

除草剤グルホシネート耐性ダイズ (*pat, Glycine max* (L.) Merr.)

(A2704-12、OECD UI: ACS-GM005-3) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	2
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	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	
(1) 供与核酸に関する情報	8
(2) ベクターに関する情報	11
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	12
(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	14
(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	18
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	18
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	21
(2) 使用等の方法	21
(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	22
(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	22
(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	22
(6) 国外における使用等に関する情報	22
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	23
2 有害物質の産生性	24
3 交雑性	25
4 その他の性質	26
第三 生物多様性影響の総合的評価	28
参考文献	30
別添資料の内容	30
緊急措置計画書の概要	31

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 7 月 13 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ダイズ (<i>pat, Glycine max</i> (L.) Merr.) (A2704-12、OECD UI: ACS-GM005-3)
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、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：ダイズ

英名：Soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

ロ 宿主の品種名

宿主は米国の民間育成品種であるダイズ品種 A2704 である。A2704 は北緯 40～43 度の地域での栽培に適した早生品種である。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) は *Soja* 亜属に属し、原産地は中国の華北又は華中であると考えられている。ダイズは熱帯から亜寒帯まで広く世界的に栽培されるが、その自然環境下での自生は確認されていない (文献 14, 30)。*Soja* 亜属の野生種である *Glycine soja* (ツルマメ) はダイズの祖先種と考えられており、中国、朝鮮、日本、ロシア東部など東アジアに分布している (文献 30, 39, 40)。我が国においては、北海道、本州、四国、九州に広く分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒地など適度の攪乱に曝される場所を主な生育地としている (文献 1)。なお、中国東北部に分布する同じ *Soja* 亜属の *G. gracilis* は、ツルマメとダイズの間型と考えられている (文献 9)。

(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

ダイズは最も古い農作物の一つであり、紀元前 17～11 世紀の間に中国東部で最初に栽培化されたことが歴史的、地理的根拠に基づいて示されている (文献 14, 30)。西洋諸国に伝播したのは比較的近年のことで 18 世紀以降である。現在の主な生産国である米国には 1765 年に導入され (文献 15, 30)、1920 年代になって栽培が本格化し、カナダや南米へと普及していった。現在では、米国、中国、ブラジル及びアルゼンチンを中心に栽培されており、その生産量は米国が最も多いが、最近、ブラジルとアルゼンチンが生産量を増しており、米国に次ぐ主要輸出

国となっている（文献 41）。

我が国では、秋田県小森山の先史時代の遺跡から籾と共にダイズの炭化物が発掘されたことから、その頃にはすでに何らかの形で栽培利用されていたとみられ、『古事記』や『日本書紀』の中にも記述が見られる。ダイズは我が国において古くから食用に加工されており、6～7世紀ごろから醤油や味噌、8世紀ごろから豆腐が作られていたと考えられている。元来、我が国で栽培されたダイズは食品用が大部分だったが、国外からの安い輸入ダイズの増加により製油用が増し、その油粕は飼料や工業原料に利用されるようになった（文献 23）。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2003/2004年度の全世界のダイズ生産量は約1億9千万tであり、主な生産国は、米国（6580万t）、ブラジル（5260万t）、アルゼンチン（3400万t）、中国（1600万t）である（文献3）。米国では29の州でダイズが栽培されているが、そのほとんどは中西部とミシシッピ川流域に集中している。

我が国においては、2003年度に27万tが生産され、その主な栽培地域は北海道（3.7万t）、秋田県（1.6万t）、新潟県（1.5万t）、佐賀県（1.4万t）、宮城県（1.4万t）であった（文献27）。ダイズは水田転作用の特定作物にとりあげられ、作付け地は今までの台地や中・山間地の傾斜畑から、水田転換畑の低地、平坦地に大きく移動し、転作ダイズがダイズ作の主体になった。また、日長感応性の差異により夏ダイズ（3～5月に播種して7～8月に収穫）と秋ダイズ（6～7月に播種して10～11月に収穫）及びその中間型に大別される。これまでに、北海道では主として夏ダイズ型、東北、関東、北陸は中間型、東海、近畿、中国、四国は秋ダイズ型、九州では夏ダイズ型と秋ダイズ型が栽培されてきたが（文献34）、転作ダイズ主体になるにつれ、関東以西では播種期が6月以降になり、九州では夏ダイズは殆どなくなり、秋ダイズが中心になっている。ダイズは品種によって、開花期になると茎の伸長が止まる有限伸育型と、開花期後も茎の伸長を続ける無限伸育型がある。有限伸育型は日本の品種に多く、一株のうちで開花が斉一で、頂端の葉身が比較的大きく、栄養生長と生殖生長とがあまり重複しない。他方、無限伸育型は米国や中国などの品種に多く、頂端の葉身は下部のものよりも小さい。栄養生長と生殖生長とは重複して行なわれ、開花始め後の栄養生長量が多い。なお、有限伸育型と無限伸育型の中間的な伸育をするものがあり、これは半無限伸育型とよばれている（文献19）。

我が国における2003年のダイズの総輸入量は約517万t、主な輸入先は米国（386万t）、ブラジル（89万t）、カナダ（19万t）、中国（14万t）、パラグアイ（7万t）であった。また、需要量は約517万t（製油用401万t、食品用104万t、飼料用12万t）であり、さらに104万tのダイズ油粕が飼料用に輸入されている（文献3）。なお、2003年度の我が国における種子用ダイズの需要は8千tであるが、現在我が国で普及奨励されているダイズの品種は全て国産であ

り、輸入種子は使われていない（文献28）。

北米やヨーロッパでの食用としての主な用途は食用油で、マーガリン、ショートニング、調理用の油やサラダ油に用いられる。また、豆腐や醤油、豆乳、肉製品などの食品に利用され、脱脂ダイズは家畜飼料の補助栄養分として用いられている（文献30）。

我が国におけるダイズの用途は多く、青刈り・緑肥用、枝豆用、子実用などに大別され、子実用はさらに製油用、味噌、醤油、納豆、豆腐、きな粉、もやし、煮豆、菓子などの加工食品用に細分される。我が国で消費されるダイズの約80%は製油用であるが、その殆どを輸入ダイズに頼っており、国産ダイズは利用されていない。国産ダイズの用途として最も多いのは豆腐や味噌、納豆である（文献13）。

また、食品工業界は、食品を製造するための副成分としてダイズ由来の製品を多く用いている。ダイズ由来の製品は、食品の物理的構造、安定性または質感を調整するために使用されている。濃縮蛋白は、一部の肉製品に増量剤として使用されており、また、代用肉としても使用されている。粗製ダイズ油から分離されたリン脂質のレシチンは、天然乳化剤、潤滑剤及び安定化剤として用いられている（文献16）。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物で、短日植物である。前述のとおり、日長感受性の程度によって、早生品種（夏ダイズ）、晩生品種（秋ダイズ）及びその中間型に分けられる。また、発芽後2~3週間すると、根粒菌（*Bradyrhizobium japonicum*）の寄生により、根にマメ科植物の特徴である根粒が形成され、空中窒素を同化して栄養源とする。開花は、気温によって異なるが、午前中に大部分の花が咲く。また、一株全花数に対する一株稔実莢数の比率（結莢率）が低いこともダイズの特徴である。環境条件によって異なるが、結莢率は30%程度にとどまる場合が多い。一莢に含まれる種子の数は普通1~3粒であるが、まれに5粒のものがある（文献12）。種子の大きさは、百粒重で8~70gの範囲に及ぶ（文献1）。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は30~35℃であり（文献12）、土壌温度が10℃以上で発芽可能、好適条件では5~7日に出芽する（文献30）。ダイズの生育適温は25℃付近であるが、低温状態が続くと、生育が抑えられ、子実生産も阻害される（文献19）。また、霜に弱く、冬季に凍結するような条件では生育できない（文献30）。他方、花芽分化に必要な暗期の長さはダイズ品種によって異なり、早生のものほど短く、晩生のものほど長い（文献19）。極早生の夏ダイズは21

～24時間の日長でも開花するが、中間型では16～19時間以下、晩生の秋ダイズでは14～16時間以下の日長条件にならないと開花しない（文献25, 12）。また、ダイズは土壌に対する適応性が広い。ダイズの栽培適地は、生育期間中はやや高温で、多照、適湿であることが望ましい（文献12）が、各地域に適応した品種が分化・育成されたことにより、ダイズの栽培は北半球ではほぼ北緯50度から赤道直下まで、さらに南半球でも南緯40度にまで拡大している（文献13）。我が国では、ダイズ栽培は全国的に可能である（文献12）が、雑草化した事例はこれまで報告されていない。

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

ダイズの種子は成熟期後、莢が乾燥して裂開し、地表に落下する。開花した花の多くは発達途中で落花・落莢する。落下する莢のうち大部分は、胚の発育を停止したものである。また、落下しなくても、莢内で胚の発育を停止するものがある（文献19）。ダイズ種子は休眠性（硬実性）を稀に示すことはあるが、多くの場合、種子は硬実ではない（文献1, 30）。また、種子の寿命は温度と含水率に依存し、子実を乾燥、低温条件で貯蔵することにより寿命を長く維持することができる。我が国の通常の状態では約3年で発芽力を失う（文献19）。

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

ダイズは種子繁殖であり、自然条件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

ダイズはふつう花が完全に開く前に雄ずいが伸長し、裂開した葯が柱頭を摩擦するので、受粉は開花前に完了する。また、開花期に乾燥や低温など不順な気象条件に曝されると閉花受精が行なわれ、特に開花期の後半は殆ど花は閉花受精する（文献1）。このため、一般にダイズは自殖性植物と考えられている（文献30）。ダイズ他殖率は、一般的には0.5～1%以下であると報告されているが（文献4, 5, 10）、十分な媒介昆虫の存在下で2.5%の他殖率も確認されている（文献2）。また、花色の異なる2品種の栽培種を用いた交雑性の試験では、15.2cm間隔の列状に2種を交互に植えた場合の交雑率は0.65～6.32%、平均1.8%であり、さらに、花粉源から0.9mで0.41%、5.4mで0.03%の交雑率が報告されている（文献37）。

我が国において、ダイズと交雑可能な近縁野生種はツルマメのみである。ツルマメは、一年

生のつる性のマメ科草本で、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地など適度の攪乱に曝される場所を主な生育地とし、丈の高い植物に巻きつきながら、ときには地面に匍匐しながら生育している（文献1）。また、ツルマメは北海道から沖縄まで広く分布しているが、北海道における自生地域は、檜山、渡島、胆振支庁及び日高支庁の河川敷とその周辺に限られている（文献32）。

ツルマメの受粉様式はダイズと同様であり、その自殖率もダイズ同様に高い（文献1）。他殖率については、2.3%（文献18）とほぼダイズ並みとの報告がある一方、秋田県雄物川の河川敷で収集したツルマメの集団では9.3~19%の他殖率が報告された（文献8）。この調査では、訪花昆虫（主にニホンミツバチとクマバチ）が頻繁に観察されており、その結果比較的高い頻度で交雑が起こったものと考察されている。その後1996から2003年にかけて実施された、本州、九州、四国などに自生するツルマメ77集団の遺伝構造の調査結果では、他殖率の平均は3.4%（範囲は0.0~37.4%）であった。ツルマメ集団の規模が大きく、訪花昆虫の飛来頻度も高いような条件では、10%を超える他殖率が観察されているが、そのような例は7集団にとどまり、大多数の集団では他殖率が低かった（文献21）。このように我が国のツルマメ集団のなかには、比較的自然交雑率の高い集団の存在が認められているが、このような事例は特殊であり、一般に見られるツルマメ集団の自然交雑率は、ダイズと同様、低いものと考えられる。

我が国においてダイズとツルマメの開花期が重なることは稀である（文献1）が、晩生の秋ダイズが栽培されている温暖な地域（九州や四国）では、ダイズの開花期とツルマメの開花期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズとツルマメを50cm隔て交互に植えて栽培した場合、結実したツルマメから採取された種子686個体中、雑種は5個体あり、交雑率は0.73%であった（文献26）。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズは1花あたり3,600粒前後の花粉を生産し（文献5）、花粉の直径は21~35 μ mである（文献9）。また、花粉の寿命は数時間であり、主としてミツバチなどの訪花昆虫によって花粉が媒介される。花粉の飛散距離と交雑率に関しては、農業環境技術研究所において行われた遺伝子組換えダイズを用いた交雑試験で、2001年には花粉源からの距離0.7mでは0.19%、3.5mでは0.025%、10.5mでは0%、また、2002年には0.7mでは0.16%、2.8mでは0.08%、3.5mでは0%であったと報告されている。なお、この試験では、訪花昆虫としてアザミウマ類と小型カメムシ類が比較的多く観察されている（文献48）。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

これまでに、ダイズが他感物質のような有害物質を産生するという報告はない。

ト その他の情報

ダイズ種子中にはプロテアーゼインヒビターとレクチンの存在が知られている。これらの役割に関しては諸説があるが、昆虫の食害に対する防御物質として働いているという報告もある（文献16）。

① プロテアーゼインヒビター

ダイズにはKunitzインヒビターとBowman-Birkインヒビターの2種のプロテアーゼインヒビターの存在が知られている（文献22）。両者はトリプシンインヒビターと呼ばれており、蛋白質の消化を阻害し、動物に成長阻害をもたらす。この成分は加熱等の変性処理によりその大半が不活性化するため、通常の食生活では問題にならない（文献16）。

② レクチン

ダイズ種子中に動物の血球を凝集する作用のある蛋白質であるレクチンの存在が報告されている（文献22）。細胞膜複合糖質（糖タンパク質や糖脂質）の糖鎖と結合することによって、細胞凝集、分裂誘発、機能活性化、細胞障害などの効果を及ぼすとされている（文献38）が、その役割についてはいまだに推測の域を出ていない。トリプシンインヒビターと同様、レクチンの活性も加熱により大きく減少することが報告されている（文献35）。

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ダイズ (*pat*, *Glycine max*(L.)Merr., A2704-12, OECD UI: ACS-GM005-3) (以下、「組換えダイズA2704-12」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を表1に示した。

なお、組換えダイズA2704-12に導入された*pat*遺伝子は、*Streptomyces viridochromogenes* から得た野生型の*pat*遺伝子の配列を植物で使用されるコドンに適合するように改変したものである。なお、この改変により産生される酵素のアミノ酸配列は変化していない(文献 7, 29, 44)。改変後の*pat*遺伝子の塩基配列を図1 (p. 10) に示した。

表1 構成要素の由来及び機能

構成要素 (略号)	サイズ (kbp)	ベクター 中の位置 (bp)	由来及び機能
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット			
P35S	0.54	461-1003	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA プロモーター。植物中で <i>pat</i> 遺伝子を構成的に発現させる(文献 31)。
<i>pat</i>	0.55	1012-1563	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来で、PAT 蛋白質をコードし、除草剤グルホシネート耐性を付与する(文献 7)。
T35S	0.20	1582-1784	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA ターミネーター。転写を終結させ、転写産物のポリアダニル化を行わせる(文献 36)。
その他			
<i>bla</i>	0.86	3876-3016	<i>E. coli</i> 由来のアンピシリン耐性遺伝子 (<i>bla</i>) で、細菌中でのみ β -ラクタマーゼを発現する(文献 42)。
ori	0.55	2253-2803	pUC19 の複製起点 (ColE1)。プラスミドの複製を開始させる(文献 47)。
RB	0.06	189-243	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti プラスミド pTiAch5 由来の右側境界(文献 11)。

(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。)

図1 野生型 *pat* 遺伝子と組換えダイズ A2704-12 において導入された *pat* 遺伝子の比較

ロ 構成要素の機能

- ① 目的遺伝子、発現調整領域、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

組換えダイズ A2704-12 の作出に用いた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (p. 9) に示した。

- 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

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。

一方、*pat* 遺伝子を導入された植物体では、ホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (PAT 蛋白質) が産生され、この酵素の働きでグルホシネートはアセチル化されて N-アセチルグルホシネートに変化する。これにより、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用は回避され、植物体中にアンモニアは蓄積されず、グルホシネートを散布しても作物が枯死しない (図 2, p. 11)。

PAT 蛋白質のヒトや動物に対する毒性は報告されておらず、GENBANK データベースに登録されている全ての蛋白質のアミノ酸配列との相同性検索において、種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示していない (文献 29)。また、PAT 蛋白質の物理化学的、生化学的特性を既知のアレルゲンと比較した結果、本蛋白質がアレルギー誘発性を有する可能性は認められなかった (文献 45)。

さらに、本蛋白質の塩基配列及びアミノ酸配列に基づいて包括的な相同性検索 (EMBL 及び Swiss Prot) 及びアレルゲンエピトープ検索を行った結果、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。

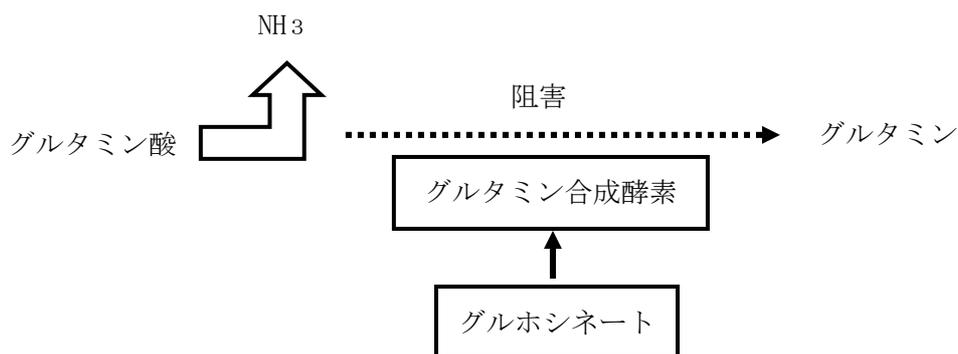
- ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

pat 遺伝子がコードする 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く、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性は殆どなく、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 43)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても PAT 蛋白質によるグルホシネート

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 29, 46）。これらのことから、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の持つ代謝経路への影響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

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成長を続けることができる。

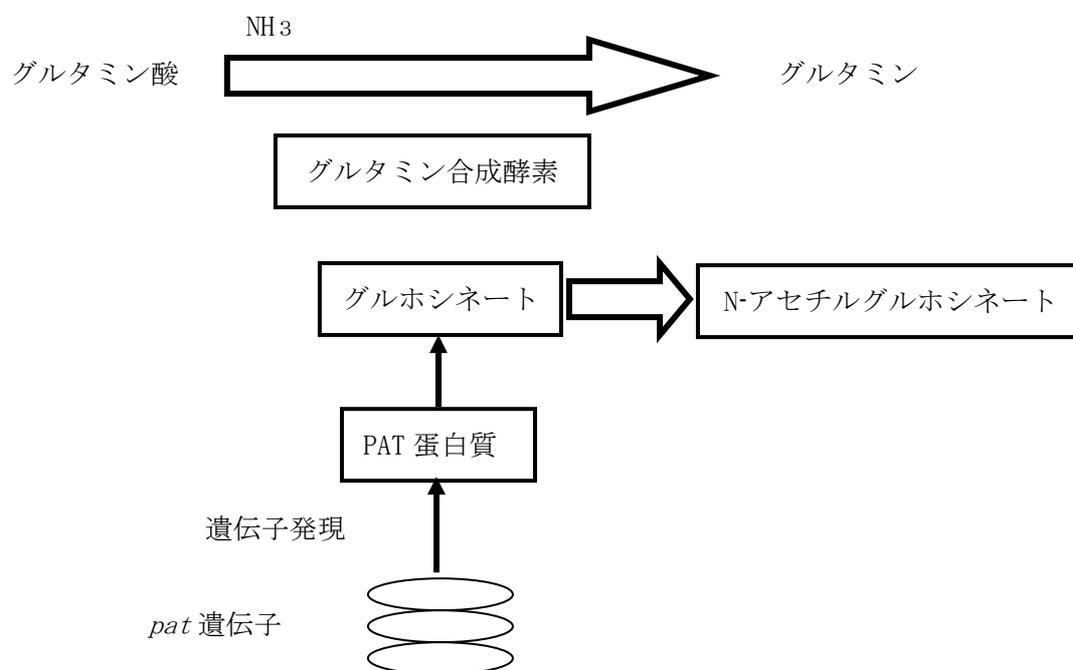


図2 *pat* 遺伝子産物による除草剤グルホシネート耐性のメカニズム
(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

組換えダイズ A2704-12 はプラスミド pB2/35SAck (図 3) を用いて作出された。プラスミド pB2/35SAck は大腸菌由来のプラスミド pUC19 を基本に構築された。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pB2/35SAck の塩基数は 4076bp である。プラスミド地図を図 3 に、また、塩基配列は別添資料 3 に示した。

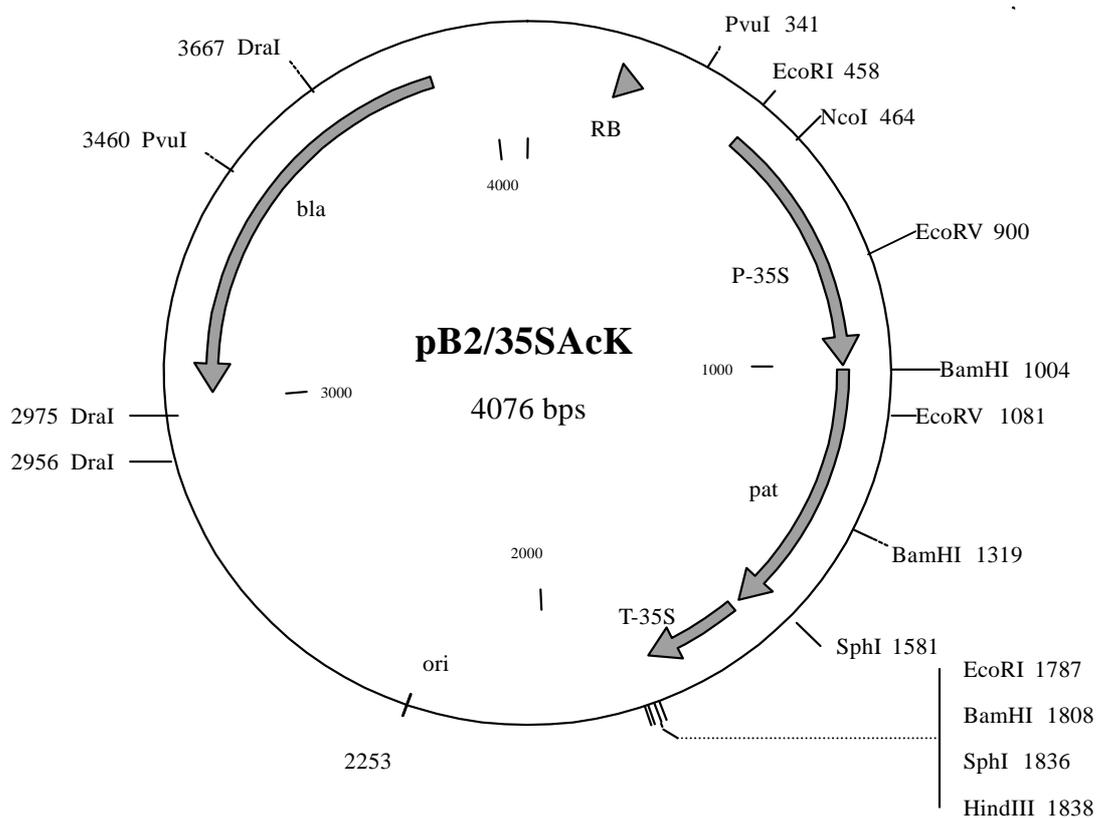


図 3 pB2/35SAck プラスミド地図

(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 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 pB2/35SAck はアンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子を有する。*bla* 遺伝子は、本プラスミドを構築する際の選抜マーカーとして利用されたが、植物のプロモーターを持たないためダイズ細胞中では機能しない。なお、プラスミド pB2/35SAck は形質転換前に制限酵素 PvuI で切断されており、*bla* 遺伝子は機能しない形に分割されている (図4)。組換えダイズ A2704-12 (R4 世代) の葉、莖、根及び種子より抽出した RNA について、*bla* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析を行ったが、いずれの組織においても *bla* 遺伝子転写産物は検出されず (検出限界 1pg)、植物体内で発現していないことが確認された (別添資料4, p.24 Figure 8)。

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 pB2/35SAck は伝達性を持たないため、感染性はない。また、本プラスミドの基礎となったプラスミド pUC19 は自律増殖可能な宿主域が大腸菌と数種のグラム陰性菌に限られていることが知られている。

(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

プラスミド pB2/35SAck は制限酵素 Pvu I で処理され、*bla* 遺伝子が切断されて大小 2 つの断片に分断されている。挿入された T-DNA の構成図を図 4 に示した。

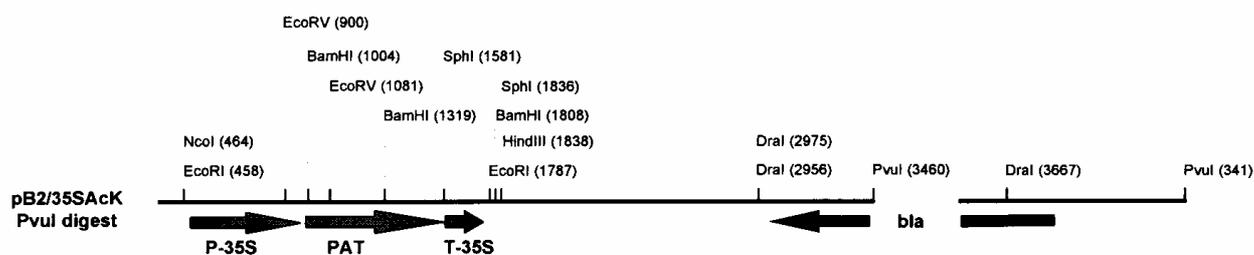


図 4 宿主内に移入された核酸の構成図

図中の PAT は *pat* 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。)

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

2ヶ所の制限酵素 PvuI 切断部位で分断された大小2つのプラスミド pB2/35SAck 断片を(図4, p. 13)、パーティクルガンを用いて4~8mmのサイズの莖頂に導入した。

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の方法

形質転換後、プロトプラスト化し、10mlのKaoの培地(文献17)中で暗黒下、室温下で8日間培養した。その後、5mlのKaoの培地を滴下して加え、室温下、2000 luxの低光量の下で培養した。このKaoの培地の滴下は毎日培養液量の半分に相当する量が加えられ、この操作を8日間行った。次にグルホシネートを含む固体培地上に移し、2~3週間後にグルホシネート耐性ダイズカルスを選抜した。選抜されたカルスを、植物ホルモンを含むMS培地上に移し幼植物体に再生させた。さらに除草剤グルホシネートによる選抜を行い、耐性個体を、順化、鉢上げし、温室にて育成した。

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

—

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

宿主品種 A2704 をプラスミド pB2/35SAck で形質転換し、当代組換えダイズ A2704-12 を得た後、自家交配を繰り返して試験に用いた各世代の植物体を得た。組換えダイズ A2704-12 の系統樹を図5(p. 15)に示した。

また、組換えダイズ A2704-12 の我が国における承認等の状況を以下に示す。

【環境安全】

1998年に農林水産省より農林水産分野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、1999年5月に農林水産省より農林水産分野等における組換え体の利用のための指針に基づき、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。

【飼料安全】

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27日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。

【食品安全】

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、2002年7月8日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。

図5 組換えダイズ A2704-12 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

pat 遺伝子座に関してヘテロ接合体である組換えダイズ A2704-12 の R1 世代を自殖して得られた個体 (R2 世代) に除草剤グルホシネートを散布した結果、除草剤耐性株と感受性株が 3 : 1 の分離比を示した (表 2-1)。そのうち耐性を示した株をさらに自殖して得られた R3 世代の種子を由来株別に畦に播種し、発芽した苗に除草剤グルホシネートを散布して耐性 : 感受性の分離比を調べたところ、全ての苗において除草剤耐性を示した株 (ホモ接合体) と、耐性苗と感受性苗を 3 : 1 の割合で含む株 (ヘテロ接合体) が 1 : 2 の分離比を示した (表 2-2)。この結果は、単一優性遺伝で予想される分離比を示していることから、挿入遺伝子は 1 本の染色体上に存在すると考えられる。

表 2-1 ヘテロ接合体の自殖によって得た R2 世代における除草剤グルホシネート耐性個体の分離データ (1995 年、米国)

世代	耐性株	感受性株	予想分離比	χ^2 ^a
R2	67	24	3:1	0.10

R2: R1 (ヘテロ接合体) の自殖によって得られた世代。

^a: χ^2 検定で有意差 (P=0.05) は認められなかった (P=0.05 で有意とは、 $\chi^2 > 3.84$, df=1)。

(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 2-2 除草剤グルホシネート耐性を示した R2 世代個体の自殖後代 (R3) における除草剤グルホシネートに対する分離比 (1995 年、米国)

世代	全ての苗が耐性を示した畦数	耐性苗と感受性苗が含まれた畦数	予想分離比	χ^2 ^a
R3	24	45	1:2	0.06

R3: R2 における除草剤グルホシネート耐性個体を自殖して得られた世代。

^a: χ^2 検定で有意差 (P=0.05) は認められなかった (P=0.05 で有意とは、 $\chi^2 > 3.84$, df=1)。

(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。)

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

組換えダイズ A2704-12 に移入された T-DNA のコピー数を調べるため、組換えダイズ A2704-12 (R4 世代) から得られたゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った (別添資料 4, p. 12~15, p. 18~22 Figure2~7)。その結果、組換えダイズ A2704-12 には 2 コピーの

pat 遺伝子カセットが同方向で配置され、その間に制限酵素 PvuI 切断部位で分断された *bla* 遺伝子の 3' 末端側及び 5' 末端側の配列の各 1 コピーが導入されていることが示唆された。また、5' *bla* 断片はプラスミド pB2/35SAck 上とは逆向きに挿入されており、完全な *bla* 遺伝子を構成していないと考えられた。さらに、シーケンス解析により、ダイズゲノムに組み込まれた領域の塩基配列が明らかにされている（別添資料 5）。

また、挿入遺伝子の安定性を調べるため、組換えダイズ A2704-12 の R3、R4 及び R5 世代から得られた各ゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った結果、各世代においてそれぞれ 2 本ずつの同一サイズのフラグメントが検出された。よって、移入された核酸が後代に安定して伝達することが確認された（別添資料 6, p10~11）。

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組換えダイズ A2704-12 には 2 コピーの *pat* 遺伝子発現カセットが同方向で反復しており、その間に制限酵素 PvuI 切断部位で分断された *bla* 遺伝子の 3' 末端領域がプラスミド pB2/35SAck 上と同方向で、また、5' 末端領域が逆方向で配置している。移入された領域を図 6 (p. 17) に示した。

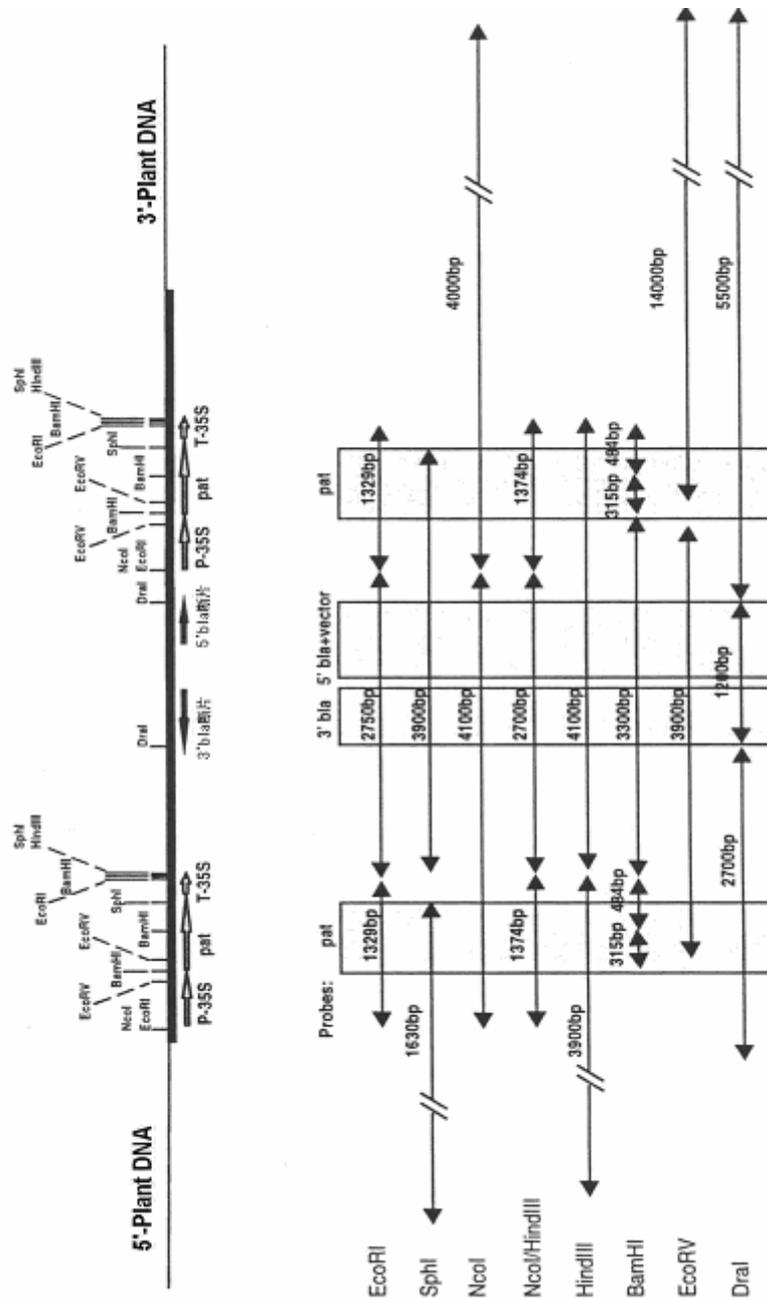


図6 組換えダイズ A2704-12 に挿入された遺伝子の構成図
 プローブとして *pat*, 3' *bla*, 5' *bla*+vector を用いてサザンブロット分析を行った場合に検出される制限酵素断片のサイズを模式的に示した。

(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。)

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

2002年に米国において、組換えダイズA2704-12及び宿主品種A2704（以下、「非組換えダイズ」とする。）各5個体の根、茎及び葉におけるPAT蛋白質をELISA法で分析した。その結果、組換えダイズA2704-12では、全ての植物体のいずれの部位においてもPAT蛋白質が検出されたが、非組換えダイズからPAT蛋白質は検出されなかった（表3-1）。また、米国及びカナダにおいて栽培された組換えダイズA2704-12の種子におけるPAT蛋白質をELISA法で分析した結果、いずれの試験においてもPAT蛋白質が検出された（表3-2）。

表3-1 ELISA法による組換えダイズA2704-12の根、茎及び葉におけるPAT蛋白質測定

植物体	部位	PAT蛋白質量の平均 ($\mu\text{g/g}$ 生重) \pm SD	粗蛋白質/生重 (%)	PAT蛋白質/粗蛋白質 (%)
組換えダイズA2704-12	根	2.23 \pm 1.29	1.95	0.011
	茎	7.63 \pm 2.20	3.58	0.021
	葉	14.5 \pm 2.4	5.96	0.024
非組換えダイズ	根	<LOD	1.61	-
	茎	<LOD	4.15	-
	葉	<LOD	5.22	-

2002年、米国
(n=5)

LOD：検出限界 根 5.12ng/g、茎 2.48ng/g、葉 4.16ng/g

(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3-2 ELISA法による組換えダイズA2704-12の収穫種子におけるPAT蛋白質測定

試料番号	PAT (ng/g試料) 平均 \pm SD	粗蛋白質含量 (%)	PAT/粗蛋白質 (%)
1	1057	-	-
2	573	-	-
3	862 \pm 268	38.03	0.000227
4	2138 \pm 33	43.5	0.00049

ーデータなし

試料番号1：3ヶ所におけるほ場試験で各プロットから得られたサンプルを各3反復で1回抽出し、2回測定した平均

試料番号2：ほ場試験から得られたサンプルを2回抽出し、測定した平均（2測定値の平均、検出限界2.0ng/g試料）

試料番号3：4ヶ所におけるほ場試験で各プロットから得られたサンプルを各3反復で2回抽出し、2回測定した平均（合計48測定値の平均、検出限界6.6ng/g試料）

試料番号4：2回抽出、2回測定した平均（合計4測定値の平均、検出限界4.0ng/g試料）

(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。)

また、組換えダイズA2704-12 (R5世代) 及び非組換えダイズ20粒を隔離ほ場に播種し、発芽した苗にバスタ除草剤 (グルホシネートを有効成分とする除草剤) を500倍希釈液として散布した。10日後に観察したところ、非組換えダイズは全て枯死したが、組換えダイズA2704-12の全ての個体は除草剤に耐性を示したことが確認された (別添資料1, p. 8)。

さらに、特定網室試験において、供試した組換えダイズA2704-12 (R6世代) と非組換えダイズの種子を播種し、発芽した苗に除草剤グルホシネートを散布した結果、非組換えダイズの苗は全て枯死したのに対し、組換えダイズA2704-12の苗は全て耐性を示し、生存が確認された。また、同特定網室において栽培・収穫した次世代の組換えダイズA2704-12及び非組換えダイズの種子についても同様の調査を行なった結果、非組換えダイズは全て枯死し、組換えダイズA2704-12は全て生存していたことが確認された (別添資料2, p. 4~6)。

以上のことから、個体間及び世代間において*pat*遺伝子が安定して発現していることが確認された。

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

組換えダイズA2704-12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移入された核酸が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

組換えダイズ A2704-12 に導入されている挿入 DNA の周辺配列を利用した 20mer 及び 21mer のプライマーを用いた PCR 法によって、本組換えダイズ A2704-12 を特異的に識別することができる。なお、本 PCR 法は組換えダイズ A2704-12 の栽培管理に通常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

組換えダイズ A2704-12 は、*pat* 遺伝子の発現により 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。

ロ 以下に挙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

1998 年度に農林水産省北海道農業試験場で行った隔離ほ場試験において、組換えダイズ

A2704-12 と非組換えダイズを比較し、相違を検討した（別添資料 1）。また、成体の越冬性、種子の脱粒性、種子の発芽率及び有害物質の産生性については、2005 年度に我が国の特定網室内において調査を行った（別添資料 2）。なお、花粉の稔性及びサイズに関しては、2002 年に Aventis CropScience 社（現 Bayer CropScience 社）がフランスで行った試験において、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズとの比較がなされている（別添資料 7）。なお、いずれの試験においても、対照の非組換えダイズとして A2704 品種が用いられた。

① 形態及び生育の特性

組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズとの間で、発芽調査において発芽始め及び発芽期（別添資料 1, p. 5, 表 2）、開花揃期調査において開花始、開花期、花の色、主茎長、主茎節数、茎の太さ、分枝数、葉の長さ、葉の幅、葉色、毛茸の色及び毛茸の量（別添資料 1, p. 5～6, 表 3-1, 3-2）、成熟期及び収穫期調査において草型、生育習性、裂莢の難易、一株地上重、一株莢実重、一株稔実莢数、莢色、一株粒重、一株完全粒数、一株完全粒重、一莢粒数、百粒重、種皮色及び臍の色（別添資料 1, p. 6～7, 表 4-1, 4-2）について比較した。その結果、いずれの項目においても相違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

生育初期における低温耐性の試験は行なっていないが、種子の越冬性を調べるため、隔離ほ場で栽培して採種後乾燥した組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの種子を、1998 年 12 月 7 日に隔離ほ場の土中 10cm の深さに置き覆土し、60 日後に回収して観察した結果、全ての種子は吸水した段階で腐敗して発芽能力を失っていたことが確認された。よって、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズは、いずれも冬季の自然環境下で発芽できず、生育して越冬することはないと考えられる。

③ 成体の越冬性又は越夏性

2005 年 8 月 17 日に播種し、特定網室内で生育させた組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの成体を成熟後も冬季の特定網室内に放置し、翌年 2 月 2 日に観察した。その結果、いずれの個体も枯死していることが確認され（別添資料 2, p. 8）、組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの成体の越冬性に相違は認められなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

2002 年にフランスで行われた試験により、花粉の稔性及び発芽性に関して、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズは同等であったことから、花粉の稔性に相違はないと考えられる（別添資料 7, p. 9）。また、花粉の形態においても両者を比較したが、相違は認められなかった（別添資料 7, p. 12）。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関わる形質として調べられた一株莢重量、一株稔実莢数、一株粒重、一株完全粒数、一株完全粒重、一莢粒数及び百粒重において、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズの間には有意差は認められなかった（別添資料 1, p. 6～7, 表 4-1, 4-2）。

脱粒性に関しては、裂莢の難易を観察したが、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズはいずれも裂莢し難く、脱粒の度合いに相違は認められなかった（別添資料 1, p. 6）。また、特定網室試験において、組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズを各 6 ポット栽培し、成熟期 1 ヶ月後まで栽培を続け、株当たりの全莢数に対して裂開した莢の割合を調べた結果、非組換えダイズに比べて組換えダイズ A2704-12 の裂莢数の割合にやや低い傾向が認められたが、株間のバラツキが大きく有意差も認められなかったことから、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズの裂莢性については、前述の隔離ほ場試験での判定結果と同様、いずれも難の階級に分類される範囲にあると考えられた（別添資料 2, p. 7, 表 3, 4）。

休眠性及び発芽率に関しては、隔離ほ場で栽培した組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズから収穫した種子を各 20 粒播種して観察した結果、発芽率はいずれも 100%であった（別添資料 1, p. 8）。また、特定網室試験において収穫された組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの種子を各 30 粒、3 反復（計各 90 粒）播種して発芽率を比較した結果、組換えダイズ A2704-12 は 98.9%、非組換えダイズは 100%の発芽率を示し、有意差は認められなかった（別添資料 2, p. 5, 表 1, 2）。このように、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズの発芽率は収穫直後から同等に高かったことから、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズの休眠性はいずれも浅いと考えられる。

⑥ 交雑率

組換えダイズ A2704-12 と 60cm の間隔で隣接して栽培された非組換えダイズ由来の種子 1066 粒を播種し、隔離温室において生育させた後、除草剤グルホシネートを散布し、耐性を示す個体数を調べた。その結果、6 個体が除草剤の影響を受けなかったことから、交雑率は 0.56%であると考えられた（別添資料 1, p. 9）。ダイズの他殖率は 0.5～1%と報告されており（文献 4）、本結果はこの範囲内であった。よって、組換えダイズ A2704-12 の花粉による交雑率は、既往の知見を上回るものではないと考えられる。

⑦ 有害物質の産生性

組換えダイズ A2704-12 の有害物質の産生性に関わる形質として、根から分泌され他の植物の生育に影響を及ぼす可能性については生育抑制物質に比較的感受性の高い作物であるダイコンを用いた後作試験、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可能性については同じくダイコンを用いた鋤込み試験、さらに根から分泌され土壤微生物相に影響を与

える可能性については土壌微生物相試験を行い、それぞれ非組換えダイズとの比較において検討した。

【後作試験】

特定網室内で3ヶ月程度栽培した組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズを収穫後、篩にかけて植物体の組織等の遺体を除いた土壌にダイコンを播種し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重を測定した。その結果、いずれの項目についても組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズとの間に有意差は認められなかった（別添資料2, p.10～12, 表5～10）。

【鋤込み試験】

特定網室内で3ヶ月程度栽培した組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズを収穫後、根部を含む植物体を乾燥、粉碎し、重量約1%の割合で新しい土壌と混和し、育苗ポットに充填した。各ポットにダイコンを播種し、その発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重を測定した結果、いずれの項目についても組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの間には有意差は認められなかった（別添資料2, p.13～16, 表11～18）。

【土壌微生物相試験】

特定網室内で3ヶ月程度栽培した組換えダイズ A27104-12 及び非組換えダイズを収穫後、植物体の根から振り落とした土壌を用いて、細菌数、放線菌数及び糸状菌数について比較した結果、いずれの項目においても、組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズの間には有意差は認められなかった（別添資料2, p.17～19, 表19～21）。

以上から、有害物質の産生性について、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズに相違はないと考えられた。

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、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

国外における承認に関する情報を表 4-1 に、我が国における承認に関する情報を表 4-2 に示した。

なお、組換えダイズ A2704-12 は、これまでにいずれの国においても商業的に栽培されたことはない。

表 4-1 国外における承認に関する情報

国名	承認機関	承認時期	承認内容
カナダ	カナダ食品検査庁	1999年10月	規制外確認
	カナダ食品検査庁	2000年12月	飼料安全確認
	カナダ厚生省	2000年11月	食品安全確認
米国	米国農務省	1996年7月	輸入・栽培承認
	連邦食品医薬品局	1998年5月	飼料・食品安全確認

表 4-2 我が国における承認に関する情報

承認機関	承認時期	承認内容
農林水産省	1999年5月	輸入（加工用及び飼料用としての利用）
厚生労働省	2002年7月	食品利用
農林水産省	2003年3月	飼料利用

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ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) は我が国において長期にわたる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

ダイズは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下において競合における優位性に関して影響を及ぼすというような報告はない。

競合における優位性に関する形質として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、花粉の稔性及びサイズについて、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズとを比較した結果、いずれにおいても相違は認められなかった。

また、組換えダイズ A2704-12 は除草剤グルホシネート耐性を有する。しかし、本形質は除草剤グルホシネートが散布される環境下においてのみ競合に優位に作用するが、自然条件下ではそのような環境は考え難く、本形質が競合において優位に作用することはないと考えられる。

以上から、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、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

ダイズは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、これまでに、ダイズ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。

組換えダイズ A2704-12 の有害物質の産生性に関して、根から分泌され周囲の植物の生育に影響を及ぼすものについては後作試験、また、植物体が内部に有し、枯死した後周囲の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験を行い、有害物質に感受性の高いダイコンの発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について、組換えダイズ A2704-12 及び非組換えダイズを比較した。また、根から分泌され土壌微生物相に影響を与えるものについては土壌微生物相試験において、細菌数、放線菌数及び糸状菌数について、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズを比較した。その結果、いずれの項目においても有意差は認められなかった。

また、*pat* 遺伝子がコードする 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し、生体内においてその他の各種アミノ酸に転移反応を生じさせることはなく（文献 43）、宿主の代謝経路に影響し、有害物質を産生することはないと考えられる。さらに、PAT 蛋白質のアレルギー誘発性の有無を調べるため、本蛋白質の塩基配列及びアミノ酸配列に基づいて、包括的な相同性検索（EMBL 及び Swiss Prot）及びアレルギーエピトープ検索を行った結果、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。よって、組換えダイズ A2704-12 がアレルギー性物質を新たに産生することはないと考えられる。

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等の判断

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

我が国に分布するダイズの近縁野生種のうち、交雑可能な種としてツルマメ (*G. soja*) が挙げられる。ツルマメは、北海道、本州、四国、九州に広く分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地など適度の攪乱に曝される場所を主な生育地としている(文献1)。その他に、我が国においてダイズと交雑可能な近縁野生種は報告されていない。従って、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物として、ツルマメが特定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

組換えダイズ A2704-12 は食用又は飼料用に輸入され、我が国において栽培する予定はない。よって、野外において生育するとすれば、運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する場合に限られる。従って、影響の具体的評価として、①運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する可能性、②発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性、③雑種の個体群が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

これまでに栽培種であるダイズの自然環境下での自生は確認されていない(文献 14, 30)。2005 年度の財団法人自然環境研究センター及び独立行政法人国立環境研究所による遺伝子組換え生物による影響監視調査において、調査した全国 7 つの港湾及びその周辺の道路沿いや河川敷、また関東地方の河川敷の合計 117 地点では、こぼれ落ちて生育したと見られるダイズの植物体は認められなかった(文献 49)。また、組換えダイズ A2704-12 の発芽・生育特性について、非組換えダイズと相違は認められなかった(別添資料 1, p. 5~8 ; 別添資料 2, p. 5)。

以上のことから、組換えダイズ A2704-12 の種子が運搬の途中でこぼれ落ちたとしても、発芽・生育する可能性は極めて低いと判断した。

我が国においてダイズとツルマメの開花期が重なることは稀である(文献 1)が、晩生の秋ダ

ダイズが栽培されている温暖な地域（九州や四国）では、ダイズの開花期とツルマメの開花期と重なる可能性がある。2004 年に行なわれた調査においてもダイズとツルマメとの開花期が重なっている事例が報告されており、全国 29 地点から採取したツルマメ 395 点中、滋賀県の 3 地点から採取された 11 個体で中間型が認められた（文献 20）。

しかし、ダイズは基本的に自家受粉するため、他殖率は 0.5～1%（文献 4, 5, 10）、十分な媒介昆虫の存在下でも 2.5%（文献 2, 6）と極めて低い。また、ダイズとツルマメの交雑率については、ダイズとツルマメの各 30 個体を隔離距離 50cm で交互に栽培し、結実したツルマメから採取した種子を調べた結果、交雑率は 0.73%であったと報告されている（文献 26）。

さらに、組換えダイズ A2704-12 とツルマメの交雑性試験は開花期が重ならなかったためデータが得られなかったが、組換えダイズ A2704-12 が非組換えダイズと比較して高い交雑性を獲得していないことが隔離ほ場試験によって確認されており（別添資料 1, p.9）、組換えダイズ A2704-12 とツルマメの交雑性はダイズとツルマメの交雑性を大幅に上回ることはないと推察される。また、*pat* 遺伝子を有する個体は、除草剤グルホシネートが散布される環境下においてのみ生存に優位に作用するが、そのような条件が考え難い自然環境下では、競合における優位性を高めることは考えられない。従って、*pat* 遺伝子を有する雑種が競合において優位性を高め、*pat* 遺伝子がツルマメの集団中に広く浸透する可能性は低いと考えられる。

以上のことから、発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性は極めて低いと判断した。

人為的に作出したダイズとツルマメの雑種について、異なる栽培管理条件下で 3 年間にわたり、雑種系統の定着度が追跡調査された。その結果、調査開始時に雑草防除を施していない試験区に播種した場合、雑種系統の多くが雑草との競合に敗れて定着できず消滅した。また、播種前に雑草防除が行なわれた試験区においても、雑種系統の定着度は親系統のツルマメと比較して顕著に低下した（文献 33）。

また、第二、1（競合における優位性）に述べたように、組換えダイズ A2704-12 は競合における優位性を高めるような形質は獲得していないと考えられることから、組換えダイズ A2704-12 とツルマメの雑種が定着度を高め、雑種の個体群が優占化する可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、雑種の個体群が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断した。

以上から、組換えダイズ A2704-12 が運搬の途中でこぼれ落ち、我が国の自然環境下に放出されたとしても、①運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する可能性、②発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性、③雑種の個体群

が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす可能性は、いずれも極めて低いと判断した。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、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

上記の他に生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる組換えダイズ A2704-12 の性質はないと考えられる。

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは、我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、これまでに、我が国の生物多様性に影響を及ぼしたとする報告はない。

競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、花粉の稔性及びサイズについて、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズとの比較において評価したが、いずれの項目においても相違は認められなかった。

また、組換えダイズ A2704-12 は除草剤グルホシネート耐性を有するが、自然環境下で除草剤グルホシネートが散布されるような状況は想定し難いため、本形質が競合において優位に作用すること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する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

ダイズは我が国では長期にわたる栽培の実績があるが、これまでに、ダイズ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。

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い、組換えダイズ A2704-12 と非組換えダイズを比較したが、いずれの項目においても有意差は認められなかった。

組換えダイズ A2704-12 は *pat* 遺伝子産物である PAT 蛋白質を新たに産生するが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝経路に影響を及ぼして有害物質を新たに産生することは考え難い。また、PAT 蛋白質と既知のアレルゲンとの相同性検索の結果、相同性は認められなかった。

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。

我が国に広く分布するツルマメはダイズと交雑して雑種を形成することが知られており、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ツルマメが挙げられた。

組換えダイズ A2704-12 は食用又は飼料用に輸入され、我が国において栽培する予定はない。よって、野外において生育するとすれば、運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する場合に限られる。従って、交雑性に起因して生物多様性に影響を及ぼす可能性として、①運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する場合、②発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する場合、③雑種の個体群が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす場合が考えられた。

これまでに、栽培種であるダイズの自然環境下での自生は確認されておらず、2005 年度の財団法人自然環境研究センター及び独立行政法人国立環境研究所による遺伝子組換え生物に

よる影響監視調査においても、こぼれ落ちて生育したと見られるダイズの植物体は認められなかった。また、組換えダイズ A2704-12 の発芽・生育特性について、非組換えダイズと相違は認められなかった。以上のことから、組換えダイズ A2704-12 の種子が運搬の途中でこぼれ落ちたとしても、発芽・生育する可能性は極めて低いと判断した。

我が国においてダイズとツルマメの開花期が重なることは稀であるが、地域や品種によっては開花期が重なることが報告されている。しかし、開花期が重なったとしても、ダイズは他殖率は極めて低いことが知られており、ダイズとツルマメの交雑率も低いいため、交雑する可能性は極めて低いと考えられる。また、組換えダイズ A2704-12 が非組換えダイズと比較して高い交雑性を獲得していないことが隔離ほ場試験によって確認されており、組換えダイズ A2704-12 とツルマメの交雑性はダイズとツルマメの既往の知見を大幅に上回ることはないと考えられた。さらに、*pat* 遺伝子を有する個体は、除草剤グルホシネートが散布される環境下においてのみ競合に優位に作用するが、そのような条件が考え難い自然環境下では、競合における優位性を高めることは考え難い。従って、*pat* 遺伝子を有する雑種が競合において優位性を高め、*pat* 遺伝子がツルマメの集団中に広く浸透する可能性は低いと考えられる。以上のことから、発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性は極めて低いと判断した。

人為的に作出したダイズとツルマメの雑種は雑草との競合に敗れて定着できないことが報告されている。また、組換えダイズ A2704-12 は競合における優位性を高めるような形質は獲得していないことから、組換えダイズ A2704-12 とツルマメの雑種が定着度を高め、雑種の個体群が優占化する可能性は極めて低いと考えられる。よって、雑種の個体群が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断した。

以上から、組換えダイズ A2704-12 が運搬の途中でこぼれ落ち、我が国の自然環境下に放出されたとしても、①運搬の途中でこぼれ落ちた種子が発芽・生育する可能性、②発芽・生育した組換えダイズ A2704-12 と我が国に自生するツルマメが交雑して雑種を形成し、さらにツルマメによる戻し交配により、ツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性、③雑種の個体群が優占化することにより、ツルマメ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、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。

以上を総合的に評価し、組換えダイズ A2704-12 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： 平成 10 年度遺伝子組換えダイズ A2704-12 の隔離ほ場における試験報告

社外秘情報につき非開示

別添資料 2： 除草剤グルホシネート耐性ダイズ A2704-12 の特定網室における環境安全性評価試験

社外秘情報につき非開示

別添資料 3： プラスミド pB2/35SAck の全塩基配列

社外秘情報につき非開示

別添資料 4： グルホシネート耐性ダイズ A2704-12 の形質転換方法及び遺伝的特性
(Transformation System and Genetic Characterization of Glufosinate Resistant Soybean Event A2704-12)

社外秘情報につき非開示

別添資料 5： 組換えダイズ A2704-12 に挿入された配列の決定

社外秘情報につき非開示

別添資料 6： 遺伝子組換えダイズ A2704-12 に導入された遺伝子の安定性
(Molecular demonstration of the stability of the integration of *Glycine max* transformation event A2704-12)

社外秘情報につき非開示

別添資料 7： 組換えダイズ A2704-12 の花粉の形態及び稔性
(Reproductive Biology Data Glufosinate-tolerant Soybean Event A2704-12)

社外秘情報につき非開示

別添資料 8： イベント識別方法

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 16 年 7 月 13 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ダイズ A2704-12 (*pat*, *Glycine max* (L.) Merr., A2704-12, OECD UI: ACS-GM005-3) (以下「組換えダイズ A2704-12」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。なお、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場合とは、組換えダイズ A2704-12 に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

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

弊社は組換えダイズ A2704-12 穀粒の我が国の輸入業者、我が国において組換えダイズ A2704-12 穀粒を配給した業者、輸入した組換えダイズ A2704-12 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

確認された明らか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 で明らかにした組換えダイズ A2704-12 穀粒の我が国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。更に、弊社は可能な限りにおいて組換えダイズ A2704-12 穀粒を我が国に配給している、また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、組換えダイズ A2704-12 を不活化する措置か、さもなくば組換えダイズ A2704-12 の環境への放出を防止するための措置、及び既に環境に放出された組換えダイズ A2704-12 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

科学的に正当性のある評価に基づき、組換えダイズ A2704-12 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。