

耐冷性ユーカリ ( <i>des9, Eucalyptus globulus</i> Labill.) 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.....	1
(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.....	5
(2) ベクターに関する情報.....	9
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	9
(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...10	
(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...10	
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	10
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.....	14
(2) 使用等の方法.....	14
(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.....	14
(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.....	14
(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.....	15
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.....	16
2. 有害物質の産生性.....	16
3. 交雑性.....	17
4. その他の性質.....	18
第三 生物多様性影響の総合評価.....	19
参考文献.....	20
緊急措置計画書.....	22

第一種使用規程承認申請書

平成25年 5月22日

文部科学大臣 下村 博文 殿  
環境大臣 石原 伸晃 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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	耐冷性ユーカリ( <i>des9, Eucalyptus globulus</i> Labill.)
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	<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 II（隔離ほ場）                      使用期間：承認の日から平成29年9月30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。</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、遺伝子組換えユーカリ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抑制する。</p> <p>(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。</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)まで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(*Symphyomyrtus*)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(文献1)である(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 $2n=44$ 、文献2)であり、*E. globulus*の全ゲノムサイズは530 Mbp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4)。

*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(文献4)。

#### (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5、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8)。

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5)。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、

43 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  
44 該当する(文献5、6)。本試験に用いる *E. globulus* もコアラの食草となるユーカリ属植物の  
45 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  
46 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.*  
47 *camaldulensis*, *E. globulus*, *E. microcorys*, *E. moluccana*, *E. propinqua*, *E. punctata*, *E.*  
48 *robusta*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* が栽培されている。一方、沖縄  
49 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.*  
50 *camaldulensis* と *E. robusta*, *E. viminalis* などの栽培が知られている。

### 51 (3) 生理学的及び生態学的特性

#### 52 イ 基本的特性

53 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4)。雌雄同花で花色は白、赤、  
54 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)。ユーカ  
55 リ属植物の多くは腋生散形花序であるが、*E. globulus* は例外的に腋生単花である(文献4)。  
56 *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。  
57 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  
58 開花から成熟まで約11ヶ月を要する。幼木は、対生の幼型葉を持つが、成木は互生葉の成  
59 型葉となり、高さ60m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  
60 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~  
61 50m、胸高直径90~210cm(文献9)にまで成長する。材は光沢のある赤色で耐久性があ  
62 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、  
63 樹高40m、樹幅15m及び胸高直径2mの大木も存在する(文献10)。日本では、街路樹等、  
64 公園緑地に樹高10m程度のもが見られる(文献4)。つくば地区における *E. globulus* の  
65 屋外栽培試験より、早いものでも植栽後1年以上経過しないと成型葉が形成されない。また、  
66 非組換えユーカリ5個体について、植栽後5年目になり初めて1個体に花芽形成が認めら  
67 れたが、他の個体には認められておらず、成木となるまで時間を要する。

#### 68 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

69 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  
70 も生存できるが低温では生育が阻害されるなど生育には適していない(文献5)。乾燥、季節  
71 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  
72 る(文献4)。降雨量は、年500~1,000mmが適しており、生育期には相当量の降雨を必要  
73 とする(文献4)。

74 *E. globulus* の自生地は、夏に涼しく、冬に比較的暖かく、寒暖の差が少ない。最暖月の  
75 平均最高気温は18~23℃、最寒月の平均最低気温は4℃である。栽培適地は、やや重く水  
76 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5)。潜伏芽更新  
77 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650~1,400mmが適し  
78 ている(文献5)。つくば地区の冬期間の気温は *E. globulus* の自生地よりも低く、過去10シ  
79 ーズンの最寒月の平均最低気温は-2.7℃である。別紙2につくば地区での冬期間の気温推移  
80 を示す。つくば地区での非組換え体を用いた屋外植栽試験では、*E. globulus* の越冬性は低  
81 く、特に1m程度までの幼木は寒さに弱く(別紙3図1)、前年までに成長した地上部の半数  
82 が枯死した。こうした結果を踏まえ、2008年3月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカ  
83 リ(*E. globulus*)においては、植栽初年と次年の冬期間にハウスで保護するなどの保温を行  
84 い

86 生存させた(別紙4図1、2)。2005年10月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ(*E.*  
87 *camaldulensis*)においては、幼苗期に冬期を迎えたため、ハウスで覆った畑の苗に苗帽子を  
88 掛け、2重の保護を行った(別紙4図3)。また、他の特性として、生育には十分な日照が  
89 必要であるため、成育の遅れた幼苗が周辺草本に埋められると成育出来ないことも明らかとな  
90 っている。前述の耐塩性遺伝子組換えユーカリ(*E. globulus*)の隔離ほ場栽培では、実験区  
91 の日照が妨げられないように実験区外周に緩衝木として植栽されている非組換え体について、  
92 毎年5月に枝打ちと樹高1mでの断幹を行い、実験区の日当たりを確保している。

93  
94 ハ 捕食性又は寄生性

95 該当しない

96  
97 ニ 繁殖又は増殖の様式

98 *E. globulus* は、適した条件下において、実生による繁殖と樹皮下に保持している潜伏芽  
99 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  
100 ともある(文献11)。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  
101 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もある。個  
102 体によっては、自家不和合性を持つ(文献12)。主に双翅目の昆虫により花粉が媒介され、  
103 その種類は多岐に渡る(文献2、13)。例としては、ハナアブ(*Eristalis tenax*)、ミツバチ類  
104 (*Apis* 属)、ヒメバチ類(*Gotra* 属)、クロバエ類(*Calliphoridae*)、マガタマハリバエ  
105 (*Epicamponera succincta*)、ノコギリハリバエ(*Compsilura concinnata*)、Syrphid flies  
106 (*Syrphus rectus*, *Allograpta obliqua*)、及び *Eupeodes americanus* などである。また、*E.*  
107 *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13)。主な媒介鳥は  
108 オウムの仲間である Swift Parrot (*Lathamus discolor*) やミツスイ科の New Holland  
109 honeyeater (*Phylidonyris novaehollandiae*) などである。一方、日本における媒介昆虫類、  
110 及び鳥類については、調査されていない。

111 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、  
112 組織培養も容易ではない。実験室内で行った挿木実験によると、試験管で発芽させた60日  
113 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  
114 発根率は15%であった(文献14)。これらの挿穂には発根させるために植物ホルモン処理  
115 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  
116 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5)。また、  
117 切り株などからの潜伏芽による更新も可能である(文献15)。*E. globulus* は、日陰におい  
118 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  
119 において、実生及び潜伏芽によって更新される(文献16)。また、*E. globulus* において、匍  
120 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)。

121  
122 ホ 病原性

123 該当しない

124  
125 ヘ 有害物質の産生性

126 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* にも土壌微生物  
127 に対する増殖阻害影響が認められる(文献17)。また、栽培作物に対しても発芽阻害性が  
128 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

129 低いアレロパシー活性を示す (文献 18)。 *E. globulus* におけるアレロパシー物質成分の同  
130 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,  $\beta$   
131 -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  
132 の他 gallic acid, ferulic acid などが同定されている(文献 4)。一方、文献 19 によると、 *E.*  
133 *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  
134 マウスに投与した場合、LD<sub>50</sub> は、562.0mg/kg であることが報告されている。

135  
136 ト その他の情報

137 1) ユーカリ属植物を摂食する昆虫等について

138 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  
139 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  
140 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  
141 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 5)。

142 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  
143 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  
144 リヒメハマキが確認された (文献 20)。また、沖縄県名護市の栽培ほ場では、ハマキガ科  
145 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  
146 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垂種が確認された (文献 20)。  
147 つくば地区における摂食昆虫類については、 *E. camaldulensis*、及び、 *E. globulus* の屋  
148 外栽培による調査が行われた。 *E. camaldulensis* はヨモギエダシャクやナシケンモン、ミ  
149 ノガ等の鱗翅目や直翅目の食害を受けたが、顕著な被害は栽培初年度でその後はほとんど  
150 発生が認められなくなった。時折、キジラミ類の発生も認められたが、一過的なものであ  
151 った。一方、 *E. globulus* では顕著な害虫類の発生が認められていない。

152  
153 2) その他

154 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承  
155 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  
156 ある(文献 7)。

158 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

159 (1) 供与核酸に関する情報

160 イ 構成及び構成要素の由来

161 耐冷性ユーカリ (*des9, Eucalyptus globulus* Labill.) (以下、本組換えユーカリとする)  
162 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  
163 換え DNA 分子の構成図は図 1 に示した通りである。

164

165 ロ 構成要素の機能

166 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  
167 りである。

168

169 <発現ユニット 1>

170 目的遺伝子である *des9* 遺伝子 (表 1 対象区分 C) は、 $\Delta 9$  デサチュラーゼをコードす  
171 るラン藻 *Anacystis nidulans* 由来の遺伝子であり、膜脂質に結合した脂肪酸の  $\Delta 9$  位を  
172 不飽和化する酵素をコードする遺伝子である (文献 22)。 $\Delta 9$  デサチュラーゼは脂肪酸のカ  
173 ルボキシル基側から数えて 9 番目の位置にある炭素間結合を不飽和化 (二重結合化) する  
174 酵素であり、炭素鎖 16 のパルミチン酸の場合、本酵素の働きによりパルミトレイン酸と  
175 なる。パルミチン酸の融点が  $63.1^{\circ}\text{C}$  であるのに対して、パルミトレイン酸は  $-0.5^{\circ}\text{C}$  であり、  
176 著しく融点が低下する。このように脂肪酸の融点が低下し、低温においても膜脂質の流動  
177 性が維持され耐冷性が付与されるものと考えられている。本遺伝子にはエンドウ *Pisum*  
178 *sativum* L. 由来の Rubisco-S の葉緑体移行シグナル (表 1 対象区分 B) が連結されており、  
179 翻訳産物は、脂肪酸の不飽和化反応がなされる葉緑体へ移行する。いくつかの細菌や植物  
180 では、当該遺伝子の導入により耐冷性が付与されたという報告もある (文献 22)。また、  
181 MC8 プロモーター (表 1 対象区分 A) はレンゲ萎縮ウイルスに由来するプロモーターであ  
182 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 B) はアグロバク  
183 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  
184 る。

185

186 <発現ユニット 2>

187 発現ユニット 2 は pGW23 ベクターの構成要素である (図 1A)。*GUS* ( $\beta$  グルクロニダー  
188 ゼ) 遺伝子 (表 1 対象区分 G) は標識遺伝子として使われており、大腸菌 *Escherichia coli*  
189 由来の *GUS* を発現する。ヒマ *Ricinus communis* 由来カタラーゼイントロン (表 1 対象  
190 区分 F) 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  
191 ている (文献 23)。*GST* プロモーター (トウモロコシ *Zea mays* 由来; 表 1 対象区分 E) 及  
192 び NOS ターミネーター (表 1 対象区分 J) は遺伝子の転写を開始及び終了させるのに必要  
193 な配列である。

194

195 <発現ユニット 3>

196 発現ユニット 3 は pGW23 ベクターの構成要素である (図 1A)。*NPTII* (ネオマイシンホ  
197 スホトランスフェラーゼ) 遺伝子 (表 1 対象区分 L) は大腸菌 *E. coli* 由来の遺伝子で ATP  
198 依存的に抗生物質カナマイシンを分解することで、宿主生物にカナマイシン耐性を付与す  
199 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 K) 及び NOS タ  
200 ーミネーター (表 1 対象区分 M) 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

201 ある。

202

203 <その他>

204 R タンパクの認識配列 (RS、表 1 対象区分 N) は醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii*  
205 由来の核酸配列である。RS 配列は、醤油酵母 R タンパクによる特異的組換え反応に必要な  
206 配列で、RS 領域に挟まれた核酸配列と特異的に欠失させることができる。本組換えユー  
207 カリにおいては、醤油酵母 R タンパク質は存在しないため機能しない。

208 右側及び左側境界配列(RB 及び LB、表 1 対象区分 O, P)は、アグロバクテリウム由来の  
209 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  
210 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  
211 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。

212

213 <核酸供与体>

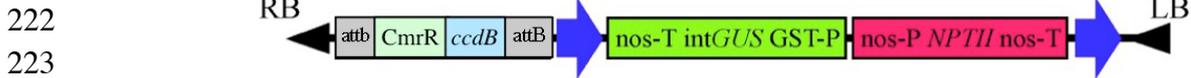
214 上記のすべての遺伝子及び配列の核酸供与体はいずれも研究開発等に係わる遺伝子組換  
215 え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成 16 年 1  
216 月 29 日文部科学省・環境省令第 1 号）第三条におけるクラス 1 に相当し、生物学的リス  
217 クはないと判断される。

218  
219  
220

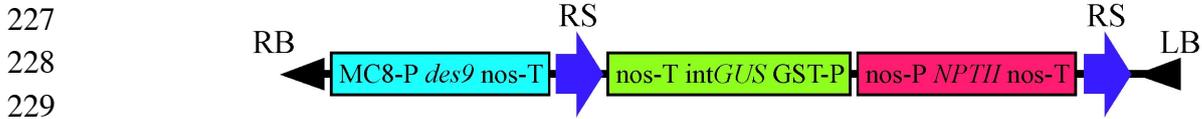
表1 形質転換・発現ベクター pGW23MC8des9 の各構成要素  
pGW23MC8des9 プラスミドは、図1及び図2に示すように、3つの発現ユニットから構成されている。その構成を以下に示す。

対象 区分	遺伝子の名称等	由来及び機能	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	MC8 プロモーター	レンゲ萎縮ウイルス ( <i>Milk vetch dwarf virus</i> ) 由来のプロモーター	ゲノムDNA	同定済
B	葉緑体移行シグナル	<i>Pisum sativum</i> の RuBisCO small subunit 由来	ゲノムDNA	同定済
C	Δ9 デサチュラーゼ遺 伝子( <i>des9</i> )	<i>Anacystis nidulans</i> 由来の遺伝子で、脂質に結合 した脂肪酸のΔ9位を不飽和化する。	ゲノムDNA	同定済
D	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
発現ユニット2				
E	GST プロモーター	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> )	ゲノムDNA	同定済
F	カタラーゼ Intron	ヒマ ( <i>Ricinus communis</i> )	ゲノムDNA	同定済
G	<i>GUS</i> 遺伝子	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来でβ-グルクロニ ダーゼを発現する。	ゲノムDNA	同定済
J	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
発現ユニット3				
K	NOS プロモーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
L	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ <sup>*</sup> 遺伝子 ( <i>NPTII</i> )	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来でカナマイシン耐 性を付与する遺伝子である。	ゲノムDNA	同定済
M	NOS ターミネーター	<i>Rhizobium radiobacter</i> (LBA4404 株)	Ti プラスミド DNA の一部	同定済
その他				
N	R タンパクの認識配列 RS	醤油酵母 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ) 由来で、組 換え反応を起こし、RS に挟まれた領域は、R タン パクの発現によって欠失する。	2μプラスミド DNA の一部	同定済
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
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 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

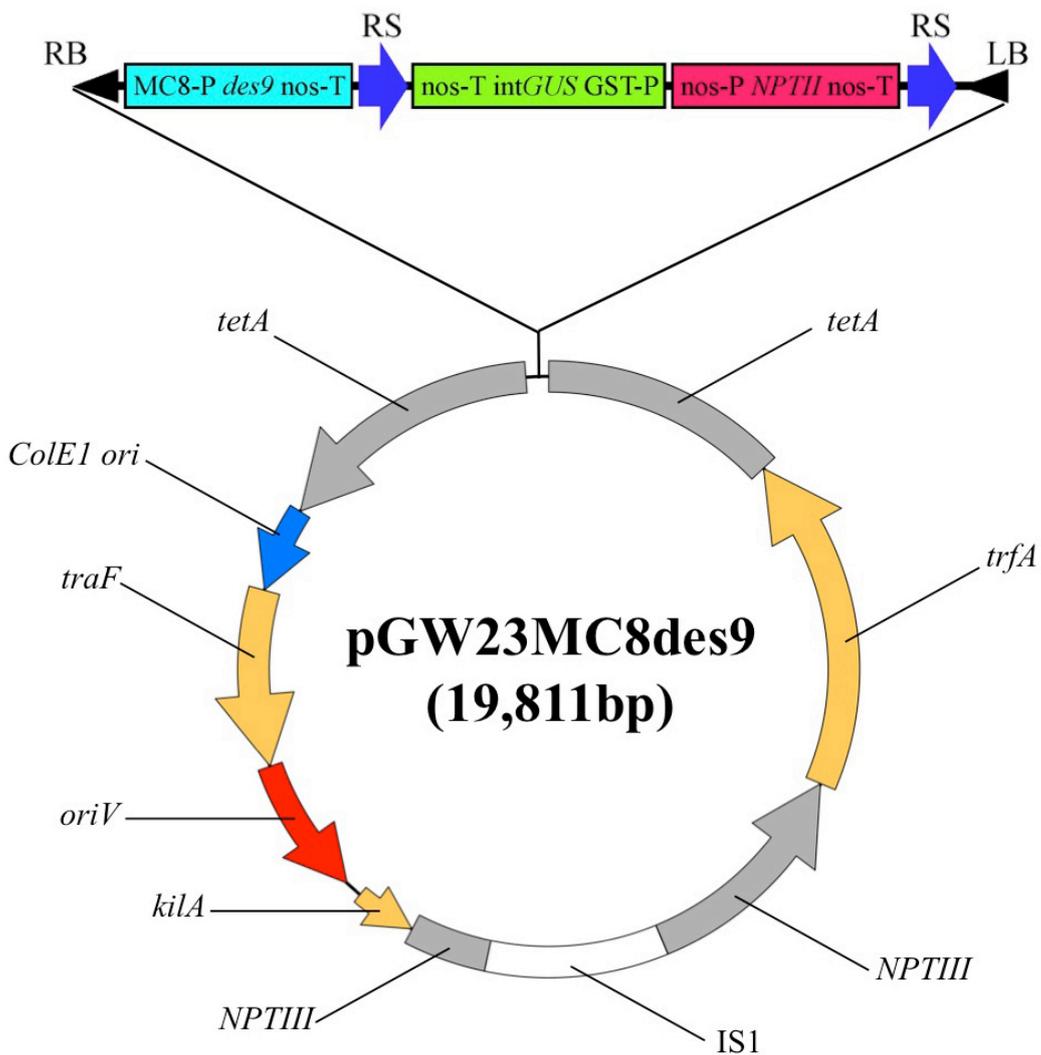
221



224 図 1 A. pGW23 概略図. RK 2 系(pBI121) 由来 (文献 21)  
 225 pBI121 を RB, LB の内側について上記のように改変した



230 図 1 B. 組換え DNA 分子の構成図  
 231 pGW23 のゲートウェイシステムである attb と attB に挟まれた領域 (図 1 A 参照) を  
 232 部位特異的な組換え反応によって *des9* カセットに置換した。



259 図 2. pGW23MC8des9 プラスミド構成図  
 260 *ColE1 ori*: 大腸菌での複製開始点, IS1: 転移因子, *kila*: 大腸菌の宿主範囲決定に関わる遺伝子, *NPTIII*:  
 261 カナマイシン耐性遺伝子(転移因子 IS1 挿入のため機能欠失), *oriV*: アグロバクテリウムでの複製開始点,  
 262 *tetA*: テトラサイクリン耐性遺伝子(T-DNA 挿入のため機能欠失), *traF*: プラスミド転移に必要な遺伝子,  
 263 *trfA*: 複製開始点が機能するために必要な遺伝子

264

265 (2) ベクターに関する情報

266 イ 名称及び由来

267 本組換えユーカリの作出に用いたプラスミドベクターは pGW23MC8des9 (図 2) であ  
268 るが、図 1 A の pGW23 を図 1 B で置き換えたものである。pGW23 は pBI121 を改変して  
269 作られたものであり、pBI121 の由来は pBR322 を改変した pBIN19 となる(文献 21)。  
270 pBIN19 は RK2 系プラスミドである。以上のように、pGW23MC8des9 は pBIN19 の派生  
271 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。

272

273 ロ 特性

274 ベクターpGW23MC8des9 の塩基数は 19,811bp であり、図 2 に示すような構成となっ  
275 ている。本ベクターの基となった pBIN19 は、DNA 複製開始点 *CoIE1 ori* と *oriV* を持つ 2  
276 本鎖環状 DNA であり、大腸菌と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  
277 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  
278 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  
279 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  
280 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、  
281 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种植物に伝達される。

282

283 (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

284 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

285 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  
286 る当該組換え核酸を *E. globulus* 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  
287 構成要素については表 1 及び図 1 に示した。

288

289 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

290 プラスミドベクターpGW23MC8des9 (図 2) 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法  
291 により *E. globulus* に導入する。

292

293 ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

294 プラスミドベクターpGW23MC8des9 を保有するアグロバクテリウムを *E. globulus* の実  
295 生胚軸に感染させ、再生個体を得る。得られた再生個体を挿し木で増殖、クローンとして試  
296 験に用いる。カルベニシリン (50  $\mu$ g/mL) を含有させた培地で培養することで除菌を行い、  
297 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  
298 テリウムの増殖がないことを確認した系統のみを特定網室において馴化栽培後に隔離ほ場  
299 に移植する。なお、移植をするのは、樹高 10cm 程度の幼木である。

300

301 ニ 本組換え生物の使用はイ～ハの手順により得られた系統について、優れた耐冷性を有す  
302 る系統を選抜するため、最大で 10 系統とする複数系統を隔離ほ場で栽培するものである。  
303 以下(4)~(6)の情報は、すべての系統に関してではなく、先行して得た系統について示して  
304 いるが、この際、花芽を付けずにユーカリを栽培すること ((6)e、3.(2)ロ d) 参照)、隔離ほ  
305 場を用いる(3.(2)参照)ことから、生物多様性影響のおそれがないと評価することは可能であ  
306 ると考えられる。

307

308 ホ 筑波大学隔離ほ場における、これまでに行われたユウカリ幼苗の植栽において、野生生  
309 物等による引き抜き、持ち出し等はなかった。仮に引き抜きが行われたとしても、細根等に  
310 ダメージを受け、秋冬期の低温、冬期間の乾燥もあり再定植は困難であると考えられる。

311  
312 (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

313 イ 核酸の存在状態

314 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。  
315 閉鎖系栽培室で生育させた本組換えユウカリと非組換えユウカリの葉から、ゲノム DNA を  
316 抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った。先行して得られた再分化個体について結果  
317 を示す(別紙5)。

318 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 を制限酵素 *EcoRI* で  
319 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  
320 Pharmacia Biotech 社) にブロットングして行った。プローブは、*des9* cDNA 遺伝子を  
321 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に先行して得られた再分化個  
322 体の結果を示す。多くの再生個体で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  
323 た。

324  
325 ロ *des9* 遺伝子の発現

326 本組換えユウカリにおける導入遺伝子の発現を確認するため、閉鎖系温栽培室で生育させ  
327 た本組換えユウカリと非組換えユウカリを用い、当該遺伝子の発現の確認をノーザンハイブ  
328 リダイゼーション法により行った。

329 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 %  
330 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  
331 Biotech 社) にブロットングして行った。プローブは、*des9* cDNA 遺伝子を DIG ラベル  
332 したものをを用い、化学発光検出した。別紙6図1に先行して得られた再分化個体について  
333 の結果を示す。一部の系統で発現の認められないものもあるが、多くの系統で導入遺伝子が発  
334 現している事が明らかとなった。

335 一方、非組換えユウカリではほとんど検出されないパルミトレイン酸が多数の組換えユウ  
336 カリより検出された(別紙7)。

337  
338 (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

339 本組換えユウカリに導入されている遺伝子配列に基づいて設計したプライマー対を用い、  
340 PCR を行うことで、導入遺伝子を特異的に検出することが可能であり、その感度については、  
341 約 50ng のゲノム DNA を反応に供すれば、本法により検出可能であることを確認した。また、  
342 サザンブロットハイブリダイゼーションによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出  
343 感度については、約 5  $\mu$ g のゲノム DNA を用いれば検出可能である。プローブは、*des9* cDNA  
344 遺伝子の部分配列を DIG ラベルしたものをを用い、化学発光検出する。

345  
346 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

347 イ 本組換えユウカリでは宿主と異なり *GUS* 遺伝子により  $\beta$ -グルクロニターゼを発現し、  
348 *NPTII* 遺伝子によりカナマイシン耐性が付与されている。さらに、*des9* 遺伝子によってコー  
349 ドされる  $\Delta 9$  デサチュラーゼは本組換えユウカリで恒常的に発現している。

350

351 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ており、様々な実  
352 験データや論文等をもとに、ヒトや動物の健康および、生物多様性に対して影響があったと  
353 という報告はこれまでのところない(文献 24, 25)。

354  
355 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、先行して得られた系統につ  
356 いて形態及び生育の特性等を調査した。

357  
358 a) 形態及び生育の特性

359 先行して得られた系統について、ほとんどの本組換えユーカリと非組換えユーカリの間  
360 で顕著な差異は認められなかったが、一部には成育が著しく抑制されるものがみとめられ  
361 た(別紙 8)。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。

362  
363 b) 生育初期における低温または高温耐性

364 非組換えユーカリ苗木については、2004 年秋に幼木を温室から遺伝子実験センター隔離  
365 ほ場に植え替えたところ、半数は越冬したが、2 年目の冬に地上部が枯死した(樹高 80cm  
366 程度:別紙 3、図 1)。発芽苗についても、2011 年晩秋に樹高 10 cm 以下の発芽苗を隔離  
367 ほ場に植栽し、うち半数は苗帽子による養生、残りには養生なしの条件で越冬性を評価し  
368 たところ、苗帽子により養生した苗はほぼ全ての個体が越冬したものの、養生が無い個体  
369 は全て枯死した。また、春期に発芽した苗についても、別紙 3 図 1 の更新萌芽(5~10 cm  
370 程度)と同様の成長が想定され、競合性が低いものと考えられる。

371 一方、本組換えユーカリについて、外植片や発根苗を用いた低温処理後の回復試験では  
372 耐冷性に優れた系統は認められていない。特定網室における耐冷性評価試験(冬期間に非  
373 暖房、窓開放)を試みたが、非組換え体に比べて成長性の良い個体は認められていない。  
374 しかし、当該実験の温度が耐性評価に必要な低温域となっていない可能性があるため、冬  
375 期間に本隔離ほ場栽培試験において低温耐性の評価を行う予定である。

376  
377 c) 越冬性または越夏性

378 非組換えユーカリについては、別紙 3 図 1 及び図 2 に示すように、1 年目のクローン苗  
379 木は、越冬したが、2 年目春に地上部が枯死した。2 年目以降のクローン苗木は、越冬し、  
380 翌年春においても地上部が枯死することはなかった。

381 本組換えユーカリにおける成体の越冬性試験は行っていないが、冬期間に本隔離ほ場栽  
382 培試験において行う予定である。なお、本実験計画においては、半年~2 年未満の幼木期  
383 における冬期間における耐冷性のスクリーニング評価を目的としており、評価後成木とな  
384 る前に伐採するため、成木となることはない。

385  
386 d) 花粉の総性及び大きさ

387 特定網室で 2 年間栽培した本組換えユーカリでは花芽形成が認められなかった。

388  
389 e) 種子の生産性、休眠性及び発芽率

390 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  
391 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、  
392 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  
393 ら 78%と報告されている(文献 12)。日本においては、*E. globulus* を好んで訪花する昆虫

394 は特定されていない。一方、本組換えユーカリについて、花芽の形成が認められていない  
395 ため、評価出来ていない。なお、本組換えユーカリは樹高 10cm 程度の幼木を用いるため、  
396 2 年間の使用期間中に成木となる可能性は低い。

397  
398 f) 交雑性

399 *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  
400 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  
401 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 26)。また、節の異なる  
402 *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  
403 のであったことが分かっている(文献 27)。さらに、花粉が長距離を移動した例として、オ  
404 ーストラリアのユーカリ林(*E. macrorhyncha*)において、最大 5 km 離れたところで、*E.*  
405 *regnans* との雑種樹木が生育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  
406 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、  
407 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 28)。

408 文献 29 によると、ユーカリ属には 13 の亜属があり、*E. globulus* は亜属 *Symphyomytus*  
409 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  
410 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 30)。  
411 *E. globulus* が属する *Maidenaria* 節には、他に *E. nitens* や *E. dunnii* などがある。通常  
412 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  
413 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  
414 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  
415 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  
416 である *E. nitens* の開花期は重なっており(文献 31)、*E. globulus* が花粉親となる場合は、  
417 雑種が形成されうると報告されている (文献 32)。また、オーストラリア・タスマニア島  
418 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  
419 は 0.4 %程度と報告されている(文献 26)。

420 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 30)。  
421 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  
422 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  
423 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  
424 くいことが認知されている (文献 33)。これは花器の構造、生理的様態及び遺伝的因子に  
425 起因する (文献 12)。さらに、人工交配実験で得られた両種の雑種は、強い他殖弱勢を起  
426 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 33)。

427 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  
428 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  
429 団は存在しない。なお、本実験計画においては、半年～2 年未満の幼木期における耐冷性  
430 のスクリーニング評価を目的とし、評価後成木となる前に伐採するため、着花および開花  
431 することはない。

432  
433 g) 有害物質の産生性

434 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  
435 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  
436 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

437 レロパシー性は、他の植林に用いられているユーカリ種と比べると相対的に低いことが知  
438 られている（文献 18）。また、本組換えユーカリのアレロパシー性は、宿主植物である非  
439 組換え *E. globulus* と比較して有意な違いはないことから、本組換えユーカリの使用が生  
440 物多様性に対して新たなリスクを与えるものではない（別紙 9）。本組換えユーカリは、耐  
441 冷性を  $\Delta 9$  デサチュラーゼの機能により付与されているが、 $\Delta 9$  デサチュラーゼは脂肪酸  
442 の不飽和化反応に特異的活性を有する酵素であり、他の代謝系に対して作用する可能性は  
443 低いと考えられ、生物多様性に対する有害物質に該当するとは考えにくい（文献 22）。ま  
444 た、*GUS* 遺伝子により  $\beta$ -グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマイシンホスホ  
445 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  
446 トや動物の健康およ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  
447 のところない（文献 24, 25）。一方、ユーカリはそもそも非食用であること、また、本実  
448 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  
449 本組換えユーカリは花粉飛散することはないことから、アレルゲン性に関する評価は本実  
450 験計画の環境影響評価に該当しない。

451 3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

452 (1) 使用等の内容

453 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

454

455 (2) 使用等の方法

456 所在地：茨城県つくば市天王台 1-1-1 (別紙 10)

457 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)

458 使用期間：承認の日から平成 29 年 9 月 30 日まで

459

460 イ. 隔離ほ場の施設：別紙 11

461 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 230cm のフェンス  
462 (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。

463 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。

464 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  
465 識を、見やすい所に掲げている。

466 c) 土、遺伝子組換えユーカリ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  
467 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  
468 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。

469

470 ロ. 隔離ほ場での作業要領

471 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  
472 生育することを抑制する。

473 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  
474 ーカリが漏出しない構造の容器に入れる。

475 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  
476 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  
477 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する。

478 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  
479 トクレーブにて不活化する。

480 e) 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ため、隔離  
481 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  
482 を行う。

483 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。

484 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。

485 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  
486 急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

487

488 (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

489 隔離ほ場において、本組換えユーカリの性質として、冬期間の生育、越冬性、生理的特性  
490 などを評価し、耐冷性系統の選抜を行う。選抜系統については導入遺伝子の安定性、発現性、  
491 脂肪酸等の解析を計画している。

492

493 (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

494 措置  
495 本申請書に添付した緊急措置計画書を参照  
496  
497 (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  
498 の結果  
499 先行して得られた一部の系統について特定網室で形質評価を行った。ほとんどの系統にお  
500 いて、本組換えユーカリと非組換えユーカリの間で顕著な差異は認められなかったが、一部  
501 には成育が著しく抑制されるものが認められた(別紙8)。一方、葉型などの外観に特記すべ  
502 き差異は認められなかった。  
503

504 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

505 1. 競合における優位性

506 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

507 別紙3図1に挙げるように、非組換えユーカリ (*E. globulus*) の苗木 (約80cm高で越冬)  
508 の多くは越冬出来ず、翌春に萌芽更新により現れた植物体が成長を開始する。周辺の草本植  
509 物の成長が著しく、萌芽個体は成長初期段階に限れば成長は劣るため (別紙3図2)、競合性  
510 が低いと考えられる。

511 本組換えユーカリは耐冷性を有すると考えられるが、その場合であっても低温環境下に置  
512 かれた限り耐冷性による競合における優位性はないと考えられる。また、本組換えユーカ  
513 リについては隔離ほ場での管理された栽培が行われるため、申請書の隔離ほ場内の施設や作  
514 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  
515 の影響のおそれはないと判断された。

516

517 (2) 影響の具体的内容の評価

518 該当しない

519

520 (3) 影響の生じやすさの評価

521 該当しない

522

523 (4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無の判断

524 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耐冷  
525 性が強化されている事が想定されるが、それ以外は非組換えユーカリとの間に大きな相違は  
526 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、  
527 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  
528 多様性への影響が生ずるおそれはないと判断された。

529

530 2. 有害物質の産生性

531 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

532 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  
533 を生じさせるような有害物質を産生させる報告は見られない。一方、ユーカリ属植物は、一  
534 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  
535 ー性は、他の植林に用いられている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  
536 (文献18)。また、本組換えユーカリのアレロパシー性は、非組換え *E. globulus* と比較して  
537 有意な違いはないことから、本組換えユーカリの使用が生物多様性に対して新たなリスクを  
538 与えるものではない (別紙9)。

539 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  
540 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  
541 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  
542 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)。

543 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、  
544 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  
545 ハマキが確認された (文献19)。

546 一方、本組換えユーカリは、耐冷性をΔ9デサチュラーゼの機能により付与されているが、

547 Δ9 デサチュラーゼは脂肪酸の不飽和化反応に特異的活性を有する酵素であり、他の代謝系  
548 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に該当するとは考  
549 えにくい。また、*GUS* 遺伝子によりβ-グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマイ  
550 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  
551 とに、ヒトや動物の健康およ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  
552 れまでのところなく（文献 24, 25）、上記鱗翅目は影響を受けないと考えられる。

553 さらに、当該第一種使用は、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で行うも  
554 のであり、かつ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（別紙 10、11）、こ  
555 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。

556

557 (2) 影響の具体的内容の評価

558 該当しない

559

560 (3) 影響の生じやすさの評価

561 該当しない

562

563 (4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無の判断

564 以上から、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明らか  
565 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  
566 との間に大きな相違はないと考えられた。限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ  
567 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、在来生態系の  
568 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。

569

570 3. 交雑性

571 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

572 本隔離ほ場栽培試験において、当該遺伝子組換えユーカリの花芽は切除される。また、本  
573 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  
574 然分布は報告されていない。従って、本組換えユーカリによる交雑によって、生物多様性へ  
575 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。

576 また、ユーカリ属植物は根茎を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  
577 のコンクリート部は地下 68cm まで及び、その下層に砕石層 15cm が設けられているため、  
578 根茎のほ場外への伸長はない。

579

580 (2) 影響の具体的内容の評価

581 該当しない

582

583 (3) 影響の生じやすさの評価

584 該当しない

585

586 (4) 生物多様性が生じるおそれの有無の判断

587 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  
588 それはないと判断された。

589

590 4. その他の性質  
591 該当しない  
592

594

595 競合における優位性に関わる形質について、宿主植物はつくば地区における屋外栽培試験によ  
596 り競合の優位性が低いことが明らかとなっている（第一、1、(3)、ロ、及び、第二、1、(1)）。  
597 本組換えユーカリは耐冷性を有すると考えられるが、低温環境下に置かれない限り耐冷性による  
598 競合における優位性はないと考えられる。また、本実験は半年～2年未満の幼木期における耐冷  
599 性のスクリーニング評価を目的とし、評価後成木となる前に伐採する。*E. globulus*は、つくば地  
600 区でのほ場栽培において、花芽形成まで植栽後5年以上、花芽形成後開花まで1年程度掛かること  
601 (第一、1、(3)、イ)から、着花および開花することはない。仮に花芽が形成された場合でも花芽  
602 の切除を行うため、種子が形成されることはなく、導入遺伝子を有する種子が漏出するおそれ  
603 はない。一方、競合において優位に生育した場合でも、本隔離ほ場の立地条件、花芽の切除等、適  
604 切な措置を講じることから、本組換えユーカリの競合における優位性には影響しないと判断され  
605 る。以上から、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、運搬及  
606 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  
607 を生じるおそれはないと判断された。

608 有害物質の産生に関して、本組換えユーカリは、耐冷性を $\Delta 9$ デサチュラーゼの機能により付  
609 与されているが、 $\Delta 9$ デサチュラーゼは脂肪酸の不飽和化反応に特異的活性を有する酵素であり、  
610 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に該当する  
611 とは考えにくい。また、*GUS* 遺伝子により $\beta$ -グルクロニターゼが、*NPTII* 遺伝子によりネオマ  
612 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  
613 に、ヒトや動物の健康およ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  
614 のところない（第一、2、ハ、(6)、g)）。当該第一種使用は、隔離ほ場で行うものであり、栽  
615 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  
616 で囲まれているため、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  
617 様性への影響が生じるおそれはないと判断された。

618 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  
619 *Eucalyptus* 属植物の自然分布は報告されていない。また、本実験は半年～2年未満の幼木期に  
620 における耐冷性のスクリーニング評価を目的とし、評価後成木となる前に伐採する。*E. globulus*  
621 は、つくば地区でのほ場栽培において、花芽形成まで植栽後5年以上、花芽形成後開花まで1年程  
622 度掛かること（第一、1、(3)、イ)から、着花および開花することはない。仮に花芽が形成され  
623 た場合、花芽の切除を行う。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  
624 るおそれはないと判断された。

625 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  
626 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  
627 響が生じるおそれがないと結論された。

628

630

- 631 1. Nicole D. (2006) *Eucalyptus* of Victoria and Tasmania, Bloomings Books, Melbourne
- 632 2. Boland D.J., M.I.H. Brooker and J.W. Turnbull (1980) *Eucalyptus* seed. CSIRO
- 633 Australia
- 634 3. Grattapaglia D. and H.D. Bradshaw (1994) Nuclear DNA content of commercially
- 635 important *Eucalyptus* species and hybrids. Canadian Journal of Forest Research 24:
- 636 1074-1078
- 637 4. 西村弘行(1987)未来の生物資源ユーカリー そのバイオテクノロジーとバイオサイエンス
- 638 ー、内田老鶴圃
- 639 5. 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
- 640 6. Eldridge K., J. Davisdon, C. Harwood and G. van Wyk (1993) Eucalypt domestication
- 641 and breeding. Oxford University Press
- 642 7. Lewis, W.H. & M.P.F. Elvin-Lewis (1977) Medical Botany, Wiley, NY
- 643 8. Brooker M.I.H. and D.A. Kleinig (1983) Field guide to Eucalypts South-eastern
- 644 Australia. Inkata Press, Sydney
- 645 9. Attiwill P.M. and M.A. Adams (1996) Nutrition of *Eucalyptus*, CSIRO Publishing
- 646 10. 日本野生植物図鑑、ハ坂書房、(1999)
- 647 11. 海外産業植林センター (2005) オーストラリアにおける *E. globulus* 産業植林地の萌芽
- 648 更新、<http://www.jopp.or.jp/jigyoreport/coppiceH16/H16coppiceReport.pdf>
- 649 12. Patterson B., R.E. Vaillancourt, D.J. Pilnbeam and B.M. Potts (2004) Factors affecting
- 650 variation in outcrossing in *Eucalyptus globulus*. Australian Journal of Botany 52:
- 651 773-780
- 652 13. Hingston A.B. and B.M. Potts (2005) Pollinator activity can explain variation in
- 653 outcrossing rate within individual trees. Austral Ecology 30: 319-324
- 654 14. Ruaud J.N., N. Lawrence, S. Pepper, B.M. Potts, and N.M.G. Borralho (1998) Genetic
- 655 variation of in vitro rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. Silvae Genetica
- 656 48: 4-7
- 657 15. Skolmen R.G. (1983) Growth and yield of some Eucalyptus of interest in California, In:
- 658 R.B. Standiford, F.T. Ledig (eds.). Proc Workshop on *Eucalyptus* in California.
- 659 Sacramento, CA. US Forest Service Gen Tech Rep PSW-69. p 49-57
- 660 16. Skolmen R.G. and F.T. Ledig (1990) *Eucalyptus globulus* Labill.: bluegum eucalyptus,
- 661 p. 299-304. In R.M. Burns and B.H. Honkala (tech. coords.), Silvics of North America:
- 662 Volume 2. Hardwoods. Agriculture Handbook 654. U.S.D.A. Forest Service,
- 663 Washington, D.C.
- 664 17. Souto X.C., J.C. Bolano, L. Gonzalez and M.J. Reigosa (2001) Allelopathic effects of
- 665 tree species on some soil microbial population and herbaceous plants, Biologia
- 666 Plantarum 44: 269-275
- 667 18. Lisanewok N. and A. Michelsen (2004) Allelopathy in agroforestry systems: the effects
- 668 of leaf extracts of *Cupressus lusitanica* and three *Eucalyptus* spp. on four Ethiopian
- 669 crops, Agroforestry Systems 21: 63-74
- 670 19. Ross I.A (2001) *Eucalyptus globules*. MEDICINAL PLANTS OF THE WOLRD. Vol. 2.
- 671 Humana Press, New Jersey

- 672 20.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,  
673 vol.48, p.123-133
- 674 Jefferson R.A., T.A. Kavanagh, M. Bevan (1987) GUS fusions: *beta*-glucuronidase as a  
675 sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J 6: 3901-3907
- 676 22.Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T.  
677 (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a  
678 nonspecific cyanobacterial desaturase. Nat Biotechnol. 14:1003-1006.
- 679 23.Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. (1990) Construction and expression in  
680 Tobacco of a  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the  
681 coding sequence. Plant cell physiol. 31:805-813
- 682 24.Gilissen, L.J.W., Metz, P.L.J., Stiekema, W.J., Nap, J.-P. (1998) Biosafety of *E. coli*  $\beta$   
683 -glucuronidase (GUS) in plants. Transgenic Res. 7:157-163
- 684 25.EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) (2007) Statement of the  
685 scientific panel on genetically modified organisms on the safe use of the *ntpII*  
686 antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. EFSA journal  
687 doi:10.2903/j.efsa.2007.742
- 688 26.Barbour R.C., B.M. Potts and R.E. Vaillancourt (2003) Gene flow between introduced  
689 and native *Eucalyptus* species: exotic hybrids are establishing in the wild. Australian  
690 Journal of Botany 51: 429-439
- 691 27.Burczyk J., W.T. Adams, G.F. Moran and A. Griffin (2002) Complex patterns of mating  
692 revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozymes markers and the  
693 neighborhood model. Molecular Ecology 11: 2379-2391
- 694 28.Jones T.H., R.E. Vaillancourt and B.M. Potts (2007) Detection and visualization of  
695 spatial genetic structure in continuous *Eucalyptus globulus* forest. Molecular Ecology  
696 16:697-707
- 697 29.Brooker M.I.H. (2000) A new classification of the genus *Eucalyptus* L' Her. (Myrtaceae).  
698 Australian Systematic Botany 13: 79-148
- 699 30.Potts B.M., R.C. Barbour, A.B. Hingston and R.E. Vaillancourt (2003) Turner Review  
700 No.6 Genetic pollution of native eucalypt gene pools identifying the risks. Australian  
701 Journal of Botany 51: 1-25
- 702 31.Barbour R.C., B.M. Potts, R.E. Vaillancourt and T.N. Tibbits (2006) Gene flow between  
703 introduced and native *Eucalyptus* species: Flowering asynchrony as a barrier to F-1  
704 hybridisation between exotic *E. nitens* and native Tasmanian *Symphomyrtus* species.  
705 Forest Ecology and Management 226: 9-21
- 706 32.Gore P.L., B.M. Potts, P.W. Volker and J. Megalos (1990) Unilateral  
707 cross-incompatibility in *Eucalyptus* the case of hybridization between *Eucalyptus*  
708 *globulus* and *Eucalyptus nitens*. Australian Journal of Botany 38: 282-294
- 709 33.Medding R.A., J.A. McComb, M.C. Calver, S.R. Thomas, and R.A. Mazanec (2003)  
710 *Eucalyptus camaldulensis* x *globulus* hybrids. Australian Journal of Botany 51:  
711 319-331
- 712



740 を周知するための方法

741

742 実験従事者に直接口頭で伝え、事実を記録する。

743

744 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  
745 的な措置等

746 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  
747 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  
748 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  
749 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。

750

751 5 文部科学大臣及び環境大臣への連絡体制

752 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  
753 及び環境省に報告する。

754

## 別紙 目録

- 別紙 1 実験従事者
- 別紙 2 つくば地区における冬期の気温
- 別紙 3 隔離ほ場での非組換えユーカリ (*E. globulus*) の生育状況と植生との競合の有無
- 別紙 4 冬期の幼苗管理
- 別紙 5 宿主内における供与 DNA の存在状態
- 別紙 6 供与 DNA 由来遺伝子の発現形式
- 別紙 7 組換えユーカリ (*E. globulus*) のパルミトレイン酸含量
- 別紙 8 特定網室および隔離ほ場における遺伝子組換えユーカリの成長性
- 別紙 9 隔離ほ場における遺伝子組換えユーカリのアレロパシー活性
- 別紙 10 筑波大学周辺地形図
- 別紙 11 屋外特定区画概略図

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
<p>個人情報のため、公表しません。</p>				

別紙 2 つくば地区における冬期の気温

表 1. つくば地区の冬期における最低気温

シーズン	'00-01	'01-02	'02-03	'03-04	'04-05	'05-06	'06-07	'07-08	'08-09	'09-10
冬日 (日)	87	76	90	85	79	93	64	83	64	64
最寒月平均 (°C)	-4.0	-2.3	-3.0	-2.9	-2.8	-3.8	-1.2	-2.9	-1.1	-2.6
最低気温 (°C)	-9.4	-6.5	-8.6	-7.0	-6.8	-7.5	-5.3	-7.3	-5.9	-6.8
最低気温[隔] (°C)	**	**	**	**	**	**	-7	-10	-6	-8

2000-2001 年～2009-2010 年シーズンのつくば市館野 (AMEDAS ポイント) における冬日の日数 (冬日)、最寒月の平均最低気温(最寒月平均)、シーズン最低気温 (最低気温) および、過去 4 シーズンにおける筑波大学隔離ほ場内でのシーズン最低気温 (最低気温[隔]) を示す。つくば市館野での冬日はシーズンあたり 60 日以上 (10 シーズン平均 78.5 日)あり、シーズン最低気温も-5°Cを下回る (10 シーズン平均-7.1°C)。また、最寒月の平均最低気温も氷点下 (10 シーズン平均-2.7°C)であった。さらに、過去 4 シーズンの筑波大学隔離ほ場におけるシーズン最低気温は館野より低い値を示した。

別紙 3 隔離ほ場での非組換え *E. globulus* の生育状況と植生との競合の有無



図 1 非組換えユーカリ (*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 (約 80cm) は越冬できず、樹皮下に形成されている潜伏芽から更新された萌芽 (矢印) からの伸長成長が見られる。萌芽の大きさは 5~10 cm 程度であった。

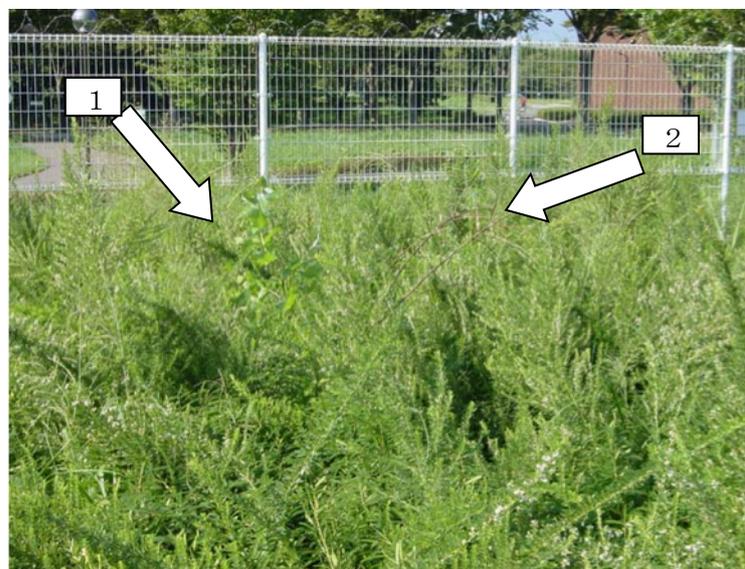


図 2 非組換えユーカリ (*E. globulus*) (矢印) の隔離ほ場における 2 年目夏の生育状況 (平成 17 年)。矢印 2 は前年に地上部が枯死したもの。更新した萌芽は植物体は周辺草本植物に埋もれるように生存している (矢印 1)。また、成育の後れた幼苗は周辺草本に埋もれ秋までに枯死した。

別紙 4 つくば地区で必要な冬期の幼苗管理



図1. 冬期の幼苗管理Ⅰ（植栽時の様子）

2008年3月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ（*E. globulus*）の寒さ対策。幼苗をビニールハウスで覆い、寒さや霜の害を防いだ。



図2. 冬期の幼苗管理Ⅱ（植栽後9ヶ月目の様子）

2008年5月にハウスからビニールを取り除き（左図）栽培を行った後、12月に寒さ対策のため再びビニールでハウスを覆う（右図）。



図3. 冬期の幼苗管理Ⅲ

2005年10月に植栽された耐塩性遺伝子組換えユーカリ（*E. camaldulensis*）の寒さ対策。幼苗でフルシーズンの冬期を過ごすためハウス内の苗に苗帽子を掛け2重に保護した。

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ユーカリと非組換えユーカリの葉から、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+ (Amersham Pharmacia Biotech 社) にプロットした。プローブは、*des9* cDNA 部分配列を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。図 1 に先行して得られた再分化個体の結果を示す。多くの再生個体で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。

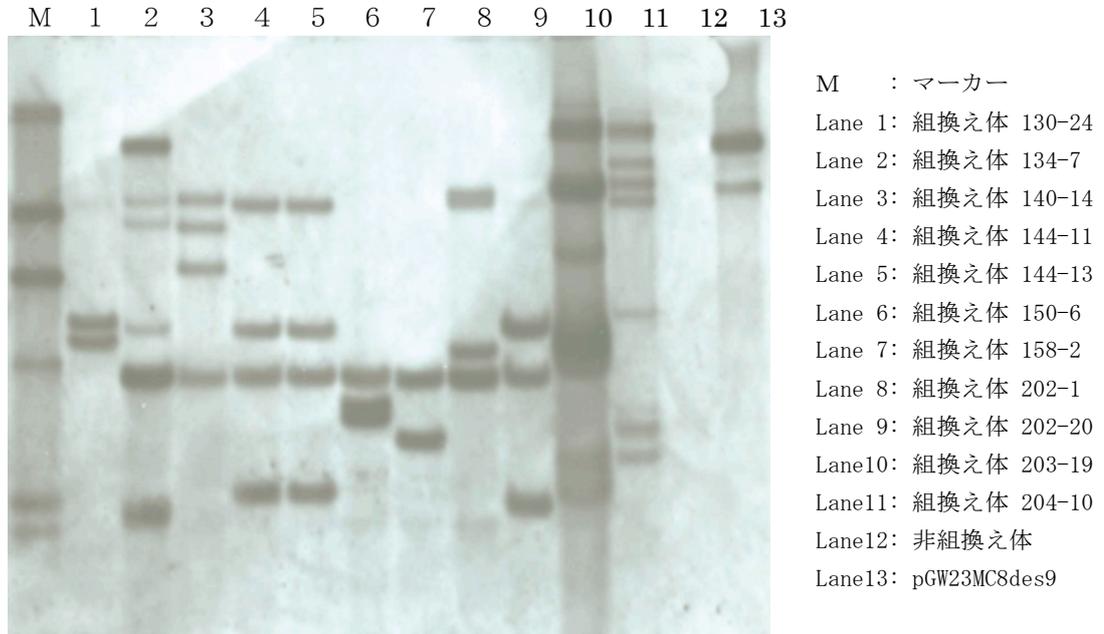


図 1 サザンハイブリダイゼーション



図 2 T-DNA 領域内の導入遺伝子カセット図

別紙 6 供与 DNA 由来遺伝子の発現形式

*des9* 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ユーカリと非組換えユーカリの葉から、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) にブロットニングした。プローブは、*des9* cDNA 部分配列を DIG ラベルしたものを用い、化学発光検出した。内部標準として rRNA 像はエチジウムブロマイド染色したもの。図 1 に先行して得られた再分化個体についての結果を示す。一部の系統で発現の認められないものもあるが、多くの系統で導入遺伝子が発現している事が明らかとなった。

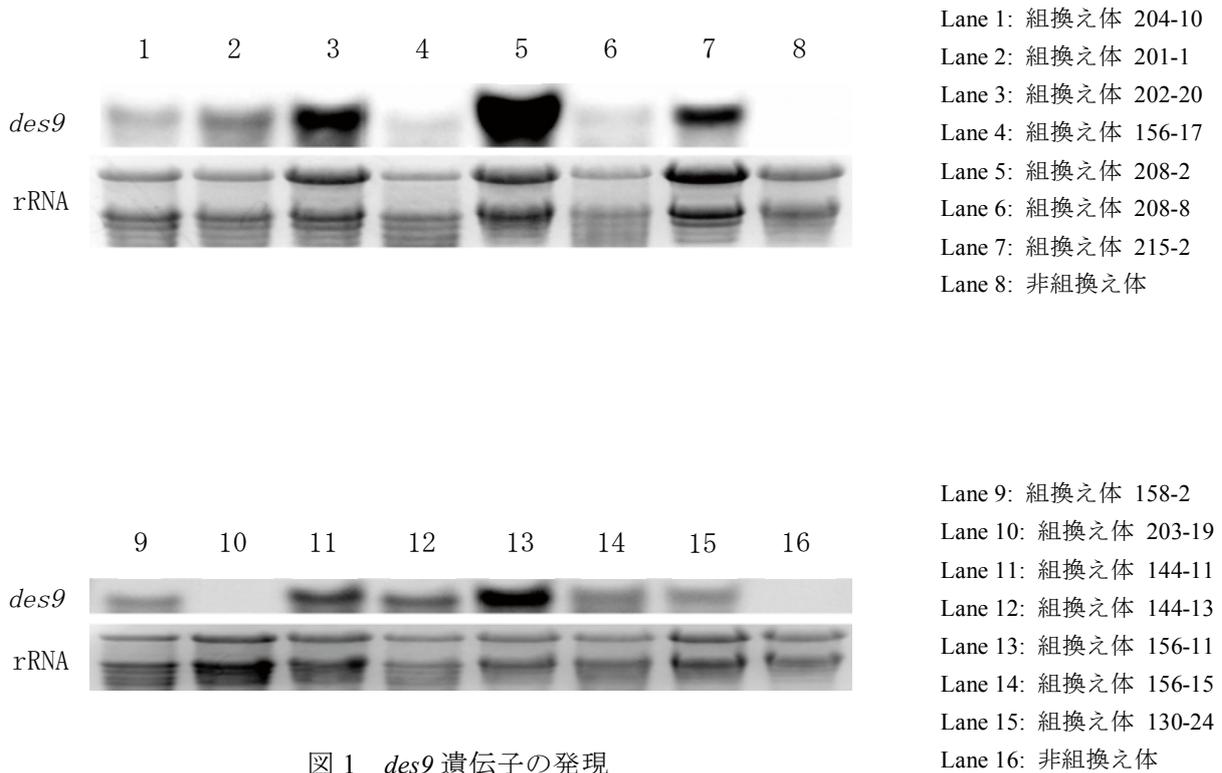
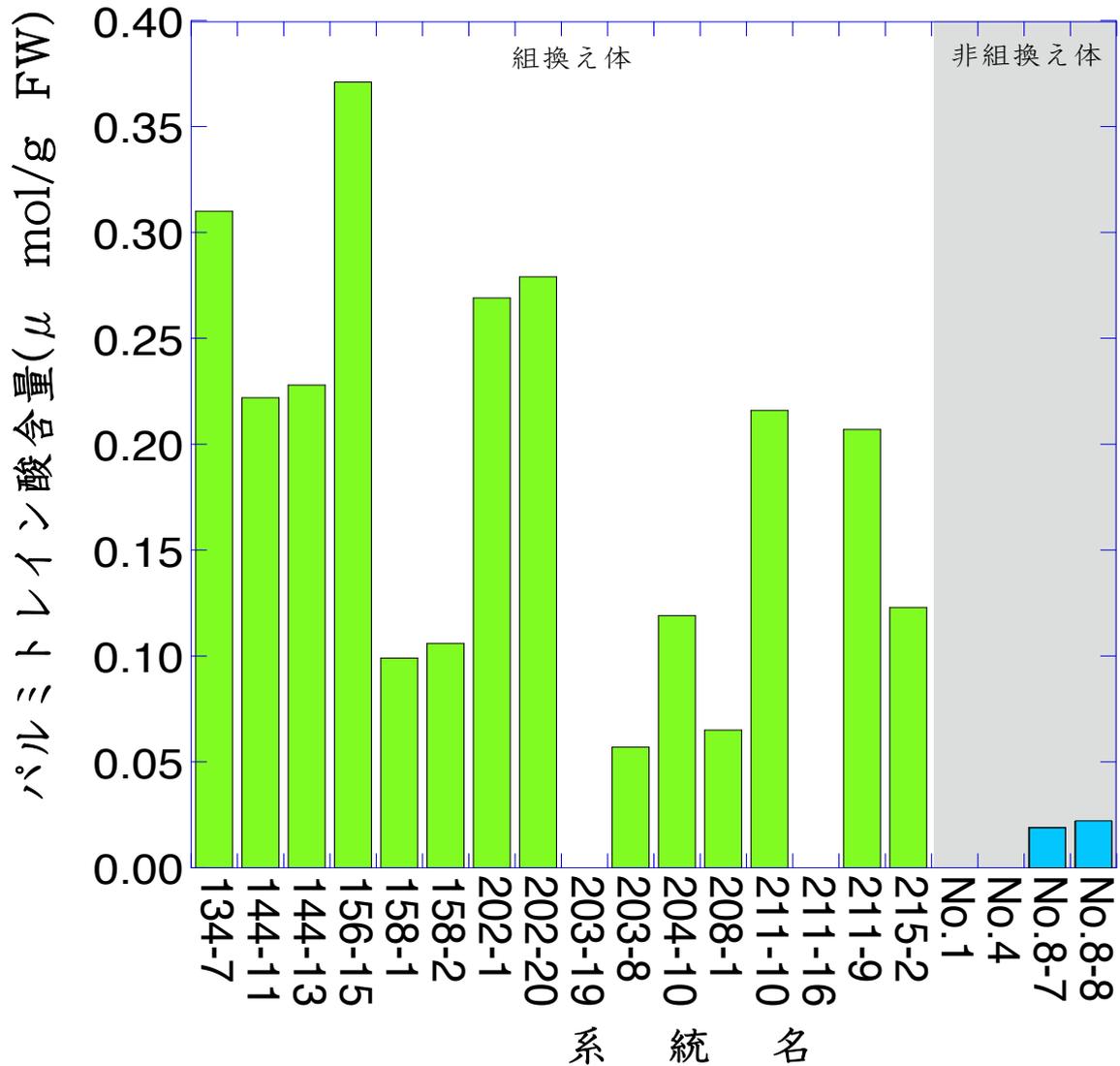


図 1 *des9* 遺伝子の発現

別紙 7 組換えユーカリ (*E. globulus*) のパルミトレイン酸含量

無菌培養しているユーカリの葉をサンプリングして秤量した。これらの葉からメタノールおよびクロロホルムにより抽出した脂肪酸（水/メタノール/クロロホルム分画したクロロホルム層）をメチルエステル化し、さらに TMS 化した。内部標準として、monadecanoic acid methylester を用いた。分析にはキャピラリー (DB17-ms) GC(Agilent 6890)-MS (LECO Pegasus) を使用した。脂肪酸と内部標準物質を MS スペクトルおよび検出時間から同定し、各化合物固有のフラグメント  $m/z$  でのエリア値を求めて、サンプル重量あたりのモル数として各脂肪酸量を算出した。先行して得られた系統のパルミトレイン酸の含有量を図に示す。

## パルミトレイン酸含量



別紙 8 特定網室および隔離ほ場における遺伝子組換えユーカリの成長性

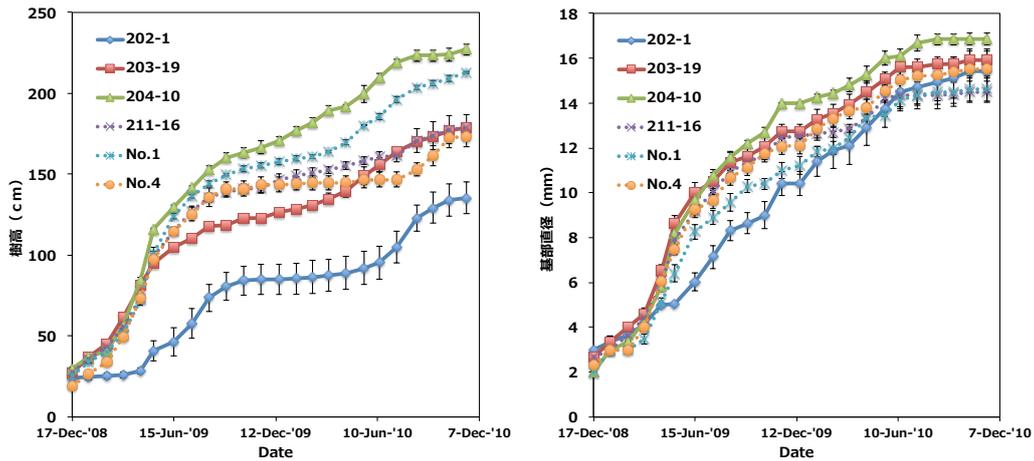


図1 特定網室試験栽培における樹高及び基部直径の推移 (2008年12月～2010年12月)  
 特定網室で生育させた組換えユーカリ4系統(202-1、203-19、204-10、211-16)、非組換えユーカリ2系統、(No.1、No.4)の各3個体を用いて、生育調査を行った。

表1 特定網室試験栽培における樹高及び基部直径の分散分析(2008年12月～2010年12月)

図1で示した各系統の最終計測時における測定値をもとに分散分析を行った。その結果、樹高に関しては6系統間に有意な差異が認められたが、樹高の組換え-非組換え群間、および基部直径の系統間、組換え-非組換え群間に有意な差異は認められなかった( $p>0.05$ )。

樹高						基部直径					
	df	SS	V	F	p		df	SS	V	F	p
系統間	6	15696.7	2616.1	15.1 ***	0.000	系統間	6	11.4	1.9	1.3 ns	0.340
└組換え-非組換え群間	1	676.0	676.0	3.9 ns	0.074	└組換え-非組換え群間	1	1.5	1.5	1.0 ns	0.333
誤差	11	1903.3	173.0			誤差	11	16.3	1.5		
全体	17	17600.0				全体	17	27.8	1.6		

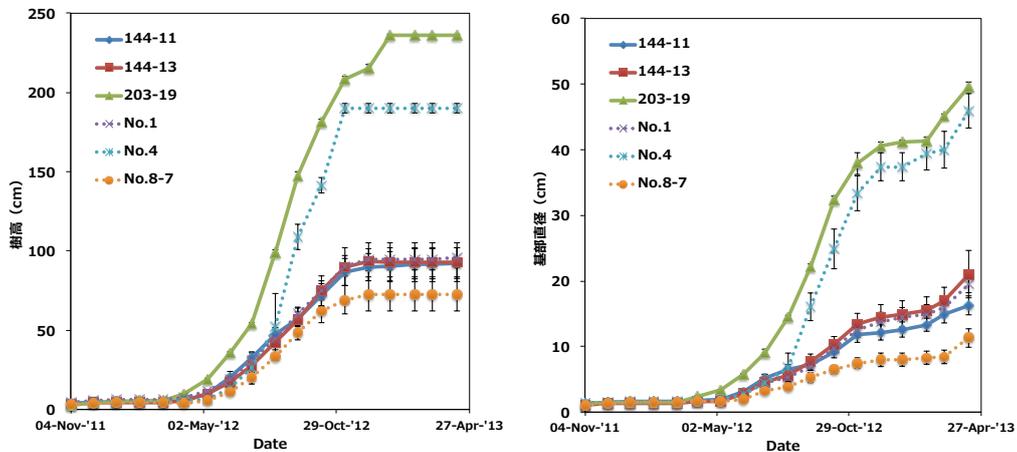


図2 隔離ほ場試験栽培における樹高及び基部直径の推移 (2011年11月～2013年4月)  
 隔離ほ場で生育させた組換えユーカリ3系統(144-11、144-13、203-19)、非組換えユーカリ3系統(No.1、No.4、No.8-7)を用いて、生育調査を行った。

表2 隔離ほ場試験栽培における樹高及び基部直径の分散分析(2011年11月～2013年4月)

図1で示した各系統の最終計測時における測定値をもとに分散分析を行った。その結果、樹高に関しては6系統間に有意な差異が認められたが、樹高の組換え-非組換え群間、および基部直径の系統間、組換え-非組換え群間に有意な差異は認められなかった( $p>0.05$ )。

樹高						基部直径					
	df	SS	V	F	p		df	SS	V	F	p
系統間	5	52316.2	10463.2	17.6 ***	0.000	系統間	5	3174.5	634.9	17.6 ***	0.000
└組換え-非組換え群間	1	291.4	291.4	0.5 ns	0.494	└組換え-非組換え群間	1	7.2	7.2	0.2 ns	0.661
誤差	15	8895.3	593.0			誤差	15	541.2	36.1		
全体	20	61211.5	3060.6			全体	20	3715.7	185.8		

別紙9 隔離ほ場における遺伝子組換えユーカリアのアレロパシー活性

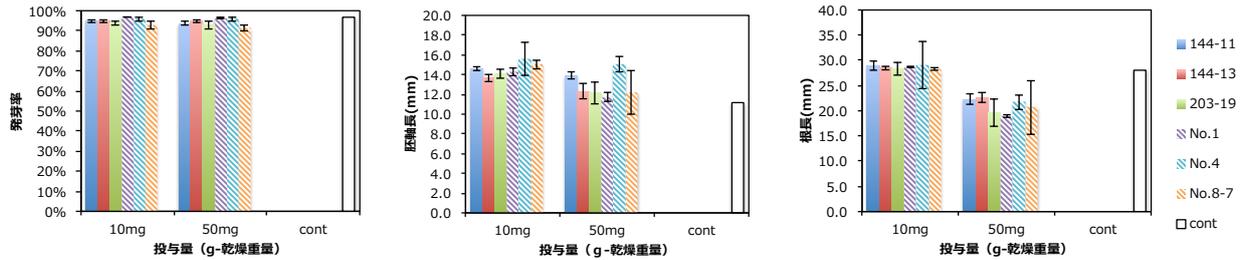


図1 隔離ほ場栽培した遺伝子組換えユーカリから採取した葉のアレロパシー活性の評価  
 2011年11月より隔離ほ場栽培している組換えユーカリ3系統(144-11、144-13、203-19)、非組換えユーカリ3系統(No.1、No.4、No.8-7)から葉を採取し、乾燥後、10mgあるいは50mgを寒天培地中に挟みこみ、検定植物(レタス)種子を播種し、暗黒下における発芽率および実生の胚軸長および根長によりアレロパシー活性を評価した。コントロール(cont)は寒天培地に播種した検定植物のデータを示す。

表1 隔離ほ場栽培した遺伝子組換えユーカリから採取した葉のアレロパシー活性の分散分析  
 図1で示した各系統の葉を挟み込んだ寒天培地に播種した検定植物の発芽率、胚軸長および根長の測定値をもとに分散分析を行った。その結果、いずれの実験区においても、系統間および組換え-非組換え群間に有意な差異は認められなかった( $p>0.05$ )。

10 mg, 発芽率						10 mg, 胚軸長						10 mg, 根長								
系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p			
組換え-非組換え群間	1	80.9	80.9	1.32	ns	0.270	組換え-非組換え群間	1	2.4	2.4	2.65	ns	0.126	組換え-非組換え群間	1	0.0	0.0	0.00	ns	0.946
誤差	14	860.2	61.4				誤差	14	12.9	0.9				誤差	14	69.6	5.0			
全体	20	1450.2	72.5				全体	20	20.3	1.0				全体	20	71.3	3.6			

50 mg, 発芽率						50 mg, 発芽率						50 mg, 発芽率								
系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p			
組換え-非組換え群間	1	80.9	80.9	1.55	ns	0.233	組換え-非組換え群間	1	0.6	0.6	0.17	ns	0.683	組換え-非組換え群間	1	17.6	17.6	1.13	ns	0.305
誤差	14	728.9	52.1				誤差	14	46.4	3.3				誤差	14	218.1	15.6			
全体	20	1366.1	68.3				全体	20	70.1	3.5				全体	20	261.6	13.1			

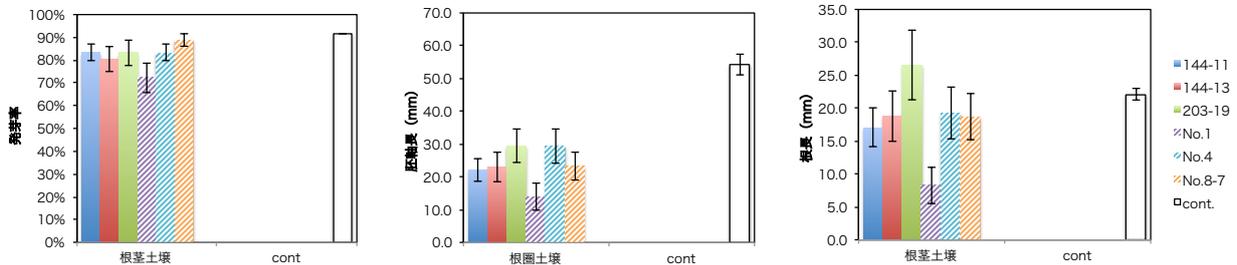
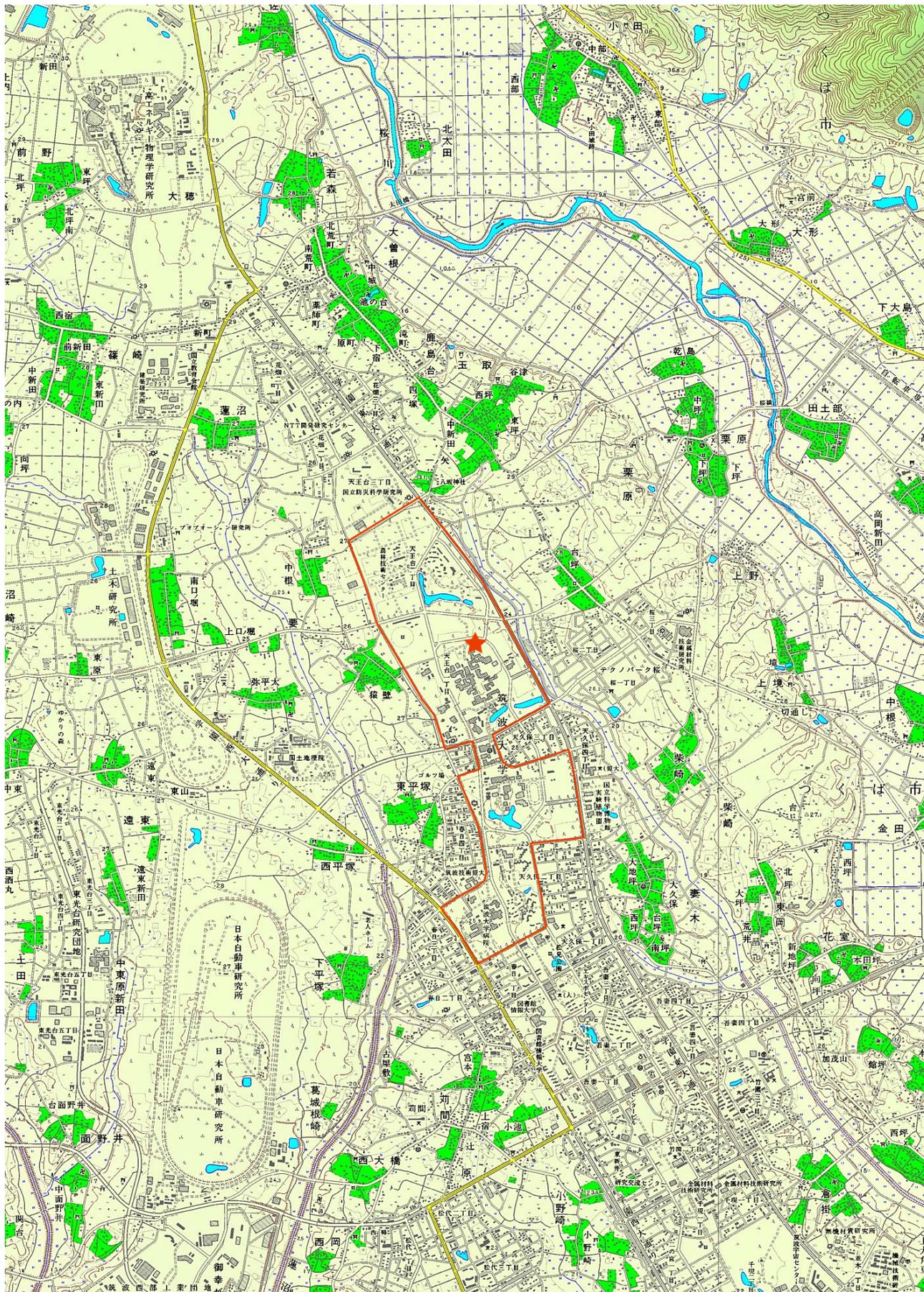


図2 隔離ほ場栽培した遺伝子組換えユーカリ根圏土壌のアレロパシー活性の評価  
 2011年11月より隔離ほ場栽培している組換えユーカリ3系統(144-11、144-13、203-19)、非組換えユーカリ3系統(No.1、No.4、No.8-7)の根圏から土壌を採取し、検定植物(レタス)種子を播種し、暗黒化における発芽率および実生の胚軸長および根長によりアレロパシー活性を評価した。コントロール(cont)は培養土に播種した検定植物のデータを示す。

表2 隔離ほ場栽培した遺伝子組換えユーカリ根圏土壌のアレロパシー活性の分散分析  
 図2で示した各系統の根圏土壌に播種した検定植物の発芽率、胚軸長および根長の測定値をもとに分散分析を行った。その結果、いずれの実験区においても、系統間および組換え-非組換え群間に有意な差異は認められなかった( $p>0.05$ )。

発芽率						胚軸長						根長								
系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p	系統間	df	SS	V	F	p			
組換え-非組換え群間	1	0.0008	0.0008	0.05	ns	0.818	組換え-非組換え群間	1	64.9	64.9	0.53	ns	0.472	組換え-非組換え群間	1	263.2	263.2	3.02	ns	0.093
誤差	30	0.4306	0.0144				誤差	30	3673.0	122.4				誤差	30	2614.7	87.2			
全体	35	0.5208	0.0149				全体	35	4666.1	133.3				全体	35	3642.2	104.1			

別紙 10 筑波大学周辺地形図

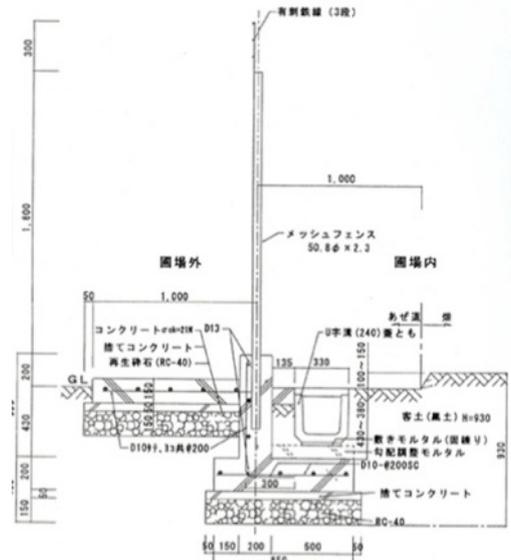


日本地図センター彩色地形図 (<http://net.jmc.or.jp/saishiki/index.asp>) より転記を改変。赤線で囲まれた領域が筑波大学（筑波キャンパス）を示す。★は植栽試験に用いる隔離ほ場の場所を示す。

別紙 11 屋外特定区画概略



i) 遺伝子実験センター隔離ほ場周辺図



ii) 隔離ほ場フェンス基礎断面図



iii) ほ場の全体図と区画の配置 (区画1～6を利用して栽培予定)



iii) 模擬的環境試験ほ場II(隔離ほ場II)の全景(2013年3月12日)