

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5, OECD UI DP-356043-5) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	2
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	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	2
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	2
(1) 供与核酸に関する情報	2
(2) ベクターに関する情報	2
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	2
(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	2
(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	2
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	2
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	2
(1) 使用等の内容.....	2
(2) 使用等の方法.....	2
(3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法	2
(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.....	2
(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	2
(6) 国外における使用等に関する情報.....	2
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	2
1 競合における優位性	2
2 有害物質の産生性.....	2
3 交雑性.....	2
第三 生物多様性影響の総合的評価	2
参考文献	2
モニタリング実施計画書	2
緊急措置計画書.....	2
別紙一覧	2

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 2 月 24 日

農林水産大臣 中川 昭一 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

申請者

氏名 シンジェンタ ジャパン株式会社
代表取締役社長 マイケル・ケスター
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (<i>gat</i> , <i>gm-hra</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：静岡県島田市神座 138 名称：シンジェンタ ジャパン株式会社 開発本部 中央研究所 神座試験センター 隔離ほ場 試用期間：承認日から平成 19 年 3 月 31 日まで 1. 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) 土、本遺伝子組換えダイズの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔

	<p>離ほ場の外への流出を防止するための設備を、排水系統に設置している。</p> <p>(4) 栽培試験区には、食害を防止するための防鳥網及び交雑を防止するための防虫網を設置する。</p> <p>2. 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場にすきこむ等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 別に定めるモニタリング実施計画に基づき、モニタリングを実施する。</p> <p>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。</p>
--	---

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** 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

ダイズの出産地は中国で、その祖先は野生種のツルマメ (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) 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 2004 年における世界総生産量は約 2 億 4 千万トンである。最大の生産国は米国であり、約 85 百万トンと全世界の生産量の約 36%を占める（FAO Statistical Database, <http://apps.fao.org/page/collections>）。一方、日本における生産量は 16 万トンで、2004 年の統計によれば、我が国は約 440 万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の 72%にあたる約 320 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）。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 75%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）。2004 年に我が国に輸入されたダイズのうち、約 320 万トンが搾油用に使われた（財務省貿易統計, <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>）。

（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 個の胚珠を内臓している。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受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）。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズ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性品種であり、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性品種であり、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）。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、これらの特性を有さない。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無及び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（*G. soja* Sieb. & Zucc.）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）との報告がある。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河流域、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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズ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、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

—

へ 有害物質の産生性

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

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356Ø43-5, OECD UI : DP-356Ø43-5) (以下、本組換えダイズと表記) における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (9 ページ) に示した。また、供与核酸の塩基配列及びアミノ酸配列は別紙 2 に示した。

ロ 構成要素の機能

① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸

の構成要素それぞれの機能

供与核酸の各構成要素の機能は表 1 (9 ページ) 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
改変型 <i>gat</i> 遺伝子発現カセット		
SCP1 Promoter	499	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域 (O'Dell <i>et al.</i> , 1985) の一部と Rsyn7-SynCoreII プロモーター (Bowen <i>et al.</i> , 2000 and 2003) 領域から構築された、転写開始のための構成的発現プロモーター。
TMV omega 5'UTR	67	タバコモザイクウイルス (TMV) オメガ 5'非翻訳領域由来の転写を促進する働きを持つエンハンサー領域 (Gallie and Walbot, 1992)。
改変型 <i>gat</i> (<i>gat4601</i>)	441	<i>Bacillus licheniformis</i> 由来の N-アセチルトランスフェラーゼを基に、グリホサートの N-アセチル化活性を高めるように、塩基配列及びアミノ酸配列を改変して作製されたグリホサート N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (改変型 <i>gat</i> : 以下、 <i>gat4601</i> と表記) (Castle <i>et al.</i> , 2004、GenBank Accession No: AY597417) で、146 アミノ酸よりなる分子量 17kDa の改変型 GAT (以下、GAT-4601 と表記) 蛋白質をコードする。なお、GAT-4601 蛋白質の機能の詳細については、本文ロ.②項に記載した。
<i>pinII</i> Terminator	316	<i>Solaunum tuberosum</i> 由来のプロテアーゼインヒビター II (<i>pinII</i>) 遺伝子が持つ転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。
改変型 <i>als</i> 遺伝子発現カセット		
SAMS Promoter	645	<i>Glycine max</i> 由来の 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	<i>Glycine max</i> 由来の 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)。
改変型 <i>als</i> (<i>gm-hra</i>)	1971	<i>Glycine max</i> のアセト乳酸合成酵素遺伝子 (<i>gm-als</i>) 由来の改変型遺伝子 (改変型 <i>als</i> : 以下、 <i>gm-hra</i> と表記) で、アミノ酸 656 個よりなる分子量 71kDa の改変型 ALS (以下、GM-HRA と表記) 蛋白質をコードする。GM-HRA 蛋白質は、2つのアミノ酸(178番目: プロリン→アラニン、555番目: トリプトファン→ロイシン)を置換し、また、その N-末端領域に 5つのアミノ酸 (メチオニン・プロリン・ヒスチジン・アスパラギン・トレオニン) が新たに付加されている。なお、GM-HRA 蛋白質の機能の詳細については、本文ロ.②に記載した。
<i>gm-als</i> Terminator	651	<i>Glycine max</i> 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。

(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)

- 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

gat4601 遺伝子

本組換えダイズに導入された改変型 *gat* (以下、*gat4601* と表記) 遺伝子は、グリホサートに対する *N*-アセチル化触媒活性を高めるために *Bacillus licheniformis* 由来のグリホサート *N*-アセチルトランスフェラーゼ (以下、GAT 蛋白質と表記) の塩基配列を改変したものであり、改変型 GAT (以下、GAT-4601 と表記) 蛋白質をコードしている (Castle *et al.*, 2004)。*B. licheniformis* は、グラム陽性の土壌細菌で、日本、米国、カナダ、ヨーロッパにおいて食品用酵素 (アルファアミラーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、ヘミセルラーゼ等) の生産において安全に使用されてきた歴史を持つ。*gat4601* 遺伝子の塩基配列 (Appendix 1 の 597 番目から 1037 番目の塩基) 及び GAT 蛋白質と比較した改変型 GAT 蛋白質のアミノ酸配列を別紙 2 に示した。

除草剤グリホサートは、植物における芳香族アミノ酸合成に関与するシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 活性を阻害し、その結果、芳香族アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる (図 1、12 ページ)。目的遺伝子である *gat4601* 遺伝子より産生される GAT-4601 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えることができるので、その結果、植物にグリホサートに対する耐性を付与する (図 1、12 ページ)。

グリホサートに対する酵素活性を k_{cat}/K_M を目安として比較したところ、*B. licheniformis* 由来の GAT 蛋白質は、 $k_{cat}/K_M = 4.21 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であるのに対し、GAT-4601 蛋白質では、 $k_{cat}/K_M = 4,570 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と、約 1,000 倍まで酵素活性が高められていた。実際に、米国において 16 箇所のは場試験が行われているが、本組換えダイズは、除草剤グリホサートに対し、高い耐性を持つことが示されている。なお、 k_{cat} は、酵素反応速度定数を K_M は、基質に対する親和性を示す。

gm-hra 遺伝子

もう一方の目的遺伝子である *Glycine max* 由来の改変型 *als* (以下、*gm-hra* と表記) 遺伝子より産生される改変型 ALS (以下、GM-HRA と表記) 蛋白質は、植物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。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関与するアセト乳酸合成酵素 (ALS) (EC 2.2.1.6) に特異的に結合して活性を阻害し、その結果、これら分枝アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる (図 2、13 ページ)。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 活性を示し、ロイシン、バリン及びイソ

ロイシンの分枝アミノ酸が合成できるため、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 2、13 ページ）。なお、2 点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子がイネより単離されており、これをイネに導入することにより、薬剤抵抗性の選抜マーカーとしての利用がなされている（いもち病及び白葉枯病抵抗性イネ（AD41）概要書<https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDetail.do>参照）。

除草剤グリホサートは雑草の生育期に散布する茎葉処理型除草剤であり、一方の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型除草剤である。今日、両除草剤は日本及び米国を始め、世界中で使用されている。*gat4601* 遺伝子の導入による除草剤グリホサート耐性、及び *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、栽培農家は異なる特性を持つ 2 つの除草剤を有効に利用することができ、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ている。

なお、GAT-4601 蛋白質及び 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、それらとの間の構造相同性を調べた。その結果、いずれの蛋白質にも既知のアレルゲン蛋白質に対する構造相同性は認められなかった。また、同様に公開データベース（NCBI、Unipot）の配列情報のデータセットから、GAT-4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質には、既知の毒性のある蛋白質に対する構造相同性は認められなかった。

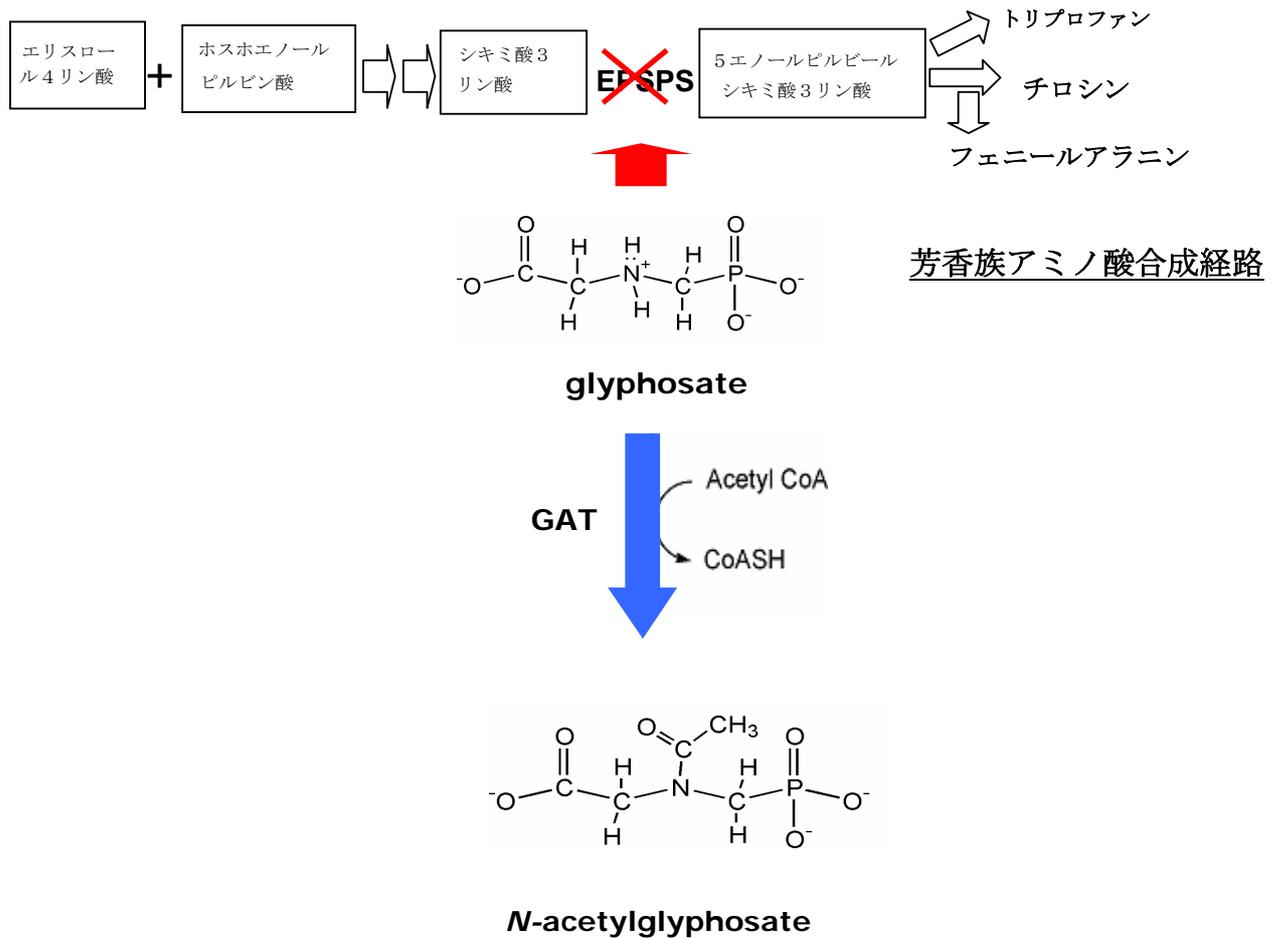


図 1 GAT 蛋白質の作用機作

除草剤グリホサートにより EPSPS 活性が阻害されると、芳香族アミノ酸が合成できなくなり植物は枯死する。一方、GAT 蛋白質により、グリホサートがアセチル化されて *N*-アセチルグリホサートになると、EPSPS 活性は阻害されない。従って芳香族アミノ酸の合成も阻害されることなく、植物は正常に成長する。

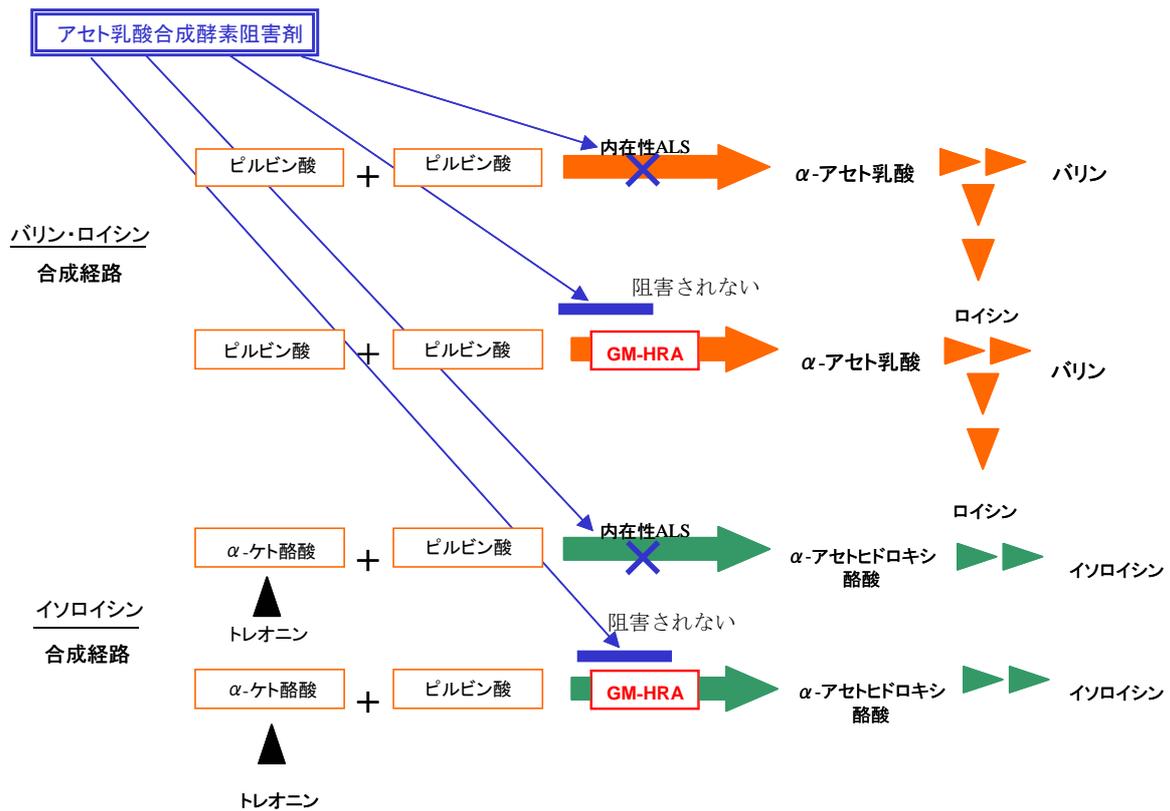


図 2 GM-HRA 蛋白質の作用機作

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によって阻害され、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、GM-HRA が存在すると、バリン等の分枝アミノ酸合成が可能となるため、植物は正常に成長する。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

gat4601 遺伝子

GAT 蛋白質は *N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。一般に *N*-アセチルトランスフェラーゼは、蛋白質の *N* 末端アミノ酸や遊離アミノ酸、ヒストンのアミノ酸側鎖等の生体内物質や抗生物質等をアセチル化することが知られている（生化学辞典）。GAT 蛋白質は、除草剤グリホサートを基質とし、グリホサートを殺草活性を持たない *N*-アセチルグリホサートに変える反応を触媒する。GAT-4601 蛋白質は、この活性が約 1,000 倍に高められたもので、植物に本除草剤に対する耐性を付与する。

GAT-4601 蛋白質のグリホサートに対する基質特異性が高く、また、一般に *N*-アセチルトランスフェラーゼの基質となる生体内基質の組成に変化がないことが示されれば、本遺伝子の導入により産生される GAT-4601 蛋白質が、宿主の代謝系に影響を与える可能性は小さいと考えることができる。そこで、GAT-4601 蛋白質の *N*-アセチル化反応に関する基質特異性について、以下に今日までに得られている知見をまとめた。

1) 結晶構造解析

結晶構造解析の結果（図 3、15 ページ）、グリホサートに対する *N*-アセチル化反応の活性中心は本蛋白質の内部奥にあることが示された（Keenan ら, 2005）。したがって、グリホサートのような低分子化合物のみが、立体障害を受けずに GAT-4601 蛋白質の活性中心に到達可能であり、このため、高分子化合物は本蛋白質の基質となる可能性が低く、低分子化合物のみが本蛋白質の基質となり得ることが示唆された。

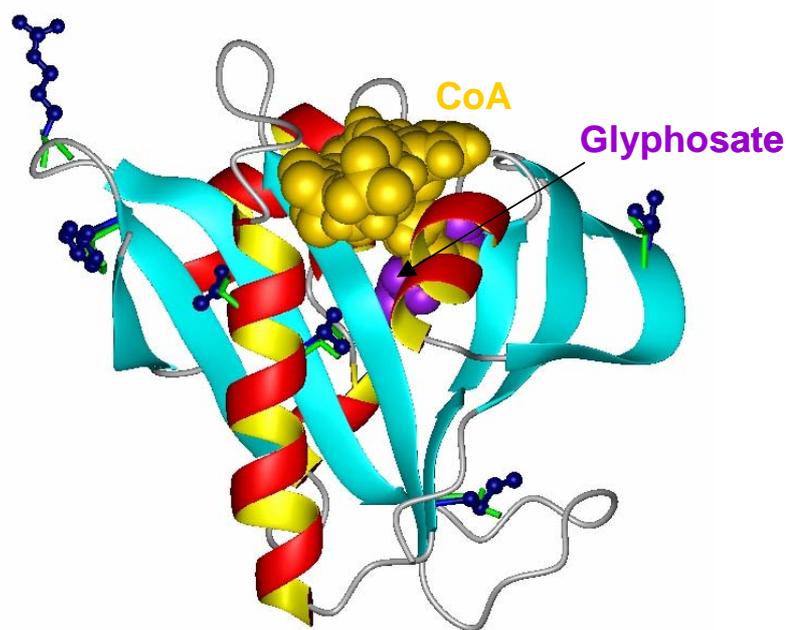


図 3 GAT4601 蛋白質の構造及びグリホサートとの反応部位
図には、アセチル CoA(CoA)とグリホサート (glyphosate) の結合した状態を示した。

(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)

2) 遊離アミノ酸に対する反応性

GAT-4601 蛋白質の基質特異性評価に先立って行われた GAT-4601 蛋白質と 99%の相同性を有する別の改変型 GAT 蛋白質の基質特異性評価の結果 (別紙 5 参照)、GAT4601 蛋白質が一部の遊離アミノ酸に対して弱い反応性を示す可能性が示唆された。そこで、GAT4601 の遊離アミノ酸 (22 種類) に対する反応性を coenzyme A の 30 分間での蓄積量を指標として調べた。

その結果、GAT-4601 蛋白質は、別の GAT 蛋白質と同程度の、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニンに対する弱い反応性を示すことが認められた(別紙 4 参照)。

3) アミノ酸組成の分析

上記の 4 種の遊離アミノ酸に、弱い反応性が認められたことから、GAT-4601 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、本形質転換ダイズのアミノ酸組成を調べることにより検討した。まず、北米の 2 箇所のは場を各々 3 区域に分け、各区から採取した種子より 300g をサンプリングして 1 反復とし、合計 6 反復でアミノ酸組成の分析を行った。

その結果、分析した全てのアミノ酸について、本組換えダイズと対照として用いた非組換えダイズとの間で同等の値であることが確認された（表 2）。

表 2 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（乾燥重量あたりの割合（%））

分析項目	種子 ¹			葉組織 ²	
	本組換えダイズ	非組換えダイズ	文献値 ⁴	本組換えダイズ	非組換えダイズ
メチオニン	0.728	0.715	0.431 – 0.681	1.53	1.52
システイン	0.677	0.664	0.370 – 0.808	- ³	-
リジン	3.07	3.15	2.29 – 2.86	6.79	7.07
トリプトファン	0.523	0.505	0.356 – 0.670	-	-
トレオニン	1.80	1.84	1.25 – 1.89	5.56	4.96
イソロイシン	1.90	1.89	1.46 – 2.12	5.35	5.35
ヒスチジン	1.23	1.20	0.878 – 1.22	2.37	2.27
バリン	1.98	1.97	1.50 – 2.44	6.54	6.55
ロイシン	3.21	3.17	2.20 – 4.00	9.93	10.02
アルギニン	2.68	2.62	2.29 – 3.49	6.51	6.69
フェニルアラニン	2.19	2.15	1.60 – 2.24	6.17	6.22
グリシン	1.82	1.80	1.46 – 2.02	4.92	5.04
アラニン	1.75	1.68	1.49 – 1.87	5.75	5.80
アスパラギン酸	5.28	5.21	3.81 – 5.12	11.75	11.71
グルタミン酸	8.18	8.16	5.84 – 8.72	11.88	12.92
プロリン	2.56	2.59	1.69 – 2.61	4.50	4.63
セリン	2.23	2.17	1.63 – 2.48	5.65	4.44
チロシン	1.43	1.42	1.02 – 1.62	4.81	4.83

1 : n=6

2 : n=5

3 : 未測定

4 : (a)ILSI (International Life Sciences Institute). 2004. (b) OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean.(c)Taylor et al. (1999) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4469-4473.

（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）

また、温室で栽培した5個体由来の葉組織の分析においても、アミノ酸組成は、本組換えダイズと非組換えダイズで同等の値であった（表 2）。これらのことから、本 GAT-4601 蛋白質の産生が本組換えダイズ中のアミノ酸組成に影響を与えていないことが確認された。今後、さらに本 GAT-4601 蛋白質を供試してグリホサート類似化合物や農薬、抗生物質等に対する反応性について調べる予定である。

gm-hra 遺伝子

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アセト乳酸合成酵素 (GM-ALS) に代わり、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 2 参照、13 ページ)。アセト乳酸合成酵素はバリンによって、トレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによって Feedback 制御されている (生化学辞典)。最終代謝産物である分枝アミノ酸の産生量がこのように、調節されることが知られているが、確認のため GM-HRA 蛋白質の発現がアミノ酸代謝系に影響を及ぼす可能性について本組換えダイズのアミノ酸組成を調べることにより検討した。

先にも示したように本組換えダイズの種子及び葉組織のアミノ酸組成は、対照に用いた非組換えダイズと同等の値であった (表 2、16 ページ)。このことから、導入した GM-HRA 蛋白質がアミノ酸組成に影響を与えていないことが確認された。

また、*gat4601* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子は、いずれも植物体中で独立した代謝経路等に関わる遺伝子であり、新たに相互作用が生ずることは考えられない。実際にアミノ酸組成の分析でも両遺伝子が導入された結果、相互作用したと考えられる結果は認められなかった (表 2、16 ページ)。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

gat-4601 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットから成る直鎖 DNA 断片、PHP20163A 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 : PHP20163

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。

PHP20163A はプラスミド PHP20163 の制限酵素処理によって抽出された、*gat-4601* 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセット ([SCP1 Promoter]-[TMV omega 5'UTR]-[*gat4601*]-[*pinII* Terminator]-[SAMS Promoter] -[SAMS Intron]- [*gm-hra*] -[*gm-als* Terminator]) から成る直鎖状 DNA 断片である (図 4 参照、18 ページ)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基数は 5,361 bp である。塩基配列は別紙 2 に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列の種類

PHP20163A は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。

③ ベクターの感染性の有無

導入に用いた PHP20163A の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。従って、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 PHP20163A 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 4 に示した。

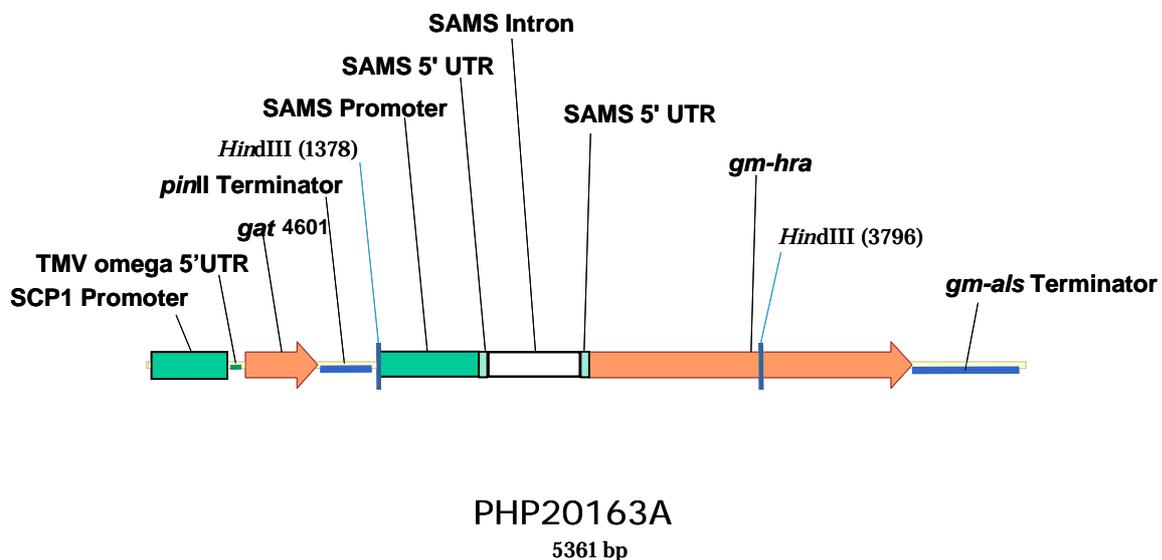


図 4 直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の供与核酸の構成及び制限酵素切断部位

(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)

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った (Klein *et al.*, 1987)。

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、その作出及び選抜・育成の過程は以下のとおりである。

① 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 5 (20 ページ) に示した。

② アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

—

③ 育成の経過及び系統樹

本組換えダイズの育成経過を図 6 (21 ページ) に示した。

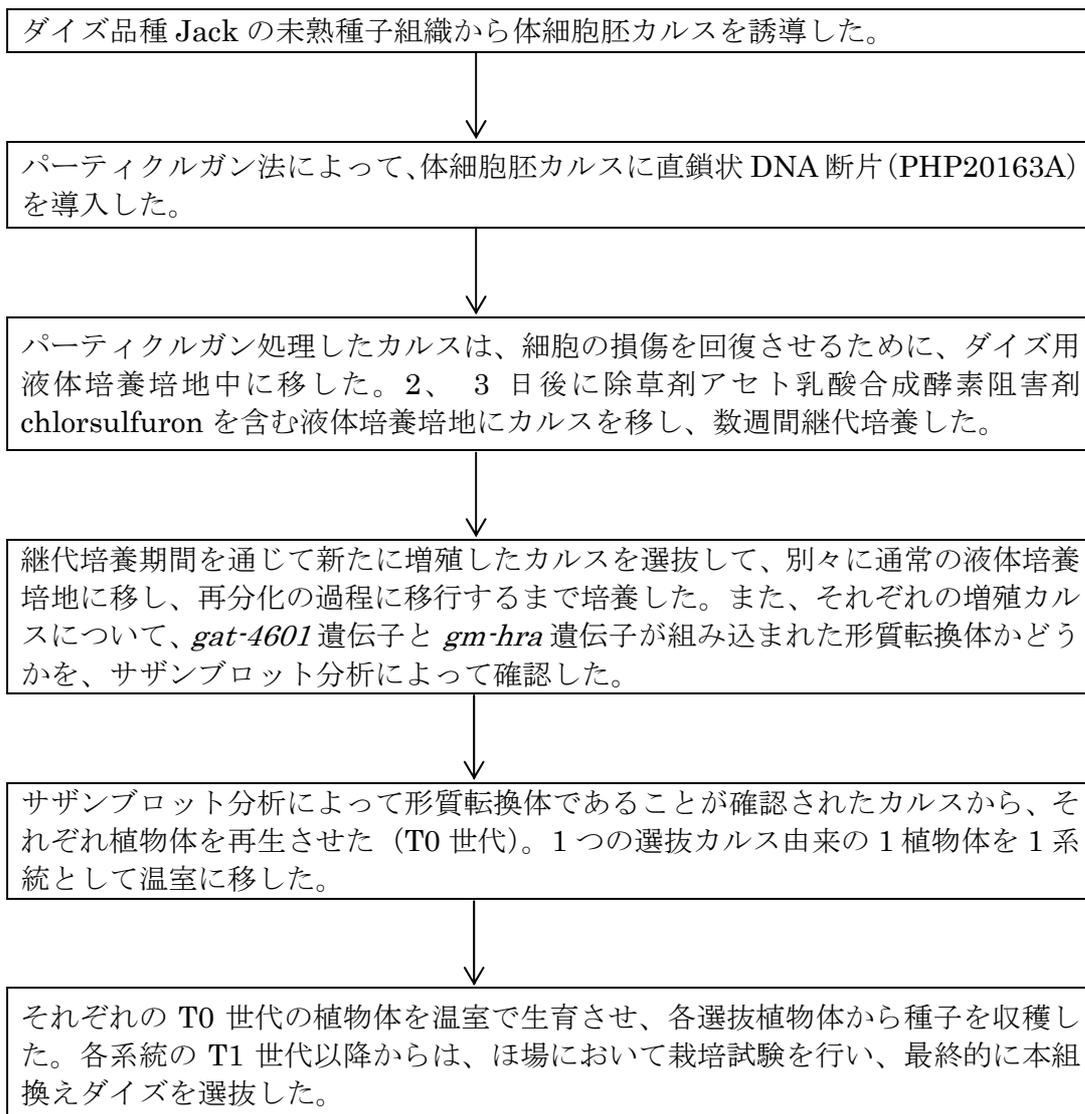


図 5 供与核酸の宿主への導入及び本組換えダイズの選抜過程

(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)

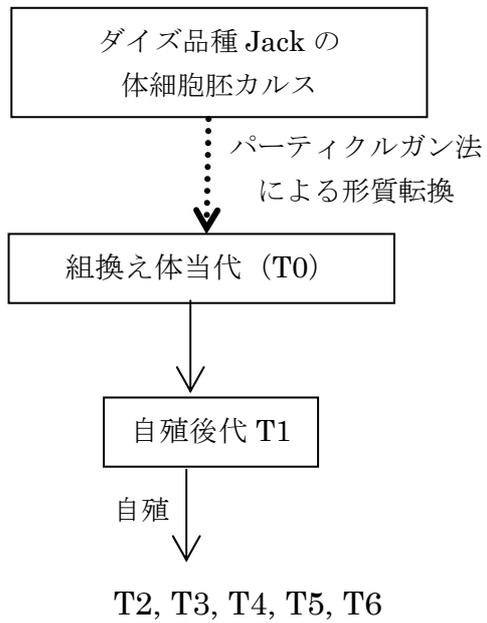


図 6 本組換えダイズの育成過程

自殖を繰り返して系統を維持した。自殖を行った回数を T 以下に付した。

(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)

(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

導入された核酸は、表 3に示すようにメンデルの法則に従って安定して遺伝することが確認されていることから、ダイズゲノム上に存在する。

表 3 T1、T2 世代における導入遺伝子の分離比の解析

供試世代	検定方法	GAT +	GAT -	期待値+	期待値-	χ^2
T1	PCR	59	23	61.5	20.5	0.524
T2	除草剤耐性	32	9	30.8	10.3	0.652

PCR 陽性のものを GAT+陰性のものを GAT-とした。また、除草剤グリホサートに耐性のものを GAT+感受性のものを GAT-とした。

(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(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について、自殖後代 T4 及び T5 世代 (図 6参照、21 ページ) を用いてサザンブロット分析により解析した。分析は、2005 年にパイオニア・ハイブレッド・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。自殖後代 T4 及び T5 世代のそれぞれ 30 及び 24 個体の葉から DNA サンプルを抽出し、制限酵素 *Hind* III で切断した。導入に用いた PHP20163A には、*pin*II Terminator と SAMS Promoter の境界部分、及び *gm-hra* 遺伝子の中間部分の 2ヶ所に *Hind* III サイトがある。(図 4参照、18 ページ)。プローブとして *gat-4601* 遺伝子領域及び *gm-hra* 遺伝子領域を用いた。サザンブロット分析の結果の要約を表 4 (23 ページ) に、サザンブロット分析の結果に基づく挿入遺伝子の模式図を図 7 (23 ページ) に、また、詳細は別紙 3 に示した。

gat-4601 遺伝子領域をプローブとした場合、制限酵素 *Hind* III サイトは、挿入された直鎖状 DNA 断片 PHP20163A 中の *gat-4601* 遺伝子の外側に一ヶ所あることから、植物のゲノム側のもう一ヶ所で切断されることにより、1 コピー導入された場合は、1,378bp 以上の断片がバンドとして検出されると予想された。実際、約 6,000bp の断片が検出された。

gm-hra をプローブとした場合は、*Hind* III サイトが遺伝子領域の中央付近にあることから、1 コピー導入された場合は、2,419bp のバンド及び、植物のゲノム側にあるサイトまでの 1,566bp 以上の断片がバンドとして検出されると予測された。プローブの *gm-hra* は、内在性のアセト乳酸合成酵素 (*als*) 遺伝子も同時に検出することから、5 本以上のバンドが検出され、組換え体に特異的な 2,500bp 付近

のバンド及び、内在性のバンドと重なった位置の約 8,000bp 付近（バンドが濃くなったことより判断）に 1 本のバンドが認められた。

これらの結果から、導入に用いた PHP20163A の 1 コピーが本組換えダイズのダイズゲノムに組み込まれていることが示された。また、供試した自殖後代 T4 世代の 30 植物体及び自殖後代 T5 世代の 24 植物体のそれぞれにおいて、検出されたバンドパターンはいずれも一致しており（表 4 及び別紙 3 参照）、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示された。

表 4 サザンブロット分析の結果の要約

供試世代	検出に用いたプローブ	制限酵素	期待される断片長 (bp) ^a	検出された断片長 (bp) ^b
T4	<i>gat-4601</i>	<i>Hind</i> III	> 1,378	約 6,000
T5	<i>gat-4601</i>	<i>Hind</i> III	> 1,378	約 6,000
T4	<i>gm-hra</i>	<i>Hind</i> III	> 1,566 2,419	約 8,000 * 2,419
T5	<i>gm-hra</i>	<i>Hind</i> III	> 1,566 2,419	約 8,000 * 2,419

* : *gm-hra* 遺伝子をプローブとした場合、*gm-hra* 遺伝子はダイズの内在性 *als* 遺伝子と相同性が高いため、いくつかの内在性 *als* 遺伝子由来の非特異的 DNA 断片が検出された。上記の約 8,000 の DNA 断片は、内在性 *als* 遺伝子由来の非特異的 DNA 断片と、サイズがほぼ重複した導入遺伝子由来の DNA 断片として検出された（別紙 3 の図 5 及び図 6 参照）。

a : 直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の 1 コピーが挿入された場合、制限酵素 *Hind* III 処理で検出が予想される DNA 断片の大きさ（本評価書の図 7 参照）。

b : 分子量マーカーに基づく、検出された DNA 断片の見かけ上の大きさ。

（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）

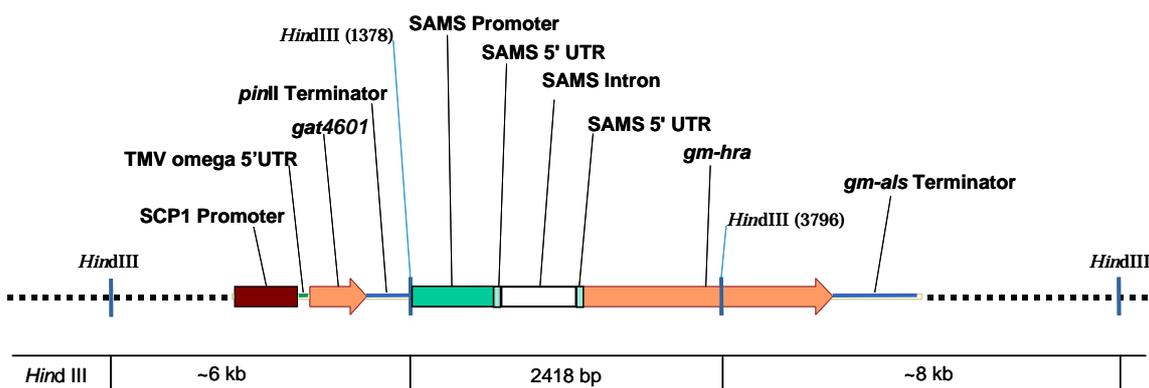


図 7 サザンブロット分析に基づく本組換えダイズに導入された遺伝子の模式図

図の下段は、本組換えダイズのゲノム DNA を制限酵素 *Hind* III で切断し、*gat-4601* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子をプローブに用いたサザンブロット分析で検出された、本組換えダイズにおける DNA 断片の大きさを示している。

（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）

ハ 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

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

ニ 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、*gat-4601* 遺伝子によって発現する GAT-4601 蛋白質、及び、*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 T5 及び T6 世代(図 6 参照、21 ページ) の 2 世代を用いて、除草剤耐性及び ELISA 法による定量分析によって確認した。

①薬剤散布試験

分析は、2005 年に米国パイオニア・ハイブレット・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 2 個体供試して 4 反復で行った。播種後 20 日目に除草剤グリホサート (1.752 kg ae/ha) 及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤 (chlorimuron (33.4 g ai/ha) + thifensulfuron (10.7 g ai/ha)) を混用散布し 2 週間後に薬剤散布による影響を評価した。なお、本使用法は、本組換えダイズが商品化された場合にの散布方法の一つである。薬害の程度は、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、自殖後代 T5 及び T6 世代の両世代とも除草剤グリホサートと除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の混用散布に対して安定した耐性を示した (表 5 及び図 8、25 ページ参照)。

表 5 除草剤混用散布による薬害程度の比較¹

	本組換えダイズ (T5 世代)	本組換えダイズ (T6 世代)	非組換えダイズ
薬剤散布	0±0.0 ²	0±0.0	89 ± 2.1
薬剤非散布	0±0.0	0±0.0	0±0.0

1: 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。値は 8 個体の平均値を示す。

2: ±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内容の責任はデュポン(株)にある)



図 8 本組換えダイズ及び非組換えダイズを用いた除草剤散布試験

除草剤グリホサート (1.752 kg ae/ha) 及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤 (chlorimuron (33.4 g ai/ha) + thifensulfuron (10.7 g ai/ha)) 混用散布後 2 週間目の自殖後代 T5 世代の結果を示す。

A : 本組換えダイズ + 除草剤の混用散布、B : 本組換えダイズ 除草剤散布なし、C : 非組換えダイズ + 除草剤の混用散布、D : 非組換えダイズ 除草剤散布なし。

(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)

②定量 ELISA 試験

定量 ELISA 分析は、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 個体の葉組織を、1 個体当たり 10mg 採取して行った。GAT-4601 蛋白質は、T5 世代で 4.6 ± 1.1 ng/mg 乾燥重、T6 世代で 3.4 ± 0.33 ng/mg 乾燥重の発現量を示した。また、GM-HAR は、T5 世代で 18 ± 6.6 ng/mg 乾燥重、T6 世代で 13 ± 3.0 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、両蛋白質とも世代間で安定的に発現することが確認された (表 6)。

表 6 本組換えダイズ における GAT-4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質の発現量

	T5 世代	T6 世代	P-値
GAT-4601 蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	4.6 ± 1.1 ¹ (3.3 - 6.7)	3.4 ± 0.33 (3.0 - 4.0)	0.65
GM-HRA 蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	18 ± 6.6 (7.0 - 30)	13 ± 3.0 (7.7 - 18)	0.43

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内容の責任はデュポン(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

① 方法

葉から抽出した DNA を鋳型にする。SCP1promoter 領域及び GAT 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、本組換えダイズ特異的な約 700bp のバンドを検出する。

② 感度

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

③ 信頼性

本組換えダイズ及び非組換えダイズを 2 箇所の異なる場所で、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内容

本組換えダイズには、グリホサート *N*-アセチルトランスフェラーゼ (GAT) を発現する *gat-4601* 遺伝子、及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないアセト乳酸合成酵素 (GM-HRA) を発現する *gm-hra* 遺伝子が導入され、除草剤グリホサート及び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。

gat-4601 遺伝子の発現により産生される GAT-4601 蛋白質は、グリホサートを *N*-アセチル化することによって、殺草活性を持たない *N*-アセチルグリホサートに変えることができ、その結果、植物体にグリホサートに対する耐性を付与する (図 1 参照、12 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、バリン及びイソロイシン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 (図 2 参照、13 ページ)。

実際に、米国で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グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の散布に対し、枯死することなく正常に生育し、実用上十分な耐性を示すことを確認している ((4). ニ参照)。

- 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

① 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、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。自殖後代 T5 世代 (図 6 参照、21 ページ) を用い、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を用いた。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、表 7 (28 ページ) に示すように 24 項目すべてにおいて、本組換えダイズと対照品種の間で差は認められなかった。

表 7 形態及び生育の特性¹

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	6/24	6/24	—
発芽率(%)	75	68	0.19
50%開花期	7/21	7/21	—
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	9/24	9/24	—
草型（主茎の伸育型に基づく）	無限	無限	—
主茎長 (cm)	86.4	94.0	0.45
主茎節数	21	22	0.58
最下位着莢節位高 (cm)	7.1	6.35	0.40
分枝数	5	5	—
裂莢の難易	難	難	—
一株総莢数	126	125	0.94
一株総莢重(g)	60	66	0.53
莢当たりの粒数	2	2	0.6
一株全粒重(g)	40	39	0.87
一株成熟粒数	265	273	0.75
一株成熟粒重 (g)	36	35	0.81
百粒重 (g)	13	13	0.34
種子の大きさ	中	中	—
臍の色	黄色	黄色	—

1 : n=60

（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(株)にある）

② 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自殖後代 T6 世代（図 6 参照、21 ページ）の本組換えダイズと対照の非組換えダイズ品種を温室でポットに播種し、発芽後間引いてそれぞれ 1 ポット 10 個体とした。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°C/12 hrs day、2°C/12 hrs night）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。これを 3 反復行った。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差は認められず、その低温耐性は同程度であることが示された（表 8、29 ページ）。

表 8 低温処理における障害程度の比較（低温耐性）

	観察日	本組換えダイズ ¹	非組換えダイズ ¹	P-値
低温障害 の程度 ²	処理前	1±0.0 ³	1±0.0	—
	7日目	2±0.0	2±0.0	—
	14日目	3±0.0	3±0.0	—
	21日目	3±0.0	3±0.0	—

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デュポン(株)にある）

③ 成体の越冬性又は越夏性

成体での越冬能力の評価は、隔離ほ場を用いて本年度行う予定である。参考までに、米国で行った試験について記載する。米国アイオワ州ジョンストンの試験ほ場から、成熟期に自殖後代 T5 世代（図 6 参照、21 ページ）の本組換えダイズを 10 個体と対照の非組換えダイズ品種を 5 個体掘り起こしてポットに移植し、ポット移植した植物体を -20℃ 下に 12 時間置いて低温ストレスを与えた後、ダイズの生育に最適な条件に設定した温室に移して植物体の再生能力を評価した。

低温ストレスを与える前の各植物体の緑化組織率を観察し（低温ストレス処理前）、その後、温室に移して 7 日目及び 14 日目に緑化再生組織の有無を観察したが、本組換えダイズ と対照の非組換えダイズ品種とも、7 日目の観察時には完全に枯死しており、組織の緑化再生は観察されなかった（表 9）。

表 9 本組換えダイズ の成体の越冬能力

温室移動後日数	緑化組織率 ¹		P-値
	本組換えダイズ ²	対照の非組換えダイズ ³	
低温ストレス処理前	8±0.1 ⁴	8±0.2	0.2
7日目	9±0.0	9±0.0	—
14日目	9±0.0	9±0.0	—

1： 緑化組織率の評価は、1 植物 1 反復として次の 9 つの分類階級を用いて行った。1=100%緑化（健全）、2=91-99%緑化、3=76-90%緑化、4=61-75%緑化、5=46-60%緑化、6=31-45%緑化、7=16-30%緑化、8=1-15%緑化、9=0%緑化（枯死）。

2： n=10

3： n=5

4： ±は標準誤差を示す。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある）

④ 花粉の稔性及びサイズ

米国のほ場試験において、種子の稔実特性（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）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ておらず（表 7 参照、28 ページ）、この結果は、花粉の受粉・受精能力に差異が無いことを間接的に示しており、従って、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。

なお、詳細な花粉の稔性については、日本における本隔離ほ場試験において確認する予定である。

⑤ 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、百粒重が評価されている。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あった。また、種子の脱粒性は難であった（表 7 参照、28 ページ）。

また、米国アイオワ州ジョンストンにおいて、T4 世代（図 6 参照、21 ページ）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の発芽率はそれぞれ 99%と 100%であった。また、発芽率調査後に、未発芽種子の生存の有無を確認するために、未発芽種子を掘り起こして、塩化テトラゾリウムによる生体染色を行ったところ、いずれも染色されず死滅していることが認められた（表 10）。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 10 本組換えダイズ の種子の発芽率

	本組換えダイズ	対照の非組換えダイズ
発芽率 (%) ¹	99	100
死滅した未発芽種子 ²	1/1	0/0

1： 滅菌土にポットあたり各 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。

2： 結果は死滅種子数/未発芽種子数で示している。

（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）

⑥ 有害物質の産生性

後作物に影響を与える内因性物質の産生性調査（サンドイッチ法）

ダイズには、後作物に影響を与えるような内因性物質の産生性は知られていない。本組換えダイズには、GAT-4601 蛋白質及び 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内因性物質の産生性について調査を行った。

試験は網室で自殖後代 T5 世代 (図 6 参照、21 ページ) 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%寒天培地重層し、その表面にレタスの種子を 5 粒置床した。その後、25°C、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。試験は 12 反復で行った。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、レタスの幼根の長さ及び胚軸の長さ及び発芽率のいずれにおいても、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった (表 11)。なお、陽性対照として用いたゼラニウム処理区では、レタスの幼根の長さは 3.2 ± 0.08 であり、著しい阻害が認められ、また、胚軸の長さにおいても 7.1 ± 0.39 であり、わずかに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る。

以上の結果により、本組換えダイズ中に後作物に影響を与えるような内因性物質が産生されていないことが確認された。なお、さらに確認のため、隔離ほ場試験においても有害物質 (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もの) の産生性の影響評価を行う予定である。

表 11 レタスの生育調査結果 (サンドイッチ法)

	本組換えダイズ ¹	非組換えダイズ ¹	P-値
幼根の長さ (cm)	9.4 ± 0.73 ²	8.8 ± 0.78	0.05
胚軸の長さ (cm)	9.6 ± 0.83	8.5 ± 0.69	0.20
発芽率 (%)	80 ± 6.0	78 ± 6.0	0.83

1: n=60

2: ±は標準誤差を示す。

(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内因性物質の産生性調査 (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、自殖後代 T5 世代を用いて根圏土壌法 (Iqbal *et al.*, 2004) により、根から分泌される他の植物体に影響を与える内因性物質の産生性について調査を行った。

試験は網室で T5 世代 (図 6 参照、21 ページ) 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、一つのコンテナあたり 4 ヶ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(穴)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ず、本組換えダイズ中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が産生されていないことが確認された (表 12)。

以上のことより、本組換えダイズは、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ないことが確認された。なお、さらに確認のため、隔離ほ場試験においても、根から有害物質を分泌して周辺の植物に影響を与える内因性物質の産生性の評価を行う予定である。

表 12 レタスの生育調査結果 (根圏土壌法)

	本組換えダイズ ¹	非組換えダイズ ¹	P-値
幼根の長さ (mm)	24.7±1.42 ²	23.5±1.29	0.57
胚軸の長さ (mm)	22.7± 0.83	22.0±0.91	0.63
発芽率 (%)	90±3.0	87±3.0	0.44

1 : n=60

2 : ±は標準誤差を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

また、ダイズには、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。確認のため、隔離ほ場試験において土壌微生物相への影響評価を行う予定である。

⑦ 交雑率

本組換えダイズの自然交雑能力を評価するため、自殖後代 T4 世代を用いて以下の実験を行った。

温室において、低リノレン酸ダイズ品種である 93M01 の 42 ポットを交雑の有無を評価するための受粉品種として配置し、その間に本組換えダイズ と対照の非組換えダイズ品種 Jack の各 21 ポットを、交雑機会が均等になるように配置した (図 9)。マルハナバチの巣箱を開花期に温室に設置して、約 4 週間放任受粉させた。

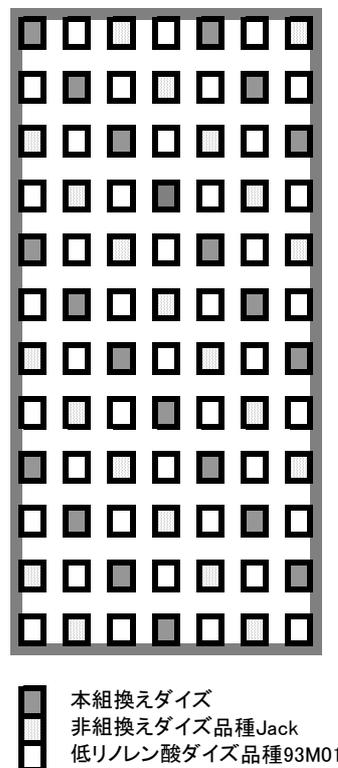


図 9 各供試ダイズの配置図

(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)

本組換えダイズと 93M01 との交雑率については、93M01 由来の 294 種子中の GAT-4601 蛋白質の発現を ELISA 法で検定することにより調査した。分析には、同じく 93M01 の全 42 植物体から無作為に 7 種子ずつを選んで (計 294 種子) 供試した。この結果、全ての種子で GAT-4601 蛋白質の発現は認められなかった。従って、今回の温室内でマルハナバチによる放任受粉させた実験における本組換えダイズの 93M01 との交雑率は 0%であった。

一方、非組換えダイズと 93M01 との交雑率について、リノレン酸含有量を指標

として調査した。低リノレン酸形質は共優性劣性形質(co-dominant recessive trait)なので、もし対照の非組換えダイズ品種と交雑していれば、その種子のリノレン酸含有量は93M01と対照の非組換えダイズ品種の中間程度になる。低リノレン酸ダイズ品種93M01のリノレン酸含量が3.5%を超えることは一般にないので、ここでは3.5%を超えた種子を対照の非組換えダイズとの交雑種子とした。93M01の全42植物体から無作為に7種子ずつ選んで(計294種子)、ガスクロマトグラフィーによって、各種子のリノレン酸含有量を分析した。

その結果、低リノレン酸ではなかった種子が1つ検出された(0.3%) (表13)。従って、今回の温室内でマルハナバチによる放任受粉させた実験における非組換えダイズと低リノレン酸ダイズ93M01との交雑率は0.3%であった。

表13 対照の非組換えダイズの温室における自然交雑率¹

種子中のリノレン酸含量の区分(総脂肪酸あたりの%)	1.5-2.4	2.5-3.4	3.5-4.4	4.5-5.4	5.5-6.4	6.5-7.4	7.5-8.4	8.5-9.4	9.5-10.4
各リノレン酸含有量区分の種子数	266	27	1						

1: 本組換えダイズ及び対照系統のJack、93M01系統に袋がけを行い、リノレン酸含有量を各々7個体について測定した。その結果、本組換えダイズは5.5-9.4%に、Jackは7.5-10.4%に、93M01は1.5-2.4%に分布した。

(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(株)にある)

一般にダイズは自家受粉作物と見なされ、そ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)。今回の温室交雑実験における本組換えダイズの交雑率は0%で、対照の非組換えダイズ品種で認められた交雑率(0.3%)を超えるものではなかったことから、本組換えダイズのは場における自然交雑能力は、従来のダイズと同程度で、これまでに報告されている文献値の範囲を超えることはないと考えられる。

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

所在地：静岡県島田市神座138

名称：シンジェンタ ジャパン (株)

開発本部 中央研究所 神座試験センター 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 19 年 3 月 31 日まで

隔離ほ場の施設

- (イ) 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。
- (ロ) 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者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。
- (ハ) 土、本遺伝子組換えダイズの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- (ニ) 栽培試験区には、食害を防止するための防鳥網及び交雑を防止するための防虫網を設置する。

隔離ほ場での作業要領

- (イ) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
 - (ロ) 本遺伝子組換えダイズをほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。
 - (ハ) (ロ) により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
 - (ニ) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズがほ場の外に持ち出されることを防止する。
 - (ホ) 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。
 - (ヘ) (イ)から(ホ)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
 - (ト) 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。
 - (チ) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。
- (3) 承認を受けようとするもの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年に米国で行われたほ場試験結果及び温室試験結果は、第一. 2. (6) の口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

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）へ無規制裁培許可を申請する予定である。

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、長年に渡り食品・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、本組換えダイズ本組換えダイズと非組換えダイズとの間に相違が認められた点について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、我が国において、自生し雑草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)．ロ．①参照）。

本組換えダイズは、除草剤グリホサート及び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、従って本形質が競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のことから、本組換えダイズ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、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生物多様性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

(ア) 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、GAT4601 蛋白質及び 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の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他感物質検定が行われた（本申請書の第一． 2． (6)． ロ． ⑥参照）。その結果、本組換えダイズも従来のダイズ同様、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。

以上の結果より、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。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検出される可能性も否定はできない。

ダイズとツルマメは雑種を生じ、その雑種の生育や生殖には障害が見られないことが知られているが、従来¹⁾の知見で得られているダイズとツルマメの交雑率は、0.7%と報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。一方、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)。

(3) 影響の生じやすさの評価

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る。自家不和合性は知られていない。また、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0.036%と非常に低率で、10m 離れると交雑率は0%になることが示されている (別紙1)。本隔離ほ場試験に先立ち、米国において、温室内でマルハナバチによる放任受粉させた実験で、本組換えダイズの交雑率の調査を行ったが、交雑率は0%で、従来のダイズと同程度であることが確認されている (本申請書の第一、2.(6).ロ.⑦参照)。

また、競合における優位性の評価において記載したように、競合における優位性に影響を与えると考えられる特性において、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で差は認められず、また、除草剤グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を有することが、競合における優位性を高めるとは考えられない。よって、本組換えダイズとツルマメの交雑により形成される雑種が自然条件下において、野生種を駆逐する可能性はないと考えられる。

前述のように、従来¹⁾の知見で得られているダイズとツルマメの交雑率は、0.7%であることが報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。我が国では、ツルマメは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ことがあるが、一般的に、ダイズの開花期はツルマメより早く (Nakayama and Yamaguchi, 2002)、開花期が重なりにくいと考えられる。

本組換えダイズの温室内でマルハナバチによる放任受粉させた実験における交雑率が従来のダイズと同程度であったこと、また従来¹⁾の知見で、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、さらに、本組換えダイズの競合における優位性が高められているわけではないことから、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。

(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、本組換えダイズを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。

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズについては、これまでも我が国において輸入や栽培がなされているが、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。

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。また、本組換えダイズは、除草剤グリホサート及び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られなかった。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の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、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他感物質検定の結果、本組換えダイズにおいても従来のダイズ同様、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、従来の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 Y. and Yamaguchi H, 2002)、また米国で行われた試験の結果、本組換えダイズの温室内でマルハナバチによる放任受粉させた実験における交雑率が従来の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の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

- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., and Ryan, C.A. 1989. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plant Cell* 1: 115-122.
- Bowen, B.A., Bruce, W.B., Lu, G., Sims, L.E. and Tagliani, L.A. 2000. Synthetic Promoters. US Patent: 6072050.
- 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.
- Bowen, B.A., Bruce, W.B., Lu, G., Sims, L.E. and Tagliani, L.A. 2003. Synthetic Promoters. US Patent: 6555673 B1.
- Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Duck, N.B., Wong, J. Liu, D. and Lassner, M.W. 2004. Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304: 1151-1154.
- Caldovic, L. and Tuchman, M. 2003. Review Article: *N*-Acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem. J.* 372: 279-290.
- Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
- de Jong, K. and H. van der Wel. 1964. *Nature* 202: 553-555.
- 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. Parves, 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, S.S. Parves, 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.
- Gallie, D.R. and Walbot, V. 1992. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.* 20: 4631-4638.
- Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *J. Am. Soc. Agron.* 18: 967-970.
- 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
- Kasahara, Y. 1982. *In: Geobotany 2: Biology and Ecology of Weeds.* (Holzner, W., Numata, M. eds.) pp285-297. W. Junk, Netherlands.
- Keenan, R.J., Siel, D.L., Gorton, R. and Castle, L.A. 2005. DNA shuffling as a tool for protein crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8887-8892
- Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. 1986. Primary structure of proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.* 14: 5641-5650.
- 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.
- 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.
- 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/hatashin/daizu/siryo/16_yunyu.pdf
- O'Dell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 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.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.olis.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
- Poehlman, J. M and D.A. Sleper. 1995. *In* Breeding Field Crops, 4th edition, p. 305. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014.
- 生化学辞典 第3版 監修 今堀和友 山川民夫 東京化学同人
- Sebastian, S. A. 1990. Soybean plants with dominant selectable trait for herbicide resistance. US Patent # 5,084,082.
- Siel, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D., and Lassner, M.W. 2004 Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Manag. Sci.* 61:235-240.
- Taylor, N., Fuchs, R., MacDonald, J., Shariff, A., and Padgett, S. (1999) Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate, *J Agri. Food Chem.* 47: 4469-4473.

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

財務省貿易統計. 2002. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>

モニタリング実施計画書

平成 18 年 2 月 24 日

氏名 デュポン株式会社
 代表取締役社長 小林 昭生
 住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

氏名 シンジェンタ ジャパン株式会社
 代表取締役社長 マイケル・ケスター
 住所 東京都中央区晴海 1 丁目 8 番 10 号
 オフィスタワーX

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
	シンジェンタ ジャパン株式会社 開発本部 中央研究所神座試験センター
	シンジェンタ ジャパン株式会社 開発本部 バイオテクノロジー
	デュポン(株) バイオテクノロジー部
	デュポン(株) バイオテクノロジー部

* 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 10m¹⁾の範囲。

1) 農林水産省 「第 1 種使用規定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(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 2 月に隔離ほ場周辺 50m の範囲でツルマメが自生している可能性について観察したところ、ツルマメと思われる植物種の痕跡は確認されなかった。なお、遺伝子組換えダイズ DP-356043-5 (以下、本組換えダイズと表記) 栽培開始に伴い、再度、範囲を広げてツルマメの生育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の方法

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、交雑による本組換えダイズからツルマメへの導入遺伝子の移入の有無の確認調査を行う。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、もし隔離ほ場の周辺 10m の範囲にツルマメが生育していなかった場合には、ほ場周辺 100m に範囲を広げ、可能な範囲でツルマメの生育を調査する (図 1、48 ページ)。そこで、ツルマメの生育が見られた場合には、生育していた中で最も隔離ほ場に近しい集団から種子を採取し、交雑の有無について調査を行う。

6. モニタリングの結果の解析の方法

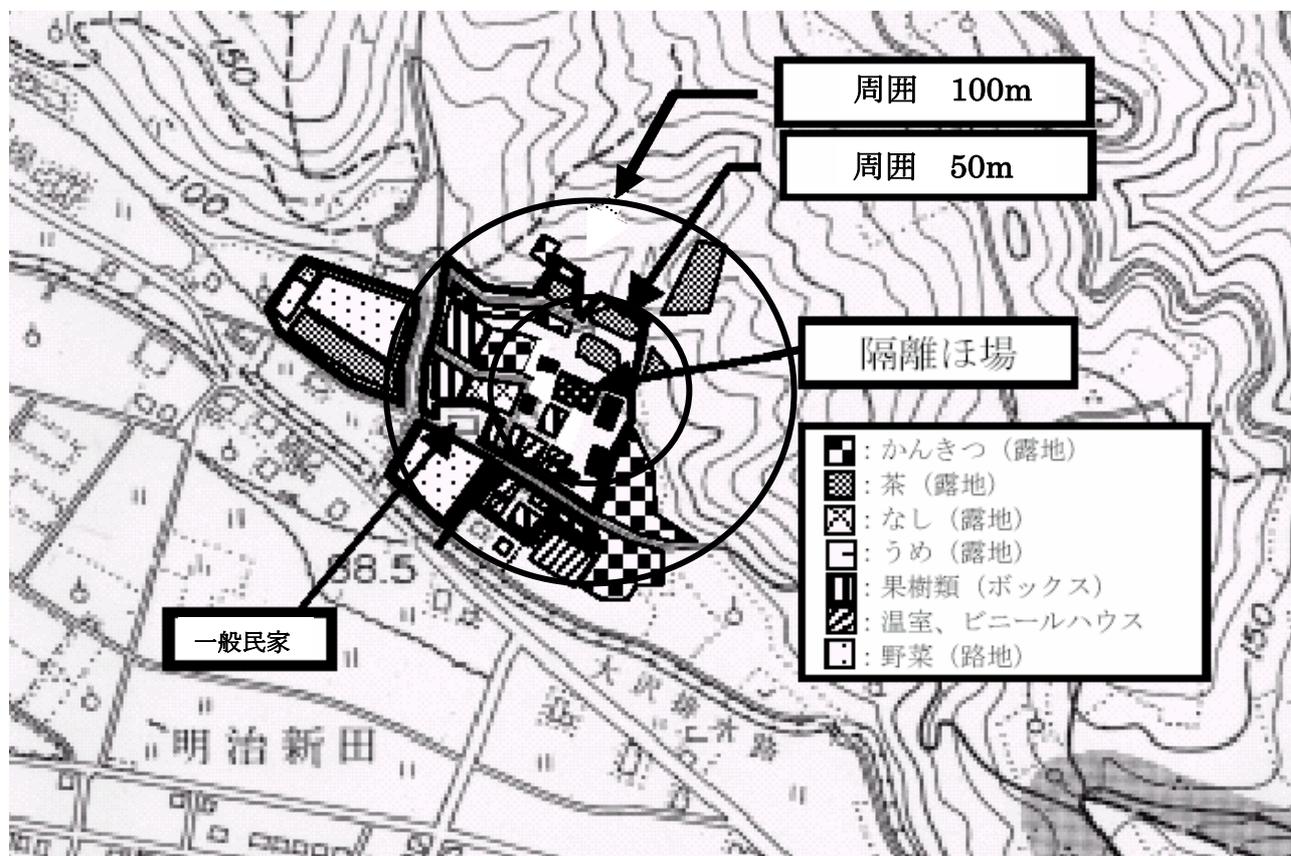
上記の調査より、本組換えダイズからツルマメへの交雑の有無、及びその頻度 (%)を算出し、本組換えダイズの自然交雑性に関する解析を行う。

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定の承認申請時に、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。



100m

図1 隔離ほ場周辺の農地利用調査

(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)

緊急措置計画書

平成 18 年 2 月 24 日

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

氏名 シンジェンタ ジャパン株式会社
代表取締役社長 マイケル・ケスター
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5) (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立証された場合には、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恐れがあると判断した場合に、第一種使用等を行う栽培実験責任者は、デュポン株式会社及びシンジェンタ ジャパン株式会社が合同で設置した生物多様性影響管理委員会に報告を行う。また、デュポン株式会社及びシンジェンタ ジャパン株式会社は、各々、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。デュポン株式会社の危機対策本部は、社長を本部長とし、デュポン株式会社の管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部）の部門長から構成される。シンジェンタ ジャパン株式会社の危機対策本部は、開発本部長を本部長とし、開発本部バイオテクノロジー登録部長、法務・管理・HSE（健康・安全・環境）部長、開発本部バイオテクノロジー広報マネージャー、事業企画開発部e-ビジネスマネージャーから構成される。危機対策本部は、生物多様性影響管理委員会、栽培実験責任者、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、並びに米国シンジェンタシード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実験者と連絡をとり、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立証された場合には、栽培従事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立証された場合には、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。

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5)

別紙一覧

- 別紙 1 第 2 回「第 1 種使用規定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 PHP20163A の塩基配列及びアミノ酸配列 (社外秘情報につき非開示)
- 別紙 3 Confidential Southern Blot Analysis Report November, 2005 (社外秘情報につき非開示)
- 別紙 4 GAT-4601 蛋白質と遊離アミノ酸の反応性(社外秘情報につき非開示)
- 別紙 5 GAT-4602 を用いた基質特異性に関する評価結果(社外秘情報につき非開示)
- 別紙 6 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ(*gat*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5)の隔離ほ場での実験計画(社外秘情報につき非開示)