

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*, 改変 *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書

5

	第一	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	1
	1.	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
	(1)	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	1
	(2)	使用等の歴史及び現状.....	2
10	(3)	生理学的及び生態学的特性.....	3
	イ	基本的特性.....	3
	ロ	生息又は生育可能な環境の条件.....	3
	ハ	捕食性又は寄生性.....	3
	ニ	繁殖又は増殖の様式.....	3
15	ホ	病原性.....	6
	ヘ	有害物質の産生性.....	6
	ト	その他の情報.....	6
	2.	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	7
	(1)	供与核酸に関する情報.....	7
20	イ	構成及び構成要素の由来.....	7
	ロ	構成要素の機能.....	7
	(2)	ベクターに関する情報.....	13
	イ	名称及び由来.....	13
	ロ	特性.....	14
25	(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	14
	イ	宿主内に移入された核酸全体の構成.....	14
	ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法.....	14
	ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	15
30	(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.....	16
	(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)	宿主又は宿主に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.....	25
35	(1)	使用等の内容.....	25
	(2)	使用等の方法.....	25

	(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.....	25
	(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.....	26
5	(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.....	26
	(6)	国外における使用等に関する情報.....	26
	第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	27
	1.	競争における優位性.....	27
10	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	27
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	28
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	29
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	29
	2.	有害物質の産生性.....	29
15	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	29
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	30
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	30
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	30
	3.	交雑性.....	30
20	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	30
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	30
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	30
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	30
	4.	その他の性質.....	31
25	第三	生物多様性影響の総合的評価.....	33
		参考文献.....	36
		別添資料の内容.....	41

緊急措置計画書

第一種使用規程承認申請書

令和2年5月25日

5

農林水産大臣 江藤 拓 殿
環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏 名 BASF ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 石田博基 印
住所 東京都中央区日本橋室町三丁目4番4号

10

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。

15

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雄性不稔セイヨウナタネ(改変 <i>bar</i> , 改変 <i>barnase</i> , <i>barstar</i> , <i>Brassica napus</i> L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7)
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	—

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

5 (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 和名、英名及び学名

和名：セイヨウナタネ

10 英名：Oilseed Rape

学名：*Brassica napus* L.

② 宿主の品種又は系統名

15 遺伝子導入に用いた宿主の品種名はN90-740である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

セイヨウナタネ (*B. napus*)は、約1万年前に*B. rapa*と*B. oleracea*との種間交雑で
20 生じた。交雑親の分布が重なる北ヨーロッパが原産地と考えられており、現在は、
世界中にその分布が見られる (稲永, 2000)。セイヨウナタネは、肥培管理が行わ
れなくても、道路沿いや空き地等で生育が可能であることが知られており、我が
国でも北海道や本州で河原や線路沿いに群生が確認されている (清水ら, 2001)。
また、ナタネの輸入港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育が報
25 告されている (農林水産省, 2018; 独立行政法人 国立環境研究所, 2018)。しかし、
セイヨウナタネは、自然環境下で優占する多年生草本と競合し自生化するこ
とは困難であることが知られている (OECD, 2012)。

我が国にはセイヨウナタネの近縁野生種は存在しない。しかしながら、我が
30 国に分布する近縁種として、*B. rapa* (アブラナ)、*B. juncea* (カラシナ)、*B. nigra*
(クロガラシ)、*Raphanus raphanistrum* (セイヨウノダイコン)、*Hirschfeldia incana*
(ダイコンモドキ)、*Sinapis arvensis* (ノハラガラシ)、*B. tournefortii* (ハリゲナタネ)、
Eruca vesicaria (キバナズシロ)、*Erucastrum gallicum* (オハツキガラシ) 及び
Sinapis alba (シロガラシ) が挙げられる (OECD, 2012; OGTR, 2017; 環境省, 2002;
35 中井, 2003; 農林水産省, 2018)。このうち*B. rapa*と*B. juncea*は、弥生時代に海外か
ら導入された栽培種に由来すると考えられる (Nishizawa *et al.*, 2010)。これとは

別に、戦後各地に広まった*B. juncea*は、雑草として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 (中井, 2003)。他方、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana*、*S. arvensis*、*B. tornafortii*、*E. vesicaria*、*E. gallicum*及び*S. alba*は、いずれも明治以降に帰化した外来種である (中井, 2003)。

5

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

10 セイヨウナタネは、13世紀にヨーロッパにおいて栽培化が始まったとされている (OECD, 2011)。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まり、*B. rapa*の栽培は少なくなっていく (杉山, 2001)。しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネの栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりや農民の他業種へ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ほとんどない (稲永, 2000)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

20 国連食糧農業機関 (FAO) によると、2017年における*Brassica*属由来の油糧用種子の栽培面積の上位国は、カナダ約844万ha、中国約665万ha、インド約600万haである (FAO, 2019)。現在、我が国で栽培されているセイヨウナタネの作付面積は約1,980haであり、収穫量は約3,670tである (FAO, 2019)。

25 セイヨウナタネには、休眠の打破、抽苔の開始及び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があり、カナダ等寒冷な地域では主に春播き品種が栽培され、ヨーロッパ等では主に秋播き品種が栽培されている (OECD, 2012)。

30 2017年における*Brassica*属由来の油糧用種子の主な生産国は、カナダ (約2,133万t)、中国 (約1,327万t)、インド (約792万t) であった (FAO, 2019)。我が国には、2018年に油脂原料として約234万tのナタネ種子が輸入され、主な輸入先はカナダ (約214万t)、次いでオーストラリア (約20万t) であった (農林水産省, 2019)。

35 セイヨウナタネ種子から搾油・精製された油は、食用、食品加工油脂及び工業用原料として利用されている。搾油後の油粕は飼肥料として用いられる (OECD, 2011)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

5

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

10

セイヨウナタネは一般的に冷涼な気候で栽培される。水分と土壌養分の量が適切であれば、広範な土壌条件に適応し、生育が可能である。最適温度は20°Cよりわずかに高く、12°Cから30°Cの間でよく成長する。発芽後の植物は、開花までは比較的低温を好み、開花期の高温は成熟を早め、開花から種子成熟までの期間が短くなる (CFIA, 2012)。

15

ハ 捕食性又は寄生性

—————

20

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

25

セイヨウナタネは成熟した1莢あたり平均15~25粒の種子ができ、成熟した種子は乾燥した莢の裂開により放出される (OGTR, 2017)。乾燥した莢は、わずかな物理的刺激により裂開するため (OECD, 2012)、脱粒性は比較的高いと考えられる。

30

セイヨウナタネの種子は、一次休眠性を持たないが、生育上好ましくない条件下では二次休眠に入ることがある。その主要な要因は、暗条件、酸素欠乏及び乾燥によるストレスとされ、二次休眠は、連続光、低温 (2~4°C) あるいは高温と低温の繰り返しなどにより打破される (OGTR, 2017)。

35

セイヨウナタネの種子の寿命は、採種条件や保存条件によって異なる。完熟後に乾燥状態で冷蔵保存した場合には25年を経過しても発芽する (OECD, 2012)。しかしながら、収穫時に飛散し、地表に落ちた種子の多くは初めの1年を越えて生存することができない (OECD, 2012)。

② 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

5 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。

③ 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及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

10

セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性について、自然交雑率は3~4.7%であり、セイヨウナタネを種子親とする場合は更に低くなり、混植条件で 1.1~1.3%となる (津田ら, 2016; OGTR, 2017)。農業生物資源研究所の試験ほ場において、花粉源となる除草剤耐性セイヨウナタネを中央に配置し、周囲に *B. juncea* を栽植して自然交雑率を調査した結果、交雑率は混植地点では 1.62%、隣接地点では 0.306%、花粉源からの距離が 1.0 m、5.0 m、10.0 m、20.0 m、27.5 m の地点では、それぞれ 0.0499%、0.0369%、0.0396%、0.0000%、0.0000%であった (Tsuda *et al.*, 2012)。一方、交配による雑種生産性の平均は、セイヨウナタネが種子親の場合 0.07 個 (雑種数/交配花)、花粉親の場合 4.05 個という報告がある (津田ら, 2016)。雑種後代に関して、F₁ 個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある (津田ら, 2016)。しかしながら、自然条件下では種々の生殖的隔離障壁が存在することを考慮すると雑種後代が優占化する可能性は低いと考えられる。

25 セイヨウナタネと *B. nigra* との交雑性について、自然交雑試験において雑種形成は確認されておらず (Bing *et al.*, 1996)、自然交雑の可能性は低いと判断される (OECD, 2012)。また、F₁ 個体の稔性は低く、F₂ 及び BC 世代を得るのは難しいと報告されている (OECD, 2012)。

30 セイヨウナタネと *B. rapa* との交雑性について、自然交雑及び遺伝子移入の可能性はあるものの、仮に雑種が形成されたとしても、実際には栽培・収穫等の人為的操作、あるいは、周囲のセイヨウナタネとの交雑により、雑種後代は定着しないと報告されている (OECD, 2012)。セイヨウナタネのほ場の外側に *B. rapa* の一群を植えた場合のセイヨウナタネとの交雑率は 0.4~1.5% であり、形成された雑種実生の生存率は 2% 未満であった (OGTR, 2017)。しかし、セイヨウナタネを種子親として、同一ほ場内に *B. rapa* と共に 1:1 で植えた場合の交雑率は 9% であった

35

(Jørgensen *et al.*, 1996)。また、F₁個体の花粉稔性は平均で35%に低下し (Jørgensen *et al.*, 1996)、更に、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の報告がある (Hauser *et al.*, 1998)。東北農業研究センターの試験ほ場において、セイヨウナタネの畝間にポット栽培の*B. rapa*の栽培品種55系統を配置し、得られた種子の倍数性をフローサイトメトリーにより調査した結果、*B. rapa*系統毎のセイヨウナタネとの自然交雑率は2~50%、平均で22.8%であった (Yamamori, 2011)。

セイヨウナタネと*H. incana*との交雑性について、人工交配によって100花当たり3.1粒のF₁種子が得られたものの、発芽率が1%未満であり、ほとんどのF₁個体において低い適応度を示したと報告されている (OECD, 2012)。

セイヨウナタネと*R. raphanistrum*との交雑性について、ほ場での調査においてセイヨウナタネを種子親とした場合の交雑率は 3.8×10^{-8} ~ 5.1×10^{-4} %、花粉親とした場合は 1×10^{-7} ~ 3.1×10^{-5} %という報告がある (Chèvre *et al.*, 2000; Rieger *et al.*, 2001; Warwick *et al.*, 2003)。また、F₁個体では幼苗の発芽率や生存率、ロゼット葉の直径、乾物重などに顕著な低下が認められ、野外で発芽し生育して生殖にまで至る可能性は低いと考えられる (Guéritaine *et al.*, 2003)。

セイヨウナタネと*S. arvensis*との交雑性について、自然交雑で雄性不稔セイヨウナタネ100花当たり0.18粒のF₁種子が得られたが、多くは稔性が低い又は完全に不稔であったと報告されている (OECD, 2012)。

また、セイヨウナタネにはアポミクシスの特性を有するという報告はない。

④ 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1花当たり約7~9万粒の花粉を生じる (Takahata *et al.*, 2008)。*Brassica*属の花粉は、重く粘性があるが小型 (約30~40 μm) であり、風によって運ばれる他、ミツバチなどの昆虫によっても媒介される (OECD, 2012)。セイヨウナタネの他殖率について、東北農業研究センターの試験ほ場において、エルシン酸含量を異にする2品種を用いて調査した結果、花粉源から風下方向に0.25 m、1 m、5 m、10 m、30 m、60 m離れた地点での他殖率は、それぞれ4.09%、1.35%、0.43%、0.15%、0.09%、0.01%と、花粉源から離れるに伴い急激に減少した (Yamamori, 2011)。また、OECD (2012) は従来の知見を総括し、他殖率は最大でも花粉源から50~100 mの地点で0.5%以下、200 mの地点で0.1%以下としている。

セイヨウナタネの花粉は、比較的長期間発芽力を有することが知られている。自然条件下では、花粉の寿命は 4~5 日間にわたり徐々に減少するとされる (Rantio-Lehtimäki, 1995)。

5

ホ 病原性

10 ヘ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸とグルコシノレートが含まれている。エルシン酸はラットの給餌実験において摂食と心臓病の発生数及び重篤度に相関する可能性があるとして報告されており、グルコシノレートは、甲状腺肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こすことが報告されている (OGTR, 2017)。しかし、品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートの品種が育成された結果、種子は食用油として、また、搾油粕は飼料用として用いられるようになった (OECD, 2011)。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 1 g 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 (OECD, 2011)、宿主品種である N90-740 もカノーラ品種である。

15
20

ト その他の情報

一般的に、一代雑種品種 (F_1 個体) 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徴を持つが、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 F_1 個体を得ることは困難である。雄性不稔形質を持つ本組換えセイヨウナタネでは、*barstar* 遺伝子を有する稔性回復性遺伝子組換えセイヨウナタネを花粉親として交配させることにより、確実に F_1 種子を得ることができる。その F_1 個体では、稔性回復性遺伝子組換えセイヨウナタネ由来の BARSTAR タンパク質が発現することで改変 BARNASE タンパク質の作用を抑制して稔性を回復させるため、自家受粉で高収量の種子生産が可能となる。

25
30

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 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雄性不稔セイヨウナタネ (改変*bar*, 改変 *barnase*, *barstar*; *Brassica napus* L.) (MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」とする。)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、表1 (p.8)に示した。また、供与核酸の塩基配列は別添資料1に示した。

ロ 構成要素の機能

- 15 ① 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

本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の構成要素は表1 (p.8)に示した。

20

表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の構成及び各構成要素の由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	由来及び機能
	サイズ(bp)	
T-DNA 領域		
RB	1-25	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i>)由来の T-DNA の反復配列右側領域 (Zambryski, 1988)。
	25	
-	26-97	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	72	
3'g7	98-309	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域の配列。転写を終結させ、3' ポリアデニル化を生じさせる (Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
	212	
-	310-331	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	22	
改変 <i>bar</i>	332-883	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> に由来するホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質)をコードする遺伝子。除草剤グルホシネート耐性を付与する (Thompson <i>et al.</i> , 1987) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端にメチオニンを付加し、続くセリンはアスパラギン酸に置換されている。
	552	
PssuAt	884-2613	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来し、 <i>rubisco</i> 小サブユニット遺伝子のプロモーター。緑色組織において遺伝子を恒常的に発現させる (Krebbers <i>et al.</i> ,1988)。
	1731	
-	2614-2658	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	45	
3'nos	2659-2919	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域。転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる (Depicker <i>et al.</i> , 1982) 。
	261	
-	2920-2935	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	16	
3' <i>barnase</i>	2936-3033	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 由来 <i>barnase</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域の配列 (Hartley, 1988)。
	98	
改変 <i>barnase</i>	3034-3369	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ (改変 BARNASE 蛋白質) をコードする遺伝子。Pta29 の支配下で葯のタペト細胞において特異的に発現し、雄性不稔形質を付与する (Hartley, 1988) 。野生型 <i>barnase</i> 遺伝子の N-末端にメチオニンを付加し、続くアラニンとグルタミンはバリンとプロリンに置換されている。
	336	
-	3370-3371	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。

	2	列。
Pta29	3372-4879	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>)由来の薬特異的遺伝子 TA29のプロモーター。薬のタペート細胞において特異的に遺伝子発現を誘導する (Seurinck <i>et al.</i> , 1990)。
	1508	
-	4880-4920	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	41	
Pnos	4921-5214	<i>R. radiobacter</i> 由来のノパリン合成酵素のプロモーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。非常に低い転写活性を示す。
	294	
-	5215-5216	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	2	
barstar	5217-5489	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR 蛋白質)をコードする配列。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と特異的に結合し、その活性を阻害する (Hartley, 1988)。アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれた。
	273	
-	5490-5554	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	65	
3'g7	5555-5766	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域の配列。転写を終結させ、3' ポリアデニル化を生じさせる (Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
	212	
-	5767-5840	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	74	
LB	5841-5865	<i>R. radiobacter</i> 由来の T-DNA の反復配列左側領域 (Zambryski, 1988)。
	25	
プラスミド外骨格領域 (本組換えセイヨウナタネには存在しない)		
aadA	5866-7745	<i>Escherichia coli</i> 由来アミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する。
	1880	
barstar	7746-8181	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR 蛋白質)をコードする遺伝子及び <i>B. amyloliquefaciens</i> の非翻訳配列を含む断片 (Hartley, 1988)。プラスミド作成過程において大腸菌内で改変 <i>barnase</i> 遺伝子がリークして発現した場合にその機能を抑制する。
	436	
aadA	8182-8405	<i>E. coli</i> 由来アミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)の上流配列の断片。
	224	
ORI pVS1	8406-12177	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来 pVS1 プラスミドの複製開始起点を含む配列。 <i>R. radiobacter</i> 内での複製開始に必要な (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
	3772	
ORI ColE1	12178-13540	<i>E. coli</i> 由来 pBR322 プラスミドの複製開始点を含む配

	1363	列。 <i>E. coli</i> 内での複製の開始に必要となる (Bolivar <i>et al.</i> , 1977)。
--	------	--

(注:本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

- ② 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
5 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
10 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無毒化されず蓄積し、作物は枯死する。

導入された改変 *bar* 遺伝子が産生するホスフィノスリシン・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
15 する (OECD, 1999)。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は枯死しない。

改変 PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはない。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、生体内において転移反応を生じ
20 させることはない (Thompson *et al.*, 1987)。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 (Wehrmann *et al.*, 1996)。よって、改変 PAT 蛋白質は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。

なお、改変 *bar* 遺伝子は、我が国において第一種使用規程承認が得られている
25 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 (MS8, OECD UI:ACS-BN005-8)、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, OECD UI:ACS-BN003-6)、除草剤グルホシネート耐性ワタ (LLCotton25, OECD UI:ACS-GH001-3)、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ (GHB119, OECD UI:ACS-BCS-GH005-8; T304-40, OECD UI:BCS-GH004-7)に導入されている。
30

【改変 BARNASE 蛋白質】

BARNASE 蛋白質は 110 個のアミノ酸で構成される一本鎖の蛋白質であり、二段階の反応様式で RNA を分解する。始めに、ポリリボヌクレオチド鎖内部の

3',5'-ホスホジエステル結合を切断してリン酸基をリボースの 2'-OH 基に転移し、2',3'-環状ヌクレオチドを中間体として生成する (リン酸転移反応)。次にこの中間体を加水分解して特異的に 3'-ヌクレオチドを生成する (加水分解反応) (Hartley, 1997)。BARNASE 蛋白質はグアニンの 3'部位の切断に対する特異性が
5 高いが、その他の部位も切断するため、完全な分解生成物からはモノ及びジヌクレオチドが検出される (Rushizky *et al.*, 1963)。

花粉形成は葯で起こる高度に制御されたプロセスであり、葯の組織のひとつであるタペート細胞は、花粉形成時及びその後の花粉の発育のために栄養供給を行う重要な役割を果たしている。タペート細胞は花粉形成の四分子期に最も
10 発達し、花粉の発達とともに退化・崩壊する (高畑, 2005)。それゆえ、タペート細胞の欠落は雄性不稔の主要な原因であると考えられている (Kaul, 1988)。

改変 *barnase* 遺伝子は、葯特異的プロモーター Pta29 の支配下でタペート細胞において一本鎖 RNA 分子を加水分解するリボヌクレアーゼ (改変 BARNASE 蛋白質)を発現し、それによりタペート細胞内の RNA が分解されて細胞が破壊さ
15 れ、花粉形成を阻害する (Drews and Goldberg, 1989; Hartley, 1989; Mariani *et al.*, 1990)。

なお、改変 *barnase* 遺伝子は、我が国において平成18年9月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ (MS8, OECD UI:ACS-BN005-8)に導入されている。

【BARSTAR 蛋白質】

BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の阻害物質である (Hartley *et al.*, 1972; Hartley, 1989)。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する (Smeaton and Elliott,
25 1967; Hartley and Smeaton, 1973; Hartley, 1989)。本組換えセイヨウナタネにおいては、形質転換による挿入部位の位置効果などにより、形質転換体において改変 BARNASE 蛋白質が葯組織以外の細胞で発現して細胞内の RNA を加水分解する可能性を想定し、この様な場合にその活性を抑えるために *barstar* 遺伝子が T-DNA 領域に組み込まれた。結果として、アグロバクテリウム法で形質転換体が
30 効率よく得られた。なお、*barstar* 遺伝子を制御する Pnos プロモーターの転写活性は弱いため、BARSTAR 蛋白質の発現は微量であり、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型 (花粉を含まない不完全な葯が花弁より低い位置で形成される) で確認している (別添資料 2)。

なお、*barstar* 遺伝子は、我が国において平成19年4月に第一種使用規程承認が
35 得られ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 (RF3, OECD UI:ACS-BN003-6)に導入されている。

【改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質のアレルギー性】

各蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2019 年にアレルゲンデータベース (COMPARE, バージョン COMPARE 19)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な
5 相同性検索した結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

③ 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】

10 改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており (Thompson *et al.*, 1987)、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。

【改変 BARNASE 蛋白質】

15 改変 *barnase* 遺伝子は、薬特異的プロモーターPta29 の支配下にあり、その発
現はタペート細胞でのみ確認されており (Mariani *et al.*, 1990)、本組換えセイヨ
ウナタネにおいても他の組織で発現することは考え難い。よって、宿主の持つ代
謝経路へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

20 【BARSTAR 蛋白質】

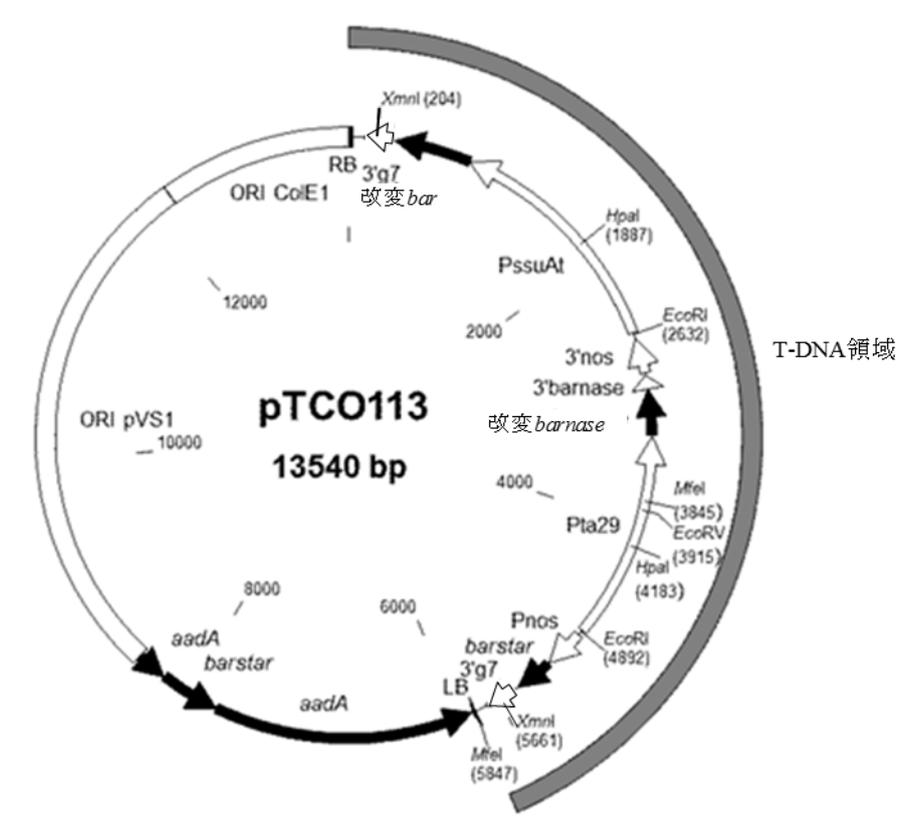
BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、その
複合体の安定性は高い (Makarov *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1995)。なお、植物中
のリボヌクレアーゼに対する BARSTAR 蛋白質の阻害作用は報告されておらず、
ヒト又は動物のリボヌクレアーゼとは結合しないことも報告されている
25 (Smeaton and Elliott, 1967; Hill *et al.*, 1983; Hartley, 1988, 1989)。よって、BARSTAR
蛋白質が宿主の持つ代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5

本組換えセイヨウナタネの作出に用いたベクターは、*E. coli*由来pGSC1700を基に構築されたプラスミドpTCO113である (図1)。



10

図1 pTCO113のベクター地図及び制限酵素切断部位
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられたプラスミドpTCO113の全塩基数は13,540bpである (別添資料1)。本ベクターの構成要素は表1 (p.8)に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10 プラスミド pTCO113 は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有している。この遺伝子は、本プラスミドを構築する際に必要な選抜マーカーとして機能する。なお、この遺伝子を含むプラスミド外骨格領域が、本組換えセイヨウナタネに導入されていないことはサザンブロット分析により確認されている (別添資料 3)。

15

③ 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pTCO113は伝達性を持たないため、感染性はない。

20

(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

25 プラスミドpTCO113の構成及び制限酵素による切断部位を図1 (p.13)に示す。宿主内に移入された領域は、RBとLBに挟まれたT-DNA領域である。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30 宿主胚軸由来カルスへの核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた (Deblaere *et al.*, 1985)。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

5 核酸が移入された組織片を、グルホシネートを含む培地によって耐性個体を選抜した。

② 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の菌体の残存の有無

10

本組換えセイヨウナタネのT₃及びBC₄B世代 (図2, p.16)のバルク種子において、無作為に抽出したサンプルからDNAを抽出した。T-DNAとプラスミド外骨格領域にまたがる位置を標的としたPCR分析を行った。その結果、すべてのサンプルにおいて標的とする増幅産物は検出されず、本組換えセイヨウ
15 ナタネに形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体が残存していないことが確認された (別添資料12)。

③ 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、隔離ほ場試験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

20

選抜した耐性個体を育成し、再度グルホシネート耐性を評価し、本組換えセイヨウナタネ T₀組換え当代を得た。本組換えセイヨウナタネの育成図を図2 (p.16)に示す。形質転換植物である T₀組換え当代は不稔であり自殖ができないため、
25 宿主品種 N90-740 との交配により形質転換体を維持し、育成図には T 系統として表記した。

なお、本申請の対象は、T₃世代、BC₄B世代及びその後代である。

本組換えセイヨウナタネの我が国における承認状況は次のとおりである。

30

2019年11月に厚生労働省より食品衛生法に基づく食品利用の承認を得た。

2019年11月に農林水産省より飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく飼料利用の承認を得た。

【社外秘情報につき非開示】

図2 本組換えセイヨウナタネの育成図

5 (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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

10 移入した核酸が宿主の染色体上に組み込まれた場合、メンデルの法則に従い分離する。本組換えセイヨウナタネの分離比を検討するため、本組換えセイヨウナタネ (T₃、T₄、T₅、BC₄B及びBC₅B世代; 図2)において、系統特異的及び改変*bar*、改変*barnase*及び*barstar*遺伝子特異的PCR分析を行い陽性個体数及び陰性個体数を調査した。その結果、陽性個体と陰性個体の分離比は、いずれの世代もほぼ1:1
15 となり、一遺伝子座支配であると仮定した場合に想定される分離比を示した (表2; 別添資料4)。

したがって、本組換えセイヨウナタネに導入された挿入DNA配列は、セイヨウナタネ染色体上の一か所に存在していることが確認された。

20 表2 本組換えセイヨウナタネにおける挿入遺伝子の分離比

世代	供試個体数	陽性個体数		陰性個体数		χ^2 値 ¹⁾
		期待値	実測値	期待値	実測値	
T ₃	84	42	42	42	42	0.00
T ₄	92	46	48	46	44	0.174
T ₅	95	47.5	39	47.5	56	3.042
BC ₄ B	89	44.5	43	44.5	46	0.101
BC ₅ B	98	49	51	49	47	0.163

1) 一遺伝子座と仮定し、 χ^2 検定を実施した。自由度1、有意水準5%において、 χ^2 値3.84以上で帰無仮説が棄却される。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

25

② 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製数世代における伝達の安定性

本組換えセイヨウナタネ (T₂世代; 図2, p.16)の葉から抽出したDNAを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、1コピーのT-DNA領域が挿入されていることが確認された (別添資料3)。

5 また、本組換えセイヨウナタネ (T₂世代; 図2, p.16)に移入されたDNA配列及びその両側近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、プラスミド pTCO113上のT-DNA領域と完全に一致することが確認された (別添資料5)。また、T-DNA領域の挿入により、挿入部位において宿主ゲノム配列の40bpが欠失していることを確認した (図3, p.18 ; 別添資料5)。

10 挿入遺伝子の伝達の安定性を確認するため、本組換えセイヨウナタネのT₂、T₃、F₁E、BC₁E、BC₂E世代 (図2, p.16)の葉から抽出したDNAを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、全ての世代において予測されたサイズの断片が確認され、本組換えセイヨウナタネに移入された挿入DNA領域は複数世代において安定して伝達されていることが確認された (別添資料6)。

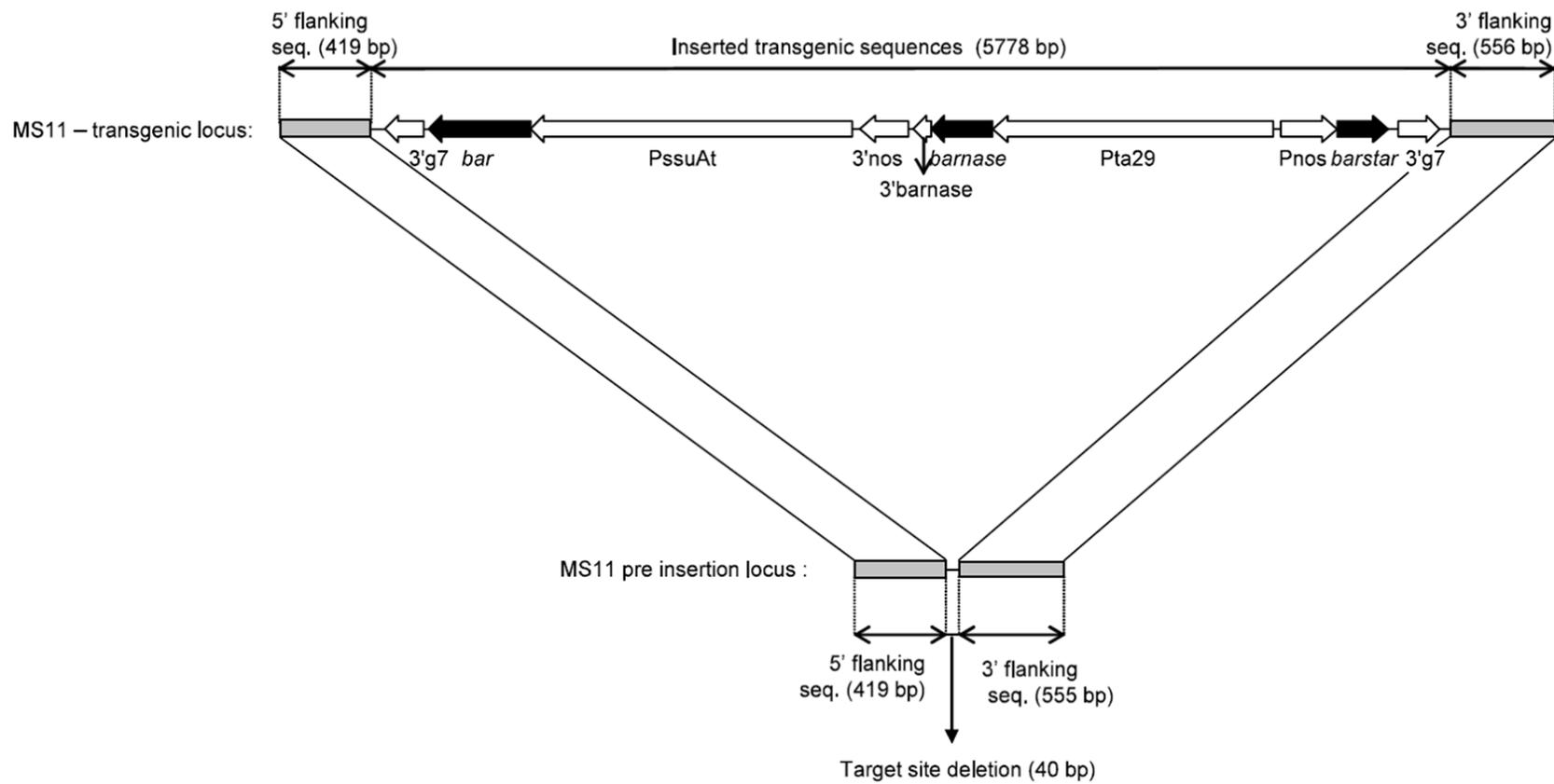


図3 本組換えセイヨウナタネにおける挿入 DNA の概略図
 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

- ③ 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

5

- ④ (6)の①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

2014年に米国及びカナダの3試験地において、栽培した本組換えセイヨウナタネ T₄ 世代 (図 2, p.16)の植物体、根、花序組織及び種子における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量を ELISA 法より分析した (表 3, p.20 ; 別添資料 7)。各試験地には、それぞれ第 2~4 葉期に除草剤グルホシネート (500g ai/ha)の散布を行った。その結果、改変 PAT 蛋白質は全ての組織において検出され、改変 BARNASE 蛋白質は全ての組織において検出限界以下であり、BARSTAR 蛋白質は、茎伸長期の根及び開花初期において微量の発現が検出された。

また、2015年に米国の温室において栽培された本組換えセイヨウナタネの T₃、T₄、T₅ 世代 (図 2, p.16)の植物体及び花序組織における改変 PAT 蛋白質量、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質を ELISA 法により分析した (表 4, p.21; 別添資料 8)。その結果、改変 PAT 蛋白質は全ての組織、世代で発現が検出され、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質はいずれの組織、世代においても検出限界未満であった。

一方、本組換えセイヨウナタネと稔性回復性形質をもつ遺伝子組換えセイヨウナタネ (RF3, OECD UI:ACS-BN003-6)と交配した後代 (MS11×RF3 系統)において、蕾においてのみ改変 *barnase* 遺伝子の転写発現が確認されており(添付資料 9)、本組換えセイヨウナタネにおいて改変 *barnase* 遺伝子は正常に発現しているものの、改変 BARNASE 蛋白質活性によりタペート細胞内の RNA が加水分解されていると考えられる。

30

他方、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験に供試した T₄ 世代 (図 2, p.16)及び形態調査区にて収穫した T₅ 世代を開花まで栽培し、開花後の葯の形態を比較した結果、両世代において本組換えセイヨウナタネにおいては葯が正常に形成されないことが確認され (別添資料 10)、世代間に渡り雄性不稔形質が発現していることが形態的に示唆された。

35

以上のことから、改変 PAT 蛋白質は個体間及び世代間において安定して発現していることが確認された。一方、改変 BARNASE 蛋白質は各組織及び世代において検出されなかったが、稔性回復系統との交配系統を用いた RNA の発現解析において、発現部位であるタペート細胞を含む蕾において発現が確認された (別添資料 9)。さらに、花器官の観察から改変 BARNASE 蛋白質の機能により、世代間に渡り本組換えセイヨウナタネは雄性不稔形質を示すことが確認された (別添資料 10)。また、BARSTAR 蛋白質は茎伸長期の根及び開花初期の植物体、根及び花序において微量の発現が認められた。BARSTAR 蛋白質の発現は、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している (別添資料 2)。

表 3 本組換えセイヨウナタネ (T₄ 世代)の各組織における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量(μg/g 新鮮重)

生育ステージ	組織	改変 PAT 蛋白質 ¹⁾	改変 BARNASE 蛋白質 ²⁾	BARSTAR 蛋白質 ³⁾
		平均値±SD	平均値±SD	平均値±SD
第 3~5 葉期	植物体	2.95±0.64 (n=15)	ND	ND
茎伸長期	植物体	2.72±1.82 (n=14)	ND	ND
	根	0.09±0.07 (n=6)	ND	0.09±0.02 (n=12)
開花初期	植物体	1.85±0.83(n=14)	ND	0.03±0.00 (n=3)
	根	0.09±0.06 (n=6)	ND	0.09±0.02(n=10)
	花序	2.99±0.78 (n=14)	ND	0.09±0.07 (n=2)
成熟期	種子	0.44±0.18 (n=15)	ND	ND

分析値は、3 試験地 (Portage la Prairie and Rathwell in Canada, Ephrata in US)毎に 5 反復で採取した試料の平均値±標準偏差 (n=15)。また、平均値±標準偏差を求める際、検出限界値以下の値は除外した。

1) 改変 PAT 蛋白質の LLOQ は、植物体で 0.05 μg/g、花序で 0.05 μg/g、種子で 0.05 μg/g、根で 0.02 μg/g であった。

2) 改変 BARNASE 蛋白質の LLOQ は、第 3~5 葉期の植物体の葉で 0.03 μg/g、茎伸長期及び開花初期の植物体で 0.05 μg/g、花序で 0.04 μg/g、種子で 0.05 μg/g、根で 0.25 μg/g であった。

3) BARSTAR 蛋白質の LLOQ は、第 3~5 葉期の植物体の葉で 0.05 μg/g、茎伸長期及び開花初期の植物体で 0.03 μg/g、花序で 0.03 μg/g、種子で 0.03 μg/g、根で 0.05 μg/g であった。

ND (not determined) : 定量限界下限値を下回ったため、検出できなかった。

LLOQ (lower limit of quantitation) : 定量限界下限値

(注 : 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

表 4 本組換えセイヨウナタネの 3 世代(T₃、T₄ 及び T₅ 世代)における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量(μg/g 新鮮重)

生育ステージ	組織	世代	改変 PAT 蛋白質 ¹⁾	改変 BARNASE 蛋白質 ²⁾	BARSTAR 蛋白質 ³⁾
			平均値±SD	平均値±SD	平均値±SD
茎伸長期	植物体	T3	1.27±0.18	<LLOQ	<LLOQ
		T4	1.22±0.10	<LLOQ	<LLOQ
		T5	1.25±0.09	<LLOQ	<LLOQ
開花初期	花序	T3	3.71±2.40	<LLOQ	<LLOQ
		T4	2.67±0.17	<LLOQ	<LLOQ
		T5	2.51±0.22	<LLOQ	<LLOQ
	植物体	T3	1.15±0.04	<LLOQ	<LLOQ
		T4	1.15±0.03	<LLOQ	<LLOQ
		T5	1.29±0.16	<LLOQ	<LLOQ

分析値は 4 個体より各個体 3 回の測定を行った値の平均値±標準偏差(n=4)。

- 5 1) 改変 PAT 蛋白質の LLOQ は、植物体において 0.05μg/g、花序において 0.05 μg/g であった。
 2) 改変 BARNASE 蛋白質の LLOQ は、植物体(根は含まない)において 0.05μg/g、花序において 0.04 μg/g であった。
 3) BARSTAR 蛋白質の LLOQ は、植物体 (根は含まない)において 0.03μg/g、花序において 0.03 μg/g であった。
- 10 LLOQ (lower limit of quantitation): 定量限界下限値
 (注:本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経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

5 本組換えセイヨウナタネは伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然環境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

10 本組換えセイヨウナタネは、本組換えセイヨウナタネに特異的なプライマー及びプローブを用いた PCR 法により検出及び識別が可能である。本法の検出限界はゲノム DNA 量比で 0.08% である (別添資料 11)。

本法の信頼性については、社外の 2 施設において施設間互換性があることを確認している (別添資料 11)

15

- (6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違

- ① 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内容

20

本組換えセイヨウナタネは改変 *bar* 遺伝子の発現により改変 PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示すと共に、改変 *barnase* 遺伝子の発現により雄性不稔を示す。なお、稔性回復性を付与する *barstar* 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために T-DNA 領域に組み込まれている。*barstar* 遺伝子を制御する *Pnos* プロモーターの転写活性は弱いため、BARSTAR 蛋白質の発現は微量であり、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している (別添資料 2)。

25

- ② 以下に掲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

30

2018 年から 2019 年にバイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所隔離ほ場 (以下、「隔離ほ場」とする)において本組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験を行った。試験には、本組換えセイヨウナタネの T₄ 世代を供試した (図 2, p.16)。

35

対照の非組換えセイヨウナタネとしては、本組換えセイヨウナタネの遺伝的背景品種 N90-740 を用いた (以下、「非組換えセイヨウナタネ」とする。)

- 5 1) 形態及び生育の特性
- 2) 生育初期における低温耐性
- 3) 成体の越冬性
- 4) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- 5) 交雑率
- 10 6) 有害物質の産生性
- 7) 世代間にわたる形質発現の確認

1) 形態及び生育の特性

農林水産省の農林水産植物種類別審査基準 (なたね種)を参考に、発芽揃い、
15 開花期、開花揃い、成熟期、草丈、一次分枝数、主茎着花数、主茎着莢数、子実
の色、地上部重 (乾燥重)の計 10 項目について本組換えセイヨウナタネと非組換
えセイヨウナタネを比較した。草丈、一次分枝数、主茎着花数、主茎着莢数、地
上部重 (乾燥重)に関しては統計処理を行い、発芽揃い、開花期、開花揃い、成熟
20 期に関しては観察結果を比較した。その結果、主茎着花数以外のすべての項目に
おいて両系統間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった (別添資料
10, 表 2-3, p.4-5.)。

2) 生育初期における低温耐性

5°C・10 時間明条件下における本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウ
25 ナタネの幼植物体の低温障害 (萎縮程度)を経時的に調査した。その結果、いず
れの調査日においても両系統の幼植物体に萎縮は確認されなかった (別添資料
10, p.6.)。

3) 成体の越冬性

30 本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネを収穫期後も栽培を続
けたところ、2018 年 2 月 8 日の観察時には、両系統の全ての株が株元まで乾燥
し、成体の枯死が確認された (別添資料 10, p.7)。

4) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

35 種子の生産量に関する項目として、農林水産省の農林水産植物種類別審査基
準 (なたね種)を参考に、2 項目 (一粒子実収量及び千粒重)を調査した。これら
の項目について統計処理を行った結果、一粒子実収量及び千粒重の調査項目に

において本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 10, 表 5, p.8)。

5 種子の脱粒性に関する項目として、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネ裂莢率を調査した。その結果、本組換えセイヨウナタネの種子の脱粒性については両系統間の裂莢率に統計学的有意差がないことから同等であると考えられた (別添資料 10, 表 5, p.8)。

10 休眠性及び発芽率に関する項目として、隔離ほ場において収穫した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの収穫後の種子の発芽率を調査した。その結果、系統間の発芽率に統計学的有意差は認められず、休眠性に差はなかった (別添資料 10, 表 6, p.9)。

5) 交雑率

15 本組換えセイヨウナタネは雄性不稔形質を有するため、交雑率は調査しなかった。

6) 有害物質の産生性

20 有害物質の産生性を調査するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

後作試験

25 隔離ほ場において収穫期まで約 5 ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの収穫後の根域土壌をそれぞれ採取し、その土壌において検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10, 表 7, p.11)。

30 鋤込み試験

35 隔離ほ場において収穫期まで約 5 ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの植物体地上部を収穫し、乾燥・粉碎して試料とした。これを重量約 1%の割合で混和した土壌において、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈及び乾物重を比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10, 表 8, p.12)。

土壌微生物相試験

5 隔離ほ場において収穫期まで約 5 ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区の土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌、放線菌及び細菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10, 表 9, p.13)。

7) 世代にわたる形質発現の確認

10 本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験に供試した世代及び形態調査区にて収穫した世代を栽培し、第 3 葉期に除草剤グルホシネートを散布し、2 週間後に耐性の有無を調査した。また、両世代を開花期まで栽培し、雄性不稔形質の有無について花器官の表現型により確認した。その結果、両世代において本組換えセイヨウナタネは、除草剤グルホシネート耐性及び
15 雄性不稔形質を有することが確認された (別添資料 10, 表 10, p.14, 図 2, p.15-16)。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

20 (1) 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

25 (2) 使用等の方法

30 (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ための措置

「緊急措置計画書」を参照。

5

- (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

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

国外における本組換えセイヨウナタネの承認に関する情報を表5に示した。

15

表5 本組換えセイヨウナタネの海外における申請・承認状況

(2020年7月現在)

機関	安全性審査の種類	承認時期
米国農務省(USDA)	環境	2017年7月承認
米国食品医薬品庁(FDA)	食品・飼料	2017年10月承認
カナダ保健省(HC)	食品	2018年1月承認
カナダ食品検査庁(CFIA)	環境・飼料	2018年1月承認
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)	食品	2017年12月承認

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

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

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネは我が国において、北海道や本州で河原や線路沿いでの群生や、主なナタネの輸入港やその周辺での生育が報告されている。一方で、我が国では長期にわたりセイヨウナタネ種子の輸入経験があるが、運搬の途中でこぼれ落ちたセイヨウナタネが野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はない。我が国におけるセイヨウナタネ集団の雑草性の強さ及び競合性についての知見はない (津田ら, 2016)が、オーストラリアでは主要な雑草とは考えられておらず、また未攪乱の土地に侵入する植物ではないと考えられている (OGTR, 2017)。また、セイヨウナタネが自然環境下で優占する多年生草本と競合することはないと報告されている (OECD, 2012)。

競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率をわが国の隔離ほ場において調査した。その結果、形態及び生育の特性のうち主茎着花数について、また種子の生産量のうち一株子実収量及び千粒重について、両系統間に統計学的有意差が認められた (第一.2.(6). ②. 1)~4)、p.23~24)。本試験では、収穫種子における諸形質の調査を行うために必要な種子量を確保するため人為的に非組換えセイヨウナタネの花と本組換えセイヨウナタネの花を接触させて受粉機会の確保を試みたが、一株子実収量については、本組換えセイヨウナタネが2.9gに対して対照の非組換えセイヨウナタネが39.1gと本組換えセイヨウナタネの方が統計学的に有意に低くなった。主茎着花数では、本組換えセイヨウナタネが132.6個に対し、対照の非組換えセイヨウナタネが107.8個であり、千粒重においては本組換えセイヨウナタネが4.2gに対し、非組換えセイヨウナタネは3.3gとそれぞれ本組換えセイヨウナタネの値が統計学的に有意に高かった。主茎着花数と千粒重に見られた有意差は、受粉頻度の低さに起因した植物に一般的にみられる生理的現象であり、導入遺伝子の特性によるものでないと考えられる。一方、一株子実収量に見られるように、自家受粉のできない本組換えセイヨウナタネの種子生産量が非組換えセイヨウナタネのそれと比較して低いことは、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるものでないと考えられる。

以上の結果から、本組換えセイヨウナタネで主茎着花数及び千粒重は有意に増加したが、これは雄性不稔形質による受粉頻度の低下に起因する生理学的現象であると考えられ、競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

5 本組換えセイヨウナタネは、改変 PAT 蛋白質の発現により除草剤グルホシネートに耐性を示すが、自然環境下においてこの除草剤が選択圧となることは考え難く、この性質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。実際に、わが国では、セイヨウナタネの輸入港周辺のモニタリング調査の結果から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は、陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、年度毎の連続性もないことから、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大していないと考えられている (農林水産省, 2018)。さらに、遺伝子組換えセイヨウナタネとカラシナ又は在来ナタネとの交雑体は確認されず (農林水産省, 2018)、交雑体と推定された種子・植物体についても、後代の定着は確認されていない (独立行政法人 国立環境研究所, 2015)。

15 さらに、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の調査において、人為的攪乱のない自然条件下で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 (Crawley and Brown, 1995)。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 (Scott and Wilkinson, 1999)。

20 これらのことから、本組換えセイヨウナタネは除草剤グルホシネートに対する耐性及び雄性不稔性形質を有するが、グルホシネートが散布されることが想定しにくい自然条件下においてグルホシネート耐性及び雄性不稔形質が競合における優位性を高めることはないと判断された。また、仮に路傍等で除草剤グルホシネートを使用して除草を行い、本組換えセイヨウナタネが残存したとしても人為的攪乱のない自然環境下において優占化していく可能性は極めて低いと考えられた。

また、改変 BARNASE 蛋白質の発現により雄性不稔形質を有するが、本形質は競合において優位に作用する形質ではないと考えられる。

30 以上のことから、競合における優位性に起因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

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えセイヨウナタネ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。

10 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

セイヨウナタネの種子には、有害物質であるエルシン酸及びグルコシノレートを含むことが知られている(OGTR, 2017)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主品種であるN90-740は、エルシン酸及びグルコシノレート含有量の低いカナラ品種である。

本組換えセイヨウナタネに導入された遺伝子から発現する改変PAT蛋白質、改変BARNASE蛋白質及びBARSTAR蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。

PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルコシノレ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 (Wehrmann *et al.*, 1996)。BARNASE蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有しRNAを分解するが、それ以外の基質に対する活性を有するという報告はない。また、BARSTAR蛋白質はBARNASE蛋白質と特異的に非共有結合するため、宿主の代謝系に影響することはないと考えられる。

実際に、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験 (第一. 2. (6). ②. 6)、p.24~25)により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

したがって、本組換えセイヨウナタネが新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、有害物質の産生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なかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 (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等の判断

10

以上のことから、本組換えセイヨウナタネの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

15

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

20

我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生していないため、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は特定されなかった。

なお、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. juncea*、*B. nigra*、*B. rapa*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis*が挙げられるが、いずれも日本に帰化した外来種である (OECD, 2012; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2017)。

25

(2) 影響の具体的内容の評価

30 (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等の判断

35

以上のことから、交雑性に起因して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

5

第二、3、(1) (p.30)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我が国在来の野生動植物等としては特定されなかった。しかし、本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種が交雑した場合に生ずる可能性のある間接的な影響として、以下の2点が考えられた。

10

- ① 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。
- ② 交雑により浸透した導入遺伝子をもたらす遺伝的負荷によって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。

15

① 雑種後代が優占化して他の野生植物の個体群を駆逐する可能性

本組換えセイヨウナタネは雄性不稔形質を有するため、花粉を形成しない。しかし、他からの花粉を受けた場合、種子を形成する可能性が考えられる。よって、本組換えセイヨウナタネと外来近縁種の交雑性及び種間雑種が優占化する可能性について検討した。

20

第一、1、(3)、二、③ (p.4)に示したように、セイヨウナタネは我が国に分布する近縁種である*B. juncea*、*B. nigra*、*B. rapa*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis*と交雑可能である。雑種後代に関して、 F_1 個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある (津田ら, 2016)。これら

の内、*B. rapa*及び*B. juncea*は、自然条件下で交雑する可能性がある (OECD, 2012; 農林水産省, 2018)が、交配し雑種を形成するためには、親植物同士の物理的距離、花粉の飛散距離及び寿命、開花期の同調性、親植物の栽培方法、花序組織の特性、花粉の交雑和合性及び他の植物の花粉との競合性等の種々の生殖的隔離障壁が存在すること (OECD, 2012)から、自然条件下で雑種後代が優占化する可能性は低く、雑種後代が他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられる。仮に、本組換えセイヨウナタネが我が国の自然環境下でこれら近縁種と交雑しても、その交雑率は低く、形成された雑種の稔性も低下すると考えられる。

35

以上から、本組換えセイヨウナタネがセイヨウナタネや外来近縁種と交雑し、自然環境下で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は、従来のセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

- 5 ② 交雑により浸透した導入遺伝子をもたらす遺伝的負荷によって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

10 第二、1及び2 (p.27~30)に示したように、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産生性は、非組換えセイヨウナタネと相違ないと考えられる。本組換えセイヨウナタネは改変*bar*遺伝子を有するが、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても遺伝的負荷にならないという報告 (Crawley *et al.*, 1993; Snow *et al.*, 1999)があることから、グルホシネートが散布されることが想定されない自然条件下において、改変*bar*遺伝子をもたらす遺伝的負荷が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。

20 本組換えセイヨウナタネは改変 *barnase* 遺伝子を有し雄性不稔形質を示す。しかし、優性の雄性不稔形質を有する植物体は世代を重ねるにつれ集団内から速やかに失われることが知られている (Kaul, 1988)ことから、改変 *barnase* 遺伝子が我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群中に浸透し、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。また、*barstar* 遺伝子がコードする BARSTAR 蛋白質は、BARNASE 蛋白質の阻害物質であるが、本組換えセイヨウナタネの T-DNA 領域に組み込まれた *barstar* 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれており、その発現は微量であるため、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している (別添資料 2)。

25 これらのことから、導入遺伝子はいずれも我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の個体群中に浸透し、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。

30

以上から、本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の交雑により間接的に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

競合における優位性

セイヨウナタネは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然
5 環境下において雑草化した例は報告されていない。

本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で競合にお
ける優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐
性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率をわが
10 国の隔離ほ場において調査した。その結果、形態及び生育の特性のうち主茎着花
数について、また種子の生産量のうち一株子実収量及び千粒重について、本組換
えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差が
認められた。本試験では、人為的に非組換えセイヨウナタネの花と本組換えセイ
15 ヨウナタネの花を接触させることで受粉機会の確保を試みたが、本組換えセイ
ヨウナタネの一株子実収量は非組換えセイヨウナタネと比べ統計学的に有意に
低くなくなり、主茎着花数及び千粒重においては本組換えセイヨウナタネの値
が統計学的に有意に高かった。主茎着花数と千粒重に見られた有意差は、受粉頻
度の低さに起因した植物に一般的にみられる生理的現象であり、導入遺伝子の
20 特性によるものでないと考えられる。したがって、これら統計学的有意差が認め
られた形質における差は、雄性不稔形質に起因する生理学的現象と考えられる
ことから、競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

また、本組換えセイヨウナタネは除草剤グルホシネート耐性を有するが、自然
環境下において除草剤が選択圧となる状況は想定し難く、この形質が競合にお
ける優位性を高めることはないと考えられた。

25 以上のことから、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるお
それはないと判断した。

有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸と
30 グルコシノレートが含まれている。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主は、
品種改良により両物質の含有量が低いカノーラ品種である。これまでにセイヨ
ウナタネが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生す
るとい報告はない。

本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で、有害物
35 質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤き込み試験及び後作試験により比較
検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

また、本組換えセイヨウナタネが遺伝子組換えにより新たに発現する改変PAT蛋白質、改変BARNASE蛋白質及びBARSTAR蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知のアレルゲンとの相同性も認められなかった。さらに、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

- 5 以上のことから、本組換えセイヨウナタネは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

交雑性

- 10 我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生していないため、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は特定されなかった。

その他の性質

- 15 我が国に自生するセイヨウナタネの交雑可能な外来近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis* が挙げられる。本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種が交雑した場合、①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、②交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって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
20 に影響を及ぼす可能性が考えられるため、既知の知見に基づき検討を行った。

セイヨウナタネと外来近縁種の交雑性及び雑種が優占化する可能性については、第二、4、① (p.31)に示したように、種々の生殖的隔離障壁が存在することから、自然条件下で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は極めて低いと考えられた。

- 25 また、導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷が我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種ゲノム中に移入したとしても遺伝的負荷にならないという報告があることから、本組換えセイヨウナタネに導入された改変*bar*遺伝子も同様であると考えられた。したがって、除草剤を散布することを想定しない
30 自然環境下では、改変*bar*遺伝子がもたらす遺伝的負荷が交雑した近縁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た。また、改変*barnase*遺伝子を獲得した植物体は雄性不稔形質を示すが、優性の雄性不稔形質を有する植物体は世代を重ねるにつれ集団内から速やかに失われることが報告されていることから、形成された雑種が優占化することは考えにくい。*barstar*遺伝子がコード
35 するBARSTAR蛋白質は、BARNASE蛋白質の阻害物質であるが、本組換えセイヨウナタネのT-DNA領域に組み込まれた*barstar*遺伝子は、アグロバクテリウム

法での形質転換効率を上げるために組み込まれており、その発現は微量であるため、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している。これらのことから、導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷が、交雑した我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁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た。

以上を総合的に評価し、本組換えセイヨウナタネを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

- 5 Bing, D.J., Downey, R.K., Rakow, G.F.W., (1996) Hybridizations among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breeding* 115, 470-473.
- 10 Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., (1977) Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- 15 CFIA, 2012, online. The biology of *Brassica napus*, L. (canola/rapeseed). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/brassica-napus-l-/eng/1330729090093/1330729278970>) (accessed on 2019-10-07)
- 20 Chèvre, A.M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J.C., Renard, M., (2000) Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100, 1233-1239.
- 25 Crawley, M.J., Hails, R.S., Rees, M., Hohn, D., Buxton, J. (1993) Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363, 620-623
- 30 Crawley, M.J., Brown, S.L., (1995) Seed Limitation and the Dynamics of Feral Oilseed Rape on the M25 Motorway. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 259, 49-54.
- 35 Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J., (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* 13, 4777-4788.
- 40 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M., (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1, 561-573.
- 45 Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, L., Van Montagu, M., Schell, J., (1983) Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2, 419-426.
- 40 Drews, G.N., Goldberg, R.B., (1989) Genetic control of flower development. *Trends in Genetics* 5, 256-261.
- 45 FAO, (2019) FAOSTAT. (<http://faostat3.fao.org/home/E>) (accessed on 2019-09-30).
- 45 Fling, M.E., Kopf, J., Richards, C., (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'' (9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13, 7095-7106.

Guéritaine, G., Bonavent, J.F., Darmency, H., (2003) Variation of prezygotic barriers in the interspecific hybridization between oilseed rape and wild radish. *Euphytica* 130, 349-353.

5 Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25, 989-994.

Hartley, R.W., Barker, E.A., (1972) Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature new biology* 235, 15-16.

10

Hartley, R.W., Smeaton, J.R., (1973) On the Reaction between the Extracellular Ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and Its Intracellular Inhibitor (Barstar). *Journal of Biological Chemistry* 248, 5624-5626.

15

Hartley, R.W., (1988) Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *Journal of Molecular Biology* 202, 913-915.

Hartley, R.W., (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 450-454.

20

Hartley, R.W., (1997) Barnase and Barstar. In: D'Alessio, G., Riordan, J.F. (Eds.), *Ribonucleases: Structures and Functions*. Elsevier Science, New York, 51-100.

25

Hauser, T.P., Jorgensen, R.B., ostergard, H., (1998) Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81, 436-443.

30

Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Seanger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K., Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends in Biochemical Sciences*. 8: 364-369.

35

Jørgensen, R., Andersen, B., Landbo, L., Mikkelsen, T.R., (1996) Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. *Acta Hort. (ISHS)* 407, 193-200.

40

Kaul, M.L.H., (1988) *Male sterility in higher plants*. Springer-Verlag.

45

Krebbers, E., Seurinck, J., Herdies, L., Cashmore, A., Timko, M., (1988) Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 11, 745-759.

50

Makarov, A.A., Protasevich, II, Kuznetsova, N.V., Fedorov, B.B., Korolev, S.V., Struminskaya, N.K., Bazhulina, N.P., Leshchinskaya, I.B., Hartley, R.W., Kirpichnikov, M.P., et al., (1993) Comparative study of thermostability and structure of close homologues-barnase and binase. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 10, 1047-1065.

Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R.B., (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347, 737-741.

5 Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G., Fersht, A.R., (1995) A calorimetric study of the thermal stability of Barstar and its interaction with Barnase. *Biochemistry*, 34, 5224-5233.

10 Nishizawa, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Nakajima, N., (2010) Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of genetically modified oilseed rape in Japan. *GM Crops* 1, 143-156.

15 OECD, (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.11. OECD Environmental Health and Safety publications.

20 OECD, (2011) Revised consensus document on compositional considerations for new varieties low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No.24. OECD Environment, Health and Safety Publications.

25 OECD, (2012) Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No.54. OECD Environment, Health and Safety Publications.

OGTR, (2017) *The Biology of Brassica napus L. (canola) and Brassica juncea (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard)*.

30 Rantio-Lehtimäki, A., (1995) Aerobiology of pollen and pollen antigens. In: Cox, C.S., Wathes, C.M. (Eds.), *Bioaerosols Handbook*. Taylor & Francis, 387-406.

35 Rieger, M.A., Potter, T.D., Preston, C., Powles, S.B., (2001) Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 103, 555-560.

Rushizky, G.W., Greco, A.E., Hartley, R.W., Sober, H.A., (1963) Studies on *B. subtilis* Ribonuclease. I. Characterization of Enzymatic Specificity. *Biochemistry* 2, 787-793.

40 Scott, S.E., Wilkinson, M.J., (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat Biotech* 17, 390-392.

45 Seurinck, J., Truettner, J., Goldberg, R.B., (1990) The nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic Acids Research* 18, 3403.

Smeaton, J.R., Elliott, W.H., (1967) Isolation and properties of a specific bacterial

ribonuclease inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 145, 547-560.

5 Snow, A.A., Andersen, B., Jørgensen, R.B., (1999) Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology* 8, 605-615.

10 Takahata, Y., Konno, N., Hinata, K., (2008) Genotypic variation for floral characters in *Brassica* and allied genera with special reference to breeding system. *Breeding Science* 58, 385-392.

15 Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J., (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO journal* 6, 2519-2523.

20 Tsuda, M., Okuzaki, A., Kaneko, Y., Tabei, Y., (2012) Relationship between hybridization frequency of *Brassica juncea* × *B. napus* and distance from pollen source (*B. napus*) to recipient (*B. juncea*) under field conditions in Japan. *Breeding Science* 62, 274-281.

25 Warwick, S.I., Simard, M.J., Légère, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Séguin-Swartz, G., Stewart, C.N., Jr., (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107, 528-539.

30 Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A., (1996) The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotech* 14, 1274-1278.

Yamamori, M., (2011) Outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an Experimental Field. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 45, 173-179.

35 Zambryski, P., (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review of genetics* 22, 1-30.

稲永忍, (2000) ナタネ. *作物学 II 工芸・飼料作物編*. 文永堂出版, p.108-118.

40 環境省, (2002) 我が国の移入種 (外来種)リスト.
(<http://www.env.go.jp/nature/report/h14-01/mat01a.pdf>) (accessed on 2016-06-07).

清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七, (2001) *日本帰化植物写真図鑑*. 全国農村教育協会.

45 杉山信太郎, (2001) 日本人とナタネ. *転作全書 第3巻 雑穀*. 農山漁村文化協会, p.273-280.

高畑義人, (2005) [タペート細胞]. 植物育種学辞典. 培風社, p.409.

5 津田麻衣, 田部井豊, 大澤良, 下野綾子, 吉田康子, 吉村泰幸, (2016) 遺伝子
組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ(*Brassica
juncea*)、アブラナ(*B. rapa*)、セイヨウアブラナ(*B. napus*)の生物情報集. 農業表環
境技術研究所報告, 36, p.1-46.

10 独立行政法人国立環境研究所, (2018) 平成 29 年度遺伝子組換え生物による影
響監視調査報告書.
(http://www.biodic.go.jp/bch/download/natane/H29_natane_hokokusho.pdf)
(accessed on 2019-10-07).

15 中井秀樹, (2003) アブラナ科, 日本の帰化植物, 清水健美 (編). 平凡社, p.80-
96.

20 農林水産省, (2018) 「平成 29 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果につい
て (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/181220.html>)
(accessed on 2019-10-07)

25 農林水産省, (2019) 農林水産物輸出入概況 2018 年 (平成 30 年) 確定値.
(http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/attach/pdf/houkoku_gaikyou-15.pdf)
(accessed on 2019-10-07).

別添資料の内容

- 別添資料 1: ベクターpTCO113 の配列特性 社外秘情報につき非開示
- 5 別添資料 2: MS11, RF3 及び MS11xRF3 における花茎形態及び花粉稔性の非組
換えセイヨウナタネとの比較 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 3: MS11 における導入遺伝子のコピー数の決定及びベクター外骨格領
域が存在するかどうかの確認 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 4: MS11 の複数世代における挿入遺伝子の伝達
社外秘情報につき非開示
- 10 別添資料 5: MS11 に挿入された配列及び近傍配列の決定
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 6: MS11 における挿入配列の安定性 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 7: 2014 年にカナダ及び米国で栽培された MS11 を用いた蛋白質発現
解析 社外秘情報につき非開示
- 15 別添資料 8: MS11 の植物体及び花序組織の 3 世代における改変 BARNASE 蛋白
質、BARSTAR 蛋白質及び改変 PAT 蛋白質の蛋白質定量解析
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 9: MS11 における改変 *barnase* 遺伝子産物の発現解析
社外秘情報につき非開示
- 20 別添資料 10: 隔離ほ場試験報告書 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 11: イベント識別方法 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 12: MS11 種子におけるアグロバクテリウムの残存の確認
社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

令和2年5月25日

氏名 BASF ジャパン株式会社

代表取締役社長 石田 博基

住所 東京都中央区日本橋室町三丁目4番4号

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雄性不稔セイヨウナタネ(改変 *bar*, 改変 *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7)(以下、「本組換えセイヨウナタネ」とする。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合は、以下の措置を執ることとする。

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

本組換えセイヨウナタネが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断された場合は、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部(表1)を速やかに設置する。

表1 危機対策本部*名簿(令和2年5月現在)

	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部 執行役員 事業部長
**	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部

*本危機対策本部は、社内 Country Incident Management Team の指揮管理のもと、第一種使用等に係る緊急措置の実働対応を行う。

**管理責任者

(個人名は個人情報のため非開示)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、BASF Agricultural Solutions Seed US LLC と連絡を取り、種子、セイヨウナタネの生産、収穫物の状況に関し、セイヨウナタネ種子の生産、供給、販売及び取扱いなど使用の可能性のある関係各社から可能な限り情報収集を行う。

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

弊社は、BASF Agricultural Solutions Seed US LLC と連絡を取り、生産農家やセイヨウナタネ種子の取扱業者など取引ルートへ本組換えセイヨウナタネの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

当該影響を生ずるおそれに基づき、弊社は BASF Agricultural Solutions Seed US LLC の協力のもと、本組換えセイヨウナタネを不活化する措置、本組換えセイヨウナタネの環境への放出を防止するための措置、又はすでに環境に放出された本組換えセイヨウナタネの拡散を防止する措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換えセイヨウナタネが我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認められた場合には、速やかに、農林水産省消費・安全局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、緊急措置に対応するための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。