

ステアリドン酸産生ダイズ(改変 *Pj.D6D*, 改変 *Nc.Fad3*, *Glycine max* (L.)
Merr.)(MON87769, OECD UI: MON-87769-7) に関する
生物多様性影響評価書申請書等の概要

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	4
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	7
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	9
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	10
(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	16
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	17
(2) ベクターに関する情報	22
イ 名称及び由来	22
ロ 特性	22
① ベクターの塩基数及び塩基配列	22
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	22
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	22
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	22
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	22
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	23
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	23
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	23
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	23
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	23
(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	26
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	26
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	27
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	29
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	29
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度	30
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	30
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	30

①	移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容	30
②	以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	31
	a 形態及び生育の特性	31
	b 生育初期における低温又は高温耐性	31
	c 成体の越冬性又は越夏性	38
	d 花粉の稔性及びサイズ	38
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	38
	f 交雑率	39
	g 有害物質の産生性	39
	h 抗酸化性	40
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	40
(1)	使用等の内容	40
(2)	使用等の方法	40
(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	40
(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	41
(5)	実験室等での使用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	41
(6)	国外における使用等に関する情報	41
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	43
1	競合における優位性	43
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
(2)	影響の具体的内容の評価	46
(3)	影響の生じやすさの評価	46
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	46
2	有害物質の産生性	46
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	46
(2)	影響の具体的内容の評価	49
(3)	影響の生じやすさの評価	49
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	49
3	交雑性	49
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	49

(2)	影響の具体的内容の評価.....	50
(3)	影響の生じやすさの評価.....	50
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	53
4	その他の性質	54
第三	生物多様性影響の総合的評価	55
参考文献	58
緊急措置計画書	68

第一種使用規程承認申請書

平成 22 年 6 月 21 日

農林水産大臣 山田 正彦 殿

5 環境大臣 小沢 鋭仁 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ステアリドン酸産生ダイズ (改変 <i>Pj.D6D</i> , 改変 <i>Nc.Fad3</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87769, OECD UI: MON-87769-7)
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、

25

30

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)。

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

5 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)。

10 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

15 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>)。

20 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>)。2007 年度におけるダイズの国内生産量は約 23 万トンであり、国内消費仕向量¹は約 430 万トンであった。国内消費仕向量の用途別内訳は、飼料用が約 12.5 万トン、種子用が約 0.7 万トン、加工用 (ダイズ油・脱脂ダイズ・味噌・醤油用) が約 322.3 万トン、減耗量²が約 8.3 万トン、食品用³が約 86.6 万トンとなっている (農林水産省「平成 19 年度食料需給表」、<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fbs-fy19d.pdf>)。

 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

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

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

³ 国内消費仕向量- (飼料用+種子用+加工用+減耗量) から算出される。

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)。

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 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) 及び 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。雑草の防除については、生育期間中に除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病虫害の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り取り・脱粒を一緒に行う方法とがある (栗原ら, 2000)。

(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, 2000)。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、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°C 以上を必要として 25°C 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)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は 30~35°C、最低発芽温度及び最低生育温度は 2~4°C であり、10°C 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°C 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である (野口ら, 1987)。

5 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 (Lammi, 2008)。

10 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

15 —

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

20

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裂莢性の程度は低い。今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3525 もまた難裂莢性で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、25 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)。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

30

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。

35

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑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現場跡地や畑の周辺、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)。

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。さらに、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、ダイズ間の他家受粉率について、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)。またツルマメ間の他家受粉率に関しても、秋田県雄物川流域で約13%という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (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 1997) 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
5 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
10 である。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。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
15 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 (Gls/93-J-01) をそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した。自然交雑実験終了後に結実したツ
20 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遺
25 伝子組換えダイズとツルマメを 5 cm 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数は 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
30 ツルマメを栽培する試験区を設定し、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ける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 粒であり、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験よりより長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であった。一方で、2 m から 10 m 離して栽培した試
35 験区におけるダイズと自然交雑した交雑種子数は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒であり、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、6 m 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)。

5

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
10 ~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
15 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
20 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)。

ホ 病原性

—

25

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。

30

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雑草化したという報告はない。

35

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖オメガ-3 脂肪酸は、心血管系疾患のリスクを軽減する効果があることが示されている (Wang *et al.*, 2006)。しかし、EPAやDHAは酸化されやすいため、食品への利用方法が制限される。そこでモンサント・カンパニーは、これら長鎖オメガ-3 脂肪酸の代謝前駆体であるステアリドン酸 (SDA) を油成分として含むダイズを開発した。SDAはオメガ-3 脂肪酸のひとつであり、EPAやDHAよりも二重結合が少ないため酸化に対して安定である。ヒトや動物に摂取されたSDAは、体内においてまずEPAに変換され、さらにそのうちの少量がDHAに変換されることが知られている (Hammond *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2008)。SDAダイズ油は、オメガ-3 脂肪酸の摂取を目的とした一部の食品の原材料として使用される。具体的には、SDAダイズ油は、マーガリン、サラダドレッシング、マヨネーズ、食パン、ケーキ、ロールパン、シリアルバー、シリアル、ヨーグルト、スムージー、乳飲料、豆乳飲料、スープ、ソース、レトルト食品、加工肉・魚製品などに利用される⁴。また、水産養殖や家畜等の餌において、魚油や他のオメガ-3 脂肪酸に富む飼料原料の代用品としての利用も考えられている。

20 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

ステアリドン酸産生ダイズ (改変 *Pj.D6D*, 改変 *Nc.Fad3*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87769, OECD UI: MON-87769-7) (以下「本組換えダイズ」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は図 1 (p12) 及び表 1 (p13~15) に示した。

なお、本組換えダイズに導入された *Pj.D6D* 遺伝子から発現する $\Delta 6$ デサチュラーゼは野生型と比べて N 末端側が 16 アミノ酸短くなっている。よって、本組換えダイズに導入された *Pj.D6D* 遺伝子は「改変 *Pj.D6D* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ」とする。また、本組換えダイズに導入された *Nc.Fad3* 遺伝子から発現する $\Delta 15$ デサチュラーゼは、翻訳開始

⁴ マーガリンの原材料となる油には、硬化油(水素添加された油脂)と未硬化の油の 2 種類が存在する。SDA ダイズ油は、未硬化の油としての利用に適している。

に重要なコザックコンセンサス配列を導入するため、N 末端配列から 2 番目のトレオニンがアラニンに改変されている。よって、本組換えダイズに導入された *Nc.Fad3* 遺伝子は「改変 *Nc.Fad3* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼ」とする。

5

また、本組換えダイズ作出の過程において選抜マーカーとして導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) は、植物中での発現量を高めるため CP4 EPSPS の機能活性を変更することの無いように塩基配列に改変を加えたものであり、*Agrobacterium sp.* CP4 株由来のアミノ酸配列と比較して N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。したがって、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とする。ただし、本組換えダイズは R1 世代において遺伝的分離により改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体のみをインベーター分析⁵により選抜している (図 3, p25)。

10

15

なお、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

ロ 構成要素の機能

20

- 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

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の各構成要素の機能は表 1 (p13~15) に示したとおりである。

25

⁵ インベーター分析は、遺伝的変異の検出や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。インベーター分析は 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。

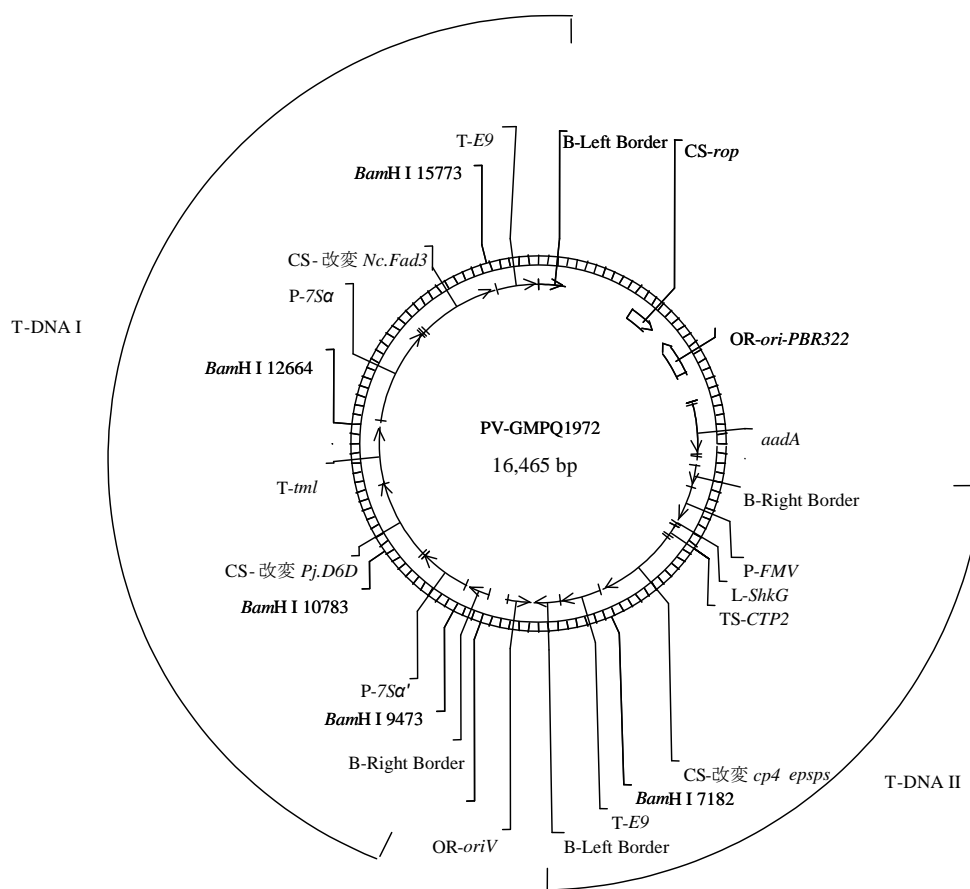


図 1 PV-GMPQ1972 のプラスミドマップ⁶

本組換えダイズの育成過程では、上図の T-DNA I 領域は持つが、T-DNA II 領域は持たない個体を選抜した。

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

表 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能⁷

構成要素	由来及び機能
T-DNA I	
B ^{注1} -Right 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右側境界配列を含む配列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
P ^{注2} -7Sa'	<i>G. max</i> のβ-コングリシニン貯蔵蛋白質をコードする遺伝子 (alpha'-bcsp) の転写を誘導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
CS ^{注3} -改変Pj.D6D	<i>Primula juliae</i> (サクラソウの1種) のΔ6デサチュラーゼのコード配列 (Ursin <i>et al.</i> , 2005)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
T ^{注4} -tml	<i>A. tumefaciens</i> オクトピン型Tiプラスミドのtml 遺伝子の3'末端非翻訳領域 (Kemp <i>et al.</i> , 2000)。mRNAのポリアデニル化を誘導する。
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をコードする遺伝子 (<i>Sphas2</i>)の転写を誘導するプロモーター及びリーダー配列 (Wang <i>et al.</i> , 2004)。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
CS-改変Nc.Fad3	<i>Neurospora crassa</i> (アカパンカビ)のΔ15デサチュラーゼのコード配列 (Ursin <i>et al.</i> , 2003)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
T-E9	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ)のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する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)。

⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA I (つづき)	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
B -Left Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む配列(Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外側骨格領域 (本組換えサイズには存在しない)	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
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。 <i>Escherichia 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
OR ^{注5} -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, 1978)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
aadA	トランスポゾンTn 7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・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
T-DNA II (本組換えサイズには存在しない)	
B-Right Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される右側境界配列を含む(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
P-FMV	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNAのプロモーター (Rogers, 2000)。植物細胞内での転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
L ^{注6} -ShkG	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) をコードしているShkG遺伝子の5'末端非翻訳領域 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子発現の調整に関与する。

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA II (本組換えダイズには存在しない) (つづき)	
TS ^{注7} -CTP2	<i>A. thaliana</i> のEPSPS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 (Klee <i>et al.</i> , 1987; Herrman, 1995)。改変CP4EPSPS蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4株の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996; Barry <i>et al.</i> , 1997)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列
T-E9	<i>Pisum sativum</i> のリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する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
B-Left Border	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
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。 <i>Agrobacterium</i> 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)

注2 P – Promoter (プロモーター)

注3 CS – Coding Sequence (コード配列)

注4 T – Transcript Termination Sequence (転写終結配列)

注5 OR – Origin of Replication (複製開始領域)

注6 L – Leader (リーダー配列)

注7 TS – Targeting Sequence (ターゲティング配列)

- 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 【改変 *Pj.D6D* 遺伝子】

本組換えダイズには *P. juliae* 由来の改変 *Pj.D6D* 遺伝子が導入されている。改変 *Pj.D6D* 遺伝子が単離された *P. juliae* は、一般的に Primrose (和名: サクラソウ) の呼び名で知られている植物の属に分類される。

- 10 この改変 *Pj.D6D* 遺伝子は、フロントエンドデサチュラーゼ (既存の二重結合とカルボキシル末端との間に二重結合を挿入するデサチュラーゼの総称) である改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードしており、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼは特定の脂肪酸においてカルボキシル末端から 6 番目と 7 番目の炭素間に二重結合を挿入する。SDA を産生することが知られている植物や動物では、SDA
- 15 は α -リノレン酸 (ALA) の $\Delta 6$ 不飽和化と γ -リノレン酸 (GLA) の ω -3 不飽和化により産生される (図 2, p20)。しかし、ダイズは $\Delta 6$ デサチュラーゼを有していないため、SDA を産生することができない。そこで、本組換えダイズに改変 *Pj.D6D* 遺伝子を導入することにより、本来、ダイズが産生できなかった SDA が産生される (図 2, p20)。なお、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼを導入したことにより、本組換えダイズにおいてオレイン酸 (18:1) やリノール酸 (18:2) に二重結合が挿入され、少量のイソリノール酸 (ILA, 18:2) や GLA (18:3) が産生される (図 2, p20)。

- 25 改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼが、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_2009⁸) を用いて FASTA 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。

【改変 *Nc.Fad3* 遺伝子】

- 30 上述の改変 *Pj.D6D* 遺伝子に加え、本組換えダイズには *N. crassa* (和名: アカパンカビ) 由来の改変 *Nc.Fad3* 遺伝子が導入されている。*N. crassa* は、子嚢菌類に分類されるカビの一種であり、非病原性、非アレルギー性であると考えられている (Perkins and Davis, 2000)。

⁸ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) AllergenOnline database (FARRP, 2009) に登録されている配列からなるデータベース

5 改変 *Nc.Fad3* 遺伝子を導入することにより、本組換えダイズにおいて改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現している。改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは、特定の脂肪酸のカルボキシル末端から 15 番目と 16 番目の炭素間に二重結合を挿入する。ダイズにはもともと内在性の $\Delta 15$ デサチュラーゼが存在するが、その活性レベルは低いことが知られている。そこで、本組換えダイズにおいて *N. crassa* 由来の改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼを発現させることにより、リノール酸から ALA の経路、及び改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼの働きによって産生された GLA を SDA へ変換する経路がより促進されるようにした (図 2, p20)。

10 以上のように、ダイズにおいて SDA を産生するためには、 $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードしている遺伝子を導入することが必須であるが、本組換えダイズにおいて改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼも同時に発現させることにより、より効率的に本組換えダイズ中での SDA 含量を高めることができると考えられる。

15 改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが、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_2009) を用いて FASTA 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。

20 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

25 本来、ダイズは $\Delta 6$ デサチュラーゼを有していないため、SDA を産生することができない。しかし、本組換えダイズは改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼと改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼを発現することにより、SDA を産生することができる。本組換えダイズは、栽培環境によっても異なるが、ダイズ油中に総脂肪酸当たり約 20%~30% 程度の SDA を産生する (表 2, p21)。また、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼを導入したことにより、本組換えダイズにおいてリノール酸 (18:2) に二重結合が挿入され、GLA (18:3) が産生される。

30 実際に、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ、従来商業品種 15 品種の種子の脂肪酸分析を行った結果、本組換えダイズの種子中で SDA (総脂肪酸当たり平均 26.13 %)、及び GLA (総脂肪酸当たり平均 7.09 %) が産生されていることが確認されている (表 2, p21)。一方で、本組換えダイズにおいて改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼがオレイン酸に作用し、ILA が産生されることが考えられたが、
35 本組換えダイズの種子の脂肪酸分析を行った結果、ILA は定量限界以下であった (表 2, p21)。また、本組換えダイズの種子において少量のトランス SDA や

トランス ALA が検出された。しかしながら、脂肪酸のトランス異性体は油の抽出及び精製過程において生じることが報告されている (Chardigny *et al.*, 1996) ことから、本組換えダイズから検出されたトランス SDA やトランス ALA は、本組換えダイズの油分中に比較的多く含まれる SDA や ALA が、油の精製過程において異性化したことで生じたものであると考えられた。

また、脂肪酸分析において本組換えダイズと対照の非組換えダイズの両方に検出された 8 種類の脂肪酸うち、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、ALA、アラキジン酸、ベヘン酸の含有量については本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には有意差が確認された(表 2, p21)。このうち本組換えダイズにおけるオレイン酸、リノール酸及び ALA の含有量は従来商業品種の分析値の範囲から外れていた。しかしながら、これらの脂肪酸はいずれも SDA の産生に至る代謝経路に含まれている脂肪酸であるため (図 2, p20) 、本組換えダイズで発現している $\Delta 6$ デサチュラーゼや $\Delta 15$ デサチュラーゼによってその含有量が変化していると考えられた。

また、アラキジン酸、パルミチン酸、ベヘン酸の本組換えダイズにおける含有量と対照の非組換えダイズにおける含有量の差は、従来商業品種の分析値の範囲内であった。アラキジン酸、パルミチン酸、ベヘン酸は SDA の産生に至る代謝経路に含まれていないことから、これらの脂肪酸において見られた差は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼや $\Delta 15$ デサチュラーゼが直接これらの脂肪酸に作用したことにより生じたものではないと考えられた。

$\Delta 6$ デサチュラーゼと $\Delta 15$ デサチュラーゼの基質特異性については、これまで *in vitro* の酵母発現システムにおいて調査が行われている (別添資料 2)。その結果、*P. juliae* 由来の改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼにおいて、その不飽和化は特異的であり、オレイン酸やリノール酸、ALA の特定の不飽和脂肪酸の $\Delta 6$ 不飽和化のみに働くことが確認されている。同様に、*N. crassa* 由来の改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼについても、リノール酸や GLA、ジホモ γ -リノレン酸 (DGLA)、アラキドン酸の脂肪酸基質における ω -3 の不飽和化に特異的であることが確認されている。

よって、本組換えダイズで発現している改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼにより、上述の脂肪酸組成の変化以外の宿主の代謝系を変化させる可能性は低いと判断された。

また、本組換えダイズにおいて新たに産生される脂肪酸である SDA は一般的な魚油に含まれている成分であり、第一の 2 (p10) に記載したとおり EPA や DHA の代謝前駆体である。GLA は母乳や内臓肉、植物種子油に、ILA は魚

や魚油、栄養補助食品に含まれており、ヒトが日頃から摂取しているものである。

5 本組換えダイズの種子中では、本来ダイズが産生しない脂肪酸である SDA
や GLA が産生されている。ダイズの種子中の脂肪酸は主にトリアシルグリセ
ロール (TAG) の一部として種子の油分中に蓄積している。TAG はダイズ種
子中の主要な貯蔵脂質であり、発芽時のエネルギー源として利用されることが
10 知られている (Liu and Brown, 1996; Taiz and Zeiger, 1998)。TAG がエネルギー
として利用される過程では、リパーゼによる加水分解によって TAG がグリ
セロールと脂肪酸に異化され、この加水分解と同時に脂肪酸はアシル CoA に
15 変換される。さらにこのアシル CoA は β 酸化により分解される。これまでに、
ヒマワリ、ケシ、アマニのリパーゼが基質特異性をもたないことが報告され
ており (Fernández-Moya *et al.*, 2000, Prokofév and Novitskaya, 1958)、多価不飽和
脂肪酸の β 酸化に必要な異性化酵素及び還元酵素は、全ての植物や動物が有
20 していることが報告されている (Stryer, 1995)。したがって、ダイズにおいて
SDA や GLA の β 酸化は、リノール酸や ALA の β 酸化と同様に行われると考
えられる。実際に、本組換えダイズの発芽時における種子中及び子葉中の脂
肪酸含量を調べた結果、SDA 及び GLA の含有量は発芽に伴って減少し、これ
らの脂肪酸がダイズの内在性脂肪酸であるリノール酸や ALA と同様にエネル
ギー代謝に利用されていることが示された(別添資料 3)。

以上のことから、本組換えダイズにおいて産生される SDA や GLA はダイ
ズ種子中に存在する他の脂肪酸と同様の生物学的役割を果たしていると考え
られる。

25

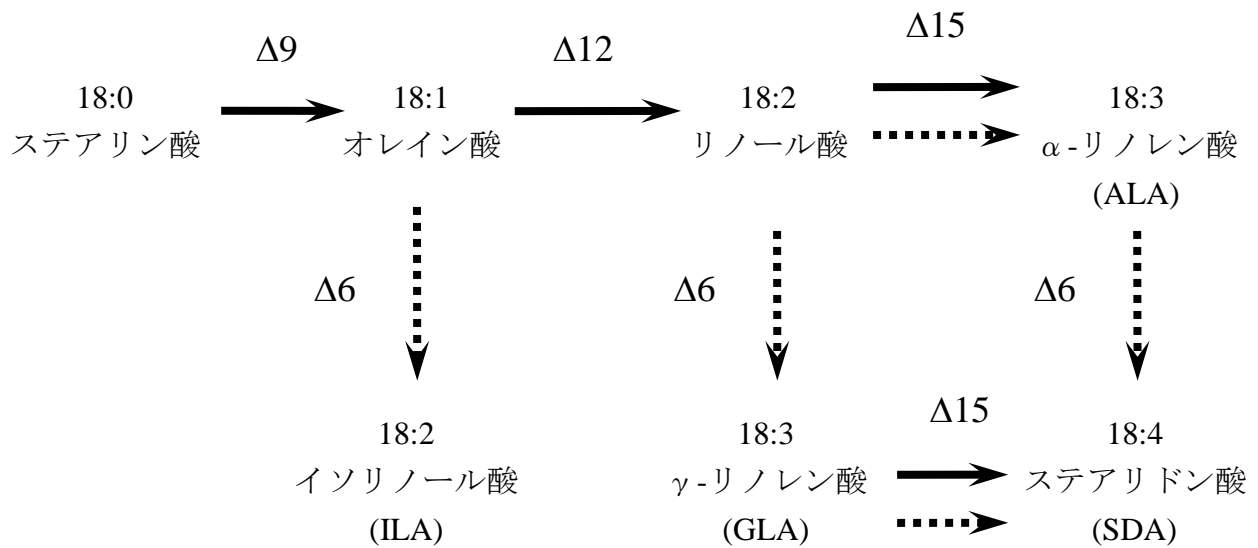
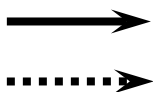


図 2 *P. juliae* 由来の改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び *N. crassa* 由来の改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼを導入したダイズにおける SDA の産生⁹



ダイズ内在性のデサチュラーゼが働く、あるいは働くと考えられる脂肪酸合成経路

導入した改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが働く脂肪酸合成経路

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

表 2 本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ、従来商業品種のダイズ油における脂肪酸組成及び種子中の脂肪含量^{1 10}

	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)	12.06 [11.53 - 12.54]	11.77 [11.14 - 12.08]	<0.001	(9.88 - 12.33) [7.28, 14.20]
18:0 Stearic (ステアリン酸)	4.19 [3.73 - 4.53]	4.15 [3.85 - 4.44]	0.245	(3.68 - 4.89) [2.87, 5.85]
18:1 Oleic (オレイン酸)	15.18 [12.66 - 18.80]	19.19 [17.24 - 21.17]	0.001	(16.70 - 23.16) [12.56, 27.98]
18:2 Linoleic (リノール酸)	22.78 [16.46 - 30.81]	54.93 [54.05 - 56.04]	<0.001	(53.36 - 57.39) [50.46, 59.96]
18:2 Isolinolenic (ILA) (イソリノール酸)	- ³	-	NA ⁴	-
18:3 Linolenic (ALA) (α -リノレン酸)	11.18 [10.20 - 11.80]	9.20 [7.42 - 10.66]	0.016	(6.95 - 10.58) [3.72, 13.46]
18:3 trans-ALA (トランス α -リノレン酸)	0.44 [0.38 - 0.48]	-	NA	-
18:3 γ -linolenic (GLA) (γ -リノレン酸)	7.09 [6.07 - 8.03]	-	NA	-
18:4 Stearidonic (SDA) (ステアリドン酸)	26.13 [16.83 - 33.92]	-	NA	-
18:4 trans-SDA (トランスステアリドン酸)	0.18 [0.058 - 0.26]	-	NA	-
20:0 Arachidic (アラキジン酸)	0.34 [0.31 - 0.37]	0.31 [0.28 - 0.34]	<0.001	(0.27 - 0.36) [0.20, 0.45]
20:1 Eicosenoic (エイコセン酸)	0.14 [0.075 - 0.20]	0.13 [0.069 - 0.19]	0.282	(0.071 - 0.19) [0, 0.31]
22:0 Behenic (ベヘン酸)	0.29 [0.26 - 0.31]	0.32 [0.28 - 0.37]	0.023	(0.30 - 0.41) [0.22, 0.49]
乾燥種子における脂肪含量				
Total Fat (脂肪)	15.91 [12.95 - 19.03]	15.94 [12.73 - 18.80]	0.955	(13.99 - 20.56) [11.04, 25.03]

¹ 米国の 5 カ所のほ場から得られたサンプルについて分析を行い、統計処理は ANOVA 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集団内において発現される値の 99% を含む。下限値の限度は 0 に設定した。

³ -; 定量限界以下 (定量限界は総脂肪酸の 0.13 %)

⁴ NA; 対照の非組換えダイズの分析値、又は本組換えダイズと対照の非組換えダイズの分析値の両方が定量限界以下であったため、適用されない。

(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-GMPQ1972 の全塩基数は 16,465bp である。本プラスミド・ベクターの全塩基配列は、別添資料 4 に示した。

- 15 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

本ベクターの感染性は知られていない。

25

(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 (p13~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p12) に示した。

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-GMPQ1972 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。

5

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

10 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-GMPQ1972 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサート、カルベニシリン及びクラフォランを添加した組織培養培地で細胞の選抜を行った。この際、グリホサートによって形質転換していない細胞を除去した。

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

20 カルベニシリン及びクラフォランを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えダイズの R4 世代において、形質転換に用いたプラスミド・ベクターPV-GMPQ1972 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・ベクターの外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 5)。このことから、本組換えダイズには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

25

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

30 形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において T-DNA I 領域 (改変 *Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセットを含む領域) をホモで有し、T-DNA II (改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む領域) が分離した個体を選抜した。R2 世代においても、この個体が T-DNA II 領域を持たないことをインベーター分析により確認している。

35 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 MON87769 系統を選抜した。

本組換えダイズの育成図を図 3 (p25) に示した。なお、第一種使用規程の承

認対象の範囲は、本組換えダイズの R4 世代及び R4 世代から派生する全ての後代交配種である。

【社外秘につき非開示】

図 3 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、
導入遺伝子をホモで有する本組換えダイズ(R4 世代)を非組換えダイズと交配
して F1 個体を作成し、この F1 世代の 1 個体を自殖して得られた F2 世代につ
いて、導入遺伝子の遺伝子型をインバーダー分析により調査し、分離比の検
10 定を行った (別添資料 6)。その結果、導入遺伝子の分離比は、メンデルの法
則に従うと仮定して期待される 1:2:1 の分離比に適合していた (表 3、p26)。
さらに、F2 世代のヘテロ接合体の 1 個体を自殖して得られた F3 世代、さら
F3 世代のヘテロ接合体の 1 個体を自殖して得られた F4 世代においても同様に
期待された分離比に適合していた (表 3、p26)。したがって、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。

15

表 3 本組換えダイズの後代における導入遺伝子の分離比¹¹

世代 ¹	供試 個体数 ²	観察値			1:2:1 の分離比の期待値 ³			χ^2	p 値
		陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性 個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性 個体数		
F2	47	11	23	13	11.75	23.5	11.75	0.2	0.9087
F3	174	48	81	45	43.5	87	43.5	0.9	0.6278
F4	222	60	102	60	55.5	111	55.5	1.5	0.482

¹ F1 世代は、本組換えダイズと、本組換えダイズの導入遺伝子を持たない非組換えダイズとを交配することにより得られた。また、F3 世代及び F4 世代は、それぞれヘテロ接合体である F2 世代及び F3 世代を自殖することによって得られた。

² 導入遺伝子の一部である T-*tml* の有無をインバーダー分析で調べることにより、各個体の遺伝子型を確認した。

³ 調査したそれぞれの世代において、観察値がメンデルの法則に従った期待値と適合することを検定するために、カイ 2 乗検定を行った。

25

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 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
5 世代における伝達の安定性

10 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えダイズのゲ
ノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれていることが確認され
た (別添資料 7 の Fig. 5, p43) 。また、外側骨格領域及び T-DNA II 領域は導入
15 されておらず (別添資料 7 の Fig. 6~7, p44~45 及び Fig. 15~16, p53~54)、T-DNA
I 領域内の改変 *Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセ
ットの全ての構成要素が組み込まれていることが確認された (別添資料 7 の
Fig. 8~13, p46~51)。さらに、導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが
15 複数世代 (R3~R6 世代) におけるサザンブロット分析によって示された (別
添資料 7 の Fig. 14, p52)。

なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を p28 に図 4 として示
した。

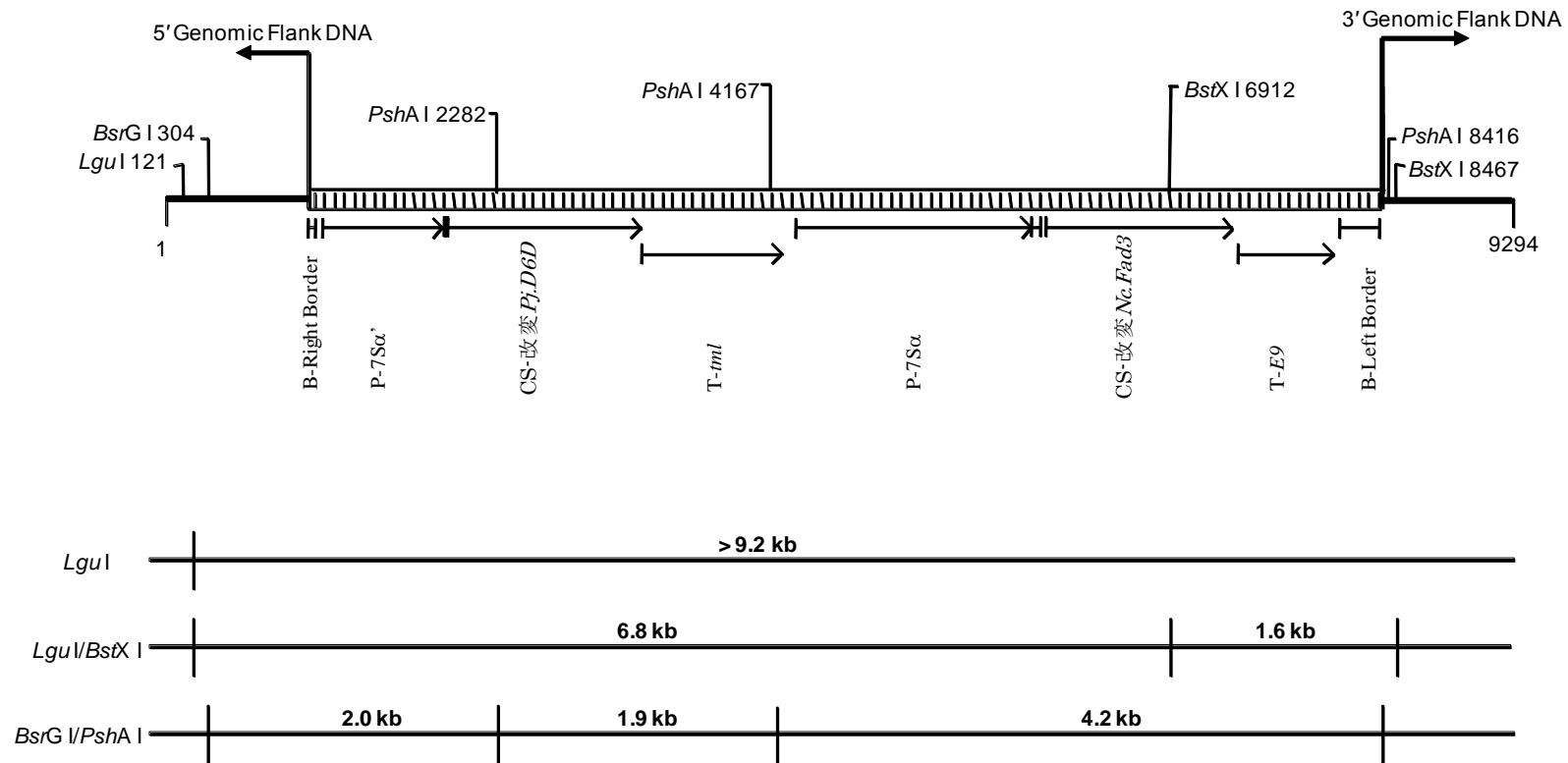


図 4 本組換えダイズの導入遺伝子地図¹²

¹²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 7 の Fig. 5, p43)。

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 米国の3ヵ所のほ場 (ネブラスカ州、アーカンソー州、ウィスコンシン州) おいて、乱塊法に従って 3 反復で栽培した本組換えダイズの葉、未熟種子及び完熟種子中での改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現量もウエスタンプロット法により分析した (別添資料 8)。

15 その結果、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼの発現量は、未熟種子において平均 $20\mu\text{g/g}$ fwt、発現量の範囲は $15\sim 25\mu\text{g/g}$ fwt であり、完熟種子においては平均 $0.99\mu\text{g/g}$ fwt、発現量の範囲は $0.43\sim 1.9\mu\text{g/g}$ fwt であった (別添資料 8 の Table 1, p17)。なお、葉における改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼの発現量は、定量限界 (LOQ= $0.625\mu\text{g/g}$) 以下であった。

20 改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現量は、未熟種子において平均 $48\mu\text{g/g}$ fwt、発現量の範囲は $26\sim 62\mu\text{g/g}$ fwt であり、完熟種子においては平均 $21\mu\text{g/g}$ fwt、発現量の範囲は $5.3\sim 52\mu\text{g/g}$ fwt であった (別添資料 8 の Table 1, p17)。なお、葉における改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現量は、定量限界 (LOQ= $0.625\mu\text{g/g}$) 以下であった。

25 また、本組換えダイズにおける改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの世代間での安定性を調べるため、本組換えダイズの自殖後代 4 世代 (R3、R4、R5、R6) の未熟種子サンプルから蛋白質を抽出し、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現をウエスタンプロット法により分析した。その結果、供試した全ての世代において $\Delta 6$ デサチュラーゼ
30 及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの分子量と一致するバンドが検出され、目的とする形質が安定的に発現していることが確認された (別添資料 9 の Fig. 1, p15 及び Fig. 2, p16)

35 以上の結果から、本組換えダイズに導入された改変 *Pj.D6D* 及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子は、複数の後代に安定して遺伝しており、また、それら後代で改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現していることが示された。

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

5 プラスミド・ベクターPV-GMPQ1972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。

10 (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

PCR 法による検出が可能である (別添資料 10)。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 15 180 粒の本組換えダイズ及び 90 粒の非組換えダイズを用いて確認試験を行った。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズにおいて、改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子の導入によりそれぞれ改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼと改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現し、結果として SDA 及び GLA が産生される。改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子は、胚特異的プロモーターである *7S α '*プロモーター及び *7S α* プロモーターによって制御されているため、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは種子においてのみ発現が認められている。また、その発現量も未熟種子のほうが高く、種子が完熟するにつれて発現量は減少することがわかっている (別添資料 8 の Table 1, p17)。
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¹³

5 2008年に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3, p25)。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。また、この試験に加え、モンサント・カンパニー(米国)の温室において低温ストレス条件の試験及び抗酸化性試験
10 を行った。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育に関する特性を比較するため、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、発芽株数、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))について本組換えダイズと対照の非組換えダイズ間の形態特性及び生育の差異を調査した。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)において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズ間に有意差は認められなかった(別添資料11の表2, p9)。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、
20 (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の間で違いが認められた(別添資料11の表2, p8、図3~5, p9及びp10)。発芽始めは本組換えダイズが7月30日、対照の非組換えダイズが8月1日であった(別添資料11の表2, p8)。
25

30 b 生育初期における低温又は高温耐性

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。

¹³本項目中の以下に続くa~h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

低温ストレス実験 1 (2006 年、別添資料 12)

5 温室において日中 29°C/夜間 21°C で本葉 2 葉期程度まで育成した本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 4 品種を人工気象室へ
10 移し、日中 15°C/夜間 8°C で 20 日間栽培した後、乾燥重、新鮮重、生育段階、主茎長及び草勢¹⁴について調査した(別添資料 12)。その結果、乾燥重、新鮮重、主茎長及び草勢について本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった生育段階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違いは認められなかった(別添資料 12 の Table 2, p5)。

15 本組換えダイズの種子中では、導入遺伝子の発現により、本来ダイズが産生することができない脂肪酸である SDA や GLA が産生されている。これらの導入遺伝子は胚特異的プロモーターにより制御されているため、種子以外の組織において SDA や GLA は産生されないと考えられる。しかしながら、
20 隔離ほ場試験の申請書の審査の際に、これらの組織において SDA や GLA が産生された場合、不飽和脂肪酸の増加に伴い生体膜が変化し低温耐性が増大する可能性が考えられた。そこで、本組換えダイズにおいて低温耐性が高まっていないことをより詳細に調べるために、3 段階の低温条件における本組換えダイズの生育を評価した(別添資料 13)。

低温ストレス実験 2 (2009 年、別添資料 13)

25 本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを温室で播種し、日中 約 30°C/夜間約 20°C で本葉 1 葉期まで生育させた後、適温条件¹⁵ (日中 29°C/夜間 24°C) 及び 3 段階の低温条件 (日中/夜間がそれぞれ、20°C/15°C、15°C/8°C、7°C/2°C) に設定された人工気象室で栽培し、人工気象室に移してから 22 日後 (7°C/2°C については 9 日後) に乾燥重、新鮮重、生育段階、主茎長及び草勢¹⁶を調査した(別添資料 13)。

30 その結果、20°C/15°C 及び 7°C/2°C における乾燥重と、20°C/15°C における主茎長で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が認められた(表 4, p35 及び別添資料 13 の Table 3, p21)。統計処理を行わなかった生育段階については、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で違いは

¹⁴草勢は 1~9 の段階で評価されており、数字が小さくなるほど生育が悪いことを示している。

¹⁵適温条件(29/24 °C)の本組換えダイズについては評価を行っていない。

¹⁶草勢は 1~9 の段階で評価されており、数字が大きくなるほど生育が悪いことを示している。

認められなかった。

乾燥重は、20°C/15°Cにおいて本組換えダイズが 3.0 g、対照の非組換えダイズが 2.6 g であり、7°C/2°Cにおいて本組換えダイズが 0.50 g、対照の非組換えダイズが 0.46 g であり、本組換えダイズの方が重かった(表 4, p35 及び別添資料 13 の Table 3, p21)。

主茎長は、20°C/15°Cにおいて本組換えダイズが 17.5 cm、対照の非組換えダイズが 16.2cm であり、本組換えダイズの方が高かった(表 4, p35 及び別添資料 13 の Table 3, p21)。

10 上述した低温ストレス実験 2 において、乾燥重及び主茎長で見られた差は小さなものであったが、本組換えダイズの低温ストレスに対する耐性が高まっている可能性を否定できるものではないと考えられた。そこで、追加試験として低温ストレス実験 3 を実施した。

15 低温ストレス実験 3 (2010 年、別添資料 14)

本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ及び従来商業品種 4 品種を温室で播種し、日中 約 30°C/夜間約 20°Cで初生葉が展開するまで生育させた後、適温条件 (日中 29°C/夜間 24°C) 及び 3 段階の低温条件 (日中/夜間がそれぞれ、20°C/15°C、15°C/8°C、7°C/2°C) に設定された人工気象室で栽培し、人工気象室に移してから 21 日後に乾燥重、生育段階、主茎長及び草勢¹⁷を調査し、乾燥重、主茎長及び草勢に関して統計処理を行った(別添資料 14)。なお、草勢の統計処理は低温処理前と処理後の草勢の差異に対して行った。

その結果、適温条件では、主茎長及び草勢において本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた(表 5、p36 及び別添資料 14 の Table 2, p9)。適温条件における主茎長の平均値は、本組換えダイズが 35.8 cm、対照の非組換えダイズが 30.3 cm であり、本組換えダイズが高かった。しかしながら、本組換えダイズの平均値は従来商業品種の範囲 (31.1 ~ 104.5 cm) 内に収まっていた。草勢は、処理前において、本組換えダイズが 1.1、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、処理後では本組換えダイズと対照の非組換えダイズとも 1.0 であった。

3 段階の低温条件では、統計処理を行った項目 (乾燥重、主茎長及び草勢)のうち、15°C/8°C及び 7°C/2°Cにおける乾燥重と、20°C/15°C及び 7°C/2°Cにおける草勢で本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた(表 5、p36 及び別添資料 14 の Table 2, p9)。また、統計処理を行

¹⁷草勢は 1~9 の段階で評価されており、数字が大きくなるほど生育が悪いことを示している。

わなかった生育段階については、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間に違いは認められなかった。

5 乾燥重は、15°C/8°Cにおいて本組換えダイズが 0.68 g、対照の非組換えダイズが 0.82 g であり、7°C/2°Cにおいて本組換えダイズが 0.13 g、対照の非組換えダイズが 0.15 g であり、いずれも本組換えダイズが低い値を示した。しかしながら、これらの温度条件における本組換えダイズの平均値はいずれも従来商業品種の範囲(15°C/8°Cで 0.46 ~ 1.00 g、7°C/2°Cで 0.12 ~ 0.17 g) に収まっていた(表 5、p36 及び別添資料 14 の Table 2, p9)。

10 草勢は、20°C/15°Cで処理前において、本組換えダイズが 1.3、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、処理後では本組換えダイズが 3.9、対照の非組換えダイズが 4.1 であった。7°C/2°Cで処理前において、本組換えダイズが 1.2、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、処理後では本組換えダイズと対照の非組換えダイズとも 9.0 (枯死) であった(表 5、p36 及び別添資料 14 の Table 2, p9)。なお、各温度条件における供試個体の草勢の分布を表 6 (p37 及び別添資料 14
15 の Table 3, p10)に示した。

表 4 低温ストレス実験 2 における本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの生育特性 (処理前及び処理後 22 日目の結果) ¹⁸

温度条件	生育特性 ^{2,3}		平均値 ¹	
			本組換えダイズ	対照の非組換えダイズ
29/24 °C ⁴ (適温条件)	乾燥重 (g)	処理後	N.A.	4.45
	新鮮重 (g)	処理後	N.A.	15.42
	生育段階	処理後	N.A.	R2- R3
	主茎長 (cm)	処理後	N.A.	36.8
	草勢	処理前	N.A.	1.0
		処理後	N.A.	2.0
20/15 °C	乾燥重 (g)	処理後	3.0*	2.6
	新鮮重 (g)	処理後	9.7	8.9
	生育段階	処理後	V3-V4	V3-V4
	主茎長 (cm)	処理前	9.4	9.4
		処理後	17.5*	16.2
	草勢	処理前	1.0	1.0
処理後		3.4	3.6	
15/8 °C	乾燥重 (g)	処理後	2.0	2.0
	新鮮重 (g)	処理後	7.3	6.9
	生育段階	処理後	V2-V3	V2-V3
	主茎長 (cm)	処理前	9.4	9.4
		処理後	12.2	11.9
	草勢	処理前	1.0	1.0
処理後		5.0	5.0	
7/2 °C ⁵	乾燥重 (g)	処理後 ⁶	0.5*	0.5
	新鮮重 (g)	処理後	1.9	1.7
	生育段階	処理後	V1 (V1)	V1 (V1)
	主茎長 (cm)	処理前	9.4	9.4
		処理後	9.6 (9.4)	9.3 (9.3)
	草勢	処理前	1.0	1.0
処理後		8.9 (6.4)	8.9 (6.6)	

注) 処理前における主茎長と草勢については本組換えダイズと対照の非組換えダイズの統計分析による比較は行っていない。処理前の主茎長を統計処理における共変量とし、処理後の主茎長を ANOVA を用いて統計処理した。処理後の乾燥重及び新鮮重は、処理前の主茎長との相関関係がなかったため、統計処理に共変量は使用せずに ANOVA を行った。草勢は、処理前と処理後の値の変化を ANOVA によって統計処理した。

*本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められた (p<0.05)。

¹ n=20

² 生育段階: Vn=本葉n葉時期、R2=開花期、R3= 莢伸長初期

³ 草勢は1~9の段階で評価された。1は生育が良く、数字が大きくなるほど生育が悪く、9は枯死している。

⁴ 適温条件(29/24 °C)の本組換えダイズについては評価を行っていない。

⁵ 7/2 °Cにおける生育段階、主茎長及び草勢について、() 内の値は処理後9日後のデータである。

15 ⁶ 7/2 °Cにおける乾燥重の平均値は、本組換えダイズが 0.50g、対照の非組換えダイズが 0.46g であったが、小数点第二位を四捨五入したため、表中ではいずれも 0.5g と表記されている。

表 5 低温ストレス実験 3 における本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ及び従来商業品種の生育特性 (処理前及び処理後 21 日目の結果) ¹⁹

温度条件	生育特性 ^{3,4}	平均値(SE) ¹		従来商業品種の範囲 ²		
		本組換えダイズ	対照の非組換えダイズ	最小値	最大値	
29/24 °C (適温条件)	乾燥重 (g)	処理後	4.26 (0.17)	4.31 (0.13)	3.66	5.08
	生育段階	処理後	R1	R1	V7	R3
	主茎長 (cm)	処理前	7.9 (0.13)	7.5 (0.15)	7.0	7.6
		処理後	35.8 (0.50)*	30.3 (0.93)	31.1	104.5
	草勢*	処理前	1.1 (0.07)	1.0 (0.00)	1.0	1.0
		処理後	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)	1.0	1.0
20/15 °C	乾燥重 (g)	処理後	2.21 (0.12)	2.45 (0.11)	2.25	2.85
	生育段階	処理後	V3-V5	V3-V5	V3	V5
	主茎長 (cm)	処理前	7.7 (0.17)	7.6 (0.14)	7.0	7.3
		処理後	16.3 (0.33)	15.6 (0.37)	13.9	29.4
	草勢*	処理前	1.3 (0.10)	1.0 (0.00)	1.0	1.0
		処理後	3.9 (0.08)	4.1 (0.09)	3.2	5.0
15/8 °C	乾燥重 (g)	処理後	0.68 (0.03)*	0.82 (0.04)	0.46	1.00
	生育段階	処理後	V1	V1	V1	V1
	主茎長 (cm)	処理前	7.8 (0.14)	7.5 (0.15)	6.2	8.0
		処理後	10.1(0.14)	10.0(0.15)	8.5	11.0
	草勢	処理前	1.3 (0.12)	1.0 (0.00)	1.0	1.0
		処理後	6.0(0.05)	6.1(0.09)	5.2	7.5
7/2 °C	乾燥重 (g)	処理後	0.13 (0.01)*	0.15 (0.00)	0.12	0.17
	生育段階	処理後	VC	VC	VC	VC
	主茎長 (cm)	処理前	7.7 (0.16)	7.4 (0.13)	6.8	7.9
		処理後	7.9 (0.19)	7.9 (0.20)	6.1	7.2
	草勢*	処理前	1.2 (0.08)	1.0 (0.00)	1.0	1.0
		処理後	9.0 (dead)	9.0 (dead)	9.0 (dead)	9.0 (dead)

注) 処理前における主茎長と草勢については本組換えダイズと対照の非組換えダイズの統計分析による比較は行っていない。処理前の主茎長を統計処理における共変量とし、処理後の15/8 °C及び7/2 °Cの乾燥重、及び処理後の主茎長をANOVAを用いて統計処理した。処理後の29/24 °C及び20/15 °Cの乾燥重は、処理前の主茎長との相関関係がなかったため、統計処理に共変量は使用せずにANOVAを行った。草勢については、処理前と処理後の値の変化をANOVAによって統計処理した。

*本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められた (p<0.05)。

¹ n=20、SE:標準偏差

10 ²従来商業品種4品種 (AG0604、AG00501、ANAND及びSchillinger 235.T) の平均値の最小値及び最大値

³生育段階: VC=初生葉展開期、Vn=本葉n葉時期、R1=開花始、R3=莢伸長初期

⁴草勢は1~9の段階で評価された。1は生育が良く、数字が大きくなるほど生育が悪く、9は枯死している。

¹⁹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 6 低温ストレス実験 3 における本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの各供試個体の草勢（処理前及び処理後 21 日目の結果）²⁰

温度条件	供試ダイズ (評価の時期)		草勢 (各評価点の個体数) ¹								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
29/24°C (適温条件)	本組換えダイズ	処理前	18	2	—	—	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	20	—	—	—	—	—	—	—	—
	本組換えダイズ	処理前	20	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	20	—	—	—	—	—	—	—	—
20/15°C	本組換えダイズ	処理前	15	5	—	—	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	20	—	—	—	—	—	—	—	—
	本組換えダイズ	処理前	—	—	3	17	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	—	—	1	17	2	—	—	—	—
15/8°C	本組換えダイズ	処理前	16	3	1	—	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	20	—	—	—	—	—	—	—	—
	本組換えダイズ	処理前	—	—	—	—	1	19	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	—	—	—	—	1	17	2	—	—
7/2°C	本組換えダイズ	処理前	17	3	—	—	—	—	—	—	—
	対照の非組換えダイズ	処理後	20	—	—	—	—	—	—	—	—
	本組換えダイズ	処理前	—	—	—	—	—	—	—	—	20
	対照の非組換えダイズ	処理後	—	—	—	—	—	—	—	—	20

- 5 ¹ 草勢は1～9の段階で評価された。1は生育が良く、数字が大きくなるほど生育が悪く、9は枯死している。各評価点の欄に記載されている数値は、その評価点であった供試個体の数を示している。

²⁰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

c 成体の越冬性又は越夏性

5 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。1月20日に冬期における生育状況を確認したが、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11の図6, p11)。

10 d 花粉の稔性及びサイズ

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ともに高い花粉稔性を示しており、その稔性に大きな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11の図7, p12)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

20 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、百粒重において有意差が認められた(別添資料11の表3, p15)。百粒重の平均値は、本組換えダイズが20.33g、対照の非組換えダイズが21.58gであり、本組換えダイズのほうが低かった。

25 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11の表3, p15)。

35 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、発芽勢に多少のバラつきが認められたが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズはいずれも高い発芽率を示し、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11の表3, p15)。

f 交雑率

5 本組換えダイズの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導入遺伝子の
有無を指標とした。

10 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から種子をバル
クで収穫した。種子を収穫した個体は、プロットの内側 2 条で栽培されてお
り、非組換えダイズのプロットと隣接する本組換えダイズのプロットとの間
には 1 m の距離があった (別添資料 11 の図 2, p5)。収穫種子から無作為に選
出した 499 粒について、導入遺伝子の有無を判定する PCR を 1 粒ごとに行っ
た。なお、PCR については導入遺伝子とその導入部分にあたる内在性遺伝子
領域をそれぞれ検出できる Taqman-PCR 法を適用した。

15 上述の PCR に供試した 499 粒のうち、491 粒について分析が行われた。8
粒については、十分な DNA が抽出されていないため、分析ができなかった。
分析が可能であった 491 粒について、導入遺伝子が検出されなかった(別添資
料 11 の表 5, p16)ことから、本調査において交雑は認められないと考えられた。
20 したがって、本調査における交雑率は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%) (Woodworth, 1922; Garber and Odland, 1926;
Cutler, 1934; Weber and Hanson, 1961; Caviness, 1966; Beard and Knowles, 1971;
Ahrent and Caviness, 1994; Abud *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2003) を超えるものでは
ないと考えられた。

g 有害物質の産生性

30 本組換えダイズから土壌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壌微生物相試験、鋤込み試験及び後
作試験を行った。その結果、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽株数
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
についても違いは見られなかった (別添資料 11 の表 6~表 8, p18)。

35

h 抗酸化性

本組換えダイズの種子中では、導入遺伝子である改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼにより、本来ダイズが産生することができない脂肪酸である SDA 及び GLA が産生されている。これらの導入遺伝子は胚特異的プロモーターにより制御されているため、種子以外の組織において SDA や GLA は産生されないと考えられる。しかし、隔離ほ場試験の申請書の審査の際に、これらの組織において SDA や GLA が産生された場合、不飽和脂肪酸の増加に伴い生体膜が変化し植物体の抗酸化性が増大する可能性が指摘された。そこで、本組換えダイズの抗酸化性が高まっているかを確認するために、モンサント・カンパニー（米国）の人工気象室で、酸化ストレスを引き起こすことが知られている除草剤パラコート（30、70、200 g active ingredient (a. i.)/ha）で幼植物に散布した（別添資料 15）。それぞれの群について散布から 3 日後及び 7 日後に葉の損傷の程度を観察した結果、いずれの散布濃度においても本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的な有意差は見られなかった（別添資料 15 の Table 2, p17）。

なお、本試験では、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを温室で播種し、日中 30℃/夜間 20℃で本葉 3 葉期から 4 葉期まで生育させた後、除草剤パラコートの散布を行った。

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

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。

(2) 使用等の方法

—

(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

本組換えダイズの諸外国における申請状況は以下のとおりである。

- 15 表 7 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

【社外秘につき非開示】

25

30

35

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 8 本組換えダイズのわが国における申請及び認可状況

5

【社外秘につき非開示】

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²¹

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ほ場の外で発見さ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、抗酸化性 (第一の 2-(6)-②-a~e 及び h, p31~40) を調査した結果、種子の生産量における百粒重と低温ストレス実験 2 及び 3 における乾燥重、主茎長及び草勢で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。また、統計処理を行わなかった項目については、形態及び生育の特性の発芽始めにおいて、本組換えダイズと対照の非組
20 換えダイズとの間に違いが認められた。

25 百粒重は、本組換えダイズが 20.33 g、対照の非組換えダイズが 21.58 g であり、本組換えダイズのほうが低かった(第一の 2-(6)-②-e, p38)。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) (De Bruin and Pedersen, 2009; Csanadi *et al.*, 2001) であった。

30 低温ストレス実験 2 の結果、20°C/15°C及び7°C/2°Cにおける乾燥重と、20°C/15°Cにおける主茎長で統計学的な有意差が認められた (第一の 2-(6)-②-b, p32)。乾燥重は、20°C/15°Cにおいて本組換えダイズが 3.0 g、対照の非組換えダイズが 2.6 g であり、7°C/2°Cにおいて本組換えダイズが 0.50 g、対照の非組換えダイズが 0.46 g であった。主茎長は、20°C/15°Cにおいて本組換えダイズが 17.5 cm、対照の非組換えダイズが 16.2cm であった(第一の 2-(6)-②-b、

²¹本項目中で、第一の 2-(6)-②の a~h 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

p32)。上記の項目で、本組換えダイズは対照の非組換えダイズと比較して草丈が高く、乾燥重が重かった。これらの差は小さなものであるが、本組換えダイズの低温ストレスに対する耐性が高まっている可能性を否定できるものではないと考えられた。

5

そこで、追加試験として低温ストレス実験 3 を実施した(第一の 2-(6)-②-b、p33)。低温ストレス実験 3 における低温ストレスの開始時期は初生葉展開直後であり、低温ストレス実験 2 における低温ストレスの開始時期 (本葉 1 葉期)と比較して、子葉における SDA や GLA の濃度がより高いと考えられた。また、低温ストレス実験 2 では供試していなかった従来商業品種も評価することで、本組換えダイズの低温ストレス耐性が従来商業品種の範囲内であるかどうかとも検討した。

低温ストレス実験 3 の結果、適温条件においては主茎長及び草勢において本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた(第一の 2-(6)-②-b、p33)。適温条件における主茎長の平均値は、本組換えダイズが 35.8 cm、対照の非組換えダイズが 30.3 cm であり、本組換えダイズが高かった。しかしながら、本組換えダイズの平均値は従来商業品種の範囲 (31.1 ~ 104.5 cm) 内に収まっていた。さらに、本隔離ほ場試験での主茎長において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差は見られなかった(第一の 2-(6)-②-a、p31)。このことから、低温ストレス実験の適温条件において見られた主茎長の差は、導入遺伝子によるものではないと考えられた。また、適温条件における草勢は、処理前において、本組換えダイズが 1.1、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、処理後では本組換えダイズと対照の非組換えダイズとも 1.0 であった(第一の 2-(6)-②-b、p33)。しかしながら、これらの数字は草勢が極めて良いことを示しており、認められた差は小さなものであった。さらに、低温ストレス実験 1 における草勢で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が見られなかった(第一の 2-(6)-②-b、p32)。したがって、低温ストレス実験 3 の草勢において見られた差異は導入遺伝子によるものではないと考えられた。

また、低温ストレス実験 3 における 3 段階の低温条件では、15°C/8°C 及び 7°C/2°C における乾燥重と 20°C/15°C 及び 7°C/2°C における草勢で本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた(第一の 2-(6)-②-b、p33)。

乾燥重は、15°C/8°C において本組換えダイズが 0.68 g、対照の非組換えダイズが 0.82 g であり、7°C/2°C において本組換えダイズが 0.13 g、対照の非組換えダイズが 0.15 g であり、いずれも本組換えダイズが低い値を示した(第一の

2-(6)-②-b, p34)。しかしながら、これらの温度条件における本組換えダイズの本組換えダイズの平均値は、いずれも供試された従来商業品種の範囲(15°C/8°Cで 0.46 ~ 1.00 g、7°C/2°Cで 0.12 ~ 0.17 g) に収まっていた。

5 草勢は、20°C/15°Cで処理前において、本組換えダイズが 1.3、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、処理後では本組換えダイズが 3.9、対照の非組換えダイズが 4.1 であった(第一の 2-(6)-②-b, p34)。しかしながら、20°C/15°Cにおける本組換えダイズの草勢は従来商業品種の範囲内に収まっていた。7°C/2°Cで処理前において、本組換えダイズが 1.2、対照の非組換えダイズが 1.0 であり、
10 処理後では本組換えダイズと対照の非組換えダイズとも 9.0 で枯死していたため、この低温条件における本組換えダイズの低温ストレス耐性は高まっていな
いと考えられた。

したがって、低温ストレス実験 3 の結果から、本組換えダイズの低温ストレスに対する耐性は従来ダイズ品種と同程度であると判断された。

15 以上をまとめると、低温ストレス実験 1 では本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間
に有意差は認められず、また、低温ストレス実験 2 及び 3 では一部の項目において有意差が認められたが、それらの差には一貫性がなかった。したがって、本組換えダイズが低温耐性を有することを示唆するよう
な結果は認められなかった。

20

発芽始めについては、本組換えダイズは 7 月 30 日、対照の非組換えダイズは 8 月 1 日であった(第一の 2-(6)-②-a, p31)。しかしながら、その違いの程度は小さかった。また、発芽個体数及び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の間
25 に有意差は見られなかった。したがって、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽特性に違いはないと判断された。

以上のことから、競合における優位性に関わる諸形質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ないと結論された。

30

改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子を胚特異的プロモーターを用いて発現させることにより、本組換えダイズの種子中では本来ダイズが産生することができない脂肪酸である SDA 及び GLA が産生されており、種子中に蓄積している。

35

一般的にダイズ種子中で産生された脂肪酸は、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

ることから (Liu and Brown, 1996; Taiz and Zeiger, 1998)、本組換えダイズ種子中の SDA 及び GLA も同様の役割を果たしていると考えられた。実際に本組換えダイズの種子中に蓄積された SDA 及び GLA の含有量を経時的に調査したところ、SDA 及び GLA の含有量は発芽に伴って減少し、これらの脂肪酸がダイズの内在性脂肪酸と同様にエネルギー代謝に利用されていることが示された (第一の 2-(1)-ロ-③, p19)。また、本組換えダイズの隔離ほ場試験の結果において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽特性に違いはないと判断された。

このことから、本組換えダイズ種子中で産生された SDA 及び GLA は内在性脂肪酸と同様の生物学的役割を果たしていると考えられた。よって、本組換えダイズにおいて産生される SDA や GLA は、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る。

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。

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

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

報告されていない。

5 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、後作試験（第一の 2-(6)-②-g、p39）により比較検討したが、差異は認められなかった。

10 本組換えダイズにおいて改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現しているが、当該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている（第一の 2-(1)-ロ-②, p16~17）。また、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは基質特異性が高いため（第一の 2-(1)-ロ-③, p17）、これらのデサチュラーゼが宿主の他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。さらに、これまでに SDA や GLA が有害物質であるとする報告はない。

15 本組換えダイズがダイズ種子を食害する野生生物に摂食された場合、本組換えダイズの種子に含まれる SDA や GLA が野生生物に影響を与える可能性が考えられた。そこで、この可能性について検討するため、日本のダイズ畑においてダイズ種子を食害する野生生物を調べ、これらの生物が SDA や GLA に影響を受けるかどうかについて考察した。

日本のダイズ畑においてダイズ種子を食害する野生生物の代表例として、表 9 (p49) に挙げたような昆虫、鳥類、哺乳類が考えられた（農林水産技術会議事務局, 2002）。

25 表 9 で挙げた昆虫、鳥類、哺乳類が SDA や GLA の影響を受けるかどうかを考察するために、SDA や GLA が昆虫、鳥類、哺乳類において代謝されるかどうかを調べた。

30 まず、昆虫、鳥類、哺乳類が、SDA や GLA のような炭素数 18 の多価不飽和脂肪酸を、EPA やアラキドン酸のような炭素数 20 の多価不飽和脂肪酸に変換できるかについて調べた。

35 哺乳類では、ヒト、イヌ、ラットが SDA を EPA に代謝できることが報告されており（James *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2007; Hammond *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Kitessa and Young, 2009）、哺乳類において GLA はリノール酸がアラキドン酸に変換される過程での中間体であることが報告されている（Fan and Chapkin, 1998）。

また、鳥類では、家禽 において EPA やアラキドン酸が産生されることが報告されている(Cook, 1991; Watkins, 1991; 1995)。

昆虫では、シロヘリカメムシ (学名 *Aelia rostrata*、カメムシ目) やハチノスツヅリガ (学名 *Galleria mellonella*、チョウ目)、キタアメリカホタル (学名 *Photinus pyralis*、コウチュウ目) において、食餌には存在しないと考えられる EPA やアラキドン酸がこれらの昆虫において検出されたことが報告されており(Cakmak *et al.*, 2007; Stanley-Samuelson *et al.* 1987; Aliza *et al.*, 2001)、これらは炭素数 18 の多価不飽和脂肪酸が不飽和化や伸長反応により変換されたものであると考えられる。

したがって、多くの昆虫、鳥類、哺乳類が、SDA や GLA のような炭素数 18 の多価不飽和脂肪酸を、EPA やアラキドン酸 のような炭素数 20 の多価不飽和脂肪酸に変換できると考えられた。

次に、SDA や GLA、そしてこれらの代謝産物である EPA やアラキドン酸が昆虫、鳥類、哺乳類において分解されるかを考察した。多価不飽和脂肪酸は昆虫、鳥類、哺乳類において β 酸化により分解されることが報告されている(Downer, 1985; Gilbert, 1967; Joanisse and Storey, 1996; Jurenka *et al.*, 1988; Sanz, 2000; Stanley-Samuelson *et al.*, 1987; Watkins, 1991)。したがって、昆虫、鳥類、哺乳類は多価不飽和脂肪酸である SDA、GLA、EPA やアラキドン酸を、ALA やリノール酸のような多価不飽和脂肪酸と同様に β 酸化すると考えられる。

表 9 に挙げたそれぞれの野生生物が SDA や GLA を代謝できるかについては報告がない。しかしながら、昆虫、鳥類、哺乳類において SDA 及び GLA が代謝されることが考えられ、このことから、表 9 にあげた野性生物も、昆虫、鳥類、哺乳類と同様に SDA や GLA を代謝できると考えられる。

したがって、本組換えダイズがダイズ種子を食害する野生生物に摂食された場合、本組換えダイズの種子に含まれる SDA や GLA は野生生物において代謝されると考えられるため、本組換えダイズの種子に含まれる SDA や GLA はこれらの野生生物に影響を与えるものではないと結論された。

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。

表 9 わが国においてダイズ種子を食害する野生生物の代表例^{1 22}

1. 昆虫
イチモンジカメムシ (カメムシ目、学名： <i>Piezodorus hybneri</i>) ホソヘリカメムシ (カメムシ目、学名： <i>Riptortus clavatus</i>) シロイチモジマダラメイガ (チョウ目、学名： <i>Etiella zinckenella</i> Treitschke) ヒメイチモジマダラメイガ (チョウ目、学名： <i>Etiella behrii</i>) マメシンクイガ (チョウ目、学名： <i>Leguminivora glycinivorella</i>) マメヒメサヤムシガ (チョウ目、学名： <i>Matsumurases phaseoli</i>) ダイズサヤムシガ (チョウ目、学名： <i>Matsumurases falcana</i>) ダイズサヤタマバエ (ハエ目、学名： <i>Asphondylia</i> sp.) タネバエ (ハエ目、学名： <i>Delia platura</i>)
2. 鳥類
ドバト (学名： <i>Columba livia</i>) キジバト (学名： <i>Streptopelia orientalis</i>) カラス (学名： <i>Corvus corone</i> (ハシボソガラス), <i>Corvus macrorhynchos</i> (ハシブトガラス)) キジ (学名： <i>Phasianus versicolor</i>)
3. 哺乳類
イノシシ (学名： <i>Sus scrofa</i>) サル (学名： <i>Macaca fuscata</i>)

¹ 農林水産技術会議事務局 (2002) をもとに作成した。

(2) 影響の具体的内容の評価

5

—

(3) 影響の生じやすさの評価

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。

15

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

²² 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

第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~9) 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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

ダイズとその近縁野生種であるツルマメとの間では低い確率で交雑が生じ、雑種が形成される(OECD, 2000)。したがって、本組換えダイズに関しても、ツルマメが交雑し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改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子がツルマメの集団中に浸透する可能性も否定できない。

10

(3) 影響の生じやすさの評価

15

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。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)。

20

25

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 5 cm 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数は 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する試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結

30

35

果、ダイズとツルマメを 5cm 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数は、2006 年の試験では 44,348 粒中 0 粒であり、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験よりより長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であった。一方で、2 m から 10 m 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数は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒であり、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、6 m 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)。

5

10

よって、一般的にダイズとツルマメ集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合う場合は交雑し得るが、そのような特殊な条件の場合でも、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられた。

15

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, p39)、本調査における交雑率は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%) (Woodworth, 1922; Garber and Odland, 1926; Cutler, 1934; Weber and Hanson, 1961; Caviness, 1966; Beard and Knowles, 1971; Ahrent and Caviness, 1994; Abud *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2003) を超えるものではないと考えられた。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場合、花粉形態及び花粉稔性(第一の 2-(6)-②-d, p38) 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, p38)において百粒重を除く項目(稔実莢数、一株当たりの粗粒重、一株当たりの精粒重)で有意差は認められなかった。さらに、統計学的有意差が認められた百粒重について、本組換えダイズの平均値は、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) (De Bruin and Pedersen, 2009; Csanadi *et al.*, 2001) であった。

20

25

30

したがって、本組換えダイズとツルマメとの交雑性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。

35

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改変 *Pj.D6D* 遺伝子や改変 *Nc.Fad3* 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、ツルマメと交雑を繰り返す必要がある。

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、経時的な調査も含め、研究が行われている。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型が探索されている。その結果、調査した 58 地点(秋田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点)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、これらの中間体は全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となった (Kuroda *et al.*, 2010)。

10 しかし、これら発見された中間体と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 地点を除いて翌年には中間体は確認されなかった。佐賀県の 1 地点では、翌年に 1 個体の雑種後代を確認したものの、翌々年は確認されなかった(Kuroda *et al.*, 2010)。

15 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」と述べている。

25 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の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。

30 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 (Oka,1983; Chen and Nelson, 2004)。

35 Kuroda は 2003 年 - 2006 年に行った中間体の調査の結果、雑種後代は速やかに自然環境から消失していたと報告している。さらに、従来ダイズ由来の遺伝子のツルマメ集団中への浸透が確認されなかった理由として、1) 硬実種

子の割合が少ないため冬季に吸水した結果、種子が腐るあるいは発芽しても寒さにより枯死する、2) 種子が越冬しても発芽後に他の植物との競合に勝てず、淘汰されたこと、の2つを挙げている(Kuroda *et al.*, 2010)。

5 以上の文献報告より、仮に交雑が起こって雑種ができたとしてもその雑種及びその雑種後代は、ダイズの遺伝子がある割合で有すことにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されることが考えられる。したがって、雑種及びその雑種後代がツルマメとの交雑を繰り返すことにより、ツルマメにダイズの遺伝子が浸透する可能性は極めて低いと考察された。

10 本組換えダイズにおいて、競合における優位性に関わる形質に違いは認められなかった。また、本組換えダイズの種子で産生される SDA や GLA によって生体膜が変化し低温耐性が増大する可能性が考えられたが、低温ストレス試験の結果、本組換えダイズの低温耐性は従来ダイズと変わるものではないと判断された(第二の 1-(1)、p45)。このことから、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしても、従来ダイズとツルマメとの交雑以上に低温耐性が付与されるものではないと考えられた。したがって、仮に本組換えダイズがツルマメと交雑したとしてもその雑種や後代が自然環境への適応においてツルマメと比べ不利となる点に違いはないと考えられる。よって、雑種及びその雑種後代がツルマメとの交雑を繰り返すことにより、ツルマメに本組換えダイズの遺伝子が浸透する可能性は、従来ダイズと同様に極めて低いと考察された。

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やその後代がツルマメとの交雑を繰り返すことにより、ツルマメに本組換えダイズの遺伝子が浸透する可能性は極めて低い、と考察される。また、わが国で本組換えダイズの種子販売は予定していない。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。

30 (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

5 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、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、抗酸化性（第一の 2-(6)-②
10 -a~h、p31~p40)) を比較検討した結果、統計処理を行った項目では、百粒重及び低温ストレス条件の試験において統計学的有意差が認められた。また、統計処理を行わなかった項目では発芽始めにおいて違いが認められた。

15 検討の結果、百粒重において見られた差の程度は小さく、本組換えダイズの百粒重の平均値は従来ダイズの百粒重の範囲内であったことから、百粒重において見られた差によって本組換えダイズの競合における優位性が高まるとは考えにくいと判断された。低温ストレス実験で、3 回の実験のうち、低温ストレス実験 2 及び 3 において、乾燥重、主茎長及び草勢の一部で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。しかしながら、低温ストレス実験 1 では本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間
20 有意差は認められず、また、低温ストレス実験 2 及び 3 では上述した一部の項目において有意差が認められたが、それらの差には一貫性がなかった。したがって、本組換えダイズが低温耐性を有することを示唆するような結果は認められなかった。発芽始めにおいても、認められた違いの程度は小さく、発芽個体数
25 及び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の間有意差は見られなかったことから、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽特性に違いはないと判断された。以上のことから、競合における優位性に関わる諸形質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ないと結論された

30 本組換えダイズでは導入された改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子から発現する $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び $\Delta 15$ デサチュラーゼによって SDA 及び GLA が産生されるが、これらの脂肪酸に競合における優位性を高めるような生物学的意味のある機能を持つという報告は無く、内在性の脂肪酸と同様のエネルギー源としての生物学的役割を持つと考えられる。また、本組換えダイズ
35 の隔離ほ場試験の結果において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽特性に違いはないと判断された。よって、本組換えダイズにおいて

産生される SDA や GLA は、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る。

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

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壤微生物相試験、鋤込み試験、後作試験（第一の 2-(6)-②-g、p39）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 本組換えダイズにおいて改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現しているが、当該蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。また、改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは基質特異性が高いため、これらデサチュラーゼが宿主の他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。さらに、SDA や GLA
15 が有害物質であるとする報告はない。

また、本組換えダイズがダイズ種子を食害する野生生物に摂食された場合においても、本組換えダイズの種子に含まれる SDA や GLA は野生生物の体内で代謝されると考えられるため、本組換えダイズの種子に含まれる SDA や
20 GLA はこれらの野生生物に影響を与えるものではないと結論された。

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。

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
25 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。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間での自然交雑率（第一の 2-(6)-②-f、p39）を調査した結果、従来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
30 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。また、本組換えダイズの種子で産生される SDA や GLA によって生体膜が変化し低温耐性が増大する可能性が考えられたが、低温ストレス試験の結果、本組換えダイズの低温耐性は従来ダイズと変わるものではないと判断された。このことから、本組換えダイズとツルマメが交雑したとしても、従来ダイズとツルマメとの交
35 雑以上に低温耐性が付与されるものではないと考えられた。したがって、仮に交雑したとしてもその雑種やその後代がツルマメとの交雑を繰り返すことに

より、ツルマメに本組換えダイズの遺伝子が浸透する可能性は極めて低い、と考察された。

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。

5

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生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

- Abel, G.H. (1970) Storage of Soybean Pollen for Artificial Crossing. *Agronomy Journal*. 62:121-123.
- 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. *Am. Bee J.* 118:555-560.
- 10
- Abud, S., P.I. MMello de Souza, C.T. Moreira, S.R.M. Andrade, A.V. Ulbrich, G.R. Vianna, E.L. Rech, and F.J. Lima Aragao. (2003) Pollen dispersal in transgenic soybean plans in the Cerrado region. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia* 38:1229-1235.
- 15
- Aliza, A.R.N, J.C. Bedick, R.L. Rana, H. Tunaz, W.W. Hoback, and D.W. Stanley. (2001) Arachidonic and eicosapentaenoic acids in tissues of the firefly, *Photinus pyralis* (Insecta: Coleoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology* 128(2):251-257.
- 20
- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. (1994) Natural cross pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
- Anderson, W.P. (1996) Weed science principles and applications, 3rd ed. West Publishing Company, St. Paul, MN. p. 27-37.
- 25
- Baker, H.G. 1974. The Evolution of Weeds. *Ann Rev Ecol Sys* 5:1-24.
- 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.
- 30
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgette and W.C. Stallings. (1997) Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. United States Patent #5,633,435.
- 35
- Beard, B.H. and P.F. Knowles. (1971) Frequency of crosspollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Sci.* 11: 489-492.

- Cakmak, O., M. Bashan, and A. Satar (2007) Total lipid and fatty acid composition of *Lertha sheppardi* (Neuroptera: Nempteridae) during its main life stages. *Biologia* 62:774-780.
- 5
- Caviness, C.E. (1966) Estimates of natural cross pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
- Chardigny, J.M., Sébédio J.L. and Berdeaux, O. (1996) Trans polyunsaturated fatty acids: occurrence and nutritional implications. *Advances in Applied Lipid Research* 2: 1-33
- 10
- 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.
- 15
- Chen, Y. and R.L. Nelson. (2004) Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. *Crop Sci.* 44:316-325.
- Cook, H.W. (1991) Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. pp. 141-169. *In* D.E. Vance and J.E. Vance (ed.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* Elsevier Science Publishers, B. V. Amsterdam.
- 20
- 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-biphosphate carboxylase. *Embo. J.* 3: 1671-1679.
- 25
- Cruden R (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in plants. *Evolution* 31:32-46.
- 30
- Csanadi, 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
- Cutler, G.H. (1934) A simple method for making soybean hybrids. *Agron. J.* 26:252-254
- 35
- De Bruin, J.L. and P. Pedersen (2009) Growth, yield, and yield component changes among old and new soybean cultivars. *Agron. J.* 101:124-130.

- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. (1982) Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 561-573.
- 5
- Downer, R.G.H. (1985) Lipid metabolism. p. 77-113. In G.A. Kerkut and L.I. Gilbert (ed.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol 10. Pergamon Press, Oxford.
- 10
- 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. *J Biol Chem* 261(20): 9228-9238.
- 15
- Fan, Y.Y., and R.S. Chapkin. (1998) Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition. *J. Nutr.* 128:1411-1414
- FAO, FAOSTAT
<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- 20
- FARRP (Food Allergy Research and Resource Program Database). (2009) www.allergenonline.com. University of Nebraska
- Fernández-Moya, V., E. Martínez-Force and R. Garcés. (2000) Metabolism of triacylglycerol species during seed germination in fatty acid sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *J. Agric. Food Chem.* 48: 770-774.
- 25
- Fling, M., J. Kopf and C. Richards. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an amonoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res.* 13: 7095-7106.
- 30
- Fujita, R., M. Ohara, O. Okazaki and Y. Shimamoto. (1997) The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *J. Hered.* 88: 124-128.
- 35
- Garber, R.J. and T.E. Odland. (1926) Natural crossing in soybeans. *Am. Soc. Agron. J.* 18: 967-970

- Giza, P.E. and R.C. Huang. (1989) A self-including runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 5 Gilbert, L.I. (1967) Lipid metabolism and function in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4:69-211.
- Graphic Maps.
<http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm>
- 10 Hammond, B. G., Lemen, J. K., Ahmed, G., Miller, K. D., Kirkpatrick, J., and Fleeman, T. (2008) Safety assessment of SDA soybean oil: results of a 28-day gavage study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 52:311-323.
- 15 Harris, W.S.; DiRienzo, M.A.; Sands, S.A.; George, C.; Jones, P.G.; Eapen, A.K. (2007) Stearidonic acid increases the red blood cell and heart eicosapentaenoic acid content in dogs. *Lipids* 42(4):325-333.
- 20 Harris, W.S., S.L. Lemke, S.N. Hansen, D.A. Goldstein, M.A. DiRienzo, H. Su, M.A. Nemeth, M.L. Taylor, G. Ahmed, and C. George. (2008). Stearidonic acid-enriched soybean oil increased the omega-3 index, an emerging cardiovascular risk marker. *Lipids* 43:805-811.
- 25 Herrmann, K.M. 1995. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 30 James, M.J., V.M. Ursin, and L.G. Cleland (2003) Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *Am. J. Clin Nutr* 77:1140-1145.
- Joanisse, D.R. and K.B. Storey (1996) Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiological Zoology* 69(5):1079-1095.
- 35 Jurenka, R.A., D.W. Stanley-Samuelson, W. Loher, and G.J. Blomquist (1988) *De novo* biosynthesis of arachidonic acid and 5,11,14-eicosatrienoic acid in the cricket *Teleogryllus commodus*. *Biochim. Biophys. Acta* 963:21-27.

- Kemp, J.D., R.F. Barker and M.J. Adang. (2000) Octopine T-DNA structural genes. United States Patent No. 6090627.
- 5 Kiang, Y.T., Y.C. Chang and N. Kaizuma. (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan. *J. Hered.* 83: 325-329.
- Kitessa, S.M. and Young, P (2009) Echium oil is better than rapeseed oil in enriching poultry meat with n-3 polyunsaturated fatty acids, including eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *British Journal of Nutrition*, 101, 709-715
- 10 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210: 437-442.
- 15 Koti, S., K.R. Reddy, V.G. Kakani, D. Zhao and V. R. Reddy. (2004) Soybean (*Glycine max*) pollen germination characteristics, flower and pollen morphology in response to enhanced ultraviolet-B radiation. *Annals of Botany* 94: 855-864.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. (2008) Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Sci.* 48:1071-1079.
- 20 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.
- 25 Lammi, J.J.. Online-Photoperiod Calculator
<http://tornio.info/sun.php3>
- Liu, K. and E.A. Brown. (1996) Fatty acid compositions in newly differentiated tissues of soybean seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1395-1398.
- 30 Mizuguti, A., Yoshimura, Y. and Matsuo, K. (2009) Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96
- 35 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.

- OECD. (2000) *Consensus document on the biology of Glycine max (L.) Merr. (soybeans)*. In: OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15.
- 5 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
- 10 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichhlotz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. (1996) *New weed control opportunities: Development of soybeans with Roundup ReadyTM gene*. In: *Herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects*. Ed. S.O. Duke. CRC Press, New York.
- 15 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
- Palmer, R.G. (2000) Genetics of four male-sterile, female-fertile soybean mutants. *Crop Sci.* 40:78–83.
- 20 Perkins, D.D. and R.H. Davis. (2000) Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Appl Environ Microbiol.* 66(12): 5107-5109.
- 25 Prokof'ev, A.A. and G. V. Novitskaya. (1958) Lipase of oil-bearing plants. *Inst. Plant Fiziol., Acad. Sci. U.S.S.R.* 23: 612-15.
- Radosevich, S., J. Holt, and C. Ghersa. 1997. Weed demography and population dynamics. *Weed ecology: implications for management*.
- 30 Ray, J.D., T.C. Kilen, A.C. Abel, and R.L. Paris. (2003) Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ. Biosafety Res.* 2:133-138.
- Rogers, S.G. (2000) Promoter for transgenic plants. United States Patent No. 6,018,100.
- 35 Sanz, M., C.J. Lopez-Bote, D. Menoyo, and J.M. Bautista. (2000) Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and β -oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *J. Nutri* 130:3034-3037.

- Schapaugh, W.T. (1997) Selection of Soybean Varieties. *Soybean Production Handbook. Kansas State University Cooperative Extension Service, Manhattan, KS:* 4-8
- 5
- 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. Genetics.* 181: 8-12.
- 10
- Stanley-Samuelson, D.W., R.A. Jurenka, W. Loher, and G.J. Blomquist. (1987) Metabolism of polyunsaturated fatty acids by larvae of the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 6:141-149.
- 15
- Stewart Jr., C.; Halfill, M.; Warwick, S. (2003) Transgenic introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics* 4: 806-817.
- 20
- Stryer, L. (1995) Biochemistry 4th ed. W.H. Freeman and Company, New York, p608-611.
- Sutcliffe, J.G. (1978) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plamid pBR322. *Symposia on Quantitative Biology.* 43: 77-103.
- Taiz, L. and E. Zeiger. (1998) *Respiration and Lipid Metabolism.* Pp 317-321. In Plant physiology. 2nd edn. Sinauer Associates, Inc. MA.
- 25
- United Soybean Board.
<http://www.plantsci.missouri.edu/soydoc/adapt.htm>
- 30
- Ursin, V., T. Voelker and B. Froman. (2003) Fatty Acid Desaturase from Fungi. WO03099216A2
- Ursin, V., B. Froman, J., Gonzales, S. Screen, D. Fenggao and T. La Rosa. (2005) Fatty Acid Desaturases from Primula. WO05021761A1
- 35
- Wang, Q. and P. Dubois. (2004) Seed specific 7S.alpha. promoter for expressing genes in plants. United States Patent No. 6,825,398.

- Wang, Chenchen, W.S. Harris, M. Chung, A.H. Lichtenstein, E.M. Balk, B. Kupelnick, H.S. Jordan and J. Lau. (2006) n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 84(1): 5-17.
- 5
- Watkins, B.A. (1991) Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *J. Nutr.* 121:1475-1485.
- Watkins, B.A. (1995) Biochemical and physiological aspects of polyunsaturates. *Poultry and Avian Biology Reviews* 6 (1):1-18.
- 10
- Weber, C.R. and W.D. Hanson. (1961) Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. *Crop Sci.* 1: 389-392.
- 15
- Woodworth, C.M. 1922. The extent of natural cross-pollination in soybeans. *Agronomy J.* 14:278-283.
- Yoshimura Y., K. Matsuo, and K. Yasuda. (2006) Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 5: 169-173.
- 20
- 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
- 25
- 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, 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
- 30
- 加賀 秋人 (2008) 栽培植物と野生種との交雑・遺伝子浸透の実態と野生化の評価—ダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関する研究—第23回 日本雑草学会シンポジウム 講演要旨
- 35
- 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, 農山魚村文化協会, 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
- 5 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 作物編 6*, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京
- 財務省 「財務省貿易統計」
<http://www.customs.go.jp/toukei/suii/html/time.htm>
- 10 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
- 15 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
- 20 農林水産省 「平成 19 年度食料自給表」
<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fbs-fy19d.pdf>
- 農林水産技術会議事務局 (2002) *大豆 -自給率向上に向けた技術開発-* 農林水産研究文献解題 No. 27
- 25 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 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
- 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

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.

緊急措置計画書

平成 22 年 6 月 21 日

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

第一種使用規程の承認を申請しているステアリドン酸産生ダイズ (改変 *Pj.D6D*, 改変 *Nc.Fad3*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87769, OECD UI: MON-87769-7) (以下「本組換え体」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的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。

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 6 月現在

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

*: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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が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。

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

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。

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。

ステアリドン酸産生ダイズ(改変 *Pj.D6D*, 改変 *Nc.Fad3*, *Glycine max* (L.) Merr.)
(MON87769, OECD UI: MON-87769-7)の別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えダイズの作出に用いられた改変 *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子から推定した改変 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼのアミノ酸配列(社外秘)
- 別添資料 2 Functional Characterization of NcD15 and PjD6 Desaturases (PAR-07-309)(社外秘)
- 別添資料 3 Fatty Acid Analyses of Germinating Cotyledons of Stearidonic Acid-Containing Soybean MON 87769 (MSL0021821) (社外秘)
- 別添資料 4 Sequence of the Genetic Elements in Plasmid Vector PV-GMPQ1972(社外秘)
- 別添資料 5 Summary of PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium* containing PV-GMPQ1972(社外秘)
- 別添資料 6 Heritability and Stability of Genes Present in MON 87769 from an F₂ to F₄ Generation(RPN-08-177) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended Report for MSL0021074: Molecular Analysis of Stearidonic Acid Producing Soybean MON 87769 (MSL0021926) (社外秘)
- 別添資料 8 Assessment of Delta 6 and Delta 15 Desaturase Protein Levels in Tissues from MON 87769 Soybeans in Support of a Japan Stage III Application (MSL 0020845) (社外秘)
- 別添資料 9 Western Blot Analysis of PjD6D and NcD15D Proteins in Immature Seed of Soybean MON 87769 across Multiple Generations(MSL0021711) (社外秘)
- 別添資料 10 SDA Soybean GM_A38136 Zygosity EndPoint TaqMan[®] PCR for Single Seeds(社外秘)
- 別添資料 11 ステアリドン酸産生ダイズ(改変 *Pj.D6D*, 改変 *Nc.Fad3*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON87769, OECD UI: MON-87769-7)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)
- 別添資料 12 An Assessment of the Effect of Sub-Optimal Temperature on SDA Soybean MON 87769 under Growth Chamber Conditions in 2006(Study # 06-01-83-21) (社外秘)
- 別添資料 13 An Assessment of the Effect of Cold Stress of SDA Soybean MON 87769 Under Growth Chamber Conditions(MSL0023334) (社外秘)
- 別添資料 14 Assessment of Cold Temperature Stress on Growth of SDA Soybean MON 87769 Under Growth Chamber Conditions in 2010 (PLC-2010-0639) (社外秘)
- 別添資料 15 An Evaluation of the Photo-Oxidative Stress Tolerance of Soybean MON 87769 when Treated with Varying Concentrations of a Commercial Formulation of Paraquat Herbicide(MSL0021835)(社外秘)