

除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ (改変 *dmo*, *Brassica napus* L.) (MON94100,
OECD UI: MON-94100-2) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1)分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(2)使用等の歴史及び現状	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
(3)生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
ハ 捕食性又は寄生性	5
ニ 繁殖又は増殖の様式	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
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	6
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	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
ホ 病原性	9
ヘ 有害物質の産生性	9
ト その他の情報	10
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	10
(1)供与核酸に関する情報	10
イ 構成及び構成要素の由来	10
ロ 構成要素の機能	11
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.....	11
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.....	16
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	17
(2)ベクターに関する情報.....	18
イ 名称及び由来.....	18
ロ 特性.....	18
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	18
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	18
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.....	18
(3)遺伝子組換え生物等の調製方法.....	18
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	18
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	19
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	19
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	19
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.....	19
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.....	19
(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.....	22
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	22
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.....	24
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.....	27
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発現の安定性.....	27
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.....	29

(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.....	29
(6)宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	29
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.....	29
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	29
a 形態及び生育の特性.....	30
b 生育初期における高温耐性.....	30
c 成体の越夏性.....	31
d 花粉の稔性及びサイズ.....	31
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	31
f 交雑率.....	32
g 有害物質の産生性.....	32
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	33
(1)使用等の内容.....	33
(2)使用等の方法.....	33
(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.....	33
(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.....	33
(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.....	33
(6)国外における使用等に関する情報.....	33
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	35
1 競合における優位性.....	35
(1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	35
(2)影響の具体的内容の評価.....	38
(3)影響の生じやすさの評価.....	38
(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	38
2 有害物質の産生性.....	38
(1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	38
(2)影響の具体的内容の評価.....	40
(3)影響の生じやすさの評価.....	40

(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	40
3 交雑性	40
(1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	40
(2)影響の具体的内容の評価	40
(3)影響の生じやすさの評価	40
(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	40
4 その他の性質	41
第三 生物多様性影響の総合的評価	43
参考文献	47
緊急措置計画書	56
別添資料リスト	58

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

2022年8月30日

農林水産大臣 野村 哲郎 殿
環境大臣 西村 明宏 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 坂田 耕平
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	除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ (改変 <i>dmo</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (MON94100, OECD UI: MON-94100-2)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 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

10

和名：アブラナ科 アブラナ属 セイヨウナタネ

英名：Oilseed Rape

学名：*Brassica napus* L.

15 ② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は 65037 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *Brassica rapa* L. と *Brassica oleracea* L. との交雑の結果できた複二倍体種である (OGTR, 2008)。セイヨウナタネは、交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパ又は地中海沿岸が原産地と考えられており、現在は世界中にその分布が見られる (OGTR, 2008; OECD, 2012)。

25 セイヨウナタネは施肥管理が行われなくても道路沿いや空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国でも北海道や本州の河原や線路沿いで群生が確認されている (清水ら, 2001; 中井, 2003)。また、ナタネの輸入港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育が報告されている (国立研究開発法人国立環境研究所, 2022; 農林水産省, 2022)。しかし、セイヨウナタネは自然環境下では多年生草本と競合し自生化することは困難であることが知られている (OECD, 1997)。

30

我が国に分布する近縁種として、アブラナ (*B. rapa*)、カラシナ (*Brassica juncea*)、クロガラシ (*Brassica nigra*)、ハリゲナタネ (*Brassica tournefortii*)、キバナスズシロ (*Eruca vesicaria*)、オハツキガラシ (*Erucastrum gallicum*)、セイヨウノダイコン (*Raphanus raphanistrum*)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)、ノハラガラシ (*Sinapis*

35

arvensis) 及びシロガラシ (*Sinapis alba*) が挙げられる (中井, 2003; OGTR, 2008; OECD, 2012; 農林水産省, 2022)。このうち、*B. rapa* と *B. juncea* は弥生時代に海外から導入された栽培種に由来すると考えられている (Nishizawa et al., 2010)。これとは別に、戦後各地に広まった *B. juncea* は、雑草としてヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている (清水ら, 2001; 中井, 2003)。他方、*B. nigra*、*B. tournefortii*、*E. vesicaria*、*E. gallicum*、*R. raphanistrum*、*H. incana*、*S. arvensis* 及び *S. alba* は、いずれも明治以降に帰化した外来種である (村上・鷲谷, 2002; 中井, 2003)。なお、セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しない。

10 (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

セイヨウナタネは、13 世紀にヨーロッパにおいて栽培が始まったとされている (Brown et al., 2008)。我が国においては、古くから *B. rapa* が栽培され、江戸時代には灯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業従事者の他業種への就労のため、急速に衰退した (稲永, 2000)。現在の我が国におけるセイヨウナタネの主産地は、北海道及び東北地方である (農林水産省, 2021)。

元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、ラットの給餌試験において心筋への脂肪蓄積に関与し心臓病変を引き起こすことが報告されているエルシン酸や、甲状腺肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こす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、食用や飼料には不向きであると考えられていた (OGTR, 2008)。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートのカノーラ品種が育成され、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 (OECD, 2012)、また、油かすは家畜飼料として利用されている (OGTR, 2008)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

35 国連食料農業機関 (FAO) の統計情報に基づくと、2020 年における世界のセイヨウ

ナタネの栽培面積は約 3,549 万 ha であり、その上位国はカナダが約 832 万 ha、インドが約 750 万 ha、中国が約 680 万 ha、EU が約 532 万 ha、オーストラリアが約 203 万 ha となっている (FAOSTAT, 2022)。現在、我が国で栽培されているセイヨウナタネの栽培面積は 1,640 ha、収穫量は 3,260 t である (農林水産省, 2021)。

5

セイヨウナタネには、花芽分化、抽苔及び開花に至るための低温要求度が低い春播き品種と、低温要求度が高い秋播き品種がある (Brown et al., 2008)。一般に、秋播き品種の方が生育期間が長く多収であるため、土壌凍結のない地域では秋播き品種が栽培され (稲永, 2000)、カナダ等の寒冷地域では春播き品種が栽培される (OGTR, 2008; OECD, 2012)。一方、日本におけるセイヨウナタネの栽培方法は、夏から秋に播種して翌春に収穫するのが一般的である (由比, 2004)。

10

日本には 2021 年度に約 234 万 t のナタネ種子が輸入され、主な輸入国はカナダ (約 212 万 t)、次いでオーストラリア (約 21 万 t) である (財務省, 2021)。

15

セイヨウナタネ種子から搾油・精製された油は、食用及び食品加工油脂として利用されている。搾油後の油かすは家畜肥料として用いられる (OGTR, 2008)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

20

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。

25

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは一般に冷涼な気候で栽培され、最適生育温度は 20°C をわずかに超えた程度である (OECD, 1997; OGTR, 2008)。また、セイヨウナタネは酸性や湿度には比較的強いが、重粘土や砂質で乾燥している土壌は適さない。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 (志賀, 1981)。

30

ハ 捕食性又は寄生性

—

35

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

5

セイヨウナタネは1つの莢の中に10~30の種子ができ、種子が成熟し乾燥した莢は裂開して種子を放出する (OECD, 2012)。乾燥した莢は、わずかな物理的刺激により裂開するため、種子を飛散させやすい (稲永, 2000)。

10 セイヨウナタネ種子は一次休眠を示さない (OGTR, 2008; OECD, 2012)。しかし、極端な変温、土壤水分の不足及び長期間の暗条件並びに酸素欠乏など発芽に不適な環境にさらされた場合、二次休眠が誘発されることがある (OGTR, 2008)。二次休眠は、2~4°Cの低温条件や変温条件などによって覚醒される (OGTR, 2008)。

15 セイヨウナタネの種子の寿命は、採種条件や保存条件によって異なる。登熟後に乾燥状態で冷蔵保存した場合には少なくとも25年を経過しても発芽する (OECD, 2012)。しかしながら、収穫時に飛散し地表に落ちた種子の多くが、初めの一年を越えて生存することができない (OECD, 2012)。

20 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ていない。

25

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

30 セイヨウナタネは自家不和合性をもたず自家受粉するが、部分的には他殖も行われる (OECD, 2012)。セイヨウナタネの同一ほ場における他殖率は平均で20~40%で、主として開花時の環境条件によって著しく異なる (OECD, 2012)。我が国の試験ほ場における調査では、花粉源と同じほ場での他殖率は、3ヵ年平均で11.61%であった (Yamamori, 2011)。

35 セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しない。セイヨウナタネ

と交雑可能な近縁種としては、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が挙げられる (中井, 2003; OGTR, 2008; OECD, 2012; 農林水産省, 2022)。

5 セイヨウナタネと *B. rapa* との交雑性について、セイヨウナタネのほ場の外側に *B. rapa* の一群を植えた場合のセイヨウナタネとの交雑率は 0.4~1.5 % であり、形成された雑種の生存率は 2 % 未満であった (OGTR, 2008)。しかし、セイヨウナタネと同一ほ場内に *B. rapa* を 1:1 で植えた場合の交雑率は、セイヨウナタネを種子親とすると 9 %、花粉親とすると 13 % であった (Jørgensen et al., 1996)。また、F₁ 個体の花粉稔性は平均
10 で 35 % に低下し (Jørgensen et al., 1996)、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の報告がある (Hauser et al., 1998)。東北農業研究センターの試験ほ場において、セイヨウナタネの畝間にポット栽培の *B. rapa* 栽培品種 55 系統を配置し、得られた種子の倍数性をフローサイトメトリーにより調査した結果、*B. rapa* 系統ごとのセイヨウナタネとの自然交雑率は
15 2~50 %、平均で 22.8 % であった (Yamamori, 2011)。

セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性について、自然条件下でセイヨウナタネを花粉親とした場合の交雑率は 3~4.7 % であった (OGTR, 2008)。農業生物資源研究所 (現: 農業・食品産業技術総合研究機構) の試験ほ場において、花粉源となる除草剤耐
20 性セイヨウナタネを中央に配置して、花粉源内で *B. juncea* を混植し、花粉源の周囲に *B. juncea* を栽植して、*B. juncea* における自然交雑率を調査した。その結果、交雑率は、花粉源内の混植地点では 1.62 %、花粉源との隣接地点では 0.306 %、花粉源からの距離が 1.0 m、5.0 m、10.0 m、20.0 m、27.5 m の地点では、それぞれ 0.0499 %、0.0369 %、0.0396 %、0.0000 %、0.0000 % であった (Tsuda et al., 2012)。一方、交配による雑種生産性の平均はセイヨウナタネが種子親の場合 0.07 個 (雑種数/交配花)、花粉親の場合 4.05 個という報告がある (津田ら, 2016)。また、形成された雑種の花粉稔性は 0~28 % と低い (OGTR, 2008)。雑種後代に関して、F₁ 個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある (津田ら, 2016)。

30 セイヨウナタネと *B. nigra* との交雑性について、両者を隣接して生育させた後に雑種の形成率を調査した報告があるが、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった (Scheffler and Dale, 1994; Bing et al., 1996)。また、人工受粉による交雑によって交雑体が得られたという報告はない。なお、*B. nigra* を花粉親として胚珠培養を行った場合、3.4 % の交雑率で交雑体が得られたが、セイヨウナタネを花粉親として胚
35 珠培養を行った場合には交雑体は得られなかったと報告されている (Kerlan et al.,

1992)。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* との交雑性について、ほ場での調査においてセイヨウナタネを種子親とした場合の交雑率は 4.0×10^{-8} 、花粉親とした場合は交雑体は確認されなかった (Rieger et al., 2001)。別の試験において、セイヨウナタネを花粉親とした場合の交雑率は $1 \times 10^{-7} \sim 3.1 \times 10^{-5}$ という報告がある (Chèvre et al., 2000)。また、F₁ 個体では幼苗の発芽率や生存率、ロゼット葉の直径、乾燥重などに顕著な低下が認められた (Guéritaine et al., 2003)。実際に、除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネと *R. raphanistrum* をほ場で栽培し、定期的なモニタリングを英国で 5 年間 (Chèvre et al., 2004) 及びカナダで 2 年間 (Warwick et al., 2003) 実施した結果、雑種は認められなかった。

セイヨウナタネと *H. incana* との交雑性について、人工授粉によりセイヨウナタネを種子親とした場合は 100 花あたり 3.1 粒、花粉親とした場合は 100 花あたり 1.3 粒の F₁ 種子が得られたが、ほとんどの F₁ 個体において発芽率が 1% 未満と低い適応度を示した (OECD, 2012)。

セイヨウナタネと *S. arvensis* との交雑性について、セイヨウナタネを花粉親とした場合の *S. arvensis* との交雑は自然条件下では認められておらず、胚珠培養を行った場合でのみ交雑体を得られた (OECD, 2012)、なお、*S. arvensis* を花粉親とした場合の雄性不稔セイヨウナタネにおける交雑率は 1.2% (Lefol et al., 1996) であった。

また、セイヨウナタネにはアポミクシスの特性を有するという報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

セイヨウナタネは 1 花当たり約 7~9 万粒の花粉を生産する (Takahata et al., 2008)。*Brassica* 属の花粉は重く粘性があるが小型 (約 30~40 μm) であり、風によって運ばれるほか、ミツバチなどの昆虫によっても媒介される (OECD, 2012)。自然条件下では、花粉の寿命は 4~5 日間にわたり徐々に減少するとされる (OGTR, 2008)。

Timmons ら (1995) の報告によると、花粉源となるセイヨウナタネから 1.5 km 離れた地点で、1 m² 当たり 0~22 粒の花粉が飛散していたとあるが、空中における花粉の密度は花粉源からの距離が増すにつれて急激に減少する。McCartney and Lancey (1991) の調査によると、ほ場から 20 m の地点での空中における花粉密度は、ほ場内

と比較して約 90 %減少していた。また、花粉の 99 %以上が 12 m 以内に飛散すると報告されている (Scheffler et al., 1993)。

セイヨウナタネ同士の交雑性と遺伝子流動については、世界中で広く研究が行われており、複数の論文の中で論じられてきた (Salisbury, 2002; Beckie et al., 2003; Messeguer, 2003; Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007)。セイヨウナタネの栽培環境における交雑は、風や虫によって花粉が運ばれることや、セイヨウナタネ個体間の接触により起こる。虫媒では特にハチによって花粉が運ばれる (Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007)。セイヨウナタネ間の交雑率は距離が増加するにつれて減少し、12 %から 55 %の幅があると報告されている (Beckie et al., 2003)。他の例では 4 km 以上離れたセイヨウナタネとの交雑が報告されている (Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007)。花粉源からの距離が 100 m 以上である場合のセイヨウナタネ同士の交雑率は、3.4 %かそれ以下であると報告されている (Salisbury, 2002; Beckie et al., 2003; Messeguer, 2003; Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007)。

東北農業研究センターの試験ほ場において、セイヨウナタネの他殖率を調査したという報告がある。エルシン酸含量を他殖を検出するマーカーとして利用するため、エルシン酸含量が異なる 2 品種を用いて調査した結果、花粉源から風下方向に 0.25 m、1 m、5 m、10 m、30 m、60 m 離れた地点での他殖率は、それぞれ 4.09 %、1.35 %、0.43 %、0.15 %、0.09 %、0.01 %と、花粉源から離れるに伴い急激に減少した (Yamamori, 2011)。また、OECD (2012) は従来の知見を総括し、他殖率は最大でも花粉源から 50~100 m の地点で 0.11 %、200 m の地点で 0.05 %としている。

ホ 病原性

25 —

へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネ種子には、ヒトを含む哺乳動物に有害と考えられるエルシン酸及びグルコシノレートが含まれている。エルシン酸は、ラットの給餌試験において心筋への脂肪酸蓄積に関与し心臓病変を引き起こすことが報告されており、グルコシノレートは、甲状腺肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こすことが報告されている (OGTR, 2008)。しかし、セイヨウナタネでは長年にわたり育種改良が続けられ、低エルシン酸かつ低グルコシノレートの品種が育成された結果、種子は食用油として、油かすは飼料用として利用されるようになった (OGTR, 2008; OECD, 2012)。なお、

このような低エルシン酸 (精製油中で 2%未満) で低グルコシノレート (油かす 1g 当たり 30 μmol 未満) のセイヨウナタネは、一般にカノーラ品種と呼ばれている (OGTR, 2008; OECD, 2012)。

5 ト その他の情報

これまでの調査結果から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、経年的な増加や年度毎の連続性もないことから、主に運搬時にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大していないと考えられている (Katsuta et al., 2015; 農林水産省, 2018; 国立研究開発法人国立環境研究所, 2022; 農林水産省, 2022; 農林水産省, 2023)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

15 バイエルグループは、除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) に対する耐性が付与された除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ (改変 *dmo*, *Brassica napus* L.) (MON94100, OECD UI: MON-94100-2) (以下「本組換えセイヨウナタネ」とする。) を作出した。

20 本組換えセイヨウナタネには *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子が導入されており、*dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下「DMO 蛋白質」とする。) により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。

25 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

30 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 1 (p12) 及び表 1 (p13~15) に示した。

35 本組換えセイヨウナタネに導入された *dmo* 遺伝子から発現する DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列 (Herman et al., 2005) と比較して、N 末端のメチオニンの直後にアラニンが挿入されている (Behrens et al.,

2007)。また、DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質の 111 番目のアミノ酸 (本組換えセイヨウナタネで発現している DMO 蛋白質では 112 番目) がトリプトファンからシステインへ置換されている。このアミノ酸置換は野生型 *dmo* 遺伝子を PCR によって増幅した際に非意図的に生じたものである (Behrens et al., 2007)。よって、本組換えセイヨウナタネに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」とする。また、本組換えセイヨウナタネでは、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、*RbcS* (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit) 及び IS (intervening sequence) に由来するアミノ酸が全て切り離されたもの及び 27 アミノ酸が切り離されずに N 末端に残ったものの 2 種類の蛋白質が生じる。本組換えセイヨウナタネ中で発現するこれら 2 種類の改変 DMO 蛋白質を総称して「改変 MON94100 DMO 蛋白質」とする。

なお、N 末端側に付加された *RbcS* 及び IS に由来するアミノ酸配列が全て切り離された改変 MON94100 DMO 蛋白質では、メチオニンアミノペプチダーゼによるプロセッシングにより N 末端のメチオニンが取り除かれている。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くの蛋白質で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。

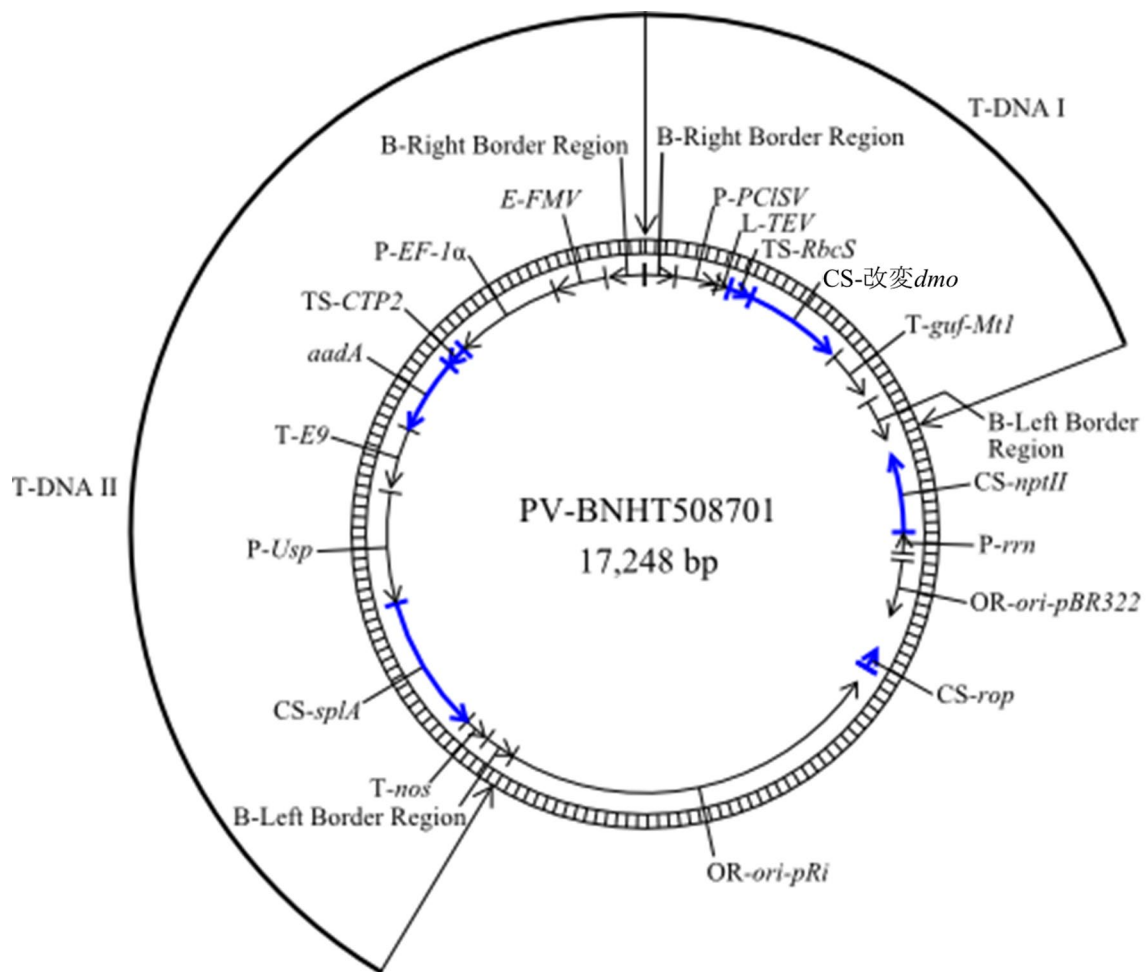
本組換えセイヨウナタネにおいて発現する改変 MON94100 DMO 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

改変 MON94100 DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、2013 年 10 月 31 日にカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けた除草剤ジカンバ耐性ダイズ (MON87708, OECD UI : MON-87708-9) で発現する改変 MON87708 DMO 蛋白質と同一である。

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

本組換えセイヨウナタネの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (p13~15) に示した。



5

図1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた PV-BNHT508701 のプラスミドマップ¹

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた PV-BNHT508701 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P ² -PCISV	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) のプロモーター。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
L ³ -TEV	Tobacco etch virus (TEV) 由来の 5'末端非翻訳領域配列であり (Niepel and Gallie, 1999)、遺伝子発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS ⁴ -RbcS	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列とコード領域の最初の 24 アミノ酸。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する (Fluhr et al., 1986)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS ⁵ -改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセットからはターゲティング配列である <i>RbcS</i> 、IS (Intervening sequence) 及び改変 <i>dmo</i> が融合した前駆蛋白質が発現する。その後、前駆蛋白質はプロセッシングにより <i>RbcS</i> 及び IS に由来するペプチドの全てが切り離されたもの及び <i>RbcS</i> の大部分が切り離され残りのペプチド (27 アミノ酸) が N 末端に残存したものの 2 種類の蛋白質が生じる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T ⁶ - <i>guf-Mtl</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931406)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。

² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた PV-BNHT508701 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	由来及び機能
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
P- <i>rrn</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。細菌細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ⁷ - <i>ori-pBR322</i>	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (<i>rop</i>)) のコード配列であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori-pRi</i>	プラスミド pRi に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye et al., 2011b)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>splA</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) C58 株に由来し、スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースフォスホリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper et al., 1999)。SPLA 蛋白質が発現する個体では、胚形成の際にスクロースの代謝が阻害される。これにより、結果的に萎縮した種子が形成される (Ye et al., 2011a)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた PV-BNHT508701 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	由来及び機能
P- <i>Usp</i>	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>) 由来の種子蛋白質をコードする遺伝子の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列 (Baumlein et al., 1991)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>E9</i>	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) のコード配列 (Fling et al., 1985)。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。
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>EF-1α</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1 alpha</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン (Axelos et al., 1989) で目的遺伝子の植物体内での恒常発現に関与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
E ⁸ - <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

¹ B-Border (境界配列)

² P-Promoter (プロモーター)

5 ³ L-Leader (リーダー配列)

⁴ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)

⁶ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

10 ⁸ E-Enhancer (エンハンサー)

- 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

5

本組換えセイヨウナタネは、*S. maltophilia*由来の改変*dmo*遺伝子が導入されており、改変MON94100 DMO蛋白質を発現している。改変MON94100 DMO蛋白質は、本組換えセイヨウナタネに除草剤ジカンバ耐性を付与する。

10 除草剤ジカンバは合成オーキシンの除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。

本組換えセイヨウナタネで産生される改変 MON94100 DMO 蛋白質は、ジカンバを脱メチル化する酵素である (図 2, p16)。ジカンバはこの酵素の働きで脱メチル化されると、除草活性のない DCSA (3,6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) となる (Chakraborty et al., 2005)。

15

実際に、*dmo* 遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ及びタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。

20

なお、*dmo* 遺伝子が発現する遺伝子組換え作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統(スタック系統は除く)は2022年5月25日(調査時点)までに5系統(ダイズ、ワタ、トウモロコシ2系統及びセイヨウナタネ³)あり、いずれの系統もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

25

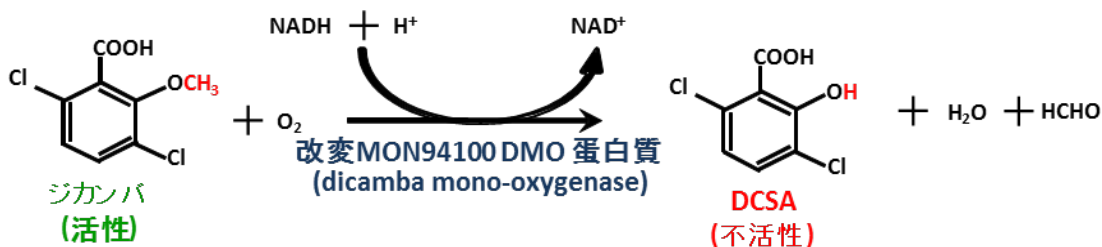


図2 改変 MON94100 DMO 蛋白質の基質と代謝物⁴

³ 本組換えセイヨウナタネであり、隔離ほ場における使用の承認を受けている。

⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

5 改変 MON94100 DMO 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、AD_2019⁵に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

10 DMO 蛋白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009) から、構造的にジカンバに類似した化合物 (カルボキシル基 (-COOH)、メトキシ基 (-OCH₃) 及びクロロ基 (-Cl) を含むフェニル環をもつ化合物) は、DMO 蛋白質の基質となる可能性があると考えられたが、セイヨウナタネにおいてクロロ基を含むフェニル環をもつ化合物は報告されていない。次に、クロロ基はないが、カルボキシル基及びメトキシ基を含むフェニル環をもつ化合物が検討されたが、その中で植物に存在している化合物中で最も構造的にジカンバに類似している *o*-アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) でも DMO 蛋白質によって代謝されないことが確認されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

20 なお、本組換えセイヨウナタネ中で発現している改変 MON94100 DMO 蛋白質は、野生型の DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端のメチオニンの直後にアラニンが挿入されている。この挿入に加え、野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列の 111 番目のアミノ酸 (本組換えセイヨウナタネで発現している改変 MON94100 DMO 蛋白質では 112 番目) がトリプトファンからシステインへ置換されている。さらに、*RbcS* 及び IS 由来のアミノ酸が全て切り離されたもの及び 27 アミノ酸が切り離されずに N 末端に残ったものの 2 種類が存在する。しかし、N 末端側から 2 番目及び 112 番目のアミノ酸の位置並びに N 末端に付加された 27 アミノ酸は、DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れているため (D'Ordine et al., 2009)、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の構造、活性及び基質特異性に影響しないと考えられた。

30 これらのことから、改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現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。

⁵ AD_2019: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,081 件のアミノ酸配列が含まれる (2019 年 2 月 20 日更新)。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

- 5 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられた PV-BNHT508701 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p13~15) に記載した。

ロ 特性

10

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えセイヨウナタネの作出に用いられた PV-BNHT508701 の全塩基数は 17,248 bp である。なお、PV-BNHT508701 の塩基配列は別添資料 2 に記載した。

15

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、ネオマイシンやカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子及びスペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA I 領域外に存在している。また、形質転換後の選抜マーカーとして利用するスクロースホスホリラーゼを発現させる *splA* 遺伝子も T-DNA I 領域外に存在している。

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

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

30

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-BNHT508701 の構成要素は表 1 (p13~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は、図 1 (p12) に示した。

35

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-BNHT508701 中の T-DNA I 及び T-DNA II 領域をアグロバクテリウム法により、従来セイヨウナタネ品種 65037 の胚軸に導入した。

5

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

10 従来セイヨウナタネ品種 65037 の胚軸と PV-BNHT508701 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB33 株を共置培養した後、スペクチノマイシン、セフトキシム及びチカルシリン・クラブラン酸を含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

15 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

カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えセイヨウナタネの R₃ 世代の種子⁶において、
20 形質転換に用いた PV-BNHT508701 の外側骨格領域を標的とした PCR を行ったところ、本組換えセイヨウナタネには PV-BNHT508701 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 3 の Table 1, p11)。このことから、本組換えセイヨウナタネには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

25 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

30 形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、R₁ 世代を作出した。R₁ 世代において、1 コピーの T-DNA I 領域を有し、T-DNA II をもたない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に最終的に本組換えセイヨウナタネを選抜した。

⁶バルクにした収穫種子の中からランダムに 27 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

本組換えセイヨウナタネの育成図を図 3 (p21) に示した。なお、本申請の対象は、 R_3 世代及び R_3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図3 本組換えセイヨウナタネの育成図

25

【社外秘につき非開示】

(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

5

本組換えセイヨウナタネの T-DNA I 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えセイヨウナタネの BC₁F₁、BC₂F₁ 及び BC₃F₁ 世代 (図 3, p21) において、T-DNA I 領域の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 4)。

10 試験に供試する BC₁F₁、BC₂F₁ 及び BC₃F₁ 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、その後代である R₁ 世代において Real-Time TaqMan PCR により、T-DNA I 領域をホモで有し、T-DNA II 領域及び外側骨格領域をもたない個体を選抜した。その後、2回の自殖により R₃ 世代を作出した。そして、T-DNA I 領域をホモで有する R₃ 世代を T-DNA I 領域をもたない非組換えセイヨウナタネ品種 (RP) と交配して、T-DNA I 領域をヘミで有する R₃F₁ (CP3878 × 65037) 世代を作出した。

15 R₃F₁ (CP3878 × 65037) 世代のうち T-DNA I 領域をヘミで有する個体と RP とを交配して BC₁F₁ 世代を作出した。BC₁F₁ 世代において End-Point TaqMan PCR により、T-DNA I 領域の分離比を確認した。

20 BC₁F₁ 世代のうち T-DNA I 領域をヘミで有する個体と RP とを交配して BC₂F₁ 世代を作出した。BC₂F₁ 世代において End-Point TaqMan PCR により、T-DNA I 領域の分離比を確認した。

BC₂F₁ 世代のうち T-DNA I 領域をヘミで有する個体と RP とを交配して BC₃F₁ 世代を作出した。BC₃F₁ 世代において End-Point TaqMan PCR により、T-DNA I 領域の分離比を確認した。

25 その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せず遺伝していることが確認された (表 2, p23)。したがって、本組換えセイヨウナタネの T-DNA I 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表2 本組換えセイヨウナタネの育成過程における T-DNA I 領域の分離様式⁷

世代	供試 個体数	実測値 ¹ 陽性 個体数	実測値 ¹ 陰性 個体数	1:1 の分離			
				期待値 陽性 個体数	期待値 陰性 個体数	χ^2	p値 ²
BC ₁ F ₁	347	167	180	173.50	173.50	0.49	0.485
BC ₂ F ₁	484	237	247	242.00	242.00	0.21	0.649
BC ₃ F ₁	435	211	224	217.50	217.50	0.39	0.533

¹実測値は End-Point TaqMan PCR により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

² BC₁F₁、BC₂F₁ 及び BC₃F₁ 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 本組換えセイヨウナタネにおける導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子の塩基配列並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケンス (NGS, Next Generation Sequencing) 解析⁸ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 5)。

10

NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150 bp ずつの塩基配列を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度⁹75 以上) で解析している。本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネから抽出したゲノムを NGS 解析に供試した結果、本組換えセイヨウナタネ (R₃ 世代) で 108.6 Gb (冗長度中央値 80)、
15 対照の非組換えセイヨウナタネで 162.2 Gb (冗長度中央値 125) の塩基配列が解析された (別添資料 5 の Appendix Table 3, p41)。

解析した塩基配列全てを PV-BNHT508701 の塩基配列と照合¹⁰した結果、本組換えセイヨウナタネでは 2 つの接合領域が特定された (別添資料 5, p26 及び Appendix Figure 4, p46)。これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 5 の Appendix Figure 27, p77-79)。対照の非組換えセイヨウナタネでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 5, p26 及び Appendix Figure 16, p66)。またこの解析からは、本組換えセイヨウナタネには PV-BNHT508701 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことも確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 4, p46)。

20 以上の解析から、本組換えセイヨウナタネの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの導入遺伝子が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことが確認された。

また、本組換えセイヨウナタネにおいて検出された導入遺伝子、接合領域及び近

⁸ NGS 解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロット法と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS 解析においては、フラグメント化した大量のサンプルゲノム DNA の配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA 領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及び配列並びに非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

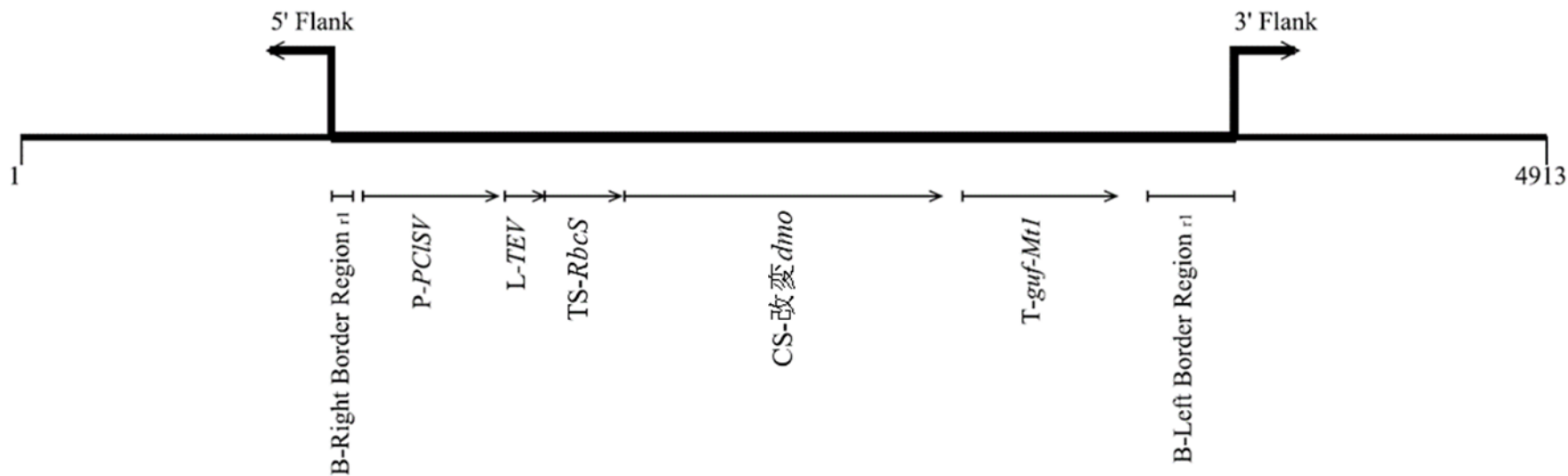
⁹ 冗長度: ゲノム上のすべての塩基に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。その中央値が 75 以上であればすべての挿入 DNA を検出することが可能であることが報告されており (Kovalic et al., 2012)、本試験では 1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

¹⁰ Bowtie 2 v2.3.4.3 (Langmead and Salzberg, 2012) により、30 bp 以上の領域で 96.6 %以上の相同性が認められた配列を選抜した。

傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の遺伝子が導入されていることが確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 5, p47、Appendix Figure 6, p48~49 及び Appendix Figure 7, p50~54)。なお、本組換えセイヨウナタネにおける導入遺伝子の模式図を図 4 (p26) に示した。

5

さらに複数世代 (R_3 、 R_3F_1 (55076 × 65037)、 R_4 、 R_5 及び R_6 世代) の本組換えセイヨウナタネを対象にした NGS 解析において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 5, p30 並びに Appendix Figure 4 及び 12~15, p46、62~65)。



5 図4 本組換えセイヨウナタネにおける導入遺伝子の模式図¹¹

MON94100 系統の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は、MON94100 系統中の構成要素の大きな位置と配列の方向を示している。図上部の直角に曲がった矢印は、導入遺伝子と近傍配列の境界を示している。なお、MON94100 系統において目的の T-DNA I 領域が導入用プラスミド PV-BNHT508701 と一致した配列で導入されており、B-Right Border Region_{r1} 及び B-Left Border Region_{r1} は MON94100 系統において導入用プラスミド PV-BNHT508701 と比較して短くなっている。

¹¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 5 の p26)。

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発現の安定性

10 本組換えセイヨウナタネの複数世代 (R₃, R₃F₁ (55076 × 65037)、R₄, R₅ 及び R₆ 世代) の種子において、改変 MON94100 DMO 蛋白質が安定して発現していることをウエスタンブロット分析により確認した (別添資料 6 の Figure 2, p14)。

15 また、2018年に米国の3カ所 (アイダホ州、サウスダコタ州及びワシントン州) 及びカナダの2カ所 (マニトバ州及びサスカチュワン州) で行ったほ場試験において、本組換えセイヨウナタネの葉、地上部、根及び種子のサンプルを採取し、改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 7)。その結果、本組換えセイヨウナタネの葉、地上部、根及び種子における改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現が確認された (表 3, p28)。

20

表3 本組換えセイヨウナタネの各組織における改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現量 (2018 年、米国及びカナダ)¹²

組織	生育段階 ¹ (BBCH スケール)	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) ²	LOQ/LOD (µg/g DW) ³
葉	第 3~6 葉が展開した時期 (13-16 BBCH)	2.5 (0.19) 0.95 - 3.6	0.094/0.008
地上部	第 9 葉が展開した時期~ 花芽形成期 (19-59 BBCH)	2.5 (0.35) 0.42 - 6.7	0.094/0.040
根	第 9 葉が展開した時期~ 花芽形成期 (19-59 BBCH)	5.0 (0.37) 1.8 - 8.3	0.094/0.004
種子	収穫期 (99 BBCH)	0.64 (0.068) 0.38 - 1.8	0.094/0.006

¹ 各組織の採取時における生育段階。カノーラ種の生育段階は、バイエル、BASF、チバガイギー及びヘキストが開発した BBCH スケールに基づいている (BBCH, 2001)。

5 ² 蛋白質の発現量は、平均値及び標準誤差 (括弧内に表記) で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の乾燥重 1g 当たりの µg で表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲(最小値-最大値)は、すべてのほ場で採取されたそれぞれの組織の値をもとに計算されている (全ての組織で 20 反復)。

SE = 標準誤差, DW = 乾燥重

³ LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)

10

¹² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10 本組換えセイヨウナタネは、本組換えセイヨウナタネに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 8; 別添資料 9)。

本 PCR 法の検出限界値は、ゲノム DNA 量比で 0.006 % である¹³ (別添資料 9 の p4, p9~10)。

15 本 PCR 法の信頼性については、米国バイエルグループと米国 Eurofins BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 9 の p13~17)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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

本組換えセイヨウナタネへ導入された改変 *dmo* 遺伝子は改変 MON94100 DMO 蛋白質を発現することにより、除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。

25 ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度¹⁴

30 本組換えセイヨウナタネの宿主は非組換えセイヨウナタネ品種 65037 であり、導入遺伝子は改変 *dmo* 遺伝子である。

¹³ 本 PCR 法の検出限界値は別添資料 9 (p10~11) において 5 コピーと報告されている。これを表 (別添資料 9, p4) によりゲノム DNA 量比に換算すれば、50,000 pg/μl 中の 3 pg/μl、すなわち 0.006% に相当する。

¹⁴ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

宿主であるセイヨウナタネには、交雑可能な近縁種である *B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が我が国に存在するが、交雑可能な在来の近縁野生種は存在しない。

5 2020年から2021年にかけてバイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場の隔離ほ場¹⁵ (以下「本隔離ほ場」という。)において本組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験を行った。隔離ほ場試験には本組換えセイヨウナタネの R₃F₁ (55076 × 65037) 世代を供試した (図 3, p21)。対照の非組換えセイヨウナタネとしては、本組換えセイヨウナタネと同様の遺伝的背景をもつ 55076 × 65037 を用いた。なお、生育初期における高温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b, p30~31) は 2020 年にバイエルグループ (米
10 国) の人工気象室において実施した。

a 形態及び生育の特性

15 形態及び生育に関する特性を比較するため、12項目 (発芽始め、発芽揃い、開花始め、開花期、開花終わり、草型、草丈、一次分枝数、成熟期、地上部重及び収穫種子の形状 (子実の色、子実の粒大整否)) について評価を行った。

統計解析を草丈、一次分枝数及び地上部重に関して行い、発芽始め、発芽揃い、開花始め、開花期、開花終わり、草型、成熟期及び収穫種子の形状 (子実の色、子実
20 の粒大整否) に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計解析を行わなかった。その結果、統計解析を行った項目において本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は見られなかった。また、統計解析を行わなかった9項目において、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの間に違いは認められなかった (別添資料 10の表3, p12)。

25

b 生育初期における高温耐性

生育初期における高温耐性試験は、米国のバイエルグループの人工気象室において実施した。生育初期における高温耐性を比較するために、本組換えセイヨウナタネ、対照の非組換えセイヨウナタネ及び従来商業品種4品種の幼苗を単一の人工気象室内で日中 21°C/夜間 18°C の条件で育苗し、生育段階 (BBCH スケール) が 1.6~1.7 の
30 個体を選抜した後、高温条件である日中 35°C/夜間 30°C の人工気象室と適温条件である日中 21°C/夜間 18°C の人工気象室の 2 ヲ所に分けて栽培した。高温条件では日中

¹⁵ 所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

30℃/夜間 25℃で 2 日間順化した後、順化の終わりの日を処理後 0 日目と定義した。高温条件と適温条件の個体それぞれについて、処理後 10 日目及び 21 日目の草丈と、処理後 21 日目の乾燥重を測定し、統計解析を行った。

5 その結果、適温条件での乾燥重においてのみ本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの間に統計学的有意差が認められた。適温条件での乾燥重の
10 平均値は本組換えセイヨウナタネが 53.8 g、対照の非組換えセイヨウナタネが 44.2 g であり、本組換えセイヨウナタネの方が高かった (別添資料 11 の Table 2, p6)。なお、本隔離ほ場における形態及び生育の特性調査 (第一の 2-(6)-②-a, p30)では、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの間に地上部重を含む評価項目に
15 統計学的有意差や違いは認められなかった (別添資料 10 の表 3, p12)。

c 成体の越夏性

15 本隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネを成熟期の後も引き続き生育させ、我が国の夏期における生育状況を観察した。2021 年 8 月 31 日に越夏性試験区において供試個体の観察を行ったが、本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネのいずれも枯死していた (別添資料 10 の図 6, p13)。

20 d 花粉の稔性及びサイズ

本隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネから採取した花粉を酢酸カーミン溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計解析を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及び
25 サイズのいずれにおいても本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の図 7 及び表 4, p14)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

30 生産量 :

本隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネについて、種子の生産量に関する 3 項目 (着莢数、莢当たり種子数及び千粒重) を調査した。これらの項目について統計解析を行った結果、いずれの項目においても
35 本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 5, p15)。

脱粒性：

5 脱粒性については、本隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネを成熟期に収穫し、植物体をガラス温室内で自然乾燥させた後に裂莢率を調査した。裂莢率について統計解析を行った結果、本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 5, p15)。

休眠性及び発芽率：

10 休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネの収穫種子をシャーレに静置し、25°C の温度条件で発芽させ、発芽個体数を経時的に調査した。その結果、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの発芽率はいずれも 100%と高かった (別添資料 10 の表 5, p15)。

15

f 交雑率

日本にはセイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

20

g 有害物質の産生性

25 本組換えセイヨウナタネから土壌微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。

30 その結果、土壌微生物相試験における細菌数と鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重において、本組換えセイヨウナタネ区と対照の非組換えセイヨウナタネ区との間で統計学的有意差が認められた。細菌数の平均値は本組換えセイヨウナタネ区が 9.89×10^7 CFU/g、対照の非組換えセイヨウナタネ区が 8.00×10^7 CFU/g であり、本組換えセイヨウナタネ区において細菌数の減少は認められなかった (別添資料 10 の表 6~表 8, p18)。鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重の平均値は、本組換えセイヨウナタネ区が 1.3 g、対照の非組換えセイヨウナタネ区が 1.4 g であり、本組換えセイヨウナタネ区の方が低かった (別添資料 10 の表 7, p18)。

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

5 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

10 —

(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

15 —

(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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

20

(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

本組換えセイヨウナタネの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は表 4 (p34) のとおりである。

30

表4 本組換えセイヨウナタネの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請及び認可状況¹⁶

2023年9月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2019年11月	2021年4月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2019年11月	2021年4月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2020年1月	2022年10月
米国農務省 (USDA)	環境	2020年3月	—
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2020年10月	2021年7月
欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料	2020年10月	2023年2月

5

なお、本組換えセイヨウナタネの我が国における申請状況は以下のとおりである(表5, p34)。

表5 本組換えセイヨウナタネの我が国における申請及び認可状況¹⁷

2023年9月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ¹⁸	2020年10月	2022年2月
農林水産省	飼料 ¹⁹	2020年11月	2022年3月
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程 ²⁰ : 隔離ほ場)	2018年7月	2020年6月
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程: 一般使用)	2022年8月	—

10

¹⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

¹⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

¹⁸ 食品衛生法に基づく。

¹⁹ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

²⁰ 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に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²¹

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネは、路傍や線路端のような定期的に人の手が加えられる地域では生育し得ることが知られているものの、自然の未攪乱の土地に侵入して生態系に影響を与えるような植物ではなく、自然条件下では多年生草本と競合し自生化することは困難であるとされている (OECD, 1997)。我が国においては、セイヨウナタネの北海道や本州の河原及び線路沿いでの群生 (清水ら, 2001) や、主なセイヨウナタネの輸入港及びその周辺での生育が報告されている (Nishizawa et al., 2010) が、セイヨウナタネは日本固有の在来種を駆逐して生物多様性影響を及ぼすセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) のような侵略的外来種としては掲載されていない (村上・鷲谷, 2002)。実際に、英国の高速道路沿い 3,658 ヲ所において 2 年間にわたりセイヨウナタネのモニタリング調査を行った結果から、運搬途中のこぼれ落ちによる種子の供給がなければ道端に生息するセイヨウナタネ集団の維持が困難であることが示され、人為的攪乱のない自然条件下に生息するセイヨウナタネは 2~4 年で消失することが示唆されている (Crawley and Brown, 1995)。

15
20 以上のことから、セイヨウナタネは定期的に人の手が加えられる地域では生育し得るものの、人の手がほとんど加えられない地域では競合における優位性は低く、侵略的外来種のように優占群落を作る可能性は低いと判断された。

25 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 (第一の 2-(6)-②-a, c~e, p30~31) を我が国での隔離ほ場試験において調査した。その結果、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間でいずれの調査項目においても統計学的有意差や違いは認められなかった。

30 また、生育初期における高温耐性 (第一の 2-(6)-②-b, p30~31) をバイエルグループ (米国) の人工気象室において調査した結果においても、高温条件での草丈及び乾燥重について本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差は認められなかった。よって、本組換えセイヨウナタネの生育

²¹ 本項目中で、第一の 2-(6)-②の a~g に記載された試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

初期における高温耐性は、対照の非組換えセイヨウナタネを上回るものではないと考えられた。その一方で、参考のために調査した適温条件での乾燥重において本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差が認められた。生育初期における適温条件での乾燥重の平均値は、本組換えセイヨウナタネが 53.8 g、対照の非組換えセイヨウナタネが 44.2 g であり、本組換えセイヨウナタネの方が約 22%高かった。このことから、本組換えセイヨウナタネの生育初期の成長は、対照の非組換えセイヨウナタネより早まる可能性が示唆された。セイヨウナタネは路傍や線路端のような定期的に人の手が加えられる環境で生育することが知られているが、本組換えセイヨウナタネの生育初期の成長が早まった場合、より攪乱の強い環境に侵入・定着し、そこに生育する荒地植物を駆逐する可能性が考えられる。これについて検討を行ったところ、以下に示す 3 つの理由により、本試験で認められた乾燥重 (平均値) の差異は本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるほどのものではなく、本組換えセイヨウナタネが荒地植物を駆逐することはないと考えられた。

15

1) Grime (1974) の報告では、セイヨウナタネがほ場以外で生育する路傍は CSR クラスに属する植物の生育地で、R クラスに属する荒地植物の生育地として挙げられる環境 (休耕地、荒廃地、激しく踏みつけられた道) とは異なることが示されている。同様に、Pierce ら (2017) により報告されている約 3,000 種の維管束植物の CSR 戦略クラス²²の分類によると、セイヨウナタネの近縁種である *Brassica elongate* は CSR クラスに分類されており (Pierce et al., 2017)、高度に攪乱される環境に適応性を示す R クラスにセイヨウナタネ及びその近縁種は含まれていない。*B. elongate* は多年生で、様々な温度範囲で発芽する種子を豊富に生産することが知られており (Young et al., 2003)、それらの形質をもたないセイヨウナタネ (OGTR, 2017) の攪乱環境への適応性は *B. elongate* よりも劣ると考えられる。したがって、セイヨウナタネが荒地植物の主たる生育環境に侵入・定着する可能性は低いと考えられる。

20

25

2) 本隔離ほ場試験では、地上部の乾燥重を含めた全ての形態及び生育に関する特性並びに自生性に関与する特性である種子の脱粒性及び休眠性 (発芽率) に、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で違いは認められていない (第一の 2-(6)-②-a 及び e, p30~32)。このことから、

30

²²Grime (1977) によって提唱された植物の生存戦略に関する仮説。植物バイオマスを制限する外部要因はストレスと攪乱の 2 つであるとし、この程度に基づき、植物を大まかに競争種 (C: competitor)、ストレス耐性種 (S: stress tolerator)、攪乱依存種 (R: ruderal) の 3 つに分類した。またそれぞれの中間種も存在する。

本組換えセイヨウナタネの競合における優位性が高まっているとは考え難い。

5 3) 石田ら (2006) は、国内のほ場においてセイヨウナタネの商業栽培品種 4 品種を栽培し、抽苔後から開花前と推測される時期に一個体当たりの新鮮重を調査した。この結果によると、セイヨウナタネ 4 品種間における個体重 (新鮮重) の平均値の差異は、最大約 120%であった。調査した重量に新鮮重と乾燥重の違いはあるものの、本試験で認められた本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの乾燥重の平均値における約 22%の差異は、石田ら (2006) による調査で示された商業栽培品種間における個体重の変動の幅から乖離するものではないと考えられた。また、主に搾油用として既に我が国に輸入されているセイヨウナタネの種子も、石田ら (2006) により調査された商業栽培品種と同様に、生育初期の個体重に品種間で差異がある商業栽培品種から収穫されていると考えられるが、後述するように輸入港周辺地域における生育実態調査の結果から、運搬時にこぼれ落ちたこれらの種子に由来する個体の定着や、生育範囲の拡大は生じていないことが確認されている。

20 以上のことから、本試験で認められた生育初期における乾燥重の平均値の差異は、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるほどのものではないと考えられた。

25 本組換えセイヨウナタネは、改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現により、除草剤ジカンバに対する耐性を有する。しかしながら、除草剤ジカンバの散布が想定されにくい自然条件下において除草剤ジカンバ耐性であることが本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めることはないと考えられる。

30 これまでにカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換えセイヨウナタネは、いずれも除草剤耐性を有するものである。承認を受け輸入された遺伝子組換えセイヨウナタネにより我が国の生物多様性への影響が生じていないことを実際に確認するため、環境省では 2003 年度から、農林水産省では 2006 年度からそれぞれセイヨウナタネの輸入港周辺地域における生育実態調査を継続している (農林水産省, 2018; 国立研究開発法人国立環境研究所, 2022; 農林水産省, 2022; 農林水産省, 2023)。これまでの調査結果から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、経年的な増加や年度毎の連続性もないことから、主に運搬時にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育

範囲は拡大していないと考えられている (Katsuta et al., 2015; 農林水産省, 2018; 国立研究開発法人国立環境研究所, 2022; 農林水産省, 2022; 農林水産省, 2023)。

5 本組換えセイヨウナタネは、これまでに第一種使用規程の承認を受けた遺伝子組換えセイヨウナタネと同様に除草剤耐性形質を有すること以外は、上述したとおり対照の非組換えセイヨウナタネと大きな差異がないことから、本組換えセイヨウナタネが運搬時にこぼれ落ち、生育したとしても、既に第一種使用規程の承認を受けた後に我が国に輸入されている遺伝子組換えセイヨウナタネと同様に、生育場所に定着したり生育範囲を拡大させたりすることはないと考えられる。

10 以上のことから、競合における優位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

15 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えセイヨウナタネは、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された。

25

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

30 セイヨウナタネ種子には、有害物質であるエルシン酸及びグルコシノレートが含まれている (OGTR, 2008)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主 (65037) は、品種改良により両物質の含有量が低く改良されたカノーラ品種である。

35 本組換えセイヨウナタネ中では改変MON94100 DMO蛋白質が発現しているが、DMO蛋白質は有害物質としては知られておらず、また既知アレルゲンと構造的に

類似のある配列を有さないことが確認されている (第一の2-(1)-ロ-②, p16~17)。また、第一の2-(1)-ロ-③ (p17) に示したように、改変MON94100 DMO蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ジカンバと構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。同様に、改変MON94100 DMO蛋白質がエルシン酸やグルコシノレートの含量に変化を及ぼすことも考えにくい。

本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験 (第一の2-(6)-②-g, p32) を行った。その結果、土壤微生物相試験の細菌数と鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重において、本組換えセイヨウナタネ区と対照の非組換えセイヨウナタネ区との間で統計学的有意差が認められた。

土壤微生物相試験における細菌数の平均値は、本組換えセイヨウナタネ区が 9.89×10^7 CFU/g、対照の非組換えセイヨウナタネ区が 8.00×10^7 CFU/g であり、本組換えセイヨウナタネ区において細菌数の減少は認められなかった。以上のことから、本組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性が高まっていることを示すような違いではないと考えられた。

鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重の平均値は、本組換えセイヨウナタネ区が 1.3 g、対照の非組換えセイヨウナタネ区が 1.4 g であり、本組換えセイヨウナタネ区の方が低かった。しかし、①検定植物であるハツカダイコンの乾燥重については、その差は僅かであり、本組換えセイヨウナタネ区の範囲 (0.53 g ~ 1.75 g) は、対照の非組換えセイヨウナタネ区の範囲 (1.06 g ~ 2.26 g) と部分的に重複していたこと、②検定植物であるハツカダイコンの発芽率では本組換えセイヨウナタネ区と対照の非組換えセイヨウナタネ区との間に統計学的有意差は認められなかったこと、③本組換えセイヨウナタネにおいて発現する改変 MON94100 DMO 蛋白質は、その作用機序から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と、及び④既に第一種使用規程の承認がなされている DMO 蛋白質が発現する除草剤ジカンバ耐性作物において、DMO 蛋白質が鋤込み試験で検定植物の生育に影響を与えたという報告はないことから、本試験で認められたハツカダイコンの乾燥重の差が本組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性が高まっていることを示すような違いではないと考えられた。

以上のことから、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

—

5 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10

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

3 交雑性

15

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、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我が国在来の野生動植物等は特定されない。

20

なお、我が国に分布するセイヨウナタネと交雑可能な外来の近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が知られている (中井, 2003; OGTR, 2008; OECD, 2012; 農林水産省, 2022)。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

30

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35 以上のことから、本組換えセイヨウナタネは、交雑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された。

4 その他の性質

5 第二の 3-(1) (p40) に示したとおり、セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、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我が国在来の野生動植物等は特定されなかった。一方で、第一の 1-(3)-ニ-③ (p6~8) に示したように、セイヨウナタネは我が国に分布する外来の近縁種である
10 *B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* と交雑し得るため、本組換えセイヨウナタネと我が国に分布する外来の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 点を挙げ、その影響を考察した。

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。

15 ② 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって、交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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が生じる。

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

20

セイヨウナタネは我が国に分布する外来の近縁種である *B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* と交雑し得るが、これらのうち、自然条件下で交雑する可能性があるのは *B. rapa* 及び *B. juncea* である (OGTR, 2008; OECD, 2012; 農林水産省, 2022)。しかし、自然条件下で交雑し雑種を形成するためには、親植物同士の物理的距離、花粉の飛散距離及び寿命、開花期の同調性、親植物の繁殖様式、花序組織の特性、花粉の交雑親和性並びに他の植物の花粉との競合性等の条件が合致することが必要である (OGTR, 2008; OECD, 2012)。実際に、従来セイヨウナタネと近縁種との交雑率は低く、雑種が形成されたとしても稔性が低下するか、もしくは不稔となる (OGTR, 2008; OECD, 2012)。よって
30 本組換えセイヨウナタネが外来の近縁種と交雑するとしても、その交雑率は低く、形成される雑種の稔性も低下することが予想されるため、雑種後代が優占化する可能性は低いと考えられる。

- ③ 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって、交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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が生じる可能性

5 第二の 1 及び 2 (p35~40) に示したように、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産生性は、従来セイヨウナタネと相違ないと考えられる。本組換えセイヨウナタネは改変 *dmo* 遺伝子を有するが、除草剤耐性セイヨウ
10 ナタネの導入遺伝子を交雑により *B. rapa* のゲノム中に移入しても交雑個体の生態学的な特性に変化は見られなかったことから (Snow et al., 1999)、同じく除草剤耐性遺伝子である改変 *dmo* 遺伝子が遺伝的負荷となり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。

したがって、本組換えセイヨウナタネが我が国に生息する外来の近縁種と交雑し、その雑種後代が自然条件に適応して野生植物種の個体群を駆逐する可能性は、
15 従来のセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。また、本組換えセイヨウナタネの導入遺伝子が遺伝的負荷となるとは考えにくい。したがって、我が国に生息する外来の近縁種の個体群中に浸透したとしても、交雑した近縁種の個体群が縮小される可能性は低く、これら近縁種に依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持への影響が生じる可能性も低いと考えられる。

20

上述した外来の近縁種の他に、交雑可能な植物種として同種の植物である非組換えセイヨウナタネが挙げられる。しかしながら、第二の 1-(1) (p35~38) に示したように、除草剤ジカンバ耐性であることが本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、本組換えセイヨウナタネと非組
25 換えセイヨウナタネとの間に生じた雑種が、我が国の自然条件に適応して優占化していく可能性は低いと考えられる。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネと我が国に生息する外来の近縁種及び非組換えセイヨウナタネの交雑により、間接的に生物多様性影響が生ずるおそ
30 れはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性；

5 セイヨウナタネは、路傍や線路端のような定期的に人の手が加えられる攪乱の強い環境では生育し得ることが知られているが、人の手がほとんど加えられない土地では、多年生草本と競合し自生化することは困難であることが報告されている。

本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で競合における優位性に関わる諸形質のうち形態及び生育の特性、成体の越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を我が国での隔離ほ場試験において比較検討した結果、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間でいずれの調査項目においても統計学的有意差や違いは認められなかった。また、生育初期における高温耐性をバイエルグループ（米国）の人工気象室において調査した結果、高温条件での草丈及び乾燥重について本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差は認められなかった。その一方で、参考のために調査した適温条件での乾燥重においてのみ本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で統計学的有意差が認められた。このことから、本組換えセイヨウナタネの生育初期の成長は、対照の非組換えセイヨウナタネより早まる可能性が示唆され、これに起因して本組換えセイヨウナタネが、荒地植物が生育するような攪乱の強い環境で優占的に自生し、それらを駆逐する可能性が考えられた。しかし、検討の結果、以下に示す 3 つの理由から、本試験で認められた乾燥重の平均値の差異は本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるほどのものではなく、本組換えセイヨウナタネが荒地植物を駆逐することはないと考えられた。

- 25 1) セイヨウナタネは典型的な荒地植物には該当せず、典型的な荒地植物ほどの競合における優位性を有していない。
- 2) 本隔離ほ場試験では、地上部の乾燥重を含めた全ての形態及び生育に関する特性並びに自生性に関与する特性である種子の脱粒性及び休眠性（発芽率）に、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で違いは認められていない。
- 30 3) 本試験で認められた本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの乾燥重の平均値における差異は、我が国での 3 か年にわたる調査で示された 4 種の商業栽培セイヨウナタネ品種間における個体重の変動の幅から乖離するものではないと考えられた。また、主に搾油用として既に我が国に輸入されているセイヨウナタネの種子もこの調査結果と同様に生育初期の個体重に品種間で差異がある商業栽培品種から収穫されていると考えられるが、
35 輸入港周辺地域における生育実態調査の結果から、運搬時にこぼれ落ちたこ

これらの種子に由来する個体の定着や、生育範囲の拡大は生じていないことが確認されている。

5 本組換えセイヨウナタネには、改変 MON94100 DMO 蛋白質の発現による除草剤ジカンバ耐性が付与されているが、除草剤ジカンバの散布が想定されにくい自然条件下において除草剤ジカンバ耐性であることが本組換えセイヨウナタネの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネは、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された。

10

有害物の産生性；

セイヨウナタネ種子には、有害物質であるエルシン酸及びグルコシノレートが含まれている。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主(65037)は、品種改良により両物質の含有量が低く改良されたカノーラ品種である。

15

本組換えセイヨウナタネでは改変 MON94100 DMO 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質は有害物質としては知られておらず、既知アレルゲンとの相同性も認められていない。また、改変 MON94100 DMO 蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ジカンバと構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して新たに有害物質を産生することは考えにくい。

20

本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結果、土壤微生物相試験の細菌数と鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重において、本組換えセイヨウナタネ区と対照の非組換えセイヨウナタネ区との間で統計学的有意差が認められた。

25

検討の結果、土壤微生物相試験の細菌数については、本組換えセイヨウナタネ区において細菌数の減少は認められなかったことから、本組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性が高まっていることを示すような違いではないと考えられた。鋤込み試験におけるハツカダイコンの乾燥重については、本組換えセイヨウナタネ区の平均値が対照の非組換えセイヨウナタネ区の平均値よりも低かった。しかし、検定植物であるハツカダイコンの乾燥重については、その差は僅かであり、本組換えセイヨウナタネ区の範囲は、対照の非組換えセイヨウナタネ区の範囲と部分的に重複していたこと、検定植物であるハツカダイコンの発芽率では本組換えセイヨウナタネ区と対照の非組換えセイヨウナタネ区との間に統計学的有意差は認められなかったこと、本組換えセイヨウナタネにおいて発現する改変 MON94100 DMO 蛋白質は、その作用機序から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

35

と及び既に第一種使用規程の承認がなされている DMO 蛋白質が発現する除草剤ジカンバ耐性作物において、DMO 蛋白質が鋤込み試験で検定植物の生育に影響を与えたという報告はないことから、本試験で認められたハツカダイコンの乾燥重の差が本組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性が高まっていることを示すような違いではないと考えられた。

5

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

交雑性；

10 セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、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。したがって、本組換えセイヨウナタネは、交雑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された。

その他；

15 セイヨウナタネと交雑可能な外来の近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana* 及び *S. arvensis* が挙げられる。本組換えセイヨウナタネと我が国に分布する外来の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及び②交雑により浸透した導入遺伝子をもたらす遺伝的負荷によって交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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が生じる可能性が考えられるため、既知の知見に基づき考察を行った。

20

①については、第二の 4-① (p41) で示したように、自然条件下で交雑し雑種を形成するためには種々の条件が揃う必要があること、さらに交雑率は低く、形成される雑種の稔性は低下するか、もしくは不稔となることから、自然条件下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられた。

25

②については、第二の 4-② (p42-42) で示したように、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても遺伝的負荷にならないという報告があることから、本組換えセイヨウナタネに導入された改変 *dmo* 遺伝子が遺伝的負荷となることは考え難い。したがって、交雑により我が国に生息する外来の近縁種の個体群中に浸透したとしても、交雑した近縁種の個体群が縮小される可能性は低く、こ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が生ずる可能性も低いと考えられた。

30

35 また、交雑可能な植物種として、上述した近縁種の他に同種の植物である非組換えセイヨウナタネが挙げられる。しかしながら、本組換えセイヨウナタネは除草剤

ジカンバに対する耐性を有するが、除草剤ジカンバを散布されることが想定されにくい自然条件下において除草剤ジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネとの間に生じた雑種が、我が国の自然条件に適応して優占化していく可能性は

5 極めて低いと考えられる。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in *Herbicide Handbook*. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Baumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassuner, M. Van Montagu, D. Inze and U. Wobus. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet* 225: 459-467.
- Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research Supplement* (2): 91-92.
- BBCH. 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Grossbeeren, Germany.
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- Beckie, H.J., S.I. Warwick, H. Nair and G. Séguin-Swartz. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications* 13: 1276-1294.
- Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline

synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.

Bing, D.J., R.K. Downey and G.F.W. Rakow. 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.

Brown, J., J.B. Davis, M. Lauver and D. Wysocki. 2008. U.S. Canola Association: Canola grower's manual. University of Idaho, Oregon State University, Boise, Idaho.

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.

Chèvre, A.-M., H. Ammitzbøll, B. Breckling, A. Dietz-Pfeilstetter, F. Eber, A. Fargue, C. Gomez-Campo, E. Jenczewski, R. Jørgensen, C. Lavigne, M.S. Meier, H.C.M. den Nijs, K. Pasher, G. Seguin-Swartz, J. Sweet, C.N. Stewart and S. Warwick. 2004. A review on interspecific gene flow from oilseed rape to wild relatives. Pages 235-251 in *Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives*. H.C.M. den Nijs, D. Bartsch, and J. Sweet (eds.). CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

Chèvre, A.M., F. Eber, H. Darmency, A. Fleury, H. Picault, J.C. Letanneur and M. Renard. 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1233-1239.

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.

Crawley, M.J. and S.L. Brown. 1995. Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 259: 49-54.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.

- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
- FAOSTAT. 2022. 2020 Rapeseed area harvested. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed February 22, 2022].
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- Fluhr, R., C. Kuhlemeier, F. Nagy and N.-H. Chua. 1986. Organ-specific and light-induced expression of plant genes. *Science* 232: 1106-1112.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- Grime, J.P. 1974. Vegetation classification by reference to strategies. *Nature* 250: 26-31.
- Grime, J.P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American naturalist* 111: 1169-1194.
- Guéritaine, G., S. Bazot and H. Darmency. 2003. Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *New Phytologist* 158: 561-567.
- Hüsken, A. and A. Dietz-Pfeilstetter. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Research* 16: 557-569.

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

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

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

Kerlan, M.C., A.M. Chèvre, F. Eber, A. Baranger and M. Renard. 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.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.

Lefol, E., V. Danielou and H. Darmency. 1996. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research* 45: 153-161.

- Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
- McCartney, H.A. and M.E. Lacey. 1991. Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Aerosol Science* 22: 467-477.
- Meinzel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* 8: 626-649.
- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 201-212.
- Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73: 9080-9088.
- Nishizawa, T., M. Tamaoki, M. Aono, A. Kubo, H. Saji and N. Nakajima. 2010. Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of genetically modified oilseed rape in Japan. *GM Crops* 1: 143-156.
- OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (oilseed rape). OCDE/GD(97)63. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 7. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD. 2012. Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.). ENV/JM/MONO(2012)41. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OGTR. 2008. The biology of *Brassica napus* L. (canola). Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, ACT, Australia.
- OGTR. 2017. The biology of *Brassica napus* L. (canola) and *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard). Australian Government, Department of Health, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia.

Pierce, S., D. Negreiros, B.E.L. Cerabolini, J. Kattge, S. Díaz, M. Kleyer, B. Shipley, S.J. Wright, N.A. Soudzilovskaia, V.G. Onipchenko, P.M. van Bodegom, C. Frenette-Dussault, E. Weiher, B.X. Pinho, J.H.C. Cornelissen, J.P. Grime, K. Thompson, R. Hunt, P.J. Wilson, G. Buffa, O.C. Nyakunga, P.B. Reich, M. Caccianiga, F. Mangili, R.M. Ceriani, A. Luzzaro, G. Brusa, A. Siefert, N.P.U. Barbosa, F.S. Chapin III, W.K. Comwell, J. Fang, G.W. Fernandes, E. Garnier, S. Le Stradic, J. Peñuelas, F.P.L. Melo, A. Slaviero, M. Tabarelli and D. Tampucci. 2017. A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes world-wide. *Functional Ecology* 31: 444-457.

Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.

Rieger, M.A., T.D. Potter, C. Preston and S.B. Powles. 2001. Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 555-560.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Salisbury, P.A. 2002. Pollen movement in canola (*Brassica napus*) and outcrossing between *B. napus* crops. Monsanto Technical.

Scheffler, J.A. and P.J. Dale. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research* 3: 263-278.

Scheffler, J.A., R. Parkinson and P.J. Dale. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2: 356-364.

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

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

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

Timmons, A.M., E.T. O'Brien, Y.M. Charters, S.J. Dubbels and M.J. Wilkinson. 1995. Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85: 417-423.

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

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1623-1626.

Warwick, S.I., M.-J. Simard, A. Légère, H.J. Beckie, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G. Séguin-Swartz and C.N. Stewart. 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. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 528-539.

Yamamori, M. 2011. outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an experimental field. *Japan Agricultural Research Quarterly* 45: 173-179.

Ye, X., W.M. Petersen, L. Gilbertson, D. Walters, S. Johnson, S. Huang and S.P. Chomet. 2011a. Methods and compositions for obtaining marker-free transgenic plants. Patent 8,076,536, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011b. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 20: 773-786.

Young, J.A., C.D. Clements and R. Wilson. 2003. *Brassica elongate* ssp. *integrifolia* seed

germination. *Journal of Range Management* 56: 623-626.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

Katsuta, K., K. Matsuo, Y. Yoshimura and R. Ohsawa. 2015. Long-term monitoring of feral genetically modified herbicide-tolerant *Brassica napus* populations around unloading Japanese ports. *Breeding Science* 65: 265-275.

稲永忍 2000 IV. 油料作物 2. ナタネ 作物学(II)-工芸・飼料作物編- 文永堂出版 東京 pp. 108-118

国立研究開発法人国立環境研究所 2022 令和3年度遺伝子組換え生物による影響監視調査報告書 令和3年度環境省請負業務
https://www.biodic.go.jp/bch/download/natane/R3_eikyo.pdf [Accessed June 9, 2022]

財務省 2021 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed January 28, 2022]

志賀敏夫 1981 V 油料 ナタネ 工芸作物学 栗.(編) 農山漁村文化協会 東京 pp. 89-110

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 東京

杉山信太郎 2001 日本人とナタネ 転作全書 第三巻 雑穀 農.(編) 農山漁村文化協会 東京 pp. 271-280

津田麻衣・田部井豊・大澤良・下野綾子・吉田康子・吉村泰幸 2016 遺伝子組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ (*Brassica juncea*)、アブラナ (*B. rapa*)、セイヨウアブラナ (*B. napus*) の生物情報集 農業環境技術研究所報告 第36号 pp. 1-45

中井秀樹 2003 アブラナ科 Cruciferae 日本の帰化植物 清.(編) 平凡社 東京 pp. 80-96

農林水産省 2018 遺伝子組換え植物実態調査結果(平成 18 年～平成 27 年実施分) 対象植物：ナタネ類 消費・安全局 農産安全管理課

<http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-135.pdf> [Accessed May 12, 2022]

農林水産省 2021 令和 3 年産なたね（子実用）の作付面積及び収穫量

https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#y17 [Accessed January 28, 2022]

農林水産省 2022 遺伝子組換え植物実態調査結果（令和 3 年実施分）対象植物：ナタネ類、ダイズ・ツルマメ 消費・安全局 農産安全管理課

<https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/220726-3.pdf> [Accessed August 9, 2022]

農林水産省 2023 遺伝子組み換え植物実態調査結果(令和 4 年実施分) 対象植物：ナタネ類、ダイズ・ツルマメ

<https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/230630-1.pdf> [Accessed July 3, 2023]

村上興正・鷺谷いづみ 2002 外来種ハンドブック 日本生態学会 地人書館 東京

石田正彦・山守誠・加藤晶子・千葉一美・奥山善直・田野崎真吾・菅原俐・遠山知子・遠藤武男・柴田悖次 2006 ナタネ新品種「菜々みどり」の育成 東北農研研報 Bull. Natl. Agric. Res. Cent. Tohoku Reg. 105, 149-162

由比進 2004 洋種ナタネ類(ハクラン、ナバナ、千宝菜) 新編 農学大事典 養賢堂 東京 pp. 547

緊急措置計画書

2022年8月30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 坂田 耕平
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ジカンバ耐性セイヨウナタネ (改変 *dmo, Brassica napus* L.) (MON94100, OECD UI: MON-94100-2) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」という。) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

2022年8月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 企業広報部長 クロップサイエンス ビジネスパートナー
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場長

*：管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、バイエルグループと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から情報収集を行う。

10 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

弊社は、バイエルグループと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えセイヨウナタネの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

15

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

20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、バイエルグループの協力のもと、本組換えセイヨウナタネが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えセイヨウナタネに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

25

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

30 弊社は、信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別添資料リスト

- 5 別添資料 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられた改変 *dmo* 遺伝子から推定した改変 MON94100 DMO 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-BNHT508701 (社外秘)
- 10 別添資料 3 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 94100 (MSL0029718) (社外秘)
- 別添資料 4 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Herbicide Tolerant Canola MON 94100 Across Three Generations (MSL0030193) (社外秘)
- 15 別添資料 5 Amended from MSL0030076: Molecular Characterization of Dicamba Tolerant Canola (MON 94100) (TRR0000306) (社外秘)
- 別添資料 6 Demonstration of the Presence of DMO Protein in Canola Seed Samples Across Multiple Generations of MON 94100 (MSL0030222) (社外秘)
- 20 別添資料 7 Assessment of DMO Protein Levels in Canola Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from MON 94100 Produced in United States and Canadian Field Trials During 2018. (TRR0000390) (社外秘)
- 25 別添資料 8 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 94100 (社外秘)
- 30 別添資料 9 In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 94100” for Global Submissions (社外秘)

別添資料 10 除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ (改変 *dmo*, *Brassica napus* L.) (MON94100, OECD UI: MON-94100-2) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)

5

別添資料 11 Assessment of the Effect of Heat Stress on Growth of Canola MON 94100 in 2020 under Controlled Environmental Conditions (TRR0001310) (社外秘)

10 別添資料 12 DT Canola heat stress study Appendix table of dry weights (PLC-2020-0371) (社外秘)