

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(荻住, 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。

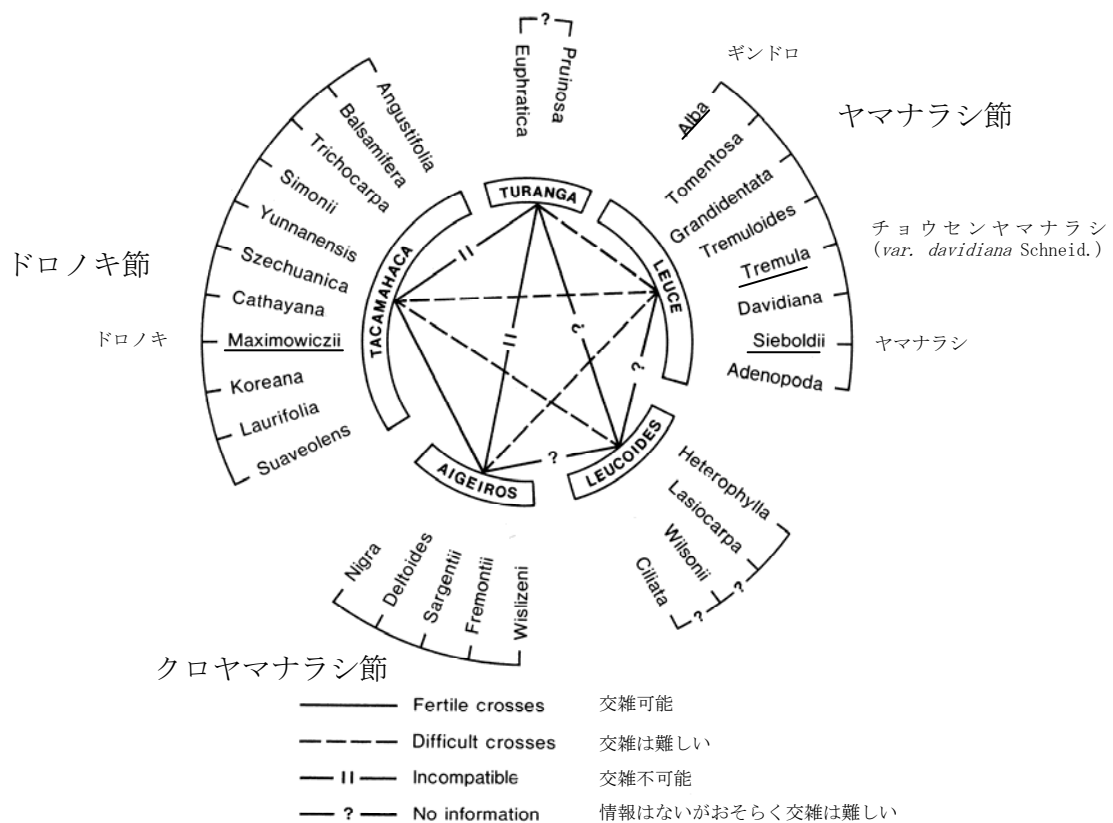


図1 ハコヤナギ属の種間交雑 (Zsuffa, 1975 より改変)

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

—

ヘ. 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クセット (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 (<i>NPTII</i>) 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

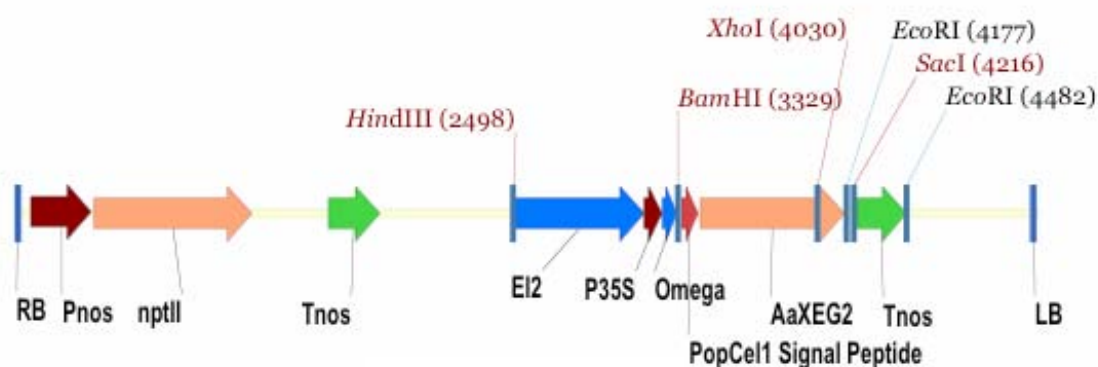


図2 高セルロース含量ギンドロの作成に使用したプラスミド
pBE2113-AaXEG2 の T-DNA

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-E12-P35S-Omega-GUS-*Eco*RI 断片で置き換えたものであ

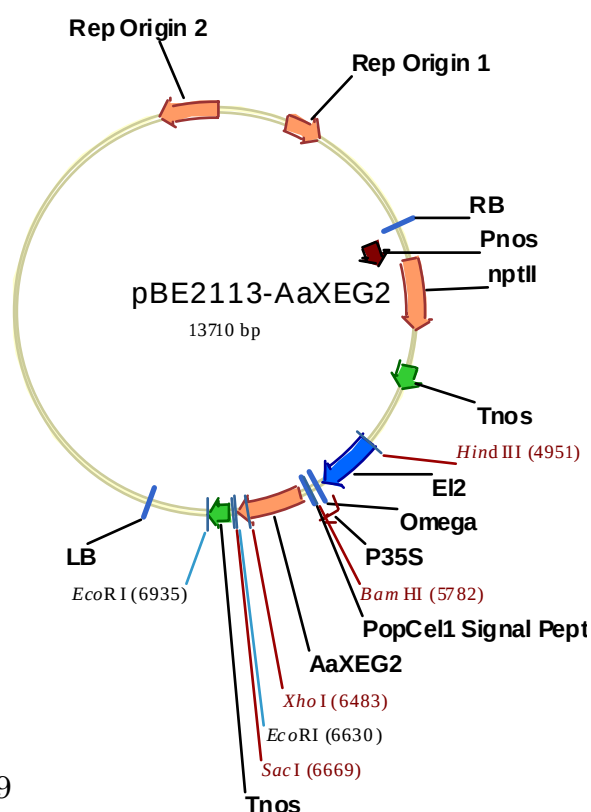


図3 プラスミド pBE2113-AaXEG2