

除草剤グリホサート耐性ダイズ (*cp4 epsps, Glycine max* (L.) Merr.) (40-3-2, OECD UI : MON-04032-6) の生物多様性影響評価書の概要

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

イ. ダイズはマメ科に属する一年生植物であり、その学名は *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr. である。

ロ. 宿主はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) である。

ハ. *Soja* 亜属には栽培種であるダイズの他に、野生種として *G. soja* (和名：ツルマメ) や *G. gracilis* も含まれる。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるダイズ (*G. max*) は野生種である *G. soja* が祖先と考えられており、一方、*G. gracilis* は *G. soja* から *G. max* への分化における中間種あるいは *G. soja* と *G. max* の雑種と考えられている。これらの野生種の内、我が国に分布しているのはツルマメのみで、*G. gracilis* の分布は認められていない。尚、ツルマメは中国、朝鮮、日本、台湾及び旧ソ連に分布しており、わが国においては北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1100 年ころにこの地域で栽培化されたと推定され、その後、中国南部、東南アジア、朝鮮及び日本へ栽培が広がったと考えられる。日本へは縄文時代に渡来、栽培が始まったと考えられ、副食として利用されていたみられる。

ロ. 国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報に基づくと、2003 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 8,370 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 2,927 万 ha、ブラジルが約 1,847 万 ha、アルゼンチンが約 1,247 万 ha、中国が約 950 万 ha となっている。尚、同統計情報に基づく 2003 年の日本における栽培面積は約 15 万 ha であった。

2003年のわが国におけるダイズの輸入量は約517万トンであり、その内の約76%が米国から輸入されている。2002年におけるダイズ供給量は合計で541万トン、そのうち輸入が514万トン、国産が27万トンとなっている。ダイズの用途別使用量は、製油用が約381万トン、食品用が約112万トン、その他が約28万トンとなっている。そのうち油用はほとんどが米国産である。

わが国におけるダイズの利用方法は多岐に渡り、味噌、醤油、豆腐、納豆、ゆば、きな粉、煮豆、もやしとして食されるほか、分離蛋白、濃縮蛋白等が食品添加物として、さらに搾油が食用植物油として、脱脂ダイズが家畜用飼料として利用されている。

わが国でのダイズの慣行栽培法は以下のとおりである。ダイズの品種は、蒔いてから開花するまでの日数と、それ以降成熟するまでの日数によって、夏ダイズ、秋ダイズ、そして中間ダイズに分類される。播種適期は東北地方南部と北陸・東山地方で6月上旬(品種は中間ダイズ)、関東地方で6月中旬(中間ダイズ)、東海地方以西中国地方までは6月下旬(中間ダイズないし秋ダイズ)、九州地方で7月上旬から8月上旬(秋ダイズ)および4月上旬から下旬(夏ダイズ)となる。種まき密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅蒔きの場合などでは密植が行われる。生育期間中は除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病害虫の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り取り・脱粒を一緒に行う方法とがある。

### (3) 生理的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉作物であり、子葉は対生し、次に卵形の初生葉が子葉と直角に対生して、それ以降は3片の小葉からなる複葉を生じる。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)の寄生によって根粒を着生する。花には1本の雌ずいがあり、その基部の子房に1~5個の胚珠を内蔵しており、子房は受精後に肥大して莢を形成する。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響し、ある時間以上の暗期が花芽分化に必要で、温度は15℃以上を必要として25℃前後までは高いほど促進的に働き、短日高温では促進効果が大きい、長日高温では促進効果がないか、かえって遅れることがある。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は 30～35℃、最低発芽温度及び最低生育温度は 2～4℃であり、10℃以下での発芽は極めて悪い。ダイズの栽培適地は、生育期間中 18～28℃程度、多照で適度の降雨のあることが望ましいとされているが、今日のダイズ品種では日長感応性が細かく分化して各種の気候に対する適応性が高くなっており、赤道直下のインドネシアから北緯 60° のスウェーデンでも栽培可能である。

尚、我が国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されていない。

#### ハ 捕食性又は寄生性

—

#### ニ 繁殖又は増殖の様式

①ダイズの種子は裂莢した際に地表に落下する。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脱粒性の程度は低い。また種子休眠性は知られていない。種子の発芽能力に関しては、常温で貯蔵した場合に通常約 3 年で失われる。

② ダイズは、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件下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があるという報告はこれまでのところない。

③ ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのは *Glycine soja*(和名：ツルマメ)のみである。ツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している。

尚、1950 年代にダイズとツルマメの形態的中間型を示す個体としてオオバツルマメが、わが国で確認されており、その形態がダイズに近かったことから、通常のツルマメと比べて、ダイズと交雑する可能性が高いことが予想された。しかし、過去 10 年以上にわたり日本各地より 800 近い集団からツルマメの収集を行った中にオオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は、見つかっていないという報告があることから、仮にこのような形態的中間型の個体が、我が国で自生していたとしても、その生育する範囲はかなり限られていることが予想される。

ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葎し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しないまま受粉する閉花受精を行う為、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられて

いる。また、それらの他家受精率は、いくつかの文献によると、ダイズでは最大で3%、ツルマメでは最大で2.3%であったことが報告されている。

しかし、ダイズをミツバチの集団と一緒にハウス内で生育させた場合、その他家受粉率は14%に達したと報告されている。またツルマメに関しても、秋田県雄物川流域で約13%という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、或いは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていないが、雄物川流域は、護岸工事などによる環境の攪乱が行われておらず、ツルマメの集団サイズも大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源である為、このツルマメの集団の周辺では、ミツバチやクマバチなどが頻繁に観察されていた。また、この集団から採取されたツルマメの1胚珠あたりの花粉数は平均で600~700粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の1胚珠あたりの平均的な花粉数の中間に位置していた。

ダイズとツルマメの交雑性に関しては、日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ(GIs/93-J-01)を、それぞれ30個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した報告がある。自然交雑実験終了後に結実したツルマメから取得された686個体の後代を調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が、5個体認められたことから、その交雑率は0.73%であった。

④ ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、稔性は2~4時間で失われる。花粉の直径は15~25 $\mu$ mである。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所において平成13年に本組換えダイズを用いて交雑試験を行った結果、花粉親からの距離が0.7mで0.19%、3.5mで0.025%、10.5mで0%の交雑率を示していた。更に平成14年に同様に農業環境技術研究所で行われた試験では、花粉親からの距離が0.7mで0.16%、2.8mで0.08%、3.5mで0%であった。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

他感物質等のような野生動植物等の生息又は生育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

—

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性ダイズ(*cp4 epsps, Glycine max (L.) Merr.*) (40-3-2, OECD UI: MON-04032-6) (以下「本組換えダイズ」とする)の作出に用いられた供与核酸の構成とその由来は表 1(p.7,8)に示した通りである。

#### ロ 構成要素の機能

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1(p.7,8)に示した。

#### 【*cp4 epsps* 遺伝子】

①除草剤グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻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。本組換えダイズの目的遺伝子である *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される 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経路が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の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の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソン酸-7-リン酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 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。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、

ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは **EPSPS** が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、**EPSPS** はホスホエノールピルビン酸塩(**PEP**)とシキミ酸-3-リン酸塩(**S3P**)から、**EPSP** と無機リン酸塩(**Pi**)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 **EPSPS** 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が、その反応性は **S3P** との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

②CP4 **EPSPS** 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(**GenBank**, **EMBL**, **PIR**, **NRL3D**, **SwissProt**)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

表 1 除草剤グリホサート耐性ダイズ 40-3-2 の作出に用いられたプラスミドベクターPV-GMGTO4 の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
P-CMoVa (E35S)により制御される <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
CMoVa (E35S)	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーターで、重複エンハンサー領域を持つ。
CTP	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。機能の詳細については p5-6 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
P-MAS により制御される <i>uidA</i> 遺伝子発現カセット(本組換えダイズ中に挿入されていない)	
P-MAS	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の <i>mannopine synthase2'</i> 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子の恒常的発現に関与する。
<i>uidA</i> (GUS)	大腸菌由来の <i>uidA</i> 遺伝子。GUS( $\beta$ -D-glucuronidase)蛋白質をコードする。
7S3'	ダイズの 7S 種子貯蔵蛋白質 $\alpha$ サブユニットの 3'末端非翻訳領域。

構成要素	由来及び機能
P-CMoVb (FMV)により制御される <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット (本組換えダイズ中に挿入されていない)	
CMoVb (FMV)	Figwort mosaic virus の 35S 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。
CTP	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。機能の詳細については p5-6 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の 3' 非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。
その他の構成要素	
LAC	Lac リプレッサーをコードする部分配列、lac プロモーター、 $\beta$ ガラクトシダーゼをコードする部分配列よりなる。大腸菌でのクローニングの際に選抜マーカーとして使用される。
<i>ori</i> -pUC	<i>Escherichia coli</i> プラスミド pUC119 由来の複製開始点領域
KAN( <i>nptII</i> )	大腸菌のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、neomycin phosphotransferase type II (NPTII) 酵素蛋白質をコードする。



## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

本遺伝子組換えダイズの作出に用いられたベクターは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pUC 119 などをもとに構築された。

### ロ 特性

本ベクターは大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子(*nptII* 遺伝子)、大腸菌での複製を可能にする複製開始点領域である *ori*-PUC, 大腸菌でのクローニングの際に選抜マーカーとして使用される LAC より構成される。各構成要素の詳細は表 1(p.7,8)に示した通りである。

本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMGTO4 の全塩基数は 10,505bp である。

本ベクターの感染性は知られていない。

## (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

本組換えダイズの作出には、上記の *nptII* 遺伝子を持つ pUC119 由来のベクターを元にして、①CP4 EPSPS 遺伝子発現カセット([E35S]-[CTP]-[CP4 EPSPS]-[NOS3']), ②GUS 遺伝子発現カセット([P-MAS]-[GUS]-[7S3']), ならびに③異なるプロモーターによって調節される CP4 EPSPS 遺伝子発現カセット([CMoVb]-[CTP]-[CP4 EPSPS]-[NOS 3'])を連結したプラスミド PV-GMGTO4 を構築し、このプラスミドをベクターとして用いた(表 1(p.7,8)及び図 1(p.10)を参照)。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド PV-GMGTO4 をパーティクルガン法によって、非組換えダイズ品種の茎頂組織細胞に導入した。

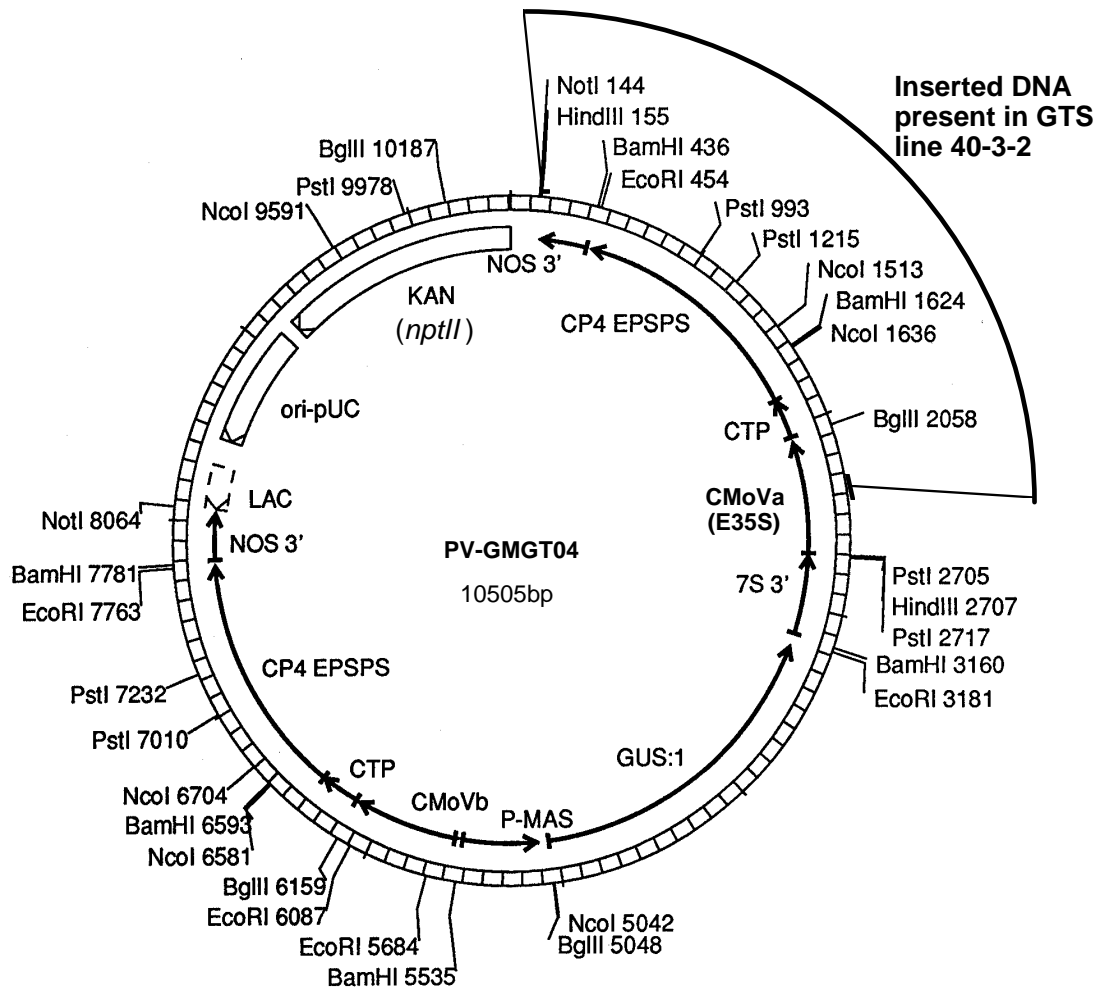


図 1 PV-GMGT04 のプラスミド・マップ

## ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① パーティクルガン法によって、プラスミド DNA を導入した茎頂細胞を、サイトカイニン及びオーキシンを含む培地上でしばらく生育させて不定芽を誘導した。

② 再分化個体の中から GUS 反応に陽性を示した 150 個体を形質転換個体(=R0 世代)として選抜して温室で生育させた(1990 年)。R0 世代以降、グリホサート耐性の評価、耐性の遺伝様式の評価、農業形質評価及び挿入遺伝子の分析を温室あるいはほ場で行い、最終的に 1991～1993 年に米国及びプエルトリコで行われたほ場試験結果(R2、R3、R4、R5 世代)に基づいて、商品化系統として本組換えダイズ(40-3-2 系統)が選抜された。それらの結果に基づいて、米国では必要な認可を受けて 1996 年から一般商業栽培が始められている。

わが国における認可状況は以下の通りである。

- 1996 年 3 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)及び栽培について、指針への適合性が確認された。
- 1996年9月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第4章」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 1996年9月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001 年 3 月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2003 年 3 月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続き」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

### (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

R5 世代を用いた本組換えダイズのサザンブロット分析による導入遺伝子解析の結果、ゲノム中に挿入されたのは 1 コピーの *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット([E35S]-[CTP]-[*cp4 epsps*]-[NOS3'])領域で、*uidA* 遺伝子発現カセット、異なるプロモーターによって調節される *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット([CMoVb]-[CTP]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3']), pUC119 由来の領域や *nptII* 遺伝子は存在しないことが確認された(p13 の図 3 の A)。尚、本組換えダイズは再分化個体である R0 世代において GUS 反応陽性個体として選抜されたが、このサザンブロット分析による導入遺伝子解析結果から *uidA* 遺伝子発現カセットが検出されなかったことに基づくと、*uidA* 遺伝子は *cp4 epsps* 遺伝子とはダイズ・ゲノム上の異なる位置に挿入され、R1～R2 世代で目的遺伝

子である *cp4 epsps* 遺伝子がホモに固定された過程で、本組換えダイズから通常の遺伝的な分離によって消失したことが示唆された。

その後の分析手法の進歩に伴って、より高感度なサザンブロット分析、コスミドクローニング及びゲノムウォーキング法などを組み合わせて R5 世代の挿入遺伝子を再度解析した結果、挿入された *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの NOS 3'末端に隣接して 250bp の *cp4 epsps* 遺伝子断片が存在し、また制限酵素 *HindIII* で得られた 937bp のゲノム断片に 72bp の *cp4 epsps* 遺伝子断片も存在することが確認され(p.13 の図 3 の B)、また、挿入された *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットにおいて NOS 3'ターミネーターを超えて転写の続く活性の弱い 2 次転写産物を生じていることが明らかにされた。

新たに検出された 250bp と 72bp の *cp4 epsps* 遺伝子断片領域は後代に安定的に受け継がれており、また、これらの遺伝子断片は機能していないことがノーザンブロット及びウエスタンブロット分析により確認されている。一方、NOS 3'ターミネーターを超えて転写の続く活性の弱い 2 次転写産物から CP4 EPSPS 蛋白質以外の蛋白質の翻訳が起こり得る可能性も極めて低いことがウエスタンブロット分析により確認されている。また、仮にオープン・リーディング・フレームが形成されたとしても、その推定ポリペプチドに既知の毒素等の有害活性物質との類似性・相関性のないことが示され、安全性に関する従来結論に影響しないことが確認されている。

挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代(用いた世代は R3、R6 世代)におけるサザンブロット分析によって示された。また、除草剤グリホサート耐性を付与する CP4 EPSPS 蛋白質も複数世代で安定して発現していることを選抜の過程や隔離ほ場試験においてグリホサート散布試験を行うことにより確認している。

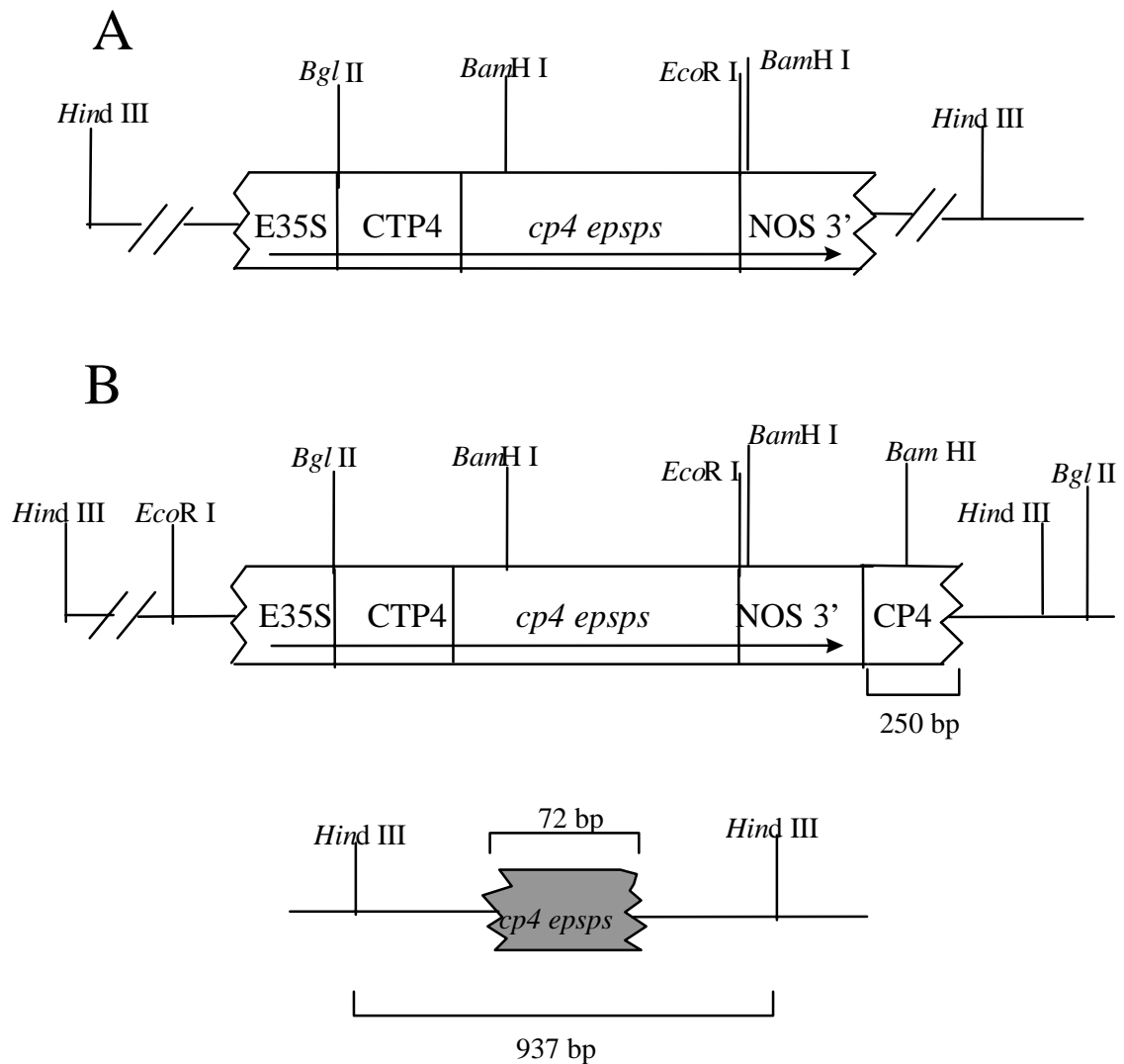


図 3 除草剤グリホサート耐性ダイズ 40-3-2 の挿入遺伝子地図

A : 当初の分析結果に基づく挿入遺伝子の模式図

B : 新たに得られた知見に基づく挿入遺伝子の模式図

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えダイズの検出・同定方法に関しては、現在、[http://www.maff.go.jp/sogo\\_shokuryo/jas/manual00.htm](http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm) に標準分析法が公表されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. 本組換えダイズ中において *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS 蛋白質が発現していることが除草剤グリホサートを散布することによって確認された。

ロ. 本組換えダイズとその宿主である対照の非組換えダイズとの相違は、主に平成7年5月から平成8年3月まで農業環境技術研究所にて行われた隔離ほ場試験の結果に基づいて検討しているが、平成6年3月から12月まで日本モンサントで行われた非閉鎖系温室試験の結果も用いて総合的に考察している。

① 形態及び生育の特性

44 項目(発芽期、発芽揃、発芽率、開花始、開花期、開花揃、開花終、黄葉期、落葉期、莢黄変期、成熟期、花数、花色、主茎長、主茎節数、茎の太さ、分枝数、葉の色、葉の大きさ、毛茸の色、毛茸の多少、毛茸の長短、毛茸の形状、毛茸の剛軟、地下部全重、伸育型、草型、生育習性、裂莢の難易、最下着莢主茎節位、最下着莢主茎節位高、一株全重、一株莢実重、一株稔実莢数、一株稔実莢重、莢の色、一株粒重、一株完全粒数、一株完全粒重、莢あたりの粒数、百粒重、種皮色、粒の揃い、臍の色)について本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズ間の形態及び生育の特性の差異を隔離ほ場試験において調査した。その結果、全ての項目において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で差異は認められなかった。

② 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えダイズと対照の非組換えダイズの幼植物をそれぞれ10℃及び1℃に設定したインキュベーターにて育成し、その影響を調査した結果、いずれの温度条件下でも本組換えダイズと対照の非組換えダイズは、新葉を形成することなく、褐変、枯死した。

### ③ 成体の越冬性又は越夏性

本組換えダイズと対照の非組換えダイズについて、収穫時に3反復各14個体の地下部(地上部第1節を含む)をそのまま残し、収穫後46日目にあたる12月11日に、新芽の再生の有無を調査した。また、収穫時に収穫を行わず放置する区を設け(3反復各7個体)、12月11日に地上部の生育を観察した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズにおいて、いずれも収穫後の地上部からの新芽の形成は観察されなかった。

### ④ 花粉の稔性及びサイズ

本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから花粉を採取し、その稔性とサイズをヨードヨードカリ液(3%ヨードカリ水溶液+1%ヨード)で染色し、顕微鏡下で観察することにより調査した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの稔性はともに99%であり有意差はみとめられなかった。またそのサイズにも差異は認められなかった。

### ⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については①の形態及び生育の特性で示したように、一株稔実莢数、一株稔実莢重、一株粒重、一株完全粒数、一株完全粒重、莢あたりの粒数、百粒重について本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で差異を調査している。その結果、全ての項目において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で差異は認められなかった。

脱粒性については、ダイズの子実肥大期頃(9月25日)より成熟期1ヶ月後(11月29日)まで、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズ栽培区(3反復)に、11cm×17cm、深さ10cmのポットを植物直下になるよう各2箇所配置し、落下種子の有無を調査した。その結果、調査期間中に本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれのポットにおいても、莢又は種子は全く認められなかった。

休眠性及び発芽率については、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから収穫した種子を、3反復各25粒ずつ温室にて播種し、播種後18日目に発芽率を調査した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの間で発芽率に有意差は認められず、その発芽率は95%以上であった。

## ⑥ 交雑率

本組換えダイズのツルマメへの自然交雑率が、対照の非組換えダイズと比較して有意に高まっていないかを調査した。

本組換えダイズ又は対照の非組換えダイズがそれぞれ畦間 60cm、株間 20cm で 35 株栽培されている 1.4m×3m の交雑実験区(各 3 反復)の中央に、人工気象室にて開花期を調節したツルマメ(BO1061 系統、北海道大学農学部より分譲)を 2 ポットずつ置床し、ダイズ開花期(8 月 7 日)から開花終期(8 月 18 日)まで生育させた。この時ツルマメと隣接ダイズの距離は 30～60cm であった。

自然交雑実験終了後、全てのポットを回収し、温室にてツルマメの種子を得た。3 反復各 50 個体のツルマメ種子(2 ポットから無作為に抽出)を栽培し、2 葉期にダイズとの雑種個体の出現率を調査した。雑種の判別は、人工交配によって雑種を作出した非閉鎖系温室実験結果を参考とし、非組換えダイズ区由来のツルマメでは、毛茸の形態から、本組換えダイズ区由来のツルマメでは、グリホサート（ラウンドアップ 250ml/10a）への感受性から雑種個体を識別した。

その結果、本組換えダイズ区由来のツルマメ種子から発芽した個体の中にグリホサートに対して耐性を示す雑種は得られなかった。同様に非組換えダイズ区由来のツルマメ種子から発芽した個体の中に毛茸の特性から交雑したことを示す個体は全く認められなかった。

尚、ダイズとツルマメの風媒のみによる交雑性に関しては、非閉鎖系温室試験を行った際に調査されている。扇風機の 20cm 前方に花粉源として本組換えダイズ又は対照の非組換えダイズを各 2 個体並べ、その延長線上 50cm と 1m の地点にツルマメを配置して、風速 4m/秒の風を 1 ヶ月間送風した後に種子を得た。各処理から得られた種子から 100 粒を無作為に選び、ポットにて育成し 3 葉期に交雑性を確認した結果、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズを花粉源として用いた交雑 50cm、1m 区のいずれのツルマメ種子からも雑種は得られなかった。

## ⑦ 有害物質の産生性

本組換えダイズから他の植物或いは土壤微生物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するために、本隔離ほ場試験では土壤微生物相試験を行い、非閉鎖系温室試験では土壤微生物相試験、後作試験、鋤き込み試験を行ったが、全ての項目で本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。

更に隔離ほ場試験では本組換えダイズから昆虫種或いは他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認する為に、本組換えダイズ栽培区と対照の非組換



えダイズ栽培区に飛来する昆虫種と発生する雑草を比較した。その結果、本組換えダイズ栽培区に飛来する昆虫種とその個体数は、対照の非組換えダイズ栽培区と比較して差異は認められなかった。また、本組換えダイズ栽培区に発生する雑草種とその草丈に関しても、対照の非組換えダイズ栽培区と比較して3反復の平均で差異は認められなかった。

### 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利用、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

—

#### (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

—

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

申請書に添付した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

—

#### (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズは1991年から1993年までの3年間、米国の215箇所のは場において導入遺伝子の発現及び生育特性を評価した結果、本組換えダイズ中でCP4 EPSPS 蛋白質が発現して除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている以外に、対照の非組換えダイズと比較して相違は認められなかった。

本組換えダイズは1995年に米国で商品化されている。2003年の本組換えダイズ

の栽培面積は、全世界で約 4,140 万 ha であったと予想されているが、これまでのところ本組換えダイズが生物多様性に影響を与えたという報告はされていない。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

### 1 競合における優位性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズは縄文時代には既に我が国で栽培されており、米麦とともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズが我が国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、発芽率、休眠性及び脱粒性(第一、2-(6)、ロ、①～⑤)を比較検討した。その結果、全ての項目で対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。

本組換えダイズは除草剤グリホサートに耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート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られない。実際に、グリホサート耐性ナタネは3年間、テンサイに関しては10年間にわたり自然条件下での生存率を調査されているが、それぞれ対照の非組換え体と比較して差異は認められなかったことから、*cp4 epsps* 遺伝子は自然条件下での競合における優位性には関与しないと判断されている。

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

—

#### (3) 影響の生じやすさの評価

—

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと

判断された。

## 2 有害物質の産生性

### (1) 影響を受ける可能性のある動植物の特定

ダイズは縄文時代には既に我が国で栽培されており、米麦とともに最も長い使用経験があるが、これまでにダイズにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤き込み試験、後作試験、飛来昆虫相試験、発生雑草試験(第一、2-(6)、ロ、⑦)により比較検討したが、差異は認められなかった。

本組換えダイズは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)-ロ-①に述べたように、CP4 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 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。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えダイズ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

以上のことから有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

### (2) 影響の具体的内容の評価

—

### (3) 影響の生じやすさの評価

—

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

### 3 交雑性

#### (1) 影響を受ける可能性のある動植物の特定

第一、1-(3)、ニ、③に記載したように、ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのはツルマメのみである。従って、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

ダイズとその近縁野生種であるツルマメとの間で雑種が生じると、その雑種は生育や生殖に障害が見られず、正常に生育することが知られている。従って、本組換えダイズに関しても、ツルマメと交雑した場合は、雑種が形成されると考えられる。また、当該雑種からツルマメへの戻し交配を経て、本組換えダイズ由来の *cp4 epsps* 遺伝子がツルマメの集団中に検出される可能性も否定できない。

しかし、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下において、グリホサート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られない。実際に、グリホサート耐性ナタネを3年間、グリホサート耐性テンサイについては10年間にわたり自然条件下での定着性が調査されているが、対照の非組換え体と比較して差異は認められなかったと報告されている。このことから挿入された *cp4 epsps* 遺伝子は宿主植物の自然条件下での競合における優位性に影響を与えないと判断されている。

更に、人為的に交配して得たダイズとツルマメの雑種系統を、親系統と共に栽培管理の異なる環境下に播種した後、それらの定着の様子を3年間追跡調査している。その結果、調査開始前に雑草防除を行っていない環境下に播種された雑種系統は、そのほとんどが雑草との競合に敗れて消滅していた。また、調査開始前に雑草防除が行われた環境下に播種された雑種系統についても、2年目の定着率は親系統であるツルマメと比較して明らかに劣っており、その差は3年目の観察時には更に顕著になっていた。

以上のことから、本組換えダイズとツルマメが交雑することにより形成される雑種が、我が国の自然条件に適応して、野生種を駆逐していく可能性は極めて低いと判断された。同様に、本組換えダイズ由来の *cp4 epsps* 遺伝子が近縁野生種であるツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性も極めて低いと判断された。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

わが国においてツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している。従って、本組換えダイズが我が国で第一種使用規程に従って使用された場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する機会があることは否定できないと考えられる。

ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葎し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しないままに受粉する閉花受精を行う為、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。また、それらの他家受精率は、いくつかの文献によると、ダイズでは最大で3%、ツルマメでは最大で2.3%であったことが報告されている。しかし、ツルマメに関して、秋田県雄物川流域で約13%という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告もある。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、或いは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていないが、雄物川流域は、護岸工事などによる環境の攪乱が行われておらず、ツルマメの集団サイズも大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源である為、このツルマメの集団の周辺では、ミツバチやクマバチなどが頻繁に観察されていた。また、この集団から採取されたツルマメの1胚珠あたりの花粉数は平均で600~700粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の1胚珠あたりの平均的な花粉数の中間に位置していた。

また、ダイズとツルマメ間での交雑の生じやすさについて、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約1ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている。しかし、他のダイズ品種と比べて、開花期が遅い日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ(GIs/93-J-01)を、それぞれ30個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調べた結果、得られた686個体のツルマメの後代の中にダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が、5個体確認され、その交雑率は0.73%であったと報告されている。

その一方で、本組換えダイズと人工気象室において開花期を調節したツルマメとの自然交雑率を本隔離ほ場試験及び非閉鎖系温室試験において調査した結果、本組換えダイズとツルマメの交雑は対照の非組換えダイズと同様に認められなかった(第一、2-(6)、ロ、⑥)。

以上のことから、本組換えダイズとツルマメは、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合う場合は、低い割合で交雑し得るが、そのような特殊な条件以外の自然条件下での交雑率は極めて低いことが予想された。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズがツルマメと交雑する可能性は、一般的に極めて低く、仮に交雑したとしてもその雑種が、我が国の自然条件に適応して、野生植物を駆逐していく可能性は極めて低いと判断された。同様に、本組換えダイズ由来の *cp4 epsps* 遺伝子が近縁野生種であるツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性も極めて低いと判断された。

従って、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。

#### 4 その他の性質

上記のほかに、生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換えダイズの性質はないと判断した。

##### 第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは縄文時代には既に我が国で栽培されており、米麦とともに最も長い使用経験がある。

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、発芽率、休眠性及び脱粒性(第一、2-(6)、ロ、①～⑤))を比較検討した。その結果、全ての項目で対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差は認められなかった。

本組換えダイズは除草剤グリホサートに耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート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られない。

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤き込み試験、後作試験、飛来昆虫相試験、発生雑草試験(第一、2-(6)、ロ、⑦))により比較検討したが、差異は認められなかった。

本組換えダイズは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、CP4 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 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ことが、確認されている。

以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された

ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのはツルマメのみである。従って、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。

本組換えダイズからツルマメへの自然交雑率が対照の非組換えダイズと比較して有意に高まっていないことを確認するために、隔離ほ場及び非閉鎖系温室内で自然交雑試験を行った。その結果、本組換えダイズとツルマメとの交雑は、対照の非組換えダイズとツルマメとの交雑と同様に認められず、本組換えダイズがツルマメと交雑する可能性は、対照の非組換えダイズと同様に極めて低いことが確認された(第一、2-(6)、ロ、⑥)。

また仮に交雑したとしてもその雑種が、我が国の自然条件に適応して、野生植物を駆逐していく可能性は極めて低いと判断された。同様に、本組換えダイズ由来の *cp4 epsps* 遺伝子が近縁野生種であるツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性も極めて低いと判断された。

以上から、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

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に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。