

耐冷性ユーカリ ( <i>des9, Eucalyptus globulus</i> Labill.) 申請の概要
--

## 第一種使用規程承認申請書

生物多様性影響評価書	1
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	
(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
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理学的及び生態学的特性	2
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
(2) ベクターに関する情報	8
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	8
(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	9
(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	9
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	9
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	13
(2) 使用等の方法	13
(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	13
(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	13
(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	14
(6) 花芽の管理について	14
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	15
2. 有害物質の産生性	15
3. 交雑性	16
4. その他の性質	16
第三 生物多様性影響の総合評価	17
参考文献	18
緊急措置計画書	20

第一種使用規程承認申請書

平成23年 4月26日

文部科学大臣 高木 義明 殿  
環境大臣 松本 龍 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学  
申請者 学長 山田 信博  
住所 茨城県つくば市天王台 1-1-1

第一種使用規程について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、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	耐冷性ユーカリ ( <i>des9, Eucalyptus globulus</i> Labill.)
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 1-1-1 名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場 II（隔離ほ場） 使用期間：承認の日から平成25年9月30日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 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30 cm、メッシュフェンス180 cm、コンクリート基部20 cm）を設置している。コンクリート部は地下68 cmまで及び、その下層に碎石層15 cmが設けられている。 (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) 土、遺伝子組換えユーカリ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ともに、遺伝子組換えユーカリの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈澱槽及び網等を設置している。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリ以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを抑制する。 (2) 遺伝子組換えユーカリを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えユーカリが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えユーカリの栽培終了後は、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリの地上部は裁断処理し隔離ほ場内に鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、オートクレーブ等で不活化する。 (4) 花粉移動を防止するために、花芽が形成された場合は、これらをすみやかに切除し、オートクレーブにて不活化する。 (5) 意図せずに遺伝子組換えユーカリが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止するため、隔離ほ場内の使用区画で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄等を行う。 (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (7) (1)から(6)に掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。 (8) 生物多様性への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。

# 生物多様性影響評価書

## 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

#### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

宿主は、フトモモ科(Myrtaceae)ユーカリ属(*Eucalyptus*)シムファイオマイルタス亜属(*Symphyomyrtus*)に属するユーカリ・グロビュラス(*Eucalyptus globulus* Labill.)、オーストラリア名はタスマニア・ブルー・ガム(文献1)である(以下宿主種を示すときは *E. globulus*、ユーカリ属全般を示すときはユーカリ属植物と称す)。2倍体植物(染色体数は $2n=44$ 、文献2)であり、*E. globulus*の全ゲノムサイズは530Mbpと概算されている(文献3)。1777年Cookの第3回航海の際に、多くの植物が採取され、標本として英国に送られたため、ユーカリ属植物が広く紹介された。当時ロンドンに滞在していたフランスの植物学者C.L.B.L' Heritierは、翌年この標本をもとに、フトモモ科(Myrtaceae)にユーカリ属(*Eucalyptus*)を設け、種名を与えた(文献4)。

*E. globulus*はヨーロッパ・アフリカ・南アメリカなど世界各地に植林されているが、その自然分布域はオーストラリアのタスマニア島周辺及びオーストラリア本土ビクトリア州南部の一部に限定されている(文献1)。ユーカリ属植物の中には、*E. globulus*に形態的・遺伝的によく似た3つの種があり、それぞれ *E. bicostata*、*E. pseudoglobulus* 及び *E. maidenii*と称される(文献1)。これらは主に本土ビクトリア州に分布し、*E. globulus*の亜種として扱われることもある(文献1)。

ユーカリ属植物は、少なくとも約600種以上であると報告されている。その大半はオーストラリア本土及びタスマニア島に自生し、ごく少数の種が本土北部に隣接するアジア太平洋地域の特定諸島に自生している(文献4)。

#### (2) 使用等の歴史及び現状

ユーカリ属植物のうち数種は商業利用されており、19世紀以降、ヨーロッパ、インド、アフリカ、アメリカ、最近では東南アジアでも多く植林されている。建材、パルプ材、あるいはユーカリオイルの材料などとして19世紀から盛んに海外で栽培されている(文献5、6)。ユーカリ属植物の中で、*E. globulus*は旧世界に最初に導入された種で、もっとも多く植林されている。特に、スペイン及びポルトガルで盛んに植林されており、1973年の植林地の総面積は、全世界で80万ヘクタール以上にも及び、植林面積は増加していると考えられている(文献6)。

葉から抽出された精油は、0.8%程度の濃度で、ダニ類(Pyroglyphidae)への防除効果があることが知られている(文献7)。また、精油には、テルペノイドを主体とする芳香性物質が含まれ、アロマセラピーなどの民間療法に幅広く用いられている(文献8)。

ユーカリ属植物は日本原産の種ではなく、日本国内への導入は明治時代に始まった。宿主植物である *E. globulus* と交雑が可能なユーカリ属植物の自然分布、及び近縁野生種の存在は報告されていない(文献4、5)。記念植樹として植えられることが多く、主に緑化木として栽培管理されている。茨城、群馬、石川県を北限とし、関東以南の温暖地、特に静岡、兵庫、高知、福岡の県に多い(文献5)。鹿児島市では *E. camaldulensis* と *E. robusta* を街路

樹として栽培している。また、原産地オーストラリアでは、ユーカリ属植物の地上部（葉）は、野生コアラの常食食料であることは公知であるが、数多くある種のうち数十種ほどがそれに該当する（文献5、6）。本試験に用いる *E. globulus* もコアラの食草となるユーカリ属植物の一種である。コアラを飼育している動物園では、新鮮なユーカリ属植物を供給するため、園内で栽培を行う場合もある。鹿児島市平川動物園では、コアラ飼料用に *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. microcorys*, *E. moluccana*, *E. propinqua*, *E. punctata*, *E. robusta*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* が栽培されている。一方、沖縄や奄美大島の諸島などで茶やあめなどの原料として利用されており、沖縄では、*E. camaldulensis* と *E. robusta*, *E. viminalis* などの栽培が知られている。

### （3） 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

ユーカリ属植物は、生態学的には常緑広葉樹に属する（文献4）。雌雄同花で花色は白、赤、ピンク、オレンジとさまざまであるが、*E. globulus* は白色の花をつける（文献1）。ユーカリ属植物の多くは腋生散形花序であるが、*E. globulus* は例外的に腋生単花である（文献4）。*E. globulus* の日本における開花時期、結実時期については詳細に調べられた報告はない。オーストラリア自生地では雨季である6月から12月くらいまで開花が認められる。種子は開花から成熟まで約11ヶ月を要する。幼木は、対生の幼型葉を持つが、成木は互生葉の成型葉となり、高さ60mにまで成長する（文献1）。パルプ用の植林地では、8～12年で収穫されている（文献6）。一方、他の有用種である *E. camaldulensis* では、成木は高さ20～50m、胸高直径90～210cm（文献9）にまで成長する。材は光沢のある赤色で耐久性があり、パルプ用にはおよそ5～8年で収穫できる（文献6）。海外の原生地や適正栽培地では、樹高40m、樹幅15m及び胸高直径2mの大木も存在する（文献10）。日本では、街路樹等、公園緑地に樹高10m程度のものが見られる（文献4）。つくば地区における *E. globulus* の屋外栽培試験より、早いものでも植栽後1年以上経過しないと成型葉が形成されない。また、非組換えユーカリ5個体について、植栽後5年目になり初めて1個体に花芽形成が認められたが、他の個体には認められておらず、成木となるまで時間を要する。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ユーカリ属植物は、平均気温25℃を最適とし15～29℃で生育、種によっては、氷点下でも生存できるが低温では生育が阻害されるなど生育には適していない（文献5）。乾燥、季節的冠水、多少の塩類土壌にも耐え、潜伏芽更新も可能であるため、世界に広く植林されている（文献4）。降雨量は、年500～1,000mmが適しており、生育期には相当量の降雨を必要とする（文献4）。

*E. globulus* の自生地は、夏に涼しく、冬に比較的暖かく、寒暖の差が少ない。最暖月の平均最高気温は18～23℃、最寒月の平均最低気温は4℃である。栽培適地は、やや重く水はけのよい土壌、または適度の湿りをもった深い良質の土壌である（文献5）。潜伏芽更新も可能であり、世界に広く植林されている（文献6）。降雨量は、年650～1,400mmが適している（文献5）。つくば地区の冬期間の気温は *E. globulus* の自生地よりも低く、過去10シーズンの最寒月の平均最低気温は-2.7℃である。別紙2につくば地区での冬期間の気温推移を示す。つくば地区での非組換え体を用いた屋外植栽試験では、*E. globulus* の越冬性は低く、特に1m程度までの幼木は寒さに弱く（別紙3図1）、前年までに成長した地上部の半数が枯死した。こうした結果を踏まえ、2008年3月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカ

リ (*E. globulus*) においては、植栽初年と次年の冬期間にハウスで保護するなどの保温を行い生存させた(別紙4図1、2)。2005年10月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ (*E. camaldulensis*) においては、幼苗期に冬期を迎えたため、ハウスで覆った畑の苗に苗帽子を掛け、2重の保護を行った(別紙4図3)。また、他の特性として、生育には十分な日照が必要であるため、成育の遅れた幼苗が周辺草本に埋められると成育出来ないことも明らかとなっている。前述の耐塩性遺伝子組換えユーカリ (*E. globulus*) の隔離ほ場栽培では、実験区の日照が妨げられないように実験区外周に緩衝木として植栽されている非組換え体について、毎年5月に枝打ちと樹高1mでの断幹を行い、実験区の日当たりを確保している。

#### ハ 捕食性又は寄生性

該当しない

#### ニ 繁殖又は増殖の様式

*E. globulus* は、適した条件下において、実生による繁殖と樹皮下に保持している潜伏芽からの更新が可能である(文献3)。植林地では潜伏芽を利用して収穫後の再利用を行うこともある(文献11)。自殖、他殖共に可能である。種子が完熟した後、果実が乾燥し破裂することによって種子を放出する。火災などによって、種子が一斉放出される場合もある。個体によっては、自家不和合性を持つ(文献12)。主に双翅目の昆虫により花粉が媒介され、その種類は多岐に渡る(文献2、13)。例としては、ハナアブ (*Eristalis tenax*)、ミツバチ類 (*Apis* 属)、Ichneumonid wasps (*Gotra* 属)、クロバエ類 (Calliphoridae)、マガタマハリバエ (*Epicampocera succincta*)、ノコギリハリバエ (*Compsilura concinnata*)、Syrphid flies (*Syrphus rectus*, *Allograpta obliqua*)、及び *Eupeodes americanus* などである。また、*E. globulus* の場合、自生地においては、鳥類によっても送粉される(文献13)。主な媒介鳥はオウム仲間である Swift Parrot (*Lathamus discolor*) やミツスイ科の New Holland honeyeater (*Phylidonyris novaehollandiae*) などである。一方、日本における媒介昆虫類、及び鳥類については、調査されていない。

挿木による増殖は非常に難しいとされている。発根技術は特許申請されるほど困難であり、組織培養も容易ではない。実験室内で行った挿木実験によると、試験管で発芽させた60日目の *E. globulus* から得た挿穂の発根率は35%であり、また100日目の個体から得た挿穂の発根率は15%であった(文献14)。これらの挿穂には発根させるために植物ホルモン処理がなされているために、実際には自然条件下での挿穂発根率は極めて低いと考えられる。共台による接木は可能であるが、コストがかかるため大量生産には向かない(文献5)。また、切り株などからの潜伏芽による更新も可能である(文献15)。*E. globulus* は、日陰においては生育が阻害されるため、自然条件においては、野火等によって日照が改善された場所において、実生及び潜伏芽によって更新される(文献16)。また、*E. globulus* において、匍匐根が形成されるという報告はないが、根茎は形成される(文献6)。

#### ホ 病原性

該当しない

#### ヘ 有害物質の産生性

ユーカリ属植物の中にはアレロパシー物質を持つものがある。*E. globulus* にも土壤微生物に対する増殖阻害影響が認められる(文献17)。また、栽培作物に対しても発芽阻害性が

認められるが、その他の植林種 (*E. camaldulensis* 及び *E. saligna*) と比べると、相対的に低いアレロパシー活性を示す (文献 18)。*E. globulus* におけるアレロパシー物質成分の同定に関する詳細な情報はないが、*E. camaldulensis* の場合では、1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene 及び  $\alpha$ -phellandrene のモノテルペノイドがアレロパシー物質の主成分であり、その他 gallic acid, ferulic acid などが同定されている (文献 4)。一方、文献 19 によると、非組換えである *E. globulus* においては、乾燥地上部の 50%エタノール粗抽出物をマウス腹腔内への注射した場合、LD50 は、562.0mg/kg であった。これは毒物又は劇物に相当するものではない。

## ト その他の情報

### 1) ユーカリ属植物を摂食する昆虫等について

オーストラリアにおける摂食昆虫としては、コガネムシ類、ハムシ類、ゾウムシ類、ハバチ類のような葉を食するもの、キジラミ類、ヨコバイ類やカタカイガラムシ類のような樹液を吸う昆虫、ならびにカミキリムシ類や大型のボクトウガ類のような、その幼虫が樹木の木質部に穴を開けるいわゆる木食い虫が挙げられる (文献 5)。

日本では、名古屋市において温室栽培のユーカリ属植物を加害している鱗翅類の調査から、ハマキガ科のチャノコカクモンハマキ、ホソバチビヒメハマキとバンジロウツノエグリヒメハマキが確認された (文献 20)。また、沖縄県名護市の栽培ほ場では、ハマキガ科のバンジロウツノエグリヒメハマキ、シャクガ科のオオトビスジエダシャクとミカンコエダシャク、ドクガ科のコシロモンドクガとマイマイガ沖縄亜種が確認された (文献 20)。つくば地区における摂食昆虫類については、*E. camaldulensis*、及び、*E. globulus* の屋外栽培による調査が行われた。*E. camaldulensis* はヨモギエダシャクやナシケンモン、ミノガ等の鱗翅目や直翅目の食害を受けたが、顕著な被害は栽培初年度でその後はほとんど発生が認められなくなった。時折、キジラミ類の発生も認められたが、一過的なものであった。一方、*E. globulus* では顕著な害虫類の発生が認められていない。

### 2) その他

ユーカリ属植物のいくつかの種は、薬用植物としても原産地や海外の発展途上国で伝統的利用が行われている。葉からの粗抽出液をノミや家庭害虫の殺虫剤として用いる場合もある (文献 7)。

## 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

#### イ 構成及び構成要素の由来

耐冷性ユーカリ (*des9, Eucalyptus globulus* Labill.) (以下、本組換えユーカリとする) 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は次項表 1 に示した通りである。組換え DNA 分子の構成図は図 1 に示した通りである。

#### ロ 構成要素の機能

本組換えユーカリの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は次項表 1 に示した通りである。

##### <発現ユニット 1>

目的遺伝子である *des9* 遺伝子 (表 1 対象区分 C) は、 $\Delta 9$  デサチュラーゼをコードするラン藻 *Anacystis nidulans* 由来の遺伝子であり、膜脂質に結合した脂肪酸の  $\Delta 9$  位を不飽和化する酵素をコードする遺伝子である (文献 22)。 $\Delta 9$  デサチュラーゼは脂肪酸のカルボキシル基側から数えて 9 番目の位置にある炭素間結合を不飽和化 (二重結合化) する酵素であり、炭素鎖 16 のパルミチン酸の場合、本酵素の働きによりパルミトレイン酸となる。パルミチン酸の融点が 63.1°C であるのに対して、パルミトレイン酸は -0.5°C であり、著しく融点が低下する。このように脂肪酸の融点が低下し、低温においても膜脂質の流動性が維持され耐冷性が付与されるものと考えられている。本遺伝子にはエンドウ Rubisco-S の葉緑体移行シグナルが連結されており、翻訳産物は、脂肪酸の不飽和化反応がなされる葉緑体へ移行する。いくつかの細菌や植物では、当該遺伝子の導入により耐冷性が付与されたという報告もある (文献 22)。また、MC8 プロモーターはレンゲ萎縮ウイルスに由来するプロモーターであり、植物内で構成的発現を起こし、NOS ターミネーターは遺伝子の転写を終了させるのに必要なユニットである。

##### <発現ユニット 2>

*GUS* ( $\beta$  グルクロニダーゼ) 遺伝子 (表 1 対象区分 G) は pGW23 ベクターの構成要素である (図 1A)。*GUS* 遺伝子は標識遺伝子として使われており、大腸菌由来の *GUS* を発現する。カタラーゼイントロンは、*GUS* 遺伝子を植物体内のみで発現させるために *GUS* 遺伝子配列に挿入されている (文献 23)。GST プロモーター及び NOS ターミネーターは遺伝子の転写を開始及び終了させる。

##### <発現ユニット 3>

*NPTII* (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子 (表 1 対象区分 L) は pGW23 ベクターの構成要素である (図 1A)。これは標識遺伝子として使われており、カナマイシン耐性遺伝子である。NOS プロモーター及び NOS ターミネーターは遺伝子の転写を開始及び終了させる。

##### <その他>

R タンパクの認識配列 (RS、表 1 対象区分 N) は組換え反応を起こす領域で、R タンパクの発現によって RS 領域に挟まれた遺伝子は欠損する。

右側及び左側境界配列 (RB 及び LB、表 1 対象区分 O、P) は、Ti プラスミド pTiT37、及び、pTiA6 に由来するノパリン型 T-DNA の境界配列を含む DNA 断片である。右側境界配列は、T-DNA がアグロバクテリウム (学名: *Rhizobium radiobacter* 以下同様) から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として、また左側境界配列は終結点として機能する。

上記のすべての遺伝子及び配列について、病原性を発揮するという報告はない。

表1 形質転換・発現ベクター pGW23MC8des9 の各構成要素

pGW23MC8des9 プラスミドは、図1及び図2に示すように、3つの発現ユニットから構成されている。その構成を以下に示す。

対象区分	遺伝子の名称等	由来及び機能	DNAの種類 (ゲノムDNA, cDNA等)	同定・未同定の区別
発現ユニット1				
A	MC8 プロモーター	レンゲ萎縮ウイルス ( <i>Milk vetch dwarf virus</i> ) 由来のプロモーター	ゲノムDNA	同定済
B	葉緑体移行シグナル	<i>Pisum sativum</i> の RuBisCO small subunit 由来	ゲノムDNA	同定済
C	Δ9 デサチュラーゼ遺伝子 ( <i>des9</i> )	<i>Anacystis nidulans</i> 由来の遺伝子で、脂質に結合した脂肪酸のΔ9位を不飽和化する。	ゲノムDNA	同定済
D	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
発現ユニット2				
E	GST プロモーター	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> )	ゲノムDNA	同定済
F	カタラーゼ Intron	ヒマ ( <i>Ricinus communis</i> )	ゲノムDNA	同定済
G	<i>GUS</i> 遺伝子	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来でβ-グルクロニダーゼを発現する。	ゲノムDNA	同定済
J	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
発現ユニット3				
K	NOS プロモーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
L	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 ( <i>NPTII</i> )	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来でカナマイシン耐性を付与する遺伝子である。	ゲノムDNA	同定済
M	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
その他				
N	R タンパクの認識配列 RS	醤油酵母 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ) 由来で、組換え反応を起こし、RS に挟まれた領域は、R タンパクの発現によって欠失する。	2 μ プラスミド DNA の一部	同定済
O	右側境界配列 (RB)	Ti プラスミド pTiT37 に由来するノバリン型 T-DNA の右側境界配列 (25bp) を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA がアグロバクテリウムから植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として機能する。	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
P	左側境界配列 (LB)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左側境界配列 (25bp) を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA がアグロバクテリウムから植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。	Ti プラスミド DNA の一部	同定済



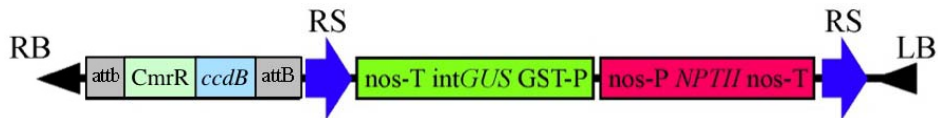


図 1 A. pGW23 概略図. RK 2 系 (pBI121) 由来 (文献 21)  
pBI121 を RB, LB の内側について上記のように改変した



図 1 B. 組換え DNA 分子の構成図  
pGW23 のゲートウェイシステムである attb と attB に挟まれた領域 (図 1 A 参照) を部位特異的な組換え反応によって *des9* カセットに置換した。

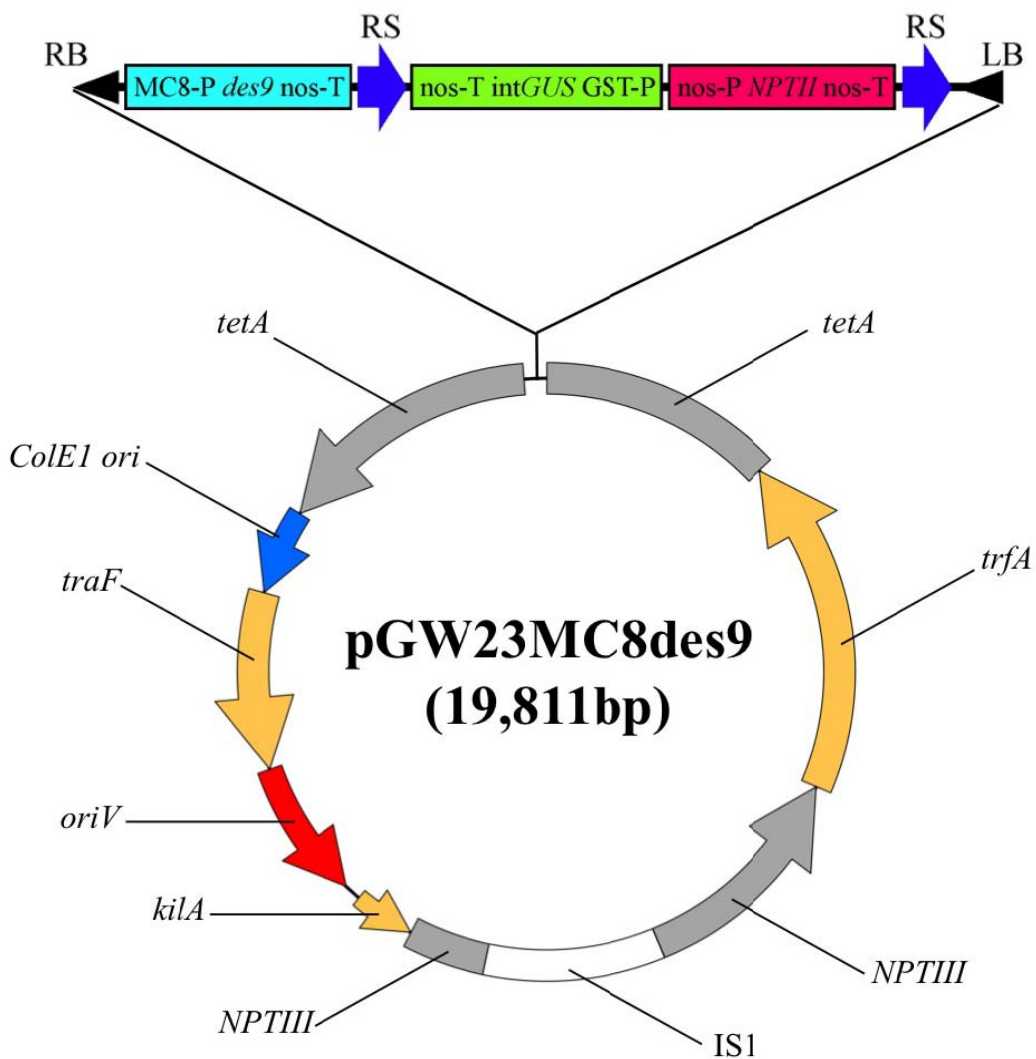


図 2. pGW23MC8des9 プラスミド構成図  
*ColE1 ori*: 大腸菌での複製開始点, *IS1*: 転移因子, *kila*: 大腸菌の宿主範囲決定に関わる遺伝子, *NPTIII*: カナマイシン耐性遺伝子 (転移因子 *IS1* 挿入のため機能欠失), *oriV*: アグロバクテリウムでの複製開始点, *tetA*: テトラサイクリン耐性遺伝子 (T-DNA 挿入のため機能欠失), *traF*: プラスミド転移に必要な遺伝子, *trfA*: 複製開始点が機能するために必要な遺伝子

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

本組換えユーカリの作出に用いたプラスミドベクターは pGW23MC8des9 (図 2) であるが、図 1A の pGW23 を図 1B で置き換えたものである。pGW23 は pBI121 を改変して作られたものであり、pBI121 の由来は pBR322 を改変した pBIN19 となる(文献 21)。pBIN19 は RK2 系プラスミドである。以上のように、pGW23MC8des9 は pBIN19 の派生型であり、プラスミドベクターの性質としては、pBIN19 と同等である。

### ロ 特性

ベクター pGW23MC8des9 の塩基数は 19,811bp であり、図 2 に示すような構成となっている。本ベクターの基となった pBIN19 は、DNA 複製開始点 *CoIE1 ori* と *oriV* を持つ 2 本鎖環状 DNA であり、大腸菌とアグロバクテリウムを含む広範囲の細菌を宿主としてカナマイシン耐性を付与する。pBIN19 は、菌体の分裂増殖によって伝達されるが、プラスミドの他への伝達性は別因子により支配されているため pBIN19 自体の伝達性は無く、感染性も知られていない。プラスミド全体は植物には伝達されないが、右側境界配列(LB)と左側境界配列(RB)に挟まれた領域の DNA (T-DNA 領域) はアグロバクテリウムの感染により、植物に伝達される。植物に導入された T-DNA は交配によってのみ同種植物に伝達される。

## (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

アグロバクテリウムの T-DNA 伝達機構により、上記 pGW23 の T-DNA 領域内に含まれる当該組換え核酸を *E. globulus* に導入する。宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素については表 1 及び図 1 に示した。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドベクター pGW23MC8des9 (図 2) 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により *E. globulus* に導入する。

### ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミドベクター pGW23MC8des9 を保有するアグロバクテリウムを *E. globulus* の実生胚軸に感染させ、再生個体を得る。得られた再生個体を挿し木で増殖、クローンとして試験に用いる。カルベニシリン (50  $\mu$ g/ml) を含有させた培地で培養することで除菌を行い、その後、無菌苗をカルベニシリンなどの抗生物質を含まない MS 培地に移植し、アグロバクテリウムの増殖がないことを確認した系統のみを特定網室において馴化栽培後に隔離ほ場に移植する。*Agrobacterium* の残存性については農業環境研究所報告第 8 号の方法に従い実施する。培養室で無菌的に発根させた組換えユーカリより、茎葉を採取し、振とう法により YEB + Km (50  $\mu$ g/ml) 培地上に微生物を分離し、*Agrobacterium* の有無を確認する。なお、移植をするのは、樹高 10cm 程度の幼木である。

ニ 本組換え生物の使用はイ〜ハの手順により得られた系統について、優れた耐冷性を有する系統を選抜するため、複数系統を隔離ほ場で栽培するものである。最大 10 系統、100 個体を計画している。各植栽個体は系統別に判別できるように管理する。以下(4)〜(6)の情報は、すべての系統に関してではなく、先行して得た系統について示しているが、この際、花芽を

付けずにユーカリを栽培すること ((6)e、3.(2)ロ d) 参照)、隔離ほ場を用いる(3.(2)参照)ことから、生物多様性影響のおそれがないと評価することは可能であると考えられる。

ホ 筑波大学隔離ほ場における、これまでに行われたユーカリ幼苗の植栽において、野生生物等による引き抜き、持ち出し等はなかった。仮に引き抜きが行われたとしても、細根等にダメージを受け、秋冬期の低温、冬期間の乾燥もあり再定植は困難であると考えられる。

#### (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

##### イ 核酸の存在状態

発根個体の葉の一部を採取し FAST DNA KIT(Q-BIO)によりゲノム DNA を抽出した。閉鎖系温室で生育させた本組換えユーカリと非組換えユーカリの葉から、ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った。先行して得られた再分化個体について結果を示す(別紙5)。

サザンハイブリダイゼーション法は、葉から抽出したゲノム DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断し、0.8 %アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルター Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロットイングして行った。プローブは、*des9* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出した。別紙5図 1 に先行して得られた再分化個体の結果を示す。多くの再生個体で導入遺伝子は染色体に安定に組込まれたことが確認された。

##### ロ *des9* 遺伝子の発現

本組換えユーカリにおける導入遺伝子の発現を確認するため、閉鎖系温室で生育させた本組換えユーカリと非組換えユーカリを用い、当該遺伝子の発現の確認をノーザンハイブリダイゼーション法により行った。

ノーザンハイブリダイゼーション法は、葉から抽出した 20  $\mu$ g の全 RNA を変性 1.2 % アガロースで電気泳動後、ナイロンフィルター Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロットイングして行った。プローブは、*des9* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出した。別紙6図 1 に先行して得られた再分化個体についての結果を示す。一部の系統で発現の認められないものもあるが、多くの系統で導入遺伝子が発現している事が明らかとなった。

一方、非組換えユーカリではほとんど検出されないパルミトイル酸が多数の組換えユーカリより検出された(別紙7)。

#### (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

本組換えユーカリに導入されている遺伝子配列に基づいて設計したプライマー対を用い、PCR を行うことで、導入遺伝子を特異的に検出することが可能であり、その感度については、約 50ng のゲノム DNA を反応に供すれば、本法により検出可能であることを確認した。また、サザンブロットハイブリダイゼーションによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 5  $\mu$ g のゲノム DNA を用いれば検出可能である。プローブは、*des9* cDNA 遺伝子の部分配列を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出する。

#### (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 本組換えユーカリでは宿主と異なり *GUS* 遺伝子により  $\beta$ -グルクロニターゼを発現し、

NPTII 遺伝子によりカナマイシン耐性が付与されている。さらに、*des9* 遺伝子によってコードされる  $\Delta 9$  デサチュラーゼは本組換えユーカリで恒常的に発現している。

ロ GUS 及び NPTII については古くから幅広く多様な植物種で使用され、生物多様性への影響のおそれのないことは公知である(文献 24)。

ハ 特定網室での栽培について平成 17 年に機関承認を受けた後、先行して得られた系統について形態及び生育の特性等を調査した。

a) 形態及び生育の特性

先行して得られた系統について、ほとんどの本組換えユーカリと非組換えユーカリの間で顕著な差異は認められなかったが、一部には成育が著しく抑制されるものがみとめられた(別紙 8)。一方、葉型などの外観に特記すべき差異は認められなかった。

b) 生育初期における低温または高温耐性

非組換えユーカリ苗木については、2004 年秋に幼木を温室から隔離ほ場に植え替えたところ、半数は越冬したが、2 年目の冬に地上部が枯死した(樹高 80cm 程度:別紙 3、図 1)。発芽苗について、日本においては、冬期以前に発芽したものの多くは冬期の低温で枯死する。また関東以北では、霜柱等の凍害も有り、発芽苗が越冬することはほとんどないことが公知として認められている。また、春期に発芽した苗についても、別紙 3 図 1 の更新萌芽(5~10 cm 程度)と同様の成長が想定され、競合性が低いものと考えられる。

一方、本組換えユーカリについて、外植片や発根苗を用いた低温処理後の回復試験では耐冷性に優れた系統は認められていない。特定網室における耐冷性評価試験(冬期間に非暖房、窓開放)を試みたが、非組換え体に比べて成長性の良い個体は認められていない。しかし、当該実験の温度が耐性評価に必要な低温域となっていない可能性があるため、冬期間に本隔離ほ場栽培試験において低温耐性の評価を行う予定である。昨冬季の最寒日は最低気温は $-7.3^{\circ}\text{C}$ を記録し、また、最低気温 $-5^{\circ}\text{C}$ を下回る日が通算 19 日あったが、網室内の気温が $-2^{\circ}\text{C}$ を下回ることがなかった。

c) 成体の越冬性または越夏性

非組換えユーカリについては、別紙 3 図 1 及び図 2 に示すように、1 年目のクローン苗木は、越冬したが、2 年目に地上部が枯死した。

本組換えユーカリにおける成体の越冬性試験は行っていないが、冬期間に本隔離ほ場栽培試験において行う予定である。なお、本組換えユーカリは樹高 10cm 程度の幼木を用いるため、2 年間の使用期間中に成木となる可能性は低い。

d) 花粉の稔性及び大きさ

特定網室で 2 年間栽培した本組換えユーカリでは花芽形成が認められなかった。

e) 種子の生産性、休眠性及び発芽率

原産地では、*E. globulus* の開花樹齢は遺伝型によって異なり、3~4 年で花芽を形成するものから 7 年ほどかかるものまでである。*E. globulus* の場合、自生地における花粉媒体は、昆虫類が主体であるが、鳥類の報告もある。他殖率は樹幹の高さによって異なり、54%

から 78%と報告されている(文献 12)。日本においては、*E. globulus* を好んで訪花する昆虫は特定されていない。一方、本組換えユーカリについて、花芽の形成が認められていないため、評価出来ていない。なお、本組換えユーカリは樹高 10cm 程度の幼木を用いるため、2 年間の使用期間中に成木となる可能性は低い。

f) 交雑性

*E. globulus* の花粉移動距離は今のところ報告されていない。*E. globulus* と同じ節に属する *E. nitens* については、植林地周辺に自生する他のユーカリ種との自然交雑頻度から花粉移動距離について 310m の移動が報告されている(文献 25)。また、節の異なる *E. regnans* では、対象木と交雑した花粉の 50%以上が、40m 以上離れた花粉親からのものであったことが分かっている(文献 26)。さらに、花粉が長距離を移動した例として、オーストラリアのユーカリ林(*E. macrorhyncha*)において、最大 5 km 離れたところで、*E. regnans* との雑種樹木が生育していることが報告されている。これは蜜を摂取する鳥類による花粉移動と考えられている(文献 6)。

文献 27 によると、ユーカリ属には 13 の亜属があり、*E. globulus* は亜属 *Symphyomytus* の *Maidenaria* 節に属する。*Symphyomytus* には 474 種が属し、植林に利用されるユーカリ種の多くは、この亜属に属している。節内の種間交雑は比較的容易である(文献 28)。*E. globulus* が属する *Maidenaria* 節には、他に *E. nitens* や *E. dunnii* などがある。通常オーストラリア自生地では、交雑できる種同士は、同じ集団を形成しなかったり、開花時期が異なったりするため、容易に雑種は形成されない(文献 6)。しかし、*E. nitens* のように、自生地以外でも広く植林されている種は、その地に自生するユーカリ種と自然交雑しうるということが報告されている。たとえばタスマニア島に自生する *E. globulus* と移入植林種である *E. nitens* の開花期は重なっており(文献 29)、*E. globulus* が花粉親となる場合は、雑種が形成されうると報告されている(文献 30)。また、オーストラリア・タスマニア島の *E. nitens* 植林における開放受粉によると、在来ユーカリ種との雑種子の平均形成率は 0.4 %程度と報告されている(文献 25)。

しかしながら、分類学的距離が遠い種の間における雑種形成は困難である(文献 28)。自然での近縁種間交雑の例は報告されているが、一般的に亜属内であっても分類節が異なると雑種弱性や致死性が認められている。例えば、日本でも公園などで鑑賞栽培がみられる *E. camaldulensis* と *E. globulus* は違う分類節に属するため自然交雑は非常に起こりにくいことが認知されている(文献 31)。これは花器の構造、生理的様態及び遺伝的因子に起因する(文献 12)。さらに、人工交配実験で得られた両種の雑種は、強い他殖弱勢を起し、適応度が著しく損なわれることが知られている(文献 31)。

本邦においては、宿主植物である *E. globulus* と交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本組換えユーカリと交雑可能な *Eucalyptus* 属野生集団は存在しない。野生集団ではないが、隣接する区画に第一種使用中の *E. globulus* (08-26-P0001-3)、及び、非組換えユーカリが植栽されている(別紙 9)。それ以外については、*E. globulus* と同じ節に属する *E. nites* での花粉移動距離に関する報告事例 310 m の範囲内は筑波大学の敷地内と県道でありユーカリの植栽がないことを確認している。本試験においてはユーカリに開花させない(花芽の切除)ことが第一種使用規程に記載されているため、交雑するおそれは無い。また、本組換えユーカリ自体の性質については、開花していないため、交雑性や導入遺伝子の拡散に関する試験は行われていない。なお、本組換えユーカリは樹高 10cm 程度の幼木を用いるため、2 年間の使用期間中に成木となる可能

性は低い。

g) 有害物質の産生性

これまでにユーカリ属植物が、日本における自然生態系に対して生物多様性に著しく影響を生じさせるような有害物質を産生させる報告はされていない。一方、ユーカリ属植物は、一般的にアレロパシー性を示し、*E. globulus* もその例外ではない。*E. globulus* のアレロパシー性は、他の植林に用いられているユーカリ種と比べると相対的に低いことが知られている（文献 18）。

一方、本組換えユーカリは、耐冷性を  $\Delta 9$  デサチュラーゼの機能により付与されているが、本酵素は有害物質に該当しない。また、*GUS* 遺伝子により  $\beta$ -グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマイシンホスホトランスフェラーゼが発現しているが両酵素も有害物質に該当しない。

### 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

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

所在地：茨城県つくば市天王台 1-1-1（別紙 10）

名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場 II（隔離ほ場）

使用期間：承認の日から平成 25 年 9 月 30 日まで

#### イ. 隔離ほ場の施設：別紙 11

- a) 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 230cm のフェンス（有刺鉄線 30cm、メッシュフェンス 180cm、コンクリート基部 20cm）を設置している。コンクリート部は地下 68cm まで及び、その下層に砕石層 15cm が設けられている。
- b) 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。
- c) 土、遺伝子組換えユーカリ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ともに、遺伝子組換えユーカリ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。

#### ロ. 隔離ほ場での作業要領

- a) 遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリ以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを抑制する。
- b) 遺伝子組換えユーカリを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えユーカリが漏出しない構造の容器に入れる。
- c) b) により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えユーカリの栽培終了後は、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリの地上部は裁断処理し隔離ほ場内に鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、オートクレーブ等で不活化する。
- d) 花粉移動を防止するために、花芽が形成された場合は、これらをすみやかに切除し、オートクレーブにて不活化する。
- e) 意図せずに遺伝子組換えユーカリが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止するため、隔離ほ場内の使用区画で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄等を行う。
- f) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- g) a) から f) に掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- h) 生物多様性への影響を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。

#### (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

隔離ほ場において、本組換えユーカリの性質として、冬期間の生育、越冬性、生理的特性などを評価し、耐冷性系統の選抜を行う。選抜系統については導入遺伝子の安定性、発現性、脂肪酸等の解析を計画している。

#### (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

本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

先行して得られた一部の系統について特定網室で形質評価を行った。ほとんどの系統において、本組換えユーカリと非組換えユーカリの間で顕著な差異は認められなかったが、一部には成育が著しく抑制されるものが認められた(別紙8)。一方、葉型などの外観に特記すべき差異は認められなかった。

(6) 花芽の管理について

*E. globulus* は直径 1.5cm 程の円錐形の花芽を付け、開花まで1年程度掛かる。植栽後1年での成長は2m程度と予想され、充分目視で花芽を見つけることが可能である。ほ場内での作業で毎月最低2回の目視を行うとともに、日常的にはほ場外から確認を行う。



## 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

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

別紙3図1に挙げるように、非組換えユーカリ (*E. globulus*) の苗木 (約80cm高で越冬) の多くは越冬出来ず、翌春に萌芽更新により現れた植物体が成長を開始する。周辺の草本植物の成長が著しく、萌芽個体は成長初期段階に限れば成長は劣るため (別紙3図2)、競合性が低いと考えられる。

低温にさらされる冬期間の生存性は高まるが、春季に発芽するものは周辺草本の生育が著しく、それらに日照が妨げられ生育出来ないと考えられるため、通年での優位性が高まるものではない。また、本組換えユーカリについては隔離ほ場での管理された栽培が行われるため、申請書の隔離ほ場内の施設や作業要領に記載されているように、管理された人工的な条件である隔離ほ場での野生動植物への影響のおそれはないと判断された。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

該当しない

#### (3) 影響の生じやすさの評価

該当しない

#### (4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無の判断

以上の事から本組換えユーカリは、栽培予定地の自然条件下で生育した場合の特性は耐冷性が強化されている事が想定されるが、それ以外は非組換えユーカリとの間に大きな相違はないと考えられ、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する範囲内では、競合に関する優位性に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性への影響が生ずるおそれはないと判断された。

### 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の特定

これまでにユーカリ属植物が、日本における自然生態系に対して生物多様性に著しく影響を生じさせるような有害物質を産生させる報告はされていない。一方、ユーカリ属植物は、一般的にアレロパシー性を示し、*E. globulus* もその例外ではない。*E. globulus* のアレロパシー性は、他の植林に用いられているユーカリ種と比べると相対的に低いことが知られている (文献18)。

オーストラリアにおける摂食昆虫としては、コガネムシ類、ハムシ類、ゾウムシ類、ハバチ類のような葉を食するもの、キジラミ類、ヨコバイ類やカタカイガラムシ類のような樹液を吸う昆虫、ならびにカミキリムシ類や大型のボクトウガ類のような、その幼虫が樹木の木質部に穴を開けるいわゆる木食い虫が挙げられる (文献3)。

日本では、名古屋市において温室栽培のユーカリ属植物を加害している鱗翅類の調査から、ハマキガ科のチャノコカクモンハマキ、ホソバチビヒメハマキとバンジロウツノエグリヒメハマキが確認された (文献19)。

一方、本組換えユーカリは、耐冷性を $\Delta 9$  デサチュラーゼの機能により付与されているが、当該酵素は有害物質に該当しない。また、当該酵素により増加すると考えられるパルミトリン酸は、マカダミアナッツ、牛肉などさまざまな食品に含まれており、有害物質には該当

しない。一方、*GUS* 遺伝子により  $\beta$ -グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマイシンホスホトランスフェラーゼが発現しているが両酵素も有害物質に該当しないので、上記鱗翅目は影響を受けないと考えられる。

さらに、当該第一種使用は、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で行うものであり、かつ隔離ほ場自体が大学の敷地内の施設等で囲まれているため（別紙 10、11）、ここから外部生態系への生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当しない

(3) 影響の生じやすさの評価

該当しない

(4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無の判断

以上から、本組換えユーカリは、栽培予定地の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないものの、筑波大学における諸情報収集及び実験等により、非組換えユーカリとの間に大きな相違はないと考えられた。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、廃棄及びこれらに付随する行為の範囲内では、在来生態系の生物多様性への影響を生じるおそれがないと判断された。

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

本隔離ほ場栽培試験において、当該遺伝子組換えユーカリの花芽は切除される。また、本邦においては、*E. globulus* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていない。従って、本組換えユーカリによる交雑によって、生物多様性への影響を生じるおそれのある野生動植物等は特定されなかった。

また、ユーカリ属植物は根茎を形成する場合があるが、隔離ほ場を取り囲むフェンス基部のコンクリート部は地下 68cm まで及び、その下層に碎石層 15cm が設けられているため、根茎のほ場外への伸長はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当しない

(3) 影響の生じやすさの評価

該当しない

(4) 生物多様性が生じるおそれの有無の判断

以上のことから、本組換えユーカリは、交雑性に関して、生物多様性への影響が生ずるおそれはないと判断された。

4. その他の性質

該当しない

### 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関わる形質について、宿主植物はつくば地区における屋外栽培試験により競合の優位性が低いことが明らかとなっている（第一、1、(3)、ロ、及び、第二、1、(1)）。本組換えユーカリは耐冷性を有すると考えられるが、低温環境下に置かれない限り耐冷性による競合における優位性はないと考えられる。また、試験期間が2年であり、当該組換え体が成木となる可能性は極めて低いこと、花芽形成後開花まで1年程度掛かること（第一、1、(3)、イ）から、期間内に花芽が形成されることはない。仮に花芽が形成された場合でも花芽の切除を行うため、種子が形成されることはなく、導入遺伝子を有する種子が漏出するおそれはない。一方、競合において優位に生育した場合でも、本隔離ほ場の立地条件、花芽の切除等、適切な措置を講じることから、本組換えユーカリの競合における優位性には影響しないと判断する。以上から、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により、競合における優位性に関して、生物多様性への影響を生じるおそれはないと判断された。

有害物質の産生に関して、本組換えユーカリは、耐冷性を $\Delta 9$ デサチュラーゼの機能により付与されているが、当該酵素は有害物質に該当しない。また、*GUS* 遺伝子により $\beta$ -グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマイシンホストトランスフェラーゼが発現しているが両酵素も有害物質に該当しない（第一、2、ハ、(6)、g）。当該第一種使用は、隔離ほ場で行うものであり、栽培のために環境が制御された人工的な場所である。また隔離ほ場自体が、大学の敷地内の施設等で囲まれているため、隔離ほ場栽培中にも有害物質の産生が仮にあっても、外部生態系への生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断された。

交雑性について本邦においては、*E. globulus* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていない。また、試験期間が2年であり、当該組換え体が成木となる可能性は極めて低いこと、花芽形成後開花まで1年程度掛かること（第一、1、(3)、イ）から、期間内に花芽が形成されることはない。仮に花芽が形成された場合、花芽の切除を行う。従って、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性への影響を生じるおそれはないと判断された。

以上のことから、本組換えユーカリは、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により、我が国の生物多様性に影響が生じるおそれがないと結論された。

## 参考文献

1. Nicole D. (2006) *Eucalyptus* of Victoria and Tasmania, Bloomings Books, Melbourne
2. Boland D. J., M. I. H. Brooker and J. W. Turnbull (1980) *Eucalyptus* seed. CSIRO Australia
3. Grattapaglia D. and H. D. Bradshaw (1994) Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. Canadian Journal of Forest Research 24: 1074-1078
4. 西村弘行(1987) 未来の生物資源ユーカリ -そのバイオテクノロジーとバイオサイエンス-、内田老鶴圃
5. プライオー L. O. (1981) ユーカリの生物学、石倉成行訳、朝倉書店
6. Eldridge K., J. Davisdon, C. Harwood and G. van Wyk (1993) Eucalypt domestication and breeding. Oxford University Press
7. Lewis, W. H. & M. P. F. Elvin-Lewis (1977) Medical Botany, Wiley, NY
8. Brooker M. I. H. and D. A. Kleinig (1983) Field guide to Eucalypts South-eastern Australia. Inkata Press, Sydney
9. Attiwill P. M. and M. A. Adams (1996) Nutrition of *Eucalyptus*, CSIRO Publishing
10. 日本野生植物図鑑、八坂書房、(1999)
11. 海外産業植林センター (2005) オーストラリアにおける *E. globulus* 産業植林地の萌芽更新、<http://www.jopp.or.jp/jigyo/report/coppiceH16/H16coppiceReport.pdf>
12. Patterson B., R. E. Vaillancourt, D. J. Pilnbeam and B. M. Potts (2004) Factors affecting variation in outcrossing in *Eucalyptus globulus*. Australian Journal of Botany 52: 773-780
13. Hingston A. B. and B. M. Potts (2005) Pollinator activity can explain variation in outcrossing rate within individual trees. Austral Ecology 30: 319-324
14. Ruaud J. N., N. Lawrence, S. Pepper, B. M. Potts, and N. M. G. Borralho (1998) Genetic variation of in vitro rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. Silvae Genetica 48: 4-7
15. Skolmen R. G. (1983) Growth and yield of some Eucalyptus of interest in California, In: R. B. Standiford, F. T. Ledig (eds.). Proc Workshop on *Eucalyptus* in California. Sacramento, CA. US Forest Service Gen Tech Rep PSW-69. p 49-57
16. Skolmen R. G. and F. T. Ledig (1990) *Eucalyptus globulus* Labill. : bluegum eucalyptus, p. 299-304. In R. M. Burns and B. H. Honkala (tech. coords.), Silvics of North America: Volume 2. Hardwoods. Agriculture Handbook 654. U. S. D. A. Forest Service, Washington, D. C.
17. Souto X. C., J. C. Bolano, L. Gonzalez and M. J. Reigosa (2001) Allelopathic effects of tree species on some soil microbial population and herbaceous plants, Biologia Plantarum 44: 269-275
18. Lisanewok N. and A. Michelsen (2004) Allelopathy in agroforestry systems: the effects of leaf extracts of *Cupressus lusitanica* and three *Eucalyptus* spp. on four Ethiopian crops, Agroforestry Systems 21: 63-74
19. Ross I. A (2001) *Eucalyptus globules*. MEDICINAL PLANTS OF THE WOLRD. Vol. 2. Humana Press, New Jersey
20. 那須義次 等, (2004) 日本においてユーカリ類を加害する鱗翅類、日本応用動物昆虫

学会, vol.48, p.123-133

21. Jefferson R.A., T.A. Kavanagh, M. Bevan (1987) GUS fusions: *beta*-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J 6: 3901-3907
22. Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T. (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. Nat Biotechnol. 14:1003-1006.
23. Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. (1990) Construction and expression in Tobacco of a  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant cell physiol. 31:805-813
24. OECD ホームページ (2007 年 7 月 3 日) Field Trials in Member Countries. [http://www.oecd.org/document/41/0,3343,en\\_2649\\_34385\\_38235049\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/41/0,3343,en_2649_34385_38235049_1_1_1_1,00.html)
25. Barbour R.C., B.M. Potts and R.E. Vaillancourt (2003) Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: exotic hybrids are establishing in the wild. Australian Journal of Botany 51: 429-439
26. Burczyk J., W.T. Adams, G.F. Moran and A. Griffin (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozymes markers and the neighborhood model. Molecular Ecology 11: 2379-2391
27. Brooker M.I.H. (2000) A new classification of the genus *Eucalyptus* L' Her. (Myrtaceae). Australian Systematic Botany 13: 79-148
28. Potts B.M., R.C. Barbour, A.B. Hingston and R.E. Vaillancourt (2003) Turner Review No.6 Genetic pollution of native eucalypt gene pools identifying the risks. Australian Journal of Botany 51: 1-25
29. Barbour R.C., B.M. Potts, R.E. Vaillancourt and T.N. Tibbits (2006) Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: Flowering asynchrony as a barrier to F-1 hybridisation between exotic *E. nitens* and native Tasmanian *Symphyomyrtus* species. Forest Ecology and Management 226: 9-21
30. Gore P.L., B.M. Potts, P.W. Volker and J. Megalos (1990) Unilateral cross-incompatibility in Eucalyptus the case of hybridization between *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. Australian Journal of Botany 38: 282-294
31. Medding R.A., J.A. McComb, M.C. Calver, S.R. Thomas, and R.A. Mazanec (2003) *Eucalyptus camaldulensis* x *globulus* hybrids. Australian Journal of Botany 51: 319-331

平成 23 年 4 月 26 日

氏名 国立大学法人 筑波大学  
学長 山田 信博  
住所 茨城県つくば市天王台 1-1-1

第一種使用規程の承認を申請している耐冷性ユーカリ (*des9, Eucalyptus globulus* Labill.) (以下、本 LMO という) の第一種使用等において、生物多様性への影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊学は生物多様性への影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険度を軽減する方法への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性への影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。なお、生物多様性への影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本 LMO に関して、科学的に我国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 1 第一種使用等における緊急措置をとるための実施体制及び責任者は以下に示す通りとする。

平成 23 年 4 月現在

筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会 委員	
	(個人情報につき、公開しません)

●実験従事責任者

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、筑波大学遺伝子実験センター実験従事者から得られた情報により把握するとともに、筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会の委員による査察を行う。

- 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

実験従事者に直接口頭で伝え、事実を記録する。

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等

具体的な措置として、本 LMO の地上部は裁断処理し隔離ほ場内に鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、オートクレーブ等で不活化し、隔離ほ場外への本 LMO の放出が行われないようにすること、また隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本 LMO が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性への影響が生じる可能性が示唆された場合、弊学はそのことを直ちに文部科学省及び環境省に報告する。

## 別紙 目録

- 別紙 1 実験従事者
- 別紙 2 つくば地区における冬期の気温
- 別紙 3 隔離ほ場での非組換えユーカリ (*E. globulus*) の生育状況と植生との競合の有無
- 別紙 4 冬期の幼苗管理
- 別紙 5 宿主内における供与 DNA の存在状態
- 別紙 6 供与 DNA 由来遺伝子の発現形式
- 別紙 7 組換えユーカリ (*E. globulus*) のパルミトレイン酸含量
- 別紙 8 成長性
- 別紙 9 実験ほ場配置
- 別紙 10 筑波大学周辺地形図
- 別紙 11 屋外特定区画概略図



別紙 1 実験従事者

氏 名	所属部局・職名	病原性微生物取扱い経験の有無	宿主の取扱い経験の有無	遺伝子組換え実験経験の有無
<p>(個人情報につき、公開しません)</p>				

別紙 2 つくば地区における冬期の気温

表 1. つくば地区の冬期における最低気温

シーズン	'00-01	'01-02	'02-03	'03-04	'04-05	'05-06	'06-07	'07-08	'08-09	'09-10
冬日 (日)	87	76	90	85	79	93	64	83	64	64
最寒月平均 (°C)	-4.0	-2.3	-3.0	-2.9	-2.8	-3.8	-3.8	-1.2	-2.9	-1.1
										-2.6
最低気温 (°C)	-9.4	-6.5	-8.6	-7.0	-6.8	-7.5	-7.5	-5.3	-7.3	-5.9
										-6.8
最低気温[隔] (°C)	**	**	**	**	**	**	**	-7	-10	-6
										-8

過去 10 シーズンのつくば市館野 (AMEDAS ポイント) における冬日の日数 (冬日)、最寒月の平均最低気温 (最寒月平均)、シーズン最低気温 (最低気温) および、過去 4 シーズンにおける筑波大学隔離ほ場内でのシーズン最低気温 (最低気温[隔]) を示す。つくば市館野での冬日はシーズンあたり 60 日以上 (10 シーズン平均 78.5 日) あり、シーズン最低気温も  $-5^{\circ}\text{C}$  を下回る (10 シーズン平均  $-7.1^{\circ}\text{C}$ )。また、最寒月の平均最低気温も氷点下 (10 シーズン平均  $-2.7^{\circ}\text{C}$ ) であった。さらに、過去 4 シーズンの筑波大学隔離ほ場におけるシーズン最低気温は館野より低い値を示した。

別紙3 隔離ほ場での非組換え *E. globulus* の生育状況と植生との競合の有無

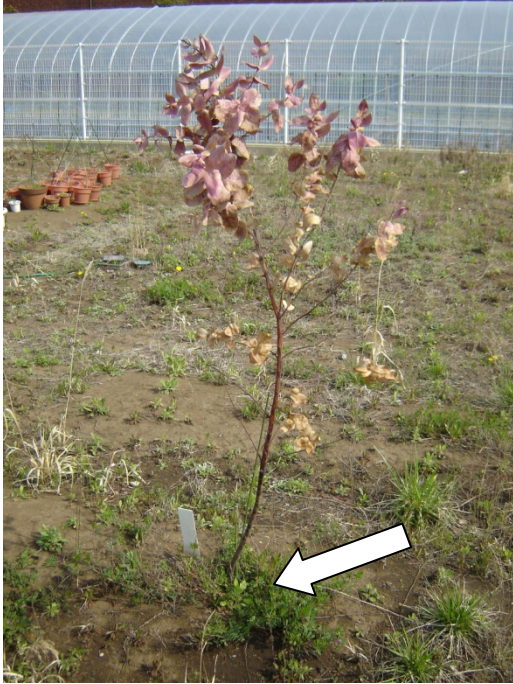


図1 非組換えユーカリ (*E. globulus*) の隔離ほ場での生育状況。植栽後2年目(平成17年4月)に撮影。地上部(約80cm)は越冬できず、樹皮下に形成されている潜伏芽から更新された萌芽(矢印)からが見られる。萌芽の大きさは5~10 cm程度であった。

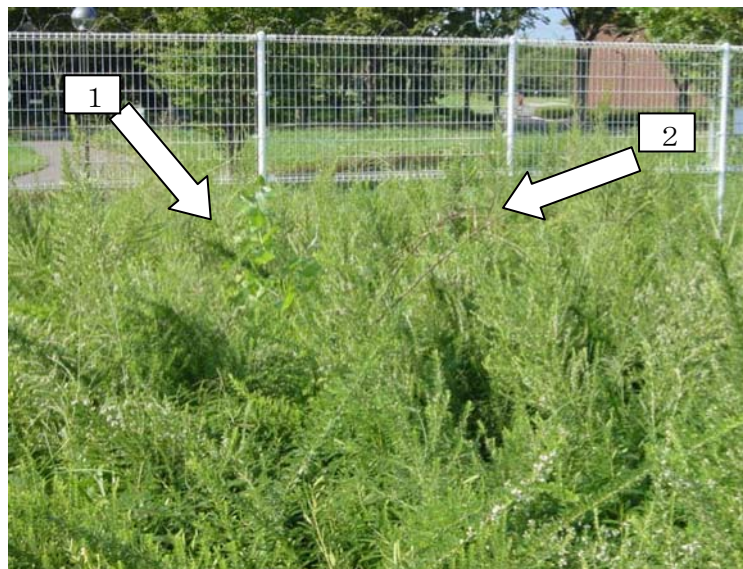


図2 非組換えユーカリ (*E. globulus*) (矢印) の隔離ほ場における2年目夏の生育状況(平成17年)。矢印2は前年に地上部が枯死したもの。更新した萌芽は植物体は周辺草本植物に埋もれるように生存している(矢印1)。また、成育の後れた幼苗は周辺草本に埋もれ秋までに枯死した。

別紙 4 つくば地区で必要な冬期の幼苗管理



図1. 冬期の幼苗管理Ⅰ（植栽時の様子）

2008年3月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ (*E. globulus*) の寒さ対策。幼苗をビニールハウスで覆い、寒さや霜の害を防いだ。



図2. 冬期の幼苗管理Ⅱ（植栽後9ヶ月目の様子）

2008年5月にハウスからビニールを取り除き（左図）栽培を行った後、12月に寒さ対策のため再びビニールでハウスを覆う（右図）。

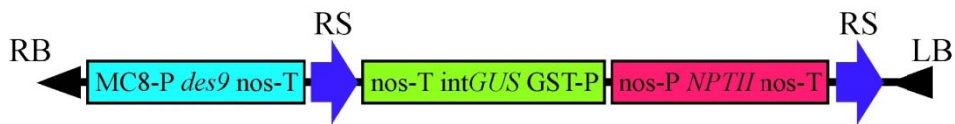
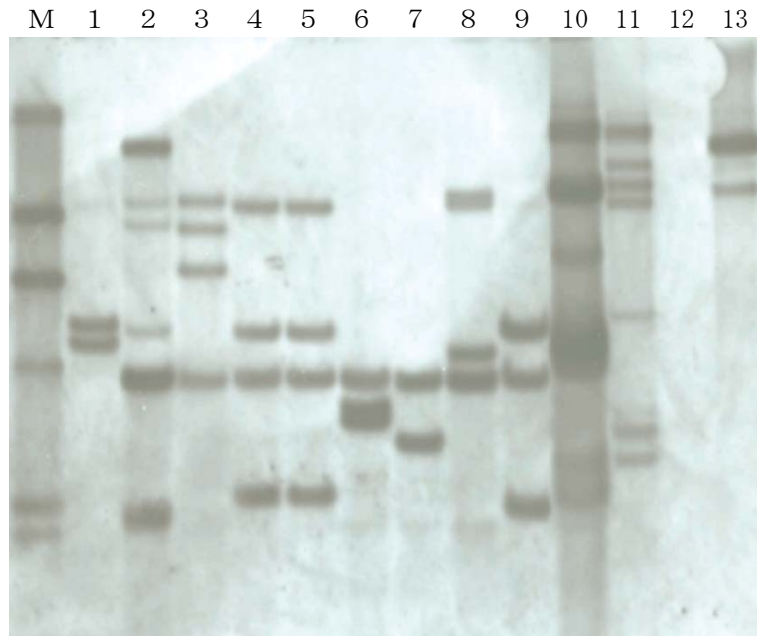


図3. 冬期の幼苗管理Ⅲ

2005年10月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ (*E. camaldulensis*) の寒さ対策。幼苗でフルシーズンの冬期を過ごすためハウス内の苗に苗帽子を掛け2重に保護した。

別紙5 宿主内における供与 DNA の存在状態

培養室で生育させた組換えユーカリと非組換えユーカリの葉から、ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った。ゲノム DNA は制限酵素 *Eco*RI で切断し、0.8%アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルターHybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロッティングした。プローブは、*des9* cDNA 部分配列を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。図1に先行して得られた再分化個体の結果を示す。多くの再生個体で導入遺伝子は染色体に安定に組込まれたことが確認された。

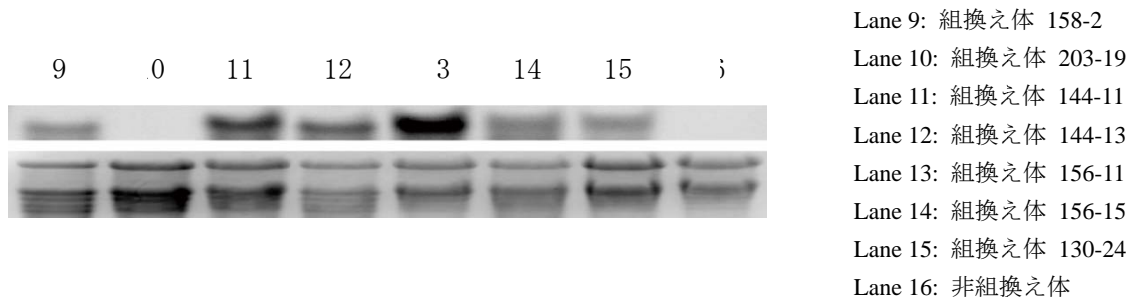
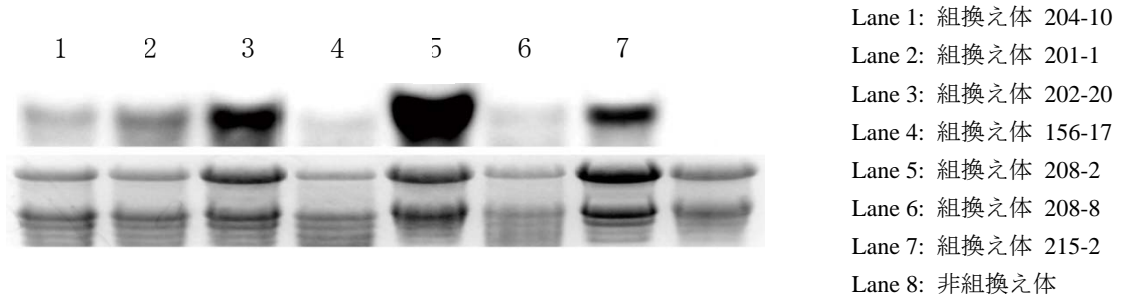


ト図

別紙6 供与 DNA 由来遺伝子の発現形式

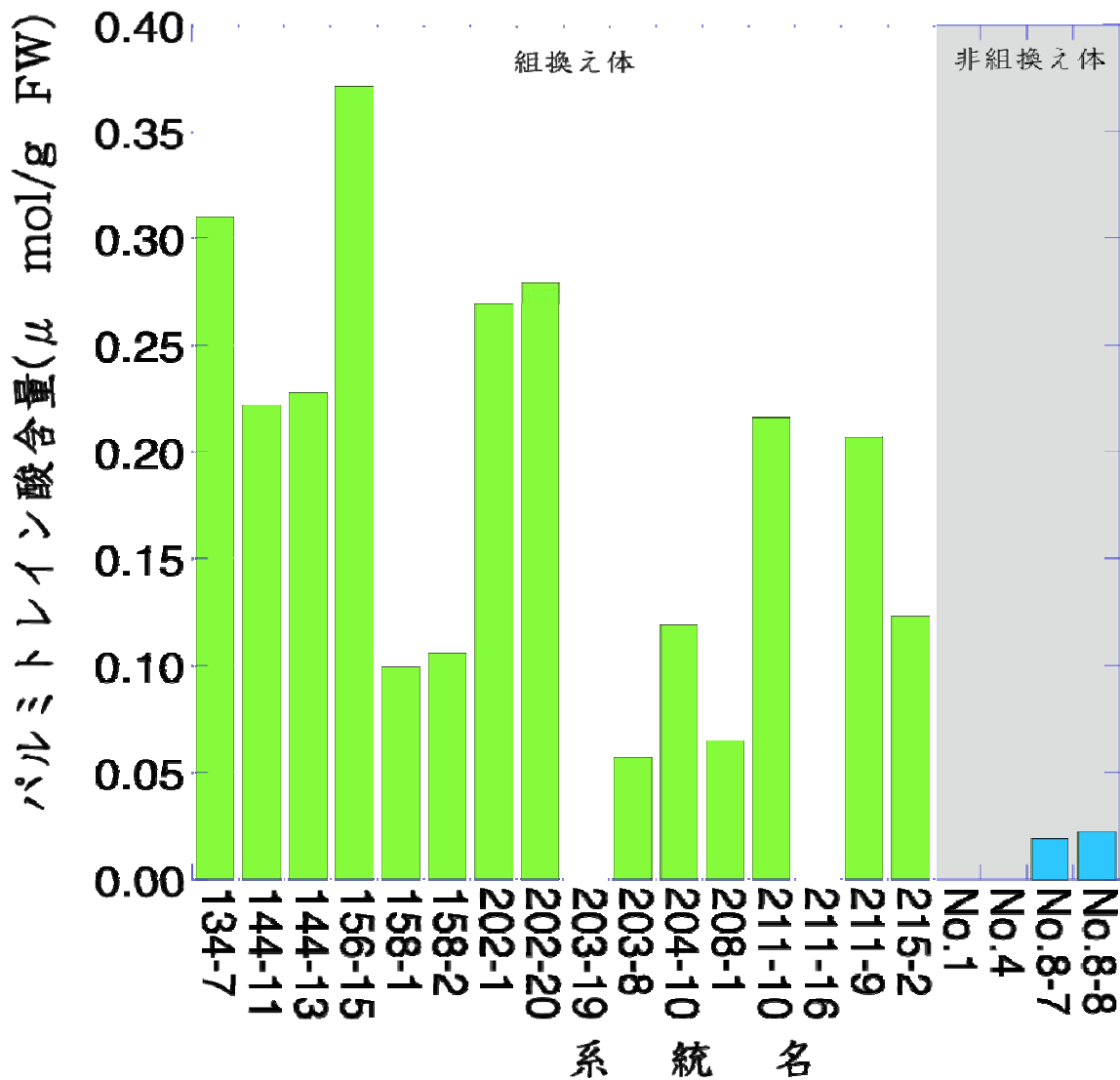
*des9* 遺伝子の発現

閉鎖系栽培室で生育させた若い苗木の組換えユーカリと非組換えユーカリの葉から、全 RNA を抽出しノーザンハイブリダイゼーションを行った。全 RNA 20  $\mu$ g を変性 1.2 %アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルター-Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロットニングした。プローブは、*des9* cDNA 部分配列を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。内部標準として rRNA 像はエチジウムブロマイド染色したもの。図 1 に先行して得られた再分化個体についての結果を示す。一部の系統で発現の認められないものもあるが、多くの系統で導入遺伝子が発現している事が明らかとなった。



無菌培養しているユーカリの葉をサンプリングして秤量した。これらの葉からメタノールおよびクロロホルムにより抽出した脂肪酸(水/メタノール/クロロホルム分画したクロロホルム層)をメチルエステル化し、さらに TMS 化した。内部標準として、monadecanoic acid methylester を用いた。分析にはキャピラリー (DB17-ms) GC(Agilent 6890)-MS (LECO Pegasus) を使用した。脂肪酸と内部標準物質を MS スペクトルおよび検出時間から同定し、各化合物固有のフラグメント m/z でのエリア値を求めて、サンプル重量あたりのモル数として各脂肪酸量を算出した。先行して得られた系統のパルミトレイン酸の含有量を図に示す。

## パルミトレイン酸含量



別紙8 特定網室における遺伝子組換えユーカリの成長性

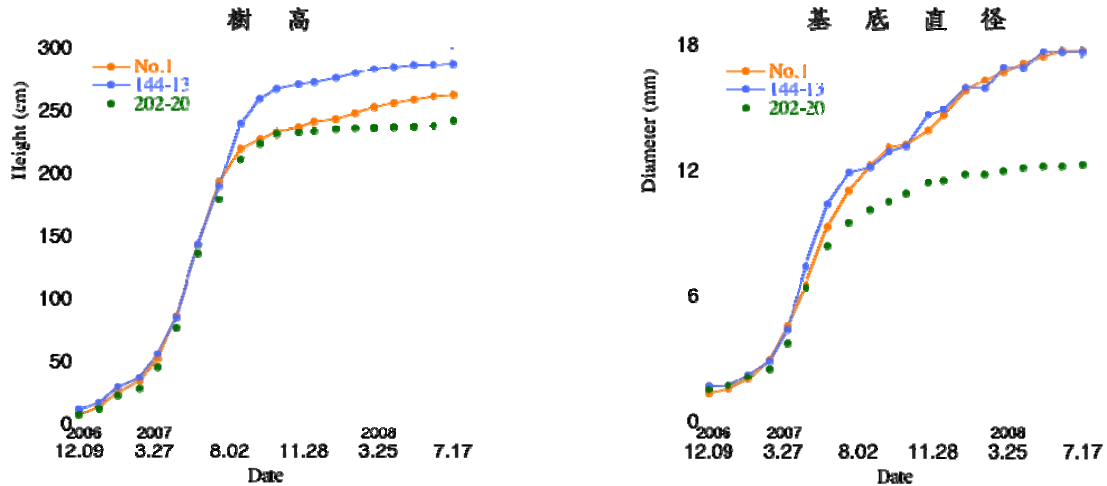


図1 樹高及び基底直径の推移 (2006年12月～2008年7月)  
 特定網室で生育させた組換えユーカリ2系統、144-13 (4個体)、202-20 (13個体)、非組換えユーカリ1系統、No.1 (15個体)を用いて、生育調査を行った。

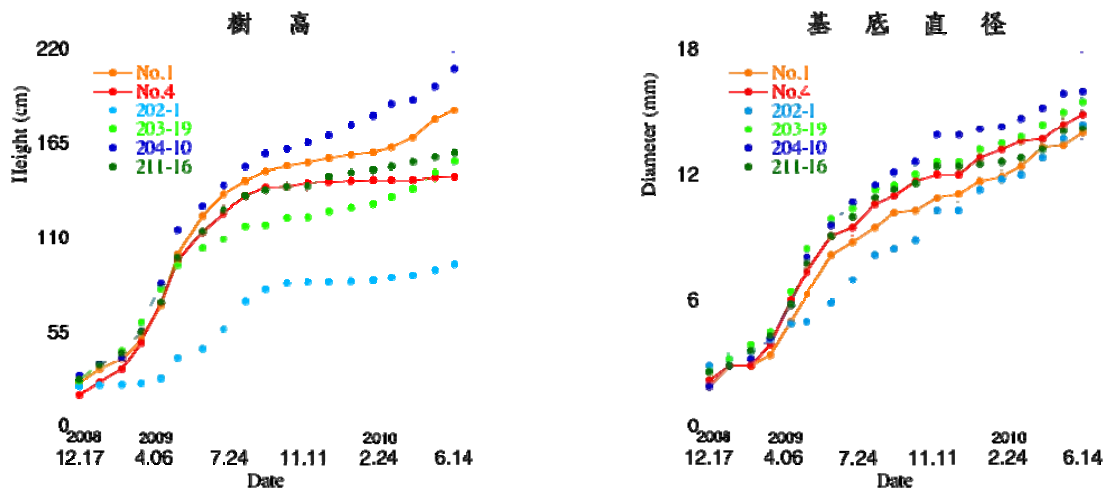


図2 樹高及び基底直径の推移 (2008年12月～2010年2月)  
 特定網室で生育させた組換えユーカリ4系統、202-1、203-19、204-10、211-16 非組換えユーカリ2系統、No.1、No.4の各3個体を用いて、生育調査を行った。

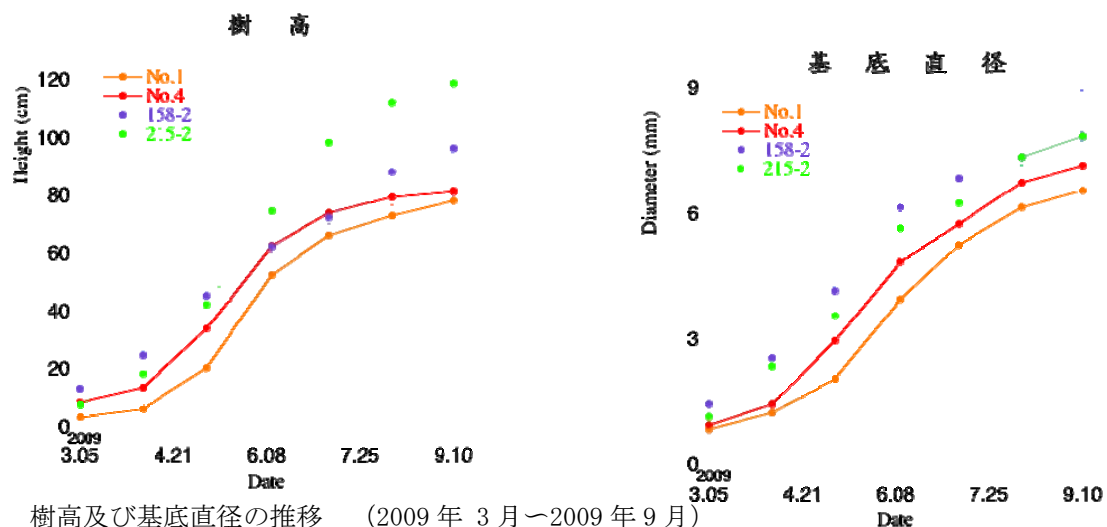


図3 樹高及び基底直径の推移 (2009年3月～2009年9月)  
 特定網室で生育させた組換えユーカリ3系統、158-2、215-2、非組換えユーカリ2系統、No.1、No.4の各5個体を用いて、生育調査を行った。



別紙9 実験ほ場配置

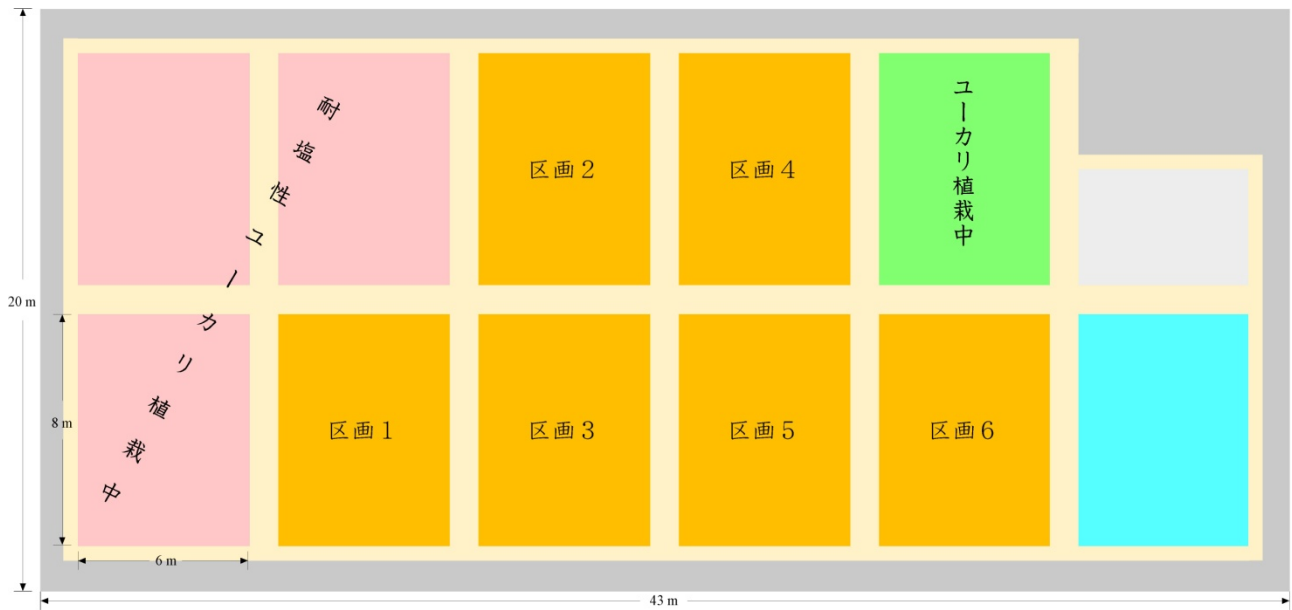
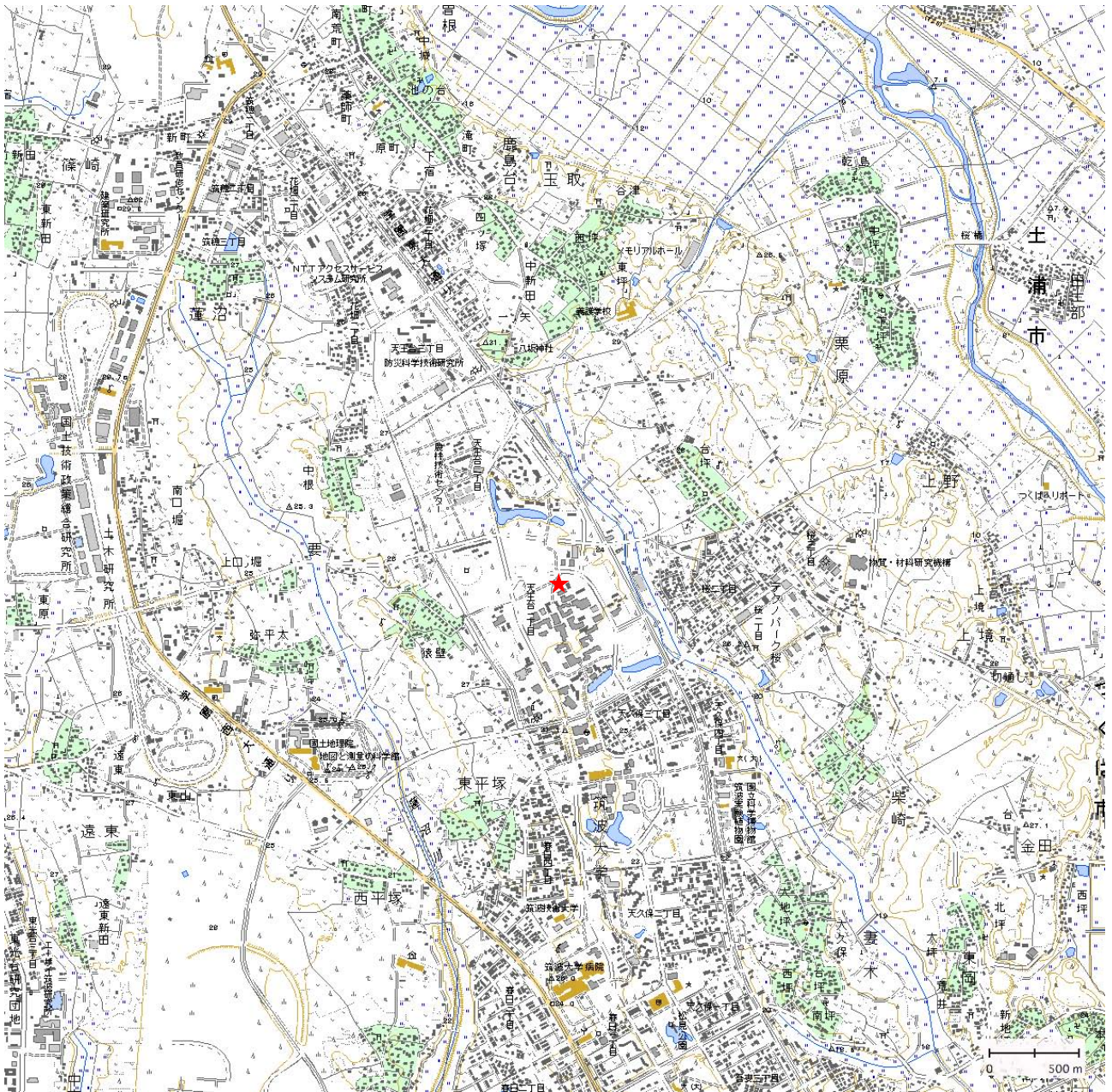
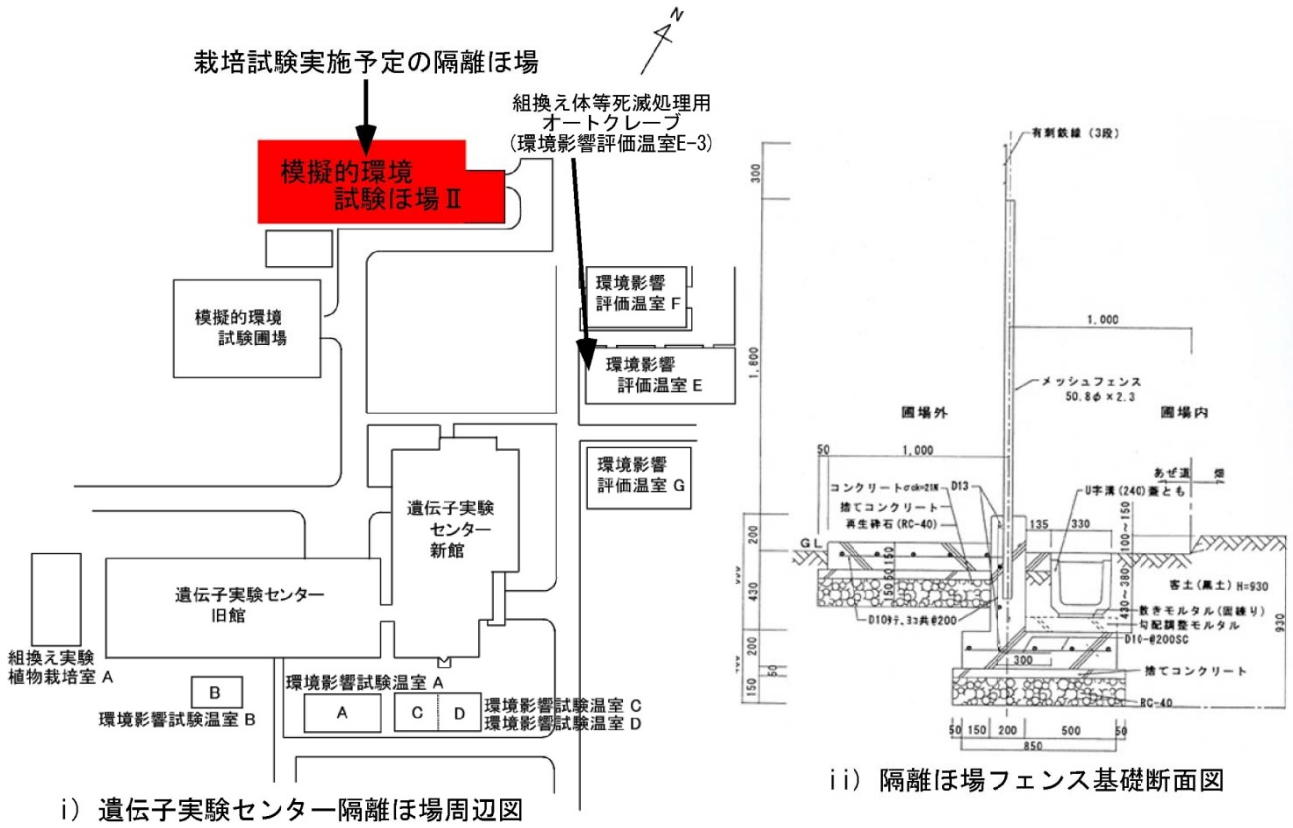


図1. ほ場の全体図と区画の配置  
区画1～6を利用して栽培予定。

別紙 10 筑波大学周辺地形図



国土地理院 <http://watchizu.gsi.go.jp/>より転記。★は植栽試験に用いる隔離ほ場の場所を示す。



iii) 模擬的環境試験ほ場 II (隔離ほ場 II) の全景 (2010年9月9日)