

| |
|--|
| <p>除草剤グルホシネート耐性ダイズ(<i>pat, Glycine max</i> (L.) Merr.)(A5547-127, OECD UI: ACS-GM006-4)申請書等の概要</p> |
|--|

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第一種使用規程承認申請書 | 1 |
| 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 | 3 |
| 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 | 3 |
| (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 | 3 |
| (2) 使用等の歴史及び現状 | 3 |
| (3) 生理学的及び生態学的特性 | 4 |
| イ 基本的特性 | 4 |
| ロ 生息又は生育可能な環境の条件 | 5 |
| ハ 捕食性又は寄生性 | 5 |
| ニ 繁殖又は増殖の様式 | 5 |
| ホ 病原性 | 7 |
| ヘ 有害物質の産生性 | 7 |
| ト その他の情報 | 7 |
| 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 | 8 |
| (1) 供与核酸に関する情報 | 8 |
| イ 構成及び構成要素の由来 | 8 |
| ロ 構成要素の機能 | 9 |
| (2) ベクターに関する情報 | 10 |
| イ 名称及び由来 | 10 |
| ロ 特性 | 10 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 | 12 |
| イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 | 12 |
| ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 | 12 |
| ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 | 12 |
| (4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 | 14 |
| (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性 | 17 |
| (6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違 | 17 |
| 3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 | 20 |
| (1) 使用等の内容 | 20 |
| (2) 使用等の方法 | 20 |

| | |
|---|---|
| (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 | 20 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置 | 20 |
| (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 | 21 |
| (6) 国外における使用等に関する情報 | 21 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 | 22 |
| 1. 競合における優位性 | 22 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 22 |
| (2) 影響の具体的内容の評価 | 23 |
| (3) 影響の生じやすさの評価 | 23 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 23 |
| 2. 有害物質の産生性 | 23 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 23 |
| (2) 影響の具体的内容の評価 | 24 |
| (3) 影響の生じやすさの評価 | 24 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 24 |
| 3. 交雑性 | 24 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 24 |
| (2) 影響の具体的内容の評価 | 25 |
| (3) 影響の生じやすさの評価 | 25 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 26 |
| 4. その他の性質 | 27 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価 | 28 |
| 参考文献 | 30 |
| 別添資料の内容 | 34 |
| 緊急措置計画書 | 36 |
| モニタリング報告書 | 社外秘情報につき非開示 |

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 10 月 15 日

5

農林水産大臣 西川 公也 殿
環境大臣 望月 義夫 殿

10

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

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

| | |
|---------------------|--|
| 遺伝子組換え生物等の種類の名称 | 除草剤グルホシネート耐性ダイズ(pat, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(A5547-127, OECD UI: ACS-GMØØ6-4) |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容 | 食品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 | |

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

和名、英名及び学名

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

宿主の品種名

- 15 宿主はダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の栽培品種A5547である。

国内及び国外の自然環境における自生地域

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

25

(2) 使用等の歴史及び現状

国内及び国外における第一種使用等の歴史

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

35

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

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

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

15

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

20

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

25

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

30

ダイズは種子で繁殖する一年生植物である(OECD, 2000)。日長や温度に対する反応が多様なため、各地に適応した生態型の品種分化が見られる(橋本, 2001a)。発芽後2~3週間すると、根粒菌の寄生により根粒が形成され始め、空中窒素を固定して栄養源とする(後藤, 2001)。種子の百粒重は、特殊なものを除き10~50gの範囲である(国分, 2002)。

35

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は30～35℃であり(後藤, 2001)、土壌温度が10℃以上で発芽が可能となり、好適条件では5～7日で出芽する(OECD, 2000)。ダイズの生育適温は25℃付近であるが、低温条件が続くと生育が抑えられ、子実生産も阻害される(昆野, 2001)。耐霜性がないため、冬季に凍結するような条件では生育できない(OECD, 2000)。ダイズの生育に適する土壌水分は飽和水分の70%であり、最適pHは6.0～6.5であるが、土壌に対する適応性は比較的広く、我が国では全国的に栽培可能である(後藤, 2001)。北米では栽培に適正な日長と緯度より、成熟群(Maturity group)を北部の[000]から赤道付近の[]まで品種を13の成熟群に分類しており(OECD, 2000)、宿主品種であるA5547は成熟群[]に分類される中生種である(William, 1997)。

ハ 捕食性又は寄生性

15

ニ 繁殖又は増殖の様式

20 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

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

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

ダイズは種子繁殖であり、自然条件下において他の器官からの繁殖はこれまでのところ報告がない。

35

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

5 ダイズは自殖性作物で(OECD, 2000)、通常、花が完全に開く前に雄ずいが伸長し、裂開した葯が柱頭を摩擦するので、受粉は開花前に完了する。また、開花期に乾燥や低温等の不順な気象条件に曝されると開花することなく蕾のまま受精してしまう(阿部・島本, 2001)。

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

15 我が国には、ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメが分布する。ツルマメの受粉様式はダイズとほぼ同じであり、その自殖率もダイズ同様に高い(阿部・島本, 2001)。自然交雑率については、2.3%(Kiang *et al.*, 1992)との報告がある一方、秋田県雄物川の河川敷で収集したツルマメの集団では9.3 ~ 19%の交雑率が報告されている(Fujita *et al.*, 1997)。この調査では、訪花昆虫(主にニホン
20 ミツバチとクマバチ)が頻繁に観察されており、その結果比較的高い頻度で交雑が起こったものと考察されている。また、秋田県、茨城県、佐賀県で継続調査されたツルマメ集団では、交雑率の平均値は2.2%(0 ~ 6.3%の範囲)であった(Kuroda *et al.*, 2008)。このうち、秋田県の1地点及び佐賀県の5地点において採取された468個体のツルマメ、17個体の中間体及び12個体のダイズについて、分子
25 マーカーによる解析が行われた結果、これらの中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動によるものと判断された。他方、中間体からツルマメへの二次的な遺伝子流動は認められなかったことから、ダイズとツルマメの雑種形成の可能性はあるが、我が国の自然環境において更なる浸透交雑が起こる可能性は極めて低いと考えられる(Kuroda *et al.*, 2010)。

30

 ダイズとツルマメの開花期のずれは、両者の遺伝子交流を妨げる一因と考えられているが(阿部・島本, 2001)、晩生の秋ダイズ型品種の作付地帯等では、両者の開花期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズ品種とツルマメを50cm間隔で交互に配置して栽培した場合、個体別の交雑率は0 ~ 5.89%、平均で
35 0.73%であった(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズを供試して、開花ピークを近づけ、組換えダイズに

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

なお、ダイズに自家不和合性やアポミクシスについての報告はない。

10

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズは一花当たり3,600粒前後の花粉を生産し(Chiang and Kiang, 1987)、花粉の直径は30 μ m前後であるが、粘性のため塊状になる傾向にある(Yoshimura, 2011)。花粉の寿命は短く、その発芽能力は湿度が一定でない条件下では8時間で失われることが報告されている(Abel, 1970)。前述の花色の異なる2品種を用いた交雑性試験では、花粉源から0.9 mで0.41%、5.4 mで0.03%の交雑率が報告されている(Ray *et al.*, 2003)。なお、風による花粉の飛散状況について花粉捕集器を用いて実際に調査した結果、1日1 cm²当たりの平均花粉捕捉数は、ダイズ畑のなかで0.386粒、畑から2.5 mの地点で0.694粒、5 mで0.309粒、10 mで0.077粒に過ぎず、風媒による他殖の可能性はほとんどないと判断された(Yoshimura, 2011)。

ホ 病原性

25

ヘ 有害物質の産生性

ダイズが他感物質等のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。

ト その他の情報

35

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グルホシネート耐性ダイズ(*pat*, *Glycine max* (L.) Merr.)(A5547-127, OECD UI: ACS-GMØØ6-4)(以下、「本組換えダイズ」とする。)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表1に示した。

10

表1 構成要素のベクター上の位置、サイズ、由来及び機能

| 構成要素 | サイズ (bp) | ベクター上の位置 (bp) | 由来及び機能 |
|------------|----------|---------------|--|
| | 188 | 1-188 | プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| RB | 55 | 189-243 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti プラスミド pTiAch5 由来の右側境界(Gielen <i>et al.</i> ,1984)。 |
| | 217 | 244-460 | プラスミド pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| P35S | 543 | 461-1003 | カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA プロモーター。植物中で <i>pat</i> 遺伝子を構成的に発現させる(Odell <i>et al.</i> ,1985)。 |
| <i>pat</i> | 552 | 1012-1563 | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来で、PAT 蛋白質をコードし、除草剤グルホシネート耐性を付与する(Strauch <i>et al.</i> , 1993)。なお、本組換えダイズに導入された <i>pat</i> 遺伝子は、 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> から得た野生型の <i>pat</i> 遺伝子の配列を植物で使用されるコドンに適合するように改変したものである(Strauch <i>et al.</i> , 1993)が、この改変により産生される酵素のアミノ酸配列は変化していない。 |
| T35S | 203 | 1582-1784 | カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA ターミネーター。転写を終結させ、転写産物の 3' ポリアデニル化を行わせる(Pietrzak <i>et al.</i> ,1986)。 |
| ORI | 550 | 2253-2803 | プラスミド pUC19 の配列断片であり、2257bp の位置に複製起点(ColE1)を有する。プラスミドの複製を開始させる(Yanisch-Perron <i>et al.</i> ,1985)。 |
| <i>bla</i> | 861 | 3016-3876 | <i>Escherichia coli</i> 由来のアンピシリン耐性遺伝子(<i>bla</i>)で、細菌中で β-ラクタマーゼを発現する(Sutcliffe,1978)。 |
| | 200 | 3877-4076 | プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

□ 構成要素の機能

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

5

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

10 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同一性を有する場合はその旨

PAT 蛋白質

15 作物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、作物は枯死する。

一方、*pat* 遺伝子が導入された植物体では、ホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素(PAT 蛋白質)が産生され、この酵素はグルホシネートをアセチル化して
20 *N*-アセチル-L-グルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する(OECD, 1999)。これにより、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用は回避され、植物体中にアンモニアは蓄積されず、グルホシネートを散布しても作物が枯死しない。

25 また、PAT 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2012 年に FARRP の AllelgenOnline データベース(version 12)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な同一性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの同一性は認められなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

30

pat 遺伝子がコードする PAT 蛋白質は、グルホシネートの L 型異性体に高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸に対しても親和性は殆どなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない(Thompson *et al.*, 1987)。また、過剰の各種ア
35 ミノ酸の存在下においても PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転移反応は阻害されるとの報告はなかった(Wehrmann *et al.*, 1996)。これらのことから、

PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。

また、グルホシネートの代謝産物である*N*-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することはなく(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響
5 はないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10

本組換えダイズの作出に用いたプラスミドは、プラスミド pUC19などを基に構築されたプラスミド pB2/35SAcK である(図 1, p.11)。

ロ 特性

15

ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pB2/35SAcK の全塩基数は 4,076 bp である。プラスミド地図を図 1(p.11)に、また、全塩基配列を別添資料 1(p.8)に示した。

20

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド pB2/35SAcK には、選択マーカーとしてアンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が導入されている。本遺伝子は、形質転換前にプラスミド
25 pB2/35SAcK を制限酵素 *Pvu*I で切断した際に 2 つに分断されている(図 2, p.12)。また、本組換えダイズ(T4 世代, 図 3 p.14)の葉、茎、根及び種子より抽出した RNA について、*bla* 遺伝子をプローブとしたノーザンプロット分析を行ったが、いずれの組織においても転写産物は検出されず(検出限界 2pg)、本遺伝子が本組換えダイズにおいて発現していないことが確認されている(別添資料 2, p.15, 図 1)。

30

ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

プラスミド pB2/35SAcK の感染性は知られていない。

35

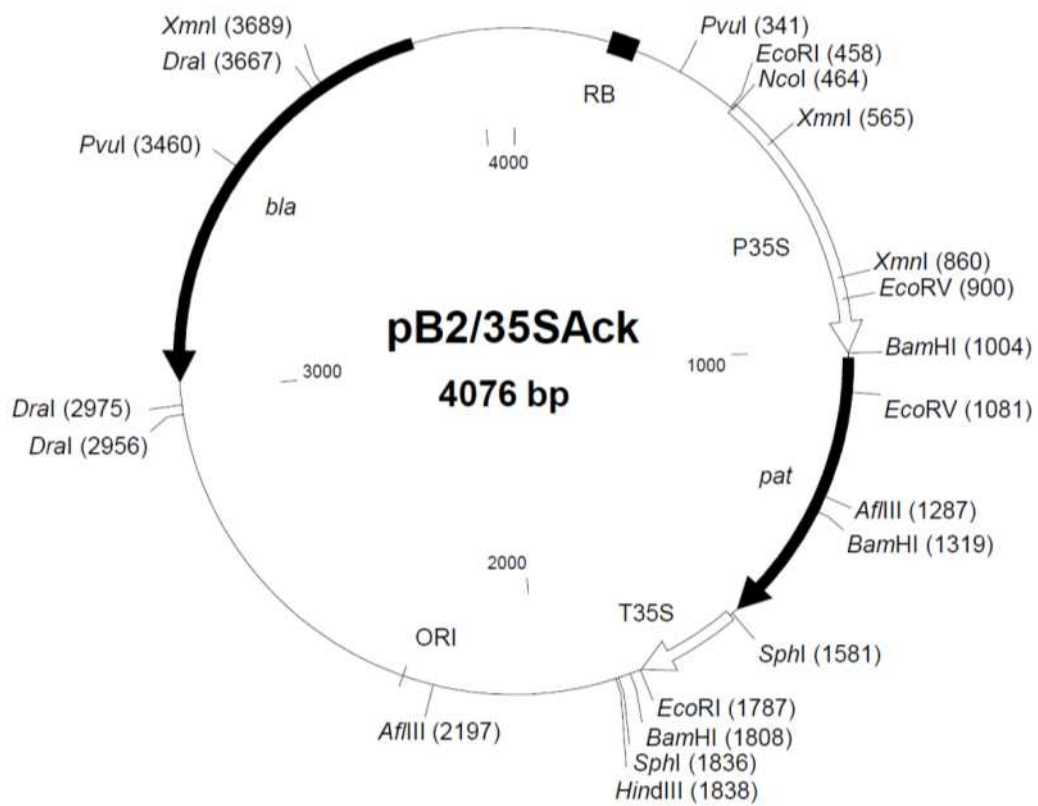


図 1 pB2/35SAcK のプラスミド地図及び制限酵素切断部位

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

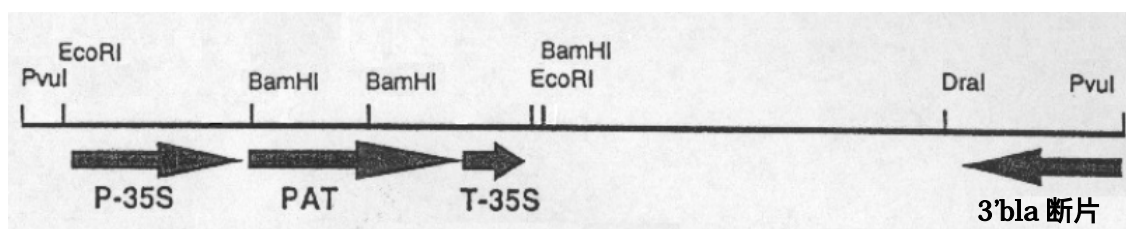
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

- 5 プラスミド pB2/35SAcK は、35S プロモーターの上流及び *bla* 遺伝子上にそれぞれ存在する *PvuI* 切断部位で切断され、2つの断片に分断されている。宿主内に移入された核酸全体の構成を図2に示した。

断片1

10



15

断片2

20

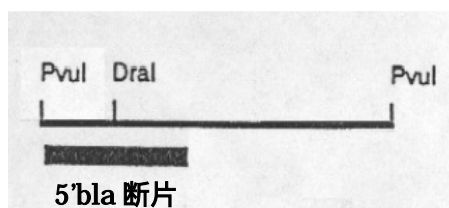


図2 供与核酸の構成図

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

25

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 2 カ所の制限酵素 *PvuI* 切断部位で分断された長短2つのプラスミド pB2/35SAcK断片(図2)を、パーティクルボンバードメント法により宿主の茎頂分裂組織に導入した。

30

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

35

形質転換を行った細胞を、植物ホルモンを含む培地に植え、シュートを誘導

した後、グルホシネートを含む培地を用いて耐性を示す個体を選抜した。

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

5

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

10

選抜した形質転換体を温室で栽培し、さらにグルホシネートによる選抜を行い、本組換えダイズ当代(T0)を得た。その後、自殖を繰り返し、各試験に用いた世代の植物体を得た。育成の経過を図 3(p.14)に示した。

15 なお、本申請の範囲は T3 世代及びその後代である。また、本組換えダイズの我が国における承認の状況を表 2 に示す。

表 2 我が国における申請及び承認状況(2014 年 10 月現在)

| 申請先 | 目的 | 申請状況 |
|-----------|---|---------------|
| 農林水産省 | 環境 ¹ (輸入) | 1999 年 5 月確認 |
| 農林水産省・環境省 | 環境 ² (食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管及び廃棄並びにこれらに付随する行為) | 2006 年 11 月承認 |
| 農林水産省・環境省 | 環境 ² (隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為) | 2012 年 12 月承認 |
| 厚生労働省 | 食品 ³ | 2002 年 7 月承認 |
| 農林水産省 | 飼料 ⁴ | 2003 年 3 月承認 |

¹ 農林水産分野等における組換え体の利用のための指針に基づく。

20 ² 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律に基づく。

³ 食品衛生法に基づく。

⁴ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

25

【社外秘情報につき非開示】

図3 本組換えダイズ系統の育成図

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

移入された核酸の複製物が存在する場所

1996年に米国で行われた試験において、*pat* 遺伝子座に関してヘテロ接合体で
10 ある T1 世代を自殖して得られた T2 世代(図 3)に除草剤グルホシネートを散布し、
耐性を示す 31 個体を選抜した。それらをさらに自殖して得られた種子(T3 世代:
図 3)を由来個体別に播種し、発芽した植物体に除草剤グルホシネートを散布し
た結果、全ての個体が耐性を示す 10 系統と、耐性個体と感受性個体に分離した
21 系統となり、T2 世代の 31 耐性個体は、一遺伝子座と仮定した場合に想定さ
15 れる 1 : 2 の分離比を示した(別添資料 5, p.3, 表 1)。

また、次項(第一、2(4))に記すとおり、本組換えダイズにおいて 1 コピーの
挿入 DNA が複数世代にわたり安定して伝達されていることがゲノミックサザン
プロット分析により確認されている。また、挿入部前後のダイズゲノム由来遺
20 伝子配列をクエリーとし、BLASTn を用いて NCBI のデータベースに保存されて
いるダイズ(*G. max*)ゲノムと比較したところ、挿入部前後の配列はダイズの 18
番染色体上に存在することが確認された(別添資料 6, p.115, Appendix 16)。

以上の結果より、本組換えダイズに移入された挿入遺伝子はダイズゲノム上
25 の一か所に存在すると判断された。

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

30 本組換えダイズ(T4 世代: 図 3)の葉から抽出したゲノム DNA についてサザン
プロット分析及びシーケンス解析を行った。その結果、本組換えダイズには 1
コピーの *pat* 遺伝子発現カセットが導入されており、その上流には 5'末端の 1~
28 bp までの配列が欠失している 5'側の *bla* 遺伝子断片が、下流には 3'側の *bla*
遺伝子断片がそれぞれ *pat* 遺伝子発現カセットと隣接して挿入されていること
35 が確認された(図 4, p.15; 別添資料 3, p.17, 表 3, p.19-22 図 2-5; 別添資料 7, p.20,
図 3)。

また、挿入遺伝子の安定性を調べるため、本組換えダイズの T3、T4、T5 及び T 世代(図 3 p.14)の葉から抽出したゲノム DNA について、*pat* 遺伝子発現カセットをプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において同一のバンドが検出され、挿入 DNA が複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認された(別添資料 8, p.11)。

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

10 上記(4)の で示したように、本組換えダイズには分断された2つの*bla*遺伝子断片が1コピーの*pat*遺伝子発現カセットを挟み隣接して存在している(図4)。



15 図 4 本組換えダイズにおける挿入 DNA の概略図

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

(6)の において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間
20 及び世代間での発現の安定性

2002 年に米国の温室内において栽培された本組換えダイズ及び非組換えダイズ各 5 個体の根、茎及び葉における PAT 蛋白質を ELISA 法により分析した結果、本組換えダイズでは全ての個体のいずれの部位においても PAT 蛋白質が検出さ
25 れた(表 3, p.16)。

表3 本組換えダイズの各組織におけるPAT蛋白質の発現量

| 系統 | 部位 | PAT蛋白質量の平均 ($\mu\text{g/g}$ 生重) \pm SD | 粗蛋白質/生重 (%) | PAT蛋白質/粗蛋白質 (%) |
|---------|----|--|----------------|--------------------|
| 本組換えダイズ | 根 | 3.73 \pm 0.98 | 2.15 | 0.017 |
| | 茎 | 11.5 \pm 1.8 | 3.62 | 0.032 |
| | 葉 | 19.0 \pm 5.0 | 6.70 | 0.028 |
| 非組換えダイズ | 根 | < LOD | 2.39 | - |
| | 茎 | < LOD | 4.30 | - |
| | 葉 | < LOD | 7.13 | - |

2002年、米国(n=5)。各部位の生重におけるPAT蛋白質の検出限界(LOD)はそれぞれ2.72ng/g(根) 3.72ng/g(茎)9.76ng/g(葉)であった。

5 (注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

また、2013年にバイエルクロップサイエンス株式会社明野事業所 隔離ほ場(以下、「隔離ほ場」とする。)において、本組換えダイズ(T 世代: 図 3, p.14)及び非組換えダイズ、並びにそれらから収穫した種子(T 世代: 図 3, p.14)を用いて除草剤グルホシネート散布試験を行った結果、本組換えダイズでは全ての個体が耐性を示した(表 4; 別添資料 9, p.17)。

表4 導入遺伝子の発現による除草剤耐性

| 系統 | T 種子 | | | T 種子 (収穫種子) | | |
|---------|-----------|-----------|--------------|-------------|-----------|--------------|
| | 散布 個体数 | 耐性 個体数 | 耐性個体率 (%) | 散布 個体数 | 耐性 個体数 | 耐性個体率 (%) |
| 本組換えダイズ | 20 | 20 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 非組換えダイズ | 20 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |

15 初生葉が展開するまで栽培し、その後、除草剤グルホシネート(薬量55.5g a.i.(有効成分含量)/450L/10a相当)を散布し、散布から2週間後に耐性を確認した。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

20 以上のことから、個体間及び世代間において PAT 蛋白質が安定して発現していることが確認された。

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

25 本組換えダイズは伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然環境下において移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えダイズは、本組換えダイズに特異的なプライマーセットと TaqMan® プローブを用いた real-time PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 5 10)。

本方法の検出限界値は、ゲノム DNA 量比で 0.08% である(別添資料 10)。

本方法の信頼性(再現性)については、社外の 12 機関において検証され、確認されている(別添資料 11)。

10 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

15 本組換えダイズは、*pat* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示す。

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
20 程度

2013年に隔離ほ場において本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った。試験に供試した本組換えダイズの世代はT 世代であった(図3, p.14)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝的背景品種A5547を用いた(以下、「非組
25 換えダイズ」とする。)。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性については、農林水産省による農林水産植物種類別審査基準・大豆(農林水産省, 2012)を参考に、20項目(発芽期、発芽揃い、伸育型、毛
30 茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、開花始め、開花期、花粉の充実度及びサイズ、成熟期、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、熟莢の色、子実の形、種皮の地色、臍の色)について、本組換えダイズと非組換えダイズを比較した。花粉の充実度及びサイズ、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、
35 子実の形に関しては統計処理を行い、発芽期、発芽揃い、開花始め、開花期、成熟期、伸育型、毛茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、熟莢の色、種皮の地色、臍の色に関しては観察結果を比較した。その結果、主茎節数の平均値は、

本組換えダイズの20.1節に対して非組換えダイズは18.8節であり、統計学的有意差が認められた。また、その他の形態及び生育の特性においては本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(別添資料9, p.5-10)。

5

b 生育初期における低温耐性

隔離ほ場において、本組換えダイズ及び非組換えダイズの幼植物体における5・10時間明条件下での低温障害を萎縮程度として経時的に達観評価を行った。その結果、全ての調査時において系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表5, p.11)。

10

c 成体の越冬性

隔離ほ場において、2013年6月に播種した本組換えダイズ及び非組換えダイズを12月の収穫期後も栽培を続けたところ、翌年2月には低温及び降霜によりいずれの株も枯死していることが確認された(別添資料9, p.12)。

15

d 花粉の稔性及びサイズ

隔離ほ場において栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズから花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色し、花粉の充実度及びサイズを比較した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズの花粉の充実度及びサイズに統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表4, p.9及び図7, p.10)。

20

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する項目として、農林水産省による農林水産植物種別審査基準・大豆(農林水産省, 2012)を参考に、6項目(一株全粒重(粗粒重)、一株成熟粒重(精粒重)、一株成熟粒数、一莢内粒数、一株稔実莢数、百粒重)を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、一莢内粒数の平均値については、本組換えダイズの2.17粒に対して非組換えダイズは2.03粒であり、統計学的有意差が認められた。その他の測定項目に関しては、本組換えダイズと非組換えダイズの間には統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表4, p.9)。

30

種子の脱粒性に関する項目として、隔離ほ場で生育し、成熟期に収穫した本組換えダイズ及び非組換えダイズの裂莢の難易を裂莢数により比較した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、莢の裂莢性に違いは認められなかった(別添資料9, 表4, p.9)。

35

休眠性及び発芽率については、隔離ほ場で生育した本組換えダイズと非組換えダイズの収穫直後及び1カ月間風乾した種子をポットに播種し、播種2週間後にそれぞれの発芽率を調査した。その結果、収穫後の期間に関わらず本組換えダイズと非組換えダイズの発芽率はほぼ100%で、統計学的有意差は認められず、
5 本組換えダイズと非組換えダイズにおいて休眠性は認められなかった(別添資料9, 表9, p.16)。

f 交雑率

隔離ほ場において栽培した非組換えダイズより収穫した種子を用いて、本組
10 換えダイズと非組換えダイズ間の交雑率を調査した。非組換えダイズの形態調査区において、1.2~1.4mの距離で本組換えダイズに隣接する株を選び、収穫した種子を無作為に抽出して温室内で播種し、初生葉から第一本葉が展開したステージの実生に除草剤グルホシネート(薬量55.5g a.i./450L/10a相当)を散布し、生存個体数を調査した。試験に供試した4,093株のうち、除草剤グルホシネート散
15 布から2週間後に44の生存個体数が確認されたため、再度グルホシネートを散布した。再散布1週間後には18個体の生存が確認されたため、これらの個体よりDNAを抽出後、PCR法により本組換えダイズに特異的な塩基配列を増幅することによって交雑の有無を確認した(別添資料10)。その結果、これら18個体は、本組
20 換えダイズに特異的な配列の増幅が確認された。よってこれら18個体は本組換えダイズとの交雑により生じたものであると考えられ、交雑率は0.44%であった。(別添資料9, p.18)。

g 有害物質の産生性

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

後作試験

隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫後の根域土壌をそれぞれ採取し、その土壌において検定作物と
30 して栽培したダイコンの発芽率、草丈、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表6, p.13)。

鋤込み試験

35 隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体地上部を収穫し、乾燥・粉碎して試料とした。これを1%の割

合で混和した土壌において、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、発芽率、草丈及び乾物重において本組換えダイズ区及び非組換えダイズ区の間には統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表7, p.14)。生重については統計学的有意差が認められ、本組換えダイズ区の方が非組換えダイズ区に比べて10個体当たりの平均で0.56g重かった(別添資料9, 表7, p.14)。

土壌微生物相試験

隔離ほ場において収穫期まで約6ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの栽培後土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌、放線菌及び細菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズ由来の試験区に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9, 表8, p.15)。

15 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。

(2) 使用等の方法

25

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

30

(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。

35

(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

5

(6) 国外における使用等に関する情報

国外における本組換えダイズの承認に関する情報を表 5 に示した。また、我が国における承認に関する情報は、第一、2(3)八 (p.13)に記した。

10

表 5 国外における本組換えダイズ承認に関する情報(2014 年 10 月現在)

| 国名 | 承認機関 | 承認年 | 安全性審査の種類 |
|------------------|--|--------|----------|
| 米国 | 米国農務省 (USDA) | 1998 年 | 環境 |
| | 米国食品医薬品庁 (FDA) | 1998 年 | 食品・飼料 |
| アルゼンチン | 農牧業バイオテクノロジー諮問委員会(CONABIA) | 2001 年 | 環境 |
| | 農畜産物衛生管理機構 (SENASA) | 2008 年 | 食品・飼料 |
| EU | 欧州食品安全機関(EFSA) | 2012 年 | 環境・食品・飼料 |
| ウルグアイ | National Biosafety Cabinet of Uruguay* | 2012 年 | 環境・食品・飼料 |
| オーストラリア・ニュージーランド | オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ) | 2004 年 | 食品 |
| カナダ | カナダ食品検査庁 (CFIA) | 2006 年 | 環境 |
| | カナダ食品検査庁 (CFIA) | 2000 年 | 飼料 |
| | カナダ保健省 (Health Canada) | 2000 年 | 食品 |
| 韓国 | 韓国食品医薬品庁(KFDA) | 2011 年 | 食品 |
| | 韓国農村振興庁(RDA) | 2011 年 | 環境・飼料 |
| ブラジル | ブラジル国家バイオ安全技術委員会(CTNBio) | 2010 年 | 環境・食品・飼料 |

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

15

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズは、我が国において長期にわたる栽培の経験があるが、自然環境下において雑草化した事例は報告されていない。

10 第一、2(6) に記載したとおり、2013年に隔離ほ場において本組換えダイズと非組換えダイズを栽培し、競合における優位性に係わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率を調査した。

その結果、主茎節数及び一莢内粒数以外の調査項目には統計学的有意差ある
15 いは差異は認められなかった。

主茎節数の平均値については、本組換えダイズの20.1節に対して非組換えダイズは18.8節であり、統計学的有意差が認められた。しかし、いずれもダイズの主茎節数の変動の範囲(8~33)内にあり(後藤, 2001)、主茎長や一株地上部重等には有意差が認められなかったことから、この差が競合における優位性を高め
20 ることはないと考えられた。

一莢内粒数の平均値については、本組換えダイズの2.17粒に対して非組換えダイズは2.03粒であり、統計学的有意差が認められた。しかし、本組換えダイズと非組換えダイズの一莢成熟粒数には統計学的有意差がなく、本組換えダイズの種子の生産量は非組換えダイズと差がないと考えられる。また、いずれの
25 一莢内粒数もダイズの一莢内粒数の範囲内(1~3)にあることから(後藤, 2001)、この差が競合における優位性を高めることはないと考えられた。

以上より、本組換えダイズの競合における優位性が非組換えダイズに比べて高まる可能性を示すような相違はないと考えられる。

30 また、本組換えダイズにはPAT蛋白質の発現により除草剤グルホシネート耐性が付与されているが、自然環境下において除草剤グルホシネートが散布されるような状況は考え難いことから、本形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

35 以上のことから、本組換えダイズについて競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 (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

10

以上のことから、本組換えダイズの競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

2. 有害物質の産生性

15

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生することは知られていない。

20

隔離ほ場試験において本組換えダイズと非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った(第一、2(6) g p.20)。鋤込み試験では、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区において、ダイコンの発芽率、草丈及び乾物重については統計学的有意差が認められなかった。他方、ダイコンの生重の平均値では本組換えダイズ区が 5.94g、非組換えダイズ区が 5.38g となり、統計学的有意差が認められた。しかし、乾物重において統計学的有意差は認められなかったことから、この差が挿入遺伝子に起因する差とは考え難い。また、後作試験、土壌微生物相試験において統計学的有意差は認められなかった。よって、本組換えダイズは新たに有害物質の産生性を獲得していないと考えられる。

本組換えダイズ中では除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、PAT 蛋白質のアミノ酸配列に基づき包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった(第一、2(1)口 p.9)。

5 なお、本組換えダイズに除草剤グルホシネートを散布すると、PAT蛋白質の代謝産物である*N*-アセチル-L-グルホシネートが産生される。*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することではなく(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。また、*N*-アセチル-L-グルホシネートはダイズにおけるグルホシネートの残留基準値(2 ppm)の規制対象化合物に含まれており(公益財団法人日本食品化学研究振興財団)、ラット、マウス、イヌ等の哺乳類を対象に毒性試験が行われた結果、その毒性は、普通物に分類されるグルホシネートよりも毒性が低いことが確認されている(バイエルクロップサイエンス株式会社, 2011)。

10

以上のことから、本組換えダイズの有害物質の産生性に関し、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

15

(3) 影響の生じやすさの評価

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

30

ダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが挙げられる。ツルマメは、北海道、本州、四国、九州に広く分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地などを主な生育地としている(阿部・島本, 2001)。したがって、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物として、ツルマメが特定され

35 た。

(2) 影響の具体的内容の評価

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

(3) 影響の生じやすさの評価

ツルマメは我が国において北海道南部から九州まで自生している(阿部・島本, 2001)。したがって、本組換えダイズを隔離ほ場において栽培した場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は否定できない。

隔離ほ場試験において、本組換えダイズと非組換えダイズ間の交雑率を調査するために、本組換えダイズを花粉親とし、非組換えダイズの収穫種子における交雑体の発生頻度を調査した。非組換えダイズの収穫種子を無作為に抽出して温室内で播種し、初生葉から第一本葉が展開したステージの実生に除草剤グルホシネート(薬量 55.5g a.i./450L/10a 相当)を散布して生存個体数を調査した。試験に供試し、発芽した 4,093 株のうち、除草剤グルホシネートを 2 度散布後の生存個体数は 18 個体であり、本調査において本組換えダイズと非組換えダイズとの間の交雑率は 0.44%であった(別添資料 9, p.17)。ダイズの他殖率は通常 1%以下であることが知られており(Caviness, 1966 ; Chiang and Kiang, 1987)、本組換えダイズと非組換えダイズの交雑率は、ダイズの通常の交雑率を超えるものではないと考えられた。さらに、花粉の充実度及びサイズについても本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 9, 表 4, p.9 及び図 7, p.10)。したがって、本組換えダイズの生殖成長の特性は従来のダイズの変動の範囲であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられた。また、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は *pat* 遺伝子により、除草剤グルホシネート耐性の形質を有すると考えられる。しかし、本形質は除草剤グルホシネートが散布されない自然環境下では競合における優位性を高めるとは考え難く、これらの形質を有する雑種が生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は低いと考えられた。

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

ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、我が国において両種の開花期が重なることは稀である(阿部・島本, 2001)が、晩生の秋ダイズが栽培されている温暖な地域(九州や四国)では、ダイズの開花期とツルマメの開花期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズとツルマメを 50 cm 間隔で交互に配置して
5 栽培した場合、結実したツルマメから採種された種子 686 個中、雑種は 5 個あり、交雑率は 0.73%であった(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズを供試して、開花ピークを近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、交雑率が 0.136% (調査 25,741 個体中、雑種 35 個体)であった。他方、組換えダイズとツルマメの
10 距離を離して栽培した場合、2、4、6 m の距離で交雑率はそれぞれ 0.013%(調査 7,521 個体、7,485 個体、7,508 個体中それぞれ雑種 1 個体)であり、8、10 m の距離では交雑種子は認められなかった(Mizuguti *et al.*, 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。
15

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35 以上のことから、本組換えダイズの交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4. その他の性質

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

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

ダイズは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下に
5 おいて雑草化した事例は報告されていない。本組換えダイズと非組換えダイズ
との間で競合における優位性に係わる諸形質のうち形態及び生育の特性、成体
の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性を隔離ほ場
試験において比較検討した。その結果、主茎節数と一莢内粒数において本組換
10 えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたが、いずれも
ダイズの主茎節数と一莢内粒数の変動の範囲内にあり、この差が競合における
優位性を高めることはないと判断した。また、主茎節数と一莢内粒数以外の項
目では本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的な有意差あるいは相
違は認められなかった。

また、本組換えダイズに導入された *pat* 遺伝子により発現する PAT 蛋白質は
15 高い基質特異性を有しており、除草剤グルホシネート耐性を付与する以外に、
宿主の代謝系を変化させ生理学的及び生態学的特性に影響を及ぼす可能性は低
いと考えられた。さらに、本組換えダイズが有する除草剤グルホシネート耐性
は、除草剤グルホシネートが散布されない自然環境下では、競合において優位
に作用することはないと考えられた。

20 以上のことから、本組換えダイズの競合における優位性に起因する生物多様
性影響が生ずるおそれはないと判断した。

有害物質の産生性：

これまでに、ダイズが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害
25 物質を産生するという報告はない。隔離ほ場試験において、本組換えダイズと
非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を後作試験、鋤込み試験及
び土壌微生物相試験により比較検討した。後作試験及び土壌微生物相試験の結
果、本組換えダイズ区と非組換えダイズ区との間で統計学的有意差は認められ
なかった。鋤込み試験の結果、本組換えダイズ区と非組換えダイズ区との間で、
30 ダイコンの発芽率、草丈及び乾物重については統計学的有意差が認められな
かったが、生重において統計学的有意差が認められた。しかし、乾物重には統計
学的有意差が認められなかったことから、挿入遺伝子に起因する差ではないと
考えられた。

本組換えダイズ中では除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発
35 現しているが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影
響して新たに有害物質を産生することは考え難い。さらに、PAT 蛋白質の代謝

産物である *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することではなく、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

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

5

交雑性：

我が国にはダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが自生していることから、本組換えダイズとツルマメが交雑して雑種を形成し、ツルマメによる戻し交配によりツルマメの集団中に *pat* 遺伝子が浸透する可能性、また、雑種の
10 個体群が優占化することにより、ツルマメの個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられた。隔離ほ場試験において交雑性、花粉の充実度及びサイズについて調査した結果、本組換えダイズの生殖特性は従来ダイズの変動の範囲内であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられた。また、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は *pat* 遺伝子によ
15 り、除草剤グルホシネート耐性の形質を有すると考えられる。しかし、本形質は除草剤グルホシネートが散布されない自然環境下では競合における優位性を高めるとは考え難く、これらの形質を有する雑種が生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は低いと考えられた。ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、開花期が重なり、かつ隣接して生育してい
20 る条件下においても交雑する可能性は低いことが報告されている。また、ダイズとツルマメの種間雑種は、自然環境下に放任された場合、速やかに淘汰されることが報告されている。よって、本組換えダイズがツルマメと交雑し、*pat* 遺伝子がツルマメの集団内に浸透してゆく可能性は極めて低いと考えられた。

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

よって、総合評価として、本組換えダイズを第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

30

参考文献

- Abel, G. H. (1970) Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agron. J.* 62: 121-123.
- 5 Ahrent, D.K.; Caviness, C.E. (1994) Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
- Caviness, C.E. (1966) Estimates of natural crosspollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
- 10 Chiang, Y.C.; Kiang, Y.T. (1987) Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 28: 1-11.
- FAO (2013) FAOSTAT Final 2013 data, Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Updated: 2014.8.4.
- 15 <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (閲覧日 2014年8月28日)
- Fujita, R.; Ohara, M.; Okazaki, K.; Shimamoto, Y. (1997) The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *J. Hered.* 88: 124-128.
- 20 Gielen, J.; De Beuckeleer, M.; Seurinck, J.; Deboeck, F.; De Greve, H.; Lemmers, M.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846.
- 25 Hymowitz, T.; Harlan, J.R. (1983) Introduction of soybean to north America by Samuel Bowen in 1765. *Econ. Bot.* 37: 371-379.
- Kiang, Y.T.; Chiang, Y.C.; Kaizuma, N. (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate prefecture, Japan. *J. Hered.* 83: 325-329.
- 30 Kuroda, Y.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Vaughan, D. A. (2008) Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Sci.* 48: 1071-1079.
- 35 Kuroda, Y.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Vaughan, D. (2010) The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Mol. Ecol.* 19: 2346-2360.
- Mizuguti, A.; Ohigashi, K.; Yoshimura, Y.; Kaga, A.; Kuroda, Y.; Matsuo, K. (2010) Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 9: 13-23.
- 40 Nakayama, Y.; Yamaguchi, H. (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a
- 45

- designed population. *Weed Biol. Manag.* 2: 25-30.
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.-H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 5 OECD (1999) Consensus Document on General Information Concerning the Genes and their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11.
- 10 OECD (2000) Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15.
- OECD (2002) Module : Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25
- 15 Pietrzak, M.; Shillito, R.D.; Hohn, T.; Potrykus, I. (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucl. Acids Res.* 14: 5857-5868.
- 20 Ray, J.D.; Kilen, T.C.; Abel, C.A.; Paris, R.L. (2003) Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ. Biosafety Res.* 2: 133-138.
- Strauch, E., Arnold, W., Renare, A., Wohlleben, W., Puhler, A., Eckes, P., Dann, G., Uhlmann, E., Hein, F., Wengenmayer, F. (1993) Phosphinothricin-resistance gene active in plants, and its use. European patent. 275957 B1.
- 25 Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3737-3741.
- 30 Thompson, C.J.; Rao Movva, N.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523.
- Wehrmann, A.; Van Vliet, A.; Opsomer, C.; Botterman, J.; Schulz, A. (1996) The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.* 14: 1274-1278.
- 35 William, K. R., (1997) United States Utility Patent Patent No. US 5,659,113 Soybean cultivar A5547.
- 40 http://www.lens.org/images/patent/US/5659113/A/US_5659113_A.pdf (閲覧日 2014年12月11日)
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- 45

- Yoshimura, Y. (2011) Wind tunnel and field assessment of pollen dispersal in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] J. Plant Res. 124:109-114
- 阿部 純; 島本 義也 (2001) *ダイズの進化 栽培植物の自然史*. 山口 裕文, 5 島本 義也 編著 北海道大学図書刊行会 p.77-95.
- 大庭 寅雄 (2001) *ダイズの品種生態と選択, 品種の生態型と選択*, 転作全書 第二巻 *ダイズ・アズキ*. 農文協 p.102-105.
- 10 加賀 秋人; 友岡 憲彦; Ugen P.; 黒田 洋輔; 小林 伸哉; 伊勢村 武久; Miranda-Jonson G.; Vaughan D. A. (2005) *野生ダイズと栽培ダイズとの自然交雑集団の探索と収集 - 秋田県及び広島県における予備的調査 -*. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p.59-71.
- 15 鎌田 慶朗 (1992) *3.大豆の化学, 大豆の科学*. 山内文男・大久保一良 編 朝倉書店 p.27-47.
- 黒田 洋輔; 加賀 秋人; Anna Apa; Vaughan D. A.; 友岡 憲彦; 矢野 博; 松岡 伸之 (2005) *野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング - 秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県における現地調査から -*. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p.73-95.
- 20
- 黒田 洋輔; 加賀 秋人; Gaufu J.; Vaughan D. A.; 友岡 憲彦 (2006) *野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング - 秋田県、茨城県、高知県、佐賀県における現地調査から -*. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第22巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 1-12.
- 25
- 黒田 洋輔; 加賀 秋人; Poafa J.; Vaughan D. A.; 友岡 憲彦; 矢野 博 (2007) *野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング 秋田県、兵庫県、佐賀県における現地調査から*. 植物遺伝資源探索導入調査報告書 通巻第23巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 9-27.
- 30
- 公益財団法人 日本食品化学研究振興財団 *食品に残留する農薬等の限量一覽表* http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/agrdtl.php?a_inq=18900 (閲覧日 2013年 1月 25日)
- 35
- 国分 牧衛 (2002) *ダイズ, 作物学事典*, 日本作物学会編. 朝倉書店 p.370-377.
- 40
- 後藤 寛治 (2001) *ダイズの起源と特性, 栽培の起源と分布*, 転作全書 第二巻 *ダイズ・アズキ*. 農文協 p.33-41.
- 昆野 昭晨 (2001) *生育のステージと生理・生態, 花芽分化の生理*, 転作全書

第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.68-73.

バイエルクロップサイエンス株式会社 (2011) 農薬抄録. グルホシネート(除草剤). 独立行政法人農林水産消費技術センター.

5 <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/glufosinate/index.htm>(閲覧日 2013年1月25日)

橋本 鋼二 (2001a) ダイズの品種生態と選択, 品種の生態型と選択, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.91-96.

10 橋本 鋼二 (2001b) ダイズの品種生態と選択, 品質・用途と品種選択, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.110-112.

農林水産省 (2012) 農林水産省植物種類別審査基準 大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill) . 農林水産省品種登録ホームページ .
15 <http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf>
(閲覧日2014年4月25日)

農林水産省 (2013) 平成23年度食料需給表 (概算値) (平成25年8月8日公表)
20 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyu/pdf/zyukyu_130808.pdf(閲覧日 2013 年 8 月 21 日)

農林水産省 (2014a) 農林水産統計. 平成 24 年産大豆、小豆、いんげん及びらっかせい (乾燥子実) の収穫量. 農林水産省大臣官房統計部 (平成 26 年 2 月 18 日
25 公表、平成 26 年 2 月 24 日訂正)
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokutei_sakumotu/pdf/syukaku_daizuetc13_a.pdf
(閲覧日 2014 年 4 月 17 日)

農林水産省 (2014b) 農林水産物輸出入概況 2013年 (平成25年) 確定値. 国際部
30 国際政策課 (平成26年3月26日公表)
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_13.pdf (閲覧日
2014 年 4 月 3 日)

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

別添資料の内容

別添資料 1 : Description of vector pB2/35SAcK. (ベクター pB2/35SAcK の説明)

社外秘情報につき非開示

5 別添資料 2 : Evaluation of cryptic gene expression of the *bla* gene in Liberty Link soybean event A5547-127(A5547-127 における *bla* 遺伝子発現の評価)

社外秘情報につき非開示

10 別添資料 3 : Molecular determination of the number of inserted *pat* and *bla* gene copies in Liberty Link soybean event A5547-127. (A5547-127 における *pat* 及び *bla* 遺伝子のコピー数の決定)

社外秘情報につき非開示

15 別添資料 4 : Detailed insert characterization of Glycine max transformation event A5547-127 by Southern blot analysis. (サザンブロット解析による A5547-127 に移入された核酸の解析)

社外秘情報につき非開示

20 別添資料 5 : Mendelian inheritance and agronomic performance of event A5547-127. (A5547-127 における分離比の調査)

社外秘情報につき非開示

25 別添資料 6 : Bioinformatic analysis of Glycine max A5547-127(A5547-127 のバイオインフォマティクス解析)

社外秘情報につき非開示

30 別添資料 7 : Determination of inserted transgenic sequences in *Glycine max* elite event A5547-127. (A5547-127 に挿入された配列の決定)

社外秘情報につき非開示

35 別添資料 8 : Molecular demonstration of the stability of the integration of *Glycine max* transformation event A5547-127. (A5547-127 における挿入配列の安定性)

社外秘情報につき非開示

別添資料 9 : 除草剤グルホシネート耐性ダイズ A5547-127 の隔離ほ場試験報告書 (2013 年度)

社外秘情報につき非開示

別添資料 10：イベント識別方法

社外秘情報につき非開示

別添資料 11：Event-specific method for the quantification of soybean line A5547-127
5 using real time PCR, validation report(A5547-127 のイベント識別法の
再現性の検証)

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 26 年 10 月 15 日

- 5 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性ダイズ(pat, *Glycine max* (L.) Merr.)(A5547-127, OECD UI: ACS-GMØØ6-4) (以下、「本組換えダイズ」とする。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合は、以下の措置を執ることとする。

- 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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。

(平成26年10月現在)

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

- 20 (個人名は個人情報のため非開示)

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

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

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

5

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

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

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

15

本組換えダイズがわが国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、速やかに、農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。