

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
(*FAD2-1A*, *FATB1-A*, 改変 *cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.)
(MON87705, OECD UI: MON-87705-6)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書.....	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	3
① 和名、英名及び学名.....	3
② 宿主の品種名又は系統名.....	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	3
(2) 使用等の歴史及び現状.....	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
イ 基本的特性.....	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	5
ハ 捕食性又は寄生性.....	6
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	6
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.....	6
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.....	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	8
ホ 病原性.....	9
ヘ 有害物質の産生性.....	9
ト その他の情報.....	9
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	9
(1) 供与核酸に関する情報.....	10
イ 構成及び構成要素の由来.....	10
ロ 構成要素の機能.....	11
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.....	11
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.....	17

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	19
(2) ベクターに関する情報.....	25
イ 名称及び由来.....	25
ロ 特性.....	25
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
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.....	25
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
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
(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
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.....	31
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.....	31
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.....	31
(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.....	33
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	33
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.....	33
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.....	33
a 形態及び生育の特性.....	34

b	生育初期における低温又は高温耐性	34
c	成体の越冬性又は越夏性	34
d	花粉の稔性及びサイズ	35
e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	35
f	交雑率	35
g	有害物質の産生性	36
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	36
(1)	使用等の内容	36
(2)	使用等の方法	36
(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	36
(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	37
(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	37
(6)	国外における使用等に関する情報	37
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	39
1	競合における優位性	39
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	39
(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	40
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	41
2	有害物質の産生性	41
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	41
(2)	影響の具体的内容の評価	41
(3)	影響の生じやすさの評価	42
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	42
3	交雑性	42
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	42
(2)	影響の具体的内容の評価	42
(3)	影響の生じやすさの評価	42
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	45
4	その他の性質	46
第三	生物多様性影響の総合的評価	47
	参考文献	49
	緊急措置計画書	57

第一種使用規程承認申請書

平成22年12月6日

5 農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 松本 龍 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	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>FAD2-1A</i> , <i>FATB1-A</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87705, OECD UI: MON-87705-6)
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

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 (マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属)

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15 ② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3525 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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 (OECD, 2000)。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるダイズ (*G. max*) は野生種である *G. soja* が祖先と考えられており、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 (OECD, 2000)、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 (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1997)。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 (OECD, 2000)、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跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1997; 大橋ら, 1999)。

25

30

なお、ダイズは夏型一年生の栽培種であり、自生しているという報告はない (OECD, 2000)。

35 (2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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 (野口ら, 1987)。わが国へは弥生時代に渡来、栽培が始まったと考えられている (山内ら, 1992)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

10 国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2008 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 9,687 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,020 万 ha、ブラジルが約 2,127 万 ha、アルゼンチンが約 1,638 万 ha、中国が約 913 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 14 万 ha であった (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>)。

15 2009 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 339 万トンであり、そのうちの約 71% が米国から輸入されている (財務省貿易統計、<http://www.customs.go.jp/toukei/suii/html/time.htm>)。2008 年度におけるダイズの国内生産量は約 26 万トンであり、国内消費仕向量¹は約 403 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 11.4 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 297.8 万トン、減耗量²が約 7.4 万トン、食品用³が約 85.7 万トンとなっている (農林水産省「平成 20 年度食料需給表」、http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fbs_fy20p.pdf)。

25 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 (御子柴, 1995)。

30 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 月下旬、東北地方南部、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 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) 及び 7

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。2009 年は輸出量は約 0 万トン、在庫は約 6 万トン増であったため、 $26+371-0+6=403$ (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。

月上旬から8月上旬(秋ダイズ)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、やがてダイズの莖葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病害虫の防除は、ダイズ

5 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(栗原ら, 2000)。

10 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉作物であり、子葉は対生し、次に卵形の初生葉が子葉と直角に対生して、それ以降は3片の小葉からなる複葉を生じる(OECD,

15 2000)。莖は主莖と分枝に分けられ、主莖節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、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(後藤, 1995)。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(後藤, 1995)。また、ダイズの花芽分化

20 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(野口ら, 1987)。

25 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℃、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(野口ら, 1987)。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応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

30 である(野口ら, 1987)。

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(Graphic Maps, 2008; United Soybean Board, 2008)。この栽培地域において、Maturity Group IIIに分類される品種は5月上旬から6月中旬の間に播種される。また、7月中旬から8月上旬までが開花期にあたり(Schapaugh, 1997)、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 (Lammi, 2008)。

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

5

—

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

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、今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3525 もまた難裂莢性である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 (昆野, 1995)。

15

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

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。

25

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

ダイズ ($2n=40$) 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、 $2n=40$) のみである (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1997; OECD, 2000)。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跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1997; 大橋ら, 1999)。

30

35 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がわが国で確認されており (島本ら, 1997; 阿部ら, 2001)、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 (阿部ら, 2001)、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。

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 (阿部ら, 2001)、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 6.32% (Ray, *et al.*, 2003)、ツルマメ同士における他家受粉率は平均で 2.3% (Kiang, *et al.*, 1992) と報告されている。

しかし、ダイズの家受粉率は条件によっては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 (Abrams, *et al.*, 1978)。またツルマメに関して、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 (Fujita, *et al.*, 1997)。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 胚珠当たりの平均的な花粉数 (Cruden, 1977) 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 (Fujita *et al.*, 1997)。

ダイズとツルマメは、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、ツルマメとダイズの開花時期は異なるため、ダイズとツルマメとの自然交雑は起こりにくいと考えられる (吉村ら, 2008)。関東地方では両者の開花には一ヶ月ほどの差がみられる (吉村, 2008)。また、Nakayama and Yamaguchi (2002) は、ダイズとツルマメの間の交雑率を調査する目的で、丹波黒を用いた交雑試験を行っている。その理由として、奥原早生や鶴の子大豆といった品種ではダイズとツルマメの開花期が全く重ならないか重なるとしても数日であるが、丹波黒はダイズ品種の中で開花期が遅いため、ダイズとツルマメの開花期が 2 週間程度重複したと報告している。

こうした条件下で丹波黒とツルマメ (GIs/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。自然交雑実験終了後に結実したツルマメから採種された 686 個の種子を生育し、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植物体が 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 (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

また、農業環境技術研究所において、2005 年に除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを 5cm 離して栽培し、ツルマメ個体の収穫種子 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 (Mizuguti, *et al.*, 2009)。

さらに、農業環境技術研究所は 2006 年及び 2007 年に、上述の 5cm 離して栽培する試験区に加え、遺伝子組換えダイズから 2、4、6、8 及び 10m 離してツルマメを栽培した試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、ダイズとツルマメを 5cm 離して栽培した試験区においてダイズと自然交雑した交雑種子数は 2006 年の試験では 44,348 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であった。一方で、2m から 10m 離して栽培した試験区におけるダイズと自然交雑した交雑種子は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 66,671 粒中 3 粒であった。なお、2007 年の試験において見られた 3 粒の交雑個体については、2、4 及び 6m の区でそれぞれ 1 個体ずつ得られたと報告されている (吉村, 2008)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花には 1 花当たり 10 本の雄ずいがあり、各雄ずいは 1 つの葯を持つ (後藤, 1995)。1 葯当たりの花粉数は 374~760 粒 (Palmer, *et al.*, 1978)、約 230~540 粒 (Koti, *et al.*, 2004) との報告がある。花粉の寿命は短く、その稔性は約 8 時間で失われることが報告されている (Abel, 1970)。花粉の直径は 15~25 μ m である (Palmer, 2000)。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 (阿部ら, 2001)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。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グリホサート耐性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 2001 年は 7.0m で交雑率 0.040%、2002 年は 2.8m で 0.08%、2003 年は 0.7~10.5m まで調査したが交雑は認められず、2004 年は 3.5 m で 0.022% であった (Yoshimura, *et al.*, 2006)。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、半翅目の昆虫が観察されたと報告している。

ホ 病原性

—

5

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。

10

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。

15

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ダイズ油は、広く食品に使用されている。しかしダイズ油は、多価不飽和脂肪酸含量が高いことから酸化されやすい。また、ダイズ油を加熱する工程や、ダイズ油の安定性を高めるための水素添加を行う工程において、多価不飽和脂肪酸の一部がトランス脂肪酸に変換されることが知られている。さらに、ダイズ油に含まれるパルミチン酸やミリスチン酸といった飽和脂肪酸が LDL コレステロールの増加に関係していると報告されている (WHO, 2003)。そこでモンサント・カンパニーは、ダイズ種子中の脂肪酸組成を改変することにより、ダイズ油の食品利用における汎用性を高めた低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ (FAD2-1A, FATB1-A, 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。本組換えダイズ由来のダイズ油は、従来のダイズの種子と同様に 5 種類の主要な脂肪酸 (飽和脂肪酸: パルミチン酸及びステアリン酸、単価不飽和脂肪酸: オレイン酸、多価不飽和脂肪酸: リノール酸及びリノレン酸) が含まれているが、通常のダイズ油と比べて飽和脂肪酸含量が低く、オレイン酸含量が高くなっており、豊富な食経験のあるカノーラ油やオリーブ油などの植物油と似た脂肪酸組成になっている (図 1, p10)。したがって、本組換えダイズから得られるダイズ油は、水素添加を行わない状態でも安定性が高い油として、調理油用やサラダドレッシングなどの食品用に利用される。

35

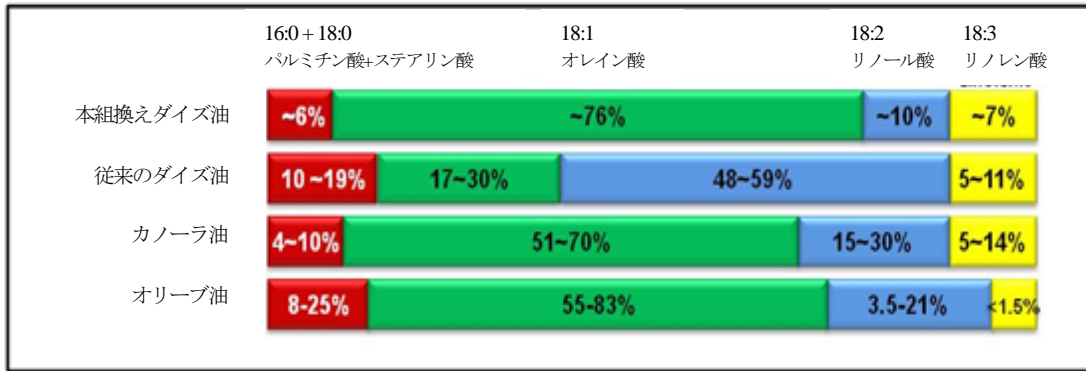


図 1 本組換えダイズ及びその他植物油の脂肪酸組成の比較⁴

5 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

10 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 2 (p12) 及び表 1 (p13~14) に示した。

なお、本組換えダイズには、ダイズの内在性遺伝子である *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 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「*FAD2-1A* 遺伝子断片」「*FATB1-A* 遺伝子断片」とする。

15 本組換えダイズはアグロバクテリウム法により2つのT-DNAを持つプラスミドベクターPV-GMPQ/HT4404(図 2, p12)を導入することにより作出された。本組換えダイズに導入されたT-DNAI及びT-DNAIIには、ダイズの脂肪酸生合成経路の酵素である*FAD2* 遺伝子及び*FATB*遺伝子の発現をRNAiにより抑制するために設計されたDNA断片が含まれる。T-DNAI中には 7Sα'プロモーターに制御される*FAD2-1A*遺伝子のイントロンと*FATB1-A*遺伝子の 5'非翻訳領域のセンス鎖が含まれる。T-DNAIIには*FAD2-1A*遺伝子のイントロンと*FATB1-A*遺伝子の 5'非翻訳領域のアンチセンス鎖が含まれる。本組換えダイズの作出の際、*FAD2-1A*遺伝子断片と*FATB1-A*遺伝子断片から転写されるRNAが二本鎖RNA(dsRNA)を形成するように、プラスミド・ベクターPV-GMPQ/HT4404(図 2, p12)のT-DNAI中の*FAD2-1A* 遺伝子断片及び

20

25 *FATB1-A*遺伝子断片とT-DNAII中の*FAD2-1A*遺伝子断片及び*FATB1-A*遺伝子断片が逆方向反復の形(図 6, p30)でゲノム中の1ヵ所に隣接した形で組み込まれた個体を

⁴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

インバーダー法⁵により選抜している。

5 また、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、
10 *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質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、発現する蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。この蛋白質は既に第一種使用規程の承認がなされている除草剤グリホサート耐性ダイズ (*cp4 epsps*, *Glycine max* (L.)
15 Merr.)(40-3-2, OECD UI : MON-Ø4Ø32-6) やこれまでにモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物中で発現している蛋白質と同一である。なお、本組換えダイズにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

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構成要素の機能は表 1 (p13~14) に示したとおりである。

⁵ インバーダー分析は、主に一塩基多型や遺伝的変異の検出及び遺伝子の定量的な分析を行うためのシグナル増幅技術である。インバーダー分析はPCRによる遺伝子増幅を必要とせず、Invader[®]法と呼ばれる切断過程により検出が行われる。この切断過程では、構造を特異的に認識できる Cleavase[®]と呼ばれる酵素によって標的遺伝子配列が切断され、蛍光が検出される。なお、Invader[®]及びCleavase[®]は、Third Wave Technologies社の商標として登録されている。

【社外秘につき非開示】

図 2 PV-GMPQ/HT4404 のプラスミドマップ

本組換えダイズの育成過程では、上図のT-DNAI領域とT-DNAII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。

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	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker, <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注2} -FMV/EF-1 α ⁷	<i>Arabidopsis thaliana</i> の EF-1 α プロモーター (Axelos, <i>et al.</i> , 1989) に Figwort Mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーターのエンハンサー配列 (Richins, <i>et al.</i> , 1987) 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} -EF-1 α	<i>A. thaliana</i> の翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする EF-1 α 遺伝子のリーダー配列 (exon 1) (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
I ^{注4} -EF-1 α	<i>A. thaliana</i> の翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする EF-1 α 遺伝子のイントロン配列 (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。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} -CTP2	<i>A. thaliana</i> の 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 (Herrmann, 1995; Klee, <i>et al.</i> , 1987)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS ^{注6} -改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium sp.</i> CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列 (Barry, <i>et al.</i> , 1997; Padgett, <i>et al.</i> , 1996a)。
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

⁷ EF-1 α は別添資料5のTable 1 (p33) に記載されている *Tsfl* と同一である。

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> (エンドウ)のリブロース-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> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi, <i>et al.</i> , 1984)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P-7Sa'	<i>G. max</i> の β -コングリシニン貯蔵蛋白質 (alpha'-bcsp) をコードしている <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 (Doyle, <i>et al.</i> , 1986)。 mRNA の転写を胚特異的に誘導する (Chen <i>et al.</i> , 1986)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
FAD2-1A ^{注8}	Δ -12 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 の部分配列 (Fillatti, <i>et al.</i> , 2003)。
FATBI-A ^P	パルミトイルアシルキャリア蛋白質チオエステラーゼをコードしている <i>G. max</i> の <i>FATBI-A</i> 遺伝子に由来する 5'非翻訳領域及び色素体ターゲティング配列の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
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 (Depicker, <i>et al.</i> , 1982; Zambryski, <i>et al.</i> , 1982)。

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 <i>Tn7</i> の 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'非翻訳領域 (Fling, <i>et al.</i> , 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注9} -ori.pBR322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
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ド配列であり、 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
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 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
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繊維蛋白質をコードしている <i>Gossypium barbadense</i> (ピマワタ)に由来する <i>H6</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域配列 (John and Keller, 1995)。
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-IA</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-IA</i> 遺伝子に由来するイントロン#1 の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
<i>FATB1-A</i> ^P	パルミトイルアシルキャリア蛋白質チオエステラーゼをコードしている <i>G. max</i> の <i>FATB1-A</i> 遺伝子に由来する 5'非翻訳領域及び色素体ターゲティング配列の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
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 (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
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
OR-ori V	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、アグロバクテリウム中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker, <i>et al.</i> , 1981)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注¹ B – Border (境界配列)

5 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)

注⁶ CS – Coding Sequence (コード配列)

10 注⁷ T – Transcriptional Termination Sequence (転写終結配列)

注⁸ P₋ Partial sequence (部分配列)

注⁹ OR – Origin of Replication (複製開始領域)

- 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

【*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片の発現産物】

本組換えダイズに導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 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 *FATB1-A* 遺伝子の一部であり(表 1, p13~14)、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、核酸にはこれまでに安全に食

10 *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、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品局 (FDA) により GRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている (FDA, 1992)。

本組換えダイズでは、*FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 遺伝子断片による RNAi 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。実際にノーザンブロット解析を行った結果、本組換えダイズにおける *FAD2-1A* 遺伝子と *FATB1-A* 遺伝子の mRNA が抑制されていることが確認された (別添資料 1 の Figure 1, p18 及び Figure 2, p19)。

20

RNAi は真核生物において遺伝子発現調節のために一般的に起こる機構である。RNAi は、二本鎖 RNA(dsRNA)が Dicer と呼ばれる酵素により切断され 21-26 塩基の siRNA が形成されることにより引き起こされる。siRNA は RNAi-induced silencing complex (RISC)と結合し、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する(図 3, p18) (Siomi and Siomi, 2009)。siRNA と結合した mRNA が分解されることにより蛋白質の産生が阻害されることとなる。RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制効果も高いことから、特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている(Kusaba, 2004)。

なお、*FAD2-1A* 遺伝子断片は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードしているダイズの *FAD2-1A* 遺伝子に由来するイントロン#1 の部分配列(Fillatti *et al.*, 2003)、*FATB1-A* 遺伝子断片はパルミトイルアシルキャリア蛋白質チオエステラーゼをコードしているダイズの *FATB1-A* 遺伝子の 5'非翻訳領域及び色素体ターゲティング配列の部分配列に由来する(Fillatti *et al.*, 2003)。これらの配列は蛋白質の翻訳領域をコードしているものではないため、本組換えダイズの導入遺伝子から新たな蛋白質が産生されるとは考えにくい。

35

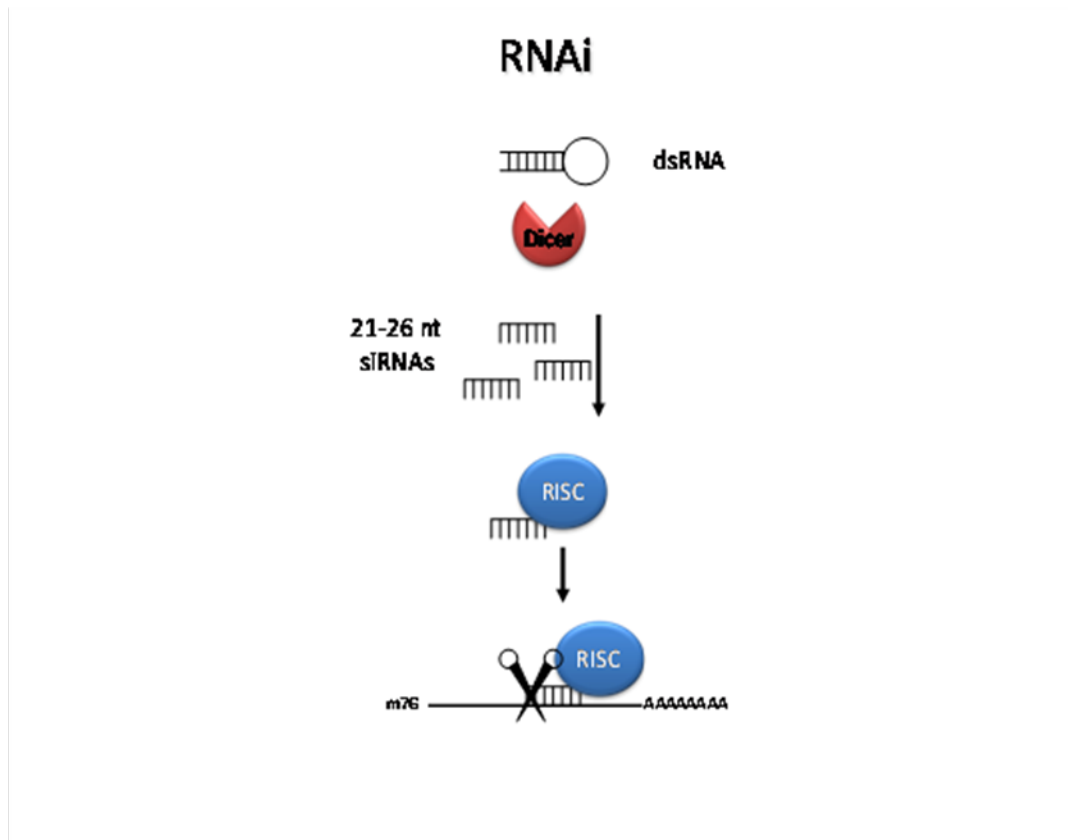


図 3 RNAiのメカニズム⁸

5 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えダイズに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、選択マーカーとして選抜の過程で使用された。野生型の *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium sp.* CP4 株より単離された遺伝子であり、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) 蛋白質をコードしている。CP4 EPSPS 蛋白質は除草剤グリホサートに対して高い耐性を付与する。本組換えダイズ中で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は別添資料 1 に示すとおりである。

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 1 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 (Haslam, 1993; Steinrücken and Amrhein, 1980)。その結果、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死する。一方で、改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する組換え植物はその働きにより、グ

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に帰属する

リホサート存在下でも活性阻害を受けないため、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CP4 EPSPS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 (AD_2009⁹) を用いてFASTA型アルゴリズム及び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。

10 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【FAD2-1A 遺伝子断片及び FATB1-A 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 (Buchanan, *et al.*, 2000)。植物の脂肪酸合成はプラスチドにおいて行われ、C₂化合物が単位となって段階的にアシル鎖と縮合する (図 4, p21 の反応①)。この反応は、植物の脂肪酸合成酵素により起こり、パルミトイル-ACP(16:0-ACP)やステアロイル-ACP (18:0-ACP)が産生される。ダイズにおいて、大部分のステアロイル-ACPはプラスチドの可溶性酵素であるΔ9デサチユ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 (図 4, p21 の反応②)。これらの脂肪酸鎖は2つの異なるアシル-ACPチオエステルラーゼ、FATAとFATBによってACPから切り離される(図 4, p21 の反応③と④)。FATAは主に18:1-ACPを加水分解し、オレイン酸を産生する(図 4, p21 の反応④)。一方、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)を加水分解するが、主にパルミトイル-ACP (16:0-ACP) やステアロイル-ACP(18:0-ACP)を加水分解し、パルミチン酸やステアリン酸を産生する(図 4, p21 の反応③)。その後、産生された遊離脂肪酸はプラスチド膜においてアシル-CoAとなり小胞体へ輸送される。

30 FATAによってACPから切り離され、遊離脂肪酸となったオレイン酸はプラスチド膜においてオレオイル-CoAとなった後にプラスチドを離れ、小胞体における脂質生合成系のケネディ経路に入る (図 4, p21)。小胞体における脂肪酸の多価不飽和化は、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Δ12不飽和化を触媒し (図 4, p21 の反応⑤)、FAD3はリノール酸 (18:2) からリノレン酸 (18:3) へのΔ15不飽和化を触媒する(図 4, p21 の反応⑥)。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。

⁹ Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)(<http://www.allergenonline.com>)から得られた配列をもとに作成されたデータベース。

本組換えダイズでは *FATB1-A* 遺伝子断片による RNAi 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 *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 4, p21 の反応①)、そのうち主にパルミトイル-ACP (16:0-ACP) 及びステアロイル-ACP(18:0-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 (Kinney, 1996)。したがって、本組換えダイズにおいても *FATB* の減少が主にパルミトイル-ACP(16:0-ACP)及びステアロイル-ACP(18:0-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、パルミチン酸 (16:0)及びステアリン酸(18:0)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 *FAD2-1A* 遺伝子断片による RNAi 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 4, p21 の反応⑤)。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、リノール酸 (18:2) へ不飽和化されるオレイン酸 (18:1)の量が減少することで、種子の細胞中のオイルボディに蓄積するオレイン酸 (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ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(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。

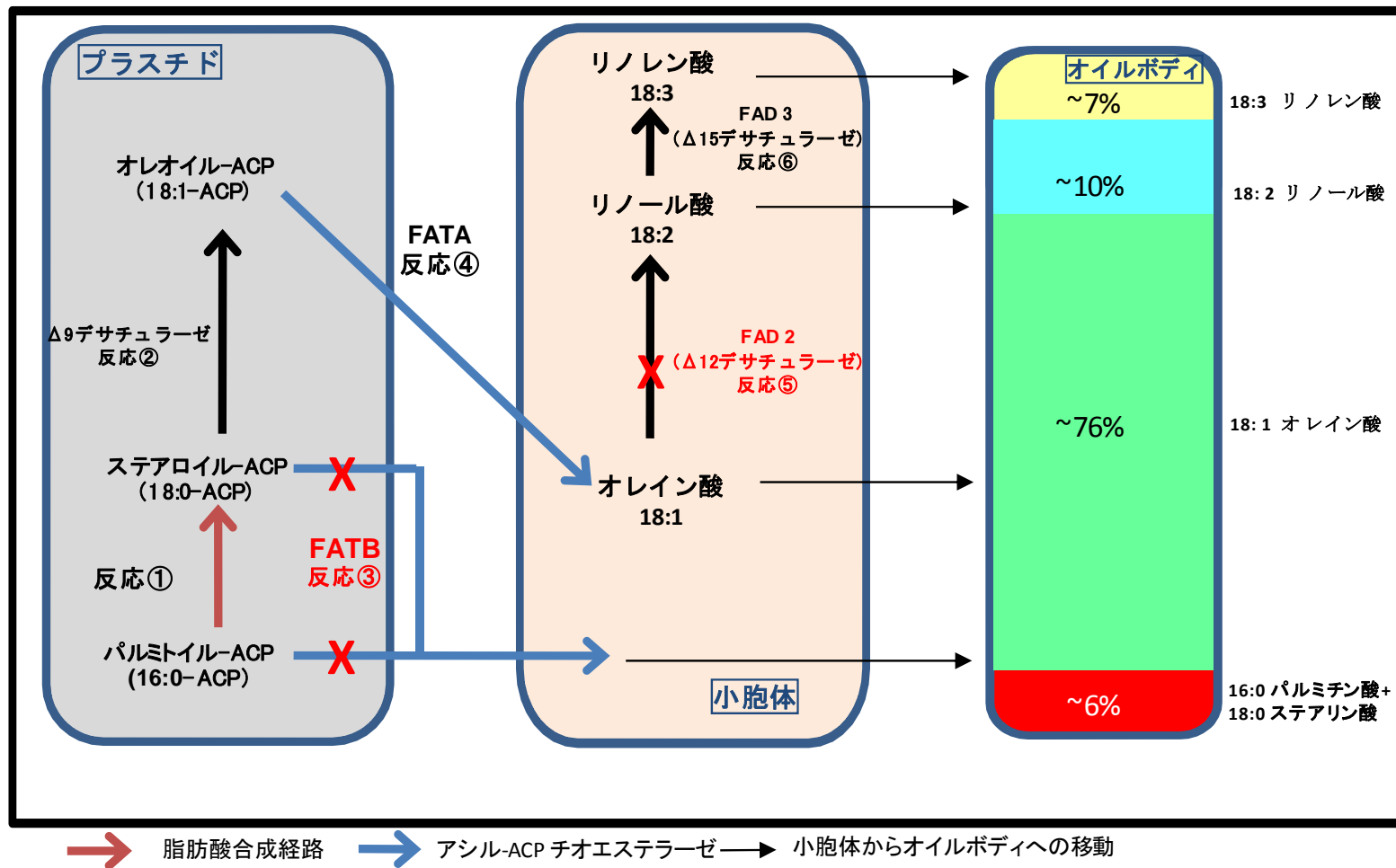


図 4 ダイズの脂肪酸生合成経路¹⁰

✕は、本組換えダイズ種子において内在性酵素 (FATB1-A 及び FAD2-1A) RNA の翻訳が抑制されることを示す。

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

実際に、本組換えダイズと対照の非組換えダイズ、従来商業品種 20 品種の種子の主要脂肪酸組成を分析した結果、意図した通り本組換えダイズでは内在性の *FATB* 遺伝子の発現が抑制されることにより、非組換えダイズと比較して飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (16:0) やステアリン酸 (18:0) の減少が認められた。本組換えダイズの種子中の総脂肪酸に占めるパルミチン酸 (16:0) の割合が 10.83% (対照の非組換えダイズ) から 2.36% (本組換えダイズ) へ、また、ステアリン酸 (18:0) については 4.50% (対照の非組換えダイズ) から 3.31% (本組換えダイズ) へそれぞれ減少したことが明らかとなった。そのため、総飽和脂肪酸としては約 15.3% (対照の非組換えダイズ) から 5.7% (本組換えダイズ) へ減少した。また、本組換えダイズでは内在性の *FAD2* 遺伝子の発現が抑制されることにより、非組換えダイズと比較して単価不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (18:1) の増加、及びオレイン酸 (18:1) の増加に伴うリノール酸 (18:2) の減少が認められた (表 2, p24)。オレイン酸 (18:1) の総脂肪酸に占める割合は 22.81% (対照の非組換えダイズ) から 76.47% (本組換えダイズ) へ増加し、リノール酸 (18:2) の総脂肪酸に占める割合が 52.86% (対照の非組換えダイズ) から 10.10% (本組換えダイズ) へ減少した。なお、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間でリノレン酸 (18:3) の含量に統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められたが、リノレン酸 (18:3) は *FAD2* 遺伝子の抑制により減少するリノール酸 (18:2) から生成されることから、その含量の減少は予想されたものであった。

【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

EPSPS 蛋白質は、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生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の 1 つであり、植物の葉緑体又は色素体に存在する (Della-Cioppa, *et al.*, 1986)。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 (Haslam, 1974; 1993)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸 (DAHP) 合成酵素により制御されるが、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階では、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 (Herrmann, 1983; Weiss and Edwards, 1980)。このことは EPSPS 蛋白質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 (Padgett, *et al.*, 1996a; Ridley, *et al.*, 2002)。実際に、通常の 40 倍の EPSPS 蛋白質を生成する植物細胞において、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いる (Smart, *et al.*, 1985)。また、モンサント・カンパニーがこれまでに商品化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、アルファルファ及びテンサイ) の食品及び

飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、現在までのところ芳香族アミノ酸含量に元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。

- 5 また、EPSPS 蛋白質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 (Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys, *et al.*, 1992)。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、Gruys ら
10 (1992) の論文を元に計算すると、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られない。

- 15 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 蛋白質の発現によって、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 (A3525) 及び従来ダイズのダイズ油¹の主要脂肪酸含量¹¹

	本組換えダイズ 平均値 (%) [範囲 (%)]	対照の非組換えダイズ 平均値 (%) [範囲 (%)]	p-値	従来商業品種 (範囲 (%)) [99% Tol. Int. ²]
脂肪酸組成 (総脂肪酸当たりの含有量 (%))				
16:0 Palmitic (パルミチン酸)	2.36 [2.25 - 2.44]	10.83 [10.51 - 11.08]	<0.001	(8.78 - 11.51) [7.62, 12.55]
18:0 Stearic (ステアリン酸)	3.31 [3.07 - 3.82]	4.50 [4.24 - 4.85]	<0.001	(3.82 - 7.21) [2.87, 7.15]
18:1 Oleic (オレイン酸)	76.47 [73.13 - 79.17]	22.81 [21.41 - 25.08]	<0.001	(20.77 - 27.19) [18.40, 30.22]
18:2 Linoleic (リノール酸)	10.10 [7.85 - 12.42]	52.86 [51.68 - 53.89]	<0.001	(48.62 - 54.74) [47.75, 56.46]
18:3 Linolenic (リノレン酸)	6.69 [5.55 - 7.81]	8.02 [6.86 - 8.60]	<0.001	(5.89 - 9.11) [4.97, 9.93]

¹ チリの 5 カ所のほ場から得られた種子サンプルについてガスクロマトグラフィーにより分析を行い、統計処理は分散分析により実施した (n=5)。

² 許容区間 (tolerance interval) は 95%の信頼度で従来商業品種の 99%が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は 0 に設定した。

¹¹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 (p13~14) 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 2 (p12) に示した。

35

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

5 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、グリホサートを追加した組織培養培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

カルベニシリン及びセフトキシムを追加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えダイズの R3 世代において、形質転換に用いたプラスミド・ベクター PV-GMPQ/HT4404 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えダイズにはプラスミド・ベクター PV-GMPQ/HT4404 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 3)。このことから、本組換えダイズには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存していないことが確認された。

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

25 形質転換された再分化個体 (R_0) を自殖し、後代である R_1 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目的とした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。

30 本組換えダイズの育成図を図 5 (p27) に示した。なお、本申請の対象は、 R_3 世代及び R_3 世代から派生する全ての交配後代種である。

【社外秘につき非開示】

図 5 本組換えダイズの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

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が染色体に存在するかどうかを調べるため、複数世代にわたる分離比のカイ二乗検定による統計解析を行った。

導入遺伝子中に存在し、かつダイズゲノム中に存在しない遺伝子として *H6* ターミネーターを分離様式の調査の指標として選択した。本組換えダイズの *R*₄ 世代と *H6* ターミネーターを含まないダイズ品種 (A3525) を交配することにより *F*₁ 世代を得た。得られた *F*₁ 世代を自殖して *F*₂ 世代を得た。その後、インベーター分析により *H6* ターミネーターをヘテロで有する個体を選抜し、自殖することにより得られた *F*₂、*F*₃、*F*₄ 及び *F*₅ 世代を用いて本組換えダイズ中の導入遺伝子の分離様式を調べた。その結果、*F*₃ 世代では分離比の実測値と予測値 (1:2:1) の間に統計学的有意差が認められた。しかし、*F*₂、*F*₄ 及び *F*₅ 世代における分離比の実測値と予測値 (1:2:1) との間に、カイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかった。3 世代 (*F*₂、*F*₄ 及び *F*₅) のデータから、本組換えダイズの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられる (別添資料 4)。

20

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

25 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 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ことが確認された (別添資料 5 の Figure 5~Figure 7, p44~46)。また、外側骨格領域は導入されておらず (別添資料 5 の Figure 8, p47 及び Figure 9, p48)、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 (*R*₃、*R*₄、*R*₅ 及び *R*₆ 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 5 の Figure 15, p59)。

30

また、導入遺伝子の塩基配列解析の結果、本組換えダイズの導入遺伝子は 7,251 bp であった。なお、T-DNA II に由来する *FATBI-A* 断片の 3' 末端に 30 bp の欠損が認められたことを除き導入遺伝子の塩基配列はプラスミド・ベクター PV-GMPQ/HT4404 の各構成要素の塩基配列と同一であることが確認された。しかし、この欠損が遺伝子抑制カセット (RNAi) の機能に影響することはないことを確認している。

35

なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を p30 に図 6 として示した。

表3 本組換えダイズにおけるH6ターミネーター遺伝子の分離様式¹²

世代 ¹	供試 個体数 ²	観測値			期待値			χ^2	p 値
		導入遺伝子 陽性・ホモ個体数	導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数	導入遺伝子 陰性個体数	導入遺伝子 陽性・ホモ個体数	導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数	導入遺伝子 陰性個体数		
F ₂	4197	1009	2091	1097	1049.25	2098.5	1049.25	3.7	0.1538
F ₃	81	30	35	16	20.25	40.5	20.25	6.3	0.0421
F ₄	266	68	126	72	66.50	133.0	66.50	0.9	0.6514
F ₅	175	44	88	43	43.75	87.5	43.75	0.0	0.9915

¹ F₂世代は、H6ターミネーターを持たないダイズ品種 (A3525) と、本組換えダイズの R₅世代との交配により得られた F₁世代を自殖することにより得られた。F₃、F₄及びF₅世代は、H6ターミネーター遺伝子をヘテロで持つそれぞれの親世代を自殖することにより得られた。

² H6ターミネーターの有無をインベーター分析によって調べた。「供試個体数」とは、検定で接合状態が明らかになった個体の総数を示す。なお、F₃、F₄及びF₅世代はそれぞれ1個体の親世代から得られた種子を用いて検定を行っている

¹²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

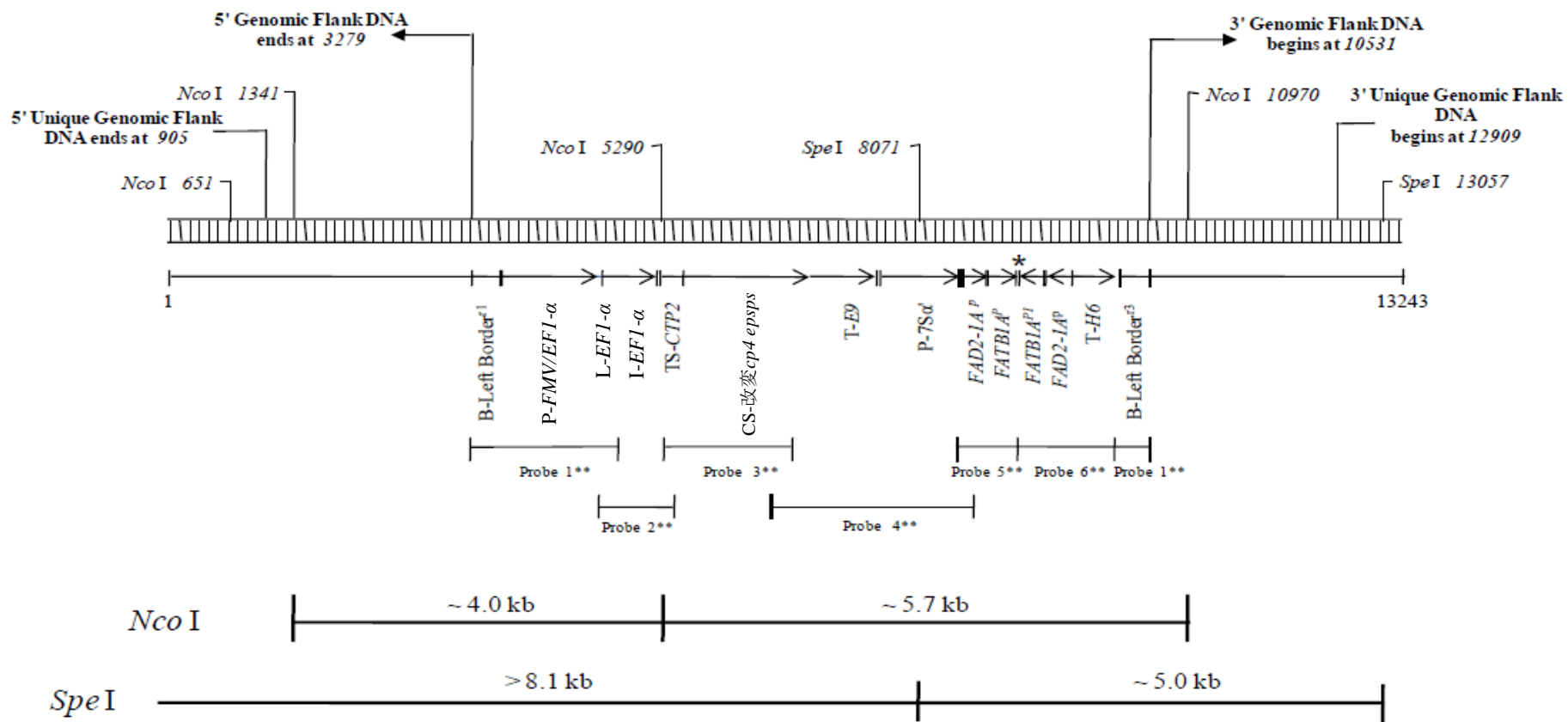


図6 本組換えダイズの導入遺伝子地図¹³

¹³ この図に記載されているEF1- α は別添資料5のFigure 3 (p41) に記載されている*Tsfl*と同一である。また、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

1 コピーなので該当しない。

5

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

10 第一の 2-(1)-ロ-②(p17)にも記載したように、本組換えダイズにおいて *FAD2-1A* 遺伝子と *FATB1-A* 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確認されている (別添資料 2 の Figure 1, p18 及び Figure 2, p19)。

15 本組換えダイズにおける改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により測定した。試験には 2007/2008 年にチリの 5 ヶ所のほ場(サンディアゴ首都州 3 ヶ所、オイギンス州 2 ヶ所)から採取された本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの葉 (over-season leaf; OSL 1~4)、地上部、根及び収穫種子を供試した。その結果、本組換えダイズにおける改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量は 40~1,000 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重 の範囲であった。改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の平均値は葉でもっとも高く (200~530 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、次いで地上部 (120 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、種子 (110 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、根 (77 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重) の順であった (表 4, p32; 別添資料 6 の Table 1, p17)。

25 ウェスタンブロット分析により、本組換えダイズの複数世代 (R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 世代) にわたり改変 CP4 EPSPS 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 7 の Figure 1, p15)。

30 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 CP4 EPSPS 蛋白質の発現を各世代で確認しながら選抜を行った。

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

35 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。

表 4 本組換えダイズの組織中における改変CP4 EPSPS蛋白質の発現量
(2007/2008年、チリ)¹⁴

組織の種類 ¹	改変 CP4 EPSPS		改変 CP4 EPSPS		LOQ/LOD ⁶ ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁴
	$\mu\text{g/g}$ 新鮮重 (SD) ^{2,4}	範囲 ³ ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁴	$\mu\text{g/g}$ 乾燥重 (SD) ^{2,5}	範囲 ³ ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁵	
OSL-1	36 (14)	16-65	200 (72)	84-340	0.57/0.26
OSL-2	110 (51)	60-230	530 (230)	290-1000	0.57/0.26
OSL-3	51 (21)	11-84	220 (94)	47-350	0.57/0.26
OSL-4	51 (21)	27-94	210 (92)	110-410	0.57/0.26
地上部	32 (5.3)	22-40	120 (24)	77-160	0.57/0.10
根	24 (6.4)	14-34	77 (24)	41-120	0.57/0.11
収穫種子	100 (39)	35-190	110 (44)	40-210	0.34/0.26

¹ OSL-1~4 は OSL1 : 3~4 葉期、OSL2 : 6~8 葉期、OSL3 : 10~12 葉期、OSL4 : 14~16 葉期を表し、それぞれの時期に葉のサンプルを採取した。地上部及び根は R5 期 (子実肥大期)、収穫種子は R8 期 (成熟期) に採種した。

² 平均値及び標準偏差 (SD) は各組織ごとに算出した (OSL-2: n=12、OSL-3: n=19、それ以外は n=15)。

³ 最小値及び最大値は、各組織ごとに算出した。

⁴ 新鮮重量当たりの蛋白質の発現量は、組織重量 (g) 当たりの蛋白質重量 (μg) で表した。

⁵ 乾燥重量当たりの蛋白質の発現量は、新鮮重量当たりの蛋白質発現量を水分分析データから得た乾燥重量変換係数で割って算出した。

⁶ LOQ: 定量限界以下、LOD: 検出限界以下

¹⁴ 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

(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

5 PCR 法による検出が可能である(別添資料 8)。本法は種子 1 粒ごとの検定を行うために十分な感度を有する。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10 ng であることが推奨されている。本法の再現精度については 44 個体の本組換えダイズ及び 46 個体の非組換えダイズを用いて分析を行い、確認試験を行った(別添資料 8)。

10 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

15 本組換えダイズでは、*FATB1-A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 遺伝子断片の発現によって生じる RNAi 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。実際にダイズ油の脂肪酸組成を分析した結果、対照の非組換えダイズにおける総飽和脂肪酸(パルミチン酸及びステアリン酸)含量が約 15.3%であったのに対し、本組換えダイズでは 5.7%に減少していた。また、対照の非組換えダイズのアレイン酸含量が 22.81%であったのに対し、本組換えダイズでは 76.47%に増加していた。このアレイン酸含量の増加に伴い、対照の非組換えダイズのリノール酸含量が 52.86%であるのに対し、本組換えダイズでは 10.10%に減少していた (表 2, p24)。

25 一方で、本組換えダイズへ導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

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¹⁵

35 2009 年から 2010 年にかけて日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えダイズの R6 世代を供試した (図 5, p27)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝子導入母本である A3525 を用いた。なお、低温耐性試験

¹⁵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

についてはモンサントカンパニー (米国)において試験を実施した

a 形態及び生育の特性

- 5 形態及び生育に関する特性を比較するため、種苗登録のための種苗特性分類表調査項目を参考に、20項目 (発芽始め、発芽期、発芽揃い、発芽個体数、発芽率、小葉の形、毛茸の多少、開花始め、開花終わり、伸育型、成熟期、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、草型、収穫期の植物重、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形)) について評価を行った。その結果、統計処理を行った項目(発芽個体数、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、収穫期の植物重)のうち、発芽個体数及び分枝数において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が見られた。また、統計処理を行わなかった項目(発芽始め、発芽期、発芽揃い、発芽率、小葉の形、毛茸の多少、開花始め、開花終わり、伸育型、成熟期、草型、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形))のうち、発芽期及び発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが認められた(別添資料 9の表2, p9)。

- 20 発芽個体数は、本組換えダイズが944個体、対照の非組換えダイズが879個体であった。発芽期については本組換えダイズが7月12日、対照の非組換えダイズが7月13日であり、発芽揃いについては、本組換えダイズが7月13日、対照の非組換えダイズが7月14日であり、それぞれの項目における差は1日のみであった。また、分枝数は、本組換えダイズが7.0本、対照の非組換えダイズが6.1本であった (別添資料 9の表2, p9)。

25 b 生育初期における低温又は高温耐性

- 30 生育初期における低温耐性試験はモンサント・カンパニー (米国) の人工気象室において実施した。生育初期における低温耐性試験は、播種後 20 日目の本組換えダイズ、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 日間栽培した後、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)。

35 c 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを成熟期の後も引き続き生育させ、わが国の冬期における生育状況を観察した。2010 年

1月5日に越冬性試験区において供試個体の観察を行ったが、本組換えダイズ及び対照のダイズともに枯死していた (別添資料 9 の図 6, p12)。

d 花粉の稔性及びサイズ

5

本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから採取した花粉をヨウ素ヨードカリ溶液で染色し、花粉の稔性及びサイズを比較した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの花 pollen 稔性に違いは認められなかった。また、花粉の形態や大きさにも違いは認められなかった (別添資料 9 の図 7, p13)。

10

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

同一条件で栽培された本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズについて、種子の生産量に関する項目 (稔実莢数、一株当たりの粗粒重、一株当たりの精粒重、百粒重) を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、一株当たりの精粒重及び百粒重において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 9 の表 3, p16)。一株当たりの精粒重は本組換えダイズが 41.3 g、対照の非組換えダイズが 44.6 g であり、百粒重は本組換えダイズが 18.2 g、対照の非組換えダイズが 19.4 g であった (別添資料 9 の表 3, p16)。

15

20

裂莢性については、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを成熟期に収穫し、植物体をビニールハウス内で自然乾燥した後に裂莢の程度を観察した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、種子の裂莢性における違いは認められなかった (別添資料 9 の表 3, p16)。

25

休眠性及び発芽率については、収穫直後の種子をシャーレに置床して、25°C でインキュベートし、発芽個体数を経時的に調査した。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽率はいずれも 98.9% と高く、最終発芽個体数において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 9 の表 4, p16)。

30

35

f 交雑率

本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間交雑率を調査するために、本組換えダイズを花粉親とし、対照の非組換えダイズの収穫種子における交

雑体の発生頻度を調査した。なお、交雑体の判定については花粉親にあたる本組換えダイズの除草剤グリホサート耐性を指標とした。

5 形態・生育特性調査区で栽培された対照の非組換えダイズ区の本組換えダイズ隣接する条（両端各3株を除く）から種子を採種した。これらの非組換えダイズは、南東あるいは北西に隣接するプロットの非組換えダイズとは1.65mの距離があった（別添資料9の図2, p5）。なお、このプロットには開花期には防虫網はかけていなかった。収穫種子から無作為に選出した480粒を温室においてポットに播種し、本葉第2-3葉期に生長した時点で、除草剤グリホサート（製品名：ラウンドアップ・マックスロード、100倍液）を散布した。

10 除草剤散布後21日目に生存個体数を確認した。

本試験に供試した480粒のうち、除草剤グリホサートの散布から21日後の生存個体数は0個体であったため、本調査において交雑は認められないと結論された（別添資料9, p17）。

15 g 有害物質の産生性

本組換えダイズから土壤微生物あるいは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土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽個体数及び乾燥重において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかったハツカダイコンの発芽率についても違いは認められなかった（別添資料9の表5~表7, p20）。

20

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

25

(1) 使用等の内容

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

30

(2) 使用等の方法

—

35 (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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

5

- (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

—

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズの海外の主要栽培国及び輸入国における申請状況は以下のとおりである(表 5, p37)

15

表 5 本組換えダイズの海外の主要栽培国及び輸入国における申請及び認可状況

20

25

【社外秘につき非開示】

なお、本組換えダイズのわが国における申請状況は以下のとおりである。

表 6 本組換えダイズのわが国における申請状況

5

10

【社外秘につき非開示】

15

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹⁶

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

10 ダイズがこれまで北米において栽培以外で見られたという報告はない(OECD, 2000)。わが国においても、ダイズは弥生時代から栽培されていると考えられ、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。

15 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、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(第一の2-(6)-②-a~e, p34~35))を調査した結果、発芽個体数、分枝数、一株当たりの精粒重及び百粒重において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が見られた。また、統計処理を行わなかった項目では、発芽期及び発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが認められた。

20

25 隔離ほ場試験において発芽個体数は、本組換えダイズが944個体、対照の非組換えダイズが879個体であった。したがって発芽個体数と播種数から算出した両者の発芽率は本組換えダイズは98.3%、対照の非組換えダイズは91.6%となり、本組換えダイズの方が高かった。しかしながら、本試験の収穫種子の発芽個体数において本組換えダイズと対照の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。さらに、本組換えダイズの隔離ほ場試験申請時に提出した米国で採種した種子を用いた発芽試験においても本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められていない(別添資料11)。

30 発芽期については本組換えダイズが7月12日、対照の非組換えダイズが7月13日であり、発芽揃いについては、本組換えダイズが7月13日、対照の非組換えダイズが7月14日であり、それぞれの項目における差は1日のみであった。しかし、この発芽期と発芽揃いの差はわずかであり、さらに、発芽始めにおいて、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いは認められなかった。

35

 これらのことから、本隔離ほ場試験で観察された発芽特性の違いは導入遺

¹⁶本項目中で、第一の2-(6)-②の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

伝子によるものではないと考えられた。

分枝数は、本組換えダイズが 7.0 本、対照の非組換えダイズが 6.1 本であった。しかしながら、種子の生産量に関わる項目（稔実莢数、一株当たりの粗粒重、一株当たりの精粒重及び百粒重）において、本組換えダイズの種子の生産性が高まるような違いは認められなかったことから、分枝数において見られた差が本組換えダイズの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

一株当たりの精粒重は、本組換えダイズが 41.3 g、対照の非組換えダイズが 44.6 g であった。しかしながら、精粒重が低いことが本組換えダイズの種子の生産性を高めるものではないと考えられた。

百粒重は、本組換えダイズが 18.2 g、対照の非組換えダイズが 19.4 g であった。しかしながら、本組換えダイズの百粒重の平均値は、これまでに報告されている従来ダイズの百粒重の範囲内 (12.5~21.8g)(Csanádi, *et al.*, 2001; De Bruin and Pedersen, 2009) であった。

本組換えダイズでは *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 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 (Liu and Brown, 1996; Taiz and Zeiger, 1998)。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いう報告はない。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。

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズは競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

5

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

10 ダイズは弥生時代から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。

15 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土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった（第一の 2-(6)-②-g、p36）。

20 本組換えダイズに導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 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 *FATB1-A* 遺伝子の一部であり（表 1, p13~14）、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、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品局（FDA）により GRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている（FDA, 1992）。よって、*FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 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。

25 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、既知アレルギー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, p17）。

30 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, p19）、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可能性は極めて低いと考えられる。

35 以上のことから、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15

第一の 1-(3)-ニ-③ (p4~6) 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 (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1997; OECD, 2000)。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。

20

(2) 影響の具体的内容の評価

ダイズとその近縁野生種であるツルマメとの間では低い確率で交雑が生じ、雑種が形成される (OECD, 2000)。したがって、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 *FAD2-1A* 遺伝子断片、*FATB1-A* 遺伝子断片及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子がツルマメの集団中に浸透していく可能性も否定できない。

25

(3) 影響の生じやすさの評価

30

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跡地、畑の周辺のほか、日当たりの良い野原や道端などに自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1997; 大橋ら, 1999)。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可能性があることは否定できない。

35

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 (阿部ら, 2001)、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、吉村ら(2006)はツルマメとダイズの開花時期は異なるため、一般にダイズとツルマメとの自然交雑は起こりにくいと述べている。吉村(2008)は、関東地方では両者の開花には一ヶ月ほどの差がみられるとしている。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(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

また、農業環境技術研究所において 2005 年に、除草剤グリホサート耐性遺伝子組換えダイズとツルマメを 5cm 離して栽培し、ツルマメ個体の収穫種子 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 (Mizuguti *et al.*, 2009)。

さらに、農業環境技術研究所は 2006 年及び 2007 年に、上述の 5cm 離して栽培する試験区に加え、遺伝子組換えダイズから 2、4、6、8 及び 10m 離してツルマメを栽培した試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、ダイズとツルマメを 5cm 離して栽培した試験区においてダイズと自然交雑した交雑種子数は 2006 年の試験では 44,348 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であった。一方で、2m から 10m 離して栽培した試験区におけるダイズと自然交雑した交雑種子は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 66,671 粒中 3 粒であった。なお、2007 年の試験において見られた 3 粒の交雑個体については、2、4 及び 6m の区でそれぞれ 1 個体ずつ得られたと報告されている (吉村, 2008)。

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頻度は極めて低いと考えられた。

本組換えダイズとツルマメとの交雑性に関する試験は行っていない。しかしながら、本隔離ほ場試験において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとを隣接した試験区で栽培し、本組換えダイズを花粉親としたときの自然交雑率を調査したところ、交雑は認められず (第一の 2-(6)-②-f, p35)、これまでに報告されているダイズ品種間の自然交雑率 (0.03~6.32%)(Abud, *et al.*, 2003; Ahrent and Caviness, 1994; Beard and Knowles, 1971; Caviness, 1966; Cutler, 1934; Garber and Odland, 1926; Ray *et al.*, 2003; Weber and Hanson, 1961; Woodworth, 1922) を超えるものではなかった。また、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結果、花粉形態及び花粉稔性 (第一の 2-(6)-②-d, p35) において違いは認められず、種子の生産性 (第一の 2-(6)-

②-e, p35)において、本組換えダイズの種子の生産性を高めるような違いは認められなかった。したがって、本組換えダイズとツルマメとの交雑率は従来ダイズとツルマメとの交雑率と同様に極めて低いと考えられた。

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 *FAD2-1A* 遺伝子断片や *FATB1-A* 遺伝子断片、又は改変 *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 2006 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体が探索されている。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) の
15のうち秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 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 17 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 (Kuroda *et al.*, 2010)。

20 しかし、これら発見された中間体が同じ集団内で生存し続けるかどうかの追跡調査を中間体の見つかった秋田県 1 地点、佐賀県 5 地点について行ったところ、佐賀県の 1 地点を除き翌年には中間体には雑種後代は確認されなかった。佐賀県の 1 地点では、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 (Kuroda *et al.*, 2010)。

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 (Kuroda, *et al.*, 2008)。同様に Stewart *et al.* (2003) も「ダイズにおいて作物から野生種への遺伝子浸透に関する分子学的事実はない」と述べて
30 いる。

35 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。実際に、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ことが示されている (Oka, 1983)。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種においては、休眠性、倒伏性、裂莢性はツルマメに比べ低下していることが報告されている (Chen and Nelson, 2004; Oka, 1983)。

5 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 F_1 雑種及びその雑種後代は、自然環境への適応に不利となるため世代を超えて長期間生存できず、このため従来ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が継続的に起きている可能性は極めて低いと考えられた。

10 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 *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 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, p34)。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 (Kojima, *et al.*, 1991)。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。

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対する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と推定される。さらに、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いく可能性は極めて低く、本組換えダイズ由来の *FAD2-1A* 遺伝子断片や *FATB1-A* 遺伝子断片、又は改変 *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考えられた。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 以上のことから、本組換えダイズは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：ダイズは弥生時代からわが国で栽培されていると考えられており、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、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）を比較検討した結果、発芽個体数、分枝数、一株当たりの精粒重及び百粒重において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が見られた。また、統計処理を行わなかった項目では、発芽期及び発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが認められた。

検討の結果、発芽特性については、発芽個体数において有意差が認められたが、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの発芽率がいずれも高く、収穫種子の発芽個体数において有意差が認められなかったこと、発芽期及び発芽揃いにおける本組換えダイズと対照の非組換えダイズの差は、1日のみであったこと、発芽始め及び発芽率において違いが認められなかったこと、本組換えダイズの隔離ほ場試験申請時に提出した米国で採種した種子を用いた発芽試験においても本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められていないことから、本組換えダイズの発芽特性は対照の非組換えダイズと同様であると考えられた。分枝数については、本組換えダイズの種子の生産性が高まるような違いが認められなかったことから、分枝数において見られた差が本組換えダイズの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。一株当たりの精粒重については、本組換えダイズが対照の非組換えダイズに比べて低かったが、精粒重が低いことが本組換えダイズの種子の生産性を高めるものではないと考えられた。また、百粒重については、本組換えダイズが対照の非組換えダイズに比べて低かったが、本組換えダイズの百粒重の平均値は、これまでに報告されている従来ダイズの百粒重の範囲内であると考えられた。よって、上述した項目において認められた有意差及び違いは、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。

本組換えダイズでは、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 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いう報告はない。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。

5 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、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

10 本組換えダイズでは *FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 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、核酸の安全性は FDA による GRAS への指定によっても支持されていることから、*FAD2-1A* 遺伝子断片と *FATB1-A* 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。また、本組換えダイズでは改変 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

15 ゲンと構造的に類似性のある配列を有していないことが確認されている。また、改変 CP4 EPSPS 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。

20

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。隔離ほ場試験において本組換えダイズと対照の非組換えダイズ間での自然交雑率を調査した結果、従来のダイズと同程度であった。また、本組換えダイズの種子の生産量、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、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考えられた。

30 したがって、本組換えダイズは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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

35

参考文献

- Abel, G.H. 1970. Storage of Soybean Pollen for Artificial Crossing. *Agron J* 62:121-123.
- 5
- Abrams, R.I., C.R. Edwards, and T. Harris. 1978. Yields and Cross-pollination of Soybeans As Affected by Honey Bees and Alfalfa Leafcutting Bees. *American Bee Journal* 118:555-556, 558.
- 10
- Abud, S., P.I. Mello de Souza, C.T. Moreira, S.R.M. Andrade, A.V. Ulbrich, G.R. Vianna, E.L. Rech, and F.J. Lima Aragao. 2003. Gene flow in transgenic soybean in the Cerrado region, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:1229-1235.
- Ahrent, D.K., and C.E. Caviness. 1994. Natural Cross-Pollination of Twelve Soybean
- 15
- Cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34:376-378.
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie, and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Mol. Gen. Genet.* 219:106-112.
- 20
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson, and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine *Ti* plasmid pTi15955. *Plant. Mol. Biol.* 2:335-350.
- 25
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett, and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. U.S.A. Patent 5,633,435. <http://www.patentstorm.us/patents/7214535.html> [Accessed June 30, 2010].
- 30
- Beard, B.H., and P.F. Knowles. 1971. Frequency of Cross-Pollination of Soybeans After Seed Irradiation. *Crop Science* 11:489-492.
- Buchanan, B., W. Gruissem, and R.L. Jones. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists edn., John Wiley and Sons.
- 35
- Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6:211-212.
- Chen, Y., and R.L. Nelson. 2004. Genetic Variation and Relationships among

Cultivated, Wild, and Semiwild Soybean. *Crop Sci* 44:316-325.

Chen, Z.L., M.A. Schuler, and R.N. Beachy. 1986. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8560-8564.

5

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards, and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO* 3:1671-1679.

10 Cruden, R.W. 1977. Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution* 31:32-46.

Csanádi, G., J. Vollmann, G. Stift, and T. Lelley. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. *Theor. Appl. Genet.* 103:912-919.

15

Cutler, G.H. 1934. A simple method for making soybean hybrids. *Journal of the American Society of Agronomy* 26:252-254.

20 De Bruin, J.L., and P. Pedersen. 2009. New and Old Soybean Cultivar Responses to Plant Density and Intercepted Light. *Crop Sci.* 49:2225-2232.

Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley, and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6873-6877.

25

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski, and H.M. Goodman. 1982. Nopaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573.

30 Doyle, J.J., M.A. Schuler, W.D. Godette, V. Zenger, R.N. Beachy and J.L. Slightom. 1986. The Glycosylated Seed Storage Proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *Structural Homologies of Genes and Proteins. The Journal of Biological Chemistry* 261:9228-9238.

35 FAO. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> [Accessed June 30, 2010].

FDA. 1992. Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties. *Federal Register* 57: 22984-23005. Department of Health and Human Services, Food and

Drug Administration.

- 5 Fillatti, J.J., N.A. Bringe, and K. Dehesh. 2003. Nucleic acid constructs and methods for producing altered seed oil compositions. International Publication Number WO 2003/080802 A3. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), World Intellectual Property Organization.
- 10 Fling, M.E., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Res. 13:7095-7106.
- Fujita, R., M. Ohara, K. Okazaki, and Y. Shimamoto. 1997. The Extent of Natural Cross-Pollination in Wild Soybean (*Glycine soja*). J Hered 88:124-128.
- 15 Garber, R.J., and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. J. Am. Soc. Agron. 18:967-970.
- Giza, P.E., and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78:73-84.
- 20 Graphic Maps. 2008. <http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> [Accessed June 30, 2010].
- Gruys, K.J., M.C. Walker, and J.A. Sikorski. 1992. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *Escherichia coli*. Biochemistry 31:5534-5544.
- 25 Haslam, E. 1974. The Shikimate Pathway. Butterworth & Co.
- 30 Haslam, E. 1993. Shikimic Acid: Metabolism and metabolites. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Herrmann, K.M. 1995. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. The Plant Cell 7:907-919.
- 35 Herrmann, K.M.. 1983. The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. Pages 301-322 in Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation, K.M. Hermann and R.L. Somerville, (eds.) Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.

- John, M.E., and G. Keller. 1995. Characterization of mRNA for a Proline-Rich Protein
5 of Cotton Fiber. *Plant Physiology* 108:669-676.
- Kiang, Y.T., Y.C. Chiang, and N. Kaizuma. 1992. Genetic Diversity in Natural
Populations of Wild Soybean in Iwate Prefecture, Japan. *J Hered* 83:325-329.
- 10 Kinney, A.J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food
applications. *J Food Lipids* 3:273-292.
- Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana*
gene encoding 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase: sequence analysis and
15 manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442.
- Kojima, M., M. Ohnisi, and S. Ito. 1991. Fatty acid compositions in *Leguminosae* seeds.
Research Bulletin of Obihiro University, I 17:227-233.
- 20 Koti, S., K.R. Reddy, V.G. Kakani, D. Zhao, and V.R. Reddy. 2004. Soybean (*Glycine*
max) Pollen Germination Characteristics, Flower and Pollen Morphology in
Response to Enhanced Ultraviolet-B Radiation. *Ann Bot* 94:855-864.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. 2008. Gene Flow and Genetic
25 Structure of Wild Soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48:1071-1079.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, and D. Vaughan. 2010. The origin and fate of
morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural
habitats in Japan. *Molecular Ecology* 19:2346-2360.
- 30 Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol* 15:139-143.
- Lammi, J.J. 2008. Online-Photoperiod Calculator. <http://www.tornio.info/sol.html>
- 35 Levin, J.G., and D.B. Sprinson. 1964. The Enzymatic Formation and Isolation of
3-Enolpyruvylshikimate 5-Phosphate. *J Biol Chem* 239:1142-1150.
- Liu, K.S., and E.A. Brown. 1996. Fatty Acid Composition in Newly Differentiated
Tissues of Soybean Seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 44:1395-1398.

- Mizuguti, A., Y. Yoshimura, and K. Matsuo. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9:93-96.
- 5 Nakayama, Y., and H. Yamaguchi. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* spp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* spp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management* 2:25-30.
- 10 OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. OECD ENV/JM/MONO(2000)9.
- 15 Oka, H. 1983. Genetic control of regenerating success in semi-natural conditions observed among lines derived from a cultivated x wild soybean hybrid. *Journal of Applied Ecology* 20:937-949.
- 20 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. 1996a. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York, U.S.A.
- 25 Palmer, R.G. 2000. Genetics of Four Male-Sterile, Female-Fertile Soybean Mutants. *Crop Sci* 40:78-83.
- Palmer, R.G., M.C. Albertsen, and H. Heer. 1978. Pollen production in soybeans with respect to genotype, environment, and stamen position. *Euphytica* 27:427-433.
- 30 Ray, J.D., T.C. Kilen, C.A. Abel, and R.L. Paris. 2003. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ Biosafety Res* 2:133-138.
- 35 Richins, R.D., H.B. Scholthof, and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Res* 15:8451-8466.
- Ridley, W.P., R.S. Sidhu, P.D. Pyla, M.A. Nemeth, M.L. Breeze, and J.D. Astwood. 2002. Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That of Conventional Corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 50:7235-7243.

- Schapaugh, W.T. 1997. Selection of Soybean Varieties. Pages 4-8 in Soybean Production Handbook Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, KS, U.S.A.
- 5
- Siomi, H., and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. Nature 457:396-404.
- Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller, and N. Amrhein. 1985. Selective Overproduction of 5-enol-Pyruvylshikimic Acid 3-Phosphate Synthase in a Plant Cell Culture Which Tolerates High Doses of the Herbicide Glyphosate. J. Biol. Chem 260:16338-16346.
- 10
- Stalker, D.M., C.M. Thomas, and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide Sequence of the Region of the Origin of Replication of the Broad Host Range Plasmid RK2. Mol. Gen. Genet. 181:8-12.
- 15
- Steinrücken, H.C., and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications 94:1207-1212.
- 20
- Stewart, C.N., M.D. Halfhill, and S.I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nature. Reviews 4:806-817.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- 25
- Taiz, L., and E. Zeiger. 1998. Respiration and lipid metabolism. Pages 317-321 in Plant physiology. 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA, U.S.A.
- 30
- United Soybean Board. 2008. <http://www.plantsci.missouri.edu/soydoc/adapt.htm> [Accessed June 30, 2010].
- Weber, C.R., and W.D. Hanson. 1961. Natural Hybridization With and Without Ionizing Radiation in Soybeans. Crop Sci. 1:389-392.
- 35
- Weiss, U., and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the Shikimate Pathway. Pages 287-301 in The Biosynthesis of Aromatic Compounds. John Wiley and Sons, New York, U.S.A.

- WHO. 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916. World Health Organization, Geneva http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf [Accessed June 30, 2010].
- 5
- Woodworth, C.M. 1922. The extent of natural cross-pollination in soybeans. J. Am. Soc. Agron. 14:278-283.
- Yoshimura, Y., K. Matsuo, and K. Yasuda. 2006. Gene flow from GM
10 glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. Environ. Biosafety Res. 5:169-173.
- Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger, and H.M. Goodman. 1982. Tumor Induction by
15 *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the Boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1:361-370.
- 浅野貞夫 (1995) 原色図鑑/芽ばえとたね、全国農村教育協会
- 阿部 純, 島本 義也(2001) 第6章 ダイズの進化—ツルマメの果たしてきた役
20 割, Pages 77-95 in 栽培植物の自然史—野生植物と人類の共進化—, 山口 裕文、島本 義也、北海道大学図書刊行会, 北海道
- 大橋 広好 (1999), マメ科, Pages 186-213 in 日本の野生植物 草本 II 離弁花類,
25 佐竹 義輔、大井 次三郎、北村 四郎、亘理 俊次、富成 忠夫、平凡社, 東京
- 栗原 浩, 蓮原 雄三, 津野 幸人他, (2000), 第6章豆類 2.ダイズ, Pages 233-246
in 作物栽培の基礎, 農山漁村文化協会, 東京
- 昆野 昭晨(1995), 生育のステージと生理、生態 Pages 基 29-33 in 農業技術大系
30 作物編 6, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京
- 後藤 寛治 (1995), ダイズの起源と特性 Pages 基 19-28 in 農業技術大系 作物
編 6, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京
- 35 財務省 「財務省貿易統計」
<http://www.customs.go.jp/toukei/suii/html/time.htm> [Accessed June 30, 2010]
- 島本義也, 福士泰史, 阿部 純 (1997) 飼料用ダイズ (オオバツルマメ) の細胞質
40 ゲノムの特徴、日本育種学会第 92 回講演会発表、鳥取

- 高橋将一、羽鹿牧太、異儀田和典 (1996) 九州中部で収集したツルマメの生育特性、九州農業研究(九農研) 第 58 号
- 5 日本雑草学会 (1991) 改訂・雑草学用語集、日本雑草学会
- 沼田 真、吉沢 長人 (1997) 新版・日本原色雑草図鑑、全国農村教育協会
- 農林水産省 「平成 19 年度食料自給表」
10 http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fy19/fbs_fy19p.pdf [Accessed June 30, 2010]
- 野口 弥吉、川田 信一郎 (1987) 第 2 次増訂改版 農学大事典、養賢堂
- 御子柴 公人 (1995) 日本人とダイズ Pages 基 3-16 in 農業技術大系 作物編
15 6, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京
- 山内 文男、大久保 一良 (1992), 1. ダイズ食品の歴史, Pages 1-11 in 大豆の科学、朝倉書店
- 20 吉村泰幸、水口亜樹、松尾和人 (2006) . ほ場で遺伝子組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は低い. 独立行政法人農業環境技術研究所 研究成果情報 第 23 集: 22-23.
- 25 吉村泰幸 (2008) 遺伝子組換え植物と野生種との交雑率評価—圃場条件下における遺伝子組換えダイズとツルマメとの自然交雑— 第 23 回日本雑草学会シンポジウム講演要旨 遺伝子組換え植物の生態系影響と管理 —LMO の適正な利用のために—p30-33 平成 21 年 8 月

緊急措置計画書

平成 22 年 12 月 6 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

10 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(*FAD2-1A*, *FATB1-A*, 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。

- 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

日本モンサント株式会社

平成 22 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 油糧作物担当課長
	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
	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 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内

10 容を周知するための方法

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

15

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

20 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、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体が環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換え体は、環境中で生存しないように不活化する。

25 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消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

30

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
 (FAD2-1A, FATB1-A, 改変 cp4 epsps, Glycine max (L.) Merr.)
 (MON87705, OECD UI: MON-87705-6) の別添資料リスト

- | | | |
|----|---------|---|
| 5 | 別添資料 1 | 本組換えダイズにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列(社外秘) |
| | 別添資料 2 | Analysis of the endogenous FAD2-1A and FATB1A RNA levels in soybean MON 87705 (MSL0021372) (社外秘) |
| 10 | 別添資料 3 | Summary of PCR Analysis to Confirm the Absence of Agrobacterium Used To Produce MON 87705 Soybean (社外秘) |
| | 別添資料 4 | Heritability and Stability of Genes Present in Biotechnology-Derived Soybean MON 87705 Across Multiple Generations (RPN-08-504) (社外秘) |
| 15 | 別添資料 5 | Amended Report for MSL0022130: Molecular Analysis of Soybean MON 87705 (MSL-0022384) (社外秘) |
| | 別添資料 6 | Assessment of CP4 EPSPS Protein Levels in Leaf, Seed, Root, and Forage Tissues from MON 87705 soybean Grown in 2007/2008 Chile Field Trials (MSL-0021832) (社外秘) |
| 20 | 別添資料 7 | Western Blot analysis of CP4 EPSPS Protein in MON 87705 Mature Soybean Seed across Multiple Generations Produced in the United States and Puerto Rico during 2006 and 2007 in Support of a Japan Stage III Application (MSL0021243) (社外秘) |
| | 別添資料 8 | Soybean GM_A94978 EndPoint TaqMan PCR with PUB Internal Control For Single Seed (BQ-QC-10583-01) (社外秘) |
| 25 | 別添資料 9 | 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 (FAD2-1A, FATB1-A, 改変 cp4 epsps, Glycine max (L.) Merr.)(MON87705, OECD UI: MON-87705-6) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘) |
| 30 | 別添資料 10 | An Assessment of the Effect of Cold Stress on Biotechnology-Derived Soybean MON 87705 under Growth Chamber Conditions (社外秘) |
| | 別添資料 11 | Dormancy and Germination Evaluation of biotechnology-Derived Soybean MON 87705 Using Seed Produced in the U.S. in 2007(社外秘) |