

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ (*2mepsps*, 改変*hppd*,
Glycine max (L.) Merr.) (FG72, OECD UI: BCS-FG072-3)申請書等の概要

	第一種使用規定承認申請書	5
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	8
5	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	8
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	8
	① 和名、英名及び学名	8
	② 宿主の品種名	8
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	8
10	(2) 使用等の歴史及び現状	8
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	8
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	8
	(3) 生理学的及び生態学的特性	9
	イ 基本的特性	9
15	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	10
	ニ 繁殖又は増殖の様式	10
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	10
20	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ずる特性を有する場合はその程度	10
	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
25	ヘ 有害物質の産生性	11
	ト その他の情報	11
	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
30	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
	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つて	
	いる蛋白質と相同性を有する場合はその旨	13
	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	16
	(2) ベクターに関する情報	19
5	イ 名称及び由来	19
	ロ 特性	19
	① ベクターの塩基数及び塩基配列	19
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	19
10	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
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	20
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	20
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	20
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	20
15	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	20
	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	21
20	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	21
	(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	21
25	① 移入された核酸の複製物が存在する場所	21
	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	22
	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	23
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	23
	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	24
35	(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) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	24

	① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的内容	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	25
5	a 形態及び生育の特性	25
	b 生育初期における低温又は高温耐性	26
	c 生体の越冬性又は越夏性	26
	d 花粉の稔性及びサイズ	26
10	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	26
	f 交雑率	27
	g 有害物質の産生性	27
	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
15	(1) 使用等の内容	28
	(2) 使用等の方法	28
	(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	30
	(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	30
20	(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	30
	(6) 国外における使用等に関する情報	30
25	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	31
	1. 競合における優位性	31
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	31
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
	(3) 影響の生じやすさの評価	32
30	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
	2. 有害物質の産生性	32
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	34
	(3) 影響の生じやすさの評価	34
35	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	34
	3. 交雑性	34

	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
	(2) 影響の具体的内容の評価	34
	(3) 影響の生じやすさの評価	34
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	36
5	4. その他の性質	36
	第三 生物多様性影響の総合的評価	37
	参考文献	39
10	別添資料の内容	40
	緊急措置計画書	41
	モニタリング計画書	43
	隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画書	45

15

第一種使用規程承認申請書

平成 22 年 2 月 5 日

5

農林水産大臣 赤松 広隆 殿
環境大臣 小沢 鋭仁 殿

10

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 ギャビン マーチャント 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

20 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>除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ(2<i>mepsps</i>, 改変 <i>hppd</i>, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FG072-3)</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 : 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 名称 : 国立大学法人宮崎大学・遺伝子組換え植物隔離ほ場(仮称) 試用期間: 承認日から平成24年5月31日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、防風林を設置している。また、栽培試験期間中は栽培実験区画を覆うように防鳥ネットを設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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</p>

	<p>及び比較対照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。</p> <p>(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。</p> <p>(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> <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>
--	--

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名：ダイズ

英名：Soybean

10 学名：*Glycine max* (L.) Merr.

② 宿主の品種名

宿主はダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の栽培品種Jackである。

15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

*Glycine*属*Soja*亜属の栽培種ダイズは、中国北部及び中部の原産で、現在では世界各地に広く栽培されるが、野生の状態では確認されていない(文献48)。一方、*Soja*亜属の野生種*G. soja*(ツルマメ)はダイズの祖先種と考えられており、中国、ロシアの隣接地域、朝鮮、日本、台湾に分布している(文献48)。我が国においては北海道南部から九州まで分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地等、適度の攪乱に曝される場所を主な生育地としている(文献1)。

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

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いる(文献48)。我が国への渡来は、これまでの推定では、1900～2000年前とされる(文献20)。西洋への導入は比較的新しく、現在の主要生産国である米国には1765年に導入された(文献27)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

世界の主要ダイズ生産国とその収穫面積は、2008年に米国3,020万ha、ブラジル2,127万ha、アルゼンチン1,638万ha、中国912万haであった(文献16)。他方、我が国の主な栽培地域とその作付面積は、2008年に北海道2.5万ha、東北4.2万ha、九州2.3万haであった(文献44)。

我が国のダイズ栽培の播種適期は、地域や品種により異なり、北海道(夏ダイズ型品種)では5月上中旬、東北・北陸地方(中間型品種の早・中生)では5月中下旬、関東から中国地方にまたがる地帯(中間型品種の晩生)では6月上～下旬、九州・四国地方では4月中下旬(夏ダイズ型品種)及び6月下旬～7月中下旬(秋ダイズ型品種)とされていたが、実際の農業経営では前作の収穫、気象条件等により適期播種が困難なことが多く、水田転換畑を主体に中間型品種作付地帯では晩播、秋ダイズ型品種作付地帯では早播傾向にある(文献47)。

我が国のダイズ輸入量は2008年に371.1万tで、主な輸入先は米国(272.8万t)、ブラジル(56.8万t)、カナダ(32.5万t)であった(文献45)。国内消費仕向量は2008年概算値で403.4万t、その内訳は加工用297.8万t、飼料用11.4万t、食用86.1t、種子用0.7万t等であった(文献46)。

ダイズの用途は、青刈り・緑肥用、枝豆用、子実用等に大別され、子実用はさらに製油用、味噌、醤油、納豆、豆腐等の加工食品用に細分される(文献24)。また、ダイズ濃縮蛋白は肉製品の増量剤や代用肉となり、粗油から分離されるリン脂質のレシチンは、天然乳化剤や潤滑剤等として用いられる(文献30)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは種子で繁殖する一年生植物である(文献48)。日長や温度に対する反応が多様なため、各地に適応した生態型の品種分化がみられる(文献23)。発芽後2～3週間すると、根粒菌の寄生により根粒が形成され始め、空中窒素を固定して栄養源とする(文献20)。種子の百粒重は、特殊なものを除き10～50gの範囲である(文献32)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は30～35℃であり(文献20)、土壌温度が10℃以上で発芽可能、好適条件では5～7日で出芽する(文献48)。ダイズの生育適温は25℃付近であるが、低温条件が続くと生育が抑えられ、子実生産も阻害される(文献33)。耐霜性がないため、冬季に凍結するような条件では生育できない(文献48)。ダイズの生育に適する土壌水分は飽和水分の70%であり、

最適pHは6.0-6.5であるが、土壌に対する適応性は比較的広く、我が国では全国的に栽培可能である(文献20)。

ハ 捕食性又は寄生性

5 ー

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

10 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、一般に米国の無限伸育性品種は裂莢しにくい(文献47)。ダイズ種子は休眠性(硬実性)を示すことがあるが、育成品種ではほとんど硬実はみられない(文献1; 文献48)。また、種子の寿命は比較的短く、常温で貯蔵した場合に通常約3年で発芽力を失う(文献33)。

15

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

ダイズは種子繁殖であり、自然条件において他の器官からの繁殖は観察されていない。

20

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

25 ダイズは通常、花が完全に開く前に雄ずいが伸長し、裂開した葯が柱頭を摩擦するので、受粉は開花前に完了する。また、開花期に乾燥や低温等の不順な気象条件に曝されると閉花受精が行われる(文献1)。このため、ダイズは自殖種と考えられる(文献48)。

30 ダイズの他殖率は、一般的には1%以下(文献6; 文献10; 文献19)とされるが、十分な花粉媒介昆虫の存在下で2.5%の事例も報告されている(文献2)。また、花色の異なる2品種を用いた最近の交雑性試験では、同一畦に15.2cm間隔で交互に2品種を植えた場合の交雑率が0.65~6.32%、平均1.8%であった(文献53)。

35 我が国において、ダイズと交雑可能な近縁野生種は*G. soja*である。*G. soja*の受粉様式はダイズとほぼ同じであり、その自殖率もダイズ同様に高い(文献1)。他殖率については、2.3%(文献31)との報告がある一方、

秋田県雄物川の河川敷で収集した*G. soja*の集団では9.3～19%の他殖率が報告された(文献17)。この調査では、訪花昆虫(主にニホンミツバチとクマバチ)が頻繁に観察されており、その結果比較的高い頻度で交雑が起こったものと考察されている。また、秋田県、茨城県、佐賀県で
5 継続調査された*G. soja*集団では、他殖率の平均は2.2%、範囲は0～6.3%であった(文献37)。

ダイズと*G. soja*の開花期のずれは両者の遺伝子交流を妨げる一因と考えられているが(文献1)、晩生の秋ダイズ型品種作付地帯等では、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*G. soja*を50cm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(文献43)。
10

なお、ダイズに自家不和合性やアポミクシスについての報告はない。
15

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズは1花当たり3,600粒前後の花粉を生産し(文献10)花粉の直径は21～35 μm である(文献18)。また、花粉の寿命は数時間であり、主として他殖が行われる場合にはミツバチなどの訪花昆虫によって花粉が媒介される。前述の花色の異なる2品種を用いた交雑性試験では、花粉源から0.9mで0.41%、5.4mで0.03%の交雑率が報告されている(文献53)。ダイズ畑の畦間に花粉捕集器を設置して花粉飛散を調査した結果では、最大でも1日1 cm^2 当たり0.368粒に過ぎず、風媒による他殖の可能性はほとんどないと判断された(文献60)。
20

25

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

ダイズが、他感物質等のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。
30

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

(1) 供与核酸に関する情報

5

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ(*2mepsps*, 改変 *hppd*, *Glycine max* (L.) Merr.)(FG72, OECD UI: MST-FG072-3)(以下、「FG72」とする。)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を表1に示した。

10

表1 構成要素のベクター上の位置、サイズ、由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	サイズ	由来及び機能
改変 <i>hppd</i> 遺伝子発現カセット			
[社外秘] (3' end of nos gene)	3262-3553	292	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)のプラスミドpTiT37のT-DNA由来ノパリン合成遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列(文献13)。[社外秘]を行う。
改変 <i>hppd</i>	3554-4630	1077	<i>Pseudomonas fluorescence</i> 系統[社外秘]の4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子。アミノ酸配列[社外秘]番目の[社外秘]を[社外秘]へ置換することで除草剤イソキサフルトールへの親和性を低減し、耐性を付与する(文献4)。
[社外秘] (TP)	4631-5002	372	ヒマワリ(<i>H. annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Z. mays</i>)のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域(アミノ酸配列[社外秘]番目を[社外秘]へ置換している)を基に合成された(文献38)。 <i>[社外秘]</i> に輸送する。
[社外秘] (5' leader)	5003-5143	141	タバコ[社外秘]ウイルスの翻訳配列を含み(文献7)、改変 <i>hppd</i> 遺伝子発現カセットにおいて[社外秘]として機能する。
[社外秘] (Phis)	5144-6433	1290	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)[社外秘]遺伝子のプロモーター領域を含む配列で、一部の内部配列を重複させることで[社外秘]を高める(文献8)。
2 <i>mepsps</i> 遺伝子発現カセット			
Ph4a748	6434-7448	1015	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列(文献8)。植物中で構成的に2 <i>mepsps</i> 遺伝子の転写を開始させる。
Intron1 h3At	7449-7929	481	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストンH3.3第II遺伝子の第一イントロンを含む配列(文献9)
TPotp C	7930-8301	372	ヒマワリ(<i>H. annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Z. mays</i>)のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペ

			プチドのコード領域を基に合成された(文献38)。成熟した2mEPSPS蛋白質を色素体に輸送する。
2mepsps	8302-9639	1338	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(<i>epsps</i> 遺伝子)に点突然変異を起こした、2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(2mEPSPS蛋白質)をコードする遺伝子で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する(文献39)。
3'histonAt	9640-10326	687	<i>A. thaliana</i> 由来のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域(文献8)を含む配列で、転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる。
その他			
-	10327-10398 1-232	304	プラスミドベクターpMCS5の塩基配列(文献26)。
-	233-457	225	プラスミドベクターpUC19の塩基配列(文献59)。
ORI ColE1	458-1244	787	<i>Escherichia coli</i> のプラスミドpBR322(文献3)由来複製起点(ORI ColE1)を含む配列。
-	1245-1403	159	プラスミドベクターpUC19の塩基配列(文献59)。
<i>bla</i>	1404-2264	861	<i>E. coli</i> のプラスミドpBR322(文献3)由来β-ラクタマーゼ遺伝子を含む。
-	2265-2394	130	プラスミドベクターpUC19の塩基配列(文献59)。
ORI fl	2395-2840	446	繊維状ファージfl(文献14)の複製起点(ORI fl)を含む配列。
-	2841-3261	421	プラスミドベクターpUC19の塩基配列(文献59)。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ 構成要素の機能

- 5 ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の
供与核酸の構成要素それぞれの機能
供与核酸の構成要素それぞれの機能は表1(p.12~13)に示した。
- 10 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

2mepsps遺伝子

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EC 2.5.1.19)(以下、「EPSPS蛋白質」とする。)は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路である、シキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、
15 ホスホエノールピルビン酸(PEP)とシキミ酸-3-リン酸(S3P)から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸(EPSP)を生ずる可逆反応を触媒す

る。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻害する(文献5)。その結果、植物は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、枯死する。

5

FG72に導入された2mepsps遺伝子は、トウモロコシ(*Z. mays*)からクローニングされたEPSPS蛋白質をコードするepsps遺伝子の2ヶ所のヌクレオチドが点突然変異により置き換えられた遺伝子である。2mepsps遺伝子が産生する2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(以下、「2mEPSPS蛋白質」とする。)のアミノ酸配列は、野生型のEPSPS蛋白質のアミノ酸の102番目のトレオニンがイソロイシンに、また106番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している。これにより、2mEPSPS蛋白質はグリホサートに対する結合親和性が低くなり、グリホサートによる活性阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、グリホサートの存在下でも生育することができる。

15

また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2008年にアレルゲンデータベース (AllelgenOnline) に登録されているアレルゲンとの相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

20

なお、2mepsps遺伝子は、我が国において平成20年5月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グリホサート耐性ワタGHB614(OECD UI:BCS-GH002-5)に導入されている。

25

改変hppd遺伝子

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ {4-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase(EC 1.13.11.27)} (以下、「HPPD蛋白質」とする。)は、数種のグラム陽性菌及び全ての好気性生物に存在し、40k-50kDaのサブユニットから構成され、細菌では4量体、真核生物では2量体の酸素添加酵素である。植物の細胞内では、HPPD蛋白質はチロシンの代謝経路においてp-ヒドロキシフェニルピルビン酸(p-HPP)及び1分子の酸素とともに酵素基質複合体を形成し、ホモゲンチジン酸(HGA)の合成を触媒する。その後HGAはチロシン異化経路に入る他、プラストキノン合成及びトコフェロール合成に利用される。プラストキノンは光合成電子伝達系の補因子として利用される

35

だけでなく、ビタミンAの合成に必要なカロチノイド合成系における補因子としても機能する。なお、トコフェロールは植物の成長及びストレス反応に必要とされるビタミンEに含まれる(文献12)。

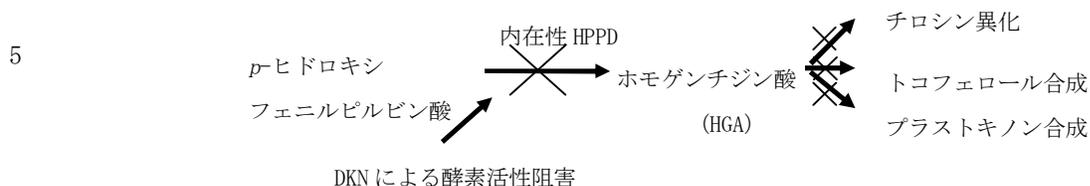
5 除草剤イソキサフルトールは、植物の根及び葉より吸収されると速やかに2-シクロプロピル-3-(2-メシル-4-トリフルオロメチルフェニル)-3-オキソ-プロパンニトリル(除草剤イソキサフルトール由来のジケトニトリル構造物。以下、「DKN」とする。)へと分解され、生じたDKNがp-HPPと競合してHPPD蛋白質の活性部位に可逆的に結合することにより、HPPD蛋白質の活性を阻害する。その結果、植物はHGAを合成できなくなり、それに伴ってチロシン異化、プラストキノン及びトコフェロールの合成が阻害される結果、葉緑体の分解を伴った白化症状を示し、その後、枯死する(図1, p.16)。

15 FG72に導入された改変*hppd*遺伝子は、*Pseudomonas fluorescence*よりクローニングされたHPPD蛋白質をコードする野生型*hppd*遺伝子の1箇所のヌクレオチドを点突然変異により置き換えた遺伝子であり、HPPD蛋白質のアミノ酸配列[社外秘]番目の[社外秘]が[社外秘]に変化したHPPD蛋白質(以後、「改変HPPD蛋白質」とする)を産生する。改変前の野生型HPPD蛋白質におけるDKNへの親和性は K_m =[社外秘]であるが(K_m : ミカエリス定数)、この改変により、改変HPPD蛋白質は活性中心付近の構造が変化することによりDKNに対する結合親和性が K_m =[社外秘]へと低下する(文献40)。その結果、DKNによる活性阻害を受けずHGA合成が機能するため、チロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノンの合成が正常に行われ、生育することができる(図1, p.16)。

30 また、改変HPPD蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2009年にアレルゲンデータベース(AllelgenOnline)に登録されているアレルゲンとの相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

35

i) 非組換えダイズの除草剤イソキサフルトール散布時



ii) FG72 の除草剤イソキサフルトール散布時

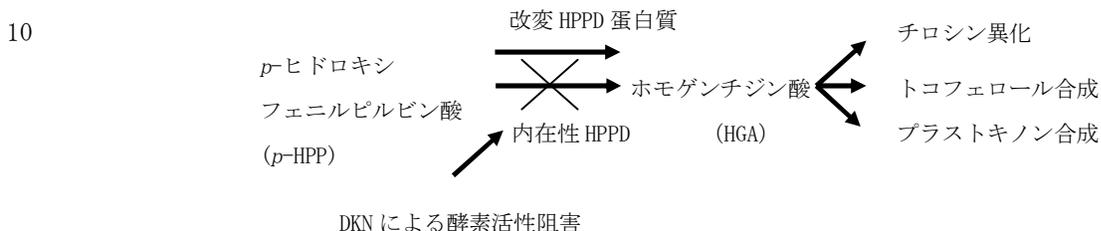


図1 改変 HPPD 蛋白質の作用機構

HPPD は *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸(*p*-HPP)からホモゲンチジン酸(HGA)への反応を触媒する。通常、イソキサフルトールの細胞内分解産物である DKN によってこの酵素活性が阻害され、チロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノン合成ができなくなり、枯死するのに対して、改変 HPPD 蛋白質は影響を受けず、正常な代謝ができることで除草剤イソキサフルトールに対して耐性を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

2mEPSPS蛋白質

2mEPSPS蛋白質と機能的に同一であるEPSPS蛋白質は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蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、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おり(文献25; 文献58)、実際に通常の40倍のEPSPS蛋白質を産生する植物培養細胞において、芳香族アミノ酸は過剰に合成されることが報告されている(文献56)。

なお、2008年米国10試験地において栽培されたFG72の収穫種子(T8世代)における芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)の含有量には、FG72の宿主品種Jack(以下、「宿主品種」とする。)の種子と比較して統計学的有意差は認められなかった(表2,

p.18)。

また、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く(文献21)、高い基質特異性を有している。

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

10 改変HPPD蛋白質

改変HPPD蛋白質と機能的に同一なHPPD蛋白質は、数種のグラム陽性菌及び全ての好気性生物に存在し、*p*-HPPを基質としHGAへの反応を触媒することが知られている(文献22; 文献42)。哺乳類においてはフェニルアラニンの異常代謝の際、HPPD蛋白質が例外的にフェニルピルビン酸(PPA)を基質とするとの報告があるが、大腸菌や放線菌の一種である *Streptomyces avermitilis* といった微生物においてPPAは基質として利用されず(文献51)、また、植物においてもシロイヌナズナ由来のHPPD蛋白質においてPPAは基質として利用されないと報告されている(文献52)。

20 上述のように、HPPD蛋白質の作用により産生されるHGAは3つの反応経路に関与する。チロシン異化においてはフマル酸とアセト酢酸に分解され、その後クエン酸回路に入り、またHGAはプラストキノンに合成され、補酵素としてカロチノイドの合成に関与する。さらに、HGAはビタミンEに含まれる各種トコフェロールの合成にも関与する。そのため、FG72において改変HPPD蛋白質の産生により既存のHPPD蛋白質に相加的に働いてHPPD蛋白質活性が増大することによる影響が考えられた。しかしながら、HPPD蛋白質活性が増加しても、HGAより下流に位置するトコフェロール合成やカロチノイド合成への影響は小さいと報告されており(文献15; 文献54; 文献57)、さらにHPPD蛋白質はこれらの反応経路における律速酵素ではないと考えられている(文献11; 文献55)。

35 実際に、2008年に米国10試験地において栽培したFG72(T8世代)及び宿主品種の収穫種子におけるアスパラギン、グルタミンを除く全てのアミノ酸組成を調査したところ、いずれのアミノ酸含量においても宿

主品種との間に統計学的有意差は認められなかった(表2)。また、ビタミンについては、ダイズの基本的栄養素として重要な各種ビタミンについて調査を行ったところ、 α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及び総トコフェロールにおいて系統間に統計学的有意差が認められたが、
 5 いずれも文献値の範囲内であった(表3, p.19)。また、ビタミンA及びビタミンKについては一部の測定値で検出限界以下となったため、統計解析は行わなかったが、いずれもFG72における平均値は宿主品種とほぼ同じであった。

10 FG72の種子におけるアミノ酸組成及び各種ビタミン含量は宿主品種と同程度であることから、FG72において改変HPPD蛋白質の発現によるHPPD蛋白質活性への影響は低いと考えられる。

15 以上から、改変*hppd*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に及ぼす影響は低いと考えられる。

表2 FG72及び宿主品種の種子におけるアミノ酸構成及び統計解析

アミノ酸 (%乾燥重量)	FG72	宿主品種	有意差 ¹⁾	文献値 ²⁾
アラニン	1.68±0.04	1.68±0.04	ns	1.51-2.10
アルギニン	2.91±0.10	2.94±0.10	ns	2.17-4.30
アスパラギン酸	4.38±0.12	4.40±0.12	ns	3.81-5.12
システイン	0.58±0.02	0.58±0.03	ns	0.37-0.81
グルタミン酸	6.77±0.23	6.75±0.21	ns	5.84-8.20
グリシン	1.68±0.04	1.68±0.04	ns	1.46-2.27
ヒスチジン	1.05±0.03	1.05±0.03	ns	0.84-1.22
イソロイシン	1.80±0.05	1.81±0.05	ns	1.54-2.32
ロイシン	2.99±0.08	2.99±0.08	ns	2.20-4.00
リジン	2.48±0.06	2.48±0.05	ns	1.55-2.84
メチオニン	0.54±0.02	0.54±0.02	ns	0.43-0.76
フェニルアラニン	1.98±0.06	1.97±0.05	ns	1.60-2.39
プロリン	1.82±0.07	1.82±0.07	ns	1.69-2.33
セリン	1.99±0.08	1.97±0.07	ns	1.11-2.48
スレオニン	1.54±0.04	1.55±0.04	ns	1.14-1.89
トリプトファン	0.44±0.03	0.45±0.03	ns	0.36-0.67
チロシン	1.40±0.04	1.40±0.04	ns	0.10-1.61
バリン	1.88±0.05	1.89±0.06	ns	1.50-2.44

分析値は、10箇所の試験地毎に3反復で採種した種子における平均値±標準偏差(n=30)。

1): t-検定(p=0.05)。ns; 統計学的有意差なし。

2): 文献28、文献49より引用。

(注: 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表3 FG72及び宿主品種の種子における各種ビタミンの構成及び統計解析

ビタミン (mg/kg 乾燥重量)	FG72	宿主品種	有意差 ¹⁾	文献値 ²⁾
ビタミンB1	3.44±0.95	3.59±0.76	ns	1.01-16.02
ビタミンB2	4.52±0.89	4.42±0.88	ns	1.9-14.5
葉酸	3.068±0.300	2.976±0.353	ns	2.4-4.7
ビタミンA	0.261±0.112	0.217±0.047	NA ³⁾	0.26-4.37
ビタミンK	0.203±0.078	0.191±0.069	NA ³⁾	0.38-0.51
α-トコフェロール	19.0±5.1	17.4±3.9	s	2-70
γ-トコフェロール	200±14	195±16	s	18-461
δ-トコフェロール	75.2±8.3	74.1±7.4	ns	31-186
総トコフェロール	294±14	286±16	s	120-674

分析値は、10箇所の試験地毎に3反復で採種した種子における平均値±標準偏差(n=30)。

1): t-検定(p=0.05)。ns; 統計学的有意差なし、s; 統計学的有意差あり。

2): 文献28、文献49より引用。

3): NA; 一部の測定値が検出限界値以下のため統計解析を行わなかった。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

FG72の作出に用いたベクターは、pCMS5に由来するプラスミドpSF10である(図2, p.20)。

10

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

FG72の作出に用いられたプラスミドpSF10の全塩基数は10,398bpである。本ベクターの構成要素は表1に示した(p.12~13)。

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

プラスミドpSF10はアンピシリン耐性を付与する*bla*遺伝子を有する。*bla*遺伝子は、本プラスミドを構築する際の選抜マーカーとして利用されたが、植物のプロモーターを持たないためダイズ細胞中では機能しない。また、プラスミドpSF10は形質転換前に*Sal* I で切断され、遺伝子導入に用いられているため、宿主への*bla*遺伝子の導入はなされていない。なお、*bla*遺伝子を含むベクター外骨格がFG72に導入されていないことはサザンブロット分析により確認されている(別添資料1, p.27~32, Table 7, 8 及びFigure 17~19)。

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

プラスミドpSF10は伝達性を持たないため、感染性はない。

5

社外秘情報につき非開示

図2 pSF10のベクター地図及び制限酵素切断部位

10

(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

15 宿主内には、pSF10上のSal I 制限酵素サイトに挟まれた改変*hppd*遺伝子発現カセット([Phis]-[5' leader]-[TP]-[改変*hppd*]-[3' end of nos gene])及び2*mepsps* 遺伝子発現カセット ([Ph4a748]-[intron1 h3At]-[TPotp C]-[2*mepsps*]-[3'histonAt])が移入された。Sal I 断片領域の構成を図3に示した。

20

社外秘情報につき非開示

25

図3 SalI 制限酵素断片の構成及び制限酵素による切断部位

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30 プラスミドpSF10を制限酵素Sal I にて処理し、目的とする改変*hppd*遺伝子発現カセット及び2*mepsps*遺伝子発現カセットを含む7.3kbの断片を直接遺伝子導入法（社外秘）により宿主品種の培養細胞へ導入した。

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

35 直接遺伝子導入法による処理後の培養細胞は、DKNを含む培地で選抜した。選抜されたカルスは植物ホルモンを含まない培地上で体細胞

胚の形成を経て植物体再生を行った。再生個体は温室にて順化、鉢上げを行った。

- 5 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

—

- 10 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

15 生育した苗条をポットに移植して温室内で栽培し、組換え当代(T0世代)を得た。除草剤グリホサート耐性形質により優良系統を選抜した。なお、本申請の対象は、組換え当代(T0世代)において除草剤グリホサート耐性を示した株を2度自殖することにより得た後代(T2世代)の内、*2mepsps*遺伝子及び改変*hppd*遺伝子においてホモ接合性及び安定性を確認した以降の世代である。

FG72の育成の経過を図4に示した。

20 社外秘情報につき非開示

図4 FG72の育成の経過

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

30 T1世代における導入遺伝子の接合性を1個体1列法により調査した。T1世代の各個体より得られたT2世代の種子を由来親毎にそれぞれ1つの畦に播種し、除草剤グリホサート処理を行った結果、全てグリホサート耐性株で構成された畦と一部に感受性株を有する畦が得られた。これらの畦の分離比は、T1世代における導入遺伝子の接合性の分離比を示しており、一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比に適合する結果を示した。また、一部に感受性株を有する畦、すなわち導入遺伝子に関して半接合性T1世代を由来とするT2世代について除草剤グリホサート

35

耐性個体及び感受性個体の分離比を調査した結果、一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比を示した(表4)。

5 表4 FG72における除草剤グリホサート耐性・感受性の分離

社外秘情報につき非開示

10 また、PCR法によりFG72のF2世代における挿入DNAの接合性検定を行ったところ、挿入DNAを有さない個体、導入遺伝子をヘテロで有する個体及び挿入DNAをホモで有する個体の分離比が1：2：1となり、一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比を示した(表5)。

15 表5 F2世代におけるPCRによる接合性検定

社外秘情報につき非開示

20 以上より、FG72に移入された核酸の複製物はダイズゲノム中に1ヵ所存在すると考えられる。

25 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

30 FG72(T7世代)の葉から抽出したゲノムDNAについてサザンブロット分析、またF2世代の葉から抽出したゲノムDNAについてシーケンス解析を行った。その結果、FG72ゲノムには、pSF10上の*Sal* I 処理断片(2*mepsps*遺伝子発現カセット及び改変*hppd*遺伝子発現カセット)が完全長で2コピー同方向に連続して配置されていた。上記の連続する挿入DNAの5'側では、宿主のゲノムとの間に2つの3'*histonAt*断片が連続して存在し、植物ゲノム側の断片ではpSF10とは逆方向に導入されていた。一方、挿入DNAの3'側では宿主ゲノムとの間にフィラーDNA(一本鎖やゲノム欠失部分等を充填する短いDNA)が存在した。また、FG72ゲノム内では宿主のゲノムの一部が同一ゲノム内に転座しており、転座領域の3'側下流の宿主ゲノム内には新規に158bpの*Phis*プロモーター断片の存在

が認められた(図5, 別添資料1, p.6~19, Table 2,3及びFigure 2~11;別添資料2, p.13~51, Figure 4~9)。

また、FG72の複数世代(T2, T7, T9及びF4世代)のゲノムDNAについて、挿入DNA領域及び3'側に挿入されたPhisプロモーター断片をプローブとしてサザンブロット分析を行い、これらの配列が安定して伝達していることを確認した(別添資料1, p.20~26, Table 4~6及びFigure 12~16)。

社外秘情報につき非開示

図5 FG72における挿入DNA領域の概略図

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

(4)の①において示したように、FG72には2コピーの2mepsps遺伝子発現カセット及び改変hppd遺伝子発現カセットが隣接して存在している。

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

2008年にベルギーの温室において栽培されたFG72のT7世代10株のFG72の葉、茎、根及び種子の各組織における2mEPSPS蛋白質量及び改変HPPD蛋白質量をELISA法により分析した(表6, p.24)。また、同じく2008年に米国の10試験地で栽培されたFG72のT8世代の種子における両蛋白質量をELISA法により分析した(表7, p.24)。その結果、いずれの世代でも両蛋白質が検出された。

以上から、FG72の個体間及び世代間において、2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質は安定して発現していることが確認された。

表6 FG72(T7世代)の各組織における2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質の発現量

組織	生育ステージ ¹⁾	2mEPSPS 蛋白質		改変 HPPD 蛋白質	
		μg/g 生鮮重量	μg/g 乾燥重量	μg/g 生鮮重量	μg/g 乾燥重量
葉	V4	90.4 ± 26.1	569 ± 164	6.10 ± 2.78	38.4 ± 17.5
	V6	79.1 ± 29.6	437 ± 163	6.48 ± 4.08	35.8 ± 22.5
	V8	115 ± 38.2	668 ± 222	4.69 ± 1.87	27.2 ± 10.9
茎	V4	18.8 ± 6.16	211 ± 68.9	1.48 ± 0.42	16.6 ± 4.65
	V8	13.4 ± 2.62	117 ± 22.9	0.69 ± 0.35	6.04 ± 3.10
根	V4	4.89 ± 1.99	32.5 ± 13.2	0.87 ± 0.35	5.81 ± 2.30
	V8	5.75 ± 2.31	43.7 ± 17.6	0.84 ± 0.50	6.42 ± 3.82
種子	—	2.37 ± 0.75	2.62 ± 0.83	1.27 ± 0.42	1.41 ± 0.47

分析値は10個体の平均値±標準偏差。

1) V4: 第4複葉期、V6: 第6複葉期、V8: 第8複葉期。

- 5 (注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

表7 FG72(T8世代)種子における2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質の発現量

	ng/g (乾燥重量)	ng/g (生鮮重量)	%(全蛋白質量に対する割合)
2mEPSPS	1360±1080 ¹⁾	1500±1180	4.0×10 ⁻⁴
改変HPPD	846±183	936±203	2.4×10 ⁻⁴

¹⁾ 分析値は、10箇所の試験地毎に3反復で採種した試料の平均値±標準偏差(n=30)。

- 10 (注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

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
 15 FG72は伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然環境下において野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

(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性

20 FG72は、移入されたDNAの周辺配列を利用したプライマーを用いたPCR法によって識別することができる(別添資料3)。なお、本識別法はFG72の栽培管理に有効に利用されている。

(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違

25

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

FG72は2*mepsps*遺伝子の発現により除草剤グリホサート耐性を示すと共に、改変*hppd*遺伝子の発現により、除草剤イソキサフルトール耐性を示す。なお、2003年に米国の2州（アイオワ州及びイリノイ州）3試験地それぞれにおいて、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールの散布試験を3反復行い、FG72及び宿主品種の両除草剤に対する耐性を収量により比較した(表8)。その結果、除草剤グリホサート又はイソキサフルトールを散布した試験区では、FG72の収量は宿主品種に比べて顕著に多く、FG72がこれらの除草剤に対して耐性を示すことが確認された。

表8 除草剤グリホサート及びイソキサフルトール処理におけるFG72 (T5世代) 及び宿主品種の収量(ブッシュェル/エーカー)比較

	慣行栽培区 ¹⁾	GLY ²⁾	IFT ²⁾	GLY+IFT ²⁾	IFT Pre ³⁾
宿主品種	47.6	0.5	18.5	0.5	3.2
FG72	43.1	34.1	38.0	30.7	37.5

分析値は、3試験地各3反復の値。標準誤差=3.4。

1): 慣行栽培区においては、各試験地の標準的な除草を講じた。

2): GLY: 除草剤グリホサート(有効活性成分2800 g ai/ha)。IFT: 除草剤イソキサフルトール(有効活性成分210 g ai/ha)。GLY+IFT: 除草剤グリホサート及び除草剤イソキサフルトールの混合剤。全て第3複葉期—第4複葉期に散布。

3): IFT Pre: 除草剤イソキサフルトール(有効活性成分 315 g ai/ha)の出芽前処理（除草剤イソキサフルトールの散布適期は出芽前後であるため）。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

2008年に米国において野外試験を行い、FG72(T8世代)の形態及び生育の特性や収量等について、宿主品種と比較した。また、2009年にバイエルクロップサイエンス株式会社結城中央研究所PIP実験温室において生育初期における低温耐性についてFG72(T9世代)と比較・検討した(別添資料4)。

a 形態及び生育の特性

2008年に米国の4州(アイオワ州、イリノイ州、インディアナ州及びミズーリ州)10試験地にて行われた試験において、伸育型、毛茸の色、小葉の形、花色、臍の色、生育初期の草勢、開花期、成熟期、草高及び倒伏抵

抗性について、FG72(T8世代)及び宿主品種を比較・検討した。その結果、草高、倒伏抵抗性において統計学的有意差が認められたが、その他の項目に差異又は統計学的有意差は認められなかった(表9)。

5 表9 FG72(T8世代)及び宿主品種における形態及び生育の特性

社外秘情報につき非開示

10 b 生育初期における低温又は高温耐性

2009年に我が国においてFG72(T9世代)及び宿主品種の幼植物体における5℃・10時間明条件下での萎縮程度について4週間にわたり達観調査によるスコア化を行い、統計学的評価を行った。その結果、全ての調査時において系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料4, p.6, 表3)。

15 c 生体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場試験にて調査を行う予定である。

20 d 花粉の稔性及びサイズ

2009年に米国の温室において開花期まで栽培したFG72(T8世代)及び宿主品種の花より花粉を採取し、*p*-フェニレンジアミン溶液による花粉の稔性を調査したところ、両系統の花粉稔性に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, p.13, Table 1)。また、酢酸カーミン染色による花粉の発芽調査を行ったところ、両系統の花粉発芽率に統計学的有意差は認められなかった。FG72及び宿主品種の花粉について、稔性及び発芽率いずれに関しても系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5, p.14, Table 2)。

30 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

2008年に米国の4州10試験地にて行われた栽培試験において、FG72(T8世代)及び宿主品種の種子の生産量、裂莢性、休眠性及び発芽率に関する形質について調査・比較した。

35 表9に示したように、種子の生産量については、一株当たりの子実重を比較した結果、両系統間に統計学的有意差は認められなかった。また、

脱粒性について、両系統の裂莢性を比較した結果、FG72及び宿主品種の裂莢性には統計学的有意差が認められたものの、その差はわずかであった(表10)。

5

表10 FG72(T8世代)及び宿主品種における種子の生産量及び脱粒性

社外秘情報につき非開示

10

発芽率については、上記試験において収穫されたFG72及び宿主品種の種子について、収穫後1~2ヶ月常温にて保存したものを供試し、発芽試験(25℃恒温、相対湿度90%条件)を実施した(表11)。播種6日目の発芽率及び硬実種子の割合については、両系統間に統計学的有意差は認められなかった。未発芽の種子についてさらに1週間調査を継続したところ、硬実種子は全て発芽し、正常発芽、異常発芽、死滅種子の割合の比較では、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。なお、ダイズ種子の休眠は硬実によるが、硬実の発生率は試験条件によって異なる可能性のあることから、隔離ほ場試験においても調査を行う予定である。

15

20

表11 FG72(T8世代)及び宿主品種の収穫種子における発芽試験結果

社外秘情報につき非開示

25

f 交雑率

我が国にはダイズと交雑可能な近縁野生種として*G. soja*(ツルマメ)が自生している。しかし、野生種である*G. soja*より遺伝的に均一で、且つ、FG72と開花期の合う種子を多数準備し、隔離ほ場で栽培することは技術的に困難である。したがって、隔離ほ場試験では、FG72の生殖特性及び対照のダイズへの交雑率を調査することにより、従来のダイズと比較してFG72の交雑性を確認する(「隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画書」参照)。

30

35

g 有害物質の産生性

2009年に行われた我が国のP1P実験室において、根から分泌され他の植

物に影響を与えるものについては後作試験、植物体内に有し、枯死した後には他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験を行った。

後作試験

5 FG72(T9世代)及び宿主品種を移植後約2ヶ月にわたり栽培した土壌を用いて、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料4, p.4, 表1)。

10 鋤込み試験

播種後約2ヶ月半にわたり栽培したFG72(T9世代)及び宿主品種の植物体乾燥試料を1%になるように混和した土壌においてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、いずれの項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料4, p.5, 表2)。

15 なお、根から分泌され土壌微生物に影響を及ぼすものについては、隔離ほ場において土壌微生物相試験を行う予定である。

20

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

25

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

30

所在地： 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地

名称： 国立大学法人宮崎大学・遺伝子組換え植物隔離ほ場(仮称)

試用期間：承認日から平成24年5月31日まで

1. 隔離ほ場の施設

35

1) 部外者の立ち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、部外者は立ち入り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。

5

3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、FG72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。

10

4) 隔離ほ場には防風林を設置している。また、栽培試験期間中は栽培実験区画を覆うように防鳥ネットを設置し、野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防止する。

15

2. 隔離ほ場での作業要領

1) FG72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。

20

2) FG72を隔離ほ場の外に運搬し、又は保存する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。

25

3) 2)により運搬又は保管をする場合を除き、FG72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鋤込む等により、確実に不活化する。

30

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FG72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。

35

6) 1)から5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、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。

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

「モニタリング計画書」を参照。

- 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

「緊急措置計画書」を参照。

- 15 (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

—

- 20 (6) 国外における使用等に関する情報

米国において、無規制承認(栽培承認)を受けるため、2009年11月に米国農務省(USDA)へ無規制承認(栽培承認)申請した。また、2009年12月に米国食品医薬品庁(FDA)へ食品及び飼料安全承認を申請した。

- 25 カナダにおいて、2009年12月に、飼料及び環境安全承認を受けるためカナダ食品検査庁(CFIA)に、また、食品安全承認を受けるためカナダ保健省(Health Canada)にそれぞれ申請した。

- 30 なお、我が国において、2010年に食品安全承認申請を厚生労働省へ、また、飼料安全承認申請を農林水産省へ、それぞれ提出する予定である。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主が属する分類学上の種であるダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、我が国において長期にわたる使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要領
5 の別表第三に基づき宿主と相違が見られた点について考慮することとする。

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

10

ダイズは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然条件下において雑草化した例は報告されていない。

15

20

25

30

35

競合における優位性に関わる形質として、2008年に米国4州(アイオワ州、イ
リノイ州、インディアナ州及びミズーリ州)10試験地において、伸育型、毛茸
の色、小葉の形、花色、臍の色、生育初期の草勢、開花期、成熟期、草高、
倒伏抵抗性、1株当たりの子実重、裂莢性、収穫種子の発芽率等について、
FG72(T8世代)及び宿主品種を比較・検討した(表9, p.26, 表10, p.27及び表11,
p.27)。その結果、草高、倒伏抵抗性及び裂莢性を除く全ての項目において両
系統間に差異又は統計学的有意差は認められなかった。草高に認められた統
計学的有意差は宿主品種と比較してFG72の草高が低くなっており、それに伴
い、倒伏抵抗性における統計学的有意差が認められたと考えられる。なお、
本試験において認められた草高の差が競合における優位性を示すものとは考
えにくい。一方、FG72及び宿主品種の裂莢性において統計学的有意差が認め
られたものの、両系統間の差は僅かであり、また、両系統共に裂莢性が難で
あると考えられることから、本形質における差が競合における優位性を示す
ものとは考えにくい。

FG72及び非組換え体(T8世代)の花粉の稔性について、*p*-フェニレンジアミ
ン染色による花粉活性及び酢酸カーミン染色による発芽試験を行ったところ、
いずれの項目においても両系統間に統計学的有意差は認められなかった。よ
って両系統の花粉の稔性は同等であると考えられる(別添資料5, p.14, Table 2)。
また、2008年の米国10試験地において採種されたFG72(T8世代)及び非組換え
体の収穫種子において硬実率に差は認められず、さらに正常発芽、異常発芽
及び死滅種子の割合を比較したところ、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(表11, p.27)。

さらに、幼植物体の低温耐性について、2009年に我が国のP1P実験温室において調査した結果、FG72(T9世代)と宿主品種の間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料4, p.6, 表3)。

5 また、FG72は除草剤グリホサート及びイソキサフルトールに耐性を有するが、自然環境下において除草剤グリホサート及びイソキサフルトールが散布されるような状況は考え難いことから、本形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

10 以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

15 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、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が生ずるおそれはないと判断した。

25

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

30 ダイズが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼすような有害物質を産生するという報告はない。

2mEPSPS蛋白質は、野生型EPSPS蛋白質と同様に、芳香族アミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではないと考えられる(文献25; 文献58)。また、FG72においては、2mEPSPS蛋白質の産生により既存のEPSPS蛋白質に相加的に働いてEPSPS蛋白質活性

35

が増大することによる影響が考えられたが、EPSPS蛋白質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は過剰に生成されないことが報告されている(文献56)。実際に、FG72と宿主品種の種子における芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）の含有量に統計学的有意差は認められなかった(表2, p.18)。さらに、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く(文献21)、高い基質特異性を有している。

改変HPPD蛋白質は、野生型HPPD蛋白質と同様にチロシン異化、トコフェロール合成及びプラストキノン合成を触媒する酵素であるが、これらの経路における律速酵素ではないと考えられている(文献11; 文献55)。また、FG72においては、改変HPPD蛋白質の産生により既存のHPPD蛋白質と相加的に働いてHPPD蛋白質活性が増大することによる影響が考えられたが、HPPD蛋白質活性が増加してもHGAより下流に位置するトコフェロール合成やカロチノイド合成への影響は小さいと報告されている(文献15; 文献54; 文献57)。実際に、FG72と宿主品種におけるアスパラギン及びグルタミンを除く全てのアミノ酸組成並びに各種ビタミンについて比較した結果、アミノ酸についてはFG72と宿主品種との間に統計学的有意差は認められなかった(表2, p.18)。一方、ビタミンについては α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及び総トコフェロールにおいて系統間に統計学的有意差が認められたものの、いずれも文献値の範囲内であり、また、ビタミンA及びビタミンKについては、両系統の平均値が共にほぼ同じであった(表3, p.19)。加えてHPPD蛋白質の基質は*p*-HPP及びフェニルピルビン酸のみであるが、後者は哺乳類のフェニルアラニン代謝異常時でのみ利用され、植物及び微生物では利用されない(文献51; 文献52)。

これらのことから、2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質が触媒する反応は限られており、宿主の代謝系に影響し新たな有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

さらに、FG72(T9世代)において、後作試験及び鋤込み試験を行った結果、両系統ともにいずれの項目についても対照の宿主品種との間に統計学的有意差は認められず、新たに有害物質の産生性を獲得していないと考えられた(別添資料4 p.4表1及びp.4 表2)。したがって、FG72においても、意図しない有害物質の産生性を獲得する可能性は低いと考えられる。

また、FG72において発現している2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質に関して、当該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

以上から、FG72が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10

(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

15

以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の生産性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

3. 交雑性

20

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズと交雑可能な近縁野生種として*G. soja*(ツルマメ)が挙げられる。*G. soja*は、北海道、本州、四国、九州に広く分布し、河川の氾濫原や土手、路傍、畑の周辺や荒廃地など適度の攪乱に曝される場所を主な生育地としている(文献1)。したがって、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物として、*G. soja*が特定される。

25

(2) 影響の具体的内容の評価

30

FG72と*G. soja*が交雑して雑種を形成し、さらに*G. soja*による戻し交配により、*G. soja*の集団中に2*mepsps*遺伝子及び改変*hppd*遺伝子が浸透する可能性、また、雑種の個体群が優占化することにより、*G. soja*の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。

35

(3) 影響の生じやすさの評価

*G. soja*は、我が国において北海道南部から九州まで自生している(文献1)。したがって、FG72を隔離ほ場において栽培した場合、FG72と*G. soja*が交雑する機会があることは否定できない。

5

ダイズと*G. soja*は自殖性植物であり、我が国において両種の開花期が重なることは稀である(文献1)が、晩生の秋ダイズが栽培されている温暖な地域(九州や四国)では、ダイズの開花期と*G. soja*の開花期が重なる可能性がある。開花期の重なるダイズと*G. soja*を50cm隔て交互に植えて栽培した場合、結実した*G. soja*から採取された種子686個体中、雑種は5個体あり、交雑率は0.73%であった(文献43)。また、組換えダイズと*G. soja*が絡み合うほど近接した状態で、人為的に開花期を重複した条件下では、検定種子32502粒中、交雑種子は1粒であったと報告されている(文献41)。このようにダイズと*G. soja*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得るが、このような特別な条件下においても、ダイズと*G. soja*が交雑する可能性は極めて低いと考えられる。

15

ダイズと*G. soja*の雑種形成及びその後のダイズから*G. soja*への遺伝子浸透に関しては、2003年から2005年にかけて(文献34)及び(文献35)により継時的な野外調査が行われており、日本各地のダイズ畑周辺における栽培ダイズと*G. soja*との中間体を探索している。その結果、ダイズ畑に隣接して生育する58地点のツルマメ集団(秋田県8地点、茨城県6地点、愛知県4地点、広島県6地点及び佐賀県33地点)のうち、秋田県1地点及び佐賀県3地点において形態的にダイズと*G. soja*の中間的な特徴を持つ中間体がそれぞれ1個体(文献34)及び11個体(文献35)発見されたが、翌年の調査において中間体が確認できたのは佐賀県1地点における1個体のみであった(文献36)。また、ダイズから*G. soja*への遺伝子流動に関しては、形態的な調査のみならず、マイクロサテライトマーカーを用いたDNAレベルでの解析も進んでいる(文献37)。実際、2004年に行われた調査のうち、秋田県、茨城県及び佐賀県における14地点の*G. soja*集団より、168個体から1334粒の種子を採種し、マイクロサテライトマーカーを用いて解析を行った結果、ダイズと自然交雑した雑種種子は認められなかった(文献37)。

20

25

30

以上のことから、FG72と*G. soja*が交雑することにより形成される雑種が、我が国の自然条件に適応して、野生種を駆逐する可能性は極めて低いと判断された。

35

また、*2mepsps*遺伝子及び改変*hppd*遺伝子を有する個体は、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールが散布される環境下においてのみ生存に有意に作用するが、そのような条件が考え難い自然環境下では、交雑における優位性を高めることは考えられない。

5

以上から、FG72 と*G. soja*との交雑の可能性、また、種間雑種が定着することで、導入遺伝子が*G. soja*の集団中に優先的に浸透して行く可能性は極めて低いと考えられた。

10 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、FG72を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いて使用する範囲内では、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

15

4. その他の性質

上記の他に生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられるFG72の性質はないと考えられる。

20

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは、我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然条件下において雑草化した例は報告されていない。

5

競合における優位性に関わる形質について、2008年の米国におけるほ場試験並びに2009年の我が国のPIP温室試験において調査した結果、FG72が競合における優位性を高める可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、FG72は除草剤グリホサート及びイソキサフルトールに耐性を有するが、自然環境下においてこれらの除草剤が選択圧となる状況は想定し難く、これらの形質が競合における優位性を高めることはないと考えられた。

以上から、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して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

有害物質の産生性に関して、これまでにダイズが他感物質等のような野生動物等に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。また、FG72が遺伝子組換えにより新たに発現する2mEPSPS蛋白質及び改変HPPD蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知のアレルゲンとの相同性も認められなかった。さらに、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。実際に、後作試験、鋤込み試験による生物検定を行った結果、FG72が他の植物の生育を阻害することを示唆する形質は認められなかった。

以上から、FG72が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、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生ずるおそれはないと判断された。

25

交雑性に関して、我が国に広く分布する*G. soja*(ツルマメ)はダイズと交雑して雑種を形成することが知られていることから、FG72と*G. soja*が交雑して雑種を形成し、さらに*G. soja*による戻し交配により、*G. soja*の集団中に2mepsps遺伝子及び改変hppd遺伝子が浸透する可能性、また、雑種の個体群が優占化することにより、*G. soja*の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられた。

FG72は早生～中生品種であり、*G. soja*と開花期が重なる可能性は極めて低い。また、ダイズ及び*G. soja*はいずれも自殖性植物であり、開花期が重複する条件下でも交雑する可能性は低いことが知られている。さらに、ダイズと*G. soja*の種間雑種は、自然環境下に放任された場合、他種との競合の影響により定着度は低下することが報告されている。また、FG72の収量、花粉稔性など生殖に関する形

35

質の調査からFG72の交雑性は従来のダイズと同程度に低いと推測された。したがって、FG72と*G. soja*との交雑により、*2mepsps*遺伝子及び改変*hppd*遺伝子が*G. soja*の集団中に浸透し、また、雑種が優占化することにより*G. soja*の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

- 5 以上のことから、隔離ほ場で使用する範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

以上を総合的に評価し、FG72を第一種使用規程に従っ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内で使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

- 10

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

- 別添資料1 挿入遺伝子の分子特性
(Summary report : molecular characterization of FG72)
5 社外秘情報につき非開示
- 別添資料2 FG72に移入された核酸の塩基配列
(Full DNA sequence of event insert and integration site of *Glycine max*
transformation event FG72)
10 社外秘情報につき非開示
- 別添資料3 イベント識別法
社外秘情報につき非開示
15
- 別添資料4 除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72にお
ける環境安全性評価試験
社外秘情報につき非開示
- 20 別添資料5 FG72及び非組換え体の花粉稔性試験
(Pollen Morphology and viability of double herbicide tolerant event FG72
Soybean and the non-transgenic counterpart, USA, 2009)
社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成22年2月5日

- 5 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 ギャビン マーチャント
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ (*2mepsps*, 改変*hppd*, *Glycine max* (L.) Merr.) (FG72, OECD UI: MST-FGØ72-3) (以下、「FG72」とする。)の第一種使用において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合は、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

- 15 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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。

危機対策本部	
(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	Bayer CropScience, BioScience

- 20 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は栽培試験担当者及び管理責任者から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行なう。

- 25 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

30 FG72の使用に伴い、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、栽培試験担当者及び管理責任者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。

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

35 当該影響を生ずるおそれに基づき、上記2及び3において示した個人または団体に対し、FG72を不活性化する措置またはFG72の環境への放出を防止するための措置、並びに既に環境に放出されたFG72の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

FG72が我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認められた場合には、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

5

モニタリング計画書

平成 22 年 2 月 5 日

5 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 ギャビン マーチャント
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

イ. 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。

氏名	所属機関・職名
*	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社

*管理責任者

ロ. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

15 名称 ツルマメ (*Glycine soja*)

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

隔離ほ場周辺 10m*の範囲内においてモニタリングを実施する。

20 *)農林水産省 第 1 種使用規定承認組換え作物栽培実験指針（改正後）を参照

ニ. モニタリングの期間

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72（以下、「FG72」とする）の栽培期間中に実施する。

25

ホ. 実施機関、頻度その他のモニタリングの方法

- 1) FG72の栽培期間中に、隔離ほ場周辺 10m 以内でのツルマメの生育の有無を調べる。
- 2) 隔離ほ場周辺 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その位置を記録するとともに、1 個体で生育しているツルマメの場合は可能な限り結実している全ての種子を、また、集団で生育している場合は、ツルマメ 1 集団当たり最低 50 粒の種子をサンプリングする。

30

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

5 収穫されたツルマメの種子に *2mepsps* 遺伝子、改変 *hppd* 遺伝子のいずれか、もしくはその両方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。

ハ. モニタリング結果の解析方法

10 上述の交雑検定の結果をもとに、当該遺伝子の移行が確認された場合は、FG72 とツルマメの種子が収穫された位置と距離から交雑率との関係を解析する。

ト. 農林水産大臣及び環境大臣への報告方法

15 モニタリング及びその解析結果は、「食用又は飼料用に供するための使用、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」における第一種使用規程の申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

チ. その他の必要な事項

20 モニタリングの期間中に採取されたツルマメから FG72 との交雑によって、当該遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

隔離ほ場における生物多様性影響評価実験計画書

社外秘情報につき非開示