

除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar*, *barstar*, *Brassica napus* L.）(RF3, OECD UI :ACS-BN00 3-6) 申請書等の概要

| | |
|---|----|
| 第一種使用規程承認申請書 | 1 |
| 生物多様性影響評価の概要 | |
| 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 | 2 |
| 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 | 2 |
| (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 | 4 |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 | 8 |
| (1) 供与核酸に関する情報 | 8 |
| (2) ベクターに関する情報 | 15 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 | 16 |
| (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 | 19 |
| (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 | 22 |
| (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 | 22 |
| 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 | 26 |
| (1) 使用等の内容 | 26 |
| (2) 使用等の方法 | 26 |
| (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 | 27 |
| (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 | 27 |
| (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 | 27 |
| (6) 国外における使用等に関する情報 | 27 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 | 29 |
| 1 競合における優位性 | 29 |
| 2 有害物質の産生性 | 31 |
| 3 交雑性 | 32 |
| 4 その他の性質 | 33 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価 | 37 |
| 参考文献 | 41 |
| 別添資料の内容 | 41 |
| 緊急措置計画書 | 42 |

第一種使用規程承認申請書

平成16年8月18日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ローレンス ユー 印
住所 東京都港区高輪4-10-8

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 | 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ (改変 <i>bar, barstar, Brassica napus</i> L.) (RF3, OECD UI : ACS-BN003-6) |
| 遺伝子組換え生物等の第一種 使用等の内容 | 食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、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 | |

生物多様性影響評価の概要

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

イ 和名、英名及び学名

和名： セイヨウナタネ

英名： Oilseed Rape

学名： *Brassica napus* L.

ロ 宿主の品種名

宿主の品種は油糧用セイヨウナタネ Drakkar である。Drakkar はフランスの春播き用 “00 品種” (種子中のエルシン酸及びグルコシノレートの含有量の少ない品種で “double low” と称される。) として品種登録されている (文献 8)。

ハ 国内及び国外の自然状況における自生地域

セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *B. rapa* (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ等) とキャベツなどが属する *B. oleracea* との交雑の結果できた複二倍体種である (文献 94)。原産地は交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパと考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (文献 38)。セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている (文献 60)。

セイヨウナタネは、肥培管理が行われなくても道路沿い、空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国では北海道や本州で河原や線路沿いに群生するセイヨウナタネが確認されている (文献 82)。また、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。実際に(財)自然環境研究センター、独立行政法人農業技術研究機構(現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構)及び独立行政法人食品総合研究所が平成 14 年 5 月から平成 16 年 3 月にかけて行った調査では、ナタネの輸入港である茨城県鹿島港周辺で運搬の途中にこぼれ落ちたと見られるセイヨウナタネの生育が観察された (文献 58)。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

セイヨウナタネとその近縁作物の使用等の歴史は古く、紀元前 2000～1500 年の古代インドの記述や、紀元前 500～200 年のギリシャ、ローマ及び中国の記述に記されている（文献 22）。また、ヨーロッパでのほ場規模での栽培は 13 世紀にベルギーで始まったとされている（文献 94）。

アジア及びヨーロッパにおいては、古くからセイヨウナタネや *B. rapa* 等の種子から油が搾られ、灯火用として広く使用されていた（文献 80）。また、ヨーロッパでは蒸気機関の潤滑油として使用されるようになり、このことがヨーロッパでのセイヨウナタネ栽培の進展を促したといわれている。さらに、第二次世界大戦時に、カナダは軍艦の蒸気機関の潤滑油を補給する目的で栽培を始めた（文献 94）。

元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが報告されているエルシン酸（文献 83）や家畜の甲状腺肥大効果のあるグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られており、食用や飼料としては不向きであると考えられていた。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種が育成されるに至り、現在ではサラダ油、ショートニング、マーガリン等の食用油として広く利用され、また搾油粕は家畜飼料として利用されている（文献 38,94）。

我が国においては古くから *B. rapa* が栽培され、江戸時代には燈油や食用油の原料として大規模に栽培されていた。一方、セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入されて栽培されるようになり、*B. rapa* よりも耐病性に優れ、多収で油分含量も多いことから全国に広がり、搾油用の *B. rapa* の栽培は少なくなっていく（文献 87）。

しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネ栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりやより収入の多い工業への農民の就労のため、急速に衰退し、現在は搾油のために商業的に栽培されることは殆どない（文献 38）。なお、近年、菜の花の景観植物としての利用や、化石燃料の代替燃料としてナタネ油を利用しようとする動きが見られる。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

セイヨウナタネは、*B. rapa* に比べて耐寒性は劣るが耐病性及び収量性に優れており、西部・中部ヨーロッパ、日本、韓国のように寒さが極端には厳しくない肥沃な土地で栽培されている（文献 94）。我が国では、以前は水田裏作のために移植栽培が主流であったが、今日では労働生産性の高い直播栽培が一般的である（文献 38）。

2003 2004 年のナタネの世界総生産量は 3876 万 t (概算)であり、主な生産国は、中国 (1100 万 t)、EU (951 万 t)、カナダ (677 万 t)、インド (650 万 t)であった (文献 1)。

主な輸出国はカナダ (360 万 t)とオーストラリア (125 万 t)で、全世界輸出量の約 82%を占める。我が国には 2003 年に 208 万 t が輸入され、主な輸入先はカナダ (166 万 t)、次いでオーストラリア (37 万 t)である (文献 1)。また、2003 年に我が国はナタネ油を 1.7 万 t、油脂原料としてナタネ種子を 208.4 万 t、さらに、飼料用の油粕を 2 万 t 輸入している (文献 59)。

なお、現在世界で栽培されるナタネ全体のうち 18%が遺伝子組換え技術により除草剤耐性が付与されたナタネである (文献 39)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは休眠の打破、抽苔の開始、花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられる (文献 38)。春播き品種の生育適温は 12~30 である (文献 60)。また、セイヨウナタネは他の作物に比べ酸性土に強く、耐湿性も強いが、重粘土や砂質で乾燥のはなはだしい土壌は適さない。発芽時には過湿を嫌うが、生育時には多くの水分が必要である。我が国では、品種を選ぶことによりどこでも栽培可能である (文献 80)。

ハ 捕食性又は寄生性

二 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

セイヨウナタネは 1 つの莢の中に多数の種子ができ、種子が成熟して乾燥した莢は莢柄の部分より裂開して種子を放出する (文献 80)。乾燥した莢は、わずかな物理的刺激により裂開し種子を飛散させやすい (文献 38)。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

種子の休眠性は、秋播き品種、春播き品種にかかわらず比較的浅いことが知られているが、暗所での水分ストレスや酸素欠乏（文献 66）など発芽に不適な環境下では二次休眠（secondary dormancy）が誘発されることがある。二次休眠とは、発芽しうる状態になった後で発芽に不適な環境にしばらくおかれた場合、新たに誘導される休眠である（文献 55）が、その程度は品種や種子の貯蔵期間・条件などで異なる（文献 65,67）。また、二次休眠性の高い品種を用いた実験では、5 や 10 の低温に比べ、20 程度の比較的高い温度条件で休眠が誘発されやすいことが確認されている（文献 28）。これらの獲得された休眠性は、2~4 の低温条件（文献 28）、変温条件（文献 67）などによって覚醒されるが、地中深く鋤込まれた種子は休眠状態のまま長期間生存し続けることが知られている。一方、地表の種子では二次休眠は誘発されないことから、二次休眠によるセイヨウナタネの雑草化を防止する耕種方法が明らかにされている（文献 67）。

セイヨウナタネの種子の寿命は比較的長いが、採種条件や保存条件によって異なることが知られている。後熟後に乾燥状態で貯蔵した場合には 6 年を経過しても 80%以上の発芽率を示すが、未熟種子では発芽力の低下が早く、室内に放置すると 3 年目には発芽力がなくなる（文献 62,81）。また、貯蔵中の種子の寿命には特に相対湿度が影響し、相対湿度 70~80%の条件では 100~120 日で発芽力を失うが、20%程度の乾燥状態では 30 の高温でも約 4 年を経過しても 80%以上の発芽率を保っている（文献 81）。

栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

セイヨウナタネは種子繁殖を行い、自然条件下において他の器官からの繁殖は観察されない。

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自殖によって種子を作ることが多い。風媒や虫媒による他殖率は 5~30%と報告されている（文献 37,60,68）。我が国での試験結果でも、栽植状況や距離で異なるが、平均して 27%程度の他殖率が認められている（文献 89）。

我が国に分布する近縁種のうち、セイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*（カラシナ、タカナ、ザーツアイ等）、*B. nigra*（クロカラシ）及び *Raphanus raphanistrum*（セイヨウノダイコン）が挙げられる。*B. rapa* は栽培由来の外来種で、我が国では古くから栽培種として利用されており（文献 45）、雑草性の亜種あるいは変種の形成は報告されていない（文献 88）。現在では、耕作地の

周囲などに比較的小さな群落が見られるほか、景観作物としても利用され、河川敷の公園などには大きな群落の形成が見られる(文献 53)。 *B. juncea* も外来種であり、我が国では古くから栽培種として利用されてきた(文献 45)。しかし、戦後広まったものはそれとは別に、ヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている(文献 57)。 *B. nigra* は明治時代以降に我が国に帰化した外来種(文献 56)で、北海道から九州に分布し、ハーブとして栽培されているが、ときに野生化している(文献 57,82)。 *R. raphanistrum* も近年になって我が国に帰化した外来種で、昭和初期に横浜市で確認され(文献 36)、現在では北海道から九州に分布している(文献 57)。

セイヨウナタネと *B. rapa* については、種間雑種が形成されるという報告がある(文献 4,81)。英国で行われたモニタリング調査において、商業用セイヨウナタネ栽培ほ場付近に自生する *B. rapa* から採種した結果、芽生えた苗のうち、雑種は 0.4~1.5% (文献 78) 又は 0.2% (文献 99) であったと報告されている。また、除草剤耐性セイヨウナタネの商業栽培ほ場付近で採取した *B. rapa* の集団から 13.6% の雑種が、また、*B. rapa* とセイヨウナタネを混在して栽培した場合、6.5~7.1% の雑種が報告されている(文献 97)。我が国で両者の交互畦栽培を行い同時開花部分に結実した種子を調査したところ、*B. rapa* では 2%、他方、セイヨウナタネでは 10% の雑種を生じたと報告されている(文献 63)。

セイヨウナタネと *B. juncea* は交雑和合性があり、栽培条件下で種間雑種を生ずることが報告されている(文献 4,5,25,43)。栽培条件下での交雑率に関して、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合は 0.3~1.1% (文献 5)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合には 3% (文献 42) の雑種形成が報告されている。

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった(文献 5)。さらに、人工交配によっても殆ど雑種は得られないか(文献 4)、または全く得られなかったことが報告されている(文献 7,44)。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを 1:600 の割合で栽培した場合、0.05% (95%信頼限界: 0.006~0.2%) の雑種形成が報告されている(文献 14)。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀(文献 73,97)であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群から、セイヨウナタネとの雑種は確認されなかった(文献 90)。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

セイヨウナタネは一花あたり約6~7万粒の花粉を生産する。花粉は黄色で、三つに縦にくびれた楕円形をしている。大きさはおよそ長径39~36 μm 、短径22~20 μm である(文献26,81)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある(文献60)。

セイヨウナタネの花粉は風又は主にミツバチなどの昆虫により媒介される(文献60,64,91,93,100)。風媒による花粉の移動距離については、花粉トラップを用いた調査において、花粉源となる作物から3m以内で花粉量はおよそ半減し(文献48)、10m以上では90%減少する(文献54)と報告されている。また、ミツバチは通常巣の周辺の植物間を移動するが(文献72)、巣から2km離れた地点までミツバチの集団を確認していること(文献69)や、除草剤耐性セイヨウナタネを用いて行った調査において、実際に1~2km地点で0.2%、2.5~3km地点で0.15%の交雑率が報告されている(文献74)ことから、セイヨウナタネの商業栽培が大規模に行われているような地域においては、虫媒による花粉の拡散は広範囲に及ぶ可能性が示唆される。

セイヨウナタネの花粉は長期間発芽力を有することが知られている。花粉の寿命は相対湿度など貯蔵条件によって変わるが、室内に1週間放置したものでも寒天培地上で70%程度の発芽率を示し、その後急激に減少することが観察されており(文献62,81)、自然条件下では4~5日間で徐々に減少するとされる(文献70)。

ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはエルシン酸とグルコシノレートが比較的高い濃度で含まれている。エルシン酸は13位にシス二重結合を持つ不飽和脂肪酸で実験動物において心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが知られている(文献83)。また、グルコシノレートは甲状腺肥大を引き起こすことが知られている(文献94)。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートである品種が育成された結果、食用油として、また搾油粕は飼料用として用いられるようになった(文献38,94)。なお、精油中のエルシン酸含量が2%未満でグルコシノレート含量が油粕1g当たり30 μmol 未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており(文献61)、宿主品種のDrakkarもカノーラ品種の一つである。

ト その他の情報

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

除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変 *bar*, *barstar*, *Brassica napus* L., RF3, OECD UI :ACS-BN003-6)(以下、「組換えセイヨウナタネ RF3」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を表 1(p.9) に示した。

なお、*Streptomyces hygroscopicus* から得た野生型の *bar* 遺伝子は、植物で使用頻度の高いコドンに適合するように GTG ATG に、また、翻訳の効率を上げるために AGC GAC に改変した。GTG ATG の改変では実際に翻訳されるアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC GAC の改変により、セリンからアスパラギン酸に変化している。しかし、本改変によって改変 *bar* 遺伝子産物である PAT 蛋白質(以下、「改変 PAT 蛋白質」とする。)の機能に変化はないことが確認されている(文献 98)。

改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の塩基配列を図 1 及び図 2(p.10)に示した。また、供与核酸全体の塩基配列は別添資料 3 (p.3) に示した。

表 1 構成要素の由来及び機能

| 構成要素 | サイズ (kbp) | ベクター中 の位置 | 由来及び機能 |
|--------------------------|--------------|--------------|---|
| <i>barstar</i> 遺伝子発現カセット | | | |
| PTA29 | 1.51 | 4763-3254 | <i>Nicotiana tabacum</i> 由来の薬特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、薬のタペート細胞においてのみ発現を誘導する (文献 79)。 |
| <i>barstar</i> | 0.27 | 3253-2981 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビター (以下、「BARSTAR 蛋白質」とする。) を産生する。BARSTAR 蛋白質は <i>barnase</i> 遺伝子産物であるリボヌクレアーゼ (以下、「BARNASE 蛋白質」とする。) と特異的に結合し、その活性を阻害する (文献 31)。 |
| 3'nos | 0.26 | 2919-2659 | pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる (文献 18)。 |
| 改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット | | | |
| PSsuAra | 1.73 | 2608-883 | <i>Arabidopsis thaliana</i> に由来し、rubisco 小サブユニット遺伝子のプロモーターで緑色組織においてのみ発現を誘導する (文献 47)。 |
| 改変 <i>bar</i> | 0.55 | 882-331 | <i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する (文献 92) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドン GTG と AGC は、ATG と GAC にそれぞれ置換されている。 |
| 3'g7 | 0.21 | 309-98 | pTiB6S3 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる (文献 20,96)。 |
| その他 | | | |
| LB | 0.02 | 4809-4833 | pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界 |
| RB | 0.02 | 1-25 | pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界 |
| Sm/Sp | 1.01 | 5393-6403 | <i>Escherichia coli</i> に由来し、ストレプトマイシン / スペクチノマイシン耐性を付与する aminoglycoside adenylyltransferase (<i>aadA</i>) をコードする領域 (文献 24)。 |
| <i>barstar</i> | 0.27 | 6754-7026 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビターをコードする。BARSTAR 蛋白質は <i>barnase</i> 遺伝子産物であるリボヌクレアーゼと特異的に結合し、その活性を阻害する (文献 31)。 |
| pVS1ori | 3.77 | 7374-11145 | <i>Pseudomonas sp.</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む領域 (文献 40)。 |
| pBRori | 1.06 | 11146-12209 | <i>Escherichia coli</i> 由来のプラスミド pBR322 の複製起点を含む領域 (文献 6)。 |

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

社外秘情報につき非開示

図1 改変 *bar* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

図2 *barstar* 遺伝子の塩基配列

□ 構成要素の機能

目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

組換えセイヨウナタネ RF3 の作出に用いられた供与核酸の構成要素それぞれの機能は、表1 (p.9) に示した。

目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

【改変 PAT 蛋白質】

作物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、作物は枯死に至る。

導入された改変 *bar* 遺伝子が産生するホスフィトリシン・アセチル基転移酵素（改変 PAT 蛋白質）は、グルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても作物が枯死しない（図3, p.13）。

改変 PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない（文献 92）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、改変 PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻

害されることはなかった（文献 98）。これらのことから、改変 PAT 蛋白質がグルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられる。

【BARSTAR 蛋白質】

BARSTAR 蛋白質は、細菌の *Bacillus amyloliquefaciens* から単離された *barnase* 遺伝子産物である BARNASE 蛋白質（リボヌクレアーゼ）の細胞内阻害物質である（文献 29；32）。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合複合体を形成し、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性を完全に阻害する（文献 30, 32, 85）。プロモーターPTA29 の支配下にある *barnase* 遺伝子から産生される BARNASE 蛋白質は、薬のタペート細胞において RNA を分解して細胞を破壊することにより、雄性不稔形質を発現する。この雄性不稔形質の組換えセイヨウナタネ RF3 による稔性回復のメカニズムを図 4（p.14）に図示した。

一代雑種品種（F1 品種）は、固定品種に比べて強健で生産力が高く、斉一性に優れるといった特長をもつ（文献 46）が、セイヨウナタネのように自殖可能な作物では、通常、確実に F1 雑種を得ることは困難である。そこで、薬のタペート細胞で特異的に発現し花粉形成を阻害するように *barnase* 遺伝子（文献 50）を導入したセイヨウナタネ {除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ（改変 *bar*, *barnase*, *Brassica napus* L., MS8, OECD UI :ACS-BN005-8）（以下、「組換えセイヨウナタネ MS8」とする。）} を雌株として、稔性回復形質を有する組換えセイヨウナタネ RF3 を雄株として交配させることにより、確実に F1 種子を得ることができる。その F1 世代では、BARSTAR 蛋白質が BARNASE 蛋白質の作用を抑制して稔性を回復させる（文献 51）ため、自殖で高収量の種子生産が可能となる。

【改変 PAT 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質の毒性及びアレルギー性】

改変 PAT 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質のアミノ酸配列について、既知のアレルゲンとの相同性を SwissProt、PIR 及び HIV-AA の各データベースを用いて検索した。また、より短いアレルゲンエピトープ検索（8 個ずつの短いアミノ酸配列）を行った。その結果、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 PAT 蛋白質】

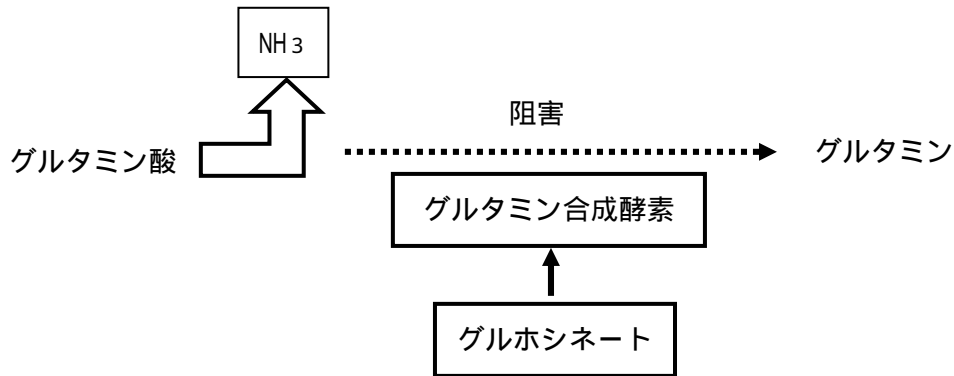
改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており（文献 92）、グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い。よって、宿主の持つ代謝経路へ影響はないと考えられる。

【BARSTAR 蛋白質】

BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合複合体を形成し、その複合体の安定性は高い（文献 49,52）。また、細菌と糸状菌のリボヌクレアーゼには、構造及び配列にかなりの相同性が認められているため、これらの酵素についても BARSTAR 蛋白質と相同の阻害物質が存在すると期待されるが、このような阻害物質が知られているのは *Bacillus intermedius* によって産生されるリボヌクレアーゼ BINASE 蛋白質のみである。BINASE 蛋白質は BARNASE 蛋白質と高い相同性（85%）を有し、BARSTAR 蛋白質に阻害される（文献 101）。また、BARNASE 蛋白質とのアミノ酸配列の相同性は 20～25%に過ぎないが、類似の立体構造を有する *Streptomyces* の細胞外リボヌクレアーゼ（文献 35）も BARSTAR 蛋白質で阻害されることが報告されている（文献 33）。しかし、植物中のリボヌクレアーゼに対する BARSTAR 蛋白質の阻害作用は報告されていない。なお、BARSTAR 蛋白質はヒト又は動物のリボヌクレアーゼとは結合しないことが報告されている（文献 31,32,35,85）。以上から、BARSTAR 蛋白質が宿主のもつ代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

A) 通常の植物

除草剤グルホシネートによってグルタミン合成酵素が阻害されるため、アンモニアが蓄積し植物は枯死する。



B) 組換え体植物

改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネートがアセチル化されて N-アセチルグルホシネートになるため、グルタミン合成酵素は阻害されないようになり、アンモニアが蓄積されず植物は成長を続けることができる。

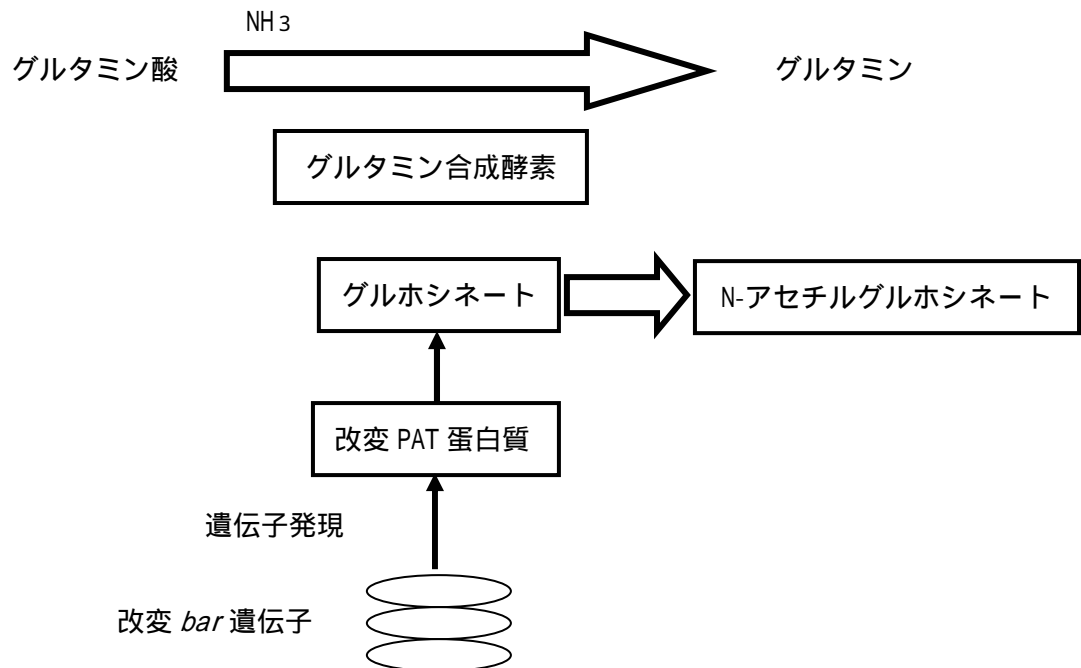


図3 改変 *bar* 遺伝子産物による除草剤グルホシネート耐性のメカニズム
(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

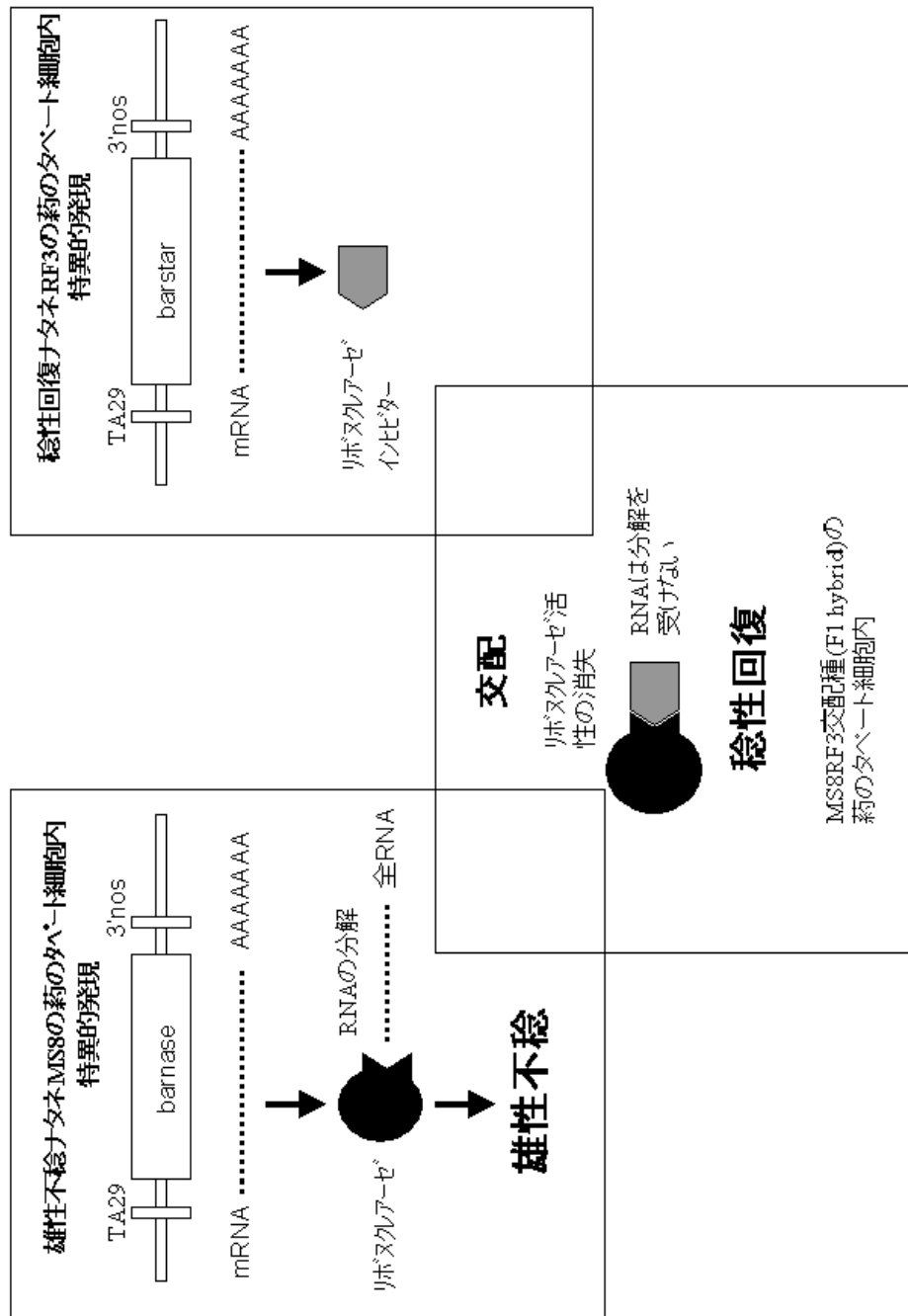


図4 *barstar* 遺伝子産物による稔性回復のメカニズム
雄性不稔組換えセイヨウナタネ MS8 を雌株、組換えセイヨウナ
タネ RF3 を雄株として交配させた場合。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

組換えセイヨウナタネ RF3 の作出に用いられたベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の pGSV1 を基礎として構築された、バイナリー-Ti プラスミドベクター pTHW118 である (文献 15)。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pTHW118 の塩基数は 12,508bp である。プラスミド地図を図 5 に、全塩基配列を別添資料 6 に示した。

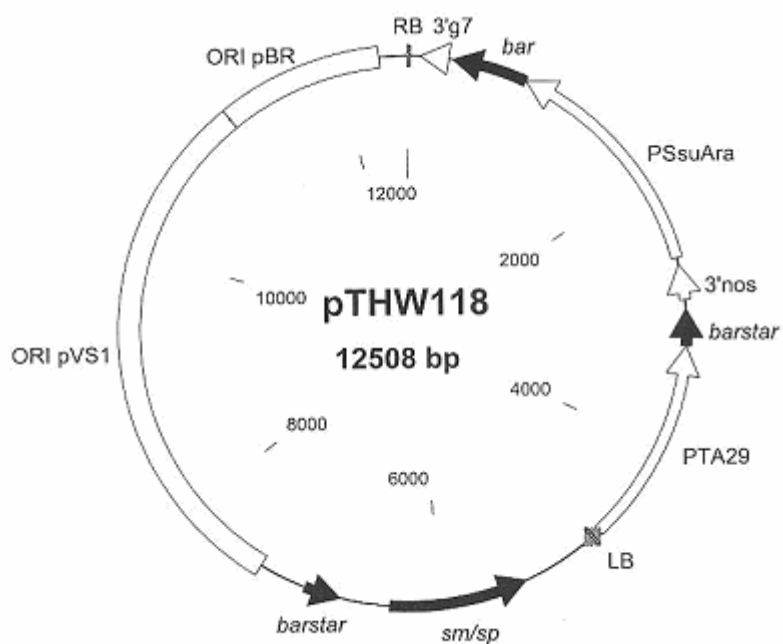


図 5 pTHW118 プラスミド地図

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド pTHW118 は T-DNA 領域の外側にストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sm/Sp)、*barstar* 遺伝子、pBRori 及び pVS1ori を有する。Sm/Sp 遺伝子はベクターの選抜マーカーとして利用されたが、細菌でのみ発現し、植物細胞中では発現しない (文献 16,95)。また、*barstar* 遺伝子は、本プラスミドを構築するために利用した基本となるプラスミド pGSV1 に存在していたものであり、pBRori 及び pVS1ori はそれぞれ大腸菌及び緑膿菌において自律的複製を行わせる複製起点である。なお、これらはいずれも T-DNA 領域の外側に位置しており、セイヨウナタネゲノムには挿入されていない。このことは、各配列を含む領域をカバーする 3 つのプロープを用いたサザンブロット分析により確認されている (別添資料 7)。

ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

プラスミド pTHW118 は自律増殖可能な宿主域が *Agrobacterium tumefaciens* や *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、植物体では感染性を持たない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

組換えセイヨウナタネ RF3 の作出には、ベクター上の LB と RB の間に、稔性回復形質を付与するための *barstar* 遺伝子発現カセットと除草剤グルホシネート耐性形質を付与するための改変 *bar* 遺伝子発現カセット (PTA29-*barstar*-3'nos-PSsuAra-改変 *bar*-3'g7) を組み込んだプラスミド pTHW118 を用いた。

ベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向は図 5 (p.15) に示した。また、制限酵素による切断部位は図 6 (p.17) に示した。

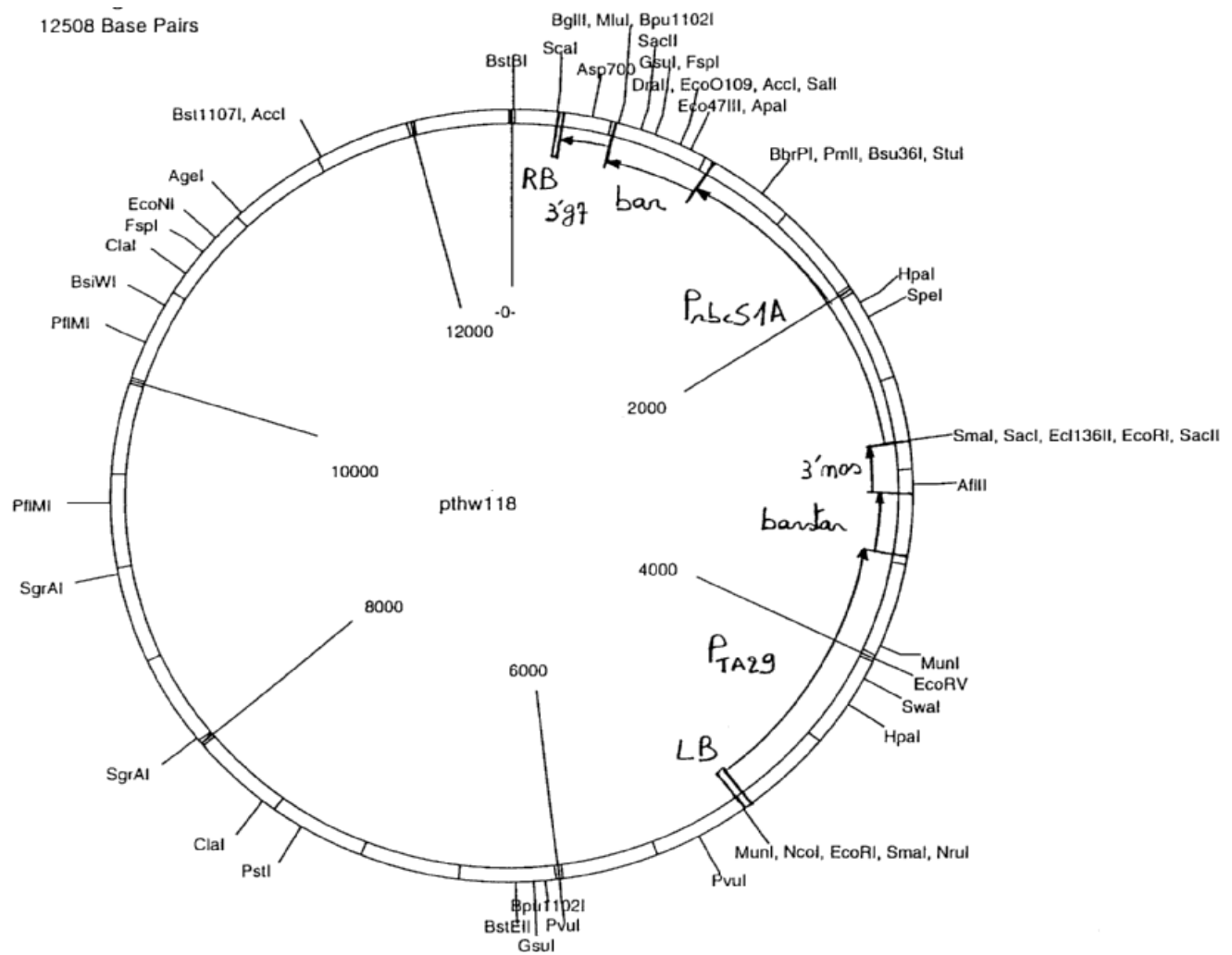


図6 制限酵素切断部位

図中の bar は改変 *bar* 遺伝子、PrbcS1A は PSsuAra を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への遺伝子の導入は、アグロバクテリウム法（文献 17）によって行った。プラスミド pTHW118 を保持した *E. coli* MC1061 株、伝達性を司るヘルパープラスミド pRK2013 を保持する *E. coli* HB101 株、非腫瘍形成性の *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R 株を共存させ、プラスミド pTHW118 を持つ *A. tumefaciens* C58C1Rif^R 株を作出した後、宿主の胚軸組織片に感染させ、pTHW118 上の RB 及び LB で挟まれた T-DNA 領域をセイヨウナタネゲノムに組み込ませた（文献 21）。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換された胚軸組織片を除草剤グルホシネートを含む培地上で培養し、除草剤グルホシネートに耐性を示した細胞を選抜した。さらに、ホルモンフリーの培地上に移して植物体を再生させた（文献 17）。

核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無

アグロバクテリウムによる形質転換後、500mg/L の Carbenicillin を培地中に加えてアグロバクテリウム菌体を除去した（文献 17）。

核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過及び系統樹

形質転換後、再生させた植物体について、さらに、除草剤グルホシネート耐性形質及び稔性回復形質、また、農業形質等に関して総合的に選抜し、組換えセイヨウナタネ RF3 を作出した。組換えセイヨウナタネ RF3 の系統樹を図 7 (p.19) に示した。

なお、我が国における組換えセイヨウナタネ RF3 の承認状況は以下の通りである。

【食品安全】

1999 年 12 月に厚生省（現 厚生労働省）より組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針に基づき、食品利用としての安全性の指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経て、2001 年 3 月に厚生労働省より食品利用としての安全性が確認された。

【飼料安全】

1999年2月に農林水産省より組換え体利用飼料の安全性評価指針に基づき、指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する手続きを経て、2003年3月に農林水産省より飼料利用としての安全性が確認された。

【環境安全】

1998年に農林水産省より農林水産分野における組換え体利用のための指針に基づき、隔離ほ場試験の承認を得た。また、2002年11月に農林水産省より農林水産分野等における組換え体の利用のための指針に基づき、我が国への輸入（加工用及び飼料用としての利用）について指針への適合性が確認された。

社外秘情報につき非開示

図7 組換えセイヨウナタネ RF3 の系統樹

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

組換えセイヨウナタネ RF3 の遺伝子導入当時は挿入遺伝子座に関してヘテロ接合体であることが想定されるため、自殖した S1 世代では除草剤グルホシネートに対して理論上、耐性個体：感受性個体は 3:1 の比率で出現することが期待される。また、耐性個体にはホモ接合体とヘテロ接合体が 1:2 の割合で含まれることが期待される。

組換えセイヨウナタネ RF3 の S1 における除草剤グルホシネート耐性個体の分離を調べた結果、理論上の分離比 3:1 に適合する分離比を示した（表 2, p.20）。また、除草剤グルホシネート耐性を示した S1 世代の各株を自殖して得られた S2 世代株の耐性株数を調査した結果、S2 世代において耐性を示し固定が確認されている S1 個体と、S2 世代において 3:1 に適合する分離比で後代の分離を示す S1 個体がほぼ 1:2 の比率を示した。前者の S1 株は挿入遺伝子座に関してホモ接合体で、後者はヘテロ接合体であると推定される（表 3, p.20）。これらの結果から、組換えセイヨウナタネ RF3 に移入された T-DNA 領域はセイヨウナタネゲノムの染色体上の 1 箇所が存在すると考えられる。

表 2 S1 世代における除草剤グルホシネート耐性株の分離

| 供試植物 | 全供試株数 | 耐性株数 | Chi ² |
|---------|-------|------|-------------------------------|
| S1 世代植物 | 38 | 31 | Chi ² (1/4 感受性) NS |

NS : 有意差なし

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 3 S1 世代の除草剤グルホシネート耐性植物体の自殖により得られた S2 世代における耐性株の分離

| S1 世代 識別番号 | 全供試株数 | 耐性株数 | 推定接合性* |
|------------|-------|------|--------|
| 1 | 51 | 38 | ヘテロ |
| 2 | 54 | 54 | ホモ |
| 3 | 55 | 39 | ヘテロ |
| 4 | 57 | 57 | ホモ |
| 5 | 52 | 44 | ヘテロ |
| 6 | 50 | 50 | ホモ |
| 7 | 45 | 45 | ホモ |
| 8 | 53 | 45 | ヘテロ |
| 9 | 50 | 38 | ヘテロ |
| 10 | 53 | 39 | ヘテロ |
| 11 | 50 | 50 | ホモ |
| 12 | 48 | 48 | ホモ |
| 13 | 53 | 38 | ヘテロ |
| 14 | 50 | 37 | ヘテロ |
| 15 | 52 | 40 | ヘテロ |
| 16 | 52 | 41 | ヘテロ |

* 挿入遺伝子座に関する接合性を推定した。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

□ 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

移入された核酸のコピー数については、サザンブロット分析(別添資料 3, p.6, 表 1; p.9~12, 図 2a~2d) PCR 及びシーケンス解析(別添資料 4)を行った結果、完全な 1 コピーの T-DNA 領域と、改変 *bar* 遺伝子を含まない不完全な 1 コピーの T-DNA 領域が導入されていることが確認された。

また、移入された核酸の伝達の安定性について、組換えセイヨウナタネ RF3 の S1、S3 及び BC1F1 において、T-DNA 領域内に 1 ヶ所の切断部位を持つ制限酵素 EcoRV(図 6, p.17) で切断し、PTA29 をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、いずれの世代でも同一のバンドパターンが認められ、複数世代において挿入遺伝子が安定して伝達されていることが確認された(別添資料 3, p.15, 図 2)。

八 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

組換えセイヨウナタネ RF3 に導入されている 2 コピーの T-DNA の位置関係を確認するため PCR 及びシーケンス解析を行った結果、1 コピーの完全な T-DNA 領域と、不完全な T-DNA 領域が逆向きの反復構造をとって配置していることが明らかになった（別添資料 4）。また、不完全な T-DNA 領域には、途中で切れた PTA29、*barstar* 遺伝子、3'nos 及び機能部分を含まない Pssuara が配置されている。それらの位置関係は図 8 に図示した。

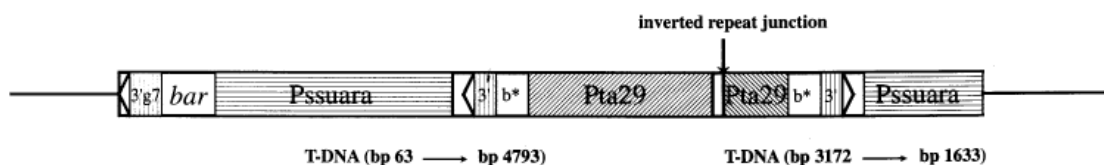


図 8 組換えセイヨウナタネ RF3 に移入された T-DNA 領域全体の構成図

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子、*b** は *barstar* 遺伝子、3'は 3'nos を示す。

（注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。）

二 (6) のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

組換えセイヨウナタネ RF3 の S3 世代の葉、花芽、花粉、乾燥種子について、改変 *bar* 及び *barstar* をプローブとしてノーザンブロット分析を行った。その結果、改変 *bar* mRNA は葉及び花芽で検出されたが、花粉及び乾燥種子では検出限界以下であった（検出限界 0.25pg）。また、*barstar* mRNA は花芽のみで検出された（検出限界 0.5pg）（別添資料 3, p.33）。

また、S1 及び F1 世代を用いて除草剤グルホシネートに対する耐性を調査した結果、いずれの世代でも全ての個体が耐性を示した。よって、改変 *bar* 遺伝子が自然条件下において世代間で安定して発現することが確認された（別添資料 3, p.38, 表 1 ; p.40 ~ 41, 表 95GBN016）。

さらに、組換えセイヨウナタネ RF3、組換えセイヨウナタネ MS8、組換えセイヨウナタネ MS8 と組換えセイヨウナタネ RF3 との交配系統である除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 *bar*, *barnase*, *barstar*,

Brassica napus L., MS8RF3, OECD UI : ACS-BN005-8×ACS-BN003-6)(以下、「組換えセイヨウナタネ MS8RF3」とする。)について、稔性/不稔性に関する分離比の調査を行った。その結果、組換えセイヨウナタネ MS8 ではほぼ 100%の個体が不稔性を示したのに対し、組換えセイヨウナタネ RF3 ではほぼ 100%の個体が稔性を示した。また、組換えセイヨウナタネ MS8RF3 では完全に稔性が回復し、自然条件下における *barstar* 遺伝子の発現の安定性が確認された(別添資料 3, p.36, 表 FBN9501₄)。

以上の結果から、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子は、自然条件下において個体間及び世代間で安定して発現していることが確認された。

ホ ウイルスの感染その他の経路を經由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

組換えセイヨウナタネ RF3 は伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然条件下において野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(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

組換えセイヨウナタネ RF3 に挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 法によって、本イベントを特異的に識別することができる。本識別方法は組換えセイヨウナタネ RF3 の栽培管理に有効に利用されている(別添資料 5)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

組換えセイヨウナタネ RF3 は除草剤グルホシネートに対して耐性を示す。また、*barnase* 遺伝子を有する雄性不稔性の遺伝子組換えセイヨウナタネと交配することにより、F1 雑種における稔性を回復させる。

ロ 以下に挙げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

平成 11 年度に独立行政法人農業技術研究機構 野菜・茶業研究所 野菜育種部で行った隔離ほ場試験において、組換えセイヨウナタネ RF3 と宿主である Drakkar 品種(以下、「非組換えセイヨウナタネ」とする。)を比較し、相違を検討した(別添資料 1)。また、交雑性について調査するため、参考品種として *B. napus* に属する「三重長島菜種」(三重県で現在ナバナとして普及しているセイヨウナタネ) さらに *B. rapa* に属するチンゲンサイの「青帝」を、ミツバチを放飼したハウス内で組換え

セイヨウナタネ RF3 と隣接して栽培した（別添資料 1, p.2, 配置図参照）。また、平成 17 年及び 18 年に我が国の特定網室内において、組換えセイヨウナタネ RF3 の有害物質の産生性を調査した（別添資料 2 及び別添資料 8）。

形態及び生育の特性

抽苔期、開花期、成熟期、草型、葉色、草丈、一次分枝数、着莢数、一穂不稔莢数、着莢率 { 着莢数 / (着莢数 + 一穂不稔莢数) }、一莢胚珠数、結実粒数、結実歩合 (結実粒数 / 一莢胚珠数)、莢長、地上部生体重、地上部乾物重、乾物率、裂莢性、子実収量、千粒重、粒色、子実の粒大整否について、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネを比較した（別添資料 1, p.6~9, 表 2-1~2-5）。

その結果、一莢当たりの結実粒数については、非組換えセイヨウナタネが 17.8 粒であったのに対し組換えセイヨウナタネ RF3 は 15.3 粒で有意差が認められた（別添資料 1, p.8, 表 2-3）。他方、抽苔期、開花期、成熟期、草型、葉色、乾物率、裂莢性、粒色及び子実の粒大整否については、両者の間に相違は認められなかった（別添資料 1, p.6, 表 2-1; p.9, 表 2-4,2-5）。また、草丈、一次分枝数、着莢数、一穂不稔莢数、着莢率、一莢胚珠数、結実歩合、莢長、地上部生体重、地上部乾物重、子実収量及び千粒重については、両者の間に有意差は認められなかった（別添資料 1, p.7, 表 2-2; p.8, 表 2-3; p.9, 表 2-4,2-5）。

生育初期における低温又は高温耐性

平成 17 年度に行われた試験において、自然換気のみで管理されている夏季の特定網室内において、平成 17 年 7 月 27 日に播種し、同年 9 月 21 日に収穫した組換えセイヨウナタネ RF3 及び非組換えセイヨウナタネの植物体の乾物重を比較した結果、有意差は認められなかった（別添資料 2, p.9, 表 8）。よって、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの生育初期における高温耐性は同等であると考えられる。

また、平成 10 年 10 月 6 日に隔離ほ場に播種した組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの越冬性（生存率）は、翌年 3 月 5 日の観察時にはいずれも 100%であった（別添資料 1, p.18, 表 4）。なお、1~2 月の平均気温は約 5 前後であり、最高気温 10、最低気温においては 0 近くまで下がるがあった（別添資料 1, p.20, 気象図 第 1 図）。以上から、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネはいずれも生育初期に低温耐性を示すと考えられる。

成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場で栽培した組換えセイヨウナタネ RF3 及び非組換えセイヨウナタネを平成 11 年 6 月の成熟期以降もほ場に放置して同年 7 月 30 日に観察を行った結果、い

ずれの系統も乾燥し、全ての個体が枯死しており、前年 10 月に播種したいずれの個体にも成体の越夏性は認められなかった（別添資料 1, p.18, 表 4）。

花粉の稔性及びサイズ

花粉の稔性については、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの生存花粉数及び経時的な発芽率の比較により調査した。調査は、改良 Hdgkin 培地(文献 84)を用いて、室温で 2 時間培養し、花粉管が花粉の直径の 2 倍以上に伸長したものを、発芽花粉としてカウントした。その結果、発芽率の経時変化において特に差異はなく、いずれも花粉採取 28 時間後には花粉管の伸長が花粉の直径の 2 倍以上に達するものはなく、花粉の発芽率に差は認められなかった（別添資料 1, p.12, 表 3-1）。よって、花粉の稔性は同等であると考えられる。また、花及び花粉の形状にも相違は見られなかった（別添資料 1, p.13, 図 4; p.14, 図 5）。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する項目として、着莢数、一穂不稔莢数、着莢率、一莢胚珠数、結実粒数、結実歩合（結実粒数/一莢胚珠数）、子実収量及び千粒重について、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネを比較した結果、（形態及び生育の特性）で述べたとおり、結実粒数において組換えセイヨウナタネ RF3 は 15.3 粒、非組換えセイヨウナタネは 17.8 粒であり、組換えセイヨウナタネ RF3 がやや少なく、有意差が認められた（別添資料 1, p.8, 表 2-3）。しかし、その他の項目について有意差は認められなかった（別添資料 1, p.7, 表 2-2; p.8, 表 2-3; p.9, 表 2-4, 2-5）。

組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの裂莢性について、その難易度を 5 段階評価（難 1 ～ 5 易）した結果、両者とも 4（やや易）であったことから、脱粒性は同等と考えられる（別添資料 1, p.9, 表 2-4）。

種子の発芽に関する調査は我が国では行っていないため、ベルギーにおいて行われた試験結果を示した。収穫後に室温で保存された組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの種子各 100 粒をそれぞれ 1m² 区画に播種し、発芽個体数を比較した結果、6 反復の平均値において組換えセイヨウナタネ RF3 が 91 個体、非組換えセイヨウナタネは 89 個体であり、ほぼ同等であった（別添資料 3, p.43, 表 FBN9516₂）。また、この結果から、組換えセイヨウナタネ RF3 は非組換えセイヨウナタネを上回るような休眠性は獲得していないと考えられる。

交雑率

組換えセイヨウナタネ RF3 と隣接して栽培された「三重長島菜種」（セイヨウナタネ）及び「青帝」（*B. rapa*）に除草剤グルホシネート耐性形質が移行するかどうかを

調査した。隔離ほ場のハウス内において、約 2000 匹のミツバチを放飼した条件下でこれらの品種を隣接して栽培し（別添資料 1, p.2, 配置図参照）それぞれ株別に収穫した種子をハウス露地に播種し、第一本葉が半ば展開した時期に除草剤グルホシネートを散布して 4 日後の生存個体数を調べた。なお、ハウス内に放飼したミツバチは四隅まで十分に訪花していることが確認されており、交雑が生じやすい条件であった。

その結果、「三重長島菜種」（セイヨウナタネ）では 1.8~2.0%、「青帝」（*B. rapa*）では 0%の生存率であった（別添資料 1, p.16, 表 3-3,3-4）。セイヨウナタネの他殖率は 5~30%（文献 37,60,68）*B. rapa* とセイヨウナタネの自然条件下における交雑率は 0.4~1.5%（文献 78）等の報告があるが、本試験によって得られた結果は既往の知見を上回るものではなかった。

有害物質の産生性

平成 17 年に特定網室内において、組換えセイヨウナタネ RF3 の根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物に影響を与えるものについては土壤微生物相試験を行った（別添資料 2）。また、鋤込み試験において検定植物であるダイコンの発芽率に差がみられたため、平成 18 年に再度、同特定網室内において鋤込み試験を行なった（別添資料 8）。

【後作試験】

組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネを栽培した土壤に、検定植物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について比較した結果、いずれの項目にも有意差は認められなかった。なお、ダイコンの根長の平均値において、組換えセイヨウナタネ RF3 は 7.3cm、非組換えセイヨウナタネは 5.9cm とやや差がみられたものの、その他の項目でほぼ同等であったことから、根から分泌され他の植物の生育に影響を与えるものの産生性について、組換えセイヨウナタネ RF3 は非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられる（別添資料 2, p.5~7, 表 1~6）。

【鋤込み試験】

組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの植物体乾燥粉末をそれぞれ 1%混和した培土にダイコンの種子を播種して栽培し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重を比較した結果、いずれの項目にも有意差は認められなかった（別添資料 2, p.8~11, 表 10,12,14）。しかし、ダイコンの発芽率の平均値については、組換えセイヨウナタネ RF3 処理区では 59%、非組換えセイヨウナタネ処理区では 86%とやや差がみられることから（別添資料 2, p.9, 表 9）鋤込み試験を再度行な

った。

再試験では、鋤込まれた植物体が他の植物に及ぼす影響を経時的に調査した（別添資料 8）。組換えセイヨウナタネ RF3 及び非組換えセイヨウナタネの植物体乾燥粉末を土壌に混和し、混和直後（0 日後）、1 週間後、2 週間後及び 4 週間後にダイコンの種子を播種し、各処理区におけるダイコンの発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重を比較した。

その結果、発芽率については、1 回目の試験と同じ混和直後の処理区を含むいずれの処理区においても有意差は認められなかった（別添資料 8, p.5~6, 表 4~7）。また、根長（別添資料 8, p.8, 表 10~13）、生重及び乾物重（別添資料 8, p.10, 表 16~19）についても、いずれの処理区においても有意差は認められなかった。他方、草丈については、混和直後は非組換えセイヨウナタネ処理区の方が大きく、1 週間後及び 2 週間後では有意差は認められず、4 週間後においては組換えセイヨウナタネ RF3 処理区の方が大きい値を示した（別添資料 8, p.7, 表 8,9）。このうち、再試験で混和直後にみられた組換えセイヨウナタネ RF3 の草丈の抑制効果は 5%以下であり、同じく混和直後の土壌を用いた 1 回目の試験では有意差は認められなかったこと、さらに、その後の処理区ではいずれも抑制効果が認められていないことから、枯死した後に他の植物に影響を与えるような有害物質の産生について、組換えセイヨウナタネ RF3 は、非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられる。

【土壌微生物相試験】

組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネを約 2 ヶ月間栽培した土壌を採取し、滅菌水で適宜希釈後、細菌及び放線菌については PTYG 培地、糸状菌についてはローズベンガル培地を用いて培養し、それぞれの菌数を比較した。その結果、いずれにおいても有意差は認められなかった（別添資料 2, p.13, 表 16,17）。よって、根から分泌され土壌微生物に影響を与える物質の産生性について、組換えセイヨウナタネ RF3 は、非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられる。

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

食用又は飼料用に供する為の使用、栽培、加工、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

(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

(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為の措置

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

(6) 国外における使用等に関する情報

商業的には、雄性不稔形質を有する組換えセイヨウナタネ MS8 と稔性回復形質を有する組換えセイヨウナタネ RF3 との交配系統である組換えセイヨウナタネ MS8RF3 の種子を用いて国外で生産・収穫された種子を我が国に輸入し、食用又は飼料用として利用している。雄性不稔形質を利用するのは容易に交配種子を得て雑種強勢を利用するためであり、組換えセイヨウナタネ RF3 はこの交配の稔性回復系統親として用いられる。なお、国外における承認状況を表 4 (p.28) に、我が国における組換えセイヨウナタネ RF3、組換えセイヨウナタネ MS8 及び組換えセイヨウナタネ MS8RF3 の承認の状況は表 5 (p.28) にそれぞれ示した。

表 4 国外における承認状況

| 国名 | 承認機関 | 承認時期 | 承認内容 |
|---------|--------------------------|----------|-----------|
| カナダ | カナダ食品検査庁 | 1996年10月 | 規制外確認 |
| | カナダ食品検査庁 | 1996年10月 | 飼料安全確認 |
| | カナダ厚生省 | 1997年3月 | 食品安全確認 |
| 米国 | 米国農務省 | 1999年3月 | 輸入・栽培承認 |
| | 連邦食品医薬品局 | 1998年9月 | 飼料・食品安全確認 |
| オーストラリア | オーストラリア・ニュージーランド食品スタンダード | 2002年5月 | 食品安全確認 |
| | オーストラリア遺伝子テクノロジー規制機関 | 2003年7月 | 環境安全確認 |

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 5 我が国における承認状況

| | 承認機関 | 承認時期 | 承認内容 |
|-----------------------|-------|----------|--------|
| 組換えセイヨウ ナタネ RF3 | 厚生労働省 | 1998年12月 | 食品安全 |
| | 農林水産省 | 1999年2月 | 飼料安全 |
| | 農林水産省 | 1998年7月 | 隔離ほ場試験 |
| | 農林水産省 | 2002年11月 | 環境安全 |
| 組換えセイヨウ ナタネ MS8 | 厚生労働省 | 1998年12月 | 食品安全 |
| | 農林水産省 | 1999年2月 | 飼料安全 |
| | 農林水産省 | 1998年7月 | 隔離ほ場試験 |
| | 農林水産省 | 2002年11月 | 環境安全 |
| 組換えセイヨウ ナタネ MS8RF3 | 厚生労働省 | 1997年12月 | 食品安全 |
| | 農林水産省 | 1998年1月 | 飼料安全 |
| | 農林水産省 | 1997年4月 | 隔離ほ場試験 |
| | 農林水産省 | 1998年7月 | 環境安全 |

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主が属する分類学上の種であるセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、我が国では明治時代から栽培されていたが、昭和 30 年代をピークに栽培が急激に減少し、それに伴い輸入量が増え続け、今日では年間 200 万 t 以上が輸入されている(文献 59)。このように、我が国では長期にわたるセイヨウナタネの使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、宿主と比較して影響が高まっているか否かを考慮することとする。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では北海道や本州で河原や線路沿いでのセイヨウナタネの群生(文献 82)や、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。しかし、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等に影響を及ぼしたとする報告はない。また、セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている(文献 60)。実際に、大規模にセイヨウナタネの商業栽培を行っている英国で行われた調査において、人為的攪乱のない自然条件下では、野生化したセイヨウナタネは 2~4 年で消滅すると報告されている(文献 13)。また、同じく英国で行われた 3 年間にわたるモニタリング調査において、ほ場から逸出して群生したと考えられるセイヨウナタネの個体群は 3 年目にはほぼ消滅したことが報告されている(文献 78)。これらのことを踏まえて、組換えセイヨウナタネ RF3 の競合における優位性に起因する生物多様性影響を評価した。

競合における優位性に関わる形質として、抽苔期、開花期、成熟期、草型、葉色、草丈、一次分枝数、着莢数、一穂不稔莢数、着莢率、一莢胚珠数、結実粒数、結実歩合、莢長、地上部生体重、地上部乾物重、乾物率、裂莢性、子実収量、千粒重、粒色、子実の粒大整否について調査した。その結果、抽苔期、開花期、成熟期、草型、葉色、乾物率、裂莢性、粒色及び子実の粒大整否に相違は認められなかった(別添資料 1, p.6, 表 2-1; p.9, 表 2-4, 2-5)。また、草丈、一次分枝数、着莢数、一穂不稔莢数、着莢率、一莢胚珠数、結実歩合、莢長、地上部生体重、地上部乾物重、子実収量及び千粒重に関して有意差は認められなかった(別添資料 1, p.7, 表 2-2; p.8, 表 2-3; p.9, 表 2-4, 2-5)。結実粒数の平均値は組換えセイヨウナタネ RF3 が

15.3 粒、非組換えセイヨウナタネが 17.8 粒であり、組換えセイヨウナタネ RF3 がやや少なく、有意差が認められた（別添資料 1, p.8, 表 2-3）。結実粒数が少ないことが組換えセイヨウナタネ RF3 の競合における優位性を高めるとは考え難いため、生物多様性に影響を及ぼすような性質ではないと考えられる。

また、生育初期における高温耐性（別添資料 2, p.9, 表 8）及び低温耐性並びに成体の越夏性（別添資料 1, p.18, 表 4）に関して、組換えセイヨウナタネ RF3 及び非組換えセイヨウナタネに相違は認められなかった。

なお、発芽率に関しては我が国の隔離ほ場試験においては調査していないため、ベルギーで行った試験の結果に基づき評価した。収穫後に室温で保存された組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの種子各 100 粒をそれぞれ 1m² 区画に播種し、発芽個体数を比較した結果、6 反復の平均値において組換えセイヨウナタネ RF3 が 91 個体、非組換えセイヨウナタネは 89 個体であり、ほぼ同等であった（別添資料 3, p.43, 表 FBN9516₂）。また、この結果から、組換えセイヨウナタネ RF3 は非組換えセイヨウナタネを上回るような休眠性は獲得していないと考えられた。

組換えセイヨウナタネ RF3 には改変 *bar* 遺伝子により除草剤グルホシネート耐性の形質が付与されているが、この形質は除草剤グルホシネートが散布される環境下においてのみ競合に優位に作用する。しかし、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難いため、本形質を有していても競合における優位性を高めることはないと考えられる。さらに、組換えセイヨウナタネ RF3 は *barstar* 遺伝子により稔性回復形質が付与されている。*barstar* 遺伝子産物である BARSTAR 蛋白質は、*barnase* 遺伝子産物である BARNASE 蛋白質（リボヌクレアーゼ）と 1:1 で特異的に結合してその活性を阻害するため、*barnase* 遺伝子により雄性不稔形質を付与されたセイヨウナタネと交雑した場合にのみ意図された機能を果たすが、そのようなセイヨウナタネが存在しない条件下では何ら機能を果たさず、組換えセイヨウナタネ RF3 の競合における優位性を高めることはないと考えられる。

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（ 2 ） 影響の具体的内容の評価

（ 3 ） 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ず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

組換えセイヨウナタネ RF3 は改変 *bar* 遺伝子産物である改変 PAT 蛋白質及び *barstar* 遺伝子産物である BARSTAR 蛋白質を新たに産生する。改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質である L-グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い(文献 98)。また、BARSTAR 蛋白質については、*barnase* 遺伝子により雄性不稔性が付与されているセイヨウナタネと交雑した場合にのみ、その後代の葯のタペート細胞において BARNASE 蛋白質と 1:1 で結合し、BARNASE 蛋白質の活性を阻害するが、その他に宿主の代謝系に影響して有害物質を産生するとは考え難い。さらに、改変 PAT 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質のアミノ酸配列について、包括的な相同性検索及びアレルゲンエピトープ検索を行なったが、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、組換えセイヨウナタネ RF3 の有害物質の産生性について、根から分泌される他の植物に影響を与えるものについては後作試験、また、植物体が内部に有し、他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験を、検定植物としてダイコンを用いて行った。さらに、根から分泌され土壌微生物相に影響を与えるものについては土壌微生物相試験を行った。その結果、いずれの試験においても組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの間で有意差は認められなかった(別添資料 2)。しかし、鋤込み試験におけるダイコンの発芽率の平均値については、組換えセイヨウナタネ RF3 処理区で 59%、非組換えセイヨウナタネ処理区で 86%とやや差がみられることから(別添資料 2, p.9, 表 9)、再度鋤込み試験を行なった。

再試験では、鋤込まれた植物体が他の植物に及ぼす影響を経時的(植物体混和直後、1 週間後、2 週間後及び 4 週間後)に調査した。その結果、1 回目の試験と同じ混和直後の処理区を含むいずれの処理区においてもダイコンの発芽率には有意差は認められなかった(別添資料 8, p.5~6, 表 4~7)。また、根長(別添資料 8, p.8, 表 10~13)、生重及び乾物重(別添資料 8, p.10, 表 16~19)についても有意差は

認められなかった。他方、ダイコンの草丈については、植物体混和直後は非組換えセイヨウナタネ処理区の方が大きく、1週間後及び2週間後では有意差は認められず、4週間後は組換えセイヨウナタネ RF3 処理区の方が大きい値を示した（別添資料8, p.7, 表8,9）。このうち、再試験で混和直後にみられた組換えセイヨウナタネ RF3 処理区におけるダイコンの草丈の抑制効果は5%以下であり、また、1回目の試験では、混和直後の土壌を用いた非組換えセイヨウナタネ処理区と組換えセイヨウナタネ RF3 処理区のダイコンの草丈に有意差は認められなかったこと、さらに、その後の組換えセイヨウナタネ RF3 処理区ではいずれも非組換えセイヨウナタネ処理区と比較して抑制効果が認められていないことから、枯死した後に他の植物に影響を与えるものの産生性について、組換えセイヨウナタネ RF3 は非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられる。

さらに、組換えセイヨウナタネ RF3 種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含量は、宿主と同等であることが確認されている（別添資料9）。

以上から、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（2）影響の具体的内容の評価

（3）影響の生じやすさの評価

（4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ず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

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* が挙げられる。セ

イヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入された栽培種である。また、*B. rapa* 及び *B. juncea* は我が国において栽培種として古くから利用されているが、栽培由来の外来種である（文献 45）。なお、現在全国的に分布している *B. juncea* は第二次世界大戦後に帰化したものが広がったものと考えられている（文献 57）。さらに、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* は明治以降に人為的影響により我が国に侵入した外来種である。このように、いずれも栽培等に由来する帰化植物と考えられ、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（２） 影響の具体的内容の評価

（３） 影響の生じやすさの評価

（４） 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4 その他の性質

第二、3（交雑性）に挙げた我が国に自生するセイヨウナタネ及びその近縁種はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等としては特定されなかった。しかし、組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種との雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する場合、交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす場合には、間接的な生物多様性影響が生ずる可能性が考えられた。

組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種の雑種後代が自然条件下で優占化していく可能性について、交雑性及び雑種の稔性等に関するデータを基に評価した。なお、セイヨウナタネ及び *B. rapa* は隔離ほ場において組換えセイヨウナタネ RF3 との交雑性試験を行っているため、その結果及び既往の知見に基づき評価した。また、*B. juncea*、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* については組換えセイヨウナタネ RF3 との交雑性試験を行わなかったが、組換えセイヨウナタネ RF3 が非組換えセイヨウナタネと比較し

て高い交雑性を獲得していないことが隔離ほ場試験によって確認され、組換えセイヨウナタネ RF3 とこれらの近縁種との交雑性が非組換えセイヨウナタネとの交雑性を大幅に上回ることはないと推察されることから、既往の知見に基づき考察した。

1) 組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネとの交雑性

隔離ほ場試験における組換えセイヨウナタネ RF3 とセイヨウナタネの交雑率は 1.8~2.0% であり(別添資料 1, p.16, 表 3-3, 3-4) 既往の知見である 5~30%(文献 37, 60, 68)を上回るものではないことが確認された。

2) *B. rapa* との交雑性

隔離ほ場試験において、組換えセイヨウナタネ RF3 と隣接して栽培された *B. rapa* 由来の幼苗のうち、除草剤グルホシネートに耐性を示す個体は認められず、交雑率は 0% であった(別添資料 1, p.16, 表 3-3, 3-4)。セイヨウナタネと *B. rapa* の交雑率については 0.4~1.5% (文献 78)、0.2% (文献 99)、6.5~7.1% (文献 97) 等の報告があるが、本試験の結果はこれらを上回るものではなかった。

また、F1 の生存率は平均で 2% 以下であり(文献 78)、*B. rapa* とセイヨウナタネの雑種の花粉の稔性が平均で 41~53% に減少することが確認されている(文献 41)。さらに、F2 及び BC 世代での適応度についても、品種・集団間に差異があるものの、全体的に低くなると報告されている(文献 34)。

3) *B. juncea* との交雑性

セイヨウナタネとの交雑性に関しては、国外のセイヨウナタネほ場周辺で雑種が発生しているのが確認されている。交雑率は、生育するセイヨウナタネと *B. juncea* の比率に依存し、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合には 0.3~1.1% (文献 5)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を栽培した場合には 3% (文献 42) の雑種形成率が報告されている。しかし、雑種の花粉稔性は 0~28% であり、種子の生産量も少ない(文献 25)。また、セイヨウナタネを雌株として得られた雑種は弱く、生育遅延が認められ、生育段階で死に至ると報告されている(文献 12)。さらに、BC 世代でも同様に初期成育遅延や個体数の減少が報告されている(文献 71)。他方、*B. juncea* を雌株として得られた雑種の栄養生長は旺盛であるが、着莢率、結実粒数、千粒重や子実収量などは劣り、減数分裂に異常が見られ、花粉稔性も 20% 程度に低下する(文献 12)。

4) *B. nigra* との交雑性

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった(文献 6)。さらに人工交配によっても、殆ど雑種は得られないか(文献 4) または全く得られなかったことが報告されている(文献

7,44)。また、雑種が形成されたとしても花粉の稔性は高くても3.1%であり、完全に不稔になるものも報告されている。さらに、F1をセイヨウナタネによって戻し交配した場合の結実率(結実数/授粉した花)は0.9%であり、*B. nigra*によって戻し交配した場合の結実率は0.06%であった。また、これらの種子は萎縮しており、温室内においても発芽しなかった(文献4)。このように、得られた雑種の稔性は低く、F2やBC世代を得るのは難しいと考えられる(文献76)。

5) *R. raphanistrum* との交雑性

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを1:600の割合で栽培した場合、0.05%(95%信頼限界:0.006~0.2%)の雑種形成が報告されている(文献14)。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀(文献73,97)であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群からセイヨウナタネとの雑種は確認されなかった(文献90)。他方、人工交配や胚培養(文献44)あるいは細胞質雄性不稔系統(文献3,23)を用いてセイヨウナタネと *R. raphanistrum* の雑種を作出することができる。しかし、得られた雑種の稔性は著しく低かったことが報告されている(文献3,23,44)。

また、除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネを用いた試験では、*R. raphanistrum* の連続戻し交配によって、雑種後代の稔性は次第に回復するが、染色体数の減少とともに耐性個体の頻度は減少し(文献9,10,11)、耐性個体では染色体不安定性が著しい(文献2)ことから、耐性遺伝子は *R. raphanistrum* のゲノムに移入していないと考えられている(文献19,75)。さらに、細胞質不適合性による適応度低下も著しいことが確認されている(文献27)。

以上から、組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種が交雑し、自然環境下で戻し交配を繰り返し、個体群中に雑種後代が浸透していく可能性は、宿主の属する種であるセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

また、挿入遺伝子が負担となり、雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の両方を有する組換えセイヨウナタネと *B. rapa* の雑種に、除草剤グルホシネートによる選抜を加えつつ *B. rapa* を3回戻し交配して得られた BC3 世代における耐性個体と非耐性個体との比較において、花粉稔性、生存性及び種子生産量に相違は認められなかったと報告されている(文献86)。したがって、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子が負担となり、短期的に種間雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上から、組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種の種間雑種が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性及び、交雑により浸透した導入遺伝子の影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性はいずれも極めて低く、交雑に起因する間接的な生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国では、セイヨウナタネは河原や線路沿いでの群生が報告されている。また、我が国では長期にわたるセイヨウナタネの種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等に影響を及ぼしたとする報告はなされていない。さらに、人為的攪乱のない自然条件下では、野生化したセイヨウナタネの個体群は短期間で消滅することが報告されている。

以上のことを踏まえ、組換えセイヨウナタネ RF3 の競合における優位性について、生物多様性影響が生ずる可能性を評価した。

競合における優位性に関する形質として、形態及び生育の特性、生育初期における高温及び低温耐性、成体の越夏性及び越冬性、種子の生産量及び脱粒性について、隔離ほ場又は特定網室において組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネを比較したが、競合において優位に作用する可能性を示唆する性質は認められなかった。なお、発芽率及び休眠性に関する調査は我が国では行われていないため、ベルギーで行われた試験結果に基づき評価したが、組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネに相違は認められなかった。

また、組換えセイヨウナタネ RF3 は改変 *bar* 遺伝子産物である改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネート耐性形質を示すが、本形質は除草剤グルホシネートが散布される環境下においてのみ競合に優位に作用する。しかし、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難いため、本形質を有していても競合において優位に作用することはないと考えられる。また、組換えセイヨウナタネ RF3 は *barstar* 遺伝子産物である BARSTAR 蛋白質を産生する。本蛋白質は *barnase* 遺伝子産物である BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に結合してその活性を阻害するため、*barnase* 遺伝子により雄性不稔形質を付与されたセイヨウナタネと交雑した場合にのみ意図された機能を果たすが、そのようなセイヨウナタネが存在しない通常の下自然条件下においては何ら機能を果たさず、組換えセイヨウナタネ RF3 の競合における優位性を高めることはないと考えられる。したがって、除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性は自然条件下において競合の優位性に関する形質として作用しないと考えられた。

以上から、自然条件下での競合における優位性に関して、組換えセイヨウナタネ RF3 は非組換えセイヨウナタネと同等であると考えられた。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物

多様性影響が生ずる可能性はないと判断した。

組換えセイヨウナタネ RF3 は改変 PAT 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質を新たに産生するが、改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い。また、BARSTAR 蛋白質については、*barnase* 遺伝子により雄性不稔性が付与されているセイヨウナタネと交雑した場合にのみ、その後代の葯のタペート細胞において BARNASE 蛋白質と 1:1 で結合し、BARNASE 蛋白質の活性を阻害するが、その他に宿主の代謝系に影響して有害物質を産生するとは考え難い。さらに、改変 PAT 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質のアミノ酸配列に基づいて包括的な相同性検索及びアレルゲンエピトープ検索を行った結果、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

組換えセイヨウナタネ RF3 の有害物質の産生性について、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物相に影響を与えるものについては土壤微生物相試験を行った。その結果、いずれの試験においても組換えセイヨウナタネ RF3 と非組換えセイヨウナタネの間で有意差は認められなかった。ただし、鋤込み試験において検定植物として用いられたダイコンの発芽率の平均値についてやや相違がみられたため、再試験を行い、土壤に混和された植物体から産生される有害物質の有無について、経時的（植物体混和直後、1 週間後、2 週間後及び 4 週間後）に調査した。その結果、ダイコンの発芽率、根長、生重及び乾物重にはいずれの調査時期においても有意差は認められなかった。他方、草丈については、混和直後は非組換えセイヨウナタネ処理区の方が大きく、1 週間後及び 2 週間後には有意差は認められず、4 週間後では組換えセイヨウナタネ RF3 処理区の方が大きい値を示した。しかし、混和直後にみられた組換えセイヨウナタネ RF3 の草丈の抑制効果は 5%以下であり、同じく混和直後の土壤を用いた 1 回目の試験では有意差は認められなかったこと、さらに、その後の処理区ではいずれも抑制効果が認められていないことから、組換えセイヨウナタネ RF3 は枯死した後に他の植物の生育を抑制するような新規の有害物質を産生していないものと考えられる。

なお、組換えセイヨウナタネ RF3 は 1999 年からカナダ及び米国において商業栽培されているが、開発期間を含め、これまでに組換えセイヨウナタネ RF3 が有害物質を産生し、周囲の動植物等に影響を及ぼしたとする報告はされていない。

以上から、組換えセイヨウナタネ RF3 は野生動植物等に影響を及ぼすような有害物質の産生性を新たに獲得していないと考えられた。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影

響が生ずるおそれはないと判断した。

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*及び*R. raphanistrum*が挙げられる。しかし、セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入された栽培種である。また、*B. rapa*及び*B. juncea*は我が国において栽培種として古くから利用されているが、いずれも栽培由来の外来種である。さらに、*B. nigra*及び*R. raphanistrum*は明治以降に人為的影響により我が国に侵入した外来種である。したがって、交雑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、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

しかし、組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種との雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する場合、交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす場合には、間接的に生物多様性影響が生ずる可能性が考えられた。

組換えセイヨウナタネ RF3 とセイヨウナタネの交雑性については隔離ほ場において調査されたが、既往の知見を上回っていないことが確認された。組換えセイヨウナタネ RF3 と *B. rapa* の交雑性についても隔離ほ場試験で調査されたが、交雑は認められなかった。また、セイヨウナタネと *B. rapa*、*B. juncea* 及び *R. raphanistrum* は自然条件下において雑種を形成する可能性はあるが、交雑率はいずれも低く、さらに雑種後代の稔性や適応度も低下することなどから、後代にわたり雑種の個体群が維持されるとは考え難い。また、*B. nigra* についてはセイヨウナタネとの種間交雑の可能性自体が極めて低い。したがって、自然条件下で戻し交配を繰り返し、これらの近縁種の個体群中に雑種後代が浸透していく可能性は極めて低いと考えられる。

また、挿入遺伝子が負担となり、雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の両方を有する組換えセイヨウナタネと *B. rapa* の雑種に、除草剤グルホシネートによる選抜を加えつつ *B. rapa* を 3 回戻し交配して得られた BC3 世代における耐性個体と非耐性個体との比較において、花粉稔性、生存性及び種子生産量に相違は認められなかったと報告されている。よって、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子が負担となり、短期的に種間雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

これらのことから、組換えセイヨウナタネ RF3 と近縁種との雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、交雑により浸透した導入遺伝子

が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性はいずれも極めて低く、交雑に起因する間接的な生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上を総合的に評価し、組換えセイヨウナタネRF3を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

別添資料1：平成11年度 遺伝子組換えセイヨウナタネの隔離ほ場における試験報告
社外秘情報につき非開示

別添資料2：試験報告書 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復セイヨウナタネ
RF3の有害物質産生性
社外秘情報につき非開示

別添資料3：国外において行われた組換えセイヨウナタネRF3の環境安全性試験成績
に基づく資料
社外秘情報につき非開示

別添資料4：組換えセイヨウナタネRF3に導入されたDNAの解析
社外秘情報につき非開示

別添資料5：イベント識別方法
社外秘情報につき非開示

別添資料6：プラスミドpTHW118の塩基配列 (pTHW118 vector sequence)
社外秘情報につき非開示

別添資料7：T-DNA領域外に存在した遺伝子のサザンプロット分析
(RF3 Proof of absence of sequences derived from the
vector -part of the construct.)
社外秘情報につき非開示

別添資料 8：試験報告書 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタ
ネ RF3 の有害物質の産生性（鋤込み試験）
社外秘情報につき非開示

別添資料 9：種子におけるエルシン酸及びグルコシノレート含量
社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 16年 8月 18日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規定の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar, barstar, Brassica napus L., RF3, OECD UI ACS-BNØØ3-6*）（以下、「組換えセイヨウナタネRF3」とする。）の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社は社内に緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は我が国への組換えセイヨウナタネRF3種子の輸出者、組換えセイヨウナタネRF3種子を配給した我が国の種苗会社、その種子を買った我が国の農家や栽培者、配給した種子の量及び時期を可能な限り特定する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ず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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにした我が国への組換えセイヨウナタネRF3種子の輸出者、我が国の種苗会社、農家や栽培者に生物多様性影響に関して情報提供を行い、当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて組換えセイヨウナタネRF3種子を我が国に配給している、またはその可能性のある国の種苗会社及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれがあると確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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の内容

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、組換えセイヨウナタネRF3を不活性化する措置か、さもなくば組換えセイヨウナタネRF3の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出された組換えセイヨウナタネRF3の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

組換えセイヨウナタネRF3が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合）

平成 16年 8月 18日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar, barstar, Brassica napus* L., RF3, OECD UI ACS-BNØØ3-6）（以下、「組換えセイヨウナタネRF3」とする。）の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は組換えセイヨウナタネRF3穀粒の我が国への輸入業者、我が国において組換えセイヨウナタネRF3穀粒を配給した業者、輸入した組換えセイヨウナタネRF3穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ず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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにした組換えセイヨウナタネRF3穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて組換えセイヨウナタネRF3穀粒を我が国に配給している、またはその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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の内容

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、組換えセイヨウナタネRF3を不活性化する措置か、さもなければ組換えセイヨウナタネRF3の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出された組換えセイヨウナタネRF3の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

組換えセイヨウナタネRF3が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。