

除草剤グルホシネート耐性ダイズ (*pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (A2704-12, OECD UI: ACS-GM005-3) 申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書	1
5		
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
	(2) 使用等の歴史及び現状	3
10	(3) 生理学的及び生態学的特性	5
	イ 基本的特性	5
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
	ハ 捕食性又は寄生性	5
	ニ 繁殖又は増殖の様式	5
15	ホ 病原性	8
	ヘ 有害物質の産生性	8
	ト その他の情報	8
	2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
	(1) 供与核酸に関する情報	9
20	イ 構成及び構成要素の由来	9
	ロ 構成要素の機能	10
	(2) ベクターに関する情報	11
	イ 名称及び由来	11
	ロ 特性	11
25	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	13
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	13
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	14
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	14
	(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	
30	性	15
	(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	20
	(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	20
	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	23
35	(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	(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	24
	(6) 国外における使用等に関する情報	24
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	25
10	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
15	2. 有害物質の産生性	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	27
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	27
20	3. 交雑性	27
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	27
	(2) 影響の具体的内容の評価	27
	(3) 影響の生じやすさの評価	27
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	29
25	4. その他の性質	29
	第三 生物多様性影響の総合的评价	30
	参考文献	32
30	別添資料の内容	37
	緊急措置計画書	39
	モニタリング報告書	社外秘情報につき非開示

第一種使用規程承認申請書

平成 28 年 5 月 11 日

5

農林水産大臣 森山 裕 殿
環境大臣 大塚 珠代 殿

10

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

15

20

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。

25

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	除草剤グルホシネート耐性ダイズ(pat, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(A2704-12, OECD UI: ACS-GMØØ5-3)
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

5 (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

和名：ダイズ

10 英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

② 宿主の品種名

15 宿主はダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の栽培品種A2704である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

*Glycine*属*Soja*亜属には栽培種のダイズの他に、野生種である*G. soja*(和名：ツ
20 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よ
り、ツルマメが栽培種であるダイズ(*G. max*)の祖先であり、*G. gracilis*はダイズと
ツルマメのいくつかの中間的な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。栽培種のダイズは世界各地で広く栽培されてい
るが、野生の状態では確認されていない(OECD, 2000)。ツルマメは、中国、朝鮮
25 半島、日本、台湾、ロシアに分布しており、*G. gracilis*は中国北東部で観察され
ている(OECD, 2000)。我が国においてツルマメは、北海道南部から九州まで分布
し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地等を主な生育地としている(阿
部・島本, 2001)。

30 (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

ダイズは紀元前17～11世紀に中国東部で最初に栽培化されたと考えられてい
35 る(OECD, 2000)。我が国への渡来は、これまでの推定では1900～2000年前とされ
る(後藤, 2001)。西洋への導入は比較的新しく、現在の主要生産国である米国に

は1765年に導入されているが(Hymowitz and Harlan, 1983)、北米での栽培が本格的に拡大したのは20世紀に入ってからであり、さらに1960年代以降、ブラジルなど南米大陸での栽培が増加した（鄭, 2008）。

5 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

世界の主要ダイズ生産国とその収穫面積は、2014年に米国: 3,361万ha、ブラジル: 3,027万ha、アルゼンチン: 1,925万haであった(FAO, 2016)。また、我が国の主な栽培地域とその作付面積は、2015年度に東北: 3.46万ha、北海道: 3.39万ha、九州: 2.19万haであった(農林水産省, 2016a)。

我が国のダイズ栽培の播種適期は、地域や品種により異なり、北海道(夏ダイズ型品種)では5月上中旬、東北・北陸地方(中間型品種の早・中生)では5月中下旬、関東から中国地方に跨る地帯(中間型品種の晩生)では6月上～下旬、九州・四国地方では4月中下旬(夏ダイズ型品種)及び6月下旬～7月中下旬(秋ダイズ型品種)とされている。しかし、実際の農業経営では前作物の収穫、気象条件等により適期播種が困難な場合が多く、水田転換畑においては、中間型品種の作付地帯では晩播に、秋ダイズ型の作付地帯では早播傾向にあり(大庭, 2001)、また、品質が劣る関係で西南暖地での夏ダイズ型品種の作付けは現在行われていない（鄭, 2008）。栽植密度は品種や栽培条件によって異なるが、標準的にはうね間70cm、株間20cmで点播の場合1株2～3粒播き、最終的な苗立ち密度を1㎡当たり15本程度確保できればよい（鄭, 2008）。生育初期の雑草防除、中耕・培土、病虫害防除など適時的確に行う必要がある。収穫は小面積の場合、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が、大面積の場合は機械による収穫が一般的であり、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）。

我が国における2015年のダイズの総輸入量は324.3万tで、主な輸入先は米国(233.2万t)、ブラジル(50.7万t)、カナダ(36.8万t)である(農林水産省, 2016b)。また、国内消費仕向量は2014年概算値で309.5万t、その内訳は加工用215.8万t、飼料用9.8万t、種子用0.6万t等であった(農林水産省, 2016c)。

ダイズの用途は、青刈り・緑肥用、枝豆用、子実用等到大別され、子実用はさらに製油用、味噌、醤油、納豆、豆腐等の加工食品用に細分される(橋本, 2001b)。また、脱脂ダイズから糖類などの可溶性分子を除いた濃縮ダイズ蛋白は、肉製品の増量剤や代用肉として使われている(山内, 1992)。ダイズのリン脂質のレシ

チンは、天然乳化剤として用いられる(鎌田, 1992)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

5 イ 基本的特性

ダイズは種子で繁殖する一年生植物であり、卵形の初生葉が伸びて子葉と直角に対生して、それ以降は3片の小葉(稀に4枚以上)からなる複葉を生ずる(OECD, 2000)。日長や温度に対する反応が多様なため、各地に適応した生態型の品種分
10 化が見られる(橋本, 2001a)。発芽後2〜3週間すると、根粒菌の寄生により根粒が形成され始め、空中窒素を固定して栄養源とする(後藤, 2001)。種子の百粒重は、特殊なものを除き10〜50gの範囲である(国分, 2002)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15

ダイズ種子の発芽適温は30〜35℃であり(後藤, 2001)、土壌温度が10℃以上で発芽が可能となり、好適条件では5〜7日で出芽する(OECD, 2000)。ダイズの生育適温は25℃付近であるが、低温条件が続くと生育が抑えられ、子実生産も阻害される(昆野, 2001)。耐霜性がないため、冬季に凍結するような条件では生育で
20 きない(OECD, 2000)。ダイズの生育に適する土壌水分は飽和水分の70%であり、最適pHは6.0〜6.5であるが、土壌に対する適応性は比較的広く、我が国では全国的に栽培可能である(後藤, 2001)。北米では栽培に適正な日長と緯度より、北部の成熟群(Maturity group)000から赤道付近の成熟群Xまで品種を13の成熟群に分類しており(OECD, 2000)、宿主品種であるA2704は成熟群IIに分類される早生種
25 である(Matson *et al.*, 1996)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

30

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

35 ダイズは成熟期を過ぎると、莢が乾燥して裂開し、種子が地表に落下する。裂莢性には品種間差があり、一般的に米国の無限伸育性品種は裂莢しにくい(大

庭, 2001)。ダイズの育成品種では種子休眠性はほとんどみられない(OECD, 2000)。また、種子の寿命は比較的短く、常温で貯蔵した場合に通常約3年で発芽力を失う(昆野, 2001)。

5 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

ダイズは種子繁殖であり、自然条件下において植物体を再生しうる組織又は器官を持たない。

10

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)。しかし、十分な花粉媒介昆虫の存在下では2.5%の事例も報告されている(Ahrent and Caviness, 1994)。また、花色の異なる2品種を用いた交雑性試験では、同一畝に15.2cm間隔で交互に2品種を植えた場合の交雑率が0.65~6.32%で、平均1.8%であった(Ray *et al.*, 2003)。

20 我が国には、ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメが分布する。ツルマメの受粉様式はダイズとほぼ同じであり、その自殖率もダイズ同様に高い(阿部・島本, 2001)。自然交雑率については、2.3%(Kiang *et al.*, 1992)との報告がある一方、秋田県雄物川の河川敷で収集したツルマメの集団では9.3~19%の交雑率が報告されている(Fujita *et al.*, 1997)。この調査では、訪花昆虫(主にニホンミツバチとクマバチ)が頻繁に観察されており、その結果比較的高い頻度で交雑が起こったものと考察されている。また、秋田県、茨城県、佐賀県で継続調査されたツルマメ集団では、交雑率の平均値は2.2%(0~6.3%の範囲)であった(Kuroda *et al.*, 2008)。このうち、秋田県の1地点及び佐賀県の5地点において採取された468個体のツルマメ、17個体の中間体及び12個体のダイズについて、分子マーカーによる解析が行われた結果、これらの中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動によるものと判断された(Kuroda *et al.*, 2010)。栽培化に関連した形質である種子の生産数や種子の越冬性に関するQTLがダイズとツルマメの中間体の自然環境への適応度に関連していることが報告されており、中間体はダイズからこれらの遺伝子を受け取ったことにより適応度が下がった(Kuroda *et al.*, 2013)。また、ツルマメ個体群におけるダイズ遺伝子の残存性がモデルにより予測されており、中間体へ導入された遺伝子は中間体の初期世代からツルマメの

個体群内から急激に消失していくことが予測されている (吉村ら, 2016)。他方、ダイズとツルマメの中間体からツルマメへの二次的な遺伝子流動は認められなかったことから、ダイズとツルマメの雑種形成の可能性はあるが、我が国の自然環境において更なる浸透交雑が起こる可能性は極めて低いと考えられる (Kuroda *et al.*, 2010)。さらに、ツルマメと除草剤耐性が付与された遺伝子組換えダイズとの雑種を作成し、越冬能力を調査するため低温耐性等を調査した結果、導入遺伝子は低温耐性や休眠性に関係なく、雑種の適応度はツルマメとダイズの間であることも報告されている (Kubo *et al.*, 2013)。

ダイズとツルマメの開花期のずれは、両者の遺伝子交流を妨げる一因と考えられているが (阿部・島本, 2001)、晩生の秋ダイズ型品種の作付地帯等では、両者の開花期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズ品種とツルマメを 50cm 間隔で交互に配置して栽培した場合、個体別の交雑率は 0~5.89%、平均で 0.73% であった (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズを供試して、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、交雑率が 0.136% (調査 25,741 個体中、雑種 35 個体) であった。他方、組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、2、4、6 m の距離での交雑率はそれぞれ 0.013% (調査 7,521 個体、7,485 個体、7,508 個体中それぞれ雑種 1 個体) であり、8、10 m の距離では交雑種子は認められなかった (Mizuguti *et al.*, 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、ダイズに自家不和合性やアポミクシスについての報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズは一花当たり 3,600 粒前後の花粉を生産し (Chiang and Kiang, 1987)、花粉の直径は 30 μ m 前後であるが、粘性のため塊状になる傾向にある (Yoshimura, 2011)。花粉の寿命は短く、その発芽能力は湿度が一定でない条件下では 8 時間で失われることが報告されている (Abel, 1970)。前述の花色の異なる 2 品種を用いた交雑性試験では、花粉源から 0.9 m で 0.41%、5.4 m で 0.03% の交雑率が報告されている (Ray *et al.*, 2003)。なお、風による花粉の飛散状況について花粉捕集器を用いて実際に調査した結果、1 日 1 cm² 当たりの平均花粉捕捉数は、ダイズ畑のなかで 0.386 粒、畑から 2.5 m の地点で 0.694 粒、5 m で 0.309 粒、10 m で 0.077 粒に過ぎず、風媒による他殖の可能性はほとんどないと判断された (Yoshimura, 2011)。

ホ 病原性

—

5 ヘ 有害物質の産生性

ダイズが他感物質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を産生するという報告はない。

10 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

5 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グルホシネート耐性ダイズ(*pat*, *Glycine max* (L.) Merr.)(A2704-12, OECD UI: ACS-GM005-3)(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に示した。

- 10 なお、本組換えダイズに導入された *pat* 遺伝子は、*Streptomyces viridochromogenes* から得た野生型の *pat* 遺伝子の配列を植物で使用されるコドンに適合するように改変したものである(Strauch *et al.*, 1993)が、この改変により産生される酵素のアミノ酸配列は変化していない。

15 表 1 構成要素のサイズ、ベクター上の位置、由来及び機能

構成要素	サイズ(bp)	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット			
P35S	543	461-1003	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA プロモーター。植物中で <i>pat</i> 遺伝子を構成的に発現させる(Odell <i>et al.</i> ,1985)。
—	8	1004-1011	ポリリンカー
<i>pat</i>	552	1012-1563	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来で、PAT 蛋白質をコードし、除草剤グルホシネート耐性を付与する(Strauch <i>et al.</i> , 1993)。
—	18	1564-1581	ポリリンカー
T35S	203	1582-1784	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA ターミネーター。転写を終結させ、転写産物のポリアデニル化を行わせる(Pietrzak <i>et al.</i> ,1986)。
その他			
—	188	1-188	プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
RB	55	189-243	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti プラスミド pTiAch5 由来の右側境界(Gielen <i>et al.</i> ,1984)。
—	217	244-460	プラスミド pUC19 の塩基配列(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
—	59	1785-1843	ポリリンカー
—	409	1844-2252	プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
ORI	550	2253-2803	プラスミド pUC19 の配列断片であり、2257bp の位置に複製起点(ColE1)を有する。プラスミドの複製を開始させる(Yanisch-Perron <i>et al.</i> ,1985)。

構成要素	サイズ(bp)	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
—	212	2804-3015	プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>bla</i>	861	3016-3876	<i>Escherichia coli</i> 由来のアンピシリン耐性遺伝子(<i>bla</i>)で、細菌中で β -ラクタマーゼを発現する(Sutcliffe,1978)。
—	200	3877-4076	プラスミド pUC19 の配列断片(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

(注：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

- 5 ① 目的遺伝子、発現調整領域、局在化シグナル、選択マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換えダイズの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p.9)に示した。

10

- ② 目的遺伝子及び選択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

15 PAT 蛋白質

作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、作物は枯死する。

- 20 一方、*pat* 遺伝子が導入された植物体では、ホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素(PAT 蛋白質)が産生され、この酵素はグルホシネートをアセチル化して N-アセチル-L-グルホシネートとし、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、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用は回避され、植物体中にアンモニアは蓄積されず、
25 ルホシネートを散布しても作物が枯死しない。

また、PAT 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2015 年に Food Allergy Research and Resource Program(FARRP)の AllergenOnline データベース(version 12)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの

相同性は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

- 5 *pat*遺伝子がコードするPAT蛋白質は、グルホシネートのL型異性体に高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することではなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性は殆どなく、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(Thompson *et al.*,1987)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においてもPAT蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転移反応は
- 10 阻害されることはなかった(Wehrmann *et al.*,1996)。これらのことから、PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。

また、グルホシネートの代謝産物であるN-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することではなく(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響

15 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

20

本組換えダイズの作出に用いたプラスミドは、プラスミド pUC19 を基本として構築されたプラスミド pB2/35SAcK である(図 1, p.12)。

ロ 特性

25

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pB2/35SAcK の塩基数は 4076 bp である。プラスミド地図を図 1(p.12)に、また、全塩基配列を別添資料 1(p.8)に示した。

30

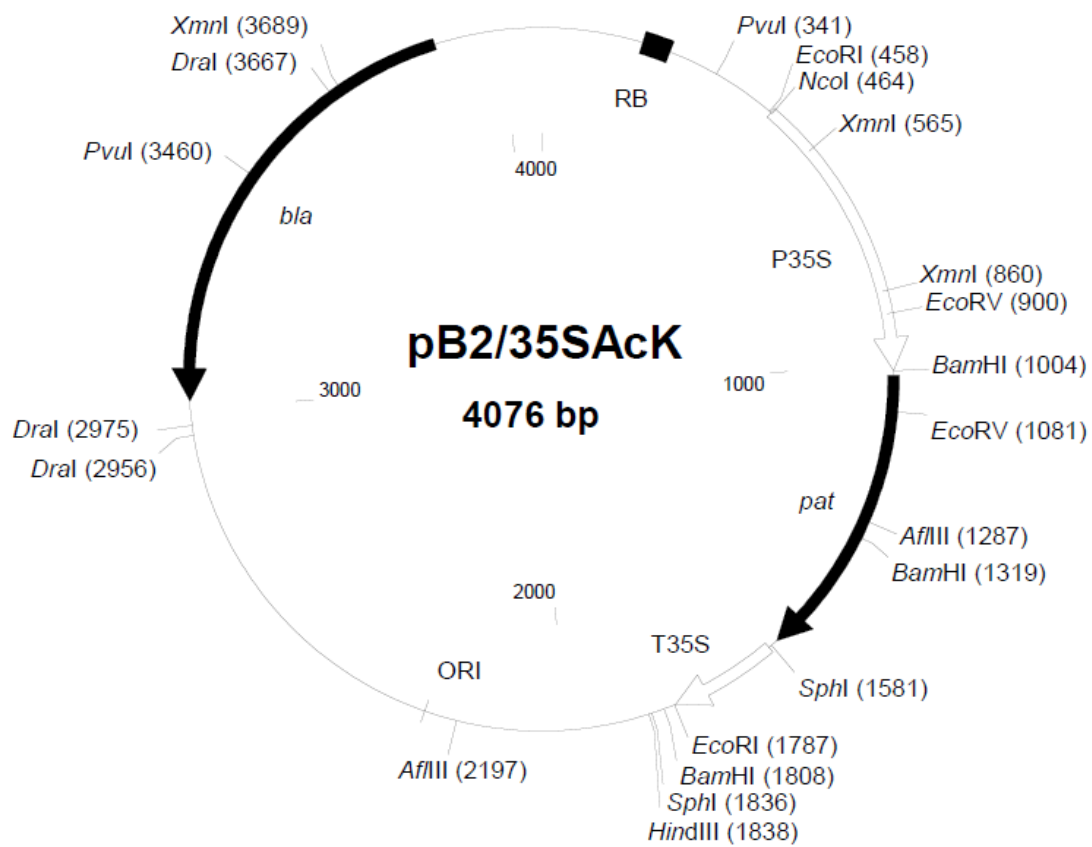


図 1 pB2/35SAcK のプラスミド地図

(注：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。)

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミドpB2/35SAcKには、選択マーカーとしてアンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が構築されている。本遺伝子は、形質転換前にプラスミド
5 pB2/35SAcKを制限酵素 *PvuI* で切断した際に2つに分断されている(図2)。また、
本組換えダイズ(T4世代, 図3の②, p.15)の葉、茎、根及び種子より抽出したRNA
について、*bla* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析を行ったが、いず
れの組織においても転写産物は検出されず(検出限界1 pg)、本遺伝子が本組換え
ダイズにおいて発現していないことが確認されている(Figure 1, p.15, 別添資料
10 2)。

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

15 プラスミド pB2/35SAcK の感染性は知られていない。

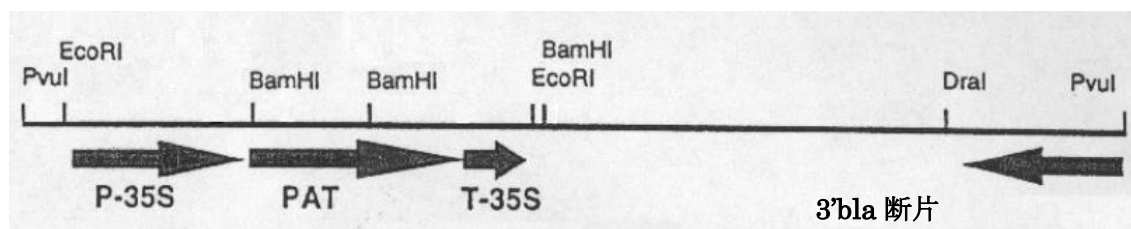
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

20

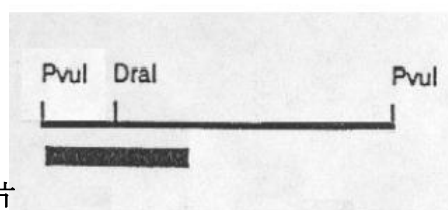
プラスミド pB2/35SAcK は、P35S の上流及び *bla* 遺伝子上にそれぞれ存在す
る *PvuI* 切断部位で切断され、2 つの断片に分断されている。宿主内に移入され
た核酸全体の構成を図 2 に示した。

断片 125



30

断片 2



35

5'bla 断片

図 2 供与核酸の構成図

(注：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

2 カ所の制限酵素 *PvuI* 切断部位で分断された長短 2 つのプラスミド pB2/35SAcK 断片(図 2, p.13)を、パーティクルガン法により宿主の茎頂分裂組織
5 に導入した。

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抜方法

10

形質転換を行った細胞を、植物ホルモンを含む培地に植え、シュートを誘導した後、グルホシネートを含む培地を用いて耐性を示す個体を選抜した。

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の菌体 15 の残存の有無

—

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 20 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

選抜した形質転換体を温室で栽培し、さらにグルホシネートによる選抜を行い、本組換えダイズ当代(T0)を得た。その後、自殖を繰り返し、各試験に用いた
25 世代の植物体を得た。育成の経過を図 3(p.15)に示した。なお、本申請の範囲は T4 世代及びその後代である。また、本組換えダイズの我が国における承認の状況を表 2(p.15)に示す。

なお、1999 年 5 月に輸入のみの使用目的で「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」への適合が確認され、2004 年のカルタヘナ法施行後も引
30 き続き輸入のみの使用目的で第一種使用規程が承認されている。本申請は、本系統の将来の活用を想定した、使用目的に栽培を含む第一種使用規程承認申請である。

表 2 我が国における申請及び承認状況(2016 年 5 月現在)

申請先	目的	申請状況
農林水産省	環境 ¹ (輸入)	1999 年 5 月確認
農林水産省・環境省	環境 ² (食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管及び廃棄並びにこれらに付随する行為)	2006 年 11 月承認
農林水産省・環境省	環境 ² (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)	2014 年 5 月承認
厚生労働省	食品 ³	2002 年 7 月承認
農林水産省	飼料 ⁴	2003 年 3 月承認

¹ 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く。

² 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律に基づく。

³ 食品衛生法に基づく。

5 ⁴ 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。

(注：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。)

【社外秘情報につき非開示】

10

図 3 本組換えダイズの育成

(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

15 ① 移入された核酸の複製物が存在する場所

2015 年にプエルトリコにおいて、宿主品種 A2704 に本組換えダイズ(Tⁱⁱⁱ世代: 図 3)を掛け合わせ、挿入 DNA に関してヘミ接合体である F1 世代を得た。この F1 世代を自殖して得られた F2 世代(図 3 の④)及び F2 世代中のヘミ接合体の自殖後代(F3 世代: 図 3 の④)の遺伝子型を PCR で確認した結果、挿入 DNA をホモで有する個体(ホモ接合体)、挿入 DNA をヘミで有する個体(ヘミ接合体)及び挿入 DNA を有さない個体(null 分離体)の分離比は 1:2:1 を示した。この結果は、挿入遺伝子座に関して一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比に適合することから、挿入遺伝子は核染色体上の 1 ヲ所に存在すると考えられる(表 3, p.16 ; Table 1, p.10, 別添資料 7)。

25

表3 F2 及び F3 世代における PCR による遺伝子型の検定(2015 年, プエルトリコ)

	F2 世代 ¹⁾		F3 世代 ²⁾	
	観測値	期待値	観測値	期待値
ホモ接合体	79	76	148	148
ヘミ接合体	158	152	295	296
null分離体	67	76	149	148
χ^2 値 ³⁾	1.421		0.010	

1) F1(ヘミ接合体)の自殖によって得られた世代。

2) F2(ヘミ接合体)の自殖によって得られた世代。

3) 一遺伝子座と仮定し、 χ^2 検定を実施。自由度 2、有意水準 5%において、 χ^2 値 5.99 以上で帰無仮説が棄却される。

(注：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 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

5

本組換えダイズ(T4 世代: 図 3 の①, p.15)の葉から抽出したゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った結果、順位で配置された 2 コピーの *pat* 遺伝子発現カセットの間に、図 4(p.18)に示すように制限酵素 *PvuI* 切断部位で分断された *bla* 遺伝子の 3'側断片及び 5'側断片各 1 コピーが挿入されたことが確認された。

10 なお、*bla* 遺伝子は *PvuI* 切断部位で分断され、5'側断片は 3'側断片とは逆位で挿入されており、挿入 DNA において *bla* 遺伝子として機能のある配列を構成しておらず、さらにノーザンブロット分析により本組換えダイズの葉、茎、根のどの器官においても発現していないことが確認されている(Figure 1, p.15, 別添資料 2、別添資料 3)。

15 また、シーケンス解析の結果、挿入 DNA の 3'側末端に *bla* 遺伝子の 3'側断片に由来する 28 bp の配列及び挿入 DNA の 3'側境界領域に 4 bp のフィラー DNA(一本鎖やゲノム欠失部分等を充填する短い DNA)が挿入されていることが確認された(Table 2, p.12, 別添資料 4)。

さらに、挿入 DNA の近傍配列の解析の結果、5'側の *pat* 遺伝子発現カセットの上流のプラスミド pB2/35SAcK 由来配列末端の 2566 bp はダイズ葉緑体ゲノムの配列が挿入されており、【社外秘情報につき非開示】(Table 3, p.13, 別添資料 10)。なお、ダイズの核ゲノムには、他の植物と同様に葉緑体の DNA が断片化して存在しているが(Chang *et al*, 2013)、葉緑体は原核生物型の発現のシステムを保っていることから、核遺伝子の転写や翻訳の仕組みとは大きく異なり、核ゲ
25 ノム上に葉緑体遺伝子が挿入されても、発現することはできない(小保方、2008)。

また、挿入遺伝子の安定性を調べるため、本組換えダイズの複数世代(T4、T5、T6、T ii 及びT iii 世代: 図3の③, p.15)の葉から抽出したゲノムDNAについて、*pat* 遺伝子発現カセットをプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において同一のバンドが検出され、挿入DNAが複数世代に安定して伝達
5 されていることが確認された(Figure 3, p.22, 別添資料5)。

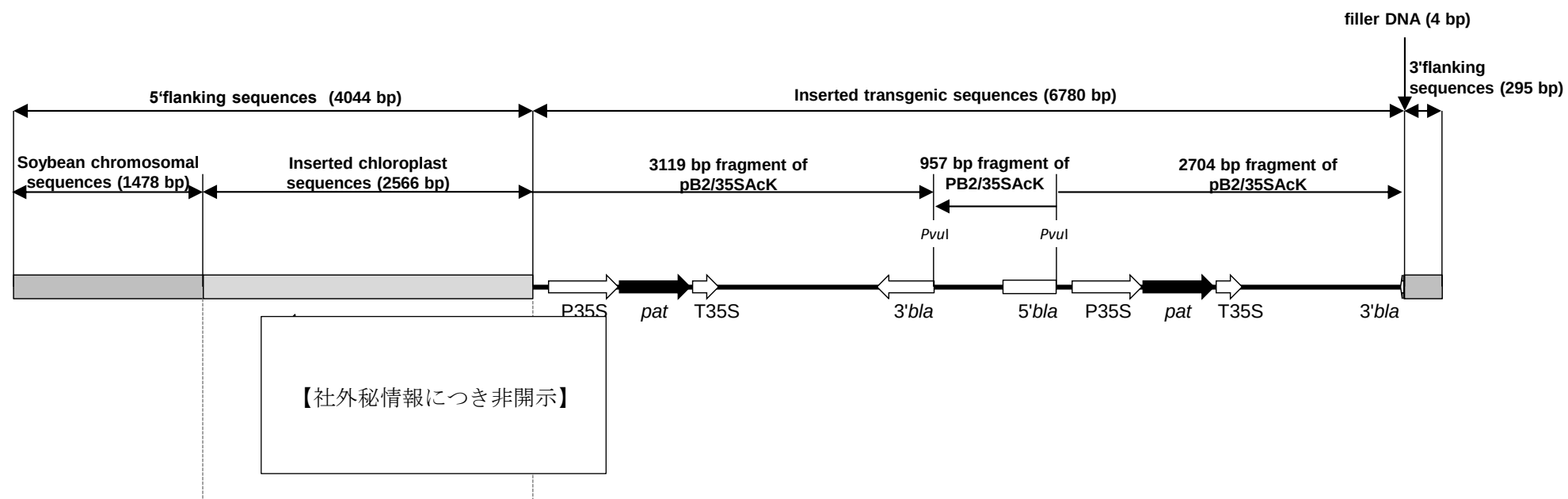


図 4 本組換えダイズにおける挿入 DNA の概略図

(注：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。)

- 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

2コピーの*pat*遺伝子発現カセット及びその間に挿入された2つの*bla*遺伝子断片並びに挿入DNAの3'側末端の*bla*遺伝子断片は、それぞれ隣接している(図4, p.18)。

- ④ 移入された核酸の発現により付与された生理学的又は生態学的特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

10

2002 年に米国の温室内で栽培された本組換えダイズ及び非組換えダイズ各 5 個体の根、茎及び葉における PAT 蛋白質を ELISA 法により分析した結果、本組換えダイズでは全ての個体のいずれの部位においても PAT 蛋白質が検出された(表 4; Table 1, p.13, Table 2, p.14, Table A3-3, p.34, Table A3-6, p.36, 別添資料 8)

15

表4 ELISA法による本組換えダイズの根、茎及び葉におけるPAT蛋白質分析

系統	部位	PAT蛋白質量の平均 ($\mu\text{g/g}$ 生重) $\pm$ SD	粗蛋白質/生重 (%)	PAT蛋白質/粗蛋白質(%)
本組換えダイズ	根	2.23 ± 1.29	1.95	0.011
	茎	7.63 ± 2.20	3.58	0.021
	葉	14.5 ± 2.4	5.96	0.024
非組換えダイズ	根	< LOD	1.61	-
	茎	< LOD	4.15	-
	葉	< LOD	5.22	-

2002年、米国(n=5)。各部位の生重におけるPAT蛋白質の検出限界 (LOD) はそれぞれ5.12ng/g (根) 2.48ng/g (茎) 4.16ng/g (葉) あった。

(注：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。)

20

また、2014 年にバイエルクロップサイエンス株式会社明野事業所 隔離ほ場 (以下、「隔離ほ場」とする。)において、本組換えダイズ(Tiii 世代: 図 3 の⑤, p.15) 及び非組換えダイズ、並びにそれらの収穫種子を用いて除草剤グルホシネート 散布試験を行った結果、本組換えダイズでは全ての個体が耐性を示した(表 5, p.20 ; p.19, 別添資料 9)。

25

30

表 5 導入遺伝子の発現による除草剤耐性

系統	T _{iii} 種子			T _{iv} 種子(収穫種子)		
	散布 個体数	耐性 個体数	耐性個 体率(%)	散布 個体数	耐性 個体数	耐性個 体率(%)
本組換えダイズ	20	20	100	100	100	100
非組換えダイズ	20	0	0	100	0	0

初生葉が展開した後、除草剤グルホシネート(薬量 55.5g a.i.(有効成分含量)/450L/10a 相当)を散布し、散布から 2 週間後に耐性を確認した。

(注：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。)

以上のことから、個体間及び世代間において *pat* 遺伝子が安定して発現していることが確認された。

5

- 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

本組換えダイズは伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然条件下において移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

10

- (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

本組換えダイズは、本系統に特異的なプライマーセットと TaqMan® プローブを用いた real-time PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 6)。

15

本方法の検出限界値は、ゲノム DNA 量比で 0.045% である(Annex 4, p.9, 別添資料 6)。

本方法の信頼性(再現性)については、自社研究所以外に Atlangene Applications と RHM Technology Ltd において検証され、確認されている(p.7, 別添資料 6)。

20

- (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

25

本組換えダイズは、*pat* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示す。

- ② 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相違の有無及び相違がある場合はその程度

2014年に隔離ほ場において本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った。試験に
5 供試した本組換えダイズの世代はT ii 世代であった(図3の⑤, p.15)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝的背景品種A2704を用いた(以下、「非組換えダイズ」とする。)。

a 形態及び生育の特性

- 10 形態及び生育の特性については、農林水産省による農林水産植物種類別審査基準・大豆(農林水産省, 2012)を参考に、20項目(発芽期、発芽揃い、伸育型、毛茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、開花始め、開花期、花粉の充実度及びサイズ、成熟期、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、熟莢の色、子実の形、種皮の地色、臍の色)について、本組換えダイズと非組換えダイズを比較
15 した。花粉の充実度及びサイズ、主茎長、主茎節数、分枝数、一株地上部重、子実の形に関しては統計処理を行い、発芽期、発芽揃い、開花始め、開花期、成熟期、倒伏抵抗性、伸育型、毛茸の色、毛茸の多少、花色、小葉の形、熟莢の色、種皮の地色、臍の色に関しては観察結果を比較した。その結果、いずれの項目についても、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
20 あるいは相違は認められなかった(p.4-7, 別添資料9)。

b 生育初期における低温耐性

- 5℃・10時間明条件下における本組換えダイズ及び非組換えダイズの幼植物体の低温障害(萎縮程度)を経時的に調査した。その結果、全ての調査時に
25 て系統間に統計学的有意差は認められなかった(表5, p.8, 別添資料9)。

c 成体の越冬性

- 2014年6月に播種した本組換えダイズ及び非組換えダイズを10月の収穫期後も栽培を続けたところ、翌年2月には低温及び降霜によりいずれの株も枯死して
30 いることが確認された(p.9, 別添資料9)。

d 花粉の稔性及びサイズ

- 本組換えダイズ及び非組換えダイズから花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色し、花粉の充実度及びサイズを比較した。その結果、本組換えダイズ及び
35 非組換えダイズの花粉の充実度及びサイズに統計学的有意差は認められなかった(表7, p.10 及び 図7, p.11, 別添資料9)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する項目として、農林水産省による農林水産植物種類別審査基準・大豆(農林水産省食料産業局新事業創出課, 2012)を参考に、6項目(一株全粒重(粗粒重)、一株成熟粒重(精粒重)、一株成熟粒数、一株稔実莢数、一莢内
5 粒数、百粒重)を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、本組換えダイズと非組換えダイズの間に統計学的有意差は認められなかった(表9, p.12, 別添資料9)。

種子の脱粒性に関する項目として、成熟期に収穫した本組換えダイズ及び非
10 組換えダイズの裂莢の難易を裂莢数により比較した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、莢の裂莢性に違いは認められなかった(表9, p.12, 別添資料9)。

休眠性及び発芽率については、本組換えダイズと非組換えダイズの収穫直後
15 及び1ヶ月間風乾した種子をポットに播種し、播種2週間後にそれぞれの発芽率を調査した。その結果、収穫後の期間に係わらず本組換えダイズと非組換えダイズの発芽率はいずれも100%となり、休眠性は認められなかった(表10, p.14, 別添資料9)。

20 f 交雑率

隔離ほ場において本組換えダイズと隣接して栽培した非組換えダイズより収穫した種子を用いて、本組換えダイズと非組換えダイズ間の交雑率を調査した。初生葉から第一本葉が展開したステージの実生4,049株に除草剤グルホシネート(薬量55.5g a.i.(有効成分含量)/450L/10a相当)を散布し、さらに、生存した3個
25 体についてPCR法により本組換えダイズ特異的な塩基配列の増幅を行った結果、本組換えダイズとの交雑は認められなかった(p.15, 別添資料9)。

g 有害物質の産生性

有害物質の産生性を調査するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相
30 試験を行った。

後作試験

隔離ほ場において収穫期まで約4ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫後の根域土壌をそれぞれ採取し、その土壌において検定作物として栽培したダイコンの発芽率、草丈及び乾物重について比較した。その結果、
35 いずれの項目についても本組換えダイズ及び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(表11, p.16, 別添資料9)。

鋤込み試験

5 隔離ほ場において収穫期まで約4ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体地上部を収穫し、乾燥・粉砕して試料とした。これを1%の割合で混和した土壌において、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈及び乾物重を比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び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(表12, p.17, 別添資料9)。

10

土壌微生物相試験

隔離ほ場において収穫期まで約 4 ヶ月間栽培した本組換えダイズ及び非組換えダイズの試験区の土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌、放線菌及び細菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズ及び非組換えダイズの試験区に統計学的有意差は認められなかった(表 13, p.18, 別添資料 9)。

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

20

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

25

—

(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

30

—

(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

35

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

5

- (6) 国外における使用等に関する情報

国外における本組換えダイズの承認に関する情報を表 6 に示した。また、我が国における承認に関する情報は、表 2(p.15)に記した。

10

表 6 国外における本組換えダイズ承認に関する情報(2016 年 5 月現在)

国名	承認機関	承認年	安全性審査の種類
米国	米国農務省 (USDA)	1996 年	無規制裁培
	米国食品医薬品庁 (FDA)	1998 年	食品・飼料
アルゼンチン	農牧業バイオテクノロジー諮問委員会(CONABIA)	2001 年	環境
	農畜産物衛生管理機構 (SENASA)	2004 年	食品・飼料
EU	欧州食品安全機関(EFSA)	2008 年	環境・食品・飼料
ウルグアイ	National Biosafety Cabinet of Uruguay*	2012 年	環境・食品・飼料
オーストラリア・ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	2004 年	食品
カナダ	カナダ食品検査庁 (CFIA)	1999 年	環境
	カナダ食品検査庁 (CFIA)	2000 年	飼料
	カナダ保健省 (Health Canada)	2000 年	食品
韓国	韓国食品医薬品庁(KFDA)	2009 年	食品
	韓国農村振興庁(RDA)	2009 年	環境・飼料
ブラジル	ブラジル国家バイオ安全技術委員会(CTNBio)	2010 年	環境・食品・飼料

*Commission for Risk Management の安全性評価を元に、National Biosafety Cabinet of Uruguay が最終的な承認を出す。

(注：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。)

15

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

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主の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、我が国の自然環境下において自生化しているとの報告はなされていない。

10

我が国の隔離ほ場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、休眠性及び収穫種子の発芽率を隔離ほ場試験にて調査した結果、全ての項目において両系統間に相違又は統計学的有意差は認められなかった(第一. 2. (6). ②. a～e、p.21～22)。

15

また、本組換えダイズは導入された *pat* 遺伝子によって PAT 蛋白質を発現し除草剤グルホシネート耐性を示すが、除草剤グルホシネートの散布が想定されにくい自然環境下において、除草剤グルホシネートに耐性であることが、競合における優位性を高めることは考え難い。

20

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関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

25

(2) 影響の具体的内容の評価

—

30 (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

35

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した。

2. 有害物質の産生性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主の属する生物種であるダイズについて、野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生するとの報告はなされていない。

- 10 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、隔離ほ場試験において後作試験、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の間
- 15 本組換えダイズ中では除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することは考え難い。また、PAT 蛋白質のアミノ酸配列に基づき包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった(第一. 2. (6). ②. g、p.22～23)。
- 20 なお、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 *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-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することではなく(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。また、本代謝産物はダイズにおけるグルホシネートの残留基準値(2 ppm)の規制対象化合物に含まれており(公益財団法人
- 25 日本食品化学研究振興財団)、ラット、マウス、イヌ等の哺乳類を対象に毒性試験が行われた結果、その毒性は、普通物に分類されるグルホシネートよりも低いことが確認されている(バイエルクロップサイエンス株式会社, 2011)。

- 30 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

(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した。

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

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
15 (第一. 1. (1). ③、p.3)。したがって、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物として、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除草剤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 *pat* 遺伝子がツルマメの集団に浸透することが考えられた。

(3) 影響の生じやすさの評価

25

ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、また、我が国において両種の開花期が重なることは稀であることから(阿部・島本, 2001)、交雑は起こりにくいと考えられる。しかし、ツルマメは我が国において北海道南部から九州まで全国的に分布しており、河川の氾濫原や土手、路傍や畑の周辺等に自生している
30 ことから(阿部・島本, 2001)、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は否定できない。

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との間の交雑率を調査するため、本組換えダイズと隣接して栽培された非組換えダイズの収穫種
35 子における交雑体の発生頻度を調査した。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、初生葉から第一本葉が展開したステージの実生に

除草剤グルホシネート(薬量 55.5g a.i./450L/10a 相当)を散布して生存個体数を調査した。その結果、発芽した 4,049 株のうち、除草剤グルホシネート散布後の生存個体が 3 個体あったが、PCR 法により本組換えダイズ特異的な塩基配列の増幅を行ったところ、いずれも本組換えダイズとの交雑に由来する株ではなかった(第一. 2. (6). ②. f, p.22)。さらに、花粉の充実度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の間に統計学的有意差は認められなかった(第一. 2. (6). ②. d, p.21)。したがって、本組換えダイズの生殖特性は宿主に使用したダイズの変動の範囲内にあり、宿主に使用したダイズと比較して、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。

ダイズとツルマメは主に自殖性の植物であり、我が国において両種の開花期が重なることは稀である(阿部・島本, 2001)が、晩生の秋ダイズが栽培されている温暖な地域(九州や四国)では、ダイズの開花期とツルマメの開花期が重なる可能性がある。ツルマメとダイズの自然交雑について、開花期の重なるダイズ品種(晩生)とツルマメを 50 cm 間隔で交互に配置して栽培した場合、結実したツルマメから採種された種子 686 個中、雑種は 5 個あり、交雑率は 0.73%であった(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズを供試して、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、交雑率が 0.136%(調査 25,741 個体中、雑種 35 個体)であった。他方、組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、2、4、6 m の距離で交雑率はそれぞれ 0.013%(調査 7,521 個体、7,485 個体、7,508 個体中それぞれ雑種 1 個体)であり、8、10 m の距離では交雑種子は認められなかった(Mizuguti *et al.*, 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合においても、本組換えダイズ由来の *pat* 遺伝子がツルマメ集団中に浸透交雑していくためには、雑種後代が自然環境中で生存し、ツルマメと交雑を繰り返す必要がある。ダイズからツルマメへの遺伝子流動については、日本各地のダイズ畑周辺におけるツルマメ集団について数年間調査が行われ、ダイズとツルマメとの中間体が秋田県や佐賀県で発見された(加賀ら, 2005; 黒田ら, 2005)。これらの中間体の後代のほとんどはその他のモニタリング調査では発見されず(黒田ら, 2006)、中間体が自生地ですべて生存する確率は非常に低いことが示唆された(黒田ら, 2006)。また、秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 地点において採取された 468 個体のツルマメ、17 個体の中間体

及び12個体の栽培ダイズについて、分子マーカーによる解析が行われた結果、これらの中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動によるものと判断された(Kuroda *et al.*, 2010)。栽培化に関連した形質である種子の生産数や種子の越冬性に関するQTLがダイズとツルマメの中間体の自然環境への適応度に関連していることが報告されており、中間体はダイズからこれらの遺伝子を受け取ったことにより適応度が下がった(Kuroda *et al.*, 2013)。また、ツルマメ個体群におけるダイズ遺伝子の残存性がモデルにより予測されており、中間体へ導入された遺伝子は中間体の初期世代からツルマメの個体群内から急激に消失していくことが予測されている(吉村ら, 2016)。他方、ダイズとツルマメの中間体からツルマメへの二次的な遺伝子流動は認められなかったことから、ダイズとツルマメの雑種形成の可能性はあるが、我が国の自然環境において更なる浸透交雑が起こる可能性は極めて低いと考えられた。

以上から、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の集団内に浸透してゆく可能性は極めて低いと考えられる。

15

また、農林水産省は、運搬中にこぼれ落ちた遺伝子組換えダイズについて、カルタヘナ法に則り、承認の際に予想されなかった生物多様性への影響が生じていないかどうかを調べるため、ダイズの輸入港10港の周辺地域において生育状況や近縁種との交雑の程度などを調査している。2009-2014年に実施された遺伝子組換え植物実態調査の結果において、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, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014)。

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25

以上のことから、本組換えダイズの交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4. その他の性質

30

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考えられる性質はないと判断された。

第三 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自生化しているとの報告はなされていない。

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、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、休眠性を隔離ほ場試験において比較検討した結果、いずれの項目においても本組換えダイズと非組換えダイズの間に統計学的な有意差あるいは相違は認められなかった。よって、本
10 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。

また、本組換えダイズには除草剤グルホシネート耐性が付与されているが、除草剤グルホシネートが散布されることが想定されにくい自然環境下において、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
15 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した。

有害物質の産生性：

20 宿主の属する生物種であるダイズについて、野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はなされていない。

有害物質の産生性について、隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施した結果、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の間で統計的有意差は認められなかった。

25 本組換えダイズ中では除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することは考え難い。さらに、PAT 蛋白質の代謝産物である *N*-アセチル-*L*-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することではなく、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。

30 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した。

交雑性：

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こと
35 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。

隔離ほ場試験において交雑性、花粉の充実度及びサイズについて調査した結果、本組換えダイズの生殖特性は宿主に使用したダイズの変動の範囲内にあり、宿主に使用したダイズと比較して、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流動も確認されていない。よって、本組換えダイズがツルマメと交雑し、*pat* 遺伝子がツルマメの集団内に浸透してゆく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を生ずるおそれはないと判断した。

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、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した。

参考文献

- Abel, G. H. (1970) Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agronomy Journal* 62: 121-123.
- 5 Ahrent, D. K., Caviness, C. E. (1994) Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: 376-378.
- Caviness, C. E. (1966) Estimates of natural crosspollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6: 211-212.
- 10 Chang, S., Wang, Y., Lu, J., Gai, J., Li, J., Chu, P., Guan, R., Zhao, T. 2013. The mitochondrial genome of soybean reveals complex genome structures and gene evolution at intercellular and phylogenetic levels. *PLOS one* 8: 1-14.
- 15 Chiang, Y. C., Kiang, Y. T. (1987) Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Academia Sinica* 28: 1-11.
- Eckhard, S. *et al.* (1993) Plant-functional phosphinothricin resistance gene and its use. European patent. 0275957 B1.
- 20 FAO (2015) FAOSTAT 2014 data, Crops production. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (閲覧日 2016年5月6日)
- 25 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.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA
30 of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO Journal* 3: 835-846.
- Hymowitz, T., Harlan, J. R. (1983) Introduction of soybean to north America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany* 37: 371-379.
- 35 Kiang Y. T., Chiang Y. C., Kaizuma N. (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate prefecture, Japan. *Journal of Heredity* 83: 325-329.
- Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N. Nishizawa, T., Tamaoki, M., Saji, H. (2013) Characterization of hybrids between wild and genetically modified glyphosate-tolerant
40 soybeans. *Plant Biotechnology* 30: 335-345.
- Kuroda Y., Kaga A., Tomooka N. and Vaughan, D. A. (2008) Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48: 1071-1079.
- 45 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.
- Kuroda Y., Kaga A., Tomooka, N., Yano, H., Takada, Y., Kato, S., Vaughan, D. (2013)
 5 QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated soybeans in experimental fields. *Ecology and Evolution* 3: 2150-2168.
- Matson, K. W., Drzycimski, D. L., Otero-Ortiz, Y. I. (1996) United States Utility Patent Patent No. US 5,576,477 A Soybean cultivar A2704.
 10 http://www.lens.org/lens/patent/US_5576477_A(閲覧日 2015年11月25日)
- 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. *Environ. Biosafety Res.* 9:
 15 13-23.
- 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.
 20
- Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N.-H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on
 25 Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf> (閲覧日 2015 年 11 月 25 日).
- OECD (2000) Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15).
 30 <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815668.pdf> (閲覧日 2015 年 11 月 25 日).
- OECD (2002) Module II: Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25. <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815748.pdf>
 35 (閲覧日 2015 年 11 月 25 日).
- Pietrzak, M., Shillito, R. D., Hohn, T., Potrykus, I. (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Research* 14: 5857-5868.
 40
- Ray, J. D., Kilen, T. C., Abel, C. A., Paris, R. L. (2003) Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ. Biosafety Res.* 2: 133-138.
- Sutcliffe, J. G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of
 45 *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3737-3741.

- Thompson, C. J., Rao Movva, N., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO Journal 6: 2519-2523.
- 5 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.
- 10 Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.
- Yoshimura, Y. (2011) Wild tunnel and field assessment of pollen dispersal in soybean
15 [*Glycine max* (L.) Merr.] J. Plant Res. 124:109-114
- 阿部 純, 島本 義也 (2001) ダイズの進化 栽培植物の自然史. 山口 裕文, 島本 義也 編著 北海道大学図書刊行会 p.77-95.
- 20 大庭 寅雄 (2001) ダイズの品種生態と選択, I 品種の生態型と選択, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.102-105.
- 小保方潤一. 2008. 遺伝子が「一生を過ごす」場としてのゲノム —生命誌56 Research01—研究を通し eds by 生命誌研究館
25 http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/056/research_11_2.html (閲覧日 2016年6月17日)
- 加賀 秋人, 友岡 憲彦, Ugen P, 黒田 洋輔, 小林 伸哉, 伊勢村 武久, Miranda-Jonson G., Vaughan D. A. (2005) 野生ダイズと栽培ダイズとの自然交雑集団
30 の探索と収集—秋田県及び広島県における予備的調査—. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p.59-71.
- 鎌田 慶朗 (1992) 3.大豆の化学, 大豆の科学. 山内文男・大久保一良 編 朝倉書店 p.27-47.
- 35 黒田 洋輔, 加賀 秋人, Anna Apa, Vaughan D. A., 友岡 憲彦, 矢野 博, 松岡 伸之(2005) 野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング—秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県における現地調査から—. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所,
40 所, p.73-95.
- 黒田 洋輔, 加賀 秋人, Gaufu J., Vaughan D. A., 友岡 憲彦 (2006) 野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリング—秋田県、茨城県、高知県、佐賀県における現地調査から—. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通
45 巻第22巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 1-12.

公益財団法人 日本食品化学研究振興財団 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 (閲覧日 2015 年 11 月 25 日)

- 5 国分 牧衛 (2002) ダイズ, 作物学事典, 日本作物学会編. 朝倉書店 p.370-377.
- 昆野 昭晨 (2001) 生育のステージと生理, ・生態, III 花芽分化の生理, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.68-73.
- 10 後藤 寛治 (2001) ダイズの起源と特性, I 栽培の起源と分布, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.33-41.
- 鄭 紹輝 (2008) 11.ダイズ, 見てわかる農学シリーズ 3 作物学概論. 大門弘幸編. 朝倉書店.
- 15 バイエルクロップサイエンス株式会社 (2011) 農薬抄録. グルホシネート(除草剤). 独立行政法人農林水産消費技術センター.
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/glufosinate/index.htm> (閲覧日 2015 年 11 月 25 日)
- 20 橋本 鋼二 (2001a) ダイズの品種生態と選択, I 品種の生態型と選択, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.91-96.
- 橋本 鋼二 (2001b) ダイズの品種生態と選択, II 品質・用途と品種選択, 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.110-112.
- 25 農林水産省 (2009) 「平成 21 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/21_kekka.pdf
- 30 農林水産省 (2010) 「平成 22 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/22_natane.pdf
- 農林水産省 (2011) 「平成 23 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/23_kekka.pdf
- 35 農林水産省 (2012) 「平成 24 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/24_kekka.pdf
- 農林水産省 (2013) 「平成 25 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
40 http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h25_kekka.pdf
- 農林水産省 (2014) 「平成 26 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h26_houkoku.pdf
- 45 農林水産省 (2016a) 農林水産統計. 平成 27 年産大豆、小豆、いんげん及びらっかせい(乾燥子実)の収穫量. 農林水産省大臣官房統計部 (平成 28 年 2 月 23 日)

公表)

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokutei_sakumotu/pdf/syukaku_daizuetc_15.pdf
(閲覧日 2016 年 5 月 6 日)

- 5 農林水産省 (2016b) 農林水産物輸出入概況 2015年 (平成27年) 確定値. 国際部
国際政策課 (平成28年3月24日公表)

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_15.pdf (閱 覧 日
2016 年 5 月 6 日)

- 10 農林水産省 (2016c) 平成26年度食料需給表 (平成28年3月31日公表)

<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyu/> (閲覧日 2016 年 5 月 6 日)

山内 文男 (1992) 3.大豆の化学, 大豆の科学 山内文男・大久保一良 編
朝倉書店, p.1-13.

15

吉村 康幸、加賀 秋人、松尾 和人 (2016) 遺伝子組換えダイズの生物多用し
え影響評価に必要なツルマメの生物情報集. 農業環境技術研究所報告36.
P.47-69.

別添資料の内容

別添資料 1: Description of vector pB2/35SAcK. (ベクターpB2/35SAcKの説明)

社外秘情報につき非開示

5

別添資料 2: Evaluation of cryptic gene expression of the *bla* gene in Liberty Link soybean event A2704-12. (A2704-12 における *bla* 遺伝子発現の評価)

社外秘情報につき非開示

10 別添資料 3: Molecular determination of the number of inserted *pat* and *bla* gene copies in Liberty Link *Glycine max* event A2704-12. (A2704-12 における *pat* 及び *bla* 遺伝子のコピー数の決定)

社外秘情報につき非開示

15 別添資料 4: Description of the transgenic locus of *Glycine max* transformation event A2704-12. (A2704-12 の挿入部位の詳細)

社外秘情報につき非開示

別添資料 5: Structural stability analysis of early and recent generations of *Glycine max* A2704-12. (A2704-12 の初期と現在の世代における挿入配列の安定性)

20

社外秘情報につき非開示

別添資料 6: イベント識別方法

社外秘情報につき非開示

25

別添資料 7: A2704-12 Soybean – Inheritance of the insert over two generations. (A2704-12 ダイズ – 二世代における挿入遺伝子の遺伝的特徴)

社外秘情報につき非開示

30

別添資料 8: PAT protein content in roots, stems and leaves of A2704-12 transgenic soybeans. USA, 2002 (A2704-12 の根、茎、葉における PAT 蛋白質含有量)

社外秘情報につき非開示

5 別添資料 9: 除草剤グルホシネート耐性ダイズ A2704-12 の隔離ほ場試験報告書(2015 年)

社外秘情報につき非開示

別添資料 10: Update of the bioinformatics analysis of newly created ORFs from soybean transformation event A2704-12. (A2704-12 ダイズにおいて新しく作られた ORF のバイオインフォマティックス解析の更新)

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 28 年 5 月 11 日

5 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

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性ダイズ(pat, Glycine max (L.) Merr.)(A2704-12, OECD UI: ACS-GM005-3)(以下、「A2704-12」とする。)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は、以下の措置を執ることとする。

15 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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。

(平成28年 5 月現在)

危機対策本部	
(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部 マーケットアクセプタンス&種子規制ポリシーマネージャー
	バイエルクロップサイエンス株式会社 広報部 部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部 種子規制部

20 (個人名は個人情報のため非開示)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

25 弊社は、米国バイエルクロップサイエンス社と連絡を取り、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、穀物取扱いなど使用の可能性のある関係各社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

弊社は、米国バイエルクロップサイエンス社と連絡を取り、生産農家や穀物取扱業者など取引ルートへA2704-12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。

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

10

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は米国バイエルクロップサイエンス社の協力のもと、A2704-12が環境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A2704-12は、環境中で生存しないように不活化する。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

A2704-12が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、速やかに、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。