

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*, 改変 *barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書

5

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 1

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 1

(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

(2) 使用等の歴史及び現状 2

10

(3) 生理学的及び生態学的特性 3

イ 基本的特性 3

ロ 生息又は生育可能な環境の条件 3

ハ 捕食性又は寄生性 3

ニ 繁殖又は増殖の様式 3

15

ホ 病原性 6

ヘ 有害物質の産生性 6

ト その他の情報 7

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

20

イ 構成及び構成要素の由来 8

ロ 構成要素の機能 8

(2) ベクターに関する情報 14

イ 名称及び由来 14

ロ 特性 15

25

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 15

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 15

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 15

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 15

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 18

(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 24

(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違 24

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 25

35

(1) 使用等の内容 25

(2) 使用等の方法 25

	(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.....	27
	(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.....	27
5	(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.....	27
	(6)	国外における使用等に関する情報.....	27
	第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	28
	1.	競争における優位性.....	28
10	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	28
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	29
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	29
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	29
	2.	有害物質の産生性.....	29
15	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	29
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	30
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	30
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	30
	3.	交雑性.....	30
20	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	30
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	31
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	31
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	31
	4.	その他の性質.....	31
25	第三	生物多様性影響の総合的評価.....	34
		参考文献.....	37
		別添資料の内容.....	42

緊急措置計画書

30	試験計画書	社外秘情報につき非開示
----	-------	-------------

第一種使用規程承認申請書

平成 28 年 10 月 3 日

5 農林水産大臣 山本 有二 殿
環境大臣 山本 公一 殿

10 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 ハーラルト・プリンツ 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

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

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>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 <i>bar</i>, 改変 <i>barnase</i>, <i>barstar</i>, <i>Brassica napus</i> L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7)</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：茨城県筑西市向上野 1500 番地 41 名称：バイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 32 年 3 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入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所に掲げている。</p> <p>(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。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置している。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えセイヨウナタネ及び比較対照の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。</p> <p>(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。</p> <p>(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セイヨウナタネを隔離ほ場内にすき込む等により确实</p>

	<p>に不活化する。</p> <ul style="list-style-type: none">(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者に遵守させる。(7) 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書に基づき、速やかに対処する。
--	---

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

5 (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

和名：セイヨウナタネ

10 英名：Oilseed Rape

学名：*Brassica napus* L.

② 宿主の品種又は系統名

15 遺伝子導入に用いた宿主の品種名はN90-740である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

セイヨウナタネ(*B. napus*)の原産地は交雑親の*B. rapa*と*B. oleracea*の分布が重
なる北ヨーロッパ又は地中海沿岸と考えられており、現在は、世界中にその分
20 布が見られる(OECD, 1997; OGTR, 2008)。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(清水ら, 2001)。ま
た、ナタネの輸入港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育が報告
25 されている(農林水産省, 2017; 独立行政法人 国立環境研究所, 2015)。しかし、
セイヨウナタネは、自然環境下で優占する多年生草本と競合し自生化することは
困難であることが知られている(OECD, 2012)。

我が国に分布する近縁種として、*B. rapa* (アブラナ)、*B. juncea* (カラシナ、タ
30 カナ、ザーツァイ等)、*B. nigra* (クロガラシ)、*B. tournefortii* (ハリゲナタネ)、*Eruca*
vesicaria (キバナスズシロ)、*Erucastrum gallicum* (オハツキガラシ)、*Hirschfeldia*
incana (ダイコンモドキ)、*Raphanus raphanistrum* (セイヨウノダイコン)、*Sinapis*
arvensis (ノハラガラシ) 及び*S. alba* (シロガラシ)が挙げられる(OECD, 2012;
OGTR, 2008; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2017)。このうち*B. rapa*と
35 *juncea*は、弥生時代に海外から導入された栽培種に由来すると考えられる
(Nishizawa *et al.*, 2010)。これとは別に、戦後各地に広まった*B. juncea*は、雑草と

してヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている(中井, 2003)。他方、*B. nigra*、*B. tornafortii*、*E. vesicaria*、*E. gallicum*、*H. incana*、*R. raphanistrum*、*S. arvensis*及び*S. alba*は、いずれも明治以降に帰化した外来種である(環境省, 2002; 村上・鷺谷, 2002; 中井, 2003)。

5

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

10 セイヨウナタネは、13世紀にヨーロッパにおいて栽培化が始まったとされている(OECD, 2011)。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、多収で油分含量も多いことから全国に広まり、*B. rapa*の
15 栽培は少なくなっていく(杉山, 2001)。しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネ栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりや農民の他業種へ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(稲永, 2000)。

20 元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、ラットの給餌実験において心筋への脂肪酸蓄積に関与し、心臓病変を引き起こすことが報告されているエルシン酸や、甲状腺肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こすグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られており、食用や飼料としては不向きであると考えられていた(OGTR, 2008)。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートのカノーラ品種が育成され、現在ではサラダ油、ショートニング、マーガリン等の食用油として広く利用され、また、搾油粕は家畜飼料として利用されている(OECD, 2011)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

30

国連食糧農業機関(FAO)によると、2014年における世界のセイヨウナタネの栽培面積は約3580万haであり、その上位国は、カナダ約807万ha、インド約720万ha、中国約655万haである(FAO, 2015)。現在、我が国で栽培されているセイヨウナタネの作付面積は約1470haであり、収穫量は約1780tである(FAO, 2015)。

35 セイヨウナタネには、休眠の打破、抽苔の開始及び花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種があり、カナダ等寒冷な

地域では主に春播き品種が栽培され、ヨーロッパ等では主に秋播き品種が栽培されている(OECD, 2012)。

2014年におけるナタネ種子の世界総生産量は約7468万tであり、主な生産国は、カナダ(約1556万t)、中国(約1160万t)、インド(約788万t)であった(FAO, 2015)。我が国には、2015年に油脂原料として約244万tのナタネ種子が輸入され、主な輸入先はカナダ(約214万t)、次いでオーストラリア(約30万t)であった(農林水産省, 2016)。

セイヨウナタネ種子から搾油・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ている。搾油後の油粕は飼肥料として用いられる(OECD, 2011)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

15

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

20 セイヨウナタネは一般に冷涼な気候で栽培され、最適生育温度は 20℃をわずかに超えた程度である(OECD, 1997; OGTR, 2008)。また、セイヨウナタネは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著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(OGTR, 2008)。

25

ハ 捕食性又は寄生性

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

35 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(OGTR, 2008)。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(OECD, 2012)。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

春播き品種、秋播き品種に関わらず、成熟したセイヨウナタネ種子はほとんど休眠性を示さない。しかし、極端な変温、土壤水分の不足及び長期間の暗条件並びに酸素欠乏など発芽に不適な環境下に曝された場合、二次休眠が誘発されることがある(OGTR, 2008)。これらの獲得された休眠性は、2~4°Cの低温条件や変温条件などによって覚醒されることが報告されている(Pekrun *et al.*, 1998; Gulden *et al.*, 2000)。

セイヨウナタネの種子の寿命は、採種条件や保存条件によって異なる。後熟後に乾燥状態で冷蔵保存した場合には少なくとも25年を経過しても発芽する(OECD, 2012)。しかしながら、収穫時に飛散し、地表に落ちた種子の多くが初めの1年を越えて生存することができない(OECD, 2012)。

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

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

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

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

我が国に分布するセイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis* が挙げられる(OECD, 2012; OGTR, 2008; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2017)。

セイヨウナタネと*B. rapa*との交雑性について、自然交雑及び遺伝子移入の可能性は高いものの、仮に雑種が形成されたとしても、実際には栽培・収穫等の人為的操作、あるいは、周囲のセイヨウナタネとの交雑により、雑種後代は定着しないと報告されている(OECD, 2012)。セイヨウナタネのほ場の外側に*B. rapa*

の一群を植えた場合のセイヨウナタネとの交雑率は0.4~1.5%であり、形成された雑種の生存率は2%未満であった(OGTR, 2008)。しかし、セイヨウナタネを種子親として同一ほ場内に*B. rapa*を1:1で植えた場合の交雑率は9%であった(Jørgensen *et al.*, 1996)。また、F1個体の花粉稔性は平均で35%に低下し(Jørgensen *et al.*, 1996)、さらに、F2及びBC世代での適応度についても、品種・集団間に差異があるものの、全体的に低くなるとの報告がある(Hauser *et al.*, 1998)。東北農業研究センターの試験ほ場において、セイヨウナタネの畝間にポット栽培の*B. rapa*栽培品種55系統を配置し、得られた種子の倍数性をフローサイトメトリーにより調査した結果、*B. rapa*系統ごとのセイヨウナタネとの自然交雑率は2~50%、平均で22.8%であった(Yamamori, 2011)。

セイヨウナタネと*B. juncea*との交雑性について、自然交雑率は3~4.7%であり、セイヨウナタネを種子親とする場合はさらに低くなり、混植条件で1.1~1.3%となる(OGTR, 2008; 津田ら, 2016)。農業生物資源研究所の試験ほ場において、花粉源となる除草剤耐性セイヨウナタネを中央に配置し、周囲に*B. juncea*を栽植して自然交雑率を調査した結果、交雑率は混植地点では1.62%、隣接地点では0.306%、花粉源からの距離が1.0m、5.0m、10.0m、20.0m、27.5mの地点では、それぞれ0.0499%、0.0369%、0.0396%、0.0000%、0.0000%であった(Tsuda *et al.*, 2012)。一方、交配による雑種生産性の平均はセイヨウナタネが種子親の場合0.07個(雑種数/交配花)、花粉親の場合4.05個という報告がある(津田ら, 2016)。また、形成された雑種の花粉稔性は0~28%と低い(OGTR, 2008)。雑種後代に関して、F1個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある(津田ら, 2016)。しかしながら、自然条件下では種々の生殖的隔離障壁が存在することを考慮すると雑種後代が優占化する可能性は低いと考えられる。

セイヨウナタネと*B. nigra*との交雑性について、自然交雑試験において雑種形成は確認されておらず(Bing *et al.*, 1996)、自然交雑の可能性は低いと判断される(OECD, 2012)。また、得られたF1個体の稔性は低く、F2やBC世代を得るのは難しいと報告されている(OECD, 2012)。

セイヨウナタネと*R. raphanistrum*との交雑性について、ほ場での調査においてセイヨウナタネを種子親とした場合の交雑率は、 3.8×10^{-8} ~ 5.1×10^{-4} %、花粉親とした場合は 1×10^{-7} ~ 3.1×10^{-5} %という報告がある(Chèvre *et al.*, 2000; Rieger *et al.*, 2001; Warwick *et al.*, 2003)。また、F1個体では幼苗の発芽率や生存率、ロゼット葉の直径、乾物重などに顕著な低下が認められ、野外で発芽し生育して生殖にまで至る可能性は低いと考えられる(Guéritaine *et al.*, 2003)。

セイヨウナタネと*H. incana*との交雑性について、人工交配によって100花当たり3.1粒のF1種子が得られたが、発芽率が1%未満とほとんどのF1個体において低い適応度を示したと報告されている(OECD, 2012)。

5

セイヨウナタネと*S. arvensis*との交雑性について、自然交雑で雄性不稔セイヨウナタネ100花当たり0.18粒のF1種子が得られたが、多くは稔性が低い又は完全に不稔であったと報告されている(OECD, 2012)。

10 また、セイヨウナタネにはアポミクスの特性を有するという報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

セイヨウナタネは1花当たり約7~9万粒の花粉を生じる(Takahata *et al.*, 2008)。

15 *Brassica*属の花粉は、重く粘性があるが小型(約30~40 μ m)であり、風によって運ばれるほか、ミツバチなどの昆虫によっても媒介される(OECD, 2012)。セイヨウナタネの他殖率について、東北農業研究センターの試験ほ場において、エルシン酸含量を異にする2品種を用いて調査した結果、花粉源から風下方向に0.25m、1m、5m、10m、30m、60m離れた地点での他殖率は、それぞれ4.09%、1.35%、
20 0.43%、0.15%、0.09%、0.01%と、花粉源から離れるに伴い急激に減少した(Yamamori, 2011)。また、OECD (2012)は従来の知見を総括し、他殖率は最大でも花粉源から50~100mの地点で0.5%以下、200mの地点で0.1%以下としている。

セイヨウナタネの花粉は、比較的長期間発芽力を有することが知られている。
25 自然条件下では、花粉の寿命は 4~5 日間にわたり徐々に減少するとされる(Rantio-Lehtimäki, 1995)。

ホ 病原性

30

へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸とグルコシノレートが含まれている。エルシン酸は、ラットの給餌実験において
35 心筋への脂肪酸蓄積に関与し、心臓病変を引き起こすことが報告されており、

グルコシノレートは、甲状腺肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こすことが報告されている (OGTR, 2008)。しかし、品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートの品種が育成された結果、種子は食用油として、また、搾油粕は飼料用として用いられるようになった(OECD, 2011)。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 1 g 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(OECD, 2011)、宿主である N90-740 もカノーラ品種の一つである。

ト その他の情報

10

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(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 除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ(改変*bar*, 改変
barnase, *barstar*; *Brassica napus* L.)(MS11, OECD UI:BCS-BNØ-12-7) (以下「本組換
えセイヨウナタネ」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、表1(p.9)に示した。また、供与核酸の塩基配列は別添資料1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

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要素は表1 (p.9)
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及び各構成要素の由来及び機能

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

構成要素	ベクター上の位置	由来及び機能
	サイズ(bp)	
T-DNA 領域		
RB	1-25	アグロバクテリウム(<i>Rhizobium radiobacter</i>)由来の T-DNA の反復配列右側領域 (Zambryski, 1988)。
	25	
-	26-97	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	72	
3'g7	98-309	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域の配列。転写を終結させ、3' ポリアデニル化を生じさせる(Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
	212	
-	310-331	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	22	
改変 <i>bar</i>	332-883	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT 蛋白質)をコードする遺伝子。除草剤グルホシネート耐性を付与する(Thompson <i>et al.</i> , 1987)。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端にメチオニンを付加し、続くセリンはアスパラギン酸に置換されている。
	552	
PssuAt	884-2613	<i>Arabidopsis thaliana</i> に由来し、 <i>rubisco</i> 小サブユニット遺伝子のプロモーター。緑色組織において遺伝子を恒常的に発現させる(Krebbers <i>et al.</i> ,1988)。
	1731	
-	2614-2658	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	45	
3'nos	2659-2919	pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域。転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
	261	
-	2920-2935	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
	16	
3' <i>barnase</i>	2936-3033	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 由来 <i>barnase</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域の配列 (Hartley, 1988)。
	98	
改変 <i>barnase</i>	3034-3369	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ (改変 BARNASE 蛋白質) をコードする遺伝子。Pta29 の支配下で蒞のタペート細胞において特異的に発現し、雄性不稔形質を付与する (Hartley, 1988)。野生型 <i>barnase</i> 遺伝子の N-末端にメチオニンを付加し、続くアラニンとグルタミンはバリンとプロリンに置換されている。
	336	

-	3370-3371 2	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
Pta29	3372-4879 1508	タバコ(<i>Nicotiana tabacum</i>)由来の葯特異的遺伝子 TA29 のプロモーター。葯のタペート細胞において特異的に遺伝子発現を誘導する(Seurinck <i>et al.</i> , 1990)。
-	4880-4920 41	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
Pnos	4921-5214 294	<i>R. radiobacter</i> 由来のノパリン合成酵素のプロモーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。非常に低い転写活性を示す。
-	5215-5216 2	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
barstar	5217-5489 273	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR 蛋白質) をコードする配列。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 (Hartley, 1988)。アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれた。
-	5490-5554 65	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
3'g7	5555-5766 212	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域の配列。転写を終結させ、3' ポリアデニル化を生じさせる(Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
-	5767-5840 74	ポリリンカー配列。DNA クローニングに利用された配列。
LB	5841-5865 25	<i>R. radiobacter</i> 由来の T-DNA の反復配列左側領域 (Zambryski, 1988)。
プラスミド外骨格領域 (本組換えセイヨウナタネには存在しない)		
aadA	5866-7745 1880	<i>Escherichia coli</i> 由来アミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する。
barstar	7746-8181 436	<i>B. amyloliquefaciens</i> に由来し、リボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR 蛋白質) をコードする遺伝子及び <i>B. amyloliquefaciens</i> の非翻訳配列を含む断片(Hartley, 1988)。プラスミド作成過程において大腸菌内で改変 <i>barnase</i> 遺伝子がリークして発現した場合にその機能を抑制する。
aadA	8182-8405 224	<i>E. coli</i> 由来アミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)の上流配列の断片。
ORI pVS1	8406-12177 3772	<i>Pseudomonas sp.</i> 由来 pVS1 プラスミドの複製開始起点を含む配列。 <i>R. radiobacter</i> 内での複製開始に必要な (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
ORI ColE1	12178-13540	<i>E. coli</i> 由来 pBR322 プラスミドの複製開始点を含む配列。

	1363	<i>E. coli</i> 内での複製の開始に必要なとなる (Bolivar <i>et al.</i> , 1977)。
--	------	--

- 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

【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
10 タミン合成酵素が阻害されてアンモニアが無毒化されず蓄積し、作物は枯死する。

導入された改変 *bar* 遺伝子が産生するホスフィノスリシン・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
15 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(OECD, 1999)。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は枯死しない。

改変 PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはない。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、生体内において転移反応を生
20 じさせることはない(Thompson *et al.*, 1987)。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(Wehrmann *et al.*, 1996)。よって、改変 PAT 蛋白質は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。

25 なお、改変 *bar* 遺伝子は、我が国において第一種使用規程承認が得られている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 (MS8, OECD UI:ACS-BN005-8)、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 (RF3, OECD UI:ACS-BN003-6)、除草剤グルホシネート耐性ワタ (LLCotton25, OECD UI:ACS-GH001-3)、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性
30 ワタ (GHB119, OECD UI:ACS-BCS-GH005-8; T304-40, OECD UI:BCS-GH004-7) に導入されている。

【改変 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。始めに、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、
5 2',3'-環状ヌクレオチドを中間体として生成する(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(加水分解反応) (Hartley, 1997)。BARNASE 蛋白質はグアニンの 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が検出される (Rushizky *et al.*, 1963)。

10 花粉形成は葯で起こる高度に制御されたプロセスであり、葯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。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(高畑, 2005)。それゆえ、タペート細胞の欠落は雄性不稔の主要な原因であると考えられている(Kaul, 1988)。

15 改変 *barnase* 遺伝子は、葯特異的プロモーターPta29 の支配下で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(改変 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(Drews and Goldberg, 1989; Hartley, 1989; Mariani *et al.*, 1990)。

20 一代雑種品種(F1 個体)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徴を持つが、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 個体を得ることは困難である。そこで、本組換えセイヨウナタネを種子親、*barstar* 遺伝子を有する不稔回復性遺伝子組換えセイヨウナタネを
25 花粉親として交配させることにより、確実に F1 種子を得ることができる。その F1 個体では、BARSTAR 蛋白質が改変 BARNASE 蛋白質の作用を抑制して稔性を回復させるため、自家受粉で高収量の種子生産が可能となる。

30 なお、改変*barnase*遺伝子は、我が国において平成18年9月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ(MS8, OECD UI:ACS-BNØØ5-8)に導入されている。

【BARSTAR 蛋白質】

35 BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質の阻害物質である (Hartley *et al.*, 1972; Hartley, 1989)。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 (Smeaton and Elliott,

1967; Hartley and Smeaton, 1973; Hartley, 1989)。本組換えセイヨウナタネにおいては、形質転換による挿入部位の位置効果などにより、形質転換体において改変 BARNASE 蛋白質が葯組織以外の細胞で発現して細胞内の RNA を加水分解する可能性を想定し、この様な場合にその活性を抑えるために *barstar* 遺伝子が T-DNA 領域に組み込まれた。結果として、アグロバクテリウム法で形質転換体が効率よく得られた。

なお、*barstar* 遺伝子は、我が国において平成19年4月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ (RF3, OECD UI:ACS-BNØØ3-6) に導入されている。

【改変 PAT 蛋白質、改変 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基づき、2015 年にデータベース (AllergenOnline, release 15) を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索した結果、既知のアレルゲンとの相同性は認めらなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【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 (Thompson *et al.*, 1987)、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。

【改変 BARNASE 蛋白質】

改変 *barnase* 遺伝子は、葯特異的プロモーター 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 (Mariani *et al.*, 1990)、本組換えセイヨウナタネにおいても他の組織で発現することは考え難い。よって、宿主の持つ代謝経路へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

【BARSTAR 蛋白質】

barstar 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために T-DNA 領域に組み込まれている。*barstar* 遺伝子を制御する Pnos プロモーターの誘導は弱いため、BARSTAR 蛋白質の発現は微量であり、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型 (花粉を含まない不完全な葯が花弁より低い位置で形成される) で確認している (別添資料 11)。

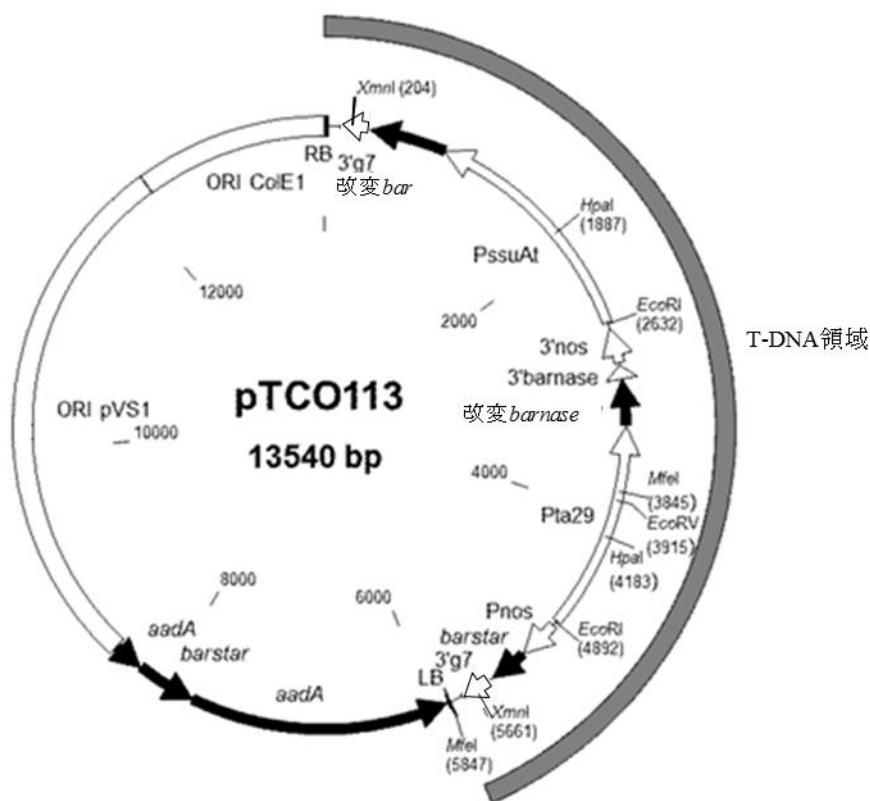
また、BARSTAR 蛋白質は BARNASE 蛋白質と 1:1 で特異的に非共有結合するため、その複合体の安定性は高い(Makarov *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1995)。なお、植物中のリボヌクレアーゼに対する BARSTAR 蛋白質の阻害作用は報告されておらず、ヒト又は動物のリボヌクレアーゼとは結合しないことも報告されている(Smeaton and Elliott, 1967; Hill *et al.*, 1983; Hartley, 1988, 1989)。よって、BARSTAR 蛋白質が宿主の持つ代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

10

イ 名称及び由来

本組換えセイヨウナタネの作出に用いたベクターは、*E. coli*由来pGSC1700を基に構築されたプラスミドpTCO113である(図1)。



15

図1 pTCO113のベクター地図及び制限酵素切断部位
 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 本組換えセイヨウナタネの作出に用いられたプラスミドpTCO113の全塩基数は13,540bpである(別添資料1)。本ベクターの構成要素は表1に示した(p.9)。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10 プラスミド pTCO113 は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有している。この遺伝子は、本プラスミドを構築する際に必要な選抜マーカーとして機能する。なお、この遺伝子を含むプラスミド外骨格領域が、本組換えセイヨウナタネに導入されていないことはサザンブロット分析により確認されている(別添資料 2)。

15

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

プラスミドpTCO113は伝達性を持たないため、感染性はない。

20 (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

25 プラスミドpTCO113の構成及び制限酵素による切断部位を図1に示す(p.14)。宿主内に移入された領域は、RBとLBに挟まれたT-DNA領域である。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30 宿主胚軸由来カルスへの核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた(Deblaere *et al.*, 1985)。

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

35

核酸が移入された組織片を、グルホシネートを含む培地において耐性個体を選抜した。

- 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

本組換えセイヨウナタネのT3世代(図2の⑨, p.17)のバルク種子において、無作為に抽出した250粒の種子を1サンプルとして3サンプルを用意し、それぞれのサンプルからDNAを抽出した。T-DNAとプラスミド外骨格領域にまたがる位置を標的としたPCR分析を行った。その結果、すべてのサンプルにおいて標的とする増幅産物は検出されず、本組換えセイヨウナタネに形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体が残存していないことが確認された(別添資料6)。

- ⑬ 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

選抜した耐性個体を育成し、再度グルホシネート耐性を評価し、本組換えセイヨウナタネ T0 組換え当代を得た。本組換えセイヨウナタネの育成図を図2(p.17)に示す。形質転換植物である T0 組換え当代は不稔であるため形質転換に用いた N90-740 系統との交配により維持を行った。得られた後代は実質的に自殖と同等であるため T1 世代に続く T 系統として表記した。

なお、本申請の対象は、T2世代及びその後代である。

25

【社外秘情報につき非開示】

図2 本組換えセイヨウナタネの育成図

5

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

移入した核酸が宿主の染色体上に組み込まれた場合、メンデルの法則に従い分離する。本組換えセイヨウナタネの分離比を検討するため、本組換えセイヨウナタネ(T3、T4、T5、BC4B及びBC5B世代; 図2の⑤, p.17)において、系統特異的及び改変*bar*、改変*barnase*及び*barstar*遺伝子特異的PCR分析を行い陽性個体数及び陰性個体数を調査した。その結果、陽性個体と陰性個体の分離比は、いずれの世代もほぼ1:1となり、一遺伝子座支配であると仮定した場合に想定される分離比を示した(表2; 別添資料7)。

10

したがって、本組換えセイヨウナタネに導入された挿入DNA配列は、セイヨウナタネ染色体上の一か所に存在していることが確認された。

15

表2 本組換えセイヨウナタネにおける挿入遺伝子の分離比

世代	供試個体数	陽性個体数		陰性個体数		χ^2 値 ¹⁾
		期待値	実測値	期待値	実測値	
T3	84	42	42	42	42	0.00
T4	92	46	48	46	44	0.174
T5	95	47.5	39	47.5	56	3.042
BC4B	89	44.5	43	44.5	46	0.101
BC5B	98	49	51	49	47	0.163

1) 一遺伝子座と仮定し、 χ^2 検定を実施した。自由度1、有意水準5%において、 χ^2 値3.84以上で帰無仮説が棄却される。

(注: 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

20

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

本組換えセイヨウナタネ(T2世代; 図2の①, p.17)の葉から抽出したDNAを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、1コピーのT-DNA領域が挿入されていることが確認された(別添資料2)。

25

また、本組換えセイヨウナタネ(T2世代; 図2の②, p.17)に移入されたDNA配列及びその両側近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、プラスミドpTCO113上のT-DNA領域と完全に一致することが確認された(別添資料3)。また、

T-DNA領域の挿入により、挿入部位において宿主ゲノム配列の40bpが欠失していることを確認した(図3, p.20 ; 別添資料3)。

5 挿入遺伝子の伝達の安定性を確認するため、本組換えセイヨウナタネのT2、T3、F1E、BC1E、BC2E世代(図2の④, p.17)の葉から抽出したDNAを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、全ての世代において予測されたサイズの断片が確認され、本組換えセイヨウナタネに移入された挿入DNA領域は複数世代において安定して伝達されていることが確認された(別添資料4)。

【社外秘情報につき非開示】

図 3 本組換えセイヨウナタネにおける挿入 DNA の概略図

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

5

- 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

2014年に米国及びカナダの3試験地において、栽培した本組換えセイヨウナタネ T4 世代(図2の⑥, p.17)15株の植物体、根、花序組織及び種子における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量を ELISA 法より分析した(表3, p.23; 別添資料8)。各試験地には、それぞれ第2~4葉期に除草剤グルホシネート(500g ai/ha)の散布を行った。その結果、改変 PAT 蛋白質は全ての組織において検出され、改変 BARNASE 蛋白質は全ての組織において検出限界以下であり、BARSTAR 蛋白質は、茎伸長期の根及び開花初期において微量の発現が検出された。

また、2015年に米国の温室において栽培された本組換えセイヨウナタネの T3、T4、T5 世代(図2の⑦, p.17)のそれぞれ4株の植物体及び花序組織における改変 PAT 蛋白質量、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質を ELISA 法より分析した(表4, p.23; 別添資料9)。その結果、改変 PAT 蛋白質は全ての組織、世代で発現が検出され、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質はいずれの組織、世代においても検出限界未満であった。

また、本組換えセイヨウナタネにおける改変 *barnase* 遺伝子発現についてノーザンブロット分析により解析を行った。その結果、蕾を含めたすべての組織において改変 *barnase* 遺伝子産物は検出されなかった(別添資料10)。このことは、改変 BARNASE 蛋白質活性によりタペート細胞内の RNA が加水分解されているためと考えられる(Mariani *et al.*, 1992)。他方、開花後の本組換えセイヨウナタネの花を非組換えセイヨウナタネと比較した結果、本組換えセイヨウナタネにおいて葯が形成されていないことから、改変 BARNASE 蛋白質の発現によりタペート細胞が破壊されていることが示唆された(別添資料11)。なお、稔性回復性形質をもつ遺伝子組換えセイヨウナタネと交配した後代では、BARSTAR 蛋白質により改変 BARNASE 蛋白質の機能が阻害されるため、正常な葯が形成された(別添資料11)。

35

以上のことから、改変 PAT 蛋白質は個体間及び世代間において安定して発現していることが確認された。改変 BARNASE 蛋白質は各組織及び世代において検出されなかったが、このことは、改変 BARNASE 蛋白質の発現が薬特異的に発現するプロモーターによって制御されていることに加え、薬組織の分化過程
5 において改変 BARNASE 蛋白質が RNA 分解を誘導し、タペート細胞の破壊を引き起こしているためであると考えられる(Mariani *et al.*, 1992)。本組換えセイヨウナタネの改変 *barnase* 遺伝子は、RNA 及び蛋白質の発現解析においていずれも検出されなかったものの、花器官の観察から改変 BARNASE 蛋白質の機能により、本組換えセイヨウナタネは雄性不稔形質を示すことが確認され、稔性回復
10 系統との交配で雄性不稔が回復することも示された(別添資料 11)。また、BARSTAR 蛋白質は茎伸長期の根及び開花初期の植物体、根及び花序において微量の発現が認められた。BARSTAR 蛋白質の発現は、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している(別添資料 11)。

表 3 本組換えセイヨウナタネ(T4 世代)の各組織における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)

【社外秘情報につき非開示】

5

表 4 本組換えセイヨウナタネの 3 世代(T3、T4 及び T5 世代)における改変 PAT 蛋白質、改変 BARNASE 蛋白質及び BARSTAR 蛋白質量($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)

【社外秘情報につき非開示】

10

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

5 本組換えセイヨウナタネは伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然環境下において野生動植物等に伝達されるおそれはない。

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10 本組換えセイヨウナタネは、挿入 DNA とその近傍配列を利用したプライマーを用いた PCR 分析により検出及び識別が可能である。本法の検出限界はゲノム DNA 量比で 0.025% である(別添資料 5)。

本法の信頼性については、社内 2 施設において施設間互換性があることを確認している(別添資料 5)

15 本組換えセイヨウナタネに特異的なプライマーを用いた定量 PCR 法による検出及び識別方法は、食用及び飼料用等とした第一種使用等の申請までに確立する予定である。

- (6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違

20

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

25 本組換えセイヨウナタネは改変 *bar* 遺伝子の発現により改変 PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示すと共に、改変 *barnase* 遺伝子の発現により雄性不稔を示す。なお、稔性回復性を付与する *barstar* 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために T-DNA 領域に組み込まれている。*barstar* 遺伝子を制御する Pnos プロモーターの誘導は弱いため、BARSTAR 蛋白質の発現は微量であり、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度で
30 はないことを表現型で確認している(別添資料 11)。

- 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

35

本組換えセイヨウナタネは、改変 *bar* 遺伝子がコードする改変 PAT 蛋白質の発現により除草剤グルホシネートに耐性を示す。改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、植物体内において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ないと報告されている(Thompson *et al.*, 1987; Wehrmann *et al.*, 1996)。

改変 *barnase* 遺伝子はリボヌクレアーゼである改変 BARNASE 蛋白質をコードするが、蒔特異的プロモーター Pta29 の支配下にあり、タペート細胞で特異的に発現する。よって、いずれの蛋白質も目的以外の宿主の生理学的又は生態学的特性に影響を与える可能性は考え難い。また、改変 BARNASE 蛋白質の阻害物質である BARSTAR 蛋白質をコードする *barstar* 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために T-DNA 領域に組み込まれている。*barstar* 遺伝子を制御する Pnos プロモーターの誘導は弱いため、BARSTAR 蛋白質の発現は微量であり、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している(別添資料 11)。以上より、本組換えセイヨウナタネの生理学的又は生態学的特性に関するデータを用いずに、隔離ほ場における生物多様性影響評価を行うことは可能であると判断した。

なお、本組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験では、以下の項目を調査する予定である。

- 1) 形態及び生育の特性
- 2) 生育初期における低温又は高温耐性
- 3) 成体の越冬性又は越夏性
- 4) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- 5) 交雑率
- 6) 有害物質の産生性
- 7) 世代にわたる形質発現の確認

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：茨城県筑西市向上野1500番地41

名称： バイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所 隔離ほ場
使用期間：承認日から平成32年3月31日まで

5 1. 隔離ほ場の施設

1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

10 2) 隔離ほ場であること、部外者は立入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所に掲げている。

15 3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本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するとともに、本組換え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。

20 4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置している。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。

2. 隔離ほ場での作業要領

25 1) 本組換えセイヨウナタネ及び比較対照の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。

30 3) 2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えセイヨウナタネの栽培終了後は、本組換えセイヨウナタネ及び比較対照のセイヨウナタネを隔離ほ場内にすき込む等により、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。

5 6) 1)から5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

7) 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書に基づき、速やかに対処する。

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

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

「緊急措置計画書」を参照。

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

25 (6) 国外における使用等に関する情報

今後、諸外国において申請を行う予定である。

また、我が国において、食品安全承認申請を厚生労働省へ、飼料安全承認申請を農林水産省へ、それぞれ提出する予定である。

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は、我が国において長年にわたる使用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相違が見られた点について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

10

セイヨウナタネは我が国において、北海道や本州で河原や線路沿いでの群生や、主なナタネの輸入港やその周辺での生育が報告されている。一方で、我が国では長期にわたりセイヨウナタネ種子の輸入経験があるが、運搬の途中でこぼれ落ちたセイヨウナタネが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。我が国におけるセイヨウナタネ集団の雑草性の強さ及び競合性についての知見はない(津田ら, 2016)が、オーストラリアなどのセイヨウナタネ生産国では農耕地及びその周辺の主要な雑草とされるも、未攪乱の土地に侵入する植物ではないと考えられている(OGTR, 2011)。また、セイヨウナタネが自然環境下で優占する多年生草本と競合することはないと報告されている(OECD, 2012)。

20

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の調査において、人為的攪乱のない自然条件下で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(Crawley and Brown, 1995)。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(Scott and Wilkinson, 1999)。

25

また、我が国では、セイヨウナタネの輸入港周辺において、環境省では 2003 年度から、農林水産省では 2006 年度から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育実態調査がそれぞれ継続されている(農林水産省, 2017; 独立行政法人 国立環境研究所, 2015)。これまでの調査結果から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は、陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、年度毎の連続性もないことから、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大していないと考えられている(農林水産省, 2017)。さらに、遺伝子組換えセイヨウナタネとカラシナ又は在来ナタネとの交雑体は確認されず(農林水産省, 2017)、交雑体と推定された種子・植物体についても、後代の定着は確認されていない(独立行政法人 国立環境研究所, 2015)。

35

本組換えセイヨウナタネは、改変 PAT 蛋白質の発現により除草剤グルホシネートに耐性を示すが、自然環境下においてこの除草剤が選択圧となることは考え難く、この性質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。
5 また、改変 BARNASE 蛋白質の発現により雄性不稔形質を有するが、本形質は競合において優位に作用する形質ではないと考えられる。

したがって、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性は、非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられ、第一種使用規程に従って、限定された
10 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かった。

(2) 影響の具体的内容の評価

15

(3) 影響の生じやすさの評価

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えセイヨウナタネの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
25 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が生ずるおそれはないと判断した。

2. 有害物質の産生性

30

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネの種子には、有害物質であるエルシン酸及びグルコシノレートを含むことが知られている(OGTR, 2008)。しかし、本組換えセイヨウナタネの
35 宿主品種であるN90-740は、エルシン酸及びグルコシノレート含有量の低いカナラ品種である。

本組換えセイヨウナタネに導入された遺伝子から発現する改変PAT蛋白質、改変BARNASE蛋白質及びBARSTAR蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。

5 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(Wehrmann *et al.*, 1996)。BARNASE蛋白質はリボヌクレアーゼ活性を有し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。また、BARSTAR蛋白質はBARNASE蛋白質と特異的に非共有結合するため、宿主の代謝系に影響することはないと考えられる。

10 したがって、本組換えセイヨウナタネが新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えセイヨウナタネの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かった。

15

(2) 影響の具体的内容の評価

20 (3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25

以上のことから、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えセイヨウナタネの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、有害物質の生産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。

30

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

我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生していないため、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

なお、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*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis*が挙げられるが、いずれも日本に帰化した外来種である(OECD, 2012; OGTR, 2008; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2017)。

(2) 影響の具体的内容の評価

10

(3) 影響の生じやすさの評価

15

(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、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えセイヨウナタネの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、交雑性に起因して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

25

第二、3、(1) (p.30)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我が国在来の野生動植物等としては特定されなかった。しかし、本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種が交雑した場合に生ずる可能性のある間接的な影響として、以下の2点が考えられた。

① 雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する。

② 交雑により浸透した導入遺伝子をもたらす遺伝的負荷によって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。

35

① 雑種後代が優占化して他の野生植物の個体群を駆逐する可能性

本組換えセイヨウナタネは雄性不稔形質を有するため、花粉を形成しない。しかし、他からの花粉を受けた場合、種子を形成する可能性が考えられる。よ
5 つて、本組換えセイヨウナタネと外来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検討した。

第一、1、(3)、ニ、③(p.4)に示したように、セイヨウナタネは我が国に分布する近縁種である*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis*と交雑可能である。雑種後代に関して、F1個体では稔性が低くなるが、
10 戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある(津田ら, 2016)。これらの内、*B. rapa*及び*B. juncea*は、自然条件下で交雑する可能性がある(OECD, 2012; 農林水産省, 2017)が、交雑し雑種を形成するためには、親植物同士の物理的距離、花粉の飛散距離及び寿命、開花期の同調性、親植物の栽培方法、花序組織の特性、花粉の交雑和合性及び他の植物の花粉との競合性等の種々の生殖的隔離障
15 壁が存在すること(OECD, 2012)から、自然条件下で雑種後代が優占化する可能性は低く、雑種後代が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る。仮に、本組換えセイヨウナタネが我が国の自然環境下でこれら近縁種と交雑しても、その交雑率は低く、形成された雑種の稔性も低下すると考
20 えられる。

以上から、本組換えセイヨウナタネ系統がセイヨウナタネや外来近縁種と交雑し、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、従来のセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

② 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって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

第二、1及び2(p.28-30)に示したように、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産生性は、非組換えセイヨウナタネと相違ないと考えられる。本組換えセイヨウナタネは改変*bar*遺伝子を有するが、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても遺伝的負荷にならないという報告(Crawley *et al.*, 1993; Snow *et al.*, 1999)があることから、グルホシネートが散布されることが想定されない自然条件下において、改変*bar*遺伝子がもたら
30 す遺伝的負荷が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。
35

本組換えセイヨウナタネは改変 *barnase* 遺伝子を有し雄性不稔形質を示す。しかし、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知られている(Kaul, 1988)ことから、改変 *barnase* 遺伝子が我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来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、*barstar* 遺伝子がコードする BARSTAR 蛋白質は、BARNASE 蛋白質の阻害物質であるが、本組換えセイヨウナタネの T-DNA 領域に組み込まれた *barstar* 遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれており、その発現は微量であるため、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している(別添資料 11)。

これらのことから、導入遺伝子はいずれも我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の個体群中に浸透し、個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上から、本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の交雑により間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

第一、2、(6) (p.24)に記載したとおり、本組換えセイヨウナタネの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えセイヨウナタネを隔離ほ場で使用する
5 場合の生物多様性影響評価を、生理学的又は生態学的特性のデータを用いずに評価した。

競合における優位性

セイヨウナタネは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然
10 環境下において雑草化した例は報告されていない。本組換えセイヨウナタネは除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔形質を有するが、自然環境下において除草剤が選択圧となる状況は想定し難く、これらの形質が競合における優位性を高めることはないと考えられた。

以上のことから、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えセイヨウナタネの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
15 随する行為の範囲内では、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。

有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸と
20 グルコシノレートが含まれている。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主は、品種改良により両物質の含有量が低いカノーラ品種である。

これまでにセイヨウナタネが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。また、本組換えセイヨウナタネが遺
25 伝子組換えにより新たに発現する改変PAT蛋白質、改変BARNASE蛋白質及びBARSTAR蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知のアレルゲンとの相同性も認めらなかった。さらに、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネが新たに有害物質の産生性を獲得
30 するとは考え難く、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される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した。

交雑性

我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生していないため、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

5

その他の性質

我が国に自生するセイヨウナタネの交雑可能な外来近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum*及び*S. arvensis*が挙げられる。本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種が交雑した場合、①雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、②交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって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るため、既知の知見に基づき検討を行った。

10

セイヨウナタネと外来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、① (p.32)に示したように、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。

15

また、導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷が我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても遺伝的負荷にならないという報告があることから、本組換えセイヨウナタネに導入された改変*bar*遺伝子も同様であると考えられた。したがって、除草剤を散布することを想定しない自然環境下では、改変*bar*遺伝子がもたらす遺伝的負荷が交雑した近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、改変*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、形成された雑種が優占化することは考えにくい。*barstar*遺伝子がコードするBARSTAR蛋白質は、BARNASE蛋白質の阻害物質であるが、本組換えセイヨウナタネのT-DNA領域に組み込まれた*barstar*遺伝子は、アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれており、その発現は微量であるため、本組換えセイヨウナタネの稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している。これらのことから、導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷が、交雑した我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

20

25

30

35

以上を総合的に評価し、本組換えセイヨウナタネを一定の作業要領を備えた限定環境で実施される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。

5

参考文献

- Bing, D.J., Downey, R.K., Rakow, G.F.W., (1996) Hybridizations among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breeding* 115, 470-473.
- 5 Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., (1977) Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- 10 Chèvre, A.M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J.C., Renard, M., (2000) Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100, 1233-1239.
- 15 Crawley, M.J., Hails, R.S., Rees, M., Hohn, D., Buxton, J. (1993) Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363, 620-623
- Crawley, M.J., Brown, S.L., (1995) Seed Limitation and the Dynamics of Feral Oilseed Rape on the M25 Motorway. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 259, 49-54.
- 20 Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J., (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* 13, 4777-4788.
- 25 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M., (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1, 561-573.
- 30 Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, L., Van Montagu, M., Schell, J., (1983) Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2, 419-426.
- 35 Drews, G.N., Goldberg, R.B., (1989) Genetic control of flower development. *Trends in Genetics* 5, 256-261.
- FAO, (2015) FAOSTAT. (<http://faostat3.fao.org/home/E>) (accessed on 2016-06-08).
- 40 Fling, M.E., Kopf, J., Richards, C., (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13, 7095-7106.
- 45 Guéritaine, G., Bonavent, J.F., Darmency, H., (2003) Variation of prezygotic barriers in the interspecific hybridization between oilseed rape and wild radish. *Euphytica* 130, 349-353.

Gulden, R., Shirtliffe, S., Thomas, A., (2000) Secondary dormancy in volunteer canola (*Brassica napus* L.). Proceeding of the 2000 National Meeting. Citeseer, 62-67.

5 Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25, 989-994.

Hartley, R.W., Barker, E.A., (1972) Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature new biology* 235, 15-16.

10 Hartley, R.W., Smeaton, J.R., (1973) On the Reaction between the Extracellular Ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and Its Intracellular Inhibitor (Barstar). *Journal of Biological Chemistry* 248, 5624-5626.

15 Hartley, R.W., (1988) Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *Journal of Molecular Biology* 202, 913-915.

Hartley, R.W., (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 450-454.

20 Hartley, R.W., (1997) Barnase and Barstar. In: D'Alessio, G., Riordan, J.F. (Eds.), *Ribonucleases: Structures and Functions*. Elsevier Science, New York, 51-100.

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

30 Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Seanger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K., Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends in Biochemical Sciences*. 8: 364-369.

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

Kaul, M.L.H., (1988) *Male sterility in higher plants*. Springer-Verlag.

40 Krebbers, E., Seurinck, J., Herdies, L., Cashmore, A., Timko, M., (1988) Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 11, 745-759.

45 Makarov, A.A., Protasevich, II, Kuznetsova, N.V., Fedorov, B.B., Korolev, S.V., Struminskaya, N.K., Bazhulina, N.P., Leshchinskaya, I.B., Hartley, R.W., Kirpichnikov, M.P., et al., (1993) Comparative study of thermostability and structure of close homologues-barnase and binase. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 10, 1047-1065.

Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R.B., (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347, 737-741.

5 Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R.B., De Greef, W., Leemans, J. (1992) A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357, 384-387.

10 Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G., Fersht, A.R., (1995) A calorimetric study of the thermal stability of Barstar and its interaction with Barnase. *Biochemistry*, 34, 5224-5233.

15 Nishizawa, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Nakajima, N., (2010) Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of genetically modified oilseed rape in Japan. *GM Crops* 1, 143-156.

20 OECD, (1997) Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (Oilseed rape). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.7. OECD Environmental Health and Safety publications.

25 OECD, (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.11. OECD Environmental Health and Safety publications.

30 OECD, (2011) Revised consensus document on compositional considerations for new varieties low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No.24. OECD Environment, Health and Safety Publications.

35 OECD, (2012) Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No.54. OECD Environment, Health and Safety Publications.

40 Offcie of the Gene Technology Regulator (OGTR), D.o.H.a.A., Australian Government, (2008) The biology of *Brassica napus* L. (canola). version 2.

45 Pekrun, C., Hewitt, J.D.J., Lutman, P.J.W., (1998) Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* 130, 155-163.

Rantio-Lehtimäki, A., (1995) Aerobiology of pollen and pollen antigens. In: Cox, C.S., Wathes, C.M. (Eds.), *Bioaerosols Handbook*. Taylor & Francis, 387-406.

50 Rieger, M.A., Potter, T.D., Preston, C., Powles, S.B., (2001) Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 103, 555-560.

- Rushizky, G.W., Greco, A.E., Hartley, R.W., Sober, H.A., (1963) Studies on *B. subtilis* Ribonuclease. I. Characterization of Enzymatic Specificity. *Biochemistry* 2, 787-793.
- 5 Scott, S.E., Wilkinson, M.J., (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat Biotech* 17, 390-392.
- Seurinck, J., Truettner, J., Goldberg, R.B., (1990) The nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic Acids Research* 18, 3403.
- 10 Smeaton, J.R., Elliott, W.H., (1967) Isolation and properties of a specific bacterial ribonuclease inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 145, 547-560.
- 15 Snow, A.A., Andersen, B., Jørgensen, R.B., (1999) Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology* 8, 605-615.
- Takahata, Y., Konno, N., Hinata, K., (2008) Genotypic variation for floral characters in *Brassica* and allied genera with special reference to breeding system. *Breeding Science* 58, 385-392.
- 20 Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J., (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO journal* 6, 2519-2523.
- 25 Tsuda, M., Okuzaki, A., Kaneko, Y., Tabei, Y., (2012) Relationship between hybridization frequency of *Brassica juncea* × *B. napus* and distance from pollen source (*B. napus*) to recipient (*B. juncea*) under field conditions in Japan. *Breeding Science* 62, 274-281.
- 30 Warwick, S.I., Simard, M.J., Légère, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Séguin-Swartz, G., Stewart, C.N., Jr., (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107, 528-539.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A., (1996) The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotech* 14, 1274-1278.
- 40 Yamamori, M., (2011) Outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an Experimental Field. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 45, 173-179.
- 45 Zambryski, P., (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review of genetics* 22, 1-30.

稲永忍, (2000) ナタネ. 作物学 II 工芸・飼料作物編. 文永堂出版, p.108-118.

環境省, (2002) 我が国の移入種 (外来種) リスト.
(<http://www.env.go.jp/nature/report/h14-01/mat01a.pdf>) (accessed on 2016-06-07).

5

清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七, (2001) 日本帰化植物写真図鑑. 全国農村教育協会.

杉山信太郎, (2001) 日本人とナタネ. 転作全書 第3巻 雑穀. 農山漁村文化協会, p.273-280.

10

高畑義人, (2005) [タペート細胞]. 植物育種学辞典. 培風社, p.409.

津田麻衣, 田部井豊, 大澤良, 下野綾子, 吉田康子, 吉村泰幸, (2016) 遺伝子組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ (*Brassica juncea*), アブラナ (*B. rapa*), セイヨウアブラナ (*B. napus*) の生物情報集. 農業表環境技術研究所報告, 36, p.1-46.

15

独立行政法人国立環境研究所, (2015) 平成26年度遺伝子組換え生物による影響監視調査報告書.
(http://www.biodic.go.jp/bch/download/natane/H26_natane_hokokusho.pdf)
(accessed on 2015-06-07).

20

村上興正, 鷺谷いづみ 監修, (2002) 外来種ハンドブック. 日本生態学会.

25

中井秀樹, (2003) アブラナ科, 日本の帰化植物, 清水健美 (編). 平凡社, p.80-96.

農林水産省, (2017) 「平成27年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170110.html>)
(accessed on 2017-02-08)

30

農林水産省, (2016) 農林水産物輸出入概況 2015年 (平成27年) 確定値.
(http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_15.pdf)
(accessed on 2016-06-09).

35

40

別添資料の内容

別添資料 1: ベクターpTCO113 の配列特性

社外秘情報につき非開示

5 別添資料 2: MS11 における導入遺伝子のコピー数の決定及びベクター外骨格領域が存在するかどうかの確認

社外秘情報につき非開示

10 別添資料 3: MS11 に挿入された配列及び近傍配列の決定

社外秘情報につき非開示

別添資料 4: MS11 における挿入配列の安定性

社外秘情報につき非開示

15 別添資料 5: イベント識別方法

社外秘情報につき非開示

別添資料 6: MS11 の種子におけるアグロバクテリウムが残存していないことの確認

20

社外秘情報につき非開示

別添資料 7: MS11 の複数世代における挿入遺伝子の伝達

社外秘情報につき非開示

25 別添資料 8: 2014 年にカナダ及び米国で栽培された MS11 を用いた蛋白質発現解析

社外秘情報につき非開示

30 別添資料 9: MS11 の植物体及び花序組織の 3 世代における改変 BARNASE 蛋白質、BARSTAR 蛋白質及び改変 PAT 蛋白質の蛋白質定量解析

社外秘情報につき非開示

別添資料 10: MS11 における改変 *barnase* 遺伝子産物の発現解析

社外秘情報につき非開示

35

別添資料 11: MS11, RF3 及び MS11xRF3 における花茎形態及び花粉稔性の非組換えセイヨウナタネとの比較

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 28 年 10 月 3 日

5 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 ハーラルト・プリンツ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

10 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セイヨウナタネ(改変*bar*, 改変*barnase*, *barstar*, *Brassica napus* L.)(MS11, OECD UI: BCS-BNØ12-7)(以下、「本組換えセイヨウナタネ」とする。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合は、以下の措置を執ることとする。

15 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

本組換えセイヨウナタネが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断された場合は、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部(表1)を速やかに設置する。

20

表1 危機対策本部名簿(平成28年10月現在)

(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 MA&RPD マネージャー
	バイエルクロップサイエンス株式会社 広報部 部長
*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部
	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部
	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部

*管理責任者

(個人名は個人情報のため非開示)

25

2 第一種使用等の状況の把握の方法

栽培試験担当者及び管理責任者は、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

5

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

10 本組換えセイヨウナタネの使用に伴い、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、栽培試験担当者及び管理責任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。

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

15

当該影響を生ずるおそれに基づき、本組換えセイヨウナタネを不活化する措置、本組換えセイヨウナタネの環境への放出を防止するための措置、又はすでに環境に放出された本組換えセイヨウナタネの拡散を防止する措置を講ずる。

20

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 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及ぼす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、緊急措置に対応するための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。