

除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ (改変 *aad-12*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr) (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	3
生物多様性影響評価書.....	4
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
(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	8
(1) 供与核酸に関する情報.....	8
(2) ベクターに関する情報.....	14
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	14
(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.....	17
(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.....	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	19
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	22
(1) 使用等の内容.....	22
(2) 使用等の方法.....	22
(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.....	22
(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....	22
(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	22
(6) 国外における使用等に関する情報.....	22
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	24
1 競合における優位性.....	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	24
(2) 影響の具体的内容の評価.....	25
(3) 影響の生じやすさの評価.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	25
2 有害物質の産生性.....	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	25
(2) 影響の具体的内容の評価.....	27
(3) 影響の生じやすさの評価.....	27
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	27
3 交雑性.....	27
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	27
(2) 影響の具体的内容の評価.....	28
(3) 影響の生じやすさの評価.....	28

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	29
4 その他の性質.....	30
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	31
参 考 文 献.....	33
緊 急 措 置 計 画 書.....	37
添付資料リスト.....	39

第一種使用規程承認申請書

平成 25年 4月 25日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環 境 大 臣 石原 伸晃 殿

氏 名 ダウ・ケミカル日本株式会社
申請者 代表取締役 栗田 道郎 印
住 所 東京都品川区東品川二丁目2番24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	除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 <i>aad-12</i> , <i>pat</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4)
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の概要

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

5 和名、英名及び学名

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

10 宿主の品種名又は系統名

宿主には、米国において中生から晩生のダイズ品種である Maverick を用いた。

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、国内及び国外ともに知られていない。

15 なお、近縁野生種であるツルマメ (*Glycine soja*) は、中国、朝鮮半島、台湾、旧ソ連邦及び我が国において広く分布している (OECD, 2000)。

(2) 使用等の歴史及び現状

国内及び国外における第一種使用等の歴史

20 ダイズは中国では約 5,000 年前から栽培されており、野生種であるツルマメが、中国大陸の東北部、揚子江流域、雲南などでみられるため、中国が起源地としてあげられている。日本には、弥生時代に伝来したといわれ、古事記の記載によると、1,300 年前にはすでに各地で栽培されていた (鄭, 2008)。

25 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

我が国において、ダイズは全国的に栽培可能であるが、主に北海道、東北、九州で栽培されている。世界的には米国、ブラジル、アルゼンチン、中国等を中心に、広い範囲で栽培されている。

30 我が国のダイズ栽培における播種適期は、地域や品種によって異なり、北海道・東北では 5 月下旬、関東・北陸・近畿では 6 月上旬、中国・四国・九州では 6 月下旬から 7 月上旬である。播種深度は 3~5cm がよく、播種量は畝間 70cm、株間 20cm で点播の場合 1 株 2~3 粒播き、最終的な苗立ち密度を 1m² 当たり 15 本程度確保できればよい。播種前の耕うんと播種と同時に除草剤を散布することで大部分の雑草を抑制できるが、中耕作業を 2 回程度行うことは効果的である。中耕は除草のほか、土壌物理性の改善効果もある。
35 また、不定根発生の促進や倒伏防止のために中耕と同時に培土 (土寄せ) することが必要で

ある。病虫害防除のために早めに適切な薬剤を散布する。収穫は小面積の場合は、地上部を手で刈り、束ねてほ場に立てて天日乾燥した後に脱穀する。大面積の場合は、機械による収穫が一般的である。ビーンハーベスタ、あるいは改良したコンバインによって刈取りと脱穀が一斉に行われる(鄭, 2008)。

5 ダイズの2011年における世界総生産量は約2億6,091万トンであり、主な生産国は米国(約8,317万トン)、ブラジル(約7,482万トン)、アルゼンチン(約4,888万トン)、中国(約1,449万トン)である。一方、日本における2011年の生産量は約22万トンである(FAO, 2013)。我が国は2012年に約273万トンのダイズを輸入しており、その輸入量の64.5%にあたる約176万トンが米国からの輸入である(財務省, 2013)。

10 ダイズは、世界的にみればその9割以上が食用油と家畜の飼料として利用されている。しかし、アジアでは古くから食品素材として盛んに利用されている。主な加工利用法は、豆腐、醤油、納豆、味噌、煮豆、炒り豆、きなこ、もやしなどである。また、工業分野では、インク(ソイインク)や接着剤として広く利用されている(鄭, 2008)。

15 (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ある。ダイズの品種は早晩性により、極早生、早生、中生、晩生、極晩生などの各品種群に分けられる。我が国では播種から開花までの長短(~)と、開花から成熟までの長短(a, b, c)の組合せによって9グループに詳しく分けら
20 れている。また、茎の成長習性の違いによって有限伸育型と無限伸育型に分けることができる。ダイズの種子は球形からやや扁楕円形で、胚と種皮からなる無胚乳種子であり、胚は幼根と子葉からなる。幼根が伸長して種皮を突き破り発芽する。発芽後下胚軸が伸長し、子葉を地上に押し上げて出芽する。出芽後、子葉の上位節に初生葉とよばれる2枚の単葉が対をなす。初生葉の上位節以降の各節には、ダイズ本来の3小葉からなる複葉が展開す
25 る。主茎は、葉数の増加とともに節間を伸長させて成長し、主茎が本葉を4~5枚出した頃、第1本葉の葉腋から分枝が発生し、主茎と同様に葉を増やして伸長する。発芽後、幼根は土中へ深く伸長して主根となり、二次根である側根を発生する。側根は主根と一定の角度をなして伸長し、さらに三次根である二次側根を発生する。根の周辺に根粒菌が存在すると、根粒菌は根毛から侵入して根の皮層細胞に感染し、根粒が形成され、根粒菌が空気中
30 の窒素ガス(N₂)を還元し、植物が利用可能なウレイド態窒素に変換して宿主植物に供給する。花は主茎、分枝の各葉腋に着生し、基部ががくに包まれ、1枚の旗弁、2枚の翼弁及び2枚の竜骨弁からなる。雌ずいと雄ずいはいずれも竜骨弁に包まれ露出しない。午前中に開花し、花粉は開花直前に葯から放たれるため自家受粉する。開花・受精の7日(早生品種)~14日(晩生品種)目頃から莢が伸長し始め、約10日間で最大(長さ4~6cm)に達する。その後、子実の肥大が急速に生じ、30~45日目には子実の乾物重が最大に達する(鄭, 2008)。
35

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズの種子は土壌温度が10℃に達すると発芽し、好適条件下では5~7日後に出芽す

る(OECD, 2000)。ダイズに適する土壌は、pH5.5~6.5、リン酸、カリウム及びカルシウムが十分含まれ、排水及び通気のよい埴土あるいは壤土である。ダイズでは乾物 1g を生産するのに必要な水の量は約 600g であり、特に乾物蓄積が最も多い開花期から約 1 ヶ月後までの間は最も水分を必要とする(鄭, 2008)。また、ダイズの品種はすべて霜に対して耐性がなく、氷点下になるような冬の条件では生き残ることがない。栽培ダイズの種子が休眠性を示すことはほとんどなく、植物体の雑草化の特性もない(OECD, 2000)。

なお、ダイズは短日条件でよく開花するため、栽培品種の適地を決定する際には、光周性及び温度応答が重要である。ダイズの栽培品種は、緯度と日照時間によって決定され、北米には、北部(北緯 45 度)の成熟群(MG)000 から赤道付近の成熟群(MG) まで、13 の成熟群(MG)があり(OECD, 2000)、遺伝子導入に用いた宿主である Maverick は、米国において、成熟群(MG) に分類されている(Sleper *et al.*, 1998)。

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

ダイズは、1 個体で最大 400 の莢を形成し、各節の莢数は 2~20 である。各莢には 1~5 個の種子が入っている。莢は成熟後、乾燥状態におくと、背軸面で裂開して種子が飛散する。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)。種子の発芽力は、通常の貯蔵条件下では 2 年後にほとんど失われる(古谷, 1977)。

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、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を有さない。

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

ダイズは自家受粉率が高い自殖性植物であり、他家受粉率は通常 1%未満である(OECD, 2000)。自家不和合性は知られていない。ダイズの近縁野生種としてはツルマメがあり、中国、朝鮮半島、台湾、旧ソ連邦及び我が国において広く分布している。ツルマメはツル性の一年生植物であり、野原や荒地などに自生しており(沼田ら, 1978)、ツルマメ集団内における自然交雑率は平均 2.2%であったことが報告されている(Kuroda *et al.*, 2008)。一方、秋田県雄物川沿いのツルマメ集団では、自然交雑率が平均 13%と比較的高いものであったことが報告されている。この地域は護岸工事や人為的介入がなされておらず、ツルマメ集団の規模が大きく、訪花昆虫であるミツバチやクマバチが頻繁に観察されていた。このように、このツルマメ集団の周辺環境は、自然交雑が通常よりも起こりやすいもので

あったと考えられる (Fujita *et al.*, 1997)。

ダイズとツルマメは染色体数 ($2n=40$) が同じであり、交雑が可能である (OECD, 2000)。一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、それぞれの開花期間が重なりにくい。他のダイズ品種と比べて開花期が遅い我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメそれぞれ 30 個体を 30cm 間隔で交互に配置した条件下での平均交雑率は 0.73% (686 個体中 5 個体) であったと報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、2005 年に、除草剤耐性遺伝子組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で、開花期の一部が重複した条件下での交雑率を調べた研究では、検定種子 32,502 個体中、開花最盛期が最も近かった組合せのツルマメ 11,860 個体の中から交雑個体が 1 個体見つかったと報告されている (Mizuguti *et al.*, 2009)。2007 年に、より開花期の遅い組換えダイズ 2 品種 (AG6702RR 及び AG5905RR) を用い、開花ピークをより近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、25,741 個体中、交雑個体は AG6702RR では 25 個体 (交雑率 0.097%)、AG5905RR では 10 個体 (交雑率 0.039%) であった。さらに、組換えダイズから 2、4、6、8、10m 離してツルマメを栽培した場合は (それぞれ 7,521 個体中、7,485 個体中、14,952 個体中、14,964 個体中、21,749 個体中)、組換えダイズ (AG6702RR) から 2、4、6m の距離で交雑個体はそれぞれ 1 個体であり、8、10m の距離では交雑個体は得られなかった (Mizuguti *et al.*, 2010)。

また、ダイズにはアポミクシスを生ずる特性を有するという報告はない。

20 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 1 花当たりの花粉の生産量は平均 3,600 粒前後であり (Chiang and Kiang, 1987)、花粉の寿命は数時間である。受精可能な期間は、開花 1 日前から開花後 2 日程度で同じ花の中で受粉する (OECD, 2000)。2001 年～2004 年に独立行政法人農業環境技術研究所で行われた花粉の飛散距離と交雑率に関する研究では、最も高い交雑率は花粉源から 0.7m で 0.19% であり (2001 年)、10.5m 離れると交雑率は 0% であった。さらに、開花期間中に畝間に飛散した花粉量は、平均 0.18 粒/cm²/日であり風媒による交雑は少ないものと示唆されている。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、カメムシ目の昆虫が観察されたと報告されている (Yoshimura *et al.*, 2006)。

30 ホ 病原性

へ 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

5 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 *aad-12*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI: DAS-68416-4) (以下「本組換えダイズ」という。)の作出に用いられた供与核酸の構成とその由来は、表1(p.8)のとおりである。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA Border B	アグロバクテリウム(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)由来の T-DNA 境界配列。
<i>RB7 MAR</i>	タバコ(<i>Nicotiana tabacum</i>)由来の核マトリックス結合領域(Allen <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子の発現を安定させる。
改変 <i>aad-12</i> カセット	
<i>AtUbi10</i>	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)由来のポリユビキチン 10(UBQ10)遺伝子のプロモーター。5' 末端非翻訳領域及びイントロンを含む(Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i>	グラム陰性桿菌である <i>Delftia acidovorans</i> 由来のアリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変 AAD-12 蛋白質を発現させる。発現する改変 AAD-12 蛋白質のアミノ酸配列に関しては、クローニングサイト導入のため、2 番目にアラニンが追加されている(Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23 3' UTR</i>	アグロバクテリウム(<i>A. tumefaciens</i>)のプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域(Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
<i>pat</i> カセット	
<i>CsVMV</i>	キャッサバベインモザイクウイルス(<i>Cassava vein mosaic virus</i>)由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む(Verdaguer <i>et al.</i> , 1998)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT 蛋白質を発現させる。発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列に関しては改変されていない(Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
<i>AtuORF1 3' UTR</i>	アグロバクテリウム(<i>A. tumefaciens</i>)のプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域(Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
T-DNA Border A	アグロバクテリウム(<i>A. tumefaciens</i>)由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	アグロバクテリウム(<i>A. tumefaciens</i>)由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	アグロバクテリウム(<i>A. tumefaciens</i>)由来の T-DNA 境界配列。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

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―その他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

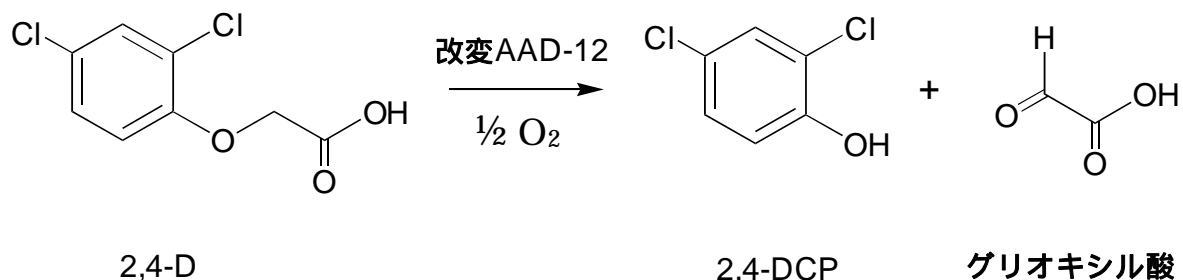
挿入遺伝子の各要素の機能を表 1(p.8)に示した。

- 5 供与核酸には、核マトリックス結合領域である *RB7 MAR* 遺伝子が含まれる。核マトリックス結合領域はゲノム DNA 配列に頻繁に見られる領域で、DNA のループ構造形成のために、核マトリックスに DNA を付着させる役割をしていると考えられている。核マトリックス結合領域が導入遺伝子のいずれかの側に隣接していると、導入遺伝子の発現を高めることや、遺伝子の発現を抑制するジーンサイレンシングを減少させることが報告されている (Allen *et al.*, 2000 ; Halweg *et al.*, 2005)

目的遺伝子及び選抜マーカ―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 アリルオキシアルカノエート・ディオキシゲナーゼ (AryloxyAlcanoate Dioxygenase、以下「改変 AAD-12 蛋白質」という。)は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。また、本組換えダイズにおいては、改変 AAD-12 蛋白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入する反応を触媒することにより、除草活性のない化合物に変換し、除草剤耐性を示す (Wright *et al.*, 2007)。例えば、改変 AAD-12 蛋白質は除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換する (図 1、p.9)。なお、改変 AAD-12 蛋白質の基質となる除草剤を添付資料 1 に示した。

- 25 改変 AAD-12 蛋白質が既知アレルギーとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルギー・データベース (FARRP Allergen Database version 12、2012) を用いて調べたところ、既知アレルギーと構造的に類似する配列を有していなかった。



- 30 図 1 改変 AAD-12 蛋白質の作用機作

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

- ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ (Phosphinothricin AcetylTransferase、以下「PAT 蛋白質」という。)は、グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない安定した化合物である *N*-アセチル-L-グルホシネート (2-アセトアミド-4-

メチルホスフィニコ-ブタン酸)に迅速に変換する。

グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量のアンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、N-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないため、PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え植物では植物毒素の生理学的影響を受けず、除草剤グルホシネートへの耐性を示す (OECD, 2002)。

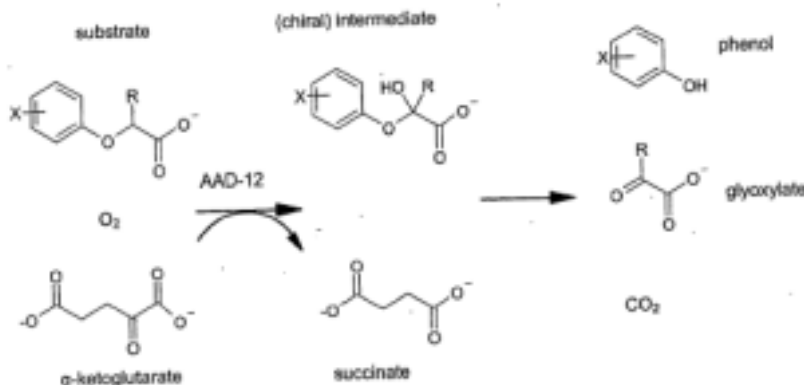
PAT 蛋白質が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース (FARRP Allergen Database version 12、2012)を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 AAD-12 蛋白質】

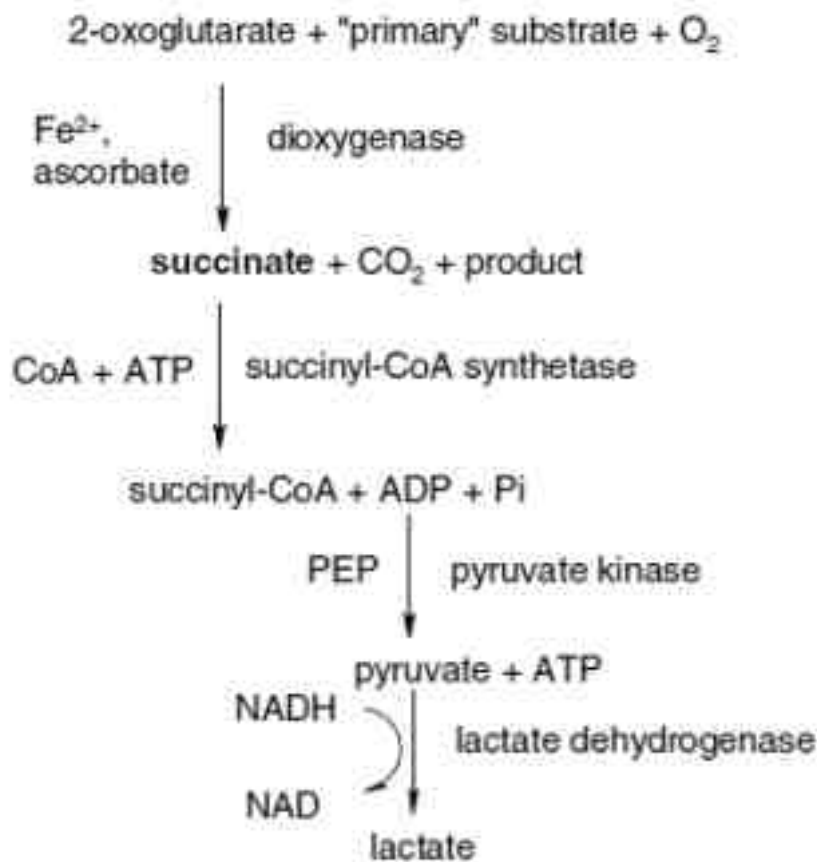
改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。

改変 AAD-12 蛋白質が基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタル酸の存在下で、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される (図 2、p.10)。そこで、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った植物体中に存在する化合物が改変 AAD-12 蛋白質の基質になり得るかどうか、 α -ケトグルタル酸を添加した改変 AAD-12 蛋白質の反応実験においてコハク酸測定 (enzyme-coupled assay) を行い、コハク酸の生成について確認した。コハク酸測定では、サクシニル CoA シンターゼ、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼを用いた反応系において、還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの酸化量を 340nm の吸光度で測定することにより、コハク酸の生成量に換算した (Luo *et al.*, 2006 ; 図 3、p.11)。アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った植物体中に存在する化合物として、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸 (GA3) 及びアミノシクロプロパン-1-カルボン酸、また、フェニルプロパノイド中間体であるトランス桂皮酸、クマル酸及びシナピン酸、さらに、20 種類の L-アミノ酸を用いた。



30 図 2 α -ケトグルタル酸存在下での改変 AAD-12 蛋白質の酵素反応

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)



5

図3 コハク酸測定の反応経路

-ketoglutarate = 2-oxoglutarate

ジオキシゲナーゼ(dioxygenase)が基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタル酸(2-oxoglutarate)はコハク酸(succinate)に変換される。

10 補酵素 A (CoA) 及びアデノシン-5-三リン酸(ATP)の存在下で、コハク酸は、サクシニル CoA シンテターゼ(succinyl-CoA synthetase)によりサクシニル CoA (succinyl-CoA)に変換され、同時に、アデノシン-5'-二リン酸(ADP)及びリン酸(Pi)が生成される。

ピルビン酸キナーゼ(pyruvate kinase)により、ホスホエノールピルビン酸(PEP)と ADP から、ピルビン酸(pyruvate)と ATP が生成される。

15 還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の存在下で、ピルビン酸が乳酸デヒドロゲナーゼ(lactate dehydrogenase)によって乳酸(lactate)に変換され、同時に NAD が生成される。この反応で生成された NAD 量は量的にコハク酸量に等しいと考えられる。

20

20種類のL-アミノ酸については、1 μ Mの改変AAD-12蛋白質の濃度においてコハク酸の生成が認められなかったため、改変AAD-12蛋白質は20種類のL-アミノ酸とは反応しないと考えられた(添付資料2、Table1、p.18)。一方、1 μ Mの改変AAD-12蛋白質を植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体に作用させた結果、クマル酸、トランス桂皮酸及びアミノシクロプロパン-1-カルボン酸について、わずかにコハク酸の生成が認められた(添付資料2、Table2、p.19)。さらに、5 μ M及び10 μ Mの改変AAD-12蛋白質を作用させた結果、インドール-3-酢酸、ジベレリン酸、アブシジン酸、クマル酸、トランス桂皮酸及びシナピン酸について、コハク酸の生成が認められた(添付資料2、Table3及びTable4、p.20及びp.21)。このように、異なる改変AAD-12蛋白質の濃度下において、いくつかの化合物でコハク酸の生成が認められた。しかしながら、enzyme-coupled assayによる測定では、基質の酸化を経なくともコハク酸生成物を誘発する脱共役反応(uncoupling)が起こる可能性がある(Hausinger, 2004)。したがって、enzyme-coupled assayにおいて反応が認められた化合物が実際に酸化されているかを確認するために、フーリエ変換質量分析(FT/MS)による一次酸化物の測定を行った。その結果、10 μ Mの改変AAD-12蛋白質を作用させた場合に、トランス桂皮酸とインドール-3-酢酸の酸化物のみが検出された。

そこで、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸、また、対照として、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物で2,4-Dと類似の化学構造を持つS-ジクロルプロップ*についてenzyme-coupled assayによる改変AAD-12蛋白質の触媒効率を検討した。その結果、トランス桂皮酸、インドール-3-酢酸及びS-ジクロルプロップについての触媒効率 K_{cat}/K_m は、それぞれ156.7M⁻¹s⁻¹、8.2M⁻¹s⁻¹及び30,175M⁻¹s⁻¹であった(添付資料2、Table5、p.22)。トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は、S-ジクロルプロップについての K_{cat}/K_m に対してそれぞれ0.52%及び0.027%であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率はS-ジクロルプロップと比較して非常に低い値であることが示された。なお、改変AAD-12蛋白質の2,4-Dについての K_{cat}/K_m は18,600M⁻¹s⁻¹であることが報告されており(Wright *et al.*, 2010)、改変AAD-12蛋白質の2,4-D及びS-ジクロルプロップについての触媒効率は同等であることから、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率は2,4-Dと比較して非常に低い値であると考えられる。

さらに、シロイヌナズナの桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ(Cinnamate-4-hydroxylase)の*in vitro*におけるトランス桂皮酸についての K_{cat}/K_m は 3.4×10^6 M⁻¹s⁻¹であることが報告されている(Chen *et al.*, 2007)。また、イネのインドール-3-酢酸アミドシンセターゼ(IAA amido synthetase)の*in vitro*におけるインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は 2.75×10^3 M⁻¹s⁻¹であると報告されている(Chen *et al.*, 2009)。このように桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ及びインドール-3-酢酸アミドシンセターゼの触媒効率はいずれも高い値であり、ト

*光学異性である除草剤ジクロルプロップのS体の化合物。除草活性を持つのはR体のみであるため、S-ジクロルプロップは除草活性を持たない。

ランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸は、植物体内の既存の代謝経路において効率的かつ特異的に利用されているものと考えられる。一方、改変 AAD-12 蛋白質のランス桂皮酸に対する $Kcat/Km$ 値は桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼのランス桂皮酸に対する $Kcat/Km$ 値の 0.005% である。また、改変 AAD-12 蛋白質のインドール-3-酢酸に対する $Kcat/Km$ 値はインドール-3-酢酸アミドシンセターゼのインドール-3-酢酸に対する $Kcat/Km$ 値の 0.3% であり、改変 AAD-12 蛋白質の $Kcat/Km$ 値はいずれも非常に低い値である。

以上より、改変 AAD-12 蛋白質はランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-12 蛋白質は、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} (半数致死濃度) は淡水魚で 1.7mg/L、オオミジンコ (*Daphnia magna*) で 1.4mg/L であり、ウキクサの EC_{50} (半数影響濃度) が 1.5mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC (無影響濃度) が 0.14mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC_{50} が 125mg/kg、オオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) の EC_{10} (10% 影響濃度) が 0.7mg/kg である (OECD, 2006)。一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} は淡水魚で 0.26mg/L、オオミジンコで 2.2mg/L であり、ウキクサの EC_{50} が 0.2992mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20mg/L である (EPA, 2004)。

このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

なお、本組換えダイズに適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、最大平均残留量は 0.047mg/kg であった (添付資料 3、Table 2、p.26)。2,4-DCP のマウスにおける急性毒性試験の LD_{50} (半数致死量) は 1,276 ~ 1,352mg/kg 体重、ラットにおける慢性毒性 (2 年間) 試験の NOAEL (無毒性量) は、雄で 440mg/kg 体重/日、雌で > 250mg/kg 体重/日であり (OECD, 2006)、本組換えダイズにおける 2,4-DCP の残留量を大きく上回っていることから、本組換えダイズの輸入種子が野生動植物に影響を及ぼすことはないと考えられる。

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない (OECD, 1999)。また、L 型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PAT 蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応に影響を受けることはない (OECD, 1999)。したがって、PAT 蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはない

と考えられる。

除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性（急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性）はグルホシネートより低いことが確認されており（食品安全委員会, 2010）、グルホシネートが散布された場合における *N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。なお、*N*-アセチル-L-グルホシネートは、ダイズの残留基準値の対象化合物に含まれている。

10 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

導入した pDAB4468 の基となったベクター pDAB2407 は、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) と大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する。

15 ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

発現ベクター pDAB4468 の塩基数は 12,154bp である。pDAB4468 の塩基配列は添付資料 4 に示した。

20 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

発現ベクター pDAB4468 はスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子を有する。*specR* 遺伝子は、発現ベクター pDAB4468 を構築する際の選抜マーカーとして利用したが、T-DNA 領域の外側に位置するため、本組換えダイズに *specR* 遺伝子は導入されていない。

25 なお、本組換えダイズ中における *specR* 遺伝子の存在の有無をサザンブロット分析により確認した結果、*specR* 遺伝子は存在していないことが確認された（添付資料 5、表 2、p.5）。

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

30 発現ベクター pDAB4468 の基となったベクターの T-DNA 領域は、表 1(p.8) に示した供与核酸に置き換えられており、アグロバクテリウムの感染を可能とする配列は含まれておらず、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

35 発現ベクター pDAB4468 の構成図を図 4(p.15) に示した。また、発現ベクター pDAB4468 の作成過程を添付資料 6 に示した。

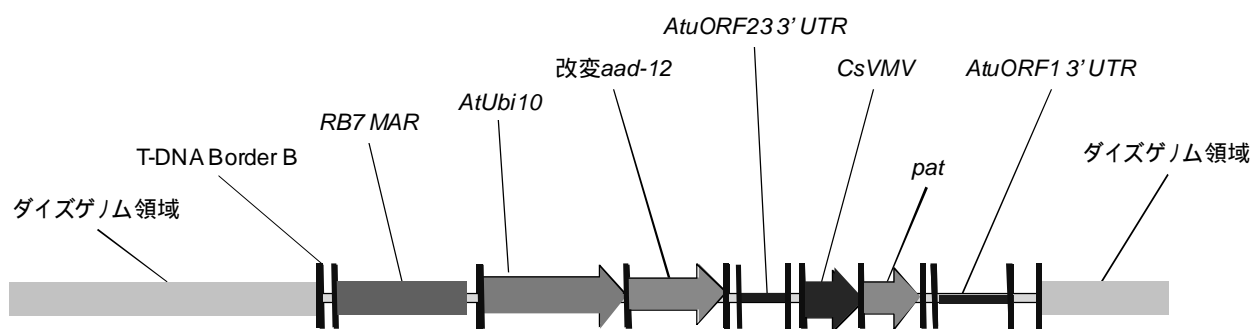
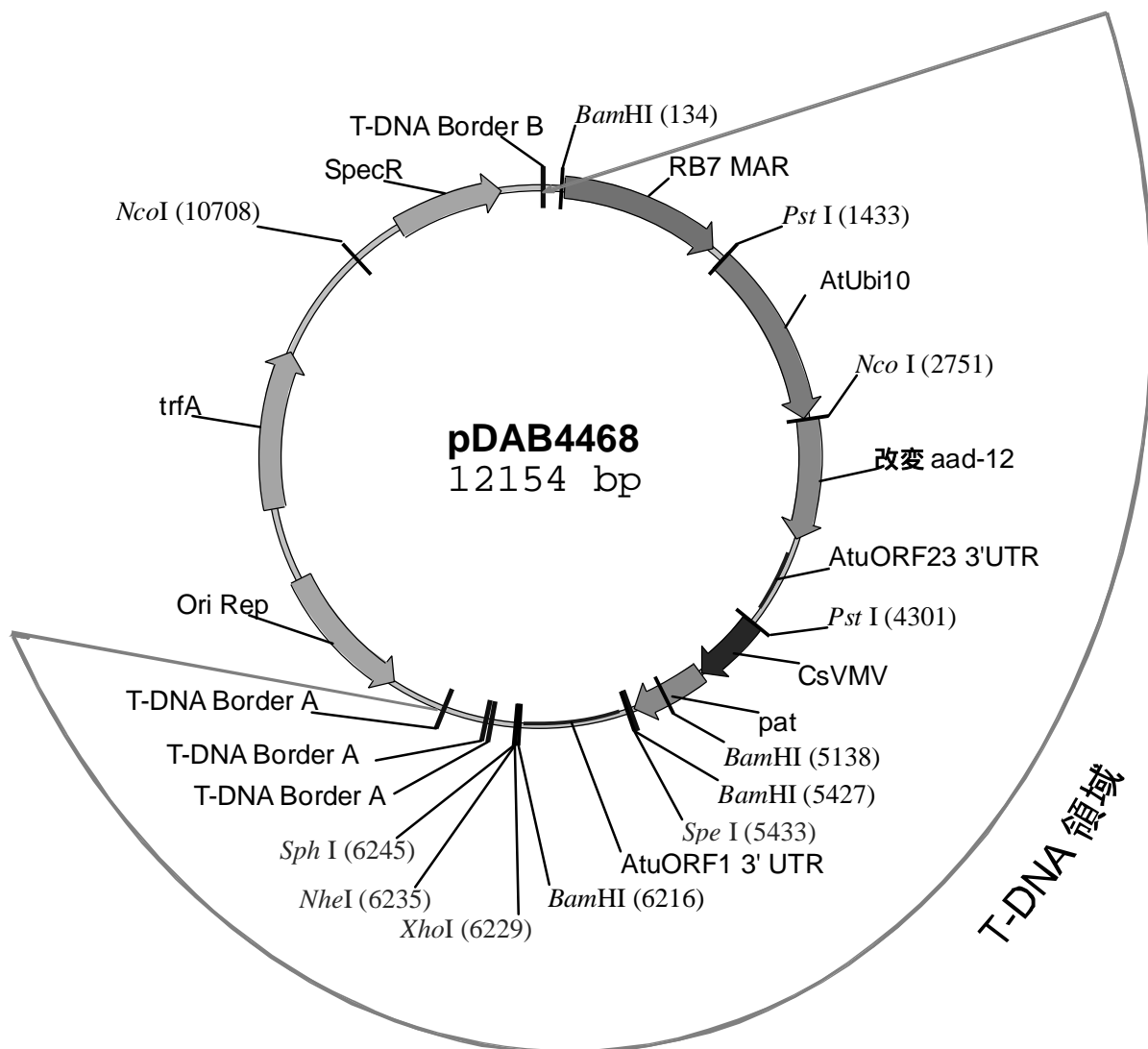


図 4 発現ベクター-pDAB4468 の構成図(上段)及び T-DNA 領域の挿入概要図(下段)

上段図の()内の数字は、T-DNA Border B を起点としたプラスミド上の制限酵素切断位置を示す。

10

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への導入はアグロバクテリウム法により行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

5 核酸が移入された細胞の選択の方法

アグロバクテリウム感染後の培養組織から形成された不定芽及びシュートを、除草剤グルホシネートを含む培地で培養することにより選抜した。

10 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

不定芽誘導培地及び不定芽伸長培地に抗生物質を添加することにより、アグロバクテリウムを殺菌した。その後、形成されたシュートを抗生物質を含まない再生培地で培養し、アグロバクテリウム菌体が残存していないことを確認した。

15 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

20 再分化した植物体にグルホシネートを塗布することにより耐性を有する個体を選抜した。選抜された植物体については、PCR法及びサザンブロット分析による導入遺伝子の解析を行った。さらに、米国及びカナダの野外ほ場において、後代系統における導入遺伝子の解析、蛋白質発現の確認、除草剤耐性及び農業形質から総合的に判断し、本組換えダイズを選抜した。申請の範囲はT3世代以降の後代系統である。

詳細を図5(p.17)に示す。

25 本組換えダイズの我が国における認可、申請の状況は次のとおりである(2013年6月現在)。

30 2009年8月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程(隔離ほ場試験)の承認を得た(使用期間:2009年8月28日から2011年3月31日まで)。

2012年5月 隔離ほ場において追加試験を行うために、再度、農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程(隔離ほ場試験)の承認を得た(使用期間:2012年5月29日から2014年3月31日まで)。

35 2013年5月 厚生労働省に「食品衛生法」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。

2013年5月 農林水産省に「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。

図 5 本組換えダイズの育成図

5

(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

移入した核酸の複製物が存在する場所

移入した核酸は、いったん植物染色体に組み込まれると、メンデル遺伝の法則に従う。本組換えダイズに導入された形質が、F2 世代(図 5、p.17)の集団でどのような分離を示すかを分析した(2009 年、米国インディアナ州)。T4 世代の系統に非組換えダイズを交配して得られた F1 世代 1 個体を自家受粉し、F2 集団における改変 AAD-12 蛋白質の発現の有無をラテラルフローストリップ法*により調べた。その結果、得られた観測値は、核内遺伝子におけるメンデルの分離法則に矛盾しないことより、移入した核酸が染色体上に存在していることを確認した(表 2、p.17)。

15

表 2 本組換えダイズの F2 世代の分離比検定

世代	合計 個体数	予測 比率	予測値 ¹⁾		観測値 ¹⁾		カイ 二乗値	P-値 ²⁾
			AAD-12 +	AAD-12 -	AAD-12 +	AAD-12 -		
F2	146	3 : 1	110.25	36.75	101	45	2.64	0.10

¹⁾ AAD-12+ : 改変 AAD-12 蛋白質が検出された個体数
 AAD-12- : 改変 AAD-12 蛋白質が検出されなかった個体数

²⁾ p<0.05

20

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

移入された核酸のコピー数を確認するため T3 世代から T5 世代におけるサザンブロット分析を行った結果、本組換えダイズに導入された *RB7 MAR*、改変 *aad-12* カセット及び *pat* カセットは 1 コピーであり、複数世代において安定して伝達されることが確認された(添付資料 5、表 2、p.4)。

また、T-DNA 領域における個々の構成要素の挿入を確認するために、宿主ゲノム境界領域を含む本組換えダイズにおける挿入遺伝子全体のクローニング及び塩基配列決定を行った。移入された核酸領域 6,400bp、5' 末端の近傍配列 2,730bp 及び 3' 末端の近傍配列 1,082bp を含む合計 10,212bp の塩基配列を決定した(添付資料 7)。その結果、全ての

30

 *毛細管現象により検体がメンブレン上を移動する際、検体中の抗原と標識抗体及び捕捉抗体の三者により免疫複合体が形成され、その標識物の集積を目視で判定する方法。本試験では、本組換えダイズが発現する改変 AAD-12 蛋白質について、メンブレン上の抗体で捕捉、バンドの目視によって、その発現の有無を確認した。

35

T-DNA Border A 及び T-DNA Border B の一部は移入されていないが、その他の構成要素は全て完全な形で移入されていることが明らかになった (図 4 下段、p.15)。

5 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
染色体上に複数コピーは存在しない。

(6)の 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 本組換えダイズの T4 世代及び T6 世代において、葉における改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により調べた(2008~2009年、米国インディアナ州)。その結果、両世代において改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質が安定して発現していることを確認した(表 3、p.18 及び表 4、p.18)。

15 表 3 本組換えダイズの T4 及び T6 世代での葉における改変 AAD-12 蛋白質の発現量¹⁾
(ng/mg 乾燥重量)

世代	平均	標準偏差	サンプル数
T4	51.42	25.22	16
T6	74.99	8.53	28
非組換えダイズ	< LOD ²⁾	-	28

¹⁾ 5 葉期の葉を供試した。

²⁾ 検出限界値(0.5ng/mg)未滿。

20 表 4 本組換えダイズの T4 及び T6 世代での葉における PAT 蛋白質の発現量¹⁾
(ng/mg 乾燥重量)

世代	平均	標準偏差	サンプル数
T4	9.17	2.99	16
T6	7.13	2.80	28
非組換えダイズ	< LOD ²⁾	-	28

¹⁾ 5 葉期の葉を供試した。

²⁾ 検出限界値(0.06ng/mg)未滿。

25 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
本組換えダイズには、伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換えダイズに導入された核酸が野生動植物等に伝達されることはない。

(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

本組換えダイズの検出及び識別の方法として、本組換えダイズに特異的な塩基配列をプライマーとして用いた PCR 法が開発されている。非組換えダイズに対する本組換えダイズの混入率について、本 PCR の検出限界値は DNA 量比で 0.04%である。なお、再現性
5 については、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国ユーロフィン・ジーンスキャン社において、施設間互換性(inter-laboratory transferability)が確保されていることが確認されている(添付資料 8、Table 12、p.28、Study ID 101716)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

10 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

本組換えダイズには、改変 *aad-12* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。アリルオキシアル
15 カノエート系除草剤耐性を付与された本組換えダイズを栽培することにより、栽培農家は使用する除草剤の選択肢が増えるとともに、他の除草剤に抵抗性を獲得した雑草を防除することができる。また、除草剤グルホシネート耐性は、選抜の際のマーカーとして使用した。

20 2012 年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで行った隔離ほ場試験において、本組換えダイズ(T10 世代)及び対照の非組換えダイズ(Maverick)の除草剤 2,4-D 及びグルホシネート耐性試験を行った。播種 17 日後(本葉 2 葉期頃)の本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各 12 個体)に 2,4-D を 1,120g a.e./ha* (通常使用量)又はグルホシネートを 374g a.i./ha* (通常使用量)それぞれ散布した。散布 2 週間後には、非組換えダイズは全て枯死したのに対し、本組換えダイズは全て薬害も見られず、十分な除草剤耐性を
25 示した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2)。

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

30 2012 年に、ダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、本組換えダイズ(T10 世代)と対照の非組換えダイズ(Maverick)の相違を検討した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽率、発芽揃い、開花始期、開花終期、成熟期、小葉の

35 -----
* 除草剤の有効成分含量は、有効成分(active ingredient ; a.i.)又は酸当量(acid equivalent ; a.e.)で表される。有効成分(a.i.)量は成分重量を示し、酸当量(a.e.)は遊離酸の量を示す。除草剤の製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含んでいる。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。2,4-D は塩基部分が異なる製剤が複数存在するため、正確な活性分量を把握するため、酸当量を用いた。

形、毛じの多少、伸育型、主茎長、最下着莢節位高、主茎節数、分枝数、収穫期の地上部生体重、稔実莢数、一株全粒重、一株成熟粒重、百粒重、子実の形について、ダイズ栽培種に関する農林水産植物種類別審査基準(農林水産省, 2012)を参考に、本組換えダイズと非組換えダイズの比較を行った。

5 隔離ほ場において、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに播種4日後に発芽を開始した。発芽率に関して本組換えダイズ(99.0%)と非組換えダイズ(80.2%)との間に有意差が認められた(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1、発芽率-1、p.3)。なお、ほ場に播種した種子と同じ本組換えダイズ種子及び非組換えダイズ種子を用い、室内における発芽試験を実施した結果、発芽率に関して本組換えダイズ(98.3%)と非組換えダイズ(95.0%)との
10 間に有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1、発芽率-2、p.3)。また、ほ場におけるその後の生育は同等であり、開花始期、開花終期及び成熟期についても、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表2、p.4)。

15 発芽率以外の項目については、統計学的有意差又は差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表3~表6、p.4~p.6)。

b 生育初期における低温耐性

本組換えダイズと非組換えダイズの生育初期における低温耐性について検討した。初生葉展開期まで生育した本組換えダイズ及び非組換えダイズ(各6個体)を4、16時間日長
20 に設定した恒温器内で栽培し、生育状況を観察した。その結果、31日後には本組換えダイズ及び非組換えダイズともに、葉の白化、植物体の萎縮及び著しい生育障害の症状を呈し、その程度に差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図3、p.7)。

c 成体の越冬性

25 本組換えダイズと非組換えダイズの成体の越冬性について検討した。ほ場で生育した株(16株)を成熟後も収穫せずに翌年まで放置し、冬季の自然条件下における植物体の状況を観察した。2013年1月に供試個体を観察した結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに、いずれの株も枯死していた(「隔離ほ場試験結果報告書」、図4、p.7)。

30 d 花粉の稔性及びサイズ

花粉の形状に差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図5、p.8)。また、ヨウ素溶液で染色した本組換えダイズと非組換えダイズの花粉の充実度及びサイズについて調査した。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの間統計学的有意差は認められ
35 なかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表7、p.9)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、本組換えダイズと非組換えダイズの稔実莢数、一株全粒重、一株成熟粒重、百粒重を比較した。その結果、全ての項目において統計学的有意差が認められなかったことから、本組換えダイズと非組換えダイズの種子の生産量に差異はないと

判断した(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 5、p.5)。

裂莢性については、完熟期に本組換えダイズ及び非組換えダイズの裂莢の程度を観察した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに難裂莢性であり、差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 8、p.9)。

5 また、本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫種子を、収穫後すぐに休眠覚醒処理を行わずにシャーレで発芽させ、発芽率を調査し、休眠性を評価した。その結果、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに高い発芽率を示し、休眠性は極めて浅いと判断された。また、統計学的有意差についても認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 7、p.9)。

10

f 交雑率

交雑性試験区(「隔離ほ場試験結果報告書」、別添図 2、p.15)に本組換えダイズ及び非組換えダイズを株間 25cm の間隔で交互に栽植し、その非組換えダイズから得られた種子 3,200 粒を隔離ほ場内に再び播種した。播種した 3,200 粒のうち、3,129 粒が発芽した(発芽率 97.8%)。本葉 2 葉期に除草剤 2,4-D を 1,120g ae/ha 処理し、生存する個体を計数することにより生存率を調査した。その結果、3,129 個体中 5 個体の生存が確認され、生存率は 0.16%であった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 9、p.10)。

15

g 有害物質の産生性

20 本組換えダイズと非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

< 後作試験 >

25 収穫期の本組換えダイズ及び非組換えダイズの根域土壌を各区 8 ヶ所から採取し混和後(8 株/区、4 反復区)、セルトレイ(25 穴)に詰めた。各セルにハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、7 日後に発芽率、21 日後に草丈及び乾燥重量の調査を行った。

その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 10、p.11)。

30

< 鋤込み試験 >

35 収穫期の本組換えダイズ及び非組換えダイズの植物体地上部を刈取り(4 株/区、4 反復区)、4 株分を 1 サンプルとし、乾燥及び粉碎した後、園芸培土とよく混和した(乾燥粉末の重量比約 0.6%)。セルトレイ(25 穴)に混和した土壌を入れ、ハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、播種 7 日後に発芽率、22 日後に草丈、乾燥重量の調査を行った。

その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 11、p.11)。

40

< 土壌微生物相試験 >

本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫後の土壌を各区 3 ヲ所から採取した(3 サンプル/区、4 反復区)。希釈平板法により、細菌数、放線菌数及び糸状菌数を測定した。その結果、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 12、p.12)。

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

「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

米国(インディアナ州、イリノイ州など、2007~2010年)では延べ215カ所、またカナダ(オンタリオ州、2008~2012年)では延べ17カ所のほ場において試験を行ってきたが、非組換えダイズと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

なお、本組換えダイズの国外における申請状況は以下のとおりである(表5、p.23)。

表5 本組換えダイズの国外における申請状況(2013年2月現在)

申請国	申請先機関	申請目的	申請状況
米国	米国農務省(USDA)	栽培	2009年12月
	米国食品医薬品庁(FDA)	食品、飼料	2009年12月 ¹⁾
カナダ	カナダ保健省(Health Canada)	食品	2010年2月 ²⁾
	カナダ食品検査庁(CFIA)	栽培、飼料	2010年2月 ²⁾
オーストラリア・ ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品 基準機関(FSANZ)	食品	2010年5月 ¹⁾
EU	欧州食品安全機関(EFSA)	食品、飼料	2011年1月
韓国	韓国食品医薬品庁(KFDA)	食品	2010年12月
	韓国農村振興庁(RDA)	飼料、環境	2010年12月

¹⁾ 2011年11月、安全性確認終了。

²⁾ 2012年10月、安全性確認終了。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

5 ダイズは、我が国において長期にわたり栽培されているが、自然環境下において雑草化しているとの報告はなされていない。

10 第一の2の(6)に示したとおり、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、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・休眠性及び収穫種子の発芽率について観察し、本組換えダイズと非組換えダイズの競合に関わる諸形質の相違を検討した。

15 その結果、形態及び生育の特性のうち、発芽率について統計学的有意差が認められた。発芽については、隔離ほ場において、本組換えダイズ及び非組換えダイズはともに播種4日後に発芽を開始したが、発芽率に関して本組換えダイズ(99.0%)と非組換えダイズ(80.2%)との間に有意差が認められた(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1、発芽率-1、p.3)。一方、ほ場に播種した種子と同じ本組換えダイズ種子及び非組換えダイズ種子を用い、室内における発芽試験を実施した結果、本組換えダイズ(98.3%)と非組換えダイズ(95.0%)との間に有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1、発芽率-2、p.3)。また、本組換えダイズ及び非組換えダイズのほ場におけるその後の生育はともに同等であり、開花始期、開花終期及び成熟期についても、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に差は見られなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表2、p.4)。

20 本試験に用いた種子の来歴については、本組換えダイズは2011年4月に、非組換えダイズは2010年5月にそれぞれ米国プエルトリコにおいて採種された種子であった。したがって、非組換えダイズは本組換えダイズと比べ、採種後の貯蔵日数が長かったため、ほ場における発芽率の低下につながったと考えられた。なお、室内における発芽試験では本組換えダイズと非組換えダイズとの間で発芽率に差は見られなかった。一方、隔離ほ場で得られた本組換えダイズ及び非組換えダイズの収穫種子について、収穫後すぐに休眠覚醒処理をせずに行った発芽試験においては、本組換えダイズ及び非組換えダイズの発芽率はともに100%であったため(「隔離ほ場試験結果報告書」、表7、p.9)、本組換えダイズ及び非組換えダイズの発芽力は同等であると考えられた。そのため、本試験のほ場において観測された発芽率の差は、その後の形態及び生育特性等の観測値に影響を及ぼすものではないと考えられた。

35 ダイズでは、長期貯蔵した種子であっても、発芽率が80%(農産物規格規程)以上であれば種子としての適格性を具備しており、その栽培特性や収量性について実用上問題はないことが報告されている(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2003)。実際に、隔離ほ場における形態及び生育特性の調査結果について、発芽率以外の項目では、統計学的有意差又は差は認められなかった。さらに、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・休眠性及び収穫種子の発芽率についても、

本組換えダイズと非組換えダイズの相違は見られなかった。

本組換えダイズには、改変*aad-12* 遺伝子及び*pat* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変AAD-12蛋白質及びPAT蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されているが、これらの除草剤を
5 散布されることが想定されない自然条件下においてアリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

また、本組換えダイズの供与核酸中には、タバコ(*N. tabacum*)由来の核マトリックス結合領域である*RB7MAR* が含まれる。*RB7MAR* は、導入遺伝子の発現を高めることや、
10 遺伝子の発現を抑制するジーンサイレンシングを減少させることが報告されているが(Allen *et al.*, 2000 ; Halweg *et al.*, 2005)、隔離ほ場試験の結果において、上述のとおり生理学的及び生態学的特性について本組換えダイズと非組換えダイズの相違はないと考えられた。したがって、*RB7MAR* が導入遺伝子の発現に影響を及ぼし、植物体の他の代謝系を変化させ、競合における優位性に関わる生理学的又は生態学的特性について宿主と
15 の相違をもたらすことはないと考えられる。

したがって、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いと判断された。

20 (2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

25

(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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えダイズの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。

30 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

ダイズには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

35 本組換えダイズは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変 AAD-12

蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質を産生する。改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質については、ともに有害物質としては知られていない。

第一の 2 の(1)口 に示したとおり、改変 AAD-12 蛋白質にはトランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、これらが植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-12 蛋白質は植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。一方、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない(OECD, 1999)。また、L型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PAT 蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応が影響を受けることはない(OECD, 1999)。したがって、PAT 蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。さらに、本組換えダイズの供与核酸中には、タバコ(*N. tabacum*)由来の核マトリックス結合領域である *RB7MAR* が含まれる。*RB7MAR* は、導入遺伝子の発現を高めることや、遺伝子の発現を抑制するジーンサイレンシングを減少させることが報告されているが(Allen *et al.*, 2000 ; Halweg *et al.*, 2005) 第一の 2 の(6)に示したとおり、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで実施したほ場試験の結果、生理学的及び生態学的特性について本組換えダイズと非組換えダイズの相違はないと考えられた。したがって、*RB7MAR* が導入遺伝子の発現に影響を及ぼし、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

また、改変 AAD-12 蛋白質が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース(FARRP Allergen Database version 12、2012)を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。また、PAT 蛋白質についても、既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース(FARRP Allergen Database version 12、2012)を用いて調べた結果、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を共有していなかった。

なお、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターの隔離ほ場試験において、本組換えダイズと非組換えダイズの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。その結果、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験のいずれにおいても、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区間に統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 10~表 12、p.11~p.12)。

一方、除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} (半数致死濃度)は淡水魚で 1.7mg/L、オオミジンコ(*Daphnia magna*)で 1.4mg/L であり、ウキクサの EC_{50} (半数影響濃度)が 1.5mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC(無影響濃度)が 0.14mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC_{50} が 125mg/kg、オオフォルソムトビムシ(*Folsomia candida*)の EC_{10} (10%影響濃度)が 0.7mg/kg である(OECD, 2006)。2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} は淡水魚で 0.26mg/L、オオミジンコで 2.2mg/L であり、ウキクサの EC_{50}

が 0.2992mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20mg/L である (EPA, 2004)。

5 このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

10 なお、本組換えダイズに適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、最大平均残留量は 0.047mg/kg であった (添付資料 3、Table 2、p.26)。なお、2,4-DCP のマウスにおける急性毒性試験の LD₅₀(半数致死量)は 1,276~1,352mg/kg 体重、ラットにおける慢性毒性(2年間)試験の NOAEL(無毒性量)は、雄で 440mg/kg 体重/日、雌で > 250mg/kg 体重/日であり (OECD, 2006)、本組換えダイズにおける 2,4-DCP の残留量を大きく上回っていることから、本組換えダイズの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられる。

15 除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性(急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性)はグルホシネートより低いことが確認されており (食品安全委員会, 2010)、グルホシネートが散布された場合における *N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。なお、*N*-アセチル-L-グルホシネートは、ダイズの残留基準値の対象化合物に含まれている。

20 したがって、有害物質の産生性に起因する影響を受ける野生動植物等は特定されないと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

25

(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

30 以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えダイズの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がないと判断された。

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

35 ダイズと交雑可能な近縁野生種として、我が国にはツルマメが自生している (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。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 ダイズとツルマメは染色体数がともに $2n=40$ であり交雑可能である(OECD, 2000)。したがって、交雑性に関する具体的な影響としては、本組換えダイズ由来の改変 *aad-12* 遺伝子もしくは *pat* 遺伝子が当該雑種からツルマメの集団中に浸透した後に、その集団の競合における優位性が高まる可能性が考えられた。

(3) 影響の生じやすさの評価

10 ツルマメは、我が国において北海道、本州、四国、九州に分布し、野原や荒地などに自生している(沼田ら, 1978)。したがって、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。

15 しかし、ダイズとツルマメは自殖性植物であり、一般的にツルマメの開花期はダイズより遅く、それぞれの開花期間が重なりにくいことが知られているため(Nakayama and Yamaguchi, 2002)、ダイズとツルマメの交雑は起こりにくいと考えられる。実際、比較的開花期が遅い我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメの平均交雑率は、0.73%であったと報告されている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。また、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で、開花期が重複した条件下では、ツルマメより採種した種子から出芽した11,860個体中、交雑個体は1個体であったと報告されている(Mizuguti *et al.*, 2009)。さらに、より開花期の遅い組換えダイズ2品種(AG6702RR及びAG5905RR)を用い、開花ピークをより近づけ、組換えダイズにツルマメが巻きついた状態で行われた実験では、25,741個体中、交雑個体はAG6702RRでは25個体(0.097%)、AG5905RRでは10個体(0.039%)であった。また、組換えダイズから2、4、6、8、10m離してツルマメを栽培した場合は(それぞれ7,521個体中、7,485個体中、14,952個体中、14,964個体中、21,749個体中)、組換えダイズ(AG6702RR)から2、4、6mの距離で交雑個体はそれぞれ1個体あり、8、10mの距離では交雑個体は得られなかったと報告されている(Mizuguti *et al.*, 2010)。このように、ダイズとツルマメが隣接して生育し、かつ開花期が重複する条件下では交雑が起こり得るが、このような特別な条件下においても、ダイズとツルマメが交雑する可能性は極めて低いと考えられた。

25 また、隔離ほ場において調査した花粉の充実度については、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に差は認められなかった。同様に、花粉の形態や大きさにも相違は認められなかったことから、本組換えダイズの生殖に関わる形質は非組換えダイズと同等であると考えられた。

35 仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合においても、本組換えダイズ由来の改変 *aad-12* 遺伝子もしくは *pat* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくためには、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。ダイズとツルマ

メの雑種形成及びダイズからツルマメへの遺伝子浸透については、我が国において調査が行われている。2003年に行われた調査では、ダイズとツルマメの交雑後代によくみられる形態的「中間体」を広島県8地点、秋田県9地点のツルマメの自生地において探索し、秋田県の1地点で1個体の中間体が発見された(加賀ら, 2005)。さらに2004年には、秋田県8地点、茨城県6地点、愛知県4地点、広島県6地点、佐賀県33地点の合計57地点のツルマメ集団(ダイズの栽培畑と隣接)を調査し、佐賀県の3地点から、11個体の中間体が発見された。しかし、2003年に行われた調査で中間体が発見された地点からは、中間体は発見されなかった(黒田ら, 2005)。この結果より、ダイズとツルマメの雑種形成はツルマメの自生地できているもののその頻度は低いと考えられた。さらに、2005年に行った秋田県、茨城県、高知県及び佐賀県における計39地点における調査では、新たなダイズ中間体は発見されなかった。また、2004年までに秋田県の1地点と佐賀県の3地点で発見された12個体の中間体のうち、後代の生存が確認できたのは佐賀県1地点の1個体のみであった。2004年は中間体が多数の種子を生産していたが、2005年には中間体がほとんど発見されなかったことから、種子は生産されても、自生地で速やかに淘汰される可能性が推測された(黒田ら, 2006)。2006年には、2005年までに中間体が発見された秋田県1地点と佐賀県3地点における後代の自生モニタリング調査及び秋田県、兵庫県、佐賀県の新たな40地点における中間体の調査が行われた。その結果、後代モニタリングでは佐賀県の1地点で1個体が見つかったのみであった。新たな40地点で行われた調査では、佐賀県の2地点でそれぞれ1個体ずつ中間体が発見されたのみであった(黒田ら, 2007)。

また、2003年から2006年にかけて秋田県の1地点及び佐賀県の5地点にて採取した468個体のツルマメ、17個体の中間体、12個体のダイズについて、20種類のマイクロサテライトマーカー及び2種類の葉緑体dCAPSマーカーを用い、多型パターンの解析を行った。その結果、中間体はすべてツルマメと晩生ダイズの交雑によるものであり、これらはダイズからツルマメへの遺伝子浸透により生じたことが明らかになった。しかしながら、中間体からツルマメ集団への二次的な遺伝子浸透は確認されなかった。このように、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性はあるが、我が国の自然環境中においてさらなる遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられた(Kuroda *et al.*, 2010)。

以上より、本組換えダイズの自然交雑率は非組換えダイズの交雑率と同程度であること、また、従来の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から、本組換えダイズとツルマメの自然条件下での交雑率は極めて低いと考えられる。

さらに、ダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存できないと推察されることより、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられる。また、第二の1の(1)より本組換えダイズの競合における優位性は高められていないと考えられることより、本組換えダイズがツルマメと交雑し、導入遺伝子がツルマメの集団中に優先的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

(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

5

第三 生物多様性影響の総合的評価

ダイズは、我が国において長期にわたり栽培されているが、自然環境下において雑草化しているとの報告はなされていない。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、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、隔離ほ場において調査した結果、本組換えダイズの競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。また、本組換えダイズはアリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネート耐性を持つが、これらの除草剤を散布されることが想定されない自然条件下において、これらの除草剤耐性を持つこと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。

ダイズには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。また、改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これら蛋白質と既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められていない。有害物質の産生性について、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、いずれの項目においても、本組換えダイズと非組換えダイズの試験区間に統計学的有意差は認められなかった。

2,4-Dの分解産物である2,4-DCPは、2,4-Dと同等もしくは2,4-Dに比べて毒性が低く、2,4-Dが散布された場合における2,4-DCPの濃度を最大に見積もっても、散布された2,4-D以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。また、2,4-Dを散布し生育した本組換えダイズの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、除草剤グルホシネートの代謝産物である*N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性はグルホシネートより低いことが確認されており、グルホシネートが散布された場合における*N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

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。

また、ダイズとその近縁野生種であるツルマメは、ともに染色体数が $2n=40$ であり交雑可能であることから、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。

しかしながら、隔離ほ場試験で実施した花粉の稔性及びサイズの調査において、本組換えダイズの生殖特性は非組換えダイズと同程度であると考えられた。また、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から、本組換えダイズとツルマメの自然条件下での交雑率は極めて低いと考えられる。さらに、ダイズとツルマメの雑種後代系統はツルマメ自生地で長期間生存できないと推察されることより、ダイズからツルマメへの遺伝子浸透が起こる可能性は極めて低いと考えられる。また、上述のとおり本組換えダイズの競合における優位性は高められていないと考えられることより、

本組換えダイズがツルマメと交雑し、導入遺伝子がツルマメの集団中に優先的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

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、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと結論づけられた。

参 考 文 献

1. Allen, George C.; Hall Jr., Gerald; Michalowski, Susan; Newman, Winnell; Spiker, Steven; Weissinger, Arthur K.; Thompson, William F. High-level transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*. 1996, 8(5), p. 899-913.
2. Allen, George C.; Spiker, Steven; Thompson, William F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), p.361-376.
3. Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), p.335-350.
4. Chen, Hao; Jiang, Hanxiao; Morgan, John A. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry*. 2007, 68(3), p.306–311.
5. Chen, Qingfeng; Zhang, Baichen; Hicks, Leslie M.; Wang, Shiping; Jez, Joseph M. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based assay for indole-3-acetic acid–amido synthetase. *Analytical Biochemistry*. 2009, 390(2), p.149-154.
6. Chiang, Y.C.; Kiang, Y.T. Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot. Bull. Academia Sinica*. 1987, 28(1), p.1-11.
7. EPA. Environmental Fate and Effects Division’s Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Document for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). 2004, <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2004-0167-0003>, (参照 2013-2-12).
8. FAO. FAOSTAT. (updated: 2013-1-16), <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>, (参照 2013-2-12).
9. Fujita, R.; Ohara, M.; Okazaki, K.; Shimamoto, Y. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *The Journal of Heredity*. 1997, 88(2), p.124-128.
10. Halweg, Christopher; Thompson, William F.; Spiker, Steven. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell*. 2005, 17(2), p.418-429.

11. Hausinger, Robert P. Fe(II)-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, 39(1), p.21-68.
12. Kuroda, Yosuke; Kaga, Akito; Tomooka, Norihiko; Vaughan, Duncan A. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science*. 2008, 48(3), p.1071-1079.
13. Kuroda, Y.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Vaughan, D. The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology*. 2010, 19(11), p.2346–2360.
14. Luo, Lusong; Pappalardi, Melissa B.; Tummino, Peter J.; Copeland, Robert A.; Fraser, Marie E.; Grzyska, Piotr K.; Hausinger, Robert P. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry*. 2006, 353(1), p. 69–74.
15. Mizuguti, Aki; Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management*. 2009, 9(1), p.93–96.
16. Mizuguti, Aki; Ohigashi, Kentaro; Yoshimura, Yasuyuki; Kaga, Akito; Kuroda, Yosuke; Matsuo, Kazuhito. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 2010, 9(1), p.13–23.
17. Nakayama, Yuichiro; Yamaguchi, Hirofumi. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*. 2002, 2(1), p.25–30.
18. Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 1993, 21(5), p.895-906.
19. OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. 1999.
20. OECD. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr.(soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. 2000.
21. OECD. Module : Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25. 2002.

- 22.OECD. '2,4-Dichlorophenol'. OECD Existing Chemicals Database. 2006,
http://webnet.oecd.org/HPV/UI/handler.axd?id=3d43ed35-5ef5-4323-bddd-4aa527db07
65, (参照 2013-2-12)
- 23.Sleper, D.A.; Nickell, C.D.; Noel, G.R.; Cary, T.R.; Thomas, D.J.; Clark, K.M.; Rao Arelli,
5 A.P. Registration of 'Maverick' soybean. *Crop Science*. 1998, 38(2), p.549-550.
- 24.Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Fux, Charles I.; Beachy, Roger N.;
Fauquet, Claude. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV)
promoter. *Plant Molecular Biology*. 1998, 37(6), p.1055–1067.
- 25.Wohlleben, W.; Arnold, W.; Broer, I.; Hillemann, D.; Strauch, E.; Pühler, A. Nucleotide
10 sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces*
viridochromogenes Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 1988, 70(1),
p.25-37.
- 26.Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Authony; Merlo, Donald J.; Jayakumar,
Pon Samuel; Lin, Gaofeng. Novel herbicide resistance genes. 2007, WO 2007/053482
15 A2.
- 27.Wright, Terry R.; Shan, Guomin; Walsh, Terence A.; Lira, Justin M.; Cui, Cory; Song,
Ping; Zhuang, Meibao; Arnold, Nicole L.; Lin, Gaofeng; Yau, Kerm; Russell, Sean M.;
Cicchillo, Robert M.; Peterson, Mark A.; Simpson, David M.; Zhou, Ning; Ponsamuel,
Jayakumar; Zhang, Zhanyuan. Robust crop resistance to broadleaf and grass
20 herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA. 2010, 107(47), p.20240-20245.
- 28.Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito; Yasuda, Koji. Gene flow from GM
glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ.*
Biosafety Res. 2006, 5(3), p.169–173.
- 25 29.加賀秋人, 友岡憲彦, Phuntsho Ugen, 黒田洋輔, 小林伸哉, 伊勢村武久, Gilda
Miranda-Jonson, Vaughan Duncan A. 野生ダイズと栽培ダイズとの自然交雑集団の探
索と収集 秋田県及び広島県における予備的調査 . 植物遺伝資源探索導入調査報告
書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, 2005, p.59-71.
- 30 30.黒田洋輔, 加賀秋人, Apa Anna, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦, 矢野博, 松岡伸之. 野
生ダイズ, 栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索, 収集とモニタリング 秋田
県, 茨城県, 愛知県, 広島県, 佐賀県における現地調査から . 植物遺伝資源探索導
入調査報告書. 通巻第 21 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, 2005, p.73-95.

- 31.黒田洋輔, 加賀秋人, Guaf Joe, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦. 野生ダイズ, 栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索, 収集とモニタリング 秋田県, 茨城県, 高知県, 佐賀県における現地調査から . 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 22 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, 2006, p.1-12.
- 5 32.黒田洋輔, 加賀秋人, Poafa Janet, Vaughan Duncan A., 友岡憲彦, 矢野博. 野生ダイズ, 栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索, 収集とモニタリング - 秋田県, 兵庫県, 佐賀県における現地調査から - . 植物遺伝資源探索導入調査報告書. 通巻第 23 巻, 独立行政法人農業生物資源研究所, 2007, p.9-27.
- 33.財務省. “概況品別国別表”. 財務省貿易統計.
10 <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=13&P=0>, (参照 2013-2-12).
- 34.食品安全委員会. 農薬評価書 グルホシネート. 2010.
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20070717010>, (参照 2013-2-12).
- 35.鄭紹輝. “ダイズ”. 作物学概論. 大門弘幸 編著. 朝倉書店, 2008, p.132-146.
- 15 36.独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構. “長期低温低湿貯蔵におけるダイズ種子の栽培特性と収量性”. 平成 15 年度九州沖縄農業研究成果情報.
http://www.naro.affrc.go.jp/org/karc/seika/kyushu_seika/2003/2003015.html, (参照 2013-2-12).
- 37.沼田真, 奥田重俊, 桑原義晴, 浅野貞夫, 岩瀬徹. 新版日本原色雑草図鑑. 沼田真, 吉
20 沢長人 編集. 全国農村教育協会. 1978, p.107.
- 38.農林水産省. “大豆審査基準”. 農林水産植物種類別審査基準. 2012,
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf>, (参照 2012-5-1).
- 39.古谷義人. “ダイズ”. 農学大事典 -1977 訂正追補版-. 野口弥吉 監修. 養賢堂. 1977,
p.501-508.

緊急措置計画書

平成 25年 4月 25日

5

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役 栗田 道郎
住所 東京都品川区東品川二丁目2番24号

10

第一種使用規程の承認を申請している除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 *aad-12, pat, Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4) (以下「本組換えダイズ」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、科学的に明らかである場合、以下の措置を執ることとする。

15

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非開示) 平成 25年 4月現在

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 東京都品川区東品川二丁目2番24号 (電話番号)
*	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

5

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、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えダイズの適切な管理、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。

10

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を取り、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、弊社は米国ダウ・アグロサイエンス社の協力のもと、本組換えダイズが環境中に放出されないようにリスクの程度に応じて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ダイズについては、環境中で生存しないように不活化するよう措置する。

15

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おそれがあると示唆された場合、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。

20

25

以上

添 付 資 料 リ ス ト

社外秘情報につき非開示

- 5
- 1 . モニタリング結果報告書
 - 2 . 除草剤アрилオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ(改変 *aad-12, pat, Glycine max* (L.) Merr.) (DAS68416, OECD UI: DAS-68416-4) の隔離ほ場試験結果報告書
 - 10 3 . 添付資料 1 : 改変 AAD-12 蛋白質が活性を示す除草剤
 - 4 . 添付資料 2 : Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12)
 - 5 . 添付資料 3 : A Risk Assessment Overview of 2,4-D Treated Soybean Containing the DAS AAD-12 Trait
 - 6 . 添付資料 4 : pDAB4468 の塩基配列
 - 15 7 . 添付資料 5 : 導入遺伝子のコピー数並びに世代間及び同一世代における安定性
 - 8 . 添付資料 6 : pDAB4468 の作成過程
 - 9 . 添付資料 7 : Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Flanking Border Regions of AAD-12 Soybean Event DAS-68416-4
 - 10 . 添付資料 8 : 本組換えダイズの検出法

20

25