

除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ
(改変 *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS44406, OECD UI :
DAS-44406-6) 申請書等の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理学的及び生態学的特性	2
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1) 供与核酸に関する情報	5
(2) ベクターに関する情報	14
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	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	18
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	20
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	20
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	23
(1) 使用等の内容	23
(2) 使用等の方法	23
(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	24
(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	24
(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	24
(6) 国外における使用等に関する情報	24
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	25
1 競合における優位性	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	25
(2) 影響の具体的内容の評価	26
(3) 影響の生じやすさの評価	26
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	26
2 有害物質の産生性	26
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26
(2) 影響の具体的内容の評価	28
(3) 影響の生じやすさの評価	29
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	29
3 交雑性	29
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29

(2) 影響の具体的内容の評価.....	29
(3) 影響の生じやすさの評価.....	29
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	31
4 その他の性質.....	31
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	32
参 考 文 献.....	34
緊 急 措 置 計 画 書.....	40
添付資料リスト.....	42

第一種使用規程承認申請書

平成 25年 11月 28日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
申請者 代表取締役 栗田 道郎 印
住所 東京都品川区東品川二丁目2番24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、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 <i>aad-12, 2mepsps, pat, Glycine max (L.) Merr.</i>) (DAS44406, OECD UI : DAS-44406-6)
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	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

5 ① 和名、英名及び学名

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

10 ② 宿主の品種名又は系統名

宿主には、米国において中生から晩生のダイズ品種である **Maverick** を用いた。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

15 自然環境において、ダイズが自生している地域は、国内及び国外ともに知られていない。

なお、近縁野生種であるツルマメ (*Glycine soja*) は、中国、朝鮮半島、台湾、旧ソ連邦及び我が国において広く分布している (OECD, 2000)。我が国においては、北海道、本州、四国、九州に分布し、野原や荒地などに自生している (沼田ら, 1978)。

20

(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

25 ダイズは紀元前 17 世紀から紀元前 11 世紀の間に中国において栽培化されたことが示唆されている (OECD, 2000)。野生種であるツルマメが、中国大陸の東北部、長江(揚子江)流域、雲南などでみられるため、中国が起源地としてあげられている。日本には、弥生時代に伝来したといわれ、古事記の記載によると、1300 年前にはすでに各地で栽培されていた (鄭, 2008)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

30 我が国において、ダイズは全国的に栽培可能であるが、主に北海道、東北、九州で栽培されており、2012 年における栽培面積は約 14 万 ha である (FAO, 2013)。また、2012 年における世界総栽培面積は約 1 億 663 万 ha であり、世界的には米国 (約 3,080 万 ha)、ブラジル (約 2,494 万 ha)、アルゼンチン (約 1,935 万 ha)、インド (約 1,080 万 ha) 等を中心に、広い範囲で栽培されている (FAO, 35 2013)。

我が国のダイズ栽培における播種適期は、地域や品種によって異なり、北海道・東北では5月下旬、関東・北陸・近畿では6月上旬、中国・四国・九州では6月下旬から7月上旬である。播種深度は3~5 cmがよく、播種量は畝間70 cm、株間20 cmで点播の場合1株2~3粒播き、最終的な苗立ち密度を1 m² 5 当たり15本程度確保できればよい。播種前の耕うんと播種と同時に除草剤を散布することで大部分の雑草を抑制できるが、中耕作業を2回程度行うことは効果的である。中耕は除草のほか、土壌物理性の改善効果もある。また、不定根発生の促進や倒伏防止のために中耕と同時に培土(土寄せ)することが必要である。病虫害防除のために早めに適切な薬剤を散布する。収穫は小面積の場合は、10 地上部を手で刈り、束ねてほ場に立てて天日乾燥した後に脱穀する。大面積の場合は、機械による収穫が一般的である。ビーンハーベスタ、あるいは改良したコンバインによって刈取りと脱穀が一斉に行われる(鄭, 2008)。

ダイズの2012年における世界総生産量は約2億5,314万トンであり、主な生産国は米国(約8,205万トン)、ブラジル(約6,570万トン)、アルゼンチン(約15 5,150万トン)、中国(約1,280万トン)である。一方、日本における2012年の生産量は約24万トンである(FAO, 2013)。我が国は2012年に約273万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の64.5%にあたる約176万トンが米国からの輸入である(財務省, 2013)。

ダイズは、世界的にみればその9割以上が食用油と家畜の飼料として利用さ20 れている。しかし、我が国も含めアジアでは古くから食品素材として盛んに利用されている。主な加工利用法は、豆腐、醤油、納豆、味噌、煮豆、炒り豆、きなこ、もやしなどである。また、工業分野では、インク(ソイインク)や接着剤として広く利用されている(鄭, 2008)。

25 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは、一年生の双子葉植物である。ダイズの品種は早晚性により、極早生、早生、中生、晩生、極晩生などの各品種群に分けられる。我が国では播種から開花までの長短(I~V)と、開花から成熟までの長短(a, b, c)の組合せによ30 って9グループに詳しく分けられている。また、茎の成長習性の違いによって有限伸育型と無限伸育型に分けることができる。ダイズの種子は球形からやや扁楕円形で、胚と種皮からなる無胚乳種子であり、胚は幼根と子葉からなる。幼根が伸長して種皮を突き破り発芽する。発芽後下胚軸が伸長し、子葉を地上に押し上げて出芽する。出芽後、子葉の上位節に初生葉とよばれる2枚の単葉が対を35 なす。初生葉の上位節以降の各節には、ダイズ本来の3小葉からなる複葉が展開する。主茎は、葉数の増加とともに節間を伸長させて成長し、主茎が本葉を4~5枚出した頃、第1本葉の葉腋から分枝が発生し、主茎と同様に葉を増やして伸長する。発芽後、幼根は土中へ深く伸長して主根となり、二次根である側根を

発生する。側根は主根と一定の角度をなして伸長し、さらに三次根である二次側根を発生する。根の周辺に根粒菌が存在すると、根粒菌は根毛から侵入して根の皮層細胞に感染し、根粒が形成され、根粒菌が空気中の窒素ガス(N₂)を還元し、植物が利用可能なウレイド態窒素に変換して宿主植物に供給する。花は主茎、分枝の各葉腋に着生し、基部ががくに包まれ、1枚の旗弁、2枚の翼弁及び2枚の竜骨弁からなる。雌ずいと雄ずいはいずれも竜骨弁に包まれ露出しない。午前中に開花し、花粉は開花直前に葯から放たれるため自家受粉する。開花・受精の7日(早生品種)~14日(晩生品種)目頃から莢が伸長し始め、約10日間で最大(長さ4~6 cm)に達する。その後、子実の肥大が急速に生じ、30~45日目には子実の乾物重が最大に達する(鄭, 2008)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズの種子は土壌温度が 10℃に達すると発芽し、好適条件下では 5~7 日後に出芽する(OECD, 2000)。ダイズ栽培に適する土壌は、pH5.5~6.5、排水及び通気の良い埴土あるいは壤土である。ダイズでは乾物 1 g を生産するのに必要な水の量は約 600 g であり、特に乾物蓄積が最も多い開花期から約 1 ヶ月後までの間は最も水分を必要とする(鄭, 2008)。また、ダイズは霜に対して耐性がなく、冬季の氷点下になるような条件では生き残ることができない。ダイズの種子が休眠性を示すことはほとんどなく、雑草化の特性もない(OECD, 2000)。

なお、ダイズは短日条件でよく開花するため、栽培品種の適地を決定する際には、光周性及び温度応答が重要である。ダイズの栽培品種は、緯度と日照時間によって決定され、北米には、北部(北緯 45 度)の成熟群(MG)000 から赤道付近の成熟群(MG) X まで、13 の成熟群(MG)があり(OECD, 2000)、遺伝子導入に用いた宿主である Maverick は、米国において、成熟群(MG) III に分類されている(Sleper *et al.*, 1998)。

ハ 捕食性又は寄生性

30 ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズは、1 個体で最大 400 の莢を形成し、各節の莢数は 2~20 である。各莢には 1~5 個の種子が入っている。莢は成熟後、乾燥状態におくと、背軸面で裂開して種子が飛散する。また、一般的に米国の品種は裂莢しにくい。ダイズ種子にはほとんど休眠性がなく、まれに越年した種子が翌年に発芽することがあるが、その場合も十分に育つことはない(OECD, 2000)。種子の発芽力は、通常の貯蔵条件下では 2 年後にほとんど失われる(古谷, 1977)。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官か

らの出芽特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、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を有さない。

- 5 ③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

ダイズは自家受粉率が高い自殖性植物であり、他家受粉率は通常1%未満である(OECD, 2000)。自家不和合性は知られていない。ダイズの近縁野生種としてはツルマメがあり、中国、朝鮮半島、台湾、旧ソ連邦及び我が国において広く
10 分布している。ツルマメはツル性の一年生植物であり、野原や荒地などに自生しており(沼田ら, 1978)、ツルマメ集団内における自然交雑率は平均2.2%であったことが報告されている(Kuroda *et al.*, 2008)。一方、秋田県雄物川沿いのツルマメ集団では、自然交雑率が平均13%と比較的高いものであったことが報告
15 されている。この地域は護岸工事や人為的介入がなされておらず、ツルマメ集団の規模が大きく、訪花昆虫であるミツバチやクマバチが頻繁に観察されていた。このように、このツルマメ集団の周辺環境は、自然交雑が通常よりも起こりやすいものであったと考えられる(Fujita *et al.*, 1997)。

ダイズとツルマメは染色体数($2n=40$)が同じであり、交雑が可能である(OECD, 2000)。一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、それぞれの開花期
20 間重なりにくい、他のダイズ品種と比べて開花期が遅い我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメそれぞれ30個体を30cm間隔で交互に配置した条件下での平均交雑率は0.73%(686個体中5個体)であったと報告されている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、2005年に、除草剤耐性遺伝子組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で、開花期の一部が重複した条件下での
25 交雑率を調べた研究では、検定種子32,502個体中、開花最盛期が最も近かった組合せのツルマメ11,860個体の中から交雑個体が1個体見つかったと報告されている(Mizuguti *et al.*, 2009)。2007年に、より開花期の遅い組換えダイズ2品種(AG6702RR及びAG5905RR)を用い、開花ピークをより近づけ、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、25,741個体中、交雑個
30 体はAG6702RRでは25個体(交雑率0.097%)、AG5905RRでは10個体(交雑率0.039%)であった。さらに、組換えダイズ(AG6702RR及びAG5905RR)から2、4、6、8及び10m離してツルマメを栽培した場合は、2mの距離での交雑個体は7,521個体中1個体、4mの距離での交雑個体は7,485個体中1個体及び6mの距離での交雑個体は14,952個体中1個体であった。また、8m及び
35 10mの距離において、それぞれ14,964個体及び21,749個体を調査したが、交雑個体は得られなかった(Mizuguti *et al.*, 2010)。

また、ダイズにはアポミクシスを生ずる特性を有するという報告はない。

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

40 ダイズの1花当たりの花粉の生産量は平均3,600粒前後であり(Chiang and

Kiang, 1987)、花粉の寿命は数時間である。受精可能な期間は、開花 1 日前から開花後 2 日程度で同じ花の中で受粉する (OECD, 2000)。2001 年～2004 年に独立行政法人農業環境技術研究所で行われた花粉の飛散距離と交雑率に関する研究では、最も高い交雑率は花粉源から 0.7 m で 0.19 % であり (2001 年)、10.5 m 離れると交雑率は 0 % であった。さらに、開花期間中に畝間に飛散した花粉量は、平均 0.18 粒/cm²/日であり風媒による交雑は少ないものと示唆されている。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、カメムシ目の昆虫が観察されたと報告されている (Yoshimura *et al.*, 2006)。

10 ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

ダイズには、自然条件下で周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

20 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS44406, OECD UI : DAS-44406-6) (以下「本組換えダイズ」という。) の作出に用いられた供与核酸の構成とその由来は、表 1 (p.5～7) のとおりである。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>RB7 MAR</i>	1166	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来の核マトリックス結合領域 (Hall <i>et al.</i> , 1991)。遺伝子の発現を安定させる。
<i>2mepsps</i> カセット		
<i>Histone H4A748 3' UTR</i>	661	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来のヒストン H4A748 遺伝子の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子の転写を終結する。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能(続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>2mepsps</i>	1338	トウモロコシ(<i>Zea 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 2 カ所の点突然変異を起こした遺伝子で、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)を発現する。発現する 2mEPSPS 蛋白質のアミノ酸配列に関しては、102 番目のトレオニンがイソロイシンに、106 番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している(Lebrun <i>et al.</i> , 1996 ; Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
<i>TPotp C</i>	372	トウモロコシ及びヒマワリ(<i>Helianthus annuus</i>)のリブローズ-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO)由来の葉緑体輸送ペプチドの翻訳領域をもとに作製された。細胞質において合成された 2mEPSPS 蛋白質の葉緑体への輸送のため、 <i>2mepsps</i> 遺伝子に連結されている(Lebrun <i>et al.</i> , 1996 ; Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
<i>Histone H4A748 promoter</i>	1430	シロイヌナズナ由来のプロモーター。ヒストン H4A748 遺伝子の 5'末端非翻訳領域及びヒストン H3 遺伝子のイントロン部位を含む(Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i> カセット		
<i>AtUbi10 promoter</i>	1322	シロイヌナズナ由来のポリユビキチン10(UBQ10) 遺伝子のプロモーター。5'末端非翻訳領域及びイントロンを含む(Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i>	882	グラム陰性桿菌である <i>Delftia acidovorans</i> 由来のアリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変アリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼ(Aryloxyalkanoate Dioxygenase、以下「改変 AAD-12 蛋白質」という。)を発現させる。発現する改変 AAD-12 蛋白質のアミノ酸配列に関しては、クローニングサイト導入のため、2 番目にアラニンが追加されている(Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23 3' UTR</i>	457	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3'末端非翻訳領域(Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
<i>pat</i> カセット		
<i>CsVMV promoter</i>	517	キャッサバベインモザイクウイルス(Cassava vein mosaic virus)由来のプロモーター。5'末端非翻訳領域を含む(Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子を植物体全体で発現させる。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能(続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>pat</i>	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT 蛋白質を発現させる。発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列に関しては改変されていない(Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
<i>AtuORF1 3' UTR</i>	704	アグロバクテリウム(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)のプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'末端非翻訳領域(Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列(Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外骨格領域		
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列(Barker <i>et al.</i> , 1983)。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列(Barker <i>et al.</i> , 1983)。
<i>Ori Rep</i>	1020	広域宿主プラスミド RK2 の複製開始点に由来する配列(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
<i>trfA</i>	1149	広域宿主プラスミド RK2 に由来する配列。プラスミドの複製に必要な複製開始蛋白質をコードする(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
<i>SpecR</i>	789	<i>E. coli</i> の <i>SpecR</i> 遺伝子に由来する配列。スペクチノマイシン耐性を付与する(Fling <i>et al.</i> , 1985)。
T-DNA Border B	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列(Barker <i>et al.</i> , 1983)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

5 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

挿入遺伝子の各要素の機能を表 1(p.5~7)に示した。

供与核酸には、核マトリックス結合領域である *RB7 MAR* 配列が含まれる。

10 核マトリックス結合領域はゲノム DNA 配列に頻繁に見られる領域で、DNA のループ構造形成のために、核マトリックスに DNA を付着させる役割をしていると考えられている。核マトリックス結合領域が導入遺伝子の近傍に隣接していると、ジーンサイレンシングを減少させることで遺伝子の発現を安定させるこ

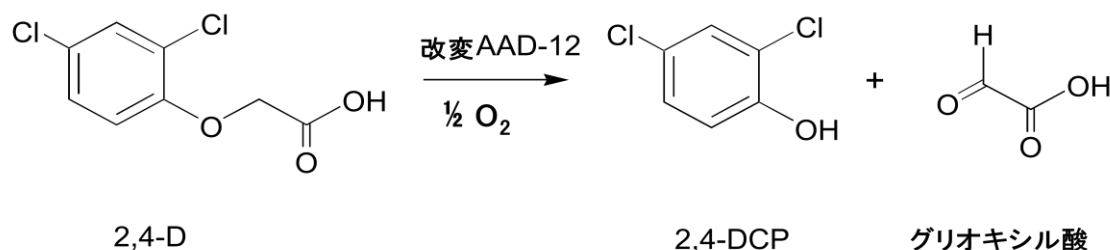
とが報告されている (Allen *et al.*, 2000)。なお、核マトリックス結合領域は導入遺伝子の発現を高めることも報告されているが (Halweg *et al.*, 2005)、内在性遺伝子の発現に影響しないことや (Chattopadhyay *et al.*, 1998)、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことが報告されている (Fukuda and Nishikawa, 2003)。

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

10 改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。

本組換えダイズにおいては、改変 AAD-12 蛋白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない化合物に変換することで、除草剤耐性を示す (Wright *et al.*, 2007)。例えば、改変 AAD-12 蛋白質は除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換する (図 1、p.8)。なお、改変 AAD-12 蛋白質の基質となる除草剤を添付資料 1 に示した。

20 改変 AAD-12 蛋白質が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース (FARRP Allergen Database version 13、2013) を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。



25

図 1 改変 AAD-12 蛋白質の作用機作

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase、以下「EPSPS 蛋白質」という。)は、植物及び微生物において、芳香族アミノ酸、ビタミン、および多くの二次代謝産物の生合成に関与している。植物において、EPSPS 蛋白質は色素体内に局在しており、ホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸を縮合して 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸を生成させる。この反応は芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路における反応の 1 つであり、ホスホエノールピルビン酸に対する

35

EPSPS 蛋白質の可逆的競合阻害剤である除草剤グリホサートにより阻害されることがよく知られている。すなわち、グリホサート散布された植物は芳香族アミノ酸の生合成が阻害され、結果としてタンパク質合成が妨げられるために枯死する。なお、この酵素は、その基質であるホスホエノールピルビン酸及び

5 3-ホスホシキミ酸に対して高い特異性がある(OECD, 1999a)。

本組換えダイズには、トウモロコシの EPSPS 蛋白質をコードする *epsps* 遺伝子に 2 ヶ所の点突然変異を引き起こした *2mepsps* 遺伝子が導入されている。*2mepsps* 遺伝子が産生する 2mEPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は、野生型の EPSPS 蛋白質のアミノ酸の 102 番目のトレオニンがイソロイシンに、また 106

10 番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している。これにより、2mEPSPS 蛋白質はグリホサートに対して非感受性となり、グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、グリホサートの存在下でも生育することができる(Lebrun *et al.*, 2003)。

2mEPSPS 蛋白質が既知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アレルゲン・データベース(FARRP Allergen Database version 13、2013)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ
(Phosphinothricin Acetyltransferase、以下「PAT 蛋白質」という。)は、グルホシネートの L 型異性体を、植物への毒性がない安定した化合物である *N*-アセチル-L-グルホシネート(2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコ-ブタン酸)に迅速に変換する。

グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量のアンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、*N*-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないため、PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え植物ではアンモニアの影響を受けず、

30 除草剤グルホシネートへの耐性を示す(OECD, 2002)。

PAT 蛋白質が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース(FARRP Allergen Database version 13、2013)を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

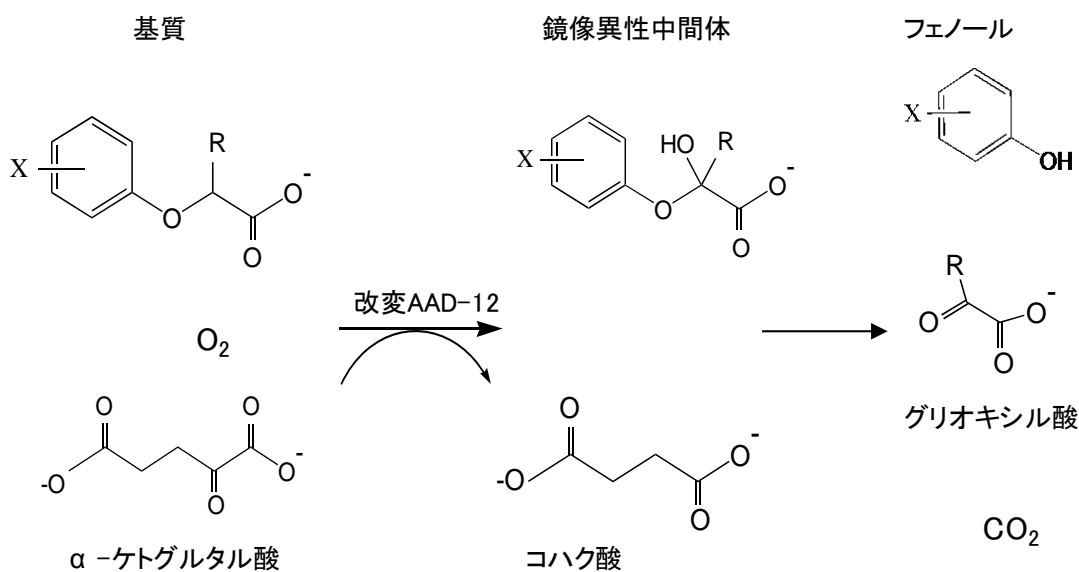
35 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 AAD-12 蛋白質】

改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。

40 改変 AAD-12 蛋白質が基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタル

酸が存在すると、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される(図 2、p.10)。



5

図 2 α -ケトグルタル酸存在下での改変 AAD-12 蛋白質の酵素反応
(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

そこで、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に類似した植物体中に存在する化合物が改変 AAD-12 蛋白質の基質になり得るかどうかを、 α -ケトグルタル酸を添加した改変 AAD-12 蛋白質の反応実験においてコハク酸測定を行い、コハク酸の生成により確認した。コハク酸測定では、図 3 に示したようにサクシニル CoA シンテターゼ、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼを用いた反応系において、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化により生成する酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 量を 340 nm の吸光度で測定することにより、コハク酸の生成量に換算した (Luo *et al.*, 2006 ; 図 3、p.11)。

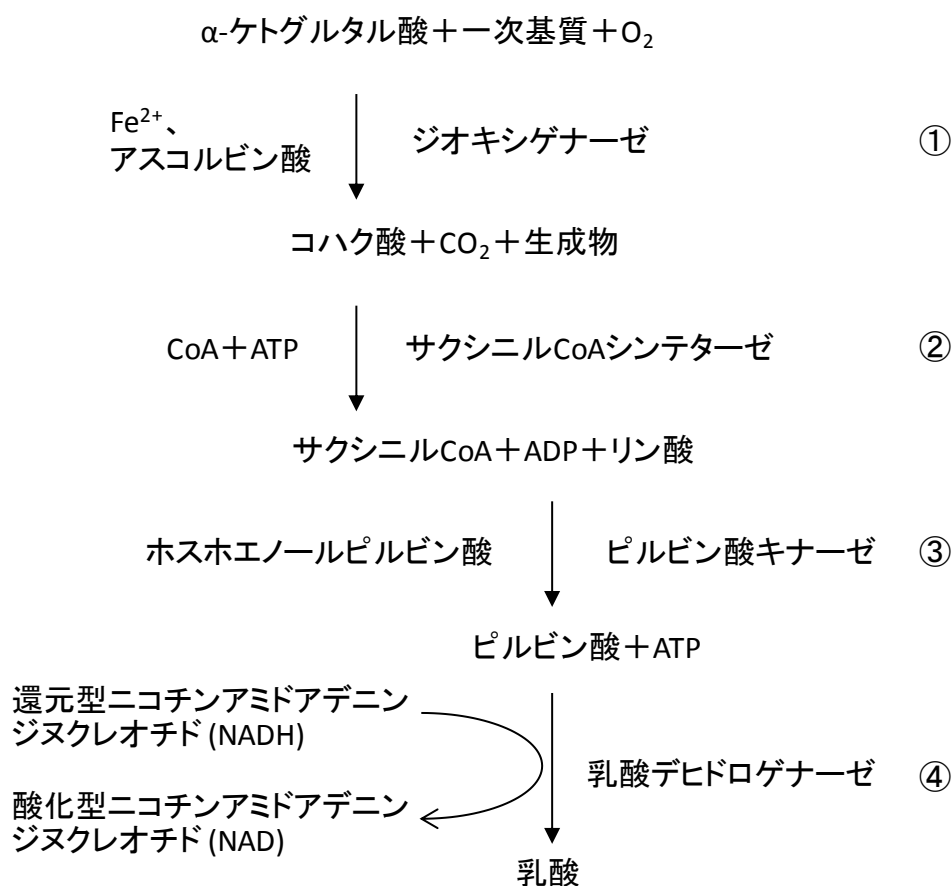


図 3 コハク酸測定の実験経路 (Luo *et al.*, 2006 の Scheme 1 を改編)

- ①ジオキシゲナーゼが基質に酸素を導入する反応において、α-ケトグルタル酸はコハク酸に変換される。
- 5 ②補酵素 A (CoA) 及びアデノシン-5-三リン酸 (ATP) の存在下で、コハク酸は、サクシニル CoA シンテターゼによりサクシニル CoA に変換され、同時に、アデノシン-5'-二リン酸 (ADP) 及びリン酸が生成される。
- ③ピルビン酸キナーゼにより、ホスホエノールピルビン酸と ADP から、ピルビン酸と ATP が生成される。
- 10 ④還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の存在下で、ピルビン酸が乳酸デヒドロゲナーゼによって乳酸に変換され、同時に NAD が生成される。この反応で生成された NAD 量は量的にコハク酸量に等しいと考えられる。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

- 15 アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に類似した植物体中に存在する化合物として、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸 (GA3)、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸、フェニルプロパノイド中間体であるトランス桂皮酸、クマル酸、シナピン酸及び
- 20 種類の L-アミノ酸をコハク酸測定に用いた。

- 20 種類の L-アミノ酸については、1μM の改変 AAD-12 蛋白質の濃度におい

てコハク酸の生成が認められなかったため、改変 AAD-12 蛋白質は 20 種類の L-アミノ酸とは反応しないと考えられた(添付資料 2、Table1、p.18)。一方、10 μ M の改変 AAD-12 蛋白質を植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体に作用させた結果、インドール-3-酢酸、クマル酸、トランス桂皮酸及びシナピン酸において、コハク酸の生成が認められた(添付資料 2、Table4、p.21)。コハク酸測定では、基質の酸化を経なくともコハク酸生成物を誘発する脱共役反応(uncoupling)が起こる可能性がある(Hausinger, 2004)。したがって、コハク酸測定において反応が認められた化合物が実際に酸化されているか否かを確認するために、フーリエ変換質量分析(FT/MS)による一次酸化物の測定を行った。その結果、10 μ M の改変 AAD-12 蛋白質を作用させた場合に、トランス桂皮酸とインドール-3-酢酸の酸化物のみが検出された(添付資料 2、Figure2 及び Figure3、p.24 及び p.25)。

そこで、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸、また、対照として、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物で 2,4-D と類似の化学構造をもつ *S*-ジクロロプロップ*についてコハク酸測定による改変 AAD-12 蛋白質の触媒効率を検討した。その結果、トランス桂皮酸、インドール-3-酢酸及び *S*-ジクロロプロップについての触媒効率 K_{cat}/K_m は、それぞれ 156.7 M⁻¹s⁻¹、8.2 M⁻¹s⁻¹ 及び 30,175 M⁻¹s⁻¹ であった(添付資料 2、Table5、p.22)。トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は、*S*-ジクロロプロップについての K_{cat}/K_m に対してそれぞれ 0.52 % 及び 0.027 % であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率は *S*-ジクロロプロップと比較して非常に低い値であることが示された。なお、改変 AAD-12 蛋白質の 2,4-D についての K_{cat}/K_m は 18,600 M⁻¹s⁻¹ であることが報告されており(Wright *et al.*, 2010)、改変 AAD-12 蛋白質の 2,4-D 及び *S*-ジクロロプロップについての触媒効率は同等であることから、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率は 2,4-D と比較して非常に低い値であると考えられる。

さらに、シロイヌナズナの桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ(Cinnamate-4-hydroxylase)の *in vitro* におけるトランス桂皮酸についての K_{cat}/K_m は 3.4×10^6 M⁻¹s⁻¹ であることが報告されている(Chen *et al.*, 2007)。また、イネのインドール-3-酢酸アミドシンセターゼ(IAA amido synthetase)の *in vitro* におけるインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は 2.75×10^3 M⁻¹s⁻¹ であると報告されている(Chen *et al.*, 2009)。このように桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ及びインドール-3-酢酸アミドシンセターゼの触媒効率はいずれも高い値であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸は、植物体内の既存の代謝経路において効率的かつ特異的に利用されているものと考えられる。一方、改変 AAD-12 蛋白質のトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値は桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼのトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.005 % である。また、改変 AAD-12 蛋白質のインドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値はインドール-3-酢酸アミドシンセターゼのイ

* 光学異性である除草剤ジクロロプロップの S 体の化合物。除草活性をもつのは R 体のみであるため、*S*-ジクロロプロップは除草活性をもたない。

インドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.3 % であり、改変 AAD-12 蛋白質の K_{cat}/K_m 値はいずれも非常に低い値である。

5 以上より、改変 AAD-12 蛋白質はトランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-12 蛋白質は、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10 除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} (半数致死濃度) は淡水魚で 1.7 mg/L、オオミジンコ (*Daphnia magna*) で 1.4 mg/L であり、ウキクサの EC_{50} (半数影響濃度) が 1.5 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC (無影響濃度) が 0.14 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21 mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC_{50} が 125 mg/kg、オオフォルソムトビムシ

15 (*Folsomia candida*) の EC_{10} (10% 影響濃度) が 0.7 mg/kg である (OECD, 2006)。一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} は淡水魚で 0.26 mg/L、オオミジンコで 2.2 mg/L であり、ウキクサの EC_{50} が 0.2992 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20 mg/L である (EPA, 2004)。

20 このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

なお、本組換えダイズと同様にアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を有するダイズ系統 (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4) (以下「ダイズ 68416 系統」という。) に適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、最大平均残留量は 0.047 mg/kg であった (添付資料 3、Table2、p.26)。2,4-DCP のマウスにおける急性毒性試験の LD_{50} (半数致死量) は 1,276 ~ 1,352 mg/kg 体重、ラットにおける慢性毒性 (2 年間) 試験の NOAEL (無毒性量) は、雄で 440 mg/kg 体重/日、雌で >250 mg/kg 体重/日であり (OECD, 2006)、ダイズ 68416 系統における 2,4-DCP の残留量を大きく上回っていることから、ダイズ 68416 系統と同様にアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を有する本組換えダイズの輸入種子が野生動植物に影響を及ぼす

35

【2mEPSPS 蛋白質】

EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸及びシキミ酸-3-リン酸と特異的に反応する酵素で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路における律速酵素ではないと示唆されており (Weiss and Edwards, 1980 ; Herrmann, 1983)、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も、最

40

終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている (Smart *et al.*, 1985)。また、これらの基質以外にシキミ酸が EPSPS 蛋白質と反応することが知られているが、その反応性はシキミ酸-3-リン酸との反応性の約 200 万分の 1 であり、生体内で基質として反応する可能性は極めて低い (Gruys *et al.*, 1992)。

一方、2mEPSPS 蛋白質と同等のアミノ酸変化である 97 番目のトレオニンがイソロイシンに、また 101 番目のプロリンがセリンに変化した大腸菌 (*E. coli*) の変異型 EPSPS 蛋白質では、野生型の EPSPS 蛋白質と同様にホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸に対して高い親和性を示したことが報告されている (Funke *et al.*, 2009)。また、2mEPSPS 蛋白質は、除草剤グリホサートに非感受性である以外は、構造的にも機能的にも EPSPS 蛋白質と類似しており、同一の作用機作をもつ (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009)。したがって、2mEPSPS 蛋白質は EPSPS 蛋白質と同様に基質特異性が高く、他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

15

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない (OECD, 1999b)。また、L-アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PAT 蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応が影響を受けることはない (OECD, 1999b)。したがって、PAT 蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

除草剤グルホシネートの代謝産物である N-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性 (急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性) はグルホシネートより低いことが確認されており (食品安全委員会, 2010)、グルホシネートが散布された場合における N-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。なお、N-アセチル-L-グルホシネートは、ダイズの残留基準値の対象化合物に含まれている。

30

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

導入した pDAB8264 のもととなったベクター pDAB2407 は、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) と大腸菌 (*E. coli*) に由来する。

35

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

発現ベクター pDAB8264 の塩基数は 16,018 bp である。pDAB8264 の塩基配

列は添付資料4に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

5 発現ベクターpDAB8264はスペクチノマイシン耐性を付与する *SpecR* 遺伝子を有する。*SpecR* 遺伝子は、発現ベクターpDAB8264を構築する際の選抜マーカーとして利用したが、T-DNA領域の外側に位置するため、本組換えダイズに *SpecR* 遺伝子は導入されていない。

10 なお、本組換えダイズ中における *SpecR* 遺伝子の存在の有無をサザンブロット分析により確認した結果、*SpecR* 遺伝子は存在していないことが確認された(添付資料5、表2、p.7)。

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

15 発現ベクターpDAB8264のもととなったベクターのT-DNA領域は、表1(p.5~7)に示した供与核酸に置き換えられており、アグロバクテリウムの感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

20 発現ベクターpDAB8264の構成図を図4(p.17)に示した。また、発現ベクターpDAB8264の作成過程を添付資料6に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

25 核酸の宿主への導入はアグロバクテリウム法により行った。

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択の方法

30 アグロバクテリウム感染後の培養組織から形成された不定芽及びシュートを、除草剤グルホシネートを含む培地で培養することにより選抜した。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無

35 本組換えダイズにアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、T0及びT1世代においてPCR法を用いて外骨格領域が検出されないことにより確認した。

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

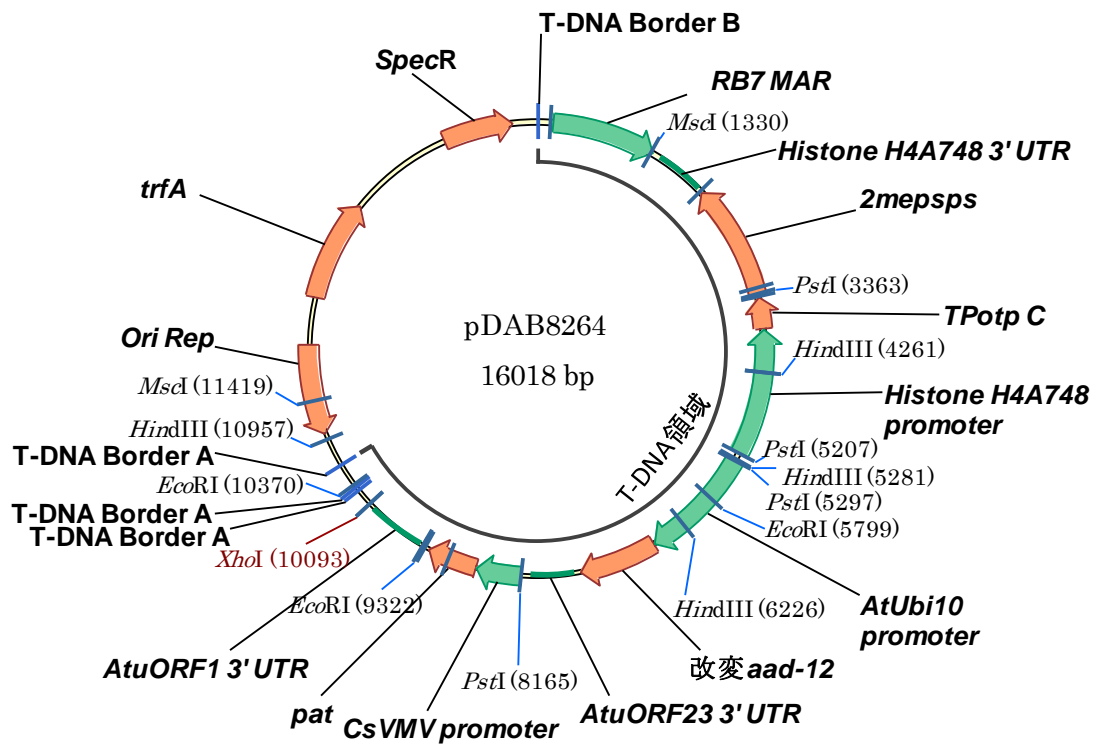
再分化した植物体にグルホシネートを塗布することにより耐性を有する個体を選抜した。選抜された植物体については、内部標準を用いた定量PCR法による改変*aad-12*遺伝子、*2mepsps*遺伝子及び*pat*遺伝子のコピー数の解析を行い、
5 1コピーの導入遺伝子をもつ植物体を選抜した (T0世代及びT1世代)。さらに、米国の野外ほ場において、後代系統 (T2世代以降) においてPCR法による改変*aad-12*遺伝子、*2mepsps*遺伝子及び*pat*遺伝子の存在確認並びにサザンブロット分析による改変*aad-12*カセット、*2mepsps*カセット、*pat*カセット及び*RB7 MAR*配列のコピー数の解析を行った。これらの結果及び改変AAD-12蛋白質、
10 2mEPSPS蛋白質及びPAT蛋白質発現の確認、除草剤耐性及び農業形質から総合的に判断し、本組換えダイズを選抜した。申請の範囲はT2世代以降の後代系統である。育成の詳細を図5 (p.18) に示す。

本組換えダイズの我が国における認可、申請の状況は次のとおりである (2013
15 年 12 月現在)。

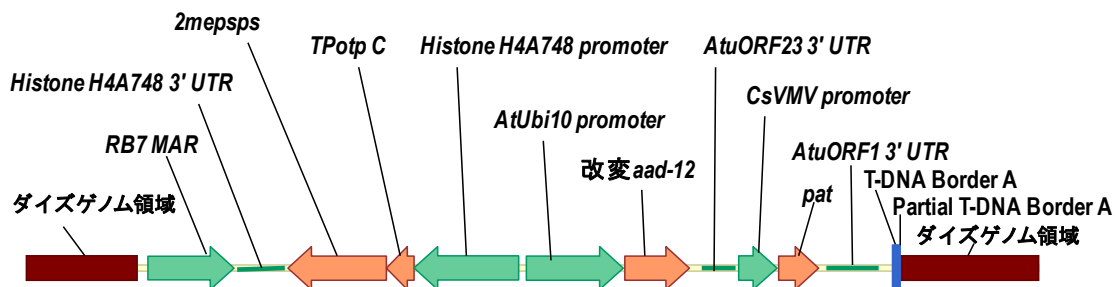
2011 年 9 月 農林水産省及び環境省より「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく第一種使用規程 (隔離ほ場試験) の承認を得た (使用期間 : 2011 年 9 月 2
20 日から 2013 年 3 月 31 日まで)。

2014 年 厚生労働省に「食品衛生法」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行う予定である。

2014 年 農林水産省に「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行う予定で
25 ある。



5



10

図 4 発現ベクターpDAB8264 の構成図(上段)及び T-DNA 領域の挿入概要図(下段)

※上段図の()内の数字は、T-DNA Border B を起点としたプラスミド上の制限酵素切断位置を示す。

15

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

図 5 本組換えダイズの育成図

5

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入した核酸の複製物が存在する場所

10 移入した核酸は、いったん植物染色体に組み込まれると、メンデル遺伝の法則に従う。本組換えダイズに導入された形質が、F2 世代(図 5、p.18)の集団でどのような分離を示すかを分析した(2011 年、米国インディアナ州)。T2 世代の系統に非組換えダイズを交配して得られた F1 世代 1 個体を自家受粉し、F2 集団における PAT 蛋白質の発現の有無をラテラルフローストリップ法[†]により調べた。また、本組換えダイズに特異的なプライマーを用いた PCR 法により移入

15 した核酸の有無を調べた。

その結果、ラテラルフローストリップ法により PAT 蛋白質が検出された個体では PCR 法で移入核酸がすべて検出された。得られた観測値は、核内遺伝子におけるメンデルの分離法則に矛盾していないことより、移入した核酸が染色体上に存在していることを確認した(表 2、p.18)。

20

表 2 本組換えダイズの F2 世代の分離比検定¹⁾

25

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

移入された核酸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を確認するため F2 世代、T2 世代、T3 世代、T4 世代及び T6 世代におけるサザンブロット分析を行った結果、本組換えダイズに導入された改変 *aad-12* カセット、*2mepsps* カセット、*pat* カセット及び *RB7MAR* 配列は 1 コピーであり、複数世代において安定して伝達されることが確認された(添付資料 5、表 2、p.5~7)。

30

また、T-DNA 領域における個々の構成要素の挿入を確認するために、宿主ゲノム境界領域を含む本組換えダイズにおける挿入遺伝子全体のクローニング及び塩基配列決定を行った。その結果、移入された核酸領域は 10,280 bp であり、

35

[†] 毛細管現象により検体がメンブレン上を移動する際、検体中の抗原と標識抗体及び捕捉抗体の三者により免疫複合体が形成され、その標識物の集積を目視で判定する方法。本試験では、本組換えダイズが発現する PAT 蛋白質について、メンブレン上の抗体で捕捉、バンドの目視によって、その発現の有無を確認した。

5'末端の近傍配列 1,494 bp 及び 3'末端の近傍配列 1,885 bp を含む合計 13,659 bp の塩基配列を決定した(添付資料7)。T-DNA Border については、T-DNA Border Bは移入されておらず、T-DNA Border Aについては一つが完全に、さらにもう一つの一部が移入されており、その他の構成要素については全て完全な形で移入されていることが明らかになった(図4下段、p.17)。一方で、挿入配列の5'末端において3 bpが新たに挿入されていること、ダイズゲノムから4,383 bpが欠失していることが明らかになった。また、導入遺伝子の挿入及びダイズゲノムの欠失による内在遺伝子及び制御領域の破壊はない事が明らかになった(添付資料7)。

10

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
染色体上に複数コピーは存在しない。

15

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

20

本組換えダイズの T5 世代及び T6 世代において、7葉期の葉における改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により調べた(2012年、米国インディアナ州)。その結果、複数世代において改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質が安定して発現していることを確認した(表3～表5、p.19)。

表3 本組換えダイズの T5 及び T6 世代での葉における改変 AAD-12 蛋白質の発現量

25

社外秘情報につき非開示

表4 本組換えダイズの T5 及び T6 世代での葉における 2mEPSPS 蛋白質の発現量

30

社外秘情報につき非開示

表5 本組換えダイズの T5 及び T6 世代での葉における PAT 蛋白質の発現量

社外秘情報につき非開示

35

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

本組換えダイズには、伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換えダイズに導入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えダイズの検出及び識別の方法として、本組換えダイズに特異的なプライマーを用いた PCR 法が開発されている。非組換えダイズに対する本組換えダイズの混入率について、本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 濃度比で 0.04% である(添付資料 8、Table 6、p.22)。なお、再現性については、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国ユーロフィン・ジーンズキャン社において、施設間互換性(inter-laboratory transferability)が確保されていることが確認されている(添付資料 8、Table 12、p.27)。

10

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズには、改変 *aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性及び除草剤グリホサートを付与された本組換えダイズを栽培することにより、栽培農家は使用する除草剤の選択肢が増えるとともに、他の除草剤に抵抗性を獲得した雑草を防除することができる。また、除草剤グルホシネート耐性は、選抜の際のマーカーとして使用した。

2012 年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで行った隔離ほ場試験において、本組換えダイズ(T7 世代)及び対照の非組換えダイズ(Maverick)の除草剤 2,4-D、除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性試験を行った。播種 17 日後(本葉 2 葉期頃)の本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各 12 個体)に 2,4-D を 1,120 g a.e.†/ha (通常使用量)を散布し、2 週間後に調査した結果、非組換えダイズは全て枯死したのに対し、本組換えダイズは全て薬害も認められず、十分な除草剤耐性を示した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2)。また、播種 17 日後(本葉 2 葉期頃)の本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各 12 個体)にグリホサートを 1,260 g a.e.†/ha (通常使用量)を散布し、2 週間後に調査した結果、非組換えダイズは全て枯死したのに対し、本組換えダイズは全て薬害も見られず、十分な除草剤耐性を示した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2)。さらに、播種 17 日後(本葉 2 葉期頃)の本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各 12 個体)にグルホシネートを 374 g a.i.†/ha (通常使用量)を散布し、2 週間後に

† 除草剤の有効成分含量は、有効成分(active ingredient ; a.i.)又は酸当量(acid equivalent ; a.e.)で表される。有効成分(a.i.)量は成分重量を示し、酸当量(a.e.)は遊離酸の量を示す。除草剤の製剤は、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んでいる。有効成分が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。2,4-D 及びグリホサートは塩基部分が異なる製剤が複数存在するため、正確な活性成分量を把握するため、酸当量を用いた。

調査した結果、非組換えダイズは全て枯死したのに対し、本組換えダイズは全て葉害も認められず、十分な除草剤耐性を示した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2)。

- 5 ② 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

2012年に、ダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、本組換えダイズ(T7世代)と対照の非組換えダイズ(Maverick)の相違を検討した。

10

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽率、発芽揃い、開花始期、開花終期、成熟期、小葉の形、毛じの多少、伸育型、主茎長、最下着莢節位高、主茎節数、分枝数、収穫期の地上部生体重、稔実莢数、一株全粒重、一株成熟粒重、百粒重及び子実の特性(大きさ、形、種皮の地色及び臍の色)について、種苗登録の基準であるダイズ栽培種に関する農林水産植物種類別審査基準(農林水産省、15 2012)の項目を参考に、本組換えダイズと非組換えダイズの比較を行った。

20

隔離ほ場において、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに播種4日後に発芽を開始した。発芽率について、本組換えダイズと非組換えダイズの間統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1、p.3)。発芽揃いについては、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に相違は認められなかった。また、開花始期、開花終期、成熟期について、本組換えダイズと非組換えダイズの間相違は認められず(「隔離ほ場試験結果報告書」、表2、p.4)、25 小葉の形、毛じの多少、伸育型及び子実の特性についても本組換えダイズと非組換えダイズの間相違は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表3及び表6、p.4及びp.6)。さらに、主茎長、最下着莢節位高、主茎節数、分枝数、収穫期の地上部生体重、稔実莢数、一株全粒重、一株成熟粒重及び百粒重のいずれの項目においても本組換えダイズと非組換えダイズの間統計学的有意差30 は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表4及び表5、p.5)。

b 生育初期における低温耐性

35

本組換えダイズと非組換えダイズの生育初期における低温耐性について検討した。初生葉展開期まで生育した本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各6個体)を4℃、16時間日長に設定した恒温器内で栽培し、生育状況を観察した。その結果、39日後に本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに、葉の白化、植物体の萎縮及び著しい生育障害の症状を呈し、その程度に差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図3、p.7)。

c 成体の越冬性

本組換えダイズと非組換えダイズの成体の越冬性について検討した。ほ場で生育した株(16株)を成熟後も収穫せずに翌年まで放置し、冬季の自然条件下における植物体の状況を観察した。2013年1月に供試個体を観察した結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに、いずれの株も枯死していたことより、越冬性は認められなかった。(「隔離ほ場試験結果報告書」、図4、p.7)。

d 花粉の稔性及びサイズ

花粉の形状に差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図5、p.8)。また、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した本組換えダイズと非組換えダイズの花粉の稔性(充実度)及びサイズについて調査した。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの間統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表7、p.9)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、本組換えダイズと非組換えダイズの稔実莢数、一株全粒重、一株成熟粒重及び百粒重を比較した。その結果、全ての項目において統計学的有意差が認められなかったことから、本組換えダイズと非組換えダイズの種子の生産量に差異はないと判断した(「隔離ほ場試験結果報告書」、表5、p.5)。

裂莢性については、完熟期に本組換えダイズ及び非組換えダイズの裂莢の程度を観察した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに難裂莢性であり、差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表8、p.9)。

また、本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫種子を、収穫後すぐに休眠覚醒処理を行わずにシャーレで発芽させ、発芽率を調査することで、休眠性を評価した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに100%の発芽率を示し、休眠性は極めて浅いと判断された(「隔離ほ場試験結果報告書」、表7、p.9)。

f 交雑率

交雑性試験区(「隔離ほ場試験結果報告書」、別添図2、p.14)に本組換えダイズ及び非組換えダイズを株間25cmの間隔で交互に栽植し、その非組換えダイズから得られた種子3,200粒を隔離ほ場内に再び播種した。播種した3200粒のうち、3,080粒が発芽した(発芽率96.3%)。本葉2葉期に除草剤2,4-Dを1,120g a.e./ha処理し、生存する個体を計数することにより生存率を調査した。その結果、3,080個体中7個体の生存が確認され、生存率は0.23%であった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表9、p.10)。

g 有害物質の産生性

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に、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

5 <後作試験>

収穫期の本組換えダイズ及び非組換えダイズの根域土壌を各区 8 ヶ所から採取し混和後(8 株/区、4 反復区)、セルトレイ(25 穴)に詰めた。各セルにハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、7 日後に発芽率、29 日後に草丈及び乾燥重量の調査を行った。

- 10 その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 10、p.11)。

<鋤込み試験>

- 15 収穫期の本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体地上部を刈取り(4 株/区、4 反復区)、4 株分を 1 サンプルとし、乾燥及び粉碎した後、園芸培土とよく混和した(乾燥粉末の重量比約 0.6%)。セルトレイ(25 穴)に混和した土壌を入れ、ハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、播種 7 日後に発芽率、22 日後に草丈、乾燥重量の調査を行った。

- 20 その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 11、p.11)。

<土壌微生物相試験>

- 25 本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫後の土壌を各区 3 ヶ所から採取した(3 サンプル/区、4 反復区)。希釈平板法により、細菌数、放線菌数及び糸状菌数を測定した。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 12、p.12)。

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

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。

35 (2) 使用等の方法

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

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

「緊急措置計画書」を参照。

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

(6) 国外における使用等に関する情報

15 米国(インディアナ州、イリノイ州など、2009～2013年)では延べ497カ所のほ場において試験を行ってきたが、非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

なお、本組換えダイズの国外における申請状況は以下のとおりである(表6、p.24)。

20 表6 本組換えダイズの国外における申請状況(2013年12月現在)

申請国	申請先機関	申請目的	申請状況
米国	米国農務省(USDA)	栽培	2011年8月
	米国食品医薬品庁(FDA)	食品、飼料	2011年9月 ¹⁾
カナダ	カナダ保健省(Health Canada)	食品	2011年9月 ²⁾
	カナダ食品検査庁(CFIA)	栽培、飼料	2011年9月 ³⁾
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)	食品	2012年4月 ⁴⁾
EU	欧州食品安全機関(EFSA)	食品、飼料	2012年2月
韓国	食品医薬品安全処(MFDS) ⁵⁾	食品	2012年6月
	韓国農村振興庁(RDA)	飼料、環境	2012年6月

¹⁾ 2013年12月、安全性確認終了。

²⁾ 2013年6月、安全性確認終了。

³⁾ 2013年6月、安全性確認終了。

⁴⁾ 2013年4月、安全性確認終了。

25 ⁵⁾ 旧 韓国食品医薬品庁(KFDA)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

5 ダイズは、我が国において長期にわたり栽培されているが、自然環境下において雑草化しているとの報告はなされていない。

10 第一の2の(6)に示したとおり、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、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について観察し、本組換えダイズと非組換えダイズの競合に関わる諸形質の相違を検討した。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの相違は見られなかった。

15 また、本組換えダイズには、改変*aad-12* 遺伝子、*2mepsps*遺伝子及び*pat* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変AAD-12蛋白質、2mEPSPS蛋白質及びPAT蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されているが、これらの除草剤を散布されることが想定されない自然条件下においてアリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

20 さらに、本組換えダイズの供与核酸中には、タバコ由来の核マトリックス結合領域である*RB7 MAR* 配列が含まれる。核マトリックス結合領域は導入遺伝子の上流もしくは両側に隣接していると導入遺伝子の発現を高めるが、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことが報告されていることから(Fukuda and Nishikawa, 2003)、*RB7 MAR* 配列は導入遺伝子の発現にのみ影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、隔離ほ場試験の結果において、上述のとおり生理学的及び生態学的特性について本組換えダイズと非組換えダイズの相違はないと考えられた。さらに、米国(2009～2013年)の延べ497カ所のほ場において試験を行ってきたが、本組換えダイズは非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

30 よって、*RB7 MAR* 配列が植物体の他の代謝系を変化させ、競合における優位性に関わる生理学的又は生態学的特性について宿主との相違をもたらすことはないと考えられる。

35 したがって、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

5

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10 以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 ダイズには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

20 本組換えダイズは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変 AAD-12 蛋白質、除草剤グリホサート耐性を付与する 2mEPSPS 蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質を産生する。改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 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。

25 2012 年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターの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に、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。その結果、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験のいずれにおいても、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間には統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 10～表 12、p.11～p.12)。

30 第一の 2 の (1) ロ③に示したとおり、改変 AAD-12 蛋白質にはトランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、これらが植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-12 蛋白質は植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸及びシキミ酸-3-リン酸と特異的に反応する酵素で、芳香族アミノ酸の生合成経路
35 であるシキミ酸経路における律速酵素ではないと示唆されており (Weiss and

Edwards, 1980 ; Herrmann, 1983)、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も、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている (Smart *et al.*, 1985)。また、これらの基質以外にシキミ酸が EPSPS 蛋白質と反応することが知られているが、その反応性はシキミ酸-3-リン酸との反応性の約 200 万分の 1 であり、生体内で基質として反応する可能性は極めて低い (Gruys *et al.*, 1992)。一方、2mEPSPS 蛋白質と同等のアミノ酸変化である 97 番目のトレオニンがイソロイシンに、また 101 番目のプロリンがセリンに変化した大腸菌の変異型 EPSPS 蛋白質では、野生型の EPSPS 蛋白質と同様にホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸に対して高い親和性を示したことが報告されている (Funke *et al.*, 2009)。また、2mEPSPS 蛋白質は、除草剤グリホサートに非感受性である以外は、構造的にも機能的にも EPSPS 蛋白質と類似しており、同一の作用機作をもつ (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009)。したがって、2mEPSPS 蛋白質は EPSPS 蛋白質と同様に基質特異性が高く、他の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない (OECD, 1999b)。また、L-アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PAT 蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応が影響を受けることはない (OECD, 1999b)。したがって、PAT 蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。さらに、本組換えダイズの供与核酸中には、タバコ由来の核マトリックス結合領域である *RB7 MAR* 配列が含まれる。核マトリックス結合領域は導入遺伝子の発現を高めることも示唆されているが (Halweg *et al.*, 2005)、内在性遺伝子の発現に影響しないことや (Chattopadhyay *et al.*, 1998)、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことが報告されていることから (Fukuda and Nishikawa, 2003)、*RB7 MAR* 配列は導入遺伝子の発現にのみ影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、第一の 2 の (6) に示したとおり、2012 年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで実施したほ場試験の結果、生理学的及び生態学的特性について本組換えダイズと非組換えダイズの相違はないと考えられた。さらに、米国 (2009~2013 年) の延べ 497 ヲ所のほ場において試験を行ってきたが、本組換えダイズは非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。よって、*RB7 MAR* 配列が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

また、改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質について既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース (FARRP Allergen Database version 12, 2012) を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

一方、除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ (半数致死濃度) は淡水魚で 1.7 mg/L、オオ

ミジンコ (*Daphnia magna*) で 1.4 mg/L であり、ウキクサの EC₅₀(半数影響濃度) が 1.5 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC(無影響濃度) が 0.14 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21 mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC₅₀ が 125 mg/kg、オオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) の EC₁₀(10%影響濃度) が 0.7 mg/kg である (OECD, 2006)。2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ は淡水魚で 0.26 mg/L、オオミジンコで 2.2 mg/L であり、ウキクサの EC₅₀ が 0.2992 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20 mg/L である (EPA, 2004)。

10 このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

15 なお、本組換えダイズと同様にアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を有するダイズ 68416 系統に適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、最大平均残留量は 0.047 mg/kg であった (添付資料 3、Table2、p.26)。2,4-DCP のマウスにおける急性毒性試験の LD₅₀(半数致死量) は 1276~1352 mg/kg 体重、ラットにおける慢性毒性(2年間)試験の NOAEL(無毒性量) は、雄で 440 mg/kg 体重/日、雌で >250 mg/kg 体重/日であり (OECD, 2006)、ダイズ 68416 系統における 2,4-DCP の残留量を大きく上回っていることから、ダイズ 68416 系統と同様にアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を有する本組換えダイズの輸入種子が野生動植物に影響を及ぼすことはないと考えられる。

25 除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性(急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性) はグルホシネートより低いことが確認されており (食品安全委員会, 2010)、グルホシネートが散布された場合における *N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。なお、*N*-アセチル-L-グルホシネートは、ダイズの残留
30 基準値の対象化合物に含まれている。

したがって、有害物質の産生性に起因する影響を受ける野生動植物等は特定されないと判断された。

35 (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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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を生ずるおそれがないと判断された。

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

ダイズと交雑可能な近縁野生種として、我が国にはツルマメが自生している(OECD, 2000)。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。

15 (2) 影響の具体的内容の評価

- ダイズとツルマメは染色体数がともに $2n=40$ であり交雑可能である(OECD, 2000)。したがって、交雑性に関する具体的な影響としては、本組換えダイズ由来の改変*aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子もしくは*pat* 遺伝子が当該雑種からツルマメの集団中に浸透した後に、その集団の競合における優位性が高まる可能性が考えられた。
- 20

(3) 影響の生じやすさの評価

- ツルマメは、我が国において北海道、本州、四国、九州に分布し、野原や荒地などに自生している(沼田ら, 1978)。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機会があることは否定できない。
- 25

- しかし、ダイズとツルマメは自殖性植物であり、一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、それぞれの開花期間が重なりにくいことが知られているため(Nakayama and Yamaguchi, 2002)、ダイズとツルマメの交雑は起こりにくいと考えられる。実際、比較的開花期が遅い我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメの平均交雑率は、0.73 %であったと報告されている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で、開花期が重複した条件下では、ツルマメより採種した種子から出芽した11,860個体中、交雑個体は1個体であったと報告されている(Mizuguti *et al.*, 2009)。
- 30
- 35 さらに、より開花期の遅い組換えダイズ2品種(AG6702RR及びAG5905RR)を用

い、開花ピークをより近づけ、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、25,741個体中、交雑個体はAG6702RRでは25個体(0.097%)、AG5905RRでは10個体(0.039%)であった。また、組換えダイズ(AG6702RR及びAG5905RR)から2、4、6、8及び10 m離してツルマメを栽培した場合は、2 mの距離での交雑個体は7,521個体中1個体、4 mの距離での交雑個体は7,485個体中1個体及び6 mの距離での交雑個体は14,952個体中1個体であった。また、8 m及び10 mの距離において、それぞれ14,964個体及び21,749個体を調査したが、交雑個体は得られなかったと報告されている(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り得るが、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た。

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を株間25 cmで交互に栽植し、その非組換えダイズから種子を採取した。その種子3,200粒を隔離ほ場内に再播種し、本葉2葉期に除草剤2,4-D処理した。除草剤耐性を示した個体を計数することで生存率を調査したところ、生存率は0.23%であった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表9、p.10)。ダイズの通常の家受粉率は1%未満であることが知られており(OECD, 2000)、本組換えダイズと非組換えダイズとの生存率(0.23%)から推測される交雑率は、ダイズの通常の家受粉率を超えるものではないと考えられた。

さらに、隔離ほ場において調査した花粉の充実度については、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に差は認められなかった。同様に、花粉の形態や大きさにも相違は認められなかったことから、本組換えダイズの交雑性は従来のダイズを超えるものではなく、本組換えダイズの生殖に関わる形質は非組換えダイズと同等であると考えられた。

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改変 *aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子もしくは *pat* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくためには、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。ダイズとツルマメの雑種形成及びダイズからツルマメへの遺伝子浸透については、我が国において調査が行われている。2003年に行われた調査では、ダイズとツルマメの交雑後代によくみられる形態的「中間体」を広島県 8 地点、秋田県 9 地点のツルマメの自生地において探索し、秋田県の 1 地点で 1 個体の中間体が発見された(加賀ら, 2005)。さらに 2004 年には、秋田県 8 地点、茨城県 6 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点の合計 57 地点のツルマメ集団(ダイズの栽培畑と隣接)を調査し、佐賀県の 3 地点から、11 個体の中間体が発見された。しかし、2003 年に行われた調査で中間体が発見された地点からは、中間体は発見されなかった(黒田ら, 2005)。この結果より、ダイズとツルマメの雑種形成はツルマメの自生地で起きているもののその頻度は低いと考えられた。さらに、2005 年に行った秋田県、茨城県、高知県及び佐賀県における計 39 地点における調査では、新たなダイズ中間体は発

見されなかった。また、2004年までに秋田県の1地点と佐賀県の3地点で発見された12個体の中間体のうち、後代の生存が確認できたのは佐賀県1地点の1個体のみであった。2004年は中間体が多数の種子を生産していたが、2005年には中間体がほとんど発見されなかったことから、種子は生産されても、自生地
5 地で速やかに淘汰される可能性が推測された(黒田ら, 2006)。2006年には、2005年までに中間体が発見された秋田県1地点と佐賀県3地点における後代の自生モニタリング調査及び秋田県、兵庫県、佐賀県の新たな40地点における中間体の調査が行われた。その結果、後代モニタリングでは佐賀県の1地点で中間体が1個体見つかったのみであった。新たな40地点で行われた調査では、佐賀県
10 の2地点でそれぞれ1個体ずつ中間体が発見されたのみであった(黒田ら, 2007)。

また、2003年から2006年にかけて秋田県の1地点及び佐賀県の5地点にて採取した468個体のツルマメ、17個体の中間体、12個体のダイズについて、20種類のマイクロサテライトマーカー及び2種類の葉緑体dCAPSマーカーを用い、多型
15 パターンの解析を行った。その結果、中間体はすべてツルマメと晩生ダイズの交雑によるものであり、これらはダイズからツルマメへの遺伝子浸透により生じたことが明らかになった。しかしながら、中間体からツルマメ集団への二次的な遺伝子浸透は確認されなかった。このように、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性はあるが、我が国の自然環境中においてさらなる遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられた(Kuroda *et al.*, 2010)。

以上より、本組換えダイズの自然交雑率は非組換えダイズの交雑率と同程度
20 であること、また、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から、本組換えダイズとツルマメの自然条件下での交雑率は極めて低いと考えられる。

さらに、ダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存で
25 きないと推察されることより、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられる。また、第二の1の(1)より本組換えダイズの競合における優位性は高められていないと考えられることより、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中に優先的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

(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

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは、我が国において長期にわたり栽培されているが、自然環境下において雑草化しているとの報告はなされていない。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、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・休眠性及び発芽率)について、隔離ほ場において調査した結果、本組換えダイズの競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。また、本組換えダイズはアリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネート耐性をもつが、これらの除草剤を散布されることが想定されない自然条件下において、これらの除草剤耐性をもつことが競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のことから、本組換えダイズは、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。

ダイズには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。また、改変 AAD-12 蛋白質、2mEPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これら蛋白質と既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められていない。有害物質の産生性について、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの項目においても、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間には統計学的有意差は認められなかった。

水生生物に及ぼす影響についての調査結果から、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。また、2,4-D を散布し生育した本組換えダイズの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性はグルホシネートより低いことが確認されており、グルホシネートが散布された場合における *N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

以上のことから、本組換えダイズは、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。

また、ダイズとその近縁野生種であるツルマメは、ともに染色体数が $2n=40$ であり交雑可能であることから、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。

しかしながら、隔離ほ場試験で実施した花粉の稔性及びサイズの調査において、本組換えダイズの生殖特性は非組換えダイズと同程度であると考えられた。

また、従来の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から、本組換えダイズとツルマメの自然条件下での交雑率は極めて低いと考えられる。さらに、ダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存できないと推察されることより、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられる。また、上述のとおり本組換えダイズの競合における優位性は高められていないと考えられることより、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中に優先的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

5

10

以上のことから、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。

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、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと結論づけられた。

15

参 考 文 献

- Allen, George C.; Hall Jr., Gerald; Michalowski, Susan; Newman, Winnell; Spiker, Steven; Weissinger, Arthur K.; Thompson, William F. High-level transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*. 1996, 8(5), p. 899-913.
- Allen, George C.; Spiker, Steven; Thompson, William F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), p.361-376.
- 10 Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), p.335-350.
- Chaboute, Marie-Edith; Chaubet, Nicole; Philipps, Gabriel; Ehling, Martine; Gigot, Claude. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 15 1987, 8(2), p.179-191.
- Chattopadhyay, S.; Whitehurst, C. E.; Chen, J. A nuclear matrix attachment region upstream of the T cell receptor beta gene enhancer binds Cux/CDP and SATB1 and modulates enhancer-dependent reporter gene expression but not endogenous gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(45), p.29838-29846.
- 20 Chen, Hao; Jiang, Hanxiao; Morgan, John A. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry*. 2007, 68(3), p.306–311.
- 25 Chen, Qingfeng; Zhang, Baichen; Hicks, Leslie M.; Wang, Shiping; Jez, Joseph M. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based assay for indole-3-acetic acid–amido synthetase. *Analytical Biochemistry*. 2009, 390(2), p.149-154.
- Chiang, Y.C.; Kiang, Y.T. Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Academia Sinica*. 1987, 28(1), 30 p.1-11.

- EPA. Environmental Fate and Effects Division's Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Document for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). 2004, <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2004-0167-0003>,
5 (参照 2013-2-12).
- FAO. FAOSTAT, 2013, <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>, (参照 2013-10-18).
- Fling, M.E.; Kopf, J.; Richards, C. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyl
10 transferase. Nucleic Acids Research. 1985, 13(19), p. 7095-7106.
- Fujita, R.; Ohara, M.; Okazaki, K.; Shimamoto, Y. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). The Journal of Heredity. 1997, 88(2), p.124-128.
- Fukuda, Yuji; Nishikawa, Satoshi. Matrix attachment regions enhance
15 transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. Plant Molecular Biology. 2003, 51, p.665-675.
- Funke, Todd; Yang, Yan; Han, Huijong; Healy-Fried, Martha; Olesen, Sanne; Becker, Andreas; Schönbrunn, Ernst. Structural Basis of Glyphosate Resistance Resulting from the Double Mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in
20 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry. 2009, 284(15), p.9854-9860.
- Gruys, K. J.; Walker, M. C.; Sikorski, J. A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from Escherichia coli. Biochemistry. 1992, 31(24) p.5534-5544.
- 25 Halweg, Christopher; Thompson, William F.; Spiker, Steven. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. The Plant Cell. 2005, 17(2), p.418-429.
- Hausinger, Robert P. Fe (II) / α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and
30 related enzymes. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2004, 39(1), p.21-68.

- Herouet-Guicheney, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.E.; Ferullo, J.M.; Hendrickx, K.; Rouan, D. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009, 54(2), p.143-153.
- Herrmann, Klaus M. "The common aromatic biosynthetic pathway". *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. Herrmann, K.; Somerville, R. eds., Addison-Wesley Publishing Co., 1983, p. 301-322.
- Kuroda, Yosuke; Kaga, Akito; Tomooka, Norihiko; Vaughan, Duncan A. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science*. 2008, 48(3), p.1071-1079.
- Kuroda, Y.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Vaughan, D. The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology*. 2010, 19(11), p.2346–2360.
- Lebrun, M.; Leroux, B.; Sailland, A. Chimeric gene for the transformation of plants. United States Patent 5,510,471. 1996-04-23.
- Lebrun, M.; Sailland, A.; Freyssinet, M.; Degryse, E. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. United States Patent 6,566,587. 2003-05-20.
- Luo, Lusong; Pappalardi, Melissa B.; Tummino, Peter J.; Copeland, Robert A.; Fraser, Marie E.; Grzyska, Piotr K.; Hausinger, Robert P. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry*. 2006, 353(1), p. 69–74.
- Mizuguti, Aki; Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management*. 2009, 9(1), p.93–96.
- Mizuguti, Aki; Ohigashi, Kentaro; Yoshimura, Yasuyuki; Kaga, Akito; Kuroda, Yosuke; Matsuo, Kazuhito. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research*. 2010, 9(1), p.13–23.

- Nakayama, Yuichiro; Yamaguchi, Hirofumi. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*. 2002, 2(1), p.25–30.
- 5 Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 1993, 21(5), p.895-906.
- 10 OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.10. 1999a, <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815618.pdf>, (参照 2013-7-29).
- 15 OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. 1999b. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf>, (参照 2013-7-31).
- OECD. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr.(soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. 2000. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815668.pdf>, (参照 2013-7-31).
- 20 OECD. Module II : Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25. 2002. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815748.pdf>, (参照 2013-7-31).
- 25 OECD. '2, 4-Dichlorophenol'. OECD Existing Chemicals Database. 2006, <http://webnet.oecd.org/HPV/UI/handler.axd?id=3d43ed35-5ef5-4323-bddd-4aa527db0765>, (参照 2013-2-12)
- Sleper, D.A.; Nickell, C.D.; Noel, G.R.; Cary, T.R.; Thomas, D.J.; Clark, K.M.; Rao Arelli, A.P. Registration of 'Maverick' soybean. *Crop Science*. 1998, 38(2), p.549-550.
- 30 Smart, C C; Johanning, D; Müller, G; Amrhein, N. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry*. 1985, 260(30), p.16338-16346.

- Stalker, D.M.; Thomas, Christopher M.; Helinski, Donald R. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics*. 1981, 181, p. 8-12.
- Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude.
5 Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31(6), p.1129–1139.
- Weiss, Ulrich; Edwards, J. Michael. "Regulation of the shikimate pathway". *The biosynthesis of aromatic compounds*, New York : John Wiley, 1980, p.287-301.
- 10 Wohlleben, W.; Arnold, W.; Broer, I.; Hillemann, D.; Strauch, E.; Pühler, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 1988, 70(1), p.25-37.
- Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Anthony; Merlo, Donald J.;
15 Jayakumar, Pon Samuel; Lin, Gaofeng. Novel herbicide resistance genes. 2007, WO 2007/053482 A2.
- Wright, Terry R.; Shan, Guomin; Walsh, Terence A.; Lira, Justin M.; Cui, Cory; Song, Ping; Zhuang, Meibao; Arnold, Nicole L.; Lin, Gaofeng; Yau, Kerrm; Russell, Sean M.; Cicchillo, Robert M.; Peterson, Mark A.; Simpson, David M.;
20 Zhou, Ning; Ponsamuel, Jayakumar; Zhang, Zhanyuan. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(47), p.20240-20245.
- Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito; Yasuda, Koji. Gene flow from GM
25 glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research*. 2006, 5(3), p.169–173.
- 加賀秋人, 友岡憲彦, Phuntsho Ugen, 黒田洋輔, 小林伸哉, 伊勢村武久, Gilda Miranda-Jonson, Vaughan Duncan A. 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
30 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, 2005, p.59-71.

- 黒田洋輔, 加賀秋人, Apa Anna, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦, 矢野博, 松岡伸之. 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, 2005, p.73-95.
- 黒田洋輔, 加賀秋人, Guaf Joe, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦. 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, 2006, p.1-12.
- 10 黒田洋輔, 加賀秋人, Poafa Janet, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦, 矢野博. 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, 2007, p.9-27.
- 財務省. “概況品別国別表”. 財務省貿易統計.
- 15 <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=13&P=0>, (参照 2013-4-12).
- 食品安全委員会. 農薬評価書 グルホシネート. 2010.
<http://www.fsciis.gov.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20070717010>, (参照 2013-4-12).
- 鄭紹輝. “ダイズ”. 作物学概論. 大門弘幸 編著. 朝倉書店, 2008, p.132-146.
- 20 沼田真, 奥田重俊, 桑原義晴, 浅野貞夫, 岩瀬徹. 新版日本原色雑草図鑑. 沼田真, 吉沢長人 編集. 全国農村教育協会. 1978, p.107.
- 農林水産省. “大豆審査基準”. 農林水産植物種類別審査基準. 2012,
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf>, (参照 2012-5-1).
- 古谷義人. “ダイズ”. 農学大事典 -1977 訂正追補版-. 野口弥吉 監修. 養賢堂.
- 25 1977, p.501-508.

緊急措置計画書

平成 25年 11月 28日

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役 栗田 道郎
住所 東京都品川区東品川二丁目2番
24号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ(改変*aad-12, 2mepsps, pat, Glycine max* (L.) Merr.) (DAS44406, OECD UI : DAS-44406-6) (以下「本組換えダイズ」という。)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、科学的に明らかになった場合、以下の措置をとることとする。

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

平成25年 11月現在

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非開示)

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 代表取締役 東京都品川区東品川二丁目 2 番 24 号 (電話番号)
*	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、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、穀物取扱など使用の可能性のある関係各者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

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え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とり、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は米国ダウ・アグロサイエンス社の協力のもと、本組換えダイズが環境中に放出されないようにリスクの程度に応じて適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えダイズについては、環境中で生存しないように不活化するよう措置する。

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おそれがあると示唆された場合、直ちに農林水産省 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。

添付資料リスト

社外秘情報につき非開示

1. 除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.)(DAS44406, OECD UI : DAS-44406-6) の隔離ほ場試験結果報告書
2. 添付資料 1 : 改変 AAD-12 蛋白質が活性を示す除草剤
3. 添付資料 2 : Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12)
4. 添付資料 3 : A Risk Assessment Overview of 2,4-D Treated Soybean Containing the DAS AAD-12 Trait
5. 添付資料 4 : pDAB8264 の塩基配列
6. 添付資料 5 : 導入遺伝子のコピー数並びに世代間及び同一世代における安定性
7. 添付資料 6 : pDAB8264 の作成過程
8. 添付資料 7 : Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-44406-6 Soybean
9. 添付資料 8 : 本組換えダイズの検出法