

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gm-fad2-1, gm-hra, Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1) の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書.....	2
<b>生物多様性影響評価書の概要.....</b>	<b>4</b>
第一 評価に当り収集した情報.....	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 .....	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	4
(2) 使用等の歴史及び現状 .....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性 .....	5
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
(2) ベクターに関する情報.....	19
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	20
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性....	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	28
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	29
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 .....	36
(1) 使用等の内容.....	36
(2) 使用等の方法.....	36
(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.....	37
(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.....	37
(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 .....	37
(6) 国外における使用等に関する情報.....	37
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	38
1 競合における優位性 .....	38
2 有害物質の産生性 .....	39
3 交雑性.....	40
第三 生物多様性影響の総合的評価 .....	42
参考文献 .....	44
モニタリング実施計画書 .....	48
緊急措置計画書.....	51
別紙一覧.....	53

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 11 月 16 日

農林水産大臣 松岡 利勝 殿

環 境 大臣 若林 正俊 殿

氏名

デュボン株式会社

代表取締役社長 天羽 稔

申請者

住所

東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (<i>gm-fad2-1</i>, <i>gm-hra</i>, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19 番地 2  名称：デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場  使用期間：承認日から平成 21 年 3 月 31 日まで</p> <p>1．隔離ほ場の施設</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。</li> <li>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすいところに掲げている。</li> <li>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</li> </ul> <p>2．隔離ほ場での作業要領</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 本組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</li> <li>(2) 本組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えダイズが漏出ししない構造の容器に入れる。</li> <li>(3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えダイズの栽培終了後は、当該遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場にすきこむ等により、確実に不活化する。</li> <li>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</li> <li>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</li> <li>(6) (1) から (5) 掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</li> <li>(7) 別に定めるモニタリング実施計画に基づき、モニタリングを実施する。</li> <li>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるにいたった場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。</li> </ul>

## 生物多様性影響評価書の概要

### 第一 評価に当り収集した情報

#### 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

###### イ 分類学上の位置付け

和名：ダイズ

英名：Soybean /Soyabean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

( The International Plant Names Index, 2004 )

###### ロ 宿主の品種名又は系統名

宿主には、米国の成熟期グループ II (早生～中生) に属するダイズ品種 Jack (無限伸育型) が用いられた。

###### ハ 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、ダイズが自生している地域は、国内・国外ともに知られていない。

##### (2) 使用等の歴史及び現状

###### イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズの原産地は中国で、その祖先は野生種のツルマメ (*Glycine soja*) であると考えられている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。約 5,000 年前にダイズが存在していたことが中国の文献に記録されており、紀元前 11 世紀頃の周時代には既にダイズが栽培されていたと見なされている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。ダイズが我が国へ渡来した時期は、約 2,000 年前と推定されており、その後、今日見られるように全国的に栽培されるまでに普及した (農業技術体系, 2002)。

###### ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

今日、ダイズは全国的に栽培可能であるが、主に北海道と東北の東日本における比重が高い (農業技術体系, 2002)。世界的には米国、中国、ブラジル、アルゼンチン等を中心に、広い範囲で栽培されている (農業技術体系, 2002)。

我が国では、主に北海道において、米国のような大規模な単作機械化栽培が行われている他、全国的に水田転換畑での栽培やコムギなど麦類の後作としての栽培が行われている（農業技術体系, 2002）。

ダイズの 2005 年における世界総生産量は約 2 億 1 千万トンである。最大の生産国は米国であり、約 83 百万トンと全世界の生産量の約 40%を占める（FAO STAT2006, <http://apps.fao.org/page/collections>）。一方、日本における生産量は 22 万 5 千トンで、2005 年の統計によれば、我が国は約 418 万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の 75%にあたる約 313 万トンが米国からの輸入である（農林水産省 大豆のホームページ（大豆関連データファイル）、[http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/16\\_yunyu.pdf](http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/16_yunyu.pdf)）。輸入されたダイズのほとんどは、ベルトコンベア等で港に隣接している搾油工場に直接運ばれる。

ダイズは搾油用、食用、飼料用として多岐に利用されている。我が国では全消費量の約 70%が搾油用に使われ、残りが、豆腐、味噌、納豆、醤油、豆乳、もやし、枝豆等の食用として使われる。また、大部分の油粕が飼料用に利用されている（農学大事典, 1994）。2005 年に我が国で消費されたダイズのうち、約 308 万トンが搾油用に使われた

（農林水産省 大豆のホームページ（大豆関連データファイル）  
[http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/12\\_jukyuu.pdf](http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/12_jukyuu.pdf)）

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

ダイズは、1 年生の双子葉植物で、子葉は対生し、次に初生葉が伸びて子葉と直角に対生する。さらに 3 片の小葉からなる第 1 複葉が出て、以降第 2、第 3 複葉と続く。茎は主茎と分枝とがあり、茎の伸長の型に基づいて、有限伸育型と無限伸育型に分けられる。根は主根と側根とに分けられ、根粒菌の寄生により根粒を着生する。花はマメ科植物の典型的なもので、旗弁 1、翼弁 2、竜骨弁 2 枚からなる。色は、白、青紫または赤紫である。雄ずいは 10 本あり、うち 9 本は癒合、1 本は離れており、それぞれが葯を持っている。雌ずいは 1 本で、その基部に子房があり、1 - 5 個の胚珠を内蔵している。ダイズの莢は、子房の心皮に由来する。莢に含まれる子実の数は、1 - 3 個が普通で、まれに 5 個のものもある（農業技術体系, 2002）。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズの栽培適地は、生育期間中の温度が 18～28 程度、多照で適度に降雨の

あるところであるが、品種の多様化によって日長感応性が細分化しており、気候に対する適応性は高い（農学大事典, 1994）。また、ダイズの好適土壌 pH は 6~7 の弱酸性から中性であるが、石灰含量が十分であればかなりの酸性土壌でも栽培可能である。生育後期まで養水分の供給が必要なことから、肥沃度の高い土壌での生産性が高く、一般に塩基の欠乏しがちな火山灰土壌での生産性は低い（農学大事典, 1994）。

## 八 捕食性又は寄生性

## 二 繁殖又は増殖の様式

### 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は子房の心皮に由来する莢の中に形成される。日本で栽培されている品種は有限伸育型品種であり、裂莢しやすいことが知られている。一方、米国で栽培されている品種は無限伸育型品種であり、裂莢しにくいことが知られている（農業技術体系, 2002）。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）。なお、種子を乾燥・低温条件下で貯蔵した場合、その寿命を長期間維持できるが、多湿や乾燥状態が繰り返される自然条件下では、種子は急速に発芽能力を失う（農業技術体系, 2002）。

### 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、これらの特性を有さない。

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

ダイズは、基本的に開花前に蕾の中で自家受粉をする自殖性植物である。自家不和合性は知られておらず、また、自然交雑率は 0.5% から 3% と報告されている（Garber and Odland, 1926； Caviness, 1966； Ahrent and Caviness, 1994； Poehlman and Sleper, 1995； 農業技術体系, 2002； 農学大事典, 1994）。ダイズの近縁野生種としては、ツルマメ (*Glycine soja*) が存在する（農学大事典, 1994； OECD, 2000）。ツルマメは、ダイズの祖先と考えられており、染色体数が同じ ( $2n=40$ ) であることからダイズとの交雑が可能である（農業技術体系, 2002）。ツルマメの自然交雑率については 2.3%（Kiang ら, 1992）と報告されている。また、13% との報告もあるが（Fujita ら, 1997） Fujita らは、訪花昆虫が多いなどの自然条件が理由で高い交雑率を示したと考察している。

なお、ツルマメは、シベリアのアムール川流域、中国、朝鮮半島、台湾及び日本に広く自生しており、我が国では全国的に分布している(農業技術体系, 2002)。ツルマメは一年生植物で、主に河原や土手に自生し、畑の周辺や果樹園にも生育が見られるが、農耕地における有害雑草とは考えられていない(Kasahara, 1982)。

また、ダイズにはアポミクシスの特性を有するとする報告はない。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズ雌ずいの受精可能な期間は、開花 1 日前から開花後 2 日間程度で、花粉自身の寿命は数時間である。また、ダイズ個体同士では、約 2m 離れると交雑率は 0.036% になり、約 10m 離れると交雑率が 0% になることが独立行政法人農業環境技術研究所より報告されている(別紙 1 参照)。

ホ 病原性

ヘ 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

## 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

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤<sup>1)</sup>耐性ダイズ(*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI : DP-305423-1)(以下、本組換えダイズと表記)における供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能を表 1(8ページ)に示した。また、供与核酸の塩基配列は別紙 2 に示した。

---

<sup>1)</sup> アセト乳酸合成酵素阻害剤としては、チフェンスルフロンメチルやクロリムロンエチル等がある。

□ 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

供与核酸の各構成要素の由来及び機能は表 1に示したとおりである。

表 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>gm-fad2-1 (frag.1)</i> 遺伝子発現カセット		
<i>KTi3</i> Promoter	2,084	ダイズ由来 Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子のプロモーター領域で、種子(胚)における転写発現活性が葉組織の 1,000 倍と特異的に高い (Jofuku and Goldberg, 1989)。
<i>gm-fad2-1 (frag.1)</i>	597	ダイズ由来 -6 デサチュラーゼ遺伝子の 400 番目のヌクレオチドから 996 番目のヌクレオチドまでの領域(以下、 <i>gm-fad2-1 (frag.1)</i> と表記)(Heppard <i>et al.</i> , 1996) 。
<i>KTi3</i> Terminator	196	ダイズ由来 Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子由来の転写を停止するためのターミネーター領域 (Jofuku and Goldberg, 1989) 。
<i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i> ) 遺伝子発現カセット		
FRT1	51	酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来の Flp 組換え酵素が認識する配列 (Broach <i>et al.</i> , 1982; GenBank ID: AY737006. 1) 。
SAMS Promoter	645	ダイズ由来 S-アデノシル-L-メチオニンシンターゼ (SAMS) 遺伝子の転写開始のためのプロモーター領域 (Falco and Li, 2003) 。
SAMS Intron	591	ダイズ由来 SAMS 遺伝子の 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域 (Falco and Li, 2003) 。
<i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i> )	1971	ダイズのアセト乳酸合成酵素遺伝子由来の改変遺伝子 ( <i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i> )) で、アミノ酸 656 個よりなる分子量 71kDa の改変 ALS 蛋白質(以下、GM-HRA と表記)をコードする。なお、GM-HRA 蛋白質の機能の詳細については、本文 2 ( 1 ) 口 ( 16 ページ) に記載した (Falco and Li, 2003) 。
<i>gm-als</i> Terminator	652	ダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子 ( <i>gm-als</i> ) が持つ転写を停止するためのターミネーター領域 (Falco and Li, 2003) 。
FRT1	51	酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来の Flp 組換え酵素が認識する配列 (Broach <i>et al.</i> , 1982; GenBank ID: AY737006. 1) 。
FRT6	51	FRT1 と 94% 相同性を持つ改変 FRT1 配列で、Flp 組換え酵素が認識する配列。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)



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

本組換えダイズには *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子が導入されている。

### *gm-fad2-1(frag.1)* 遺伝子

本組換えダイズには、*gm-fad2-1( frag.1)* 遺伝子が導入されている。*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子は、ダイズ (*G.max*) 由来のリノール酸生成反応を触媒する -6 デサチュラーゼ (図 1) をコードする -6 デサチュラーゼ遺伝子の一部である。本組換えダイズは、ダイズ内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子及び本導入遺伝子の発現レベルがいずれも抑制され<sup>2)</sup>、結果として、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸含有量が減少し、オレイン酸含有量が脂肪酸全体の 80%程度に高められている。

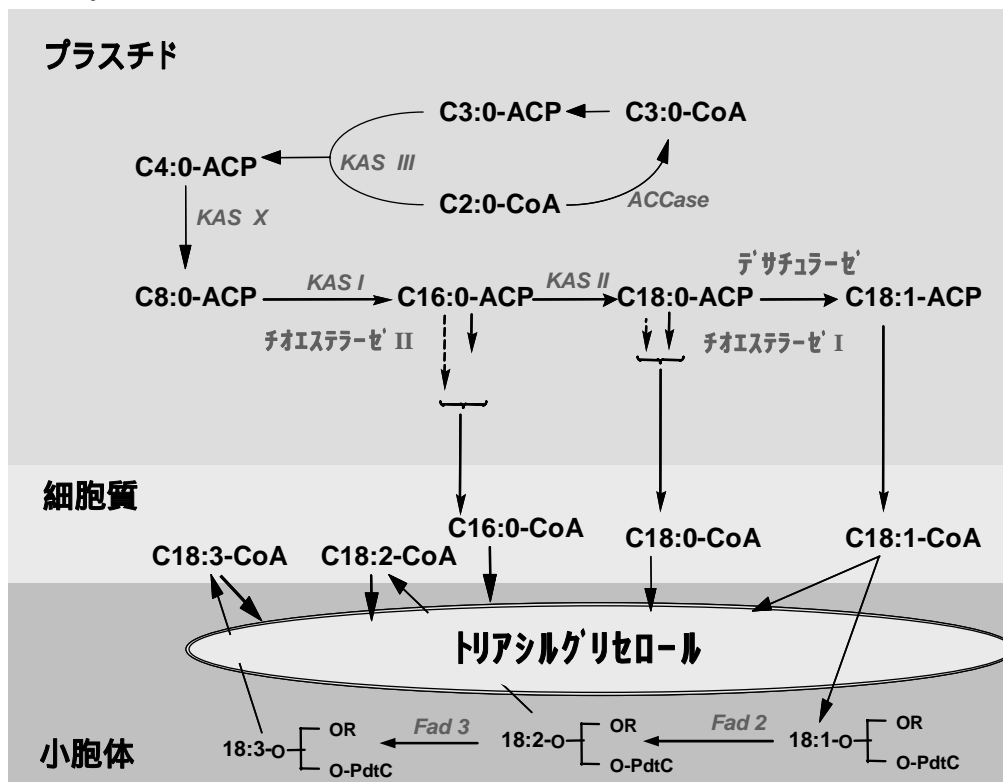


図 1 油糧作物における脂肪酸合成経路

C18:1 = オレイン酸、C18:2 = リノール酸、C18:3 = リノレン酸、

*Fad2* = -6 デサチュラーゼ、*Fad3* = -3 デサチュラーゼ

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

<sup>2)</sup> 外来遺伝子を植物の核ゲノムに導入した形質転換体において、導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象が知られており、ジーンサイレンシングと呼ばれる (森野、島本、1996)。

オレイン酸含量の高められた本組換えダイズ由来の油は、高い熱安定性が求められるような使用においても、通常の大豆油で行われる水素添加の必要がほとんどなく、さらに調理された食品自体の劣化も遅らせると期待されている。特に酸化安定性の高い油が求められるクラッカーや煎餅、コーンフレークのスプレー用油として、また、天ぷらやとんかつ、ポテトチップス、フライドポテト等の揚げ油としての使用が推奨される。さらに、健康面や味覚、安定性を高めるために他の植物油とブレンドしての使用も考えられる。特に、健康面では、心臓病の原因といわれている飽和脂肪酸や多価不飽和脂肪酸の過剰摂取を抑えることができるため、これらの脂肪酸を多く含まない本組換えダイズ由来の油は、その使用場面に応じた理想的な油のベースとして期待される。

導入された *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子は、ダイズ内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の 399 番目のヌクレオチドから 997 番目のヌクレオチドまでの領域である。本導入遺伝子の塩基配列を別紙 2 に示した。

ダイズ中には、*gm-fad2-1* と、*gm-fad2-2* の 2 種類の  $\Delta 6$  デサチュラーゼ遺伝子が存在する。このうち、*gm-fad2-2* 遺伝子は植物体全体で発現が見られるが、*gm-fad2-1* 遺伝子は種子中でのみ時期特異的に発現し、葉や茎、根組織中での発現は認められないことが報告されている (図 2)(Heppard ら、1996)。そこで、本組換えダイズにおいても、ジーンサイレンシングにより、種子特異的な遺伝子発現抑制を誘導するために、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子上流に *Glycine max* 由来 Kunitz トリプシンインヒビター遺伝子 3 (*KTi3*) のプロモーター領域を連結した。ダイズの Kunitz トリプシンインヒビター遺伝子は、少なくとも 10 種類以上が認められているが、*KTi3* は、種子における転写発現活性が葉組織の 1,000 倍と、特異的に高いことが明らかとなっている (Jofuku and Goldberg, 1989)。また、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いた研究から、*KTi3* が胚特異的に発現していることも示されている (Perez-Grau and Goldberg, 1989)。

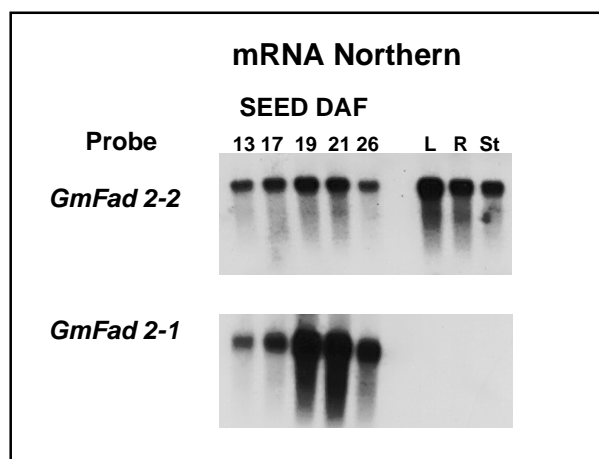


図 2 ダイズ種子における登熟段階別及び組織別 *gm-fad2-1* 及び *gm-fad2-2* の mRNA のノーザンプロット分析 (Heppard ら、1996)

上記図中の L は葉を、R は根を、St は茎を示し、DAF は開花後の日数を示す。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

-6 デサチュラーゼ遺伝子の一部分である *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子が *KTi3* プロモーターにより種子特異的に発現することで、ジーンサイレンシングが意図したように機能し、種子中でのみ内在性及び導入遺伝子の発現レベルが抑制されることを確認するために以下の試験が行われた。2005年に米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社によって自殖後代 T4 世代の本組換えダイズの開花後 20 日目及び 30 日目の種子及び葉組織を供試してノーザンブロット分析が行われた。その結果、開花後 20 日目及び 30 日目の本組換えダイズの種子中では、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子及び外来性 *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子に由来する mRNA の産生が著しく抑制されていることが確認された (図 3、12ページ及び図 4、13ページ)。

一方、葉組織では、期待されたように本組換えダイズでは内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子及び導入遺伝子に由来する mRNA のバンドは検出されず、非組換えダイズでも内在性遺伝子由来の mRNA のバンドは検出されなかった (図 5、14ページ)。

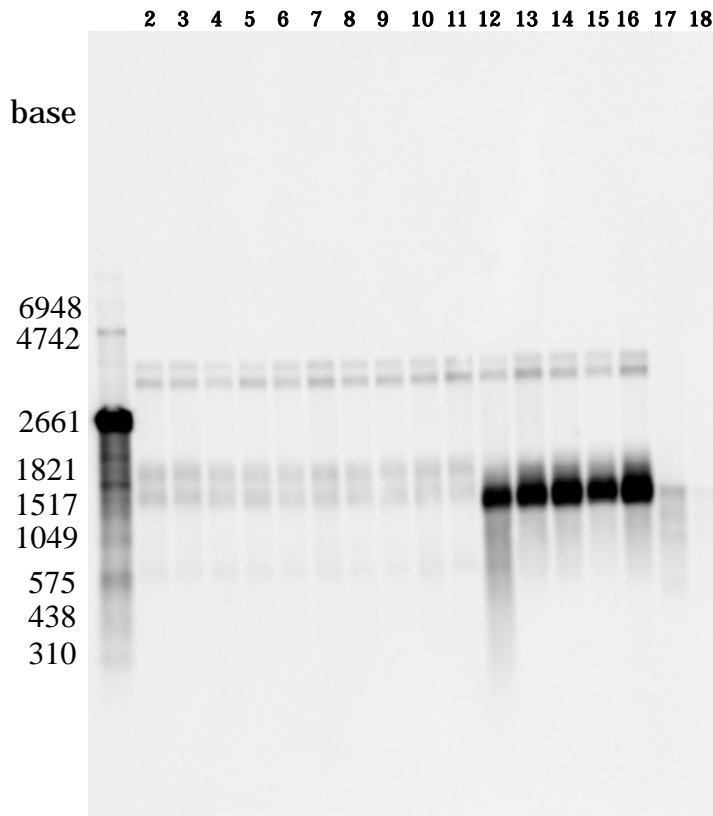


図 3 本組換えダイズの開花後 20 日目の種子における *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析結果

レーン	供試サンプル <sup>1</sup>	レーン	供試サンプル <sup>1</sup>
2	本組換えダイズ-1	10	本組換えダイズ-9
3	本組換えダイズ-2	11	本組換えダイズ-10
4	本組換えダイズ-3	12	非組換えダイズ-1
5	本組換えダイズ-4	13	非組換えダイズ-2
6	本組換えダイズ-5	14	非組換えダイズ-3
7	本組換えダイズ-6	15	非組換えダイズ-4
8	本組換えダイズ-7	16	非組換えダイズ-5
9	本組換えダイズ-8	17	陽性対照 <sup>2</sup> 25 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物
		18	陽性対照 <sup>2</sup> 5 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物

1: 1レーン当たり 200ng の mRNA を泳動した。サンプルの番号は、個体番号を示す。

2: *gm-fad2-1* の *in vitro* 転写産物をレーン 17 は 25pg、レーン 18 は 5pg 泳動した。

非組換えダイズでは、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物である約 1,500b の大きさのバンドが検出された。一方、本組換えダイズでは内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物のバンド (1,500 b) 及び *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子の転写産物の弱いバンド (約 600b) が検出されたものの、非組換えダイズと比べて遺伝子発現レベルは大きく抑制されていた。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

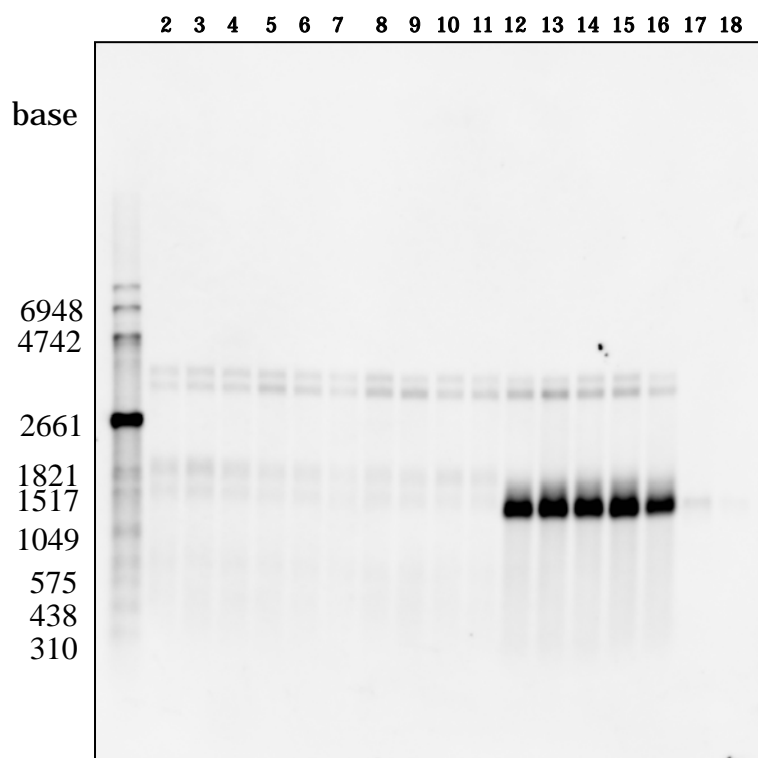


図 4 本組換えダイズの開花後 30 日目の種子における *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析結果

レーン	供試サンプル <sup>1</sup>
2	本組換えダイズ-1
3	本組換えダイズ-2
4	本組換えダイズ-3
5	本組換えダイズ-4
6	本組換えダイズ-5
7	本組換えダイズ-6
8	本組換えダイズ-7
9	本組換えダイズ-8

レーン	供試サンプル <sup>1</sup>
10	本組換えダイズ-9
11	本組換えダイズ-10
12	非組換えダイズ-1
13	非組換えダイズ-2
14	非組換えダイズ-3
15	非組換えダイズ-4
16	非組換えダイズ-5
17	陽性対照 <sup>2</sup> 25 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物
18	陽性対照 <sup>2</sup> 5 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物

1: 1レーン当たり 200ng の mRNA を泳動した。サンプルの番号は、個体番号を示す。

2: *gm-fad2-1* の *in vitro* 転写産物をレーン 17 は 25pg、レーン 18 は 5pg 泳動した。

非組換えダイズでは、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物である約 1,500b の大きさのバンドが検出された。一方、本組換えダイズでは内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物のバンド (1,500 b) 及び *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の転写産物の弱いバンド (約 600b) が検出されたものの、非組換えダイズと比べて遺伝子発現レベルは大きく抑制されていた。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン㈱にある)

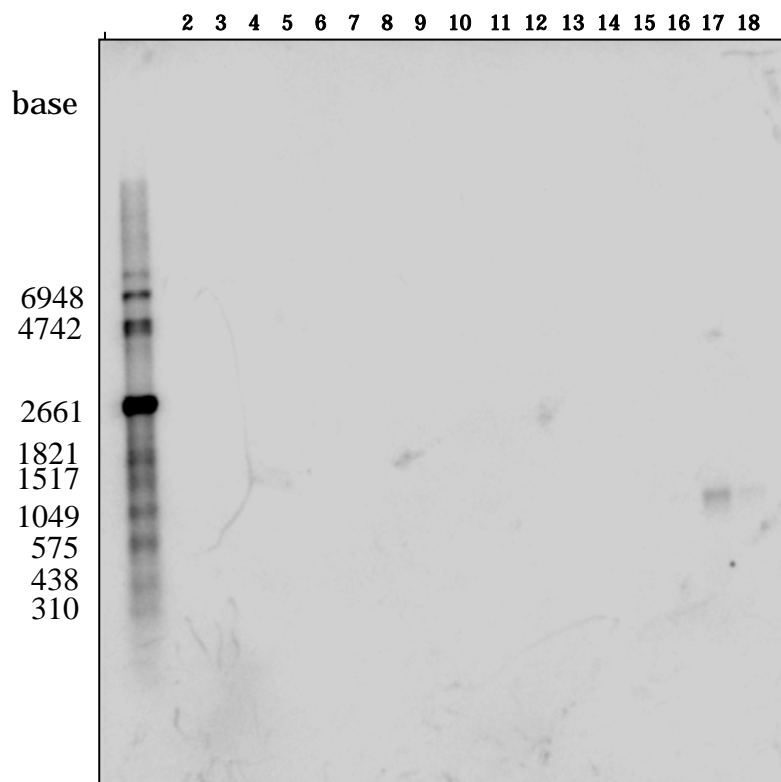


図 5 本組換えダイズの葉組織における *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析結果

レーン	供試サンプル <sup>1</sup>	レーン	供試サンプル <sup>1</sup>
2	本組換えダイズ-1	10	本組換えダイズ-9
3	本組換えダイズ-2	11	本組換えダイズ-10
4	本組換えダイズ-3	12	非組換えダイズ-1
5	本組換えダイズ-4	13	非組換えダイズ-2
6	本組換えダイズ-5	14	非組換えダイズ-3
7	本組換えダイズ-6	15	非組換えダイズ-4
8	本組換えダイズ-7	16	非組換えダイズ-5
9	本組換えダイズ-8	17	陽性対照 <sup>2</sup> 25 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物
		18	陽性対照 <sup>2</sup> 5 pg <i>gm-fad2-1</i> 転写産物

1: 1レーン当たり 200ng の mRNA を泳動した。サンプルの番号は、個体番号を示す。

2: *gm-fad2-1* の *in vitro* 転写産物をレーン 17 は 25pg、レーン 18 は 5pg 泳動した。

非組換えダイズでは、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物である約 1,500b の大きさのバンドは検出されなかった。また、本組換えダイズにおいても、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物のバンド(約 1,500 b)、及び *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子の転写産物(約 600 b) のバンドのいずれも検出されなかった。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

## gm-hra 遺伝子

本組換えダイズに導入された改変 *als* (以下、*gm-hra* と表記) 遺伝子は、ダイズのアセト乳酸合成酵素 (*als*) 遺伝子由来であり、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けない改変 ALS (以下、GM-HRA と表記) 蛋白質をコードしている (Fang *et al.*, 1992)。

除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は、植物中のロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成に關与するアセト乳酸合成酵素 (ALS) 活性を阻害する。その結果、これらの分枝アミノ酸が合成されなくなり、植物を枯死させる (図 6、16 ページ)。*gm-hra* 遺伝子により產生される GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けず、本剤の存在下でも ALS 活性を示すので、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成が可能となり、植物に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与される (図 6、16 ページ)。なお、改変 *als* 遺伝子を利用した組換え作物の作出は、すでにイネやダイズの他の系統で報告されている

( [http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_356043\\_5ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5ap.pdf)、[http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/AD41ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/AD41ap.pdf) )

除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は、雑草の発生前から発生初期に散布する土壌処理兼茎葉処理型除草剤である。今日、本除草剤は日本及び米国を始め、世界中で使用されている。*gm-hra* 遺伝子の導入による除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与したダイズの栽培によって、栽培農家に雑草防除における幅広い選択肢を提供することになると期待される。

なお、GM-HRA 蛋白質が、既知のアレルゲン蛋白質と相同性を有さないことを確認するために、公開データベース (Swiss-Prot、TrEMBL、NCBI、PIR 等) の配列情報を基に、同一のものが重複しない 1,758 の登録既知アレルゲンからなるデータベースを構築し、アミノ酸配列を比較した。その結果、本蛋白質において有意な相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、既知毒性タンパク質との間で相同性を持たないことを確認するため、公開データベース (NCBI、Uniprot) に登録されている既知毒性蛋白質との間の検索を行った結果、GM-HRA 蛋白質と既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。

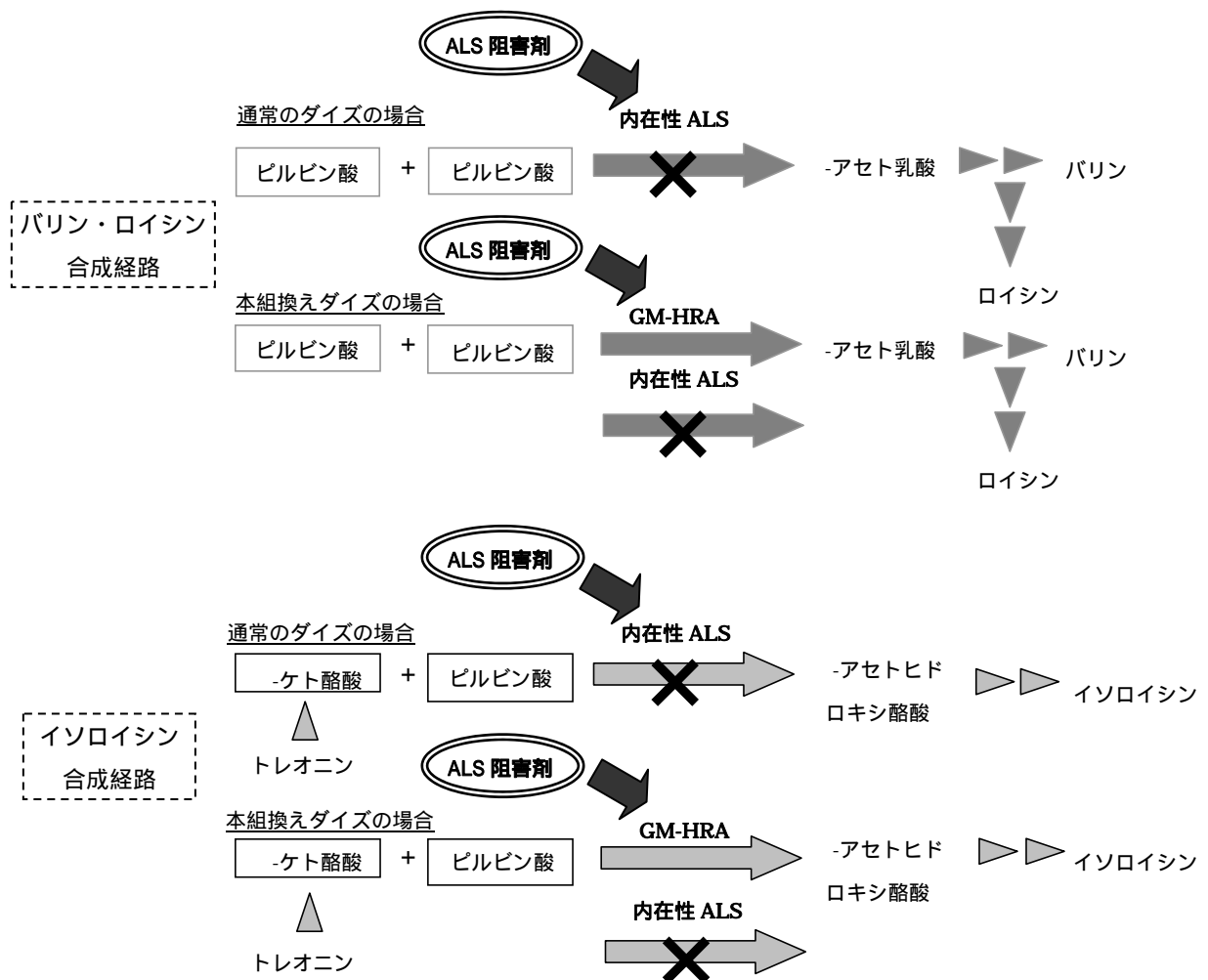


図 6 GM-HRA 蛋白質の作用機作

植物の内在性アセト乳酸合成酵素（ALS）は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤（ALS 阻害剤）によって阻害され、バリン・ロイシン合成経路及びイソロイシン合成経路において、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸合成ができなくなり、植物は枯死する。一方、本組換え大ダイズのように GM-HRA が存在すると、ALS 阻害剤の影響を受けないため、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸合成が可能となり、植物は正常に成長する。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

### *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子

油糧作物において、種子形成時の多価不飽和脂肪酸の生合成は、膜結合型の 2 種類の不飽和化酵素により触媒される (Kinney, 1994)。まず、*gm-fad2* 遺伝子がコードする -6 デサチュラーゼにより、モノ不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (C18:1) の -12 (n-6) 位に第二の二重結合が挿入されてリノール酸 (C18:2) となり (Okuley *et al.*, 1994; Heppard *et al.*, 1996)、次いで *fad3* 遺伝子がコードする -3 デサチュラーゼにより、リノール酸の -15 (n-3) 位に第三の二重結合が導入されリノレン酸 (C18:3) となる (Yadav *et al.*, 1993) (図 1、9 ページ)。したがって、*gm-fad2* 遺伝子がコードする -6 デサチュラーゼの発現を抑制することによって、オレイン酸からリノール酸への生合成反応が阻害され、オレイン酸含有量を高め



ることが可能となる（図 1、9ページ）。

本組換えダイズでは *gm-fad2-1* 遺伝子の nt399 から nt997 の領域である *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子を導入することにより、ジーンサイレンシングを誘導し（Waterhouse & Helliwell, 2003） $\Delta 6$  デサチュラーゼ遺伝子の発現レベルを抑制することを試みた。また、種子特異的プロモーターである *KTi3 Promoter* に連結することにより、種子特異的に発現レベルを抑制した。

実際に、本組換えダイズの種子中では、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子及び外来性 *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の発現レベルがいずれも著しく抑制され（図 3、12ページ及び図 4、13ページ）、オレイン酸の含有量は、統計学的に有意に高まっていることが確認された（表 2）。一方、それに伴い、リノール酸及びリノレン酸含有量は減少した。

また、本組換えダイズの葉組織においては、内在性 *gm-fad2-1* 遺伝子及び外来性 *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の発現は認められなかった（図 5、14ページ）。オレイン酸の含有量は、本組換えダイズで 4.4%、非組換えダイズで 3.6%で、統計学的有意差は認められたものの、種子中で認められたような著しいオレイン酸含有量の増加は認められなかった（表 3、18ページ）。

なお、種子中の脂肪酸合成及び脂質含量の調節には、ACCase や KASIII などの脂肪酸代謝系の酵素が律速因子となっていることが知られており（Ohlrogge et al., 1993） $\Delta 6$  デサチュラーゼのような脂肪酸の不飽和化酵素が律速因子となっている報告はない。実際に種子中の脂質含量を測定したところ、本組換えダイズの脂質含量が 15.9%であったのに対して、非組換えダイズの脂質含量は、14.9%であり、統計学的な有意差は認められなかった。

表 2 種子における主要脂肪酸組成分析結果

供試材料 <sup>2</sup>	脂肪酸組成（総脂肪酸量に対する割合（%）） <sup>1,3</sup>				
	パルミチン酸 （16:0）	ステアリン酸 （18:0）	オレイン酸 （18:1）	リノール酸 （18:2）	リノレン酸 （18:3）
本組換えダイズ	8.2 ± 0.2 (7.2-10.4)	2.5 ± 0.1 (2.2-2.7)	78.8 ± 0.7 (74.8-83.5)	1.3 ± 0.1 (0.7-1.9)	3.6 ± 0.2 (2.9-5.1)
非組換えダイズ	13.1 ± 0.2 (12.0-15.6)	4.2 ± 0.1 (3.8-4.7)	18.0 ± 1.1 (12.1-26.0)	56.3 ± 0.7 (52.0-61.6)	7.2 ± 0.5 (4.1-11.7)

1：分析値の平均値を示す。カッコ内は、（最大値・最小値）を示す。±は、標準誤差を示す。

2：n=15

3：表中の全ての脂肪酸は1%水準で有意差有り。

非組換えダイズにおける脂肪酸組成は、従来のダイズ油で報告されている文献値の変動の範囲内であった。（パルミチン酸 8.0~13.5%、ステアリン酸 2.0~5.4%、オレイン酸 17.0~30.0%、リノール酸 48.0~59.0%、リノレン酸 4.5~11.0%（Codex-Stan210, 2005））

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン㈱にある）

表 3 葉組織における主要脂肪酸組成分析結果

供試材料	脂肪酸組成（総脂肪酸量に対する割合（％）） <sup>1</sup>				
	パルミチン酸 （16:0）	ステアリン酸 （18:0）	オレイン酸 <sup>4</sup> （18:1）	リノール酸 （18:2）	リノレン酸 <sup>4</sup> （18:3）
本組換えダイズ <sup>2</sup>	11.2 ± 0.3 (10.6-11.7)	4.9 ± 0.2 (4.6-5.2)	4.4 ± 0.02 (4.4-4.5)	10.2 ± 1.0 (8.1-12.3)	47.4 ± 0.3 (46.6-48.2)
非組換えダイズ <sup>3</sup>	10.7 ± 0.2 (10.0-11.3)	4.9 ± 0.1 (4.6-5.2)	3.6 ± 0.1 (3.2-4.0)	9.6 ± 0.3 (8.1-10.9)	50.0 ± 0.7 (47.6-53.1)

1：分析値の平均値を示す。カッコ内は、（最大値・最小値）を示す。±は、標準誤差を示す。

2：n=4

3：n=8

4：1%水準で有意差有り。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン㈱にある）

### gm-hra 遺伝子

*gm-hra* 遺伝子がコードする GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって活性阻害される内在性 ALS の代わりに、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成経路で作用する（図 6、16ページ）。分枝アミノ酸合成経路のうち、バリン・ロイシン合成経路においては、バリンにより ALS がフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによる ALS のフィードバック制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによってフィードバック制御されていることが知られている（生化学辞典, 1998）。したがって、仮に GM-HRA 蛋白質により ALS の触媒活性が高まり、その結果、分枝アミノ酸合成量が高まったとしても、フィードバック制御が働くことにより、特定のアミノ酸のみの含有量が高まるとは考え難い。確認のために、2005 年にほ場で栽培して得た BC1F5 世代の種子（n=18）及び米国の温室で 2006 年に栽培した T4 世代の植物体 5 個体の葉組織を供試して、本組換えダイズの種子及び葉組織中のアミノ酸組成の分析を行った。その結果、本組換えダイズの種子においては、対照の非組換えダイズと比較してトレオニン、グルタミン酸、葉組織においては、ロイシンに統計学的に 5%水準で有意差が認められたが、1%水準では全てのアミノ酸において統計学的に有意差は認められなかった（表 4、社外秘）。このことから、GM-HRA 蛋白質の産生が本組換えダイズのアミノ酸合成経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。また、本組換えダイズに導入されている *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子は、それぞれ脂肪酸合成経路及びアミノ酸合成経路に関わる遺伝子であり、両合成経路は、いずれも植物体中で独立した代謝経路であるため、両遺伝子の発現が相互に影響するとは考え難い。

表 4 本組換えダイズ及び非組換えダイズの種子及び葉組織中のアミノ酸組成  
( 社外秘 )

( 2 ) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子カセットから成る PHP19340A の基となったベクターの名称及び由来は以下のとおりである。

名称 : PHP19340

由来 : 大腸菌( *Escherichia coli* )由来のプラスミド pUC19 等を基に構築された。

PHP19340A は、プラスミド PHP19340 の制限酵素処理によって抽出された、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子カセット ( [KTi3 Promoter]-[*gm-fad2-1 (frag.1)*]-[KTi3 Terminator] ) のみから成る直鎖状 DNA 断片である ( 図 7、社外秘 )。

一方、*gm-hra* 遺伝子発現カセットから成る PHP17752A の基となったベクターの名称及び由来は以下のとおりである。

名称 : PHP17752

由来 : 大腸菌( *Escherichia coli* )由来のプラスミド pUC19 等を基に構築された。

PHP17752A は、プラスミド PHP17752 の制限酵素処理によって抽出された、*gm-hra* 遺伝子発現カセット ( [FRT1]-[SAMS Promoter]-[SAMS Intron]-[*gm-hra*]-[*gm-als* Terminator]-[FRT1]-[FRT6] ) のみから成る直鎖状 DNA 断片である ( 図 8、社外秘 )。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A の塩基数は、それぞれ 2,924bp 及び 4,512 bp である。両直鎖状 DNA 断片の塩基配列は別紙 2 に示した。

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

PHP19340A 及び PHP17752A は、いずれも目的遺伝子カセット領域のみから成る直鎖状 DNA 断片で、それ以外の特定の機能を有する配列は含まれていない。

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

導入に用いた PHP19340A 及び PHP17752A とも、全塩基配列は明らかにされており、他の生物への伝達を可能とする配列を含んでいない。したがって、感染性はない。

### (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

導入に用いた PHP19340A 及び PHP17752A における供与核酸の構成要素の位置及び方向、並びに、制限酵素による切断部位は図 7 (社外秘) 及び図 8 (社外秘) に示した。

図 7 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A の供与核酸の構成及び制限酵素切断部位 (社外秘)

図 8 直鎖状 DNA 断片 PHP17752A の供与核酸の構成及び制限酵素切断部位 (社外秘)

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主内への導入はパーティクルガン法で行い (Klein *et al.*, 1987) 直鎖状 DNA 断片である PHP19340A と PHP17752A を混合したものを導入した。

#### ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換えダイズは、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社によって開発された遺伝子組換えダイズであり、その作出から選抜・育成の過程は以下のとおりである。

## 核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換体の選抜の過程は図 9（22ページ）に示した。

## アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

## 育成の経過及び系統樹

本組換えダイズ の育成経過を図 10（社外秘）に示した。

なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為」における第一種使用の申請のほか、食品としての安全性確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行う予定である。

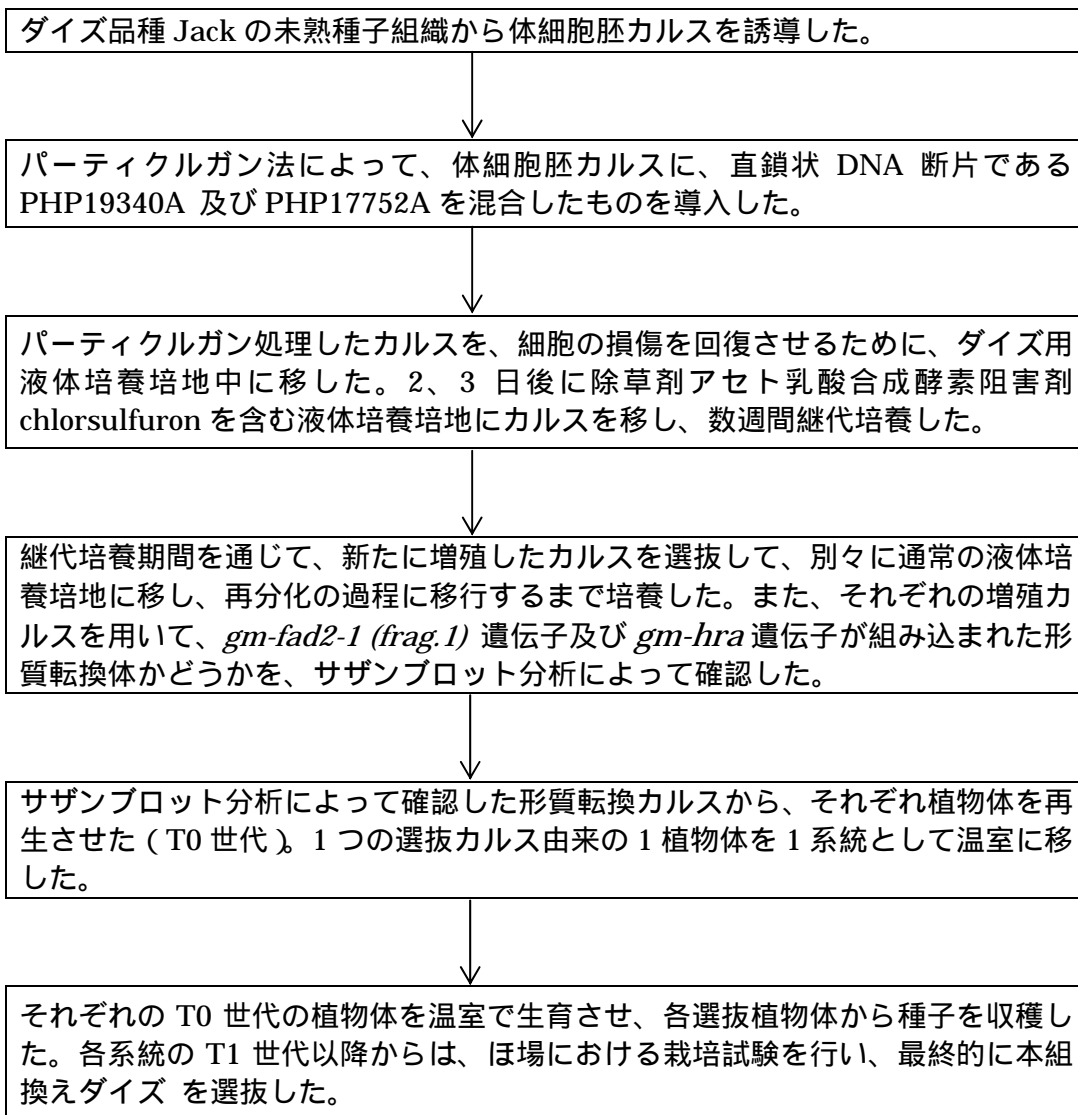


図 9 供与核酸の宿主への導入及び本組換えダイズ の選抜過程

図 10 本組換えダイズの育成過程 (社外秘)

(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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

T1, T2 及び T3 世代の本組換えダイズ 1 個体より採種した種子中の脂肪酸含有量をガスクロマトグラフィーにより測定した。表 5 (23 ページ) に示すように、オレイン酸含有量が総脂肪酸量の 80% 程度のものと、20% 程度のものが 3:1 に適合する分離比を示した。また、BC1F2 世代を用いて PCR により *gm-hra* 遺伝子の分離比を求めたところ、3:1 に適合する分離比を示した。このように移入された核酸は、メンデルの法則に従って安定して伝達することが確認されたことから、ダイズ染色体ゲノム上に存在する。

表 5 導入遺伝子の分離比の解析

採種した個体の世代	高オレイン酸の種子数	高オレイン酸でない種子数	高オレイン酸種子の期待値	高オレイン酸でない種子の期待値	P 値
T1	26	4	22.5	7.5	0.140
T2	30	7	27.8	9.3	0.393
T3	78	23	75.8	25.3	0.605

目的遺伝子をヘテロに持つ各供試世代 1 個体より得た種子中の脂肪酸含有量をガスクロマトグラフィーにより測定し、オレイン酸含有量の高い種子を数えた。3:1 の分離比を想定して、期待値を計算し  $\chi^2$  検定を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

ロ 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

本組換えダイズ に導入された核酸のコピー数及び伝達の安定性を調べるために、自殖後代 T4 及び T5 世代の 2 世代を供試し、サザンブロット分析により解析した。分析は、2005 年に米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社が栽培した植物体を用いて行った。各世代ごとに 7 植物体の葉から抽出した DNA サンプルを、制限酵素 *Hind* III または *Nco* I で切断し、PCR で増幅した *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子と *gm-hra* 遺伝子をプローブとして用いた。

PHP19340A より導入された核酸のコピー数及び伝達の安定性

図 7 (社外秘) に示すように、PHP19340A においては、制限酵素 *Hind*III では、*KTi3* プロモーター領域中で 3 箇所、*KTi3* ターミネーター領域で 1 箇所切断され、制限酵素 *Nco*I では *KTi3* プロモーター領域中で 1 箇所切断される。したがって、1 コピーの PHP19340A が本組換えダイズ染色体ゲノム中に導入された場合、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子をプローブとした分析では、*Hind*III 消化では、1,688bp の断片が 1 つ検出されることが予想された。また、*Nco*I 消化では、2,322bp 以上の断片が 1 つ検出されることが予想された。

分析の結果、表 6 (25 ページ) に示すように、本組換えダイズ特異的な断片が、*Hind*III 消化では 2 断片、*Nco*I 消化では 6 断片検出されたことから、本組換えダイズのダイズ染色体ゲノムには、PHP19340A 由来の *gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子が 6 コピー存在すると考えられた (別紙 3 参照)。今後、さらに詳細な検討を行う予定である。

また、供試した自殖後代 T4 及び T5 世代の各 7 植物体において、検出されたバンドパターンはいずれも一致していることから (表 6、25 ページ及び別紙 3) 本組換えダイズにおける挿入遺伝子が、後代に安定的に伝達していることが確認された。

#### PHP17752A より導入された核酸のコピー数及び伝達の安定性

図 8 (社外秘) に示すように、PHP17752A においては制限酵素 *Hind*III により 6 箇所切断され、そのうち 1 箇所が *gm-hra* 遺伝子内で切断される (別紙 3、図 4)。したがって、1 コピーの PHP17752A が本組換えダイズ染色体ゲノム中に導入された場合、*gm-hra* 遺伝子をプローブとした分析では、*Hind*III 消化により 1,528bp 及び 2,418bp の断片がそれぞれ 1 つずつ検出されることが予想された。また、制限酵素 *Nco*I により *gm-hra* 遺伝子内の 1 箇所が切断される。したがって、*Nco*I 消化では、1,500bp 以上及び 3,000bp 以上の断片がそれぞれ 1 つずつ検出されることが予想された。

分析の結果、表 6 (25 ページ) に示すように、*Hind*III 消化では 1,528bp 及び 2,418bp の 2 断片、*Nco*I 消化では約 3,200bp 及び約 3,600 bp の 2 断片が検出されたことから、PHP17752A 由来の遺伝子が 1 コピー本組換えダイズ中に導入されたことが示された。

また、供試した自殖後代 T4 及び T5 世代の各 7 植物体において、検出されたバンドパターンはいずれも一致していることから (表 6、25 ページ及び別紙 3) 本組換えダイズ中に導入された遺伝子が、複数世代にわたり安定的に遺伝していることが確認された。



表 6 サザンブロット分析結果の要約

プローブ	制限酵素	期待される断片長 (bp) <sup>1</sup>	検出された断片長 (bp) <sup>2</sup>
<i>gm-fad2-1</i>	<i>Hind</i> III	1,687	1,687 約 2,400
<i>gm-fad2-1</i>	<i>Nco</i> I	> 2,322	約 2,900 約 6,100 (薄いバンド) 約 7,400 >8,600 (3本のバンド)
<i>gm-hra</i>	<i>Hind</i> III	1,529 2,418	1,529 2,418
<i>gm-hra</i>	<i>Nco</i> I	> 1,500 > 3,000	約 3,200 約 3,600

1: 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A あるいは PHP17752A の 1 コピーが挿入された場合、各制限酵素処理で検出が予想される DNA 断片の大きさ。

2: 期待される断片長及び分子量マーカーに基づく、導入遺伝子として特異的に検出された DNA 断片の大きさ。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)

#### 八 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

本組換えダイズのダイズ染色体ゲノムには、導入に用いた PHP19340A 由来の 1 つの部分断片を含めた *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子が 6 コピー存在することが考えられた(前述の口参照)。サザンブロット分析の結果、供試した 2 世代の全ての植物体でそのバンドパターンは一致していた。この結果は、これらのコピーが連鎖して後代に遺伝していることを示している。さらに、優良品種と戻し交配を行った本組換えダイズと他品種とのかけ合わせの系統においても、分離は認められず、本結果と同様の結果が得られていることから、これらのコピーは単一の遺伝子座上に存在すると考えられた。

また、BC1F2 世代の植物体を用いて PCR により *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の分析を行ったところ、同じ分離パターンを示したことから、*gm-hra* 遺伝子も *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子と同じ遺伝子座上に存在することが示唆された。

#### 二 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

本組換えダイズ中に導入された *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子導入によるオレイン

酸含量の増加について、自殖後代 T4 及び T5 世代の 2 世代の種子を用いた脂肪酸組成分析を行って確認した。両世代の種子をそれぞれ個々に摩砕し、trimethylsulfonium hydroxide(TMSH)を添加したヘプタン抽出によって脂肪酸メチルエステル画分を得た。そして、それぞれの種子の脂肪酸メチルエステル画分を、ガスクロマトグラフィーにかけて、主要な脂肪酸組成を分析した。

その結果、従来のダイズ油の脂肪酸中のオレイン酸含有量が 17.0～30.0%であるのと比較して (Codex. Stn.210, 2005)、本組換えダイズの自殖後代 T4 及び T5 世代において、オレイン酸含有量は 80%程度まで高められており、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の導入による高オレイン酸形質が、複数世代にわたり安定的に遺伝していることが確認された (表 7、26ページ)。また、表 7 (26ページ) の最大値と最小値から推察されるように、個体間の差も小さく、オレイン酸含有量が高められた特性が個体間で安定して発現していることが確認された。

表 7 複数世代を用いた主要脂肪酸組成分析結果

供試材料	脂肪酸組成 (総脂肪酸量に対する割合 (%)) <sup>1</sup>				
	パルミチン酸 <sup>4</sup> (16:0)	ステアリン酸 <sup>4</sup> (18:0)	オレイン酸 (18:1)	リノール酸 (18:2)	リノレン酸 <sup>4</sup> (18:3)
T4 世代 <sup>2</sup>	8.2 ± 0.2 (7.2-10.4)	2.5 ± 0.1 (2.2-2.7)	78.8 ± 0.7 (74.8-83.5)	1.3 ± 0.1 (0.7-1.9)	3.6 ± 0.2 (2.9-5.1)
T5 世代 <sup>3</sup>	7.2 ± 0.1 (6.7-7.7)	3.0 ± 0.1 (2.6-3.4)	78.3 ± 0.3 (76.4-80.2)	1.3 ± 0.1 (1.0-1.8)	5.9 ± 0.2 (4.5-7.2)

1：分析値の平均値を示す。カッコ内は、(最小値-最大値)を示す。±は、標準誤差を示す。

2：n=15

3：n=14

4：1%水準で有意差あり。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

一方、本組換えダイズ中に導入された *gm-hra* 遺伝子によって発現する GM-HRA 蛋白質が本組換えダイズの後代でも安定して産生されることを、自殖後代 T6 世代及び戻し交配後代 BC1F5 世代の 2 世代を用いて、除草剤に対する耐性並びに ELISA 法による定量分析によって確認した。

#### 薬剤散布試験

アセト乳酸合成酵素阻害剤 (グリホサート (33.4 g ai/ha)+ フェンソリンメチル(10.7 g ai/ha)) を散布し、2 週間後に観察を行った (表 8、27ページ及び図 11、27ページ)。

薬害程度の分析は、2005 年に米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社において行われ、本組換えダイズ及び非組換えダイズを各 10 個体供試して 3 反復で行った。播種後 12 日目に除草剤アセト乳酸合成による薬害の程度

を 0% (全く影響を受けていない) から 100% (完全に枯死している) のスケールで評価した。その結果、非組換えダイズでは除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤散布により、約 60%の薬害が認められたのに対して、本組換えダイズでは、自殖後代 T6 世代及び戻し交配後代 BC1F5 世代ともに薬害は認められず、複数世代にわたり除草剤耐性形質が安定的に遺伝していることが確認された。

表 8 薬剤散布による薬害程度の比較

		本組換えダイズ <sup>1</sup>	非組換えダイズ <sup>1</sup>
T6 世代	薬剤散布	0 ± 0.0 <sup>2,3</sup>	58 ± 2.9
	薬剤非散布	0 ± 0.0	0 ± 0.0
BC1F5 世代	薬剤散布	0 ± 0.0	59 ± 3.6
	薬剤非散布	0 ± 0.0	0 ± 0.0

1 : n=30

2 : 各個体の薬害の程度を 0 (健全) から 100% (完全枯死) で評価した。各値は 8 個体の平均値を示す。

3 : ± は標準誤差値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)



A

B

C

D

図 11 本組換えダイズ及び非組換えダイズを用いた薬剤散布試験

A: 本組換えダイズ+除草剤散布、B: 本組換えダイズ 除草剤散布なし

C: 非組換えダイズ+除草剤散布、D: 非組換えダイズ 除草剤散布なし

除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤 (カリロンIyl(33.4 g ai/ha) + フィンルロンメyl (10.7 g ai/ha) 散布後 2 週間目の BC1F5 世代の結果を示す。

(本図に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

## 定量 ELISA 試験

定量分析には、上述の薬剤散布 2 週間後の本組換えダイズ及び非組換えダイズの各 3 個体の葉組織から 1 個体当たり 10mg 採取し、供試した。その結果、GM-HRA 蛋白質は、T6 世代では  $1.1 \pm 0.03$  ng/mg 乾燥重、BC1F5 世代では  $0.9 \pm 0.13$  ng/mg 乾燥重の発現量を示し、これらの世代間で統計学的有意差は認められず、複数世代にわたり GM-HRA 蛋白質が安定的に発現することが確認された (表 9)。

表 9 本組換えダイズ における GM-HRA 蛋白質の発現量

	T6 世代	BC1F5 世代	P-値
平均蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	$1.1 \pm 0.03^1$ (1.0-1.1)	$0.9 \pm 0.13$ (0.7-1.1)	0.18

1: 上段は分析値の平均値 (n=3) 及び標準誤差を示す。下段のカッコ内は分析値の最小値-最大値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

ホ 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

移入された核酸は、伝達を可能とする配列を含まない。よって伝達性はない。

## (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

### 方法

葉から抽出した DNA を鋳型にする。KTi3 promoter 領域及び *gm-fad2-1* (*frag.1*) 遺伝子のコード領域にプライマーを設定し、アニーリング温度 55 °C、サイクル回数 35 回で PCR を行う。アガロース電気泳動を行い、本組換えダイズ に特異的な約 400bp のバンドを検出する。

### 感度

40ng の DNA サンプルを希釈して PCR を行ったところ、検出限界は 8pg であった。

### 信頼性

本組換えダイズ 及び非組換えダイズを 2 箇所異なる場所で、それぞれ 5 個体供試して、各個体について 6 反復行う試験を行い、再現性を確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 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

本組換えダイズにおいては、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の導入によって、ダイズ内在性 -6 デサチュラーゼ遺伝子の発現レベルが抑制され、結果として、オレイン酸含有量が高められているとともに、GM-HRA 蛋白質を発現する *gm-hra* 遺伝子の導入によって、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。

*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子の導入により、ダイズ内在性 -6 デサチュラーゼの発現レベルを抑制することによって、オレイン酸からリノール酸への生合成反応が阻害され、その結果、オレイン酸含有量が高めることが可能となる(2(1)ロ 参照、16ページ)。実際に本組換えダイズの種子中のオレイン酸含有量は、従来のダイズ油が脂肪酸全体の 17.0~30.0%であるのと比較して(Codex. Stn.210, 2005)、80%程度まで高められていることを確認した(2(4)ニ参照、25ページ)。

一方、*gm-hra* 遺伝子の発現により産生される GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって活性を阻害される植物内在性アセト乳酸合成酵素に代わって、ロイシン等の分枝アミノ酸合成に関与し、その結果、植物体に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する(2(1)ロ 参照、9ページ)。実際に、米国の温室試験やほ場試験において、本組換えダイズが除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けずに生育することを確認した(2(4)ニ参照、25ページ)。

ロ 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

形態及び生育の特性

本組換えダイズの形態及び生育の特性を評価するため、種苗法に基づく品種登録における審査基準の評価項目を参考にして、戻し交配後代 BC1F5 世代及び対照として遺伝的背景が極めて近い非組換えダイズ品種 PHSB01 を供試して、米国アイオワ州ジョンストンの1ヶ所のほ場で調査を行った。調査は、50%発芽揃い期、発芽率、50%開花期、小葉の形、小葉の数、毛じの色、毛じの多少、花色、80%成熟期、草型(主茎の伸育型に基づく)、主茎長、主茎節数、最下位着莢節位高、分枝数、裂莢の難易、一株総莢数、一株総莢重、莢当たりの粒数、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重、百粒重、種子の大きさ、臍の色の計24項目について1反復10個体として、3反復で行った。

その結果、本組換えダイズの主莖長において、対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたこと及び臍の色がやや異なっていたこと以外に、残りの 23 項目に関して差異は認められなかった (表 10、30ページ)。

表 10 形態及び生育の特性<sup>1</sup>

農業形質	本組換えダイズ	非組換えダイズ	P-値
50%発芽揃い期	7月4日	7月5日	-
発芽率(%)	62	59	0.77
50%開花期	7月29日	7月26日	-
小葉の形	円葉	円葉	-
小葉の数	3枚葉	3枚葉	-
毛じの色	淡褐色	淡褐色	-
毛じの多少	中	中	-
花色	紫	紫	-
80%成熟期	10月5日	10月2日	-
草型(主莖の伸育型に基づく)	無限型	無限型	-
主莖長 (cm)	84	71	0.0001 <sup>2</sup>
主莖節数	18	17	0.18
最下着莢節位高 (cm)	11.9	10.4	0.06
分枝数	5	5	0.6
裂莢の難易	難	難	-
一株総莢数	118	102	0.36
一株総莢重(g)	53	57	0.68
莢当たりの粒数	2	2	0.30
一株全粒重(g)	36	37	0.83
一株成熟粒数	249	246	0.95
一株成熟粒重 (g)	36	37	0.86
百粒重 (g)	14	15	0.09
種子の大きさ	中	中	-
臍の色	淡褐色	褐色	-

1: n=30

2: 5%水準で有意差有り。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュボン株にある)

#### 生育初期における低温耐性

本組換えダイズ の生育初期における低温耐性に関して、戻し交配後代 BC1F5 世代の本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種をそれぞれ温室でポットに播

種し、発芽後にそれぞれ1ポット10個体に間引いた。この本組換えダイズと対照の非組換えダイズの各3ポット(1ポット/反復)を、本葉1葉期に低温条件の人工気象室(12/12時間明、2/12時間暗)に入れ、処理前、7日目、14日目及び21日目に低温障害の程度を観察した。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種の低温障害の程度に、統計学的有意差は認められず( $p < 0.05$ )、その低温耐性は同程度であることが示された(表11、31ページ)。

表 11 低温処理における障害程度の比較(低温耐性)

低温障害程度 <sup>2</sup>	観察日	本組換えダイズ <sup>1</sup>	非組換えダイズ <sup>1</sup>	P値
	処理前	1 ± 0.0 <sup>3</sup>	1 ± 0.0	-
	7日目	2 ± 0.1	2 ± 0.1	0.4
	14日目	3 ± 0.1	3 ± 0.1	1.0
	21日目	3 ± 0.1	3 ± 0.1	0.8

1: n=30

2: 低温障害程度の評価は、生育抑制、萎凋、倒伏、葉の退色及び葉の壊死等の症状から総合的に判断し、次の9つの分類階級を用いて行った。1=0%(健全)、2=1-15%の低温障害、3=16-30%の低温障害、4=31-45%の低温障害、5=46-60%の低温障害、6=61-75%の低温障害、7=76-90%の低温障害、8=91-99%の低温障害、9=100%の低温障害(枯死)。

3: ±は標準誤差値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)

#### 成体の越冬性又は越夏性

我が国における隔離ほ場試験において調査を行う予定である。

#### 花粉の稔性及びサイズ

花粉の稔性及びサイズについては、我が国における隔離ほ場試験において調査を行う予定である。

米国のほ場試験において、種子の稔実に関わる特性(一株総莢数、莢当たりの粒数、一株成熟粒数)に本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種との間で差異は認められなかった(表10、30ページ)。この結果は、花粉の受粉及び受精能力に差異が無いことを間接的に示しており、したがって、本組換えダイズの花粉の稔性は対照の非組換えダイズ品種と同程度と考えられる。

#### 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

米国のほ場試験において、裂莢の難易、一株総莢重、一株全粒重、一株成熟粒重、百粒重が評価されているが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種との間で、これらの項目に差異は認められておらず、種子の生産量は同程度で、また、種子の裂莢性が難であることから、脱粒性も難であると考えられた(表10、

30ページ)。

米国アイオワ州ジョンストンにおいて、戻し交配後代 BC1F5 世代の種子を用いて 25 、90%相対湿度の条件下で発芽率調査を行ったところ、本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種とも 99%の発芽率を示した。また、この時発芽しなかった種子、本組換えダイズ及び非組換えダイズから各々1個について塩化テトラゾリウム染色を行ったところ、いずれも染色されず、死滅していたことが認められた(表 12、32ページ)。このことは、本組換えダイズの種子休眠性は、対照の非組換えダイズ品種と同様に極めて低いことを示している。

表 12 本組換えダイズの種子の発芽率

	本組換えダイズ	非組換えダイズ
発芽率 (%) <sup>1</sup>	99	99

1: 滅菌土にポット当たり各 25 種子を播種し、1 供試材料/ポット/反復 x 4 反復とした。また、発芽率調査は、播種後 5 日目に行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

#### 交雑率

本組換えダイズの交雑能力が従来のダイズと同等であることを調べるため、2006 年米国アイオワ州ジョンストンの米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社のほ場にて、自殖後代 T6 世代を用いて以下の実験を行った。

ほ場において、本組換えダイズ 68 粒及び低リノレン酸品種 93M01 の種子 30 粒を、図 12(A) に示すように受粉株である 93M01 との交雑機会が均等になるように播種した(株間 30cm、畝間 80cm)(以下、組換え体試験区と表記)。組換え体試験区と 30m 以上の緩衝地帯を設けて、同様に非組換えダイズ(Jack 品種) 68 粒及び 93M01 品種の種子 30 粒を、受粉株である 93M01 との交雑機会が均等になるように播種した(以下、非組換え体試験区と表記、図 12(B)、33ページ)。なお、Jack 品種の交雑が DNA マーカーで区別できるように、遺伝的背景が異なる 93M01 が、受粉株として選択された。

成熟期に、組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を採取し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。初生葉(V1 期)より葉組織を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、*gm-fad2-1 (frag.1)* 遺伝子発現カセット領域に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、導入遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。



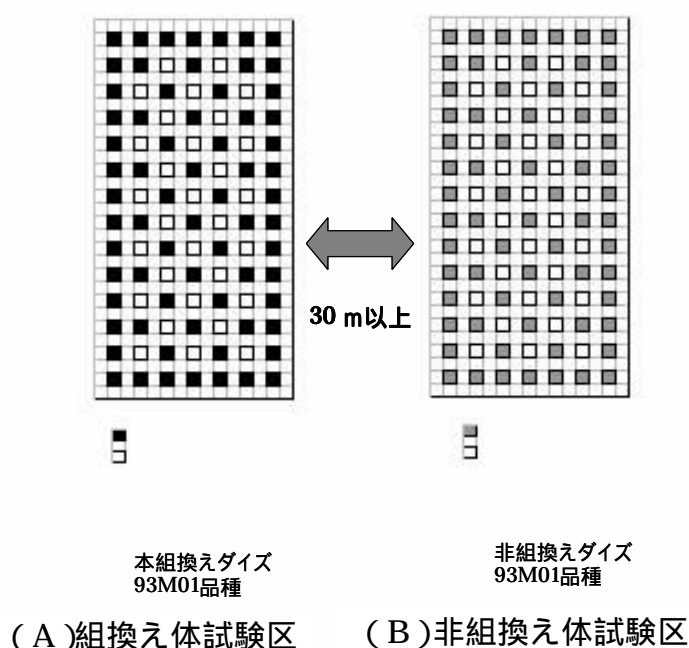


図 12 各供試ダイズの米国ほ場での配置図

\* 株間 30cm、畝間：80cm、7 条×14 株の計 98 株（受粉親 30 株及び花粉親 68 株）とした。

同様に、非組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率を調査するために、非組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を採取し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。初生葉より葉組織を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、非組換えダイズの DNA マーカーを用いてリアルタイム PCR を行い、マーカー遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。

今回、試験調査をした結果、本組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率は、0.3% であり、非組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率は 0.7% であった。

一般にダイズの自然交雑率は通常 0.5～3%以下である（Garber and Odland, 1926；Caviness, 1966；Ahrent and Caviness, 1994；Poehlman and Sleper, 1995；農業技術体系, 2002；農学大事典, 1994）。今回の米国ほ場における交雑実験の結果、本組換えダイズの交雑率は 0.3%、対照の非組換えダイズ品種で認められた交雑率は 0.7%と、ダイズの通常自然交雑率を超えるものではなかったことから、本組換えダイズのほ場における自然交雑能力は、従来のダイズと同程度であると考えられた。

#### 有害物質の産生性

植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性（サンドイッチ法）

ダイズには、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性は知られていない。本組換えダイズには、GM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。確認のため、サンドイッチ法 (Fujii et al., 2003 and 2004、農環研究成果報告書, 1997) により、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性について調査を行った。

試験は網室で、戻し交配後代 BC1F5 世代及び対照として非組換えダイズを用いて行った。プラスチックコンテナに、各供試ダイズを約 5 粒播種して生育させた。1 コンテナを 1 反復として、2 反復で行った。各供試ダイズの V4 ステージ (第 5 葉節の葉が展開する時期) の新葉から葉サンプルを採取して凍結乾燥させた。6 穴シャーレの各ウェルに凍結乾燥した 50mg の葉サンプルを秤量して、5mL の 0.5%寒天培地を添加して固めた後、更に 5mL の 0.5%寒天培地を重層し、その表面にレタスの種子を 5 粒置床した。試験は 12 反復で行った。その後、25℃、暗黒条件下で 60 時間培養し、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを測定した。また、レタスの生長を阻害する阻害物質を分泌する陽性対照として、温室で生育させたゼラニウム (*Geranium* sp.) (Fujii et. al., 2003) から同様に直径 5mm の葉サンプルを採取して凍結乾燥させたものを用いた。

その結果、幼根の長さ、胚軸の長さ及び発芽率のいずれにおいても、本組換えダイズ処理と非組換えダイズ処理との間に統計学的有意差は認められなかった (表 13、34 ページ)。なお、陽性対照として用いたゼラニウム処理区では、胚軸の長さの平均については  $7.2 \pm 0.43\text{cm}$  でわずかな阻害しか認められなかったものの、幼根の長さについては  $3.2 \pm 0.08\text{cm}$  と著しく阻害が認められたことから、試験は適切に行われたと考えられた。

以上のように、後作物に影響を与えるような有害物質の産生性について本組換えダイズと非組換えダイズとの間に有意差は認められなかった。なお、さらに確認のため、我が国における隔離ほ場試験においても、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性の評価を行う予定である。

表 13 レタスの生育調査結果 (サンドイッチ法)

	本組換えダイズ <sup>1</sup>	非組換えダイズ <sup>1</sup>	P-値
幼根の長さ (cm)	$7.6 \pm 0.56$ <sup>2</sup> (4.9 - 11.7)	$8.0 \pm 0.62$ (5.4 - 10.6)	0.61
胚軸の長さ (cm)	$8.6 \pm 0.64$ (5.8 - 12.5)	$8.2 \pm 0.67$ (5.5 - 12.6)	0.64
発芽率 (%)	$82 \pm 5.8$ (40 - 100)	$78 \pm 7.6$ (20 - 100)	0.60

1 : n=12

2 : ±は標準誤差を示す。カッコ内は、測定値の最小値・最大値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

## 根から分泌され他の植物体に影響を与える有害物質の産生性調査（根圏土壌法）

ダイズについて、根から有害物質を分泌して周辺の植物に影響を与えることは知られていない。確認のため、根圏土壌法（Iqbal et al., 2004）により、根から分泌され他の植物体に影響を与える有害物質の産生性について調査を行った。

試験は網室で、戻し交配後代 BC1F5 世代及び対照として非組換えダイズを用いて行った。プラスチックコンテナに、各供試ダイズを約 5 粒播種して生育させた。1 コンテナを 1 反復として、2 反復で行った。各供試ダイズの V4 ステージ（第 5 葉節の葉が展開する時期）に、植物の畝間の地点の地表 6cm から 12～20cm までの深さの根圏の土壌を、1 つのコンテナ当たり 4 箇所採取してコンテナ（反復）ごとによく混和し、土壌サンプルとした。試験は 1 コンテナを 1 反復として 2 反復で行った。6 穴シャーレの各ウェルに 4g の土壌サンプルを秤量し、続いて 5mL の寒天培地を添加し混和して固めた。さらに 3.2mL の 0.5% 寒天培地を重層し、その表面にレタスの種子を 5 粒置床した。試験は 12 反復で行った。その後、25℃、暗黒条件下で 60 時間培養し、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを測定した。その結果、レタスの発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さ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間には統計学的有意差は認められなかった（表 14、35 ページ）。

以上のように、根から分泌されて周辺の植物に影響を与えるような有害物質の産生性について、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に有意差は認められなかった。なお、わが国における隔離ほ場試験においても、確認のために根から分泌されて周辺の植物に影響を与えるような有害物質の産生性の評価を行う予定である。

表 14 レタスの生育調査結果（根圏土壌法）

	本組換えダイズ <sup>1</sup>	非組換えダイズ <sup>1</sup>	P-値
幼根の長さ (mm)	24.0 ± 0.87 <sup>2</sup> (20.2 – 30.2)	22.4 ± 1.31 (15.5 – 28.4)	0.43
胚軸の長さ (mm)	22.3 ± 0.81 (17.5 – 26.2)	19.9 ± 1.22 (11.0 – 25.8)	0.19
発芽率 (%)	85 ± 3.6 (60 – 100)	85 ± 0.05 (60 – 100)	1.00

1 : n=12

2 : ±は標準誤差を示す。カッコ内は、測定値の最小値・最大値を示す。

（本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン㈱にある）

また、ダイズは根から有害物質を分泌して周辺の土壌微生物に影響を与えることは知られていない。わが国における隔離ほ場試験においては、確認のために根から分泌して土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性の評価を行う予定である。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

#### (2) 使用等の方法

隔離ほ場所在地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19 - 2

名称：デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 21 年 3 月 31 日まで

隔離ほ場の施設：

- (1) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている。
- (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

隔離ほ場での作業要領：

- (1) 本組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えダイズが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場にすきこむ等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。
- (7) 別に定めるモニタリング実施計画に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるにいたった場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

(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

申請書の別添資料「モニタリング実施計画書」を参照。

(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

申請書の別添資料「緊急措置計画書」を参照。

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

本組換えダイズの、2005年及び2006年に米国で行われたほ場試験結果及び温室試験結果は、2(6)の口(29ページ)に記載したとおりである。

(6) 国外における使用等に関する情報

2003年から2006年にかけて、米国の延べ15箇所のほ場において試験を行ったが、目的とした形質が本組換えダイズに付与されている以外に非組換えダイズとの相違は報告されていない。米国においては、2006年に米国食品医薬品局(FDA)へ食品及び飼料としての安全性の申請を、米国農務省(USDA)へ無規制裁培許可の申請を行う予定である。

なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為」における第一種使用の申請のほか、食品としての安全性確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行う予定である。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主であるダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、長年にわたり食品・飼料への加工用として海外より輸入されてきた。また、食用として我が国でも栽培されている。我が国における、これまでのダイズの輸入や栽培の中で、ダイズが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はないことから、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えダイズと非組換えダイズとを比較して影響が高まっているか否かを考察することとする。

### 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

ダイズについては、これまでも我が国において栽培がなされているが、野生化したという報告はない。米国におけるほ場試験において、本組換えダイズの競合における優位性に影響を与えると考えられる特性(種子の生産量、裂莢の難易、休眠性、発芽率等)について調査を行ったが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差は認められなかった(本申請書の第一2(6)口参照、29ページ)。なお、主茎長の平均値が、本組換えダイズで83.8cm、非組換えダイズで71.1cmとなり、統計処理を行った結果有意差が認められた。しかし、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの主茎長の平均値は、いずれも従来ダイズ品種の変動範囲(45 cm - 85 cm; Buehring ら、2003)を超えるようなものではなく、本組換えダイズの競合における優位性に影響を与えるとは考えにくい。

本組換えダイズは、種子中のオレイン酸の含有量が80%程度に高められているが、オレイン酸が発芽時におけるエネルギー供給などに特に有用であるという報告はない。したがって、種子中での高オレイン酸形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。また、本組換えダイズは、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を持つが、自然環境下でこれらの除草剤が散布されることは想定されにくい。したがって本形質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、本組換えダイズの競合における優位性は従来ダイズと同程度と考えられ、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

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、競合における優位性に関して野生動植物等に影響を生じ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

ダイズについては、生物多様性に影響を与えるような有害物質を産生することは報告されていない。本組換えダイズには、GM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。

本組換えダイズの有害物質の産生性が従来ダイズと同等であることを確認するため、米国において、レタスを検定植物とした本組換えダイズの葉を用いたサンドイッチ法、及び栽培土壌を用いた根圏土壌法による有害物質の産生に関する検定が行われた（第一 2（6）口 参照、33ページ）。その結果、後作物に影響を与えたり周辺植物に影響を与える有害物質の産生性において、本組換えダイズは、従来ダイズとの間に差異はないと考えられた。

以上の結果により、本組換えダイズの有害物質の産生性に関して、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

### (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

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、有害物質の産生性に関して生物多様性影響を生じ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

ダイズと交雑可能な近縁野生種として、ツルマメが我が国に自生していることが知られている。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としてツルマメが特定された。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

本組換えダイズとツルマメが交雑した場合には、雑種が形成されるものと考えられる。また、その場合には、形成された雑種とツルマメとの交雑により、本組換えダイズに付与された形質がツルマメの集団中に浸透していく可能性も否定できない。しかし、以下に示す実験結果及び論文の報告から、本組換えダイズとツルマメが交雑し、さらに当該遺伝子がツルマメの集団中に浸透していく可能性は極めて低いと考えられる。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

- 1) ダイズ及びツルマメは、基本的に開花前に蕾の中で自家受粉する自殖性植物であり、自家不和合性は知られていない。ツルマメ間での自然交雑率については2.3% (Kiang ら、1992) とされている。また、訪花昆虫が多い自然条件では、交雑率が13%との報告もなされている (Fujita ら、1997)。一方、ダイズの品種間での自然交雑率は0.5%から3%と報告されている (Garber and Odland, 1926; Caviness, 1966; Ahrent and Caviness, 1994; Poehlman and Sleper, 1995; 農業技術体系, 2002; 農学大事典, 1994)。さらに、約2m 離れると交雑率は、0.036%と非常に低率となり、10m 離れると0%になることが報告されている (別紙1)。
- 2) 一般的に、ダイズの開花期はツルマメより早く、ダイズとツルマメの開花期は重なりにくいことが知られている (Nakayama Y. and Yamaguchi H., 2002)。Nakayama ら (2002) により、ツルマメ及びダイズ (丹波黒) を用いて、開花時期を重ね、交互に50cm の間隔をあけて栽培した実験条件下で自然交雑率を求める実験が行われた。当該試験における訪花昆虫の調査では、訪花昆虫として、バラハキリバチモドキ、コハナバチ科の一種及びアザミウマの一種が見られた。この試験の条件下においても、ツルマメのダイズ品種との交雑率は、0.7%であった。
- 3) わが国での隔離ほ場試験に先立ち、2006年に米国アイオワ州のほ場において、本組換えダイズの交雑率の調査を行ったが、交雑率は0.3%で、同時に行った非組換えダイズ及び従来ダイズ (0.7%) と同程度であることが確認された (第一2(6)口 参照、32ページ)。



4) ダイズやツルマメの葉緑体の持つ DNA には両者を特徴付ける二つの多型があり、それらの組み合わせによりダイズやツルマメの葉緑体 DNA は 3 種類の型 (I 型、II 型及び III 型) に分類することができる。I 型は、近代の栽培ダイズに多くみられ、III 型は、ツルマメ、または栽培原種及びツルマメと栽培種の間中型である *G.gracilis* に多くみられることが明らかにされている。Abe ら (1999) は、日本において収集したツルマメの葉緑体 DNA を用いてその分類を行い、日本のツルマメと栽培ダイズ間の浸透交雑の程度を検証した。その結果、日本において収集したツルマメ (全 330 地域) の葉緑体 DNA は、その多くが III 型であり、I 型を示したツルマメは 1.8% (6 地域) であることが確認された。I 型を示した 6 地域のツルマメのうち、4 地域では、ツルマメと同様の形態的特徴を示した。その理由の一つとして、交雑により生じた雑種が自然選択圧により、野生型に戻っていった結果 (dedomestication) であると推測されている。

以上、本組換えダイズとツルマメとの交雑の可能性について検討した結果、

ダイズ、ツルマメ共に、閉花受粉を行う自殖性の高い植物であること、ダイズとツルマメは一般的に開花期が重なりにくいことが知られており、開花期を合わせて交互に株間 50cm の隣接栽培を行った場合でも、交雑率は 0.7% であるとの報告があること、

米国ほ場で、本組換えダイズを用いて、従来ダイズ品種との交雑率を調べた実験の結果、交雑率は従来のダイズ同士の交雑率を超えるものではなかったこと、

などから、本組換えダイズとツルマメの交雑率は、従来のダイズとツルマメと同等に低いと判断された。また、今回申請の第一種使用規程に従うことで、その確率はさらに低下すると考えられる。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、交雑性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。なお、念のために、我が国で隔離ほ場試験を行う際に、隔離ほ場周辺のツルマメの生育や本組換えダイズとの交雑の有無に関してモニタリングを行う予定である。

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国における、これまでのダイズの輸入や栽培の中で、ダイズが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はない。

米国におけるほ場試験において、本組換えダイズの競合における優位性に影響を与えると考えられる特性（種子の生産量、裂莢の難易、休眠性、発芽率等）について調査を行ったが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差は認められなかった。なお、主茎長において統計学的有意差が認められたが、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの主茎長の平均値は、いずれも従来ダイズ品種の範囲を超えるようなものではなく、本組換えダイズの競合における優位性に影響を与えとは考えにくい。本組換えダイズでは、種子中のオレイン酸の含有量が 80%程度に高められているが、種子中での高オレイン酸形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。また、本組換えダイズは、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を持つが、自然条件下でこれらの除草剤が散布されることは想定されにくく、本形質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、本組換えダイズの競合における優位性は従来ダイズと同程度と考えられ、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、競合における優位性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

ダイズについて、これまで生物多様性に影響を与える有害物質の産生性は報告されていない。米国において行った、本組換えダイズの葉を用いたサンドイッチ法、及び栽培土壌を用いた根圏土壌法による有害物質検定の結果、本組換えダイズにおいても従来ダイズ同様、後作物に影響を与えたり周辺植物に影響を与える有害物質は産生されていないことが確認された。以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、競合における優位性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

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、ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメが特定された。しかしながら、従来知見で得られているダイズとツルマメの交雑率は 0.7%と報告されており（Nakayama and Yamaguchi, 2002）また 2006 年に米国アイオワ州のほ場で行われた試験の結果、本組換えダイズの交雑率は従来ダイズと同程度であった。また、上述のように競合における優位性も従来ダイズと同程度であると考えられること、さらに開花期も重なりにくいことから、本組換えダイズの我が国における隔離ほ場での利用に際して、本組換えダイズがツルマメと交雑し、さらに導入遺伝子がツルマメの集団中に浸透してゆく可能性は低いと考えられた。以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従った隔離ほ場における栽培に際して、交雑性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

以上の評価に基づき、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、我が国の生物多様性に影響を生じるおそれはないと結論された。

## 参考文献

- Abe, J., Hasegawa, A., Fukushi, H., Mikami, T., Ohara, M. and Shimamoto, Y. 1999. Introgression between wild and cultivated soybeans of Japan revealed by RFLP analysis for chloroplast DNAs. *Economic Botany* 53(3), 285-291.
- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
- Broach, J.R., Guarascio V.R. and M. Jayaram. 1982. Recombination within the yeast plasmid 2 mu circle is site-specific. *Cell* 29: 227-234.
- Buehring, N.W., M.P. Harrison, R.R. Dobbs, and Bernie white. 2003. Roundup and conventional soybean variety trials. Annual Report 2002 of the North Mississippi Research and Extension center. Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station Information Bulletin 389:88-92.
- Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
- CODEX STAN 210. 2005, Named Vegetable Oils
- Falco, C.S. and Z. Li. 2003. S-adenosyl-L-methionine Synthetase Promoter and Its Use in Expression of Transgenic Genes in Plants. US Patent Application: 2003/0226166.
- FAO Statistical Database. 2004. (<http://apps.fao.org/page/collections>)
- Fujii, Y, S.S. Parvez, M.M. Parvez, Y. Ohmae, and O. Iida. 2003. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and Management* 3: 233-241
- Fujii, Y, , Shibuya, T., Nakatani, K., Itani, T., Hiradate, S., and M.M. Parvez. 2004. Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biology and Management* 4: 19-23
- Fujita, R, Ohara, M. Okazaki, K. and Shimamoto, Y. 1997. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *Journal of Heredity* 88:124-128.

Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *J. Am. Soc. Agron.* 18: 967-970.

Heppard, E.P., A.J. Kinney, K.L. Stecca and G.-H. Miao. 1996. Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal omega-6 Desaturase Genes in Soybeans. *Plant Physiol.* 110: 311-319.

いもち病および白葉枯病抵抗性イネ (AD41) 概要書

[http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/AD41ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/AD41ap.pdf)

ILSI (International Life Sciences Institute). 2004. *ILSI Crop Composition Database Version 2.0* <http://www.cropcomposition.org/>

Iqbal, Z., A. Furubayashi and Y. Fujii. 2004. Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants. *Weed Biology and Management* 4: 43-48

Jofuku, K.D. and R.B. Goldberg. 1989. Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093.

Kasahara, Y. 1982. *In: Geobotany 2; Biology and Ecology of Weeds.* (Holzner, W., Numata, M. eds.) pp285-297. W. Junk, Netherlands.

Kiang, Y.T., Y.C. Chiang, and N. Kaizuma. 1992. Genetic Diversity in Natural Populations of Wild Soybean in Iwate Prefecture, Japan. *J. of Heredity* 83: 325-329.

Kim, S.; Jung, W.; Ahn, J.; and Chung, I., 2004, Analysis of Isoflavone Concentration and Composition in Soybean [*Glycine max* (L.)] Seeds Between the Cropping Year and Storage for Three Years, *European Food Research and Technology*, vol. 220, No. 2, February 2005, pp. 207-214, 2004

Kinney, A.J. 1994. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 144-151.

Klein T.M., E.D. Wolf, R. Wu and J.C. Sanford. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.

森野和子、島本功 (1996) 植物の相同性依存型ジーンサイレンシング、植物のゲノムサイエンス：遺伝子・染色体から生体機能を解明する (大山莞爾、飯田滋、

島本功監修 \ p161-169、秀潤社

Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 2002. *Weed Biology and Management* 2: 25-30.

農学大事典 第2次増訂改版 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 1994: 537-541.  
株式会社 養賢堂発行.

農業環境研究成果情報 平成9年度(1997) 寒天を使用した「サンドイッチ法」による植物の葉から出る他感物質の検定 14:35-36

農業技術体系 作物編第6巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2002(最終追補年度).  
社団法人 農山漁村文化協会

農林水産省 大豆のホームページ(大豆関連データファイル)  
[http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatasbbbbbb/aizu/siryo/16\\_yunyu.pdf](http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatasbbbbbb/aizu/siryo/16_yunyu.pdf)

OECD. 2000. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 15: Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean).  
([http://www.oilis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.oilis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2000)9))

OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean): Key food and feed nutrients, and anti-nutrients. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, ENV/JM/MONO(2001)15

Ohlrogge JB, Jaworski JG and Post-Beittenmiller D. 1993. *De novo* fatty acid biosynthesis. In TS Moore, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC, Boca Raton, FL. Pp3-32

Okuley, J., J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark and J. Browse. 1994. *Plant Cell* 6: 147-158.

Perez-Grau, L. and R.B. Goldberg, 1989. Soybean Seed Protein Gene Are Regulated Spatially during Embryogenesis. *The Plant Cell* 1, 1095-1109

Poehlman, J. M and D.A. Sleper. 1995. In *Breeding Field Crops*, 4<sup>th</sup> edition, p. 305. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014.

生化学辞典 第3版 生化学辞典 第3版. 1998. 監修 今堀和友、山川民夫.

東京化学同人

Taylor, N., Fuchs, R., MacDonald, J., Shariff, A., and Padgett, S., 1999, Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4469-4473.

The International Plant Names Index. 2004. <http://www.ipni.org/index.html>.

Yadav, N.S., A. Wierzbicki, M. Aegerter, C.S. Caster, L. Perez-Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz *et al.* 1993. *Plant Physiol.* 103: 467-476.

Waterhouse, P.M. and Helliwell, C.A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews: Genetics* 4, 29-38

# モニタリング実施計画書

平成 18 年 11 月 16 日

氏名 デュポン株式会社  
代表取締役社長 天羽 稔

住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

## 1. 実施体制及び責任者

### (1) 実施体制

表 1 モニタリング実施体制

氏名	所属機関・職名
	デュポン株式会社 バイオテクノロジー事業部
	デュポン株式会社 バイオテクノロジー事業部
	デュポン株式会社 宇都宮事業所

\* 管理責任者

## 2. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

ツルマメ (*Glycine max* subsp. *soja*)

## 3. モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の生育又は生息状況

### (1) モニタリングの実施場所

隔離ほ場を中心とした周辺 10m<sup>1)</sup>の範囲。

1) 農林水産省 「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1: 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方 2. サイズ(申請書別紙 1)による。



## (2) 対象となる野生動植物等の生育又は生息状況

平成 18 年 8 月に隔離ほ場周辺 10m の範囲でツルマメが自生しているかどうかについて観察したところ、ツルマメの自生は確認されなかった。そこで、さらに念のため範囲を広げ、100m 範囲内で調査可能な地点についてツルマメの自生の有無を調査したが、ツルマメの自生は認められなかった。なお、遺伝子組換えダイズ DP-305423-1 (以降、本組換えダイズと表記する) 栽培開始に伴い、再度、ツルマメの自生状況を調査する予定である。

### 4 . モニタリングの期間

本組換えダイズの栽培期間中。

### 5 . 実施時期、頻度その他のモニタリング方法

本組換えダイズの栽培期間中に、隔離ほ場の周辺 10m の範囲にツルマメの生育の有無を確認し、記録する。生育していた場合は、ツルマメの種子を、採取に適した時期 (秋) にツルマメ 1 集団あたり最低 50 粒ずつ採取する。

採取した種子 1 粒ごとに、本組換えダイズからツルマメへの交雑による導入遺伝子の移入の有無を確認するため、調査を行う。調査方法については、実際に収集されたツルマメのサンプル数などを考慮の上決定することとする。

なお、隔離ほ場の周辺 10m の範囲にツルマメが生育していなかった場合、または 10m の範囲でツルマメとの交雑が認められた場合には、念のためモニタリングの範囲を 100m に広げ、調査可能な地点でのツルマメの自生の有無を確認する。そこで、ツルマメの生育が見られた場合には、最も隔離ほ場に近い集団から種子を採取し、調査を行うこととする。

### 6 . モニタリングの結果の解析の方法

上記の調査より、本組換えダイズからツルマメへの交雑の有無、及びその頻度 (%) を算出し、本組換えダイズの自然交雑性に関する解析を行う。

### 7 . 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

モニタリング及びその解析の結果は、「食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為」における第一種使用規程の承認申請時に、農林水産大臣及び環境大臣へ報告書として添付する。

### 8 . その他必要な事項

採取されたツルマメ中に本組換えダイズとの交雑により当該遺伝子が移行した、又は移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と、モニタリング期間等について協議を行うものとする。

# 緊急措置計画書

平成 18 年 11 月 16 日

氏名 デュポン株式会社  
代表取締役社長 天羽 稔

住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ(*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-3Ø5423-1, OECD UI:DP-3Ø5423-1) (以下、本組換えダイズと表記) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、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には、当該影響を効果的に防止するため、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

本組換えダイズが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合に、第一種使用等を行う栽培試験責任者は、弊社内に設置されている生物多様性影響管理委員会に報告を行う。また、弊社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部、バイオテクノロジー事業部）の部門長から構成される。危機対策本部が、生物多様性影響管理委員会、栽培試験責任者、並びに本組換えダイズの開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。

## 2. 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等を行っている栽培試験者と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、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

本組換えダイズ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根拠に基づき認められた場合には、栽培試験者へ直接連絡を取り、口頭で伝える。

また必要に応じて、ホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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

科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、直ちに栽培試験を中止し、本組換えダイズを隔離ほ場内において鋤き込む等、不活化又は拡散防止のための必要な措置を取る。

#### 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに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。

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gm-fad2-1*,  
*gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1)  
別紙一覧

- 別紙 1 第 2 回「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1：栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方 2. ダイズ
- 別紙 2 導入に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP17752A 及び PHP19340A の塩基配列 (社外秘につき非開示)
- 別紙 3 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 (社外秘につき非開示)
- 別紙 4 高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (DP-305423-1) の隔離ほ場での栽培試験計画 (社外秘につき非開示)