

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ(*2mepsps*, *hppdPfw336*, *Glycine max* (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FGØ72-2)申請書等の概要

5	第一種使用規程承認申請書	1
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
10	(2) 使用等の歴史及び現状	3
	(3) 生理学的及び生態学的特性	4
	イ 基本的特性	4
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
	ハ 捕食性又は寄生性	5
15	ニ 繁殖又は増殖の様式	5
	ホ 病原性	7
	ヘ 有害物質の産生性	7
	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
20	(1) 供与核酸に関する情報	8
	イ 構成及び構成要素の由来	8
	ロ 構成要素の機能	10
	(2) ベクターに関する情報	17
	イ 名称及び由来	17
25	ロ 特性	17
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	20
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	20
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	20
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	20
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	21
	(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	26
	(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	26
	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	30

	(1) 使用等の内容	30
	(2) 使用等の方法	30
	(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法	30
5	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	30
	(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	30
	(6) 国外における使用等に関する情報	31
10		
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	32
	1. 競合における優位性	32
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
15	(3) 影響の生じやすさの評価	32
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
	2. 有害物質の産生性	33
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	33
	(2) 影響の具体的内容の評価	34
20	(3) 影響の生じやすさの評価	34
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	35
	3. 交雑性	35
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	35
	(2) 影響の具体的内容の評価	35
25	(3) 影響の生じやすさの評価	35
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
	4. その他の性質	37
	第三 生物多様性影響の総合的評価	38
30		
	参考文献	40
	別添資料の内容	48

緊急措置計画書.....	49
モニタリング報告書	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 26 年 10 月 15 日

5

農林水産大臣 西川 公也 殿
環境大臣 望月 義夫 殿

10

申請者 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 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

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

25

30

35

40

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ (<i>2mepsps, hppdPfw336, Glycine max</i> (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FGØ72-2)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	

5

10

15

20

25

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

和名、英名及び学名

和名：ダイズ
10 英名：soybean
学名：*Glycine max* (L.) Merr.

宿主の品種名

15 宿主はダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の米国栽培品種Jackである。

国内及び国外の自然環境における自生地域

20 *Glycine*属*Soja*亜属の栽培種ダイズは、中国北部及び中部が原産で、現在では世界各地で広く栽培されているが、野生の状態では確認されていない(OECD, 2000)。一方、*Soja*亜属の野生種ツルマメ(*G. soja*)はダイズの祖先種と考えられており、中国、朝鮮半島、日本、台湾、ロシアに分布している(OECD, 2000)。我が国においては、北海道南部から九州まで分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地等を主な生育地としている(阿部・島本, 2001)。

25

(2) 使用等の歴史及び現状

国内及び国外における第一種使用等の歴史

30 ダイズは紀元前17～紀元前11世紀に中国東部で最初に栽培化されたと考えられている(OECD, 2000)。我が国への渡来は、これまでの推定では1900～2000年前とされる(後藤, 2001)。西洋への導入は比較的新しく、現在の主要生産国である米国には1765年に導入された(Hymowitz and Harlan, 1983)。

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

世界の主要ダイズ生産国とその収穫面積は、2013年に米国: 3,070万ha、ブラジル: 2,786万ha、アルゼンチン: 1,972万haであった(FAO, 2013)。また、我が国の主な栽培地域とその作付面積は、2013年度に東北: 3.22万ha、北海道: 2.68万ha、九州: 2.04万haであった(農林水産省, 2014a)。

我が国のダイズ栽培の播種適期は、地域や品種により異なり、北海道(夏ダイズ型品種)では5月上中旬、東北・北陸地方(中間型品種の早・中生)では5月中下旬、関東から中国地方に跨る地帯(中間型品種の晩生)では6月上～下旬、九州・四国地方では4月中下旬(夏ダイズ型品種)及び6月下旬～7月中下旬(秋ダイズ型品種)とされている。しかし、実際の農業経営では前作物の収穫、気象条件等により適期播種が困難な場合が多く、水田転換畑においては、中間型品種の作付地帯では晩播に、秋ダイズ型の作付地帯では早播傾向にある(大庭, 2001)。

我が国における2013年のダイズの総輸入量は276.2万tで、主な輸入先は米国(166.6万t)、ブラジル(64.9万t)、カナダ(37.8万t)である(農林水産省, 2014b)。また、国内消費仕向量は2011年概算値で303.7万t、その内訳は加工用209.3万t、飼料用10.7万t、種子用0.7万t等であった(農林水産省, 2013)。

ダイズの用途は、青刈り・緑肥用、枝豆用、子実用等に大別され、子実用はさらに製油用、味噌、醤油、納豆、豆腐等の加工食品用に細分される(橋本, 2001b)。また、脱脂ダイズから糖類などの可溶性分子を除いた濃縮ダイズ蛋白は、肉製品の増量剤や代用肉として使われている(山内, 1992)。ダイズのリン脂質のレシチンは、天然乳化剤として用いられる(鎌田, 1992)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは種子で繁殖する一年生植物である(OECD, 2000)。日長や温度に対する反応が多様なため、各地に適応した生態型の品種分化が見られる(橋本, 2001a)。発芽後2～3週間すると、根粒菌の寄生により根粒が形成され始め、空中窒素を固定して

栄養源とする(後藤, 2001)。種子の百粒重は、特殊なものを除き10～50gの範囲である(国分, 2002)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

5

ダイズ種子の発芽適温は30～35℃であり(後藤, 2001)、土壤温度が10℃以上で発芽が可能となり、好適条件では5～7日で出芽する(OECD, 2000)。ダイズの生育適温は25℃付近であるが、低温条件が続くと生育が抑えられ、子実生産も阻害される(昆野, 2001)。耐霜性がないため、冬季に凍結するような条件では生育できない(OECD, 2000)。ダイズの生育に適する土壤水分は飽和水分の70%であり、最適pHは6.0～6.5であるが、土壤に対する適応性は比較的広く、我が国では全国的に栽培可能である(後藤, 2001)。北米では栽培に適正な日長と緯度より、成熟群(Maturity group)を北部の[000]から赤道付近の[]まで品種を13の成熟群に分類しており(OECD, 2000)、宿主品種であるJackは成熟群[II]に分類される早生種である(Nickell *et al.*, 1990)。

10

ハ 捕食性又は寄生性

20 二 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズは成熟期を過ぎると、莢が乾燥して裂開し、種子が地表に落下する。裂莢性には品種間差があり、一般的に米国の無限伸育性品種は裂莢しにくい(大庭, 2001)。ダイズの育成品種では種子休眠性はほとんどみられない(OECD, 2000)。また、種子の寿命は比較的短く、常温で貯蔵した場合に通常約3年で発芽力を失う(昆野, 2001)。

25

30 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、自然条件下において他の器官からの繁殖はこれまでのところ報告がない。

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性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

5 ダイズは自殖性作物で(OECD, 2000)、通常、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
や低温等の不順な気象条件に曝されると開花することなく蕾のまま受精してしま
う(阿部・島本, 2001)。

10 ダイズの他殖率は、一般的には1%以下(Caviness, 1966; Chiang and Kiang, 1987)と
されるが、十分な花粉媒介昆虫の存在下で2.5%の事例も報告されている(Ahrent and
Caviness, 1994)。また、花色の異なる2品種を用いた交雑性試験では、同一畝に15.2cm
10 間隔で交互に2品種を植えた場合の交雑率が0.65～6.32%で、平均1.8%であった(Ray
et al., 2003)。

15 我が国には、ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメが分布する。ツルマ
メの受粉様式はダイズとほぼ同じであり、その自殖率もダイズ同様に高い(阿部・島
本, 2001)。自然交雑率については、2.3%(Kiang *et al.*, 1992)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%の交雑率が報告され
ている(Fujita *et al.*, 1997)。この調査では、訪花昆虫(主にニホンミツバチとクマバチ)
20 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。また、秋田県、茨城県、佐賀県で継続調査されたツルマメ集団では、交
雑率の平均値は2.2%(0～6.3%の範囲)であった(Kuroda *et al.*, 2008)。このうち、秋田
県の1地点及び佐賀県の5地点において採取された468個体のツルマメ、17個体の中
25 間体及び12個体のダイズについて、分子マーカーによる解析が行われた結果、これ
らの中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動によるものと判断された。他方、
中間体からツルマメへの二次的な遺伝子流動は認められなかったことから、ダイズ
とツルマメの雑種形成の可能性はあるが、我が国の自然環境において更なる浸透交
雑が起こる可能性は極めて低いと考えられる(Kuroda *et al.*, 2010)。

30 ダイズとツルマメの開花期のずれは、両者の遺伝子交流を妨げる一因と考えられ
ている(阿部・島本, 2001)、晩生の秋ダイズ型品種の作付地帯等では、両者の開花
期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズ品種とツルマメを50cm間隔で交互
に配置して栽培した場合、個体別の交雑率は0～5.89%、平均で0.73%であった
(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換

えダイズを供試して、開花ピークを近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、交雑率が0.136%(調査25,741個体中、雑種35個体)であった。他方、組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、2、4、6mの距離での交雑率はそれぞれ0.013%(調査7,521個体、7,485個体、7,508個体中それぞれ雑種1個体)であり、8、10mの距離では交雑種子は認められなかった(Mizuguti *et al.*, 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、ダイズに自家不和合性やアポミクシスについての報告はない。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズは一花当たり3,600粒前後の花粉を生産し(Chiang and Kiang, 1987)、花粉の直径は30 μ m前後であるが、粘性のため塊状になる傾向にある(Yoshimura, 2011)。花粉の寿命は短く、その発芽能力は湿度が一定でない条件下では8時間で失われることが報告されている(Abel, 1970)。前述の花色の異なる2品種を用いた交雑性試験では、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(Ray *et al.*, 2003)。なお、風による花粉の飛散状況について花粉捕集器を用いて実際に調査した結果、1日1cm²当たりの平均花粉捕捉数は、ダイズ畑のなかで0.386粒、畑から2.5mの地点で0.694粒、5mで0.309粒、10mで0.077粒に過ぎず、風媒による他殖の可能性はほとんどないと判断された(Yoshimura, 2011)。

ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

ダイズが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を産生するという報告はない。

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

5 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ(*2mepsps*, *hppdPfw336*, *Glycine max* (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FGØ72-2)(以下、「本組換えダイズ」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。

10

表1 構成要素のベクター上の位置、サイズ、由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	サイズ	由来及び機能
<i>hppdPfw336</i> 遺伝子発現カセット			
3' nos	3262-3553	292	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)のプラスミド pTiT37のT-DNA由来ノパリン合成遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。転写を終結し、3'ポリアデニル化を行う。
<i>hppdPfw336</i>	3554-4630	1077	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A32株の4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(HPPD W336蛋白質)をコードする遺伝子を由来とする。アミノ酸配列336番目のグリシンをトリプトファンへ置換することで除草剤イソキサフルトールへの親和性を低減し、耐性を付与する (Boudec <i>et al.</i> , 2001)。
TPotp Y	4631-5002	372	ヒマワリ(<i>Helianthus annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Zea mays</i>)のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域(アミノ酸配列55番目をチロシンへ置換している)を基に合成された (Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。HPPD W336蛋白質を色素体に輸送する。
5'tev	5003-5143	141	Tobacco etch virusの非翻訳配列を含み(Carrington and Freed, 1990)、 <i>hppdPfw336</i> 遺伝子発現カセットにおいて翻訳エンハンサーとして機能する。
Ph4a748 ABBC	5144-6433	1290	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列で、一部の内部配列を重複させることで植物細胞内でのプロモーター活性を高める(Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。

2mepsps遺伝子発現カセット			
Ph4a748	6434-7448	1015	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列(Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。植物中で構成的に2mepsps遺伝子の転写を開始させる。
Intron1 h3At	7449-7929	481	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストンH3.3第3遺伝子の第一イントロンを含む配列(Chaubet <i>et al.</i> , 1992)。生長の著しい植物組織での発現を高める。
TPotp C	7930-8301	372	ヒマワリ(<i>H. annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Z. mays</i>)のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に合成された(Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。2mEPSPS蛋白質を色素体に輸送する。
2mepsps	8302-9639	1338	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(<i>epsps</i> 遺伝子)に点突然変異を導入した、2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(2mEPSPS蛋白質)をコードする遺伝子で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する(Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
3'histonAt	9640-10326	687	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域(Chaboute <i>et al.</i> , 1987)を含む配列で、転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる。
外側骨格領域 (本組換えサイズには存在しない)			
-	10327-10398 1-232	304	プラスミドベクター pMCS5 の塩基配列(Hoheisel, 1994)。
-	233-457	225	プラスミドベクター pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。
ORI ColE1	458-1244	787	<i>Escherichia coli</i> のプラスミド pBR322(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)由来複製起点(ORI ColE1)を含む配列。
-	1245-1403	159	プラスミドベクター pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。
<i>bla</i>	1404-2264	861	<i>E. coli</i> のプラスミドpBR322 (Bolivar <i>et al.</i> , 1977)由来β-ラクタマーゼ遺伝子を含む。
-	2265-2394	130	プラスミドベクター pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。
ORI f1	2395-2840	446	繊維状ファージf1(Dotto <i>et al.</i> , 1982)の複製起点(ORI f1)を含む配列。
-	2841-3261	421	プラスミドベクター pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。

(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。)

□ 構成要素の機能

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

5

本組換えダイズの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能は表1(p.8)に示した。

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

10

2mEPSPS蛋白質

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(以下、「EPSPS蛋白質」とする。)は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸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、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とシキミ酸-3-リン酸(S3P)から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸(EPSP)を生ずる可逆反応を触媒する。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻害する(Boocock and Coggins, 1983)。その結果、植物は蛋白質の合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり、枯死する。

20

本組換えダイズに導入された2mepsps遺伝子の供与体は、トウモロコシ(品種Black Mexican Sweet; *Z. mays*)である。2mepsps遺伝子は、トウモロコシから単離された野生型epsps遺伝子の翻訳領域2カ所に部位特異的に点突然変異を導入して作製された。この突然変異により、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列は、野生型epsps遺伝子産物であるEPSPS蛋白質の102番目のトレオニン(Thr)がイソロイシン(Ile)に、また、106番目プロリン(Pro)がセリン(Ser)にそれぞれ変化している(Lebrun *et al.*, 2003)。これにより、2mEPSPS蛋白質はグリホサートに対する結合親和性が低くなり、グリホサートによる活性阻害を受けずにシキミ酸合成が正常に機能するため、植物はグリホサートの存在下でも生育することができる。

25

また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2011年にFARRPのAllelgenOnlineデータベース(version11)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

30

なお、2mepsps遺伝子は、我が国において平成22年6月に第一種使用規程承認が得

られている除草剤グリホサート耐性ワタGHB614(OECD UI:BCS-GH002-5)に導入されている。

HPPD W336蛋白質

5 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ { 4-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27) } (以下、「HPPD蛋白質」とする。)は、数種のグラム陽性菌を除く全ての好気性生物に存在し、40kと50kDaのサブユニットから構成され、細菌では4量体、真核生物では2量体の酸素添加酵素である。植物の細胞内では、HPPD蛋白質はチロシンの代謝経路において

-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (p-HPP)及び1分子の酸素とともに酵素基質複合体を形成し、ホモゲンチジン酸 (HGA)の合成を触媒する (図1, p.12, 図2, p.15)。その後HGAはフマル酸及びアセト酢酸に代謝される他、プラストキノン及びトコフェロール合成に利用される。プラ

10 ストキノンは光合成電子伝達系の補因子として利用されるだけでなく、ビタミンAの合成に必要なカロチノイド合成系における補因子としても機能する。なお、トコフェロールは植物の成長及びストレス反応に必要とされるビタミンEである (DellaPenna and Pogson, 2006)。

除草剤イソキサフルトールは、植物の根及び葉より吸収されると速やかに2-シクロプロピル-3-(2-メチル-4-トリフルオロメチルフェニル)-3-オキソ-プロパンニトリル(除草剤イソキサフルトール由来のジケトニトリル構造物。以下、「DKN」とする。)へと代謝され、生じたDKNがp-HPPと競合してHPPD蛋白質の活性部位に可逆的に

20 結合することにより、HPPD蛋白質の活性を阻害する。その結果、植物はHGAを合成できなくなり、それに伴ってチロシン異化、プラストキノン及びトコフェロールの合成が阻害される結果、葉緑体の分解を伴った白化症状を示し、その後、枯死する(図1, p.12)。

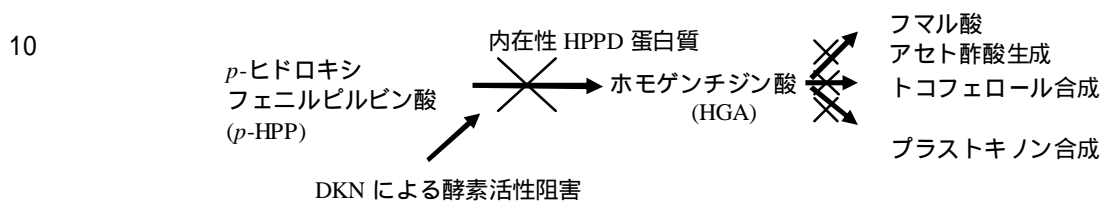
25 本組換えダイズに導入されたhppdPfw336遺伝子の供与体は、*P. fluorescens*A32株である。hppdPfw336遺伝子は、*P. fluorescens*A32株から単離された野生型hppd遺伝子の翻訳領域の1カ所に部位特異的に突然変異を導入して作製された。この突然変異によりHPPD W336蛋白質のアミノ酸配列は野生型HPPD蛋白質の336番目のアミノ酸のグリシン(Gly)がトリプトファン(Trp)に変化している(Boudec *et al.*, 2001)。

30 DKNが4-HPPの競合阻害剤となることから、DKNに対する結合定数 (constant of association; K_{on}) 値を*P. fluorescens*由来の野生型HPPD蛋白質とHPPD W336蛋白質で比較したところ、前者の 1.3×10^4 ($M^{-1}S^{-1}$) に対し後者は 4.4×10^2 ($M^{-1}S^{-1}$) であり、野生型HPPD蛋白質のDKNに対する結合定数値はHPPD W336蛋白質のそれと比較

して29.5倍高かった (Matringe *et al.*, 2005)。その結果、HPPD W336蛋白質はDKNによる活性阻害を受けずHGA合成が機能するため、チロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノンの合成が正常に行われ、生育することができる(図1)。

また、HPPD W336蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2010年にデータベース (AllelgenOnline, version10)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

)非組換えダイズに除草剤イソキサフルトール散布



)本組換えダイズに除草剤イソキサフルトール散布

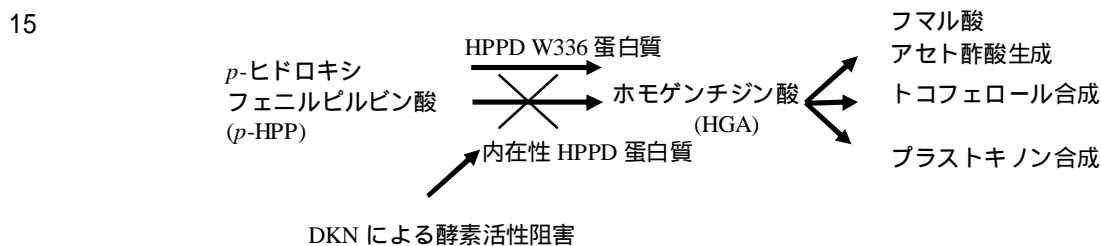


図1 本組換えダイズにおける HPPD W336 蛋白質の作用機作

HPPD 蛋白質は*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸(*p*-HPP)からホモゲンチジン酸(HGA)への反応を触媒する。通常、イソキサフルトールの細胞内代謝産物である DKN によってこの酵素活性が阻害され、チロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノン合成ができなくなり、枯死するのに対して、HPPDW336 蛋白質は影響を受けず、正常な代謝ができることで除草剤イソキサフルトールに対して耐性を示す。

25 (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。)

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

2mEPSPS蛋白質

5 2mEPSPS蛋白質と機能的に同一である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る(Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。また、通常
の40倍のEPSPS蛋白質を生成する植物培養細胞において、最終産物の芳香族アミノ
10 酸は過剰に合成されないことが報告されている(Smart *et al.*,1985)。

なお、2008年米国10試験地(アイオワ州において7試験地、ミズーリ州、イリノ
イ州、インディアナ州それぞれにおいて1試験地)において栽培された本組換えダ
イズの収穫種子(T8世代：図5, p.21)における芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、
トリプトファン及びチロシン)の含有量には、本組換えダイズの宿主品種Jack(以下、
15 「宿主品種」とする。)と比較して統計学的有意差は認められなかった(表2, p.16)。

また、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応す
ることが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く(Gruys *et*
al.,1992)、高い基質特異性を有している。

20

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の持つ代謝系への影響はないと考
えられる。

HPPD W336蛋白質

25

HPPD W336蛋白質と機能的に同一なHPPD蛋白質は、数種のグラム陽性菌及び全
ての好気性生物に存在し、*p*-HPPを基質としHGAへの反応を触媒することが知られ
ている(Gunsior *et al.*, 2004; Moran, 2005)。哺乳類においてはフェニルアラニンの異
常代謝の際、HPPD蛋白質が例外的にフェニルピルビン酸(PP)を基質とするとの報
告があるが、大腸菌や放線菌の一種である*Streptomyces avermitilis*といった微生物に
30 においてPPは基質として利用されず(Olivera *et al.*, 1998; Johnson-Winters *et al.*, 2003)、
また、植物においてもシロイヌナズナ由来のHPPD蛋白質においてPPは基質として
利用されないと報告されている(Purpero and Moran, 2006)。

5 上述のように、HPPD蛋白質の作用により産生されるHGAはチロシン異化、カロチノイドの合成、ビタミンEである各種トコフェロールの合成に關与する(図2, p.15)。そのため、本組換えダイズにおいてHPPD W336蛋白質の産生により既存のHPPD蛋白質に相加的に働いてHPPD蛋白質活性が増大することによる影響が考えられた。しかしながら、HPPD蛋白質活性が増加しても、HGAより下流に位置するトコフェロール量が増加しない又は著しくは増加しないことが報告されており(Tsegaya *et al.*, 2002; Rippert *et al.*, 2004; Dufourmantel *et al.*, 2007)、さらにHPPD蛋白質はこれらの反応経路における律速酵素ではないと考えられていることから(Shewmaker *et al.*, 10 1999; Collakova and DellaPenna, 2003)、HPPD W336蛋白質の発現により宿主の持つ代謝系に影響を及ぼさないか、仮に影響を及ぼすとしてもその影響は小さいと考えられる。

15 実際に、2008年に米国10試験地において栽培した本組換えダイズ(T8世代：図5, p.21)及び宿主品種の収穫種子における遊離のアミノ酸を含む全アミノ酸組成(蛋白質の加水分解物を含む)を調査したところ、いずれのアミノ酸含量においても宿主品種との間に統計学的有意差は認められなかった(表2, p.16)。また、ビタミンについては、ダイズの基本的栄養素として重要な各種ビタミンについて調査を行ったところ、 α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及び総トコフェロールにおいて系統間に統計学的有意差が認められたが、 α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及び総トコフェロールともに文献値の範囲内であった(表3, p.17)。また、ビタミンAに関しては一部のサンプルの分析結果に定量限界値未満のものを含むため平均値の算出を行わなかったものの、その量は少なく、各処理区で検出された測定値の最大値はいずれも文献値の範囲内であった。

25 本組換えダイズの種子における遊離のアミノ酸を含む全アミノ酸組成(蛋白質の加水分解物を含む)及び各種ビタミン含量は宿主品種と同程度であることから、本組換えダイズにおいてHPPD W336蛋白質の発現によるアミノ酸及びビタミン含量への影響は低いと考えられる。

30 以上から、HPPD W336蛋白質の発現により、宿主の代謝系に及ぼす影響は低いと考えられる。

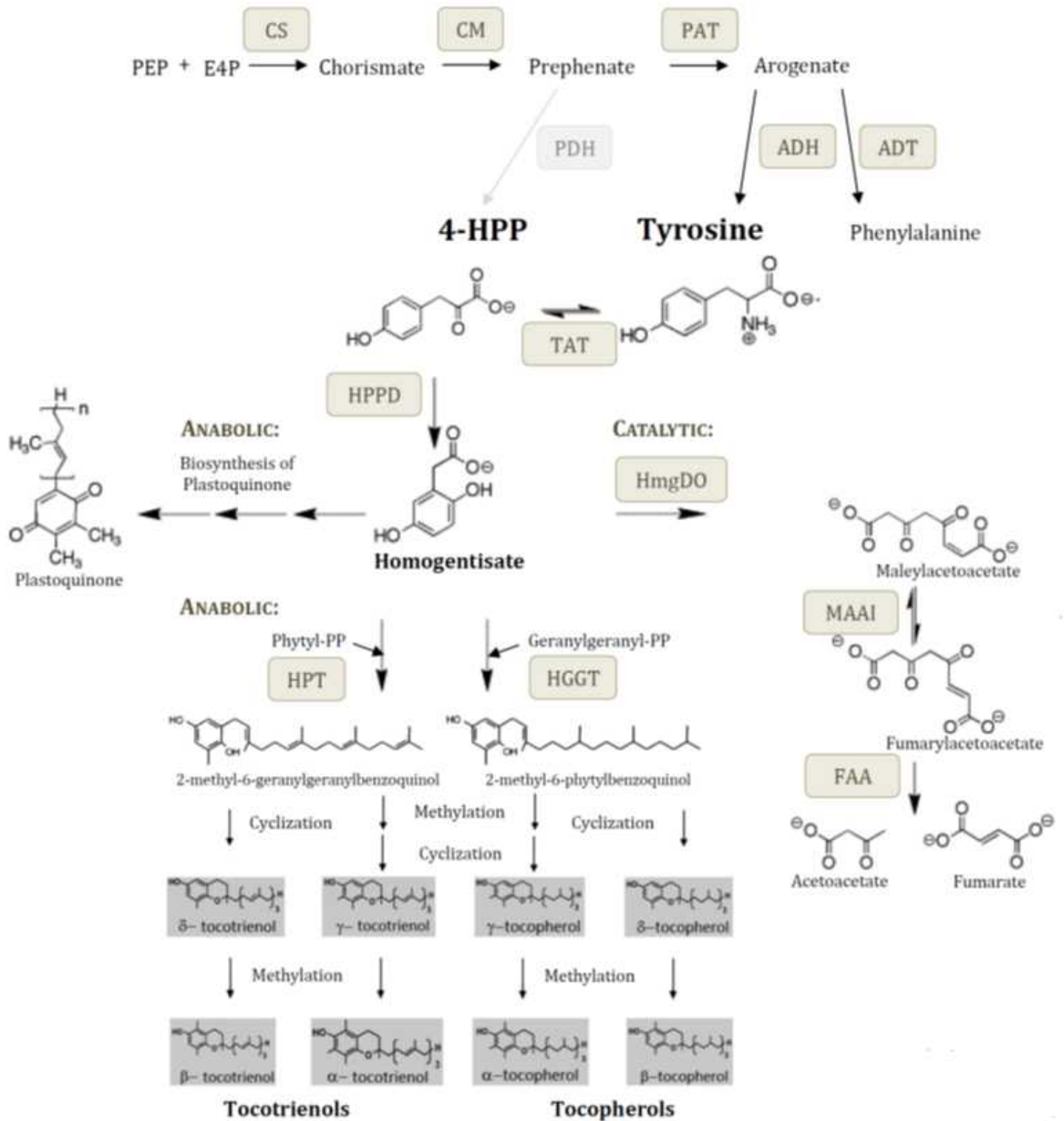


図2 チロシン代謝経路における HPPD 蛋白質

図中の略語の正式名称

CS: chorismate synthase
 CM: chorismate mutase
 E4P: erythrose 4-phosphate
 PEP: phosphoenol pyruvate
 PAT: prephenate aminotransferase
 ADH: arogenate dehydrogenases
 ADT: arogenate dehydratases
 PDH: prephenate dehydrogenase

4-HPP: 4-hydroxypyruvate
 HPPD: hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
 TAT: tyrosine aminotransferase
 HmgDO: homogentisate dioxygenase
 HPT: homogentisate phytyltransferase
 HGGT: homogentisate geranylgeranyltransferase
 MAAI: maleylacetoacetate isomerase
 FAA: fumaryl acetoacetase

40

(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。)

表2 本組換えダイズ及び宿主品種の種子における遊離のアミノ酸を含む全アミノ酸組成（蛋白質の加水分解物を含む）

アミノ酸 ⁴⁾ (%乾燥重量)	本組換えダイズ	宿主品種	p値 ¹⁾	文献値 ²⁾
アラニン	1.68 ± 0.04	1.68 ± 0.04	0.693	1.51-2.10
アルギニン	2.91 ± 0.10	2.94 ± 0.10	0.153	2.17-4.30
アスパラギン酸 ³⁾	4.38 ± 0.12	4.40 ± 0.12	0.523	3.81-5.12
システイン	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.951	0.37-0.81
グルタミン酸 ³⁾	6.77 ± 0.23	6.75 ± 0.21	0.618	5.84-8.20
グリシン	1.68 ± 0.04	1.68 ± 0.04	0.871	1.46-2.27
ヒスチジン	1.05 ± 0.03	1.05 ± 0.03	0.991	0.84-1.22
イソロイシン	1.80 ± 0.05	1.81 ± 0.05	0.373	1.54-2.32
ロイシン	2.99 ± 0.08	2.99 ± 0.08	0.923	2.20-4.00
リジン	2.48 ± 0.06	2.48 ± 0.05	0.980	1.55-2.84
メチオニン	0.54 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.891	0.43-0.76
フェニルアラニン	1.98 ± 0.06	1.97 ± 0.05	0.777	1.60-2.39
プロリン	1.82 ± 0.07	1.82 ± 0.07	0.484	1.69-2.33
セリン	1.99 ± 0.08	1.97 ± 0.07	0.497	1.11-2.48
スレオニン	1.54 ± 0.04	1.55 ± 0.04	0.908	1.14-1.89
トリプトファン	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.057	0.36-0.67
チロシン	1.40 ± 0.04	1.40 ± 0.04	0.629	0.10-1.61
バリン	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.06	0.520	1.50-2.44

分析値は、2008年米国10カ所の試験地(Marcus, Iowa Falls, Glidden, Perry, Adel, Winterset, Osborn, Fithian, Sharpsville, Mediapolis)毎に3反復区それぞれから採種した種子における平均値 ± 標準偏差(n=30)。

- 1): 有意水準5%において分散分析による有意差検定を行った。
- 2): OECD(2001)、ILSI(2007)より引用。
- 3): 加水分解後に測定しているため、アスパラギン酸及びグルタミン酸の数値は、それぞれアスパラギン、グルタミンを含む値。
- 4): 遊離のアミノ酸を含む全アミノ酸量（蛋白質の加水分解物を含む）を測定した。

（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。）

表3 本組換えダイズ及び宿主品種の種子における各種ビタミン組成

ビタミン (mg/kg 乾燥重量)	本組換えダイズ	宿主品種	p値 ¹⁾	文献値 ²⁾
ビタミンB1	3.44 ± 0.95	3.59 ± 0.76	0.279	1.01-16.02
ビタミンB2	4.52 ± 0.89	4.42 ± 0.88	0.694	1.90-14.5
葉酸	3.068 ± 0.300	2.976 ± 0.353	0.194	2.39-4.71
ビタミンA	<0.200 ± 0.573	<0.200 ± 0.400	NA ³⁾	0.26-4.37
ビタミンK	<0.100 ± 0.388	<0.100 ± 0.326	0.400	0.38-0.51
α-トコフェロール	19.0 ± 5.1	17.4 ± 3.9	0.003 ^{*4)}	2-70
γ-トコフェロール	200 ± 14	195 ± 16	0.011 ^{*4)}	18-461
δ-トコフェロール	75.2 ± 8.3	74.1 ± 7.4	0.257	31-186
総トコフェロール	294 ± 14	286 ± 16	0.007 ^{*4)}	120-674

分析値は、2008年米国10カ所の試験地(Marcus, Iowa Falls, Glidden, Perry, Adel, Winterset, Osborn, Fithian, Sharpsville, Mediapolis)毎に3反復区それぞれから採種した種子における平均値 ± 標準偏差(n=30)。

1): 有意水準5%において分散分析による有意差検定を行った。

2): OECD(2001)、ILSI(2007)より引用。

3): NA; 一部の測定値が定量限界値以下のため統計解析を行わなかった。

4): 太字・アスタリスク(*)の数値は、統計学的有意差が認められたことを示す。

(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。)

(2) ベクターに関する情報

5 イ 名称及び由来

本組換えダイズの作出に用いたベクターは、pUC19由来のpMCS5などを基に構築されたプラスミドpSF10である(図3, p.19)。

10 ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えダイズの作出に用いられたプラスミドpSF10の全塩基数は10,398bpである。プラスミドpSF10の構成要素は表1(p.8)に示した。

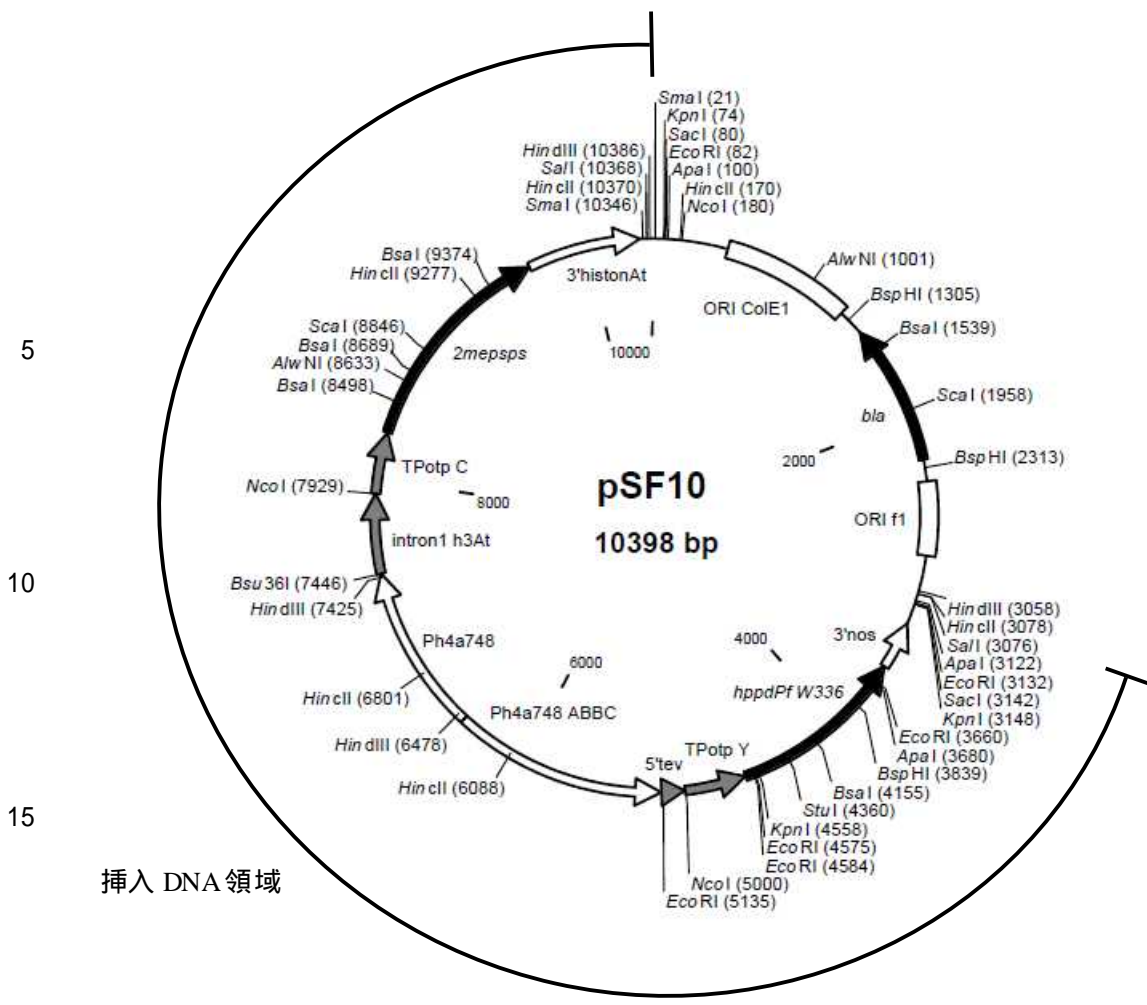
特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミドpSF10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。また、プラスミドpSF10は形質転

5 換前に制限酵素 *SalI* で処理した後、*bla* 遺伝子を含むベクター外骨格は高速液体クロマトグラフィーにより分離除去されているため、*bla* 遺伝子は宿主には導入されていない。なお、*bla* 遺伝子を含むベクター外骨格が本組換えダイズ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1, p.27~32, 表 7, 8 及び図 17~19)。

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

10 プラスミド pSF10 の感染性は知られていない。



挿入 DNA 領域

図3 pSF10のプラスミド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。)

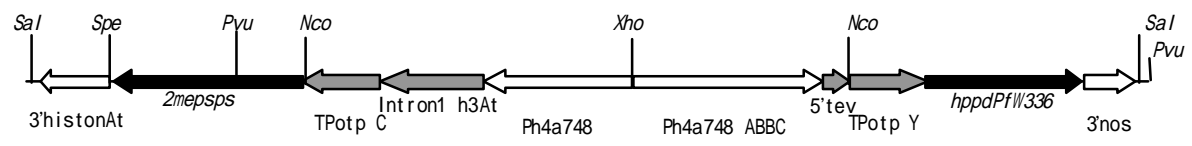


図4 SaII 制限酵素断片の構成及び制限酵素による切断部位

(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。)

(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

5 宿主内には、pSF10上の*SalI*制限酵素サイトに挟まれた*hppdPfw336*遺伝子発現カセット([Ph4a748ABBC]-[5'tev]-[TPotp Y]-[*hppdPfw336*]-[3'nos])及び*2mepsps*遺伝子発現カセット([Ph4a748]-[intron1h3At]-[TPotp C]-[*2mepsps*]-[3'histonAt])が移入された。*SalI*断片領域の構成を図4(p. 19)に示した。

10 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドpSF10を制限酵素*SalI*にて処理し、目的とする*hppdPfw336*遺伝子発現カセット及び*2mepsps*遺伝子発現カセットを含む7.3kbの断片を単離後、パーティクルボンバードメント法により宿主品種の培養細胞へ導入した。

15

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

20 形質転換を行った細胞は、DKNを含む培地で選抜した。

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

25

-

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

30

選抜した形質転換体を温室内で栽培し、本組換えダイズ当代(T0)を得た。その後、除草剤グリホサート耐性形質により優良系統を選抜した。本組換えダイズの育成の経過を図5(p.21)に示した。なお、本申請の範囲は、図5(p.21)に示し

たT2及びそれに由来する後代である。

本組換えダイズの我が国における承認の状況を表4に示す。

5 表4 我が国における申請及び承認状況(2014年10月現在)

申請先	目的	申請状況
農林水産省・環境省	環境 ¹ (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)	2012年12月承認
厚生労働省	食品 ²	2013年3月申請
農林水産省	飼料 ³	2013年3月申請

¹ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律に基づく。

² 食品衛生法に基づく。

³ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

(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。)

10

【社外秘情報につき非開示】

図5 本組換えダイズ系統の育成図

15 (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

移入された核酸の複製物が存在する場所

20 T1世代における導入遺伝子の遺伝子型を1個体1列法により調査した。T1世代の各
個体より得られたT2世代の種子(図5, p.21)を由来親毎にそれぞれ1つの畝に播種し、
除草剤グリホサート処理を行った結果、全ての個体が耐性を示すホモ接合体が1系
25 統と、耐性個体と感受性個体に分離したヘテロ接合体が4系統得られた。この内、
一部に感受性株を有する系統、すなわち導入遺伝子に関してヘテロ接合性であるT1
世代各個体より得られたT2世代4系統の172個体について除草剤グリホサート耐性
個体及び感受性個体の分離比を調査した。その結果、一遺伝子座支配と仮定した場
合に想定される分離比を示した(表5, p.22)。

表5 本組換えダイズにおける除草剤グリホサート耐性・感受性の分離

	耐性個体数	感受性個体数	期待値	² 値 ²⁾
T2世代 ¹⁾	124	48	3 : 1	0.775

1): T2世代で除草剤グリホサート耐性個体が分離したT1個体(ヘテロ接合体)を由来とする。得られた耐性個体数及び感受性個体数は4系統を合計した値。

2): 一遺伝子座と仮定し、²検定を実施。自由度1、有意水準5%において、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。)

5 また、PCR法により本組換えダイズのF2世代(図5, p.21)における挿入DNAの遺伝型の検定を行ったところ、挿入DNAを有さない個体、挿入DNAをヘテロで有する個体及び挿入DNAをホモで有する個体の分離比が1 : 2 : 1となり、一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比を示した(表6)。

表6 F2世代におけるPCRによる遺伝型の検定

	供試個体数	ホモ接合体 (-/-) ²⁾	ヘテロ接合体 (+/-)	ホモ接合体 (+/+)	分離比	期待値	² 値 ³⁾
F2世代 ¹⁾	901	212	471	218	0.24:0.52:0.24	1 : 2 : 1	1.946

1): 本組換えダイズのT6世代と商業品種の交雑により得たF2世代(図5, p.21)。

2): プライマーは、野生型に特異的な領域として、挿入前領域のCとBに跨る断片を増幅するもの (-: 陰性)、また、本組換えダイズに特異的な領域として、挿入DNA領域の3' 末端にある2mepsps遺伝子に隣接する3'histonAtと3' 側近傍配列に跨る断片を増幅するもの(+: 陽性)を用いた(図6, p.24)。

3): 一遺伝子座と仮定し、²検定を実施。自由度2、有意水準5%において、²値5.99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。)

10

15 なお、除草剤グリホサート散布による遺伝型の検定では2mepsps遺伝子を、PCR法による遺伝型の検定で用いたプライマーは2mepsps遺伝子に隣接する3'histonAtをそれぞれ対象にしている。また、次項(第一、2(4))に示すとおり、本組換えダイズには2mepspsp遺伝子及びhppdPfW336遺伝子を含む挿入DNAが隣接して存在しており、複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認されている。

20 以上のことから、本組換えダイズに移入された挿入遺伝子はダイズゲノム上の1カ所に存在すると考えられる。

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

- 5 本組換えダイズ (T7世代: 図5, p.21)の葉から抽出したゲノムDNAについてサザン
5 プロット分析、またF2世代(図5, p.21)の葉から抽出したゲノムDNAについてシーク
エンス解析を行った。その結果、本組換えダイズゲノムには、pSF10上の*SalI*処理断
片(2*mepsps*遺伝子発現カセット及び*hppdPfw336*遺伝子発現カセット)が完全長で2コ
ピーが順位で連続して配置していた。上記の連続する挿入DNAの5'側では、宿主の
10 ゲノムとの間に2つの3'*histonAt*断片が逆位、尾・尾結合(tail-to-tail)で連続して導入
されていた。一方、挿入DNAの3'末端では宿主ゲノムとの間にフィラーDNA(一本
鎖やゲノム欠失部分等を充填する短いDNA)が存在した。また、本組換えダイズゲ
ノム内では宿主のゲノムの一部が転座しており、転座領域の3'側下流の宿主ゲノム
内には新規に158bpのPh4a748プロモーター断片の存在が認められた(図6, p.24, 別添
資料1, p.6~19, 表 2,3及び図 2~11;別添資料2, p.13~51, 図 4~9)。
- 15 また、本組換えダイズの複数世代(T2, T7, T9及びF4世代: 図5, p.21)のゲノムDNA
について、挿入DNA領域及び3'側に挿入されたPh4a748プロモーター断片をプロー
ブとしてサザンプロット分析を行い、これらの配列が安定して伝達していることが
確認された(別添資料1, p.20~26, 表 4~6及び図 12~16)。

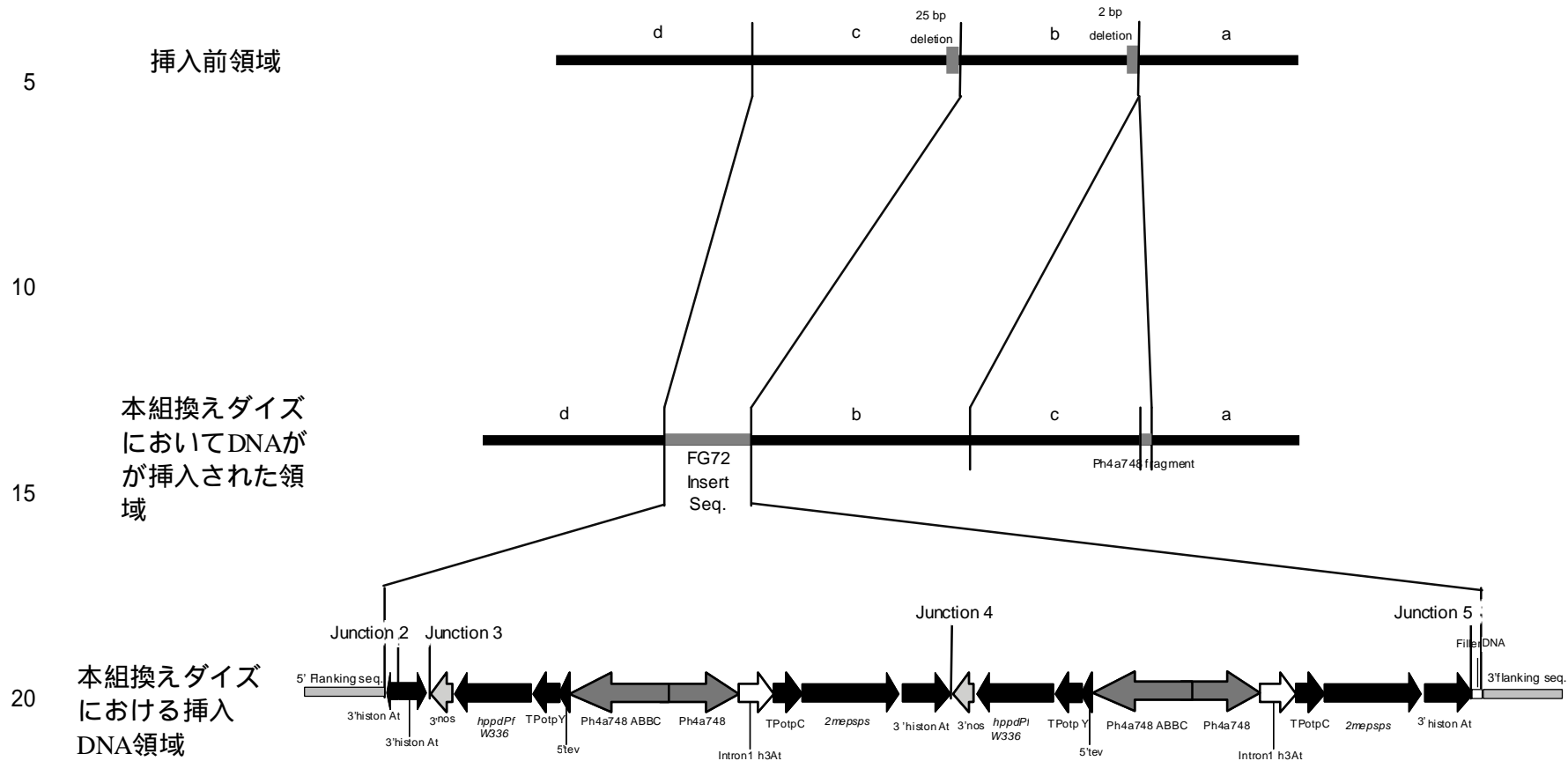


図6 本組換えダイズにおける挿入DNA領域の概略図

(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。)

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)の において示したように、本組換えダイズには2コピーの2mepsps遺伝子発現カセット及びhppdPfw336遺伝子発現カセットが隣接して存在している(図6, p.24)。

(6)の 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

10 2008年にベルギーの温室において栽培された本組換えダイズのT7世代 (図5, p.21)10株の本組換えダイズの葉、茎及び根の各組織における2mEPSPS蛋白質量及びHPPD W336蛋白質量をELISA法により分析した (表7)。また、同じく2008年に米国の10試験地で栽培された本組換えダイズのT8世代(図5, p.21)の種子における両蛋白質量をELISA法により分析した(表8, p.26)。その結果、いずれの組織、世代でも両蛋白質が検出された。

15 以上のことから、個体間及び世代間において2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質は安定して発現していることが確認された。

表7 本組換えダイズの各組織における2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現量

組織	生育ステージ ¹⁾	2mEPSPS蛋白質 µg/g 乾燥重量	HPPD W336蛋白質 µg/g 乾燥重量
葉	V4	569 ± 164	38.4 ± 17.5
	V6	437 ± 163	35.8 ± 22.5
	V8	668 ± 222	27.2 ± 10.9
茎	V4	211 ± 68.9	16.6 ± 4.65
	V8	117 ± 22.9	6.04 ± 3.10
根	V4	32.5 ± 13.2	5.81 ± 2.30
	V8	43.7 ± 17.6	6.42 ± 3.82

20 分析値は10個体より各個体3回の測定を行った値の平均値 ± 標準偏差(n=30)。2mEPSPS蛋白質の葉、茎のLOQは75.2ng/g 生鮮重で、根の定量限界は37.6ng/g 生鮮重であり、HPPD W336蛋白質のLOQは各器官において40ng/g 生鮮重であった。2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現レベルは、本組換えダイズの全ての器官と発達段階において検出され、定量限界値より高かったため、検出限界は測定しなかった。

25 1) V4: 第4複葉期、V6: 第6複葉期、V8: 第8複葉期。

(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。)

表8 本組換えダイズの種子における2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現量

蛋白質	乾燥重量	全蛋白質量に対する割合
2mEPSPS蛋白質	130 ± 22(μg/g)	3.9 × 10 ⁻² (%)
HPPD W336蛋白質	846 ± 183(ng/g)	2.4 × 10 ⁻⁴ (%)

分析値は、10カ所の試験地(Marcus, Iowa Falls, Glidden, Perry, Adel, Winterset, Osborn, Fithian, Sharpsville, Mediapolis)毎に3反復で採種した試料の平均値 ± 標準偏差(n=30)。

5 2mEPSPS蛋白質の種子のLOQは160ng/g、LODは60.1ng/gであった。HPPD W336蛋白質の種子のLOQは80ng/gで、LODは20.8ng/gであった。

(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。)

10 ウイルスの感染その他の経路を經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

本組換えダイズは伝達性のある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。

15

(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

本組換えダイズは、本組換えダイズに特異的なプライマーセットとTaqMan[®]プローブを用いたreal-timePCR法による検出及び識別が可能である(別添資料3)。

20

本方法の検出限界値は、ゲノムDNA量比で0.08%である(別添資料3)。

本方法の信頼性(再現性)については、社外の12機関において検証され、確認されている(別添資料4)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

25

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

本組換えダイズは2mepsps遺伝子の発現により2mEPSPS蛋白質が産生され、除草剤グリホサート耐性を示すと共に、hppdPfw336遺伝子の発現によりHPPD W336蛋白質が産生され、除草剤イソキサフルトール耐性を示す。

30

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

2013年に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(以下、「隔離ほ場」とする。)において、本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った(別添資料5)。試験に供試した本組換えダイズの世代はBC3F6世代であった(図5, p.21)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝的背景品種MST39を用いた(以下、「非組換えダイズ」とする。)。また、2009年にバイエルクロップサイエンス株式会社結城中央研究所PIP実験温室において、生育初期における低温耐性について本組換えダイズ(T9世代：図5, p.21)と比較・検討した(別添資料6)。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性については、農林水産省による農林水産植物種類別審査基準・大豆(農林水産省, 2012)を参考に、21項目(発芽期、発芽揃い、伸育型、毛茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、開花始め、開花期、花粉の充実度及びサイズ、成熟期、倒伏抵抗性、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、熟莢の色、子実の形、種皮の地色、臍の色)について、本組換えダイズと非組換えダイズを比較した。花粉の充実度及びサイズ、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、子実の形に関しては統計処理を行い、発芽期、発芽揃い、開花始め、開花期、成熟期、倒伏抵抗性、伸育型、毛茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、熟莢の色、種皮の地色、臍の色に関しては観察結果を比較した。その結果、形態及び生育の特性においては本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(別添資料5, p.5-10)。

b 生育初期における低温耐性

PIP実験温室試験において、本組換えダイズ及び非組換えダイズの幼植物体における5°C・10時間明条件下での低温障害を萎縮程度として経時的に評価した。その結果、全ての調査時において系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料6, 表3 p.6)。

c 成体の越冬性

隔離ほ場において、2013年6月に播種した本組換えダイズ及び非組換えダイズを12月の収穫期後も栽培を続けたところ、翌年2月には低温及び降霜によりいずれの

株も枯死していることが確認された(別添資料5, p.11)。

d 花粉の稔性及びサイズ

5 隔離ほ場において栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズから花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色し、花粉の充実度及びサイズを比較した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズの花粉の充実度及びサイズに統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表6 p.9及び図7 p.10)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

10 種子の生産量に関する項目として、農林水産省による農林水産植物種類別審査基準・大豆(農林水産省食料産業局新事業創出課, 2012)を参考に、6項目(一株全粒重(粗粒重)、一株成熟粒重(精粒重)、一株成熟粒数、一莢内粒数、一株稔実莢数、百粒重)を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、本組換えダイズと非組換えダイズの間には統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表6 p.9)。

15 種子の脱粒性に関する項目として、隔離ほ場で生育し、成熟期に収穫した本組換えダイズ及び非組換えダイズの裂莢の難易を裂莢数により比較した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、莢の裂莢性に違いは認められなかった(別添資料5, 表6 p.9)。

20 休眠性及び発芽率については、隔離ほ場で生育した本組換えダイズと非組換えダイズの収穫直後及び1カ月間風乾した種子をポットに播種し、播種2週間後にそれぞれの発芽率を調査した。その結果、収穫後の期間に係わらず本組換えダイズと非組換えダイズの発芽率はほぼ100%で、統計学的有意差は認められず、本組換えダイズと非組換えダイズにおいて休眠性は認められなかった(別添資料5, 表10 p.15)。

f 交雑率

30 隔離ほ場において栽培した非組換えダイズより収穫した種子を用いて、本組換えダイズと非組換えダイズ間の交雑率を調査した。非組換えダイズの形態調査区において、1.2~1.4mの距離で本組換えダイズに隣接する株を選び、収穫した種子を無作為に抽出して温室内で播種し、初生葉から第一本葉が展開したステージの実生に除草剤グリホサート(薬量108g a.i.(有効成分含量)/450L/10a相当)及びイソキサフルトール(薬量7g a.i./450L/10a相当)混合溶液を水量45L/10aで散布し、生存個体数を調

査した。試験に供試した4,234株において、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールの散布後に生存した2個体についてPCR法により本組換えダイズ特異的な塩基配列の増幅を行ったところ、本組換えダイズとの交雑に由来する株はなかった(別添資料5, p.17)。

5

g 有害物質の産生性

隔離ほ場試験において、有害物質の産生性を調査するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

10 後作試験

隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫後の根域土壌をそれぞれ採取し、その土壌において検定作物として栽培したダイコンの発芽率、草丈、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表7 p.12)。

15

鋤込み試験

隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体地上部を収穫し、乾燥・粉砕して試料とした。これを1%の割合で混和した土壌において、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表8 p.13)。

20

25 土壌微生物相試験

隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区の土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌、放線菌及び細菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表9 p.14)。

30

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

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

20

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

25

(6) 国外における使用等に関する情報

国外における本組換えダイズの承認に関する情報を表9に示した。また、我が国における承認に関する情報は、第一、2(3)八 (p.21)に記した。

5

表9 国外における本組換えダイズ承認に関する情報(2014年10月現在)

国名	承認機関	承認年	安全性審査の種類
米国	米国農務省 (USDA)	2013年	環境
	米国食品医薬品庁 (FDA)	2012年	食品・飼料
ウルグアイ	National Biosafety Cabinet of Uruguay*	2012年	環境・食品・飼料
オーストラリア・ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)	2012年	食品
カナダ	カナダ食品検査庁 (CFIA)	2012年	環境
	カナダ食品検査庁 (CFIA)	2012年	飼料
	カナダ保健省 (Health Canada)	2012年	食品
韓国	韓国食品医薬品安全庁(MFDS)	2014年	食品
	韓国農村振興庁(RDA)	2012年	環境・飼料

* Commission for Risk Managementの安全性評価を元に、National Biosafety Cabinet of Uruguayが最終的な承認を出す。

(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。)

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

5 (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の経験があるが、自然環境下において雑草化した事例は報告されていない。

10 第一、2(6) に記載したとおり、本組換えダイズと非組換えダイズを栽培し、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、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率を隔離ほ場試験にて調査した(別添資料5)。その結果、全ての項目において系統間に相違又は統計学的有意差は認められなかった。

15

また、本組換えダイズには除草剤グリホサート及びイソキサフルトールに耐性が付与されているが、自然環境下において除草剤グリホサート及びイソキサフルトールが散布されるような状況は考え難いことから、本形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。

20

以上のことから、本組換えダイズについて競合における優位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。

(2) 影響の具体的内容の評価

25

(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

以上のことから、本組換えダイズの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。

5

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

10 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ことは知られていない。

本組換えダイズは除草剤グリホサート耐性を付与する2mEPSPS蛋白質及び除草剤イソキサフルトール耐性を付与するHPPD W336蛋白質を産生する。2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質についてはいずれも有害物質としては知られていない。

15 隔離ほ場試験において本組換えダイズと非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果(第一の2(6) g)、いずれの項目についても本組換えダイズ(BC4F6世代：図5, p.21)と非組換えダイズの試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5)。

20 2mEPSPS蛋白質は、野生型EPSPS蛋白質と同様に、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではないと考えられる(Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。また、本組換えダイズにおいては、2mEPSPS蛋白質の産生により既存のEPSPS蛋白質に相加的に働いてEPSPS蛋白質活性が増大することによる影響が考えられたが、EPSPS蛋白質活性が増大して
25 も本経路の最終産物である芳香族アミノ酸は過剰に生成されないことが報告されている(Smart *et al.*, 1985)。実際に、本組換えダイズと宿主品種の種子における芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)の含有量に統計学的有意差は認められなかった(表2, p.16)。さらに、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質と
30 シキミ酸の反応性は低く(Gruys *et al.*, 1992)、高い基質特異性を有している。

HPPD W336蛋白質は、野生型HPPD蛋白質と同様にチロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノン合成に關与する酵素であるが、これらの経路における律

速酵素ではないと考えられている(Shewmaker *et al.*, 1999; Collakova and DellaPenna, 2003)。また、本組換えダイズにおいては、HPPD W336蛋白質の産生により既存のHPPD蛋白質と相加的に働いてHPPD蛋白質活性が増大することによる影響が考えられたが、HPPD蛋白質活性が増加してもHGAより下流に位置するトコフェロール合成やカロチノイド合成への影響は小さいと報告されている(Tsegaya *et al.*, 2002; Rippert *et al.*, 2004; Dufourmantel *et al.*, 2007)。実際に、本組換えダイズと宿主品種における遊離のアミノ酸を含む全アミノ酸組成(蛋白質の加水分解物を含む)並びに各種ビタミンについて比較した結果、測定したアミノ酸すべてについて本組換えダイズと宿主品種との間に統計学的有意差は認められなかった(表2, p.16)。一方、 α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及び総トコフェロールにおいて系統間に統計学的有意差が認められたものの、いずれも文献値の範囲内であり、また、ビタミンAについては、一部のサンプルに定量限界値未満のものを含むため平均値の算出を行わなかったものの、その量は少なく、各処理区で検出された測定値の最大値はいずれも文献値の範囲内であった(表3, p.17)。加えてHPPD W336蛋白質は高い基質特異性を有している(別添資料7)。

これらのことから、2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質が触媒する反応は限られており、宿主の代謝系に影響し新たな有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

また、本組換えダイズにおいて発現している2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質に関して、当該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

以上のことから、本組換えダイズの有害物質の産生性に関し、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

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

3. 交雑性

10 (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 ダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが挙げられる。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を主な生育地としている(阿部・島本, 2001)。したがって、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た。

(2)影響の具体的内容の評価

20 本組換えダイズとツルマメが交雑して雑種を形成し、ツルマメによる戻し交配によりツルマメの集団中に*2mepsps*遺伝子及び*hppdPfw336*遺伝子が浸透した後に、その集団の競合における優位性が高まることが考えられた。

(3)影響の生じやすさの評価

25 ツルマメは、我が国において北海道南部から九州まで自生している(阿部・島本, 2001)。したがって、本組換えダイズが我が国で第一種使用規程に従って使用された場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は否定できない。

30 隔離ほ場試験において、本組換えダイズと非組換えダイズ間の交雑率を調査するために、本組換えダイズを花粉親とし、非組換えダイズの収穫種子における交雑体の発生頻度を調査した。非組換えダイズの収穫種子を無作為に抽出して温室内で播種し、初生葉から第一本葉が展開したステージの実生に除草剤グリホサート(薬量 108g a.i./450L/10a相当)及びイソキサフルトール(薬量 7g a.i./450L/10a相当)混合溶液

を水量450L/10aで散布して生存個体数を調査した。試験に供試し、発芽した4,234株は全て本組換えダイズとの交雑に由来する株ではなかった。さらに、花粉の充実度及びサイズについても本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, 表6, p.9及び図7, p.10)。したがって、本組換えダイズの生殖成長の特性は従来のダイズの変動の範囲であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられた。また、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は2*mepsps*遺伝子及び*hppdPfW336*遺伝子により、除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性の形質を有すると考えられる。しかし、本形質は除草剤グリホサート及びイソキサフルトールが散布されない自然環境下では競合における優位性を高めるとは考え難く、これらの形質を有する雑種が生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は低いと考えられた。

次にダイズとツルマメとの交雑及びダイズからツルマメへの遺伝子浸透の可能性を検討した。

ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、我が国において両種の開花期が重なることは稀である(阿部・島本, 2001)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間隔で交互に配置して栽培した場合、結実したツルマメから採種された種子686個中、雑種は5個あり、交雑率は0.73%であった(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズを供試して、開花ピークを近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、交雑率が0.136%(調査25,741個体中、雑種35個体)であった。他方、組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、2、4、6mの距離で交雑率はそれぞれ0.013%(調査7,521個体、7,485個体、7508個体中それぞれ雑種1個体)であり、8、10mの距離では交雑種子は認められなかった(Mizuguti *et al.*, 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合においても、本組換えダイズ由来の2*mepsps*遺伝子もしくは*hppdPfW336*遺伝子がツルマメ集団中に浸透交雑していくためには、雑種後代が自然環境中で生存し、ツルマメと交雑を繰り返す必要があ

る。ダイズからツルマメへの遺伝子流動については、日本各地のダイズ畑周辺におけるツルマメ集団について数年間調査が行われ、ダイズとツルマメとの中間体が秋田県や佐賀県で発見された(加賀ら, 2005; 黒田ら, 2005)。これらの中間体の後代のほとんどはその他のモニタリング調査では発見されず(黒田ら, 2006)、中間体が自生地
5
10
15
20
25
で生存する確率は非常に低いことが示唆された(黒田ら, 2007)。また、秋田県の1地点及び佐賀県の5地点において採取された468個体のツルマメ、17個体の中間体及び12個体の栽培ダイズについて、分子マーカーによる解析が行われた結果、これらの中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動によるものと判断された。他方、中間体からツルマメへの二次的な遺伝子流動は認められなかったことから、ダイズとツルマメの雑種形成の可能性はあるが、我が国の自然環境において更なる浸透交雑が起こる可能性は極めて低いと考えられる(Kuroda *et al.*, 2010)。

以上から、本組換えダイズがツルマメと交雑し、導入遺伝子がツルマメの集団内に浸透してゆく可能性は極めて低いと考えられる。

(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、本組換えダイズの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

上記の他に本組換えダイズに関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

5 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雑草化した事例は報告されていない。本組換えダイズと非組換えダイズとの間で競合における優位性に関わる諸形質のうち形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性を隔離ほ場試験において比較検討した結果、全ての項目において本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的な有意差あるいは相違は認められなかった。

10 また、本組換えダイズは除草剤グリホサート及びイソキサフルトールに耐性を有するが、自然環境下では、競合において優位に作用することはないと考えられた。

 以上のことから、本組換えダイズの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。

15 有害物質の産生性：

 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。隔離ほ場試験において、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験により比較検討した結果、本組換えダイズが他の植物の生育を阻害することを示唆する形質は認められなかった。また、本組換えダイズが遺伝子組換えにより新たに発現する2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336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れなかった。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。

20 以上のことから、本組換えダイズの有害物質の産生性に起因する生物多様性影響
25 が生ずるおそれはないと判断した。

交雑性：

 我が国にはダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが自生していることから、本組換えダイズとツルマメが交雑して雑種を形成し、ツルマメによる戻し交配によりツルマメの集団中に2mepsps遺伝子及びhppdPfW336遺伝子が浸透する可能性、また、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た。隔離ほ場試験において交雑性、花粉の充実度及びサイズについて調査した結果、本組換えダイズの生殖特性は従来のダイズの変動の範

5 園内であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられた。
また、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は*2mepsps*遺伝子及び
*hppdPfw336*遺伝子により、除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性の形質
を有すると考えられる。しかし、本形質は除草剤グリホサート及びイソキサフルト
10 ールが散布されない自然環境下では競合における優位性を高めるとは考え難く、こ
れらの形質を有する雑種が生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優
占化する可能性は低いと考えられた。ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、
開花期が重なり、かつ隣接して生育している条件下においても交雑する可能性は低
いことが報告されている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、ダイズとツルマメ
15 の種間雑種は、自然環境下に放任された場合、速やかに淘汰されることが報告され
ている(黒田ら, 2006; 黒田ら, 2007)。よって、本組換えダイズがツルマメと交雑し、
*2mepsps*遺伝子及び*hppdPfw336*遺伝子がツルマメの集団内に浸透してゆく可能性は
極めて低いと考えられた。

15 以上のことから、本組換えダイズの交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるお
それはないと判断した。

よって、総合評価として、本組換えダイズ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

- Abel, G. H. (1970) Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agron. J.* 62: 121-123.
- Ahrent, D. K.; Caviness, C.E. (1994) Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars
5 in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
- Bolivar, F.; Rodriguez, R.L.; Greene, P. J.; Betlach, M. C.; Heyneker, H. L; Boyer, H. W.
(1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. . A multipurpose
cloning system. *Gene* 2: 95-113.
10
- Boocock, M. R.; Coggins, J. R. (1983) Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate
syntase inhibition by glyphosate. *FEBS LETTERS* 154: 127-133.
- Boudec, P.; Rodgers, M.; Dumas, F; Sailland, A.; Bourdon, H. (2001) Mutated
15 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain
such a gene and which are tolerant to herbicide. US Patent US 6245968B1 (12-JUN-2001)
AVENTIS CROPSCIENCE S.A. (FR).
- Carrington, J. C.; Freed, D. (1990) Cap-independent enhancement of the translation by a
20 plant potyvirus 5' non translated region. *Journal of Virology* 64: 1590-1597.
- Caviness C.E. (1966) Estimates of natural crosspollination in Jackson soybeans in Arkansas.
Crop Sci. 6: 211-212.
- 25 Chaboute, M.; Chaubet, N.; Philipps, G; Ehling, M.; Gigot, C. (1987) Genomic
organization and nucleotide sequence of two histone H3 and two histone H4 genes of
Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 8: 179-191.
- Chaubet, N.; Clement, B.; Gigot, C. (1992) Genes encoding a histone H3.3-like variant in
30 *Arabidopsis* contain intervening sequences. *Journal of Molecular Biology* 225: 569-574.
- Chiang, Y.C.; Kiang, Y. T. (1987) Geometric position of genotypes, honeybee foraging
patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 28: 1-11.

- Collakova, E.; DellaPenna, D. (2003) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for Tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 632-642.
- 5 DellaPenna, D.; Pogson B. J. (2006) Vitamin synthesis in plant: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 11-38.
- Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H. M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 561-573.
- 10 Dotto G. P., Horiuchi K and Zinder N. D. (1982) Initiation and termination of phage f1 plus-strand synthesis. *Biochemistry* 79: 7122-7126.
- Dufourmantel, N.; Dubald, M.; Matringe, M.; Canard, H.; Garcon, F.; Job, C.; Kay, E.;
15 Wisnieski, J.; Ferullo, J.; Pelissier, B.; Sailland, A.; Tissot, G. (2007) Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 5: 118-133.
- 20 FAO (2013) FAOSTAT Final 2013 data, Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Updated: 2014.8.4.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (閲覧日 2014年8月28日)
- 25 Fujita, R.; Ohara, M.; Okazaki, K.; Shimamoto, Y. (1997) The extent of natural cross pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *J. Hered.* 88: 124-128.
- Gruys, K. J.; Walker, M. C.; Sikorsli, J. A. (1992) Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31:
30 5534-5544.
- Gunsior, M.; Ravel, J.; Challis, G. L.; Townsend C. A. (2004) Engineering *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase to a *p*-hydroxymandelate synthase and evidence for the proposed benzene oxide intermediate in homogentisate formation. *Biochemistry* 43:

663-674.

- Herrmann K. M. (1983) The common aromatic biosynthetic pathway. :In amino acids: Biosynthesis and genetic regulation., Herrmann K., M. and R. L. Somerville, (eds)
5 Addison-Wesley, Reading, MA. pp.301-322.
- Hoheisel J. F. (1994) Creation of a rate cutter multiple cloning site. *Bio Techniques*, 17: 456-459.
- 10 Hymowitz, T.; Harlan, J. R. (1983) Introduction of soybean to north America by Samuel Bowen in 1765. *Econ. Bot.* 37: 371-379.
- ILSI (2007) International Life Science Institute- Crop composition database- serch results version 3.0; Average, minimum and maximum nutrient and anti-nutrient content in soybean
15 seeds. ILSI Crop Composition database.
http://www.cropcomposition.org/cgi-perl/search_ora.cgi
- Johnson-Winters, K.; Purpero, V. M.; Kavana, M.; Moran, G. R. (2003) Accumulation of multiple intermediates in the catalytic cycle of (4-hydroxyphenyl) pyruvate dioxygenase
20 from *Streptomyces avermitilis*. *Biochemistry* 44: 7189-7199.
- Kiang, Y. T.; Chiang, Y. C.; Kaizuma, N. (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan. *J. Hered.* 83: 325-329.
- 25 Kuroda, Y.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Vaughan, D. A. (2008) Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Sci.*48: 1071-1079.
- Kuroda Y.; Kaga A.; Tomooka N.; Vaughan D. (2010) The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Mol.*
30 *Ecol.* 19: 2346-2360.
- Lebrun, M.; Leroux, B.; Sailland, A. (1996) Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE-POULENC AGROCHIMIE (FR).

- 5 Lebrun, M.; Sailland, A.; Freyssinet, G.; Degryse, E. (2003) Mutated 5-enol-pyruvylshikimate -3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. US patent US6566587B1 (20-MAY-2003). Bayer CropScience SA (FR).
- 10 Matringe, M.; Sailland, A.; Pelissier, B.; Rolland, A.; Zink, O. (2005) p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Management Science* 61 : 269-275.
- Mizuguti, A.; Ohigashi, K.; Yoshimura, Y.; Kaga, A.; Kuroda, Y.; Matsuo, K. (2010) Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 9: 13-23.
- 15 Moran, G. R. (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 443: 117-128.
- 20 Nakayama, Y.; Yamaguchi, H. (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biol. Manag.* 2: 25-30.
- Nickell, C. D.; Noel, G R.; Thomas, D. J.; Waller R. (1990) Registration of 'Jack' soybean. *Crop Science* 30: 1365.
- 25 OECD (2000) Consensus Document on the Biology of Glycine Max (L.) Merr. (Soybean).
- OECD (2001) Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. ENV/JM/MONO 15.
- 30 Olivera, E. R.; Minambres, B.; Gracia, B.; Muniz, C.; Moreno, M. A.; Ferrandez, A.; Diaz, E.; Gracia, J. L.; Luengo, J. M. (1998) Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: The phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6419-6424.

- Purpero, V. M.; Moran, G. R. (2006) Catalytic, noncatalytic, and inhibitory phenomena: Kinetic analysis of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 45: 6044-6055.
- 5
- Ray, J. D.; Kilen, T. C.; Abel, C. A.; Paris, R. L. (2003) Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ. Biosafety Res.* 2: 133-138.
- Rippert, P.; Scimemi, C.; Dubald, M.; Matringe, M. (2004) Engineering plant shikimate
10 oathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* 134: 92-100.
- Shewmaker, C. K.; Sheehy, J. A.; Daley, M.; Colburn, S.; Ke, D. Y. (1999) Seed-specific overexpression of phytoen synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects.
15 *The Plant Journal* 20: 401-412.
- Smart, C. C.; Johanning, D.; Muller, G.; Amrhein, N. (1985) Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260: 16338-16346.
- 20
- Tsegaya, Y.; Shimtani, D. K.; DellaPenna, D.; (2002) Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem.* 40: 913-920.
- 25
- Weiss, U.; Edwards, J. M. (1980) Regulation of the shikimate pathway. : In the biosynthesis of aromatic compounds. John Wiley and Sons, New York. pp.287-301.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- 30
- Yoshimura, Y.; Matsuo, K.; Yasuda, K. (2006) Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 5: 169-173.

Yoshimura, Y. (2011) Wind tunnel and field assessment of pollen dispersal in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. J. Plant Res. 124: 109-114.

5 阿部 純, 島本 義也(2001)ダイズの進化 栽培植物の自然史 山口 裕文、島本 義也 編著 北海道大学図書刊行会 p.77-95.

大庭 寅雄(2001)ダイズの品種生態と選択、 品種の生態型と選択、 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ、農文協 p.102-105.

10 加賀 秋人・友岡 憲彦・Ugen P.・黒田 洋輔・小林 伸哉・伊勢村 武久・Miranda-Jonson G・Vaughan D. A. (2005) 野生ダイズと栽培ダイズとの自然交雑集団の探索と収集 - 秋田県及び広島県における予備的調査 - . 植物遺伝資源探索導入調査報告書 通巻第21巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, 21: 59-71.

15 鎌田 慶朗(1992) 3.大豆の化学、 大豆の科学 山内文男・大久保一良 編 朝倉書店、p.27-47.

20 黒田 洋輔・加賀 秋人・Anna Apa・Vaughan D.A.・友岡 憲彦・矢野 博・松岡 伸之 (2005) 野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング - 秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県における現地調査から - . 植物遺伝資源探索導入調査報告書 通巻第21巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 73-95.

25 黒田 洋輔・加賀 秋人・Gaufu J.・Vaughan D. A.・友岡 憲彦 (2006) 野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング - 秋田県、茨城県、高知県、佐賀県における現地調査から - . 植物遺伝資源探索導入調査報告書通巻第22巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 1-12.

30 黒田 洋輔・加賀 秋人・Poafa J.・Vaughan D. A.・友岡 憲彦・矢野 博(2007)野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング 秋田県、兵庫県、佐賀県における現地調査から . 植物遺伝資源探索導入調査報告書通巻第23巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 9-27.

- 国分 牧衛(2002) *ダイズ*. 作物学事典 日本作物学会編 朝倉書店, p.370-377.
- 後藤 寛治(2001) *ダイズの起源と特性 栽培の起源と分布*, 転作全書 第二卷 *ダイズ・アズキ*, 農文協 p.33-41.
- 5 昆野 昭晨(2001) *生育のステージと生理、生態 花芽分化の生理* 転作全書 第二卷 *ダイズ・アズキ*, 農文協 p.68-73.
- 10 農林水産省(2012) 農林水産省植物種類別審査基準 大豆(*Glycine max(L.) Merrill*). 農林水産省品種登録ホームページ . <http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf> (閲覧日 2014年4月25日)
- 15 農林水産省(2013) 平成23年度食料需給表(概算値)(平成25年8月8日公表) http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyu/pdf/zyukyu_130808.pdf(閲覧日 2013年8月21日)
- 20 農林水産省(2014a) 農林水産統計、平成24年産大豆、小豆、いんげん及びらっかせい(乾燥子実)の収穫量. 農林水産省大臣官房統計部(平成26年2月18日公表、平成26年2月24日訂正) http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_daizuetc13_a.pdf (閲覧日 2014年5月20日)
- 25 農林水産省(2014b) 農林水産物輸出入概況 2013年(平成25年)確定値. 国際部国際政策課(平成26年3月26日公表) http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_13.pdf (閲覧日 2014年4月3日)
- 30 橋本 鋼二(2001a)*ダイズの品種生態と選択、品種の生態型と選択*, 転作全書 第二卷 *ダイズ・アズキ*, 農文協 p.91-96.
- 橋本 鋼二(2001b)*ダイズの品種生態と選択、品質・用途と品種選択*, 転作全

書 第二巻 ダイズ・アズキ、 農文協 p.110-112.

山内 文男(1992) 3.大豆の化学, 大豆の科学 山内文男・大久保一良 編 朝倉書店, p.1-13.

別添資料の内容

- 別添資料1： Summary report： molecular characterization of FG72 (挿入遺伝子の分子特性)
5 社外秘情報につき非開示
- 別添資料2： Full DNA sequence of event insert and integration site of *Glycine max* transformation event FG72 (FG72に移入された核酸の塩基配列)
10 社外秘情報につき非開示
- 別添資料3： イベント識別法
社外秘情報につき非開示
- 別添資料4： Event-specific method for the quantification of soybean FG72 validation report (FG72のイベント識別法の再現性の検証)
15 社外秘情報につき非開示
- 別添資料5： 除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72の隔離ほ場試験報告書
20 社外秘情報につき非開示
- 別添資料6： 除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72における温室試験報告書
社外秘情報につき非開示
25
- 別添資料7： 内在性のダイズHPPD酵素の基質特異性
社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 26 年 10 月 15 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リホサート及びイソキサフルトール耐性
ダイズ(2mepsps, hppdPfw336, Glycine max (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FGØ72-2) (以下、
「本組換えダイズ」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。

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

15

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。

(平成26年10月現在)

危機対策本部	
	バイエルクロップサイエンス株式会社 開発本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 開発本部 種子規制部長
	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 開発本部 種子規制部

(個人名は個人情報のため非開示)

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

25 弊社は、米国バイエルクロップサイエンス社と連絡を取り、種子、穀物生産、収穫物の状
況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱いなど使用の可能性のある関係各社から可
能な限り情報収集を行う。

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

5 弊社は、米国バイエルクロップサイエンス社と連絡を取り、生産農家や穀物取扱業者など取引ルートへ本組換え系統ダイズの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

10

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は米国バイエルクロップサイエンス社の協力のもと、本組換えダイズが環境に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、環境中に放出された本組換えダイズは、環境中で生存しないように不活化する。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

20

本組換えダイズがわが国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、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報告する。