

p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ (改変 *avhppd, pat, Glycine max* (L.) Merr.)(SYHT0H2, OECD UI: SYN-000H2-5) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	2
第 1 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
和名、英名及び学名	2
宿主の品種又は系統名	2
国内及び国外の自然環境における自生地帯	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
国内及び国外における第一種使用等の歴史	2
主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
イ、基本的特性	4
ロ、生息又は生育可能な環境の条件	4
ハ、捕食性又は寄生性	4
二、繁殖又は増殖の様式	5
種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	5
栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	5
自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	5
花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	6
ホ、病原性	6
ヘ、有害物質の産生性	6
ト、その他の情報	7
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
(1) 供与核酸に関する情報	7
イ、構成及び構成要素の由来	7
ロ、構成要素の機能	10
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.....	10
目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び 当該蛋白質がアレルギー性(食品としてのアレルギー性を除く)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
宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	12
(2) ベクターに関する情報.....	17
イ、名称及び由来.....	17
ロ、特性.....	17
ベクターの塩基数及び塩基配列.....	17
特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能.....	18
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.....	18
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	18
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成.....	18
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法.....	20
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	20
核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	20
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.....	20
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.....	20
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性.....	21
移入された核酸の複製物が存在する場所(染色体上、細胞小器官内、原形 質内の別).....	21
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.....	22
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.....	23
(6)のイ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.....	23
ウイルス感染その他の経路を經由して移入された核酸が野生動植物等に 伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度.....	23
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性.....	23
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	24

移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容.....	24
以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	24
a 形態及び生育の特性.....	24
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	25
c 成体の越冬性.....	25
d 花粉の稔性及びサイズ.....	25
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	25
f 交雑率	26
g 有害物質の産生性.....	26
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	27
(1) 使用等の内容.....	27
(2) 使用等の方法.....	27
(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	27
(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.....	27
(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	27
(6) 国外における使用等に関する情報	27
第2 項目ごとの生物多様性影響評価	29
1. 競合における優位性.....	29
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	29
(2) 影響の具体的な内容の評価.....	30
(3) 影響の生じやすさの評価.....	30
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	30
2. 有害物質の産生性	30
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	30
(2) 影響の具体的な内容の評価.....	31
(3) 影響の生じやすさの評価.....	32
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	32
3. 交雑性.....	32
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	32

(2) 影響の具体的内容の評価.....	32
(3) 影響の生じやすさの評価.....	32
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	34
4. その他.....	34
第3 生物多様性影響の総合的評価.....	35
引用文献.....	37
緊急措置計画書.....	44

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 6 月 20 日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 シンジェンタジャパン株式会社

代表取締役社長 篠原 聡明

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

申請者

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社

代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ

住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

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	<i>p</i> -ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ(改変 <i>avhppd</i> , <i>pat</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (SYHT0H2, OECD UI : SYN-000H2-5)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

生物多様性影響評価書

第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

和名、英名及び学名

10

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15

宿主の品種又は系統名

宿主は無限伸育型のダイズ品種 Jack である。

国内及び国外の自然環境における自生地域

20

国内及び国外の自然環境におけるダイズの自生は知られていない。

25

Glycine 属 *Soja* 亜属には、栽培種であるダイズの他に、野生種である *G. soja* (和名：ツルマメ)及び *G. gracilis* が含まれる。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、ツルマメが栽培種であるダイズの祖先であり、また、*G. gracilis* はダイズとツルマメの中間的ないくつかの表現形質を有しており、ダイズの雑草型あるいは半野生型と考えられている。ツルマメは日本、中国、朝鮮半島、台湾及びロシアに自生しており、一方、*G. gracilis* は中国北東部で観察されている(OECD, 2000)。

30

我が国において、ツルマメは北海道、本州、四国及び九州で認められ(後藤, 2008)、その生育期間は3~10月で開花期は8~9月(新版 日本原色雑草図鑑, 1975)である。ツルマメは河川、水田、畑及び灌漑用水路等の周辺に主に自生している(Kuroda *et al.*, 2005)。

(2) 使用等の歴史及び現状

35

国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズは中国を原産とする最も古い栽培作物の一つと考えられ、紀元前 2838 年に中

5 国皇帝によって書かれた書物に記録が残されている。歴史的及び地理的な証拠から、ダイズは紀元前 17 世紀から紀元前 11 世紀の間に中国で最初に栽培化されたことが示唆されている。今日の最大のダイズ生産国である米国へ最初に導入されたのは 1765 年のことである(OECD, 2000)。また、我が国へ渡来した時期は 1900 ~ 2000 年前と推定され、平安時代にはかなり栽培が普及していたと考えられている(後藤, 2008)。

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

10 ダイズの栽培地域はアジアとアメリカ大陸に集中しており、2012 年におけるダイズの世界総栽培面積は 1 億 663 万ヘクタールで、その上位 5 カ国は米国(3,080 万ヘクタール)、ブラジル(2,494 万ヘクタール)、アルゼンチン(1,935 万ヘクタール)、インド(1,080 万ヘクタール)及び中国(675 万ヘクタール)であった。また、同年の世界総生産量は 2 億 5,314 万トンで、その上位 5 カ国は米国(8,205 万トン)、ブラジル(6,570 万トン)、アルゼンチン(5,150 万トン)、中国(1,280 万トン)及びインド(1,150 万トン)であった(FAO, 2013)。

15 なお、我が国におけるダイズの栽培面積と生産量は、2013 年でそれぞれ 12 万 8,700 ヘクタールと 19 万 8,000 トンであり、その栽培上位 5 都道府県は、北海道(2 万 6,800 ヘクタール)、宮城(9,540 ヘクタール)、佐賀(7,940 ヘクタール)、福岡(7,810 ヘクタール)及び秋田(7,410 ヘクタール)であった(農林水産省大臣官房統計部, 2014)。

20 ダイズは夏作物なので、基本的には春に播種し、秋に収穫する(国分, 2004)。播種適期は地域や品種によって異なるが、我が国においては、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・九州・四国では 6 月下旬から 7 月上旬である(鄭, 2008)。栽植密度は南北アメリカ諸国では極めて高いのに対し、我が国では低いが、これには品種の耐倒伏性と生育前期の降雨量・日射量等の差が関係している(国分, 2010)。

25 我が国は 2013 年に 276 万トンのダイズ子実を輸入しており、そのうち 166 万トン(60%)は米国からの輸入である。また、176 万トンのダイズ油かすも輸入しており、輸入量はインド 56 万トン(32%)、中国 54 万トン(31%)、ブラジル 21 万トン(12%)である(財務省, 2014)。輸入ダイズ子実の 191 万トンは搾油に利用されており(農林水産省食料産業局食品製造卸売課, 2014)、搾油後の油かす及び輸入油かすは、配合・混合飼料の原料として 2012 年度には 298 万トンが利用されている(配合飼料供給安定機構, 2013)。ダイズは搾油や飼料に利用されている他、豆腐・油揚げ、味噌、納豆、醤油、枝豆等の多岐にわたる食品として利用されている(農林水産省生産局農産部穀物課, http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_tisiki/index.html)。

35

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

5 ダイズは一年生の双子葉植物である。種子が発芽して最初に現れる子葉は対生し、次に単葉の初生葉が伸びて子葉と直角に対生し、その後、3枚の小葉(まれに4枚以上)からなる本葉が互生する。子葉の色は緑か紫である(OECD, 2000; 喜多村・国分, 2004; 後藤, 2008)。

10 莖は主莖と分枝に分けられ、主莖の本葉の葉腋から分枝が生じる。また、莖の伸長性に基づいて、中下位節の花芽分化後まもなく莖頂の生長が止まる有限伸育型、下位節の花芽分化後も莖頂の生長が長く続く無限伸育型、両者の中間である半無限伸育型に分類される(喜多村・国分, 2004; 大山, 2008; 後藤, 2008)。

15 花は各葉腋に着生する総状花序で、花色は白、青紫あるいは赤紫である。花芽分化には日長と温度が影響し、短日条件下で促進されるが、その感応性はダイズ品種間で多様である。開花はほとんど午前中に行われ、通常、受粉は開花前に終わっている。受粉した花は肥大して莢を形成し、普通は1莢当たり1~3粒の種子が稔実するが、まれに5粒の場合もある(喜多村・国分, 2004; 後藤, 2008; 昆野, 2008)。

20 なお、マメ科植物の特徴として、根には空気中の窒素固定能を持つ根粒菌が寄生して根粒が形成されるが、その程度はダイズ品種との親和性、土壌条件、日照等に影響される(喜多村・国分, 2004; 大山, 2008)。

ロ、生息又は生育可能な環境の条件

25 ダイズの発芽適温は30~35℃で10℃以下では極めて不良となる。発芽には種子に約50%の含水率が必要で、最適な土壌湿度はpF3.5程度である。生長及び開花の適温は25~30℃の間と考えられており、花芽分化には15℃以上であることが必要で、25℃前後までは花芽分化や開花に対して促進的に働く。また、生育期における土壌湿度はpF1.7程度が適切とされる。土壌pHの最適値は6.0~6.5であるが、pH4~7の範囲では生育及び収量に大きな差はなく、土壌に対する適応性は高い(後藤, 2008; 昆野, 2008)。

30 ダイズは短日植物であるが、日長や温度に対する反応が多様なため、今日、北緯50度から赤道直下まで、さらに南緯40度までの地域で栽培が行われている(橋本, 2008)。なお、宿主であるJackはGroup maturityに分類される品種で、米国において北緯40~42度の地域での栽培に適している(Nickell *et al.* 1990)。

35 ハ、捕食性又は寄生性

—

二、繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

5 ダイズの種子は莢内に稔実し、成熟後には裂莢して脱粒する。裂莢性には品種間差があり、一般的に日本の品種に比べて米国の無限伸育型品種は裂莢しにくい(大庭, 2008)。ダイズ種子は成熟期前に発芽能力が最高になり、その後、徐々に低下して回復することはない(異儀田, 2008)。また、栽培種のダイズ種子が休眠性を示すことはほとんどない(OECD, 2000)。

10 種子の寿命は保存条件によって異なり、種子含水率や温度が低いほど長くなる。種子を 20 で保存した場合、発芽力を失うまでの期間は、収穫時の一般的な種子含水率 18.1%で 5~9 ヶ月、収穫乾燥後の一般的な種子含水率 13.9%では 2 年未満であった。一方、10 で保存した場合、発芽力を失うまでの期間は、収穫時の一般的な種子含水率 18.1%で 2 年程度、収穫乾燥後の一般的な種子含水率 13.9%では 8 年程度と長くなる(昆野, 2008)。以上のことから、湿度や気温の変動する自然条件下では、発芽能力は急速に低下すると考えられる。

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

20

ダイズは種子繁殖する一年生植物であり、種子以外に自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官を持たない。

25

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

ダイズの場合、受粉は開花前に蕾の中で終わるために自殖性が極めて高く、他殖率は通常 1%以下である(OECD, 2000; 昆野, 2008)。

30

ダイズと交雑可能な近縁野生種として我が国にはツルマメが自生している(後藤, 2008)。ツルマメはダイズと同じ *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するつる性の一年生植物であり、我が国におけるツルマメの開花期は 8~9 月である(OECD, 2000; 新版 日本原色雑草図鑑, 1975)。一般にダイズよりも 1 ヶ月近く遅いので開花期が重複する可能性は低い。秋ダイズ型品種のように播種時期が遅いと、開花期が重複する可能性が高まる(Mizuguchi *et al.*, 2008)。ツルマメの他殖率については、平均 2.2~2.3%と報告されている(Kiang *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 2008)。これに対し、平均 13%であったとの報告もあるが、これは訪花昆虫が多かったこと等によると考察されている(Fujita *et al.*, 1997)。

35

Nakayama and Yamaguchi (2002)は、ツルマメと開花期が比較的重複する日本品種である丹波黒を花粉親にし、0.5m 間隔の 5×12 列で交互に各 30 個体を配置して自然交雑試験を行った結果、ツルマメから収穫した種子の合計 686 個体中 5 個体がダイズとの雑種であり、交雑率は 0.73%であったと報告している。

5 また、独立行政法人 農業環境技術研究所において 2005～2007 年の 3 年間、除草剤耐性ダイズを花粉親に用いたツルマメとの自然交雑試験が行われた。2005 年と 2006 年の試験結果では、ツルマメをダイズにからみつくほど近づけて栽培した混植区でも、開花期がほぼ重複しない場合はダイズと交雑したツルマメ雑種は認められなかった。一方、開花期ができるだけ重複するように栽培した場合、収穫したツルマメ種子の 11,860
10 個体中で 1 個体の交雑雑種(交雑率：0.0084%)が検出された。さらに、試験を実施した 3 年間で開花期が最も重複していた 2007 年の試験結果では、ツルマメをダイズにからみつくほど近づけて栽培した混植区のツルマメ収穫種子の 25,741 個体中で 35 個体の交雑雑種(交雑率：0.136%)が検出されたが、花粉親から 8m 及び 10m 離れたツルマメ栽培区では交雑雑種は検出されなかった(Mizuguti *et al.*, 2009, 2010)。

15 以上のように、ダイズはツルマメと自然交雑して雑種を生じることがあるが、その可能性は極めて低いことが知られている。

 なお、ダイズがアポミクシスを生じる特性を有するとの報告はない。

20 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

 ダイズの花形状は球形から扁球形で、平均直径は 21～30 μ m である(Carlson and Lersten, 2004)。花粉飛散に関しては、2001～2004 年の 4 年間、除草剤耐性ダイズを花粉親に用いた非組換えダイズとの自然交雑試験が行われたが、2001 年の最も近接させた栽培区(0.7m)での交雑率 0.19%が最大で、10.5m 離れた栽培区では 4 年とも交雑率は 0%であったことが報告されている(Yoshimura *et al.*, 2006)。また、花粉の寿命は短く、8 時間保管した花粉の発芽率は 2%以下であることが報告されている(Abel, 1970)。

30 ホ、病原性

—

 へ、有害物質の産生性

35 ダイズにおいて、野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ト、その他の情報

我が国には1996年以降遺伝子組換えダイズが輸入されているが、ダイズの輸入実績港10港の周辺地域で平成21～24年度に行われた調査の結果、ダイズ(遺伝子組換えを含む)やツルマメの生育は確認されているものの、ツルマメと遺伝子組換えダイズとの交雑体は見つかっていない(農林水産省消費・安全局農産安全管理課, 2011a, 2011b, 2012, 2013)。

10 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ、構成及び構成要素の由来

p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(以下、「HPPD」という。)阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ(改変 *avhppd*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.)(SYHT0H2, OECD UI : SYN-000H2-5)(以下、「本組換えダイズ」という。)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1(7～9 ページ)に示した。また、供与核酸の塩基配列を別紙 1(社外秘情報により非開示)に示した。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた供与核酸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
改変 <i>avhppd</i> 遺伝子カセット		
FMV エンハンサー	194	Figwort mosaic virus(FMV)由来のエンハンサー領域(Maiti <i>et al.</i> , 1997)で、転写活性を高める。
35S エンハンサー	293	Cauliflower mosaic virus(CaMV)由来の 35S エンハンサー領域(Ow <i>et al.</i> , 1987)で、転写活性を高める。
SMP プロモーター	39	Cestrum yellow leaf curling virus 由来の TATA box 配列(Stavolone <i>et al.</i> , 2003a)と、Cauliflower mosaic virus(CaMV)由来の 35S プロモーターの 3'末端領域から TATA box までの配列(Ow <i>et al.</i> , 1987)を組合わせて合成した、プロモーターとして機能する必要最小限の植物の合成プロモーター(Synthetic minimal plant promoter)。恒常的(全ての組織で機能する)プロモーター由来であることから、SMP プロモーターも恒常的に転写を誘導すると考えられる。

TMV エンハンサー	68	Tobacco mosaic virus(TMV)由来のオメガ配列(5'末端側非翻訳リーダー配列)(Gallie <i>et al.</i> , 1987)で、植物での翻訳活性を高める(Gallie, 2002)。
改変 <i>avhppd</i> 遺伝子	1,320	エンバク(<i>Avena sativa</i> L.)由来の <i>p</i> -ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(改変 AvHPPD 蛋白質)をコードする遺伝子。コドンサイズでの発現のために最適化して人工的に合成した。なお、クローニングの過程でエンバク HPPD 蛋白質における 1 アミノ酸(109 又は 110 番目の Ala)を欠失したことから、エンバク HPPD 蛋白質とはアミノ酸配列で 99.8%の相同性を持つ。HPPD 蛋白質は、チロシン代謝経路におけるプラストキノンやビタミン E 生成に必要な芳香族前駆体であるホモゲンチジン酸生成を触媒する酵素であり、HPPD 阻害型除草剤はこの酵素活性を阻害することで植物を枯死させる(Matringe <i>et al.</i> , 2005)。サイズの内在性 HPPD 蛋白質が HPPD 阻害型除草剤によって活性を阻害されるのに対し、改変 <i>avhppd</i> 遺伝子がコードする改変 AvHPPD 蛋白質は、HPPD 阻害型除草剤の存在下でも酵素活性を示し、その結果、植物に HPPD 阻害型除草剤耐性を付与する。
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>pat</i> 遺伝子(<i>pat-03-01</i>)カセット		
35S プロモーター	521	Cauliflower mosaic virus(CaMV)由来のプロモーター領域(Ow <i>et al.</i> , 1987)で、目的遺伝子を恒常的に転写させる。
<i>pat</i> 遺伝子 (<i>pat-03-01</i>)	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> strain Tü494 由来で、ホスフィンオスリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードする遺伝子。発現を高めるために野生型のコード配列(Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)のコドン最適化した(Strauch <i>et al.</i> , 1994)。PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化して不活化することで植物にグルホシネート耐性を付与する。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>pat</i> 遺伝子(<i>pat-03-02</i>)カセット		
CMP プロモーター	654	Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター及びリーダー配列(Stavolone <i>et al.</i> , 2003b)で、目的遺伝子を恒常的に転写させる。

TMV エンハンサー	68	Tobacco mosaic virus(TMV)由来のオメガ配列(5'末端側非翻訳リーダー配列)(Gallie <i>et al.</i> , 1987)で、植物での翻訳活性を高める(Gallie, 2002)。
<i>pat</i> 遺伝子 (<i>pat-03-02</i>)	552	<i>S. viridochromogenes</i> strain Tü494 由来で、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードする遺伝子。発現を高めるために野生型のコード配列(Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)のコドン最適化する(Strauch <i>et al.</i> , 1994)とともに、 <i>pat-03-01</i> と同じ制限酵素認識部位を持たないように塩基配列を改変した。PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化して不活化することで植物にグルホシネート耐性を付与する。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
境界領域		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA 左側境界領域で、植物ゲノムへの T-DNA 領域の組み込みに必要な領域(Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA 右側境界領域で、植物ゲノムへの T-DNA 領域の組み込みに必要な領域(Wang <i>et al.</i> , 1984)。
外側骨格領域 (本組換えサイズには存在しない)		
<i>spec</i>	789	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ遺伝子(<i>aadA</i>) (Fling <i>et al.</i> , 1985)。ストレプトマイシンやスペクチノマイシン耐性を付与するため、細菌の選抜マーカーとして使用した。
<i>virG</i>	726	pAD1289 由来の VirGN54D 遺伝子で、アグロバクテリウム法による効率的な植物の形質転換に必要(Hansen <i>et al.</i> , 1994)。
<i>repA</i>	1,074	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来の pVS1 複製蛋白質をコードする遺伝子で、植物に寄生するグラム陰性菌中で機能する最小の pVS1 レプリコンの一部(Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
VS1 ori	405	<i>P. aeruginosa</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点と分断領域の共通配列で、 <i>A. tumefaciens</i> の複製開始点として機能する(Itoh <i>et al.</i> , 1984)。
ColE1 ori	807	大腸菌由来のプラスミドの複製起点(Itoh and Tomizawa, 1979)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

ロ、構成要素の機能

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

5

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(7~9 ページ)に示した。

10

目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性(食品としてのアレルギー性を除く)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

改変AvHPPD蛋白質

15

HPPD 阻害型除草剤は、植物のチロシン代謝経路におけるフマル酸、アセト酢酸、プラストキノン並びにビタミンEの生成に必要な芳香族前駆体であるホモゲンチジン酸形成を触媒する *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(HPPD 蛋白質)の酵素活性を阻害することで植物を枯死させる (Matringe *et al.*, 2005) (図 1、11 ページ)。

20

25

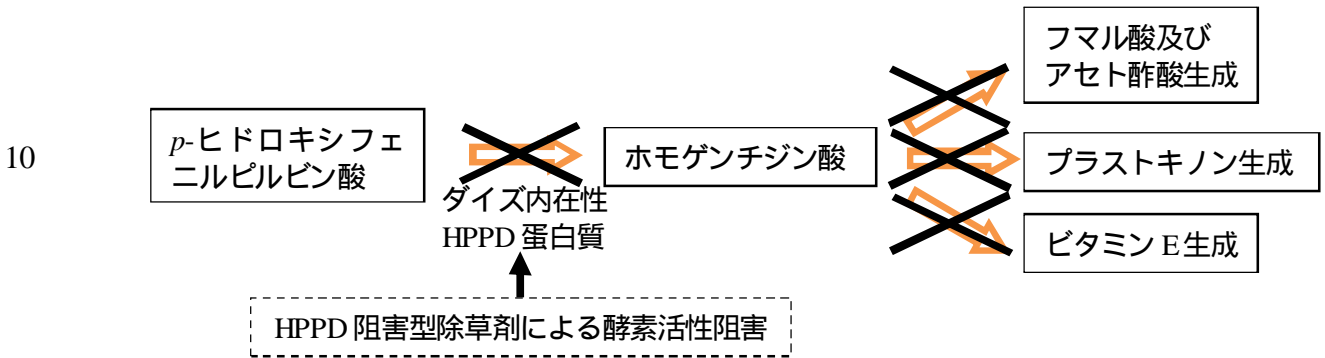
単子葉植物由来の HPPD 蛋白質と双子葉植物由来の HPPD 蛋白質では、HPPD 阻害型除草剤であるメソトリオンへの親和性に違いがあることが明らかとなっている(別紙 2、社外秘情報により非開示)。ダイズと同じ双子葉植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)由来の HPPD 蛋白質とメソトリオンは非常に安定した複合体を形成し、その複合体の半減期は 25 で約 2 日と推定された(別紙 2、社外秘情報により非開示)。一方、単子葉植物であるエンバクの HPPD 蛋白質由来である改変 AvHPPD 蛋白質とメソトリオンとの結合は比較的弱く、改変 AvHPPD 蛋白質 - メソトリオン複合体の半減期は約 15 分であった(別紙 2、社外秘情報により非開示)。また、メソトリオンに対する阻害定数(K_i 値)は、改変 AvHPPD 蛋白質で 11nM、シロイヌナズナ由来の HPPD 蛋白質で 0.015nM と推定された。阻害定数は、酵素と阻害剤が会合した酵素 - 阻害剤複合体の解離定数で、阻害剤の阻害剤結合部位への親和性を示し、値が小さいほど親和性が強い(生化学辞典, 2007)。このように、メソトリオンに対する改変 AvHPPD 蛋白質の親和性はシロイヌナズナ由来の HPPD 蛋白質に比べて弱いことから、改変 AvHPPD 蛋白質に対するメソトリオンの阻害効果はシロイヌナズナ由来の HPPD 蛋白質に比べて弱いと考えられる。以上のことから、双子葉植物であるダイズに改変 AvHPPD 蛋白質をコードする改変 *avhppd* 遺伝子を導入することで、HPPD 阻害型除草剤に耐性を付与することが期待され、本組換えダイズが作出された(図 1、11 ページ)。

35

改変 AvHPPD 蛋白質が既知アレルゲンと相同性を持たないことを、FARRP AllergenOnline Database を用いた相同性検索によって 2012 年に確認した。

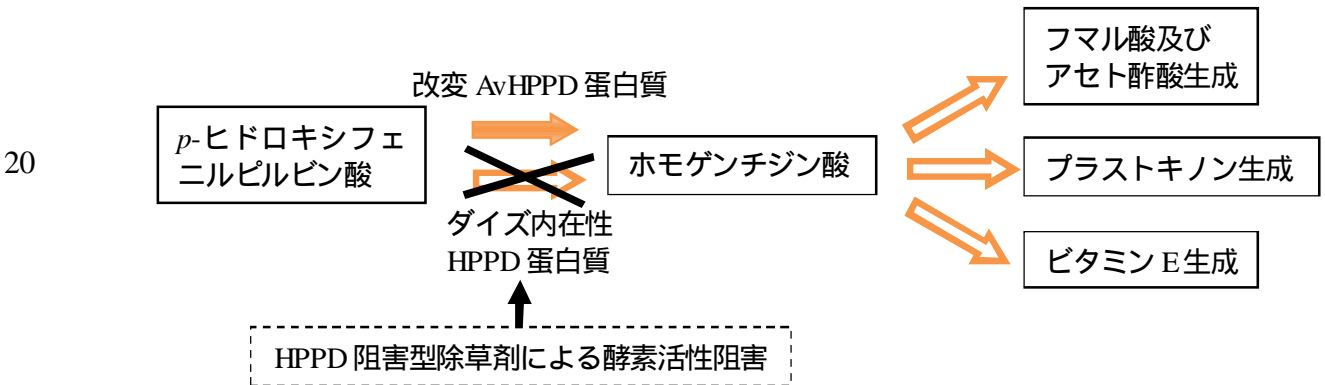
5

A. 非組換えダイズへの HPPD 阻害型除草剤処理 白化症状、枯死



15

B. 本組換えダイズへの HPPD 阻害型除草剤処理 除草剤耐性



25

図 1 本組換えダイズにおける HPPD 阻害型除草剤耐性の作用機作

HPPD 蛋白質は *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応を触媒するが、ダイズ内在性の HPPD 蛋白質活性は HPPD 阻害型除草剤によって阻害されるため、非組換えダイズでは白化症状が現れて植物体は枯死する(A)。一方、改変 AvHPPD 蛋白質を発現する本組換えダイズでは、HPPD 阻害型除草剤の存在下でも *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応が触媒され、HPPD 阻害型除草剤耐性を示す(B)。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

30

35 PAT 蛋白質

植物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役

5 割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、植物は枯死する。一方、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートをアセチル化して *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝し、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する(OECD, 1999)。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても植物は枯死しない。

PAT 蛋白質が既知アレルゲンと相同性を持たないことを、FARRP AllergenOnline Database を用いた相同性検索によって 2012 年に確認した。

10 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

本組換えダイズで発現する蛋白質は、HPPD 阻害型除草剤の存在下でも HPPD 蛋白質として機能する改変 AvHPPD 蛋白質と、除草剤グルホシネートをアセチル化して不活化する PAT 蛋白質である。

15

HPPD 蛋白質はチロシン代謝経路において *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応を触媒する酵素であり、産生されるホモゲンチジン酸からフマル酸、アセト酢酸、プラストキノン並びにビタミン E(トコフェロール、トコトリエノール)が生成される(Arias-Barrau *et al.*, 2004; Moran, 2005; DellaPenna and Pogson, 2006; Zbierzak *et al.*, 2010)(図 2、14 ページ)。

20

哺乳類由来の HPPD 蛋白質では、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸以外に生体内で基質となりうる成分があることが報告されている(Fellman *et al.*, 1972; Baldwin *et al.*, 1995; Crouch *et al.*, 1997)。これらのうち、植物体内に存在することが知られており、市販もされている *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸のアナログ 3 種(フェニルピルビン酸、 α -ケトイソカプロン酸、 β -ケト- γ -メチルチオ酪酸)を改変 AvHPPD 蛋白質と反応させて活性を比較した(別紙 3、社外秘情報により非開示)。ただし、アナログ 3 種は活性が低いことが見込まれていたため、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の場合よりも改変 AvHPPD 蛋白質の添加量を 10 倍、反応時間を 2 倍として試験を行った。その結果、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸を 100%とした時の相対反応速度はフェニルピルビン酸で 4.2%、 α -ケトイソカプロン酸及び β -ケト- γ -メチルチオ酪酸で検出限界値以下(<0.3%)であった(別紙 3、社外秘情報により非開示)。このように、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸よりも酵素量を増やし、反応時間を長くした有利な条件下であってもこれらアナログに対する活性は低かった。なお、最も活性が高かったフェニルピルビン酸も、実際の植物体内には競合する生体内物質が存在すること、植物組織中で稀にしか検出されないことから(Maeda and Dudareva, 2012)、本組換えダイズの植物体中でフェニルピルビン酸が改変 AvHPPD 蛋白質の基質となる可能性は極めて低い。このように、改変 AvHPPD 蛋白質は *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸に

25

30

35

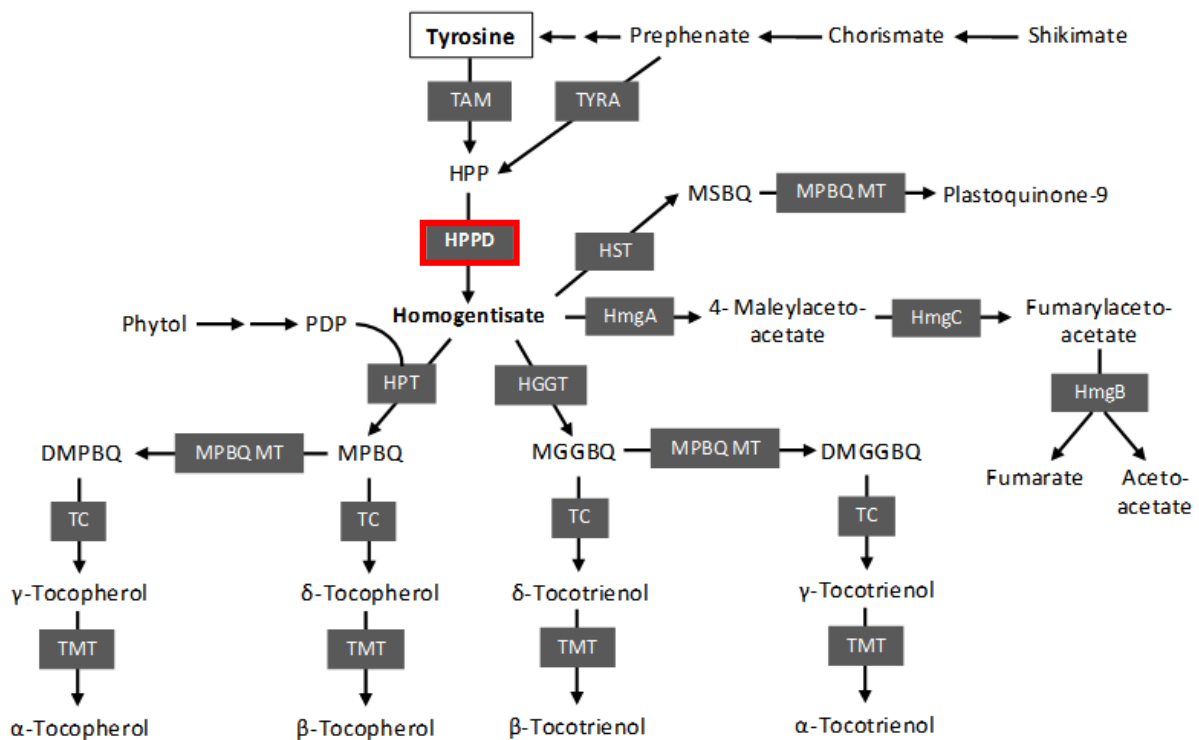
高い基質特異性を有することから、生体内において改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝経路に非意図的な影響を及ぼすことはないと考えられる。

5 これまでの研究から、チロシン代謝経路において、HPPD 蛋白質を単独で過剰発現
させただけでは、下流の最終代謝産物であるトコフェロール量やプラストキノン量が、
増加しない又は著しくは増加しないことが報告されている (Tsegaye *et al.*, 2002; Falk
et al., 2003; Rippert *et al.*, 2004; Karunanandaa *et al.*, 2005)。一方、トコフェロー
ル量は、HPPD 蛋白質の下流代謝酵素であるホモゲンチジン酸フィチルトランスフェ
10 ラーゼ(HPT)やトコフェロールサイクラーゼ(TC)の過剰発現によって、著しく増加す
ることが示されている (Collakova and DellaPenna, 2003; Kanwischer *et al.*, 2005;
Lee *et al.*, 2007)。加えて、HPPD 蛋白質の基質である *p*-ヒドロキシフェニルピルビ
ン酸は植物においてチロシンから生成されるが、チロシンの生合成はチロシン自身に
よるフィードバック阻害によって調節されており (Siehl, 1999; Rippert and
Matringe, 2002)、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の生成はこの制御下にある。これ
15 らのことから、HPPD 蛋白質の過剰発現は宿主の持つ代謝系に影響を及ぼさないか、
仮に影響を及ぼすとしてもその影響は小さいと考えられる。

実際に、本組換えダイズにおける改変 AvHPPD 蛋白質の発現が宿主の持つ代謝系
に及ぼす影響について、2010 年に米国 8 ヶ所のほ場(アイオワ州リッチランド、ネブ
20 ラスカ州ヨーク、ミズーリ州フィスク、イリノイ州スチュワードソン、ノースカロラ
イナ州メバネ、ペンシルベニア州ハンブルグ、イリノイ州カーライル及びインディア
ナ州ロックヴィル)で栽培した本組換えダイズと対照の非組換えダイズを用いて、種子
中のビタミン E を分析するとともに、種子と茎葉の主要構成成分を分析して検討した
(表 2~4、15~17 ページ)。その結果、ビタミン E として種子で定量できた α -トコ
25 フェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロールのうち、 α -トコフェロール及び
 γ -トコフェロールにおいて本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意
差が認められた(表 2、15 ページ)。しかし、本組換えダイズのこれらの分析値は、非
組換えダイズよりも有意に増加していたものの、同一ほ場で栽培した参考品種の範囲
内であった。種子と茎葉の主要構成成分の分析では、茎葉の脂質のみ本組換えダイズ
30 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められたものの、それ以外の主要構成
成分で統計学的有意差は認められなかった(表 3~4、16~17 ページ)。また、統計学
的有意差が認められた成分も含めて、本組換えダイズの分析値はいずれも同一ほ場で
栽培した参考品種の範囲内であった。以上のように、本組換えダイズの分析値はいず
35 れの項目においても従来のダイズの変動の範囲内であったことから、本組換えダイズ
で発現している改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝系に及ぼす影響は小さいと考えら
れる。

PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化することで、*N*-アセチル-L-グルホシネ

ートへと代謝する酵素である。PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い親和性を示すものの、他の各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどない(Thompson *et al.*, 1987)。よって、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない。また、
 5 過剰の各種アミノ酸の存在下でも、PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応が阻害されることはなかった(Wehrmann *et al.*, 1996)。このように、PAT 蛋白質が高い基質特異性を有することから、生体内において PAT 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。



10

図 2 チロシン代謝経路図 (別紙 2、社外秘情報により非開示)

反応生成物略語の名称：

15 HPP=*p*-hydroxyphenylpyruvate、PDP=phytyldiphosphate、
 MSBQ=2-methyl-6-solanyl-1,4-benzoquinone、MPBQ=2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone、
 DMPBQ=2,3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone、
 MGGBQ=2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone、
 DMGGBQ=2,3-dimethyl-5-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone。

20 反応酵素略語(白抜き英文字)の名称：

TYRA=bifunctional chorismate mutase-prephenate dehydrogenase、
 TAM=L-tyrosine aminotransferase、HPPD=*p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase、
 HST=homogentisate solanyltransferase、MPBQ MT=MPBQ methyltransferase、
 HmgA=homogentisate dioxygenase、HmgB=fumarylacetoacetate hydrolase、
 25 HmgC=maleylacetoacetate isomerase、HPT=homogentisate phytyltransferase、
 HGGT=homogentisate geranylgeranyl transferase、
 TC=tocopherol cyclase、TMT=tocopherol methyltransferase

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

表 2 種子におけるビタミンEの分析結果

ビタミン E (mg/g 乾燥重)	本組換え ダイズ ^{ab}	非組換え ダイズ ^a	p 値 ^c	ダイズ 参考品種 ^d	従来品種の文献値 (ILSI, 2010) ^e
-トコフェロール	0.0241	0.0258	0.145	0.0115-0.0771	0.0019-0.0617
-トコフェロール	- ^f	-	-	<LOQ-0.00779	ND ^h
-トコフェロール	0.214	0.201	0.004 ^{*g}	0.127-0.236	ND
-トコフェロール	0.0760	0.0611	<0.001 [*]	0.0320-0.112	ND
-トコトリエノール	-	-	-	<LOQ	ND
-トコトリエノール	-	-	-	<LOQ	ND
-トコトリエノール	-	-	-	<LOQ	ND
-トコトリエノール	-	-	-	<LOQ	ND

a : 8 カ所のほ場における 4 反復(N=32)の平均値。

b : 本葉 3 葉(V3)期 ~ 本葉 4 葉(V4)期に除草剤メソトリオン 0.11kg active ingredient (a.i.)/ha とグルホシネート 0.45kg a.i./ha を散布した。

5 c : 混合モデルを使った分散分析(ANOVA)により本組換えダイズと非組換えダイズの統計的有意性を検定した。

d : 8 カ所のほ場で同時に栽培された 6 つのダイズ商業品種(N=192)における範囲。

e : ILSI Crop Composition Database に登録されたダイズ従来品種の分析値。ビタミン E として報告されており、引用時の分析数は N=234 (ILSI, 2010)。

10 f : 「-」は各ほ場における分析値のいくつか又は全てが定量限界値 (LOQ)以下だったので計算しなかったことを示す。なお、トコフェロールとトコトリエノールの LOQ はいずれも 0.0053-0.0058mg/g DW であった。

g : 太字・斜体・アスタリスク(*)の数値は、統計学的有意差が認められたことを示す。

h : ND=No data (データなし)。

15 (本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

表 3 種子における主要構成成分の分析結果

項目 (%) ^a	本組換え ダイズ ^{b,c}	非組換え ダイズ ^b	<i>p</i> 値 ^d	ダイズ 参考品種 ^e	従来品種の文献値 (ILSI, 2010) ^f
水分	8.80	8.70	0.429	6.10-14.30	4.7-34.4
蛋白質	38.4	38.2	0.642	30.6-44.4	33.19-45.48
脂質	20.6	20.7	0.294	15.8-25.0	8.104-23.562
灰分	5.17	5.25	0.200	4.14-6.59	3.885-6.994
炭水化物	35.9	35.7	0.716	25.2-43.8	29.6-50.2
ADF ^g	14.6	14.8	0.591	8.20-20.6	7.81-18.61
NDF ^h	16.4	16.7	0.451	11.2-21.9	8.53-21.25

a : 水分のみ%新鮮重。その他の項目は%乾燥重。

b : 8カ所のほ場における4反復(N=32)の平均値。ただし、本組換えダイズの灰分のみ N=31 の平均値。

c : 本葉3葉(V3)期～本葉4葉(V4)期に除草剤メソトリオン 0.11kg a.i./ha とグルホシネート 0.45kg a.i./ha を散布した。

d : 混合モデルを使った分散分析(ANOVA)により本組換えダイズと非組換えダイズの統計的有意性を検定した。

e : 8カ所のほ場で同時に栽培された6つのダイズ商業品種(N=192)における範囲。

f : ILSI Crop Composition Database に登録されたダイズ従来品種の分析値。引用時の水分、蛋白質、脂質、灰分及び炭水化物の分析数は N=323、ADF 及び NDF の分析数は N=149 (ILSI, 2010)。

g : ADF=酸性デタージェント繊維。

h : NDF=中性デタージェント繊維。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

表 4 茎葉における主要構成成分の分析結果

項目 (%) ^a	本組換え ダイズ ^{b,c}	非組換え ダイズ ^b	<i>p</i> 値 ^d	ダイズ 参考品種 ^e	従来品種の文献値 (ILSI, 2010) ^f
水分	70.8	69.9	0.105	53.2-76.4	73.5-81.6
蛋白質	18.7	18.4	0.418	12.0-25.1	14.38-24.71
脂質	5.66	6.15	0.039 ^{*g}	2.68-11.40	1.302-5.132
灰分	6.74	6.73	0.944	5.06-8.88	6.718-10.782
炭水化物	68.9	68.7	0.671	58.9-75.2	59.8-74.7
ADF ^h	26.3	27.3	0.183	18.4-38.3	ND ^j
NDF ⁱ	32.0	32.6	0.432	23.0-44.2	ND

a : 水分のみ%新鮮重。その他の項目は%乾燥重。

b : 8 ヲ所のほ場における 4 反復(N=32)の平均値。

5 c : 本葉 3 葉(V3)期 ~ 本葉 4 葉(V4)期に除草剤メソトリオン 0.11kg a.i./ha とグルホシネート 0.45kg a.i./ha を散布した。

d : 混合モデルを使った分散分析(ANOVA) により本組換えダイズと非組換えダイズの統計的有意性を検定した。

e : 8 ヲ所のほ場で同時に栽培された 6 つのダイズ商業品種(N=192)における範囲。

10 f : ILSI Crop Composition Database に登録されたダイズ従来品種の分析値。引用時の水分、蛋白質、脂質、灰分及び炭水化物の分析数はいずれも N=72 (ILSI, 2010)。

g : 太字・斜体・アスタリスク(*)の数値は、統計学的有意差が認められたことを示す。

h : ADF=酸性デタージェント繊維。

i : NDF=中性デタージェント繊維。

j : ND=No data (データなし)。

15 (本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

(2) ベクターに関する情報

20 イ、名称及び由来

本組換えダイズの作出に用いたベクターは pSYN15954 である。このベクターは大腸菌由来の pBluescript SK+等を基に構築された。

25 ロ、特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

30 ベクターの塩基数は10,904bpであり、その塩基配列は明らかにされている(別紙1、社外秘情報により非開示)。

特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

5 ベクターには、微生物を用いてベクターを構築する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を発現する *spec* 遺伝子が含まれるものの、本組換えダイズ中にこの遺伝子は導入されていない。

ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

10 ベクター中に感染性を示すような配列はない。

(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

15 本組換えダイズの作出に用いたベクター pSYN15954 の各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、本組換えダイズに移入された核酸の構成を図 3 (19 ページ) に示した。

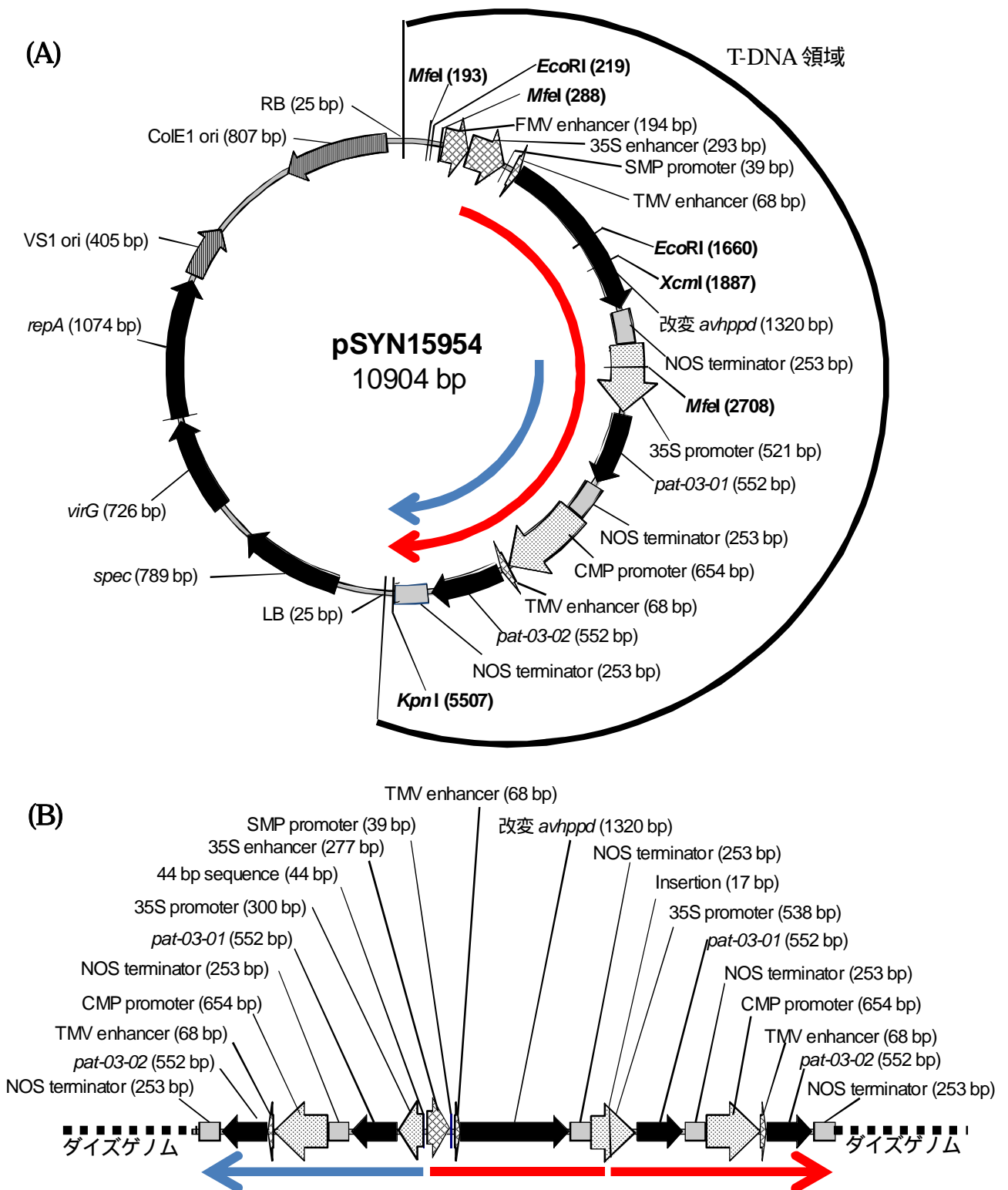


図 3 ベクターpSYN15954(A)及び本組換えゲノムに移入された核酸の構成(B)

5 (A)のRBとLBに挟まれた部分がT-DNA領域。実際に本組換えゲノムに移入された核酸の構成を分析した結果、ベクターpSYN15954の2つのT-DNA断片が、改変 *avhppd* 遺伝子の配列と類似する44bpのDNA配列を挟んで逆方向に挿入されていた。また、ベクターpSYN15954では521bpのサイズであった35Sプロモーターは、内部に17bpのDNA配列が挿入されたため、サイズが538bpであった(B) (別紙4、社外秘情報により非開示)。

10 (本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の導入はアグロバクテリウム法により行った。

5 八、遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

10 ベクターpSYN15954 を含むアグロバクテリウムと共存培養したダイズ未熟種子を、
グルホシネートを含む培地で培養することにより選抜した。

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

15 核酸の導入後、アグロバクテリウムの除菌のためにセフトキシム等の抗生物質を
添加した培地で培養した。その後、本組換えダイズの T0 世代や複数の後代系統(T2
~ T7、F2、BC2F2、BC3F2 の各世代)の葉から DNA を抽出し、ベクターの外側骨格
領域に存在する *spec* 遺伝子の欠如を PCR により確認していることから、本組換えダ
イズにおいて菌体の残存はないと考えられる。

20

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

25

選抜細胞から再分化した植物体について、改変 *avhppd* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *spec*
遺伝子の存在の有無を PCR により確認した。その中で、改変 *avhppd* 遺伝子及び *pat*
遺伝子が存在し、*spec* 遺伝子の欠如が確認された植物体を本組換えダイズの T0 世代
として選抜した。

30

生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために供試した世代の育成の経過を、
図 4(21 ページ)に示した。なお、承認申請の対象となるのは、図 4 で示した 社外秘情
報により非開示 である。

35

本組換えダイズの我が国における申請及び承認状況は表 5(21 ページ)のとおりであ
る。

5

社外秘情報により非開示

10

図 4 本組換えダイズの育成図

15

表 5 我が国における申請及び承認状況 (2014年8月現在)

申請先	目的	申請・承認状況
農林水産省・環境省	環境 (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) ^a	2012年9月承認
農林水産省・環境省	環境 (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) ^a	2014年6月申請
厚生労働省	食品 ^b	2013年8月申請
農林水産省	飼料 ^c	2013年8月申請

a : 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に基づく。

b : 食品衛生法に基づく。

c : 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

20

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入された核酸の複製物が存在する場所(染色体上、細胞小器官内、原形質内の別)

25

本組換えダイズの複数世代を用いて改変 *avhppd* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の有無を確認する PCR 分析を行い、挿入遺伝子の分離比評価を行った。その結果、改変 *avhppd* 遺伝子及び *pat* 遺伝子のどちらも、各世代における分離比がメンデルの法則に基づく分離期待値と矛盾しないことから、移入された核酸は染色体上に存在することが確認された(表 6、22 ページ)。

30

表 6 PCR 分析による挿入遺伝子の分離比 (別紙 5、社外秘情報により非開示)

	F2		BC2F2		BC3F2	
	実測値	期待値	実測値	期待値	実測値	期待値
陽性個体数 ^a	115	123	99	104.25	134	131.25
陰性個体数 ^a	49	41	40	34.75	41	43.75
合計個体数	164	164	139	139	175	175
カイ二乗値 ^b	2.08		1.06		0.23	

a：陽性個体は改変 *avhppd* 遺伝子及び *pat* 遺伝子どちらも陽性、陰性個体はどちらも陰性であった。

b：カイ二乗検定(Strickberger, 1976)により適合度を検定した。5%水準での棄却値は 3.84 で (Strickberger, 1976)、上記のカイ二乗値はいずれも棄却値以下なので、実測値はメンデルの分離法則と矛盾しない。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

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

本組換えダイズに挿入された塩基配列を分析した結果、ベクター pSYN15954 の 2 つの T-DNA 断片が、改変 *avhppd* 遺伝子の配列と類似する 44bp の DNA 配列を挟んで逆方向に挿入されていた(図 3、19 ページ)。2 つの T-DNA 断片のうち、5'末端側のコピーには、RB、改変 *avhppd* 遺伝子カセット全体、*pat-03-01* 遺伝子カセットの 35S プロモーターの一部及び LB が存在しなかった。一方、3'末端側のコピーには、RB、改変 *avhppd* 遺伝子カセットの FMV エンハンサー全体と 35S エンハンサーの一部及び LB が存在しなかった。さらに、3'末端側のコピーの 35S プロモーター領域内部には、17bp の DNA 配列が挿入されていたが、この配列の最後の 15bp は、17bp の DNA 配列上流の複製配列であった(別紙 4、社外秘情報により非開示)。

次に、複数世代における伝達の安定性を調査するため、本組換えダイズの複数世代から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクター pSYN15954 の T-DNA 領域及び外側骨格領域をプローブとして、サザンブロット分析を行った(別紙 6、社外秘情報により非開示)。T-DNA 領域をプローブに用いたサザンブロット分析の結果、本組換えダイズの塩基配列の分析結果から予想されたサイズのバンドが複数世代で検出された(別紙 6、社外秘情報により非開示)。さらに、ベクター pSYN15954 の外側骨格領域をプローブとして用いたサザンブロット分析の結果、本組換えダイズに T-DNA 以外の領域は挿入されていないことが確認された(別紙 6、社外秘情報により非開示)。

以上の結果から、本組換えダイズにはベクター pSYN15954 の T-DNA 領域由来の配列がゲノムの 1 ヶ所に挿入されており、後代へ安定して伝達していることが確認された。

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

5 本組換えダイズには、ベクター-pSYN15954の2つのT-DNA断片が、改変*avhppd*遺伝子の配列と類似する44bpのDNA配列を挟んで逆方向に挿入されているが、それらがゲノムの1カ所に挿入されていることが確認されている(本評価書の第1.2.(4)、22ページ)。

10 (6)のイ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

2011年に米国シンジェンタ社の温室において、本組換えダイズの複数世代を栽培し、本葉4葉(V4)期の葉における改変AvHPPD蛋白質及びPAT蛋白質の発現量をELISA法により測定した(別紙7、社外秘情報により非開示)。その結果、改変AvHPPD蛋白質及びPAT蛋白質それぞれの平均発現量は、T4世代で428.54µg/g乾燥重と190.21µg/g乾燥重、T5世代で499.21µg/g乾燥重と124.29µg/g乾燥重、T6世代で452.41µg/g乾燥重と75.67µg/g乾燥重であった(別紙7、社外秘情報により非開示)。

20 以上のことから、本組換えダイズでは、改変AvHPPD蛋白質及びPAT蛋白質が、複数個体及び複数世代で発現していることが確認された。

ウイルス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

25 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、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

30 挿入されたDNAの周辺配列(別紙13、社外秘情報により非開示)を利用したプライマーを用いて、本組換えダイズを特異的に検出できるPCR識別法が開発されている(別紙8、社外秘情報により非開示)。当該識別法では、非組換えダイズに本組換えダイズが混入した場合の定量限界値はゲノムDNA量比で0.08%である。なお、自社研究所以外にEurofins GeneScan USAにおいて信頼性が確認されている(別紙9、社外秘情報により非開示)。

35

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

5

本組換えダイズに付与された特性は、改変 *avhppd* 遺伝子によって発現する改変 AvHPPD 蛋白質による HPPD 阻害型除草剤耐性と、*pat* 遺伝子によって発現する PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性である。本組換えダイズが HPPD 阻害型除草剤であるメソトリオンと除草剤グルホシネートに対して耐性を示すことを、隔離ほ場での除草剤散布試験によって確認している(別紙 10、社外秘情報により非開示)。さらに、米

10

国ほ場での複数の HPPD 阻害型除草剤の散布試験により、本組換えダイズは、ダイズに登録予定のメソトリオンとイソキサフルトールには耐性を示すものの、それ以外の除草剤には商品化に十分な程度の耐性を示さないことを確認している(別紙 11、社外秘情報により非開示)。

15

本組換えダイズに散布された除草剤グルホシネートは、PAT 蛋白質によりアセチル化され、*N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝されるものの、*N*-アセチル-L-グルホシネートはダイズにおけるグルホシネートの残留基準値(2ppm)の規制対象化合物に含まれている(公益財団法人 日本食品科学研究振興財団, 2014)。また、動物試験の結果から、*N*-アセチル-L-グルホシネートの毒性は親化合物であるグルホシネートより低いと考えられる(食品安全委員会, 2010)。

20

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

25

2013 年にシンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 神座サイトにおいて、本組換えダイズを用いた隔離ほ場試験を実施し、対照の非組換えダイズとの相違の有無を検討した。なお、隔離ほ場試験の詳細については別紙 10(社外秘情報により非開示)に示した。

30

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、農林水産植物種類別審査基準(農林水産省食料産業局新事業創出課, 2012)を参考に、発芽経過(発芽始め、発芽揃い)、発芽率、開花期、小葉の形、毛じの多少、成熟期、草型、主茎長、主茎節数、最下着莢節位高、分枝数、収穫期の植物体重、裂莢の難易、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重、稔実莢数、百粒重及び子実の形について、本組換えダイズと非組換えダイズとの比較を行った。その結果、どちらの種子も発芽始めは 6 月 14 日(播種 4 日後)であったものの、発芽揃

35

5 いは本組換えダイズが6月20日(播種10日後)で非組換えダイズが6月16日(播種6日後)であり、また、発芽率は本組換えダイズが79.7%、非組換えダイズが97.4%と統計学的有意差が認められた(別紙10、社外秘情報により非開示)。このように発芽揃いと発芽率では差が見られたものの、その後の生育においては本組換えダイズと非組換えダイズとの間で差は見られず、その他の項目では本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

10 なお、隔離ほ場試験と同じ世代の別ロットの種子を用いて25の条件下で発芽試験を行った結果、本組換えダイズと非組換えダイズの発芽始め、発芽揃いに相違は認められず、発芽率はどちらも100%であった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

b 生育初期における低温又は高温耐性

15 生育初期における低温耐性を比較するため、本組換えダイズと非組換えダイズを本葉1葉(V1)期まで生育した後、冬季を想定した設定(昼夜温度:10/2、日長サイクル:12/12時間)の人工気象器に移して生育を観察した。その結果、両ダイズとも葉の黄化、壊死斑、著しい生育抑制等の低温による障害が観察され、その程度に相違は認められなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

c 成体の越冬性

25 成体の越冬性を比較するため、成熟期に達した11月11日以降もほ場で本組換えダイズと非組換えダイズの生育を観察したところ、いずれの個体も12月27日には完全に枯死・褐変していた(別紙10、社外秘情報により非開示)。

d 花粉の稔性及びサイズ

30 花粉の稔性及びサイズを比較するため、本組換えダイズと非組換えダイズの花粉をアセトカーミン溶液で染色して顕微鏡下で観察した。その結果、花粉の充実度及びサイズに統計学的有意差は認められず、形状にも相違はなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

35 種子の生産量に関する項目として、本組換えダイズと非組換えダイズの一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重、稔実莢数及び百粒重を比較した。その結果、全ての項目において本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められな

った(別紙 10、社外秘情報により非開示)。

5 種子の脱粒性に関する項目として、本組換えダイズと非組換えダイズの裂莢の難易を成熟期に比較した結果、どちらも難裂莢性で相違は認められなかった(別紙 10、社外秘情報により非開示)。

10 種子の休眠性を比較するため、隔離ほ場試験で収穫した本組換えダイズと非組換えダイズの種子の発芽試験を 25 の条件下で行った結果、本組換えダイズと非組換えダイズの発芽率に統計学的有意差は認められなかった(別紙 10、社外秘情報により非開示)。また、発芽しなかった種子はいずれも生存していないことをトリフェニルテトラゾリウムクロライドによる染色で確認した。

f 交雑率

15 本組換えダイズと非組換えダイズを株間 20cm で隣接して栽培後、非組換えダイズの収穫種子を無作為に抽出して温室内で播種し、本葉 2 葉(V2)期に除草剤グルホシネートを処理して生存個体数を調べた。その結果、処理した 282 個体中 2 個体の生存が確認された。よって、生存率から推定される交雑率は 0.71%以下であった(別紙 10、社外秘情報により非開示)。

g 有害物質の産生性

25 有害物質の産生性を比較するため、本組換えダイズと非組換えダイズを収穫期まで栽培し、その栽培土壌及び植物体を用いて後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

後作試験：

30 本組換えダイズと非組換えダイズの各試験区から根域土壌を採取してハツカダイコンを播種した。ハツカダイコンの播種11日後に発芽率を調査し、播種14日後に収穫して乾燥重を測定した。その結果、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

鋤込み試験：

35 本組換えダイズと非組換えダイズの茎葉部を収穫、乾燥、粉碎して調整した粉末と土壌を混和してハツカダイコンを播種した。ハツカダイコンの播種8日後に発芽率を調査し、播種14日後に収穫して乾燥重を測定した。その結果、ハツカダイコンの発芽率

及び乾燥重について、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

土壌微生物相試験：

- 5 本組換えダイズと非組換えダイズの各試験区から土壌を採取し、希釈平板法により糸状菌数、細菌数及び放線菌数を計測した。その結果、糸状菌数、細菌数及び放線菌数について、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(別紙10、社外秘情報により非開示)。

10

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

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

(2) 使用等の方法

20 —

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

—

25

- (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

添付の「緊急措置計画書」を参照。

30

- (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

—

35

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズの国外における申請及び承認状況は表 7(28 ページ)のとおりである。

表 7 国外における申請及び承認状況 (2014 年 8 月現在)

申請先	目的	申請・承認状況
米国食品医薬品庁(FDA)	食品、飼料	2014 年 3 月確認終了
米国農務省(USDA)	無規制裁培	2014 年 7 月承認
カナダ保健省(Health Canada)	食品	2014 年 5 月承認
カナダ食品検査庁(CFIA)	飼料、環境	2014 年 6 月承認
オーストラリア・ニュージーランド食品 基準機関(FSANZ)	食品	2014 年 2 月承認

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

第 2 項目ごとの生物多様性影響評価

1. 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

10 隔離ほ場試験において本組換えダイズと対照の非組換えダイズを栽培し、競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を調査した(本評価書の第 1. 2. (6). . a~ e、24~ 26 ページ)。

その結果、形態及び生育の特性のうち、隔離ほ場に播種した本組換えダイズと非組換えダイズ種子の発芽始めはどちらも 6 月 14 日(播種 4 日後)であったものの、発芽揃いは本組換えダイズが 6 月 20 日(播種 10 日後)で非組換えダイズが 6 月 16 日(播種 6 日後)であり、また、発芽率は本組換えダイズが 79.7%、非組換えダイズが 97.4%と統計学的有意差が認められた(本評価書の第 1. 2. (6). . a、24 ページ)。隔離ほ場試験に使用した種子の来歴を調べたところ、どちらも 2012 年 10 月に採種されてその後の保管条件も同等であったものの、本組換えダイズは米国アイオワ州、非組換えダイズは米国イリノイ州と異なるほ場で栽培した植物体から収穫された種子であった。これらのことから、隔離ほ場試験で見られた発芽に関する本組換えダイズと非組換えダイズの相違は、採種した植物体を栽培したほ場の違いに起因したものであると考えられた。そこで、隔離ほ場試験に用いた種子とは別の本組換えダイズと非組換えダイズの種子(2011 年 10 月に米国イリノイ州の同じほ場から採種)を用いて 25 の条件下で発芽試験を行った結果、発芽始め、発芽揃いに相違はなく、発芽率はどちらも 100%で統計学的有意差は認められなかった。さらに、隔離ほ場試験で収穫した種子の発芽率にも本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). . e、26 ページ)。

また、発芽揃いと発芽率以外の項目では本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). . a~ e、24~ 26 ページ)。

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

35 本組換えダイズは、導入された改変 *avhppd* 遺伝子と *pat* 遺伝子によって、改変 AvHPPD 蛋白質と PAT 蛋白質を発現し、HPPD 阻害型除草剤及びグルホシネート耐性を示す。しかし、自然条件下においてこれらの除草剤が散布されるとは想定しにくいことから、本組換えダイズに付与された除草剤耐性形質によって競合における優位性が高まることはない

と考えられる。

以上のことから、本組換えダイズについて競合における優位性に起因する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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10 (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

15

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

20 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

25 宿主の属する分類学上の種であるダイズには我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

30 隔離ほ場試験において本組換えダイズと対照の非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). . g、26～27 ページ)。

35 改変 AvHPPD 蛋白質及び PAT 蛋白質は、既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されており、また、当該蛋白質が有害物質であるとの報告はない。さらに、改変 AvHPPD 蛋白質は HPPD 阻害型除草剤によって阻害される内在性 HPPD 蛋白質に代わり、チロシン代謝経路における *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応を触媒し、フマル酸、アセト酢酸、プラストキノン並びにビタミン E を産生するが、これらの物質が有害物質であるとの報告はない。

5 10 15 20 25 30 35

改変 AvHPPD 蛋白質は *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸に高い基質特異性を有することから、生体内において改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝経路に非意図的な影響を及ぼすことはないと考えられる(本評価書の第 1. 2. (1). 口. 、12~13 ページ)。また、これまでの研究から、HPPD 蛋白質を過剰発現しても宿主の持つ代謝系への影響はない又は影響は小さいと考えられる(本評価書の第 1. 2. (1). 口. 、13 ページ)。確認のため、米国で栽培した本組換えダイズと非組換えダイズの茎葉の主要構成成分や種子の主要構成成分及びチロシン代謝経路の最終代謝産物であるビタミン E を分析して検討した。その結果、種子中の γ -トコフェロールと α -トコフェロール、茎葉の脂質において、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたものの、本組換えダイズの分析値はいずれの項目においても同一ほ場で栽培した参考品種の範囲内であったことから、本組換えダイズで発現している改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝系に及ぼす影響は小さいと考えられる(本評価書の第 1. 2. (1). 口. 、13 ページ及び 15~17 ページ)。

したがって、改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝系に影響することで、新たな有害物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

15 20 25 30 35

本組換えダイズで発現する PAT 蛋白質は、L-ホスフィノスリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルホスフィノスリシンに対して高い基質特異性を示し、これら以外に PAT 蛋白質の基質となる他の蛋白質若しくはアミノ酸は報告されていない。よって、PAT 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる(本評価書の第 1. 2. (1). 口. 、13~14 ページ)。

25 30 35

本組換えダイズに散布された除草剤グルホシネートは、PAT 蛋白質によりアセチル化され、*N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝されるものの、*N*-アセチル-L-グルホシネートはダイズにおけるグルホシネートの残留基準値(2ppm)の規制対象化合物に含まれており、また、動物試験の結果から親化合物であるグルホシネートより毒性は低いと考えられる(本評価書の第 1. 2. (6). 、24 ページ)。これらのことから、除草剤グルホシネートの本組換えダイズへの散布によって生じる *N*-アセチル-L-グルホシネートが新たな有害物質になるとは考えにくい。

30 35

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

(2) 影響の具体的内容の評価

35 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

10

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

15 我が国にはダイズと交雑可能な近縁野生種として、ツルマメが自生している(本評価書の第 1. 1. (3). 二. 、5 ページ)。したがって、交雑性によって影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

20

ツルマメが本組換えダイズと交雑して HPPD 阻害型除草剤及びグルホシネート耐性の雑種が生じること、さらに、本組換えダイズ由来の改変 *avhppd* 遺伝子及び *pat* 遺伝子がツルマメ集団へと拡散することが考えられた。

25 (3) 影響の生じやすさの評価

ダイズとツルマメはどちらも自殖性植物であり、また、一般に我が国におけるツルマメの開花期はダイズよりも遅いことから(Nakayama and Yamaguchi, 2002)、交雑は起こりにくいと考えられる。しかし、ツルマメは北海道、本州、四国及び九州に分布しており(後藤, 2008)、河川、水田、畑及び灌漑用水路等の周辺に自生している(Kuroda *et al.*, 2005) ことから、ツルマメの自生している周辺で本組換えダイズが栽培された場合、ツルマメと交雑する可能性を否定できない。

35 隔離ほ場試験において、本組換えダイズと非組換えダイズを株間 20cm で隣接して栽培後、非組換えダイズの収穫種子を無作為に抽出して温室内で播種し、本葉 2 葉(V2)期に除草剤グルホシネートを処理して生存個体数を調査したところ、その生存率から推定される交雑率は 0.71%以下であった(本評価書の第 1. 2. (6). f、26 ページ)。ダイズその他殖率は通常 1%以下であることが知られており(OECD, 2000; 昆野, 2008)、本組換えダイズと非

組換えダイズの生存率から推定される交雑率は、ダイズの通常の交雑率を超えるものではないと考えられた。さらに、花粉の稔性及びサイズについても本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). d, 25 ページ)。したがって、本組換えダイズの生殖特性は従来のダイズの変動の範囲内であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられたことから、次にダイズとツルマメとの交雑及びダイズからツルマメへの遺伝子浸透の可能性を検討した。

ツルマメのダイズとの自然交雑性に関し、ツルマメと開花期が比較的重複する日本品種である丹波黒を花粉親にし、0.5m 間隔の 5×12 列で交互に各 30 個体を配置して自然交雑試験を行った結果、ツルマメから収穫した種子の合計 686 個体中 5 個体がダイズとの雑種であり、交雑率は 0.73%であったと報告されている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

また、除草剤耐性ダイズを花粉親に用いたツルマメとの自然交雑試験が 2005～2007 年の 3 年間行われ、2005 年と 2006 年の試験結果では、ツルマメをダイズにからみつくほど近づけて栽培した混植区でも、開花期がほぼ重複しない場合はダイズと交雑したツルマメ雑種は認められなかった。一方、開花期ができるだけ重複するように栽培した場合は、収穫したツルマメ種子の 11,860 個体中で 1 個体の交雑雑種(交雑率:0.0084%)が検出された。さらに、試験を実施した 3 年間で開花期が最も重複していた 2007 年の試験結果では、ツルマメをダイズにからみつくほど近づけて栽培した混植区のツルマメ収穫種子の 25,741 個体中で 35 個体の交雑雑種(交雑率:0.136%)が検出されたが、花粉親から 8m 及び 10m 離れたツルマメ栽培区では交雑雑種は検出されなかった(Mizuguti *et al.*, 2009, 2010)。

ダイズとツルマメの雑種形成、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透については、我が国の自然環境下において調査が行われている。2003 年～2006 年にかけて、ダイズとツルマメの中間的形態を持った中間体の調査が秋田、茨城、愛知、兵庫、広島、高知、佐賀県の計 189 地点で行われたが、そのうち 6 地点(秋田県 1 地点、佐賀県 5 地点)で計 17 個体の中間体が発見された(Kuroda *et al.*, 2010)。なお、189 地点のそれぞれで数百個体の調査が行われたものの、見つかった中間体の合計はわずか 17 個体であり、ダイズとツルマメの交雑が生じる頻度は低かった。次に、中間体が発見された 6 地点において、17 個体の中間体、468 個体のツルマメ、12 個体のダイズの葉を採取し、核のマイクロサテライト及び葉緑体の dCAPS マーカーによる分析を行った結果、これらの中間体は全てツルマメと晩生ダイズとの交雑に由来しており、ダイズからツルマメ方向への遺伝子浸透によるものであることが判明した。しかし、中間体からツルマメへの二次的な遺伝子浸透は確認されなかった。

また上記の調査において、中間体が発見された 6 地点では継続してモニタリングが行われたが、中間体は自然環境下において速やかに消滅していく傾向が認められた(Kuroda *et al.*, 2010)。佐賀県の 1 地点の場合、2004 年に雑種後代と考えられる 7 個体の中間体が見つかったが、その後の中間体の数は 2005 年には 2 個体、2006 年にはゼロへと減少した。

個体数が減少した主な理由としては、中間体が自然条件下での淘汰を受けること、中間体の自然環境への適応度(例えば、種子の越冬性、生育期における他の植物との競合性)が野生種であるツルマメほど高くはないこと、中間体の種子には冬季の生存に適した硬実種子が少ないことが挙げられている。

5

以上の知見に基づくと、ツルマメのダイズとの自然交雑率は開花期が重複した場合でも低率であり、ダイズ栽培区から 10m 程度離れると交雑する可能性はさらに低下する。また、交雑により雑種やその後代が生じた場合でも、それらの個体は自然環境下において消滅する傾向にあり、ツルマメへの二次的な遺伝子浸透も確認されていないことから、ダイズ

10

の遺伝子が自然交雑によってツルマメ集団に拡散するのは容易ではないと考えられる。これらのことから、本組換えダイズがツルマメと交雑し、導入遺伝子がツルマメ集団へと拡散する可能性は極めて低いと考えられる。

15

また、我が国には 1996 年以降遺伝子組換えダイズが輸入されているが、ダイズの輸入実績港 10 港の周辺地域で平成 21～24 年度に行われた調査の結果、ダイズ(遺伝子組換えを含む)やツルマメの生育は確認されているものの、ツルマメと遺伝子組換えダイズとの交雑体は見つかっていない(農林水産省消費・安全局農産安全管理課, 2011a, 2011b, 2012, 2013)。

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズの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判断された。

25

4. その他

上記の他に、本組換えダイズに関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると

30

考えられる性質はないと判断された。

第3 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

5 宿主の属する分類学上の種であるダイズについては長期の使用経験があるが、我が国の自然環境下で自生したという例は報告されていない。競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を隔離ほ場試験において比較検討した。その結果、形態及び生育の特性のうち、隔離ほ場に播種した本組換えダイズと非組換えダイズ種子の発芽に関して相違が認められたが、播種した種子の来歴を調べたところ、採種時期と保管条件は同等であったものの、異なるほ場で栽培した植物体から収穫された種子であったことから、発芽に関する本組換えダイズと非組換えダイズの相違は、採種した植物体を栽培したほ場の違いに起因したものであると考えられた。一方、別の本組換えダイズと非組換えダイズの種子(同時期に同じほ場から採種)や隔離ほ場試験で収穫された種子の発芽試験の結果では相違は見られなかった。また、発芽以外の項目では本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった。よって、本組換えダイズの競合における優位性が非組換えダイズに比べて高まる可能性を示すような相違はないと考えられた。

20 本組換えダイズには HPPD 阻害型除草剤及びグルホシネート耐性が付与されているが、自然条件下においてこれらの除草剤が散布されるとは想定しにくいことから、付与された除草剤耐性形質によって競合における優位性が高まることはないと考えられた。

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

有害物質の産生性：

25 宿主の属する分類学上の種であるダイズについては長期の使用経験があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。有害物質の産生性については、隔離ほ場試験で後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施した結果、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった。

30 改変 AvHPPD 蛋白質及び PAT 蛋白質は、既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている。また、改変 AvHPPD 蛋白質はチロシン代謝経路における *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応を触媒し、フマル酸、アセト酢酸、プラストキノン並びにビタミン E を産生するが、これらの物質が有害物質であるとは考えられていない。改変 AvHPPD 蛋白質は *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸に高い基質特異性を有することから、生体内において改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝経路に非意図的な影響を及ぼすことはないと考えられた。

35 また、これまでの研究から HPPD 蛋白質を過剰発現しても宿主の代謝系への影響はない又は影響は小さいと考えられるものの、確認のために構成成分の分析を行った。その結果、本組換えダイズの分析値はいずれの項目においても非組換えダイズと同程度か、同一ほ場

で栽培した参考品種の範囲内であったことから、本組換えダイズで発現している改変 AvHPPD 蛋白質が宿主の代謝系に及ぼす影響は小さいと考えられた。

PAT 蛋白質については、L-ホスフィノスリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルホスフィノスリシンに対して非常に高い基質特異性を示し、これら以外の基質は知られていないことから、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。加えて、本組換えダイズに散布された除草剤グルホシネートは、PAT 蛋白質によるアセチル化で *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝されるものの、*N*-アセチル-L-グルホシネートはダイズにおいて残留基準値の対象化合物に含まれており、動物試験の結果から毒性影響は親化合物であるグルホシネートより小さいと考えられることから、*N*-アセチル-L-グルホシネートが新たな有害物質になるとは考えにくい。

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

交雑性：

我が国にはダイズの近縁野生種としてツルマメが存在し、ツルマメはダイズと低率であるが自然交雑することが示されていることから、交雑に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。隔離ほ場試験の結果、本組換えダイズの生殖特性は従来のダイズの変動の範囲内であり、ツルマメとの交雑性に影響を与えるような相違はないと考えられた。ツルマメのダイズとの自然交雑率は開花期が重複した場合でも低率であり、ダイズ栽培区から 10m 程度離れると交雑する可能性はほぼなくなることが知られている。また、交雑により雑種やその後代が生じた場合でも、それらの個体は自然環境下において消滅する傾向にあり、ツルマメへの二次的な遺伝子浸透も確認されていないことから、ダイズの遺伝子が自然交雑によってツルマメ集団に拡散するのは容易ではないと考えられる。これらのことから、従来のダイズと同様に、本組換えダイズがツルマメと交雑して導入遺伝子がツルマメ集団へと拡散する可能性は極めて低いと考えられた。

以上のことから、本組換えダイズの交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本組換えダイズを第一種使用規程に従って使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

引用文献

Abel GH. 1970. Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agronomy Journal* 62: 121-123.

Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernandez C, Galan B, Garcia JL, Diaz E, Minambres B. 2004. The homogentisate pathway: A central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 186: 5062-5077.

Baldwin JE, Crouch NP, Fujishima Y, Lee MH, MacKinnon CH, Pitt JPN, Willis AC. 1995. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase appears to display α -ketoisocaproate dioxygenase activity in rat liver. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5: 1255-1260.

Carlson JB, Lersten NR. 2004. Reproductive Morphology. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. 3rd ed, Agronomy Monograph no. 16. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. pp.59-95.

Collakova E, DellaPenna D. 2003. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 632-642.

Crouch NP, Adlington RM, Baldwin JE, Lee MH, MacKinnon CH. 1997. A mechanistic rationalisation for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). *Tetrahedron* 53: 6993-7010.

DellaPenna D, Pogson BJ. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology* 57:11-38.

Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40.

FAO. 2013. FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (accessed Jan 15, 2014)

Fellman JH, Fujita TS, Roth ES. 1972. Substrate specificity of *p*-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase. *Biochimica et Biophysica Acta* 268: 601-604.

Fling ME, Kopf J, Richards C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Fujita R, Ohara M, Okazaki K, Shimamoto Y. 1997. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *Journal of Heredity* 88: 124-128.

Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. 1987. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 15: 3257-3273.

Gallie DR. 2002. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Research* 30: 3401-3411.

Hansen G, Das A, Chilton MD. 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7603-7607.

Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O'gara F, Haas D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 232-237.

ILSI. 2010. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, v. 4.2. http://www.cropcomposition.org/query/workflow.wiz?_flowExecutionKey=_c9659A004-88A0-AB8B-EC84-F3512F31DCA7_k4E18EABC-875E-0B9E-6C37-74B14BB85053 (accessed July 14, 2011)

Itoh T, Tomizawa J. 1979. Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology* 43: 409-417.

Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.

Kanwischer M, Porfirova S, Bergmuller E, Dormann P. 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition and oxidative stress. *Plant Physiology* 137: 713-723.

Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, Baszis SR, Jensen PK, Wong YH, Jiang J, Venkatramesh M, Gruys KJ, Moshiri F, Post-Beittenmiller D, Weiss JD, Valentin HE. 2005. Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metabolic Engineering* 7: 384-400.

Kiang YT, Chiang YC, Kaizuma N. 1992. Genetic Diversity in Natural Populations of Wild Soybean in Iwate Prefecture, Japan. *Journal of Heredity* 83: 325-329.

Kuroda Y, Kaga A, Apa A, Vaughan DA, Tomooka N, Yano H, Matsuoka N. 2005. Exploration, collection and monitoring of wild soybean and hybrid derivatives between wild soybean and cultivated soybean: Based on field surveys at Akita, Ibaraki, Aichi, Hiroshima and Saga prefectures. *Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources* 21: 73-95.

- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA. 2008. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48: 1071-1079.
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D. 2010. The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology* 19: 2346-2360.
- Lee K, Lee SM, Park S, Jung J, Moon J, Cheong J, Kim M. 2007. Overexpression of *Arabidopsis* homogentisate phytyltransferase or tocopherol cyclase elevates vitamin E content by increasing γ -tocopherol level in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Molecules and Cells* 24: 301-306.
- Maeda H, Dudareva N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 73-105.
- Maiti IB, Gowda S, Kiernan J, Ghosh SK, Shepherd RJ. 1997. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. *Transgenic Research* 6: 143-156.
- Matringe M, Sailland A, Pelissier B, Rolland A, Zink O. 2005. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Management Science* 61: 269-276.
- Mizuguchi A, Yoshimura Y, Ohigashi K, Matsuo K. 2008. Analysis of flowering phenology overlapping between *Glycine soja* and *G. max* in Japan. *Journal of Weed Science and Technology* 53 (Sup.): 148.
- Mizuguti A, Yoshimura Y, Matsuo K. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
- Mizuguti A, Ohigashi K, Yoshimura Y, Kaga A, Kuroda Y, Matsuo K. 2010. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 9: 13-23.
- Moran GR. 2005. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433: 117-128.
- Nakayama Y, Yamaguchi H. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management* 2: 25-30.
- Nickell CD, Noel GR, Thomas DJ, Waller R. 1990. Registration of 'Jack' soybean. *Crop Science* 30: 1365.
- OECD. 1999. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 11. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes

that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.

OECD. 2000. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 15. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). ENV/JM/MONO(2000)9.

Ow DW, Jacobs JD, Howell SH. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4870-4874.

Rippert P, Matringe M. 2002. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269: 4753-4761.

Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M. 2004 Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* 134: 92-100.

Siehl DL. 1999. The biosynthesis of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine from chorismate. In: Singh BK (Ed.), *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. Marcel Dekker Inc, New York, pp.171-204.

Stavolone L, Ragozzino A, Hohn T. 2003a. Characterization of Cestrum yellow leaf curling virus: a new member of the family Caulimoviridae. *Journal of General Virology* 84: 3459-3464.

Stavolone L, Kononova M, Pauli S, Ragozzino A, de Haan P, Milligan S, Lawton K, Hohn T. 2003b. Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops. *Plant Molecular Biology* 53: 703-713.

Strauch E, Arnold W, Alijah R, Wohlleben W, Pühler A, Eckes P, Donn G, Uhlmann E, Hein F, Wengenmayer F. 1994. Phosphinothricin-resistance gene, and its use. Hoechst Aktiengesellschaft. Patent No. 5276268. United States Patent.

Strickberger MW. 1976. Probability and statistical testing. In: *Genetics*, 2nd ed., New York: Macmillan Publishing Company, pp.140-163.

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.

Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D. 2002. Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 913-920.

Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of

DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.

Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.

Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Pühler A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.

Yoshimura Y, Matsuo K, Yasuda K. 2006. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5: 169-173.

Zambryski P, Depicker A, Kruger K, Goodman HM. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Brehelin C, Kessler F, Dormann P. 2010. Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal* 425: 389-399.

異儀田和典. 2008. 種子の質と出芽, 生育. 農業技術体系 作物編第 6 巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008 年追録第 30 号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基本技術編 pp.85-87.

大庭寅雄. 2008. 栽培条件と品種の反応. 農業技術体系 作物編第 6 巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008 年追録第 30 号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基礎編 pp.88-91.

大山卓爾. 2008. ダイズ収量の成り立ちとその理論. 農業技術体系 作物編第 6 巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008 年追録第 30 号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基本技術編 pp.3-10.

喜多村啓介, 国分牧衛. 2004. 14 食用植物 -マメ類 ダイズ. 山崎耕宇, 久保祐雄, 西尾敏彦, 石原邦監修. 新編 農学大事典. 株式会社 養賢堂. pp.466-470.

公益財団法人 日本食品科学研究振興財団. 2014. 食品に残留する農薬等の限量一覧表. http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/agrdtl.php?a_inq=18900 (accessed Jul 3, 2014)

国分牧衛. 2004. 第 5 章 豆類-豆類の種類と特徴-ダイズ. 堀江武編著. 新版 作物栽培の基礎. 社団法人 農山漁村文化協会. pp.162-171.

国分牧衛. 2010. 第 3 章 世界のダイズ生産技術の現状と展望. 喜多村啓介編集委員長. 大豆のすべて. 株式会社 サイエンスフォーラム. pp.75-92.

後藤寛治. 2008. ダイズの起源と特性. 農業技術体系 作物編第 6 巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008 年追録第 30 号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基礎編 pp.17-25.

昆野昭晨. 2008. 生育のステージと生理, 生態. 農業技術体系 作物編第6巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008年追録第30号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基礎編 pp.29-71.

財務省. 2014. 貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> (accessed Feb 24, 2014)

食品安全委員会. 2010. 農薬評価書 グルホシネート. 食品健康影響評価の結果の通知について (平成 22 年 2 月 25 日付け府食第 139 号)

新版 日本原色雑草図鑑. 1975. 沼田真, 吉沢長人編. 株式会社 全国農村教育協会. p.107.

生化学辞典. 2007. 第 4 版. 今堀和友, 山川民夫監修. 株式会社 東京化学同人. p.781.

鄭紹輝. 2008. 11 ダイズ. 大門弘幸編著. 作物学概論. 株式会社 朝倉書店. pp.132-146.

農林水産省大臣官房統計部. 2014. 平成 25 年産大豆、小豆、いんげん及びらっかせい(乾燥子実)作物統計(普通作物・飼料作物・工芸農作物) 豆類(乾燥子実)及びそばの収穫量(全国農業地域別・都道府県別)大豆 平成 26 年 2 月 18 日公表.
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokutei_sakumotu/ (accessed Feb 24, 2014)

農林水産省生産局農産部穀物課. 大豆のホームページ. 大豆のまめ知識.
http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_tisiki/index.html (accessed Feb 24, 2014)

農林水産省消費・安全局農産安全管理課. 2011a. 「平成 21 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/21_kekka.pdf (accessed Apr 11, 2014)

農林水産省消費・安全局農産安全管理課. 2011b. 「平成 22 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/22_natane.pdf (accessed Apr 11, 2014)

農林水産省消費・安全局農産安全管理課. 2012. 「平成 23 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/23_kekka.pdf (accessed Apr 11, 2014)

農林水産省消費・安全局農産安全管理課. 2013. 「平成 24 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について.
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/130924.html> (accessed Apr 11, 2014)

農林水産省食料産業局食品製造卸売課. 2014. 油糧生産実績調査(平成 25 年 12 月)平成 26 年 1 月 31 日公表.
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/Xlsdl.do?sinfid=000023619908> (accessed Feb 24, 2014)

農林水産省食料産業局新事業創出課. 2012. 農林水産植物種類別審査基準 大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill). 農林水産省品種登録ホームページ. <http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf> (accessed Feb 12, 2014)

配合飼料供給安定機構. 2013. 配合・混合飼料用原料使用量. 社団法人 配合飼料供給安定機構ホームページ. <http://mf-kikou.lin.gr.jp/seisan/seisan.htm#2> (accessed Feb 24, 2014)

橋本鋼二. 2008. 品種の生態型と選択. 農業技術体系 作物編第6巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 2008年追録第30号. 社団法人 農山漁村文化協会. 基礎編 pp.77-84.

緊急措置計画書

平成 26 年 6 月 20 日

氏名 シンジェンタジャパン株式会社
代表取締役社長 篠原 聡明
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

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

シンジェンタジャパン株式会社及びバイエルクロップサイエンス株式会社(以下「両社」という。))は、第一種使用規程の承認を申請している *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ(改変 *avhppd*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (SYHT0H2, OECD UI:SYN-000H2-5) (以下「本組換えダイズ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、以下の措置を執ることとする。

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

シンジェンタジャパン株式会社：生物多様性影響管理委員会委員 平成 26 年 6 月現在

氏名	所属	電話番号
(管理責任者)	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部	
	シンジェンタジャパン株式会社 コーポレートアフェアーズ	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	

(個人名・職名・電話番号は個人情報により非開示)

氏 名	所 属	電話番号
(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社 開発本部	
	バイエルクロップサイエンス株式会社 開発本部 種子規制部	
	バイエルクロップサイエンス株式会社 広報部	
	バイエルクロップサイエンス株式会社 開発本部 種子規制部	

(個人名・職名・電話番号は個人情報により非開示)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

両社は米国シンジェンタ社及び米国バイエルクロップ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、穀物取扱業者等の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。

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

両社は米国シンジェンタ社及び米国バイエルクロップサイエンス社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者等の取引ルートへ本組換えダイズの適切な管理、取扱い等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。

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

本組換えダイズの第一種使用等により、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、両社は米国シンジェンタ社及び米国バイエルクロップサイエンス社の協力のもと、本組換えダイズが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、環境中に放出された本組換えダイズが、環境中で生存しないように不活化するよう措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換えダイズの第一種使用等により、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、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。