

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ(*gat4621, Brassica napus L.*)
(73496, OECD UI: DP-073496-4) 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
10	(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
	(2) 使用等の歴史及び現状	3
	(3) 生理学的及び生態学的特性	5
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
15	(1) 供与核酸に関する情報	8
	(2) ベクターに関する情報	14
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	14
	(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 ...	16
	(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	19
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	19
20	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	24
	(1) 使用等の内容	24
	(2) 使用等の方法	24
	(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方 法	25
25	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止す るための措置	25
	(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境で の使用等の結果	25
	(6) 国外における使用等に関する情報	25
30	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	26
	1 競合における優位性	26
	2 有害物質の産生性	27
	3 交雑性	28
	4 その他の性質	29
35	第三 生物多様性影響の総合的評価	31
	緊急措置計画書	33
	モニタリング計画書	35
	参考文献	37
	別紙リスト	37

第一種使用規程承認申請書

5

平成 22 年 3 月 1 日

農林水産大臣 赤松 広隆 殿
環境大臣 小沢 鋭仁 殿

10

氏名

デュポン株式会社

代表取締役社長 天羽 稔

申請者

15

住所

東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

20

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。

25

30

35

40

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ (<i>gat4621, Brassica napus</i> L.) (73496, OECD UI : DP-073496-4)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19-2 名称：デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 25 年 3 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えセイヨウナタネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該セイヨウナタネの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 虫媒による花粉の飛散を減少させるための防虫網を開花期に設置する。 (5) 本遺伝子組換えセイヨウナタネの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期に防鳥網を設置する。 <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 本遺伝子組換えセイヨウナタネ及び比較対照の非遺伝子組換えセイヨウナタネ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えセイヨウナタネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該セイヨウナタネが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えセイヨウナタネの栽培終了後は、当該セイヨウナタネ及び比較対照の非遺伝子組換えセイヨウナタネを隔離ほ場に鋤き込む等により、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えセイヨウナタネが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。 (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。 (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

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：セイヨウナタネ、セイヨウアブラナ

英名：Oilseed rape、Rapeseed

学名：*Brassica napus* L.

15

② 宿主の品種名又は系統名

宿主は 1822 系統セイヨウナタネである。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

セイヨウナタネは、ヨーロッパ、南北アメリカ、アジア、アフリカ、オセアニア等の温帯に分布し（日本帰化植物写真図鑑, 2001）、一般に、農地、野原、庭園、道路沿い及び廃棄物処理場等で自生している（OECD, 1997）。我が国においては、北海道から九州にかけて河原や線路沿いで自生し（日本帰化植物写真図鑑, 2001；日本の帰化植物, 2003）、港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育も確認されている（環境省, 2009；農林水産省, 2008）。

(2) 使用等の歴史及び現状

30

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

紀元前 2000～1500 年のサンスクリット語（インド）による文書では、セイヨウナタネが油糧用及びからし用に使用されていたことが言及されており、ヨーロッパでは中世に栽培化された（OECD, 1997）。現在、ナタネは、ダイズ、綿実に次ぐ重要な植物油脂原料である。我が国には明治時代初期に欧米から導入され、現在、青森県、北海道、鹿児島県等で地域資源作物として栽培されている（農学大事典, 2004）。

40

従来のナタネの種子中には、ヒトや動物に有害と考えられるエルシン酸やグルコシノレートが含まれている（OECD, 2001）。エルシン酸は脂肪酸の 1 つで、心機能障害を起こす可能性が示されている。また、グルコシノレートは含硫配糖体の総称で、甲状腺肥大作用がある。したがって、両物質の含量が低いナタネ品種が各国で育成され（農学大事典, 2004）、カナダではカノーラという名称で登録さ

れており (OECD, 2001)、カノーラの搾油後の油かすは飼料として広く用いられている (OGTR, 2008)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

栽培地域：

世界の上位生産国は、カナダ、中国及びインドである (FAOSTAT, 2010)。我が国では、北海道、青森及び鹿児島等で地域振興作物として栽培されている (農学大事典, 2004)。

10

栽培方法：

セイヨウナタネには秋播き性の高い品種と春播き性の高い品種とがある。西部・中部ヨーロッパ、韓国及び我が国等では、秋播き性の高い品種の冬作が行われ、中部スウェーデンやカナダのように寒冷な地域では、春播き性の高い品種の夏作が行われている (農業技術体系, 1996)。

15

我が国では、東北地方のような寒地では 8~9 月に播種し、翌年の 6~7 月に収穫する。また、九州のような暖地では 10~11 月に播種し、翌年の 4~5 月に収穫する。水田の裏作や畑作の輪作体系中の作物として利用される (作物学各論, 1999)。

20

流通実態：

セイヨウナタネを含む油糧用ナタネの、2008 年における全世界総生産量は 5,786 万トンで、上位 3 カ国はカナダ (1,264 万トン)、中国 (1,210 万トン)、インド (583 万トン) であった (FAOSTAT, 2010)。

25

2008 年における我が国への油糧用ナタネの総輸入量は 231 万トンで、主要輸入相手国はカナダ (221 万トン) であった (財務省貿易統計, 2009)。2008 年の我が国におけるナタネ油生産量は、輸入原料由来のものが 95 万トンで国産原料が 253 トン、油かすの生産量は、輸入原料が 126 万トンで国産原料が 387 トンであった (農林水産省, 2009a)。また、2008 年度に配合・混合飼料用原料として使用されたナタネ油かすの量は 102 万トンであった (配合飼料供給安定機構, 2009)。

30

我が国の 2004 年におけるナタネ総生産量 1,255 トンで、上位 3 都道府県は、青森県 (547 トン)、北海道 (423 トン)、鹿児島県 (105 トン) であった (農林水産省, 2006)。

35

用途：

搾油・精製された油は、食用、食品加工油脂及び工業用原料として利用される。搾油後の油かすは飼肥料となる。また、専用品種における抽苔後の若い葉や花茎、蕾が、緑黄色野菜として利用される (農学大事典, 2004)。

40

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

5

葉は、しばしば白粉状のロウ質に覆われ（農学大事典, 2004）、濃青緑色で、滑らか又は縁に毛が散在することもあり、茎の一部を抱く。分枝が多く、その程度は品種や環境に依存する。分枝は、茎の最上位葉の軸に由来し、末端に花序を生じる。花序は長い総状花序、花は黄色で、頂部は房状になるが、頂芽より高くなることはない。開花は花序の基部から上に進む。花は、4 枚の花弁を十字の形で有する（OECD, 1997）。

10

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15

セイヨウナタネは一般に冷涼な気候を好む。12～30℃で生育し、最適生育温度は20℃をわずかに超えた程度である（CFIA, 1994）。我が国では北海道や九州で栽培可能で（農学大事典, 2004）、秋播き性の高い品種の場合、ヨーロッパ北部や北海道等の極寒地方でも、秋期にある程度の大きさまで生長すれば越冬可能である（農業技術体系, 1996）。幼苗期や越冬直後は湿害を受けやすく、排水不良のほ場では生育不良や枯死することもある（農学大事典, 2004）。

20

ハ 捕食性又は寄生性

—

25

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

30

種子が成熟するにしたがって莢は乾燥し、下部から裂開して種子を放出する。莢は、割れやすい（農業技術体系, 1996）。莢当たり種子数は15～25粒である（OGTR, 2008）。

35

成熟種子は休眠性を示さないが、発芽に適さない環境条件下では休眠（2次休眠）することがある。2次休眠は、急激な温度変化、水分欠乏、長期間の暗条件及び酸素欠乏によって誘導され、2～4℃の低温条件や高温と低温を切り替えることによって打破される（OGTR, 2008）。

40

室内保存した場合、収穫後4年目でほぼ発芽しなくなるが、乾燥状態で保存した場合、6年目でも80%の発芽力を示す（農業技術体系, 1996）。また、土壌中に休眠種子が鋤き込まれた場合、少なくとも5年間は発芽力が維持され、16年目でも1%の発芽率を示したと報告されている（OGTR, 2008）。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

5 自然条件下で、種子以外に植物体を再生することができる組織又は器官は知られていない。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

10

基本的に自殖であり、5~30%の他殖率を示す (OECD, 1997)。自家不和合性は有さない (農業技術体系, 1996)。

15 セイヨウナタネと自然交雑可能な近縁野生種 (OECD, 1997; OGTR, 2008) のうち、我が国に生育する種は、カラシナ (*B. juncea*; 1976 年以前渡来)、クロガラシ (*B. nigra*; 1947 年以前渡来)、アブラナ (在来ナタネ; *B. rapa*; 奈良時代以前渡来)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*; 1954 年以前渡来)、セイヨウノダイコン (*Raphanus raphanistrum*; 1929 年以前渡来) 及びノハラガラシ (*Sinapis arvensis*; 1928 年以前渡来) である。これらの近縁野生種は栽培等
20 を通じて日本に帰化した外来種で、耕作地、荒地、路傍、河川及び港湾周辺で生育する (外来種ハンドブック, 2002; 国土交通省, 2009; 日本帰化植物写真図鑑, 2001; 日本の帰化植物, 2003; 農学大事典, 2004; 農林水産省, 2008; 新牧野日本植物圖鑑, 2008)。

25 セイヨウナタネとカラシナ、アブラナ、セイヨウノダイコン及びノハラガラシとの交雑率は、それぞれ 3~4.7%、0~15.7%、0.05%以下及び 0~3.7%である (農業技術体系, 1996; OGTR, 2008)。クロガラシとは自然条件下での交雑は観察されなかった (Bing *et al.*, 1996)。ダイコンモドキの場合、セイヨウナタネとダイ
30 コンモドキを 625 : 1 の比率で栽培した場合でも 1.5%と報告されている (OGTR, 2008)。

セイヨウナタネにはアポミクシスの特性を有するとした報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

35

セイヨウナタネの花は、1花当たり約7~9万粒の花粉を生じる (Takahata *et al.*, 2008)。花粉は黄色で 3 つに縦にくびれた楕円形をしており、その長径は 37~39 μ m、短径は 20~22 μ m である (農業技術体系, 1996)。

40 花粉の媒介方法は、隣接して生育する株との接触、虫媒又は風媒である。長距離の花粉媒介は、主にミツバチやマルハナバチ等の昆虫による虫媒による (OECD, 1997)。ミツバチの行動半径は、巣から 1~2km、最大 4km となることもあるが、ハチの飛行距離のほとんど (最大 80%) は 1m 未満で、花粉の飛散距離は 5m 未

満である (OGTR, 2008)。ミツバチの巣箱を設置して行ったセイヨウナタネの交雑試験の結果、1m で交雑率 1.5%、47m で 0.00033%であった (OECD, 1997)。風による花粉の飛散距離は、ほとんどが 10m 未満で、長距離の花粉媒介における風媒の寄与はごくわずかである。花粉の発芽率は 4~5 日かけて徐々に減少する (OGTR, 2008)。

5

ホ 病原性

—

10

へ 有害物質の産生性

従来のセイヨウナタネの種子中には、動物に有害と考えられるエルシン酸やグルコシノレートが含まれる (OECD, 2001)。両物質の含量が低いナタネ品種が各国で育成され (農学大事典, 2004)、カナダではカノーラという名称で登録されており (OECD, 2001)、カノーラの搾油後の油かすは飼料として広く用いられている (OGTR, 2008)。本組換えセイヨウナタネの宿主として用いた 1822 系統もカノーラである。

15

20

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

5

イ 構成及び構成要素の由来

10 除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ(*gat4621*, *Brassica napus* L.) (73496, OECD UI : DP-073496-4) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」と表記)における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (8ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列は別紙 1 の図 1 (社外秘情報につき非開示) に示した。

ロ 構成要素の機能

15 ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

供与核酸の各構成要素の機能を表 1 (8ページ) に示した。

20 表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>UBQ10</i> プロモーター	1,305	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来 <i>UBQ10</i> ポリユビキチン遺伝子の構成的発現プロモーター領域で、転写を開始する (Norris <i>et al.</i> , 1993)。
<i>gat4621</i>	444	<i>Bacillus licheniformis</i> の 3 つの株 (ST401 株、B6 株及び DS3 株) 由来の <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を基に、遺伝子を制限酵素処理し、PCR 法によりランダムに再構築する技術を用いて作製された改変型グリホサート <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (改変 <i>gat</i> : 以下、「 <i>gat4621</i> 遺伝子」と表記) (Castle <i>et al.</i> , 2004; Siehl <i>et al.</i> , 2007; GenBank Accession No: CS022547)。除草剤グリホサートを <i>N</i> -アセチル化する <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (改変 GAT: 以下、「GAT4621 蛋白質」と表記) をコードする。
<i>pinII</i> ターミネーター	310	バレイショ (<i>Solanum tuberosum</i>) 由来プロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。

- 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

a 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

10 *gat4621* 遺伝子の発現により産生される GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化活性 (以下、「グリホサート *N*-アセチル化活性」と表記) を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼで、147 個のアミノ酸からなり、分子量は約 17kDa である。本蛋白質のアミノ酸配列を別紙 1 の図 2 (社外秘情報につき非開示) に示した。

15 除草剤グリホサートは、植物におけるシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 活性を阻害する。その結果、芳香族アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる (図 1、11ページ)。これに対し、GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えるため、除草剤グリホサートに対する耐性を植物に付与する。この GAT4621 蛋白質をコードする遺伝子は、以下に示す方法で作出した。

20

a-1 GAT4621 蛋白質をコードする遺伝子の作出

25 はじめに、グリホサート *N*-アセチル化活性を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼの探索を行った。グリホサート *N*-アセチル化活性の指標には、マススペクトル法により測定した *N*-アセチルグリホサート量を用いた。その結果、デュポン社保有のバチルス属微生物の中から、グリホサート *N*-アセチル化活性を示した *B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株を選抜し、それぞれのゲノム DNA から *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングした。これら 3 つの遺伝子を植物に導入したが、除草剤グリホサートに対する耐性を付与することはできなかった。

30

35 そこで、*N*-アセチルトランスフェラーゼの活性を高めるために、*N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の改変を行った。既に実用化されており、植物に除草剤グリホサート耐性を付与する PAT 蛋白質も *N*-アセチルトランスフェラーゼであることから、改変に当たっては、本蛋白質の活性レベルを参考にした。PAT 蛋白質のグリホサートに対する k_{cat}/K_M 値¹⁾は 20,400 min⁻¹ mM⁻¹で、野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの約 5,000 倍の活性を示すことが報告されている (Siehl *et al.*, 2005)。したがって、本改変においても、*B. licheniformis* 株の野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの約 5,000 倍の活性を改変の目標とした。

40

¹⁾ k_{cat} は酵素反応速度定数を、 K_M は基質に対する親和性を、 k_{cat}/K_M 値は基質に対する触媒効率を示す。

5 5 改変は、クローニングした上記 3 つの *B. licheniformis* 株の野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を用い、以下の DNA シャッフリング法で行った (Castle *et al.*, 2004; Keenan *et al.*, 2005)。

5 1) クローニングした遺伝子を DNA 消化酵素で断片化し、プライマーを添加しない PCR で増幅した後、基となった遺伝子の両端部分をプライマーとした PCR を行い遺伝子を再構築した。

2) 再構築した遺伝子を大腸菌に導入し、グリホサート *N*-アセチル化活性を示すコロニーを選抜した。

10 3) 選抜したコロニーのうち、高い *N*-アセチル化活性を示すクローンを複数選抜し、遺伝子をクローニングした。

15 部位特異的変異による遺伝子改変も加えながら、1)~3)の工程を 11 回繰り返した結果、目標の活性を持つ改変型 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*gat4621* 遺伝子) を選抜した。本遺伝子の塩基配列を別紙 1 の図 1 の下線部 (社外秘情報につき非開示) に示した。

20 *gat4621* 遺伝子が発現する GAT4621 蛋白質は、元の野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの 3,700~5,500 倍の活性を示す (k_{cat}/K_M 値 = 6,719 min⁻¹ mM⁻¹)。本蛋白質は、野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼと 75~78% のアミノ酸配列相同性を有する (別紙 1 の図 2 ; 社外秘情報につき非開示)。

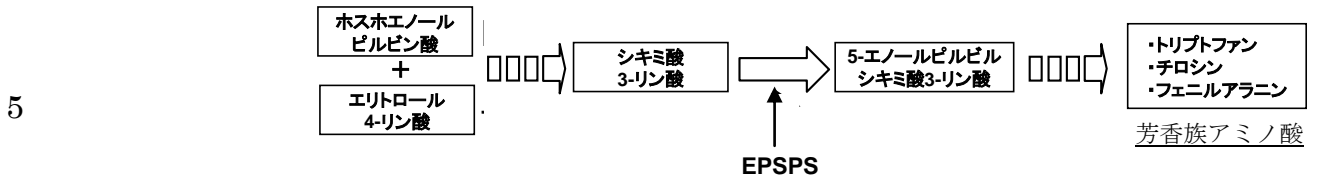
a-2 GAT4621 蛋白質の除草剤耐性の確認

25 GAT4621 蛋白質によって植物に十分な除草剤グリホサート耐性が付与されることを確認するため、除草剤散布試験を行った結果、本組換えセイヨウナタネにおいて薬害は認められなかった (表 3、18 ページ)。

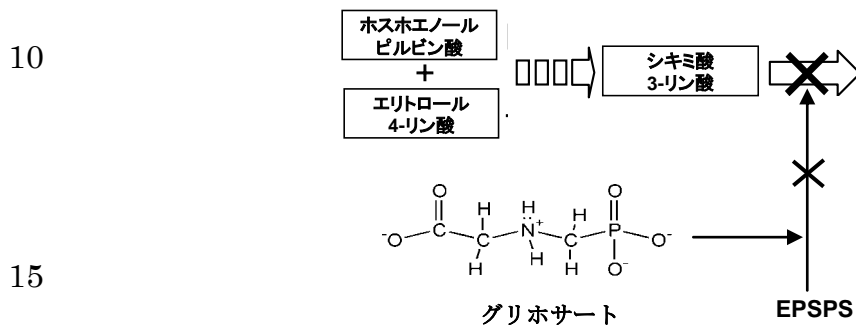
b 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

30 GAT4621 蛋白質と既知のアレルゲンとの構造相同性を検討するため、ネブラスカ大学の Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) が提供するアレルゲンデータベース (Release 9 - January 2009) と、FASTA34 アルゴリズム (Pearson and Lipman, 1988) を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。本データベース中には、1,386 件の既知アレルゲンのアミノ酸配列が含まれる。本データベースを用いて解析を行った結果、GAT4621 蛋白質と相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。

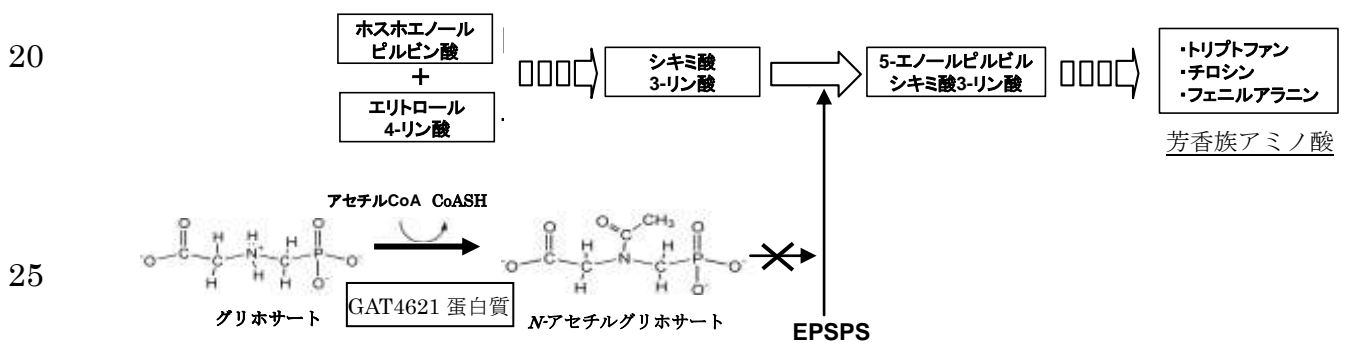
i) 非組換えセイヨウナタネへの除草剤非散布時



ii) 非組換えセイヨウナタネへの除草剤グリホサート散布時



iii) 本組換えセイヨウナタネへの除草剤グリホサート散布時



30 図 1 GAT4621 蛋白質の作用機作

i) EPSPS は、5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸の合成に関わる酵素であり、5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸は、トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸の合成に用いられる。

35 ii) 非組換えセイヨウナタネにおいては、除草剤グリホサートにより EPSPS 活性が阻害される結果、芳香族アミノ酸が合成できなくなり植物は枯死する。

iii) 本組換えセイヨウナタネにおいては、GAT4621 蛋白質が除草剤グリホサートの N-アセチル化を触媒し、EPSPS 活性を阻害しない N-アセチルグリホサートに変えるため、トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸合成が可能になる。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5 GAT4621 蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させるかどうかについて、はじめに、蛋白質の高次構造を基に基質となり得る化合物の推定を行った。次に、可能性があると考えられた低分子化合物について触媒活性を測定して確認した。

GAT4621 蛋白質の基質となり得る化合物

10 蛋白質の高次構造から基質となり得る化合物を検討するに当たり、既に研究が行われている GAT4602 蛋白質の評価結果 (Siehl *et al.*, 2005) を参考とした。

15 GAT4602 蛋白質においては、除草剤グリホサートの *N*-アセチル化反応の活性中心は当該蛋白質の内部奥にあり、除草剤グリホサートは内部に取り込まれ、そこに補酵素のアセチル CoA が結合して反応する (Keenan *et al.*, 2005; Siehl *et al.*, 2007)。このことは、除草剤グリホサートのような低分子化合物だけが、立体障害を受けずに活性中心に到達し本蛋白質の基質となり得ること、すなわち高分子化合物が本蛋白質の基質となる可能性の低いことを示唆している。したがって、高分子化合物は GAT4602 蛋白質の基質にならないと推定した。

20 しかしながら、*N*-アセチルトランスフェラーゼは、生体内高分子アミンである蛋白質の N 末端アミノ酸、ヒストン等のアミノ酸側鎖をアセチル化することが知られている (生化学辞典, 1998)。そこで、実際に生体内高分子アミン類に対する GAT4602 蛋白質の基質特異性を評価したが、生体内高分子アミンであるヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン及び tRNA は GAT4602 蛋白質の基質とはならなかった (Siehl *et al.*, 2005)。したがって、GAT4621 蛋白質においても、同様に高分子化合物は基質にならないと推定した。

30 これら GAT4602 蛋白質及び GAT4621 蛋白質は、いずれもグリホサート *N*-アセチル化触媒活性を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼである。GAT4602 蛋白質は、GAT4621 蛋白質と 91%のアミノ酸配列相同性を有し、高次構造も類似していると考えられる。また、GAT4602 蛋白質の活性中心の 4つのアミノ酸残基 (Siehl *et al.*, 2007) は、GAT4621 蛋白質でも保存されている。したがって、GAT4602 蛋白質の評価結果を基に、GAT4621 蛋白質の基質となり得る化合物を推定できると考えた。なお、*N*-アセチルトランスフェラーゼは、生体内低分子アミンもアセチル化することが知られているため (生化学辞典, 1998)、D-グルコサミン、セロトニン、アントラニレート、オルニチン、プリン及びピリミジン塩基についても評価したが、これら低分子アミンも GAT4602 蛋白質の基質ではなかった (Siehl *et al.*, 2005)。したがって、GAT4621 蛋白質においても、同様に上記の低分子アミンは基質にならないと推定した。

GAT4621 蛋白質の基質となることが考えられた低分子化合物に対する触媒活性の測定

次に、GAT4621 蛋白質の基質となることが考えられた低分子化合物に対する触媒活性を、GAT4621 蛋白質により測定した。本実験では検出力を高めるために、*N*-アセチル化反応における反応産物である coenzyme A を 30 分間蓄積させた量で判定した。基質には、アミノ酸 (21 種)、農薬 (除草剤、殺虫剤及び殺菌剤 20 種)、抗生物質 (カナマイシンやアンピシリン等、10 種) を用いた。

その結果、対照として用いたグリホサートの他、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、セリン及びグリシンの 5 種のアミノ酸に対して触媒活性が認められた。しかしながら、その中で比較的高い coenzyme A の蓄積量を認めたアスパラギン酸とグルタミン酸においても、その蓄積量はグリホサートの場合の約 3% であった。

そこで、生体内でも GAT4621 蛋白質によって上記 5 種のアミノ酸がアセチル化されるかを調べるため、前述の k_{cat}/K_M 値の測定 (本文第一. 2. (1) . ロ. ②、10 ページ) で用いた反応液に 100mM KCl を加え、生体内に近いイオン強度条件にした反応液を用い、触媒活性の測定を行った。本試験においては、グリホサートと構造が類似する 4 種類の化合物 (D-2-アミノ-3-ホスホノプロピオネート、L-2-アミノ-3-ホスホノプロピオネート、DL-2-アミノ-4-ホスホノブチレート、DL-2-アミノ-5-ホスホノペンタノエート) も基質として用いた。その結果、GAT4621 蛋白質のグリホサートに対する k_{cat}/K_M 値が $1,063 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であったのに対し、アスパラギン酸及びグルタミン酸に対しては $12.1 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と $8.32 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であった。また、トレオニンとセリンに対しては $0.605 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 以下で、グリシン及びグリホサート類似化合物に対しては触媒活性が認められなかった。

N-アセチルアミノ酸

上述のように、生体内に近い反応条件で、GAT4621 蛋白質がアミノ酸に対して触媒活性を有することが認められたため、本組換えセイヨウナタネにおいて、*N*-アセチルアミノ酸が非組換えセイヨウナタネに比べ増加する可能性が考えられた。今後、本組換えセイヨウナタネの *N*-アセチルアミノ酸含有量及びアミノ酸組成を測定する予定である。

しかしながら、*N*-アセチルアミノ酸は、本組換えセイヨウナタネ中に新たに産生された成分ではない。実際に分析を行った結果、肉類、穀類、野菜、果物等の動植物中にもこれら *N*-アセチルアミノ酸が含まれていた (別紙 2 ; 社外秘情報につき非開示)。

なお、*gat4621* 遺伝子を導入したトウモロコシ DP-098140-6 においても、*N*-アセチルアミノ酸の有意な増加が認められたが、ブロイラーの飼養試験及びラッ

トの 90 日経口投与毒性試験結果から、DP-098140-6 は非組換えトウモロコシと栄養学的及び毒性学的に同等であることが示されている (McNaughton *et al.*, 2008; Appenzeller *et al.*, 2009)。

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10 本組換えセイヨウナタネの作出に用いたベクターは、プラスミド PHP28181 である (図 2、15ページ)。プラスミド PHP28181 は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pUC19 から作成された。プラスミド PHP28181 を制限酵素 *Hind* III(1) 及び *Not* I(2,113)で切断して直鎖状 DNA 断片 PHP28181A を切り出し、核酸の移入に用いた。

15 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

20 プラスミド PHP28181 及び直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の塩基数は、それぞれ 4,770 bp 及び 2,112 bp である。直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の塩基配列を別紙 1 の図 1 (社外秘情報につき非開示) に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

25 プラスミド PHP28181 の外骨格領域には、抗生物質アンピシリン耐性遺伝子の *bla*(Ap^R) (Sutcliffe, 1978; Yanisch-Perron, *et al.*, 1984)が含まれる。本遺伝子は、微生物中でベクターを増殖させる際に、形質転換プラスミドを含む微生物を含む微生物を選抜するために必要なマーカーとして機能する。本抗生物質耐性遺伝子は、宿主には導入されていないことが確認されている。

30

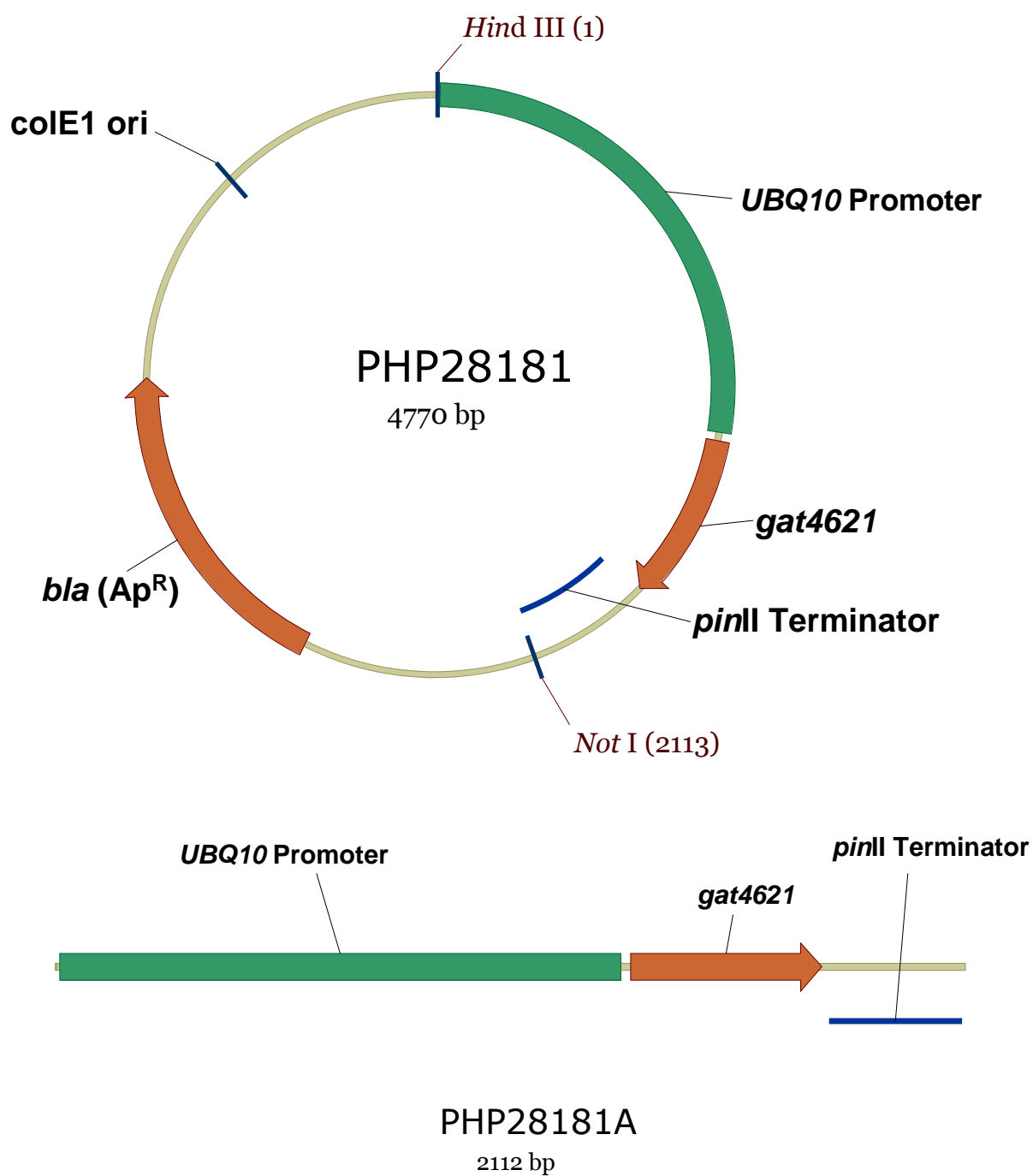
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

これらベクターに感染性はない。

35 (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

40 核酸の移入に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP28181A における供与核酸の構成を、図 2 (15ページ) に示した。



5

図 2 プラスミド PHP28181 及び直鎖状 DNA 断片 PHP28181A における
供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位

図の上段：プラスミド PHP28181。

10 図の下段：プラスミド PHP28181 から制限酵素 *Hind III* 及び *Not I* によって
切り出される直鎖状 DNA 断片 PHP28181A。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A をパーティクルガン法により移入した。

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方法

10 除草剤グリホサートを添加した培地で胚を 2 週間生育させ、除草剤グリホサート耐性の胚を選抜した (T0 世代)。

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

15

—

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

20

本組換えセイヨウナタネの育成経過を図 3 (16ページ; 社外秘情報につき非開示) に示した。本申請における承認対象の範囲は、T1以降である。

25

(社外秘情報につき非開示)

図 3 本組換えセイヨウナタネの育成経過

30

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

35 本組換えセイヨウナタネの T1F2 及び T3F3 世代 (図 3、16ページ; 社外秘情報につき非開示) を用い、除草剤グリホサート耐性を指標として *gat4621* 遺伝子の分離比を検定した (別紙 3 の APPENDIX 1; 社外秘情報につき非開示)。その結果、表 2 (17ページ) に示すように、除草剤グリホサート耐性の有無は、期待値の 3:1 に一致していた。したがって、*gat4621* 遺伝子はメンデルの法則に従い
40 安定して伝達されているため、移入された核酸の複製物は、セイヨウナタネ染色体ゲノム上に存在すると考えられた。

表 2 除草剤グリホサート耐性を指標とした *gat4621* 遺伝子の分離比

世代	期待値		実測値		χ^2 値 *
	耐性個体数	感受性個体数	耐性個体数	感受性個体数	
T1F2	56	19	54	21	0.360
T3F3	74	25	72	27	0.273

T1F2 及び T3F3 世代を温室で栽培し、それぞれ播種 14 及び 10 日後に除草剤グリホサート 2.7 kg a.e./ha (米国及びカナダにおける農薬登録の最大使用量の 4 倍量) を散布し、7 日後に耐性の有無を評価した (a.e. = acid equivalent)。耐性個体：生存個体。感受性個体：枯死個体。

5 * 統計学的有意差なし。5%水準における帰無仮説棄却限界は 3.84 であり、 χ^2 値はいずれも 3.84 未満であった。

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

10 移入された核酸の複製物のコピー数及び安定性を確認するため、T2 世代 12 個体及び T3F2 世代 98 個体の葉を用いて、*gat4621* 遺伝子特異的なプライマーとプローブによる定量 PCR 分析を行った (別紙 3 の APPENDIX 2 ; 社外秘情報につき非開示)。その結果、両世代とも遺伝子発現カセットが 1 コピー移入され、導入遺伝子が安定して伝達されていることが確認された。なお、遺伝子発現カセットの完全性については、本組換えセイヨウナタネの T1 世代の葉を用い、*UBQ10* プロモーター、*gat4621* 及び *pinII* ターミネーターの領域を増幅するプライマーによる PCR 分析により確認した (別紙 3 の APPENDIX 3 ; 社外秘情報につき非開示)。

20 さらに、コピー数、安定性及び完全性を確認するため、T2 及び T3 世代各 2 個体の葉を用い、サザンブロット分析を行った (別紙 5 ; 社外秘情報につき非開示)。その結果、上述の PCR 分析の結果と同様、両世代とも完全な遺伝子発現カセットが 1 コピー移入され、導入遺伝子が安定して伝達されていることが確認された。

25 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

—

30 ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

35 本組換えセイヨウナタネにおける GAT4621 蛋白質の発現安定性を確認するため、除草剤散布試験及び ELISA 法による分析を行った (別紙 3 の APPENDIX 4 及び 5 ; 社外秘情報につき非開示)。

除草剤散布試験

T2 及び T3 世代を用いた除草剤グリホサート散布試験の結果、本組換えセイヨウナタネに付与された除草剤耐性の形質が、複数世代にわたり安定的に遺伝

していることが確認された（表 3、18ページ）。

表 3 除草剤散布に対する耐性

本組換え セイヨウナタネ		非組換え セイヨウナタネ ³⁾
T2世代 ¹⁾	7.9 ± 0.4 (7 - 8)	1.0 ± 0
T3世代 ²⁾	8.8 ± 0.4 (8 - 9)	

T2 及び T3 世代を栽培し、3～4 葉期（BBCH 13-14）に除草剤グリホサート 2.7 kg a.e./ha を散布し、各々14 及び 11 日後に 1～9 のスケールで耐性を評価した。1：枯死。3：重度のクロロシス、壊死斑点及び生育阻害がある。5：中度～重度のクロロシスがあり、ネクロシスは認められず、多少の生育阻害がある。7：軽度のクロロシスがあり、ネクロシス及び生育阻害はなく、クロロシスから完全回復する。9：健全。結果は、平均値±標準偏差（最小値－最大値）で表した。

1) n=8。2) n=64。3) 1822 系統、n=8。

ELISA 分析

T3 及び T3F1 世代を用いた ELISA 法による蛋白質発現量測定の結果、GAT4621 蛋白質が、複数世代において産生されていることが確認された（表 4、18ページ）。

表 4 葉における GAT4621 蛋白質の発現量

本組換え セイヨウナタネ		非組換え セイヨウナタネ ³⁾
T3 世代 ¹⁾	9.1 (7.0 - 11)	検出されず
T3F1 世代 ²⁾	8.8 ± 0.91 (7.4 - 10)	

結果は、平均値±標準偏差（最小値－最大値）（ng/mg 乾物重）で表した。

1) n=2。T3 世代の 10 個体を栽培し、播種 24 日後に葉を採取し、5 個体ごとにまとめて計 2 サンプルとした。

2) n=7。本組換えセイヨウナタネ T3 世代と、非組換えセイヨウナタネ（1822 系統を除く。図 3、16ページ（社外秘情報につき非開示）参照）を掛け合わせて作出したハイブリッド 7 系統それぞれについて 16 個体を栽培し、播種 24 日後にハイブリッドごとに葉を採取し、16 個体ごとにまとめて計 7 サンプルとした。

3) 1822 系統、4474 系統、4082×3932 系統及び 5536×3932 系統。n=4。

- 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

移入された核酸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

5 本組換えセイヨウナタネの検出及び識別には、抽出した DNA を用い、以下の条件で PCR 分析を行う。

- 特異的プライマー対：UBQ10 プロモーターと *gat4621* 遺伝子の境界領域を増幅する（別紙 1 の表 1；社外秘情報につき非開示）
- 内在性遺伝子プライマー対：セイヨウナタネ内在性 FatA 遺伝子(Genbank accession number X87842.1) を増幅し、陽性対照として用いる（別紙 1 の表 1；社外秘情報につき非開示）
- アニーリング温度：65 °C
- サイクル数：35 回

15 特異的プライマー対を用いた場合の増幅産物のサイズは 675 bp、内在性遺伝子プライマー対の場合、506 bp である。

20 本法の感度を確認するため、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネから抽出した各 100 ng の DNA を用いて PCR 分析を行った（別紙 3 の APPENDIX 7；社外秘情報につき非開示）。その結果、特異的プライマー対を用いた場合、本組換えセイヨウナタネだけに約 600 bp のバンドが検出され、内在性遺伝子プライマー対を用いた場合、いずれにおいても約 450 bp のバンドが検出された。また、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネ各 3 個体において同じ結果が得られており、本法の信頼性も確認されている。

25 なお、本組換えセイヨウナタネを食用又は飼料用等として第一種使用等申請するまでに、系統特異的な識別方法を開発する予定である。

30 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- ① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

35 本組換えセイヨウナタネに付与された特性は、*gat4621* 遺伝子がコードする GAT4621 蛋白質による除草剤グリホサート耐性である。

- 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

40 a 形態及び生育の特性

2008 年にカナダの 7 ヶ所（マニトバ州 3 ヶ所、アルバータ州 2 ヶ所、オンタリオ州 1 ヶ所及びサスカチュワン州 1 ヶ所）のほ場において、本組換えセイヨウナ

5 タネ T3 世代及び非組換えセイヨウナタネ 1822 系統を用い、形態及び生育の特性として、初期の草勢、開花までの日数、成熟までの日数、草丈、種子含水率、収量について調査した（別紙 3 の APPENDIX 8；社外秘情報につき非開示）。試験は 3 反復で、2008 年 5 月に播種、9 月に収穫し、線形混合モデルを用いた統計解析を行った。

10 本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの間で初期の草勢、開花までの日数及び収量に統計学的有意差 ($P < 0.05$) が認められた（表 5、21 ページ）。しかしながら、開花までの日数の差は 1 日であり、収量は本組換えセイヨウナタネで 2,140 kg/ha、非組換えセイヨウナタネで 2,310 kg/ha であった。その他の特性について統計学的有意差は認められなかった。我が国の隔離ほ場試験において、品種登録制度における「なたね種」審査基準（農林水産省, 2010）を参考に、形態及び生育特性を調査する予定である。

表 5 形態及び生育の特性

形 質		本組換え セイヨウナタネ (T3 世代)	非組換え セイヨウナタネ (1822 系統)
初期の草勢 ¹⁾	平均値	7.37	6.50
	範囲	6 - 8	6 - 7
	標準偏差	0.866	0.441
	P 値	0.0395 ⁴⁾	
開花までの 日数 ²⁾	平均値	45.7	44.6
	範囲	42 - 49	40 - 50
	標準偏差	2.78	3.09
	P 値	0.000218 ⁴⁾	
成熟までの 日数 ³⁾	平均値	92.8	93.0
	範囲	89 - 105	87 - 106
	標準偏差	5.71	5.99
	P 値	0.468	
草丈 (cm) ²⁾	平均値	91.6	89.5
	範囲	60 - 118	65 - 115
	標準偏差	15.0	14.5
	P 値	0.355	
種子含水率 (%) ²⁾	平均値	7.76	7.74
	範囲	5.8 - 11.1	5.4 - 10.4
	標準偏差	1.76	1.73
	P 値	0.864	
収量 (kg/ha) ²⁾	平均値	2,140	2,310
	範囲	1,140-2,910	1,020 - 3,500
	標準偏差	573	666
	P 値	0.0311 ⁴⁾	

1) 3ヶ所×3反復 (n=9)。4~6葉期に1~9のスケールで判定。1:植物体は弱くて健全でなく、葉の被覆率は低い。3:植物体は弱く、葉の被覆率は低~中程度。5:植物体は健全だが小さく葉の被覆率は低~中程度。7:植物体は強く健全で、葉の被覆率は中程度。9:植物体は強く健全で、葉の被覆率は高い。

2) 7ヶ所×3反復 (n=21)。

3) 6ヶ所×3反復 (n=18)。

4) 統計学的有意差 (P<0.05) 有り。

5

10

b 生育初期における低温又は高温耐性

5 本組換えセイヨウナタネ T3F3 ハイブリッド世代及び非組換えセイヨウナタネ
5536×1822 系統を、米国 1 ヶ所（ワシントン州）及びカナダ 2 ヶ所（サスカチ
ュワン州及びマニトバ州）のほ場で 2009 年に栽培した。観察を行った播種後約 1
ヶ月間の週平均最低／最高気温は、ワシントン州ほ場 6.8℃／29.4℃、サスカチ
ュワン州ほ場 6.1℃／25.3℃、マニトバ州ほ場 3.9℃／26.1℃であった。その結果、
10 生育障害は見られず、両者間で初期の生育に相違は観察されなかった。我が国に
おける隔離ほ場試験で生育初期における低温及び高温耐性を調査する予定である。

c 成体の越冬性又は越夏性

15 本組換えセイヨウナタネ T3F3 ハイブリッド世代及び非組換えセイヨウナタネ
5536×1822 系統を、米国 1 ヶ所（ワシントン州）及びカナダ 2 ヶ所（サスカチ
ュワン州及びマニトバ州）のほ場で 2009 年に栽培した結果、生育障害は見られず、
夏期の生育に相違は観察されなかった。なお、我が国における隔離ほ場試験で成
体の越冬性及び越夏性を調査する予定である。

20 d 花粉の稔性及びサイズ

我が国における隔離ほ場試験において、本組換えセイヨウナタネ及び非組換え
セイヨウナタネの花粉を染色し、染色率及び直径を調査する予定である。

25 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量：収量調査を行い、本組換えセイヨウナタネの収量に非組換えセ
イヨウナタネとの間で統計学的に有意な減少 ($P<0.05$) が認められた（表 5、21
ページ）。

30

発芽率：本組換えセイヨウナタネ T5 世代及び非組換えセイヨウナタネ 1822 系
統の種子を室温で 8 ヶ月間、10℃で 6 ヶ月間保管した後、以下の 2 条件で発芽率
調査を行った（別紙 3 の APPENDIX 8；社外秘情報につき非開示）。

35

- ・高温発芽：25℃で 7 日間
- ・低温発芽：10℃で 10 日間の後、25℃で 3 日間

その結果、本組換えセイヨウナタネの発芽率に非組換えセイヨウナタネとの間
で統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められず、かつ、いずれも発芽率は 98%以上で
あった（表 6、23ページ）。

40

なお、我が国における隔離ほ場試験で、収穫種子を同日中に播種し、発芽率を
調査する予定である。

表 6 発芽率調査の結果(%)

条 件		本組換え セイヨウナタネ	非組換え セイヨウナタネ
高温発芽	平均値	99.2	97.8
	範囲	96.7 - 100	94.6 - 100
	標準偏差	1.47	1.83
	P 値	0.148	
低温発芽	平均値	97.9%	98.2
	範囲	93.0 - 100	96.3 - 100
	標準偏差	2.18	1.66
	P 値	0.755	

n=8。約 50 粒の種子を 1 反復とし、計 8 反復で試験を行った。統計解析には、一般化線形混合モデルを用いた。

5

脱粒性：本組換えセイヨウナタネ T3F3 ハイブリッド世代及び非組換えセイヨウナタネ 5536×1822 系統を、米国 1ヶ所（ワシントン州）及びカナダ 2ヶ所（サスカチュワン州及びマニトバ州）のほ場で 2009 年に栽培した結果、両者間で脱粒性に相違は観察されなかった。脱粒性については、我が国における隔離ほ場試験で調査する予定である。

10

f 交雑率

我が国における隔離ほ場試験で、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネを隣接して栽培し、交雑率を調査する予定である。

15

g 有害物質の産生性

本組換えセイヨウナタネ T3 世代及び T3 ハイブリッド (T3×5536) 世代、並びに非組換えセイヨウナタネ 1822 系統を 2008 年にカナダのマニトバ州の 4ヶ所のほ場で栽培した。同区画に作物（それぞれ、トウモロコシ、オオムギ、ダイズ及びインゲンマメ）を 2009 年に栽培した結果、本組換えセイヨウナタネ栽培後に栽培した作物の生育に、非組換えセイヨウナタネ栽培後に栽培した作物の生育との相違は観察されなかった。我が国における隔離ほ場試験で、鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験を行う予定である。

20

25

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

隔離ほ場における栽培、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 所在地：栃木県宇都宮市清原工業団地19-2
名称：デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場
使用期間：承認日から平成25年3月31日まで

隔離ほ場の施設

- 15 (1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている。
- 20 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えセイヨウナタネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該セイヨウナタネの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- (4) 虫媒による花粉の飛散を減少させるための防虫網を開花期に設置する。
- 25 (5) 本遺伝子組換えセイヨウナタネの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期に防鳥網を設置する。

隔離ほ場での作業要領

- 30 (1) 本遺伝子組換えセイヨウナタネ及び比較対照の非遺伝子組換えセイヨウナタネ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本遺伝子組換えセイヨウナタネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該セイヨウナタネが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えセイヨウナタネの栽培終了後は、当該セイヨウナタネ及び比較対照の非遺伝子組換えセイヨウナタネを隔離ほ場に鋤き込む等により、確実に不活化する。
- 35 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えセイヨウナタネが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 40 (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。
- (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

(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

5 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。

(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

10 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

15 本組換えセイヨウナタネを用いて 2008 年にカナダで行ったほ場試験結果は、2(6)②(19ページ)に記載したとおりである。

(6) 国外における使用等に関する情報

20 米国 (USDA) 及びカナダ (CFIA) においてほ場試験のための許可を得て、2007 年から 2009 年にかけて、米国及びカナダの延べ 66 箇所のほ場において栽培を行ったが、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で、生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

25 なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用の申請の他、食品としての安全性確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行う予定である。

30

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 宿主であるセイヨウナタネ(*Brassica napus* L.)は、長年にわたり我が国における使用の実績がある。本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、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比較により、影響が生ずる可能性について以下に考察した。

1 競合における優位性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 セイヨウナタネは、北海道から九州にかけて河原や線路沿いで自生する（日本帰化植物写真図鑑, 2001；日本の帰化植物, 2003）。港周辺では、運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育や、在来ナタネ（*B. rapa*）との雑種である可能性のある個体も確認されている（環境省, 2009；農林水産省, 2008）。また、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はない。

20 茨城県鹿島港周辺における調査の結果、除草剤グリホサート耐性のセイヨウナタネは、非組換えセイヨウナタネの従来生育地にしか生育していなかった（農業環境技術研究所, 2007）。また、他の植物群落が広い範囲に存在し、競合が起こる条件下では、セイヨウナタネの生育が確認できないか、生育が確認された場合であっても極めて短期間に消滅したため、セイヨウナタネは周辺群落に侵入した場合でも、競合により他の植物を駆逐して生育域を拡大することはないことが確認されている（農林水産省, 2009b）。したがって、仮に遺伝子組換えセイヨウナタネが生育した場合でも、競合により他の植物を駆逐して生育域を拡大することはないと考察されている（農林水産省, 2009b）。

30 本組換えセイヨウナタネの競合における優位性に関わる諸特性（形態及び生育の特性、種子の生産量、発芽率）について評価を行った結果、非組換えセイヨウナタネとの間で初期の草勢、開花までの日数及び収量に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）が認められた（第一. 2.(6).②. a 及び e, 19及び22ページ）。しかしながら、成熟までの日数や草丈に統計学的有意差は認められず、開花までの日数の差は1日であり、収量は本組換えセイヨウナタネで2,140 kg/ha、非組換えセイヨウナタネで35 2,310 kg/haであった。これら初期の草勢及び開花までの日数の違い並びに種子生産量の減少が競合における優位性を高めるとは考え難い。

40 本組換えセイヨウナタネには、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されているが、除草剤が散布されることが想定され難い自然環境下では、除草剤耐性形質が本組換えセイヨウナタネの競合における優位性が高まるとは考え難い。

以上、本組換えセイヨウナタネを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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

5 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

10

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

15

2 有害物質の産生性

20

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

従来のセイヨウナタネの種子中には、動物に有害と考えられるエルシン酸やグルコシノレートが含まれる (OECD, 2001)。本組換えセイヨウナタネの宿主として用いた 1822 系統は、品種改良により両物質の含量を低減したいわゆるカノーラであり、野生動物の生息に影響を及ぼすことはないと考えられる。

25

本組換えセイヨウナタネに産生される GAT4621 蛋白質については有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンとの相同性も認められていない (第一.2.(1).ロ.②、9ページ)。また、本組換えセイヨウナタネへの除草剤グリホサート散布時に、GAT4621 蛋白質により *N*-アセチルグリホサートが産生されるが、本物質が有害物質であるとの報告はない。

30

本組換えセイヨウナタネにおいて *N*-アセチルアミノ酸が非組換えセイヨウナタネに比べ増加する可能性が考えられたが、*N*-アセチルアミノ酸は本組換えセイヨウナタネ中に新たに産生された成分ではなく、動植物中にもこれら *N*-アセチルアミノ酸は含まれている (第一.2.(1).ロ.③、12ページ)。

35

以上、本組換えセイヨウナタネを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

40

(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

—

10 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

15

3 交雑性

20 (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 (OECD, 1997; OGTR, 2008) のうち、我が国在来の種はない。したがって、本組換えセイヨウナタネに関して、交雑性に起因する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。

25

なお、セイヨウナタネと自然交雑可能な外来の近縁野生種 (OECD, 1997; OGTR, 2008) のうち、我が国に生育する種は、カラシナ (*B. juncea*)、クロガラシ (*B. nigra*)、アブラナ (在来ナタネ; *B. rapa*)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)、セイヨウダイコン (*Raphanus raphanistrum*) 及びノハラガラシ (*Sinapis arvensis*) であるが、これらはいずれも栽培等を通じて日本に帰化した外来種である。2008年6月に行ったモニタリング調査では、隔離ほ場周辺 600m の範囲内において、これら近縁野生種の生育は観察されなかった。

30

35 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(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

5 以上、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた
隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲
内では、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

10 第二. 3 (28ページ) に挙げた我が国に生育するセイヨウナタネ及びその近縁種
はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある
野生動植物等としては特定されない。しかしながら、本組換えセイヨウナタネ
15 と近縁種が交雑した場合、(1)交雑により生じた雑種が競合において優位になり、
他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、(2)交雑により浸透した導入遺伝子の
影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息している昆虫等の野
生動植物の個体群の維持に支障を及ぼす可能性について評価を行った。

20 (1) 交雑により生じた雑種が競合において優位になり、他の野生植物種の個体群
を駆逐する可能性

セイヨウナタネと各近縁種の交雑性及び稔性等に関する知見を基に、本組換え
セイヨウナタネが他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性について検討した。

25 ① カラシナ (*B. juncea*) との交雑性

セイヨウナタネとカラシナの交雑率は 3~4.7%である。また、形成された雑種
の花粉稔性は 0~28%と低い (OGTR, 2008)。

30 ② クロガラシ (*B. nigra*) との交雑性

自然条件下での交雑は観察されなかった (Bing *et al.*, 1996)。

③ アブラナ (在来ナタネ; *B. rapa*) との交雑性

セイヨウナタネとアブラナの交雑率は 0~15.7%である (農業技術体系, 1996)。
雑種の生存率は 2%未満である (OGTR, 2008)。

35 ④ ダイコンモドキ (*H. incana*) との交雑性

セイヨウナタネとダイコンモドキの交雑率は、セイヨウナタネとダイコンモド
キを 625 : 1 の比率で栽培した場合でも 1.5%である。その雑種の種子の生存率は
低く、花粉はほとんど産生されず、産生した花粉も死滅した。雑種は花の数、莢
40 の数及び種子数も少ない (OGTR, 2008)。

⑤ セイヨウノダイコン (*R. raphanistrum*) との交雑性

セイヨウナタネとアブラナの交雑率は、0.05%以下である。雑種のほとんどが雄

性不稔で、花粉稔性も1%未満であった (OGTR, 2008)。

⑥ ノハラガラシ (*S. arvensis*) との交雑性

5 セイヨウナタネとノハラガラシの交雑率は、0~3.7%である。雑種の花粉稔性は0~30%と低い (OGTR, 2008)。

10 以上、セイヨウナタネとこれら近縁種との交雑性は低く、仮に本組換えセイヨウナタネが交雑しても、稔性が低い等の理由により雑種が自然環境下で優占種となる可能性は低いと考えられる。また、本組換えセイヨウナタネとの雑種は除草剤グリホサート耐性の形質を有すると考えられるが、本形質が競合における優位性を高めるとは考え難い (第二. 1、26ページ)。

15 (2) 交雑により浸透した導入遺伝子の影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息している昆虫等の野生動植物の個体群の維持に支障を及ぼす可能性

20 本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産生性は、非組換えセイヨウナタネと相違がないと考えられる (第二. 1 及び 2、26~27ページ) ページ)。また、除草剤グリホサート耐性遺伝子が近縁種に移入されても、生存への顕著な負担にならないと報告されており (Jørgensen *et al.*, 2009 ; Warwick *et al.*, 2008)、本組換えセイヨウナタネの場合も、本組換えセイヨウナタネ由来の遺伝子が近縁種の生存に負担になることは考え難い。したがって交雑した近縁野生種が駆逐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に影響が生じる可能性も低いと判断された。

(3) 結論

30 以上、本組換えセイヨウナタネと近縁種が交雑した場合においても、他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性及び野生動植物の個体群の維持に支障を及ぼす可能性は低いと考えられた。

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 セイヨウナタネは、北海道から九州にかけて河原や線路沿い、港周辺で生育する。しかしながら、セイヨウナタネは周辺群落に侵入した場合でも、競合により他の植物を駆逐して生育域を拡大することはないことが確認されている。本組換えセイヨウナタネの競合における優位性に関わる諸特性について評価を行った結果、非組換えセイヨウナタネとの間で初期の草勢、開花までの日数及び収量に統計学的有意差が認められたが、これらの差が競合における優位性を高めるとは考え難い。本組換えセイヨウナタネには、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されているが、除草剤が散布されることが想定され難い自然環境下では、除草剤耐性形質が本組換えセイヨウナタネの競合における優位性が高まるとは考え難い。したがって、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

20 従来のセイヨウナタネの種子中には、動物に有害と考えられるエルシン酸やグルコシノレートが含まれる。本組換えセイヨウナタネの宿主として用いた系統は、品種改良により両物質の含量を低減したいわゆるカノーラである。本組換えセイヨウナタネに産生される GAT4621 蛋白質については有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンとの相同性も認められていない。また、*N*-アセチルグリホサートが有害物質であるとの報告もない。本組換えセイヨウナタネにおいて *N*-アセチルアミノ酸が非組換えセイヨウナタネに比べ増加する可能性が考えられたが、*N*-アセチルアミノ酸は本組換えセイヨウナタネ中に新たに産生された成分ではなく、実際に動植物中にもこれら *N*-アセチルアミノ酸が含まれていた。したがって、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

30 セイヨウナタネと自然交雑可能な近縁野生種のうち、我が国に生育する種は、カラシナ (*Brassica juncea*)、クロガラシ (*B. nigra*)、アブラナ (在来ナタネ; *B. rapa*)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)、セイヨウノダイコン (*Raphanus raphanistrum*) 及びノハラガラシ (*Sinapis arvensis*) である。これらはいずれも栽培等を通じて日本に帰化した外来種であり、影響を受ける可能性のある我が国在来の野生植物としては特定されない。したがって、本組換えセイヨウナタネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

40 上述のセイヨウナタネ及び近縁種との交雑性に起因して、間接的に生物多様性が生ずる可能性 (交雑により生じた雑種が競合において優位になり、他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、交雑により浸透した導入遺伝子の影響により近

5 縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息している昆虫等の野生動植物の個
体群の維持に支障を及ぼす可能性) について評価した。その結果、セイヨウナタ
ネとこれら近縁種との交雑性は低く、仮に本組換えセイヨウナタネと交雑しても、
稔性が低い等の理由により雑種が自然環境下で優占種となる可能性は低いと考え
10 られた。また、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産
生性は、非組換えセイヨウナタネと相違がないと考えられ、本組換えセイヨウナ
タネ由来の遺伝子が近縁種において負担になることは考え難い。したがって、交
雑した近縁野生種が駆逐される可能性は低く、これら近縁種に依存して生息する
15 昆虫等の野生生物の個体群に影響が生じる可能性も低いと判断された。以上、交
雑に起因して、間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

15 以上のことから、総合的評価として、本組換えセイヨウナタネは、限定された
環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並び
にこれらに付随する行為の範囲内では、我が国における生物多様性影響を生ずる
おそれはないと結論された。

緊急措置計画書

平成 22 年 3 月 1 日

5

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

10

15 除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ(*gat4621, Brassica napus L.*) (73496, OECD UI : DP-073496-4) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」と表記) について、
第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

20 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

25 第一種使用等を行う栽培試験責任者は、弊社内に設置されている生物多様性影響管理委員会に報告を行う。また、弊社内に緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部、バイオテクノロジー事業部）の部門長等から構成される。危機対策本部が、生物多様性影響管理委員会、栽培試験責任者及び本組換えセイヨウナタネの開発者である米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、バイオテクノロジー事業部長が副責任者となる。

30

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

35 2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等を行っている栽培試験者と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

5 本組換えセイヨウナタネが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき認められた場合には、栽培試験者へ直接連絡を取り、口頭で伝える。

また必要に応じて、ホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

10

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

15 科学的根拠に基づき、本組換えセイヨウナタネが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、直ちに栽培試験を中止し、本組換えセイヨウナタネを隔離ほ場内において鋤込む等、不活化又は拡散防止のための必要な措置を取る。

20

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 科学的根拠に基づき、本組換えセイヨウナタネが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省消費・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連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

モニタリング計画書

平成 22 年 3 月 1 日

5 氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

1. 実施体制及び責任者

10

実施体制及び責任者は以下に示す通りである。

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

15 2. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

カラシナ (*Brassica juncea*)

アブラナ (*Brassica rapa*)

クロガラシ (*Brassica nigra*)

20 ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)

セイヨウノダイコン (*Raphanus raphanistrum*)

ノハラガラシ (*Sinapis arvensis*)

25 3. モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の 生息又は生育状況

隔離ほ場周辺 600m²⁾の範囲内において、モニタリングを実施する。

30 平成 20 年 6 月に行ったモニタリング調査では、隔離ほ場周辺 600m の範囲内（道
路から確認できない私有地を除く）において上記の植物種の生育は観察されなかった。

4. モニタリングの期間

35

本組換えセイヨウナタネの栽培期間中とする。

²⁾ 農林水産省 第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針（最終改定：平成 20 年 7 月 31 日）
(<http://www.s.affrc.go.jp/docs/anzenka/action/pdf/sisin.pdf>) で定められている隔離距離。

5. 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

5 本組換えセイヨウナタネの開花前及び開花盛期に、モニタリング対象植物種の生育の有無、開花の有無、生育場所及び生育状況（栽培か自生か、個体数）について、隔離ほ場の半径 600m 以内の範囲（別添；社外秘情報につき非開示）で調査する。半径 600m の範囲でモニタリング対象植物種の生育及び開花が確認された場合、さらに周辺における生育状況を把握するため、調査範囲を隔離ほ場の半径 1km まで広げて同様の調査を行う。調査は、道路端、田畑、公園、河川流域を中心に行う。

10

本組換えセイヨウナタネと開花期が重複しており、種子を採取可能な個体があった場合は、種子を収穫する。収穫種子を播種して発芽個体数を調査後、除草剤グリホサートを散布し、耐性個体数を調査する。耐性個体のイベントの特定が必要な場合には、サザンプロット分析等を行う。調査方法については、実際に収集されたサンプル数などを考慮の上決定することとする。

15

6. モニタリングの結果の解析の方法

20 除草剤グリホサートを散布した発芽個体数当りの耐性個体数から、本組換えセイヨウナタネとの自然交雑の有無及び交雑率を評価する。

7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

25 本組換えセイヨウナタネの第一種使用規程（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）の申請に際し、隔離ほ場栽培試験報告書に本モニタリング結果を記載して報告する。

8. その他必要な事項

30 本モニタリング計画書に変更があった場合、また、*gat4621* 遺伝子がモニタリング対象植物種へ移行したおそれがある場合又は移行が確認された場合、農林水産省及び環境省と必要事項について協議を行うこととする。

参考文献

(社外秘情報につき非開示)

5

別紙リスト

(社外秘情報につき非開示)