

チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.)
 (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) 申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書	1
5	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
	和名、英名及び学名	4
10	宿主の品種名	4
	国内及び国外の自然環境における自生地帯	4
	(2) 使用等の歴史及び現状	5
	国内及び国外における第一種使用等の歴史	5
	主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
15	(3) 生理学的及び生態学的特性	6
	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	7
	ニ 繁殖又は増殖の様式	7
20	種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	7
	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	7
	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	8
25	花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	12
	ホ 病原性	12
	ヘ 有害物質の産生性	12
	ト その他の情報	12
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	13
30	(1) 供与核酸に関する情報	13
	イ 構成及び構成要素の由来	13
	ロ 構成要素の機能	15
	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	15
35	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	21
	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	25

	(2) ベクターに関する情報.....	25
	イ 名称及び由来	25
	ロ 特性.....	25
	ベクターの塩基数及び塩基配列.....	25
5	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	25
	ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	25
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	25
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	25
10	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	26
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	26
	核酸が移入された細胞の選抜の方法	26
	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.....	26
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	26
	(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	29
	移入された核酸の複製物が存在する場所	29
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.....	31
	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.....	35
	(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.....	35
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	38
	(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..	38
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	38
30	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	38
	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	38
35	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	39
	(1) 使用等の内容.....	39
	(2) 使用等の方法.....	39
	(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方	

	法	40
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置.....	41
5	(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	41
	(6) 国外における使用等に関する情報	41
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	43
	1 競合における優位性	43
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
10	(2) 影響の具体的内容の評価.....	43
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	43
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44
	2 有害物質の産生性	44
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	44
15	(2) 影響の具体的内容の評価.....	53
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	53
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	54
	3 交雑性	54
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	54
20	(2) 影響の具体的内容の評価.....	54
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	55
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	56
	4 その他の性質.....	56
	第三 生物多様性影響の総合的評価	57
25	参考文献	59
	緊急措置計画書.....	70
	隔離ほ場試験計画書.....	77
	別添資料リスト	98
30	Next-Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis for the Characterization of DNA Inserted into Crop Plants.....	100

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 10 月 31 日

農林水産大臣 林 芳正 殿
5 環境大臣 石原 伸晃 殿

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

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

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>チョウ目害虫抵抗性ダイズ (<i>cry1A.105</i>, 改変 <i>cry2Ab2</i>, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>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 30 年 5 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、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。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業</p>

	<p>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。</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書に基づき、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書に基づき、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

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

和名、英名及び学名

10

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15

宿主の品種名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3555 である。

国内及び国外の自然環境における自生地域

20

ダイズはマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する。*Soja* 亜属には栽培種であるダイズの他に、野生種として *G. soja* (和名: ツルマメ) や *G. gracilis* も含まれる (OECD, 2000)。細胞学的、形態学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるダイズ (*G. max*) は野生種である *G. soja* が祖先と考えられており、一方、*G. gracilis* は *G. soja* から *G. max* への分化における中間種若しくは *G. soja* と *G. max* の雑種であるという報告があるが (OECD, 2000)、確認はされていない。これらの野生種のうち、わが国に分布しているのはツルマメのみであり、*G. gracilis* の分布は認められていない (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991)。なお、ツルマメは中国、韓国、日本、台湾及びロシアに分布しており (OECD, 2000)、わが国においては北海道、本州、四国及び九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (沼田ら, 1975; 浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 大橋, 1999)。また、北海道、東北、四国で行われたツルマメの自生地に関する調査では、主に河川流域で自生地が多く確認されている (河野ら, 2004; 菊池ら, 2005; 猿田ら, 2007; 山田ら, 2008; 猿田ら, 2009; 友岡ら, 2009)。

25

30

35

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

(2) 使用等の歴史及び現状

5

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

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、2011 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 10,360 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 2,986 万 ha、ブラジルが約 2,397 万 ha、アルゼンチンが約 1,876 万 ha、インドが約 1,018 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2011 年のわが国における栽培面積は約 13.7 万 ha であった (FAOSTAT, 2013)。

20

わが国でのダイズの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は北海道地方で 5 月下旬、東北地方南部、北陸・東山地方で 6 月上旬、関東地方で 6 月中旬、東海地方以西中国地方までは 6 月下旬、九州地方で 4 月上旬から下旬 (夏ダイズ) 及び 7 月上旬から 8 月上旬 (秋ダイズ) となる。播種密度は、品種や栽培条件によって異なるが、早生品種・寒地・遅播きの場合などでは密植が行われる。雑草の防除については、生育期間中に除草を早めに行い、初期の雑草を抑えれば、やがてダイズの茎葉が繁茂してくるので、雑草は比較的発生し難くなる。また病害虫の防除は、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、

25
30

抜き取るか地ぎわから刈り取り、これを地干し、又は掛け干しして乾燥し脱粒機で脱粒する方法と、コンバインで刈り取り・脱粒を一緒に行う方法とがある (栗原ら, 2000)。

2012 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 273 万トンであり、そのうちの約 65% が米国から輸入されている (財務省, 2013)。2012 年におけるダイズ

35

の国内生産量は約 24 万トンであり、国内消費仕向量¹ は約 304 万トンであった。国内消費仕向量の用途別内訳は、飼料用が約 10.7 万トン、種子用が約 0.7 万トン、加工用² が約 209.3 万トン、減耗量³ が約 5.5 万トン、粗食料⁴ が約 77.5 万トンとなっている（農林水産省, 2013）。

5

わが国におけるダイズの利用方法は多岐にわたり、味噌、醤油、豆腐、納豆、ゆば、きな粉、煮豆及びもやしとして食される他、分離蛋白、濃縮蛋白等は食品添加物として、搾油は食用植物油として、脱脂ダイズは家畜用飼料として利用されている（御子柴, 1995）。

10

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

15

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉作物であり、子葉は対生し、次に卵形の初生葉が子葉と直角に対生して、それ以降は 3 片の小葉からなる複葉を生じる（OECD, 2000）。茎は主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌の寄生によって根粒を着生する（後藤, 1995）。花には 1 本の雌ずいがあり、その基部の子房に 1~5 個の胚珠を内蔵しており、子房は受粉後に肥大して莢を形成する（後藤, 1995）。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響する。花芽分化には、ある時間以上の暗期が必要で、温度は 15°C 以上を要し 25°C 前後までは高いほど促進的に働く。短日高温では促進効果が大いだが、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（昆野, 1987）。

20

25

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は 30~35°C、最低発芽温度及び最低生育温度は 2~4°C であり、10°C 以下での発芽は極めて悪い（昆野, 1987）。ダイズの栽培適地は、

30

¹ 国内生産量 + 輸入量 - 輸出量 - 在庫の増加量（又は + 在庫の減少量）から算出される。2012 年は、輸出量は約 0 万トン、在庫は約 7.4 万トン減であったため、 $24 + 273 - 0 + 7 = 304$ （万トン）が国内消費仕向量となる。

² ダイズの加工用の定義は搾油用、味噌用及び醤油用への仕向量とされている。

³ 食料が生産された農場等の段階から、輸送、貯蔵を経て家庭の台所等に届く段階までに失われる全ての数量を示す。

⁴ 国内消費仕向量 - (飼料用 + 種子用 + 加工用 + 減耗量) から算出される。

生育期間中 18~28°C 程度、多照で適度の降雨が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 (昆野, 1987)。

5 本組換えダイズの宿主である A3555 は米国において、およそ北緯 38°から 40°の栽培地域に適した品種 (Maturity Group) に分類される (Wiebold, 2002; Graphic Maps, 2012)。この栽培地域において、Maturity Group III に分類される品種は 5 月上旬から 6 月中旬の間に播種される。また、7 月中旬から 8 月上旬までが開花期に当たり (Schapaugh, 1997)、開花が始まる最も早い時期
10 の日長時間は約 15 時間である (Lammi, 2008)。

なお、わが国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されていない。

15 八 捕食性又は寄生性

-

二 繁殖又は増殖の様式

20

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
25 されている米国等では、ほとんどの品種が難裂莢性であり裂莢性の程度は低い。今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3555 もまた難裂莢性であることが認められている。

ダイズの種子休眠性については知られていない。また、種子の発芽能力に関しては、常温で貯蔵した場合に通常約 3 年で失われる (昆野, 1995)。

30

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

ダイズは塊茎や地下茎等による栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件
35 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。

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

5

ダイズ ($2n=40$) と交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのは *G. soja* (和名: ツルマメ、 $2n=40$) のみである (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991; OECD, 2000)。ツルマメは北海道、本州、四国及び九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、
10 その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (沼田ら, 1975; 浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 大橋, 1999)。また、北海道、東北、四国で行われたツルマメの自生地に関する調査では、主に河川流域で自生地が確認された例が多く報告されている (河野ら, 2004; 菊池ら, 2005; 猿田ら, 2007; 山田ら, 2008; 猿田ら, 2009; 友岡ら, 2009)。

15

なお、1950年代にダイズとツルマメの形態的中間型を示す個体としてオオバツルマメがわが国で確認されており (島本ら, 1997; 阿部ら, 2001)、その形態がダイズに近かったことから、通常のツルマメと比べて、ダイズと交雑する可能性が高いことが予想された。しかし、過去 10 年以上にわたり日本各地
20 より 800 近い集団からツルマメの収集を行った中に、オオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は見つかっていないという報告があることから (阿部ら, 2001)、仮にこのような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育範囲はかなり限られていることが予想される。

25

次にダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して述べる。ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しない閉花受粉であるため (阿部ら, 2001)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のほ場条件で
30 ダイズ同士における他家受粉率は平均で 3.62% (Beard and Knowles, 1971)、ツルマメ同士における他家受粉率は平均で 2.3% (Kiang et al., 1992) と報告されている。

35

しかし、ダイズの家受粉率は条件によっては上昇することもある。例えば、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズほ場の中心に設置した場合、平均で 2.96~7.26% となり、局所的には 19.5% に達したと報告されている (Abrams et al., 1978)。またツルマメ間の他家受粉率に関しても、秋田県雄物

川流域で約 13% という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (Fujita et al., 1997)。この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠当たりの花粉数は平均で 600~700 粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の 1 胚珠当たりの平均的な花粉数 (Cruden, 1977) の間に位置していた。この
5 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、若しくは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事等による環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメの集団の周辺では花粉を媒介する昆虫であるミツバチ
10 やクマバチ等が頻繁に観察されていた。このことから、このツルマメ集団の周辺の環境には、他家受粉を引き起こす要因が通常よりも多く存在していたと考えられる (Fujita et al., 1997)。

ダイズとツルマメは、前述したようにいずれも閉花受粉を行う自殖性植物である。さらに吉村らはツルマメとダイズの開花時期は異なるため、ダイズ
15 とツルマメとの自然交雑は起こりにくいと述べている (吉村ら, 2006)。吉村は、関東地方では両者の開花には 1 ヶ月ほどの差が見えられるとしている (吉村, 2008)。なお、ツルマメの開花時期について、岩手県では 8 月上旬から 9 月中旬との報告がある (須田ら, 1995)。また、加賀らは青森及び広島で採取されたツルマメ系統を秋田県、茨城県、広島県の 3 地点で栽培したところ、
20 その開花期は 8 月中旬から 9 月中旬であったと報告している (加賀ら, 2006)。

Nakayama and Yamaguchi は、ダイズとツルマメの間の交雑率を調査する目的で、丹波黒を用いた交雑試験を行っている。その理由として、奥原早生や鶴の子大豆といった品種ではダイズとツルマメの開花期が全く重ならないか、
25 重なるとしても数日であるが、丹波黒はダイズ品種の中で開花期が遅いため、ダイズとツルマメの開花期が 2 週間程度重複したと報告している。こうした条件下で丹波黒とツルマメ (品種名: GIs/93-J-01) を 50cm 間隔でそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した。自然交雑実験終了後に結実したツルマメから採種された 686 個の種子から植物体を生育させ、調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された植物体が 5 個体認め
30 られたことから、その交雑率は 0.73% と報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

また、農業環境技術研究所において、2005 年に除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを 5cm 離して異なる 3 つの播種日で栽培し、
35 ツルマメ個体の収穫種子を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子はそれぞれの播種日で 7,814 粒中 0 粒、12,828 粒中 0 粒及び 11,860 粒中 1 粒

であり、この交雑種子はダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群から見つかったと報告されている (Mizuguti et al., 2009)。

さらに、2006年及び2007年には除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズのプロット(4条(10個体/条))の間にツルマメ3個体を網状の壁に沿わせて栽培した場合の自然交雑率が調査されている(吉村, 2008)。その結果、ダイズと自然交雑した交雑種子数は2006年の試験では44,348粒中0粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が2006年の試験より長くなった2007年の試験では25,741粒中35粒であったと報告されている(吉村, 2008)。また、農業環境技術研究所は2006年及び2007年に、前述の5cm離して栽培する試験区に加え、遺伝子組換えダイズから2、4、6、8及び10m離してツルマメを栽培した試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、自然交雑した交雑種子は、2006年の試験では68,121粒中0粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が2006年の試験より長くなった2007年の試験では66,671粒中3粒であった。なお、2007年の試験において見られた3粒の交雑個体については、2、4及び6mの区でそれぞれ1個体ずつ得られたと報告されている(吉村, 2008)。

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

実際に、1996年以降、15年間除草剤グリホサート耐性ダイズが輸入されているが、農林水産省による遺伝子組換え植物実態調査(平成21年、22年及び23年)のダイズ輸入実績港10港での調査の結果では、ダイズ陸揚地点から半径5km以内において除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は認められなかった(農林水産省, 2011a; 農林水産省, 2011b; 農林水産省, 2012)。また、わが国と同様に、ツルマメの自生地域であり、かつ除草剤グリホサート耐性ダイズを輸入している韓国において、2000年に広範囲の地域から採取された243系統のツルマメに除草剤グリホサートを散布したところ、全ての系統が枯死し、除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は確認されなかったと報告されている(Kim et al., 2003)。

従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、わが国において経時的な調査が行われている。2003年から2006年にかけてツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間体が探索されている。その結果、調査した58地点(秋

田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点) のうち秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 地点から形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ 17 個体の中間体が発見され、その後、マイクロサテライトマーカーにより、これらの中間体はすべてダイズとツルマメの自然交雑に由来することが明らかになった (Kuroda et al., 2010)。

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

さらに、ダイズからツルマメへの自然交雑の有無を DNA レベルで明らかにするために、F1 雑種及び雑種後代が発見された地点を含めて、秋田県、茨城県、佐賀県の 14 地点の種子 1,344 サンプルをマイクロサテライトマーカーで解析した結果、従来ダイズ由来の遺伝子のツルマメ集団中への浸透は確認されなかった (Kuroda et al., 2008)。同様に Stewart らも「ダイズから野生種への遺伝子浸透に関する分子学的事実はない」と述べている (Stewart et al., 2003)。

このようにダイズとツルマメの雑種の生存が制限される理由として、雑種自体の競合性の低下が考えられる。ダイズは人為的な栽培環境に適応進化し、自然環境で生育していくための形質を失っている可能性が考えられる。実際に、自然環境に適応したツルマメと栽培作物であるダイズでは形態的及び生態的特性に大きな違いがある。したがって、雑種及び雑種後代が栽培作物であるダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境に適応するのに不利になっている可能性がある。

実際に、人為的に交配して得た従来ダイズとツルマメの雑種をツルマメの親系統とともに播種した後で、それらの定着の様子を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統の定着率は親系統であるツルマメと比較して明らかに劣っていたことが示されている (Oka, 1983)。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種や両者の中間の表現形を示す個体において、休眠性、倒伏性、裂莢性はツルマメに比べ低下していることが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004)。

上述したように、Kuroda らは 2003~2006 年に行った中間体の調査の結果、17 個体の中間体を発見しているが、雑種後代は速やかに自然環境から消失していたと報告している。その理由として、1) F1 雑種の休眠性は種子親であるツルマメの形質によって決定されるため土壌中で生存するが、雑種後代種子

では硬実種子の割合が減少するため冬期に種子が腐るか、又は発芽しても寒さにより枯死する、2) 雑種後代の種子が越冬して発芽しても、その競合性はツルマメより低いために他の植物との競合に勝てず、淘汰されたこと、の 2 つを挙げている (Kuroda et al., 2010)。

5

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花には 1 花当たり 10 本の雄ずいがあり、各雄ずいは 1 つの葯を持つ (後藤, 1995)。1 葯当たりの花粉数は 374~760 粒 (Palmer et al., 1978)、約 230~540 粒 (Koti et al., 2004) の報告がある。花粉の寿命は短く、その発芽能力は湿度が一定でない条件下では約 8 時間で失われることが報告されている (Abel, 1970)。花粉の直径は 15~25 μ m である (Palmer, 2000)。また、花粉の飛散距離に関しては、農業環境技術研究所が 2001 年から 2004 年の 4 年間に行った除草剤グリホサート耐性遺伝子組換えダイズを用いた非組換えダイズとの交雑試験を行った。その結果、交雑が観測された最長距離での交雑率は花粉親からの距離が 2001 年は 7.0m で交雑率 0.040%、2002 年は 2.8m で 0.08%、2003 年は 0.7~10.5m まで調査したが交雑は認められず、2004 年は 3.5m で 0.022%であった (Yoshimura et al., 2006)。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、カメムシ目の昆虫が観察されたと報告している (Yoshimura et al., 2006)。

ホ 病原性

25

-

ヘ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、自然条件下で野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

30

ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたダイズが雑草化したという報告はない。

35

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 モンサント・カンパニーは *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の Cry1A.105 蛋白質及び Cry2Ab2 蛋白質を産生するチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (以下、「本組換えダイズ」という。) を作出した。

10 本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質はコーンイヤールーム (*Helicoverpa zea*) やフォールアーミーワーム (*Spodoptera frugiperda*) といった標的チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。このチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されることにより、本組換えダイズは、チョウ目害虫による被害が深刻な地域において効果的な害虫防除方法を農家に提供することが期待されている。

15

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

20

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 2 (p16) 及び表 1 (p17~20) に示した。

本組換えダイズには *cry1A.105* 遺伝子及び *cry2Ab2* 遺伝子が導入されている。

25

そのうち、本組換えダイズの作出に用いられた *cry1A.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のドメイン I 及び II⁵、Cry1F 蛋白質のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインにより構成されている (図 1, p15)。ドメイン I 及び II について、Cry1A.105 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は 100% である。また、ドメイン III について、Cry1A.105 蛋白質と Cry1F 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は 99% である。さらに、C 末端ドメインについて、Cry1A.105 蛋白質と Cry1Ac 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は 100% である (別添資料 1 の Figure 3; 図 1, p15)。

30

本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質の N 末端には葉緑体輸送ペプチド (chloroplast transit peptide (以下、「CTP」とする。)) が付加されている。一般的に、CTP と結合した蛋白質が葉緑体に輸送されると、蛋白質の N 末端に結合して

35

⁵ Cry1Ab 蛋白質のドメイン I・ は Cry1Ac 蛋白質のドメイン I・ は同一のアミノ酸配列である。

いた CTP は stromal processing peptidase (SPP; Richter et al., 2005) により切断される。本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質についてアミノ酸配列を解析した結果、N 末端に CTP に由来する 4 アミノ酸 (CMQA) が残っていることが確認された。

5

本組換えダイズの作出に用いられた *cry2Ab2* 遺伝子がコードする改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列は、野生型 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、クローニングの際の制限酵素切断部位を挿入するために N 末端にアスパラギン酸が付加されている。

10

しかし、本組換えダイズ中で発現する Cry2Ab2 蛋白質の N 末端は野生型 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、15 アミノ酸が欠損していることが確認されている。この欠損は、Cry2Ab2 蛋白質の N 末端に結合する CTP が stromal processing peptidase (SPP; Richter et al., 2005) により切断された際に起こったと考えられる。

15

よって、本組換えダイズに導入された *cry2Ab2* 遺伝子を「改変 *cry2Ab2* 遺伝子」とし、発現する Cry2Ab2 蛋白質を「改変 Cry2Ab2 蛋白質」とする。

20

本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は既に第一種使用の承認 (2008 年 1 月 31 日) を受けているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3) (以下、「MON89034」とする。) 中で発現している Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質とそれぞれ 99% 及び 98% 以上の相同性を持つ。さらに、本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列は MON89034 の Cry1A.105 蛋白質及び Cry2Ab2 蛋白質と 100% 一致する (別添資料 1 の Figure 1 及び 2)。これらのドメインは殺虫活性及び特異性に関わる部位であることが知られている (Widner and Whitely, 1989; Gill et al., 1992)。

25

30

本組換えダイズにおいて発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 2 に示した。

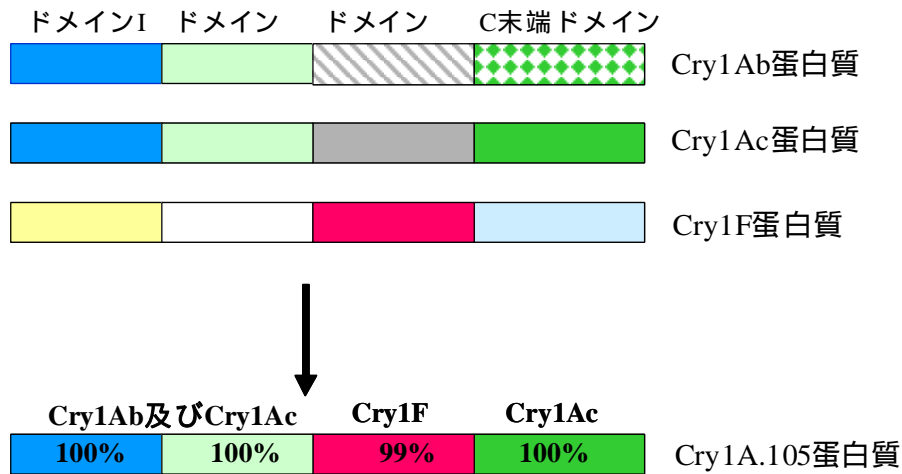


図 1 本組換えダイズにおいて発現している Cry1A.105 蛋白質の構造⁶

*Cry1A.105 蛋白質の各ドメインの色分けは、それぞれのドメインが同じ色で示した上段の Cry 蛋白質に由来することを示す。

5

□ 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

10

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 (p17~20) に示したとおりである。

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。

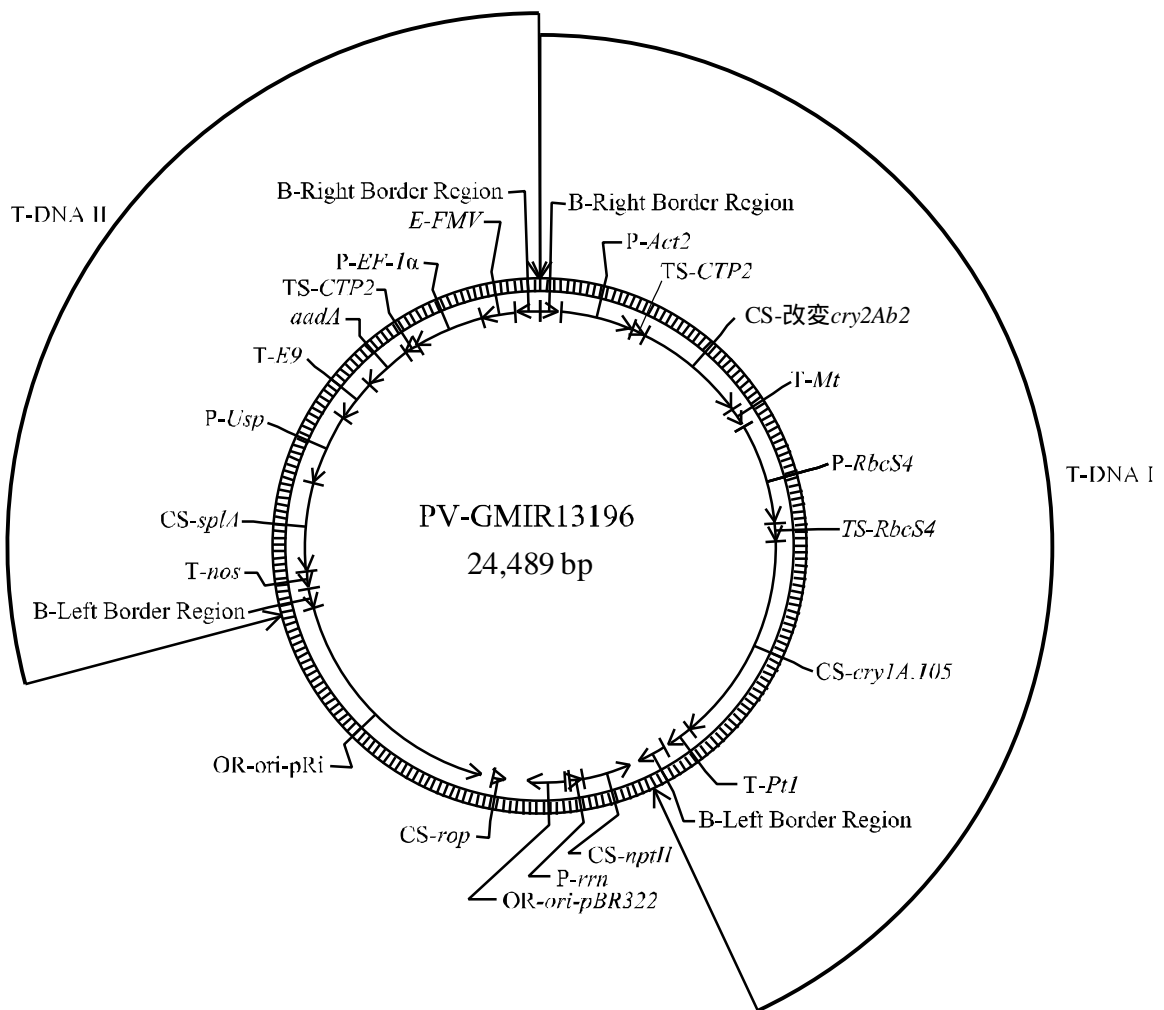


図 2 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 のプラスミドマップ⁷

本組換えダイズの育成過程で、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。

⁷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 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能⁸

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA I 領域		
B ^{注1} -Right Border Region	1-285	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	286-337	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>Act2</i>	338-1,545	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>act2</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン (An et al., 1996)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	1,546-1,555	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注3} - <i>CTP2</i>	1,556-1,783	シロイヌナズナ (<i>A. 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) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 Cry2Ab2 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	1,784-1,792	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注4} -改変 <i>cry2Ab2</i>	1,793-3,697	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする配列で、チョウ目昆虫に対する抵抗性を付与する (Donovan, 1991)。
Intervening Sequence	3,698-3,700	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注5} - <i>Mt</i>	3,701-4,000	イネ (<i>Oryza sativa</i>) のメタロチオネイン様蛋白質をコードする <i>Mt</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で、mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)
Intervening Sequence	4,001-4,045	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>RbcS4</i>	4,046-5,768	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター及びリーダー配列 (Krebbers et al., 1988; De Almeida et al., 1989)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
TS- <i>RbcS4</i>	5,769-6,032	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列 (Wong et al., 1992)。蛋白質を葉緑体へ輸送する。

⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA I 領域		
CS- <i>cryIA.105</i>	6,033-9,566	<i>Bacillus thuringiensis</i> の Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のコード配列で、殺虫活性を示すキメラ蛋白質をコードする (U.S. EPA, 2010)。
Intervening Sequence	9,567-9,569	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>PtI</i>	9,570-9,969	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) のリン酸トランスポーターをコードする <i>PTI</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Liu et al., 1998)。
Intervening Sequence	9,970-10,088	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	10,089-10,530	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない)		
Intervening Sequence	10,531-10,739	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	10,740-11,534	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)
P- <i>rrn</i>	11,535-11,759	<i>A. tumefaciens</i> のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。
Intervening Sequence	11,760-11,835	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注6} - <i>ori-pBR322</i>	11,836-12,424	pBR322 由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)
Intervening Sequence	12,425-12,851	DNA クローニングの際に利用された配列。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	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)		
CS-rop	12,852-13,043	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 (Repressor of primer (rop)) のコード配列で <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	13,044-13,231	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pRi	13,232-17,345	プラスミド pRi に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye et al., 2011)
Intervening Sequence	17,346-17,352	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-DNA II 領域 (本組換えダイズには存在しない)		
B-Left Border Region	17,353-17,671	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	17,672-17,703	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-nos	17,704-17,956	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノバリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)
Intervening Sequence	17,957-17,972	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-splA	17,973-19,430	<i>A. tumefaciens</i> C58 株に由来し、スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースフォスフォリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper et al., 1999)。
Intervening Sequence	19,431-19,442	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-Usp	19,443-20,621	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>) 由来の種子蛋白質をコードするリーダー配列の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Baumlein et al., 1991)。
Intervening Sequence	20,622-20,672	DNA クローニングの際に利用された配列。

表 1 本組換えダイズの作出に用いた PV-GMIR13196 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA II 領域 (本組換えダイズには存在しない)		
T-E9	20,673-21,315	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1, 5-ニ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 (Coruzzi et al., 1984)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	21,316-21,330	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	21,331-22,122	トランスポゾン Tn7 由来の 3" (9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター及びコード配列並びに 3' 末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
TS-CTP2	22,123-22,350	シロイヌナズナ (<i>A. 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) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	22,351-22,359	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>EF-1α</i>	22,360-23,507	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1α</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に關与する (Axelos et al., 1989)
Intervening Sequence	23,508-23,530	DNA クローニングの際に利用された配列。
E ^{注7} - <i>FMV</i>	23,531-24,067	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	24,068-24,117	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	24,118-24,474	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない)		
Intervening Sequence	24,475-24,489	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹B, Border (境界配列)

注²P, Promoter (プロモーター)

注³TS, Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁴CS, Coding Sequence (コード配列)

注⁵T, Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁶OR, Origin of Replication (複製開始領域)

注⁷E, Enhancer (エンハンサー領域)

目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

5

【*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

本組換えダイズには *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質の発現により、特定のチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

10

Bt蛋白質は、感受性昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合することにより殺虫活性を示すことが知られている (OECD, 2007; Pigott and Ellar, 2007)。

15

Bt蛋白質は、感受性昆虫に摂食されると腸管内のプロテアーゼにより、コア蛋白質に分解される。このコア蛋白質は感受性昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合し、頂端膜に小孔を形成する。形成された小孔は、浸透圧の調節を喪失させ、その結果、細胞融解を起こすことにより殺虫活性を示すことが知られている (Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; Zhuang and Gill, 2003)。

20

この特異的受容体は鳥類や哺乳類といった非標的生物には存在しないため、Bt蛋白質がこれらの生物に対して影響を及ぼすとは考えにくい (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

25

一般的に Bt 蛋白質は、特定の昆虫目に対して殺虫活性を示すことが知られており (de Maagd et al., 2001)、*Cry1* 蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を持つことが報告されている (Crickmore et al., 1998; de Maagd et al., 2001; Romeis et al., 2006)。*Cry2* 蛋白質の一種である *Cry2Aa* (旧名 *CryB1*) 蛋白質はチョウ目及びハエ目に殺虫活性を示すが (de Maagd et al., 2001)、*Cry2Ab2* 蛋白質 (旧名 *CryB2* 蛋白質) はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を示すことが知られている (Widner and Whitely, 1989)。

30

35

第一の 2-(1)-イ (p14)に記載したように、本組換えダイズ中で産生される *Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質は MON89034 中で発現している *Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質とそれぞれ 99%及び 98%以上の相同性を持つ。さらに、本組換えダイズ中で産生される *Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列は

MON89034 の Cry1A.105 蛋白質及び Cry2Ab2 蛋白質と 100%一致する。

MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトルについて、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質をダイズ栽培における主要チョウ目害虫及び非標的生物に混餌投与することにより調査が行われている (U.S. EPA, 2010)。チョウ目、コウチュウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目、12 種について殺虫活性を調査した結果 (表 2, p23 及び表 3, p24)、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を示すことが確認された。

さらに、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が相乗的に殺虫効果を示すかどうかについて、両 Bt 蛋白質に対して感受性を示す 2 種のチョウ目昆虫 (ヨーロッパコナボラ (*Ostrinia nubilalis*) 及びコーンイヤーム (*Helicoverpa zea*)) を用いて調査が行われている (Hunter, 2007; U.S. EPA, 2010)。その結果、両蛋白質は拮抗作用及び相乗作用を示すことはなく、標的昆虫及び非標的生物に対して非意図的な作用を示すことはないことが確認されている (U.S. EPA, 2010)。

なお、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か、AD_2013⁹ を用いて、FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

⁹ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database に登録されている配列からなるデータベースで、2013 年 1 月の時点で、1,630 件のアミノ酸配列が含まれる。

表 2 MON89034 における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のチョウ目昆虫に対する殺虫活性¹⁰

目	科	和名/英名(学名)	蛋白質	投与日数	投与方法	LC ₅₀ (µg/mL diet)
Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	タマナヤガ	Cry1A.105	7	混餌	33
		(<i>Agrotis ipsilon</i>)	改変 Cry2Ab2	5	表面滴下	>100 ¹
		コーンイヤールーム	Cry1A.105	7	混餌	6
		(<i>Helicoverpa zea</i>)	改変 Cry2Ab2	7	混餌	9.9
		フォールアーミーワーム	Cry1A.105	7	混餌	6.9
		(<i>Spodoptera frugiperda</i>)	改変 Cry2Ab2	7	表面滴下	< 50 ²
	Crambidae (ツトガ科)	ヨーロッパアンコーンポーター	Cry1A.105	12	混餌	0.43
	(<i>Ostrinia nubilalis</i>)	改変 Cry2Ab2	12	混餌	1.5	

U.S. EPA (2010)より抜粋。

「>」の付いた数値は検定に用いた中で最も高い濃度を示す。

¹ 最大投与量 100 µg/mL を与えた時の致死率は 42%であった。

² 最小投与量 50 µg/mL を与えた時の致死率は 61%であった。

¹⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 3 MON89034 における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の非標的昆虫に対する無影響濃度 (NOEC)¹¹

科	種	蛋白質	投与日数	投与方法	最大投与量 ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet)	NOEC ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet)
Coleoptera (コウチュウ目)						
Curculionidae (ゾウムシ科)	<i>Anthonomus grandis grandis</i>	Cry1A.105	7	表面滴下	100	>100
		改変 Cry2Ab2	7	表面滴下	100	>100
Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>	Cry1A.105	5	表面滴下	100	>100
		改変 Cry2Ab2	5	表面滴下	100	>100
Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Coleomegilla maculata</i>	Cry1A.105	20	混餌	240	>240
		改変 Cry2Ab2	20	混餌	120	>120
Hymenoptera (ハチ目)						
Ichneumonidae (ヒメバチ科)	<i>Ichneumon promissorius</i>	Cry1A.105	21	混餌	240	>240
		改変 Cry2Ab2	21	混餌	100	>100
Apidae (ミツバチ科)	<i>Apis mellifera</i> (成虫)	Cry1A.105	18	混餌	550	>550
		改変 Cry2Ab2	19	混餌	68	>68
	<i>Apis mellifera</i> (幼虫)	Cry1A.105	18	表面滴下	1100	>1100 ¹
改変 Cry2Ab2		12	表面滴下	100	>100 ²	
Hemiptera (カメムシ目)						
Aphididae (アブラムシ科)	<i>Myzus persicae</i>	Cry1A.105	5	混餌	80	>80
		改変 Cry2Ab2	5	表面滴下	80	>80
Miridae (カスミカメムシ科)	<i>Lygus hesperus</i>	Cry1A.105	5	混餌	80	>80
		改変 Cry2Ab2	5	表面滴下	80	>80
Anthocoridae (ハナカメムシ科)	<i>Orius insidiosus</i>	Cry1A.105	14	混餌	240	120 ³
		改変 Cry2Ab2	14	混餌	100	>100

U.S. EPA (2010)より抜粋。

¹NOEC (無影響濃度)は投与された飼料溶液中の蛋白質濃度で示した。なお、蛋白質濃度が 1,110 $\mu\text{g/ml}$ の飼料溶液を 10 μl 給与した場合、総投与量は 11 μg Cry1A.105/cell となる。

²*Apis mellifera* (幼虫) の NOEC は投与された飼料溶液中の蛋白質濃度で示した。なお、蛋白質濃度が 68 $\mu\text{g/ml}$ の飼料溶液を 10 μl 給与した場合、総投与量は 0.68 μg Cry2Ab2/cell となる。

³ 最大投与量である 240 μg Cry1A.105/g diet においてのみ有意な致死率が認められた。観察された致死率は 44~48%であり、コントロールにおける致死率は 8~12%であった。この試験における投与量はほ場における曝露量を大きく上回るものである。30、60 及び 120 μg Cry1A.105/g diet において、影響が認められなかったことから、NOEC を 120 μg Cry1A.105/g of diet とした。

¹¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

-

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979)などを基に構築された。詳細は表 1 (p17) に記載した。

ロ 特性

15 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-GMIR13196 の全塩基数は 24,489bp である。なお、PV-GMIR13196 の塩基配列は別添資料 3 に記載した。

20 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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-DNAI 領域外に存在している。

25 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

本ベクターには感染性の知られている配列は含まれていない。

30

(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 宿主内に移入された PV-GMIR13196 の構成要素を表 1 (p17~20) 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に関しては、図 2 (p16) 及び

図 5 (p34) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 5 PV-GMIR13196 をアグロバクテリウム法によって、非組換えダイズ品種 A3555 の幼芽の頂端分裂組織に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

10 核酸が移入された細胞の選抜の方法

従来ダイズ品種 A3555 の幼芽の頂端分裂組織と PV-GMIR13196 を含む *A. tumefaciens* AB30 株を共置培養した後、スペクチノマイシンを添加した組織培養培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

15

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

20

カルベニシリン、セフトキシム及びチカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えダイズの R3 世代において、形質転換に用いた PV-GMIR13196 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えダイズには PV-GMIR13196 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 4)。このことから、本組換えダイズには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

25

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

30

形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、R1 世代を作出した。R1 世代において、Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNAII 領域を持たず T-DNAI 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、合計 5 回の自殖を行い、R3~R7 世代において導入遺伝子が 1 カ所に 1 コピー導入されていることを確認した (別添資料 6)。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に、

35

最終的に商品化系統として本組換えダイズを選抜した。

本組換えダイズの育成図を図 3 (p28) に示した。なお、本申請の対象は、R3 世代及び R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

25

図 3 本組換えダイズの育成図

30

【社外秘につき非開示】

35

(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

移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えダイズの T-DNA I 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えダイズの F₂、F₃ 及び F₄ 世代 (図 3, p28) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した。

10

試験に供試する F₂、F₃ 及び F₄ 世代を作出するために、まず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 Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、T-DNA I 領域をホモで有する R₁ 世代を自殖することにより R₂ 世代を作出した。さらに、R₂ 世代を自殖することにより R₃ 世代を作出した。T-DNA I 領域をホモで有する本組換えダイズの R₃ 世代を *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子のいずれも持たないダイズ品種 MonSoy8329 と従来育種法を用いて交配し、T-DNA I 領域をヘテロで有する F₁ 世代を作出した。得られた F₁ 世代を自殖し、F₂ 世代を作出した。さらに得られた F₂ 世代で T-DNA I 領域をヘテロで有する個体を Real-Time TaqMan PCR 法により選抜し、再度自殖を行って F₃ 世代を作出した。この F₃ 世代においても Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA I 領域の有無を確認し、T-DNA I 領域をヘテロで有する個体を自殖することにより F₄ 世代を作出した。作出した F₄ 世代においても、Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA I 領域の有無を確認した。これら F₂、F₃ 及び F₄ 世代において行われた Real-Time TaqMan PCR 法による T-DNA I 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。

15

20

25

30

その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せず に遺伝していることが確認された (表 4, p30 及び別添資料 5 の Table 1, p6)。したがって、本組換えダイズの T-DNA I 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表 4 本組換えダイズの F2、F3 及び F4 世代における導入遺伝子の分離比¹²

世代 ¹	供試 個体数	実測値			1:2:1 の分離比の期待値				
		陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	χ^2	p 値 ²
F2	152	39	72	41	38	76	38	0.47	0.79
F3	214	49	114	51	53.5	107	53.5	0.95	0.62
F4	204	58	105	41	51	102	51	3.01	0.22

¹ 導入遺伝子の分離比は Real-Time TaqMan PCR 法により確認した。

² F2、F3 及び F4 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p \leq 0.05$)。

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

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

- 5 導入遺伝子のコピー数、非意図的なプラスミド配列の有無及び導入遺伝子の複製数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術¹³及びバイオインフォマティクスによる接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/ Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)¹⁴ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及びシーケンス解析を実施した。以下に、本解析の手法及び本組換えダイズを用いて行なった解析の結果を述べる。

15 NGS では、植物ゲノムを約 100 bp の DNA フラグメントに断片化し、この DNA フラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina) を用いて解析することで、冗長度 75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 4, p33 の)。次に、JSA において、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの塩基配列と照合¹⁵する (図 4, p33 の)。この結果において導入用プラスミドとの相同性がある配列及び相同性がない配列の両方をもつ DNA フラグメントを、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列
20 において重複する領域を並べることで、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 4, p33 の)。こうして NGS/JSA により接合領域の数を調べ、さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及び

¹³ 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

¹⁴ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えダイズのゲノムの全領域に相当する配列を 100 bp 程度のフラグメントとして増幅し、次に、これらのフラグメントを JSA によって T-DNA 領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

¹⁵ BLAST 検索において、*E*-score が 1×10^{-5} 以下且つ 30 bp 以上の領域で 96.7% 以上の相同性が認められた配列を選抜した。

シーケンス解析により調べることで、導入遺伝子のコピー数と非意図的なプラスミド配列の有無を判定することが出来る。仮に 1 コピーの導入遺伝子がゲノムの 1 カ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。

5

本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから抽出したゲノムを NGS/JSA に供試した結果、本組換えダイズで 104.4Gb、対照の非組換えダイズで 167.1Gb (それぞれ平均冗長度 75 以上) の塩基配列を解析することができた (別添資料 6 の p30)。本組換えダイズでは 2 つの接合領域が特定され (図 5, p34; 別添資料 6 の p30)、これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 6 の Figure 4, p56~57)。なお、対照の非組換えダイズでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 6 の p30)。

10

また、本組換えダイズにおいて検出された接合領域及び導入遺伝子を含む領域を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA I 領域が導入されていることが確認された (別添資料 6 の Figure 5, p58 及び Figure 6, p59~63)。

15

以上のことから、本組換えダイズの核ゲノム中 1 カ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれていることが確認された。また、NGS/JSA において検出された接合領域は、導入遺伝子に起因する接合領域のみであり (図 5, p34; 別添資料 6 の p30)、導入用プラスミド PV-GMIR13196 の T-DNA II 領域及び外側骨格領域¹⁶との相同性を持つジャンクション配列は認められなかった (別添資料 6 の追加資料の Figure 1) ことから、T-DNA I 領域以外の外側骨格領域及び T-DNA II 領域は挿入されていないことが確認された。さらに複数世代 (R3~R7 世代) の本組換えダイズを対象にした NGS/JSA において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 6, p33~34)。なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を図 5 (p34)に示した。

20

25

30

¹⁶別添資料 6 の追加資料の Figure 1 において示されている「backbone」の結果は、導入用プラスミド PV-GMIR13196 の T-DNA II 領域及び外側骨格領域の両方を含む配列と照合した結果である。

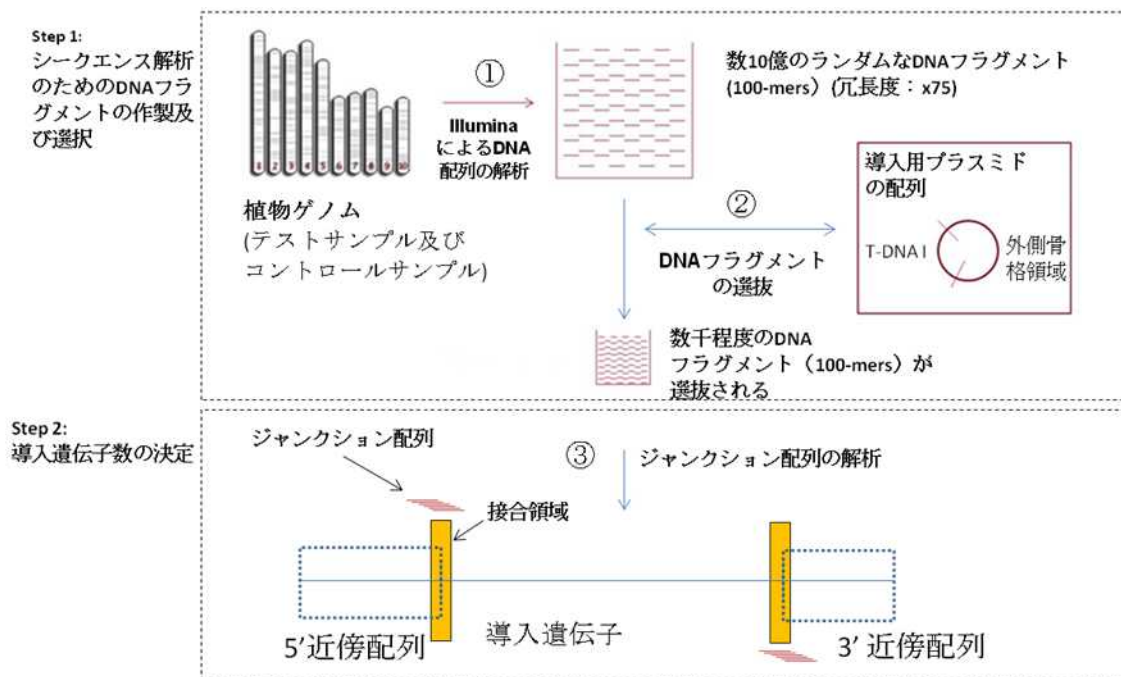


図 4 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)¹⁷

¹⁷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。

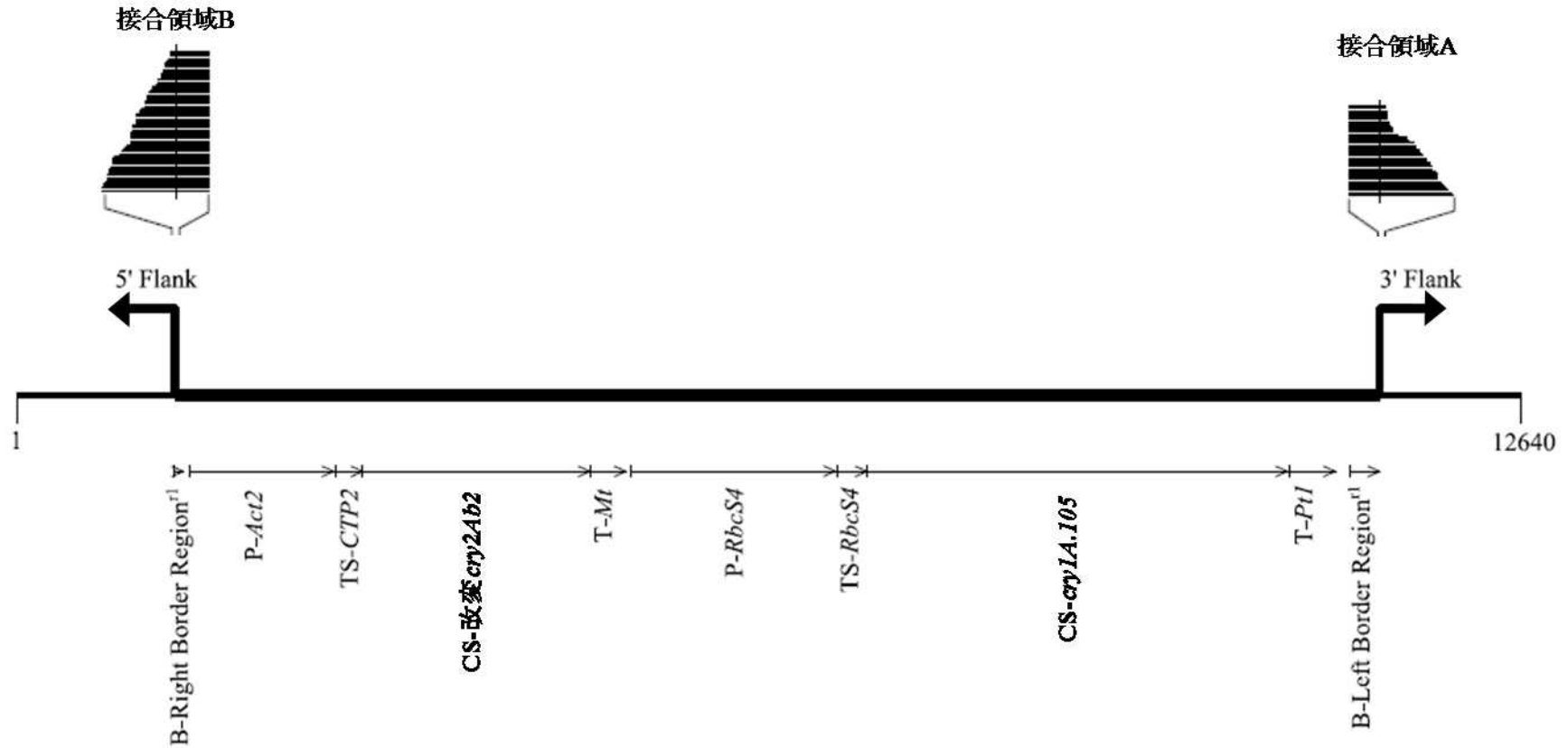


図 5 本組換えダイズの導入遺伝子図¹⁸

図は本組換えダイズ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図上段の太矢印 (➡) により導入遺伝子の 5'末端及び 3'末端に隣接するゲノム DNA 配列の開始位置を示した。また、図下段の導入遺伝子内の矢印 (→) により、本組換えダイズ中の構成要素の配列の方向を示した。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。

¹⁸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。

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

5

1 コピーなので該当しない (別添資料 6, p29~33)。

(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

ウエスタンプロット分析により、本組換えダイズの複数世代 (R3~R7世代) にわたり Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 7 の Figure 2, p17 及び Figure 3, p18)。

15

また、2012年に米国の5カ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州、カンザス州、ノースカロライナ州及びペンシルバニア州) において、4反復で栽培した本組換えダイズの葉 (Over-season leaf, OSL)、根、地上部、種子での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 5, p36 及び表 6, p37; 別添資料 8)。また、米国の1カ所のほ場 (イリノイ州) で 1反復で栽培した本組換えダイズの花粉 (葯を含む) 中での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量も測定した (表 5, p36 及び表 6, p37; 別添資料 8)。

20

25

その結果、本組換えダイズの葉、地上部、種子及び花粉において、Cry1A.105 蛋白質の発現が確認された。なお、根における Cry1A.105 蛋白質の発現量は検出限界以下であった (表 5, p36; 別添資料 8 の Table 1, p18)。また、本組換えダイズの葉、根、地上部、種子及び花粉において、改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現が確認された (表 6, p37; 別添資料 8 の Table 2, p19)。

表 5 本組換えダイズの組織中における Cry1A.105 蛋白質の発現量 (2012 年、米国)¹⁹

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD)	平均値 (SD)	LOQ/LOD ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁵
		範囲 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ³	範囲 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁴	
OSL1	V3-V4	130 (50) 61 – 220	580 (250) 260 – 1100	1.500/0.406
OSL2	V5-V7	120 (54) 13 – 220	590 (270) 68 – 1100	1.500/0.406
OSL3	R2-R3	79 (45) 8.5 – 160	400 (220) 50 – 780	1.500/0.406
OSL4	R6	230 (82) 120 – 480	790 (280) 430 – 1600	1.500/0.406
根	R6	<LOD(N/A) N/A – N/A	N/A (N/A) N/A – N/A	0.563/0.322
地上部	R6	62 (21) 31 – 110	230 (91) 110 – 440	1.500/0.524
種子	R8	2.1 (0.46) 1.5 – 2.9	2.4 (0.50) 1.7 – 3.2	0.900/0.226
花粉/葯	R2	11 (N/A) N/A – N/A	N/A (N/A) N/A – N/A	1.500 /N.D. ⁶

- 2012 年に米国の 5 カ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州、カンザス州、ノースカロライナ州及びペンシルバニア州) において、4 反復で栽培した本組換えダイズの葉 (Over-season leaf, OSL1-4)、根、地上部、種子のサンプルを採取し、発現量を ELISA 法により分析した。花粉については、米国の 1 カ所の (イリノイ州) で 1 反復で採し、発現量を ELISA 法により分析した。
- 採取した各組織の生育段階。V3-V4 : 3-4 葉期、V5-V7 : 5-7 葉期、R2 : 開花期、R3 : 莢伸長初期、R6 : 子実肥大期、R8 : 成熟期
- 蛋白質発現量は平均値及び標準偏差で表し、組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織ごとの値を基に計算されている (OSL1 は 1 サンプルで LOD 未満だったため n=19、それ以外は n=20、花粉は n=1)。N/A=該当しない。
- 蛋白質発現量は平均値及び標準偏差で表し、組織の乾燥重 1g 当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。
- LOQ=limit of quantitation (定量限界); LOD=limit of detection (検出限界)
- N.D. =Not determined. 花粉/葯は十分なサンプル量が得られなかったため、LOD を設定しなかった。

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

表 6 本組換えダイズの組織中における改変 Cry2Ab2蛋白質の発現量 (2012年、米国)²⁰

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ³	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁴	LOQ/LOD ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁵
OSL1	V3-V4	5.4 (0.74) 4.4 – 6.8	24 (5.9) 17 – 37	0.625/0.034
OSL2	V5-V7	5.2 (0.70) 4.0 – 6.6	26 (3.1) 20 – 33	0.625/0.034
OSL3	R2-R3	6.3 (0.80) 5.2 – 8.0	32 (5.2) 25 – 43	0.625/0.034
OSL4	R6	6.9 (0.79) 5.5 – 8.5	24 (2.7) 18 – 29	0.625/0.034
根	R6	4.6 (1.0) 3.1 – 7.1	15 (2.7) 11 – 22	1.250/1.241
地上部	R6	3.9 (0.60) 3.0 – 5.1	14 (2.2) 11 – 18	0.313/0.060
種子	R8	3.6 (0.71) 2.3 – 4.7	4.0 (0.77) 2.6 – 5.1	0.313/0.094
花粉/葯	R2	7.7 (N/A) N/A – N/A	N/A (N/A) N/A – N/A	0.313/N.D. ⁶

- 2012年に米国の5ヵ所のほ場（アーカンソー州、アイオワ州、カンザス州、ノースカロライナ州及びペンシルバニア州）において、4反復で栽培した本組換えダイズの葉（Over-season leaf, OSL1-4）、根、地上部、種子のサンプルを採取し、発現量をELISAにより分析した。
- 採取した各組織の生育段階。V3-V4：3-4葉期、V5-V7：5-7葉期、R2：開花期、R3：莢伸長初期、R6：子実肥大期、R8：成熟期。
- 蛋白質発現量は平均値及び標準偏差で表し、組織の新鮮重1g当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲（最小値 - 最大値）は全ての反復で採取されたそれぞれの組織ごとの値を基に計算されている（OSL1は1サンプルでLOD未満だったためn=19、それ以外はn=20。花粉はn=1）。N/A=該当しない。
- 蛋白質発現量は平均値及び標準偏差で表し、組織の乾燥重1g当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。
- LOQ= limit of quantitation (定量限界); LOD= limit of detection (検出限界)
- N.D. =Not determined. 花粉/葯は十分なサンプル量が得られなかったため、LODを設定しなかった。

²⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(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

10

本組換えダイズは、本組換えダイズに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、End-Point TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 9)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10ng であることが推奨されており、葉の一部(リーフディスク)を用いて検定できる。

15

本法の再現精度については 45 サンプルの本組換えダイズ及び 45 サンプルの非組換えダイズを用いて確認試験を行った(別添資料 9 の p3)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

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 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は *Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質を発現することにより、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

25

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

30

本組換えダイズの宿主は非組換えダイズ品種 A3555 であり、導入遺伝子は *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子である。

35

宿主であるダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国にはツルマメが自生している。しかしながら、2012 年及び 2013 年にそれぞれ数回にわたり行った日本モンサント株式会社隔離ほ場周辺 10m の範囲(民家の敷地内を除く)において、ツルマメの生育は確認されなかった。

本組換えダイズ中では、チョウ目害虫抵抗性を付与する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が産生される。

Cry 蛋白質は酵素ではないため、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。

よって、導入遺伝子である *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子による影響が、目的とした宿主の生理学的又は生態学的特性であるチョウ目害虫抵抗性以外に及ぶとは予想されない。

したがって、本組換えダイズの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると考えられた。

なお、本組換えダイズの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

形態及び生育の特性 (発芽始め (月日)、発芽率 (%)、小葉の形、開花始め (月日)、開花終わり (月日)、成熟期 (月日)、主茎長 (cm)、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高 (cm)、収穫期の 1 個体あたりの地上部重 (g)、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形)) 成体の越冬性 花粉の稔性及びサイズ 種子の生産量、裂莢性及び発芽率 交雑性 有害物質の産生性 (土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験)

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 30 年 5 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、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、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網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する場合を除き、本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書に基づき、速やかに対処する。

なお、日本モンサント株式会社隔離ほ場の地図を別添の試験計画書の図1 (p11) 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書に基づき、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

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

-

10

(6) 国外における使用等に関する情報

これまで本組換えダイズについて 2010~2013 年の間に米国、アルゼンチン及びチリにおいて延べ 395 ヲ所のほ場試験が行われているが(表 7, p42)、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。

15

なお、本組換えダイズの海外における申請状況は以下の通りである (表 8, p42)。

20

表 7 海外で本組換えダイズのほ場試験を行ったほ場数及び国²¹

年	ほ場の数	国
2010	53	米国
2010	18	アルゼンチン
2011	61	米国
2011	16	アルゼンチン
2012	128	米国
2012	24	アルゼンチン
2012	1	チリ
2013	94	米国

表 8 本組換えダイズの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況

5

10

【社外秘につき非開示】

²¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一の 2-(6)- (p38~39) に記載したとおり、本組換えダイズの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えダイズを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

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

10

ダイズがこれまで北米において栽培ほ場の外で発見されたという報告はない (OECD, 2000)。わが国においても、ダイズは弥生時代から栽培されていると考えられ、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

15

本組換えダイズには Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によりチョウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、競合性が高く、優占化する傾向にある雑草は、いくつかの特性 (例; 休眠性、長期間に渡る大量の種子生産、裂莢性など) を 2 つ以上合わせ持つことが知られている (Baker, 1974; Anderson, 1996; Radosevich et al., 1997)。よって、このチョウ目害虫に対する抵抗性が付与された要因のみで、これまで栽培作物として品種改良されてきたダイズが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

20

25

以上のこと及び本組換えダイズが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されることから、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。

30

(2) 影響の具体的内容の評価

-

35

(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

5 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、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考えられた。

2 有害物質の産生性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

15 本組換えダイズ中ではチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していないことが確認されている（第一の 2-(1)-ロ- , p22)。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、酵素活性を持たないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質はチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すが、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認されている（表 2, p23 及び表 3, p24）。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

本組換えダイズを隔離ほ場で栽培した場合、わが国に生息するチョウ目昆虫が、本組換えダイズ由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質に曝露される経路としては、1. 本組換えダイズを直接食餌する場合、2. 本組換えダイズから飛散した花粉を食餌する場合、そして 3. 本組換えダイズが交雑によりツルマメと雑種を形成し、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌する場合が考えられた。

これらの経路から Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質に曝露され、何らかの影響を受ける可能性を 環境省第4次レッドリスト昆虫類（環境省、2012）に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫、 ツルマメを食餌するチョウ目昆虫を対象とし、評価を行った。

絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫

環境省第4次レッドリスト昆虫類(環境省, 2012)に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫について、1) 本組換えダイズを直接食餌する可能性、2) 生息地が農耕地周辺で本組換えダイズの飛散した花粉を食餌する可能性、3) 本組換えダイズが交雑しチョウ目害虫抵抗性を獲得した交雑個体を食餌する可能性から絞込みを行った結果、影響を受けることが否定できない種として17種が特定された(表9, p46~47)。さらに、42種については、食餌植物又は生息域に関する情報が不足していた(表10, p48~52)。

ツルマメに寄生するチョウ目昆虫

ツルマメに寄生するチョウ目昆虫については、農業環境技術研究所、農業・食品産業技術総合研究機構及び農業生物資源研究所が、東北地方(岩手県盛岡市)、関東地方(茨城県つくば市、筑西市)、中国地方(広島県福山市、三原市、岡山県岡山市、倉敷市、島根県大田市)、九州地方(熊本県熊本市、菊池市、合志市、菊池郡大津町、上益城郡嘉島町、佐賀県佐賀市、神崎市、小城市)の国内4地域において、それぞれ数カ所のツルマメ個体群を定期調査地点として選定し、2011年5月~11月に調査を行っている(安田ら, 2012)。隔離ほ場が所在する関東地方において「頻繁に発生が確認されるもの」に分類されたチョウ目昆虫として、ダイズサヤムシガ及びヒメクロミスジノメイガの2種が報告されている(安田ら, 2012)。

以上のことから、有害物質産生性に起因して影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫として、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種から17種、ツルマメに寄生するチョウ目昆虫に関する調査報告から2種を特定した。さらに、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種のうち42種については、食餌植物又は生息域に関する情報が不足していることから、影響を受ける可能性が否定できないため、以下に続く影響の生じやすさの評価の対象とした。

表 9 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫^{*22}

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
台湾ツバメシジミ南西諸島亜種	<i>Everes lacturnus lacturnus</i>	海岸近くの樹林帯に隣接する農地周辺、草原、ガレ場。	マメ科のシバハギなど。
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
ヒメシロチョウ	<i>Leptidea amurensis</i>	採草地、農地、河川堤防、人家周辺、林縁。	マメ科のツルフジバカマなど。
台湾ツバメシジミ本土亜種	<i>Everes lacturnus kawaii</i>	海岸近くの樹林帯に隣接する農地周辺、草原、ガレ場。	マメ科のシバハギなど。
シルビアシジミ	<i>Zizina emelina</i>	河川堤防、農地、採草地。	マメ科のミヤコグサ、ヤハズソウ、シロツメクサなど。
ソトオビエダシャク	<i>Isturgia arenacearia</i>	河川敷内のマメ科草本の粗生する乾性草原。マコモ、ヨシなどが密生した場所にはいない。本州 (長野県)。	ツルフジバカマ、クサフジ、ヤハズエンドウなどマメ科植物。
オイワケクロヨトウ	<i>Lacanobia aliena</i>	北海道定山溪、青森県手賀町、長野県菅平高地の草原と関係すると思われる。	ホースシューヴェッチ(マメ科、 <i>Hippocrepis comosa</i> L.)などの草本類を食べる。
絶滅危惧 類 (VU)			
ベニモンマダラ道南亜種	<i>Zygaena niphona hakodatensis</i>	草原。	ツルフジバカマ。
スキバホウジャク	<i>Hemaris radians</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬、沖縄島、西表島。	オミナエシ、オトコエシ、スイカズラ (以上スイカズラ科)、アカネ (アカネ科)。
ギンモンアカヨトウ	<i>Plusilla rosalia</i>	北海道、本州、四国、九州。低湿地、河川敷、火山草原。低湿地でよく検出されており、水辺を好むものと思われる。	ヤナギタデ(タデ科)。

²²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 9 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫* (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
ベニモンマダラ本土亜種	<i>Zygaena niphona niphona</i>	草原。	クサフジ。
カバイロシジミ	<i>Glaucopteryx lycormas</i>	北海道、青森県北部の津軽半島と下北半島の海岸沿い。分布は狭い地域。	マメ科のクサフジ、オオバクサフジ、ヒロハノクサフジ、クララ、ムラサキツユクサ、アカツメクサ。
ヒメスズメ	<i>Deilephila askoldensis</i>	北海道、本州、四国、九州。火山性草原、河川敷。	カワラマツバ、キバナカワラマツバ (アカネ科)。
クワヤマエグリシャチホコ	<i>Ptilodon kuwayamae</i>	日本を中心とした東北アジアの冷温帯林。北海道、及び本州中部の高原。	マメ科ヤマハギの単食性。 ヤナギ科のヤナギ類でも飼育できる。
ウスジロドクガ	<i>Calliteara virginea</i>	本州。東北地方や本州中部の草原で採取されるがまれである。	ハギ類 (マメ科)。
マエアカヒトリ	<i>Aloa lactinea</i>	本州、四国、九州、屋久島、トカラ列島、沖縄島、石垣島、西表島。	ネギ (ネギ科)、ダイズ (マメ科)、トウモロコシ (イネ科)、ミソハギ (ミソハギ科)。
キシタアツバ	<i>Hypena claripennis</i>	宮城県付近を北限。四国、九州、対馬に至る。人里的な環境を好む。	ヤブマオ (イラクサ科)。
アカヘリヤガ	<i>Adisura atkinsoni</i>	関東地方以西の本州、四国、九州。	フヨウ (アオイ科)、フジマメ、ノアズキ (マメ科)。

*環境省自然環境局野生生物課 (2006)、井上ら(1982)、岸田 (2011a; 2011b)、福田ら(1982; 1983; 1984a; 1984b)、白水 (2006)、山本ら (1987)、矢野 (2011)、手代木 (1990; 1997)、安田 (2010; 2012)、青木ら (2005)、矢田 (2007)、みんなで作る日本産蛾類図鑑 (2012)、山口むしの会 (2013)、中村ら (1996)、吉松 (1994)、岐阜県 (2010)、秋田県 (2002)、長野県 (2004)、石川県 (2009)及び駒井ら (2011) を用いて、1) 生息地及び2) 幼虫の食餌植物の調査を行った。

5

表 10 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫²³

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
カバシタムクゲエダシヤク	<i>Sebastosema bubonaria</i>	疎林のある河川敷。	不明。
ノシメコヤガ	<i>Sinocharis korbae</i>	人里的な環境。	不明。
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
ミスジコスカシバ	<i>Scalarnathia montis</i>	長野県追分、高ボッチ高原でのみ採集されている。	不明。
チャホシホソバナミシヤク	<i>Brabira kasaii</i>	本州 (青森県)。	幼虫は未発見。同属のキリバネホソバナミシヤクはウド (ウコギ科) を食べる。
ヒトスジシロナミシヤク本州亜種	<i>Eporhoe hastulata echigoensis</i>	北海道、本州。	ヨーロッパでは、ヤエムグラ属。
ミツモンケンモン	<i>Cymatophoropsis trimaculata</i>	中小都市の郊外の田園地帯あるいは二次林。	クロウメモドキ科：クロウメモドキ、クロツバラ。
ヘリグロヒメヨトウ	<i>Candica illustrata</i>	長野県松本盆地周辺の丘陵地、八坂村、明科町。	キク科。
オガサワラヒゲヨトウ	<i>Dasypolia fani</i>	岩手県 (盛岡市沼宮内町、浄法寺町)、宮城県 (宮城)、栃木県藤原町、群馬県沼田市、長野県松本市など主に内陸盆地。	ヨーロッパの同属種では大型のセリ科を食す。
クロコシロヨトウ	<i>Leucapamea hikosana</i>	九州 (福岡県英彦山)。	不明。同属のコマエアカシロヨトウはスゲ属の一種 (カヤツリグサ科) を食べる。
コンゴウミドリヨトウ	<i>Staurophora celsia</i>	岡山県新見市。	ヨーロッパでは <i>Calamagrostis epigejos</i> (ノガリヤス属)、ヒロハノコメススキ、ミヤマハルガヤ。
ヒメカクモンヤガ	<i>Chersotis deplanata</i>	利尻島、本州(関東地方、中部地方の高原)。	不明。

²³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 10 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 類 (VU)			
アキヨシトガリエダシャク	<i>Hypoxystis pulcheraria</i>	本州 (山口県秋吉台) でのみで採集されている。	不明。バラ科植物を与えたが、全く食いつかなかったという。
ヒロバカレハ	<i>Gastropacha quercifolia</i>	本州 (仙台市、長野、静岡などの草原)。	ヨーロッパでは、バラ科、ヤナギ科などの多くの植物につく。
ミヤノスゲドクガ	<i>Laelia miyanoi</i>	本州 (愛知県、岐阜県)。	不明。本属の他の種はイネ科やカヤツリグサ科などを食べる。
マガリスジコヤガ	<i>Protedeltote wiscotti</i>	北海道東部。本州では極めて少ない。沼沢地で採集される。	不明。
ヌマベウスキヨトウ	<i>Chilodes pacificus</i>	北海道、本州。ヨシ草原を中心とした湿地環境に生息。東京荒川河川敷では56月に水辺のヨシ原に多産する。	不明。シルクメイトによる人工飼育に成功している。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。
キュウシュウスジヨトウ	<i>Doerriesa coenosa</i>	本州 (千葉県、三重県)、九州、対馬。海岸の湿地。	不明。
エゾスジヨトウ	<i>Doerriesa striata</i>	北海道、本州。湿地環境。	不明。採集記録などから、モウセンゴケを伴う傾斜地の貧栄養湿地が本種の生息環境と推測される。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。
アサギリヨトウ	<i>Sideridis incommoda</i>	静岡県富士宮市朝霞高原のみ。	ヨモギ (キク科)。
エゾクシヒゲモンヤガ	<i>Pseudohermonassa velata</i>	北海道 (十勝、釧路支庁管内のみ) (北部、東部の草原)。	不明。

表 10 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
ヤホシホソマダラ	<i>Balataea octomaculata</i>	本州、四国、九州。	イネ科：ササ、タケ類、ヌマガヤ。
ルリハダホソクロバ	<i>Rhagades pruni</i>	本州、九州、対馬、種子島。	ズミ、他にも <i>Prunus</i> を食べるものと推定される。
ゴマフツトガ	<i>Chilo puleratus</i>	本州、四国、九州、沖縄本島に局地的に分布する。ヨシやススキなどの自生する明るい湿地に見られる。	幼虫の食草は不明であるが、湿地を好む植物と思われる。
モリオカツトガ	<i>Chrysoteuchia moriokensis</i>	北海道、本州(東北地方、関東北部、北陸)の湿地に局地的分布。高原のヨシなどが生える冷涼な湿原と考えられる。	不明。同属のテンスジツトガはムギ(イネ科)を食べる。
ムナカタミズメイガ	<i>Paraponyx ussuriensis</i>	北海道南部、本州。	イネ。
シロマダラカバナミシヤク	<i>Eupithecia extensaria</i>	北海道、本州。草原	不明。ヨーロッパではヨモギ属の1種 <i>Artemisia maritima</i> の花と実を食べる。
カバイロシャチホコ	<i>Ramesa tosta</i>	本州、四国、九州。静岡県伊東市と裾野市が北限。草地の蛾でまれな種。生育には広い草原が必要なのであろうか。	メヒシバ(イネ科)。

表 10 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
トラサンドクガ	<i>Kidokuga torasan</i>	本州、四国、九州、対馬。草原性の蛾。	クヌギ (ブナ科) で飼育されている。
ゴマベニシタヒトリ	<i>Phyparia purpurata</i>	本州 (群馬県、長野県)。長野県諏訪湖周辺の山地や浅間山周辺の高原性草原に産する。	キンギンボク (スイカズラ科)、オオバコ (オオバコ科)、ヤブムグラ (アカネ科)、ノコギリソウ (キク科)。
チョウカイシロコブガ	<i>Nola umetsui</i>	本州、秋田県にかほ市 (鳥海山麓) でのみ発見されている。ススキ草原と低層湿地、ハンノキ林が混交する環境に生息する。	不明。本属の他の種ではシソ科、スイカズラ科 (ツマグロコブガ)、カヤツリグサ科 (クロスジシロコブガ)、マンサク科 (クロフマエモンコブガ)、ブナ科、カバノキ科、バラ科 (カバイロコブガ) などが知られている。
カギモンハナオイアツバ	<i>Cidaripura sugnata</i>	本州、四国、九州、屋久島。明るい雑木林の林縁や河川敷などの草地に発生しているが少ない。	不明。同属のキスジハナオイアツバは藻類を食べる。
クビグロケンモン	<i>Acronicta digna</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬。	カキツバタ (アヤメ科)、イタドリ (タデ科)。
ウスジロケンモン	<i>Acronicta lutea</i>	北海道、本州 (青森県、岩手県、秋田県、長野県)。	ワレモコウ (バラ科)。
ツリフネソウトラガ	<i>Sarbanissa yunnana</i>	九州 (大分県、熊本県)。	ツリフネソウ、キツリフネ、ハガクレツリフネ (ツリフネソウ科)。
アオモンギンセダカモクメ	<i>Cucullia argntea</i>	本州、四国、九州、対馬で記録されているが、分布は局所的。	カワラヨモギ (キク科)。
ホシヒメセダカモクメ	<i>Cucullia fraudatrix</i>	北海道、本州中部に分布。本州中部では高原地帯や河川敷などに生息し、やや局所的。	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)。

表 10 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
ギンモンセダカモクメ	<i>Cucullia jankowskii</i>	北海道、本州、九州に分布するが分布は局所的で河川敷や火山性草原などに生息。	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)。
ダイセンセダカモクメ	<i>Cucullia mandschuriae</i>	分布はかなり局所的で秋田県にかほ市冬師、静岡県伊東市大室山、富士山周辺、奈良県曽爾村曾爾高原、鳥取県大山、山口県秋吉台、福岡県、長野県大野原などの草原が保存された場所。	ノコンギク、ユウガギク (キク科)。
ギンスジアカヤガ	<i>Heliothis bivittata</i>	九州(長崎)。	不明
シロオビヨトウ	<i>Hadena compta</i>	北海道、東北地方、新潟県及び本州中部地方産地の高原地帯で採集。	カワラナデシコ、ホソバナデシコ(ナデシコ科)。
ハマヤガ	<i>Agrotis desertorum</i>	本州(秋田県、新潟県、石川県の海岸砂浜)。	カワラヨモギ。
アサマウスモンヤガ	<i>Xestia descripta</i>	浅間山湯ノ平、長野県川上村、国師岳、岡谷市高ボッチなどの草原に局所的に産する稀種。標高 1900m 付近の高原に生息する。	不明。

*環境省自然環境局野生生物課 (2006)、井上ら(1982)、岸田 (2011a; 2011b)、福田ら(1982; 1983; 1984a; 1984b)、白水 (2006)、山本ら (1987)、矢野 (2011)、手代木 (1990; 1997)、安田 (2010; 2012)、青木ら (2005)、矢田 (2007)、みんなで作る日本産蛾類図鑑 (2012)、山口むしの会 (2013)、中村ら (1996)、吉松 (1994)、岐阜県 (2010)、秋田県 (2002)、長野県 (2004)、石川県 (2009)及び駒井ら (2011) を用いて、1) 生息域及び2) 幼虫の食餌植物の調査を行った。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を発揮するが、LC₅₀ (半数致死濃度) から明らかなようにその活性は種によって異なることが分かっている (表 2, p23)。

10 本組換えダイズにおけるタマナヤガ (*Black Cutworm; Agrotis ipsilon*)、コーンイヤークワーム (*Corn Earworm; Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム (*Fall Amyworm; Spodoptera frugiperda*) に対する LC₅₀ (半数致死濃度) は、Cry1A.105 蛋白質については、それぞれ 33µg/mL diet、6µg/mL diet、6.9µg/mL diet である。また、改変 Cry2Ab2 蛋白質については、それぞれ >100µg/mL diet、9.9µg/mL diet、<50µg/mL diet である (表 2, p23)。

15

(3) 影響の生じやすさの評価

20 (1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズを直接食餌することにより個体群で影響を受けるのは、そのチョウ目昆虫の幼虫が、隔離ほ場内に局所的に生息している場合に限られる。しかしながら、そのような可能性は極めて低く、(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズを直接食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

25 次に (1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、本組換えダイズから飛散した花粉を食餌する可能性について評価した。本組換えダイズの花粉における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量 (それぞれ 11µg/g 新鮮重及び 7.7µg/g 新鮮重) は、他の組織、特にチョウ目害虫抵抗性を発揮するのに重要な葉 (OSL1~OSL4) における Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量 (それぞれ 79~230µg/g 新鮮重及び 5.2~6.9µg/g 新鮮重) と同等又は葉における発現量より低いことが確認されている (表 5, p36 及び表 6, p37)。さらに、ダイズの花粉の生産量は極めて少なく、かつ花粉に粘着性があるため、花粉が飛散する可能性は低いと考えられる。実際にわが国でダイズほ場中心部における畦間のダイズ花粉飛散量を測定したところ、花粉の堆積量は最大で 1 日当たり 0.368 粒/cm²、平均値は 0.18 粒/cm²であった (Yoshimura et al., 2006)。また、(1) で
35 特定されたチョウ目昆虫が、隔離ほ場周辺に局所的に生息するとの報告はないことから、本組換えダイズの花粉を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は、本組換えダイズを直接食餌する場合と同様に極めて低いと判断された。

40 最後に本組換えダイズが交雑によりツルマメと雑種を形成し、チョウ目害虫

抵抗性を獲得した雑種及びその後代を (1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が食餌する場合について評価を行った。

また、第二の 3 の交雑性の項目 (p54~56) に記載したとおり、ダイズとツルマメはいずれも閉花受粉を行う自殖性植物であること、一般的にダイズとツルマメの開花期は重なりにくいこと、実際にこれまで行われてきた交雑性試験によりダイズとツルマメは条件によっては交雑し得るが、その交雑率は極めて低いことが確認されている。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での使用であるため、交雑する可能性はさらに低くなると考えられる。仮に交雑したとしても、ダイズとツルマメの雑種及びその後代は、ダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境での適応においてツルマメより不利になり、速やかに消失するとされていることから、*cry1A.105* 遺伝子又は改変 *cry2Ab2* 遺伝子を持つ雑種がわが国の自然条件に適応してツルマメ集団内で優占化する可能性は極めて低いと考えられた。

したがって、(1) で特定されたチョウ目昆虫の幼虫が、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

(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、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考えられた。

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)-二- (p8~12) 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 (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991; 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

ダイズとその近縁野生種であるツルマメとの間では低い確率で交雑が生じ、雑種が形成される (OECD, 2000)。したがって、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 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 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

高まることが考えられた。

(3) 影響の生じやすさの評価

5 本組換えダイズがわが国で第一種使用規程に従って使用された場合、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性があることは否定できない。しかし、第一の 1-(3)-二- (p8~12) に記載したように、ダイズとツルマメはともに、自殖性植物であり、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重複した場合でもその交雑率は低いことが報告されている (阿部ら, 2001; Nakayama and Yamaguchi, 2002; 吉村ら, 2006; 吉村, 2008; Mizuguti et al., 2009)。

10 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 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 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。しかしながら、ダイズとツルマメの雑種及びその後代は、ダイズ
15 の遺伝子のある割合で有することにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されることが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004; Kuroda et al., 2010)。

20 第二の 2 の有害物質の産生性 (p45) に記載したように、隔離ほ場が所在する関東地方において「頻繁に発生が確認されるもの」に分類されたチョウ目昆虫として、ダイズサヤムシガ及びヒメクロミスジノメイガが報告されている (安田ら, 2012)。よって、仮に本組換えダイズとツルマメの雑種が形成され、*Cry1A.105* 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質によってチョウ目昆虫に対する抵抗性が付与された場合、雑種の競合性がツルマメより高まる可能性も考えられる。
25 しかしながら、ダイズサヤムシガ及びヒメクロミスジノメイガはツルマメ以外にダイズやイネ科のチゴザサを食餌することが知られており (井上ら, 1982; みんなで作る日本産蛾類図鑑, 2012)、ツルマメのみを優先して食餌することはないと考えられる。また、ツルマメの生育を制限する要因に関して、生育初期には暑さと乾燥により多数死亡し、生き残った個体も草刈で大きな損傷を受けて死亡したと報告されている (中山ら, 2000)。また、Oka は、ツルマメの生育の制限要因として、周辺に生育する雑草種の影響をあげている (Oka, 1983)。さらに、羽鹿らは、ツルマメの自生場所は河原や工事現場など常に攪乱が生じているところで、生息環境が元々不安定な上、都市近郊などでは自生地が開発で破壊されたりするケースもあり、消滅する個体群も少なくない、と報告している (羽鹿ら, 2003)。さらに、遷移の進んだ自生地ではイネ科などの雑草との競合により消えつつある個体群も見られ、攪乱が生じた後ツルマメが増殖を繰り返すことが可能な期間はかなり短い印象を受けたと報告している (羽鹿ら, 2003)。

35 したがって、チョウ目害虫抵抗性の付与のみによって、雑種の競合性がツルマメより高まり、本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメ集団中に優先的に浸透していく可能性は従来のダイズと同様に低
40

いと考えられた。

5 以上をまとめると、本組換えダイズとツルマメは、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合うような特殊な条件であっても交雑率は極めて低い。また、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での使用であるため、交雑する可能性はさらに低くなると考えられる。仮に交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、チョウ目害虫抵抗性の形質のみで雑種の競合性がツルマメより高まることも考えにくいことから、本組換えダイズ由来の *cryIA.105* 遺伝子及び改変
10 *cry2Ab2* 遺伝子が、ツルマメ集団中へ浸透していく可能性も極めて低いと判断された。したがって、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

15 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 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考えられた。

4 その他の性質

-

25

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一の 2-(6)- (p38~39) に記載したとおり、本組換えダイズの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えダイズを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

10 競合における優位性：ダイズは弥生時代からわが国で栽培されていると考えられており、イネ・ムギとともに最も長い使用経験があるが、これまでダイズがわが国の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

15 本組換えダイズには、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、このチョウ目害虫に対する抵抗性付与の要因のみによって、これまで栽培作物として品種改良されてきたダイズが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

20 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、競合における優位性に起因する生物多様性を生ずるおそれはないと判断された。

25 有害物質の産生性：ダイズにおいて、これまでに有害物質の産生性は報告されていない。

30 本組換えダイズ中ではチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと類似の配列を有しないことが確認されている。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能しているため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

35 さらに、わが国に生息する絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫及びツルマメに寄生するチョウ目昆虫が 1. 本組換えダイズを直接食餌する場合、2. 本組換えダイズから飛散した花粉を食餌する場合、そして 3. 本組換えダイズが交雑によりツルマメと雑種を形成し、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代を食餌する場合に受ける影響を考察した。その結果、特定されたチョウ目昆虫が、隔離ほ場内に局所的に生息している可能性は極めて低いこと、ダイズの花粉の産出量は極めて少なく、かつ花粉に粘着性があるため飛散する可能性は低いこと、そしてダイズとツルマメの交雑率は開花期の
40 違いや開花特性から極めて低く、仮に交雑したとしてもダイズとツルマメの雑種は自然環境において競合における優位性がツルマメよりも劣っていることなどから、その雑種がわが国の自然条件に適応してツルマメ集団内で優占化する可能性は極めて低く、本組換えダイズ中の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメ集団中へ浸透していく可能性は極めて低いと判断された。よ

って、特定された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫及びツルマメに寄生するチョウ目昆虫が個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

5 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。

10 交雑性：交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてツルマメが特定された。従来知見より、ダイズとツルマメの開花期は重なりにくく、それぞれの集団が隣接して生育し、かつ開花期が重複した場合でもその交雑率は低いことが知られている。

15 さらに、仮に本組換えダイズとツルマメが交雑し、本組換えダイズとツルマメの雑種が形成され、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質によってチョウ目昆虫に対する抵抗性が付与された場合であっても、本組換えダイズとツルマメの雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子が、ツルマメ集団中へ浸透していく可能性も極めて低いと判断された。

20 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。

25 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

- Abel, G.H. 1970. Storage of soybean pollen for artificial crossing. *Agronomy Journal* 62: 121-123.
- 5
- Abrams, R.I., C.R. Edwards and T. Harris. 1978. Yields and cross-pollination of soybeans as affected by honey bees and alfalfa leafcutting bees. *American Bee Journal* 118: 555-558.
- 10
- An, Y.Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* 10: 107-121.
- 15
- Anderson, W.P. 1996. Weed ecology. Pages 27-38 in *Weed Science: Principles and Applications*. Third Edition. West Publishing Company, St. Paul, Minnesota.
- 20
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.
- 25
- Baker, H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 1-24.
- 30
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 35
- Baumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassuner, M. Van Montagu, D. Inze and U. Wobus. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet* 225: 459-467.
- 40
- Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research* S2: 91-92.
- 45
- Beard, B.H. and P.F. Knowles. 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Science* 11: 489-492.
- 50
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon

Tn5. Gene 19: 327-336.

Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Research 11: 369-385.

5

Chen, Y. and R.L. Nelson. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. Crop Science 44: 316-325.

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

15 Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.

Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31: 32-46.

20 De Almeida, E.R.P., V. Gossele, C.G. Muller, J. Dockx, A. Reynaerts, J. Botterman, E. Krebbers and M.P. Timko. 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: Sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. Molecular and General Genetics 218: 78-86.

25 de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics 17: 193-199.

30 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.

Donovan, W.P. 1991. CryIIB crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. Patent 5,073,632, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

35 FAOSTAT. 2013. World soybean area harvested 2011. Rome, Italy.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor> [Accessed August 16, 2013].

40 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase.

Nucleic Acids Research 13: 7095-7106.

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 4803-4807.

Fujita, R., M. Ohara, K. Okazaki and Y. Shimamoto. 1997. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). Journal of Heredity 88: 124-128.

Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology 37: 615-636.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.

Graphic Maps. 2012. North America. Worldatlas, Galveston, Texas.

<http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> [Accessed May 10, 2012].

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907-919.

Hunt, A. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. Annu Rev plant physiol plant mol biol 45: 47-60.

Hunter, M.J. 2007. Review of "Evaluation of potential interactions between the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry1A.105, Cry2Ab2, and Cry3Bb1" for Monsanto's MON 89034 X MON 88017 maize MRID 469513-05 & 469513-06. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.

Kiang, Y.T., Y.C. Chiang and N. Kaizuma. 1992. Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan. Journal of Heredity 83: 325-329.

Kim, K.-U., T.-D. Kang, J.-H. Lee, I.-J. Lee, D.-H. Shin, Y.-H. Hwang, S.-U. Kim and H.-M. Kim. 2003. Physio-ecological characteristics of wild soybeans (*Glycine soja*) collected throughout Korea and their response to glyphosate. Korean Journal of Weed Science 23: 153-159.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and

manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

5 Koti, S., K.R. Reddy, V.G. Kakani, D. Zhao and V.R. Reddy. 2004. Soybean (*Glycine max*) pollen germination characteristics, flower and pollen morphology in response to enhanced ultraviolet-B radiation. *Annals of Botany* 94: 855-864.

10 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

15 Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.

20 Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D. Vaughan. 2010. The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology* 19: 2346-2360.

Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2008. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48: 1071-1079.

25 Lammi, J.J. 2008. Online-Photoperiod Calculator. <http://www.sci.fi/~benefon/sol.html> [Accessed May 10, 2012].

30 Liu, H., A.T. Trieu, L.A. Blaylock and M.J. Harrison. 1998. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 14-22.

35 Mizuguti, A., Y. Yoshimura and K. Matsuo. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.

Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 2002. 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* 2: 25-30.

40

- OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) merr. (soybean). ENV/JM/MONO(2000)9. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 5
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 10
- Oka, H.-I. 1983. Genetic control of regenerating success in semi-natural conditions observed among lines derived from a cultivated x wild soybean hybrid. *Journal of Applied Ecology* 20: 937-949.
- 15
- Palmer, R.G. 2000. Genetics of four male-sterile, female-fertile soybean mutants. *Crop Science* 40: 78-83.
- Palmer, R.G., M.C. Albertsen and H. Heer. 1978. Pollen production in soybeans with respect to genotype, environment, and stamen position. *Euphytica* 27: 427-433.
- 20
- Pigott, C.R. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 255-281.
- Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.
- 25
- Radosevich, S., J. Holt and C. Ghera. 1997. Weed demography and population dynamics. *Weed ecology: implications for management*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 30
- Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
- Richter, S., R. Zhong and G. Lamppa. 2005. Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiologia Plantarum* 123: 362-368.
- 35
- Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 40
- Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus*

thuringiensis toxins and biological control. Nature Biotechnology 24: 63-71.

5 Schapaugh, W.T. 1997. Selection of soybean varieties. Pages 4-7 in Soybean Production Handbook. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.

10

Stewart, C.N., M.D. Halfhill and S.I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nature Reviews Genetics 4: 806-817.

15 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

20 U.S. EPA. 2010. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division, Washington D.C.

25 Widner, W.R. and H.R. Whitely. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. Journal of Bacteriology 171: 965-974.

30 Wiebold, B. 2002. Soybean variety adaptation. United Soybean Board, University of Missouri College of Agriculture, Food, and Natural Resources, Columbia, Missouri. <http://www.plantsci.missouri.edu/soydoc/adapt.htm> [Accessed February 1, 2011].

35 Wong, E.Y., C.M. Hironaka and D.A. Fischhoff. 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. Plant Molecular Biology 20: 81-93.

40 Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Res 20: 773-786.

Yoshimura, Y., K. Matsuo and K. Yasuda. 2006. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5: 169-173.

- 5 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

Zhuang, M. and S.S. Gill. 2003. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Pages 213-234 in *Chemistry of Crop Protection: Progress and Prospects in Science and Regulation*. G. Voss and G. Ramos (eds.). Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

青木 典司ほか 2005 日本産幼虫図鑑 学習研究社 東京

- 15 秋田県 2002 秋田県の絶滅のおそれのある野生生物 2002 秋田県版レッドデータブック 動物編 秋田県環境と文化のむら協会 秋田

浅野 貞夫 1995 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会 東京 p. 62

- 20 阿部 純・島本 義也 2001 第6章 ダイズの進化：ツルマメの果たしてきた役割．栽培植物の自然史 - 野生植物と人類の共進化 - 山口 裕文・島本 義也(編) 北海道大学図書刊行会 北海道 pp. 77-95

石川県 2009 改訂・石川県の絶滅のおそれのある野生生物 いしかわレッドデータブック 動物編 2009
25 http://www.pref.ishikawa.lg.jp/sizen/reddata/rdb_2009/documents/ikkatu.pdf [Accessed Aug 2012]

- 井上 寛・杉 繁朗・黒子 浩・森内 茂・川辺 湛・大和田 守・1982 日本産蛾類大図鑑 講談社

大橋 広好 1999 マメ科 新装版 日本の野生植物 草本II 離弁花類 佐竹 義輔・大井 次三郎・北村 四郎・亘理 俊次・富成 忠夫(編) 平凡社 東京 p.211

- 35 加賀秋人・黒田洋輔・友岡憲彦・Duncan Vaughan・大澤良・佐治光・田部井豊 2006 (2) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の環境拡散リスクと植物多様性影響評価に関する研究 ダイズとツルマメの雑種後代の適応度に関する研究 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究 pp. 145-155.

40

河野雄飛・高田吉丈・湯本節三 2004 東北地域における野生大豆(ツルマメ)の収集 岩手県内北上川および北部河川流域 植物資源探索導入調査報告書 20: 11-17.

- 5 環境省 2006 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 5 [昆虫類] 環境省自然保護局野生生物課 (編) 自然環境研究センター 東京

環境省 2012 第4次レッドリスト昆虫類

10 http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20554&hou_id=15619 [Accessed Aug, 2012]

菊池彰夫・猿田正恭・岡部昭典 2005 吉野川流域における野生大豆(ツルマメ)の収集 植物資源探索導入調査報告書 21: 1-7.

- 15 岸田 泰則 2011a. 日本産蛾類標準図鑑 1 学習研究社 東京

岸田 泰則 2011b. 日本産蛾類標準図鑑 2 学習研究社 東京

20 岐阜県 2010 岐阜県の絶滅のおそれのある野生動物 (動物編)改訂版 6. 昆虫類 <http://www.pref.gifu.lg.jp/kankyo/shizen/red-data-dobutsu/konchu-ru/> [Accessed Aug, 2012]

栗原 浩・蓬原雄三・津野 幸人・山田 盾 2000 第6章 豆類 2.ダイズ.作物栽培の基礎 農山漁村文化協会 東京 pp. 233-246

25 駒井 古実・吉安 裕・那須 義次・斉藤 寿久 2011 日本の鱗翅類 - 系統と多様性 東海大学出版 東京

30 昆野 昭晨 1987 13. 食用作物 ダイズ .農学大事典 第2次増訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 養賢堂 東京 pp. 551-557

昆野 昭晨 1995 生育のステージと生理、生態 I 種子と発芽 .農業技術大系 作物編 6 農山漁村文化協会 東京 pp. 基 29-33

35 後藤 寛治 1995 ダイズの起源と特性 III 植物としての特性 . 農業技術大系 作物編 6 農山漁村文化協会 東京 pp. 基 19-25

財務省 2013 財務省貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed June 13]

40 猿田正恭・菊池彰夫・岡部昭典 2007 四万十川流域における野生大豆(ツルマメ)の収集 植物資源探索導入調査報告書 23: 1-7.

猿田正恭・高田吉丈・岡部昭典 2009 愛媛県における野生大豆(ツルマメ)の探索・収集 植物資源探索導入調査報告書 25: 13-19.

- 5 島本 義也・福土 泰史・阿部 純 1997 飼料用ダイズ (オオバツルマメ) の細胞質ゲノムの特徴 育種学雑誌 47(別 2): 159.

白水 隆 2006 日本産蝶類標準図鑑 学習研究社

- 10 須田 裕・白澤 澄江 1995 岩手県紫波郡矢巾町の花暦 -開花時期と開花期間-. 岩手大学教育学部研究年報 第 55 巻第 1 号 165-183.

大豆油糧日報 2011 食品産業新聞社. 東京.

- 15 高橋 将一・羽鹿 牧太・異儀田 和典 1996 九州中部で収集したツルマメの生育特性 九州農業研究 58: 51.

手代木 求 1990 日本産蝶類幼虫・成虫図鑑 1 タテハチョウ科 東海大学出版会 神奈川県

20

手代木 求 1997 日本産蝶類幼虫・成虫図鑑 2 シジミチョウ科 東海大学出版会 神奈川県

- 25 友岡憲彦・Muthaiyan Pandiyan・田口哲彦・根本英男・加賀秋人・伊勢村武久・Duncan A. Vaughan 2009 北海道におけるマメ科植物遺伝資源の探索収集、2008 年 植物資源探索導入調査報告書 25: 1-11.

中村正直・工藤広悦・内藤幸之助, 1996. 葦毛湿原(豊橋市岩崎町)で獲られた蛾類目録(葦毛第 2 湿原(指定外地)の蛾類調査 蛾類通信 189: 223-230

30

中山 祐一郎・山口 裕文 2000 トランスジェニック作物からの遺伝子の生態系への拡散防止に関する研究 2. 大豆の祖先野生種ツルマメはどこでどのように生活しているのか 雑草研究. 別号, 講演会講演要旨 (39), 182-183, 2000-04-20. 日本雑草学会

35

長野県 2004 長野県版レッドデータブック ~長野県の絶滅のおそれのある野生動物~ 動物編 長野県自然保護研究所 長野

- 40 日本雑草学会(編) 1991 第 編 雑草名 . 改訂・雑草学用語集 日本雑草学会 東京 p. 67

沼田 真・浅野 貞夫・奥田 重俊・吉沢 長人・桑原 義晴・岩瀬 徹 1975 新版・
日本原色雑草図鑑 沼田真人・吉沢長人(編) 全国農村教育協会 東京 p.107

- 5 農林水産省 2009. 我が国の油脂事情
<http://www.library.maff.go.jp/GAZO/20036901.htm>
- 農林水産省. 2011a. 「平成 21 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/21kekka.pdf
- 10 農林水産省. 2011b. 「平成 22 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/22_natane.pdf
- 農林水産省. 2012. 「平成23年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/23_kekka.pdf
- 15 農林水産省 2013 平成24年度食料需給表 (概算値)
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyu/pdf/zyukyu_130808.pdf [Accessed
August 16, 2013]
- 20 羽鹿 牧太・高橋 浩司・平賀勸 2003 房総半島におけるツルマメの探索・収集
植物資源探索導入調査報告書 19: 7-15.
- 福田 晴夫・浜 栄一・葛谷 健・高橋 昭・高橋 真弓・田中 蕃・田中 洋・若林 守
男・渡辺 康之 1982 原色日本蝶類生態図鑑 保育社.
- 25 福田 晴夫・浜 栄一・葛谷 健・高橋 昭・高橋 真弓・田中 蕃・田中 洋・若林 守
男・渡辺 康之 1983 原色日本蝶類生態図鑑 保育社.
- 福田 晴夫・浜 栄一・葛谷 健・高橋 昭・高橋 真弓・田中 蕃・田中 洋・若林 守
30 男・渡辺 康之 1984a 原色日本蝶類生態図鑑 保育社.
- 福田 晴夫・浜 栄一・葛谷 健・高橋 昭・高橋 真弓・田中 蕃・田中 洋・若林 守
男・渡辺 康之 1984b 原色日本蝶類生態図鑑 保育社.
- 35 松尾 和人・川島 茂人・杜 明遠・斎藤 修・松井 正春・大津 和久・大黒 俊哉・
松村 雄・三田村 強 2002 Bt 遺伝子組換えトウモロコシの花粉飛散が鱗翅目昆
虫に及ぼす影響評価 農業環境技術研究所報告 第 21 号. 41-73
- 40 間野 隆裕 2009 矢作川上中流域のガ類群集 矢作川研究 13:39-60

御子柴 公人 1995 日本人とダイズ I. ダイズの日本史 . 農業技術大系 作物編
6 農山漁村文化協会 東京 pp. 基 3-8

みんなで作る日本産蛾類図鑑 2012 <http://www.jpmoth.org/> [Accessed Aug. 2012]

5

安田耕司・榊原充隆・菊地淳志・水谷信夫・松村正哉・加賀秋人・菊池彰夫・高
田吉丈・大木信彦 2012 ツルマメを寄主植物とするチョウ目昆虫 蛾類通信
263: 333-335.

10 安田 守 2010 イモムシハンドブック 文一総合出版 東京

安田 守 2012 イモムシハンドブック2 文一総合出版 東京

矢田 脩 2007 新訂 原色昆虫大図鑑 第 巻(蝶・蛾 篇) 北隆館 東京

15

矢野 高広 2011 高ボッチ高原のミスジコスカシバ やどりが 230, 6-7

山内 文男 1992 1. 大豆食品の歴史 . 大豆の科学 山内 文男・大久保 一良(編)
朝倉書店 東京 pp. 1-13

20

山口むしの会

<http://www.geocities.jp/yamagutimusinokai/topics/2009/090825akiyosidai/090823a.htm>
[Accessed June. 13, 2013]

25 山田 哲也・羽鹿 牧太・松永 亮一・高橋 浩司 2008 静岡県伊豆半島における
ツルマメの探索・収集 植物資源探索導入調査報告書 24: 1-7

山本 光人・中臣 謙太郎・佐藤 力夫・中島 秀雄・大和田 守 1987 日本産蛾類
生態図鑑 杉 繁郎 (編) 講談社 東京

30

吉松慎一 1994 ヌマベウスキョトウの幼生期と人工飼育 蛾類通信 177:22-23

吉村 泰幸 2008 遺伝子組換え植物と野生種との交雑率の評価 - 圃場条件下に
おける遺伝子組換えダイズとツルマメとの自然交雑 - . 第 23 回日本雑草学会シン
35 ポジウム講演要旨 遺伝子組換え植物の生態系影響評価と管理 - LMO の適正な
利用のために - 日本雑草学会(編) 日本雑草学会 pp. 30-33

吉村 泰幸・水口 亜樹・松尾 和人 2006 ほ場で遺伝子組換えダイズとツルマメ
が交雑する可能性は低い . 独立行政法人 農業環境技術研究所 研究成果情報 第
40 23 集 pp.22-23

緊急措置計画書

平成 25 年 10 月 31 日

5

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

10

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) (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、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

15

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

20 平成25年10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 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部

*: 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。

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

10

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

15

本組換えダイズ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ダイズの放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換えダイズ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。

20

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25

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見出された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

モニタリング計画書

平成 25 年 10 月 31 日

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

1. 実施体制及び責任者

10

チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) (以下「本組換えダイズ」という。)のモニタリングについて、現時点での実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

15 平成 25 年 10 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 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部

* : 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*)

5 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 の範囲内においてモニタリングを実施する。

10 なお、2013 年 6 月の時点で隔離ほ場周辺 10m 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。

4. モニタリングの期間

15 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

20 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。

25 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ともに、秋にツルマメ 1 集団当たり最低 50 粒の種子をサンプリングする。

30 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。隔離ほ場周辺の利用状況を示す地図を別添 1 として、また隔離ほ場の位置を示す地図を別添 2 として添付した。2013 年 6 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。

35 収集されたツルマメ種子に *cry1A.105* 遺伝子又は改変 *cry2Ab2* 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

40

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

5

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、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。

10 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 *cry1A.105* 遺伝子又は改変 *cry2Ab2* 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、若しくはその疑いがある場合にあっては、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。

15

別添 1

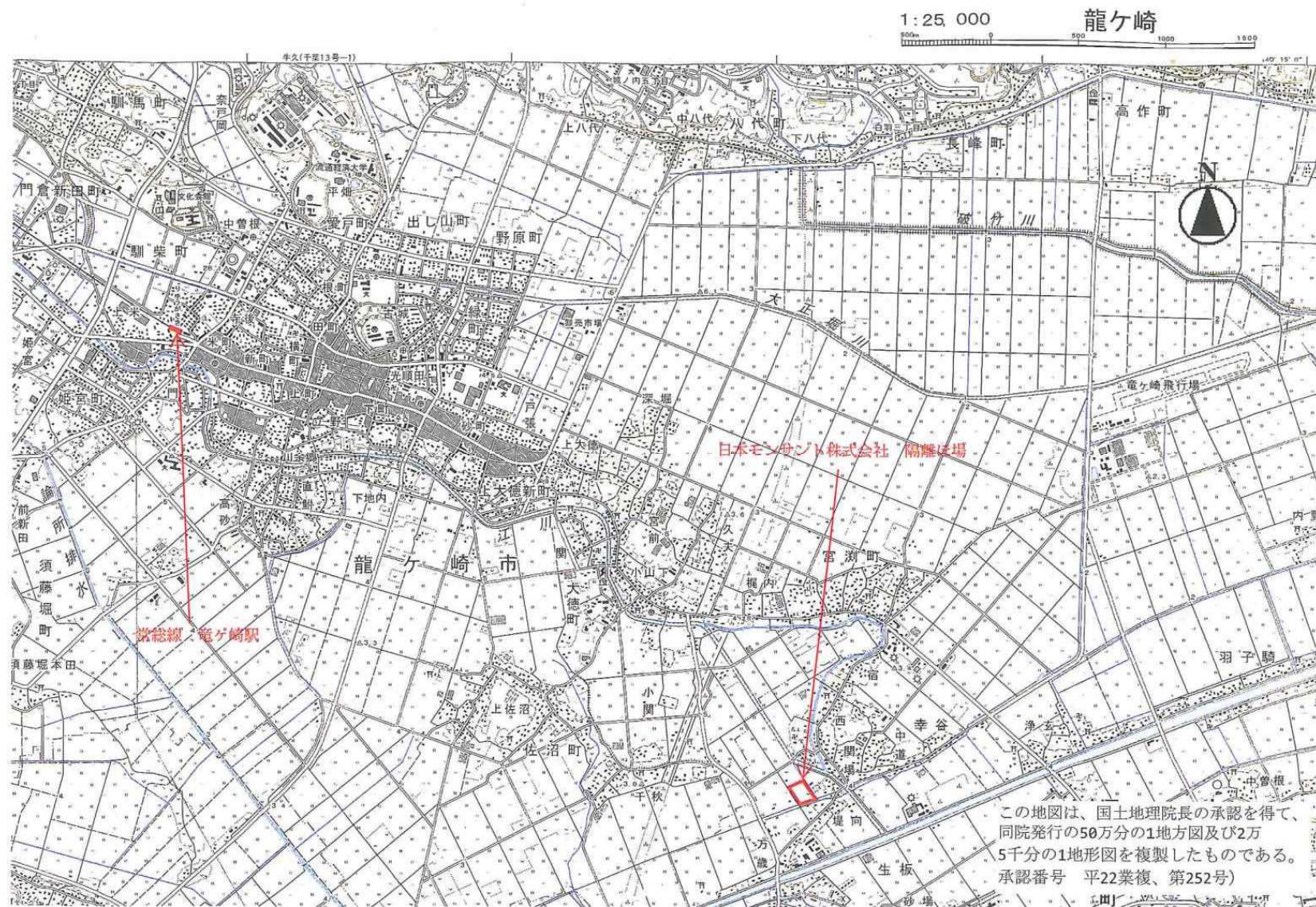
5

10

15

【個人情報を含むため非開示】

別添 2 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置 (赤線で示した箇所)



チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 の
隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

5

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

10

日本モンサント株式会社河内研究農場隔離ほ場

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板 4717 番地

15

3. 電話番号

0297-60-4011

20

4. 地図

図 6 (p91) 参照

II. 責任者等

25

1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部)

30

2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 代表取締役社長)

III. 試験期間

35

承認日から平成 30 年 5 月 31 日まで

40 IV. 施設概要

部外者の立ち入りを防止するためのフェンス（高さ 1.6 m）、立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識、洗い場、焼却炉を設置している（図 7, p92）。

5

V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

10 約 6,292 m²

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

15

3. 試験区の配置図

図 8 (p93) 参照

20 VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する（図 9, p94）。

25

2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路（隔離ほ場のフェンスから 約 2.5 m の距離）として利用されている。

30

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等）はない。なお、上記の自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約 15 km である。

35

4. 気象条件

40 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所（龍

ヶ崎市大徳町)における気象データの平年値を表 11 (p79) に示した(気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス 2012 年 10 月 26 日 :

- 5 http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view=

表 11 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所(龍ヶ崎市大徳町)における気象データの平年値

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	()	()	()	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1988～2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1月	54.2	3.1	9.2	-2.4	2.2	183.9
2月	54.9	4	9.9	-1.4	2.5	167.4
3月	110.1	7.3	13.0	1.9	2.9	166.8
4月	110.9	12.7	18.5	7.3	3.2	171.6
5月	119.9	17.4	22.5	13.0	3.2	164.0
6月	145.4	20.5	25.1	16.9	2.7	119.1
7月	117.1	24.1	28.9	20.6	2.6	147.6
8月	118.7	25.6	30.8	22.0	2.5	177.0
9月	185.3	22.1	26.9	18.5	2.6	129.4
10月	185.0	16.4	21.6	12.0	2.2	134.3
11月	88.5	10.5	16.5	5.2	1.9	147.1
12月	49.2	5.4	11.8	-0.3	2.0	175.5
年	1343.9	14.1	19.6	9.5	2.5	1887.7

5. 台風の襲来歴

平年値

- 5 気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信越地方への台風接近数^{注24}の平年値は、3.1 個である（気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2013 年 6 月 3 日：<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>）。

10 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

- 15 関東甲信地方に台風が接近し^{注1}、かつ隔離ほ場最寄の観測地点（茨城県龍ヶ崎アメダス観測所）において日ごとの最大風速が 15m/s を超えた個数^{注25}を隔離ほ場周辺への台風の接近個数とした。過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数は、合計 7 個（2004 年 5 月、2004 年 8 月、2004 年 10 月、2007 年 9 月、2009 年 10 月、2011 年 9 月、2012 年 6 月）^{注3}であった（気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2013 年 6 月 3 日）

- 20 台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
 - ・ 補強支柱などの資材は常に準備しておき、気象情報により取り付ける。
- また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にほ場が冠水したことはない。

7. 過去 10 年における強風の経験とその程度・頻度

^{注24} 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている。
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

^{注25} 台風の強風域の定義が平均風速 15m/s であることによる。

（気圧配置 台風に関する用語(気象庁): http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html）

^{注3} 過去の気象データ検索(気象庁): <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etm/index.php> から、地点として龍ヶ崎を選択し、さらに関東甲信越地方に台風が接近した年月を選択。該当年月における日ごとの最大風速が 15m/s を超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が 15m/s を超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け（策定されている場合）

- 5 隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、100年～200年に1回程度起こる大雨により洪水が生じた場合に、水深1.0～2.0mとなると想定されている。

<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/kurashi/iza/tebiki/kouzui/index.html>

10 9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

鳥獣害の被害報告はない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

15

1. 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

20

本組換えダイズにはチョウ目害虫抵抗性が付与されていることから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

25

環境省第4次レッドリスト昆虫類（環境省、2012）に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫について、1) 本組換えダイズを直接食餌する可能性、2) 生息地が農耕地周辺で本組換えダイズの飛散した花粉を食餌する可能性、3) 本組換えダイズが交雑しチョウ目害虫抵抗性を獲得した交雑個体を食餌する可能性から絞込みを行った結果、影響を受けることが否定できない種として17種が特定された（表12, p82～83）。さらに、42種については、食餌植物又は生息域に関する情報が不足していた（表13, p84～88）

30

また、ツルマメに寄生するチョウ目昆虫について、隔離ほ場が所在する関東地方において「頻繁に発生が確認されるもの」に分類されたチョウ目昆虫として、ダイズサヤムシガ及びヒメクロミスジノメイガの2種が報告されている（安田ら、2012）。

35

以上のことから、有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫として、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種から17種、ツルマメに寄生するチョウ目昆虫に関する調査報告から2種を特定した。

表 12 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫²⁶

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
台湾ツバメシジミ南西諸島亜種	<i>Everes lacturnus lacturnus</i>	海岸近くの樹林帯に隣接する農地周辺、草原、ガレ場。	マメ科のシバハギなど。
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
ヒメシロチョウ	<i>Leptidea amurensis</i>	採草地、農地、河川堤防、人家周辺、林縁。	マメ科のツルフジバカマなど。
台湾ツバメシジミ本土亜種	<i>Everes lacturnus kawaii</i>	海岸近くの樹林帯に隣接する農地周辺、草原、ガレ場。	マメ科のシバハギなど。
シルビアシジミ	<i>Zizina emelina</i>	河川堤防、農地、採草地。	マメ科のミヤコグサ、ヤハズソウ、シロツメクサなど。
ソトオビエダシャク	<i>Isturgia arenacearia</i>	河川敷内のマメ科草本の粗生する乾性草原。マコモ、ヨシなどが密生した場所にはいない。本州 (長野県)。	ツルフジバカマ、クサフジ、ヤハズエンドウなどマメ科植物。
オイワケクロヨトウ	<i>Lacanobia aliena</i>	北海道定山溪、青森県手賀町、長野県菅平高地の草原と関係すると思われる。	ホースシューヴェッチ (マメ科、 <i>Hippocrepis comosa</i> L.)などの草本類を食べる。
絶滅危惧 類 (VU)			
ベニモンマダラ道南亜種	<i>Zygaena niphona hakodatensis</i>	草原。	ツルフジバカマ。
スキバハウジャク	<i>Hemaris radians</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬、沖縄島、西表島。	オミナエシ、オトコエシ、スイカズラ (以上スイカズラ科)、アカネ (アカネ科)。
ギンモンアカヨトウ	<i>Plusilla rosalia</i>	北海道、本州、四国、九州。低湿地、河川敷、火山草原。低湿地でよく検出されており、水辺を好むものと思われる。	ヤナギタデ(タデ科)。

²⁶本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 12 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
ベニモンマダラ本土亜種	<i>Zygaena nippona nippona</i>	草原。	クサフジ。
カバイロシジミ	<i>Glaucopsyche lycormas</i>	北海道、青森県北部の津軽半島と下北半島の海岸沿い。分布は狭い地域。	マメ科のクサフジ、オオバクサフジ、ヒロハノクサフジ、クララ、ムラサキツユクサ、アカツメクサ。
ヒメスズメ	<i>Deilephila askoldensis</i>	北海道、本州、四国、九州。火山性草原、河川敷。	カワラマツバ、キバナカワラマツバ (アカネ科)。
クワヤマエグリシャチホコ	<i>Ptilodon kuwayamae</i>	日本を中心とした東北アジアの冷温帯林。北海道、及び本州中部の高原。	マメ科ヤマハギの単食性。ヤナギ科のヤナギ類でも飼育できる。
ウスジロドクガ	<i>Calliteara virginea</i>	本州。東北地方や本州中部の草原で採取されるがまれである。	ハギ類 (マメ科)。
マエアカヒトリ	<i>Aloa lactinea</i>	本州、四国、九州、屋久島、トカラ列島、沖縄島、石垣島、西表島。	ネギ (ネギ科)、ダイズ (マメ科)、トウモロコシ (イネ科)、ミソハギ (ミソハギ科)。
キシタアツバ	<i>Hypena claripennis</i>	宮城県付近を北限。四国、九州、対馬に至る。人里的な環境を好む。	ヤブマオ (イラクサ科)。
アカヘリヤガ	<i>Adisura atkinsoni</i>	関東地方以西の本州、四国、九州。	フヨウ (アオイ科)、フジマメ、ノアズキ (マメ科)。

*環境省自然環境局野生生物課 (2006)、井上ら(1982)、岸田 (2011a; 2011b)、福田ら(1982; 1983; 1984a; 1984b)、白水 (2006)、山本ら (1987)、矢野 (2011)、手代木 (1990; 1997)、安田 (2010; 2012)、青木ら (2005)、矢田 (2007)、みんなで作る日本産蛾類図鑑 (2012)、山口むしの会 (2013)、中村ら (1996)、吉松 (1994)、岐阜県 (2010)、秋田県 (2002)、長野県 (2004)、石川県 (2009)及び駒井ら (2011) を用いて、1) 生息地、及び 2) 幼虫の食餌植物の調査を行った。

表 13 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫²⁷

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
カバシタムクゲエダシャク	<i>Sebastosema bubonaria</i>	疎林のある河川敷。	不明。
ノシメコヤガ	<i>Sinocharis korbae</i>	人里的な環境。	不明。
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
ミスジコスカシバ	<i>Scalarignathia montis</i>	長野県追分、高ボッチ高原でのみ採集されている。	不明。
チャホシホソバナミシャク	<i>Brabira kasaii</i>	本州 (青森県)。	幼虫は未発見。同属のキリバネホソナミシャクはウド (ウコギ科) を食べる。
ヒトスジシロナミシャク本州亜種	<i>Eporhoe hastulata echigoensis</i>	北海道、本州。	ヨーロッパでは、ヤエムグラ属。
ミツモンケンモン	<i>Cymatophoropsis trimaculata</i>	中小都市の郊外の田園地帯あるいは二次林。	クロウメモドキ科：クロウメモドキ、クロツバラ。
ヘリグロヒメヨトウ	<i>Candica illustrata</i>	長野県松本盆地周辺の丘陵地、八坂村、明科町。	キク科。
オガサワラヒゲヨトウ	<i>Dasypolia fani</i>	岩手県(盛岡市沼宮内町、浄法寺町)、宮城県(宮城)、栃木県藤原町、群馬県沼田市、長野県松本市など主に内陸盆地。	ヨーロッパの同属種では大型のセリ科を食す。
クロコシロヨトウ	<i>Leucapamea hikosana</i>	九州 (福岡県英彦山)。	不明。同属のコマエアカシロヨトウはスゲ属の一種 (カヤツリグサ科) を食べる。
コンゴウミドリヨトウ	<i>Staurophora celsia</i>	岡山県新見市。	ヨーロッパでは <i>Calamagrostis epigejos</i> (ノガリヤス属)、ヒロハノコメススキ、ミヤマハルガヤ。
ヒメカクモンヤガ	<i>Chersotis deplanata</i>	利尻島、本州(関東地方、中部地方の高原)。	不明。

²⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 13 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
絶滅危惧 類 (VU)			
アキヨシトガリエダシャク	<i>Hypoxystis pulcheraria</i>	本州 (山口県秋吉台) でのみで採集されている。	不明。バラ科植物を与えたが、全く食いつかなかったという。
ヒロバカレハ	<i>Gastropacha quercifolia</i>	本州 (仙台市、長野、静岡などの草原)。	ヨーロッパでは、バラ科、ヤナギ科などの多くの植物につく。
ミヤノスゲドクガ	<i>Laelia miyanoi</i>	本州(愛知県、岐阜県)。	不明。本属の他の種はイネ科やカヤツリグサ科などを食べる。
マガリスジコヤガ	<i>Protodeltote wiscotti</i>	北海道東部。本州では極めて少ない。沼沢地で採集される。	不明。
ヌマベウスキヨトウ	<i>Chilodes pacificus</i>	北海道、本州。ヨシ草原を中心とした湿地環境に生息。東京荒川河川敷では 5~6 月に水辺のヨシ原に多産する。	不明。シルクメイトによる人工飼育に成功している。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。
キュウシュウスジヨトウ	<i>Doerriesa coenosa</i>	本州(千葉県、三重県)、九州、対馬。海岸の湿地。	不明。
エゾスジヨトウ	<i>Doerriesa striata</i>	北海道、本州。湿地環境。	不明。採集記録などから、モウセンゴケを伴う傾斜地の貧栄養湿地が本種の生息環境と推測される。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。
アサギリヨトウ	<i>Sideridis incommoda</i>	静岡県富士宮市朝霞高原のみ。	ヨモギ(キク科)。
エゾクシヒゲモンヤガ	<i>Pseudohermonassa velata</i>	北海道(十勝、釧路支庁管内のみ) (北部、東部の草原)。	不明。

表 13 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
ヤホシホソマダラ	<i>Balataea octomaculata</i>	本州、四国、九州。	イネ科：ササ、タケ類、ヌマガヤ。
ルリハダホソクロバ	<i>Rhagades pruni</i>	本州、九州、対馬、種子島。	ズミ、他にも <i>Prunus</i> を食べるものと推定される。
ゴマフツトガ	<i>Chilo puleratus</i>	本州、四国、九州、沖縄本島に局地的に分布する。ヨシやススキなどの自生する明るい湿地に見られる。	幼虫の食草は不明であるが、湿地を好む植物と思われる。
モリオカツトガ	<i>Chrysoteuchia moriokensis</i>	北海道、本州(東北地方、関東北部、北陸)の湿地に局地的分布。高原のヨシなどが生える冷涼な湿原と考えられる。	不明。同属のテンスジツトガはムギ(イネ科)を食べる。
ムナカタミズメイガ	<i>Paraponyx ussuriensis</i>	北海道南部、本州。	イネ。
シロマダラカバナミシャク	<i>Eupithecia extensaria</i>	北海道、本州。草原	不明。ヨーロッパではヨモギ属の1種 <i>Artemisia maritima</i> の花と実を食べる。
カバイロシャチホコ	<i>Ramesa tosta</i>	本州、四国、九州。静岡県伊東市と裾野市が北限。草地の蛾でまれな種。生育には広い草原が必要なのであろうか。	メヒシバ(イネ科)。

表 13 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
トラサンドクガ	<i>Kidokuga torasan</i>	本州、四国、九州、対馬。草原性の蛾。	クヌギ (ブナ科) で飼育されている。
ゴマベニシタヒトリ	<i>Phyparia purpurata</i>	本州 (群馬県、長野県)。長野県諏訪湖周辺の山地や浅間山周辺の高原性草原に産する。	キンギンボク (スイカズラ科)、オオバコ (オオバコ科)、ヤブムグラ (アカネ科)、ノコギリソウ (キク科)。
チョウカイシロコブガ	<i>Nola umetsui</i>	本州、秋田県にかほ市 (烏海山麓) でのみ発見されている。ススキ草原と低層湿地、ハンノキ林が混交する環境に生息する。	不明。本属の他の種ではシソ科、スイカズラ科 (ツマグロコブガ)、カヤツリグサ科 (クロスジシロコブガ)、マンサク科 (クロフマエモンコブガ)、ブナ科、カバノキ科、バラ科 (カバイロコブガ) などが知られている。
カギモンハナオイアツバ	<i>Cidariplura sugnata</i>	本州、四国、九州、屋久島。明るい雑木林の林縁や河川敷などの草地に発生してるが少ない。	不明。同属のキスジハナオイアツバは藻類を食べる。
クビグロケンモン	<i>Acronicta digna</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬。	カキツバタ (アヤメ科)、イタドリ (タデ科)。
ウスジロケンモン	<i>Acronicta lutea</i>	北海道、本州 (青森県、岩手県、秋田県、長野県)。	ワレモコウ (バラ科)。
ツリフネソウトラガ	<i>Sarbanissa yunnana</i>	九州 (大分県、熊本県)。	ツリフネソウ、キツリフネ、ハガクレツリフネ (ツリフネソウ科)。
アオモンギンセダカモクメ	<i>Cucullia argntea</i>	本州、四国、九州、対馬で記録されているが、分布は局所的。	カワラヨモギ (キク科)。
ホシヒメセダカモクメ	<i>Cucullia fraudatrix</i>	北海道、本州中部に分布。本州中部では高原地帯や河川敷などに生息し、やや局所的。	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)。

表 13 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫 (つづき)

和名	学名	生息地	幼虫の食餌植物
準絶滅危惧 (NT)			
ギンモンセダカモクメ	<i>Cucullia jankowskii</i>	北海道、本州、九州に分布するが分布は局所的で河川敷や火山性草原などに生息。	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)。
ダイセンセダカモクメ	<i>Cucullia mandshuriae</i>	分布はかなり局所的で秋田県にかほ市冬師、静岡県伊東市大室山、富士山周辺、奈良県曽爾村曾爾高原、鳥取県大山、山口県秋吉台、福岡県、長野県大野原などの草原が保存された場所。	ノコンギク、ユウガギク (キク科)。
ギンスジアカヤガ	<i>Heliothis bivittata</i>	九州(長崎)。	不明
シロオビヨトウ	<i>Hadena compta</i>	北海道、東北地方、新潟県及び本州中部地方産地の高原地帯で採集。	カワラナデシコ、ホソバナデシコ(ナデシコ科)。
ハマヤガ	<i>Agrotis desertorum</i>	本州(秋田県、新潟県、石川県の海岸砂浜)。	カワラヨモギ。
アサマウスモンヤガ	<i>Xestia descripta</i>	浅間山湯ノ平、長野県川上村、国師岳、岡谷市高ボッチなどの草原に局所的に産する稀種。標高 1900m 付近の高原に生息する。	不明。

*環境省自然環境局野生生物課 (2006)、井上ら(1982)、岸田 (2011a; 2011b)、福田ら(1982; 1983; 1984a; 1984b)、白水 (2006)、山本ら (1987)、矢野 (2011)、手代木 (1990; 1997)、安田 (2010; 2012)、青木ら (2005)、矢田 (2007)、みんなで作る日本産蛾類図鑑 (2012)、山口むしの会 (2013)、中村ら (1996)、吉松 (1994)、岐阜県 (2010)、秋田県 (2002)、長野県 (2004)、石川県 (2009)及び駒井ら (2011) を用いて、1) 生息域及び2) 幼虫の食餌植物の調査を行った。

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

Glycine soja (ツルマメ)

5

なお、平成 25 年 6 月の時点で隔離ほ場の敷地内及び隔離ほ場周辺 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。

10

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

15

隔離ほ場における栽培履歴は図 10 (p95 ~ 96) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

20

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、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には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

3. 栽培終了後の利用計画 (ボランティア植物の監視を含む)

25

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、本組換えダイズの栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

30

隔離ほ場は下記(1)~(4)の設備を備えている。

(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。

35

(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、靴などに付着した土、本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、本組換え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、花粉の飛散を減少するための防風網を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

5 5. 作業要領

- (1) 試験実施中の本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。
- 10 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本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。
- 15 (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書に基づき、モニタリングを実施する。
- 20 (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書に基づき、速やかに対処する。

以上

25

図 6 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置

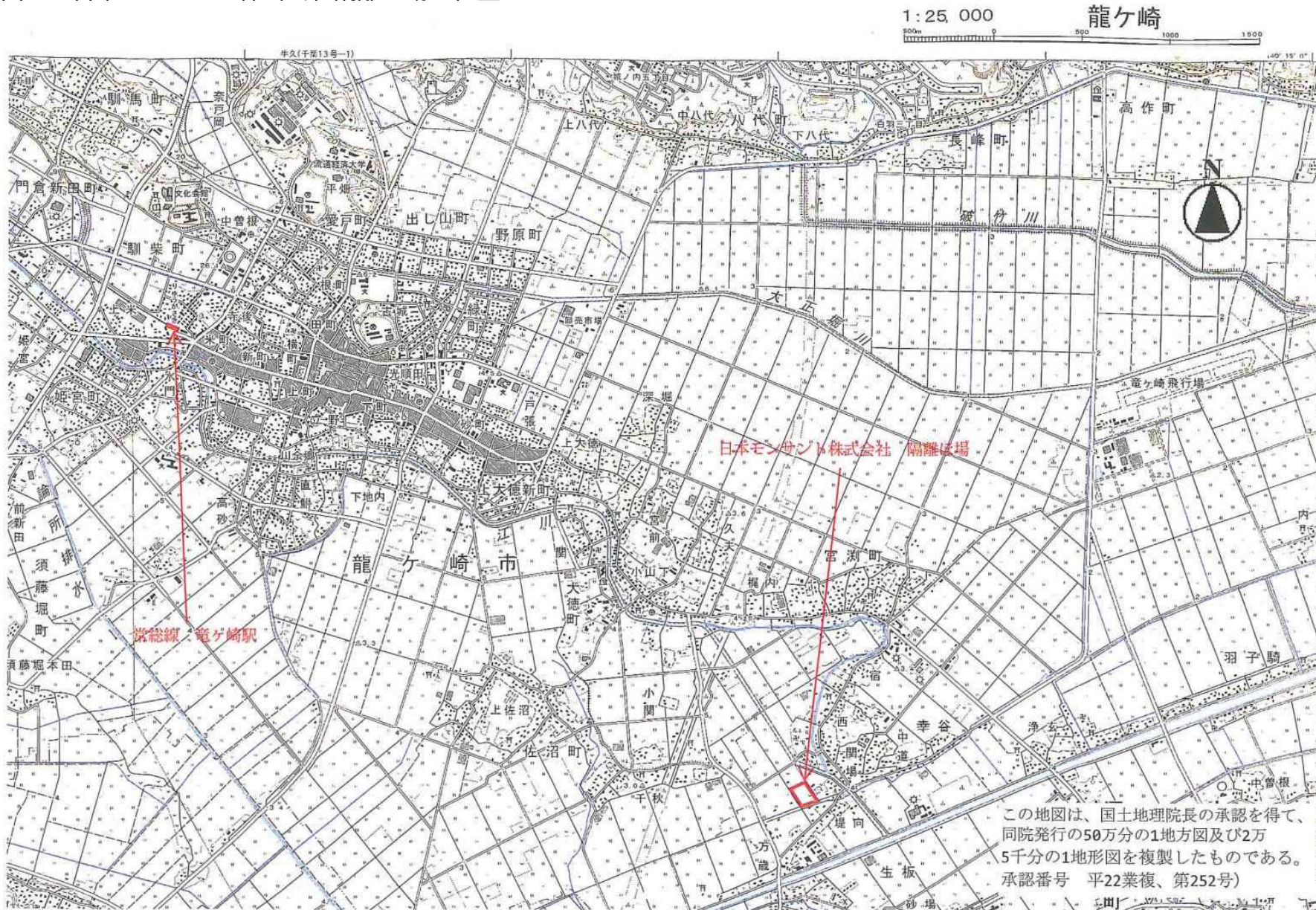


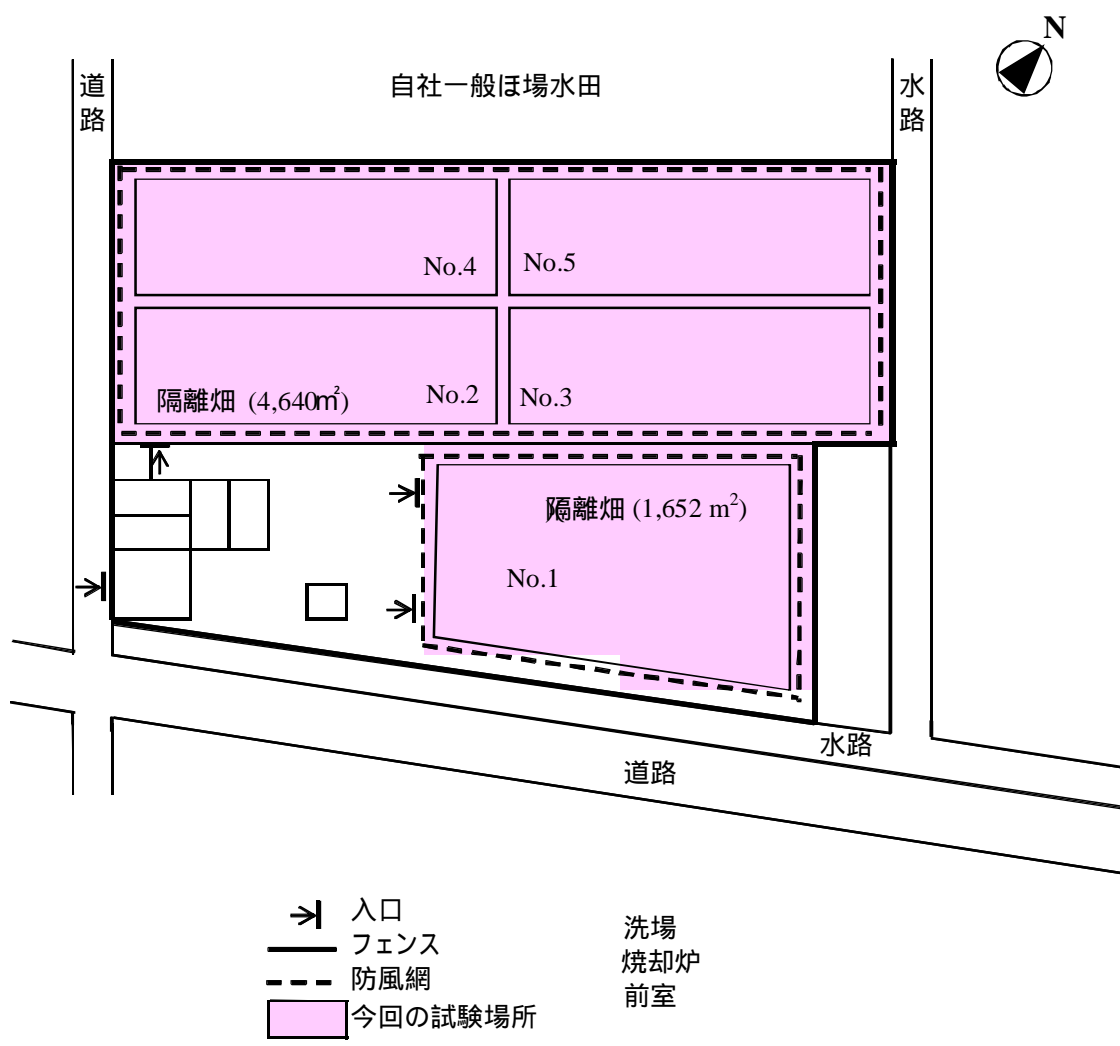
図 7 隔離ほ場の設備²⁸



立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識
焼却炉
洗い場

²⁸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。

図 8 試験区の配置図²⁹



上記試験場所のうち約 1,000 m²の面積において栽培予定。

²⁹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。

図 9 日本モンサント株式会社隔離ほ場地図 (広域)

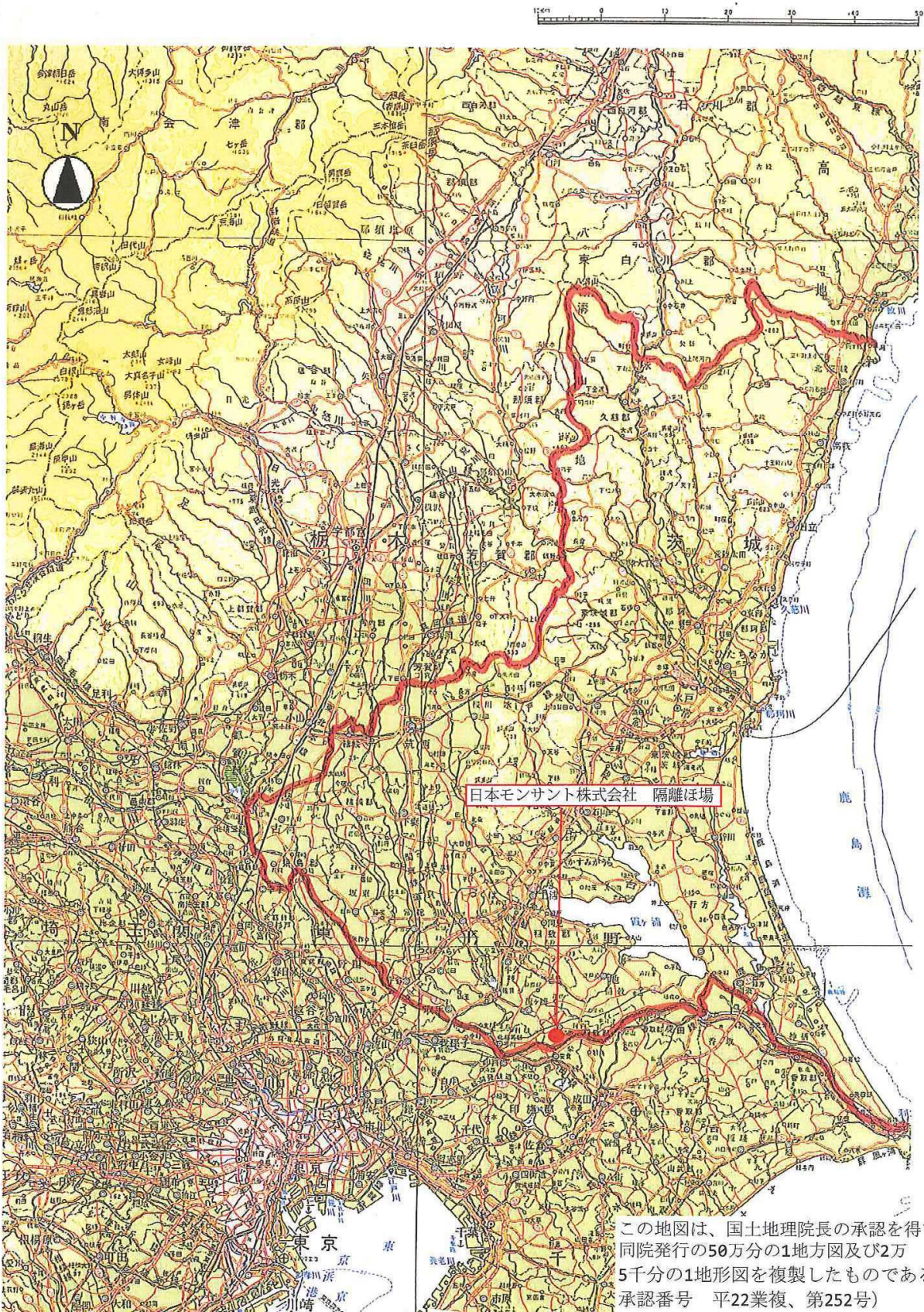


図 10 隔離ほ場における栽培履歴³⁰

ほ場 No.	作物	栽培期間(2011年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ソルガム					←							
	遺伝子組換え トウモロコシ					←				→			
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←				→			
	遺伝子組換え ダイズ					←				→			
	非遺伝子組換え ダイズ					←				→			
No.2	遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ソルガム					←							
No.3	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ソルガム					←							
	遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
No.4	遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
	非遺伝子組換え ライムギ	→											
No.5	遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
	非遺伝子組換え ライムギ	→											

ほ場 No.	作物	栽培期間(2012年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	遺伝子組換え トウモロコシ					←				→			
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←				→			
	遺伝子組換え ダイズ					←				→			
	非遺伝子組換え ダイズ					←				→			
No.2	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.3	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	遺伝子組換え ワタ					←				→			
	非遺伝子組換え ワタ					←				→			
No.4	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.5	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	遺伝子組換え ワタ					←				→			
	非遺伝子組換え ワタ					←				→			

³⁰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。

図 10 隔離ほ場における栽培履歴 (続き)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2013年) (予定も含む)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←				
No.3	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	遺伝子組換え ワタ				→								
	非遺伝子組換え ワタ				→								
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			
No.4	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←				
No.5	非遺伝子組換え ライムギ	→											←
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←				

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】

別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変
5 Cry2Ab2 蛋白質と MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質
及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列の比較 (社外秘)
- 別添資料 2 本組換えダイズの作出に用いられた *cry1A.105* 遺伝子及び改変
cry2Ab2 遺伝子から推定した Cry1A.105 蛋白質及び改変
Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 3 Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR13196 (社外秘)
- 10 別添資料 4 Summary of PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium*
tumefaciens used to produce MON87751 (MSL0024716) (社外秘)
- 別添資料 5 Segregation Analysis of the Coding Sequences Present in Insect
Protected Soybean MON87751 Across Multiple Generations
(MSL0024794) (社外秘)
- 15 別添資料 6 Next-Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis for the
characterization of DNA inserted into crop plants

Molecular Characterization of Insect Protected Soybean(MON87751)
(MSL0024773) (社外秘)

Figure 1. Normalized selected Sequence data. (社外秘)
- 20 別添資料 7 Demonstration of the Presence of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Proteins in
Soybean Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87751
(MSL0024813) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0024805: Assessment of Cry1A.105 and
25 Cry2Ab2 Protein Levels in Soybean Tissues Collected from
MON87751 Produced in U.S. Field Trials during 2012
(MSL0025199) (社外秘)
- 別添資料 9 Method Characterization Summary for Monsanto SOP
30 BQ-QC-10926, Confirming the Presence of the Crop MON 87751
Transformation Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue
(RAR-2013-0214) (社外秘)

別添資料 6

Next-Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis for the characterization of DNA inserted into crop plants

Next-Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis for the Characterization of DNA

Inserted into Crop Plants

Background

Safety assessments of biotechnology-derived crops include a detailed molecular characterization of the inserted DNA sequence and its location within the genome (Codex Alimentarius, 2009). Typically, molecular characterization has relied on Southern blot analysis to establish locus and copy number along with targeted sequencing of polymerase chain reaction products spanning any inserted DNA to complete the characterization process. With the advent of next-generation sequencing (Shendure and Ji, 2008; Zhang et al., 2011) improvements in sequencing technologies have enabled alternative methods for molecular characterizations which do not require Southern blot analysis. Next-Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis bioinformatics (NGS/JSA) utilizes sequencing (both next-generation technologies and traditional methods) and bioinformatics to produce characterizations equivalent to those achieved by current Southern blot based methods.

There are multiple advantages to using next-generation sequencing and bioinformatics, most notably the robustness, simplicity and consistency of the method compared with Southern blot studies, which require customized experimental design for every transformation event. The new sequencing-based method overcomes many technical challenges inherent in Southern blot analyses (*e.g.*, false positive hybridization bands resulting from incomplete digestion or star activity and the need for radioactive ³²P-labeled probes. This new method provides higher reproducibility, because it is less dependent on complex lab based procedures. The method described here is essentially identical for all transformation events and it robustly establishes molecular characteristics of genetically engineered crops (Kovalic et al., 2012). Additionally, similar techniques are being used to characterize transgene integration sites and insert molecular anatomy in mammalian systems (DuBose et al., 2013; Zhang et al., 2012).

Method Synopsis

Molecular characterization of the inserted DNA and associated native flanking sequences consists of a multistep approach to determine:

1. the number of insertion sites;
2. the presence/absence plasmid backbone;
3. insert copy number at each insertion site;
4. DNA sequence of each inserted DNA;
5. sequence of the native locus at each insertion site.

Additionally, current methods also establish a description of any genetic rearrangements that may have occurred at the insertion site as a consequence of transformation. Generational stability analysis, which demonstrates the stable heritability of inserted DNA sequences over a number of breeding generations, is also routinely conducted.

The first step of the molecular characterization, determination of number of insert sites, is conducted using a combination of next-generation sequencing technologies (NGS) and Junction Sequence Analysis (JSA) bioinformatics (DuBose et al., 2013; Kovalic et al., 2012; Zhang et al.,

2012). A schematic representation of the basis of the characterization including the NGS/JSA methodology and the directed sequencing is presented in Figure 1 (Kovalic et al., 2012).

Genomic DNA from the transformation event and the conventional control are used to generate short (~100 bp) randomly distributed sequence fragments (sequencing reads) in sufficient numbers to ensure comprehensive coverage of the genomes (Shendure and Ji, 2008) (Figure 1 box 1). Sufficient numbers of sequence fragments are obtained (>75x effective genome coverage) to comprehensively cover the genomes of the sequenced samples (Ajay et al., 2011; Clarke and Carbon, 1976; Wang et al., 2008). Previous studies with a variety of transformation events demonstrate that 75x coverage of the genome is adequate to provide comprehensive coverage and ensure detection of inserted DNA, producing results equivalent to Southern blot analysis (Kovalic et al., 2012). The 75x coverage used in this method is predicted based on established and accepted methods (Clarke and Carbon, 1976; Lander and Waterman, 1988) to provide genome coverage that would be expected to not miss a single basepair in complex genomes (Kovalic et al., 2012). Furthermore, even with known biases in next-generation sequencing techniques, including the Illumina sequencing by synthesis method employed here (Minoche et al., 2011), it has previously been established experimentally that given deep next-generation sequencing it is possible to achieve comprehensive coverage of complex genomes that form the foundation for accurate whole genome studies (Ajay et al., 2011; Wang et al., 2008).

To confirm sufficient sequence coverage in both the transformation event and the control, the 100 bp sequence reads are analyzed to determine the coverage of a known single-copy endogenous gene, this analysis demonstrates coverage at >75x median depth in each sample. Furthermore, in order to confirm the method's ability to detect any sequences derived from the transformation plasmid, plasmid DNA is spiked into conventional control DNA at a single copy genome equivalent ratio and 1/10 copy genome equivalent ratio. This analysis demonstrates that any portion of the plasmid may be detected at a single copy per genome level and 1/10 copy genome equivalent level, which is adequate sensitivity to observe any inserted fragment.

Also of note is that although the method presented here provides >75x coverage of the genomes under study, accurate assembly of complete genome sequences for the transformation event and conventional control is not technically possible using currently available sequence assembly tools. This is due to the nature of the sequences generated in this study, short reads of a single short insert length (Miller et al., 2010), in addition to limitation on available sequence assembly algorithms (Zhang et al., 2011). The sequences generated with this method represent datasets sufficient for achieving precise molecular characterization of transformed DNA in transformation events where reference to a template sequence (plasmid DNA) is utilized for comparison (Kovalic et al., 2012).

Using bioinformatics tools, the sequence reads that are derived from the plasmid vector are selected for further analysis out of the comprehensive genomic sequence dataset produced from the transformation event. To determine the insert number, the known sequence of the transformation vector plasmid is used as an "e-probe" in the bioinformatics analysis to search for and select the sequences that contain any portion of sequence of the plasmid. The DNA sequencing reads with a match to the query sequence having an e-value of 1×10^{-5} or less and having a match length of at least 30 bases with at least 96.7% sequence identity are collected. The results of a parameter optimization study that systematically evaluated many different potential

parameter sets established these selection criteria as providing the best possible combination of sensitivity and specificity.

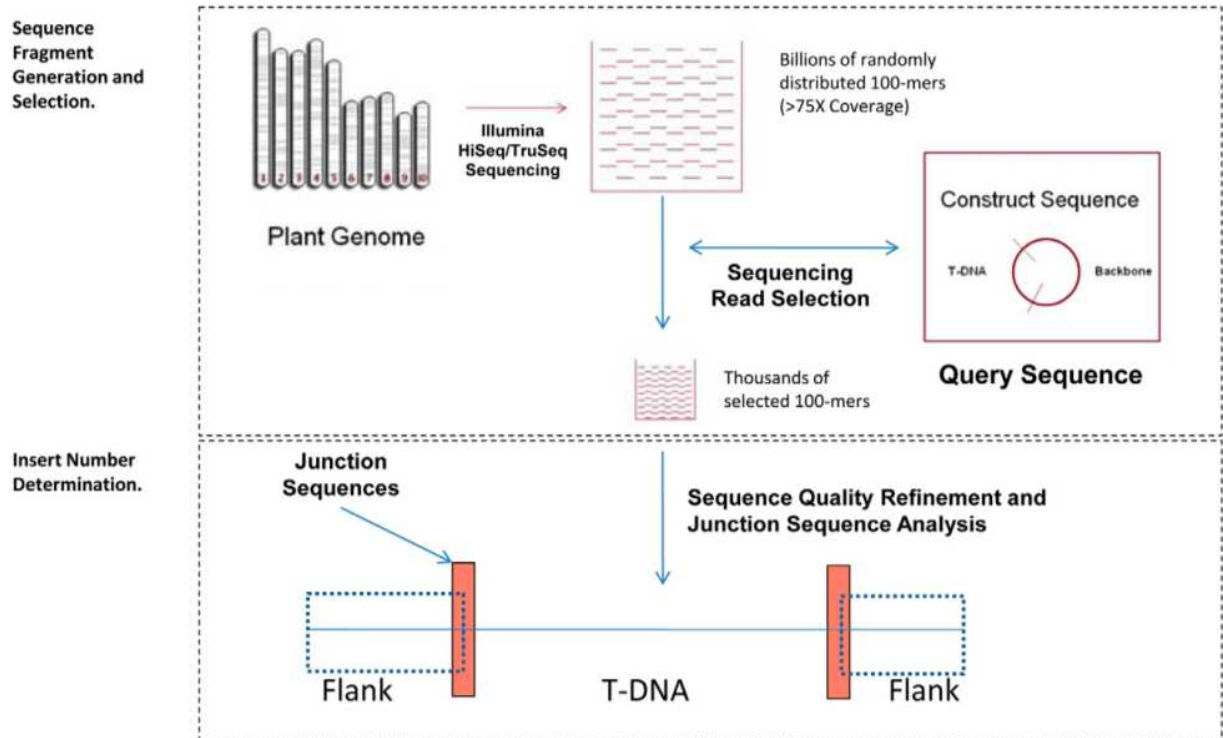


Figure 1. Sequencing and Sequence Selection

Genomic DNA from the test and control material were sequenced using Illumina HiSeq/TruSeq technology (Illumina, Inc.) that produces large numbers of short sequence reads approximately 100 bp in length. Sufficient numbers of these sequence fragments were obtained to comprehensively cover the genomes of each sample at >75x average coverage. Using these genome sequence reads, bioinformatics search tools were used to select all sequence reads that are significantly similar (as defined in the text) to the transformation plasmid. Only the selected sequence reads were used in further bioinformatics analysis to determine the insert number by detecting and characterizing all junction sequences and the presence or absence of the plasmid backbone sequences by lack of detectable sequences, including the use of suitable controls for experimental comprehensiveness and sensitivity.

The number of DNA inserts is determined by analyzing the selected sequences for novel junctions. The junctions of the DNA insert and flanking DNA are unique for each insertion and an example is shown in Figure 2 below (Kovalic et al., 2012). Therefore, insertion sites can be recognized by analyzing for sequence reads containing such junctions. Each insertion will produce two unique junction sequence classes characteristic of the genomic locus, with one at the 5' end of the insert, in this case named Junction Sequence Class A (JSC-A), and similarly one at the 3' end of the insert, JSC-B (as illustrated in Figure 3 from (Kovalic et al., 2012). By evaluating the number and the sequences of all unique junction classes detected, the number of insertion sites of the plasmid

sequence can be determined. For a single insert, two junction sequence classes are expected, one each originating from either end of the insert, both containing portions of T-DNA and flanking sequence.

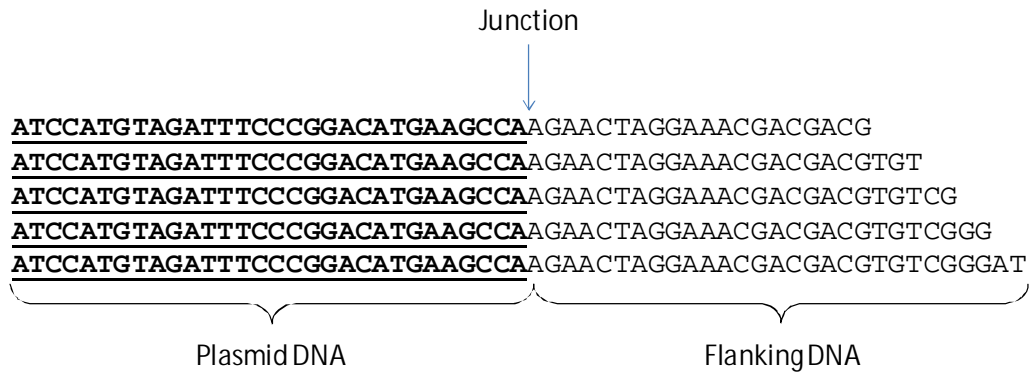


Figure 2. Junctions and Junction Sequences

Depicted above are five example junction sequences formatted and labeled to indicate the plasmid/flanking DNA portions of the sequences and with the junction point indicated (plasmid DNA is shown in bold, underlined text and flank DNA is shown in plain text). Junctions are detected by examining the NGS data for sequences having portions of plasmid sequences that span less than the full read. Detected junctions are typically characteristic of plasmid insertions in the genome. A group of junction sequences which share the same junction point and common flanking sequence (as shown above) is called a Junction Sequence Class (or JSC).

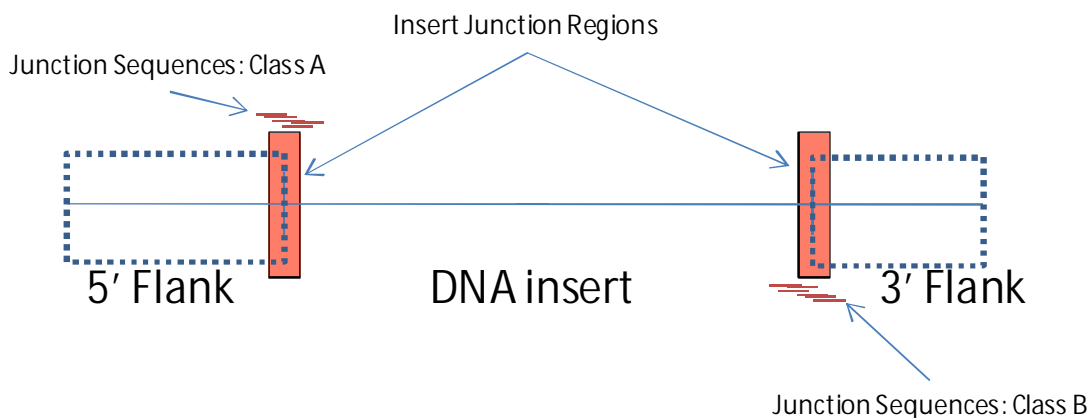


Figure 3. Two Unique Junction Sequence Classes are Produced by the Insertion of a Single Plasmid Region

A schematic representation of a single DNA insertion within the genome showing the inserted DNA, the 5' and 3' flanks (depicted as areas bounded by dotted lines), and the two distinct regions spanning the junctions between inserted DNA and flanking DNA (shaded boxes). The group of ~100-mer sequences in which each read contains sequences from both the DNA insert and the adjacent flanking DNA at a given junction is called a Junction Sequence Class. In this example, two distinct junction sequence classes (in this case: Class A at the 5' end and Class B at the 3' end) are represented.

The next step in the molecular characterization is determination of the insert copy number, integrity of the insert, lack of backbone or other unintended plasmid sequences, and flanking sequence of the native locus at the insertion site. This analysis is conducted using directed sequencing, locus-specific PCR and DNA sequencing analyses, which complements the NGS/JSA analyses, and is common to both the Southern-based and the NGS/JSA characterization methods. Directed sequencing (locus-specific PCR and DNA sequencing analyses) of the transformation event determines the complete sequence of the insert and flanks. This determines if the sequence of the insert is identical to the corresponding sequence in plasmid vector, if each genetic element in the insert is intact, if the plasmid vector sequence is inserted as a single copy, and establishes no vector backbone or other unintended plasmid sequences were inserted in the event. This comparison allows a determination of whether the T-DNA elements are present in the intended order. Furthermore, the genomic organization at the insertion site is assessed by comparing the insert and flanking sequence to the sequence of the insertion site in conventional control genome.

Finally, the stability of the T-DNA across multiple generations is evaluated by NGS/JSA analyses. Genomic DNA from multiple generations of the transformation event is assayed for the number and sequences of all unique junction classes, as described above. This information is used to determine the number and identity of insertion sites. For a single insert, two junction sequence classes are expected, both containing portions of T-DNA and flanking sequence (Figure 2), with one each originating from either end of the insert (Figure 3). In the case of an event where a single locus is stably inherited over multiple generations, two identical junction sequence classes are expected in all the generations tested.

References

- Ajay, S.S., S.C.J. Parker, H. Ozel Abaan, K.V. Fuentes Fajardo and E.H. Margulies. 2011. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. *Genome Research* 21: 1498-1505.
- Clarke, L. and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic CoI EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- Codex Alimentarius. 2009. Foods derived from modern biotechnology. Second Edition, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- DuBose, A.J., S.T. Lichtenstein, N. Narisu, L.L. Bonnycastle, A.J. Swift, P.S. Chines and F.S. Collins. 2013. Use of microarray hybrid capture and next-generation sequencing to identify the anatomy of a transgene. *Nucleic Acids Research* 41: e70-e70.
- Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgette and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome Journal* 5: 149-163.
- Lander, E.S. and M.S. Waterman. 1988. Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis. *Genomics* 2: 231-239.
- Miller, J.R., S. Koren and G. Sutton. 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* 95: 315-327.
- Minoche, A.E., J.C. Dohm and H. Himmelbauer. 2011. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and genome analyzer systems. *Genome Biol* 12: R112.
- Shendure, J. and H. Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145.
- Wang, J., W. Wang, R. Li, Y. Li, G. Tian, L. Goodman, W. Fan, J. Zhang, J. Li, J. Zhang, Y. Guo, B. Feng, H. Li, Y. Lu, X. Fang, H. Liang, Z. Du, D. Li, Y. Zhao, Y. Hu, Z. Yang, H. Zheng, I. Hellmann, M. Inouye, J. Pool, X. Yi, J. Zhao, J. Duan, Y. Zhou, J. Qin, L. Ma, G. Li, Z. Yang, G. Zhang, B. Yang, C. Yu, F. Liang, W. Li, S. Li, D. Li, P. Ni, J. Ruan, Q. Li, H. Zhu, D. Liu, Z. Lu, N. Li, G. Guo, J. Zhang, J. Ye, L. Fang, Q. Hao, Q. Chen, Y. Liang, Y. Su, A. san, C. Ping, S. Yang, F. Chen, L. Li, K. Zhou, H. Zheng, Y. Ren, L. Yang, Y. Gao, G. Yang, Z. Li, X. Feng, K. Kristiansen, G.K.-S. Wong, R. Nielsen, R. Durbin, L. Bolund, X. Zhang, S. Li, H. Yang and J. Wang. 2008. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature* 456: 60-65.
- Wei, H., C. Therrien, A. Blanchard, S. Guan and Z. Zhu. 2008. The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids*

Research 36: e50.

Zhang, J., R. Chiodini, A. Badr and G. Zhang. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* 38: 95-109.

Zhang, R., Y. Yin, Y. Zhang, K. Li, H. Zhu, Q. Gong, J. Wang, X. Hu and N. Li. 2012. Molecular characterization of transgene integration by next-generation sequencing in transgenic cattle. *PLoS ONE* 7: e50348.