

プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性ダイズ
(*H₉₀ PPO*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON94115, OECD UI: MON-94115-8)
申請書等の概要

目次

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
① 和名、英名及び学名	4
② 宿主の品種名又は系統名	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(2) 使用等の歴史及び現状	5
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	5
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ 基本的特性	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	7
ハ 捕食性又は寄生性	8
ニ 繁殖又は増殖の様式	8
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	8
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	8
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	8
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	13
ホ 病原性	13
ヘ 有害物質の産生性	13
ト その他の情報	13
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	14
(1) 供与核酸に関する情報	14
イ 構成及び構成要素の由来	14
ロ 構成要素の機能	15
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	15
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	22
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	23
(2) ベクターに関する情報	30
イ 名称及び由来	30
ロ 特性	30
① ベクターの塩基数及び塩基配列	30
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	30
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	30
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	30
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	30
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	31
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	31
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	31
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	31
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	31
(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	37
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	37
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	37
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	41
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件下での個体間及び世代間での発現の安定性	41
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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	43
(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	43
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	43
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	43
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	43
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	44
(1) 使用等の内容	44
(2) 使用等の方法	44
(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
(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	46
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	48
(3) 影響の生じやすさの評価	49
(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	49
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	49
(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	50
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	50
3 交雑性	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	50
(3) 影響の生じやすさの評価	50
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	52
4 その他の性質	52
第三 生物多様性影響の総合的評価	53
参考文献	55

緊急措置計画書	67
隔離ほ場試験計画書	69
モニタリング計画書	81
別添資料リスト	86

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

2025 年 7 月 9 日

農林水産大臣 殿

5 環境大臣 殿

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社

申請者 代表取締役社長 大島 美紀

10 住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、
15 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	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性ダイズ (<i>H_N90 PPO, Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON94115, OECD UI: MON-94115-8)
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：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名称：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場 使用期間：承認日から 2031 年 12 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入を防止するため、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、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。 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象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象のダイズを隔離ほ場内に鋤込む等により、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) までに掲げる事項について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。
--	---

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 宿主の品種名又は系統名

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域

20

ダイズは、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する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)。

25

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* が祖先種と考えられており (吉村ら, 2016)、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、我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 (吉村ら, 2016)。なお、ツルマメは、中国、朝鮮半島、台湾、ロシア及び我が国に分布しており (OECD, 2000)、我が国においては、北海道から九州南部まで分布し、河原の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地等、適度の攪乱にさらされる場所を主な生育地としている (吉村ら, 2016)。

35

(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 ダイズは、紀元前 17~11 世紀に中国東部で最初に栽培化されたと考えられて
10 おり (OECD, 2000)、これまでの推定では我が国には 1900~2000 年前に渡来
 したとされている (後藤, 2001)。他方、土器表面の圧痕の調査結果等から、縄
 文時代に、日本国内でのツルマメの栽培行為により栽培型の形態を備えたダ
 イズが生み出されたとする説もある (小畑, 2009; 小畑, 2010; 中山, 2015)。この
 考古学から得られた知見は、ダイズとツルマメの単純反復配列 (simple
 sequence repeat。以下「SSR」という。) マーカー (Kuroda et al., 2009) 及び葉緑
 体 DNA の SSR における遺伝子型のパターン (Xu et al., 2002) から読みとれる
 ダイズの起源に関する考察と矛盾のないものである。

15 西洋におけるダイズ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、ブラジル等南米大陸での栽培が増加した (鄭, 2008)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

20

a 主たる栽培地域

 我が国において、ダイズは全国的に栽培可能であるが、主に北海道、東北
 及び九州で栽培されており、2023 年における栽培面積は約 15 万 ha である
 (FAO, 2025)。また、2023 年における世界総栽培面積は約 1 億 3,690 万 ha であ
25 り、世界的にはブラジル (約 4,445 万 ha)、米国 (約 3,335 万 ha)、アルゼンチン
 (約 1,436 万 ha)、インド (約 1,308 万 ha) 等を中心に、広い範囲で栽培されてい
 る (FAO, 2025)。

b 栽培方法

30 我が国のダイズ栽培における播種適期は、地域や品種によって異なり、北
 海道・東北では 5 月下旬、関東・北陸・近畿では 6 月上旬、中国・四国・九
 州では 6 月下旬から 7 月上旬である。播種深度は 3~5 cm がよく、播種量は畝
 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 本程度確保できればよい。播種前の耕うんと播種と同時に除草
35 剤を散布することで大部分の雑草を抑制できるが、中耕作業を 2 回程度行う
 ことは効果的である。中耕は除草のほか、土壌物理性の改善効果もある。ま

た、不定根発生の促進や倒伏防止のために中耕と同時に培土 (土寄せ) することが必要である。害虫や病害を発見した場合は、早めに適切な薬剤を散布し防除することが必要である (鄭, 2008)。収穫に際して、作付けが小面積の場合は、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。大面積の場合は、機械による収穫が一般的であり、ビーンハーベスタ又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)。

c 流通実態及び用途

ダイズの 2023 年における世界総生産量は約 3 億 7,117 万トンであり、主な生産国はブラジル (約 1 億 5,214 万トン)、米国 (約 1 億 1,334 万トン)、アルゼンチン (約 2,504 万トン) 及び中国 (約 1,949 万トン) である。一方、我が国における 2023 年の生産量は約 26 万トンである (FAO, 2025)。我が国は 2024 年に約 317 万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の 65.7%にあたる約 208 万トンが米国からの輸入である (財務省, 2025)。

ダイズは、世界的にみればその 9 割以上が食用油と家畜の飼料として利用されている。しかし、我が国も含めアジアでは古くから食品素材として盛んに利用されている。主な加工利用法は、豆腐、醤油、納豆、味噌、煮豆、炒り豆、きなこ、もやし等である。また、工業分野では、インク (ソイインク) や接着剤として広く利用されている (鄭, 2008)。脱脂ダイズから糖類等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)。一般に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、我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、袋又は箱詰めされる。

(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)。ダイズの茎は、主茎と分枝とに分けられる。主茎の第 5 複葉が伸長するころ、第 1 複葉の葉腋から分枝の葉が現われ、 n 葉と $(n-4)$ 葉節の分枝とが同時に発生する。発芽後 2~3 週間すると、根に根粒が見え始める。これは、根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の寄生による。根粒菌は、播種後 20~30 日には空中窒素の固定を始める (後藤, 2001)。雌ずいは 1 本で、

その基部に子房があり 1~5 個の胚珠を内蔵している。莢は子房の心皮に由来し、莢に含まれる子実の数は 1~3 個が普通で、稀に 5 粒のものがある (後藤, 2001)。また、ダイズの花芽分化に最も大きく影響する環境要因は日長と温度である。花芽分化には、ある時間以上の暗期と 15°C 以上の温度が必要であり、このうち温度は、25°C 前後までは高いほど促進的に働く。加えて、花芽分化に対する日長と温度の影響は、両者の組合せによって異なり、短日条件では、高温による促進程度は大きい、長日条件では、高温による促進効果はないか、かえって遅れることがある (昆野, 2001a)。

ダイズは、開放花と閉鎖花という 2 つの異なる形態の花を同一個体がつける。開花して結実に至る開放花は、潜在的に他殖と自殖の両方を行うことが可能であるが (宮下ら, 1999)、ダイズでは通常開花前に開葯し同花受粉を行なうことが知られている (阿部・島本, 2001)。他方、閉鎖花は、開花することなく蕾の中で同花受粉による自殖のみ行う (宮下ら, 1999)。花は主茎、分枝の各葉腋に着生する (鄭, 2008)。開放花は、基部ががくに包まれ、1 枚の旗弁、2 枚の翼弁及び 2 枚の竜骨弁からなる。雌ずいと雄ずいは、いずれも竜骨弁に包まれ露出しない (鄭, 2008)。開放花は午前中に開花し、花粉は、開花直前に葯から放たれ自家受粉する。開花・受精の 7 日 (早生品種) ~14 日 (晩生品種) 目頃から莢が伸長し始め、約 10 日間で最大 (長さ 4~6 cm) に達する (鄭, 2008)。その後、子実の肥大が急速に生じ、30~45 日目には子実の乾物重が最大に達する (鄭, 2008)。種子の百粒重は、特殊なものを除き 10~50 g の範囲である (国分, 2002)。

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°C であり (後藤, 2001)、土壌温度が 10°C 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°C 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, 2001b)。ダイズ栽培に適する土壌は、pH5.5~6.5、排水及び通気のよい埴土又は壤土である。ダイズでは乾物 1 g を生産するのに必要な水の量は約 600 g であり、特に乾物蓄積が最も多い開花期から約 1 か月後までの間は最も水分を必要とする (鄭, 2008)。また、ダイズは霜に対して耐性がなく、冬季の氷点下になるような条件では生き残ることができない。ダイズの種子が休眠性を示すことはほとんどなく、雑草としての特性はない (OECD, 2000)。

なお、ダイズは短日条件でより早く開花するため、栽培品種の適地を決定する際には、光周性及び温度応答が重要である。ダイズの栽培品種は、緯度

と日照時間によって決定され、北米には、北部(北緯 45 度)の成熟群 (Maturity Group。以下「MG」という。) 000 から赤道付近の MG X まで、13 の MG がある (OECD, 2000)。ダイズの栽培適地は、生育期間中やや高温、多照、かつ適湿であることが望ましいとされているが、品種改良がすすむにつれて栽培地域は拡大してきている (後藤, 2001)。

なお、我が国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されていない。

ハ 捕食性又は寄生性

—

二 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

ダイズは、1 個体で最大 400 の莢を形成し、各節の莢数は 2~20 である。各莢には 1~5 個の種子が入っている (OECD, 2000)。ダイズは、成熟期を過ぎると莢が乾燥して裂開し、種子が地表に落下する。裂莢性には品種間差があり、一般的に米国の無限伸育性品種は裂莢しにくい (大庭, 2001)。ダイズの育成品種では種子休眠性はほとんどみられない (OECD, 2000)。また、種子は、常温で貯蔵した場合に通常約 3 年で発芽力を失う (昆野, 2001c)。

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、種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、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を有さない。

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

a 自殖性、他殖性の程度

ダイズは、開放花と閉鎖花という 2 つの異なる形態の花を同一個体にもつことが知られているが (宮下ら, 1999)、一般的に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、全 167 株中 56 株 (33.5%) では交雑が確認されず、交雑が確認された 111 株での交雑率は 0.65~6.32%、平均で 1.8%であった (Ray et al., 2003)。

b 自家不和合性の有無

自家不和合性は知られていない。

c 近縁野生種との交雑性の程度

・近縁野生種について

ダイズの近縁野生種としてはツルマメがある。ツルマメは、中国、朝鮮半島、台湾、ロシア及び我が国に分布する匍匐性又はツル性の一年生植物である (OECD, 2000)。一般に日当たりの良い野原、路傍、荒地、河原等に生息するほか、果樹園や畑地にも広がり (奥田, 1997)、河原の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺、荒地等、適度の攪乱にさらされる場所を主な生息地とし、水田の畔や道路法面等にも個体群が観られる (吉村ら, 2016)。ヨモギ (*Artemisia indica*)、ススキ (*Miscanthus sinensis*)、ヨシ (*Phragmites australis*)、セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) 等の丈の高い植物に絡み付いて生育する個体や、カナムグラ (*Humulus scandens*)、ヤエムグラ (*Galium spurium* var. *echinospermon*) 等のツル性植物とともに生育する個体のほか、地面を匍匐しながら生育する個体も見られる (吉村ら, 2016)。

ツルマメは、ダイズと同様に開放花と閉鎖花をつけ (宮下ら, 1999)、また、開放花においても、通常開花前に開葯し受粉が完了する上に、開花期の後半はほとんどの花が開花せず自家受粉する (阿部・島本, 2001)。北海道鵲川流域及び秋田県雄物川流域で採集したツルマメ種子を栽培した結果、花の総数に占める開放花の割合は、前者が約 3%、後者が 1%以下と低かったと報告されている (宮下ら, 1999)。開花・受粉形態から、ツルマメは、典型的な自殖性植物であると考えられている。ツルマメ集団内における自然交雑率は、平均 2.2%であったことが報告されている (Kuroda et al., 2008) 一方、秋田県雄物川沿いのツルマメ集団では、自然交雑率が平均 13%と比較的高いものであったことが報告されている。この雄物川沿いの地域は護岸工事や人為的介入がほとんどなされておらず、ツルマメ集団の規模が大きく、訪花昆虫であるミツバチやクマバチが頻繁に観察されていた (Fujita et al., 1997)。このように、ツルマメ集団の規模が大きく、多数の開放花が同時期に開花する場合は、多くの訪花昆虫を誘引し、その結果、開放花における自然交雑の頻度が高くなる

可能性がある。

・ダイズとツルマメとの交雑について

ダイズとツルマメは、染色体数 ($2n=40$) が同じであり、交雑が可能である (OECD, 2000)。一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、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%、平均で 0.73%であった (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、除草剤耐性が付与された晩生の遺伝子組換えダイズ (以下「組換えダイズ」という。) を、開花ピークを近づけ、ツルマメが巻きついた状態で栽培した結果、交雑率は 0.136% (調査 25,741 個体中雑種 35 個体) であった一方、組換えダイズとツルマメの距離を離して栽培した場合、2、4、6 m の距離での交雑率はそれぞれ 0.013% (調査 7,521 個体、7,485 個体、7,508 個体中それぞれ雑種 1 個体) であり、8、10 m の距離では交雑種子は認められなかった (Mizuguti et al., 2010)。このようにダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こりうるが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

また、ダイズとツルマメの雑種形成については、我が国の自然環境下において調査が行われている。

2003 年に行われた調査では、ダイズとツルマメの雑種後代によくみられる形態的「中間体」を広島県 8 地点、秋田県 9 地点のツルマメ自生地において探索し、秋田県の 1 地点で 1 個体の中間体が発見された (加賀ら, 2005)。

2004 年には、秋田県、茨城県、愛知県、広島県及び佐賀県の合計 57 地点のツルマメ自生地 (ダイズ栽培ほ場の周辺) で調査が行われ、佐賀県 (調査地点数 33) の 3 地点から、11 個体の中間体が発見された一方、2003 年の調査で中間体が発見された地点からは、中間体は発見されなかった。この結果から、自生地における中間体の頻度は栽培実験の値よりも明らかに少ないとされている (黒田ら, 2005)。

2005 年に行われた秋田県、茨城県、高知県及び佐賀県の合計 39 地点のツルマメ自生地における調査では、2004 年にダイズが栽培されていたほ場と隣接する 14 地点を含め全地点で新たなダイズ中間体は発見されなかったことから、ダイズとツルマメの自然交雑率は非常に低いことが示唆されたとされている (黒田ら, 2006)。

2006年には、秋田県、兵庫県及び佐賀県の40地点で調査が行われた結果、佐賀県の2地点でそれぞれ1個体ずつ中間体が発見されたのみであった(黒田ら, 2007)。これらの結果から、ダイズとツルマメの雑種形成はツルマメの自生地で起きているものの、その頻度は低いと考えられた。

5

さらに、我が国では、1996年以降、約30年間組換え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~2023年)のダイズ輸入実績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、組換え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, 2018a; 農林水産省, 2018b; 農林水産省, 2020; 農林水産省, 2021; 農林水産省, 2022a; 農林水産省, 2022b; 農林水産省, 2023; 農林水産省, 2024)。また、我が国と同様に、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、交雑により除草剤グリホサート耐性を獲得した組換え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)。

10

15

20

・ダイズからツルマメへの遺伝子浸透について

ダイズからツルマメへの遺伝子浸透については、我が国の自然環境下において調査が行われている。

2004年に、2003年にダイズとツルマメの形態的中間体が発見された秋田県のツルマメ自生地1地点で調査が行われたところ、中間体の後代は発見されなかった(黒田ら, 2005)。

25

2005年には、2003年に中間体が発見された秋田県1地点及び2004年に中間体が発見された佐賀県3地点の計4地点で調査が行われたところ、中間体の後代の生存が確認されたのは佐賀県1地点の1個体のみであった(黒田ら, 2006)。

30

2006年にも、2005年と同じ4地点で調査が行われたところ、2004年及び2005年に中間体及びその後代が発見された佐賀県の地点では、3年連続して中間体が発見することはできず、発見された中間体は、佐賀県の上記と異なる1地点の1個体のみであった(黒田ら, 2007)。このことから、黒田ら(2007)は、中間体がツルマメ自生地で生存する確率は非常に低いことが示唆されたとしている。

35

また、2003~2006年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、より透水性の高い種皮を有することに伴い冬期に種子が腐敗した、冬期に発芽し枯死した、春期に発芽したものの他の個体との競合に勝てず成熟期まで生存できなかった等、中間体の後代の適応度がツルマメより低かったことに伴う自然淘汰を受けた可能性が高いとされている (Kuroda et al., 2010)。

実際に、ダイズとツルマメを人工交配して得た F₃ 雑種について、親系統のツルマメとともに播種した後の定着状況を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統の定着率は、親の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)。加えて、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たことが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004)。

また、国内産ツルマメをダイズ品種「フクユタカ」又は「リュウホウ」と人工交配して得た F₁ 雑種を国内で管理栽培し、その種子生産数及び種子の越冬率 (冬期を通じて土中に埋めた種子の発芽率及び休眠種子の割合) を親のツルマメと比較した結果、F₁ 雑種の種子生産数はツルマメと同等又はそれよりも少なく、種子の越冬率はツルマメより低かったことが報告されている (Kuroda et al., 2013)。その中で、栽培化に関連した形質である種子生産数や種子の越冬率に関する量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus。以下「QTL」という。) がダイズとツルマメの雑種後代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、雑種後代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されている (Kuroda et al., 2013)。

広島県産ツルマメとフクユタカとの F₁ 雑種から得られた F₂ 雑種において、個体当たりの種子生産数及び種子の越冬率に関し、それぞれ 2 つ及び 3 つの QTL の情報が得られるとともに、それらの QTL が及ぼす遺伝の相加及び優性成分の総和として、種子の生産数と越冬率に対して負の影響を及ぼすことが明らかになった。よって、ダイズとツルマメの雑種及び後代は、上記の 2 形質において雑種弱勢の状態にあり、組換えダイズの導入遺伝子が、交雑によってツルマメ集団内に拡がることはないと予測された。本予測は、後代における完全自殖又は 10% の他殖率を仮定したシミュレーションによっても支持されている (Kitamoto et al., 2012)。

また、2003 年から 2006 年に秋田県の 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り生じたものと判断された一方、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、我が国の自然環境下において更なる遺伝

子浸透が起こることはほとんどないと考察されている (Kuroda et al., 2010)。

d アポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

5 ダイズがアポミクシスを生ずる特性を有するという報告は確認されていない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 雄ずいは 10 本あり、うち 1 本が離れており、それぞれが葯をもっている
(後藤, 2001)。1 葯当たりの花粉数は 374~760 粒 (Palmer et al., 1978)、約 230~540
粒 (Koti et al., 2004) との報告がある。ダイズの花粉には粘着性があり
(Yoshimura, 2011)、花粉の寿命は短く、その発芽能力は湿度によらず 8 時間で
15 ほぼ失われることが報告されている (Abel, 1970)。花粉の直径は、21~30 μm
である (Carlson and Lersten, 2004)。また、花粉の飛散距離に関しては、花粉採
集器を用いた開花期 19 日間の観測の結果、1 日 1 cm^2 当たりの花粉密度の最
大値は、ほ場から 1.0 m 及び 2.5 m 離れた地点で 1.235 粒であり、5 m の地点
で 0.617 粒、10 m 及び 20 m の地点ではいずれも 0.309 粒であったことから、
ほ場内及び周囲への花粉の飛散はほとんどないと報告されている (Yoshimura,
20 2011)。また、訪花する昆虫の種類は、アザミウマ類が最も頻度が高く、次い
でそれらを捕食するカメムシ目の昆虫が観察されたと報告されている
(Yoshimura et al., 2006)。

ホ 病原性

25 —

へ 有害物質の産生性

30 ダイズには、自然条件下で周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及
ぼすような有害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

35 —

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

バイエルグループは、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性が付与されたダイズ (*H_N90 PPO*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON94115, OECD UI: MON-94115-8) (以下「本組換えダイズ」という。) を作出した。

本組換えダイズには、*Enterobacter cloacae* 由来の *H_N90 PPO* 遺伝子が導入されており、*H_N90 PPO* 遺伝子から発現するプロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (以下「PPO」という。) により、PPO 阻害型除草剤に対する耐性が付与されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えダイズの作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を図 1 (p16) 及び表 1 (p17~21) に示した。

本組換えダイズには細菌の一種である *E. cloacae* 由来の *H_N90 PPO* 遺伝子が導入されており、PPO 蛋白質が発現する。

本組換えダイズにおいて発現する PPO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。本組換えダイズにおいて、PPO 蛋白質は N 末端側に *apg6* 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドが付加された前駆蛋白質として産生される。前駆蛋白質は葉緑体に運ばれた後、プロセッシングにより葉緑体輸送ペプチドの大部分が切り離されるが、3 アミノ酸が切り離されずに PPO 蛋白質の N 末端に残存する。このため、本組換えダイズで発現する PPO 蛋白質は、葉緑体輸送ペプチドに由来する 3 アミノ酸を含む 181 アミノ酸からなる (別添資料 1)。なお、本組換えダイズで発現する PPO 蛋白質のうち、葉緑体輸送ペプチドに由来する 3 アミノ酸を除いた 178 アミノ酸の配列は、野生型 PPO 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

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与核酸の構成要素それぞれの機能

5

本組換えダイズの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能を表 1 (p17~21) に示した。

10

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMHT533023 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
その他	
B¹-Left Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<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左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
loxP	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
addA遺伝子発現カセット	
P²-Act7-At1	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>Act7</i> 遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (McDowell et al., 1996)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS³-CTP2	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) 蛋白質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子のうちのターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。葉緑体輸送ペプチドをコードしており、目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
aadA	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-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。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T⁴-nos	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来のノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている <i>nos</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
その他	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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-GMHT533023 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
<i>cre</i> 遺伝子発現カセット	
P-<i>RSP1-Gm1</i>	ダイズ (<i>Glycine max</i>) 由来のストレス誘導耐性遺伝子の BURP ファミリー (Xu et al., 2010; Ye et al., 2023) に関連する <i>Resistance Sensitive Protein-1 (RSP1)</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列で、植物の生殖細胞における転写を誘導する。
CS⁵-<i>cre1</i>	バクテリオファージ P1 由来の Cre リコンビナーゼ遺伝子の第 1 エキシソンの部分配列 (Zhang et al., 2003)。
I⁶-<i>LS1</i>	ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) 由来の <i>LS1</i> 遺伝子 (<i>light inducible gene</i>) の第 2 インترون配列であり、目的遺伝子の発現制御に関わる (Rose, 2008)。
CS-<i>cre</i>	バクテリオファージ P1 由来の Cre リコンビナーゼ遺伝子の第 2 エキシソンの部分配列 (Zhang et al., 2003)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-<i>CDC45-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の <i>cell division cycle 45 (CDC45)</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Stevens et al., 2004; Ye et al., 2023)。
その他	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>Cpf1</i> 遺伝子*発現カセット	
P-<i>ubq-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) 由来の推定ユビキチン遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン配列で (GenBank Accession: PP262578)、恒常的な転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS-NLS-<i>Sl1</i>	トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) 由来の熱ストレス転写因子 HSF1 の核局在シグナル (NLS) で、蛋白質を核へ輸送する (Lyck et al., 1997)。

* *Cpf1* 遺伝子は、図 1 及び本表を除き、評価書中では *Cas12a* 遺伝子と記載している。

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMHT533023 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
CS-Cpf1-Lb1	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006株由来のクラスII、タイプV CRISPR/CasシステムRNA誘導エンドヌクレアーゼ (Cpf1エンドヌクレアーゼ) のコード配列で、標的ゲノム位置でDNA切断を誘導する (Begemann et al., 2017)。
TS-NLS-S11	トマト (<i>S. lycopersicum</i>) 由来の熱ストレス転写因子 HSFA1の核局在シグナル (NLS) で、蛋白質を核へ輸送する (Lyck et al., 1997)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-guf-Mt1	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の機能未知遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931406)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
その他	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>crRNA(Gm1)-I</i> **発現カセット	
P-U6-Gm1	ダイズ (<i>G. max</i>) 由来の推定 U6 遺伝子 (Sun et al., 2015) のプロモーターで、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>crRNA(Gm)-1</i>	CRISPR RNA (crRNA) 分子をコードする配列で、ステムループ構造を形成する直列反復配列と、Cpf1 エンドヌクレアーゼに結合して誘導するダイズ (<i>G. max</i>) 由来の遺伝子間スペーサー配列で構成されている (Safari et al., 2019)。 <i>crRNA(Gm)-1</i> は、ガイド RNA (gRNA) として機能する。
その他	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。

** *crRNA(Gm)-I* は、図 1 及び本表を除き、評価書中では *gRNA* と記載している。

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMHT533023 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
<i>H_N90 PPO</i> 遺伝子発現カセット	
P-<i>ubq-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) 由来の推定ユビキチン遺伝子の推定プロモーター、リーダー及びイントロン配列で (GenBank Accession: PP262578)、恒常的な転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS-<i>apg6-Ad1</i>	バオバブ (<i>Adansonia digitata</i>) 由来の輸送ペプチドをコードしている <i>apg6</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: PP262581) で、目的蛋白質を葉緑体へと輸送する (von Heijne, 1990)。
CS-<i>H_N90 PPO</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> 由来のプロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) のコード配列で、PPO 阻害型除草剤耐性を付与する (Larue et al., 2020)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-<i>GST314</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来の複数の3'末端非翻訳領域の配列を基に作製された3'末端非翻訳領域 (GenBank Accession: PP262580) (To et al., 2021)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
その他	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
ベクターバックボーン (本組換えダイズには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-<i>aadA-Ec1</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-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3'末端非翻訳領域の配列で (Fling et al., 1985)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。

表1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMHT533023 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
CS-<i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする neo 遺伝子のコード配列 (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>	<i>R. radiobacter</i> (<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)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR⁷-ori-pBR322	プラスミド pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR-ori-pRi	プラスミド pRi に由来する複製開始領域。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye et al., 2011)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

¹ B-Border (境界配列)

² P-Promoter (プロモーター)

5 ³ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

⁴ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)

⁶ I-Intron (イントロン)

⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

10 * T-DNA 領域のうち、*aadA* 遺伝子発現カセット (P-*Act7-At1*、TS-*CTP2*、*aadA*、T-*nos*)、*cre* 遺伝子発現カセット (P-*RSPI-Gm1*、CS-*cre1*、I-*LS1*、CS-*cre*、T-*CDC45-At1*)、*Cpf1* 遺伝子発現カセット (P-*ubq-Mt1*、TS-*NLS-S11*、CS-*Cpf1-Lb1*、TS-*NLS-S11*、T-*guf-Mt1*) 及び *crRNA(Gm)-I* 発現カセット (P-*U6-Gm1*、*crRNA(Gm)-I*) 並びに *loxP* 配列の 1 つは、Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法により除去されるため、本組換えダイズには存在しない。なお、本組換えダイズに存在する構成要素のみを別添資料 5 の Appendix Table 15 2 (p40~41) に示している。

- 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 PPO 蛋白質は、原核生物及び真核生物において保存されており、ヘムやクロロフィル等の環状テトラピロールの生成における酵素反応段階であるプロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酸化を触媒する (図 2, p23)。植物において、PPO 蛋白質は PPO 阻害型除草剤の標的であり、活性部位に PPO 阻害型除草剤が結合することが報告されている (Koch et al., 2004; 10 Corradi et al., 2006)。PPO 阻害型除草剤を感受性植物に散布すると、色素体内でのヘム及びクロロフィルの生合成経路におけるプロトポルフィリノーゲン IX の酸化が阻害され (図 2, p23)、プロトポルフィリノーゲン IX が蓄積し、色素体から漏出する。細胞質ゾルでプロトポルフィリノーゲン IX はプロトポルフィリン IX に非特異的に酸化され、酸素と光の存在下で急速に活性酸素種を 15 生成する。その結果、制御不能な細胞膜脂質の過酸化が生じ、細胞膜の完全性が喪失し膜崩壊が発生することで細胞死が引き起こされ、最終的に植物は死に至る (Dayan and Duke, 2010)。

PPO 蛋白質には HemY 型や HemG 型が存在し、これらは相同蛋白質ではないが同一の機能を有する (O'Brian, 2009)。HemY 型 PPO 蛋白質は真核生物及び 20 原核生物に遍在し、陸生植物において PPO 阻害型除草剤の標的である。HemY 型 PPO 蛋白質は、膜結合二量体を形成する酸素依存性の酵素であり、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補因子とする。一部の細菌は HemY 型 PPO 蛋白質をもたず、その代わり HemG 型 PPO 蛋白質を有している。HemG 型 PPO 蛋白質は、膜結合オリゴマーを形成する酸素非依存性の酵素であり、 25 非共有的に結合したフラビンモノヌクレオチド (FMN) を補因子とする (Boynton et al., 2009; Wang et al., 2024)。本組換えダイズに導入されている *E. cloacae* 由来の *H_N90* PPO 遺伝子から発現する PPO 蛋白質は HemG 型 PPO 蛋白質であり、PPO 阻害型除草剤に対する耐性が調査された結果、PPO 阻害型除草剤の存在下でも継続的に作用し、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酵素的酸化が維持されることが明らかにされている (Larue et al., 2020) (図 2, p23)。実際に、同蛋白質を発現する遺伝子組換えワタ、トウモロコシ、ダイズ及びセイヨウナタネは、いずれも PPO 阻害型除草剤に対する耐性を示すことが報告されている (Larue et al., 2020)。このように、 *H_N90* PPO 遺伝子から発現する PPO 蛋白質は、PPO 阻害型除草剤の存在下において、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酸化を触媒することによって、本組換えダイズに PPO 阻害型除草剤耐性を付与している。 35

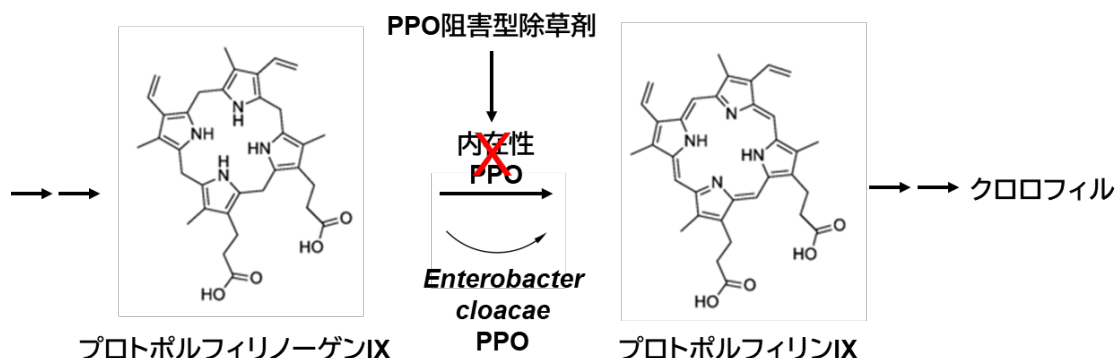


図2 本組換えダイズのクロロフィル生合成経路における *E. cloacae* 由来の PPO 蛋白質の作用機序³

5

なお、PPO 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どうかを判断するため、AD_2024⁴に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

10

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

15

本組換えダイズは、*E. cloacae* 由来の *H_N90 PPO* 遺伝子から HemG 型 PPO 蛋白質を発現する。上述のとおり、HemY 型及び HemG 型 PPO 蛋白質は、いずれもヘム及びクロロフィル生合成経路においてプロトポルフィリノーゲン IX を基質とするが (O'Brian, 2009)、PPO 阻害型除草剤に対する感受性において差を有している。実際に、*H_N90 PPO* 遺伝子から発現する HemG 型 PPO 蛋白質は、HemY 型 PPO 蛋白質とは対照的に PPO 阻害型除草剤に対して顕著な非感受性を示す一方で、プロトポルフィリノーゲン IX に対して HemY 型 PPO 蛋白質と同様の *K_m* 値を示すことが明らかにされている (Larue et al., 2020)。

20

PPO 蛋白質は、ヘム及びクロロフィル生合成経路の律速酵素として知られておらず、同経路の制御においては、最終産物であるヘム及びクロロフィルによってフィードバック阻害を受けるグルタミル tRNA レダクターゼ (GluTR,

³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

⁴AD_2024: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,748件のアミノ酸配列が含まれる (2024年2月2日更新)。

Glutamyl t-RNA Reductase) が重要とされている (Tanaka and Tanaka, 2007) (図 3, p25)。実際に、同経路におけるアミノレブリン酸 (ALA) 合成以降の中間体は、いずれも過剰に蓄積した場合、光の下で植物体にとって潜在的に有害な活性酸素種を生成するおそれがあるため、GluTR のフィードバック阻害により

5 ALA 合成を制御する生理的な利点は大きいとされている (Tanaka and Tanaka, 2007)。さらに、本経路に関与する遺伝子の発現誘導によって、クロロフィルや中間体の過剰蓄積を引き起こした事例はこれまでに報告されていない (Tanaka and Tanaka, 2007)。これらのことから、本組換えダイズにおいて内在性の HemY 型 PPO 蛋白質に加えて HemG 型 PPO 蛋白質が発現することで、本経

10 路の最終産物であるヘム及びクロロフィルの濃度が従来ダイズにおける変動の範囲を超えて高まることは想定し難い。

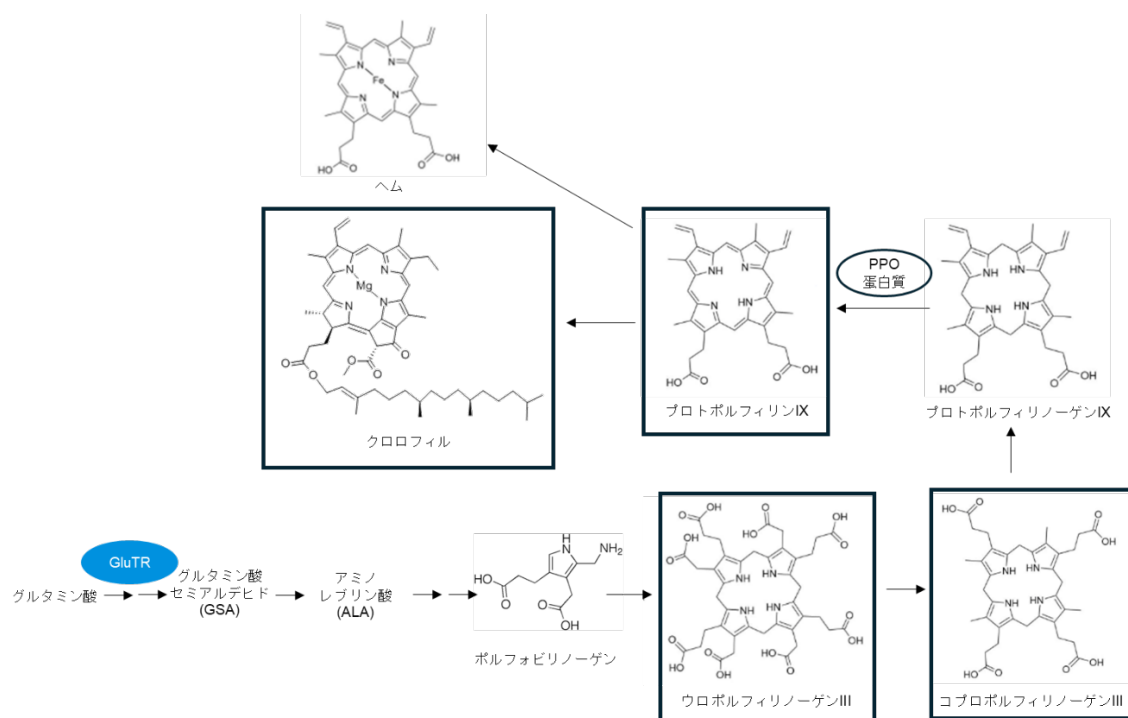


図3 ヘム及びクロロフィル生合成経路⁵

- 5 四角で囲まれた化合物のうち、クロロフィルはそれ自体が、クロロフィル以外の 3 化合物はその誘導体が植物代謝産物データベースに対する *in silico* スクリーニングにより同定された (詳細は本文を参照)。本経路の制御においては、最終産物であるヘム及びクロロフィルによってフィードバック阻害を受ける GluTR (グルタミル tRNA レダクターゼ、図内に青円で示す。) が重要であるとされている (Tanaka and Tanaka, 2007)。
- 10 蛋白質は、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酸化を触媒する。

⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- HemG 型 PPO 蛋白質は、HemY 型 PPO 蛋白質と同様に、ポルフィリノーゲン化合物であるプロトポルフィリノーゲン IX を、補因子の助けにより環状テトラピロール構造をエナミンからイミンへ互変異性化することで、ポルフィリン化合物であるプロトポルフィリン IX へと酸化する (Koch et al., 2004; Boynton et al., 2009)。また、HemG 型 PPO 蛋白質については、これまでに精製蛋白質を用いた酵素活性試験により、プロトポルフィリノーゲン IX、コプロポルフィリノーゲン III 及びその類縁体メソポルフィリノーゲンの 3 種類のポルフィリノーゲン化合物のうち、プロトポルフィリノーゲン IX にのみ活性を示し、コプロポルフィリノーゲン III 及びメソポルフィリノーゲンに対しては活性を示さないことが報告されている (Boynton et al., 2009)。このことから、ヘム及びクロフィル生合成経路において、HemG 型 PPO 蛋白質は、プロトポルフィリノーゲン IX に特異的な活性を有することが示唆される。
- HemG 型 PPO 蛋白質の潜在的基質となりうる、プロトポルフィリノーゲン IX と類似したダイズ内在性化合物の有無を確認するために、ダイズ内在性化合物を含む植物代謝産物データベース⁶中の全化合物 (155,000 超) を対象に、化合物間の類似性の尺度である Tanimoto スコア⁷を算出することにより、プロトポルフィリノーゲン IX と分子的類似性の高い化合物の *in silico* スクリーニングを実施した。その結果、データベース中の全化合物のうち、最も Tanimoto スコアが高い化合物のスコアは 0.47 であり、プロトポルフィリノーゲン IX とスコア 0.85 を超える分子的類似性を示す化合物は同定されなかった (表 2, p27; 図 4, p28)。

⁶ トウモロコシ、ナタネ、ワタ、コムギ、ダイズを含む様々な生物学的資源に由来する天然物のデータベース NAPRALERT (<https://pharmacognosy.pharmacy.uic.edu/napralert/>) から、潜在的な基質となりうる植物内在性化合物を選定した。

⁷ Tanimoto スコアは、2種類の化合物間の分子的類似性を 0~1 で表す尺度である。化合物 A と化合物 B 間の Tanimoto スコアは、化合物 A と化合物 B のフィンガープリント (化合物内の特定の部分構造や構造的特徴の有無を 0 又は 1 で表現したもの) の積集合の要素数を、和集合の要素数で割ることで算出する。本解析では、フィンガープリントとして化合物内の原子の種類、結合の種類、原子間距離を考慮したアトムペアフィンガープリントを用いて Tanimoto スコアを算出した。Tanimoto スコアが 0.85 より大きければ、2種類の化合物が類似である確率が高いことを示す (Patterson et al., 1996)。

表2 プロトポルフィリノーゲン IX と Tanimoto スコア 0.2 以上の分子的類似性を示した植物代謝産物データベース中の化合物とそのスコア⁸

Compound ID	IUPAC 名又は慣用名	Tanimoto スコア
169785	イソコプロポルフィリン	0.47
11103	ヘマトポルフィリン	0.44
96772	コプロポルフィリン I	0.35
72424	ウロポルフィリン	0.26
6433192	クロロフィル	0.24
15086398	カンナビシン A	0.23
3085061	6-メトキシゴッシポール	0.22
3503	ゴッシポール	0.22
44144519	diethyl [(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-[2-(methoxymethoxy)-5-prop-2-enylphenyl]-2-methyl-5-prop-1-en-2-ylcyclohexen-1-yl] phosphate	0.22
375713	6,6'-メトキシゴッシポール	0.21
25202994	4-formyl-3-hydroxy-8a-methyl-7-(4-methylpent-3-enyl)-9,10-dioxo-1-propan-2-yl-8,10a-dihydro-5H-anthracen-2-olate	0.20

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

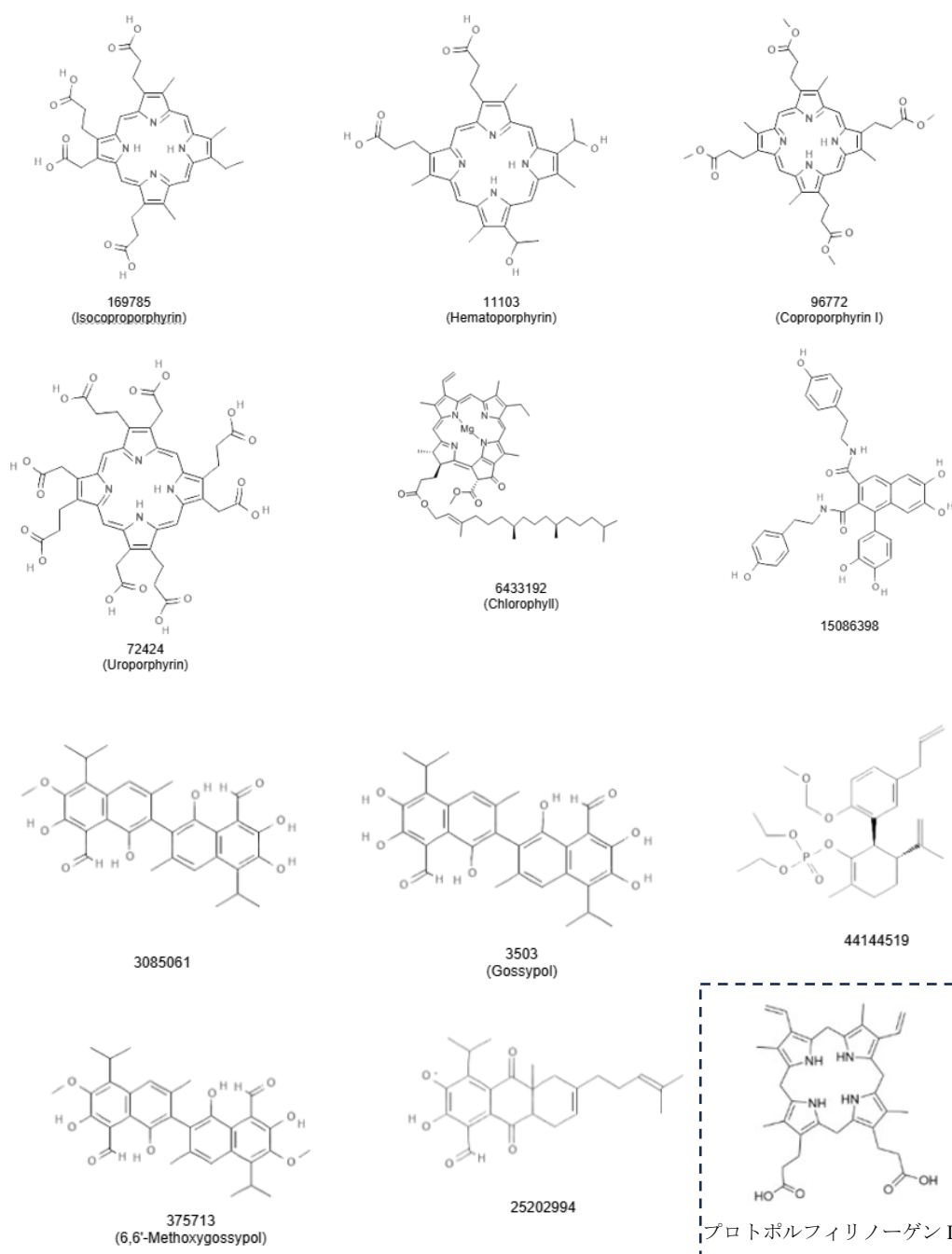


図4 プロトポルフィリノーゲン IX と Tanimoto スコア 0.2 以上の分子的類似性を示した植物代謝産物データベース中の化合物の構造式⁹

5

各構造式下の数字は表 2 に記載された Compound ID を示す。スクリーニングに用いたプロトポルフィリノーゲン IX の構造式を破線で囲み右下に示す。

⁹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- また、Tanimoto スコア上位 5 化合物 (イソコプロポルフィリン¹⁰、ヘマトポルフィリン¹¹、コプロポルフィリン I¹²、ウロポルフィリン¹³及びクロロフィル) はいずれもポルフィリン化合物であった (表 2, p27 及び図 4, p28) が、酸化された環状テトラピロールを有するこれらポルフィリン化合物が、HemG 型 PPO 蛋白質によってさらに酸化されることは考え難い。加えて、環状テトラピロールを有するポルフィリノーゲン化合物であるプロトポルフィリノーゲン IX の構造的特異性を考慮すると、HemG 型 PPO 蛋白質が他の植物内在性化合物に対して活性を示すことは想定し難い。
- 10 以上のことから、PPO 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

¹⁰ コプロポルフィリノーゲンIIIの酸化物であるコプロポルフィリンIの異性体。

¹¹ プロトポルフィリンIXの誘導体。

¹² コプロポルフィリノーゲンIIIの酸化物。

¹³ ウロポルフィリノーゲンIIIの酸化物。

(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 PV-GMHT533023 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) 等をもとに構築した。詳細を表 1 (p17~21) に記載した。

ロ 特性

10

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た PV-GMHT533023 の全塩基数は 21,400 bp である。なお、PV-GMHT533023 の塩基配列を別添資料 2 に記載した。

15

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20 *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、ネオマイシン及びカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子がベクターバックボーンに存在している。

形質転換体の選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域に存在している。なお、本組換えダイズの育成の過程で当該 *aadA* 遺伝子は除去されるため、本組換えダイズには存在しない (2-(3)-ハ-③, p31~35)。

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-GMHT533023 の構成要素を表 1 (p17~21) 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を図 1 (p16) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-GMHT533023 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非遺伝子組換えダイズ(以下「非組換えダイズ」という。)品種 A3555 の分裂組織断片に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

非組換えダイズ品種 A3555 の分裂組織断片と PV-GMHT533023 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB30 株を共存培養した後、スペクチノマイシンを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

カルベニシリン、セフトキシム及びチメンチン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を除去した。さらに、本組換えダイズの R₄ 世代の種子¹⁴において、形質転換に用いた PV-GMHT533023 のベクターバックボーンを標的とした RealTime Taqman™ PCR を行ったところ、本組換えダイズには PV-GMHT533023 のベクターバックボーンは存在しなかった(別添資料 3 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を確認した。

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

本組換えダイズ作出に当たっては、形質転換時に、事前に選定したダイズゲノム中の特定の領域に PV-GMHT533023 中の T-DNA 領域を正確に導入する目的で、CRISPR/Cas ゲノム編集システムを利用した遺伝子の部位特異的導入法(site directed integration; SDI 法)(Begemann et al., 2017)を用いた。さらに、選抜マーカーによる形質転換体の選抜後に、選抜マーカー遺伝子である *aadA* 遺

¹⁴ バルクにした収穫種子の中からランダムに約50粒取り、DNAを抽出しPCRに用いた。

伝子発現カセット及び SDI 法に必要な構成要素を除去する目的で、Cre/lox 組換えを利用した自己切除法を用いた。SDI 法及び Cre/lox 組換えを利用した自己切除法を用いた本組換えダイズの作出過程の概略を図 5 (p34~35) に示す。

- 5 SDI 法では、事前に選定した宿主ゲノム中の特定の領域に T-DNA 領域を正確に導入するため、Cas12a エンドヌクレアーゼ及び gRNA 発現カセットから発現する転写産物 (gRNA) の一過的な発現を利用して、標的となる配列に正確に二本鎖切断 (DSB) を形成する (図 5 の③及び④, p34~35)。なお、両者をコードする Cas12a 遺伝子及び gRNA 配列は、*aadA* 遺伝子、*H_N90 PPO* 遺伝子並びに Cre/lox 組換えに必要な *cre* 遺伝子及び一対の *lox* 配列とともに、T-DNA 領域に配置されている (図 1, p16)。

- 10 本組換えダイズの作出に用いた gRNA 配列の設計に当たっては、バイエルグループが開発したプログラム¹⁵を使用し、宿主ゲノム内に 1 か所のみ存在する 23 塩基の配列を選抜した。本プログラムでは、標的配列に対応する gRNA 配列の候補を、オフターゲットの起こる可能性が高いと推定される配列を排除しつつ設計することが可能である。実際に、本プログラムの条件に従い設計された gRNA 配列は、植物体内でオフターゲットを生じないことが実証されている (Rymarquis et al., 2024)。

- 20 Cre/lox 組換えでは、Cre リコンビナーゼを介した部位特異的組換えによって、一対の *lox* 配列の間に位置する DNA 配列がゲノムから切り出され、1 つの *lox* 配列が残る (Hare and Chua, 2002; Zhang et al., 2003)。Cre リコンビナーゼを発現する系統と、目的遺伝子及び *lox* 配列間に選抜マーカー遺伝子を有する系統を交配することで Cre/lox 組換えを誘導し、選抜マーカー遺伝子を除去する手法

¹⁵ 本プログラムは Python 及び R スクリプトのパッケージを用いて開発したものであり、すべての gRNA 配列に対し以下の 1) から 3) を評価することで、オフターゲットの起こる可能性が高いと推定される配列を排除しつつ、標的配列に特異的な gRNA 配列を選抜する (Rymarquis et al., 2024)。

1) PAM 配列 (プロトスペーサー隣接配列) に隣接する 23 塩基の gRNA 配列のうち、最初の 20 塩基が宿主ゲノムと一致する数。

2) gRNA 配列の 23 塩基が宿主ゲノムと完全に一致し、かつ Cas12a エンドヌクレアーゼのオンターゲット PAM 配列に隣接する数。

3) gRNA 配列の 23 塩基が 3 塩基以下のミスマッチで宿主ゲノムと一致又は gRNA 配列の最初の 20 塩基が 1 塩基以下のミスマッチで宿主ゲノムと一致し、かつオン及びオフターゲット PAM 配列に隣接する数。これにより、宿主ゲノムに存在する全てのオンターゲット及びオフターゲットが検出される。

(交配による Cre/lox 組換え法) は、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 等の第一種使用規程の承認を受けている複数の遺伝子組換え農作物の育成に既に利用されている (環境省, 2022)。

5 従来の交配による Cre/lox 組換え法に対し、本組換えダイズの育成に用いた Cre/lox 組換えを利用した自己切除法では、生殖細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現させることで、形質転換当代 (R_0 世代) において選抜マーカーによる形質転換体のスクリーニングを実施した後に、同一の世代で lox 配列間に位置する領域を除去することが可能である。本組換えダイズの作出では、 R_0 世代において T-DNA 領域上の *aadA* 遺伝子、*cre* 遺伝子、*Cas12a* 遺伝子及び *gRNA* の各発現カセットを含む領域を除去した (図 5 の⑥及び⑦, p34~35) (以下 PV-GMHT533023 の T-DNA 領域のうち最終的に本組換えダイズに残った領域を「導入遺伝子領域」という。図 5 の⑧, p34~35)。

15 形質転換された再分化個体 (R_0 世代) を自殖し、 R_1 世代を作出した。 R_1 世代において、*aadA* 遺伝子、*cre* 遺伝子、*Cas12a* 遺伝子及び *gRNA* の発現カセットのいずれも有さず、導入遺伝子領域をホモで有する個体を、定量的 PCR により選抜した。こうして得られた R_1 個体の後代から、望ましい農業特性 (意図しない性質や生産者にとって望ましくない性質を示さず、宿主と同等の収量等を示すこと)、形質の有効性、表現型、導入遺伝子領域の存在状態等を指標に
20 最終的に本組換えダイズを選抜した。

本組換えダイズの育成図を図 6 (p36) に示した。なお、本申請の対象は、 R_4 世代及び同世代から派生する全ての交雑後代系統である。

25

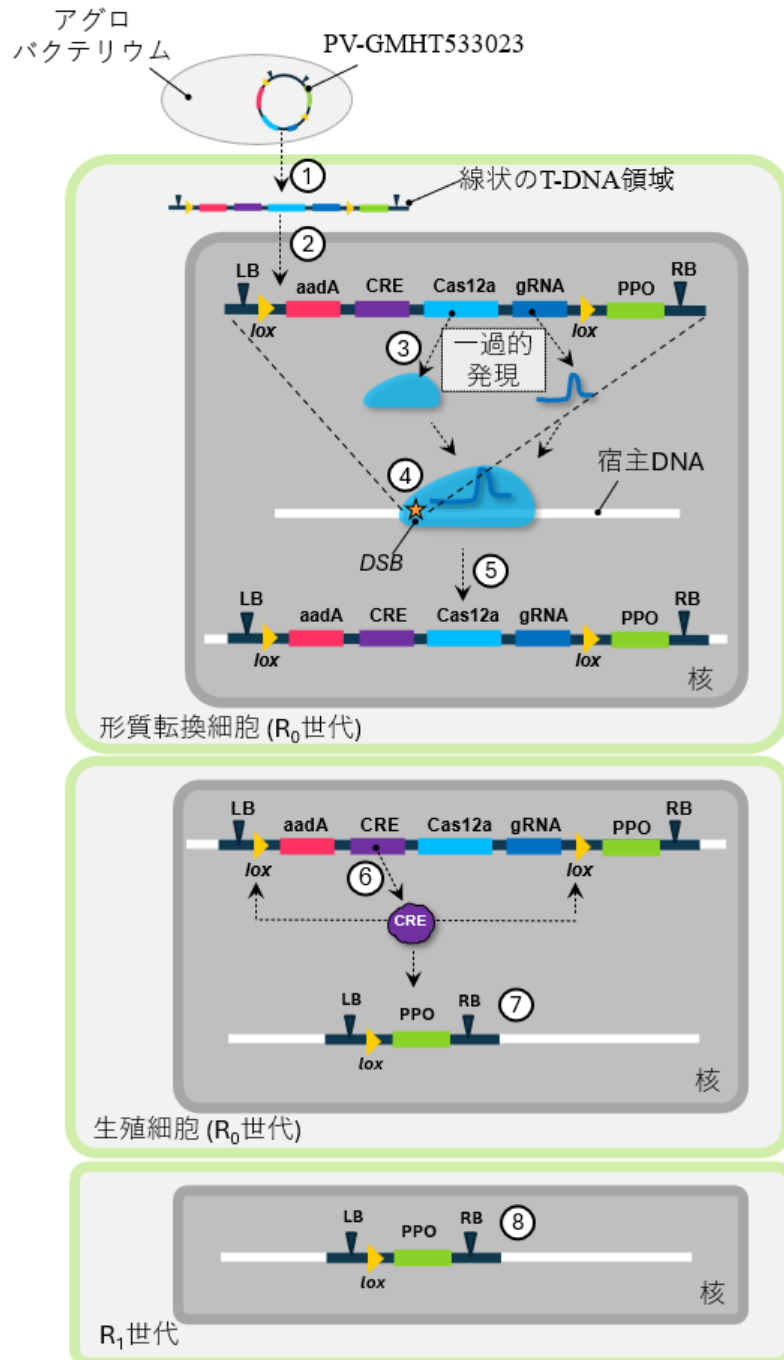


図5 部位特異的導入法 (SDI 法) 及び Cre/lox 組換えを利用した自己切除法を用いた本組換えダイズの作出過程の概略¹⁶

- 5 ①アグロバクテリウムによって導入用プラスミドに由来する一本鎖の T-DNA 領域が宿主 (ダイズ) の細胞に挿入される。②線状の T-DNA 領域が植物の細胞質から核に移動する。③宿主ゲノムに導入されていない T-DNA 領域から、Cas12a エンドヌクレアーゼ及び gRNA が核内で一過的に発現する。④Cas12a エンドヌクレアーゼ及び gRNA が宿主ゲノム中の標的配列を認識し、DSB を形成する。⑤非相同末端結合 DNA 修復機構を介し、T-DNA 領域が DSB に組み込まれる。ここまでのステップにより、事前に選定した宿主ゲノム中の特定の領域に T-DNA 領域が導入される。

¹⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- 5 T-DNA 領域が導入された遺伝子座は、その後の体細胞分裂の過程で各娘細胞に引き継がれる。
- ⑥生殖細胞系列において、生殖細胞特異的な発現を誘導するプロモーターにより Cre リコンビナーゼの発現が誘導され、*loxP* 配列間の *aadA* 遺伝子、*cre* 遺伝子、*Cas12a* 遺伝子及び *gRNA* の各発現カセット並びに *loxP* 配列の 1 つがゲノムから切除される。切除された配列は分解され、細胞内には残らない。⑦⑥により、*H_N90 PPO* 遺伝子発現カセットを含む細胞が生成される。⑧R₀ 世代の自殖により得られた R₁ 世代は、SDI 法及び Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法のために必要な構成要素をもたず、*H_N90 PPO* 遺伝子発現カセット及び *loxP* 配列の 1 つのみを有する。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

図 6 本組換えダイズの育成図

20

【社外秘につき非開示】

(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 本組換えダイズの導入遺伝子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 (R₄ 世代) の導入遺伝子領域の 5'及び 3'末端近傍配列をクエリー配列として、FASTA 型アルゴリズムによりダイズのゲノムデータベース (GMA_2024¹⁷) に対して相同性検索を行った。その結果、本組換えダイズの導入遺伝子領域はゲノムの 13 番染色体に座乗していることを確認した (別添資料 4 の Figure 2, p10)。

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 本組換えダイズにおける導入遺伝子領域の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子領域及びその近傍の塩基配列並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケンシング (NGS, Next Generation Sequencing) ¹⁸並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 5)。

20 NGS では、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ランダムに断片化し、断片の両端から約 150 bp ずつの塩基配列 (リード) をシーケンシングするペアエンド法により、全ゲノムの解析に十分な量で解析した。その結果、本組換えダイズの R₄ 世代では 152.4 Gb (平均リード深度 ¹⁹ 139)、対照の非組換えダイズでは 180.3 Gb (平均リード深度 150) の塩基配列を

¹⁷ GMA_2024: ダイズのリファレンスゲノム (GCF_000004515.6_Glycine_max_v4.0、ダウンロード日: 2024年1月16日) から抽出されたデータベースである。

¹⁸ NGSは、塩基配列解析とバイオインフォマティクス解析により、サザンブロットティングと同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGSにおいては、フラグメント化した大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA領域と宿主の内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配列並びに非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

¹⁹ 平均リード深度は、ダイズゲノムに1コピーで存在する内在遺伝子 (*lel*遺伝子) について読まれた塩基数から算出した。

解析し、いずれも平均有効リード深度が 75 を超えること²⁰を確認した(別添資料 5 の Appendix Table 3, p42)。

5 本組換えダイズ (R₄ 世代) に由来するリードを PV-GMHT533023 の塩基配列とアライメント²¹した結果、導入遺伝子領域の全ての配列が検出されていることを確認した(別添資料 5 の Appendix Figure 4, p47)。なお、PV-GMHT533023 の T-DNA 領域のうち、Cre/lox 組換えを利用した自己切除法により除去された領域の一部 (P-RSP-Gm1、P-ubq-Mt1 及び P-U6-Gm1) にリードのマッピングが認められたが、P-RSP-Gm1 及び P-U6-Gm1 については、同様の結果が対照の非組換えダイズに由来するリードを PV-GMHT533023 の塩基配列とアライメント
10 した場合にも認められたことから、両領域の塩基配列とダイズ内在性塩基配列との一致を示したものであると考えられた(別添資料 5 の Appendix Figure 16, p78)。また、P-ubq-Mt1 に認められたリードのマッピングについては、本構成要素が、PV-GMHT533023 の T-DNA 領域のうち Cre/lox 組換えを利用した自己切除法により除去された領域に加え、除去されずに本組換えダイズに残る導入遺伝子領域にも重複して存在していることから、導入遺伝子領域に由来するリードが、両領域の P-ubq-Mt1 間でランダムにマッピングされたものと考え
15 られた。本組換えダイズの導入遺伝子領域の P-ubq-Mt1 におけるリード深度が、導入遺伝子領域の他の構成要素と比べて約半数であること及び除去された領域の P-ubq-Mt1 の境界付近でリード数が減少し、接合領域の特徴が認められないことは、本考察を支持するものである(別添資料 5 の Appendix Figure 4, p47)。加えて、PV-GMHT533023 のベクターバックボーンにある P-rrn 領域、DNA クローニングに用いられる Intervening Sequence 及び OR-ori-pBR322 領域の一部において1つのリードがマッピングされた。しかし、ベクターバックボーンに由来する配列の散発的かつ少数のリードの検出は過去にも報告されていることか
20 ら (Zastrow-Hayes et al., 2015)、このマッピングはゲノム DNA の調製中に混入した環境に遍在する細菌に由来するものであると考えられた。これらのことから、本組換えダイズには意図した導入遺伝子領域が挿入されていること並びに Cre/lox 組換えを利用した自己切除法により除去された *aadA* 遺伝子、*cre* 遺伝子、*Cas12a* 遺伝子及び *gRNA* の各発現カセット領域を含む
25

²⁰ 平均リード深度が75以上であれば導入遺伝子領域の全ての配列を検出することが可能であること (Kovalic et al., 2012) 及び平均リード深度が11であっても25塩基長の短い導入遺伝子領域の配列及び非意図的な配列を検出できることが報告されている (Cade et al., 2018)。

²¹ Bowtie 2 v2.3.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012) を使用して、解析した塩基配列をアライメントした。Bowtie 2でフラグメントの片側の配列に対するアライメントを行う場合、30 bp 以上の相同性を検出基準としている。

PV-GMHT533023 由来の非意図的な配列が挿入されていないことを確認した。

また、本組換えダイズ (R₄ 世代) における導入遺伝子領域の挿入箇所数を決定するため接合領域の解析を行った結果、2 つの接合領域が特定された (別添資料 5 の p26)。これらはそれぞれ導入遺伝子領域の 5' 及び 3' 末端を含む配列であつた (別添資料 5 の Appendix Figure 30, p92~93, 末尾の confidential attachment に収録)。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 5 の p26)。

以上の解析から、本組換えダイズの核ゲノム中 1 か所に 1 コピーの導入遺伝子領域が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことを確認した。

また、本組換えダイズ (R₄ 世代) において検出された導入遺伝子領域、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の遺伝子が導入されていることを確認した (別添資料 5 の Appendix Figure 6, p49~50 及び Appendix 7, p51~67, いずれも末尾の confidential attachment に収録)。なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子領域の模式図を図 7 (p40) に示した。

さらに、複数世代 (R₄、R₅、R₆、R₇ 及び R₈ 世代) の本組換えダイズを対象にした NGS において、導入遺伝子領域が安定して後代に遺伝していることを確認した (別添資料 5 の p30)。

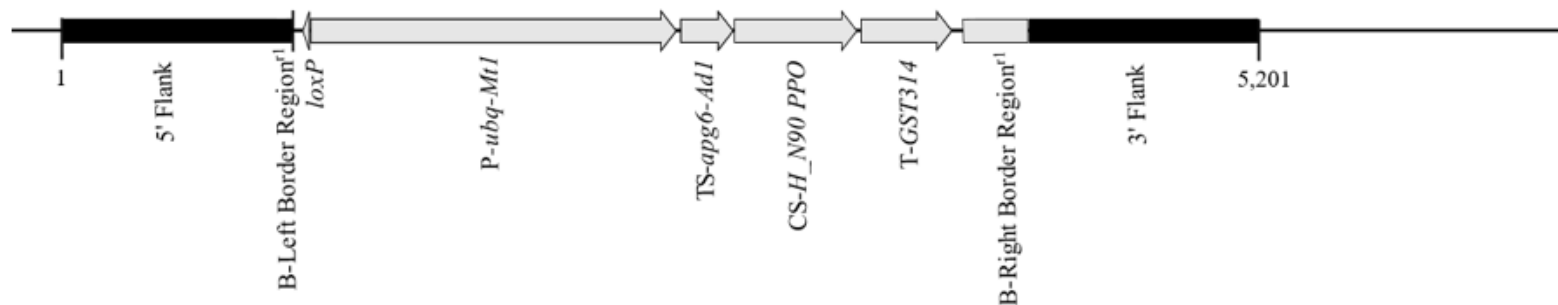


図7 本組換えダイズにおける導入遺伝子領域の模式図²²

本組換えダイズにおける導入遺伝子領域中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示す。黒い太線は近傍配列を示す。なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子領域の配列は、PV-GMHT533023 における該当領域の配列と一致している。図中の「rl」の表記は、本組換えダイズに導入された B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が、PV-GMHT533023 の当該エレメントと比較して短くなっていることを示す。

²² 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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

1 コピーのため該当しない (別添資料 5 の p26)。

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 本組換えダイズの複数世代 (R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 世代) の種子において、PPO 蛋白質が安定して発現していることを、ウエスタンブロッティングにより確認した (別添資料 6 の Figure 2, p14)。

15 また、2023 年に米国の 5 か所 (アイオワ州、イリノイ州、インディアナ州、ネブラスカ州及びオハイオ州) で行ったほ場試験において 本組換えダイズの葉、地上部、根及び種子のサンプル (種子以外の組織: R_6 世代、種子: R_7 世代) を採取し、PPO 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 7)。その結果、供試した全ての組織において PPO 蛋白質の発現を確認した (表 3, p42)。

表 3 本組換えダイズの組織中における PPO 蛋白質の発現量 (2023 年、米国)²³

組織	生育段階 ¹	平均値 (SE) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ²	LOQ/LOD ($\mu\text{g/g DW}$) ³
葉	3 葉期~4 葉期	36 (3.1) 5.7 - 63	0.500/0.188
地上部	子実肥大期	11 (0.95) 4.8 - 20	0.250/0.084
根	子実肥大期	4.2 (0.30) 2.1 - 6.7	0.250/0.094
種子	成熟期	0.97 (0.066) 0.43 - 1.4	0.063/0.034

¹ 発現量分析に供した各組織の採取時における生育段階。

5 ² 蛋白質の発現量は組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値－最大値) は全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算している (n=20)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

³ LOQ=limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)。

²³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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播されるおそれがある場合は、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に結合可能なプライマーセットを利用して、EndPoint TaqMan PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 8)。検定に用いる葉の DNA 量は、PCR の 1 反応当たり 5~20 ng であることが推奨されている。

15 本法の再現精度は、ポジティブサンプルとして供試した本組換えダイズ 45 サンプル及びネガティブサンプルとして供試したダイズ 45 サンプルを用いて確認されている (別添資料 8 の Table 1, p14)。

- (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 *H_N90 PPO* 遺伝子は、PPO 蛋白質を発現することにより、PPO 阻害型除草剤耐性を付与する。

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

30 本組換えダイズの宿主は非組換えダイズ品種 A3555 であり、*H_N90 PPO* 遺伝子が導入されている。*H_N90 PPO* 遺伝子は PPO 蛋白質を発現することにより、本組換えダイズに PPO 阻害型除草剤耐性を付与する。

35 宿主であるダイズと交雑可能な近縁野生種として我が国にはツルマメが生している。しかしながら、2024 年 10 月に行ったバイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場内にある隔離ほ場の試験区周辺 10 m の範囲 (民家の敷地内

を除く)において、ツルマメの生育は確認されなかった。

2-(1)-ロ-③ (p23~29) で論じたとおり、本組換えダイズにおいて内在性の HemY 型 PPO 蛋白質に加えて *H_N90 PPO* 遺伝子に由来する HemG 型 PPO 蛋白質が発現することで、PPO 蛋白質が関与するヘム及びクロロフィル生合成経路の最終産物であるヘム及びクロロフィルの濃度が従来ダイズにおける変動の範囲を超えて高まることは想定されず、また、HemG 型 PPO 蛋白質が基質とするプロトポルフィリノーゲン IX の構造的 특異性を考慮すると、HemG 型 PPO 蛋白質が他の植物内在性化合物に対して活性を示すことで、宿主の代謝系を変化させることは考え難い。

よって、導入遺伝子である *H_N90 PPO* 遺伝子による影響が、目的とした宿主の生理学的特性である PPO 阻害型除草剤耐性以外に及ぶとは予想されない。

以上のことから、本組換えダイズの隔離ほ場試験を行うに当たっては、これまでに海外で得られた生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると考えられる。

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成体の越冬性、③花粉の稔性及びサイズ、④種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、⑤交雑率、⑥有害物質の産生性

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：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場

使用期間：承認日から 2031 年 12 月 31 日まで

① 隔離ほ場の施設

- 1) 部外者の立入を防止するため、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、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

② 隔離ほ場での作業要領

- 1) 本組換えダイズ及び比較対象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、当該ダイズ及び比較対象のダイズを隔離ほ場内に鋤込む等により、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) までに掲げる事項について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。

(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

別に定めるモニタリング計画書を参照。

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

—

(6) 国外における使用等に関する情報

これまで本組換えダイズについて 2021~2024 年の間に米国において延べ 98 か所のほ場試験が行われているが (表 4, p46)、対照の非組換えダイズと比較して生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

なお、本組換えダイズの海外における申請予定は表 5 (p47) のとおりである。

表 4 国外において本組換えダイズのほ場試験を行ったほ場の数及び国 ²⁴

年	ほ場の数	国
2021	21	米国
2022	25	米国
2023	37	米国
2024	15	米国

²⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 5 本組換えダイズの海外における申請予定 ²⁵

2025 年 10 月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2025年5月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2025年5月
米国農務省 (USDA)	環境	【申請予定】
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2025年7月
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	【申請予定】

²⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一の 2-(6)-② (p43~44) に記載したとおり、本組換えダイズの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えダイズを隔離ほ場試験で使用する
場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

1 競合における優位性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズは雑草性を有しておらず、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)。我が国においても、ダイズはイネ、ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでにダイズが我が国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

20 本組換えダイズは、PPO 蛋白質の発現により、PPO 阻害型除草剤耐性形質が付与されているが、当該除草剤が散布されることが想定されにくい自然条件下において、本形質が競合における優位性を高めるとは考え難い。

25 なお、除草剤耐性形質を有する組換えダイズが 1996 年以降輸入されている我が国において、2009 年から 2023 年まで農林水産省によって遺伝子組換え植物実態調査が実施されているが、組換えダイズが世代交代を繰り返すことにより生育範囲が経年的に拡大しているといった状況はこれまでの調査で認められていない (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, 2018a; 農林水産省, 2018b; 農林水産省, 2020; 農林水産省, 2021; 農林水産省, 2022a; 農林水産省, 2022b; 農林水産省, 2023; 農林水産省, 2024)。

30 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

35 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズは、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。

10

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

15

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支障を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

20

本組換えダイズ中では PPO 阻害型除草剤耐性形質を付与する PPO 蛋白質が発現しているが、当該蛋白質は有害物質としては知られておらず、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことを確認している（第一の 2-(1)-ロ-②, p22~23）。

25

また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p23~35) に記載したように、PPO 蛋白質は高い基質特異性を有し、構造的に類似する植物内在性化合物を基質とすることは想定し難いため、PPO 蛋白質が宿主の代謝系に作用して新たな有害物質を産生することは考えにくい。

30

以上のことから、有害物質の産生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

—

35

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズは、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。

10

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 第一の 1-(3)-ニ-③ (p8~13) 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我が国に自生する植物はツルマメのみである (吉村ら, 2016)。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。

20 (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、交雑性に起因する具体的な影響としては、本組換えダイズ由来の *H_N90 PPO* 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
25 ことが考えられた。

(3) 影響の生じやすさの評価

30 交雑性に起因する影響の生じやすさを評価するにあたり、1) 本組換えダイズがツルマメと交雑する可能性、2) 本組換えダイズ由来の *H_N90 PPO* 遺伝子がツルマメの遺伝的背景の中で競合における優位性を高める可能性の2点を検討した。

35 イ 本組換えダイズがツルマメと交雑する可能性

第一の 1-(3)-ニ-③ (p8~13) に記載したように、ダイズとツルマメはともに、

自家受粉率の高い自殖性植物である (OECD, 2000; 阿部・島本, 2001)。また、一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、この開花期のずれは、両者の遺伝子交流を妨げる一因と考えられている (阿部・島本, 2001)。さらに、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においても、
5 ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いことが報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002; Mizuguti et al., 2010)。

また、ダイズとツルマメの雑種形成については、我が国の自然環境下において 2003 年から 2006 年にかけて経時的な調査が行われた結果、ツルマメ自生地においてダイズとツルマメの形態的中間体が発見される頻度は栽培実験の
10 値よりも明らかに少ないことが報告されるとともに、ダイズとツルマメの自然交雑率は非常に低いことが示唆されたとされている (加賀ら, 2005; 黒田ら, 2005; 黒田ら, 2006; 黒田ら, 2007)。

本組換えダイズには、*H_N90 PPO* 遺伝子により、PPO 阻害型除草剤耐性形質が付与されている。当該除草剤耐性形質が、花粉の形態及び稔性、種子の生産性等、生殖に関わる特性を変化させることは想定しにくいことから、本組換えダイズの交雑性が従来ダイズと比較して高まっていることは考え難い。

上記のことから、本組換え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た。
20

ロ 本組換えダイズ由来の *H_N90 PPO* 遺伝子がツルマメの遺伝的背景の中で競合における優位性を高める可能性

仮に本組換えダイズとツルマメが交雑した場合も、本組換えダイズ由来の導入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、雑種及び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 (p8~13) 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、ダイズの遺伝子が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

また、1 (1) (p48~49) で論じたように、本組換えダイズには、PPO 蛋白質の発現により PPO 阻害型除草剤耐性形質が付与されているが、当該除草剤が散布されることが想定されにくい自然条件下において、本形質が競合における
35

優位性を高めるとは考え難い。Kubo ら (2013) は、除草剤グリホサート耐性組換えダイズとツルマメの雑種における形態特性、開花特性及び繁殖特性は、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であったことから、除草剤グリホサートが散布されることが無い場合、導入遺伝子は適応度に影響しないと報告している。

上記のことから、本組換えダイズとツルマメの雑種が我が国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、本組換えダイズに由来する PPO 阻害型除草剤耐性形質のみにより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。

したがって、本組換えダイズの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、本組換えダイズは、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。

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一の 2-(6)-② (p43~44) に記載したとおり、本組換えダイズの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えダイズを隔離ほ場試験で使用する
場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

競合における優位性：

10 ダイズは雑草性を有しておらず、我が国においてイネ、ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでに我が国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

本組換えダイズは、PPO 蛋白質の発現により PPO 阻害型除草剤耐性形質が付与されているが、当該除草剤が散布されることが想定されにくい自然条件下において、本形質が競合における優位性を高めるとは考え難い。

15 したがって、本組換えダイズは、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：

20 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支障を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

本組換えダイズ中で発現する PPO 蛋白質は、有害物質としては知られておらず、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことを確認している。

25 また、PPO 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性化合物を基質とすることは想定し難いため、これらの蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

したがって、本組換えダイズは、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。

30 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。具体的な影響として、本組換えダイズ由来の *H_{N90} PPO* 遺伝子がダイズとツルマメの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。

35 交雑性に起因する影響の生じやすさを検討したところ、我が国の自然条件下において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ること、

付与された PPO 阻害型除草剤耐性形質が、生殖に関わる特性を変化させることは想定しづらく、本組換えダイズの交雑性が従来ダイズと比較して高まっていることは考え難いことから、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は、従来の非組換えダイズと同じく極めて低いと考えられた。

- 5 また、仮に本組換えダイズとツルマメが交雑した場合も、国内外で行われた調査研究結果から、その雑種が我が国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、加えて、本組換えダイズに由来する PPO 阻害型除草剤耐性形質のみにより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。

- 10 したがって、本組換えダイズは、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。

- 15 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、我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.

Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural Cross-Pollination of Twelve Soybean Cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: cropscl1994.0011183X003400020013x.

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.

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 Supplement* (2): 91-92.

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.

Begemann, M., B. Gray, E. January, G. Gordon, Y. He, H. Liu, X. Wu, T. Brutnell, T. Mockler and M. Oufattole. 2017. Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Scientific Reports* 7: 1-6.

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.

Boynton, T.O., L.E. Daugherty, T.A. Dailey and H.A. Dailey. 2009. Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity. *Biochemistry* 48: 6705-6711.

Cade, R., K. Burgin, K. Schilling, T.-J. Lee, P. Ngam, N. Devitt and D. Fajardo. 2018. Evaluation of whole genome sequencing and an insertion site characterization method for molecular characterization of GM maize. *Journal of Regulatory Science* 6(1):1-14.

Carlson, J.B. and N.R. Lersten. 2004. Reproductive Morphology. Pages 59-95 in Soybeans: Improvement, Production, and Uses.

Chen, Y. and R.L. Nelson. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. *Crop Science* 44: 316-325.

Corradi, H.R., A.V. Corrigall, E. Boix, C.G. Mohan, E.D. Sturrock, P.N. Meissner and K.R. Acharya. 2006. Crystal structure of protoporphyrinogen oxidase from *Myxococcus xanthus* and its complex with the inhibitor Acifluorfen. *Journal of Biological Chemistry* 281: 38625-38633.

Dayan, F. and S. Duke. 2010. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Pages 1733-1751 in *Handbook of Pesticide Toxicology*. United States Department of Agriculture, University of Mississippi.

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.

FAO. 2025. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed February 3, 2025].

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.

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. Hoffmann 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.

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.

Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.

Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *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.

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

Kim, K.-U., T.-D. Gang, 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.

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.

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.

Koch, M., C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber and A. Messerschmidt. 2004. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: A key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *The EMBO Journal* 23: 1720-1728.

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.

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.

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.

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.

Kuroda, Y., N. Tomooka, A. Kaga, S.M.S.W. Wanigadeva and D.A. Vaughan. 2009. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [*G. max* (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 1045-1055.

Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.

Larue, C.T., J.E. Ream, X. Zhou, F. Moshiri, A. Howe, M. Goley, O.C. Sparks, S.T. Voss, E. Hall, C. Ellis, J. Weihe, Q. Qi, D. Ribeiro, X. Wei, S. Guo, A.G. Evdokimov, M.J. Varagona and J.K. Roberts. 2020. Microbial HemG-type protoporphyrinogen IX oxidase enzymes for biotechnology applications in plant herbicide tolerance traits. *Pest Management Science* 76: 1031-1038.

Lyck, R., U. Harmening, I. Höhfeld, E. Treuter, K.D. Scharf and L. Nover. 1997. Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. Pages 117-125 in *Planta*. Volume 202. Springer, Berlin.

McDowell, J.M., Y.Q. An, S. Huang, E.C. McKinney and R.B. Meagher. 1996. The arabidopsis *ACT7* actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology* 111: 699-712.

Mizuguti, A., K. Ohigashi, Y. Yoshimura, A. Kaga, Y. Kuroda and K. Matsuo. 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: 13-23.

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.

O'Brian, M.R. 2009. Heme biosynthesis. Pages 194-209 in *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). M. Schaechter (ed.). Academic Press, Oxford.

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 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.

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.

Patterson, D.E., R.D. Cramer, A.M. Ferguson, R.D. Clark and L.E. Weinberger. 1996. Neighborhood Behavior: A Useful Concept for Validation of "Molecular Diversity" Descriptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 39: 3049-3059.

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

Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in*

Microbiology and Immunology: 277-290.

Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.

Rymarquis, L., C. Wu, D. Hohorst, M. Vega-Sanchez, T.E. Mullen, V. Vemulapalli and D.R. Smith. 2024. Impact of predictive selection of LbCas12a CRISPR RNAs upon on- and off-target editing rates in soybean. *Plant Direct* 8: e627.

Safari, F., K. Zare, M. Negahdaripour, M. Barekati-Mowahed and Y. Ghasemi. 2019. CRISPR Cpf1 proteins: Structure, function and implications for genome editing. *Cell & Bioscience* 9.

Stevens, R., M. Grelon, D. Vezon, J. Oh, P. Meyer, C. Perennes, S. Domenichini and C. Bergounioux. 2004. A *CDC45* homolog in Arabidopsis is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. *The Plant Cell* 16: 99-113.

Sun, X., Z. Hu, R. Chen, Q. Jiang, G. Song, H. Zhang and Y. Xi. 2015. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports* 5: 10342.

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.

Tanaka, R. and A. Tanaka. 2007. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 321-346.

To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant biotechnology traits. *Frontiers in Plant Science* 12.

von Heijne, G. 1990. Protein targeting signals. *Current Opinion in Cell Biology* 2: 604-608.

Wang, C., M. Zheng, C. Est, R. Lawal, W. Liang, D.A. Korasick, M.J. Rau, S.A. Saracco, V. Johnson, Y. Wang, T. White, W. Li, J. Zhang, X. Gu and F. Liu-Gontarek. 2024. Production and characterization of homologous protoporphyrinogen IX oxidase (PPO) proteins: Evidence that small N-terminal amino acid changes do not impact protein function. PLOS ONE 19: e0311049.

Xu, D., J. Abe, J. Gai and Y. Shimamoto. 2002. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. Theoretical and Applied Genetics 105: 645-653.

Xu, H., Y. Li, Y. Yan, K. Wang, Y. Gao and Y. Hu. 2010. Genome-scale identification of soybean BURP domain-containing genes and their expression under stress treatments. BMC Plant Biology 10: 197.

Ye, X., Z. Vaghchhipawala, E.J. Williams, C. Fu, J. Liu, F. Lu, E.L. Hall, S.X. Guo, L. Frank and L.A. Gilbertson. 2023. Cre-mediated autoexcision of selectable marker genes in soybean, cotton, canola and maize transgenic plants. Plant Cell Reports 42: 45-55.

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.

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

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.

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.

Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-

sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *The Plant Genome* 8: 1-15.

Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1157-1168.

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.島. (編) 北海道大学図書刊行会 北海道 77-95

大庭寅雄 2001 ダイズの品種生態と選択 5. 栽培条件と品種の反応 転作全書第二巻 ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 102-105

奥田重俊 1997 ツルマメ 日本野生植物館 奥. (編) 小学館 東京 88

小畑弘己 2009 日本先史時代のマメ類と栽培化 さまざまな栽培植物と農耕文化：ユーラシア農耕史4 木. (編) 臨川書店 京都 252-261

小畑弘己 2010 縄文時代におけるアズキ・ダイズ栽培について 先史学・考古学論究V 上巻 龍. (編) 龍田考古会 熊本 239-272

加賀秋人・友岡憲彦・Phuntsho, U.・黒田洋輔・小林伸哉・伊勢村武久・Gilda, M-J.・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－秋田県及び広島県における予備的調査－ 植物遺伝資源探索導入調査報告書 21:59-71

鎌田慶朗 1992 3.大豆の化学 大豆の科学 山.大. (編) 朝倉書店 東京 27-47

環境省 2022 チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1B.868*, 改変 *cry1Da*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.)Iltis) (MON95379, OECD UI: MON-95379-3) 申請書等の概要 https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1994&ref_no=1 [Accessed December 12, 2024]

黒田洋輔・加賀秋人・Apa, A.・Vaughan, D. A.・友岡憲彦・矢野博・松岡伸之 2005 野生ダイズ, 栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索, 収集とモニタリング－

秋田県, 茨城県, 愛知県, 広島県, 佐賀県における現地調査からー 植物遺伝資源探索導入調査報告書 21:73-95

黒田洋輔・加賀秋人・Joe, G.・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 22:21-12

黒田洋輔・加賀秋人・Janet, P.・Vaughan, D. A.・友岡憲彦・矢野博 2007 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, 兵庫県, 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 23:29-27

国分牧衛 2002 ダイズ 作物学事典 日. (編) 朝倉書店 東京 370-377

後藤寛治 2001 ダイズの起源と特性 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 33-41

昆野昭晨 2001a 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 農山漁村文化協会 東京 68-73

昆野昭晨 2001b 生育のステージと生理・生態 II 栄養成長の生理、生態 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 50-67

昆野昭晨 2001c 生育のステージと生理・生態 I 種子と発芽 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 45-49

財務省. 2025. 財務省貿易統計. <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed February 3, 2025].

鄭紹輝 2008 ダイズ 作物学概論 大. (編) 朝倉書店 東京 132-146

中山誠二 2015 縄文時代のダイズの栽培化と種子の形態分化 植生史研究 第23巻 第2号 33-42

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 https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/21_kekka.pdf [Accessed

April 12, 2022]

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
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/22_natane.pdf [Accessed
April 12, 2022]

農林水産省 2012 「平成 23 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/23_kekka.pdf [Accessed
April 12, 2022]

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
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/24_kekka.pdf [Accessed
April 12, 2022]

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
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h25_kekka.pdf [Accessed
April 12, 2022]

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
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h26_houkoku.pdf [Accessed
September 16, 2022]

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
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-42.pdf>
[Accessed April 12, 2022]

農林水産省 2018a 「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
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-134.pdf>
[Accessed April 12, 2022]

農林水産省 2018b 「平成 29 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 12 月 20 日 公表
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-172.pdf>
[Accessed April 12, 2022]

農林水産省 2020 「平成 30 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 2 年 9 月 7 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-226.pdf>

[Accessed April 12, 2022]

農林水産省 2021 「令和元年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 3 年 1 月 8 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-272.pdf>

[Accessed April 12, 2022]

農林水産省 2022a 「令和 2 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 4 年 7 月 26 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-17.pdf>

[Accessed July 28, 2022]

農林水産省 2022b 「令和 3 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 4 年 7 月 26 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-21.pdf>

[Accessed July 28, 2022]

農林水産省 2023 「令和 4 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 5 年 6 月 30 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-39.pdf>

[Accessed January 24, 2024]

農林水産省 2024 「令和 5 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 令和 6 年 6 月 26 日 公表

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-66.pdf>

[Accessed December 5, 2024]

宮下京子・松田晴光・大原雅・三澤為一・島本義他 1999 ツルマメおよびダイズにおける開放花と閉鎖花の着花・結実動態 北海道大学農学部農場研究報告 41-48

山内文男 1992 3.大豆の化学 大豆の科学 山.大.(編) 朝倉書店 東京 1-13

吉村泰幸・加賀秋人・松尾和人 2016 遺伝子組換えダイズの生物多様性影響評

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 第 36 号: 47-69

緊急措置計画書

2025年7月9日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 大島 美紀
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

第一種使用規程の承認を申請しているプロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性ダイズ (*H₂N90 PPO*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON94115, OECD UI: MON-94115-8) (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。

2025年7月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 社外広報マネジャー
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー

*：管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

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

具体的措置として、本組換えダイズを隔離ほ場内で鋤込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換えダイズの放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換えダイズが隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

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おそれが見込まれた場合、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。

隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

5 I. 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河内試験圃場

10

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

15

3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

20

図 8 (p76) 参照

II. 責任者等

25 1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】 (バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T)

30 2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】 (バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー)

35

III. 試験期間

承認日から 2031 年 12 月 31 日まで

5 IV. 施設概要

部外者の立入を防止するためのフェンス (高さ 1.6 m)、立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示するための標識、洗い場を設置している (図 9, p77)。

10 V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

15

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

20 3. 試験区の配置図

図 10 (p77) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

25

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 11, p78)。

30 2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路 (隔離ほ場のフェンスから約 2.5 m の距離) として利用されている。

35

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

5 隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域 (国立公園、
 5 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。なお、上記の
 自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ
 場からの距離は約 15 km である。

4. 気象条件

10 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ
 崎市大徳町) における気象データの平年値を表 6 (p71) に示した。

表 6 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ崎市大徳町) における気象データの平年値

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020
資料年数	30	30	30	30	30	30
1 月	55.4	3.3	9.4	-2.3	2.4	190.8
2 月	52.9	4.3	10.2	-1.2	2.7	172.3
3 月	103.3	7.8	13.5	2.3	3.0	174.3
4 月	109.0	13	18.6	7.5	3.4	178.4
5 月	122.6	17.8	22.9	13.5	3.2	179.9
6 月	135.1	21.0	25.4	17.5	2.8	125.7
7 月	128.1	24.6	29.4	21.2	2.7	155.7
8 月	99.4	25.8	30.9	22.2	2.6	183.5
9 月	182.8	22.5	27.2	18.8	2.7	133.9
10 月	212.8	16.9	21.8	12.6	2.4	134.0
11 月	87.5	10.9	16.7	5.6	2.0	148.4
12 月	53.4	5.5	11.7	0.0	2.1	169.1
年	1352.8	14.5	19.8	9.8	2.7	1927.9

気象庁ホームページ、過去の気象データ検索、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_am

15 [d_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view](http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_am_d_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view)、アクセス日: 2025 年 1 月 7 日。

5. 台風の襲来歴

① 平年値

5 隔離ほ場のある関東甲信地方への台風接近数²⁶の平年値(1991年~2020年の30年平均)は、3.3個である(気象庁ホームページ、台風の平年値、<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>、アクセス日:2025年1月7日)。

10 ② 過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

関東甲信地方に台風が接近し²⁶、かつ隔離ほ場最寄の観測地点(茨城県龍ヶ崎アメダス観測所)において日ごとの最大風速が15 m/sを超えた個数²⁷を隔離ほ場周辺への台風の接近個数とした。過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数
15 は、合計5個(2016年8月、2017年10月、2018年10月、2019年9月、2019年10月)²⁸であった。

台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- ・強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
 - 20 ・補助支柱などの資材は常に準備しておき、気象状況により取り付ける。
- また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

²⁶ 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等から300 km以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている(気象庁ホームページ、関東地方および甲信地方への接近数、http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html、アクセス日:2025年1月7日)。

²⁷ 台風の強風域の定義が平均風速15 m/sであることによる(気象庁ホームページ、気圧配置 台風に関する用語、http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html、アクセス日:2025年1月7日)。

²⁸ 過去の気象データ検索(気象庁ホームページ、<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>、アクセス日:2025年1月7日)から、地点として龍ヶ崎を、さらに関東甲信地方に台風が接近した年月を選択し、該当年月における日ごとの最大風速が15 m/sを超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が15 m/sを超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にはほ場が冠水したことはない。

5

7. 過去 10 年における強風の経験とその程度・頻度

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

10

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け (策定されている場合)

河内町の洪水ハザードマップによると、現時点の河道 (利根川・小貝川・霞ヶ浦) 及び洪水調節施設の整備状況 (利根川・小貝川) を勘案して、想定最大規模降雨に伴う洪水により氾濫した場合の隔離ほ場の浸水の状況は、水深 0.5m 以上 ~3.0 m 未満となると想定されている (茨城県河内町ホームページ、洪水ハザードマップ、<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/page/page000262.html>、アクセス日: 2025 年 1 月 7 日)。

15

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

20

鳥獣害の被害報告はない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

25

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植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。

30

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

Glycine soja (ソルマメ)

35

なお、2024 年 10 月に隔離ほ場内試験区 (図 10, p77) の周辺 10 m の範囲 (民家

の敷地内を除く) でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

VIII. 栽培管理等

5

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図 12 (p79) に示したとおりである。

10

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、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。

15

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、ただちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性ダイズ MON94115 (以下「本組換えダイズ」という。) の栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

20

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

隔離ほ場は下記 (1)~(4) の設備を備えている。

25

(1) 部外者の立入を防止するため、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。

30

(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、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

35

5. 作業要領

- (1) 本組換えダイズ及び比較対象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、当該ダイズ及び比較対象のダイズを隔離ほ場内に鋤込む等により、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) までに掲げる事項について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。

以上

地理院地図
GSI Maps

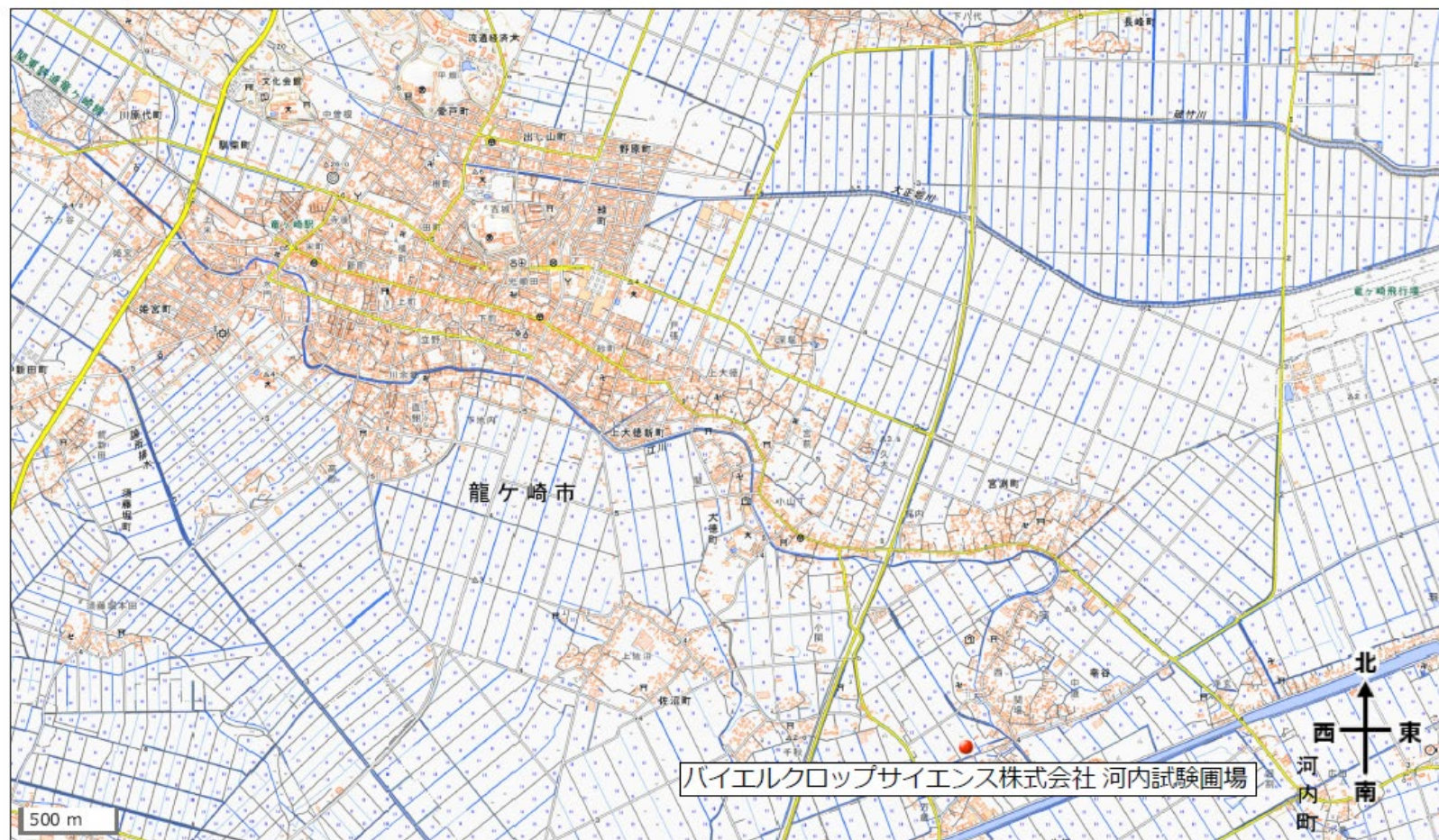


図8 バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場の位置

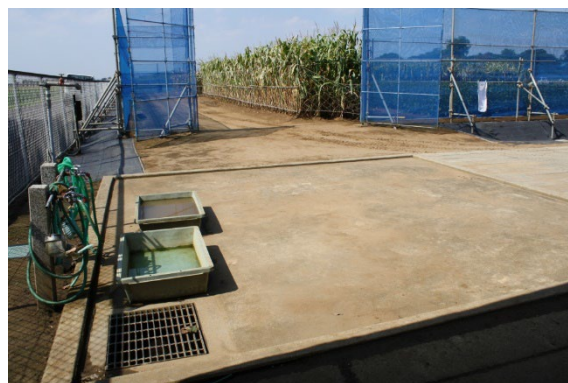


図 9 隔離ほ場の設備²⁹

(左) 立入禁止であることを明示するための標識、(右) 洗い場

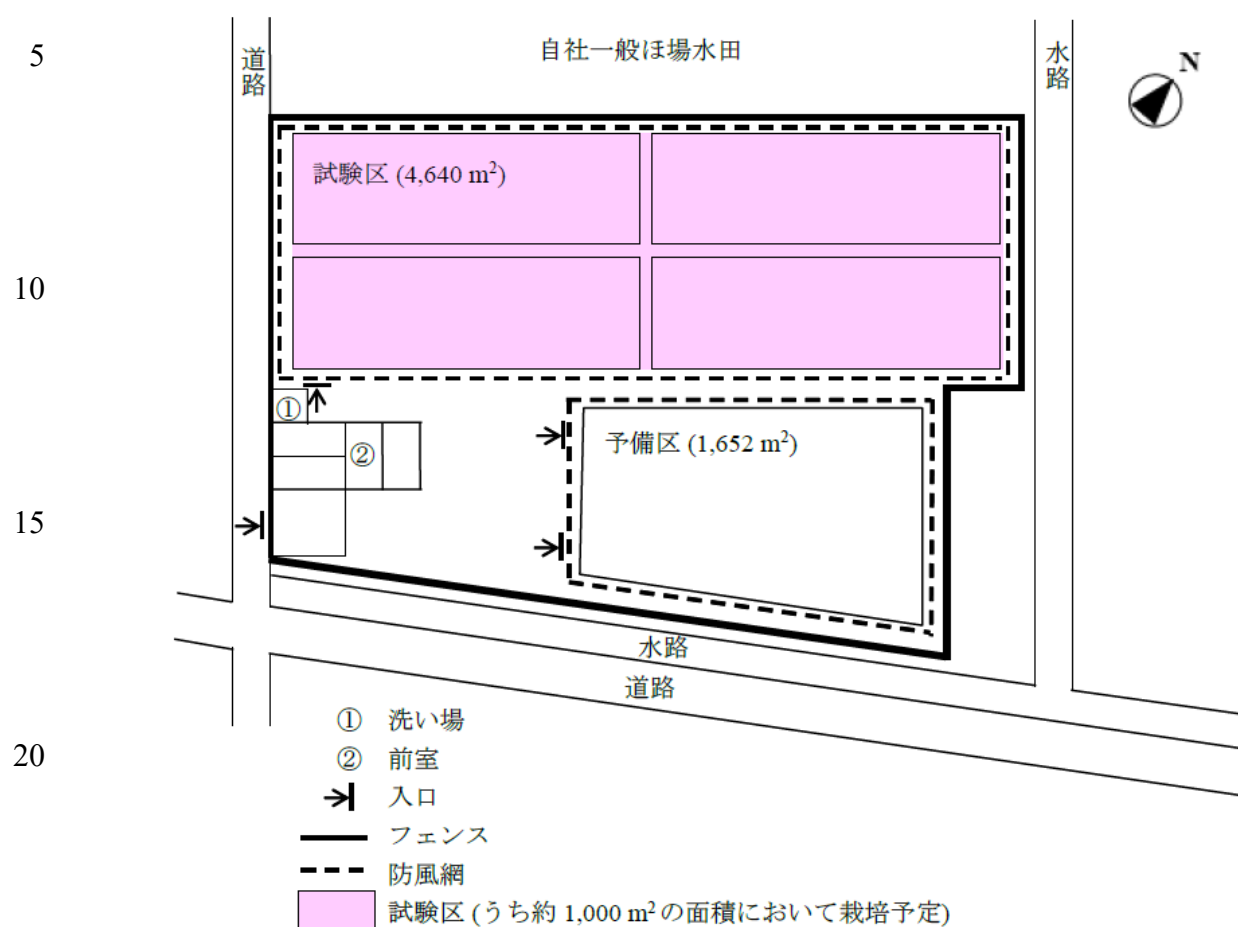


図 10 試験区の配置図³⁰

²⁹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

³⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

地理院地図 GSI Maps

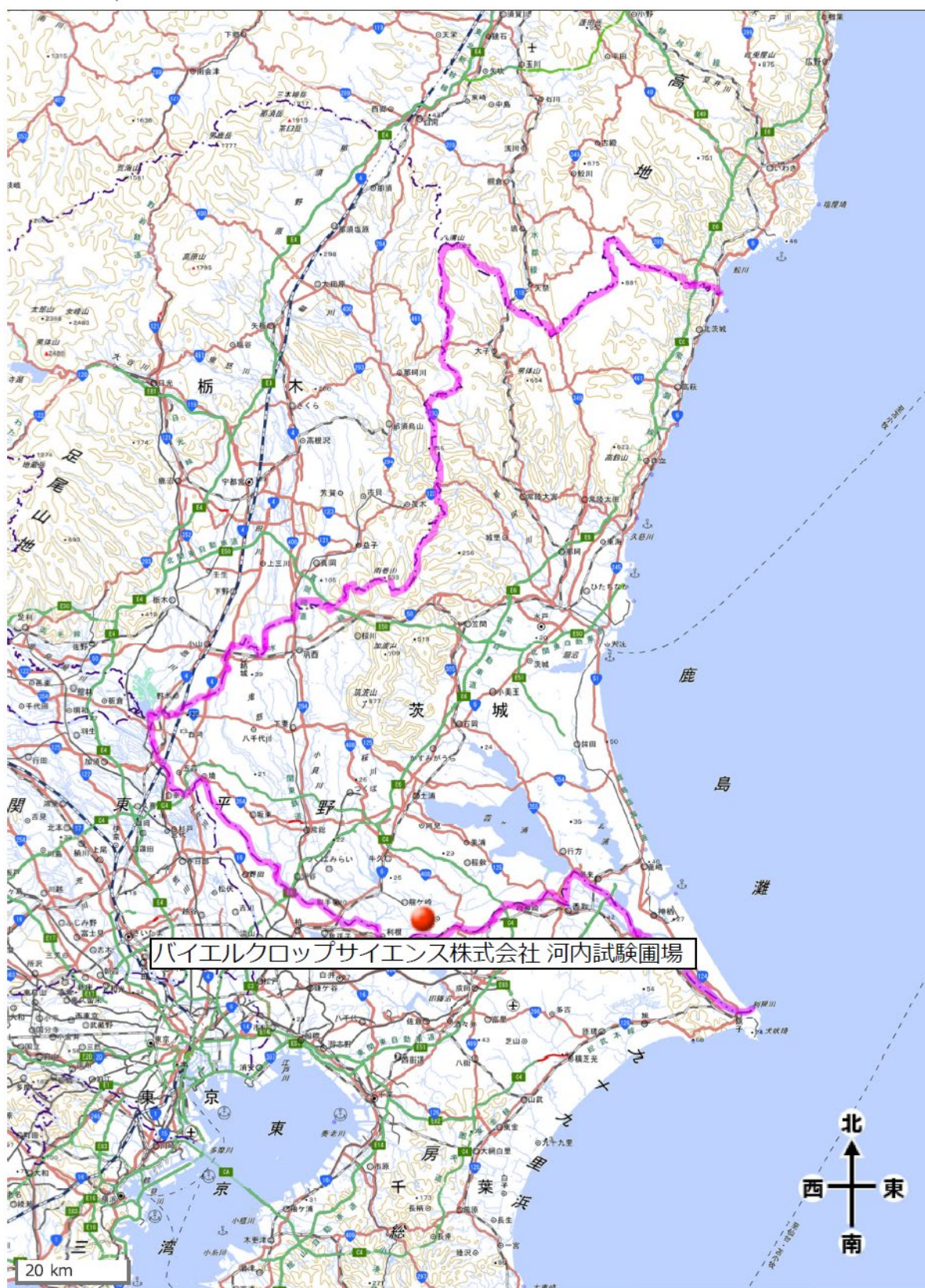


図 11 隔離ほ場の位置 (広域図)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2022年)											
		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 ライムギ			→								←	
No.2	非遺伝子組換え ライムギ											←	
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←						
	遺伝子組換え トウモロコシ						←						

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2023年)											
		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 ライムギ			→								←	
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←							
	遺伝子組換え トウモロコシ					←							
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え テンサイ					←							
	遺伝子組換え テンサイ					←							
No.5	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ											←	

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2024年)											
		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 ライムギ			→								←	
No.2	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ						←						
	遺伝子組換え ダイズ						←						
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え テンサイ				→								
	遺伝子組換え テンサイ				→								
	非遺伝子組換え ライムギ											←	
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え ダイズ						←						
	遺伝子組換え ダイズ						←						

図 12 隔離ほ場における栽培履歴³¹⁾

³¹⁾ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】

モニタリング計画書

2025年7月9日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 大島 美紀
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

1. 実施体制及び責任者

プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型除草剤耐性ダイズ (*H₂N90 PPO*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON94115, OECD UI: MON-94115-8) (以下「本組換えダイズ」という。)のモニタリングについて、現時点での実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

2025年7月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 社外広報マネジャー
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー

*: 管理責任者

2. 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*)

3. 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息又は生育状況

本組換えダイズの隔離ほ場試験は、バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場内にある隔離ほ場で行う。隔離ほ場内において本組換えダイズの栽培を予定している試験区周辺 10m の範囲においてモニタリングを実施する。

なお、2024 年 10 月の時点で試験区周辺 10m の範囲 (民家の敷地内を除く) でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

4. モニタリングの期間

本組換えダイズをバイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場内隔離ほ場で栽培している期間内とする。

5. 実施時期、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、試験区周辺 10m 以内にツルマメが生育しているかどうかを確認する。
- 2) 1)により、ツルマメの生育が認められた場合で、かつ、そのツルマメ集団の開花期間が本組換えダイズの開花期間と重複した場合、ツルマメ集団の位置情報を記録する。記録したツルマメ集団において秋以降に結実が見られた場合、ツルマメ 1 集団当たり最低 50 粒の種子を収集する。
- 3) 1) により、ツルマメの生育が認められない場合には、試験区周辺 75 m 以内で調査可能な範囲において最も試験区に近いツルマメの集団について、2) と同様の作業を行う。なお、試験区周辺 75 m 以内の土地は水田・畑・道路・用水路・民家等として利用されている。隔離ほ場周辺の地図を図 13 (p84) として、また隔離ほ場の位置を示す地図を図 14 (p85) として示す。

収集されたツルマメ種子に本組換えダイズの導入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。

6. モニタリングの結果の解析の方法

交雑検定の結果を基に、本組換えダイズからツルマメへの距離に依存した自然交雑の有無・頻度を解析する。

7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

本組換えダイズの第一種使用規程 (食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為) の申請時にモニタリング結果報告書を提出する。

8. その他必要な事項

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の導入遺伝子が検出される等、当該遺伝子のツルマメへの移行が認められ、若しくはその疑いがある場合にあっては、農林水産省及び環境省とモニタリングの期間等について協議を行うものとする。



図 13 隔離ほ場周辺の地図

本組換えダイズを栽培予定の試験区周辺 10m の範囲を赤で、75m の範囲を青で示した。

地理院地図 GSI Maps

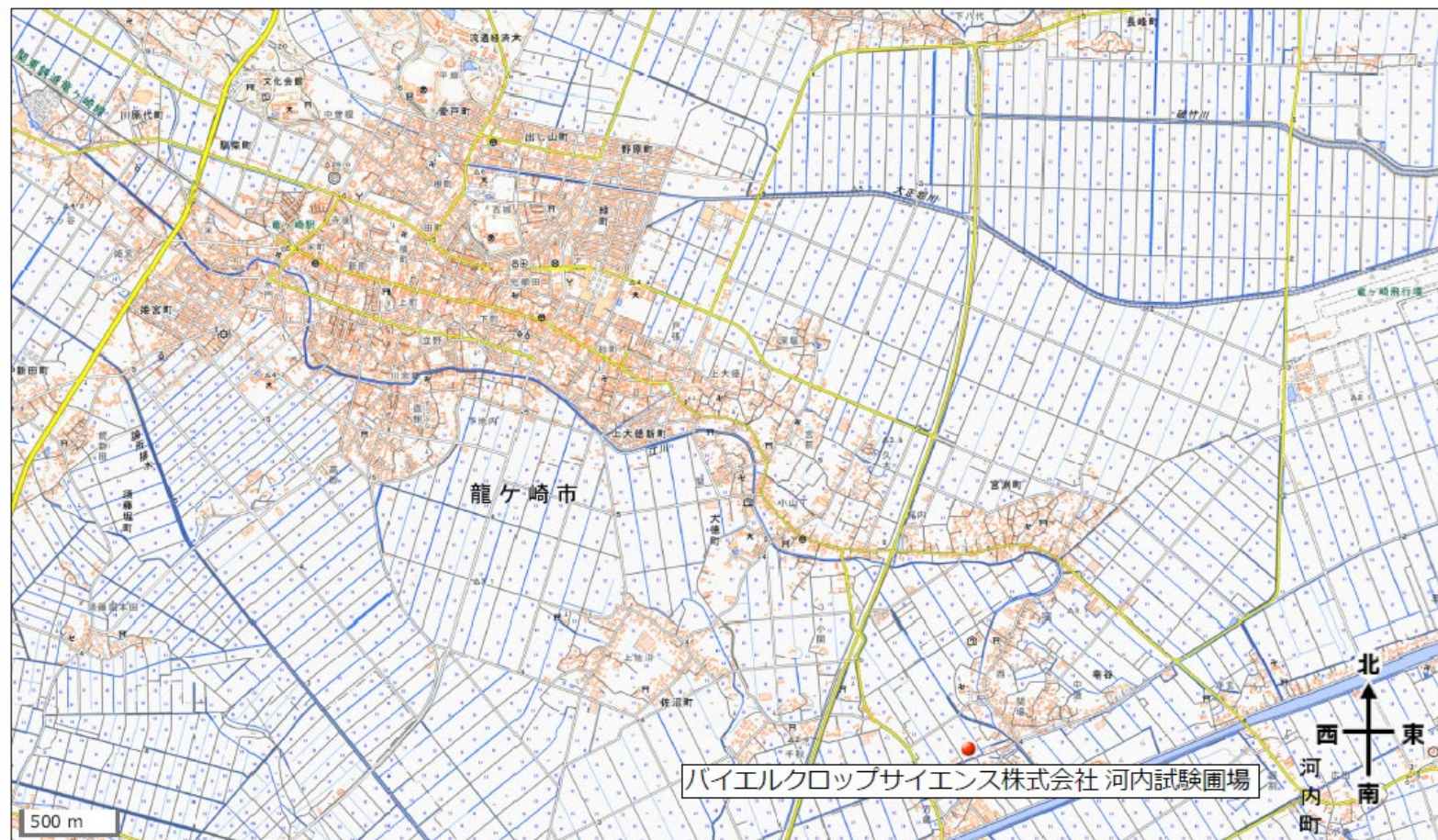


図 14 隔離ほ場の位置

別添資料リスト

別添資料 1	本組換えダイズで発現する PPO 蛋白質の推定アミノ酸配列 (社外秘)
別添資料 2	Sequence of Genetic Elements in PV-GMHT533023 (社外秘)
別添資料 3	PCR Analysis to Confirm the Absence of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Used to Produce MON 94115 (M-865756-01-1) (社外秘)
別添資料 4	Bioinformatics Evaluation of the MON 94115 Insertion Site Utilizing the GMA_2024 Database (M-860289-01-1) (社外秘)
別添資料 5	Amended from M-865659-01-1: Molecular Characterization of Herbicide-Tolerant Soybean MON 94115 (M-865659-02-1) (社外秘)
別添資料 6	Demonstration of the Presence of PPO Protein in Soybean Seed Samples Across Multiple Generations of MON 94115 (M-858620-01-1) (社外秘)
別添資料 7	Assessment of PPO Protein Levels in Herbicide Treated Leaf, Forage, Root and Grain Soybean Tissues Collected from MON 94115 Produced in United States Field Trials During 2023 (M-867685-01-1) (社外秘)
別添資料 8	Summary of Method for Detecting the Presence of the Soybean MON 94115 Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (M-869512-02-1) (社外秘)