

チョウ目害虫抵抗性ダイズ
 (*cryIA.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.)
 (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) 申請書等の概要

5	第一種使用規程承認申請書	1
	生物多様性影響評価書	3
	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
10	① 和名、英名及び学名	3
	② 宿主の品種名	3
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
	(2) 使用等の歴史及び現状	4
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
15	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
	(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	6
20	ニ 繁殖又は増殖の様式	6
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
	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	6
	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	7
25	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	11
	ホ 病原性	11
	ヘ 有害物質の産生性	11
	ト その他の情報	11
30	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	13
	(1) 供与核酸に関する情報	13
	イ 構成及び構成要素の由来	13
	ロ 構成要素の機能	17
	① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の 供与核酸の構成要素それぞれの機能	17
35	② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及 び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白 質と同一性を有する場合はその旨	23

	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	28
	(2) ベクターに関する情報	28
	イ 名称及び由来	28
	ロ 特性	28
5	① ベクターの塩基数及び塩基配列	28
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	28
	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	28
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	28
10	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	28
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	29
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	29
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	29
15	② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無	29
	③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過	29
	(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	32
20	① 移入された核酸の複製物が存在する場所	32
	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	34
	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	39
25	④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	39
	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	42
	(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 ..	42
30	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	42
	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	42
	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間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	42
35	a. 形態及び生育の特性	43
	b. 生育初期における低温耐性	43
	c. 成体の越冬性	44

	d. 花粉の稔性及びサイズ	44
	e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	44
	f. 交雑率	45
	g. 有害物質の産生性	45
5	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	46
	(1) 使用等の内容	46
	(2) 使用等の方法	46
	(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	46
10	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	46
	(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	46
	(6) 国外における使用等に関する情報	47
15	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	48
	1 競合における優位性	48
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	48
	(2) 影響の具体的内容の評価	49
	(3) 影響の生じやすさの評価	49
20	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	49
	2 有害物質の産生性	50
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	50
	(2) 影響の具体的内容の評価	51
	(3) 影響の生じやすさの評価	51
25	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	52
	3 交雑性	53
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	53
	(2) 影響の具体的内容の評価	53
	(3) 影響の生じやすさの評価	53
30	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	58
	4 その他の性質	58
	第三 生物多様性影響の総合的評価	59
	参考文献	63
	緊急措置計画書	77
35	別添資料リスト	79

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成30年2月8日

5 農林水産大臣 齋藤 健 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役 ダビッド・ブランコ 印
住所 東京都中央区京橋二丁目5番18号

15 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	チョウ目害虫抵抗性ダイズ (<i>cryIA.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7)
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、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

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

① 和名、英名及び学名

10

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15

② 宿主の品種名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3555 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地

20

ダイズは、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する。*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 (OECD, 2000)。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若しくは *G. soja* と *G. max* の雑種であるという報告があるが (OECD, 2000)、確認はされていない。これらの野生種のうち、わが国に分布しているのはツルマメのみであり、*G. gracilis* の分布は認められていない (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991)。なお、ツルマメは、中国、韓国、日本、台湾及びロシアに分布しており (OECD, 2000)、わが国においては北海道、本州、四国及び九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (沼田ら, 1975; 浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 大橋, 1999)。また、北海道、東北、四国で行われたツルマメの自生地に関する調査では、主に河川流域で自生地が多く確認されている (河野ら, 2004; 菊池ら, 2005; 猿田ら, 2007; 山田ら, 2008; 猿田ら, 2009; 友岡ら, 2009)。

25

30

35

なお、ダイズは夏型一年生の栽培種であり、自生しているという報告はない (OECD, 2000)。

(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

5

ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1,100 年頃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(昆野, 1987)。わが国へは弥生時代に渡来し、栽培が始まったと考えられている(山内, 1992)。

10

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

a. 主たる栽培地域

15

国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2014 年の全世界におけるダイズの栽培面積は、約 11,772 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,342 万 ha、ブラジルが約 3,027 万 ha、アルゼンチンが約 1,925 万 ha、インドが約 1,091 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2014 年のわが国における栽培面積は、約 13.2 万 ha であった(FAOSTAT, 2017)。

20

b. 栽培方法

わが国でのダイズの慣行栽培法は、以下のとおりである。播種適期は北海道地方で 5 月下旬、東北地方南部、北陸・東山地方で 6 月上旬、関東地方で 6 月中旬、東海地方以西中国地方までは 6 月下旬、九州地方で 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) 及び 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。雑草の防除については、生育期間中に除草を早めに行い、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にくくなる。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(栗原ら, 2000)。

35

c. 流通実態及び用途

2016 年のわが国におけるダイズの輸入量は、約 288 万トンであり、そのうちの約 70% が米国から、約 18% がブラジルから輸入されている(財務省, 2017)。

輸入されたダイズがわが国で使用される際の用途は、1) 搾油用、2) 飼料用及び3) 食品用(搾油用を除く、以下同じ。)に大別される。2015年には、全輸入ダイズの69.3%に当たる約225万トンが搾油用、3.5%に当たる約10.2万トンが飼料用、29.6%に当たる約96万トンが食品用(搾油用を除く)として用いられている(農林水産省, 2018a)。

なお、海外から輸入される栽培用ダイズ種子は32キロから50トン(2006~2015年)(植物防疫所, 2017)と変動は大きいものの、国産種子(年間6,000トン(農林水産省, 2018a)と比べるとごくわずかである。

輸入される栽培用種子の大半は中国産である(植物防疫所, 2017)。海外における種子生産の際には異品種の混入を避けるために隔離措置がとられており、わが国に輸入される際には、コンテナにバラ積みされることはなく、袋または箱詰めされる。また、わが国における採種については、最近まで主要農作物種子法に基づき審査を受けた採種ほ場(指定種子生産ほ場)のみで行われていた。指定種子生産ほ場は、異品種の混入を避けるために隔離され、異株は抜き取られることとなっており、また生産された種子についても異品種の混入の有無を審査することとなっている。審査の際の異品種の混入はないことが条件とされている(農林水産省生産局農産部穀物課(2011年当時)聞き取り)。

(3) 生理学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ずる(OECD, 2000)。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の寄生によって根粒を着生する(後藤, 1995)。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、子房は受粉後に肥大して莢を形成する(後藤, 1995)。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響する。花芽分化には、ある時間以上の暗期が必要で、温度は15℃以上を要し25℃前後までは高いほど促進的に働く。短日高温では開花を促進する効果は大きいですが、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(昆野, 1987)。

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(昆野, 1987)。ダイズの栽培適地は、生

育期間中 18~28℃ 程度、多照で適度の降雨が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 度のスウェーデンでも栽培可能である (昆野, 1987)。

5 今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3555 は米国において、およそ北緯 38 度から 40 度の栽培地域に適した品種 (Maturity Group III) に分類される (Wiebold, 2002; Graphic Maps, 2012)。この栽培地域において、Maturity Group III に分類される品種は 5 月上旬から 6 月中旬の間に播種される。また、7 月中旬から 8 月上旬までが開花期に当たり (Schapaugh, 1997)、開花が始まる最も早い時期の日長時間
10 は約 15 時間である (Lammi, 2008)。

なお、わが国において、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

15

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

20 ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は、裂莢した際に地表に落下する。わ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等では、ほとんどの品種が難裂莢性であり裂莢性の程度は低い。今回、
25 遺伝子導入に用いた宿主である A3555 もまた難裂莢性であることが認められている。

ダイズの種子休眠性については知られていない。また、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 (昆野, 1995)。

30 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、塊茎や地下茎等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
35 はこれまでのところない。

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

ダイズ ($2n=40$) 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、
5 *G. soja* (和名: ツルマメ、 $2n=40$) のみである (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991;
OECD, 2000)。ツルマメは、北海道、本州、四国及び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 (沼田ら, 1975; 浅野, 1995; 高橋ら,
1996; 大橋, 1999)。また、北海道、東北、四国で行われたツルマメの自生地に関
10 する調査では、主に河川流域で自生地が確認された例が多く報告されている (河
野ら, 2004; 菊池ら, 2005; 猿田ら, 2007; 山田ら, 2008; 猿田ら, 2009; 友岡ら, 2009)。

なお、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 (島本ら, 1997; 阿部ら, 2001)、その形態がダ
15 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 (阿部ら, 2001)、仮に
このような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育範囲
20 はかなり限られていることが予想される。

次に、ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して述べる。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
25 んどの花が開花しない閉花受粉であるため (阿部ら, 2001)、どちらも典型的な自
殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のほ場条件でダイズ同士に
おける他家受粉率は 0.03~3.62% (Beard and Knowles, 1971)、ツルマメ同士におけ
る他家受粉率は平均で 2.3% (Kiang et al., 1992) と報告されている。

しかし、ダイズの家受粉率は条件によっては上昇することもある。例えば、
ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズほ場の中心に設置した場合、平均で
30 2.96~7.26% となり、局所的には 19.5% に達したと報告されている (Abrams et al.,
1978)。また、ツルマメ間の他家受粉率に関しても、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 (Fujita et al., 1997)。
この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠当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 胚珠当たりの平均的な花粉数
35 (Cruden, 1977) の間に位置していた。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、若しくは集団内の遺伝的特性によるものな
かは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事等
による環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては

非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメ集団の周辺では花粉を媒介する昆虫であるミツバチやクマバチ等が頻繁に観察されていた。このことから、このツルマメ集団の周辺の環境には、他家受粉を引き起こす要因が通常よりも多く存在していたと考えられる (Fujita et al., 1997)。

5 ダイズとツルマメは、前述したようにいずれも閉花受粉を行う自殖性植物である。さらに、吉村ら (2006) は、ツルマメとダイズの開花時期は異なるため、ダイズとツルマメとの自然交雑は起こりにくいと述べている。吉村 (2008) は、関東地方では両者の開花には 1 ヶ月ほどの差が見られるとしている。なお、ツルマメの開花時期について、岩手県では 8 月上旬から 9 月中旬との報告がある (須田ら, 1995)。また、加賀ら (2006) は、青森及び広島で採取されたツルマメ系統を秋田県、茨城県、広島県の 3 地点で栽培したところ、その開花期は 8 月中旬から 9 月中旬であったと報告している。

15 Nakayama and Yamaguchi (2002) は、ダイズとツルマメの間の交雑率を調査する目的で、丹波黒を用いた交雑試験を行っている。その理由として、奥原早生や鶴の子大豆といった品種ではダイズとツルマメの開花期が全く重ならないか、重なるとしても数日であるが、丹波黒はダイズ品種の中で開花期が遅いため、ダイズとツルマメの開花期が 2 週間程度重複したと報告している。こうした条件下で、丹波黒とツルマメ (品種名 : GIs/93-J-01) を 50 cm 間隔でそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した。自然交雑実験終了後に結実したツルマメから採種された 686 個の種子から植物体を生育させ、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植物体が 5 個体認められたことから、その交雑率は 0.73% と報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

25 また、農業環境技術研究所において、2005 年に除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを 5 cm 離して異なる 3 つの播種日で栽培し、ツルマメ個体の収穫種子を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は、それぞれの播種日で 7,814 粒中 0 粒、12,828 粒中 0 粒及び 11,860 粒中 1 粒であり、この交雑種子は、ダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群から見つかったと報告されている (Mizuguti et al., 2009)。

30 さらに、2006 年及び 2007 年には、除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズのプロット (4 条 (10 個体/条)) の間にツルマメ 3 個体を網状の壁に沿わせて栽培した場合の自然交雑率が調査されている (吉村, 2008)。その結果、ダイズと自然交雑した交雑種子数は、2006 年の試験では 44,348 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であったと報告されている (吉村, 2008)。また、農業環境技術研究所は、35 2006 年及び 2007 年に、前述の 5 cm 離して栽培する試験区に加え、遺伝子組換えダイズから 2、4、6、8 及び 10 m 離してツルマメを栽培した試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、自然交雑した交雑種子は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試

験より長くなった 2007 年の試験では、66,671 粒中 3 粒であった。なお、2007 年の試験において見られた 3 粒の交雑個体については、2、4 及び 6 m の区でそれぞれ 1 個体ずつ得られたと報告されている (吉村, 2008)。

5 よって、ダイズとツルマメ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頻度で交雑しうるが、そのような特殊な条件の場合でも、ダイズとツルマメが交雑する頻度は極めて低いと考えられた。

10 実際には、1996 年以降、約 20 年間除草剤グリホサート耐性ダイズが輸入されているが、農林水産省による遺伝子組換え植物実態調査 (2009 年~2016 年) のダイズ輸入実績港 10 港での調査の結果では、ダイズ陸揚げ地点から半径 5 km 以内において除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は認められなかった (農林水産省, 2011a; 農林水産省, 2011b; 農林水産省, 2012; 農林水産省, 2013; 農林水産省, 2014; 農林水産省, 2015; 農林水産省, 2017; 農林水産省, 2018b)。また、わが国と同様に、ツルマメの自生地域であり、かつ除草剤グリホサート耐性ダイズを輸入している韓国において、2000 年に広範囲の地域から採取された 243 系統のツルマメに除草剤グリホサートを散布したところ、全ての系統が枯死し、除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は確認されなかったと報告されている (Kim et al., 2003)。

20 従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、わが国において経時的な調査が行われている。2003 年から 2006 年にかけて、ツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間体が探索されている。その結果、調査した 58 地点 (秋田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点) のうち、秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 地点から、形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ 17 個体の中間体が発見され、その後、マイクロサテライトマーカーにより、これらの中間体は全てダイズとツルマメの自然交雑に由来することが明らかになったと報告されている (Kuroda et al., 2010)。

30 しかし、これら発見された中間体が同じ集団内で生存し続けるかどうかの追跡調査を、中間体の見つかった秋田県 1 地点、佐賀県 5 地点について行ったところ、佐賀県の 1 地点を除き、翌年には雑種後代は確認されなかった。佐賀県の 1 地点では、翌年に 1 個体の雑種後代を確認したものの、翌々年は確認されなかったと報告されている (Kuroda et al., 2010)。

35 さらに、ダイズからツルマメへの自然交雑の有無を、DNA レベルで明らかにするために、F₁ 雑種及び雑種後代が発見された地点を含めて、秋田県、茨城県、佐賀県の 14 地点の種子 1,344 サンプルをマイクロサテライトマーカーで解析した結果、従来ダイズに由来する遺伝子のツルマメ集団中への浸透は確認されなかった (Kuroda et al., 2008)。同様に、Stewart ら (2003) も「ダイズから野生種への遺伝

子浸透に関する分子学的事実はない」と述べている。

このように、ダイズとツルマメの雑種の生存が制限される理由として、雑種自体の競合性の低下が考えられる。ダイズは人為的な栽培環境に適応進化し、自然環境で生育していくための形質を失っている可能性が考えられる。実際に、自然環境に適応したツルマメと栽培作物であるダイズでは形態的及び生態的特性に大きな違いがある。したがって、雑種及び雑種後代が栽培作物であるダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境に適応するのに不利になっている可能性がある。Kuroda ら (2010) は 2003~2006 年に行った中間体の調査で発見された 17 個体の中間体の後代が速やかに自然環境から消失していた理由として、1) F₁ 雑種の休眠性は種子親であるツルマメの形質によって決定されるため土壌中で生存するが、雑種後代種子では硬実種子の割合が減少するため冬期に種子が腐るか、又は発芽しても寒さにより枯死する、2) 雑種後代の種子が越冬して発芽しても、その競合性はツルマメより低いために他の植物との競合に勝てず淘汰される、の 2 つを挙げている (Kuroda et al., 2010)。

実際に、人為的に交配して得た従来ダイズとツルマメの雑種をツルマメの親系統とともに播種した後で、それらの定着の様子を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統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いたことが示されている (Oka, 1983)。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種や両者の中間の表現形を示す個体において、休眠性、倒伏性、裂莢性はツルマメに比べ低下していることが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004)。また、広島産ツルマメとダイズ品種「フクユタカ」、青森産ツルマメとダイズ品種「リュウホウ」との F₁ 雑種を、国内 3 地点で管理栽培し、その種子生産量、莢数、種子の越冬率 (12 月下旬から 4~5 月まで土中に埋めた種子の発芽率及び休眠種子の割合) を親であるツルマメと比較した結果、F₁ 雑種の種子生産量、莢数はツルマメよりも少なく、F₁ 雑種に実った種子の越冬率はツルマメよりも低いことを報告している (Kuroda et al., 2013)。さらに、Kubo ら (2013) は除草剤グリホサート耐性遺伝子組換えダイズとツルマメの雑種について、種子の低温耐性 (4°C で 3 ヶ月間保存した種子の発芽率及び発芽個体の生存率) 並びに形態生育特性を調査した結果、雑種は親系統のダイズやツルマメと同等かそれらの中間的性質を示したと報告している。

さらに、上述の広島産ツルマメとダイズ品種「フクユタカ」との F₁ 雑種から得られた F₂ 雑種種子について調査した結果に基づくシミュレーションの結果、雑種後代がダイズ由来の種子生産性及び休眠性に関連する QTL を雑種が有する場合、競合において不利になりダイズからツルマメへの遺伝子浸透が生じる可能性が低下することを示している (Kitamoto et al., 2012)。

35

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花には、1 花当たり 10 本の雄ずいがあり、各雄ずいは 1 つの葯を持つ (後藤, 1995)。1 葯当たりの花粉数は 374~760 粒 (Palmer et al., 1978)、約
5 230~540 粒 (Koti et al., 2004) との報告がある。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約 8 時間で失われることが報告されている (Abel, 1970)。花粉の直径は、15~25 μm である (Palmer, 2000)。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所が 2001 年から 2004 年の 4 年間に行った除草剤グリホサート耐性遺伝子組換えダイズを用いた非組換えダイズとの交雑試験を行った。その結果、交雑が観測された最長距離での交雑率は花粉親からの距離が、
10 2001 年は 7.0 m で交雑率 0.040%、2002 年は 2.8 m で 0.08%、2003 年は 0.7~10.5 m まで調査したが交雑は認められず、2004 年は 3.5 m で 0.022%であった (Yoshimura et al., 2006)。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、カメムシ目の昆虫が観察されたと報告している (Yoshimura et al., 2006)。

15

ホ 病原性

—

20

へ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、自然条件下で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報告されていない。

25

ト その他の情報

① ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメの生育を制限する要因

30

一般的に、自然条件下で自生する植物体の群落は他の植物との競合、非生物的環境との相互作用、昆虫や動物による食害及び人間活動の影響といったいくつかの要因によって制限されている (Tilman, 1997)。

35

ツルマメの生育を制限する要因に関して、出芽したツルマメを個体識別し、その生存・死亡状況を約 2 週間間隔で観察した結果、生育初期には、暑さと乾燥により多数死亡し、生き残った個体も草刈で大きな損傷を受けて死亡したと報告されている (中山ら, 2000)。

また、Oka (1983) は、ツルマメの生育は、周辺に生育する雑草種の影響を受けていると述べている。また、羽鹿ら (2003) は、ツルマメの自生場所は河原や工事現場など常に攪乱が生じているところで、生息環境が元々不安定な上、都

市近郊などでは自生地が開発で破壊されたりするケースもあり、消滅する個体群も少なくない、と報告している。さらに、遷移の進んだ自生地ではイネ科植物などの雑草との競合により消えつつある個体群も見られ、攪乱が生じた後ツルマメが増殖を繰り返すことが可能な期間はかなり短い印象を受けたと報告している (羽鹿ら, 2003)。

② ツルマメを摂食するチョウ目昆虫

ツルマメを摂食するチョウ目昆虫については、農業・食品産業技術総合研究機構が、東北地方、関東地方、中国四国地方、九州地方の国内 4 地域において、それぞれ数カ所のツルマメ個体群を定期調査地点として選定し、2011 年及び 2012 年のツルマメ生育期間 (5 月~11 月) 及び 2012 年のツルマメ発芽期~初期生育期 (4~5 月) に調査を行っている (安田ら, 2014)。その結果、66 種のチョウ目昆虫の幼虫が、ツルマメを食餌していたことが確認された。

③ ツルマメに対する昆虫等の生物による食害程度及びその食害が種子生産性に及ぼす影響

生育中期から成熟期のツルマメが、昆虫等の生物から受ける食害程度を明らかにするために、2011 年から 2013 年に茨城県及び佐賀県において、自生するツルマメがチョウ目昆虫から受ける食害程度の調査が行われている。その結果、ツルマメはチョウ目以外の多くの生物により食害及び傷害を受けていることが明らかとなった。また、ツルマメが受ける食害・傷害程度は環境要因を含めた様々な要因に影響を受けていると考えられたが、チョウ目昆虫による食害程度は、異なる環境及び年次においてもコウチュウ目昆虫、バッタ目昆虫並びにその他の生物及び病害等と比較して低かった (Goto et al., 2016)。

また、チョウ目昆虫による食害が、ツルマメの種子生産性に与える影響を評価するため、チョウ目昆虫の食害を模した摘葉処理試験が行われている。その結果、R1~R2 期 (開花始~開花期) にツルマメの 10、25 及び 50%の葉を取り除いた場合でも、無処理区と比較して莢数及び種子数の減少は認められなかった (Goto et al., 2016)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは、*Bacillus thuringiensis* 由来の Cry1A.105 蛋白質及び
5 び改変 Cry2Ab2 蛋白質を産生するチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変
cry2Ab2, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (以下、「本
組換えダイズ」という。)を作出した。

本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、
コーンイヤールーム (*Helicoverpa zea*) やフォールアーミーワーム (*Spodoptera*
10 *frugiperda*) といった標的チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。このチョウ
目害虫抵抗性の形質が付与されることにより、本組換えダイズは、チョウ目害
虫による被害が深刻な地域において、効果的な害虫防除方法を農家に提供する
ことが期待されている。

15

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

20 本組換えダイズ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は、
図 4 (p18) 及び表 1 (p19~22) に示した。

本組換えダイズには、*cry1A.105* 遺伝子及び *cry2Ab2* 遺伝子が導入されている。

まず、*cry1A.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質について記載する。本
25 組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質は 1,181 個のアミノ酸からなる。3
つのドメインを持ち、分子量は約 133 kDa である。Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab
蛋白質又は Cry1Ac 蛋白質¹由来のドメイン I 及び II、Cry1F 蛋白質由来のドメイ
ン III、Cry1Ac 蛋白質由来の C 末端ドメインからなるキメラ蛋白質である (図 1,
p15)。Cry1Ac 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、及び Cry1F 蛋白質は土壌細菌 *B.*
30 *thuringiensis* に由来する殺虫蛋白質で、作用機構については一般的な Bt 蛋白質と
同一である。

cry1A.105 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、標的であるチョウ目害虫
に対する殺虫活性を高めるため、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせること
により作製された。このような Bt 蛋白質間でのドメインの組換えは自然界で
35 も起こることが知られており、このドメインの組換えによって Bt 蛋白質は多様
性を獲得したと報告されている (de Maagd et al., 2001; de Maagd et al., 2003)。この
報告後、分子生物学的手法を用いたドメインの組換えにより、Cry1 蛋白質のチ

¹Cry1Ab 蛋白質と Cry1Ac 蛋白質のドメイン I と II のアミノ酸配列相同性は 100%であった。

5 ヨウ目害虫に対する殺虫活性の特異性を高めるよう改良した Bt 蛋白質が開発されている (Baum, 1998; Baum et al., 1999)。また、既に第一種使用の承認 (2006 年 4 月 10 日) を受けているチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ (*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5) で発現する Cry1F 蛋白質も、複数の Bt 蛋白質のドメイン又は配列を組み合わせたキメラ蛋白質である (Gao et al., 2006)。Cry1A.105 蛋白質のドメイン I 及び II はそれぞれ Cry1Ab 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のアミノ酸配列と 100%の相同性を持つ。ドメイン III は Cry1F 蛋白質のドメイン III との相同性が 99%である。また、C 末端ドメインは、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインとの相同性が 100%である (図 1, p15)。

10 なお、Cry1A.105蛋白質とCry1Ac蛋白質、Cry1Ab蛋白質及びCry1F蛋白質それぞれとの相同性は、93.6%、90.0%及び76.7%である。

15 本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質には、発現蛋白質を葉緑体に移動させる目的で、5'末端に葉緑体輸送ペプチド (CTP) であるRbcS4をコードする塩基配列が付加されている。RbcS4は葉緑体へCry1A.105蛋白質前駆体を輸送した後、蛋白質分解酵素により切断される。本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質のN末端アミノ酸配列解析の結果から、既に第一種使用の承認 (2008年1月31日) を受けているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI : MON-89034-3) (以下、「MON89034」とする。) で発現するCry1A.105蛋白質と比較して4アミノ酸が付加されていることが確認された (図 2, p15)。この4アミノ酸を除き、本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列と、MON89034で発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列の相同性は100%であった (図 2, p15)。

20 「MON89034」とする。) で発現するCry1A.105蛋白質と比較して4アミノ酸が付加されていることが確認された (図 2, p15)。この4アミノ酸を除き、本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列と、MON89034で発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列の相同性は100%であった (図 2, p15)。

25 N末端に追加されていた4アミノ酸は、標的昆虫への特異性と殺虫活性に関わるトリプシン耐性コア蛋白質に含まれていないため、本組換えダイズ中で発現するCry1A.105蛋白質の殺虫活性及びその特異性に影響はないものと考えられた。

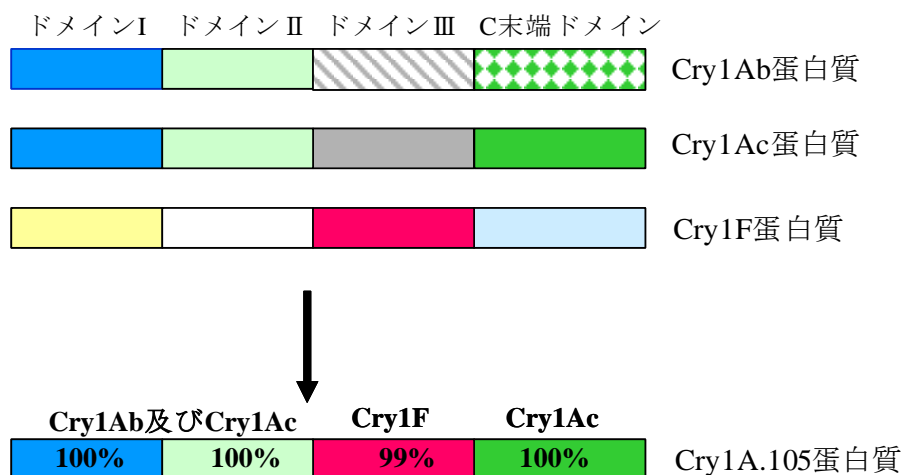


図1 本組換えダイズにおいて発現している Cry1A.105 蛋白質の構造²
 *Cry1A.105 蛋白質の各ドメインの色分けは、それぞれのドメインが同じ色で示した上段の Cry 蛋白質に由来することを示す。

5

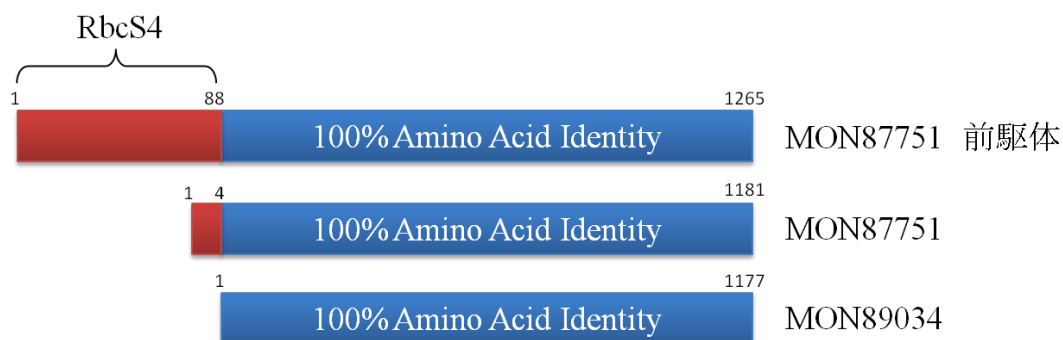


図2 本組換えダイズ及び MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質のアミノ酸配列の概略図³

10

次に、*cry2Ab2* 遺伝子がコードする Cry2Ab2 蛋白質について記載する。

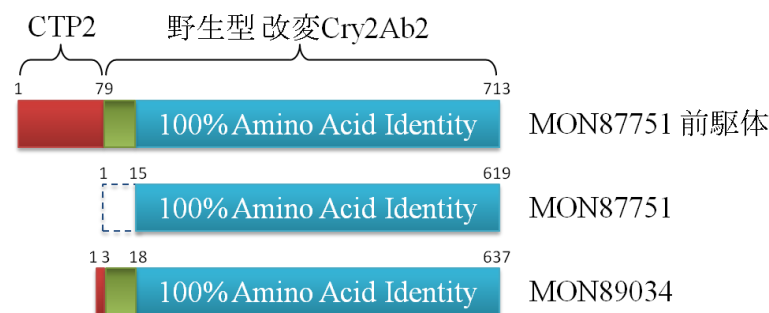
Cry2Ab2 蛋白質をコードする *cry2Ab2* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-263 株の CryIIB と呼ばれるオープンリーディングフレームに由来するが
 15 (Donovan, 1991)、植物中での発現を高めるためにコドンが最適化されている (Fischhoff and Perlak, 1996)。本組換えダイズ中で発現する Cry2Ab2 蛋白質には、制限酵素切断部位を挿入する目的で、N 末端から 2 番目にアスパラギン酸が挿

² 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

入されている。よって、本組換えダイズに導入された *cry2Ab2* 遺伝子を「改変 *cry2Ab2* 遺伝子」とし、発現する Cry2Ab2 蛋白質を「改変 Cry2Ab2 蛋白質」とする。

本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアダメインのアミノ酸配列は、MON89034 中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアダメインのアミノ酸配列と 100%一致する。本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質には、発現蛋白質を葉緑体に移動させる目的で N 末端に CTP2 が付加されている。Rbcs4 同様、CTP2 は葉緑体へ改変 Cry2Ab2 蛋白質前駆体を輸送した後、蛋白質分解酵素により切断される。本組換えダイズで発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端アミノ酸配列解析の結果、野生型 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端と比較して、CTP2 とともに N 末端から 15 アミノ酸が切断されていることが確認された (別添資料 1 の Figure 1, p1~2; 図 3, p16)。これは、改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端が一般的な細胞質プロセシングペプチド (SPP) によってプロセシングを受けた結果によるものと考えられた (Richter and Lamppa, 1998)。MON89034 で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質は、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端に 3 アミノ酸が付加されている (U.S. EPA, 2010)。結果的に、本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質は、MON89034 で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質よりも 18 アミノ酸短くなっていることが確認された (図 3, p16)。しかし、本組換えダイズで発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の切断された N 末端のアミノ酸は、標的昆虫への特異性と殺虫活性に関わるトリプシン耐性コア蛋白質には含まれていないため、本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫活性及びその特異性に影響はないものと考えられる。



25 図 3 本組換えダイズ及び MON89034 中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列の概略図⁴

本組換えダイズにおいて発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 2 に示した。

30

⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

ロ 構成要素の機能

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

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 (p19~22) に示したとおりである。

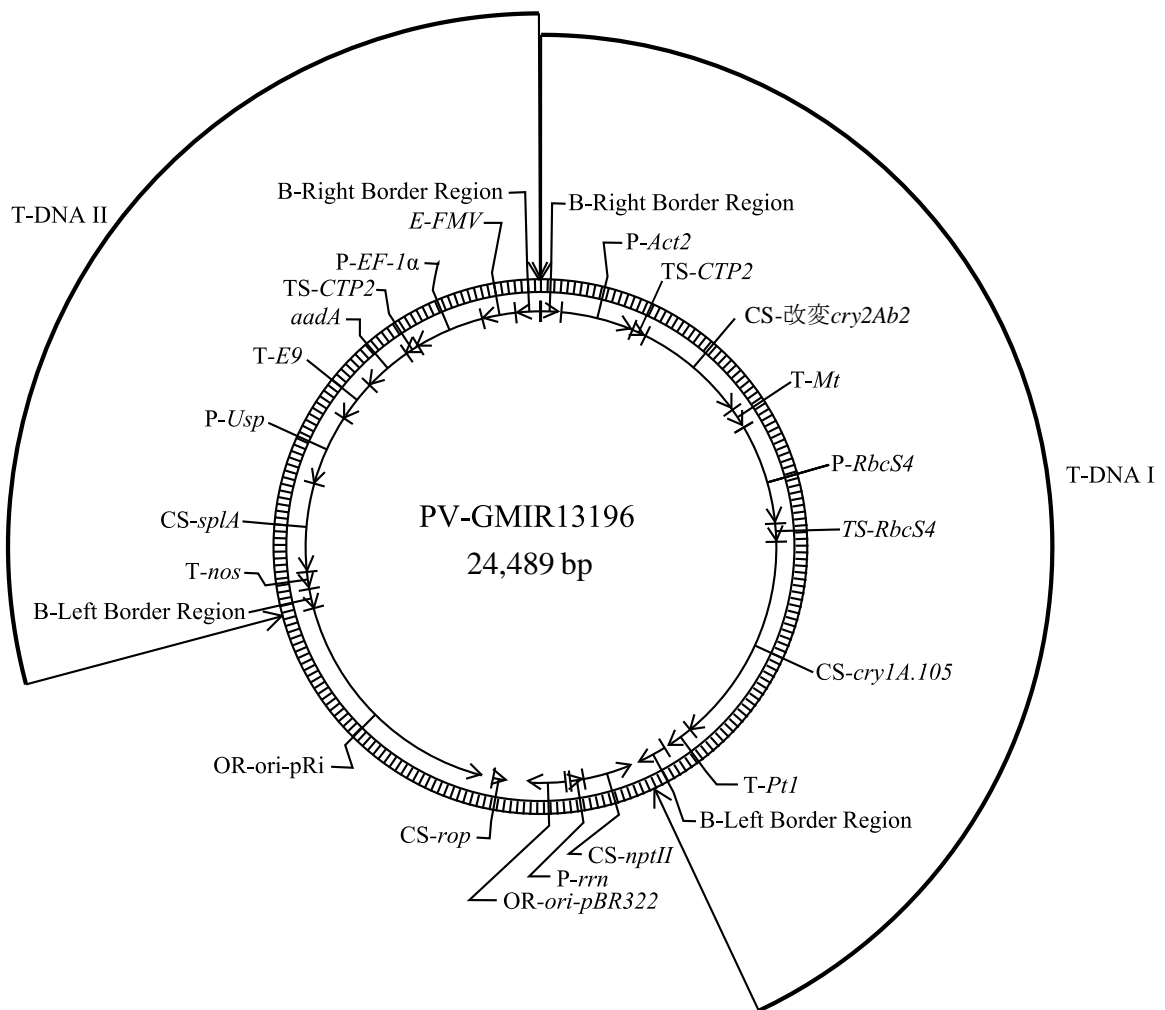


図4 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 のプラスミドマップ⁵

本組換えダイズの育成過程で、上図の T-DNAI 領域は持つが、T-DNAII 領域は持たない個体を選抜した。

⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能⁶

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNAI 領域		
B ^{注1} -Right Border Region	1-285	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	286-337	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>Act2</i>	338-1,545	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>act2</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン (An et al., 1996)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	1,546-1,555	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注3} - <i>CTP2</i>	1,556-1,783	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 Cry2Ab2 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	1,784-1,792	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注4} -改変 <i>cry2Ab2</i>	1,793-3,697	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする配列で、チョウ目昆虫に対する抵抗性を付与する (Donovan, 1991)。
Intervening Sequence	3,698-3,700	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注5} - <i>Mt</i>	3,701-4,000	イネ (<i>Oryza sativa</i>) のメタロチオネイン様蛋白質をコードする <i>Mt</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で (GenBank, 2014)、mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	4,001-4,045	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>RbcS4</i>	4,046-5,768	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター及びリーダー配列 (Krebbers et al., 1988; De Almeida et al., 1989)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
TS- <i>RbcS4</i>	5,769-6,032	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列 (Wong et al., 1992)。Cry1A.105 蛋白質を葉緑体へ輸送する。

⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
CS- <i>cryIA.105</i>	6,033-9,566	<i>B. thuringiensis</i> の Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のコード配列で、殺虫活性を示すキメラ蛋白質をコードする (U.S. EPA, 2010)。
Intervening Sequence	9,567-9,569	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>PtI</i>	9,570-9,969	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) のリン酸トランスポーターをコードする <i>PTI</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で (Liu et al., 1998)、mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	9,970-10,088	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	10,089-10,530	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない)		
Intervening Sequence	10,531-10,739	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	10,740-11,534	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
P- <i>rrn</i>	11,535-11,759	<i>A. tumefaciens</i> のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。細菌内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	11,760-11,835	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注6} - <i>ori-pBR322</i>	11,836-12,424	pBR322 由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	12,425-12,851	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>rop</i>	12,852-13,043	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	13,044-13,231	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori-pRi</i>	13,232-17,345	プラスミド pRi に由来する複製開始領域 (Ye et al., 2011)。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	17,346-17,352	DNA クローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNAII 領域 (本組換えダイズには存在しない)		
B-Left Border Region	17,353-17,671	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列 (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	17,672-17,703	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-nos	17,704-17,956	<i>A. tumefaciens</i> pTi 由来のノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域で (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)、ポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	17,957-17,972	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>splA</i>	17,973-19,430	<i>A. tumefaciens</i> C58 株に由来し、スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースホスホリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper et al., 1999)。
Intervening Sequence	19,431-19,442	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Usp</i>	19,443-20,621	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>) 由来の種子蛋白質をコードするリーダー配列の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列 (Bäumlein et al., 1991)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	20,622-20,672	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>E9</i>	20,673-21,315	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーの 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	21,316-21,330	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	21,331-22,122	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) のコード配列 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
TS- <i>CTP2</i>	22,123-22,350	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。蛋白質を葉緑体へと輸送する。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
Intervening Sequence	22,351-22,359	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>EF-1α</i>	22,360-23,507	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1α</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に關与する (Axelos et al., 1989)。
Intervening Sequence	23,508-23,530	DNA クローニングの際に利用された配列。
E ^{注7} - <i>FMV</i>	23,531-24,067	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	24,068-24,117	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	24,118-24,474	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない)		
Intervening Sequence	24,475-24,489	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹B- Border (境界配列)

注²P- Promoter (プロモーター)

注³TS- Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁴CS- Coding Sequence (コード配列)

注⁵T- Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁶OR- Origin of Replication (複製開始領域)

注⁷E- Enhancer (エンハンサー領域)

5

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

5 【*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

本組換えダイズには、*B. thuringiensis*由来のCry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質の発現により、特定のチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

10

Bt蛋白質は、感受性昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合することにより殺虫活性を示すことが知られている (OECD, 2007; Pigott and Ellar, 2007)。

15

Cry蛋白質は、プロトトキシシン (毒前駆体) として産生され、標的とする昆虫体内で結晶封入体から蛋白質分解酵素により活性を持つコア蛋白質へと変換され、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合することにより、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示す (Vachon et al., 2012)。この特異的受容体は、鳥類や哺乳類といった非標的生物には存在しないため、Bt蛋白質がこれらの生物に対して影響を及ぼすとは考えにくい (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

20

一般的に Bt 蛋白質は、特定の昆虫目に対して殺虫活性を示すことが知られており (de Maagd et al., 2001)、Cry1 蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を持つことが報告されている (Crickmore et al., 1998; de Maagd et al., 2001; Romeis et al., 2006)。Cry2 蛋白質の一種である Cry2Aa (旧名 CryB1) 蛋白質はチョウ目及びハエ目に殺虫活性を示すが (de Maagd et al., 2001)、Cry2Ab2 (旧名 CryB2) 蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を示すことが知られている (Widner and Whitely, 1989)。

25

第一の 2-(1)-イ (p13~16) に記載したように、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と非常に高い相同性を持つ。さらに、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列は MON89034 の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と 100%一致する。

35

実際に、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変

Cry2Ab2 蛋白質と MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫活性を比較するため、*Escherichia coli* で調製した蛋白質を用いてコーンイヤールーム (*H. zea*) への混餌投与による生物検定を行った (別添資料 3; 別添資料 4)。その結果、本組換えダイズ及び MON89034 中で発現している Cry1A.105 蛋白質のコーンイヤールーム (*H. zea*) に対する EC₅₀ (半数効果濃度) は同等であり、その平均値はそれぞれ 0.0042 µg/ml diet 及び 0.0040 µg/ml diet であった (別添資料 3 の Table 1, p15)。また、本組換えダイズ及び MON89034 中で発現している改変 Cry2Ab2 蛋白質のコーンイヤールーム (*H. zea*) に対する EC₅₀ も同等であり、その平均値はそれぞれ 0.065 µg/ml diet 及び 0.079 µg/ml diet であった (別添資料 4 の Table 1, p15)。よって、以下に記載する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、MON89034 中で産生される蛋白質を用いて得られたものを用いた。

MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラムについて、*E. coli* で調製した Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質を、ダイズ栽培における主要チョウ目害虫及び非標的生物に混餌投与することにより調査が行われている (U.S. EPA, 2010)。チョウ目、コウチュウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目、12 種について殺虫活性を調査した結果、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を示すことが確認された (表 2, p26 及び表 3, p27)。

さらに、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が相乗的に殺虫効果を示すかどうかについて、両 Bt 蛋白質に対して感受性を示す 2 種のチョウ目昆虫 (ヨーロッパアンコーンボラー (*Ostrinia nubilalis*) 及びコーンイヤールーム (*H. zea*)) を用いて調査が行われている (Hunter, 2007; U.S. EPA, 2010)。その結果、両蛋白質は拮抗作用及び相乗作用を示すことはなく、標的昆虫及び非標的生物に対して非意図的な作用を示すことはないことが確認されている (U.S. EPA, 2010)。したがって、本組換えダイズで発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質も拮抗作用及び相乗作用を示すことはなく、標的昆虫及び非標的生物に対して非意図的な作用を示すことはないと考えられる。

なお、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か、

AD_2017⁷を用いて、FASTA型アルゴリズムと連続する8つのアミノ酸配列によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

⁷AD_2017: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource、2017年2月9日)に登録されている配列から構成されるデータベースで、1,970件のアミノ酸配列が含まれる。

表2 MON89034におけるCry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質のチョウ目昆虫に対する殺虫活性⁸

目	科	和名/英名(学名)	蛋白質	投与日数	投与方法	LC ₅₀ (µg/mL diet)
チョウ目 (Lepidoptera)	ヤガ科 (Noctuidae)	タマナヤガ (<i>Agrotis ipsilon</i>)	Cry1A.105	7	混餌	33
			改変 Cry2Ab2	5	表面滴下	>100 ¹
		コーンイヤールーム (<i>Helicoverpa zea</i>)	Cry1A.105	7	混餌	6
			改変 Cry2Ab2	7	混餌	9.9
		フォールアーミーワーム (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	Cry1A.105	7	混餌	6.9
			改変 Cry2Ab2	7	表面滴下	< 50 ²
	ツトガ科 (Crambidae)	ヨーロッパアンコンボローラー (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	Cry1A.105	12	混餌	0.43
			改変 Cry2Ab2	12	混餌	1.5

U.S. EPA (2010)より抜粋。

「>/<」の付いた数値は検定に用いた中で最も低い又は高い濃度を示す。

¹ 最大投与量 100 µg/mL を与えた時の致死率は 42%であった。

² 最小投与量 50 µg/mL を与えた時の致死率は 61%であった。

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表3 MON89034におけるCry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質の非標的昆虫に対する無影響濃度(NOEC)⁹

科	種	蛋白質	投与日数	投与方法	最大投与量 ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet)	NOEC ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet)
コウチュウ目 (Coleoptera)						
ゾウムシ科 (Curculionidae)	ワタミハナゾウムシ (<i>Anthonomus grandis grandis</i>)	Cry1A.105	7	表面滴下	100	>100
		改変Cry2Ab2	7	表面滴下	100	>100
ハムシ科 (Chrysomelidae)	ジュウイチホシウリハムシ (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>)	Cry1A.105	5	表面滴下	100	>100
		改変Cry2Ab2	5	表面滴下	100	>100
テントウムシ科 (Coccinellidae)	スポットドレディビートル(テントウ ムシの一種) (<i>Coleomegilla maculata</i>)	Cry1A.105	20	混餌	240	>240
		改変Cry2Ab2	20	混餌	120	>120
ハチ目 (Hymenoptera)						
ヒメバチ科 (Ichneumonidae)	バンデットカタピラーパラサイト (<i>Ichneumon promissorius</i>)	Cry1A.105	21	混餌	240	>240
		改変Cry2Ab2	21	混餌	100	>100
ミツバチ科 (Apidae)	セヨウミツバチ(成虫) (<i>Apis mellifera</i>)	Cry1A.105	18	混餌	550	>550
		改変Cry2Ab2	19	混餌	68	>68
	セイヨウミツバチ(幼虫) (<i>Apis mellifera</i>)	Cry1A.105	18	表面滴下	1100	>1100 ¹
		改変Cry2Ab2	12	表面滴下	100	>100 ²
カメムシ目 (Hemiptera)						
アブラムシ科 (Aphididae)	モモアカアブラムシ (<i>Myzus persicae</i>)	Cry1A.105	5	混餌	80	>80
		改変Cry2Ab2	5	表面滴下	80	>80
カスミカメムシ科 (Miridae)	ウエスタンターニッシュドプラントバグ (<i>Lygus hesperus</i>)	Cry1A.105	5	混餌	80	>80
		改変Cry2Ab2	5	表面滴下	80	>80
ハナカメムシ科 (Anthocoridae)	インシディアスフラワーバグ (<i>Orius insidiosus</i>)	Cry1A.105	14	混餌	240	120 ³
		改変Cry2Ab2	14	混餌	100	>100

U.S. EPA (2010)より抜粋。

¹ *Apis mellifera* (幼虫) NOEC (無影響濃度) は投与された飼料溶液中の蛋白質濃度で示した。なお、蛋白質濃度が 1,110 $\mu\text{g/ml}$ の飼料溶液を 10 μl 給与した場合、総投与量は 11 μg Cry1A.105/cell となる。

² *Apis mellifera* (幼虫) の NOEC は投与された飼料溶液中の蛋白質濃度で示した。なお、蛋白質濃度が 68 $\mu\text{g/ml}$ の飼料溶液を 10 μl 給与した場合、総投与量は 0.68 μg 改変Cry2Ab2/cell となる。

³ 最大投与量である 240 μg Cry1A.105/g diet においてのみ有意な致死率が認められた。観察された致死率は 44~48 % であり、コントロールにおける致死率は 8~12 % であった。この試験における投与量はほ場における曝露量を大きく上回るものである。30、60 及び 120 μg Cry1A.105/g diet において、影響が認められなかったことから、NOEC を 120 μg Cry1A.105/g diet とした。

⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979)などを基に構築された。詳細は、表 1 (p19~22)に記載した。

ロ 特性

15 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 の全塩基数は、24,489 bp である。なお、PV-GMIR13196 の塩基配列は別添資料 5 に記載した。

20 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

E. coli における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が、T-DNAI 領域外に存在している。

25

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

本ベクターの感染性は知られていない。

30

(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

35 宿主内に移入された PV-GMIR13196 の構成要素を、表 1 (p19~22) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 4 (p18)

に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 5 PV-GMIR13196 を、アグロバクテリウム法によって非組換えダイズ品種 A3555 の幼芽の頂端分裂組織に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- 10 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

従来ダイズ品種 A3555 の幼芽の頂端分裂組織と PV-GMIR13196 を含む *A. tumefaciens* AB30 株を共置培養した後、スペクチノマイシンを添加した組織培養培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

15

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

20

カルベニシリン、セフトキシム及びチカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。さらに、本組換えダイズの R₇ 世代の種子¹⁰において、形質転換に用いた PV-GMIR13196 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えダイズには PV-GMIR13196 の外側骨格領域は存在しなかった(別添資料 6 の Table 1, p12)。このことから、本組換えダイズには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

25

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

30

形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、R₁ 世代を作出した。R₁ 世代において、Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNAII 領域を持たず T-DNAI 領域をホモで有する個体を選抜した。選抜された個体の後代を、導入遺伝子

¹⁰収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 60 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えダイズを選抜した。

5 本組換えダイズの育成図を図 5 (p31) に示した。なお、本申請の対象は、 R_3 世代及び R_3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

【社外秘につき非開示】

図5 本組換えダイズの育成図

(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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えダイズの T-DNAI 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えダイズの F₂、F₃ 及び F₄ 世代 (図 5, p31) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 7)。

10 試験に供試する F₂、F₃ 及び F₄ 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、その後代である R₁ 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNAI 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、T-DNAI 領域をホモで有する R₁ 世代を自殖することにより R₂ 世代を作出した。さらに、R₂ 世代を自殖することにより R₃ 世代を作出した。T-DNAI 領域をホモで有する本組換えダイズの R₃ 世代を、
15 *cryIA.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子のいずれも持たないダイズ品種 MonSoy8329 と従来育種法を用いて交配し、T-DNAI 領域をヘテロで有する F₁ 世代を作出した。得られた F₁ 世代を自殖し、F₂ 世代を作出した。さらに得られた F₂ 世代で、T-DNAI 領域をヘテロで有する個体を Real-Time TaqMan PCR 法により選抜し、再度自殖を行って F₃ 世代を作出した。この
20 F₃ 世代においても Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNAI 領域の有無を確認し、T-DNAI 領域をヘテロで有する個体を自殖することにより F₄ 世代を作出した。作出した F₄ 世代においても、Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNAI 領域の有無を確認した。これら F₂、F₃ 及び F₄ 世代において行われた Real-Time TaqMan PCR 法による T-DNAI 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。
25

その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せず
30 に遺伝していることが確認された (表 4, p33)。したがって、本組換えダイズの T-DNAI 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表4 本組換えダイズにおける導入遺伝子の分離比¹¹

世代 ¹	供試 個体数 ²	実測値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数	実測値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体 数	実測値 導入遺伝子 陰性個体数	1:2:1 分離				
					期待値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数	期待値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体 数	期待値 導入遺伝子 陰性個体数	χ^2	p 値 ³
F ₂ ¹	152	39	72	41	38	76	38	0.47	0.79
F ₃ ¹	214	49	114	51	53.5	107	53.5	0.95	0.62
F ₄ ¹	204	58	105	41	51	102	51	3.01	0.22

¹実測値は、Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

²「供試個体数」は、アッセイにより接合性を観察することができた総個体数である。

³F₂、F₃及びF₄世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p<0.05)。

¹¹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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製数世代における伝達の安定性

5 本組換えダイズに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、外側骨格配列及び T-DNAII 領域の有無及び導入遺伝子の複製数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術¹²及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)¹³ 並びに導入遺伝子領域の
10 PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 8)。以下に、本解析の手法及び本組換えダイズを用いて行った解析の結果を述べる。

NGS では、フラグメント化したゲノム配列から約 100bp の塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて解析することで、植物ゲ
15 ノムの塩基配列を解析することができる (図 6 の①, p37)。なお、導入遺伝子の全配列を検出するため、平均冗長度¹⁴ 75 以上¹⁵で解析を行った。次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの塩基配列と照合¹⁶する (図 6 の②, p37)。この結果において導入用プラスミドと相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出された DNA フラグメン
20 トにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 6 の②, p37)。さらに、JSA において、DNA フラグメントの塩基配列の一部の

¹²次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

¹³NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えダイズのゲノムの全領域に相当する配列をフラグメントとして増幅し、これらのフラグメントにおいて 100bp 程度の配列を解析する。次に、各フラグメントにおいて得られた 100 bp の配列情報を用い、JSA によって T-DNA 領域と宿主の内存在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

¹⁴冗長度: 特定の DNA (ゲノム DNA 又は遺伝子) に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。

¹⁵冗長度 75 以上の NGS/JSA によって遺伝子組換えダイズの導入遺伝子を十分に検出でき、参照として供試された 0.1 ゲノム等量のプラスミドについても、その配列の 100%を正しく検出できたことが報告されている (Kovalic et al., 2012)。

¹⁶BLAST 検索において、*E*-score (expectation score; 期待値) が 1×10^{-5} 以下かつ 30 bp 以上の領域で 96.7%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

みが連続して導入用プラスミドと一致するものを、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列の重複性を比較することで、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 6 の③, p37)。仮に 1 コピーの導入遺伝子が核ゲノムの 1 ヲ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及び塩基配列解析により調べることで、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

10 本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから抽出したゲノムを NGS/JSA に供試した結果、本組換えダイズの R₃ 世代で 104.4 Gb (平均冗長度¹⁷75)、対照の非組換えダイズで 167.1 Gb (平均冗長度 126) の塩基配列が得られた (別添資料 8 の Appendix Table 3, p45) ことから、本解析において、十分な冗長度¹⁸が確保されていることが確認された。本組換えダイズでは
15 2つの接合領域が特定され (図 7, p38; 別添資料 8 の p29)、これらはそれぞれ T-DNA I 領域の 5'末端及び 3'末端を含む配列であった (別添資料 8 の Figure 4, p50~57)。対照の非組換えダイズでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 8 の p29)。さらに、本組換えダイズから得られた全ての DNA フラグメントについて、PV-GMIR13196 の全配列との相同性を調べた
20 結果、外側骨格領域及び T-DNA II 領域が含まれていないことが示された (別添資料 8 の補足資料 Figure 3, p5)。このことから、本組換えダイズの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれており、外側骨格領域及び T-DNA II 領域は挿入されていないことが確認された。

また、本組換えダイズにおいて検出された接合領域及び T-DNA I 領域を
25 含む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA I 領域が導入されていることが確認された (別添資料 8 の Appendix Figure 5, p58、Appendix Figure 6, p59~63 及び Appendix Figure 7, p64~74)。

¹⁷ ダイズゲノムに 1 コピーで存在する *Le1* 遺伝子について調べた冗長度の平均値を指標として、本解析が冗長度 75 以上で行われていることを確認している。

¹⁸ 本解析は、1 ゲノム等量及び 0.1 ゲノム等量の PV-GMIR13196 が存在する場合に、そのプラスミド配列の 100% 及び 100% を検出する感度を有することが示されている (別添資料 8 の Appendix Table 4, p46)。

以上をまとめると、NGS/JSA において検出された接合領域は、T-DNA I 領域に起因する接合領域のみであり、PV-GMIR13196 の T-DNA II 領域及び外側骨格領域¹⁹との相同性を持つジャンクション配列は認められなかったことから、T-DNA I 領域以外の外側骨格領域及び T-DNA II 領域は挿入されていないことが確認された。また、T-DNA I 領域の PCR 分析及び塩基配列解析により、導入された T-DNA I 領域の塩基配列は PV-GMIR13196 の T-DNA I 領域と同一であることが確認された。

5

10

よって、本組換えダイズのゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が導入遺伝子として組み込まれており、T-DNA 領域以外は挿入されていないことが確認された。

さらに複数世代 (R₃~R₇ 世代) の本組換えダイズを対象にした NGS/JSA において、T-DNA I 領域が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 8, p33~34)。なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を図 7 (p38) に示した。

15

¹⁹別添資料 8 の補足資料の Figure 3 において示されている「backbone」の結果は、PV-GMIR13196 の T-DNA II 領域及び外側骨格領域の両方を含む配列と照合した結果である。

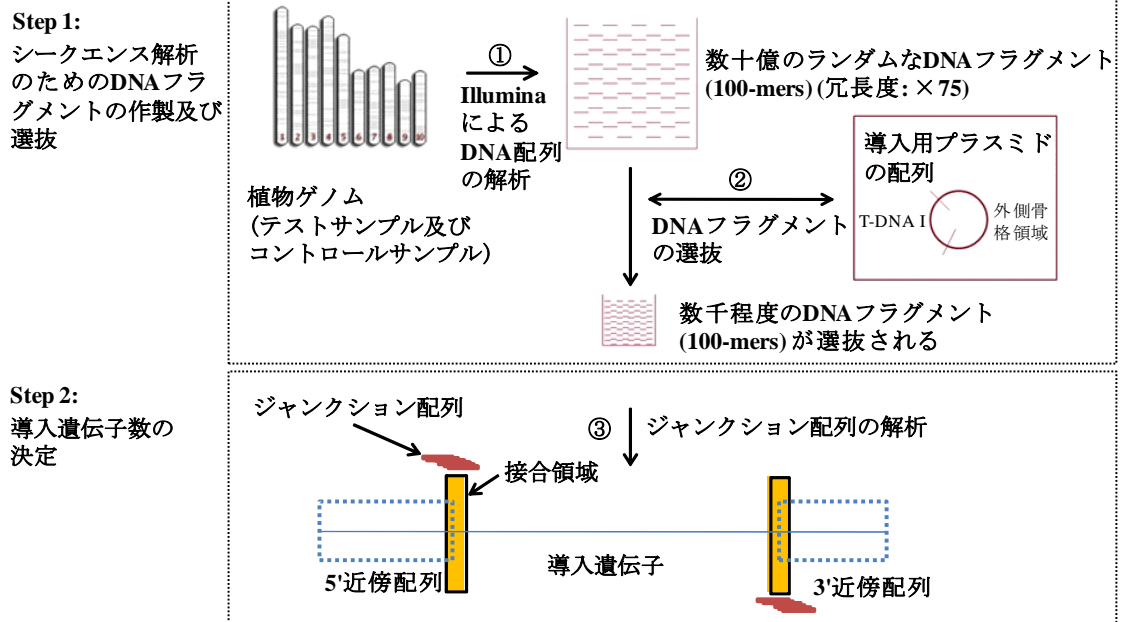


図 6 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al. (2012) より改変)²⁰

²⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

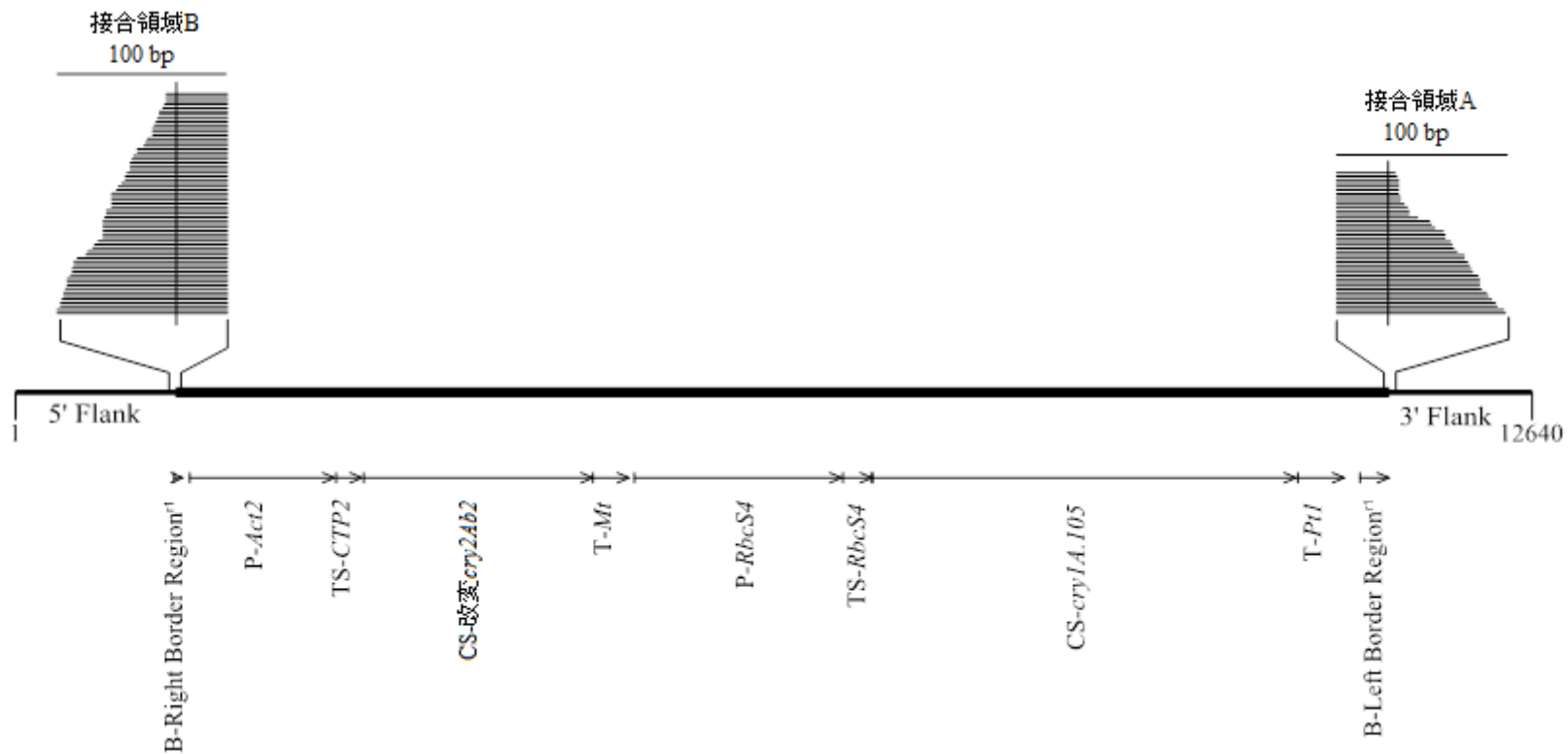


図7 本組換えダイズの導入遺伝子図²¹

本組換えダイズ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えダイズ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。図の上部に、NGS/JSAにおいて検出された接合領域A及びBの模式図を示した。なお、本組換えダイズにおいて目的のT-DNA I領域がPV-GMIR13196と一致した配列で導入されており、B-Right Border Region及びB-Left Border Regionが本組換えダイズにおいてPV-GMIR13196と比較して短くなっている。

20

²¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5

1 コピーなので該当しない (別添資料 8, p29)。

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

10

ウエスタンブロット分析により、本組換えダイズの複数世代 (R₃~R₇ 世代) にわたり Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 9 の Figure 2, p18 及び Figure 3, p19)。

15

また、2012 年に米国の 5 ヶ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州、カンザス州、ノースカロライナ州及びペンシルバニア州) において、4 反復で栽培した本組換えダイズの葉 (Over-season leaf, OSL)、根、地上部、種子での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量を ELISA により分析した (表 5, p40 及び表 6, p41; 別添資料 10)。また、米国の 1 ヶ所のほ場 (イリノイ州) で、1 反復で栽培した本組換えダイズの花粉 (葯を含む) 中での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量も測定した (表 5, p40 及び表 6, p41; 別添資料 10)。

20

25

その結果、本組換えダイズの葉、地上部、種子及び花粉/葯において、Cry1A.105 蛋白質の発現が確認された。なお、根における Cry1A.105 蛋白質の発現量は検出限界値以下であった (表 5, p40)。また、本組換えダイズの葉、根、地上部、種子及び花粉/葯において、改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現が確認された (表 6, p41)。

表5 本組換えダイズの葉、根、地上部、種子及び花粉/葯における Cry1A.105 蛋白質の発現量 (2012 年、米国)²²

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g FW}$) ³	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ⁴	定量限界値 /検出限界値 ($\mu\text{g/g FW}$)
葉 OSL1	3~4 葉期	130 (50) 61 ~ 220	580 (250) 260 ~ 1100	1.500/0.406
葉 OSL2	5~7 葉期	120 (54) 13 ~ 220	590 (270) 68 ~ 1100	1.500/0.406
葉 OSL3	開花期~ 莢伸長初期	79 (45) 8.5 ~ 160	400 (220) 50 ~ 780	1.500/0.406
葉 OSL4	子実肥大期	230 (82) 120 ~ 480	790 (280) 430 ~ 1600	1.500/0.406
根	子実肥大期	<LOD(N/A) N/A ~ N/A	N/A (N/A) N/A ~ N/A	0.563/0.322
地上部	子実肥大期	62 (21) 31 ~ 110	230 (91) 110 ~ 440	1.500/0.524
種子	成熟期	2.1 (0.46) 1.5 ~ 2.9	2.4 (0.50) 1.7 ~ 3.2	0.900/0.226
花粉/葯	開花期	11 (N/A) N/A ~ N/A	N/A (N/A) N/A ~ N/A	1.500 /N.D. ⁵

¹OSL = over-season leaf (葉)

²採取した各組織の生育段階

³蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (SD: 括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 (FW) 1 g 当たりの μg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限-上限) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (OSL1 は 1 サンプルで LOD 未満だったため n=19、それ以外は n=20。花粉は n=1)。N/A = 該当しない。

⁴蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。SD=標準偏差, DW=乾燥重

⁵N.D. = Not determined. 花粉/葯は得られたサンプル量が限られていたため、検出限界値を設定することができなかった。

²² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 6 本組換えダイズの葉、根、地上部、種子及び花粉/葯における改変
Cry2Ab2 蛋白質の発現量 (2012 年、米国)²³

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g FW}$) ³	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ⁴	定量限界値 /検出限界値 ($\mu\text{g/g FW}$)
葉	3~4 葉期	5.4 (0.74)	24 (5.9)	0.625/0.034
OSL1		4.4 - 6.8	17 - 37	
葉	5~7 葉期	5.2 (0.70)	26 (3.1)	0.625/0.034
OSL2		4.0 - 6.6	20 - 33	
葉	開花期~ 莢伸長初期	6.3 (0.80)	32 (5.2)	0.625/0.034
OSL3		5.2 - 8.0	25 - 43	
葉	子実肥大期	6.9 (0.79)	24 (2.7)	0.625/0.034
OSL4		5.5 - 8.5	18 - 29	
根	子実肥大期	4.6 (1.0)	15 (2.7)	1.250/1.241
		3.1 - 7.1	11 - 22	
地上部	子実肥大期	3.9 (0.60)	14 (2.2)	0.313/0.060
		3.0 - 5.1	11 - 18	
種子	成熟期	3.6 (0.71)	4.0 (0.77)	0.313/0.094
		2.3 - 4.7	2.6 - 5.1	
花粉/葯	開花期	7.7 (N/A)	N/A (N/A)	0.313/N.D. ⁵
		N/A - N/A	N/A - N/A	

¹OSL = over-season leaf (葉)

²採取した各組織の生育段階

³蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (SD: 括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 (FW) 1g 当たりの μg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限-上限) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (OSL1 は 1 サンプルで LOD 未満だったため n=19、それ以外は n=20。花粉は n=1)。N/A = 該当しない。

⁴蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1g 当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。

⁵N.D. = Not determined. 花粉/葯は得られたサンプル量が限られていたため、検出限界値を設定することができなかった。

²³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(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

10

本組換えダイズは、本組換えダイズに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 11)。

本 PCR 法の検出限界値は、ゲノム DNA 量比で 0.040% である (別添資料 12 の p10)。

15

本 PCR 法の信頼性については、米国モンサント・カンパニーと米国 BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 12 の p13~15)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

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

本組換えダイズへ導入された *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質を発現することにより、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

25

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間の相違の有無及び相違がある場合はその程度²⁴

30

2014 年から 2015 年にかけて、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場 (以下、「本隔離ほ場」とする。) において本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えダイズの R₇ 世代を供試した (図 5, p31)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝子導入母本である

²⁴ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

A3555 を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b, p43) は 2013 年に米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において試験を実施した。

5 a. 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を比較するため、登録出願品種審査要領に基づく農林水産植物種類別審査基準「大豆審査基準」(農林水産省, 2012a) を参考に、10 項目 (小葉の形、開花始め (月日)、開花終わり (月日)、成熟期 (月日)、主
10 茎長 (cm)、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高 (cm)、収穫期の一株当たり
の地上部重 (g)、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形)) について評価を
行った。統計処理を主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高及び収穫
15 期の一本当たりの地上部重に関して行い、小葉の形、開花始め、開花終
わり、成熟期、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形) に関しては量的なば
らつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。統計処理を行っ
た 5 項目 (主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高及び収穫期の一株当
20 当たりの地上部重) では、主茎長及び最下着莢節位高において本組換えダイズ
と対照の非組換えダイズの間統計学的有意差が認められた (別添資料 13
の表 3, p11)。主茎長は、本組換えダイズが 104.2 cm、対照の非組換えダイ
ズが 108.7 cm であった。最下着莢節位高は、本組換えダイズが 10.3 cm、対
照の非組換えダイズが 8.0 cm であった。

また、統計処理を行わなかった 5 項目 (小葉の形、開花始め、開花終わり、
成熟期、収穫種子の形状) では、開花始めに違いが認められた。開花始めは、
本組換えダイズが 7 月 8 日、対照の非組換えダイズが 7 月 4 日であった (別添資
25 料 13 の表 3, p11)。

b. 生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性試験は、米国のモンサント・カンパニーの人
30 工気象室において実施した。播種後 13 日目の本組換えダイズ、対照の非組
換えダイズ A3555 及び従来商業品種 4 品種の幼苗を、日中 15 °C/夜間 8 °C
に設定した人工気象室で栽培した。低温処理開始後 10 日目に主茎長及び生
育段階を調査した。また、低温処理開始後 20 日目の個体は、主茎長、生育
35 ステージ、生体重及び乾燥重について調査を行った。統計処理を主茎長、
生体重及び乾燥重に関して行い、生育ステージに関しては、供試個体の生
育状況を把握するための指標であるため、結果の記載にとどめた。

その結果、いずれの項目においても本組換えダイズと対照の非組換えダイズ

ズの間には統計学的有意差は認められなかった (別添資料 14 の Table 2, p6)。また、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの生育段階は、低温処理開始後 10 日目はそれぞれ V3-5 及び V3-4、低温処理開始後 20 日目はそれぞれ V5-8 及び V6-7 であったので違いはないと考えられた (別添資料 14 の Table 2, p6)。

5

c. 成体の越冬性

本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを、成熟期の後も引き続き生育させ、わが国の冬期における生育状況を観察した。2015 年 1 月 6 日に越冬性試験区において供試個体の観察を行ったが、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれも枯死していた (別添資料 13 の図 6, p13)。

10

d. 花粉の稔性及びサイズ

15

本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから採取した花粉を、Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれにおいても本組換えダイズ及び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 (別添資料 13 の 図 7 及び表 4, p14)。

20

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

25 生産量：

本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズについて、種子の生産量に関する 4 項目 (一株当たりの稔実莢数、一株当たりの粗粒重 (g)、一株当たりの精粒重 (g)、百粒重 (g)) 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、一株当たりの粗粒重においてのみ、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 13 の表 5, p15)。一株当たりの粗粒重の平均値は、本組換えダイズが 64.9 g、対照の非組換えダイズが 58.8 g であった (別添資料 13 の表 5, p15)。また、それ以外の種子の生産量に関する項目では、統計学的有意差は認められなかった。

30

35

脱粒性：

裂莢性については、本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを成熟期に収穫し、植物体をビニールハウス内で自然乾燥させた後に目視で裂莢の有無やその程度を観察した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、種子の裂莢性に違いは認められなかった (別添資料 13 の表 5, p15)。

40

休眠性及び発芽率：

5 休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの収穫後 19 日目の種子をシャーレ上に静置し、25 °C に設定した恒温器内での発芽個体数を数えた。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの収穫種子の発芽率はそれぞれ 98.5%、97.0%といずれも高く、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 13 の表 5, p15)。

10 f. 交雑率

本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間交雑率を調査するために、本組換えダイズを花粉親とし、対照の非組換えダイズの収穫種子における交雑体の発生頻度を調査した。なお、交雑体の判定については花粉親にあたる本組換えダイズの発現蛋白質を指標とした。

15 本隔離ほ場試験の形態・生育特性調査区で栽培された対照の非組換えダイズ区のうち、本組換えダイズと隣接する条 (両端各 3 株を除く) から種子を採種した。これら対照の非組換えダイズは、南東又は北西に隣接する本組換えダイズとは 1.65 m の距離があった (別添資料 13 の図 2, p6)。なお、このプロットでは開花期に防虫網を掛けていなかった。収穫種子から無作為に選出した 480 粒を温室においてポットに播種し、本葉第 2~3 葉期に生長した時点で、葉における発現蛋白質の有無をラテラルフロー法により検定した。

20 本試験に供試した 480 粒のうち、発現蛋白質が検出されたものは存在しなかったため、本調査において交雑は認められなかった (別添資料 13, p16)。

25 g. 有害物質の産生性

30 本組換えダイズから土壌微生物又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ため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重において本組換えダイズ区と対照の非組換えダイズ区との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 13 の表 6~表 8, p17)。

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

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

(2) 使用等の方法

10 —

(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

15 —

(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

20 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

25 —

(6) 国外における使用等に関する情報

5 本組換えダイズの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は、表 7 (p47) のとおりである。

表 7 本組換えダイズの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況²⁵
2018年6月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
米国農務省 (USDA)	環境	2013年11月	2014年10月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2013年11月	2015年5月
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2013年9月	2014年10月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2013年9月	2014年10月
欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料	2014年9月	審査中
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2015年1月	2016年1月

10

なお、本組換えダイズのわが国における申請状況は、表 8 (p47) のとおりである。

15 表 8 本組換えダイズのわが国における申請及び認可状況²⁶

2018年6月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²⁷	2016年4月	2016年10月
農林水産省	飼料 ²⁸	2016年4月	2016年10月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ²⁹ : 隔離ほ場)	2013年10月	2014年5月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 : 一般使用)	2015年8月	2016年11月

²⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

²⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

²⁷ 食品衛生法に基づく。

²⁸ 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。

²⁹ 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。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価³⁰

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

ダイズが、これまで北米において栽培ほ場の外で発見されたという報告はない (OECD, 2000)。わが国においても、ダイズは弥生時代から栽培されていると考えられ、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわ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する項目として、形態・生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性 (充実度)・サイズ、並びに種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した (第一の 2-(6)-②-a, c~e, p43~45)。その結果、形態及び生育の特性において、統計処理を行った項目では、主茎長及び最下着莢節位高において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた。また、統計処理を行わなかった項目では、開花始めに違いが認められた。

主茎長は、本組換えダイズが104.2 cm、対照の非組換えダイズが108.7 cmであり、本組換えダイズの方が低かった (別添資料 13の表3, p11)。しかし、本組換えダイズの主茎長の平均値 (104.2 cm) は、これまでに報告されているダイズの主茎長の範囲 (44~121 cm) (昆野, 2001) に収まっていた。また、最下着莢節位高は、本組換えダイズが10.3 cm、対照の非組換えダイズが8.0 cmであり、本組換えダイズの方が高かった (別添資料 13の表3, p11)。しかし、本組換えダイズの最下着莢節位高の平均値 (10.3 cm) も、これまでに報告されているダイズの最下着莢節位高の範囲 (7.00~24.17 cm) (Ramteke et al., 2012) に収まっていた。このことから、本組換えダイズにおいて認められた主茎長及び最下着莢節位高の値は、非組換えダイズの種内品種間変動の範囲内であると判断された。

開花始めは、本組換えダイズが7月8日、対照の非組換えダイズが7月4日であり、本組換えダイズが4日遅かった (別添資料 13の表 3, p11)。しかし、本組換えダイズの開花始めから開花終わりまでの期間は7月8日から8月12日、対照の非組換えダイズの開花始めから開花終わりまでの期間は7月4日から8月12日であり、開花期間はほぼ重複していた。したがって、観察された開花始めの差によって本組換えダイズの競合における優位性が高まることはないと考えられた。

種子の生産量において、一株当たりの粗粒重で統計学的有意差が認められた。

³⁰ 本項目中で、第一の 2-(6)-②-a~g に記載された試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

一株当たりの粗粒重の平均値は、本組換えダイズが 64.9 g、対照の非組換えダイズが 58.8 g であり、本組換えダイズの方が高かった (別添資料 13 の表 5, p15)。しかし、本組換えダイズの一株当たりの精粒重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に統計学的有意差は認められなかった。したがって、
5 本隔離ほ場試験で認められた一株当たりの粗粒重の差により本組換えダイズの競合における優位性が高まることはないと考えられた。

本組換えダイズには、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によりチョウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、チョウ目昆虫による食害の
10 みがダイズがわが国の自然条件下において生育することを困難にさせる要因ではない。また、本組換えダイズの隔離ほ場及び米国の人工気象室における試験において、第一の 2-(6)-②-b、c、e (p43~45) の項目に記載した本組換えダイズの自然環境下における生存に関与する形質 (b. 生育初期における低温耐性、c. 成体の越冬性、e. 種子の脱粒性、休眠性及び発芽率) に違いがなかったことから、
15 このチョウ目害虫に対する抵抗性が付与された要因のみで、これまで栽培作物として品種改良されてきたダイズが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

以上のことから、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為 (国内における栽培を含まない) とする範囲内では、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野生動植物等の特定

5 ダイズは、弥生時代からわが国で栽培されており、イネ・ムギ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。

10 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、鋤込み試験及び後作試験（第一の 2-(6)-②-g、p45）により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

15 本組換えダイズ中では、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現しているが、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いことが確認されている（第一の 2-(1)-ロ-②、p24~25）。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、酵素活性を持たないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

20 本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すが、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認されている（表 2、p26 及び表 3、p27）。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

25 本組換えダイズがわが国へ輸入された場合、わが国に生息するチョウ目昆虫が、本組換えダイズ由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質に暴露される可能性として、食用又は飼料用に供するために輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に生育した場合が想定された。さらに、その経路としては、1) 本組換えダイズを直接食餌する場合、2) 本組換えダイズから飛散した花粉を食餌する場合、そして 3) 本組換えダイズが交雑によりツルマメと雑種を形成し、

30 チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌する場合が考えられた。

35 これらの経路から Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質に暴露され、何らかの影響を受ける可能性を、環境省レッドリスト 2017 昆虫類（環境省, 2017a）に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫を対象とし、評価を行った（別添資料 15）。

環境省レッドリスト 2017 昆虫類（環境省, 2017a）に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫について、1) 本組換えダイズを直

接食餌する可能性、2) 生息地が農耕地周辺やダイズの主要輸送経路である幹線道路沿いで本組換えダイズの飛散した花粉を食餌する可能性、3) 本組換えダイズとツルマメの雑種個体を食餌する可能性から絞込みを行った結果、影響を受けることが否定できない種として17種が特定された(別添資料15)。さらに、42種については、食餌植物又は生息地に関する情報が不足していた(別添資料15)。

(2) 影響の具体的内容の評価

Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を発揮するが、LC₅₀ (半数致死濃度) からも明らかのように、その活性は種によって異なることが分かっている(表2, p26)。

本組換えダイズの標的昆虫であるタマナヤガ (Black Cutworm; *Agrotis ipsilon*)、コーンイヤークワーム (Corn Earworm; *H. zea*)、フォールアーミーワーム (Fall Armyworm; *S. frugiperda*) に対する LC₅₀ は、Cry1A.105 蛋白質については、それぞれ 33 µg/mL diet、6 µg/mL diet、6.9 µg/mL diet である。また、改変 Cry2Ab2 蛋白質については、それぞれ >100 µg/mL diet、9.9 µg/mL diet、<50 µg/mL diet である(表2, p26)。

(3) 影響の生じやすさの評価

(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズを直接食餌することにより個体群で影響を受けるのは、そのチョウ目昆虫の幼虫が、ダイズを専食し、かつ輸入された本組換えダイズが輸送中にこぼれ落ちて生育する場所に局所的に生息している場合に限定される。しかしながら、(1) で特定されたチョウ目昆虫は、ダイズ以外の食草が報告されている。さらに、その生息地が、ダイズの主要輸送経路である幹線道路沿いに限定されているとは考えにくい。したがって、(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズを直接、食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

次に、(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズから飛散した花粉を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性について評価した。ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、かつ花粉に粘着性があるため、花粉が飛散する可能性は低いと考えられる。実際に、わが国でダイズほ場中心部における畝間のダイズ花粉飛散量を測定したところ、花粉の堆積量は最大で1日当たり 0.368 粒/cm²、平均値は 0.18 粒/cm²であった (Yoshimura et al., 2006)。また、(1) で特定されたチョウ目昆虫が、ダイズの主要輸送経路である幹線道路沿いに

局所的に生息するとは考えにくい。さらに、本組換えダイズの花粉における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量 (それぞれ 11 µg/g FW 及び 7.7 µg/g FW) は、他の組織、特にチョウ目害虫抵抗性を発揮するのに重要な葉 (OSL1~OSL4) における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量 (それぞれ 79~230 µg/g FW 及び 5.2~6.9 µg/g FW) と同等又は葉における発現量より低いことが確認されている (表 5, p40 及び表 6, p41)。以上のことから、本組換えダイズの花粉を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は、本組換えダイズを直接食餌する場合と同様に極めて低いと判断された。

5

10

最後に、本組換えダイズがツルマメとの交雑により雑種を形成し、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を (1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が食餌する場合について評価を行った。

15

第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~10) に記載したとおり、ダイズとツルマメはいずれも閉花受粉を行う自殖性植物であること、一般的にダイズとツルマメの開花期は重なりにくいこと、実際にこれまで行われてきた交雑性試験によりダイズとツルマメは条件によっては交雑しうるが、その交雑率は極めて低いことが確認されている。

20

仮に交雑したとしても、ダイズとツルマメの雑種及びその後代は、ダイズの遺伝子のある割合で有することにより、自然環境での適応においてツルマメより不利になり、速やかに消失するとされている (Kuroda et al., 2010)。さらに、第一の 1-(3)-ト (p11~12) に記載したように、自生するツルマメがチョウ目昆虫から受ける食害はツルマメの種子生産性に影響を及ぼすほどのものではないと考えられる。したがって、*cry1A.105* 遺伝子又は改変 *cry2Ab2* 遺伝子を持つ雑種も持たない雑種と同様、自然環境での適応においてツルマメより不利になり、速やかに消失すると考えられる。

25

30

さらに、(1) で特定されたチョウ目昆虫はダイズ又はツルマメ以外の食草が報告されており、また、その生息地がダイズの主要輸送経路である幹線道路沿いに限定されているとは考えにくい。したがって、(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為 (国内における栽培を含まない) とする範囲内では、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。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

5 第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~10) 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 (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991; OECD, 2000)。したがって、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。

10 (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は、低い確率で交雑が生じ、雑種が形成される (OECD, 2000)。したがって、交雑性に関する具体的な影響としては、本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子が当該雑種からツルマメの集団中に浸透した後に、その集団の競合における優位性が高まることが考えられた。

(3) 影響の生じやすさの評価

20 本組換えダイズが、わ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可能性があることは否定できない。

しかしながら、第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~10) に記載したように、ダイズとツルマメはともに、自殖性植物であり、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重複した場合でもその交雑率は低いことが報告されている (阿部ら, 2001; Nakayama and Yamaguchi, 2002; 吉村ら, 2006; 吉村, 2008; Mizuguti et al., 2009)。

本組換えダイズとツルマメとの交雑性に関する試験は行っていない。しかしながら、本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とを隣接した試験区で栽培し、本組換えダイズを花粉親とした時の自然交雑率を調査したところ、交雑は認められず (第一の 2-(6)-②-f, p45)、これまでに報告されているダイズ品種間の自然交雑率 (0.03~6.32%) (Woodworth, 1922; Garber and Odland, 1926; Cutler, 1934; Weber and Hanson, 1961; Caviness, 1966; Beard and Knowles, 1971; Ahrent and Caviness, 1994; Abud et al., 2003; Ray et al., 2003) を超えるものではなかった。よって、本組換えダイズの交雑性は従来ダイズと比較して高まっていないと考えられた。

35 本組換えダイズには、*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子により、チョウ目害虫抵抗性が付与されている。

そこで、仮に本組換えダイズがツルマメと交雑した場合に、本組換えダイズ

由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子を持つツルマメ集団の競合における優位性が高まるかについて、①本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメの競合における優位性を高める可能性 (ハザード) 及び②輸送中にこぼれ落ちた本組換えダイズ種子が生育した後にツルマメと交雑する可能性 (暴露量) の2点に基づき、影響の生じやすさの評価を行った。

なお、上記の評価は、本組換えダイズを含め既に栽培を除く第一種使用規定の承認がなされている6系統のチョウ目害虫抵抗性ダイズ (うち3系統は掛け合わせ品種) (表9, p54) の生物多様性影響評価に用いられた知見に加え、承認後に蓄積された輸入ダイズの輸送経路沿いのモニタリング結果等の知見も踏まえて行った。以下に詳細を記載する。

表9 これまでに第一種使用等の承認を受けているチョウ目害虫抵抗性遺伝子組換えダイズ系統³¹

系統名	遺伝子組換え生物等の種類の名称
MON87751 (本組換えダイズ)	チョウ目害虫抵抗性ダイズ (<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7)
MON87701	チョウ目害虫抵抗性ダイズ (改変 <i>cry1Ac</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI: MON-87701-2)
DAS81419	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ (改変 <i>cry1F</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , <i>pat</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DAS81419, OECD UI: DAS-81419-2)
MON87701 × MON89788	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズ (改変 <i>cry1Ac</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87701 × MON89788, OECD UI: MON-87701-2 × MON-89788-1)
MON87751 × MON87701 × MON87708 × MON89788	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤ジカンバ及びグリホサート耐性ダイズ (<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , 改変 <i>dmo</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87751 × MON87701 × MON87708 × MON89788, OECD UI: MON-87751-7 × MON-87701-2 × MON-87708-9 × MON-89788-1) 並びに当該ダイズの分離系統に包含される組合せ (既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)
DAS81419 × DAS44406	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アリオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 <i>cry1F</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , 改変 <i>aad-12</i> , <i>2mepsps</i> , <i>pat</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DAS81419 × DAS44406, OECD UI: DAS-81419-2 × DAS-44406-6)

³¹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

① 本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメの競合性を高める可能性 (ハザード)

5

第一の 1-(3)-ト (p12) に記載したように、66 種のチョウ目昆虫の幼虫がツルマメを食餌していたことが報告されている (安田ら, 2014)。よって、仮に本組換えダイズ中の *cry1A.105* 遺伝子と改変 *cry2Ab2* 遺伝子が、交雑によりツルマメに移行することで、ツルマメにチョウ目昆虫に対する抵抗性が付与された場合、このツルマメの競合性が高まる可能性が示唆された。しかしながら、自生するツルマメはチョウ目昆虫以外の多くの生物から食害を受けており、バッタ目及びコウチュウ目昆虫による食害が最も多く、チョウ目昆虫による食害程度は 2% 以下であったことが報告されている (Goto et al., 2016)。さらに、ツルマメに異なる条件の摘葉処理 (0%、10%、25%、50% 及び 100%) を施したところ、ツルマメは補償作用が働くことにより 50% の葉を失った場合でも葉の欠損のない場合と同等の莢数及び種子数を維持できることから、自生するツルマメがチョウ目昆虫から受ける食害程度はツルマメの種子生産性に影響を及ぼすほどのものではないと報告している (Goto et al., 2016)。

さらに、第一の 1-(3)-ト (p12) に記載したように、ツルマメは、生育初期の暑さと乾燥、草刈 (中山ら, 2000)、周辺に生育する雑草種との競合 (Oka, 1983; 羽鹿ら, 2003) といった様々な要因によって生育を制限されている。

上記に加えて、本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくためには、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。しかしながら、第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~10) に記載したように、ダイズとツルマメの雑種及びその後代は、ダイズの遺伝子のある割合で有することにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されることが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004; Kuroda et al., 2010; Kitamoto et al., 2012; Kuroda et al., 2013)。

30

以上のことから、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、チョウ目害虫抵抗性の形質のみで雑種の競合性がツルマメより高まることはないと考えられた。

② 輸送中にこぼれ落ちた本組換えダイズの種子が生育した後にツルマメと交雑する可能性 (暴露量)

35

上述したように、本組換えダイズを含めたチョウ目害虫抵抗性ダイズ 6 系統

は、栽培を除く食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為を第一種使用等の範囲として承認を受けている。これらのチョウ目害虫抵抗性ダイズについては、わが国に輸入された種子が、その輸送中にこぼれ落ちたとしても、ツルマメとの交雑種子が発生する可能性は極めて低いと結論されている。しかし、これらのダイズ系統は、その第一種使用にあたり輸入ダイズの輸送経路沿いのモニタリングを実施することを求められており、既に商業栽培が開始されている MON87701×MON89788 については 2013 年から 2016 年にかけてモニタリングが実施されている。そこで、これまでに蓄積されたモニタリング等の知見に基づいて、これまでにチョウ目害虫抵抗性ダイズに対して行われた暴露量評価の妥当性について検証した。

1) これまでに生物多様性影響評価で実施された暴露量評価

わが国におけるダイズの輸入量、用途別の使用量、使用実態及び輸送形態については、MON87701 の生物多様性影響評価の際に、2009 年の統計情報等を基に以下の a. ~ c. の順で評価されており、これらの情報に基づき本組換えダイズの暴露量の評価が既に行われている (別添資料 16) (環境省, 2017b)。

- a. わが国に輸入されたダイズ種子が輸送中にこぼれ落ちる可能性
- b. 輸送中にこぼれ落ちたダイズ種子が生育する可能性
- c. こぼれ落ちから生育したダイズが、ツルマメと隣接して生育し、交雑する可能性

以上の a.~c. に基づく暴露量評価の結果から、食用又は飼料用に供するために輸入されたダイズ種子が、輸送中にこぼれ落ちた後に生育し、ツルマメと交雑する可能性は極めて低いと結論されている。さらに、これらの情報を基に港湾から各飼料工場までの輸送中にこぼれ落ち、開花まで生育したダイズと交雑したツルマメに結実する交雑種子数について試算が行われている。試算の結果、港から飼料工場への輸送中にこぼれ落ち、ツルマメと隣接して生育する可能性のあるダイズ個体数は最大で 11.99 個体であり、これらのダイズ個体とツルマメが交雑することにより発生する可能性のある交雑種子数は最大で 0.75 粒と推定されている (別添資料 16)³²。

また、ダウ・ケミカル日本株式会社は、DAS81419 の生物多様性影響評価の際に、暴露量評価を行っている。そこでは、輸入された DAS81419 とツルマメの交雑個体が発生する可能性について、a) 輸入された DAS81419 の種子が国内

³²申請書に添付の緊急措置計画書に基づき、評価の前提となるダイズ種子の輸入量、使用実態等に関して情報収集を行うこととする。

運搬中にこぼれ落ちた場合に生育する可能性、及び b) こぼれ落ちたダイズ種子から生育した個体がツルマメと隣接して生育し交雑する可能性の 2 点から考察が行われている。その結果、ダイズ植物群落の発見確率は、ダイズ陸揚げ地点からの距離に伴い著しく減少し、陸揚げ地点から 2km 以上離れた場所において

5 ほぼ 0 になることが推測されることから、輸入された DAS81419 の種子が輸送中にこぼれ落ちた後に生育し、ツルマメと交雑し、その交雑個体が生育する可能性は極めて低いと結論されている (環境省, 2017c)。

10 2) 輸入ダイズの輸送経路沿いのモニタリング結果等の知見に基づく暴露量評価の検証

MON87701×MON89788 の第一種使用規程に基づくモニタリングとして、輸入ダイズの輸送経路である幹線道路沿い (全道路長 172 km のうち約 7 km が対象) の調査が 2013 年以降に行われている。これまで、4 年間 (2013 - 2016 年) 調査が行われているが、全ての経路においてダイズ生育個体は確認されていない (日本モンサント株式会社, 2014; 日本モンサント株式会社, 2015; 日本モンサント株式会社, 2016; 日本モンサント株式会社, 2017)。

15

Goto ら (2016) は、上述の MON87701×MON89788 に対するモニタリングで調査対象となっている輸入ダイズの輸送経路である幹線道路沿いにおいてダイズ個体及びツルマメ集団の有無を 3 年間 (2012~2014 年) にわたって調査した結果をまとめている。さらに、2015 年には、同経路においてこぼれ落ちダイズ粒の有無を調査している。調査の結果、輸入ダイズのこぼれ落ちは輸送経路の始点である港湾付近に限定される一方で、ツルマメ集団は港湾から離れた場所でのみ確認されたことから、輸入ダイズのこぼれ落ちに起因する生育個体とツルマメが隣接して生育する可能性は低いと考えられた。さらに、仮に両者が隣接して生育し、開花期が重複したとしても、両者が交雑する可能性は低いことが文献情報から明らかにされており、遺伝子組換えダイズを輸入目的で使用した場合の暴露量は低いと結論している (Goto et al., 2016)。

20

25

さらに、農林水産省により、2009 年から 2016 年にダイズの輸入実績港 10 港のダイズ陸揚げ地点から半径 5 km の地域を対象に、ダイズ又はツルマメの生育状況の調査 (遺伝子組換え植物実態調査) が行われている。その結果、生育が確認されたダイズは 2009 年は 16 個体、2010 年は 8 個体、2011 年及び 2012 年は 9 個体、2013 年は 12 個体、2014 年は 7 個体、2015 年は 13 個体、2016 年は 6 個体であった (農林水産省, 2011a; 農林水産省, 2011b; 農林水産省, 2012; 農林水産省, 2013; 農林水産省, 2014; 農林水産省, 2015; 農林水産省, 2017; 農林水産省, 2018b)。

30

35

8 か年の調査の結果、遺伝子組換えダイズの生育地点は、例年、陸揚げ地点の近傍の道路沿いであることが多く、その生育には各年度の連続性がないことから、

生育していた遺伝子組換えダイズは、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大していないと考えられた。また、ツルマメと遺伝子組換えダイズの両者が確認された鹿島港においても、それぞれの生育場所は重複しておらず、これまでの調査では遺伝子組換えダイズとの交雑体も確認されなかったこと

5

から、ツルマメの生育に遺伝子組換えダイズが影響を及ぼす可能性及び導入遺伝子がツルマメに移行する可能性は低いと結論されている(農林水産省, 2017)。
以上をまとめると、これまでに実施された遺伝子組換えダイズの生物多様性影響評価において、遺伝子組換えダイズが輸送中にこぼれ落ちた後に生育し、ツルマメと交雑し、その交雑個体が生育する可能性は極めて低いと結論されている。さらに、その評価の際に想定した暴露量を超えることはないことが、MON87701×MON89788の第一種使用規程に基づくモニタリング等の知見から確認された。

10

以上のことから、①ハザードについて、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしても、その雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、チョウ目害虫抵抗性の形質のみで雑種の競合性がツルマメより高まることはないと考えられた。また、②暴露量について、本組換えダイズが食用又は飼料用に供するために輸入され、輸送中にこぼれ落ちた後に、生育する可能性は低い。さらに、仮に本組換えダイズが輸送中にこぼれ落ち、生育した場合でも、輸送経路である幹線道路沿いに生育するツルマメと隣接して生育する可能性は低いと考えられた。そして、仮に輸送中にこぼれ落ちたダイズがツルマメの集団と隣接して生育し、かつ開花期が重なり合うような特殊な条件であっても、その交雑率は極めて低いことから、わが国に輸入された本組換えダイズとツルマメとの交雑種子が発生する可能性は極めて低いと考えられた。

15

20

25

したがって、本組換えダイズを輸入した際に交雑性に起因する生物多様性影響の生じやすさは極めて低いと判断された。

(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、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、本組換えダイズとツルマメの交雑個体が発生する可能性も極めて低いことから、本組換えダイズを輸入した際に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考えられた。

30

35

4 その他の性質

—

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 ダイズは弥生時代からわが国で栽培されていると考えられており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

10 本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズとの間で競合における優位性に関する諸形質(形態・生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性(充実度)・サイズ、並びに種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率)を、わが国の隔離ほ場において調査した。その結果、形態及び生育の特性において、主莖長及び最下着莢節位高で本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差が認められ、開花始めに違いが認められた。また、種子の生産量において、一株当たりの粗粒重で統計学的有意差が認められた。また、生育初期における低温耐性を米国において調査した結果、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の間で統計学的有意差は認められなかった。

15 検討の結果、本組換えダイズの主莖長及び最下着莢節位高の平均値は、これまでに報告されているダイズの主莖長及び最下着莢節位高の平均値の範囲に収まっていた。また、一株当たりの粗粒重について統計学的有意差が認められたものの、精粒重を含むそれ以外の種子の生産量における項目で、差異は認められなかった。また、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの開花期間はほぼ重複していた。したがって、認められた差異が本組換えダイズの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

20 本組換えダイズには、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、このチョウ目害虫に対する抵抗性付与の要因のみによって、これまで栽培作物として品種改良されてきたダイズが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

25 以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為(国内における栽培を含まない)とする範囲内では、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。

有害物質の産生性：

35 ダイズにおいて、これまでに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、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、いずれの項目においても統計学的有意差は認められなかった。

本組換えダイズ中では、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと類似の配列を有しないことが確認されている。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能しているため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

さらに、本組換えダイズ由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質に暴露される経路として、1) 本組換えダイズを直接食餌する場合、2) 本組換えダイズから飛散した花粉を食餌する場合、そして 3) 本組換えダイズが交雑によりツルマメと雑種を形成し、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌する場合を想定し、わが国に生息する絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫及びツルマメを摂食するチョウ目昆虫が個体群で影響を受ける可能性について評価した。その結果、特定されたチョウ目昆虫が、ダイズの主要輸送経路である幹線道路沿いに限定して局所的に生息している可能性は極めて低いこと、ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、かつ花粉に粘着性があるため飛散する可能性は低いこと、そしてダイズとツルマメの交雑率は開花期の違いや開花特性から極めて低く、仮に交雑したとしてもダイズとツルマメの雑種は自然環境において競合における優位性がツルマメよりも劣っていることなどから、その雑種がわが国の自然条件に適応してツルマメ集団内で優占化する可能性は極めて低く、本組換えダイズ中の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメ集団中へ浸透していく可能性は極めて低いと判断された。よって、特定された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫が個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為(国内における栽培を含まない)とする範囲内では、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。

交雑性：

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。

まず、仮に本組換えダイズとツルマメが交雑し、本組換えダイズとツルマメの雑種が形成され、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質によっ

てチョウ目昆虫に対する抵抗性が付与された場合に、ツルマメの競合性が高まる可能性(ハザード)について評価を行った。その結果、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、チョウ目害虫抵抗性の形質のみで雑種の競合性がツルマメより高まることはないと考えられた。さらに、仮にダイズとツルマメの雑種が形成されたとしても、雑種及びその後代は、ダイズの遺伝子のある割合で有することにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されると考えられた。

次に、輸送中にこぼれ落ちた本組換えダイズの種子が生育した後にツルマメと交雑する可能性(暴露量)について評価を行った。その結果、食用又は飼料用に供するために輸入された本組換えダイズを含めたチョウ目害虫抵抗性ダイズ 6 系統の種子が輸送中にこぼれ落ちた後に生育する可能性は低く、仮に本組換えダイズが輸送中にこぼれ落ち、生育した場合でも、輸送経路である幹線道路沿いに生育するツルマメと隣接して生育する可能性は低いと考えられた。そして、仮に輸送中にこぼれ落ちたダイズがツルマメの集団と隣接して生育し、かつ開花期が重なり合うような特殊な条件であっても、その交雑率は極めて低いことから、わが国に輸入された本組換えダイズとツルマメとの交雑種子が発生する可能性は極めて低いと考えられた。さらに、MON87701×MON89788 の第一種使用規程に基づくモニタリングとして、輸入ダイズの輸送経路である幹線道路沿い(全道路長 172 km のうち約 7 km が対象)の調査が 2013 年以降に行われているが、これまでの 4 年間(2013~2016 年)の調査では、全ての経路においてダイズ生育個体は確認されていない。また、農林水産省によるダイズの輸入実績港 10 港のダイズ陸揚げ地点から半径 5 km の地域を対象にしたダイズ又はツルマメの生育状況の調査結果からも、生育していた遺伝子組換えダイズは、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大しておらず、ツルマメの生育に遺伝子組換えダイズが影響を及ぼす可能性及び導入遺伝子がツルマメに移行する可能性は低いと結論されている。

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為(国内における栽培を含まない)とする範囲内では、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された。

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用等の内容を、食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為(国内における栽培を含まない)とする範囲内では、わが国の生物

多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- Abel, G.H. 1970. Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agronomy Journal* 62: 121-123.
- 5
- Abrams, R.I., C.R. Edwards and T. Harris. 1978. Yields and cross-pollination of soybeans as affected by honey bees and alfalfa leafcutting bees. *American Bee Journal* 118: 555-558.
- 10
- Abud, S., P.I. Mello de Souza, C.T. Moreira, S.R.M. Andrade, A.V. Ulbrich, G.R. Vianna, E.L. Rech and F.J. Lima Aragão. 2003. Gene flow in transgenic soybean in the Cerrado region, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 1229-1235.
- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: 376-378.
- 15
- An, Y.-Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* 10: 107-121.
- 20
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.
- 25
- Bäumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassüner, M. Van Montagu, D. Inzé and U. Wobus. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Molecular and General Genetics* 225: 459-467.
- 30
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 35
- Baum, J.A. 1998. Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection* 79: 127-130.
- Baum, J.A., T.B. Johnson and B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and

recombinant bioinsecticide products. Pages 189-209 in *Methods in Biotechnology: Biopesticides: Use and Delivery*. Volume 5. F.R. Hall and J.J. Menn (eds.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

- 5 Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research* S2: 91-92.
- 10 Beard, B.H. and P.F. Knowles. 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Science* 11: 489-492.
- 15 Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- 20 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- 25 Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6: 211-212.
- 30 Chen, Y. and R.L. Nelson. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. *Crop Science* 44: 316-325.
- 35 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 40 Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813.
- 45 Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- 50 Cutler, G.H. 1934. A simple method for making soybean hybrids. *Journal of the American Society of Agronomy* 26: 252-254.

- De Almeida, E.R.P., V. Gossele, C.G. Muller, J. Dockx, A. Reynaerts, J. Botterman, E. Krebbers and M.P. Timko. 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: Sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Molecular and General Genetics* 218: 78-86.
- 5
- de Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H.E. Schnepf. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37: 409-433.
- 10
- de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 15
- Donovan, W.P. 1991. CryIIB crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. Patent 5,073,632, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 20
- FAOSTAT. 2017. World soybean area harvested 2014. Rome, Italy.
<http://faostat3.fao.org/home/E> [Accessed November 24, 2017].
- Fischhoff, D.A. and F.J. Perlak. 1996. Synthetic plant genes. Patent 5,500,365, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 25
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 30
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- 35
- Fujita, R., M. Ohara, K. Okazaki and Y. Shimamoto. 1997. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *Journal of Heredity* 88: 124-128.

- Gao, Y., K.J. Fencil, X. Xu, D.A. Schwedler, J.R. Gilbert and R.A. Herman. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F δ -endotoxin expressed in transgenic cotton plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 829-835.
- 5
- Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 18: 967-970.
- GenBank. 2014. "Terminator Mt.". National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Accessed October 21, 2014].
- 10
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 15
- Goto, H., H. Shimada, J.M. Horak, A. Ahmad, M.B. Baltazar, T. Perez, A.M. McPherson, D. Stojšin, A. Shimono and R. Ohsawa. 2016. Characterization of Natural and Simulated Herbivory on Wild Soybean (*Glycine soja* Seib. et Zucc.) for Use in Ecological Risk Assessment of Insect Protected Soybean. *PLOS one* 11: e0151237. doi:0151210.0151371/journal.pone.0151237.
- 20
- Graphic Maps. 2012. North America. Worldatlas, Galveston, Texas. <http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> [Accessed May 10, 2012].
- 25
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
- 30
- Hunter, M.J. 2007. Review of "Evaluation of potential interactions between the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry1A.105, Cry2Ab2, and Cry3Bb1" for Monsanto's MON 89034 X MON 88017 maize MRID 469513-05 & 469513-06. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic
- 35
- Substances, Washington, D.C.
- Kiang, Y.T., Y.C. Chiang and N. Kaizuma. 1992. Genetic diversity in natural

populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan. *Journal of Heredity* 83: 325-329.

5 Kim, K.-U., T.-D. Kang, J.-H. Lee, I.-J. Lee, D.-H. Shin, Y.-H. Hwang, S.-U. Kim and H.-M. Kim. 2003. Physio-ecological characteristics of wild soybeans (*Glycine soja*) collected throughout Korea and their response to glyphosate. *Korean Journal of Weed Science* 23: 153-159.

10 Kitamoto, N., A. Kaga, Y. Kuroda and R. Ohsawa. 2012. A model to predict the frequency of integration of fitness-related QTLs from cultivated to wild soybean. *Transgenic Research* 21: 131-138.

15 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

20 Koti, S., K.R. Reddy, V.G. Kakani, D. Zhao and V.R. Reddy. 2004. Soybean (*Glycine max*) pollen germination characteristics, flower and pollen morphology in response to enhanced ultraviolet-B radiation. *Annals of Botany* 94: 855-864.

25 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

30 Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.

35 Kubo, A., M. Aono, N. Nakajima, T. Nishizawa, M. Tamaoki and H. Saji. 2013. Characterization of hybrids between wild and genetically modified glyphosate-tolerant soybeans. *Plant Biotechnology* 30: 335-345.

Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D. Vaughan. 2010. The origin and fate of

- morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology* 19: 2346-2360.
- 5 Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2008. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48: 1071-1079.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, H. Yano, T. Yoshitake, S. Kato and D. Vaughan. 2013. QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated soybeans in experimental fields. *Ecology and Evolution* 3: 2150-2168.
- 10 Lammi, J.J. 2008. Online-Photoperiod Calculator. <http://www.sci.fi/~benefon/sol.html> [Accessed May 10, 2012].
- Liu, H., A.T. Trieu, L.A. Blaylock and M.J. Harrison. 1998. Cloning and
15 characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 14-22.
- Mizuguti, A., Y. Yoshimura and K. Matsuo. 2009. Flowering phenologies and natural
20 hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
- Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 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.
- 25
- OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). ENV/JM/MONO(2000)9. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. Organisation for Economic Co-operation and
30 Development, Paris, France.
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in
35 Biotechnology No. 42. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- Oka, H.-I. 1983. Genetic control of regenerating success in semi-natural conditions observed among lines derived from a cultivated x wild soybean hybrid. *Journal of Applied Ecology* 20: 937-949.
- 5 Palmer, R.G. 2000. Genetics of four male-sterile, female-fertile soybean mutants. *Crop Science* 40: 78-83.
- Palmer, R.G., M.C. Albertsen and H. Heer. 1978. Pollen production in soybeans with respect to genotype, environment, and stamen position. *Euphytica* 27: 427-433.
- 10 Pigott, C.R. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 255-281.
- Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.
- 15 Ramteke, R., D. Singh and P. Maulidharan. 2012. Selecting soybean (*Glycine max*) genotypes for insertion height of the lowest pod, the useful trait for combine harvester. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 82: 511-515.
- 20 Ray, J.D., T.C. Kilen, C.A. Abel and R.L. Paris. 2003. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environmental Biosafety Research* 2: 133-138.
- 25 Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
- Richter, S. and G.K. Lamppa. 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7463-7468.
- 30 Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 35 Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.

- Schapaugh, W.T. 1997. Selection of soybean varieties. Pages 4-7 in Soybean Production Handbook. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas.
- 5 Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.
- 10 Stewart, C.N., M.D. Halfhill and S.I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nature Reviews Genetics 4: 806-817.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.
- 15 Tilman, D. 1997. Mechanisms of plant competition. Pages 239-261 in Plant Ecology. Second Edition. M.J. Crawley (ed.). Blackwell Science, Ltd., Oxford, England.
- 20 U.S. EPA. 2010. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- 25 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. Journal of Invertebrate Pathology 111: 1-12.
- 30 Weber, C.R. and W.D. Hanson. 1961. Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. Crop Science 1: 389-392.
- Widner, W.R. and H.R. Whitely. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. Journal of Bacteriology 171: 965-974.
- 35 Wiebold, B. 2002. Soybean variety adaptation. United Soybean Board, University of Missouri College of Agriculture, Food, and Natural Resources, Columbia, Missouri. <http://www.plantsci.missouri.edu/soydoc/adapt.htm> [Accessed February 1, 2011].

- Wong, E.Y., C.M. Hironaka and D.A. Fischhoff. 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 20: 81-93.
- 5
- Woodworth, C.M. 1922. The extent of natural cross-pollination in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 14: 278-283.
- Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 20: 773-786.
- 10
- Yoshimura, Y., K. Matsuo and K. Yasuda. 2006. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5: 169-173.
- 15
- Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.
- 20
- 浅野 貞夫 1995 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会 東京 p. 62
- 阿部 純・島本 義也 2001 第6章 ダイズの進化：ツルマメの果たしてきた役割. 栽培植物の自然史－野生植物と人類の共進化－ 山口 裕文・島本 義也 (編) 北海道大学図書刊行会 北海道 pp. 77-95
- 25
- 大橋 広好 1999 マメ科. 新装版 日本の野生植物 草本Ⅱ 離弁花類 佐竹 義輔・大井 次三郎・北村 四郎・亙理 俊次・富成 忠夫 (編) 平凡社 東京 p.211
- 30
- 加賀秋人・黒田洋輔・友岡憲彦・Duncan Vaughan・大澤良・佐治光・田部井豊 2006 (2) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の環境拡散リスクと植物多様性影響評価に関する研究 ⑤ダイズとツルマメの雑種後代の適応度に関する研究 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究 pp. 145-155.
- 35

環境省 2017a 環境省レッドリスト2017 平成29年3月31日公表

<http://www.env.go.jp/nature/kisho/hozen/redlist/MOERedlist2017.pdf>

環境省 2017b チョウ目害虫抵抗性ダイズ (改変*cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.)

- 5 (MON87701, OECD UI:MON-87701-2) 生物多様性影響評価検討会での検討の結果

http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1590&ref_no=2

[Accessed November 7, 2017]

- 10 環境省 2017c チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ (改変*cry1F*, 改変*cry1Ac*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS81419, OECD UI: DAS-81419-2) 生物多様性影響評価検討会での検討の結果

http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1790&ref_no=2

[Accessed November 7, 2017]

15

菊池彰夫・猿田正恭・岡部昭典 2005 吉野川流域における野生大豆 (ツルマメ) の収集 植物資源探索導入調査報告書 21: 1-7.

- 20 栗原 浩・蓬原雄三・津野 幸人・山田 盾 2000 第6章 豆類 2.ダイズ. 作物栽培の基礎 農山漁村文化協会 東京 pp. 233-246

河野雄飛・高田吉丈・湯本節三 2004 東北地域における野生大豆 (ツルマメ) の収集 一岩手県内北上川および北部河川流域— 植物資源探索導入調査報告書 20: 11-17.

25

後藤 寛治 1995 ダイズの起源と特性 III 植物としての特性. 農業技術大系作物編 6 農山漁村文化協会 東京 pp. 基19-25

- 30 昆野 昭晨 1987 13. 食用作物 ダイズ. 農学大事典 第2次増訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 養賢堂 東京 pp. 551-557

昆野 昭晨 1995 生育のステージと生理、生態 I 種子と発芽. 農業技術大系作物編 6 農山漁村文化協会 東京 pp. 基 29-33

- 35 昆野 昭晨 2001 生育のステージと生理、生態 II 栄養生長の生理、生態. 転作全書 2: ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 pp. 50-67

財務省 2017 財務省貿易統計

<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed January 13, 2017]

- 5 猿田正恭・菊池彰夫・岡部昭典 2007 四万十川流域における野生大豆(ツルマメ)の収集 植物資源探索導入調査報告書 23: 1-7.

猿田正恭・高田吉丈・岡部昭典 2009 愛媛県における野生大豆(ツルマメ)の探索・収集 植物資源探索導入調査報告書 25: 13-19.

- 10 島本義也・福士泰史・阿部純 1997 飼料用ダイズ(オオバツルマメ)の細胞質ゲノムの特徴 育種学雑誌 47(別2): 159.

植物防疫所 2017 2015(平成27)年植物検疫統計

<http://www.pps.go.jp/TokeiWWW/Pages/report/index.xhtml> [Accessed Jan 11, 2017]

15

須田裕・白澤澄江 1995 岩手県紫波郡矢巾町の花暦 -開花時期と開花期間-. 岩手大学教育学部研究年報 第55巻第1号 165-183.

- 20 高橋将一・羽鹿牧太・異儀田和典 1996 九州中部で収集したツルマメの生育特性 九州農業研究 58: 51.

友岡憲彦・Muthaiyan Pandiyan・田口哲彦・根本英男・加賀秋人・伊勢村武久・Duncan A. Vaughan 2009 北海道におけるマメ科植物遺伝資源の探索収集、2008年 植物資源探索導入調査報告書 25: 1-11.

25

中山祐一郎・山口裕文 2000 トランスジェニック作物からの遺伝子の生態系への拡散防止に関する研究 2. 大豆の祖先野生種ツルマメはどこでどのように生活しているのか 雑草研究. 別号, 講演会講演要旨(39), 182-183, 2000-04-20. 日本雑草学会

30

日本モンサント株式会社 2014 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2014年7月1日公表 <http://www.monsanto.com/global/jp/newsviews/Documents/140701.pdf>

- 35 日本モンサント株式会社 2015 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2015年6月29日公表

<http://www.monsanto.com/global/jp/newsviews/Documents/150629.pdf>

日本モンサント株式会社 2016 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2016年6月1日公表

5 http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/demo2015/Documents/BtRR2Y_Monitoring%20Report_160126_for%20webpage.pdf

日本モンサント株式会社 2017 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2017年3月31日公表

10 http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/Documents/BtRR2Y_Monitoring_Report_Web_170127.pdf

日本雑草学会(編) 1991 第Ⅱ編 雑草名. 改訂・雑草学用語集 日本雑草学会 東京 p. 67

15

沼田 真・浅野 貞夫・奥田 重俊・吉沢 長人・桑原 義晴・岩瀬 徹 1975 新版・日本原色雑草図鑑 沼田真人・吉沢長人(編) 全国農村教育協会 東京 p. 107

20

農林水産省 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 平成23年1月7日公表

http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/21_kekka.pdf

25 農林水産省 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 平成23年10月14日公表

http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/22_natane.pdf

農林水産省 2012a 農林水産植物種類別審査基準 大豆 2012年4月公表

30 <http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf>

農林水産省 2012b 「平成23年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 平成24年9月12日公表 <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/120912-02.pdf>

35

農林水産省 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 平成25年9月24日公表

http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/24_kekka.pdf

農林水産省 2014 「平成25年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
平成26年11月21日公表

5 http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h25_kekka.pdf

農林水産省 2015 「平成26年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
平成27年10月29日公表

http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h26_houkoku.pdf

10

農林水産省 2017 「平成27年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
平成29年1月10日公表

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/170110-1.pdf>

15

農林水産省 2018a 大豆関連データ集 11 大豆の需要動向

http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/attach/pdf/index-20.pdf [Accessed
on Feb. 6, 2018]

農林水産省 2018b 「平成28年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
平成30年2月6日公表

20

<http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-134.pdf>

羽鹿 牧太・高橋 浩司・平賀勸 2003 房総半島におけるツルマメの探索・収
集 植物資源探索導入調査報告書 19: 7-15.

25

安田 耕司・加賀 秋人・榊原 充隆・菊池 彰夫・菊地 敦志・高田 吉丈・水谷 信
夫・松村 正哉・大木 信彦 2014 第2編 第1章 (3) 遺伝子組換え Bt ダイズの
生物多様性影響評価手法の開発 新農業展開ゲノムプロジェクト -GMO 評
価・管理領域- pp. 471-478

30

山内 文男 1992 1. 大豆食品の歴史. 大豆の科学 山内 文男・大久保 一良
(編) 朝倉書店 東京 pp. 1-13

山田 哲也・羽鹿 牧太・松永 亮一・高橋 浩司 2008 静岡県伊豆半島における
ツルマメの探索・収集 植物資源探索導入調査報告書 24: 1-7

35

吉村 泰幸・水口 亜樹・松尾 和人 2006 ほ場で遺伝子組換えダイズとツルマ

メが交雑する可能性は低い. 独立行政法人 農業環境技術研究所 研究成果情報 第23集 pp.22-23

- 5 吉村 泰幸 2008 遺伝子組換え植物と野生種との交雑率の評価—圃場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメとの自然交雑—. 第23回日本雑草学会シンポジウム講演要旨 遺伝子組換え植物の生態系影響評価と管理—LMOの適正な利用のために— 日本雑草学会(編) 日本雑草学会 pp. 30-33

緊急措置計画書

平成30年2月8日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役 ダビッド・ブランコ
住所 東京都中央区京橋二丁目5番18号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (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、科学的に判断された場合、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は以下に示すとおりである。

平成30年2月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 取締役社長 東京都中央区京橋二丁目5番18号 (電話番号 03-6264-4790)
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 業務調整課 課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 規制調整課 課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請・登録課 課長

*: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、本組換えダイズの生物多様性影響評価の前提となったわが国における輸入ダイズの使用状況に関して情報収集を行う。また、モンサント・カンパニーと連絡をとり、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、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から情報収集を行う。

10

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

15 弊社は、わが国において輸入ダイズを使用する穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えダイズの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

20

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

25 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、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とるとともに、環境中に放出された本組換えダイズに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

30

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを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。

35

別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変
5 Cry2Ab2 蛋白質と MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質
及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列の比較 (社外秘)
- 別添資料 2 本組換えダイズの作出に用いられた *cry1A.105* 遺伝子及び改変
cry2Ab2 遺伝子から推定した Cry1A.105 蛋白質及び改変
Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 3 Comparison of the Functional Activity of two *E. coli*-Produced
10 Cry1A.105 Protein Lots (10000776 and 11349124) Against a
Susceptible Lepidopteran Species (MSL0025113) (社外秘)
- 別添資料 4 Comparison of the Functional Activity of two *E. coli*-Produced
Cry2Ab2 Protein Lots (11346423 and 11351673) Against a
Susceptible Lepidopteran Species (MSL0025112) (社外秘)
- 15 別添資料 5 Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR13196 (社外秘)
- 別添資料 6 Amended Report for MSL0025644: PCR analysis to confirm the
absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON 87751
(MSL0025667) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended Report for MSL0025106: Segregation Analysis of the
20 Coding Sequences Present in Insect Protected Soybean MON 87751
Across Multiple Generations (MSL0025712) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0025901: Molecular Characterization of
Insect Protected Soybean (MON 87751) (MSL0027271) (社外秘)
- 別添資料 9 Amended Report for MSL0024813: Demonstration of the Presence of
25 Cry1A.105 and Cry2Ab2 Proteins in Soybean Leaf Samples across
Multiple Generations of MON 87751 (MSL0025695) (社外秘)

- 別添資料 10 Amended Report for MSL0024805: Assessment of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87751 Produced in U.S. Field Trials during 2012 (MSL0025199) (社外秘)
- 5 別添資料 11 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan[®] PCR for MON 87751 (社外秘)
- 別添資料 12 In House Validation Summary for “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan[®] PCR for MON 87751” (社外秘)
- 10 別添資料 13 チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 別添資料 14 Assessment of the Effect of Cold Stress on Soybean MON 87751 under Growth Chamber Conditions (MSL0024840) (社外秘)
- 15 別添資料 15 環境省レッドリスト 2017 昆虫類掲載の滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫のうち、「有害物質の産生性」に係る生物多様性影響評価において影響を受ける可能性が否定できない種の特定
- 20 別添資料 16 わが国に輸入されたダイズ種子の量及びその使用形態に関する情報並びに輸送中にこぼれ落ちた後に生育したダイズがツルマメと交雑することで発生する交雑種子数の試算 (社外秘)
- 別添資料 17 モニタリング結果報告書 (社外秘)