

耐塩性ユーカリ ( <i>codA, Eucalyptus globulus</i> Labill.) (1-9-1) 申請書の概要
---

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書.....	2
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.....	2
(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.....	3
2. 遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報	
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
(2) ベクターに関する情報.....	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	10
(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.....	11
(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.....	11
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	12
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.....	15
(2) 使用等の方法.....	15
(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.....	16
(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.....	16
(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.....	16
(6) 国外における使用等に関する情報.....	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.....	17
2. 有害物質の産生性.....	17
3. 交雑性.....	18
4. その他の性質.....	19
第三 生物多様性影響の総合評価.....	20
参考文献.....	21
緊急設置計画書の概要.....	23

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 7 月 30 日

文部科学大臣 伊吹 文明 殿  
環境大臣 若林 正俊 殿

氏名 国立大学法人 筑波大学  
申請者 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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	耐塩性ユーカリ( <i>codA, Eucalyptus globulus</i> Labill.) (1-9-1)
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これらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：茨城県つくば市天王台 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 II (隔離ほ場) 使用期間：承認日から平成 23 年 12 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、高さ 230cm のフェンス (有刺鉄線 30cm、メッシュフェンス 180cm、コンクリート基部 20cm) を設置している。コンクリート部は地下 68cm まで及び、その下層に碎石層 15cm が設けられている。 (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するとともに、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。 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、隔離ほ場内の使用区画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、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリの地上部は裁断処理し隔離ほ場内に鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、オートクレーブ等で不活化する。 (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) に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (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。

# 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) 分類学上の位置付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*)シムファイオマイルタス亜属(*Symphyortus*)に属するユーカリ・グロビュラス(*Eucalyptus globulus* Labill.)、オーストラリア名はタスマニア・ブルー・ガムである(文献1、以下宿主種を示すときは *E. globulus*、ユーカリ属全般を示すときはユーカリ属植物と称す)。2倍体植物(染色体数は  $n=22$ 、文献2)であり、*E. globulus*の全ゲノムサイズは530Mbpと概算されている(文献3)。1777年Cookの第3回航海の際に、多くの植物が採取され、標本として英国に送られたため、ユーカリ属植物が広く紹介された。当時ロンドンに滞在していたフランスの植物学者C.L.B.L'Heritierは、翌年この標本をもとに、フトモモ科(Myrtaceae)にユーカリ属(*Eucalyptus*)を設け、種名を与えた(文献5)。

*E. globulus*はヨーロッパ・アフリカ・南アメリカなど世界各地に植林されているが、その自然分布域はオーストラリアのタスマニア島周辺及びオーストラリア本土ビクトリア州南部の一部に限定されている(文献1)。ユーカリ属植物の中には、*E. globulus*に形態的・遺伝的によく似た3つの種があり、それぞれ *E. bicostata*、*E. pseudoglobulus* 及び *E. maidenii* と称される(文献1)。これらは主に本土ビクトリア州に分布し、*E. globulus*の亜種として扱われることもある(文献1)。

ユーカリ属植物は、少なくとも約600種以上であると報告されている。その大半はオーストラリア本土及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。

#### (2) 使用等の歴史及び現状

ユーカリ属植物のうち数種は商業利用されており、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4,6)。ユーカリ属植物の中で、*E. globulus*は旧世界に最初に導入された種で、もっとも多く植林されている。特に、スペイン及びポルトガルで盛んに植林されており、1973年の植林地の総面積は、全世界で80万ヘクタール以上にも及び、植林面積は増加していると考えられている(文献6)。

葉から抽出された精油は、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7)。また、精油には、テルペノイドを主体とする芳香性物質が含まれ、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9)。

ユーカリ属植物は日本原産の種ではなく、日本国内への導入は明治時代に始まった。宿主植物である *E. globulus* と交雑が可能なユーカリ属植物の自然分布、及び近縁野生種の存在は報告されていない(文献 4, 5)。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、特に静岡、兵庫、高知、福岡の県に多い(文献 4)。鹿児島市では *E. camaldulensis* と *E. robusta* を街路樹として栽培している。また、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が、数多くある種のうち数十種ほどがそれに該当する(文献 4, 6)。*E. globulus* はコアラが食すユーカリ属植物の一種である。コアラを飼育している動物園では、新鮮なユーカリ属植物を供給するため、園内で栽培を行う場合もある。鹿児島市平川動物園では、コアラ飼料用に *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. microcorys*, *E. moluccana*, *E. propinqua*, *E. punctata*, *E. robusta*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* が栽培されている。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おり、沖縄では、*E. camaldulensis* と *E. robusta*, *E. viminalis* などの栽培が知られている。

つくば地区におけるユーカリ属植物の栽培は、個別の工場敷地などの緑化、あるいは大学・研究所における試験栽培に限られている。筑波大学においても遺伝子組換え *E. camaldulensis* (第一種使用規程承認済み)及び非組換え体 *E. globulus* の栽培が行われている。遺伝子組換え *E. camaldulensis* の栽培においては、花芽が形成され次第、第一種使用規程により除去するように管理されている。つくば市近辺におけるユーカリ属植物の栽培の状況を別紙 2 に挙げる。また、ユーカリ属植物は、園芸店などにおいて、室内園芸植物として販売されている。

また、世界各地において、遺伝子組換えユーカリ属植物の開発が行われている。海外でのユーカリ属植物を用いた遺伝子組換え体の第一種使用等を別紙 3 にまとめた。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

ユーカリ属植物は、生態学的には常緑広葉樹に属する(文献 5)。雌雄同花で花色は白、赤、ピンク、オレンジとさまざまであるが、*E. globulus* は白色の花をつける(文献 1)。*E. globulus* はユーカリ属植物では例外的に腋生単花(多くは腋生散形花序)である(文献 5)。*E. globulus* の日本における開花時期、結実時期については詳細に調べられた報告はない。オーストラリア自生地では雨季である 6 月から 12 月くらいまで開花が認められる。種子は開花から成熟まで約 11 ヶ月を要する。幼木は、対生の葉を持つが、成木は互生葉で、高さ 60 m にまで成長する(文献 1)。パルプ用の植林地では、8-12 年で収穫されている(文献 6)。一方、他の有用種である *E. camaldulensis* では、成木は高さ 20-50m、胸高直径 90-210 cm(文献 28) にまで成長する。材は光沢のある赤色で耐久性があり、パルプ用にはおよそ 5-8 年で収穫できる(文献 6)。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 29)。日本では、街路樹等、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の条件

ユーカリ属植物は、平均気温 25℃を最適とし 15–29℃で生育、種によっては、氷点下でも生存できるが低温には適していない(文献 4)。乾燥、季節的冠水、多少の塩類土壌にも耐え、潜伏芽更新も可能であるため、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 5)。

*E. globulus* の自生地は、夏涼しく、冬比較的暖かく、寒暖の差が少ない。真夏月の平均最高気温は 18–23℃、真冬月の平均最低気温は 4℃である。最適地は、やや重く水はけのよい土壌、または適度の湿りをもった深い良質の土壌である(文献 4)。潜伏芽更新も可能であり、世界に広く植林されている(文献 6)。降雨量は、年 650–1,400 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 4)。

## ハ 捕食性又は寄生性

該当しない

## ニ 繁殖又は増殖の様式

*E. globulus* は、適した条件下で、実生による繁殖と樹皮下に保持している潜伏芽からの更新が可能である(文献 3)。植林地では潜伏芽を利用して収穫後の再利用を行うこともある(日本製紙)。自殖、他殖共に可能である。種子が完熟した後、果実が乾燥し破裂することによって種子を放出する。火災などによって、種子が一斉放出される場合がある。個体によっては、自家不和合性を持つ(文献 8)。主に双翅目の昆虫により花粉が媒介され、その種類は多岐に渡る(文献 2, 10)。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 americanus*(Weidemann)などである。また、*E. globulus* の場合、自生地においては、鳥類によっても送粉される(文献 10)。主な媒介鳥はオウムの仲間である Swift Parrot (*Lathamus discolor*) やミツスイ科の New Holland honeyeater (*Phylidonyris novaehollandiae*)などである。一方、日本における媒介昆虫類及び鳥類については、調査されていない。

挿木による増殖は非常に難しいとされている。発根技術は特許申請されるほど困難であり、組織培養も容易ではない。実験室内で行った挿し木実験によると、試験管で発芽させた 60 日目の *E. globulus* から得た挿穂の発根率は 35%であり、また 100 日目の個体から得た挿穂の発根率は 15%であった(文献 27)。これらの挿穂には発根させるために植物ホルモン処理がなされているために、実際には自然条件下での挿穂発根率は極めて低いと考えられる。共台による接木は可能であるが、コストがかかるため大量生産には向かない(文献 4)。また、切り株などからの潜伏芽による更新も可能である(文献 11)。*E. globulus* は、日陰においては生育が阻害されるため、自

然条件においては、野火等によって日照が改善された場所において、実生及び潜伏芽によって更新される（文献 12）。また、*E. globulus* において、匍匐根が形成されるという報告はないが、根茎は形成される（文献 6）。

#### ホ 病原性

該当しない

#### ヘ 有害物質の産生性

ユーカリ属植物の中にはアレロパシー物質を持つものがある。*E. globulus* にも土壤微生物に対する増殖阻害影響が認められる（文献 13）。また、栽培作物に対しても発芽阻害性が認められるが、その他の植林種（*E. camaldulensis* 及び *E. saligna*）と比べると、相対的に低いアレロパシー活性を示す（文献 14）。*E. globulus* におけるアレロパシー物質成分の同定に関する詳細な情報はないが、*E. camaldulensis* の場合では、1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene 及び  $\alpha$ -phellandrene のモノテルペノイドがアレロパシー物質の主成分であり、その他 gallic acid, ferulic acid などが同定されている（文献 5）。一方、文献 15 によると、*E. globulus* においては、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。

#### ト その他の情報

##### (1) ユーカリ属植物を摂食する昆虫等について

オーストラリアにおける摂食昆虫としては、コガネムシ類、ハムシ類、ゾウムシ類、ハバチ類のような葉を食するもの、キジラミ類、ヨコバイ類やカタカイガラムシ類のような樹液を吸う昆虫、ならびにカミキリムシ類や大型のボクトウガ類のような、その幼虫が樹木の木質部に穴を開けるいわゆる木食い虫が挙げられる（文献 4）。

日本では、名古屋市において温室栽培のユーカリ属植物を加害している鱗翅類の調査から、ハマキガ科のチャノコカクモンハマキ、ホソバチビヒメハマキとバンジロウツノエグリヒメハマキが確認された（文献 16）。また、沖縄県名護市の栽培ほ場では、ハマキガ科のバンジロウツノエグリヒメハマキ、シャクガ科のオオトビスジエダシャクとミカンコエダシャク、ドクガ科のコシロモンドクガとマイマイガ沖縄亜種が確認された（文献 16）。

##### (2) その他

ユーカリ属植物のいくつかの種は、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行われている。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 7）。

## 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 (*codA, Eucalyptus globulus* Labill.) (1-9-1) (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 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次項表 1 に示した通りである。

##### 発現ユニット 1

目的遺伝子である *codA* 遺伝子 (表 1 対照区分 B) は、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の遺伝子であり、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 32)。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。塩や乾燥による植物の成長阻害は、浸透圧ストレスによって引き起こされることが知られており、いくつかの細菌や植物はグリシンベタインを適合溶質として利用し、浸透圧ストレスを緩和すると考えられている。また、ユビキチンプロモーターは植物内で構成的発現を起こし、NOS ターミネーターは遺伝子の転写を終了させるのに必要なユニットである。

##### 発現ユニット 2

*GUS* ( $\beta$  グルクロニダーゼ) 遺伝子 (表 1 対照区分 F) は pGW23 ベクターの構成要素である(文献 17)。*GUS* 遺伝子は標識遺伝子として使われており、大腸菌由来の *GUS* を発現する。カラーゼイントロンは、*GUS* 遺伝子を植物体内のみで発現させるために *GUS* 遺伝子配列に挿入されている。GST プロモーター及び NOS ターミネーターは遺伝子の転写を開始及び終了させる。

##### 発現ユニット 3

*NPTII* (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子 (表 1 対照区分 K) は pGW23 ベクターの構成要素である(文献 17)。これは標識遺伝子として使われており、カナマイシン耐性遺伝子である。NOS プロモーター及び NOS ターミネーターは遺伝子の転写を開始及び終了させる。

##### その他

R タンパクの認識配列 (RS、表 1 対照区分 M) は組換え反応を起こす領域で、R タンパクの発現によって RS 領域にはさまれた遺伝子は欠損する。

右側及び左側境界配列(RB 及び LB、表 1 対照区分 N)は、Ti プラスミド pTiT37 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 *Agrobacterium tumefaciens* 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。

上記のすべての遺伝子及び配列は、病原性を発揮するものではない。

表 1 形質転換・発現ベクター pGW23codA の各構成要素.

プラスミド pGW23codA は、図 1 及び図 2 に示すように、3 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。

対象区分	遺伝子の名称等	由来及び機能	別表第 2 ※ における区分	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	ユビキチンプロモーター	ユーカリ ( <i>Eucalyptus globulus</i> ) 由来のプロモーター	植物	ゲノム DNA	同定済み
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。	1-(1)	ゲノム DNA	同定済み
C	NOS ターミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み
発現ユニット 2					
D	GST プロモーター	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> )	植物	ゲノム DNA	同定済み
E	カタラーゼ Intron	ヒマ ( <i>Ricinus communis</i> )	植物	ゲノム DNA	同定済み
F	<i>GUS</i> 遺伝子	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来で $\beta$ -グルクロニダーゼを発現する。	1-(1)	ゲノム DNA	同定済み
G	NOS ターミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み
発現ユニット 3					
J	NOS プロモーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み
K	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 ( <i>NPTII</i> )	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	1-(1)	ゲノム DNA	同定済み
L	NOS ターミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404 株)	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み



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、R タンパクの発現によって欠失する。	1-(1)	2 $\mu$ プラスミド DNA の一部	同定済み
N	右側境界配列(RB)	Ti プラスミド pTiT37 に由来するノパリン型 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。	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み
O	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。	1-(1)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済み

← RB-attb-CmrR-*ccdB*-attB-RS-int*GUS*-GSTP-nosP-*NPTII*-nosT-RS-LB →

図 1 A. pGW23 概略図. RK 2 系(pBI121) (Jeferson et al. 1987, 由来)  
pBI121 を RB, LB の内側について上記のように改変した

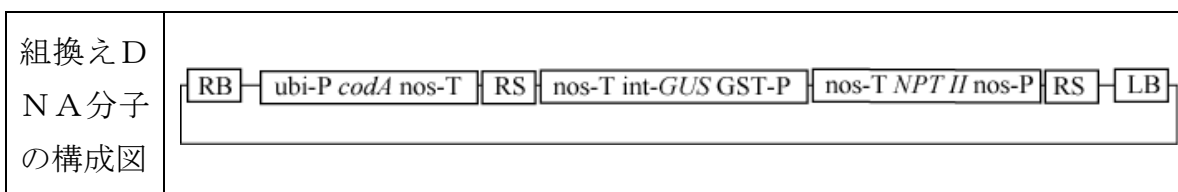


図 1 B. 組換え DNA 分子の構成図  
pGW23 のゲートウェイシステムである attb と attB の領域 (図 1 A 参照) に *codA* カセットを相同組換えした。

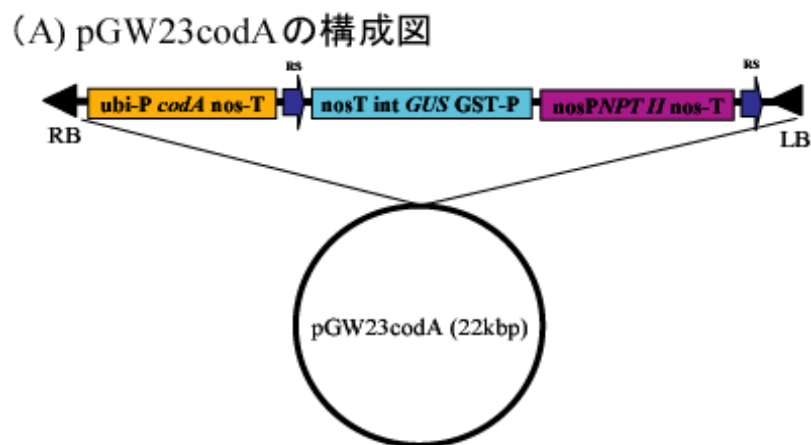


図 2. プラスミド構成図

## (2) ベクターに関する情報

### 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 を改変した pBIN19 である。pBIN19 は、アグロバクテリウムを宿主とした場合、法令上の認定宿主ベクター系であり、pGW23 は、これに由来する。

### ロ 特性

pBIN19 は、細菌に対してカナマイシン耐性を付与する。アグロバクテリウム及び大腸菌においては菌体分裂増殖によって伝達されるが、pBIN19 自体の感染性は知られていない。pBIN19 は、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。

## (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 pGW23 の T-DNA 領域内に含まれる当該組換え核酸を *E. globulus* 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方法

プラスミドベクター pGW23codA (図 2) 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により *E. globulus* に導入した。

### 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 pGW23codA を保有するアグロバクテリウムを *E. globulus* の実生胚軸に感染させ、再生個体 1-9-1 を得た。得られた再生個体を挿し木で増殖、クローンとして試験に用いている。カルベニシリン (50 µg / mL) を含有させた培地で培養することで除菌を行い、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 4)。

得られた再生個体について挿入遺伝子 *codA* の発現解析と実際の耐塩性によって選抜をすすめ、閉鎖系栽培室、特定網室での試験を経て、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、当該遺伝子組換えユーカリの調整・解析は平成17年10月6日より機関承認実験として筑波大学特定網室にて行ったものであり（筑波大学承認番号050029、050077、050114、筑波大学遺伝子実験センター区画利用承認番号40、41、48）、本申請は、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。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)。

サザンハイブリダイゼーション法は、葉から抽出したゲノムDNAは制限酵素 *EcoRI* で切断し、0.8%アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルターHybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech社) にブロッティングして行った。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1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。導入遺伝子は、1-9-1には1コピー存在すると推察された。

##### 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、特定網室で生育させた組換え体と非組換え体を用い、当該遺伝子の発現の確認をノーザンハイブリダイゼーション法により行った。

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 µg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) にブロッティングして行った。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6に示すように、導入遺伝子は発現していると考えられた。

発現形質の調査を目的として、特定網室において発根及び植え替えから7週間毎日100 mL程度灌水をして生育させた。これらの個体に、500mMのNaCl溶液100 mLを各植物体に5日間、毎日灌注した。非組換え体の耐性と比較したところ、組換え体1-9-1は強い耐性を示した(別紙7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性

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、化学発光を検出する。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

ロ *GUS* 及び *NPTII* については古くから幅広く多様な植物種で使用され、生物多様性への影響のおそれのないことは公知である(文献 31)。

ハ 特定網室での栽培について平成 17 年に機関承認を受けた後、平成 18 年 1 月から形態及び生育の特性(別紙 8)と有害物質の産生性(別紙 9)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

樹高について、別紙 8 に挙げ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。一方、葉型などの外観に特記すべき差異は認められなかった。

b) 生育初期における低温または高温耐性

生育初期における組換え *E. globulus* の低温耐性試験は行っていないが、隔離ほ場栽培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、2004 年秋に幼木を温室から隔離ほ場に植え替えたところ、半数が越冬したが、2 年目の冬に地上部が枯死した(別紙 10、図 1)。発芽苗について、日本においては、冬期以前に発芽したものの多くは冬期の低温で枯死する。また関東以北では、霜柱等の凍害も有り、発芽苗が越冬することはほとんどないことが公知として認められている。春期に発芽した苗は、在来の草本などに対して競合性がないため、生存の優位性がないことも財団法人地球環境産業技術研究機構(RITE)等試験研究機関で報告されている(文献 30)。

c) 成体の越冬性または越夏性

組換え *E. globulus* における成体の越冬性試験は行っていないが、隔離ほ場栽培試験において行う予定である。非組換え体については、別紙 10 図 1 及び図 2 に示すように、1 年目のクローン苗木は、越冬したが、2 年目に地上部が枯死した。

d) 花粉の稔性及び大きさ

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。原産地では、*E. globulus* の開花樹齢は遺伝型に

よって異なり、3~4年で花芽を形成するものから7年ほどかかるものまでである。*E. globulus*の場合、自生地における花粉媒体は、昆虫類が主体であるが、鳥類の報告もある。他殖率は樹幹の高さによって異なり、54%から78%と報告されている(文献8)。日本においては、*E. globulus*を好んで訪花する昆虫は特定されていない。

#### f) 交雑性

*E. globulus*の花粉移動距離は今のところ報告されていない。*E. globulus*と同じ節に属する*E. nitens*については、植林地周辺に自生する他のユーカリ種との自然交雑頻度から花粉移動距離は最大で310m程度であると報告されている(文献19)。また、節の異なる*E. regnans*では、対象木と交雑した花粉の50%以上が、40m以上離れた花粉親からのものであったことが分かっている(文献20)。さらに、花粉が長距離を移動した例として、オーストラリアのユーカリ林(*E. macrorhyncha*)において、最大5km離れたところで、*E. regnans*との雑種樹木が生息していることが報告されている。これは蜜を摂取する鳥類による花粉移動と考えられている(文献6)。一方、*E. globulus*の風による種子飛散距離は、成熟木と幼木の遺伝的空間構造から、平均で10m程度と予測されている(文献18)。

文献21によると、ユーカリ属には13の亜属があり、*E. globulus*は亜属*Symphyomytus*の*Maidenaria*節に属する。*Symphyomytus*には474種が属し、植林に利用されるユーカリ種の多くは、この亜属に属している。節内の種間交雑は比較的容易である(文献22)。*E. globulus*が属する*Maidenaria*節には、他に*E. nitens*や*E. dunnii*などがある。通常オーストラリア自生地では、交雑できる種同士は、同じ集団を形成しなかったり、開花時期が異なったりするため、容易に雑種は形成されない(文献6)。しかし、*E. nitens*のように、自生地以外でも広く植林されている種は、その地に自生するユーカリ種と自然交雑しうることが報告されている。たとえばタスマニア島に自生する*E. globulus*と移入植林種である*E. nitens*の開花期は重なっており(文献24)、*E. globulus*が花粉親となる場合は、雑種が形成されうると報告されている(文献25)。また、オーストラリア・タスマニア島の*E. nitens*植林における開放受粉によると、在来ユーカリ種との雑種種子の平均形成率は0.4%程度と報告されている(文献19)。

しかしながら、分類学的距離が遠い種の間における雑種形成は困難である(文献22)。自然での近縁種間交雑の例は報告されているが、一般的に亜属内であっても分類節が異なると雑種弱性や致死性が認められている。例えば、日本でも公園などで鑑賞栽培がみられる*E. camaldulensis*と*E. globulus*は違う分類節に属するため自然交雑は非常に起こりにくいことが認知されている(文献23)。これは花器の構造、生理的様態及び遺伝的因子に起因する(文献8)。さらに、人工交配実験で得られた両種の雑種は、強い他植弱勢を起こし、適応度が著しく損なわれることが知られている(文献26)。

本邦においては、宿主植物である*E. globulus*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* 属野生集団は存在しない。さらに、つくば地区において、自然条件下で容易に交雑しえるユーカリ属植物の大規模な栽培はない。

本組換えユーカリ自体の性質については、開花していないため、交雑性や導入遺伝子拡散に関する試験は行われていない。

g) 有害物質の産生性(別紙 9)

サンドイッチ法によるアレロパシー物質の検定: 特定網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アレロパシー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。種子 5 粒ずつ 3 セットを 1 反復とし、3 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 9 (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。

また、これとは別に、特定網室からの葉サンプルの鋤き込み鋤込み試験を行った (別紙 9 (実験 2))。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。種子 5 粒を 1 反復とし、6 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について 70 から 80% 程度であり、アルファレベル 0.05 における統計的有意差はなかった。

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を行った (別紙 9 (実験 3))。特定網室で、遺伝子組換えユーカリを 14 ヶ月間ポット栽培し、根圏土壌 30 g をサンプルとした。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 分間震盪した後、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) を比較した。各系統について、3 反復行い、t 検定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なかった。

### 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

名称：筑波大学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：承認された日から平成 23 年 12 月 31 日

#### イ. 隔離ほ場の施設：別紙 11 及び別紙 12

- 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 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、その下層に砕石層 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。

#### ロ. 隔離ほ場での作業要領

- a) 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、隔離ほ場内の使用区画で生育することを最小限に抑える。
- b) 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。
- c) b) 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、隔離ほ場内において、当該遺伝子組換えユーカリ及び比較対照のユーカリの地上部は裁断処理し隔離ほ場内に鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、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、これらをすみやかに切除し、オートクレーブにて不活化する。
- e) 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。
- 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、当該遺伝子組換え体の性質評価として生育調査、導入遺伝子の安定性、導入形質の発現の有無、生理的特性などを、生物多様性への影響評価として、アレロパシー検定、及び土壌微生物及び訪来する生物等について継続的にモニタリングする。

(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

特定網室で形質評価を行い、別紙8 及び9 に示すように、組換え体と非組換え体の間に、顕著な差異がないことが認められた。

(6) 国外における使用等に関する情報

中国の研究関係者から得た間接的な情報によると、本申請と別の研究として、中国において耐塩性を付与した遺伝子組換えユーカリのは場試験が行われている。研究内容の詳細は明らかとなっていないため、直接の比較はできないが、非組換えユーカリと遺伝子組換えユーカリの間には生物多様性に影響を生じるおそれのある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

別紙 10 (隔離ほ場)に挙げるように、非組換え体ユーカリ *E. globulus* の苗木(約 80 cm 高で越冬)は他のユーカリ種 (*E. camaldulensis*) に比べて成長が早いものの、非組換え体 *E. globulus* の大きめの苗木であっても、周辺の草本植物の成長の方が著しいことから競合できない。よって、成長初期段階に限れば成長は劣る。

第一、2、(6)、a)項に示すように、特定網室においては、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。

本組換え体ユーカリは耐塩性を有するが、塩類濃度の高い土壌での栽培や塩水灌水が行われない限り耐塩性による競合における優位性はないと考えられる。本組換え体ユーカリについては隔離ほ場での管理された栽培が行われる。また申請書の隔離ほ場内の施設や作業要領に記載されているように、管理された人工的な条件である隔離ほ場での野生動植物への影響のおそれはないと判断された。

#### (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、栽培予定地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、生物多様性への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属植物が、日本における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させる報告はされていない。一方、ユーカリ属植物は、一般的にアレロパシー性を示し、*E. globulus* もその例外ではない。*E. globulus* のアレロパシー性は、他の植林ユーカリ種と比べると相対的に低いことが知られている (文献 14)。

オーストラリアにおける摂食昆虫としては、コガネムシ類、ハムシ類、ゾウムシ類、ハバチ類のような葉を食するもの、キジラミ類、ヨコバイ類やカタカイガラムシ類のような樹

液を吸う昆虫、ならびにカミキリムシ類や大型のボクトウガ類のような、その幼虫が樹木の木質部に穴を開けるいわゆる木食い虫が挙げられる(文献3)。

日本では、名古屋市において温室栽培のユーカリ属植物を加害している鱗翅類の調査から、ハマキガ科のチャノコカクモンハマキ、ホソバチビヒメハマキとバンジロウツノエグリヒメハマキが確認された(文献15)。

さらに、当該第一種使用は、隔離ほ場で行うものであり、栽培のために環境が制御された人工的な場所である。また隔離ほ場自体が、大学の敷地内の施設等で囲まれているため、ここから外部生態系への生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断された。

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。サンドイッチ法による定性試験結果では、アレロパシー性の顕著な違いは認められなかった(別紙9(実験1))。上記定性試験を確認するためのバイオアッセイとしての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(別紙9(実験2))。土壌サンプルの主要微生物の培養可能な種の総コロニー数においても統計学的に顕著な差異は認められなかった(別紙9(実験3))。

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じる恐れの有無の判断

以上から、本組換えユーカリは、栽培予定地の天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ものの、筑波大学における諸情報収集及び実験等により、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、また、有害物質の産生性に関して、非組換え体との相違はないことから、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、生物多様性への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

日本においては、冬期以前に発芽したものの多くは冬期の低温で枯死する。また関東以北では、霜柱等の凍害も有り、発芽苗が越冬することはほとんどないことが公知として認められている。春期に発芽した苗は、在来の草本などに対して競合性がないため、生存の優位

性がないことも財団法人地球環境産業技術研究機構（RITE）等試験研究機関で報告されている(文献 30)。

本邦においては、*E. globulus* 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。筑波大学においては、2005 年（H17 年）より遺伝子組換え *E. camaldulensis* の第一種使用を隔離ほ場にて行っている。しかし、形成された花芽は切除するように管理されている。また、栽培予定地周辺に非組換え体の *E. globulus* が栽培されているほか、つくば地区ではユーカリ属植物の栽培が確認されている。しかし、本申請の *E. globulus* は形成された花芽を切除する管理を行うため、他のユーカリ属植物と交雑するおそれはない。従って、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性への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。

また、ユーカリ属植物は根茎形成する場合があるが、隔離ほ場を取り囲むフェンス基部の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 が設けられているため、根茎のほ場外への伸長を防止する。

(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、生物多様性への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

該当しない

### 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検出されなかった。本組換え体ユーカリは耐塩性を有するが、塩類濃度の高い土壌での栽培や塩水灌漑が行われない限り耐塩性による競合における優位性はないと考えられる。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、生物多様性への影響を生じるおそれはないと判断された。

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、サンドイッチ法試験、鋤き込み試験、土壌微生物の培養可能な種の総コロニー数を比較したが、統計学的に顕著な差異は認められなかった。このため、有害物質産生が生物多様性に与える影響は極めて低いと現段階では判断された。当該第一種使用は、隔離ほ場で行うものであり、栽培のために環境が制御された人工的な場所である。また隔離ほ場自体が、大学の敷地内の施設等で囲まれているため、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ないと判断された。

交雑性について本邦においては、*E. globulus* 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。開花は実験期間に起こる可能性は非常に低く、仮に開花し種子が形成されても、冬期の温度で苗は枯死する可能性が高い。また、本組換え体は、隔離ほ場で栽培管理されるものであり、花芽形成が認められたら切除するため、交雑の可能性はない。従って、本組換えユーカリが交雑して、生物多様性への影響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 11 及び別紙 12 に示している。

## 参考文献

1. Nicole D. (2006) *Eucalyptus* of Victoria and Tasmania, Bloomings Books, Melbourne
2. Boland D.J., M.I.H. Brooker and J.W. Turnbull (1980) *Eucalyptus* seed. CSIRO Australia
3. Grattapaglia D. and H.D. Bradshaw (1994) Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. Canadian Journal of Forest Research 24: 1074-1078
4. プライオー L.O. (1981) ユーカリの生物学、石倉成行訳、朝倉書店
5. 西村弘行(1987)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–、内田老鶴圃
6. Eldridge K., J. Davidson, C. Harwood and G. van Wyk (1993) Eucalypt domestication and breeding. Oxford University Press
7. Lewis, W.H. & M.P.F. Elvin-Lewis (1977) Medical Botany, Wiley, NY
8. Patterson B., R.E. Vaillancourt, D.J. Pilbeam and B.M. Potts (2004) Factors affecting variation in outcrossing in *Eucalyptus globulus*. Australian Journal of Botany 52: 773-780
9. Brooker M.I.H. and D.A. Kleinig (1983) Field guide to Eucalypts South-eastern Australia. Inkata Press, Sydney
10. Hingston A.B. and B.M. Potts (2005) Pollinator activity can explain variation in outcrossing rate within individual trees. Austral Ecology 30: 319-324
11. Skolmen R.G. (1983) Growth and yield of some Eucalyptus of interest in California, In: R.B. Standiford, F.T. Ledig (eds.). Proc Workshop on *Eucalyptus* in California. Sacramento, CA. US Forest Service Gen Tech Rep PSW-69. p 49–57
12. Skolmen R.G. and F.T. Ledig (1990) *Eucalyptus globulus* Labill.: bluegum eucalyptus, p. 299-304. In R.M. Burns and B.H. Honkala (tech. coords.), Silvics of North America: Volume 2. Hardwoods. Agriculture Handbook 654. U.S.D.A. Forest Service, Washington, D.C.
13. Souto X.C., J.C. Bolano, L. Gonzalez and M.J. Reigosa (2001) Allelopathic effects of tree species on some soil microbial population and herbaceous plants, Biologia Plantarum 44: 269-275
14. Lisanewok N. and A. Michelsen (2004) Allelopathy in agroforestry systems: the effects of leaf extracts of *Cupressus lusitanica* and three *Eucalyptus* spp. on four Ethiopian crops, Agroforestry Systems 21: 63-74
15. Ross I.A (2001) *Eucalyptus globules*. MEDICINAL PLANTS OF THE WOLRD. Vol. 2. Humana Press, New Jersey
16. 那須 義次 等, (2004) 日本においてユーカリ類を加害する鱗翅類、日本応用動物昆虫学会, vol.48, p.123-133
17. Jefferson R.A., T.A. Kavanagh, M. Bevan (1987) GUS fusions: *beta*-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J 6: 3901-3907

18. Jones T.H., R.E. Vaillancourt and B.M. Potts (2007) Detection and visualization of spatial genetic structure in continuous *Eucalyptus globulus* forest. *Molecular Ecology* 16:697-707
19. Barbour R.C., B.M. Potts and R.E. Vaillancourt (2003) Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: exotic hybrids are establishing in the wild. *Australian Journal of Botany* 51: 429-439
20. Burczyk J., W.T. Adams, G.F. Moran and A. Griffin (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozymes markers and the neighborhood model. *Molecular Ecology* 11: 2379–2391
21. Brooker M.I.H. (2000) A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Australian Systematic Botany* 13: 79-148
22. Potts B.M., R.C. Barbour, A.B. Hingston and R.E. Vaillancourt (2003) Turner Review No.6 Genetic pollution of native eucalypt gene pools – identifying the risks. *Australian Journal of Botany* 51: 1-25
23. Meddings, R.A.J.A. McComb, M.C. Calver, S.R. Thomas and R.A. Mazanec (2003) *Eucalyptus camadulensis* x *globulus* hybrids. *Australian Journal of Botany* 51: 319-331
24. Barbour R.C., B.M. Potts, R.E. Vaillancourt and T.N. Tibbits (2006) Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: Flowering asynchrony as a barrier to F-1 hybridisation between exotic *E. nitens* and native Tasmanian Symphyomyrtus species. *Forest Ecology and Management* 226: 9-21
25. Gore P.L., B.M. Potts, P.W. Volker and J. Megalos (1990) Unilateral cross-incompatibility in *Eucalyptus* – the case of hybridization between *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. *Australian Journal of Botany* 38: 282-294
26. Medding R.A., J.A. McComb, M.C. Calver, S.R. Thomas, and R.A. Mazanec (2003) *Eucalyptus camaldulensis* x *globulus* hybrids. *Australian Journal of Botany* 51: 319-331
27. Ruaud J.N., N. Lawrence, S. Pepper, B.M. Potts, and N.M.G. Borralho (1998) Genetic variation of in vitro rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. *Silvae Genetica* 48: 4-7
28. Attiwill P.M. and M.A. Adams (1996) *Nutrition of Eucalyptus*, CSIRO Publishing
29. 日本野生植物図鑑、八坂書房、(1999)
30. 財団法人地球環境産業技術研究機構 (RITE) (2004) RITE 植生拡大PJ 報告会 2月18日
31. OECD ホームページ (2007、7月3日) Field Trials in Member Countries. [http://www.oecd.org/document/41/0,3343,en\\_2649\\_34385\\_38235049\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/41/0,3343,en_2649_34385_38235049_1_1_1_1,00.html)
32. Hayashi H., Alia, L. Mustardy, P. Deshniem, M. Ida, N. Murata (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal* 12:133-142

## 緊急措置計画書

平成19年7月30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(*codA*, *Eucalyptus globulus* Labill.) (1-9-1) (以下、本 LMO という) の第一種使用等において、生物多様性への影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊学は生物多様性への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を必要に応じて行う。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、生物多様性への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、生物多様性への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。

\* 個人情報のため公開しない



## 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鋤き込み、また、株元は裁断後、鋤き込み、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 1-9-1

別紙 目録

- 別紙 1 実験従事者
- 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
- 別紙 3 海外でのユーカリを用いた遺伝子組換え体の第一種使用例
- 別紙 4 培養室において生育された組換えユーカリからの *Agrobacterium* 残存性検定結果
- 別紙 5 宿主内における供与 DNA の存在状態
- 別紙 6 供与 DNA 由来の発現形式
- 別紙 7 特定網室における組換えユーカリの耐性評価
- 別紙 8 特定網室における組換えユーカリの生育評価
- 別紙 9 組換えユーカリと非組換えユーカリから放出される他感物質の検定
- 別紙 10 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
- 別紙 11 屋外特定区画概略図
- 別紙 12 実験ほ場配置

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	遺伝子組 換え実験 経験の有 無

\* 個人情報のため公開しない

## 1 調査方法

つくば市の筑波大学遺伝子実験センターを中心とした半径 10 km の範囲において、平成 17 年度の第一種使用規定承認で報告された情報を参考に、平成 19 年に植栽されているユーカリの分布状況を現地調査を行い把握した。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。

- 茨城県及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
- 造園業者ほ場等

## 2 調査結果

## (1) 植栽ユーカリ属の分布状況の把握

## i) 茨城県及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 ㎡）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。

## ii) 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 1 に示す 4 地点で植栽されたユーカリを確認した。

表 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	森林総合研究所	展示・試験	野外	つくば市松の里 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
4	国立大学法人筑波大学遺伝子 実験センター	試験	野外	つくば市天王台 1-1-1

## iii) 街路樹、造園業者ほ場等

街路樹、造園業者等を調査した結果、表 2 に示す 1 地点で植栽されたユーカリを確認した。また、ジョイフルホンダ（土浦市）、ホームジョイ本田（常総市）、グランステージ山新（つくば市）、ホームマック（つくば市）などのホームセンターでレモンユーカリを鉢植で販売しているが、これは室内向けで、越冬はできないと業者からコメントがあった。

表 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
5	土浦市役所新治支所	緑化	野外	土浦市藤沢 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 1 及び図 2 に示した。

表 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	森林総合研究所				
	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
	展示・試験：まれに研究試料として使われる。		野外	<i>E. viminalis</i>	10年以上
	生育状況	樹高	直径	生育	花芽
	-	-	-	良好	あり
備 考	-				
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	-				
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、「生長が早い」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	直径	生育	花芽
	約 20 m	-	良好	-	-
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	国立大学法人筑波大学 遺伝子実験センター				
	目的		栽培方法	樹種と本数	栽培時期
	試験：日本における雑草性、越冬性及び越夏性などの生態学的情報の収集を行っている。		野外	<i>E. globulus</i> (12本) <i>E. camaldulensis</i> (17本) 承認済み組換え <i>E. camaldulensis</i> (15本)	H16 H17 (組換え体栽培開始)
	生育状況	樹高	直径	生育	花芽
	約 2 m	2~3 cm	良好	なし	なし
備 考	-				
5	土浦市役所新治支所				
	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。		野外	<i>E. camaldulensis</i> (未同定)	H1頃
	生育状況	樹高	直径	生育	花芽
	約 20 m	50 cm	良好	なし	なし
備 考	-				

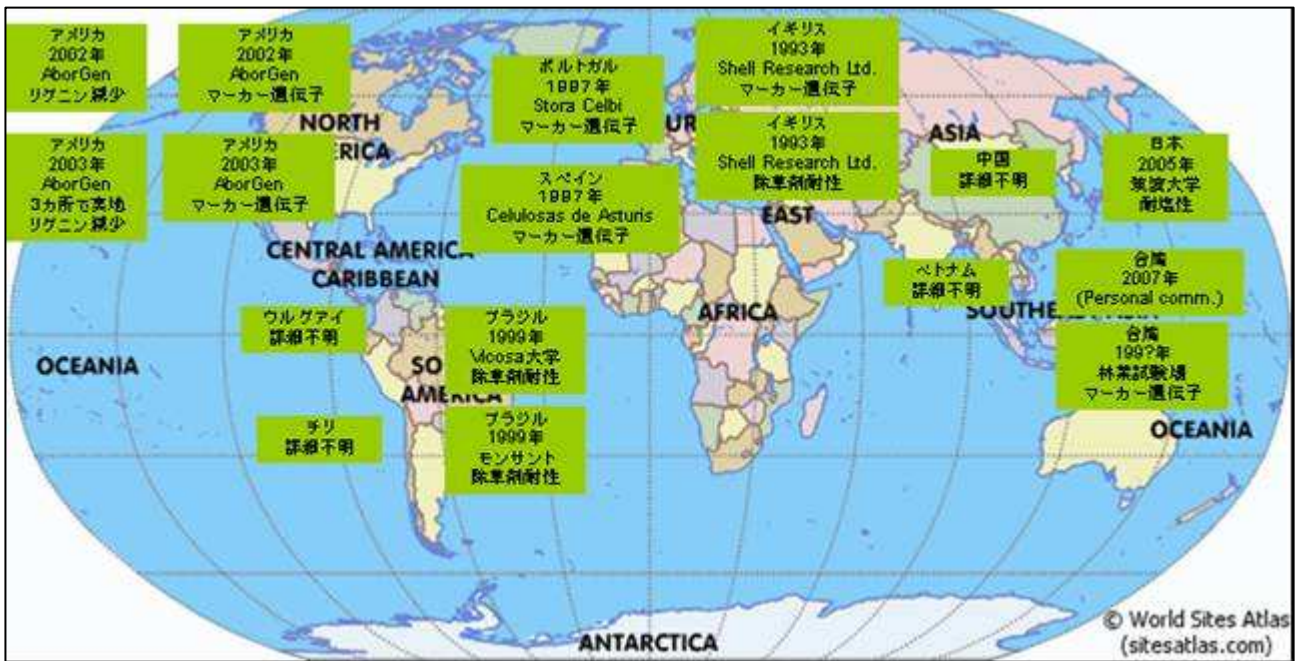


図1 研究機関及び工場等で植栽されたユーカリの分布



図2 業者等で植栽されたユーカリの分布

別紙 3 海外でのユーカリを用いた遺伝子組換え体の第一種使用例



上記に挙げた使用例は、すべて試験栽培を目的とするものである。



別紙 4 培養室で育生された組換えユーカリからの *Agrobacterium* 残存性検定結果

*Agrobacterium* の残存性について組換えユーカリ無菌苗からの *Agrobacterium* の分離

培養室で無菌的に発根させた 3 系統の組換えユーカリより、農業環境研究所報告第 8 号の方法に従って茎葉を採取し、振とう法により YEB, YEB+Km (50 µg / ml) 培地上に微生物を分離した。*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株について、いずれのプレートからも検出されなかった(表 1、図 1)。

	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の検出	
	YEB	YEB+Km
組換え体 107-1	0	0
組換え体 1-9-1	0	0
組換え体 2-1-1	0	0

表 1 ユーカリ茎葉からの微生物の検出

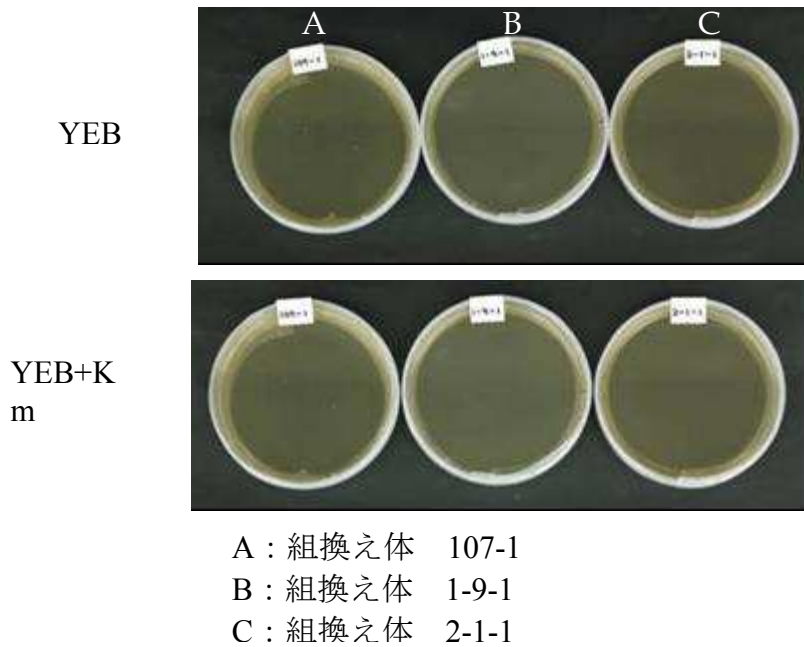


図 1 ユーカリ茎葉からの微生物の検出

別紙 5 宿主内における供与 DNA の存在状態

培養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。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、ナイロンフィルターHybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロッティングした。プローブは、*codA* 遺伝子を 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、導入遺伝子は染色体に安定に組み込まれ、コピー数は 107-1 が 2 コピー、1-9-1 が 1 コピー、2-1-1 が 3 コピーと推察された。

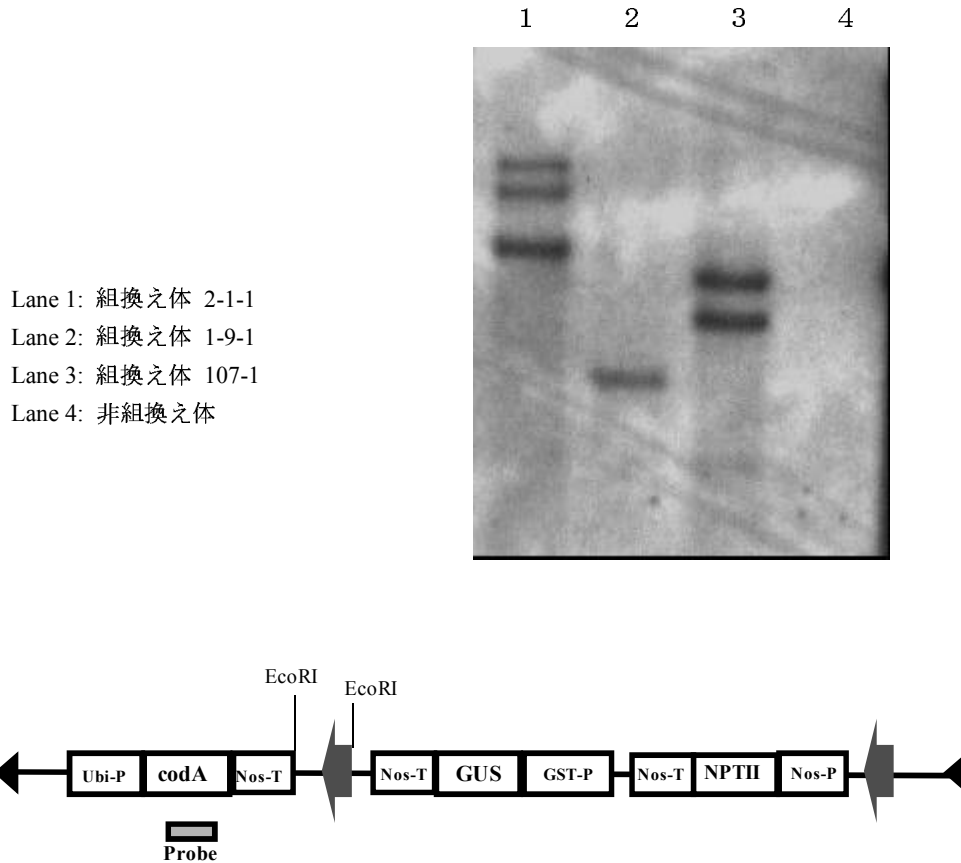


図 1 サザンハイブリダイゼーション

別紙 6 供与 DNA 由来遺伝子の発現形式

*codA* 遺伝子の発現

閉鎖系栽培室で生育させた若い苗木の組換え体と非組換え体の葉から、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 µg 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) にブロッティングした。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。

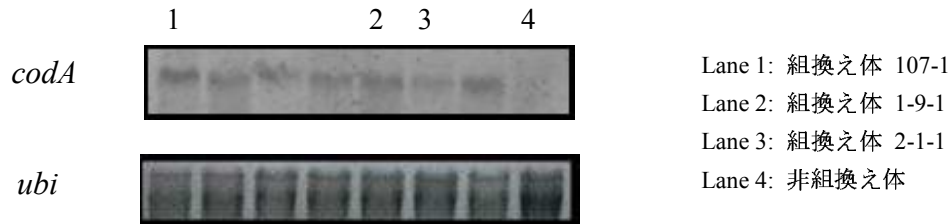


図 1 *codA* 遺伝子の発現

別紙 1-9-1

別紙 7 特定網室における組換えユーカリ *E. globulus* の耐性評価

特定網室に移植後約 7 週間目の植物体について、500 mM NaCl 溶液 100 mL を、5 日間にわたり毎日、計 5 回灌注した。

		生存率		
	系統	(%)	試験数	生存数
非組換え	Np1	0	10	0
	No.8-20	0	4	0
	L047	0	5	0
組換え体	107-1	69	13	9
	1-9-1	36	11	4
	2-1-1	10	10	1

表 1 上記の耐塩性実験における各系統の生存率。非組換え体が枯死したのに比べて、*codA* 遺伝子を有する組換え体は、107-1 で 69 %、1-9-1 で 36 %、2-1-1 で 10 %の生存率を示した。

別紙 8 特定網室における組換えユーカリ *E. globulus* の生育評価

特定網室で生育させた組換え体 1-9-1 系統 4 個体、2-1-1 系統 5 個体と非組換え体 5 個体の葉を用いて、生育調査を行った。

特定網室における生長（1-9-1、2-1-1 及び非組換え体）

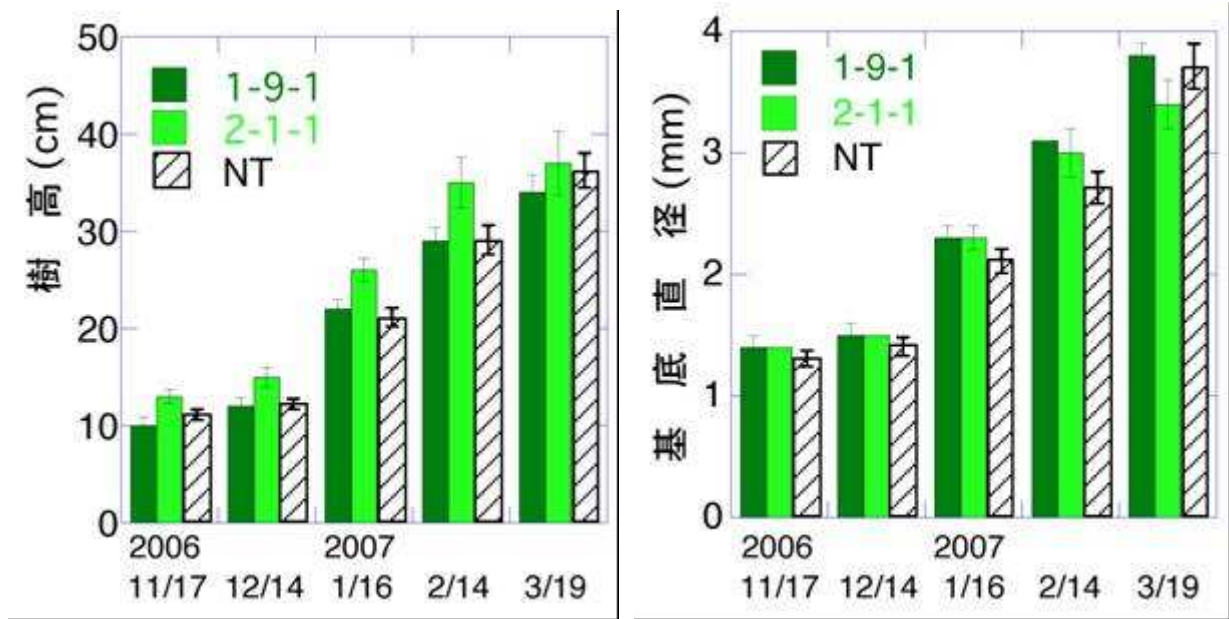


図 1 樹高及び基底直径の推移（平成 18 年 11 月～平成 19 年 3 月）（非組換え体 NT 及び組換え体 1-9-1 及び 2-1-1）

エラーバーは、平均値からの標準誤差を表す。

(実験 1)

特定網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 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。非組換え体 5 個体、1-9-1 系統 4 個体及び 2-1-1 系統 5 個体を調査した。1 個体につき、種子 5 粒ずつ 3 セットを 1 反復とし、3 反復試験した。1 セットにつきユーカリの乾燥葉 50 mg を用い、アレロパシー物質の効果を検定した。その結果、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。

アレロパシー検定 (50 mg) (1-9-1、2-1-1 及び非組換え体)

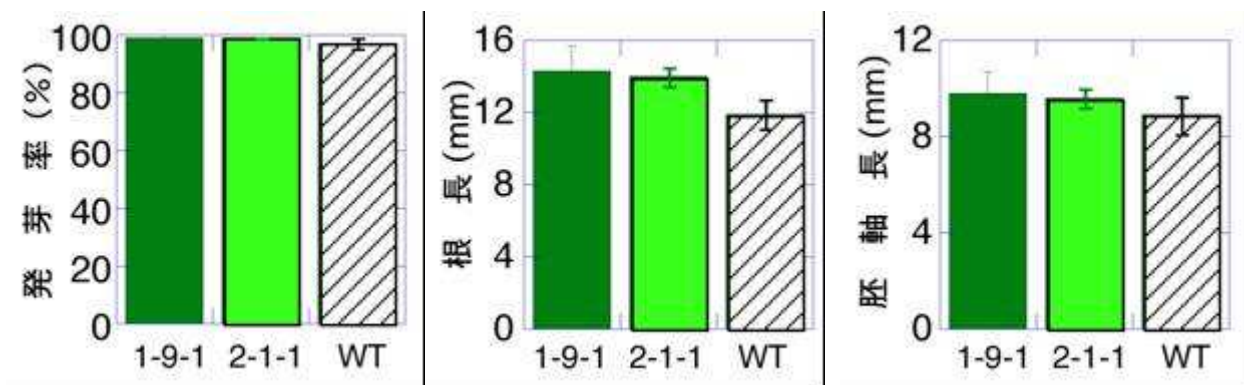


図 1. 組換え体 NT、非組換え体 1-9-1 及び 2-1-1 の乾燥葉 50 mg を用いたアレロパシー効果のサンドイッチ検定

エラーバーは、平均値からの標準誤差を表す。

(実験 2)

特定網室で生育させた組換え体と非組換え体から採取した葉を用いて、農業環境研究所報告書第 8 号の方法に基づき、鋤き込み試験を行った。検定植物としてレタス(Great Lakes 366)を用いた。非組換え体 5 個体、組換え体 1-9-1 系統 4 個体及び 2-1-1 系統 5 個体について調査した。1 個体につき、種子 5 粒を 1 反復とし、6 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において 70 %から 80 %程度であり、アルファレベル 0.05 において統計的有意差はなかった。また、胚軸及び根ともに生長に系統間で差異はなかった。

鋤き込み試験 (1-9-1、2-1-1 及び非組換え体)

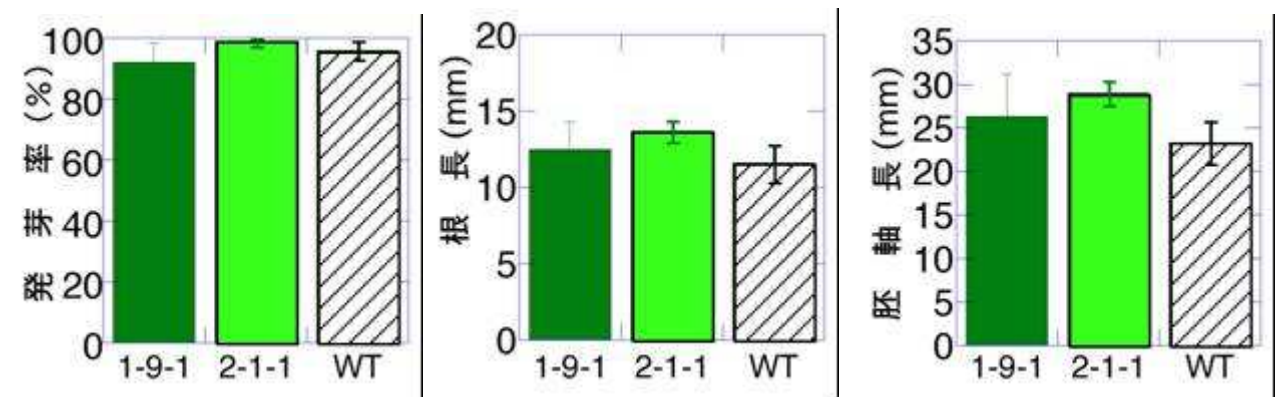


図 2. 鋤き込みによるレタス種子発芽試験 (非組換え体 NT、組換え体 1-9-1 及び 2-1-1)  
エラーバーは、平均値からの標準誤差を表す。

(実験 3)

遺伝子組換えユーカリ *E. globulus* の栽培土壌における微生物相への影響評価

農業環境研究所報告書第 8 号の方法に基づき、平板希釈法を用いて土壌微生物影響調査を行った。特定網室で遺伝子組換え体及び非組換え体をポット栽培し、実験を開始してから 14 ヶ月目に、根圏土壌 30 g をサンプリングした。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 分間震盪した後、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) を下記図に示す。非組換え体 5 個体、組換え体 1-9-1 系統 4 個体及び 2-1-1 系統 5 個体について 3 反復試験した。t 検定では有意差は認められず、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。

土壌微生物培養試験 (1-9-1、2-1-1 及び非組換え体)

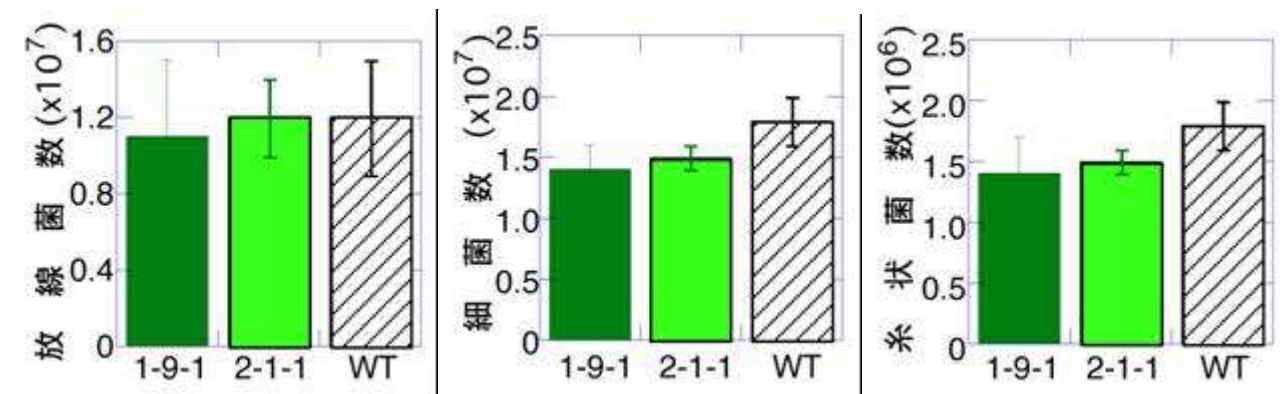


図 3. 平板希釈法による土壌微生物コロニー数の検定 (非組換え体 NT、組換え体 1-9-1 及び 2-1-1)  
エラーバーは、平均値からの標準誤差を表す。





図1 非組換え体 *E. globulus* の隔離ほ場での生育状況。植栽後2年目（平成17年4月）に撮影。地上部は越冬できず、樹皮下に形成されている萌芽（矢印）から更新が見られる。

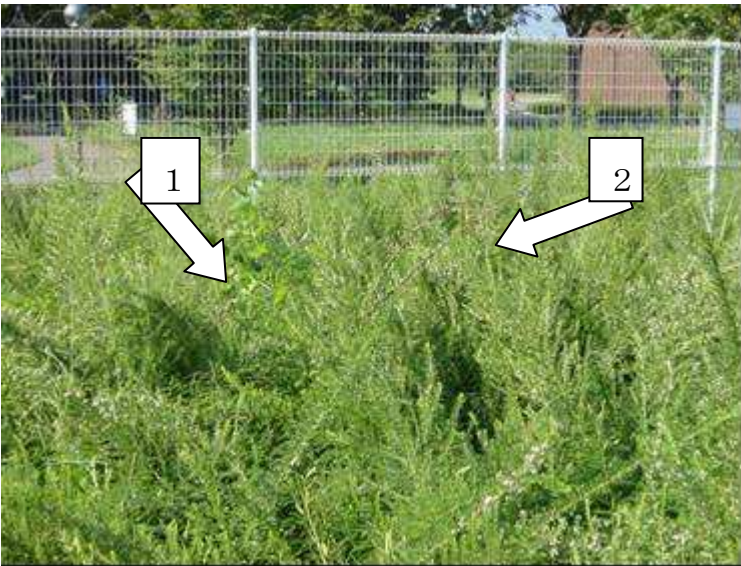
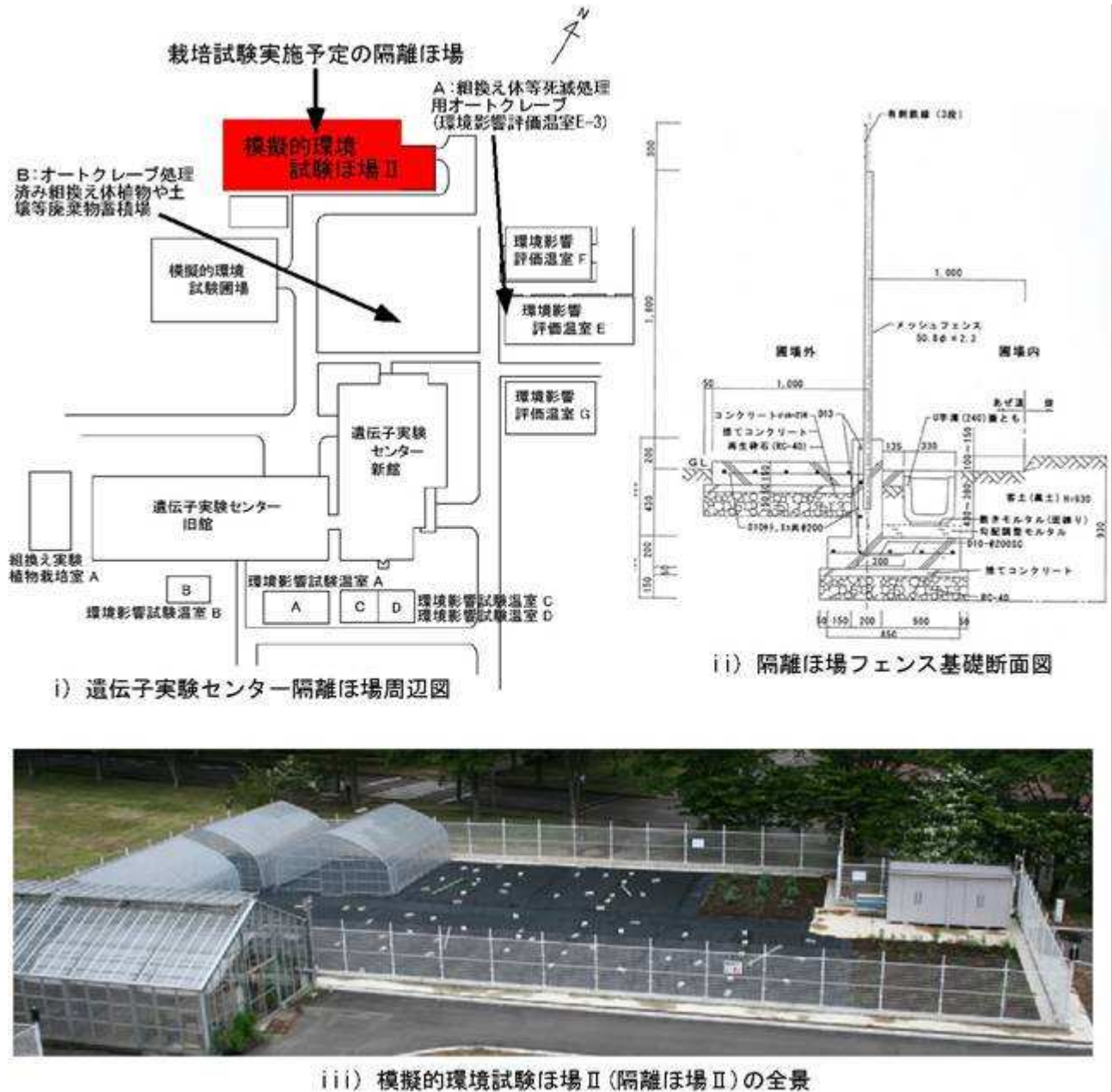
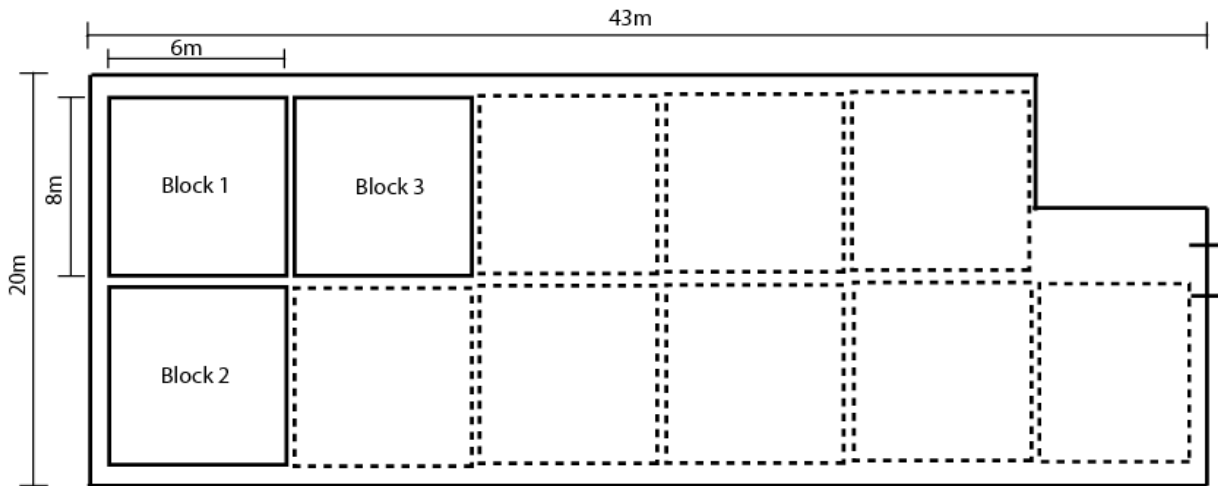


図2 非組換え体 *E. globulus*（矢印）の隔離ほ場における2年目夏の生育状況（平成17年）。矢印2は前年に地上部が枯死したもの。萌芽から新生した枝は、かろうじて生存している（矢印1）。





利用区画

N1, N2, N3: それぞれ異なる非組換え系統

T1, T2, T3: それぞれ異なる遺伝子組換え系統

S: 実生の非組換え体

Block 1						Block 2						Block 3					
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S	N1	N1	T3	T3	S	S	T1	T1	N3	N3	S	S	T2	T2	N1	N1	S
S	N1	N1	T3	T3	S	S	T1	T1	N3	N3	S	S	T2	T2	N1	N1	S
S	T2	T2	N2	N2	S	S	N2	N2	T3	T3	S	S	T1	T1	N3	N3	S
S	T2	T2	N2	N2	S	S	N2	N2	T3	T3	S	S	T1	T1	N3	N3	S
S	N3	N3	T1	T1	S	S	N1	N1	T2	T2	S	S	T3	T3	N2	N2	S
S	N3	N3	T1	T1	S	S	N1	N1	T2	T2	S	S	T3	T3	N2	N2	S
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S