

除草剤アリルオキシアルカノエート系、グルホシネート及びグリホサート耐性ダイズ(改変 *aad-12, pat*, 改変 *cp4 epsps, Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416×MON89788, OECD UI : DAS-68416-4×MON-89788-1) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	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.....	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	6
(1) 供与核酸に関する情報.....	7
(2) ベクターに関する情報.....	17
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	18
(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.....	20
(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.....	21
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	21
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	23
(1) 使用等の内容.....	23
(2) 使用等の方法.....	23
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法.....	23
(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....	23
(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	23
(6) 国外における使用等に関する情報.....	23
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	25
1 競合における優位性.....	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	25
(2) 影響の具体的内容の評価.....	25
(3) 影響の生じやすさの評価.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	25
2 有害物質の産生性.....	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	25
(2) 影響の具体的内容の評価.....	25
(3) 影響の生じやすさの評価.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	25

3 交雑性	26
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26
(2) 影響の具体的内容の評価	26
(3) 影響の生じやすさの評価	26
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	26
4 その他の性質第三 生物多様性影響の総合的評価	26
第三 生物多様性影響の総合的評価	27
参 考 文 献	28
緊 急 措 置 計 画 書	35
資 料 一 覧	37
資料 1	38
資料 2	41

第一種使用規程承認申請書

平成26年1月9日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 石原 伸晃 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤アリルオキシアルカノエート系、グルホシネート及びグリホサート耐性ダイズ（改変 <i>aad-12, pat</i> , 改変 <i>cp4 epsps, Glycine max</i> (L.) Merr.) (DAS68416×MON89788, OECD UI : DAS-68416-4×MON-89788-1)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

5 和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

② 宿主の品種名又は系統名

10 親系統の宿主はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*G. max* (L.) Merr.) である。親系統の作出に用いた品種名は次のとおりである。

DAS68416 は品種 Maverick を用いた。

MON89788 は品種 A3244 を用いた。

15

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

Soja 亜属には栽培種であるダイズのほかに、野生種として *G. soja* (和名：ツルマメ) が含まれる。自然環境において、ダイズが自生している地域は、国内及び国外ともに知られていない。なお、近縁野生種であるツルマメは、中国、
20 朝鮮半島、台湾、旧ソ連邦及び我が国において広く分布している (OECD, 2000)。我が国においては、北海道、本州、四国、九州に分布し、野原や荒地などに自生している (沼田ら, 1978)。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

25 ダイズは紀元前 17 世紀から紀元前 11 世紀の間に中国において栽培化されたことが示唆されている (OECD, 2000)。野生種であるツルマメが、中国大陸の東北部、長江 (揚子江) 流域、雲南などでみられるため、中国が起源地としてあげられている。日本には、弥生時代に伝来したといわれ、古事記の記載による
30 と、1,300 年前にはすでに各地で栽培されていた (鄭, 2008)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

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

万 ha)、インド(約 1,080 万 ha)等を中心に、広い範囲で栽培されている (FAO, 2013)。

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

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

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

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

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

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

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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

なお、ダイズは短日条件でよく開花するため、栽培品種の適地を決定する際には、光周性及び温度応答が重要である。ダイズの栽培品種は、緯度と日照時間によって決定され、北米には、北部（北緯 45 度）の成熟群 (MG) 000 から赤道付近の成熟群 (MG) X まで、13 の成熟群 (MG) があり (OECD, 2000)、DAS68416 の宿主である Maverick 及び MON89788 の宿主である A3244 は、米国において、成熟群 (MG) III に分類されている (Sleper *et al.*, 1998; Wiebold, 2002; Graphic Maps, 2012)。この栽培地域において、成熟群 (MG) III に分類される品種は 5 月上旬から 6 月中旬の間に播種される。また、7 月中旬から 8 月上旬までが開花期に当たり (Schapaugh, 1997)、開花が始まる最も早い時期の日長時間は約 15 時間である (Lammi, 2008)。

ハ 捕食性又は寄生性

35

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズは、1 個体で最大 400 の莢を形成し、各節の莢数は 2～20 である。各莢には 1～5 個の種子が入っている。莢は成熟後、乾燥状態におくと、背軸面で

裂開して種子が飛散する。我が国で栽培されるダイズの裂莢性には品種間差があるが、ダイズが大規模に栽培され、収穫が機械化されている米国などでは、ほとんどの品種が難裂莢性であり裂莢性の程度は低い。Maverick 及び A3244 もまた難裂莢性であることが認められている。ダイズ種子にはほとんど休眠性がなく、まれに越年した種子が翌年に発芽することがあるが、その場合も十分に育つことはない (OECD, 2000)。種子の発芽力は、通常の貯蔵条件下では 2 年後にほとんど失われる (古谷, 1977)。

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

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性を有さない。

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

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

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

AG5905RR) から 2、4、6、8 及び 10 m 離してツルマメを栽培した場合は、2 m の距離での交雑個体は 7,521 個体中 1 個体、4 m の距離での交雑個体は 7,485 個体中 1 個体及び 6 m の距離での交雑個体は 14,952 個体中 1 個体であった。また、8 m 及び 10 m の距離において、それぞれ 14,964 個体及び 21,749 個体中を

調査したが、交雑個体は得られなかった (Mizuguti *et al.*, 2010)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花当たりの花粉の生産量は平均 3,600 粒前後であり (Chiang and Kiang, 1987)、花粉の寿命は数時間である。受精可能な期間は、開花 1 日前から開花後 2 日程度で同じ花の中で受粉する (OECD, 2000)。2001 年～2004 年に独立行政法人農業環境技術研究所で行われた花粉の飛散距離と交雑率に関する研究では、最も高い交雑率は花粉源から 0.7 m で 0.19 % であり (2001 年)、10.5 m 離れると交雑率は 0 % であった。さらに、開花期間中に畝間に飛散した花粉量は、平均 0.18 粒/cm²/日であり風媒による交雑は少ないものと示唆されている。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、カメムシ目の昆虫が観察されたと報告されている (Yoshimura *et al.*, 2006)。

ホ 病原性

20 ———

へ 有害物質の産生性

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

25

ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたダイズが雑草化したという報告はない。

30 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

除草剤アリルオキシアルカノエート系、グルホシネート及びグリホサート耐性ダイズ (改変 *aad-12*, *pat*, 改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.)

(DAS68416×MON89788, OECD UI : DAS-68416-4×MON-89788-1) (以下

「本スタック系統ダイズ」という。) は、以下の2つの遺伝子組換えダイズを従

35 来の交雑育種法を用いて交配させた交配後代品種である。

- 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 *aad-12, pat, Glycine max*(L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI:DAS-68416-4) (以下「DAS68416」という。)
- 除草剤グリホサート耐性ダイズ (改変 *cp4 epsps, Glycine max* (L.) Merr.) (MON89788, OECD UI:MON-89788-1) (以下「MON89788」という。)

以下ではDAS68416及びMON89788の調製等に関する情報について概要等を記載した。

10

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

DAS68416 及び MON89788 の作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来は、表 1～表 2 (p.8～p.9) に示したとおりである。

15

表 1 DAS68416 の作出に用いた pDAB4468 の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
T-DNA Border B	24	アグロバクテリウム (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 境界配列。
<i>RB7 MAR</i>	1,166	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来の核マトリックス結合領域 (Allen <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子の発現を安定させる。
改変 <i>aad-12</i> カセット		
<i>AtUbi10</i>	1,322	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来のポリユビキチン 10 (UBQ10) 遺伝子のプロモーター。5' 末端非翻訳領域及びイントロンを含む (Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i>	882	グラム陰性桿菌である <i>Delftia acidovorans</i> 由来のアリルオキシアルカノエート・ディオキシゲナーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変アリルオキシアルカノエート・ディオキシゲナーゼ (<u>A</u> ryloxy <u>A</u> lkan <u>o</u> ate <u>D</u> ioxygenase、以下「改変 AAD-12 蛋白質」という。) を発現させる。発現する改変 AAD-12 蛋白質のアミノ酸配列に関しては、クローニングサイト導入のため、2 番目にアラニンが追加されている (Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23 3' UTR</i>	457	アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) のプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
<i>pat</i> カセット		
<i>CsVMV</i>	517	キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava vein mosaic virus) 由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1998)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
<i>pat</i>	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT 蛋白質を発現させる。発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列に関しては改変されていない (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
<i>AtuORF1 3' UTR</i>	704	アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) のプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 境界配列。

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

表 2 MON89788 の作出に用いた PV-GMGOX20 の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
T-DNA 領域		
B ¹ -Right Border	357	T-DNA を伝達する際に伝達の開始点として利用される右側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
P ² - <i>FMV</i> / <i>Tsf1</i> *	1,040	シロイヌナズナ <i>Tsf1</i> プロモーター (Axelos <i>et al.</i> , 1989) に Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S プロモーターのエンハンサー配列 (Richins <i>et al.</i> , 1987) を結合させたキメラプロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。
L ³ - <i>Tsf1</i> *	46	シロイヌナズナの翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsf1</i> 遺伝子のリーダー配列 (exon 1) (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。翻訳の際のリボソーム結合部位である。
I ⁴ - <i>Tsf1</i> *	622	シロイヌナズナの翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsf1</i> 遺伝子のイントロン配列 (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
TS ⁵ - <i>CTP2</i>	228	シロイヌナズナ EPSPS の <i>shkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。芳香族アミノ酸の合成が行われる色素体へ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を輸送する。
CS ⁶ -改変 <i>cp4 epsps</i>	1,368	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコーディング配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996; Barry <i>et al.</i> , 1997)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。
T ⁷ - <i>E9</i>	643	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット (<i>RbcS2</i>) E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域配列 (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。
B-Left Border	442	T-DNA を伝達する際に伝達の終結点として利用される左側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。

表 2 MON89788 の作出に用いた PV-GMGOX20 の構成要素の由来及び機能
(つづき)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
T-DNA の外側の構成要素 (MON89788 には存在しない)		
OR ^s -ori V	397	広宿主域プラスミド RK2 に由来する <i>Agrobacterium</i> の複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖機能を付与する (Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
CS-rop	192	プライマー蛋白質のリプレッサー (repressor of primer) のコーディング配列であり、 <i>Escherichia coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
OR-ori-PBR322	629	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
aadA	889	トランスポゾン Tn 7 由来の、アミノグリコシド改変酵素である 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター及びコーディング配列 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。

¹B-border (境界配列)

²P-promoter (プロモーター)

5 ³L-leader (リーダー配列)

⁴I-intron (イントロン)

⁵TS- targeting sequence (ターゲティング配列)

⁶CS- coding sequence (コード配列)

⁷T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

10 ⁸OR- Origin of Replication (複製開始領域)

**Tsf1* は、近年 *EF-1α* として広く知られている。

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

15 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

DAS68416 及び MON89788 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表 1～表 2 (p.8～p.9) に示したとおりである。

20 なお、DAS68416 の供与核酸には、核マトリックス結合領域である *RB7MAR* 配列が含まれる。核マトリックス結合領域はゲノム DNA 配列に頻繁に見られる領域で、DNA のループ構造形成のために、核マトリックスに DNA を付着させる役割をしていると考えられている。核マトリックス結合領域が導入遺伝子の近傍に隣接していると、ジーンサイレンシングを減少させることで導入遺伝子の
25 の発現を安定させることが報告されている (Allen *et al.*, 2000)。なお、核マトリ

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

5

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

10 a. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

【改変 AAD-12 蛋白質】

改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。DAS68416 においては、改変 AAD-12 蛋白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入し、除草活性のない化合物に変換することで、除草剤耐性を示す (Wright *et al.*, 2007)。例えば、改変 AAD-12 蛋白質は除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換する (図 1、p.11)。

20

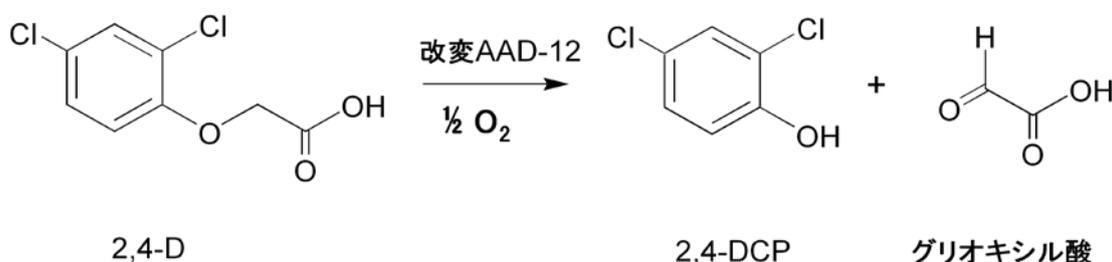


図 1 改変 AAD-12 蛋白質の作用機作

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

【PAT 蛋白質】

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

35 グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。

したがって、除草剤グリホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量のアンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、*N*-アセチル-L-グリホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないため、PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え植物では植物毒素の生理学的影響を受
5 けず、除草剤グリホシネートへの耐性を示す (OECD, 2002)。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

植物は除草剤グリホサートを処理すると 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下「EPSPS 蛋白質」という。) が阻
10 害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。MON89788 の目的遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子はグリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することが
15 できる。

なお、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように野生型 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものであり、発現蛋白質のアミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されているのみである。
20

b. 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の相同性

改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が既知のアレ
25 ルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するかどうかを以下のデータベースを用いて比較したところ、既知アレルギーと類似の配列は共有していなかった。

FARRP Allergen Database version 13¹: 改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質
AD_2013²: 改変 CP4 EPSPS 蛋白質

¹ Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) のデータベースで 2013 年 2 月の時点で 1,630 配列が含まれる。

² Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで 2013 年 1 月の時点で 1,630 配列が含まれる。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 AAD-12 蛋白質】

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

改変 AAD-12 蛋白質が基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタル酸が存在すると、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される (図 2、p.13)。そこで、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に類似した植物体中に存在する化合物が改変 AAD-12 蛋白質の基質になり得るかどうかを、 α -ケトグルタル酸を添加した改変 AAD-12 蛋白質の反応実験においてコハク酸測定を行い、コハク酸の生成により確認した。コハク酸測定では、図 3 に示したようにサクシニル CoA シンテターゼ、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼを用いた反応系において、還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの酸化量を 340 nm の吸光度で測定することにより、コハク酸の生成量に換算した (Luo *et al.*, 2006 ; 図 3、p.14)。アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に類似した植物体中に存在する化合物として、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸 (GA3) 及びアミノシクロプロパン-1-カルボン酸、及びフェニルプロパノイド中間体であるトランス桂皮酸、クマル酸及びシナピン酸、並びに 20 種類の L-アミノ酸をコハク酸測定に用いた。

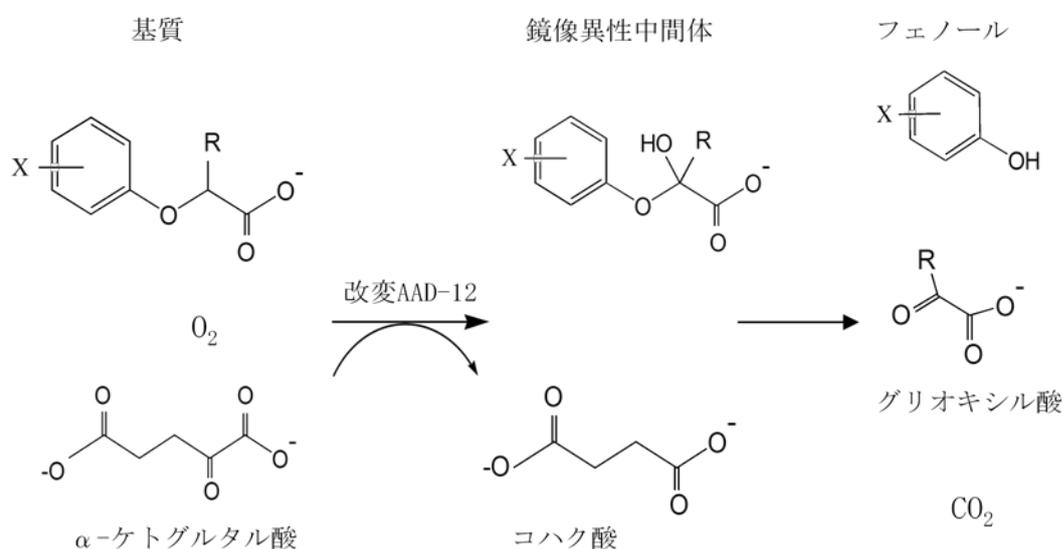


図 2 α -ケトグルタル酸存在下での改変 AAD-12 蛋白質の酵素反応

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

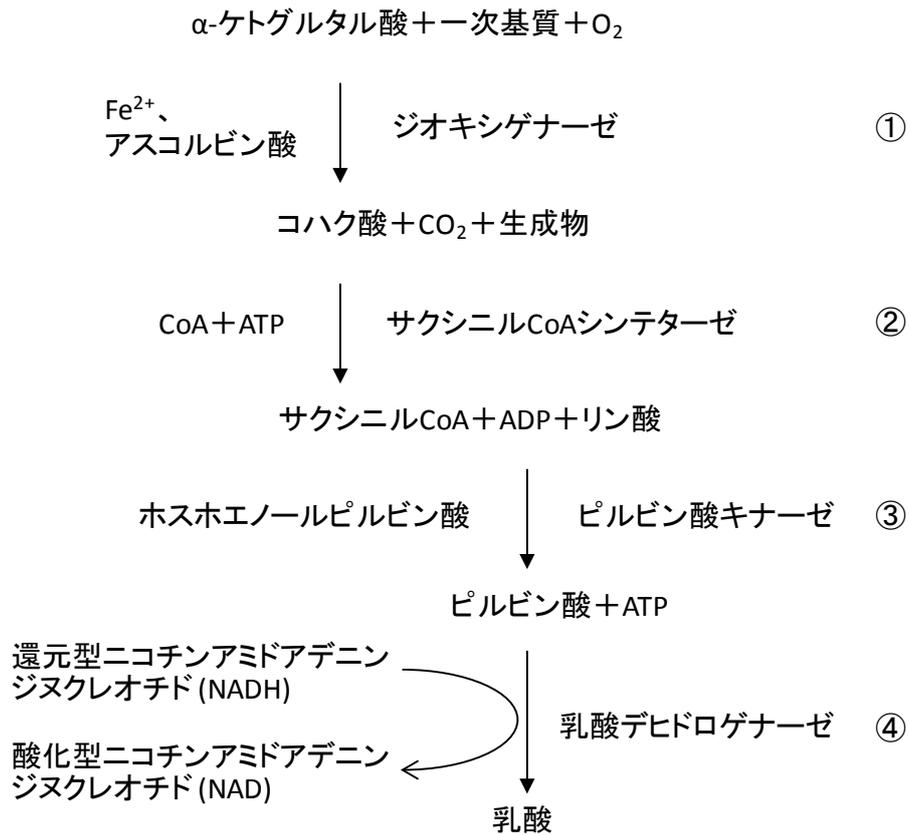


図 3 コハク酸測定反応の経路 (Luo *et al.*, 2006 の Scheme 1 を改編)

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

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

- 15 20 種類の L-アミノ酸については、1 μ M の改変 AAD-12 蛋白質の濃度においてコハク酸の生成が認められなかったため、改変 AAD-12 蛋白質は 20 種類の L-アミノ酸とは反応しないと考えられた。一方、10 μ M の改変 AAD-12 蛋白質を植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体に作用させた結果、インドール-3-酢酸、クマル酸、トランス桂皮酸及びシナピン酸において、コハク酸の生成
- 20 が認められた (Cicchillo *et al.*, 2010)。コハク酸測定による測定では、基質の酸

化を経なくともコハク酸生成物を誘発する脱共役反応 (uncoupling) が起こる可能性がある (Hausinger, 2004)。したがって、コハク酸測定において反応が認められた化合物が実際に酸化されているか否かを確認するために、フーリエ変換質量分析 (FT/MS) による一次酸化物の測定を行った。その結果、10 μM の改変 AAD-12 蛋白質を作用させた場合に、トランス桂皮酸とインドール-3-酢酸の酸化物のみが検出された (Cicchillo *et al.*, 2010)。

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

さらに、シロイヌナズナの桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ (Cinnamate-4-hydroxylase) の *in vitro* におけるトランス桂皮酸についての K_{cat}/K_m は $3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることが報告されている (Chen *et al.*, 2007)。また、イネのインドール-3-酢酸アミドシンセターゼ (IAA amido synthetase) の *in vitro* におけるインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は $2.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であると報告されている (Chen *et al.*, 2009)。このように桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ及びインドール-3-酢酸アミドシンセターゼの触媒効率はいずれも高い値であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸は、植物体内の既存の代謝経路において効率的かつ特異的に利用されているものと考えられる。一方、改変 AAD-12 蛋白質のトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値は桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼのトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.005 % である。また、改変 AAD-12 蛋白質のインドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値はインドール-3-酢酸アミドシンセターゼのインドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.3 % であり、改変 AAD-12 蛋白質の K_{cat}/K_m 値はいずれも非常に低い値である。

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

³ 光学異性である除草剤ジクロルプロップの S 体の化合物。除草活性を持つのは R 体のみであるため、*S*-ジクロルプロップは除草活性を持たない。

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

5 除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ (半数致死濃度) は淡水魚で 1.7 mg/L、オオミジンコ (*Daphnia magna*) で 1.4 mg/L であり、ウキクサの EC₅₀ (半数影響濃度) が 1.5 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC (無影響濃度) が 0.14 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21 mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC₅₀ が 125 mg/kg、オオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) の EC₁₀ (10%影響濃度) が 0.7 mg/kg である (OECD, 2006)。一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ は淡水魚で 0.26 mg/L、オオミジンコで 2.2 mg/L であり、ウキクサの EC₅₀ が 0.2992 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20 mg/L である (EPA, 2004)。

10

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

なお、DAS68416 に適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、最大平均残留量は 0.047 mg/kg であった (Cleveland and Blewett, 2011)。2,4-DCP のマウスにおける急性毒性試験の LD₅₀ (半数致死量) は 1,276~1,352 mg/kg 体重、ラットにおける慢性毒性 (2年間) 試験の NOAEL (無毒性量) は、雄で 440 mg/kg 体重/日、雌で >250 mg/kg 体重/日であり (OECD, 2006)、DAS68416 における 2,4-DCP の残留量を大きく上回っていることから、DAS68416 の輸入種子が野生動植物に影響を及ぼす

20

25

ことはないと考えられる。

【PAT 蛋白質】

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

30

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

35

40

留基準値の対象化合物に含まれている。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩（以下「S3P」という。）と特異的に反応することが知られており（Gruys *et al.*, 1992）、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こりやすさを示す特異性定数（Specificity constant） k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず（Gruys *et al.*, 1992）、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

親系統の作出に用いたプラスミド・ベクターは次のとおりである。

DAS68416 : アグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) と大腸菌 (*E. coli*) 由来のベクター pDAB2407 をもとに構築した pDAB4468

MON89788 : *E. coli* 由来のベクター pBR322 などをもとに構築した PV-GMGOX20 (詳細は表 2 に記載した。)

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いたプラスミド・ベクターの塩基数は次のとおりである。

DAS68416 : pDAB4468; 12,154 bp

MON89788 : PV-GMGOX20; 9,664 bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。

DAS68416 : スペクチノマイシンに対する耐性を付与する *specR* 遺伝子

MON89788 : スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子

なお、これらの抗生物質耐性遺伝子はいずれの宿主にも導入されていない。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

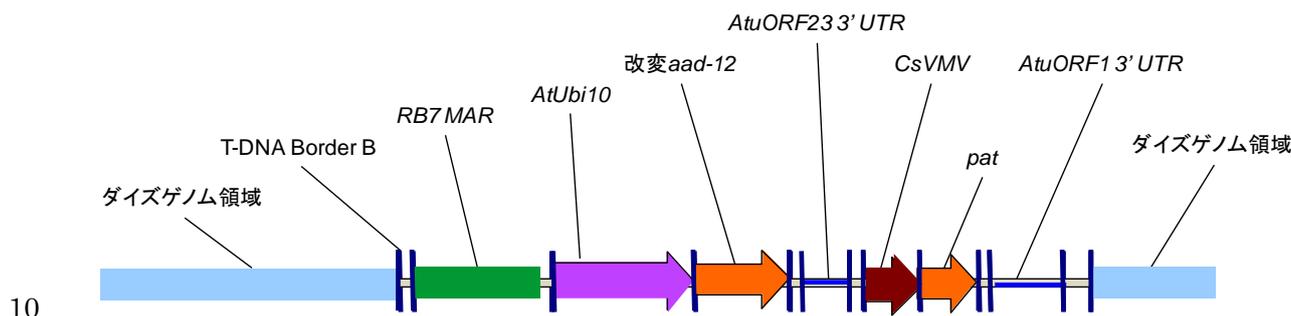
pDAB4468 及び PV-GMGOX20 の感染性はいずれも知られていない。

5

(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

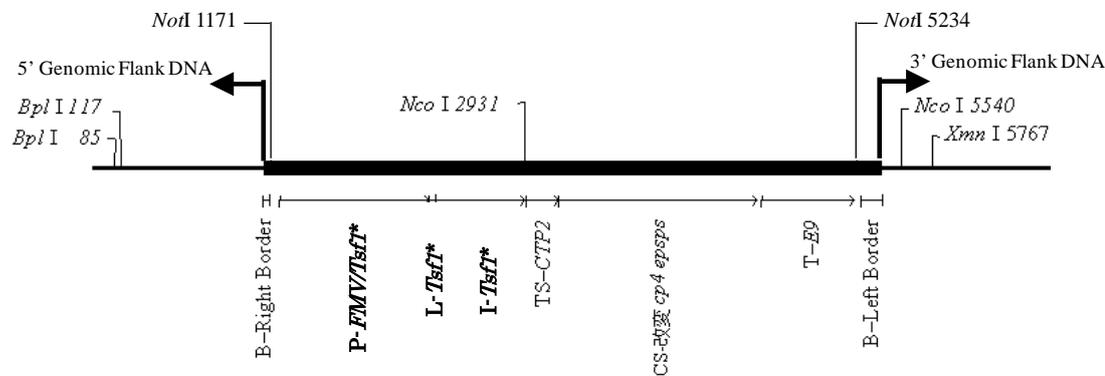
DAS68416 及び MON89788 のそれぞれに移入された核酸全体の構成図をそれぞれ図 4～図 5 (p.18) に示した。



10

図 4 DAS68416 に移入した核酸全体の構成図

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



15 図 5 MON89788 に移入した核酸全体の構成図

図中の数字は核ゲノム中における位置を示しているため、表 2 に示す各構成要素のサイズとは一致しない。

図中の直角に曲がった矢印は導入遺伝子の 5'及び 3'末端とそれにつづく近傍のダイズ内在性配列を示している。

20 * *Ts1f* は、近年 *EF-1 α* として広く知られている。

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

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入については、DAS68416 及び MON89788 のいずれの場合もアグロバクテリウム法を用いて行った。

5 ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選択の方法

形質転換細胞の選抜は、以下を添加した培地を用いて行った。

DAS68416：グルホシネート

MON89788：グリホサート

10

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

DAS68416 及び MON89788 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、それぞれの親系統の評価において確認されている。

15

すなわち、DAS68416 については、不定芽誘導培地及び不定芽伸長培地に抗生物質を添加することにより、アグロバクテリウムを殺菌した。その後、形成されたシュートを抗生物質を含まない再生培地で培養し、アグロバクテリウム菌体が残存していないことを確認した。一方、MON89788 については、培地へカルベニシリン及びセフトキシムを添加することによりアグロバクテリウムの除去を行った。さらに、形質転換に用いたプラスミド・ベクターPV-GMGOX20

20

の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、プラスミド・ベクター PV-GMGOX20 の外側骨格領域は存在しなかった。これらのことから、MON89788 には形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存していないことを確認した (Urquhart and Paul, 2011)。

25

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

本スタック系統サイズは、DAS68416及びMON89788を交雑育種法により掛け合わせて育成したスタック系統である。図 6 (p.19) に本スタック系統サイズの育成例を示す。なお、DAS68416、MON89788及び本スタック系統サイズの我が国における申請・認可状況を表3に記載した (表 3、p. 20)。

30

35

社外秘情報につき非開示

図 6 本スタック系統サイズの育成図

40

表 3 DAS68416、MON89788 及び本スタック系統ダイズの我が国における申請・認可状況（2014 年 1 月現在）

	食品 ¹⁾	飼料 ²⁾	環境 ³⁾
DAS68416	2013年5月 申請	2013年5月 申請	2013年8月 総合検討会終了
MON89788	2007年11月 安全性確認	2007年10月 安全性確認	2008年1月 第一種使用規程承認
本スタック系統 ダイズ	社外秘情報に つき非表示	社外秘情報に つき非表示	2014 年 1 月 申請

1) 食品衛生法

2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律

5 3) 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

(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

10 ① 移入した核酸の複製物が存在する場所

DAS68416 及び MON89788 の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認されている。

15 ② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

【DAS68416】

20 サザンブロット分析を行った結果、DAS68416 に導入された *RB7 MAR*、改変 *aad-12* カセット及び *pat* カセットは 1 コピーであり、複数世代において安定して伝達されることが確認された（社内報告書 1）。また、全ての T-DNA Border A 及び T-DNA Border B の一部は移入されていないが、その他の構成要素は全て完全な形で移入されていることが明らかになった（Poorbaugh *et al.*, 2009）。

【MON89788】

25 サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON89788 のゲノム中 1 ヶ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されておらず、T-DNA 領域内の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットも全ての構成要素が組み込まれていることが確認された。さらに、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることを、複数世代におけるサザンブロット分析によって確認した（Dickinson *et al.*, 2006）。

30

- ③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

DAS68416 及び MON89788 は全て 1 コピーなので該当しない。

- 5 ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

親系統の発現の安定性については以下のように親系統の評価で確認されている。

10 DAS68416 : ELISA 法による改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量の確認

MON89788 : ウェスタンブロット分析による改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現確認 (Mozaffar and Silvanovich, 2006)

- 15 ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

DAS68416 及び MON89788 に移入された核酸の配列には、伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

- 20 (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

DAS68416 の検出及び識別の方法として、DAS68416 に特異的な塩基配列をプライマーとして用いる PCR 法が開発されている (Song, 2010)。

25 MON89788 の検出及び識別の方法として、導入遺伝子及びその周辺の核ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いる PCR 法により、MON89788 を特異的に検出することが可能である (Dickinson and Masucci, 2006)。

本スタック系統ダイズを検出及び識別するためには、上記の方法を 1 個体由来のサンプルごとに行う必要がある。

30

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- ① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本スタック系統ダイズには各親系統に由来する次の特性が付与されている。

35 DAS68416 : 導入遺伝子に由来する改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質によるアリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性

MON89788 : 導入遺伝子に由来する改変 CP4 EPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性

これらの蛋白質の機能的な相互作用の可能性について検討した。

5 5 改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。したがって、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

10 10 以上のことから、本スタック系統ダイズにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

15 15 したがって、本スタック系統ダイズと宿主の属する分類学上の種であるダイズとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である DAS68416 及び MON89788 を個別に調査した結果に基づき評価した。

② 生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

20 20 各親系統の生物多様性影響評価は終了しており、以下の生理学的又は生態学的特性について、各親系統とそれぞれの対照の非組換えダイズとの間に相違がないことが確認されている（ダウ・ケミカル日本株式会社, 2013; 日本モンサント株式会社, 2007）。なお、生理学的又は生態学的特性に関する情報は日本版バイオセーフティクリアリングハウスホームページ⁴ から参照できる。

25

- a 形態及び生育の特性
- b 生育初期における低温耐性
- c 成体の越冬性
- d 花粉の稔性及びサイズ
- 30 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- f 交雑率
- g 有害物質の産生性

⁴DAS68416

http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/H25_11_5.daizu1.pdf
MON89788

https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=1003&ref_no=1

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

5

(2) 使用等の方法

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

10

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

15

「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

20

(6) 国外における使用等に関する情報

DAS68416、MON89788 及び本スタック系統ダイズの諸外国における申請・認可状況は表 4 (p.24) に示したとおりである。

表 4 DAS68416、MON89788 及び本スタック系統ダイズの諸外国における申請・認可状況 (2014 年 1 月現在)

	DAS68416	MON89788	本スタック系統ダイズ
FDA	2011 年 11 月 安全性確認	2007 年 1 月 安全性確認	該当せず
USDA	2009 年 12 月 申請	2007 年 7 月 安全性確認	該当せず
Health Canada	2012 年 10 月 安全性確認	2007 年 6 月 安全性確認	該当せず
CFIA	2012 年 10 月 安全性確認	2007 年 7 月 安全性確認	2013 年 3 月 通知
EFSA	社外秘情報に つき非表示	2008 年 12 月 安全性確認	社外秘情報につき非表示
FSANZ	2011 年 11 月 安全性確認	2008 年 7 月 安全性確認	2013 年 12 月 通知
MFDS	社外秘情報に つき非表示	2009 年 2 月 安全性確認	社外秘情報につき非表示
RDA	社外秘情報に つき非表示	2009 年 1 月 安全性確認	社外秘情報につき非表示

FDA: 米国食品医薬品庁(食品・飼料)

5 USDA: 米国農務省(環境)

Health Canada: カナダ保健省(食品)

CFIA: カナダ食品検査庁(環境・飼料)

EFSA: 欧州食品安全機関(食品・飼料)

FSANZ: オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(食品)

10 MFDS: 韓国食品医薬品安全処(食品)

RDA: 韓国農村振興庁(環境・飼料)

15 また、DAS68416、MON89788 及び本スタック系統ダイズの我が国における申請・認可状況は表 3 (p. 20) に記載した。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統サイズは DAS68416 及び MON89788 から交雑育種法により作出した。

5

本スタック系統サイズにおいて発現する改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。また、改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響はないと考えられ、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え

10

難い。

このように、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統サイズの植物体内において相互に影響する可能性は低く、各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

15

したがって、本スタック系統サイズの生物多様性影響の評価は、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。以下の「1 競合における優位性」、「2 有害物質の産生性」、「3 交雑性」の各項目について、資料 1 及び 2 のとおり、各親系統において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論されている。このため、本スタック系統サイズは、競合における優位性、有害物質の産生性及び

20

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

25

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

30

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

35

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

40

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

5 (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

10

4 その他の性質

第三 生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統ダイズにおいて発現する改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。また、改変 AAD-12 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響はないと考えられ、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え

5 5
10

10 10
15 15

このように、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統ダイズの植物体内において相互に影響する可能性は低く、各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

本スタック系統ダイズの生物多様性影響の評価を、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した結果、本スタック系統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が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

15 15

参 考 文 献

- Allen, George C.; Hall Jr., Gerald; Michalowski, Susan; Newman, Winnell; Spiker, Steven; Weissinger, Arthur K.; Thompson, William F. High-level
5 transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*. 1996, 8(5), p.899-913.
- Allen, George C.; Spiker, Steven; Thompson, William F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), p.361-376.
- 10 Axelos, M.; Bardet, C.; Liboz T.; Le Van Thai, A.; Curie C.; Lescure, B. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics*. 1989, 219, p.106-112.
- Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. Nucleotide sequence of
15 the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), p.335-350.
- Barry, G.F.; Kishore, G.M.; Padgett, S.R.; Stallings, W.C. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. 1997, Patent 5,633,435, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 20 Chattopadhyay, S.; Whitehurst, C. E.; Chen, J. A nuclear matrix attachment region upstream of the T cell receptor beta gene enhancer binds Cux/CDP and SATB1 and modulates enhancer-dependent reporter gene expression but not endogenous gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(45), p. 29838-29846.
- 25 Chen, Hao; Jiang, Hanxiao; Morgan, John A. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry*. 2007, 68(3), p.306-311.
- Chen, Qingfeng; Zhang, Baichen; Hicks, Leslie M.; Wang, Shiping; Jez, Joseph M. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based assay
30 for indole-3-acetic acid-amido synthetase. *Analytical Biochemistry*. 2009, 390(2), p.149-154.
- Chiang, Y.C.; Kiang, Y.T. Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 1987, 28(1), p.1-11.

- Cicchillo, Robert M.; Godbey, Jeff; Wright, Terry. Substrate specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, 2010, Study ID: 101617. (社内報告書)
- 5 Cleveland, C.B.; Blewett, T.C. A risk assessment overview of 2,4-D treated soybean containing the DAS AAD-12 trait. Dow AgroSciences LLC, 2011, Study ID: 110297. (社内報告書)
- 10 Coruzzi, G.; Broglie, R.; Edwards C.; Chua, N.-H. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. The EMBO Journal, 1984, 3, p.1671-1679.
- Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H.M. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics. 1982, 1, p.561-573.
- 15 Dickinson, E.C.; Masucci, J.D. PCR and DNA sequence analysis of conventional soybean to examine the MON 89788 insertion site. 2006. Monsanto Technical Report MSL-20320. St. Louis, Missouri. (社内報告書)
- Dickinson, E.C.; Pineda, N.G.; Scanlon, N.K.; Whetsell, A.J.; Masucci, J.D. Molecular analysis of glyphosate-tolerant soybean MON 89788. 2006. Monsanto Technical Report MSL-20160. St. Louis, Missouri. (社内報告書)
- 20 EPA. Environmental Fate and Effects Division's Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Document for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). 2004, <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2004-0167-003>, (参照 2013-2-12).
- 25 FAO. FAOSTAT, 2013. <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>, (参照 2013-10-18).
- Fling, M.E.; Kopf, J.; Richards, C. Nucleotide sequence of the transposon Tn 7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research. 1985, 13, p.7095-7106.
- 30 Fujita, R.; Ohara, M.; Okazaki, K.; Shimamoto, Y. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). The Journal of Heredity. 1997, 88(2), p.124-128.

- Fukuda, Yuji; Nishikawa, Satoshi. Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. *Plant Molecular Biology*. 2003, 51, p.665-675.
- Giza, P.E.; Huang, R.C.C. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene*. 1989, 78, p.73-84.
- Graphic Maps. North America. *Worldatlas*, Galveston, Texas. 2012. <http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> (参照 2012-3-10),
- Gruys, K.J.; Walker, M.C.; Sikorski, J.A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1992, 31, p.5534-5544.
- Halweg, Christopher; Thompson, William F.; Spiker, Steven. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell*. 2005, 17(2), p.418-429.
- Hausinger, Robert P. Fe (II) / α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, 39(1), p.21-68.
- Klee, H.J.; Muskopf, Y.M.; Gasser, C.S. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics*. 1987, 210, p.437-442.
- Kuroda, Yosuke; Kaga, Akito; Tomooka, Norihiko; Vaughan, Duncan A. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science*. 2008, 48(3), p.1071-1079.
- Lammi, J. Online-Photoperiod Calculator. 2008. <http://www.sci.fi/~benefon/sol.html> (参照 2012-3-10).
- Luo, Lusong; Pappalardi, Melissa B.; Tummino, Peter J.; Copeland, Robert A.; Fraser, Marie E.; Grzyska, Piotr K.; Hausinger, Robert P. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry*. 2006, 353(1), p. 69-74.

- Mizuguti, Aki; Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management*. 2009, 9(1), p.93–96.
- 5 Mizuguti, Aki; Ohigashi, Kentaro; Yoshimura, Yasuyuki; Kaga, Akito; Kuroda, Yosuke; Matsuo, Kazuhito. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research*. 2010, 9(1), p.13–23.
- 10 Mozaffar, S.; Silvanovich, A. Assessment of CP4 EPSPS protein quantities in leaf, seed, root, and forage tissues from second-generation glyphosate-tolerant soybean MON 89788 produced in 2004/2005 Argentina field trials. 2006. Monsanto Technical Report MSL 20221. St. Louis, Missouri. (社内報告書)
- 15 Nakayama, Yuichiro; Yamaguchi, Hirofumi. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*. 2002, 2(1), p.25–30.
- 20 Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 1993, 21(5), p.895-906.
- 25 OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. 1999.
- OECD. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr.(soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. 2000.
- 30 OECD. Module II : Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25. 2002.
- OECD. ‘2,4-Dichlorophenol’. OECD Existing Chemicals Database. 2006, <http://webnet.oecd.org/HPV/UI/handler.axd?id=3d43ed35-5ef5-4323-bddd-4aa527db0765>, (参照 2013-2-12)

- Padgett, S.R.; Re, D.B.; Barry, G.F.; Eichholtz, D.E.; Delannay, X.; Fuchs, R.L.; Kishore, G.M.; Fraley, R.T. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. Duke S.O. (ed.). 1996. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Poorbaugh, Josh; Zhou, Ning; Mo, Jing. Cloning and characterization of the DNA sequence for the insert and flanking border regions of AAD-12 soybean event DAS-68416-4. Dow AgroSciences LLC, 2009, Study ID: 091048. (社内報告書)
- Richins, R.D.; Scholthof, H.B.; Shepherd, R.J. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). Nucleic Acids Research. 1987, 15, p.8451-8466.
- Schapaugh, W.T. Selection of soybean varieties. in Soybean Production Handbook. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas. 1997, p.4-7.
- Sleper, D.A.; Nickell, C.D.; Noel, G.R.; Cary, T.R.; Thomas, D.J.; Clark, K.M.; Rao Arelli, A.P. Registration of 'Maverick' soybean. Crop Science. 1998, 38(2), p.549-550.
- Song, P. Protocol for event-specific quantitation of DAS-68416-4 soybean. Dow AgroSciences LLC, 2010, Study ID: 101715. (社内報告書)
- Stalker, D.M.; Thomas, C.M.; Helinski, D.R. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Molecular and General Genetics. 1981, 181, p.8-12.
- Sutcliffe, J.G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Symposia on Quantitative Biology. 1979, 43, p.77-103.
- Urquhart, W.; Paul, S. PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON89788. 2011. Monsanto Technical Report MSL0023745. St. Louis, Missouri. (社内報告書)
- Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Fux, Charles I.; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. Plant Molecular Biology. 1998, 37(6), p.1055-1067.

- Wiebold, B. Soybean variety adaptation. United Soybean Board, University of Missouri College of Agriculture, Food, and Natural Resources, Columbia, Missouri. 2002. <http://www.plantsci.missouri.edu/soydoc/adapt.htm> (参照 2011-2-1),
- 5 Wohlleben, W.; Arnold, W.; Broer, I.; Hillemann, D.; Strauch, E.; Pühler, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 1988, 70(1), p.25-37.
- 10 Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Authony; Merlo, Donald J.; Jayakumar, Pon Samuel; Lin, Gaofeng. Novel herbicide resistance genes. 2007, WO 2007/053482 A2.
- 15 Wright, Terry R.; Shan, Guomin; Walsh, Terence A.; Lira, Justin M.; Cui, Cory; Song, Ping; Zhuang, Meibao; Arnold, Nicole L.; Lin, Gaofeng; Yau, Kerm; Russell, Sean M.; Cicchillo, Robert M.; Peterson, Mark A.; Simpson, David M.; Zhou, Ning; Ponsamuel, Jayakumar; Zhang, Zhanyuan. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(47), p.20240-20245.
- 20 Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito; Yasuda, Koji. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research*. 2006, 5(3), p.169-173.
- 25 財務省. “概況品別国別表”. 財務省貿易統計. 2013. <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=13&P=0>, (参照 2013-2-12).
- 食品安全委員会. 農薬評価書 グルホシネート. 2010. <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20070717010>, (参照 2013-2-12).
- 30 ダウ・ケミカル日本株式会社. 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 *aad-12*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4)の隔離ほ場試験結果報告書. 2013. (社内報告書)
- 鄭紹輝. “ダイズ”. 作物学概論. 大門弘幸 編著. 朝倉書店, 2008, p.132-146.

日本モンサント株式会社. 除草剤グリホサート耐性ダイズ (改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON89788, OECD UI: MON89788-1) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書. 2007. (社内報告書)

5 沼田真, 奥田重俊, 桑原義晴, 浅野貞夫, 岩瀬徹. 新版日本原色雑草図鑑. 沼田真, 吉沢長人 編集. 全国農村教育協会. 1978, p.107.

古谷義人. “ダイズ”. 農学大事典 -1977 訂正追補版-. 野口弥吉 監修. 養賢堂. 1977, p.501-508.

10 社内報告書 1 : DAS68416 ; 導入遺伝子のコピー数並びに世代間及び同一世代における安定性

緊急措置計画書

平成26年1月9日

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

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤アリルオキシアルカノエート系、
 グルホシネート及びグリホサート耐性ダイズ(改変*aad-12, pat*, 改変*cp4 epsps*,
Glycine max (L.) Merr.) (DAS68416×MON89788, OECD UI: DAS-68416-4
 ×MON-89788-1) (以下「本スタック系統ダイズ」という。)の第一種使用等に
 15 において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に明らかになった場
 合、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非表示) 平成26年1月現在

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

* : 管理責任者

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

5

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

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本スタック系統ダイズの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

10

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

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

15

20 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれがあると示唆された場合、直ちに農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課及び環境省 自然環境局 野生生物課に報告する。

25

資料一覧

5

資料 1 : 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 *aad-12*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4)」

【総合検討会 : 2013 年 8 月 6 日】

10

資料 2 : 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「除草剤グリホサート耐性ダイズ (改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON89788, OECD UI : MON-89788-1)」

15

【総合検討会 : 2007 年 10 月 4 日】

生物多様性影響評価検討会での検討の結果

名称：除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ
(改変 *aad-12*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI :

DAS-68416-4)

第一種使用等の内容：食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社

(1) 生物多様性影響評価の結果について

本組換えダイズは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) と大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pDAB2407 をもとに構築された pDAB4468 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入し作出されている。

本組換えダイズは、*Delftia acidovorans* 由来の改変 AAD-12 蛋白質をコードする改変 *aad-12* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の PAT 蛋白質をコードする *pat* 遺伝子及びタバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の核マトリックス結合領域 RB7 MAR (導入遺伝子発現の安定化を行う) を含む T-DNA 領域が染色体上に 1 コピー組み込まれ、複数世代にわたり安定して伝達されていることが遺伝子の分離様式及びサザンブロット分析により確認されている。

(ア) 競合における優位性

宿主が属する生物種であるダイズは、我が国において長期にわたり栽培されているが、自然環境下において雑草化しているとの報告はなされていない。

2012 年に我が国の隔離ほ場において、本組換えダイズの競合における優位性に係る諸形質について調査が行われた。その結果、形態及び生育の特性のうち、発芽率について統計学的有意差が認められたが、この違いが本組換えダイズの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。発芽率以外の項目については、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に差異は認められなかった。

本組換えダイズには、改変 *aad-12* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されており、改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質の産生により、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されているが、これらの除草剤が散布されることが想定しにくい自然条件下においてこれらの除草剤に耐性であることが競合における優位性を高めるとは考え難い。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えダイズの競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(イ) 有害物質の産生性

宿主が属する生物種であるダイズは、野生動植物等への有害物質を産生するとの報告はなされていない。

本組換えダイズは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変 AAD-12 蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質を産生するが、当該両蛋白質ともに有害物質としての報告は無く、既知アレルゲンと類似のある配列を有していないことも確認されている。

本組換えダイズと非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験が行われた。その結果、いずれの試験においても、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区間に統計学的有意差は認められなかった。除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性（急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性）はグルホシネートより低いことが確認されており、散布されたグルホシネート以上に *N*-アセチル-L-グルホシネートが影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれがないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(ウ) 交雑性

ダイズの近縁野生種としては我が国においてツルマメが自生しており、ともに染色体数が $2n=40$ で交雑可能であることから、影響を受ける可能性のある野生植物としてツルマメを特定し、以下のように検討を行った。

ダイズとツルマメとの人為的な交雑を行った雑種の生育には特に障害が見られないことから、我が国の自然環境下において本組換えダイズとツルマメが交雑した場合は、その雑種が生育するとともに、当該雑種からツルマメとの交雑を経て、本組換えダイズに導入された遺伝子がツルマメの集団中で拡散していく可能性がある。また、ツルマメは全国に分布し、河原や土手、畑の周辺や果樹園等に自生していることから、本組換えダイズが近接して生育した場合、交雑する可能性がある。

しかしながら、

ダイズとツルマメは自殖性植物であり、一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、それぞれの開花期間が重なりにくいことが知られているため、ダイズとツルマメの交雑は起こりにくいと考えられる。実際、比較的開花期が遅い我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメの平均交雑率は、0.73%であった

組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で、開花期が重複した条件下では、ツルマメより採種した種子から出芽した11,860個体中、交雑個体は1個体であった

開花期の遅い組換えダイズ2品種(AG6702RR及びAG5905RR)を用い、開花ピークを近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、25,741個体中、交雑個体はAG6702RRでは25個体(0.097%)、AG5905RRでは10個体(0.039%)であった。また、組換えダイズ(AG6702RR)から2、4、6、8、10m離してツルマメを栽培した場合は(それぞれ7,521個体中、7,485個体中、14,952個体中、14,964個体中、21,749個体中)、2、4、6mの距離で交雑個体はそれぞれ1個体であり、8、10mの距離では交雑個体は得られなかった

などの報告がある。

さらに、花粉の充実度については、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に差は認められなかった。同様に、花粉の形態や大きさにも相違は認められなかった。

以上のように、ダイズとツルマメの開花期は重なりにくく、その交雑率も低いことに加え、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に花粉の性状に関する差異が認められなかったことから、本組換えダイズとツルマメの自然条件下での交雑率は極めて低いと考えられる。さらに、ダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存できないと推察されることより、本組換えダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられた。

以上より、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価を踏まえた結論

以上を踏まえ、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、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

生物多様性影響評価検討会での検討の結果

- 1 (略)
- 2 (略)
- 3 (略)
- 4 (略)
- 5 名称：除草剤グリホサート耐性ダイズ

(改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr)

(MON89788, OECD UI: MON-89788-1)

第一種使用等の内容：食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、
保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

申請者：日本モンサント(株)

(1) 生物多様性影響評価の結果について

ア 競合における優位性

宿主が属する生物種であるダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) は、我が国において長期にわたり栽培されているが、自生化しているとの報告はなされていない。

本組換えダイズでは、移入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子によりグリホサート耐性が付与されている。しかし、自然環境下においてグリホサートが選択圧となることは想定されず、この形質により競合における優位性が高まるとは考えにくい。

我が国の隔離ほ場において、競合における優位性に関わる諸形質につ

いて調査が行われており、種子の百粒重にのみ、非組換えダイズとの間で有意差が認められた。しかしながら、この差異のみにより競合における優位性が高まるとは考えにくい。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

イ 有害物質の産生性

宿主が属する生物種であるダイズについては、野生動植物等への有害物質を産生するとの報告はなされていない。

本組換えダイズでは、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の産生性が付与されているが、本蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性は認められていない。また、本蛋白質は基質特異性が高く、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

我が国の隔離ほ場において、本組換えダイズの有害物質（根から分泌され他の植物に影響を与えるもの、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの、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）の産生性が調査されているが、非組換えダイズとの有意差は認められていない。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

ウ 交雑性

(ア) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国に自生しているツルマメ (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) は、ダイズと交雑することが知られているため、影響を受ける可能性のある野生植物としてツルマメが特定される。

(イ) 影響の具体的内容の評価

既存の文献によれば、ダイズとツルマメの雑種の生育や生殖には障害が見られないことから、我が国の自然環境下において本組換えダイズとツルマメが交雑した場合は、その雑種が生育するとともに、当該雑種からツルマメへの戻し交雑を経て、本組換えダイズに移入された遺伝子がツルマメの集団中で低い割合でとどまらずに拡散していく可能性がある。

(ウ) 影響の生じやすさの評価

ツルマメは全国の日当たりのよい野原、道ばた等に広く自生していることから、本組換えダイズが我が国において栽培された場合は、双方が近接して生育する機会があることは否定できない。しかしながら、

- a ダイズ及びツルマメは共に閉花受精を行う典型的な自殖性作物であり、また、一般にダイズの開花期はツルマメより 1 ヶ月近く早いこと、
- b 既存の文献によれば、開花時期がツルマメと重なるダイズの系統とツルマメを隣接して生育させた場合であっても、その交雑率は 1 %

未満であったこと、

c 我が国における隔離ほ場試験の結果から、本組換えダイズの交雑性は、従来のダイズと同程度であり、ツルマメとの交雑率も従来のダイズと同程度と考えられること、

d 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の発現により付与されるグリホサート耐性は自然環境下での選択圧に対して優位に働く可能性は低いと考えられること、

などから、我が国の自然環境下で本組換えダイズとツルマメが稀に近接して生育した場合であっても、それらが交雑する可能性及び移入された遺伝子がツルマメの集団中で低い割合でとどまらずに拡散していく可能性は、確率的に極めて低いと考えられる。

(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論

以上を踏まえ、本組換えダイズを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。