

高オイルダイズ(*dgat2A, Glycine max* (L.) Merr.) (MON87754, OECD UI :
MON-87754-1)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	
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
① 和名、英名及び学名	4
② 宿主の品種名	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(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	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	6
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または器官からの出芽特性	7
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	7
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
ホ 病原性	8
ヘ 有害物質の産生性	8
ト その他の情報	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	10
イ 構成及び構成要素の由来	10
ロ 構成要素の機能	10
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	10
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨	15
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	18

(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	22
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択の方法	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及び系統樹	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	25
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	25
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複製数世代における伝達の安定性	25
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	25
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	25
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度	26
(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	26
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	26
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	26
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	26
a 形態及び生育の特性	26
b 生育初期における低温又は高温耐性	28
c 成体の越冬性又は越夏性	29

d 花粉の稔性及びサイズ	29
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	29
f 交雑率	30
g 有害物質の産生性	30
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	30
(1) 使用等の内容	30
(2) 使用等の方法	31
(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	32
(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	32
(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	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	33
1 競合における優位性	33
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	33
(2) 影響の具体的内容の評価	38
(3) 影響の生じやすさの評価	38
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	38
2 有害物質の産生性	38
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
(2) 影響の具体的内容の評価	39
(3) 影響の生じやすさの評価	39
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	39
3 交雑性	39
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	39
(2) 影響の具体的内容の評価	40
(3) 影響の生じやすさの評価	40
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	42
4 その他の性質	42
第三 生物多様性影響の総合的評価	43
参考文献	45
緊急措置計画書	46
モニタリング計画書	48

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 12 月 25 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿
環境大臣 鴨下 一郎 殿

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

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	高オイルダイズ (<i>dgat2A</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87754, OECD UI: MON-87754-1)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びに これらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 22 年 1 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場 を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であ ること及び管理責任者の氏名を明示した標識を 見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に附着 した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄 によって除去するための洗い場を設置している とともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出 を防止するための設備を排水系統に設置してい る。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するた めの防風網を設置している。また、播種時には 防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ 以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最 小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬 し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出し ない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本 遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイ ズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込 む等により、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作 業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、 意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の

	<p>外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。</p> <p>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。</p>
--	---

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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

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

② 宿主の品種名

宿主はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*G. max*) であり、品種名は A3244 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1100 年頃にこの地域で栽培化されたと推定され、その後、中国南部、東南アジア、朝鮮及び日本へ栽培が広がったと考えられる (文献 8)。わが国へは縄文時代に渡来、栽培が始まったと考えられ、

副食として利用されていたと思われる (文献 9)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2006 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 9,360 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 2,898 万 ha、ブラジルが約 2,201 万 ha、アルゼンチンが約 1,510 万 ha、中国が約 959 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2005 年のわが国における栽培面積は約 14 万 ha であった(文献 10)。

2005 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 418 万トンであり、そのうちの約 75%が米国から輸入されている (文献 11)。2005 年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 434 万トンであった。国内消費仕向量の用途別内訳は、製油用が約 308 万トン、食品用が約 87 万トン、味噌・醤油用が約 17 万トン、飼料用が約 13 万トン、その他が約 9 万トンとなっている (文献 12)。

わが国におけるダイズの利用方法は多岐に渡り、味噌、醤油、豆腐、納豆、ゆば、きな粉、煮豆、もやしとして食されるほか、分離蛋白、濃縮蛋白等は食品添加物として、搾油は食用植物油として、脱脂ダイズは家畜用飼料として利用されている (文献 9)。

わが国でのダイズの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は北海道地方で 5 月中旬～6 月上旬、東北地方、北陸・東山地方で 6 月上旬、関東地方で 6 月中旬、東海地方以西中国地方までは 6 月下旬、九州地方で 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) 及び 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。生育期間中は除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病虫害の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り取り・脱粒を一緒に行う方法とがある (文献 9)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

¹国内生産量+輸入量-輸出量-在庫の増加量(または+在庫の減少量)から算出される。2005 年は輸出量は 0、在庫は約 7 万トン増であったため、 $23+418-0-7=434$ (万トン)が国内消費仕向量となる。

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(文献1)。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌の寄生によって根粒を着生する(文献9)。花には1本の雌ずいがあり、その基部の子房に1~5個の胚珠を内蔵しており、子房は受粉後に肥大して莢を形成する(文献9)。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響し、ある時間以上の暗期が花芽分化に必要で、温度は15℃以上を必要として25℃前後までは高いほど促進的に働き、短日高温では促進効果が大きい、長日高温では促進効果がないか、かえって遅れることがある(文献8)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は30~35℃、最低発芽温度及び最低生育温度は2~4℃であり、10℃以下での発芽は極めて悪い(文献8)。ダイズの栽培適地は、生育期間中18~28℃程度、多照で適度の降雨のあることが望ましいとされているが、今日のダイズ品種では日長感受性が細かく分化して各種の気候に対する適応性が高くなっており、赤道直下のインドネシアから北緯60°のスウェーデンでも栽培可能である(文献8)。

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

—

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

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脱粒性の程度は低い。また種子休眠性は知られていない。種子の発芽能力に関しては、常温で貯蔵した場合に通常約3年で失われる(文献9)。

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

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

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

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

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 (文献 13; 文献 14)、その形態がダイズに近かったことから、通常のツルマメと比べて、ダイズと交雑する可能性が高いことが予想された。しかし、過去 10 年以上にわたり日本各地より 800 近い集団からツルマメの収集を行った中にオオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は見つかっていないという報告があることから (文献 14)、仮にこのような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育する範囲はかなり限られていることが予想される。

ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しないままで受粉する閉花受粉を行うため (文献 14)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のは場条件でダイズ同士における他家受粉率は最大で 3.62% (文献 15)、ツルマメ同士における他家受粉率は最大で 2.3% (文献 16) と報告されている。

特異的な条件では交雑率が上昇することもある。例えば、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズほ場の中心に設置した場合、その他家受粉率は平均で 2.96~7.26% となり、局所的には 19.5% に達したと報告されている (文献 17)。またツルマメに関しても、秋田県雄物川流域で約 13% という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (文献 18)。この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠あたりの花粉数は平均で 600~700 粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の 1 胚珠あたりの平均的な花粉数の中間に位置していた。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。しかし、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ミツバチやクマバチなどが頻繁に観察されていた。

ダイズとツルマメの交雑性に関しては、上述したようにいずれも閉花受粉をおこなう自殖性植物であることに加え、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約1ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている(文献14)。他のダイズ品種と比べて開花期が遅い日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ (Gls/93-J-01) をそれぞれ30個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した報告では、自然交雑実験終了後に結実したツルマメから取得された686個体の後代を調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が5個体認められたことから、その交雑率は0.73%と報告されている(文献19)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、稔性は2~4時間で失われる。花粉の直径は15~25 μm である(文献20)。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所が平成13年に行った除草剤耐性の遺伝子組換えダイズを用いた交雑試験では、交雑率は花粉親からの距離が0.7mで0.19%、3.5mで0.025%、10.5mで0%であった。さらに平成14年に同研究所で行われた試験では、花粉親からの距離が0.7mで0.16%、2.8mで0.08%、3.5mで0%の交雑率であった(文献21)。

ホ 病原性

—

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また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。

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畑以外で生育したという報告はない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

高オイルダイズ (*dgat2A*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87754, OECD UI : MON-87754-1) (以下「本組換えダイズ」とする)には *dgat2A* 遺伝子が導入されている。*dgat2A* 遺伝子は真菌(*Umbelopsis ramanniana*)由来のトリアシルグリセロール (TAG) 生合成反応を触媒するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2A (DGAT2A、以下「DGAT2A 蛋白質」とする) をコードする(文献 22)。ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) は植物、真菌、哺乳類に普遍的に存在し、TAG の生合成における最終段階である、ジアシルグリセロールに脂肪酸を付加して TAG を合成する反応を触媒する。本組換えダイズでは、*dgat2A* 遺伝子をダイズ由来の 7Sa'プロモーター(文献 23)によって胚特異的に発現させることにより、従来品種と比較して種子中の蛋白質含量及び収量に影響をあたえることなく油分含量を約 1.5%増加させることを目標としている。

TAG は動植物に広く分布しており、エネルギー源として重要な分子である。また、油糧作物においては脂肪種子における主要な貯蔵脂質であり、植物油として利用されている。穀物市場に上場される商品であるダイズ油(粗油²)の 95 - 97%、可食油として供される精製油の 99%以上は TAG である(文献 24)。したがって、ダイズ種子の TAG 生産量を増加させ、種子中の油分含量を高めることで、より多くのダイズ油を得ることが可能となる。本組換えダイズでは種子中の TAG 含量及び油分含量を約 1.5%増加させることを目標としており、実際に米国の 6 箇所のは場で油分含量を測定したところ、油分含量が 1.67%増加していることが確認された(表 2, p21、別添資料 1)。

ダイズ油は植物油の原料として、世界で最も多く使用されている(文献 25)。近年、中国やインドなどの発展途上の市場の著しい拡大などの要因により、全世界における植物油の需要は高まる一方である。また、燃料価格は記録的な高値を示し、今後も高値傾向は続くと予測されている。この燃料価格の上昇により、ダイズ油からも生産可能であるバイオディーゼルのような代替エネルギーの需要も高まっている。このような背景に起因してダイズ油の市場価値も高まっていることから、本組換えダイズのようなダイズ油分含量の高いダイズは従来商業品種に比較して経済価値が高まると期待される(別添資料 2)。

²ダイズから溶媒によって抽出したのみの状態の油で精製前のもの。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 1(p11)及び表 1 (p12~14)に示した。

なお、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 CP4 EPSPS 蛋白質は植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することの無いように塩基配列に改変を加えたもので、*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、本組換えダイズに挿入された *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 世代において通常の散布量よりも低薬量での除草剤グリホサート散布を行い、除草剤による傷害を受けた個体のみを選抜した上で、さらに改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たないことを PCR 分析により確認することによって、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選抜している(図 3, p24)。

ロ 構成要素の機能

- ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1(p12~14)に示したとおりである。

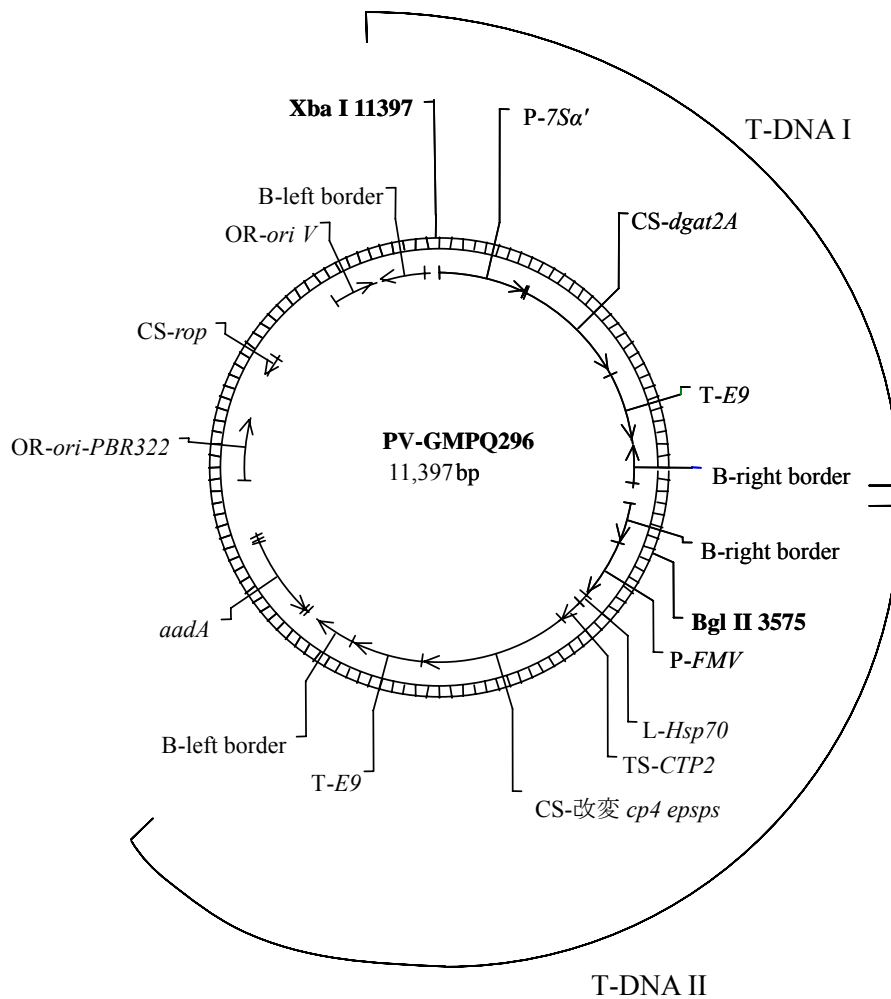


図 1 PV-GMPQ296 のプラスミドマップ³

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。

³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

構成要素	由来及び機能
T-DNA I	
B ^{注1} -Left Border	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 26)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注2} -75α'	β-コングリシニン貯蔵蛋白質 (alpha'-bcsp) をコードしている <i>G. max</i> の <i>Sphas1</i> 遺伝子に由来するプロモーター及びリーダー配列 (文献 23)。mRNA の転写を胚特異的に誘導する(文献 27)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS ^{注3} - <i>dgat2A</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i> 由来のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 (diacylglycerol acyltransferase type 2A) をコードする配列(<i>Urdgat2A</i>)(文献 22)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T ^{注4} - <i>E9</i>	<i>Pisum sativum</i> のリブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する(文献 28)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Right Border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 29)。
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

表 1(つづき) 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMPQ296 の各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)	
B-Right Border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 29)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus (FMV) の 35SRNA のプロモーター(文献 30)。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5} - <i>Hsp70</i>	<i>Petunia Hybrida</i> の熱ショック蛋白質 70 をコードする <i>DnaK</i> 遺伝子の 5'末端非翻訳リーダー領域(文献 31)。遺伝子の発現制御を補助する役割を持つ。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
TS ^{注6} - <i>CTP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)蛋白質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (文献 32)。
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコーディング配列 (文献 33; 文献 34)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T- <i>E9</i>	<i>P. sativum</i> のリブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する(文献 28)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域 (文献 26)。

表 1(つづき) 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMPQ296 の各構成要素の由来及び機能⁴

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域(本組換えダイズには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ由来の細菌プロモーター、コーディング配列及び 3' 非翻訳領域 (文献 35)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注7} - <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (文献 36)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>CS-rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコーディング配列であり、 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (文献 37)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR- <i>ori V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (文献 38)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注¹ B—Border region (境界配列)

注² P—Promoter (プロモーター)

注³ CS—Coding Sequence (コーディング配列)

注⁴ T—Transcript termination sequence (転写終結配列)

注⁵ L—Leader (リーダー配列)

注⁶ TS—Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁷ OR—Origin of Replication (複製開始領域)

⁴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 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同一性を有する場合はその旨

【*dgat2A* 遺伝子】

本組換えダイズには、真菌の一種である *U. ramanniana* 由来の *dgat2A* 遺伝子 (*Urdgat2A*) が導入されている。*dgat2A* 遺伝子は TAG 生合成反応を触媒する DGAT2A 蛋白質をコードする(文献 22)。*U. ramanniana* は森林土壌に普通に生息している真菌であり、世界最大の細胞・微生物・遺伝子バンクである American Type Culture Collection (ATCC) では、バイオセーフティレベル 1 に分類されている。バイオセーフティレベル 1 とは、米国病気抑制防止局 (CDC) と米国国立衛生研究所 (NIH) による定義づけで、全ての菌株の中で最も安全で、ヒトや動物に対する病原性を持たないものである(文献 39)。

DGAT は、植物、真菌、哺乳動物において、TAG の生合成における最終段階を触媒する酵素であり、ジアシルグリセロールに脂肪酸を付加して TAG を合成する反応を触媒する。p17 の図 2 に TAG 生合成経路を示す。DGAT はジアシルグリセロールの *sn*-3 位にアシル CoA 由来の脂肪酸を結合する反応を触媒し、TAG を産生する。

TAG はダイズのような油糧種子における主要な貯蔵物質である。ダイズ種子では上述した TAG の生合成と蓄積は胚で起こる。産生された TAG は細胞質にあるオイルボディの中に貯蔵される。貯蔵された TAG は発芽の際にリパーゼによってグリセロールと脂肪酸の間のエステル結合が順次加水分解され、グリセロールと脂肪酸になる(文献 40; 文献 41)。脂肪酸はその後 β 酸化系などによりエネルギーとして使用される。

DGAT が植物、真菌、哺乳類において、TAG 生合成経路における律速反応を触媒しているとの報告は複数存在する (文献 42; 文献 43; 文献 44; 文献 45, 文献 46; 文献 47; 文献 48) 。このうち、植物種子において DGAT が TAG 生合成経路の律速酵素であり、油分含量を左右する重要な因子であることは以下の i)~ iii) の報告により示唆されている。

- i) シロイヌナズナにおいて、*dgat* 遺伝子に突然変異を生じ正常に機能していない突然変異体では種子の発達段階に影響が生じて種子が完全には充実せず (文献 49) 、TAG の前駆体であるジアシルグリセロールと TAG の比 (DAG/TAG 比) が増大し (文献 50) 、種子の油分含量が低下する(文献 51; 文献 49, 文献 52)。
- ii) 西洋ナタネにおいて、油分の蓄積に関与する酵素の活性が高く胚における油分の蓄積が盛んな時期 (受粉後 17 日目から 46 日目) の胚を摘出し胚中の脂質成分の分析を行った結果、TAG の前駆体であるジアシルグリセロー

ル蓄積量が多かったことから、油分蓄積の律速因子が DGAT であることが示唆された（文献 45, 文献 46）。また、一般的に明条件では脂肪酸及び脂質の生合成が活発に行われ、暗条件下ではこれらの物質の生合成は活発には行われないことが知られている。そこで、西洋ナタネで、受粉後 30 日目に植物体を暗条件と明条件のどちらかに 4 時間おいた後に胚を摘出し、胚中に蓄積している脂質及び DGAT 活性を比較した(文献 48)。この結果、明条件下では暗条件下と比べて DGAT 活性及び TAG の量に変化は認められなかったが、ジアシルグリセロールの蓄積量は増加した。詳細を見るために上記と同じ条件の胚で TAG 生合成経路の酵素（図 2 の①、②、③と DGAT, p17）の酵素活性と TAG 生合成経路の中間物質(図 2 の a,b,c,d, p17)の量を測定し胚組織 1g あたりに換算したところ、DGAT の活性は最も低く、ジアシルグリセロールの蓄積量は最も多かった（文献 48）。

- iii) コムギにおいて、DGAT 活性または DGAT の発現量の増加と TAG 生合成量の増加は正の相関を示すと報告されている(文献 53)。同様に、ダイズにおいても、従来ダイズ品種で油分含量の高い品種は登熟中の種子における DGAT 活性が高い傾向があることから、油分含量と DGAT 活性の間には正の相関があるとの報告がある（文献 54）。

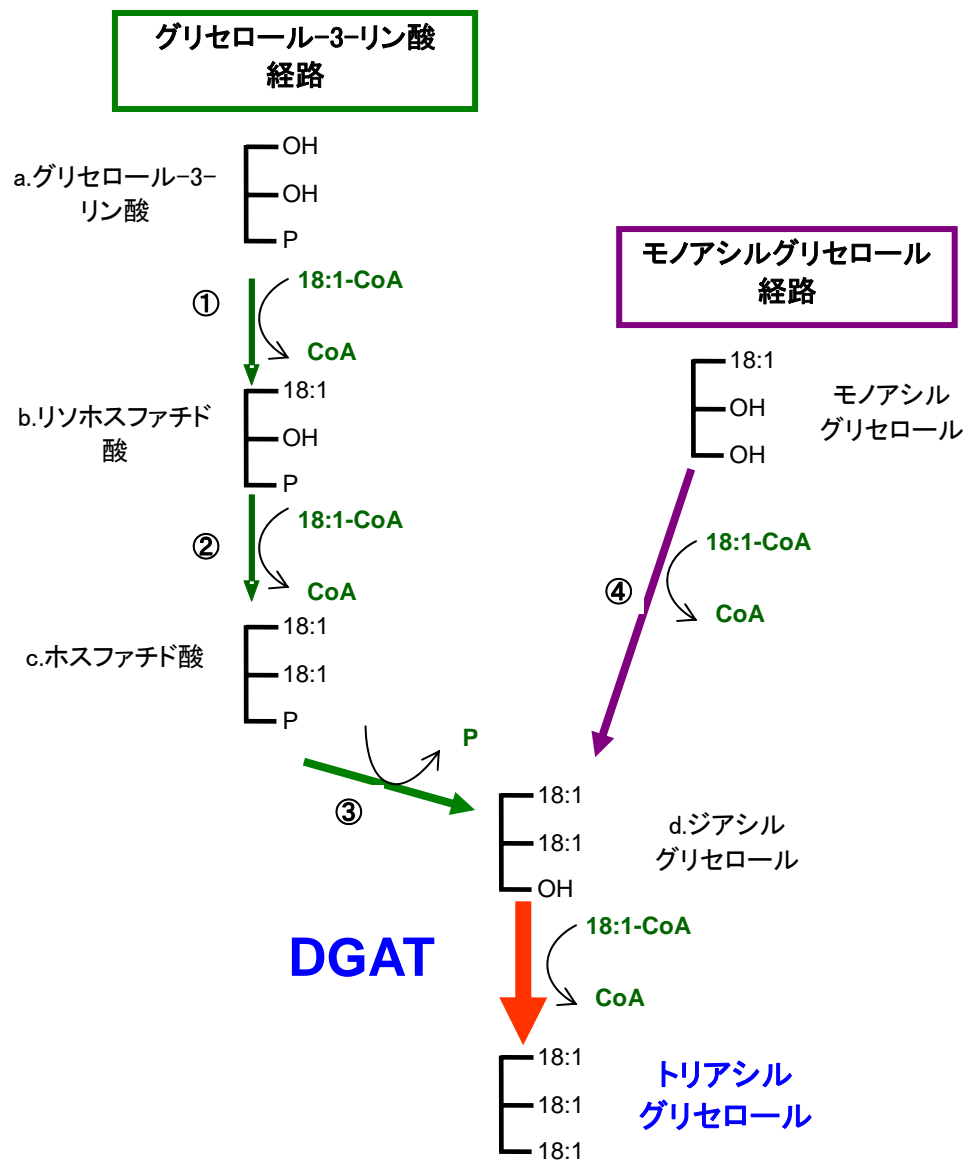
このような試験結果から、DGAT 活性を高めるか DGAT の発現量を増やすことにより TAG 生合成能を高めることができると考えられた。実際にシロイヌナズナ由来の DGAT をコードする cDNA を、シロイヌナズナの胚特異的に過剰発現させたところ種子の油分含量が増加することが確認された（文献 55）。

以上の知見により、ダイズにおいても外来の *dgat2A* 遺伝子を導入し、DGAT の発現量を高めることで、ダイズ種子における TAG 含量及び油分含量を増加させることができると考えられた。

dgat2A 遺伝子から推定した DGAT2A 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 3 に示すとおりである。

DGAT2A 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース 6 (AD6⁵) を用いて FASTA 型アルゴリズム及び ALLERGENSEARCH 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

⁵ 文献 56 に登録されていた配列からなるデータベース。



- ① グリセロール-3-リン酸 ホスファチド酸 アシルトランスフェラーゼ
- ② リソホスファチド酸 ホスファチド酸 アシルトランスフェラーゼ
- ③ ホスファチド酸 ホスファチド酸 ホスファターゼ
- ④ アシル CoA:モノアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ (MGAT)
18:1 オレイン酸(脂肪酸の1例として。他の脂肪酸もあてはまる)

図 2 トリアシルグリセロール生合成経路における DGAT の役割⁶

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。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容⁷

油糧種子であるダイズ種子は、その登熟過程で貯蔵物質として TAG を生合成し、胚内に蓄積する(文献 40; 文献 41)。油糧種子における TAG 生合成経路のうち、DGAT によって触媒されるジアシルグリセロールにアシル-CoA 由来の脂肪酸を付加して TAG に変換する反応は TAG の生合成における重要な律速因子であると考えられている(詳細は第一の 2-(1)-ロ-②(p15~16)に記載)。本組換えダイズでは、*U. ramanniana* 由来の DGAT2A 蛋白質を胚特異的に発現させることにより、従来ダイズよりも胚における DGAT の発現量が増え、ジアシルグリセロールから TAG への生合成が促進し、その結果、従来ダイズよりも種子中の TAG の含量及び油分含量が増加する。

実際に、本組換えダイズおよび対照の非組換えダイズ A3244 の種子の構成成分を測定したところ、本組換えダイズの TAG 含量及び油分含量(総脂質含量)において A3244 との間に統計学的有意差が認められ、種子重量に対してそれぞれ 1.46%dw と 1.67%dw 増加していた(表 2, p21)。

さらに、2006 年に米国の 19 箇所のほ場(各 4 反復)及びアルゼンチンの 13 箇所のほ場(各 3 反復)の計 32 箇所のほ場において、本組換えダイズ、Null 型ダイズ⁸及び本組換えダイズの遺伝子導入母本である非組換えダイズ品種 A3244 を栽培し、収穫種子の油分含量を測定した。その結果、本組換えダイズと Null 型ダイズ、及び本組換えダイズと A3244 の間では 32 箇所のほ場全てにおいて油分含量に統計学的有意差が認められた(別添資料 4 の表 1~2, p5~6)。したがって、本組換えダイズにおける導入遺伝子の効果は様々な地理的条件及びそれに伴う環境条件の変動の下でも一定して油分含量を増加することが示された。収量についても本組換えダイズの導入遺伝子によって影響は生じないことが示されている(別添資料 4、5、6)。

なお、文献によるとダイズ種子より抽出した粗油の組成は約 95-97%が TAG であり、その他に 1.5-2.5%のリン脂質と微量のステロール、遊離脂肪酸などが含まれる(文献 24)。表 2(p21)より計算すると、本組換えダイズの TAG 以外の脂質は種子重量に対し 2.29%dw、対照の非組換えダイズ A3244 の TAG 以外の脂質は 2.08%dw であることから、本組換えダイズの種子中では TAG が増加しているがその他の脂質成分を大幅に変えることはないと考えられた。

⁷本項目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。

⁸本組換えダイズの育成過程の R1 世代において、遺伝的分離によって *dgat2A* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体を選抜し、自殖して得られたダイズであり、本組換えダイズとの差異は導入遺伝子の有無のみである。

本組換えダイズ種子の脂肪酸組成において、調査した7項目中6項目で統計学的有意差が認められたが、統計学的有意差が認められた脂肪酸の値は従来ダイズの文献値の範囲内であった(表 2, p21)。さらに、本組換えダイズに導入された *U. ramanniana* 由来の DGAT2A 蛋白質の基質特異性を調査するために DGAT2 蛋白質の酵素反応速度を調査した。その結果、DGAT2A 蛋白質は試験した脂肪酸の中では特定の脂肪酸を持つ基質に結合しやすいという傾向は認められなかった(別添資料 7)。蛋白質含量については、本組換えダイズの種子の蛋白質含量に関して、米国の6ほ場で行われた試験では変化は認められなかった(表 2, p21; 別添資料 1)。一方、2006年に米国の19箇所及びアルゼンチンの13箇所の計32箇所のほ場で収穫された本組換えダイズ、Null型ダイズ及び非組換えダイズ A3244 との間で種子の蛋白質含量を比較したところ、本組換えダイズと Null型ダイズの間で32箇所のほ場中7箇所で統計学的有意差が認められ、いずれも MON87754 系統が低かった(別添資料 4 の表 1, p5)。さらに、米国及びアルゼンチンのそれぞれのほ場全体で統計を行った結果でも、米国、アルゼンチンとも本組換えダイズが有意に低く、本組換えダイズでそれぞれ 41.54%dw、41.28%dw であったのに対し、Null型ダイズでは 41.74%dw と 41.55%であった(別添資料 4 の表 4, p8)。また、本組換えダイズと A3244 の間では32箇所中3箇所のほ場で統計学的有意差が認められ、いずれも MON87754 系統が低かった(別添資料 4 の表 2, p6)。さらに、米国及びアルゼンチンのそれぞれのほ場全体で統計を行った結果では、アルゼンチンで本組換えダイズが有意に低く、本組換えダイズで 41.28%dw、A3244 では 41.55%dw であった(別添資料 4 の表 4, p8)。このことから、本組換えダイズの蛋白質含量は Null型ダイズあるいは A3244 と比較して若干低下していたが、その差は 0.3%dw 未満であり、またほ場ごとの統計の結果で有意差が認められた計 10 箇所における本組換えダイズの蛋白質含量の値 (40.66%dw、41.15%dw、40.75%dw、42.48%dw、42.30%dw、41.00%dw、41.20%dw、40.83%dw、41.38%dw、41.27%dw) はすべて従来品種における蛋白質含量の文献値 33.19 - 45.48%dw (文献 57) の範囲内であった。これらのことから、TAG の増加が本組換えダイズの脂肪酸組成や蛋白質含量に大きな影響を及ぼすことはないと考えられた。

DGAT は真核生物に普遍的に存在しており、本組換えダイズに導入された微生物 (*U. ramanniana*) 由来の DGAT2A 蛋白質を含む真菌の DGAT、哺乳類の DGAT 及び植物の DGAT は全て同じ遺伝子ファミリーに属し(文献 22)、同じ機能を有する酵素である(文献 22; 文献 58; 文献 59)。DGAT はジアシルグリセロールにアシル基由来の脂肪酸を結合する反応を触媒する酵素であるが、哺乳類の DGAT においては本来の DGAT 活性に加えて弱いモノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(MGAT)活性も有する可能性を示唆する報告がある(文献 60)。MGAT は、モノアシルグリセロールにアシル CoA 由来の脂肪酸を結合し、DGAT の基質であるジアシルグリセロールを生成する酵素である(図 2 の④, p17)。哺乳類の DGAT の MGAT 活性によってジアシルグリセロールが供給されても、DGAT 自身の非常に強い DGAT 活性により TAG 生産の基質として用いられると考えられて

いる(文献 60)。本組換えダイズに導入した *U. ramanniana* 由来の DGAT2A 蛋白質が哺乳類の DGAT と同様に MGAT 活性を有するかどうかについては特定されていない。しかし、仮に本組換えダイズに導入された DGAT2A 蛋白質が、哺乳類の DGAT の報告と同様に MGAT 活性を有すると想定した場合、本組換えダイズ中においても MGAT 活性によって産生されたジアシルグリセロールは TAG 合成の基質として用いられると考えられる。

以上のことから、本組換えダイズに導入された *dgat2A* 遺伝子はダイズの胚で DGAT2A 蛋白質を発現させることで TAG の生産能を増し、その結果ダイズの油分含量を高めるが、それ以外の代謝経路に影響することはないと考えられる。

なお、TAG の産生が生体膜を構成するリン脂質の生成に影響を及ぼす可能性があるため、本組換えダイズにおいて TAG が増加することで生体膜に何らかの影響を及ぼし、酸化ストレス等に対する耐性に変化が生じる可能性が示唆された。その確認のため、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズについて温室で抗酸化性試験、乾燥耐性試験及び低温耐性試験を行う予定であり、それぞれの試験計画を別添資料 8~10 に示した。

表 2 本組換えダイズ、非組換えダイズ及び一般的なダイズ種子の成分組成の比較⁹

成分	本組換え ダイズ	A3244	ILSI Range ¹	
TAG 含量 (%dw) ²	15.60*	14.14	— ³	
油分含量(%dw) ⁴	17.89*	16.22	8.10 - 23.56	
蛋白質含量(%dw) ⁵	38.01	38.11	33.19 - 45.48	
脂肪酸組成 (% total FA) ⁶	本組換え ダイズ	A3244	ILSI Range	Codex Range ⁷
C16:0 (パルミチン酸)	10.64*	11.20	9.55-15.77	8.0-13.5
C18:0 (ステアリン酸)	4.46	4.52	2.70-5.88	2.0-5.4
C18:1 (オレイン酸)	23.36*	21.42	14.3-32.2	17-30
C18:2 (リノール酸)	52.62*	53.79	42.3-58.8	48.0-59.0
C18:3 (リノレン酸)	7.83*	8.48	3.00-12.52	4.5-11
C20:0 (アラキジン酸)	0.40*	0.20	0.163-0.482	0.1-0.6
C22:0 (ベヘン酸)	0.29*	0.13	0.277-0.595	ND ⁸ -0.7

本組換えダイズの R4 世代を米国の 6 ほ場(2 反復)で栽培し、得られた種子を分析した。

*本組換えダイズと A3244 との間で統計学的有意差が認められた (分散分析、 $p \leq 0.05$)

¹ 文献 57

² 種子中の TAG 含量。種子サンプルの重量を測定したのち、液体高速クロマトグラフィー (HPLC) によって TAG 分析した(別添資料 1)。

³ 文献値なし

⁴ 種子中の総脂質含量。種子サンプルの重量を測定したのち、2050 Soxtec Avanti Automatic Extraction System を用いてヘキサン抽出した脂質の重量を測定して換算した。

⁵ サンプルを燃焼させ窒素含量を測定した(換算係数 6.25)(別添資料 1)。

⁶ キャピラリーガス液体クロマトグラフィーによって分析した (別添資料 1)。

⁷ 文献 61

⁸ ND – non detectable ($\leq 0.05\%$)

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

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

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

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-GMPQ296 の全塩基数は 11,397bp である。

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。

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。

(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

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(p12~14) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1(p11) 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-GMPQ296 をアグロバクテリウム法によって、非組換えダイズ品種 A3244 の胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選択の方法

従来ダイズ品種 A3244 の胚から採取した分裂組織とプラスミド・ベクター PV-GMPQ296 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサート、カルベニシリン及びクラフォランを添加した組織培養培地で細胞の選抜を行った。この際、グリホサートによって形質転換していない細胞を除去した。

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

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。なお、隔離ほ場試験の前にPCR法を用いてアグロバクテリウムの残存が無いことを確認する予定である。

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及び系統樹

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世代において通常の散布量よりも低薬量での除草剤グリホサート散布を行い改変*cp4 epsps*遺伝子の有無に関する一次スクリーニングを行った。ここでグリホサートによって傷害を受けた個体を改変*cp4 epsps*遺伝子を持たない個体として選抜し、その後さらにPCR分析によって改変*cp4 epsps*遺伝子が無いことを確認した。ここで選抜した改変*cp4 epsps*遺伝子を持たないR1個体において、さらに*dgat2A*遺伝子のインベーター分析を行って*dgat2A*遺伝子をホモで有する個体を選抜することで、最終的にT-DNAI (*dgat2A*遺伝子発現カセットを含む領域)をホモで有し、T-DNAII (改変*cp4 epsps*遺伝子発現カセットを含む領域)を持たない個体を選抜した。選抜されたR1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MON87754系統を選抜した。

本組換えダイズの育成図を図 3(p24) に示した。なお、本評価書における本組換えダイズ MON87754 系統とは、R1 世代において T-DNAII 領域が分離し、かつ T-DNAI 領域のみを持つ個体及びその後代の全てを指す。

[社外秘に付き非開示]

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

本組換えダイズの導入遺伝子はメンデルの法則に従って次世代に遺伝していることから、染色体上に存在する (別添資料 11)。

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

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えダイズのゲノム中1ヶ所に1コピーのT-DNA I領域が組み込まれており (別添資料 12の Figure 5, p22)、複数世代 (R5 世代と R7 世代) にわたり安定して後代に遺伝していることが確認されている (別添資料 12の Figure 12, p29)。また、外側骨格領域及びT-DNA II領域は導入されていないことが確認されている (別添資料 12の Figure 10~11, p27~28)。

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

1 コピーなので該当しない (別添資料 12の Figure 5, p22)

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

DGAT2A 蛋白質の発現の安定性に関しては、育成の過程において本組換えダイズの種子中の油分含量を計測することにより確認している。また、本組換えダイズの葉、完熟種子中での DGAT2A 蛋白質の発現量も ELISA 法により分析した (別添資料 13)。なお、測定に用いた種子はプエルトリコの 1 ほ場の約 350 個体から採種したバルク種子であり、このバルク種子から 10 粒ずつを 1 サンプルとしてサンプリングした計 4 サンプルについて DGAT2A 蛋白質の発現量を測定した。また、測定に用いた葉は温室で育成した 20 個体の幼植物から 1 枚ずつ葉を採取したものであり、5 個体分の葉を 1 サンプルとした計 4 サンプルについて DGAT2A 蛋白質の発現量を測定した。その結果、完熟種子中の DGAT2A 蛋白質の発現量は、平均 1,200 μ g/g fwt で、発現量の範囲は 950~1,600 μ g/g fwt であった (別添資料 13の Table 1, p15)。なお、葉における DGAT2A 蛋白質の発現量は定量限界以下(LOQ=3.1 μ g/g)であった。また、葉以外の組織についてもウエスタンブロット分析を行ったが、DGAT2A 蛋白質は胚特異的に発現している

ことが確認された(別添資料 14)。

- 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

プラスミド・ベクターPV-GMPQ296は自律増殖可能な宿主域が *E. coli* や *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られているため、移入された核酸が自然条件下において野生動植物等に伝達される可能性はない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

サザンブロット分析による特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 10 μ g のゲノミック DNA を用いれば検出可能である。なお、PCR による検出・同定方法に関しては、現在開発中である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズへ導入された *dgat2A* 遺伝子はジアシルグリセロールの *sn-3* 位に脂肪酸を結合し TAG を生成する反応を触媒する DGAT2A 蛋白質をコードしており、本組換えダイズの種子で特異的にこの蛋白質が発現することにより、種子中の TAG 含量及び油分含量を高める(表 2, p21)。

- 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¹⁰

a 形態及び生育の特性

本組換えダイズと対照品種を供試し、試験 A～C の 3 種類のは場試験を行い形態及び生育の特性について調査したところ、試験 A で群落高、試験 A・B・C で収量、試験 C で百粒重について統計学的有意差が認められた。以下に試験 A～C の別に統計学的有意差の認められた項目について相違の程度を述べる。

¹⁰本項目中の以下に続く a～g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

【試験 A. 2006 年に米国イリノイ州の 3 箇所で行ったほ場試験（別添資料 5）】

2006 年に米国イリノイ州の 3 箇所のほ場 (Cameron, Monmouth, Roseville)において形態及び生育に関する特性 9 項目 {苗立ち株数、初期の草勢、50%開花期までの日数、花色、倒伏性、群落高、脱粒性、収穫種子の水分含量、収量(種子の生産量)} について本組換えダイズ、及び本組換えダイズの遺伝子導入母本である対照の非組換えダイズ品種 A3244 を供試し、ほ場試験を行った。なお、参考品種として従来商業品種 3 品種を供試し、試験は 4 反復で行った(別添資料 5)。その結果、群落高及び収量で統計学的有意差が認められたが、その他の項目については有意差は認められなかった(別添資料 5 の Table 2, p5)。

群落高に関して、統計学的有意差が認められたのは 3 箇所のほ場中 1 箇所のほ場(Roseville)で、本組換えダイズでは 86.4cm、対照の非組換えダイズでは 91.4cm であった。しかしこの値は参考として供試された従来商業品種の平均値の範囲内 (83.8~94.0cm) であった(別添資料 5 の Table 2, p5)。

収量に関して、統計学的有意差が認められたのは 3 箇所のほ場中 1 箇所のほ場(Roseville)で、本組換えダイズの収量は 3.9t/ha、対照の非組換えダイズは 4.3t/ha であった。しかしこの値は参考として供試された従来商業品種の平均値の範囲内 (3.3~4.6t/ha) であった(別添資料 5 の Table 2, p5)。

【試験 B. 2006 年に米国およびアルゼンチンの計 32 箇所で行ったほ場試験(別添資料 4)】

2006 年に本組換えダイズ、非組換えダイズ A3244 及び Null 型ダイズ(p18 の脚注 8 参照)の 3 系統を供試し、米国で 19 箇所、アルゼンチンで 13 箇所の計 32 箇所ではほ場試験を行い、収量を調査した。なお、試験は米国は 4 反復、アルゼンチンは 3 反復で行った。ほ場ごとに統計処理を行なった結果、本組換えダイズと A3244 との間、本組換えダイズと Null 型ダイズの間、Null 型ダイズと A3244 との間でそれぞれいくつかのほ場で収量に統計学的有意差が認められた(別添資料 4 の表 1~3, p5~7)。

収量に関して、本組換えダイズと Null 型ダイズとの間で統計学的有意差が認められたのは 32 箇所中 2 箇所のほ場であった。本組換えダイズの収量は 2 箇所のほ場でそれぞれ 4,036.78kg/ha、5,414.17kg/ha であったのに対し、Null 型ダイズではそれぞれ 4,241.70kg/ha、5,961.77kg/ha であった(別添資料 4 の表 1, p5)。しかし、米国、アルゼンチンのほ場をそれぞれ統合して統計分析を行ったところ、本組換えダイズと Null 型ダイズとの間では統計学的有意差は認められなかった (別添資料 4 の表 4, p8)。

また、本組換えダイズと A3244 との間で収量に統計学的有意差が認められたが、統計学的有意差が認められたのは 32 箇所中 8 箇所のほ場であった。本組

換えダイズの収量は 8 箇所のは場でそれぞれ 4,888.07kg/ha、4,161.75kg/ha、3,843.94kg/ha、4,914.28kg/ha、5,846.87kg/ha、2,526.34kg/ha、3,841.92kg/ha、3,506.65kg/ha であったのに対し、A3244 ではそれぞれ 5,406.11kg/ha、4,662.31kg/ha、4,281.35kg/ha、5,398.72kg/ha、6,582.60kg/ha、2,936.20kg/ha、4,486.95kg/ha、3,836.55kg/ha であった(別添資料 4 の表 3, p7)。また、米国、アルゼンチンのは場をそれぞれ統合して統計分析を行ったところ、米国とアルゼンチンの双方で本組換えダイズの収量は A3244 よりも統計学的に有意に低下していた (別添資料 4 の表 4, p8)。

【試験 C. 2007 年に米国の計 17 箇所で行ったほ場試験(別添資料 6-A)】

2007 年に本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズ品種 A3244 米国の計 17 箇所ではほ場試験を行い、百粒重と収量を調査した。なお、参考品種として各ほ場で従来商業品種 4 品種を供試し、試験は 3 反復で行った (別添資料 6-A)。別添資料 6-B に本試験の試験期間における気象データを示した (別添資料 6-B)。

ほ場ごとに統計処理を行なった結果、百粒重と収量において統計学的有意差が認められた(別添資料 6-A の Table3, p5)。

収量に関して、統計学的有意差が認められたのは 17 箇所のは場中 1 箇所のは場(ネブラスカ州、NE)であった。NE における本組換えダイズの収量は 4.6t/ha、対照の非組換えダイズは 4.8t/ha であった(別添資料 6-A の Table3, p5)。しかし、全てのは場を統合して統計分析を行った場合には統計学的有意差は認められなかった (別添資料 6-A の Table2, p4)。

百粒重に関して、統計学的有意差が認められたのは 17 箇所のは場中 3 箇所のは場(イリノイ州の 2 箇所:IL2 と IL3、ミシガン州:MI)であった。本組換えダイズの百粒重は IL2、IL3 及び MI のほ場でそれぞれ 12.6g、12.7g、19.7g であったのに対し、対照の非組換えダイズではそれぞれ 14.0g、14.8g、20.5g であった(別添資料 6-A の Table3, p5)。しかし、全てのは場を統合して統計分析を行った場合には統計学的有意差は認められなかった (別添資料 6-A の Table2, p4)。

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、播種後 23 日目の本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3244 及び従来商業品種 4 品種の幼苗を日中 15°C/夜間 8°C に設定した人工気象室で 21 日間栽培したのち、草勢、主茎長、生育ステージ、生体重及び乾燥重について比較した。

その結果、乾燥重及び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との間に統計学的有意差が認められた (別添資料 15 の Table 3, p6)。乾燥重は

本組換えダイズでは 2.6g、対照の非組換えダイズでは 2.4g であった。また、主茎長は本組換えダイズでは 15.3cm、対照の非組換えダイズでは 17.1cm であった(別添資料 15 の Table 3, p6)。しかし、本組換えダイズの乾燥重(2.6g)は、参考品種である従来商業品種 4 品種の平均値の範囲内(2.1~2.9g)であった。本組換えダイズの主茎長(15.3cm)は従来商業品種 4 品種の平均値の範囲 (19.7~26.7cm)よりも短い、対照の非組換えダイズ(17.1cm)も同様に従来品種の平均値の範囲を下回っていた。

c 成体の越冬性又は越夏性

ダイズは夏型一年生植物であり、成熟期には自然に枯死する。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に、海外でのほ場試験において本組換えダイズは成熟期に枯死していることが確認されている。以上のことから、成体の越冬性試験は行っていない。なお、隔離ほ場試験の試験終了時に本組換えダイズの冬季における生育を観察する予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ

米国のは場で栽培された本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3244 及び従来商業品種 5 品種から花粉を採取し、その稔性とサイズを調査した。その結果、本組換えダイズの花粉稔性は 98.4%であり、対照の非組換えダイズの 99.6%と比較して統計学的有意差は認められなかった。また、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの花粉サイズはそれぞれ 26.3 μ m と 25.8 μ m であり、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 16 の Table 1, p4、Figure 1, p5)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

第一の 2-(6)-②-a(p26~28)に上述したとおり、種子の生産量(収量)について、A、B、C の 3 種類の試験でそれぞれ本組換えダイズと非組換えダイズ A3244 との間にくつつかのほ場において統計学的有意差が認められた。また、試験 B においては本組換えダイズと Null 型ダイズとの間にもくつつかのほ場において統計学的有意差が認められた。

脱粒性については本組換えダイズと非組換えダイズ A3244 との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5 の Table2, p5)。

20°C16 時間と 30°C8 時間の条件下における種子の発芽率について、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3244 及び従来商業品種 4 品種より収穫した種子を、4 反復各 100 粒ずつ温室にて播種し、休眠性と発芽率の調査を行った。

発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子については硬実種子率、枯死種子率及び吸水膨潤状態の種子 (viable firm-swollen seed) 率に分けて測定した。その結果、正常発芽率については本組換えダイズ (100.0%)、対照の非組換えダイズ (98.8%)の間で発芽率に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 17 の Table 1, p4)。また、異常発芽率、硬実種子率、枯死種子率及び吸水膨潤状態の種子(viable firm-swollen seed)率についても統計学的有意差は認められなかった (別添資料 17 の Table 1, p4)。

f 交雑率

わが国にはダイズと交雑可能な近縁野生種としてツルマメが生育している。本組換えダイズにおいて交雑率の試験は行っていない。なお、本組換えダイズとツルマメとの交雑率に関しては、隔離ほ場試験において本組換えダイズと従来ダイズとの交雑率を調査することにより評価する予定である。

g 有害物質の産生性

本組換えダイズからほか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、米国の温室において本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3244 及び従来商業品種 6 品種を供試して鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、鋤込み試験においてはいずれの項目においても検定植物であるレタスの発芽株数、生育ステージ、草丈、生体重及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 18 の Table 1, p4)。後作試験においては、レタスの草丈に本組換えダイズ区と対照の非組換えダイズ区との間で統計学的有意差が認められたが、発芽率、生育ステージ、生体重及び乾燥重においては統計学的有意差は認められなかった(別添資料 18 の Table 1, p4)。

統計学的有意差の認められた草丈では、本組換えダイズ区では 13.0cm、対照の非組換えダイズ区では 14.7cm であった(別添資料 18 の Table 1, p4)。また、本組換えダイズ区における草丈(13.0cm)は、従来商業品種 6 品種の平均値の範囲 (13.4~14.8cm)を下回っていた。なお、隔離ほ場試験においても鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験を行う予定である。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2)使用等の方法

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 22 年 1 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。

2. 隔離ほ場の作業要領

- (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えダイズの栽培終了後は、当該ダイズ及び比較対照のダイズを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料 19 の図 2(p3)に示した。

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

別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用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

これまで本組換えダイズについて 2004~2007 年の間に米国やアルゼンチンにおいて延べ 86 ヶ所のは場試験が行われているが、非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生ずるおそれがあるような相違は報告されていない。

なお、本組換えダイズに関しては、（以下社外秘）。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹¹

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

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

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率、休眠性及び脱粒性(第一の2-(6)-②、a~e, p26~30)を比較検討した。その結果、群落高、種子の生産量(収量)、百粒重について統計学的有意差が認められた。また、生育初期における低温耐性試験における主茎長と乾燥重について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。以下に統計学的有意差の認められた項目ごとに考察する。

1) 群落高(第一の2-(6)-②-a, p27)

試験A(p27、別添資料5)において本組換えダイズと対照の非組換えダイズA3244との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められたのは3箇所のは場のうちの1箇所(Roseville)であった。Rosevilleにおける群落高は本組換えダイズは86.4cm、対照の非組換えダイズでは91.4cmであった(別添資料5のTable2, p5)。しかし、統計学的有意差が認められたのは3箇所のは場のうち1箇所であり、本組換えダイズの群落高はRosevilleで参考として供試された従来商業品種4種の範囲内(群落高:83.8~94.0cm)には納まっていたことから、Rosevilleのは場で観察された群落高の値は従来品種の変動の範囲内であると判断された(別添資料5のTable2, p5)。

2) 収量(第一の2-(6)-②-a, p26~28)

収量については、試験A、B、Cの3つの試験で、それぞれいくつかのは場において統計学的有意差が認められた。

¹¹本項目中で、第一の2-(1)ロ.の③及び第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

(i) 試験 A (p27、別添資料 5)

3 箇所のほ場のうち Roseville のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは 3.9t/ha、対照の非組換えダイズでは 4.3t/ha であった(別添資料 5 の Table2、p5)。しかし統計学的有意差が認められたのは 3 箇所のほ場のうち Roseville のほ場 1 箇所であり、本組換えダイズの収量は Roseville で参考として供試された従来商業品種 4 種の範囲内(収量：3.3~4.6t/ha)に納まっていたことから、Roseville のほ場で観察された収量の値は従来品種の変動の範囲内であると判断された(別添資料 5 の Table2、p5)。

(ii) 試験 B (p27~28、別添資料 4)

本組換えダイズと A3244 との間には 32 箇所中 8 箇所のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズと Null 型ダイズ(p18 の脚注 8 参照)の間には 32 箇所中 2 箇所のほ場で統計学的有意差が認められた(第一の 2-(6)-②-a, p27)。しかし、いずれも *dgat2A* 遺伝子を持たない系統である Null 型ダイズと A3244 を比較した場合にも統計学的有意差が認められた(別添資料 4 の表 3, p7)。Null 型ダイズは A3244 と比較した場合に 32 箇所中 5 箇所のほ場で統計学的に有意に収量が低いが、これらの 5 箇所のほ場では、本組換えダイズも A3244 と比較して有意に収量が低かった(別添資料 4 の表 2、p6)。すなわち、本組換えダイズと Null 型ダイズの収量は同様の挙動を示していると考えられる。また、本組換えダイズと Null 型ダイズとの間で米国、アルゼンチンのほ場をそれぞれ統合して統計分析を行ったところ、統計学的有意差は認められなかった(別添資料 4 の表 4, p8)。本組換えダイズと Null 型ダイズは育成過程が同じであるため、両者の差異は *dgat2A* 遺伝子の有無のみと考えられるが、ほ場を統合して統計分析を行った場合に統計学的有意差は認められなかったため、導入された *dgat2A* 遺伝子によって収量が低下する可能性は極めて低いと考えられた(別添資料 4 の表 4, p8)。

したがって、本組換えダイズと A3244、及び Null 型ダイズと A3244 との間で認められた収量の差異は、形質転換の過程及び A3244 集団における遺伝的な不均一性に由来するものであると考えられる(別添資料 4)。

以上のことから、本試験において本組換えダイズと A3244 の間で認められた数箇所のほ場における統計学的有意差は導入した *dgat2A* 遺伝子の発現によって起こる TAG 生合成の影響によるものではなく、A3244 と本組換えダイズ及び Null 型ダイズの育成過程の差異によって説明できるものと考えられた(別添資料 4)。

(iii) 試験 C (p28、別添資料 6-A)

17 箇所のほ場のうちネブラスカ州のほ場(NE)で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズでは 4.6t/ha、対照の非組換えダイズでは 4.8t/ha であった(別

添資料 6-A の Table3, p5)。しかし統計学的有意差が認められたのは、17 箇所のは場のうち 1 箇所であり(別添資料 6-A の Table3, p5) 、全てのは場を統合して統計分析を行った場合には統計学的有意差は認められなかった(別添資料 6-A の Table2, p4)。

以上の 3 つの試験の結果において、本組換えダイズと Null 型ダイズあるいは非組換えダイズ A3244 との間においていくつかのは場で収量に統計学的有意差が認められた。

遺伝的な差異が *dgat2A* 遺伝子の有無のみと考えられる本組換えダイズと Null 型ダイズの間では、は場を統合して統計処理を行なった場合に統計学的有意差は認められなかったため、本組換えダイズにおいて導入した *dgat2* 遺伝子の影響によって収量が低下する可能性は極めて低いと考えられた。したがって、本組換えダイズと A3244 との間で認められた収量の差異は、本組換えダイズと A3244 の育成過程の差異に起因するものであり、本組換えダイズの競合における優位性に影響はないと考えられた。

3) 百粒重(第一の 2-(6)-②-a、p28)

試験 C においてイリノイ州の 2 箇所のは場(IL2 と IL3)及びミシガン州の 1 箇所のは場(MI)で統計学的有意差が認められ、本組換えダイズではそれぞれ 12.6g、12.7g、19.7g であったのに対し、対照の非組換えダイズではそれぞれ 14.0g、14.8g、20.5g であった(第一の 2-(6)-②-a、p28)。しかし統計学的有意差が認められたのは、17 箇所のは場のうち 3 箇所であり(別添資料 6-A の Table3, p5) 、試験全体で統計分析を行った場合には統計学的有意差は認められなかった(別添資料 6-A の Table2, p4) 。また、統計学的有意差が認められたは場において収量に有意差は認められていないので(別添資料 6-A の Table3, p5) 、総合的な種子の生産性には影響しないと考えられた。

4) 生育初期の低温耐性(第一の 2-(6)-②-b、p28～29)

生育初期の低温耐性においては、低温処理後の幼植物体の乾燥重及び主茎長において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められた(別添資料 15 の Table 3, p6) 乾燥重は本組換えダイズでは 2.6g、対照の非組換えダイズでは 2.4g であった。主茎長は本組換えダイズでは 15.3cm、対照の非組換えダイズでは 17.1cm であった(別添資料 15 の Table 3, p6)。

本組換えダイズで認められた低温処理後の幼植物体の乾燥重(2.6g)は従来商業品種 4 品種の平均値の範囲内(2.1～2.9g)であり、従来品種の変動の範囲内であると判断された。本組換えダイズの主茎長(15.3cm)は従来商業品種 4

品種の平均値の範囲 (19.7~26.7cm)を下回っていたが、対照の非組換えダイズ(17.1cm)についても同様に従来品種の平均値の範囲を下回っていたこと、低温処理開始前の時点から本組換えダイズの主莖長(13.5cm)及び非組換えダイズの主莖長(13.8cm)は従来商業品種 4 品種の平均値の範囲(16.3~21.9cm)を下回っていたことから(別添資料 15 の Table1, p4)、本組換えダイズと従来商業品種との主莖長の差異は品種間差によるものであると考えられた。また、本組換えダイズにおける主莖長は、対照の非組換えダイズよりも低かったことから、本組換えダイズが低温条件下で対照の非組換えダイズよりも伸長速度が速いということはないと考えられた。以上のことから、本組換えダイズの低温耐性が従来品種よりも高まっていることは考えにくい。

5) 種子における構成成分の差異(表 2,p21、別添資料 1、別添資料 4)

ダイズ種子に含まれる脂質には TAG 以外に 1.5-2.5%のリン脂質と微量のステロール、遊離脂肪酸などが含まれる(文献 24)。TAG の産生が生体膜を構成するリン脂質の生成に影響を及ぼす可能性があるが、表 2 (p21)より計算すると、本組換えダイズの TAG 以外の脂質は種子重量に対し 2.29%dw、対照の非組換えダイズ A3244 の TAG 以外の脂質は 2.08%dw であった。したがって、本組換えダイズの種子中では TAG が増加しているがその他の脂質成分を大幅に変えることはないと推測される。

本組換えダイズの種子の蛋白質含量に関して、米国の 6 ほ場で行われた試験では統計学的有意差は認められなかった(表 2, p21;別添資料 1)。一方、2006 年に米国の 19 箇所及びアルゼンチンの 13 箇所の計 32 箇所のほ場で収穫された本組換えダイズ、Null 型ダイズ及び非組換えダイズ A3244 との間で種子の蛋白質含量を比較したところ、本組換えダイズと Null 型ダイズの間で 32 箇所のほ場中 7 箇所で統計学的有意差が認められ、いずれも MON87754 系統が低かった (別添資料 4 の表 1, p5)。さらに、米国及びアルゼンチンのそれぞれのほ場全体で統計を行った結果でも、米国、アルゼンチンとも本組換えダイズが有意に低く、本組換えダイズでそれぞれ 41.54%dw、41.28%dw であったのに対し、Null 型ダイズでは 41.74%dw と 41.55%であった(別添資料 4 の表 4, p8)。また、本組換えダイズと A3244 の間では 32 箇所中 3 箇所のほ場で統計学的有意差が認められ、いずれも MON87754 系統が低かった(別添資料 4 の表 2, p6)。さらに、米国及びアルゼンチンのそれぞれのほ場全体で統計を行った結果では、アルゼンチンで本組換えダイズが有意に低く、本組換えダイズで 41.28%dw、A3244 では 41.55%dw であった (別添資料 4 の表 4, p8)。このことから、本組換えダイズの蛋白質含量は Null 型ダイズあるいは A3244 と比較して若干低下していたが、その差は 0.3%dw 未満であり、またほ場ごとの統計の結果で有意差が認められた計 10 箇所における本組換えダイズの蛋白質含量の値 (40.66%dw、41.15%dw、40.75%dw、42.48%dw、

42.30%dw、41.00%dw、41.20%dw、40.83%dw、41.38%dw、41.27%dw) はすべて従来品種における蛋白質含量の文献値 33.19 - 45.48%dw (文献 57) の範囲内であった。したがって、本組換えダイズの種子における蛋白質含量は従来品種の変動の範囲内と考えられた。

脂肪酸含量に関しても、本組換えダイズと A3244 との間で調査した 7 項目中 6 項目において統計学的有意差が認められたが(表 2,p21、別添資料 1)、いずれの項目も従来品種における脂肪酸含量の文献値(表 2,p21)の範囲内であったことから、本組換えダイズの種子における脂肪酸組成は従来品種の変動の範囲内と考えられた。

以上の 1)~5)のことから、これらの差異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。

本組換えダイズに導入された *dgat2A* 遺伝子はジアシルグリセロールの *sn-3* 位に脂肪酸を結合し TAG を生成する反応を触媒する DGAT 蛋白質をコードしており、本組換えダイズの種子で特異的にこの蛋白質が発現することにより、種子中の TAG 含量及び油分含量を高める(表 2, p21)。

一般的にダイズ種子中の TAG は、ダイズ種子におけるエネルギー源として貯蔵されており(文献 41; 文献 62)、本組換えダイズで高まった TAG についても、一般的なダイズの持つ TAG と同様の生物学的役割を有すると考えられる。

一方、TAG の産生が生体膜を構成するリン脂質の生成に影響を及ぼす可能性があるため、本組換えダイズにおいて TAG の増加により生体膜に何らかの影響が生じ、酸化や乾燥ストレス等の環境ストレスに対する耐性に変化が生じる可能性が示唆された。

しかし、本組換えダイズに導入されている *dgat2A* 遺伝子は胚特異的プロモーターを用いて発現されている。このため DGAT2A 蛋白質の発現はダイズ種子中に限られており (別添資料 13、別添資料 14) 、したがって本遺伝子の導入による油分含量の増加は種子のみで生じていると考えられる。

そこで発芽に関する項目など本組換えダイズの競合における優位性を高めるような特性を含め、植物体への潜在的な影響の評価を行った。本組換えダイズの発芽に関する特性については、第一の 2-(6)-②-e(p29~30)に上述したとおり実験室において発芽試験を行うことにより調査した (別添資料 17)。その結果、本組換えダイズの発芽に関する特性は従来ダイズとの間に差異は認められなかった。生体の生育については、米国の異なる温度条件及び降水量条件下の 17 箇所のは場 (別添資料 6-A、6-B) で本組換えダイズと非組換えダイズ A3244 の収量及び百粒重を比較調査した結果、本組換えダイズの収量及び百粒重に競合における優位性を左右するような重大な差異は認められていない(p28、別添資料 6-A) 。したがって、この結果から、少なくともこの気象条件の変動の範囲内では本組換えダイズにおいて TAG の産生による植物体への意図しないような影響は確認されなかった。

なお、本組換えダイズ中での TAG の増加による生体膜への何らかの影響をさらに詳細に調査するため、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズについて温室で抗酸化性試験、乾燥耐性試験及び低温耐性試験を行う予定であり、それぞれの試験計画を別添資料 8~10 に示した。

以上のことから、本組換えダイズを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する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

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

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

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

2007 年に米国の温室で行われた鋤込み試験及び後作試験では、後作試験においてレタスの草丈に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が、レタスの発芽率、生育ステージ、生体重及び乾燥重には統計学的有意差が認められなかったことから、本組換えダイズから有害物質が産生されているとは考えにくい(別添資料 18)。有害物質の産生性については、わが国における隔離ほ場試験において再度調査を行う予定である。

本組換えダイズはジアシルグリセロールの *sn*-3 位に脂肪酸を結合し TAG を生成する反応を触媒する DGAT2A 蛋白質を産生する性質を有しているが、本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)。

また、第一の 2-(1)-ロ-③(p19~20)に記載したとおり、哺乳類の DGAT では本来の DGAT 活性に加えて弱いモノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (MGAT)活性も有する可能性を示唆する報告があるが、仮にジアシルグリセロールが産生されたとしても、自身の非常に強い DGAT 活性により TAG 生産の基質として用いられると考えられている(文献 60)。本組換えダイズに導入された DGAT2A 蛋白質が MGAT 活性を有するかどうかは特定されていない。しかし、仮に MGAT 活性を有するとしても MGAT 活性によって産生されたジアシルグリセロールは TAG 生産の基質として用いられるため、新たな有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

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

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

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

第一の 1-(3)-ニ-③ (p7~8) に記載したように、ダイズと交雑可能な近縁野生種

としてわが国に分布しているのはツルマメのみである(文献2; 文献3; 文献1)。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。

(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交雑が生じると、その雑種は生育や生殖に障害が見られず、正常に生育することが知られている(文献14)。したがって、本組換えダイズに関しても、ツルマメと交雑した場合は雑種が形成されることが考えられる。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 *dgat2A* 遺伝子がツルマメの集団中に検出される可能性も否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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

しかし、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葎し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しないままで受粉する閉花受粉を行うため(文献14)、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、ダイズとツルマメ間の交雑においては、一般的にダイズの開花期はツルマメよりも約1ヶ月近く早く、それぞれの開花期間は重なりにくいことが知られている(文献14)。実際、他のダイズ品種と比べて開花期が遅い日本固有の栽培品種である丹波黒とツルマメをそれぞれ30個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調べた結果、得られた686個体のツルマメの後代の中にダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が5個体確認されており、その交雑率は0.73%と報告されている(文献19)。よって、一般的に自然条件下では、ダイズとツルマメが交雑する可能性は低いと考えられた。

本組換えダイズの交雑性の試験は行っていない。しかし、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で生殖に関わる形質を比較した場合、花粉形態及び花粉稔性(別添資料16のTable 1, p4, Figure 1, p5)に有意な差異は認められず、また、種子の生産性(収量)に関しては、第二の1-(1)-2(p33~35)に上述したとおり、本組換えダイズとA3244の間の差異は導入遺伝子によるものではないと考えられたことから、この差異によって本組換えダイズの生殖に関わる性質が影響を受けることはないと考えられた。以上のことから、本組換えダイズの交雑性は従来のダイズを超えるも

のではなく、本組換えダイズとツルマメの交雑性は極めて低いと推測された。

従来ダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種では種子の油分含量はダイズとツルマメの中間となる。従来ダイズの種子の油分含量は約 20%、ツルマメでは約 11%であり、従来ダイズとツルマメの雑種では種子の油分含量は約 15%であることが報告されている(文献 63)。また、仮に本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種では本組換えダイズに導入された *dgat2A* 遺伝子の機能により、従来ダイズとツルマメとの雑種に比べて種子の油分含量が増加する可能性がある。そこで、雑種種子の油分含量の増加が競合における優位性に与える影響を検討した。

まず、雑種種子の油分含量の増加が、競合における優位性を高める重要な形質である休眠性・倒伏性・脱粒性(文献 64; 文献 65)を高めるかどうかをツルマメの近縁種であるダイズで検討した。なお、ダイズとツルマメは非常に近縁な種であり、ダイズとツルマメの間には交雑の障壁はなく、交雑で得られた種子は正常に発芽し、また F1 の花粉及び種子は完全に稔性であり、生育にも障害は見られないことが知られている(文献 4、文献 14)。検討の結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で休眠性、倒伏性、脱粒性及び発芽率に相違は認められず、油分含量の増加により競合における優位性は高まっていなかった。

次に、ダイズとツルマメの雑種がツルマメ集団中で優占するかどうかを検討したが、競合における優位性に関わる休眠性、倒伏性、脱粒性は雑種においてツルマメに比べ低下していることが報告されている(文献 66、文献 63)。さらに、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ダイズとツルマメの形態的中間型を示す個体はみつかっていない(文献 14)。また、日本各地でダイズ畑の周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間型を探索した結果、中間型が発見されたのは 57 サイト調査したうちの 3 サイト(計 11 個体)であった(文献 67)。また、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共に播種した後で、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(文献 66)。以上のことから、ダイズとツルマメの雑種がツルマメ集団中で優占していく可能性は低いことが示唆された。

これらのことから、本組換えダイズとツルマメとの雑種は従来ダイズとツルマメの雑種に比べて *dgat2A* 遺伝子によって油分含量が高まると考えられるが、ツルマメの近縁種であるダイズにおいて油分含量の増加が競合における優位性に関わる形質に影響を与えていないこと、さらに従来ダイズとツルマメの雑種がツルマメ集団中に優占して生育していないことから、本組換えダイズとツルマメとの雑種がツルマメ集団中に優占する可能性は低いと考えられた。

よって、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場合は低い割合で交雑し得るが、そのような特殊な条件以外の自然条件下での交雑率は極めて低く、仮に交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応して、野生植物を駆逐していく可能性は極めて低いと判断された。したがって、本組換えダイズ由来の *dgat2A* 遺伝子がツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性も極めて低いと考えられた。さらに、本組換えダイズは限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場において栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為を行うので、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：ダイズは縄文時代には既にわが国で栽培されており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験がある。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、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率、休眠性）を比較検討した結果、群落高、種子の生産性（収量）、百粒重について統計学的有意差が認められた。また、生育初期の低温試験において、乾燥重及び主茎長について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。種子の構成成分を調査したところ、蛋白質含量と脂肪酸組成について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。その他の項目では有意な差異は認められなかった。検討の結果、統計学的有意差の認められた項目における差異は競合における優位性を高めるものではないと判断された。

本組換えダイズでは、導入された *dgat2A* 遺伝子で発現する DGAT2A 蛋白質によって、種子中での油分含量が高まるが、種子中の油分含量が高まることによって本組換えダイズの競合における優位性が高まっているとは考えにくいと判断された。

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

有害物質の産生性：ダイズに関して、これまでに有害物質の産生性は報告されていない。2007年に米国の温室で行われた鋤込み試験及び後作試験から、本組換えダイズから有害物質が産生されていないと判断された。本組換えダイズはジアシルグリセロールの *sn-3* 位に脂肪酸を結合し TAG を生成する反応を触媒する DGAT2A 蛋白質を産生する性質を有しているが、本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。また、DGAT2A 蛋白質は TAG 生合成系以外の代謝経路には影響せず、新たな有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。

以上のことから、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為により、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ツルマメが特定された。従来を知見より、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。また、本組換えダイズの種子の生産量(収量)、花粉形態及び花

粉稔性など生殖に関わる形質の調査結果から、本組換えダイズの交雑性は高まっていないと推測された。

仮に本組換えダイズとツルマメが交雑した場合であっても、本組換えダイズ由来の *dgat2A* 遺伝子がツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性は極めて低いと判断された。

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

よって、総合的評価として、本組換えダイズは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

[社外秘に付き非開示]

緊急措置計画書

平成 19 年 12 月 25 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高オイルダイズ (*dgat2A, Glycine max (L.) Merr.*)(MON87754, OECD UI: MON-87754-1) (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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、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は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。

平成 19 年 12 月現在

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

第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

実験従事者に直接口頭で伝える。

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

具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、また隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。

モニタリング計画書

平成 19 年 12 月 25 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

1. 実施体制及び責任者

現時点での実施体制及び責任者は以下に示す通りである。

平成 19 年 12 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	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. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

名称 ツルマメ (*Glycine soja*)

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

隔離ほ場周辺 10m^{注)}の範囲内においてモニタリングを実施する。

なお、2007年8月の時点で隔離ほ場周辺75mの範囲（民家の敷地内を除く）でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

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

4. モニタリングの期間

本組換えダイズの栽培期間中とする。

5. 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

- 1) 本組換えダイズの栽培期間中に、隔離ほ場周辺 10m 以内にツルマメが生育しているかどうかを確認する。
- 2) 隔離ほ場周辺 10m 以内にツルマメが生育しており秋に種子をつけていた場合には、位置情報を記録すると共に、秋にツルマメ 1 集団あたり最低 50 粒の種子をサンプリングする。
- 3) 1)により、ツルマメの生育が認められない場合には、隔離ほ場から 75m の範囲内で調査可能な範囲において最もほ場に近いツルマメの集団について、2)と同様の作業を行う。なお、隔離ほ場 75m 以内の土地は水田・畑・道路・用水路・民家等として利用されている。隔離ほ場周辺の地図を別添 1*として添付した。2007年8月の時点で隔離ほ場周辺75mの範囲（民家の敷地内を除く）でツルマメの生育の有無を調査したが、ツルマメは生育していなかった。

収集されたツルマメ種子に *dgat2A* 遺伝子が移行しているかどうかを 1 粒ごとに検定する。検定方法は収集されたサンプルの量等を考慮して適宜決定する。

6. モニタリングの結果の解析の方法

交雑検定の結果を基に、ダイズからツルマメへの距離に依存した自然交雑の有無・頻度を解析する。

7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

本組換えダイズの第一種使用規程(食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)の申請時の最終試験報告

書中にモニタリング結果を記載し、報告する。尚、(以下社外秘)。

8. その他必要な事項

モニタリングの期間中に採取されたツルマメから *dgat2A* 遺伝子が検出される等、当該遺伝子のツルマメへの移行が認められ、又はその疑いがある場合にあつては、農林水産省及び環境省とモニタリングの期間等について協議を行うものとする。

*別添 1 については個人情報等を含む為、社外秘