

高セルロース含量ギンドロtrg300-1 (<i>AaXEG2</i>, <i>Populus alba</i> L.) 第一種使用規程申請書等の概要
--

第一種使用規程承認申請書

1

生物多様性影響評価書の概要

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 4

(2) 使用等の歴史及び現状 5

(3) 生理学的及び生態学的特性 6

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 1 4

(2) ベクターに関する情報 1 9

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 2 0

(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 2 1

(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 2 2

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 2 3

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 2 8

(2) 使用等の方法 2 8

(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 2 9

(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 3 0

(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 3 0

(6) 国外における使用等に関する情報 3 0

第二 項目ごとの生物多様性影響評価	
1 競合における優位性	3 1
2 有害物質の産生性	3 2
3 交雑性	3 3
4 その他の性質	3 4
第三 生物多様性影響の総合的評価	3 6
文献情報	3 9
モニタリング計画書	4 4
緊急措置計画書	4 7
隔離ほ場における実験計画	4 9

第一種使用規程承認申請書

平成18年8月14日

農林水産大臣 中 川 昭 一 殿
環境大臣 小 池 百合子殿

氏名 独立行政法人 林木育種センター
申請者 理事長 田野岡 章
住所 茨城県日立市十王町伊師3809番地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	高セルロース含量ギンドロtrg300-1 (<i>AaXEG2</i> , <i>Populus alba</i> L.)
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番地1 名称：独立行政法人 林木育種センター 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成23年12月31日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りの防止及び折れた枝の飛散防止のために、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。 (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) 土並びに本遺伝子組換えギンドロの植物体の一部が付着する可能性のあ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い場を設置しているとともに、当該組換えギンドロの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統等に設置している。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えギンドロ及び比較対照の非遺伝子組換えギンドロ以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えギンドロを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ギンドロ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、本遺伝子組換えギンドロの栽培終了後、当該ギンドロ及び比較対照の非遺伝子組換えギンドロはチェーンソー等を用いて伐倒し丸太に裁断後、隔離ほ場内のコンクリート打ちのチップ集積場に積み置きし、乾燥させることにより不活化処理をする。その後にチップとして隔離ほ場内に鋤き込む。また、落枝・落葉なども作業可能な範囲で回収し、乾燥もしくは焼却により不活化する。残存する根系は、伐採後の最初の6月頃まで根萌芽を成長させた後に葉に散布するだけで根を枯死させることがで

	きる除草剤であるグリホサートを葉面散布するとともに切り株へ除草剤グリホサートを注入することにより不活化する。 (4) 本遺伝子組換えギンドロの一部分が高さ8mのフェンスを超えるおそれが生じた場合は、フェンスを越えないようにすみやかにその部分を切除する。 (5) 本遺伝子組換えギンドロに花芽形成が認められた場合は、これらをすみやかに切除するなどして、交雑防止の措置を行う。 (6) 隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えギンドロが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (7) 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。 (8) (1) から(7)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (9) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。 (10) 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の概要

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

宿主は和名をギンドロ（銀泥）（別名 ハクヨウ（白楊）あるいはウラジロハコヤナギ（裏白箱柳））と称し、ヤナギ科(*Salicaceae*)ハコヤナギ属(*Populus* L.)に属する(上原, 1961)。学名は *Populus alba* L. であり、種小名 *alba* は、ラテン語で「白い」を意味する *albell(us)* が北フランス方言からデンマーク語を經由して英語化したものである。英名は *white poplar* が一般的であるが、*silver-leaved poplar*、*silverleaf poplar* としても知られている。ハコヤナギ属(*Populus*)は、*Durango*、*Leucoides*、*Aigeiros* (クロヤマナラシ節)、*Tacamahaca* (ドロノキ節)、*Populus (Leuce)* (ヤマナラシ節) の5節に区分され、その重要性、分布、経済性などが大きく異なっている。ヤマナラシ節はさらに二つの亜節、*Albidae* (ギンドロ亜節) と *Trepidae* (ヤマナラシ亜節) に分かれる。宿主であるギンドロはヤマナラシ節ギンドロ亜節に属する (OECD, 2000; Zsuffa, 1975)。ギンドロを含む外来種を「ポプラ」と総称するが、本申請書中では正確を期するため「ギンドロ」と表記する。

ロ. 宿主の品種名又は系統名

森林総合研究所樹木園内の雌株といわれているギンドロ成木（当時、約植栽後20年）の枝を森林総合研究所において1980年代の後半に無菌化した。寒天培地上で継代されていた無菌植物体を平成6年（1994年）に分与を受け、寒天上で継代培養したもので、品種及び系統については不明である。

ハ. 国内及び国外の自然環境における自生地域

ギンドロは、欧州中南部、西北アジア、中央アジア原産である (OECD, 2000)。中国では、新疆エルティシ（爾齊斯）河及びその支流のブルチュン（布爾津）河以西に分布し、海拔450～750m地帯に天然林がある（中国樹木誌編集委員会、

1985；国家林業局国有林場和林木種苗工作總站，2001）。日本では1991年までに宮城県で逸出による自生の報告がある（上野，1991）。

（2）使用等の歴史及び現状

イ．国内及び国外における第一種使用等の歴史

ギンドロは、国内外において主に街路樹や庭園樹に用いられている（大橋，1995）。一方、ギンドロとヤマナラシ節の種とは、天然にも交雑し易く、天然雑種はGray Poplarと呼ばれている。この天然雑種はヨーロッパ各地に分布し、各種の土壌で良く生育し、耐乾性にも優れるとされている。アメリカとカナダにおいてもギンドロとヤマナラシ節の天然雑種が報告されている。このようにヤマナラシ節は節内での交雑が容易であり、生育特性や耐乾性に優れた形質を持つことから、ギンドロとヤマナラシ節間やヤマナラシ節内での交雑育種がカナダ、スウェーデン、デンマーク、ドイツ、アメリカ、日本等で進められてきた（千葉，1966）。

ギンドロの日本国内への一般的な導入経緯についての資料は明らかでないが、王子製紙（株）の担当者によると、ギンドロの導入時期は下記の通りである。

第1期：明治期、*P. nigra*と同様に導入された。雌雄は不明。

第2期：1955年頃、育種母材料としてドイツより導入された。すべて雌株。

近況では、1991年に交雑育種に利用するために王子製紙（株）森林博物館（北海道夕張郡栗山町）にギンドロ雄株が直接導入された例がある。

ロ．主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

ギンドロは、日当たりと水はけのよい場所に腐葉土などを施して植え付ける。耐寒性に非常に優れているため北海道全域でも植栽可能である。夏の暑さは苦手なので九州及び四国南部以南での植栽は避けたほうがよいといわれている（<http://www.engei.net/>）。

中国では、ギンドロは新疆、遼寧南部、河北、北京、山東、山西、河南、陝西、甘肅、青海、寧夏、チベット西部等で栽培されている（中国樹木誌編集委員会，1985；国家林業局国有林場和林木種苗工作總站，2001）。新疆楊（*Populus alba* var. *pyramidalis*）は中国の在来品種として西北地域で栽培されており、中国温暖帯の大陸性気候地域において主要な造林樹種となっている。統計によ

ると、新疆、青海、甘肅、寧夏、陝西、山西及びモンゴル地域における新疆楊の人工造林面積は約17万 ha である(鄭世鏞, 1992)。また、日本国内では、ギンドロは記念樹や街路樹として多くの植物園や公園(大阪万博記念公園、花巻ぎんどろ公園など)に植栽され、さらに、多くの園芸店で販売されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

ギンドロは、落葉喬木、雌雄異株で樹高25~30mになる樹木であり、北海道では、樹齡40年で樹高は16.5~20m、平均胸高直径37.5cmという記録がある(千葉, 1966)。成長等に優れた選抜クローンのさし木5年生の樹高は6.3~7.0m、胸高直径は6.7~9.0cmと報告されている(千葉・永田, 1976)。樹皮は若枝では初めは白色で絹毛があり、しだいに無毛、灰色となり条裂し、暗黒粗皮となる。雄株の枝はやや直立にでるが、雌株の枝は横に張り傘状の樹形となるため並木としては雄株の方が良い。葉は卵形からやや広い卵形をしており、掌状に3~5裂に浅く裂ける。また、葉は互生で裏面が銀白色、綿毛が密生している(上原, 1961)。徒長枝や萌芽枝、実生と成木の短枝では葉形は異なる。ギンドロ及びギンドロが属するヤマナラシ節を含むハコヤナギ属のほとんどは開花までに10~15年を要する。穂は暗赤色で長さ4~10cm、雌花穂は黄緑色でやや短く(佐藤孝夫, 1990)、開花期は筑波で3月下旬から4月上旬、北海道で4月中旬から5月で、開花の1ヶ月後には果実は熟する(森, 1998)。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

ギンドロは、適潤性~弱湿性で弱酸性の土壌を好む(荏住, 1987)。地中海沿岸地域、ヨーロッパから中央アジアを原産とし、大陸性乾燥気候に適しているが、中国・新疆では-40℃以下で凍害がある。南疆の夏季炎熱気候下では成長は良好であるが湿熱には耐えない。病虫害に比較的強いが南方の栽培地域では病虫害を受け成長不良となる。やや耐塩性があり、砂質土壌に適するが、重粘土には耐えない(中国樹木誌編集委員会, 1985)。

また、ギンドロは、遷移の途中相で優占する陽樹であるが、山火事等により主幹が損失を受けた場合に根萌芽による栄養繁殖により一斉更新し、優占樹種となる。しかし、時間の経過とともに他の樹種が侵入し、本種の個体数は減少

する（渡邊，1994；竹原，1995）。

ハ．捕食性又は寄生性

—

ニ．繁殖又は増殖の様式

①種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ギンドロの種子には、長く白い絹状の毛があり、風散布によって非常に長い距離を拡散し、遺伝子流動が大きい。つくば市周辺では5月中旬に果実は成熟し（森，1998）、その後種子散布される。ヤマナラシ節は毎年多くの種子を産生し、3～5年に一度、豊作の年がある。ギンドロの種子は、1グラムあたり2,000粒弱である（国家林業局国有林場和林木種苗工作総站，2001）。

ハコヤナギ属の種子は休眠せず、種子は乾燥に弱く、短寿命の種子の代表の様に言われ（森，1998）、落下後数日のうちに発芽するかもしれない死滅する（OECD，2000）。また、発芽には光と持続的な水分と粒子の細かな鉍質土壌が必要であるが、発芽に適した新しい鉍質土壌のある海岸線、砂洲や古い砂利採取場でも発芽することは稀である（OECD，2000）。芽生えはわずかな乾燥にも弱く、土壌の移動するところでは定着できないので、実生による天然更新地は限定される（森，1998）。一方、ハコヤナギ属の種子の人工的な条件での発芽率は高く、ヤマナラシの例では80%以上とされている（森，1998）。

②栄養繁殖の様式

ギンドロが属するヤマナラシ節は、切り株からの萌芽は少ないが、根萌芽の頻度は高い（OECD，2000；油津・田端，1964；田中・鮫島，1985）。根萌芽の発生する根は地下10～20cm内外の深さを横に走る直径1～2.5cmの太さの水平根に限られる（竹原，1995）。ギンドロの根萌芽を掘取る調査をしたところ、直径0.5～3cm内外の太さの地表面直下から10cmの深さを走る水平根より根萌芽は発生しており（別紙3-1）、前述の竹原（1995）の記述とほぼ一致した。

隔離ほ場で栽培するギンドロは、組織培養により得られた植物体を順化後にさし木により増殖したものである。隔離ほ場での栽培予定期間は5年であるが、それとほぼ同じ4年生さし木の根系については、数本のやや太い垂下根と斜出根

が分岐するが、細根と小径根の分岐は少なく（荻住，1987）、水平根はそれほど発達しないと考えられる。

一方、30年生ほどのギンドロの成木では、水平根は40cm内外までの地表層を横走する（荻住，1987）。森林総合研究所の成木の調査においても水平根は地表より3～15cmの深さを走ることが確認された（別紙3-2）。また、成木の水平根はいちじるしく発達し、主幹より半径50mにまで広がる場合もある（竹原，1995）が、垂下根は貧弱で最大深さは110cm程度である（荻住，1987）。

水平根から発生する根萌芽の数は、ギンドロ交雑種の調査結果では1,569～8,188本/haと報告されている（鮫島・千葉，1983）。一方、ヤマナラシ節は、伐採等で主幹が消失したり、開墾や下草刈り等で根が損傷を受けた場合に多数の根萌芽が発生する（竹原，1995）。ササの刈払い有無によるギンドロ交雑種の根萌芽の発生数の違いを調査した結果によると萌芽数は刈払い区では27,143本/haであるが、無刈払い区では1,238本/haであった（鮫島・千葉，1984）。ギンドロの主幹が山火事により損失するときわめて早い時期から根萌芽の発生が始まる（竹原，1995）。また、ギンドロの根系は腐朽しやすい（荻住，1987）。

結論として、ギンドロは水平根から発生する根萌芽による栄養繁殖が容易であるが、5年生程度の若齢木の場合は、水平根はそれほど発達せず、根萌芽の発生範囲も成木より狭いと考えられる。

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

ギンドロを含むほとんどのハコヤナギ属は雌雄異株であり、必然的に他殖性である。唯一、ヤマナラシ節の *P. tremuloides* の場合、生殖芽が誘導される時期によって、雄花、雌花、あるいは両性花へと発達することが報告されている。また、例外的に *Leucooides* 節の *P. lasiocarpa* の場合、通常、雌雄同株で自殖性であるが（OECD，2000）、ギンドロを含む他のハコヤナギ属についてこのような報告はされていない。

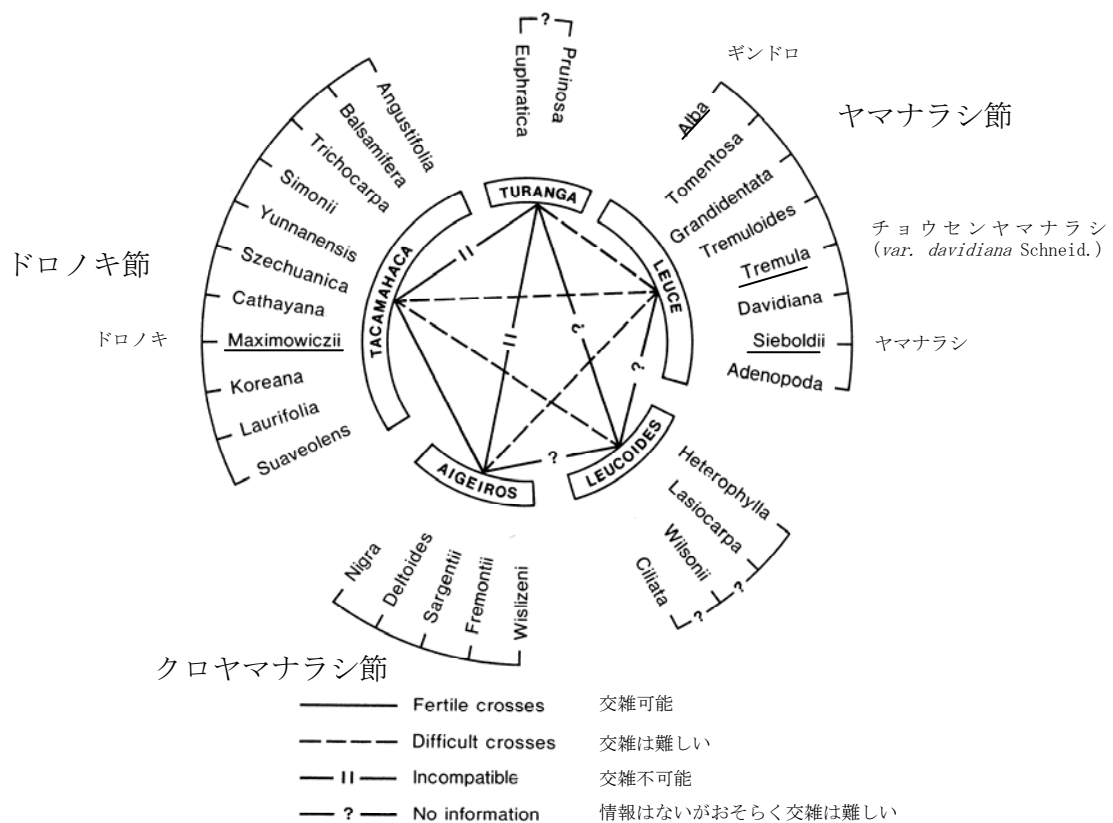


図1 ハコヤナギ属の種間交雑 (Zsuffa, 1975 より改変)

種間交雑の結果について図1に示した(Zsuffa, 1975)。同じ節内での交雑は容易であり、*Populus tremuloides* と *Populus tremula* の雑種の様に雑種強勢に注目した育種が進められた(OECD, 2000)。しかし、節間での交雑の難易は、組合せによって異なる。クロヤマナラシ節 (*Aigeiros*) とドロノキ節 (*Tacamahaca*) の間では容易に交雑できるが、ヤマナラシ節 (*Leuce*) とクロヤマナラシ節 (*Aigeiros*) 間、及びヤマナラシ節 (*Leuce*) とドロノキ節 (*Tacamahaca*) 間の交雑は非常に難しく、種子が出来ても発芽しない、あるいは実生が矮性となる。種間雑種を用いれば節間の交雑がより容易に行われる場合もある(OECD, 2000)。

また、日本国内には、ドロノキ節に属するドロノキ (*Populus maximowiczii* A. Henry)、ヤマナラシ節に属するヤマナラシ及びチョウセンヤマナラシが自生している。国内の分布域は、ヤマナラシは北海道・本州・四国・九州、チョウセンヤマナラシは北海道と本州(岩手県早池峰)とされている(北村・村田, 1979)。Zsuffa(1975)によれば、ギンドロはドロノキとの交雑は難しく、ヤマナラシお

よびチョウセンヤマナラシとは交雑可能である。ギンドロとヤマナラシやチョウセンヤマナラシとの雑種後代の稔性について調べられた報告はなされていないが、同じ節内の交雑であり、一定の稔性はある可能性が高い。

北海道・札幌市周辺では、ヤマナラシの開花時期は4月下旬であり(森, 1998)、ギンドロの開花時期は5月上旬(開本孝昭, 1975)であって、開花期が異なり、北海道夕張郡栗山町にある王子製紙(株)森林博物館構内では自然雑種は見られていない。つくば市周辺では、ヤマナラシの開花時期は3月下旬から4月上旬(森, 1998)、ギンドロの開花時期は4月上旬(森, 1998)と開花時期が重複する期間がある。しかし、つくば市周辺での自然雑種について報告された事例はない。

④花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ハコヤナギ属の花粉は球形で無口型に分類され、花粉の直径は31~37 μ mであり(幾瀬, 1956)、花粉の媒介方法は風媒による(OECD, 2000)。ギンドロについて花粉の飛散距離の報告はないが、アメリカ、オレゴン州内において10年生の *P. trichocarpa* $\times$ *P. deltoids* と *P. trichocarpa* との間で調べられた結果、群落によって異なるが受粉距離の平均(マイクロサテライトマーカーにより交雑が確認された種子親と花粉親の間の距離の平均値)は約0.1~1.1kmであった(DiFazio *et al.*, 2004)。このことより、ギンドロの受粉距離もこれと同程度と考えられる。

ヤマナラシとドロノキの場合、毎年花粉が生産され、結実する(森, 1998)。ドロノキの花粉の場合、採集時点での発芽率は18%と低いので花粉稔性は低く、また、1週間後にはほとんどが発芽しないので寿命は短いと推測される(近藤ら, 2004)。

ホ. 病原性

—

へ. 有害物質の産生性

*P. nigra*の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他感作用は、マメ科の植物等に比較して活性が弱いことがサンドイッチ法により示唆された(藤井, 1994)。

また、*P. × euroamericana* の葉をちぎり取ると食害などに対する自己防御のシステムが働いて52時間後にフェノール性化合物の濃度が増加するが、すぐ隣に置かれた無傷の植物体にもその情報が伝わり同様にフェノール性化合物の増加が起こる。このことより、揮発性物質による何らかの他感作用があることが示唆されている (Baldwin・Schultz, 1983)。

しかし、ギンドロを含むハコヤナギ属の種がその他の種類の有害物質を産生することは知られていない。

ト. その他の情報

①加害昆虫について

ハコヤナギ属の国内外の加害昆虫は以下の様である。なお、学名の左に和名を併記した種は日本に植栽されているハコヤナギ属の害虫として挙げられている種であり (小林・滝沢, 1991)、学名の左に英名を記した種は海外において害虫とされている種である (OECD, 2000)。

穿孔性害虫		
コウチュウ目 (Coleoptera)	ゾウムシ科 (Curculionidae)	ヤナギシリジロゾウムシ (<i>Cryptorhynchus lapathi</i>) Poplar/willow borer (<i>Cryptorhynchus lapathi</i>)
	カミキリムシ科 (Cerambycidae)	クワカミキリ (<i>Apriona japonica</i>) ゴマダラカミキリ (<i>Anoplophora malasiaca</i>) イタヤカミキリ (<i>Mecynippus publicornis</i>) ウスバカミキリ (<i>Megopis sinica</i>) Poplar borer (<i>Saperda calcerata</i>) (<i>Anoplophora glabripennis</i>)
	タマムシ科 (Buprestidae)	Bronze poplar borer (<i>Agrilus grandulatus lirogus</i>)
	ハマキガ科 (Tortricidae)	Cottonwood twig borer (<i>Gypsonoma haimbachiana</i>)
チョウ目 (Lepidoptera)	ハマキガ科 (Tortricidae)	Cottonwood twig borer (<i>Gypsonoma haimbachiana</i>)

食葉性害虫		
チョウ目 (Lepidoptera)	シャチホコガ科 (Notodontidae)	セグロシャチホコ (<i>Chlostera anastomosis orientalis</i>) ツマアカシャチホコ (<i>Chlostera anachoreta</i>) ナガグリモクメシャチホコ (<i>Harpyia lanigera</i>) Satin moth (<i>Gluphisia septentrionis</i>) poplar tent maker (<i>Ichthyura inclusa</i>)
	ヒトリガ科 (Arctiidae)	アメリカシロヒトリ (<i>Hyphantria cunea</i>)

	ヤガ科 (Noctuidae) メイガ科 (Pyralidae) イラガ科 (Limacodidae) ドクガ科 (Lymantriidae) タテハチョウ科 (Nymphalidae) ハマキガ科 (Tortricidae) カレハガ科 (Lasiocampidae) ホソガ科 (Gracillariidae)	ナシケンモン (<i>Apatele rumicis oriens</i>) オオキノメイガ (<i>Botyodes principalis</i>) ヒロヘリアオイラガ (<i>Latoia lepida</i>) モンシロドクガ (<i>Euproctis similis</i>) ヤナギドクガ (<i>Leucoma salicis</i>) Gypsy moth (<i>Lymantria dispar</i>) Viceroy butterfly larvae (<i>Basilarchia archippus</i>) Mourningcloak butterfly (<i>Nymphalis antiopa</i>) Pandemis leafroller (<i>Pandemis pyrusana</i>) large aspen tortrix (<i>Choristoneura conflictana</i>) forest tent caterpillar (<i>Malacosoma disstria</i>) aspen blotch miner (<i>Phyllocnistis populiella</i>)
ハチ目 (Hymenoptera)	ハバチ科 (Tenthredinidae)	ボブラハバチ (<i>Trichiocampus populi</i>) サクツクリハバチ (<i>Stauronema compressicornis</i>) Scented willow sawfly (<i>Nematus salicisodoratus</i>)
コウチュウ目 (Coleoptera)	ハムシ科 (Chrysomelidae)	ヤナギハムシ (<i>Chrysomela vigintipunctata</i>) ヤナギルリハムシ (<i>Plagiodera versicolora</i>) ドロノキハムシ (<i>Chrysomela populi</i>) Phratora leaf Beetle (<i>Phratora californica</i>) Flea beetle (<i>Altica</i> sp.) cottonwood leaf beetle (<i>Chrysomela scripta</i>) leaf beetle (<i>Zeugophora scutellaris</i>)

吸汁性害虫		
カメムシ目 (Hemiptera)	アブラムシ科 (Aphididae)	ヤナギクロケアブラムシ (<i>Chaitophorus saliniger</i>)

虫えい害虫		
ハエ目 (Diptera)	タマバエ科 (Cecidomyiidae)	ヤナギシントメタマバエ (<i>Rabdophaga Rosaria</i>) ヤナギエダタマバエ (<i>Rabdophaga rigidae</i>) poplar gall midge (<i>Prodiplosis morrisi</i>)
ハチ目 (Hymenoptera)	ハバチ科 (Tenthredinidae)	シバヤナギハバチ (<i>Pontania shibayangii</i>) カワヤナギハバチ (<i>Pontania</i> sp.)

②病害について

国内では、ハコヤナギ属の葉さび病を起こす病原菌類が5種類知られており、

そのうち最も大きな被害を与えるものとして、ポプラ葉さび病 (*Melampsora larici-populina*)がよく知られている(小口, 1970)。

また、OECD(2000)によると、海外では、ハコヤナギ属に関与するカビ類(真菌類)は非常に多様で、*P. tremuloides*の腐朽に関わるものだけでも250種以上知られている。ヤマナラシ節、クロヤマナラシ節、ドロノキ節について調べられているが、他の節については全く調べられていない。

ヤマナラシ 節には、胴枯病菌 (*Hypoxylon stem canker* ; *Hypoxylon mammatum* (Whal.) Miller])が広く分布しているが、特定の地域でのみ胴枯れ病を起こす。この菌はヨーロッパにおいては*P. trichocarpa*に対して、北アメリカでは様々な交雑クローンにおいて発病する。白色腐朽菌 (*Phellinus tremulae* (Bond.) Bond. & Borisov.)もヤマナラシ節に深刻な腐朽をもたらす。

③加害動物について

国内では、ウサギ・シカ・ネズミ類及びキツツキ類(コゲラ;*Dendrocopos kizuki* やアオゲラ;*Picus awokera* 等) が樹木を加害する動物として広く知られ、これらはポプラ類を加害すると考えられる。

OECD (2000) によると、海外では、多くの動物がポプラの樹皮・葉及び根を食する。主な加害動物はカンジキウサギsnowshoe hares (*Lepus americanus*)、ビーバー (*Castor canadensis*)、ヤマアラシ porcupine (*Erethizon dorsatum*)、ホリネズミ pocket gophers (*Thomomys bottae*)、オポッサム opossum (*Trichosurus vulpecula*)である。シカ、ムース、エルク (*Cervus elaphus*) などの有蹄類は若葉・新芽などを食べるだけでなく、樹皮をかんだり枝角でこすり取ったりして損傷を与える。牛や羊も再生した若葉・新芽などを食べて根に損傷を与える。交雑種の組み合わせによるほ乳類の反応についてはほとんど知られていないが、交雑種及び個々のクローン間で摂食の好みの多様性があるらしい。このことはほ乳類に対して防御的に働くフェノール性配糖体の濃度の違いによると考えられている。

マウスや野ネズミは若い植栽ポプラに対して重大な損傷を与えうる。また、多くの種類の鳥類がはびこり、あるものは摂食によって損傷を与える。すなわちエリマキライチョウ ruffed grouse やホソオライチョウ sharp-tailed grouse は新芽を食し、エリマキライチョウ ruffed grouseは夏の間に葉を食する。胸が赤褐色 (Red-breasted) 及び腹部が黄色 (yellow-bellied) のシルスイキツツ

キ類 sapsuckers は樹皮の虫をあさるときに孔を開けて幹を傷つける。カラス、タカ、ハト類は、葉のついた生枝を巣材として使うために折り取って持ち去るが、その多くはマツ、ヒノキ、カラマツ等の針葉樹である (INAXギャラリー, 1993)。しかし、鳥類にとって生枝を折り取ることは非常に困難で、その頻度は非常に低く (樋口・森下, 2000)、ギンドロのように針葉樹に比べて生枝を折り取るために止まる枝が少ない樹種では生枝を鳥類が持ち去ることは考えにくい。

④その他

組換えギンドロを用いた隔離ほ場試験が行われた例はない。ギンドロの雑種を含む他のハコヤナギ属樹種についてヨーロッパ、アメリカ、カナダ及び中国では現在多数の隔離ほ場試験が進行中である (別紙4)。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

本組換えギンドロは、コウジカビ (*Aspergillus aculeatus*) 由来のキシログルカナナーゼを構成発現している。このことにより、セルロースマイクロフィブリルを架橋しているキシログルカンが恒常的に分解される。その結果、細胞の束縛がゆるめられることにより細胞の伸長が促進され、初期成長量が増加する。また、細胞膜上のセルロース合成酵素は架橋による抑制・束縛を受けなくなるため、セルロース生合成が活性化されてセルロース含量が増加するとともに比重も増加する。

セルロース含量と比重が高いという本組換えギンドロの特徴はパルプ原料として適した性質である。本申請の隔離ほ場での栽培の結果により、本組換えギンドロの性質がパルプ原料としての利用に適したものであることが確認され、使用期間中の管理を適切に実施すれば生物多様性影響が生じるおそれがないと判断されれば、本組換えギンドロの実用的使用について検討する予定である。具体的には、平地でのほ場栽培など管理の容易な条件で栽培し、開花樹齢に達する前に伐採してパルプ原料として利用することを想定している。

(1) 供与核酸に関する情報

イ. 構成及び構成要素の由来

供与核酸を含んだプラスミドの構成は、pBI121 binary vector (AF485783) (Chen *et al.*, 2003) 内の *Hind*III-*Sac*I の領域を図2に示した *Hind*III-*Sac*I

断片と置き換えた構成と同等である。供与核酸の構成及び各構成要素の由来、塩基数及び塩基配列については表 1 に示した通りである。

表 1 プラスミド pBE2113-AaXEG2 の各構成要素.

構成要素	由来	塩基数 (bp)	塩基配列 (GenBank 登録番号)	機能
カナマイシン耐性選抜マーカースセット (Km ^r)				
Pnos	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) LBA4404株	307	AF485783	ノパリン合成酵素遺伝子nos 5' プロモーター領域
nptII	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) トランス ポゾンTn5	795	AF485783	ネオマイシンホスホトランス フェラーゼII (NPTII) 遺伝子 (Neomycin phosphotransferase typeII) (カナマイシン耐性遺伝子)
Tnos	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	253	AF485783	ノパリン合成酵素遺伝子nos 3' 非翻訳領域終止シグナル (転写ターミネーター及び mRNAポリアデニル化シグナ ル)
AaXEG2遺伝子発現カセット				
E12	カリフラワーモ ザイクウイルス (CaMV)	654	図 2, 別紙 5	35Sプロモーター上流領域E12 配列 (-419~-90 bp の 2 回繰 り返し配列)
P35S	カリフラワーモ ザイクウイルス (CaMV)	90	図 2, 別紙 5	35Sプロモーター領域 (-90~ -1 bp)
Omega	タバコモザイク ウイルス (TMV)	71	図 2, 別紙 5	5' 非翻訳領域エンハンサー Ω配列
PopCell1 Signal peptide	<i>Populus alba</i> L. 雌株: ヤナギ科 ハコヤナギ属ギ ンドロ	81	D32166	セルラーゼ PopCell1 シグナ ルペプチド (翻訳開始点のメ チオニンからロイシンまでの 27 アミノ酸をコードしてい る配列 (Met1-Ala27) を含

				む)。
<i>AaXEG2</i>	糸状不完全菌類 コウジカビ属菌 (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	709	AY160774	キシログルカナーゼ <i>AaXEG2</i> (Park <i>et al.</i> , 2004)
Tnos	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	253	AF485783	ノパリン合成酵素遺伝子nos 3' 非翻訳領域終止シグナル (転写ターミネーター及び mRNA ポリアデニル化シグナ ル)
その他の構成要素				
Right Border (RB)	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) Ti プラスミド pTiT37	357	AF485783	T-DNA の右側境界配列(25bp) を含むDNA断片で、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 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 シグナルとして機能する。
Left Border (LB)	<i>Rhizobium radiobactor</i> (旧名称 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) Ti プラスミド pTiA6	442	AF485783	T-DNA の左側境界配列(25bp) を含むDNA断片で、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへT-DNA領域 (RBとLBで挟まれた塩基配 列) の導入の終結点シグナル として機能する

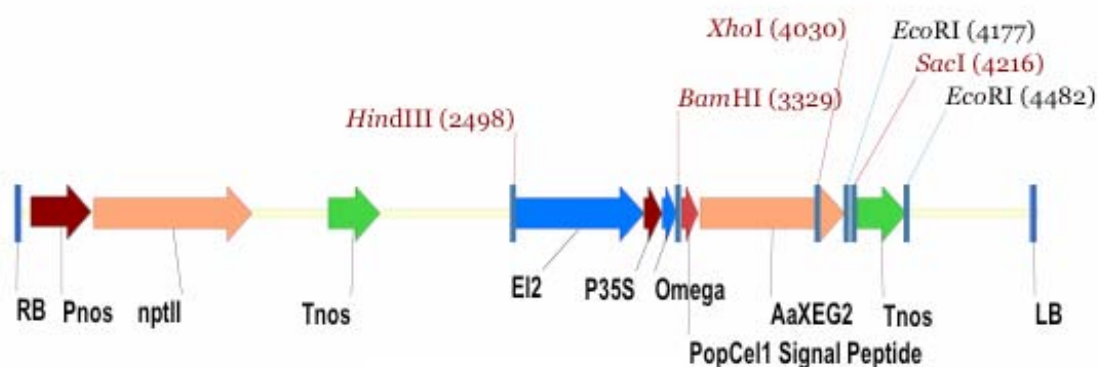


図2 高セルロース含量ギンドロの作成に使用したプラスミド
pBE2113-AaXEG2 の T-DNA

ロ．構成要素の機能

①供与核酸の各構成要素の機能は表 1 に示した通りである。

○供与核酸であるPopCell シグナルペプチドは、ギンドロから単離したセルラーゼ*PopCell* cDNAの翻訳開始点メチオニンからロイシンまでの27アミノ酸をコードしている配列 (Met1-Ala27) である (Nakamura *et al.*, 1995)。その機能は、下流にあるコウジカビ (*A. aculeatus*) 由来キシログルカナーゼ (AaXEG2) と融合タンパク質の形で発現してキシログルカナーゼタンパク質を細胞質から細胞膜を通して外側の細胞壁に輸送することである。なお、細胞質から細胞壁へ移動するときにシグナルペプチドの配列部分は切断されて除去される (von Heijne, 1983)。

○コウジカビ (*A. aculeatus*) 由来のキシログルカナーゼXEGは、植物細胞壁多糖ヘミセルロースを構成する成分の一つであるキシログルカンの特異的基質とする酵素である (Pauly *et al.*, 1999)。AaXEG2も、コウジカビ (*A. aculeatus*) 由来のキシログルカナーゼであり、XEGとは1アミノ酸残基のみが異なるアイソザイムの関係にあり、XEGと同様にキシログルカンの特異的基質とする。植物細胞には、広くキシログルカナーゼ活性が存在していることがすでに知られており、エンドウでは、すでにタンパク質が精製されているが (Matsumoto *et al.*, 1997)、遺伝子は同定されていない。また、一般に植物自身が持っているキシログルカナーゼ活性はカビやバクテリアのものよりも弱いため、より強い活性を持つタンパク質をコードしている遺伝子をコウジカビ (*A. aculeatus*) から見だして利用した。コウジカビ (*A. aculeatus*) は、「食品衛生法に基づく添加物の表示等」に記載されているように、インベルダーゼやヘミセルラーゼ等の食品添加物を得ることに用いられており、これまで安全に産業利用等がなされている。また、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の規定に基づき認定宿主ベクター系等を定める件」(平成18年2月6日文部科学省告示第19号) 別表第2において、区分1-省令第三条の表第一号の文部科学大臣が定める微生物等 (1) に該当し、実験分類はクラス1に属しており、ヒトを含む哺乳動物に対する病原性はないとされている。

○供与核酸であるカナマイシン耐性遺伝子 *nptII* は、大腸菌トランスポゾンTn5由来の *neomycin phosphotransferase type II* 遺伝子をコードしており、カナ

マイシンなどの抗生物質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不活性化させる。これらカナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質は、リボソーム上のタンパク質と特異的に結合しタンパク質の合成を阻害することによって細胞を殺すが、NPTII タンパク質によって不活化されるとリボソーム上の標的タンパク質と結合できなくなり、この遺伝子を発現する細胞はこれらの抗生物質存在下でも生育できるようになる。

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同一性を有する場合はその旨。

組換えギンドロで新たに産出されるタンパク質の同一性検索によるアレルギー性の可能性の判断は、「Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22-25 January 2001」に従った。1)既知のアレルギー性を持つタンパク質とタンパク質全体に渡っての高い同一性があるかどうか、2)連続する80アミノ酸残基のうち28個(35%)以上既知のアレルギー性タンパク質と同じアミノ酸残基を含むかどうか、3)連続する6アミノ酸残基が既知のアレルギー性タンパク質内に含まれるかどうか、の3点について検索を行い、いずれかの検索で陽性であったものについてのみ、同一性検索の結果アレルギー性を示す可能性があるとして判断することとして、SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins, The University of Texas Medical Branch (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>, Last Modified: January 25, 2005) からアレルゲンエピトープ検索を行った。その結果、いずれのタンパク質も既知のアレルゲンとの同一性を示さなかった。

また、コウジカビ(*A. aculeatus*)由来キシログルカナーゼ(AaXEG2)及びPopCell1シグナルペプチドの塩基配列及びアミノ酸配列をBLASTn及びBLASTp検索したところ、花粉アレルゲンとして知られている植物細胞壁関連タンパク質(エクспанシン・エクステンシン・ペクテートリアーゼ・ポリガラクトナーゼ)を含む既知のアレルゲン遺伝子及びタンパク質との同一性は認められなかった。さらに、*nptII*遺伝子に関しては多数の使用例があり、何らかの影響があることはこれまで報告されていない。したがって、本タンパク質産物にはアレルギー性がないことが示唆された。

③宿主の代謝系を変化させる場合はその内容。

コウジカビ (*A. aculeatus*) のキシログルカナーゼをギンドロで発現させることによって、ギンドロを含む植物が一般的に持っているキシログルカナーゼ活性が20倍以上に増強され（表2）、細胞壁多糖のキシログルカンの分解すなわち代謝が増大する。その結果、ペクチン含量には変化がないが、細胞壁に結合しているキシログルカンの90%以上が分解され、セルロース含量が約10%増加した（表2）。また、非組換えギンドロの材の比重は0.31であったのに対し、組換えギンドロの比重はtrg300-1、trg300-2の両系統ともに0.36となり、非組換えギンドロに対して約16%増加した。なお、キシログルカナーゼはキシログルカンのみを特異的基質とし、キシログルカンの分解以外の代謝系には直接影響しないと考えられる。

表2 キシログルカナーゼ活性、キシログルカン含量、セルロース含量の比較

	キシログルカナーゼ活性 (unit/mg protein)	キシログルカン含量 (μ g/g 乾燥重量)	セルロース含量 (mg/g乾燥重量)
組換えギンドロ (trg300-1)	234	5.3 $\pm$ 0.5	467 $\pm$ 12
組換えギンドロ (trg300-2)	283	5.9 $\pm$ 0.7	458 $\pm$ 21
非組換えギンドロ	9	82.0 $\pm$ 9.0	420 $\pm$ 15

キシログルカナーゼ活性は細胞壁結合画分の値、キシログルカンとセルロース木部の値を示す。
(閉鎖系温室でのデータ)

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

本組換えギンドロの作出に用いたバイナリーベクター pBE2113-GUS (Mitsuhashi *et al.*, 1996) は、バイナリーベクター pBIN19 (Bevan, 1984) を原形として作られた pBI121 (Chen *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 1987) に由来し、その T-DNA 領域 (RB と LB で挟まれた植物に伝達される領域) 内の一部分、P35S-GUS 領域 (*Hind*III-*Eco*RI 断片) を *Hind*III-EI2-P35S-Omega-GUS-*Eco*RI 断片で置き換えたものであ

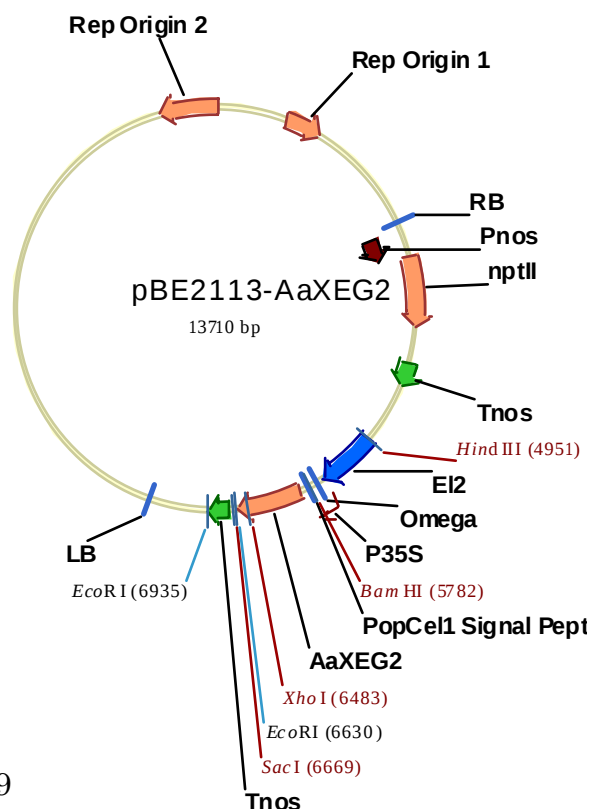


図3 プラスミド pBE2113-AaXEG2

る。このGUS遺伝子の部分を供与核酸である*PopCell signal peptide* 配列及び*AaXEG2*と置き換えた構築物がpBE2113-AaXEG2である（図3）。

ロ．特性

①ベクターの塩基数及び塩基配列

本ベクターの全塩基数は13,710 bpである。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。ベクターの全体図は図3に示した。

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に列記した。バイナリーベクター pBE2113の右側境界配列(RB)と左側境界配列(LB)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。

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

上記pBE2113-AaXEG2ベクターのT-DNA 領域を導入した。宿主内に移入された核酸全体の構成要素については表1及び図2に示した。制限酵素による切断部位については図3に示した。

ロ．宿主内に移入された核酸の移入方法

pBE2113-AaXEG2中のT-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入した。

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

無菌条件下において生育させたギンドロ幼植物体の葉を0.5～1.0 cm角に切りとった葉切片に pBE2113-AaXEG2を保持したアグロバクテリウムを無菌条件下で感染させ、2日間共存培養させた後、500mg/Lカルベニシリンを除菌のために含有させながら選抜薬剤として50 mg/Lカナマイシンを加えた茎頂誘導培地上で、2週間ごとに新鮮な培地に移植しながら選抜した。

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

約2ヶ月後に誘導された組換えギンドロの苗を500mg/Lカルベニシリンを含むがカナマイシンを除いた1/2MS培地に移植し、アグロバクテリウムの除菌を継続しつつ1ヶ月毎に新鮮な培地にさし木増殖によって移植しながら継代培養した。アグロバクテリウムの菌体の残存の有無については、約1年後に組換えギンドロの茎葉（約200mg）を採取し、滅菌蒸留水1mlを加えて無菌条件下、乳鉢を用いてすりつぶし、ナイロンメッシュで濾過した濾過液を50 mg/Lカナマイシンを含む培地上に塗布し、28℃、48時間培養したところ、細菌の増殖は全く見られなかった（別紙6）ことから、残存していないことを確認した。

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及び系統樹

アグロバクテリウムが残存していないことを確認した再生個体系統について、挿入遺伝子から産生されたAaXEG2タンパク質の酵素活性解析により幹の細胞壁画分におけるキシログルカナナーゼ活性が20倍以上上昇した2個体を選抜した（表2）。本組換えギンドロは、平成13年に作出し、平成15年1月より閉鎖系温室にて約2年間生育させた。そして、平成17年5月より特定網室に移した。本組換えギンドロは栄養増殖（さし木増殖）によって増殖し、閉鎖系温室に移してから2度のさし木増殖を経ている。

なお、本件の承認申請の単位は、組換えた当代の栄養繁殖に由来するもののみである。

(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。すなわち、特定網室で生育させた組換えギンドロの幼葉20-25mgから抽出したゲノムDNA 5 µgを制限酵素HindIIIで完全切断し、0.8%アガロースで電気泳動した。AaXEG2 cDNA全長をPCR-DIGラベルしたプローブを調製し、化学発光により検出した（別紙7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1と推定された（別紙7の図1）。また、移入された核酸は2回のさし木による栄養繁殖を経た複数の個体において保持されていた。

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

—

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

2回のさし木による栄養繁殖で得られた複数の個体においてウエスタンブロットを行った結果、導入遺伝子産物のタンパク質の発現が維持されていることが確認された（別紙7の図2）。その上、非組換え体と比較して厚く小さく濃い緑色を呈する葉の形態（図5）も安定して維持されていた。

ホ. 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等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

なし

(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

植物は広くキシログルカナーゼ活性を持っており、独自の遺伝子も保持していると考えられるが、コウジカビ(*A. aculeatus*)由来のキシログルカナーゼは植物由来の遺伝子やタンパク質との配列の違いから、挿入遺伝子の配列を用いたサザンハイブリダイゼーションにより特異的に検出可能であり、その検出感度については、幼葉 約20～25mg から抽出したゲノムDNA約5 μ gを用いれば検出可能である（別紙7）。また、そのタンパク質産物については、その抗体を用いたウエスタンブロットにより特異的に検出可能であり、幼葉 100～200 μ g から抽出した総タンパク質 3 μ gを用いれば検出可能である（別紙7）。導入遺伝子に特異的なプライマー（AaXEG2 ; CGGTGACTTCACCCTGTACAACG、GGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTCC）の組み合わせにより、PCRによって導入遺伝子が

ら推測されるサイズのバンドを特異的にゲノムDNAより検出した（別紙7）。

(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

移入された核酸の複製物の発現によりコウジカビ (*A. aculeatus*) のキシログルカナーゼであるAaXEG2タンパク質が、ギンドロの細胞質及び細胞壁に存在することが確認された。すなわち、閉鎖系温室で生育した組換えギンドロの茎から、細胞外、細胞質及び細胞壁、それぞれの画分のタンパク質を抽出してAaXEG2抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、移入された核酸の生産物であるAaXEG2タンパク質が細胞質及び細胞壁の画分で検出された（図4）。このコウジカビ (*A. aculeatus*) のキシログルカナーゼをギンドロで発現させることによって、ギンドロを含む植物が一般的に持っているキシログルカナーゼ活性が20倍以上増強され（表2）、細胞壁多糖のキシログルカンの分解すなわち代謝が増大する。その結果、ペクチン含量に変化がないが、細胞壁に結合しているキシログルカンの90%以上が分解され、初期成長が1.4倍に増加するとともにセルロース含量が10%増加する (Park *et al.*, 2004)。また、培養室内でさし木苗を90度横倒しにして育てたところ、あて材形成による姿勢制御が著しく阻害されていることがわかり、さらに、閉鎖系温室において樹幹に傾斜を与えて形成されたあて材のひずみ量を測定したところ、非組換えギンドロと比較して引張の成

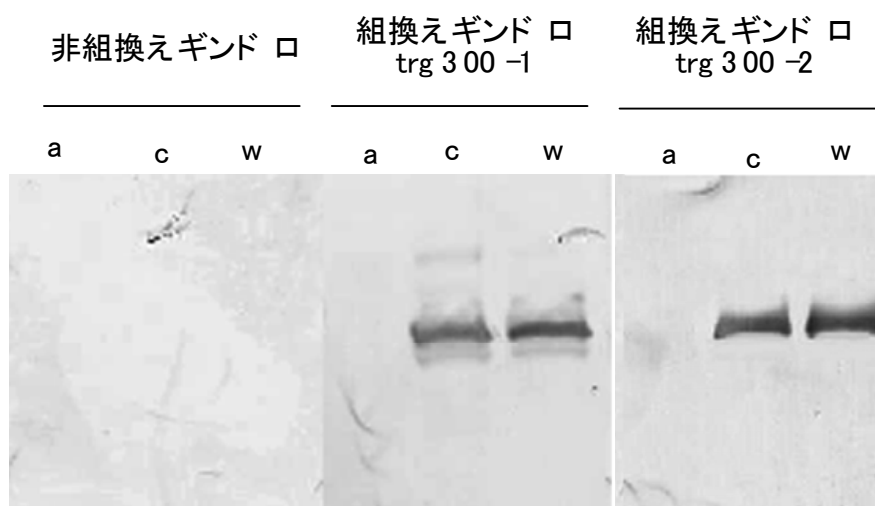


図4 移入された核酸の発現により生産されるAaXEG2タンパク質のウエスタンブロッティングによる検出。a；細胞外画分、c；細胞質画分、w；細胞壁画分。

長応力が約30%弱くなっていた。

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

葉の形態は、強光条件のもとで形成される陽葉に類似した形態を示す(図5)。すなわち柵状組織が肥大し、細胞間隙が小さくなった結果、葉は厚く小さく濃い緑色を呈し、乾重量にして約 1.3倍増加した。また、順化後1ヶ月の初期成長量は1.4倍に増加した(Park *et al.*, 2004)。しかし、その後の生長量は組換え体、非組換え体の間で顕著な差は見られなくなった(別紙8)。傾斜を与えて生育させると、あて材は形成するが、あて材の発生する成長応力が弱く、姿勢制御能力が非組換え体に比べて劣っていた。

②生育初期における低温または高温耐性

非組換えギンドロの場合、側枝を用いた凍結試験の報告により、 -50°C 以下に致死限界を持つことが示されている(館, 1970)。また、高温耐性についても、大阪万博記念公園などに植栽され現在も生育していることから、日本の真夏の気温に十分耐えうるが夏の暑さは苦手と九州及び四国南部での植栽は避けた方が良いと言われている。組換えギンドロを用いた試験は行っていないが、以上の知見により、本組換えギンドロにおいても同様の低温、高温耐性を示すと考えられる。

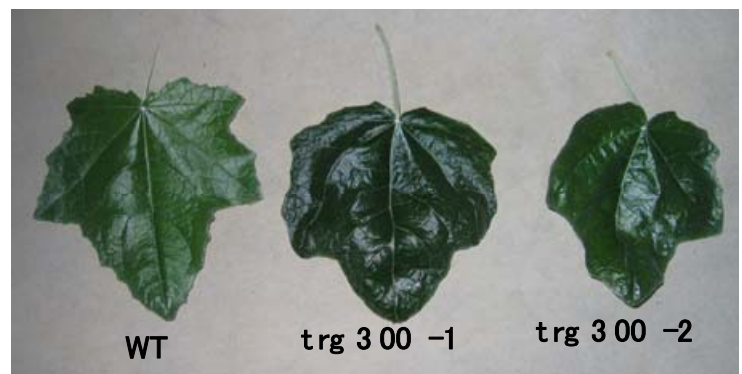


図5 非組換え体(WT)と組換え体(trg300-1、trg300-2)の葉の形態の比較

③成体の越冬性または越夏性

別紙4に示すように、ハコヤナギ属の遺伝子組換え体の野外試験は多数行われているが、越冬性や越夏性が宿主と比較して変化したという報告はない。これらのことから、本組換えギンドロは宿主と同等の越冬性及び越夏性を示すと考えられる。

④花粉の稔性及びサイズ

ギンドロが初めて花芽を付けるまでには10～15年を要する(Schreiner, 1974)。実際、温室内で育てた1～4年生の組換え体、非組換え体では開花は見られなかった。よって、本項目については調査していない。また、今回第一種使用等を申請する本組換えギンドロは、栽培予定期間終了後に5年生となるが、栽培予定期間中に花芽を形成して結実することはないと考えられる。花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどして交雑を防止する措置をとる。

⑤種子の生産性、脱粒性、休眠性及び発芽率

ギンドロが初めて花芽を付けるまでには10～15年を要する(Schreiner, 1974)。実際、温室内で育てた1～4年生の組換え体、非組換え体では開花は見られなかった。よって、本項目については調査していない。また、今回第一種使用等を申請する本組換えギンドロは、栽培予定期間終了後に5年生となるが、栽培予定期間中に花芽を形成して結実することはないと考えられる。花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどして交雑を防止する措置をとる。なお、Bt遺伝子に移入した*Populus nigra*の種子の人工環境下での発芽率は約70%と高いが、自然環境下での種子の寿命は2週間と短く、実生の生存率も低かった(Lu *et al.*, 2006)。これらは、ハコヤナギ属に属する種の特長であり、Bt遺伝子の移入による変化は認められなかったことを示している。

⑥交雑率（交雑可能な近縁の野生植物が我が国において生育している場合に限る。）

ギンドロが初めて花芽を付けるまでには10～15年を要する(Schreiner, 1974)。実際、温室内で育てた1～4年生の組換え体、非組換え体では開花は見られなかった。また、今回第一種使用等を申請する本組換えギンドロは、栽培予定期間終了後に5年生となるが、栽培予定期間中に花芽を形成して結実することはないと考えられる。花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどして交雑を防止する措置をとる。よって、本項目については調査していない。なお、Bt遺伝子に移入した*Populus nigra*では、花粉飛散による、交雑可能な距離は500mであり、ハコヤナギ属の花粉飛散距離と同等であることが報告されている(Lu *et al.*, 2006)。

⑦ 有害物質の産生性

○根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性

組換えギンドロ及び非組換えギンドロを閉鎖系温室内にてさし木増殖により約3ヶ月生育させた植物体を用い、プラントボックス法(藤井, 1991)により根から分泌される他感物質による他感作用の検定を行った。検定植物としてレタス(グレートレークス366)種子を用いた。ギンドロ各系統について4復検定し、分散分析による有意差検定を行ったところ、図6に示したとおり、5%の危険率で組換えギンドロ及び非組換えギンドロとの間で有意差は認められなかった。

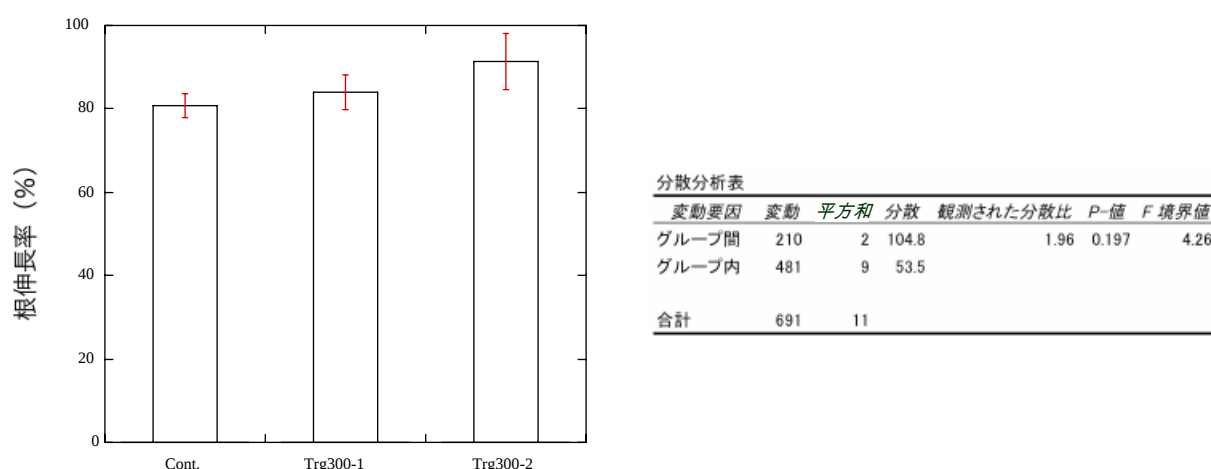


図6 根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性

レタス種子のみをプラントボックスで生育させたときの根の伸長量を100としてその伸長率で示した。

○根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性

特定網室において組換えギンドロ及び非組換えギンドロを約5ヶ月間栽培したポットからランダムにサンプルを採取し、それぞれから根圏土壌30gを採取し、(株)環境研究センター(つくば市)に依頼し、希釈平板法(土壌環境分析法編集委員会, 1997)により、乾燥土壌1g中の糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数(CFU/g)に差異があるかどうかを検定した。その結果、図7に示したとおり、各系統について6復検定し、分散分析による有意差検定を行ったところ、5%の危険率で組換えギンドロ及び非組換えギンドロとの間で有意差は認められなかった。

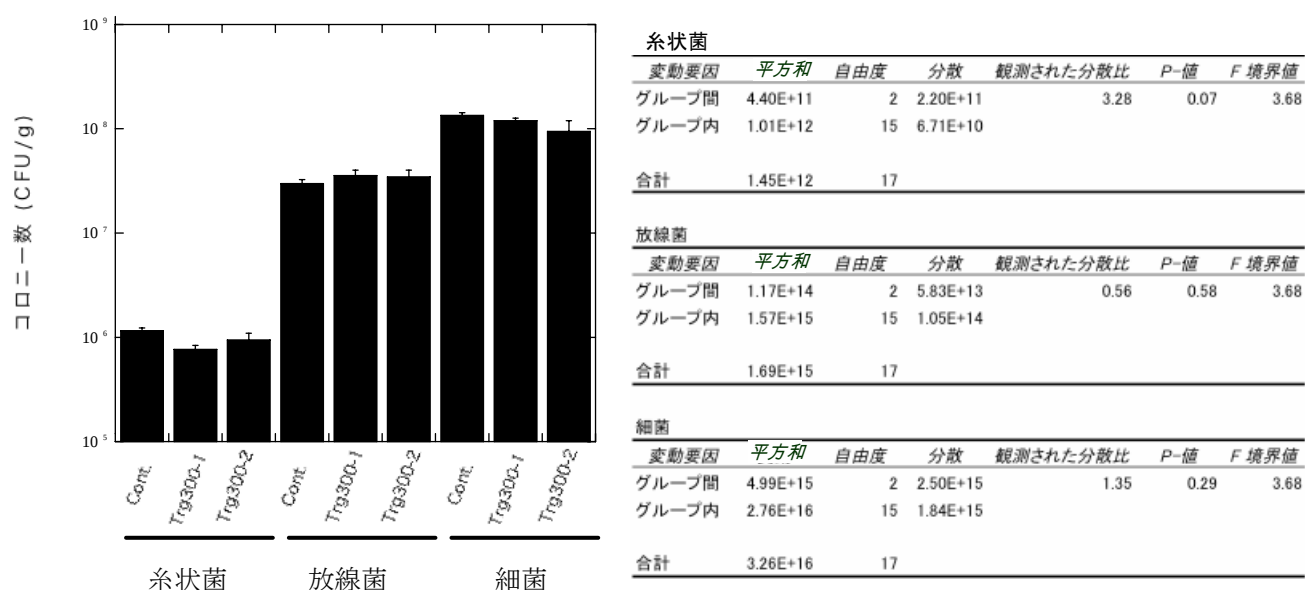


図7 根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性（希釈平板法による）

○ 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

特定網室において約5ヶ月間栽培した組換えギンドロ及び非組換えギンドロの落葉を用いて鋤込み法により検定した(Iqbal *et al.*, 2004)。60℃、24時間乾燥した落葉を、180gの乾燥土壌に対して0, 1, 2, 4 g (0, 0.6%, 1.14%, 2.3%)の割合で混合した土壌を6×6 cmの植物培養用ポットに移し、検定植物としてレタス（グレートレークス366）種子を6個×3列播種し25℃にて生育した。4日後に間引きをして2週間後に各処理区4～8個体を検定し分散分析による有意差検定を行った。その結果、図8に示したとおり、5%の危険率で組換えギンドロ及び非組換えギンドロとの間で有意差は認められなかった。

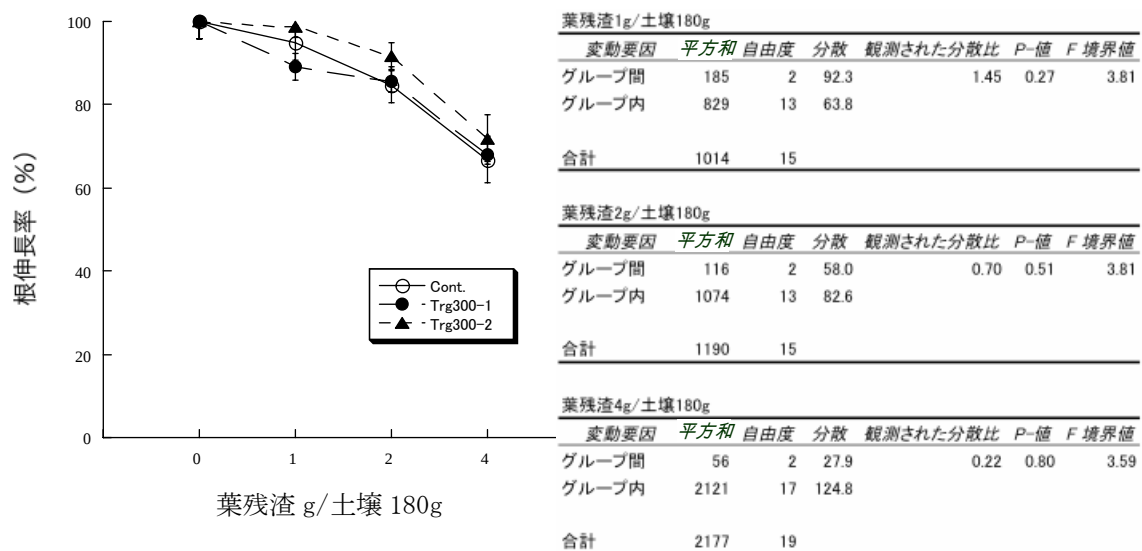


図8 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものの産生性（鋤込み法による）

○宿主の属する分類学上の種が産生するその他の種類の有害物質
その他の種類の有害物質の産生は知られていない。

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番地1

名称：独立行政法人 林木育種センター 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成23年12月31日まで

イ 隔離ほ場の施設

① 部外者の立入りの防止及び折れた枝の飛散防止のために、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。

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土並びに本遺伝子組換えギンドロの植物体の一部が付着する可能性のあ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い場を設置してい

るとともに、当該組換えギンドロの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統等に設置している。

ロ 隔離ほ場での作業要領

①本遺伝子組換えギンドロ及び比較対照の非組換えギンドロ以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを最小限に抑える。

②本遺伝子組換えギンドロを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該組換えギンドロが漏出しない構造の容器に入れる。

③②により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えギンドロの栽培終了後、当該組換えギンドロ及び比較対照の非遺伝子組換えギンドロはチェーンソー等を用いて伐倒し丸太に裁断後、隔離ほ場内のコンクリート打ちのチップ集積場に積み置きし、乾燥させることにより不活化処理をする。その後にチップとして隔離ほ場内に鋤き込む。また、落枝・落葉なども作業可能な範囲で回収し、乾燥もしくは焼却により不活化する。残存する根系は、伐採後の最初の6月頃まで根萌芽を成長させた後に葉に散布するだけで根を枯死させることができる除草剤であるグリホサートを葉面散布するとともに切り株へ除草剤グリホサートを注入することにより不活化する。

④ 本遺伝子組換えギンドロの一部分が高さ8mのフェンスを超えるおそれが生じた場合は、フェンスを越えないようにすみやかにその部位を切除する。

⑤花芽形成が認められた場合は、これらをすみやかに切除するなどして、交雑防止の措置を行う。

⑥ 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ギンドロが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

⑦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。

⑧ ①から⑦に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

(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

モニタリング計画書を参照

(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い。

(6) 国外における使用等に関する情報

京都大学とイスラエルCBD社 (<http://cbdtech.com>) との共同研究で本実験に用いたコウジカビ (*A. aculeatus*) 由来キシログルカナーゼを導入した組換えユーカリの隔離ほ場試験が2006年以降に計画されている。

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

ギンドロを含むヤマナラシ節の樹種の種子は寿命が短く、発芽に適した土壌においても発芽することは稀である (OECD, 2000)。また、きわめて陽性の強い樹種である上に、種子、芽生えともにわずかな乾燥にも弱く、土壌の移動するところでは定着できないので、実生による天然更新地は限定される (森, 1998)。ヤマナラシ節の天然更新の多くは栄養繁殖により行われ、遷移の途中相で優占する陽樹であり、山火事等により主幹が損傷を受けた場合に根萌芽により一斉更新し、優占樹種となる。しかし、時間の経過とともに他の樹種が侵入し、個体数は減少する (渡邊, 1994 ; 竹原, 1995)。これらの特性はギンドロが典型的なパイオニア植物であることを示している。

本組換えギンドロは、非組換えギンドロと比べ、セルロース含量が増加し、比重も高くなるとともに、引張あて材形成による姿勢制御能が低下するなどの相違がある。しかしながら、このような性質が、自然環境下において当組換えギンドロの競合における優位性を宿主以上に高めるとは考えにくい。また、本組換えギンドロは非組換えギンドロと比較して葉が厚く小さく濃い色を呈しているので、光合成の特性が違い、そのことに起因して生長量に変化することが考えられた。しかし、別紙8に示すように組換えギンドロのさし木1ヶ月後の初期成長量は大きいものの、その後は宿主と差が認められなくなったので、競合における優位性が宿主以上に高まるとは考えにくい。さらに、本組換えギンドロ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。

ギンドロの栄養繁殖の能力は旺盛でその様式は、第一の1の(3)のニの②に示したように根萌芽である。根萌芽は地表10~20cm内外の深さを横に走る水平根から発生するが、4年生程度のさし木苗では数本のやや太い垂下根と斜出根が分岐するが、細根と小径根の分岐は少なく (荏住, 1987)、水平根はそれほど発達しないと考えられる。本申請においては、1年生のさし木苗である組換えギンドロを地下1mの擁壁を設けた隔離ほ場で5年間栽培し、栽培終了後には除草剤グリホサートにより根系を不活化する。また、通常ギンドロの開花は10~15年生以降であり、5年に限られる本隔離ほ場栽培中に開花する可能性は低い。

さらに仮に花芽分化した場合はこれらをすみやかに切除するなどして、交雑防止の措置を行う。したがって、第一種使用規程に従い組換えギンドロを隔離ほ場で栽培する限り、組換えギンドロが隔離ほ場外で繁殖するおそれはない。

以上から、本組換えギンドロは、非組換えギンドロに比べ、セルロース含量が増加することなどにより、競合における優位性が高まるとは考え難いばかりでなく、本申請においては、隔離ほ場での栽培に限定され、隔離ほ場外にて野生化しないよう措置を講ずることから、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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えギンドロ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

ギンドロを含むハコヤナギ属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。

本組換えギンドロに導入した遺伝子の産物は植物体内のキシログルカンの特異的に標的として働くものであり有害物質に該当せず、キシログルカンを分解する以外は他の代謝系に直接影響しないと考えられる。第一の2の(1)のロ.の②に示すようにアレルギー性も知られていない。また、第一の2の(6)のロ.の⑦に記したとおり、本組換えギンドロと非組換えギンドロとの比較から、プラントボックス法、鋤込み法及び希釈平板法、いずれの手法を用いた場合も、有害物質の産生性に有意差が検出されず、栽培土壌中の主要微生物の集団頻度においても有意差が検出されなかった。

これらのことより、有害物質の産生性において本組換えギンドロより直接的な影響を受ける可能性が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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本組換えギンドロ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。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

日本国内には、ドロノキ節に属するドロノキ及びヤマナラシ節に属するヤマナラシとチョウセンヤマナラシが自生している。ギンドロはドロノキ節に属するドロノキとの交雑は難しいが、ヤマナラシ節に属するヤマナラシ及びチョウセンヤマナラシとは交雑可能である（図1参照）。また、ヤマナラシ節内の種間交雑種とも交雑可能であると考えられる。これらのことより本組換えギンドロが開花樹齢に達するまで屋外で栽培した場合、本組換えギンドロより交雑性において影響を受ける可能性のある野生動植物としてヤマナラシ、チョウセンヤマナラシ及びヤマナラシ節内の種間交雑種が挙げられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

ヤマナラシ、チョウセンヤマナラシ又はヤマナラシ節内の種間交雑種とギンドロとが交雑した場合の稔性についての報告はないが、これらの種間の交雑は同一節内の交雑であることから、一定の稔性を有する可能性が高い。このことより、本組換えギンドロに移入された核酸がヤマナラシ節の種や節内の雑種に伝達されることが考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

チョウセンヤマナラシの国内の分布域は、北海道と本州の一部（岩手県早池峰）である（北村・村田，1979）ことより、野生のチョウセンヤマナラシと隔離ほ場で栽培する本組換えギンドロが交雑することはない。一方、ギンドロとヤマナラシの交雑率について調べられた具体的なデータはないが、北海道・札幌市周辺では、ヤマナラシの開花時期は4月下旬であり（森，1998）、ギンドロの開花時期は5月上旬（開本孝昭，1975）であって、開花期が異なり、王子製紙（株）森林博物館構内（北海道）では自然雑種は見られない。つくば市周辺では、ヤマナラシの開花時期は3月下旬から4月上旬で、ギンドロの開花時期は4月上旬（森，1998）と重複する期間があるが、開花期が重複する場合においてもヤマナラシとギンドロの自然雑種について報告された事例はない。しかし、別紙2に記すように交雑が否定できない範囲内にヤマナラシは自然に生育している可能性がある。また、ヤマナラシ節内の種間交雑による雑種も自然に生育している可能性がある。

なお、ギンドロは開花までに10～15年を要する（Schreiner，1974）が、隔離ほ場で栽培する組換えギンドロはさし木による1年生であるので、栽培終了時の組換えギンドロは5年生となる。したがって、栽培予定期間中に本組換えギンドロが花芽を形成することはないと考えられる。しかしながら、本組換えギンドロが宿主と比較して開花樹齢が早まらなないと断定することはできないことから、花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどして交雑を防止する措置をとる。このため、本組換えギンドロが野生種と交雑する可能性はない。

(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、本組換えギンドロ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。

4. その他の性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本組換えギンドロは、非組換えギンドロに比較してセルロース含量が増加すると共に、葉が陽葉に類似した形態を示す（Park *et al.*，2004）など宿主と異なる特性を有する。ギンドロを食べる野生動植物等として、チョウ目及びコウチュウ目の食葉性害虫や穿孔性害虫等がある。また、ギンドロに被害をもたらす病害も知られている。これら病虫害の被害の程度が本組換えギンドロと宿主

の間で異なる可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本組換えギンドロに対する病虫害による被害の程度が下がるのか、逆に被害程度が上がるのかは現時点では不明である。被害が大きくなり病虫害の原因となる害虫や病原菌類の密度が増加した場合に、周囲に生育する植物が害虫や病原菌類の増加により生育環境が変化するなどの、間接的影響を受ける可能性を完全に否定することはできない。そこで、本組換えギンドロを隔離ほ場で栽培する期間中に本組換えギンドロに発生する病虫害の種類と被害の程度を非組換えギンドロと比較する。また、ハコヤナギ属を含む100種以上の樹種を加害する食葉性の害虫であるチョウ目ヒトリガ科のアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) 等の害虫に本組換えギンドロを摂食させた時の影響を調査する。

(3) 影響の生じやすさの評価

本組換えギンドロに対する病虫害の被害が非組換えギンドロと異なる場合に、本組換えギンドロが間接的に周囲環境に影響を及ぼすことを完全には否定することはできない。しかし、本組換えギンドロは、限定された環境である隔離ほ場での栽培であることに加え、隔離ほ場周辺は管理された樹木試験地が主であり、ギンドロの病虫害を引き起こす害虫や病原菌類の密度は高くはない。また、隔離ほ場で本組換えギンドロの病虫害の被害が周辺環境に影響を及ぼすと判断される程増加した場合には、直ちに防除を行うなどして、周辺環境への影響を防ぐ。このことより、本組換えギンドロを隔離ほ場で栽培する際に、病虫害を介した周辺環境への影響はないと考える。

(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、本組換えギンドロを第一種使用規程に従って隔離ほ場内で使用等した場合に、本組換えギンドロより間接的に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

ギンドロを含むヤマナラシ節は、主に栄養繁殖により天然更新し、遷移の途中相で優占する陽樹である。また、山火事等により主幹が損傷を受けた場合に根萌芽により一斉更新し、優占樹種となる。しかし、時間の経過とともに他の樹種が侵入し、個体数は減少する（渡邊，1994；竹原，1995）。これらの特性はギンドロが典型的なパイオニア植物であることを示している。一方、本組換えギンドロは、非組換えギンドロに比べ、セルロース含量が増加することなど宿主と異なる性質を持つが、これらのことにより競合における優位性が高まるとは考え難い。また、本組換えギンドロは非組換えギンドロと比較して葉が厚く小さく濃い色を呈しているので、光合成の特性が違い、そのことに起因して生長量が変わることが考えられた。しかし、本組換えギンドロのさし木 1 ヶ月後の初期成長量は宿主より大きいものの、その後は宿主と差が認められなくなったので、競合における優位性が宿主以上に高まるとは考えにくい。さらに、本組換えギンドロ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。さらに、本申請においては、隔離ほ場での栽培に限定され、根萌芽などにより隔離ほ場外にて本組換えギンドロが野生化しないよう措置を講ずる。これらのことより、競合における優位性において本組換えギンドロ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、本組換えギンドロ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。

ギンドロを含むハコヤナギ属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。本組換えギンドロに導入した遺伝子の産物は植物体内のキシログルカンの特異的に標的として働くものであり有害物質に該当せず、キシログルカン进行分解する以外は他の代謝系に直接影響しないと考えられる。第一の2の(1)のロ.の②に示すようにアレルギー性も知られていない。また、第一の2の(6)のロ.の⑦に記したとおり、本組換えギンドロと非組換えギンドロとの比較から、プラントボックス法、鋤込み法及び希釈平板法、いずれの手法を用いた場合も、有害物質の産生性に有意差が検出されず、栽培土壤中の主要微生物の集団頻度においても有意差が検出されなかった。したがって、本組換えギンドロを第一種使用

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。

日本国内には、ドロノキ節に属するドロノキ及びヤマナラシ節に属するヤマナラシとチョウセンヤマナラシが自生している。ギンドロはドロノキ節に属するドロノキとの交雑は難しいが、ヤマナラシ節に属するヤマナラシ及びチョウセンヤマナラシとは交雑可能である（図1参照）。また、ヤマナラシ節内の交雑種とも交雑可能であると推測される。したがって本組換えギンドロが開花樹齢に達するまで屋外で栽培した場合、本組換えギンドロに移入された核酸がこれらヤマナラシ節の種やヤマナラシ節内の種間雑種に伝達される可能性がある。一方、ギンドロは開花までに10～15年を要する(Schreiner, 1974)が、隔離ほ場で栽培する組換えギンドロは1年生であるので、栽培終了時の組換えギンドロは5年生となる。したがって、栽培予定期間中に花芽を形成することはないと考えられる。本組換えギンドロが宿主と比較して開花樹齢が早まらないと断定することはできないが、花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどして交雑を防止する措置をとるので本組換えギンドロが野生種と交雑する可能性はない。したがって、本組換えギンドロ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。

本組換えギンドロは、非組換えギンドロに比較してセルロース含量が増加すると共に、葉が陽葉に類似した形態を示すなど宿主と異なる特性を有する。このことに起因し、病虫害の被害の程度が本組換えギンドロと宿主の間で異なる可能性がある。病虫害の被害が大きくなり、その原因となる害虫や病原菌類の密度が増加した場合に、周囲に生育する植物が害虫や病原菌類の増加により生育環境が変化するなどの、間接的影響を受ける可能性を完全に否定することはできない。しかし、本組換えギンドロは、限定された環境である隔離ほ場での栽培であることに加え、隔離ほ場周辺は管理された樹木試験地が主であり、ギンドロの病虫害を引き起こす害虫や病原菌類の密度は高くはない。また、隔離ほ場で本組換えギンドロの病虫害の被害が周辺環境に影響を及ぼすと判断される程増加した場合には、直ちに防除を行うなどして、周辺環境への影響を防ぐ。このことより、本組換えギンドロを隔離ほ場で栽培する際に、病虫害を介した間接的な生物多様性への影響はないと判断した。

以上の結果から、本組換えギンドロは、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

- Baldwin, I.T., Schultz, J.C. (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science*, **221**, 277-279.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8711-8721.
- Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong, S.C., 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.
- DiFazio, S.P., Slavov, G.T., Burczyk, J., Leonardi, S., Strauss, S.H. (2004) Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. In Walter, C., Carson, M. (eds.), *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 405-422.
- 土壤環境分析法編集委員会 (1997) 9. 微生物数 [A. 希釈平板法]. In 土壤環境分析法編集委員会 (ed.), 土壤環境分析法. 博友社, pp. 138-141.
- 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. *農業環境研究成果情報*, **8**, 31-32.
- 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. *農業環境技術研究所報告*, **10**, 115-218.
- 樋口広芳, 森下英美子 (2000) カラス どこが悪い. 小学館文庫
- 茨城県高等学校教育研究会生物部 (1975) *茨城の生物 第1集*. 茨城県高等学校教育研究会生物部
- 幾瀬マサ (1956) 日本植物の花粉. 広川書店, 東京 INAX ギャラリー (1993) 生きものたちも建築家 巣のデザイン INAX BOOKLET Vol.1 No.1. INAX 出版
- Iqbal, Z., Furubayashi, A., Fujii, Y. (2004) Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants. *Weed Biol. Manag.*, **4**, 43-48.
- 伊藤武治 (2005) 注入処理によるアカギ (*Bischofia javanica* Blume) 防除に利

- 用可能な除草剤の検討. *雑草研究*, **50**, 18-20.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
- 開本孝昭 (1975) 光珠内周辺における木本類の開花時期と落葉時期 *光珠内季報*, **24**, 7-12.
- 環境を守る日立市民会議 (1988) *日立の植物 (日立の自然シリーズ・第1集)*. 日立市役所
- 荻住昇 (1987) ウラジロハコヤナギ (ギンドロ). 樹木根系図説. 誠文堂新光社, 東京, pp. 640.
- 北村四郎, 村田源 (1979) ハコヤナギ属 *Populus* L. In 原色日本植物図鑑・木本編 II. 保育社, pp. 337-340.
- 小林富士雄, 滝沢幸雄 (1991) 緑化木・木材の害虫. 187pp, 養賢堂, 東京
- 近藤禎二, 谷口亨, 渡辺敦史, 栗田学, 大宮泰徳, 福田陽子 (2004) コナラ・ドロノキ・シラカンバ花粉の屋外での生存期間. 日本花粉学会第45回大会講演要旨集, p. 43.
- 小山泰弘 (1999) ニセアカシアの枯らし方. 長野県林業総合センターミニ技術情報, **9**.
- Lu, M., Chen, X., Hu, J. (2006) Empirical assessment of gene flow from transgenic poplar plantation. In Proceedings of "9th International Symposium on the Genetically Modified organisms". pp. 129-134.
- Matsumoto, T., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) A xyloglucan-specific endo-1,4- β -glucanase isolated from auxin-treated pea stems. *Plant Physiol.*, **114**, 661-667.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., Ohashi, Y. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 49-59.
- 森徳典 (1998) ハコヤナギ属 *Populus* Linn. (Poplar). In 勝田 栞, 森徳典, 横山敏孝 (eds.), 日本の樹木種子 広葉樹編. 社団法人 林木育種協会, pp.

1-5.

- Nakamura, S., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1995) Cloning and sequencing of a cDNA for poplar endo-1,4- β -glucanase. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1229-1235.
- OECD (2000) No. 16 CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF POPULUS L. (POPLARS)
In OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology
- 小口建夫 (1970) ポプラの葉さび病とその防除について. *光珠内季報*, **5**, 52-53.
- 大橋広好 (1995) ポプラ, 大橋広好ら編, 植物の世界 68. 朝日新聞社, 東京, pp. (6-)251-253.
- Park, Y.W., Baba, K., Furuta, Y., Iida, I., Sameshima, K., Arai, M., Hayashi, T. (2004) Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Lett.*, **564**, 183-187.
- Pauly, M., Andersen, L., Kauppinen, S., Kofod, L., York, W., Albersheim, P., Darvill, A. (1999) A xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology*, **9**, 93-100.
- 鮫島淳一郎, 千葉茂 (1983) ポプラの萌芽更新と栽培技術. 農林水産技術会議事務局発行, 生物資源の効率的利用技術の開発に関する総合研究 (バイオマス変換計画) 」57年度研究報告, 60-61.
- 鮫島淳一郎, 千葉茂 (1984) ポプラの萌芽更新と栽培技術. 農林水産技術会議事務局発行, 生物資源の効率的利用技術の開発に関する総合研究 (バイオマス変換計画) 」58年度研究報告, 80-81.
- 佐藤孝夫 (1990) ギンドロ. *In* 北海道樹木図鑑 増補改訂版. 亜細亜社, p. 86.
- Schreiner, E.J. (1974) *Populus* L. -- Poplar. *In* Schopmeyer, C.S. (ed.), Seeds of woody plants in the United States. Forest Service, USDA, Washington, DC, Agricultural Handbook No. 450, pp. 645-655.
- 鈴木昌友, 清水修, 安見珠子, 安昌美, 藤田弘道, 中崎保洋, 和田尚幸. (1981) 茨城県植物誌. 水戸茨城県植物誌刊行会
- 社団法人林業薬剤協会 (1992) 林業用除草剤使用の手引
- 高萩の植物編集委員会 (1976) 高萩の植物. 高萩市

- 竹原明秀 (1995) 山火事とポプラ. 大橋広好ら編, 植物の世界 68. 朝日新聞社, 東京, pp. (6-)253.
- 竹本俊夫, 外山篤司 (1995) 除草剤によるニセアカシアの駆除-除伐後の萌芽に着目した低コスト化の試み-. 林業技術, **641**, 32-33.
- 田中京子, 鮫島淳一郎 (1985) チョウセンヤマナラシ天然林における家系の解析. 日本林学会大会発表論文集, **96**, 303-304.
- 館和夫 (1970) 道南地方産樹木の凍結試験. 光珠内季報, **6**, 20-23.
- 鄭世鎔 (1992) 新疆楊. In 楊樹豊産栽培. 金盾出版社, 北京, pp. 54-56.
- Thielges, B. A. (1985) *Breeding poplars for disease resistance*. FAO, Rome.
- 千葉茂 (1966) ハンノキ・ポプラ属の交雑並びに倍数性による育種に関する研究. 王子製紙株式会社 林木育種研究所 研究報告, **1**, 1-160.
- 千葉茂, 永田義明 (1976) 山地造林用ポプラの育種の経過と現状. 王子製紙株式会社 林木育種研究所 研究報告, **3**, 1-14.
- 中国樹木誌編集委員会 (1985) 52. 楊柳科 *SALICACEAE* 組 1. 白楊組 Sect. *Populus*. In 中国樹木誌編集委員会 (ed.), 中国樹木志 第二卷. 中国林業出版社, p. 1959.
- 上原敬二 (1961) ギンドロ. In 樹木大図説. 有明書房, 1, pp. 574-576.
- 上野雄規 (1991) *SALICACEAE* ヤナギ科. In 上野雄規 (ed.), 北本州産高等植物チェックリスト. 東北植物研究会, p. 133.
- 渡邊定元 (1994) 樹木社会学. 450pp, 東京大学出版会, 東京
- Weisgerber, H., Kownatzki, D., Mussong, M. (1995) Natural poplar resources in China and their significance for breeding and afforestation. *Silvae Genetica*, **44**, 298-303.
- 油津雄夫, 田端英雄 (1964) 北見経営区におけるヤマナラシ天然更新 (I). 日本林学会大会講演集, **75**, 358-360.
- Zsuffa, L. (1975) A summary review of interspecific breeding in the genus *Populus* L. In Proceedings 14th meeting of the Canadian Tree Improvement Association, part 2. Dept. Environment, Canadian Forestry Service, Ottawa, pp. 107-123.
- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 17-21.
- 国家林業局国有林場和林木種苗工作総站 (2001) 楊属 *Populus* L. In 国家林業

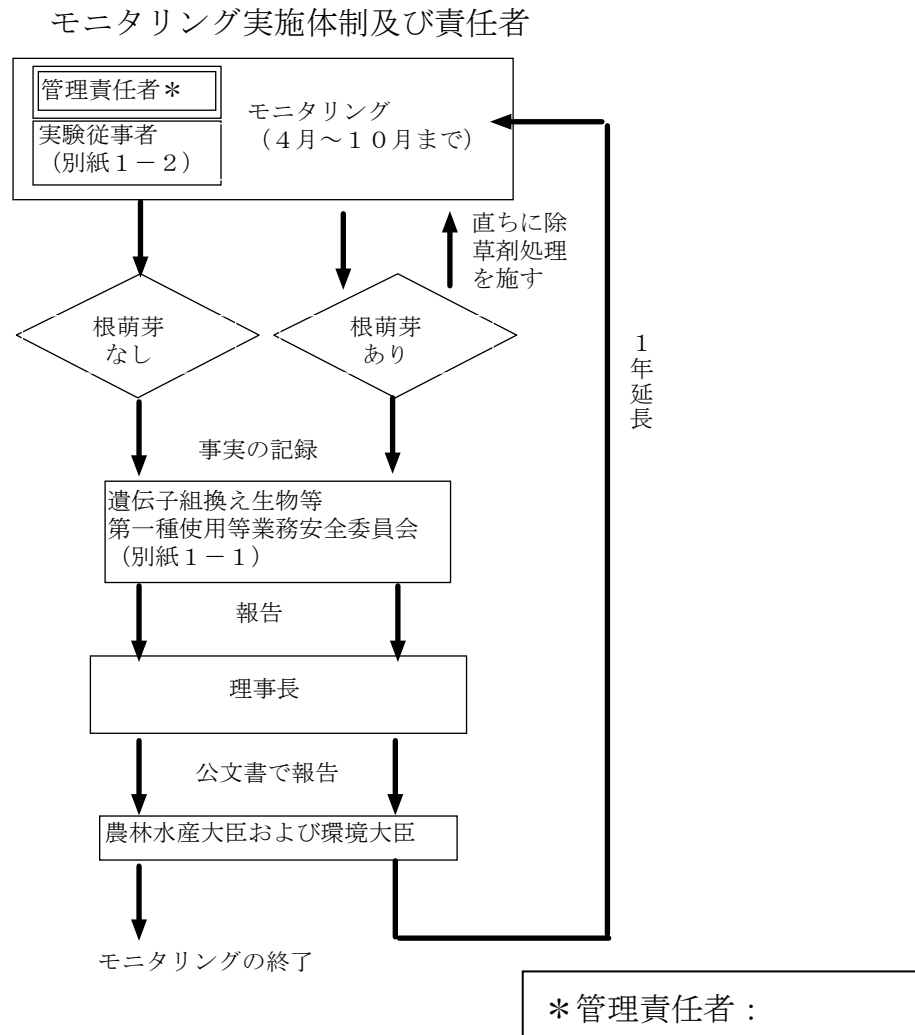
局国有林場和林木種苗工作總站 (ed.), 中国木本植物種子. 中国林業出版社, 北京, pp. 451-460.

モニタリング計画書

平成18年8月14日

氏名 独立行政法人 林木育種センター
理事長 田野岡 章
住所 茨城県日立市十王町伊師 3809番地1

イ 実施体制及び責任者



- ロ モニタリングの対象となる植物等の種類の名称 個人情報につき非公開
ー (ギンドロの根萌芽発生についてモニタリングを行う)

ハ モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる植物等の生育状況

・モニタリングを実施する場所

茨城県日立市十王町伊師3809番地1 独立行政法人 林木育種センター（試験期間中は隔離ほ場の周囲10mの範囲、試験終了後は隔離ほ場内部及びその周辺10mの範囲）

・その場所における対象となる植物等の生育状況

－（現時点では、周辺 10m の範囲内にはギンドロは成育していない。隔離ほ場内の主な植生はワラビ、ススキ、スギナ、ドクダミである。ほ場の東側にはスギが、南側にはヒノキとウメが植栽され、北側と西側は裸地となっている。ほ場周囲 10m の範囲の植栽木以外の主な植生はワラビ、ササ類、メヒシバであり、コナラ等の木本類の稚樹も少数存在する。ほ場の周囲 10m の範囲は植栽木以外の植物の刈り払いが定期的に行われており、根萌芽発生に適した光環境が保たれていて、根萌芽の発生を容易にモニタリングできる状態となっている。）

ニ モニタリングの期間

試験開始から試験終了後 1 年間の期間とする。試験終了後から 1 年以内に根萌芽が認められた場合には、除草剤処理により根系の不活化を行うとともに、根萌芽が認められなくなるまでモニタリングの期間を 1 年ずつ延長する。

ホ 実施時期、頻度、その他のモニタリングの方法

試験期間中は隔離ほ場の周囲 10m の範囲を 4 月から 10 月の根萌芽が起こりうる期間に限って毎月 1 回定期的に根萌芽を目視によって確認し、根萌芽が認められた場合には、除草剤処理によって根系を速やかに不活化する。

試験終了後は、隔離ほ場の内部及び周囲 10m の範囲を 4 月から 10 月の根萌芽が起こりうる期間に限って毎月 1 回定期的に根萌芽を目視によって確認し、根萌芽が認められた場合には、除草剤処理によって根系を速やかに不活化する。

ヘ モニタリングの結果の解析の方法

根萌芽の発生をモニタリングすることにより、ギンドロの根系の不活化に必

要な期間が明らかになる。また、根萌芽が現れた時期、地点、根萌芽の系統（組換え体か非組換え体の別）の調査結果をもとに根萌芽発生の期間及び範囲を解析し、モニタリング方法を検証する。

ト 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

林木育種センターは、各年度に実施したモニタリングの結果がまとまり次第速やかに毎年農林水産省及び環境省に報告する。

チ その他必要な事項

—

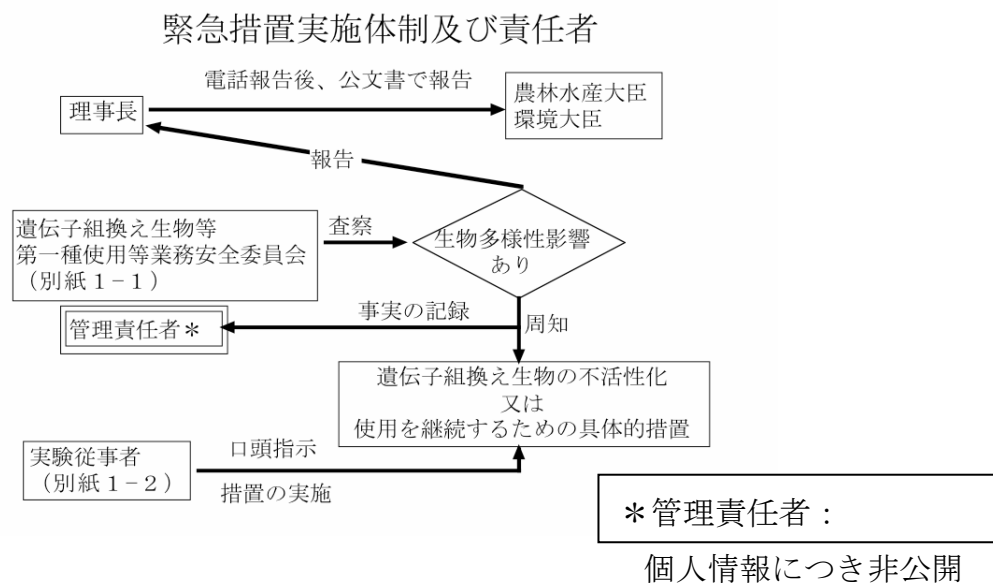
緊急措置計画書

平成18年8月14日

氏名 独立行政法人 林木育種センター
理事長 田野岡 章
住所 茨城県日立市十王町伊師 3809番地1

第一種使用規程の承認を申請している高セルロース含量ギンドロ trg300-1 (*AaXEG2*, *Populus alba* L.) (以下、組換えギンドロ という) 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、林木育種センター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、以下のことを行う。

(1) 実施体制及び責任者



(2) 申請に係る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、林木育種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、林木育種センター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

実験従事者に直接口頭で伝え、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、組換えギンドロを隔離ほ場内でチップ集積場に積み置きして乾燥により不活化させるか、オートクレーブあるいは焼却処理するなどして不活化し隔離ほ場外への組換えギンドロ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組換えギンドロ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) 農林水産大臣及び環境大臣への連絡の方法

生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合、林木育種センターはそのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。

(6) その他必要な事項

—

隔離ほ場における実験計画

用途としては、平地でのほ場栽培によるパルプ用材としての利用を想定し、以下の実験を計画した。

1. 導入遺伝子の存在及び発現の安定性の調査

サザンハイブリダイゼーション及びウエスタンブロッティングを行うことにより、細胞内に移入した核酸の存在の安定性及び当該核酸の発現の安定性を調査する。枝変わり、挿し木の繰り返しによる影響についても検討する。

2. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) 形態及び生育特性の調査

毎年の4月から11月まで月1回、各系統の樹高、胸高直径及び花芽の有無を調査する。また、毎春に新葉の形態を観察し写真に記録する。

(2) 葉の物理的強度調査

引張り試験により、葉の物理的強度の違いを組換えギンドロと非組換えギンドロの系統別に調査する。

(3) 材の成分含量調査

各年度の成長休止期に各系統より3本を伐採し、材のセルロース、ヘミセルロース及びリグニン含量を調査する。

(4) 外生菌根菌の調査

各系統のプロット内を数区画に分割するとともに、プロットの外に向けて最小1m間隔で区画し、毎年6月から10月まで子実体の発生数を梅雨期及び9月中旬については週2回、その他の期間は週1回調査する。

(5) 摂食試験

アメリカシロヒトリなどの食葉性の昆虫を捕獲し、水差しした枝葉に放して葉を摂食させ、摂食の程度を組換えギンドロと非組換えギンドロの系統別で比較する。

(6) 病虫害調査

系統別に穿孔性害虫、食葉性害虫、さび病の被害の有無と、被害があった場合は被害量を調査する。調査時期は開葉時から9月までの月2回とする。

(7) 幹と枝葉の腐朽の調査

各系統より採取した一定重量の幹及び枝葉をネット等に入れ、隔離ほ場内の

土壌表面に放置し、3 ヶ月間隔で枝葉の重量変化を調査する。

(8) 土壌成分調査

植栽年と全伐採直近の10月に各系統のプロット内の土壌を採取し、窒素・炭素・リン・カリウム含量を測定することにより、土壌成分に及ぼす影響を調査する。

(9) 有害物質の産生性

①根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性

毎年10月に各系統のプロット内の土壌を採集し、その土壌を用いて検定植物の生長量を測定することにより、根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性を調査する。

②根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性

毎年10月に各系統のプロット内の土壌を採集し、土壌中の微生物数（細菌、放線菌及び糸状菌数）を希釈平板法により測定することにより、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性を調査する。

③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

毎年10月に各系統より枝葉を採取し、鋤込み法により検定植物の生長量を測定することにより、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を調査する。

これらの実験項目を次表の年次計画に沿って行う。サンプリングの方法は地点間差が大きくなることを考慮して行う。また、5年目の成長休止期には全ての植栽木を伐採し、伐採後の最初の6月頃に、発生した根萌芽と伐根に除草剤処理を行うことにより根系の不活化を行う。その後は根萌芽の発生をモニタリングする（モニタリング計画参照）。なお、本組換えギンドロの葉のほ場外への飛散が顕著な場合には、必要に応じて隔離ほ場の周囲に設置するフェンス内に網目の小さいネットを張るなどの措置をとる。

隔離圃場における年次計画

実験項目	1年目	2年目	3年目	4年目	5年目
1. 導入遺伝子の存在及び発現の安定性の調査	○	○	○	○	○
2. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違					
(1) 形態及び生育特性の調査	○	○	○	○	○
(2) 葉の物理的強度試験		○			
(3) 材の成分含量調査		○	○	○	○
(4) 外生菌根菌の調査	○	○	○	○	○
(5) 摂食試験	○				
(6) 病虫害調査	○	○	○	○	○
(7) 幹と枝葉の腐朽の調査			○	○	○
(8) 土壌成分調査	○				○
(9) 有害物質の産生性					
① 根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性	○	○	○	○	○
② 根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものの産生性	○	○	○	○	○
③ 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	○	○	○	○	○

高セルロース含量ギンドロAaXEG2, *Populus alba* L.)

生物多様性影響評価書

添 付 資 料

- 別紙 1-1 独立行政法人林木育種センター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 1-2 実験従事者
- 別紙 2 林木育種センター周辺におけるハコヤナギ属の植栽と自生の状況
- 別紙 3-1 ギンドロ (*Populus alba*)の根萌芽の調査
- 別紙 3-2 ギンドロ (*Populus alba*)の水平根の調査
- 別紙 4 ハコヤナギ属遺伝子組換え体の海外での第1種使用例(件数)
- 別紙 5 El2-P35S- Ω -PopCel Signal Peptide-AaXEG2 カセットの全塩基配列
- 別紙 6 組換えギンドロのアグロバクテリウム残存の有無
- 別紙 7 組換えギンドロにおける供与遺伝子の存在状態およびさし木による栄養繁殖個体間の安定性
- 別紙 8 特定網室における組換えギンドロの生育評価
- 別紙 9-1 ギンドロへの除草剤グリホサート系液剤処理
- 別紙 9-2 ギンドロの除草剤グリホサート系液剤処理による不活化の方法
- 別紙 10 特定網室および隔離ほ場概略図
- 別紙 11 隔離ほ場周辺の地形図
- 別紙 12 隔離ほ場における植栽計画

別紙 1-1 独立行政法人林木育種センター
遺伝子組換え生物等第一種使用等業務安全委員会名簿

* 個人情報につき公開しない

別紙 1 — 2 実験従事者

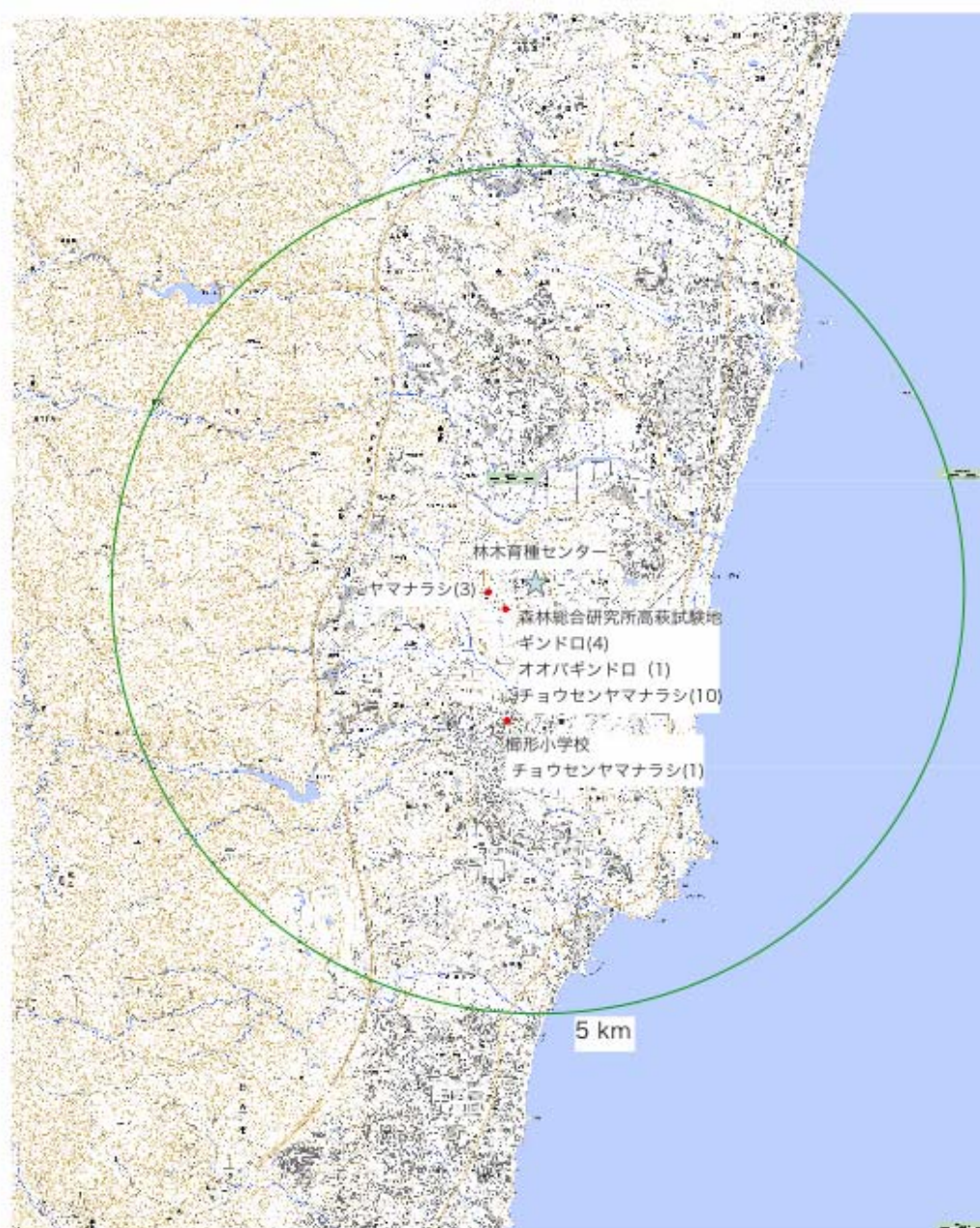
個人情報につき公開しない

別紙2 林木育種センター周辺におけるハコヤナギ属の植栽と自生の状況

当センター敷地内にギンドロは発見されなかったが、ギンドロと交雑可能なヤマナラシ(*Populus sieboldii* Miq.)の実生由来と考えられる高さ6~7mのものが3個体、15cm~1m程度の幼植物体が数個体自生している。また、当センター南隣の森林総合研究所高萩試験地敷地内に樹高15~20m前後のギンドロが4本、立て札が古く判別不能であるが管理者の話によるとオオバギンドロといわれている個体が1本、チョウセンヤマナラシ(*Populus tremula* var. *Davidiana* (Dode) Schneid)が10本植栽されていた。当センターから半径5km以内、高萩市及び日立市の街路樹、公園や学校について調査したところ、日立市十王町の楡形小学校に樹高13m、胸高直径 56.5cmのチョウセンヤマナラシが1本植栽されていた(別紙2 図)。これら林木育種センター周辺に自生または植栽されているギンドロと交雑可能なヤマナラシ節の雌雄については調査していない。日立市周辺ではヤマナラシはややまれであり、中深萩、高鈴山、大久保、真弓山に自生が確認されている(環境を守る日立市民会議, 1988)。高萩市周辺の山地にややまれに見られるが、大きいものは見られなくなった(高萩の植物編集委員会, 1976)。茨城県内のその他の地域においても、ヤマナラシは山野に自生が確認されている(茨城県高等学校教育研究会生物部, 1975; 鈴木ら, 1981)。

別紙2

図 林木育種センター周辺におけるハコヤナギ属の植栽状況（本数）



別紙 3-1 ギンドロ (*Populus alba*)の水平根より発生する根萌芽の調査

調査地；ギンドロ成木（樹高 15m、胸高直径 15cm、森林総合研究所（茨城県つくば市）樹木園の植栽木）の周囲 3m の範囲

根萌芽 10 個体について掘取り調査したところ、直径 0.5～3cm 内外の太さの地表面直下から 10cm の深さを走る水平根より根萌芽は発生し（写真 1～3）、佐原（1995）の記述と一致した。また、根萌芽は光環境の良い場所に発生していた。



写真 1 地表面直下を走る直径 0.5cm 程の水平根より発生した根萌芽。



写真 3 地表面より 10cm の深さを走る直径 3cm 程の水平根より発生した根萌芽。



写真 2 地表面直下を走る直径 0.5～1.5cm 程の水平根より群生した根萌芽。

別紙 3-2 ギンドロ (*Populus alba*) の水平根の調査

調査木；ギンドロ成木（樹高 15m、胸高直径 15cm、森林総合研究所（茨城県つくば市）樹木園の植栽木）

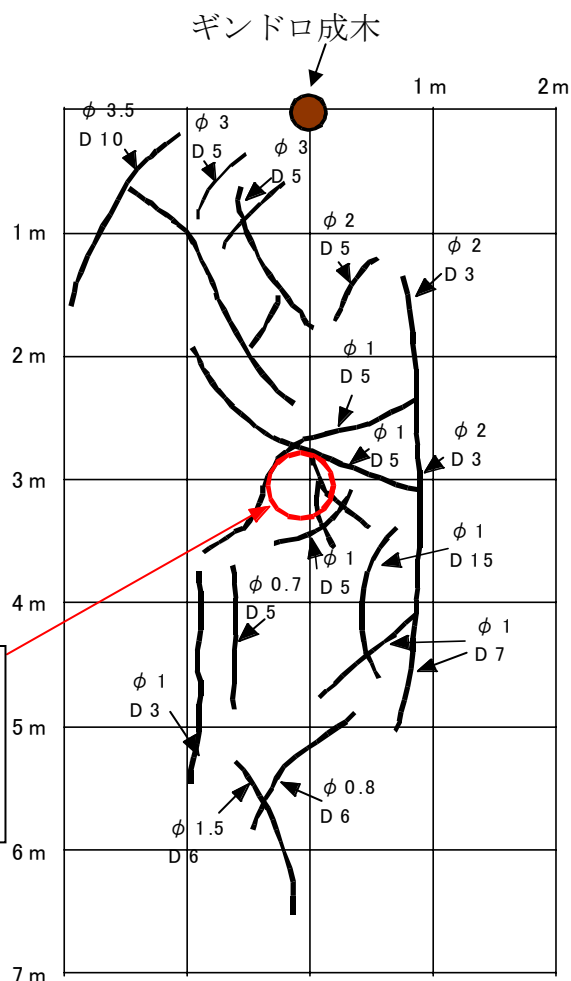
太さ 1～3cm 程の水平根は、地表より 3～15cm の深さを走っていた。また、調査地の一部については、80cm の深さまで掘り下げたが、ギンドロの根は見られなかった。



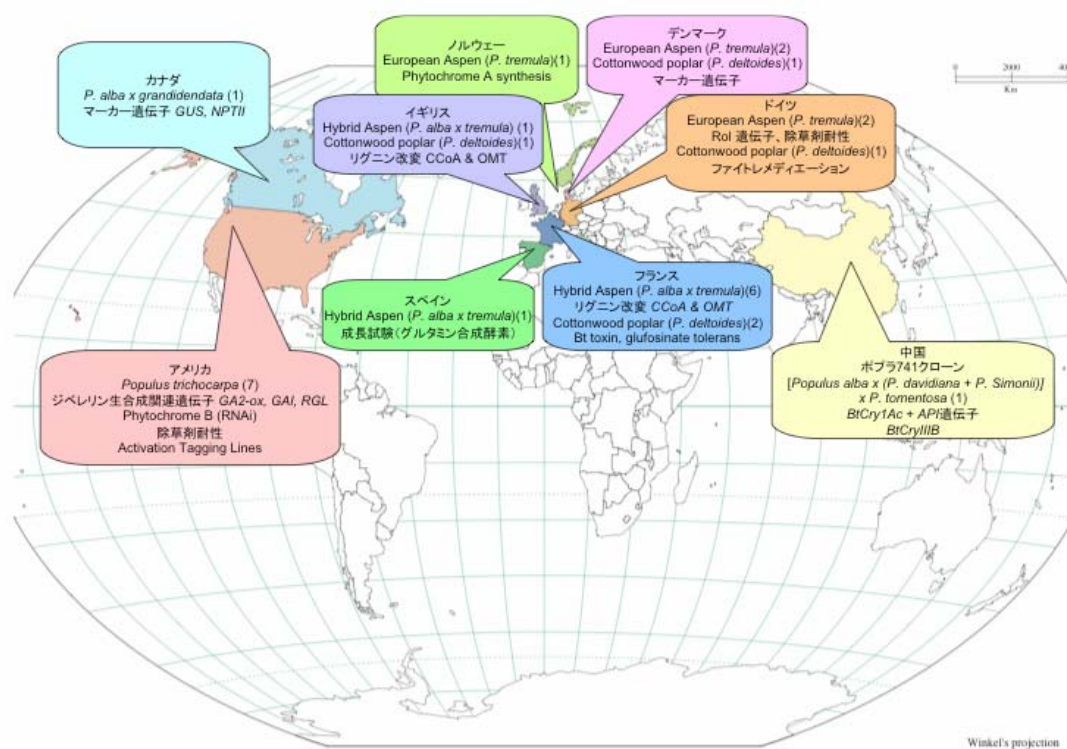
右図の実線は、ギンドロの根を示す（直径と地表面からの深さを cm 単位で併記する）。

赤い円の部分は深さ 80cm まで掘ったが、地表付近の水平根以外の根は見られなかった。

φ；直径、D；地表面からの根の深さ（cm）



別紙 4 ハコヤナギ属遺伝子組換え体の海外での第1種使用例 (件数)



別紙 5 El2-P35S-Ω-PopCel Signal Peptide-AaXEG2 カセットの全塩基配列

aagcttgaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtcctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaaca
aagggtaatatcgggaaacctctcggtattccattgccagctatctgtcacttcataaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatg
ccatcattgcgataaaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtgggtccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaa
aagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgataacatgggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagata El2
cagtcctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctctcggtattccattgccagctatctgtcacttcac
aaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtgggt
ccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgat P35S
atctccact
gacgtaagggtatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggt Ω
tacgtatttttacaaca
attaccaacaacaacaacaacaacaacattacattttacattctacaactacatctagaggatcctttggagggggaaatggctaatacca ← PopCel1
ctacattttcactaatgttgagtttttctcgttaactttttgtgtctgagctatttttagctttgccttcacttctctagagcgccgcagcagcttctcg Signal
gg
tcagtgggataccgccaccgcggtgacttcacctgtacaacgatcttggggcgagagcgccggcaccggctcccagtgcactggagtcgactect Peptide
acagcggcgataccatcgcttggcacaccagctggtcctggtcggaggtagcagcagcgtcaagagctatgctaaccgcgctctgacctcacccc sequence
caccagctgaactgcattctccagcattcctaccacctggaagtgtgcataactccggctctagcatcgttggcgacgtcgcttacgacacattcctggc
cgaaacgccagcggtcttccaagtacgagatcatggtctggtcgcggcctggggcggtgctggccccatctcgtcgaccggatcgaccatcgcca AaXEG2
ccccgacgattgccggcgtaactggaagctgtactccggcccaacggggacaccacctctacagcttcgtcgctgactcgaccaccgagagcttc
tccggtgacctgaacgacttctcacctacctggtcgacaacgagggcggtgtccgatgagctgtacctgaccacctcgagggcggtaccgagccctt
cactggtccgacgccaagttgacctctccgagtacagcatctccattgagtaaatcaaacgttgagtgtcacggatggccgaccgtgttgctgtg
accgcggctgacggggagaatcactagtgaattcgcggcgctgcaggtcgaccatatgggagagctc

aagctt; *HindIII*

gatatc; *EcoRV*

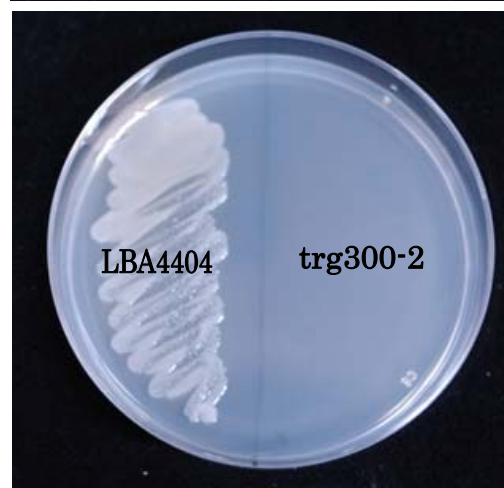
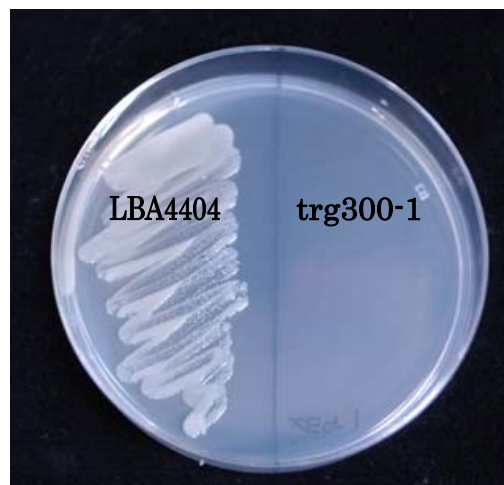
tacgta; *SnaBI*

tctaga; *XbaI*

gagctc; *SacI*

別紙 6 組換えギンドロのアグロバクテリウム残存の有無

組換えギンドロ trg300-1 及び trg300-2 の茎葉（約 200mg）を採取し、滅菌蒸留水 1ml を加えて無菌条件下、乳鉢を用いてすりつぶし、ナイロンメッシュで濾過した濾過液を 50 mg/L カナマイシンを含む培地上に塗布し、28℃、48 時間培養したところ、細菌の増殖は全く見られなかった。



別紙 7 組換えギンドロにおける供与遺伝子の存在状態およびさし木による栄養繁殖個体間の安定性

サザンハイブリダイゼーション (図 1) ; 幼葉 約 20-25mg から抽出したゲノム DNA 5 μ g を制限酵素 *Hind*III で完全切断し、0.8% アガロースで電気泳動した。*AaXEG2* cDNA 全長を PCR-DIG ラベルしたプローブを調製し、化学発光により検出した。その結果、さし木を 2 回繰り返した個体においても移入された *AaXEG2* 遺伝子がゲノム上に安定して存在していることが確認された。

ウェスタンブロッティング (図 2) ; 幼葉 100-200 μ g から抽出した総タンパク質 3 μ g に 2 $\times$ SDS サンプルバッファーを等量加えて 95°C、5 min 反応させることによって直鎖状に変成させ、SDS-PAGE で分離し、エレクトロブロッティングにより PVDF 膜に転写した後、*AaXEG2* 抗体と共にインキュベートし、ECL Western Blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社)により発光検出した。その結果、*AaXEG2* と予想される 28kDa の特異的なバンドが検出され、さし木を 2 回繰り返した個体においても安定して *AaXEG2* タンパク質が産生していることが確認された。

PCR 分析 (図 3) ; キシログルカナーゼ遺伝子に特異的なプライマー (CGGTGACTTCACCCTGTACAACG、GGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTCC)を用い、PCR によって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。

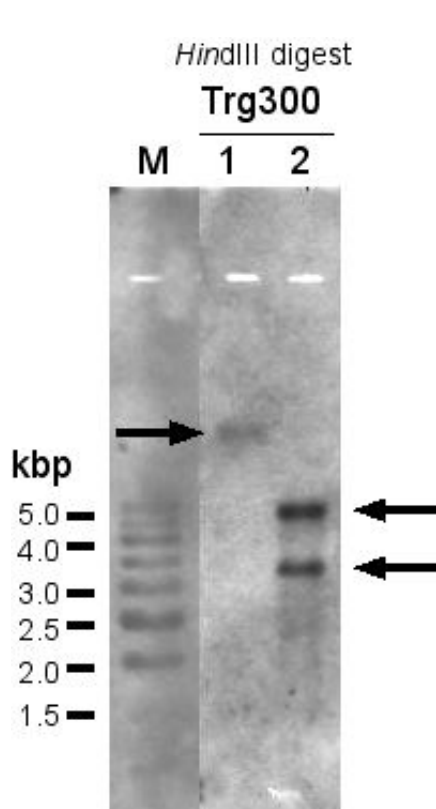


図 1 サザンハイブリダイゼーション

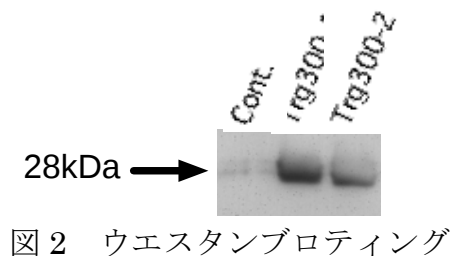


図 2 ウェスタンブロッティング

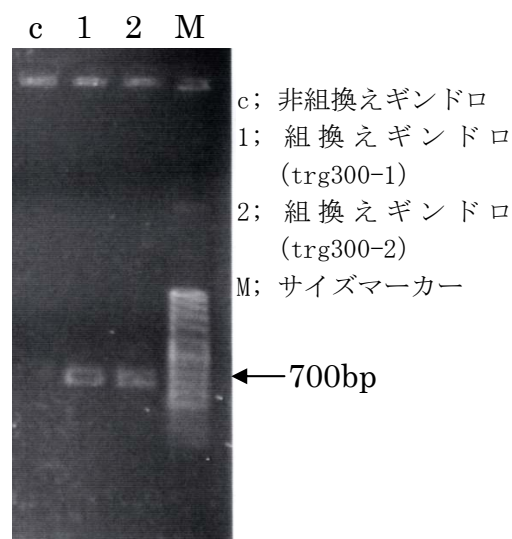


図 3 PCR 分析

別紙 8 特定網室における組換えギンドロの生育評価

図 1 樹高・直径の推移

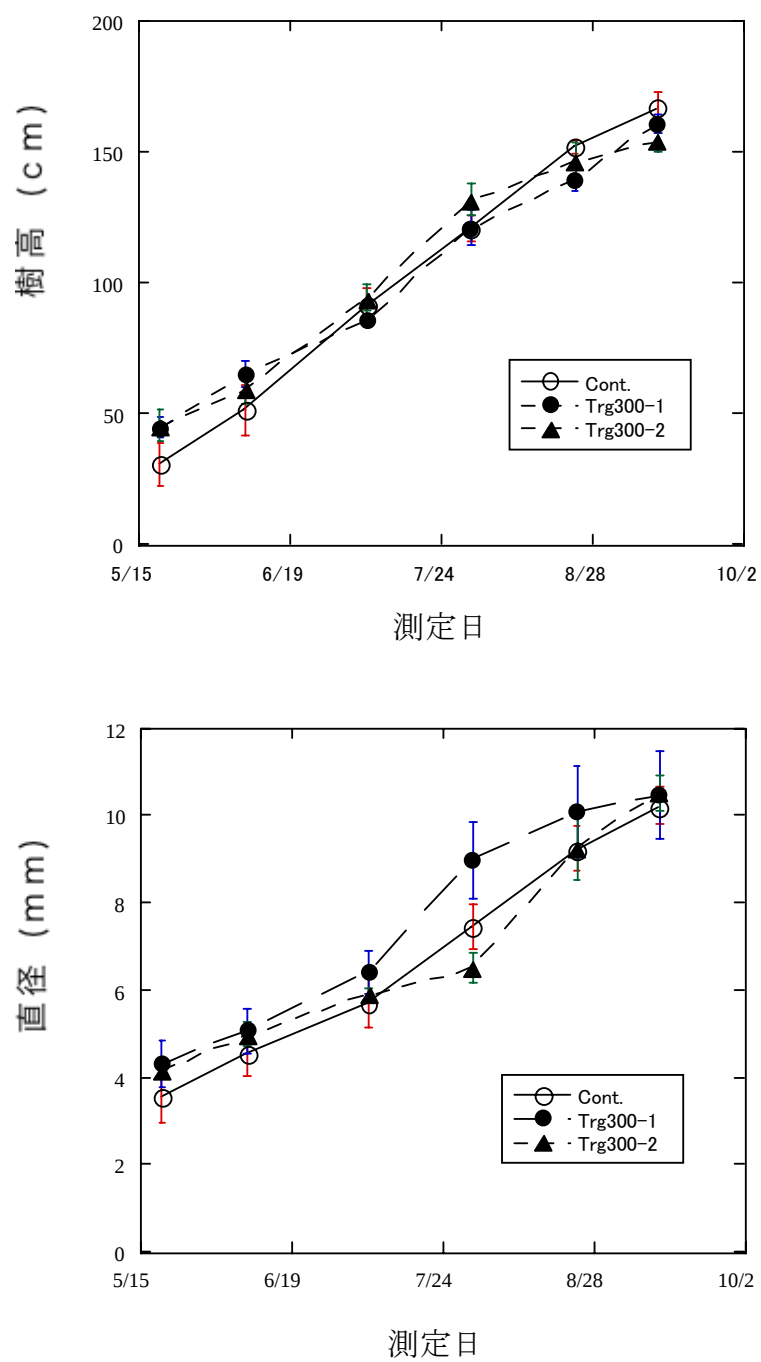


図2 特定網室に移して3ヶ月経過後の様子

図中で *trg300-1* 及び *trg300-2* は組換えギンドロ、WT は非組換えギンドロを示す。



別紙 9-1 ギンドロへの除草剤グリホサート系液剤処理

非組換えギンドロのポット苗にグリホサート系液剤を葉面散布することにより、ギンドロが不活化されることを確認した。



写真 A; 処理日のギンドロ。約 40cm の苗にグリホサート系液剤 10 倍希釈液、5 倍希釈液を葉面散布した（各処理 2 個体）。

写真 B; 処理 74 日後の茎葉。グリホサート系液剤を処理した苗の茎葉は、枯死していた。

写真 C; 処理 74 日後の根系。グリホサート系液剤を処理した苗の根系は、枯死していた。

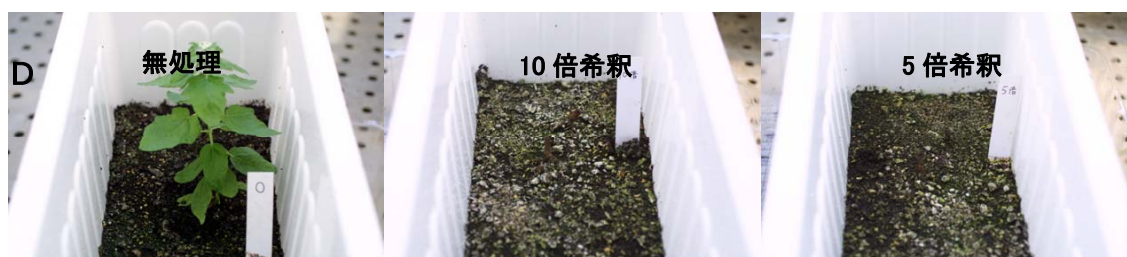


写真 D: グリホサート系液剤の葉面散布により根系が完全に枯死していることを確認するために、写真 C の個体より地上部を切除した根系を土に移植した。移植 55 日後には、無処理の根系からは萌芽が発生したが、グリホサート系液剤処理を行った根系からは萌芽発生は認められなかった。

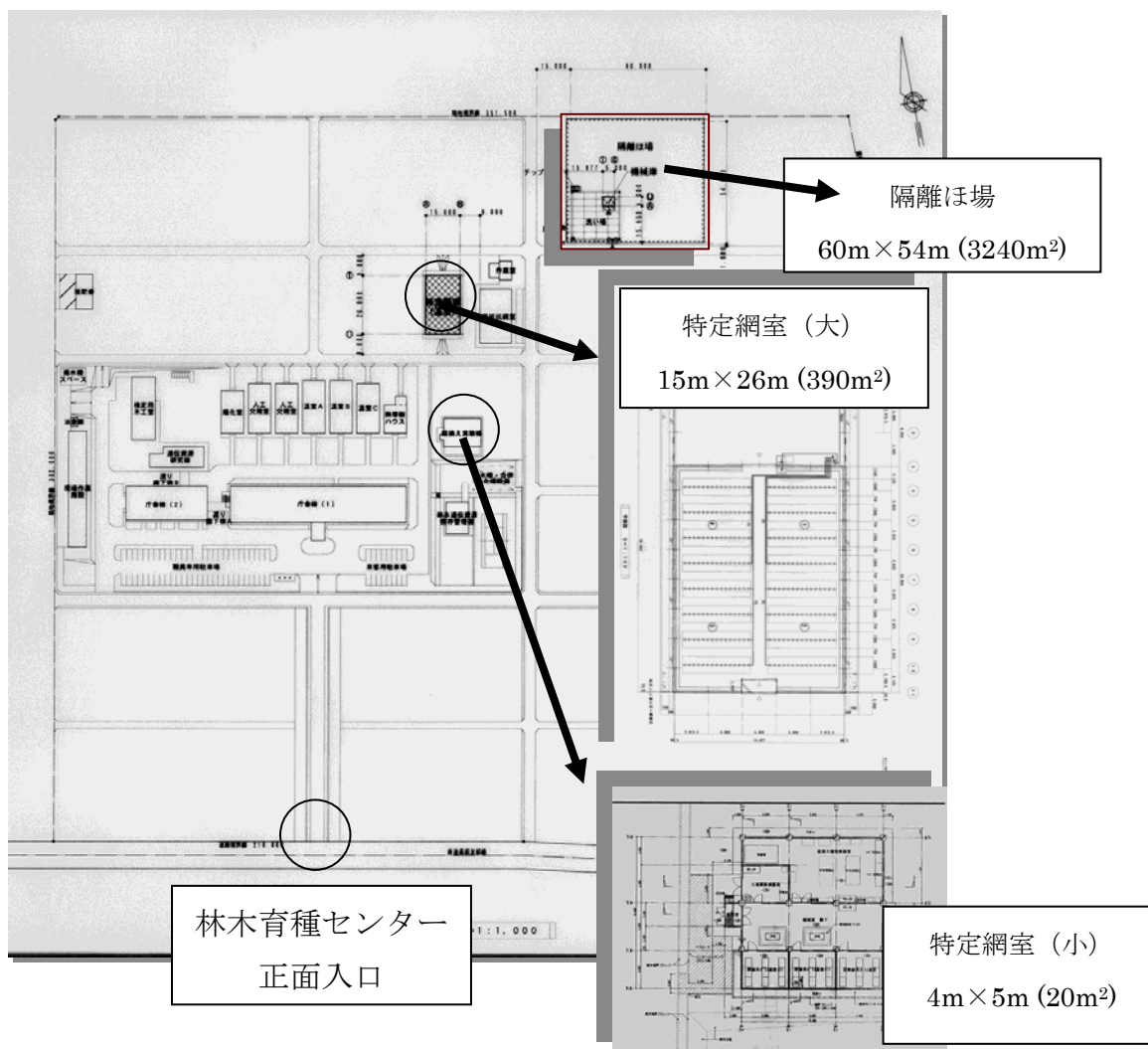
別紙 9-2 ギンドロの除草剤グリホサート系液剤処理による不活化の方法

グリホサート系液剤は、広範な植物に対して効果を発揮する除草剤として良く知られ、根絶が困難とされている樹種であるアカギやニセアカシアを枯殺することができる（伊藤，2005；竹本・外山，1995；小山，1999）。本除草剤の特徴は、成分の地下組織への移行が特に多く、地上部に処理するだけで根を枯死させることである（社団法人林業薬剤協会，1992）。本除草剤がギンドロに対しても効果を示すことは、別紙 9-1 に示したとおりである。また、フランス国立農業試験場とアメリカ合衆国オレゴン州立大学の隔離ほ場におけるギンドロ雑種を含む組換えポプラの不活化にも本除草剤が使用されている。これらのことから、組換えギンドロの不活化にはグリホサート系液剤処理が有効と考えられる。グリホサート系液剤処理の方法を次に示す。

除草剤の効果を高めるために伐採後に根萌芽を誘導し、根萌芽に除草剤を葉面散布する方法をとる。その具体的方法は以下のとおりである。生長休止期に伐採し、伐採後の最初の 6 月頃まで根萌芽を成長させる。成長した根萌芽にグリホサート系液剤 10 倍希釈液を葉面散布する。同時に、直径が 10cm 以下の伐採木の場合には 2～3 カ所、10～20cm の伐採木の場合には 4～8 カ所鉋目あるいはドリルで切り株に穴を開け、グリホサート系液剤原液を各箇所へ 1ml ずつ注入する。

樹幹注入する除草剤の濃度と量は社団法人林業薬剤協会（1992）に従った。また、葉面散布する除草剤の濃度は別紙 9-1 の実験例とニセアカシアへの使用例（竹本・外山，1995）に従った。

別紙 10 特定網室および隔離ほ場概略図



別紙 11 隔離ほ場周辺の地形図



別紙 12 隔離ほ場における植栽計画

隣接して植栽する他の系統の影響を排除するため、1系統25本で構成する方形プロット（5×5）とし、プロットには2回繰り返しを設ける。さらに、組換えギンドロと非組換えギンドロの根が混在しないようにプロット間に深さ30cmの溝を設ける。

