

る。このGUS遺伝子の部分を供与核酸である*PopCell1 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50mg/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 $\mu$ g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 $\mu$ 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 $\mu$ g から抽出した総タンパク質 3 $\mu$ 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、GGCCGCGAATTCAGTAGTATTCTCC）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

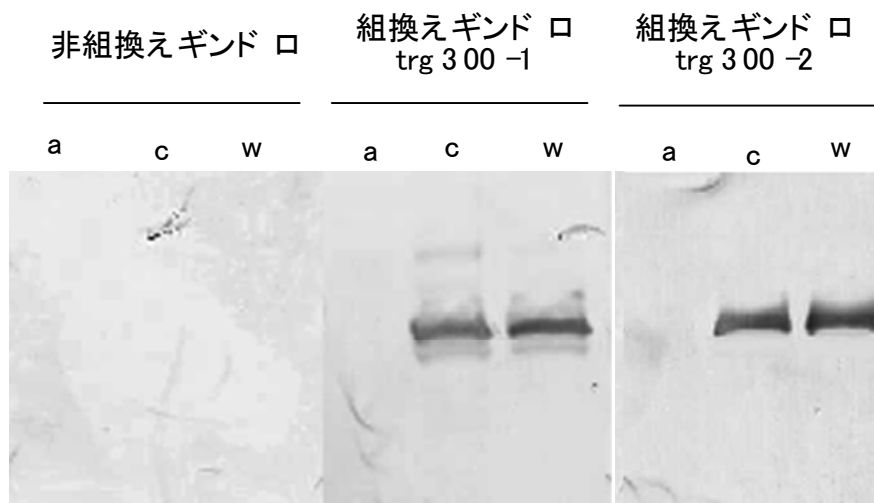


図4 移入された核酸の発現により生産されるAaXEG2タンパク質のウエスタンブロットによる検出。a; 細胞外画分、c; 細胞質画分、w; 細胞壁画分。

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、 $-50^{\circ}\text{C}$ 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な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。

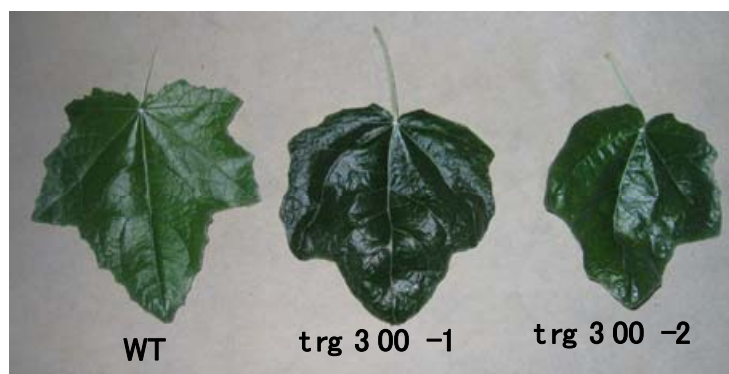


図5 非組換え体 (WT) と組換え体 (trg300-1、trg300-2) の葉の形態の比較

#### 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。これらのことより、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遺伝子を移入した*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性であり、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遺伝子を移入した*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。

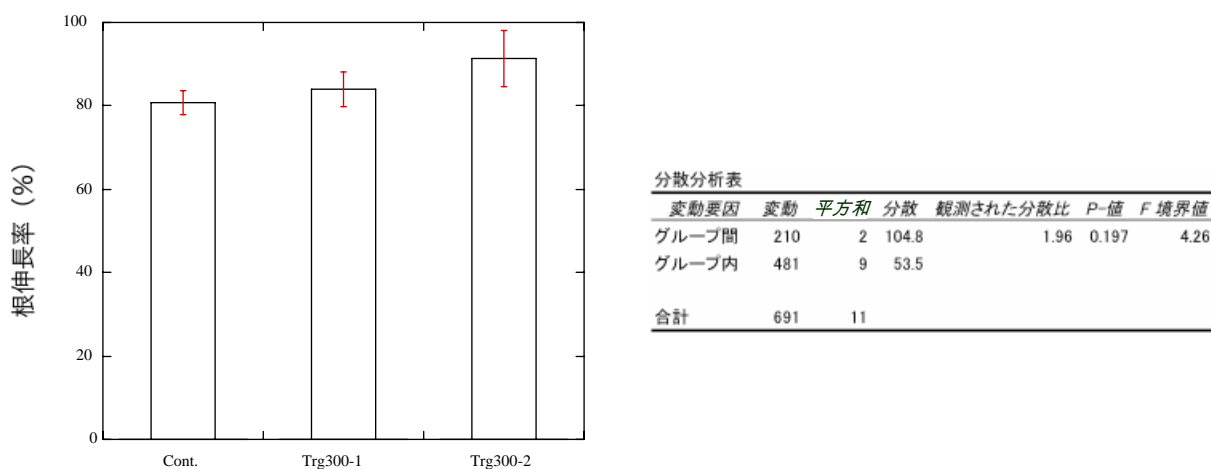
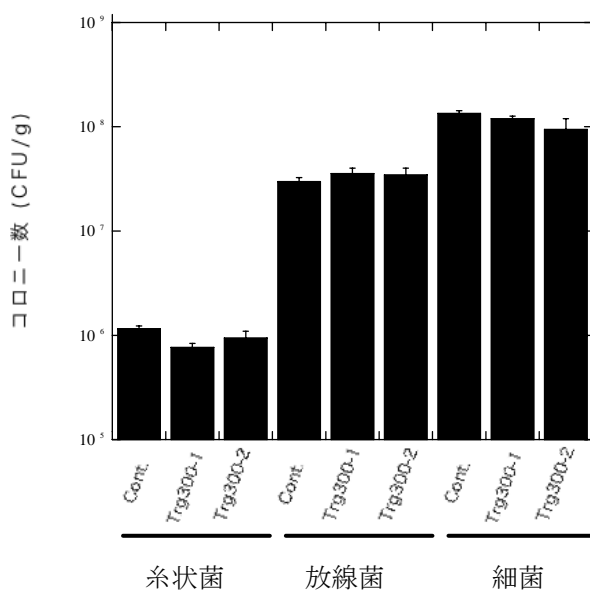


図6 根から分泌され他の植物に影響を与えるものの産生性

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。



#### 糸状菌

変動要因	平方和	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	4.40E+11	2	2.20E+11	3.28	0.07	3.68
グループ内	1.01E+12	15	6.71E+10			
合計	1.45E+12	17				

#### 放線菌

変動要因	平方和	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	1.17E+14	2	5.83E+13	0.56	0.58	3.68
グループ内	1.57E+15	15	1.05E+14			
合計	1.69E+15	17				

#### 細菌

変動要因	平方和	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	4.99E+15	2	2.50E+15	1.35	0.29	3.68
グループ内	2.76E+16	15	1.84E+15			
合計	3.26E+16	17				

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。



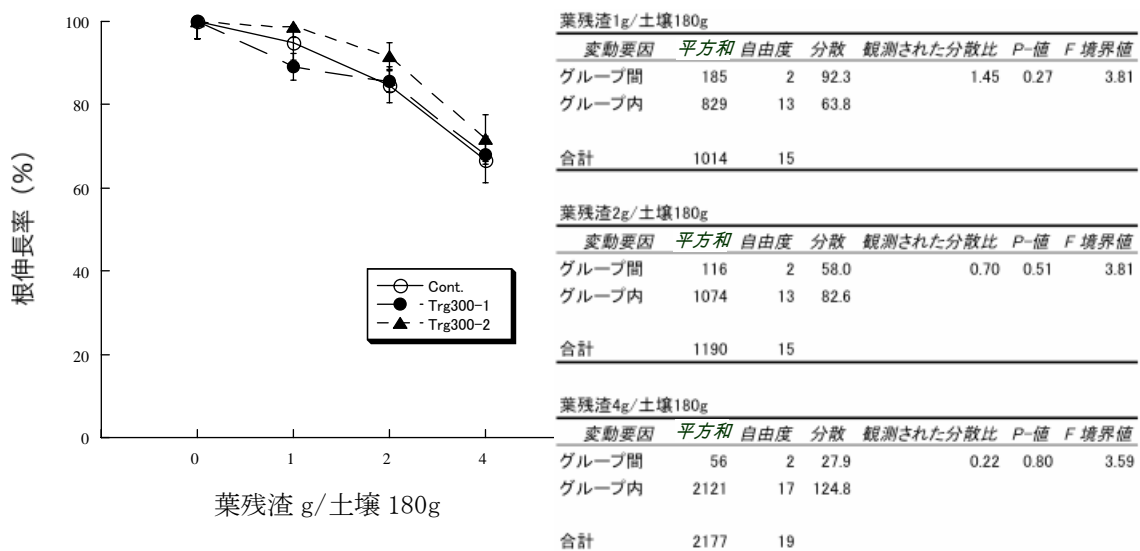


図8 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものの産生性（鋤込み法による）

○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し。

(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ため、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 (荻住, 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、キシログルカン分解以外に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。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る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。