

除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 *bar*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.）（MS1RF2, OECD UI: ACS-BN004-7 × ACS-BN002-5）の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価の概要	
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
（1） 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
（2） 使用等の歴史及び現状	2
（3） 生理学的及び生態学的特性	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
（1） 供与核酸に関する情報	8
（2） ベクターに関する情報	14
（3） 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
（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	18
（5） 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	22
（6） 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	22
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	25
（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	25
（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	25
（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	28
1 競争における優位性	28
2 有害物質の産生性	29
3 交雑性	31
4 その他の性質	32
第三 生物多様性影響の総合的評価	35
参考文献	38
別添資料の内容	38
緊急措置計画書	39

# 第一種使用規程承認申請書

平成16年8月18日

農林水産大臣 亀井 善之 殿  
環境大臣 小池 百合子 殿

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

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ( 改変 <i>bar</i> , <i>barnase</i> , <i>barstar</i> , <i>Brassica napus</i> L. ) ( MS1RF2, OECD UI : ACS-BN004-7 × ACS-BN002-5 )
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、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	

## 生物多様性影響評価書の概要

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

###### イ 和名、英名及び学名

和名： セイヨウナタネ

英名： Oilseed Rape

学名： *Brassica napus* L.

###### ロ 宿主の品種名

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

###### ハ 国内及び国外の自然状況における自生地域

セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *B. rapa* (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ等) とキャベツなどが属する *B. oleracea* との交雑の結果できた複二倍体種である (文献 95)。原産地は交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパと考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (文献 38)。セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている (文献 60)。

セイヨウナタネは、肥培管理が行われなくても道路沿い、空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国で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 (文献 83)。また、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。実際に財団法人自然環境研究センター、独立行政法人農業技術研究機構及び独立行政法人食品総合研究所 (現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) が平成 14 年 5 月から平成 16 年 3 月にかけて行った調査では、ナタネの輸入港である茨城県鹿島港周辺で運搬の途中にこぼれ落ちたと見られるセイヨウナタネの生育が観察された (文献 58)。

##### (2) 使用等の歴史及び現状

## イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

セイヨウナタネとその近縁作物の使用等の歴史は古く、紀元前 2000～1500 年の古代インドの記述や、紀元前 500～200 年のギリシャ、ローマ及び中国の記述に記されている（文献 22）。また、ヨーロッパでのほ場規模での栽培は 13 世紀にベルギーで始まったとされている（文献 95）。

アジア及びヨーロッパにおいては、古くからセイヨウナタネや *B. rapa* 等の種子から油が搾られ、灯火用として広く使用されていた（文献 81）。また、ヨーロッパでは蒸気機関の潤滑油として使用されるようになり、このことがヨーロッパでのセイヨウナタネ栽培の進展を促したといわれている。さらに、第二次世界大戦時に、カナダは軍艦の蒸気機関の潤滑油を補給する目的で栽培を始めた（文献 95）。

元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが報告されているエルシン酸（文献 84）や家畜の甲状腺肥大効果のあるグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られており、食用や飼料としては不向きであると考えられていた。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種が育成されるに至り、現在ではサラダ油、ショートニング、マーガリン等の食用油として広く利用され、また搾油粕は家畜飼料として利用されている（文献 38；95）。

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（文献 87）。

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

## ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

セイヨウナタネは、*B. rapa* に比べて耐寒性は劣るが耐病性及び収量性に優れており、西部・中部ヨーロッパ、日本、韓国のように寒さが極端には厳しくない肥沃な土地で栽培されている（文献 95）。我が国では、以前は水田裏作のために移植栽培が主流であったが、今日では労働生産性の高い直播栽培が一般的である（文献 38）。

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

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

なお、現在世界で栽培されるカノーラ全体のうち 18%が遺伝子組換え技術により除草剤耐性が付与されたセイヨウナタネである (文献 39)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物である。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは休眠の打破、抽苔の開始、花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられる (文献 38)。春播き品種の生育適温は 12~30 である (文献 60)。また、セイヨウナタネは他の作物に比べ酸性土に強く、耐湿性も強いが、重粘土や砂質で乾燥のはなはだしい土壌は適さない。発芽時には過湿を嫌うが、生育時には多くの水分が必要である。我が国では、品種を選ぶことによりどこでも栽培可能である (文献 81)。

#### ハ 捕食性又は寄生性

### 二 繁殖又は増殖の様式

#### 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

セイヨウナタネは 1 つの莢の中に多数の種子ができ、種子が成熟して乾燥した莢は莢柄の部分より裂開して種子を放出する (文献 81)。乾燥した莢は、わずかな物理的刺激により裂開し種子を飛散させやすい (文献 38)。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

種子の休眠性は、秋播き品種、春播き品種にかかわらず比較的浅いことが知られ

ているが、暗所での水分ストレスや酸素欠乏（文献 66）など発芽に不適な環境下では二次休眠（secondary dormancy）が誘発されることがある。二次休眠とは、発芽しうる状態になった後で発芽に不適な環境にしばらくおかれた場合、新たに誘導される休眠である（文献 55）が、その程度は品種や種子の貯蔵期間・条件などで異なる（文献 65；67）。また、二次休眠性の高い品種を用いた実験では、5 や 10 の低温に比べ、20 程度の比較的高い温度条件で休眠が誘発されやすいことが確認されている（文献 27）。これらの獲得された休眠性は、2~4 の低温条件（文献 27）、変温条件（文献 67）などによって覚醒されるが、地中深く鋤込まれた種子は休眠状態のまま長期間生存し続けることが知られている。一方、地表の種子では二次休眠は誘発されないことから、二次休眠によるセイヨウナタネの雑草化を防止する耕種方法が明らかにされている（文献 67）。

セイヨウナタネの種子の寿命は比較的長いが、採種条件や保存条件によって異なることが知られている。後熟後に乾燥状態で貯蔵した場合には 6 年を経過しても 80%以上の発芽率を示すが、未熟種子では発芽力の低下が早く、室内に放置すると 3 年目には発芽力がなくなる（文献 62；82）。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%以上の発芽率を保っている（文献 82）。

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

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

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自殖によって種子を作ることが多い。風媒や虫媒による他殖率は 5~30%と報告されている（文献 37；60；68）。我が国での試験結果でも、栽植状況や距離で異なるが、平均して 27%程度の他殖率が認められている（文献 90）。

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）及び *Raphanus raphanistrum*（セイヨウノダイコン）が挙げられる。*B. rapa* は栽培由来の外来種で、我が国では古くから栽培種として利用されており（文献 45）、雑草性の亜種あるいは変種の形成は報告されていない（文献 89）。現在では、耕作地での周囲などに比較的小さな群落が見られるほか、景観作物としても利用され、河川

敷の公園などには大きな群落の形成が見られる（文献 53）。*B. juncea* も外来種であり、我が国では古くから栽培種として利用されてきた（文献 45）。しかし、戦後広まったものはそれとは別に、ヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている（文献 57）。*B. nigra* は明治時代以降に我が国に帰化した外来種（文献 56）で、北海道から九州に分布し、ハーブとして栽培されているが、ときに野生化している（文献 57；83）。*R. raphanistrum* も近年になって我が国に帰化した外来種で、昭和初期には横浜市で確認され（文献 36）、現在では北海道から九州まで全国に分布している（文献 57）。

セイヨウナタネと *B. rapa* については、自然交雑で種間雑種が形成されるという報告がある（文献 5；82）。英国で行われたモニタリング調査において、商業用セイヨウナタネ栽培ほ場付近に自生する *B. rapa* から採種した結果、芽生えた苗のうち、雑種は 0.4～1.5%（文献 78）又は 0.2%（文献 99）であった。また、除草剤耐性セイヨウナタネの商業栽培ほ場付近で採取した *B. rapa* の集団から 13.6%の雑種が、また、*B. rapa* とセイヨウナタネを混在して栽培した場合、6.5～7.1%の雑種が報告されている（文献 97）。我が国で両者の交互畦栽培を行い同時開花部分に結実した種子を調査したところ、*B. rapa* では 2%、他方、セイヨウナタネでは 10%の雑種を生じたと報告されている（文献 63）。

セイヨウナタネと *B. juncea* は交雑親和性があり、栽培条件下で種間雑種を生ずることが報告されている（文献 5；6；25；42）。栽培条件下での交雑率に関して、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合は 0.3～1.1%（文献 6）、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合には 3%（文献 41）の雑種形成が報告されている。

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかったと報告されている（文献 6）。さらに、人工交配によってもほとんど雑種は得られないか（文献 5）または全く得られなかったことが報告されている（文献 7；44）。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを 1：600 の割合で栽培した場合、0.05%（95%信頼限界：0.006～0.2%）の雑種形成が報告がされている（文献 14）。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀（文献 74；97）であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群から、セイヨウナタネとの雑種は確認されなかった（文献 91）。

#### 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39~36 $\mu\text{m}$ 、短径22~20 $\mu\text{m}$ である(文献26;82)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある(文献60)。

セイヨウナタネの花粉は風又は主にミツバチなどの昆虫により媒介される(文献60;64;92;94;100)。風媒による花粉の移動距離については、花粉トラップを用いた調査において、花粉源となる作物から3m以内で花粉量はおよそ半減し(文献48)、10m以上では90%減少する(文献54)と報告されている。また、ミツバチは通常巣の周辺の植物間を移動する(文献73)が、巣から2km離れた地点までミツバチの集団が確認されていること(文献69)や、除草剤耐性セイヨウナタネを用いて行った調査において、1~2km地点で0.2%、2.5~3km地点で0.15%の交雑率が報告されている(文献75)ことから、セイヨウナタネの商業栽培が大規模に行われているような地域においては、虫媒による花粉の拡散は広範囲に及ぶ可能性が示唆される。

セイヨウナタネの花粉は比較的長期間発芽力を有することが知られている。花粉の寿命は相対湿度など貯蔵条件によって変わるが、室内に1週間放置したものでも寒天培地上で70%程度の発芽率を示し、その後急激に減少することが観察されており(文献62;82)自然条件下では4~5日間で徐々に減少するとされる(文献70)。

#### ホ 病原性

##### へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはエルシン酸とグルコシノレートが比較的高い濃度で含まれている。エルシン酸は13位にシス二重結合を持つ不飽和脂肪酸で実験動物において心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが知られている(文献84)。また、グルコシノレートは甲状腺肥大を引き起こすことが知られている(文献95)。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートである品種が育成された結果、食用油として、また搾油粕は飼料用として用いられるようになった(文献38;95)。なお、精油中のエルシン酸含量が2%未満でグルコシノレート含量が油粕1g当たり30 $\mu\text{mol}$ 未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており(文献61)宿主品種であるDrakkarもカノーラ品種の一つである。

#### ト その他の情報



## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ( 改変 *bar*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L., MS1RF2, OECD UI: ACS-BN004-7 x ACS-BN002-5)( 以下、「MS1RF2」とする。) は、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., MS1, OECD UI: ACS-BN004-7)( 以下、「MS1」とする。) と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., RF2, OECD UI: ACS-BN002-5)( 以下、「RF2」とする。) との交配によって得たハイブリッドである。MS1RF2の交配親であるMS1及びRF2の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表1-1(p.9)及び表1-2(p.10)にそれぞれ示した。

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

また、改変 *bar* 遺伝子、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の塩基配列をそれぞれ図1-1、1-2及び1-3(p.11)に示した。

表 1-1 構成要素の由来及び機能 (MS1)

構成要素	サイズ ( kbp )	由来及び機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
3'g7	0.2	pTiB6S3 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献 21 ; 96)。
改変 <i>bar</i>	0.6	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 ( 改変 PAT 蛋白質 ) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する(文献 93) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドン GTG と AGC は、それぞれ ATG と GAC に置換されている。
PSsuAra	1.9	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来する緑色組織においてのみ発現を誘導する RuBisCo 小サブユニット遺伝子のプロモーターSsuAra(文献 47) と、葉緑体を標的とする輸送ペプチド ( TP ) 配列で構成される。
<i>barnase</i> 遺伝子発現カセット		
3'nos	0.3	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献 20)。
<i>barnase</i>	0.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 由来し、タバート細胞内で RNA を分解する酵素 ( リボヌクレアーゼ ) を発現して雄性不稔形質を付与する遺伝子 ( 文献 30 ) 。
PTA29	1.5	<i>Nicotiana tabacum</i> 由来の薬特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、タバート細胞における発現を誘導する ( 文献 80 ) 。
<i>neo</i> 遺伝子発現カセット		
Pnos	0.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の pTiT37 に由来するノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターで、植物中で <i>neo</i> 遺伝子の転写を開始させる ( 文献 20 ) 。
<i>neo</i>	1.0	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 由来で、neomycin phosphotransferase ( NPT ) をコードし、アミノグリコシド系抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子 ( 文献 4 ) 。
3'ocs	0.9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のオクトピン合成酵素遺伝子の 3'末端調節領域で、転写を終結させ、転写産物のポリアデニル化を行わせる ( 文献 19 ) 。
その他		
RB	0.02	pTiB6S3 に由来する T-DNA 領域の右境界反復。
LB	0.02	pTiB6S3 に由来する T-DNA 領域の左境界反復。

( 注 : 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。 )

表 1-2 構成要素の由来及び機能 (RF2)

構成要素	サイズ ( kbp )	由来及び機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
3'g7	0.2	pTiB6S3 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献 21 ; 96)。
改変 <i>bar</i>	0.6	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する(文献 93) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドン GTG と AGC は、それぞれ ATG と GAC に置換されている。
PSsuAra	1.9	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来する緑色組織においてのみ発現を誘導する RuBisCo 小サブユニット遺伝子のプロモーターSsuAra(文献 47) と、葉緑体を標的とする輸送ペプチド (TP) 配列で構成される。
<i>barstar</i> 遺伝子発現カセット		
3'nos	0.3	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献 20)。
<i>barstar</i>	0.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビターをコードする遺伝子。 <i>barnase</i> 遺伝子産物であるリボヌクレアーゼ (BARNASE 蛋白質) と特異的に結合し、その働きを阻止することにより、雄性不稔性を回復させる (文献 30) 。
PTA29	1.5	<i>Nicotiana tabacum</i> 由来の薬特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、薬のタペート細胞における発現を誘導する (文献 80) 。
<i>neo</i> 遺伝子発現カセット		
Pnos	0.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の pTiT37 に由来するノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターで、植物中で <i>neo</i> 遺伝子の転写を開始させる (文献 20) 。
<i>neo</i>	1.0	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 由来で、neomycin phosphotransferase (NPT ) をコードし、アミノグリコシド系抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子 (文献 4) 。
3'ocs	0.9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のオクトピン合成酵素遺伝子の 3'末端調節領域で、転写を終結させ、転写産物のポリアデニル化を行わせる (文献 19) 。
その他		
RB	0.02	pTiB6S3 に由来する T-DNA 領域の右境界反復。
LB	0.02	pTiB6S3 に由来する T-DNA 領域の左境界反復。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

社外秘情報につき非開示

図 1-1 改変 *bar* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

図 1-2 *barnase* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

図 1-3 *barstar* 遺伝子の塩基配列

#### □ 構成要素の機能

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

MS1 及び RF2 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能については、それぞれ表 1-1 (p.9) 及び表 1-2 (p.10) に示した。

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

#### 【改変 PAT 蛋白質】

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

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

改変 PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない（文献 93）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、改変 PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった（文献 98）。これらのことから、改変 PAT 蛋白質がグルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられる。

#### 【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。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（第一段リン酸転移反応）。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（第二段加水分解反応）（文献 33）。グアニンの 3'部位の切断に対する特異性が高いが、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のみが検出される（文献 76）。

花粉形成は葯で起こる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第一の原因であると考えられている（文献 43）。

*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（文献 23 ; 31 ; 50）。また、プロモーター PTA29 の支配下にある *barnase* 遺伝子は、日中 37 °C の高温条件下においても安定して発現することが示されている（文献 2）。なお、プロモーター PTA29 が温度依存性の発現を誘導するという報告はない。

#### 【BARSTAR 蛋白質】

BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の細胞内阻害物質である（文献 28 ; 31）。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（文献 29 ; 31 ; 85）。

一代雑種品種（F1 品種）は、固定品種に比べて強健で生産力が高く、斉一性に優れるといった特長をもつ（文献 46）が、セイヨウナタネのように自殖可能な作物で

は、通常、確実に F1 雑種を得ることは困難である。そこで、葯のタペート細胞で特異的に発現し花粉形成を阻害するように *barnase* 遺伝子を導入した MS1 を雌株、稔性回復形質を有する RF2 を雄株として交配させることにより、F1 種子を得ることができる。その F1 世代では、BARSTAR 蛋白質が BARNASE 蛋白質の作用を抑制して稔性を回復させる（文献 51）ため、自殖で高収量の種子生産が可能となる。

#### 【改変 PAT 蛋白質、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質の毒性及びアレルギー性】

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

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

#### 【改変 PAT 蛋白質】

改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており（文献 93）、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。

#### 【BARNASE 蛋白質】

*barnase* 遺伝子は、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（文献 50）、他の組織で発現することは考え難い。タペート細胞は花粉形成の四分子期に最も発達し、花粉の発達とともに退化・崩壊する（文献 88）。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、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（文献 49 ; 52）。さらに、細菌と糸状菌のリボヌクレアーゼには、構造及び配列にかなりの相同性が認められているため、これらの酵素についても BARSTAR 蛋白質と相同の阻害物質が存在すると期待される。しかしこのような阻害物質が知られているのは *Bacillus intermedius* によって産生されるリボヌクレアーゼ BINASE 蛋白質のみである。BINASE 蛋白質は BARNASE 蛋白質と高い相同性（85%）を有し、BARSTAR 蛋白質に阻害される（文献 101）。また、BARNASE 蛋白質とのアミノ酸配列の相同性は 20~25%に過ぎないが、類似の立体構造を有する *Streptomyces* の細胞外リボヌクレアーゼ（文献 35）も BARSTAR 蛋白質で阻害されることが報告されている（文献 32）。しかし、植物中のリ

ポヌクレアーゼに対する BARSTAR 蛋白質の阻害作用は報告されていない。なお、BARSTAR 蛋白質はヒト又は動物のリボヌクレアーゼとは結合しないことが報告されている（文献 30 ; 31 ; 35 ; 85）。以上から、BARSTAR 蛋白質が宿主のもつ代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

MS1 及び RF2 の作出に用いられたベクターは、それぞれ pTTM8RE 及び pTVE74RE である。いずれもベクター-pGV825（文献 17）を基礎として構築された。

### ロ 特性

#### ベクターの塩基数及び塩基配列

pTTM8RE 及び pTVE74RE の塩基数はそれぞれ 15,339bp 及び 15,225bp である。両ベクターの塩基配列を別添資料 1-1 及び 1-2 に示した。また、それぞれのベクター地図及び制限酵素による切断部位を図 2（p.15）及び図 3（p.16）に示した。

#### 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pTTM8RE 及び pTVE74RE は T-DNA 領域の外側にストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子（*Sm/Sp*）、カナマイシン耐性遺伝子（*KanR*）、ORI<sub>pBR</sub>、*barstar* 遺伝子を持つ。*Sm/Sp* 及び *KanR* はベクター選抜マーカーとして使用された。また、ORI<sub>pBR</sub> は *E. coli* において自律的複製を行わせる複製起点である。さらに、*barstar* 遺伝子は両プラスミドを構築する際に基礎となったプラスミドに存在していたものであり、pTTM8RE を構築するために大腸菌を用いて *barnase* 遺伝子をプラスミド上に導入する際に、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、大腸菌が死んでしまうため、この BARNASE 蛋白質の酵素活性を抑制するために利用された。なお、これらの配列は T-DNA 領域の外側に存在するため、セイヨウナタネゲノムには挿入されていないと考えられる（別添資料 2, p.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

pTTM8RE 及び pTVE74RE は自律増殖可能な宿主域が *Agrobacterium tumefaciens* 及び *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、植物体では伝達性を持たない。

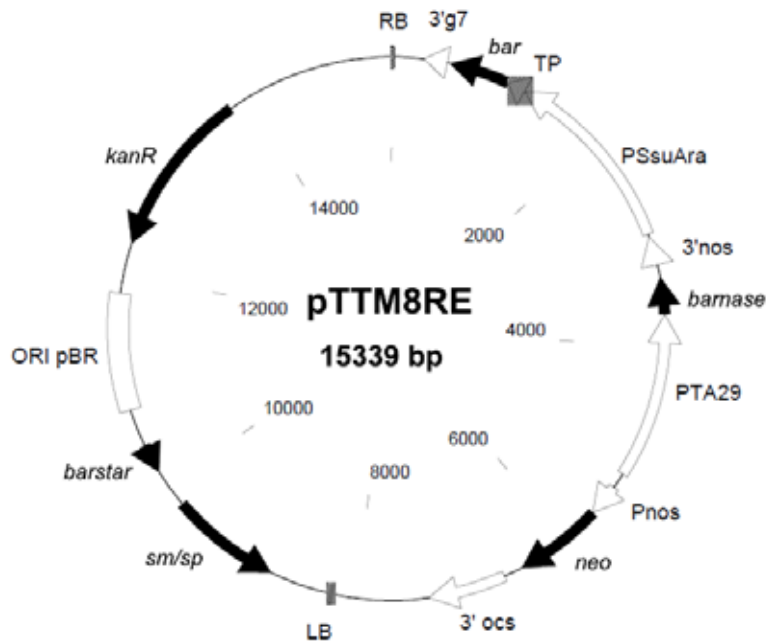


図 2-1 pTTM8RE のベクター地図

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

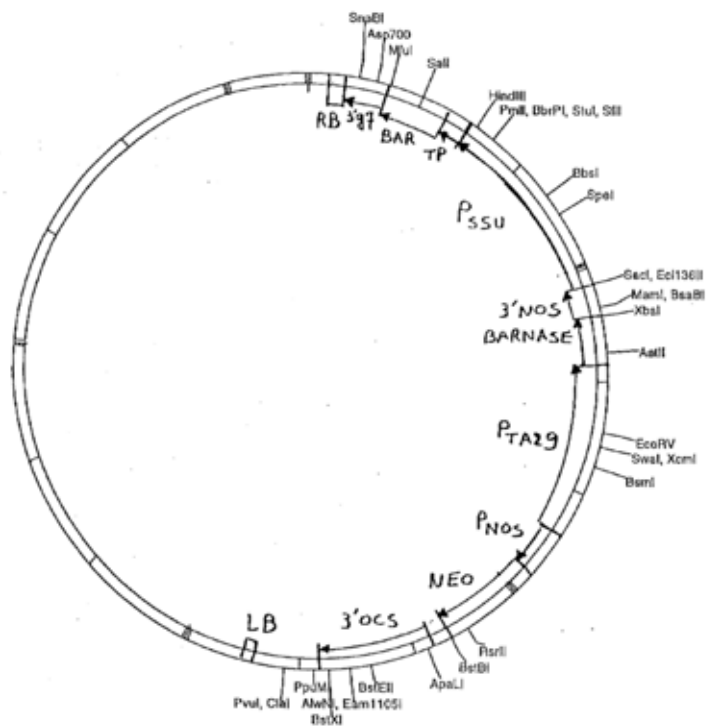


図 2-2 pTTM8RE の制限酵素切断部位

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)



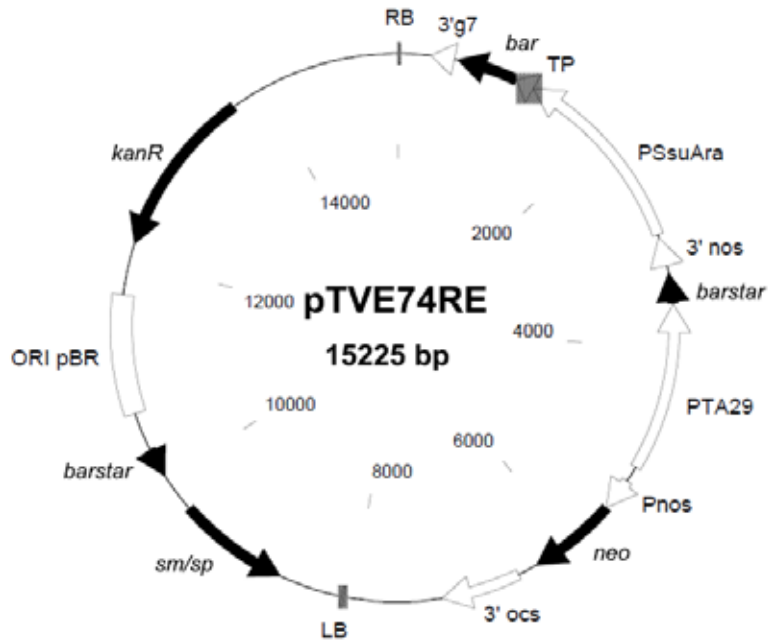


図 3-1 pTVE74RE のベクター地図

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

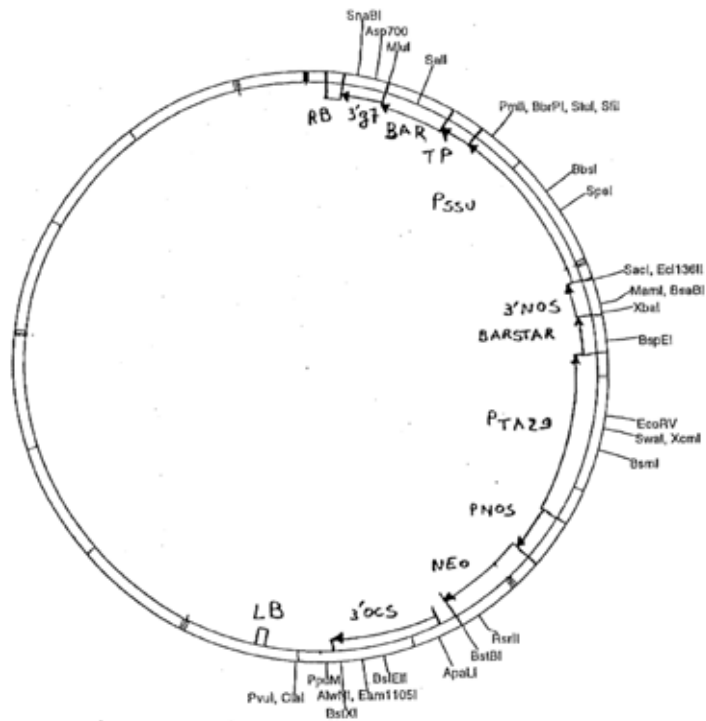


図 3-2 pTVE74RE の制限酵素切断部位

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

### (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

MS1 に移入されたのは、pTTM8RE 上の LB と RB で挟まれた T-DNA 領域の *neo* 遺伝子発現カセット、*barnase* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット (3'ocs-*neo*-Pnos-PTA29-*barnase*-3'nos-PSsuAra-改変 *bar*-3'g7) である (図 2-1, p.15)。また、RF2 に移入されたのは、pTVE74RE 上の LB と RB で挟まれた T-DNA 領域の *neo* 遺伝子発現カセット、*barstar* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット (3'ocs-*neo*-Pnos-PTA29-*barstar*-3'nos-PSsuAra-改変 *bar*-3'g7) である (図 3-1, p.16)。

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

MS1 及び RF2 への核酸の移入はいずれもアグロバクテリウム法(文献 18)を用いて行なわれた。

pTTM8RE または pTVE74RE を保持した *E. coli* MC1061 株、伝達性を司るヘルパープラスミド pRK2013 を保持する *E. coli* HB101 株及び非腫瘍形成性の *A. tumefaciens* C58C1Ri<sup>f</sup> 株を共存させ、pTTM8RE または pTVE74RE を持つ *A. tumefaciens* C58C1Ri<sup>f</sup> 株を作出した後、宿主の胚軸組織片に感染させ、RB 及び LB で挟まれた T-DNA 領域をセイヨウナタネゲノムに組み込ませた。

### ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

#### 核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換された胚軸組織片を 50mg/l Kanamycin-SO<sub>4</sub> 又は 20mg/l Phosphinotricin を含む培地上で選抜した後、ホルモンフリーの培地上に移し、植物体を再生させた。

#### 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

アグロバクテリウムによる形質転換後、500mg/l の Carbenicillin を培地に加え、アグロバクテリウム菌体を除去しており(文献 18) MS1 及び RF2 の植物体には残存していない(別添資料 3, p.5, Figure 2; p.10, Figure 2)。

#### 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及び系統樹

形質転換後、再生させた MS1 及び RF2 の各植物体について、さらに発現形質及び農業形質等に関して総合的に選抜した。なお、MS1RF2 は、MS1 の BC2F1 世代以降の系統と RF2 の T3 又は BC2F1 世代以降の系統を掛け合わせて作出された。MS1RF2 の

育成の経過を図 4 に示した。また、我が国における MS1RF2 の承認状況は以下のとおりである。

#### 【食品安全】

厚生省（現 厚生労働省）より組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針に基づき、1997 年 5 月 26 日に PGS2 及び PHY36 として、また、1999 年 11 月 15 日に PHY23 として、それぞれ食品利用としての安全性の指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経て、2001 年 3 月 30 日に厚生労働省により食品利用としての安全性が確認された。

#### 【飼料安全】

農林水産省より組換え体利用飼料の安全性評価指針に基づき、1997 年 6 月 13 日に除草剤グルホシネート耐性カノーラ PGS2 及び除草剤グルホシネート耐性カノーラ PHY36 として、また、1999 年 2 月 26 日に除草剤グルホシネート耐性カノーラ PHY23 として、それぞれ指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する手続きを経て、2003 年 3 月 27 日に農林水産省により飼料利用としての安全性が確認された。

#### 【環境安全】

1996 年に農林水産省より農林水産分野等における組換え体利用のための指針に基づき、隔離ほ場試験の承認を得た。また、1997 年 4 月 4 日に農林水産省により同指針に基づき、我が国への輸入（加工用及び飼料用としての利用）について指針への適合性が確認された。

社外秘情報につき非開示

図 4 MS1RF2 の系統樹

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

MS1 及び RF2 の遺伝子導入当代はいずれも挿入遺伝子座に関してヘテロ接合体であることが想定される。雄性不稔性が付与されている MS1 は非組換えセイヨウナタ

ネ品種との交配で維持されるため、1 遺伝子座支配であれば、除草剤グルホシネートに対する耐性：感受性の理論上の分離比は 1：1 になることが想定される。また、RF2 当代の自殖によって得られる T1 世代では除草剤グルホシネート耐性：感受性の理論上の分離比は 3：1 となり、耐性を示した複数の個体をさらに自殖して得られる T2 世代の集団では、理論上、耐性：感受性の分離比は 5：1 となることが想定される。

実際に MS1 及び RF2 の各世代における除草剤グルホシネート耐性：感受性の分離比を調べた結果、MS1 の BC1F1 及び BC2F1 世代ではいずれも理論上の分離比に適合する分離を示した（別添資料 11, p.2, Table GBN114; p.12, FBN9301<sub>2</sub>）。また、RF2 の T1 世代及びそのうち除草剤に耐性を示した個体を自殖して得られた T2 世代においても理論上の分離比に適合した分離を示した（別添資料 11, p.9,10, GBN030<sub>1,3</sub>）。このように、いずれも想定されたとおりの分離比を示したことから、MS1 及び RF2 に移入された核酸の複製物はいずれもセイヨウナタネゲノムの 1 箇所が存在すると考えられる。

#### ロ 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

MS1 (BC2F1 世代) 及び RF2 (T3 世代) から抽出した DNA を制限酵素で切断し、改変 *bar* プローブ、PSsuAra プローブ、PTA29 プローブ及び *neo* プローブを用いてサザンプロット分析を行った。その結果、いずれにおいても、ベクター由来の断片と同一サイズのバンドが確認され、MS1 及び RF2 のいずれにおいても 1 コピーの T-DNA 領域が移入されていることが確認された（別添資料 4-1, p.8~9, Figure 2a~d; 別添資料 4-2, p.8~9, Figure 2a~d）。また、MS1 及び RF2 におけるシーケンス解析により、各プラスミド上の T-DNA 領域と同一の配列が挿入されていることが確認されている（別添資料 5-1 及び 5-2）。MS1 及び RF2 に移入された T-DNA 領域を図 5-1 及び図 5-2 (p.20) に示した。

また、MS1 の F1、BC2F1、BC4F1 (品種 A により戻し交配) 及び BC5F1 (品種 B により戻し交配) についてサザンプロット分析を行った結果、いずれの世代においても予想された 13kb 及び 9kb のバンドが検出された(別添資料 4-1, p.14, Figure 3)。さらに、RF2 についても T1、T3 及び BC2F1(品種 C による戻し交配)についてサザンプロット分析を行った結果、いずれの世代においても予想された 14kb 及び 7kb のバンドが認められた（別添資料 4-2, p.12, Figure 2）。これらのことから、MS1 及び RF2 に挿入された遺伝子は複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認された。

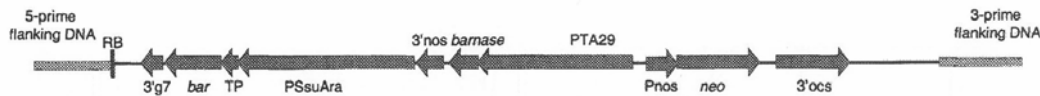


図 5-1 MS1 に移入された T-DNA 領域

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子、TP は輸送ペプチドを示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

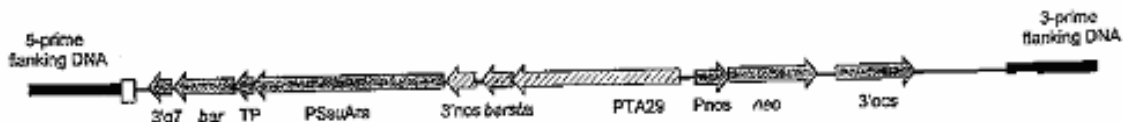


図 5-2 RF2 に移入された T-DNA 領域

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子、TP は輸送ペプチドを示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

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

MS1RF2 は、各交配親由来の染色体上に改変 *bar* 遺伝子がそれぞれ 1 コピー存在するため、2 コピーの改変 *bar* 遺伝子を有する。

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

【改変 *bar* 遺伝子】

改変 *bar* 遺伝子の発現は、除草剤グルホシネート散布試験により確認した。除草剤グルホシネート耐性に関して、MS1 はヘテロ接合体であるため、理論上、約 50% の個体が耐性を示し、他方、RF2 及び MS1RF2 は 100% の個体が耐性を示すことが想定される。

国外の複数地域で行われた試験において、除草剤グルホシネート耐性：感受性の分離比を調べた結果、MS1 の BC1F1 及び BC3F1 世代（品種 A により戻し交配）において約 50%（別添資料 11, p.2, GBN114；p.3, FNB147<sub>1</sub>）、RF2 の T3 及び T5 世代において約 100%（別添資料 11, p.17, FNB9301<sub>2</sub>；p.23, FNB9401<sub>2</sub>）、さらに MS1RF2[MS1

の BC2F1 世代 × RF2 の T4] においても約 100% (別添資料 11, p.23, FNB9401<sub>2</sub>) の個体が耐性を示した。このように、いずれの世代でもほぼ想定された分離比を示したことから、自然条件下において改変 *bar* 遺伝子は個体間及び世代間で安定して伝達していることが確認された。

#### 【*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子】

MS1 における *barnase* 遺伝子、RF2 及び MS1RF2 における *barstar* 遺伝子の発現は、稔性または不稔性個体の発現により確認した。MS1 は非組換えセイヨウナタネとの交配により維持されるため、*barnase* 遺伝子の発現による雄性不稔個体と稔性個体が理論上、1:1 の割合で含まれると想定される。また、RF2 では全個体が稔性を示し、さらに、MS1RF2 では BARSTAR 蛋白質により BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性が阻害され、全個体が稔性を示すことが想定される。

国外の複数地域で行なわれた試験において、MS1 の BC2F1 世代では約 50% の個体が稔性を示した (別添資料 11, p.6, Table FBN9302<sub>6</sub>)。また、RF2 の T3 及び T5 世代、及び MS1RF2 ([MS1 の BC2F1 × RF2 の T3] 及び [MS1 の BC2F1 × RF2 の T4]) において約 100% の個体が稔性を示した (別添資料 11, p.19, Table FNB9301<sub>6</sub>; p.24, Table FNB9401<sub>5</sub>)。このように、いずれもほぼ想定されたとおりの分離比を示したことから、自然環境下において *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子は安定して発現していると考えられる。

さらに、MS1 及び RF2 に導入された改変 *bar* 遺伝子、*barnase* 遺伝子 (MS1 のみ)、*barstar* 遺伝子 (RF2 のみ) 及び *neo* 遺伝子について、MS1 (BC2F1 世代) 及び RF2 (T3 世代) の葉、蕾、種子及び花粉を用いてノーザンブロット分析を行なった。

#### MS1

改変 *bar* 遺伝子の転写産物は葉のみで検出された (検出限界 0.1pg/μg 全 RNA)。また、いずれの組織においても *barnase* 遺伝子の転写産物は検出されなかった (検出限界 0.4 pg/μg 全 RNA)。さらに、いずれの組織においても *neo* 遺伝子転写産物は検出されなかった (検出限界 0.2 pg/μg 全 RNA) (別添資料 6, p.3, Table 2)。

#### RF2

改変 *bar* 遺伝子転写産物は、葉、花芽及び蕾において検出されたが、その他の組織においては検出されなかった (検出限界 0.2pg/μg 全 RNA)。また、*barstar* 遺伝子転写産物は蕾のみで検出された (検出限界 0.1pg/μg 全 RNA)。さらに、いずれの組織においても *neo* 遺伝子転写産物は検出されなかった (検出限界 0.1pg/μg 全 RNA) (別添資料 6, p.2, Table 1)。

また、葉における改変 PAT 蛋白質の酵素活性について、MS1 の F1、BC2F1、BC4F1 (品種 A により戻し交配) 及び BC4F1 (品種 B により戻し交配)、並びに RF2 の T1、

T3 及び BC2F1 (品種 C により戻し交配) の各世代を用いて分光光度法により測定した。その結果、両系統の全ての世代において活性が認められた (別添資料 7, p.2, Table L12; p.4, Table L11)。また、MS1 及び RF2 のこれらの世代を用いて、NPT 蛋白質の酵素活性を測定した。その結果、両系統のいずれの世代においても本蛋白質の酵素活性が認められた (別添資料 8, p.3, Figure L11<sub>1</sub>; p.6, Figure L10<sub>1</sub>)。

ホ ウイルス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

MS1 及び RF2 はいずれも伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然条件下において野生動植物等に伝達されるおそれはない。

#### (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

MS1RF2 の識別は、MS1 及び RF2 それぞれに挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 法によって、植物体 (種子) ごとに調査することによって可能である。本識別方法は各イベントの栽培管理に有効に利用されている (別添資料 12)。

#### (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 移入核酸の複製物の発現により付与された特性

MS1 には除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔性、また、RF2 には除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性がそれぞれ付与されている。MS1 と RF2 を交配すると、F1 世代の葯のタペート細胞において BARNASE 蛋白質と BARSTAR 蛋白質が 1:1 で非共有結合し、BARNASE 蛋白質の活性が阻害されるため、稔性が回復される。

ロ 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

1996 年に北海道農業試験場の隔離ほ場において、MS1RF2 { [MS1 (品種 X により戻し交配) × RF2 (T0 の 3 回以上の自殖後代)]、別添資料 9 の「PGS2」に相当する。} と、その対照となるセイヨウナタネ (品種 X と Drakkar を掛け合わせて作出。以下、「非組換えセイヨウナタネ」とする。別添資料 9 の「非組換え PGS2」に相当する。) を比較し、それらの相違を検討した (別添資料 9)。また、生育初期の高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の休眠性及び有害物質の産生性については、2006 年に我が国の特定網室内において、MS1RF2 [MS1 の BC6F1 世代 × RF2 の T6 世代] を宿主品種の Drakkar と比較した (別添資料 10)。

なお、国外の複数地域において行なわれた栽培試験 (別添資料 11) を評価の参考

として用いた。

#### 形態及び生育の特性

隔離ほ場において、草丈、一次分枝数、茎葉重（乾燥）、草型、葉色、抽だい期、開花期、成熟所要日数、着莢率、莢長、結実数（粒/莢）及び粒色について調査した。その結果、MS1RF2の草丈及び茎葉重は非組換えセイヨウナタネに比べてやや低い数値を示した。その他の形質について、MS1RF2と非組換えセイヨウナタネの間にほとんど相違は認められなかった（別添資料9, p.4, 表1,2）。

#### 生育初期における低温又は高温耐性

MS1RF2及びDrakkarの幼植物体を35℃・12時間明暗条件下で栽培した結果、1ヶ月後の観察時にはいずれも枯死していることが確認された（別添資料10, p.18, 表23）。よって、MS1RF2の生育初期における高温耐性はDrakkarと同様に低いと考えられる。

なお、一般に我が国の秋期に播種されたセイヨウナタネは、生育速度は異なるものの、暖地及び寒地いずれの冬期においても生育することが知られている（文献82）。

#### 成体の越冬性又は越夏性

MS1RF2の越夏性については、隔離ほ場において、非組換えセイヨウナタネ及び他の参考品種と同等であることが観察されている（別添資料9, p.3）。

なお、セイヨウナタネは一般に高い耐寒性、耐雪性を示すことが知られている（文献82）。

#### 花粉の稔性及びサイズ

特定網室内で栽培したMS1RF2及びDrakkarから花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色した結果、いずれの系統も99%の花粉が染色されており、高い稔性が認められた（別添資料10, p.15）。また、花粉のサイズを比較した結果、統計学的有意差は認められなかった（別添資料10, p.17, 表21）。

#### 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

隔離ほ場試験において、MS1RF2の子実収量（g/株）は、非組換えセイヨウナタネと比較して4.8g重かった。また、千粒重についてほとんど相違は認められなかった（別添資料9, p.4, 表2）。

なお、国外の栽培試験では、1993年に7地域、1994年に5地域においてMS1RF2の子実収量（kg/ha）をDrakkarと比較したが、いずれの年のいずれの地域においてもMS1RF2とDrakkarの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料11, p.20, Table FBN9301<sub>8</sub>; p.25, Table FNB9401<sub>8</sub>）。



脱粒性については、隔離ほ場試験において裂莢の難易度を比較した結果、MS1RF2 と非組換えセイヨウナタネはいずれも裂莢性やや易で、相違は認められなかった(別添資料 9, p.4, 表 2)。

特定網室内において栽培した MS1RF2 及び Drakkar の収穫種子を各 20 粒播種し、1 週間後に発芽率を測定した結果、MS1RF2 は 95%(19/20 粒)、Drakkar は 85%(17/20 粒)であった(別添資料 10, p.20, 表 24)。また、発芽が認められなかった種子についてテトラゾリウム法を用いて生死判別を試みたが、いずれの種子も腐敗が進み種皮内部はほとんど失われており、明瞭な染色結果が得られなかったことから、不発芽が死滅によるものであり、休眠によるものではないことが確認された。よって、生存種子はいずれも播種 1 週間後には全て発芽しており、種子の休眠性はいずれも極めて低いと考えられる。

#### 交雑率

MS1RF2 の交雑率の試験は行っていないが、2006 年に特定網室で調査した花粉の稔性は Drakkar と同等であり(別添資料 10, p.15)。サイズについては統計学的有意差がないことが確認されていること(別添資料 10, p.17, 表 21)。さらに、花粉の受け手としての交雑性についても、1993 年及び 1994 年に国外の複数地域において調査された子実収量(kg/ha)が Drakkar との比較において、いずれの年及び地域でも統計学的有意差は認められなかった(別添資料 11, p.20, Table FBN9301<sub>8</sub>; p.25, Table FNB9401<sub>8</sub>)ことから、MS1RF2 の交雑性は Drakkar と相違はないと推察される。

#### 有害物質の産生性

特定網室内において、根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験、植物体内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物に影響を及ぼすものについては土壤微生物相試験を行なった。

後作試験： MS1RF2 及び Drakkar を移植後約 2 ヶ月間栽培した土壤に、検定作物としてダイコンを栽培し、ダイコンの発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について比較した結果、いずれの項目にも統計学的有意差は認められなかった(別添資料 10, p.6~8, 表 1,3,4,6,7)。よって、MS1RF2 は根から分泌され他の植物に影響を及ぼす物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

鋤込み試験： 播種後約 3 ヶ月間栽培した MS1RF2 及び Drakkar の植物体乾燥粉末をそれぞれ 1%混和した培土でダイコンを栽培し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾

物重を比較した結果、いずれの項目にも統計学的有意差は認められなかった（別添資料 10, p.9～12, 表 9,11,13,14,16,17）。よって、MS1RF2 は枯死した後に他の植物に影響を及ぼす物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

土壌微生物相試験： MS1RF2 及び Drakkar を移植後約 2 ヶ月間栽培した土壌を採取し、滅菌したリン酸緩衝液で適宜希釈後、細菌及び放線菌については PTYG 培地、糸状菌についてはローズベンガル培地を用いて培養し、それぞれの菌数を比較した。その結果、細菌数及び放線菌数において、MS1RF2 と Drakkar の間に統計学的有意差が認められたが、MS1RF2 の方が高い数値を示している（別添資料 10, p.14, 表 19）ことから、MS1RF2 は根から分泌され土壌微生物の生菌数減少に影響を及ぼすような物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、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

MS1RF2 の商業栽培は 1997 年に開始し、2003 年に作付けされたのを最後に栽培を終了した。また、MS1RF2 の栽培はカナダでのみ行なわれた。1997 年から 2003 年の栽培面積の推移を表 2 に示した（推計）。なお、今後も MS1RF2 の極少量の混入の可能性は否定できないが、大量に我が国に輸入されることはないと考えられる。また、国外及び我が国における承認に関する情報を表 3-1 及び表 3-2（p.27）に示した。

表 2 カナダにおける MS1RF2 の栽培面積の推移（推計）（1997～2003 年）

社外秘情報につき非開示

表 3-1 国外における承認状況

国名		承認機関	承認時期	承認内容
カナダ	MS1	カナダ食品検査庁	1995年4月	規制外
		カナダ食品検査庁	1995年12月	飼料安全
		カナダ厚生省	1995年8月	食品安全
	RF2	カナダ食品検査庁	1995年4月	規制外
		カナダ食品検査庁	1995年12月	飼料安全
		カナダ厚生省	1995年8月	食品安全
	MS1RF2	カナダ食品検査庁	1995年4月	規制外
		カナダ食品検査庁	1995年12月	飼料安全
		カナダ厚生省	1995年8月	食品安全
米国	MS1	米国農務省	1996年3月	輸入
		連邦食品医薬品局	1996年4月	飼料・食品安全
	RF2	米国農務省	1996年3月	輸入
		連邦食品医薬品局	1996年4月	飼料・食品安全
	MS1RF2	親系統が承認された場合、そのスタック系統について承認は求められない。		
オーストラリア ニュージーランド	MS1	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	食品安全
		オーストラリア遺伝子技術規制局 (OGTR)	2003年7月	環境安全 (オーストラリアのみ)
	RF2	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	食品安全
		オーストラリア遺伝子技術規制局 (OGTR)	2003年7月	環境安全 (オーストラリアのみ)
	MS1RF2	親系統が承認された場合、そのスタック系統について承認は求められない。		
	EU	MS1	ヨーロッパ委員会, 保健消費者保護総局	旧指針: 1997年6月 法制化後: 2005年4月
RF2		ヨーロッパ委員会, 保健消費者保護総局	旧指針: 1997年6月 法制化後: 2005年4月	食品*、飼料及び栽培
MS1RF2		ヨーロッパ委員会, 保健消費者保護総局	旧指針: 1997年6月 法制化後: 2005年4月	食品*、飼料及び栽培

\* 油としての利用

(注: 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 3-2 我が国における承認状況

承認機関	承認年月	承認内容
農林水産省	1996年	隔離ほ場試験
農林水産省	1997年4月 (PGS2)	環境安全 (輸入) (旧指針)
厚生省	1997年5月 (PGS2, PHY36) 1999年11月 (PHY23)	食品安全 (旧指針)
厚生労働省	2001年3月	食品安全 (食品衛生法)
農林水産省	1997年6月 (PGS2, PHY36) 1999年2月 (PHY23)	飼料安全 (旧指針)
	2003年3月	飼料安全 (飼料安全法)

(注: 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

### 1 競合における優位性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では北海道や本州で河原や線路沿いでセイヨウナタネの群生（文献 83）や、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。しかし、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等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かかる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている（文献 60）。実際に、大規模にセイヨウナタネの商業栽培を行っている英国で行われた調査において、人為的攪乱のない自然条件下では、野生化したセイヨウナタネは 2～4 年で消滅すると報告されている（文献 13）。また、同じく英国で行われた 3 年間にわたるモニタリング調査において、ほ場から逸出して群生したと考えられるセイヨウナタネの個体群は 3 年目にはほぼ消滅したことが報告されている（文献 79）。これらのことを踏まえて、MS1RF2 の競合における優位性に起因する生物多様性影響を評価した。

競合における優位性に関わる形質として、我が国の隔離ほ場試験において、MS1RF2 の草丈、一次分枝数、茎葉重（乾燥）、抽だい期、開花期、成熟所要日数、着莢率、莢長、一莢当たりの結実数、子実収量（g/株）、千粒重、裂莢性及び成体の越夏性について、対照品種と比較した。その結果、MS1RF2 の草丈及び茎葉重は対照品種に比べて僅かに低く、子実収量はやや高い数値を示した。その他の形質について MS1RF2 と対照品種との間にほとんど相違は認められなかった（別添資料 9, p.4, 表 1,2）。また、我が国の特定網室試験において調査した生育初期の高温耐性、発芽率及び休眠性について、MS1RF2 と宿主品種である Drakkar を比較した結果、いずれの形質にも相違は認められなかった。

なお、1993年及び1994年に国外の複数地域において行なわれた試験では、MS1RF2の子実収量(kg/ha)はDrakkarとの比較において統計学的有意差は認められなかった(別添資料11, p.20, Table FNB9301<sub>8</sub>; p.25, Table FBN9401<sub>8</sub>)。

以上から、MS1RF2の競合における優位性を高めることを示唆する形質は認められなかった。

MS1RF2は改変PAT蛋白質により除草剤グルホシネート耐性を示す。本形質は除草剤グルホシネートの存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難い。また、NPT蛋白質によりネオマイシンやカナマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質耐性が付与されているが、自然環境下ではこれらの抗生物質が選択圧となる条件は考え難い。よって、これらの形質を有していても競合における優位性を高めることはないと考えられる。さらに、交配親のMS1にはBARNASE蛋白質による雄性不稔形質が、他方、RF2にはBARSTAR蛋白質による稔性回復性がそれぞれ付与されているため、F1品種であるMS1RF2では、BARNASE蛋白質のリボヌクレアーゼ活性がBARSTAR蛋白質によって抑制されて花粉を形成する。しかし、MS1RF2の花粉の稔性は宿主品種のDrakkarと同等であり(別添資料10, p.15) サイズについては統計学的有意差がないことが確認されている(別添資料10, p.17, 表19)。よって、本形質は競合における優位性を高めるもので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する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

## (2) 影響の具体的内容の評価

## (3) 影響の生じやすさの評価

## (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## 2 有害物質の産生性

## (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

MS1RF2 は、交配親である MS1 に由来する BARNASE 蛋白質、RF2 に由来する BARSTAR 蛋白質、両交配親に由来する改変 PAT 蛋白質及び NPT 蛋白質を有する。改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い(文献 93)。NPT 蛋白質は高い基質特異性を有し、ATP の存在下でネオマイシンやカナマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質に対してのみ特異的にリン酸化反応を触媒する(文献 15 ; 16)。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、BARNASE 蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有し、宿主の 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、MS1RF2 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し、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、各蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、包括的な相同性検索及びアレルゲンエピトープ検索を行なったが、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、我が国の特定網室試験において、MS1RF2 の根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験、植物体内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物相に影響を及ぼすものについては土壤微生物相試験を行なった。その結果、後作試験及び鋤込み試験において調査されたすべての項目について、MS1RF2 と Drakkar の間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 10, p.6~12)。他方、土壤微生物相試験において調査された細菌数、放線菌数及び糸状菌数のうち、細菌数及び放線菌数において、両者間に統計学的有意差が認められたが、MS1RF2 の方が高い数値を示していることから(別添資料 10, p.14, 表 19)、MS1RF2 は根から分泌され土壤微生物の生菌数減少に影響を及ぼすような物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

さらに、国外での調査において、MS1RF2 のエルシン酸及びグルコシノレート含量を 1993 年及び 1994 年に国外の複数地域において調査しており、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(別添資料 11, p.21, Table

FBN9301<sub>9</sub>; p.26, Table FBN9401<sub>9</sub> )

以上から、MS1RF2 は有害物質の産生性を新たに獲得したとは考えられず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

### 3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

(2) 影響の具体的内容の評価



### (3) 影響の生じやすさの評価

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## 4 その他の性質

第二、3(交雑性)に挙げた我が国に自生するセイヨウナタネ及びその近縁種はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等としては特定されなかった。しかし、MS1RF2と近縁種が交雑した場合、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、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が考えられた。

MS1RF2の交雑率は調査していないが、2006年に我が国の特定網室試験において調査した花粉の稔性は宿主品種のDrakkarと同等であり(別添資料10, p.15)、サイズについては統計学的有意差がないことが確認されている(別添資料10, p.17, 表21)。また、花粉の受け手としての交雑性についても、1993年及び1994年に国外の複数地域において調査された子実収量(kg/ha)は、Drakkarとの比較において、いずれの年及び地域でも統計学的有意差は認められなかった(別添資料11, p.20, Table FBN9301<sub>8</sub>; p.25, Table FNB9401<sub>8</sub>)。これらのことから、MS1RF2の交雑性はDrakkarと相違はないと推察される。よって、セイヨウナタネと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%と報告されている(文献37; 60; 68)。

#### 2) *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%(文献78)、0.2%(文献99)、6.5~7.1%(文献97)等の報告がある。また、F1の生存率は平均で2%以下であり(文献78)、*B. rapa*とセイヨウナタネの雑種の花粉の稔性が平均で41~53%に減少することが確認されている(文献40)。さらに、F2及びBC世代での適応度についても、品種・集団間に差異があるものの、全体的に低くなると報告されている(文献34)。

### 3) *B. juncea* との交雑性

セイヨウナタネと *B. juncea* の交雑性については、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合には 0.3~1.1% (文献 6)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合には 3% (文献 41) の雑種形成率が報告されている。

また、セイヨウナタネと *B. juncea* の雑種の花粉稔性は 0~28% であり、種子の生産量も少ないと報告されている (文献 25)。また、セイヨウナタネを雌株として得られた雑種は弱く、生育遅延が認められ、生育段階で死に至ると報告されている (文献 12)。さらに、BC 世代でも同様に初期生育遅延や個体数の減少が報告されている (文献 71)。他方、*B. juncea* を雄株として得られた雑種の栄養生長は旺盛であるが、着莢率、結実粒数、千粒重や子実収量などは劣り、減数分裂に異常がみられ、花粉稔性も 20% 程度に低下することが報告されている (文献 12)。

### 4) *B. nigra* との交雑性

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった (文献 6)。さらに人工交配によってもほとんど雑種は得られないか (文献 5) または全く得られなかったことが報告されている (文献 7; 44)。また、雑種が形成されたとしても花粉の稔性は高くても 3.1% であり、完全に不稔になるものも報告されている。さらに、F1 をセイヨウナタネによって戻し交配した場合の結実率 (結実数/授粉した花) は 0.9% であり、*B. nigra* によって戻し交配した場合の結実率は 0.06% であった。また、これらの種子は萎縮しており、温室内においても発芽しなかった (文献 5)。このように、得られた雑種の稔性は低く、F2 や BC 世代を得ることは難しいと考えられる (文献 77)。

### 5) *R. raphanistrum* との交雑性

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、セイヨウナタネと *R. raphanistrum* を 600:1 の割合で栽培した場合、0.05% の雑種形成が報告されている (文献 14)。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀 (文献 74; 97) であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群からセイヨウナタネとの雑種は確認されなかった (文献 91)。他方、人工交配や胚培養 (文献 44)、あるいは細胞質雄性不稔系統 (文献 3; 24) を用いてセイヨウナタネと *R. raphanistrum* の雑種を作出することができる。しかし、得られた雑種の花粉の稔性は著しく低かったことが報告されている (文献 3)。

以上から、MS1RF2 と近縁種が交雑し、自然条件下で雑種が優占化して他の野生植

物種の個体群を駆逐する可能性は、宿主品種の属する種であるセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

他方、導入遺伝子が負担となり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、*neo* 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（文献 86）。よって、これらの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（文献 43）ことから、*barnase* 遺伝子が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、*barnase* 遺伝子はプロモーターPTA29 により葯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の影響で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。

以上から、MS1RF2 とセイヨウナタネを含む近縁種が交雑した場合、雑種が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、導入遺伝子の影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性はいずれも極めて低く、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国では、セイヨウナタネは河原や線路沿いでの群生が報告されている。また、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、種子のこぼれ落ちはこれまでも起こっていたと考えられるが、こぼれ落ちたセイヨウナタネが我が国の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。

なお、MS1RF2 は 2003 年に作付けされたのを最後に栽培を終了していることから、今後大量に我が国に輸入される可能性はないと考えられる。しかし、運搬の途中に混入種子がこぼれ落ちる場合には、我が国の自然環境に放出される可能性が考えられた。

MS1RF2 の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、成体の越冬性、種子の生産量及び脱粒性については、1996 年の我が国での隔離ほ場試験において非組換えセイヨウナタネと比較した。また、生育初期における高温耐性、種子の休眠性、花粉の稔性及びサイズについては、2006 年の我が国での特定網室試験において宿主品種の Drakkar と比較した。さらに、子実収量については 1993 年及び 1994 年に国外の複数地域において調査されている。これらの調査の結果、MS1RF2 の競合における優位性を高めることを示唆する形質は認められなかった。

また、MS1RF2 は改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネート耐性を示す。本形質は除草剤グルホシネートの存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難い。また、NPT 蛋白質によりネオマイシンやカナマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質耐性が付与されているが、自然環境下ではこれらの抗生物質が選択圧となる条件は考え難い。さらに、交配親の MS1 には BARNASE 蛋白質による雄性不稔形質が、他方、RF2 には BARSTAR 蛋白質による稔性回復性がそれぞれ付与されているおり、ハイブリッドである MS1RF2 では、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性が BARSTAR 蛋白質によって抑制されて花粉を形成する。しかし、形成された花粉の稔性は Drakkar と同等であり、サイズについては統計学的有意差がないことが確認されている。よって、これらの形質は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。

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。

改変 PAT 蛋白質及び NPT 蛋白質は、それぞれ高い基質特異性を有している。また、BARNASE 蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有し、宿主の 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、MS1RF2 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 の支配下であり、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。以上から、これらの蛋白質が宿主の他の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。さらに、各蛋白質のアミノ酸配列に基づいて相同性検索を行なった結果、いずれにおいても既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、我が国の特定網室試験において、MS1RF2 の有害物質の産生性について後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった結果、有害物質の産生性を新たに獲得したことを示唆する形質は認められなかった。

さらに、国外での調査において、MS1RF2 のエルシン酸及びグルコシノレート含量は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。

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。

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* が挙げられた。しかし、いずれも外来種であり、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。よって、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、MS1RF2 と近縁種が交雑した場合、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、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について検討した。

MS1RF2 の交雑率について試験は行なっていないが、我が国での特定網室試験において、MS1RF2 の花粉の稔性は Drakkar と同等であり、サイズについて統計学的有意差は認められなかった。また、花粉の受け手としての交雑性についても、子実収量について Drakkar との間に相違は認められなかった。これらのことから、交雑性についても相違はないと推察された。また、セイヨウナタネと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 MS1RF2 と近縁種の雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性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、*neo* 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ことから、これらの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た。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から、*barnase* 遺伝子が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た。

また、*barnase* 遺伝子については、プロモーターPTA29 の支配下で薬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の影響で死に至るか、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。したがって、本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た。

以上を総合的に評価し、MS1RF2 を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## 参考文献

社外秘情報につき非開示

## 参考資料

参考資料 1 : 生物多様性影響評価書 (MS1)

参考資料 2 : 生物多様性影響評価書 (RF2)

## 別添資料

- 別添資料 1-1 : プラスミド pTTM8RE の全塩基配列 社外秘情報につき非開示
- 1-2 : プラスミド pTVE74RE の全塩基配列 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 2 : MS1 及び RF2 における T-DNA 領域外配列の確認  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 3 : MS1 及び RF2 におけるアグロバクテリウム残存の有無  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 4-1 : MS1 における分子分析 社外秘情報につき非開示
- 4-2 : RF2 における分子分析 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 5-1 : 雄性不稔セイヨウナタネ MS1 における挿入遺伝子のシーケンス解析 社外秘情報につき非開示
- 5-2 : 稔性回復性セイヨウナタネ RF2 における挿入遺伝子のシーケンス解析 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 6 : MS1 及び RF2 におけるノーザンプロット分析結果  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 7 : MS1 及び RF2 における PAT 活性 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 8 : MS1 及び RF2 における NPT 活性 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 9 : 隔離ほ場試験報告書 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 10 : 特定網室試験報告書 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 11 : 国外における栽培試験報告 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 12 : MS1 及び RF2 のイベント識別法 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 16年 8月 18日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社  
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変*bar, barnase, barstar, Brassica napus L.*, MS1RF2, OECD UI: ACS-BN 004-7×ACS-BN002-5）（以下、「MS1RF2」とする。）の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

### 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

### 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社はMS1RF2穀粒の我が国への輸入業者、我が国においてMS1RF2穀粒を配給した業者、輸入したMS1RF2穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

### 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにしたMS1RF2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MS1RF2穀粒を我が国に配給している、またはその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

### 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、MS1RF2を不活性化する措置か、さもなければMS1RF2の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出されたMS1RF2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

MS1RF2が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。