

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ
(*gm-fad2-1, gm-hra, Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI :
DP-305423-1) の生物多様性影響評価書の概要

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	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	16
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
(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 ..	20
(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	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	34
(1) 使用等の内容	34
(2) 使用等の方法	34
(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	34
(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	34
(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	34
(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	36
1 競合における優位性	36
2 有害物質の産生性	37
3 交雑性	38
4 その他の性質	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
参考文献	43
緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合及び栽培目的の場合）	44

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 7 月 7 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿
環境大臣 鴨下 一郎 殿

氏名
デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔

申請者

住所
東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 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、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	高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (<i>gm-fad2-1</i> , <i>gm-hra</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

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 /Soyabean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

(The International Plant Names Index, 2004)

15

② 宿主の品種名又は系統名

宿主の品種名は Jack である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

国内外ともに、自然環境下でダイズが自生している地域は知られてない。

25

(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

30

ダイズの出産地は中国で、祖先の野生種はツルマメ (*Glycine soja*) と考えられている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。約 5,000 年前にダイズが存在していたことが中国の文献に記録されており、紀元前 11 世紀頃の周時代にはダイズが栽培されていたと考えられている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。

35

ダイズが我が国へ渡来した時期は、約 2,000 年前と推定され、現在では、全国的に栽培されている (農業技術体系, 2002)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

栽培地域：

40

米国、中国、ブラジル、アルゼンチン等を中心に、広い地域で栽培されている (農業技術体系, 2002)。我が国では、主として東日本で栽培されており、なかでも北海道と東北に多い (農業技術体系, 2002)。

栽培方法：

5 基肥として2~3kg/10aの窒素を施肥する。一般に、畝幅60~75cm、株間20cm、1株2粒播きで播種する。全株の80~90%の莢の色が変わり、軽く叩くとカラカラと音がするようになったら1週間以内に収穫し、種子の水分が15%程度に乾燥した後、脱穀する（作物学各論, 1999）。我が国では、主に北海道において、米国のような大規模な単作機械化栽培が行われている。また、全国的には水田転換畑での栽培やコムギ等麦類の後作としての栽培が行われている（農業技術体系, 2002）。

10 流通実態：

2006年における世界総栽培面積は約9,300万haで、最大の生産国である米国の栽培面積（約2,900万ha）がその31%を占める（FAOSTAT, 2007）。また、2006年における世界総生産量は約2億2千万トンで、米国は約8,800万トンと総生産量の40%を占める（FAOSTAT, 2007）。

15

我が国における2006年の栽培面積は14万2千haで、生産量は23万トンである（農林水産省, 2007）。同年に404万トンのダイズを輸入しており、そのうちの322万トン（80%）が米国からのものである（財務省貿易統計, 2007）。また、ダイズ油かすも輸入しており、2006年の輸入量は165万トンで、そのうち、米国からの輸入量は53万トン（32%）である（財務省貿易統計, 2007）。

20

用途：

我が国の場合、ダイズ消費量の約75%は搾油用に使われ、残り約25%は、豆腐、味噌、納豆、醤油、豆乳、もやし、枝豆等として利用されている。搾油後の油かすは飼料として利用される。

25

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

30

ダイズは一年生の双子葉植物で、最初に出る子葉は対生しており、次に初生葉が伸びて子葉と直角に対生する。さらに3片の小葉からなる第1複葉が出て、第2、第3複葉と続く。茎は主茎と分枝があり、主茎の伸長の型により有限伸育型と無限伸育型に分けられる。根は主根と側根に分けられ、根粒菌の寄生により根粒を着生する。花はマメ科植物に典型的なもので、旗弁1枚、翼弁2枚、竜骨弁2枚からなる。色は、白、青紫又は赤紫である。雄ずいは10本あり、うち9本は癒合、1本は離れており、それぞれが葯を持つ。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。ダイズの莢は子房の心皮に由来する。莢に含まれる種子の数は通常1~3個で、5個のものもある（農業技術体系, 2002）。

35

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

5 ダイズの栽培適地は、生育期間中の温度が 18～28℃程度、多照で適度に降雨のある所である。気候に対する適応性は高く（農学大事典, 1994）、北緯約 60 度のスウェーデンで栽培可能な品種もある（農業技術体系, 2002）。ダイズの好適土壌 pH は 6～7 の弱酸性から中性である（農学大事典, 1994）。

ハ 捕食性又は寄生性

10 —

ニ 繁殖又は増殖の様式

15 ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

20 ダイズの種子は莢の中に形成されることから、脱粒性は裂莢の難易に依存する。我が国で栽培されている品種は裂莢しやすく、米国の品種はしにくいことが知られている（農業技術体系, 2002）。ダイズ種子にはほとんど休眠性がない。まれに越年した種子が翌年に発芽することがあるが、その場合も十分に育つことはない（OECD, 2000）。乾燥・低温の貯蔵条件下では、種子の寿命は長期間維持できるが、多湿や乾燥状態が繰り返される自然条件下では、種子は急速に発芽能力を失う（農業技術体系, 2002）。

25 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

30 自然条件下で、種子以外に植物体を再生することができる組織又は器官は知られていない。

35 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

40 ダイズは、基本的に開花前に自家受粉する自殖性植物である（別紙 1）。自家不和合性は知られておらず、自然交雑率は 0.5%から 3%と報告されている（Garber and Odland, 1926； Caviness, 1966； Ahrent and Caviness, 1994； Poehlman and Sleper, 1995； 農業技術体系, 2002； 農学大事典, 1994）。

45 我が国に生育する、ダイズと交雑可能な近縁野生種はツルマメ (*G. soja*) である（農学大事典, 1994； OECD, 2000）。我が国では全国的に分布しており、シベリアのアムール川流域、中国、朝鮮半島及び台湾にも広く自生している（農業技術体系, 2002）。一年生植物で主に河原や土手に自生し、畑の周辺や果樹園にも生育が見られる（Kasahara, 1982）。ツルマメどうしの自然交雑率については 2.2～

2.3% (Kuroda *et al.*, 2008、Kiang *et al.*, 1992) との報告がある。また、13%であったとの報告 (Fujita *et al.*, 1997) もあるが、この高い交雑率は、訪花昆虫が多い等が理由であると考察されている。

5 ツルマメはダイズの祖先と考えられており、染色体数が同じ ($2n=40$) であり、ダイズとの交雑が可能である (農業技術体系, 2002)。しかしながら、ダイズの開花期はツルマメよりも早く、両種の開花期は重なりにくいことが知られている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。両種間の自然交雑を調査した結果、交雑を示唆する遺伝マーカーは検出されなかった (Kuroda *et al.*, 2008)。人為的に開花期を一致させ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で生育させた交雑試験では、収穫したツルマメ種子 32,502 粒中、1 粒のみダイズと交雑していた (農環研ニュース, 2008)。また、両種の開花期を人為的に一致させ、ダイズとツルマメを交互に 50cm 間隔で栽培した試験における両種間の交雑率は 0.73%であった (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

15

ダイズにはアポミクシスの特性を有するとして報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

20 花粉の生産量は少なく、花粉の寿命は 2~4 時間で失われる。花粉の直径は 21~30 μm である (Boerma and Specht, 2004)。ダイズ雌ずいの受精可能期間は、開花 1 日前から開花後 2 日間程度であり、花粉の寿命は数時間である。媒介方法は虫媒といわれているが、ダイズ個体同士では、約 2m 離れると交雑率は 0.036% になり、約 10m 離れると交雑率が 0% になることが報告されている (独立行政法人農業環境技術研究所、別紙 1)。

25

ホ 病原性

—

30

へ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、野生動植物等の生息又は生育に支障をおよぼすような有害物質の産生は知られていない。

35

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

10 高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤¹⁾耐性ダイズ (*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI : DP-305423-1) (以下、本組換えダイズ と表記) における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (7ページ) に、塩基配列を別紙 2 の図 3 及び図 4 に示した。

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

供与核酸の各構成要素の機能を表 1 (7ページ) に示した。

¹⁾ アセト乳酸合成酵素阻害剤としては、チフェンスルフロンメチルやトリベヌロンメチル等がある。

表 1 供与核酸の構成及びその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>gm-fad2-1</i> 遺伝子発現カセット (PHP19340 A)		
KTi3 プロモーター	2,084	ダイズ由来の Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子のプロモーター領域で、転写を開始する。胚形成時の胚における転写活性が最も高く、その活性は葉における転写活性の約1,000倍ある (Jofuku and Goldberg, 1989; Jofuku <i>et al.</i> , 1989)。
<i>gm-fad2-1</i>	597	ダイズ由来の内在性 <i>FAD2-1</i> 遺伝子における 399 番目のヌクレオチドから 995 番目のヌクレオチドまでの領域よりなる DNA 断片 (以下、 <i>gm-fad2-1</i> と表記) である。ダイズ内在性 <i>FAD2-1</i> 遺伝子は、オレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する ω -6 デサチュラーゼをコードする。 <i>gm-fad2-1</i> 遺伝子は、ジーンサイレンシング ²⁾ を誘導し、 ω -6 デサチュラーゼの発現を抑制する目的で導入した。
KTi3 ターミネーター	196	ダイズ由来の Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子のターミネーター領域で、転写を停止する (Jofuku and Goldberg, 1989; Jofuku <i>et al.</i> , 1989)。
<i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i>) 遺伝子発現カセット (PHP17752A)		
FRT1	51	酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 由来の Flp 組換え酵素認識配列 (Broach <i>et al.</i> , 1982) である。
SAMS プロモーター	645	ダイズ由来の S-アデノシル-L-メチオニンシンテターゼ (SAMS) 遺伝子の構成的発現プロモーター領域 (Falco and Li, 2003) で、転写を開始する。
SAMS イントロン	591	ダイズ由来の SAMS 遺伝子における 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域で (Falco and Li, 2003)、遺伝子発現量や転写産物の安定性を高める。
<i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i>)	1,971	ダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子(<i>als</i>)を、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないように改変した遺伝子 (<i>gm-hra</i>) で、GM-HRA 蛋白質前駆体をコードする。改変により、内在性アセト乳酸合成酵素 (ALS) の 178 番目のプロリンがアラニンに、555 番目のトリプトファンがロイシンに置換されている。また、N-末端に 5つのアミノ酸 (メチオニン-プロリン-ヒスチジン-アスパラギン-トレオニン) が付加されている (Falco and Li, 2003)。
<i>als</i> ターミネーター	652	ダイズ由来の <i>als</i> 遺伝子のターミネーター領域で、転写を停止する (Falco and Li, 2003)。
FRT6	51	FRT1 と 94%の相同性を持つ改変 FRT1 配列で、Flp 組換え酵素の認識配列である。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

²⁾ 内在性遺伝子とホモロジーのある外来遺伝子を植物の核ゲノムに導入した形質転換体において、導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現がいずれも低く抑えられる現象が知られており、ジーンサイレンシングと呼ばれる (森野と島本, 1996)。

- 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

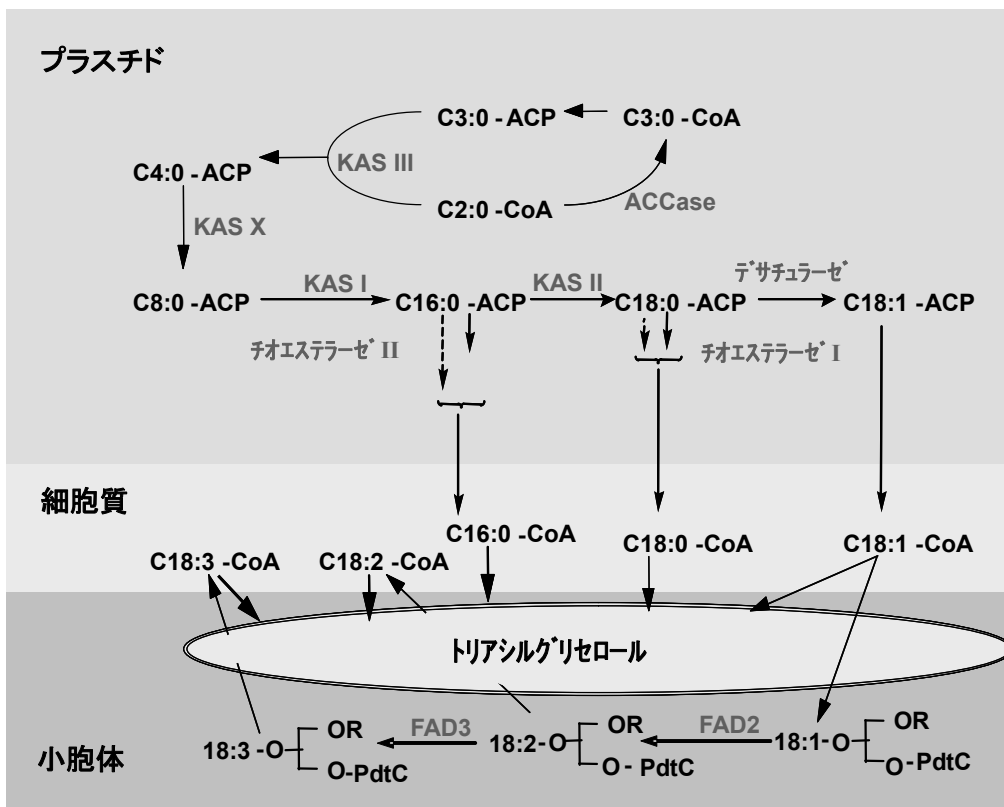
5

本組換えダイズには、高オレイン酸の形質を付与するための *gm-fad2-1* 遺伝子及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与するための *gm-hra* 遺伝子が導入されている。

10 *gm-fad2-1* 遺伝子

本組換えダイズには、*gm-fad2-1* 遺伝子が導入されている。*gm-fad2-1* 遺伝子は、ダイズ中で、オレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する ω -6 デサチュラーゼ(図 1,8ページ)をコードするダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の一部である。本遺伝子は、ジーンサイレンシングを誘導して ω -6 デサチュラーゼの発現を抑制することを目的に導入された。後述のように、本組換えダイズにおいては、意図したようにダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の発現レベルが抑制されており(図 7、26ページ)、結果としてリノール酸含有量が減少し、オレイン酸含有量が脂肪酸全体の75%程度に高められている(表 2、12ページ)。

20



C18:1=オレイン酸、C18:2=リノール酸、C18:3=リノレン酸、
FAD2= ω -6 デサチュラーゼ、FAD3= ω -3 デサチュラーゼ

図 1 油糧作物における脂肪酸合成経路

25

(本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

GM-HRA 蛋白質

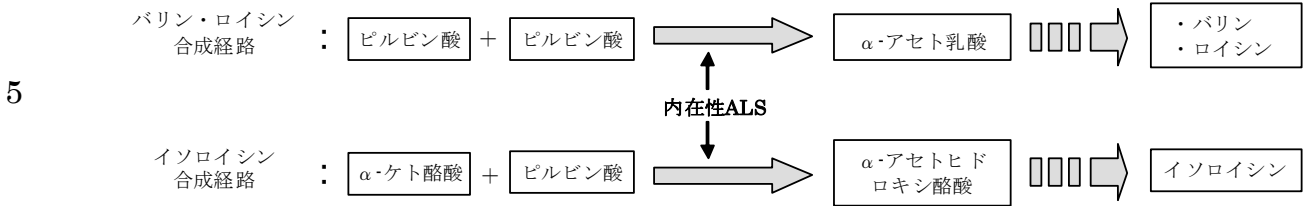
5 *gm-hra* 遺伝子がコードする GM-HRA 蛋白質前駆体は、N-末端の 5 つのアミノ酸の後に 47 個のアミノ酸からなる葉緑体移行配列を有する。葉緑体移行配列は、葉緑体への移行に伴い切断除去され、604 個のアミノ酸からなる 65kDa の成熟型 GM-HRA 蛋白質（以下、GM-HRA 蛋白質と表記）となる（別紙 2 の図 2）。

10 アセト乳酸合成酵素阻害剤は、植物中の分枝アミノ酸合成に関与する内在性アセト乳酸合成酵素の活性を特異的に阻害するため、植物中にバリン、ロイシン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる（図 2、10ページ）。GM-HRA 蛋白質は、アセト乳酸合成酵素阻害剤の存在下でも活性を示し、分枝アミノ酸合成経路が阻害されないことから、植物にアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する（図 2、10ページ）。

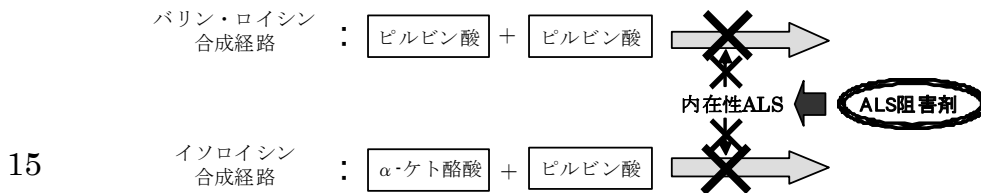
15 GM-HRA 蛋白質と既知アレルゲンとの構造相同性を検討するため、ネブラスカ大学 Food Allergy Research and Resource Program (FARRP, 2006) が提供するアレルゲンデータベースと、FASTA34 アルゴリズム (Pearson, 2000) を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。本データベース中には、合計 1,541 の重複のないアミノ酸配列が含まれる。本データベースを用いて統計解析を行った結果、20 GM-HRA 蛋白質と相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。

25 また、GM-HRA 蛋白質と既知毒性蛋白質との構造相同性を検討するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から入手可能な蛋白質アミノ酸配列データベースと、blastp アルゴリズム (NCBI, 2006; version 2.2.13) を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。本データベースを用いて統計解析を行った結果、GM-HRA 蛋白質と相同性を示す既知毒性蛋白質は認められなかった。

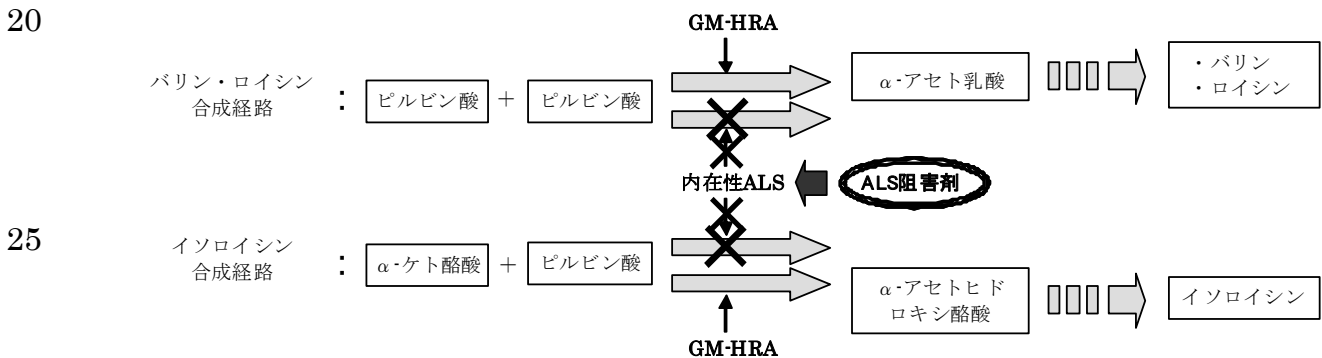
i) 非組換えダイズの除草剤非散布時



10 ii) 非組換えダイズのアセト乳酸合成酵素阻害剤散布時



20 iii) 本組換えダイズのアセト乳酸合成酵素阻害剤散布時



30 図 2 GM-HRA 蛋白質の作用機作

- 35
- i) 植物の内在性アセト乳酸合成酵素 (ALS) は、バリン、ロイシン及びイソロイシンの分枝アミノ酸を合成する。
 - ii) 非組換えダイズでは、アセト乳酸合成酵素阻害剤 (ALS 阻害剤) により ALS が阻害され、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成されず枯死する。
 - iii) 本組換えダイズでは GM-HRA 蛋白質の産生により、ALS 阻害剤の影響を受けず、分枝アミノ酸合成が可能となる。
- (本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5 宿主の持つ代謝系を変化させる可能性について、*gm-fad2-1* 遺伝子及び GM-HRA 蛋白質について、それぞれ評価を行い、さらに両者が相互に影響するかどうかについて評価した。

a *gm-fad2-1* 遺伝子

10 本組換えダイズでは、導入された *gm-fad2-1* 遺伝子によりダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の発現レベルが抑制されることから、リノール酸の合成が抑制され、結果としてオレイン酸含有量が高くなる（本文第一.2.（1）.ロ.②、7ページ）。

15 本組換えダイズ種子中の総脂肪酸量に対するオレイン酸含有率は、非組換えダイズの 21.1%から 76.5%に増加し、リノール酸の含有率は 52.5%から 3.62%に低下した（表 2、12ページ）。パルミチン酸、ステアリン酸及びリノレン酸の含有率は、非組換えダイズと比べ統計学的に有意（P 値<0.05）に低下したが、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値あるいは文献値の範囲内であった（表 2、12ページ）。

20 葉中の主要脂肪酸組成については、オレイン酸及びリノレン酸の含有率に統計学的有意差（P 値<0.05）が認められた。非組換えダイズのオレイン酸含有率が 3.61%であったのに対し、本組換えダイズは 4.43%であった。また、リノレン酸は、非組換えダイズが 50.0%であったのに対し、本組換えダイズは 47.4%であった。（表 2、12ページ）。

25 なお、種子中の脂質の含有量を測定した結果、本組換えダイズと非組換えダイズの脂質含有率はそれぞれ 15.9%と 14.9%であり、統計学的有意差（P 値<0.05）は認められなかった。

表 2 種子及び葉における主要脂肪酸組成¹⁾

分析項目	種子					葉		
	本組換え ダイズ ²⁾	非組換え ダイズ ²⁾	P 値	許容値の 範囲 ³⁾	文献値の 範囲 ⁴⁾	本組換え ダイズ ⁵⁾	非組換え ダイズ ⁵⁾	P 値
パルミチン酸 (C16:0)	6.28±0.16	10.3±0.2	0.0001	2.93 – 19.6	7–15.8	11.2±0.3	10.7±0.2	0.18
ステアリン酸 (C18:0)	4.36±0.16	4.98±0.16	0.0001	0.852 – 8.34	2–5.88	4.92±0.17	4.89±0.09	0.87
オレイン酸 (C18:1)	76.5±1.3	21.1±1.3	0.0001	11.3 – 32.6	14.3 – 34	4.43±0.02	3.61±0.09	0.0001
リノール酸 (C18:2)	3.62±0.91	52.5±0.9	0.0001	41.7 – 64.3	42.3 – 60	10.1±1.2	9.56±0.36	0.55
リノレン酸 (C18:3)	5.39±0.53	9.35±0.53	0.0001	1.15 – 14.7	2–12.5	47.4±0.4	50.0±0.8	0.04

1) 分析値は総脂肪酸量に占める割合(%)で示した。

2) n=18、平均値±標準誤差。2005年に北米の6ヶ所のほ場の3ブロックで栽培して得た BC1F5 世代 (図 6、19ページ) の種子を用いた。統計解析には、分散分析を用いた。

3) 許容値の範囲は、2005年に北米の6ヶ所で栽培された4つの商業非組換えダイズ品種の分析結果に基づいて、分析値の99%を含むように統計学的に設定された上限値と下限値の区間を示す。

4) ILSI (2004) 及び OECD (2001) の文献データに基づく。

5) 本組換えダイズは n=4、非組換えダイズは n=8、平均値±標準誤差。2006年に米国の温室で栽培した T4 世代 (図 6、19ページ) の葉を用いた。統計解析には、t 検定を用いた。葉に関して、許容値及び文献値はない。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

b GM-HRA 蛋白質

GM-HRA 蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させないかどうかについて、はじめにアミノ酸合成への影響を、次に脂肪酸合成への影響を検討した。

アミノ酸合成について

GM-HRA 蛋白質は、内在性 ALS 蛋白質と同様、分枝アミノ酸合成経路で作用する (図 2、10ページ)。このうち、バリン・ロイシン合成経路においては、内在性 ALS 蛋白質は、バリンによるフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによるフィードバック制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼが、イソロイシンによるフィードバック制御を受けることが知られている (生化学辞典, 1998)。したがって、内在性 ALS 及び GM-HRA 蛋白質が同時に分枝アミノ酸合成経路で作用した場合においても、フィードバック制御が働き、これらの分枝アミノ酸含有量が増加することはないと考えられる。

実際に、本組換えダイズの種子及び葉中のアミノ酸組成の分析を行った結果、種子においては、トレオニン及びグルタミン酸について、非組換えダイズとの間に統計学的有意差 ($P<0.05$) が認められたが、非組換えダイズの分析値に基づく許容値あるいは文献値の範囲内であった。また、葉においては、ロイシンに統計学的有意差が認められたが、その含有率は非組換えダイズが 9.60%で、本組換えダイズが 9.97%であった。その他のアミノ酸については、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった (表 3、13ページ)。

表 3 種子及び葉のアミノ酸組成

分析項目	種子					葉		
	本組換えダイズ ¹⁾	非組換えダイズ ¹⁾	P値	許容値の範囲 ²⁾	文献値の範囲 ³⁾	本組換えダイズ ⁴⁾	非組換えダイズ ⁴⁾	P値
アスパラギン酸	4.91±0.08	5.01±0.08	0.07	3.67 – 6.33	3.81 – 5.12	11.0±0.1	10.8±0.1	0.28
トレオニン	1.95±0.03	1.91±0.03	0.02	1.57 – 2.21	1.14 – 1.89	5.07±0.13	5.09±0.13	0.99
セリン	2.28±0.04	2.26±0.04	0.35	1.85 – 2.71	1.11 – 2.48	4.37±0.28	4.97±0.29	0.24
グルタミン酸	7.92±0.11	7.69±0.11	0.02	6.04 – 9.54	5.84 – 8.72	12.1±0.1	12.3±0.1	0.47
プロリン	2.32±0.04	2.27±0.04	0.18	1.85 – 2.70	1.69 – 2.61	4.70±0.10	4.55±0.10	0.40
グリシン	1.93±0.03	1.89±0.03	0.37	1.54 – 2.18	1.46 – 2.02	5.04±0.07	4.99±0.07	0.68
アラニン	1.73±0.04	1.66±0.04	0.22	1.35 – 2.07	1.49 – 2.10	5.59±0.07	5.62±0.07	0.73
シスチン	0.614 ± 0.018	0.638 ± 0.017	0.13	0.378 – 0.869	0.370 – 0.808	1.27±0.04	1.31±0.04	0.38
バリン	1.87±0.04	1.84±0.04	0.36	1.58 – 2.18	1.50 – 2.44	6.37±0.07	6.37±0.07	0.98
メチオニン	0.712±0.011	0.714±0.011	0.92	0.488 – 0.852	0.431 – 0.681	2.09±0.04	2.05±0.04	0.55
イソロイシン	1.79±0.03	1.78±0.03	0.57	1.56 – 2.09	1.46 – 2.12	5.36±0.03	5.28±0.03	0.14
ロイシン	2.99±0.03	2.97±0.03	0.54	2.53 – 3.52	2.20 – 4.00	9.97±0.07	9.60±0.08	0.01
チロシン	1.36±0.04	1.34±0.04	0.67	0.908 – 1.69	1.02 – 1.62	4.71±0.05	4.71±0.05	0.94
フェニルアラニン	2.10±0.04	2.07±0.04	0.57	1.74 – 2.43	1.60 – 2.35	5.98±0.09	5.90±0.09	0.57
ヒスチジン	1.21±0.03	1.17±0.03	0.29	0.897 – 1.41	0.878 – 1.22	2.48±0.02	2.44±0.02	0.25
リシン	2.58±0.05	2.56±0.05	0.77	1.98 – 3.10	2.29 – 2.86	7.23±0.14	7.36±0.14	0.51
トリプトファン	0.507±0.014	0.496±0.014	0.36	0.359 – 0.632	0.356 – 0.670	- 5)	- 5)	
アルギニン	2.99±0.08	2.81±0.08	0.07	2.01 – 3.60	2.29 – 3.49	6.61±0.11	6.69±0.11	0.65

1) n=18、平均値±標準誤差。種子の分析値は乾物重当たりの割合 (%) で示した。北米の 6ヶ所のほ場の 3 ブロックで 2005 年に栽培した BC1F5 世代 (図 6、19ページ) を用いた。統計解析には、分散分析を用いた。

2) 許容値の範囲は、2005 年に北米の 6ヶ所で栽培された 4つの商業非組換えダイズ品種の分析結果に基づいて、分析値の 99%を含むように統計学的に設定された上限値と下限値の区間を示す。

3) ILSI (2004)、OECD (2001) 及び Taylor *et al.* (1999) の文献データに基づく。

4) n=5、平均値±標準誤差。葉の分析値は総アミノ酸量に占める割合 (%) で示している。米国の温室で 2006 年に栽培した T4 世代 (図 6、19ページ) を用いた。統計解析には、分散分析を用いた。葉に関して、許容値及び文献値はない。

5) 未分析。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

脂肪酸の生合成について

5 本組換えダイズ種子中の脂肪酸組成を分析した結果、非組換えダイズに比べ、
ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸に統計学的に有意な増加 ($P<0.05$) が認めら
れたが、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の総脂肪酸量に占める割合は、それ
ぞれ 0.798%と 1.19%であった。(表 4、14ページ)。

10 図 2 (10ページ) に示すとおり、内在性 ALS は、分枝アミノ酸合成系におい
てピルビン酸及び α -ケト酪酸を基質とする。これらは、脂肪酸合成系における基
質でもある(別紙 3)。GM-HRA 蛋白質は、内在性 ALS に比べ α -ケト酪酸に対
する基質親和性が低く、本組換えダイズでは、 α -ケト酪酸濃度がピルビン酸より
15 相対的に高まり、 α -ケト酪酸から合成されるヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸
の含有量が増加するのではないかと推測した。詳細は、別紙 3 に記述した。なお、
文部科学省の日本食品標準成分表(2005)によると、ヘプタデカン酸とヘプタデ
セン酸は、多くの動植物に含まれる一般的な脂肪酸であることが示されている
(表 5、15ページ及び表 6、16ページ)。

20 オレイン酸、リノール酸、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸以外の脂肪酸に
ついては、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差 ($P<0.05$) が
認められないか、差が認められた場合でも、非組換えダイズの分析値に基づく許
容値あるいは文献値の範囲内であった。

表 4 種子中のヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の総脂肪酸量に占める割合 (%)
(社外秘)

25

表 5 動植物中のヘプタデカン酸 (C17:0) の総脂肪酸量に占める割合 (%)

野菜類	ナス	1.4
	セロリ	0.9
	ニンジン	0.7
	ニンニク	0.6
	キャベツ	0.4
	ヤマトイモ	0.4
果実類	カキ	0.8
	リンゴ	0.7
	キンカン	0.6
	レモン	0.6
キノコ類	ブナシメジ	0.8
	マッシュルーム	0.8
藻類	ヒジキ	0.5
魚介類	シジミ	2.9
	アサリ	1.9
	タイショウエビ	1.8
	ブリ	1.6
	メザシ	1.5
	カキ	1.4
肉類	牛	1.0
	豚	0.3
卵類	鶏卵	0.3

文部科学省の日本食品成分標準表 (2005) のデータに基づく。

表 6 動植物中のヘプタデセン酸 (C17:1) の総脂肪酸量に占める割合 (%)

野菜類	タマネギ	0.7
	シュンギク	0.3
	ニンニク	0.3
	インゲン	0.2
	カボチャ	0.2
果実類	カキ	0.7
	ウンシュウミカン	0.4
	キンカン	0.2
キノコ類	マイタケ	0.3
	キクラゲ	0.3
藻類	ヒジキ	0.4
	マコンブ	0.3
魚介類	アユ	1.5
	タイショウエビ	1.5
	カキ	1.3
	ウニ	1.2
	ブリ	1.0
	マグロ	0.8
肉類	牛	1.0
	豚	0.3
卵類	鶏卵	0.2

文部科学省の日本食品成分標準表 (2005) のデータに基づく。

5

c *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の発現が相互に影響するかどうかについて

10 *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の発現は、それぞれオレイン酸からリノール酸への合成及び分枝アミノ酸合成に関わるが、両合成経路はいずれも植物体中で独立した代謝経路で、基質も異なることから、両遺伝子の発現が相互に影響することは考え難い。

(2) ベクターに関する情報

15

イ 名称及び由来

20 本組換えダイズの作出に用いたベクターは、プラスミド PHP19340 (図 3、17 ページ) 及び PHP17752 (図 4、17 ページ) である。これらは、大腸菌 (*E. coli*) 由来のプラスミド pUC19 から作成された。プラスミド PHP19340 及び PHP17752 から、制限酵素により直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A をそれぞれ切り出し、本組換えダイズへの導入に用いた。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 プラスミド PHP19340 及び PHP17752 の塩基数は、それぞれ 5,438bp 及び 7,026bp である。また、直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A の塩基数は、それぞれ 2,924bp、4,512bp である。各直鎖状 DNA 断片の塩基配列を、別紙 2 の図 3 及び図 4 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

15 プラスミド PHP19340 及び PHP17752 の外骨格領域には、抗生物質ハイグロマイシン耐性マーカー遺伝子、*hyg* 遺伝子が含まれる。本遺伝子は、微生物中でベクターを増殖させる際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するために必要なマーカーとして機能する。本抗生物質耐性遺伝子は、宿主には導入されていないことが確認されている（別紙 4）。

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

20 本ベクターに感染性はない。

(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

25 導入に用いた PHP19340A、PHP17752A における供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位を、図 3（17ページ）及び図 4（17ページ）に示した。

30 図 3 プラスミド PHP19340 及び直鎖状 DNA 断片 PHP19340A における供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位（社外秘）

 図 4 プラスミド PHP17752 及び直鎖状 DNA 断片 PHP17752A における供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位（社外秘）

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

 宿主内への核酸の移入は、パーティクルガン法で行った（Klein *et al.*, 1987）。供与核酸の宿主への移入の経過を図 5（19ページ）に示した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

5 本組換えダイズの、作出から選抜・育成の過程は以下のとおりである（図 5、19ページ）。

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

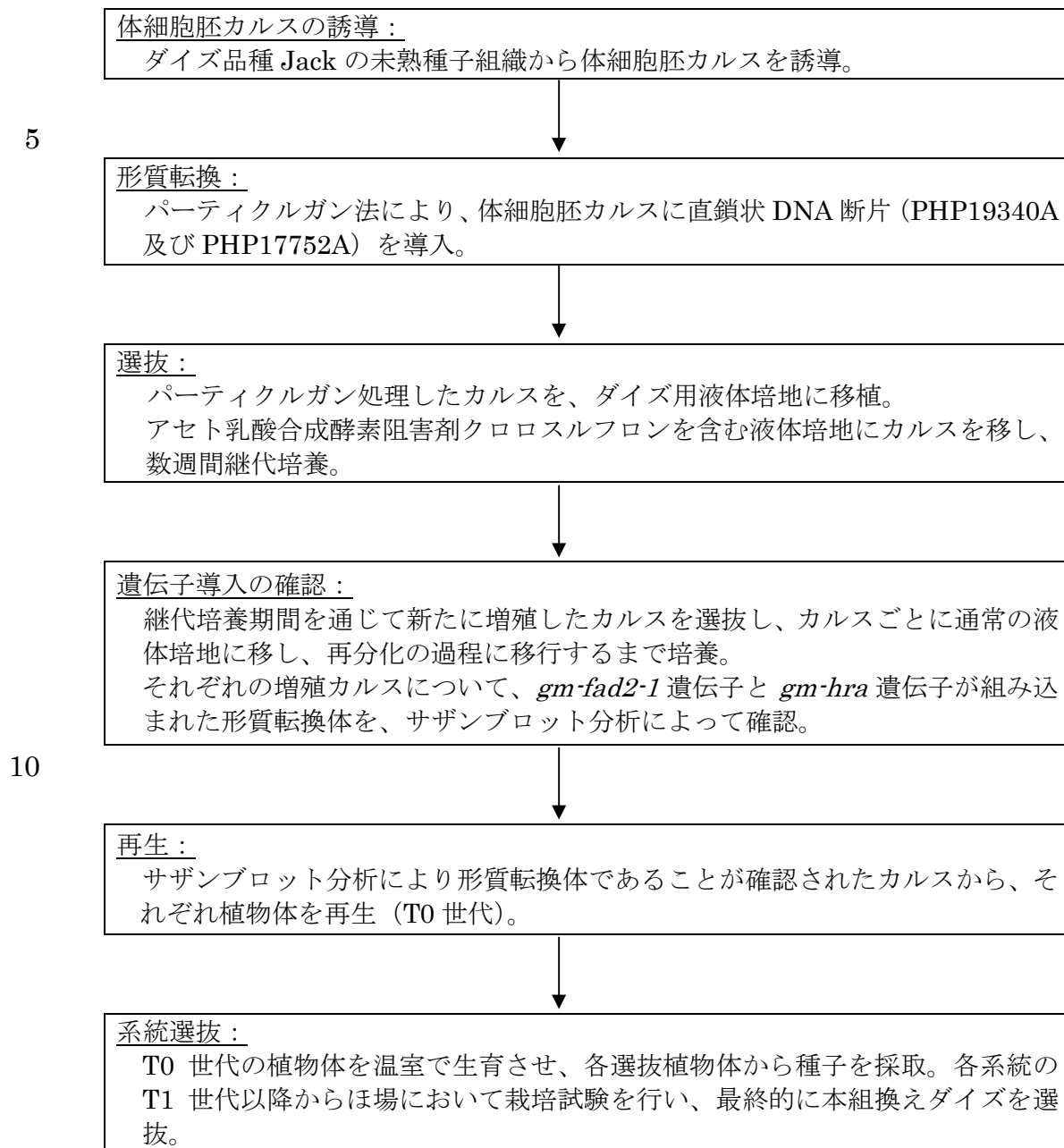
10 核酸が移入された細胞の選抜は、体細胞胚カルスをアセト乳酸合成酵素阻害剤を加えた培地で培養して行った。

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

15 —

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及び系統樹

20 本組換えダイズの育成経過を図 6（19ページ）に示した。なお、本組換えダイズの承認申請の範囲は、図 6の育成経過における T0 以降である。



15 図 5 供与核酸の宿主への移入及び本組換えダイズの選抜過程
(本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

20 図 6 本組換えダイズの育成経過 (社外秘)

(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

gm-fad2-1 遺伝子 : T1、T2 及び T3 世代 (図 6、19ページ) を用い、高オレイン酸形質を指標として分離比を解析した。その結果、いずれの世代においても、オレイン酸含有率が総脂肪酸量の 75%程度であった個体数と 20%程度であった個体数の比率は、期待値の 3:1 に一致した (表 7、20ページ)。

10

gm-hra 遺伝子 : 本組換えダイズの BC1F2 世代 (図 6、19ページ) を用い PCR 分析で *gm-hra* 遺伝子を有する個体数を計測し、分離比を検定した。その結果、分離比は、期待値の 3:1 に一致した (表 8、20ページ)。

15

以上、移入した両遺伝子が、メンデルの法則に従って後代に安定して伝達されていたことから、移入された核酸の複製物は、ダイズ染色体ゲノム上に存在することが確認された。

20

表 7 T1、T2 及び T3 世代におけるオレイン酸含有率に基づく分離比の解析

供試世代	種子数実測値		種子数期待値		P 値
	高オレイン酸種子	高オレイン酸でない種子	高オレイン酸種子	高オレイン酸でない種子	
T1	26	4	22.5	7.5	0.14
T2	30	7	27.75	9.25	0.39
T3	78	23	75.75	25.25	0.61

2002 年及び 2003 年に米国の温室で、各供試世代 1 個体を栽培し、収穫した種子中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより測定した。オレイン酸含有率が総脂肪酸量の 75%程度の個体数と 20%程度の個体数を数えた。分離比の期待値を 3:1 として χ^2 検定を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

25

表 8 BC1F2 世代における PCR 分析による *gm-hra* 遺伝子の分離比の解析

供試世代	個体数実測値		個体数期待値		P 値
	<i>gm-hra</i> 遺伝子有り	<i>gm-hra</i> 遺伝子無し	<i>gm-hra</i> 遺伝子有り	<i>gm-hra</i> 遺伝子無し	
BC1F2	111	33	108	36	0.63

2006 年に米国の温室で BC1F2 世代の種子を播種し、各個体から葉を採取し、PCR 分析を行い、*gm-hra* 遺伝子を有する個体を数えた。分離比の期待値を 3:1 として χ^2 検定を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

30

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

5 移入された核酸の複製物のコピー数

本組換えダイズに移入された核酸の複製物のコピー数を、サザンブロット分析により調べた。分析は、T4 及び T5 世代 (図 6、19ページ) の葉から抽出したゲノム DNA を用い、複数の制限酵素とプローブの組合せで行った (別紙 4)。

10

その結果、本組換えダイズには、断片を含む複数コピーが導入されていることが確認された (別紙 4)。そこで、挿入領域をクローニングし塩基配列を決定した結果、遺伝子が 4 つの領域に挿入されたことが分かった。各領域の構成は以下のとおりである。

15

- ・領域 1 : 1 コピーの完全な *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット (PHP19340A) と 1 コピーの完全な *gm-hra* 遺伝子発現カセット (PHP17752A) に加えて、3 つの PHP19340A 断片及び 1 つの KTi3 プロモーター断片からなる (別紙 4 の図 7)。
- ・領域 2 : 1 つの PHP19340A 断片からなる (別紙 4 の図 8)。
- ・領域 3 : 1 つの KTi3 プロモーター断片及び 495 bp のプラスミド外骨格領域からなる (別紙 4 の図 9)。
- ・領域 4 : 逆方向に挿入された PHP19340A 断片からなる (別紙 4 の図 10)。

20

25 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

本組換えダイズの T4、T5 及び F2 世代を用い、サザンブロット分析を行った。T4 及び T5 世代はそれぞれ 7 個体、F2 世代は 100 個体で行った。T4 及び T5 世代の 7 個体のバンドパターンは、いずれも一致していた (別紙 4、図 11 及び図 12)。F2 世代では、1 個体を除いて、バンドパターンは、T4 及び T5 世代の結果と一致していた。このことから、本組換えダイズ中に導入された遺伝子が、複数世代に渡り安定的に遺伝していることが確認された。

30

なお、F2 世代においてバンドパターンが異なっていた 1 個体は、本組換えダイズの挿入遺伝子の内、挿入遺伝子 1 の *gm-hra* 遺伝子発現カセット及び隣接する KTi3 プロモーター断片が脱落したと考えられた (別紙 4 の図 11)。

35

そこで、このような遺伝子の脱落が容易に生じる現象ではないことを調べるため、さらに F2 世代の 1,000 個体について、PCR 法により遺伝子の有無を確認した結果、遺伝子の脱落は観察されなかった。

40

以上の結果から、本組換えダイズの挿入遺伝子は、後代に安定して遺伝することが確認された。

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 ② (21ページ) で述べたように、本組換えダイズに移入された核酸の複製物は、染色体上の 4 つの領域に挿入されたことが示され、1,000 個体においても遺伝子の脱落は認められなかった。

10 このことから、本組換えダイズで特定された 4 つの挿入領域は、強く連鎖しており同一遺伝子座に存在すると考えられた。

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

15 a *gm-fad2-1* 遺伝子による高オレイン酸形質発現の安定性

gm-fad2-1 遺伝子によって付加された高オレイン酸形質の確認のため、T4 及び T5 の 2 世代 (図 6、19ページ) の 14~15 株から収穫した種子を用いて、脂肪酸組成を分析した。

20

その結果、両世代のオレイン酸含有率は 75%程度であり、付与された高オレイン酸形質が個体間及び世代間で安定して発現していることが確認された (表 9、22ページ)。

25 表 9 T4 及び T5 世代における主要脂肪酸組成

供試世代	脂肪酸組成 (総脂肪酸量に対する割合 (%)) ¹⁾				
	パルミチン酸 (C16:0)	ステアリン酸 (C18:0)	オレイン酸 (C18:1)	リノール酸 (C18:2)	リノレン酸 (C18:3)
T4 世代 ²⁾	8.23±0.22 (7.00 - 10.42)	2.53±0.05 (2.20 - 3.03)	78.8± 0.7 (74.8 - 83.5)	1.25 ±0.08 (0.681 - 1.86)	3.61±0.17 (2.90 - 5.05)
T5 世代 ³⁾	7.19±0.08 (6.73 - 7.74)	2.98±0.06 (2.62 - 3.41)	78.3± 0.3 (76.4 - 80.2)	1.31 ±0.06 (0.970 - 1.80)	5.88±0.21 (4.46 - 7.23)

1) 平均値±標準誤差 (最小値-最大値)。2005 年に米国の温室で栽培し、収穫した種子中の脂肪酸含有量をガスクロマトグラフィーにより測定した。

2) n=15。

3) n=14。

30 (本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

b *gm-hra* 遺伝子の発現の安定性

35 GM-HRA 蛋白質が本組換えダイズで安定して産生されることを確認するため、本組換えダイズの T6 世代と BC1F5 世代 (図 6、19ページ) を用い、除草剤散布試験及び ELISA 分析を行った。

薬剤散布試験

5 アセト乳酸合成酵素阻害剤を散布して、薬害程度を、0%（全く影響を受けていない）から 100%（完全に枯死している）のスケールで目視観察した。

10 その結果（表 10、23ページ）、非組換えダイズにおいて約 60%の薬害が認められたが、本組換えダイズでは、T6 及び BC1F5 世代のいずれの個体にも薬害は認められなかった。したがって、アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性の形質が世代間及び個体間で安定して発現していることが確認された。

表 10 アセト乳酸合成酵素阻害剤散布の結果

供試世代	薬剤散布の有無	本組換えダイズ	非組換えダイズ
T6 世代	薬剤散布	0±0	58±3
	薬剤非散布	0±0	0±0
BC1F5 世代	薬剤散布	0±0	59±4
	薬剤非散布	0±0	0±0

15 n=30、平均値±標準誤差。米国の温室で 2005 年に実施した。本組換えダイズ及び非組換えダイズを各 10 種子 3 反復で播種し、播種 12 日後にアセト乳酸合成酵素阻害剤（クロリムロン（33.4 g ai/ha）+ チフェンスルフロン（10.7 g ai/ha））を散布した。散布 2 週間後に、各個体の薬害の程度を 0（健全）から 100%（完全枯死）で目視観察した。なお、本散布試験は、米国における農薬登録使用基準の 6 倍の薬量で行った。

20 （本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある）

ELISA 分析による葉中 GM-HRA 蛋白質の測定

25 本組換えダイズについて各世代 3 個体の葉を用い、GM-HR 蛋白質の ELISA 分析を行った。その結果、本組換えダイズの全ての個体で GM-HRA 蛋白質が発現し、その産生量に T6 世代と BC1F5 世代の間で統計学的有意差は認められなかった。また、非組換えダイズでは、発現が認められなかった。このことから GM-HRA 蛋白質が、個体間世代間で安定的に産生されることが確認された（表 11、23ページ）。

30

表 11 ELISA 分析による GM-HRA 蛋白質の産生量

蛋白質量	T6 世代	BC1F5 世代	P 値
GM-HRA 蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	1.1±0.0 (1.0 - 1.1)	0.9±0.1 (0.7 - 1.1)	0.18

35 n=3、平均値±標準誤差（最小値-最大値）。米国の温室で 2005 年に栽培した、播種 5 週間後の本組換えダイズ及び非組換えダイズ各 3 個体の葉 10mg/個体を用いて、ELISA 分析を行った。

（本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある）

⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、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

① 検出及び識別の方法

種子から抽出した 100ng のゲノム DNA を鋳型とし、以下の条件でリアルタイム PCR 分析を行う。

15

- ・プライマー：KTi3 プロモーターとダイズゲノム DNA の境界領域を増幅するプライマー対。プライマー及びプローブの塩基配列は、別紙 2 の図 5 に示した。
- ・アニーリング温度：60℃
- ・サイクル回数：45 回

20

本法により、本組換えダイズ特異的に増幅が行われる。

② 感度

25

100ng のゲノム DNA をサンプルとした場合の定量限界は 0.09%である。

③ 信頼性

30

本組換えダイズを用い、8 反復、2 ヶ所で分析を行い、本法に再現性があることを確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

35

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

gm-fad2-1 遺伝子により付与された特性

40

gm-fad2-1 遺伝子は、 ω -6 デサチュラーゼをコードするダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の一部である。本遺伝子は、ジーンサイレンシングを誘導して ω -6 デサチュラーゼの発現を抑制することを目的に導入された。

内在性 *FAD2-1* 遺伝子の発現レベルが抑制されていることを確認するため、本組換えダイズ種子を用い、ノーザンブロット分析を行った。その結果、本組換えダイズの種子において、内在性 *FAD2-1* 遺伝子の発現が著しく抑制されていることが確認された（図 7、26ページ）。また、葉を用いてノーザンブロット分析を行った結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズのいずれにおいても、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子及び *gm-fad2-1* 遺伝子由来の mRNA のバンドは検出されなかった（図 8、27ページ）。したがって、両遺伝子の発現が種子特異的であることが示された。

実際に、本組換えダイズ種子中の総脂肪酸量当りのオレイン酸含有率が、75%程度に高まっていることを確認した（表 2、12ページ）。オレイン酸の摂取は、ヒトの血中 LDL-コレステロール（いわゆる悪玉コレステロール）を低下させることが報告されている（Wollet and Dietschy, 1994）。また、市販の食用油脂の製造においては、酸化安定性を高めるために水素添加が行われるが、その過程でトランス脂肪酸が生成することが知られている。このトランス脂肪酸の摂取は、血中 LDL コレステロールを増加させる（食品安全委員会, 2007）。本組換えダイズ由来の油は、酸化安定性の高いオレイン酸を高含有することから、水素添加の必要性が低い。したがって、本組換えダイズ由来の油を利用することにより、トランス脂肪酸の摂取量を抑えることができると期待される。

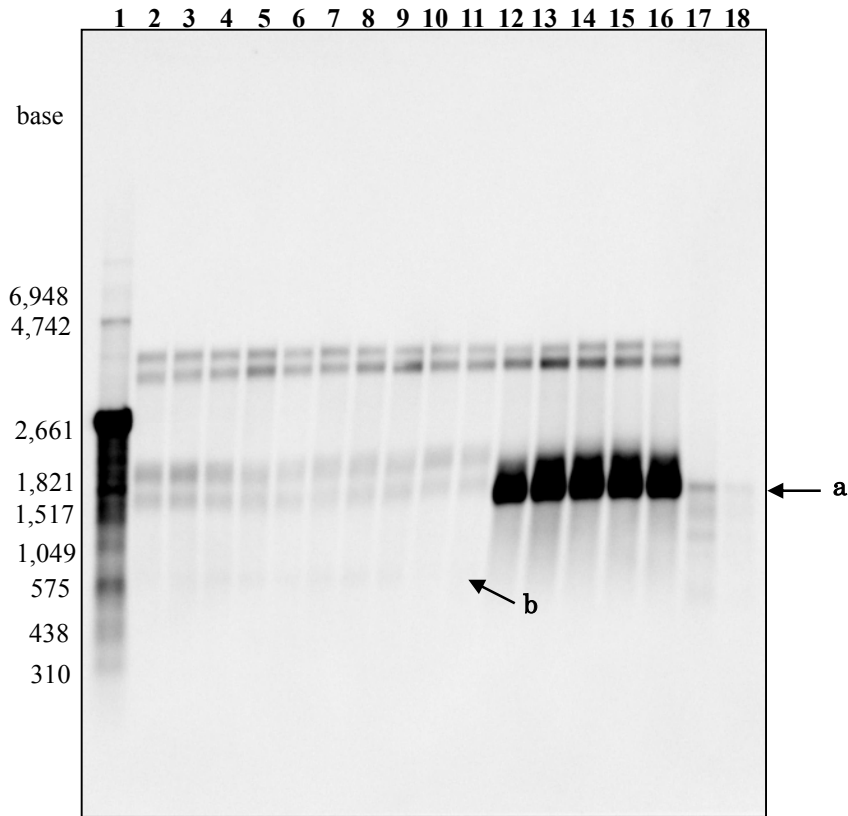


図 7 種子における *gm-fad2-1* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析

レーン	供試サンプル	レーン	供試サンプル
1	分子量マーカー (DIG RNAI)	10	本組換えダイズ-9
2	本組換えダイズ-1	11	本組換えダイズ-10
3	本組換えダイズ-2	12	非組換えダイズ-1
4	本組換えダイズ-3	13	非組換えダイズ-2
5	本組換えダイズ-4	14	非組換えダイズ-3
6	本組換えダイズ-5	15	非組換えダイズ-4
7	本組換えダイズ-6	16	非組換えダイズ-5
8	本組換えダイズ-7	17	陽性対照* (25 pg <i>FAD2-1</i> 遺伝子転写産物)
9	本組換えダイズ-8	18	陽性対照* (5 pg <i>FAD2-1</i> 遺伝子転写産物)

5 * ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の *in vitro* 転写産物をそれぞれ泳動した。

10 米国の温室で T4 世代を栽培し、開花 30 日後に種子を採取した。分析において 1 レーン当たり 200ng の mRNA を泳動した。非組換えダイズでは、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の転写産物である約 1,500base のバンド (図中 a) が検出された。一方、本組換えダイズにおけるダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の転写レベルは、非組換えダイズと比べて著しく抑制されており、また、検出された *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物のバンド (約 700base、図中 b) も微弱であった。

(本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)

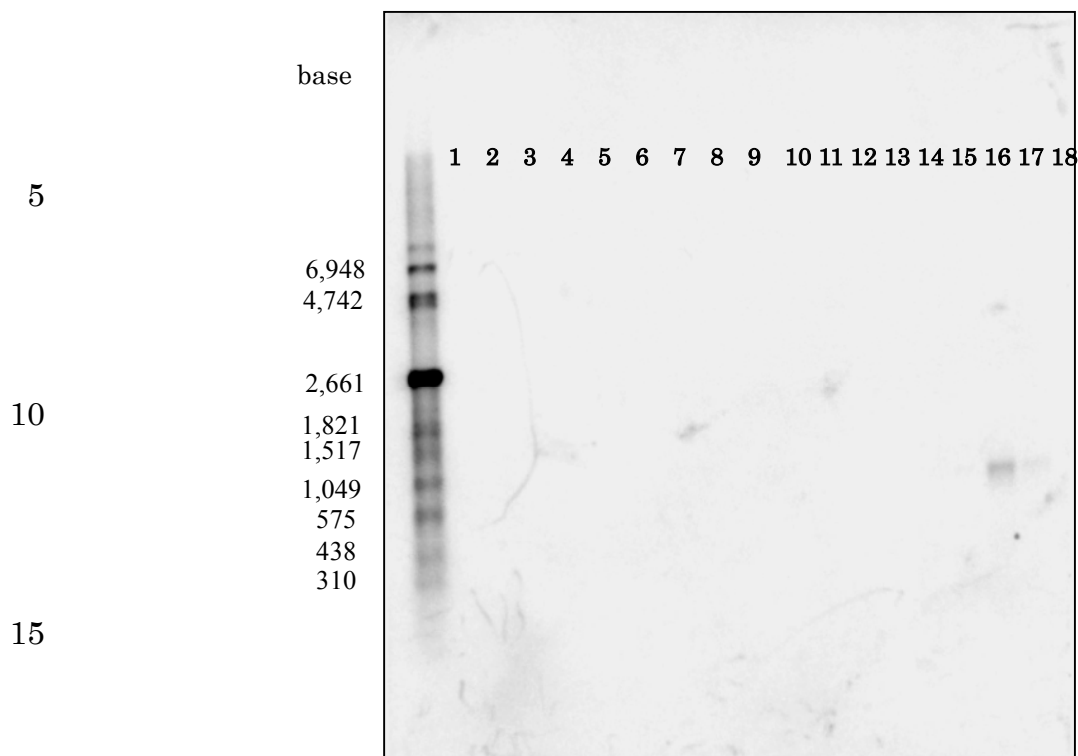


図 8 葉における *gm-fad2-1* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析

レーン	供試サンプル	レーン	供試サンプル
1	分子量マーカー (DIG RNAI)	10	本組換えダイズ-9
2	本組換えダイズ-1	11	本組換えダイズ-10
3	本組換えダイズ-2	12	非組換えダイズ-1
4	本組換えダイズ-3	13	非組換えダイズ-2
5	本組換えダイズ-4	14	非組換えダイズ-3
6	本組換えダイズ-5	15	非組換えダイズ-4
7	本組換えダイズ-6	16	非組換えダイズ-5
8	本組換えダイズ-7	17	陽性対照* (25 pg <i>FAD2-1</i> 遺伝子転写産物)
9	本組換えダイズ-8	18	陽性対照* (5 pg <i>FAD2-1</i> 遺伝子転写産物)

20 * ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の *in vitro* 転写産物をそれぞれ泳動した。

米国の温室で栽培した T4 世代の葉を用いた。分析においては 1 レーン当たり 200ng の mRNA を泳動した。非組換えダイズにおいて、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の転写産物である約 1,500base のバンドは検出されなかった。本組換えダイズでは、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の転写産物のバンド (約 1,500 base) 及び *gm-fad2-1* 遺伝子の転写産物 (約 700 base) のバンドのいずれも検出されなかった。

25

(本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)

gm-hra 遺伝子により付与された特性

5 本組換えダイズは、*gm-hra* 遺伝子の導入により、アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を有する（表 10、23ページ）。

10 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

15 本組換えダイズと宿主の属する分類学上の種との間の相違を検討するため、本組換えダイズの BC1F6 世代（図 6、19ページ）を用い、2007 年にデュポン株式会社 宇都宮事業所において隔離ほ場試験を実施し、次の a から g の項目について評価した（別紙 5）。なお、非組換えダイズとして、本組換えダイズの育成過程
20 中で挿入遺伝子が分離・脱落して生じた BC1F6 null を用いた（図 6、19ページ）。試験は、本組換えダイズと対照の非組換えダイズのプロット 1 組を 1 反復とする計 4 反復のブロックデザインで行った。

25 a 形態及び生育の特性

20 農林水産省によるダイズの特性分類調査基準に示されている形態及び生育の特性項目を参考に、発芽揃い、発芽率、開花期、小葉の形、毛じの多少、成熟期、草型、主茎長、最下着莢節位高、主茎節数、分枝数、一株総莢数、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重、百粒重、裂莢の難易、子実の形の計 18 項目について、1 プロット当たり 12 株を対象として調査した（4 反復）。統計処理が可能な
25 項目については、本組換えダイズと非組換えダイズの間で系統及び反復を要因とする分散分析を行った。

30 その結果、いずれの調査項目においても本組換えダイズと非組換えダイズの間で、統計学的有意差 ($P < 0.05$) や相違は認められなかった（表 12、28ページ）。

表 12 形態及び生育の特性（社外秘）

35 b 生育初期における低温又は高温耐性

ダイズは冬季に生育しないことから、本組換えダイズの生育初期における低温耐性について検討した。

40 本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫種子を、1 プロット当たり 12 粒ずつポットに播種した。発芽後、1 ポット 4 本立てとし、植物体を 2~3 葉期まで温室で育成した。その後、隔離ほ場内（試験期間中の平均気温 3℃、平均最低気温 -6℃）へ移し、8、15、22 日目にポットごとに低温による障害程度を、目視により 7 段

階で評価した。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 4 反復で行い、本組換えダイズと非組換えダイズの間で分散分析を行った。

- 5 その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの植物体は、ともに低温処理 22 日後に枯死し、両者間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった (表 13、29ページ)。

表 13 低温条件における障害程度の比較 (低温耐性) (社外秘)

10

c 成体の越冬性又は越夏性

本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体を、収穫期以降もほ場で栽培を続け、この間の生育状況を目視調査することにより、成体の越冬性を検討した。

15

その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの植物体はいずれも 12 月中旬に枯死し、両者間に生育状況 (枯死) の相違は認められなかった。

d 花粉の稔性及びサイズ

20

本組換えダイズ及び非組換えダイズの開花直前の花を、1 プロット当たり 5 株から 1 花/株ずつ採取した。花から採取した花粉を酢酸カーミン液で染色し写真撮影した。1 プロット当たり 300 個の花粉のうち、染色された花粉の割合を算出した。花粉のサイズについては 1 プロット当たり 12 個の直径を計測した。各調査は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 4 反復で行い、本組換えダイズと非組換えダイズの間で分散分析を行った。

25

その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの花粉は、染色率及び直径のいずれにおいても両者間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった (表 14、29ページ)。

30

表 14 花粉の染色率及び花粉の直径 (社外秘)

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

35

種子の生産量 : ②. a (28ページ) に示した調査において、一株総莢数、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重及び百粒重を調査した結果、いずれにおいても、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった (表 12、28ページ)。

40

脱粒性 : ②. a (28ページ) の調査において、脱粒性を裂莢の難易で評価した結果、本組換えダイズと非組換えダイズはいずれも難で、両者間の脱粒性に相違は

認められなかった（表 12、28ページ）。

5 発芽率：1プロット当たり50粒の種子を採取し、収穫後数時間以内にポットに
播種して温室（20℃設定）で栽培し、播種20日後に発芽率を調査した。試験は、
ほ場における1プロットを1反復とする4反復で行い、本組換えダイズと非組換
えダイズの間で分散分析を行った。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズ
10 の種子はいずれも98%以上の発芽率を示し、両者間に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）
は認められなかった（表 15、30ページ）。なお、本ほ場試験の播種時にも発芽率
の調査を行ったが（表 12、28ページ）、本組換えダイズと非組換えダイズの間
に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった。

表 15 収穫種子の発芽率（社外秘）

15 休眠性：ダイズ種子にはほとんど休眠性がないとされている（OECD, 2000）。
上記の発芽率試験において、収穫後数時間以内の種子を播種して発芽率を調査し
た結果、いずれのダイズにおいても90%以上の発芽率であった（表 15、30ペー
ジ）。このことから、本組換えダイズも非組換えダイズと同様、休眠性はないも
のと考えられた。

20

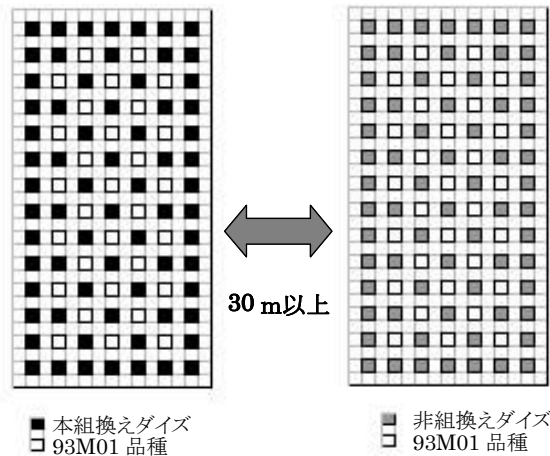
f 交雑率

交雑能力について本組換えダイズと従来のダイズとの間での同等性を調べるた
め、T6世代（図 6、19ページ）を用い、米国のほ場にて以下の実験を行った。

25

本組換えダイズ及び低リノレン酸ダイズ品種93M01の種子それぞれ68粒及び
30粒を、受粉株である93M01との交雑機会が均等になるように播種した（株間
30cm、畝間80cm）（以下、組換え体試験区と表記、図 9（A）、31ページ）。また、
組換え体試験区と30m以上の緩衝地帯を設け、非組換えダイズ（Jack品種）種
30 子68粒及び93M01品種の種子30粒を、受粉株である93M01との交雑機会が均
等になるように播種した（以下、非組換え体試験区と表記、図 9（B）、31ページ）。
各試験区の93M01品種の種子を収穫し、本組換えダイズ又は非組換えダイズか
ら93M01品種への交雑率を調査した。

35 その結果、本組換えダイズ又は非組換えダイズと93M01品種間の交雑率はそ
れぞれ0.3%又は0.7%であった。



(A) 組換え体試験区 (B) 非組換え体試験区

図 9 米国ほ場での交雑率試験配置図

株間 30cm、畝間 80cm、7 条×14 株の計 98 株（受粉親 30 株及び花粉親 68 株）として、2006 年に実施した。

- 5 (A) 組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を成熟期に収穫し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。1 葉期に葉を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、*gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット領域に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、導入遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。
- 10 (B) 非組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率を調査するために、非組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を採取し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。初生葉より葉を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、非組換えダイズの DNA マーカーを用いてリアルタイム PCR を行い、マーカー遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。
- (本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

15 また、我が国の隔離ほ場試験において、本組換えダイズと隣接している非組換えダイズ個体（株間 30cm）から、合計 1,600 粒の種子を採取し播種した。その後 1 葉期まで温室で育成し、アセト乳酸合成酵素阻害剤（トリベヌロンメチル、薬量 4.5 g ai/ha）を散布した結果、全株に薬害が認められた（平均薬害 74±2%）。

20 同時に育成、除草剤散布した本組換えダイズには薬害が認められなかった（薬害 0±0%）、したがって、本試験において本組換えダイズと非組換えダイズの交雑は認められなかった（交雑率 0%）。

25 一般にダイズの自然交雑率は通常 0.5~3%以下である（Garber and Odland, 1926； Caviness, 1966； Ahrent and Caviness, 1994； Poehlman and Sleper, 1995； 農業技術体系, 2002； 農学大事典, 1994）。米国及び我が国の試験における本組換えダイズの交雑率は、ダイズの自然交雑率を超えるものではなかった。

g 有害物質の産生性

5 ダイズが野生植物の生息又は生育に有害な影響をおよぼすような物質を産生するとの報告はない。本組換えダイズには、*gm-fad2-1* 遺伝子の導入により高オレイン酸形質が付与され *gm-hra* 遺伝子の導入により GM-HRA 蛋白質が産生されているが、これらが植物の生長や土壌微生物に有害な影響を与えることは報告されていない。そこで、有害物質の非意図的な産生がないことを確認するため、後作試験、鋤込み試験、土壌微生物相試験を行った。

10 根から分泌され他の植物に影響を与えるもの（後作試験）

15 収穫期に各プロットの株元周囲約 20cm から根圏土壌を採取した。植物残渣を取り除いて混和した後、各プロットの土壌をそれぞれ 25 個のポット（幅 6cm×6cm、深さ 5.5cm）に詰めた。検定作物としてハツカダイコン（品種：アイシクル）を 1 ポット当たり 1 粒播種し、温室内（設定 20℃）で生育させ、25 ポットごとに発芽率を調査した。また、播種 14 日後に植物体を採取して乾物重を測定し、25 ポットごとの発芽植物体の乾物重平均値を 1 反復の値とした。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 4 反復で行い、本組換えダイズと非組換えダイズの栽培土壌の間で分散分析を行った。

20 その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの栽培土壌間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾物重に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（表 16、32ページ）。

25 表 16 後作試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重（社外秘）

30 米国においても、根圏土壌法 (Iqbal *et al.*, 2004) により、レタスの発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを指標として、根から分泌され他の植物体に影響を与える内因性物質の産生性を調査した。その結果、後作試験と同様に、本組換えダイズと非組換えダイズの栽培土壌間で各指標に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1) の生物多様性影響評価書の概要、http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_305423_1ap.pdf)。

35 以上、根から分泌され他の植物に有害な影響を与えるような物質の産生性に、両者間で相違はないと考えられた。

40 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるもの（鋤込み試験）

 本組換えダイズでは、種子中においてオレイン酸含有量が高まり、リノール酸含有量が低くなっている（本文第一. 2. (1) .ロ. ③、11ページ）。したがって、

鋤込み試験は、種子以外の地上部植物体（以下、茎葉とする）と種子をそれぞれ用い実施した。

5 収穫期に各プロットの植物体の茎葉及び種子を採取し、それぞれの乾燥粉末を調製した。これを育苗用培土に 0.5% (w/w) の割合で混和し、1 プロット当たり 25 個のポット（直径 6.5cm、深さ 8cm）に詰めた。検定作物としてハツカダイコン（品種：アイシクル）を 1 ポット当たり 1 粒播種し、温室内（設定 20℃）で生育させ、25 ポットごとに発芽率を調査した。また、播種 14 日後に植物体を採取して乾物重を測定し、25 ポットごとの発芽植物体の乾物重平均値を 1 反復の値とした。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 4 反復で行い、本組換えダイズと非組換えダイズの鋤込み土壌間で分散分析を行った。

15 その結果、茎葉及び種子のいずれにおいても、本組換えダイズ及び非組換えダイズの鋤込み土壌間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾物重に統計学的有意差 (P<0.05) は認められなかった（表 17、33ページ）。

表 17 鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重（社外秘）

20 また、米国において本組換えダイズの葉を用い、サンドイッチ法 (Fujii *et al.*, 2003 and 2004、農業環境研究成果情報, 1997) により、レタスの発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを指標として、他の植物に影響を与える内因性物質の産生性について調査を行った。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの葉の間で各指標に統計学的有意差 (P<0.05) は認められなかった（高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1)の生物多様性影響評価書の概要、http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_305423_1ap.pdf)。

30 以上、枯死した後に他の植物に有害な影響を与える内因性物質の産生性に、両者間で相違はないと考えられた。

根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの（土壌微生物相試験）

35 収穫期に各プロット 4 植物体の株元から土壌を採取し、プロットごとに混和した。滅菌水を加え 10^{-3} から 10^{-6} までの土壌希釈液を作成し、希釈平板法により 25℃ で静置培養した。培地は、細菌及び放線菌の場合 PTYG 培地を、また糸状菌についてはローズベンガル培地を用い、それぞれ 7 日間及び 3 日間培養した。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 4 反復で行い、本組換えダイズ及び非組換えダイズの栽培土壌における細菌数、糸状菌数及び放線菌数を計測し、本組換えダイズと非組換えダイズの間で分散分析を行った。

その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズの栽培土壌間で、細菌数、糸状菌数及び放線菌数に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった (表 18、34 ページ)。

- 5 以上、根から分泌され土壌微生物に有害な影響を与える物質の産生性に、両者間で相違はないと考えられた。

表 18 採取土壌中の細菌数、糸状菌数及び放線菌数 (社外秘)

10 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

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

(2) 使用等の方法

—

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

—

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 (44ページ)。

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

—

35 (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズを用いたほ場試験を、米国及びカナダの延べ 15 ヶ所において 2003 年から 2006 年に実施した。

40 本組換えダイズの申請は、下記の表 (社外秘) に示した国で行った。

5 本組換えダイズは高オレイン酸含有ダイズとして付加価値のあるダイズ油の搾油を目的としており、商業栽培は、米国でのみ実施する予定である。なお、本組換えダイズに付与されたアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性形質は、遺伝子導入された細胞を選抜するためのマーカーとしてのみ利用され、本組換えダイズを除草剤耐性のダイズとして農家に販売する予定はない。

10 我が国では、2007年5月に第一種使用等（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）が承認された。2007年5月から2008年1月に、デュポン株式会社 宇都宮事業所にて隔離ほ場試験を実施した。また、2007年10月、厚生労働省に食品としての安全性の確認申請を、農林水産省に飼料としての安全性の確認申請をそれぞれ行った。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、長年に渡り食品・飼料への加工用として海外より輸入されており、我が国でも食用として栽培されている。これまで、我が国においてダイズが野生化し、野生動植物の生育に影響をおよぼしたという報告はない。本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えダイズと非組換えダイズとの比較により、生物多様性に影響が生ずる可能性について以下に考察した。

10 1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズが我が国において野生化したという報告はない。

15

我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの諸特性、すなわち、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率の評価を行った。その結果、いずれの調査項目についても、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意差や相違は認められなかった(本文第一. 2.(6).②. a~e, 28~30ページ)。したがって、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で、諸特性に相違はないと考えられた。

20

また、本組換えダイズでは、導入した *gm-fad2-1* 遺伝子により、オレイン酸含有率が 75%程度まで増加し、リノール酸含有率が 4%程度に低下している(本文第一. 2.(1).ロ. ③、11ページ)。しかしながら、種子中のオレイン酸が発芽時におけるエネルギー供給等に特に有用であるという報告はない。

25

さらに、本組換えダイズには、*gm-hra* 遺伝子によりアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。しかしながら、自然環境下でアセト乳酸合成酵素阻害剤が散布されることは想定され難い。したがって、本形質が本組換えダイズの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

30

以上、競合における優位性に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

35

(2) 影響の具体的内容の評価

—

40

(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

5 影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズが野生動植物の生息又は生育に影響をおよぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

15 我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの有害物質の産生性に関し、栽培土壌を用いた後作試験、茎葉及び種子を用いた鋤込み試験、栽培土壌中の微生物相試験を実施した。その結果、後作試験及び鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重、土壌微生物相試験における細菌数、糸状菌数及び放線菌数について、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった（本文第一. 2. (6) . ②. g、32ページ）。したがって、本組
20 換えダイズと非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性に相違はないと考えられた。

本組換えダイズに産生される GM-HRA 蛋白質は、有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンや既知毒性蛋白質との間で相同性も認められなかった（本文
25 第一. 2. (1) . ロ. ②、7ページ）。また、本組換えダイズに導入された *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の発現は、それぞれオレイン酸からリノール酸への合成及び分枝アミノ酸合成に関わるが、両合成経路はいずれも植物体中で独立した代謝経路で、基質も異なることから、両遺伝子の発現が相互に影響することは考
30 え難い（本文第一. 2. (1) . ロ. ③、11ページ）。

さらに、本組換えダイズ種子中では、オレイン酸含有率が 75%程度にまで増加しており（本文第一. 2. (6) . ①、24ページ）、また、種子のヘプタデカン酸とヘ
35 プタデセン酸並びに葉中のロイシンが非組換えダイズと比べ統計学的に有意に増加していた（本文第一. 2. (1) . ロ. ③、11ページ）。しかしながら、これら脂肪酸及びロイシンは多くの動植物種にも含まれ、有害物質であるという報告はない。実際に、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物試験において、ハツカダイコンの発芽率や乾物重に計学的有意差は認められていない。

40 以上、有害物質の産生性に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5 (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

10

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、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された。

15 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

20

ダイズと交雑可能な近縁野生種として、ツルマメが我が国に自生していることが知られている。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

25

ダイズとツルマメの自然交雑により生じた雑種は、生育や生殖に障害が見られないことが知られている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。したがって、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合には雑種を形成し、本組換えダイズに導入された遺伝子がツルマメの集団中に浸透する可能性が考えられる。

30

(3) 影響の生じやすさの評価

35

我が国において、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は否定できない。そこで、交雑性に関する影響の生じやすさを評価するに当たり、まず、従来のダイズとツルマメの雑種が生ずる可能性及び本組換えダイズとツルマメの雑種が生ずる可能性を検討した。次に、雑種が生じた場合に、集団中で優占化する可能性について考察し、本組換えダイズの導入遺伝子が、ツルマメの集団中に浸透する可能性について検討した。

40

従来のダイズとツルマメの雑種が生ずる可能性：

ツルマメは全国的に分布し (農業技術体系, 2002)、主に河原や土手に生育し、畑の周辺や果樹園にも見られる (Kasahara, 1982)。

しかしながら、ダイズの開花期はツルマメよりも早く、両種の開花期は重なりにくいことが知られている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。両種間の自然交雑を調査した結果、交雑を示唆する遺伝マーカーは検出されなかった (Kuroda *et al.*, 2008)。人為的に開花時期を一致させ、除草剤グリホサート耐性の組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で生育させた交雑試験では、収穫したツルマメ種子 32,502 粒中、1 粒のみダイズと交雑していた (農環研ニュース, 2008)。また、両種の開花時期を人為的に一致させ、ダイズとツルマメを交互に 50cm 間隔で栽培した試験における両種間の交雑率は 0.73%であった (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。このように、交雑の可能性を高めた条件下でも、従来のダイズとツルマメの雑種が生ずる可能性は低いと考えられた。

本組換えダイズとツルマメの雑種が生ずる可能性：

本組換えダイズとツルマメの交雑率の調査は行っていない。しかしながら、本組換えダイズの花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量等の生殖に関わる形質について、非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった (本文第一. 2. (6). ②. d~e, 29ページ)。また、ほ場における本組換えダイズの非組換えダイズとの交雑率は、これまでに知られているダイズ間の自然交雑率 (0.5~3%) を超えるものではなかった (本文第一. 2. (6). ②. f, 30ページ)。このように、本組換えダイズの生殖に関わる形質が、非組換えダイズと同程度であることから、本組換えダイズがツルマメと雑種を生ずる可能性は、従来のダイズと同程度に低いと考えられた。

本組換えダイズとツルマメの雑種が生じた場合に、集団中で優占化する可能性：

仮に本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は *gm-hra* 遺伝子により、アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性の形質を有すると考えられる。しかし、前述のとおり、本形質が競合における優位性を高めるとは考え難い (本文第二. 1. (1)、36ページ)。

したがって、アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性の形質を有する雑種が生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は低いと考えられる。

結 論

以上、我が国に自生するツルマメが本組換えダイズと交雑する可能性は、従来のダイズと同程度に低いと考えられた。仮に交雑して雑種を生じたとしても、その雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は考え難い。したがって、本組換えダイズの導入遺伝子が、ツルマメの集団中に浸透する可能性は低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上、本組換えダイズの交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

5

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、長年に渡り食品・飼料への加工用として海外より輸入されており、我が国でも食用として栽培されている。これまで、我が国においてダイズが野生化し、野生動植物の生育に影響をおよぼしたという報告はない。

本組換えダイズの競合における優位性に関し、我が国において実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの諸特性、すなわち、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率の評価を行った。その結果、いずれの調査項目についても、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で統計学的有意差や相違は認められなかった。したがって、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で、諸特性に相違はないと考えられた。

本組換えダイズでは、導入した *gm-fad2-1* 遺伝子により種子中のオレイン酸含有量が高められ、リノール酸含有量が低下している。しかしながら、種子中のオレイン酸が発芽時におけるエネルギー供給等に特に有用であるという報告はない。また、本組換えダイズには、*gm-hra* 遺伝子によりアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されているが、自然条件下でアセト乳酸合成酵素阻害剤が散布されることは想定され難く、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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された。

ダイズが野生動植物の生息又は生育に影響をおよぼすような有害物質を産生するとの報告はない。我が国で実施した隔離ほ場試験において、後作試験、茎葉又は種子を用いた鋤込み試験、土壌微生物相試験を実施したが、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった。したがって、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性に相違はないと考えられた。

本組換えダイズで産生される GM-HRA 蛋白質は、有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンや既知の毒性蛋白質との間で相同性がないことを確認している。また、本組換えダイズに導入された *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子は、それぞれリノール酸合成及び分枝アミノ酸合成という異なる代謝経路に関わり、基質も異なるため、これら遺伝子の発現が相互に影響するとは考え難い。

また、本組換えダイズでは、種子中の総脂肪酸量当たりのオレイン酸、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸、葉のロイシンにおいて統計学的に有意な増加が認められた。しかしながら、これら脂肪酸及びロイシンは多くの動植物種にも含まれ、有害物質であるという報告はない。実際に、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物試験において、統計学的有意差は認められていない。

以上、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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された。

- 5 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、ダイズと交雑可能なツルマメが特定された。ダイズとツルマメの開花期は重なりにくく、交雑率が低いことが知られている。本組換えダイズの花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量の生殖に関わる形質は、非組換えダイズと同程度であり、本組換えダイズと非組換えダイズとの間の交雑率は、従来のダイズ間の交雑率を超えるものではなかった。したがって、本組換えダイズとツルマメが雑種を生ずる可能性は、従来のダイズと同程度に低いと考えられた。仮に本組換えダイズとツルマメの雑種を生じた場合、その雑種は高オレイン酸含有及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性の形質を有すると考えれる。しかしながら、これらの形質が競合における優位性を高めることは考え難く、雑種がツルマメの集団において優占化する可能性は低い。
- 10 したがって、本組換えダイズの導入遺伝子が、ツルマメの集団中に浸透する可能性は低いと判断された。
- 15

以上、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

- 20 上記の各評価に基づき、本組換えダイズを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生じるおそれはないと総合的に結論された。

参考文献

【社外秘情報につき非開示】

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合及び栽培目的の場合）

平成 20 年 7 月 7 日

5 氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

10

高オレイン酸含有及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ(*gm-fad2-1*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.)(DP-305423-1, OECD UI: DP-305423-1) (以下、本組換えダイズと表記) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

15

20 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社内に緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部、バイオテクノロジー事業部）の部門長から構成される。危機対策本部が、本組換えダイズの開発者である米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、バイオテクノロジー事業部長が副責任者となる。

25

30 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本組換えダイズの開発者である米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

35

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

40

米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、米国における本組換えダイズ種子の購入者及び穀物取扱い業者、ダイズの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、これら

の連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、弊社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

5

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置をとり、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

10 科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社とともに、日本向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して本件を通知する。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

20 科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与える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、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

25