

第一種使用規程承認申請書

平成26年9月5日

文部科学大臣 下村博文 殿
環境大臣 望月義夫 殿

氏名 独立行政法人 森林総合研究所
申請者 理事長 鈴木和夫 印
住所 茨城県つくば市松の里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	雄性不稔スギ(<i>barnase</i> B4, <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don)
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：茨城県日立市十王町伊師3809-1 名称：独立行政法人 森林総合研究所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成30年3月31日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りの防止のために、隔離ほ場を取り囲むように高さ8 mのフェンス(金網40 mm目)を設置している。フェンスの下に地下1 mまでコンクリートの擁壁を設けている。 (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、正面入口の見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗場を設置しているとともに、本遺伝子組換えスギの隔離ほ場

外への漏出を防止するための設備を排水系統等に設置している。

2 隔離ほ場の作業要領

- (1) 適切な除草管理等を行う。
- (2) 本遺伝子組換えスギを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該スギ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、本遺伝子組換えスギの栽培終了後は、当該スギ及び比較対照の非遺伝子組換えスギの地上部及び株元は、焼却すること又は切断後に隔離ほ場内にすき込むことにより不活化する。
- (4) 本遺伝子組換えスギから花粉の飛散の可能性が示唆された場合、当該系統の組換えスギを伐採し、花粉飛散を防止する。また、本遺伝子組換えスギから種子の飛散の可能性が生じた場合、種子飛散を防止するために摘果又は袋掛け等の措置を講じる。
- (5) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えスギが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (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)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。
- (8) 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。

生物多様性影響評価書

雄性不稔スギ

(*barnase* B4, *Cryptomeria japonica* D. Don)

独立行政法人 森林総合研究所

目次

第一	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1.	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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	2
(3)	生理学的及び生態学的特性	3
2.	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
(1)	供与核酸に関する情報	7
(2)	ベクターに関する情報	12
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	13
(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	15
(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	16
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	16
3.	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	18
(1)	使用等の内容	18
(2)	使用等の方法	18
(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	19
(4)	生物多様性影響が生じ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	20
(5)	実験室等での使用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	20
第二	項目ごとの生物多様性影響評価	21
1.	競合における優位性	21
2.	有害物質の産生性	22
3.	交雑性	23

第三 生物多様性影響の総合的評価	26
文献情報	29
緊急措置計画書	33
隔離ほ場試験の計画書	35
別添資料	

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) 分類学上の位置づけ及び自然環境における分布状況

イ. 和名、英名及び学名

宿主の和名はスギ(杉)である。スギ科(Taxodiaceae)スギ属(*Cryptomeria*)に属するとされてきたが(佐竹ら, 1989)、近年の分子系統研究の結果よりスギ科はヒノキ科(Cupressaceae)に統合した方が妥当とされ(Gadek et al, 2000; Kusumi et al, 2000)、現在ではスギは広義のヒノキ科スギ属に属する種となっている。英名は Japanese cedar、学名は *Cryptomeria japonica* D. Don である(浅川ら, 1981)。

ロ. 宿主の品種名又は系統名

メス親をスギ精英樹 郡山2号、オス親をスギ精英樹 箱根4号とした人工交配により形成させた未成熟種子から培養細胞を誘導した。誘導した培養細胞は1個の種子毎に1個の系統として管理し、不定胚形成効率の高い系統の培養細胞 10A-4-22 系統を選抜し、宿主とした(谷口ら, 2012)。

ハ. 国内及び国外の自然環境における自生地域

スギは本州、四国、九州の温帯～暖帯に分散して天然分布しており、かつ、ひとつの集団の領域は狭く、隔離分布する遺存種であるとされる(渡邊, 1994)。分布の北限は青森県西津軽郡矢倉山で、南限は鹿児島県屋久島である。スギの天然分布区域は裏日本系統とされる日本海側のものと表日本系統とされる太平洋側のものとに区分される。日本海側では秋田、山形、新潟、富山、福井、鳥取、島根などの諸県下に分布する。太平洋側では分布域は日本海側に比べると少なく、屋久島、高知県の東部、紀伊半島、静岡県下などに分布する(林, 1960)。いずれも数ヘクタールから数十ヘクタールの狭い限られた森林しか残されていないが、まとまったものとしては、秋田県の米代川流域、鹿児島県の屋久島、高知県の魚梁瀬などが有名である(坂口, 1983; 津村, 2012)。

スギは日本産の樹種中最も利用度の高い有用樹木であるため、人力による植林が盛んに行われてきた。その結果、スギの自生地域とされるもののうち、秋

田、富山、新潟、鳥取、島根、高知などの海拔の高い地域や屋久島には純然たる天然林が残存するが、それ以外は天然林か人工林かの判断に苦しむところが多い（林，1960）。

スギの変種とされるカワイスギ（柳杉）*Cryptomeria japonica* D. Don var. *sinensis* Sieb. は中国中南部に天然分布し、中国では*C. fortunei*の学名が用いられている（浅川ら，1981）。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. 国内及び国外における栽培等の歴史

スギは我が国の最も重要な造林樹種であり、スギの本格的な人工造林は室町時代に始まったとされるが（井出・白石，2012）、寺社等での植林はそれ以前から行われていた（佐藤，1950）。わが国のスギの本格的な育種は1950年代に開始され、人工林あるいは天然生林から成長その他の形質が優れる精英樹が3,632本選抜され（大庭・勝田，1991）、現在は主に精英樹の交配による子供集団より、第二世代の精英樹の選抜が進められている。中国では寺院に樹齢1,000年に近いとも、500年以上ともいわれる巨木が見られ、また、福建省、浙江省、江西省、湖北省で主に造林されている（坂口，1983）。台湾では1896年に日本からスギが導入されたとされ、韓国では1915年頃からスギの植林が試みられたと考えられる（坂口，1983）。また、大西洋のポルトガル領アゾレス諸島では1925年頃よりスギが造林されている（田島，2000）。

ロ. 主たる栽培地域、栽培方法、利用樹齢、流通実態及び用途

スギは、北海道西部から本州、四国、九州にわたって広く植栽されている。2007年の統計によると、スギ人工林の面積は450万ヘクタールであり、我が国の国土面積の12%、森林面積の18%、人工林面積の43%に相当する（林野庁，2012）。また、庭園、公園などに植栽されている。

スギの造林においては苗畑で育苗した2年生の実生苗を植林することが主流であるが、九州ではさし木苗を植栽することが多い。耐陰性はそれほど高くなく（浅川ら，1981）、造林後の5～6年間は植栽木の周辺の競合する雑草木を除去し、十分に光を与えるための下刈り作業が必要である。また、健全に成林させるためには、収穫伐採までの期間、つる切り、除伐、間伐の保育作業が必要である。木材は、加工しやすく、内装材や構造材等として広く利用されている。

スギの伐採時期は地域や用途等により異なるが、50年生程度の場合が多い。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

スギは、常緑高木で高さ30～40m、胸高直径2mほどに達する(坂口, 1983)。平均的な寿命は500年余りといわれているが、屋久島には2000年を超えるとされる巨木が見られる。関東地方のスギ人工林では、主林分の平均樹高は15年生では8.2m、40年生では18.8m、平均直径は40年生で24.9cmとされている(坂口, 1983)。また、茨城県日立市にスギ精英樹の2年生の実生苗及び不定胚より再生させたクローン苗を植栽した例では、樹高の平均値は、植栽1年目で0.8m、2年目で1.4m、3年目で2.4m程度であった(谷口ら, 2009)。スギは雌雄同株であり、単性花をつける。

スギの雌花は新梢の小枝の先端に単生し、ほぼ球形(径5～6mm)で緑色を呈する。雌花の鱗片の基部に3～5個の直立した胚珠をもつ。雌花芽は開花前年の7月中旬から9月下旬に認められる。10月になると珠皮と珠心が分化した胚珠が観察される。この段階で発育は一時休止し、胚嚢母細胞の減数分裂は翌春の開花期になって始まる(橋詰, 1973)。受粉能力のもっとも高い雌花が満開となる開花時期は、2月下旬～3月下旬であり、雌花の珠孔から珠孔液が分泌する。この頃に風媒により花粉が雌花の珠孔液に運ばれ、受粉する(坂口, 1983)。受粉後、雌花は急速に発達し、6月頃の受精の時期にはほぼ球形(径1.5～2cm)の球果となる。開花年の10～11月に種子は成熟し、その後、球果が開裂して、種子が飛散する(浅川ほか, 1981)。

スギの雄花は腋生であり、楕円形(長さ5mm、径2mm程度)で淡黄色を呈す。また、雄花は一般に雌花の着生する枝より下部の小枝の先端に短穂状をなして群生する。雄花芽は開花前年の6月下旬から9月下旬に形成され始める。花粉母細胞は9月下旬～11月上旬(最盛期は10月中旬)に減数分裂を行い、四分子期となる。その後、四分子から小孢子期の未熟な花粉が分離され、10月下旬～12月頃には生殖核と花粉管核をそれぞれ1個持った成熟花粉となる(橋詰, 1973)。翌春、越冬後に花粉嚢が裂けて花粉が飛散する。その最盛期は雌花の満開の時期と同じ2月下旬～3月下旬頃である。なお、茨城県日立市の温室の鉢植え個体では、成熟花粉は12月に入ってから見られた。

スギの雌雄花芽は、環状剥皮、乾燥、過湿などにより着花促進の効果が観察

され、特に、ジベレリンの着花促進効果は当年生の芽生えでも見られることは良く知られている（坂口，1983）。ジベレリンの葉面への散布又は浸漬処理を7月上旬頃に行うと主に雄花の着生が、8月上旬頃に行うと主に雌花の着生が促進される。スギ採種園においては、種子の生産性を高めるために、ジベレリン処理による雄花と雌花の誘導が事業的に行われている。

ロ． 生息又は生育可能な環境の条件

スギは年降水量2000mm以上の降水量の多い湿潤な気候を好んでよく生育する（安田，1985）。日本海側のスギの分布密度の多い自生地の間年降水量は2000mmから2500mm程度、太平洋側では3000mmから4000mm程度である（林，1960）。天然分布の北限の平均最低気温は -8.2°C 、南限の平均最高気温は 31.6°C であり（林，1960）、低温にも高温にも耐えうる樹種といえる。発芽には $16\sim 20^{\circ}\text{C}$ の温度が適しているが、 10°C 以下や 30°C 以上ではほぼ発芽しない。土壌としては、適潤またはやや湿潤な谷筋や緩傾斜の肥沃な土地を好む（浅川ら，1981）。

ハ． 捕食性又は寄生性

捕食性並びに寄生性は認められていない。

ニ． 繁殖又は増殖の様式

① 種子の散布様式、休眠性、寿命、形状、生産開始樹齢、飛散距離

スギの種子は重力と風により散布される。種子には休眠性はない。種子を貯蔵するためには乾燥剤とともに密閉した容器に入れ、冷蔵する方法が一般的であり、数年間は貯蔵が可能であるが、室温に放置すると一夏で発芽力はほとんどなくなる（白澤，1910）。埼玉県内の約40年生のスギ植林地とそれに隣接する広葉樹二次林の埋土種子の調査では、スギ実生は出現しなかったことより（川西ら，2007）、スギ種子は埋土状態で生存する可能性は低いと考えられる。種子の形状は扁平で2枚ときには3枚の翼を持つ。長さは $5\sim 7\text{mm}$ 、翼をあわせて幅 $2\sim 3\text{mm}$ 、厚さ $0.7\sim 1.0\text{mm}$ 、重さ 3mg 前後と比較的小さい種子である（坂口，1983）。スギが種子を生産する結実年齢は、通常は20年以上といわれているが、3～4年生の苗木や10年生程度の幼齢木で結実する例も見られる（上田，1950）。種子の多くは樹高程度の距離内に落下するが（吉田，1991）、屋久島の天然林に設定した200m四方の調査プロットでのSSRマーカーによる調査事例によると、種子

飛散の最大距離は170.7mとされ (Takahashi et al, 2008)、このことは、種子は風により広い範囲に飛散しうることを示唆している。

218 家系の種子を供試した人工環境下での種子の発芽率調査では平均発芽率は27%と報告されている (浅川ら, 1981)。一方、高知県の魚梁瀬での天然更新試験の結果から (吉田, 1991)、スギ林の林床での種子の発芽率は0.6%程度と推測される。また、スギは肥沃で適潤な土壌を好み (林, 1960)、光環境としては相対照度20%程度がスギの更新に適するとされる (吉田, 1991)。従って、自然環境で種子が発芽したとしても、乾燥や光不足などにより枯死し、芽生えが定着できる環境は限定的である (渡邊, 1994)。また、芽生えが定着したとしても耐陰性はあまり強くないので稚樹は競合する植物に被圧され易い (吉田, 1991)。これらのことは、スギの天然下種更新による育林が非常に困難であることの原因と考えられる (坂口, 1983)。実際、本州から九州にかけての各地域のスギ人工林の林床でスギの更新がほとんど見られない (渡邊, 1994)。なお、2500~5000年前頃の後氷期には現在よりもスギが繁栄していたことが花粉分析の結果より示されている (高桑, 2013)。この後氷期の現在よりも冷温で多雨な時代は日本の各地で山地の崩壊と土石流を頻発させ、土壌条件と湿潤な気候がスギの更新条件を整え、生育良好な結果をもたらしたものと推測される (渡邊, 1994)。

② 栄養繁殖の様式 (伏状、萌芽等) 並びに自然条件において植物体を再生する組織又は器官からの出芽特性

スギは一般にさし木による栄養繁殖が容易な樹種であり、主に九州地方で植林用にさし木苗が用いられることもよくある。しかし、さし木苗作製のためには、さし穂の採取時期、さし穂の調製方法やさし付け後の灌水などの管理が適切でなければならない。このことから、自然状態で母樹から分離した枝が発根する可能性は極めて低いと考えられる。一方、伏状更新 (母樹の根元近くの枝が母樹とつながった状態で地表に接触し、そこから発根して独立した個体となること) は、東北から中国地方までの多雪地帯のスギの天然林等で一般に認められる積雪に適応した更新形態とされるが、伏状により成立した稚幼樹を生育させるためには、上木伐採などによる光環境の改善が必要とされる (坂口, 1983)。また、スギの萌芽性は旺盛ではないが、立条更新 (母樹の幹の下部の枝や株に発生した芽条が幹の消失の後に伸びて幹になる更新) を行っているスギが多雪地帯のスギ林に広く見られる。立条更新を利用した台スギ林業が京都の北山地

方で行われていた（坂口，1983）。

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

スギは他殖性であるが自殖も可能であり、採種園における自殖率の最大値は20%との報告例がある(Moriguchi et al, 2005)。自家不和合性に関する報告は見られないが、種子の発芽率低下や成長阻害等の近交弱勢が強く現れることが一般に知られている(古越・大谷, 1985)。スギ属に属する種はスギのみであり、スギは種内でのみ交雑し、他種との交雑の報告はない。アポミクシスは報告されていない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、生産開始樹齢、飛散距離及び寿命

スギは風媒花であり、花粉は球形で直径 36 μ m 前後である。遠心極にパピラと呼ばれる鉤状に曲がった突起物をもつ(日本花粉学会, 1994)。10~20 年生以降に樹齢が進むにつれて雄花の着生量が多くなるとされるが、2~3 年生の実生でも着生することもある(橋詰, 1990)。花粉の飛散距離については、樹高 2~3m の花粉源を置いた調査事例では、花粉の飛散距離は 10m 以内であった(山手, 1975; 菊池・古越, 1976)。花粉源の高さを 5m 程度に高くした場合の最大の飛散距離は 31m であった(半田・古越, 1981)。また、採種園では 10m 以内の距離にある個体より飛散する花粉は約 60%とされるが(大庭・勝田, 1991)、採種園より 5km 離れたスギ林より花粉が飛散することが示唆されている(Moriguchi et al, 2005)。これらのことは、花粉源の量や花粉源の高さにより飛散距離は異なり、花粉源が多くなると、また花粉源の樹高が高くなると飛散距離は長くなりうることを示している。

スギ花粉の採取時の発芽率の平均値は 84.2%、その後屋外環境に置いた場合の 2 週間後の花粉の平均発芽率は 40%程度になり、発芽率がゼロになったのは早い個体で 50 日目、遅い個体では 71 日目、平均 62 日目と報告されている(近藤ら, 2006)。一方、-20 $^{\circ}$ C で乾燥剤とともに密閉してスギ花粉を貯蔵すると 2 年間貯蔵後の花粉の発芽率は 50~60%と報告されている(橋詰, 1984)。

ホ. 病原性

病原性は認められていない。

へ. 有害物質の産生性

約 180 種の植物の落葉・落枝のアレロパシー活性をサンドイッチ法で調査したところ、スギのアレロパシー活性は非常に弱いことが示唆された(藤井, 1994)。このことより、スギの周囲の野生植物の生育を抑制する他感物質の産生性は高くはないと考えられた。

ト. その他の情報

遺伝子組換えスギを用いた隔離ほ場試験が行われた例は国内外ともない。遺伝子組換えにより雄性不稔化した針葉樹の野外試験としては、雄花で RNA 分解酵素を特異的に発現させるようにしたマツ (*Pinus rigida* x *P. taeda*) の米国での実施例があり、4 年間の観察により雄性不稔性と正常な生育が確認されたと報告されている (Zhang et al, 2012)。

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

雄性不稔性スギ (*barnase* B4, *Cryptomeria japonica* D. Don) 作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表 1 に示した。

表 1 形質転換したプラスミドの T-DNA 領域の各構成要素

構成要素	塩基数 (bp)	塩基配列 (GenBank 登録番号)	由来及び機能
発現カセット 1			
<i>nos</i> プロモーター	252	AB489142	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i> 旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)由来、ノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) プロモーター
<i>nptII</i> 遺伝子	795	AB489142	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)由来、カナマイシン耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子

<i>nos</i> ターミ ネーター	256	AB489142	アグロバクテリウム由来、ノパリン合成酵素 遺伝子 (<i>nos</i>) ターミネーター
発現カセット 2			
<i>CjMALE1</i> プ ロモーター	2718	AB753164	スギに由来する <i>CjMALE1</i> 遺伝子のプロモータ ーで、雄花の減数分裂期以降のタペート層と 減数分裂期から四分子期までの将来花粉とな る細胞で機能する (Kurita et al, 2013)。
<i>barnase</i> 遺 伝子	336	X12871	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、RNA 分解酵素 (リボヌクレアーゼ) である <i>barnase</i> タンパク質をコードする遺伝子 (Hartley, 1988)。 <i>CjMALE1</i> プロモーターの支配下で発現 し、雄性不稔形質をスギに付与する。なお、 下記の CAT-1 イントロン配列が挿入されてい る。
<i>CAT-1</i> イン ترون	190	AB489142	Castor bean(<i>Ricinus communis</i>)に由来するカタラ ーゼ遺伝子 <i>CAT-1</i> の第一イントロン配列であ る。 <i>barnase</i> 遺伝子の第一エクソン (179bp) と第 二エクソン (157bp) の間に挿入され、大腸菌やア グロバクテリウム内で <i>barnase</i> タンパク質が発現 することを防ぐ。
<i>nos</i> ターミ ネーター	256	AB489142	アグロバクテリウム由来、ノパリン合成酵素 遺伝子 (<i>nos</i>) ターミネーター
発現カセット 3			
<i>nos</i> プロモ ーター	252	AB489142	アグロバクテリウム由来、ノパリン合成酵素 遺伝子 (<i>nos</i>) プロモーター
<i>barstar</i> 遺 伝子	273	X15545	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボ ヌクレアーゼインヒビターである <i>barstar</i> タ ンパク質をコードする遺伝子。 <i>Barstar</i> タン パク質は <i>barnase</i> タンパク質と特異的に結合 し、 <i>barnase</i> タンパク質の活性を阻害する (Hartley, 1988)。
<i>nos</i> ターミ ネーター	256	AB489142	アグロバクテリウム由来、ノパリン合成酵素

ネーナー			遺伝子 (<i>nos</i>) ターミネーター
その他の構成要素			
右側境界配列 (RB)	25	AB489142	アグロバクテリウムの Ti プラスミド pTiT37 に由来する。T-DNA の右側境界配列である DNA 断片で、アグロバクテリウムから植物ゲノムへ T-DNA 領域 (RB と LB で挟まれた塩基配列) の導入を開始するためのシグナルである。
左側境界配列 (LB)	25	AB489142	アグロバクテリウムの Ti プラスミド pTiA6 に由来する。T-DNA の左側境界配列である DNA 断片で、アグロバクテリウムから植物ゲノムへ T-DNA 領域の導入の終結点シグナルである。

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

本遺伝子組換えスギの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表 1 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タンパク質の機能及び当該タンパク質がアレルギー性（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タンパク質と相同性を有する場合はその旨

nptIIタンパク質

発現カセット 1 の大腸菌由来の *nptII* 遺伝子は、*nptII* タンパク質をコードしている。カナマイシンは、リボソーム上のタンパク質と結合してタンパク質の合成を阻害するアミノグリコシド系抗生物質である。*nptII* タンパク質は、カナマイシンのアミノグリコシドの水酸基にアデノシン 5' -三リン酸 (ATP) の末端リン酸基を転移させることによってカナマイシンを不活性化させる。本遺伝子組換えスギにおいて、*nptII* 遺伝子は *nos* プロモーターの支配下で *nptII* タンパク質を発現し、カナマイシン耐性を付与する。

barnaseタンパク質

発現カセット2の**barnase**遺伝子は、*Bacillus amyloliquefaciens*に由来し、リボヌクレアーゼである**barnase**タンパク質をコードする遺伝子である。また、*CjMALE1*プロモーターは、スギ由来の雄花特異的遺伝子である*CjMALE1*遺伝子のプロモーターである (Kurita et al, 2013)。RT-PCR解析では、*CjMALE1*遺伝子は、分化途中の雄花で発現するが、成熟した雄花、枝葉や根で発現しないことが示された (Kurita et al, 2011)。また、*CjMALE1*プロモーターと*GUS*遺伝子を連結したコンストラクトを導入した遺伝子組換えスギの発現解析により、*CjMALE1*プロモーターは雄花の減数分裂期以降のタペート層と減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で機能し、雄花以外の組織では機能しないことが明らかになっている (Kurita et al, 2013)。なお、タペート層とは、雄花の花粉嚢の最内層にある花粉を取囲む細胞層であり、発達途中の花粉に養分や物質等を供給し、花粉形成には必須の組織である。

*barnase*遺伝子は、*CjMALE1*プロモーターの支配下で雄花の減数分裂期以降のタペート層の細胞や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で**barnase**タンパク質を発現し、これらの細胞でRNAが分解され、その結果、花粉形成が阻害されると考えられる。

barstarタンパク質

発現カセット3の**barstar**遺伝子は、*Bacillus amyloliquefaciens*に由来し、リボヌクレアーゼインヒビターである**barstar**タンパク質をコードする。即ち、**barstar**タンパク質は、**barnase**タンパク質の阻害因子であり、**barnase**タンパク質と1:1で特異的に結合し、**barnase**タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する。

花器官特異的プロモーターの支配下で**barnase**タンパク質をタペート層などで発現させることにより花粉形成が阻害されることがセイヨウナタネやタバコ等の植物で既に報告されている (Mariani et al, 1990)。しかし、花器官特異的プロモーターの支配下で**barnase**タンパク質を発現させた場合、形質転換効率が低下することや組換え体の生育が阻害されることも知られている (Skinner et al, 2000; Länneppää et al, 2005; Wei et al, 2007)。その理由は、**barnase**タンパク質が花器官以外の細胞で異所的に弱く発現するためと考えられる。そこで、**barstar**タンパク質を構成的に発現させることにより、異所的に発現する

barnaseタンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害し、形質転換効率の低下や組換え体の生育阻害を防ぐ方法が報告されている (Beals and Goldberg, 1997; Wei et al, 2007; Gardner et al, 2009)。

本遺伝子組換えスギにおいては、*CjMALE1*プロモーターの支配下でbarnaseタンパク質が雄花の減数分裂期以降のタペート層や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で強く発現していると考えられるが、それ以外の細胞でもbarnaseタンパク質が僅かに異所的に発現している可能性がある。そこで、barnaseタンパク質の異所的発現による形質転換効率の低下や組換えスギの生育不全を無くすため、*nos*プロモーターの支配下でbarstarタンパク質を構成発現させる発現カセット3をスギに導入している。

なお、*nptII* タンパク質、barnase タンパク質及び barstar タンパク質の各アミノ酸配列について、データベース (AllergenOnline バージョン 13: 2012 年 2 月 12 日公開) に登録されているアミノ酸との比較を行った結果、いずれについても既知の毒素又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

③ 宿主の代謝系を変化させる場合はその内容

nptII 遺伝子に関しては多数の使用例があり、宿主にカナマイシン耐性を付与すること以外に宿主に何らかの影響を与えることはこれまで報告されていない。

barnase タンパク質はスギの *CjMALE1* プロモーターの支配下で発現し、その結果、雄花の減数分裂期以降のタペート層や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞でリボヌクレアーゼが機能して花粉形成が阻害される。雄花以外の組織で barnase タンパク質が微量に発現して宿主の RNA が分解される場合には代謝系の変化が想定される。

barstar タンパク質は *nos* プロモーター支配下にあり、植物体で構成的に発現していると考えられる。barstar タンパク質は barnase タンパク質と 1:1 で特異的に結合し、barnase タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する。しかし、植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用は報告されていない。従って、barstar タンパク質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

本遺伝子組換えスギにおいては barstar タンパク質が構成的に発現しているため、雄花以外の組織で barnase タンパク質が微量に発現する場合には、barstar タンパク質により barnase タンパク質の活性は阻害されるので、barnase タンパ

ク質は、花粉形成を阻害することにより雄性不稔性を付与すること以外に宿主の代謝系を変化させる可能性は低いと考えられる。

なお、セイヨウナタネ (*Brassica napus*) に *barnase* 遺伝子を導入した MS8 及びセイヨウナタネ (*Brassica napus*) に *barstar* 遺伝子を導入した RF3 は、F₁ 種子の採種のために北米で使用され、我が国においても第一種使用規程承認と食品及び飼料としての安全性確認を得ている。

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

本遺伝子組換えスギ作出に用いたバイナリーベクターは、pBI-CjMALE1::*barnase*-NOS::*barstar* である (図1)。本ベクターは、バイナリーベクターpBIN19 (Bevan, 1984) を原形として作られた pIG121-Hm (Ohta et al, 1990) に由来し、その T-DNA 領域 (RB と LB に挟まれた植物に伝達される領域) 内の一部分である P35S::*GUS* 領域を P-CjMALE1::*barnase* に、また、P35S::*HPT* 領域を P-nos::*barstar* に置き換えたものである。

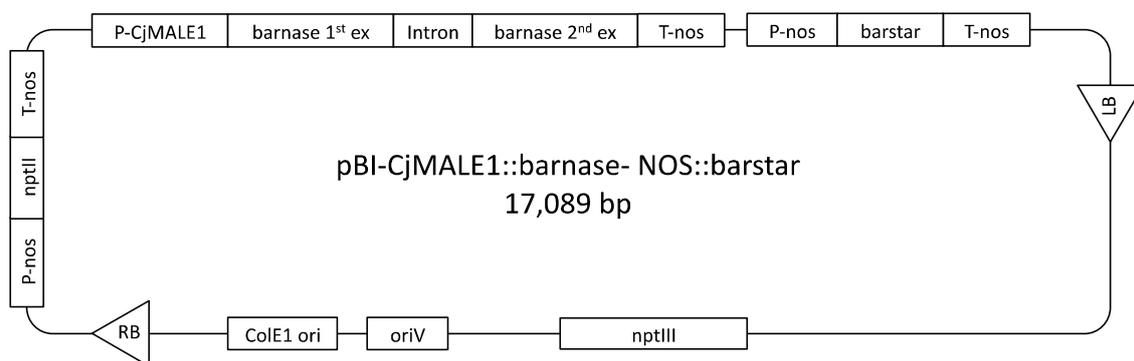


図1. 本遺伝子組換えスギ作出に用いた形質転換用プラスミド (バイナリーベクター) の構造

P-nos: *nos*プロモーター、nptII, nptIII^(注1): カナマイシン耐性遺伝子、T-nos: *nos*ターミネーター、P-CjMALE1: *CjMALE1*プロモーター、*barnase* 1st ex: *barnase* 遺伝子の第一エクソン、intron: *CAT-1*遺伝子の第一イントロン、*barnase* 2nd ex: *barnase* 遺伝子の第二エクソン、*barstar*: *barstar*遺伝子、ColE1 ori^(注2): 大腸菌での複製開始点、oriV^(注3): アグロバクテリウムでの複製開始点

(注1) nptIII: *Streptococcus faecalis*由来の野生型ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼIII遺伝子。大腸菌およびアグロバクテリウムにおけるカナマイシン耐性を付与する。

(注2) ColE1 ori:大腸菌由来ColE1型プラスミドの複製開始点。大腸菌内で複製開始領域として働く。

(注3) oriV: 大腸菌由来広宿主プラスミドRK2の複製開始点。アグロバクテリウム内で複製開始領域として働く。

ロ. 特性

①ベクターの塩基数及び塩基配列

バイナリーベクター pBI-CjMALE1::barnase-NOS::barstar の塩基数は17,089bpである(図1)。塩基配列については表1にGenBank登録番号を明記することにより代替した。

②特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

表1にバイナリーベクター pBI-CjMALE1::barnase-NOS::barstar の各構成要素の機能を列記した。また、右側境界配列(RB)と左側境界配列(LB)に挟まれた領域のDNAである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。

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に関する情報 本ベクターの感染性は知られていない。

(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

バイナリーベクターの構成要素は表1に示した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は図1に示した。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法により導入した(Konagaya et al, 2013)。

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

スギの培養細胞にバイナリーベクターを保持させたアグロバクテリウムを感染させた。2日間共存培養した後、除菌のための抗生物質であるメロペネムを

10mg/L の濃度で添加した培地で培養した。1～3週間培養後、細胞の増殖が見られる頃にメロペネム及び、選抜のための抗生物質であるカナマイシンを50mg/L の濃度で添加した培地に移植した。その後、2週間毎に同組成の新鮮培地に移植しながら核酸が移入された細胞を選抜した。メロペネムとカナマイシン含有の培地で増殖する細胞を不定胚誘導培地に移植して不定胚を誘導した。次に不定胚を発芽培地に移植し、発芽させて遺伝子組換えスギの植物体を得た。

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

本遺伝子組換えスギのシュートを滅菌蒸留水中ですり潰した液をアグロバクテリウム培養培地に塗布したところ、菌体の増殖は全く見られなかった。よって、アグロバクテリウムの菌体は残存していないと判断した（別紙1）。

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、隔離ほ場試験に供する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及び系統樹

平成23年5月に形質転換を行い、メロペネムとカナマイシン含有の培地で増殖する細胞より形質転換された系統をPCR(別紙2)により選抜した。その後、不定胚を誘導・発芽させて4系統(B4#1、B4#3、B4#5、B4#8)の植物体を作製した。閉鎖系温室で順化した植物体を平成24年5月より特定網室で栽培し、平成24年7月に雄花誘導のためにジベレリン水溶液を枝葉に散布した。平成24年10月～平成25年3月にかけて誘導された雄花の花粉の発達の様子を観察し、4系統全ての組換えスギでは花粉が形成されないことを確認した。平成25年度の花粉形成能の調査でも組換えスギでは花粉が形成されないことを確認した。

平成24年に培養瓶で成育中のB4#1、B4#3、B4#8の植物体よりシュートを採取し、培養瓶内でさし木を行った。2～3ヶ月後に発根した植物体からシュートを採取し、再度、培養瓶内にさし木を行った。この培養瓶内でのさし木を25年度末まで繰り返し、26年4月に発根した植物体を順化した。

前記のイ～ハの方法により作製した3系統、最大81個体程度を隔離ほ場に植栽する予定である。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) は、栽培予定の 3 系統から得た情報である。

(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. 移入された核酸の複製物が存在する場所

サザンハイブリダイゼーションにより、移入された核酸の複製物は染色体上に存在することが推定された (別紙 2 の図 1)。

ロ. 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

項目イ. に示したサザンハイブリダイゼーションにより、移入された核酸のゲノム上での複製物のコピー数は B4#1 と B4#3 では 1、B4#8 では 2 と推定された (別紙 2 の図 1)。また、移入された核酸は 5 回の培養瓶内でのさし木による栄養繁殖を経た複数の個体においても安定的に保持されていることが PCR により示された。

ハ. 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

本組換え体は栄養繁殖によってのみ増殖させているため、交雑後代は得られていない。従って、染色体上に複数コピーが存在している場合に移入された核酸が隣接しているか離れているかの確認は行っていない。

ニ. (6) のイ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

不定胚の発芽後、1.5 年及び 2.5 年の苗木に特定網室でジベレリン処理し、雄花を誘導した。また、培養瓶内で 3 回さし木増殖し、特定網室で生育させた 1 年目の苗木にもジベレリンにより雄花を誘導した。これらの遺伝子組換えスギにおいて雄性不稔であることを確認した。なお、スギの若齢の苗木にジベレリンを処理すると主軸の伸長成長が促されることは一般的に知られているが、それ以外の変化は伴わず、ジベレリン処理による雄性不稔性の評価は自然状態での評価と同等と見なしてよい。

ホ. ウイルス等を核酸の移入に利用する場合、野生動植物に対する伝達性

該当しない。

(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

本遺伝子組換えスギ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て PCR を行うことで、導入遺伝子の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 100ng 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（別紙 2 の図 2）。また、サザン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 10 μ g のゲノム DNA を用いれば検出可能である。プローブは、*barnase* の cDNA の配列を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した（別紙 2 の図 1）。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. 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の具体的な内容

本遺伝子組換えスギにおいては、*CjMALE1* プロモーターの支配下で雄花の減数分裂期以降のタペート層や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で *barnase* タンパク質を強く発現し、また、その結果、遺伝子組換えスギには花粉が全く形成しない雄性不稔形質が付与されたと考えられる（別紙 3）。

ロ. 遺伝子組換え林木と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

① 形態及び生育の特性

特定網室で 2 年間の成長速度を比較した結果、遺伝子組換えスギと宿主の非遺伝子組換えスギでは明確な差は見られなかった（別紙 4）。また、枝葉等その他の形態にも差異は見られなかった。

② 生育初期における低温または高温耐性

遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギを栽培した特定網室の最低気温は -4.2°C 、最高気温は 39.5°C であった。この温度範囲内では遺伝子組換えスギは非遺伝子組換えスギと同じように生育したことより、低温と高温に対する耐性には差がないと判断された。

③ 花粉の稔性及びサイズ、寿命及び生産開始樹齢

スギの雄花は10～20年生以降に樹齢が進むにつれて着花量が多くなるとされるが、2～3年生の実生でも着生することもある。また、スギはジベレリン処理により容易に雄花が着生することが知られている（坂口，1983）。特定網室での栽培実験でも、発芽後約1.5年及び2.5年の遺伝子組換えスギ及び非遺伝子組換えスギにジベレリン処理を行ったところ遺伝子組換えスギ、非遺伝子組換えスギともに雄花が着生した。遺伝子組換えスギの雄花を調査したところ、花粉が全く形成されていなかった。一方、非遺伝子組換えスギでは雄花には花粉が形成され、発芽試験を行ったところ花粉管が伸長したので花粉の稔性があると判断した。

④ 種子の生産量、休眠性、発芽率及び生産開始樹齢

スギの結実年齢は、通常は20年以上といわれているが、3～4年生の苗木や10年生程度の幼齢木で結実する例も見られる（上田，1950）。特定網室での2年間の栽培実験では、遺伝子組換えスギ、非遺伝子組換えスギともに種子が得られなかったので本項目については調査していない。なお、隔離ほ場での栽培期間中に種子が形成した場合には、種子飛散前に球果に袋掛けを行い、種子の生産量、休眠性、発芽率に関する調査を行う予定である。

本申請は限定された隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行い、雌花が形成した場合には、前記の袋掛けを行う球果以外は種子飛散前に球果を摘果するなどして種子飛散を防止するので、本項目のデータがなくても生物多様性への影響評価は可能であると考えられる。

⑤ 交雑率

スギは種内でのみ交雑可能である。スギは日本産の樹種の中で最も利用度の高い樹木であり、人為による伐採や植栽が盛んに行われた。その結果、スギ天然林は、現在は山奥に小面積しか残っておらず（津村，2006）、人為の影響のないスギ天然林は、秋田、富山、新潟、鳥取、島根、高知などの高海拔地域や屋久島などの限られた地域のみに残存するとされている（林，1960）。これらのことより、隔離ほ場周辺にはスギの天然林は存在しないと考えられる。一方、別紙5に示すように隔離ほ場周辺には、森林総合研究所の敷地内及び敷地の近隣

地にスギの植栽木が多数存在する。また、植栽木の交雑に由来するスギも自生していると考えられる。なお、近隣地のスギは、主には里山人工林、二次林、屋敷林、防風林、神社林、緑化木である。また、約2km西に位置する常磐自動車道の以西の阿武隈山系の南端である山地部にはスギの造林地が広がる。

遺伝子組換えスギは花粉を形成しないために遺伝子組換えスギが花粉親となる交雑はないと考えられる。一方、遺伝子組換えスギが種子親となり、交雑する能力は非遺伝子組換えスギと同等と考えられるが、隔離ほ場で雌花が着生した場合、種子飛散を防止しながら交雑率に関する調査を行う予定である。

これらのことより、隔離ほ場において外部環境への拡散を防止しつつ栽培を行う本申請において、交雑率に関するデータがなくても生物多様性への影響評価は可能であると考えられる。

⑥ 有害物質の産生性

本遺伝子組換えスギと非組換えスギの有害物質の産生性について、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、また、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについてはサンドイッチ法による試験を検定植物としてレタスを用いて行った。さらに、根から分泌され土壤微生物相に影響を与えるものについては希釈平板法による試験を行った。いずれの試験の結果においても、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの間に有意差は検出されなかった（別紙6）。また、宿主であるスギが産生するその他の有害物質については知られていない。

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:茨城県日立市十王町伊師3809-1

名称:独立行政法人 森林総合研究所 隔離ほ場

使用期間:承認日から平成30年3月31日まで

イ 隔離ほ場の施設

- ① 部外者の立入りの防止のために、隔離ほ場を取り囲むように高さ 8 m のフェンス（金網 40 mm 目）を設置している。フェンスの下に地下 1 m までコンクリートの擁壁を設けている。
- 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、正面入口の見やすい所に掲げている。
- ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗場を設置しているとともに、本遺伝子組換えスギの隔離ほ場外への漏出を防止するための設備を排水系統等に設置している。

ロ 隔離ほ場の作業要領

- ① 適切な除草管理等を行う。
- ② 本遺伝子組換えスギを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該スギ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、本遺伝子組換えスギの栽培終了後は、当該スギ及び比較対照の非遺伝子組換えスギの地上部及び株元は、焼却すること又は切断後に隔離ほ場内にすき込むことにより不活化する。
- ④ 本遺伝子組換えスギから花粉飛散の可能性が示唆された場合、当該系統の組換えスギを伐採し、花粉飛散を防止する。また、本遺伝子組換えスギから種子の飛散の可能性が生じた場合、種子飛散を防止するために摘果又は袋掛け等の措置を講じる。
- ⑤ 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えスギが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 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。
- ⑧ 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。

(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

隔離ほ場での栽培期間中、観察等を通して情報収集を行う。

(4) 生物多様性影響が生じ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

緊急措置計画書を参照

(5) 実験室等での使用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

2 の(6)の宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違の項において記載した情報以外に生物多様性影響の評価の際に参考とすべき情報は特になし。

(6) 国外における使用等に関する情報

なし

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等の特定

スギは肥沃で湿潤な土壌を好む（林，1960）。自然環境でのスギの種子の発芽率は低い（吉田，1991）。発芽したとしても、芽生えが定着できる環境は限定的であり（渡邊，1994）、適度な光環境がスギの更新に必要とされ（吉田，1991）、乾燥や日照不足により芽生えは枯死することが多い。芽生えが定着したとしても耐陰性はあまり強くないので稚樹は競合する植物に被圧され易い（吉田，1991）。スギ人工林では、植栽後の5～6年間は植栽木の周辺の競合する雑草木を除去し、十分に光を与えるための下刈り作業が必要である。また、本州から九州にかけての各地域のスギ人工林の林床でスギの更新がほとんど見られない（渡邊，1994）。これらのことより、スギが他の植物と比較して高い競合上の優位性を持つとは考えにくい。

本遺伝子組換えスギでは、*CjMALE1* プロモーターの支配下で barnase タンパク質が発現して雄性不稔形質が付与されているが、雄性不稔形質は競合において優位に作用する形質ではない。また、barstar タンパク質は barnase タンパク質と特異的に結合し、barnase タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する。しかし、barnase タンパク質以外の植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用は報告されておらず、barstar タンパク質が宿主の代謝系を変化させ、競合における優位性を高めることはないと考えられる。さらに、本遺伝子組換えスギは抗生物質カナマイシン耐性遺伝子を有しているが、ここで付与された抗生物質耐性はこれまでに多数の使用例があり、自然環境下で競合の優位性に作用したという報告はされていない。また、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの生育の特性には有意な差は認められず、形態的にも相違は認められなかった。

以上から、雄性不稔形質が付与された本遺伝子組換えスギが非組換えスギに比べ、競合による優位性が高まるとは考え難い。また、本申請においては、隔離ほ場での栽培に限定され、管理された栽培が行われることから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

競合におけ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が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

競合におけ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が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合、競合における優位性について影響を受ける野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

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

スギが日本の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しているという報告はされていない。また、約 180 種の植物の落葉・落枝のアレロパシー活性を調査した結果より（藤井, 1994）、スギの周囲の野生植物の生育を抑制する他感物質の産生性は高くはないと考えられた。

また、本遺伝子組換えスギに導入した遺伝子の産物である barnase タンパク質、barstar タンパク質及び nptII タンパク質のアミノ酸配列について、既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、いずれにおいても相同性は認められなかった。

barnase タンパク質はリボヌクレアーゼ活性を有し、RNA を分解するがそれ以外の基質に対する活性を持つという報告は無い。本遺伝子組換えスギでは、*CjMALE1* プロモーターの支配下で barnase タンパク質が雄花の減数分裂期以降のタペート細胞や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で発現し、これらの細胞で RNA が分解されることにより雄性不稔形質が付与されるが、宿主の代謝系が変化して有害物質が産生されるとは考え難い。また、雄花以外で僅かに barnase タンパク質が発現した場合においても、*nos* プロモーターの支配下で発現する barstar タンパク質が barnase タンパク質の活性を阻害するので、宿主の代謝系が変化し、有害物質が産生されることはないと考えられた。

barstar タンパク質は、barnase タンパク質と特異的に 1:1 で結合し、barnase タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害するが、植物のリボヌクレアーゼを阻害することは知られていない。従って、barstar タンパク質の発現により宿主

の代謝系が変化し、有害物質が産生されることはないと考えられた。

また、選抜マーカーである nptII タンパク質に関しては多数の使用例があり、生物多様性に関して何らかの影響があることはこれまで報告されていない。

さらに、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの有害物質の産生性について、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、また、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについてはサンドイッチ法による試験を、検定植物としてレタスを用いて行った。根から分泌され土壤微生物相に影響を与えるものについては希釈平板法による試験を行った。いずれの試験の結果においても、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの間に有意差は検出されなかった（別紙6）。

以上から、雄性不稔形質が付与された本遺伝子組換えスギが非組換えスギに比べ、有害物質の産生性が高まるとは考え難い。また、本申請においては、隔離ほ場での栽培に限定され、管理された栽培が行われることから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の具体的内容の評価は実施していない。

(3) 影響の生じやすさの評価

有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、影響の生じやすさの評価は実施していない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合に、有害物質の産生性に起因する影響を受ける野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

3. 交雑性

本遺伝子組換えスギは雄性不稔形質を有し、特定網室での2カ年にわたる栽培試験により花粉は全く形成されないことが確認されている。このことより、隔離ほ場で本遺伝子組換えスギを栽培した場合も雄性不稔となり、花粉を飛散

しないと考えられる。なお、花粉飛散時期前に雄花断面を観察することにより雄性不稔であることを確認するとともに、花粉を形成することが示唆される場合においては、その系統の組換えスギを伐採して不活化し、交雑を防止する措置を講じる。これらのことより、本遺伝子組換えスギが花粉親となる交雑はないと判断した。しかし、本遺伝子組換えスギが周辺から花粉を受け、種子を形成する可能性が考えられる。そこで本遺伝子組換えスギが種子親となる交雑性について評価した。

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

スギは本州、四国、九州の温帯～暖帯に分散して天然分布しており、分布の北限は青森県西津軽郡矢倉山で、南限は鹿児島県屋久島である。スギは日本産の樹種の中で最も利用度の高い樹木であり、人為による伐採や植栽が盛んに行われてきた。その結果、スギ天然林は、現在は山奥に小面積しか残っておらず（津村, 2006）、人為の影響のないスギ天然林は、秋田、富山、新潟、鳥取、島根、高知などの高海拔地域や屋久島などの限られた地域のみに残存しているとされている（林, 1960）。これらのことより、隔離ほ場周辺にはスギの天然林は存在しないと考えられる。

本申請で使用する隔離ほ場は海岸線から約 2km の海岸台地に位置する。隔離ほ場の周囲 2 km 圏内は海岸台地と沖積平野であり、多数のスギが植栽されている（別紙 5）。また、2km 以西の山岳部にはスギの人工林が広がっている。また、植栽されたスギの交雑に由来するスギも存在すると考えられるが、スギが自然状態で更新できる立地はごく限られたところではない（渡邊, 1994）ことより、植栽されたスギの交雑に由来するスギの数は少ないと考えられる。

スギは一属一種であり、種内でのみ交雑が可能である。前述のとおり、隔離ほ場周辺にはスギの天然林は存在しないと考えられるが、植栽されたスギとそれに由来するスギは存在する。本遺伝子組換えスギが種子親としての交雑性において影響を受ける可能性のある植物として、植栽されたスギとそれらの交雑に由来する更新したスギが挙げられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換えスギに雌花が形成された場合には、周辺から花粉を受けて交雑して種子が形成され、移入された核酸をもつ雄性不稔の個体が自然状態で更

新する可能性がある。

(3) 影響の生じやすさの評価

スギの雌花芽は7月中旬から9月下旬に認められる。雌花は新梢の小枝の先端に単生し、10月には、ほぼ球形（径5～6mm）で緑色を呈する。雌花形成開始の翌年の2月下旬～3月下旬に開花して受粉し、その後、雌花は急速に発達し、6月頃の受精の時期にはほぼ球形（径1.5～2cm）の球果となる。同じ年の10～11月には種子は成熟し、その後、球果が開裂して、種子が飛散する（浅川ほか、1981）。種子の自然状態の発芽率は低く、天然更新試験の結果から林床での発芽率は0.6%程度と推定される。また、発芽したとしてもスギが自然状態で更新できる立地は限定される（渡邊、1994）。更に、稚樹は競合する植物に被圧され易い（吉田、1991）。

一方、スギの結実年齢は、通常は20年以上といわれている。しかし、3～4年生の苗木や10年生程度の幼齢木で結実する例も見られる（上田、1950）ことより、1年生の個体を3年間栽培する計画である隔離ほ場での栽培試験中に本遺伝子組換えスギに雌花が形成され、結実することも考えられる。雌花が形成した場合には、隔離ほ場での作業要領に従い、種子が飛散する前までには球果の摘果や袋掛け等の措置を講じる。このように、本申請では限定された隔離ほ場において第一種使用規程に従い、本遺伝子組換えスギより種子が飛散するのを防止するので、交雑性について、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合に、交雑性について、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

スギの自然環境での種子の発芽率は低く、発芽したとしても乾燥や日照不足により芽生えは枯死することが多い。また、稚樹は競合する植物に被圧され易い（吉田，1991）。これらのことより、スギが他の植物と比較して高い競合上の優位性を持つとは考えにくい。本遺伝子組換えスギでは、*CjMALE1* プロモーターの支配下で barnase タンパク質が発現して雄性不稔形質が付与されているが、雄性不稔形質は競合において優位に作用する形質ではない。また、barstar タンパク質は、barnase タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を特異的に阻害するが、植物のリボヌクレアーゼに対する阻害作用は報告されておらず、barstar タンパク質が宿主の代謝系を変化させ、競合における優位性を高めることはないと考えられる。さらに、本遺伝子組換えスギは抗生物質カナマイシン耐性遺伝子を有しているが、自然環境下で競合の優位性に作用したという報告はされていない。これらのことより、隔離ほ場での栽培に限定され、管理された栽培が行われる本申請においては、競合における優位性において本遺伝子組換えスギより影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。したがって、本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合に、競合における優位性において生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

スギが日本の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しているという報告はされていない。本遺伝子組換えスギに導入した遺伝子の産物である barnase タンパク質、barstar タンパク質及び nptII タンパク質のアミノ酸配列について、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。本遺伝子組換えスギでは、*CjMALE1* プロモーターの支配下で barnase タンパク質が雄花の減数分裂期以降のタペート細胞や減数分裂期から四分子期までの将来花粉となる細胞で発現し、これらの細胞で RNA が分解されることにより雄性不稔形質が付与される。また、雄花以外で僅かに barnase タンパク質が発現した場合においては、*nos* プロモーターの支配下で発現する barstar タンパク質が barnase タンパク質の活性を阻害すると考えられる。これらのことより、barnase タンパク質の発現により宿主の代謝系が変化し、有害物質が産生されることはないと考えられた。barstar タンパク質は、barnase タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を特異的に阻害するが、植物のリボヌクレアーゼを阻害することは知られていないので、barstar タンパク質の発現により宿主

の代謝系が変化し、有害物質が産生されることはないと考えられた。また、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの有害物質の産生性について、後作試験、サンドイッチ法及び希釈平板法による試験を行った。いずれの試験の結果においても、本遺伝子組換えスギと非組換えスギの間に有意差は検出されなかった（別紙6）。したがって、本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合に、有害物質の産生性について、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

本遺伝子組換えスギは雄性不稔形質を有し、特定網室での2カ年にわたる栽培試験により花粉は全く形成されないことが確認されている。このことより、隔離ほ場で本遺伝子組換えスギを栽培した場合も雄性不稔となり、花粉を飛散しないと考えられる。なお、花粉飛散時期前に雄花断面を観察することにより雄性不稔であることを確認するとともに、花粉が形成することが示唆される場合には、その系統の組換えスギを伐採し、花粉飛散を防止する。このことより、本遺伝子組換えスギが花粉親となる交雑はないと判断した。しかし、本遺伝子組換えスギが種子を形成する可能性が考えられるので本遺伝子組換えスギが種子親となる場合の交雑性における生物多様性影響を評価した。

スギは本州、四国、九州の温帯～暖帯に分散して、主に狭い領域の集団として天然分布している（渡邊, 1994）。また、スギは最も利用度の高い樹木であり、隔離ほ場周辺にも多数のスギが植栽されている。一方、自然状態でのスギの更新は困難であるので、植栽されたスギの交雑に由来するスギは少数であると考えられる。本遺伝子組換えスギに雌花が形成された場合には、周辺から花粉を受けて交雑して種子が形成され、移入された核酸をもつ雄性不稔の個体が自然状態で更新する可能性がある。スギの雌花芽は、ほぼ球形（径 5～6 mm）で、7月中旬から9月下旬に認められる。翌年の2月下旬～3月下旬に開花し、その後、雌花は急速に発達し、6月頃の受精の時期にはほぼ球形（径 1.5～2cm）の球果となる。10～11月には種子は成熟し、その後、球果が開裂して、種子が飛散する（浅川ほか, 1981）。スギの結実年齢は、通常は20年以上といわれているが、隔離ほ場で栽培する幼齢木にも雌花が形成し、結実することも考えられる。雌花が形成した場合には、隔離ほ場での作業要領に従い、種子が飛散する前に球果の摘果等の措置を講じる。このため、本遺伝子組換えスギを第一種使用規程に従って使用等した場合に本遺伝子組換えスギより種子が飛散すること

を防止するので、交雑性について、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

以上を総合的に評価し、本遺伝子組換えスギは、限定された環境下で一定の作業要項を備えた隔離ほ場における栽培・管理・運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為により、第一種使用規程に従って使用等を行った場合に、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

文献情報

- 浅川澄彦・勝田 柁・横山敏孝・小林義雄(1981) スギ属. 90-101. 日本の樹木種子
針葉樹編. 浅川澄彦・勝田 柁・横山敏孝編, 150pp, 林木育種協会, 東京
- Beals TP, Goldberg RB (1997) A novel cell ablation strategy blocks tobacco
anther dehiscence. *Plant Cell* 9:1527-45
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation.
Nucleic Acids Res 12:8711-8721
- 古越隆信・大谷賢二(1985)スギ、ヒノキ、アカマツにおける近交弱性の現れ方.
日林論 96:273-276
- 藤井義晴(1994)アレロパシー検定法の確立とムクナに含まれる作用物質 L-DOPA
の機能. *農環研報* 10:115-218
- Gadek PA, Alpers DL, Heslewood MM, Quinn CJ (2000) Relationships within
Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular
approach. *Am. J. Bot.* 87: 1044-1057
- Gardner N, Felsheim R, Smith AG (2009) Production of male-and
female-sterile plants through reproductive tissue ablation. *Journal
of plant physiology* 166: 871-881
- 半田孝俊・古越隆信(1983)スギ採種園の花粉動態に関する研究(IV)—花粉源を
高くしたことによる有効飛散距離の変化—. *関東林木育種場年報*
15:165-173
- Hartley RW (1988) Barnase and barstar, expression of its cloned inhibitor
permits expression of a cloned ribonuclease. *Journal of Molecular
Biology* 202: 913-915
- 橋詰隼人(1973) 針葉樹の花芽分化・花性分化とその調節に関する研究. *鳥大演
習報* 7:1-139
- 橋詰隼人(1984) 林木の交配に関する基礎研究 (X) 針葉樹花粉の長期貯蔵試験.
鳥大農研報 36:28-34
- 橋詰隼人(1990) 日本列島のスギ林における花粉の生産に関する研究 (I) 各地
のスギ林の着生状況、品種による着花生の差異及び着花に影響する因子に
ついて. *鳥大演習報* 19:67-122
- 林弥栄(1960) 日本産針葉樹の分類と分布. 202pp, 農林出版, 東京
- 井出雄二・白石進(2012) 森林遺伝育種学. 296pp, 文永堂, 東京

- 川西基博・崎尾均・米林仲 (2007) 実生出現法によるスギ植林地と広葉樹二次林の埋土種子集団の比較. 地球環境研究. 9:31-41
- 菊池利喜夫・古越隆信(1976) スギの花粉飛散と受粉範囲. 日林論 87:179-180
- Konagaya K, Kurita M, Taniguchi T (2013) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cryptomeria japonica* D. Don by co-cultivation on filter paper wicks followed by meropenem treatment to eliminate *Agrobacterium*. Plant Biotechnology, 30(5), 523-528.
- 近藤禎二・谷口 亨・渡辺敦史・栗田 学・大宮泰徳・福田陽子・板鼻直榮(2006) 林木花粉の屋外での生存期間. 林木育種センター研究報告 22: 217-223
- Kurita M, Konagaya K, Watanabe A, Kondo T, Ishii K, Taniguchi T (2013) The promoter of an A9 homolog from the conifer *Cryptomeria japonica* imparts male strobilus-dominant expression in transgenic trees. Plant Cell Reports 32:319-328
- Kurita M, Taniguchi T, Nakada R, Kondo T, Watanabe A (2011) Spatiotemporal gene expression profiles associated with male strobilus development in *Cryptomeria japonica* by suppression subtractive hybridization. Breeding science, 61: 174-182
- Kusumi J, Tsumura Y, Yoshimaru H, Tachida H (2000) Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences. Am. J. Bot. 87: 1480-1488.
- Länneppää M, Hassinen M, Ranki A, Hölttä-Vuori M, Lemmetyinen J, Keinonen K, Sopanen T (2005) Prevention of flower development in birch and other plants using a BpFULL1:BARNASE construct. Plant Cell Rep 24: 69-78
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 347: 737-741
- Moriguchi Y, Tani N, Itoo S, Kanehira F, Tanaka K, Yomogida H, Taira H, Tsumura Y (2005) Gene flow and mating system in five *Cryptomeria japonica* D. Don seed orchards as revealed by analysis of microsatellite markers. Tree Genet. Genom. 1, 174-183
- 日本花粉学会(1994)花粉学辞典. 454pp, 朝倉書店, 東京

- 大庭喜八郎・勝田 梶(1991) 林木育種学. 337pp, 文永堂, 東京
- Ohta S, Mira S, Hattori T, Nakamura K (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31:805-813
- 林野庁 (2012) 森林・林業白書 (平成 24 年度版)
- 坂口勝美(1983) 新版スギのすべて. 629pp, 全国林業改良普及協会, 東京
- 佐竹義輔・原寛・亘理俊次・富成忠夫(1989) 日本の野生植物 木本 I. 平凡社, 東京
- 佐藤彌太郎(1950) スギの研究. 754pp, 養賢堂, 東京
- 白澤保美 (1910) 主要林木種子ノ貯蔵試験. 林試報 7: 11-20
- Skinner JS, Meilan R, Brunner AM, Strauss SH (2000) Options for genetic engineering of floral sterility in forest trees. In: Jain SM, Minocha SC (eds) *Molecular biology of woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 135-153
- 田島正啓(2000) ポルトガル共和国アゾレス諸島のスギ〜サン・ミゲル島を訪ねて〜. 林木育種センターだより 2000:3
- Takahashi T, Tani N, Niiyama K, Yoshida S, Taira T, Tsumura Y (2008) Genetic succession and spatial genetic structure in a natural old growth *Cryptomeria japonica* forest revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology and Management* 255:2820-2828
- 高桑進(2013) スギから見た日本列島の森林について. 京都女子大学研究紀要 26: 69-92
- 谷口亨・栗田学・近藤禎二・石井克明(2009) 不定胚経由のスギクローン苗の植栽 3 年目までの成長. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(東京) 講演要旨集. 27:60
- 谷口亨・小長谷賢一・栗田学・石井克明(2012) 人工交配を行ったスギ精英樹未成熟種子からの不定胚誘導について. 平成 23 年度版林木育種センター年報:88-90
- 津村義彦(2006) 緑化ガイドライン検討のための解説 -植物の地理的な遺伝変異と形態形質変異との関連. 59-73. 生物多様性緑化ハンドブック. 亀山章監修, 323pp 地人書館, 東京
- 津村義彦(2012) シリーズ: 日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (1) スギ (ヒノ

- キ科スギ属) . 森林遺伝育種 1:17-22
- 上田弘一郎(1950)スギの開花結実. 65-80. 贈訂スギの研究. 佐藤彌太郎監修,
754pp 養賢堂, 東京
- 渡邊定元(1994)樹木社会学. 450pp, 東京大学出版会, 東京
- Wei H, Meilan R, Brunner AM, Skinner JS, Ma C, Gandhi HT, Strauss SH (2007)
Field trial detects incomplete barstar attenuation of vegetative
cytotoxicity in Populus trees containing a poplar LEAFY promoter:
barnase sterility transgene. Mol Breed 19: 69-85
- 山手広太(1975)スギ採種園における花粉の有効飛散距離の推定. 昭和 49 年度九
州育種場年報:90-94
- 安田喜憲(1985) 環日本海文化の変遷 一花粉分析学の視点から一. 国立民族学
博物館研究報告 9:761-798
- 吉田実 (1991) スギ択伐天然林における後継樹の確保～魚梁瀬営林署管内 2 試
験地での事例～. 森林総合研究所四国情報 No. 6
- Zhang C, Norris-Caneda KH, Rottmann WH, Gullledge J E, Chang S, Kwan BYH,
Thomas AM, Mandel LC, Kothera RT, Victor AD, Pearson L, Hinchee MA (2012)
Control of pollen-mediated gene flow in transgenic trees. Plant
physiology 159:1319-1334

緊急措置計画書

平成26年9月5日

氏名 独立行政法人 森林総合研究所
理事長 鈴木 和夫
住所 茨城県つくば市松の里1

第一種使用規定の承認を申請している雄性不稔スギ (*barnase* B4, *Cryptomeria japonica* D. Don) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、森林総合研究所では生物多様性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措置など必要に応じて行う。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

実験従事者*

実験従事者**

実験従事者

実験従事者

実験従事者

実験従事者

実験従事者

実験従事者

※個人情報のため、非公表

*管理責任者、**管理主任者

(以上は現時点での体制及び責任者であり、移動や所内での業務体制の見直しによる変更の際には適切な対応を行う)

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、森林総合研究所実験従事者から得られた情報により把握するとともに、森林総合研究所遺伝子組換え生物等第一種使用等業務安全委員会の委員による査察を行う。

3. 申請に係る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

緊急措置が必要となった場合には、すぐにその内容を実験従事者に対して、口頭、電話、電子メールなどにより伝え、事実を記録する。

4. 申請に係る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

具体的な措置として、本遺伝子組換えスギの地上部及び株元は、焼却による不活化又は切断後に隔離ほ場内にすき込むことにより不活化し、隔離ほ場外への本遺伝子組換えスギ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遺伝子組換えスギの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

生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合、森林総合研究所はそのことを直ちに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野性生物課に報告する。

隔離ほ場試験の計画書

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称 独立行政法人 森林総合研究所 隔離ほ場
2. 住所 茨城県日立市十王町伊師 3809-1
3. 連絡先電話番号 0294-39-7000（森林総合研究所 総務部 管理課）

II. 試験期間

承認日から平成 30 年 3 月 31 日

III. 隔離ほ場の施設

部外者の立入りの防止のために、隔離ほ場を取り囲むように高さ8mのフェンス(金網40mm目)を設置している。フェンスの下に地下1mまでコンクリートの擁壁を設けている。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、正面入口の見やすい所に掲げている。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場を設置しているとともに、本遺伝子組換えスギの隔離ほ場外への漏出を防止するための設備を排水系統等に設置している。

IV. 面積

隔離ほ場全体の面積約 32a

V. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

海岸線から約 2km の上台台地に位置する。

2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場は、研究機関の敷地内にある。隔離ほ場外周から敷地境界まで最短で約 70m である。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

隔離ほ場の周辺には環境省の定める自然保護地域(国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域)はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、同国定公園までの最短距離は約 70 キロである。

4. 気象条件

隔離ほ場が所在する日立市の気象情報観測地点である茨城県日立アメダス観測所(茨城県日立市会瀬町)における気象データの平年値を表 2 に示した(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス日 2014 年 1 月 20 日、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1011&year=&month=&day=&view=)。

表2. 茨城県日立アメダス観測所(茨城県日立市会瀬町)における気象データの平均値

要素	降水量 (mm)	平均気温 (°C)	最高気温 (°C)	最低気温 (°C)	平均風速 (m/s)	日照時間 (時間)
統計期間	1981~2010	1981~2010	1981~2010	1981~2010	1981~2010	1986~2010
資料年数	30	30	30	30	30	25
1月	51.4	4.4	9.0	0.1	2.2	184.8
2月	57.8	4.4	8.8	0.2	2.3	168.5
3月	111.6	7.0	11.2	2.7	2.3	170.5
4月	137.9	11.9	16.1	7.6	2.3	179.4
5月	155.8	15.9	19.7	12.1	2.1	164.6
6月	167.5	19.0	22.4	16.0	1.8	125.2
7月	164.7	22.8	26.3	20.0	1.7	137.9
8月	147.0	24.7	28.3	22.0	1.9	167.5
9月	181.4	21.6	25.2	18.8	2.0	127.5
10月	177.3	16.6	20.5	13.1	1.9	138.3
11月	80.5	11.7	16.0	7.6	1.9	153.3
12月	44.6	7.1	11.6	2.8	2.1	179.6
年	1477.3	13.9	17.9	10.2	2.0	1895.7

5. 台風の襲来歴

隔離ほ場のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 3 に示した(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス日 2014 年 1 月 20 日、http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)。

表3. 関東地方への過去10年間の台風の接近数(台風を中心か茨城県、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 以内に入った場合を「関東甲信地方(伊豆諸島および小笠原諸島を除く)に接近した台風」としています。)

(注)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ません。

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
2013									1	2			3
2012									1	2			3
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3
2004					1	1		2	1	2			7

6. 過去10年におけるほ場冠水の経験とその程度

2006年に隔離ほ場を建設して以来、冠水の経験はない。

7. 過去10年における強風の経験とその程度

2006年に隔離ほ場を建設して以来、強風による隔離ほ場での設備、植栽木への被害はない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、日立市の津波及び洪水のハザードマップにおいて、浸水想定区域に指定されていない。

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場にはフェンスが設置されており、獣害は発生していない。また、鳥害も発生していない。

VI. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え植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植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

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

隔離ほ場周辺にはスギの天然林は存在しないと考えられる。なお、隔離ほ場が所在する森林総合研究所林木育種センター敷地内には試験研究用のスギが植栽され、また、敷地周辺には里山人工林、屋敷林、防風林、神社林、緑化木などとしてスギが植栽されている。

VII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

現在は休閑地である。

2. 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培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じる。

3. 隔離ほ場における生物多様性影響の安全対策に関する措置

- (1) 適切な除草管理等を行う。
- (2) 本遺伝子組換えスギを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該スギ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、本遺伝子組換えスギの栽培終了後は、当該スギ及び比較対照の非遺伝子組換えスギの地上部及び株元は、焼却又は切断後に隔離ほ場内にすき込むことにより不活化する。
- (4) 遺伝子組換えスギから花粉の飛散の可能性が示唆された場合、当該系統の組換えスギを伐採し、花粉飛散を防止する。また、遺伝子組換えスギから種子の飛散の可能性が生じた場合、種子飛散を防止するために摘果又は袋掛け等の措置を講じる。
- (5) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えスギが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (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)に掲げる事項を、第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 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。

◎ 栽培計画に関する情報（隔離ほ場における試験計画）

今回、申請者は、1種類の DNA コンストラクトを用い、遺伝子組換えにより作製した宿主を同一とする雄性不稔スギ (*barnase* B4, *Cryptomeria japonica* D. Don) の隔離ほ場での栽培試験を計画している。本遺伝子組換えスギは、第二種使用等（特定網室栽培）で、植物ホルモンであるジベレリン処理により誘導した雄花を調査し、花粉が形成されない雄性不稔であることを2カ年にわたり確認している。

本試験では、屋外環境で以下の項目を調査することにより、生育や形態に及ぼす導入遺伝子の効果とその効果の組換えスギの系統間での差異を明らかにすることを目的とする。これらのことにより、今回用いたコンストラクトの有効性を検証し、今後の遺伝子組換え樹木の研究開発のための基礎的データとする。

1. 隔離ほ場で栽培する遺伝子組換えスギの各系統の生育や形態を非遺伝子組換えスギと比較し、生育阻害や形態異常が生じるかどうかを調査する。
2. 生育阻害や形態異常が観察された場合、導入遺伝子の発現量との関連を調査する。
3. ジベレリン溶液に枝葉を浸漬する処理により雄花の誘導を行い、花粉母細胞が四分子期、小孢子期へと発達する時期であり、かつ、花粉が飛散する前の時期である10月～12月において、花粉崩壊が確認されるまで2週間毎に組換えスギの系統毎に雄花を採取し、組換えスギの雄花における花粉崩壊の過程と導入遺伝子の発現量の関係を調査する。
4. ジベレリン処理により雌花の誘導も行い、種子の飛散前に球果を採取する。得られる種子を播種し、導入遺伝子の次世代への伝達性を確認する。また、種子の生産性、発芽率を非遺伝子組換えスギと比較する。

本試験では栽培管理を系統別に判別できるように行う。本遺伝子組換えスギ3

系統(B4#1, B4#3, B4#8)、合計最大 81 個体程度と比較対照用に非遺伝子組換えスギ 27 個体程度を植栽する予定である。植栽間隔は、スギの一般的な植栽間隔である 1.8m×1.8m とする予定である。また、周辺効果を抑制するために、これら遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギの植栽エリアを非遺伝子組換えスギ 2 列で取り囲む計画である。

生物多様性影響評価書

別添資料

雄性不稔スギ (*barnase* B4, *Cryptomeria japonica* D. Don)

独立行政法人 森林総合研究所

- 別紙 1 遺伝子組換えスギのアグロバクテリウム残存の有無
- 別紙 2 遺伝子組換えスギにおける供与核酸の存在状況と検出
- 別紙 3 遺伝子組換えスギの花粉形成の調査
- 別紙 4 遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギの成長速度の比較
- 別紙 5 隔離ほ場周辺の地形図とスギの存在状況
- 別紙 6 有害物質の産生性に関する調査
- 別紙 7 隔離ほ場の位置
- 別紙 8 森林総合研究所遺伝子組換え生物等第一種使用等業務安全委員会名簿

別紙1 遺伝子組換えスギのアグロバクテリウム残存の有無

培養瓶で生育中の組換えスギ B4#1、B4#3 及び B4#8 の幼植物体より採取したシュート先端約 3 cm に滅菌蒸留水 1 ml を加えてすり潰した。次に、すり潰した液をカナマイシン含有のアグロバクテリウム培養培地に塗布した。28°C、48 時間培養したところ、アグロバクテリウムの増殖は全く見られなかった。これらにより、遺伝子組換えスギにはアグロバクテリウムの菌体は残存していないと判断した。



別紙2 遺伝子組換えスギにおける供与核酸の存在状況と検出

組換えスギのシュート先端 (200-250mg) から抽出したゲノム DNA をサザンハイブリダイゼーションに用いた。抽出したゲノム DNA 10 μ g を制限酵素 *Hind*III または *Xba*I で完全消化し、1%アガロースで電気泳動により分離した後、ナイロンメンブレンへ転写した。細胞内に移入した核酸を検出するために *barnase* の cDNA を PCR-DIG ラベルしたプローブを用い、化学発光により検出した。その結果、組換えスギのゲノム DNA ではシグナルバンドが検出され、非組換えスギではシグナルバンドは検出されなかった (図1)。このことより、移入された核酸の複製物は染色体上に存在することが推定された。検出されたシグナルバンドの位置は系統により異なり、系統を区別することができた。また、シグナルバンドの数より、移入された核酸のゲノム上での複製物のコピー数は B4#1 と B4#3 では1、B4#8 では2 と推定された。

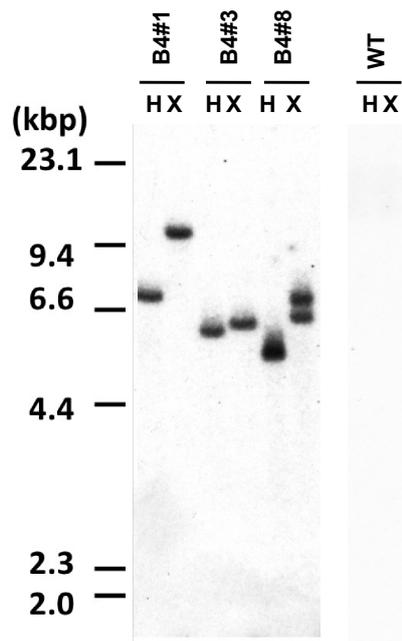


図1 サザンハイブリダイゼーション解析による *barnase* 遺伝子の検出と移入コピー数の推定

B4#1、B4#3 及び B4#8 は遺伝子組換えスギ、WT は非遺伝子組換えスギ、H は制限酵素 *Hind*III で処理した DNA、X は制限酵素 *Xba*I で処理した DNA を示す。

PCR では、*CjMALE1* プロモーターと *barnase* 遺伝子に特異的なプライマーセット (Muka14-R: 5' -CATAACATTGCATTTCATTGCCTTGCAC-3' , Barnase-R02: 5' -CTGATTTTTGTAAAGGTCTGATAAT-3')、*barstar* 遺伝子に特異的なプライマーセット (barstarF-BamHI: 5' -GTCGGATCCATGAAAAAAGCAGTCATTAACG-3' , barstarR-BamHI: 5' -CCCGGATCCTTAAGAAAGTATGATGGTGATG-3')、*nptII* 遺伝子に特異的なプライマーセット (NPTII-F01: 5' -GTTCTTTTTGTCAAGACCGACCT-3' , NPTII-R01: 5' -CTCTTCAGCAATATCACGGGTAG-3') を用い、導入遺伝子から推測されるサイズのバンドを特異的に検出した (図 2)。PCR による検出は、約 100ng のゲノム DNA を反応に供することで可能であった。

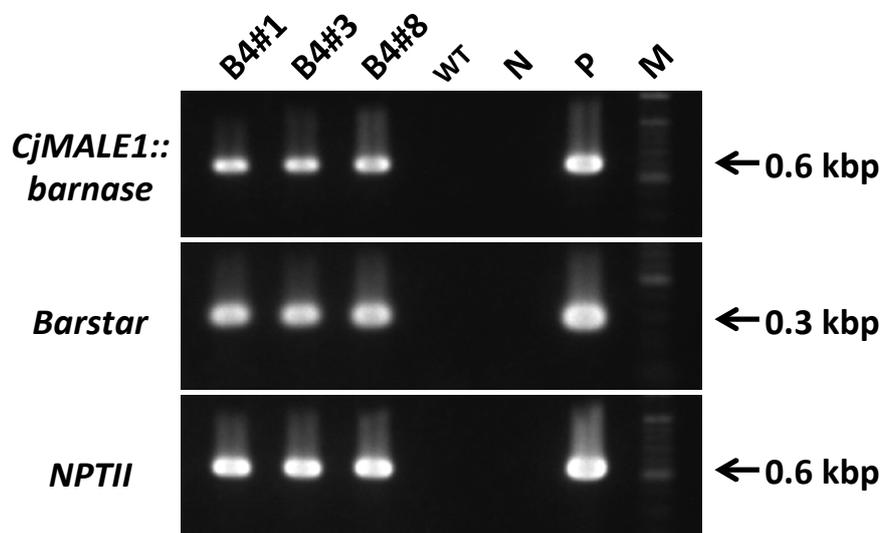


図 2 PCR 分析による移入核酸の検出

B4#1、B4#3 及び B4#8 は遺伝子組換えスギ、WT は非遺伝子組換えスギ、N は鋳型 DNA 無しのネガティブコントロール、P はポジティブコントロール (バイナリーベクター-pBI-*CjMALE1::barnase-NOS::barstar*)、M は 100bp ラダーマーカを示す。各増幅バンドの想定サイズ位置に矢印を示した。

別紙 3 遺伝子組換えスギの花粉形成の調査

特定網室で栽培した遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギに雄花を形成させるために7月にジベレリン処理を行った。形成した雄花の凍結切片を観察し、花粉形成を調査した(図1)。非遺伝子組換えスギでは、10月後半に四分子期、10月末には小孢子が見られた。その後、タペート層は分解し、12月には成熟花粉が見られた。遺伝子組換えスギでは、10月末においても四分子期の花粉は見られず、11月中旬には花粉母細胞が崩壊し、12月下旬には花粉囊の内部が空洞化していた。翌年の3月には非遺伝子組換えスギの雄花は開花し、花粉飛散が確認されたが、遺伝子組換えスギでは花粉飛散は見られなかった(図2)。これら遺伝子組換えスギの花粉形成には、系統間(B4#1、B4#3、B4#8)で差異は見られなかった。これらの観察結果より、遺伝子組換えスギでは、減数分裂期以降の花粉形成が阻害され、花粉が全く形成できない雄性不稔となると考えられた。

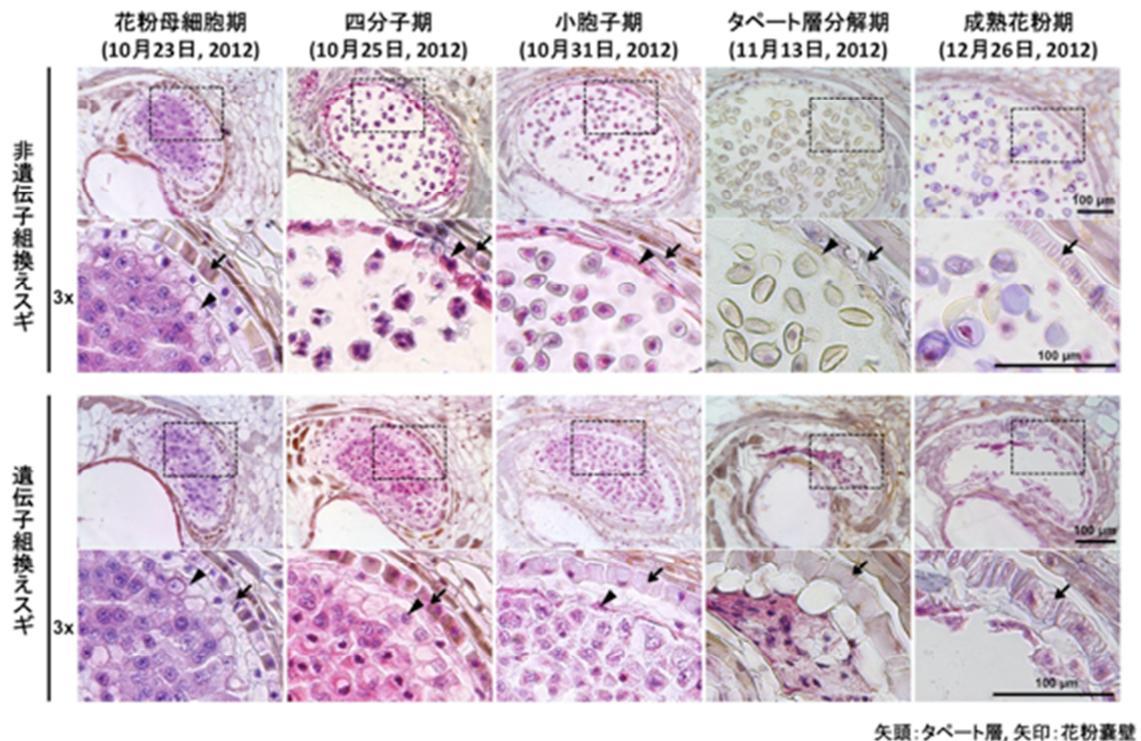


図1 遺伝子組換えスギ(下段)と非遺伝子組換えスギ(上段)の花粉囊の断面の比較



図2 雄花開花期における花粉の飛散の比較（左が非遺伝子組換えスギ、右が遺伝子組換えスギ）

別紙4 遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギの成長速度の比較

遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギを特定網室で栽培し、成長速度を比較した。図1は特定網室で栽培1年目の結果、図2は栽培2年目の結果である。ともに6月～8月の1日当たりの伸長成長量を示す。非遺伝子組換えスギと比較した結果、遺伝子組換えスギの成長速度は1年目、2年目ともにどの系統においても有意差は認められなかった (Tukey HSD、 $P>0.05$)。

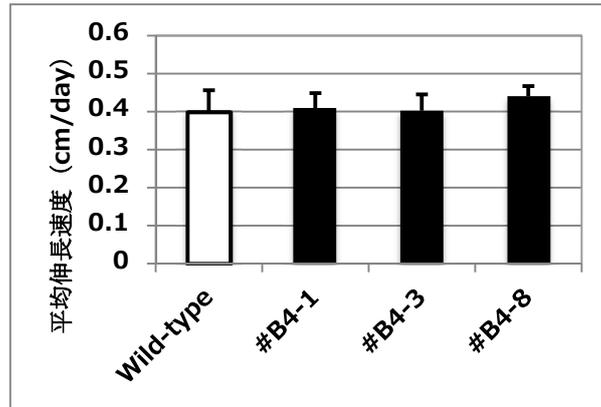


図1 1年目の成長速度の比較

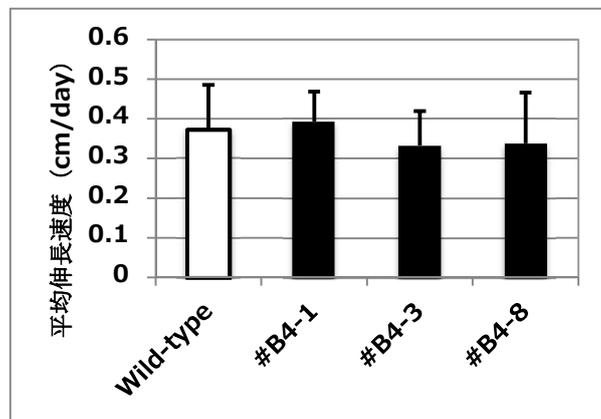


図2 2年目の成長速度の比較

別紙5 隔離ほ場周辺の地形図とスギの存在状況

隔離ほ場が位置する日立市十王町は、海岸台地と沖積平野からなる幅約 4km 海岸地帯とその西側の阿武隈山地の南端の山岳部に区分される。隔離ほ場は海岸線から約 2km の海岸台地に位置する。

森林総合研究所林木育種センターの敷地内には、試験研究用のスギが植栽されている。敷地周辺には、植栽されたスギ林（図）が存在する。スギ林の主要な利用形態は、里山人工林、屋敷林、防風林、神社林、緑化木である。

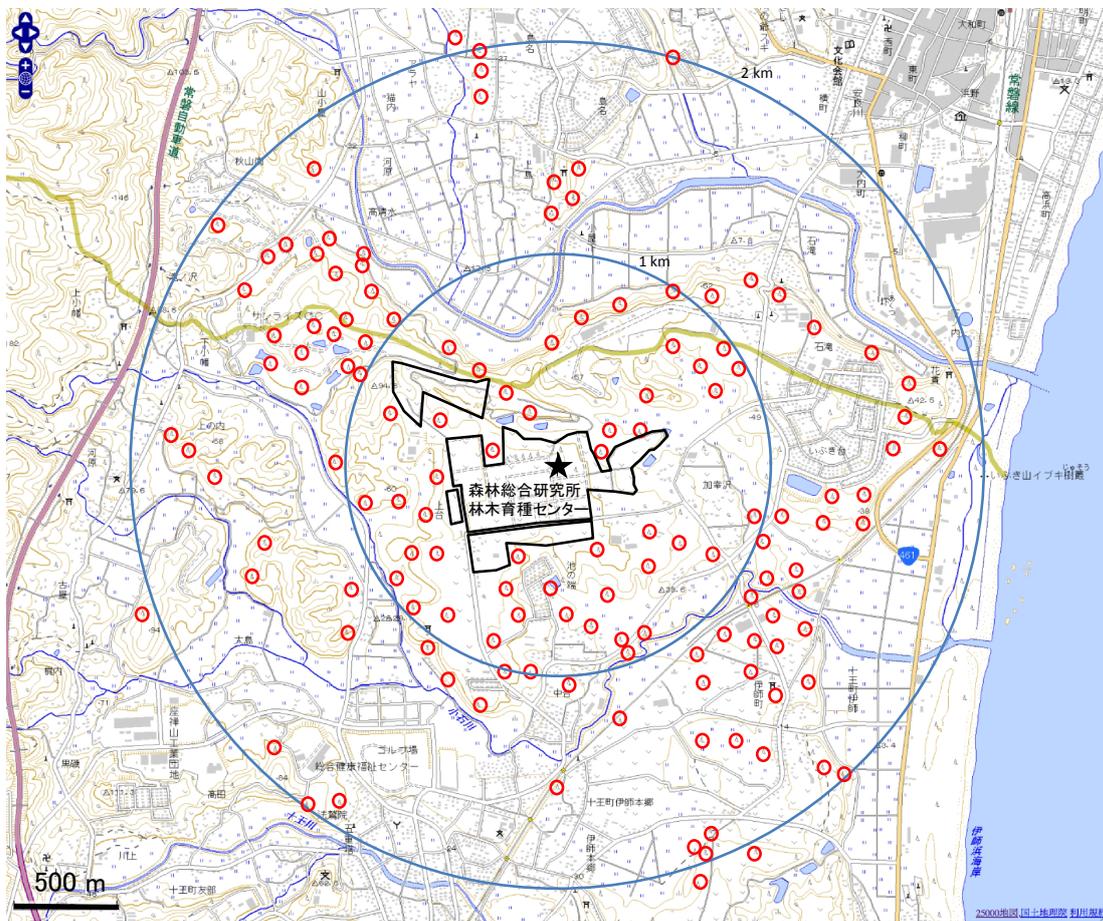


図 隔離ほ場の周辺の地形図と隔離ほ場より半径 2 km 圏内における林木育種センター敷地周辺のスギの生育場所
星印：隔離ほ場、実線：林木育種センターの敷地、赤丸印：スギ林の位置
(国土地理院のウェブサービス <http://watchizu.gsi.go.jp/>より作成)

別紙6 有害物質の産生性に関する調査

1. 後作試験による「根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性」の調査

特定網室で遺伝子組換えスギ及び非遺伝子組換えスギを約6ヶ月間栽培した土壌をポットに入れ、検定植物であるレタス（グレートレックス 366）の種子25粒を播種した。25℃16時間日長の条件で栽培し、播種4日後に発芽率を測定するとともにポット当たり10個体を残すように間引きを行った。播種7日後には下胚軸長と新鮮重量を測定した。各区4反復とし、発芽率、新鮮重量及び下胚軸長について、遺伝子組換えスギ（B4#1、B4#3、B4#8）と非遺伝子組換えスギで比較したところ、有意差は認められなかった（Dunnett 検定、 $p>0.05$ ）（表1）。なお、発芽率については逆正弦変換後に検定した。

これらのことより、根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性は、遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギで差は無いと判断した。

表1. スギを栽培した土壌に播種したレタスの発芽率、新鮮重量及び下胚軸長

系統	発芽率(%)			新鮮重量(mg)			下胚軸長(mm)		
	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値
野生型	86.0	± 4.0		27.1	± 4.2		15.9	± 2.2	
B4#1	92.0	± 7.3	0.25	27.3	± 5.1	1.00	16.1	± 1.9	1.00
B4#3	89.0	± 3.8	0.90	27.8	± 4.5	1.00	17.0	± 1.5	0.83
B4#8	87.0	± 6.8	0.98	26.3	± 4.4	0.99	17.6	± 1.6	0.55

2. サンドイッチ法による「植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものの産生性」の調査

特定網室で約10ヶ月間栽培した遺伝子組換えスギ及び非遺伝子組換えスギより、雄花を着けた枝葉を採取し、60℃、24時間乾燥させた。枝葉と雄花を乾燥重量で9:1の比で混合し、微粉末とした。植物組織培養用6穴プレートの各穴に微粉末30mgを入れ、0.75%(w/v)低融点寒天5mlでゲル化させた。その上に低融点寒天5mlを重層して固化させ、検定植物レタス（グレートレックス 366）の種子5粒を置床した。各区3反復とし、暗所、25℃で3日間培養し、発芽率、幼根長、下胚軸長を測定した。これらの値を遺伝子組換えスギ（B4#1、B4#3、B4#8）と非遺伝子組換えスギで比較したところ、有意差は認められなかった

(Dunnett 検定、 $p>0.05$) (表 2)。なお、発芽率については逆正弦変換後に検定した。

これらのことより、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものの産生性は、遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギで差は無いと判断した。

表 2. スギの枝葉と雄花の粉末をゲル化させた寒天培地に播種したレタスの発芽率、幼根長、下胚軸長

系統	発芽率(%)			幼根長(mm)			下胚軸長(mm)		
	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値
野生型	94.4	± 1.9		27.2	± 0.4		22.7	± 0.7	
B4#1	98.9	± 1.9	0.07	28.4	± 2.1	0.84	19.5	± 2.3	0.16
B4#3	95.6	± 1.9	0.96	28.2	± 0.7	0.89	21.4	± 1.8	0.75
B4#8	97.8	± 1.9	0.28	29.5	± 3.6	0.46	21.9	± 2.3	0.91

3. 平板培養法による「根から分泌され土壤微生物相に影響を与えるもの」の調査

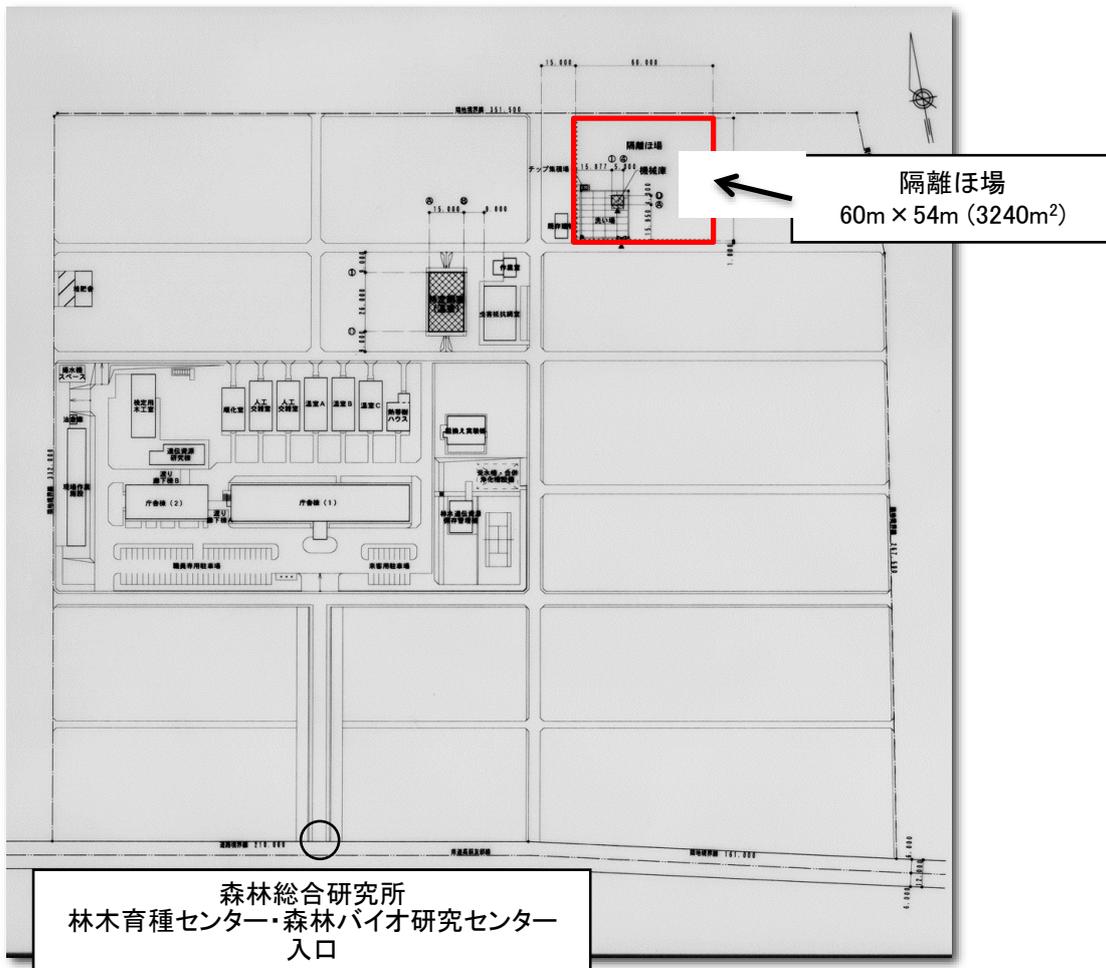
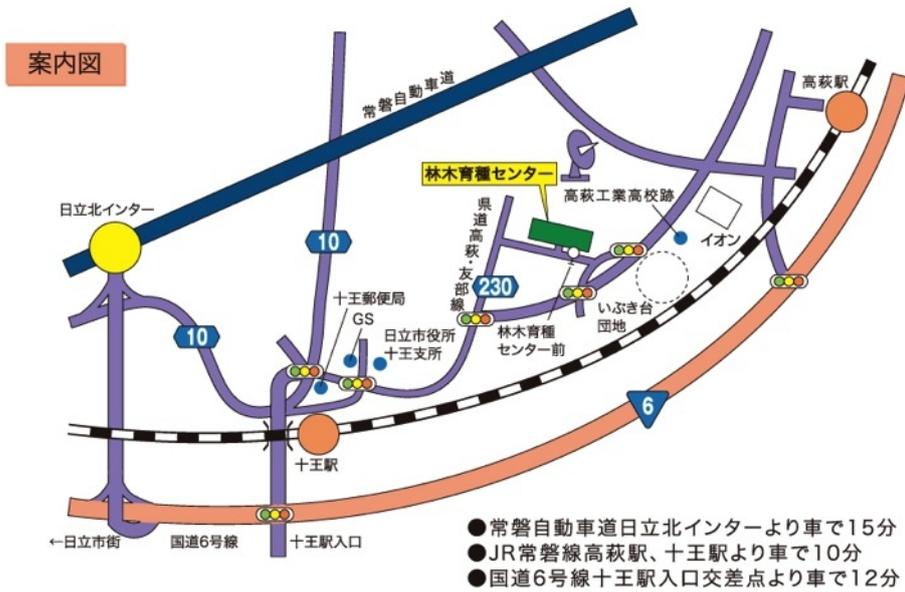
特定網室で遺伝子組換えスギ及び非遺伝子組換えスギを約 6 ヶ月間栽培したポットから採取した根圏土壤 30g を用い、希釈平板法により、乾燥土壤 1g 中の糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数を測定した。各区 4 反復とし、糸状菌、放線菌、細菌の菌体数を遺伝子組換えスギ (B4#1、B4#3、B4#8) と非遺伝子組換えスギで比較したところ、有意差は認められなかった (Dunnett 検定、 $p>0.05$) (表 3)。

これらのことより、根から分泌され土壤微生物相に影響を与えるものの産生性は、遺伝子組換えスギと非遺伝子組換えスギで差は無いと判断した。

表 3. スギを栽培した土壤の微生物数

系統	糸状菌($\times 10^5$ CFU/g)			放線菌($\times 10^6$ CFU/g)			細菌($\times 10^7$ CFU/g)		
	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値	平均値	± 標準偏差	P値
野生型	1.89	± 0.29		2.08	± 1.09		1.81	± 0.67	
B4#1	1.59	± 0.37	0.65	1.86	± 0.62	0.96	1.74	± 0.22	1.00
B4#3	1.87	± 0.69	1.00	1.77	± 0.66	0.91	1.71	± 0.90	0.99
B4#8	1.94	± 0.21	1.00	2.47	± 0.89	0.85	1.96	± 0.59	0.98

別紙 7 隔離ほ場の位置と概観





隔離ほ場



隔離ほ場の入り口



植栽予定箇所

別紙 8 森林総合研究所遺伝子組換え生物等第一種使用等業務安全委員会名簿

平成26年5月現在

※個人情報のため、非公表