

除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 *bar*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.）(MS8RF3, OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6)の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価の概要	
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
（1） 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
（2） 使用等の歴史及び現状	2
（3） 生理学的及び生態学的特性	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
（1） 供与核酸に関する情報	8
（2） ベクターに関する情報	17
（3） 遺伝子組換え生物等の調製方法	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	24
（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	26
（6） 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	26
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	30
（1） 使用等の内容	30
（2） 使用等の方法	30
（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	30
（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	30
（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	30
（6） 国外における使用等に関する情報	30
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	33
1 競合における優位性	33
2 有害物質の産生性	35
3 交雑性	36
4 その他の性質-1	37
5 その他の性質-2	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
参考文献	44
別添資料の内容	44
緊急措置計画書	45

第一種使用規程承認申請書

平成16年8月18日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ（改変 <i>bar</i> , <i>barnase</i> , <i>barstar</i> , <i>Brassica napus</i> L.） （MS8RF3, OECD UI: ACS-BN005-8 × ACS-BN003-6）
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬 及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 和名、英名及び学名

和名： セイヨウナタネ

英名： Oilseed Rape

学名： *Brassica napus* L.

ロ 宿主の品種名

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

ハ 国内及び国外の自然状況における自生地域

セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *B. rapa* (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ等) とキャベツなどが属する *B. oleracea* との交雑の結果できた複二倍体種である (文献 92)。原産地は交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパと考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (文献 35)。セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている (文献 58)。

セイヨウナタネは、肥培管理が行われなくても道路沿い、空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国でも北海道や本州で河原や線路沿いに群生が確認されている (文献 80)。また、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。実際に (財) 自然環境研究センター、独立行政法人農業技術研究機構及び独立行政法人食品総合研究所 (現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) が平成 14 年 5 月から平成 16 年 3 月にかけて行った調査では、ナタネの輸入港である茨城県鹿島港周辺で運搬の途中にこぼれ落ちたと見られるセイヨウナタネの生育が観察された (文献 56)。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

セイヨウナタネとその近縁作物の使用等の歴史は古く、紀元前 2000～1500 年の古代インドの記述や、紀元前 500～200 年のギリシャ、ローマ及び中国の記述に記されている（文献 18）。また、ヨーロッパでのほ場規模での栽培は 13 世紀にベルギーで始まったとされている（文献 92）。

アジア及びヨーロッパにおいては、古くからセイヨウナタネや *B. rapa* 等の種子から油が搾られ、灯火用として広く使用されていた（文献 78）。また、ヨーロッパでは蒸気機関の潤滑油として使用されるようになり、このことがヨーロッパでのセイヨウナタネ栽培の進展を促したといわれている。さらに、第二次世界大戦時に、カナダは軍艦の蒸気機関の潤滑油を補給する目的で栽培を始めた（文献 92）。

元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが報告されているエルシン酸（文献 81）や家畜の甲状腺肥大効果のあるグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られており、食用や飼料としては不向きであると考えられていた。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種が育成されるに至り、現在ではサラダ油、ショートニング、マーガリン等の食用油として広く利用され、また搾油粕は家畜飼料として利用されている（文献 35；92）。

我が国においては古くから *B. rapa* が栽培され、江戸時代には燈油や食用油の原料として大規模に栽培されていた。一方、セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入されて栽培されるようになり、*B. rapa* よりも耐病性に優れ、多収で油分も多いことから全国に広がり、搾油用の *B. rapa* の栽培は少なくなっていく（文献 84）。

しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネ栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりやより収入の多い工業への農民の就労のため、急速に衰退し、現在は搾油のために商業的に栽培されることはほとんどない（文献 35）。なお、近年、菜の花の景観植物としての利用や、化石燃料の代替燃料としてナタネ油を利用しようとする動きが見られる。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

セイヨウナタネは、*B. rapa* に比べて耐寒性は劣るが耐病性及び収量性に優れており、西部・中部ヨーロッパ、日本、韓国のように寒さが極端には厳しくない肥沃な土地で栽培されている（文献 92）。我が国では、以前は水田裏作のために移植栽培が主流であったが、今日では労働生産性の高い直播栽培が一般的である（文献 35）。

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

主な輸出国はカナダ(360 万 t)とオーストラリア(125 万 t)で、全世界輸出量の約 82%を占める。我が国には 2003 年に 208 万 t が輸入され、主な輸入先はカナダ(166 万 t)、次いでオーストラリア(37 万 t)である(文献 1)。また、2003 年に我が国はナタネ油を 1.7 万 t、油脂原料としてナタネ種子を 208.4 万 t、さらに、飼料用の油粕を 2 万 t 輸入している(文献 57)。

なお、現在世界で栽培されるカノーラ全体のうち 18%が遺伝子組換え技術により除草剤耐性が付与されたセイヨウナタネである(文献 36)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは休眠の打破、抽苔の開始、花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられる(文献 35)。春播き品種の生育適温は 12~30 である(文献 58)。また、セイヨウナタネは他の作物に比べ酸性土に強く、耐湿性も強いが、重粘土や砂質で乾燥のはなはだしい土壌は適さない。発芽時には過湿を嫌うが、生育時には多くの水分が必要である。我が国では、品種を選ぶことによりどこでも栽培可能である(文献 78)。

ハ 捕食性又は寄生性

二 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

セイヨウナタネは 1 つの莢の中に多数の種子ができ、種子が成熟して乾燥した莢は莢柄の部分より裂開して種子を放出する(文献 78)。乾燥した莢は、わずかな物理的刺激により裂開し種子を飛散させやすい(文献 35)。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

種子の休眠性は、秋播き品種、春播き品種にかかわらず比較的浅いことが知られているが、暗所での水分ストレスや酸素欠乏（文献 64）など発芽に不適な環境下では二次休眠（secondary dormancy）が誘発されることがある。二次休眠とは、発芽しうる状態になった後で発芽に不適な環境にしばらくおかれた場合、新たに誘導される休眠である（文献 53）が、その程度は品種や種子の貯蔵期間・条件などで異なる（文献 63；65）。また、二次休眠性の高い品種を用いた実験では、5 や 10 の低温に比べ、20 程度の比較的高い温度条件で休眠が誘発されやすいことが確認されている（文献 24）。これらの獲得された休眠性は、2~4 の低温条件（文献 24）、変温条件（文献 65）などによって覚醒されるが、地中深く鋤込まれた種子は休眠状態のまま長期間生存し続けることが知られている。一方、地表の種子では二次休眠は誘発されないことから、二次休眠によるセイヨウナタネの雑草化を防止する耕種方法が明らかにされている（文献 64）。

セイヨウナタネの種子の寿命は比較的長いが、採種条件や保存条件によって異なることが知られている。後熟後に乾燥状態で貯蔵した場合には 6 年を経過しても 80%以上の発芽率を示すが、未熟種子では発芽力の低下が早く、室内に放置すると 3 年目には発芽力がなくなる（文献 60；79）。また、貯蔵中の種子の寿命には特に相対湿度が影響し、相対湿度 70~80%の条件では 100~120 日で発芽力を失うが、20%程度の乾燥状態では 30 の高温でも約 4 年を経過しても 80%以上の発芽率を保っている（文献 79）。

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

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

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自殖によって種子を作ることが多い。風媒や虫媒による他殖率は 5~30%と報告されている（文献 34；58；66）。我が国での試験結果でも、栽植状況や距離で異なるが、平均して 27%程度の他殖率が認められている（文献 87）。

我が国に分布する近縁種のうち、セイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*（カラシナ、タカナ、ザーツアイ等）、*B. nigra*（クロカラシ）及び *Raphanus raphanistrum*（セイヨウノダイコン）が挙げられる。*B. rapa* は栽培由来の外来種で、我が国では古くから栽培種として利用されており（文献 43）、雑草性の亜種あるいは変種の形成は報告されていない（文献 86）。現在では、耕作地の

周囲などに比較的小さな群落が見られるほか、景観作物としても利用され、河川敷の公園などには大きな群落の形成が見られる(文献 51)。 *B. juncea* も外来種であり、我が国では古くから栽培種として利用されてきた(文献 43)。しかし、戦後広まったものはそれとは別に、ヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている(文献 55)。 *B. nigra* は明治時代以降に我が国に帰化した外来種(文献 54)で、北海道から九州に分布し、ハーブとして栽培されているが、ときに野生化している(文献 55 ; 80)。 *R. raphanistrum* も近年になって我が国に帰化した外来種で、昭和初期に横浜市で確認され(文献 33)、現在では北海道から九州に分布している(文献 55)。

セイヨウナタネと *B. rapa* については、種間雑種が形成されるという報告がある(文献 4 ; 79)。英国で行われたモニタリング調査において、商業用セイヨウナタネ栽培ほ場付近に自生する *B. rapa* から採種し、芽生えた苗のうち、雑種は 0.4 ~ 1.5% (文献 75) 又は 0.2% (文献 97) であったと報告されている。また、除草剤耐性セイヨウナタネの商業栽培ほ場付近で採取した *B. rapa* の集団から 13.6% の雑種が、また、*B. rapa* とセイヨウナタネを混在して栽培した場合、6.5 ~ 7.1% の雑種が報告されている(文献 95)。我が国で両者の交互畦栽培を行い同時開花部分に結実した種子を調査したところ、*B. rapa* では 2%、他方、セイヨウナタネでは 10% の雑種を生じたと報告されている(文献 61)。

セイヨウナタネと *B. juncea* は交雑和合性があり、栽培条件下で種間雑種を生ずることが報告されている(文献 4 ; 5 ; 22 ; 40)。栽培条件下での交雑率に関して、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1 : 1 の割合で栽培した場合は 0.3 ~ 1.1% (文献 5)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合には 3% (文献 39) の雑種形成が報告されている。

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった(文献 5)。さらに、人工交配によってもほとんど雑種は得られないか(文献 4)、または全く得られなかったことが報告されている(文献 7 ; 42)。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを 1 : 600 の割合で栽培した場合、0.05% (95%信頼限界: 0.006 ~ 0.2%) の雑種形成が報告がされている(文献 11)。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀(文献 71 ; 95)であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群から、セイヨウナタネとの雑種は確認されなかった(文献 88)。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

セイヨウナタネは一花あたり約6~7万粒の花粉を生産する。花粉は黄色で、三つに縦にくびれた楕円形をしている。大きさはおよそ長径39~36 μm 、短径22~20 μm である(文献23;79)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある(文献58)。

セイヨウナタネの花粉は風又は主にミツバチなどの昆虫により媒介される(文献58;62;89;91;98)。風媒による花粉の移動距離については、花粉トラップを用いた調査において、花粉源となる作物から3m以内で花粉量はおよそ半減し(文献46)、10m以上では90%減少する(文献52)と報告されている。また、ミツバチは通常巣の周辺の植物間を移動するが(文献70)、巣から2km離れた地点までミツバチの集団が確認されている(文献67)ことや、除草剤耐性セイヨウナタネを用いて行った調査において、1~2km地点で0.2%、2.5~3km地点で0.15%の交雑率が報告されている(文献72)ことから、セイヨウナタネの商業栽培が大規模に行われているような地域においては、虫媒による花粉の拡散は広範囲に及ぶ可能性が示唆される。

セイヨウナタネの花粉は長期間発芽力を有することが知られている。花粉の寿命は相対湿度など貯蔵条件によって変わるが、室内に1週間放置したものでも寒天培地上で70%程度の発芽率を示し、その後急激に減少することが観察されており(文献60;79)、自然条件下では4~5日間で徐々に減少するとされる(文献68)。

ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはエルシン酸とグルコシノレートが比較的高い濃度で含まれている。エルシン酸は13位にシス二重結合を持つ不飽和脂肪酸で実験動物において心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが知られている(文献81)。また、グルコシノレートは甲状腺肥大を引き起こすことが知られている(文献92)。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートである品種が育成された結果、食用油として、また搾油粕は飼料用として用いられるようになった(文献35;92)。なお、精油中のエルシン酸含量が2%未満でグルコシノレート含量が油粕1g当たり30 μmol 未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており(文献59)、宿主品種のDrakkarもカノーラ品種の一つである。

ト その他の情報

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変 *bar*, *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L., MS8RF3, OECD UI: ACS-BN005-8 × ACS-BN003-6)(以下、「MS8RF3」とする。) は、除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ(改変 *bar*, *barnase*, *Brassica napus* L., MS8, OECD UI: ACS-BN005-8)(以下、「MS8」とする。) と除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変 *bar*, *barstar*, *Brassica napus* L., RF3, OECD UI: ACS-BN003-6)(以下、「RF3」とする。) を交配して得られる F1 品種である。

MS8 及び RF3 の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1-1 (p.9) 及び 1-2 (p.10) に示した。

表 1-1 MS8 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>barnase</i> 遺伝子発現カセット		
PTA29	1.5	<i>Nicotiana tabacum</i> 由来の薬特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、薬のタペート細胞においてのみ発現を誘導する(文献 77)。
<i>barnase</i>	0.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、RNA 分解酵素 (BARNASE 蛋白質) をコードする遺伝子。PTA29 の支配下で薬のタペート細胞において発現し、雄性不稔形質を付与する (文献 27) 。
3'nos	0.3	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献 15)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
PSsuAra	1.7	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来し、rubisco 小サブユニット遺伝子のプロモーターで緑色組織においてのみ発現を誘導する(文献 45)。
改変 <i>bar</i>	0.5	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する(文献 90) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドンは ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
3'g7	0.2	pTiB6S3由来のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(文献16 ; 94)。
その他		
RB	0.02	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界。
LB	0.02	pTiB6S3由来のT-DNAの左側境界。
<i>Sm/Sp</i>	1.0	<i>Escherichia coli</i> に由来し、ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性を付与する aminoglycoside adenytransferase(<i>aadA</i>)をコードする領域 (文献 21) 。
<i>barstar</i>	0.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビター (BARSTAR 蛋白質) をコードする。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と特異的に結合し、その活性を阻害する (文献 27) 。
pVS1ori	3.8	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む領域 (文献 37) 。
pBRori	1.1	<i>Escherichia coli</i> 由来のプラスミド pBR322 の複製起点を含む領域 (文献 6) 。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 1-2 RF3 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>barstar</i> 遺伝子発現カセット		
PTA29	1.51	<i>Nicotiana tabacum</i> 由来の薬特異的遺伝子 TA29 のプロモーターで、薬のタペート細胞においてのみ発現を誘導する (文献 77)。
<i>barstar</i>	0.27	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビター (BARSTAR 蛋白質) を産生する。BARSTAR 蛋白質は <i>barnase</i> 遺伝子産物であるリボヌクレアーゼ (BARNASE 蛋白質) と特異的に結合し、その活性を阻害する (文献 27)。
3'nos	0.26	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる (文献 15)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット		
PSsuAra	1.73	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来し、rubisco 小サブユニット遺伝子のプロモーターで緑色組織においてのみ発現を誘導する (文献 45)。
改変 <i>bar</i>	0.55	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する (文献 90) 。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドン GTG と AGC は、ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
3'g7	0.21	pTiB6S3 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる (文献 16 ; 94)。
その他		
LB	0.02	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界
RB	0.02	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界
<i>Sm/Sp</i>	1.01	<i>Escherichia coli</i> に由来し、ストレプトマイシン / スペクチノマイシン耐性を付与する aminoglycoside adenylyltransferase (<i>aadA</i>) をコードする領域 (文献 21)。
<i>barstar</i>	0.27	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼインヒビターをコードする。BARSTAR 蛋白質は <i>barnase</i> 遺伝子産物であるリボヌクレアーゼと特異的に結合し、その活性を阻害する (文献 27)。
pVS1ori	3.77	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む領域 (文献 37)。
pBRori	1.06	<i>Escherichia coli</i> 由来のプラスミド pBR322 の複製起点を含む領域 (文献 6)。

(注 : 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

なお、改変 *bar* 遺伝子は、*Streptomyces hygroscopicus* から得た野生型の *bar* 遺伝子を植物で使用頻度の高いコドンに適合するように GTG ATG に、また、翻訳の効率を上げるために AGC GAC に改変したものである。GTG ATG の改変では実際に翻訳されるアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC GAC の改変により、セリンからアスパラギン酸に変化している。しかし、本改変によって改変 *bar* 遺伝子産物である改変 PAT 蛋白質の機能に変化はないことが確認されている(文献 96)。

改変 *bar* 遺伝子、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の塩基配列を図 1-1、1-2 及び 1-3 にそれぞれ示した。

社外秘情報につき非開示

図 1-1 改変 *bar* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

図 1-2 *barnase* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

図 1-3 *barstar* 遺伝子の塩基配列

□ 構成要素の機能

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

MS8 及び RF3 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表 1-1 (p.9) 及び 1-2 (p.10) にそれぞれ示した。

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

【改変 PAT 蛋白質】

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

導入された改変 *bar* 遺伝子が産生するホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素（改変 PAT 蛋白質）は、グルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても作物が枯死しない（図 2, p.15）。

改変 PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない（文献 90）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、改変 PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった（文献 96）。これらのことから、改変 PAT 蛋白質がグルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられる。

【BARNASE 蛋白質】

BARNASE 蛋白質は 110 個のアミノ酸で構成される一本鎖の蛋白質であり、二段階の反応様式で RNA を分解する。ポリリボヌクレオチド鎖内部の 3',5'-ホスホジエステル結合を切断してリン酸基をリボースの 2'-OH 基に転移し、2',3'-環状ヌクレオチドを中間体として生成する（第一段リン酸転移反応）。次にこの中間体を加水分解して特異的に 3'-ヌクレオチドを生成する（第二段加水分解反応）（文献 30）。グアニンの 3'部位の切断に対する特異性が高いが、その他の部位も切断するため、完全な分解生成物からはモノ及びジヌクレオチドのみが検出される（文献 73）。

花粉形成は薬で起こる高度に制御されたプロセスで行われる。薬の組織のひとつであるタペート細胞は、花粉形成時及びその後の花粉の発育のために栄養供給を行う重要な役割を果たしている。それゆえ、タペート細胞の欠落は雄性不稔の第一の原因であると考えられている（文献 41）。

barnase 遺伝子は、プロモーター PTA29 の支配下で薬のタペート細胞において一本

鎖 RNA 分子を加水分解するリボヌクレアーゼ (BARNASE 蛋白質) を発現し、それによりタペート細胞内の RNA が分解されて細胞が破壊され、花粉形成を阻害する (文献 19 ; 28 ; 48)。また、プロモーター-PTA29 の支配下にある *barnase* 遺伝子は、日中 37 °C の高温条件下においても安定して発現することが確認されている (文献 2)。なお、プロモーター-PTA29 が温度依存性の発現を誘導するという報告はない。

【BARSTAR 蛋白質】

BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の細胞内阻害物質である (文献 25 ; 28)。BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する (文献 26 ; 28 ; 82)。

一代雑種品種 (F1 品種) は、固定品種に比べて強健で生産力が高く、斉一性に優れるといった特長をもつ (文献 44) が、セイヨウナタネのように自殖可能な作物では、通常、確実に F1 雑種を得ることは困難である。そこで、薬のタペート細胞で特異的に発現し花粉形成を阻害するように *barnase* 遺伝子 (文献 48) を導入した MS8 を雌株、稔性回復形質を有する RF3 を雄株として交配させることにより、F1 種子を得ることができる。その F1 世代では、BARSTAR 蛋白質が BARNASE 蛋白質の作用を抑制して稔性を回復させる (文献 49) ため、自殖で高収量の種子生産が可能となる。

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

各蛋白質のアミノ酸配列について、既知のアレルゲンとの相同性を Swiss Prot、PIR 及び HIV-AA の各データベースを用いて検索した。また、より短いアレルゲンエピトープ検索 (8 個ずつの短いアミノ酸配列) を行った。その結果、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 PAT 蛋白質】

改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており (文献 90)、グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い。よって、宿主の持つ代謝経路へ影響はないと考えられる。

【BARNASE 蛋白質】

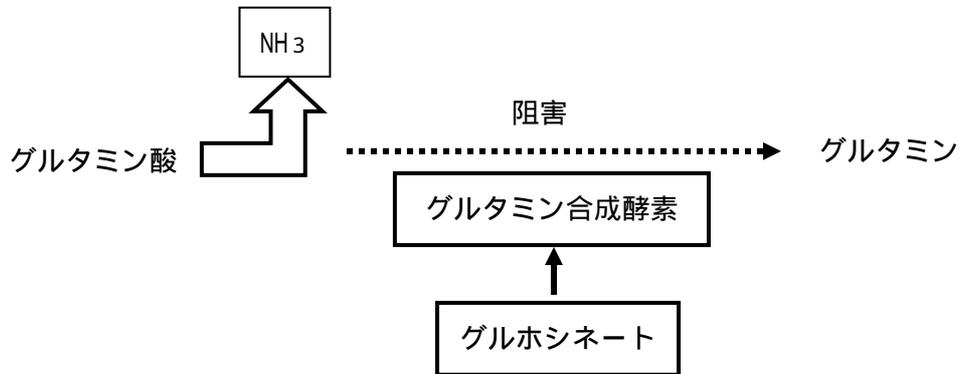
barnase 遺伝子は、プロモーター-PTA29 の支配下にあり、その発現はタペート細胞でのみ確認されており、他の組織で発現することは考え難い。タペート細胞は花粉形成の四分子期に最も発達し、花粉の発達とともに退化・崩壊する (文献 85)。よって、*barnase* 遺伝子がタペート細胞以外の組織において発現し、植物体の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

【BARSTAR 蛋白質】

barstar 遺伝子は、プロモーターPTA29の支配下にあるため、タペート細胞以外の組織で発現することは考え難い。また、BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、その複合体の安定性は高い(文献 47 ; 50)。さらに、細菌と糸状菌のリボヌクレアーゼには、構造及び配列にかなりの相同性が認められているため、これらの酵素についても BARSTAR 蛋白質と相同の阻害物質が存在すると期待される。しかしこのような阻害物質が知られているのは *Bacillus intermedius* によって産生されるリボヌクレアーゼ BINASE 蛋白質のみである。BINASE 蛋白質は BARNASE 蛋白質と高い相同性(85%)を有し、BARSTAR 蛋白質に阻害される(文献 99)。また、BARNASE 蛋白質とのアミノ酸配列の相同性は 20~25%に過ぎないが、類似の立体構造を有する *Streptomyces* の細胞外リボヌクレアーゼ(文献 32)も BARSTAR 蛋白質で阻害されることが報告されている(文献 29)。しかし、植物中のリボヌクレアーゼに対する BARSTAR 蛋白質の阻害作用は報告されていない。なお、BARSTAR 蛋白質はヒト又は動物のリボヌクレアーゼとは結合しないことが報告されている(文献 27 ; 28 ; 32 ; 82)。以上から、BARSTAR 蛋白質が宿主のもつ代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

A) 通常の植物

除草剤グルホシネートによってグルタミン合成酵素が阻害されるため、アンモニアが蓄積し植物は枯死する。



B) 組換え体植物

改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネートがアセチル化されて N-アセチルグルホシネートになるため、グルタミン合成酵素は阻害されないようになり、アンモニアが蓄積されず植物は生長を続けることができる。

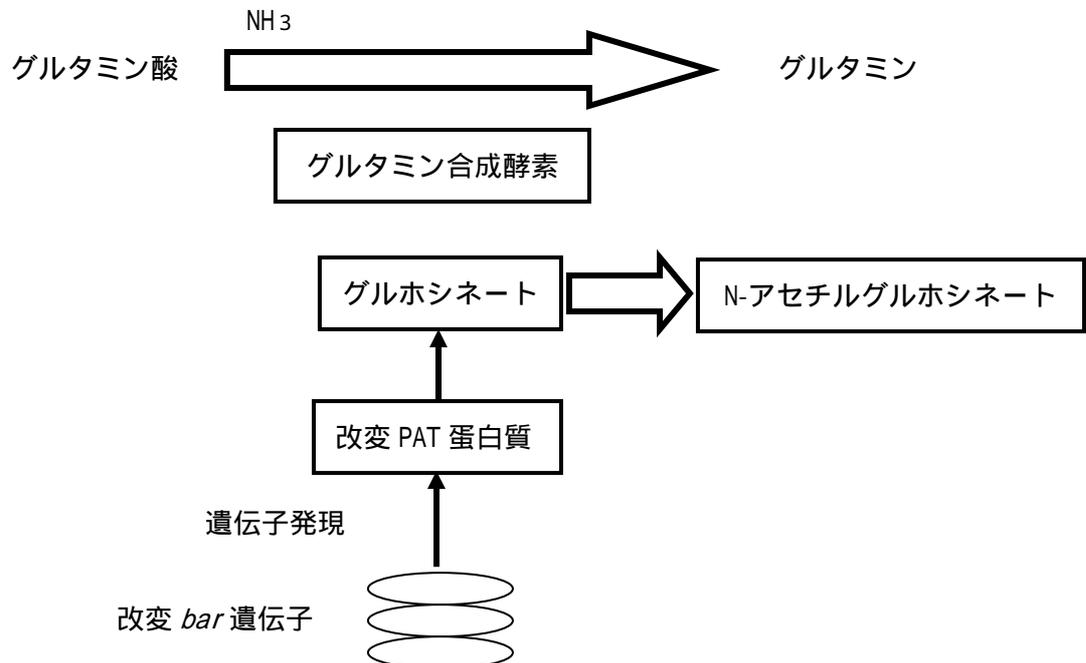


図2 改変 *bar* 遺伝子産物による除草剤グルホシネート耐性のメカニズム

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

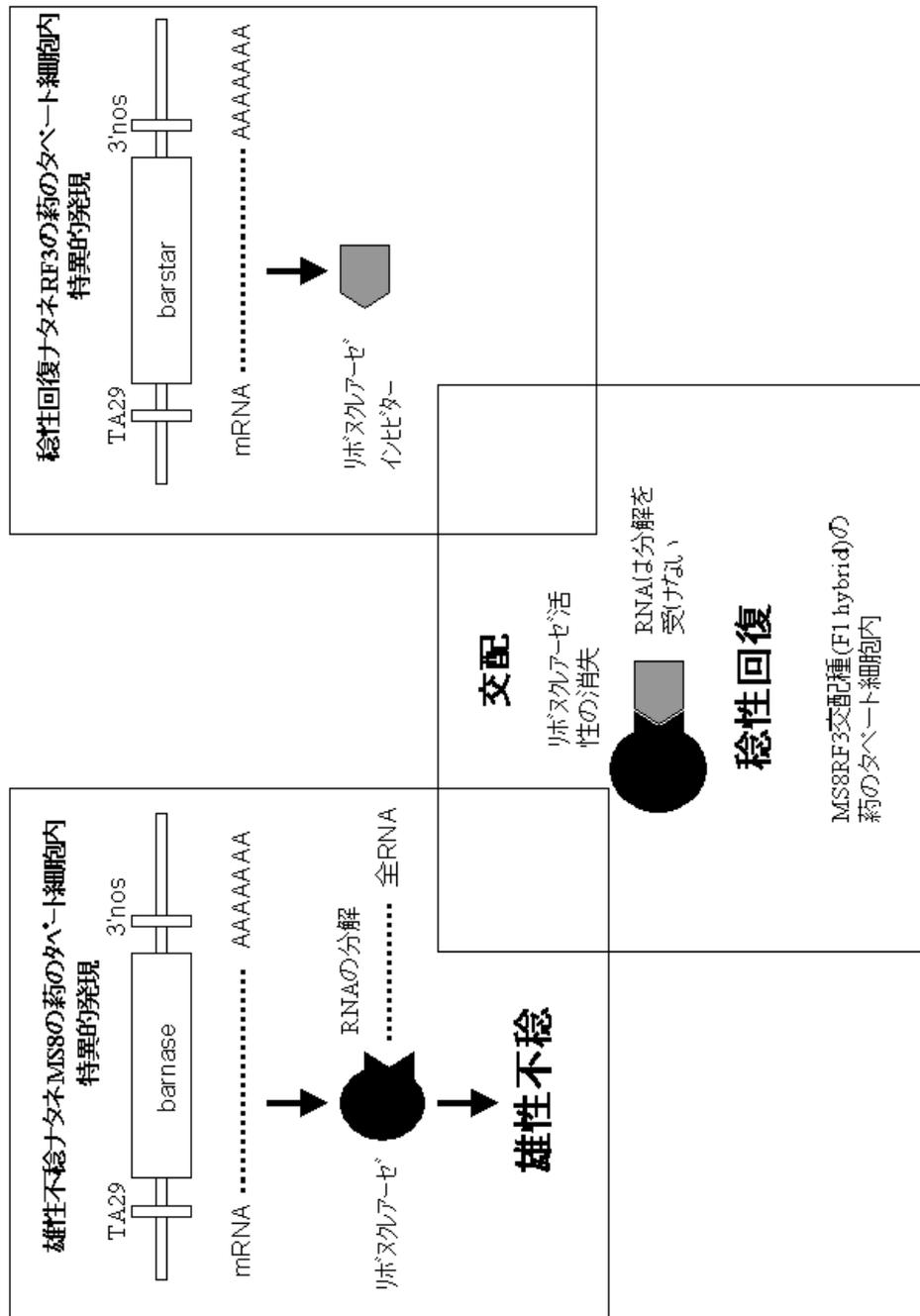


図3 稔性回復のメカニズム

MS8 を雌株、RF3 を雄株として交配させた場合。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

MS8 の作出に用いられたベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のベクター-pGSV1 を基礎として構築された、バイナリー-Ti プラスミド pTHW107 である。また、RF3 の作出に用いられたベクターも、同じく大腸菌由来の pGSV1 を基礎として構築された、バイナリー-Ti プラスミド pTHW118 である (文献 12)。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

pTHW107 の塩基数は 12,622bp、また、pTHW118 の塩基数は 12,508bp である。各プラスミド地図を図 4-1(p.18)及び 4-2(p.19)に示した。また、各ベクターの全塩基配列をそれぞれ別添資料 1{pTHW107 (p.1~7)、pTHW118 (p.8~14)}に示した。

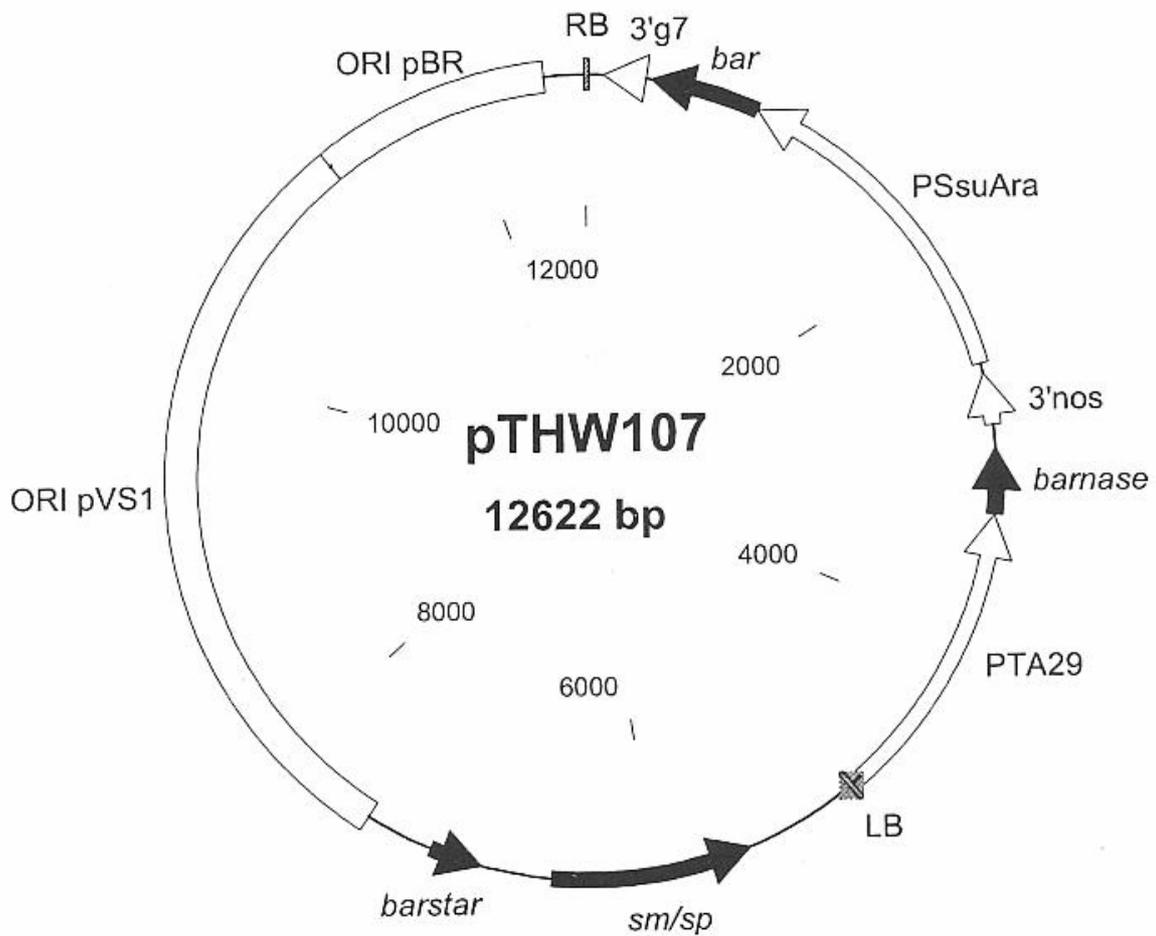


図 4-1 pTHW107 のプラスミド地図

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

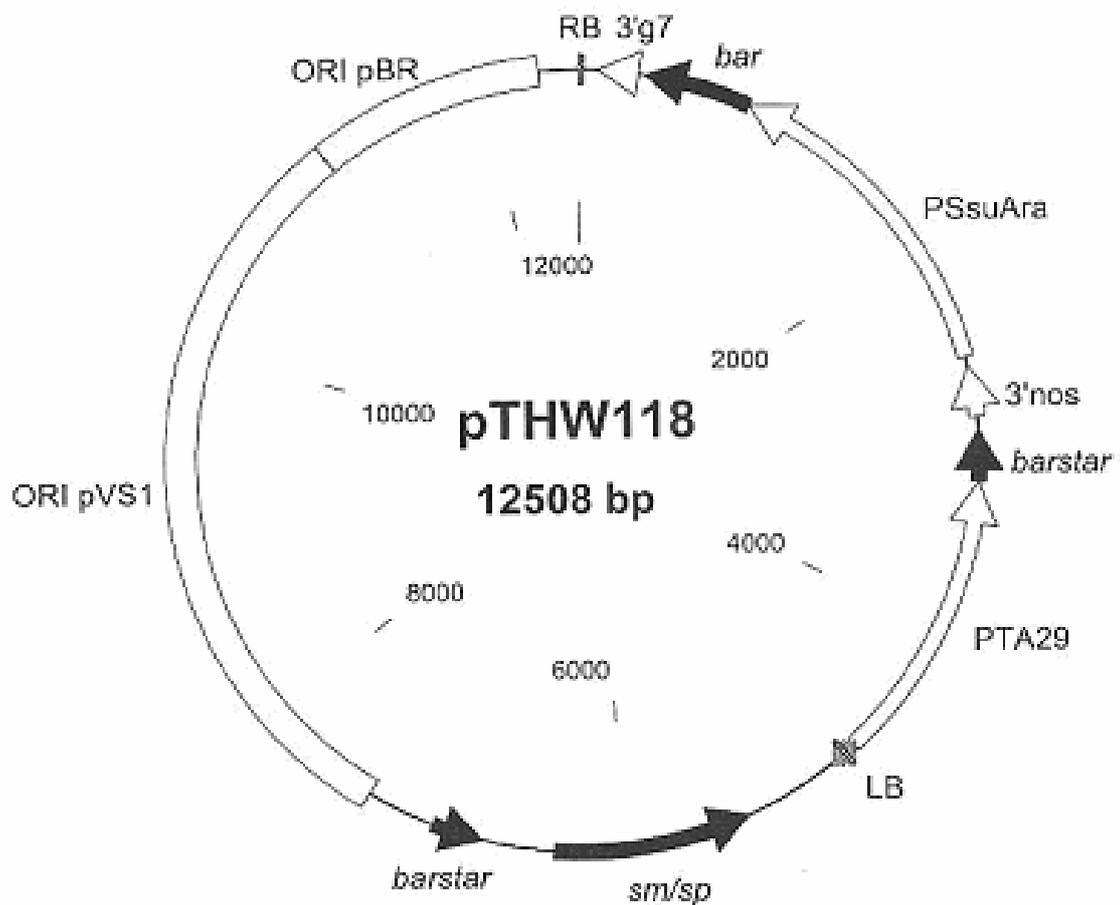


図 4-2 pTHW118 のプラスミド地図

図中の *bar* は改変 *bar* 遺伝子を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド pTHW107 及び pTHW118 はいずれも、T-DNA 領域の外側にストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*Sm/Sp*)、*barstar* 遺伝子、pBRori 及び pVS1ori を有する。*Sm/Sp* 遺伝子はベクターの選抜マーカーとして利用されたが、細菌でのみ発現し、植物細胞中では発現しない(文献 13 ; 93)。また、*barstar* 遺伝子は基本となるプラスミド pGSV1 に存在していたものであるが、pTHW107 を構築する過程で大腸菌を用いて *barnase* 遺伝子をプラスミド上に導入する際に、たとえ植物用のプロモーターを用いていても、少量の BARNASE 蛋白質が発現し、大腸菌が死んでしまうため、この活性を抑制するために利用された。さらに、pBRori 及び pVS1ori はそれぞれ大腸菌及び緑膿菌において自律的複製を行わせる複製起点である。なお、これらはいずれも T-DNA 領域の外側に位置しており、MS8 及び RF3 のセイヨウナタネゲノムには挿入されていないことが確認されている(別添資料 2, p.7~9 及び 18~21)。

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

プラスミド pTHW107 及び pTHW118 は自律増殖可能な宿主域が *Agrobacterium tumefaciens* や *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、植物体では感染性を持たない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

MS8 には、pTHW107 上の LB と RB の間の領域にある、*barnase* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット (PTA29-*barnase*-3'nos-PSsuAra-改変 *bar*-3'g7) が移入された。また、RF3 には、pTHW118 上 LB と RB の間の領域にある、*barstar* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット (PTA29-*barstar*-3'nos-PSsuAra-改変 *bar*-3'g7) が移入された。なお、プラスミド上の供与核酸の構成要素の位置及び方向は図 4-1 (p.18) 及び 4-2 (p.19) に、また、制限酵素による切断部位は図 5-1 (p.21) 及び 5-2 (p.22) にそれぞれ示した。また、MS8 及び RF3 のそれぞれに移入された T-DNA 領域の塩基配列を別添資料 3{MS8(p.1~4) RF3(p.5~8)}に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への遺伝子の導入はいずれもアグロバクテリウム法によって行った(文献14)。プラスミド pTHW107 又は pTHW118 を保持した *E. coli* MC1061 株、伝達性を司るヘルパープラスミド pRK2013 を保持する *E. coli* HB101 株、非腫瘍形成性の *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R 株を共存させ、pTHW107 又は pTHW118 を持つ *A. tumefaciens* C58C1Rif^R 株を作出した後、宿主の胚軸組織片に感染させ、T-DNA 領域をセイヨウナタネゲノムに組み込ませた(文献17)。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換された胚軸組織片を除草剤グルホシネートを含む培地上で培養し、除草剤グルホシネートに耐性を示した細胞を選抜した。さらに、ホルモンフリーの培地に移して植物体を再生させた(文献14)。

核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無

アグロバクテリウムによる形質転換後、500mg/l の Carbenicillin を培地中に加えてアグロバクテリウム菌体を除去した(文献14)。

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

形質転換後、再生させた MS8 及び RF3 の各植物体について、各目的形質及び農業形質等に関して総合的に選抜した。MS8RF3 の育成の経過を図6(p.24)に図示した。なお、MS8RF3 は、MS8 の BC2F1 世代以降の系統と RF3 の T3 または BC2F1 世代以降の系統を掛け合わせて作出された。また、我が国における MS8RF3 の承認状況は以下のとおりである。

【食品安全】

1997年12月に厚生省(現厚生労働省)より組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針に基づき、MS8RF3として食品利用としての安全性の指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経て、2001年3月に厚生労働省より食品利用としての安全性が確認された。

【飼料安全】

1997年12月に農林水産省より組換え体利用飼料の安全性評価指針に基づき、除

草剤グルホシネート耐性カノーラ（MS8RF3）として指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する手続きを経て、2003 年 3 月に農林水産省より飼料利用としての安全性が確認された。

【環境安全】

1997 年 4 月に農林水産省より農林水産分野等における組換え体利用のための指針に基づき、隔離ほ場試験の承認を得た。また、1998 年 1 月に農林水産省により同指針に基づき、除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復ナタネ（MS8RF3）として我が国への輸入（加工用及び飼料用としての利用）について指針への適合性が確認された。

社外秘情報につき非開示

図 6 MS8RF3 の系統樹

（４）細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

MS8 の遺伝子導入当代は挿入遺伝子座に関してヘテロ接合体であると考えられ、雄性不稔形質を有する MS8 は非組換えセイヨウナタネを掛け合わせて維持されるため、1 遺伝子座支配であれば、その後代では除草剤グルホシネート耐性：感受性個体の理論上の分離比は 1：1 になることが想定される。F1、品種 A により戻し交配した BC1F1 及び BC2F1 の各世代における除草剤グルホシネート耐性：感受性の分離比を調査した結果、いずれの世代でも想定されたとおり、およそ 50%の個体が除草剤耐性を示したことから（別添資料 5, p.25, 表 PC24 及び PC33）、MS8 に移入された T-DNA 領域はセイヨウナタネゲノムの染色体上の 1 箇所に存在すると考えられる。

また、RF3 の遺伝子導入当代は挿入遺伝子座に関してヘテロ接合体であることが想定されるため、1 遺伝子座支配であれば、自殖した T1 世代では除草剤グルホシネートに対して理論上、耐性個体：感受性個体は 3：1 の比率で出現することが期待される。また、耐性個体にはホモ接合体とヘテロ接合体が 1：2 の割合で含まれることが期待される。RF3 の T1 世代における除草剤グルホシネート耐性個体の分離を調べた結果、理論上の分離比 3：1 に適合する分離比を示した（別添資料 5, p.27, 表

93GNB033₁)。また、除草剤グルホシネート耐性を示した T1 世代の各株を自殖して得られた T2 世代株の耐性株数を調査した結果、T2 世代において耐性を示し固定が確認されている T1 個体 (ホモ接合体) と、T2 世代において 3 : 1 に適合する分離比で後代の分離を示す T1 個体 (ヘテロ接合体) がほぼ 1 : 2 の比率を示した (別添資料 5, p.28, 表 93GNB033₂)。これらの結果から、RF3 に移入された T-DNA 領域はセイヨウナタネゲノムの染色体上の 1 箇所が存在すると考えられる。

ロ 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

MS8 に移入された核酸のコピー数については、BC2F1 世代を用いてサザンプロット分析 (別添資料 5, p.9~11) 及びシーケンス解析 (別添資料 4, p.1~5) を行なった結果、改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *barnase* 遺伝子発現カセットの各 1 コピーが連鎖した状態で組み込まれていることが確認された (別添資料 4, p.5)。

同じく、RF3 に移入された核酸のコピー数については、T3 世代を用いてサザンプロット分析 (別添資料 5, p.12~15) 及びシーケンス解析 (別添資料 4, p.6~10) を行なった結果、完全な 1 コピーの T-DNA 領域と、改変 *bar* 遺伝子を含まない不完全な 1 コピーの T-DNA 領域が導入されていることが確認された (別添資料 4, p.10)。

MS8 及び RF3 に移入された核酸の複数世代にわたる伝達の安定性については、MS8 の F1、BC2F1 及び品種 B により戻し交配した BC1F1 の各世代、また、RF3 の T1、T3 及び BC1F1 の各世代におけるサザンプロット分析を行った結果、各系統のいずれの世代においても同一のバンドパターンが認められた。よって、移入された核酸は複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認された (別添資料 5, p.19, 図 3)。

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

MS8 には改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *barnase* 遺伝子発現カセットが連鎖して移入されており、本項目は該当しない。

他方、RF3 に導入された 2 コピーの T-DNA の位置関係については、前述のとおり、サザンプロット分析及びシーケンス解析を行った結果、1 コピーの完全な T-DNA 領域と、不完全な T-DNA 領域が逆向きの反復構造をとって配置していることが明らかになった。また、不完全な T-DNA 領域には、途中で切れた PTA29、*barstar* 遺伝子、3' nos 及び機能部分を含まない PSsuAra が配置されている (別添資料 4, p.10)。

MS8RF3 は、各交配親由来の染色体上に改変 *bar* 遺伝子がそれぞれ 1 コピー存在するため、2 コピーの改変 *bar* 遺伝子を有する。

ニ (6) のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及

び世代間での発現の安定性

【除草剤グルホシネート耐性】

2006年に行なわれた特定網室試験において、供試種子{MS8(BC5F1)×RF3(T9)}を播種して芽生えた全ての幼苗は除草剤グルホシネートに対して耐性を示したことから(別添資料7, p.18, 表21)本形質は自然条件下で安定して発現すると考えられる。

【雄性不稔及び稔性回復性】

除草剤グルホシネートによる選抜を経たMS8、RF3及びMS8RF3について、不稔性/稔性に関する分離比を調査した結果、MS8ではほぼ100%の個体が不稔性、RF3ではほぼ100%の個体が稔性を示し、さらに、MS8RF3では全ての個体が稔性を示した(別添資料5, p.22, 表FBN9501₄)。よって、本形質は自然条件下において安定して発現すると考えられる。

【挿入遺伝子の発現】

さらに、MS8RF3の改変 *bar* 遺伝子、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の発現について、幼葉、成熟葉、根、花蕾、花粉、乾燥種子及び未成熟種子由来のRNAについてノーザンプロット分析を行なった。その結果、改変 *bar* mRNAは幼葉、成熟葉、根、花蕾及び未成熟種子において検出されたが、花粉及び乾燥種子においては検出されなかった(検出限界0.5pg)。また、*barnase* mRNA及び *barstar* mRNAはいずれも花蕾でのみ検出された(検出限界はそれぞれ1pg及び0.5pg)(別添資料5, p.30, Table 3)。

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

MS8及びRF3は伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然条件下において野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

(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

MS8RF3の識別は、MS8及びRF3それぞれに挿入されたDNAの周辺配列を利用したプライマーを用いたPCR法により、植物体(種子)個体ごとに調査することによって可能である。本識別方法は各イベントの栽培管理に有効に利用されている(別添資料8)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 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

MS8RF3 は除草剤グルホシネート耐性を示す。なお、交配親である MS8 は雄性不稔性、RF3 は稔性回復性を有するが、両系統の F1 品種である MS8RF3 においては、MS8 由来の BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性は RF3 由来 BARSTAR 蛋白質により阻害されるため、花粉を形成する。

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

1997 年度に北海道農業試験場（現 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター）において隔離ほ場試験を行い、MS8RF3 の形態及び生育の特性、成体の越夏性、種子生産量等について、宿主品種である Drakkar（以下、「Drakkar」とする。）と比較した（別添資料 6）。

また、2006 年に我が国の特定網室において、MS8RF3{MS8 (BC5F1) × RF3 (T9)} の幼植物体の高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、有害物質の産生性等を Drakkar と比較した（別添資料 7）。

なお、1995 年に国外の複数地域で行なわれた栽培試験結果を参考として用いた（別添資料 5, p.20 ~ 24）。

形態及び生育の特性

隔離ほ場試験において、草丈、一次分枝数、茎葉重（乾燥）、草型、抽だい期、開花期、成熟期、着莢率、莢長、結実粒数及び粒色について、MS8RF3 と Drakkar を比較した。その結果、MS8RF3 の草丈は Drakkar に比べて 7cm 低く有意差が認められた。莢長及び結実粒数も Drakkar に比べて低く有意差が認められた。また、茎葉重は 31g 軽かった。一次分枝数は MS8RF3 が 8 本、Drakkar が 9 本であった。抽だい期は 4 日、開花期は 5 日、成熟期は 2 日、それぞれ MS8RF3 は Drakkar に比べて早かった。MS8RF3 の着莢率は Drakkar に比べて 3.0% 低かった。また、草型、葉色及び粒色に相違は認められなかった（別添資料 6, p.4, 表 1,2）。

なお、1995 年に国外の複数地域（ベルギー、英国の 2 地域、フランス、カナダ及びスウェーデン）で行なわれた栽培試験において、発芽及び苗立ち、草勢、開花始期、成熟度及び草丈について調査されたが、MS8RF3 の発芽及び苗立ち、草勢及び成熟度は、対照品種との間にほとんど相違は認められなかった。また、開花始期は地域によっては MS8RF3 と対照品種の間に 1~2 日の差が見られたが、顕著な相違は認められなかった。さらに、草丈については 4 地域で対照品種と比較されたが、そのうち 3 地域において 5~14cm の差で MS8RF3 が高い値を示したが、1 地域においては 1cm の差で MS8RF3 が低かった（別添資料 5, p.21 ~ 22, 表 FBN9501_{1,2,3,5,6}）。

生育初期における低温又は高温耐性

MS8RF3 及び Drakkar の発芽 1 週間後の植物体を 35 °C・12 時間明暗条件下で栽培した結果、6 週間後には全ての個体の枯死が確認された(別添資料 7, p.16, 表 20)。よって、いずれも生育初期における高温耐性は示さないと考えられる。

なお、一般に我が国の秋期に播種されたセイヨウナタネは、生育速度は異なるものの、暖地及び寒地いずれの冬期においても生育することが知られている(文献 79)。

成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場における越夏性の観察結果から、MS8RF3 と他の供試品種との間に相違は認められなかった。

なお、セイヨウナタネは一般に高い耐寒性、耐雪性を示すことが知られている(文献 79)。

花粉の稔性及びサイズ

特定網室内で栽培した MS8RF3 及び Drakkar からそれぞれ花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色して観察した結果、いずれも 99% の花粉が染色されており、高い稔性が確認された(別添資料 7, p.14, 図 3)。また、花粉サイズを比較した結果、両者間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 7, p.15, 表 19)。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

隔離ほ場試験において、MS8RF3 及び Drakkar の子実収量及び千粒重を比較した結果、子実収量は 1.6g の差で MS8RF3 が低かったが、千粒重は MS8RF3 が Drakkar に比べて重く、有意差が認められた(別添資料 6, p.4, 表 2)。また、子実収量及び千粒重の数値からそれぞれの一株当たり種子数を算出すると、MS8RF3 は 1.41×10^4 個、Drakkar は 1.88×10^4 個であった。

なお、種子収量(kg/ha)については、1995 年に国外の 5 地域(ベルギー、英国の 2 地域、フランス及びカナダ)において調査され、そのうち 3 地域では MS8RF3 が対照品種に比べて多く、逆に他の 2 地域では少なかったことから、常に一定の傾向を示さないと考えられる(別添資料 5, p.22, 表 FBN9501₇)。また、千粒重については 2 地域(英国及びベルギー)において調査されたが、いずれの地域においても対照品種との間にほとんど相違は認められなかった(別添資料 5, p.23, 表 FBN9501₈)。

隔離ほ場試験において、MS8RF3 と Drakkar の裂莢性について、その難易度を 5 段階評価(難 1-5 易)した結果、両者とも 4(やや易)であったことから、脱粒性は同等であると考えられる(別添資料 6, p.4, 表 2)。

特定網室内において収穫した MS8RF3 及び Drakkar の種子を播種し、1 週間後の発

芽率を調査した結果、MS8RF3 は 100% (20/20 粒)、Drakkar は 85% (17/20 粒) の発芽率が認められた (別添資料 7, p.18, 表 21)。また、Drakkar において発芽が認められなかった種子については、土壌中から取り出した後テトラゾリウム法により生死判定を行ない、死滅していることを確認した。播種 1 週間後において生存している種子は全て発芽したことから、いずれも休眠性は極めて浅いと考えられる。

交雑率

隔離ほ場において、ミツバチの放飼環境下において MS8RF3 と隣接して栽培した Drakkar、セイヨウナタネである樺太、また、*B. juncea* である黄カラシナへの除草剤グルホシネート耐性形質の移行により評価した。各系統の収穫種子由来の幼植物体に除草剤グルホシネートを散布し、耐性個体の割合を調査した結果、Drakkar において 18.4~21.2%、樺太において 3.1~7.3%、黄カラシナにおいて 0.1%の個体が耐性を示した (別添資料 6, p.6, 表 1)。

セイヨウナタネの他殖率は 5~30% (文献 34 ; 66) と報告されており、Drakkar 及び樺太における耐性個体の比率はいずれも既往の知見を上回らなかった。また、セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性は 0.3~1.1% (文献 5) と報告されているが、黄カラシナにおける耐性個体の比率についても、既往の知見を上回らなかった。

有害物質の産生性

特定網室内において、MS8RF3 の根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものについては土壌微生物相試験を行った。

【後作試験】

MS8RF3 及び Drakkar を約 2 ヶ月間栽培した土壌に、検定植物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について比較した結果、いずれの項目にも統計学的有意差は認められなかった (別添資料 7, p.6~7, 表 1~6)。よって、MS8RF3 は根から分泌され他の植物の生育に影響を及ぼす物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

【鋤込み試験】

播種後約 3 ヶ月間栽培した MS8RF3 及び Drakkar の植物体乾燥粉末をそれぞれ 1% 混和した培土でダイコンを栽培し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重を比較した結果、いずれの項目にも統計学的有意差は認められなかった (別添資料 7, p.10~11, 表 9~14)。よって、MS8RF3 は枯死した後に他の植物に影響を及ぼす物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

【土壌微生物相試験】

MS8RF3 及び Drakkar を約 2 ヶ月間栽培した土壌を採取し、滅菌したリン酸緩衝液で適宜希釈後、細菌及び放線菌については PTYG 培地、糸状菌についてはローズベungal 培地を用いて培養し、それぞれの菌数を比較した。その結果、いずれにおいても統計学的有意差は認められなかった（別添資料 7, p.13, 表 15~17）。よって、MS8RF3 は根から分泌され土壌微生物に影響を与える物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

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

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

緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(6) 国外における使用等に関する情報

国外における承認状況を表 2 に、我が国における承認状況を表 3 (p.32) にそれぞれ示した。

表 2 国外における承認状況

国名		承認機関	承認時期	承認内容
カナダ	MS8	カナダ食品検査庁	1996年10月	規制外確認
		カナダ食品検査庁	1996年10月	飼料安全確認
		カナダ厚生省	1997年3月	食品安全確認
	RF3	カナダ食品検査庁	1996年10月	規制外確認
		カナダ食品検査庁	1996年10月	飼料安全確認
		カナダ厚生省	1997年3月	食品安全確認
	MS8RF3	カナダ食品検査庁	1996年10月	規制外確認
		カナダ食品検査庁	1996年10月	飼料安全確認
		カナダ厚生省	1997年3月	食品安全確認
米国	MS8	米国農務省	1999年3月	規制外確認
		連邦食品医薬品局	1998年9月	飼料・食品安全確認
	RF3	米国農務省	1999年3月	規制外確認
		連邦食品医薬品局	1998年9月	飼料・食品安全確認
	MS8RF3	親系統が承認された場合、そのスタック系統について承認は求められない。		
オーストラリア及び ニュージーランド	MS8	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関	2002年5月	食品安全確認
		オーストラリア遺伝子テクノロジー規制機関	2003年7月	環境安全確認 (オーストラリアのみ)
	RF3	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関	2002年5月	食品安全確認
		オーストラリア遺伝子テクノロジー規制機関	2003年7月	環境安全確認 (オーストラリアのみ)
	MS8RF3	親系統が承認された場合、そのスタック系統について承認は求められない。		
EU	MS8	ヨーロッパ委員会 保健消費者保護総局	旧指針：1999年11月 法制化後：2005年4月	食品安全確認(油)
			2005年4月	飼料安全確認
			2007年3月	輸入及び加工(飼料又は工業用目的)
	RF3	ヨーロッパ委員会 保健消費者保護総局	旧指針：1999年11月 法制化後：2005年4月	食品安全確認(油)
			2005年4月	飼料安全確認
			2007年3月	輸入及び加工(飼料又は工業用目的)
	MS8RF3	ヨーロッパ委員会 保健消費者保護総局	旧指針：1999年11月 法制化後：2005年4月	食品安全確認(油)
			2005年4月	飼料安全確認
			2007年3月	輸入及び加工(飼料又は工業用目的)

食用油としての利用のみ

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 3 我が国における承認状況

	承認機関	承認時期	承認内容
MS8	厚生省	1998年12月(旧指針)	食品安全
	厚生労働省	2001年3月	
	農林水産省	1999年2月(旧指針)	飼料安全
		2003年3月	
	農林水産省	1998年7月	隔離ほ場試験
	農林水産省	2002年11月(旧指針)	環境安全
農林水産省/環境省	2006年9月	環境安全	
RF3	厚生省	1998年12月(旧指針)	食品安全
	厚生労働省	2001年3月	
	農林水産省	1999年2月(旧指針)	飼料安全
		2003年3月	
	農林水産省	1998年7月	隔離ほ場試験
	農林水産省	2002年11月(旧指針)	環境安全
農林水産省/環境省	2007年4月	環境安全	
MS8RF3	厚生省	1997年12月(旧指針)	食品安全
	厚生労働省	2001年3月	
	農林水産省	1997年12月(旧指針)	飼料安全
		2003年3月	
	農林水産省	1997年4月	隔離ほ場試験
農林水産省	1998年1月(旧指針)	環境安全	

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主が属する分類学上の種であるセイヨウナタネは、我が国では明治時代から栽培されていたが、昭和 30 年代をピークに栽培が急激に減少し、それに伴い輸入量が増え続け、今日では年間 200 万 t 以上が輸入されている（文献 57）。このように、我が国では長期にわたるセイヨウナタネの使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、宿主と比較して影響が高まっているか否かを考慮することとする。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では北海道や本州で河原や線路沿いでのセイヨウナタネの群生（文献 80）や、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。しかし、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はない。また、セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている（文献 58）。実際に、大規模にセイヨウナタネの商業栽培を行っている英国で行われた調査において、人為的攪乱のない自然条件下では、野生化したセイヨウナタネは 2～4 年で消滅すると報告されている（文献 10）。また、同じく英国で行われた 3 年間にわたるモニタリング調査において、ほ場から逸出して群生したと考えられるセイヨウナタネの個体群は 3 年目にはほぼ消滅したことが報告されている（文献 76）。これらのことを踏まえて、MS8RF3 の競合における優位性に起因する生物多様性影響を評価した。

競合における優位性に関わる形質として、我が国での隔離ほ場試験において、草丈、一次分枝数、茎葉重（乾燥）、草型、抽だい期、開花期、成熟期、着莢率、莢長、結実粒数、粒色、裂莢性、子実収量、千粒重及び越夏性について、宿主品種である Drakkar と比較した（別添資料 6）。また、我が国での特定網室試験において、生育初期の高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、休眠性について、Drakkar と比較した（別添資料 7）。

その結果、隔離ほ場試験において、MS8RF3 の草丈、莢長及び結実粒数は Drakkar に比べて低く、また、千粒重は Drakkar に比べて重く、それぞれ統計学的有意差が認められた。また、茎葉重は MS8RF3 が Drakkar に比べて低く、一次分枝数は 1 本の

差で MS8RF3 が少なかった。MS8RF3 の抽だい期は 4 日、開花期は 5 日、成熟期は 2 日、いずれも Drakkar に比べて早かった。MS8RF3 の着莢率は Drakkar に比べて 3.0% 低く、子実収量は 1.6g の差で MS8RF3 が Drakkar に比べて低かった。(別添資料 6, p.4, 表 1,2)。子実収量及び千粒重の数値から一株当たり種子数を算出すると、MS8RF3 は 1.41×10^4 個、Drakkar は 1.88×10^4 個となり、MS8RF3 の方が少なかった。また、生育初期における高温耐性(別添資料 7, p.16, 表 20) 成体の越夏性(別添資料 6, p.3) 及び裂莢性(別添資料 6, p.4, 表 2) について Drakkar との間に相違は認められなかった。さらに、Drakkar と比較して花粉の稔性は同等でサイズについては統計学的有意差がないことが確認された(別添資料 7, p.14~15)。休眠性については、特定網室において栽培、収穫した MS8RF3 及び Drakkar の種子の発芽率を調査したが、生存種子は播種 1 週間後には全て発芽したことから、休眠性はいずれも極めて低く、MS8RF3 は新たに高い休眠性を獲得していないことが確認された(別添資料 7, p.18, 表 21)。

なお、1995 年に国外の複数地域において、MS8RF3 の発芽及び苗立ち、草勢、開花始期、成熟度、草丈、収量(kg/ha) 及び千粒重について調査されており、発芽及び苗立ち、草勢及び成熟度は、対照品種との間に相違は認められなかった。開花始期は地域によって MS8RF3 と対照品種の間に 1~2 日の差が見られたが、顕著な相違は認められなかった。また、草丈については 4 地域で調査されたが、そのうち 3 地域において 5~14cm の差で MS8RF3 が高い値を示したが、1 地域においては 1cm の差で MS8RF3 が低かった。収量についても、MS8RF3 が高くなる地域と低くなる地域の両者が認められ、常に一定の傾向は示さなかった。また、千粒重は調査された 2 地域のいずれにおいてもほとんど相違は認められなかった(別添資料 5, p.21~22, 表 FBN9501_{1,2,3,5,6,7,8})。

以上から、生育及び形態の特性並びに種子の生産量に関して、MS8RF3 の競合における優位性を高めることを示唆する形質は認められなかった。

MS8RF3 は改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネート耐性を示す。本形質は除草剤グルホシネートの存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難いため、本形質を有していても競合における優位性を高めることはないと考えられる。また、交配親の MS8 には BARNASE 蛋白質による雄性不稔形質が、他方、RF3 には BARSTAR 蛋白質による稔性回復性がそれぞれ付与されているため、F1 品種である MS8RF3 では、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性が BARSTAR 蛋白質によって抑制されて花粉を形成する。しかし、MS8RF3 の花粉の稔性は宿主品種の Drakkar と同等であり、サイズについては統計学的有意差がないことが確認されている。よって、本形質は競合における優位性を高めるものではないと考えられる。

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

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

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

MS8RF3 は、両交配親に由来する改変 PAT 蛋白質、交配親である MS8 に由来する BARNASE 蛋白質、RF3 に由来する BARSTAR 蛋白質を有する。改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難い(文献 90)。よって、宿主の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、BARNASE 蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有し、宿主の RNA を分解するが、それ以外の基質に対する活性を有するという報告はない。なお、MS8RF3 では、BARNASE 蛋白質は薬のタペート細胞において BARSTAR 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、そのリボヌクレアーゼ活性は阻害される。また、BARSTAR 蛋白質はリボヌクレアーゼを阻害する以外の機能を有するという報告はなく、植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用も報告されていない。さらに、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子はプロモーター PTA29 の支配下であり、タペート細胞以外の組織において発現することは考え難い。したがって、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質が植物体内の他の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、各蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、包括的な相同性検索及びアレルゲンエピトープ検索を行なったが、いずれにおいても既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、MS8RF3 の根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験（別添資料 7, p.6~7, 表 1~6）植物体内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験（別添資料 7, p.10~11, 表 9~14）根から分泌され土壌微生物相に影響を及ぼすものについては土壌微生物相試験（別添資料 7, p.13, 表 15~17）を行なった。その結果、いずれの調査項目においても、MS8RF3 と Drakkar の間に統計学的有意差は認められなかった。

さらに、国外での調査において、MS8RF3 種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含量は、カノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されている（別添資料 5, p.23, 表 FBN9501₉）。

以上から、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（ 2 ） 影響の具体的内容の評価

（ 3 ） 影響の生じやすさの評価

（ 4 ） 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

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

3 交雑性

（ 1 ） 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* が挙げられる。セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入された栽培種である。また、*B. rapa* 及び *B. juncea* は我が国において栽培種として古くから利用されているが、栽培由来の外来種である（文献 43）。なお、現在全国的に分布している *B. juncea* は第二次世界大戦後に帰化したものが広がったものと考えられている（文献 55）。さ

らに、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* は明治以降に人為的影響により我が国に侵入した外来種である。このように、いずれも栽培等に由来する帰化植物と考えられ、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は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4 その他の性質 - 1

第二、3(交雑性)に挙げた我が国に自生するセイヨウナタネ及びその近縁種はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等としては特定されなかった。しかし、MS8RF3 と近縁種が交雑した場合、雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、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が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられた。

我が国の隔離ほ場試験において MS8RF3 の交雑性について調査し、MS8RF3 がセイヨウナタネ及び *B. juncea* への交雑率に関する既往の知見を上回っていないことを確認した。よって、セイヨウナタネと近縁種の交雑性及び種間雑種が優占化する可能性について、既往の知見に基づき検討した。

1) セイヨウナタネとの交雑性

隔離ほ場で行なわれた交雑率の調査において、ミツバチの放飼条件下で MS8RF3 と隣接して栽培されたセイヨウナタネ品種の Drakkar 及び樺太への除草剤グルホシネート耐性の移行は、それぞれ 18.4~21.2% 及び 3.1~7.3% であった(別添資料 6, p.6, 表 1)。これらの結果は、セイヨウナタネの他殖率に関する既往の知見である 5~30% (文献 34 ; 58 ; 66) を上回るものではなかった。

2) *B. rapa* との交雑性

セイヨウナタネと *B. rapa* の交雑率については 0.4~1.5%(文献 75)、0.2%(文献 97)、6.5~7.1%(文献 95) 等の報告がある。また、F1 の生存率は平均で 2% 以下であり(文献 75)、*B. rapa* とセイヨウナタネの雑種の花粉の稔性が平均で 41~53%に減少すること(文献 38)が報告されている。さらに、F2 及び BC 世代での適応度についても、品種・集団間に差異があるものの、全体的に低くなると報告されている(文献 31)。

3) *B. juncea* との交雑性

隔離ほ場試験において、ミツバチの放飼条件下で MS8RF3 と隣接して栽培された *B. juncea* (黄カラシナ)への除草剤グルホシネート耐性の移行は 0.1%であった(別添資料 6, p.6, 表 1)。

セイヨウナタネとの交雑性に関しては、国外のセイヨウナタネほ場周辺で雑種が発生しているのが確認されている。交雑率は、生育するセイヨウナタネと *B. juncea* の比率に依存し、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合には 0.3~1.1%(文献 5)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を栽培した場合には 3%(文献 39)の雑種形成率が報告されている。隔離ほ場試験で認められた交雑率は、これらの知見を上回っていなかった。

また、雑種の花粉稔性は 0~28%であり、種子の生産量も少ない(文献 22)。また、セイヨウナタネを雌株として得られた雑種は弱く、生育遅延が認められ、生育段階で死に至ると報告されている(文献 9)。さらに、BC 世代でも同様に初期生育遅延や個体数の減少が報告されている(文献 69)。他方、*B. juncea* を雌株として得られた雑種の栄養生長は旺盛であるが、着莢率、結実粒数、千粒重や子実収量などは劣り、減数分裂に異常が見られ、花粉稔性も 20%程度に低下すると報告されている(文献 9)。

4) *B. nigra* との交雑性

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった(文献 5)。さらに人工交配によっても、ほとんど雑種は得られないか(文献 4)または全く得られなかったことが報告されている(文献 7; 42)。また、雑種が形成されたとしても花粉の稔性は高くても 3.1%であり、完全に不稔になるものも報告されている。さらに、F1 をセイヨウナタネによって戻し交配した場合の結実率(結実数/授粉した花)は 0.9%であり、*B. nigra* によって戻し交配した場合の結実率は 0.06%であった。また、これらの種子は萎縮しており、温室内においても発芽しなかった(文献 4)。このように、得られた雑種の稔性は低く、F2 や BC 世代を得るのは難しいと考えられる(文献 74)。

5) *R. raphanistrum* との交雑性

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを 1:600 の割合で栽培した場合、0.05% (95%信頼限界: 0.006 ~ 0.2%) の雑種形成が報告されている (文献 11)。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀 (文献 71; 95) であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群からセイヨウナタネとの雑種は確認されなかった (文献 88)。他方、人工交配や胚培養 (文献 42) あるいは細胞質雄性不稔系統 (文献 3; 20) を用いてセイヨウナタネと *R. raphanistrum* の雑種を作出することができる。しかし、得られた雑種の稔性は著しく低かったことが報告されている (文献 3; 20; 42)。

以上から、MS8RF3 と近縁種が交雑し、自然環境下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は、宿主品種の属する種であるセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

他方、導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子を有する組換えセイヨウナタネと *B. rapa* の雑種に、除草剤グルホシネートによる選抜を加えつつ *B. rapa* を 3 回戻し交配して得られた BC3 世代における耐性個体と非耐性個体との比較において、それぞれの花粉稔性、発芽後の生存性及び種子生産量等に顕著な差は認められなかったと報告されている (文献 83)。よって、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子が負担となり、短期的に種間雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。また、*barnase* 遺伝子を獲得した植物体は雄性不稔形質を示すが、優性の雄性不稔形質を有する植物体は世代を重ねるにつれ集団内から速やかに失われることが報告されている (文献 41) ことから、*barnase* 遺伝子が近縁種の個体群中に浸透し、個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

また、*barnase* 遺伝子はプロモーター PTA29 によりタペート細胞で発現して細胞を破壊し、花粉形成を阻害するが、仮に *barnase* 遺伝子がプロモーター PTA29 の支配を外れ、植物中で構成的に発現するプロモーターを獲得したとしても、その発現カセットを付与された植物体はリボヌクレアーゼの影響で正常に生育できないか、死に至ると考えられる。さらに、部位特異的のような誘導的プロモーターを獲得した場合でも、植物体の調節機能が正常に働かず、正常に生育する可能性は低いと考えられる。よって、これらのような植物体が自然条件下で正常に生育し、継続的にその遺伝子が後代に引き継がれる可能性は低い。したがって、これらの遺伝子が近縁

種の個体群中に浸透する可能性は低いと考えられる。

以上から、MS8RF3 と近縁種が交雑した場合、 雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、 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が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は、いずれも極めて低く、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

5 その他の性質 - 2

MS8RF3 は MS8 と RF3 を交配した F1 品種として栽培され、F2 世代の種子が収穫されるが、F2 世代には、MS8 及び RF3 と同様の性質を有すると考えられる、MS8RF3 が分離して生じた種子が含まれる。したがって、第一種使用規程に従い MS8RF3 を使用した場合に、MS8 及び RF3 と同様の性質を有する種子が我が国の環境に放出されることになる。しかしながら、MS8 は 2006 年 9 月に、RF3 は 2007 年 4 月に、それぞれ農林水産省及び環境省より、第一種使用等（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）の承認が得られており、第一種使用等により生物多様性影響が生ずる可能性は極めて低いと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国では、セイヨウナタネは河原や線路沿いでの群生が報告されている。また、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等に影響を及ぼしたとする報告はなされていない。さらに、人為的攪乱のない自然条件下では、ほ場から逸出して野生化したと考えられるセイヨウナタネの個体群は短期間で消滅することが報告されている。

我が国での隔離ほ場試験及び特定網室試験において、MS8RF3 の形態及び生育の特性、生育初期における高温耐性、成体の越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性及び休眠性について調査した結果、競合における優位性を高めることを示唆する形質は認められなかった。

MS8RF3 は改変 PAT 蛋白質により除草剤グルホシネート耐性を示す。本形質は除草剤グルホシネートの存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されることは想定し難いため、本形質を有していても競合における優位性を高めることはないと考えられた。また、交配親の MS8 には BARNASE 蛋白質による雄性不稔形質が、他方、RF3 には BARSTAR 蛋白質による稔性回復性がそれぞれ付与されているため、F1 品種である MS8RF3 では、BARNASE 蛋白質のリボヌクレアーゼ活性が BARSTAR 蛋白質によって抑制されて花粉を形成する。しかし、MS8RF3 の花粉の稔性は宿主品種の Drakkar と同等であり、サイズについては統計学的有意差がないことが確認されている。よって、本形質は競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

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

改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することは考え難い。また、BARNASE 蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有し、宿主の RNA を分解するが、それ以外の基質に対する活性を有するという報告はない。なお、MS8RF3 では、BARNASE 蛋白質は薬のタペート細胞において BARSTAR 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合し、そのリボヌクレアーゼ活性は阻害される。また、BARSTAR 蛋白質はリボヌクレアーゼを阻害する以外の機能を有するという報告はなく、植物中のリボヌクレアーゼに対する阻害作用も報告されていない。さらに、*barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子はプロモーター PTA29 の支配下にあり、タペート細胞以外の組織において発現することは考え難い。これらのことから、BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質が宿主の他の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられた。さらに、各蛋白質のアミノ酸配列に基づいて相同性検

索を行なった結果、いずれにおいても既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、我が国の特定網室において、MS8RF3の有害物質の産生性について、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった結果、いずれの調査項目においても宿主品種である Drakkar との間に統計学的有意差は認められなかった。

さらに、国外での調査において、MS8RF3のエルシン酸及びグルコシノレート含量はカノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されている。

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

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*及び*R. raphanistrum*が挙げられる。しかし、いずれも外来種であり、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。よって、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

しかし、MS8RF3と近縁種が交雑した場合、雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性について検討した。

MS8RF3の交雑性については、我が国での隔離ほ場試験においてセイヨウナタネ及び*B. juncea*への交雑率が調査され、既往の知見を上回らないことが確認されている。また、セイヨウナタネと近縁種の交雑性及び雑種が優占化する可能性については、第二、4に詳述したように、種々の生殖的隔離障壁が存在することから、自然条件下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられた。

他方、導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子を有するセイヨウナタネと *B. rapa* の戻し交配後代における除草剤グルホシネート耐性個体と非耐性個体との比較において、花粉稔性、発芽後の生存性及び種子生産量等に顕著な相違は認められなかったとの報告があることから、改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子が負担となり、短期的に種間雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、*barnase* 遺伝子を獲得した植物体は雄性不稔形質を示すが、優性の雄性不稔形質を有する植物体は世代を重ねるにつれ集団内から速やかに失われることが報告されていることから、*barnase* 遺伝子が近縁種の個体群中に浸透し、個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

また、*barnase* 遺伝子は、プロモーターPTA29の支配下で薬のタペート細胞におい

て発現して細胞を破壊し、花粉形成を阻害するが、仮に *barnase* 遺伝子がプロモーターPTA29 の支配を外れ、植物中で構成的に発現するプロモーターや部位特異的のような誘導的プロモーターを獲得した場合でも、植物体はリボヌクレアーゼの影響で死に至るか、調節機能が正常に働かず、正常に生育する可能性は低いと考えられる。よって、そのような植物体が自然条件下で正常に生育し、継続的にその遺伝子が後代に引き継がれる可能性は低い。したがって、本遺伝子が近縁種の個体群中に浸透する可能性は低いと考えられた。

F1 品種である MS8RF3 の収穫種子 (F2 世代) には、MS8 及び RF3 と同様の性質を有すると考えられる、MS8RF3 が分離して生じた種子が含まれるため、第一種使用規程に従い MS8RF3 を使用した場合に、そのような種子が我が国の環境に放出されることになる。しかしながら、MS8 及び RF3 については、農林水産省及び環境省より、第一種使用等 (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) の承認が得られており、第一種使用等により生物多様性影響が生ずる可能性は極めて低いと判断した。

以上を総合的に評価し、MS8RF3 を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

別添資料1： ベクターpTHW107及びpTHW118の塩基配列

社外秘情報につき非開示

別添資料2： T-DNA領域外に存在した遺伝子のサザンプロット分析
(MS8/RF3 Proof of absence of sequences derived from the
vector -part of the construct.)

社外秘情報につき非開示

別添資料3： ベクター上のT-DNA領域の塩基配列
(TDNA insert of pTHW107/pTHW118)

社外秘情報につき非開示

別添資料4： MS8及びRF3における挿入遺伝子のシーケンス解析結果
(Sequence of the *Brassica napus* elite event Ms8/Rf3 insert)

社外秘情報につき非開示

別添資料5： MS8及びRF3における分子分析及び形質発現に関する資料

社外秘情報につき非開示

別添資料6： 平成9年（1997年）隔離ほ場試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料7： 2006年 特定網室試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料8： イベント識別方法（MS8 及び RF3）

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 16年8月18日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変*bar, barnase, barstar, Brassica napus* L.) (MS8RF3, OECD UI ACS-BN005-8×ACS-BN003-6) (以下、「MS8RF3」とする。)の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は我が国へのMS8RF3種子の輸入者、MS8RF3種子を配給した我が国の種苗会社、その種子を買った我が国の農家や栽培者、配給した種子の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにしたMS8RF3種子の輸入者、我が国の種苗会社、農家や栽培者に生物多様性影響に関して情報提供を行い、当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいてMS8RF3種子を我が国に配給している、又はその可能性のある国の種苗会社及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、MS8RF3を不活性化する措置か、さもなければMS8RF3の環境への放出を防止するための措置及びすでに環境に放出されたMS8RF3の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

MS8RF3が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

緊急措置計画書(食用、飼料用に供する場合)

平成 16年8月18日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔及び稔性回復性セイヨウナタネ(改変*bar, barnase, barstar, Brassica napus* L.)、(MS8RF3, OECD UI: ACS-BN005-8×ACS-BN003-6) (以下、「MS8RF3」とする。)の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社はMS8RF3穀粒の我が国への輸入業者、我が国においてMS8RF3穀粒を配給した業者、輸入したMS8RF3穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにしたMS8RF3穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいてMS8RF3穀粒を我が国に配給している、又はその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、MS8RF3を不活性化する措置か、さもなければMS8RF3の環境への放出を防止するための措置及びすでに環境に放出されたMS8RF3の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

MS8RF3が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。