観察されなかった。

#### c 成体の越冬性又は越夏性

- 25 宿主及び本組換えファレノプシスの成体の越冬性、冬季の生育について、隔離ほ場で調査した。冬季、成熟個体を屋外ほ場で栽培したところ、宿主及び本組換えファレノプシスともに全て枯死し（別添資料 7、P14～16）、越冬性は観察されなかった。

- 30 宿主及び本組換えファレノプシスの成体の越夏性、夏季の生育について、隔離ほ場で調査した。夏季、成熟個体を屋外ほ場で栽培したところ、宿主及び本組換えファレノプシスともに、強く障害（葉の黄化が顕著）されたが、枯死する個体はなかった（別添資料 7、P17～22）。宿主及び本組換えファレノプシスの成体においては、越夏性が観察された。

#### d 花粉の稔性及びサイズ

- 35 特定網室において生育した宿主、本組換えファレノプシスの花粉塊を目視にて観察した。本組換えファレノプシスでは、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）。

また、隔離ほ場において生育した宿主及び本組換えファレノプシスについても、花粉塊の数及び大きさに差はなかった（別添資料 7、P5）。

本組換えファレノプシス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。

- 5 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）。

- 10 しかし、宿主及び本組換えファレノプシスは共に 3 倍体であり、花粉の核 DNA 含量を分析し、稔性のある 2 倍体及び 4 倍体のファレノプシスの花粉と比較したところ、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉は、減数分裂の際に不等分離し、ほとんどのものが稔性を喪失している可能性が示唆された（別添資料 6、P20～23）。

- 15 さらに、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉塊を、国内に唯一自生するファレノプシスであるナゴラン（*Phalaenopsis japonica*）の柱頭に人為的に受粉し、花粉管の発芽及び伸長を調査したところ、花粉は発芽するものの、受精のために必要なさく果への花粉管の伸長が全く観察されなかった（表 5、別添資料 6、P24～29）。

表 5 ナゴランへ人為的に受粉した花粉管の伸長

花粉親	受粉したナゴランの花数	花粉管の観察されたさく果数
宿主	5	0
本組換えファレノプシス	5	0
のりか（4 倍体園芸品種）	5	5

- 20 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

- 25 本組換えファレノプシスは宿主と同様 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。そのことを確認するために、隔離ほ場において、宿主及び本組換えファレノプシスの花（それぞれ 25 個）を人為的に自殖させ、調査したが、全ての交配した花は、さく果が形成される前に枯死し、種子は全くできなかった（表 6、別添資料 7、P6）。

表 6 自殖した花の経過観察

	自殖した花数	さく果形成前に枯死した花数
宿主	25	25
本組換えファレノプシス	25	25



f 交雑率

本組換えファレノプシス（3倍体）と近縁野生種との交雑

- 5 宿主及び本組換えファレノプシスの花粉塊を採取し、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。宿主及び本組換えファレノプシス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、本組換えファレノプシス 16 個）は完熟する前に全て枯死し、充実した種子は全く得られなかった。また、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉塊を人為的に受粉したフウラン
- 10 のさく果（宿主 13 個、本組換えファレノプシス 14 個）も完熟する前に全て枯死し、充実した種子は全く得られなかった（別添資料 5、P14～16）。

さらに、追加試験として、本組換えファレノプシスの花 101 個から花粉塊を採取し、ナゴランの 101 個の花の柱頭へ人為的に交配したが、全てのさく果は完熟する前に枯死し、充実した種子は全く得られなかった（表 7、別添資料 6、P30～34）。

15

表 7 宿主及び本組換えファレノプシスのナゴランとの人工交配（追加試験）

花粉親	人工交配したナゴランの花数	充実した種子の観察されたさく果数
宿主	101	0
本組換えファレノプシス	101	0

本組換えファレノプシス（3倍体）と園芸品種（4倍体）との交雑

20

人為的な交配による本組換えファレノプシス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。宿主及び本組換えファレノプシス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、本組換えファレノプシス 20 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）。

25

よって、宿主及び本組換えファレノプシスともに、近縁野生種及び園芸品種との交雑性は極めて低い。

g 有害物質の産生性

30

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。導入遺伝子が本組換えファレノプシス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、特定網室において、鋤き込み試験によるレタス種子の発芽への影響を調査した。その結果、宿主及び本組換えファレノプシスを含む系統「311」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

5 ついて調査したが、宿主及び本組換えファレノプシス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)。

さらに、隔離ほ場において、植物組織の鋤き込み試験、栽培土壌 (ミズゴケ) の鋤き込み試験及び栽培土壌 (ミズゴケ) 中の微生物相の調査を行ったが、何れも、宿主及び本組換えファレノプシス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 7、P25~28)。

10

### 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 観賞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

#### (2) 使用等の方法

—

10

#### (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

—

#### (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

15

申請書に添付した緊急措置計画書を参照

#### (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

20

—

#### (6) 国外における使用等に関する情報

25

—

## 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。

10 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、宿主と本組換えファレノプシス間における相違を評価した。生育特性については、特定網室において、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た（別添資料5、P8～10）。隔離ほ場においては、植物体の長さ、花序の数、最大葉の大きさ、花の横径において、宿主と本組換えファレノプシス間で統計学的有意差（Student *t* 検定或  
15 いは Welch *t* 検定、有意水準5%）が認められた（別添資料7、P3～5）。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、特定網室と隔離ほ場での相違した項目に異なったものがあることから、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、これらの培養変異が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っても本組換えファレノプシスに導入された遺伝子は安定して伝達されている。

25

また、隔離ほ場において、鉢上げ直後の幼苗及び成体の越冬性及び越夏性を調査した。宿主、本組換えファレノプシスともに、幼苗及び成体に越冬性はなかった。一方、越夏性については、宿主及び本組換えファレノプシスの成体は共に越夏したが、幼苗においては、宿主は越夏したが、本組換えファレノプシスでは全て枯死した。本組換えファレノプシス幼苗の  
30 越夏性における相違が導入遺伝子の影響か否かは不明だが、生存において不利な形質であり、この相違が競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。

一方、生殖・繁殖特性については、特定網室での調査において、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、P11～12）。隔離ほ場において生育した宿主及び本組換えファレノプシスについても、花粉塊の数及び大きさに差はなかった（別添資料7、P5）。また、特定網室で栽培した本組換えファレノプシ

35

ス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（別添資料 5、P12～13）。

5

本組換えファレノプシス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、本組換えファレノプシスを隔離ほ場で栽培し、訪花昆虫を調査したが、訪花する昆虫は見られなかった（別添資料 7、P23）。また、実験室において、本組換えファレノプシスの花の入ったアクリルケースヘナゴランの花粉媒介昆虫であるトラマルハナバチを放飼したが、人為的な誘引のない条件では訪花は観察されなかった（別添資料 6、P35～36）。これらのことから、本組換えファレノプシスの花色の変化によって、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。

また、本組換えファレノプシス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。

以上のことから、宿主と本組換えファレノプシス間の相違は、競合における優位な形質とは考えられず、本組換えファレノプシスには野生植物と栄養分、日照、生育場所等の資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質はないと考えられた。

したがって、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。

30 (2) 影響の具体的な内容

—

(3) 影響の生じやすさの評価

35

—

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

5 以上のことから、本組換えファレノプシスは、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

### 10 (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。

15

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生産する可能性の有無を明らかにするために、特定網室で生育した本組換えファレノプシスを含む植物の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。

20

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、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 (別添資料 5、P21)。さらに、プラントボックス法で、本組換えファレノプシス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、宿主との間で幼根長に統計学的有意差 (Student *t* 検定、有意水準 5%) は認められなかった (別添資料 5、P20)。次に、隔離ほ場において、植物組織の鋤き込み試験、栽培土壌 (ミズゴケ) の鋤き込み試験及び栽培土壌 (ミズゴケ) 中の微生物相の調査を行ったが、何れの項目においても、宿主及び本組換えファレノプシス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 7、P25~28)。

25

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、本組換えファレノプシス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。

35

したがって、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

5 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

10

(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、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。

15

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

20

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。

25

30

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

35

(2) 影響の具体的な内容の評価

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。本組換えファレノプシス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柱の先端に 2 個ずつ存在する。特定網室で生育した本組換えファレノプシスは、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、P11～12）。隔離ほ場において生育した宿主及び本組換えファレノプシスについても、花粉塊の数及び大きさに差はなかった（別添資料 7、P5）。次に、本組換えファレノプシス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（別添資料 5、P12～14）。したがって、花粉の基本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。

#### 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介されるが、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。隔離ほ場試験において、本組換えファレノプシスへ訪花する昆虫の調査を実施したが、訪花する昆虫は観察されなかった（別添資料 7、P23）。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、宿主及び本組換えファレノプシスの花の横径は 5.4～7.1cm 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。この点を検証するために、国内に唯一自生する同属のナゴランの花粉媒介昆虫であるトラマルハナバチ（Suetsugu



and Tanaka, 2013) を用いた訪花試験を行ったが、人為的な誘引のない条件では、本組換えファレノプシスへの訪花は全くなく、また、ハチミツで誘引して訪花させた場合においても、本組換えファレノプシスの花粉塊がハチに付着することはないと、トラマルハナバチが本組換えファレノプシスの花粉を媒介する可能性はないと考えられた(別添資料 6、P35～39)。

- 5 したがって、本組換えファレノプシスの花粉塊が昆虫によって野生種へ運ばれ、交雑する可能性はほとんどないと考えられた。

風媒による交雑の可能性：

- 10 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、花粉塊柄と小嚙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 10～50 $\mu$ m)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
- 15 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：

- 20 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、本組換えファレノプシス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。また、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉の核 DNA 含量を分析したところ、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉は、減数分裂の際に不等分離し、ほとんどのものが稔性を喪失して
- 25 いる可能性が示唆された(別添資料 6、P20～23)。さらに、宿主及び本組換えファレノプシスの花粉塊をナゴラン(*Phalaenopsis japonica*)の柱頭に人為的に受粉し、花粉管の発芽及び伸長を調査したところ、両者とも花粉管の発芽は観察されたが、受精のために必要なさく果への花粉管の伸長が全く見られなかった(別添資料 6、P24～29)。以上のことから、本組換えファレノプシスの花粉稔性は無いか極めて低いことが推察された。そこで、宿主及び
- 30 本組換えファレノプシス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の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しないまま枯死し、充実した種子は得られなかった(別添資料 5、P14～17、別添資料 6、P30～34)。また、宿主及び本組換えファレノプシス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、本組換えファレノプシスの花粉稔性は無いか極めて低く、人為的交配でも本組換えファレノプシス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。
- 35

5 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。さらに、本組換えファレノプシスは3倍体であり、花粉の稔性は無いが極めて低いことが推察され、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近縁野生種と交雑し、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。

10

#### (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。

15

#### 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：

- 5      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たとの報告はない。

- 10      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、特定網室での栽培において、植物体の長さ、花序1本当りの花数、花の横径及び縦径に、宿主と本組換えファレノプシス間で差異が認められた。また、隔離ほ場での栽培において、植物体の長さ、花序の数、  
15      最大葉の大きさ、花の横径に差が見られた。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、これらの相違はファレノプシス属の種  
15      間の相違の範囲内であり、これらが競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。

- 20      隔離ほ場で実施した幼苗の越冬性試験において、宿主と本組換えファレノプシス間で差異が認められたが、本組換えファレノプシスがより高温に脆弱であり、競合における優位性を示す形質であるとは考えにくい。

20

- 25      生殖・繁殖特性に関する調査において、特定網室で生育した本組換えファレノプシスでは、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。隔離ほ場において生育した宿主及び本組換えファレノプシスについても、花粉塊の数及び大きさに差はなかった。また、本組換えファレノプシスの花粉塊を、オルセイン染色して顕微  
25      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（Student *t* 検定、有意水準 5%）は認められ  
25      なかった。

- 30      本組換えファレノプシス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れず、実際に隔離ほ場において調査したが、本組換えファレノプシスへ訪花する昆虫は観察されなかった。したがって、本組換えファレノプシスの花色の変化によって、生物多様性に影響を与えるような訪花昆虫相  
35      の変化が起こる可能性は極めて低いと考えられる。

また、本組換えファレノプシスは導入遺伝子の発現の結果、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。

- 5 以上のことから、本組換えファレノプシス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：

- 10 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。

- 15 また、導入した遺伝子によって本組換えファレノプシス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。

- 20 実際に、特定網室において本組換えファレノプシスを含む植物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、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。また、プラントボックス法で、本組換えファレノプシス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、宿主との間で幼根長に統計学的有意差 (Student  $t$  検定、有意水準 5%) は認められなかった。また、隔離ほ場において、本組換えファレノプシスの植物組織の鋤き込み試験、栽培土壌 (ミズゴケ) の鋤き込み試験及び栽培土壌 (ミズゴケ) 中の微生物相の調査を  
25 行ったが、何れの項目においても、宿主及び本組換えファレノプシス間で統計学的有意差 (Student  $t$  検定、有意水準 5%) はなかった。

- 30 また、本組換えファレノプシス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、本組換えファレノプシス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。

- 35 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)、P37）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。

- 5 宿主及び本組換えファレノプシスでは花粉塊の存在が認められた。しかしながら、宿主及び本組換えファレノプシス共に 3 倍体であり、花粉の核 DNA の分析や花粉管発芽・伸長試験から花粉稔性が極めて低いことが示唆され、また、近縁野生種との人為的交配を行ったが、充実した種子は全く得られなかった。また、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、隔離ほ場において、宿主及び本組換えファレノプシスへ訪花する昆虫が観察されなかったこと、実験室において、人為的に誘引して本組換えファレノプシスへ訪花させたトラマルハナバチへ花粉塊が付着しなかったこと、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。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、本組換えファレノプシス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。

よって、総合評価として、本組換えファレノプシスを第一種使用規定に従って使用した場合に、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。

20

引用文献

- 5 Balilashaki, K., Gantait, S., Naderi, R., and Vahedi, M. (2015) Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and maturity. *Physiol. Mol. Biol. Plants* *21*, 341-347.
- 10 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.
- 15 Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* *12*, 8711-8721.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Burnham, C. R. (1962) Chapter 7 Autopolyploidy. In: *Discussion in Cytogenetics*, pp.168-202. Burgess Pub. Co.
- 35 Cavanas, M. J., Vazoquez, D. and Modolell, J. (1978) Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur. J. Biochem.* *87*, 21-27.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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 genes 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., Carlsward, 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.),  
5 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.
- 10 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  
15 in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Plant Biotechnol. 15, 23-28.
- Wood, J., Carlsward, 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  
20 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  
25 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  
30 coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. Plant Cell 2, 403-418.
- 青山幹男 (1993) フェ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  
35レー栽培, 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
- 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  
5 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.
- 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  
10 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 最新園芸大辞典編集委員会 (1969) 第 4 巻 pp.2098-2102, 最新園芸大辞典 株式会社  
誠文堂新光社
- 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
- 20 中島睦子 (2012) 日本ラン科植物図譜 文一総合出版
- 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
- 25 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
- 農林水産省 (2008) 品目別作付け面積及び出荷量累年統計
- 30 農林水産省 (2009) オランダ花き輸出戦略調査報告書
- 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
- 35 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

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.

5

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

10 米田和夫、百瀬博文、窪田聡 (1993) コシ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.

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

15

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

令和 2年 5月 13日

5

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

10

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）（311NR）（以下「本組換え体」という。）の第一種使用等において、  
15 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、以下の措置をとること  
とする。

- 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は以下に示すとおりである。

20

令和 2年 4月 1日現在

委員	
個人情報のため非開示	石原産業株式会社 中央研究所 シニアマネージャー 滋賀県草津市西渋川 2-3-1 (電話番号 077-562-3574)
	石原産業株式会社 バイオサイエンス事業本部 執行役員 大阪府大阪市西区江戸堀 1-3-15 (電話番号 06-6444-7154)
	石原産業株式会社 執行役員 中央研究所長 滋賀県草津市西渋川 2-3-1 (電話番号 077-562-3574)
	石原産業株式会社 バイオサイエンス事業本部 部長補佐 大阪府大阪市西区江戸堀 1-3-15 (電話番号 06-6444-7154)

\* : 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握

- 5 (1) 本組換え体の栽培状況については、栽培委託契約を締結した限定された生産者（以下「栽培委託生産者」という。）を通じて栽培状況を把握するとともにその情報を整理して記録する。
- (2) さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、(1)により把握している栽培委託生産者の現状の栽培状況を把握し、得られた情報を整理し、記録する。

## 10 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ず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

15 緊急措置を講ずる必要が生じた場合には、すぐにその内容を把握している栽培委託生産者に対して電話や文章などにより連絡を取る。また、周知するために石原産業株式会社のホームページ等で本件についてのお知らせを掲載するとともに、問合せ専用窓口を設置する。

## 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

20 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は、直ちに本組換え体の栽培を中止し、栽培中の本組換え体は鋤き込み等による不活化を行うよう栽培委託生産者に対し指示する。さらに、栽培地周辺を調査し、環境中に放出された本組換え体が存在した場合、本組換え体との交雑が疑われる個体が存在した場合は、それらを回収し、鋤き込み等による不活化を行う。

25

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に報告する。

30

緊急措置計画書（観賞の用に供する場合）

令和 2年 5月 13日

5

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

10

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）（311NR）（以下「本組換え体」という。）の第一種使用等において、  
15 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、以下の措置をとること  
とする。

- 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は以下に示すとおりである。

20

令和 2年 4月 1日現在

委員	
個人情報のため非開示	石原産業株式会社 中央研究所 アドバイザー 滋賀県草津市西渋川 2-3-1 (電話番号 077-562-3574)
	石原産業株式会社 バイオサイエンス事業本部 執行役員 大阪府大阪市西区江戸堀 1-3-15 (電話番号 06-6444-7154)
	石原産業株式会社 執行役員 中央研究所長 滋賀県草津市西渋川 2-3-1 (電話番号 077-562-3574)
	石原産業株式会社 バイオサイエンス事業本部 部長補佐 大阪府大阪市西区江戸堀 1-3-15 (電話番号 06-6444-7154)

\* : 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握

本組換え体は、石原産業株式会社だけが独占的に事業を行い、栽培委託契約を締結した限定された生産者（以下「栽培委託生産者」という。）によって生産される。栽培条件と出荷量（株数）を把握するとともにその情報を記録する。

想定される生産・流通量を超える本組換え体の流通や栽培等の情報が得られた場合には、都道府県名、そのおおよその量などについて、把握しうる限りの情報を記録する。さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、栽培委託生産者の現状の栽培状況、並びに販売契約を結んだ限定された販売・流通業者の現状の販売・流通状況を把握し、得られた情報を整理し、記録する。

## 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ず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

緊急措置を講ずる必要が生じた場合には、栽培委託生産者と販売契約を結んだ販売・流通業者に対して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められたことを連絡する。また、周知するために石原産業株式会社のホームページ等で本件についてのお知らせを掲載するとともに、問合せ専用窓口を設置する。

## 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

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は、栽培委託生産者や流通、販売に関わる業者に取り扱いの中止と鋤き込み等による不活化処分を指示する。

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に報告する。

## 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
- 別添資料 6 「特定網室で実施した追加試験」  
社外秘情報につき非開示
- 20 別添資料 7 「隔離ほ場試験」  
社外秘情報につき非開示