

除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性並びに雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変 *bar*, 改変 *cp4 epsps*, 改変 *gox v247*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.) (MS8×RF3×RT73, OECD UI: ACS-BNØØ5-8×ACS-BNØØ3-6×MON-ØØØ73-7) (MS8、RF3 及び RT73 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	5
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	5
① 和名、英名及び学名	5
② 宿主の品種名	5
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯	5
(2) 使用等の歴史及び現状	6
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	6
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	7
(3) 生理学的及び生態学的特性	8
イ 基本的特性	8
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	8
ハ 捕食性又は寄生性	8
ニ 繁殖又は増殖の様式	8
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	8
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	9
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	9
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	11
ホ 病原性	11
ヘ 有害物質の産生性	11
ト その他の情報	12
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	13
(1) 供与核酸に関する情報	13
イ 構成及び構成要素の由来	13
ロ 構成要素の機能	17
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	17
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	

質と相同性を有する場合はその旨 .....	17
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....	20
(2) ベクターに関する情報 .....	22
イ 名称及び由来 .....	22
ロ 特性 .....	22
① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....	22
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 .....	26
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 .....	26
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	26
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....	26
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....	26
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....	27
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....	27
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 .....	27
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 .....	27
(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 .....	29
① 移入された核酸の複製物が存在する場所 .....	29
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 .....	29
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 .....	29
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 .....	29
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 .....	30
(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 .....	30
(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違 .....	30
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 .....	30
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 .....	34
a. 形態及び生育の特性 .....	35
b. 生育初期における低温又は高温耐性 .....	35
c. 成体の越冬性又は越夏性 .....	37

d. 花粉の稔性及びサイズ .....	37
e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 .....	37
f. 交雑率 .....	38
g. 有害物質の産生性 .....	39
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 .....	40
(1) 使用等の内容 .....	40
(2) 使用等の方法 .....	40
(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 .....	40
(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 .....	40
(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 .....	40
(6) 国外における使用等に関する情報 .....	40
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	42
1 競争における優位性 .....	42
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	42
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	44
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	44
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	44
2 有害物質の産生性 .....	44
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	44
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	46
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	46
3 交雑性 .....	46
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	46
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	46
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	47
4 その他の性質 .....	47
第三 生物多様性影響の総合的評価 .....	52
参考文献 .....	55
別添資料の内容 .....	65
緊急措置計画書 .....	66

第一種使用規程承認申請書

平成 22 年 11 月 18 日

農林水産大臣 鹿野 道彦 殿  
環境大臣 松本 龍 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 ギャビン マーチャント  
印  
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

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及びグリホサート耐性並びに雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 <i>bar</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , 改変 <i>gox v247</i> , <i>barnase</i> , <i>barstar</i> , <i>Brassica napus</i> L.）（MS8×RF3×RT73, OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6×MON-00073-7）（MS8、RF3 及び RT73 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統のもの（既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。）を含む。）
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

#### (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

英名： Oilseed Rape

学名： *Brassica napus* L.

##### ② 宿主の品種名

除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性並びに雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 *bar*, 改変 *cp4 epsps*, 改変 *gox v247*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.）（MS8×RF3×RT73, OECD UI: ACS-BNØØ5-8×ACS-BNØØ3-6×MON-ØØØ73-7）（以下、「本スタック系統」とする。）の各系統親の作出に用いた宿主の品種名は以下の通りである。

- － 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*, *barnase*, *Brassica napus* L.）（MS8, OECD UI: ACS-BNØØ5-8）（以下、「MS8」とする。）：宿主は、春播きセイヨウナタネ品種 *Drakkar* である。
- － 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、「RF3」とする。）：宿主は、春播きセイヨウナタネ品種 *Drakkar* である。
- － 除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ（改変 *cp4 epsps*, 改変 *gox v247*, *Brassica napus* L.）（RT73, OECD UI: MON-ØØØ73-7）（以下、「RT73」とする。）：宿主は春播きセイヨウナタネ品種 *Westar* 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、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（角田, 2001）。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（稲永, 2000）。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 (OECD, 1997)。

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、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 (独立行政法人 国立環境研究所, 2009; 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 2010)。

また、我が国に分布するセイヨウナタネの近縁の野生種として、*B. rapa*、*B. juncea* (カラシナ)、*B. nigra* (クロカラシ)、*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino (ハマダイコン)、*R. raphanistrum* (セイヨウノダイコン)、*Hirschfeldia incana* (ダイコンモドキ) 及び *Sinapis arvensis* (ノハラガラシ) が挙げられる (角田, 2001; 環境省, 2002; 中井, 2003)。

*B. rapa* は、古くから栽培種として利用されている (Kihara, 1969) が、雑草性の亜種あるいは変種の形成は報告されていない (竹松・一前, 1993)。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大きな群落が見られる (松尾ら, 2005)。*B. juncea* も我が国では古くから栽培種として利用されてきた (Kihara, 1969) が、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おり、現在では全国に分布し、耕作地や荒地、路地でその自生が見られる (中井, 2003)。*B. nigra* は明治以降に帰化した外来種 (村上・鷺谷, 2002) で、現在では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 (清水ら, 2001; 中井, 2003)。*R. sativus* L. var. *raphanistroides* Makino はハツカダイコンが野生化したもので、各地の海浜の砂地に生育する (清水ら, 2001)。*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* はいずれも近年になって我が国に帰化した外来種で、全国に分布している (中井, 2003)。

## (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

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 (Downey and Röbbelen, 1989)。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 (角田, 2001)。

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（志賀, 1981）。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（角田, 2001）。

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（新谷, 1995）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（角田, 2001; 稲永, 2000）。

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った（杉山, 2001）。

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）。なお、近年、菜の花の景観植物としての利用や、化石燃料の代替としてナタネ油を利用しようとする動きが見られる。

## ② 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（角田, 2001）。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（稲永, 2000）。

2009年におけるナタネ種子（Rapeseed）の世界総生産量は約 6163 万 t であり、主な生産国は、中国（1350 万 t）、カナダ（1183 万 t）、インド（720 万 t）であった（FAOSTAT）。我が国には、2009年に油脂原料としてナタネ種子約 207 万 t が輸入され、主な輸入先はカナダ（約 196 万 t）、次いでオーストラリア（約 12 万 t）であった（農林水産

省, 2010)。

### (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 (稲永, 2000)。春播き品種の生育適温は 12~30°C である (OECD, 1997)。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 (志賀, 1981)。

#### ハ 捕食性又は寄生性

---

#### 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

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 (志賀, 1981)。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 (稲永, 2000)。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

種子の休眠性について、成熟したセイヨウナタネ種子はほとんど休眠性を示さない (Lutman, 1993; Pekrun *et al.*, 1998) が、発芽に不適な環境下では休眠を誘発される場合がある (二次休眠)。二次休眠は、極端な変温、土壌水分の不足及び長期間の暗条件 (Pekrun *et al.*, 1997b) 並びに酸素欠乏 (Pekrun *et al.*, 1998) など発芽に不適な環境下に曝された場合に誘発されることがある。これらの獲得された休眠性は、例えば 12°C や 20°C といった比較的一定の温度条件下で休眠状態を保つ (Pekrun *et al.*, 1997a) が、2~4°C の低温条件 (Gulden *et al.*, 2000)、変温条件 (Pekrun *et al.*, 1998)



などによって覚醒される。

セイヨウナタネの種子の寿命は比較的長い、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(小河原, 1943; 志賀, 2001)。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%のときは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%以上の発芽率を保つ(志賀, 2001)。

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

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

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自家受粉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(Hühn and Rakow, 1979; Rakow and Woods, 1987; OECD, 1997)。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(田坂, 1943)。

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、ザーツァイ等)、*B. nigra* (クロカラシ)、*R. raphanistrum* (セイヨウノダイコン)、*H. incana* (ダイコンモドキ) 及び *S. arvensis* (ノハラガラシ) が挙げられる(OGTR, 2008; 環境省, 2002)。*B. rapa* は栽培由来の外来種である(Kihara, 1969)。*B. juncea* も栽培種に由来する外来種である(Kihara, 1969)が、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(中井, 2003)。*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana*、*S. arvensis* はいずれも明治以降に我が国に帰化した外来種である(村上・鷲谷, 2002; 中井, 2003; 環境省, 2002)。

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(Bing, 1991; 志賀, 2001)。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* から採種して調べた結果、芽生えた苗のうち、雑種は0.4~1.5%(Scott and Wilkinson, 1998) 又は0.2%(Wilkinson *et al.*, 2000)

であった。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 (Warwick *et al.*, 2003)。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 (小此木, 1934)。

セイヨウナタネと *B. juncea* は交雑親和性があり、栽培条件下で種間雑種を生ずることが報告されている (Bing, 1991; Frello *et al.*, 1995; Bing *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 1998; Bielikova and Rakousky, 2001)。また、セイヨウナタネが花粉源となる場合やセイヨウナタネと *B. juncea* が近隣に生育している場合には、3~4.7%の交雑率が報告されている (Bing *et al.*, 1991; Jørgensen *et al.*, 1996) が、逆に *B. juncea* が花粉親となる場合には交雑率が低くなることが報告されている (Jørgensen *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 1998)。

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いことが報告されている (Bing *et al.*, 1996)。また、人工交配によってもほとんど雑種は得られないか (Bing, 1991)、又は全く得られなかったことが報告されている (Kerlan *et al.*, 1992; Brown and Brown, 1996)。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑性に関しては、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は  $3.8 \times 10^{-8} \sim 5.1 \times 10^{-4}\%$ 、*R. raphanistrum* を種子親とした場合は  $1 \times 10^{-7} \sim 3.1 \times 10^{-5}\%$ 等の雑種形成率の報告があり (Rieger *et al.*, 2001; Chevre *et al.*, 2000; Warwick *et al.*, 2003)、雑種形成の可能性は極めて低い (OGTR, 2008)。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 (Thalmann *et al.*, 2001)。

セイヨウナタネと *H. incana* については、セイヨウナタネが花粉親となる場合に交雑し得ることが知られているが、雑種が形成される可能性は低い (OGTR, 2008)。フランスで行なわれた調査では、セイヨウナタネと *H. incana* を 625 : 1 の割合で栽培した場合、*H. incana* に形成された種子のうち雑種は 1.5%であったと報告されている (Lefol *et al.*, 1996b)。

セイヨウナタネと *S. arvensis* の交雑性については、雄性不稔セイヨウナタネと *S. arvensis* を花粉媒介昆虫の放飼条件下で栽培した場合 (Lefol *et al.*, 1996a) や、花粉源となる他のナタネ類から隔離した状態で栽培した場合 (Chevre *et al.*, 1996) には、0.012~0.18%の交雑率が認められた。他方、花粉稔性のあるセイヨウナタネと *S. arvensis* を花粉媒介昆虫の放飼条件下で栽培した場合、或いは、特に制限を設けない

通常のは場条件では、*S. arvensis* から採種した 290 万粒の生存種子の中に雑種は認められなかった (Lefol *et al.*, 1996a)。

#### 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39~37 $\mu\text{m}$ 、短径22~20 $\mu\text{m}$ である (藤原, 1935; 志賀, 2001)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある (OECD, 1997)。

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 (Williams *et al.*, 1986; Paul *et al.*, 1995; Timmons *et al.*, 1995; OECD, 1997; Thompson *et al.*, 1999)。風媒による花粉の移動距離については、殆ど花粉は10 m以上移動することはなく、花粉源からの離れるに伴い減少する (Scheffler *et al.*, 1993; Timmons *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1999)。セイヨウナタネ花粉の拡散範囲は数メートルから360 m であるが、1.5 kmの時点でも確認されている例もあり (Timmons *et al.*, 1995)、花粉の拡散距離は環境的・地形的条件によって様々である。また、ミツバチは通常巣の周辺の植物間を移動するが (Rieger *et al.*, 1999)、巣から2 km離れた地点までミツバチの集団が確認されていること (Ramsay *et al.*, 1999) 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、1~2 km地点で0.2%、2.5~3 km地点で0.15%の交雑率が報告されていること (Rieger *et al.*, 2002) 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の寿命は、環境条件、特に気温と湿度に依存する。実験室の調整された環境下では 24 時間から 1 週間生存できることが報告されている (Mesquida and Renard, 1982)。また、自然条件下では4~5 日間で徐々に減少するとされる (Rantio-Lehtimaki, 1995)。

#### 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

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(新谷, 1995)。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(角田, 2001)。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(角田, 2001; 稲永, 2000)。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  $\mu\text{mol}$  未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており(OECD, 2001)、Drakker や Westar 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

本スタック系統の親系統 MS8、RF3 及び RT73 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それぞれ表 1~3 (p.14~16) に示した。

MS8 及び RF3 には野生型 *bar* 遺伝子を改変した *bar* 遺伝子、RT73 には野生型 *cp4 epsps* 遺伝子を改変した *cp4 epsps* 遺伝子及び野生型 *gox* 遺伝子を改変した *gox* 遺伝子が導入されており、以下これらの遺伝子をそれぞれ「改変 *bar* 遺伝子」、「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」及び「改変 *gox v247* 遺伝子」とし、発現する蛋白質をそれぞれ「改変 PAT 蛋白質」、「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」及び「改変 GOX v247 蛋白質」とする。

MS8 及び RF3 中で発現する改変 PAT 蛋白質は、野生型 *bar* 遺伝子がコードする野生型 PAT 蛋白質を、植物で使用頻度の高いコドンに適合するために N 末端のコドン GTG を ATG に、また、翻訳の効率を上げるために 2 番目のコドン AGC を GAC に改変したものである。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。

また、RT73 中で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、野生型の CP4 EPSPS 蛋白質と比較して、N 末端配列 2 番目のセリンがロイシンに改変されているが、この改変は N 末端側にクローニングの過程で *SphI* の制限酵素切断部位を作るために行われた。

さらに、RT73 中で発現する改変 GOX v247 蛋白質は、グリホサート分解活性を高めるために、N 末端配列 84 番目のアミノ酸であるグリシンがセリンに、153 番目のアミノ酸であるアルギニンがリジンに、334 番目のアミノ酸であるアルギニンがヒスチジンにそれぞれ置換されている。

表 1 MS8 の作出に用いられたプラスミド pTHW107 の構成要素

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>barnase</i> 遺伝子発現カセット		
PTA29	1.51	<i>Nicotiana tabacum</i> (タバコ) 由来の葯特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、葯のタペート細胞において発現を誘導する (Seurinck <i>et al.</i> , 1990)。
<i>barnase</i>	0.34	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、RNA 分解酵素 (BARNASE 蛋白質) をコードする遺伝子。PTA29 の支配下で葯のタペート細胞において発現し、雄性不稔形質を付与する (Hartley, 1988)。
3'nos	0.26	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 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
PSsuAra	1.73	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) 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発現を誘導する (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)。
改変 <i>bar</i>	0.55	<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 (Thompson <i>et al.</i> , 1987)。野生型 PAT 蛋白質の N 末端の 2 つのコドンは ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
3'g7	0.21	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 (Velten and Schell, 1985; Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
その他		
RB	0.03	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界 (Gielen <i>et al.</i> , 1984)。
LB	0.03	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界 (Gielen <i>et al.</i> , 1984)。
<i>Sm/Sp</i>	1.01	<i>Escherichia coli</i> (大腸菌) 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 adenytransferase をコードする領域 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
<i>barstar</i>	0.27	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビター (BARSTAR 蛋白質) をコードする。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)。
pVS1ori	3.78	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来のプラスミド pVS1 (Itoh <i>et al.</i> , 1984) の複製起点を含む領域。
pBRori	1.16	<i>E. coli</i> (大腸菌) 由来のプラスミド pBR322 の複製起点を含む領域 (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。)

表 2 RF3 の作出に用いられたプラスミド pTHW118 の構成要素

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>barstar</i> 遺伝子発現カセット		
PTA29	1.51	<i>N. tabacum</i> (タバコ) 由来の葯特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、葯のタペート細胞において発現を誘導する (Seurinck <i>et al.</i> , 1990)。
<i>barstar</i>	0.27	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビター (BARSTAR 蛋白質) を産生する。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)。
3'nos	0.26	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 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
PSsuAra	1.73	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ) 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発現を誘導する (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)。
改変 <i>bar</i>	0.55	<i>S. 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 (Thompson <i>et al.</i> , 1987)。野生型 PAT 蛋白質の 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	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 (Velten and Schell, 1985; Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
その他		
RB	0.03	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界 (Gielen <i>et al.</i> , 1984)。
LB	0.03	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界 (Gielen <i>et al.</i> , 1984)。
<i>Sm/Sp</i>	1.01	<i>E. coli</i> (大腸菌) 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 adenytransferase をコードする領域 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
<i>barstar</i>	0.27	<i>B. 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 BARNASE 蛋白質と特異的に結合し、その活性を阻害する (Hartley, 1988)。
pVS1ori	3.78	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来のプラスミド pVS1 (Itoh <i>et al.</i> , 1984) の複製起点を含む領域。
pBRori	1.16	<i>E. coli</i> (大腸菌) 由来のプラスミド pBR322 の複製起点を含む領域 (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。)

表 3 RT73 の作出に用いられたプラスミド PV-BNGT04 の構成要素

構成要素	由来及び機能
改変 <i>gox v247</i> 遺伝子発現カセット	
P-FMV	<i>Figwort mosaic virus</i> の 35S プロモーター (Gowda <i>et al.</i> , 1989; Richins <i>et al.</i> , 1987; Sheperd <i>et al.</i> , 1987)。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。
Arab-SSU1A /CTP1	<i>Arabidopsis</i> の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase の small subunit 1A の葉緑素輸送ペプチド配列の N 末端配列 (Timko <i>et al.</i> , 1988)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>gox v247</i>	<i>Ochrobacterum anthropi</i> LBAA 株由来のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase ; GOX) の変異体 (Barry <i>et al.</i> , 1994; Woodward <i>et al.</i> , 1994)。グリホサートをアミノメチルホスホン酸 (AMPA) とグリオキシレートに分解する。
E9 3'	エンドウの <i>rbcS E9</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域で改変 <i>gox v247</i> 及び改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子のポリアデニル化を終結させる (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984; Morelli <i>et al.</i> , 1985)。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-FMV	<i>Figwort mosaic virus</i> の 35S プロモーター (Gowda <i>et al.</i> , 1989; Richins <i>et al.</i> , 1987; Sheperd <i>et al.</i> , 1987)。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。
AEPSPS/CTP2	<i>Arabidopsis</i> の <i>EPSPS</i> 遺伝子の葉緑素輸送ペプチド配列の N 末端配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (Padgett <i>et al.</i> , 1993)。除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。
E9 3'	エンドウの <i>rbcS E9</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域で改変 <i>gox v247</i> 及び改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子のポリアデニル化を終結させる (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984; Morelli <i>et al.</i> , 1985)。
その他の構成要素	
Right Border (RB)	pTiT37 プラスミドに由来する制限フラグメントであり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の導入を開始する (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
Left Border (LB)	Octopine Ti プラスミド pTiA6 に由来する制限フラグメントで、25 bp の T-DNA 左境界を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
ori-V	広域ホストプラスミド RK2 に由来する <i>Agrobacterium</i> での複製起点セグメント (Rogers <i>et al.</i> , 1987)。
ori-322	pBR322 由来で、 <i>E. coli</i> 中における PV-BNGT04 の複製開始点 (Sutcliffe, 1979)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 由来の、アミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-スクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。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 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。(GenBank accession X03043)
<i>rop</i>	プライマー蛋白質のリプレッサーをコーディングしている配列。 <i>E.coli</i> 内でプラスミド数を維持する (Giza and Huang, 1989)。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。)



## ロ 構成要素の機能

- 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

MS8、RF3 及び RT73 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表 1～3 (p.14～16) にそれぞれ示した。

- 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。

改変 *bar* 遺伝子産物の改変 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。

### 改変 CP4 EPSPS 蛋白質

除草剤グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) (E.C.2.5.1.19) と特異的に結合してその活性を阻害する (Steinrüken and Amrhein, 1980; Haslam, 1993)。そのため、植物はグリホサートを処理すると EPSPS 活性が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。RT73 の目的遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。

### 改変 GOX v247 蛋白質

土壌中でグリホサートは微生物によって分解・活性化される。これは微生物中のグリホサート分解酵素 (Glyphosate Oxidoreductase; GOX) が、グリホサートを殺草

活性がないアミノメチルホスホン酸（AMPA）とグリオキシレートへと分解するためであり、これまでにグリホサートを分解する多数のグラム陰性菌やグラム陽性菌で見いだされている（Pipke and Amrhein, 1988; Jacob *et al.*, 1988）。そこで、グリホサートから AMPA とグリオキシレートへの分解能を持つと推定される微生物の中から、最も高いグリホサート分解能を示した *Ochrobacterium anthropi*（旧分類名：*Achromobactor* sp.）LBAA 株を選抜し、*gox* 遺伝子を単離した（Hallas *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 1994）。*Ochrobacterium anthropi* LBAA 株は植物根圏中に最も多く存在する微生物の一つとして報告されており（Joos *et al.*, 1988）、*Ochrobacterium anthropi* LBAA 株は、グリホサートを炭素源やリン源として利用することができることが分かっている（Barry *et al.*, 1994）。

### BARNASE 蛋白質

花粉形成は葯内で高度に制御されたプロセスで行われる。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。それゆえ、タペート細胞の欠落は雄性不稔の主な原因であると考えられている（Kaul, 1988）。

*barnase* 遺伝子は、プロモーターPTA29 の支配下で葯の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（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れ、花粉形成を阻害する（Drews and Goldberg, 1989; Hartley, 1989; Mariani *et al.*, 1990）。

### BARSTAR 蛋白質

MS8 における *barnase* 遺伝子と同様に、*barstar* 遺伝子はプロモーターPTA29 の支配下にあり、葯のタペート細胞において BARSTAR 蛋白質を発現する。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の細胞内阻害物質であり、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, 1967; Hartley and Smeaton, 1973; Hartley, 1989）。

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（濃沼, 2005）が、セイヨウナタネのように自殖可能な作物では、自殖による種子形成も行なわれるため、確実に他殖による F1 種子を得ることは困難である。そこで、*barnase* 遺伝子の発現により雄性不稔を示す MS8 を種子親、*barstar* 遺伝子により稔性回復性を有する示す RF3 を花粉親として交配させることにより、効率的に F1 種子を得ることができる（図 1, p.17）。その F1 世代では、BARSTAR 蛋白質が BARNASE 蛋白質の作用を抑制して花粉稔性を回復させる（Mariani *et al.*, 1992）ため、自殖で高収量の種子生産が可能となる。

なお、MS8 と RF3 のスタック系統、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*, *barster*, *Brassica napus* L.）（MS8RF3,

OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6) (以下、「MS8RF3」とする) については、2007年8月に第一種使用規程承認を得ている。

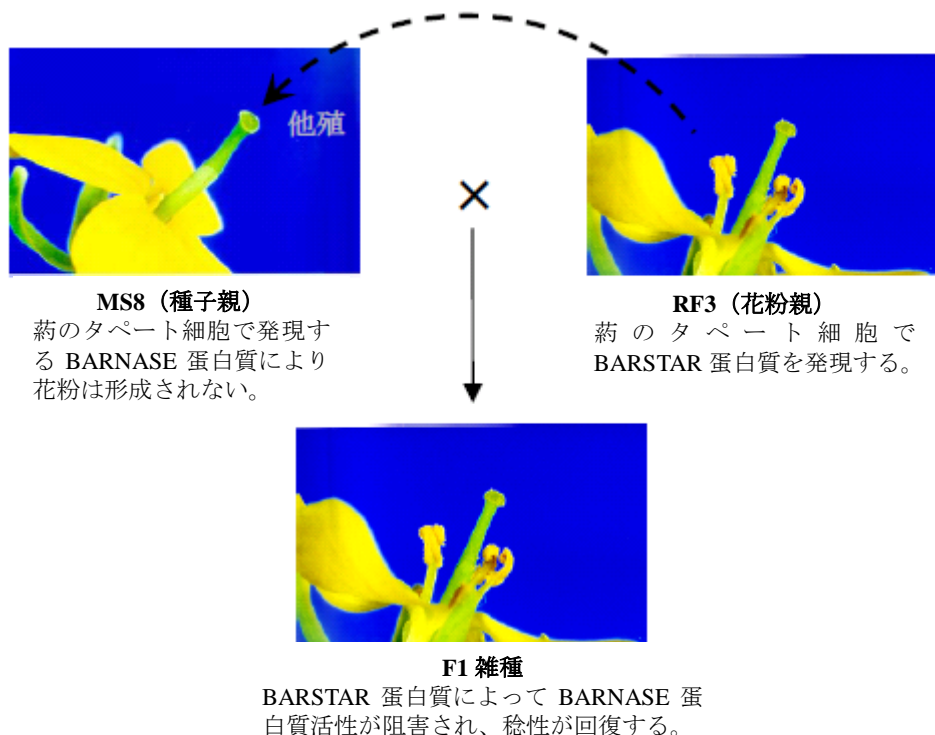


図1 雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネによる F1 品種作出の概略図  
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

改変 PAT 蛋白質、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質の各アミノ酸配列について、2009年にデータベース (AllergenOnline) に登録されているアミノ酸との比較を行った結果、いずれについても既知の毒素又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース (AD\_2009<sup>1</sup>) を用いて FASTA 型アルゴリズム及び ALLERGENSEARCH 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

<sup>1</sup> FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2009) に 2009 年 1 月の時点で登録されていた配列からなるデータベース。

### 改変 PAT 蛋白質

改変PAT蛋白質は、グルホシネートにアセチル基を転移して不活性化させる酵素である。グルホシネートはL-アミノ酸に分類されるが、改変PAT蛋白質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ずることはない (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蛋白質のグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されないことが報告されている (Wehrmann *et al.*, 1996)。よって、改変PAT蛋白質はグルホシネートに高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### 改変 CP4 EPSPS 蛋白質

EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体又は色素体に存在する (Della-Cioppa *et al.*, 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の5分の1に関与すると考えられる重要な代謝経路である (Haslam, 1974; Haslam, 1993)。本経路はその第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸 (3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate, DAHP) 合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている (Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、したがって、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の40倍のEPSPSを生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており (Smart *et al.*, 1985)、加えて、モンサント社がこれまでに製品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物 (ダイズ、ワタ、トウモロコシ) の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは、EPSPS が本経路における律速酵素でないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から、EPSP と無機リン酸 (Pi) を生ずる可逆的反応を触媒する酵素であり (Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys *et al.*, 1992)。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の200万分の1にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

### 改変 GOX v247 蛋白質

GOX 蛋白質は、グリホサートを AMPA とグリオキシレートに分解する反応を触媒する酵素である。GOX 蛋白質は基質特異性が高く、基質であるグリホサート以外に GOX 蛋白質と反応することが知られている化合物は構造が類似しているイミノ二酢酸 (IDA) と 2-メチルグリホサートであるが (Padgett *et al.*, 1994)、これらの化合物が植物体内に存在するという報告はない。なお、RT73 で発現している改変 GOX v247 蛋白質は、グリホサート分解活性を高める目的で GOX 蛋白質と比べてアミノ酸が 3ヶ所変換されているが、改変 GOX v247 蛋白質を発現する RT73 の成分分析を行った結果、対照の非組換えセイヨウナタネと相違は認められておらず、改変 GOX v247 蛋白質の基質特異性は GOX 蛋白質と同様であると考えられた。

### BARNASE 蛋白質

薬特異的プロモーターPTA29 の支配下にある *barnase* 遺伝子を導入したセイヨウナタネの蒴において、タペート細胞のみが特異的に破壊されることが確認されており (Mariani *et al.*, 1990)、他の組織で発現することは考え難い。タペート細胞は花弁形成の四分子期に最も発達し、小胞子の発達とともに退化・崩壊する (高畑, 2005)。よって、*barnase* 遺伝子がタペート細胞以外の組織において発現し、BARNASE 蛋白質が植物体の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

### BARSTAR 蛋白質

*barstar* 遺伝子は、プロモーターPTA29 の支配下にあるため、タペート細胞以外の組織で発現することは考え難い。また、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 (Martinez *et al.*, 1995)。さらに、細菌と糸状菌のリボヌクレアーゼには、構造及び配列に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 (Yakovlev *et al.*, 1995)。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 (Hill *et al.*, 1983) も BARSTAR 蛋白質で阻害されることが報告されている (Hartley *et al.*, 1996)。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。以上から、BARSTAR 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

MS8: *E.coli* 由来の pGSV1 を基に構築されたバイナリーTi プラスミド pTHW107 (図 2, p.23)。

RF3: *E.coli* 由来の pGSV1 を基に構築されたバイナリーTi プラスミド pTHW118 (図 3, p.24)。

RT73: *E.coli* 由来のプラスミド pBR322 などから構築されたプラスミドベクター PV-BNGT04 (図 4, p.25)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

pTHW107 : 12,622 bp

pTHW118 : 12,508 bp

PV-BNGT04 : 11,491 bp

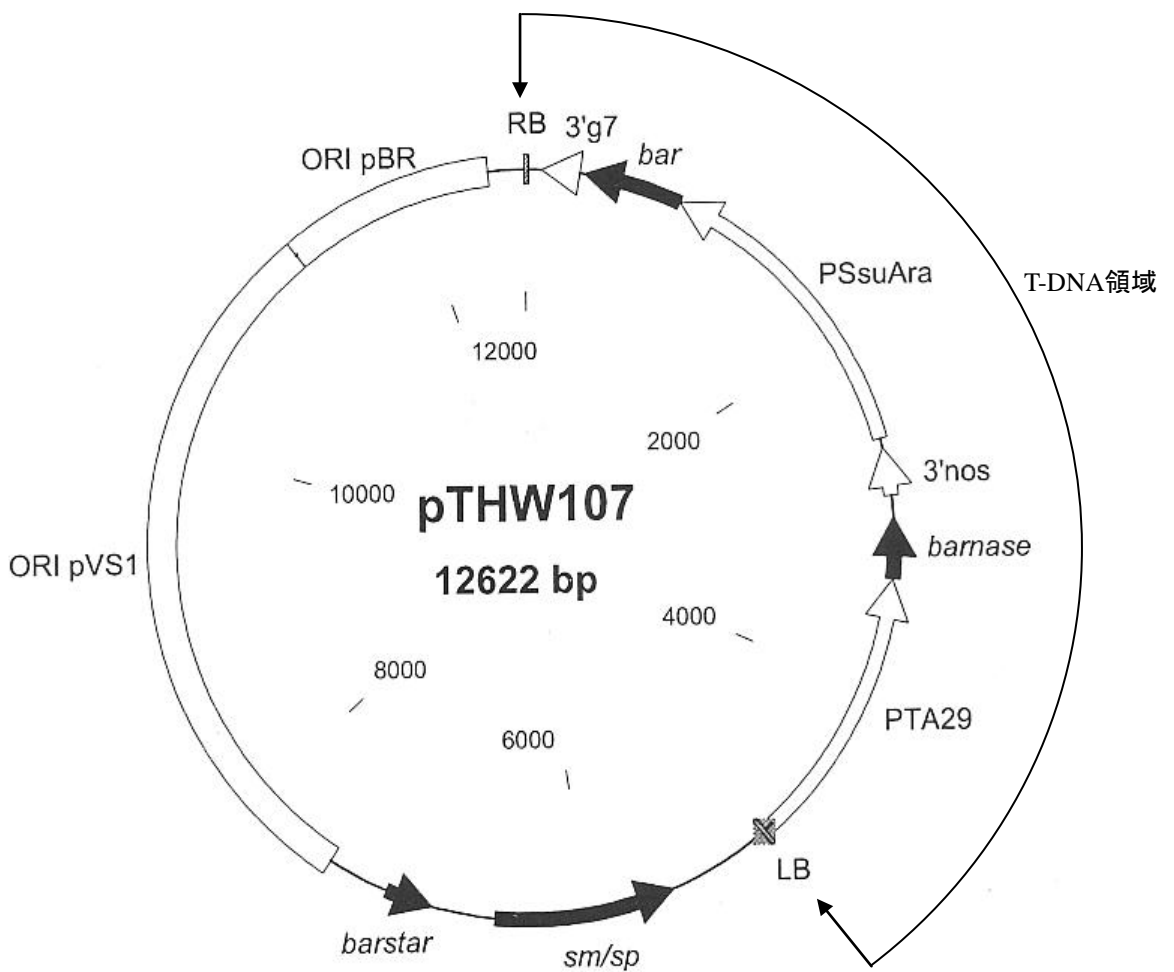


図 2 pTHW107 のプラスミド地図

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係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

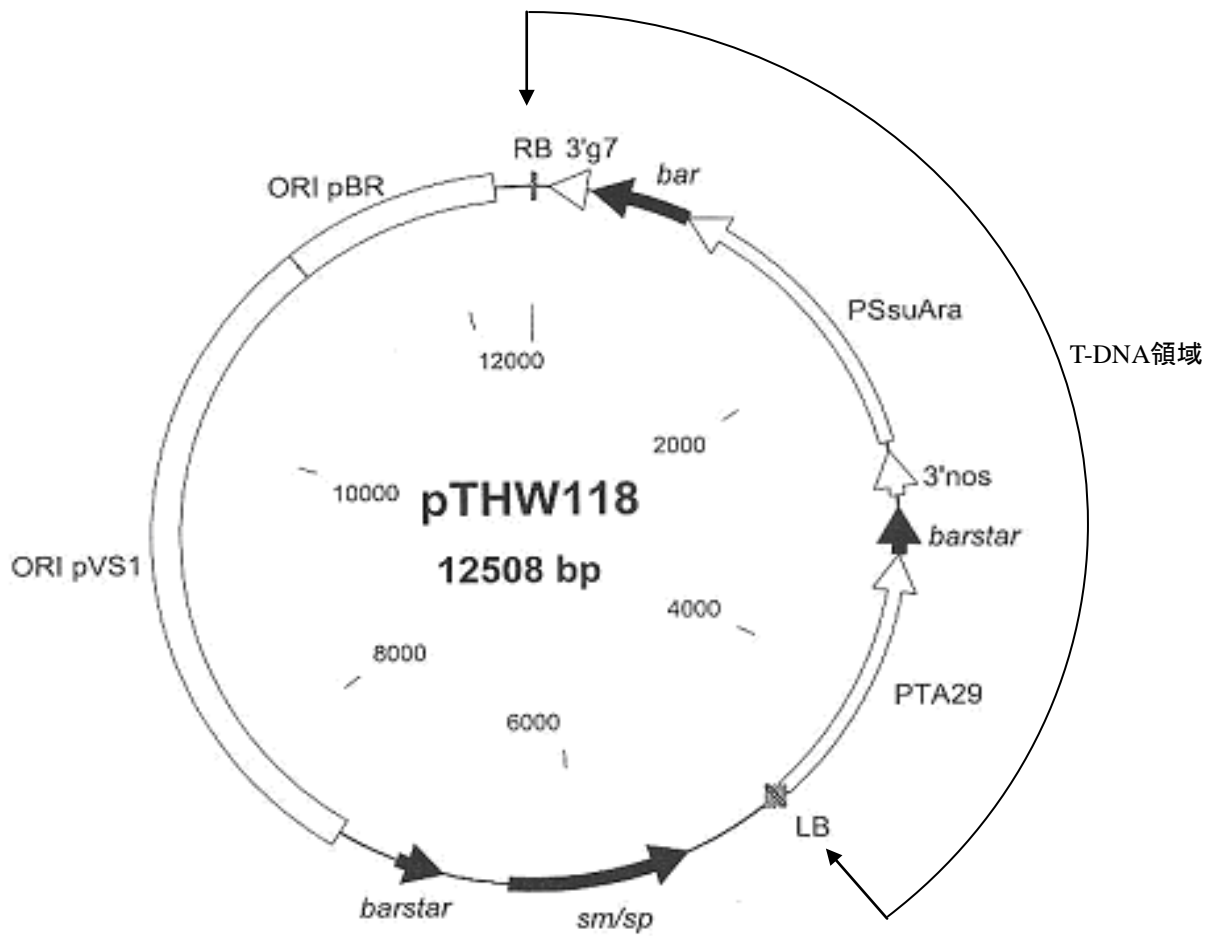


図3 pTHW118のプラスミド地図

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係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)



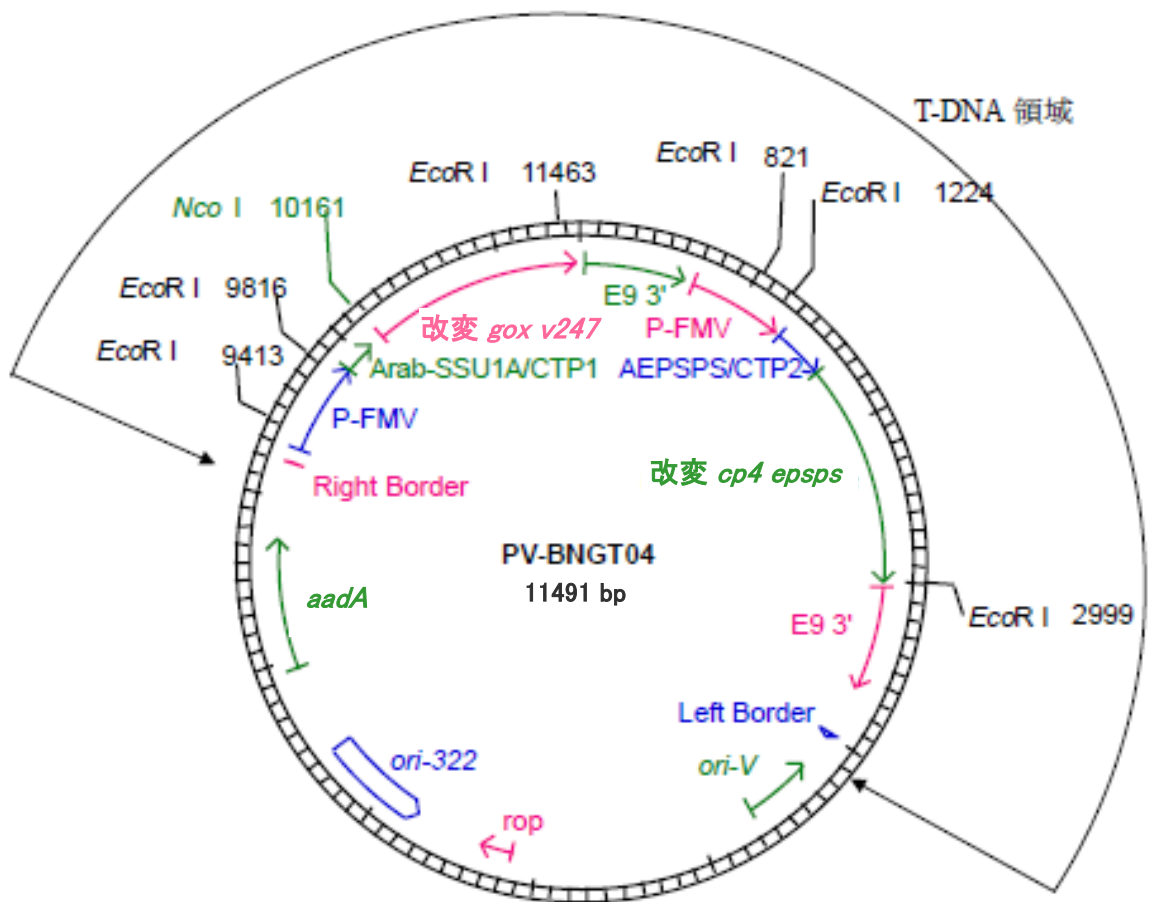


図4 PV-BNGT04のプラスミド地図

(注:本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。)

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pTHW107、pTHW118 及び PV-BNGT04 の各構成要素については、それぞれ表 1～表 3 (p.14～16) に示した。

なお、pTHW107 及び pTHW118 の外骨格の *barstar* 遺伝子は pGSV1 に構築されたものであるが、この目的は pTHW107 を構築する過程で大腸菌を用いて *barnase* 遺伝子をプラスミド上に導入する際に、たとえ植物用のプロモーターを用いていても、少量の BARNASE 蛋白質が発現して大腸菌が死んでしまうため、この活性を抑制するために利用された。

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

pTHW107、pTHW118 及び PV-BNGT4 の感染性はいずれも知られていない。

(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

MS8 : pTHW107 上の T-DNA 領域は、*barnase* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット [PTA29]-[*barnase*]-[3'nos]-[PSsuAra]-[改変 *bar*]-[3'g7] で構成される (図 2, p.23)。

RF3 : pTHW118 上の T-DNA 領域は、*barstar* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット [PTA29]-[*barstar*]-[3'nos]-[PSsuAra]-[改変 *bar*]-[3'g7] で構成される (図 3, p.24)。

RT73 : PV-BNGT04 の T-DNA 領域は FMV プロモーターによって制御される改変 *gox v247* 遺伝子発現カセット [P-FMV]-[Arab-SSU1A/CTP1]-[改変 *gox v247*]-[E9 3'] 及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット [P-FMV]-[AEPSPS/CTP2]-[改変 *cp4 epsps*]-[E9 3'] で構成される (図 4, p.25)。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入は、MS8、RF3 及び RT73 のいずれもアグロバクテリウム法を用いて行われた。

## 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の方法

核酸が移入された細胞の選抜は、以下を添加した培地を用いて行った。

MS8：グルホシネート

RF3：グルホシネート

RT73：グリホサート

### 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菌体の残存の有無

MS8 及び RF3 については、形質転換後カルベニシリンを含む培地で培養し、アグロバクテリウム菌体を除去した。また、MS8、RF3 にアグロバクテリウム菌体の残存がないことは、カルベニシリンを含まない培地上で培養し、アグロバクテリウムのコロニーが形成されないことにより確認した。

また、RT73 については、カルベニシリン及びパロモマイシンを含む培地で培養することによりアグロバクテリウムを除去した。なお、RT73 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン及びパロモマイシン無添加の培地に RT73 を移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

### 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

MS8 及び RF3 については、形質転換後再生させた各植物体について、各目的形質及び農業形質等に関して総合的に選抜された。

RT73 については、得られた再生個体について挿入遺伝子や改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、ほ場での実際のグリホサート耐性及び農業形質などから総合的に判断して RT73 が選抜された。

本スタック系統の育成の経過を図 5 (p.28) に示した。なお、本申請の対象は、MS8、RF3 及び RT73 の三系交雑により作出された本スタック系統の当代及びその後代である。

また、各親系統及び本スタック系統の我が国における申請・承認状況を表 4 (p.28)

に示した。

表 4 我が国における各親系統及び本スタック系統の承認状況

	食品	飼料	環境
MS8	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2006年9月 第一種使用規程承認
RF3	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2007年4月 第一種使用規程承認
RT73	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2006年3月 第一種使用規程承認
本スタック系統	2010年11月申請	2010年11月届出	2010年11月申請

(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。)

社外秘情報につき非開示

図 5 本スタック系統の育成の経過

(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

MS8、RF3 及び RT73 に移入された核酸は、いずれも染色体上に存在することが確認されている。

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数世代における伝達の安定性

MS8 には、1 コピーの T-DNA 領域が挿入されていることがサザンブロット分析及びシーケンス解析により確認されている。

RF3 には、1 コピーの T-DNA 領域及び途中で切れた PTA29、*barstar* 遺伝子、3'nos 及び機能部分を含まない PSsuAra が逆位で隣接して挿入されていることがサザンブロット分析及びシーケンス解析により確認されている。

RT73 については、サザンブロット分析及び PCR 分析により挿入遺伝子の解析を行った結果、RT73 のゲノム DNA 中には改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *gox v247* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域が 1 ヶ所に 1 コピーのみ挿入されており、その他の構成要素は挿入されていないことが明らかとなっている。

MS8、RF3 及び RT73 における挿入遺伝子の伝達の安定性については、いずれも複数世代におけるサザンブロット分析により確認されている。

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

MS8 及び RT73 にはそれぞれ 1 コピーの T-DNA 領域のみが挿入されているため、本項目は該当しない。

他方、RF3 に導入された 1 コピーの T-DNA 領域及び途中で切れた PTA29、*barstar* 遺伝子、3'nos 及び機能部分を含まない PSsuAra は、隣接して挿入されていることがシーケンス解析により確認されている。

④ (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

発現の安定性について以下のように確認した。

MS8：ノーザンブロット分析、除草剤グルホシネート散布試験並びに除草剤グル

ホシネート耐性を示した個体における雄性不稔の確認

RF3： ノーザンブロット分析、除草剤グルホシネート散布試験及びMS8RF3における稔性回復の確認

RT73： 除草剤グリホサート散布試験

- 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

MS8 及び 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と考えられる。また、RT73 の作出に用いられた PV-BNGT04 は、自律増殖可能な宿主域が *E.coli* と *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物に対する伝達性は考えられない。

- (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

MS8 及び RF3 は、それぞれ挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 法によって特異的に識別することができる。

RT73 を検出及び識別するための方法としては、挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして定性的 PCR 法を開発しており、本法により RT73 を特異的に検出可能である。

本スタック系統を検出及び識別するためには、上記の方法を種子1粒ごと又は植物体1個体ごとについてそれぞれの方法で分析する必要がある。

- (6) 宿主又は宿主の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な内容

本スタック系統は親系統が有する以下の特性が付与されている。

MS8： 除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔性

RF3： 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性

RT73： 除草剤グリホサート耐性

改変PAT蛋白質は、グルホシネートにアセチル基を転移して不活性化させる酵素である。グルホシネートはL-アミノ酸に分類されるが、改変PAT蛋白質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ずることはない

(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蛋白質のグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されないことが報告されている (Wehrmann *et al.*, 1996)。よって、改変PAT蛋白質はグルホシネートに高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

改変 CP4 EPSPS 蛋白質は野生型 EPSPS 蛋白質と同様に、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、EPSPS 蛋白質は本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質である PEP と S3P と特異的に反応することが知られている (Gruys *et al.*, 1992) が、これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているシキミ酸は、Gruys らの論文を元に計算すると、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応することは考えられない。

GOX 蛋白質は、グリホサートを AMPA とグリオキシレートに分解する反応を触媒する酵素である。GOX 蛋白質は基質特異性が高く、基質であるグリホサート以外に GOX 蛋白質と反応することが知られている化合物は構造が類似しているイミノ二酢酸 (IDA) と 2-メチルグリホサートであるが、これらの化合物が植物体内に存在するという報告はない (Padgett *et al.*, 1994)。なお、RT73 で発現している改変 GOX v247 蛋白質は、グリホサート分解活性を高める目的で GOX 蛋白質と比べてアミノ酸が 3ヶ所変換されているが、改変 GOX v247 蛋白質を発現する RT73 の成分分析を行った結果、対照の非組換えセイヨウナタネと相違は認められておらず、改変 GOX v247 蛋白質の基質特異性は GOX 蛋白質と同様であると考えられた。

BARNASE 蛋白質は一本鎖 RNA 分子を加水分解するリボヌクレアーゼであるが、プロモーター PTA29 によってタペート細胞でのみ発現するため、その他の植物体の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の細胞内阻害物質であり、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 (Makarov *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1995)。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 (Yakovlev *et al.*, 1995)。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 (Hill *et al.*, 1983) も BARSTAR 蛋白質で阻害されることが報告されている (Hartley *et al.*, 1996)。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。以上から、BARSTAR 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

このように、改変PAT蛋白質、改変CP4 EPSPS蛋白質及び改変GOX v247蛋白質はそれぞれ異なる作用機作で独立して作用している。他方、BARNASE蛋白質とBARSTAR蛋白質は相互作用を示すものの、改変PAT蛋白質、改変CP4 EPSPS蛋白質及び改変GOX v247蛋白質との相互作用は示さないものと考えられる。また、BARNASE蛋白質とBARSTAR蛋白質はいずれもプロモーターPTA29の支配下で薬のタペート細胞で発現し特異的に複合体を形成する。よって、本スタック系統においても、これらの発現蛋白質が意図しない機能上の相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

実際に、本スタック系統においてこれらの発現蛋白質が機能上の相互作用を示していないことを確認するため、以下の生物検定を行った。

#### 除草剤グルホシネート散布試験

2010年にベルギーにおいて、温室内でポット栽培した本スタック系統、MS8RF3、MS8×RT73及びMS8の本葉1-2葉期の実生に、1倍（有効成分0.2 g/1.5 m<sup>2</sup>: 通常使用量）及び5倍濃度の除草剤グルホシネートを散布し、除草剤に対する耐性の程度をスコア化して統計解析を行った。その結果、いずれの濃度においても、同じ遺伝的背景を有する本スタック系統とMS8RF3との間、並びにMS8×RT73とMS8の間に、いずれも統計学的有意差は認められなかった（表5, p.33）。

よって、除草剤グルホシネート耐性に関して、掛け合わせによる変化は認められず、改変PAT蛋白質と、改変CP4 EPSPS蛋白質及び改変GOX v247蛋白質との間に機能上の相互作用はないと考えられる。

#### 除草剤グリホサート散布試験

2010年にベルギーにおいて、温室内でポット栽培した本スタック系統及びRT73の本葉1-2葉期の実生に、1倍（有効成分0.108 g/1.5 m<sup>2</sup>: 通常使用量）及び5倍濃度の除草剤グリホサートを散布し、除草剤に対する耐性の程度をスコア化して統計解析を行った。その結果、いずれの濃度においても、本スタック系統とRT73の間に統計学的有意差は認められなかった（表5, p.33）。

よって、除草剤グリホサート耐性に関して、掛け合わせによる変化は認められず、改変CP4 EPSPS蛋白質及び改変GOX v247蛋白質と、改変PAT蛋白質、BARNASE蛋白質及びBARSTAR蛋白質との間に機能上の相互作用はないと考えられる。



表 5 除草剤に対する耐性の程度<sup>1)</sup>

供試系統	除草剤グルホシネート				
	1 倍 <sup>2)</sup>			5 倍	
	平均値±標準偏差	有意差 <sup>4)</sup>	平均値±標準偏差	有意差	
本スタック系統	5.0 ± 0	ns	5.0 ± 0	ns	
MS8RF3	5.0 ± 0		5.0 ± 0		
MS8×RT73	4.8 ± 0.45	ns	3.0 ± 0	ns	
MS8	4.6 ± 0.55		3.0 ± 0		
非組換え体	1.0 ± 0	-	1.0 ± 0	-	

供試系統	除草剤グリホサート				
	1 倍 <sup>3)</sup>			5 倍	
	平均値±標準偏差	有意差	平均値±標準偏差	有意差	
本スタック系統	4.6 ± 0.55	ns	3.2 ± 0.45	ns	
RT73	4.0 ± 0		3.0 ± 0		
非組換え体	1.0 ± 0	-	1.0 ± 0	-	

<sup>1)</sup> 5 試験区において 1 試験区当たり約 51 個（雄性不稔性を示す MS8 は常に非組換え体と掛け合わせるにより継代されるため、理論上、導入遺伝子が受け継がれるのは生産する種子の 50% である。よって、MS8 及び MS8×RT73 については倍量の種子を播種した。）の種子を播種し、発芽した実生（本葉 1-2 葉期）に除草剤を散布して試験区ごとに除草剤に対する耐性を評価し、5 試験区のスコアの平均値及び標準偏差を示した（n=5）。耐性の指標は、1: 非常に低度の耐性（100-80%の薬害）、2: 低度の耐性（79-60%の薬害）、3: 中度の耐性（59-40%の薬害）、4: 高度の耐性（39-20%の薬害）、5: 非常に高度の耐性又は薬害は認められない（19-0%の薬害）、として評価した。

<sup>2)</sup> 除草剤グルホシネート；有効成分 0.2 g/1.5 m<sup>2</sup>。

<sup>3)</sup> 除草剤グリホサート；有効成分 0.108 g/1.5 m<sup>2</sup>。

<sup>4)</sup> 統計解析はマンホイットニーの U 検定（有意水準 5%）により行った。ns: 統計学的有意差なし。  
-: 統計学的評価は行わなかった。

（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。）

#### 雄性不稔及び稔性回復性の調査

2008年にカナダの5試験地（サスカチュワン州2試験地及びアルバータ州3試験地）において、試験地あたり各系統400株、計2000株について調査を行った。なお、本スタック系統についてはグルホシネート及びグリホサート処理を施した区と無処理の区を設けた。また、MS8RF3、MS8×RT73、MS8及びRF3にはグルホシネート処理を施し、非組換え体は無処理とした。

その結果、本スタック系統とMS8RF3はいずれもほぼ全ての株が花粉稔性を示し、系統間に統計学的有意差は認められなかった。また、MS8×RT73とMS8はいずれもほぼ全ての株が雄性不稔を示し、系統間に統計学的有意差は認められなかった。なお、RF3は非組換え体と同様にほぼ全ての株が稔性を示し、統計学的有意差は認められなかった（表6, p.34）。

よって、雄性不稔性及び稔性回復性に関して、いずれも掛け合わせによる変化は認められず、BARNASE 蛋白質と、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質

質との間、並びに BARSTAR 蛋白質と、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質との間にはいずれも機能上の相互作用はないと考えられる。

表 6 雄性不稔性及び稔性回復性の調査

供試系統	除草剤 処理 <sup>1)</sup>	予測株数		実測株数		$\chi^2$ 値 <sup>2)</sup>	p 値
		不稔	稔性	不稔	稔性		
本スタック系統	Gly + Glu	0	2000	1	1999	0.33 (ns)	0.564
本スタック系統	—	0	2000	0	2000	2.00 (ns)	0.157
MS8RF3	Glu	0	2000	2	1998		
MS8×RT73	Glu	2000	0	2000	0	1.00 (ns)	0.317
MS8	Glu	2000	0	1999	1		
RF3	Glu	0	2000	8	1992	0.69 (ns)	0.405
非組換え体	—	0	2000	5	1995		

5 試験地において、供試系統につき 1600 個（雄性不稔性を示す MS8 は常に非組換え体と掛け合わせるにより継代されるため、理論上、導入遺伝子が受け継がれるのは生産する種子の 50% である。よって、MS8 及び MS8×RT73 については倍量の種子を播種した。）の種子を播種し、生育した植物体のうち、1 試験地あたり 400 株、計 2000 株について、稔性／不稔性の調査を行った。なお、MS8×RT73 及び MS8 については生育期に除草剤グルホシネート処理を行い、改変 *bar* 遺伝子を有する株を選抜した後、同様に開花期に 1 試験地あたり 400 株、計 2000 株の稔性／不稔性を調査した。

<sup>1)</sup> 各処理は以下の要領で行った。

Gly + Glu: 子葉-2 葉期にグリホサート処理（有効成分 450 g/ha）を 1 回、続いて 4-6 葉期にグルホシネート処理（有効成分 500 g/ha）を 1 回行った。

Glu: 2-4 葉期にグルホシネート処理（有効成分 500 g/ha）を 1 回行った。

<sup>2)</sup> 花粉稔性／不稔性において導入遺伝子による影響は無いと仮定した場合、 $\chi^2$  値が 3.84 ( $p=0.05$ ) 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。）

以上から、本スタック系統における発現蛋白質間で意図しない機能上の相互作用はなく、各性質は親系統から変化していないと考えられる。

したがって、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種との生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である MS8、RF3 及び RT73 を個別に調査した結果に基づき評価した。

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

以下の a から g に挙げた項目に関する情報収集は、以下のとおり行った。

MS8： 隔離ほ場試験（1999 年度、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）及び我が国における特定網室試験（2005 年）

RF3： 隔離ほ場試験（1999 年度、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）及び我が国における特定網室試験（2005 年及び 2006 年）

RT73： 隔離ほ場試験（1995 年 5 月から 1996 年 3 月、農業環境技術研究所）及び非閉鎖系温室試験（1994 年 7 月から 1995 年 2 月、日本モンサント）

#### a. 形態及び生育の特性

MS8、RF3 及び RT73 とそれぞれ非組換え対照品種との間で、表 7（p.36）に示した項目について調査を行った。

MS8 については、着莢率において対照品種との間に統計学的有意差が認められた（別添資料 1: 社外秘情報につき非開示）。これは、セイヨウナタネは主に自殖により種子を形成するが、MS8 は花粉を形成しないため、種子生産は他系統の花粉に依存しており、受粉の機会が対照品種よりも少ないことが着莢率に影響したものと考えられた。

RF3 については、結実粒数において対照品種よりもやや少なく統計学的有意差が認められた（別添資料 3: 社外秘情報につき非開示）。これは、統計学的有意差は認められなかったものの、一莢胚珠数が対照品種よりもやや少ない傾向にあったことが影響したものと考えられた。

RT73 については、調査した全ての項目において、対照品種との間で差異は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

#### b. 生育初期における低温又は高温耐性

MS8 及び RF3 の生育初期における低温耐性に関して、隔離ほ場において 1998 年 10 月に播種した MS8 及び RF3 と各対照品種の生存率は、翌年 3 月の観察時にはいずれも 100%であった（別添資料 1: 社外秘情報につき非開示；別添資料 3: 社外秘情報につき非開示）。また、生育初期における高温耐性に関して、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、7 月に播種し、約 2 ヶ月後に収穫した MS8 及び RF3 と各対照品種の乾物重をそれぞれ比較した結果、いずれも統計学的有意差は認められなかった（別添資料 2: 社外秘情報につき非開示；別添資料 4: 社外秘情報につき非開示）。

RT73 については、1-2 葉期程度の RT73 及び対照品種の草丈と葉齢を調査した後、5℃に設定した人工気象器（湿度 35%、3,500lx、12 時間日長）内で生育させ、30 日後に再び草丈と葉齢を調査して、低温耐性を評価した。その結果、RT73 と対照品種の生育程度に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）。また、隔離ほ場試験においても、RT73 の夏季及び冬季での生育を対照品種と比較するために、夏季における生育調査では、1995 年 7 月 25 日に 5-6 葉期の苗を

定植してその後の生育を調査するとともに、同年 8 月 1 日に播種を行い発芽率などを調査した。また、冬季における生育調査では、秋播き（播種日：10 月 6 日）を行い、発芽率と初期成育を調査した（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。その結果、夏季における定植試験及び播種試験において、その生存率、草丈、発芽率などに、RT73 及び対照品種間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。また秋播きでの発芽率と初期成育ともに RT73 及び対照品種間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

表 7 形態及び生育の特性に関する試験項目及び結果の概要

調査項目	MS8	RF3	RT73
抽だい期	○	○	—
開花期	○	○	—
成熟期	○	○	—
開花始め	—	—	○
開花終わり	—	—	○
収穫期	—	—	○
発芽揃い	—	—	○
発芽率	—	—	○
一次分枝数	○	○	○
草丈	○	○	○
草型	○	○	○
葉色	○	○	—
開花数	—	—	○
着莢数	○	○	○
裂莢率	—	—	○
一穂不稔莢数	○	○	—
一莢胚珠数	○	○	—
着莢率	○*	○	—
莢長	○	○	○
莢の幅	—	—	○
結実粒数（莢当たりの種子数）	○	○*	○
結実歩合（%）	○	○	—
粒色（子実の色）	○	○	○
子実の粒大整否	○	○	○
臍の形	—	—	○
収穫期の地上部の生体重（地上部生体重）	○	○	○
収穫期の地下部の生体重	—	—	○
地上部の乾燥重	○	○	○
地下部の乾燥重	—	—	○
乾物率（%）	○	○	—
子実収量	○	○	—
千粒重	○	○	—

○：調査を行った。—：調査は行わなかった。\*：統計学的有意差（有意水準 5%）が認められた。  
（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。）

c. 成体の越冬性又は越夏性

MS8 及び RF3 の成体の越夏性に関して、隔離ほ場において 1998 年 10 月にそれぞれ対照品種と共に播種し、翌年 6 月の成熟期以降もほ場に放置した結果、7 月 30 日の観察時にはいずれの系統も全ての個体が枯死していることが確認された（別添資料 1: 社外秘情報につき非開示; 別添資料 3: 社外秘情報につき非開示）。

RT73 については、1995 年 5 月 31 日に定植を行った RT73 と対照品種を、収穫を行わずに成体の越冬性の調査を行った結果、いずれも同年 11 月 22 日には褐色・枯死しており、差異は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

d. 花粉の稔性及びサイズ

MS8 については、花粉が形成されないことを確認した（別添資料 1: 社外秘情報につき非開示）。RF3 については、花粉の稔性及び形状又はサイズは対照品種と相違がないことが確認されている（別添資料 3: 社外秘情報につき非開示）。

また、RT73 についても、花粉の稔性について対照品種との間に有意差は認められず（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）、そのサイズにも差異は認められなかった（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）。

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量

MS8 については、a で述べたとおり、着莢率において対照品種との間に統計学的有意差が認められた（別添資料 1: 社外秘情報につき非開示）。これは、MS8 は花粉を形成しないため種子生産は他系統の花粉に依存しており、受粉の機会が対照品種よりも少ないことが影響したものと考えられた。

RF3 については、a で述べたとおり、結実粒数において対照品種よりもやや少なく統計学的有意差が認められた（別添資料 3: 社外秘情報につき非開示）。これは、統計学的有意差は認められなかったものの、一莢胚珠数が対照品種よりもやや少ない傾向にあったことが影響したものと考えられた。

RT73 については、着莢数及び莢当たりの種子数（結実粒数）について対照品種と比較しているが、いずれも系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。また、人工受粉及び自然交雑により得られた莢当たりの種子数、着莢数、着莢率に関しても、RT73 と対照品種の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

## 脱粒性

MS8 及び RF3 の裂莢性について対照品種と比較した結果、いずれも相違又は統計学的有意差は認められなかった。(別添資料 1: 社外秘情報につき非開示; 別添資料 3: 社外秘情報につき非開示)。

RT73 については、裂莢率を対照品種と比較した結果、対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 7: 社外秘情報につき非開示)。

## 休眠性及び発芽率

MS8 については、隔離ほ場で栽培・収穫した各系統と対照品種の種子の発芽率を比較した結果、いずれも 100%の発芽率を示した (別添資料 1: 社外秘情報につき非開示)。

RF3 については、我が国では種子の発芽率に関する調査は行っていないが、1995 年にベルギーで行った試験において、収穫後に室温で保存された RF3 及び対照品種の種子の発芽は、100 粒播種・6 反復の平均値がそれぞれ 91 個及び 89 個であり、同等であることが確認されている (別添資料 6: 社外秘情報につき非開示)。

RT73 については、それぞれ人工受粉により得られた RT73 と対照品種の種子の発芽率を調査した結果、それぞれ 100%と 99%であり統計学的有意差は認められなかった (別添資料 8: 社外秘情報につき非開示)。

### f. 交雑率

MS8 については、花粉ができないため MS8 の花粉を介する交雑は生じない。しかし、雌性配偶子は正常であることから、周辺からの花粉によって他家受精が行われるが、交雑及び種子生産の可能性は周囲の条件に依存すると考えられる。

RF3 については、ミツバチの放飼条件下で RF3 と隣接して栽培した非組換えセイヨウナタネ (三重長島菜種) 及び *B. rapa* (在来ナタネ: 青帝) への交雑率を調査した。各系統の収穫種子由来の実生に除草剤グルホシネートを散布した。その結果、耐性を示した個体は非組換えセイヨウナタネでは 1.8~2.0%、*B. rapa* では 0%となり (別添資料 3: 社外秘情報につき非開示)、セイヨウナタネの他殖率 (5~30%: Hühn and Rakow, 1979; Rakow and Woods, 1987) 及び *B. rapa* とセイヨウナタネの交雑率 (0.4~1.5%: Scott and Wilkinson, 1998) に関する既往の知見を上回らなかった。

RT73 については、隔離ほ場において、非組換えセイヨウナタネの対照品種、*B. juncea* (カラシナ) 及び *B. rapa* (在来ナタネ) を用いて、それぞれ RT73 栽培区から東西南北 0、2、5 及び 10m 区での交雑率を調査した。その結果、RT73 と対照品種との交雑率は隣接 0m 区が最も高く、10m 区では 1%以下であった。全ての交雑試験を通じて隣接 0m 区で示された最大交雑率は 21%であり (別添資料 7: 社外秘情報につき非開示)、この値は非組換えセイヨウナタネ同士を隣接して栽培した場合の自然

交雑率（20 数%、畑作全書、農文協）と差異はなかった。また、RT73 と *B. juncea*（カラシナ）及び *B. rapa*（在来ナタネ）との交雑率も、隣接 0m 区が最大であったが、10m 区で 0%であった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

なお、1989 年にカナダのは場で花粉飛散性実験を行った結果（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）、RT73 栽培区から 50m 離れた対照品種区での交雑個体出現頻度は 0.19%（3 区平均）、100m 区では 0.12%（3 区平均）、150 から 225m 区では 0.08%（4 区平均）であった（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）。

非閉鎖系温室で、人工風による花粉の飛散距離とミツバチの訪花行動特性を調査した結果、いずれも RT73 と対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）。

また、閉鎖系温室において、交雑試験に用いた *B. juncea*（カラシナ）及び *B. rapa*（在来ナタネ）の RT73 と対照品種に対する交雑親和性に関して、人工受粉により得られた莢中の稔実種子の数を調べることにより調査した。その結果、*B. juncea*（カラシナ）、*B. rapa*（在来ナタネ）共に、RT73 と対照品種に対する交雑親和性に大きな差異は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

さらに、*B. juncea*（カラシナ）、*B. rapa*（在来ナタネ）、RT73 及び対照品種の全ての組み合わせで交配して得られた種子の発芽率を調査した結果、RT73 の交配による休眠性の変化は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示）。

#### g. 有害物質の産生性

MS8 について、特定網室において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験でも調査した全ての項目について、対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 2: 社外秘情報につき非開示）。

RF3 について、特定網室において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験でも調査した全ての項目について、対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 4: 社外秘情報につき非開示）。しかし、統計学的有意差は認められなかったものの鋤込み試験における検定植物（ダイコン）の発芽率は RF3 区で 59.0%、対照品種区で 86.0%と差がみられたことから（別添資料 4: 社外秘情報につき非開示）、再試験を行った。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）に調査した結果、ダイコンの発芽率、根長、生重及び乾物重についていずれも統計学的有意差は認められなかったが、草丈については、混和直後及び 4 週間後の土壌において RF3 区と対照品種区との間に統計学的有意差が認められた（別添資料 5: 社外秘情報につき非開示）。混和直後の土壌におけるダイコンの草丈は RF3 区が対照品種区に比べ僅かに低く、他方、混和 4 週間後の土壌では、RF3 区の方が対照品種区と比べて高かった（別添資料 5: 社外秘情報につき非開示）。

RT73 については、隔離ほ場試験で土壌微生物相試験を行い、非閉鎖系温室試験で、後作試験、鋤込み試験、葉からのリーチング液による検定及び土壌微生物相試験を行った。その結果、全ての項目で RT73 と対照品種間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7: 社外秘情報につき非開示; 別添資料 8: 社外秘情報につき非開示）。

### 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。

#### (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ための措置

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

MS8、RF3 及び RT73 並びに本スタック系統の国外における承認状況を表 8 (p.41) に示した。なお、各親系統及び本スタック系統の我が国における承認状況は表 4 (p.28) に示した。



表 8 国外における各親系統及び本スタック系統の承認状況

規制機関	承認年月			本スタック系統
	MS8	RF3	RT73	
カナダ保健省 (HC)	1997年3月	1997年3月	1994年11月	—
カナダ食品検査庁 (CFIA)	1996年10月	1996年10月	1995年3月	2008年5月 (報告)
米国食品医薬品局 (FDA)	1998年9月	1998年9月	1995年10月	—
米国農務省 (USDA)	1999年3月	1999年3月	1999年1月	—
オーストラリア・ ニュージーランド 食品基準機関 (FSANZ)	2002年5月	2002年5月	2000年7月	—
オーストラリア 遺伝子技術規制局 (OGTR)	2003年7月	2003年7月	2003年12月	2010年9月 申請済み

—: 親系統の承認が得られているスタック系統の承認申請は求められないため、承認申請は行っていない。

(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

本スタック系統は、MS8、RF3 及び RT73 を親系統として用い、従来の交雑育種法により作出したものである。

改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質はいずれも高い基質特異性を有する。また、BARNASE 蛋白質と BARSTAR 蛋白質はいずれも菫のタペート細胞で特異的に働くプロモーターPTA29 の支配下でタペート細胞において発現し、特異的に複合体を形成して BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性が阻害される。さらに、BARSTAR 蛋白質は植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用の報告はない。よって、これらの蛋白質が植物体内の他の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

また、改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作で独立して作用している。他方、BARNASE 蛋白質と BARSTAR 蛋白質は相互作用を示すが、改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質との相互作用は示さないものと考えられる。また、BARNASE 蛋白質と BARSTAR 蛋白質はいずれも菫のタペート細胞においてのみ発現することから、本スタック系統において、これらの発現蛋白質が意図しない機能上の相互作用を示す可能性は低いと考えられた。実際に生物検定を行った結果、本スタック系統の除草剤グルホシネートに対する薬害程度は、同じ遺伝的背景を有する MS8RF3 との間に統計学的有意差は認められなかった (表 5, p.33)。また、除草剤グリホサートに対する耐性の程度についても、本スタック系統と本形質の由来親である RT73 との間に統計学的有意差は認められなかった (表 5, p.33)。さらに、本スタック系統及び MS8RF3 の稔性株数、並びに MS8×RT73 及び MS8 の不稔株数のいずれについても、系統間に統計学的有意差は認められなかった (表 6, p.34)。これらの結果から、本スタック系統が獲得した形質は掛け合わせにより変化しておらず、本スタック系統において、発現蛋白質は意図しない機能上の相互作用を示していないと考えられた。

したがって、各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考え、本スタック系統の生物多様性影響の評価は、親系統である MS8、RF3 及び RT73 の諸形質を個別に調査した結果に基づき行った。

### 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

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 (清水ら, 2001) 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。しかし、

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。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 (OECD, 1997)。また、農林水産省が 2006 年から 2008 年までの 3 年間にわたり、ナタネの輸入実績のある 12 輸入港の周辺を調査した結果、各調査対象地域における遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は毎年ほぼ同じ範囲に限られており、遺伝子組換えセイヨウナタネと *B. juncea* (カラシナ) 又は *B. rapa* (在来ナタネ) との交雑個体も見つからなかった (農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 2010)。なお、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 (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)。これらのことを踏まえて、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、本スタック系統の親系統である MS8、RF3 及び RT73 の形態及び生育の特性、生育初期における低温又は高温耐性、成体の越冬性又は越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、MS8 の着莢率及び RF3 の結実粒数について、対照品種との間に統計学的有意差が認められた (別添資料 1: 社外秘情報につき非開示; 別添資料 3: 社外秘情報につき非開示)。しかし、MS8 及び RF3 の一株あたりの子実収量及び千粒重はいずれも対照品種との間に統計学的有意差は認められておらず、MS8 の着莢率及び RF3 の結実粒数に認められた差によって、競合における優位性が高まることはないと考えられる。

また、本スタック系統は、除草剤グルホシネート及びグリホサートに耐性を示すが、自然環境下においてこれらの除草剤が選択圧となることは考え難く、これら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。また、本スタック系統の親系統 MS8 は雄性不稔性を、RF3 は稔性回復性を示すが、本スタック系統においては MS8 由来の BARNASE 蛋白質活性は RF3 由来の BARSTAR 蛋白質により抑制され、非組換えセイヨウナタネと同様に花粉を形成する。なお、雄性不稔性は競合において優位に作用する性質ではないと考えられる。また、稔性回復性は BARNASE 蛋白質により雄性不稔形質を付与された個体と交雑した場合のみ意図された機能を果たすが、そのような個体が存在しない条件下では何ら機能を果たさないことから、本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等の判断

以上から、本スタック系統は、競合における優位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。

## 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、心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすエルシン酸（新谷, 1995）や、甲状腺肥大を引き起こすグルコシノレート（角田, 2001）が比較的高い濃度で含まれている。しかし、本スタック系統の親系統の宿主品種である **Drakkar** 及び **Westar** はいずれもエルシン酸及びグルコシノレート含有量の低いカノーラ品種である。また、**MS8**、**RF3** 及び **RT73** の種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含有量は、いずれもカノーラとして規定される範囲内（エルシン酸含量が精油中の2%未満、グルコシノレート含量が油粕1g当たり30  $\mu\text{mol}$  未満）であることが確認されている。

本スタック系統が有する改変 **PAT** 蛋白質、改変 **CP4 EPSPS** 蛋白質、改変 **GOX v247** 蛋白質、**BARNASE** 蛋白質及び **BARSTAR** 蛋白質はいずれも、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。

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（Wehrmann *et al.*, 1996）。また、改変 **CP4 EPSPS** 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、**EPSPS** 活性が増大して

も、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。さらに、GOX 蛋白質は、グリホサートを AMPA とグリオキシレートに分解する反応を触媒する酵素であり、基質特異性は高く、基質であるグリホサート以外に反応することが知られている化合物は構造が類似しているイミノ二酢酸 (IDA) と 2-メチルグリホサートであるが (Padgett *et al.*, 1994)、これらの化合物が植物体内に存在するという報告はない。改変 GOX v247 蛋白質は GOX 蛋白質と比べてアミノ酸が 3ヶ所変換されているが、改変 GOX v247 蛋白質を発現する RT73 の成分分析の結果、対照の非組換えセイヨウナタネと相違は認められず、改変 GOX v247 蛋白質の基質特異性は GOX 蛋白質と同様であると考えられた。また、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。なお、本スタック系統では、BARNASE 蛋白質は薬のタペート細胞において BARSTAR 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、そのリボヌクレアーゼ活性は阻害される。また、BARSTAR 蛋白質はリボヌクレアーゼを阻害する以外の機能を有するという報告はなく、植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用も報告されていない。さらに、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子はプロモーター PTA29 の支配下にあり、タペート細胞以外の組織において発現することは考え難い。したがって、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質が植物体内の他の代謝系に影響することはないと考えられる。

以上から、改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、改変 GOX v247 蛋白質、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質に起因して、本スタック系統中に有害物質が産生されることはないと考えられた。

実際に、MS8、RF3 及び RT73 の有害物質の産生性に関して、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験、また、RT73 についてはこれらに加えて葉からのリーチング液による検定を行った。RF3 について行なった鋤込み試験の経時的調査（混和直後、1 週間後、2 週間後及び 4 週間後の 4 つの調査区）の結果、ダイコンの草丈に関して、混和直後では RF3 区が対照品種区に比べて低く、他方、混和 4 週間後では RF3 区が対照品種区に比べて高く、それぞれ統計学的有意差が認められた（別添資料 5: 社外秘情報につき非開示）。しかし、その他の調査区では統計学的有意差は認められておらず、混和直後と混和 4 週間後に認められた差も一貫した傾向を示していないことから、RF3 は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。また、その他の系統については、調査したいずれの項目においても対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった。よって、本スタック系統においても、新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

以上から、本スタック系統において、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等の判断

以上から、本スタック系統において、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*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が挙げられる (OGTR, 2008; 環境省, 2002)。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、栽培由来の外来種である (Kihara, 1969)。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。さらに、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* はいずれも近年になって人為的影響により我が国に侵入した外来種である (中井, 2003; 環境省, 2002)。

(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等の判断

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、(1)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、本スタック系統と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。

- 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が負担となることで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。

##### 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

本スタック系統の外来近縁種に対する交雑率は調査していないが、親系統であるRF3についてはセイヨウナタネ及び*B. rapa*との交雑率（別添資料3: 社外秘情報につき非開示）、RT73についてはセイヨウナタネ、*B. rapa*及び*B. juncea*との交雑率を調査し（別添資料7: 社外秘情報につき非開示）、いずれも既往の知見を上回らないか、或いは差異がないことが確認されている。これらのことから、本スタック系統の交雑性は非組換えセイヨウナタネと相違ないと考えられる。よって、本スタック系統とセイヨウナタネを含む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、既往の知見に基づき検討した。

##### 1) セイヨウナタネの他殖性

セイヨウナタネの他殖率は5～30%（Hühn and Rakow, 1979; Rakow and Woods, 1987; OECD, 1997）とされている。

##### 2) セイヨウナタネと*B. rapa*との交雑性

セイヨウナタネと*B. rapa*の交雑率については0.4～1.5%（Scott and Wilkinson, 1998）、0.2%（Wilkinson *et al.*, 2000）、6.5～7.1%（Warwick *et al.*, 2003）等の報告がある。また、F1の生存率は平均で2%以下であり（Scott and Wilkinson, 1998）、

*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%に減少することや結実度が低いこと (Jørgensen and Andersen, 1994) が報告されている。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 (Hauser *et al.*, 1998)。

### 3) セイヨウナタネと *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 (Bing *et al.*, 1991; Frello *et al.*, 1995; Bing *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 1998; Bielikova and Rakousky, 2001)。また、セイヨウナタネが花粉源となる場合やセイヨウナタネと *B. juncea* が近距離に生育している場合には、3～4.7%の交雑率が報告されている (Bing *et al.*, 1991; Jørgensen *et al.*, 1996) が、逆に *B. juncea* が花粉親となる場合には交雑率が低くなることが報告されている (Jørgensen *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 1998)。また、雑種の花粉稔性は0～28%であり、種子の生産量も少ない (Frello *et al.*, 1995)。また、セイヨウナタネを種子親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 (Choudhary and Joshi, 1999)。さらに、BC 世代でも同様に初期生育遅延や個体数の減少が報告されている (Rao *et al.*, 1993)。他方、*B. juncea* を種子親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%程度に低下すると報告されている (Choudhary and Joshi, 1999)。

### 4) セイヨウナタネと *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ことが報告されている (Bing *et al.*, 1996)。また、人工交配によっても、ほとんど雑種は得られないか (Bing, 1991)、又は全く得られなかったことが報告されている (Kerlan *et al.*, 1992; Brown and Brown, 1996)。さらに、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。また、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/受粉した花) は0.9%、*B. nigra* によって戻し交配した場合の結実率は0.06%であり、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 (Bing, 1991)。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 (Scheffler and Dale, 1994)。

### 5) セイヨウナタネと *R. raphanistrum* との交雑性

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑性に関しては、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は  $3.8 \times 10^{-8} \sim 5.1 \times 10^{-4}\%$ 、*R. raphanistrum* を種子親とした場合は  $1 \times 10^{-7} \sim 3.1 \times 10^{-5}\%$  等の雑種形成率の報告があり (Rieger *et al.*,



2001; Chevre *et al.*, 2000; Warwick *et al.*, 2003)、雑種形成の可能性は極めて低い (OGTR, 2008)。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 (Thalmann *et al.*, 2001)。

F1 雑種における花粉生存率は1%以下である (Warwicke *et al.*, 2003) が、ほとんどが不稔となること (Pinder, 1999)、F1 雑種の種子生産量は1株当たり 0.78 個と極めて少ないことが報告されている (Chevre *et al.*, 1998)。他方、F1 雑種を花粉親として *R. raphanistrum* への戻し交配を数回行うことにより稔性や収量の回復も示唆されている (Chevre *et al.*, 2003; Chevre *et al.*, 1998)。また、F1 雑種において幼苗の生存率やロゼット葉の直径、乾物重の顕著な低下が認められ、栽培条件及び自然条件下において生存する可能性は低いことが示唆される (Gueritain *et al.*, 2003)。これらのことから、F1 雑種が花粉親となり *R. raphanistrum* への戻し交配が起こる機会は限定されると考えられる (OGTR, 2008)。

#### 5) セイヨウナタネと *H. incana* との交雑性

セイヨウナタネと *H. incana* については、セイヨウナタネが花粉親となる場合に交雑し得ることが知られているが、雑種が形成される可能性は低い。フランスで行なわれた調査では、セイヨウナタネと *H. incana* を 625 : 1 の割合で栽培した場合、*H. incana* に形成された種子のうち 1.5% が雑種であったと報告されている。また、F1 雑種の稔性、種子生産量及び収穫種子の生存率に顕著な低下がみられる。F1 雑種の雄しべには殆ど花粉が形成されず、形成される花、莢及び種子も極めて少ない。さらに、戻し交配世代においても高い不稔性率が認められ、種子生産量は少ない (Lefol *et al.*, 1996b)。

#### 6) セイヨウナタネと *S. arvensis* との交雑性

セイヨウナタネと *S. arvensis* の交雑性については、雄性不稔セイヨウナタネと *S. arvensis* を花粉媒介昆虫の放飼条件下で栽培した場合 (Lefol *et al.*, 1996a) や、花粉源となる他のナタネ類から隔離した状態で栽培した場合 (Chevre *et al.*, 1996) には、0.012~0.18% の交雑率が認められた。他方、花粉稔性のあるセイヨウナタネと *S. arvensis* を花粉媒介昆虫の放飼条件下で栽培した場合、或いは、特に制限を設けない通常のは場条件では、*S. arvensis* から採種した 290 万粒の生存種の中に雑種は認められなかった (Lefol *et al.*, 1996a)。また、Warwick (2003) は、1、2 年前に除草剤耐性セイヨウナタネが栽培されていたほ場内又はほ場付近における 79 の *S. arvensis* の個体群から採種し、芽生えた 43,000 株の苗に対象の除草剤を散布した結果雑種は認められず、セイヨウナタネと *S. arvensis* の交雑率は  $2 \times 10^{-5}$  % 以下であるとしている。

また、7224 株の F1 雑種に *S. arvensis* を花粉親として人工交配した結果、2 つの

種子が得られたが、いずれも発芽しなかったことが報告されている (Lefol *et al.*, 1996a)。また、ほぼ雄性不稔の F1 雑種と *S. arvensis* を自然交配させた場合の雑種形成率は 0.12% と報告されている (Chevre *et al.*, 1996)。さらに、808 株の F1 雑種にセイヨウナタネの花粉を用いて人工交配した結果、9 個の種子が得られた。また、そのうちの 1 個からセイヨウナタネに類似した BC1F1 世代の個体を得られ、次世代の戻し交配はセイヨウナタネとのみ成功したものの、得られた種子は僅かであったと報告されている (Lefol *et al.*, 1996a)。

以上から、本スタック系統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。

## ② 導入遺伝子が負担となり外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性

改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子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、それぞれの花粉稔性、発芽後の生存性及び種子生産量等に顕著な差は認められなかったと報告されている (Snow *et al.*, 1999)。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。また、*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知られている (Kaul, 1988) ことから、*barnase* 遺伝子が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。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び改変 *gox v247* 遺伝子は、除草剤グリホサートが散布されることが想定されにくい自然条件下においては、競合における優位性を高めることはないことが示されている (Crawley *et al.*, 2001; CFIA, 1995)。このことから、本スタック系統と外来近縁種との交雑種の競合における優位性は、除草剤グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においては、非組換えセイヨウナタネの交雑種と同程度であり、交雑種が他の野生植物種を駆逐するような性質を有するとは考え難い。さらに、除草剤耐性の形質が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても負担とならないという報告がある (Crawley *et al.*, 1993; Légère, 2005; Snow and Jorgensen, 1999; Snow *et al.*, 1999)。

*barnase* 遺伝子はプロモーター PTA29 により薬のタペート細胞で発現して細胞を破壊し、花粉形成を阻害するが、仮に *barnase* 遺伝子がプロモーター PTA29 の支配

を外れ、植物中で構成的に発現するプロモーターを獲得したとしても、その発現カセットを付与された植物体はリボヌクレアーゼにより細胞が破壊され正常に生育できないか、死に至ると考えられる。さらに、部位特異的のような誘導的プロモーターを獲得した場合でも、植物体の調節機能が正常に働かず、正常に生育する可能性は低いと考えられる。よって、これらのような植物体が自然条件下で正常に生育し、継続的にその遺伝子が後代に引き継がれる可能性は低い。したがって、これらの遺伝子が近縁種の個体群中に浸透する可能性は低いと考えられる。

これらのことから、導入遺伝子はいずれも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。

以上から、本スタック系統と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

本スタック系統は、MS8、RF3 及び RT73 から交雑育種法により作出されたものであり、各親系統の特性を併せ持つ。本スタック系統で発現する改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、改変 GOX v247 蛋白質はいずれも高い基質特異性を有し、それぞれ異なる作用機作で独立して作用している。また、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質はいずれもプロモーターPTA29 の支配下で蒴のタペート細胞において発現して特異的に複合体を形成する。よって、本スタック系統においても、これらの発現蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低く、また、これらの発現蛋白質間に意図しない機能上の相互作用は生じないと考えられた。実際に、生物検定の結果から、本スタック系統において、各親系統由来の発現蛋白質が付与する形質は本スタック系統において変化していないことが確認された。

したがって、本スタック系統の生物多様性影響の評価は MS8、RF3 及び RT73 の諸形質を個別に調査した結果に基づき行った。

我が国では、セイヨウナタネは河原や線路沿いでの群生や、主なナタネ輸入港やその周辺での生育が報告されている。また、長期にわたりセイヨウナタネ種子の輸入経験があるが、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、ほ場から逸出して野生化したと考えられる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。また、我が国の3年間にわたるナタネの輸入港周辺の調査では、各調査対象地域における遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は毎年ほぼ同じ範囲に限られており、遺伝子組換えセイヨウナタネと *B. juncea* (カラシナ) 又は *B. rapa* (在来ナタネ) との交雑個体も見つからなかったことが報告されている。

競合における優位性に関して、隔離ほ場試験及び特定網室試験等において、MS8、RF3 及び RT73 の形態及び生育の特性、生育初期における低温又は高温耐性、成体の越冬性又は越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性及び休眠性について調査した結果、いずれの系統についても競合における優位性を高める可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、本スタック系統は、除草剤グルホシネート及びグリホサートに耐性を示すが、自然環境下においてこれらの除草剤が選択圧となることは考え難い。また、本スタック系統において、BARNASE 蛋白質による雄性不稔形質は BARSTAR 蛋白質により抑制され、非組換えセイヨウナタネと同様に花粉を形成する。なお、雄性不稔形質が競合において優位に作用するとは考え難く、稔性回復性については、BARNASE 蛋白質による雄性不稔性が付与された個体と交雑した場合にのみ意図された機能を果たすが、そのような個体が存在しない条件下では何ら機能を果たさな

い。したがって、これらの形質が本スタック系統の競合における優位性に影響することはないと考えられる。

以上から、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。

セイヨウナタネの種子に含まれる有害物質としてエルシン酸やグルコシノレートが知られているが、MS8、RF3 及び RT73 の種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含有量は、いずれもカノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されている。

本スタック系統が有する改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、改変 GOX v247 蛋白質、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質はいずれも、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。

また、改変 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 GOX v247 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響を及ぼし、新たに有害物質を産生することは考え難い。また、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性は BARSTAR 蛋白質で阻害されるが、いずれの蛋白質もプロモーターPTA29 の支配下で葯のタペート細胞のみで発現すること、また、BARNASE 蛋白質の植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用は報告されていないことから、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質が植物体内の他の代謝系に影響することはないと考えられた。以上から、これらの発現蛋白質に起因して、本スタック系統が新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。

実際に、有害物質の産生性に関して、MS8 及び RF3 については後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験、RT73 についてはこれらの試験に加えて葉からのリーチング液による検定を行なった結果、RF3 の鋤込み試験において、調査項目の一部で対照品種との間に統計学的有意差が認められたものの、差に一貫した傾向は認められなかったことから、有害物質の産生性は新たに獲得していないと考えられた。また、その他の系統においては、いずれの調査項目でも対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった。

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。

我が国には、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁種は自生しておらず、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、我が国にはセイヨウナタネと交雑可能な外来近縁種として、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が自生しており、本スタック系統とこれらの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導入遺伝子が負担となり外来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が考えられた。

本スタック系統の外来近縁種に対する交雑率は調査していないが、親系統である RF3 及び RT73 と外来近縁種との交雑率は既往の知見を上回らないことが確認されたことから、本スタック系統の交雑性についても非組換えセイヨウナタネと差異はないと判断し、本スタック系統の交雑性及び種間雑種が優占化する可能性について、既往の知見に基づき検討した。

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 に詳述したように、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。

他方、導入遺伝子が負担となり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、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子を有するセイヨウナタネと *B.rapa* の戻し交配後代における除草剤グルホシネート耐性個体と非耐性個体との比較において、花粉稔性、発芽後の生存性及び種子生産量等に顕著な相違は認められなかったとの報告がある。改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び改変 *gox v247* 遺伝子については、除草剤耐性の形質が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても負担とならないという報告がある。また、*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。さらに、*barnase* 遺伝子は、プロモーターPTA29 の支配下で葯のタペート細胞において発現して細胞を破壊し、花粉形成を阻害するが、仮に *barnase* 遺伝子がプロモーターPTA29 の支配を外れ、植物中で構成的に発現するプロモーターや部位特異的のような誘導的プロモーターを獲得した場合でも、植物体はリボヌクレアーゼにより細胞が破壊され死に至るか、調節機能が正常に働かず、正常に生育する可能性は低いと考えられる。よって、そのような植物体が自然条件下で正常に生育し、継続的にその遺伝子が後代に引き継がれる可能性は低い。これらのことから、導入遺伝子が負担となり交雑した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。

以上から、本スタック系統と外来近縁種が交雑した場合に、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、また、②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極めて低いと判断された。

以上を総合的に評価し、本スタック系統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

- 1) Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V., Kemp, J.D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 2) Barry, G and Kishore, G.M. (1994) Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Glyphosate-to- Aminomethylphosphonic Acid Degrading Activity from *Achromobacter* sp. Strain LBAA MSL-13245.
- 3) Bielikova, L., Rakousky, S. (2001) Survey on oilseed rape cultivation and weed relatives in the Czech republic. In “*European Science Foundation Meeting of a Working Group on: Interspecific gene flow from oilseed rape to weedy species, June 2001*”. Rennes, France. pp.9.
- 4) Bing, D.J. (1991) Potential of gene transfer among oilseed Brassica and their weedy relatives. MSc thesis, Department of Crop Science and Plant Ecology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- 5) Bing, D.J., Downey, R.K., Rakow, F.W. (1991) Potential of gene transfer among oilseed Brassica and their weedy relatives. In: GCIRC 1991 Congress pp 1022-1027.
- 6) 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.
- 7) Bolivar, F., Roderiguez, 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 vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 96-113.
- 8) Brown, J., Brown, A.P. (1996) Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B.campestris* L.) and related weed species. *Ann. Appl. Biol.* 129: 513-522.
- 9) CFIA (Canadian Food Inspection Agency) (1995) Determination of environmental safety of Monsanto Canada Inc.’s Roundup® Herbicide-Tolerant *Brassica napus* Canola Line GT73 <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dd/dd9502e.shtml>
- 10) Choudhary, B.R., Joshi, P. (1999) Interspecific hybridization in Brassica. “New Horizons for an old crop” Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress. Canberra, Australia.
- 11) Chevre, A.M., Eber, F., Kerlan, M.C., Barret, P., Festoc, G., Vallee, P., Renard, M. (1996) Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic *Brassicac*s. *Acta Horticulturae* 407: 169-179.
- 12) Chevre, A.M., Eber, F., Baranger, A., Hureau, G., Barret, P., Picault, H., Renard, M. (1998) Characterisation of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 90-98.
- 13) Chevre, 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. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1233-1239.
- 14) Chevre, A.M., Eber, F., Jenczewski, E., Darmency, H., Renard, M. (2003) Gene flow from oilseed rape to weedy species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science* 53: 22-25.
  - 15) Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. and Chua, N.H. (1984) Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Embo J.* 3: 1671-1679.
  - 16) Crawley, M.J., Hails, R.S., Rees, M., Kohn, D., Buxton, J. (1993) Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363: 620-623.
  - 17) Crawley, M.J., Brown, S.L. (1995) Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 259: 49-54.
  - 18) Crawley, M.J., Brown, S.L., Hails, R.S., Kohn, D.D., Rees, M. (2001) Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 409: 682-683
  - 19) Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G. (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6873-6877.
  - 20) Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
  - 21) Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, J., 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.
  - 22) Downey, R.K., Robbelen, G. (1989) Brassica species. In: *Oil Crops of the World*. Robbelen *et al.* (eds.) McGraw-Hill, New York, p.339-362.
  - 23) Drews, G.N., Goldberg, R.B. (1989) Genetic control of flower development. *Trends in Genetics* 5: 256-261.
  - 24) FAOSTAT <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Updated: 2 September, 2010)
  - 25) Fling, M.E., Kopf, J., Rechards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 13: 7095-7106.
  - 26) Frello, S., Hansen, K.R., Jensen, J., Jørgensen, R.B. (1995) Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*) specific RAPD markers and a transgene in the cross *B.juncea* x (*B.juncea* x *B.napus*). *Theor. Appl. Genet.* 91: 236-241.



- 27) Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *The EMBO Journal* 3: 835-846.
- 28) Giza, P.E., Huang, R.C. (1989) A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 29) Gowda, S., Wu, F.C., Shepard, R.J. (1989) Identification of promoter sequences for the major RNA transcripts of figwort mosaic and peanut chlorotic streak viruses (caulimovirus group). *J.Cell. Biochem.* 13D (supplement): 301.
- 30) Gueritaine, G., Bazot, S., Darmency, H. (2003) Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *New Phytologist* 158: 561-567.
- 31) Gulden, R.H., Shirliffe, S.J., Thomas, A.G. (2000) Secondary dormancy in volunteer canola (*Brassica napus* L.). Expert Committee on Weeds-Proceedings of the 2000 National Meeting. Canada. p62-67.
- 32) Gruys, K.J., Walker, M.C., Sikorski, J.A. (1992) Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *E. coli*. *Biochem.* 31: 5534-5544.
- 33) Hallas, L.E., Hahn, E.M., Korndorfer, C. Hallas, L.E., Hahn, E.M., Korndorfer, C. (1988) Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. *J. Industrial Microbiol.* 3: 377-385.
- 34) Haslam, E. (1974). *The Shikimate Pathway*, John Wiley and Sons, New York, New York.
- 35) Haslam, E. (1993) *Shikimic Acid : Metabolism and Metabolites*, John Wiley and Sons, Chichester, England.
- 36) Herrmann, K.M. (1983) *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation* (Herrmann, K.M. and Somerville, R. L., Eds.) Addison-Wesley, Reading, MA. pp.301-322.
- 37) Hartley, R.W., Smeaton, J.R. (1973) On the reaction between the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and its intracellular inhibitor (Barstar). *The Journal of Biological Chemistry* 248: 5624-5626.
- 38) 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.
- 39) Hartley, R.W. (1989) Barnase and barstar : two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Science* 14: 450-454.
- 40) Hartley, R.W., Both, V., Hebert, E.J., Homerova, D., Jucovic, M., Nazarov, V., Rybajlak, I., Sevcik, J. (1996) Expression of extracellular ribonucleases from recombinant genes of four *Streptomyces* strains with the aid of the barstar gene. *Protein Pept Lett.* 3: 225-231.
- 41) Hauser, T.P., Jørgensen, R.B., Østergård, H. (1998) Fitness of backcross and F2

- hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B.napus*). *Heredity* 81: 436-443.
- 42) Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, 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.
  - 43) Hühn, M., Rakow, G. (1979) Einige experimentelle Ergebnisse zur Fremdbefruchtungsrate bei Winterraps (*Brassica napus oleifera*) in Abhängigkeit von Sorte und Abstand. *Z. Pflanzenzüchtg* 83: 289-307.
  - 44) Itoh, Y., Watson, J.M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.
  - 45) Jacob, G.S., Garbow, J.R., Hallas, L.E., Kimack, N.M., Kishore, G.M., Schaefer, J. (1988) Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2953-2958.
  - 46) Joos, S.B., Lambert, B., Leyns, F., De Roeck, A., Swings, J. (1988) Inventory of Natural Rhizobacterial Populations from Different Crop Plants. *In The Release of Genetically-engineered Micro-organisms.* M.Sussman *et al.*, eds. Academic Press, London. pp39-142.
  - 47) Jørgensen, R.B., Andersen, B. (1994) Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B.campestris* (Brassicaceae): a risk of growing genetically modified oilseed rape. *Amer. J. Bot.* 81: 1620-1626.
  - 48) Jørgensen, R.B., Andersen, B., Landbo, L. and Mikkelsen, T.R. (1996) Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. *Acta Hort.* 407: 193-200.
  - 49) Jørgensen, R.B., Andersen, B., Hauser, T.P., Landbo, L., Mikkelsen, T.R., Østergård, H. (1998) Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species – an avenue for the escape of engineered genes. *Acta Hort.* 459: 211-217.
  - 50) Kaul, M.L.H. (1988) Male sterility in higher plants. Monographs on theoretical and applied genetics. Vol. 10. Springer Verlag, Berlin 1005p.
  - 51) Kerlan, M.C., Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., Renard, M. (1992) Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species : I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 62: 145-153.
  - 52) Kihara, H. (1969) History of biology and other science in Japan in retrospect. *Proc. XII Intern. Congr. Genetics* 3: 49-70.
  - 53) Klee, H.J., Muskopf, Y.M., Gasser, C.S. (1987) Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase : Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol.Genet.*210: 437-442.

- 54) Krebbers, E., Seurinck, J., Herdies, L., Cashmore, A.R., Timko, M.P. (1988) Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.
- 55) Lefol, E., Danielou, V., Darmency, H. (1996a) Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research* 45: 153-161.
- 56) Lefol, E., Freury, A., Carmency, H. (1996b) Gene dispersal from transgenic crops. II. Hybridisation between oilseed rape and wild Hoary mustard. *Sexual plant reproduction* 9: 189-196.
- 57) Légère, A. (2005) Risks and consequences of gene flow from herbicide-resistant crops: canola (*Brassica napus* L.) as a case study. *Pest Management Science*. 61:292-300.
- 58) Levin, J.G., Sprinson, D.B. (1964) The Enzymatic Formation and Isolation of 3-Enolpyruvylshikimate 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* 239: 1142-1150.
- 59) Lutman, P.J.W. (1993) The occurrence and persistence of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *Aspects of Applied Biology* 35: 29-35.
- 60) 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.
- 61) Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R.B., De Greef, W., Leemans, J. (1992) A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-387.
- 62) Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G., Fersht, A.R. (1995) A calorimetric study of the thermal stability of berstar and its interaction with barnase. *Biochemistry* 34: 5224-5233.
- 63) Mesquida, J., Renard, M. (1982) Study of the pollen dispersal by wind and of the importance of wind pollination in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Metzger) (English Summary). 353-366.
- 64) Morelli, G., Nagy, F., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Chua, N. (1985) A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. *Nature* 315: 200-204.
- 65) OECD (1997) Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (Oilseed rape). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.7, OECD/GD(97)63.
- 66) OECD (2001) Consensus document on key nutrients and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola). Series on the safety of novel foods and feeds. No.1, ENV/JM/MONO(2001)13.
- 67) OGTR (2008) The biology of *Brassica napus* L. (canola). Version 2: February 2008.

- 68) Padgett, S.R. *et al.* (1993) Purification, Cloning and Characterization of a Highly Glyphosate-tolerant EPSP Synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. MSL-12738 (Monsanto Company Confidential Report).
- 69) Padgett, S.R., Taylor, M.L., Barry, G.F., Huber, T., Harrison, L.A., Kishore, G.M. (1994) Characterization of Glyphosate Oxidoreductase. MSL-13234.
- 70) Paul, E.M., Thompson, C., Dunwell, J.M. (1995) Gene dispersal from genetically modified oilseed rape in the field. *Euphytica* 81: 283-289.
- 71) Pekrun, C., Lutman, P.J.W., Baeumer, K. (1997a) Germination behaviour of dormant oilseed rape seeds in relation to temperature. *Weed Research* 37: 419-431.
- 72) Pekrun, C., Lutman, P.J.W., Baeumer, K. (1997b) Induction of secondary dormancy in rape seeds (*Brassica napus* L.) by prolonged imbibition under conditions of water stress or oxygen deficiency in darkness. *European Journal of Agronomy* 6: 245-255.
- 73) Pekrun, C., Hewitt, J.D.J., Lutman, P.J.W. (1998) Cultural control of volunteer oilseed rape. *Journal of Agricultural Science* 130: 155-163.
- 74) Pipke, R., Amrhein, N. (1988) Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by arthrobacter atrocyaneus ATCC 13752. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1293-1296.
- 75) Rakow, G., Woods, D.L. (1987) Outcrossing in rape and mustard under Saskatchewan prairie conditions. *Can. J. Plant Sci.* 67: 147-151.
- 76) Ramsay, G., Thompson, C.E., Neilson, S., Mackay, G.R. (1999) Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. BCPC Symposium Proceedings No.72: Gene Flow and Agriculture. Relevance for Transgenic Crops p.209-214.
- 77) Röntio-Lehtimäki, A. (1995) Aerobiology of pollen and pollen antigens. In: Cox, C & Wathes, C. (eds.) *Bioaerosols Handbook*. CRC Lewis.
- 78) Rao, M.V.B., Babu, V.R., Radhika, K. (1993) Introgression of earliness in *Brassica napus* L. I. An interspecific *B.juncea* and *B.napus* cross. *Intern. J. Trop. Agric.* 11: 14-19.
- 79) Richins, R.D., Scholthof, H.B., Shepard, R.J. (1987) Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucl. Acids Res.* 15: 8451-8466.
- 80) Rieger, M.A., Preston C., Powles S.B. (1999) Risk of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 115-128.
- 81) Rieger, M.A, Potter, T.D., Preston, C., Powles, S.B. (2001) Hybridization between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 103: 555-560.
- 82) Rieger, M.A., Lamond, M., Preston, C., Powles, S.B., Roush, R.T. (2002) Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296: 2386-2388.

- 83) Rogers, S.G., Klee, H., Horsch, R., Fraley, R.T. (1987) Improved vectors for plant transformation : Expression cassette vectors and new selectable markers. *Meth. Enzymol.* 153: 253-277.
- 84) Scheffler, J.A., Parkinson, R., Dale, P.J. (1993) Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2: 356-364.
- 85) Scheffler, J.A., Dale, P.J. (1994) Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research* 3: 263-278.
- 86) Scott, S.E., Wilkinson, M.J. (1998) Transgene risk is low. *Nature* 393: 320.
- 87) Scott, S.E., Wilkinson, M.J. (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nature Biotechnology* 17: 390-392.
- 88) Seurinck, J., Truettner, J., Goldberg, R.B. (1990) The nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic Acids Research* 18: 3403.
- 89) Sheperd, R.J., Richins, J.F., Duffus, J.F., Handley, M.K. (1987) Figwort mosaic virus: Properties of the virus and its adaptation to a new host. *Phytopathology* 77: 1668-1673.
- 90) Smart, C.C., Johanning, D., Muller, G., Amrhein, N. (1985) Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260: 16338-16346.
- 91) Smeaton, J.R., Elliott, W.H. (1967) Isolation and properties of a specific bacterial ribonuclease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 145: 547-560.
- 92) Snow, A.A., Jørgensen, R.B. (1999) Fitness costs associated with transgenic glufocinate tolerance introgressed from *Brassica napus* ssp. *Oleifera* (oilseed rape) into weedy *Brassica rapa*. *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops.* 72: 137-142.
- 93) 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.
- 94) Steinrücken, H.C., Amrhein, N. (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94: 1207-1212.
- 95) Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposium* 43: 77-90.
- 96) Thalmann, C., Guadagnuolo, R., Felber, F. (2001) Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the

wild species. Bot. Helvetica 111: 107-119.

- 97) Thompson, C.E., Squire, G., Mackay, G.R., Bradshaw, J.E., Crawford, J., Ramsay, G. (1999) Regional patterns of gene flow and its consequence for GM oilseed rape. BCPC Symposium Proceedings No.72: Gene Flow and Agriculture. Relevance for Transgenic Crops p.95-100.
- 98) Thompson, C.J., Rao Movva, N., 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.
- 99) Timko, M.P., Krebbers, E. (1988) Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. In The Impact of Chemistry on Biotechnology. ACS Books. pp279-295.
- 100) Timmons, A.M., O'Brien, E.T., Charters, Y.M., Dubbels, S.J., Wilkinson, M.J. (1995) Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Euphytica 85: 417-423.
- 101) Velten, J., Schell, J. (1985) Selection-expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. Nucleic Acids Research 13:6981-6998.
- 102) Warwick, S.I., Simard, M.J., Legere, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G., Stewart, C.N. (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.
- 103) 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. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.
- 104) Weiss, U., Edwards, J. M. (1980) The biosynthesis of aromatic compounds. John Wiley and Sons, New York. pp287-301.
- 105) Wilkinson, M.J., Davenport, I.J., Charters, Y.M., Jones, A.E., Allainguillaume, J., Butler, H.T., Mason, D.C., Raybould, A.F. (2000) A direct regional scale estimate of the transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. Molecular Ecology 9: 983-991.
- 106) Williams, I.H., Martin, A.P., White, R.P. (1986) The pollination requirements of oil-seed rape (*Brassica napus* L.). The Journal of Agricultural Science 106: 27-30.
- 107) Woodward, H.D., Barry, G.F., Forgey, R., Taylor, M.L., Padgett, S.R., Marino, M.H., Kishore, G.M. (1994) Isolation and characterization of a variant of the enzyme glyphosate oxidoreductase with improved kinetic properties. MSL-13246.
- 108) Yakovlev, G.I., Moiseyev, G.P., Protasevich, I.I., Ranjbar, B., Bocharov, A.L., Kirpichnikov, M.P., Gilli, R.M., Briand, C.M., Hartley, R.W., Makarov, A.A. (1995) Dissociation constants and thermal stability of complexes of *Bacillus intermedius* RNase and the protein inhibitor of *Bacillus amyloliquefaciens* RNase, FEBS Lett.

366: 156-158.

- 109) 独立行政法人 国立環境研究所 (2009) 平成 20 年度環境省請負業務 遺伝子組換え生物による環境影響調査報告書  
[http://www.bch.biodic.go.jp/natane\\_20.html](http://www.bch.biodic.go.jp/natane_20.html)
- 110) 藤原 弘俊 (1935) アブラナ属各種作物及それらの種間雑種の花粉に関する観察 遺伝学雑誌 11:134-139.
- 111) 稲永 忍 (2000) ナタネ, 作物学Ⅱ 工芸・飼料作物編 文永堂出版 p.108-117.
- 112) 濃沼 圭一 (2005) [一代雑種品種] 植物育種学辞典 編者 日本育種学会 培風館 p.39.
- 113) 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/mat01b.pdf>
- 114) 松尾 和人、小林 敏弘、田部井 豊 (2005) 組換え体植物の開放系での利用に伴う遺伝子拡散のリスク評価のための基礎的研究. 農林水産技術会議事務局研究成果 No.428 p.161-168.
- 115) 三浦 清之 (2005) [二次休眠]、植物育種学辞典 編者 日本育種学会、培風館、p.496.
- 116) 村上 興正、鷺谷 いづみ 監修 (2002) 外来種ハンドブック 日本生態学会 390p.
- 117) 中井 秀樹 (2003) [アブラナ科] 日本の帰化植物、清水・近田 編、平凡社 p.80-96.
- 118) 農林水産省 (2010) 農林水産物輸出入概況 2009 年 (平成 21 年) 確定値.  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu\\_gaikyo\\_09.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_09.pdf)
- 119) 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課 (2010) 遺伝子組換え植物実態調査結果 (平成 18 年～平成 20 年実施分の取りまとめ) 対象植物: ナタネ類. 平成 22 年 8 月. <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/100823-01.pdf>
- 120) 小河原 進 (1943) 菜種の採種に就いて、教育園芸 12: 331-338.
- 121) 小此木 榮治 (1934) 結球白菜と洋種菜種との自然交配 農及園 9: 1095-1100.
- 122) 志賀 敏夫 (1981) ナタネ、工芸作物学、栗原 浩 編、農文協 p.89-110.
- 123) 志賀 敏夫 (2001) ナタネ、生育のステージと生理、生態: 転作全書 第三卷 雑穀 p.293-332.
- 124) 清水 矩宏、森田 弘彦、廣田 伸七 編・著 (2001) 日本帰化植物写真図鑑 全国農村教育協会.

- 125) 新谷 勳 (1995) 食品油脂の科学 幸書房
- 126) 杉山 信太郎 (2001) 日本人の生活とナタネ、転作全書 第三卷 雑穀、農文協、p.273-280.
- 127) 高畑 義人 (2005) [タペート細胞]、植物育種学辞典、培風社、p.409.
- 128) 竹松 哲夫、一前 宣正 (1993) 世界の雑草Ⅱ. 離弁花類、全国農村教育協会、東京、p.835.
- 129) 田坂 修一郎 (1943) 菜種の自然交雑に就いて、農友 339 : 6-10.
- 130) 角田 重三郎 (2001) ナタネの起源と特性、転作全書 第三卷 雑穀、農文協、p.281-292.
- 131) 畑作全書、雑穀編、農文協、19-221, 1981.



## 別添資料の内容

別添資料1：【MS8】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：【MS8】試験報告書 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の有害物質産生性

社外秘情報につき非開示

別添資料3：【RF3】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4：【RF3】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の有害物質産生性

社外秘情報につき非開示

別添資料5：【RF3】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における有害物質の産生性の経時的観察（鋤込み試験）

社外秘情報につき非開示

別添資料6：【RF3】国外における農業的特性に関する調査

社外秘情報につき非開示

別添資料7：【RT73】社外秘情報につき非開示

別添資料8：【RT73】社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成 22 年 11 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 ギャビン マーチャント  
 住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 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及びグリホサート耐性並びに雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar*, 改変*cp4 epsps*, 改変*gox v247, barnase, barstar, Brassica napus L.*）（MS8×RF3×RT73, OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6×MON-00073-7）（以下「本スタック系統」という。）並びにMS8、RF3及びRT73のそれぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統のも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リスク評価において確認された場合は、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。なお、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場合とは、本スタック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

1 第一種使用等における緊急措置を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。  
 （平成22年11月現在）

危機対策本部	
（危機対策本部長）	バイエルクロップサイエンス株式会社 研究開発本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 研究開発本部 バイオサイエンスグループリーダー
	バイエルクロップサイエンス株式会社 社長室長
	Bayer CropScience, BioScience Global regulatory affairs manager, Canola

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は本スタック系統穀粒及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の穀粒の我が国への輸入業者、我が国における配給業者、輸入した本スタック系統穀粒及び当該セイヨウナタネの

親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の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き、適切に、弊社は上記2で明らかにした本ストック系統穀粒及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の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本ストック系統穀粒及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の穀粒を我が国に配給している、又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

確認された明らか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において示した個人又は団体に対し、本ストック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統を不活性化する措置又は環境への放出を防止するための措置、並びに既に環境に放出された本ストック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統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

科学的根拠に基づき、本ストック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統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（栽培目的の場合）

平成 22 年 11 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 ギャビン マーチャント  
 住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 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及びグリホサート耐性並びに雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar*, 改変*cp4 epsps*, 改変*gox v247*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.）（MS8×RF3×RT73, OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6×MON-00073-7）（以下「本スタック系統」という。）並びにMS8、RF3及びRT73のそれぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統のも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リスク評価において確認された場合は、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。なお、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場合とは、本スタック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

### 1 第一種使用等における緊急措置を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。  
 （平成22年11月現在）

危機対策本部	
（危機対策本部長）	バイエルクロップサイエンス株式会社 研究開発本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 研究開発本部 バイオサイエンスグループリーダー
	バイエルクロップサイエンス株式会社 社長室長
	Bayer CropScience, BioScience Global regulatory affairs manager, Canola

### 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は我が国への本スタック系統の種子及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の種子の輸出者、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並びに配給した

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で明らかにした我が国への本スタック系統の種子及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の種子の輸出者、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本スタック系統の種子及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統の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

確認された明らか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、本スタック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統を不活性化する措置または環境への放出を防止するための措置並びにすでに環境に放出された本スタック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統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

科学的根拠に基づき、本スタック系統及び当該セイヨウナタネの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該セイヨウナタネから分離した後代系統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。