

除草剤グリホサート耐性テンサイ (*cp4 epsps, Beta vulgaris* L.subsp. *vulgaris* var *altissima*)(H7-1,OECD UI:KM-00H71-4) の生物多様性影響評価書の概要

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：テンサイ 英名：Sugar beet 学名：*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*

ロ. 宿主はアカザ科(*Chenopodiaceae*)に属する二年生草本であるテンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)に属する民間育成品種 3S0057 である。3S0057 は 2 倍体の多胚性品種である。

ハ. テンサイの正式な学名は *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *altissima* で、フダンソウ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *cicla*、*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *flavescens*)、食用根菜ビート(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*)、飼料用ビート(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *rapacea*)などのビート類と同様に *Beta vulgaris* 種に属する 1 変種である。

テンサイを含む全ての栽培ビート類の起源は東部地中海沿岸といわれている。祖先種はヨーロッパから西アジアの海岸によく見られるハマフダンソウ(*Beta vulgaris* subsp. *maritima*)と考えられている。古代のハマフダンソウが有史前より葉を食用とする野菜として栽培化され、根が肥大した形状の物が 1 世紀ごろより根部を利用するものとして栽培化されたと考えられている。

ハマフダンソウは起源中心地である東部地中海沿岸より、地中海に沿ってカナリア諸島、アゾレス諸島に広がり、その後大西洋沿岸に沿ってアイルランドとスコットランドの南部に拡大したと考えられており、現在ではエジプトからヨーロッパ北部に分布している。ハマフダンソウは海岸性の植物であり、高潮線から 10~20m 内陸の海岸にのみ自生している。自然環境に定着したテンサイもハマフダンソウと同様に海岸から離れた地域では生育していない。

なお、我が国においてテンサイ及び *Beta* 属植物が自生しているという報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. テンサイの中ではフダンソウが野生種に最も近い形態を示しており、栽培の歴史も古く有史以前からのものである。ビートの葉は紀元前 6 世紀から 4 世紀には栽培化され野菜として用いられてきたことから、おそらく野生種から初めに栽培種のフダンソウが分化し、ついで根菜の系統(食用根菜ビートや飼料用ビートなど)が分化し、最後にテンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)が分化したものであろうといわれている。実際に根部が肥大した飼料用ビートが栽培化されたのは 15 世紀であり、テンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)は 18 世紀末に初めて栽培化された。

1747 年に Markgraf はビートにショ糖が含まれている事を発見し、1790 年 Achard が砂糖製造に成功し育種にも手を広げた。後継者によって現栽培種の礎となったホワイトシレジア種が生まれた。1806 年ナポレオン 1 世による大陸封鎖令以降欧州各国に砂糖の自給と国内産業保護の機運が高まり、次第に隆盛になった。

現在、テンサイは世界中の温帯地域で栽培される主要砂糖製造用原料作物である。2001 年における全世界での生産量は約 2 億 3,425 万トンで、フランス(2,672 万トン)について、ドイツ(2,440 万トン)、米国(2,336 万トン)、ウクライナ(1,549 万トン)及びロシア(1,454 万トン)が主要生産国になっている。

ロ. テンサイが砂糖原料として日本に導入されたのは西暦 1,870 年頃であり、北海道に導入された。1950 年代に東北から九州へのテンサイ導入が試みられた事もあるが、暖地では病害の発生が多く、収量が少ない等採算性がとれずに断念され、現在の栽培は北海道に限られている。2003 年のテンサイの作付面積は約 6.8 万 ha、生産量はおよそ 416 万トンであった。

テンサイは諸外国では直播栽培であるが、我が国の栽培地帯(北海道)では春の播種期を早めるため主に移植栽培を行っている。播種は定植の約 1 ヶ月前である 3 月下旬に行う。ペーパーポットに土壌を詰めて播種し、ビニールハウスで育苗する。4 月下旬～5 月下旬の本葉 2～4 葉期にほ場に定植する。施肥量は 10a あたり堆肥 2 トン施用を前提として、化学肥料は窒素 12～16kg、リン酸 18～25kg、カリ 14～18kg が北海道の基準となっている。栽培期間中は適宜薬剤散布や機械により除草及び病害虫防除を行う。テンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)は 2 年生作物であり、1 年目の冬季の低温により生殖生長への転換とそれによる根部の収量・糖分低下が起こることから、収穫は生育初年度の 10～11 月に行われる。従って、実際の栽培において種子生産目的以外では種子が形成さ

れる可能性は極めて低い。

テンサイは生鮮食品としてはほとんど使用されていない。テンサイは砂糖、パルプ及び糖蜜に加工される。テンサイを糖に加工する際に副産物として生産される乾燥ビートパルプは、単純乾燥物、乾燥糖蜜(約25%の糖蜜を含む)及びペレット化糖蜜など、多くの形で生産され販売されている。これらは乳牛、肉牛及びヒツジの飼料として使用されている。もう一つの重要な副産物は糖蜜であり、これは結晶化できない48%のショ糖を含む粘稠な液体である。糖蜜は、酵母、化学物質、医薬品の生産やウシ用混合飼料の生産に使用されている。日本は2002年に、テンサイ糖としておよそ2トン、ビートパルプとしておよそ72万トンを輸入しており、ビートパルプは主に米国(36.4万トン)、中国(28.1万トン)、チリ(8.8万トン)から輸入されている。また、2003年に我が国に輸入されたテンサイの種子はおよそ68.7トンであり、主にドイツ(約34.8トン)、フランス(約30.9トン)、ベルギー(約2トン)、アメリカ(約0.8トン)から輸入されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

テンサイは種子繁殖する二年生のアカザ科作物で、基本染色体数は $x=9$ であり、2倍体、3倍体、4倍体が存在する。草丈は通常30cm~120cmだが200cmに達する場合もある。葉は有柄で地表部にある冠部からロゼッタ状に出葉する。葉柄の長さ、葉身の形状、大きさ、色は品種・発生時期によって異なる。葉柄の地表面に対する角度にも変異があり、直立型、開平型、中間型などと区別する。根は生育初年度に著しく肥大する。

テンサイは通常春に播種され、生育初年度は栄養生長を行い根部が充実する。一般に生育相は幼苗期、繁茂期、登熟期の3期に分けられる。幼苗期は気温の上昇とともに出葉し、7月上旬には大型葉を抽出する。繁茂期は7月中旬から9月上旬で、この時期に光合成が盛んに行われ、根部の肥大が進む。登熟期は9月以降で、この時期に根部の肥大はさらに進み、地上部では葉の黄化・凋落が始まり、糖が盛んに蓄積される。

冬季の低温(4~7℃)により春化をうけ生殖生長への転換が起こり、翌春から夏の長日条件により花芽が分化してとうが立ち(抽苔)、開花して種子を生産する。開花は6~7月ごろで、種子は8月ごろに形成される。春化に必要な低温の期間は90~110日間であり、品種により異なる。生育初年度にも低温にさらされると生殖生長への転換が起こり、花芽が形成されて抽苔することがある。しかし生育初年度における抽苔は著しい収量・糖分の低下を引き起こすため、近年は初年度

に抽苔が生じない品種が育成され、栽培されている。花序は主茎の先端部に形成され、通常大きく、集散花序で分枝する。雌雄同花であり、3本の雌しべの周囲を5本の雄しべ及び5枚の細い萼片による花被が囲んでおり、花弁はない。花は主茎の先端部及び花序の側枝に付く。

テンサイは本来は複数の花で構成される種房又は種球を有し、複数の種が集合して多胚のテンサイ種子を形成する。しかし1粒の種子から多数の個体が出芽することは栽培上間引きに労力を多く要し機械化が困難なため、大規模な採種集団の中から特殊なタイプとして単胚種子を生じる劣性遺伝子 m ホモ型が選抜された。1948年のこの発見以来、遺伝子 m はあらゆる品種に導入されるようになった。

現在のテンサイ栽培品種のほとんどが細胞質雄性不稔(CMS)の一代雑種である。テンサイのハイブリッド品種の開発は、テンサイにおける細胞質雄性不稔(CMS)の発見とその後のハイブリッド育種技法の開発により可能となった。テンサイのCMSは、核遺伝子間の相互作用とミトコンドリアゲノムの変異によるものである。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

テンサイの栽培は温帯から亜寒帯に広く分布している。180～200日の生育期間中に積算温度:2,400～3,000℃、平均気温:12.3～16.4℃を要し、降水量:年間600mm程度が理想的といわれる。北海道では春先の残雪と低温、10月の霜雪が生育期間を短縮させ、かつ秋雨が糖分の低下をもたらして低収・低糖分に悩まされた。土壌は作土が深く有機質に富み、排水良好で、pHは中性ないしアルカリ性が適する。

ハ. 捕食性又は寄生性

—

ニ. 繁殖又は増殖の様式

- ① テンサイの脱粒性は弱いですが、成熟後に長期間放置された場合には種子が脱粒する場合があります。通常テンサイの種子といわれるものは植物学上の果実に相当し、正確には球果もしくは種球と称し、この中に1から4個の真の種子(真正種子)が含まれる。複数の真正種子が含まれる原因は、花茎の葉腋に着生した花房の各花が密着しており、種子が登熟するにつれて合体するからである。真正種子を1個含む種球を単胚種子、2個以上含む種球を多胚種子というが、種子中に多数の胚を含むという意味ではない。テンサイの種子の寿命は長く、土壤中に10年以上生存することが可能である。実験室の条件で、採種後6年目の種子で70%、8年目の種子で59%の発芽率が確認されている。
- ② テンサイは種子により繁殖し、植物組織からの自然増殖は見られない。暖冬であれば根の収穫後に残った冠(根頭)が翌春にとうを生じることがある。
- ③ テンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)は高度の自家不和合性を有する他殖性の二年生植物である。テンサイは風媒を主体とする。開花期間は約4週間であり、通常午前中に開花する。雌蕊は開花時には完全には成熟しておらず、これが自家不和合性の1つの原因となっている。雌蕊は開花後2週間程度受精可能である。

一般的にはテンサイの自家不和合性は配偶体型であり、少なくとも4遺伝子座が関与しており、これらの遺伝子座はそれぞれ複数の対立遺伝子を有する。その他にも複数の修飾遺伝子が関与していると考えられている。この遺伝的機構が破壊されると「偽自家受精」や「偽自家受粉」が生じることがある。この現象は異なった遺伝子型間では多少見られ、環境要因、特に温度の影響を受けやすい。また、それとは別に、特殊な自殖遺伝子である S^f 遺伝子を保有する個体は放任受粉条件下においても90~95%の比率で自殖種子をつける。

現在、使用されているテンサイの栽培品種は細胞質雄性不稔品種が大半であるため、これらの品種においては自家不和合性の強弱に関わらず種子が生じることがほとんどない。

テンサイ(*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)はフダンソウ、食用根菜ビート、飼料用ビートなどの *vulgaris* 種に属する各変種と同種であるため、これらの変種との交雑においては生殖隔離機構は存在せず、容易に交雑可能である。

テンサイすなわち *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima* が属する *Beta* 属 *Beta* 亜属に属する野生種である *B. maritima*、*B. macrocarpa*、*B. artiplicifolia* の間の交雑についての以前の報告は、欧州共同体が資金提供した BRIDGE 試験 (BRIDGE, 1993)により確認されている。*B. maritima* はアジアのステップ地帯から

東インド、カナリア諸島、ヨーロッパ北海沿岸と広く分布している。*B. artiplicifolia* と *B. macrocarpa* の分布は地中海地方に限定されている。*B. macrocarpa* と *B. vulgaris* の雑種はテンサイ畑に非栽培種混入の問題を生じさせているが、これら2つの種の間には遺伝的障壁があり、雑種では花粉不稔や胚の死滅が見られる。BRIDGE 試験では、これより頻度は低いものの *B. vulgaris* と *B. macrocarpa* の雑種も見られている。

Beta 属 *Corollinae* 亜属の品種の中には、困難は伴うものの、人工雑種作成の可能な品種がある。しかし、これらの雑種は不稔性が高く、テンサイとの戻し交配ではほとんど種子を生じない。テンサイと *Procumbentes* 亜属との間の人工交雑による F1 は通常芽生え期に死滅する。これを防止するためにはテンサイに接ぎ木をするとよく生育する。これらの雑種はほぼ完全に不稔であり、戻し交配ではほとんど種子を生じない。栽培種テンサイと *Nanae* 亜属の *B. nana* との間の雑種は報告されていない。

結論として、アカザ科の中では、テンサイは *Beta* 属 *Beta* 亜属に属する野生種とのみ交配が可能である。しかし我が国には *Beta* 属植物は自生しておらず、さらに、テンサイの収穫は、特に栽培用種子を生産する目的以外では花を形成する前である生育初年度の秋に行われるため、開花する可能性は非常に低い。以上の事から、我が国においてテンサイが近縁野生種と自然交雑する可能性は考えられない。

- ④ テンサイは風媒花である。昆虫による花粉の移動も行われる事があるが、頻度は低く、受粉にはあまり寄与しない。花粉粒は球形で表面に多数の凹凸がある。1 葯あたりの花粉数は約 17,000 粒である。従って 1 花あたり約 85,000 粒、1 個体あたり約 10 億粒の花粉を産生すると考えられる。花粉の寿命は環境条件、特に湿度によるが最大 24 時間である。2 倍体に生じる 1 倍体花粉のサイズは直径約 20 μ m であり、3 倍体に生じる 2 倍体花粉は約 30 μ m である。

OECD のテンサイ種子生産計画によれば、種子生産地として承認されるのは *Beta* 属が自生していないことが確認された場所のみである。交配や商業種子生産を行う際に設定されている隔離距離は国によって異なるが、米国オレゴン州の場合にはテンサイの他品種からはおよそ 972m、その他の *Beta* 属植物とは 2,432m 以上隔離するよう義務付けられている。これはテンサイの花粉飛散距離は 1,000m 以内であるとする報告に基づいている。

ホ. 病原性

—

へ. 有害物質の産生性

他感物質等のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

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

除草剤グリホサート耐性テンサイ (*cp4 epsps*, *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var *altissima*)(H7-1, OECD UI: KM-000H71-4)(以下本組換えテンサイとする)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 p9 の表 1 に示した通りである。

ロ. 構成要素の機能

本組換えテンサイの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は p9 の表 1 に示した。

①目的遺伝子である *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS 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一つであり、植物中では葉緑体または

色素体に存在する。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。本経路は、その第一段階に関与する3-デオキシ-D-arabino-ヘプツロソン酸-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されたり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。このことはEPSPSが本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS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。実際に、通常の40倍のEPSPS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、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/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元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。また、EPSPS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(S3P)から、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、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一EPSPS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が、その反応性はS3Pとの反応性の200万分の1にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

以上のことから、植物EPSPS蛋白質と機能的に同一である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る。

②CP4 EPSPS蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(AD4, TOXIN5, ALLPEPTIDE)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

表 1 本組換えテンサイの作出に用いたプラスミド PV-BVGT08 の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
右境界配列 (Right Border)	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列の DNA 断片。右境界配列は、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される。
P-FMV	figwort mosaic virus の 35S プロモーター。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。尚、FMV はわが国に未発生ウイルスであるが、FMV の近縁ウイルスがテンサイが属する <i>Beta</i> 属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた。
ctp2	<i>Arabidopsis thaliana</i> の <i>epsps</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列の N 末端。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
cp4 <i>epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株の <i>epsps</i> 遺伝子。機能の詳細については p7-8 に記載した。
E9 3'	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
左境界配列 (Left Border)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左境界配列の DNA 断片。左境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。
(T-DNA の外側の構成要素)	
ori-V	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ABI 株においてベクターに自律増殖能を付与する。
ori-322	<i>E. coli</i> プラスミド pBR322 に由来する複製開始領域であり、ベクターに <i>E. coli</i> における自律増殖能を付与する。
rop	pBR322 由来に由来する複製開始制御領域であり、 <i>E. coli</i> のような宿主内でのプラスミド数の維持の為に RNA プライマーの形成を抑制する。
aad	Tn7 由来の 3''(9)-O-アミノグリコシドアデニリルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン、あるいはストレプトマイシン耐性を付与する。

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

本組換えテンサイの作出に用いられたプラスミド・ベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*)由来のプラスミド pBR322 などをもとに構築された。

ロ. 特性

本組換えテンサイの作出に用いられた PV-BVGT08 の塩基数は 8,590bp である。大腸菌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や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 *aad* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換えテンサイの作出には、上記の *aad* 遺伝子を有する pBR322 由来のベクターを元にして、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセット([P-FMV]-[*ctp2*]-[*cp4 epsps*]-[E9 3'])を連結したプラスミド PV-BVGT08 を構築し、このプラスミドをベクターとして用いた。

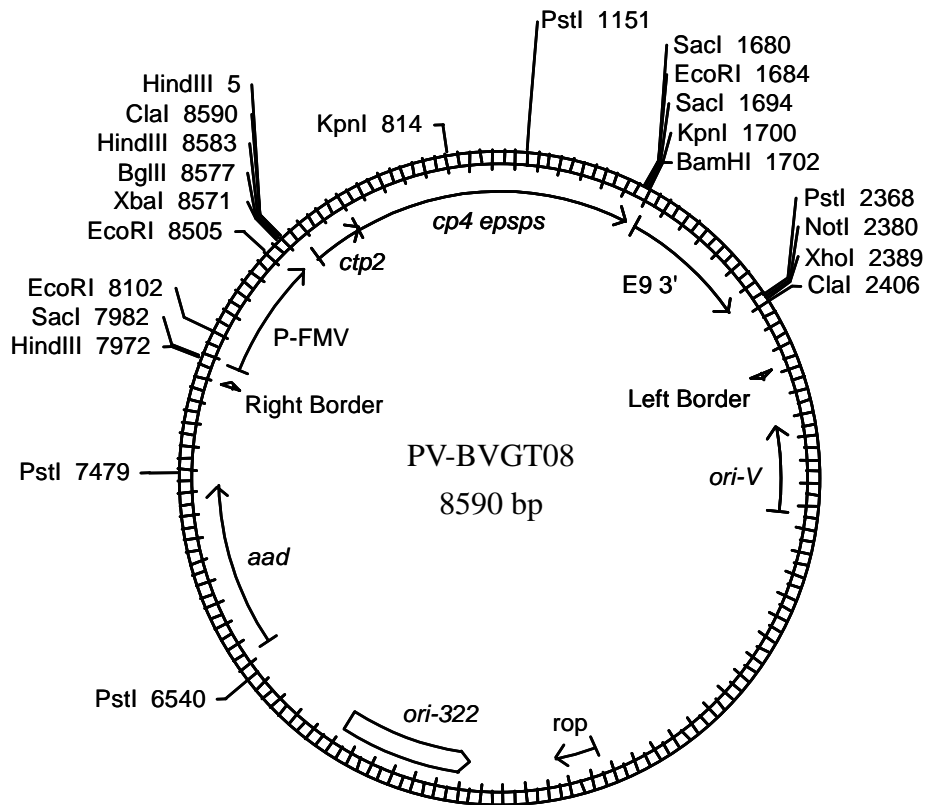


図1 PV-BVGT08 のプラスミドマップ

本組換えテンサイに導入された T-DNA 領域は上図の Right Border から時計回りに Left Border までの領域である。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド・ベクターPV-BVGT08中のT-DNA領域をアグロバクテリウム法により従来テンサイの育成品種である3S0057の幼植物の子葉組織に導入した。

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミドPV-BVGT08を導入した *Agrobacterium tumefaciens* を滅菌したテンサイ幼植物の子葉に接種した後インキュベートし、2~4日間アグロバクテリウムと共存培養した。その後、500mg/Lのカルベニシリンを含む除菌培地でアグロバクテリウムを除いた。そして、グリホサートを含む選抜培地で培養を行ってカルス選抜を行った後、得られたカルスを再分化させてポットに移植し、再分化個体におけるグリホサートに対する耐性を評価した。再分化世代(R0)において導入遺伝子の解析を行うとともに、実際にF1雑種品種を作成して1995年より圃場試験を行い、最終的に商品化系統としてH7-1系統を選抜した。

なお、本組換えテンサイはモンサント社とドイツのKWS SAAT AG社との共同開発によるものである。

我が国における認可状況は以下の通りである。

2002年12月 農林水産省に飼料としての安全性確認の申請を行った。現在審査中である。

2003年6月 厚生労働省より「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

(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

染色体上である。

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

サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、本組換えテンサイのゲノム中 1ヶ所に 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。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されておらず、T-DNA 領域内の *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットも完全な状態で挿入されていた。更に挿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におけるサザンブロット分析によって示された。

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

1 コピーなので該当しない。

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

本組換えテンサイの葉及び根部(根組織を加工処理したブライ)中での CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。その結果、CP4 EPSPS 蛋白質の発現量は、収穫時の葉において平均値 161 μ g/g 生組織重で、その発現量の範囲は 112~201 μ g/g 生組織重量であり、一方、根部(ブライ)においては平均値 181 μ g/g 生組織重で、発現量の範囲は 145~202 μ g/g 生組織重であった。尚、CP4 EPSPS 蛋白質の発現の安定性に関しては、各世代での除草剤グリホサートに対する耐性により評価している。

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

本組換えテンサイの作出にはアグロバクテリウム法を用いているが、アグロバクテリウムが残存していない事を確認している為、移入された DNA 断片が野生植物等に伝達されるおそれは無い。

(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

サザンブロットによる特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 $10\mu\text{g}$ のゲノミック DNA を用いれば検出可能である。尚、PCR による検出・同定方法に関しては、現在開発中である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. 本組換えテンサイ中において *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS 蛋白質が発現していることが除草剤グリホサートを散布することによって選抜の過程で確認されている。

ロ. 2000年～2001年に米国、イタリアの9箇所のほ場およびドイツの温室において、本組換えテンサイの特性検定試験を行った。対照品種は本組換えテンサイの遺伝子導入親である 3S0057 を用いた。なお、テンサイの品種改良においては通常2倍体の単胚性 CMS 系統を母本に、2倍体もしくは4倍体の多胚性系統を花粉親に用いて育成を行う。このとき、2倍体の花粉親系統は自殖2代目又は3代目の系統であり、遺伝的に十分固定していない。本組換えテンサイの作出に用いた遺伝子導入親である 3S0057 系統も自殖3代目の2倍体花粉親であるため、遺伝的に固定されていない。本組換えテンサイは再分化(R0)個体より採種した R1 個体を花粉親として R2 世代を育成し、この R2 世代を元に後代系統が育成されている。従って本組換えテンサイ系統においては 3S0057 の有する遺伝的変異を引き継いでおり、後代に進むに従ってその変異が多様に分離するため、本組換えテンサイの後代系統は厳密には 3S0057 と遺伝的背景が同じではない。以上の理由より、ほ場試験において本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間に差異が生じることが予想されたため、ほ場試験においては KWS 社の育成した標準的な単胚性品種と多胚性品種を比較品種として用いた。

① 形態及び生育の特性

16項目(苗立ち率、胚軸色、葉色、葉の白化程度、葉形(縦横比)、分枝型、草勢、初年度の抽苔個体率(%)、根部収量、砂糖収量(テンサイ根重あたり及び単位面積あたり)、抽苔期、開花始、種子の成熟期、早晚性、種子の休眠性、発芽率について本組換えテンサイ及び対照の非組換えテンサイ、比較の従来テンサイ品種の間の形態特性及び生育の差異を調査した。

胚軸色、葉色、葉の白化程度、葉形(縦横比)について本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイ並びに従来テンサイ品種(多胚性品種 12 品種、単胚性品種 12 品種)との間で比較したところ、差異は認められなかった。

分枝型、抽苔期、開花初、種子の成熟期、早晩性について、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイ並びに従来テンサイ品種(多胚性品種 10~12 品種、単胚性品種 10~12 品種)との間で比較したところ分枝型において差異が認められたが、その他の項目では差異は認められなかった。分枝型では、本組換えテンサイの2次分枝数が20~30本であったのに対し、対照の非組換えテンサイの2次分枝数は25~35本であった。

5℃、15℃、25℃、昼 25℃夜 15℃の4条件下における種子の発芽率について、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間で比較した。発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子については枯死種子率(腐敗し完全に発芽力を失っていると判定される種子)と非発芽率(休眠種子率:12日間の観察期間終了時に発芽しなかった種子)に分けて測定し、分散分析により差異を検定した。この結果、全ての項目において本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間に統計学的有意差は認められず、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間において発芽率及び種子の休眠性に差異は認められなかった。

苗立ち率、草勢、初年度の抽苔個体率(%), 根部収量、砂糖収量(テンサイ根重あたり)及び砂糖収量(単位面積あたり)の6項目について測定を行い、得られた結果について統計処理を行った。その結果、すべての項目において統計学的有意差は認められなかった。

② 生育初期における低温又は高温耐性

一般的に従来テンサイ品種では個体間で耐寒性に差異が見られるが、これは各個体の遺伝的背景の差異によるものである。KWS社の育種家により、本組換えテンサイ H7-1 系統の開発開始(1993年)からこれまで本組換えテンサイの系統維持・選抜過程において、本組換えテンサイの生育初期における低温又は高温耐性は、従来テンサイ品種の低温または高温耐性の範囲内であったと報告されている。さらに、1995年から2004年までの10年間、431箇所における海外でのほ場試験において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に生育初期における生育特性の差異があったという報告はなかった。隔離ほ場試験において調査する予定である。

③ 成体の越冬性又は越夏性

第一の1-(3)-イ(p3)に述べたとおり、テンサイは二年生であり、生育初年度の冬季の低温条件(4~7℃)は生殖生長に転換して種子を生産するために必要である

が、さらに低温(-10℃以下)の条件では1週間で枯死する。一般的に従来テンサイ品種では個体間で耐寒性に差異が見られるが、これは各個体の遺伝的背景の差異によるものである。KWS社の育種家により、本組換えテンサイ H7-1 系統の開発開始(1993年)からこれまで本組換えテンサイの系統維持・選抜過程において、本組換えテンサイの耐寒性は、従来テンサイ品種の耐寒性の範囲内であったと報告されている。さらに、1995年から2004年までの10年間、431箇所における海外でのほ場試験において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に成体における生育特性の差異があったという報告はなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

花粉の稔性(花粉の発芽率)及び花粉のサイズについて、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイ並びに従来テンサイ品種(多胚性品種 10~12 品種、単胚性品種 10~12 品種)との間で比較したところ、花粉のサイズについて本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間で若干の差異が認められたが、この値は比較の従来テンサイ品種の範囲内であった。花粉の直径については、本組換えテンサイの平均値が $19.9 \mu\text{m}$ (範囲 $17.8 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であったのに対し、対照の非組換えテンサイでは $21.7 \mu\text{m}$ (範囲 $20.2 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であった。

⑤ 種子の生産量、休眠性及び発芽率

KWS社の育種家により、本組換えテンサイ H7-1 系統の開発開始(1993年)からこれまで本組換えテンサイの系統維持・選抜過程において、本組換えテンサイの種子の生産量は、従来テンサイ品種の種子の生産量の範囲内であったと報告されている。また、種子生産に関わると考えられる生殖器官の形態特性(蒴の重さ、1花あたりの蒴の数、1花あたりの雄蕊の数、花粉の直径、1蒴あたりの花粉数、花粉の発芽率、子房あたりの胚珠数、胚珠の長さ、胚珠の幅、胚珠の縦横比)について本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイ並びに従来テンサイ品種(多胚性品種 10~12 品種、単胚性品種 10~12 品種)との間で比較したところ、1蒴あたりの花粉数及び花粉の直径において本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間に若干の差異が認められたが、その他の形質においては差異は認められなかった。1蒴あたりの花粉数については、本組換えテンサイが 49118 粒であったのに対し、対照の非組換えテンサイでは 52254 粒であった。花粉の直径については、本組換えテンサイの平均値が $19.9 \mu\text{m}$ (範囲 $17.8 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であったのに対し、対照の非組換えテンサイでは $21.7 \mu\text{m}$ (範囲 $20.2 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であった。

p14の第一の2-(6)-ロ-①に述べたとおり、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間に種子の休眠性及び発芽率に統計学的有意差は認められなかった。

⑥ 交雑率

p5の第一の1-(3)-ニ-③に記述したように、我が国では本組換えテンサイと交雑可能な *Beta* 属に属する近縁野生種は生育していない。従って交雑率の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

テンサイにおいて有害物質の産生性は報告されていない。本組換えテンサイは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の2-(1)-ロ-①に示したように、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合成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 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。実際に、本組換えテンサイの食品安全性の評価の過程で、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間でアミノ酸組成に相違は無い事が確認されている。さらに、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/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元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。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えテンサイ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断されたため、有害物質の産生性については試験を行っていない。確認のため、隔離ほ場試験において後作、鋤き込み、土壌微生物相試験を行う予定である。

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

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

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板 4717

名称：日本モンサント隔離ほ場

使用期間：平成 17 年 4 月 1 日から平成 17 年 12 月 31 日まで

1 隔離ほ場の施設

(1) 7836 m²の隔離ほ場の外周を囲むように約 1.5m の高さのフェンスを設置して

いる。

- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること明示した標識を掲げている。
- (3) 隔離ほ場で使用した機械又は器具、隔離ほ場で作業に従事した者の靴等に付着した遺伝子組換え農作物を洗浄するための洗い場、隔離ほ場で使用した靴等を保管する靴箱等を設置している。
- (4) 3196 m²の隔離畑を囲むように防風網を設置している。

2 隔離ほ場の作業要領

- (1) 試験対象植物以外の植物の隔離圃場内における生育を最小限に抑えるため、隔離圃場内の試験の目的にあわせて雑草管理は適宜行う。
 - (2) 播種及び育苗は弊社河内研究農場内の温室内で行い、隔離ほ場には本葉2～4枚の幼苗を移植する。播種はペーパーポットに各ポット1粒ずつ点播し、発芽しなかったポットは種子を完全に不活化するためにオートクレーブ処理の後、隔離ほ場内に鋤き込んで処分する。隔離ほ場において本組換えテンサイの栽培が終了した後、当該遺伝子組換え農作物を隔離ほ場内に鋤き込むか、焼却炉で焼却することにより不活化する。
 - (3) 本組換えテンサイを隔離ほ場の外に運搬し又は保管する場合は、密閉された容器に本組換えテンサイを入れる。
 - (4) 隔離ほ場で使用する機械又は器具は隔離ほ場専用の物を使用する。やむを得ずほ場害に持ち出す際には十分に洗浄し、隔離ほ場外に土や植物残渣を持ち出すことの無いように十分留意する。
 - (5) 隔離ほ場で作業に従事した物の靴等は、隔離ほ場内に設置した洗い場で洗浄する。
 - (6) 本組換えテンサイの花粉飛散を防止するため、抽苔した場合には調査のち開花前に切除する。
 - (7) 隔離ほ場内の設備については随時点検、整備する。
 - (8) (1)～(7)に掲げる事項を使用等をするものに遵守させること。
 - (9) 生物多様性影響のおそれがあると認められたときに添付書類の緊急措置計画書に定められた生物多様性影響を効果的に防止するための措置を確実に講ずること。
- (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じ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

本組換えテンサイ 3～4 系統と従来テンサイ品種の病害虫感受性に関して、5 種の病害の発生に着目して評価した。これらの試験は品種登録試験の一環であり、テンサイに関する専門的な知識を備えた育種家が観察している。その結果、本組換えテンサイの病害抵抗性は従来テンサイ品種の病害抵抗性と同程度の抵抗性を示すか、あるいは若干抵抗性において優れていた。ただし、本組換えテンサイの複数系統で一貫して抵抗性が高まっているわけではなかったため、これは各系統の遺伝的背景によるもので導入遺伝子によるものではないと考えられた。従って、病害感受性について本組換えテンサイと従来テンサイ品種の間に差異は無いと考えられた。

さらに、1998～2001 年に米国において行われた 98 件のほ場試験において、本組換えテンサイと従来テンサイ品種の病害虫感受性に関して 10 種の病虫害の発生に着目してモニタリングを行い評価を行った。この結果、病害に関しては 1 件のほ場試験においては本組換えテンサイのうどんこ病に対する抵抗性が従来テンサイ品種に比較して低く、3 件のほ場試験においてはうどんこ病に対する抵抗性が高く、2 件のほ場試験においてはテンサイ褐斑病に対する抵抗性が高かった。これらはいずれも本組換えテンサイの遺伝的背景によるものと考えられ、また 98 件のほ場試験において一貫した傾向は見られなかったため、本組換えテンサイの導入遺伝子によるものではないと考えられた。また、虫害については本組換えテンサイと従来テンサイ品種の間で差異は報告されなかった。

以上の結果より、本組換えテンサイと従来テンサイ品種の間に病害感受性に関して差異は認められなかった。

(6) 国外における使用等に関する情報

これまで 1995～2004 年の間に 13 ヶ国において延べ 431 ヶ所の圃場試験が行われているが、非組換えテンサイと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

諸外国における認可状況は以下の通りである。

2003 年 4 月 カナダ厚生省(Health Canada)に食品としての安全性確認の申請を行った。現在審査中である。

- 2003年4月 カナダ農務省(CFIA)に飼料及び無規制裁培の申請を行った。現在、審査中である。
- 2003年11月 米国農務省(USDA)に無規制裁培の申請を行った。現在、審査中である。
- 2004年8月 米国食品医薬品局(FDA)より食品及び飼料としての安全性認可を受けた。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国において、テンサイは西暦 1870 年頃に導入されこれまでに西南暖地、東北地方、北海道において栽培されているが、我が国においてテンサイ及び *Beta* 属植物が自生しているという報告はない。この理由としては、1)テンサイの栽培品種のほとんどが、細胞質雄性不稔品種であること、2)雑草との競合性が弱いこと、3)ほ場で栽培される場合は、初年度に充実した根部を収穫するため、翌年の開花、結実まで至らないことなどが挙げられる。

本組換えテンサイは非選択性除草剤グリホサートに高い耐性を持つが、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られない。

競合における優位性に関わる諸形質について、第一の 2-(6)-① 形態及び生育の特性、⑤種子の生産量、休眠性及び発芽率、そして第一の 3-(5) 害虫/病原菌に対する感受性に記載した調査項目について本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイを比較検討したが、分枝型、花粉の直径、1 蒴あたりの花粉数を除く全ての項目で両者の間に差異は認められなかった。差異の認められた分枝型では、本組換えテンサイの 2 次分枝数の平均値が 20-30 本であったのに対し、対照の非組換えテンサイは 25-35 本であり、本組換えテンサイで 2 次分枝数が約 5 本少ない値を示したが、この値は比較の従来品種の値の範囲内であった。1 蒴あたりの花粉数については、本組換えテンサイが 49118 粒であったのに対し、対照の非組換えテンサイでは 52254 粒であり、花粉の直径については、本組換えテンサイの平均値が $19.9 \mu\text{m}$ (範囲 $17.8 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であったのに対し、対照の非組換えテンサイでは $21.7 \mu\text{m}$ (範囲 $20.2 \sim 21.5 \mu\text{m}$)であったが、これらの値についても、比較の従来品種の値の範囲内であった。

以上のことから、本組換えテンサイは、我が国の自然条件下で生育した場合の

特性は明らかにされていないが、非組換えテンサイとの間に大きな相違はないと考えられ、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いと考えられた。

(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、本組換えテンサイは、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がないと判断された。

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

これまでテンサイが生物多様性に影響を生じさせるような有害物質を産生するといった報告はされていない。

本組換えテンサイは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)-ロ-①に示したように、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 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。実際に、本組換えテンサイの食品安全性の評価の過程で、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間で主要構成成分並びにアミノ酸組成に相違は無いことが確認されている。さらに、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品及び飼料安全性の評価の過程においても、芳香族アミノ酸含量に元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。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えテンサイ中に有害物質が産生さ

れるとは考えにくいと判断された。

また、1995～2004年の間に行われた延べ431ヶ所における本組換えテンサイのほ場試験において、ほ場内の益虫等に影響がないかどうかを目視観察によってモニタリングしているが、本組換えテンサイとの間に相違は報告されていない。

以上のことから、有害物質の産生性について、本組換えテンサイは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換えテンサイとの間に大きな相違はないと考えられ、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いと考えられた。

(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、本組換えテンサイは、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生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

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

p5の第一の(3)-ニ-③に記述したように、我が国では本組換えテンサイと交雑可能な *Beta* 属に属する近縁野生種は生育していない。

よって、交雑性について、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と考えられた。

(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、本組換えテンサイは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率、休眠性)を本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間で比較検討した。その結果、分枝型、花粉の直径、1 蒴あたりの花粉数で両者の間に差異が認められたが、その他の項目では認められなかった。分枝型、花粉の直径、1 蒴あたりの花粉数については差異が観察されたが、本組換えテンサイの値は比較に用いた従来品種の範囲であり、これらの差異により競合における優位性が高まるとは考えられないと判断された。

また、本組換えテンサイは除草剤グリホサートに耐性を持つが、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られない。

以上から、本組換えテンサイは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換えテンサイとの間に大きな相違は無いと考えられ、第一種使用規程に従って、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いて使用する範囲内では、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。

テンサイに関して、これまでに有害物質の産生性は報告されておらず、これまでの海外でのほ場試験においても有害物質の産生性に関わる相違は報告されていない。また、本組換えテンサイの食品安全性の審査の過程において、主要構成成分並びにアミノ酸組成に相違は無いことが確認されている。

以上から、本組換えテンサイは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換えテンサイとの間に大きな相違は無いと考えられ、第一種使用規程に従って、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いて使用する範囲内では、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。

本組換えテンサイと交雑可能な *Beta* 属に属する植物は我が国に生育していない。

以上から、本組換えテンサイは、第一種使用規程に従って、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いて使用する範囲内では、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。

よって、総合的評価として、本組換えテンサイを第一種使用規程に従って、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いて使用する範囲内では、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと結論された。