

水利用効率改善交雑アスペン
 (*AtGolS2*, *Populus tremula* x *P. tremuloides* clone T89)
 申請の概要

第一種使用規程承認申請書

生物多様性影響評価書	1
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	1
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	2
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	4
(2) ベクターに関する情報	7
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	8
(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	9
(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	9
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	9
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	11
(2) 使用等の方法	12
(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	13
(4) 生物多様性影響が生ず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	13
(5) 実験室等での使用等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	13
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	13
2. 有害物質の産生性	15
3. 交雑性	15
4. その他の性質	16
第三 生物多様性影響の総合評価	16
参考文献	18
緊急措置計画書	20

第一種使用規程承認申請書

平成30年4月13日

文部科学大臣 林 芳正 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学
申請者 学長 永田 恭介
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>水利用効率改善交雑アスペン (<i>AtGolS2</i>, <i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i> clone T89)</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 : 筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター 遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場 II (隔離ほ場) 使用期間: 承認の日から平成 34 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、高さ 230 cm のフェンス (有刺鉄線 30 cm、メッシュフェンス 180 cm、コンクリート基部 20 cm) を設置している。コンクリート部は地下 68 cm まで及び、その下層に碎石層 15 cm が設けられている。</p> <p>(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。</p> <p>(3)土、遺伝子組換え交雑アスピンの残さ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、遺伝子組換え交雑アスピンの隔離ほ場の外への流出を防止するために、排水系統には沈澱槽及び網等を設置している。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1)遺伝子組換え交雑アスペン及び比較対照の交雑アスペン以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを抑制する。</p> <p>(2)遺伝子組換え交雑アスピンを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換え交雑アスペンが漏出しない構造の容器に入れる。</p>

<p>遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法 (つづき)</p>	<p>(3)(2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換え交雑アスペンの栽培終了後は、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換え交雑アスペン及び比較対照の交雑アスペンは裁断後、オートクレーブ等で不活化する。</p> <p>(4)花粉移動を防止するために、花芽が形成された場合は、これらを速やかに切除し、オートクレーブにて不活化する。</p> <p>(5)意図せずに遺伝子組換え交雑アスペンが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止するため、隔離ほ場内の使用区画で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄等を行う。</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) に掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(8)生物多様性への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。</p>
---	--

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響に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

宿主は、ヤナギ科 (Salicaceae) ヤマナラシ属 (*Populus* L.) に属するヨーロッパヤマナラシ (*Populus tremula* L.) とアメリカヤマナラシ (*P. tremuloides* Michx.) の交雑種のクローン T89 系統である。ヨーロッパヤマナラシとアメリカヤマナラシによる交雑種 (以降、交雑アスペン) は、北欧で優れた生育特性を示したことから、1950 年代にスウェーデンで大規模な育種プログラムが実施され多くの交雑系統が作出された [1] [2] [3]。T89 系統は、高い培養特性、特にアグロバクテリウム媒介法による形質転換効率の高さから研究材料として広く利用されている [4, 5]。

ヤマナラシ属の分類については、多くの学説があるが、最新の学説によれば、およそ 30 種程度とされる [1] [6]。ヤマナラシ属は 6 種の節 (Abaso 節、Turanga 節、Leucoides 節、Aigeiros (クロヤマナラシ) 節、Tacamahaca (ドロノキ) 節、*Populus* (ヤマナラシ) 節) に大分され、その利用、分布、経済性などが大きく異なる。本交雑アスペンの交配親であるヨーロッパヤマナラシとアメリカヤマナラシはいずれもヤマナラシ節に属する。同じ節内での交雑は比較的容易とされる (別紙 2)。一方で、節間での交雑の難易については、組み合わせによって異なるが困難、あるいは不可能である組み合わせが多いことが知られる [1] (別紙 2)。

交雑アスペン T89 系統は実験室では世界中で広く利用されるが、大規模な植林に使用された情報はなく、自然にも自生しない。交雑アスペンの交配親の一方であるヨーロッパヤマナラシ (*P. tremula*) は、ヨーロッパ、北アフリカ、北東アジアに広く分布する。交雑アスペンの他方の交配親であるアメリカヤマナラシ (*P. tremuloides*) は北アメリカのみに分布するが、その分布域は、経度 110°、緯度 47° にわたり、木本植物の中で 2 番目に広い分布域である [1]。

日本では、Tacamahaca 節に属するドロノキ (*P. suaveolens* Fich. (旧学名 *P. maximowiczii* A. Henry) と及び *Populus* 節に *P. tremula* の亜種であるヤマナラシ (*P. tremula* var. *sieboldii*) と チョウセンヤマナラシ (*P. tremula* var. *davidiana*) が自生する。ドロノキ及びヤマナラシは、北海道から九州まで全国に分布する。チョウセンヤマナラシは、北海道と本州の一部地域 (岩手県早池峰) に分布する [7]。2002 年 3 月から 2004 年 10 月の期間に実施された筑波大学構内のフロラ調査では、ヤマナラシ (*P. tremula* var. *sieboldii*) 2 標本が採取され、筑波大学構内での自生が確認されている [8]。日本に自生するヤマナラシ属の樹木であるヤマナラシ (*P. sieboldii* Miq.) は、ヨーロッパヤマナラシの亜種 (*P. tremula* var. *sieboldii*) として分類された時期もあった

が、現在は別種と考えられている [1] [6]。

(2) 使用等の歴史及び現状

ヤマナラシ属の樹木は、古くから人類によって利用されてきた林木の一つであり、1 万年以上前の中東ユーフラテス川でヤマナラシ属の樹木を薪として利用した痕跡が発見されているのをはじめ、ヨーロッパでは、ギリシャ神話にも見られるように古代から人々の暮らしの中にあった。印象派の巨匠クロード・モネの有名なポプラの連作で知られるように、ヤマナラシ属の樹木栽培は 18 世紀半ばまでにはヨーロッパの人々の暮らしに広く浸透していた [6]。

また中国では、近年、ヤマナラシ属林木の産業植林及びそれを材料とした木材工業が急速に成長し、目覚ましく発展を遂げている [9]。

FAO が把握するヤマナラシ属林木の植林地の総計は 8,826.6 万ヘクタールで、国別では、最も広い中国で 757.0 万ヘクタール、次いで 23.6 万でフランス、15.0 万ヘクタールでイラン、12.5 万ヘクタールでトルコ、10.9 万ヘクタールでハンガリー、10.5 万ヘクタールでスペイン、10.1 万ヘクタールでイタリア、4.9 万ヘクタールでスウェーデン、4.8 万ヘクタールでルーマニアと続く [6]。

日本でも明治以降にポプラの植林が導入されて各所に並木として植林されたが、産業植林は殆ど根付かなかった。林野庁の森林・林業統計要覧 2016 や地方自治体の林業統計をみても、ヤマナラシ属の樹木の植林地の統計はないが、森林・林業統計要覧 2016 の樹種別人工造林面積の統計では、広葉樹の人工造林面積が 2,637 ヘクタールであり、この一部にヤマナラシ属の樹木が含まれていると推察しても諸外国と比較して小規模である [10]。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ヤマナラシ属の樹木は、落葉喬木、雌雄異株である。本組換え体の宿主である交雑アスペン T89 系統は雄株である。交雑アスペン T89 系統及び他のクローンに関して、わが国で生育した際の樹高や直径に関する情報は見つからなかったが、フィンランドにおける交雑アスペン (*P. tremulax P. tremuloides*) 4 系統の生育に関する報告では、植林 2 年目の樹高及び胸高直径の平均値の範囲は 184.5 ~ 194.2 cm 及び 1.0 ~ 1.4 cm、5 年目の樹高及び胸高直径の平均値の範囲は 435.4 ~ 512.3 cm 及び 3.6 ~ 4.3 cm であり、いずれも交配片親のヨーロッパヤマナラシ (*P. tremula*) (2 年目の平均樹高及び平均胸高直径は 144.7 cm 及び 0.9 cm、5 年目の平均樹高及び平均強行直径は 324.9 cm 及び 3.3 cm) よりも有意に大きかった [3]。同じヤマナラシ節のギンドロは、落葉喬木、雌雄異株で樹高 25 ~ 30 m になる樹木であり、成長等に優れた選抜クローンの 5 年生の樹高は 6.3 ~ 7.0 m、胸高直径は 6.7 ~ 9.0 cm と報告されている [7]。2007 年 3 月から 2010 年 12 月まで 3 年 9 か月の間、独立行政法人林木育種センター（現 国

立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所 林木育種センター) (以下、林木育種センター) 隔離ほ場 (茨城県日立市十王町伊師 3809 番地 1) で実施された遺伝子組換えギンドロの第一種使用における非形質転換ギンドロの樹高は約 3.7 m であったことが報告されている [11]。

ほとんどのヤマナラシ属の樹木の開花開始年齢は、10 年から 15 年生以降である。ヒロハヤマナラシ (*P. deltoids*) は例外的に早熟で 4 年で開花することがある [1]。穂は暗赤色で長さ 4 ~ 10 cm、雌花穂は黄緑色でやや短く、開花期はつくば地区で 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 [7]。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ヨーロッパハコヤナギ (*P. tremula*) と アメリカヤマナラシ (*P. tremuloides*) の交雑アスペンは北欧で優れた生育特性を示すことが知られるが [1] [2] [3]、わが国での栽培特性についての情報は無いが、同じヤマナラシ節のギンドロ (*P. alba*) については、以前、わが国で実施された第一種使用に先立って収集された生息又は生息可能な環境情報に関する情報がある [7]。これによると、ギンドロは地中海沿岸のヨーロッパから中央アジアを原産とし、適潤性から弱湿性の弱酸性土壌の条件を好むが、-40°C 以下といった極端な低温や夏季の高温高湿に耐えることができないことや、病虫害には比較的強いことが報告されている [7]。また、ギンドロは山火事等により森林が損失を受けた場合に根萌芽による栄養繁殖により一時的に優占樹種となるが、時間の経過とともに他の樹種が侵入することで個体数は減少する [7]。

わが国には、ヨーロッパハコヤナギ (*P. tremula*) 及び アメリカヤマナラシ (*P. tremuloides*) は自生しないが、ヤマナラシ属植物としては、ドロノキ (*P. suveolens* Fich.)、ヤマナラシ (*P. tremula* var. *sieboldii*) 及びチョウセンヤマナラシ (*P. tremula* var. *davidiana*) が自生する [7] [12] [13] [14]。ドロノキは、日当たりのよい谷間や湿地など、やや湿った土地を好むのに対し、ヤマナラシ及びチョウセンヤマナラシは、日当たりの良い乾いた丘陵地や原野を好む [12] [13] [14]。

ハ 捕食性又は寄生性

該当しない

ニ 繁殖又は増殖の様式

交雑アスペン T89 系統に関して、わが国では、実験室以外での繁殖又は増殖した例は見つからない。交雑アスペン T89 系統の実験室では、挿し木による栄養増殖が一般的である。また、ヤマナラシ属の樹木は基本的に雌雄異株であり、交雑アスペン T89 系統は雄株であるため、種子は生産しない一方、交雑アスペンの交雑親の一方であるアメリカヤマナラシ (*P. tremuloides*) では、雌雄株にかかわらず、高地等の特殊な環境下で、生殖芽が例外的に雄花、雌花、両性花のいずれにも分化し、交配により種子が形成

されることがある [1]。花粉の媒介は主に風による [1]。

ヤマナラシ属の樹木は個体あたりの種子生産量が多く、典型的なヒロハヤマナラシ (*P. deltoids*) は1季節あたり約2,800万粒、ヨーロッパヤマナラシ (*P. tremula*) は約5,400万粒の種子を生産すると推定されている [1]。一方で、種子は休眠せず、典型的な自然条件下での種子の寿命は約2週間から4週間とかなり短い [1]。発芽様式は、地上子葉型 (epigeal 型) である。

ヤマナラシ属の樹木は、根萌芽による栄養繁殖が一般的で、北米で新たにヤマナラシ属林木が植林された地域の周囲では、根萌芽によって生じた栄養増殖個体が見つかることは一般的である [1]。ヤマナラシ属の樹木は、切り株や株元、根から非常に旺盛な萌芽がみられる [1]。また、根萌芽増殖により巨大なクローン群を形成することが知られる [1]。

一方、折れた枝からの発根・増殖に関しては、北米西部の頻繁に氾濫が起こる河川流域に分布するバルサムポプラ (*P. balsamifera*) やブラックコットンウッド (*P. balsamifera* subsp. *trichocarpa*) では川の氾濫による倒木からの増殖を生存戦略として行っているのではないかという報告もあるが、ヤマナラシ属全体からみれば非常に特殊なケースである [15]。林木として利用されるヤマナラシ属植物では、折れ落ちた枝からの増殖に関する報告はない [1]。また、林木育種センターで実施された組換えギンドロ (*P. alba*) の第一種使用においても、実験室における交雑アスペン (*P. tremula* x *P. tremuloides*) の挿し木からの折れ落ちた枝からの増殖に関する報告はない [11, 16]。不定根形成では、オーキシンの外生投与及び高温高湿度 (28°C恒温、相対湿度 80%) で3週間保持することで行われる [17]。交雑アスペン (*P. tremula* x *P. tremuloides*) が生育可能な地域で折れ落ちた枝がこのような条件におかれることは非常に稀であると考えられる。

ホ 病原性

該当しない

へ 有害物質の産生性

藤井は、ヨーロッパクロヤマナラシ (*P. nigra*) の弱い他感作用を報告している [18]。Baldwin と Schultz は、カイリョウポプラ (*P. x euroamericana*) は食害等の傷害に応答して産生する揮発性のフェノール性化合物は、近傍の無傷の改良ポプラの同化合物産生を誘導する他感作用の存在を示唆している [19]。ヤマナラシ属の他の種がその他の種類の多感作用物質や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

カルタヘナ議定書の Biosafety Clearing-House に登録された情報によると、これまでにフィンランドで2件、ドイツで1件、計3件の交雑アスペン T89 の遺伝子組換え体

の隔離ほ場試験が報告されているが、実施に際して各国の規制当局が行った環境リスク評価や試験栽培による環境への影響等の報告はない [20]。これを含めて、400 件以上のヤマナラシ属の林木を宿主とした遺伝子組換え植物の隔離ほ場試験が実施されているが、試験栽培による環境への影響等の報告はない (別紙 10)。

わが国でも、交雑アスペンと同じヤマナラシ属ヤマナラシ節のギンドロ (*Populus alba* L.) を宿主とする 2 件の第一種使用が 2007 年 3 月から 2011 年 12 月にかけて、林木育種センターで実施されているが、試験栽培による環境への影響等の報告はない [7] [11] [16]。

ヤマナラシ属の林木を食害することが知られる国内外の昆虫については別紙 3 に示す [7]。別紙 3 の表 3-1 に環境省のレッドリスト 2017 に記載された絶滅危惧種は含まれていない。

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

水利用効率改良遺伝子組換え交雑アスペン (*AtGolS2*, *Populus tremula* x *P. tremuloides* clone T89) (以下、本組換え交雑アスペンとする) 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次項表 1 に示した通りである。組換え DNA 分子の構成図は図 2 に示した通りである。

ロ 構成要素の機能

本組換え交雑アスピンの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を次項表 1 に示す。本組換えアスペンへ導入された核酸は、形質転換・発現ベクター pH35GS-GolS2 の右側及び左側境界配列 (RB 及び LB) に挟まれる T-DNA 配列であり、以下に記述する 2 つの発現ユニットを含む (図 2、表 1)。

<発現ユニット 1 >

AtGolS2 遺伝子 (表 1 対象区分 C) は、ガラクトチノール合成酵素をコードするシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の遺伝子である。ガラクトチノール合成酵素は、UDP-ガラクトースと myo-イノシトールを基質としてガラクトチノールを合成する反応を触媒する酵素である。ガラクトチノールは、ラフィノース属オリゴ糖であるラフィノース及びスタキオース合成の基質となる糖アルコールである。ラフィノース属オリゴ糖は植物の種子の成熟過程において蓄積がみられ、過剰発現することで種子以外の器官にも乾燥耐性を付与することが報告されている [21]。ガラクトチノール合成酵素遺伝子は、シロイヌナズナゲノムに 7 つあることが報告されており、*AtGolS2* は乾燥及び低温ストレスに応答して発現が増加することが知られる [21]。ガラクトチノ

ール合成酵素遺伝子はヤマナラシ属植物にも複数存在し、*Populus trichocarpa* (Tacamahaca 節) ではゲノム中に 9 つ存在することが報告されている [22]。35S プロモーター (表 1 対象区分 A) はカリフラワーモザイクウイルスに由来するプロモーターであり、植物内で構成的発現を起こし、*NOS* ターミネーター (表 1 対象区分 E) はアグロバクテリウム *Rhizobium radiobacter* 由来の遺伝子の転写を終了させるのに必要な配列である。attB1 及び attB2 は、λファージのクロナーゼに触媒される λファージ染色体 DNA と大腸菌染色体間での DNA 組み換えにおいてクロナーゼと特異的に相互作用する DNA 配列で、本組換え体において機能を持たない。

<発現ユニット 2>

HPT (ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ) 遺伝子 (表 1 対象区分 G) は大腸菌 *E. coli* 由来の遺伝子で ATP 依存的に抗生物質ハイグロマイシンをリン酸化することで不活性型とし、宿主生物にハイグロマイシン耐性を付与するもので標識遺伝子として使われる。*NOS* プロモーター (表 1 対象区分 F) 及び RuBisCO 小サブユニット遺伝子 (*RbcS-2B*) ターミネーター (表 1 対象区分 H) は遺伝子の転写を開始及び終了させるのに必要な配列である。

<その他>

RB 及び LB (表 1 対象区分 I 及び J) は、アグロバクテリウム由来の Ti プラスミド pTiT37、及び、pTiA6 に由来するノパリン型 T-DNA の境界配列を含む DNA 断片である。右側境界配列は、T-DNA がアグロバクテリウム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、また左側境界配列は終結点として機能する。

ハ 構成要素の核酸供与体

本組換え交雑アスペンに導入されたすべての遺伝子及び配列の核酸供与体は表 1 に示す。いずれも研究開発等に係わ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 (平成 16 年 1 月 29 日文部科学省・環境省令第 1 号) 第三条におけるクラス 1 に相当し、生物学的リスクはないと判断される。

表 1 水利用効率改善交雑アスペン (*AtGolS2*, *Populus tremula* x *P. tremuloides* clone T89) に導入された pH35GS-GolS2 プラスミドに由来する T-DNA の核酸構成要素

対象区分	遺伝子の名称等	由来及び機能	DNA の種類 (ゲノム DNA、cDNA 等)	同定・未同定の区別
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 (Cauliflower mosaic virus) 由来の転写開始因子	ゲノム DNA	同定済
B	attB1 配列	λファージと大腸菌間でのクロナーゼによる特異的組み換え	ゲノム DNA	同定済

		え配列		
C	<i>AtGolS2</i> 遺伝子	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の遺伝子で、ガラクトキノール合成酵素をコードする	ゲノム DNA	同定済
D	attB2 配列	λ ファージと大腸菌間でのクロナーゼによる特異的組み換え配列	ゲノム DNA	同定済
E	NOS ターミネーター	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i> LBA4404 株) の Ti プラスミドに由来の転写終結因子	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
発現ユニット 2				
F	NOS プロモーター	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i> LBA4404 株) の Ti プラスミドに由来の転写開始因子	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
G	ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子 (<i>HPT</i>)	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来でハイグロマイシン耐性を付与する遺伝子である。	ゲノム DNA	同定済
H	<i>RbcS-2B</i> ターミネーター	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来の転写終結因子	ゲノム DNA	同定済
その他				
I	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 がアグロバクテリウム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。	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
J	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 がアグロバクテリウムから植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。	Ti プラスミド DNA の一部	同定済

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換え交雑アスピンの作出に用いたプラスミドベクターは pH35GS-GolS2 プラスミドである (図 2)。pH35GS-GolS2 プラスミドは、pH35GS プラスミドの模式図中で GATEWAY と表記する区間を *AtGolS2* 遺伝子で置き換えたものである (図 1)。pH35GS は pSMAH621 を改変して作られたものであり、pSMAH621 は pBIN19 に由来するバイナリープラスミドベクターである [23]。以上のように、pH35GS-GolS2 は pBIN19 の派生型であり、プラスミドベクターの性質としては、pBIN19 と同等である。

ロ 特性

pH35GS-GolS2 の基となった pBIN19 は、pBR322 及び pRK2 に由来する 2 種類

の DNA 複製開始点 (*ColE1 ori* 及び *oriV*) を持つ 2 本鎖環状 DNA であり、大腸菌及びアグロバクテリウムを含む広範囲の細菌を宿主としてカナマイシン耐性を付与する。pBIN19 は菌体の分裂増殖によって伝達されるが、プラスミドの他への伝達性は別因子により支配されているため pBIN19 自体の伝達性は無く、感染性も知られていない。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。植物に導入された T-DNA は交配によってのみ同種植物に伝達される。

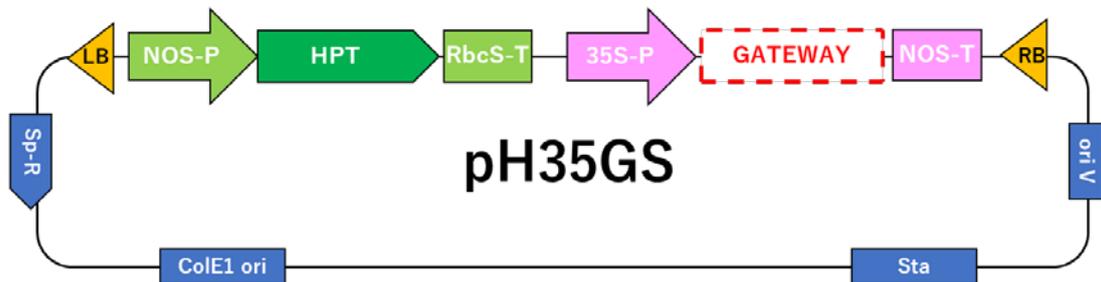


図 1 pH35GS ベクターの構造模式図

- 35S-P :CaMV35Sプロモーター
- GATEWAY :Gateway反応によって組み換えられる配列(attR1-CmR-ccdB-attR2)
- NOS-T :NOSターミネーター
- NOS-P :NOSプロモーター
- HPT :ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子)
- RbcS-T : *RbcS-2B*ターミネーター
- ColE1 ori :ColE1複製開始点(大腸菌での複製開始点)
- oriV :pRK2複製開始点(アグロバクテリウムでの複製開始点)
- Sp-R :スペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性遺伝子
- Sta :プラスミドの安定化に必要な配列 (*Pseudomonas* pVS1プラスミド由来)

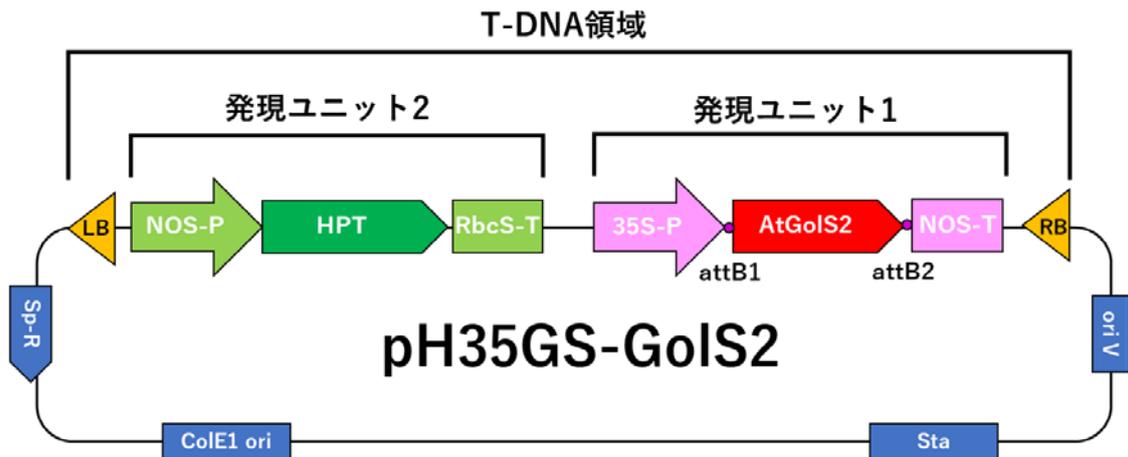


図 2 pH35GS-GolS2 プラスミドの構成模式図

35S-P	:CaMV35Sプロモーター
AtGolS2	: <i>AtGolS2</i> 遺伝子
NOS-T	: <i>NOS</i> ターミネーター
attB1/attB2	:Gateway反応の組み換え配列
NOS-P	: <i>NOS</i> プロモーター
HPT	:ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子)
RbcS-T	: <i>RbcS-2B</i> ターミネーター
ColE1 ori	:ColE1複製開始点(大腸菌での複製開始点)
oriV	:pRK2複製開始点(アグロバクテリウムでの複製開始点)
Sp-R	:スペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性遺伝子
Sta	:プラスミドの安定化に必要な配列 (<i>Pseudomonas</i> pVS1プラスミド由来)

(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

アグロバクテリウムの T-DNA 伝達機構により、上記 pH35GS-GolS2 プラスミドの T-DNA 領域内に含まれる当該組換え核酸を交雑アスペン T89 系統に導入する。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 2 に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドベクター pH35GS-GolS2 (図 2) を保有するアグロバクテリウム (*Rhizobium rhizobacter* GV3101 (pMP90) 株) を交雑アスペン T89 系統の葉外植片に感染させることで、アグロバクテリウムの T-DNA 伝達機構により、プラスミドベクター pH35GS-GolS2 中の T-DNA が宿主の核へ移入され、宿主の核ゲノム DNA 中に挿入される。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミドベクター pH35GS-GolS2 を保有するアグロバクテリウム (*R. radiobacter* GV3101 (pMP90) 株) を交雑アスペン T89 系統の葉外植片に感染させ、再生個体を得た。感染に用いたアグロバクテリウムは、除菌剤を含む培地で継代培養することで除菌し、最終的に、すり潰し法及び振盪法によってアグロバクテリウムの不在を確認した (別紙 4)。得られた再生個体を *in vitro* で挿し木増殖したクローン苗を試験に供する。尚、隔離ほ場に移植には、*in vitro* で増殖した個体を鉢上げし、栽培室等で馴化した後特定網室へ移動し、更に 1 カ月程度馴化・栽培を経た樹高 20 cm 程度の幼木を用いる。本第一種使用には、このようにして得られた遺伝子組換え体のうち、AtGolS2-5 及び AtGolS2-14 の 2 系統を供する。

ニ 第一種使用等を行う系統について

ヨーロッパヤマナラシ (*P. tremula* L.) とアメリカヤマナラシ (*P. tremuloides* Michx.) による交雑種 (以降、交雑アスペン) は、もともとは北欧で優れた生育特性

を示したことから 1950 年代にスウェーデンにおいて、複数の交雑種クローンが得られた [1] [2] [3]。その後、T89 系統はこれらの交雑アスペンクローンの中で高い培養特性、特にアグロバクテリウム媒介法による形質転換効率の高いクローンとして、評価され、今日研究材料として広く利用されているクローンである [4, 5]。そこで、本組換え交雑アスペンの作出に当たり、宿主として本 T89 系統を採用した。一方で、T89 系統に特定された屋外での栽培特性を明示した報告は見つからなかった。わが国でも、T89 系統は、実験室及び温室試験では多用されるものの、屋外で生育した事例は見つからなかった。

同様に本第一種使用等は本組換え交雑アスペンそのものの将来の実用化を想定したのではなく、ヤマナラシ属のモデルである T89 系統を宿主とした組換え植物の第一種使用の際の栽培評価試験における管理手法及び生物多様性影響評価手法の構築・評価を目的とし、以後のヤマナラシ属の実用系統を宿主とした組換え体の設計・開発の際にあたっての基盤的知見の提供を目的とする。また、将来、本組換え体の特性が発揮されることが期待される海外の地域での特性評価を目的とした圃場試験等の実施を想定し、生物多様性影響評価も併せて実施する。

(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

無菌培養した本組換え交雑アスペンと非組換え交雑アスペンの葉から、ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行い、導入した T-DNA 領域は安定して交雑アスペンのゲノム DNA 中に組み込まれており、本組換え交雑アスペンゲノムへの挿入コピー数は、2 コピーであると推察される (別紙 5)。一方で、プラスミドベクター pH35GS-GolS2 の T-DNA 領域以外の DNA 断片が本組換え交雑アスペンのゲノム DNA 中に移入されていないことを確認した (別紙 6)。

ロ *AtGolS2* 遺伝子の発現

供与核酸による *AtGolS2* 遺伝子の過剰発現状態について調べるために、無菌培養した組換え交雑アスペン及び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実験を行った結果、核ゲノムに導入された当該核酸が組換え交雑アスペンにおいて発現していることが確認された (別紙 7)。

(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

上述のようにサザンプロットハイブリダイゼーションによって特異的検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 5 μ g のゲノム DNA を用いれば検出可能である。プローブは、*HPT* 遺伝子 cDNA の部分配列を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出する。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 本組換え交雑アスペンでは宿主と異なり *HPT* 遺伝子によりハイグロマイシン耐性が付与されている。さらに本組換え交雑アスペンは、シロイヌナズナ由来の *AtGolS2* 遺伝子によってコードされるガラクトキノール合成酵素を恒常的に発現している。

ロ *HPT* については古くから幅広く多様な植物種で使用されており、様々な実験データや論文等をもとに、ヒトや動物の健康及び生物多様性に対して影響があったという報告はこれまでのところない [24]。

ハ 本申請に先立ち、本組換え交雑アスペンを筑波大学遺伝子実験センターの特定網室で試験栽培し、形態及び生育の特性等を調査した。

a) 形態及び生育の特性

本組換え交雑アスペンと非組換え体の中で顕著な形態及び生育の差異は認められなかった (別紙 8)。

b) 生育初期における低温または高温耐性

本組換え体の宿主となる T89 系統を含む交雑アスペン (*P. tremula* x *P. tremuloides*) は、日本での栽培の報告がないことから 2015 年春より交雑アスペン T89 系統を筑波大学遺伝子実験センター隔離ほ場 (模擬的環境試験圃場 I) で栽培し、生育特性を評価している。これまでに 3 度、交雑アスペン T89 系統苗木を温室での馴化を経て、隔離ほ場への移植を行ったが、移植直後の気温や降水量の違いにより、3 回中 2 回は移植直後に頂芽休眠したものの、1 カ月程度で再び成長を開始し、枯死した個体は殆どなかった (別紙 9)。

c) 越冬性または越夏性

非組換え交雑アスペン T89 系統については、10 月中旬より休眠芽を形成し、11 月下旬から 12 月中旬までにすべての葉を落葉する。すべての個体が越冬し、翌 4 月下旬から 5 月上旬に休眠覚醒がみられる (別紙 9)。また、春から初夏にかけての葉の褐変が観察されるが、生存には影響しない。ただ、夏場に熱や乾燥によるストレスによる影響が頂芽に生じた場合、頂芽優勢が崩れて樹形が乱れる。別紙 11 に示すように、ヤマナラシ属の樹木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、本組換え交雑アスペンは宿主と同等の越冬性及び越夏性を示すと考えられる。

d) 花粉の稔性及び大きさ

本組換え交雑アスペンは花をつけたことがないため、花粉稔性及び大きさに関する情報はない。今回、第一種使用等を申請する本組換え交雑アスペンは、栽培予定期間は5年以内とするため、栽培予定期間中に花芽形成して開花することはないと考えられる。本第一種使用では、花芽形成が認められた場合は花芽を切除することとするため、花粉の稔性及び大きさに関する情報は得られない。

e) 種子の生産性、休眠性及び発芽率

今回、第一種使用等を申請する本組換え交雑アスペンは雄株であり、種子は得られない。

f) 交雑性

ヤマナラシ属ヤマナラシ節の林木が、初めて花芽を付けるまでには10年から15年を要するとされる [1]。予備試験として当地で栽培している非組換え交雑アスペンについても、移植後3年目の初夏までに花芽形成はみられない (別紙9)。本遺伝子組換え体についても、特定網室で約2年間栽培しているが花芽形成はみられない。本組換え交雑アスペンの宿主は、そもそも雄株であり種子は得られない。また、本第一種使用における本組換え交雑アスペンの実質栽培予定期間は5年以内であり、栽培期間中に花芽を形成して花粉を飛散させることはない。加えて、万が一、花芽形成が認められた場合は花芽を切除するため、交雑は起こらない。

g) 有害物質の産生性

本組換え交雑アスペン及び非組換え交雑アスペンを特定網室において、3カ月以上ポット栽培した培土を用いて、①希釈平板法による土壌微生物相へのアレロパシー活性の調査 (別紙12)、及び、②後作残留試験による植物へのアレロパシー活性の調査 (別紙13)、晩秋に自然落葉した落ち葉を用いた③サンドイッチ法による植物へのアレロパシー性の調査 (別紙14) を行った。その結果、本組換え交雑アスペンのアレロパシー性は、宿主植物である非組換え交雑アスペン T89 系統と比較して有意な違いはないことから、本組換え交雑アスペンの使用が生物多様性に対して新たなリスクを与えるものではないと結論した。

本組換え交雑アスペンは、ガラクトキノール合成酵素の機能により環境ストレス耐性を付与されていることが期待される。ガラクトキノール合成酵素は、UDP-ガラクトースと myo-イノシトールを基質としてガラクトキノールを合成する反応を触媒する酵素であり、他の代謝系に対して作用する可能性は低いと考えられ、生物多様性に対して有害性を発揮する物質の産生性への関与は考えにくい [21]。また、*HPT* 遺伝子によりハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼが発現しているが、両酵素も様々な実験データや論文等をもとに、ヒトや動物の健康及び生物多様性に対して有害物質として作用するという報告はこれまでのところない [24]。

交雑アスペンはそもそも非食用であること、また、本実験計画は試験研究を目的としたごく小規模の試験であること、かつ、本実験計画において本組換え交雑アスペンは花粉飛散することはない。AtGolS2 がコードするアミノ酸配列 (PROTEIN_ID BAB78531.1) について、国立医薬品・食品衛生研究所が公開するアレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety: 最終更新日 2017 年 2 月 21 日) の既知のアレルゲンタンパク質及びエピトープ検索した。FAO/WHO のガイドラインでは、既知のアレルゲン性エピトープと連続する 6 残基以上の一致がないことでアレルゲン性の予測はで一致する場合、追加の検証がタンパク質との一致はなく、また、既知のアレルゲン性エピトープと連続する 6 残基以上で一致する場合にアレルゲン性を持つ可能性があるともみなすとされているが [25]、AtGolS2 は既知のアレルゲン性エピトープと連続する 6 残基以上で一致する配列はないことを確認した。

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：茨城県つくば市天王台 1-1-1 (別紙 15)

名称：筑波大学 T-PIRC 遺伝子実験センター模擬的環境試験ほ場 II (隔離ほ場)

使用期間：承認の日から平成 34 年 12 月 31 日まで

イ. 隔離ほ場の施設 (別紙 16)

- a) 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、高さ 230 cm のフェンス (有刺鉄線 30cm、メッシュフェンス 180 cm、コンクリート基部 20 cm) を設置している。コンクリート部は地下 68 cm まで及び、その下層に碎石層 15 cm が設けられている。
- b) 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。
- c) 土、遺伝子組換えアスペンの残さ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、遺伝子組換え交雑アスペン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。
- d) 本隔離ほ場では、2008 年以降これまでに 5 件の耐塩性及び耐冷性遺伝子組換えユーカーリの第一種使用による隔離ほ場栽培試験を行った実績がある (08-26P-0001 ~ 3、11-26P-0001、13-26P-0013) [26]。

ロ. 隔離ほ場での作業要領

- a) 遺伝子組換え交雑アスペン及び比較対照の交雑アスペン以外の植物が、隔離ほ場内の使用区画で生育することを抑制する。
- b) 遺伝子組換え交雑アスペンを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換え交雑アスペンが漏出しない構造の容器に入れる。
- c) b)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換え交雑アスペンの栽培終了後は、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換え交雑アスペン及び比較対照の交雑アスペンは裁断後、オートクレーブ等で不活化する。
- d) 花粉移動を防止するために、花芽が形成された場合は、これらを速やかに切除し、オートクレーブにて不活化する。
- e) 意図せずに遺伝子組換え交雑アスペンが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止するため、隔離ほ場内の使用区画で使用した機械、器具及び靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄等を行う。
- f) 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。
- g) a)から f)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。
- h) 生物多様性への影響を生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

隔離ほ場において、本組換え交雑アスペンの性質として、当地における通常栽培管理条件における生育及び形態特性、越夏性などの評価及び、同条件における生物多様性に与える影響について、非組換え体対照と比較調査する。

(4) 生物多様性影響が生ず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

本申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等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

宿主となった非組換え交雑アスペンも含めてわが国での屋外栽培に関する参照可能な情報は、本実験に先立って申請者が実施を開始した予備試験以外に殆どない。交雑アスペンと同じヤマナラシ属ヤマナラシ節のギンドロ (*P. alba* L.) を宿主とする2件の第一種使用が2007年3月から2011年12月にかけて、本第一種使用計画と同じ茨城県内の林木育種センター隔離ほ場で実施されている [7] [11] [16]。約4年間の栽培試験で非組換え体は平均樹高3.5 m以上に生育しているところ、組換え体では平均2.5 m以下であり3割程度生育量が少なかった [11]。また、ギンドロの第一種使用において環境への影響等の報告はない [7] [11] [16]。

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の特定

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 [1]。また、きわめて陽性の強い樹種である上に、種子、芽生えはわずかな乾燥にも弱く、かつ、種子の寿命が短いため、実生による天然更新地は限定される [27]。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 [28] [29]。これらの特性はヤマナラシ節の樹種が典型的なパイオニア植物であることを示している。

本組換え交雑アスペンは、非組換え交雑アスペンと比べ、ラフィノース属オリゴ糖含量が増加することで水利用効率の改善が期待される。そもそも、当地を含めわが国のほとんどの地域は、ヤマナラシ属植物の成木の生育の律速となるような水が制限された環境条件にはなく、また本使用は本隔離ほ場での栽培試験あることから、自然環境下において本組換え交雑アスペンの競合における優位性が宿主以上に顕著に高まるとは考えにくい。一方で、種子や芽生えは僅かな乾燥にも弱いことから、自然環境下において本組換え交雑アスペンの競合における優位性が高まる可能性がある。通常ヤマナラシ属林木の開花は10年から15年生以降であり、栽培予定期間は5年以内であり、本隔離ほ場栽培中に開花する可能性は低い。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本組換え交雑アスペンを隔離ほ場で栽培する限り、本組換え交雑アスペンが隔離ほ場外で繁殖するおそれはない。

さらに、本組換え交雑アスペンは抗生物質ハイグロ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。

ヤマナラシ節の樹種の栄養繁殖の能力は旺盛でその様式は、第一の1の(3)のニに示したように根萌芽である。筑波大学遺伝子実験センターの隔離ほ場で実施した T89 系統の予備栽培試験においても、植栽1年目の地上部伐採による萌芽誘導や、植栽に2年目以降に地下の根から根萌芽を観察している(別紙10)。本申請においては、1年生の差し木苗である組換え交雑アスペンは、隔離ほ場の土中に包埋したポット(直径60cm程度、深さ60cm以上、ポット周縁は地上から約10cm露出するように包埋する)中で栽培し、ポット周縁を超えて根が成長しないように定期的に監視・管理する。また、第一種使用が終了する前年に、栽培終了後には根系含めた植物体は、隔離ほ場の中からすべて取り除くとともに、除草剤(グルホシネート剤等の非選択性除草剤)で処理し、その後1年程度をかけ、根萌芽が生じないことをモニタリングする。

一方で、第一の1の(3)のニに示したように、第一種使用する交雑アスペンから折れ

落ちた枝が不定根を発生することはつくば地区では殆ど無いと考えられる。筑波大学遺伝子実験センターの隔離ほ場で実施した T89 系統の予備栽培試験においても、栽培 2 年目の春に 1 年生の非組換え交雑アスペン 3 個体の地上部を伐採し、その一部を地中に包埋したが、6 ヶ月以上経過しても萌芽は見られなかったことから、掘り返して包埋した枝の状態を確認したところ、不定根の形成もなく腐朽していた。

以上から、本組換え交雑アスペンは、非組換え交雑アスペンに比べて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い。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当しない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換え交雑アスペン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

ヤマナラシ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。本組換え交雑アスペンに導入した遺伝子産物により植物体内での蓄積が期待されるラフィノース属オリゴ糖は有害物質に該当せず、また、当該遺伝子産物は、他の代謝系に直接影響しないと考えられる。また、第一の 2 の(6)のハの g に記したとおり、本組換え交雑アスペンと非組換え交雑アスペンとの比較から、サンドイッチ法、後作培養法及び希釈平板法、いずれの手法を用いた場合も、他の植物に対する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交雑アスペン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

該当しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当しない。

(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、本組換え交雑アスペン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する。ヤマナラシは筑波大学構内にも自生が確認されている [8]。交雑アスペン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。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交雑アスペンが開花樹齢に達するまで屋外で栽培した場合、本組換え交雑アスペン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。ただ、ヤマナラシ属の林木の開花開始年齢は 10 年から 15 年生以降であるため、交配の可能性は極めて低い。

(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交雑アスペン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、本組換え交雑アスペン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）であることより [12, 13]、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交雑アスペンが交雑することはない。

一方、ヤマナラシやヤマナラシ節内の種間交雑による雑種は、当地周辺にも自生が確認されており [8]、開花期が重複する場合には交雑が否定できない。しかし、ヤマナラシ属の樹木は開花までに10年から15年を要する [1]が、隔離ほ場で栽培する本組換え交雑アスペンはさし木による1年生であるので、栽培期間内に開花に至る可能性は殆どないと考えられる。ただ、交雑アスペンについてはわが国での屋外栽培に関する経験が少ないこと、本組換え交雑アスペン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ことから、本第一種使用においては、本組換え交雑アスペン

に花芽形成が認められた場合は花芽を切除するなどし、交雑を防止する措置をとる。
以上から、本組換え交雑アスペン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、本組換え交雑アスペン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

該当しない。

第三 生物多様性影響の総合的評価

本組換え交雑アスペンの宿主植物である交雑アスペンを含むヤマナラシ属ヤマナラシ節の樹木は、典型的なパイオニア植物であり、生態系において他の植物に対して持続的に競合における優位はない（第一 1(3)ロ、第二 1(1)）。本組換え交雑アスペンは、シロイヌナズナ由来のガラクトキノール合成酵素を恒常的に発現することで、ガラクトキノール及びガラクトキノールを基質として合成されるラフィノース属オリゴ糖であるラフィノース及びスタキオースが細胞内に蓄積することで、非組換え交雑アスペンに比べて乾燥耐性を有することが期待される（第一 2(1)ロ、第一 2(6)イ）。しかし、つくば地区はそもそも交雑アスペンを含むヤマナラシ属の樹木の生育を制限する乾燥条件になく（第一 1(1)、第一 2(6)ハ）、乾燥耐性の付与により、競合における優位性が向上するとは考え難い。また、ヤマナラシ節の樹木は、主に根からの萌芽による無性生殖によって増殖するが、ガラクトキノール合成酵素を恒常的に発現が根萌芽形成に影響を与えるとは考え難く、競合における優位性が向上するとは考え難い。したがって、つくば地域において、本組換え交雑アスペンはその宿主植物である交雑アスペンに対して競合における優位性はないと考えられる。

本組換え交雑アスペンに導入された、シロイヌナズナ由来のガラクトキノール合成酵素は myo-イノシトールを基質としてガラクトキノールを構成する反応を触媒する酵素で、ガラクトキノール及びガラクトキノールを基質として合成されるラフィノース属オリゴ糖であるラフィノース及びスタキオースの生合成に関与する（第一 2(1)ロ、第一 2(6)イ）。このため、その他の代謝系に対して作用する可能性は低いと考えられ、生物多様性に対する有害物質を産生するとは考えにくい。加えて、本組換え交雑アスペンは、*HTP*遺伝子によりハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼが発現しているが、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼが生物多様性に影響を与える有害物質として作用するという報告はない（第一 2(1)ロ、第一 3(6)ロ）。さらに、筑波大学遺伝子実験センター特定網室で栽培した本組換え交雑アスペンの落葉及び栽培後の培土の他の植物に対するアレロパシー活性の調査したところ、本組換え交雑アスペンは宿主植物である交雑アスペンとの間で他の植物に対するアレロパシー活性に有意な差はなかった（第二 2(1)）。同様に、特定網室で栽培した本組

換え交雑アスペンを栽培した培土中の土壌微生物の数と宿主植物である交雑アスペンを栽培した培土中の土壌微生物の数間に有意な違いはなかった（第二 2(1)）。さらに、当該第一種使用は隔離ほ場で行うものであり、隔離ほ場栽培中に有害物質の産生が仮にあっても、外部生態系への生物多様性への影響が生じるおそれは限定的である。したがって、本実験計画に基づいて本組換え交雑アスペンの第一種使用をする限り、本組換え交雑アスペンは有害物質産生による生物多様性への影響はないと判断した。

本組換え交雑アスペンの宿主植物である交雑アスペンは雄株で種子は作らない（第一 1(3)イ）。本組換え交雑アスペン及び宿主植物である交雑アスペンの花粉の稔性や種間交雑に関する事前情報は得られていないが、ヤマナラシ属ヤマナラシ節内では種間交雑が比較的起こりやすいことが知られることから、本組換え交雑アスペンの花粉は、つくば地区に自生するヤマナラシ属ヤマナラシ節の樹木の雌花との間で交雑が起こる可能性は否定できない（第一 1(1)、第二 3(1)）。一方で、ヤマナラシ属の樹木の開花開始年齢は10年から15年生以降であり、5年以内の栽培期間となる本実験計画の間には開花が殆どないとかんがえられる（第二 3(3)）。さらに、第一種使用中に万が一花芽が形成された場合には切除する（第二 3(3)）。したがって、本実験計画に基づいて本組換え交雑アスペンの第一種使用をする限り、交雑による生物多様性への影響はないと判断した。

以上のことから、本組換え交雑アスペンを本実験計画に基づいて実施される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、わが国の生物多様性に影響が生じるおそれはないと総合的に結論した。

参考文献

- [1] OECD, Consensus document on the biology of Populus L. (poplars), 2000.
- [2] E. Beuker, “Aspen breeding in Finland, New Challenges.,” *Baltic Forestry*, pp. 6: 81-84, 2000.
- [3] Q. Yu, P. Tigerstedt, M. Haapanen, “Growth and phenology of hybrid aspen clones (Populus tremula L. x Populus tremuloides Michx.),” *Silva Fennica*, pp. 35: 15-25, 2001.
- [4] O. Nilsson, T. Alden, F. Sitbon, C. Little, V. Chalupa, G. Sandberg, O. Olsson, “Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging.,” *Transgenic Research*, 第1巻, pp. 209-220, 1992.
- [5] H. Bohlenius, Control of flowering time and growth cessation in Arabidopsis and Populus trees, Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, 2007.
- [6] J. Isebrands, J. Richardson, Poplars and Willows, FAO, 2014.
- [7] 林木育種センター, “高セルロース含有ギンドロ trg300-1 (AaXEG2, Populus alba L.)

- 第一種使用規定申請書,” 日本版バイオセーフティクリアリングハウス, 2006.
- [8] 路川宗夫, 今井清太, 野水美奈, 宮田佳奈, 鎌田博, “筑波大学構内の植物相 2004,” *筑波大農林研報*, pp. 15-35, 2005.
- [9] 岩崎誠, 坂志朗, 藤間剛, 林隆久, 松村順司, 村田功二, 早世樹—産業植林とその利用—, 海青社, 2012.
- [10] 林野庁, “森林・林業統計要覧 2016,” [オンライン]. Available: http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/toukei/youran_mokuzi.html. [アクセス日: 11 7 2017].
- [11] T. Taniguchi, K. Konagaya, M. Kurita, N. Tanaka, K. Ishii, T. Kondo, F. Funahashi, S. Ohta, T. Kaku, K. Baba, R. Kaida, T. Hayashi, “Growth and root sucker ability of field-grown transgenic poplars overexpressing xyloglucanase,” *J Wood Sci.*, pp. 58: 550-556, 2012.
- [12] 北村四郎, 村田源, 原色日本植物図鑑・木本編, 保育社, 1979.
- [13] 奥山春季, 新訂増補 原色日本野外植物図譜, 誠文堂新光社, 1982.
- [14] 牧野富太郎, 新分類牧野日本植物図鑑, 株式会社北隆館, 2017.
- [15] S. Rood, A. Kalischuk, M. Polzin, J. Braatne, “Branch propagation, not cladogenesis, permits dispersive, clonal reproduction of riparian cottonwoods,” *Forest Ecology and Management*, 第 卷 186, pp. 227-242, 2003.
- [16] T. Taniguchi, Y. Ohmiya, M. Kurita, M. Tsubomura, T. Kondo, Y.-W. Park, K. Baba, T. Hayashi, “Biosafety assessment of transgenic poplars overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) prior to field trials,” *J Wood Sci.*, pp. 54: 408-413, 2008.
- [17] S.-P. Yan, R.-H. Yang, F. Wang, F.-L. Sun, X.-S. Song, “Effect of Auxins and Associated Metabolic Changes on Cuttings of Hybrid Aspen,” *Forests*, 第 卷 8, p. DOI: 10.3390/f8040117, 2017.
- [18] 藤井義晴, “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,” *農業環境技術研究所報告*, pp. 10: 115-218, 1994.
- [19] I. Baldwin, J. Schultz, “Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants,” *Science*, pp. 221:277-279, 1983.
- [20] Convention on Biological Diversity, “Biosafety Clearing-house,” [オンライン]. Available: <https://bch.cbd.int/>. [アクセス日: 11 7 2017].
- [21] T. Taji, C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, “Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*,” *Plant J*, pp. 417-426, 2002.

- [22] J. Zhou, Y. Yang, J. Yu, L. Wang, X. Yu, M. Ohtani, M. Kusano, K. Saito, T. Demura, Q. Qiang Zhuge, “Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses,” *J Plant Research*, vol.2, 第 127, pp. 347-358, 2014.
- [23] M. Kubo, M. Udagawa, N. Nishikubo, G. Horiguchi, M. Yamaguchi, J. Ito, T. Mimura, H. Fukuda, T. Demura, “Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation.,” *Genes Dev.*, pp. 19:1855-1860, 2005.
- [24] EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, “Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants,” *EFSA J.*, pp. 48: 1-18, 2004.
- [25] CTC ラボラトリーシステムズ株式会社, タンパク質のアレルギー評価手法に関する調査報告書, 内閣府食品安全委員会, 2004.
- [26] 環境省, “バイオセーフティクリアリングハウス (J-BHC),” [オンライン]. Available: <https://www.biodic.go.jp/bch/>. [アクセス日: 21 7 2017].
- [27] 森徳典, “ハコヤナギ属 *Populus* Linn. (Poplar).,” 著: *日本の樹木種子 広葉樹編*, 社団法人 林木育種協会, 1998, pp. 1-5.
- [28] 渡邊定元, 樹木社会学, 東京: 東京大学出版会, 1994.
- [29] 竹原明秀, “山火事とポプラ,” 著: *植物の世界 68*, 朝日新聞社, 1995, p. 253.

		個人情報のため、公表しません。	

●実験従事責任者

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、実験従事者から得られた情報により把握するとともに、筑波大学遺伝子組換え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に従って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の地上部は裁断処理し隔離ほ場内にすき込み、また、株元は裁断後、すき込み、オートクレーブ等で不活化し、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

生物多様性への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 目録

- 別紙 1 実験従事者
- 別紙 2 ヤマナラシ属の種間交雑に関する情報
- 別紙 3 ヤマナラシ属の林木を食害することが知られる国内外の昆虫
- 別紙 4 アグロバクテリウム不在の確認
- 別紙 5 導入遺伝子の宿主核ゲノムへの組み込みの確認
- 別紙 6 ベクター骨格由来の DNA 断片の宿主核ゲノム中での不在の確認
- 別紙 7 導入遺伝子の宿主における発現の確認
- 別紙 8 本組換え交雑アスペンの特定網室での生育
- 別紙 9 非組換え交雑アスペンの隔離ほ場での生育
- 別紙 10 非組換え交雑アスペンの予備栽培試験で確認された根萌芽
- 別紙 11 世界の組換えヤマナラシ属林木の隔離ほ場試験の実施状況
- 別紙 12 本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の土壤微生物相へのアレロパシー活性の比較
- 別紙 13 本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の植物へのアレロパシー活性の比較 (1)
- 別紙 14 本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の植物へのアレロパシー活性の比較 (2)
- 別紙 15 筑波大学周辺地形図
- 別紙 16 屋外特定栽培区画 (隔離ほ場) の概略

別紙 1: 実験従事者

表 1-1 従事者リスト

氏 名	所属部局・職名	宿主の取扱い 経験の有無	遺伝子組換え実験従 事者講習会受講の有 無
(実験責任者)			
<p>個人情報のため、公表しません。</p>			

別紙3：ヤマナラシ属林木を摂食する昆虫

表 3-1 ヤマナラシ属林木を食害することが知られる国内外の昆虫

摂食法による分類	目	科	和名又は英名 (学名)		
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>)		
		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)	ナシケンモン(<i>Apatele rumicis oriens</i>)		
		メイガ科(Pyalidae)	オオキノメイガ(<i>Botyodes principalis</i>)		
		イラガ科(Limacodidae)	ヒロヘリアオイラガ(<i>Latoia lepida</i>)		
		ドクガ科(Lymantriidae)	モンシロドクガ(<i>Euproctis similes</i>)		
			ヤナギドクガ(<i>Leucoma salicis</i>)		
			Gypsy moth(<i>Lymantria dispar</i>)		
		タテハチョウ科(Nymphalidae)	Viceroy butterfly larvae(<i>Basilarchia archippus</i>)		
			Mourningcloak butterfly(<i>Nymphalis antiopa</i>)		
		ハマキガ科(Tortricidae)	Pandemis leafroller(<i>Pandemis pyrusana</i>)		
			large aspen tortrix(<i>Choristoneura conflictana</i>)		
		カレハガ科(Lasiocampidae)	forest tent caterpillar (<i>Malacosoma disstria</i>)		
		ホンガ科(Gracillariidae)	aspen blotch miner (<i>Phyllocnistis populiella</i>)		
		ハチ目(Hymenoptera)	ハバチ科(Tenthredinidae)	ポプラハバチ (<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>Plagioderia versicolora</i>)	
				ドロノキハムシ(<i>Chrysomela populi</i>)	
				Phratora leaf Beetle(<i>Phratora californica</i>)	
				Flea beetle(<i>Altica sp.</i>)	
				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 sp.</i>)		

種名とともに和名を記した種は日本の植林地で観察された種であり、英名を記した種は海外の植林地において観察された種を示す。

(本文参照文献[5]より抜粋し改変)

別紙4：アグロバクテリウム不在の確認

培養室で無菌的に維持・継代培養している組換え交雑アスペン 2 系統 (AtGolS2-5、AtGolS2-14) 及び非形質転換体 (T89) の各 3 個体から 1 枚ずつ葉を採取し、これらをラインごとに 1 つにまとめ、以下の 2 法でアグロバクテリウムの残存がないことを確認した。

方法① (すり潰し法)

葉をラインごとに 1.5 mL チューブに入れてプラスチックロットを用いてすり潰した後に、500 μ L の YEB 液体培地に懸濁させ、100 μ L ずつを 50 μ g/mL リファンピシンを含む YEB 寒天培地に塗布し、28°C で 48 時間培養後のコロニーの不在を確認した (図 4-1 上段、表 4-1 上段)。

方法② (振盪法)

葉をラインごとに 1.5 mL チューブに入れた後に 1 mL の YEB 液体培地を添加し、28°C 200 rpm の条件で 1 時間振盪培養を行った後に、100 μ L ずつを 50 μ g/mL リファンピシンを含む YEB 寒天培地に塗布し、28°C で 48 時間培養後のコロニーの不在を確認した (図 4-1 下段、表 4-1 下段)。

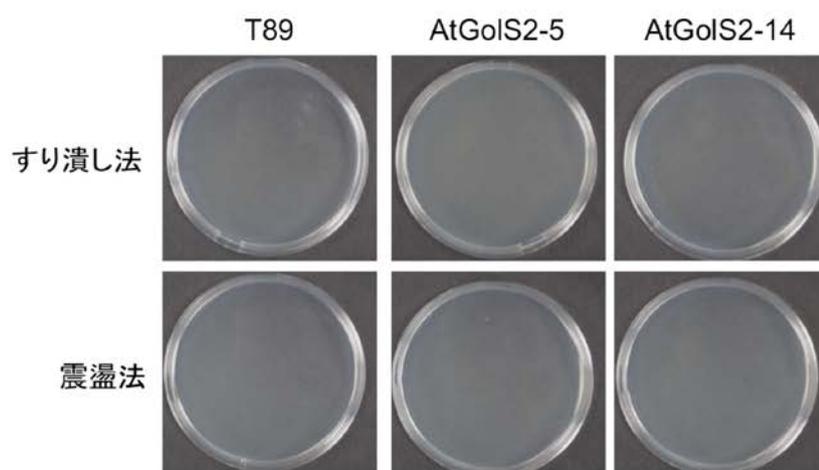


図 4-1 すり潰し法及び振盪法による培養後のプレートの様子

表 4-1 すり潰し法及び振盪法により検出されたアグロバクテリウムのコロニー数

	T89	AtGolS2-5	AtGolS2-14
すり潰し法	0	0	0
震盪法	0	0	0

別紙 5：導入遺伝子の宿主核ゲノムへの組み込みの確認

導入遺伝子の宿主の核ゲノムへの組み込みをサザンハイブリダイゼーション法によって確認した。培養室で無菌的に維持・継代培養している組換え交雑アスペン 2 系統 (AtGolS2-5、AtGolS2-14) 及び非形質転換体 (T89) から抽出したゲノム DNA 20 μg を制限酵素 *Bam*HI または *Hind*III で一晚切断処理し、0.7%アガロースゲルで電気泳動展開した後、ナイロンメンブレンへとトランスファーした。AtGolS2 遺伝子の相同遺伝子がポプラゲノム中にも多数存在するため、AtGolS2 プローブを用いた分析では導入遺伝子の組み込みの確認は困難であるため、プローブとしては組換えポプラ作出に用いた pH35GS ベクターの T-DNA 上に座乗するハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPT*) の配列を用いた。DIG 標識したプローブは化学発光法により検出した。T-DNA 配列中の *Bam*HI 及び *Hind*III の制限酵素切断認識サイト及びプローブの設計位置の模式図は図 5-1 に示す。

図 5-2 に示すように、*Bam*HI 処理では形質転換 2 系統いずれも 1 本のみバンドのみ、*Hind*III 処理では AtGolS2-5 系統には 2 本のバンド、AtGolS2-14 系統では高分子領域にスミアなバンドが得られた。*Bam*HI 処理のバンドの濃淡及び *Hind*III 処理でのバンド数から AtGolS2-5 系統及び AtGolS2-14 系統の挿入コピー数は、それぞれ 2 コピー及び 1 コピーと推定した。

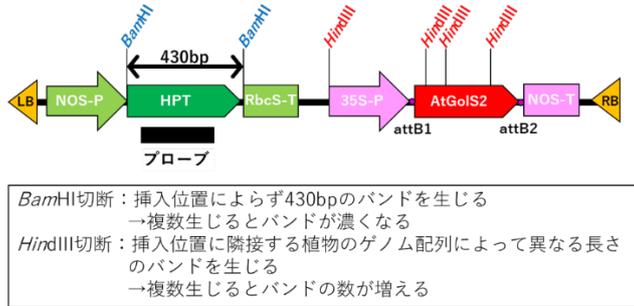


図 5-1 AtGolS2-5、AtGolS2-14 に挿入された T-DNA 配列中の制限酵素サイトの模式図

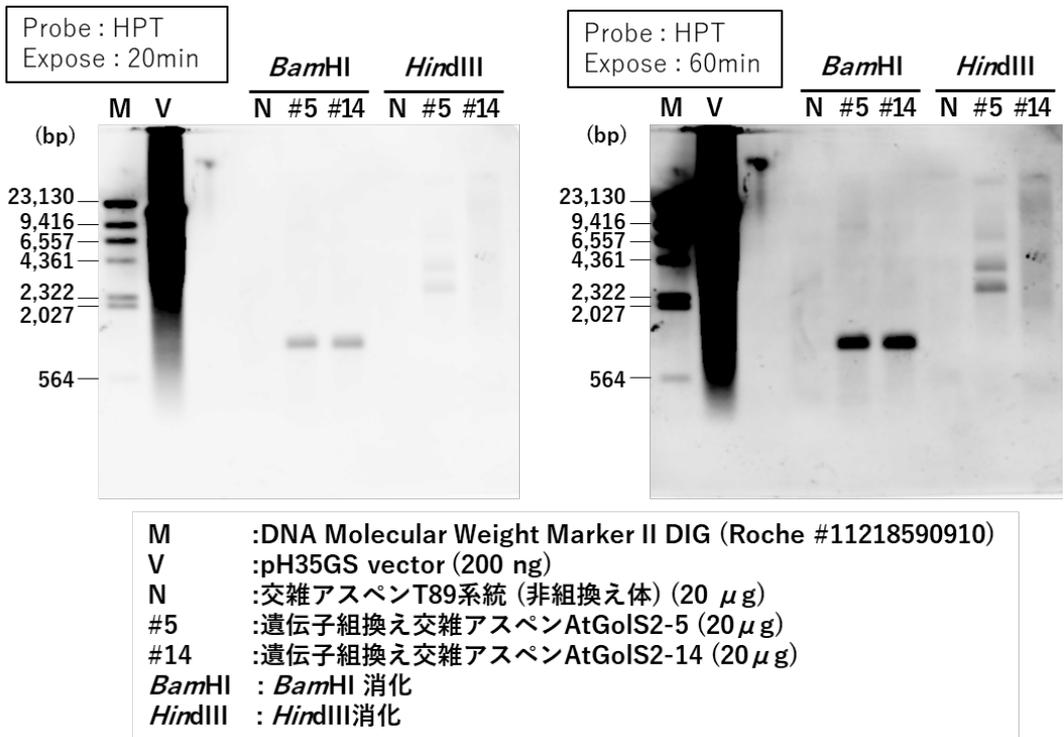


図 5-2 サザンハイブリダイゼーションの結果

別紙6 ベクター骨格由来の DNA 断片の宿主核ゲノム中での不在の確認

宿主 DNA 中に Ti プラスミドベクターの T-DNA 以外のベクター骨格が導入されていないことを確認するため、本組換え体の形質転換に用いた pH35GS-GolS2 ベクターの基となった pH35GS ベクターの配列情報を基に、左側境界配列 (LB) を基準とし、5,800 bp 付近、8,400 bp 付近、11,600 bp 付近にプライマー対を設計し、PCR を実施した (図 6-1)。尚、T-DNA 内部の配列として P35S を増幅するプライマー対¹⁾、ポプラゲノム内在性マーカーとして *PtKUP1* 遺伝子²⁾ を増幅するプライマー対による PCR を対照試験として実施した。その結果、T-DNA 領域外側に設計した 3 つのプライマー対による PCR から増幅が得られず、ポプラゲノム DNA 中に存在しないことが確認された (図 6-2)。

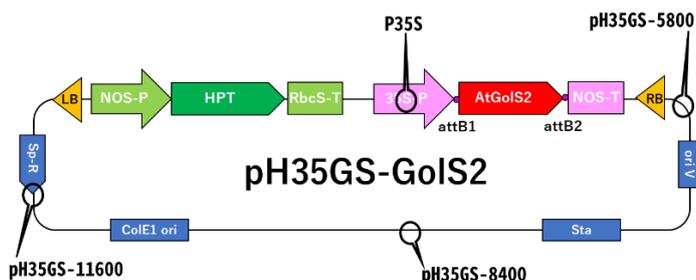


図 6-1 プライマー設計位置の模式図

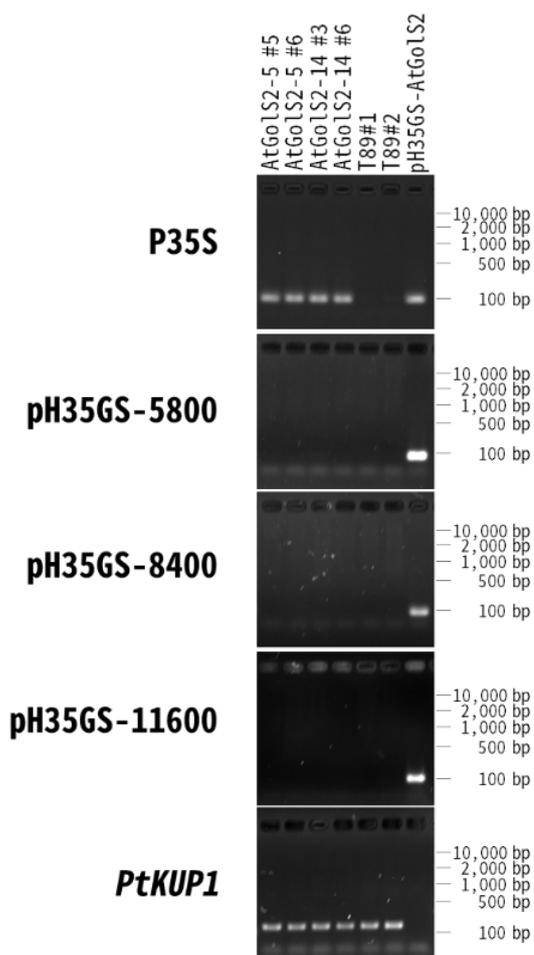


図 6-2 ゲノミック PCR の結果

¹⁾ Kuribara H *et al.* (2002) Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*85: 1077-1089

²⁾ Noda Y *et al.* (2016) Short day length-induced decrease of cesium uptake without altering potassium uptake manner in poplar. *Scientific Reports* 6: 38360

別紙7 導入遺伝子の宿主における発現の確認

導入遺伝子の宿主における発現を RT-PCR 法によって確認した。培養室で無菌的に維持・継代培養している組換え交雑アスペン2系統 (AtGolS2-5、AtGolS2-14) 及び非形質転換体 (T89) の葉から全 RNA を抽出した全 RNA はオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し、これを鋳型として *AtGolS2* 遺伝子を特異的に PCR 増幅した。ポプラ内生 *ELF4A* 遺伝子は対照として増幅した。

その結果、図 7-1 のとおり、本実験で使用を予定する組換え交雑アスペン2系統 (AtGolS2-5、AtGolS2-14、図 7-1 中赤丸で示した) はいずれからも導入遺伝子の異所的発現が確認された

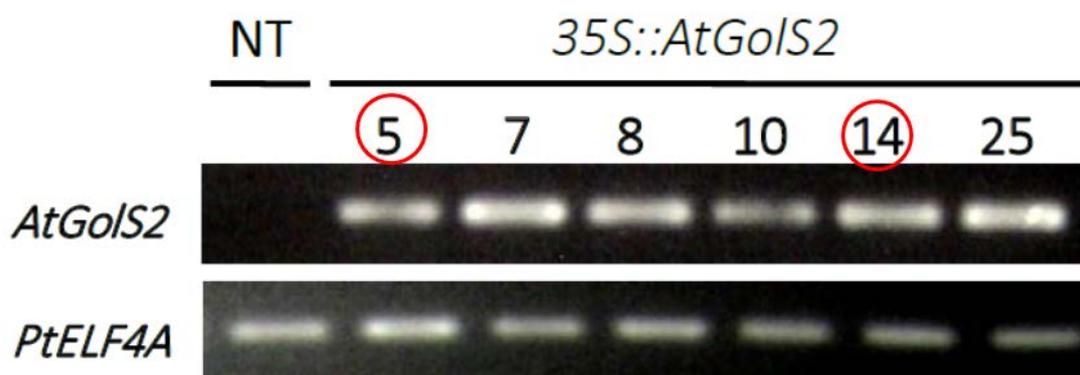


図 7-1 RT-PCR 法による *AtGolS2* 遺伝子の発現解析の結果
(Yu, X. *et al* (2017) Mol. Breeding 37:57 DOI 10.1007/s11032-016-0618-0 から転載)

別紙 8：本組換え交雑アスピンの特定網室での生育

2015年8月下旬から約4カ月間、組換え交雑アスペン4系統（AtGolS2導入2系統、及びAtSRK2C導入2系統）及び交雑アスペンT89株、各8～10個体を筑波大学遺伝子実験センター特定網室でポット栽培した（図8-1）。栽培期間中はおよそ2週間毎に樹高を測定した（図8-2）。2015年12月22日時点での樹高をAtGolS2導入2系統及びT89株の間の有意差を一元配置分散分析によって検定した結果、3系統間及びAtGolS2遺伝子導入の有無による有意差は検出されなかった（表8-1）。その後、栽培した組換え及び非組換え交雑アスピンの落葉及び栽培後の培土（根圏土壌）は、生物多様性評価試験に供した。



図8-1 組換え交雑アスピンの特定網室栽培試験の様子
(赤い網は落葉を採集するために設置した)

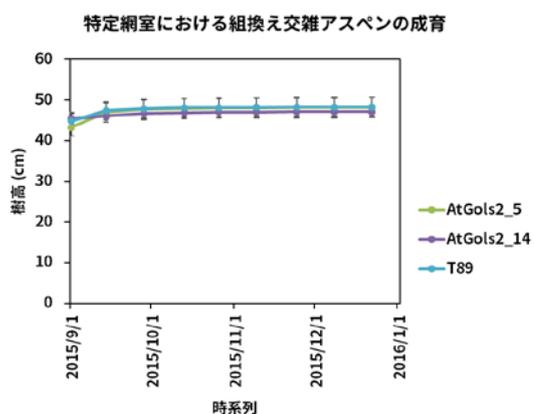


図8-2 組換え及び非組換え交雑アスペン成育記録

表8-1 一元配置分散分析表

要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ^{*1}	122.5	2	61.2	1.368	0.265	ns ^{*3}
└群間 ^{*2}	19.8	1	19.8	0.442	0.509	ns ^{*3}
└誤差	102.7	1				
誤差	2103.8	47	44.8			
全変動	2226.2	49				

^{*1} AtGolS2-5系統、AtGolS2-14系統、及び非形質転換T89系統の3系統間で母平均の差を検定

^{*2} AtGolS2(AtGolS2-5系統及びAtGolS2-14系統)と非形質転換T89系統の2群間で母平均の差を検定

^{*3} 有意水準5%で有意差が検出されなかった

2015年12月22日時点での樹高を評価した

別紙 9：非組換え交雑アスペンの隔離ほ場での生育

2015 年 5 月 28 日に交雑アスペン T89 株を筑波大学遺伝子実験センター模擬的環境試験圃場に移植し、交雑アスペン T89 株の当地での生育や植栽管理法に関する情報収集を行った（申請時も試験栽培は継続中）。図 9-1 に栽培試験中の植物体の様子を、図 9-2 に植栽後 2 年目冬季までの樹高及び基部直径の推移を示した。

2015 年 6 月 22 日



移植後、茎頂部の葉に褐変がみられたが、本区画の交雑アスペンは休眠することなく、生育を続けた。

2015 年 8 月 18 日



2015 年 11 月 27 日



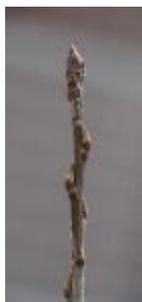
10 月中旬位から休眠芽を形成し、縦方向の成長はほぼないが、11 月下旬でも落葉の傾向はない（12 月中旬位に落葉した）。植栽から落葉までは、温室で観察されているのとはほぼ同様の形態・生育であった。

図 9-1（次ページに続く）

2016年2月26日



2016年4月8日



2016年4月19日



4月下旬に一斉に休眠から覚醒した。

2016年5月23日



2016年6月20日



手前の2列6個体は、挿し木による増殖を検討するため、4月中旬に地上部を切除した（挿し木は失敗した）。休眠・休眠覚醒以降は、頂芽優勢が崩れ、腋芽成長がみられるようになったため、夏以降に側枝を枝打ちした。

図9-1 (前ページより続く)

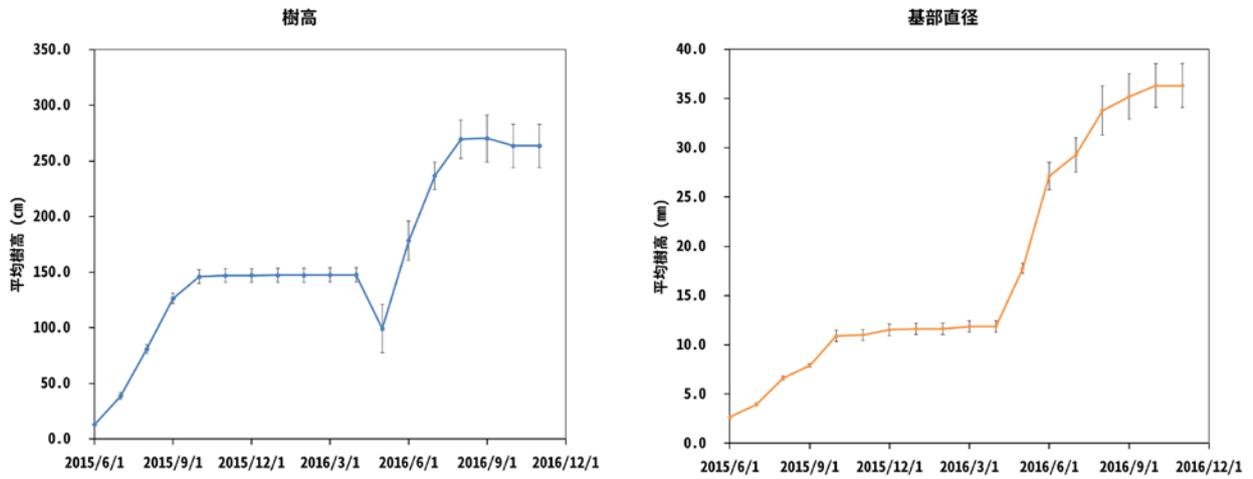


図 9-2 植栽 2 年冬季までの当地での交雑アスピンの樹高及び基部直径の推移
 各値及び誤差は、9 個体の平均値及び標準誤差を示す。
 (注：2016 年 4 月に 9 本中 6 本の地上部を切断したため、2016 年 5 月の樹高が下落している。)

別紙 10：非組換え交雑アスペンの予備栽培試験で確認された根萌芽

筑波大学 T-PIRC 遺伝子実験センター隔離ほ場に植栽した非形質転換交雑アスペンに、2 年目春に確認された根萌芽の様子を示す。



図 10-1 交雑アスペン T89 株の根萌芽様子

桃色の上向き矢印は植栽した個体、青色下向き矢印は桃色矢印で示した個体の根から萌芽したシュートを示す。



図 10-2 1 年目の冬季に地上部を撤去した交雑アスペン栽培区画に残存した根から萌芽したシュートの様子 (図中のコインは百円硬貨)

別紙 11：世界の組換えヤマナラシ属林木の隔離ほ場試験の実施状況

表 11-1 組換えヤマナラシ属林木の海外での隔離ほ場試験の実施件数(文献¹⁾の Table1 を参考に改変)

国又は地域	ヤマナラシ属林木の隔離ほ場試験 (confined field trial) の実施件数	導入特性の例
米国	261 ²⁾	害虫抵抗性、除草剤耐性、細胞壁改変、光合成強化、 リグニン含量改変、花成時期改変、根萌芽抑制等 ²⁾
中国	34 ¹⁾	害虫抵抗性 ¹⁾ 等
カナダ	59 ³⁾	除草剤耐性、二次代謝物改変、炭水化物含量改変、 カビ抵抗性等 ³⁾
EU	45 ⁴⁾⁵⁾	バイオマス収量改良、木質改変、ファイトリメディ エーション等 ⁴⁾
日本	2 ⁶⁾	高セルロース含量 ⁶⁾

¹⁾ Haggman H et al. (2013) Genetically engineered trees for plantation forests: key considerations for environmental risk assessment. Plant Biotechnology J 11: 785–798

²⁾ https://www.aphis.usda.gov/brs/status/BRS_public_data_file.xlsx (アクセス日 2017/7/10)

³⁾ <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/field-trials/eng/1313872595333/1313873672306> (アクセス日 2017/7/10)

⁴⁾ http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_browse.aspx (アクセス日 2017/7/10)

⁵⁾ <http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/overview/dbplants.asp> (アクセス日 2017/7/10)

⁶⁾ https://www.biodic.go.jp/bch/bch_3.html (アクセス日 2017/7/10)

別紙 12：本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の土壤微生物相へのアレロパシー活性の比較

組換え及び非組換え交雑アスペン間の土壤微生物相へのアレロパシー活性を希釈平板培養法によって比較した。2015年8月下旬から2016年1月まで、特定網室でポット栽培した組換え及び非組換え交雑アスペン T89 株から土壌を採取し、15 mM リン酸バッファーに懸濁し、その上清を希釈した希釈液を OGYE 培地及び PTYG 培地に塗布し室温暗所でそれぞれ3日間及び7日間培養し、形成したコロニー数をカウントし、土壌乾燥重量 1 g 当たりの生菌数を計算により求めた (図 12-1)。一元配置分散分析の結果、糸状菌、放線菌、細菌の数に *AtGols2* 遺伝子導入組換え交雑アスペンと非組換え交雑アスペンの間に有意な差は示されなかったことから (表 12-1)、*AtGols2* 遺伝子導入による交雑アスペンの土壤微生物相へのアレロパシー活性に影響はないと判断した。

表 12-1 一元配置分散分析表

糸状菌						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	1.86E-01	2	9.29E-02	0.850	0.452	ns ³
┆群間 ²	2.45E-02	1	2.45E-02	0.224	0.644	ns ³
┆誤差	1.61E-01	1				
誤差	1.31E+00	12	1.09.E-01			
全変動	1.50E+00	14				
放線菌						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	8.51E-02	2	4.26E-02	1.488	0.265	ns ³
┆群間 ²	5.46E-02	1	5.46E-02	1.908	0.192	ns ³
┆誤差	3.05E-02	1				
誤差	3.43E-01	12	2.86.E-02			
全変動	4.28E-01	14				
放線菌を除く細菌						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	2.28E-02	2	1.14E-02	0.438	0.655	ns ³
┆群間 ²	1.31E-03	1	1.31E-03	0.050	0.827	ns ³
┆誤差	2.15E-02	1				
誤差	3.13E-01	12	2.61.E-02			
全変動	3.35E-01	14				

¹ AtGols2-5系統、AtGols2-14系統、及び非形質転換T89系統の3系統間で母平均の差を検定

² AtGols2(AtGols2-5系統及びAtGols2-14系統)と非形質転換T89系統の2群間で母平均の差を検定

³ 有意水準5%で有意差が検出されなかった

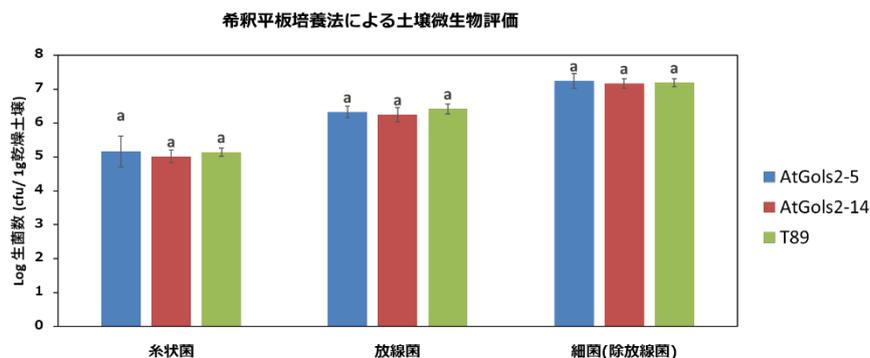


図 12-1 希釈平板培養法の結果

棒グラフの上部に付記した同じアルファベットは Tukey-HSD 法による多重解析で系統間に有意差が検出されないことを示す (有意水準 5%)。

別紙 13：本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の植物へのアレロパシー活性の比較

本組換え交雑アスペン及び非組換え体からの主として根からの滲出液を介した植物へのアレロパシー活性を後作残留試験によって比較した。2015年8月下旬から2016年1月まで、特定網室でポット栽培した組換え及び非組換え交雑アスペン T89 株から根圏土壌をセルトレイ（セルサイズ 37 mm x 37 mm x 38 mm）に入れ、そこに検定植物（レタス）種子5粒をまき、水道水をスプレーし、遮光し、5日間 25°C で培養した後の検定植物の発芽率、幼根長、及び、胚軸長を測定した（図 13-1）。一元配置分散分析の結果、発芽率、幼根長、及び、胚軸長に *AtGols* 遺伝子導入組換え交雑アスペンと非組換え交雑アスペン株の間に有意な差は示されなかったことから（表 13-1）、*AtGols* 遺伝子導入による交雑アスペン株の根圏土壌の他植物へのアレロパシー活性に影響はないと判断した。

表 13-1 一元配置分散分析表

発芽率						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	5.926	2	2.963	2.667	0.110	ns ³
┆群間 ²	1.481	1	1.481	1.333	0.271	ns ³
┆誤差	4.444	1				
誤差	13.333	12	1.111			
全変動	19.259	14				
幼根長						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	8.447	2	4.224	1.713	0.222	ns ³
┆群間 ²	3.151	1	3.151	1.278	0.280	ns ³
┆誤差	5.297	1				
誤差	29.580	12	2.465			
全変動	38.028	14				
胚軸長						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	8.158	2	4.079	1.273	0.315	ns ³
┆群間 ²	7.780	1	7.780	2.428	0.145	ns ³
┆誤差	0.378	1				
誤差	38.451	12	3.204			
全変動	46.609	14				

¹ AtGols2-5系統、AtGols2-14系統、及び非形質転換T89系統の3系統間で母平均の差を検定

² AtGols2(AtGols2-5系統及びAtGols2-14系統)と非形質転換T89系統の2群間で母平均の差を検定

³ 有意水準5%で有意差が検出されなかった

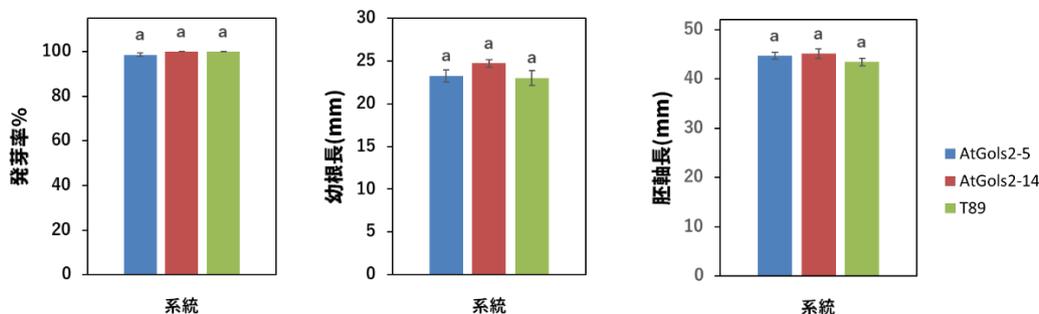


図 13-1 後作残留試験の結果

棒グラフの上部に付記した同じアルファベットは Tukey-HSD 法による多重解析で系統間に有意差が検出されないことを示す（有意水準 5%）。

別紙 14：本組換え交雑アスペン及び非組換え体間の植物へのアレロパシー活性の比較 (2)

本組換え交雑アスペン及び非組換え体間からの植物へのアレロパシー活性をサンドイッチ法によって比較した。2015年8月下旬から特定網室でポット栽培した組換え及び非組換え交雑アスペン T89 株から12月中旬以降に自然落葉した葉を採取し、6穴プレートの各穴に秤量した30 mgの葉を0.5% (w/v) アガロースゲル10 mL中に包埋し、その表面に検定植物(レタス)種子5粒をまき、遮光し、5日間25°Cで培養した後の検定植物の発芽率、幼根長、及び、胚軸長を測定した(図14-1)。一元配置分散分析の結果、発芽率、幼根長、及び、胚軸長に *AtGols2* 遺伝子導入組換え交雑アスペンと非組換え交雑アスペン株の間に有意な差は示されなかったことから(表14-1)、*AtGols2* 遺伝子導入による交雑アスペンの落葉滲出物に由来する他植物へのアレロパシー活性に影響はないと判断した。

表 14-1 一元配置分散分析表

発芽率						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	45.926	2	22.963	2.016	0.176	ns ³
┆群間 ²	5.926	1	5.926	0.520	0.485	ns ³
┆誤差	40.000	1				
誤差	136.667	12	11.389			
全変動	182.593	14				
幼根長						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	156.800	2	78.400	0.203	0.819	ns ³
┆群間 ²	2.089	1	2.089	0.005	0.943	ns ³
┆誤差	154.711	1				
誤差	4623.571	12	385.298			
全変動	4780.371	14				
胚軸長						
要因	偏差平方和	自由度	分散	分散比F	P値	判定
系統間 ¹	438.611	2	219.306	1.454	0.272	ns ³
┆群間 ²	5.208	1	5.208	0.035	0.856	ns ³
┆誤差	433.403	1				
誤差	1810.289	12	150.857			
全変動	2248.900	14				

*1 *AtGols2*-5系統、*AtGols2*-14系統、及び非形質転換T89系統の3系統間で母平均の差を検定

*2 *AtGols2*(*AtGols2*-5系統及び*AtGols2*-14系統)と非形質転換T89系統の2群間で母平均の差を検定

*3 有意水準5%で有意差が検出されなかった

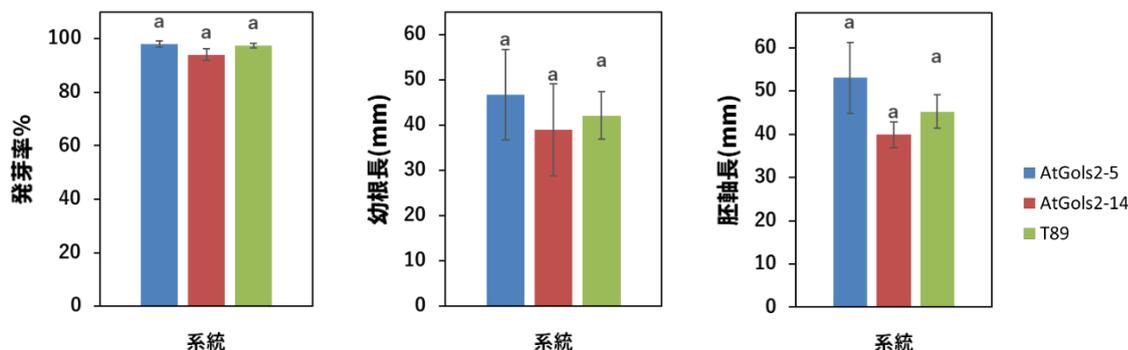
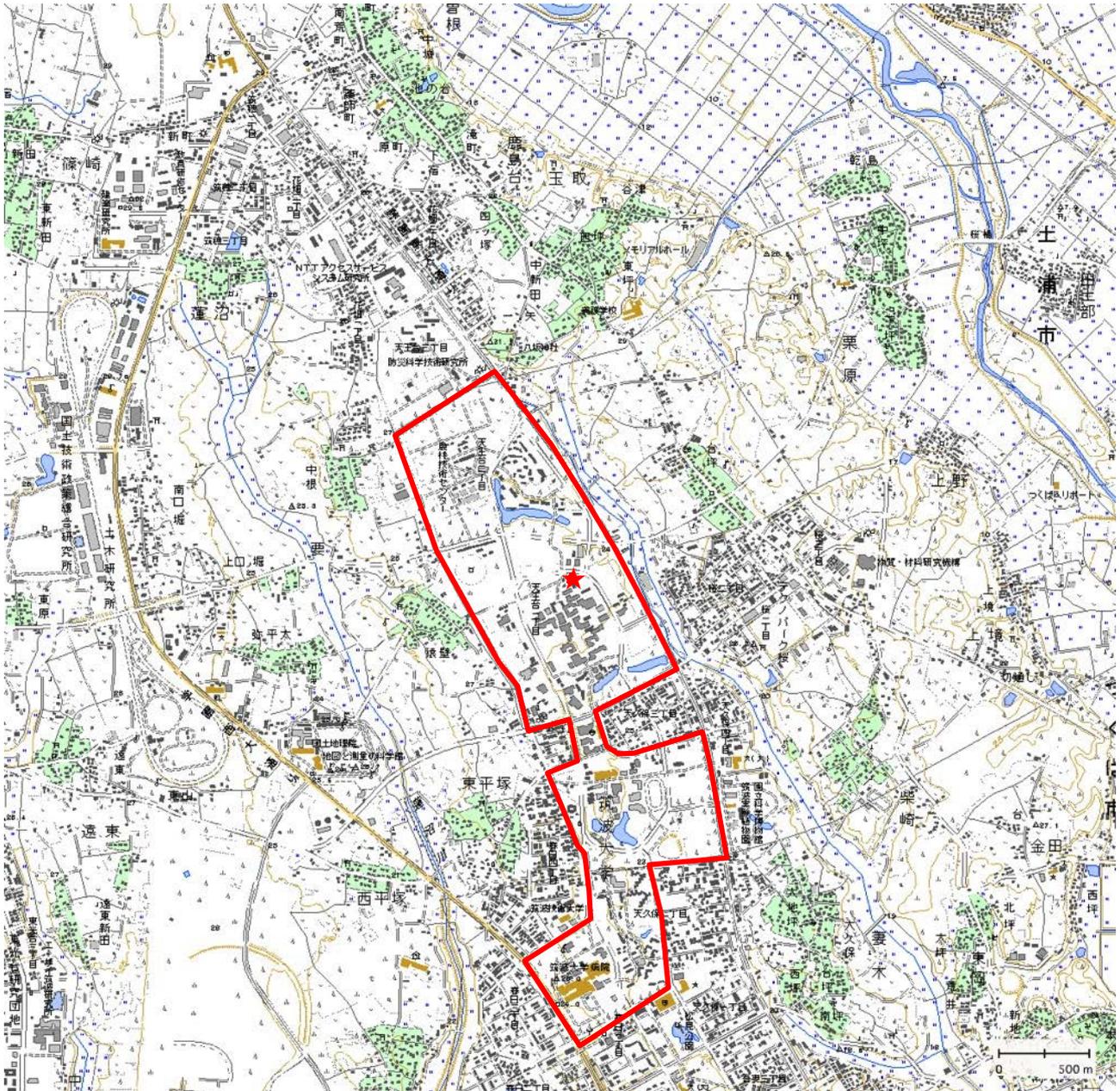


図 14-1 サンドイッチ試験の結果

棒グラフの上部に付記した同じアルファベットは Tukey-HSD 法による多重解析で系統間に有意差が検出されないことを示す(有意水準5%)。

別紙 15：筑波大学周辺地形図



国土地理院 <http://watchizu.gsi.go.jp/>より転記を改変。赤線で囲まれた領域が筑波大学（筑波キャンパス）を示す。★は植栽試験に用いる隔離ほ場の場所を示す

別紙 16：屋外特定栽培区画（隔離ほ場）の概略



図 16-1 遺伝子実験センター隔離ほ場周辺図

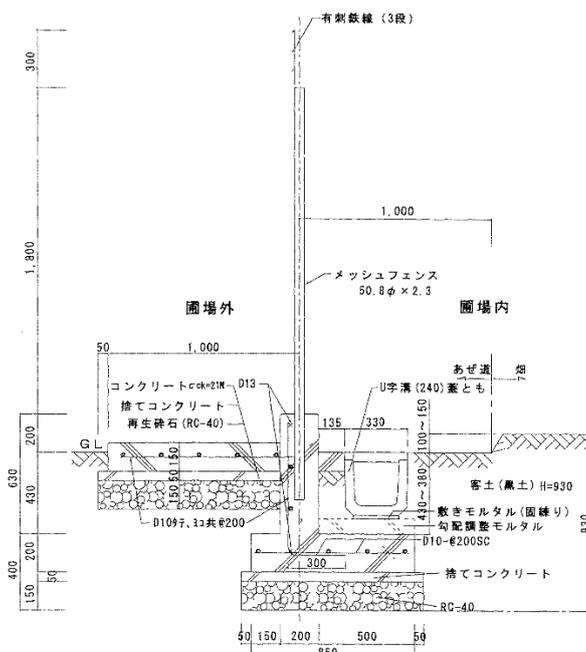


図 16-2 隔離ほ場フェンス基礎断面図

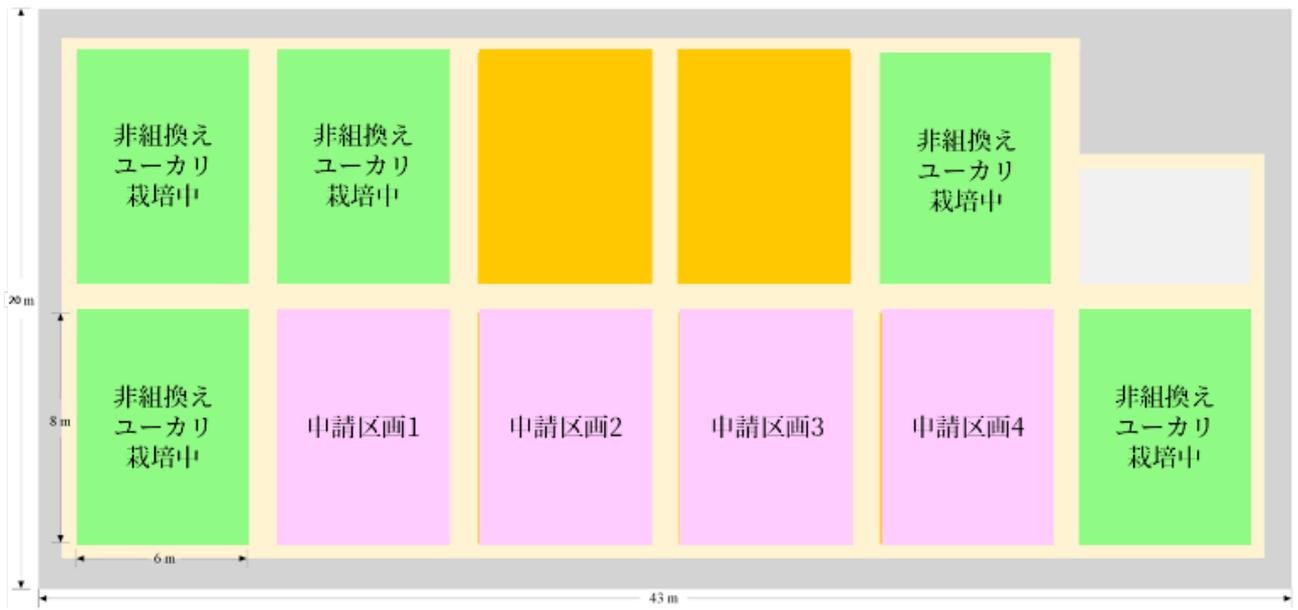


図 16-3 ほ場の全体図と区画の配置（区画 1～4 を利用して栽培予定）



図 16-4 模擬的環境試験ほ場 II (隔離ほ場 II) の全景 (2017 年 10 月 16 日撮影)