

5

除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.)  
(MON87708, OECD UI : MON-87708-9)申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書 .....	1
	生物多様性評価書.....	4
10	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	4
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	4
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 .....	4
	① 和名、英名及び学名 .....	4
	② 宿主の品種名又は系統名.....	4
15	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	4
	(2) 使用等の歴史及び現状 .....	4
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	4
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途 .....	5
	(3) 生理学的及び生態学的特性.....	6
20	イ 基本的特性.....	6
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件 .....	6
	ハ 捕食性又は寄生性 .....	6
	ニ 繁殖又は増殖の様式 .....	7
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	7
25	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 .....	7
	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.....	7
	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	9
30	ホ 病原性.....	9
	ヘ 有害物質の産生性 .....	9
	ト その他の情報.....	9
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	9
	(1) 供与核酸に関する情報 .....	11
35	イ 構成及び構成要素の由来.....	11
	ロ 構成要素の機能 .....	11
	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.....	11
40	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 .....	16
	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....	18
	(2) ベクターに関する情報 .....	28
	イ 名称及び由来 .....	28
5	ロ 特性 .....	28
	① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....	28
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 .....	28
	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 .....	28
10	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	28
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....	28
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....	28
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....	29
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....	29
15	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 .....	29
	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 .....	29
20	(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 .....	32
	① 移入された核酸の複製物が存在する場所 .....	32
	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 .....	32
25	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 .....	33
	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 .....	33
	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 .....	33
30	(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 .....	33
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 .....	34
	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な内容 .....	34
35	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 .....	34
	a 形態及び生育の特性 .....	34
	b 生育初期における低温又は高温耐性 .....	35

	c 成体の越冬性又は越夏性.....	35
	d 花粉の稔性及びサイズ.....	35
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	35
	f 交雑率.....	36
5	g 有害物質の産生性.....	36
	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	36
	(1) 使用等の内容.....	36
	(2) 使用等の方法.....	37
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.....	38
	(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.....	38
	(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.....	38
15	(6) 国外における使用等に関する情報.....	38
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	39
	1 競合における優位性.....	39
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	39
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	40
20	(3) 影響の生じやすさの評価.....	40
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	40
	2 有害物質の産生性.....	40
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	40
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	42
25	(3) 影響の生じやすさの評価.....	43
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	43
	3 交雑性.....	43
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	43
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	43
30	(3) 影響の生じやすさの評価.....	43
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	46
	4 その他の性質.....	46
	第三 生物多様性影響の総合的評価.....	47
	参考文献.....	49
35	緊急措置計画書.....	50
	モニタリング計画書.....	52

第一種使用規程承認申請書

平成21年8月18日

農林水産大臣 石破 茂 殿

5 環境大臣 齊藤 鉄夫 殿

氏名 日本モンサント株式会社

申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印

10 住所 東京都中央区銀座四丁目10番10号

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

15 申請します。

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 <i>dmo</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87708, OECD UI : MON-87708-9)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 25 年 1 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、本遺伝子組換えダイズ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、当該ダイズ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、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズ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をする場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(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ダイズが隔離ほ場の</p>

	<p>外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。</p> <p>(8) 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。</p>
--	--

## 生物多様性評価書

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 5 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

###### ① 和名、英名及び学名

10

和名：ダイズ(マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属)

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15

###### ② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3525 である。

20

###### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

*Soja* 亜属には栽培種であるダイズのほかに、野生種として *G. soja* (和名: ツルマメ) や *G. gracilis* も含まれる (文献 1)。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるダイズ (*G. max*) は野生種である *G. soja* が祖先と考えられており、一方、*G. gracilis* は *G. soja* から *G. max* への分化における中間種あるいは *G. soja* と *G. max* の雑種であるという報告があるが (文献 1)、確認はされていない。これらの野生種のうち、わが国に分布しているのはツルマメのみであり *G. gracilis* の分布は認められていない (文献 2; 文献 3)。なお、ツルマメは中国、韓国、日本、台湾及びロシアに分布しており (文献 1; 文献 4)、わが国においては北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。

30

なお、ダイズは夏型一年生の栽培種であり、自生しているという報告はない(文献 8; 文献 4; 文献 1)。

35

##### (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

40

ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1100 年頃にこの地域で栽培化されたと推定され、その後、中国南部、東南アジア、朝鮮及び日本へ栽培が広がったと考えられる (文献 9)。わが国へは弥生時代に渡来、栽培が始まったと考えられて

いる (文献 10)。

## ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5 国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2007 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 9,490 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,056 万 ha、ブラジルが約 2,064 万 ha、アルゼンチンが約 1,610 万 ha、中国が約 890 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2007 年のわが国における栽培面積は約 15 万 ha であつた(文献 11)。

10

2008 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 371 万トンであり、そのうちの約 74%が米国から輸入されている(文献 12)。2007 年度におけるダイズの国内生産量は約 23 万トンであり、国内消費仕向量<sup>1</sup>は約 430 万トンであつた。国内消費仕向量の用途別内訳は、飼料用が約 12.5 万トン、種子用が約 0.7 万トン、加工用 (ダイズ油・脱脂ダイズ・味噌・醤油用) が約 322.3 万トン、減耗量<sup>2</sup>が約 8.3 万トン、食品用<sup>3</sup>が約 86.6 万トンとなっている(文献 13)。

15

わが国におけるダイズの利用方法は多岐に渡り、味噌、醤油、豆腐、納豆、ゆば、きな粉、煮豆、もやしとして食されるほか、分離蛋白、濃縮蛋白等は食品添加物として、搾油は食用植物油として、脱脂ダイズは家畜用飼料として利用されている (文献 14)。

20

わが国でのダイズの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は北海道地方で 5 月中旬～6 月上旬、東北地方、北陸・東山地方で 6 月上旬、関東地方で 6 月中旬、東海地方以西中国地方までは 6 月下旬、九州地方で 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) 及び 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。雑草の防除については、生育期間中に除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病虫害の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り

30

---

<sup>1</sup> 国内生産量+輸入量-輸出量-在庫の増加量(又は+在庫の減少量)から算出される。2007 年は輸出量は約 1 万トン、在庫は約 8 万トン増であつたため、 $23+416-1-8=430$ (万トン)が国内消費仕向量となる。

<sup>2</sup> 食料が生産された農場等の段階から、輸送、貯蔵を経て家庭の台所等に届く段階までに失われる全ての数量。

<sup>3</sup> 国内消費仕向量- (飼料用+種子用+加工用+減耗量) から算出される。

取り・脱粒を一緒に行う方法とがある (文献 14)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### 5 イ 基本的特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉作物であり、子葉は対生し、次に卵形の初生葉が子葉と直角に対生して、それ以降は 3 片の小葉からなる複葉を生じる (文献 1)。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌の寄生によって根粒を着生する (文献 14)。花には 1 本の雌ずいがあり、その基部の子房に 1~5 個の胚珠を内蔵しており、子房は受粉後に肥大して莢を形成する (文献 14)。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響し、ある時間以上の暗期が花芽分化に必要で、温度は 15°C 以上を必要として 25°C 前後までは高いほど促進的に働き、短日高温では促進効果が大きい、長日高温では促進効果がないか、かえって遅れることがある (文献 9)。

#### 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°C、最低発芽温度及び最低生育温度は 2~4°C であり、10°C 以下での発芽は極めて悪い (文献 9)。ダイズの栽培適地は、生育期間中 18~28°C 程度、多照で適度の降雨のあることが望ましいとされているが、今日のダイズ品種では日長感応性が細かく分化して各種の気候に対する適応性が高くなっており、赤道直下のインドネシアから北緯 60°のスウェーデンでも栽培可能である (文献 9)。

本組換えダイズの宿主である A3525 は、米国において、およそ北緯 38°から 40°の栽培地域に適した品種 (Maturity Group III) に分類される (文献 15; 文献 16)。この栽培地域において、Maturity Group III に分類される品種は 4 月下旬から 6 月中旬の間に播種される。また、6 月から 8 月までが開花期に当たり (文献 17)、開花が始まる最も早い時期の日長時間は約 15 時間である (文献 18)。

なお、わが国において、ダイズ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

35

—

## 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

5       ダイズの種子は裂莢した際に地表に落下する。わが国で栽培されるダイズの裂莢性には品種間差があるが、ダイズが大規模に栽培され、収穫が機械化されている米国などでは、ほとんどの品種が難裂莢性であり裂莢性の程度は低い。今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3525 もまた難裂莢性であることが認められている。ダイズの種子休眠性については知られていない。また、種子の発芽能力に關しては、常温で貯蔵した場合に通常約 3 年で失われる (文献 14)。

### 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

15       ダイズは塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件下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があるという報告はこれまでのところない。

### 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

20       ダイズ ( $2n=40$ ) と交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのは *G. soja* (和名: ツルマメ、 $2n=40$ ) のみである (文献 2; 文献 3; 文献 1)。ツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。

30       なお、1950 年代にダイズとツルマメの形態的中間型を示す個体としてオオバツルマメ (*G. soja* Sieb. et Zucc.) がわが国で確認されており (文献 19; 文献 20)、その形態がダイズに近かったことから、通常のツルマメと比べて、ダイズと交雑する可能性が高いことが予想された。しかし、過去 10 年以上にわたり日本各地より 800 近い集団からツルマメの収集を行った中にオオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は見つかっていないという報告があることから (文献 20)、仮にこのような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育する範囲はかなり限られていることが予想される。

35       ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯し、受粉が完了する。さらに、開花期の後半は、ほとんどの花

が開花しない閉花受粉であるため (文献 20)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のほ場条件でダイズ同士における他家受粉率は最大で 3.62% (文献 21)、ツルマメ同士における他家受粉率は最大で 2.3% (文献 22) と報告されている。

5

しかし、ダイズの家受粉率は、条件によっては上昇することもある。例えば、ダイズ間の他家受粉率については、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズほ場の中心に設置した場合、平均で 2.96~7.26%となり、局所的には 19.5%に達したと報告されている (文献 23)。またツルマメ間の他家受粉率に関しても、秋田県雄物川流域で約 13%という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (文献 24)。この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠当たりの花粉数は平均で 600~700 粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の 1 胚珠当たりの平均的な花粉数 (文献 25) の間に位置していた。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、あるいは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事などによる環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメの集団の周辺では花粉を媒介する昆虫であるミツバチやクマバチなどが頻繁に観察されていた。このことから、このツルマメ集団の周りの環境には、他家受粉を引き起こす要因が通常よりも多く存在していたと考えられる (文献 24)。

10

15

20

ダイズとツルマメは、上述したようにいずれも閉花受粉を行う自殖性植物である。さらに、開花期については地域、品種及び播種時期に影響されるが、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約 1 ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている (文献 20)。他のダイズ品種と比べて開花期が遅い日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ (GIs/93-J-01) をそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した報告では、自然交雑実験終了後に結実したツルマメから取得された 686 個体の後代を調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体認められたことから、その交雑率は 0.73%と報告されている (文献 26)。

25

30

また、除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを隣接して栽培し、ツルマメ個体の収穫種子 32,502 粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は 1 粒であり、この交雑種子はダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群の 11,860 粒の中から見つかったと報告されている (文献 27)。

35

#### ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花には1花あたり10本の雄ずいがあり、各雄ずいは1つの葯を持つ(文献14)。1葯あたりの花粉数は374~760粒(文献28)、約230~540粒(文献29)との報告がある。花粉の寿命は短く、約8時間で失われることが報告されている。花粉の直径は15~25 $\mu\text{m}$ である(文献30)。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所が2001年から2004年の4年間に行った除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズを用いた非組換えダイズとの交雑試験では、交雑が観測された最長距離での交雑率は花粉親からの距離が2001年は7.0mで交雑率0.040%、2002年は2.8mで0.08%、2003年は0.7~10.5mまで調査したが交雑は認められず、2004年は3.5mで0.022%であった(文献31)。

#### ホ 病原性

15

—

#### ヘ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、自然条件下で野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

20

#### ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたダイズが雑草化したという報告はない。

25

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

除草剤ジカンバ耐性ダイズ(改変*dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87708, OECD UI: MON-87708-9) (以下、「本組換えダイズ」という。)は栽培時に、最大で3回の除草剤ジカンバ処理(表1(p10)中の「最高使用薬量」で示した体系)を行っても正常に生育できるダイズを育成する目的で開発された。ジカンバは合成オーキシシン型の除草剤であり(文献32)、茎葉処理剤として用いられている。従来ダイズにジカンバを散布した場合には従来ダイズは枯死する。また、ジカンバには若干の残効性があるため、従来ダイズの発芽前にジカンバを散布した場合に、従来ダイズがジカンバによる薬害を受けることがある。しかし、本組換えダイズではジカンバの茎葉処理を行ってもダイズは正常に生育し、発芽前処理を行ってもダイズがジカンバによる薬害を受ける心配が無い。

30

35

本組換えダイズの除草剤ジカンバに対する耐性を確認するため米国やアルゼンチンの複数ほ場試験を実施した。これらの試験では、本組換えダイズに対して除草剤ジカンバの連続処理を①～③のパターン、

- 5 ① 発芽前処理として1.12 kg a.e.<sup>4</sup>/ha、3-4葉期に茎葉処理として1.12 kg a.e./ha を散布、
- ② 発芽前処理として2.24 kg a.e./ha、3-4葉期に茎葉処理として2.24 kg a.e./ha を散布、
- ③ 発芽前処理として1.12 kg a.e./ha、3-4葉期と開花初期に茎葉処理として1.12 kg a.e./haを散布、

10 で行った。この結果、本組換えダイズはいずれの処理体系においてもジカンバに対し十分な耐性を示しており、開発目標が達成されたことが確認された。

なお、本組換えダイズが商品化された際に予定されている本組換えダイズに対する除草剤ジカンバの使用体系を表 1(p10)に示した。

15 表 1 本組換えダイズに対する除草剤ジカンバの使用体系<sup>5</sup>

	発芽前処理	茎葉処理		
		ダイズ3葉期	ダイズ6葉期	ダイズ開花初期
最高使用薬量	1.12 kg a.e./ha	0.56 kg a.e./ha	散布しない	0.56 kg a.e./ha
通常の雑草種に対する推奨使用薬量	0.56 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	散布しない	散布しない
難防除雑草種に対する推奨使用薬量 <sup>1</sup>	0.56 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	散布しない

<sup>1</sup> 雑草の発生時期が遅い場合を含む。

<sup>4</sup> a.e.; acid equivalent(酸換算)。除草剤製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分の塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

<sup>5</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

## (1) 供与核酸に関する情報

### イ 構成及び構成要素の由来

5

本組換えダイズ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図 1(p12)及び表 2 (p13~15)に示した。

10 なお、本組換えダイズに導入された *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ(dicamba mono-oxygenase ; 以下、「DMO」とする。)は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から a<sup>6</sup>番目のメチオニンの後にアラニンが挿入されている(本組換えダイズで発現している DMO 蛋白質では b<sup>6</sup>番目) (文献 33)。また、クローニング・エラーにより、DI-6 15 株由来の DMO 蛋白質のアミノ酸配列の c<sup>6</sup>番目のアミノ酸(本組換えダイズで発現している DMO 蛋白質では d<sup>6</sup>番目)がトリプトファンからシステインへ置換されている (文献 33)。よって、本組換えダイズに導入された *dmo* 遺伝子は「改変 *dmo* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 DMO 蛋白質」とする。

20 また、本組換えダイズ作出の過程において選抜マーカーとして用いられた *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変 25 されている。よって、本組換えダイズに挿入された *cp4 epsps* 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とする。ただし、本組換えダイズは、R1 世代において通常の散布量よりも低薬量での除草剤グリホサート散布を行い、除草剤による傷害を受けた個体のみを選抜することによって、遺伝的分離により改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体のみを選抜している(図 8, p31)。

### 30 ロ 構成要素の機能

- 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

35 本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 (p13~15)に示したとおりである。

---

<sup>6</sup> 社外秘につき非開示

5

10

15

【社外秘につき非開示】

20

25

30

図 1 PV-GMHT4355 のプラスミドマップ

35

表 2 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能<sup>7</sup>

構成要素	由来及び機能
	T-DNA I
B <sup>注1</sup> -Right Border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列(文献 34; 文献 35)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P <sup>注2</sup> -PCISV	Peanut chlorotic streak caulimovirus <sup>注3</sup> (PCISV)の全ゲノムの転写によって生じる完全長転写物 <sup>注4</sup> (Full Length transcript, Flt)の転写を誘導するプロモーター (文献 36)。植物細胞内での転写を誘導する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
L <sup>注5</sup> -TEV	Tobacco Etch virus <sup>注6</sup> (TEV)由来の 5'非翻訳領域(文献 37)。遺伝子発現の調整に関与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
TS <sup>注7</sup> -RbcS	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ)のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子( <i>RbcS</i> )に由来し、輸送ペプチドから成熟蛋白質の N 末端から 24 アミノ酸までをコードする配列(文献 38)。改変 DMO 蛋白質を葉緑体へ輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS <sup>注8</sup> -改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> のジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子のコード領域(文献 39, 文献 40)。アミノ酸配列に関しては、野性型と比較して N 末端から 2 番目にアラニンが挿入され、112 番目のトリプトファンがシステインに置換されている。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T <sup>注9</sup> -E9	<i>P. sativum</i> のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する(文献 41)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む(文献 42)。

<sup>7</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 2 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域 (本組換えダイズ中には存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR <sup>注10</sup> -ori V	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 43)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS-rop	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコード配列。 <i>Escherichia coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (文献 44)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR-ori-PBR322	pBR322 から単離された複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 45)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
aadA	トランスポゾン Tn 7 の 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ(アミノグリコシド改変酵素)の細菌プロモーター・コード配列・3'非翻訳領域(文献 46)。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。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-DNA II (本組換えダイズ中には存在しない)	
B-Left Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む(文献 42)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-E9	<i>P. sativum</i> のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する(文献 41)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

表 2 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA II (つづき)(本組換えダイズ中には存在しない)	
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS)をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列(文献 47; 文献 48)。
TS-CTP2	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列(文献 49)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
L- <i>DnaK</i>	<i>Petunia hybrid</i> (ペチュニア)の <i>Hsp70</i> 遺伝子に由来する 5'非翻訳領域リーダー配列(文献 50)。遺伝子の発現の調節に関与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P- <i>FMV</i>	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーター(文献 51)。植物細胞内での転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Right Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (文献 34; 文献 35)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注<sup>1</sup> B – Border (境界配列)

注<sup>2</sup> P – Promoter (プロモーター)

5 注<sup>3</sup> PC1SV は *Arachis hypogaea*(ラッカセイ)、*Phaseolus vulgaris* (インゲンマメ)、*Vigna unguiculata* (ササゲ)、*G. max* (ダイズ)、*Datura stramonium* (シロバナヨウシュチョウセンアサガオ)、*Nicotiana*(タバコ)属の数種を宿主とし(文献 52)、Chlorotic Vein Banding disease の原因となるウイルスである(文献 53)。

10 注<sup>4</sup> PC1SV はカリモウイルスに属するウイルスである。カリモウイルスは一般的にウイルスゲノム中に最低2つのプロモーターを持っており、その一つは全ゲノムからなる完全長転写物の転写を誘導し、もう一つはゲノムの一部のみの転写を誘導する。P-PC1SVはこのうち、完全長転写物の転写を誘導するプロモーターである。

注<sup>5</sup> L – Leader (リーダー配列)

注<sup>6</sup> TEV は *Lycopersicon* 属(トマト)、*Capsicum* 属(トウガラシ)、*Nicotiana* 属(タバコ)、多数のナス科雑草を宿主とし (文献 54)、Tobacco etch disease の原因となるウイルスである(文献 55)。

15 注<sup>7</sup> TS – Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注<sup>8</sup> CS – Coding Sequence (コード配列)

注<sup>9</sup> T – Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注<sup>10</sup> OR – Origin of Replication (複製開始領域)

- 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 *dmo* 遺伝子】

本組換えダイズは *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6株由来の改変 *dmo* 遺伝子がコードするジカンバモノオキシゲナーゼ(改変DMO蛋白質)を発現することにより、除草剤ジカンバ(3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid :3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸)に対する耐性が付与されている。 *S. maltophilia* は湿潤環境や土壌及び植物に偏在するグラム陰性細菌であり (文献56)、DI-6株は土壌より単離された (文献57)。

10

15

20

改変DMO蛋白質はDI-6株由来のDMO蛋白質と同様に3量体で機能する酵素であり(文献58)、ジカンバのメチル基に酸素を添加して除草活性の無い3,6-ジクロロサリチル酸(DCSA)とホルムアルデヒド(HCHO)と水(H<sub>2</sub>O)に変換することで、植物にジカンバ耐性を付与する(図2, p16)。実際に、本組換えダイズの作成に用いられたのと全く同じ改変 *dmo* 遺伝子発現カセット ([P-PCISV]-[L-TEV]-[TS-RbcS]-[CS-改変 *dmo*]-[T-E9])をダイズ、トマト、シロイヌナズナ並びにタバコに対し導入することによってこれらの植物に除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている(文献33)。

25

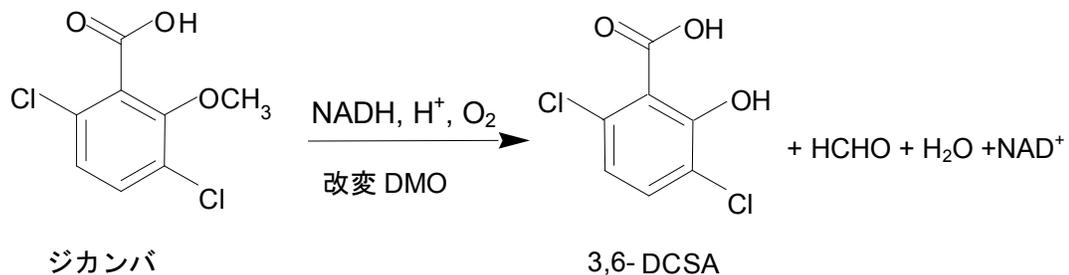


図 2 改変 DMO 蛋白質の作用機作<sup>8</sup>

30

本組換えダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子の5'末端側には、目的蛋白質を葉緑体に輸送する chloroplast transit peptide (葉緑体輸送ペプチド。以下、「CTP」とする) の57アミノ酸をコードする塩基配列と、目的蛋白質の葉緑体への輸送の効率

<sup>8</sup>本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

を高めるリブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットのN末端から24アミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列(文献59)、並びにクローニングの際に用いられたIntervening sequence (9塩基)が付加されている。このため、  
5 改変DMO蛋白質はアミノ酸配列のN末端側にCTPを含む84アミノ酸が連結された形で産生されている。通常、CTPは葉緑体に目的蛋白質が輸送された後、プロテアーゼにより目的蛋白質から切り離され、速やかに分解される(文献60)。このことから本組換えダイズ中で発現する改変DMO蛋白質においてもCTPが切り離されていると考え、葉及び種子においてウエスタン分析を行ったところ、改変DMO蛋白質として2本のバンドが検出された(別添資料2のFigure2, p17)。1本のバンドは~37kDa  
10 であり、もう一本は~41kDaであった。そこで、N末端側のアミノ酸配列を分析したところ、~37kDaのバンドから得られた蛋白質は、84アミノ酸が連結されていない改変DMO蛋白質であり、~41kDaのバンドから得られた蛋白質は、CTPの57アミノ酸が切り離され、リブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット由来の24アミノ酸とIntervening sequence由来の3アミノ酸の計27アミノ酸が  
15 連結された改変DMO蛋白質であることが確認された。さらに、CTPが切断される部位を予測するために開発されたアルゴリズム(文献61)を用いて本組換えダイズ内で産生されている84アミノ酸を含む改変DMO蛋白質のアミノ酸配列の解析を行ったところ、84アミノ酸中にCTPが切り離される部位は2ヵ所存在しており、1ヵ所の切断部位で切断された場合には84アミノ酸が切り離された改変DMO蛋白質となり、もう1ヵ所の切断部位で切断された場合には27アミノ酸が連結された改変DMO蛋白質となることを予測する結果が得られた(別添資料1)。

以上の結果から、本組換えダイズには、27アミノ酸が付加されていない改変DMO蛋白質と27アミノ酸が付加された改変DMO蛋白質とが存在していることが示された。以下、27アミノ酸が付加されていない改変DMO蛋白質を「改変DMO蛋白質」、27アミノ酸が付加された改変DMO蛋白質を「改変DMO+27蛋白質」とする。  
25

改変 DMO 蛋白質並びに改変 DMO+27 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかを、改変 DMO+27 蛋白質のアミノ酸配列(別添資料 1) についてアレルゲンデータベース 2009 (AD\_2009<sup>9</sup>)を用いて  
30 FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。改変 DMO 蛋白質のアミノ酸配列は改変 DMO+27 蛋白質のアミノ酸配列に含まれるため、改変 DMO 蛋白質についても既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められないと考えられた。  
35

---

<sup>9</sup> 文献 62 に 2009 年 1 月の時点で登録されている配列からなるデータベースで、1,386 件のアミノ酸配列が含まれる。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

- 5 改変 DMO 蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかどうかを検討した。改変 DMO 蛋白質の基質特異性について先行研究がなかったため、米国において、基質特異性の試験として本組換えダイズとは別の除草剤ジカンバ耐性遺伝子組換えダイズ系統を供試した *in vivo* 試験及び大腸菌で産生した DMO 蛋白質を供試した *in vitro* 試験を行った(表 3、p18)。
- 10 なお、試験ごとに供試材料が異なることから、まず以下の I~II で供試材料について記述した。次に III として試験結果の概要について記載し、IV として改変 DMO 蛋白質の基質特異性、並びに改変 DMO 蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかどうかについて考察した。

表 3 改変 DMO 蛋白質の基質特異性を調査するために行った試験<sup>10</sup>

目的	試験	試験内容	供試材料	参照図表
各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験	A	各種除草剤散布試験 ( <i>in vivo</i> )	ジカンバ耐性ダイズ系統 (系統 A <sup>11</sup> , 系統 B <sup>11</sup> , 系統 C <sup>11</sup> , 系統 D <sup>11</sup> ) (詳細は p19 及び p20 の表 4 参照)	本評価書の表 5 (p25) 本評価書の表 6 (p26) 別添資料 3 の Table 1 (別添資料 3、p8)
	B	2,4-D の DMO 蛋白質による代謝試験 ( <i>in vitro</i> )	大腸菌で産生・精製した his-野生型 DMO 蛋白質 (詳細は p20~21 参照)	別添資料 3 の Figure 1,2 (別添資料 3、p12)
	C	DMO 蛋白質の結晶に対する 2,4-D と o-アニス酸の結合性試験 ( <i>in vitro</i> )	大腸菌で産生・精製した his-DMOw 蛋白質 (詳細は p20~21 参照)	本評価書の図 7 (p27) 別添資料 3 の Figure 5 (別添資料 3、p15)
	D	2,4-D 存在下での DMO 蛋白質とジカンバとの反応性試験 ( <i>in vitro</i> )	大腸菌で産生・精製した his-野生型 DMO 蛋白質 (詳細は p20~21 参照)	別添資料 3 の Figure 3 (別添資料 3、p13)
ダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験	E	ダイズ内在性化合物の DMO による代謝試験 ( <i>in vitro</i> )	大腸菌で産生・精製した his-野生型 DMO 蛋白質 (詳細は p20~21 参照)	別添資料 3 の Figure 4 (別添資料 3、p14)

<sup>10</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

<sup>11</sup>社外秘につき非開示

## I. 試験 A(*in vivo*)の基質特異性試験の供試系統について

試験 A (*in vivo*)には、本組換えダイズとは別の除草剤ジカンバ耐性遺伝子組換えダイズ系統である系統 A<sup>12</sup>、系統 B<sup>12</sup>、系統 C<sup>12</sup>、系統 D<sup>12</sup> の 4 系統を供試した。系統 A<sup>12</sup> は非組換えダイズ品種 E<sup>12</sup> を宿主とし、本組換えダイズの作成時に用いた改変 *dmo* 遺伝子発現カセット([P-*PCISV*]-[L-*TEV*]-[TS-*RbcS*]-[CS-改変 *dmo*]-[T-*E9*])と同一の遺伝子発現カセットを持つプラスミド・ベクター F<sup>12</sup> を用いて作成された(文献 33)。また、系統 B<sup>12</sup>、系統 C<sup>12</sup> 並びに系統 D<sup>12</sup> は非組換えダイズ品種 G<sup>12</sup> を宿主とし、系統 A<sup>12</sup> と同じプラスミド・ベクター F<sup>12</sup> を用いて作成された(文献 33)。品種 E<sup>12</sup> はネブラスカ大学、品種 G<sup>12</sup> はオハイオ州立大学、本組換えダイズの宿主である A3525 はアスグロー社によって育成された非組換えダイズ品種で、いずれも成熟期群 III に属する無限伸育性の品種である。

試験 A に供試した 4 系統は、本組換えダイズとは別イベントである。しかし、以下に示す 3 つの理由から、試験 A によって得られた結果は、本組換えダイズ中で発現する改変 DMO 蛋白質の基質特異性に関する調査の参考とすることが出来ると考えられた。なお、隔離ほ場試験の期間中に、本組換えダイズを供試して試験 A の試験を米国の温室で再度行う予定である。

1. 試験 A(各種除草剤散布試験)において供試された 4 系統は本組換えダイズと同一の改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを導入することにより作出されているため、本組換えダイズと同じ改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質が発現していると考えられる(文献 33)。
2. 供試系統 4 系統の改変 DMO 蛋白質と改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量を ELISA 法で測定したところ、供試系統の発現量はいずれも本組換えダイズよりもやや低いものの大きな差異は認められなかった(表 4, p20)。
3. 供試された 4 系統は 2 種類の異なる遺伝的背景を持ち、4 系統の間で葉における改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量に差異があったが、各系統は 20 種類の除草剤に対してそれぞれ同様の傷害程度を示した(Table 1, 別添資料 3 の追加資料 p1 ; 表 6, p26)。このことは、各系統の遺伝的背景の差異や、改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量の差異は、改変 DMO 蛋白質の基質特異性に影響を及ぼさないことを示唆している。

---

<sup>12</sup> 社外秘につき非開示

表 4 本組換えダイズと基質特異性調査試験に供試したジカンバ耐性ダイズ系統における改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量<sup>13</sup>

ジカンバ耐性 ダイズ系統	宿主	プラスミ ド・ベクタ ー	葉(μg/g fwt) 範囲 (平均値) <sup>1</sup>	葉(μg/g dwt) 範囲 (平均値) <sup>1</sup>	種子 (μg/g fwt) <sup>2</sup>	種子 (μg/g dwt) <sup>2</sup>
本組換えダイズ	A3525	PV-GMHT 4355	8.8-12 (10.0)	63-84 (75)	17.8	20
系統 A <sup>14</sup>	品種 E <sup>14</sup>	F <sup>14</sup>	2.3-3.8 (3.1)	17-27 (22)	14.9	17
系統 B <sup>14</sup>	品種 G <sup>14</sup>	F <sup>14</sup>	5.9-8.1 (6.8)	42-58 (49)	10.3	12
系統 C <sup>14</sup>	品種 G <sup>14</sup>	F <sup>14</sup>	4.8-7.9 (6.3)	34-57 (45)	15.6	18
系統 D <sup>14</sup>	品種 G <sup>14</sup>	F <sup>14</sup>	4.4-7.9 (6.0)	32-56 (43)	6.4	7.2

<sup>1</sup> 5 サンプルについて測定した平均値 (N=5)。温室で栽培した各系統 10-12 個体(2 葉期)から葉を 1 枚ずつ採取してバルクとしたものを 1 サンプルとした。

5 <sup>2</sup> 各系統 25 粒ずつの種子をバルクとして抽出した 1 サンプルについて測定した。

## II. 試験 B～E(*in vitro*)の基質特異性試験の供試蛋白質について

10 *in vitro* の試験に供試した DMO 蛋白質はヒスチジンタグを付加し大腸菌で産出・精製して得られた DMO 蛋白質である。このうち、B、D、E の試験に供試した DMO 蛋白質(以下、「his-野生型 DMO 蛋白質」とする)は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質(p11)の N 末端にヒスチジンタグが付加されたものである(図 3, p21)。一方、C の試験に供試した DMO 蛋白質(以下、「his-DMOw 蛋白質」とする)は野生型 DMO 蛋白質の N 末端側から b<sup>14</sup> 番目にアラニンが挿入され、C 末端にヒスチジンタグが付加されたものである(図 3, p21)。したがって、*in vitro* の試験に供試した DMO 蛋白質 2 種と、本組換えダイズ中で発現している改変 DMO 蛋白質との違いは、ヒスチジンタグの有無と、アミノ酸配列の N 末端側から b<sup>14</sup> 番目のアラニンの有無と、d<sup>14</sup> 番目のアミノ酸がトリプトファンかシステインかの違いのみである(図 3, p21)。b<sup>14</sup> 番目及び d<sup>14</sup> 番目のアミノ酸やヒスチジンタグの位置は DMO の触媒部位から立体構造的に離れており(図 4, p21)、また、ヒスチジンタグは一般的に蛋白質の構造には影響しないといわれていることから(文献 63)、これらのアミノ酸配列の違いは DMO の基質特異性や *in vitro* での試験の結果には影響しないと考えられた。

25

<sup>13</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

<sup>14</sup>社外秘につき非開示

5

【社外秘につき非開示】

10

15 図 3 野生型 DMO 蛋白質、改変 DMO 蛋白質並びに改変 DMO+27 蛋白質と、A～E  
の各試験に供試した供試材料中の DMO 蛋白質とのアミノ酸配列の比較

20

25

【社外秘につき非開示】

30

35

図 4 DMO 蛋白質の結晶構造

### III. 試験の結果

#### III-1 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験(試験 A~D)

##### A. 各種除草剤散布試験(*in vivo*)

5           まず、*in vivo* の試験として、ジカンバ耐性ダイズ系統 4 系統(系統 A<sup>15</sup>、  
系統 B<sup>15</sup>、系統 C<sup>15</sup>、系統 D<sup>15</sup>)と対照品種として非組換えダイズ品種 E<sup>15</sup>  
を供試し、作用機作の異なる 8 グループ 20 種の除草剤の散布試験を行っ  
た(表 5, p25)。米国の温室において栽培した 2-3 葉期のダイズ各系統 6  
10           個体に対し、各除草剤を 2~3 段階の散布薬量で散布し、散布後 12 日目  
から 28 日目の間に除草剤による傷害程度を調査して除草剤耐性を評価し  
た。

          その結果、ジカンバ耐性ダイズ系統はいずれも、供試した除草剤 20 種  
のうち、除草剤ジカンバと同じ人工オーキシシン型除草剤である 2,4 ジク  
15           ロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、2-メチル-4-クロロフェノキシ酢酸(MCPA)及  
び 2,4-ジクロロフェノキシ酪酸(2,4-DB) (図 5, p27)に対してのみ弱い耐性  
を示した(別添資料 3 の Table 1, p8 ; 表 6, p26)。

          以上のことから、改変 DMO 蛋白質は 2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB を代謝  
している可能性が示唆された。

##### B. 2,4-D の DMO 蛋白質による代謝試験(*in vitro*)

          試験 A においてジカンバ耐性ダイズ系統が弱い耐性を示した人工オー  
キシシン型除草剤 3 種のうち、最もジカンバと化学構造に近い 2,4-D を用  
いて、DMO 蛋白質によってジカンバ以外のオーキシシン型除草剤が代謝さ  
れるかどうかを評価した。2,4-D が DMO 蛋白質によって代謝される場合、  
2,4-D は 2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)へと変換されると予想される。  
25           そこで、2,4-D を his-野生型 DMO 蛋白質と反応させ、2,4-DCP やその他  
の化合物が生成されるかどうか、LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行った。

          その結果、いずれの分析においても 2,4-D の減少は見られず、また  
2,4-DCP やそれ以外の化合物も検出されなかった(別添資料 3 の Figure 2,  
30           p12)。

          したがって、his-野生型 DMO 蛋白質は 2,4-D を代謝しないと考えられ  
た。また、試験 A においてジカンバ耐性ダイズ系統が 2,4-D に弱い耐性  
を示したにも関わらず、his-野生型 DMO 蛋白質は 2,4-D を代謝しないこ  
とから、2,4-D が DMO 蛋白質と結合し、それによって植物体に作用する  
35           2,4-D の除草剤成分が減少する可能性が示唆された。

##### C. DMO 蛋白質の結晶に対する 2,4-D と o-アニス酸の結合性試験(*in vitro*)

<sup>15</sup> 社外秘につき非開示

ジカンバ、2,4-D 及び o-アニス酸(図 6, p27)の溶液にそれぞれ his-DMOw 蛋白質の結晶を浸漬し構造解析を行った。なお、o-アニス酸はジカンバと構造が類似した化合物で、ジカンバとの違いは 2 つのクロロ基がないことである(図 5, p27)。

5           その結果、o-アニス酸は his- DMOw 蛋白質の触媒部位に結合しなかった。一方、2,4-D は his-DMOw 蛋白質に結合したが、触媒部位での配置がジカンバとは異なっていた(図 7, p27)。

10           以上のことから、まず、his-DMOw 蛋白質の触媒部位に基質が結合するにはクロロ基が必要であると考えられた。さらに、2,4-D はクロロ基を有するため his-DMOw 蛋白質に結合できるが、クロロ基の位置がジカンバとは異なるために活性部位に正しく結合できず、結果として 2,4-D は his-DMOw 蛋白質に代謝されないと考えられた。また、2,4-D と構造的に良く似ており、クロロ基を有する MCPA 及び 2,4-DB(図 5, p27)も同様に、DMO 蛋白質に対して結合するが、代謝はされないと推定された。よって、ジカンバ耐性ダイズ系統が 2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB に対して弱い耐性を示した理由は、改変 DMO 蛋白質がこれらの除草剤成分を代謝したからではなく、これらの除草剤成分が改変 DMO 蛋白質に結合することで、植物体に作用する除草剤の有効成分が減少したためと考えられた。

15           また、ここまでの結果より、2,4-D が DMO 蛋白質に結合することによって、DMO 蛋白質の酵素活性が阻害される可能性が示唆された。

#### D. DMO 蛋白質の 2,4-D 存在下でのジカンバとの反応性試験 (*in vitro*)

25           2,4-D の結合によって DMO の酵素活性が阻害される可能性を評価するため、*in vitro* で、2,4-D を 10 $\mu$ M~10mM で添加した条件下において his-野生型 DMO 蛋白質と 50 $\mu$ M のジカンバを反応させた。

30           その結果、2,4-D が 10~100 $\mu$ M では his-野生型 DMO 蛋白質とジカンバとの反応は阻害されないが、2,4-D が高濃度になるにしたがって his-野生型 DMO 蛋白質とジカンバとの反応は徐々に低下し、1mM になると約 70%に低下した (別添資料 3 の Figure 3, p13)。

          したがって、DMO の酵素活性は 2,4-D の濃度がジカンバの 2 倍程度までの場合は阻害されず、2,4-D がジカンバの 20 倍では弱く阻害されることが明らかとなった。

### III-2 ダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 E)

#### E. ダイズ内在性化合物の DMO による代謝試験(*in vitro*)

          続いて、DMO 蛋白質が植物の内在性の化合物を代謝する可能性について検討した。*in vitro* の試験で、ジカンバと構造的に類似したダイズ中に

5 存在する化合物である o-アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸、シナピン酸 (図 6, p27) の 5 種をそれぞれ his-野生型 DMO 蛋白質を含む反応溶液と his-野生型 DMO 蛋白質を含まない反応溶液に添加してインキュベートした後、反応溶液の LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行い、添加した化合物が減少するか、あるいは DMO 蛋白質により他の化合物が生成されているかどうかを調査した。

10 その結果、いずれの分析においても 5 種の内在性化合物の減少は見られず、また他の化合物も検出されなかった(別添資料 3 の Figure 4, p14; 別添資料 3 追加資料 2)。したがって、供試した 5 種のダイズ内在性化合物は his-野生型 DMO 蛋白質によって代謝されないことが確認された(別添資料 3 の Figure 4, p14; 別添資料 3 追加資料 2)。

#### 15 IV. 改変 DMO 蛋白質の基質特異性及び改変 DMO 蛋白質の宿主の持つ代謝系への影響の考察

15 以上の各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験(試験 A~D)及びダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験(試験 E)の結果から、本組換えダイズ中で発現する改変 DMO 蛋白質はジカンバに対する基質特異性を有することが示された。よって、改変 DMO 蛋白質が宿主であるダイズの代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は低いと判断された。

20

表 5 ジカンバ耐性ダイズ系統に対する各種除草剤散布試験に供試した除草剤<sup>16</sup>

除草剤活性成分	除草剤の種類(作用機作) <sup>1</sup>
2,4-D	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
2,4-DB	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
MCPA	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
トリクロピル	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
クロピラリド	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
ピクロラム	フェノキシカルボン酸系(人工オーキシシン)
アラクロール	クロロアセトアミド系(超長鎖脂肪酸合成阻害)
アセトクロール	クロロアセトアミド系(超長鎖脂肪酸合成阻害)
アトラジン	トリアジン系 (光化学系 II 阻害)
DCMU	ウレア系 (光化学系 II 阻害)
リニュロン	ウレア系 (光化学系 II 阻害)
オキシフルオルフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
ラクトフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
クロリムロン	スルホニルウレア系(アセト乳酸合成酵素阻害)
クロロスルフロン	スルホニルウレア系(アセト乳酸合成酵素阻害)
ハロスルフロン	スルホニルウレア系(アセト乳酸合成酵素阻害)
イマザピル	イミダゾリノン系(アセト乳酸合成酵素阻害)
トリフルラリン	ジニトロアニリン系 (紡錘体微小管形成阻害)
パラコート	ビピリジリウム系(光化学系 I 電子転換)
グリホサート	グリシン系 (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素阻害)

<sup>1</sup> 文献 64

<sup>16</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 6 ジカンバ耐性ダイズ 4 系統に対するジカンバ、2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB の  
散布試験結果

5

【社外秘につき非開示】

10

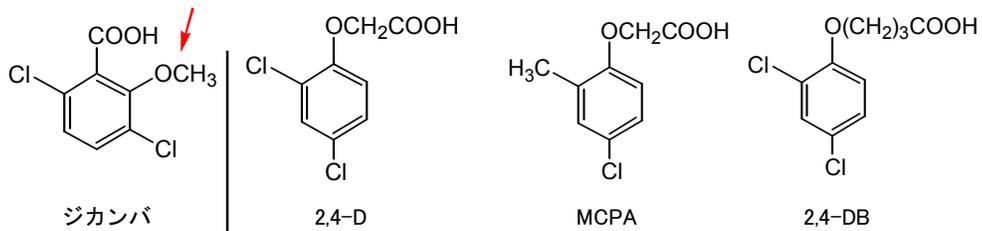
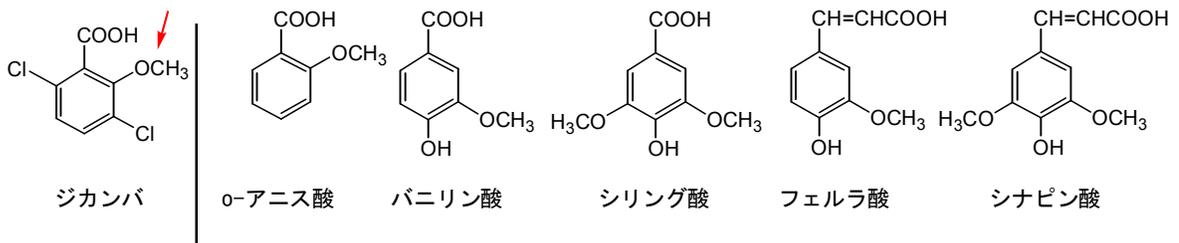


図 5 ジカンバ及びジカンバ耐性ダイズ系統が低薬量での散布時に耐性を示したオーキシシン型除草剤<sup>17</sup>  
赤い矢印は改変 DMO 蛋白質が酸化するメチル基を示す。



5

図 6 ジカンバ及びジカンバと類似した構造をもつダイズ内在性の化合物<sup>18</sup>  
赤い矢印は改変 DMO 蛋白質が酸化するメチル基を示す。

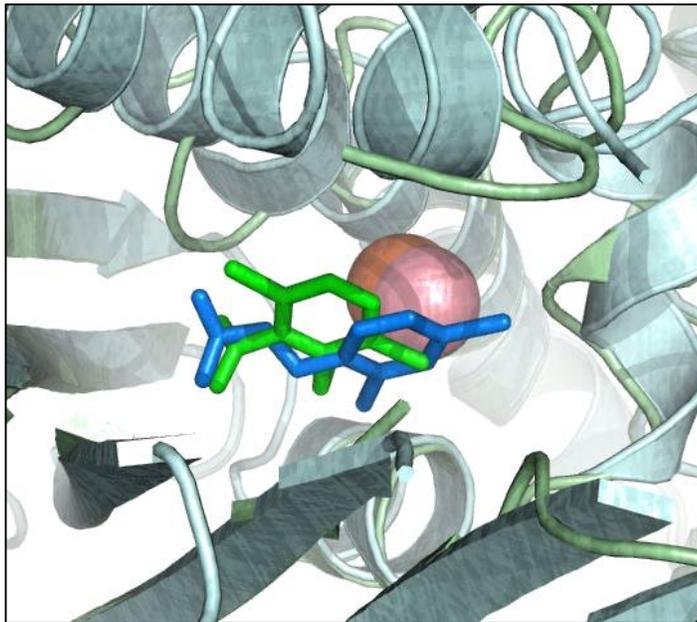


図 7 改変 DMO 蛋白質の触媒部位におけるジカンバと 2,4-D の配置<sup>19</sup>

10

緑色はジカンバ分子、青色は 2,4-D 分子を示す。なお、ジカンバと 2,4-D は同時には結合しない。

<sup>17</sup>本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

<sup>18</sup>本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

<sup>19</sup>本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

5

本組換えダイズの作出に用いられたベクターPV-GMHT4355 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などをもとに構築された。

### ロ 特性

10

#### ① 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 PV-GMHT4355 の全塩基数は 11,352bp である。

15

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

*E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

20

#### 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

本ベクターの感染性は知られていない。

25

## (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

30

宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 2 (p13~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1(p12) に示した。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

35

プラスミド・ベクターPV-GMHT4355 をアグロバクテリウム法によって、非組換えダイズ品種 A3525 の胚細胞から切り取った分裂組織に導入した。

## 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

5 非組換えダイズ品種 A3525 の胚から採取した分裂組織とプラスミド・ベクター PV-GMHT4355 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサートを添加した組織培養培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

10 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

15 カルベニシリン、セフトキシム及びチカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えダイズのR3世代において、形質転換に用いたプラスミド・ベクター PV-GMHT4355 の外側骨格領域を標的としたPCR分析を行ったところ、本組換えダイズにはプラスミド・ベクターの外側骨格領域は存在しなかった(別添資料 4)。このことから、本組換えダイズには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

20 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

25 形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代であるR1世代において通常の散布量よりも低薬量の除草剤グリホサート散布を行い改変*cp4 epsps*遺伝子の有無に関するスクリーニングを行った。ここでグリホサートによって傷害を受けた個体のみをT-DNA II (改変*cp4 epsps*遺伝子発現カセットを含む領域) を持たない個体として選抜した。ここで選抜したT-DNA IIを持たないR1個体において、さらにELISA法、インバーダー分析<sup>20</sup>並びにTaqMan PCR法によりT-DNA I (改変*dmo*遺伝子発現カセットを含む領域) を1コピーのみホモで有する個体を選抜した。  
30 選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統としてMON87708系統を選抜した。

---

<sup>20</sup>インバーダー分析は、遺伝的変異の検出や遺伝子の定量的な分析を行うためのシグナル増幅技術である。インバーダー分析はPCRによる遺伝子増幅を必要とせず、Invader<sup>®</sup>法と呼ばれる切断過程により検出が行われる。この切断過程では、構造を特異的に認識できる Cleavase<sup>®</sup>と呼ばれる酵素によって標的遺伝子配列が切断され、蛍光が検出される。なお、Invader<sup>®</sup>及び Cleavase<sup>®</sup>は、Third Wave Technologies 社の商標として登録されている。

本組換えダイズの育成図を図 8(p31) に示した。なお、本評価書における本組換えダイズ MON87708 系統とは、R1 世代において T-DNAII 領域が分離し、かつ T-DNAI 領域のみを持つ 1 個体及びその後代の全てを指す。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図 8 本組換えダイズの育成図

25

#### (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

本組換えダイズの導入遺伝子が染色体に存在するかどうかを調べるため、改変 *dmo* 遺伝子をホモで有する本組換えダイズ(R4 世代)を、改変 *dmo* 遺伝子を持たない従来ダイズ品種[社外秘につき非開示]と交配して F1 個体を作成した。この F1 個体を自殖して得られた F2 世代で改変 *dmo* 遺伝子についてヘテロ接合体である個体を選抜し、これを自殖することで得られた F3 世代において改変 *dmo* 遺伝子の遺伝子型をインバーダー分析により調査し、分離比の検定を行った (別添資料 5 の Figure 1, p5)。その結果、改変 *dmo* 遺伝子の分離比は、メンデルの法則に従うと仮定して予想される 1:2:1 の分離比に一致していた(別添資料 5 の Table 1, p6 ; 表 7, p32)。したがって本組換えダイズの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられる。

15

表 7 本組換えダイズの F3 世代における改変 *dmo* 遺伝子の分離比<sup>21</sup>

供試 個体数 <sup>1</sup>	観察値			1:2:1 の分離比の期待値				
	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性 個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性 個体数	$\chi^2$	p 値
118	29	52	37	29.5	59	29.5	2.7	0.2534

<sup>1</sup> インバーダー分析に供試し、かつインバーダー分析によって遺伝子型が解析できた個体数

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

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えダイズのゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれており (別添資料 6 の Figure 3~5, p37~39)、複数世代(R2~R6 世代)にわたり安定して後代に遺伝していることが確認された(別添資料 6 の Figure 15, p51)。また、外側骨格領域及び T-DNA II 領域は導入されていないことが確認された (別添資料 6 の Figure 6~9, p40~43)。

25

<sup>21</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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 1 コピーなので該当しない (別添資料 6 の Figure 3~5, p37~39)。

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えダイズの複数世代(R2~R6 世代)にわたり改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質が安定して発現していることが確認された(別添資料 2 の Figure 2, p17)。

15 なお、米国の温室において、4 反復で育成した本組換えダイズの葉 (14 葉期)での改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量を ELISA 法により分析した(別添資料 7)。また、同じ温室で 1 反復で育成した本組換えダイズの種子中での改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量も測定した。

20 その結果、改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質の合計の発現量の平均値及び範囲(括弧内に示す)は葉で 20 $\mu$ g/g fwt(12~26 $\mu$ g/g fwt)、種子で 33 $\mu$ g/g fwt(28~40 $\mu$ g/g fwt)であった(別添資料 7 の Table 1, p17)。

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

25 プラスミド・ベクターPV-GMHT4355 は自律増殖可能な宿主域が *E. coli* や *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られているため、移入された核酸が自然条件下において野生動植物等に伝達される可能性はない。

30 (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

35 PCR 法による検出が可能である(別添資料 8)。本法は種子 1 粒ごとの検定を行うために十分な感度を有する。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10ng であることが推奨されている。本法の信頼性については 44 個体以上の本組換えダイズ及び非組換えダイズを用いて分析を行い、確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 5 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な内容

本組換えダイズへ導入された改変*dmo*遺伝子は改変DMO蛋白質を発現することにより、除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。

- 10 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<sup>22</sup>

15 a 形態及び生育の特性

15

形態及び生育に関する特性を比較するため、2007年に米国の3カ所のほ場（ジャクソンビル（イリノイ州）、ノコミス（イリノイ州）、ウィチタ（カンザス州））において9項目（苗立ち株数の多寡、初期の草勢、50%開花期までの日数、花色、倒伏性、主茎長、裂莢性、収穫種子の水分含量、収量）について本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種A3525の間の形態特性及び生育の差異を調査した。なお、ジャクソンビル、ノコミスのほ場においては参考品種として従来商業品種を8品種供試した。試験はいずれのほ場においても3反復で行った（別添資料9）。

25 その結果、統計処理を行った項目（初期の草勢、50%開花期までの日数、倒伏性、主茎長、収穫種子の水分含量、収量）において、ノコミスのほ場で主茎長と収量に関して本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で有意差が認められた（別添資料9のTable 2, p5）。なお、ジャクソンビルにおける初期の草勢については、データにばらつきがなかったため統計処理を行えなかったが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズは同じ値であった。また、統計処理を行わなかった項目（苗立ち株の多寡、花色、裂莢性）については、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で違いは認められなかった。

35 主茎長に関しては、3カ所中1カ所（ノコミス）のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは81.3cm、対照の非組換えダイズでは77.0cmであった（別添資料9のTable 2, p5）。

---

<sup>22</sup> 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社には帰属する

収量に関しては、3カ所中1カ所(ノコムス)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは4.1t/ha、対照の非組換えダイズでは4.2t/haであった。しかし、本組換えダイズの値はノコムスのほ場で参考として供試された従来商業品種8  
5 品種の平均値の範囲内 (収量: 3.5~4.6t/ha) であった(別添資料9のTable 2, p5)。

#### b 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試験は、播種後 21 日目の本組換えダイズ、対照の  
10 非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 6 品種の幼苗を日中 15°C/夜間 8°C に  
設定した人工気象室で 23 日間栽培したのち、草勢、主茎長、生育ステージ、生  
体重及び乾燥重について比較した。その結果、統計処理を行った項目(草勢、主  
15 茎長、生体重及び乾燥重)について本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間  
で有意差は認められず、統計処理を行わない項目(生育ステージ)についても本組  
換えダイズと対照の非組換えダイズの間で違いは認められなかった(別添資料  
10 の Table 4, p21)。

#### c 成体の越冬性又は越夏性

ダイズは夏型一年生植物である。栽培終期において成熟した後には枯死し、  
20 再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。米国のジャクソンピ  
ル、ノコムス及びウィチタのほ場試験時の収穫期では、本組換えダイズと対照  
の非組換えダイズが枯死していることが確認されている。なお、隔離ほ場試験  
の試験終了時に本組換えダイズの越冬性を確認する予定である。

25

#### d 花粉の稔性及びサイズ

米国の 1 カ所のほ場(クリントン、イリノイ州)で栽培された本組換えダイズ、  
対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 4 品種から花粉を採取し、その  
30 稔性とサイズを調査した結果、統計学的有意差は認められなかった (別添資料  
11 の Table 2, p15、Figure 1, p16)。

#### e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

第一の2-(6)-②-a (p34) に上述したとおり、収量に関しては、ノコムスのほ場  
で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは4.1t/ha、対照の非組換えダ  
イズでは4.2t/haであり、ノコムスで参考として供試された従来商業品種8品種の  
35 平均値の範囲内 (収量: 3.5~4.6t/ha) であった。裂莢性について本組換えダイズ

と対照の非組換えダイズはともに難裂莢性で違いは認められなかった(別添資料9のTable 2, p5)。

5 種子の休眠性及び発芽率について、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ  
A3525 及び従来商業品種 4 品種より収穫した種子を 4 反復各約 100 粒ずつ温室  
にて播種し、休眠性と発芽率の調査を行った。温度条件は 30°C 8 時間/20°C 16  
時間とした。発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非  
10 発芽種子については硬実種子率、枯死種子率及び吸水膨潤状態 (viable  
firm-swollen) の種子率に分けて測定した (別添資料 12)。その結果、すべての項  
目において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の Table 1, p4)。

#### f 交雑率

15 わ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生育している。  
本組換えダイズとツルマメとの交雑率の試験は行っていない。ダイズとツルマ  
メとの交雑率を管理されたほ場内で調査するためには、遺伝的背景が均一なツ  
ルマメ系統を多数用意する必要がある。さらに、交雑試験では、雑草であるツ  
ルマメの発芽及び生育の均一性の確保や、ツルマメの開花期をダイズに合わせ  
20 るための日長処理など、技術的に困難な作業が必要になる。よって、隔離ほ場  
試験においては本組換えダイズと従来ダイズの生殖特性及び交雑率を比較する  
ことにより、本組換えダイズのツルマメとの交雑性が従来ダイズのツルマメと  
の交雑性に比べて高まっているかを考察する予定である。

#### g 有害物質の産生性

25 本組換えダイズから他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを  
確認するために、米国の温室において本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ  
A3525 及び従来商業品種 6 品種を供試して鋤込み試験及び後作試験を行った。  
その結果、いずれの試験においても検定植物であるレタスの発芽株数、生育ス  
30 テージ、葉長、生体重及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった (別添  
資料 13 の Table 1, p4)。なお、隔離ほ場試験においても鋤込み試験、後作試験及  
び土壌微生物相試験を行う予定である。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

35

#### (1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

## (2) 使用等の方法

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

5 名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 25 年 1 月 31 日まで

### 1. 隔離ほ場の施設

- 10 (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。
- (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、本組換えダイズ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、当該ダイズ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。
- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。

### 2. 隔離ほ場での作業要領

- 20 (1) 本組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。
- 25 (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (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ダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 30 (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) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。
- 35 (8) 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。

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料 14 の

図 2(p3)に示した。

(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

5

別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。

(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

10

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用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

15

—

(6) 国外における使用等に関する情報

20

これまで本組換えダイズについて 2006～2008 年の間に米国、アルゼンチン及びチリにおいて延べ 81 ヲ所のは場試験が行われているが(表 8, p38)、非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生ずるおそれがあるような相違は報告されていない。

なお、本組換えダイズに関しては、【以下社外秘】

25

表 8 海外で本組換えダイズのは場試験を行ったは場数及び国<sup>23</sup>

年	は場の数	国
2006	16	米国
2006/2007	18	アルゼンチン(14), チリ(4)
2007	34	米国
2008	13	米国

<sup>23</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価<sup>24</sup>

### 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

10         ダイズがこれまで北米において栽培ほ場の外で発見されたという報告はない  
(文献 1)。わが国においても、ダイズは弥生時代から栽培されていると考えられ、  
イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然  
条件下で雑草化した例は報告されていない。

15         本組換えダイズと対照の非組換えダイズの競合における優位性に関わる諸形  
質 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、  
種子の生産量、裂莢性、休眠性及び発芽率 (第一の 2-(6)-②-a~e、p34~36) を調  
査した結果、統計処理を行った項目については、3 カ所の試験のうち 1 カ所で主  
20         茎長及び収量に統計学的有意差が認められたが、それ以外の項目では本組換えダ  
イズと対照の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。また、  
統計処理を行わなかった項目については、違いは認められなかった。

20

       主茎長に関しては、ノコミスのほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズ  
では 81.3cm、対照の非組換えダイズでは 77.0cm であり、本組換えダイズは対照の非組  
25         換えダイズより主茎長が高かった(別添資料 9 の Table 2, p5)。本組換えダイズと対照の  
非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められたのは、3 カ所のほ場のうち 1 カ所  
であり、その他の 2 カ所のほ場では統計学的有意差は認められなかった(別添資料 9 の  
Table 2, p5)。また、この主茎長の差異によって本組換えダイズの競合における優位性  
が高まるとは考えにくい。

       収量に関しては、ノコミスのほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイ  
30         ズでは 4.1t/ha、対照の非組換えダイズでは 4.2t/ha であった。しかし、ノコミスの  
ほ場における本組換えダイズの収量は同じノコミスのほ場で参考として供試さ  
れた従来商業品種 8 品種の平均値の範囲内 (収量: 3.5~4.6t/ha) に収まっていた  
ことから、ノコミスのほ場で観察された収量の値は従来品種の変動の範囲内であ  
ると判断された(別添資料 9 の Table 2, p5)。

35

       本組換えダイズには改変 DMO 蛋白質の発現により除草剤ジカンバに耐性を持

---

<sup>24</sup> 本項目中で、第一の 2-(6)-②の a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モン  
サント株式会社に帰属する

つが、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下においてジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

5 以上のことから、本組換えダイズを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

## (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

20 以上の結果から、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

## 2 有害物質の産生性

### 25 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズは弥生時代からわが国で栽培されていると考えられており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでにダイズにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

30

本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を鋤込み試験及び後作試験(第一の 2-(6)-②-g, p36)により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

35

本組換えダイズ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 DMO 蛋白質及び改変 DMO+27 蛋白質が発現しているが、両蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両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た(第一の 2-(1)-ロ-②, p17)。さらに、第一の 2-(1)-ロ-③ (p18~27) に

示したように、改変 DMO 蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ダイズ内在性のジカンバと構造の類似した物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することは無いと考えられた。したがって、改変 DMO 蛋白質が原因で、本組換えダイズ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布した際には、図 2(p16)に示したように改変 DMO 蛋白質の作用によって除草剤ジカンバに酸素が添加され、3,6-DCSA とホルムアルデヒドと水が産生される。このうちホルムアルデヒドは粘膜に対し刺激性のある有害物質として知られている(文献 65)。このため、本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布した際に生じるホルムアルデヒドにより野性動植物に影響が及ぶ可能性を以下に考察した。

ホルムアルデヒドは、自然のプロセスおよび人為的発生の結果として、環境中に広く存在している。自然の発生源としては主として大気中における炭化水素の酸化が挙げられる。人為的発生源としては、ホルムアルデヒドは工業的に大量に生産・使用されているほか、自動車排気ガスや木材の燃焼が挙げられる。通常人為的発生源から離れた大気中には  $0.1 \sim 2.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、人間が活動している場所では  $7 \sim 12 \mu\text{g}/\text{m}^3$  のホルムアルデヒドが含まれる(文献 65)。ホルムアルデヒドは土壌もしくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中においては酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられている(文献 65)。また、ホルムアルデヒドはほとんど全ての生物種において 1 炭素化合物の代謝過程の中間体として生体内に存在している。実際に、ホルムアルデヒドは多くの植物種で検出されており、その濃度は最大で数千  $\text{mg}/\text{kg}$  との報告もある(文献 66)。食品でも同様にホルムアルデヒド濃度の報告があり、果物や野菜といった生鮮食品では  $1 \sim 98 \text{ mg}/\text{kg}$  程度含まれていると報告されている(文献 67; 文献 65)。

ホルムアルデヒドはほとんど全ての生物種において 1 炭素化合物の代謝過程の中間体として生体内に存在しているものであり、すなわちほとんどの生物はホルムアルデヒドを代謝する能力を持つと考えられる。植物におけるホルムアルデヒド代謝能については、オリヅルランの植物組織から得た抽出物を用い、ホルムアルデヒドを代謝する酵素であるホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が測定されている(文献 68)。その結果、 $K_m$  値は  $30 \mu\text{M}$ (約  $0.9 \text{ mg}/\text{kg}$ )であり、オリヅルランは 1 時間の間に生鮮組織  $1 \text{ g}$  あたり  $12.8 \mu\text{g}$ ( $12.8 \text{ mg}/\text{時間}/\text{kg}$ )のホルムアルデヒドを代謝する能力を有することが明らかとなった(文献 68)。コムギ、トウモロコシ、スギナの抽出物においてもホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素活性はオリヅルランと同等と考えられる(文献 68)。また、ダイズにおいても、振盪培養組織を用いた試験でホルムアルデヒドが代謝され、有機酸やアミノ酸として同化されることが確認されている(文献 68)。

本組換えダイズの開花初期に 0.56 kg a.e./ha の除草剤ジカンバを散布した場合に、本組換えダイズ植物体において生成されるホルムアルデヒド量の最大値を以下の仮定に基づき試算した。

- 5 仮定 1. ダイズの群落により畦間は完全に覆われている状態であり、散布したジカンバの全量がダイズ植物体に付着する。
- 仮定 2. ダイズに付着したジカンバの 50%量が、瞬間的にダイズ植物体に吸収され、ホルムアルデヒドに分解される。
- 仮定 3. ジカンバ由来のホルムアルデヒドは生成されている間に代謝によって減少しない。
- 10 仮定 4. ダイズの栽植密度は 100,000 本/エーカー(247,105 本/ha)、ダイズ 1 本あたりの重量は 30g とした。

以上の条件での本組換えダイズの植物体中におけるホルムアルデヒド濃度の最大値は、ダイズ植物体 1kg あたり 5.13mg と試算された<sup>25</sup>。しかし、この値は上述した数種の植物種での最大濃度(数千 mg/kg)と比較して低く、また生鮮食品で報告されている濃度(1~98mg/kg)の範囲内であった。

15

以上をまとめると、隔離ほ場における本組換えダイズの栽培時に、本組換えダイズに対して除草剤ジカンバを散布し、本組換えダイズ中でホルムアルデヒドが産生されたとしても、その産生量は通常の植物種や野菜・果物等の生鮮食品において報告されている量を超えるものではないため、本組換えダイズ中でジカンバの散布によって生じるホルムアルデヒドによって野生動植物が影響を受けることはないと考えられた。なお、隔離ほ場試験において、除草剤ジカンバを散布した本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を鋤込み試験、後作試験並びに土壌微生物相試験により比較検討する予定である。

20

25 以上のことから、本組換えダイズを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する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。

30

## (2) 影響の具体的内容の評価

—

---

<sup>25</sup> 計算式は以下のとおりである。

$$560(\text{g a.e./ha}) \times 0.5 \div 221.04 (\text{ジカンバの分子量}) \times 30.03 (\text{ホルムアルデヒドの分子量}) \div 247105.4 \text{ 本/ha} \div 0.030 \text{ kg/本} \times 1000 \text{ mg/g} = 5.13 \text{ mg/kg}$$

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10 以上の結果から、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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

15

第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~9) に記載したように、ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのはツルマメのみである(文献 2; 文献 3; 文献 1)。したがって、交雑性に起因して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特定された。

20

(2) 影響の具体的内容の評価

25 ダイズとその近縁野生種であるツルマメとの間では低い確率で交雑が生じ、雑種が形成される(文献 1)。したがって、本組換えダイズに関しても、ツルマメと交雑した場合は雑種が形成されると考えられる。また、当該雑種からツルマメへの戻し交配を経て、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子がツルマメの集団中に検出される可能性も否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

30

わが国においてツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地、畑の周辺のほか、日当たりの良い野原や道端などに自生している(文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。したがって、本組換えダイズがわ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機会があることは否定できない。

35

しかし、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯して受粉が完了する上に、開花期の後半にはほとんどの花が開花することなく蕾のまま受精する閉花受精を行うため(文献 20)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。さ

らに、開花期については地域、品種及び播種時期に影響されるが、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約1ヵ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている(文献20、文献26)ため、ダイズとツルマメの間の交雑は起こりにくいと考えられる。実際、日本固有の栽培品種でありツルマメと開花期が重複する丹波黒とツルマメをそれぞれ30個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調べた結果、得られた686個体のツルマメの後代の中にダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が5個体確認されており、その交雑率は0.73%と報告されている(文献26)。また、除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを隣接して栽培し、採種したツルマメ種子32,502粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は1粒であり、この交雑種子はダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群の11,860粒の中から見つかったと報告されている(文献27)。よって、一般的にダイズとツルマメ集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合う場合は交雑し得るが、そのような特殊な条件の場合でも、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た。

本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で生殖に関わる形質を比較した場合、花粉形態及び花粉稔性(別添資料11のTable 2, p15、Figure 1, p16)に有意な違いは認められず、また、種子の生産性(収量)に関しては、第二の1-(1)(p39)に上述したとおり、本組換えダイズの値は従来品種の変動の範囲内であると判断されたことから、本組換えダイズとツルマメの交雑率は従来のダイズと同様に極めて低いと推測された。さらに、2009年6月の時点で隔離ほ場の敷地内及び隔離ほ場周辺75mの範囲(民家の敷地内を除く)でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。さらに、本組換えダイズは一定の作業要領を備えた隔離ほ場において第一種使用規程に従って使用することから、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は通常よりもさらに低くなると考えられた。

仮に、本組換えダイズとツルマメが自然交雑した場合でも、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくには、F1雑種やその雑種後代が自然環境中で生存し、ツルマメと戻し交雑を繰り返す必要がある。そこで、この雑種や雑種後代がツルマメ集団中で生存し、優占するかについて以下に考察する。

従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、わが国において経時的な調査が行われている。2003年から2005年にかけてツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間体が探索されている。その結果、調査した58地点(秋田県8地点、茨城県7地点、愛知県4地点、広島県6地点、佐賀県33地点)のうち秋田県の1地点及び

佐賀県の3地点から形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ11個体の中間体が発見された(文献 69; 文献 70; 文献 71)。

しかし、これら発見された F1 雑種及び雑種後代が同じ集団内で生存し続けるかどうかの追跡調査を秋田県 1 地点、佐賀県 3 地点について行ったところ、7 個体の雑種後代が見つかった佐賀県の 1 地点で、翌年に 1 個体の雑種後代を発見したものの、翌々年は確認されなかった(文献 72; 文献 73)。

さらに、ダイズからツルマメへの自然交雑の有無を DNA レベルで明らかにするために、F1 雑種及び雑種後代が発見された地点を含めて、秋田県、茨城県、佐賀県の 14 地点の種子 1,344 サンプルをマイクロサテライトマーカーで解析した結果、従来ダイズ由来の遺伝子のツルマメ集団中への浸透は確認されなかった(文献 74)。同様に文献 75 も「ダイズにおいて作物から野生種への遺伝子浸透に関する分子学的事実はない」と述べている。

このようにダイズとツルマメの雑種の生存が制限される理由として、雑種自体の競合性の低下が考えられる。ダイズは人為的な栽培環境に適応進化しており、自然環境に適応したツルマメとは遺伝的、形態的、生理学的及び生態的特性に大きな違いがある。したがって、雑種及び雑種後代が栽培作物であるダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境に適応するのに不利になっている可能性がある。実際に人為的に交配して得た従来ダイズとツルマメの雑種を親系統とともに播種した後で、それらの定着の様子を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統の定着率は親系統であるツルマメと比較して明らかに劣っていたことが示されている(文献 76)。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種においては、競合における優位性に関わる休眠性、倒伏性、裂莢性はツルマメに比べ低下していることが報告されている(文献 76; 文献 77)。

以上の文献報告より、ツルマメの生育する自然環境下では、従来ダイズとツルマメの F1 雑種及びその雑種後代は自然環境への適応に不利となるため世代を超えて長期間生存することができず、このため従来ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が継続的に起きている可能性は極めて低いと考えられた。

以上のことに加えて、本組換えダイズは除草剤ジカンバに対して耐性を有するが、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下において、ジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。このことから、仮に本組換えダイズとツルマメの雑種が形成され、その雑種に改変 DMO 蛋白質によってジカンバ耐性を付与されたとしても、形成された雑種の競合性がツルマメより高まるとは考えにくく、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子が、ツルマメ集団中に遺伝子浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

以上をまとめると、本組換えダイズとツルマメは、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合うような特殊な条件であっても交雑率は極めて低いと推定される。また、本組換えダイズは限定された環境で一定の作業要領を備

えた隔離ほ場での使用であるため、交雑する可能性はさらに低くなると考えられる。さらに、仮に交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子が、ツルマメ集団中へ浸透していく可能性も極めて低いと考えられた。したがって、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことと、本組換えダイズは限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内で使用されることから、本組換えダイズは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

#### 4 その他の性質

15

—

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

5 競合における優位性；ダイズは弥生時代からわが国で栽培されていると考えられており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。本組換えダイズと対照の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（形態及び生育の特性、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率、休眠性）を比較検討した結果、統計処理を行った項目では3カ所の試験のうち1カ所で主茎長及び収量について有意差が認められたがその他の項目では有意差は認められなかった。また、統計処理を行わなかった項目については、違いは認められなかった。主茎長については、10 3カ所中1カ所のほ場で統計学的有意差が認められたが、その他の2カ所のほ場では統計学的有意差が認められず、またこの差異によって本組換えダイズの競合における優位性が高まるとは考えにくい。また、収量については、15 3カ所中1カ所のほ場で統計学的有意差が認められたものの、このほ場で参考として供試された従来商業品種8品種の平均値の範囲内に収まっていた。よってこれらの統計学的有意差が競合における優位性を高めるものではないと判断された。

本組換えダイズには、改変 DMO 蛋白質の発現によるジカンバ耐性が付与されているが、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下において、ジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

したがって、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性；ダイズに関して、これまでに有害物質の産生は報告されていない。米国の温室で行われた鋤込み試験及び後作試験から、本組換えダイズから有害物質が産生されていないと判断された。

30 本組換えダイズ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 DMO 蛋白質が発現しているが、改変 DMO 蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、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。また、改変 DMO 蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ダイズ内在性のジカンバに構造の類似した物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

35 本組換えダイズに対し除草剤ジカンバを散布した際には、改変 DMO 蛋白質によって除草剤ジカンバが分解され、ホルムアルデヒドが生じる。しかし、本組換えダイズで除草剤ジカンバの散布によって生じるホルムアルデヒドの量は、植物

種あるいは生鮮食品(野菜・果物を含む)に含まれるホルムアルデヒドの量の範囲を超えるものではなかったことから、野生動植物等が影響を受けることは無いと考えられた。

5 したがって、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10 交雑性;交雑に起因して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特定された。従来知見よりダイズとツルマメの開花期は重なりにくく、その交雑率も低いことが知られている。また、本組換えダイズの種子の生産量(収量)、花粉形態及び花粉稔性など生殖に関わる形質の調査結果から、本組換えダイズの交雑性は従来ダイズと同様に低いと推測された。さらに、仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合であっても本組換えダイズとツルマメの雑種

15 雑種がツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

以上のことから、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為により、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

20 よって、総合的評価として、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

【社外秘につき非開示】

緊急措置計画書

平成21年8月18日

5 氏名 日本モンサント株式会社  
代表取締役社長 山根 精一郎  
住所 東京都中央区銀座四丁目10番10号

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ耐性ダイズ(改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87708, OECD UI : MON-87708-9) (以下「本組換え体」という。)の法的に認められた範囲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根拠に基づき立証された場合、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は以下に示すとおりである。

平成21年8月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目10番10号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

20 \* : 管理責任者

25

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

## 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

10

実験従事者に直接口頭で伝える。

## 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

具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

20

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。

モニタリング計画書

平成 21 年 8 月 18 日

5

氏名 日本モンサント株式会社  
代表取締役社長 山根 精一郎

住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

1. 実施体制及び責任者

10

現時点での実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

平成 21 年 8 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

15 \* : 管理責任者

2. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

名称 ツルマメ(*Glycine soja*)

20

3. モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の

生息又は生育状況

隔離ほ場周辺 10m<sup>注)</sup>の範囲内においてモニタリングを実施する。

- 5 なお、2009年6月の時点で隔離ほ場周辺75mの範囲（民家の敷地内を除く）でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

注)農林水産省 第1種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(平成16年2月24日、平成20年7月31日改正)

10 4. モニタリングの期間

本組換えダイズの栽培期間中とする。

15 5. 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

15

1) 本組換えダイズの栽培期間中に、隔離ほ場周辺10m以内にツルマメが生育しているかどうかを確認する。

20

2) 隔離ほ場周辺10m以内にツルマメが生育しており秋に種子をつけていた場合には、位置情報を記録するとともに、秋にツルマメ1集団当たり最低50粒の種子をサンプリングする。

25

3) 1)により、ツルマメの生育が認められない場合には、隔離ほ場から75mの範囲内で調査可能な範囲において最もほ場に近しいツルマメの集団について、2)と同様の作業を行う。なお、隔離ほ場75m以内の土地は水田・畑・道路・用水路・民家等として利用されている。隔離ほ場周辺の利用状況を示す地図を別添1<sup>#</sup>として、また隔離ほ場の位置を示す地図を別添2<sup>#</sup>として添付した。2009年6月の時点で隔離ほ場周辺75mの範囲（民家の敷地内を除く）でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

30

収集されたツルマメ種子に改変 *dmo* 遺伝子が移行しているかどうかを1粒ごとに検定する。検定方法は収集されたサンプルの量等を考慮して適宜決定する。

35 6. モニタリングの結果の解析の方法

35

交雑検定の結果を基に、ダイズからツルマメへの距離に依存した自然交雑の有無・頻度を解析する。

## 7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

- 5 本組換えダイズの第一種使用規程(食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)の申請時の最終試験報告書中にモニタリング結果を記載し、報告する。なお、【以下社外秘】

## 8. その他必要な事項

- 10 モニタリングの期間中に採取されたツルマメから改変 *dmo* 遺伝子が検出される等、当該遺伝子のツルマメへの移行が認められ、若しくはその疑いがある場合にあつては、農林水産省及び環境省とモニタリングの期間等について協議を行うものとする。

#別添 1、別添 2 については個人情報等を含む為、社外秘