

線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ(*cry14Ab-1.b*, *hppdPf-4Pa*, *Glycine max* (L.) Merr.) (GMB151, OECD UI: BCS-GM151-6) 申請書等の概要

5 第一種使用規程承認申請書

	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
	(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
10	(2) 使用等の歴史及び現状.....	1
	(3) 生理学的及び生態学的特性	3
	イ 基本的特性	3
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	3
	ハ 捕食性又は寄生性.....	4
15	ニ 繁殖又は増殖の様式	4
	ホ 病原性.....	6
	ヘ 有害物質の産生性.....	6
	ト その他の情報.....	6
	2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
20	(1) 供与核酸に関する情報.....	7
	イ 構成及び構成要素の由来.....	7
	ロ 構成要素の機能	7
	(2) ベクターに関する情報.....	22
	イ 名称及び由来.....	22
25	ロ 特性	23
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	23
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	23
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	24
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	24
30	(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	27
	(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.....	31
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	31
35	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	32
	(1) 使用等の内容	32

	(2)	使用等の方法.....	32
	(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	33
5	(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.....	33
	(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	33
	(6)	国外における使用等に関する情報.....	34
	第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	35
10	1.	競合における優位性	35
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	35
	(2)	影響の具体的内容の評価	36
	(3)	影響の生じやすさの評価	36
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	36
15	2.	有害物質の産生性.....	37
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	37
	(2)	影響の具体的内容の評価	37
	(3)	影響の生じやすさの評価	38
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	46
20	3.	交雑性.....	47
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	47
	(2)	影響の具体的内容の評価	47
	(3)	影響の生じやすさの評価	47
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	51
25	4.	その他の性質.....	51
	第三	生物多様性影響の総合的評価	52
	参考文献		56
	別添資料の内容.....		67
30	緊急措置計画書		
	モニタリング計画書		
	試験計画書		

第一種使用規程承認申請書

令和元年 5 月 13 日

5

農林水産大臣 吉川 貴盛 殿
環境大臣 原田 義昭 殿

氏 名 BASF ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 石田博基
住所 東京都中央区日本橋室町三丁目 4 番 4 号

10

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。

15

遺伝子組換え生物等の種類の名称	線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ(<i>cry14Ab-1.b, hppdPf-4Pa, Glycine max</i> (L.) Merr.) (GMB151, OECD UI: BCS-GM151-6)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：茨城県筑西市向上野 1500 番地 41 名 称：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 使用期間：承認日から令和 5 年 7 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置している。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しないう構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等に

	より確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (7) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。 (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
--	---

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 宿主の品種又は系統名

15 宿主はダイズの栽培品種Thorneである。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20 ダイズ (*G. max*)の国内及び国外の自然環境における自生は知られていない
(OECD, 2000)。

25 *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。ツルマメは、中国、朝鮮半島、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

35 ダイズは紀元前17~紀元前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）。アジア以外の国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、2019年にブラジル: 3,588万ha、米国: 3,035万ha、アルゼンチン: 1,657万haであった（FAO, 2020）。また、我が
10 国の主な栽培地域とその作付面積は、2020年度に北海道: 3.89万ha、東北: 1.95万ha、九州: 1.60万haであった（農林水産省, 2020a）。

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
15 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月中、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晩播に、秋ダイズ型の作付地帯で早播傾向にある（大庭, 2001）。栽植密度は
20 品種や栽培条件によって異なるが、標準的には畝間70 cm、株間20 cmで点播の場合1株2~3粒播き、最終的な苗立ち密度を1 m²当たり15本程度とする（鄭, 2008）。生育初期の雑草防除、中耕・培土、病虫害防除など適時行う必要がある。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
25 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2019年のダイズの総輸入量は339.2万tで、主な輸入先は米国（248.5万t）、ブラジル（55.1万t）、カナダ（33万t）である（農林水産省, 2020b）。
30 また、国内消費仕向量は2017年に367.0万tで、その内訳は加工用266.3万t、飼料用8.2万t、種子用0.8万t等であった（農林水産省, 2020c）。

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）。
35 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化が見られる（橋本, 2001a）。発芽後2~3週間すると、根粒菌の共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ことができる（後藤, 2001）。

ダイズの茎は主茎と分枝に分けられ、主茎の本葉の葉腋から分枝が生じる。また、茎の伸長性に基づいて、有限伸育型、無限伸育型及び、両者の中間型に分けられる。花は各葉腋に着生する総状花序で、花色は白、青紫又は赤紫である。開花は気温によって異なるが、ほとんどが午前中に咲き、受粉は通常開花前に終わる。莢は子房の心皮に由来し、莢に含まれる子実の数は、通常1~3粒である（後藤, 2001）。子実の百粒重は、特殊なものを除き10~50 gの範囲である（国分, 2002）。

20

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℃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Thorneは成熟群3.5に分類される中生種である（Mcblain et al., 1993）。

35

ハ 捕食性又は寄生性

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は莢内に稔実し、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難い（大庭, 2001）。栽培種のダイズ種子は休眠性を示すことはほとんどない（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）。

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

ダイズは種子繁殖を行い、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。

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15.2 cm間隔で交互に2品種を植えた場合の交雑率は0.65~6.32%で、平均値は1.8%であった（Ray et al., 2003）。

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、岩手県での調査の平均値は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)。ダイズの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QTL¹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と考えられる (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50 cm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%の範囲で、平均値は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の距離での交雑率は全て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。

¹ Quantitative trait loci (量的形質遺伝子座): 複数の遺伝子の効果の組み合わせにより表現される量的形質を決定しているDNA 領域。

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 μm 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 cm^2 当たりの平均花粉捕捉数は、ダイズ畑の中で0.386粒、畑から2.5 m離れた地点で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

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。

ト その他の情報

我が国においてダイズの輸入港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる遺伝子組換えダイズの生育が報告されているが、その生育範囲の拡大及びツルマメとの交雑体は認められていない (農林水産省, 2021)。

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

線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ (*cry14Ab-1.b*, *hppdPf-4Pa*, *Glycine max* (L.) Merr.) (GMB151, OECD UI: BCS-GM151-6) (以下、「本組換えダイズ」とする) の
10 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。

ロ 構成要素の機能

① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供
15 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は表1に示した。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた供与核酸の各構成要素の由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	由来及び機能
<i>cry14Ab-1.b</i> 遺伝子発現カセット		
T35S	345-614	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列 (Sanfaçon et al., 1991)。
	615-625	合成ポリリンカー配列
<i>cry14Ab-1.b</i>	626-4183	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の 8 内毒素遺伝子のコード領域で、線虫抵抗性を付与する (GenBank accession number: AGU13817.1)。なお、ダイズにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
Pubi10At	4184-5490	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のユビキチン 10 遺伝子のプロモーター (Grefen et al., 2010)。 <i>cry14Ab-1.b</i> 遺伝子を植物体内で構成的に発現させる。
<i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子発現カセット		
T35S	5596-5790	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列 (Sanfaçon et al., 1991)。
	5791-5802	合成ポリリンカー配列
<i>hppdPf-4Pa</i>	5803-6879	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A32 株の 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子 (Porée et al., 2014) で、HPPD-4 蛋白質を産生させる。アミノ酸配列は、335 番目のグルタミン酸がプロリンへ、336 番目のグリシンがトリプトファンへ、339 番目のリシンがアラニンへ、340 番目のアラニンがグルタミンへ置換され

		ている。この置換により 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型 (HPPD 阻害型) 除草剤への耐性を付与する (Boudec et al., 2001)。
<i>TPotp Y-1Pf</i>	6880-7251	ヒマワリ (<i>Helianthus annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Zea mays</i>) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の輸送ペプチドのコード領域 (ベクター構築の際にアミノ酸配列 55 番目がチロシンへ置換された) (Lebrun et al., 1996)。HPPD-4 蛋白質を色素体へ輸送する。なお、ダイズにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
	7252-7272	合成ポリリンカー配列
Ltev	7273-7399	Tobacco Etch Virus のゲノム RNA のリーダー配列 (転写開始部位から翻訳開始部位までの領域) を含む (Allison et al., 1985)。mRNA の翻訳効率を上げる。
	7400-7405	合成ポリリンカー配列
P2x35S	7406-8155	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S ゲノム RNA を反復して配列させ、機能を強化したプロモーター配列 (Kay et al., 1987)。hppdPf-4Pa 遺伝子を植物体内で構成的に発現させる。
その他		
RB	190-214	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の T-DNA 由来の右側境界配列 (Zambryski, 1988)。
	215-344	合成ポリリンカー配列
	5491-5595	合成ポリリンカー配列
	8156-8282	合成ポリリンカー配列
LB	8283-8307	<i>A. tumefaciens</i> の T-DNA 由来の左側境界配列 (Zambryski, 1988)。
外骨格領域(本組換えダイズには存在しない)		
ftiR	1-184	pTiAch5 の Ti プラスミドの T-DNA 由来の右側境界配列 (Zhu et al., 2000)。
	185-189	合成ポリリンカー配列
ftiL	8308-8612	pTiAch5 の Ti プラスミドの T-DNA 由来の左側境界配列 (Zhu et al., 2000)。
TaadA	8613-8864	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) のトランスポゾン Tn7 のアミノグルコシド系抗生物質耐性遺伝子の 3'ターミネーター領域を含む配列 (Fling et al., 1985)。
aadA	8865-9656	大腸菌 (<i>E. coli</i>) のトランスポゾン Tn7 のアミノグルコシド系抗生物質耐性遺伝子のコード領域 (Fling et al., 1985)。
PaadA	9657-10394	大腸菌 (<i>E. coli</i>) のトランスポゾン Tn7 のアミノグルコシド系抗生物質耐性遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Fling et al., 1985)。
	10395-10400	合成ポリリンカー配列
ORI pVS1	10401-13187	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む配列 (Heeb et al., 2000)。
ORI ColE1	13188-14251	大腸菌 (<i>E. coli</i>) のプラスミド pBR322 由来の複製起点を含む配列 (Bolivar et al., 1977)。
	14252-14361	合成ポリリンカー配列

(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 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 【Cry14Ab-1 蛋白質】

線虫について

(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。)

10 線虫は、昆虫が属する節足動物門とは別の線形動物門に属する動物の総称で (図1)、数万から数千万種の線虫が真水、海水及び土壌中に生息している。線虫は生活する場所によって、①植物の根や葉に寄生して生活し、ヒトには害

15 のない植物寄生性、②土の中で細菌や菌などを食べて生活し、ヒトには害がない自由生活性、③ヒトを含む動物に感染・寄生する動物寄生性の3つに分類

20 される (Agrios, 1997)。線虫の10%は植物寄生性であると推定されており、これらは口針を用いて植物の養分を摂食する。植物寄生性線虫の内、農作物に甚大な被害をもたらす線虫の多くは、クキセンチュウ目 (Tylenchida) 及びニセハリセンチュウ目 (Dorylaimida) に属する。

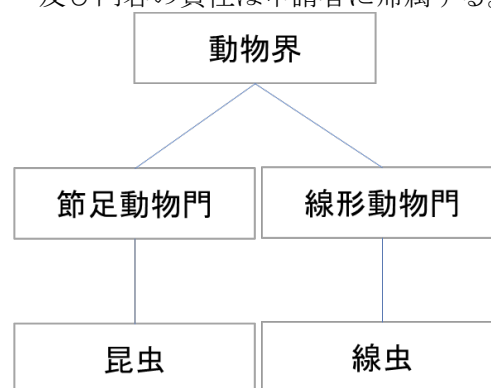


図1 昆虫と線虫の関係

これらの植物寄生性線虫のサイズは、長さ最大4 mm程度、直径15~35 μmと小さく、観察には光学顕微鏡を要する (Agrios, 1997)。

一般に線虫は農業機械、灌漑、ヒト及び動物に付着する等によって畑へ持ち込まれ、農作物に対し被害を引き起こすが、線虫の移動範囲は限定的である。例えば、*C. elegans*の2齢幼虫は湿らせた細砂粒を詰めたカラム中において水平方向へ48時間後に4cm未満の移動度を示し (Young et al., 1998)、また、代表的な農業害虫であるネコブセンチュウの2齢幼虫は、日本の農耕地に多くみられる黒ボク土を詰めたカラムの中を流水条件下で水平方向へ7日間で2~3 cmしか移動できないという報告 (Fujimoto et al., 2010) があり、活動範囲は限定的である。

本組換えダイズが標的とする線虫は、クキセンチュウ目に属するダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) 及びネグサレセンチュウ類 (*Pratylenchus* spp.)である。

● ダイズシストセンチュウ

クキセンチュウ目に属するダイズシストセンチュウは、定住性の内部寄生性線虫で北東アジア、日本、ジャワ島、北アメリカ、コロンビア、ブラジルで発見されている (Agrios, 1997)。ダイズシストセンチュウのメス成虫は、植物の根に寄生してシスト (メス成虫が卵を内蔵したまま体表に硬い膜を作り死亡した状態のもの) を形成する。ダイズシストセンチュウは、適した温度及び湿度でシストからふ化し、さらに寄主作物から放出されるふ化促進物質が刺激となりふ化が促進される。ふ化した幼虫は2齢幼虫で根に侵入して養分を摂取する。メスは成虫になると次第にレモン状に肥大し、根の内部に頭部を残して根の外側に乳白色の虫体を露出する。メス成虫は卵の一部をゼラチン様物質の中に産卵し、これらの卵は容易にふ化するが、残りの卵はメス成虫の体内に保持され、メス成虫は死亡する。死亡したメス成虫は硬い殻のシストとなり、シストの表面が茶色に変化し成熟すると根から離れて土中に残り、越冬する。また、雄成虫は受精後、根から土へ移動し、直ぐにその生涯を終える (Agrios, 1997; Niblack et al., 2006)。ダイズシストセンチュウはマメ科植物に寄生するが、農作物ではダイズ、インゲン、アズキでのみ増殖するため、感染されたこれらの作物は生育不良になり、葉が黄化、萎凋、枯死する。

日本におけるダイズシストセンチュウの分布は主に関東以北とされているが、信越地域でも発生が確認されている (串田, 2012)。さらに、東京都、神奈川県、千葉県、埼玉県といった首都圏、ならびに、奈良県、大阪府、兵庫県といった関西圏にも分布が広がっている (豊田ら、未発表)。しかしながら、ダイズほ場におけるダイズシストセンチュウの生息状況は、千葉県の54ほ場では60%が汚染されていた (武田ら、投稿予定) が、兵庫県の43ほ場では20%しか汚染されておらず (豊田ら、未発表)、地域及びほ場により大きなばらつきを示した。このことから、宿主植物であるダイズを栽培しているダイズシストセンチュウの生育に適した環境においてもダイズシストセンチュウが生息していない場合があり、本組換えダイズのこぼれ落ちにより生育する可能性のある河川の氾濫原や土手、路傍及び港湾付近のような環境にダイズシストセンチュウが生息する可能性は非常に低いと考えられる。

● ネグサレセンチュウ類

クキセンチュウ目に属するネグサレセンチュウ類は、移動性の内部寄生性線虫であり、世界中の至る所で発生し、広食性のため多くの種類の植物の根に寄生する。ネグサレセンチュウ類は、根組織中又は土壤中ではふ化し、成虫も幼虫も運動性があるため根組織に出入りして摂食する。ネグサレセンチュウ類が植物に感染すると、若い根に病徴を形成するため、根の成長が遅くなり若しくは阻害さ

れ、カビやバクテリアの二次感染により腐敗し、結果として成長が抑制され、植物は枯死する (Agrios, 1997)。

● 線虫がダイズ生産に及ぼす損失

5 ダイズ寄生性線虫が世界のダイズ生産に及ぼす損失は、年平均 10~15%に上ると見積もられている (Lima et al., 2017)。ダイズシストセンチュウは、ダイズの主要生産国である米国において最大の減収要因となっており、ブラジルにおいてもダイズさび病 (*Phakopsora pachyrhizi*)、紫斑病 (*Cercospora kikuchii*) に続き問題となっている (Wrather et al., 2010)。ネグサレセンチュウ類は、特にブラジルにおいて問題となっている (Machado, 2014)。また、日本のダイズ栽培においても、ダイズシストセンチュウが減収の原因となっている (水久保, 2016)。

Cry 蛋白質について

15

Cry 蛋白質は、土壌中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* が産生する結晶性蛋白質であるプロトキシンで、感受性動物に摂食されると腸管内のプロテアーゼにより消化され、活性のある毒素 (コア蛋白質、別名: δ -endotoxins) となる。コア蛋白質は、中腸上皮にある特異的受容体と結合し、中腸細胞膜に細孔構造を作ることによって、細胞が恒常性を失い、破壊が誘導され、標的となる生物を死に至らしめる (OECD, 2007)。この特異的受容体は鳥類や他の哺乳類といった非標的生物には存在しないため、Cry 蛋白質が非標的生物に対して影響を及ぼすとは考え難い (OECD, 2007)。

20 Cry 蛋白質をコードする *cry* 遺伝子は、これまでに 700 遺伝子以上同定され、さらに、アミノ酸配列に基づき少なくとも 70 のグループに分類されている (Crickmore et al., 1998)。チョウ目 (Lepidoptera)、コウチュウ目 (Coleoptera)、ハエ目 (Diptera)、カメムシ目 (Hemiptera) 等の昆虫に対して殺虫活性を示す Cry 蛋白質が知られているが、加えて線形動物門に属する線虫へ殺線虫活性をもつ Cry 蛋白質 (Cry5、Cry6、Cry12、Cry14、Cry21) が存在することが報告されている (Wei et al., 2003, Bravo et al., 2007; Koch et al., 2015)。

30

● Cry14Ab-1 蛋白質について

本組換えダイズで発現する Cry14Ab-1 蛋白質は特定のクキセンチュウ目に属するダイズ寄生性線虫に対して抵抗性を付与する。一般に、線虫は地球上に数千万から数千万種が存在することが知られているものの、種まで同定されている線虫は主に農作物に影響を及ぼす線虫に限られているため、Cry14Ab-1 蛋白質の

35

殺線虫スペクトラムを個々の線虫に対して特定することは技術的に困難である。特に、植物寄生性線虫については宿主が限定されていることが多く、バイオアッセイが技術的に難しい。したがって、ダイズに大きな被害をもたらすクキセンチュウ目の 5 つの植物寄生性線虫（ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*)、ネグサレセンチュウ類 (*Pratylenchus* spp.)、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita* 及び *Meloidogyne javanica*)、ナミラセンセンチュウ類 (*Helicotylenchus* spp.) 及びニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*)) を選び、評価を行った (別添資料 9)。その結果、本組換えダイズに寄生するダイズシストセンチュウの個体数は非組換えダイズと比べて 50%程度に抑えられた。

同様に、本組換えダイズに寄生するネグサレセンチュウ類の個体数は非組換えダイズと比べて 10%程度に抑えられた。しかしながら、同じクキセンチュウ目に属するネコブセンチュウ、ナミラセンセンチュウ及びニセフクロセンチュウには効果を示さなかったことから、クキセンチュウ目に属する線虫の中でも Cry14Ab-1 蛋白質への感受性が異なることが確認された。

なお、Cry14Ab-1 蛋白質の標的線虫のうち、ダイズシストセンチュウに対する殺線虫活性は、Kahn ら (2021)により報告されている。Kahn ら (2021)は、ダイズ栽培品種 Jack に Cry14Ab-1 蛋白質を発現させた組換えダイズ²及び対照ダイズ (非組換えダイズ及び選抜ベクターで形質転換したダイズ)を用いてダイズシストセンチュウに対する殺線虫活性を温室でのポット栽培とほ場での栽培において評価した。温室での試験は、形質転換後の 2 世代 (T1 及び T2 種子)をポットに播種し、約 3 週間後に 2 種類のダイズシストセンチュウ二齢幼虫 (OP50 系統³またはほ場で採取した野外個体群 HG タイプ 2.5.74)をそれぞれ接種した。ダイズシストセンチュウの生活環は 30 日のため、播種後 1 サイクル (30 日)が経過したポット内ではメス成虫の個体数、または 2 サイクル (60 日)が経過したポット内においてはメス成虫の個体数及びシストの個数を合わせて調査した結果、すべての条件において組換えダイズにおけるそれぞれの個体数の平均値は対照ダイズのそれより低く、統計学的に有意に低かった (図 2, p.14)。次に、イリノイ州のダイズシストセンチュウの存在が確認されているほ場においてダイズ栽培品種 Jack に Cry14Ab-1 蛋白質を発現させた組換えダイズ及び対照ダイズを栽培し、栽培中期及び収穫期の土壌を採取した。それぞれの土壌サンプルからダイズシストセンチュウの卵の個数を調査し、繁殖係数 (栽培中期及び収穫期の個体数密度を植え付け時の個体数密度で割って算出した値)を算出し、

² 形質転換したダイズ栽培品種 Jack は Cry14Ab-1 蛋白質を産生しており、本組換えダイズとは別の系統である。

³ ダイズシストセンチュウを交配してホモ接合体とした系統 (HG タイプ 1.2.3.5.6) (Dong and Opperman, 1997)。

⁴ HG タイプ : 7つの抵抗性品種(1-PI 548402 (Peking), 2-PI 88788, 3-PI 90763, 4-PI437654, 5-PI209332, 6-PI 89772, 7-PI 548316 (Cloud))へのダイズシストセンチュウの寄生性の違いを指標として個体群として特徴づけたもの (Niblack et al., 2002)。

比較した。その結果、栽培中期 ($p = 0.00179$) 及び収穫期 ($p = 0.00156$) の両方において、組換えダイズの繁殖係数は対照ダイズと比較して統計学的に有意に低かった (図 3, p.15)。以上より、Cry14Ab-1 蛋白質のダイズシストセンチュウへの密度抑制効果が温室及びほ場において確認された。

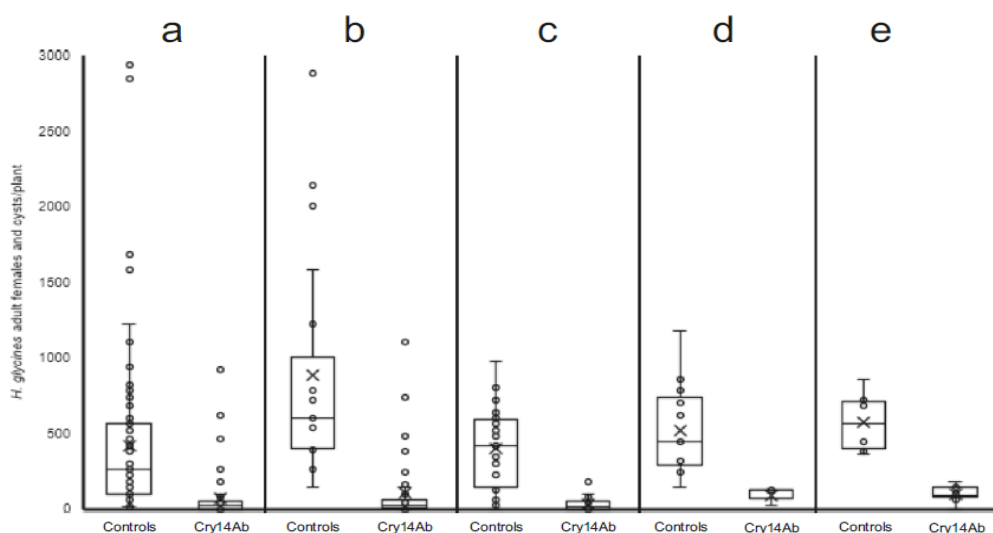
また、Cry14Ab-1 蛋白質の活性を評価するために農業上問題となる害虫や病原菌に対して様々な投与量 (0.2-1.1 mg/ml) を用いて定性的なバイオアッセイを行った (別添資料 10)。その結果、11 種のチョウ目 (シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*)、タマヤナガ (*Agrotis ipsilon*)、コナガ (*Plutella xylostella*)、ヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*)、ツマジロクウサヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*)、ニセアメリカタバコガ (*Heliothis virescens*)、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*)、ダイズシャクトリムシ (*Pseudoplusia includens*)、サトウキビメイガ (*Diatraea saccharalis*)、サウスウェスタンコーンボラー (*Diatraea grandiosella*)、ビリードマメケムシ (*Anticarsia gemmatilis*)、1 種のコウチュウ目 (ウェスタンコーンルーフトワーム (*Diabrotica virgifera*))、1 種のカメムシ目 (ミナミアオカメムシ (*Nezara viridula*))、6 種の病原菌類 (エンバク裸黒穂病 (*Ustilago avenae*)、コムギ葉枯病 (*Septoria tritici*)、菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、イネ紋枯病 (*Rhizoctonia solani*)、灰色かび病 (*Botrytis cinerea*)、黒斑病 (*Alternaria alternata*)) においては影響が見られなかったが、自由生活性線虫である *Caenorhabditis elegans* の生育を阻害した。本組換えダイズが標的としない *C. elegans* の生育を阻害したが、これはバイオアッセイにおいて過剰量を与えているためと考えられる。

さらに、Cry14Ab-1 蛋白質に直接的又は間接的に曝露される可能性が考えられる非標的生物であるミツバチ (*Apis mellifera*)、ニセフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*)、シマミズ (*Eisenia fetida*)、テントウムシ (*Coleomegilla maculata* 又は *Coccinella septempunctata*)、ミドリクサカゲロウ (*Chrysoperla carnea*) 及びミジンコ (*Daphnia magna*) を選定し、混餌投与によるバイオアッセイを行った (別添資料 1)。その結果、試験対象とした全ての非標的生物に対して Cry14Ab-1 蛋白質は殺虫活性を示さなかった (表 2, p16)。

Cry14Ab-1 蛋白質の作用機作については、Kahn ら (2021) が蛍光標識を付けた Cry14Ab-1 蛋白質 (1mg/mL) を用いて *C. elegans* へのバイオアッセイを行った。その結果、消化管に明らかなダメージが確認された。このことから、Cry14Ab-1 蛋白質も他の Cry 蛋白質の作用機作と同様に、腸の細胞膜に小孔を形成し、その結果として線虫の腸管が破壊される殺線虫活性を示すことが示唆された。

また、Cry14Ab-1 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、COMPARE データベース (version: COMPARE 18⁵, 検索日:2018 年 6 月 7 日) を用いて既知のアレルゲンと包括的な相同性検索を行った結果、既知アレルゲンとの相同性は認められなかった。

5



(Kahn et al., 2021)

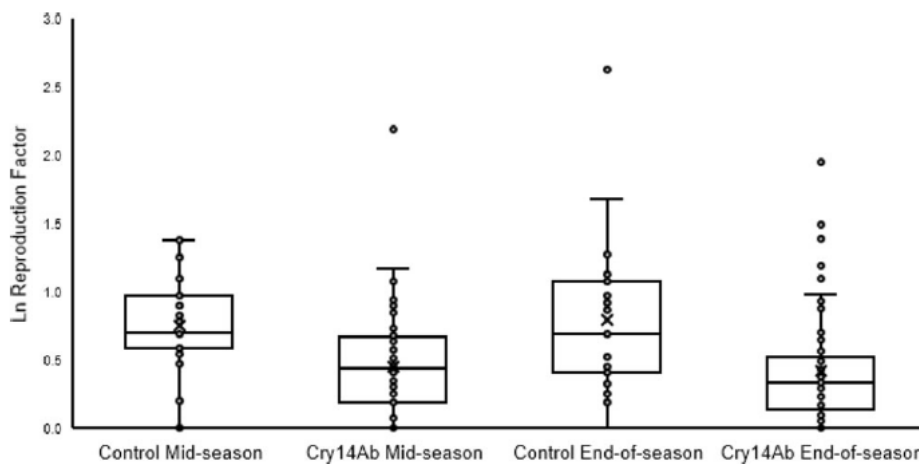
図 2 Cry14Ab-1 蛋白質のダイズシストセンチュウに対する増殖抑制効果 (温室栽培)

組換えダイズ (Cry14Ab) のメス成虫の個体数及びシストの個体密度を、非組換えダイズ及び選択ベクターのみで形質転換した対照ダイズ (Control) と比較した。箱ひげ図は、中央値 (中線)、平均値 (×)、25~75 パーセンタイル (箱)、5~95 パーセンタイル (ひげ)、各データポイント (○) を示す。結果は t 検定 ($p < 0.05$) で解析した。

(a) T1 世代に *H. glycines* (OP50 系統) を接種し、30 日後にメス成虫の個体数を数えた ($p < 0.0001$, $t = 4.8$, $df = 137$)。 (b) T1 世代に *H. glycines* (OP50 系統) を接種し、60 日後にメス成虫の個体数とシストの個数を数えた ($p < 0.0001$, $t = 5.1$, $df = 56$)。 (c) T2 世代に *H. glycines* (OP50 系統) を接種し、60 日後にメス成虫の個体数とシストの個数を数えた ($p < 0.0001$, $t = 10.0$, $df = 82$)。 (d) T1 世代に *H. glycines* (HG タイプ 2.5.7) を接種し、30 日後にメス成虫の個体数を数えた ($p = 0.03$, $t = 2.3$, $df = 16$)。 (e) T2 世代に *H. glycines* (HG タイプ 2.5.7) を接種し、60 日後にメス成虫の個体数とシストの個数を数えた ($p < 0.0001$, $t = 6.2$, $df = 12$)。

(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。)

⁵ COMprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE; <http://comparedatabase.org/>) : 本データベースは、十分な裏付けのあるアレルギー性の蛋白質をデータベース化することを目的とし、International Life Sciences Institute's Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI) によって管理され、一般に公開されているアレルゲンデータベースである。初めのバージョンは、2015 年 5 月から 2016 年 5 月に National Center for Biotechnology (NCBI) に登録され、注釈がついている配列を元にデータベースに入れる候補を洗い出し、それらをアレルギーの専門家が論文等の蛋白質のアレルギー性試験の結果 (IgE による免疫学的検定) 等を元にデータベースに追加する配列を決定した (COMPARE18 バージョンには 2038 の配列が含まれている)。今後は、NCBI に追加された配列に基づき 1 年に 1 回データベースを更新し、また、それとは独立して新たな論文等を元に候補の蛋白質を追加する。なお、2016 年の AllergenOnline データベースに含まれていた全配列を含んでいる。



(Kahn et al., 2021)

図 3 Cry14Ab-1 蛋白質のダイズシストセンチュウに対する増殖抑制効果（ほ場栽培）

- 15 米国（アイオワ州）のほ場で栽培した組換えダイズ（Cry14Ab）のダイズシストセンチュウに対する効果を、非組換えダイズ及び選択ベクターのみで形質転換した対照ダイズ（Control）と比較した。箱ひげ図は、中央値（中線）、平均値（×）、25～75 パーセンタイル（箱）、5～95 パーセンタイル（ひげ）、各データ（○）を示す。植え付けから 60 日後の栽培中期（Mid-season）、収穫期（End-of-season）に土壌サンプルを採取し、*H. glycines* の個体数密度から繁殖係数（植え付け時の個体密度を植え付け時の個体密度で割った値）を算出した。結果は栽培中期または収穫期をそれぞれ ANOVA で解析した：栽培中期（ $F=10.447$, $p=0.00179$, $df=1,77$ ）、収穫期（ $F=10.742$, $p=0.00156$, $df=1,71$ ）。
- 20

（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。）

表 2 給餌又は接種試験による Cry14Ab-1 蛋白質の非標的生物に対する活性

和名	学名	目	Cry14Ab-1 蛋白質の EEC/EED ¹ (µg 乾燥重)	NOEC/NOED ²	MOE ³	活性 ⁴
ミツバチ (幼虫)	<i>Apis mellifera</i>	ハチ目 (花粉媒介者)	0.1442 µg/larvae	≥1 mg/g diet/ 154 µg/larvae	1068	無
ミツバチ (成虫)	<i>Apis mellifera</i>	ハチ目 (花粉媒介者)	0.8652 µg/day	≥1 mg/g diet/ 32.1 µg/bee/day	37	無
テントウムシ	<i>Coleomegilla maculata</i>	コウチュウ目 (捕食者)	290.44 µg/g	≥3.4 mg/g diet	12	無
テントウムシ	<i>Coccinella septempunctata</i>	コウチュウ目 (捕食者)	299.044 µg/g	≥1.83 mg/g diet	6.3*	無
ミドリクサカゲロウ	<i>Chrysoperla carnea</i>	アミメカゲロウ目 (捕食者)	299.044 µg/g	≥3.4 mg/g diet	12	無
ミジンコ	<i>Daphnia magna</i>	ミジンコ目 (水生生物)	23.2 µg/L	≥0.50mg/L	3722	無
ニセフォルソムトビムシ	<i>Folsomia candida</i>	トビムシ目 (土壌生物)	0.32 µg/g	≥10mg/g diet	31250	無
シマミミズ	<i>Eisenia fetida</i>	ナガミミズ目 (土壌生物)	0.32 µg/g	≥0.05mg/soil	156	無

¹ EEC/EED (Expected Environmental Concentrations/Doses): 推定環境濃度。それぞれの非標的生物の曝露経路と考えられる組織 (花、根を含む植物体、葉) における Cry14Ab-1 蛋白質発現量、または Cry14Ab-1 蛋白質発現量と平均摂取量からほ場条件での最大曝露量を算出した。

² NOEC/NOED (No Observed Effect Concentrations/Doses): 死亡個体の生存個体に対する常態的な影響を与える最高濃度である無影響濃度。試験に用いた推定環境濃度の 10 倍相当の投与濃度において生存率及び致死率が統計学的に優位でない場合は投与濃度で表す。ミツバチ(幼虫又は成虫)の NOED は 1mg Cry14Ab-1/g の餌を投与し、1 匹当たりのミツバチ(幼虫又は成虫)が摂取した総量がそれぞれ 154 µg 又は 32.1 µg であること示す。

³ MOE (Margins of Exposure): 曝露マージン。それぞれの非標的生物の無影響濃度の推定環境濃度に対する割合を示す (Rose, 2007)。

⁴ MOE の値が 10 を上回っている場合は、活性が無いことを示す (Rose, 2007)。

* *C. septempunctata* は最小リスク値と考えられている 10 を下回っているが、曝露経路の一つである花粉で MOE を算出した場合は 25 を上回るため活性がないと評価した。

15

(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。)

HPPD-4 蛋白質

植物の細胞内で、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(4-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)) (以下、「HPPD蛋白質」
とする。)は、チロシンの代謝経路において4-ヒドロキシフェニルピルビン酸
(4-HPP) 及び1分子の酸素とともに酵素基質複合体を形成し、ホモゲンチジン酸
(HGA) の合成を触媒する (図5, p.19)。生成されたHGAは、微生物及び動物では
フマル酸及びアセト酢酸に代謝される (Brownlee et al., 2004)。植物ではこの反
応に加え、HGAはトコトリエノール、トコフェロール及びプラストキノン合成
に利用される。これらは光合成電子伝達系や抗酸化反応に必須な化合物である
(Fritze et al., 2004) (図4, p.18)。

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤 (以下、
「HPPD阻害型除草剤」とする)の1つである除草剤イソキサフルトールは、植物
の根及び葉より吸収されると速やかに2-シクロプロピル-3-(2-メチル-4-トリフ
ルオロメチルフェニル)-3-オキソ-プロパンニトリル (除草剤イソキサフルトール
由来のジケトニトリル構造物。以下、「DKN」とする。)へと代謝され、生じ
たDKNが4-HPPと競合してHPPD蛋白質の活性部位に可逆的に結合することによ
り、HPPD蛋白質の活性を阻害する。その結果、植物はHGAを合成できなくな
り、それに伴ってチロシン異化、プラストキノン及びトコフェロールの合成が
阻害される結果、葉緑体の分解を伴った白化症状を示し、その後、枯死する (図
5, p.19)。

HPPD-4蛋白質は、*P. fluorescens* A32株からクローニングされ、C末端にある
335番目のアミノ酸であるグルタミン酸がプロリンに、336番目のグリシンがトリ
プトファンに、339番目のリシンがアラニンに、340番目のアラニンがグルタ
ミンへ置換されている。

また、HPPD-4 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、COMPARE データベース
(version: COMPARE 18, 検索日:2018年6月7日)を用いて既知のアレルゲン
と包括的な相同性検索を行った結果、既知アレルゲンとの相同性は認められな
かった。

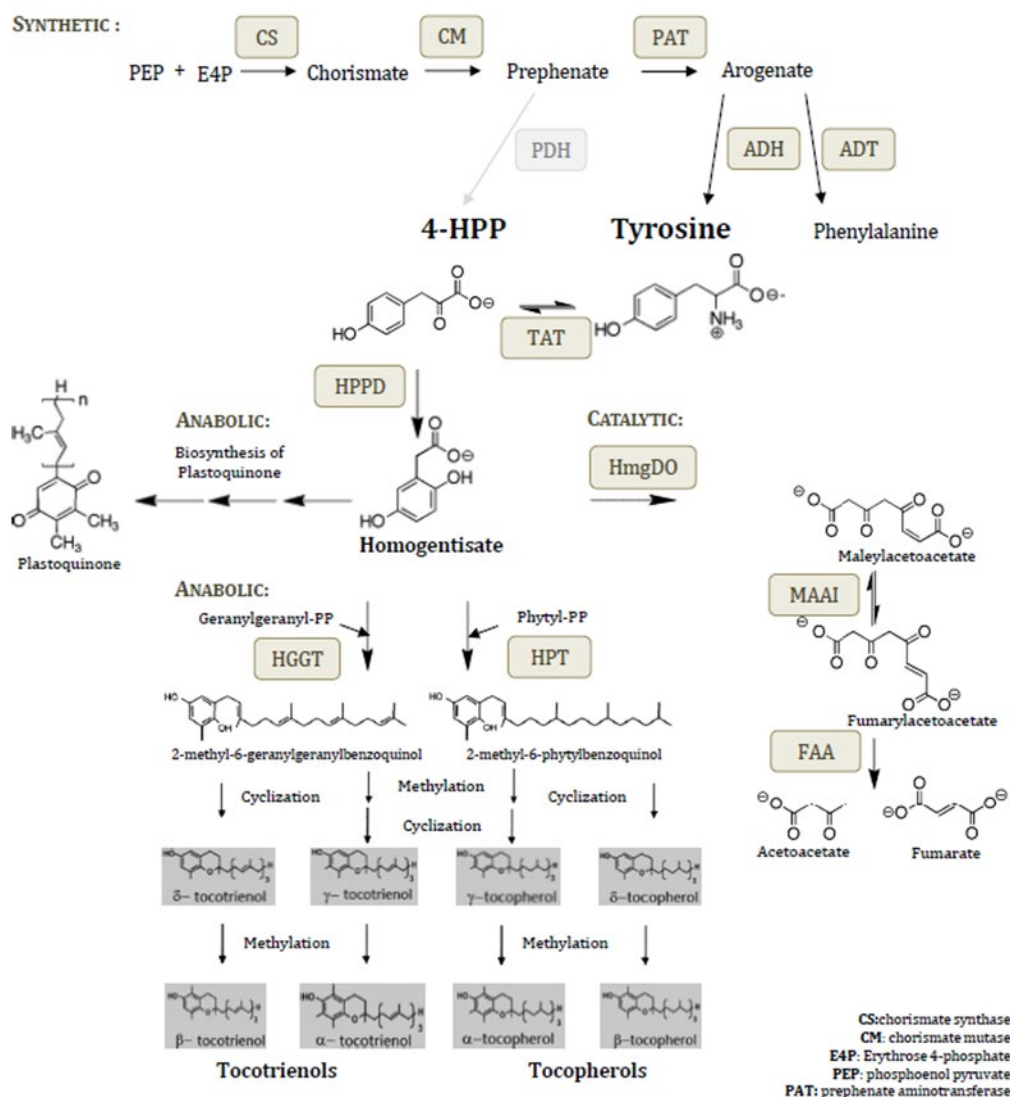


図4 チロシン代謝経路におけるHPPD蛋白質

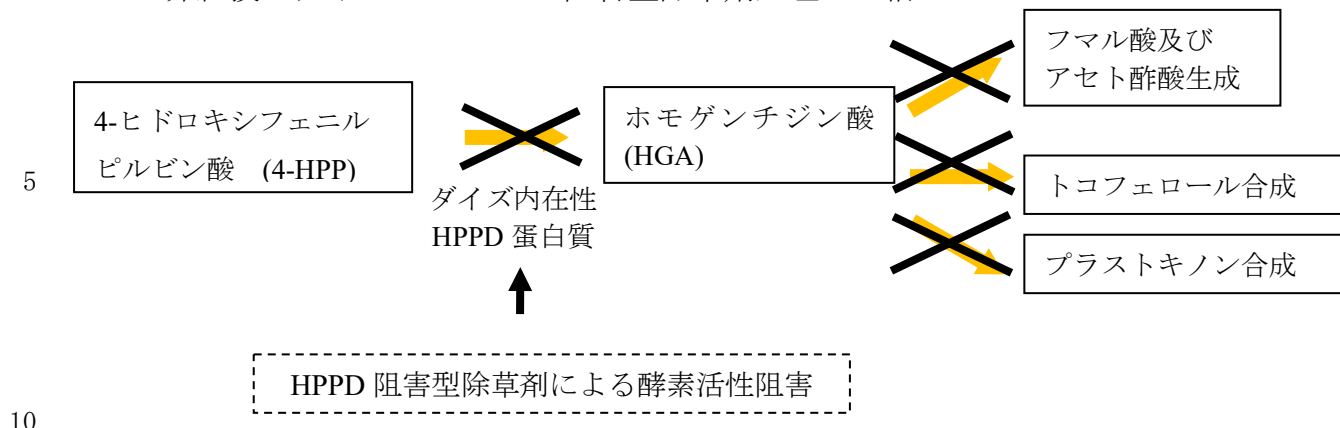
5

略語の名称

CS: chorismate synthase	4-HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate
CM: chorismate mutase	HPPD: hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
E4P: erythrose 4-phosphate	TAT: tyrosine aminotransferase
PEP: phosphoenolpyruvic acid	HmgDO: homogentisate 1,2-dioxygenase
PAT: prephenate aminotransferase	HPT: homogentisate phytyltransferase
ADH: arogenate dehydrogenase	HGGT: homogentisate geranylgeranyltransferase
ADT: arogenate dehydrogenase	MAAI: maleylacetoacetate isomerase
PDH: prephenate dehydrogenase	FAA: fumaryl acetoacetase
HGA: homogentisic acid	

(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。)

A. 非組換えダイズへの HPPD 阻害型除草剤処理 ⇒枯死



B. 本組換えダイズへの HPPD 阻害型除草剤処理 ⇒除草剤耐性

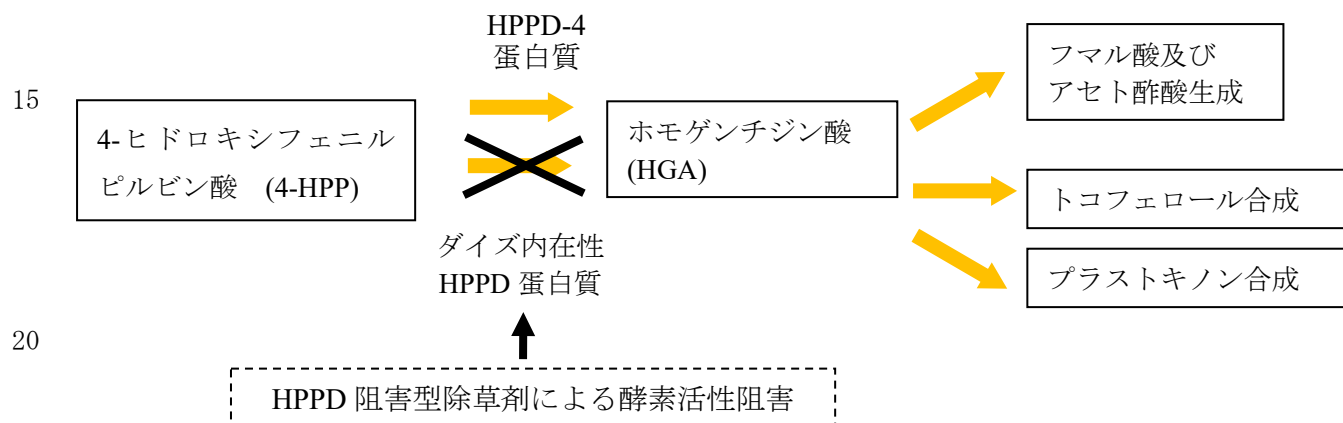


図 5 本組換えダイズにおける HPPD-4 蛋白質の作用機作

HPPD 蛋白質は 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) からホモゲンチジン酸 (HGA) への反応を触媒する。ダイズ内在性の HPPD 蛋白質活性は HPPD 阻害型除草剤によって阻害されるため、非組換えダイズは枯死する (A)。一方、HPPD-4 蛋白質を発現する本組換えダイズでは、HPPD 阻害型除草剤の存在下でも 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への反応が触媒され、HPPD 阻害型除草剤耐性を示す (B)。

(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 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

Cry14Ab-1蛋白質

Cry蛋白質が酵素活性を示す報告はなされておらず、Cry14Ab-1蛋白質は宿主の持つ代謝系とは独立して機能すると考えられる。よって、宿主の持つ代謝系へ影響はないと考えられる。

HPPD-4蛋白質

HPPD-4蛋白質は、HPPD阻害型除草剤によって阻害されるダイズ内在性のHPPD蛋白質に代わり、チロシン代謝経路における4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) からホモゲンチジン酸 (HGA) への反応を触媒する酵素である。

第一 2 (1) ロ ②で記載したように、HPPD蛋白質の作用により産生されるHGAはチロシン異化、カロチノイドの合成、ビタミンEである各種トコフェロールの合成に関与する (図4, p.18)。そのため、本組換えダイズにおいてHPPD-4蛋白質の産生により既存のHPPD蛋白質に相加的に働いてHPPD蛋白質活性が増加することによる影響が考えられた。しかしながら、HPPD蛋白質の触媒する反応は、植物体内におけるトコフェロール生成の律速段階ではないことが報告されており (Mène-Saffrané and Dellapenna, 2010)、ナタネ、イネ、タバコ及びシロイヌナズナにおいてHPPD蛋白質を単独で過剰発現させても総トコフェロール量をほとんど変化させないことが報告されている (Tsegaye et al., 2002; Falk et al., 2003; Raclaru et al., 2006; Farré et al., 2012)。この理由の一つとして、4-HPPの上流にあるチロシン量がフィードバック制御を受けていると考えられている (Tsegaye et al., 2002; Falk et al., 2003; Raclaru et al., 2006; Mène-Saffrané and Dellapenna, 2010; Farré et al., 2012)。なお、本組換えダイズのチロシン、ホモゲンチジン酸及び α -トコフェロール (ビタミンE) 量は、対照の非組換えダイズと同程度であることが分析によって示されている。よって、HPPD-4蛋白質の発現により宿主の持つ代謝系に影響を及ぼさないか、仮に影響を及ぼすとしてもその影響は小さいと考えられる。

HPPD蛋白質の基質特異性に関し、真核生物及び原核生物におけるHPPD蛋白質の基質となり得る化合物について、文献調査を行った。その結果、HPPD蛋白質の基質として知られる4-HPPのほかに、植物体内に存在し、基質となり得る化合物としてフェニルピルビン酸 (PP)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC)、 α -ケト- γ -(メチルチオ)ブチル酸 (KMTB) が挙げられた (別添資料2)。そこで、基質となり得る4つの化合物それぞれについて両蛋白質との反応を4-HPPと相対的に比較したところ、PP、KIC

及びKMTBでは反応がみられなかった。一方、3,4-dHPPのみわずかに反応が見られたがその値は非常に小さく（野生型HPPD; 6.7%, HPPD-4; 2.7%）、また、人工的に調整した*in vitro*試験における結果であることから、自然条件下で3,4-dHPPは植物体内において基質としての機能はないと考えられた（別添資料3, Table 3, p.14）。

また、HPPD-4蛋白質と3アミノ酸異なるHPPD W336蛋白質を発現させたHPPD阻害型除草剤耐性を持つ除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72及び、エンバク（*Avena sativa* L.）由来のAvHPPD-03蛋白質を発現させた

p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズSYHT0H2は、第一種使用規程が承認されており（平成28年11月25日）、これらのHPPD蛋白質は宿主の持つ代謝へ影響がないと結論付けられている。

以上より、HPPD-4蛋白質の産生により、HPPD蛋白質活性が増加しても、単独ではチロシン異化経路の代謝量に影響はなく、 α -トコフェロール及びその他の代謝産物への影響は低いと考えられる。したがって、HPPD-4蛋白質の発現が宿主の持つ代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

- 5 本組換えダイズの作出に用いたプラスミドは、pSZ8832である（図6）。

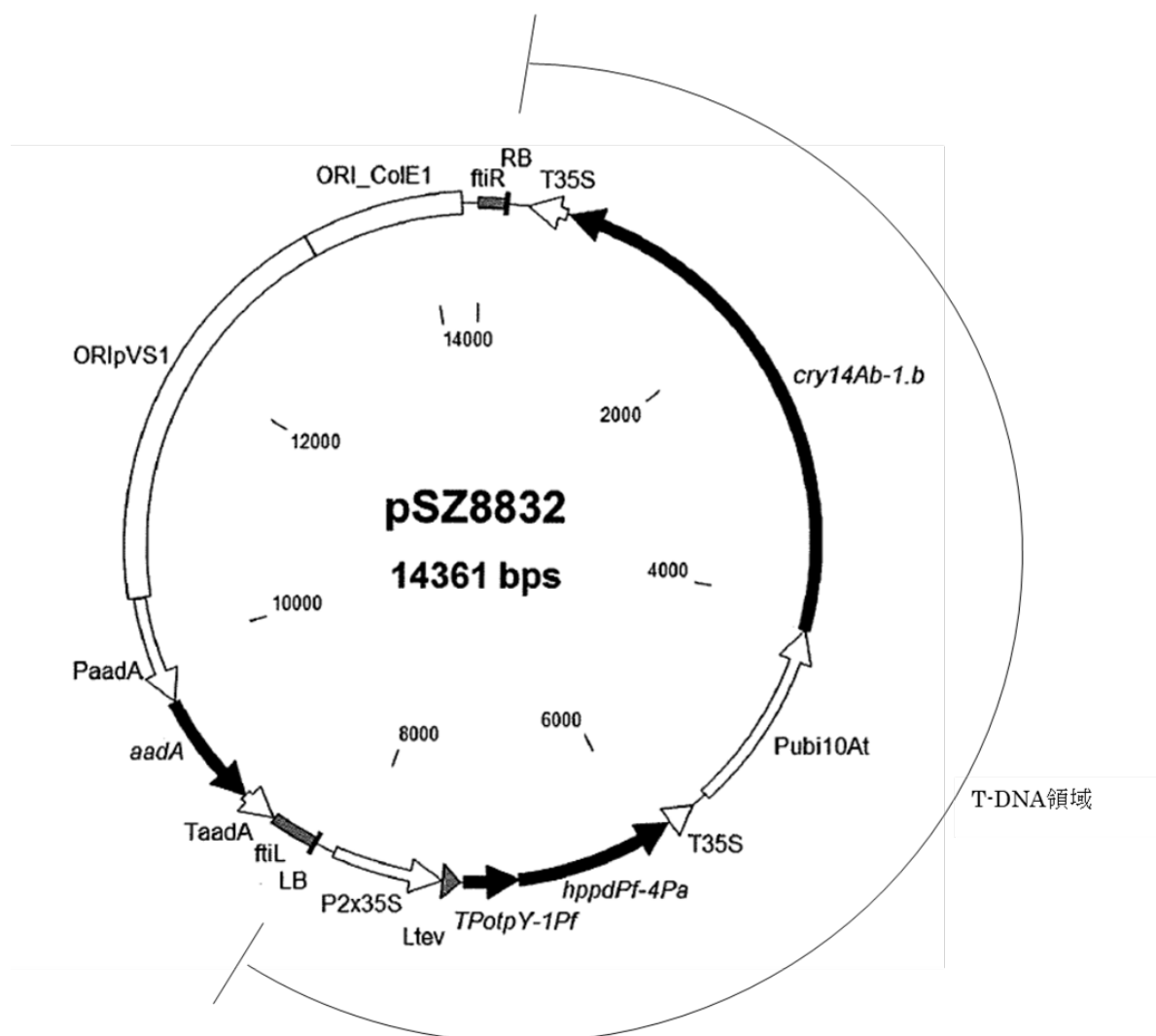


図 6 pSZ8832 のプラスミド地図

(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。)

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 プラスミド pSZ8832 の塩基数は 14361bp である (別添資料 4)。プラスミド地図を図 6 (p.22) に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10 プラスミド pSZ8832 は、T-DNA 領域配列外側に下記に示す機能を持つ配列を有する。

- *aadA*は、*E. coli*由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子で選択マーカーとしてプラスミド構築において利用された。
- *TPotp Y-1Pfl*は、ヒマワリ (*H. annuus*) 及びトウモロコシ (*Z. mays*) の RuBisCo小サブユニット遺伝子由来で、HPPD-4蛋白質を色素体へ輸送する (Lebrun et al., 1996)。ベクター構築の際に55番目のアミノ酸がチロシンへ置換されている。
- *LteV*は、Tobacco Etch VirusのゲノムRNAのリーダー配列 (転写開始部位から翻訳開始部位までの領域) を含んでおり、mRNAの翻訳効率を上げる機能を有する (Allison et al., 1985)。
- *E. coli*のプラスミドpBR322由来複製起点 (ORI ColE1; Bolivar et al., 1977) 及び*P. aeruginosa*のプラスミドpVS1の複製起点 (ORI pVS1; Heeb et al., 2000)は、それぞれ*E. coli*及び*A. tumefaciens*において自律的複製を行わせる機能を有する。

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

プラスミドpSZ8832 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

35 宿主内にはプラスミド pSZ8832 上の T-DNA 領域が移入された。T-DNA 領域の構成は図 6 (p.22) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた。

5 ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

10 形質転換を行った外植片は、HPPD 阻害型除草剤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の残存の有無

15 本組換えダイズの T₆ 世代 (図 7, p.26) のバルク種子において、無作為に抽出した 10 粒の種子を 1 サンプルとして 3 サンプル用意し、それぞれのサンプルから DNA を抽出した。T-DNA とプラスミド pSZ8832 外骨格領域にまたがる位置を標的として PCR 分析を行ったところ、調査した全てのサンプルにおいて標的とする増幅産物は得られなかった。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存在しないことが確認された。

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

25

宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。宿主品種 Thorne の外植片を準備し、ヘルパープラスミドとプラスミド pSZ8832 を含むアグロバクテリウムを培地において共存培養させ、その後アグロバクテリウム菌体の除菌のために抗生物質チカルシリンを、また形質転換された外植片を選抜するために HPPD 阻害型除草剤の 1 つであるテンボトリオンを含む選抜培地にて培養し、植物体 (T₀ 世代) を再生させ、自殖により T₁ 世代を得た。本図中に該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を図 7 (p.26) に示した。

35 本組換えダイズについては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用等の申請を行う予定である。その他、2019年に食品衛生法に基づ

く食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、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飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行った。

【社外秘情報につき非開示】

5

図7 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

5 ① 移入された核酸の複製物が存在する場所

次項の塩基配列解析により確定した挿入 DNA 及び近傍配列をクエリーとし、NCBI Genome Reference Sequences⁶の *Glycine max* データベースを用いて相同性検索を行った結果、本組換えダイズにおいて、移入された核酸はダイズの 7
10 番染色体に組み込まれていることが確認された。

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

15 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、ベクターの外骨格領域の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、NGS 解析、相同性検索並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を行った (別添資料 5 及び 6)。

20 本組換えダイズ (T₂ 世代: 図 7, p.26) 及び対照の非組換えダイズから抽出したゲノムを約 125bp に断片化し、次世代シーケンサー (Illumina[®] HiSeq[™]) を用いて解析した。本解析において、シーケンス深度⁷は、75 以上だったため、十分なシーケンス深度が確保されている。得られた塩基配列のうち、導入用プラスミドと相同性がある DNA 断片を選び、外骨格領域と相同性がある配列の有
25 無を確認した結果、外骨格領域とは相同性が認められなかった。

さらに、DNA 断片の塩基配列の一部が導入用プラスミド及び宿主のゲノムと一致するものを、導入遺伝子と宿主のゲノムとの接合配列として選抜し、接合領域を特定した (Junction sequence analysis 解析)。本組換えダイズでは 2 つの接合領域が特定され、プラスミド pSZ8832 の RB と LB と配列の一致が認めら
30 れた。一方、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。よって、本組換えダイズのゲノム中の 1 カ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組込まれており、外骨格領域は挿入されていないことが確認された。

⁶ NCBI Genome Reference Sequences -*Glycine max*: NCBI の Reference Sequence プロジェクトより完全な塩基配列及び染色体情報を含む。本検索では、ダイズ (*Glycine max*) のデータベースが使用された。検索日: 2018 年 3 月 13 日。

⁷ シーケンス深度: 同じ箇所を何回シーケンスを行ったかを表す尺度。シーケンス深度が 75 以上において、十分な検出が行えることが報告されている (Kovalic et al., 2012)。

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 領域を含む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した。その結果、挿入 DNA の 5'側 (1000bp) の近傍配列は対照の非組換えダイズの挿入位置に隣接する配列と一致し、挿入 DNA の 3'側 (1000bp) の近傍配列は非組換えダイズと比較して 1bp の相違が認められ、挿入位置において 63bp の欠失が確認された (図 8, p.29)。

また、本組換えダイズに導入された 1 コピーは、完全な *cry14Ab-1.b* 遺伝子発現カセット及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子のプロモーターである P2x35S の 5'側 482bp を欠いた *hppdpf-4Pa* 遺伝子発現カセットが含まれていることが確認された。

さらに、T-DNA と 3'側近傍配列の間において、39bp のフィラー (挿入) DNA が認められた。その内の 21bp がプラスミド pSZ8832 の外骨格領域である ORI_{pVS1} の配列の一部と一致し、17bp は 3'側近傍配列と一致し、8460bp に位置する 1bp はプラスミド pSZ8832 の配列と一致しなかった。よって、NGS 解析においては外骨格領域が見つからなかったものの、塩基配列解析及び相同性検索により本組換えダイズのゲノム DNA の配列を解析した結果、本組換えダイズに 21bp のベクターの外骨格領域が含まれていることが確認された。

本組換えダイズ内に挿入された T-DNA の複数世代 (T₂、T₄、T₅ 及び T₆ 世代: 図 7, p.26) における安定性について、NGS 解析及び相同性検索により評価した結果、挿入された T-DNA は安定して後代に遺伝していることが確認された。

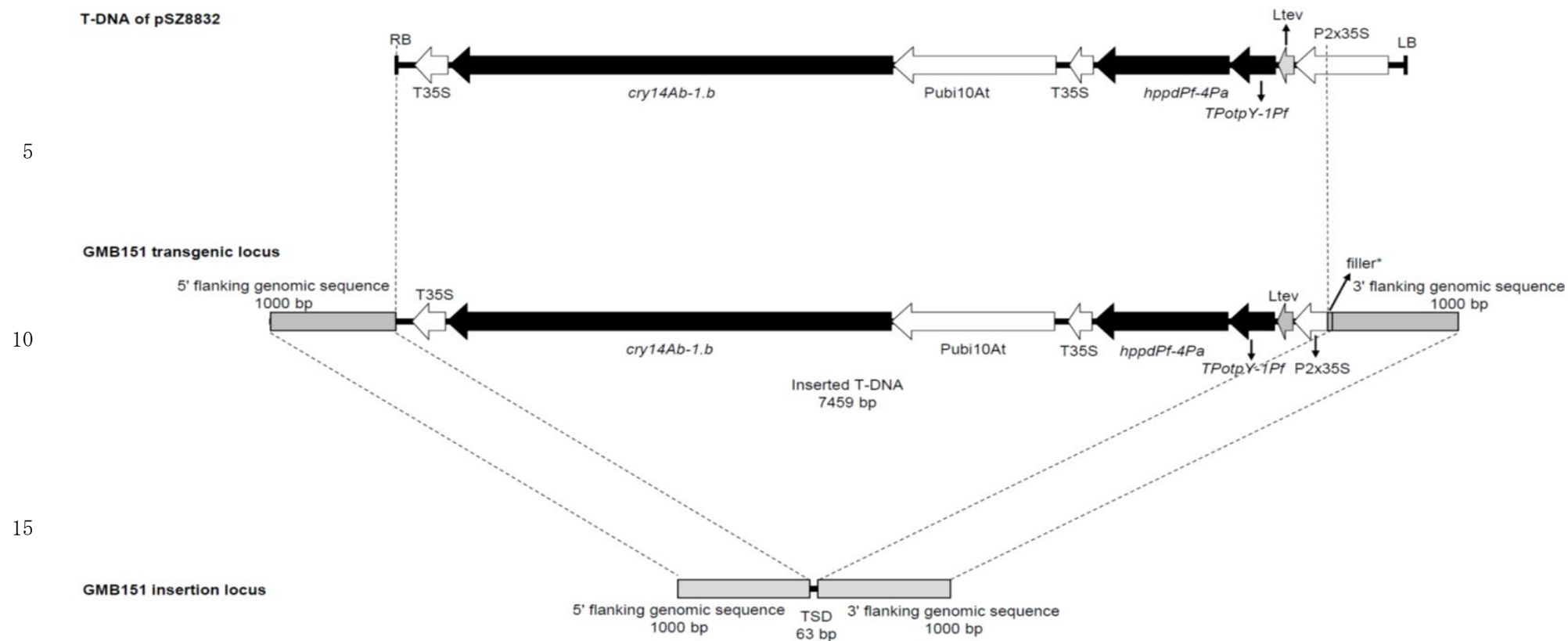


図8 本組換えダイズにおける挿入DNA領域の概略図

図中のGMB151 transgenic locusはDNA挿入後の概略図を、GMB151 insertion locusは対照の非組換えダイズの染色体におけるDNA挿入前の概略図をそれぞれ示す。また、TSD (Target Site Deletion) は、遺伝子挿入により欠失した部位を示す。

(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

5

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

10 米国の温室内で栽培された本組換えダイズ (T₄ 及び T₆ 世代: 図 7, p.26) から第 6~7 葉期の茎及び根、成熟期の種子をサンプルとして採取し、Cry14Ab-1 蛋白質及び HPPD-4 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。その結果、各組織及び各世代間で両蛋白質が安定して発現していることが確認された (表 3, 別添資料 7)。

15

表 3 本組換えダイズ (T₄ 及び T₆ 世代) における葉、根及び種子の Cry14Ab-1 蛋白質及び HPPD-4 蛋白質の発現量

組織	供試世代	Cry14Ab-1(μg/g 乾燥重) 平均値±標準偏差	HPPD-4(μg/g 乾燥重) 平均値±標準偏差
葉	T ₄	240±11	109±24
	T ₆	231±26	148±13
根	T ₄	49±14	21±3.5
	T ₆	38±33	18±3.1
種子	T ₄	124±24	2.0±0.5
	T ₆	114±17	2.1±0.4

20 全て n=4 で測定し、平均値及び標準偏差を算出した。各組織における定量限界下限値 (LLOQ) は Cry14Ab-1 蛋白質では 0.13μg/g 乾燥重であり、HPPD-4 蛋白では葉において 8μg/g 乾燥重、根及び種子において 1μg/g 乾燥重であった。

(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。)

- 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

25

本組換えダイズは伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然環境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。

(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、本組換えダイズに特異的なプライマーと Taqman プローブを用いた PCR 法による検出及び識別が可能である（別添資料 8）。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5ng から 80ng が推奨されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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内容

本組換えダイズは、*cry14Ab-1.b* 遺伝子の発現により Cry14Ab-1 蛋白質が産生され、標的とする線虫に対する抵抗性が、また、*hppdPf-4Pa* 遺伝子の発現により、HPPD-4 蛋白質が産生され、HPPD 阻害型除草剤に対する耐性が付与されている。

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

本組換えダイズは *cry14Ab-1.b* 遺伝子の発現により線虫抵抗性を示し、*hppdPf-4Pa* 遺伝子の発現により HPPD 阻害型除草剤に耐性を示す。これらの蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられ（第一 2 (1) ロ ③）、いずれの蛋白質についても、これまでに線虫抵抗性及び HPPD 阻害型除草剤耐性を付与する以外に、宿主の生理学的又は生態学的特性に影響を及ぼしたとする報告はない。

宿主であるダイズは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下において雑草化した例はない。

以上より、Cry14Ab-1 蛋白質及び HPPD-4 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性、生理学的及び生態学的特性に影響を与える可能性は低い。よって、本組換えダイズの生理学的又は生態学的特性に関するデータを用いずに、隔離ほ場における生物多様性影響評価を行うことは可能であると判断した。

なお、本組換えダイズの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

- 1) 形態及び生育の特性
- 2) 生育初期における低温耐性
- 3) 成体の越冬性
- 4) 花粉の粘性及びサイズ
- 5) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- 6) 有害物質の産生性
- 7) 交雑性
- 8) 世代にわたる形質発現の確認

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

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

(2) 使用等の方法

所在地： 茨城県筑西市向上野1500番地41

名称： 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

使用期間：承認日から令和5年7月31日まで

1. 隔離ほ場の施設

- 1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- 2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- 4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置している。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。

2. 隔離ほ場での作業要領

1) 本組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

5 2) 本組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。

3) 2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えダイズの栽培終了後は、本組換えダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。

10 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行う。

15 6) 1)から5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

7) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。

8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

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

モニタリング計画書を参照。

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

緊急措置計画書を参照。

30 (5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(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4に示した。また、我が国において、食品安全承認申請を厚生労働省へ、飼料安全承認申請を農林水産省へ、それぞれ提出する予定である。

表 4 本組換えダイズの海外における申請状況 (2021 年 12 月現在)

機関	安全性審査の種類	申請時期
米国農務省 (USDA)	環境	2019 年 3 月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2019 年 2 月
カナダ保健省 (HC)	食品	2019 年 5 月 (2021 年 5 月承認)
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2019 年 5 月 (2021 年 5 月承認)
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2019 年 11 月 (2020 年 12 月承認)

(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。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主であるダイズは、我が国において長年にわたる使用実績があることから、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき宿主と相違が見られた点について考察した。

また、本組換えダイズの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におけるCry14Ab-1蛋白質に起因する生物多様性影響リスクについては、リスクアセスメントの観点から土壤中のCry14Ab-1蛋白質濃度が曝露量と考えられ、Cry14Ab-1蛋白質を土壤中の線虫が摂食し、影響を受けることがハザードと考えられる。したがって、本組換えダイズの曝露量及びハザードについての試験を元に競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性を検討した。

1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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い。また、管理された生態系においては、ダイズが他の栽培植物や元来の植生と競合することはない (OECD, 2000)。また、わが国のダイズの輸入港周辺において、農林水産省は2006年度から遺伝子組換えダイズの生育実態調査を継続している。これまでの調査結果から、遺伝子組換えダイズの生育は、陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、年度を超えての連続性もないことから、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来するが、その生育範囲は拡大していないと考えられている (農林水産省, 2021)。さらに、近縁野生種であるツルマメとの交雑及び遺伝子組換えダイズ間の交雑は確認されていない (農林水産省, 2021)。

我が国の自然環境下において、本組換えダイズがツルマメと雑種を形成する可能性は否めない。本組換えダイズにおいては、*cry14Ab-1.b*遺伝子により発現するCry14Ab-1蛋白質によって標的とする線虫に対する抵抗性を示すため、本組換えダイズとツルマメとの雑種及びその後代が線虫抵抗性を獲得した場合に適応度が上がることが考えられる。しかしながら、標的とするダイズシストセンチュウは宿主植物であるダイズを栽培している環境においても生息していない場合があり、ツルマメが生育する河川の氾濫原や土手、路傍のような環境において生息することは困難であることから本組換えダイズとツルマメとの雑種及びその後代が線虫抵抗性を獲得した要因のみで適応度が上がる可能性は低いと考

えられる。また、一般に植物が自然環境下において、他の野生植物と競合し、生存及び増殖して優占化するためには、休眠性、長期に渡る大量の種子生産、裂莢性等の複数の特性を併せ持つことが必要であることが知られている (Lingenfelter and Hartwing, 2007)。さらに、Cry14Ab-1蛋白質は酵素ではなく、植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。よって、本組換えダイズの持つ線虫抵抗性の形質のみをもって競合における優位性を獲得するとは考え難い。

また、*hppdPf-4Pa*遺伝子により発現するHPPD-4蛋白質は、他のHPPD蛋白質を発現させた植物体を用いた実験より、植物体のチロシン代謝系以外の代謝を変化させることはないと考えられる (Tsegaye et al., 2002; Falk et al., 2003; Raclaru et al., 2006; Farré et al., 2012)。したがって、この導入遺伝子による影響が宿主の持つ代謝系を変化させ、競合における優位性に関わる生理学的又は生態学的特性について宿主との相違をもたらすことはないと考えられる。さらに、HPPD-4蛋白質によりHPPD阻害型除草剤に耐性を示すが、HPPD阻害型除草剤を散布されることが想定され難い自然環境下において、HPPD阻害型除草剤に耐性であることが、競合における優位性を高めることは考え難い。

したがって、本組換えダイズの競合における優位性は、非組換えダイズと相違はないと考えられ、第一種使用規定に従って、限定された作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因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。

(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、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えダイズの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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

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 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。

第一 2 (1) ロ ③に記載した通り、本組換えダイズ中に産生される Cry14Ab-1 蛋白質は酵素ではなく、また、HPPD-4 蛋白質は HPPD 阻害型除草剤耐性を付与する酵素であるが、高い基質特異性を有する。したがって、本組換えダイズ
10 が産生する両蛋白質が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ないと考えられる。さらに、Cry14Ab-1 蛋白質及び HPPD-4 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、既知のアレルゲンと包括的な相同性検索を行った結果、既知アレルゲンとの相同性は認められなかった。

本組換えダイズに産生される Cry14Ab-1 蛋白質は、バイオアッセイの結果から、地上部、水中及び土壌中に生息する非標的生物に対しては活性を持たないことを確認した（別添資料 1）。しかしながら、自由生活性線虫である *C. elegans* 及び標的とする特定のダイズ寄生性線虫に対して殺線虫活性を示した。また、HPPD-4 蛋白質は、有害物質としては知られていない。

15 以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等として線虫が特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

一般に線虫はその生物学的特性から移動範囲は限られているため（評価書、
25 p.9）、土壌中の線虫が隔離ほ場施設とその周辺環境間で往来することは考えにくく、隔離ほ場の周辺環境に生育する線虫への本組換え体ダイズによる直接的な Cry14Ab-1 蛋白質への曝露はないと考えられる。したがって、本組換えダイズを隔離ほ場で栽培した場合、直接本組換えダイズを食餌することにより影響を受ける線虫は基本的に隔離ほ場の土壌中に生息する線虫に限られる。また、線虫
30 が Cry14Ab-1 蛋白質に曝露される経路としては、本組換えダイズを直接食餌する場合、本組換えダイズから土壌中へ移行した Cry14Ab-1 蛋白質を摂食した場合、さらに、本組換えダイズが隔離ほ場施設外のツルマメと雑種を形成し、線虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を直接的又は間接的に食餌する場合が考えられた。しかしながら、一般に、属及び種が同定されている線虫は限られているため、Cry14Ab-1 蛋白質の殺線虫スペクトラムを詳細に決定することや影響を受ける線虫を個別に特定することは技術的に困難といえる。そこで、本組換えダ
35

イズを栽培することによる土壌中の線虫への生物多様性影響を総合的に検討するため、曝露量を評価するための (i) 土壌中の Cry14Ab-1 蛋白質の確認、及びハザードを評価するための (ii) 本組換えダイズを栽培したほ場の土壌に生息する線虫群集の調査を行った。

5

(3) 影響の生じやすさの評価

(i) 土壌中の Cry14Ab-1 蛋白質の確認

これまでに、遺伝子組換えトウモロコシが発現する Cry1Ab-1 蛋白質が根から土壌中へ滲出する現象が培養実験及びほ場で採取した土壌サンプルにおいて報告されている (Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2002)。本組換えダイズが発現する Cry14Ab-1 蛋白質は同じ Cry 蛋白質ファミリーであることから、Cry14Ab-1 蛋白質が本組換えダイズの根から植物の一般的な生理現象である滲出液に含まれる、又は根組織又は地上部が枯死又は損傷することにより土壌中に放出される可能性について調査した。温室でポット栽培した第 4~6 葉期、開花期及び着莢期における本組換えダイズの根組織及び根圏土壌を採取し、それぞれの試料から粗蛋白質を抽出し、ELISA 法を用いて Cry14Ab-1 蛋白質の測定を行った (別添資料 11)。その結果、根圏土壌において、0.002~0.003 μ g/g (生重) の Cry14Ab-1 蛋白質が平均濃度として検出されたが、これは根組織で発現する Cry14Ab-1 蛋白質濃度 2.59 ~4.10 μ g/g (生重) の約 1/1000 量であった。なお、測定した吸光度はサンプルによっては定量下限値 (LLOQ) 以下になり、その場合はゼロではなく LLOQ の値と見なして平均濃度を算出した。そのため、実際の土壌中の Cry14Ab-1 蛋白質の濃度は算出された平均濃度より低いと考えられる。さらに、ポットの中で旺盛に張った微小な根毛を完全に分離することは難しく、根圏土壌において算出された平均濃度は除去できなかった微量の根毛からの Cry14Ab-1 蛋白質も反映していると考えられることから、実際のほ場における栽培土壌中の Cry14Ab-1 蛋白質量は極めて微量であると推定される。

なお、Kahn ら (2021) は、大腸菌又は *B. thuringiensis* で発現させた Cry14Ab-1 蛋白質 (1mg/mL) を用いて *C. elegans* に対するバイオアッセイを行った。その結果、Cry14Ab-1 蛋白質の半数効果容量 (ED_{50}) はそれぞれ 7 μ g/mL 又は 11 μ g/mL であり、この値は根圏土壌において検出された Cry14Ab-1 蛋白質の最大濃度の 1296 又は 2037 倍に相当していた。このことから、土壌中に検出された Cry14Ab-1 蛋白質濃度は、*C. elegans* に対して殺線虫活性を持たない低濃度であると言える。

また、土壌中に移行した Cry14Ab-1 蛋白質の分解速度について試験を行った (別添資料 12)。分解速度については、400 μ g の当該蛋白質を米国の 4 か所の物

理化学的特性の異なるほ場（カルフォルニア州の砂壤土、アイオワ州の壤土、カンザス州及びネブラスカ州の微砂質壤土）から採取した 5g の土壌中に混ぜ、ELISA 法で定量した。その結果、Cry14Ab-1 蛋白質の半減期は 0.1~0.3 日であることを確認した。

5

以上より、根から移行した Cry14Ab-1 蛋白質は微量であり、さらに土壌中での分解速度も速いため、土壌中に蓄積して当該蛋白質濃度が高まることは考え難いと考察した。

10 (ii) 本組換えダイズを栽培したほ場の土壌に生息する線虫群集の調査

本組換えダイズを栽培したほ場の土壌に生息する線虫群集が、本組換えダイズの生育による影響を受けているかどうかを検討するため線虫群集分析⁸を行った（別添資料 13）。

15 本組換えダイズの栽培ほ場における線虫群集分析は、Cry14Ab-1 蛋白質が標的とするダイズ寄生性線虫以外の土壌中線虫へ影響を及ぼしているかという検証に適している。さらに、土壌中線虫は細菌食性、菌食性等の様々な食性を持つことから、食物網の各階層で重要な役割を担っている。例えば、ある食性を持つ線虫群集構造が攪乱されるとその線虫群集の捕食者等の関係する生物が影響を受け、土壌中の生態系の構造が変化することから、土壌中全体の生物多様性影響
20 についても考察することができる。そのため、2019 年に米国（ネブラスカ州）において、本組換えダイズを 2 年間不耕起栽培したほ場から採取した土壌サンプルに含まれる線虫を形態に基づいて属を同定し、線虫個体数及び群集指数を用いて線虫群集構造の分析を行った。本試験では、子実肥大期及び収穫期に根圏土壌（ダイズの根組織に接着していた土壌）及び畝間土壌（各プロットの畝からの
25 中間点の土壌）を土壌サンプルとして採取した。

ほ場から採取した各土壌サンプルから土壌線虫を抽出し、顕微鏡下で各線虫の分類学上の属を同定した。同定した 86 属の線虫のうち、自由生活性線虫は 39 科、69 属に分類された（別添資料 13）。

10 土壌中に生息する全ての線虫が分類学上の属を同定されていないことから、属を同定した線虫を用いて、土壌サンプルに含まれている線虫群集の多様性を

⁸ 採取した土壌から線虫を分離し、集めた線虫をプレパラート上に固定して生物顕微鏡で個々の形態学的特徴から分類群毎の出現頻度を検出する調査方法で、線虫が持つ生物学的特性を利用した土壌汚染や土壌への温暖化の影響等を評価する目的で用いられている。線虫を生物指標として用いる主な利点として、1) 口器などの違いで判別する形態同定に基づいて属又は科に分類でき、その分類ごとに肉食、細菌食、菌食、雑食などの食性群にさらに分類することでそれぞれの食性群が生態系の様々な栄養段階を反映する、2) 同じ食性群の中にも生理生態学的特性が異なる機能群を判別することができ、その構成から土壌の肥沃度や食物網の発達程度などの情報が得られる、3) 線虫の種類は数万から数千万にも上ると言われているが、国や地域に共通して分布する線虫が多いため、世界共通の群集指標化が可能である、4) 線虫は移動能力が低いため、各分類群の多少が生息する土壌環境を直接反映する等が挙げられる（岡田, 2005; 岡田, 2007; 日本土壌肥料学会編, 2009）。

比較するために多様度指数である Shannon 指数⁹を求めた。Shannon 指数は線虫群集全体を反映していると推定される。その結果、比較要因が根圏土壌と畝間土壌においては統計学的有意差 ($p=0.02$)が見られ、根圏土壌の方が線虫群集の多様性が大きいことが示された。しかし、ダイズ系統の違いを含めたその他の比較要因においては統計学的有意差が見られなかったため（ダイズ系統において $p=0.67$ 、サンプリング時期において $p=0.67$ ）、土壌中の線虫群集の多様性は本組換えダイズによる影響を受けていないと考えられた。

さらに、属を同定した線虫を Yeates (1993)の分類に基づいて食性群（肉食、雑食、細菌食、菌食、植物食）に分類し、各食性群の 100cc 土壌当たりの個体数を数えた（図 9, p.41）。その結果、子実肥大期及び収穫期の食性群の線虫個体数を比較すると、子実肥大期においては細菌食線虫、菌食性線虫及び雑食性線虫で本組換えダイズが対照ダイズ系統より多い傾向が見られたが統計学的な有意差はなく（捕食者群 ($p=1.00$)、細菌食性群 ($p=0.61$)、菌食性群 ($p=0.71$)、雑食性群 ($p=1.00$))、収穫期においてはどの食性群においても 4 つのダイズ系統において線虫の個体数に差は見られなかった（別添資料 13）。子実肥大期に見られた線虫個体数の傾向は、本組換えダイズの線虫抵抗性形質により生じたものではなく、採取した土壌に依存した一過性のものであると考えられた。

⁹ Shannon 指数: ある群集に含まれる種の多様性を種の豊富さ (richness)と均等度 (evenness)で表した多様度指数のひとつで、一般的に種の数が多いほどその群集は多様であることを示す (Shannon, 1948)。

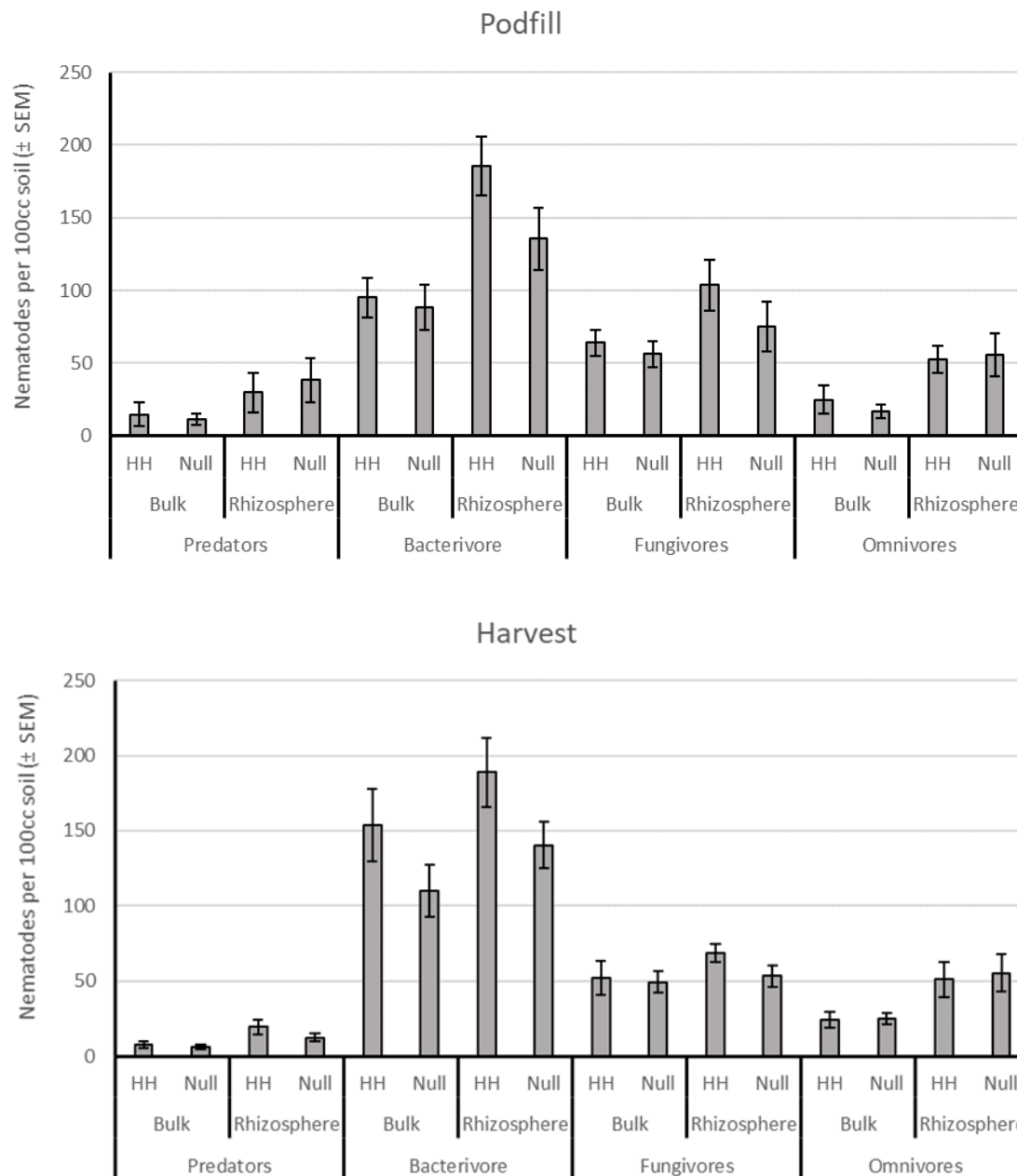


図9 各食性群における個体数の比較（上：子実肥大期、下：収穫期）

横軸は本組換えダイズ(HH)及び非組換えダイズ(Null)の根圏土壌(rhizosphere)及び畝間土壌(bulk)の食性群、縦軸は100cc土壌サンプルに含まれる各食性群の線虫の個体数を表す。食性群は、肉食性線虫(predators; $t = 0.20, p = 1.00$), 細菌食性線虫(bacterivores; $t = 3.09, p = 0.09$), 菌食性線虫(fungivores; $t = 2.04, p = 0.62$), 雑食性線虫(Omnivores; $t = -0.01, p = 1.00$)を示す。

(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。)

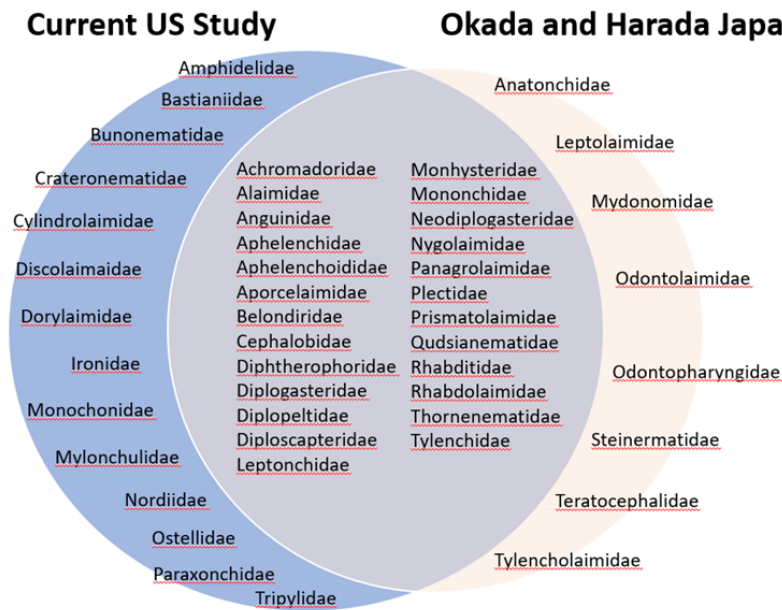
したがって、本組換えダイズは米国の栽培ほ場における土壌線虫群集に有意な生物多様性に影響を及ぼさないこと、さらに、土壌線虫の群集構造が安定して保持されていたことから土壌中の食物網の生物多様性に影響を及ぼすことは考え難いと結論した。

5 上記の線虫群集分析により同定した 39 科、69 属の自由生活性線虫は日本のダイズほ場から採取した土壌サンプルを用いて線虫群集分析を行った Okada ら (2007)の結果と比較して、日米間で科において 77%及び属において 68%の線虫が重複していた (図 10, p.44)。また、本試験で検出された属は Okada ら (2007)で報告された属 (個体数で 94%を占める属)と同じ属であった(図 11, p.44)。個体
10 数の多い線虫の属が日米間で共通して確認されたことから、米国での調査結果を用いて日本における本組換えダイズを栽培した土壌中の当該蛋白質が線虫群集構造に及ぼす影響を考察することは妥当であると考えられた。

加えて、米国での弊社の調査結果を属レベルで詳細に解析すると、総個体数の 99.5%以上を占める 59 属は本組換えダイズ及び非組換えダイズの両方のほ場
15 において検出された。つまり、優占する線虫の属において、本組換えダイズを栽培したことにより個体群として消失した線虫は確認されなかった。一方、総個体数の 0.5%以下に相当する低頻度で出現する 27 属について、12 属は本組換えダイズ及び非組換えダイズの両ほ場において検出された。残りの 15 属は本組換えダイズ又は非組換えダイズのいずれかで検出され、その内の 8 属は本組換えダイズ
20 のほ場で検出されなかった (表 5, p.45)。低頻度で出現する線虫の属について、本組換えダイズ又は非組換えダイズを栽培したほ場におけるそれぞれの個体数を用いて統計学的検定を行った結果、低頻度で出現する属の線虫の個体数に統計学的有意差はなかった。したがって、低頻度で出現する属の線虫においても本組換えダイズの栽培に起因して個体群が消失又は減少したのではないと判断し
25 た。

なお、総個体数の 99.5%以上を占める線虫属のうち、5 つの属 (*Alaimus*, *Mylonchulus*, *Chiloplacus*, *Paratylenchus*, *Paraphelenchus*)の個体数平均値は本組換えダイズにおいて非組換えダイズより大きい値となり、4 つの属 (*Axonchium*, *Diplogasteriana*, *Paramphidelus*, *Solididens*)の個体数の平均値
30 は非組換えダイズにおいて本組換えダイズより大きい値となった。しかしながら、その標準偏差は大きく、一般にほ場における線虫の不均一な分布のためと考えられ、この傾向は、低頻度で出現する属の線虫でより顕著になると考えられる。また、線虫の 4 つの食性群に着目し本組換えダイズの線虫群集に及ぼす影響を検討したところ、統計的に有意な影響は見られなかったこと (図 9, p.41)から、
35 米国において本組換えダイズは栽培ほ場における土壌線虫群集に有意な生物多様性への影響を及ぼさないことを確認した。

以上より、本組換えダイズは栽培ほ場における土壌中の線虫群集に有意な生物多様性影響を及ぼさないこと、さらに、土壌線虫の群集構造が安定して保持されていたことから土壌中の食物網にも生物多様性影響を及ぼすことはないと考えた。



15 図 10 線虫群集分析の結果、同定された線虫の科レベルにおける日米間での比較
左；米国ほ場で同定された線虫、右；Okada and Harada (2007)で同定された線虫の属を表す。
(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。)

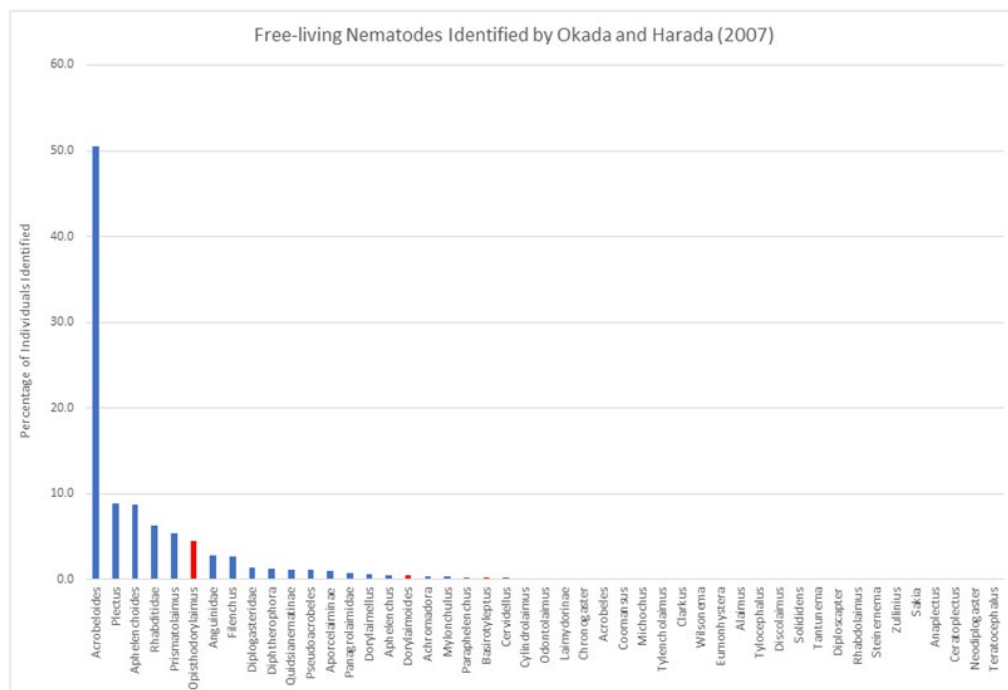


図 11 米国で同定された属と日本で同定された属の個体数の対応

横軸は Okada and Harada (2007)で同定された線虫の属、縦軸は Okada and Harada (2007)で集計した線虫の個体数 (%)を表す。青色は日米で共通して検出された属、赤色は日本のみで検出された属を表す。

(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。)

表 5. 分類された線虫の属ごとの個体数

Genera	FG	本組換えダイズ	非組換えダイズ	Genera	FG	本組換えダイズ	非組換えダイズ
<i>Heterodera</i>	PPI ₃	122.1 ± 199.0	133.7 ± 224.5	<i>Cervidellus</i>	Ba ₂	0.5 ± 1.8	0.1 ± 0.4
<i>Helicotylenchus</i>	PPI ₃	53.2 ± 99.6	41.2 ± 78.6	<i>Prionchulus</i>	Pr ₄	0.5 ± 3.0	0.2 ± 0.9
<i>Pelodera</i>	Ba ₁	52.3 ± 58.3	34.7 ± 41.1	<i>Diplogasteriana</i>	Om ₁	0.4 ± 1.7	1.3 ± 6.8
<i>Aporcelaimellus</i>	Pr ₅	37.2 ± 47.2	32.6 ± 44.7	<i>Lelenchus</i>	PPI ₂	0.4 ± 1.1	0.3 ± 0.9
<i>Aphelenchoides</i>	Fu ₂	18.1 ± 24.3	12.0 ± 18.5	<i>Metaporcelaimus</i>	Om ₅	0.4 ± 1.0	0.5 ± 1.9
<i>Pristionchus</i>	Om ₁	17.1 ± 25.0	12.6 ± 18.6	<i>Tylenchorhynchus</i>	PPI ₃	0.4 ± 1.7	0.1 ± 0.7
<i>Filenchus</i>	PPI ₂	17.0 ± 24.8	20.0 ± 29.0	<i>Aporcelaimus</i>	Pr ₅	0.3 ± 1.3	0.3 ± 1.4
<i>Plectus</i>	Ba ₂	16.1 ± 35.4	10.4 ± 27.2	<i>Cylindrolaimus</i>	Ba ₃	0.3 ± 1.4	0.1 ± 0.7
<i>Acrobeles</i>	Ba ₂	14.5 ± 15.7	12.0 ± 22.1	<i>Dorylaimellus</i>	PPI ₅	0.3 ± 1.0	0.3 ± 1.2
<i>Panagrolaimus</i>	Ba ₁	12.8 ± 21.7	11.0 ± 23.3	<i>Paramphidelus</i>	Ba ₄	0.3 ± 1.4	0.6 ± 2.0
<i>Pratylenchus</i>	PPI ₃	11.0 ± 28.7	11.0 ± 31.4	<i>Quinisulcius</i>	PPI ₃	0.3 ± 1.8	0.1 ± 1.0
<i>Acrobeloides</i>	Ba ₂	10.2 ± 11.6	7.5 ± 11.2	<i>Tylencholaimus</i>	Fu ₄	0.3 ± 1.1	0.3 ± 0.9
<i>Achromadora</i>	Om ₃	9.6 ± 18.9 ^a	12.4 ± 27.9	<i>Diptherophora</i>	Fu ₃	0.2 ± 0.9	0.1 ± 0.5
<i>Mesorhabditis</i>	Ba ₁	8.5 ± 13.4	8.4 ± 19.3	<i>Diploscapter</i>	Ba ₁	0.2 ± 1.0	0.3 ± 1.0
<i>Eucephalobus</i>	Ba ₂	8.3 ± 11.4	7.9 ± 10.5	<i>Solididens</i>	Pr ₅	0.2 ± 1.3	0.8 ± 3.9
<i>Geomonhystera</i>	Ba ₂	7.9 ± 11.0	6.2 ± 8.4	<i>Wilsonema</i>	Ba ₂	0.2 ± 1.3	0.0 ± 0.1
<i>Aphelenchus</i>	Fu ₂	7.3 ± 8.6	5.6 ± 7.4	<i>Longidorus</i>	PPI ₅	0.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0
<i>Alaimus</i>	Ba ₄	6.1 ± 11.4	3.0 ± 7.4	<i>Acrolobus</i>	Ba ₂	0.1 ± 0.8	0.1 ± 0.6
<i>Ditylenchus</i>	Fu ₂	6.1 ± 8.8	6.5 ± 7.6	<i>Aquatides</i>	Pr ₅	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.6
<i>Protorhabditis</i>	Ba ₁	6.0 ± 10.5	6.7 ± 17.6	<i>Boleodorus</i>	PPI ₂	0.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0
<i>Mylonchulus</i>	Pr ₄	5.5 ± 10.6	2.6 ± 7.4	<i>Chrysonema</i>	Om ₄	0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.3
<i>Chiloplacus</i>	Ba ₂	5.2 ± 7.9	2.8 ± 4.1	<i>Deficephalobus</i>	Ba ₂	0.1 ± 0.8	0.0 ± 0.0
<i>Paratylenchus</i>	PPI ₂	4.9 ± 26.3	0.2 ± 1.0	<i>Discolaimium</i>	Pr ₅	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0
<i>Ironus</i>	Pr ₄	4.2 ± 6.8	3.5 ± 12.8	<i>Discolaimus</i>	Pr ₅	0.1 ± 0.6	0.6 ± 1.6
<i>Mesodorylaimus</i>	Om ₄	3.7 ± 11.2	4.1 ± 12.9	<i>Ecumenicus</i>	Om ₄	0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.1
<i>Rhabditis</i>	Ba ₁	2.9 ± 5.4	3.8 ± 15.5	<i>Laimydorus</i>	Om ₅	0.1 ± 0.5	0.0 ± 0.0
<i>Microdorylaimus</i>	Om ₄	2.5 ± 7.3	2.1 ± 4.8	<i>Lordellonema</i>	Om ₄	0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.1
<i>Prismatolaimus</i>	Om ₃	2.1 ± 3.2	3.3 ± 6.2	<i>Nygolaimus</i>	Pr ₅	0.1 ± 0.4	0.4 ± 2.0
<i>Paraphelenchus</i>	Fu ₂	2.0 ± 7.3	1.0 ± 2.3	<i>Paravulvulus</i>	Pr ₅	0.1 ± 0.5	0.0 ± 0.3
<i>Clarkus</i>	Pr ₄	1.8 ± 4.6	2.7 ± 7.7	<i>Pseudacrobeles</i>	Ba ₂	0.1 ± 0.6	0.2 ± 0.7
<i>Leptonchus</i>	Fu ₄	1.7 ± 3.9	1.2 ± 3.3	<i>Akrotonus</i>	Pr ₅	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.9
<i>Tylocephalus</i>	Ba ₂	1.7 ± 6.3	1.9 ± 6.2	<i>Anaplectus</i>	Ba ₂	0.0 ± 0.4	0.1 ± 0.7
<i>Crassolabium</i>	Om ₄	1.5 ± 3.0	1.2 ± 2.0	<i>Carcharolaimus</i>	Pr ₅	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0
<i>Psilenchus</i>	PPI ₂	1.5 ± 5.3	1.5 ± 4.2	<i>Coslenchus</i>	PPI ₂	0.0 ± 0.4	0.0 ± 0.3
<i>Eudorylaimus</i>	Pr ₄	1.4 ± 4.8	2.3 ± 11.5	<i>Mesocriconema</i>	PPI ₃	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
<i>Tripyla</i>	Pr ₃	1.4 ± 4.2	1.5 ± 5.4	<i>Aglenchus</i>	PPI ₂	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.5
<i>Paraxonchium</i>	Om ₅	1.3 ± 4.0	1.0 ± 4.3	<i>Bastiana</i>	Ba ₃	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.7
<i>Cephalobus</i>	Ba ₂	1.2 ± 2.7	0.9 ± 1.9	<i>Belondira</i>	Om ₅	0.0 ± 0.0	0.1 ± 1.1
<i>Discolaimoides</i>	Pr ₅	1.0 ± 2.2	1.2 ± 2.5	<i>Dorydorella</i>	Om ₄	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1
<i>Axonchium</i>	Om ₅	0.8 ± 2.1	1.9 ± 5.4	<i>Lobocriconema</i>	PPI ₃	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.3
<i>Pungentus</i>	Om ₄	0.7 ± 2.5	0.3 ± 1.0	<i>Paratrachodorus</i>	PPI ₄	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.3
<i>Xiphenema</i>	PPI ₅	0.7 ± 1.6	0.4 ± 2.1	<i>Rhabdolaimus</i>	Ba ₃	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.3
<i>Eumonhystera</i>	Ba ₂	0.6 ± 2.7	0.3 ± 1.9	<i>Rotylenchulus</i>	PPI ₃	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.6

FG (food guild) : 食性群を表す。

総個体数の 0.5%以下に相当する線虫は緑色で示した。

(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。)

また、本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと交雑して雑種を形成し、Cry14Ab-1 蛋白質による線虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代の根からCry14Ab-1 蛋白質が移行する可能性は否定できない。しかしながら、仮に、本組換えダイズと交雑したツルマメの雑種及びその後代から本試験と同等のCry14Ab-1 蛋白質が移行していたとしても、上述のように土壤中の線虫に対して毒性を示す可能性は低いと推定された。さらに、Cry14Ab-1 蛋白質が付与する線虫抵抗性は土壤中の線虫群集構造を攪乱せず、このことは間接的に土壤生態系への影響を及ぼさないことを示すため、本組換えダイズと交雑したツルマメの雑種及びその後代の地下部に生息する線虫群集に影響を及ぼすことは考え
5
10 難いと考察した。

以上より、生物多様性影響リスクにおいて曝露量と考えられる土壤中のCry14Ab-1 蛋白質の定量試験により本組換えダイズが発現する Cry14Ab-1 蛋白質は根圏土壌において微量に検出されたが、その濃度はモデル生物である *C. elegans* の ED₅₀ の 1/544 倍であり、根圏においての Cry14Ab-1 蛋白質の自由生活性線虫への曝露は、生育阻害等を誘発する濃度で生じる可能性は考え難い。さらに、Cry14Ab-1 蛋白質を土壤中の線虫が摂食し、影響を受けるハザードについては、本組換えダイズを栽培したほ場の土壤中の線虫群集分析を行い、その結果は、本組換えダイズが当該ほ場の線虫群集構造に影響を及ぼしていないことを示した。一方で、線虫を調査する技術的な限界があるため、影響を受ける土壤線虫が存在する可能性は否めないが、上述の線虫群集分析の結果やバイオアッセイの結果も踏まえると限定的であり、加えて影響を受けると考えられる線虫は一般に移動性をほとんど持たないことから、本組換えダイズが生育する限定された土壌の範囲でのみの影響であり、かつ、隔離ほ場の様に管理された環境で
15
20
25 の栽培である場合は生物多様性影響が生じる可能性は低いと考えられる。

(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、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えダイズの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の範囲内では、有害物質の生産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。

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(第一 1(1) 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

ツルマメが本組換えダイズと交雑して線虫抵抗性及び HPPD 阻害型除草剤耐性の雑種が生じること、さらに、本組換えダイズ由来の *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 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

ダイズとツルマメの交雑について：

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)、交雑は起こり難いと考えられる。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。

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、遺伝子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、遺伝子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 の距離で交雑率は全て 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報告されている。

本組換えダイズの交雑性について：

本組換えダイズの生殖に関与する性質である花粉の形態及び稔性について宿主ダイズと有意な差異は認められなかった。本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの交雑率は、米国で行ったほ場試験で調査した結果、本組換えダイズと
5 76cm の畝間で隣接して栽植した非組換えダイズから採取された収穫種子 3000 粒の内 1 粒のみが交雑していた (別添資料 14)。この試験で得た本組換えダイズの交雑率 (0.03%) は、Yoshimura ら (2006) が報告している除草剤グリホサート耐性ダイズと非組換えダイズを用いた交雑試験の結果 (花粉親からの距離が 70cm において 0.023~0.19%) の範囲内だった。加えて、米国において隣接して栽植した
10 ダイズの自然交雑率を調査した文献によるとその交雑率は 0.5% 未満であり、本組換えダイズの交雑率はこれらの範囲内であった (Garber and Odland, 1926; Caviness, 1966; Chiang and Kiang, 1987; Ray et al., 2003)。したがって、本組換えダイズの交雑性は従来のダイズと比較して高まっていないと考えられた。

また、第一 2 (1) ロ ③より、本組換えダイズの導入遺伝子である *cry14Ab-1.b* 遺伝子により発現する Cry14Ab-1 蛋白質は酵素ではないことから、植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。また、*hppdPf-4Pa* 遺伝子により発現する HPPD-4 蛋白質は基質特異性が高く、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。したがって、これら導入遺伝子による影響が宿主の持つ代謝系を変化させ、交雑性に関わる生理学的又は生態学的特性について
20 宿主との相違をもたらすことはないと考えられる。

隔離ほ場施設周辺における本組換えダイズの交雑性について：

本組換えダイズを隔離ほ場で栽培した場合に、隔離ほ場施設周辺において生物多様性影響を生ずる可能性は、本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと雑
25 種を形成し、線虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を土壤中に生息する線虫が直接的又は間接的に食餌する場合であると考えられる。本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと交雑するには、本組換えダイズが隔離ほ場外へ放出し、開花期まで十分に生育すること、又は本組換えダイズの花粉が飛散し、隔離ほ場外のツルマメに受粉することが必要となる。しかしながら、本組換えダイズを隔離
30 ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる等の一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えダイズの隔離ほ場試験において、本組換えダイズの種子が隔離ほ場外へ逸出することは考え難い。また、隔離ほ場試験の栽培試験期間中には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する措置をとる
35 予定である。一方、花粉の飛散については、上述した通り、従来のダイズを超えるものでないと考えられ、また、ダイズとツルマメの自然交雑率は低いとい

う報告がある。例えば、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、交雑率は 0.73% であり (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 5 個体中、雑種 35 個体) であった。他方、遺伝子組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、花粉親から 2~6 m の距離で交雑率は 0.013% であったものの、8~10 m の距離では交雑種子は認められなかったとの報告がある (Mizuguti et al., 2010)。したがって、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えるが、このような特別な条件下におい 10 ても、交雑率は極めて低いといえる。

以上から、本組換えダイズとツルマメの交雑率は従来のダイズと同様に低いと考えられる。なお、本組換えダイズの隔離ほ場試験を予定しているほ場の周囲 60m にツルマメ及びダイズが存在しないことを過去のモニタリングで確認している。したがって、本組換えダイズの隔離ほ場試験期間中に本組換えダイズが隔離ほ場施設周辺のツルマメ及びダイズと交雑する可能性は極めて低いと考えら 15 れる。

我が国の自然環境下での本組換えダイズの交雑性について：

本組換えダイズの第一種使用には栽培を含まないため、これまでに評価済みの *Bt* 蛋白質を産生する遺伝子組換えダイズと同様に、輸送中のこぼれ落ちに起因する交雑性について検討した。 20

我が国の自然環境下において、本組換えダイズが近縁野生種であるツルマメと雑種を形成する可能性は否めない。交雑により形成された雑種及びその後代が *Cry14Ab-1* 蛋白質の発現により線虫抵抗性を獲得した場合に、ツルマメの集団内で優位になる可能性について検討した。 25

仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、本組換えダイズ由来の *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 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。本組換えダイズとツルマメとの雑種が *Cry14Ab-1* 蛋白質を発現して線虫抵抗性を獲得した場合に、ツルマメ集団内で競合における優位性が高まる可能性が考えられる。しかしながら、植物が自然環境下において、他の野生植物と競合し、生存及び増殖して優占化するためには、休眠性、長期に渡る大量の種子生産、裂莢性等の複数の特性を併せ持つことが必要であることが報告されている (Lingenfelter and Hartwing, 2007)。よって、本組換えダイズの持つ線虫抵抗性 30 のみをもって競合における優位性を獲得するとは考え難い。

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）。しかしながら、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）、中間体が自生地で生存する確率は非常に低いことが示唆された。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）。ダイズの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、ダイズとツルマメの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り、初期のダイズとツルマメの中間体の自殖系統が生存できなかったと考えられた（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で急激に消失していくことが予測されている（吉村ら, 2016）。さらに、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（Kuroda et al., 2010）。

一方で、先述したように（p.10, L.18）、標的とするダイズシストセンチュウは宿主植物であるダイズを栽培している環境においても生息していない場合があり、ツルマメが生育する河川の氾濫原や土手、路傍のような環境において生息することは困難であることから本組換えダイズとツルマメとの雑種及びその後代が線虫抵抗性を獲得した要因のみで適応度が上がる可能性は低いと考えられる。

次に、過去の Cry 蛋白質を産生するダイズの生物多様性影響評価で実施された曝露量評価を元にし、本組換えダイズの交雑性についての結果と合わせて総合的に本組換えダイズのこぼれ落ちからの生育及びツルマメと交雑する可能性について検討した。

バイエルクロップサイエンス株式会社は、2013~2016 年に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スタック系統（MON87701xMON89788）の国内運搬中におけるこぼれ落ちに関するモニタリングを実施し、同スタック系統及びその他の分離後代の生育は確認されなかった（環境省, 2017a）。また、ダウ・アグロサイエンス株式会社は、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（DAS81419）の第一種使用申請において統計的に曝露量を推定し

ている。統計解析の結果、輸入された DAS81419 の種子が国内輸送中にこぼれ落ち、生育後にツルマメと交雑し、その交雑個体が生育する可能性は極めて低いと結論している (環境省, 2017b)。以上の結果から、我が国の自然条件下において遺伝子組換えダイズがツルマメと雑種を形成し、その雑種が生育する可能性は極めて低いことが示されている。

本組換えダイズの交雑性について、弊社が米国で行ったほ場における試験の結果から、本組換えダイズとツルマメの交雑率は従来のダイズと同様に低いと考えられる。仮に、本組換えダイズが輸送中にこぼれ落ちて生育し、その後ツルマメと交雑する可能性は、過去に評価された Cry 蛋白質を産生する遺伝子組換えダイズと同等であると考えられる。なお、対照とする非組換えダイズとの交雑試験は、隔離ほ場試験において実施する予定である。

以上より、本組換えダイズが我が国へ輸入され、国内の輸送途中でこぼれ落ちた場合に、ツルマメと交雑して雑種を形成し、Cry14Ab-1蛋白質による線虫抵抗性を獲得した雑種の競合性がツルマメより高まり、本組換えダイズ由来の *cry14Ab-1.b* 遺伝子がツルマメ集団に優先的に浸透していく可能性は、これまでに第一種使用等の承認を受けたCry蛋白質を産生する遺伝子組換えダイズと同等に低いと考えられる。加えて、ダイズとツルマメの自然交雑率が低いこと、開花期が重ならないこと及びダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存できないと推察されることから、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起きている可能性は極めて低いと考えられる。さらには、第二 1 (1)において本組換えダイズの競合における優位性は高められていないと考えられることより、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中に優先的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

(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、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えダイズの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の範囲内では、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

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

本組換えダイズの生物多様性影響評価においては、土壌中の Cry14Ab-1 蛋白質濃度が曝露量と考えられ、Cry14Ab-1 蛋白質を土壌中の線虫が摂食し、影響を受けることがハザードと考えられる。

第一 2 (6) に記載したとおり、本組換えダイズの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えダイズを隔離ほ場で使用する場合の生物多様性影響評価を、生理学的又は生態学的特性のデータを用いずに評価した。

競合における優位性：

宿主であるダイズは、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。

本組換えダイズの導入遺伝子である *cry14Ab-1.b* 遺伝子により発現する Cry14Ab-1 蛋白質は酵素活性を有しないため、植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。一方、*hppdPf-4Pa* 遺伝子により発現する HPPD-4 蛋白質は、HPPD 蛋白質を植物体で発現させた従来知見により、植物の代謝系を変化させることはないと考えられる。

我が国の自然環境下において、本組換えダイズが近縁野生種であるツルマメと雑種を形成する可能性は否めず、本組換えダイズとツルマメとの雑種及びその後代が線虫抵抗性を獲得した場合に適応度が上がることが考えられる。しかし、標的とするダイズシストセンチュウの宿主植物であるダイズを栽培している環境においても生息していない場合がある生態特性から、ツルマメが多く生育する河川の氾濫原や土手、路傍のような攪乱のない環境において増殖することは困難であり、本組換えダイズとツルマメとの雑種及びその後代が線虫抵抗性を獲得した要因のみで適応度が上がる可能性は低いと考えられる。さらに、植物が自然環境下において、他の野生植物と競合し、生存及び増殖して優占化するためには、休眠性、長期に渡る大量の種子生産、裂莢性等の複数の特性を併せ持つことが必要であることから、付与された線虫抵抗性形質によって競合における優位性が高まることはないと考えられた。また、本組換えダイズには HPPD-4 蛋白質により HPPD 阻害型除草剤耐性が付与されているが、HPPD 阻害型除草剤が散布されることが想定され難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と考えられた。

以上のことから、第一種使用規程に従って、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

有害物質の産生性：

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。

本組換えダイズに導入した *cry14Ab-1.b* 遺伝子により発現する Cry14Ab-1 蛋白質が影響を及ぼす可能性がある野生動植物等として線虫が特定された。本組換えダイズを隔離ほ場で栽培した場合、線虫の持つ生物学的特性から、影響を受ける線虫は基本的に隔離ほ場の土壤中に生息する線虫に限られ、その線虫が本組換えダイズに曝露される経路は本組換えダイズを直接食餌する場合、本組換えダイズから土壤中へ移行した Cry14Ab-1 蛋白質を摂取した場合、さらに、本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと雑種を形成し、Cry14Ab-1 蛋白質により線虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を直接的又は間接的に食餌する場合と考えられた。したがって、Cry14Ab-1 蛋白質の曝露量及びハザードを考察するための試験を行った。その結果、根から土壤中へ移行する Cry14Ab-1 蛋白質は微量であり、また、土壤中での Cry14Ab-1 蛋白質の分解速度も速いことから、土壤中の生物多様性に影響を及ぼすことは考えにくく、本組換えダイズは、栽培ほ場における土壤線虫群集に有意な生物多様性影響を及ぼさないと考えられる。さらに、土壤中の線虫群集構造が安定して保持されていたことから土壤中の食物網にも生物多様性影響を及ぼすことはないと考えた。また、仮に、本組換えダイズと交雑したツルマメの雑種及びその後代から本試験と同等の Cry14Ab-1 蛋白質が移行していたとしても、上述のように Cry14Ab-1 蛋白質の曝露量は微量であり、土壤中の線虫に対して毒性を示す可能性は低いと推定される。さらに、本組換えダイズの栽培ほ場で行った線虫文集分析の結果から、ツルマメとの雑種及びその後代が発現する Cry14Ab-1 蛋白質は土壤中の線虫群集構造を攪乱しないため、間接的に土壤生態系への影響を及ぼすことは考え難いと判断した。

HPPD-4 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ないと考えられる。

また、Cry14Ab-1 蛋白質及び HPPD-4 蛋白質と既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められていない。

以上のことから、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、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。

- 5 本組換えダイズを隔離ほ場で栽培した場合に、隔離ほ場施設周辺において生物多様性影響を生ずる可能性は、本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと雑種を形成し、線虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を土壤中に生息する線虫が直接的又は間接的に食餌する場合であると考えられる。本組換えダイズが隔離ほ場外のツルマメと交雑するには、本組換えダイズが隔離ほ場外へ逸出し、開
10 花期まで十分に生育すること、又は本組換えダイズの花粉が飛散し、隔離ほ場外のツルマメに受粉することが必要となる。しかしながら、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えダイズの隔離ほ場試験において、本組換えダイズの種子が隔離ほ場外へ逸出することは考え難い。また、隔離ほ場試験の栽培試験期間中には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による
15 遺伝子組換え種子の拡散を防止する措置をとる予定である。一方、花粉の飛散については、従来のダイズを超えるものでないと考えられる。

したがって、本組換えダイズの隔離ほ場試験期間中に本組換えダイズが隔離ほ場施設周辺のツルマメ及びダイズと交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

- 20 加えて、本組換えダイズの第一種使用には栽培を含まないため、これまでに評価済みの Cry 蛋白質を産生する遺伝子組換えダイズと同様に、輸送中のこぼれ落ちに起因する交雑性について検討した。

- 従来の知見より、ダイズとツルマメはいずれも自殖性植物であり、開花期が重なり、かつ隣接して生育している条件下においても交雑する可能性は低いことが報告されている。
25

- 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 10 m 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。
30

- 本組換えダイズの花粉の飛散及び交雑率については、試験の結果より従来のダイズを超えるものでないと考えられた。また、ツルマメとの交雑におけるハザード及び曝露量についての検討から、Cry14Ab-1 蛋白質により線虫抵抗性を獲得した雑種の競合性がツルマメより高まり、本組換えダイズ由来の *cry14Ab-1.b* 遺伝子がツルマメ集団に優先的に浸透していく可能性は、これまでに第一種使用
35

等の承認を受けた Cry 蛋白質を産生する遺伝子組換えダイズと同等に低いと考えられる。

5 よって、本組換えダイズがツルマメと交雑し、*cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 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。

10 以上を総合的に評価し、本組換えダイズを第一種使用規程に従って、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内で使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論づけた。

参考文献

- Abel, G. H. 1970. Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agronomy Journal* 62: p.121-123.
- 5 Agrios, G. N. 1997. *Plant pathology* 4th edition. Harcourt/Academic Press.
- Ahrent, D. K., Caviness, C. E. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: p.376-378.
- 10 Allison R. F., Dougherty W. G., Parks T. D., Willis L, Johnston R. E., Kelly, M., Armstrong F. B. 1985. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology*, 147: p.309-316.
- 15 Blaxter, M. L., Ley, P. D., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., and Thomas, W. K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: p.71-75.
- 20 Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. a multipurpose cloning system. *Gene* 2: p.95-113.
- Bongers, T. (1990) The maturity index: an ecological measure of
25 environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*. 83: p.14-19.
- Boudec, P., Rodgers, M., Dumas, F., Sailland, A., Bourdon, H. 2001. Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of
30 plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicide. US Patent US 6245968B1 (12-JUN-2001) Aventis CropScience S.A. (FR).
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.
35 *Toxicon* 49: p.423-435.

Brownlee, J. M., Johnson-Winters, K., Harrison, D. H., Moran, G. R. 2004. Structure of ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry* 43: p.6370-6377.

5

Caviness, C. E. 1966. Estimates of natural cross pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: p.211-212

Chiang, Y. C., Kiang, Y. T. 1987. Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Academia Sinica* 28: p.1-11.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. H., 1998. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 62: 807 813.

15

Dong, K. and Opperman, C. H. 1997. Genetic analysis of parasism in the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Genetics* 146: p.1311-1318.

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

20

FAO. 2020. FAOSTAT 2019 data, Crops production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
(閲覧日 2021年1月12日)

25

Farré, G., Sudhakar, D., Naqvi, S., Sandmann, G., Christou, P., Capell, T., Zhu, C. 2012. Transgenic rice grains expressing a heterologous *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the γ to the α isoform without increasing absolute tocopherol levels. *Transgenic research* 21: p.1093-1097

30

Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R. G. M. (2001) A framework for soil food web disgonostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*. 18: p.13-29.

35

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

5 Fritze, I. M., Linden, L., Freigang, J., Auerbach, G., Huber, R. Steinbacher, S. 2004. The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Plant Physiology 134: p.1388-1400.

10 Fujimoto, T., Hasegawa, S., Otobe, K., Mizukubo, T. (2010) The effect of soil water flow and soil properties on the motility of second-stage juveniles of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Soil Biology & Biochemistry. 42: p.1065-1072.

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

20 Garber, R. J., Odland, T. E. 1926. Natural crossing in soybean. Am. Soc. Agron. J. 18: p.967-970

Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., Blatt, M. R. 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. The Plant journal 64: p.355-365.

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

30 Hymowitz, T., Harlan, J. R. 1983. Introduction of soybean to north America by Samuel Bowen in 1765. Economic Botany 37: p.371-379.

35 Kahn, T. W., Duck, N. B., McCarville, M. T., Cooper Schouten, L., Schweri, K., Zaitseva, J., Daum, J. 2021. A *Bacillus thuringiensis* Cry protein controls

soybean cyst nematode in transgenic soybean plants. Nature Communication
12: p.3380-3392.

Kay, R., Chan, A., Daly, M., McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S
promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236:
p.1299-1302.

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: p.325-329.

Koch, M. S., Ward, J. M., Levine, S. L., Baum, J. A., Vicini, J. L., Hammond,
B. G. 2015. The food and environmental safety of *Bt* crops. Frontiers in plant
science 6: p.1-22.

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

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

Kuroda, Y., Kaga A., Tomooka, N., Vaughan, D. A. 2008. Gene flow and
genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. Crop Science 48:
p.1071-1079.

Kuroda Y., Kaga, A., Tomooka, N., Vaughan, D. 2010. The origin and fate of
morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their
natural habitats in Japan. Molecular Ecology 19: p.2346-2360.

Kuroda, Y., Kaga, A., Tomooka, N., Yano, H., Takada, Y., Kato, S., Vaughan,
D. 2013. QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated
soybeans in experimental fields. Ecology and Evolution 3: p.2150-2168.

Lebrun, M., Leroux, B., Sailland, A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996) Rhone-Poulenc Agrochimie (FR)

5 Lingenfelter, D. D., Hartwig, N. L. 2007. Introduction to weeds and herbicides. The Pennsylvania State University Extension.

10 Lima, F. S. O., Correa, V. R., Nogueira, S. R., Santos, P. R. R. 2017. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. In Kasai., M. (Ed), *Soybean The basis of yield, biomass and productivity*. DOI: 10.5772/67030

15 McBlain, B. A., Fioritto, R. J., St Martin, S. K., Calip-Dubois, A. J., Schmitthenner, A. F., Cooper, R. L., Martin, R. J. 1993. Registration of ‘Thorne’ soybean. Crop Sci. 33: p.1406.

20 Mène-Saffrané, L., DellaPenna, D. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: p.301-309

25 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: p.13-23.

30 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: p.25-30.

35 Neher, D. A., Olson, R. K. (1999) Nematode communities in soils of four farm cropping management systems. Pedobiologia, 43: p.430-438.

 Neher, D. A. (2001) Role of nematodes in soil health and their use as indicators. Journal of Nematology. 33: p.161-168.

Niblack, T. L., Arelli, P. R., Noel, G. R., Opperman, C. H., Orf, J. H., Schmitt, D. P., Shannon, J. G., Tylka, G. L. 2002. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology 34: p.279-288.

5

Niblack, T. L., Lambert, K. N., Tylka, G. L. 2006. A model plant pathogen from the kingdom Animalia: *Heterodera glycines*, the soybean cyst nematode. Annual Review of Phytopathology 44: p.283-303.

10 Niblack, T.L., Tylka, G.L., Arelli, P., Bond, J., Diers, B., Donald, P., Faghihi, J., Ferris, V.R., Gallo, K., Heinz, R.D., Lopez-Nicora, H., von Qualen, R., Welacky, T., Wilcox, J. 2009. A standard greenhouse method for assessing soybean cyst nematode resistance in soybean: SCEo8 (standardized cyst evaluation 2008). Plant Managemant Network.

15

OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815668.pdf> (閲覧日 2019 年 5 月 29 日).

20

OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.42.

<https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815888.pdf> (閲覧日 2019 年 5 月 29

25

日)

Okada, H., Harada, H. (2007) Effects of tillage and fertilizer on nematode communities in a Japanese soybean field. Applied Soil Ecology. 35: p.582-598.

30 Porée, F., Heinrichs, V., Lange, G., Laber, B., Peters, C., Schouten, L. 2014. HPPD variants and methods of use. Patent application WO/2014/043435 (20-MAR-2014), Bayer CropScience LP (US), Bayer CropScience AG (DE)

35 Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M. K., Friedt, W., Frentzen, M., Weier, D. 2006. Increase of the tocochromanol

content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Molecular Breeding* 18: p.93-107

Ray, J. D., Kilen, T. C., Abel, C. A., Paris, R. L. 2003. Soybean natural cross-
5 pollination rates under field conditions. *Environ. Biosafety Res.* 2: p.133-138.

Rose R. I., 2007. White paper on tier-based testing for the effects of proteinaceous insecticidal plant-incorporated protectants on non-target arthropods for regulatory risk assessments. *Biotechnology Regulatory*
10 *Services, Biopesticides and Pollution Prevention Division*, 40

Sanfaçon, H., Brodmann, P., Hohn, T. 1991. A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes & development* 5: p.141-149.

15 Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. *Nature* 402: p.480-481.

Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G. 2002. *Bt* toxin is released in root exudates from we transgenic corn hybrids representing three transformation events.
20 *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1p.33-137.

Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Thechnical Journal.* 27: p.379-423

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

30 Wei, J.-Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C., Aroian, R. V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: p.2760-2765.

Winter, S. M. J., Shelp, B. J., Anderson, T. R., Welacky, T. W., Rajcan, I.
35 2007. QTL associated with horizontal resistance to soybean cyst nematode in *Glycine soja* PI464925B. *Theoretical and applied genetics* 114: p.461-472.

Wrather, A., Shannon, G., Balardin, R., Carregal, L., Escobar, R., Gupta, G. K., Ma, Z., Morel, W., Ploper, D., Tenuta, A. 2010. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. Plant Management Network.

5

Yeates, G. W., Bongers, T., de Goede, R. G. M., Freckman, D. W., Georgieva, S. S. (1993) Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*. 25: p.315-331.

10 Yoshimura et al., 2006. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 5: p.169-173.

15 Yoshimura, Y. 2011. Wild tunnel and field assessment of pollen dispersal in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] *J. Plant Res.* 124: p.109-114

20 Young, I. M., Griffiths, B. S., Robertson, W. M., McNicol, J. W. (1998) Nematode (*Caenorhabditis elegans*) movement in sand as affected by particle size, moisture and the presence of bacteria (*Escherichia coli*). *European Journal of Soil Science*. 49: p.237-241.

Zambryski, P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review of genetics*. 22: p.1-30.

25 Zhou, Y.-Y., Luo, S.-H., Yi, T.-S., Li, C.-H. Luo, Q., Hua, J., Liu, Y. Li, S.-H. 2011. Secondary metabolites from *Glycine soja* and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* 59: p.6004-6010.

30 Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas P. J. J., Farrand S. K., Winans, S. C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of bacteriology* 182: p.3885-3895.

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.

35

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.

5 岡田 浩明 (2005) 土壤生態系を評価するための線虫群集指数. 植物防疫. 59 巻10号: p.17-20.

岡田 浩明 (2007) 線虫群集を利用して土壤の健康度を評価する. 化学と生物. 45: p.43-50.

10 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の探索と収集ー秋田県及び広島県における予備的調査ー. 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.

15 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.

環境省. 2017a. チョウ目害虫抵抗性ダイズ(改変*cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.) (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
20 http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1590&ref_no=2 (閲覧日 2021 年 1 月 12 日)

環境省. 2017b. 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
25 *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 (閲覧日 2021 年 1 月 12 日)

30 串田 篤彦. 2012. ダイズシストセンチュウの生態的特性と防除対策. 植物防疫. 第 66 巻第 6 号, p.25-29.

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ー秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県における現地調査からー. 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.73-95.
35

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ー秋田県、茨城県、高知県、佐賀県における現地調査からー. 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第22巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, p. 1-12.

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.

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.

10

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.

15

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.

日本土壌肥料学会編 (2009) 土壌の原生生物・線虫群集. 博友社. 31-35, 116-130.

20

農林水産省. 2020a. 農林水産統計. 令和 2 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（令和 2 年 10 月 30 日公表）
<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/menseki/attach/pdf/index-5.pdf> (閲覧日 2021 年 1 月 12 日)

25

農林水産省. 2020b. 農林水産物輸出入概況 2019年（令和元年）国際部国際政策課（令和2年3月27日公表）
https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/attach/pdf/houkoku_gaikyou-22.pdf (閲覧日 2021 年 1 月 12 日)

30

農林水産省. 2020c. 令和元年度食料需給表 農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室（令和 2 年 8 月公表）
<https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/attach/pdf/index-9.pdf> (閲覧日 2021 年 1 月 12 日)

35

農林水産省. 2021. 遺伝子組換え植物実態調査（令和元年実施分）対象植物：
ナタネ類、ダイズ・ツルマメ（令和3年1月公表）
<https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/210108.html>
（閲覧日 2021年1月8日）

5

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
10 書 第二巻 ダイズ・アズキ. 農文協 p.110-112.

水久保 隆之. 2016. 有害線虫の被害と対策, 牧草と園芸 (64) 3, p.11-16.

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性影
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: GMB151 に発現している Cry14Ab-1 蛋白質の環境への安全性評価 社外秘情報につき非開示

別添資料 2: HPPD 蛋白質の基質になり得る化合物の文献調査

5

社外秘情報につき非開示

別添資料 3: *Pseudomonas fluorescens* 由来の野生型 HPPD 蛋白質 HPPD Pf と HPPD-4 蛋白質の基質特異性の比較 社外秘情報につき非開示

別添資料 4: プラスミド pSZ8832 の詳細 社外秘情報につき非開示

別添資料 5: 次世代シーケンス技術及び接合部は配列の解析による GMB151

10

ダイズの挿入部位の評価 社外秘情報につき非開示

別添資料 6: GMB151 の挿入部位及び挿入 DNA の塩基配列の決定

社外秘情報につき非開示

別添資料 7: 3 世代の GMB151 の葉、根、種子における Cry14Ab-1 蛋白質と HPPD-4 蛋白質の含量 社外秘情報につき非開示

15

別添資料 8: イベント識別法 社外秘情報につき非開示

別添資料 9: クキセンチュウ目に属する線虫の GMB151 への接種試験

社外秘情報につき非開示

別添資料 10: Cry14Ab-1 蛋白質の概要 社外秘情報につき非開示

別添資料 11: 根圏土壤中の Cry14Ab-1 蛋白質の定量 社外秘情報につき非開示

20

別添資料 12: 土壤中の Cry14Ab-1 蛋白質の分解 社外秘情報につき非開示

別添資料 13: GMB151 が自由生活性線虫に及ぼす潜在的な影響についてのほ場調査 社外秘情報につき非開示

別添資料 14: GMB151 ダイズの交雑試験 社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

令和元年5月13日

氏名 BASF ジャパン株式会社
代表取締役社長 石田 博基
住所 東京都中央区日本橋室町三丁目4番4号

第一種使用規程の承認を申請している線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ (*cry14Ab-1.b*, *hppdPf-4Pa*, *Glycine max* (L.) Merr.) (GMB151, OECD UI: BCS-GM151-6) (以下、「本組換えダイズ」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。

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

本組換えダイズが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断された場合は、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部 (表1) を速やかに設置する。

表1 危機対策本部*名簿 (令和元年5月現在)

(危機対策本部長)	BASF ジャパン株式会社
	アグロソリューション事業部 執行役員 事業部長
**	BASF ジャパン株式会社
	アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社
	アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社
	アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社
	アグロソリューション事業部

*本危機対策本部は、社内 Country Incident Management Team の指揮管理のもと、第一種使用等に係る緊急措置の実働対応を行う。

**管理責任者

本栽培試験は、BASF ジャパン株式会社がバイエルクロップサイエンス株式会社との契約の元、同社明野事業所隔離ほ場を借用し実施するものである。

(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

栽培試験担当者及び管理責任者は、第一種使用等の状況に関し、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

本組換えダイズの使用に伴い、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は、栽培試験担当者及び管理責任者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。

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

当該影響を生ずるおそれに基づき、本組換えダイズを不活化する措置、本組換えダイズの環境への放出を防止するための措置、又はすでに環境に放出された本組換えダイズの拡散を防止する措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認められた場合には、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連絡するとともに、緊急措置に対応するための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

モニタリング計画書

令和元年 5 月 13 日

氏 名 BASF ジャパン株式会社

申請者 代表取締役社長 石田博基

住 所 東京都中央区日本橋室町三丁目 4 番 4 号

イ. 実施体制及び責任者

実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

表 1 モニタリング実施体制

(令和元年 5 月現在)

氏名	所属機関・職名
*	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部

*管理責任者

(氏名は個人情報につき非開示)

ロ. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

名称：ツルマメ (*Glycine soja*)

ハ. モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の生育又は生育状況

隔離ほ場周辺 10 m の範囲内においてモニタリングを実施する。

ニ. モニタリングの期間

線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ (*cry14Ab-1.b*, *hppdPf-4Pa*, *Glycine max* (L.) Merr.) (GMB151, OECD UI: BCS-GM151-6) (以下、「本組換えダイズ」とする。)の栽培期間中に実施する。

ホ. 実施期間、頻度その他のモニタリングの方法

- 1) 本組換えダイズの栽培期間中に、隔離ほ場周辺 10 m 以内でのツルマメの生育の有無を調べる。

2) 隔離ほ場周辺 10 m 以内にツルマメが生育し、種子をつけていた場合にはその位置を記録するとともに、1 個体で生育している場合は可能な限り結実している全ての種子を、また、集団で生育している場合は、ツルマメ 1 集団当たり最低 50 粒の種子をサンプリングする。

5 3) 上記 1)により、ツルマメの生育が認められない場合は、さらに隔離ほ場から 50 m 以内の調査可能な範囲において上記 2)と同様の作業を行う。

10 収穫されたツルマメの種子に *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子が移行しているかどうかを 1 粒ごとに検定する。検定方法は収集されたサンプルの量等を考慮して適宜決定する。

へ. モニタリング結果の解析方法

15 上述の交雑検定の結果をもとに、当該遺伝子の移行が確認された場合は、本組換えダイズとツルマメの種子が収穫された位置と距離から交雑率との関係解析する。

ト. 農林水産大臣及び環境大臣への報告方法

20 モニタリング及びその解析結果は、「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」における第一種使用規程の申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

チ. その他の必要な事項

25 モニタリングの期間中に採取されたツルマメから本組換えダイズとの交雑によって、当該遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画書

第1 受容環境

1. 隔離ほ場の所在地等

(1) 名称

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

(2) 住所

茨城県筑西市向上野 1500 番地 41

(3) 電話番号

0296-54-5120

(4) 地図

図 1 (p.6)参照

2. 責任者等

(1) 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】

BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部

(2) 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】

BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部

3. 試験期間

承認日から令和 5 年 7 月 31 日まで

4. 施設概要

部外者の立入りを禁止するための施設（フェンスや標識）及び組換え体がほ場外に流出することを防ぐための各種設備（洗い場、防鳥網、防風網、排水溝、オートクレーブ等）を設置している（図 2, p.7）。

5. 面積

(1) 隔離ほ場全体の面積

約 5200 m²

- (2) 試験に使用する面積
約 220 m²

- (3) 試験区の配置図
図 3 (p.7)参照

6. 隔離ほ場の周辺環境

- (1) 隔離ほ場周辺の地形

隔離ほ場が位置する茨城県筑西市は、茨城県の西部、筑波山の西側に位置する。市域はほぼ平坦で、利根川の支川、鬼怒川・小貝川が南北に貫流している（茨城県筑西市ホームページ、<http://www.city.chikusei.lg.jp/index.php?code=38>）。

隔離ほ場には用水路が、また約 1.5km 離れた場所には桜川があるものの、隔離ほ場は筑西市が作成した洪水ハザードマップによると浸水想定区域に指定されておらず、また浸水実績区域にも含まれない。また、平成 27 年 9 月関東・東北豪雨の際にも浸水していない。

- (2) 土地利用状況

隔離ほ場の周辺は工業団地として利用されている。また、工業団地の周辺は水田・畑・民家・道路・用水路として利用されている。

- (3) 周辺の環境保護区

隔離ほ場より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等）はない。また、最も近い自然保護地域は、水郷筑波国定公園（筑波地区）であり、隔離ほ場からの距離は約 2.5 km である。

- (4) 気象条件の平年値

- ① 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である下妻アメダス観測所（茨城県下妻市）における気象データの平年値を表 1 (p.8)に示す。
- ② 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である下妻アメダス観測所（茨城県下妻市）における過去 3 年分の気象データを表 2 (p.9)に示す。

- (5) 台風の襲来歴

- ① 平均値

隔離ほ場のある関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）への台風接近数の平均値は、3.1 個である（気象庁ホームページ気象統計情報、アクセス 2019 年 6 月 24 日）。

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>

② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近数

関東甲信地方に台風が接近し¹、かつ隔離ほ場の最寄りの観測地点（茨城県下妻アメダス観測所）において日ごとの最大風速が 15m/s を超えた回数²を隔離ほ場周辺への接近回数とした。過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近回数は、合計 9 回（2009 年 10 月、2011 年 9 月、2012 年 6 月、2012 年 9 月、2013 年 9 月、2016 年 8 月、2017 年 9 月、2018 年 9 月及び 10 月）であった。

(6) 過去 10 年間の隔離ほ場冠水の状況

隔離ほ場は 2012 年に完成して以来、冠水していない。なお、隔離ほ場が位置する工業団地内において、過去 10 年間にわたって冠水していない。

(7) 強風による被害の状況

防風網を設置していることから、強風による被害は受けにくく、過去に隔離ほ場で栽培した作物が強風により大きな被害を受けたことはない。

(8) ハザードマップ

筑西市が作成した洪水ハザードマップ（筑西市ホームページ；https://www.city.chikusei.lg.jp/data/doc/1545292117_doc_342_2.pdf）において、隔離ほ場周辺は浸水想定区域に指定されていない。また浸水実績区域内に位置していない。

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

鳥獣による農作物への被害が考えられるが、隔離ほ場にはフェンス及び試験区画には防鳥網を設置する。

7. 隔離ほ場周辺の生物相

(1) 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

なし

¹ 台風の中心が、茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）に接近した台風」とする。気象庁ホームページ気象統計情報ページより（閲覧日 2019 年 6 月 24 日）
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

² 台風の強風域の定義が平均風速 15m/s であることによる。
http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html

- (2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

ツルマメ (*Glycine soja*)

8. 栽培管理

- (1) 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴を表 3 (p.10)に示す。

- (2) 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合には、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

- (3) 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、直ちに隔離ほ場内にすき込む等の適切な手段で処分する。

- (4) 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

① 隔離ほ場の施設

- 1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- 2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 3) 隔離ほ場で使用した、機械、器具、靴等に付着した土、本組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該作物の隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- 4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置している。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。

② 隔離ほ場での作業要領

- 1) 本組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が隔離ほ場で生育することを最小限に抑える。
- 2) 本組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該作物が漏出しにくい構造の容器に入れる。
- 3) 2)により運搬又は保管をする場合を除き、本組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場で洗浄すること等により、

意図せず本組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

- 5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行う。
- 6) 1)から 5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 7) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。
- 8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

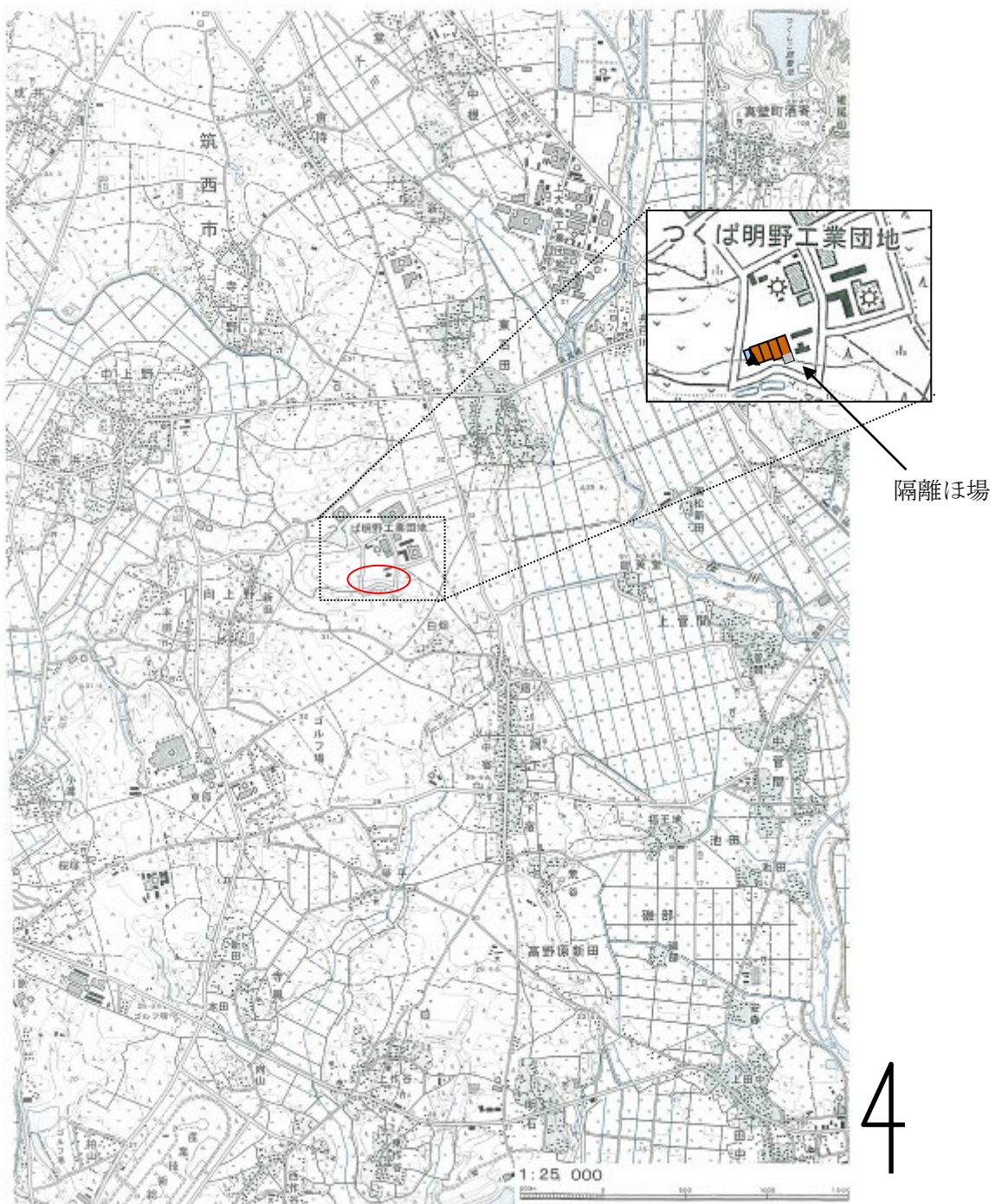


図 1 隔離ほ場所在地に関する地図

○: 隔離ほ場の所在地

「この地図は国土地理院長の承認を得て、同院発行の 2 万 5 千分の 1 地形図を複製したものである。(承認番号 平 23 情複、第 273 号)」



図 2 隔離ほ場の設備

①事務所兼実験棟、②洗い場、③入口、④隔離ほ場を示す標識

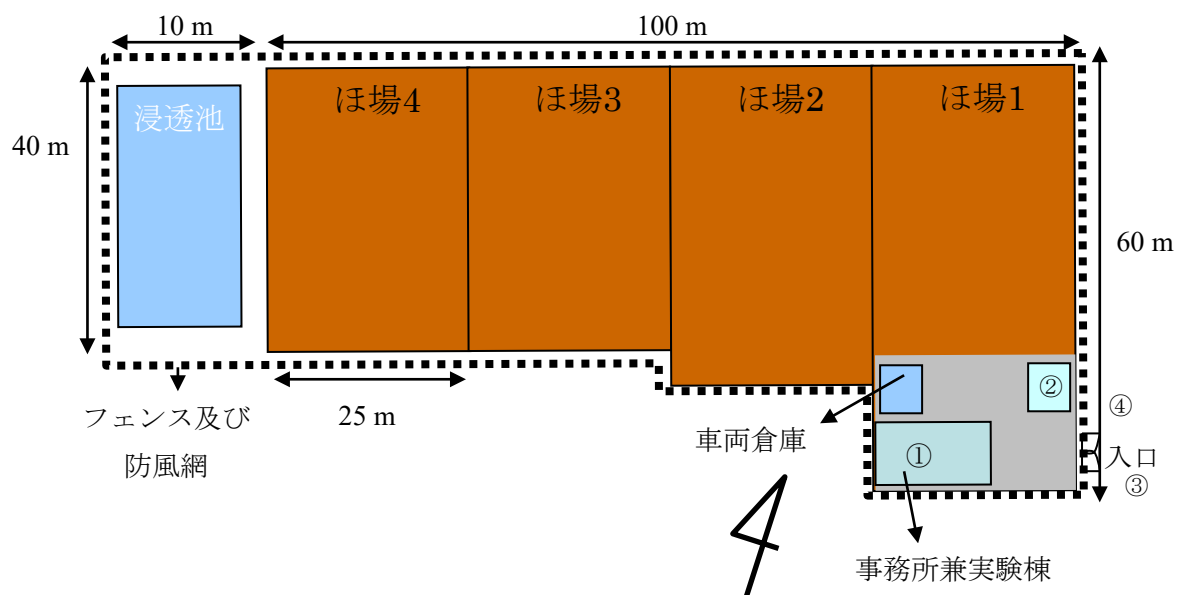


図 3 試験区の配置図

ほ場 1~4 のうち約 220m²を使用する予定である。

図中の①~④は図 2 の設備の位置を示す。

表 1 隔離ほ場周辺における気象データの平年値

(下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における気象データの平年値)

要素	降水量 (mm)	平均気温 (℃)	最高気温 (℃)	最低気温 (℃)	平均風速 (m/s)	日照時間 (時間)
統計期間	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010
資料年数	30	30	30	30	30	24
1 月	35.5	2.7	8.8	-2.7	2.0	190.0
2 月	44.9	3.6	9.5	-1.8	2.2	180.3
3 月	85.0	7.0	12.8	1.6	2.3	180.3
4 月	101.1	12.6	18.6	7.0	2.5	175.7
5 月	121.8	17.3	22.5	12.8	2.3	162.9
6 月	131.1	20.6	25.0	16.9	2.0	113.7
7 月	140.4	24.1	28.7	20.7	1.8	128.7
8 月	141.8	25.5	30.5	22.0	1.9	168.5
9 月	176.0	22.0	26.8	18.3	1.8	123.8
10 月	155.8	16.1	21.4	11.8	1.5	138.4
11 月	68.2	10.1	16.0	5.0	1.5	153.6
12 月	39.2	4.9	11.3	-0.5	1.7	182.1
年	1242.8	13.9	19.3	9.3	2.0	1901.6

* 気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード (アクセス:2018 年 10 月 24 日)

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&prec_ch=%88%E%8F%E9%8C%A7&block_no=0322&block_ch=%89%BA%8D%C8&year=&month=&day=&elm=normal&view

表 2 隔離ほ場周辺における過去 3 年分の気象データ

(下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における気象データ)

月	降水量(mm)				気温(℃)					風向・風速(m/s)					日照
	合計	日最大	最大		平均			最高	最低	平均 風速	最大風速		最大瞬間風速		時間 (h)
			1時間	10分間	日平均	日最高	日最低				風速	風速	風向	風速	
2018															
1	24.5	15.5	3.5	1	2.4	8.2	-3.6	14.8	-9.3	2.4	11.6	西北西	17.8	西	224.8
2	5	2	1	0.5	3.6	9.4	-2.3	14.8	-6.9	2.3	11.3	西	18.2	西	182.4
3	148	52.5	21	8.5	9.9	15.9	4.1	24.7	-1.1	2.5	13	西北西	19	西	207.1
4	103.5	70	14.5	5.5	15.6	21.7	9.6	29.6	2.9	2.8	13.6	南南西	20.6	南	202.6
5	137.5	31.5	17.5	11	18.8	24	14.2	28.7	7.7	2.5	9.5	南	13.3	南	198.9
6	84	29	8.5	4	21.7	25.9	18.2	32.6	14.4	2.6	11.1	南	16.5	南	175.9
7	102	44.5	16.5	9	27.3	31.9	23.7	36.3	19	2.6	11.7	南	19.5	南	220.2
8	90	44.5	41	23.5	26.7	31.9	22.8	37.1	14.9	2.6	11.6	南	17.7	南	202.9
9	250	39.5	15.5	13	22.1	26.6	18.7	33.2	12.5	2.3	15.7	南	25.3	南	82.8)
10	42.5	16	15.5	5	17.7	22.6	13.3	32.5	6.5	2	20	南	31.4	南	154.4
11	41	27.5	13	3.5	12.2	17.3	7.4	22.8	1.8	1.5	6.6	西北西	10.2	西北西	160
12	32	14	4	1	5.8	11.2	0.8	19.6	-5.7	2	10.6	西北西	16.7	西北西	164.5
2017															
1	13.5	6.5	1.5	0.5	3.4	9.7	-2.4	17.7	-6.6	2.4	10.9	西	18.1	西北西	233.7
2	13.5	7.0	2.5	1.0	5.0	10.8	-1.1	21.4	-5.3	3.1	13.4	西北西	20.5	西北西	221.2
3	66.0	24.5	4.0	1.5	7.0	12.4	1.1	17.5	-4.1	2.4	9.7	西	15.8	西	203.0
4	86.5	30.0	11.5	5.0	13.3	19.0	7.6	26.0	1.9	2.8	11.6	南	17.7	西北西	210.7
5	51.5	25.0	5.0	2.0	19.1	24.0	14.7	31.4	7.9	2.4	8.5	南	14.1	西北西	196.2
6	59.5	23.0	20.5	15.5	21.0	25.7	17.2	29.7	12.2	2.5	11.1	南南東	17.7	南東	176.6
7	163.5	67.5	28.5	8.5	26.3	30.7	22.9	33.3	20.9	2.2	7.3	南南東	12.3	北東	175.2
8	82.0	27.0	13.0	8.5	25.2	29.0	22.2	34.6	18.6	2.0	7.9	南南東	12.4	南東	84.8
9	148.0	40.0	37.5	18.0	21.8	26.6	18.0	32.7	14.1	2.1	15.9	南南東	23.5	南南東	145.5
10	346.5	97.5	12.5	4.0	16.0	20.0	12.6	28.2	4.7	2.3	14.1	西	22.6	西	111.6
11	23.5	18.0	4.0	1.0	9.6	15.3	4.2	21.8	-1.0	1.7	8.7	西	13.5	西南西	168.6
12	12.5	5.5	3.0	1.0	4.4	10.4	-1.2	16.1	-6.4	2.1	9.8	西北西	16.9	西北西	221.9
2016															
1	70.0	53.0	8.5	2.0	3.7	9.7	-2.0	15.6	-6.4	2.2	11.7	西	18.0	西	210.5
2	39.0	22.5	6.0	2.0	5.0	10.9	-0.4	21.2	-5.2	2.2	12.6	西北西	21.5	西北西	181.1
3	61.0	24.5	3.5	1.0	8.6	14.0	3.2	20.8	-4.2	2.4	11.8	西北西	18.3	西北西	170.2
4	100.0	37.5	7.5	2.5	14.1	19.3	9.1	25.2	1.3	3.0	15.6	南	22.9	南	153.1
5	61.0	21.0	5.0	2.0	19.1	24.3	14.2	30.3	9.7	2.9	14.7	南	21.6	南	202.6
6	87.0	42.0	6.0	2.0	21.8	25.7	18.3	31.3	10.6	2.4	8.3	南南東	13.6	南	148.0
7	72.5	31.5	24.0	7.0	24.4	28.5	21.2	33.5	18.4	2.0	7.8	南南東	13.7	東北東	149.3
8	256.0	95.0	26.0	9.5	26.1	30.7	22.7	35.3	18.8	2.5	15.4	西南西	24.2	西南西	186.2
9	145.0	33.5	19.0	10.5	23.4	27.2	20.6	32.8	17.3	2.0	7.2	南南東	11.4	北	98.9)
10	79.0	32.0	11.5	5.0	17.1	21.8	12.9	31.1	4.6	1.7	10.8	南	16.4	南	144.7
11	114.5	47.0	14.0	3.0	9.7	14.5	5.2	20.4	-3.4	1.8	11.1	西北西	18.4	北西	147.7
12	66.5	28.0	14.0	4.5	6.4	12.5	0.9	18.7	-3.3	2.2	9.9	西北西	16.5	西北西	207.2

* 表中の)は統計を行う対象資料が許容範囲でかけているものの、上位の統計を用いる際は一部の例外を除いて正常値(資料が欠けていない)と同等に扱うもの(準正常値)とする。必要な資料数は、要素または現象または統計方法により若干異なるが、全体数の 80%を基準としている。気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード(アクセス:2019 年 6 月 24 日)

2018 年 :

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&block_no=0322&year=2018&month=&day=&view=p1

2017 年 :

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&block_no=0322&year=2017&month=&day=&view=p1

2016 年

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&block_no=0322&year=2016&month=&day=&view=p1

表 3 隔離ほ場における過去 3 年間の栽培履歴

ほ場	作物	栽培期間(2018)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	遺伝子組換えナタネ												→
	非遺伝子組換えナタネ												→
No.2													
No.3													
No.4													

ほ場	作物	栽培期間(2017)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	遺伝子組換えワタ												→
	非遺伝子組換えワタ												→
No.2													
No.3													
No.4													

ほ場	作物	栽培期間(2016)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換えエンパク					→							
No.2	非遺伝子組換えナタネ												
	非遺伝子組換えワタ												
No.3	非遺伝子組換えエンパク					→							
No.4	非遺伝子組換えエンパク					→							

第 2 隔離場における生物多様性影響評価試験計画

【社外秘情報につき非開示】