

第一種使用規程承認申請書

平成 17 年 3 月 16 日

文部科学大臣 中山 成 彬殿  
環境大臣 小 池 百合子殿

申請者 氏名 国立大学法人 筑波大学 印  
学長 岩崎 洋一  
住所 茨城県つくば市天王台 1-1-1

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>耐塩性ユーカリ <i>E. camaldulensis</i> codA 12-5B</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：茨城県つくば市天王台 1-1-1  名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場）  使用期間：承認日から平成 21 年 12 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1)部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。  (2)隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。  (3)土、遺伝子組換えユーカリの残渣等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、遺伝子組換えユーカリの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している。  (4)遺伝子組換えユーカリの栽培区画を取り囲むように防風網を設置している。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1)遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。  (2)遺伝子組換えユーカリを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えユーカリが漏出ししない構造の容器に入れる。  (3)(2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えユーカリの栽培終了後は、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。  (4)花粉飛散を防止するために、花芽が形成された場合は、これらをすみやかに切除し、オートクレーブにて不活化する。  (5)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、意図せずに遺伝子組換えユーカリが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p>

	<p>(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。</p> <p>(7)(1)から(6)に掲げる事項による第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(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に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

# 生物多様性影響評価書

## 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

### 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### (1) 分類学上の位置づけ及び自然環境における分布状況

宿主は、フトモモ科(Myrtaceae)ユーカリ属(*Eucalyptus*)に属するユーカリ(*Eucalyptus camaldulensis*)(文献 1)、オーストラリア名はリバーレッド・ガムである。2 倍体で染色体数は、22 である(文献 2)。

ユーカリ属は約 600 種存在するといわれているが、その大半はオーストラリア本土およびタスマニア島に自生し、ごく少数の種が本土北部に隣接するアジア太平洋地域の特定諸島に自生している。

ユーカリは日本原産の種ではなく、宿主植物である *E. camaldulensis* と交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布、及び近縁野生種の存在は報告されていないことから(文献 3, 4)、本組換えユーカリと交雑可能な *Eucalyptus* 属植物は存在しないと考えられる。

#### (2) 使用等の歴史及び現状

19 世紀以降、ヨーロッパ、インド、アフリカ、アメリカ、最近では東南アジアでも多く植林されている。建材、パルプ材あるいはユーカリオイルの材料などとして 19 世紀から盛んに海外で栽培されている(文献 3, 5)。日本では明治時代に導入された。

記念植樹として植えられることが多く、主に緑化木として栽培管理されている。茨城、群馬、石川県を北限とし、関東以南の温暖地、とくに静岡、兵庫、高知、福岡の諸県に多い(文献 5)。つくば地区におけるユーカリ属の栽培は、個別の工場敷地などの緑化に限られている。*E. camaldulensis* については、私有地での栽培などを含めて数件程度で、体系的な栽培はみられない。これら状況は別紙 2 にあげる。

#### (3) 生理学的及び生態学的特徴

##### イ 基本的特性

ユーカリは、生態学的には硬葉樹に属する常緑広葉樹である(文献 3)。雌雄同花で花色は白から淡黄色である(文献 6)。成木は高さ 20 ~ 50 m、胸高直径 90 ~ 210 cm(文献 7)にまで成長する。材は赤色、光沢、耐久性があり、パルプ用にはおよそ 5 ~ 8 年で収穫できる(文献 5)。海外の原生地や適正栽培地では、樹高 40 m、樹幅 15 m 及び胸高直径 2 m の大木も存在する(文献 8)。日本では、公園緑地に樹高 10 m 程度のものが見られる(文献 5)。

#### ロ 生息又は生育可能な環境条件

ユーカリは、平均気温 25 °C を最適とし 15—29 °C で生育、種によっては、氷点下でも冬場生存できるが低温には適していない(文献 1)。乾燥、季節的冠水、多少の塩類土壌にも耐え、萌芽更新も可能であり、世界に広く植林されている(文献 5)。降雨量は、年 500—1,000 mm が適しており、生育期には相当量の降雨を必要とする(文献 8)。

#### ハ 繁殖又は増殖の様式

種子繁殖及び栄養繁殖が可能な多年生木本植物である(文献 3)。種子繁殖の場合、自殖、他殖共に可能であり、果実は種子が完熟すると破裂して種子を放出する(文献 6)。虫媒により花粉が伝達され、その際の媒介昆虫は、双翅目の昆虫が幅広く媒介する(文献 2, 6)。例としては、ハナアブ (*Eristalis tenax*) ; ミツバチ類 (*Apis* 属) ; Ichneumonid wasps (*Gotra* 属) ; クロバエ類 (*Calliphoridae*) ; マガタマハリバエ (*Epicampocera succincta*) ; ノコギリハリバエ (*Compsilura concinnata*) ; Syrphid flies (*Syrphus rectus*, *Allograpta obliqua*) 及び *Eupeodes* (formerly *Metasyrphus*) *americanus* (Weidemann) などである。

栄養繁殖の場合、挿し木及び取り木による増殖が可能である(文献 3)。

#### ニ 有害物質の生産性

*E. camaldulensis* については野生動植物に対する有害物質生産性は知られていない。文献 9 によると、近縁の *E. globulus* について、乾燥地上部の 50 % エタノール粗抽出物を腹腔内への注射投与によりマウスに投与した場合、LD<sub>50</sub> は、562.0 mg / kg であることが報告されている。葉からのエッセンシャルオイルは、0.8 % 程度の濃度で、ダニ類 (*Pyroglyphidae*) への防除効果があることが知られている(文献 10)。原産地オーストラリアでは、ユーカリ属植物の地上部 (葉)

は、野生コアラの常食食料であることは公知である(文献 3, 5)。一方、日本では、沖縄や奄美大島の諸島などで茶やあめなどの原料として利用されている。テルペノイドを主体とする芳香性物質が産生され、ユーカリエッセンシャルオイルとして、これはアロマセラピーなどの民間療法に幅広く用いられている(文献 10)。

#### ホ その他の情報

ユーカリ属のいくつかの種は、薬用植物としても原産地や海外の発展途上国で伝統的利用がされている(文献 9)。また、葉からの粗抽出液をノミや家庭害虫の殺虫剤として用いる場合もある(文献 10)。

また、別紙 11 (文献 11, 12 )に示すように異なる種のユーカリを用いて、遺伝子組換えユーカリをほ場評価している件数が多数あるが、これらについて環境影響があった報告はない。

## 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

耐塩性ユーカリ (*E. camaldulensis* codA 12-5B) (以下、本組換えユーカリとする)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は表1に示した通りである。組換えDNA分子の構成図は図1に示した通りである。

#### ロ 構成要素の機能

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

目的遺伝子である *codA* 遺伝子(表1対照区分B)は、コリンからグリシンベタインを生産する酵素をコードする遺伝子である(文献13)。グリシンベタインは、細胞の浸透圧を制御する物質である。植物における塩や乾燥による成長阻害は、浸透圧ストレスで誘導されることが知られている。いくつかの細菌や植物はベタインを適合溶質として利用して、浸透圧ストレスを緩和すると考えられている。

*ipt* 遺伝子(表1対照区分K)と *R*(組換え酵素)遺伝子(表1対照区分H)はMATベクターの構成成分である(文献14)。アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の *ipt* 遺伝子は植物ホルモンであるサイトカイニンを生産する。サイトカイニンは一般に植物の茎葉の分化を促進する効果があり、*ipt* 遺伝子の過剰発現によって、芽の塊の状態になる。次に、図1に示すように、*R* 遺伝子がRS(相同組換えを起こす部位)で組換え反応を起こし、RSに挟まれた *R* 遺伝子と *ipt* 遺伝子が欠失する。*ipt* 遺伝子が失われた細胞は、細胞内サイトカイニン濃度が低下し、正常な茎葉が伸長してくると予測されている。

表 1 形質転換・発現ベクター pMATCODA の各構成要素.

プラスミド pMATCODA は、図 1 及び図 2 に示すように、4 つの発現ユニットから構成されている。その構成を以下に示す。また、各遺伝子のポジションは添付の別紙 4 プラスミドの全塩基配列表に対応している。

対象区分	遺伝子の名称等	由来及び機能	プラスミド pMATCODA 中の塩基配列開始点	プラスミド pMATCODA 中の塩基配列終了点	アクセッション番号
発現ユニット 1					
A	35S プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター (植物中で構成的発現性)	2840	3674	V00141
B	コリンオキシダーゼ遺伝子 ( <i>codA</i> )	<i>Arthrobacter globiformis</i> 由来で、コリンからグリシンベタインを生産する酵素をコードする遺伝子である。グリシンベタインは、細胞の浸透圧を制御する物質である。	3698	5729	X84895
C	NOS タミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	5777	6029	AE009420
発現ユニット 2					
D	NOS プロモーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	6048	6370	X04881
E	<i>GUS</i> 遺伝子	大腸菌由来で グルクロニダーゼを発現する。	6393	8201	S69413
F	NOS タミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	8272	8524	AE009420
発現ユニット 3					
G	35S プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター (植物中で構成的発現性)	9132	9966	V00141
H	組換え酵素遺伝子 ( <i>R</i> )	醤油酵母 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )。RS で組換え反応を起こし、RS に挟まれた遺伝子は、欠失する。	10003	11476	AX380956
I	NOS タミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	11493	11743	AE009420



発現ユニット4					
J	ipt プロモーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (P022 株)。	11756	12431	AB025109
K	イソペンチニルホスホトランスフェラーゼ ( <i>ipt</i> ) 構造遺伝子	ipt プロモーターは根・カルスで強い発現を示す。 <i>ipt</i> 遺伝子が失われた細胞は、細胞内サイトカイニン濃度が低下し、正常な茎葉が伸長してくると予測されている。	12440	13162	AB025109
L	ipt ターミネーター		13163	13753	AB025109
その他					
M	R タンパクの認識配列 RS	醤油酵母 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )。RS で組換え反応を起こし、RS に挟まれた遺伝子は、欠失する。	8732	9111	X02398
N	R タンパクの認識配列 RS	醤油酵母 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )。RS で組換え反応を起こし、RS に挟まれた遺伝子は、欠失する。	13756	14140	X02398
O	右側境界配列 (RB)	Ti プラスミド pTiT37 に由来するノバリン型 T-DNA の右側境界配列 (25bp) を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として機能する。	2454	2479	AF485783
P	左側境界配列 (LB)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左側境界配列 (25 bp) を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。	14936	14968	AF485783

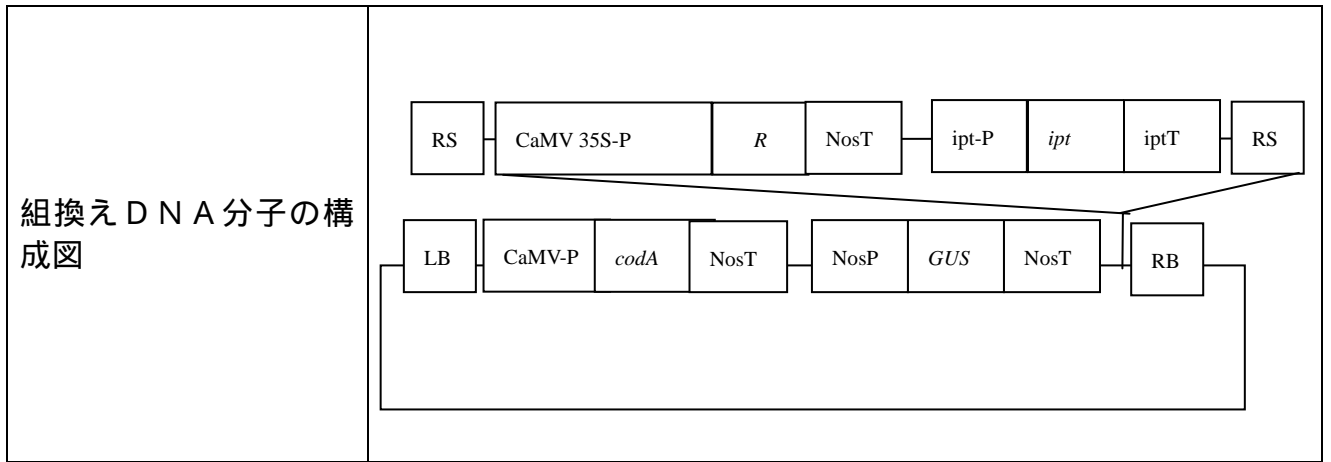
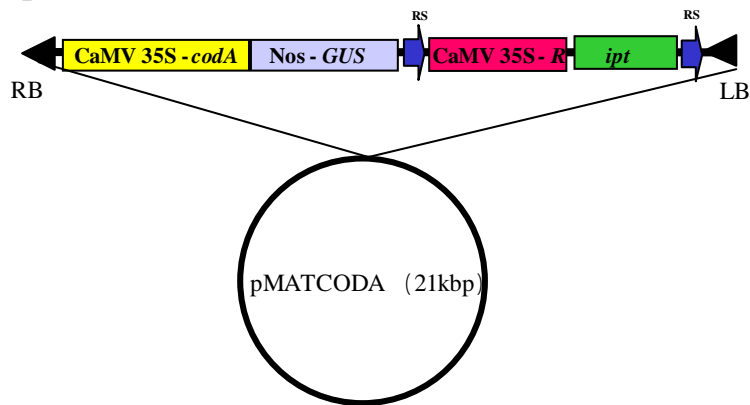


図1 . 組換えDNA分子の構成図

(A) pMATCODA の構成図



(B) 植物の染色体DNA挿入後の遺伝子構成図

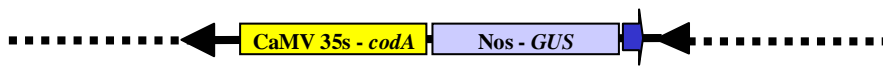


図2 . プラスミド構成図 (A)植物移入時、(B)最終構成図

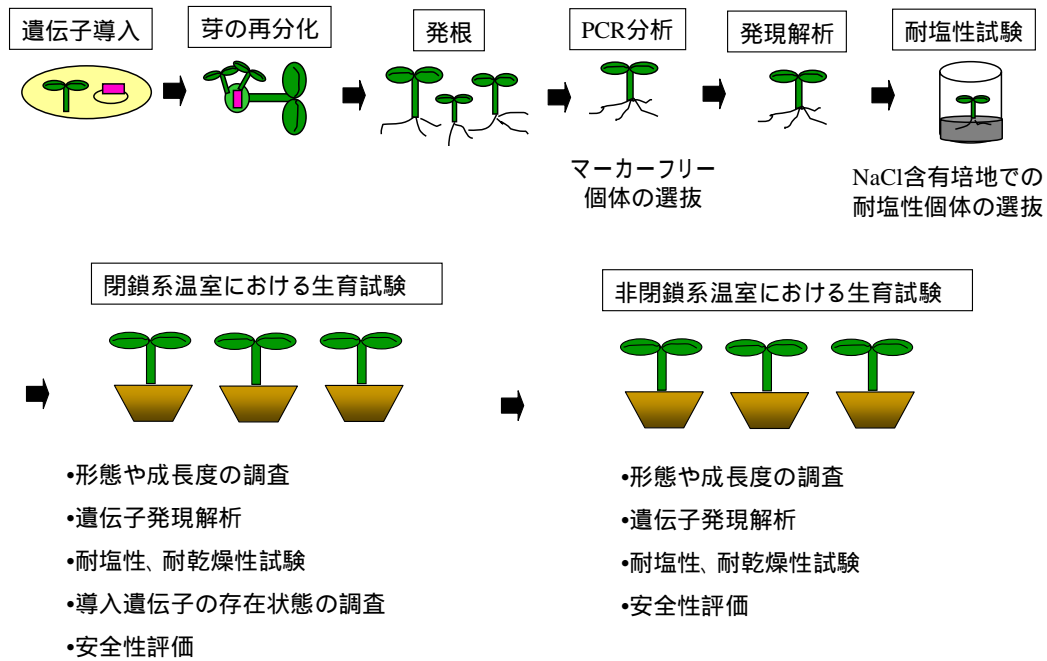


図 3 . 各生育段階における試験

## (2) ベクターに関する情報(文献 13-15)

### イ 名称及び由来

本組換えユーカリの作出に用いたプラスミドベクターの由来は pBR322 を原体とした pBIN19 である。pBR322 は、*E. coli* 由来の合成プラスミドである。

### ロ 特性

pBIN19 は、微生物においてカナマイシン耐性を発現し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。DNA 複製開始点 *ori* 配列を持つ 2 本鎖環状 DNA である。プラスミド全体は植物には伝達されないが、右側境界配列(LB)と左側境界配列(RB)に挟まれた領域の DNA ( T-DNA 領域 ) はアグロバクテリウムの感染により、植物に伝達される。植物ゲノム DNA に挿入された後、RS に挟まれた部分は組換え酵素の作用により、欠失する。最終的な組換え植物では RS で挟まれた領域が切り出されてなくなったもので、環境中に拡散する可能性のある遺伝子はその欠失型である(別紙 5 (実験 3) 図 1)。これについては、PCR やダイレクトシーケンス等で、切り出しを確認したデータを別紙 5 (実験 3)図 2 に示す。

## (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

上記の pBIN19 ベクターの組換え機構により、T-DNA 領域を *E. camaldulensis* に導入した。宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素については表 1 及び図 1 に示した。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入法

プラスミドベクター pMATCODA 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により *E. camaldulensis* に導入した。

### ハ 遺伝子組換え生物等の育成経過(文献 15)

本組換えユーカリの開発は、平成 12 年より始まった。プラスミドベクター pMATCODA を保有するアグロバクテリウムを *E. camadulensis* の成長点に感染させ、再生個体 12-5B を得た。除菌方法は、組織培養の培地中にカルベニシリン ( 500 mg / L ) の濃度で含有させた。その後、無菌苗をカルベニシリンなどの抗生物質を含まない MS 培地に移植し、アグロバクテリウム

の増殖がないことを確認している（別紙 3）。

得られた再生個体について挿入遺伝子 *codA* タンパクの発現解析と実際の耐塩性によりさらに選抜をすすめ、人工気象室、温室試験を経て、耐塩性及び植物体諸形質などから総合的に判断して本組換えユーカリが選抜された。第一次選抜までは組織培養個体を用い、組換え体の茎葉が分化してきた際に、200 mM NaCl を含有させた培地に移植した。本申請に関わる遺伝子組換えユーカリは形質転換当代である。

なお、本申請は、平成 15 年度に大臣確認実験として環境影響試験温室にて行った実験であり（15 文科振第 159 号、平成 15 年 6 月 20 日及び筑大研企画第 03-40 号、平成 15 年 7 月 24 日、実施開始平成 15 年 8 月 12 日、筑波大学遺伝子実験センター区画利用承認番号 1）、これを隔離ほ場で進展させるためのものである。

#### (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 核酸の存在状態

発根個体の葉の一部を採取し FAST DNA KIT(Q-BIO)によりゲノム DNA を抽出した。*codA* 遺伝子の存在の有無を確認するために、別紙 5 に示すプライマーを用い、抽出した DNA を鋳型として PCR 分析を行った。別紙 5 図 1 に示すように、*codA* 遺伝子を検出するプライマーと *ipt* 遺伝子を検出するプライマーを用いた。その結果、正常に発根した組換え体は目的の *codA* 遺伝子は検出されたが、標識遺伝子である *ipt* の存在は認められなかった。従って、今回作成した組換え体は RS 配列で挟まれた標識遺伝子部分を欠くマーカーフリー個体であると推測された。

閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉から、ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った（別紙 5 図 2）。ゲノム DNA は制限酵素 *EcoRI* で切断し、0.8 % アガロースで電気泳動した。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出した。別紙 5 図 2 に示すように、導入遺伝子は染色体に安定に組込まれたことが確認された。コピー数は 12-5B は 1 と考えられた。

##### ロ *codA* 遺伝子の発現

遺伝子組換えユーカリにおける導入遺伝子の発現を確認するため、環境影響

評価温室（特定網室）で生育させた組換え体と非組換え体を用い、RNA の確認をノーザンハイブリダイゼーション法で、タンパク質の確認をウエスタンブロットにより行った。

ノーザンハイブリダイゼーション法は葉から抽出した、20  $\mu$ g の全 RNA を変性 1.2 % アガロースで電気泳動後、ナイロンフィルター Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にプロットし行った。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子と、内部標準として *ubiquitin* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出した。別紙 7 図 1 に示すように、導入遺伝子は発現していると考えられた。

ウエスタンブロットは葉からタンパク質を抽出して行った。各 1 g の葉を採取し、ミクロ遠心管中、氷上ですりつぶした。抽出緩衝液 1 mL を加え攪拌した後、10,000  $\times$  g で 10 分間遠心することによって、可溶性画分を調製して行った。可溶性画分に含まれる可溶性タンパク質を SDS-PAGE で分離し、セミドライブロッターを用いてナイロン膜 (Immobilon PVDF; Millipore 社) に転写した。この膜をコリンオキシダーゼに対する抗体とともにインキュベートし、ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社) で検出した。コリンオキシダーゼに対する抗体は基礎生物学研究所の村田教授より譲り受けた。ウエスタンブロットによるタンパク質解析を行った結果、コリンオキシダーゼに対応する 64k Da の免疫応答性タンパク質の存在が確認された (別紙 7 図 2)。これらの結果は、導入した *codA* 遺伝子が正常にタンパクを生産していることが明らかになった。

発現形質について閉鎖系温室で、耐塩性と相関の高い耐乾燥性の試験を実施した。3 ヶ月毎日 100 mL 程度水やりをして生育させた個体を、2 週間水切りした。組換え体 12-5B は高い乾燥耐性が見られた。

環境影響評価温室において、3 ヶ月間毎日 100mL 程度水やりをして生育させた個体を、2 M の NaCl 溶液を 100 mL 各植物体に 1 度施与し、1 日置きに、100 mL 灌水し、1 週間放置した。組換え体 12-5B は耐性で、顕著な影響は見られなかったが、非組換え体は著しく乾燥萎枯した。

発現の安定性については、別紙 7 実験 3 にあげるように、実験 1 と同様のノーザン解析により遺伝子発現の安定性を確認した。苗木を環境影響評価温室に移植後 18 ヶ月目に新規の展開をしている木化していない初年度の枝部分について、葉をサンプルし、*codA* 遺伝子の発現の安定性を見た。ノーザン解析による

と安定した遺伝子発現が認められた。また、発現形質については、別紙 8 図 1 に示すように耐塩性試験を行った。環境影響評価温室に移植後約 18 ヶ月目の植物体について、200 mM NaCl 溶液 400 mL を、20 日間に渡り一日おきに計 10 回、灌漑した。遺伝子組換えユーカリでは、枝先の若葉の萎みはあったものの顕著な影響は見られなかった (B) が、非組換え体葉が著しく乾燥萎枯 (C) した。ゲノムサイズについてもフローサイトメトリーにより非組換え体との比較を行ったが、差異は認められなかった(別紙 8 表 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度

サザンブロットによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 5 µg のゲノミック DNA を用いれば検出可能である。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出する。なお、PCR による検出・同定方法に関しても、20 ng 程度のゲノミック DNA を用いれば検出可能である。プライマー (*codA*: TCCAGCTCGGTCTCCTACATCCACCC, CGGTGTTGTGCGTCTTGCGGATGTAGT; *ipt*: ATGGA TCTGCGTCTAATTTTCGG, GACTTTTTGCGCGAAAATAATGGA)を用い、抽出した DNA を鋳型として PCR 分析 [94 (1分) 55 (1分) 72 (1分) 35 サイクル]を行う。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ *codA* 遺伝子によってコードされる choline oxydase は本組換えユーカリで恒常的に発現している。

ロ 環境影響評価温室で平成 15 年に大臣確認実験を受けた後、形態及び生育の特性(別紙 8 及び別紙 9)と有害物質の産生(別紙 10)について調査した。下記に示すように、組換え体と非組換え体の間で顕著な差異は認められなかった。

a) 形態及び生育の特性(別紙 9)

樹高及び胸高直径について、別紙 9 にあがるように組換え体と非組換え体の間で、統計学的な差異は認められなかった。葉型についても大きさや外観に差異はなかった。樹形や葉色などの形態外観についても別紙 7 の写真にあがるように組換え体と非組換え体の間で顕著な差異はみられない。

b) 生育初期における低温または高温耐性

生育初期における低温耐性試験は行っていないが、隔離ほ場試験において行う予定である。非組換え体苗木については、隔離ほ場において冬期に半数の苗木は枯死した。

c) 成体の越冬性または越夏性

成体の越冬性試験は行っていないが、隔離ほ場試験において行う予定である。非組換え体苗木については、別紙 11 図 2 及び図 3 に示すように、辛うじて越冬する株もあるが、半数は枯死した。

d) 花粉の稔性及び直径

1 年生の苗木では開花はみられなかった。

e) 種子の生産性、休眠性及び発芽率

1 年生の苗木では開花はみられなかった。

f) 交雑性

本邦においては、宿主植物である *E. camaldulensis* と交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本組換えユーカリと交雑可能な *Eucalyptus* 属植物は存在しないと考えられる。また、本組換えユーカリは開花していないため試験していない。

g) 有害物質の産生(別紙 10)

閉鎖系温室及び環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉から農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って、フェノール酸を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを行った。その結果、別紙 10 (実験 1) 図 1 に示すように、組換え体と非組換え体で差異は認められなかった。

サンドイッチ法による他感物質の検定：閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉を用いて農業環境研究成果第 14 号の方法に従って、サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。その結果、別紙 10 (実験 2) 表 1 に示すように、形質転換体と非組換え体で差異は認められなかった。環境影響評価温室からのサンプル



の鍬込み試験の結果の分散分析について、環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体の葉を用いて農業環境研究成果第 14 号の方法に従って、サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。10 個体を 1 反復とし、4 反復試験した。幼根及び上胚軸の長さについて測定した。その結果、別紙 10 (実験 2) 表 2 に示すように、分散分析によると組換え体と非組換え体で差異は認められなかった。

また、これとは別に、ユーカリ栽培土壌を用いての発芽試験について、環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体のポットから採取した土壌を用いて発芽試験を行った(別紙 10 (実験 2) 表 3)。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。種子 30 粒を 1 反復とし、4 反復試験した。発芽率は、組換え体と非組換え体のポット土壌それぞれ 70 % 程度で差異はなかった。

栽培土壌における微生物相への影響評価：本組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響評価について、環境影響評価温室で、遺伝子組換えユーカリを 6 か月間(温室移植後 8 ヶ月目) 30 リットルの園芸用土にてポット栽培し、根圏土壌 30 g をサンプルした。当土壌を、滅菌水 270 mL と共に 500 mL 容量の三角フラスコにて、10 分間震盪したのち、滅菌水で希釈して寒天平板培地に塗布した。土壌 1 g あたりの糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数(CFU/g)を別紙 10 (実験 3) 表 1 に示すように、比較した。各系統について、3 反復行い、ダンカンマルチプルレンジテストによる有意差検定を行った。組換え体と非組換え体の間で有意な差は認められず、本組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響はないと考えられた。

閉鎖系温室サンプルでのガスクロマトグラフィー：閉鎖系温室及び環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体から、農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って、揮発性物質を捕集し、ガスクロマトグラフィーを行った。その結果、別紙 10 (実験 4) 図 1 に示すように、組換え体と非組換え体で差異は認められなかった。

### 3. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の情報

#### (1) 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それらに付随する行為

#### (2) 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法

所在地：茨城県つくば市天王台 1-1-1

名称：筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場（隔離ほ場）

使用期間：承認された日から平成 21 年 12 月 31 日

#### 1. 隔離ほ場の施設：(別紙 12 及び 13)

- (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。
- (3) 土、遺伝子組換えユーカリの残渣等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具及び靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、遺伝子組換えユーカリの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈殿槽及び網等を設置している。
- (4) 遺伝子組換えユーカリの栽培区画を取り囲むように防風網を設置している。

#### 2. 隔離ほ場での作業要領

- (1) 遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 遺伝子組換えユーカリを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えユーカリが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えユーカリの栽培終了後は、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- (4) 花粉飛散を防止するために、花芽が形成された場合は、これらをすみやかに切除し、オートクレーブにて不活化する。
- (5) 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、意図せずに遺伝子組換えユーカリが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

(7)(1)から(6)に掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。

(8)生物多様性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に基づき、速やかに対処する。

生物多様性影響の恐れがあると認められた時には添付書類の緊急措置計画書に定められた生物多様性影響を効果的に防止するための措置を確実に担保すること。

### 3. 生物多様性影響が生じる恐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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照

### 4. 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

閉鎖系温室及び環境影響評価温室での形質評価について行い、別紙 8 及び 9 に示すように、顕著な差異がないことが認められた。

### 5. 国外における使用等に関する情報

直接に比較はできないが、中国においてこれまでに、類似の遺伝子を用いた本申請とは異なる組換え体ユーカリ系統についてはほ場試験が行われているが、非組換えユーカリと比較して生物多様性に影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

### 1. 競合に関する優位性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

別紙 11 (隔離ほ場)にあげるように、非組換え体ユーカリ *E. camaldulensis* の苗木(30 cm 高で越冬)は成長が緩慢で、周辺の 1 年生草本に席卷されている。非組換え体ユーカリ *E. globulus* の大きめの苗木(80 cm 高で越冬)においても、周辺の 1 年生草本と競合しておらず、周辺草本の成長が著しい。

第一、2、(6)、a)項(P13)に示すように、環境影響評価試験温室においては、本組換えユーカリと非組換えユーカリとの間に生育特性に顕著な差異は認められていない。また、本遺伝子組換えユーカリにより、影響を受けると想定され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

該当せず

#### (3) 影響の生じやすさの評価

該当せず

#### (4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無の判断

以上の事から本組換えユーカリは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は非組換えユーカリとの間に大きな相違はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合に関する優位性に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

### 2. 有害物質の産生性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

これまでにユーカリが、生物多様性に影響を生じさせるような有害物質を産生させる報告はされていない。

本組換えユーカリは、耐塩性を choline oxydase の機能により付与されているが、当該酵素は有害物質に該当しない。本組換えユーカリと対象の非組換えユーカリとの間で、第一、2-(6)、(g) 及び別紙 10 に記載したように、

参考として液体クロマトグラフィー(別紙 10 (実験 1))及びガスクロマトグラフィー(別紙 10 (実験 4))により比較した。その結果、それぞれの溶出パターンに差異は認められなかった。サンドイッチ法の試験結果には、顕著な違いは認められなかった(別紙 10 (実験 2))。鋤き込み試験においても統計学的に顕著な差異は認められなかった。土壌サンプルの主要微生物の集団頻度においても統計学的に顕著な差異は認められなかった。

このため、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

該当せず

(3)影響の生じやすさの評価

該当せず

(4)生物多様性影響が生じる恐れの有無の判断

以上から、本組換えユーカリは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換えユーカリとの間に大きな相違はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬、廃棄及びこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に関して、生物多様性影響を生じるおそれがないと判断された。

3. 交雑性

(1)影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本邦においては、*E. camaldulensis* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていない。従って、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性影響を生じるおそれのある野生動植物等は特定されなかった。

(2)影響の具体的内容の評価

該当せず

(3)影響の生じやすさの評価

該当なし

(4)生物多様性が生じるおそれの有無の判断

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

4.その他の性質

該当なし

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性に関わる形質について、本組換えユーカリと対照の非組換えユーカリとの間で有意差はないと判断した。以上から、本組換えユーカリは、非組換えユーカリとの間に大きな相違はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為により、競合における優位性に関して、生物多様性影響を生じるおそれがないと判断された。

有害物質の産生に関して、本組換えユーカリは、耐塩性を choline oxydase の機能により付与されているが、当該酵素は有害物質に該当しない。また、本組換えユーカリと対象の非組換えユーカリとの間で、液体クロマトグラフィー分析、サンドイッチ法試験、鋤き込み試験、土壌の主要微生物の集団頻度においても統計学的に顕著な差異は認められなかった。このため、有害物質生産性がないと判断された。

交雑性について本邦においては、*E. camaldulensis* を含め本組換えユーカリと交雑が可能な *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていない。従って、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性を生じるおそれはないと判断された。

以上のことから、本組換えユーカリは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為により、我が国の生物多様性に影響が生じるおそれがないと結論された。なお、隔離ほ場配置図は、別紙 12 及び 13 に示している。

## 緊急措置計画書

平成17年3月16日

氏名 国立大学法人 筑波大学  
学長 岩崎洋一  
住所 茨城県つくば市天王台 1-1-1

第一種使用規定の承認を申請している耐塩性ユーカリ *E. camaldulensis* codA 12-5B、(以下、本 LMO 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、弊学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方法への協力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。なお、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とは、本 LMO に関して、科学的に我国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

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

平成17年3月現在

個人情報につき公開しない



## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

## 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を対処する必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

実験従事者に直接口頭で伝え、事実を記録する。

## 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置等

具体的な措置として、本 LMO を隔離ほ場内で鋤き込むか抜き取ってオートクレーブあるいは焼却処理するなどして隔離ほ場外への本 LMO の放出が行われないようにすること、また隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本 LMO が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

## 5 文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制

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

## 別紙 文献情報

1. [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Eucalyptus\\_camaldulensis.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Eucalyptus_camaldulensis.html)
2. Eucalyptus seed, D.J.Boland, M.I.H.Brooker and J.W.Turnbull 著, CSIRO Australia(1980)
3. ユーカリの生物学、L.O.プライオー著、石倉成行訳、朝倉書店
4. 未来の生物資源ユーカリ -そのバイオテクノロジーとバイオサイエンス-、西村弘行 編、内田老鶴圃 刊
5. Eucalypt domestication and breeding, K.Eldridge, J.Davidson, C.Harwood and G.van Wyk. Oxford University Press,(1993)
6. Field guide to Eucalypts South-eastern Australia, M.I.H.Brooker and D.A.Kleinig, Inkata Press, Sydney, (1983)
7. Nutrition of Eucalyptus, P.M.Attiwill and M.A.Adams, CSIRO Publishing, (1996)
8. 日本野生植物図鑑、八坂書房(1999)
9. Eucalyptus globules. MEDICINAL PLANTS OF THE WOLRD. Vol. 2. Humana Press, New Jersey. Ross, I. A., (2001)
10. Medical Botany, Lewis, W. H. & M. P. F. Elvin-Lewis, Wiley, NY, 1977
11. Ebinuma H and Komamine A, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, vol.37, p.103-113, 2001
12. Hayashi H et al, Plant J., vol.12, p.133-142, 1997
13. 河岡 明義 等、第70回紙パルプ研究発表会、p.2-7, 2003
14. OECD Database of Field Trials , <http://webdomino1.oecd.org/ehs/biotrack.nsf>
15. ILSI, <http://www.cropcomposition.org/>

別紙 目録

別紙 1	実験従事者	2
別紙 2	つくば市周辺におけるユーカリ栽培状況 / 海外での試験状況	3
別紙 3	海外でのユーカリを用いた遺伝子組換え体の第 1 種使用例	7
別紙 4	プラスミド pMATCODA の全塩基配列	8
別紙 5	宿主内における供与 DNA の存在状態	13
別紙 6	閉鎖系温室における組換えユーカリからの <i>Agrobacterium</i> 残存性検定結果	15
別紙 7	供与 DNA 由来の発現形式	16
別紙 8	環境影響評価温室における組換えユーカリの耐性評価	18
別紙 9	環境影響評価温室における組換えユーカリの生育評価	22
別紙 10	組換えユーカリと非組換えユーカリから放出される成分の分析結果 (高速液体クロマトグラフィーのチャートと鋤き込み試験) 環境影響評価温室で生育させた組換え体と非組換え体から、揮発性物質を捕集し行ったガスクロマトグラフィーの分析結果	27
別紙 11	隔離ほ場での非組換えユーカリの生育状況と植生との競合の有無	32
別紙 12	屋外特定区画 外略図	34
別紙 13	実験ほ場配置	35

別紙 1 実験従事者

氏名	所属部局・職名	病原性微生物取扱い経験の有無	宿主の取扱い経験の有無	組換え DNA 実験経験の有無
<p>※個人情報につき公開しない</p>				

1 調査方法

つくば市に設置予定の遺伝子組換えユーカリの屋外試験場を中心とした半径 10 km の範囲において植栽されているユーカリの分布状況を現地調査により把握した。分布が認められた場合は、その位置、規模、種類等を明らかにした。

図 1 に示す調査範囲のうち、以下に示す緑地においてユーカリ植栽の可能性が高いと考え、これら緑地周辺を中心に調査を行った。

- 茨城県およびつくば市が管理する都市公園等
- 研究機関、工場等
- 街路樹
- 造園業者圃場等

2 調査結果

(1) 植栽ユーカリ属の分布状況の把握

(a) 茨城県およびつくば市が管理する都市公園等

つくば市内において 141 公園（総面積 1,908,693 m<sup>2</sup>）が整備・管理されている。現地調査の結果、これら都市公園の主な植栽樹種はアラカシ、シラカシ、サクラなどで、ユーカリはすべての公園において植栽されていなかった。

(b) 研究機関、工場等

現地において、研究機関、工場等を調査した結果、表 2-1 に示す 3 地点で植栽されたユーカリを確認した。

表 2-1 ユーカリの植栽地確認場所

No.	植栽ユーカリ確認施設	目的	栽培方法	確認場所
1	国立科学博物館附属 筑波実験植物園	展示	温室	つくば市天久保 4-1-1
2	国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場	試験	ビニールハウス	つくば市八幡台 1
3	日立電線株式会社	緑化	野外	土浦市木田余町 3550 番地

(c) 街路樹、造園業者圃場等

街路樹、造園業者等を調査した結果、表 2-2 に示す 1 地点で植栽されたユーカリを確認した。

表 2-2 ユーカリの植栽地確認場所

No.	植栽ユーカリ確認施設	目的	栽培方法	確認場所
4	新治村役場	緑化	野外	新治郡新治村藤沢 975 番地

(2) ユーカリ植栽地詳細調査

(1)で把握されたユーカリ植栽地において、ユーカリ属の生育状況等詳細な調査を実施し、表 2-3 にまとめ、確認地点は図 2-1 及び図 2-2 に示した。

表 2-3 ユーカリ属の生育状況等詳細調査結果

No.	植栽ユーカリ 確認施設	植 栽 状 況				
1	国立科学博物館 附属筑波実験植 物園	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
		展示	サバンナ気候の植物展 示用に植栽している。	温室		—
		生育 状況	樹高 約 14 m	直径 —	生育 良好	花芽 なし
	備 考	<p>・温室内のため、定期的に伐採している。</p> <p>・温室は自動開閉のため、夏場の日中は開きっぱなしである。</p> <p>・<i>E. camaldulensis</i>、<i>E. globulus</i>はかつて植栽されていたが、成長が早く、また日本国内で比較的どこでも見ることができるので、展示をやめ野外に植えかえた。その後、枯死した。</p>				
2	国立医薬品食品 衛生研究所筑波 薬用植物栽培試 験場	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
		試験	国内外の薬用植物遺伝 資源の収集・保存を行 っている。	ビニールハウス	<i>E. citriodora</i>	—
		生育 状況	樹高 —	直径 —	生育 —	花芽 —
	備 考	・調査実施日は、施設内へ立ち入りはできなかった。				
3	日立電線（株） 土浦工場	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
		緑化	土浦工場が建設された 当時、「成長が早い」と いう樹種特性に縁起を かつぎ植栽した。	野外	<i>E. spp.</i> 15本	S38 頃
		生育 状況	樹高 約 20 m	直径 —	生育 良好	花芽 —
	備 考	・民間施設のため、施設内への立ち入りはできなかった。				
4	新治村役場	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
		緑化	保健センターが設立さ れた頃に、おそらく記 念樹として植栽された が詳細は不明である。	温室	<i>E.</i> <i>camaldulensis</i> (未同定)	H1 頃

		生育状況	樹高	直径	生育	花芽	結実
			約 20 m	50 cm	良好	なし	なし
	備考	-					

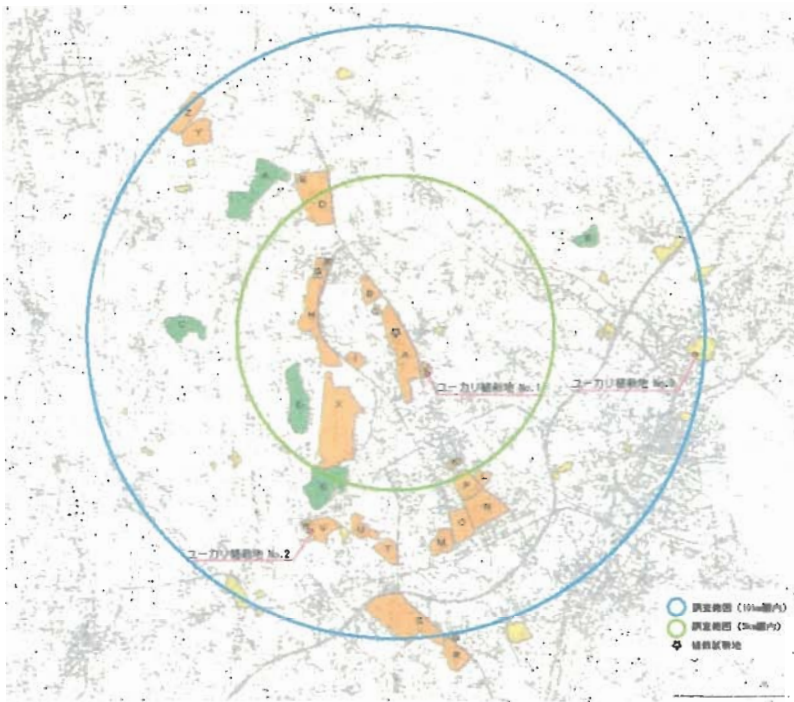


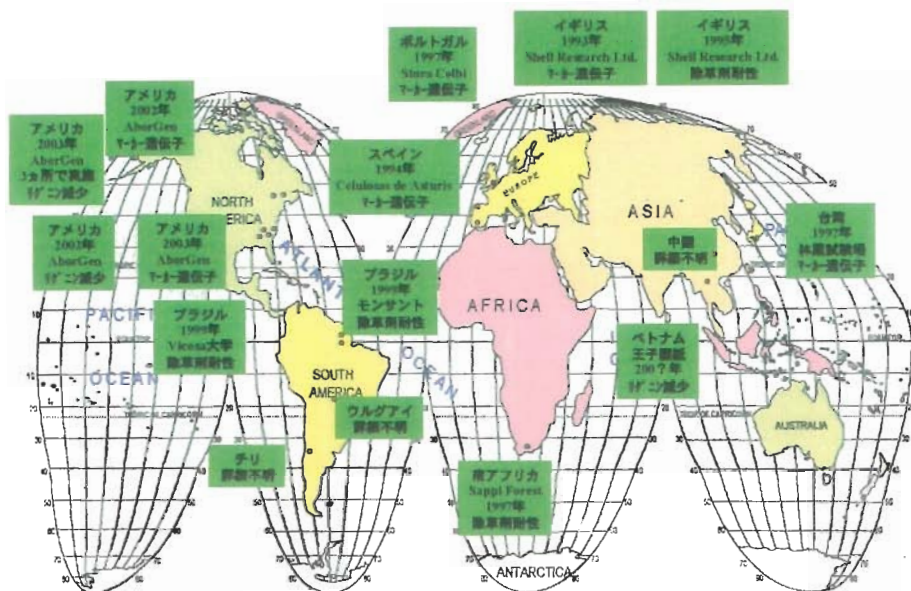
図 2-1 研究機関及び工場等で植栽されたユッカの分布



図 2-2 業者等で植栽されたユッカの分布



別紙3 海外でのユウカリを用いた遺伝子組換え体の第1種使用例



別紙4 プラスミド pMATCODA の全塩基配列

tgagcgtcgcaaaggcgctcggctcttgccttgcctcgtcgtcggatgtacttaccagctcccggaagtgcctctcttgatggagcgcattggggacg  
tgccttgcaatcacgcgcacccccggcgttttagcggc taaaaaagtcattggctctgccctcgggcgaccacgcccatcatgaccttgccaag  
ctcgtcctgctctctctcgtatcttcgccagcaggggcaggatcgtggcatcaccgaaccgcgctgcggggctcgtcggtagccagagtttcag  
caggcccccaggcggccccaggctgccattgatgcgggcccagctcgcggacgtgctcatagctccacgacgccgtgattttgtagccctggccgac  
ggccagcaggttagccgacaggctcatgccggccgcgcgccttttctcaatcgtctctcgttcgtctcgtcgtcggaggcagctacacctgataggtgg  
gctgcccttctgggtggcttgggttcatcagccatccgcttgcctcctcgttacgcggcggttagccggccagcctcgcagagcaggattccc  
gttagcaccgccaggctgcgaataaggacagtgaaagaagaaaccccgcctcgcgggtggcctacttaccatacctgccggctgacgcccgtg  
gatacaccagaagatctacacgaacctttggcaaaatcctgtatctcgtcgcgaaaaaggatggatataccgaaaaatcgtataatgacccc  
gaagcagggttatgcagcggaaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcga  
cgaggagcctccagggggaaacgcctggatctttatagctcgtcgggttccgccacctcgtacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcag  
ggggcgggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctcctggccttttgcctggccttttgcctacatgttcttctcgtgta  
ccccgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcaggg  
aagcggagagcgcagaaaggccgagagagccgagcgcggcctgaggcttggacgctagggcagggcatgaaaaagcccgtagcggcctgct  
acggcgctcgtacgcgggtgaaagggggaggatgttgcctacatggcctcgtcgttagtgagtggttgcctcggcagcggctcctgatacaatc  
gtcacccttctcggctctcaacgcttctcagcaacgagcctcctttcgcgaatccatcgacaatcaccgcagctcctcgtcgaacgctcgtc  
cggaccggctcgtcgaaggcgtctatcgcggcccgaacagcggcgagagcggagcctgttcaacggtgccgcgcgctcgcggcctcgtcgtc  
gccggcctgctcctcaagcagcggccccaacagtgaaagtgcgtgattgctatcagcgcattgacggcgtccccggcggaaaaaccgctcgcagag  
gaagcgaagctgcgcgctggcctttccatctcgggtgcgcccggctcgcgtcggcatggatgcgcgcgcacatcgcggtaggcgagcagcgcctg  
cctgaagctgcgggcatcctccgacagaaatgagcgcagctcgtcgtcggcctcggcaccgaatgcgtagatctccgccagcaggttggc  
cagtgctcgtcagcagcgcgcctgttctcgaagtgcagtaaaagcgcggctgcgtaacccccaacgcttccgcccagtttgcgtgctcagacc  
gtctacggcagctcgttcaacaggtccaggcggcagcaggtacactgtattcggctgcaactttgtcatgcttgacactttatcactgataaacat  
aataatgtccaacacttatcagtgataaagaatccgcgcttcaatcggaccagcggagctggtccggaggccagcgtgaaacccaacataccc  
ctgatcgtaatctgagcactgtcgcgctcagcgtcgtcggcctcggcctgatattgccggctgctcggggcctcctcgcgcatctggttactc  
aacgacgtcaccgcccacatggcattctgctggcgtcgtatgcttgggtgcaatttgcctgcgcacctgctgctgggcgcgctcgtcggatcgtt  
ggcgggcgcccaatcttgcctcgtcctcgtcggcggcgcagatctggggaacctgtggttggcatgcacatacaaatggacgaacggaataaacct  
ttcagccccttttaataatccgattatcttaataaacgctctttctcttagGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAaacactgatagtttaaac  
tgaaggcgggaaacgacaatctgatcatgagcggagaatgaaggagctcagcttatgaccccccgatgacgcgggacaagcggcttttacgcttg  
gaactgacagaaccgcaacgattgaaggagcccactcagccccatcgcctcagcctgagcgcacgtttgggaaggcgcagcggctcggcgcct  
ttcgtattacccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcagtaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgagctgtgaaacgac  
ggccagtgccaagcttgcgactctagaggatcccTgcatgctcaggtccccagattagcctttcaatttcagaaagaatgtaaccccag  
atggttagagaggcttacgagcaggtctcatcaagcagatcaccgagcaataatcaccagaaatcaataaccttcccagaaggttaagat  
gcagtaaaaagattcaggactaacgcatcaagaacacagagaaagatataatctcaagatcagaagtactatccagtatggacgattcaagc  
ttgcttcaaaaacaggcaagtaatagagattggagctctaaaaaggtagttcccactgaatcaaaaggccatggagtcгааатcaaatagag  
gacctaacagaactcgcgtaaaagactggcgaacagttcatacagagctctctacgactcaatgacaagaagaaaaatctcgtcaacatggtggag  
cacgacacacclgtctactccaaaaatcaaaagatacagctcagaagacaaaaggcaatttgagactttcaacaagggttaatatccggaac  
ctcctcggattccattgcccagctatctgtcactttattgtgaagatagtgaaaaggaaaggtggctcctacaaatgccatcatgcgataaagga  
aaggccatcgttgaagatgcctcgcgcagctggctccaaagatggacccccaccacgaggagcactcgtggaaaaaagaagacgttccaaccag  
cttcaaaagcaagtgattgatgtgatactccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccttctctataaagga  
agttcatttcaatttgagagaacacgggggactctagatgtaattaacaatggccttctcagttcttctcctcgcagcagttgccaccgcagcaa  
tgttgcctcaagtaacatggttgacactttcactggccttaagtcagctgctcctatccctgttcaaggaaagcaaaaccttgacatcactlccat  
tgccagcaacggcggaaagagtgcaatgcatgcatatgcacatcgacaacatcgagaacctgagcgcagggagttcgcactacatcgtcgtcggcgg  
cgggtcgcggggggcgcgctcgcgcggcggctgagcagagatcccgcagtgagcgtggcgtggtggaggccggccggatgaccgcccgtgcc  
cgaggctgctcagctggaccgctggatggagctgctggaaatcgggctacgactgggactaccgatcagcgcagggagaacggcaactcctcct  
gcgcatgccctgccaaggctatggcgggctgctccagccacaactcctgcatgcctcttgggccccgcgagggacctggacgagttgggaggc  
caagtacggcgcaccggctggaacgccgagggcggctggcgcgtgtacaagcggctggaaaccaacgaggacgcgggcccggacgcgcgcacca  
cggggactccggccccgtgacactgatgaactgccccgaaggaccgacccggcgtcgcgctcctggacgctcgcgagcaggccggcatcccgcg  
cggaagtcaacaccggcaccacgctggctaacggcgcacacttctccagatcaacggcgcgcggacggcaccgcctcctccagctcggctct  
ctacatccaccgatcgtcagcagggagaacttaccctgctaacggcctcgcgcggcggcagctgggtgtcgcagcggacagggcgtcaccgg  
cgctcagatcgtggactccgcttccggcgcaccatccgctgacggcgcgcaatgaagctcgtcctccaccggcgcgatcgatacgcggaagct

gttgatgctctccggaatcggccccgcccccacctcgccgagcacggcatcgaggctcttggtggactccccggcgtgggcgagcacctgcagg  
accaccgggaaggcgtggtgcagttcgaggccaagcagcccatggtcgccgagtcacgcagtggtgggagatcggcatcttacccccaccgagg  
acggcctggaccgccccgacctgatgatgcaactacggctccgtgcccgtcgacatgaacacctcgggcacggctacccccaccgagaaacgggc  
ttcagcctcaccocgaacgtcacgcacgcccctccccggcactgtccggctgcccagccgacttccgcgataagcccatggtcgaccggc  
tacttcaccgaccagaaggccatgacatgcccgtcatggtcgccgcatccgcaaggccccgaaaatcgcccagcccgccatggcggaatg  
gaccggccggagctctccccggcgtcgaggcgcagaccgacgaggagctgcaggactacatccgcaagacgcacaacaccgcttaccaccocg  
ggcaccgtgcccagtgggcggcgtcgaggacgagatgtccccgctcgaccocgagctcggggtcaaggcgtcaccggctgcccgtcgccgacgc  
ctggctcatgcccgagcactgaccgtcaaccccaacatcaccgtcatgatgatcgccgagcgtgcccggaccttatccgctccgcccggccg  
tgaaacaacgacggcggacgcccagctgagcgcggccctcgccaaagcgggagcggccagccggggcctgtccggaaccacctggggggcccc  
catggggccggacacaatgcccgttaactaagggtgcccgaagcagtcctgcttccacaccgcgtttgacgcccggccggcaactggcccggcc  
ggctaagccgaaggctctccggggggccggatcgctgcccggcagtcctcgccagccgctgcagcgtgcccggcggtaattggcggtgtaggca  
gagctogaattccccgatggttcaaacatttggcaataaagtttcttaagattgaaatcctggtgcccgtctgcatgattatcatataatctt  
gttgaaattacgttaagcatgtaataatfaacatgtaatgcatgacgttatattatgagatgggttttatgatlagagtcgccaatatacattta  
atacgcgatagaaaacaaaatagcgcgcaaac taggataaattatcgccgcccgggtgcatctatgttactagatcgggGGAATTCtaccocg  
gatcatgagcggagaattaaggagtcacgttatgacccccccgatgacgcgggacaagccgttttacgtttggaactgacagaaccgcaacgtt  
gaaggagccactcagcccggggtttctggagtttaatgagctaacacatacgtcagaaccatattgcccgttcaaaagtcccgaaggtcact  
atcagctagcaaatatcttctgtcaaaaatgctccactgacgttccataaattccccctcggtatccaattagagctcctatctcaatcca  
aataatctgcagatcctagacgatcgtttcggatccccgggggtggtcagtccttatgttacgtcctgtagaaacccaaccgctgaaatcaaaa  
aactcgacggcctgtgggcatcagctcggatcgcaaaaactgtggaattgatcagcgttggtgggaaagcgcgttacaagaaagccgggcaattg  
ctgtgccagcagtttaacgatcagttcggcagatgcagatattcgttaattatgcccgaacgtctggatcagcgcgaagctttataccgaaag  
gttggcagccagcgtatcgtgctgcttccgatgcccgtcactcattacggcaaaagtgtgggtcaataatcaggaagtgatggagcatcaggc  
gctatacgcatttgaagccgatgtcacgcccgtatgttatgcccgggaaaagtgtacgtatacaccgtttgtgtgaacaacgaactgaactggcaga  
ctatccccggggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaagcagctcttacttccatgatttctttaactatgccggaatccatcgcagc  
taatgctctacaccacgcccgaacacctgggtggacgatatcaccgtggtgacgcatgtcgcgcaagactgtaaccacgcgtctgtgactggcagg  
tggtggccaatggtgatgtcagcgtgaaactgcgtgatgcccgatcaacaggtggttgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtgtga  
atccgcacctcggcaaccgggtgaaggtatctctatgaactgtgctcacagccaaaagccagacagagtgatgatctaccgcttcgctc  
gcacccggtcagtggcagtgaaaggccaacagttcctgattaaccaaaaaccgttctactttactggctttggctcgtatgaagatgggacttac  
gtggcaaggattcgataacgtgctgatggtgcacgaccacgcattaatggactggatggggccaactcctaccgtacctgcattaccttacg  
ctgaagagatgctcgactgggcagatgaacatggcatcgtggtgatgatgaactgctgctgctggctttaaactctctttaggcattggttccg  
aagcgggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtcacggggaaaactcagcaagcgcacttacaggcattaaagagctgalagcc  
gtgacaaaaaccaccaagcgtggtgatgtggagtattgccaacgaaccggataaccgctccgcaagtgcacgggaatatttcccactggcggag  
caacgcgtaaacctgaccgacgcgtccgatcaccctgcgtcaatgtaatgtctcgcagcctcacaccgataccatcagcgtctctttgatgtgc  
tgtgctgaaccgttattacggatggtatgtccaaagcggcatttggaacggcagagaaggtactggaaaaagaactctggcctggcaggaga  
aactgcacagccgattatcatcaccgaatacggcgtggatagcttagccggcgtgactcaatgtacaccgacatgtggagtgaagagtatcag  
gtgcatggctggatattgatcaccgctctttgatcgcgtcagcgcctgctggtgaaacaggtatggaatttccgcatggttggaccctgcaag  
gcatttgcgcttggcggtaacaagaaaggatcttccactcgcgaccgcaaacggaagtcggcggctttctgctgcaaaaacgctggactggca  
tgaactcgggtgaaaaaccgagcagggaggcaacaatgaatcaacaactctcctggcgcaccatcgtcggctacagcctcgggaattgctaccg  
agctcgaatttccccgatcgttcaaacatttggcaataaagtttcttaagattgaaatcctggtgcccgtcttgcgatgattatcatataatctt  
ttgaattacgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatattatgagatgggttttatgatlagagtcgccaatatacatttaa  
tacgcgatagaaaacaaaatagcgcgcaaac taggataaattatcgccgcccgggtgctcctatgttactagatcggGAATTCgtaatcatggct  
atagctgttctctgtgtaaatgtttatccgctcacaattccacacaacatacagcgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcttaatgagt  
gagtaactcacattaattgctgtgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgctccagctgcattaatgggaatCCTGCAGGggtat  
tgtggaatggagtggtgtgtggaacggggttaattgtaatgataatgataatgataacgggtgggttatagagcatgcatctgctcagttac  
atgatagattgtaagggcggcagcgggtatggcctaataaatttagtttagcttaataataatttagttttctagggagatcatatcactgtg  
acgttgatgaaagaatacgttatctttcatcaaatcgtctttcattaatcgttctttcatcaaatcgttctttcatcaagtcgttctttcact  
aaccgtaccgcccagaaaggagcctgcccagcgggttgcacagaattaaccattactctatcgaataaacattgactacgagaagcttgca  
tgccggtccccagattagcctttcaatttcagaaagaatgctaacccacagatggttagagaggcttacgcagcaggtctcatcaagacgatcta  
cccagcaataatctccaggaatcaaaatccttcccagaaggttaaagatgcagtcaaaagatcaggactaacgcacaaagacagagaa  
agatatatttctcaagatcagaagctactattccagatgagcagatcaaggcttgcttcaaaaacaggcaagtaatagagattggagctctaa  
aaaggtagttcccactgaaatcaaaaggccatggagtcaaaagatcaaatagaggacctaacagaactcggcgtaaagactggcgaacagttcataca  
gagctcttacgactcaatgacaagaagaaaatcttctgcaacatggtggagcagcacacacttctctactccaaaaatataaagatcacgctc

agaagaccaaaggcaattgagactttcaacaaaggtaatatccggaacctctcggattccattgcccagctatcigtactttatigtgaa  
gatagtggaaggaagggtggctcctacaatgccatcattgcgataaaggaaggccatcggtgaaatgacctgcccagcagtggtcccaaga  
tgaccacccacgaggagcatcggtgaaaaagaagcgttccaaccacgcttccaagcaagtggtgatgatctccacigacglaag  
ggatgacgcacaatcccacatccttcgcaagaccttccctataataaggaagtccattccattggagagaacacgggggaccttagaggatcc  
ccgggtggtagtcccttatgcaatgaccaaggatactgaaatttcaacaattaatagacaaatgtcagacttcagcagcgttagtcaaatccct  
cccttacaccagatctctaaaaataaagacattttggagaaatgagaacctttacctaaggaaaaactagccctccatctgacgatgataatftig  
atggccaatttggcgagtcagaaaagaaggacgttccctgtcaagcgtccactttctgaaataccagaggcttatftcaaaaacattgcaatac  
gattcttccactaaaacggtatcctttgaataccatttgaagaccaagtaagcctaataaaggactcgaagatggtgtatcgccclatagatt  
gttgtgggggtacacgaaaagcctgatgatgtaatgagtcatttatctgctgtacatatgagaaaggaagcaggctcgaaaagagatttgggtaac  
aagattaatgatgaaatcactaaaaatcgctgaaacacaggaaactatttgggggtttgtcggggaagactatggacttaatagaagctagaactact  
cggcctacaacaaaagccgctacaatcttttgcctcagcgcacttttatgaaatggtttagagcagacgacttaagaaalaccgatatacagaca  
tttgaagttatccagacaagcacttggccgcatgctacgtgcttttgcctccagagactaagactggctactcgttttgtctatftcttccctgt  
aaaggacgatgacaccgctgttggcactagatctacacctccatggacagatcctattcccaaaactcgaactactgatgggatgacgctat  
gattaccagcttctcaggaacagctctgttaggctcatatgacgggtttatctcacaacatcggtatgagacatctttaaatacccaatggaccg  
aaagcgcatttaggcaggcatgtgacagcttcatatcttcaataatgagatggataaagaagccagcctctatggtaattggtctgcccgcgg  
gaagaaggtgttagccgtgtggctaaggctcgatacatgcacacgatagaaaagagtcggccttcttatttatttgcgttctatcggggtttat  
aatatcacagccgaaaggcgtgtgagttggtgatccaaatagcaaccttgaacaagacaagaatatctctatgatatacagatacagaca  
ttgatggctcggtatggaagaatgcagaaataatccaatggatgtattggttttttgagcagctatgccaggtcaagaataacgaaggtaaa  
gagataagttacaagcaagaagttcccgaggcgtcccagatftccggataatgggagaactgcactttataacgcttaacagcggcacatgtg  
aagcgcgaaagattagcattgtctgctggacgatccatcgacacctctgagagctcgaatttcccgatcgctcaaacatttggcaalaaagttt  
cttaagattgaaatccgttgcggcttggcgatgattatcatataatftctgttgaatcagtttaagcatgtaataataacatgtaatgcatgac  
gttatttatgagatgggtttttatgattagagtcggcaattatacatfttaatacggatagaaaacaaaatatagcgcgcaaac taggataaatt  
atcgcgcgggtgtcatctatgttactagatcggaGAATTCctctgtacaagtattgcagctttataaatgcatatataatgcaatcttgatg  
tttaacaacgaaggtaatggcgtaaaagaaaaatgtatgtattgtattgatcttccattatgttgaagtgcccataatgatgtataagtaa  
aatatcaactgtcgcatttatgaaatggcactgttattcaaccatcttctgtatctgtgacaatgacaacgactgcaagaagtaataataga  
cgccgttgttaaaggattgctatcatatgtgacctaatatagggacattcagctcaatgtgaaatagtcgccccttatfttgacgtctcacctaat  
caaatatacaacagatctcactctgtcgcagcaatgggtgtaatcagcgcagacaagtggcagtaaagcgcggaaaacgtccccgagtggcag  
aatagctgcccctgtattgtctgatttagtcagccttatttgacttaagggtgcccctgcttagtgacaaatgcttccaaggagacagccatgcccc  
acactgtgtgaaaaacaaatgccccttggggagacggtaaagccagttgctctcaataaggaaatctcgaggaggcaatataaccgctctggt  
agtacacttcttaatcaaaaaatcaatttgtatccaagataaccgaaaaaacttatggatctgctgctaatfttcggctcaacttgcacaggaaa  
gacgtcgaccgcggtagctcttgcaccagcagactgggcttccagctcttctgctcgatcggttccaatgttgcctcagctgtcaaccggaagcgg  
acgaccaacagtggaagaactgaaaggaacgagccgctctatacctgatgatcgccctctggtgaagggtatcatcgagccaagcaagctcalga  
aaggctgatgggggaggtgtataatfatgaggccacggcgggcttatcttgaggaggatctatctgcttgcctcaagtgcattggcgcaaacgag  
ttatggagtgccggttttctgttggcatattatcgccacaggttagcacacgaggagaccttcatgaacgtggccaaggccagagttaaagcagat  
gttacgccccgcttcaggcctttctattatccaagagttggttgatcttggaaagagcctcggtgaggcgcatactgaaagagatcgatggata  
tcgatatgccatgttgtttgttagccagaaccagatcacatccgatatgctattgcagcttgacgcagatatggaggataagttgattcatgggat  
cgctcaggagtatctcatccatgcaacgcaagaacagaaaatccccctgagttaacgcagccgcttacgacggatcgaaggtcatccattcgg  
aatgtattagtttgcaccagctccgctgacacctgtcttccattgaaataagatgttcgcaattgtttttagctttgtctgttggcagggcgg  
caagctctcagacatcatcctgttttcaaaatftatgctggtgaaacagcttcttaatctcttggaaatactagactgctcttaaaat tacgat  
gtctagatgaagatgtgatgtgaaataaaccatttaagtttccatttagaacataagtttatgaaatgttcttccatttctgctatcgaacgaat  
aagagtaatacaccfttttaacattataaaaataagttcttatacgttgtttatacaccgggaatcatttccattatfttcgcaaaaagtca  
cggatattcgtgaaagcgacaaaaactgcgaaatttgcggggaggtgtcttcagtttgcctattaatattlagtttgacactaatgttaccattgc  
agccaagctcagctgtttctttcttaaaaacgcaggatcgaaagagatgactcggcaaggttggcttggaccatgcatftctcatgcaaaagat  
gatcaactgcaggtgcactctGAATTCtgagggggtattgtggaatggaggtgtgtgtgtggaacggggttaattgtaatgataatgataatgat  
aacggtgggttatagagcattgcatctgctgagttacgatgatagagttgtaagggcggcagcgggtatggcccaaaataatttagtttagcttaat  
ataatttagttttctagggcagatcatatcactgtggacgttgatgaaagaatacgttattcttccatcaaatcgctcttccatataatctgctct  
ttcatcaaatcgctcttccatcaagctgcttcttcatcaaccgtaaccgcccagaaggagcctgcccaggggttgcacagaaatftaaaccatt  
actctatcgaataaacatttgactacgaCCTGCAGGatctcgaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaa  
ccgtaaaaaggccgcttgcctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgagcctcaagctcagaggtggcgaaacc  
gacaggactataaagataaccaggcgttccccctggaagctccctgctgctctctgttccgacctgccccttaccggatacctgtccgctt  
tctcccttcgggaagcgtgggggccttccaacagttgcgcagcctgaaatggcggccgctcccttctgcttcttcccttcttctcgcacgii

cgccggctttcccgctcaagctcctaaatcgggggctcccttttagggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaacttgatttggg  
tgatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttccgctttgacgttggagtcacgctctttaaagtgaggactctgttccaaac  
tggaacaacactcaacctatctcgggctattcttttgattataagggttttgcgatttcggaaccaccatcaaacaggatttccgctgctg  
gggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctcagggccaggcggtaagggaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaacc  
accceagtaacataaaaaagctccgcaatgtgttattaagttgtcctaagcgtcaatttgtttacaccacaataatctcggcaccagccagccaaca  
gctccccgaccggcagctcggcacaataatcaccactcgatacaggcagcccatcagctccgggacggcgtcagcgggagagccgttgtaaggcggca  
gactttgctcatgttaccgatgctattcggagaacggcaactaagctgcccgggttgaaacacggatgatctcgggagggtagcatgltgatlg  
taacgatgacagagcgttgctgctgtgatcaaatatcatctccctcgagagatccgaattatcagcctcttattcatttctcgcttaaccgtg  
acaggctgtcgtatcttgagaactatgcccacataataggaaatcgttgataaagccgctgaggaagctgagtgggcctatttctttagaagtga  
cgttgacgatacaacccccatccattgctcaccgaatggtacaggtcggggaccggaagtccgactgtcggcctgatgcatccccggctgat  
cgaccccgatctggggctgagaaagccagtaaggaacaactgttaggttcgagctcgagatccccggaaaccaaggaagtaggttaaaccgg  
ctccgatcaggccgagccacggcaggccgagaacattggttccgttaggcctcgggatggcgatcaaacacaaagctactggaacgagcagaa  
gtctccggcccgagctgcccaggcggtaaggtgagcagaggcagggagggtgccaactgcccggctcagcaggttccgaacgccatggaaccg  
ccccgccaggcccgctcgcagccgacagagatctagcgtgctgtttggtgtcaacaccaacagcggccacgcccagcttccgcaaatagcccca  
ggaccgccatcaatcgtatcgggctacc tagcagagcggcagagatgaacacgaccatcagcggctgcacagcgcctaccgtcggcgcgacccccg  
ccggcaggcggtagaccgaaataaacaacaagctccagaatagcgaatat taagtgcggcaggatgaagatgcccacccagatccccgttg  
gaatctgtcggacgatcatcacgagcaataaaccgcccggcaacgcccgcagcagcataaccggcgacccctcggcctcgtgttcgggctccacga  
aaacgcccagcagatgccccttgtagcgtctctggggcgtctctctgtttgaagaccgacgcccgaatgatctcggcctcagatgtagggcggca  
atggccacggcctcgcgaaccgttcagcgaacgctccatgggcttttctctcgtgctcgtaaacggaccgcaacatctctggagcttcttca  
gggcccgaatcggatctcgggaaatctgcacgtcggcgcctccaagccgctcgaatctgagccttaatcacaattgtcaattttaatctctgtl  
ttatcggcagttcgttagagcgcggcgtgctcccagcagatctgagcgaagcaagtgctcagcagctgcccgtgttctcgtgaaatgccagtaa  
agcgttggtgctgaacccccagccggaactgaccccaaggccctagcgtttgcaatgcaccaggctcatcattgaccagggcglgttccaccag  
gcccgtgctcgaactcttcgaggcttcggcagctgctcggccacttcttcacgcccgggtggaatccgatccgcacatgaggcgggaaggttct  
cagcttgagcgggtacggctcccggctgcgagctgaaatagtcgaacatccgctcgggcccgtcggcgacagcttgccggtacttctcccatatgaatt  
cgtgtagtgtcggcagcaaacagcagcagatttctcgtcgtcagcagcctggcaacgggacgttttcttggccaggtccaggacgcccgaagcg  
gtgcagcagcagaccgatccagggtgcccacgcccgtcggcagctgaagccatccgctcgcctgttaggcgagcagggcattctcggcctcgt  
gtaataccggccattgatcagaccagccaggtcttggcaaacgctcgtagaacgtgaaggtgatcggctcggcagataggggtgctcctcgcgtactc  
caacacctgctgccacaccagttcgtcatcgtcggcccgcagctcagcggcgggtgtaggtgatcttcagctcttgttgacgtggaataatgacct  
gttttgagcgcctcgcggggattttctgtttgcgctggtgaacagggcagagcgggcccgtgctgtttggcatcgcctcgcacgtgtcggcca  
cggcgaataatcgaacaaggaaagctgcatctcttgatctgctgcttctgtgtttcagcaacgggcccgtcttggcctcgcctgacctgtttlgc  
caggctctcggcggggttttctgcttcttggtcgtcatagtctctcggctgctgatggtcactcagcttcgccaacctgcccctcctgtctgag  
acgacgcgaacgctccacggcggccgatggcggggcaggccagggggagccagttgcacgctgtcggcctcagatcttggccgtagcttctcggac  
catcgagccgacggactggaaggtttcggggggcgcagcagatgacgggtcggcttcogatgggttcggcactcctggcggaaaaccocgctcagat  
cagttcttggctgtatgcttccgggtcaaacgtccgattcatcaccctcttggggatlgccccagctcagcgggggcaatgtgccccttatct  
ctgatctgaccgcccgtgcttgggtgctccagataatccacctatcggcaatgaagtcggctccgtagaccgtctggccgtctctctcgtactt  
ggtattccgaatcttgcctgcacgaataccagcagcccttgcacaatacttgcctgggcccggcctgagagccaaaacactlgatgcccga  
gaagtcggtgctcctgcttctcggcggcagctgctgcccacatctaggtactaaaacaatcactccagtaaaaataataatatttatttctccc  
aatcaggcttgatccccagtaagcaaaaaatagctcgacatactgttcttccccgatctctccctgatcagcggcagcagaaggcaatgtcat  
accacttgcggcctgcccgttctcccaagatcaataaagccacttacttggcactcttcacaagatgttctgctctccaggctcggcglggg  
aaaagacaagtctctctcgggcttttccgtctttaaanaatcatacagctcgcgggactctttaaagtgagtgctcttctccagtttccgcaat  
ccacatcggccagatcgttattcagtaagtaatacattcggcgaagcggctgctcagctattctgatatagggacaatccgatatgtcagtgagg  
gaaagagcctgatgactccgatacagctcgataatctttcagggcttggctcactctcactctctccgagcaaaaggacgccatcggcctcag  
tcatgagcagattgctccagccatcatgcccgttcaaggtgcaggacctttggaacaggcagcttctctccagccatagcagatctctctccc  
gttccacatcataggtggctctttataccggctgctcgtcatttttaatataggttttcaatttctcccaccagcttatataccttagcaggag  
acattctctccgtatcttttacgcagcgggtatttttgatcagtttttcaatccgggtgatattctcatttttagcatttattattctctctc  
tttctacagtatttaagatacccccaagaagctaatataacaagcgaactccaattcactgttcttgcattctaaaacctaaataaccagaa  
aacagctttttcaaagttgtttcaaagttggcgtataacatagatcagcggagccgatttgaaaccacaatgatgggtgatgctgccaactta  
ctgatcttagtgatgatgggtgttttgagggtgctccagtggtctctgtgtctatcagctgtcccctctgttcagctactgacgggggtggctgctaa  
cggcaaaagcaccgcccagcagcagctatctctgctctcactgcccgtaaaacatggcaactgcagttcacttacaccgctctcaaccggfac  
gcaccagaaaaatcattgatatggccatgaatggcgttggatgcccgggcaacagcccgatctatgggcttggcctcaaacagattttacgtcactt  
aaaaaactcaggccgagtcggtaacctcgcgcatacagccggcagtgacgtcatcgtctcgcgggaaatggacgaacagtggggctatgtcggg

gctaaatcgcgccagcgcctggctgttttacgcgtatgacagtcctccggaagacggttgttgccacgtatcgggtgaacgcactatggcgacgctg  
ggcgctcttatgagcctgctgtcaccctttgacgtgggtgatatggatgacggatggctggccgctgtatgaatcccgcctgaagggaaagctgac  
gtaatcagcaagcagatatacgcagcgaattgagcggcataacctgaatctgaggcagcacctggcacggctgggacggaagtcgctgtcgttctca  
aaatcgggtggagctgcatgacaaagtcacgggcattatctgaacataaaacactatcaataaagttggagtcattaccaatgatagaaattta  
caagctataaggttattgtcctgggtttcaagcattagtcacatgcaagttttatgctttgcccattctatagatataatgataagcgcctgct  
atgccttgccccctgaaatccttacatacggcgatatcttctataataaaagatatattatcttatcagtatigtcaatatattcaaggcaatctgc  
ctctcctcctctctcct  
cggataatcttacctatcacctcaaatgggtcgtgggtttatcgcacccccgaacacgagcacggcaccccgaccactatgccaagaatgcc  
aaggtaaaaattgccggccccgccatgaagtcctgtaatgccccgacggccgaagtgaagggcaggccgccaccaggccgcgccctcactgcc  
ggcaccctggctgctgaatgtcgatgccagcacctgcccacgtcaatgcttccgggctcgcgctcgggctgatgcccatcccgttactgcccc  
atcccggcaatggcaaggactgccagcgtgccatttttggggtgaggccgttcgcggccgaggggagcagccctgggggggatgggagcccg  
ttagcgggcccgggaggttcgagaagggggggcaccctctggcgtgcccgggtcacgcgcacagggcgcagccctggttaaaaacaaggtttat  
aaatatgggttaaaagcaggttaaaagacaggttagcgggtggccgaaaaacgggcggaaaccttgcaaatgctggattttctgctgtggaaag  
cccctcaaatgtcaataggtgcgccctcatctgtcagcactctgccctcaagtgtcaaggatcgcgccctcatctgtcagtagtcgcgccct  
caagtgtcaataaccgcagggcacttatcccaggcttgctccacatcatctgtgggaaactcgcgtaaaatcaggcgttttcgccgatttgccaggc  
tggccagctccacgtcgcggccgaaatcgagcctgccccctcatctgtcaacgcgcgcgggtgagtcggccctcaagtgtcaacgtccgcccc  
tcctctgtcagtgagggccaagttttccgcgaggtatccacaacgcggcggccggtgtctcgcacacggcttcgacggcgtttctggcgcgtt  
tgcagggccatagacggccgccagcccagcggcgagggcaaccagccgg

LOCUS AF485783 14758 bp circular DNA

別紙5 宿主内における供与 DNA の存在状態

(実験1) 発根個体の葉の一部を採取し FAST DNA KIT(Q-BIO)によりゲノム DNA を抽出した。*codA* 遺伝子の存在の有無を確認するために、図1に示すプライマー(*codA*: TCCAGCTCGGTCTCCTACATCCACCCGA, CGGTGTTGTGCGTCTTGCGGATGTA-GT; *ipt*: ATGGATCTGCGTCTAATTTTCGG, GACTTTTTCGCGGAAAAT- AATGGA)を用い、抽出したDNAを鋳型としてPCR分析[94℃(1分)、55℃(1分)、72℃(1分)、35サイクル]を行った。図1に示すように、*codA* 遺伝子を検出するプライマーと *ipt* 遺伝子を検出するプライマーを用いた。その結果、正常に発根した組換え体は目的の *codA* 遺伝子は検出されたが、標識遺伝子である *ipt* の存在は認められなかった。従って、今回作成した形質転換体はRS配列で挟まれた標識遺伝子部分を欠くマーカーフリー個体であると推測された。

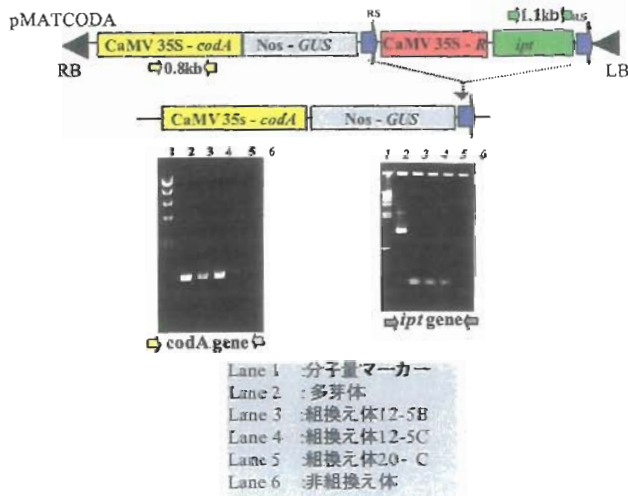


図1. PCR分析

(実験2) 閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉から、ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った。ゲノム DNA は制限酵素 *EcoRI* で切断し、0.8%アガロースで電気泳動した。プローブは、*codA* cDNA 遺伝子を DIG ラベルしたのものを用い、化学発光検出した。図2に示すように、導入遺伝子は染色体に安定に組込まれ、コピー数は12-5Bと12-5Cが1、20-Cが2と考えられた。

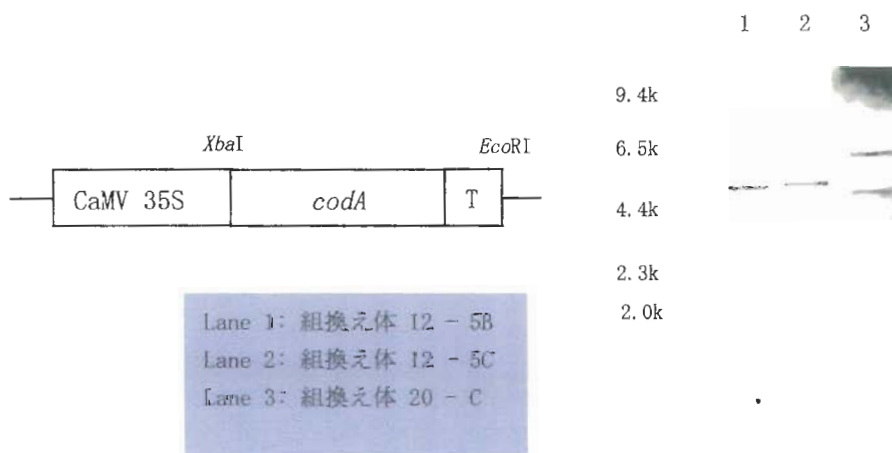


図2 サザンハイブリダイゼーション

(実験 3)

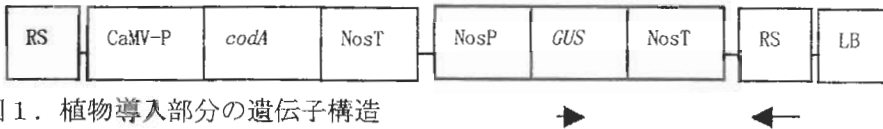


図 1. 植物導入部分の遺伝子構造

植物導入部分の遺伝子構造と RS 配列に挟まれた構造部分が欠失したデータ

各組換え体 3 系統と非組換え体の葉から抽出したゲノム DNA を鋳型として、図 1 の矢印部分の PCR プライマーを用いて PCR 反応 [94 °C (1 分)、55 °C (1 分)、72 °C (1 分)、35 サイクル] を行った。その結果、図 2 に示すように、組換え体では RS 配列に挟まれた *ipt* 遺伝子と組換え酵素遺伝子 *R* が抜け落ちた場合に予測される 1.7 kbp に DNA 断片が増幅された。以上から、組換え体のゲノム DNA 上には RS 配列に挟まれた領域は存在しないと考えられた。

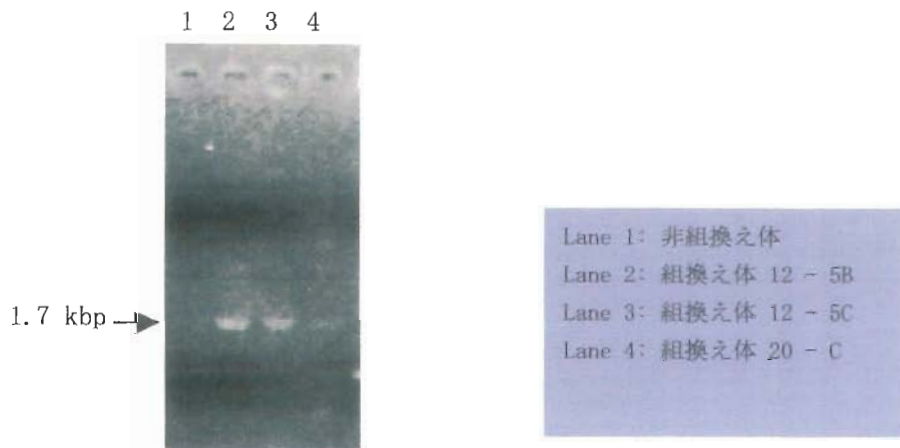


図 2. RS 配列部分 PCR の結果



別紙6 閉鎖系温室における組換えユーカリからの *Agrobacterium* 残存性検定結果

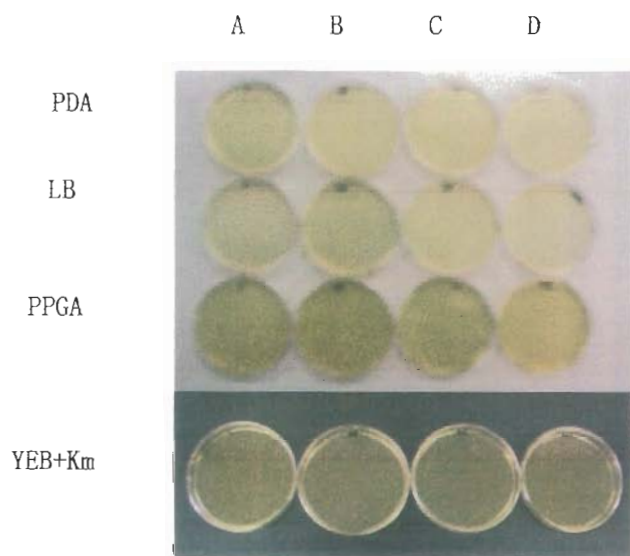
*Agrobacterium* の残存性について

閉鎖系温室における組換えユーカリからの *Agrobacterium* の分離

(実験1) 閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体から、農業環境研究所報告第8号の方法に従って、4サンプルの茎葉を採取し、振とう法により PDA、LB、PPGA、YEB+Km (50 µg / ml) 培地上に微生物を分離した。*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株と類似のコロニーをもつものは、組換え体と非組換え体いずれからも検出されなかった(表1、図1)。

表1 ユーカリ茎葉からの微生物の検出

	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の検出			
	PDA	LB	PPGA	YEB+Km
非形質転換体	0	0	0	0
形質転換体 12 - 5B	0	0	0	0
形質転換体 12 - 5C	0	0	0	0
形質転換体 20 - C	0	0	0	0



- A : 非組換え体
- B : 組換え体 12 - 5B
- C : 組換え体 12 - 5C
- D : 組換え体 20 - C

(実験1) *codA* 遺伝子の発現

特定網室で生育させた若い苗木を形質転換体と非形質転換体の葉から、全 RNA を抽出しノーザンハイブリダイゼーションを行った。全 RNA 20  $\mu$ g を変性 1.2 %アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルターHybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にプロットングした。プローブは、*codA* cDNA と、内部標準としてユビキチン cDNA (*ubi*) を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出した。図 1 に示すように、導入遺伝子は安定に発現していると考えられた。

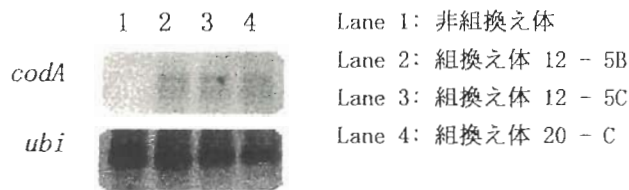


図 1 *codA* 遺伝子の発現

(実験2) *codA* タンパク質の発現

特定網室で生育させた非組換え体および組換え体の葉 1g を採取し、マイクロ遠心管中、氷上ですりつぶした。抽出緩衝液 1 mL を加え攪拌した後、10,000 x *g* で 10 分間遠心することによって、可溶性画分を調製した。可溶画分に含まれる可溶性タンパク質を SDS-PAGE で分離し、セミドライプロッターを用いてナイロン膜 (Immobilon PVDF; Millipore 社) に転写した。この膜をコリンオキシダーゼに対する抗体とともにインキュベートし、ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社) で検出した。コリンオキシダーゼに対する抗体は基礎生物学研究所の村田教授より譲り受けた。ウエスタンブロットによるタンパク質解析を行った結果、コリンオキシダーゼに対応する 64 kDa の免疫応答性タンパク質の存在が確認された (図 2)。これらの結果は、導入した *codA* 遺伝子が正常にタンパクを生産していることが明らかになった。



図 2. *codA* タンパクの発現

(実験3) *codA* 遺伝子の発現の安定性

苗木を特定網室(環境影響評価温室A)に移植後18ヶ月目に新規の展開をしている木化していない初年度の枝部分について、葉をサンプルし、*codA* 遺伝子の発現の安定性を見た。

形質転換体と非形質転換体の葉から、全RNAを抽出しノーザンハイブリダイゼーションを行った。変性1.2%アガロースで電気泳動した。プローブは、*codA* cDNA と内部標準としてユビキチン cDNA (*ubi*)をDIGラベルしたものを用い、化学発光検出した。図3に示すように、導入遺伝子は安定に発現していると考えられた。

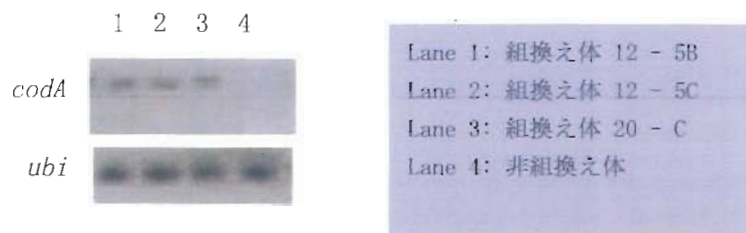


図3 *codA* 遺伝子の発現



図1 日本製紙閉鎖系温室での耐性試験

左：非組換え体ユーカリ、右：組換え体ユーカリ 12 - 5C

発現形質：閉鎖系温室で、耐塩性と相関の高い耐乾燥性の試験を実施した。3ヶ月毎日 100 mL 程度水やりをして生育させた個体を、2週間水切りした。組換え体 12 - 5C は高い乾燥耐性が見られた。



図2 環境影響評価温室A（特定網室）での耐性試験

左：非組換え体ユーカリ、右：組換え体ユーカリ 12 - 5C

環境安全評価温室Aでは、3ヶ月毎日約100 mL程度水やりをして生育させた個体を、2 M の Na Cl 溶液を100 mL 各植物体に1度施与し、1日置きに、100 mL 灌水し、1週間放置した。耐性ユーカリでは、顕著な影響は見られなかったが、非組換え体は著しく乾燥萎枯した。

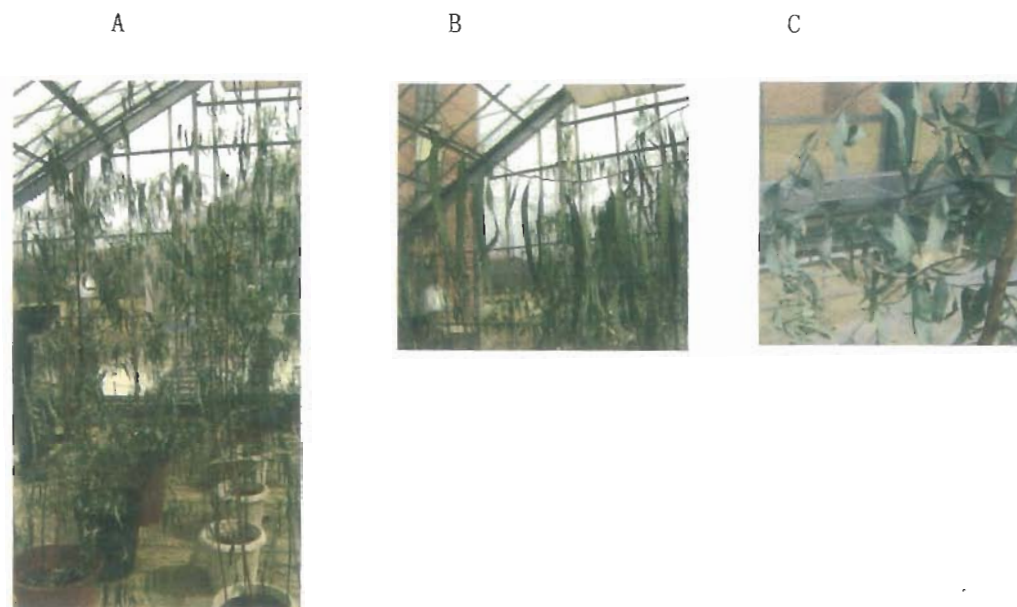


図3 環境影響評価温室に移植後約18ヶ月目の植物体について、200 mM NaCl 溶液 400 mL を、20 日間に渡り一日おきに計 10 回、灌注した。遺伝子組換えユーカリでは、枝先の若葉の萎みはあったものの顕著な影響は見られなかった(B)が、非組換え体葉が著しく乾燥萎枯(C)した。平成 17 年 2 月 24 日撮影。

A: 左手前は非組換え体、右手前は 12 - 5C

B: 12 - 5C

C: 非組換え体

表1 環境影響表か温室 A に移植後 18 ヶ月目の植物体におけるフローサイトメトリーによる倍数性の検定。  
3 葉/株、3 株の平均を示す。

系統	ゲノムサイズ(Mbp / 1C)	CV(%)
非組換え体ユーカリ下位枝の成熟葉	678.2	9.50
非組換え体ユーカリ上位枝の若葉	647.3	8.32
12 - 5B 下位枝の成熟葉	657.5	8.01
12 - 5B 上位枝の若葉	625.4	7.12
イネ(T65)	430.0	4.85

イネのゲノムサイズを 430 Mbp / 1C として推定した。

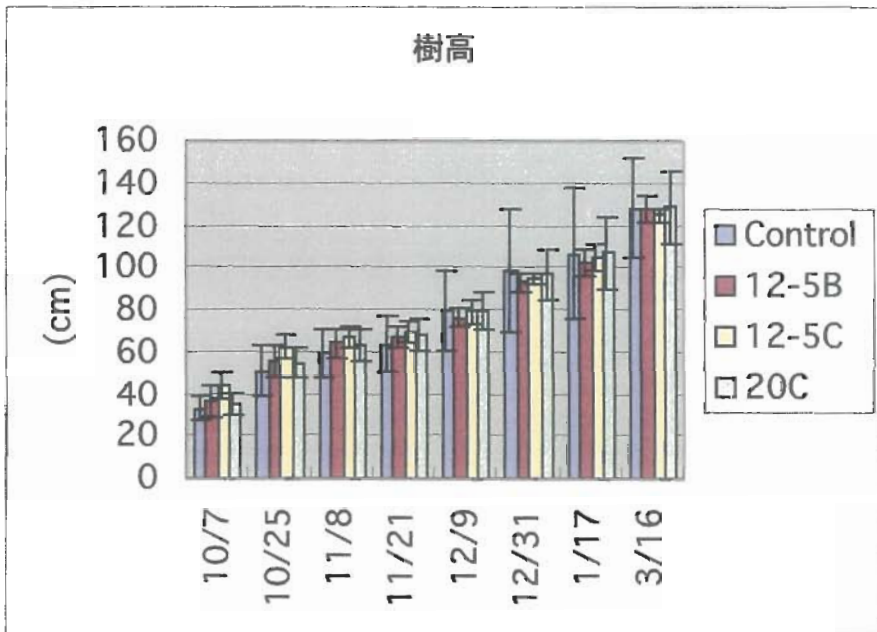


図1 樹高の推移 (平成15年10月～平成16年3月、5株平均)

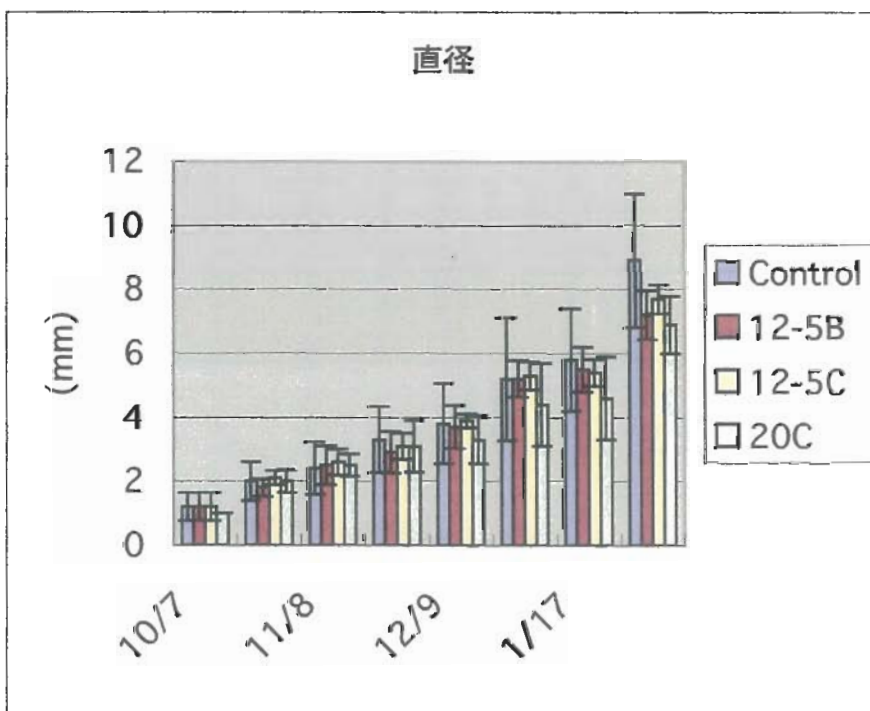


図2 茎の直径の推移 (平成15年10月～平成16年3月、5株平均)





図3 平成15年12月9日撮影 茶色ポットは非組換え体、他のポットは組換え体、両者に顕著な形態や成長の差異は認められない。

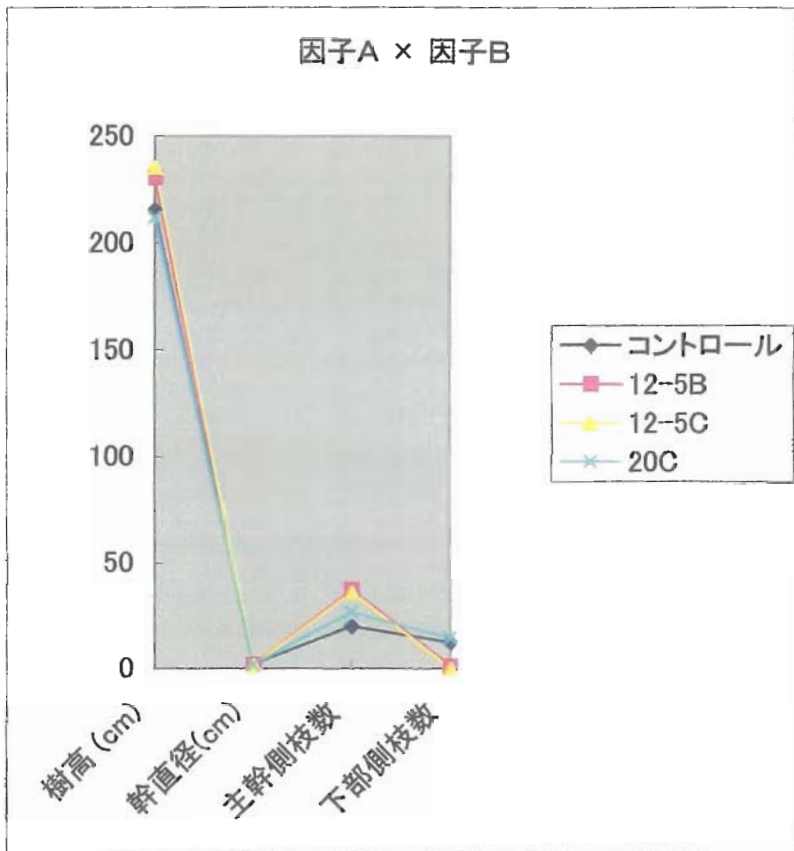


図4 平成16年11月19日（外気温が低くなり、非加温で成長が緩慢になった時期）における特定網室での基本形質の比較。単因子ANOVAによるとそれぞれの形質での有意な差は、樹高及び幹直径では認められなかった。主幹側枝数では、組換え体12-5B及び12-5Cで非組換え体（コントロール）に比べて枝数が多くなる傾向があった。一方、下部側枝数の方で、組換え体12-5B及び12-5Cで少なくなっており、総側枝数では有意な差はなかった。



図5 平成16年3月19日撮影。  
両者に顕著な形態や成長の差異は認められない。  
茶色ポットは非組換え体、他のポットは組換え体。



図6 平成16年6月26日撮影。  
灌水及び施肥を制限し、徒長しないように成長を抑制しているが、  
樹高は約2mとなっている。  
茶色ポットは非組換え体、他のポットは組換え体。

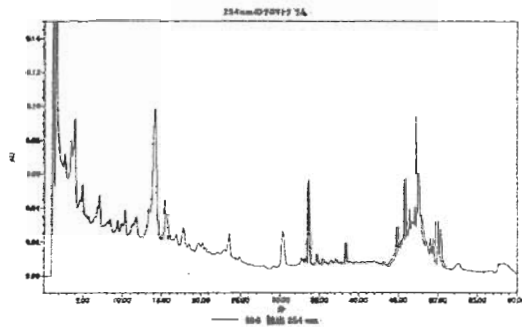


図7 平成17年2月24日撮影。  
灌水及び施肥を制限し、徒長しないように成長を抑制しているが、  
樹高は約3 mとなっている。  
茶色ポットは非組換え体、他のポットは組換え体。

有毒物質産生の有無

(実験 1) 閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉から農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って、フェノール酸を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを行った。その結果、図 1 に示すように形質転換体と非形質転換体で差異は認められなかった。

(A) 非組換え体



(B) 組換え体 12-5C

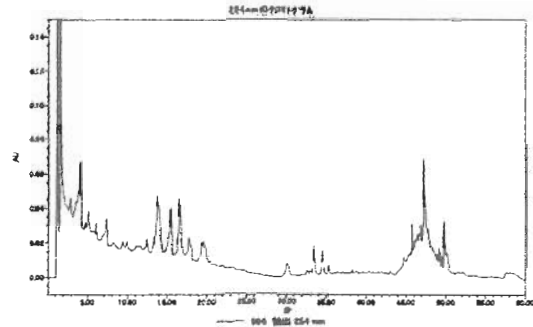


図 1 非組換え体と組換え体のフェノール系物質の高速液体クロマトグラフィーのチャート

(実験 2)

表 1 閉鎖系温室で生育させた形質転換体と非形質転換体の葉を用いて農業環境研究成果第 14 集の方法に従って、サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。その結果、表 1 に示すように形質転換体と非形質転換体で差異は認められなかった。

表 1. 鋤き込み試験

	個体数	幼根長 (mm)	上胚軸 (mm)
非形質転換体	10	4.0	9.2
形質転換体 12 - 5C	10	3.9	9.7

表 1 の結果に関する分散分析

サンドイッチ法 分散分析結果 1

胚軸

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F	P	判定
系統	3	1.475	0.4917	0.0942	0.9628	ns
誤差	36	187.900	5.2194			
全体	39	189.375				

根

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F	P	判定
系統	3	1.0	0.333	0.2198	0.8820	ns
誤差	36	54.6	1.517			
全体	39	55.6				

表2 環境影響評価温室Aからのサンプルの鋳込み試験の結果の分散分析

環境影響評価温室Aで生育させた形質転換体と非形質転換体の葉を用いて農業環境研究成果第14集の方法に従って、サンドイッチ法による他感物質の検定を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。10個体を1反復とし、4反復試験した。幼根及び上胚軸の長さについて測定した。その結果、表に示すように分散分析によると形質転換体と非形質転換体で差異は認められなかった。

サンドイッチ法 分散分析結果2 (4反復)

幼軸

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F	P	判定
系統	3	26.6186	8.8729	1.5671	0.1999	ns
反復	3	17.9186	5.9729	1.0549	0.3703	ns
系統 X 反復	9	7.7563	0.8618	0.1522	0.9978	ns
誤差	144	815.3000	5.6618			
全体	159	867.5938				

根

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F	P	判定
系統	3	4.725	1.5750	0.7431	0.5280	ns
反復	3	17.825	5.9420	2.8034	0.0420	*
系統 X 反復	9	2.225	0.2472	0.1166	0.9993	ns
誤差	144	305.200	2.1190			
全体	159	329.975				

表3 レタス種子発芽試験

ユーカリ栽培土壌を用いての発芽試験について、環境影響評価温室Aで生育させた形質転換体と非形質転換体のポットから採取した土壌を用いて発芽試験を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。種子30粒を1反復とし、4反復試験した。発芽率は、形質転換体と非形質転換体のポット土壌それぞれ70%程度で差異はなかった。

発芽試験分散分析結果

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F	P	判定
系統	3	0.0075	0.0025	0.2308	0.8782	ns
誤差	12	0.1300	0.0108			
全体	15	0.1375				

(実験3) 遺伝子組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響評価

環境影響評価温室Aで、遺伝子組換えユーカリを6か月間(温室移植後8ヶ月目) 30 リットルの園芸用土にてポット栽培し、根圏土壌30gをサンプルした。当土壌を、滅菌水270 mLと共に500 mL 容量の三角フラスコにて、10分間震盪したのち、滅菌水で希釈して寒天平板培地に塗布した。土壌1gあたりの糸状菌、放線菌及び細菌のコロニー数(CFU/g)を下記表1に示す。各系統について、3反復行い、分散分析を行った。F値で優位な差は認められず、遺伝子組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響はないと考えられた。

表1 遺伝子組換えユーカリの栽培土壌における微生物相への影響評価

系統	糸状菌	放線菌	細菌
非組換え体ユーカリ	1.95 x 10 <sup>5</sup>	4.92 x 10 <sup>5</sup>	9.64 x 10 <sup>6</sup>
組換え体12-5C	2.21 x 10 <sup>5</sup>	4.31 x 10 <sup>5</sup>	1.11 x 10 <sup>7</sup>

糸状菌

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F.	P	判定
系統	3	2.674 x 10 <sup>9</sup>	8.913 x 10 <sup>8</sup>	1.6721	0.2492	ns
誤差	8	4.264 x 10 <sup>9</sup>	5.330 x 10 <sup>8</sup>			
全体	11	6.938 x 10 <sup>9</sup>				

放線菌

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F.	P	判定
系統	3	7.892 x 10 <sup>10</sup>	2.631 x 10 <sup>10</sup>	1.4354	0.3028	ns
誤差	8	1.466 x 10 <sup>11</sup>	1.833 x 10 <sup>10</sup>			
全体	11	2.256 x 10 <sup>12</sup>				

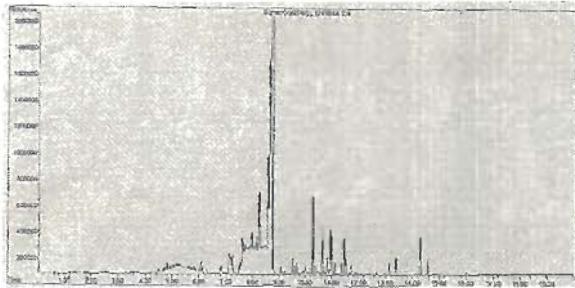
細菌

要因	d. f.	S. S.	M. S.	F.	P	判定
系統	3	4.289 x 10 <sup>12</sup>	1.4298 x 10 <sup>12</sup>	0.7790	0.5380	ns
誤差	8	1.468 x 10 <sup>13</sup>	1.8354 x 10 <sup>12</sup>			
全体	11	1.897 x 10 <sup>13</sup>				

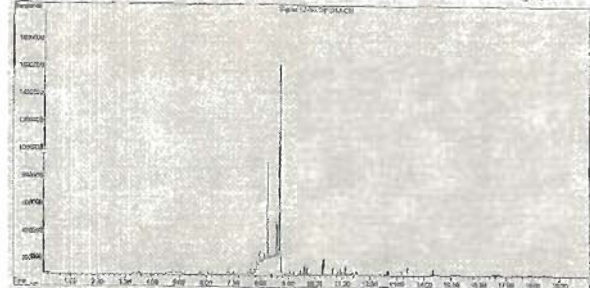


(実験4) 閉鎖系温室で生育させた組換え体と非組換え体から、農業環境研究所報告第8号の方法に従って、揮発性物質を捕集し、ガスクロマトグラフィーを行った。その結果、図1に示すように形質転換体と非形質転換体で差異は認められなかった。

(A) 非組換え体



(B) 組換え体 12-5C



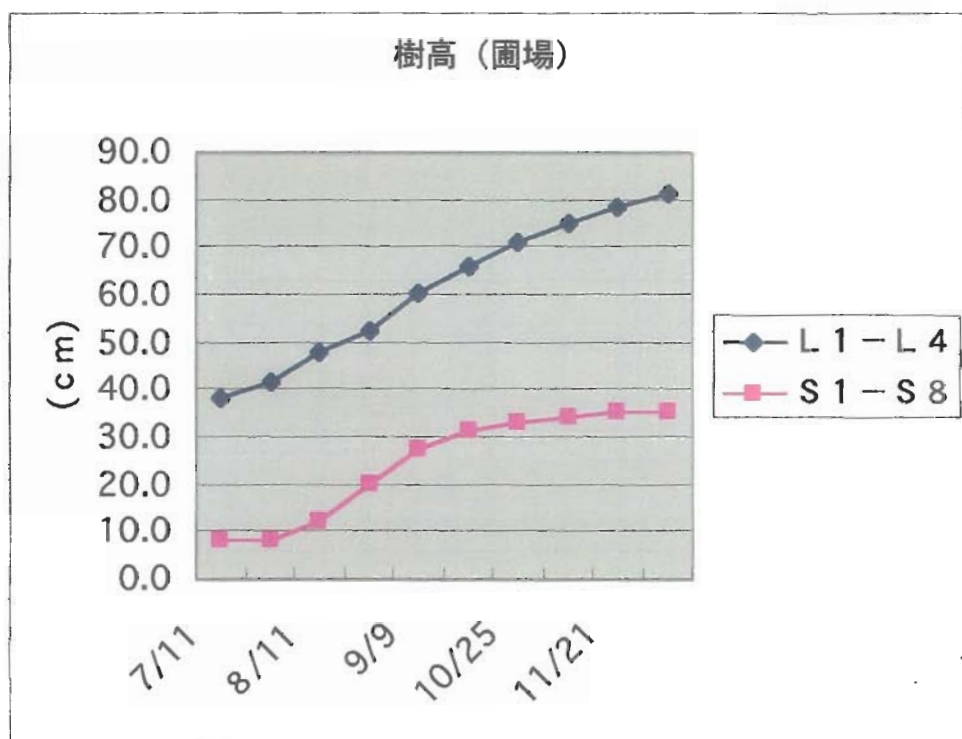


図 1 非組換え体ユーカリの隔離ほ場（屋外特定区画）の生育調査 L1-L4 は *E. globules* 4 株の平均樹高、S1-S8 は、*E. camaldulensis* 8 株の平均樹高（平成 15 年 7 月～ 11 月、以後は、低温で成長認められず）

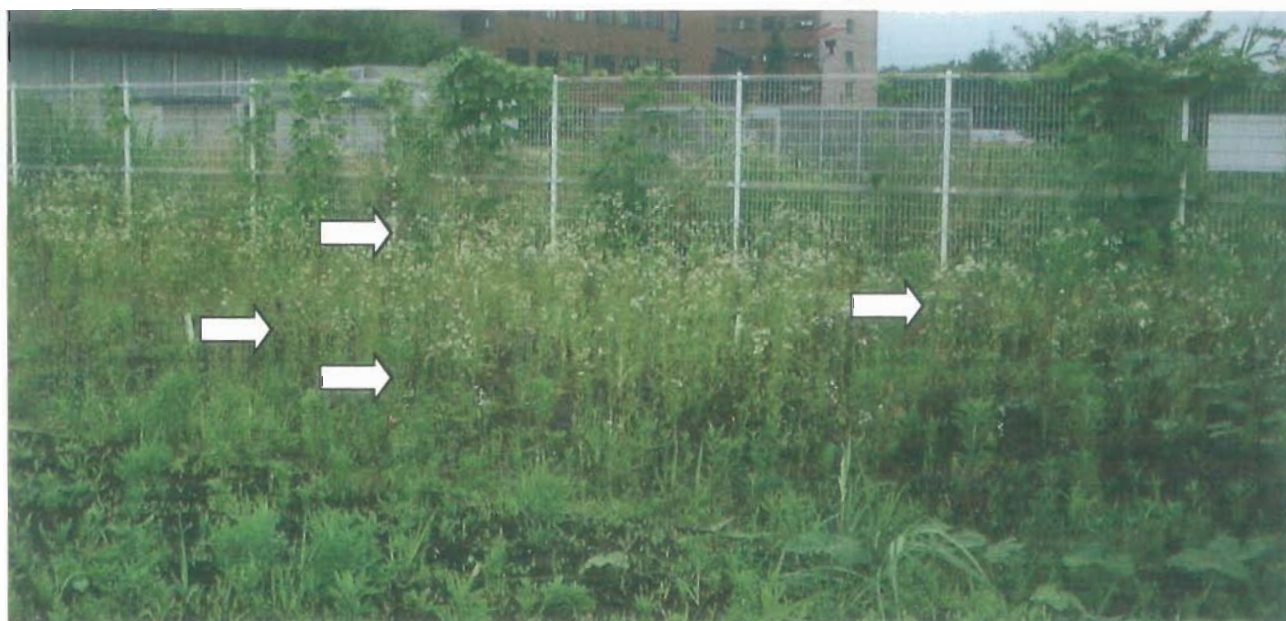


図 2 非組み換え体ユーカリ（矢印）の隔離ほ場での生育状況。前年 8 本定植したが、4 本は越冬できず、4 本のみ生き残った。1 年生草本の生育が旺盛で競合できない。（平成 16 年 6 月 13 日）

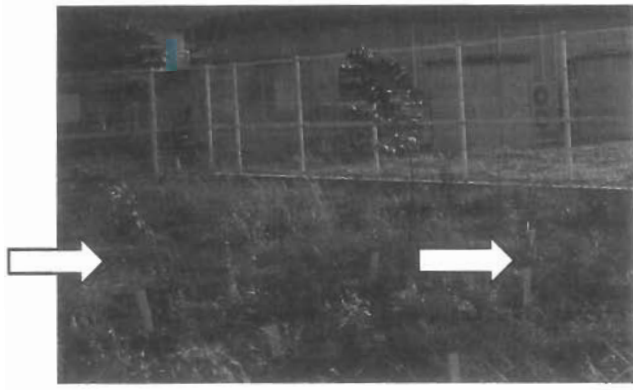
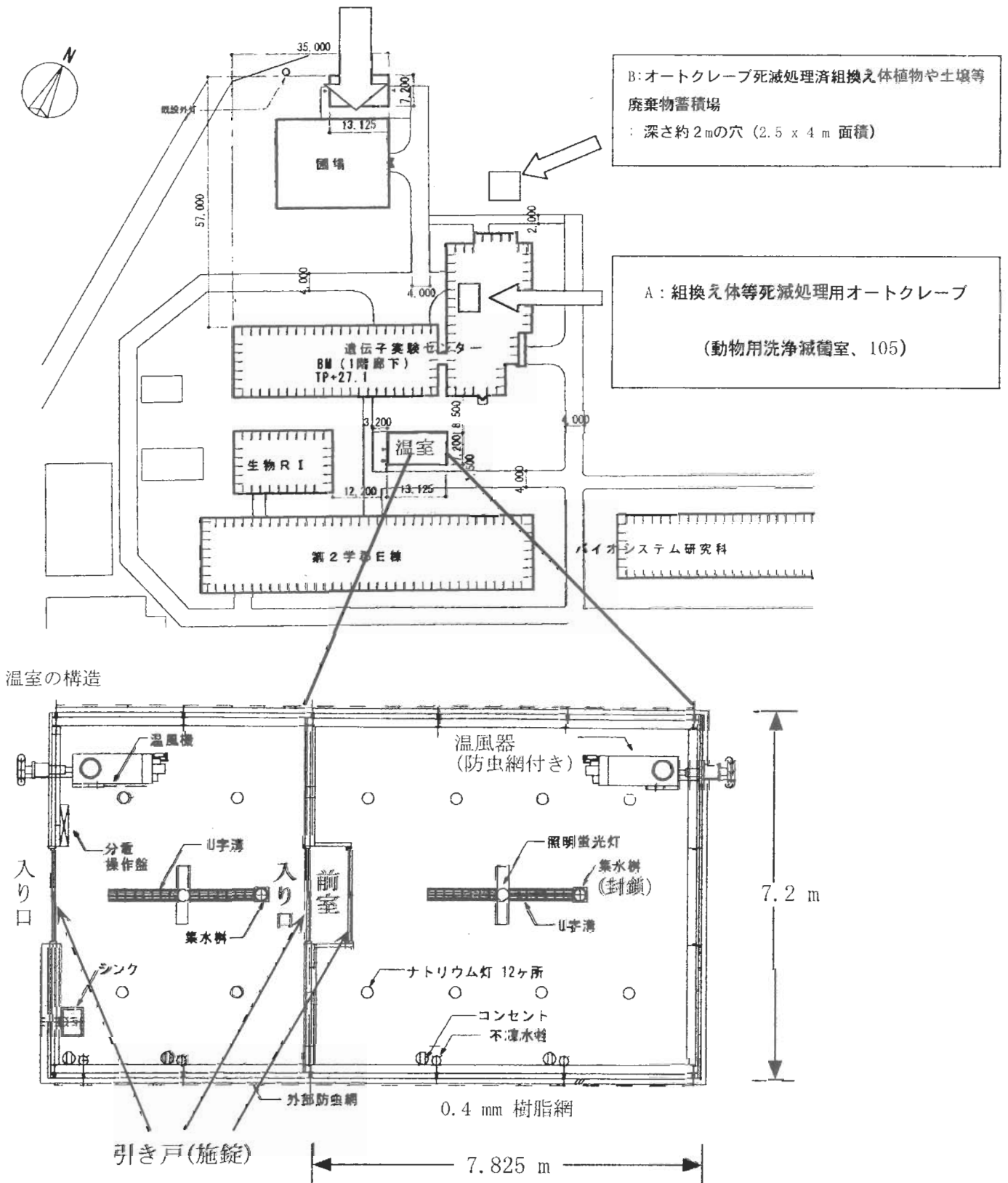
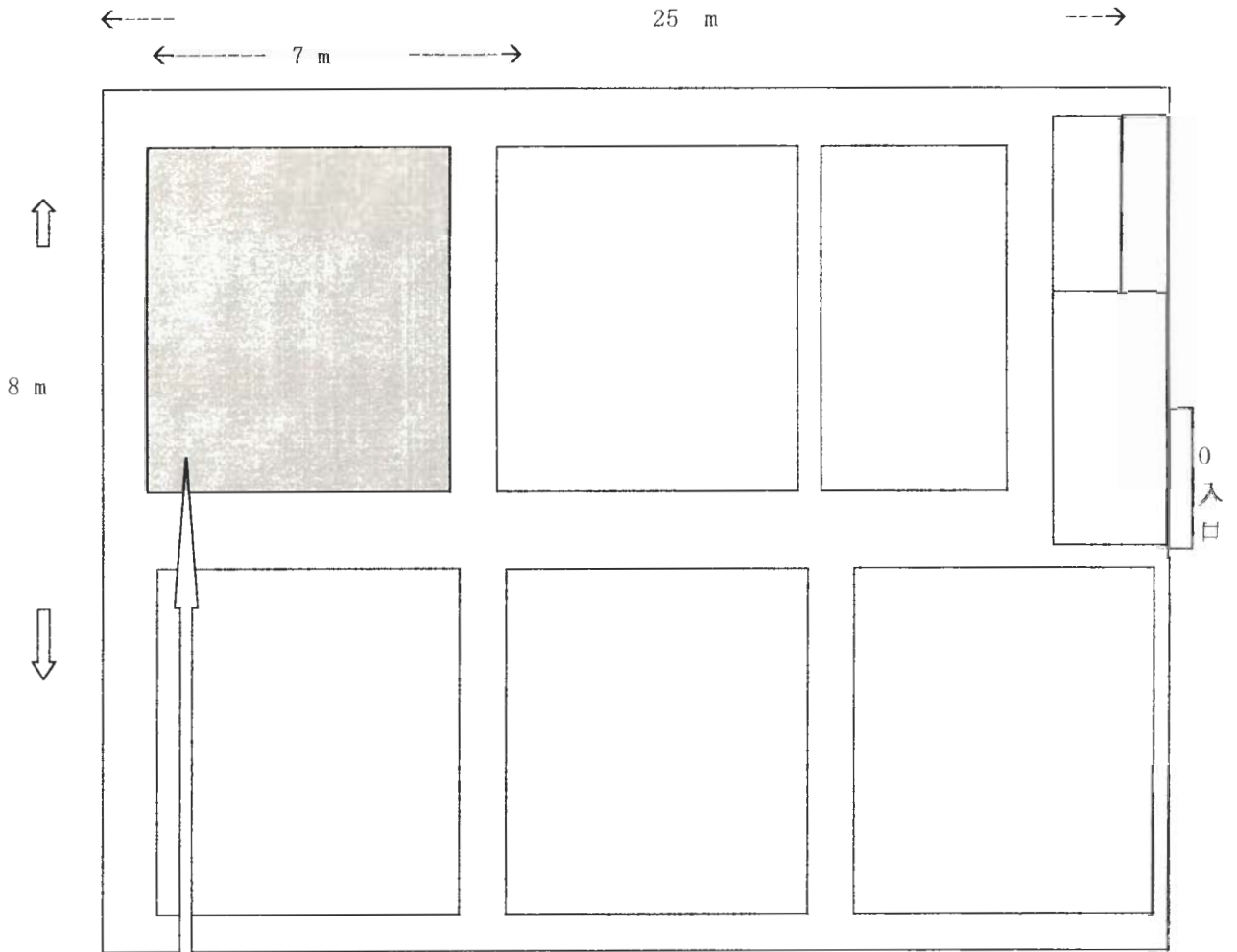


図3 非組み換え体ユーカリ（矢印）の隔離ほ場における2年目の越冬状況。かろうじて生存している。（平成17年2月4日撮影）

遺伝子実験センター隔離ほ場（屋外特定区画）（下矢印）及び周辺拡大図



別紙 13 実験ほ場配置



利用区画

N: 非組み換え体、A, B, Cそれぞれ異なる遺伝子組換え体

N	N	N	N	N	N
N	A	B	C	N	N
N	C	A	N	B	N
N	B	N	A	C	N
N	N	A	C	B	N
N	A	C	B	N	N
N	N	N	N	N	N