

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat4601*,
gm-hra, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI :
DP-356043-5) の生物多様性影響評価書の概要

目次

| | |
|--|----|
| 第一種使用規程承認申請書..... | 1 |
| 第一 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 |
| (2) 使用等の歴史及び現状..... | 3 |
| (3) 生理学的及び生態学的特性..... | 4 |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報..... | 6 |
| (1) 供与核酸に関する情報..... | 6 |
| (2) ベクターに関する情報..... | 15 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... | 15 |
| (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 .. | 18 |
| (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 | 22 |
| (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 .. | 23 |
| 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報..... | 29 |
| (1) 使用等の内容 .. | 29 |
| (2) 使用等の方法 .. | 29 |
| (3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の 方法..... | 29 |
| (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 .. | 29 |
| (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..... | 29 |
| (6) 国外における使用等に関する情報 .. | 30 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .. | 31 |
| 1 競合における優位性..... | 31 |
| 2 有害物質の産生性 .. | 32 |
| 3 交雑性 .. | 33 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価 .. | 36 |
| 参考文献 .. | 38 |
| 別紙一覧 .. | 38 |
| 緊急措置計画書(食用、飼料用に供する場合)..... | 39 |
| 緊急措置計画書 (栽培目的の場合)..... | 41 |

第一種使用規程承認申請書

平成19年2月16日

農林水産大臣 松岡 利勝 殿
環境大臣 若林 正俊 殿

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

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

| | |
|-------------------------|--|
| 遺伝子組換え生物等の 種類の名称 | 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐 性ダイズ (<i>gat4601, gm-hra, Glycine max</i> (L.) Merr.) (DP-356Ø43-5、OECD UI : DP-356Ø43-5) |
| 遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容 | 食用また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 | |

第一 評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 分類学上の位置付け

和名：ダイズ

英名：Soybean /Soyabean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

(The International Plant Names Index, 2004)

ロ 宿主の品種名又は系統名

宿主には、米国の成熟期グループ II (早生～中生) に属するダイズ品種 Jack (無限伸育型) が用いられた。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、ダイズが自生している地域は、国内・国外ともに知られていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズの出産地は中国で、その祖先は野生種のツルマメ (*Glycine soja*) であると考えられている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。約 5,000 年前にダイズが存在していたことが中国の文献に記録されており、紀元前 11 世紀頃の周時代には既にダイズが栽培されていたと見なされている (農学大事典, 1994 ; OECD, 2000)。ダイズが我が国へ渡来した時期は、約 2,000 年前と推定されており、その後、今日見られるように全国的に栽培されるまでに普及した (農業技術体系, 2002)。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

今日、ダイズは全国的に栽培可能であるが、主に北海道と東北の東日本における比重が高い (農業技術体系, 2002)。世界的には米国、中国、ブラジル、アルゼンチン等を中心に、広い範囲で栽培されている (農業技術体系, 2002)。

我が国では、主に北海道において、米国のような大規模な単作機械化栽培が行われている他、全国的に水田転換畑での栽培やコムギなど麦類の後作としての栽

培が行われている（農業技術体系, 2002）。

ダイズの 2005 年における世界総生産量は約 2 億 1 千万トンである。最大の生産国は米国であり、約 83 百万トンと全世界の生産量の約 40%を占める（FAO STAT2006, <http://apps.fao.org/page/collections>）。一方、我が国における生産量は 22 万 5 千トンで、2005 年の統計によれば、我が国は約 418 万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の 75%に当たる約 313 万トンが米国からの輸入である（農林水産省 大豆のホームページ（大豆関連データファイル）、http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/16_yunyu.pdf）。輸入されたダイズのほとんどは、ベルトコンベア等で港に隣接している搾油工場に直接運ばれる。

ダイズは搾油用、食用、飼料用として多岐に利用されている。我が国では全消費量の約 70%が搾油用に使われ、残りが豆腐、味噌、納豆、醤油、豆乳、もやし、枝豆等の食用として使われる。また、大部分の油粕が飼料用に利用されている（農学大事典, 1994）。2005 年に我が国で消費されたダイズのうち、約 308 万トンが搾油用に使われた（農林水産省 大豆のホームページ（大豆関連データファイル）http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/siryo/12_jukyu.pdf）。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ダイズは、一年生の双子葉植物で、子葉は対生し、次に初生葉が伸びて子葉と直角に対生する。さらに 3 片の小葉からなる第 1 複葉が出て以降、第 2、第 3 複葉と続く。茎は主茎と分枝とがあり、茎の伸長の型に基づいて、有限伸育型と無限伸育型に分けられる。根は主根と側根とに分けられ、根粒菌の寄生により根粒を着生する。花はマメ科植物の典型的なもので、旗弁 1、翼弁 2、竜骨弁 2 枚からなる。色は、白、青紫または赤紫である。雄ずいは 10 本あり、うち 9 本は癒合、1 本は離れており、それぞれが葯を持っている。雌ずいは 1 本で、その基部に子房があり、1 - 5 個の胚珠を内蔵している。ダイズの莢は、子房の心皮に由来する。莢に含まれる子実の数は、1 - 3 個が普通で、まれに 5 個のものもある（農業技術体系, 2002）。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズの栽培適地は、生育期間中の温度が 18 ~ 28 程度、多照で適度に降雨のあるところであるが、品種の多様化によって日長感应性が細分化しており、気候に対する適応性は高い（農学大事典, 1994）。また、ダイズの好適土壌 pH は 6 ~ 7 の弱酸性から中性であるが、石灰含量が十分であれば、かなりの酸性土壌でも栽培可能である。生育後期まで養水分の供給が必要なことから、肥沃度の高い土壌

での生産性が高く、一般に塩基の欠乏しがちな火山灰土壌での生産性は低い（農学大事典, 1994）。

八 捕食性又は寄生性

二 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は子房の心皮に由来する莢の中に形成される。我が国で栽培されている品種は有限伸育性品種であり、裂莢しやすいことが知られている。一方、米国で栽培されている品種は無限伸育性品種であり、裂莢しにくいことが知られている（農業技術体系, 2002）。ダイズ種子にはほとんど休眠性がなく、まれに越年した種子が翌年に発芽することがあるが、その場合も十分に育つことはない（OECD, 2000）。なお、種子を乾燥・低温条件下で貯蔵した場合、その寿命を長期間維持できるが、多湿や乾燥状態が繰り返される自然条件下では、種子は急速に発芽能力を失う（農業技術体系, 2002）。

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

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、これらの特性を有さない。

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無及び近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

ダイズは、基本的に開花前に蕾の中で自家受粉する自殖性植物である。自家不和合性は知られておらず、また、自然交雑率は 0.5%から 3%と報告されている（Garber and Odland, 1926； Caviness, 1966； Ahrent and Caviness, 1994； Poehlman and Sleper, 1995； 農業技術体系, 2002；農学大事典, 1994）。ダイズの近縁野生種としては、ツルマメ (*Glycine soja*) が存在する（農学大事典, 1994； OECD, 2000）。ツルマメは、ダイズの祖先と考えられており、染色体数が同じ ($2n=40$) であることからダイズとの交雑が可能である（農業技術体系, 2002）。ツルマメの自然交雑率については 2.3%（Kiang *et al.*, 1992）との報告がある。また、13%との報告もあるが（Fujita *et al.*, 1997）Fujita らは、訪花昆虫が多いなどの自然条件が理由で高い交雑率を示したと考察している。

なお、ツルマメは、シベリアのアムール川流域、中国、朝鮮半島、台湾及び日本に広く自生しており、我が国では全国的に分布している（農業技術体系, 2002）。ツルマメは一年生植物で、主に河原や土手に自生し、畑の周辺や果樹園にも生育が見られるが、農耕地における有害雑草とは考えられていない（Kasahara, 1982）。

また、ダイズにはアポミクシスの特性を有するとする報告はない。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズ雌ずいの受精可能な期間は、開花 1 日前から開花後 2 日間程度で、花粉自身の寿命は数時間である。また、ダイズ個体同士では、約 2m 離れると交雑率は 0.036% になり、約 10m 離れると交雑率が 0% になることが独立行政法人農業環境技術研究所より報告されている（別紙 1 参照）。

ホ 病原性

ヘ 有害物質の産生性

ダイズには、自然条件下で周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤¹⁾耐性ダイズ (*gat4601*, *gm-hra*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356Ø43-5, OECD UI : DP-356Ø43-5) (以下「本組換えダイズ」と表記) における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (7ページ) に示した。また、供与核酸の塩基配列及びアミノ酸配列は別紙 2 に示した。

ロ 構成要素の機能

目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

供与核酸の各構成要素の機能は表 1 (7ページ) に示したとおりである。

¹⁾ アセト乳酸合成酵素阻害剤としては、チフェンスルフロンメチルやクロリムロンエチル等がある。

表 1 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 | サイズ(bp) | 由来及び機能 |
|------------------------------------|---------|--|
| <i>gat4601</i> 遺伝子発現カセット | | |
| SCP1 Promoter | 499 | カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域 (O'Dell <i>et al.</i> , 1985) の一部と Rsyn7 - SynCoreII プロモーター (Bowen <i>et al.</i> , 2000 and 2003) 領域から構築された、転写開始のための構成的発現プロモーター。 |
| TMV omega 5'UTR | 67 | タバコモザイクウイルス (TMV) オメガ 5'非翻訳領域由来の転写を促進する働きを持つエンハンサー領域 (Gallie and Walbot, 1992)。 |
| <i>gat4601</i> (改変 <i>gat</i>) | 441 | <i>Bacillus licheniformis</i> 由来の <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼを基に、除草剤グリホサートの <i>N</i> -アセチル化触媒活性を高めるように、塩基配列及びアミノ酸配列を改変して作製されたグリホサート <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(改変 <i>gat</i> : 以下「 <i>gat4601</i> 」と表記) (Castle <i>et al.</i> , 2004, Keenan <i>et al.</i> , 2005, GenBank Accession No: AY597417) で、146 個のアミノ酸よりなる分子量 17kDa の改変 GAT (以下「GAT4601」と表記) 蛋白質をコードする。 |
| <i>pinII</i> Terminator | 316 | バレイショ由来のプロテアーゼインヒビター-II (<i>pinII</i>) 遺伝子における転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。 |
| <i>gm-hra</i> 遺伝子発現カセット | | |
| SAMS Promoter | 645 | ダイズ由来の <i>S</i> -アデノシル-L-メチオニンシンターゼ (SAMS) 遺伝子の転写開始のためのプロモーター領域 (Falco and Li, 2003)。 |
| SAMS Intron | 591 | ダイズ由来の SAMS 遺伝子の 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域 (Falco and Li, 2003)。 |
| <i>gm-hra</i> (改変 <i>als</i>) | 1971 | ダイズのアセト乳酸合成酵素遺伝子(<i>gm-als</i>)由来の改変遺伝子(改変 <i>als</i> : 以下「 <i>gm-hra</i> 」と表記)で、アミノ酸 656 個よりなる分子量 71kDa の改変 ALS(以下「GM-HRA」と表記)蛋白質をコードする。GM-HRA 蛋白質の N-末端領域に 5 つのアミノ酸 (メチオニン-プロリン-ヒスチジン-アスパラギン-トレオニン) が新たに付加されている (Falco and Li, 2003)。 |
| <i>gm-als</i> Terminator | 652 | ダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子 (<i>gm-als</i>) が持つ転写を停止するためのターミネーター領域。 |

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン株にある)

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

gat4601 遺伝子

本組換えダイズに導入された改変 *gat* (以下「*gat4601*」と表記) 遺伝子は、*Bacillus licheniformis* 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼの塩基配列を基に、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化触媒活性を高めるように改変した遺伝子であり、改変 GAT (以下「GAT4601」と表記) 蛋白質をコードしている (Castle *et al.*, 2004 ; Siehl *et al.*, 2005; Keenan *et al.*, 2005)。 *B. licheniformis* は、日本、米国、カナダ、ヨーロッパにおいて食品用酵素 (アルファアミラーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、ヘミセルラーゼ等) の生産に利用されているグラム陽性細菌である。*gat4601* 遺伝子の塩基配列 (別紙 2 の Appendix 1 における 597 番目から 1037 番目の塩基) 及び GAT4601 蛋白質のアミノ酸配列を別紙 2 に示した。

除草剤グリホサートは、植物中のトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸合成に関与するシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の活性を阻害する。その結果、これらの芳香族アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる (図 1、10ページ)。 *gat4601* 遺伝子により産生される GAT4601 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えることで、植物に除草剤グリホサートへの耐性を付与する (図 1、10ページ)。

除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化触媒活性を k_{cat}/K_M を目安として比較したところ、*B. licheniformis* 由来の改変前の *N*-アセチルトランスフェラーゼ蛋白質は、 $k_{cat}/K_M = 4.21 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であったのに対し、GAT4601 蛋白質では、 $k_{cat}/K_M = 4,570 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と、約 1,000 倍まで高められていた。実際に、これまで米国やカナダで行われたほ場試験において、本組換えダイズは、除草剤グリホサートに対し、高い耐性を持つことが示されている。なお、 k_{cat} は、酵素反応速度定数を K_M は、基質に対する親和性を示す。

gm-hra 遺伝子

本組換えダイズに導入された改変 *als* (以下「*gm-hra*」と表記) 遺伝子は、ダイズのアセト乳酸合成酵素 (*gm-als*) 遺伝子由来であり、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けない改変 ALS (以下「GM-HRA」と表記) 蛋白質をコードしている。*gm-hra* 遺伝子の塩基配列 (別紙 2 の Appendix 1 における 2697 番目から 4667 番目の塩基) 及び GM-HRA 蛋白質のアミノ酸配列を別紙 2 に示した。

除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は、植物中のロイシン、バリン及びイソロイ

シンの分枝アミノ酸合成に関与するアセト乳酸合成酵素(ALS)活性を阻害する。その結果、これらの分枝アミノ酸が合成されなくなり、植物を枯死させる(図 2、11 ページ)。 *gm-hra* 遺伝子により産生される GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けず、本剤の存在下でも ALS 活性を示すので、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成が可能となり、植物に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与される(図 2、9 ページ)。なお、改変 *als* 遺伝子を利用した組換え作物の作出は、既にイネで報告されている(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/AD41ap.pdf)。

GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質が、既知のアレルゲン蛋白質と相同性を有さないことを確認するため、ネブラスカ大学の Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) が提供するアレルゲンデータベース (FARRP6 database, Release 6、2006 年 1 月版) を用いてアミノ酸配列を比較した。本データベース中には、1,541 件の既知アレルゲン及び推定アレルゲンのアミノ酸配列が含まれる。その結果、両蛋白質と有意な相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、Genbank、Swiss-Prot、PIR、Protein Research Foundation 及び Protein Data Bank の公的データベースを統合して構築した、重複のない登録蛋白質のアミノ酸配列から成るデータベース (Genpept “nr” dataset, Release 153.0, 4/15/06) を用い、GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質の既知毒性タンパク質との相同性検索も行った。その結果、両蛋白質において既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。

除草剤グリホサートは雑草の生育期に散布する茎葉処理型除草剤であり、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は雑草の発生前から発生初期に散布する土壌処理型除草剤である。今日、両除草剤は日本や米国を始め、世界中で使用されている。*gat4601* 遺伝子の導入による除草剤グリホサート耐性及び *gm-hra* 遺伝子の導入による除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与したダイズの栽培によって、栽培農家は異なる特性を持つ 2 つの除草剤を有効に利用することができ、雑草防除における選択肢がさらに広がると期待されている。

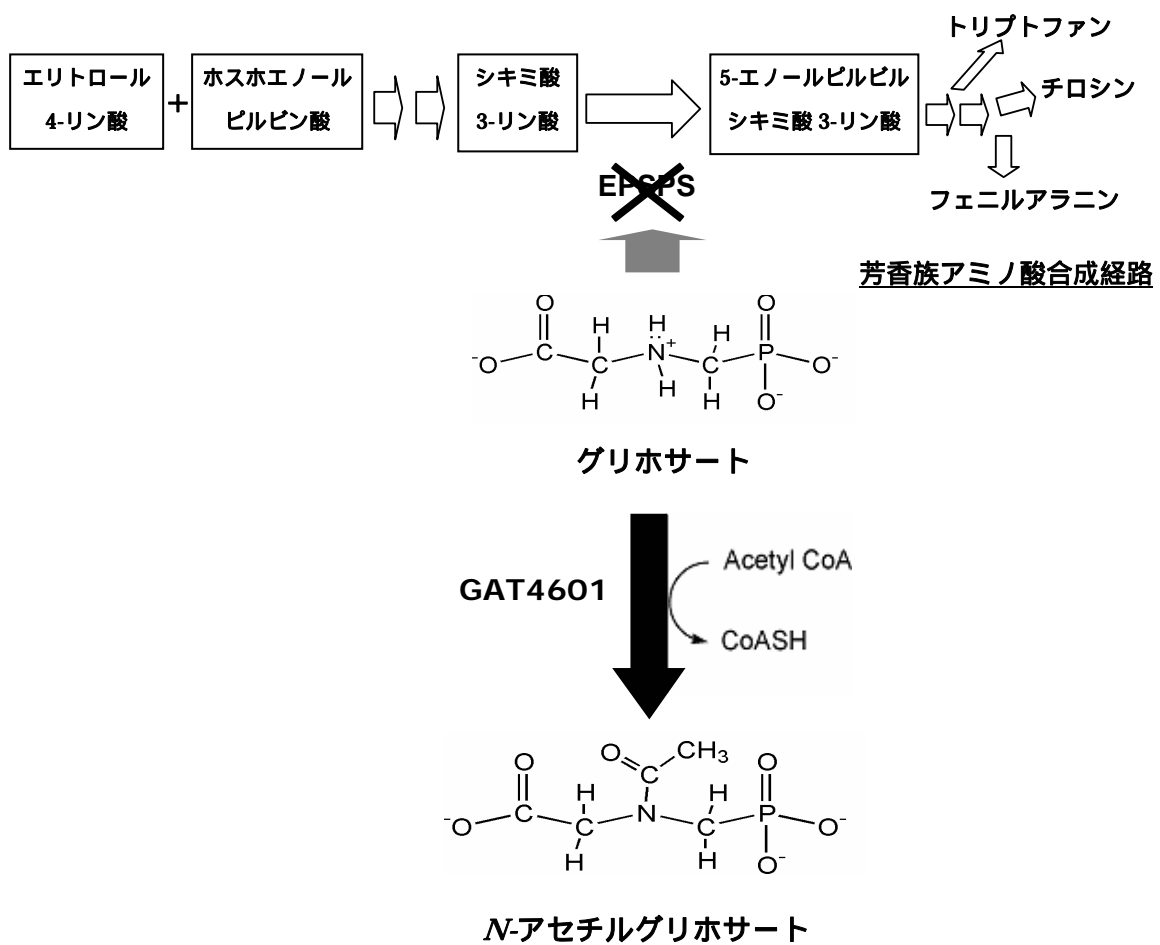


図 1 GAT4601 蛋白質の作用機作

除草剤グリホサートにより EPSPS 活性が阻害されると、芳香族アミノ酸が合成できなくなり植物は枯死する。一方、GAT4601 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変える。そのため、芳香族アミノ酸の合成が可能となる。

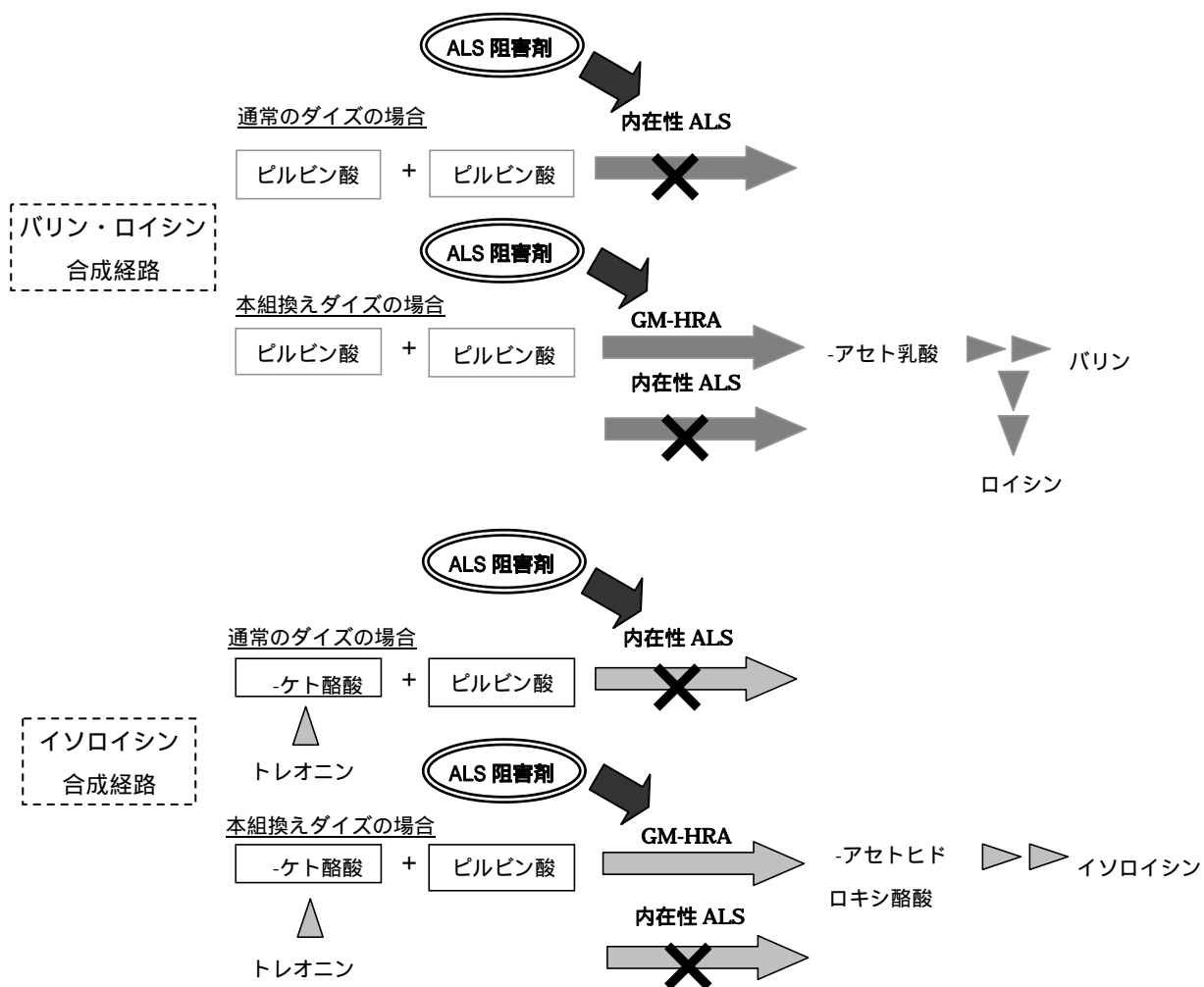


図 2 GM-HRA 蛋白質の作用機作

植物の内在性アセト乳酸合成酵素 (ALS) は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤 (ALS 阻害剤) によって阻害され、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸合成ができなくなり、植物は枯死する。一方、GM-HRA 蛋白質が産生されると、除草剤 ALS 阻害剤の影響を受けないため、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸合成が可能となる。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

gat4601 遺伝子

本組換えダイズに導入された *gat4601* 遺伝子が産生する GAT4601 蛋白質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。一般に *N*-アセチルトランスフェラーゼは、蛋白質の *N* 末端アミノ酸や生体アミン化合物である遊離アミノ酸及びヒストンのアミノ酸側鎖並びに抗生物質等をアセチル化することが知られている (生化学辞典, 1998)。GAT4601 蛋白質は除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化触媒活性を高めるように改変された蛋白質で、微生物由来の *N*-アセチルトラ

ンスフェラーゼに比べて、除草剤グリホサートに対する活性が約 1,000 倍に高められている。本 GAT4601 蛋白質が、宿主の代謝系に影響を及ぼさないことを確認するために、以下のような評価を行い検討した。

1) 結晶構造解析

GAT4601 蛋白質の 3 次元構造解析の結果から、GAT4601 蛋白質における除草剤グリホサートの *N*-アセチル化反応の活性中心は当該蛋白質の内部奥にあり、除草剤グリホサートは内部に取り込まれ、そこに補酵素のアセチル CoA が結合して反応することが明らかとなっている (図 3、13 ページ; Keenan *et al.*, 2005, Siehl *et al.*, 2007)。このことは除草剤グリホサートのような低分子化合物のみが、立体障害を受けずに当該蛋白質の活性中心に到達して本蛋白質の基質となり得ること、すなわち高分子化合物が本蛋白質の基質となる可能性の低いことを示唆する。なお、GAT4601 蛋白質とホモロジーの高い GAT4602 蛋白質²を用いた研究で、当該蛋白質が、生体内アミン類のうち、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン、tRNA といった高分子化合物に対し、*N*-アセチル化触媒活性を示さないことが報告されている (Siehl *et al.*, 2005)。

2) 基質反応性実験

基質となる可能性のある低分子化合物と GAT4601 蛋白質との反応性について、20 種類の農薬 (除草剤、殺虫剤及び殺菌剤) (別紙 3 の表 1)、11 種類の抗生物質 (カナマイシンやアンピシリン等) (別紙 3 の表 2) 及び 21 種類のアミノ酸 (別紙 3 の表 3) を用い検討した。GAT4601 蛋白質による *N*-アセチル化反応の触媒活性測定は、本反応の補酵素、アセチル CoA の反応産物である coenzyme A の 30 分間の蓄積量を指標として行った。その結果、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸の 5 つのアミノ酸に対して触媒活性が認められたが、それ以外の化合物では触媒活性は認められなかった (別紙 3 の表 1~3)。触媒活性の認められた 5 つのアミノ酸のうち、最も高い触媒活性を示したのはアスパラギン酸であったが、それでもグリホサートを基質とした時の触媒活性の 3% 程度であった (別紙 3 の表 3)。

次に、上記の活性の認められた 5 種類のアミノ酸及び除草剤グリホサートと構造が極めて類似する 6 種類の化合物について、これらを基質とした場合の GAT4601 蛋白質の k_{cat}/K_m 値を測定した (別紙 3 の表 4)。本試験は、生体内に近い条件となるように、反応溶液に 100mMKCl を加えて行った。その結果、GAT4601 蛋白質の除草剤グリホサートに対する k_{cat}/K_m 値は、 $267\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であった。また、5 つのアミノ酸のうち、アスパラギン酸とグルタミン酸では除草

² GAT4602 蛋白質は、本組換えサイズに導入した GAT4601 蛋白質と 96% のアミノ酸配列の同一性 (identity) 及び 99% の類似性 (similarity) を持ち、また除草剤グリホサートに対して同等の *N*-アセチル化触媒活性 (GAT4601: $4,570\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$, GAT4602: $4,160\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) を有する。

剤グリホサートに対する触媒活性の3%程度の触媒活性が認められたが、生体内に近い本条件下では、トレオニン、セリン、グリシンでは触媒活性は認められなかった（別紙3の表4）。

また、除草剤グリホサート類似化合物では、D-2-Amino-3-phosphonopropionateでのみ触媒活性が認められたが、その触媒活性は除草剤グリホサートに対する触媒活性の約5%であり、また、その光学異性体であるL-2-Amino-3-phosphonopropionateでは触媒活性は認められなかった（別紙3の表4）。

以上のことから、GAT4601蛋白質は除草剤グリホサートに対して極めて高い基質特異性を有していると考えられた。

【社外秘情報につき非開示】

図 3 GAT4601 蛋白質の構造及び除草剤グリホサートとの反応部位

3) アミノ酸の分析

GAT4601 蛋白質は除草剤グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられるが、上述のようにアスパラギン酸及びグルタミン酸に対して除草剤グリホサートに対する触媒活性の3%程度の活性を示すことが認められたことから、本組換えダイズのアミノ酸含有量を対照の非組換えダイズと比較した。種子及び種子を除いた地上部のアミノ酸分析は、北米の6箇所のお場から各々3反復でサンプリングし、合計18反復で行った。その結果、種子及び種子を除いた地上部におけるアミノ酸含有量において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった（表2）。

表 2 アミノ酸分析

【社外秘情報につき非開示】

なお、食品、飼料としての実質的同等性を調べるために、構成成分の詳細な分析が行われている。その際、GAT4601蛋白質がアスパラギン酸及びグルタミン酸に対して弱い触媒活性を示したことから、種子中の遊離アミノ酸に含まれるN-アセチルアスパラギン酸及びN-アセチルグルタミン酸の分析を行ったところ、本組換えダイズ中では、従来のダイズに比べて有意に増加していることが認められた（別紙4、表1）。遊離アミノ酸は、ダイズ種子中の全アミノ酸量の1%未満であることが報告されているが（Takashi *et al.*, 2003）、本組換えダイズ及び非組換えダイズ種子中の遊離アミノ酸含量は両者とも全アミノ酸含量の0.5%程度で、統計

的有意差は認められなかった。また、遊離アミノ酸の組成においては、プロリンとバリンにおいて統計学的有意差が認められたが、その他の遊離アミノ酸においては、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった(別紙4、表2)。有意差の認められたプロリンとバリンについても、商業品種に認められるばらつきの範囲内であった。

このように、少量の遊離アスパラギン酸及び遊離グルタミン酸が本組換えダイズ中でアセチル化されたことが認められたものの、アセチル化されたアミノ酸含量は、遊離アミノ酸の全量や組成に影響を与えるものではなかったことが示された。また、蛋白質を構成するアミノ酸の含有量や組成に相違がなかったこと(表2、13ページ)さらに、2006年度における我が国の隔離ほ場試験及び2005年度に米国で行ったほ場試験の結果から本組換えダイズの生育特性等は、非組換えダイズと同等であることが示されていることから、*gat4601* 遺伝子による GAT4601 蛋白質の産生は、宿主の持つ代謝系に影響を及ぼさないと判断された。

なお、非組換えダイズでも *N*-アセチルアスパラギン酸と *N*-アセチルグルタミン酸が検出されたことから分かるように、アセチル化されたアミノ酸は植物や動物を含めた多くの生物において産生される物質であり、例えば、細胞質タンパク質の翻訳後修飾で生じる *N*-末端アミノ酸のアセチル化は最も一般的な事例である (Persson *et al.*, 1985; Polevoda and Sherman, 2002)。また、*N*-アセチルアスパラギン酸と *N*-アセチルグルタミン酸に関して有害物質であるとの報告もない。

gm-hra 遺伝子

gm-hra 遺伝子によって産生される GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって阻害される内在性 ALS の代わりに、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成経路で作用する(図2、11ページ)。分枝アミノ酸合成経路のうち、バリン・ロイシン合成経路においては、バリンにより ALS がフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによる ALS のフィードバック制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによってフィードバック制御されていることが知られている(生化学辞典, 1998)。したがって、仮に GM-HRA 蛋白質により ALS の触媒活性が高まり、その結果、分枝アミノ酸合成量が高まったとしても、フィードバック制御が働くことにより、特定のアミノ酸のみの含有量が高まるとは考え難い。実際に、本組換えダイズの種子の分枝アミノ酸について統計学的有意差は認められなかった(表2、13ページ)。このことから、本組換えダイズにおける GM-HRA 蛋白質の産生は、宿主の持つ代謝系に影響を及ぼさないと判断された。

なお、*gat4601* 遺伝子は、除草剤グリホサートのアセチル化に関与する遺伝子であり、一方、*gm-hra* 遺伝子は分枝アミノ酸合成に関与する遺伝子であることから、両遺伝子の発現が相互に影響する可能性は考え難い。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

gat4601 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットから成る直鎖状 DNA 断片である PHP20163A の基となったベクターの名称及び由来は、以下のとおりである。

名称：PHP20163

由来：大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pUC19 等を基に構築された。

PHP20163A はプラスミド PHP20163 の制限酵素処理によって抽出された、*gat4601* 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセット ([SCP1 Promoter]-[TMV omega 5'UTR]-[*gat4601*]-[*pinII* Terminator]-[SAMS Promoter] -[SAMS Intron]- [*gm-hra*] -[*gm-als* Terminator]) から成る直鎖状 DNA 断片である (図 4、16ページ)。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基数は 5,362 bp である。塩基配列は別紙 2 に示した。

特定の機能を有する塩基配列の種類

PHP20163A は目的遺伝子カセット領域のみから成る直鎖状 DNA 断片で、それ以外の特定の機能を有する配列は含まれていない。

ベクターの感染性の有無

導入に用いた PHP20163A の全塩基配列は明らかにされており、他の生物への伝達を可能とする配列を含んでいない。したがって、感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

導入に用いた PHP20163A における供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位は図 4に示した。

【社外秘情報につき非開示】

図 4 直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の供与核酸の構成及び制限酵素切断部位

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主内への移入は、パーティクルガン法で行った (Klein *et al.*, 1987)。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換えダイズは、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社によって開発された遺伝子組換えダイズであり、その作出及び選抜・育成の過程は以下のとおりである。

核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換体の選抜の過程は図 5 (17ページ) に示した。

アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

育成の経過及び系統樹

本組換えダイズの育成経過を図 6 (18ページ) に示した。なお、本組換えダイズの承認申請の範囲は、育成過程に示す T1 以下の後代系統である。

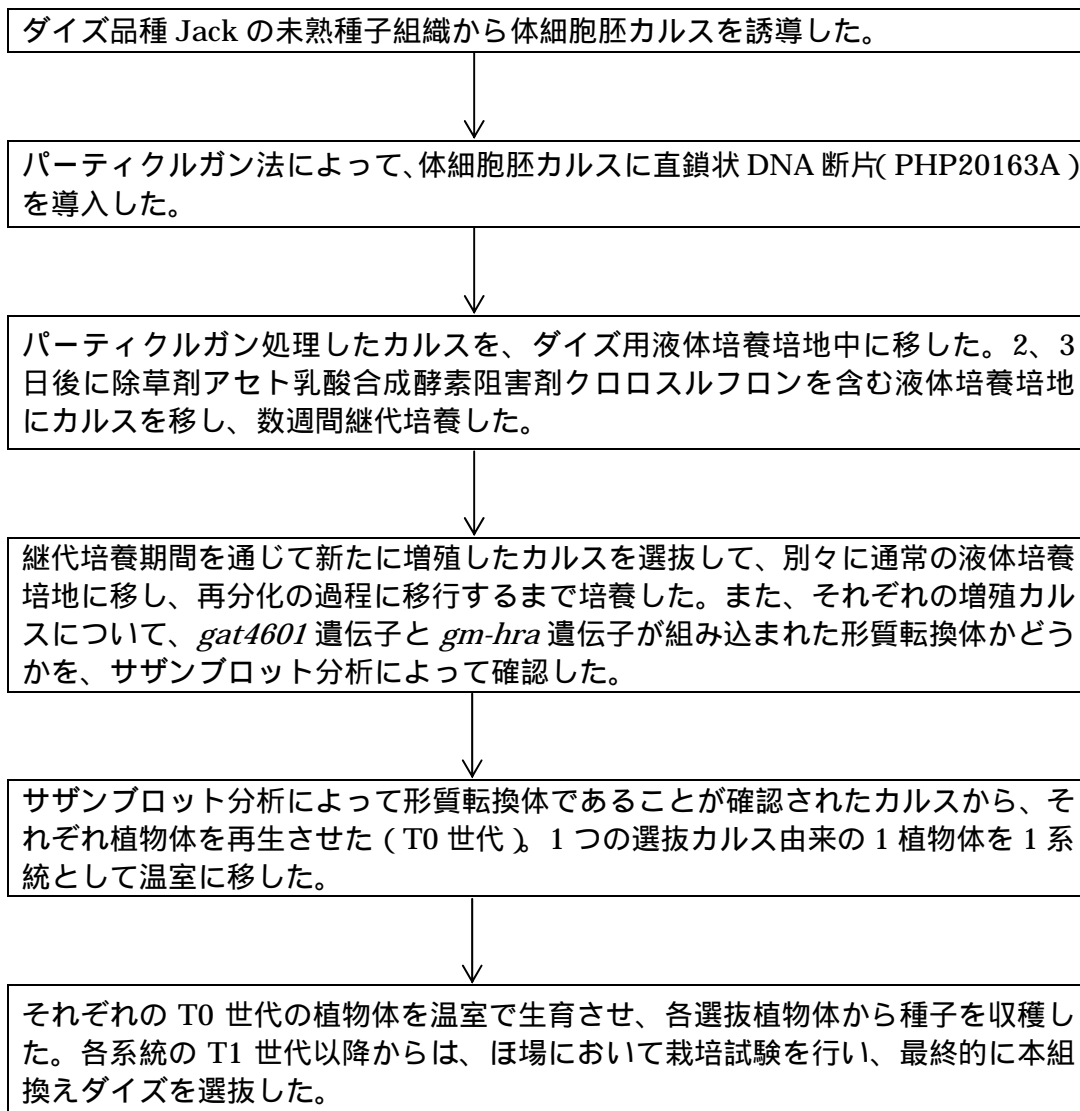


図 5 供与核酸の宿主への導入及び本組換えダイズの選抜過程

(本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

【社外秘情報につき非開示】

図 6 本組換えダイズの育成過程

(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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

T1 及び F3 世代の本組換えダイズ中の *gat4601* 遺伝子の有無を PCR 法及びウェスタンブロット法で調査した。その結果、移入された核酸の遺伝様式は、3:1 に適合する分離比を示した（表 3）。また、F3 世代において、ウェスタンブロット法に用いたと同じ植物体に対してサザンブロット法にて *gm-hra* 遺伝子の分離比を求めたところ同様に 3:1 に適合する分離比を示した。このように移入された核酸は、メンデルの法則に従って安定して伝達することから、移入された核酸は、ダイズゲノム上に存在することが確認された。

表 3 導入遺伝子の分離比の解析

| 供試世代 | 検定方法 | <i>gat4601</i> 遺伝子陽性 個体 | <i>gat4601</i> 遺伝子陰性 個体 | <i>gat4601</i> 遺伝子陽性個 体の期待値 | <i>gat4601</i> 遺伝子陰性個 体の期待値 | P 値 |
|------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| T1 | PCR 法 | 59 | 23 | 61.5 | 20.5 | 0.61 |
| F3 | ウェスタン ブロット法 | 75 | 15 | 67.5 | 22.5 | 0.09 |

供試世代の親個体は、目的遺伝子をヘテロに持つ個体由来の種子とし、T1 世代では PCR 法により、また、F3 世代ではウェスタンブロット法により *gat4601* 遺伝子の有無を確認した。導入遺伝子がゲノムの 1 箇所が存在する場合の分離比の期待値を 3:1 として χ^2 検定を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュボン株にある)

ロ 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

本組換えダイズに導入された核酸のコピー数及び伝達の安定性について、自殖後代 T4 及び T5 世代（図 6 参照、18 ページ）を用いてサザンブロット法により解析した。解析は、2005 年に米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社が栽培した植物体を用いて行った。自殖後代 T4 及び T5 世代のそれぞれ 30 及び 24 個体の葉から DNA サンプルを抽出し、制限酵素 *Hind* III で切断した。導入に用いた PHP20163A には、*pinII* Terminator と SAMS Promoter の境界部分（1,378 番目）及び *gm-hra* 遺伝子の中間部分（3,796 番目）の 2 箇所に *Hind* III サイトがある（図 4 参照、16 ページ）。プローブとして *gat4601* 遺伝子領域及び *gm-hra* 遺伝子領域を用いた。サザンブロット法による解析の結果の要約を表 4（20 ページ）に、その詳細は別紙 5 に示した。

gat4601 遺伝子領域をプローブとした場合、制限酵素 *Hind* III サイトは、挿入

された直鎖状 DNA 断片 PHP20163A 中の *gat4601* 遺伝子の外側に一箇所(1,378 番目) あることから、植物のゲノム側のもう 1 箇所で切断されることにより、1 コピー導入された場合は、1,378bp 以上の断片がバンドとして検出されると予想された。実際、本組換えダイズにおいて約 6,000bp の断片がバンドとして検出された(別紙 5、図 3 及び図 4)。

gm-hra 遺伝子領域をプローブとした場合、1 コピー導入されたとすると、直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の中央にある 2,419bp の *Hind* III 断片(1,378 - 3,796) 及び *Hind* III サイト(3,796 番目) から植物のゲノム側にあるサイトまでの 1,567bp 以上の断片がそれぞれバンドとして検出されると予測された。また、*gm-hra* 遺伝子はダイズの内在性 *als* 遺伝子と相同性が高いため、導入遺伝子由来のバンドに加えて複数の内在性 *als* 遺伝子由来の DNA 断片も検出されると予測された。実際に内在性の *als* 遺伝子由来のバンドが複数個認められ、また、本組換えダイズに特異的なバンドとして 2,419bp のバンド及び約 8,000bp 付近のバンドが認められた(別紙 5、図 5 及び図 6)。

これらの結果から、導入に用いた PHP20163A の 1 コピーが本組換えダイズのダイズゲノムに組み込まれていることが示された。また、供試した自殖後代 T4 世代の 30 植物体及び自殖後代 T5 世代の 24 植物体のそれぞれにおいて、検出されたバンドパターンはいずれも一致しており(表 4、20 ページ及び別紙 5 参照)、本組換えダイズにおける挿入遺伝子が、後代に安定的に伝達していることが示された。

このサザンプロット法による解析結果に基づく、本組換えダイズの挿入遺伝子の模式図を図 7 (20 ページ) に示した。

表 4 サザンブロット分析の結果の要約

| 供試世代 | 検出に用いた プローブ | 制限酵素 | 期待される 断片長 (bp) ^a | 検出された 断片長 (bp) ^b |
|------|----------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| T4 | <i>gat4601</i> | <i>Hind</i> III | > 1,378 | 約 6,000 |
| T5 | <i>gat4601</i> | <i>Hind</i> III | > 1,378 | 約 6,000 |
| T4 | <i>gm-hra</i> | <i>Hind</i> III | > 1,567 2,419 | 約 8,000 * 2,419 |
| T5 | <i>gm-hra</i> | <i>Hind</i> III | > 1,567 2,419 | 約 8,000 * 2,419 |

* : *gm-hra* 遺伝子をプローブとした場合、*gm-hra* 遺伝子はダイズの内在性 *als* 遺伝子と相同性が高いため、複数の内在性 *als* 遺伝子由来の DNA 断片が検出された。上記の約 8,000 の DNA 断片は、内在性 *als* 遺伝子由来の DNA 断片とサイズがほぼ重複していたが、非組換えダイズにおけるバンドと比べて明らかに濃いことから、導入遺伝子由来の DNA 断片であると判断された（別紙 5 の図 5 及び図 6 参照）。

a : 直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の 1 コピーが挿入された場合、制限酵素 *Hind* III 処理で検出が予想される DNA 断片の大きさ（本評価書の図 4 参照）。

b : 分子量マーカーに基づく、検出された DNA 断片の見かけ上の大きさ。

（本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュボン株にある）

【社外秘情報につき非開示】

図 7 サザンブロット分析に基づく本組換えダイズに導入された遺伝子の模式図

ハ 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

サザンブロット分析によって 1 コピーであることが確認されているので、本項目は該当しない。

ニ 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

本組換えダイズ中に導入された、*gat4601* 遺伝子によって産生する GAT4601 蛋白質及び *gm-hra* 遺伝子によって産生する GM-HRA 蛋白質が、本組換えダイズの後代でも安定して産生されることを、自殖後代 T5 及び T6 世代（図 6 参照、18 ページ）の 2 世代を用いて、除草剤散布試験及び ELISA 法による定量分析によって確認した。

除草剤散布試験

除草剤散布試験は、2005 年に米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナシヨ

ナル社において行われ、本組換えダイズ及び非組換えダイズを、反復当たり各々2個体供試して4反復で行った。播種後20日目に除草剤グリホサート(1.752 kg ae/ha)及びアセト乳酸合成酵素阻害剤(クロリムロン(33.4 g ai/ha) + チフェンスルフロン(10.7 g ai/ha))を混合散布し2週間後に除草剤散布による影響を評価した。なお、本使用法は、本組換えダイズが商品化された場合の散布体系の一つである。薬害の程度は、0% (全く影響を受けていない) から100% (完全に枯死している) のスケールで目視により評価した。

その結果、自殖後代 T5 及び T6 世代の両世代とも除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の混合散布に対して薬害は認められなかった(表 5)。また、供試した全ての組換えダイズにおいて除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の混合散布に対して薬害が認められなかったことから、個体間においても発現が安定していることが確認された。

表 5 除草剤混合散布による薬害程度の比較¹

| | 本組換えダイズ (T5 世代) | 本組換えダイズ (T6 世代) | 非組換えダイズ |
|--------|----------------------|--------------------|----------|
| 除草剤散布 | 0 ± 0.0 ² | 0 ± 0.0 | 89 ± 2.1 |
| 除草剤無散布 | 0 ± 0.0 | 0 ± 0.0 | 0 ± 0.0 |

1: 各個体の薬害の程度を0(健全)から100%(完全枯死)で評価した。値は8個体の平均値を示す。

2: ±は、標準誤差を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

定量 ELISA 試験

定量 ELISA 分析は、上述の薬剤散布 2 週間後の本組換えダイズ及び除草剤無散布の非組換えダイズの各 3 個体の葉組織を、1 個体当たり 10mg 採取して行った。GAT4601 蛋白質は、T5 世代で 4.6 ± 1.1 ng/mg 乾燥重、T6 世代で 3.4 ± 0.33 ng/mg 乾燥重の産生量を示した。また、GM-HRA 蛋白質は、T5 世代で 18 ± 6.6 ng/mg 乾燥重、T6 世代で 13 ± 3.0 ng/mg 乾燥重の産生量を示し、両世代間で統計学的有意差は認められず、両蛋白質とも世代間で安定的に産生されることが確認された（表 6）。

表 6 本組換えダイズにおける GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質の産生量

| | T5 世代 ¹ | T6 世代 ¹ | P-値 | 非組換えダイズ ² (参考) |
|-----------------------------|---|------------------------------|------|---------------------------|
| GAT4601 蛋白質量 (ng/mg 乾物重) | 4.6 ± 1.1 ³ (3.3 - 6.7) | 3.4 ± 0.3 (3.0 - 4.0) | 0.65 | 定量限界値以下 ⁴ |
| GM-HRA 蛋白質量 (ng/mg 乾物重) | 18.0 ± 6.6 (7.0 - 30) | 13.0 ± 3.0 (7.7 - 18) | 0.43 | 定量限界値以下 ⁵ |

1 : n=3

2 : n=6

3 : ± は、標準誤差を示す。カッコ内は分析値の最小値-最大値を示す。

4 : GAT4601 蛋白質の定量限界値 : 0.11 ng/mg 乾物重。

5 : GM-HRA 蛋白質の定量限界値 : 0.27 ng/mg 乾燥重。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

ホ ウイルスの感染その他の経路を經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がある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって伝達性はない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

方 法

葉から抽出した DNA を鋳型にする。SCP1promoter 領域及び GAT のコード領域にプライマーを設定し、アニーリング温度 55°C、サイクル回数 35 回で PCR を行う。アガロース電気泳動を行い、本組換えダイズ特異的な約 700bp のバンドを検出する。

感 度

40 ng の DNA サンプルを希釈して PCR 法で分析したところ、検出限界(LOD)は、40pg であった。

信頼性

本組換えダイズ及び非組換えダイズを 2 箇所の異なる場所で、それぞれ 5 個体供試して、各個体について 6 反復で分析を行い、再現性を確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズには、GAT4601 蛋白質を発現する *gat4601* 遺伝子及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないアセト乳酸合成酵素 (GM-HRA) を発現する *gm-hra* 遺伝子が導入され、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。

gat4601 遺伝子の発現によって産生される GAT4601 蛋白質は、除草剤グリホサートを *N*-アセチル化することによって、殺草活性を持たない *N*-アセチルグリホサートに変えることができ、その結果、植物体に除草剤グリホサートに対する耐性を付与する (図 1 参照、10 ページ)。一方、*gm-hra* 遺伝子の発現によって産生される GM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤により活性を阻害される植物内在性アセト乳酸合成酵素に代わって、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成経路で作用し、その結果、植物体に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する (図 2 参照、11 ページ)。

実際に、米国での温室試験やほ場試験において、本組換えダイズが除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の散布に対して薬害は認められず、実用上十分な耐性を示すことを確認している ((4). 二参照)。また、後述のように、我が国における隔離ほ場試験においても、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の散布試験を実施し、本組換えダイズが両除草剤に耐性を示すことを確認した (別紙 6 の表 1 及び図 2~5)。

ロ 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

本組換えダイズと宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無について、本組換えダイズの自殖後代 T6 世代 (図 6 参照、18 ページ) と、対照品種として宿主の非組換えダイズ品種 Jack を用い、2006 年に我が国において隔離ほ場試験を

実施し、以下の項目について評価した（別紙 6）。

形態及び生育の特性

本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの形態及び生育の特性に関して、農林水産省によるダイズの特性審査基準及び特性表を参考に、発芽揃い期、発芽率、開花期、小葉の形、小葉の数、毛じの色、毛じの多少、花色、成熟期、草型、主茎長、主茎節数、最下着莢節位高、分枝数、裂莢の難易、一株総莢数、一株総莢重、莢当たりの粒数、一株全粒数、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重、百粒重、子実の形及び臍の色の計 25 項目について 3 反復で調査した。

その結果、主茎長を除いて、その他の形質については統計学的な有意差は認められなかった（別紙 6 の表 3、13 ページ）。主茎長においては、本組換えダイズの平均が 47.5 cm であったのに対し、対照の非組換えダイズでは平均が 55.2 cm であり、統計学的有意差が認められた。

そこで、主茎長について、他の栽培区（遺伝子発現確認区及び予備区）で確認のための調査を行ったところ、遺伝子発現確認区及び予備区では、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は認められなかった（別紙 6 の表 4、13 ページ）。

生育初期における低温耐性

ワグネルポット（1/5000a）にほ場の土壌を充填し、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズをポット当たり 15 粒ずつ播種し、後に 5 株立てとして恒温恒湿棟（16 時間明 - 8 時間暗、25℃）に置床した。ダイズが V1 期に達した段階でグロースチャンバーに移して低温処理（12 時間明、12℃ - 12 時間暗、2℃）を行い、1 ヶ月後に低温による障害を目視により調査した。試験は 3 反復で行い、本組換えダイズと非組換えダイズの間で t-検定を行った。

その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの低温障害程度に統計学的有意差は認められなかった（別紙 6 の表 5、14 ページ）。このことにより、本組換えダイズの初期成育の低温耐性は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

成体の越冬性又は越夏性

植物体を収穫せずに残しておき、低温により植物体が枯れ上がってから、各反復より本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを各々 5 植物体ずつ合計 30 個体選び、これらを覆うようにビニールトンネルを設置した。12 月 8 日より 3 週間温風ヒーター（シンクス株式会社製、HURRYHEAT SH1）を用いてビニールトンネル内を加熱し（サーモスタット設定温度：25℃）植物体の再生を観察した。3 週間の加熱期間中、トンネル内の気温は昼夜とも 20℃前後で保たれていた。

なお、トンネル内の環境を確認するために、各植物体の脇にダイズを 30 粒播種した。

その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの植物体は収穫期以後いずれも完全に枯れ上がり、両者の間に相違は観察されなかった。また、3 週間加温しても、本組換えダイズと非組換えダイズのいずれにおいても、新たな萌芽や植物組織の再生は観察されず、完全に枯死していることが確認された。

なお、トンネル内に播種したダイズ種子は、加温期間中に 30 粒全てが発芽し、この条件下でダイズが生育することが確認された。これらのことから、本組換えダイズの成体の越冬性は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

花粉の稔性及びサイズ

開花直前の本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの花を各反復当たり（3 反復）各々5 花採取し、顕微鏡下で葯を取り出した。染色用の酢酸カーミン液中でピンセットの先を使い、押しつぶすように葯から花粉を出し、20 分以上静置した後、適当な視野を選んで写真撮影を行った。後日、プリントしたものについて、各反復当たり 5 視野を選び、1 視野当たり 100 個前後の花粉について染色の有無を調査した。染色が確認された花粉は、花粉稔性があると判断し、本組換えダイズと非組換えダイズを比較して t-検定を行った。また、サイズについては 1 花当たり適当な 1 視野を選び、10 個の花粉について直径を計測し、本組換えダイズと非組換えダイズを比較して t-検定を行った。

その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの花粉は、いずれも酢酸カーミン液で 98%以上が染色され、花粉の生体反応活性に両者間で統計学的有意差は認められなかった。このことにより、花粉稔性に差がないことが示唆された。また、花粉のサイズ（直径）においても両者間で統計学的有意差は認められなかった。以上の結果から、本組換えダイズの花粉の稔性及びサイズは、非組換えダイズと同程度であると結論した。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する特性として、一株総莢数、一株総莢重、莢当たりの粒数、一株全粒数、一株全粒重、一株成熟粒数、一株成熟粒重及び百粒重を調査したが、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で、これらの項目に統計学的有意差は認められなかった（別紙 6 の表 3、13 ページ）。したがって、本組換えダイズの種子生産量は、対照の非組換えダイズと同程度であることが確認された。また、両者とも裂莢性は難で、脱粒性についても同程度であることが確認された（別紙 6 の表 3、13 ページ）。

また、休眠性及び発芽率については、以下のようにして評価した。各プロット

中央 12 株から各々3 粒を採種した種子（全 36 粒/プロット、採種後 63 日目）を用いて、シャーレ上の吸水したろ紙に、16 時間・明 - 8 時間・暗、25 °C の条件で静置した。試験は 3 反復で行い、4 日後に発芽の有無を調査し、本組換えダイズと非組換えダイズの間で t-検定を行った。無発芽の種子については塩化テトラゾリウムによる染色で生体反応を確認した。なお、種子は自然乾燥させた後、常温にて保管したものをを用いた。

その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの収穫種子は、いずれも 97% 以上の発芽率を示し、両者間で統計学的有意差は認められなかった（別紙 6 の表 7、17 ページ）。供試した 108 個の本組換えダイズの種子のうち、3 個の種子が発芽しなかった。これらの種子について、塩化テトラゾリウムによる生体染色を行ったが、未発芽種子はすべて死滅していた。これまで栽培ダイズに休眠性があるとの報告がないこと及び今回得られた本組換えダイズと非組換えダイズの間で発芽率に変化がなく、また未発芽種子が枯死していたことから、本組換えダイズの種子休眠性は、対照の非組換えダイズと同程度であると考えられた。以上の結果から、本組換えダイズの種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

交雑率

本組換えダイズの交雑能力が従来のダイズと同程度であるかを評価するため、2006 年米国アイオワ州ジョンストンの米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社のほ場にて、T5 世代（図 6、18 ページ）を用いて以下の実験を行った。

ほ場において、本組換えダイズ 68 粒及び低リノレン酸品種 93M01 の種子 30 粒を、図 8 (A) (27 ページ) に示すように本組換えダイズと受粉株である 93M01 との交雑機会が均等になるように播種した（株間 30cm、畝間 80cm）（以下「組換え体試験区」と表記）。組換え体試験区と 30m 以上の緩衝地帯を設けて、同様に非組換えダイズ（Jack 品種）68 粒及び 93M01 品種の種子 30 粒を、非組換えダイズと受粉株である 93M01 との交雑機会が均等になるように播種した（以下「非組換え体試験区」と表記、図 8 (B)）。なお、Jack 品種の交雑が DNA マーカーで区別できるように、遺伝的背景が異なる 93M01 が、受粉株として選択された。

成熟期に、組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を採取し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。初生葉（V1 期）より葉組織を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、*gat4601* 遺伝子発現カセット領域に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、導入遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。

【社外秘情報につき非開示】

図 8 各供試ダイズの米国ほ場での配置図

同様に、非組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率を調査するために、非組換え体試験区の 93M01 品種 30 個体より種子を採取し、そのうち 300 粒をほ場に播種した。初生葉より葉組織を採取し DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、非組換えダイズの DNA マーカーを用いてリアルタイム PCR を行い、マーカー遺伝子の有無を調査し交雑率を求めた。

その結果、本組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率は、1.0%であり、非組換えダイズと 93M01 品種間の交雑率は 0.7%であった。

一般にダイズの自然交雑率は通常 0.5 ~ 3%と報告されている (Garber and Odland, 1926 ; Caviness, 1966 ; Ahrent and Caviness, 1994 ; Poehlman and Sleper, 1995 ; 農業技術体系, 2002 ; 農学大事典, 1994)。今回の米国ほ場における交雑実験の結果、本組換えダイズの交雑率は 1.0%で、対照の非組換えダイズ品種で認められた交雑率と同程度であり、ダイズの通常自然交雑率を超えるものではなかったことから、本組換えダイズのほ場における自然交雑能力は、従来のダイズと同程度であると考えられた。

なお、我が国の隔離ほ場において、形態及び生育の特性調査区の本組換えダイズと隣接した非組換えダイズ (畝間 80cm) から種子を採種し、本組換えダイズと非組換えダイズの交雑の有無を調査した (別紙 6、20 ページ)。その結果、本試験での交雑率は 0%であった。

有害物質の産生性

根から分泌され他の植物に影響を与えるもの (後作試験)

ダイズについて、根から有害物質を分泌して周辺の植物に影響を与えることは知られていない。確認のため、後作試験により、根から分泌され他の植物体に影響を与える有害物質の産生性について調査を行った。

収穫後に試験区各プロット (3 反復) の植物体の根元 3 箇所から根圏土壌を採取し、篩で根などを取り除き混和した後、プロットごとに 1/5000a ワグネルポットに詰めた。検定植物としてハツカダイコンをポット当たり 30 粒播種し、発芽率調査後に 10 個立てとした。播種後約 3 週間ガラス温室内で生育させた後、植物体を採取し、草丈、新鮮重量及び乾燥重量を測定した。その結果、ハツカダイコンの発芽率、草丈、新鮮重量及び乾燥重量において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められなかった (別紙 6 の表 8、18 ページ)。

なお、2005 年に米国パイオニア・ハイブレード・インターナショナルにおいて、

T5 世代を用いて根圏土壌法 (Iqbal *et al.*, 2004) により、根から分泌され他の植物体に影響を与える内因性物質の産生性について調査を行った。その結果からも、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められないことが確認されている

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5ap.pdf)

これらのことから、本組換えダイズの根から分泌され他の植物に影響を与えるような有害物質の産生性は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

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

ダイズには、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性は知られていない。本組換えダイズには、GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。確認のため、植物体鋤込み試験により、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性について調査を行った。

収穫後の植物体の地上部を各プロット (3 反復) より採取して乾燥粉末を調製した。これを 0.5%(w/w)の割合で非耕作区の畑の土壌と混和して、それぞれ 1/5000a ワグネルポットに詰めた。検定植物としてハツカダイコンをポット当たり 30 粒播種し、発芽率調査後に 10 個立てとした。播種後約 3 週間ガラス温室で生育させた後、植物体を採取し、草丈、新鮮重量及び乾燥重量を測定した。その結果、ハツカダイコンの発芽率、草丈、新鮮重量及び乾燥重量において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの植物体を鋤込んだ土壌間で、統計学的有意差は認められなかった (別紙 6 の表 9、19 ページ)。

なお、2005 年に米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナルにおいて、T5 世代を用いて、サンドイッチ法 (Fujii *et al.*, 2003 and 2004、農環研究成果報告書, 1997) により、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える内因性物質の産生性について調査を行った。その結果からも、本組換えダイズと非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められないことが確認されている (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5ap.pdf)

これらのことから、本組換えダイズが植物体内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの (土壌微生物相試験)

ダイズが根から有害物質を分泌して周辺の土壌微生物に影響を与えることは知

られていない。確認のため、希釈平板法により根から分泌され土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性について調査を行った。

各プロット内の4地点からコアサンプラーを用いて100mlずつ土壌を採取し混和した。これに滅菌水を加えブレンダーを用いて攪拌混合した後、 10^{-3} から 10^{-7} までの希釈液を作成した。希釈平板法により、細菌及び放線菌についてはPTYG培地で7日間、糸状菌についてはローズベンガル培地で3日間25℃で静置培養した。土壌採取は、7月24日と10月16日に行った。試験は3反復で行い、本組換えダイズ及び非組換えダイズの栽培土壌における細菌数、糸状菌数及び放線菌数を調査し、本組換えダイズと非組換えダイズの間でt検定を行った。

この結果、いずれの採取時期においても、本組換えダイズと対照品種のプロットから採取した土壌中の細菌数、糸状菌数及び放線菌数に統計学的有意差は認められなかった(別紙6の表10、20ページ)。これらのことから、本組換えダイズの根から分泌され土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性は、対照の非組換えダイズと同程度であると結論した。

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

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

(2) 使用等の方法

(3) 承認を受けようとするもの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

申請書の別添資料「緊急措置計画書」を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(6) 国外における使用等に関する情報

2003年から2006年にかけて、米国及びカナダの延べ62箇所のほ場において本組換えダイズの栽培試験が行われているが、目的とした形質が本組換えダイズに付与されている以外に非組換えダイズとの相違は報告されていない。

また、2006年11月に米国食品医薬品局（FDA）へ食品及び飼料としての安全性の申請を、そして、2006年9月に米国農務省（USDA）へ無規制裁培許可の申請をそれぞれ行っている。

我が国においては、隔離ほ場試験を行うための安全性確認を行い、2006年7月に承認が得られている。また、2007年に食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省にそれぞれ行う予定である。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主であるダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、長年にわたり食品・飼料への加工用として海外より輸入されてきた。また、食用として我が国でも栽培されている。我が国におけるこれまでのダイズの輸入や栽培の中で、ダイズが野生化し、野生動植物の生育に支障をきたしたという報告はないことから、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えダイズと非組換えダイズを比較して影響が高まっているか否かを考察することとする。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズについては、これまでも我が国において栽培がなされているが、我が国において、野生化したという報告はない。我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの諸特性(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)について評価を行った。その結果、主茎長において、本組換えダイズの平均が47.5 cmであったのに対し、対照の非組換えダイズでは、平均が55.2 cmであり、統計学的に有意差が認められた。しかし、この有意差が、競合における優位性に関して、生物多様性影響が生ずるとは考えにくい。なお、主茎長についてさらに確認のための調査を行ったところ、新たな調査では、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は認められなかった。また、調査したその他の特性についても、本組換えダイズは、対照の非組換えダイズと同程度であることが確認された。

本組換えダイズには除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されているが、自然条件下でこれらの除草剤が散布されることは想定され難く、したがって本形質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、本組換えダイズの競合における優位性は従来のダイズと同程度と考えられ、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

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、競合における優位性に関して生物多様性影響を生じ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

ダイズにおいて、生物多様性に影響を与えるような有害物質の産生は報告されていない。本組換えダイズには、GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。両蛋白質において、相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。さらに、本組換えダイズで産生する GAT4601 蛋白質は除草剤グリホサートに対して極めて高い基質特異性を示し、もう 1 つの産生蛋白質である GM-HRA 蛋白質についても、分枝アミノ酸合成経路におけるフィードバック制御を受けていることが示されており、宿主の持つ代謝系に影響を及ぼす可能性は低く、加えて、両者は独立した代謝経路等に関わる酵素蛋白質であることから相互に影響することも考え難い。

一方、我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの有害物質の産生性に関して、栽培土壌を用いた後作試験、収穫後の植物を用いた鋤込み試験及び栽培土壌中の微生物相試験を実施した。その結果、いずれの試験においても、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差は認められなかった（第一．2．(6)．口．参照）。

以上のことから、本組換えダイズの有害物質（根から分泌され他の植物体に影響を与えるもの、植物体が内部に有し枯死した後に他の植物に影響を与えるもの、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの）の産生性は、従来ダイズと同程度であると結論され、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

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、有害物質の産生性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

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

ダイズと交雑可能な近縁野生種として、ツルマメが我が国に自生していることが知られている。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物としてツルマメが特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

ツルマメはダイズと低率ではあるが自然交雑し、生じた雑種の生育や生殖には障害が見られないことが知られている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。ツルマメは一年生植物で、主に河原や土手に自生し、畑の周辺や果樹園にも生育が見られることから、本組換えダイズが我が国で第一種使用規程に従って使用された場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する機会があることは否定できない。そこで、雑種形成の可能性及び雑種が形成された場合に、本組換えダイズに付与された形質を有する雑種個体群が優占化し、その雑種を通じて、本組換えダイズの導入遺伝子がツルマメの集団中に浸透してゆく可能性について以下に検討した。

(3) 影響の生じやすさの評価

1) 本組換えダイズと非組換えダイズの自然交雑率の比較

ダイズは、基本的に開花前に蕾の中で自家受粉する自殖性植物であり、自家不和合性は知られていない。まれに虫媒により自然交雑が起こると考えられており (別紙 1)、ダイズの品種間の自然交雑率は 0.5% から 3% であることが報告されている (Garber and Odland, 1926; Caviness, 1966; Ahrent and Caviness, 1994; Poehlman and Sleper, 1995; 農業技術体系, 2002; 農学大事典, 1994)。

米国の栽培ほ場において、本組換えダイズを用いて自然交雑性試験を行った結果、本組換えダイズまたは非組換えダイズと受粉株の 93M01 との交雑率は、各々 1.0% と 0.7% と同程度であり、これまでに知られているダイズ間の自然交雑率の範囲内 (0.5 - 3.0%) であることが確認された。上述のように、ダイズではまれに虫媒により自然交雑が起こるとされていることから本組換えダイズと非組換えダイズにおいて虫媒に由来すると考えられる自然交雑率は、同程度であると考えられた。また、我が国での隔離ほ場試験において、交雑性に関与すると考えられる花粉の稔性及びサイズの調査を行った結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズの

間に有意な差は認められなかった。さらに、本組換えダイズと隣接した非組換えダイズ(畝間 80cm)から種子を採種し、本組換えダイズとの交雑の有無を調査したが、本試験における交雑率は0%であった。

以上の結果より、本組換えダイズの自然交雑能力は、非組換えダイズと同等であると判断された。本組換えダイズとツルマメとの交雑性については、直接調査は行わなかったが、本組換えダイズの自然交雑率は非組換えダイズの自然交雑率と同程度であることから、ツルマメとの自然交雑率についても本組換えダイズと非組換えダイズは同等であると推定された。

2) ツルマメとの雑種形成の可能性についての検討

ダイズとツルマメの交雑率に関しては、ツルマメ及びダイズを用いて、交互に50cm の間隔をあけて栽培した実験条件下で交雑率を評価する実験が行われている。その結果、開花時期が一致した場合のツルマメとダイズ品種との交雑率は約0.7%であったと報告されている (Nakayama & Yamaguchi (2002))。しかし、一般的に、ダイズの開花期はツルマメより早く、ダイズとツルマメの開花期は重なりにくいことが知られている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

本組換えダイズと非組換えダイズの自然交雑率の試験結果及びツルマメとダイズ品種の自然交雑率についてこれまでに得られている知見から、本組換えダイズとツルマメとの自然交雑率も、従来のダイズと同様であると考えられる。

3) 雑種が形成された場合の優占化及び浸透の可能性についての検討

ツルマメ間での自然交雑率については2.3% (Kiang *et al.*, 1992) とされており、また、訪花昆虫が多い自然条件では、交雑率が13%との報告もなされている (Fujita *et al.*, 1997)。

ダイズやツルマメの葉緑体 DNA には両者を特徴付ける二つの多型があり、それらの組み合わせにより、ダイズやツルマメの葉緑体 DNA は3種類の型 (I型、II型及びIII型) に分類することができる (Close *et al.*, 1989)。I型は、近代の栽培ダイズに多くみられ、III型は、ツルマメ、または栽培原種及びツルマメと栽培種の間中型である *G.gracilis* に多くみられることが明らかにされている。Abeら (1999) は、日本で収集したツルマメの葉緑体 DNA を用いてその分類を行い、日本のツルマメと栽培ダイズ間の浸透交雑の程度を検証した。その結果、日本において収集したツルマメ (全 330 地域) の葉緑体 DNA は、その多くが III 型であり、I型を示したツルマメは1.8% (6 地域) であることが確認された。I型を示した6地域のツルマメのうち、4地域では、ツルマメと同様の形態的特徴を示した。その理由の一つとして、交雑により生じた雑種が自然選択圧により、野生型に戻っていった結果 (dedomestication) であると推測されている。

したがって、栽培ダイズからツルマメへの遺伝子の浸透は容易でないと考えら

れる。

4) まとめ

以上、本組換えダイズとツルマメが自然交雑する可能性は従来のダイズ品種と変わらないと考えられた。また、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、その雑種個体群が優占化する可能性は考え難く、したがって、本組換えダイズの導入遺伝子がツルマメの集団中に浸透してゆく可能性も極めて低いと結論された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、交雑性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主であるダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)は、長年にわたり食品・飼料への加工用として海外より輸入されてきた。また、食用として我が国でも栽培されている。我が国における、これまでのダイズの輸入や栽培の中で、ダイズが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はない。

我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えダイズの諸特性（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）について評価を行い、調査を行った特性について、本組換えダイズは、対照の非組換えダイズと同程度であることが認められた。

また、本組換えダイズには除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されているが、自然条件下でこれらの除草剤が散布されることは想定され難く、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。以上のことから、本組換えダイズの競合における優位性は従来のダイズと同程度と考えられ、競合における優位性に関して、本組換えダイズにおいて生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

ダイズにおいて、生物多様性に影響を与えるような有害物質の産生は報告されていない。本組換えダイズでは、導入遺伝子によって GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が有害物質であるという報告はない。両蛋白質において、相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。さらに、本組換えダイズで産生する GAT4601 蛋白質は除草剤グリホサートに対して極めて高い基質特異性を示し、もう 1 つの産生蛋白質である GM-HRA 蛋白質についても、分枝アミノ酸合成経路におけるフィードバック制御を受けていることが示されており、宿主の持つ代謝系に影響を及ぼす可能性は低く、加えて、両者は独立した代謝経路等に関わる酵素蛋白質であることから相互に影響することも考え難い。

一方、隔離ほ場試験において、本組換えダイズの有害物質の産生性に関して、根から分泌されて後作物や周辺植物に影響を及ぼす可能性、収穫後の植物が土壌に鋤き込まれて後作物や周辺植物に影響を及ぼす可能性及び根から分泌されて土壌微生物に影響を及ぼす可能性について評価したが、本組換えダイズにおいてそれらの可能性は認められなかった（第一．2．(6)．口．参照）。

以上のことから、有害物質の産生性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物としてダイズと交雑可能

なツルマメが特定された。従来、ダイズとツルマメの交雑率は0.7%と報告されている（Nakayama and Yamaguchi, 2002）。また2006年に我が国の隔離ほ場及び米国アイオワ州のほ場で行われた試験の結果、本組換えダイズの交雑率は従来のダイズと同程度であった。したがって、ダイズとツルマメとの交雑率も従来のダイズと同程度であると推定されること、また、上述のように競合における優位性も従来のダイズと同程度であると考えられること、さらに開花期も重なりにくいことから、本組換えダイズが、ツルマメと自然交雑し、さらに導入遺伝子がツルマメの集団中に浸透してゆく可能性は低いと考えられた。

以上の評価に基づき、仮に本組換えダイズとツルマメが自然交雑することがあったとしても、その雑種個体群が優占化する可能性は考え難く、また、本組換えダイズの導入遺伝子がツルマメの集団中に浸透してゆく可能性も極めて低いと結論され、したがって、交雑性に関して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

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

参考文献

【社外秘につき非公開】

別紙一覧

- 別紙 1 第 2 回「第 1 種使用規定承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1：栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方 2. サイズ
- 別紙 2 導入に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基配列及び GAT4601 蛋白質及び GM-HRA 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘につき非公開)
- 別紙 3 GAT4601 蛋白質を用いた基質特異性に関する評価結果 (社外秘につき非公開)
- 別紙 4 種子における遊離アミノ酸含有量 (社外秘につき非公開)
- 別紙 5 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 (社外秘につき非公開)
- 別紙 6 隔離ほ場における栽培試験報告書 (社外秘につき非公開)

緊急措置計画書(食用、飼料用に供する場合)

平成 19 年 2 月 16 日

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

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat4601, gm-hra, Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5) (以下、本組換えダイズと表記)) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1. 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

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

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

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

ると認められた場合には、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

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

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

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

5．農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成 19 年 2 月 16 日

氏名 デュボン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔

住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (*gat4601, gm-hra, Glycine max* (L.) Merr.) (DP-356043-5、OECD UI : DP-356043-5) (以下、本組換えダイズと表記) について、第一種使用規定に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1. 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

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

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

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

ると認められた場合には、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

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

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

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

5．農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。