

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ
(改変 *csr1-2*, *Glycine max* (L.) Merr.)(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)
申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	3
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
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	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
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	5
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	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	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	6
ホ 病原性	6
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	7
(1) 供与核酸に関する情報	7
イ 構成及び構成要素の由来	7
ロ 構成要素の機能	7
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	7
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	12
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	12
(2) ベクターに関する情報	13
イ 名称及び由来	13
ロ 特性	13
① ベクターの塩基数及び塩基配列	13
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	13

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	13
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	15
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	15
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	15
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	15
①核酸が移入された細胞の選抜の方法	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	15
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	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
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	18
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	19
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	21
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	21
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がある場合は、当該伝達性の有無及び程度	23
(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	23
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
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	24
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	24
a 形態及び生育の特性	24
b 生育初期における低温又は高温耐性	25
c 成体の越冬性又は越夏性	25
d 花粉の稔性及びサイズ	25
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	25
f 交雑率	26
g 有害物質の産生性	26
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	27
(1) 使用等の内容	27
(2) 使用等の方法	28
(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	28
(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	28
(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	28

(6) 国外における使用等に関する情報	28
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	29
1 競合における優位性	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	29
2 有害物質の産生性	30
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
(2) 影響の具体的内容の評価	30
(3) 影響の生じやすさの評価	30
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	30
3 交雑性	30
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
(2) 影響の具体的内容の評価	31
(3) 影響の生じやすさの評価	31
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
4 その他の性質	32
第三 生物多様性影響の総合的評価	33
参考文献	34
緊急措置計画書	35

第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 9 月 29 日

5

農林水産大臣 赤松 広隆 殿
環境大臣 小沢 鋭仁 殿

10

氏名 **BASF ジャパン株式会社**
代表取締役社長 成尾 友良
申請者

住所 東京都港区六本木六丁目 10 番 1 号
六本木ヒルズ森タワー21 階

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。

20

遺伝子組換え生物等の種類の名称	イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 <i>csr1-2</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)
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

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

英名:Soybean

学名:*Glycine max* (L.) Merr.

15

② 宿主の品種名

宿主には、米国成熟期グループ VIII(中生)に属するダイズ品種 Conquista を用いた。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、国内でダイズが自生している地域は知られていない。近縁野生種であるツルマメ(*Glycine soja*)は、韓国、台湾、中国北東部、中国とロシアの国境地域に自生し(文献 13)、我が国においても広く分布している(文献 44)。

25

(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

30

ダイズの原産地である中国では、紀元前 11 世紀頃にはすでにダイズが栽培されていたと報告されている(文献 4)。我が国には中国から伝わったとされ、「古事記」(712 年)、「日本書紀」(720 年)に記録があることから、その当時既に我が国でも栽培されていたと考えられる(文献 43)。1950 年代には米国が中国を越え世界最大の生産国となり、1960 年代にはブラジル、1970 年代にはアルゼンチンなどでも生産が拡大した。2009 年の我が国の主要なダイズ輸入先国は米国、ブラジル、カナダ、中国であった(文献 41)。

35

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

40

主たる栽培地域

2008 年の我が国の大豆の作付面積(乾燥子実)は 14 万 7,100 ha で、全国的に栽培されているが、主に北海道、東北、九州などで栽培されている(文献 47)。世界では、米国、ブラジル、アルゼンチン等が主要な生産国であるが、中国、インド等アジアでも栽培されている(文献 29)。

45

栽培方法

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、北日本では5月中・下旬、関東地方では6月、九州地方では6~7月が標準である。種子は消毒済みのものを用い、播種深度は3~5cmがよく、播種量は畝間70cm、株間20cmで点播の場合1株2~3粒播き、最終的な苗立ち密度を1m²当たり15本程度確保できればよい。播種後、個体群がほ場一面を覆うようになるまでは、ほ場の除草が必要である。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回程度行うと効果的である。病虫害は発生が多い地帯では抵抗性の品種を採用するとともに、早めに適切な薬剤を散布する。収穫適期は、莢の水分が20%以下、茎の水分が50~60%以下になったときである。小規模な栽培では手作業で引き抜き、地干し乾燥して脱穀する方法や、ビーンハーベスタ(集束型刈取機)で刈り取り、脱穀・乾燥する方法がとられている。近年、大規模な経営ではコンバインを用いる場合が多くなっている(文献42; 文献43)。

ダイズは短日植物である(文献9)。ダイズにはさまざまな栽培品種があるが、それぞれの光周性及び最適生育温度がその品種の栽培に適した地域を決定する上で、重要な要素となっている。ダイズの品種は、光周性に基づく最適生育緯度によって成熟期グループ(Maturity Groups; MG)に分類されている。MGには北部のMG000(緯度45度)から赤道付近のMGXまで13種類ある。MGごとに、品種はさらに生育日数によって早生、中生、晩生品種に分類されている。

流通実態及び用途

ダイズは代表的油糧種子作物であり、今日世界中で消費されている(文献28)。現在、世界のダイズ生産量は、他のあらゆる食用油糧種子作物を大きく上回っている(文献35; 文献29)。2008年の総生産量は2億2090万トンであり、世界の油糧種子総生産量の56%を占めている(文献29)。ダイズは食品業界、産業界で幅広く使用されており、食用植物油や動物飼料用高蛋白粉の主要原料である。食品用途には主に、マーガリン、ショートニング、サラダ油、料理用のダイズ油などがある。また、ダイズ油は石鹼等の産業用途としても使われている。

我が国では大部分を輸入に頼っているが、北海道、東北地方などでダイズの国内生産が行われており、国内生産量は約23万トンである(文献48)。現在我が国では年間約415万トンのダイズが消費されている。そのうち約72%が製油原料、約25%が豆腐・味噌・醤油などの食品用途となっている(文献50)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

ダイズは種子植物であり、一年生の双子葉植物である。成長特性によって、無限伸育型、有限伸育型の2種類が主に栽培品種として使用されている(文献2)。無限伸育型は、下位節の花芽分化後も茎頂の生育が長く続き、頂部ほど茎が細く、葉が小さくなり、頂部の花房は未発達で終了する。無限伸育型は、主に米国中部・

北部で栽培されている(MG 000~IV)。有限伸育型は、下位節の花芽分化後まもなく頂部の成長が止まり、頂部の茎、葉は大きく、花房は発達する。有限伸育型は主に米国南部で栽培されている(MG V~X)。また、我が国の品種のほとんどは有限伸育型である。

5

ダイズの発芽後、子葉の次に出る 1 枚目の葉を初生葉という。通常、卵型単葉で対生する。本葉は複葉で、通常 3 枚の小葉から形成される。小葉を 4 枚以上持つ複葉も時折みられる。ダイズの花は、5 片からなる 1 管状がく、5 花弁(旗弁 1 枚、翼弁 2 枚、竜骨弁 2 枚)からなる 1 花冠、1 本の雌ずい、1 本が離れている 10 本の雄ずいから構成されている。莢はまっすぐ、あるいはわずかに曲がり、長さは 2~7cm 程度である。種子の形状は通常卵型だが、長いもの、平らなもの、ほぼ球状など、品種によって異なる場合がある(文献 4)。ダイズが必要とする窒素の 25~75% が根粒における内部共生菌 *Bradyrhizobium japonicum* の窒素固定により供給される(文献 34)。

10

15

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子は土壌温度が 10°C に達すると発芽し、5~7 日後に出芽する。ダイズは弱酸性から中性で肥料養分に富み、排水のよい土壌でよく生育する。酸性土では生産性が落ちるため、酸性土壌では石灰を投入し、pH6.0~6.5 に調整する(文献 43)。霜耐性ダイズ品種は存在せず、ダイズが冬季の凍結環境を生き延びることはない(文献 24)。

20

USDA の有害雑草リストにダイズは含まれておらず(文献 33)、これまで我が国においてダイズが雑草化した例は報告されていない。

25

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

通常、ダイズ植物 1 個体中の莢数は最高 400、各節に 2~20 の莢が形成される。各莢には 1~5 個の種子が入っている(文献 24)。莢は完熟すると褐色に変化し、乾燥が進むことにより裂莢し、種子がはじき出され地表に落下する(文献 43)。裂莢性には品種間差があり、一般にアメリカの無限伸育性品種は裂莢しにくく、日本の品種は裂莢しやすい(文献 46)。ダイズ種子には休眠性がほとんどなく、ある特殊な条件下で越冬した際に発芽する場合もあるが、十分に生育することはない(文献 24)。ダイズ子実の発芽力は常温では通常約 3 年で失われる(文献 45)。

35

40

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

45

種子繁殖するダイズは、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しない。

- 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

10 ダイズの自家受粉率は高く、他家受粉率は通常 1%未満である(文献 6)。自家不和合性は知られていない。近縁野生種としては、染色体数が同じ(2n=40) ツルマメ(*Glycine soja*)が挙げられ、細胞学的、形態学的、分子生物学的に見てダイズの祖先と考えられている。ツルマメは、韓国、台湾、中国北東部、中国とロシアの国境地域に自生し(文献 13)、我が国においても広く分布している(文献 44)。ダイズとツルマメとの交雑率については、独立行政法人農業環境技術研究所において調べられており、2005 年に組換えダイズ(除草剤グリホサート耐性ダイズ)をツルマメから 5cm の距離に移植し、植えつけ時期を調節することにより両者の開花最盛期を近づけ交雑率を調査した結果、検定したツルマメ種子 32,502 粒中、自然交雑したのは 1 粒であったと報告されている(文献 20)。

20 また、丹波黒とツルマメの自然交雑率を調査した事例もある。丹波黒は、一般的なダイズ品種と比較して開花期が遅く、我が国固有のダイズ栽培品種である。この丹波黒とツルマメを 50 cm 間隔(鉢の中心から隣接鉢の中心間との距離)で交互に各 30 個体配置し(5×12 列)、ダイズとツルマメとの自然交雑率を調べた結果、得られたツルマメの後代 686 個体中、丹波黒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、交雑率は 0.73%であったと報告されている(文献 22)。我が国ではツルマメは畑の周辺等にも自生しているが、一般的にダイズの開花期はツルマメより早く(文献 22)、開花期が重なりにくいと考えられている。一方、ツルマメ同種間の交雑率は、訪花昆虫が多く観察された自然条件下では、平均 13%であったとの報告がある(文献 8)。

30 なお、ダイズが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

35 ダイズ花粉の直径は21~30 μ mである(文献3)。ダイズは1花あたり3,600粒前後の花粉を生産し(文献7)、花粉の寿命は数時間である。受精可能な時期は開花1日前から開花後2日程度で、同じ花の中で受粉がおこる(文献24)。ダイズ花粉の媒介は主に訪花昆虫による。飛散距離と自然交雑率については、独立行政法人農業環境技術研究所により報告されている。2001~2004年の4年間、花粉源からの距離0.7m、1.4m、2.1m、2.8m、3.5m、7.0m、10.5mでダイズ間の交雑率を調べた結果、0.7mの距離間でも交雑率は0.023~0.19%、10.5m離れると交雑率は0%であった。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、半翅目の昆虫が観察されたと報告されている(文献36)。

45 ホ. 病原性

—

へ. 有害物質の産生性

5 自然条件下において、ダイズが周囲の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ことは、これまでに知られていない。

ト. その他の情報

—

10

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

15

イ. 構成及び構成要素の由来

供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1(p9)に示した。

ロ. 構成要素の機能

20

- 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

25

供与核酸の構成要素の機能については表 1(p9)に示した。目的遺伝子及び発現調節領域等については下記に詳細を記した。

改変 *csr1-2* 遺伝子

30

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (CV127, OECD UI: BPS-CV127-9) (以下、CV127 系統とする)は、BASF プラントサイエンス社とブラジル農業畜産研究公社(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria; EMBRAPA)とで共同開発された。

35

CV127 系統に導入されたイミダゾリノン系除草剤耐性遺伝子(シロイヌナズナ由来改変 *csr1-2* 遺伝子)は、アセトヒドロキシ酸合成酵素(以下、AHAS 蛋白質とする) (別名 アセト乳酸合成酵素 (ALS)) をコードしており、その遺伝子産物である AHAS 蛋白質のアミノ酸配列 653 番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換されている(以下、改変 AHAS 蛋白質とする) (文献 11; 文献 12)。

40

AHAS 蛋白質は、多くの植物が生存に必要とする酵素で、あらゆる植物、微生物に含まれ、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成の第 1 段階を触媒する(文献 32)。通常の植物では、イミダゾリノン系除草剤が AHAS 蛋白質を阻害することで分岐鎖アミノ酸が欠乏し、生育が阻害される。一方、改変 *csr1-2* 遺伝子を導入した植物は、通常の生合成機能は影響を受けず、本除草剤に対して耐性を示す(文献 25; 図 1, p10)。この改変 AHAS 蛋白質における

45

アミノ酸変異により、イミダゾリノン系除草剤の結合が阻害され、通常の生合成

機能が影響を受けることなく除草剤耐性が付与されることが知られている(文献23)。

表 1. 供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	位置 (bp)	由来及び機能
ダイズゲノムへの導入に使用した約 6.2kb の直鎖状 DNA 断片 (LF-6.2PvuII)		
<i>lacZ</i> promoter	8468-8589	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i> ; <i>E. coli</i>) <i>lacZ</i> プロモーター; β -ガラクトシダーゼ アルファフラグメント(<i>lacZ'</i>) の転写を促進する
<i>lacZ'</i> CDS	8590-8669 5718-5994	<i>E. coli</i> β -ガラクトシダーゼ アルファフラグメントのコーディング配列; アルファ相補性により、マルチクローニングサイトへ目的配列が挿入されたかどうかを青白選抜で確認できる
T3 promoter ¹	8632	バクテリオファージ T3 プロモーター転写開始部位; ファージミドで T3 RNA ポリメラーゼによる RNA <i>in vitro</i> 合成を可能にする
Arabidopsis gDNA, unannotated 1	1-1051	シロイヌナズナゲノム DNA 由来の配列 相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は同定されていない
<i>AtSEC61γ</i> 5'UTR	1052-1113	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 5'非翻訳領域 <i>SEC61γ</i> 遺伝子の転写・制御に関わる領域
<i>AtSEC61γ</i> CDS	1114-1207 1307-1422	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> コーディング領域 <i>SEC61γ</i> サブユニットは、 α 及び β サブユニットと共に、輸送蛋白質複合体の一部を形成する
<i>AtSEC61γ</i> intron 1	1208-1306	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 第1イントロン 転写後に切り出され、最終RNA産物には含まれない
<i>AtSEC61γ</i> 3'UTR and terminator	1423-1442 1916-2119	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 3'非翻訳領域及びターミネーター <i>SEC61γ</i> 遺伝子の転写終結・制御に関わる領域
<i>AtSEC61γ</i> intron 2	1443-1915	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 第2イントロン 転写後に切り出され、最終RNA産物には含まれない
<i>AtAHAS</i> 5'UTR and putative promoter	2120-2483	シロイヌナズナ <i>AHAS</i> 5'非翻訳領域及び推定プロモーター <i>AHAS</i> 遺伝子の転写・制御に関わる領域
改変 <i>csr1-2</i> 遺伝子	2484-4496	シロイヌナズナ改変 <i>csr1-2</i> 遺伝子領域 <i>AHAS</i> 蛋白質のアミノ酸配列 653 番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された改変アセトヒドロキシ酸合成酵素(改変 <i>AHAS</i> 蛋白質) を発現させ、イミダゾリノン系除草剤耐性をもたらす
<i>AtAHAS</i> 3'UTR and terminator	4497-4714	シロイヌナズナ改変 <i>AHAS</i> 3'非翻訳領域及びターミネーター <i>AHAS</i> 遺伝子の転写終結・制御に関わる領域
Arabidopsis gDNA, unannotated 2	4715-5717	シロイヌナズナゲノム DNA 由来の配列 相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は同定されていない
T7 promoter ¹	5805	バクテリオファージ T7 プロモーター転写開始部位; ファージミドで T7 RNA ポリメラーゼによる RNA <i>in vitro</i> 合成を可能にする

1. T3 promoter、T7 promoterの終止点は決定されていない。

太枠内は改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社に帰属する)

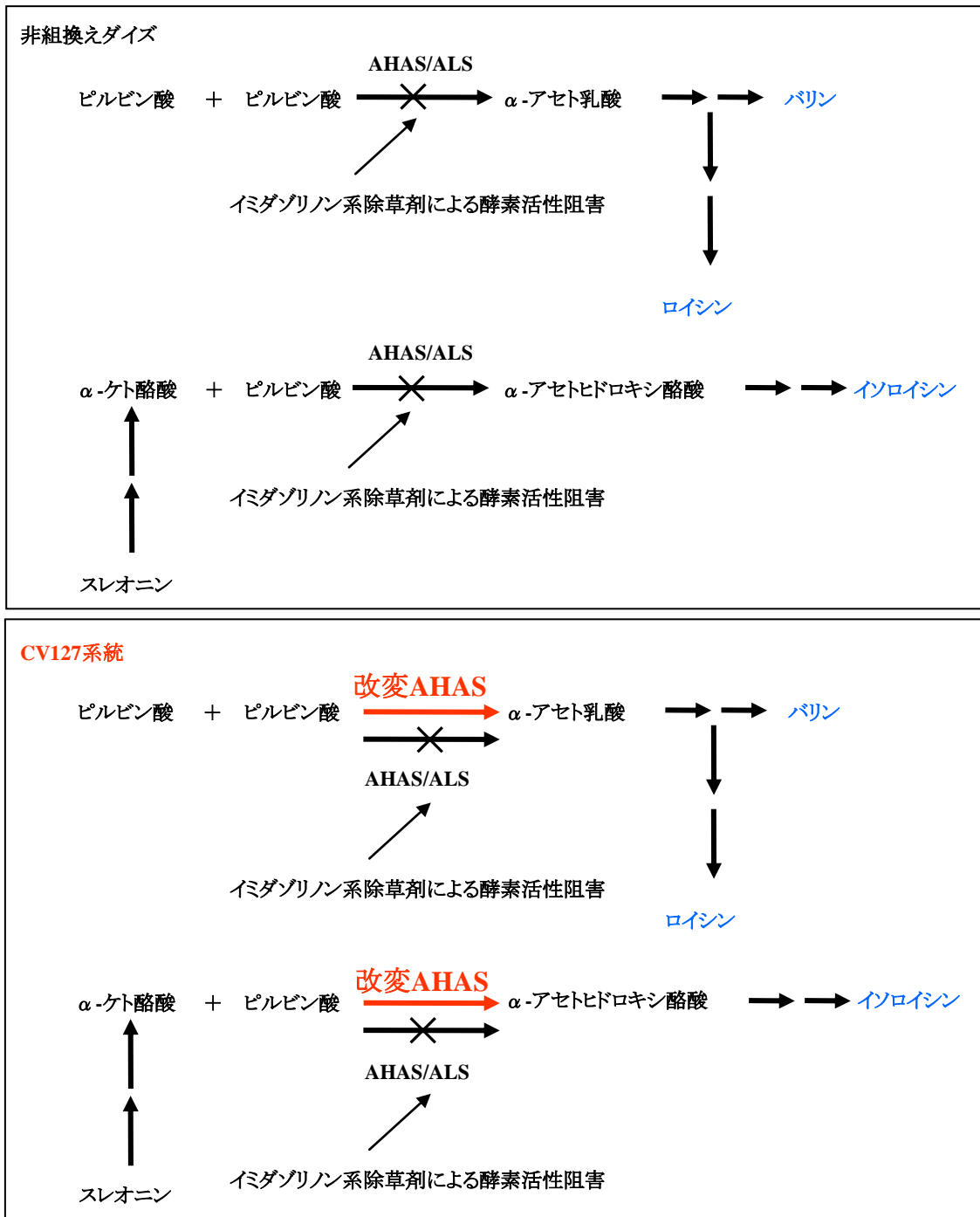


図1. 改変AHAS蛋白質の作用機構

AHAS/ALSは、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成の第1段階を触媒する。通常、イミダゾリノン系除草剤によってこの酵素活性が阻害されるのに対し、改変AHAS蛋白質は影響を受けず、イミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFジャパン株式会社に帰属する)

発現調節領域

5 改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域はシロイヌナズナ由来の *AHAS* 遺伝子プロモーターから発現し、シロイヌナズナ由来の 3'非翻訳領域(UTR)を含んでいる。

局在化シグナル

10 改変 *csr1-2* 遺伝子産物は、N 末端領域の葉緑体輸送ペプチドを含む 670 アミノ酸配列からなる前駆体を形成すると考えられている(文献 19)。その後、前駆体(670 アミノ酸)から葉緑体輸送ペプチド(85 アミノ酸)が切断され、585 アミノ酸からなる成熟した改変 *AHAS* 蛋白質になると推測されている。改変 *AHAS* 蛋白質は葉緑体に局在する。

15 *AtSEC61γ* サブユニット遺伝子

改変 *csr1-2* 遺伝子をクローニングした当時、*AHAS* 遺伝子のプロモーター情報はまだわかっておらず、ダイズへの形質転換には、改変 *csr1-2* 遺伝子の開始コドンから上流約 2.5 kbp を含めた断片を用いた。その後 2000 年にシロイヌナズナの全塩基配列が決定され、その情報をもとに相同性検索(BLASTn 検索)を行ったところ、この約 2.5 kbp 中に完全な *AtSEC61γ* サブユニット遺伝子(GenBank 国際塩基配列データベース Accession No. At3g48570, 69 アミノ酸) (以下、*AtSEC61γ* 遺伝子とする) が含まれていることがわかった。この遺伝子がコードする *SEC61γ* サブユニット蛋白質は、*SEC61α* 及び *SEC61β* サブユニット蛋白質とともに、輸送蛋白質複合体を形成し、あらゆる植物及び真核生物に高く保存されている(文献 10)。

30 ダイズゲノム中には 4 つの *SEC61γ* 遺伝子が存在することがわかっている。シロイヌナズナとダイズの *SEC61γ* サブユニット蛋白質間にはアミノ酸配列の相同性(約 86%) がみられる(図 2; 表 2)。このことから、シロイヌナズナ *SEC61γ* サブユニット蛋白質は、従来のダイズに存在する *SEC61γ* サブユニット蛋白質と同等であると判断される。

35 図 2. シロイヌナズナとダイズ (Soy) の *SEC61γ* サブユニット蛋白質のアライメント (社外秘)

40 表 2. シロイヌナズナとダイズ (Soy) の *SEC61γ* サブユニット蛋白質のアミノ酸配列の相同性 (%) (社外秘)

45

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 CV127 系統では、導入した改変 *csr1-2* 遺伝子産物である改変 AHAS 蛋白質におけるアミノ酸変異により、イミダゾリノン系除草剤の結合が阻害され、通常の生合成機能が影響を受けることなく除草剤耐性を有するようになる。

10 CV127 系統で発現している改変 AHAS 蛋白質と既知アレルゲンとの相同性を確認するため、食品アレルギー研究プログラム (Food Allergy Research and Resource Program ; FARRP) アレルゲン蛋白質データベース (version 8.00) をダウンロードし、相同性検索を行った(2007年4月26日)。その結果、改変 AHAS 蛋白質は既知のアレルゲンと相同性を有していないことが明らかになった。

15 また、選抜マーカーとしては導入した改変 *csr1-2* 遺伝子を用いた。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

20 改変 AHAS 蛋白質は、AHAS 蛋白質における S653N の変異により除草剤耐性のみが付与され(別添資料 4)、他の代謝系や基質特異性に影響を与えない。従って、改変 AHAS 蛋白質は、AHAS 蛋白質と同様に、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成経路の第 1 段階のみを触媒し、アミノ酸以外の他の代謝系には影響を与えないと考えられる。

25 改変 AHAS 蛋白質がアミノ酸代謝系に影響を与える可能性について、CV127 系統の種子中のアミノ酸組成を調べることにより検討した。トリプトファンについては、文献 31 の方法に基づいて分析した。その他のアミノ酸については、文献 30 の方法に基づいて分析した。なお、アスパラギン酸の結果にはアスパラギン、グルタミン酸の結果にはグルタミンがそれぞれ含まれる。

30 t 検定を行った結果、分析したダイズ種子中の全てのアミノ酸について、CV127 系統 BC2-F6 世代(図 5, p18)と対照の非組換えダイズ(以下、対照品種とする)との間に統計学的有意差は認められなかった(表 3)。

35 表3. ダイズ種子中のアミノ酸組成(mg / 乾燥重量 100 g) (社外秘)

40

45

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

5 CV127 系統の作出に用いた約 6.2kb の直鎖状 DNA 断片(以下、LF-6.2PvuII とする)はプラスミド pAC321 から切り出した断片である。プラスミド pAC321 はプラスミド pBluescript SK (-)を基に構築された(文献 27)。プラスミド pAC321 については図 3A (p14)に、LF-6.2PvuII については表 1 (p9)及び図 3B (p14)に示した。

ロ. 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15 プラスミド pAC321 の全長は 8,669 bp である。詳細は図 3A に示した。また、塩基配列は別添資料 1 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

20 プラスミド pAC321 の構築に用いられたプラスミドや DNA 断片は、非病原性の大腸菌 (*Escherichia coli*; *E.coli*) あるいはシロイヌナズナに由来するものであり、既知の有害塩基配列は含まれていない。

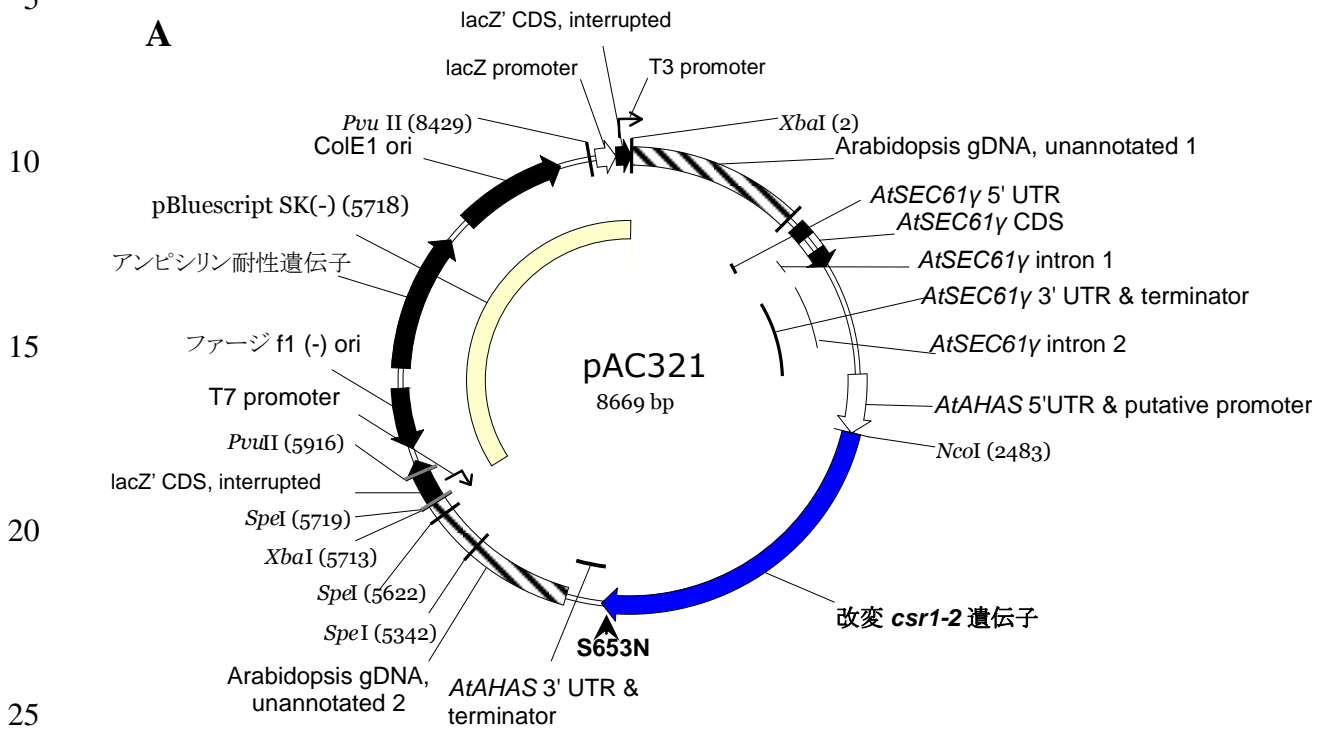
25 ダイズゲノムへの導入に用いた LF-6.2PvuII は、プラスミド pAC321 から切り出しており、この断片にはアンピシリン耐性遺伝子は含まれていない。また、プラスミド pAC321 には伝達を可能とする配列は含まれていない。

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

30 プラスミド pAC321 の感染性はないと考えられる。

5

A



25

B

30

35

40

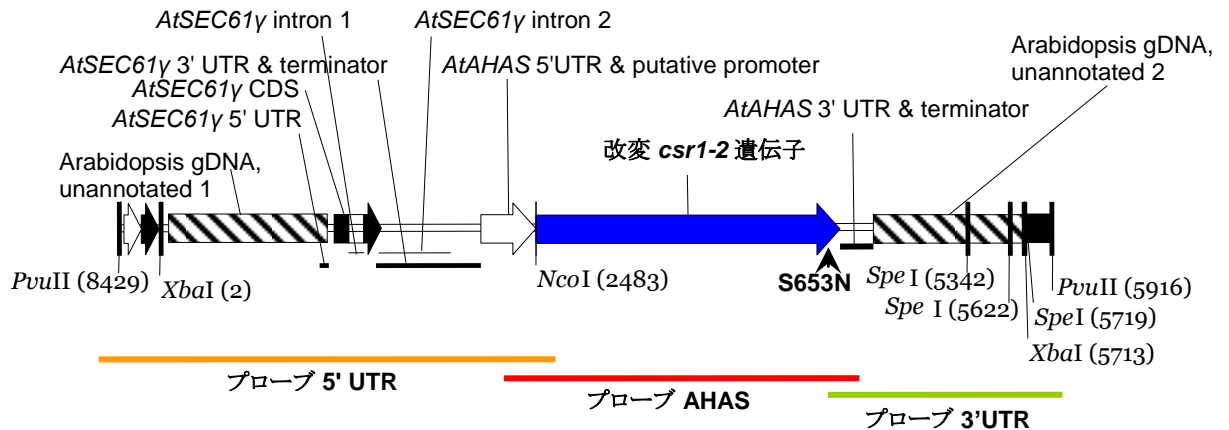


図3. プラスミドpAC321のマップ及びダイズへ導入した約6.2kb直鎖状DNA断片

A. プラスミドpAC321のマップを示す。

B. ダイズへ導入した約6.2 kbの直鎖状DNA断片(LF-6.2PvuII)を示す。また、コピー数、世代間の安定性に関するサザンブロット分析に用いた制限酵素サイト (*NcoI*, *XbaI*, *SpeI*) 及びプローブの領域も示す。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社 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 導入領域の構成要素のプラスミド pAC321 内での位置及び方向は表 1(p9)及び図 3A(p14)に示した。また、導入領域の構成図を図 3B に示した。導入配列は制限酵素 *PvuII* の切断により生じる LF-6.2*PvuII* である。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

10

改変 *csr1-2* 遺伝子のクローニング及びダイズへの形質転換方法は以下のとおりである(図 4, p17)。

15 エチルメタンスルホン酸(ethyl methanesulfonate; EMS)処理により作出したイミダゾリノン系除草剤耐性シロイヌナズナ変異体の cDNA をベクター λ *sep6* にクローニングし、LE392 株の大腸菌に形質転換して、cDNA ゲノムライブラリーを構築した(文献 17)。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の *AHAS* 遺伝子配列をプローブとし、このゲノムライブラリーから *AHAS* 遺伝子配列をもつクローンを選抜し(文献 19)、制限酵素 *XbaI* で切断した約 5.7 kb の断片をプラスミド pBluescript SK (-)(Stratagene 社)にクローニングした。その後、 β -ガラクトシダーゼ アルファフラグメントのアルファ相補性による青白選抜を行い、約 5.7 kb の断片が挿入されたプラスミドのシーケンス解析を行った。プラスミド pBluescript SK (-)に改変 *csr1-2* 遺伝子導入領域がクローニングされたことを確認し、約 8.7 kb の本プラスミドをプラスミド pAC321 とした。このプラスミドから制限酵素 *PvuII* で約 6.2 kb の直鎖状 DNA 断片、LF-6.2*PvuII* を
20 切り出し、アガロースゲル電気泳動で分離後精製し、ダイズに形質転換を行った。

30 1 粒のダイズ成熟種子から頂端分裂組織を含む胚軸を取り出し(文献 1)、44.3 μ M ベンジルアミノプリン、3%スクロースを含む MS 寒天培地(文献 21)にのせ、パーティクルガン法により LF-6.2*PvuII* を宿主へ導入した(文献 14; 文献 16; 文献 26)。CV127 系統はこの 1 回の形質転換と後述する選抜方法に従って作出した。

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

35

0.5~1.0 μ M イミダゾリノン系除草剤イマザピル選択培地を用いて選抜した。

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の菌体の残存の有無

40

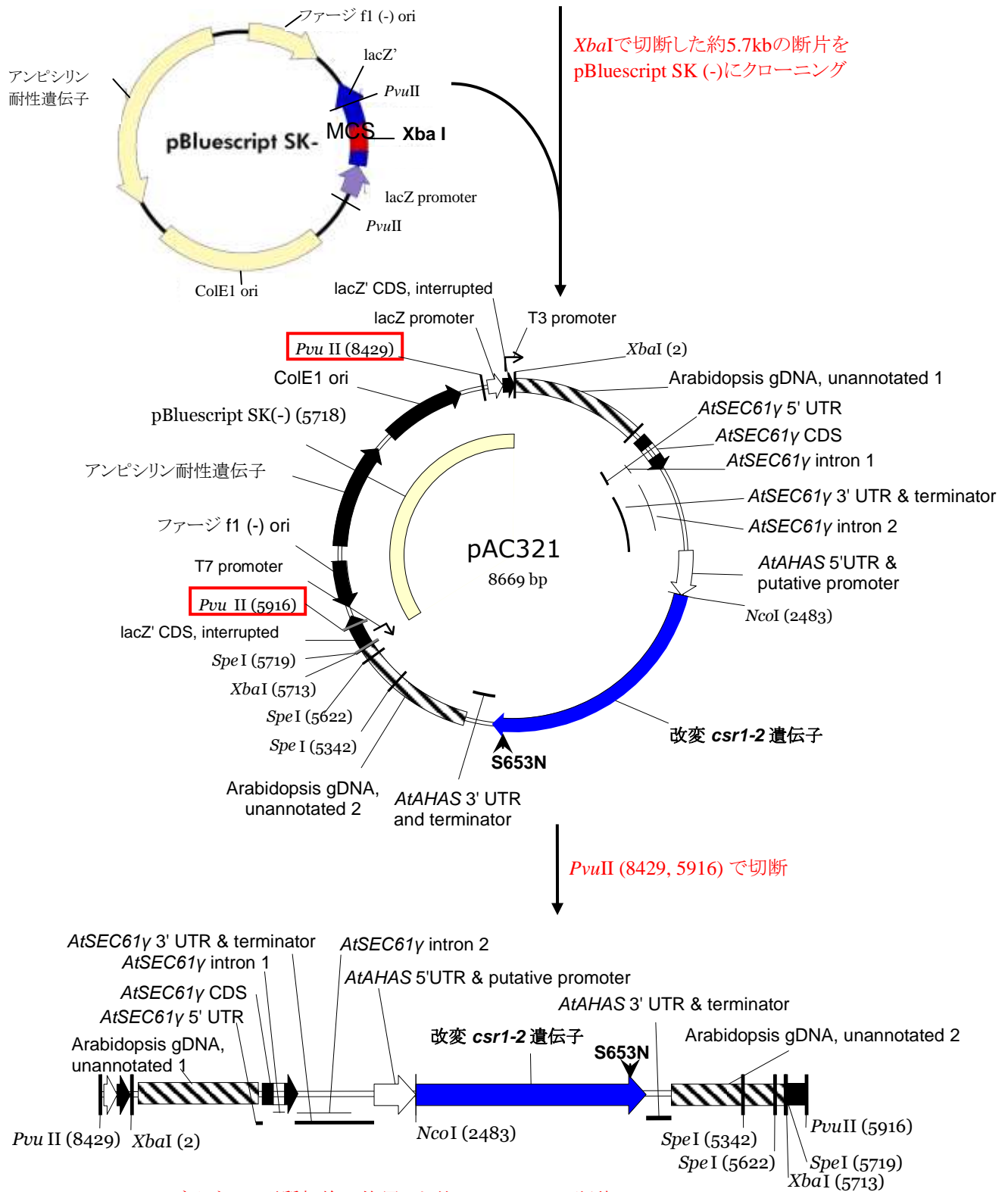
—

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

45

ダイズ近傍配列を含むシーケンス解析、世代間の安定性を確認するためのサザンブロット解析及び生物多様性影響評価に必要な情報収集のため用いた系統を図 5(p18)の育成図に示した。

1. エチルメタンサルホン酸(ethyl methanesulfonate; EMS)処理により作出したイミダゾリノン系除草剤耐性シロイヌナズナ変異体のcDNAをベクターλ sep6にクローニングし、LE392株の大腸菌に形質転換して、cDNAライブラリーを作成した。
2. 酵母のAHAS遺伝子配列をプローブとし、AHAS遺伝子配列をもつクローンを選抜した。



ダイズへの形質転換に使用した約 6.2 kbのPvuII断片 (LF-6.2PvuII)

図4. 改変*csr1-2*遺伝子のクローニング及びダイズへの形質転換のフローチャート
(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFジャパン株式会社に帰属する)

図 5. CV127 系統の育成図 (社外秘)

5

表 4. 安全性評価に供試した使用世代の一覧 (社外秘)

10

(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

15

下記の遺伝解析と後述のサザンブロット解析により、移入された改変*csr1-2*遺伝子発現領域は染色体上に存在することが確認された。

PCR 法及び除草剤散布による導入遺伝子の遺伝解析

20

CV127 系統 BC2-F3 世代ヘテロ接合型の自殖後代(BC2-F4 世代)を 2 反復に分け(57 植物体からなる反復 1 及び 52 植物体からなる反復 2)、プライマー「イベント PCR3」を用いた本イベント特異的 PCR 法(表 10, p24)によって導入遺伝子の遺伝解析を行った(表 5-1)。本 PCR 法はプライマーに蛍光標識することにより優性ホモ、ヘテロ及び劣性ホモを定量的に検出することが出来る定量 PCR 解析である。その結果、観察された個体数と期待値との間に統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$)。

25

同様に CV127 系統 BC2-F4 世代の 2 反復を用いて、イミダゾリノン系除草剤イマザピル(100g a.i. (active ingredient; 有効成分) / ha)に対する耐性及び感受性について評価した(表 5-2)。その結果、観察された個体数と期待値との間に統計学的有意差は認められず($p < 0.05$)、メンデルの法則に従って分離していることから、改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域は染色体上に存在すると考えられる。

30

35

表 5-1. CV127 系統 BC2-F4 世代における改変 *csr1-2* 遺伝子の PCR 法による遺伝解析 (社外秘)

40

表 5-2. CV127 系統 BC2-F4 世代における改変 *csr1-2* 遺伝子の除草剤散布による遺伝解析 (社外秘)

45

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

挿入領域のシーケンス解析の結果等

5

改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域を含むダイズゲノムへの挿入配列及び近傍配列を別添資料 2 に示す。全挿入領域及び近傍配列の構造解析結果を図 7(p20)に示した。

10

CV127 系統のシーケンス解析の結果、イミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する 653 番目のセリン残基からアスパラギン残基への置換 (S653N) はダイズゲノムへの形質転換後も保存されていることがわかった。また、形質転換後、新たに改変 *csr1-2* 遺伝子の塩基配列中に G から A への点突然変異が 1 箇所見つか、その結果、272 番目のアルギニン残基がリジン残基へ置換(R272K)されていることがわかった。アミノ酸置換 R272K, S653N の両方を含む AHAS 蛋白質のアミノ酸配列を別添資料 3 に示す。この R272K, S653N を含む AHAS 蛋白質は、アミノ酸置換 S653N のみを含む AHAS 蛋白質と同程度の触媒活性及びイミダゾリノン系除草剤耐性を有することが示されている(別添資料 4)。

15

20

コピー数及び挿入配列の完全性

コピー数の確認、世代間の安定性を確認するためのサザンブロット分析を行った。使用した CV127 系統の育成図は図 5 (p18)に示した。なお、サザンブロット分析用プローブ作成に使用したプライマー配列は表 6 (p20)に、サザンブロット分析による推定及び観察されたバンドサイズは表 7 (p20)に示した。

25

CV127 系統に導入された挿入配列のコピー数については、CV127 系統 BC1-F8 世代のゲノム DNA を制限酵素 *NcoI*, *SpeI*, *XbaI* で消化し、サザンブロット解析により評価した。プローブには、AHAS 5' UTR 領域、AHAS 領域、及び AHAS 3' UTR 領域を用いた(図 3B, p14)。その結果、CV127 系統のゲノム中には、完全な形の改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域が 1 コピー組み込まれていることが示された(図 8 のレーン 4,8,12, p20)。

30

サザンブロット解析による世代間の安定性

35

CV127 系統のゲノムに導入した改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域の安定性を確認するため、4 世代(T4, BC1-F4, BC1-F8, BC1-F9)のゲノム DNA を用いてサザンブロット解析を行った。プローブには、AHAS 5' UTR 領域、AHAS 領域、及び AHAS 3' UTR 領域を用いた(図 3B, p14)。導入した改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域は、BC1-F4、BC1-F8、BC1-F9 世代のゲノム中に 1 コピー存在することが明らかとなった(図 9 のレーン 5-7,12-14, p21)。一方、戻し交配する前の T4 世代(レーン 4 及び 11)のゲノム中には、複数コピーが断片的に存在しており、全体的にレーンのバックグラウンドが高かった。これらの結果から、戻し交配後の Conquista 品種雑種後代 CV127 系統 BC1-F4 世代では改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域は 1 コピーとなり、さらにこの 1 コ

40

ピーはその後の CV127 系統 BC1-F8、BC1-F9 世代へ安定的に継承されていることがわかった。

プラスミド pAC321 の外骨格領域の不在

5

CV127 系統を作出するにあたり、プラスミド pAC321 から制限酵素 *PvuII* により約 6.2 kb の LF-6.2*PvuII* を切り出し、アガロースゲル電気泳動で分離後精製し、ダイズゲノムへ導入した。そのため、プラスミド pAC321 の外骨格領域の塩基配列がダイズゲノムへ挿入される可能性は考えにくい。

10

CV127 系統のゲノム中にプラスミド pAC321 の外骨格領域が存在しないことを確認するために CV127 系統 BC1-F8 世代を用いてサザンブロット分析を行った。プローブには、pAC321 の外骨格領域を特異的に認識する VP1、VP2 プローブを用いた(表 6,7, p20; 図 10C, p21)。

15

その結果、CV127 系統のゲノムからは、プラスミド pAC321 の外骨格領域に対応する DNA 断片は検出されず、CV127 系統にはプラスミド pAC321 の外骨格領域が挿入されていないことが確認された(図 10 のレーン 4, 8, 12, p21)。

20

3'末端に生じた 推定 501 bp ORF のアミノ酸配列と RT-PCR 解析

挿入遺伝子のシーケンス解析の結果、改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域の一部配列である 376 bp が、3'末端にセンス配列で挿入されていることがわかり(図7; 別添資料 2)、その結果、501bp のオープンリーディングフレーム(ORF)を形成している可能性が考えられた(図6)。そこで、この予想ORFが転写されているかどうかを、CV127 系統 BC1-F8 世代の若い葉組織を用いて RT-PCR 解析を行った結果、この推定ORFは検出されなかった(図11, p21)。

25

30

図6. 推定501 bp ORFのアミノ酸配列 (社外秘)

35

図 7. ダイズへ形質転換した約 6.2kb の LF-6.2*PvuII* とダイズへ導入された 4758bp の配列との比較 (社外秘)

40

表 6. サザンブロット分析用プローブ作成に使用したプライマー配列 (社外秘)

45

表7. サザンブロット分析による推定、及び観察されたバンドサイズ (社外秘)

図 8. コピー数を確認するためのサザンブロット解析 (社外秘)

図 9. 世代間の安定性を確認するためのサザンブロット解析 (社外秘)

5

図10. プラスミドpAC321の外骨格領域を確認するためのサザンブロット解析 (社外秘)

10

図 11. 改変 *csr1-2* 遺伝子の一部配列(376 bp)挿入による推定 501 bp ORF に関する RT-PCR 解析 (社外秘)

15

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

20

サザンブロット解析によって1コピーであることが確認されているので、本項目には該当しない。

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

25

CV127 系統の改変 AHAS 蛋白質の発現量と安定性を調べるため、酵素免疫測定法(ELISA)による測定を行った。なお、本試験に用いた抗体はダイズ由来の AHAS 蛋白質と改変 AHAS 蛋白質の両方を認識するため、CV127 系統及び対照品種の総 AHAS 蛋白質量を測定した。

30

2006 年 10 月から 2007 年 3 月 (シーズン 1) にかけて CV127 系統 BC2-F5 世代を用い、ブラジルの 5 カ所の野外試験場で葉を、4 カ所の野外試験場で種子を採取した。また、2007 年 2 月から 2007 年 7 月 (シーズン 2) にかけて後代の BC2-F6 世代を用い、各 4 カ所の野外試験場で葉及び種子を採取して試験を行った(表 8, p22)。

35

試験に供試した生育期を下記に示す。

V2 期： 幼苗期 (草高 15-20 cm で 3 節、展開葉 2 枚)

R8 期： 成熟期

40

CV127 系統と対照品種から葉及び種子をそれぞれ V2 期と R8 期に採取し、分析に供試した。葉は、各試験場の 2 区画からそれぞれ 6 植物体の初生葉を採取した。1 区画から採取した 6 植物体をまとめて破碎したものを 1 サンプルとし、合計 2 サンプルの総 AHAS 蛋白質量を測定した(n=2)。種子も同様に、各試験場の 2 区画からそれぞれ 500g 以上を採取した。1 区画の種子をまとめて破碎したものを 1 サンプルとし、合計 2 サンプルの総 AHAS 蛋白質量を測定した(n=2)。

45

5 総 AHAS 蛋白質の酵素活性は、分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イ
ソロイシン) や他のアミノ酸を必要とする栄養生長期の葉で最も高いことが
知られており (文献 5)、本試験でも両シーズンにおいて、CV127 系統の V2
10 期の葉で総 AHAS 蛋白質量発現が最も高かった (表 8)。葉において CV127
系統中の総 AHAS 蛋白質量発現が、対照品種と比較して高いが、これはイ
ミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する改変 *csr1-2* 遺伝子の導入に
より改変 AHAS 蛋白質とダイズ由来の AHAS 蛋白質の両方が発現している
ためであると考えられる。また、AHAS 蛋白質は葉以外の組織に非常に低
15 レベルで発現することが確認されている。本試験の種子では、総 AHAS 蛋
白質発現量は CV127 系統と対照品種ともに定量限界値またはそれ未満であ
った。

15 表 8. シーズン 1 及びシーズン 2 にブラジルの野外試験場で栽培された
CV127 系統と対照品種の葉 (V2 期) 及び種子 (R8 期) 中の総 AHAS 蛋白質量
(社外秘)

20 また、2008 年に茨城県つくば市の農業環境技術研究所の隔離ほ場において
行った、CV127 系統 W-F5 世代のイミダゾリノン系除草剤イマザピルに対する耐
性試験により、CV127 系統のイミダゾリノン系除草剤耐性の発現を調査した。
CV127 系統及び対照品種(Williams)をポットに 2 植物個体ずつ生育させ、各区 8
25 ポットを試験に用い、播種 20 日後に除草剤イマザピル 70 g a.i./ha(ブラジルの標
準使用量)をダイズ上部から茎葉散布した。処理後 2、4、7、11、14 日後に薬害を
達観調査し、薬害の程度を評価 0-5 で示した。CV127 系統は 70 g a.i./ha の除草
剤濃度においてイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示した(表 9, p23)。一方、
対照品種はこの濃度でほぼ枯死し、CV127 系統がイミダゾリノン系除草剤に対し、
30 耐性を持つことが示された。また、ブラジルの 2 試験場でイミダゾリノン系除草剤
に対する耐性を評価した結果を別添資料 5 に示す。

35 以上の結果から CV127 系統に導入された改変 *csr1-2* 遺伝子は、後代に安定
して遺伝しており、また、後代でも改変 AHAS 蛋白質が発現していることが示され
た。

表 9. 除草剤イマザピル処理による薬害試験結果

調査日	処理後日数 (日目)	CV127 系統 ^{1,2} W-F5	対照品種 ^{1,2} Williams
2008年8月20日	2	0	3
8月22日	4	0	4
8月25日	7	0	4
8月29日	11	0	4
9月1日	14	0	5

1. ダイズ各 8 ポット×2 植物個体を調査した。播種 20 日後に除草剤 イマザピル 70 g a.i./ha(ブラジルの標準使用量)をダイズ上部から茎葉散布した。
2. 薬害は処理後 2 日目を以降に達観調査をおこない、薬害程度を以下の指標で評価した。
 評価 0: 傷害なし
 評価 1: 軽微な生育遅延及び一時的に葉にクロロシス(黄白化症状)が見られる
 評価 2: 葉が顕著に黄色くなり、症状が数日続く
 評価 3: 顕著な生育遅延及び葉にクロロシスが見られたり、紫色になる
 評価 4: 成長点の著しい阻害及び葉の著しい傷害が広範囲に見られる
 評価 5: 大部分の植物が大きな傷害を受ける又は枯死する

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社に帰属する)

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がある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸の塩基配列には、野生動植物等への伝達性はない。

(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

本イベント特異的 PCR 法の開発

近傍配列及び挿入配列から得た情報を用いて本イベント特異的 PCR 法を開発した。設計した 4 組のプライマーのそれぞれ一方は 5' 末端近傍配列領域、もう一方は改変 *csr1-2* 遺伝子発現領域内に位置している。表 10 (p24)にプライマーの情報を示す。予想 PCR 産物は 212~447bp である。

全 PCR で本イベント特異的な予想バンドサイズが増幅されたことから、これら 4 組のプライマーを用いて挿入遺伝子を確認できることがわかり、その後の解析に用いている(図 12A, p24)。さらに、本イベント特異的プライマーセット「イベント PCR3」を用いた PCR 産物について、6 箇所異なる試験地から収集した CV127 系統及び対照品種の試料を用いてさらに検証した(図 12 B, C)。その結果、CV127 系統の 24 試料全てで特異的に増幅されたが、コントロールの対照品種の試料では増幅されなかった。これらのことから、特に「イベント PCR3」を用いた本イベント特異的 PCR 法は感度もよく信頼性があると考えられる。

表 10. 本イベント特異的 PCR に用いたプライマーの組み合わせ (社外秘)

5

図12. CV127系統特異的PCR法 (社外秘)

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

15

通常植物では、イミダゾリノン系除草剤が AHAS 蛋白質を阻害することで分岐鎖アミノ酸が欠乏し、生育が阻害される。一方、改変 *csr1-2* 遺伝子を導入した CV127 系統は、通常の生合成機能は影響を受けず、イミダゾリノン系除草剤が AHAS 蛋白質に結合できない変異を起こしているためイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示し、正常に生育する特性(図 1, p10)を有する。

20

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

25

2008 年に茨城県つくば市の農業環境技術研究所の隔離ほ場において、CV127 系統の隔離ほ場試験を行った。試験には、成熟期グループ(MG) VIII の Conquista 品種である CV127 系統 BC1 及び BC2 では成熟期グループが適合せず生育しないと考えられたため、我が国の環境に適した MG IV の Williams 品種と交配して作成した CV127 系統 W-F5 世代を使用した(図 5, p18)。対照の非組換えダイズ(以下、対照品種とする)としては、CV127 系統作出に用いた品種 Williams を用いた。なお、各試験の詳細については、別添資料 6 に示す。

30

a 形態及び生育の特性

35

形態及び生育に関する特性を比較するため、12項目(発芽率、小葉の形、毛茸の多少、50%開花期、花色、伸育型、80%成熟期、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、地上部重)について、CV127系統及び対照品種(Williams)の間の形態特性及び生育の差異を調査した。その結果、最下着莢節位高でCV127系統と対照品種との間に統計学的有意差が認められた(表11)。

40

表 11. 形態及び生育の特性 (社外秘)

45

b 生育初期における低温又は高温耐性

5 CV127 系統の生育初期における低温処理の影響について調査した。25°C 12 時間(明期)、20°C 12 時間(暗期)で生育させた本葉 1 葉期の幼苗を 10°C 12 時間(明期)、5°C 12 時間(暗期)の低温条件で栽培し、14 日後と 28 日後の低温障害の程度を調査した。

10 その結果、CV127 系統及び対照品種(Williams)は、低温処理を開始してから 14 日後には生育遅延が始まっており、14 日後、28 日後のいずれの時期においてもその低温障害の程度に統計学的有意差は認められなかった(表 12)。従って、CV127 系統と対照品種の低温耐性は同程度であることが示された。

15 表12. 生育初期における低温障害の程度 (社外秘)

20 c 成体の越冬性又は越夏性

25 本隔離ほ場で生育した CV127 系統及び対照品種(Williams)を成熟期(2008 年 11 月 25 日)後もほ場に残して生育させ、我が国の冬期における生育状況を観察した。2009 年 3 月 5 日時点で越冬後の生育状況を観察したが、CV127 系統及び対照品種ともに枯死していた。

d 花粉の稔性及びサイズ

30 CV127 系統及び対照品種(Williams)から採取した花粉をアセトカルミン溶液で染色し、花粉の稔性を比較した。その結果、CV127 系統及び対照品種ともに高い花粉稔性を有しており、統計学的有意差は認められなかった(表13)。花粉の直径はともに約30µmで、花粉の形態にも相違は観察されなかった。

35 表13. 花粉の稔性 (社外秘)

40 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

45 種子の生産量に関する形質として、本隔離ほ場試験の収穫期調査において、一株稔実莢数、一株精粒重、一株全粒重、百粒重について CV127 系統と対照品種(Williams)を比較した。その結果、評価を行った全ての項目において、CV127 系統と対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった(表 14, p26)。

裂莢性については、CV127 系統及び対照品種(Williams)を成熟期に収穫し、植物体を自然乾燥した後に 60°C で熱風処理し裂莢の難易を調査した。CV127 系統及び対照品種のいずれも難裂莢性であり、差異は認められなかった(表 15)。

5 発芽率については、収穫直後の CV127 系統及び対照品種(Williams)の種子の発芽率を播種後 10 日目に調査したところ、いずれも高い発芽率を示し、統計学的有意差は認められなかった(表 16)。CV127 系統及び対照品種の種子の発芽率がともに高いことから、休眠性はいずれも浅いと考えられた。

10

表 14. 種子の生産量 (社外秘)

15

表15. 裂莢性 (社外秘)

20

表 16. 播種後 10 日目の種子の発芽率 (社外秘)

f 交雑率

25

本隔離ほ場において、CV127 系統と隣接して栽培した対照品種(Williams)である非組換えダイズにおける自然交雑の調査を行った。交雑の判定は、非組換えダイズの種子中から、花粉親にあたる CV127 系統に導入された改変 *csr1-2* 遺伝子領域を PCR 反応により増幅することにより行った。100 個体の非組換えダイズから収穫した合計 13,726 粒のダイズ種子を PCR 検定で調査した結果、1 粒が遺伝子組換え個体であることが明らかとなった。従って、CV127 系統と非組換えダイズとの自然交雑率は 0.007%であった。

30

g 有害物質の産生性

35

これまでにダイズにおいて他の植物の生育を阻害するような有害物質の産生性は報告されていない。

40

CV127 系統の有害物質の産生性を調べるため、すき込み試験及び後作試験を行った。2008 年に隔離ほ場で CV127 系統と対照品種(Williams)を栽培後、それらの植物体をすき込んだ土壌あるいは栽培した土壌を用い、閉鎖系温室においてダイコン *Raphanus sativus* の種子を播種し、通常管理下で生育させ、種子の発芽率、草高、生体重及び乾燥重を調査した。また、土壌微生物相への影響も調査した。

45

すき込み試験

5 本隔離ほ場で栽培した CV127 系統及び対照品種の茎葉部を十分乾燥させ細かく裁断したものを重量比 1%となるようにすき込んだ土壌を使用した。1 区にダイコン 50 粒播種 2 反復で試験を行った。

その結果、CV127 系統区と対照品種区との間で、発芽率、草高、生体重及び乾燥重ともに統計学的有意差は認められなかった(表 17)。

10 後作試験

本隔離ほ場で CV127 系統及び対照品種を栽培終了後、各栽培区より採取した土壌から、植物残渣を除いて使用した。1 区にダイコン 50 粒播種 2 反復で試験を行った。

15

その結果、CV127 系統区と対照品種区との間で、発芽率、草高、生体重及び乾燥重において統計学的有意差は認められなかった(表 18)。

土壌微生物相への影響

20

本隔離ほ場で栽培したCV127系統及び対照品種を収穫後、根付近の土壌を採取して試験に供試した。糸状菌、細菌、放線菌について、常法に従って調査を行った結果、いずれの項目においてもCV127系統及び対照品種の間に統計学的有意差は認められなかった(表19)。

25

表 17. すき込み試験 (社外秘)

30

表 18. 後作試験 (社外秘)

35

表19. 土壌微生物相への影響 (社外秘)

40 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

45 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

—

5 (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

—

10 (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。

15 (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

—

20 (6) 国外における使用等に関する情報

CV127 系統の国外における使用については、ブラジル、アルゼンチンでの商業栽培を主な目的としている。

25 国外及び国内における使用等に関する情報をそれぞれ表 20 及び表 21 に示した。我が国では 2009 年に食品及び飼料としての安全性の承認申請を行った。

表 20. 国外における使用等に関する情報

国名	申請内容	申請または承認時期
米国	栽培承認申請、食品、飼料としての安全性	2009 年 1 月(申請済)
カナダ	食品としての安全性	2009 年 2 月(申請済)
	栽培承認申請	2009 年 3 月(申請済)
	飼料としての安全性	2009 年 4 月(申請済)
EU	食品、飼料としての安全性	2009 年 1 月(申請済)
ブラジル	栽培承認申請、食品、飼料としての安全性	2009 年 12 月承認
オーストラリア/ ニュージーランド	栽培承認申請、食品、飼料としての安全性	2009 年 10 月(申請済)
アルゼンチン	食品、飼料としての安全性	2010 年 5 月(申請済)
	栽培承認申請	2010 年 6 月(申請済)

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社に帰属する)

30

表 21. 国内における使用等に関する情報

国名	申請内容	申請時期
日本	食品としての安全性	2009 年 10 月(申請済)
日本	飼料としての安全性	2009 年 9 月(申請済)

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン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

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

第一の 1 で述べたように、ダイズが自然環境において我が国で自生したという報告はない。

10 競合における優位性に関わる形質(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、裂莢性、休眠性及び発芽率)(第一の 2-(6)-②-a~e, p24)を比較調査した結果、最下着莢節位高を除く、全ての項目で CV127 系統と対照品種との間に差異あるいは統計学的有意差は認められなかった。

15 統計学的有意差の認められた最下着莢節位高に関しては、CV127系統が9.9cm、対照品種が6.7cmであった(第一の2-(6)-②-a, p24)。最下着莢節位高は密植や早播栽培で上昇するなど、栽培条件や品種による変動が大きいことが知られている(文献46)。そこで、全区画の環境要因について検討したところ、一部の区画で水はけが劣る傾向にあった。この栽培環境の要因が最下着莢節位高に影響を与えた可能性が考えられる。また、最下着莢節位高は種子の生産量との相関が低く(文献18)、この形質のみが変化したとしても競合における優位性が高まるとは考えがたい。以上のことから、この形質のみが変化したとしてもCV127系統の競合における優位性が高まるとは考えがたい。

25 CV127系統はイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を有しているが、本除草剤が散布されることが想定しにくい自然条件下で、本除草剤耐性が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

30 以上のことから、CV127 系統を栽培するにあたり、競合における優位性に関して影響を受け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

35 —

(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

45 以上のことから、CV127 系統は、競合における優位性に関して生物多様性に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

5 第一の 1 の(2)で述べたとおり、ダイズは古くから国内外で栽培されている作物であり、
ダイズが生物多様性に影響を与える有害物質を産生することは知られていない。また、
第一の 2 の(1)で述べたとおり、CV127 系統は、イミダゾリノン系除草剤に耐性を
示す改変 AHAS 蛋白質を産生する。本蛋白質が有害物質であるという報告はない。
10 本蛋白質は分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成経路の第 1 段階を
触媒するが、ダイズ種子中のアミノ酸組成において CV127 系統と対照品種との間に
統計学的有意差は認められなかった(表 3, p12)。従って、CV127 系統中に有害物質
が産生されるとは考えにくい。

15 CV127 系統の有害物質の産生性を検証するために 2009 年にすき込み試験、後
作試験、土壌微生物相試験を行った(第一の 2-(6)-②-g, p26)。CV127 系統と対照品
種との間で、全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。これら
の結果から、有害物質の産生性について、CV127 系統と対照品種との間に差異は
ないと考えられる。

20 以上のことから、CV127 系統が有害物質を産生する可能性は低く、生物多様性影
響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

25 —

(3) 影響の生じやすさの評価

30 —

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35 以上のことから、CV127 系統は、有害物質の産生性に関して生物多様性に影響
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

40 第一の 1-(3)-ニ-③(p6)に記載したとおり、ダイズと交雑可能な近縁野生種として、
ダイズの祖先と考えられているツルマメ(*Glycine soja*)が挙げられる。ツルマメは我が
国に広く分布していることが知られている。従って、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。

45

(2) 影響の具体的内容の評価

CV127 系統とツルマメが交雑することにより、雑種を形成し、ツルマメの生存、維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。

5

(3) 影響の生じやすさの評価

ツルマメは我が国に広く分布している。第一の 1(3)-ニ-③(p6)に上述したように、ダイズとツルマメの交雑は起こりうるものの、ダイズとツルマメはともに自殖性植物であり、一般的にダイズの開花期はツルマメより早く(文献 22)、開花期が重なりにくいと考えられている。また、ダイズとツルマメを隣接して栽培し、かつ開花期を重複させた条件下でも、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(文献 20)。

10

本隔離ほ場試験において CV127 系統と対照品種である非組換えダイズとを隣接した試験区で栽培し、非組換えダイズへの自然交雑を調査したところ、交雑率は 0.007%であった(第一の 2-(6)-②-f, p26)。これは、他家受粉率は通常 1%未満である(文献 6)という従来のダイズにおける自然交雑率を超えるものではないと考えられる。さらに、本隔離ほ場試験において、生殖に関わる形質(花粉の稔性、花粉形態、種子の生産性)を調査したが、CV127 系統と対照の非組換えダイズで有意差は認められず、CV127 系統とツルマメとの交雑性は従来のダイズとツルマメ同様に極めて低いと推測された。

15

20

栽培ダイズからツルマメへの遺伝子浸透の実態については、日本各地で過去数年にわたり調査が行われている。2003 年に広島県、秋田県の計 17 地点のツルマメ集団を調査した結果、秋田県の 1 地点から栽培ダイズとの自然交雑によって生じた雑種あるいはその後代と考えられる形態的「中間体」が 1 個体発見された(文献 37)。2004 年に秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県の合計 57 地点のツルマメ集団を調査した結果、佐賀県の 3 地点から計 11 個体の中間体が発見された(文献 38)。2003 年に発見された秋田県の中間体は発見されなかった(文献 38)。2005 年の調査では、日本各地の計 39 地点のツルマメ集団を調査したものの、新たにダイズ中間体が発見することはできなかった。そのうち少なくとも 14 地点は、前年の時点でダイズが栽培されていることが明らかな地点であることから、自生地ではダイズからツルマメへの遺伝子流動がほとんど起きていないことが示唆された(文献 39)。2003 及び 2004 年に、秋田県の 1 地点と佐賀県の 3 地点で発見された中間体のうち、後代の生存が確認できたのは 2005 年に佐賀県 1 地点で 1 個体であった(文献 39)。2004 年に中間体は多数の種子を生産していたにもかかわらず、2005 年に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、自生地ですみやかに淘汰される運命にあるのではないかと推測された(文献 39)。さらに、2006 年の調査では、佐賀県の別の 1 地点で中間体 1 個体のみが発見され、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(文献 40)。

25

30

35

40

また、2004 年に秋田県、茨城県、佐賀県の計 14 のツルマメ集団から 168 個体、1334 種子を収集し、7 種のマイクロサテライトマーカーを用いてダイズからツルマメ及びツルマメ間での遺伝子流動を調査したところ、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 15)。

45

5 以上、ダイズとツルマメの自然交雑率が低いこと、開花期が重なりにくいこと、雑種後代が自生地で生存する確率は非常に低いと示唆されることから、ダイズからツルマメへの遺伝子流動の可能性は非常に低いと言える。さらに、CV127 系統とツルマメの自然交雑率は従来のダイズとツルマメの自然交雑率を超えるものではないと考えられることから、CV127 系統がツルマメと交雑し、その雑種後代がツルマメの生存、維持に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

10 (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、CV127 系統は、交雑性に関して生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

15 4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは古くから栽培されている作物の 1 つであり、我が国において生物多様性に影響を与えたという報告はない。

5

競合における優位性に関わる形質を比較調査した結果、最下着莢節位高を除く、全ての項目で対照品種との間に差異あるいは統計学的有意差は認められなかった。統計学的有意差の認められた最下着莢節位高に関しては、栽培条件や品種による変動が大きく、種子の生産量との相関が低いことが知られており、この形質のみが変化したとしても CV127 系統の競合における優位性が高まるとは考えがたい。また、CV127 系統はイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を有しているが、本除草剤が散布されることが想定しにくい自然条件下で、本除草剤耐性が競合における優位性を高めるとは考えにくい。以上のことから、CV127 系統の競合における優位性は従来のダイズと同程度と考えられ、CV127 系統は、競合における優位性に関して生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

10
15

ダイズにおいて、これまでに有害物質の産生性は報告されていない。CV127 系統中で産生される改変 AHAS 蛋白質は、これまでに有害物質であるという報告はなく、ダイズ種子中でのアミノ酸組成において CV127 系統と対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった。また、すき込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。これらの結果から、有害物質の産生性に関し、CV127 系統と対照品種との間に差異はないと考えられる。以上のことから、CV127 系統は、有害物質の産生性に関して生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

20
25

ダイズは基本的に自殖性植物であるが、我が国に広く分布し、交雑の可能性がある野生植物としてツルマメが特定された。しかし、ダイズとツルマメの自然交雑率が低いこと、開花期が重なりにくいこと、雑種後代が自生地ですべて生存する確率は非常に低いと示唆されることから、ダイズからツルマメへの遺伝子流動の可能性は非常に低いと言える。さらに、CV127 系統の自然交雑率は従来のダイズの自然交雑率を超えるものではないことから、CV127 系統がツルマメと交雑し、その雑種後代がツルマメの生存、維持に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。よって、CV127 系統は、交雑性に関して生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

30
35

以上を総合的に評価し、CV127 系統を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性に影響を与えることはない結論づけた。

参考文献

5

社外秘情報に付き非開示

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成 21 年 9 月 29 日

5

氏名 BASF ジャパン株式会社
代表取締役社長 成尾 友良

10

住所 東京都港区六本木六丁目 10 番 1 号
六本木ヒルズ森タワー21 階

15 第一種使用規程の承認を申請しているイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csrl-2*,
Glycine max (L.) Merr.) (CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)(以下、「CV127 系統」という)
の第一種使用において、生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合、当社は生
物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす
影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定に対する協力な
20 どを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性やそれが起こり得る確率から
判断して、生物多様性影響が生じるおそれがあると科学的に判断された場合には、当該
影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じて以下のことを行う。

25 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

社内に緊急措置に対応するために速やかに危機対策本部を設置する。危機対策
本部は、常務執行役員農薬本部 本部長を本部長とし、6名のメンバー及び事務局
30 員で構成する(平成 21 年 9 月現在)。

30

個人名・所属は個人情報につき非開示。

危機対策本部は、CV127 系統の開発者である BASF プラントサイエンス社との円
滑な連絡確保に努める。

35

2. 第一種使用等の状況把握方法

当社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

40 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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、
厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

45

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、CV127 系統の環境放出が行われ
ないようにすること、環境中に放出された CV127 系統があった場合はそれらが環境中
で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5

5. 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

CV127 系統が我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確認
された場合には、速やかに危機対策本部事務局より農林水産省農産安全管理課及
び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓
口を報告する。

10

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成 21 年 9 月 29 日

5

氏名 BASF ジャパン株式会社
代表取締役社長 成尾 友良

10

住所 東京都港区六本木六丁目 10 番 1 号
六本木ヒルズ森タワー21 階

15 第一種使用規程の承認を申請しているイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2*,
Glycine max (L.) Merr.) (CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)(以下、「CV127 系統」という)
の第一種使用において、生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合、当社は生
物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす
影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定に対する協力な
20 どを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性やそれが起こり得る確率から
判断して、生物多様性影響が生じるおそれがあると科学的に判断された場合には、当該
影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じて以下のことを行う。

25 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

社内に緊急措置に対応するために速やかに危機対策本部を設置する。危機対策
本部は、常務執行役員農薬本部 本部長を本部長とし、6名のメンバー及び事務局
30 員で構成する(平成 21 年 9 月現在)。

30

個人名・所属は個人情報につき非開示。

危機対策本部は、CV127 系統の開発者である BASF プラントサイエンス社との円
滑な連絡確保に努める。

35

2. 第一種使用等の状況把握方法

当社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

40

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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、
厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

45

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、CV127 系統の環境放出が行われ
ないようにすること、環境中に放出された CV127 系統があった場合はそれらが環境中
で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5

5. 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

CV127 系統が我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確認
された場合には、速やかに危機対策本部事務局より農林水産省農産安全管理課及
び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓
口を報告する。

10