

5 低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ
(*GmFAD2-1A*, *GmFATB1A*, 改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.)
(MON87705, OECD UI: MON-87705-6)申請書等の概要

目次

	第一種使用規程承認申請書.....	4
10	生物多様性影響評価書.....	7
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	7
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	7
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	7
	① 和名、英名及び学名.....	7
15	② 宿主の品種名又は系統名.....	7
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	7
	(2) 使用等の歴史及び現状.....	7
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	7
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	8
20	(3) 生理的及び生態学的特性.....	9
	イ 基本的特性.....	9
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	9
	ハ 捕食性又は寄生性.....	9
	ニ 繁殖又は増殖の様式.....	9
25	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	9
	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.....	10
	③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との 交雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程 度.....	10
30	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	11
	ホ 病原性.....	11
	ヘ 有害物質の産生性.....	12
	ト その他の情報.....	12
35	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	12
	(1) 供与核酸に関する情報.....	12
	イ 構成及び構成要素の由来.....	12
	ロ 構成要素の機能.....	13
	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.....	13
40	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.....	19

	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	20
	(2) ベクターに関する情報.....	25
	イ 名称及び由来.....	25
	ロ 特性.....	25
5	① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	25
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	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.....	25
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	25
10	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	25
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	26
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	26
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	26
15	② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバク テリウムの菌体の残存の有無.....	26
	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.....	26
20	(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.....	28
	① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	28
	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.....	28
25	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.....	30
	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.....	30
30	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.....	30
	(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.....	30
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	30
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.....	30
	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.....	31
40	a 形態及び生育の特性.....	31
	b 生育初期における低温又は高温耐性.....	32
	c 成体の越冬性又は越夏性.....	32
	d 花粉の稔性及びサイズ.....	32

	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	33
	f 交雑率	33
	g 有害物質の産生性	33
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	34
5	(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	35
10	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響 を防止するための措置	35
	(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	35
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	36
15	1 競合における優位性	36
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	36
	(2) 影響の具体的内容の評価	37
	(3) 影響の生じやすさの評価	37
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
20	2 有害物質の産生性	37
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	37
	(2) 影響の具体的内容の評価	38
	(3) 影響の生じやすさの評価	38
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	38
25	3 交雑性	38
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
	(2) 影響の具体的内容の評価	39
	(3) 影響の生じやすさの評価	39
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	41
30	4 その他の性質	41
	第三 生物多様性影響の総合的評価	43
	参考文献	45
	緊急措置計画書	46
	モニタリング計画書	48

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 12 月 1 日

5 農林水産大臣 石破 茂 殿
環境大臣 齊藤 鉄夫 殿

10 申請者 氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15 第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ (<i>GmFAD2-1A</i>, <i>GmFATB1A</i>, 改変 <i>cp4 epsps</i>, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87705, OECD UI: MON-87705-6)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 24 年 1 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。 <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

	<p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。</p> <p>(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。</p>
--	--

生物多様性影響評価書

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

10

① 和名、英名及び学名

ダイズ [英名: soybean] はマメ科に属する一年生植物であり、その学名は *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr. である。

15

② 宿主の品種名又は系統名

宿主はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*G. max*) である。実際に遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3525 である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

Soja 亜属には栽培種であるダイズのほかに、野生種として *G. soja* (和名: ツルマメ) や *G. gracilis* も含まれる (文献 1)。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるダイズ (*G. max*) は野生種である *G. soja* が祖先と考えられており、一方、*G. gracilis* は *G. soja* から *G. max* への分化における中間種あるいは *G. soja* と *G. max* の雑種であるという報告があるが(文献 1)、確認はされていない。これらの野生種のうち、わが国に分布しているのはツルマメのみであり *G. gracilis* の分布は認められていない (文献 2; 文献 3)。なお、ツルマメは中国、韓国、日本、台湾及びロシアに分布しており (文献 1; 文献 4)、わが国においては北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。

30

なお、ダイズは夏型一年生の栽培種であり、自生しているとう報告はない (文献 8; 文献 4; 文献 1)。

35

(2) 使用等の歴史及び現状

40

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1100 年頃にこの地域で栽培化されたと推定され、その後、中国南部、東南アジア、朝鮮及び日本へ栽培が広

がったと考えられる (文献 9)。わが国へは縄文時代に渡来、栽培が始まったと考えられ、副食として利用されていたと思われる (文献 10)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2007 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 9,490 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,056 万 ha、ブラジルが約 2,064 万 ha、アルゼンチンが約 1,610 万 ha、中国が約 890 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2007 年のわが国における栽培面積は約 15 万 ha であ

10

2007 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 416 万トンであり、そのうちの約 80%が米国から輸入されている (文献 12)。2007 年度におけるダイズの国内生産量は約 23 万トンであり、国内消費仕向量¹は約 430 万トンであった。国内消費仕向量の用途別内訳は、飼料用が約 12.5 万トン、種子用が約 0.7 万トン、加工用 (ダイズ油・脱脂ダイズ・味噌・醤油用) が約 322.3 万トン、減耗量²が約 8.3 万トン、食品用³が約 86.6 万トンとなっている (文献 13)。

15

わが国におけるダイズの利用方法は多岐に渡り、味噌、醤油、豆腐、納豆、ゆば、きな粉、煮豆、もやしとして食されるほか、分離蛋白、濃縮蛋白等は食品添加物として、搾油は食用植物油として、脱脂ダイズは家畜用飼料として利用されている (文献 10)。

20

わが国でのダイズの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は北海道地方で 5 月中旬～6 月上旬、東北地方、北陸・東山地方で 6 月上旬、関東地方で 6 月中旬、東海地方以西中国地方までは 6 月下旬、九州地方で 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) 及び 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。雑草の防除については、生育期間中に除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病虫害の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り取り・脱粒を一緒に行う方法とがある (文献 10)。

25

30

35

¹ 国内生産量+輸入量-輸出量-在庫の増加量(又は+在庫の減少量)から算出される。2007 年は輸出量は約 1 万トン、在庫は約 8 万トン増であったため、 $23+416-1-8=430$ (万トン)が国内消費仕向量となる。

² 食料が生産された農場等の段階から、輸送、貯蔵を経て家庭の台所等に届く段階までに失われる全ての数量。

³ 国内消費仕向量- (飼料用+種子用+加工用+減耗量) から算出される。

(3) 生理的及び生態学的特性

イ 基本的特性

- 5 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
生じる(文献1)。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が
10 伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌の寄生によって根
粒を着生する(文献10)。花には1本の雌ずいがあり、その基部の子房に1~5
個の胚珠を内蔵しており、子房は受粉後に肥大して莢を形成する(文献10)。
また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響し、ある時間以上の暗
期が花芽分化に必要で、温度は15℃以上を必要として25℃前後までは高いほ
ど促進的に働き、短日高温では促進効果が大きい、長日高温では促進効果
がないか、かえって遅れることがある(文献9)。

15

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

- 20 ダイズ種子の発芽適温は30~35℃、最低発芽温度及び最低生育温度は2~
4℃であり、10℃以下での発芽は極めて悪い(文献9)。ダイズの栽培適地は、
生育期間中18~28℃程度、多照で適度の降雨のあることが望ましいとされて
いるが、今日のダイズ品種では日長感受性が細かく分化して各種の気候に対
する適応性が高くなっており、赤道直下のインドネシアから北緯60°のスウ
ェーデンでも栽培可能である(文献9)。

- 25 本組換えダイズの宿主であるA3525は、米国において、およそ北緯38°か
ら40°の栽培地域に適した品種(Maturity Group III)に分類される(文献14;
文献15)。この栽培地域において、Maturity Group IIIに分類される品種は4月
下旬から6月中旬の間に播種される。また、6月から8月までが開花期にあたり
(文献16)、開花が始まる最も早い時期の日長時間は約15時間であることが
報告されている(文献17)

- 30 なお、わが国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されてい
ない。

ハ 捕食性又は寄生性

35 —

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

40

ダイズの種子は裂莢した際に地表に落下する。わが国で栽培されるダイズ
の裂莢性には品種間差があるが、ダイズが大規模に栽培され、収穫が機械化

5 されている米国などでは、ほとんどの品種が難裂莢性であり脱粒性の程度は低い。今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3525 もまた難裂莢性で脱粒性が低いことが認められている。ダイズの種子休眠性については知られていない。また、種子の発芽能力に関しては、常温で貯蔵した場合に通常約 3 年で失われる (文献 10)。

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

10 ダイズは塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件下において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

15 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じる特性を有する場合はその程度

20 ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのは *G. soja* (和名: ツルマメ) のみである (文献 2; 文献 3; 文献 1)。ツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。

25 なお、1950 年代にダイズとツルマメの形態的中間型を示す個体としてオオバツルマメ (*G. soja* Sieb. et Zucc.) がわが国で確認されており (文献 18; 文献 19)、その形態がダイズに近かったことから、通常のツルマメと比べて、ダイズと交雑する可能性が高いことが予想された。しかし、過去 10 年以上にわたり日本各地より 800 近い集団からツルマメの収集を行った中にオオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は見つかっていないという報告があることから (文献 19)、仮にこのような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育する範囲はかなり限られていることが予想される。

35 ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、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しない閉花受粉であるため (文献 19)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のは場条件でダイズ同士における他家受粉率は最大で 3.62% (文献 20)、ツルマメ同士における他家受粉率は最大で 2.3% (文献 21) と報告されている。

40 しかし、条件によっては交雑率が上昇することもある。例えば、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズは場の中心に設置した場合、その他家受粉率は平均で 2.96~7.26% となり、局所的には 19.5% に達したと報告されている (文献 22)。またツルマメに関しても、秋田県雄物川流域で約 13% という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (文献 23)。この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠当たりの花粉数は平均で 600~700 粒で、この数

は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の 1 胚珠あたりの平均的な花粉数 (文献 24) の間に位置していた。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、あるいは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸
5 工事などによる環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメの集団の周辺では花粉を媒介する昆虫であるミツバチやクマバチなどが頻繁に観察されていた。このことから、このツルマメ集団の周りの環境には、他家受粉を引き起こす要因が通常よりも多く存在していたと考えられる (文献 23)。

ダイズとツルマメの交雑性に関しては、上述したようにいずれも閉花受粉を行う自殖性植物である。さらに、開花期については地域、品種及び播種時期に影響されるが、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約 1 ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている (文献 19)。他
15 のダイズ品種と比べて開花期が遅い日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ (Gls/93-J-01) をそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した報告では、自然交雑実験終了後に結実したツルマメから取得された 686 個体の後代を調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体認められたことから、その交雑率は 0.73%と報告されている (文献
20 25)。

また、組換えダイズとツルマメを隣接して栽培し、ツルマメがダイズにまきついて生育している状態で採種したツルマメ種子 32,502 粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は 1 粒であり、この交雑種子はダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群の 11,860 粒の中から
25 見つかったと報告されている(文献 26)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、花粉の寿命は 2~4 時間で失われる。花粉の直径は 15~25 μm である (文献 27)。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所が 2001 年から 2004 年の 4 年間に行った除草剤耐性の遺伝子組換えダイズを用いた非組換えダイズとの交雑試験では、交雑が観測された最長距離での交雑率は花粉親からの距離が 7.0m で交雑率 0.040%(2001 年)、2.8m で 0.08% (2002 年)、3.5 m で 0.022% (2004 年) であった⁴。なお、2003 年
35 は 0.7~10.5m まで調査した結果いずれの距離においても交雑率は 0%であった(文献 28)。

ホ 病原性

—

⁴ 2003年は0.7~10.5mまで調査した結果いずれの距離においても交雑率は0%であった。

へ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、自然条件下で野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

5

ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたダイズが生育したという報告はない。

10

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

高トランス脂肪酸、高飽和脂肪酸及び高脂肪を伴う食事は慢性疾患のリスクを高めることが知られており、これらの脂肪酸含量を抑えた体に良い油に対する需要が高まっている。そこでモンサント・カンパニーは、体に良いダイズ油の原料として、種子の油分組成が改変された低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ(*GmFAD2-1A*, *GmFATB1A*, 改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87705, OECD UI: MON-87705-6) (以下「本組換えダイズ」という。)を開発した。本組換えダイズでは、そのダイズ油において飽和脂肪酸含量を8%未満に低下させることと、オレイン酸含量を55%よりも高めることを目標としている。本組換えダイズから得られるダイズ油は、その低い飽和脂肪酸含量と高い単価不飽和脂肪酸含量が風味を損なうことなく安定性の向上に寄与することから、調理油用やサラダドレッシング用の水素添加を行わないオイルに適している。上記のように、本組換えダイズのダイズ油は食品原料として使用されるが、バイオディーゼル燃料として利用される可能性もある。バイオディーゼル燃料として使用される植物油にとって、油分中の飽和脂肪酸含量が低いことは寒冷条件下の性能を改善するための重要な要素であり、より高いオレイン酸含量は油の安定性を向上させ、窒素酸化物 (NOx) の排出を減少させる。したがって、本組換えダイズはバイオディーゼル燃料製造の需要にも適合している。

15

20

25

30

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

35

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は

図 1 (p14) 及び表 1 (p15) に示した。

5 なお、本組換えダイズには、*FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1A* 遺伝子の部分的な配列が導入されており、これらをそれぞれ「*GmFAD2-1A* 遺伝子断片」「*GmFATB1A* 遺伝子断片」とする。

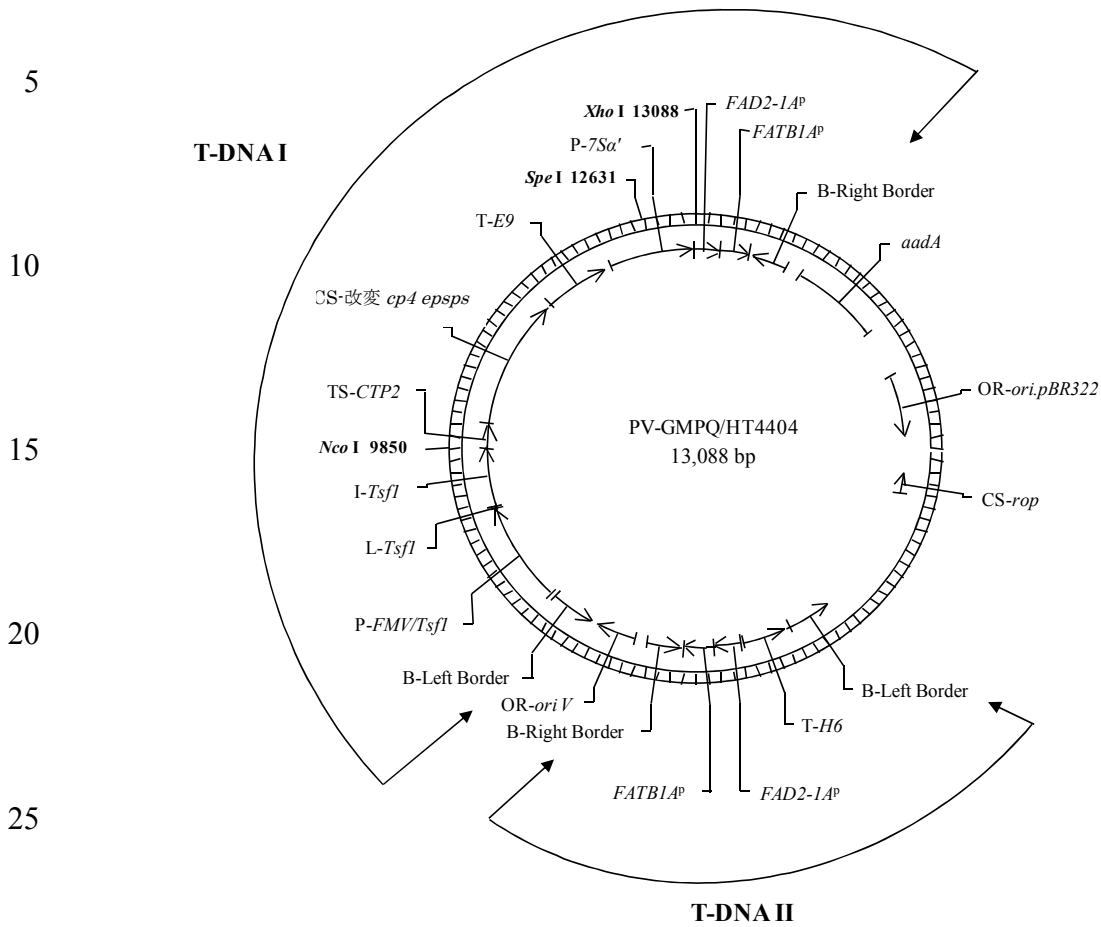
10 また、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、植物中での発現量を高めるため CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することの無いように塩基配列に改変を加えたものであり、*Agrobacterium* subsp. CP4 株由来のアミノ酸配列と比較して N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。したがって、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質は「改変 CP4EPSPS 蛋白質」とする。

15 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

20 本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の各構成要素の機能は表 1 (p15) に示したとおりである。

25 なお、本組換えダイズでは、*GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片の発現によって生じるジーンサイレンシングにより、ダイズの内在性遺伝子である *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子の発現がそれぞれ抑制される。実際にノーザン解析を行った結果、本組換えダイズにおける *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子の mRNA レベルが対照の非組換えダイズと比較して著しく低いことが示された。(別添資料 1 の Figure 1, p18 及び Figure 2, p19)



30 図 1 PV-GMPQ/HT4404 のプラスミドマップ⁵

本組換えダイズの育成過程では、上図の T-DNA I 領域と T-DNA II 領域がゲノム中の 1 ヲ所に組み込まれた個体を選抜した。

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

表 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能⁶

構成要素	由来及び機能
T-DNA I	
B ^{注1} -Left Border	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 29)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注2} - <i>FMV/Tsfl</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> の <i>Tsfl</i> プロモーター (文献 30) に Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S プロモーターのエンハンサー配列 (文献 31) を結合させたキメラプロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。
L ^{注3} - <i>Tsfl</i>	<i>A. thaliana</i> の翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsfl</i> 遺伝子のリーダー配列 (exon 1) (文献 30)。翻訳の際のリボソーム結合部位である。
I ^{注4} - <i>Tsfl</i>	<i>A. thaliana</i> の翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsfl</i> 遺伝子のイントロン配列 (文献 30)。目的遺伝子の発現を高める。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
TS ^{注5} - <i>CTP2</i>	<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> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (文献 32)。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS ^{注6} -改変 $cp4\ epsps$	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコーディング配列 (文献 33; 文献 34)。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

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

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA I (つづき)	
T ^{注7} -E9	<i>Pisum sativum</i> のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアダニル化を誘導する (文献 35)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P-7S α '	β -コングリシニン貯蔵蛋白質 (α '-bcsp) をコードしている <i>G. max</i> の <i>Sphas1</i> 遺伝子に由来するプロモーター及びリーダー配列 (文献 36)。mRNA の転写を胚特異的に誘導する (文献 37)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>FAD2-1A</i> ^{p注8}	$\Delta 12$ デサチュラーゼをコードしている <i>Glycine max</i> の <i>FAD2-1A</i> 遺伝子に由来するイントロン#1 の部分的なセンス配列 (文献 38)。内在性遺伝子 <i>FAD2-1A</i> の RNA レベルを抑制する。
<i>FATB1A</i> ^p	パルミトイル ACP チオエステラーゼをコードしている <i>G. max</i> の <i>FATB1A</i> 遺伝子に由来する 5' 非翻訳領域及び葉緑体ターゲティング配列の部分的なセンス配列 (文献 38)。内在性遺伝子 <i>FATB1A</i> の RNA レベルを抑制する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Right Border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 39)

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域 (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
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ由来の細菌プロモーター、コーディング配列及び3'非翻訳領域 (文献 40)。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
OR ^{注9} -ori.pBR322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (文献 41)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS-rop	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコーディング配列であり、 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (文献 42)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-DNA II	
B-Left Border	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 29)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-H6	2 次細胞壁の形成に関わる蛋白質をコードしている <i>Gossypium barbadense</i> に由来する H6 遺伝子の 3' 非翻訳領域であり、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 43)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA II (つづき)	
<i>FAD2-1A</i> ^P	Δ12 デサチュラーゼをコードしている <i>G. max</i> の <i>FAD2-1A</i> 遺伝子に由来するイントロン#1 の部分的なアンチセンス配列 (文献 38)。内在性遺伝子 <i>FAD2-1A</i> の RNA レベルを抑制する。
<i>FATB1A</i> ^P	パルミトイル ACP チオエステラーゼをコードしている <i>G. max</i> の <i>FATB1A</i> 遺伝子に由来する 5' 非翻訳領域及び葉緑体ターゲティング配列の部分的なアンチセンス配列(文献 38)。内在性遺伝子 <i>FATB1A</i> の RNA レベルを抑制する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Right Border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 39)
外側骨格領域 (本組換えサ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
OR-ori <i>V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (文献 44)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

- 5 注¹ B – Border (境界配列)
 注² P – Promoter (プロモーター)
 注³ L – Leader (リーダー配列)
 注⁴ I – Intron (イントロン)
 注⁵ TS – Targeting Sequence (ターゲティング配列)
 10 注⁶ CS – Coding Sequence (コーディング配列)
 注⁷ T – 3' nontranslated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences (3'非翻訳転写終止配列及びポリアダニル化シグナル配列)
 注⁸ ^P – Partial sequence (部分的な配列)
 注⁹ OR – Origin of Replication (複製開始領域)
 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

5

【*GmFAD2-1A* 遺伝子断片及び *GmFATB1A* 遺伝子断片の発現産物】

本組換えダイズに導入された *GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片は、ダイズの内在性遺伝子である *FAD2-1A* 遺伝子と *FATB1A* 遺伝子の一部であり (表 1、p15)、これらの遺伝子断片の RNA が産生されることで内在性の *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子のそれぞれの発現が抑制される。なお、RNA がアレルギー性や毒性を持つという報告はなく、RNA は日常的な食物として GRAS (Generally Recognized As Safe) に指定されている(文献 45 及び 文献 46)。RNA の安全性に対するこうした認識は、サプリメントとして多量の RNA をマウス、ラット及びヒトに経口投与した安全性試験により支持されている (文献 47;文献 48)。

10

15

【改変 CP4EPSPS 蛋白質】

20

25

30

35

形質転換体の選抜のために導入された除草剤耐性マーカー遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* CP4 株より単離された遺伝子で、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしており、除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は別添資料 2 に示すとおりである。改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように野生型 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものであり、アミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されているのみである。なお、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターには、目的遺伝子の全組織での恒常的発現を高める目的でシロイヌナズナ由来の *Tsf1* プロモーター (文献 30) にフィグウォートモザイクウイルス(FMV) 35S プロモーターのエンハンサー配列 (文献 31) を結合させたキメラプロモーターが用いられている。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が芳香族アミノ酸生合成の場である葉緑体で機能するように、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の 5' 上流にはシロイヌナズナ EPSPS の *shkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする塩基配列 (*CTP2*) (文献 32) が組み込まれている。

40

除草剤グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS)(E.C.2.5.1.19) と特異的に結合してその活性を阻害する (文献 49; 文献 50)。そのため、植物はグリホサートが散布されると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸経

路が正常に機能して生育することができる。

5 改変 CP4EPSPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース 8 (AD8⁷) を用いて FASTA 型
15 アルゴリズム及び ALLERGENSEARCH 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

10 【*GmFAD2-1A* 遺伝子断片及び *GmFATB1A* 遺伝子断片】

15 植物油の生合成経路はよく知られており、一般的な植物生化学のテキストに要約されている(文献 51)。植物の脂肪酸合成はプラスチドにおいて行われ、 C_2 化合物が単位となって段階的にアシル鎖と縮合する(図 2、p21)。この反応は、植物の脂肪酸合成酵素により起こる。脂肪酸合成酵素はアシル-アシルキャリアー蛋白質(アシル-ACP)を基質とする酵素の複合体であり、ステアロイル-ACP (18:0-ACP) は脂肪酸合成酵素により生じる最終生成物である。ダイズにおいて、大部分の 18:0-ACP はプラスチドの可溶性酵素である Δ 9 デサチュラーゼにより不飽和化されて、オレオイル-ACP (18:1-ACP) になる。脂肪酸鎖は2つの異なるアシル-ACP チオエステラーゼ、FATA と FATB によって ACP から切り離される。FATB は炭素数が 14 から 18 までの飽和脂肪酸残基をもつアシル-ACP (14:0-ACP ~18:0-ACP) を加水分解し(図 2、p21 の反応①)、そのうち主にパルミトイル-ACP (16:0-ACP) を加水分解する。一方で、FATA は主に 18:1-ACP を加水分解する。これらの反応により脂肪酸合成は終了する。チオエステラーゼ活性、脂肪酸の生合成及び不飽和化のバランスにより、生物種や組織によって特有の脂肪酸組成がプラスチドで生じる(図 2、p21)。

30 FATA と FATB によって ACP から切り離された後、遊離脂肪酸はプラスチドを離れ、小胞体における脂質生合成系のケネディ経路に入る。ここで、脂肪酸はリン脂質に組み込まれ小胞体膜の一部となる(図 2、p21)。リン脂質における脂肪酸の多価不飽和化は、小胞体の2つの膜結合型酵素、FAD2 と FAD3 により起こる。FAD2 はオレイン酸 (18:1) からリノール酸 (18:2) への Δ 12 不飽和化を触媒し(図 2、p21 の反応②)、FAD3 はリノール酸 (18:2) からリノレン酸 (18:3) への Δ 15 不飽和化を触媒する。ダイズの種子において、小胞体のリン脂質の大部分はジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (CPT) により修飾され、ジアシルグリセロールになる。さらに、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) がジアシルグリセロールに脂肪酸を付加し、種子油の主成分であるトリアシルグリセロールが生成する。種子油は最終的に種子の細胞中のオイルボディに蓄積する。

本組換えダイズでは *GmFATB1* 遺伝子断片の発現によって、内在性の *FATB* 遺伝子の発現が抑制されている。前述のように、チオエステラーゼである

⁷ 文献52に2008年1月の時点で登録されていた配列からなるデータベース。

FATB は、炭素数が 14 から 18 までの飽和脂肪酸残基をもつアシル-ACP (14:0-ACP ~18:0-ACP) を加水分解し (図 2、p21 の反応①)、そのうち主にパルミトイル-ACP (16:0-ACP) を加水分解することが知られており、飽和脂肪酸の産生に重要なプラスチドの酵素である。実際に、ダイズにおいて FATB が抑制された結果、油分中の飽和脂肪酸、特にパルミチン酸(16:0)の含有量が減少したことが報告されている (文献 53)。したがって、本組換えダイズにおいても FATB の減少が主に 16:0-ACP の加水分解の低下を引き起こし、そのためにダイズ油分中の飽和脂肪酸、特にパルミチン酸(16:0)の含有量が減少する。また、これに伴い、ダイズ油分中の不飽和脂肪酸の割合が増加する。

また、本組換えダイズでは *GmFAD2-1A* 遺伝子断片の発現によって、内在性の *FAD2* 遺伝子の発現が抑制されている。前述のように、*FAD2* は $\Delta 12$ デサチュラーゼであり、小胞体において単価不飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸への反応を触媒する (図 2、p21 の反応②)。したがって、本組換えダイズにおいては、小胞体で *FAD2* が減少することにより、オレイン酸(18:1) からリノール酸 (18:2) へのフラックスが減少することで、オレイン酸 (18:1) の量が高まる。その結果、オレイン酸(18:1) をもつジアシルグリセロールが多く作られる。その後、ジアシルグリセロールは *DGAT* によりトリアシルグリセロールになり、結果的に油分中のオレイン酸 (18:1) の含有量が増加し、リノール酸 (18:2) の含有量が減少する。

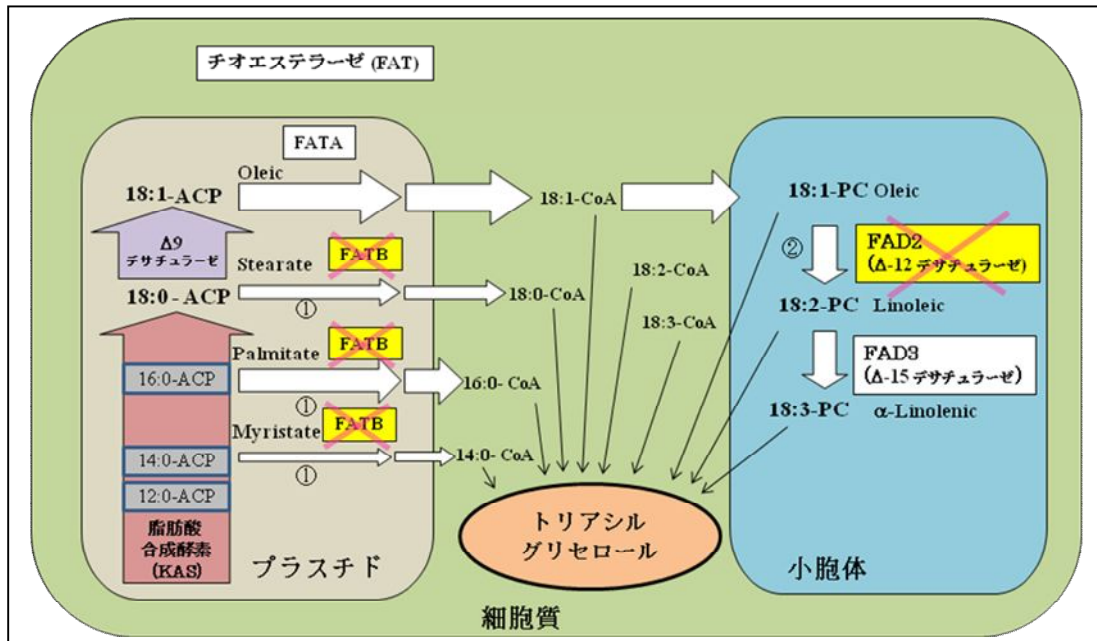


図 2 ダイズの脂肪酸合成経路⁸

*本組換えダイズにおいて発現が抑制される酵素(FATB 及び FAD2) を \times で示した。

*アシル-ACP はチオエステラーゼによる加水分解をうけて脂肪酸になり、その後アシル-CoA に変換される。

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

実際に、精油・脱色・脱臭したダイズ油の脂肪酸組成を分析し、本組換え
ダイズと対照の非組換えダイズとを比較した。その結果、飽和脂肪酸である
5 パルミチン酸 (16:0) やステアリン酸 (18:0) 、単価不飽和脂肪酸であるオレ
イン酸 (18:1) について、意図したとおりに統計学的な有意差 ($P<0.05$) が認
められた (表 2, p24 又は別添資料3の Table 1, p5)。飽和脂肪酸含量の平均は、
従来ダイズが 10~19%の範囲であったのに対し、本組換えダイズは 6%未満で
10 あった。また、オレイン酸含量の平均値は、従来ダイズが 17~30%の範囲で
あったのに対し、本組換えダイズは 71%を超えていた。なお、本組換えダイ
ズのリノール酸(18:2)の含量は対照の非組換えダイズに比べて有意に低かつ
たが、これは本組換えダイズにおいてオレイン酸含量が増大したためであり、
予期したとおりの結果であった。

15 【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ
酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体又は色素体に存在す
る (文献 54)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考
えられる重要な代謝経路である (文献 55; 文献 50)。本経路は、その第一段階
20 に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトロン酸-7-リン酸
(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate -7-phosphate, DAHP) 合成酵素によって調節
を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシ
キミ酸 3 リン酸 (EPSP) の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階で
25 は、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極
めて低いことが明らかにされている (文献 56; 文献 57)。このことは EPSPS が
本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、したがって、EPSPS
活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まる
ことはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物
30 細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており
(文献 58)、加えて、モンサント・カンパニーがこれまでに開発した除草剤グ
リホサート耐性作物 (ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ、アルファルファ、
テンサイ) の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物中のアミノ
酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に対照
35 の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。

また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩
(S3P) から、EPSP と無機リン酸塩 (Pi) を生じる可逆反応を触媒する酵素であ
り (文献 59)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (文献 60)。
40 これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体で
あるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎ
ず、生体内で基質として反応するとは考えにくい。

以上のことから、植物 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS
45 蛋白質の植物における発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼ

す可能性は極めて低いと判断される。

表 2 本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ及び従来ダイズのダイズ油¹の脂肪酸含量⁹

Analytical Component	本組換えダイズ 平均値 ² (S.E.) [Range] ²	対照の非組換えダイズ 平均値 ² (S.E.) [Range] ²	従来ダイズ Range ³	p 値
脂肪酸 (% Total FA ⁴)				
14:0 ミリスチン酸	0.031 (0.0017) [0.031 - 0.032]	0.090 (0.0017) [0.086 - 0.097]	ND - 0.2	<0.001
16:0 パルミチン酸	2.49 (0.087) [2.36 - 2.69]	11.59 (0.087) [11.36 - 11.83]	8.0 - 13.5	<0.001
16:1 パルミトレイン酸	0.13 (0.0044) [0.12 - 0.14]	0.11 (0.0044) [0.096 - 0.11]	ND - 0.2	0.012
18:0 ステアリン酸	3.22 (0.072) [3.00 - 3.40]	4.47 (0.072) [4.33 - 4.57]	2.0 - 5.4	<0.001
16:0 と 18:0 の合計	5.71 [5.36 - 6.09]	16.06 [15.69 - 16.4]	10 - 18.9	NA
18:1 オレイン酸	71.51 (0.85) [69.30 - 73.01]	23.16 (0.85) [21.44 - 25.54]	17 - 30	<0.001
18:2 リノール酸	14.41 (0.92) [12.25 - 17.39]	51.08 (0.92) [50.02 - 52.06]	48 - 59	<0.001
18:3 リノレン酸	4.76 (0.38) [4.08 - 5.46]	5.13 (0.38) [4.21 - 5.96]	4.5 - 11	0.094
20:0 アラキジン酸	0.29 (0.0088) [0.27 - 0.31]	0.36 (0.0088) [0.34 - 0.38]	0.1 - 0.6	0.001
20:1 エイコセン酸	0.33 (0.016) [0.29 - 0.37]	0.19 (0.016) [0.17 - 0.21]	ND - 0.5	<0.001
22:0 ベヘン酸	0.31 (0.011) [0.30 - 0.35]	0.35 (0.011) [0.33 - 0.38]	ND - 0.7	0.001

¹ 本組換えダイズと非組換えダイズのダイズ油は、2007年に米国の2カ所のほ場で収穫した種子を用い、一般的に用いられる手法により準備した。脂肪酸組成は AOCS 公定法に基づいたキャピラリーガス液体クロマトグラフィーによって測定された。統計解析には分散分析を使用した。また、本組換えダイズと非組換えダイズの間有意差は 0.05%水準で検出した (p<0.05)

² 平均値は 4 サンプル、2 反復の分析値から求めた

³ Codex, 2005

⁴ FA = fatty acid (脂肪酸)

⁵ S.E. = standard error (標準誤差)

⁶ 22:1 エルシン酸、24:0 リグノセリン酸は検出できなかった (検出限界=0.02%)

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

(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られたベクターPV-GMPQ/HT4404 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などをもとに構築された。

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られた PV-GMPQ/HT4404 の全塩基数は 13,088bp である。

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

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

20

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

25

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

30

宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 1 (p15) 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と制限酵素による切断部位に関しては、

図 1 (p14) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 5 プラスミド・ベクターPV-GMPQ/HT4404 をアグロバクテリウム法によって、非組換えダイズ品種 A3525 の胚細胞へ導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- 10 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

15 従来ダイズ品種 A3525 の胚から採取した分裂組織とプラスミド・ベクター PV-GMPQ/HT4404 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサート、カルベニシリン及びクラフォランを添加した組織培養培地で細胞の選抜を行った。この際、グリホサートによって形質転換していない細胞を除去した。

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

20 カルベニシリン及びクラフォラ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、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体が残存していないことをプラスミド・ベクター PV-GMPQ/HT4404 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行うことによって確認した (別添資料 4)。

25

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

30 形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、後代である R1 世代において導入遺伝子をホモで有し、かつその成熟個体から収穫された種子が望ましい脂肪酸組成を示すものを選抜した。この選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として MON87705 系統を選抜した。

35

本組換えダイズの育成図を図 3 (p27) に示した。なお、本評価書における本組換えダイズ MON87705 系統とは、R1 世代において導入遺伝子をホモで有する個体及びその後代の全てを指す。

5

[社外秘につき非開示]

10

15

20

図 3 本組換えダイズの育成図

25

(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はメンデルの法則に従って次世代に遺伝していることから、染色体上に存在する (別添資料 5)。

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

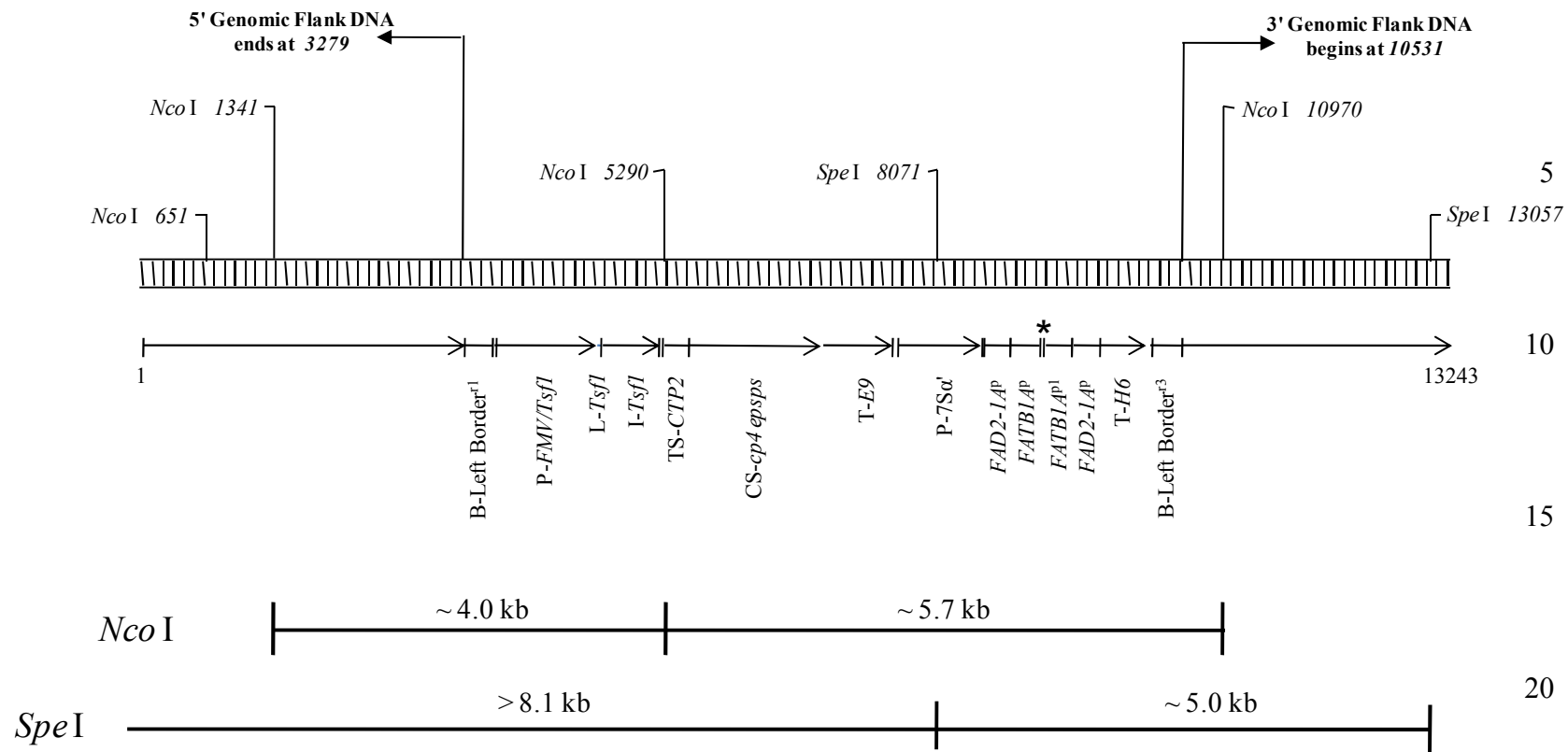
10

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えダイズのゲノム中 1 ヶ所に 1 コピーの T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域が隣接した形で組み込まれていることが確認された (別添資料 6 の Fig. 5~Fig. 7, p29~31)。また、外側骨格領域は導入されておらず (別添資料 6 の Fig. 8, p32 及び Fig. 9, p33)、導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代 (R3、R4、R5、R6 世代) におけるサザンブロット分析によって示された (別添資料 6 の Fig. 10, p34)。

15

なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を p29 に図 4 として示した。

20



25 図4 本組換えダイズの導入遺伝子地図¹⁰

¹⁰本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

- ③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

5 本組換えダイズでは、ゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域が隣接した形で組み込まれている(別添資料 6 の Fig. 5~Fig. 7, p29~31)。したがって、1 コピーなので該当しない。

- 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

本組換えダイズの未熟種子における *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子の発現を調べるため、ノーザン解析を行った。その結果、それぞれの遺伝子の mRNA レベルが対照の非組換えダイズと比較して顕著に低いことが示された (別添資料 1 の Figure 1, p18 及び Figure 2, p19)。

15

本組換えダイズの葉及び種子における改変 CP4EPSPS の発現を ELISA 法により分析した。その結果、改変 CP4EPSPS の葉(OSL-1)における発現量は、平均値が 31 $\mu\text{g/g}$ fwt で、その発現量の範囲は 27 $\mu\text{g/g}$ fwt~35 $\mu\text{g/g}$ fwt であった (別添資料 7 の Table 1, P16)。また、改変 CP4EPSPS の種子における発現量は、平均値が 170 $\mu\text{g/g}$ fwt で、その発現量の範囲は 160 $\mu\text{g/g}$ fwt~180 $\mu\text{g/g}$ fwt であった (別添資料 7 の Table 1, P16)。

20

また、育成の過程において、本組換えダイズのダイズ油における飽和脂肪酸含量及びオレイン酸含量と、改変 CP4EPSPS 蛋白質の発現を各世代で確認しながら選抜を行った。

25

- 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

30

プラスミド・ベクターPV-GMPQ/HT4404 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* や *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られているため、移入された核酸が自然条件下において野生動植物等に伝達される可能性はない。

- (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

35

PCR 法による検出が可能である (別添資料 8)。

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

40

- 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

本組換えダイズにおいて、*GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片の発現により内在性 *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子のそれぞれの発現が抑制さ

れ、結果として種子中のオレイン酸含量が高まり、飽和脂肪酸含量は減少する。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子の導入によって、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている。

5 *GmFATB1* 遺伝子断片の発現により、チオエステラーゼである内在性の FATB の発現が抑制され、主にパルミチック-ACP の加水分解が抑制されて、ダイズ油分中の飽和脂肪酸を減少させることが可能になる。実際にダイズ油の脂肪酸組成を分析した結果、従来ダイズにおける飽和脂肪酸含量の平均が 10~19 %の範囲であったのに対し、本組換えダイズでは 6%未満であった(表 2、
10 p24 又は別添資料 3 の Table 1, p5)。

また、*GmFAD2-1A* 遺伝子断片の発現により、 $\Delta 12$ デサチュラーゼである内在性の FAD2 の発現が抑制され、オレイン酸 からリノール酸への $\Delta 12$ 不飽和化が抑制される。このため、油分中のオレイン酸含量を増大させることが可能になる。実際にダイズ油の脂肪酸組成を分析した結果、従来ダイズのオレイン酸含量が 17~30 %の範囲であったのに対し、本組換えダイズでは 71%を超えていた (表 2、p24 又は別添資料 3 の Table 1, p5)。
15

一方で、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。なお、本組換えダイズにおいて改変 CP4EPSPS が発現していることは、ELISA 法により確認された (別添資料 7 の Table 1, P16)。
20

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¹¹

30 a 形態及び生育の特性

形態及び生育に関する特性を比較するため、米国の3カ所のほ場 (オタワ郡 (ミシガン州), フェイエット郡 (オハイオ州), バーク郡 (ペンシルバニア州)) において9項目 (苗立ち株数、初期の草勢、50%開花期までの日数、花色、倒伏性、主茎長、脱粒性、収穫種子の水分含量、収量) について本組換えダイズと対照の非組換えダイズ A3525 の間の形態特性及び生育の差異を調査した。なお、参考品種として従来商業品種5品種を供試し、試験は3反復で行った (別添資料9)。
35

その結果、50%開花期までの日数、主茎長及び苗立ち株数を除く全ての項目で有意な差は認められなかった (別添資料9の Table 2, p6)。
40

¹¹ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

統計学的有意差の認められた項目のうち、50%開花期までの日数に関しては、バーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは209.0日、対照の非組換えダイズでは207.3日であった(第一の2-(6)-②-a, p31)。

5 また、主茎長に関しては、バーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは72.6 cm、対照の非組換えダイズでは81.3 cmであった。

しかし、50%開花期までの日数及び主茎長に関しては、バーク郡のほ場で参考として供試された従来商業品種5品種の平均値の範囲内(50%開花期までの日数：208.0-209.0日、主茎長：69.3-87.9 cm)であった。

10 苗立ち株数に関しては、調査を行った3カ所のほ場のうちフェイエツテ郡及びバーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズの360株当たりの苗立ち株数がそれぞれのほ場で平均112.0個体、平均262.3個体であったのに対し、対照の非組換えダイズではそれぞれ平均159.0個体、平均288.0個体であった(別添資料9のTable 2, p6)。このうち、バーク郡のほ場における本組換えダイズの苗立ち株数は、従来商業品種5品種の変動の範囲内(215.0~297.3個体)

15 であった。一方で、フェイエツテ郡のほ場では、従来商業品種5品種の変動の範囲(115.7~153.7個体)を下回っていた(別添資料9のTable 2, p6)。

b 生育初期における低温又は高温耐性

20

生育初期における低温耐性試験は、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種6品種を日中15°C/夜間8°Cで設定された人工気象室で20日間栽培し、その後、草勢、主茎長、生育ステージ、生体重及び乾燥重について比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えダイズと

25 対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料10のTable 3, p6)。

c 成体の越冬性又は越夏性

30

ダイズは夏型一年生植物である。栽培終期において成熟した後には枯死し、再生長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。米国でのほ場試験の収穫期に、本組換えダイズと対照の非組換えダイズが枯死していることが確認されている。なお、隔離ほ場試験の試験終了時に本組換えダイズが枯死

35 していることを確認する予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ

40

米国のほ場で栽培された本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種5品種から花粉を採取し、その稔性とサイズを調査した。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料11のTable 2, p16)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

5 第一の 2-(6)-②-a (p31) に上述したとおり、種子の生産量及び脱粒性について本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった。

10 20°C16 時間と 30°C8 時間の条件下における種子の発芽率について、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 4 品種より収穫した種子を 4 反復各 100 粒ずつ温室にて播種し、休眠性と発芽率の調査を行った。発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子については硬実種子率、枯死種子率及び吸水膨潤状態 (viable firm-swollen) の種子率に分けて測定した (別添資料 12)。その結果、全ての項目において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の Table 1, p5)。

15 f 交雑率

わが国にはダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが生育している。本組換えダイズとツルマメの交雑率の試験は行っていない。ダイズとツルマメとの交雑率を管理されたほ場内で調査するためには、遺伝的背景が均一なツルマメ系統を多数用意する必要がある。さらに、交雑試験では、雑草であるツルマメの発芽及び生育の均一性の確保や、ツルマメの開花期をダイズに合わせるための日長処理など、技術的に困難な作業が必要になる。よって、隔離ほ場試験においては本組換えダイズと従来ダイズの生殖特性及び交雑率を比較することにより、本組換えダイズとツルマメとの交雑性が従来ダイズとツルマメとの交雑性に比べて高まっていないことを確認する予定である。

g 有害物質の産生性

30 本組換えダイズから他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するために、温室において本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 6 品種を供試して鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、鋤込み試験においてはいずれの項目においても検定植物であるレタスの発芽株数、生育ステージ、草丈、生体重及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 13 の Table 1, p5)。後作試験においては、レタスの発芽株数に本組換えダイズ区と対照の非組換えダイズ区との間で統計学的有意差が認められたが、生育ステージ、草丈、生体重及び乾燥重においては統計学的有意差は認められなかった(別添資料 13 の Table 1, p5)。

40 統計学的有意差の認められた後作試験の発芽株数では、本組換えダイズ区では平均 5.5 個体、対照の非組換えダイズ区では 6.0 個体であった(別添資料 13 の Table 1, p5)。また、本組換えダイズ区における発芽株数(平均 5.5 個体)は、従来商業品種 6 品種の変動の範囲(5.8~6.0 個体)を下回っていた。なお、隔離ほ場試験においても鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験を行う予定である。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

5 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

10 名称: 日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間: 承認日から平成 24 年 1 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

- 15 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 20 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等などに付着した土、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同時に、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、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。

25

2. 隔離ほ場での作業要領

- (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- 30 (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をする場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- 35 (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発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 40 (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、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。

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料 14

の図 2 (p3) に示した。

(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

5

別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。

(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

10

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

15

—

(6) 国外における使用等に関する情報

20

これまで本組換えダイズについて 2006~2007 年の間に米国、アルゼンチン、チリにおいて延べ 47 ヲ所のほ場試験が行われているが、非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生ずるおそれがあるような相違は報告されていない。

25

なお、本組換えダイズに関しては(以下社外秘)。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹²

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズがこれまで北米において栽培ほ場の外で発見されたという報告はない(文献1)。わが国においても、ダイズは縄文時代には既に栽培されており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

10

米国の3ヵ所のほ場(オタワ郡、フェイエッテ郡、バーク郡)において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、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(第一の2-(6)-②-a-e、p31))を比較調査した。その結果、苗立ち株数、50%開花期までの日数及び主茎長を除く、全ての項目で本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に差異あるいは統計学的有意差は認められなかった。

15

50%開花期までの日数に関しては、バーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは209.0日、対照の非組換えダイズでは207.3日であった(第一の2-(6)-②-a、p31)。また、主茎長に関しては、バーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは72.6cm、対照の非組換えダイズでは81.3cmであった。しかし、バーク郡のほ場における本組換えダイズの50%開花期までの日数及び主茎長に関しては、同一ほ場において参考として供試された従来商業品種5品種の平均値の範囲内(50%開花期までの日数:208.0-209.0日、主茎長:69.3-87.9cm)に収まっていたことから、バーク郡のほ場で観察された50%開花期までの日数と主茎長の値は従来品種の変動の範囲内であると判断された。なお、本組換えダイズに導入された*GmFATB1A* 遺伝子断片及び*GmFAD2-1A* 遺伝子断片の発現は胚特異的プロモーターによって誘導されるため、50%開花期までの日数及び主茎長において認められた有意差は、これらの遺伝子断片に起因するものではないと考えられた。

20

25

30

苗立ち株数に関しては、調査を行った3ヵ所のほ場のうちフェイエッテ郡及びバーク郡のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズの360株当たりの苗立ち株数がそれぞれのほ場で平均112.0個体、平均262.3個体であったのに対し、対照の非組換えダイズではそれぞれ平均159.0個体、平均288.0個体であった(第一の2-(6)-②-a、p31)。このうち、バーク郡のほ場における本組換えダイズの苗立ち株数は、従来商業品種5品種の平均の範囲内(215.0~297.3個体)であったが、フェイエッテ郡のほ場における本組換えダイズの苗立ち株数は、従来商業品種5品種の平均値の範囲を下回っていた(115.7~153.7個体)。しかしながら、苗立ち株数が低いことが雑草性の増大に寄与す

35

40

¹² 本項目中で、第一の2-(6)-②-a~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

るものではないと考えられることから、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間に見られた苗立ち株数の差異が、競合における優位性を高めるものではないと判断された。

5 本組換えダイズでは *GmFATB1A* 遺伝子断片及び *GmFAD2-1A* 遺伝子断片の
発現により、本組換えダイズの種子中では飽和脂肪酸含量が低下しており、
オレイン酸含量が高められている。一般的にダイズ種子中の油分は、ダイズ
10 種子におけるエネルギー源として貯蔵され、主に発芽などにおいて利用され
ることが知られている (文献 61; 文献 62)。しかしながら、種子中の飽和脂肪
酸含量の低下やオレイン酸含量の増大が発芽におけるエネルギー供給におい
て特に有用であるとは考えられない。また、本組換えダイズは改変 *cp4 epsps*
15 遺伝子の恒常的な発現により、除草剤グリホサートに耐性を持つ。しかしな
がら、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグ
リホサートへの耐性が競合における優位性を高めるとは考えられない。

15 以上のことから、本組換えダイズを限定された環境で一定の作業要領を備
えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する生物多
様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

20 (2) 影響の具体的内容の評価

—

25 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

30 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、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。

35 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

40 ダイズは縄文時代には既にわが国で栽培されており、イネ・ムギとともに最
も長い使用経験があるが、これまでにダイズにおいて有害物質の産生性は報
告されていない。

45 本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無
を鋤込み試験及び後作試験により比較検討した結果、後作試験においてレタ
スの発芽株数に統計学的有意差が認められた(第一の 2-(6)-②-g, p33)。しかし

ながら、生育ステージ、草丈、生体重及び乾燥重においては統計学的有意差は認められなかったことから、本組換えダイズから有害物質が産生されているとは考えにくい(別添資料 13 の Table 1, p5)。

5 本組換えダイズに導入された *GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片は、ダイズの内在性遺伝子である *FAD2-1A* 遺伝子と *FATB1A* 遺伝子の一部であり (表 1、p15)、これらの遺伝子断片の RNA が産生されることで内在性の *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子のそれぞれの発現が抑制される。なお、RNA がアレルギー性や毒性をを持つという報告はなく、RNA は日常的な食物として GRAS (Generally Recognized As Safe) に指定されている(文献 45 及び 文献 10 46)。RNA の安全性に対するこうした認識は、サプリメントとして多量の RNA を経口摂取させた安全性試験により支持されている (文献 47;文献 48) 。よって、*GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片の発現によって新たな有害物質が産生されるとは考えにくい。

15 また、本組換えダイズ中では改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、当該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、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が確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p19)。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高いため (第一の 2-(1)-ロ-③, p20)、当該蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼし、新たな有害物質を産生する 20 可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、本組換えダイズを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

25

(2) 影響の具体的内容の評価

—

30 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35

以上のことから、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

40

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

45 第一の 1-(3)-ニ-③ (p4~5) に記載したように、ダイズと交雑可能な近縁野生

種としてわが国に分布しているのはツルマメのみである(文献 2; 文献 3; 文献 1)。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。

5 (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。したがって、本組換えダイズに関しても、ツルマメと交雑した場合は雑種が形成されると考えられる。また、当該雑種からツルマメへの戻し交配を経て、本組換えダイズ由来の *GmFAD2-1A* 遺伝子断片、*GmFATB1A* 遺伝子断片及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子がツルマメの集団中に検出される可能性も否定できない。

15 (3) 影響の生じやすさの評価

わが国においてツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場現場跡地、畑の周辺のほか、日当たりの良い野原や道ばたなどに自生している (文献 5; 文献 6; 文献 3; 文献 7)。したがって、本組換えダイズがわが国で第一種使用規程に従って使用された場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する機会があることは否定できない。

しかし、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯して受粉が完了する上に、開花期の後半にはほとんどの花が開花することなく蕾のまま受精する閉花受精を行うため (文献 19)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。さらに、開花期については地域、品種及び播種時期に影響されるが、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約 1 ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている (文献 19) ため、ダイズとツルマメの間の交雑は起こりにくいと考えられる。実際、日本固有の栽培品種でありツルマメと開花期が重複する丹波黒とツルマメをそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調べた結果、得られた 686 個体のツルマメの後代の中にダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体確認されており、その交雑率は 0.73%と報告されている (文献 25)。また、組換えダイズとツルマメを隣接して栽培し、ツルマメがダイズにまきついて生育している状態で採種したツルマメ種子 32,502 粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は 1 粒であり、この交雑種子はダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群の 11,860 粒の中から見つかったと報告されている(文献 26)。よって、一般的にダイズとツルマメ集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合う場合は交雑し得るが、そのような特殊な条件の場合でも、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられた。

40 本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で生殖に関わる形質を比較した場合、花粉形態及び花粉稔性(別添資料 11 の Table 2, p16)、種子の生産性(収量) (別添資料 9 の Table 2, p6)に有意な差異は認められず、本組換えダイズの交雑性は従来のダイズと同様に極めて低いと推測された。さらに、2008 年 8 月の時点で隔離ほ場の敷地内および隔離ほ場周辺 75m 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。このことと、本組換えダイズは一定の作業要領を備えた隔離ほ場において第一種使用規程に従って使用することから、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は通常よりもさらに低くなると考えられた。

5 仮に本組換えダイズとツルマメが自然交雑した場合でも、本組換えダイズ由来の *GmFAD2-1A* 遺伝子断片や *GmFATB1A* 遺伝子断片、または改変 *cp4 epsps* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくには、F1 雑種やその雑種後代が自然環境中で生存し、ツルマメと戻し交雑を繰り返す必要がある。

10 従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、わが国において経時的な調査が行われている。2003 年から 2005 年にかけてツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間型が探索されている。その結果、調査した 58 地点(秋田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点)
15 のうち秋田県の 1 地点及び佐賀県の 3 地点から形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ 11 個体の中間体が発見され、その後、マイクロサテライトマーカーにより、これらの中間体はすべてダイズとツルマメの自然交雑に由来することが明らかになった (文献 63; 文献 64; 文献 65)。そのうち、佐賀
20 県の 1 地点で見つかった 7 個体の中間体は、F1 雑種が自殖した雑種後代であると推察された(文献 65)。

しかし、これら発見された F1 雑種及び雑種後代が同じ集団内で生存し続けるかどうか追跡調査を行ったところ、7 個体の雑種後代が見つかった佐賀県の 1 地点で、翌年に 1 個体の雑種後代を発見したものの、翌々年は確認されなかった(文献 66; 文献 67)。

25 さらに、ダイズからツルマメへの自然交雑の有無を DNA レベルで明らかにするために、F1 雑種及び雑種後代が発見された地点を含めて、秋田県、茨城県、佐賀県の 14 地点の種子 1,344 サンプルをマイクロサテライトマーカーで解析した結果、従来ダイズ由来の遺伝子のツルマメ集団中への浸透は確認されなかった(文献 68)。同様に文献 69 も「ダイズにおいて作物から野生種への
30 遺伝子浸透の分子学的証明はない」と述べている。

このようにダイズとツルマメの雑種の生存が制限される理由として、雑種自体の競合性の低下が考えられる。ダイズは人為的な栽培環境に適応進化しており、自然環境に適応したツルマメとは遺伝的、形態的、生理学的及び生態的特性に大きな違いがある。したがって、雑種及び雑種後代が栽培作物であるダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境に適応するのに不利になっている可能性がある。実際、文献 70 は、人為的に交配して得た従来ダイズとツルマメの雑種を親系統とともに播種した後で、それらの定着の様子を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統の定着率は親系統であるツルマメと比較して明らかに劣っていたと報告している。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種においては、競合における優位性に関わる休眠性、倒伏性、脱粒性はツルマメに比べ低下していることが知られている(文献 70; 文献 71)。
35
40

これらのことから、ツルマメの生育する自然環境下では、従来ダイズとツル

マメの F1 雑種及びその雑種後代は、上述した生物学的な障壁などにより長期間生存できず、従来ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起きている可能性は極めて低いと考えられた。

5 一方で、仮に本組換えダイズがツルマメと交雑した場合、その雑種は本組換えダイズに導入された *GmFAD2-1A* 遺伝子断片及び *GmFATB1A* 遺伝子断片の機能により従来ダイズとツルマメの雑種と比較して種子中の飽和脂肪酸含量が減少し、オレイン酸含量が増加している可能性が考えられる。しかしながら、本組換えダイズの諸形質 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、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) を調べた結果は、本組換えダイズ中の導入遺伝子が競合における優位性を高めていないことを支持している (第一の 2-(6)-②-a~e、p31)。また、オレイン酸はダイズ及びツルマメの種子に含まれる脂肪酸の 1 つである (文献 72)。したがって、種子における低い飽和脂肪酸含量や高いオレイン酸含量が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

10
15
20 また、本組換えダイズには改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されているため、本組換えダイズがツルマメと交雑した場合、その雑種は除草剤グリホサートに耐性も併せ持つ可能性が考えられる。しかしながら、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

25 以上をまとめると、本組換えダイズとツルマメは、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合うような特殊な条件であっても交雑率は極めて低い。また、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での使用であるため、交雑する可能性はさらに低くなると考えられる。仮に交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応して、野生植物を駆逐していく可能性は極めて低く、本組換えダイズ由来の *GmFAD2-1A* 遺伝子断片や *GmFATB1A* 遺伝子断片、または改変 *cp4 epsps* 遺伝子が、ツルマメ集団中へ浸透していく可能性も極めて低いと判断された。したがって、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) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35 以上のことと、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使用されることから、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。

40

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 競合における優位性；ダイズは縄文時代には既にわが国で栽培されており、
イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然
条件下で雑草化した例は報告されていない。本組換えダイズと対照の非組換
えダイズとの間で競合における優位性に関わる諸形質（形態及び生育の特性、
10 生育初期における低温耐性、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（第一の 2-(6)-②-a~e、p31))を比較検討した結果、苗立ち株
数、50%開花期までの日数及び主茎長について対照の非組換えダイズとの間に
15 差異が認められたが、その他の項目では差異あるいは統計学的有意差は認めら
れなかった。検討の結果、統計学的有意差の認められた項目における差異は競
合における優位性を高めるものではないと判断された。

15 本組換えダイズでは、*GmFATB1A* 遺伝子断片及び *GmFAD2-1A* 遺伝子断片
の発現により、種子中の飽和脂肪酸含量が低下しており、オレイン酸含量が高
められている。しかしながら、低い飽和脂肪酸含量や高いオレイン酸含量が発
芽におけるエネルギー供給において特に有用であるとは考えられない。また、
本組換えダイズは改変 *cp4 epsps* 遺伝子の恒常的な発現により、除草剤グリホ
20 サートに耐性を持つ。しかしながら、グリホサートを散布されることが想定し
にくい自然条件下においてグリホサートへの耐性が競合における優位性を高
めるとは考えられない。

したがって、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
25 範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれ
はないと判断された。

有害物質の産生性：ダイズに関して、これまでに有害物質の産生性は報告
されていない。本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の
30 産生性の有無を鋤込み試験及び後作試験により比較検討した結果、本組換
えダイズから有害物質が産生されていないと判断された。

本組換えダイズでは *GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺伝子断片の
RNA が産生されることで内在性の *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子のそれぞれの
発現が抑制される。しかしながら、RNA がアレルギー性や毒性を持つとい
う報告はなく、RNA の安全性は GRAS への指定や経口摂取による安全性試験
35 により支持されていることから、*GmFAD2-1A* 遺伝子断片と *GmFATB1A* 遺
伝子断片の発現により有害物質が産生されることは無いと考えられた。一方
で、本組換えダイズの中では改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、当
該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、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が確認されている。また、改変 CP4 EPSPS
40 蛋白質は基質特異性が高いため、宿主の代謝系に影響を及ぼし、新たな有害
物質を産生する可能性は極めて低いと考えられた。

したがって、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備え
た隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の
範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれ
はないと判断された。

いと判断された。

5 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。従来知見よりダイズとツルマメの開花期は重なり
にくく、その交雑率も低いことが知られている。また、本組換えダイズの種子の
生産量(収量)、花粉形態及び花粉稔性など生殖に関わる形質の調査結果から、
10 本組換えダイズの交雑性は従来ダイズと同様に低いと推測された。さらに、仮
に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合であっても本組換えダイズとツ
ルマメの雑種がツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性は極めて低
いと判断された。

15 したがって、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、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。

20 よって、総合的評価として、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、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと
結論された。

参考文献

[社外秘につき非開示]

緊急措置計画書

平成 20 年 12 月 1 日

5 氏名 日本モンサント株式会社
社
代表取締役社長 山根 精一
郎
10 住所 東京都中央区銀座四丁
目 10 番 10 号

15 第一種使用規程の承認を申請している低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ(*GmFAD2-1A*, *GmFATB1A*, 改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87705, OECD UI: MON-87705-6) (以下「本組換え体」という。)の法的に認められた範囲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根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

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は以下に示すとおりである。

平成 20 年 12 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農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

10 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

15 具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体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体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。

20 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。

モニタリング計画書

平成 20 年 12 月 1 日

5 氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎

住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

1. 実施体制及び責任者

10

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。

平成 20 年 12 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

15 * : 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*)

20

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

隔離ほ場周辺 10m^{注)}の範囲内においてモニタリングを実施する。

25

なお、2008 年 8 月の時点で隔離ほ場周辺 75m 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。

注)農林水産省 第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(平成 16 年 2 月 24 日、平成 20 年 7 月 31 日改正)

4. モニタリングの期間

本組換えダイズの栽培期間中とする。

5

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、隔離ほ場周辺 10m 以内にツルマメが生育しているかどうかを確認する。

10

2) 隔離ほ場周辺 10m 以内にツルマメが生育しており秋に種子をつけていた場合には、位置情報を記録するとともに、秋にツルマメ 1 集団当たり最低 50 粒の種子をサンプリングする。

15

3) 1)により、ツルマメの生育が認められない場合には、隔離ほ場から 75m の範囲内で調査可能な範囲において最もほ場に近しいツルマメの集団について、2)と同様の作業を行う。なお、隔離ほ場 75m 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別添 1*として添付した。2008 年 8 月の時点で隔離ほ場周辺 75m 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。

20

収集されたツルマメ種子に *GmFAD2-1A* 遺伝子断片又は *GmFATB1A* 遺伝子断片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。

25

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、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。

30

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)の申請時の最終試験報告書中にモニタリング結果を記載し、報告する。なお、(以下社外秘)。

35

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 *GmFAD2-1A* 遺伝子断片又は *GmFATB1A* 遺伝子断片が検出される等、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。

40

45 *別添 1 については個人情報等を含む為、社外秘