

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ
 (改変 *cp4 epsps*, *Brassica napus* L.)
 (MON88302, OECD UI: MON-88302-9)申請書等の概要

5

	第一種使用規程承認申請書	1
	生物多様性影響評価書	3
10	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
	和名、英名及び学名	3
	宿主の品種名又は系統名	3
15	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
	国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
	主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
	(3) 生理学的及び生態学的特性	5
20	イ 基本的特性	5
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	6
	ハ 捕食性又は寄生性	6
	ニ 繁殖又は増殖の様式	6
	種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
25	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
	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	7
	花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
30	ホ 病原性	9
	ヘ 有害物質の産生性	9
	ト その他の情報	9
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
	(1) 供与核酸に関する情報	9
35	イ 構成及び構成要素の由来	9
	ロ 構成要素の機能	14
	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	14
40	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.....	14
	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	14
	(2) ベクターに関する情報.....	15
	イ 名称及び由来.....	15
5	ロ 特性.....	15
	ベクターの塩基数及び塩基配列.....	15
	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	15
	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.....	15
10	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	16
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	16
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	16
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	16
	核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	16
15	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.....	16
	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.....	16
20	(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性.....	19
	移入された核酸の複製物が存在する場所.....	19
	移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複製数世代における伝達の安定性.....	21
	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.....	23
25	(6)の 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.....	23
	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.....	25
30	(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性.....	25
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	25
	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.....	25
	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.....	26
35	a 形態及び生育の特性.....	26
	b 生育初期における高温耐性.....	26
	c 成体の越夏性.....	27
40	d 花粉の稔性及びサイズ.....	27

	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	27
	f 交雑率	27
	g 有害物質の産生性	28
	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
5	(1) 使用等の内容	28
	(2) 使用等の方法	28
	(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	28
10	(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	28
	(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	29
	(6) 国外における使用等に関する情報	29
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	30
15	1 競合における優位性	30
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
	(3) 影響の生じやすさの評価	32
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
20	2 有害物質の産生性	32
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	33
	(3) 影響の生じやすさの評価	33
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
25	3 交雑性	34
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
	(2) 影響の具体的内容の評価	34
	(3) 影響の生じやすさの評価	34
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	34
30	4 その他の性質	34
	交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する。	35
	交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、交雑した近縁種の個体群が縮小されることで、これら近縁種に依存して生息する昆虫などの野生生物の個体群に影響が生じる。	35
35	第三 生物多様性影響の総合的評価	38
	参考文献	41
	緊急措置計画書	50
	除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (MON88302, OECD UI: MON-88302-9) の別添資料リスト	52
40		

第一種使用規程承認申請書

平成 24 年 11 月 26 日

5 農林水産大臣 郡司 彰 殿
環境大臣 長浜 博行 殿

10 申請者 氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15 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	除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (MON88302, OECD UI: MON-883Ø2-9)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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

和名、英名及び学名

10

和名：セイヨウナタネ

英名：oilseed rape

学名：*Brassica napus* L.

15

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 Ebony である。

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 *B. rapa* L. (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ、ノザワナ、ツケナ、チンゲンサイ、パクチョイ等と呼ばれるもの全体を指す) (以下、「*B. rapa*」という。) とキャベツなどが属する *B. oleracea* L. (以下、「*B. oleracea*」という。) との交雑の結果できた複 2 倍体種である (角田, 2001)。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が原産地と考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (稲永, 2000)。アブラナ属のうち日本に自生しているものは、セイヨウナタネ、*B. rapa* (在来ナタネ)、*B. juncea* (L.) Czern (カラシナ) (以下、「*B. juncea*」という。) 及び *B. nigra* (L.) Koch (クロガラシ) (以下、「*B. nigra*」という。) である (清水ら, 2008)。なお、*B. juncea* には、カラシナの他に明治以前にわが国に導入され各地で栽培されているザアサイ等の野菜類もあるが (由比, 2004)、現在、荒地、路傍、河原などで自生化しているものは、カラシナである (清水ら, 2008 ; 中井, 2003)。また、アブラナ科の帰化植物種として、上記の植物以外にダイコン属の *Raphanus raphanistrum* L. (セイヨウノダイコン) (以下、「*R. raphanistrum*」という。) 及び *Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino (ハマダイコン)、ダイコンモドキ属の *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss. (ダイコンモドキ) (以下、「*H. incana*」という。) 及びシロガラシ属の *Sinapis arvensis* L. (ノハラガラシ) (以下、「*S. arvensis*」という。) が挙げられる¹。

35

¹ 近縁種のうち、*B. nigra* と *S. arvensis* については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は報告されていない。また、*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino については、人為的な交配も含め、セイヨウナタネとの交雑は報告されていない。

セイヨウナタネは路傍や工場跡地のような定期的に人の手が加えられる場所では自生化し得ることが知られており(OECD, 1997)、わが国においては、河原等で生育していたり(清水ら, 2008; 国土交通省, 2012)、海外から種子が陸揚げされる港湾の周辺で生育していることがこれまでに報告されている(Nishizawa et al., 2009)。しかし、セイヨウナタネは、人の手がほとんど加えられない自然環境下では、多年生の雑草や樹木との競合に敗れ、自生化することは困難であることが知られている(OECD, 1997)。

(2) 使用等の歴史及び現状

10 国内及び国外における第一種使用等の歴史

セイヨウナタネの使用等の歴史は古く、紀元前 2000~1500 年の古代インドの記述や、紀元前 500~200 年のギリシャ、ローマ及び中国の記述に記されている(Downey and Röbbelen, 1989)。ヨーロッパにおけるほ場規模での栽培は、13 世紀にベルギーで始まったとされている(角田, 2001)。

アジアやヨーロッパでも、古くからセイヨウナタネは種子から油が搾られ、灯火用として広く使用されていた(志賀, 1981)。また、ヨーロッパでは蒸気機関の潤滑油として使用されるようになり、このことがヨーロッパでのセイヨウナタネ栽培の進展を促した。カナダにおいては、第二次世界大戦時に、軍艦の蒸気機関の潤滑油を補給する目的でセイヨウナタネ栽培が始まった(角田, 2001)。

本来、セイヨウナタネ種子からとられた油は、エルシン酸や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いる。エルシン酸は、実験動物に多量に給与した場合、心筋や骨格筋などに病的な変化が生ずることが報告されている。また、グルコシノレートは、家畜の甲状腺を肥大させることが知られている(志賀, 1981)。したがって、セイヨウナタネ種子からとられた油は、食用や飼料用には不向きであると考えられていた。しかし、カナダでの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、その結果として、現在ではサラダ油、マーガリン等の食用油として広く利用されている(志賀, 1981)。また搾油かすは飼料として利用されている(杉山, 2001)。

日本において古くから栽培されているのは *B. rapa* である。この種の栽培は地中海東部からシベリアや西域を経て中国に入り、古代に中国・朝鮮から渡来したと考えられている。平安時代の「延喜式」には花芽を食べる野菜として記されている。江戸時代に燈油や食用油の原料として大規模に栽培されるようになった。一方、セイヨウナタネは明治時代から栽培されるようになり、全国に広がっていき、*B. rapa* (在来ナタネ)は少なくなっていく(角田, 2001)。

わが国でのセイヨウナタネの栽培面積及び生産量は、昭和 12~13 年に 11 万 ha 及び 12 万~13 万 t に達したが、第二次世界大戦によって激減した。戦後再び増加し、昭和 27~33

年には 20 数万 ha 及び 30 万 t に達した。しかし、その後、イネ栽培の早期化による作期の重なりや、昭和 30 年代のわが国の経済発展によって、その栽培面積は減少し、現在では国内需要のほとんどを輸入品に頼っており、国産ナタネは主に緑肥や景観作物として栽培されている (稲永, 2000; FAOSTAT, 2012)。

5

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

10 国連食料農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2010 年における全世界のセイヨウナタネの栽培面積は約 3,164 万 ha であり、栽培面積の上位国を挙げると中国が約 737 万 ha 次いで EU が約 690 万 ha、カナダが約 651 万 ha、インドが約 553 万 ha、オーストラリアが約 173 万 ha となっている (FAOSTAT, 2012)。

15 なお、同統計情報によると、現在、わが国で栽培されているセイヨウナタネの栽培面積は 790 ha で収穫量は約 1000 t である (FAOSTAT, 2012)。

20 カナダにおいてはセイヨウナタネは春播きで栽培される。一方、日本におけるセイヨウナタネの栽培方法は、秋に播種して、春から初夏にかけて収穫する秋播栽培が一般的である (志賀, 1981)。

25 日本には 2011 年度に 231.9 万 t が輸入され、主な輸入国はカナダ(226.0 万 t)、次いでオーストラリア(5.8 万 t)である (農林水産省, 2012)。また、ナタネ油は 2011 年に 2.8 万 t、飼料用の油かすは 2.8 万 t 輸入されている (財務省, 2012)。なお、モンサント・カナダの調査によると、2012 年現在、カナダで商業栽培されているセイヨウナタネのうち、約 96 % が遺伝子組換え技術により作出されたセイヨウナタネ品種で、約 4 % が非遺伝子組換えセイヨウナタネ品種である。

30 現在、セイヨウナタネの用途は、油糧用と飼肥料用に大別される。油糧用として子実から搾油・精製された油の多くは食用植物油として、又はマヨネーズ、マーガリン、ショートニングなどの食用加工油脂として利用されている。飼肥料用としては、搾油後の油かすが有機肥料や配合飼料として有効活用されている。またナタネ油及びその廃食油をバイオディーゼル燃料に精製する試みが始まっている (農業・生物系特定産業技術研究機構, 2006)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

35

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。

40

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは、休眠打破、抽苔の開始及び花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられる (稲永, 2000)。セイヨウナタネの播種期の気温は 15~20°C であり、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 (志賀, 1981)。セイヨウナタネは、発芽時の過湿を嫌うが、生育時には多くの水分が必要である。また、日本全国で栽培可能である (志賀, 1981)。

ハ 捕食性又は寄生性

ニ 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

セイヨウナタネでは 1 つの莢の中に多数の種子ができ、種子が成熟し乾燥した莢は莢柄の部分より裂開して種子を放出する (志賀, 1981)。

乾燥した莢は、わずかな物理的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)。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、春播き品種に関わらず比較的浅いことが知られているが、気温の大きな変動、水分の欠乏及び暗黒条件が長時間続いた場合に休眠性を獲得することが知られている (Pekrun et al., 1997)。また、遺伝子型によっては 20°C 以上の高温条件下で休眠性を獲得する品種も報告されている (Gulden et al., 2000)。これらの獲得された休眠性は、種子が光にさらされ、かつ低温条件 (2~4°C) (Gulden et al., 2000) や再度変温条件下におかれることで破られることが知られている (Pekrun et al., 1997)。

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貯蔵した場合には 6 年を経過しても 80% の発芽力があつたが、室内に放置した場合の 3 年後の発芽率は約 30% であつたと報告されている (志賀, 2001)。

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。

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

5 セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自家受粉によって種子を作ることが多い。風媒や虫媒による他家交雑率は12~55%と報告されている(Beckie et al., 2003)。

セイヨウナタネと交雑可能な近縁種としては、わが国で古来から栽培種として利用されている *B. rapa* と、帰化植物である *B. nigra*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*、*B. juncea* 及び *H. incana* が挙げられる(杉山, 2001; 清水ら, 2008 ; OGTR, 2002; 中井, 2003)。

10 *B. rapa* には、在来ナタネの他に、その変種であるカブ、ハクサイ、コマツナ、ノザワナ、ツケナ、チンゲンサイ、パクチョイも含まれるが、わが国の荒地や路傍で自生化しているものは、在来ナタネである(杉山, 2001)。*B. rapa* のセイヨウナタネとの交雑性に関しては、セイヨウナタネのほ場の境界線より外側のほ場に *B. rapa*(在来ナタネ)の集団を植え、*B.*
15 *rapa* の種子における交雑体を調べた場合は、その交雑率は低く 0.4% ~ 1.5%であった(Scott and Wilkinson, 1998)。また、自然条件においてセイヨウナタネの集団と隣接して存在する *B. rapa* の集団において、セイヨウナタネと *B. rapa* との交雑率は0.1%であった(Wilkinson et al., 2000)。しかし、セイヨウナタネのほ場内に *B. rapa*(在来ナタネ)を植え、*B. rapa* の種子
20 における交雑体を調べた場合の交雑率は 13%であったと報告されている(Jørgensen et al., 1996)。

B. juncea には、カラシナの他に明治以前にわが国に導入され各地で栽培されているザアサイ等の野菜類もあるが(由比, 2004)、現在、荒地、路傍、河原などで自生化しているものは、戦後にヨーロッパや北アメリカから持ち込まれた帰化植物のカラシナである(清水ら,
25 2008 ; 中井, 2003)。*B. juncea* とセイヨウナタネの交雑はどちらが花粉親の場合でも起こるが、セイヨウナタネが花粉親の場合の交雑率(0.3%)は、*B. juncea*(カラシナ)が花粉親の場合の交雑率(1.1%)に比べて低いことが報告されている(Bing et al., 1996)。

30 *H. incana* は、地中海沿岸を原産とする帰化植物であり、わが国では戦後に発見された(中井, 2003)。セイヨウナタネとの交雑率に関しては、*H. incana* とセイヨウナタネを 1:625 の比率で栽培した場合に、*H. incana* の収穫種子の 1.0%が交雑体であったと報告されている(Lefol et al., 1996a)。

35 *R. raphanistrum* は、ヨーロッパ、北アフリカ及び中近東を原産とする帰化植物であり、わが国では昭和初期に発見された(中井, 2003)。セイヨウナタネとの交雑性に関しては、セイヨウナタネを *R. raphanistrum* と混合して育成させた場合の交雑頻度が調査されており、フランスでは 1×10^{-5} ~ 1×10^{-7} (Chèvre et al., 2004)、オーストラリアでは 4×10^{-8} (Rieger et al., 2001)、そしてカナダでは 3×10^{-5} (Warwick et al., 2003) という報告がされている。しかし、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イギリスにおいて5年間(Norris and Sweet, 2002)及び、カナダで2年間(Warwick
40

et al., 2003) 実施した結果、雑種は認められなかった。

5 *S. arvensis*は地中海沿岸を原産とする帰化植物であり、わが国では昭和初期に発見された(中井, 2003)。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、*in vitro*の試験で交雑の例があるのみである(Chèvre et al., 1996; Moyes et al., 2002)、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., 1996b)であると報告されている。

10 *B. nigra*はヨーロッパから西アジアを原産とする帰化植物であり、栽培種からの逸出により1947年以前にわが国に渡来したと考えられている(日本生態学会, 2002; 中井, 2003)。セイヨウナタネとの交雑性については、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、雑種の形成は認められなかった(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を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%の交雑率で交雑体を得られたと報告されているが(Kerlan et al., 1992)、セイヨウナタネを花粉親として胚珠培養を行った場合には交雑体は得れなかったと報告されている(Kerlan et al., 1992)。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

20 セイヨウナタネは1花当たり約6~7万粒の花粉を生産する。

ほ場において、花粉の発芽率は開花4~5日後から次第に低下することが報告されている(Rantio-Lehtimäki, 1995)。

25 セイヨウナタネの花粉は黄色で、3つに縦にくびれた楕円形をしている。大きさは長径37~39 μm 及び短径20~22 μm である(志賀, 2001)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある(OECD, 1997)。

花粉の媒介方法は風又は昆虫(主にハチ)である(OECD, 1997)。

30 セイヨウナタネの花粉は重くて粘着性があるが、サイズが小さいため、花粉は風によって飛散する(Harker et al., 2002)。Timmonsら(1995)の報告によると花粉源から1.5km離れた地点で、1 m^2 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とLacey(1991)の調査によると、ほ場から10mの地点で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12m以内に飛散すると報告されている(Scheffler et al., 1993)。

35 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する。セイヨウナタネ間の交雑率は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4km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100m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)。

ホ 病原性

10

ヘ 有害物質の産生性

セイヨウナタネ種子において、ヒトを含む哺乳動物に対する有害物質としてエルシン酸及びグルコシノレートの産生が知られている。エルシン酸は、実験動物に多量に給餌した場合、心筋や骨格筋などに病的な変化が生ずることが報告されている。またグルコシノレートは、家畜の甲状腺を肥大させることが知られている(志賀, 1981)。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、低エルシン酸で低グルコシノレートの品種が育成された結果、今日、その油がヒトの食用として、油かすが飼料として利用されるようになった。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 μ mol未満)のセイヨウナタネは一般にカノーラと呼ばれ、本組換えセイヨウナタネの遺伝子導入の母本となったEbonyもカノーラと認められている(CFIA, 2010)。

20

ト その他の情報

25

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは従来の雑草防除法と比べて効果的な雑草防除法を提供し、ナタネ栽培における低コスト・省力化栽培を目的として除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302(改変 *cp4 epsps*, *Brassica napus* L.)(MON88302, OECD UI: MON-88302-9)(以下、「本組換えセイヨウナタネ」という。)を開発した。

(1) 供与核酸に関する情報

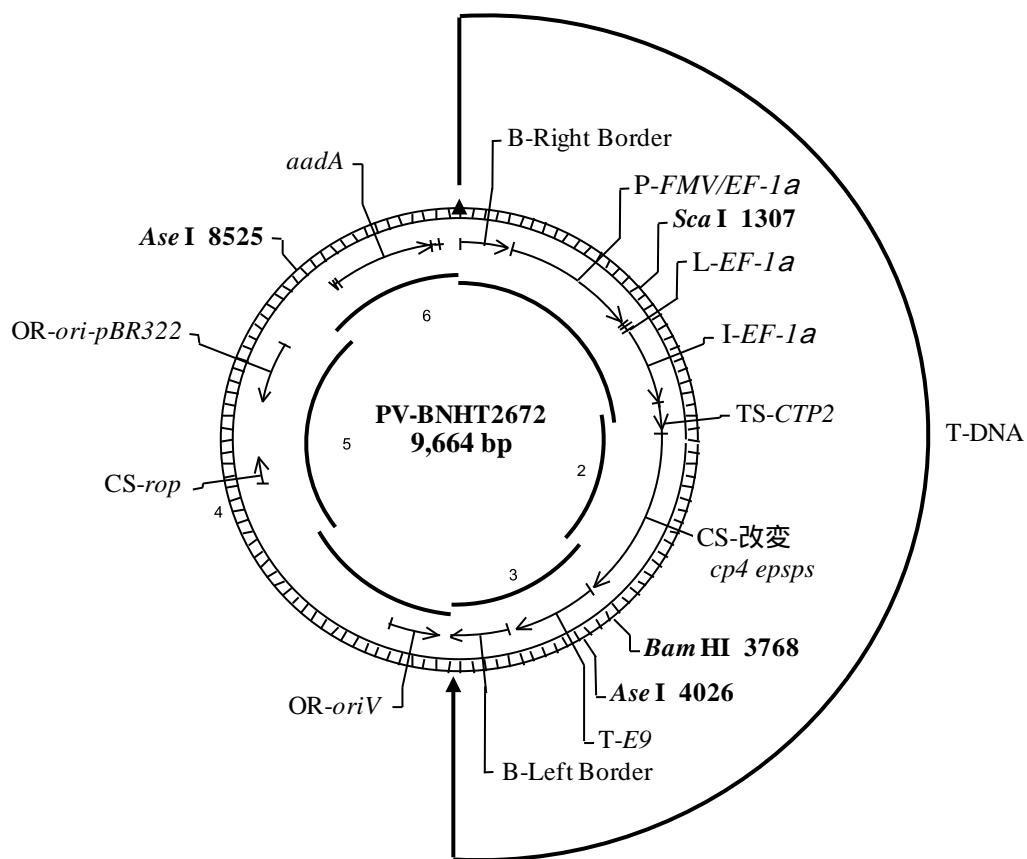
35

イ 構成及び構成要素の由来

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(p11)及び(表1、p12~13)に示した。

40

5 なお、本組換えセイヨウナタネに導入された *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS
蛋白質は、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、*Agrobacterium*
10 sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目のセリン
 がロイシンに改変されている。したがって、本組換えセイヨウナタネに導入された *cp4 epsps*
 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」と
 する。本組換えセイヨウナタネにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、これまでにモ
 ンサント・カンパニーが開発し、既に第一種使用規程の承認がなされている遺伝子組換え
10 セイヨウナタネ RT73 及びその他の除草剤グリホサート耐性作物中で発現している蛋白質
 と同一である。なお、本組換えセイヨウナタネにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の
 推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。



5 図1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられたPV-BNHT2672のプラスミドマップ²

EF-1aは別添資料4のFigure1(p33)に記載されている *Tsfl* と同一である。

²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いたPV-BNHT2672の各構成要素の由来及び機能³

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNA		
B ^{注1} -Right Border	1~357	<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配列(Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)
Intervening Sequence	358~427	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注2} -FMV/EF-1a ^{注3}	428~1,467	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)由来の <i>Tsf1</i> プロモーター(Axelos et al., 1989) に Figwort Mosaic Virus(FMV)の 35S プロモーターのエンハンサー配列(Richins et al., 1987)を結合させたキメラプロモーター。目的遺伝子の恒常的発現に關与する。
L ^{注4} -EF-1a	1,468~1,513	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ) 由来の <i>Tsf1</i> 遺伝子(翻訳伸長因子EF-1 alphaをコードする)(Axelos et al., 1989)の 5'非翻訳リーダー領域(exon 1)。目的遺伝子の発現を高める。
I ^{注5} -EF-1a	1,514~2,135	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ)由来の <i>Tsf1</i> 遺伝子(翻訳伸長因子EF-1 alphaをコードする)(Axelos et al., 1989)のイントロン配列。目的遺伝子の発現を高める。
Intervening Sequence	2,136~2,144	DNA クローニングの際に利用された配列
TS ^{注6} -CTP2	2,145~2,372	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ)の EPSPS をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 CP4EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS ^{注7} -改変 <i>cp4 epsps</i>	2,373~3,740	グラム陰性菌である <i>Agrobacterium</i> CP4 株の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996b; Barry et al., 2001)。
Intervening Sequence	3,741~3,782	DNA クローニングの際に利用された配列
T ^{注8} -E9	3,783~4,425	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ) のリブロー-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットをコードする <i>rbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
Intervening Sequence	4,426~4,468	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	4,469~4,910	<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)。

³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 (続き)本組換えセイヨウナタネの作出に用いた PV- BNHT2672 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
外側骨格領域 (本組換えセイヨウナタネ中には存在しない)		
Intervening Sequence	4,911~4,996	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注9} - <i>ori V</i>	4,997~5,393	広宿主域プラスミド RK2 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立増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	5,394~6,901	DNA クローニングの際に利用された配列
CS- <i>rop</i>	6,902~7,093	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のコード配列。 <i>E. coli</i> 中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	7,094~7,520	DNA クローニングの際に利用された配列
OR- <i>ori-pBR322</i>	7,521~8,109	pBR322 から単離された複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	8,110~8,639	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>aadA</i>	8,640~9,528	トランスポゾン Tn7 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)の細菌プロモーター、コード配列及び 3'非翻訳領域 (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。
Intervening Sequence	9,529~9,664	DNA クローニングの際に利用された配列

5 ¹ B-Border(境界配列)

² P-Promoter(プロモーター)

³ *EF-1a*は別添資料 4 の Table 1(p29-30)に記載されている *Tsf1* と同一である。

⁴ L-Leader(リーダー配列)

⁵ I-Intron(イントロン)

10 ⁶ TS-Targeting Sequence(ターゲティング配列)

⁷ CS-Coding Sequence(コード配列)

⁸ T-Transcription Termination Sequence(転写終結配列)

⁹ OR-Origin of Replication(複製開始領域)

□ 構成要素の機能

5 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 (p12~13) に示した。

10 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

15 除草剤グリホサートは、植物内在性の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の 1 つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下「EPSPS 蛋白質」という。)を阻害し、細胞死を引き起こす(Franz et al., 1997)。本組換えセイヨウナタネは導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサートに耐性を持つ。

20 改変CP4 EPSPS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、アレルゲンデータベース (AD_2012)⁴ を用いてFASTA型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸による相同性検索を行ったが、既知アレルゲンと類似の配列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

25 EPSPS 蛋白質は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するための生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素のひとつであり、植物中では葉緑体又は色素体に存在する(Della-Cioppa et al., 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である(Haslam, 1974; Haslam, 1993)。本経路は、その第一段階に
30 与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害又は抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている
(Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。このことは EPSPS 蛋白質が本経路における律速
35 酵素ではないことを示唆しており、したがって、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている(Padgette et al., 1996a; Ridley et al., 2002)。実際に、通常の 40 倍の EPSPS 蛋白質を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており(Smart et al., 1985)、
加えて、モンサント・カンパニーがこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダ

⁴ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) AllergenOnline database (2011 年 12 月の時点) に登録されている配列からなるデータベースであり、1,603 件のアミノ酸配列が含まれる。

イズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ、アルファルファ及びテンサイ)の食品及び飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に関して、もとの非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは EPSPS 蛋白質が本経路における律速酵素ではないことを支持している。

5

また、EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下、「S3P」という) から、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり(Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている(Gruys et al., 1992)。これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 にすぎず(Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10

15

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

20

本組換えセイヨウナタネの作出に用いられたプラスミド・ベクターPV-BNHT2672 は、*E. coli* 由来のベクターpBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

ロ 特性

25

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プラスミド・ベクターPV-BNHT2672 の塩基数は 9,664bp である。

30

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

35

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、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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。

40

(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

5 宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素は表 1 (p12~13)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と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p11)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10 PV-BNHT2672 中の T-DNA 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 Ebony の胚軸に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

15 核酸が移入された細胞の選抜の方法

20 従来セイヨウナタネ品種 Ebony の胚軸をプラスミド・ベクターPV-BNHT2672 を含む *A.tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、除草剤グリホサートを含有する培地にて選抜を行った。

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

25 カルベニシリン及びチカルシリン・クラブラン酸を添加した培地により、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 世代において、形質転換に用いたプラスミド・ベクターPV-BNHT2672 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えセイヨウナタネにはプラスミド・ベクターの外側骨格領域は存在しなかった(別添資料 2)。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。

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

35 選抜された再分化個体(R0)を土壤に移植した後、自家受粉を行い R1 種子を作出した。R0 個体と R1 個体について除草剤グリホサートへの耐性と改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが存在すること、かつ PV-BNHT2672 の骨格部分(*ori V*)の配列が存在しないことを確認した。その後、1 コピーの T-DNA 領域をホモで有する R2 個体を除草剤グリホサート散布、PCR 分析及びサザンブロット分析を用いて選抜した。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。

- 5 本組換えセイヨウナタネにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子の発現の安定性及びわが国で隔離ほ場試験に用いられた世代について、図2(p18)の育成図に記載した。なお、第一種使用規程に係る承認対象の範囲は、図2(p18)に記載するとおり R3 世代及び R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

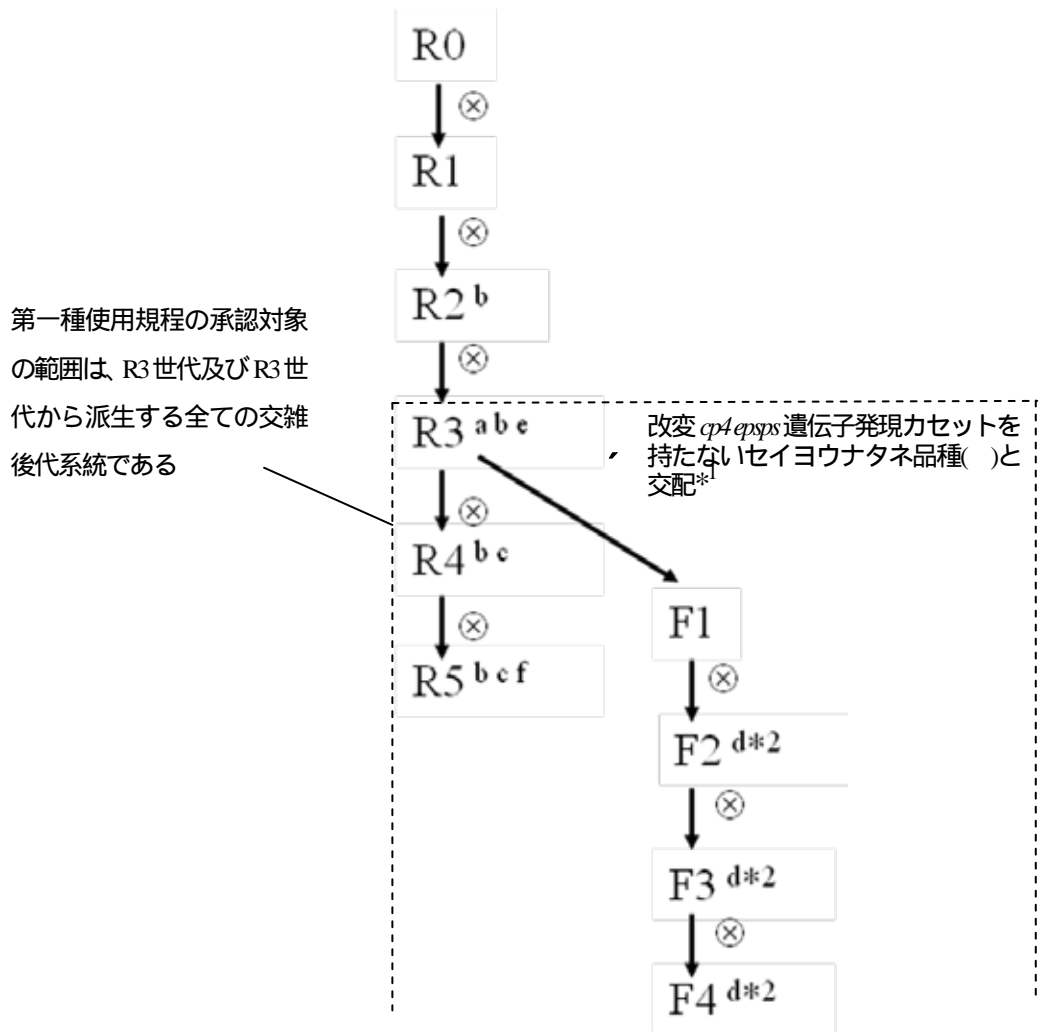


図2 本組換えセイヨウナタネの育成図⁵

5

Ä 自殖

^a 導入遺伝子の解析に供試した世代 (サザンプロット分析及び塩基配列解析)

^b 導入遺伝子(サザンプロット分析)及び発現蛋白質(ウエスタンプロット分析)の世代間の安定性試験に供試した世代

^c ELISA法による蛋白質発現の確認に供試した世代

10 ^d 導入遺伝子の分離比検定に用いた世代

^e 商品化品種の育成に用いられる世代

^f 日本での隔離ほ場試験に供試した世代

*1 後代分離比の分析の目的で、本組換えセイヨウナタネを改変 *cp4 ep5ps* 遺伝子発現カセットを持たない従来セイヨウナタネ品種(65037)と交配し、F1世代(ヘテロ接合体)を作出した。

15 *2 F2、F3及びF4世代は1つ前の世代で改変 *cp4 ep5ps* 遺伝子発現カセットをヘテロで有する個体のみを自殖することにより作出された。

⁵本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

(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

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導入遺伝子が染色体上に存在するか否かを調べるため、導入遺伝子をホモで有する本組換えセイヨウナタネ(R3 世代)を、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを持たないセイヨウナタネ品種と交配して F1 個体を作成した。この F1 の 1 個体を自殖し、F2 世代を作成した。次に F2 世代の個体について real-time TaqMan PCR 法により改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの有無を調べ、ヘテロ接合性の F2 個体を選抜して自殖し、F3 世代を作成した。同様に、ヘテロ接合性の F3 個体を選抜して自殖し、F4 世代を作成した。このようにして作出した F2、F3 及び F4 世代を用いて、real-time TaqMan PCR 法によって本組換えセイヨウナタネ中の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの分離比の検定を接合性に基づいて行った(表 2, p20; 別添資料 3)。この場合の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの分離比は、メンデルの法則に従い 1:2:1 (ホモ接合性 + + : ヘテロ接合性 + - : ホモ接合性 - -) と予想された。

その結果、F2、F3 及び F4 世代では分離比の実測値と期待値との間に、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(表 2, p20; 別添資料 3 の Table 1, p7)。したがって、本組換えセイヨウナタネの導入遺伝子は染色体上に存在し、メンデルの分離法則に矛盾せず

20

表 2 本組換えセイヨウナタネのF2、F3 及びF4 世代における改変*cp4 epsps*遺伝子の分離比⁶

世代 ¹	供試 個体数 ²	実測値			1:2:1 の分離比の期待値				
		陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	χ^2	p 値 ³
F ₂	220	51	122	47	55.00	110.00	55.00	2.76	0.251
F ₃	166	39	94	33	41.50	83.00	41.50	3.35	0.187
F ₄	198	53	97	48	49.50	99.00	49.50	0.33	0.847

¹ F₂、F₃ 及び F₄ 世代は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットをヘテロで持つそれぞれの親世代 (F₁、F₂ 及び F₃ 世代) を自殖することにより得られた。

² 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの有無を real-time TaqMan PCR 法によって調べた。

³ F₂、F₃ 及び F₄ 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p≤0.05)。

5

⁶本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えセイヨウナタネの核ゲノム中の1ヵ所に1コピーのT-DNA領域が組み込まれていることが確認された(別添資料4のFigure 4-5, p37-38)。またT-DNA領域以外の外側骨格領域は挿入されていないことが確認された(別添資料4のFigure 6~8, p39~41)。さらに導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代(R2、R3、R4及びR5)におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料4のFigure16, p57)。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3(p22)に示した。
- 10

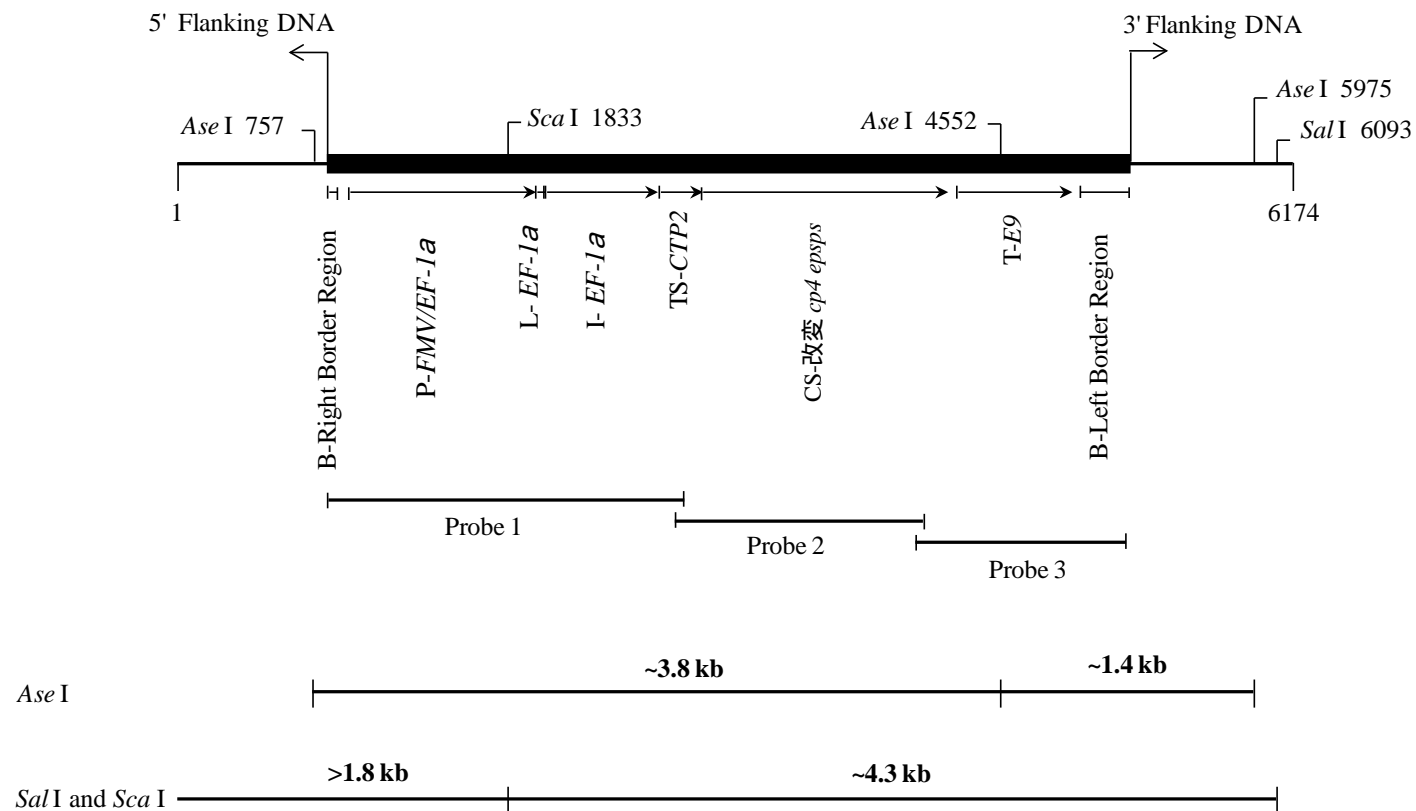


図3 本組換えセイヨウナタネの導入遺伝子地図⁷

5 図の上段は本組換えセイヨウナタネ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。この地図には導入遺伝子内の構成要素及びサザンプロット分析に用いた制限酵素切断部位を地図と相対的な位置とともに記載した。図の中段には、別添資料4のFigure 1 (p33)に示したT-DNAプローブの相対サイズ及び位置を示した。図の下段は各制限酵素で切断した後に予想されるDNA断片のサイズを示した。矢印(→)により導入遺伝子末端と導入遺伝子の5'末端及び3'末端に隣接する核ゲノムDNA配列の開始位置を示した。また、矢印(→)により、本組換えセイヨウナタネ中の構成要素の配列の方向を示した。

⁷本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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 4 の Figure 4~5, p37~38)。

(6)の 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

10

本組換えセイヨウナタネの複数世代(R2、R3、R4 及び R5)の葉においてウエスタンブロット分析を行い、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が安定して発現していることを確認した(別添資料 5 の Figure 1, p15)。

15 米国の 3 カ所 (アイダホ州 1 カ所、ミネソタ州 1 カ所及びノースダコタ州 1 カ所) 及びカナダの 3 カ所 (マニトバ州 2 カ所及びサスカチュワン州 1 カ所) のほ場において 4 反復で生育した本組換えセイヨウナタネの地上部、種子、葉、及び根のサンプルを採取し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 3, p24、別添資料 6)。ELISA 分析の結果、本組換えセイヨウナタネの地上部、種子、葉及び根における改変 CP4 EPSPS 蛋白質
20 の発現が確かめられた (表 3, p24、別添資料 6 の Table 1, p16-17)。

表 3 米国とカナダのほ場¹における本組換えセイヨウナタネの各部位の改変CP4 EPSPS蛋白質発現量 (2009 年)⁸

供試部位 ²	新鮮重での平均値 (標準偏差) 範囲 (µg/g FW)	乾燥重での (標準偏差) 範囲 (µg/g DW)
地上部	18 (4.4) 14-28	170 (22) 120-210
種子	25 (5.2) 21-43	27 (5.6) 22-46
葉(OSL-1)	23 (10) 10-45	180 (40) 110-250
葉(OSL-2)	22 (5.9) 18-37	180 (41) 120-250
葉(OSL-3)	31 (6.3) 20-41	230 (50) 130-300
葉(OSL-4)	36 (14) 20-85	210 (80) 110-500
根(Root-1)	19 (4.1) 11-25	82 (17) 46-100
根(Root-2)	10 (3.3) 7.0-17	38 (14) 24-62

¹ 米国の3カ所 (アイダホ州1カ所、ミネソタ州1カ所及びノースダコタ州1カ所) 及びカナダの3カ所 (マニトバ州2カ所及びサスカチュワン州1カ所) のほ場において4反復で生育した本組換えセイヨウナタネの地上部、種子、葉、及び根のサンプルを採取し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。

² 各部位のサンプルを採取した時期とサンプル数は以下のとおりである。

地上部 (n=20): 主茎伸長開始期、種子 (n=16): 収穫期、葉(OSL-1) (n=16): 第3~4葉が展開した時期、葉(OSL-2) (n=9): 第7-9葉が展開した時期、葉(OSL-3) (n=20): 主茎伸長開始期、葉(OSL-4) (n=20): 開花始めから20%開花期、根(Root-1) (n=19): 主茎伸長開始期、根(Root-2) (n=11): 10-30%の莢が肥大終期に達した時期

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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は伝達を可能とする配列を含まないため、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に結合可能なプライマーセットを利用して、End-Point TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料7)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10ng であることが推奨されており、種子 1 粒を用いて検定が可能である。

15 本法の再現精度については 89 粒の本組換えセイヨウナタネ及び 180 粒の非組換えセイヨウナタネを用いて確認試験を行った(別添資料 7)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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 *cp4 epsps* 遺伝子は改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

25 本組換えセイヨウナタネに除草剤グリホサートに対する耐性が付与されていることを確認するために、人工気象室において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 1,500 g a.e.⁹/haの除草剤グリホサートを散布した。その結果、散布後 5~6 日目において対照の非組換えセイヨウナタネの個体は全てが枯死していたが、本組換えセイヨウナタネは全ての個体が生存していた(表 4, p25)。よって、本組換えセイヨウナタネが除草剤グリホサートに耐性を示すことが示された。

30 表 4 本組換えセイヨウナタネの除草剤グリホサート耐性の調査結果⁽¹⁾⁽²⁾ 10

	生存個体数	枯死した個体数
本組換えセイヨウナタネ	24	0
対照の非組換えセイヨウナタネ	0	24

⁽¹⁾ 播種後 5~7 日目(初生葉の時期)の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グリホサート散布後を行い、散布後 5~6 日目に、その外観から生存 / 枯死を判定した。

⁽²⁾ 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、各 24 個体を供試した。

⁹ a.e.; acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤の有効成分は塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

¹⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5

2011年から2012年にかけて日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において本組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えセイヨウナタネのR5世代を供試した(図2, p18)。対照の非組換えセイヨウナタネとしては、本組換えセイヨウナタネの遺伝子導入母本であるEbonyを用いた。なお、生育初期における高温耐性試験(項目b, p26)は米国の人工気象室で実施し、交雑率を評価するための試験(項目f, p27)は米国(カリフォルニア州)のほ場で実施した。

10

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。

統計処理を草丈、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、子実の粒大整否)に関しては統計処理を行わなかった。その結果、統計処理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。統計処理を行わなかった項目においては、開花始め及び開花期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違いが見られた(別添資料8の表4, p13)。

25

開花始め及び開花期は、本組換えセイヨウナタネが3月11日及び4月9日、対照の非組換えセイヨウナタネが3月9日及び4月7日であった(別添資料8の表4, p13)。

b 生育初期における高温耐性

30

生育初期における高温耐性試験は、米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。この試験では、播種後20日目の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Ebony及び従来商業品種4品種の幼苗を日中35°C/夜間30°Cに設定した人工気象室で21日間栽培したのち、生育ステージ、草勢、生体重及び乾燥重について比較した。その結果、統計処理を行った項目(草勢、生体重及び乾燥重)のうち、草勢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統計学的有意差が認められた。統計処理を行わなかった項目(生育ステージ)については、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違いは認められなかった(別添資料9のTable 5, p21)。

35

40 草勢の平均値は、本組換えセイヨウナタネが5.9、対照の非組換えセイヨウナタネが5.1であり、本組換えセイヨウナタネの草勢¹¹が劣っていた(別添資料9のTable 5, p21)。

¹¹草勢は訓練を受けた測定者が目視観察により各個体の状態を相対的に1~9の9段階で評価された。1は非常に良好な生育を意味し、数字が大きくなるほど生育が劣り、9は枯死又は枯死に近い状態を示す。

c 成体の越夏性

5 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、わが国の夏期における生育状況を観察した。2012年7月24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8の図6, p15)。

d 花粉の稔性及びサイズ

10 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 Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉稔性及び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8の表5, p16)。

15

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

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項目(着莢数、莢当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処理を行った結果、千粒重において、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に統計学的有意差が認められた(別添資料8の表6, p17)。千粒重の平均値は、本組換えセイヨウナタネが3.30g、対照の非組換えセイヨウナタネが4.61gであり、本組換えセイヨウナタネの方が低かった(別添資料8の表6, p17)。しかしながら、本組換えセイヨウナタネの千粒重の平均値(3.30g)は、これまでに報告されているセイヨウナタネの千粒重の範囲(約2.5g~6g)(CCC, 2012)に収まっていた。

25

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、植物体をビニールハウス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処理を行った結果、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に統計学的有意差が認められた。裂莢率の平均値は、本組換えセイヨウナタネが1.8%、対照の非組換えセイヨウナタネが3.2%であり、本組換えセイヨウナタネの方が低かった(別添資料8の表6, p17)。

30

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置床して、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%と高く、休眠性は認められなかった(別添資料8の表8, p18)。

35

40 f 交雑率

交雑率を評価するための試験は、2009年から2010年にかけて米国(カリフォルニア州)のほ場において実施した。この試験では、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それぞれを花粉親とし、これらの個体から2m離して栽培された従来セイヨウナタネの収穫種子における交雑体の発生頻度を調査した。この試験は、花粉親である

45

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、種子親である従来セイヨウナタネの開花期を一致させた条件において実施した(別添資料 10a の Table2, p6 及び別添資料 10b の Table3, p7)。また、交雑体の判定は、本組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合には導入遺伝子を PCR 法で検出することにより実施し、対照の非組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合には対照の非組換えセイヨウナタネに特有の 8 つの SNP マーカーを DNA マイクロアレイで検出することにより実施した。

本組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合と対照の非組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合のそれぞれについて、種子親である従来セイヨウナタネの収穫種子 1000 粒を供試し、交雑体の発生頻度を調査した。その結果、交雑率は本組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合で 1.3%、対照の非組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合で 1.4% であり(別添資料 10a の Table3, p6 及び別添資料 10b の Table4, p7)、いずれもこれまでに報告されているセイヨウナタネの交雑率(花粉親と種子親の距離が 5m 以内の場合において、0.0121% ~ 14.5% (Beckie et al., 2003; Ramsay et al., 2003; Hüskén and Dietz-Pfeilstetter, 2007; Cai et al., 2008))と同程度であった。

g 有害物質の産生性

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。その結果、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び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に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 8 の表 9~表 11, p20)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

-

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

申請書に添付した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

5

- (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海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は以下のとおりである(表5, p29)。

10

表5 本組換えセイヨウナタネの国外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¹²

2012年11月現在			
申請時期	承認時期	機関	安全性審査の種類
2011年3月	2012年4月	米国食品医薬品庁(FDA)	食品・飼料
2011年6月	審査中	米国農務省(USDA)	環境
2011年4月	2012年6月	カナダ保健省(Health Canada)	食品
2011年4月	2012年6月	カナダ食品検査庁(CFIA)	環境・飼料
2011年8月	審査中	欧州食品安全機関(EFSA)	食品・飼料
2012年3月	審査中	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)	食品
■■■■ ¹³	■■■■ ¹³	韓国食品医薬品庁(KFDA)	食品
■■■■ ¹³	■■■■ ¹³	韓国農村振興庁(RDA)	環境
■■■■ ¹³	■■■■ ¹³	中国農業部(MOA)	環境・食品・飼料

- 15 なお、本組換えセイヨウナタネのわが国における申請状況は以下のとおりである(表6, p29)。

表6 本組換えセイヨウナタネのわが国における申請及び認可状況¹⁴

2012年11月現在			
申請時期	承認時期	機関	内容
2010年7月	2011年8月	農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程 ¹⁵ : 隔離ほ場)
2012年11月		厚生労働省	食品 ¹⁶
2012年11月		農林水産省	飼料 ¹⁷
2012年11月		農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程: 一般使用)

20

¹² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹³ 社外秘につき非開示

¹⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹⁵ 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。

¹⁶ 食品衛生法に基づく。

¹⁷ 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。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネは路傍や工場跡地のような定期的に人の手が加えられる地域では自生化し得ることが知られており(OECD, 1997)、わが国においては河原等で生育していたり(清水ら, 2008; 国土交通省, 2012)、海外から種子が陸揚げされる港湾の周辺で生育していることが、これまでに報告されている(Anonymous, 2004; Saji et al., 2005; Aono et al., 2006; 農業環境技術研究所, 2007; Nishizawa et al., 2009; 農業環境技術研究所, 2011; Mizuguti et al., 2011)。

しかし、セイヨウナタネはかく乱が起こる条件で一時的に生育する植物であると認識されており (CFIA, 2005)、人の手がほとんど加えられない地域では、多年生の雑草や樹木などとの競合に敗れて自生化することは困難であることが知られている(OECD, 1997)。わが国においてセイヨウナタネは、外来種タンポポ種群(*Taraxacum* spp.)やセイトカアワダチソウ(*Solidago altissima*)などのような日本固有の在来種を駆逐して生物多様性に影響を及ぼす侵略的外来種としては掲載されていない(小川, 2002)。また、セイヨウナタネは生態系に影響を与える有害雑草ではないことが報告されており (Crawley et al., 1993; EC, 2000; Hall et al., 2005)、かく乱された土地に自生したセイヨウナタネの集団は、2、3年程度で消失する傾向にある (Crawley and Brown, 1995; Hall et al., 2005)。このことから、セイヨウナタネが生態系への影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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自生化し得るものの、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。

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)- a~e, p26~27) をわが国での隔離ほ場試験において調査した。その結果、種子の生産量における千粒重及び脱粒性における裂莢率において、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。統計処理を行わなかった項目では、開花始め及び開花期において、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違いが認められた。また、生育初期における高温耐性 (第一の 2-(6)- b, p26) を米国において調査した結果、草勢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で統計学的有意差が認められ、統計処理を行わなかった項目については、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で違いは認められなかった。

千粒重の平均値は、本組換えセイヨウナタネが 3.30 g、対照の非組換えセイヨウナタネが 4.61 g であり、本組換えセイヨウナタネの方が低かった。しかし、本組換えセイヨウナタネの千粒重の平均値 (3.30 g) は、これまでに報告されているセイヨウナタネの千粒重の

範囲 (約 2.5 g~6 g) (CCC, 2012) に収まっていた。また、本組換えセイヨウナタネの種子の生産量に関する他の項目 (裂莢率及び発芽率) において、競合における優位性を高めるような形質は認められなかった。これらのことから、本試験で認められた千粒重の差が競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

5 裂莢率の平均値は、本組換えセイヨウナタネが 1.8 %、対照の非組換えセイヨウナタネが 3.2 %であり、本組換えセイヨウナタネの方が低かった。本組換えセイヨウナタネの方が対照の非組換えセイヨウナタネより裂莢率が低いことから、本組換えセイヨウナタネの脱粒性は、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。よって、本試験で認められた裂莢率の差が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。

10 開花始め及び開花期は、本組換えセイヨウナタネが 3 月 11 日及び 4 月 9 日、対照の非組換えセイヨウナタネが 3 月 9 日及び 4 月 7 日であり、いずれも本組換えセイヨウナタネの方が 2 日遅かった。しかし、その差がわずかであることから、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開花特性が大きく異なっていることはないと考えられた。よって、本試験で認められた開花始め及び開花期の差が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。

15 生育初期における高温耐性試験での草勢の平均値は、本組換えセイヨウナタネが 5.9、対照の非組換えセイヨウナタネが 5.1 であり、本組換えセイヨウナタネの草勢が劣っていた。本組換えセイヨウナタネの方が対照の非組換えセイヨウナタネより草勢が低いことから、本組換えセイヨウナタネの生育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。よって、本試験で認められた草勢の差が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。

25 本組換えセイヨウナタネは、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現により、除草剤グリホサートに対する耐性を有する。しかしながら、グリホサートが散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めることはないと考えられる。実際に、わが国において鹿島港周辺の幹線道路沿いに生育するセイヨウナタネのモニタリング調査を実施した結果、除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えセイヨウナタネが、従来セイヨウナタネが生育する地域以外に生育している事例は認められなかった (農業環境技術研究所, 2007; 農業環境技術研究所, 2011)。また、人の手が加えられる地域に自生した除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えセイヨウナタネ及び従来セイヨウナタネを 3 年間調査した結果、集団の著しい拡大や生育の継続は認められなかったこと (Nishizawa et al., 2009) 及び、自生したセイヨウナタネ個体の多くが頻繁な人為的かく乱によって開花前に消失していたこと (Mizuguti et al., 2011) が報告されている。

30 さらに、英国では除草剤耐性の形質が付与された遺伝子組換え作物 (除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ及びトウモロコシ、除草剤グリホサート耐性テンサイ) を気候条件の異なる 12 カ所のほ場で放任栽培し、自然条件下での競合における優位性を 10 年間にわたり調査している。調査の結果、全ての遺伝子組換え作物の個体群のサイズは対照の非組換え作物と同様に、播種の翌年から他の多年生の植物との競合により縮小し、セイヨウナタネに関しては 4 年後には消失していた (Crawley et al., 2001)。

40

これらのことから、本組換えセイヨウナタネは除草剤グリホサートに対する耐性を有するが、グリホサートが散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めることはないと判断された。また、仮に路傍等で除草剤グリホサートを使用して除草を行い、本組換えセイヨウナタネのみが残存した場合にも、前述したようにそれらが路傍等からさらに広がって、人の手がほとんど加えられない自然条件下において優占化していく可能性は極めて低いと考えられた。

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

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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。

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

従来セイヨウナタネ種子において、ヒトを含む哺乳動物に対する有害物質としてエルシン酸及びグルコシノレートの産生が知られている。エルシン酸は、実験動物に多量に給与した場合、心筋や骨格筋などに病的な変化が生ずることが報告されている。またグルコシノレートは、家畜の甲状腺を肥大させることが知られている(志賀, 1981)。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、低エルシン酸で低グルコシノレートの品種が育成された結果、今日、その油がヒトの食用として、油かすが飼料として利用されるようになった。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 μ mol 未満)のセイヨウナタネは一般にカノーラと呼ばれ、本組換えセイヨウナタネの母本となった Ebony もカノーラと認められている(CFIA, 2010)。

本組換えセイヨウナタネの中では遺伝子組換えにより改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている(第一の 2-(1)-ロ- , p14)。また、第一の 2-(1)-ロ- (p14~15) に示したように、改

変CP4 EPSPS蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことが確認されている。これまでのモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物(トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ及びテンサイ)の食品及び飼料の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含量に対照の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。

さらに、第一の2-(1)-口- (p14~15)に示したように、EPSPS蛋白質は、その基質であるホスホエノールピルビン酸塩(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)と特異的に反応することが報告されている(Gruys et al., 1992)。これらの基質以外に唯一EPSPS蛋白質と反応することが知られている基質は、S3Pの類似体であるシキミ酸であるが、Gruysら(1992)の論文をもとに計算すると、その反応性はS3Pとの反応性よりも低く、基質として反応する可能性は極めて低い(第一の2-(1)-口- , p14~15)。これらのことから、CP4 EPSPS蛋白質の基質特異性は非常に高く、植物代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。以上のことから、植物EPSPS蛋白質と機能的に同一である改変CP4 EPSPS蛋白質の植物における発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断された。

実際に、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験(第一の2-(6)- -g, p28)により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

したがって、改変CP4 EPSPS蛋白質が原因で、本組換えセイヨウナタネ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。同様に、エルシン酸やグルコシノレートの含量にも変化を及ぼすことも考えにくい。

よって、改変CP4 EPSPS蛋白質の発現による意図しない有害物質の産生性はないと判断された。

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

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

わが国の自然条件でセイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*、*B. juncea* 及び *H. incana* が存在する。しかし、
10 セイヨウナタネ及び *B. rapa* は栽培種であり、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*、*B. juncea* 及び *H. incana* は帰化植物である (杉山, 2001; 清水ら, 2008 ; OGTR, 2002; 中井, 2003)。したがって、これらは交雑に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物としては特定されなかった。

15 (2) 影響の具体的内容の評価

20 (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

25 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

30 わが国の自然条件でセイヨウナタネと交雑可能な近縁種のうち、セイヨウナタネ及び *B. rapa* は栽培種であり、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*、*B. juncea* 及び *H. incana* は帰化植物である (杉山, 2001; 清水ら, 2008 ; OGTR, 2002; 中井, 2003) ため、交雑に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物は特定されなかった。しかし、セイヨウナタネとこれらの近縁種が交雑した場合に生ずる間接的な影響の可能性として、
35 て、以下の2点を挙げ、その影響を考察した。

交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する。交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、交雑した近縁種の個体群が縮小されることで、これら近縁種に依存して生息する昆虫などの野生生物の個体群に影響が生じる。

5

交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性

本組換えセイヨウナタネと外来近縁種との交雑率は調査していない。しかし、本組換えセイヨウナタネと従来セイヨウナタネとの交雑率が、対照の非組換えセイヨウナタネと従来セイヨウナタネとの交雑率と変わるものではないことを試験により確認している (第一の 2-(6)- f, p27~28)。よって、本組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネを含む外来近縁種の交雑性及び雑種後代が優占化する可能性を、既往の知見に基づき以下に検討した。

10

1) セイヨウナタネの他殖性

15 セイヨウナタネの他家交雑率は 12 ~ 55% と報告されている (Beckie et al., 2003)。

2) セイヨウナタネと *B. rapa* との交雑性

20

セイヨウナタネを花粉親、*B. rapa* を種子親とした場合の交雑率は、0.4% ~ 1.5% (Scott and Wilkinson, 1998) 及び 0.1% (Wilkinson et al., 2000) の報告がある。また、*B. rapa* を花粉親、セイヨウナタネを種子親とした場合の交雑率については、13% という報告がある (Jørgensen et al., 1996)。セイヨウナタネと *B. rapa* の交雑体の適応度が調査された結果、F1 世代の適応度はセイヨウナタネと *B. rapa* の適応度の範囲内であった (Hauser et al., 1998)。F2 及び BC 世代での適応度は、品種・集団間に差異があるものの、セイヨウナタネ、*B. rapa* 及び F1 世代の適応度より低くなると報告されている (Hauser et al., 1998)。

25

3) セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性

30

セイヨウナタネと *B. juncea* の交雑はどちらが花粉親の場合でも起こるが、セイヨウナタネが花粉親の場合の交雑率 (0.3%) は、*B. juncea* (カラシナ) が花粉親の場合の交雑率 (1.1%) に比べて低いことが報告されている (Bing et al., 1996)。また、雑種の花粉稔性は 0 ~ 28% である (Frello et al., 1995)。セイヨウナタネを種子親として得られた雑種は弱く、生育段階で死に至ると報告されている (Choudhary and Joshi, 1999)。他方、*B. juncea* を種子親として得られた雑種の栄養生長は旺盛であるが、莢当たりの種子数、種子重量及び収量などは劣り、減数分裂に異常が見られ、花粉稔性も 20% 程度に低下すると報告されている (Choudhary and Joshi, 1999)。

35

4) セイヨウナタネと *H. incana* との交雑性

40

セイヨウナタネを花粉親、*H. incana* を種子親とし、*H. incana* とセイヨウナタネを 1:625 の比率で栽培した場合、*H. incana* の収穫種子の 1.0% が交雑体であったと報告されている (Lefol et al., 1996a)。また、F1 雑種の稔性、種子生産量及び収穫種子の生存率に顕著な低下がみられる。F1 雑種の雄しべには花粉が形成されず、1 個体当たりの莢数、1 莢

当たりの種子数及び1個体当たりの種子数も極めて少ない。さらに、戻し交配世代においても高い不稔性率が認められ、種子生産量は少ない (Lefol et al., 1996a)。

5) セイヨウナタネと *R. raphanistrum* との交雑性

5 セイヨウナタネと *R. raphanistrum* との交雑性に関しては、セイヨウナタネを *R. raphanistrum* と混合して育成させた場合の交雑頻度が調査されており、フランスでは $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7}$ (Chèvre et al., 2004)、オーストラリアでは 4×10^{-8} (Rieger et al., 2001)、そしてカナダでは 3×10^{-5} (Warwick et al., 2003) と報告されている。また、F1 雑種における花粉生存率は1%以下であり (Warwick et al., 2003)、F1 雑種の種子生産量は1個体当たり 0.78 個と極めて少ないことが報告されている (Chèvre et al., 1998)。F1 雑種を花粉親とした *R. raphanistrum* への戻し交配を繰り返すことで稔性及び1個体当たりの種子数が回復することが示唆されている (Chèvre et al., 1998)。しかし、F1 雑種では幼苗における草勢及び生存率の低下や生育の遅延、ロゼット葉の直径及び乾物重の顕著な低下が見られるため、F1 雑種が栽培条件及び自然条件下において生存する可能性はセイヨウナタネと *R. raphanistrum* と比べて低いことが示唆されている (Guéritaine et al., 2003)。また、セイヨウナタネと *R. raphanistrum* との間には低い確率で交雑が生じるが、F1 雑種では稔性の低下、種子数の低下、栄養成長の遅延及び生存率の低下が生じるため、F1 雑種が花粉親となり *R. raphanistrum* への戻し交配が起こる機会は限定されると考えられる (OGTR, 2008)。さらに、戻し交配した世代においてゲノムの構成や染色体数に違いが認められることや、セイヨウナタネから *R. raphanistrum* への遺伝子浸透の報告がないことは、雑種から *R. raphanistrum* への遺伝子浸透の可能性が低いことを示唆している (OGTR, 2008)。

6) セイヨウナタネと *S. arvensis* との交雑性

25 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、*in vitro* の試験で交雑の例があるのみである (Chèvre et al., 1996; Moyes et al., 2002)。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., 1996b) であると報告されている。さらに、7224 個の F1 雑種の花に対して *S. arvensis* の花粉を人工授粉した結果、2843 個の莢が形成したが、これらの莢から得られた種子は2粒であり、これらの種子はいずれも発芽しなかった (Lefol et al., 1996b)。

7) セイヨウナタネと *B. nigra* との交雑性

35 セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑性については、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、雑種の形成は認められなかった (Scheffler and Dale, 1994; Bing et al., 1996)。また、人工授粉による交雑によって交雑体を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% の交雑率で交雑体を得られたと報告されているが (Kerlan et al., 1992)、セイヨウナタネを花粉親として胚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)。

40 また、胚珠培養により得られた F1 雑種を戻し交配した場合の結実率 (結実数 / 受粉し

た花)は、セイヨウナタネを種子親とした場合に0.9%、*B. nigra*を種子親とした場合に0.06%であった。また、*B. nigra*への戻し交配は成功せず、セイヨウナタネに戻し交配をした場合には雄性不稔となり、2粒の種子しか得られなかったと報告されている (Bing et al., 1991)。このように、得られた雑種の稔性は低く、F2やBC世代を得るのは難しいと
5 考えられる (Scheffler and Dale, 1994)。

したがって、本組換えセイヨウナタネはわが国の自然条件下において近縁種と交雑する可能性はあるが、その交雑率は非組換えセイヨウナタネの場合と同程度に低く、形成された雑種の稔性も低下すると考えられる。よって、これらの雑種がわが国の自然条件に適応して
10 優占化していく可能性は極めて低いと考えられる。

交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、交雑した近縁種の個体群が縮小されることで、これら近縁種に依存して生息する昆虫などの野生生物の個体群に影響が生じる可能性
15

第二の1-(1) (p30~p32)に示したように、本組換えセイヨウナタネは改変CP4 EPSPS蛋白質の発現により除草剤グリホサートに対する耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート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。このことから、本組換えセイヨウナタネと外来近縁種との交雑種の競合における優位性は、除草剤グリホサートが散布されることが想定しにくい自然条件下においては、非組換えセイヨウナタネの交雑種と同程度であると考えられた。さらに、除草剤耐性の形質が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても、近縁種の生育の負担にはならないという報告がある (Crawley et al., 1993; Snow et al., 1999; Snow and
20 Jørgensen, 1999; Legere, 2005)。
25

これらのことから、導入遺伝子はいずれも近縁種の個体群中に浸透し、個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上から、本組換えセイヨウナタネと近縁種の交雑により間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。
30

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 競合における優位性：

宿主であるセイヨウナタネは路傍や工場跡地のような定期的に人の手が加えられる地域では自生化し得るが、人の手がほとんど加えられない自然環境下では自生化は困難であることが報告されている。

10 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わが国での隔離ほ場試験において比較検討した結果、種子の生産量における千粒重及び脱粒性における裂莢率において、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。統計処理を行わなかった項目では、開花始め及び開花期において、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違いが認められた。また、生育初期における高温耐性を米国において調査した結果、草勢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で統計学的有意差が認められ、統計処理を行わなかった項目については、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で違いは認められなかった。

20 検討の結果、千粒重については、本組換えセイヨウナタネの千粒重の値がこれまでに報告されてるセイヨウナタネの千粒重の範囲に収まっていることから、この差が競合における優位性を高めることはないとは判断された。裂莢率については、本組換えセイヨウナタネの裂莢率が対照の非組換えセイヨウナタネの裂莢率に比べて低いことから、この差が競合における優位性を高めることはないとは判断された。開花始め及び開花期についてはいずれも本組換えセイヨウナタネの方が対照の非組換えセイヨウナタネに比べ2日遅かったが、開花時期の2日の差によって競合における優位性が高まることはないとは判断された。また、生育初期における高温耐性試験での草勢については、本組換えセイヨウナタネの方が対照の非組換えセイヨウナタネより劣っていたことから、本組換えセイヨウナタネの生育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。このことから、草勢で認められた差が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。よって、前述した項目において認められた有意差及び違いにより、競合における優位性が高まることはないとは判断された。

35 本組換えセイヨウナタネには、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性が付与されているが、除草剤グリホサートの散布が想定されにくい自然条件下において、グリホサート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は判断された。

有害物質の産生性：

40 宿主であるセイヨウナタネ種子において、ヒトを含む哺乳動物に対する有害物質としてエルシン酸及びグルコシノレートの産生が知られている。エルシン酸は、実験動物に多量に給餌した場合、心筋や骨格筋などに病的な変化が生ずることが、またグルコシノレート

は、家畜の甲状腺を肥大させることが知られている。しかし、育種改良が続けられ、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 μ mol 未満)の一般的にカノーラと呼ばれるセイヨウナタネが育成された。本組換えセイヨウナタネの母本となった Ebony もカノーラ品種である。

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

本組換えセイヨウナタネの中では遺伝子組換えにより改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質はシキミ酸経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことが確認されている。これまでにモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物(トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ及びテンサイ)の食品及び飼料安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含量に対照の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質発現による意図しない有害物質の産生性はないと判断される。

したがって、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。

20 交雑性；

セイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*、*B. juncea* 及び *H. incana* が存在するが、これらは栽培種又は帰化植物であるため、交雑に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物には該当しない。したがって、交雑に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物としては特定されなかった。このことから、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。

その他；

本組換えセイヨウナタネと交雑可能な帰化植物種であるセイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*H. incana*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis* 及び *B. nigra* との交雑によって形成された雑種がわが国の自然条件下で優占化した場合等には、交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、及び、交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、交雑した近縁種の個体群が縮小されることで、これら近縁種に依存して生息する昆虫などの野生生物の個体群に影響が生じる可能性、が考えられた。

35 本組換えセイヨウナタネと外来近縁種との交雑率は調査していない。しかし、本組換えセイヨウナタネと従来セイヨウナタネとの交雑率が、対照の非組換えセイヨウナタネと従来セイヨウナタネとの交雑率と変わるものではないことを試験により確認している。このことから、本組換えセイヨウナタネと上記近縁種との交雑率は、従来セイヨウナタネと上記近縁種との交雑率と同程度に低いと考えられる。よって、本組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネを含む外来近縁種の交雑性及び雑種後代が優占化する可能性を、既往の知見

に基づき検討した。

交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性については、第二の 4 で述べたとおり、種々の生殖的隔離障壁が存在することから、自然条件下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられた。

交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、除草剤耐性の形質が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても負担とならないという報告がある。このことから、改変 *cp4 epsps* 遺伝子が負担となり交雑した外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上から、本組換えセイヨウナタネと外来近縁種が交雑した場合に、交雑により生じた雑種後代が優占化し、その他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、及び、交雑により浸透した導入遺伝子が負担となり、交雑した近縁種の個体群が縮小されることで、これら近縁種に依存して生息する昆虫などの野生生物の個体群に影響が生じる可能性は極めて低いと判断された。

よって、総合的評価として、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、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

- Anonymous. 2004. Actual investigation of the fall-off of the imported rapeseeds. Pages 1-11 in
5 Bureau of Agriculture, Forestry and Fishery Technology Conference, Technical Safety Group:
Bureau of Agriculture, Forestry and Fishery Technology, Kashima, Japan.
- Aono, M., S. Wakiyama, M. Nagatsu, N. Nakajima, M. Tamaoki, A. Kubo and H. Saji. 2006.
10 Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environmental
Biosafety Research* 5: 77-87.
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family
15 encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1a: 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.
- 20 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant
5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington,
D.C.
- Beckie, H.J., S.I. Warwick, H. Nair and G. Séguin-Swartz. 2003. Gene flow in commercial fields of
25 herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications* 13: 1276-1294.
- Bing, D.J., R.K. Downey and G.F.W. Rakow. 1991. Potential of gene transfer among oilseed
Brassica and their weedy relatives. Pages 1022-1027 in GCIRC 8th International Rapeseed Congress,
Saskatoon, Canada.
- 30 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.
- 35 Cai, L., B.W. Zhou, X.L. Guo, C.H. Dong, X.J. Hu, M.S. Hou and S.Y. Liu. 2008. Pollen-mediated
gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chinese
Science Bulletin* 53: 2333-2341.
- CCC. 2012. Wide range of seed weights. Canola Council of Canada, Winnipeg, Manitoba.
40 <http://www.canolawatch.org/2012/04/25/wide-range-of-seed-weights/> [Accessed September 4,

2012].

CFIA. 2005. The biology of *Brassica napus* L. (Canola/rapeseed). BIO1994-09. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office, Ottawa, Ontario.

5 <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9409e.shtml> [Accessed November 8, 2010].

CFIA. 2010. Ebony. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office, Ottawa, Ontario.

<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbrpov/cropreport/can/app00001576e.shtml> [Accessed September 29, 2010].

10

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.

15

Chèvre, A.M., F. Eber, A. Baranger, G. Hureau, P. Barret, H. Picault and M. Renard. 1998. Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F₁ interspecific hybrids: An assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 90-98.

20

Chèvre, A.M., F. Eber, A. Baranger, M.C. Kerlan, P. Barret, G. Festoc, P. Vallée and M. Renard. 1996. Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic *Brassicas*. *Acta Horticulturae* 407: 169-179.

25

Choudhary, B.R. and P. Joshi. 1999. Interspecific hybridization in Brassica. "New horizons for an old crop". Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

30

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. *EMBO Journal* 3: 1671-1679.

35

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.

Crawley, M.J., R.S. Hails, M. Rees, D. Kohn and J. Buxton. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363: 620-623.

40

Crawley, M.J., S.L. Brown, R.S. Hails, D.D. Koh and M. Rees. 2001. Biotechnology-Transgenic

- crops in natural habitats. *Nature* 409: 682-683.
- Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-*enol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.
- 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.
- Downey, R.K. and G. Röbbelen. 1989. *Brassica* species. Pages 339-362 in *Oil Crops of the World*. G. Röbbelen, R.K. Downey, and A. Ashri (eds.). McGraw-Hill, New York, New York.
- EC. 2000. Opinion regarding submission for placing on the market of Glufosinate tolerant oilseed rape transformation event liberator PHOE 6/AC notified by the Hoechst scherung Agrevo Company [Now AVENTIS CROPS SCIENCE] (Notification C/DE/98/6) (Opinion adopted by written procedure following the SCP meeting of 30 November 2000). European Commission Scientific Committee on Plants-Genetically Modified Organisms, Paris, France.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out88_gmo_en.html.
- FAOSTAT. 2012. World Rapeseed Area harvested/Yield 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> [Accessed Sep. 10, 2012].
- 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.
- Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Pages 521-535 in *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Frello, S., K.R. Hansen, J. Jensen and R.B. Jørgensen. 1995. Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* x (*B. juncea* x *B. napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 236-241.
- 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.
- Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.

- Guéritaine, G., S. Bazot and H. Darmency. 2003. Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *New Phytologist* 158: 561-567.
- 5 Gulden, R.H., S.J. Shirtliffe and A.G. Thomas. 2000. Secondary dormancy in volunteer canola (*Brassica napus* L.). Pages 62-67 in Expert Committee on Weeds- Proceedings of the 2000 National Meeting, Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec.
- 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.
- 10 Hall, L.M., M.H. Rahman, R.H. Gulden and A.G. Thomas. 2005. Volunteer oilseed rape - Will herbicide-resistance traits assist fertility? Pages 59-79 in *Crop Fertility and Volunteerism*. J. Gressel (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 15 Harker, K.N., G.W. Clayton and R.K. Downey. 2002. GMO canola - Track record in Canada. Pages 1-4 in 2002 Oilseed Updates, Agribusiness Crop Updates, Perth, Australia.
- Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in 20 *The Shikimate Pathway*. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-16 in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
- 25 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.
- Herrmann, K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. K.M. Herrmann and R.L. Somerville (eds.). Addison-Wesley 30 Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 35 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 40 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.
- 5
- Lefol, E., A. Fleury and H. Darmency. 1996a. Gene dispersal from transgenic crops: II. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sexual Plant Reproduction* 9: 189-196.
- 10
- Lefol, E., V. Danielou and H. Darmency. 1996b. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research* 45: 153-161.
- Legere, A. 2005. Risks and consequences of gene flow from herbicide-resistant crops: canola (*Brassica napus* L) as a case study. *Pest Management Science* 61: 292-300.
- 15
- Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 239: 1142-1150.
- 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.
- 20
- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 201-212.
- 25
- Mizuguti, A., Y. Yoshimura, H. Shibaie and K. Matsuo. 2011. Persistence of feral populations of *Brassica napus* originated from spilled seeds around the Kashima seaport in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* 45: 181-185.
- Moyes, C.L., J.M. Lilley, C.A. Casais, S.G. Cole, P.D. Haeger and P.J. Dale. 2002. Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Molecular Ecology* 11: 103-112.
- 30
- Nishizawa, T., N. Nakajima, M. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo and H. Saji. 2009. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environmental Biosafety Research* 8: 33-44.
- 35
- Norris, C. and J. Sweet. 2002. Monitoring large scale releases of genetically modified crops (EPG 1/5/84). Incorporating report on project EPG 1/5/30: Monitoring releases of genetically modified crop plants. National Institute of Agricultural Botany, Cambridge, United Kingdom.
- 40

- OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (oilseed rape). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 7. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 5 OGTR. 2002. The biology and ecology of canola (*Brassica napus*). Australian Government, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, ACT, Australia.
- OGTR. 2008. The biology of *Brassica napus* L. (canola). Australian Government, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, ACT, Australia.
- 10 Padgette, S.R., N.B. Taylor, D.L. Nida, M.R. Bailey, J. MacDonald, L.R. Holden and R.L. Fuchs. 1996a. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition* 126: 702-716.
- 15 Padgette, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996b. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 20 Pekrun, C., T.C. Potter and P.J.W. Lutman. 1997. Genotypic variation in the development of secondary dormancy in oilseed rape and its impact on the persistence of volunteer rape. Pages 243-248 in *1997 Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, British Crop Protection Council, Brighton, United Kingdom.
- 25 Ramsay, G., C. Thompson and G. Squire. 2003. Quantifying landscape-scale gene flow in oilseed rape. Final Report of DEFRA Project RG0216: An experimental and mathematical study of the local and regional scale movement of an oilseed rape transgene. Department for Environment, Food and Rural Affairs, London, United Kingdom.
- 30 Rantio-Lehtimäki, A. 1995. Aerobiology of pollen and pollen antigens. Pages 387-406 in *Bioaerosols Handbook*. C.S. Cox and C.M. Wathes (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 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.
- 35 Ridley, W.P., R.S. Sidhu, P.D. Pyla, M.A. Nemeth, M.L. Breeze and J.D. Astwood. 2002. Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7235-7243.
- 40 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.
- 5 Saji, H., N. Nakajima, M. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo, S. Wakiyama, Y. Hatase and M. Nagatsu. 2005. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environmental Biosafety Research* 4: 217-222.
- 10 Salisbury, P. 2002. Pollen movement in canola (*Brassica napus*) and outcrossing between *B. napus* crops. University of Melbourne, Institute of Land and Food Resources, Melbourne, Australia.
- 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.
- 15 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.
- Scott, S.E. and M.J. Wilkinson. 1998. Transgene risk is low. *Nature* 393: 320.
- 20 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 16338-16346.
- 25 Snow, A.A. and R.B. Jørgensen. 1999. Fitness costs associated with transgenic glufosinate tolerance introgressed from *Brassica napus* ssp *oleifera* (oilseed rape) into weedy *Brassica rapa*. Pages 137-142 in *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. BCPC Symposium Proceedings No. 72. P.J.W. Lutman (ed.). British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom.
- 30 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.
- 35 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 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.
- 40 Timmons, A.M., E.T. O'Brian, 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.

- 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.
- Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- Wilkinson, M.J., I.J. Davenport, Y.M. Charters, A.E. Jones, J. Allainguillaume, H.T. Butler, D.C. Mason and A.F. Raybould. 2000. A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. *Molecular Ecology* 9: 983-991.
- 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.
- 稲永 忍 2000 油料作物 2 . ナタネ. 作物学 () — 工芸・飼料作物編 — 石井 龍一 (編) 文永堂出版 pp.108-118
- 角田 重三郎 2001 ナタネ ナタネの起源と特性 原産と来歴. 転作全書 3 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp.283-288
- 国土交通省 2012 河川環境データベース (2010年度調査結果)
http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkanky0/01/index.files/map_sch.jsp
[Accessed on Sep. 10, 2012]
- 財務省 2012 財務省貿易統計 (2011年の結果)
<http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=&P=> [Accessed on Sep. 10, 2012]
- 杉山 信太郎 2001 ナタネ 日本人とナタネ 日本人の生活とナタネ. 転作全書 3 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp.273-278
- 志賀 敏夫 2001 ナタネ 生育のステージと生理、生態 発芽から抽苔までの生理、生態 抽苔から開花までの生理、生態. 転作全書 3 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp.295-314
- 志賀 敏夫 1981 V 油料 . 工芸作物学 栗原 浩(編) 農山漁村文化協会 東京 pp.89 - 110
- 小川 潔・服部 保 2002 外来種タンポポ / セイタカアワダチソウ . 外来種ハンドブック 地

- 人書館 東京 pp.192-196
- 清水 矩宏・森田 弘彦・廣田 伸七 2008 アブラナ科．日本帰化植物写真図鑑 全国農村教育協会 東京 pp.85-115
- 5 中井 秀樹 2003 アブラナ科．日本の帰化植物 清水建美(編) 平凡社 東京 pp.80-96
- 日本生態学会 2002 付表 10 外来種リスト．外来種ハンドブック 地人書館 東京 p325
- 10 農業環境技術研究所 2007 輸入港周辺の遺伝子組換えナタネは、従来のナタネ生育地にしか生育していない．研究成果情報 平成18年度(第23集) 主要研究成果6
http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result23/result23_24.html [Accessed on Sep. 10, 2012]
- 15 農業環境技術研究所 2011 道路沿いのセイヨウナタネは草刈りなどの攪乱が多い環境に生育しやすい．研究成果情報 平成22年度(第27集) 主要研究成果10
http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result27/result27_24.html [Accessed on Sep. 10, 2012]
- 農業・生物系特定産業技術研究機構 2006 ナタネ．最新農業技術事典 農山漁村文化協会 東京 p.1124
- 20 農林水産省 2012 農林水産物輸出入概況 2011年(確定値)
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/Xlsdl.do?sinfid=000012894206> [Accessed on Sep. 10, 2012]
- 25 由比 進 2004 15.園芸作物 菜類 カラシナ類(カラシナ、タカナ)．新編農学大事典 養賢堂 東京 p.546

緊急措置計画書

平成24年11月22日

5

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎
住所 東京都中央区銀座四丁目10番10号

10

15 第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (改変 *cp4 epsps*, *Brassica napus* L.) (MON88302, OECD UI: MON-883Ø2-9) (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、科学的根拠に基づき立証された場合、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

20 平成24年11月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部

*: 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、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、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可能な限り情報収集を行う。

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

15 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、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。

20 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

25 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、モンサント・カンパニーの協力のもと、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は、環境中で生存しないように不活化する。

25

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

30 弊社は、信憑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。

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (改変 *cp4 epsps*, *Brassica napus* L.) (MON88302, OECD UI: MON-883Ø2-9) の別添資料リスト

- 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 *cp4 epsps* 遺伝子から推定した改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Summary of PCR Analysis to Confirm the Absence of Agrobacterium Used To Produce Glyphosate-Tolerant (Roundup Ready[®]) RR2 Canola MON 88302 (社外秘)
- 10 別添資料 3 Segregation of the *cp4 epsps* Coding Sequence in MON 88302 in the F₂, F₃ and F₄ Populations (RPN-10-085) (社外秘)
- 別添資料 4 Molecular Analysis of Glyphosate-Tolerant Roundup Ready[®] 2 (RR2) Canola MON 88302 (MSL0022523) (社外秘)
- 15 別添資料 5 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Canola Leaf Tissue of MON 88302 Across Multiple Generations by Western Blot Analysis Produced in U.S. Greenhouse during 2009-2010 (MSL0022592) (社外秘)
- 20 別添資料 6 Amended Report for MSL 0022681:Assessment of CP4 EPSPS Protein Levels in Canola Tissues Collected from MON 88302 Produced in United States and Canadian Field Trials during 2009 (MSL0023090) (社外秘)
- 別添資料 7 a) EndPoint TaqMan PCR with *FatA* Internal Control for Single Seed (BQ-QC-10760-03) (社外秘)
25 b) Supplemental File for BQ-QC-10760-03 Canola MON88302 EndPoint TaqMan PCR with *FatA* Internal Control for Single Seed (社外秘)
- 別添資料 8 除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (改変 *cp4 epsps*, *Brassica napus* L.) (MON88302, OECD UI: MON-883Ø2-9) 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)
- 30 別添資料 9 Assessment of the Effect of Heat Stress on Glyphosate Tolerant Canola MON 88302 under Growth Chamber Conditions (MSL0023177) (社外秘)
- 35 別添資料 10 a) Assessment of the Outcrossing Rate of Roundup Ready 2 Canola MON 88302 in 2009-2010 Field Trial in the US (PLC-09-422) (社外秘)
b) Assessment of the Outcrossing Rate of Ebony Canola in 2009-2010 Field Trial in the US (PLC-09-422) (社外秘)

40

別添資料 11 モニタリング結果報告書 (社外秘)