別添資料１

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2*, *Glycine max* (L.) Merr.)
(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)　申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書 …… 1
生物多様性影響評価書
第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 …… 3
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 …… 3
（1）　分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 …… 3
①　和名、英名及び学名 …… 3
②　宿主の品種名 …… 3
③　国内及び国外の自然環境における自生地域 …… 3
（2）　使用等の歴史及び現状 …… 3
①　国内及び国外における第一種使用等の歴史 …… 3
②　主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途 …… 3
（3）　生理学的及び生態学的特性 …… 4
イ　基本的特性 …… 4
ロ　生息又は生育可能な環境の条件 …… 5
ハ　捕食性又は寄生性 …… 5
ニ　繁殖又は増殖の様式 …… 5
ホ　病原性 …… 6
ヘ　有害物質の産生性 …… 6
ト　その他の情報 …… 6
2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 …… 7
（1）　供与核酸に関する情報 …… 7
イ　構成及び構成要素の由来 …… 7
ロ　構成要素の機能 …… 7
（2）　ベクターに関する情報 …… 12
イ　名称及び由来 …… 12
ロ　特性 …… 12
（3）　遺伝子組換え生物等の調製方法 …… 14
イ　宿主内に移入された核酸全体の構成 …… 14
ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法 …… 14
ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過 …… 14
（4）　細胞内に移入され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 … 16
①　移入された核酸の複製物が存在する場所 …… 16
②　移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性 …… 17
③　染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別 …… 25
④　(6)の①において具体的に示される特性について、自然条件下での個体間及び世代間での発現の安定性 …… 25
⑤　ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度 …… 27
（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 27

（6） 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 …… 29
① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的内容 …… 29
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度29
a 形態及び生育の特性 …… 29
b 生育初期における低温又は高温耐性 …… 30
c 成体の越冬性又は越夏性 …… 30
d 花粉の稔性及びサイズ …… 31
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 …… 31
f 交雑率 …… 31
g 有害物質の産生性 …… 32
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 …… 34
（1） 使用等の内容 …… 34
（2） 使用等の方法 …… 34
（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 …… 35
（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 …… 35
（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 …… 35
（6） 国外における使用等に関する情報 …… 35
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 …… 36
1 競合における優位性 …… 36
（1） 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 …… 36
（2） 影響の具体的内容の評価 …… 36
（3） 影響の生じやすさの評価 …… 36
（4） 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 …… 37
2 有害物質の産生性 …… 37
（1） 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 …… 37
（2） 影響の具体的内容の評価 …… 37
（3） 影響の生じやすさの評価 …… 37
（4） 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 …… 37
3 交雑性 …… 38
（1） 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 …… 38
（2） 影響の具体的内容の評価 …… 38
（3） 影響の生じやすさの評価 …… 38
（4） 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 …… 38
4 その他の性質 …… 39
第三 生物多様性影響の総合的評価 …… 40
引用文献 …… 42
モニタリング計画書
緊急措置計画書
別添資料一覧

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 3 月 11 日

農林水産大臣　若林　正俊　殿
環 境 大 臣　鴨下　一郎　殿

申請者
氏名　BASF アグロ株式会社
代表取締役社長　ハンス・ヨアヒム・ローエ

住所　東京都港区六本木一丁目 4 番 30 号
六本木 25 森ビル 23 階

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2, Glycine max* (L.) Merr.)(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所 在 地:茨城県つくば市観音台三丁目 1 番地 3 名　　称:独立行政法人農業環境技術研究所隔離ほ場 使用期間:承認日から平成 22 年 3 月 31 日 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ところに掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 栽培試験区には、食害を防止するための防鳥網を設置する。花粉の飛散を防止するための防風林を設置している。 2. 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、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こむことにより、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (7) 別に定めるモニタリング実施計画に基づき、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。

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1　　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名
和名：ダイズ
英名：Soybean
学名：*Glycine max* (L.) Merr.

② 宿主の品種名

宿主には、米国成熟期グループ VIII（中生）に属するダイズ品種 Conquista を用いた。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、国内及び国外でダイズが自生している地域は知られていない。
なお、近縁野生種であるツルマメ（*Glycine soja*）は、ロシア、中国、朝鮮半島、台湾及び我が国において広く分布している（Hymowitz and Newell, 1981; 新編農学大事典, 2004）。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史
ダイズの原産地である中国では、紀元前 11 世紀頃にはすでにダイズが栽培されていたと報告されている（Boerma and Specht, 2004）。我が国には中国から伝わったとされ、「古事記」（712 年）、「日本書紀」（720 年）に記録があることから、その当時我が国でも栽培されていたと考えられる。1950 年代には米国が中国を越え世界最大の生産国となり、1960 年代にはブラジル、1970 年代にはアルゼンチンなどでも生産が拡大した。米国、中国、ブラジル、アルゼンチンに加えてカナダも我が国の主要な輸入先国である。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

<u>主たる栽培地域</u>

1960 年代以降、ダイズは主要油糧種子作物として世界で生産されてきており（Smith and Huyser, 1987）、過去 20 年間でダイズ生産は 7500 万トン増加し、2006 年の世界総生産量は 2 億 2800 万トンであった。過去 50 年間、米国が最大のダイズ生産国であり、2006 年の生産量は約 8600 万トン（世界総生産量の約 38%）であり、生産量第 2 位、第 3 位はそれぞれブラジル、アルゼンチンで、それぞれ 5600 万トン、4400 万トンであった。アジアにおけるダイズ生産量上位 2 カ国は中国(約 1600 万トン)及びインド(約 700 万トン)であった。

栽培方法

ダイズは短日植物である(Garner and Allard, 1920)。ダイズにはさまざまな栽培品種があるが、それぞれの光周性及び最適生育温度がその品種の栽培に適した地域を決定する上で、重要な要素となっている。ダイズの品種は、光周性に基づく最適生育緯度によって成熟期グループ（Maturity Groups；MG）に分類されている。MG には北部の MG000(緯度 45 度)から赤道付近の MGX まで 13 種類ある。MG ごとに、品種はさらに生育日数によって早生、中生、晩生品種に分類されている。

ダイズには根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* との共生窒素固定により、大気中窒素を固定する能力があるため、トウモロコシ、コムギ、ワタ、イネなどとの輪作に用いられることが多い。一般にダイズを他の作物と交互に栽培することで、ダイズ及び次作物の収量が増加すると報告されている（Johnson, 1987; Wesley, 1999）。

流通実態及び用途

ダイズは代表的油糧種子作物であり、今日世界中で消費されている。現在、世界のダイズ生産量は、他のあらゆる食用油糧種子作物を大きく上回っている（Wilcox, 2004; Soy Stats, 2007）。2006 年の世界のダイズ総生産量 2 億 2800 万トンは、世界の油糧種子総生産量の 57%にあたる（Soy Stats, 2007）。ダイズは食品業界、産業界で幅広く使用されており、食用植物油や動物飼料用高蛋白粉の主要原料である。食品用途には主に、マーガリン、ショートニング、サラダ油、料理用のダイズ油などがある。また、ダイズ油は石鹸等の産業用途としても使われている。

現在の我が国のダイズ輸入量は約 420 万トンであり、米国、ブラジル、中国等から輸入されている。国内生産量は約 22 万トンである（農林水産省、食料需給表 2005 年）。主に北海道、東北地方で生産されており、豆腐、納豆、みそ、醤油などの加工品として、また国産ダイズは蛋白質を多く含み、脂肪、炭水化物の含有量が適度なことから煮豆としても利用されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ. 基本的特性

ダイズは種子植物であり、一年生の双子葉植物である。ダイズの品種は成長特性によって、無限伸育型、有限伸育型の2種類が主に栽培品種として使用されている(Bernard and Weiss, 1973)。無限伸育型は、下位節の花芽分化後も茎頂の生育が長く続き、頂部ほど茎が細く、葉が小さくなり、頂部の花房は未発達で終了する。無限伸育型は、主に米国中部・北部で栽培されている(MG 000～IV)。有限伸育型は、下位節の花芽分化後まもなく頂部の成長が止まり、頂部の茎、葉は大きく、花房は発達する。有限伸育型は主に米国南部で栽培されている(MG V～X)。また、我が国の品種のほとんどは有限伸育型である。

ダイズの発芽後、子葉の次に出る 1 枚目の葉を初生葉という。通常、卵型単葉で対生する。本葉は複葉で、通常 3 枚の小葉から形成される。小葉を 4 枚以上持つ複葉も時折みられる。ダイズが必要とする窒素の 25～75%が根粒における内部共生菌 *Bradyrhizobium japonicum* の窒素固定により供給される(Varco, 1999)。ダイズの花は、5 片からなる 1 管状がく、5 花弁(旗弁 1 枚、翼弁 2 枚、竜骨弁 2 枚)からなる 1 花冠、

1 本の雌ずい、1 本が離れている 10 本の雄ずいから構成されている。莢はまっすぐ、あるいはわずかに曲がり、長さは 2～7cm 程度である。種子の形状は通常卵型だが、長いもの、平らなもの、ほぼ球状など、品種によって異なる場合がある（Boerma and Specht, 2004）。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子は土壌温度が 10℃に達すると発芽し、5~7 日後に出芽する。ダイズは弱酸性から中性で肥料養分に富み、排水のよい土壌でよく生育する。ダイズは酸性土では生産性が落ちるため、酸性土壌では石灰を投入し、pH6.0～6.5 に調整する（新版　作物栽培の基礎）。ダイズ種子には休眠性がほとんどなく、ある特殊な条件下で越冬した際に発芽する場合もあるが、十分に生育することはない（OECD, 2000）。

USDA の有害雑草リストにダイズは含まれておらず(USDA, 2006)、これまで我が国においてダイズが雑草化した例は報告されていない。

ハ. 捕食性又は寄生性

―

ニ. 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

通常、ダイズ植物 1 個体中の莢数は最高 400、各節に 2～20 の莢が形成される。各莢には 1～5 個の種子が入っている。莢は完熟すると褐色に変化し、乾燥が進むことにより莢が裂開し、種子が地表に落下する (OECD, 2000)。霜耐性ダイズ品種は存在せず、ダイズが冬季の凍結環境を生き延びることはない。

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

種子繁殖するダイズは、自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性を有しない。

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

ダイズの自家受粉率は高く、他家受粉率は通常 1%未満である(Caviness, 1966)。近縁野生種としては、染色体数が同じ（2n=40）ツルマメ（*Glycine soja*）が挙げられる。ツルマメは細胞学的、形態学的、分子生物学的証拠から、ダイズの祖先と考えられている。ツルマメは、韓国、台湾、中国北東部、中国とロシアの国境地域に自生し(Hymowitz and Newell, 1981)、我が国においても広く分布している（新編農学大事典, 2004）。ダイズとツルマメとの交雑率については、独立行政法人農業環境技術研究所において調べられている（農業環境技術研究所研究成果第 23 集, 2006）。2005 年に組換えダイズ（除草剤グリホサート耐性ダイズ）にツルマメをからませ（混植区）、植えつけ時期を調節することにより両者の開花最盛期を近づけ交雑率を検定した結果、検定種子数 32,502 粒中、自然交雑したのは 1 粒であったと報告されている。

また、一般的なダイズ品種と比較して開花期が遅く、我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ(Gls/93-J-01)を 50 cm 間隔（鉢の中心から隣接鉢の中心間との距離）で交互に各 30 個体配置し（5×12 列）、ダイズとツルマメとの自然交雑率が調べられている（Nakayama and Yamaguchi, 2002）。その結果、得られたツルマメの後代 686 個体中、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体確認され、交雑率の平均値は 0.73%であったと報告されている。我が国ではツルマメは畑の周辺等にも自生しているが、一般的にダイズの開花期はツルマメより早く（Nakayama and Yamaguchi, 2002）、開花期が重なりにくいと考えられている。一方、ツルマメ同種間の交雑率は、訪花昆虫が多く観察された自然条件下では、平均値 13%であったとの報告がある(Fujita, 1997)。

以上のことから、ダイズとツルマメとの交雑は起こりうるものの、我が国においてダイズとツルマメとの開花期が重なり合い、さらにこれらが隣接して生育するような特殊な条件以外での自然条件下では、ダイズとツルマメとの交雑は起こりにくいと考えられる。また、ダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種後代が自然条件に適応し、野生生物を駆逐する可能性は低いと考えられる。

なお、ダイズがアポミクシスを生ずる特性を有するという報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズ花粉の生産量は極めて少なく、稔性は 2～4 時間で失われる。花粉の直径は 21～30 μ m である（Boerma and Specht, 2004）。ダイズ花粉の媒介は主に訪花昆虫である。飛散距離と自然交雑率については、独立行政法人農業環境技術研究所において報告されている。2001～2004 年の 4 年間、花粉源からの距離 0.7m、1.4m、2.1m、2.8m、3.5m、7.0m、10.5m で交雑率を調べた結果、0.7m の距離間でも交雑率は 0.023～0.19%、10.5m 離れると交雑率は 0%であった。また、訪花昆虫の種類は、主にアザミウマ類、半翅目の昆虫が観察されたと報告されている（Yoshimura, 2006）。

ホ. 病原性

―

ヘ. 有害物質の産生性

自然条件下において、ダイズが周囲の野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質を産生することは、これまでに知られていない。

ト. その他の情報

―

2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ. 構成及び構成要素の由来

供与核酸の構成及び構成要素の由来を 8 ページの表 1 に示した。また、塩基配列及びアミノ酸配列は別添資料 1、2 に示した。

ロ. 構成要素の機能

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

構成要素の由来及び機能については 8 ページの表 1 に示した。目的遺伝子及び発現調節領域等については下記に詳細を記した。

改変 *csr1-2* 遺伝子

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ（改変 *csr1-2, Glycine max* (L.) Merr.）(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)（以下「本組換えダイズ」と表記）は、BASF プラントサイエンス社とブラジル EMBRAPA 研究所 (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria)とで共同開発された。

本組換えダイズに導入されたイミダゾリノン系除草剤耐性遺伝子（シロイヌナズナ由来改変 *csr1-2* 遺伝子）は、突然変異によりアセトヒドロキシ酸合成酵素（AHAS）（別名アセト乳酸合成酵素（ALS）ともよばれている）にセリン残基からアスパラギン残基の 1 アミノ酸置換（S653N）を起こした改変遺伝子である（Haughn and Somerville, 1986: Haughn and Somerville, 1990）。AHAS は、多くの植物が生存に必要とする酵素で、あらゆる植物、微生物に含まれ、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成の第 1 段階を触媒する(Stidham and Singh, 1991)。通常の植物では、イミダゾリノン系除草剤が AHAS を阻害することで分岐鎖アミノ酸や他の物質が欠乏し、生育できなくなる。一方、改変 *csr1-2* 遺伝子を導入した植物は、通常の生合成機能が影響を受けず、当該除草剤に対して耐性を示す(Pang et al., 2002、9 ページの図 1)。この改変 AHAS 蛋白質におけるアミノ酸変異により、イミダゾリノン系除草剤の結合が阻害され、通常の生合成機能が影響を受けることなく除草剤耐性をもたらすことが知られている(Newhouse et al., 1992)。

表1．pAC321 (8669 bp)プラスミドの構成要素の由来及び機能(Sathasivan et al., 1990)

構成要素	位置(bp)	由来及び機能
T-DNA 挿入領域		
シロイヌナズナゲノム由来の配列	1-1051	相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は検索されず、ORF を形成していない
At3g48570 5' UTR	1052-1113	シロイヌナズナ*Sec61 γ* 5'非翻訳領域
At3g48570 CDS	1114-1207 1307-1422	シロイヌナズナ*Sec61 γ*コーディング領域
At3g48570 intron 1	1208-1306	シロイヌナズナ*Sec61 γ*第一イントロン
At3g48570 3' UTR	1423-1442 1916-2119	シロイヌナズナ*Sec61 γ* 3'非翻訳領域
At3g48570 intron 2	1443-1915	シロイヌナズナ*Sec61 γ*第ニイントロン
＜改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセット領域＞ 改変 *csr1-2* 5' UTR and putative promoter	2120-2483	シロイヌナズナ由来改変 *csr1-2* プロモーター及び 5'非翻訳領域:*AHAS* は栄養生長期の葉組織において高い活性を示すことがわかっている。また、非常に低い発現ながらも全ての組織において発現が確認されている (Brasileiro, 1992)。
＜改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセット領域＞ 改変 *csr1-2* CDS	2484-4496	シロイヌナズナ由来改変 *csr1-2* コーディング領域
＜改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセット領域＞ 改変 *csr1-2* 3' UTR	4497-4714	シロイヌナズナ由来改変 *csr1-2* 3'非翻訳領域
シロイヌナズナゲノム由来の配列	4715-5717	相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は検索されず、ORF を形成していない
ベクター領域		
pBluescript SK(-) phagemid	5718-8669	ストラタジーン社製ベクター配列(Short *et al*., 1988)
T7 promoter	5805	バクテリオファージT7プロモーター転写開始部位;ファージミドでT7 RNAポリメラーゼによるRNA *in vitro*合成を可能にする
ファージ f1 (-) ori	5986-6442	バクテリオファージのf1複製起点;ヘルパーファージ存在時に、F'エピソームを含む*E. coli*における単鎖DNA合成を可能にする
bla CDS	6573-7433	*E. coli* β-ラクタマーゼ・コード配列;アンピシリン、カルベニシリンなどのβ-ラクタム抗生物質耐性をもたらす
ColE1 ori	7581-8248	pUC19 に由来する *E. coli* プラスミド複製起点 ColE1;
lacZ promoter	8468-8589	*E. coli* lacZ プロモーター; β-ガラクトシダーゼ(lacZ')アルファフラグメントの転写を促進する
lacZ' CDS	8590-8669 5718-5994	*E. coli* β-ガラクトシダーゼ・アルファフラグメント・コード配列;アルファ相補性により、pBluescript SK(-)マルチクローニングサイトのDNAインサート青白選抜を可能にする
T3 promoter	8632	バクテリオファージ T3 プロモーター転写開始部位;ファージミドで T3 RNA ポリメラーゼによる RNA *in vitro* 合成を可能にする

1. pAC321の配列は、www.Arabidopsis.orgで入手可能なシロイヌナズナゲノム配列データと、pAC321のノンアノテーション領域5073 ntでA残基が1つ欠損していることから1nt異なる。
2. pAC321のpBluescript SK(-)配列は、pAC321の7751ntでAccession number X52324と異なる。pAC321の7751ntはTであり(pUC19複製起点配列と一致：Accession number L09137)、X52324配列ではこの位置はC残基となっている。この変異領域は、形質転換に用いた 6156 bp フラグメント中に存在しない。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

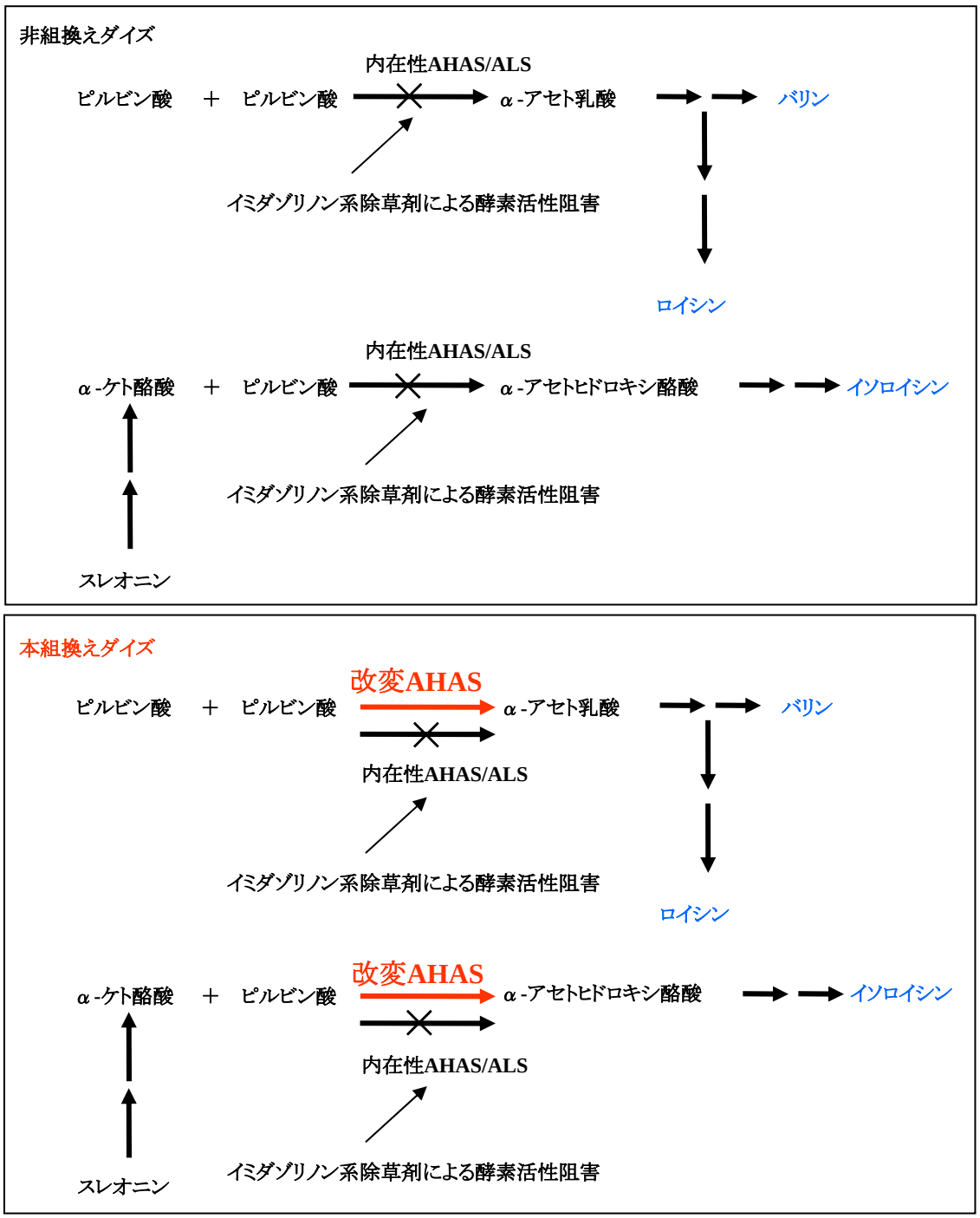


図1. 改変AHASの作用機構

AHAS/ALSは、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）生合成の第1段階を触媒する。通常、イミダゾリノン系除草剤によってこの酵素活性が阻害されるのに対して、改変AHASは影響を受けず、イミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示す。

発現調節領域

改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットはシロイヌナズナ由来の内在性プロモーターから発現し、シロイヌナズナ由来の内在性 3'非翻訳領域(UTR)を含んでいる。

局在化シグナル

改変 *csr1-2* 遺伝子産物は、N 末端領域の葉緑体輸送ペプチド(85 アミノ酸配列)を含む 670 アミノ酸配列からなる前駆体を形成する。その後、前駆体(670 アミノ酸)から葉緑体輸送ペプチドが切断され、585 アミノ酸からなる成熟した改変 AHAS 蛋白質となる。改変 AHAS 蛋白質は葉緑体に局在する。なお、本作用機構は熱ショック蛋白質(hsp70)により葉緑体まで運ばれ、葉緑体の TicToc 輸送体へ到着後、葉緑体内へ送り込まれ、その後葉緑体輸送ペプチドが切除される一般的な作用を受け成熟蛋白質になると考えられる。

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

導入した改変 *csr1-2* 遺伝子産物の機能は、先述した。Genbank、EMBL、DDBJ、PDB、BASF プラントサイエンス社所有データベースを用いたアミノ酸配列の比較から、改変 *csr1-2* 遺伝子によりコードされる改変 AHAS 蛋白質のアミノ酸配列は、既知のアレルゲンや毒素のアミノ酸配列と相同性を示さないことが確認されている。また、選抜に用いたマーカー遺伝子は、導入した改変 *csr1-2* 遺伝子であるため、形質転換体の選抜にはイミダゾリノン系除草剤イマザピルを用いている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

AHAS は、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成の第1段階を触媒する。そのため、アミノ酸代謝系に影響を与える可能性について、本組換えダイズ種子中のアミノ酸組成を調べることにより検討した。

トリプトファンについては、Spies(1967)の方法に基づいて分析した。その他のアミノ酸については、Spackman ら(1958)の方法に基づいて分析した。なお、アスパラギン酸の結果にはアスパラギン、グルタミン酸の結果にはグルタミンが含まれる。

t検定を行った結果、分析したダイズ種子中の全てのアミノ酸について、本組換えダイズ CV127 系統 F6 世代は対照品種 Conquista(以下「非組換えダイズ」と表記)との間に統計学的有意差は認められなかった(11 ページの表 2)。

表 2. ダイズ種子中のアミノ酸組成（mg / 乾燥重量 100 g）

	組換えダイズ	非組換えダイズ	
	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	P 値*
アラニン	1.63 ± 0.12	1.64 ± 0.11	0.91
アルギニン	3.01 ± 0.22	3.03 ± 0.27	0.91
アスパラギン酸	4.61 ± 0.37	4.64 ± 0.34	0.91
システイン	0.46 ± 0.12	0.41 ± 0.10	0.55
グルタミン酸	7.54 ± 0.62	7.61 ± 0.55	0.87
グリシン	1.65 ± 0.12	1.65 ± 0.11	1.00
ヒスチジン	0.85 ± 0.07	0.87 ± 0.07	0.70
イソロイシン	1.61 ± 0.12	1.61 ± 0.13	1.00
ロイシン	2.87 ± 0.22	2.89 ± 0.22	0.90
リジン	2.46 ± 0.18	2.48 ± 0.18	0.88
メチオニン	0.19 ± 0.07	0.17 ± 0.04	0.64
フェニルアラニン	1.98 ± 0.15	1.99 ± 0.16	0.93
プロリン	1.91 ± 0.15	1.98 ± 0.16	0.55
セリン	2.07 ± 0.15	2.09 ± 0.15	0.86
スレオニン	1.55 ± 0.11	1.56 ± 0.10	0.90
トリプトファン	0.76 ± 0.12	0.73 ± 0.09	0.70
チロシン	1.31 ± 0.09	1.34 ± 0.10	0.67
バリン	1.64 ± 0.12	1.66 ± 0.13	0.83

6 箇所のほ場を各々4 区域に分け、各区から採取した種子より 100gをサンプリングして 1 反復とし、合計 4 反復で種子中のアミノ酸組成分析を行った。

* t検定（両側）

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

(2)ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットは、pAC321 プラスミドにクローニングされており、ダイズに導入された直鎖状 DNA 断片は、6.2 kb のシロイヌナズナゲノム由来 DNA 断片である(Sathasivan et al., 1990、13 ページの図 2)。本組換えダイズの作出に用いられたベクターは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来の pBluescript SK(-)をもとに構築された。

ロ. 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

宿主に導入された pAC321 プラスミドの塩基数は 8,669 bp である。pAC321 プラスミドは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来の pBluescript SK(-)(Short *et al*., 1988)をもとに 13 ページの図 2A のように構築した(Sathasivan et al., 1990)。このプラスミドを構築するにあたり、シロイヌナズナ由来の内在性プロモーターを使用するため改変 *csr1-2* 遺伝子の開始コドンから上流約 2.5 kb 及び終止コドンから下流約 1.5kb を含めた約 6.2kb をシロイヌナズナのゲノムからクローニングし、*Pvu*II 制限酵素サイトを用いて pAC321 プラスミドに挿入した(Sathasivan et al., 1990)。ダイズへの形質転換を行った後、イミダゾリノン系除草剤耐性による選抜を行っている段階でシロイヌナズナの全ゲノム配列が解読された。改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットを含むダイズゲノムに挿入された全塩基配列及び隣接ダイズゲノムの塩基配列(導入した配列とダイズゲノムの結合地点から上流約 1.3kb 及び下流約 4kb)の Genbank、EMBL、DDBJ、PDB、BASF プラントサイエンス社所有データベースを用いた BLAST 検索を行った(別添資料 1)。その結果、上流約 2.5 kb 中には、既知の遺伝子との相同性を有しないシロイヌナズナゲノム由来の配列及び完全な *Sec61* γサブユニット遺伝子(At3g48570)を含んでいることがわかった(8 ページの表 1)。また改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットの下流にも既知の遺伝子との相同性を有しないシロイヌナズナゲノム由来の配列を含んでいることがわかった(8 ページの表 1)。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

シロイヌナズナのゲノム解読が終了した結果、上述した改変 *csr1-2* 遺伝子の開始コドンから上流約 2.5 kb 中に完全な *Sec61* γサブユニット遺伝子(At3g48570)を含んでいることがわかった。この遺伝子はあらゆる植物及び真核生物に含まれる輸送蛋白質をコードしている (Hartmann, *et al*., 1994)。*Sec61*γ5' UTR (The Arabidopsis Information Resource での名称)の配列は、導入遺伝子とダイズゲノム DNA の 5'側の結合地点から下流 18 ヌクレオチド先で開始している(別添資料 1)。したがって、導入した遺伝子発現カセット内に *Sec61*γ遺伝子の内在性プロモーターが含まれる可能性は非常に低いと考えられる。*Sec61*γ遺伝子発現解析は(4)で後述する。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主領域に関する情報

Genbank、EMBL、DDBJ、PDB、BASF プラントサイエンス社所有データベースを用いた全塩基配列の相同性検索の結果から、導入されたプラスミドの感染性はないと考えられる。

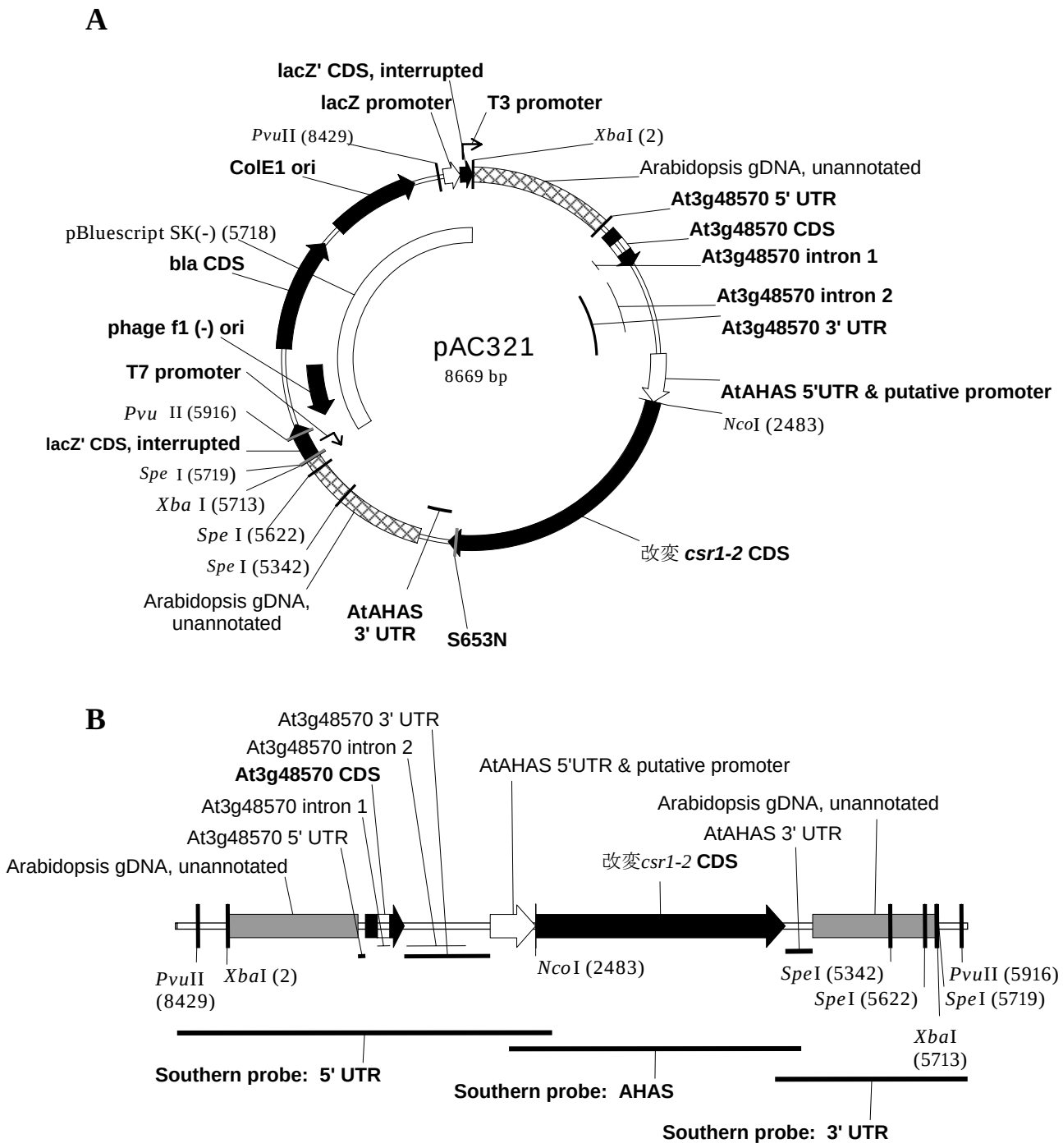


図2. pAC321プラスミドマップ（各略号の説明は表1を参照）
A. pAC321プラスミドマップを示している。B. 導入した改変*csr1-2*遺伝子カセットを含むフラグメントを示している。コピー数、世代間の安定性に関するサザンブロット解析に用いた制限酵素サイト（*Nco*I、*Xba*I、*Spe*I）及びプローブの領域も示してある。

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

(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

移入された構成要素のベクター内での位置及び方向は 8 ページの表 1 及び 13 ページの図2に示した。また、移入した核酸全体の構成は 13 ページの図 2-B に示した。移入した配列は制限酵素 PvuⅡの切断により生じる部分である。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

1 つのダイズ成熟種子から頂端分裂組織を含む胚軸を取り出し（Aragão *et al.,* 1996）、44.3 μ M ベンジルアミノプリン、3%Sucrose を含む MS 寒天培地(Murashige and Skoog, 1962)にのせ、パーティクルガン法により宿主へ導入した(Klein *et al.,* 1987; Lee *et al.,* 1996: Sanford *et al.,* 1993)。本組換えダイズはこの 1 回の形質転換、後述する選抜方法に従って作出した。

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

0.5～1.0 μM イミダゾリノン系除草剤イマザピル選択培地を用いて選抜した。

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

－

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

ダイズ隣接配列を含むシークエンス解析、世代間の安定性を確認するためのサザンブロット解析及び生物多様性影響評価に必要な情報収集のため用いられた系統を 15 ページの図 3 の系統図に示した。

[社外秘情報につき非開示]

図3. 本組換えダイズ系統図（pedigree）

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所(染色体上、細胞小器官内、原形質内の別)

下記の遺伝解析と後述のサザンブロット解析により、移入された改変*csr1-2*遺伝子発現カセットは染色体上に存在することが確認された。

PCR 法及び除草剤散布による導入遺伝子の遺伝解析

CV127 系統 F4 世代の 2 つの集団(57 植物体からなるファミリー1 及び 52 植物体からなるファミリー2)を用いてプライマー「イベント PCR3」を用いた本イベント特異的 PCR 法(27 ページの表 6)によって解析した(表 3-1)。本 PCR 法はプライマーに蛍光標識することにより優性ホモ、ヘテロ及び劣性ホモを定量的に検出することが出来る定量 PCR 解析を行った。その結果、観察された個体数と期待値との間に統計学的有意差は認められなかった($p<0.05$)。

同様に CV127 系統 F4 植物体を用いて、イミダゾリノン系除草剤イマザピル(100g a.i./ha)に対する耐性及び感受性について評価した(表 3-2)。その結果、観察された個体数と期待値との間に統計学的有意差は認められず($p<0.05$)、メンデルの法則に従って分離していることから、改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットは染色体上に存在すると考えられる。

表 3-1. CV127 系統 F4 世代における改変 *csr1-2* 遺伝子の PCR 法による遺伝解析(分離比 1:2:1)

PCR 法	観察された個体数	期待値 (分離比 1:2:1)	P 値*
ファミリー1			
優性ホモ	18	14.25	0.22
ヘテロ	30	28.50	
劣性ホモ	9	14.25	
計	57	57	
ファミリー2			
優性ホモ	14	13	0.69
ヘテロ	23	26	
劣性ホモ	15	13	
計	52	52	

* カイ二乗検定

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

表 3-2. CV127 系統 F4 世代における改変 *csr1-2* 遺伝子の除草剤散布による遺伝解析(分離比 3:1)

除草剤散布	観察された個体数	期待値 (分離比 3:1)	P 値*
ファミリー1			
耐性	493	508.5	0.17
感受性	185	169.5	
計	678	678	
ファミリー2			
耐性	330	340.5	0.26
感受性	124	113.5	
計	454	454	

* カイ二乗検定

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

コピー数の確認、世代間の安定性及びプラスミド pAC321 由来のベクターバックボーンの不在を確認するためにサザンブロット解析を行った。サザンブロット解析方法の詳細は別添資料 3 に示した。

コピー数及びインサートの完全性

本組換えダイズに導入されたインサートのコピー数については、本組換えダイズ CV603 系統 F8 世代のゲノム DNA を制限酵素 *Nco*I、*Spe*I、*Xba*I で消化し、サザンブロット解析により評価した。プローブには、*AHAS* 5' UTR 領域、コーディング領域、及び 3' UTR 領域を用いた(13 ページの図 2-B)。19 ページの図 5 の結果から、本組換えダイズのゲノム中には、完全な形の改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットが 1 コピー組み込まれていることが示された。また、*AHAS* のコーディング領域内に存在する 376 bp の配列が、下記のように遺伝子発現カセットの 3'末端に挿入されていることが分かった（図 4）。その結果、501bp のオープンリーディングフレーム(ORF)を形成している可能性があった。そこで、この予想 ORF が転写されているかどうかを、本組換えダイズの若い葉組織を用いて RT-PCR で検証した結果、この ORF は発現していないことがわかった。（20 ページの図 6）。

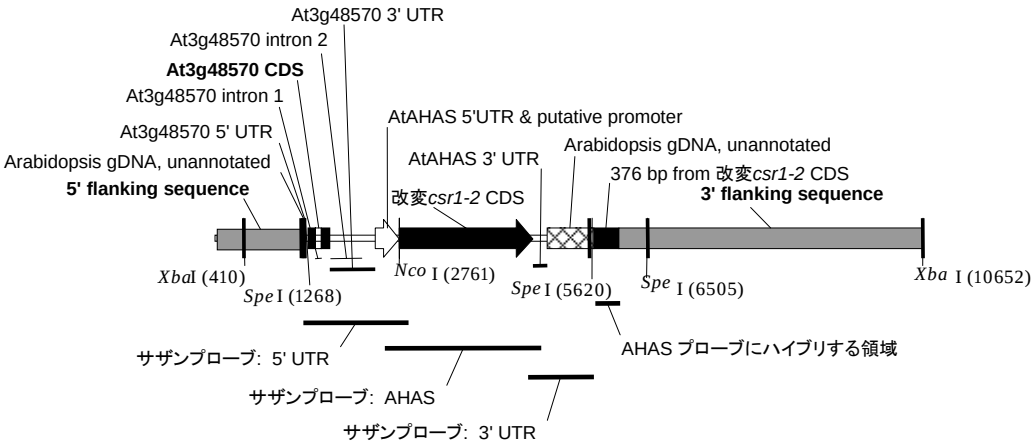


図 4. 導入されたインサート領域

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

サザンブロット解析による世代間の安定性

本組換えダイズのゲノムに導入した改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットの安定性を確認するため、4 世代(T4、CV603 系統 F4、CV603 系統 F8、CV603 系統 F9)のゲノム DNA 試料についてサザンブロット解析を行った。プローブには、*AHAS* 5' UTR 領域、コーディング領域、及び 3' UTR 領域を用いた(13 ページの図 2-B)。導入した改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットは、CV603 系統 F4、CV603 系統 F8、CV603 系統 F9 世代のゲノム中に 1 コピー存在することが明らかとなった(21 ページの図 7)。一方、戻し交配する前の T4 世代のゲノム中には、複数コピーが存在していることがわかる。これらの結果から、戻し交配後の Conquista 品種雑種後代 CV603 系統 F4 世代では 1 コピーであることが示された。さらに、この 1 コピーはその後の CV603 系統 F8 世代、CV603 系統 F9 世代へ安定的に継承されている。

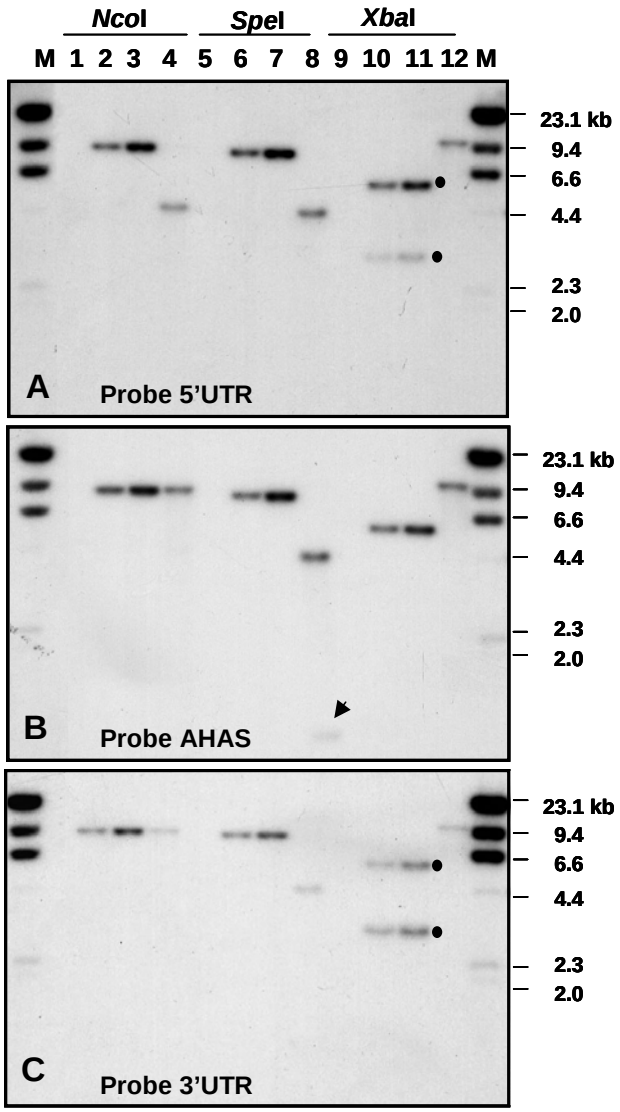


図5. コピー数を確認するためのサザンブロット解析

レーン1-4は制限酵素*Nco*I、レーン5-8は*Spe*I、レーン9-12は*Xba*Iで消化した。ハイブリダイゼーションはプローブ5' UTR(A)、AHAS(B)、3' UTR(C)で行った。両端のマーカーレーンはλ/*Hind*IIIラダー(サイズはkb)。Bの矢印は、本組換えダイズの3'隣接配列部位に存在する改変*csr1-2*フラグメント(376bp)を含む*Spe*Iフラグメント(885bp)を示す。また、5' UTRプローブと3' UTRプローブはそれぞれpAC321に含まれる*Xba*I部位とオーバーラップするため，同プラスミドの両フラグメントにハイブリダイズする。この2バンドの右側にはドットを打ってある(AとCのレーン11)。

レーン1:非組換えダイズCV603系統F8世代のゲノムDNA
レーン2: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン3: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン4:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA
レーン5:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン6: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン7: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン8:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA
レーン9:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン10: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン11: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン12:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

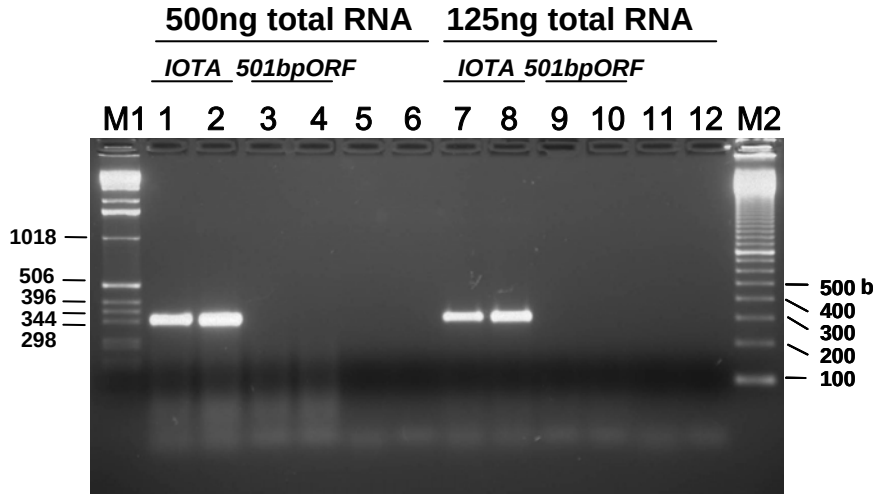


図6. 改変*csr1-2*コード配列の376bp部位挿入により形成された501bpORFに関するRT-PCR解析

本組換えダイズCV603系統F8世代及び非組換えダイズの葉組織を用いた。ダイズプロテアソーム*Iota*サブユニット遺伝子に特異的なプライマーを設計し、ポジティブコントロールとした。M1は1kbラダー、M2は100bpラダーを示す。

レーン1:非組換えダイズ
レーン2:本組換えダイズCV603系統F8世代
レーン3:非組換えダイズ
レーン4:本組換えダイズCV603系統F8世代
レーン5:テンプレートを入れず、*IOTA*特異的プライマーによるPCR
レーン6:テンプレートを入れず、501bpORF特異的プライマーによるPCR
レーン7:非組換えダイズ
レーン8:本組換えダイズCV603系統F8世代
レーン9:非組換えダイズ
レーン10:本組換えダイズCV603系統F8世代
レーン11:テンプレートを入れず、*IOTA*特異的プライマーによるPCR
レーン12:テンプレートを入れず、501bpORF特異的プライマーによるPCR

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

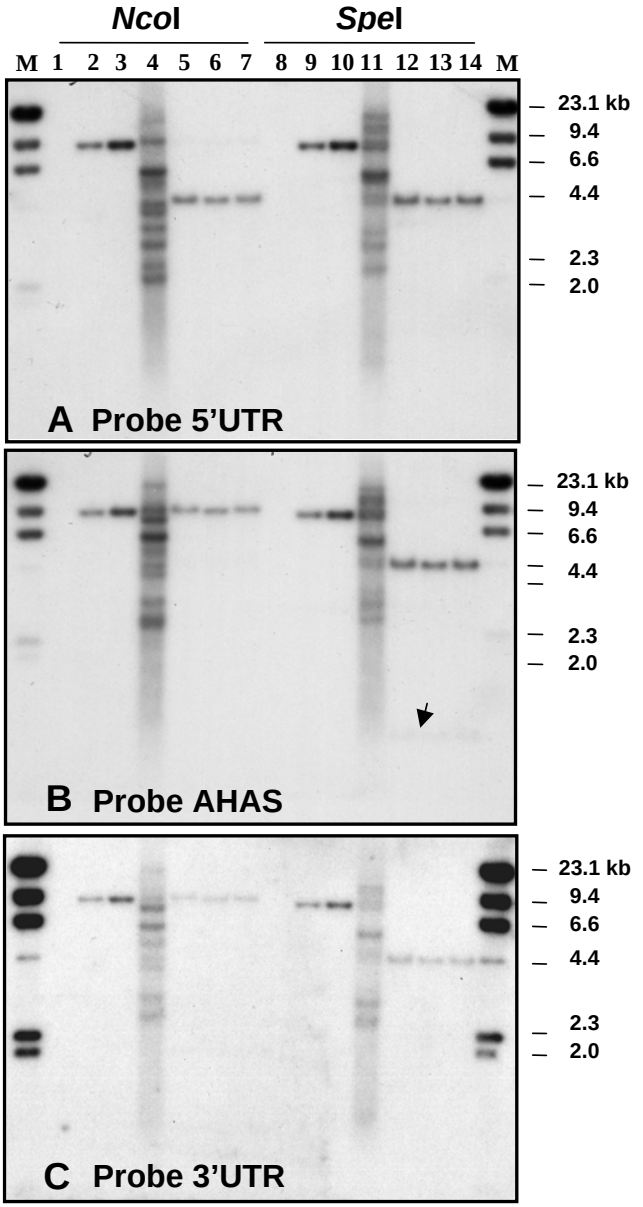


図7. 世代間の安定性を確認するためのサザンブロット解析

レーン1-7は制限酵素*Nco*I、レーン8-14は制限酵素*Spe*Iで消化した。ハイブリダイゼーションはプローブ5' UTR(A)、AHAS(B)、3' UTR(C)で行った。両端のマーカーレーンはλ/*Hind*IIIラダー(サイズはkb)。Bの矢印は、本組換えダイズの3'隣接配列部位に存在する改変*csr1-2*フラグメント(376bp)を含む*Spe*Iフラグメント(885bp)を示す(レーン12-14)。なお、戻し交配する前のT4世代(レーン4及び11)には複数コピーが断片的に存在するため全体的にレーンのバックグラウンドが高くなっている。

レーン1:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン2: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン3: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン4: 本組換えダイズ T4世代のゲノムDNA
レーン5: 本組換えダイズCV603系統F4世代のゲノムDNA
レーン6: 本組換えダイズCV603系統F8世代のゲノムDNA
レーン7: 本組換えダイズCV603系統F9世代のゲノムDNA
レーン8: 非組換えダイズのゲノムDNA
レーン9: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン10: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン11: 本組換えダイズ T4世代のゲノムDNA
レーン12: 本組換えダイズCV603系統F4世代のゲノムDNA
レーン13: 本組換えダイズCV603系統F8世代のゲノムDNA
レーン14: 本組換えダイズCV603系統F9世代のゲノムDNA

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

プラスミド pAC321 由来ベクターバックボーンの不在

ダイズへの形質転換に用いた DNA 配列はプラスミド pAC321 由来であるが、本組換えダイズのゲノム中に pAC321 ベクター由来の DNA 配列が存在しないことを確認するために本組換えダイズ CV603 系統 F8 世代を用いてサザンブロット解析を行った。プローブには、pAC321 の配列を特異的に認識するプローブを用いた。

その結果、本組換えダイズのゲノムからは、pAC321 由来の配列は検知されず、本組換えダイズには pAC321 由来の配列が組み込まれなかったことが確認された（23 ページの図 8）。

シロイヌナズナ *Sec61* γサブユニット遺伝子発現解析

本組換えダイズ中でのシロイヌナズナ *Sec61* γサブユニット遺伝子の RT-PCR による発現解析を CV603 系統 F7 世代を用いて行った。

その結果、本組換えダイズにはシロイヌナズナ *SEC61γ*の mRNA が転写されていないことが確認された。さらに、バイオインフォマティクス解析からシロイヌナズナ Sec61 γサブユニット蛋白質配列には、既知のアレルゲンや毒素と相同性のある配列は存在しなかった（24 ページの図 9）。

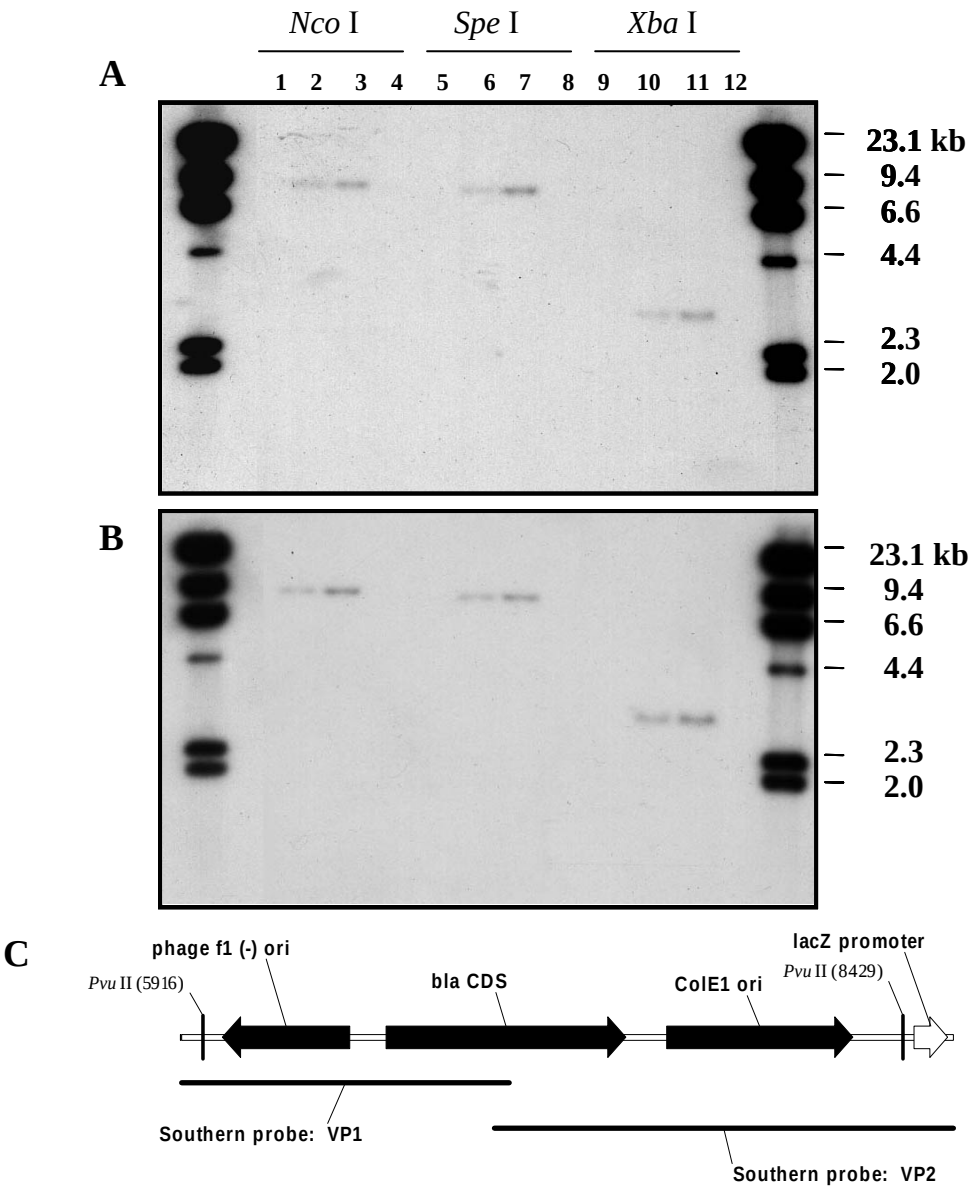


図8. プラスミドpAC321ベクターバックボーンを確認するためのサザンブロット解析

レーン1-4は制限酵素*Nco*I、レーン5-8は*Spe*I、レーン9-12は*Xba*Iで消化した。ブロットのハイブリダイゼーションはプローブVP1(A)、VP2(B)で行った。両端のレーンはλ/*Hind*IIIラダー(サイズはkb)。CにはpAC321配列におけるプローブVP1及びVP2領域を示す。

レーン1:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン2: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン3: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン4:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA
レーン5:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン6: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン7: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン8:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA
レーン9:非組換えダイズのゲノムDNA
レーン10: pAC321の1ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン11: pAC321の2ゲノム当量を加えた非組換えダイズ
レーン12:本組換えダイズCV603系統F8世代ゲノムDNA

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFアグロ㈱にある）

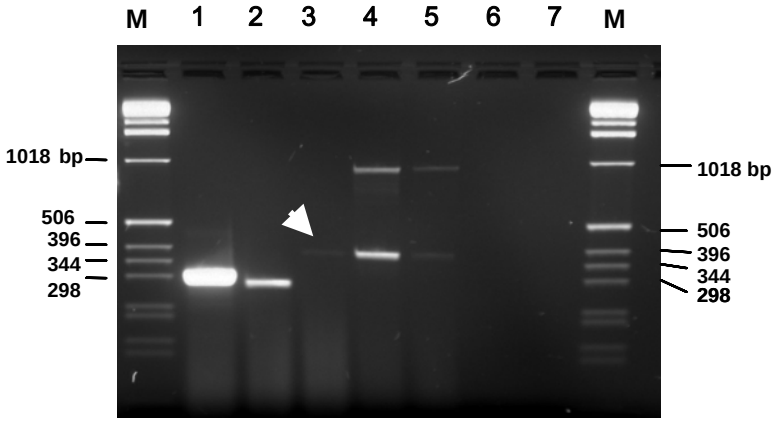


図9. シロイヌナズナ*Sec61* γ遺伝子のRT-PCRによる発現解析
矢印は、シロイヌナズナ*Sec61* γサブユニット（393 bp）に対応する箇所を示しているが、検出されなかった。

レーン1:本組換えダイズCV603系統F7世代を用いてダイズプロテアソーム*IOTA*サブユニット遺伝子を増幅
レーン2:本組換えダイズCV603系統F7世代を用いて内在性ダイズ*Sec61* γサブユニット遺伝子を増幅
レーン3:本組換えダイズCV603系統F7世代を用いてシロイヌナズナ*Sec61* γサブユニット遺伝子を増幅
レーン4:シロイヌナズナの葉を用いてシロイヌナズナ*Sec61* γサブユニット遺伝子を増幅
レーン5:シロイヌナズナの根を用いてシロイヌナズナ*Sec61* γサブユニット遺伝子を増幅
レーン6:テンプレートを入れず、内在性ダイズ*Sec61* γサブユニット特異的プライマーでPCR
レーン7:テンプレートを入れず、シロイヌナズナ*Sec61* γサブユニット特異的プライマーでPCR

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFアグロ㈱にある）

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

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

④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件下での個体間及び世代間での発現の安定性

本組換えダイズの改変 AHAS 蛋白質の発現量を調べるため、CV127 系統 F5 世代を用いて ELISA 試験を行った。なお、本試験に用いた抗体は内在性ダイズ AHAS 蛋白質と改変 AHAS 蛋白質の両方を認識しているため、本組換えダイズ及び非組換えダイズの総 AHAS 蛋白質量を測定した。各 3 個体の成熟期の葉及び種子を、1 個体当たり 0.1g 採取して行い、本試験を合計 3 回行った結果を下記に示した（表 4）。通常、シロイヌナズナの AHAS 蛋白質量は非常に低く、葉においてのみ微量に発現していることがわかっている。本組換えダイズの葉では、総 AHAS 蛋白質を検出したが、種子中の総 AHAS 蛋白質量は本組換えダイズ及び非組換えダイズ両方において定量限界以下であった。

表 4. ダイズの葉及び種子中の総 AHAS 蛋白質量（ng/g 生重）

組織	葉		種子	
	本組換えダイズ	非組換えダイズ	本組換えダイズ	非組換えダイズ
1 回目 総 AHAS 蛋白質量	24	<13*	<13*	<13*
2 回目 総 AHAS 蛋白質量	26	<13*	<13*	<13*
3 回目 総 AHAS 蛋白質量	24	<13*	<13*	<13*

* <;定量限界以下の検出があったことを示す。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

CV127 系統 F4 世代の 2 つのファミリーを用いて、イミダゾリノン系除草剤イマザピル（100g a.i./ha）に対する耐性試験により（16 ページの表 3-2）、本組換えダイズのイミダゾリノン系除草剤耐性の発現を観察した。また、除草剤イマザピル処理による薬害試験を行った（表 5）。その結果、本組換えダイズは 70～140g a.i./ha の除草剤濃度においてイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示した。一方、非組換えダイズは 70g a.i/ha の除草剤濃度でほぼ枯死した。

表 5. 除草剤イマザピル処理による薬害試験結果

	イマザピル処理量 [3] (g a.i./ha)	薬害指数(%)[4]	
		本組換えダイズ [2]	非組換えダイズ [2]
ロンドリナ試験地 [1]	0	0	0
	70	0	90
	140	5.7	95
	280	13.3	97
ポンタグロッサ試験地 [1]	0	0	0
	70	1.7	90
	140	6.7	90
	280	16.7	90
平均値	0	0	0
	70	0.9	90
	140	6.2	92.5
	280	15.0	94.0

1. 試験は 2003 年 1 月から 2 月にかけてブラジルの 2 箇所で実施した。
2. 長さ 8m の畝を 6 畝用いて 1m につき 13 粒の種子を播いた。
3. 播種 20 日後に慣行法により除草剤イマザピルをダイズ上部から茎葉散布した。
4. 薬害は処理後 14 日に達観調査をおこない、0%（無症状）～100%（完全枯死）で評価した。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸配列は、野生動植物等への伝達性はない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本イベント特異的 PCR 法の開発

DNA 隣接配列及びインサート配列から得た情報を用いて本イベント特異的 PCR 法を開発した。設計した 4 組のプライマーのそれぞれ一方は 5'末端隣接配列、もう一方は改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセット内に位置している。表 6 にプライマーの情報を示す。予想 PCR 産物は 212～447bp であった。

全 PCR で本イベント特異的な予想バンドサイズが増幅されたことから、これら 4 組のプライマーを用いて挿入遺伝子を確認できることがわかり、その後の解析に用いている（28 ページの図 10A）。さらに、本イベント特異的プライマーセット「イベント PCR3」を用いた PCR 産物について、6 つの異なる栽培地から収集した本組換えダイズ及び非組換えダイズ Conquista 品種の試料を用いてさらに検証した（28 ページの図 10-B、C）。その結果、本組換えダイズの 24 試料全てで特異的に増幅されたが、コントロールの非組換えダイズ試料では増幅されなかった。これらのことから、特に「イベント PCR3」を用いた本イベント特異的 PCR 法は非常に感度もよく信頼性があると考えられる。

表 6. 本イベント特異的 PCR に用いたプライマーの組み合わせ

名前	方向	プライマー配列	位置（別添資料 1）
イベント PCR1	Forward Reverse	GAAAATAGGAAGTTTAGGCTTG CACTGCTCTTAGCGAAATCTC	1000-1021 1426-1446
イベント PCR2	Reverse Reverse	CACTGCTCTTAGCGAAATCTC GCCGTACGCACAGCTACTTTC	1210-1231 1592-1612
イベント PCR3	Forward Reverse	ATAGGAAAGCGCAAACTG CGAACACTGCTCTTAGCGAAAT	1128-1145 1429-1450
イベント PCR4	Forward Reverse	GCCCTCCTTATTTATCCCCTTA AGGATCGATTGCGGAATCA	1210-1231 1403-1421

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

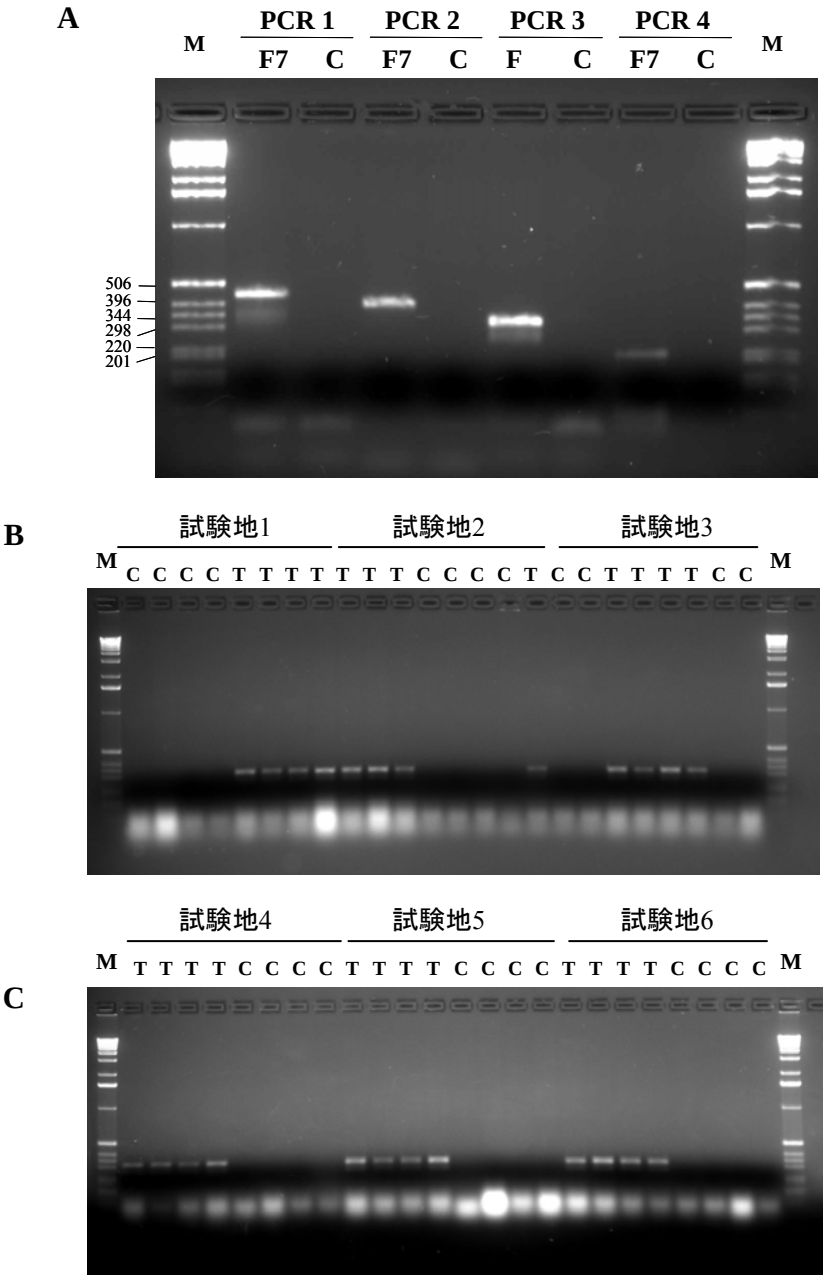


図10.　本組換えダイズイベント特異的PCR法

4組のプライマー（イベントPCR1～4）を本組換えダイズCV603系統F7世代及び非組換えダイズConquista(C)を材料として試験した(図10-A)。さらに、6箇所の試験地の本組換えダイズ(T)及び非組換えダイズConquista(C)各4個体を用いてプライマー「イベントPCR3」の検出感度を確認した(図10-B、C)。

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

通常の植物では、イミダゾリノン系除草剤が AHAS を阻害することで分岐鎖アミノ酸やそれらのアミノ酸を構成要素とする蛋白質が欠乏し、生育できなくなる。一方、改変 *csr1-2* 遺伝子を導入した本組換えダイズは、通常の生合成機能が影響を受けず、イミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示し、正常に生育する特性(9 ページの図 1)を示す。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

本組換えダイズ CV127 系統 F5 あるいは CV127 系統 F6 世代及び非組換えダイズを用いて 2006～2007 年にブラジルの 6 箇所でほ場試験を実施した(表 7)。下記に調査した結果を示す(a～g)。なお、本組換えダイズの越冬性、交雑率及び土壌微生物相に関しては我が国の隔離ほ場試験で調査する予定である。

表7. ブラジルのほ場試験地、播種日、収穫日

ほ場試験地	播種日(2006年)	収穫日(2007年)
サンアントニオ・デ・ポッセ	10月25日	3月16日
ロンドリナ	10月18日	3月14日
ウベラバ	11月21日	3月29日
ブラジリア	11月16日	3月29日
ゴイアニア	11月7日	3月15日
セテラゴアス	9月9日	3月22日

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

a 形態及び生育の特性

本組換えダイズの形態及び生育の特性を調べるために、6 箇所のほ場試験地(表 7)で発芽率、草高、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数、百粒重及び収量に関して調査を行い、合計 4 反復行った。各ほ場試験地の試験結果は別添資料 4 に示した。

その結果、6 箇所全てのほ場試験において、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数及び収量については本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。サンアントニオ・デ・ポッセ試験地では草高について、ゴイアニア試験地では発芽率について本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められた。しかしながら、これら 2 項目については残りの 5 箇所のほ場試験では統計学的有意差は認められなかった。百粒重についてはロンドリナ試験地以外の 5 箇所のほ場で本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められ、本組換えダイズの百粒重は非組換えダイズと比較して大きい値を示した。しかしながら、MG7~9 のダイズの百粒重は 12～22g の範囲であり(Brugnera, 2006)、本組換えダイズの百粒重の値は従来品種の変動範囲を超えるものではなかったと考えられる。

b 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えダイズの生育初期における低温処理の影響について、2007 年にブラジルのロンドリナでチャンバーを用いて調査した。生育初期段階の植物体として 12 時間 30℃の明期、12 時間 22℃の暗期条件下で育てた播種後 14 日目の植物体を用いて、12 時間 10℃の明期、12 時間 1℃の暗期条件下で 2 週間低温処理を行い、14 日目の生長度合い及び草高を調査した。その後、暗期の温度条件を 0℃に変更したチャンバーで 2 週間生育させ、低温処理後 28 日目の生長度合い及び草高を調査した。

その結果、低温処理後 14 日目、28 日目の生長度合い及び草高とも本組換えダイズ及び非組換えダイズとの間で統計学的有意差は認められなかった（表 8）。なお、別添資料図 5-1 に低温処理後 28 日目の生育写真を示した。

表 8. 低温処理における生長度合い及び草高

	生長度合い*		草高(cm) （平均値±標準偏差）		
	本組換えダイズ [1]	非組換えダイズ [1]	本組換えダイズ [1]	非組換えダイズ [1]	P 値 [2]
低温処理前 [3]	5.0	5.0	10.08±0.59	10.15±0.70	0.68
低温処理後 [4] 14 日目	4.0	4.0	10.30±0.89	10.53±0.80	0.30
低温処理後 [5] 28 日目	3.0	3.0	10.60±1.13	10.12±0.93	0.08

1. n=30
2. t検定（両側）
3. チャンバーは 12 時間 30℃の明期、12 時間 22℃の暗期に設定し、播種後 14 日目の植物体を調査した。
4. チャンバーは 12 時間 10℃の明期、12 時間 1℃の暗期に設定した。
5. 低温処理後 14 日目に生長度合い及び草高を調査後、28 日目までチャンバーは 12 時間 10℃の明期、12 時間 0℃の暗期に設定した。

*生長度合いの評価(30 個体の平均値を示している)
評価 1: 枯死
評価 2: 著しい生育遅延及び障害がみられる
評価 3: 軽微な生育遅延及び障害がみられる
評価 4: 葉に黄化がみられるが、生育遅延及び障害はない
評価 5: 正常に生育

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

c 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場試験にて調査する予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換えダイズの花粉の特性を調べるために、本組換えダイズ及び非組換えダイズを用いて、2007 年にブラジルのロンドリナで花粉数、花粉発芽率及び花粉管の長さについて試験を行った。12 時間 28℃の明期、12 時間 20℃の暗期の閉鎖系温室で育てた各 5 個体の花粉数、花粉発芽率(発芽率(%)＝発芽花粉数/花粉数×100)及び花粉管の長さを測定した。

その結果、本組換えダイズと非組換えダイズとの間でこれら 3 項目に関して統計学的有意差は認められなかった(表 9)。

表9. 花粉の調査

	本組換えダイズ[1] (平均値±標準偏差)	非組換えダイズ[1] (平均値±標準偏差)	P 値*
花粉数	8053±387	8093±203	0.84
花粉発芽率(%)[2]	36.3±2.8	35.3±1.8	0.91
花粉管(μm)	103.1±1.9	102.7±1.2	0.70

1. n=5個体

2. 0.45M sucroseを含む培地に葯を入れ、約3時間静かに振とうさせ、花粉の発芽誘導を行った(Satoh, 1998; Uemachi, 2004)。発芽率(%)＝発芽花粉数/花粉数×100

*; t検定(両側)を行った。なお、発芽率については角変換後t検定(両側)を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

aに上述したように、本組換えダイズ種子の生産量と非組換えダイズ種子の生産量との間に統計学的有意差は認められなかった。

表 7 のロンドリナ試験地で 2006 年～2007 年に生育させたダイズから種子を収穫し、収穫後 10 日以内に発芽率を調査した。調査方法は、ブラジル農務省が規定した種子試験法(Brasil, 1992)の操作手順に基づき、50 粒の種子をペーパータオルに包み、25℃でインキュベートし、播種後 5 日目の発芽率を調査した。本試験を 4 反復行った。

その結果、本組換えダイズと非組換えダイズとの間で発芽率に統計学的有意差は認められなかった(表 10)。

表 10. 本組換えダイズ種子の発芽率

	本組換えダイズ[1] (%) (平均値±標準偏差)	非組換えダイズ[1] (%) (平均値±標準偏差)	P 値[2]
発芽率	79.4±11.0	80.1±11.0	1.0

1. n=4 (50 粒の種子を用いて発芽率を調査し、本試験を合計 4 反復行った。)

2. 角変換後 t 検定(両側)を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

f 交雑率

隔離ほ場試験にて調査する予定である。

g 有害物質の産生性

これまでにダイズにおいて他の植物の生育を阻害するような有害物質の産生性は報告されていない。

本組換えダイズの有害物質の産生性を調べるため、すきこみ試験及び後作試験を行った。2007 年にロンドリナ試験地でダイズを栽培後（29 ページの表 7 参照）、それらの植物体をすきこんだ土壌あるいは栽培した土壌を用いてロンドリナでの閉鎖系温室にてダイコン（*Raphanus sativus*）の種子を 100 粒播き、12 時間 28℃の明期、12 時間 20℃の暗期条件下で生育させた。それらの生長度合いを評価し、種子の発芽率、草高、生重量及び乾燥重量を調査した。本試験は合計 4 反復行った。

すきこみ試験

ブラジルのロンドリナ試験地（29 ページの表 7 参照）で栽培した本組換えダイズあるいは非組換えダイズの葉を 60℃の恒温器に 72 時間静置し乾燥させ、細かく刻んだものを 10%（vol/vol）すきこんだ土壌を使用した。

その結果、本組換えダイズ区と非組換えダイズ区との間で生長度合いに差はなく、発芽率、草高、生重及び乾燥重において統計学的有意差は認められなかった（表 11）。

表 11. すきこみ試験

播種後日数	調査項目	本組換えダイズ区 [1] (10%) （平均値±標準偏差）	非組換えダイズ区 [1] (10%) （平均値±標準偏差）	P 値 [2]
7 日目	発芽率(%)	95.8±3.3	95.3±3.3	0.92
14 日目	生長度合い*	5.0	5.0	-
	草高(cm)	10.1±0.8	10.4±0.7	0.60
28 日目	生長度合い*	5.0	5.0	-
	生重(g)	137.3±22.6	130.3±20.8	0.66
	乾燥重(g)	7.6±1.9	7.5±2.3	0.95

1. n=4 (ダイコンの種子を 100 粒播き、閉鎖系温室にて 12 時間 28℃の明期、12 時間 20℃の暗期条件下で生育させた。本試験を合計 4 反復行った。)
2. t検定（両側）を行った。なお、発芽率については角変換後 t 検定（両側）を行った。

*生長度合いの評価（16 個体の平均値を示している）
評価 1: 枯死
評価 2: 著しい生育遅延及び障害がみられる
評価 3: 軽微な生育遅延及び障害がみられる
評価 4: 葉に黄化がみられるが、生育遅延及び障害はない
評価 5: 正常に生育

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある）

後作試験

ブラジルのロンドリナ試験地で(29 ページの表 7 参照)栽培した本組換えダイズあるいは非組換えダイズを生育させた土壌を回収し、植物残渣を除いた後、ふるいにかけた土壌を使用した。

その結果、後作試験において本組換えダイズ区の播種後 7 日目のダイコンの発芽率が若干低かったものの(表 12)、本組換えダイズ区と非組換えダイズ区との間で生長度合いに差はなく、発芽率、草高、生重及び乾燥重において統計学的有意差は認められなかった。

表 12. 後作試験

播種後日数	調査項目	本組換えダイズ区[1] (平均値±標準偏差)	非組換えダイズ区[1] (平均値±標準偏差)	P 値[2]
7 日目	発芽率(%)	84.5±5.1	90.0±5.6	0.63
14 日目	生長度合い*	5.0	5.0	-
	草高(cm)	10.3±1.1	10.7±1.2	0.64
28 日目	生長度合い*	5.0	5.0	-
	生重(g)	97.3±27.7	104.7±21.2	0.69
	乾燥重(g)	5.8±2.3	6.85±0.5	0.43

1. n=4 (ダイコンの種子を 100 粒播き、閉鎖系温室にて 12 時間 28℃の明期、12 時間 20℃の暗期条件下で生育させた。本試験を合計 4 反復行った。)
2. t検定(両側)を行った。なお、発芽率については角変換後 t 検定(両側)を行った。

*生長度合いの評価(16 個体の平均値を示している)
評価 1: 枯死
評価 2: 著しい生育遅延及び障害がみられる
評価 3: 軽微な生育遅延及び障害がみられる
評価 4: 葉に黄化がみられるが、生育遅延及び障害はない
評価 5: 正常に生育

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ㈱にある)

なお、すきこみ試験、後作試験のダイコン生育画像を別添資料5-図2に示した。また、我が国の隔離ほ場試験においてはすきこみ、後作試験に加え土壌微生物相への影響も調査予定である。

3　　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

（1） 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

（2） 使用等の方法

所在地:　　茨城県つくば市観音台三丁目1番地3
名称:　　独立行政法人　農業環境技術研究所隔離ほ場
使用期間:　　承認日から平成 22 年 3 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ところに掲げている。
（3） 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えダイズの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ダイズの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
（4） 栽培試験区には、食害を防止するための防鳥網を設置する。花粉の飛散を防止するための防風林を設置している。

2. 隔離ほ場での作業要領

（1） 本遺伝子組換えダイズ及び比較対照のダイズ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
（2） 本遺伝子組換えダイズを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ダイズが漏出しない構造の容器に入れる。
（3） (2)により運搬又は保管する場合を除き、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こむことにより、確実に不活化する。
（4） 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えダイズが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
（5） 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
（6） (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
（7） 別に定めるモニタリング実施計画に基づき、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、独立行政法人農業環境技術研究所の隔離ほ場内地図を別添資料 6 として示した。

(3) 承認をう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

「モニタリング計画書」を参照。

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

「緊急措置計画書」を参照。

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

―

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズの国外及び国内における使用等に関する情報をそれぞれ表 13 及び表 14 に示した。

表 13. 国外における使用等に関する情報
[社外秘情報につき非開示]

表 14. 国内における使用等に関する情報
[社外秘情報につき非開示]

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価

1　　競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定

第一の 1 で述べたように、ダイズが自然環境において国内外で自生したという報告はなく、2006 年の USDA の有害雑草リストにダイズは含まれていない。

第一の 2 の(6)で述べたとおり、2006～2007 年にブラジルの 6 箇所のほ場(29 ページの表 7)で形態及び生育の特性（発芽率、草高、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数、百粒重及び収量）に関して調査した。その結果、6 箇所全てのほ場試験において、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数及び収量について本組換えダイズと非組換えダイズとの間には、統計学的有意差は認められなかった。なお、サンアントニオ・デ・ポッセ試験地では草高について、ゴイアニア試験地では発芽率について本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められた。しかしながら、草高及び発芽率については残りの 5 箇所のほ場試験では統計学的有意差は認められなかった。また、ブラジルの従来品種の草高は 55～120 cm、発芽率は 78～95%であり、これらの項目における差異は、従来品種の変動範囲内であった（Brugnera, 2006:MG8 に相当）。百粒重についてはロンドリナ試験地以外の 5 箇所のほ場で本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められ、本組換えダイズの百粒重は非組換えダイズと比較して大きい値を示した。しかしながら、ブラジルのダイズ栽培品種の百粒重は 12～22g の範囲であり（Brugnera, 2006:MG8 に相当）、本組換えダイズの百粒重の値は従来品種の変動範囲を超えるものではなかった。

一方、2006～2007 年にロンドリナ試験地で生育初期における低温耐性、花粉数、花粉発芽率、花粉管の長さ及び種子の発芽率を調査した結果、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。以上のことから、本組換えダイズの形態及び生育特性に関する形質は、百粒重が大きい値を示すものの非組換えダイズと同程度であると考えられ、本形質が競合における優位性に影響を与えるとは考えにくい。

本組換えダイズは、イミダゾリノン系除草剤耐性を有するが、この除草剤が自然条件下で散布されることは想定されにくく、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上のことから、本組換えダイズを第一種使用規程に従って隔離ほ場で栽培するにあたり、競合における優位性に関して影響を受ける野生植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

―

(3) 影響の生じやすさの評価

―

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、競合における優位性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定

第一の 1 の(2)で述べたとおり、ダイズは古くから国内外で栽培されている作物であり、ダイズが生物多様性に影響を与える有害物質を産生することは知られていない。

第一の 2 の(1)で述べたとおり、本組換えダイズは、イミダゾリノン系除草剤に耐性を示す改変 AHAS 蛋白質を産生する。本蛋白質が有害物質であるという報告はなく、本蛋白質が分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）生合成経路の第 1 段階を触媒することにより、ダイズ種子中のアミノ酸組成において非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった(11 ページの表 2)。したがって、本組換えダイズ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

本組換えダイズの有害物質の産生性を検証するために 2007 年にブラジルのロンドリナ試験地ですきこみ試験及び後作試験を行った。その結果、すきこみ試験では、本組換えダイズ区と非組換えダイズ区との間にダイコンの生長度合いの評価に差は認められず、草高、生重量及び乾燥重量に統計学的有意差は認められなかった。後作試験では本組換えダイズ区の播種後 7 日目のダイコンの発芽率が若干低かったものの、その後の生長度合い評価では差はなく、すきこみ試験と同様に全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。これらの結果から、有害物質の産生性において、本組換えダイズは非組換えダイズとの間に差異はないと考えられる。

以上のことから、第一種使用規程に従って隔離ほ場で栽培するにあたり、本組換えダイズが有害物質を産生する可能性は低く、影響を受ける可能性のある野生植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

―

(3) 影響の生じやすさの評価

―

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、有害物質の産生性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

3　　交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生植物等の特定

第一の 1、(3)の繁殖又は増殖の様式で述べたとおり、ダイズと交雑可能な近縁野生種として、ダイズの祖先と考えられるツルマメ(*Glycine soja*)が挙げられる。ツルマメは我が国に広く分布していることがわかっている。

(2) 影響の具体的内容の評価

本組換えダイズとツルマメが交雑することにより、雑種を形成し、ツルマメの生存、維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

本組換えダイズにおけるツルマメとの交雑率及び同種間の交雑率の調査は行っていないが、これまでに独立行政法人農業環境技術研究所においてダイズとツルマメとの交雑性が調べられている(農業環境技術研究所研究成果第 23 集, 2006)。2005 年に組換えダイズ(除草剤グリホサート耐性ダイズ)にツルマメをからませ(混植区)、植えつけ時期を調節することにより両者の開花最盛期を近づけ交雑率を検定した結果、検定種子数 32,502 粒中、自然交雑したのは 1 粒であったと報告されている。また、一般的なダイズ品種と比較して開花期が遅く、我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ(Gls/93-J-01)を 50 cm 間隔(鉢の中心から隣接鉢の中心間との距離)で交互に各 30 個体配置し(5×12 列)、ダイズとツルマメとの自然交雑率が調べられている(Nakayama and Yamaguchi, 2002)。その結果、得られたツルマメの後代 686 個体中、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体確認され、交雑率の平均値は 0.73%であったと報告されている。我が国ではツルマメは畑の周辺等にも自生しているが、一般的にダイズの開花期はツルマメより早く(Nakayama and Yamaguchi, 2002)、開花期が重なりにくいと考えられている。一方、ツルマメ同種間の交雑率は、訪花昆虫が多く観察された自然条件下では、平均値 13%であったとの報告がある(Fujita, 1997)。

仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は改変*csr1-2* 遺伝子を有することにより、イミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示すことが予想される。しかしながら、自然条件下で本除草剤が散布されることは想定されにくく、競合における優位性を高めるとは考えにくい。従って、ツルマメ集団中に本遺伝子が拡散していく可能性も低いと考えられる。

以上のことから、ダイズとツルマメとの交雑は起こりうるものの、我が国においてダイズとツルマメとの開花期が重なり合い、さらにこれらが隣接して生育するような特殊な条件以外での自然条件下では、ダイズとツルマメとの交雑は起こりにくいと考えられる。また、ダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種後代が自然条件に適応し、競合における優位性を高め、野生生物を駆逐する可能性は低いと考えられる。

(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、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、交雑性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。なお、本組換えダイズの同種間の交雑率に関しては隔離ほ場で調査する予定である。また、第一種使用規程承認組換え作物

栽培実験指針による交雑防止措置に従って、同種栽培作物と 10m 以上隔離する予定である。

4　その他の性質

―

第三　生物多様性影響の総合的評価

ダイズは古くから栽培されている作物の 1 つであり、我が国において生物多様性に影響を与えたという報告はない。

本組換えダイズの競合における優位性に影響を与えると考えられる特性（発芽率、草高、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数、百粒重及び収量）について、ブラジルの 6 箇所のほ場において調査を行った結果、6 箇所全てのほ場試験において、完全開花期までの日数、完全成熟期までの日数及び収量について本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。なお、6 箇所のほ場のうち 1 箇所のほ場では草高について、別の 1 箇所のほ場では発芽率について本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたが、これら 2 項目は他のほ場では統計学的有意差は認められず、宿主の変動範囲内であった。また、百粒重については 6 箇所のうち 5 箇所のほ場で本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められ、本組換えダイズの百粒重は非組換えダイズと比較して大きい値を示した。しかしながら、本組換えダイズの百粒重の値は従来品種の変動範囲を超えるものではなかった。一方、生育初期における低温耐性、花粉数、花粉発芽率、花粉管の長さ及び種子の発芽率を調査した結果、本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。以上のことから、本組換えダイズの形態及び生育特性に関する形質については、百粒重が大きい値を示すものの、その値は従来品種の変動範囲内であったことから非組換えダイズと同程度であると考えられた。また、本組換えダイズは、イミダゾリノン系除草剤耐性を有するが、自然条件下でこの除草剤が散布されることは想定されにくく、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上のことから、本組換えダイズの競合における優位性は従来のダイズと同程度と考えられ、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、競合における優位性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

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。

本組換えダイズ中で産生される改変 AHAS 蛋白質は、これまでに有害物質であるという報告はなく、ダイズ種子中でのアミノ酸組成において本組換えダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。また、すきこみ試験及び後作試験を行った結果、全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。これらの結果から、有害物質の産生性に関し、本組換えダイズは非組換えダイズとの間に差異はないと考えられる。

以上のことから、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、有害物質の産生性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

ダイズは基本的に自殖性植物であるが、我が国に広く分布しており、交雑の可能性がある野生植物としてツルマメが特定された。独立行政法人農業環境技術研究所によると（農業環境技術研究所研究成果第 23 集, 2006）、2005 年に組換えダイズ（除草剤グリホサート耐性ダイズ）にツルマメをからませ（混植区）、植えつけ時期を調節することにより両者の開花最盛期を近づけ交雑率を検定した結果、検定種子数 32,502 粒中、自然交雑したのは 1 粒であったと報告されている。また、一般的なダイズ品種と比較して開花期が遅く、我が国固有の栽培品種である丹波黒とツルマメ(Gls/93-J-01)を 50 cm 間隔（鉢の中心から隣接鉢の中心間との距離）で交互に各 30 個体配置し（5×12 列）、ダイズとツルマメとの自然交雑率が調べられている（Nakayama and Yamaguchi, 2002）。その結果、得られたツルマメの後代 686 個体中、ダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体確認され、交雑率の平均

値は 0.73%であったと報告されている。我が国ではツルマメは畑の周辺等にも自生しているが、一般的にダイズの開花期はツルマメより早く（Nakayama and Yamaguchi, 2002）、開花期が重なりにくいと考えられている。一方、ツルマメ同種間の交雑率は、訪花昆虫が多く観察された自然条件下では、平均値 13%であったとの報告がある(Fujita, 1997)。

仮に、本組換えダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種は改変*csr1-2* 遺伝子を有することにより、イミダゾリノン系除草剤に対して耐性を示すことが予想される。しかしながら、自然条件下で本除草剤が散布されることは想定されにくく、競合における優位性を高めるとは考えにくい。従って、ツルマメ集団中に本遺伝子が拡散していく可能性も低いと考えられる。

以上のことから、ダイズとツルマメとの交雑は起こりうるものの、我が国においてダイズとツルマメとの開花期が重なり合い、さらにこれらが隣接して生育するような特殊な条件以外での自然条件下では、ダイズとツルマメとの交雑は起こりにくいと考えられる。また、ダイズとツルマメが交雑した場合、その雑種後代が自然条件に適応し、野生生物を駆逐する可能性は低いと考えられる。

したがって、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、交雑性に関して生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

以上を総合的に評価し、本組換えダイズの第一種使用規程に従っ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内で、本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えることはないと結論付けられた。

引用文献

Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., J. C. Sanford, J. C., Faria, J. C., and Rech, E. L. (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean *(Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theor. Appl. Genet. 93:142-150.

Bernard, R.L. and Weiss, M.G. (1973) Qualitative Genetics: Soybeans, Production and Uses. B.E. Caldwell (ed.), Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp. 117-154.

Boerma, H. R. and Specht, J. E. (2004), Reproductive morphology. In: Soybeans: Improvement, production, and uses. Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA pp. 59-95.

Boerma, H. R. and Specht, J. E. (2004), Speciation and cytogenetics. In: Soybeans: Improvement, production, and uses. Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 97-136.

BRASIL. (1992) Ministério da Agricultura. Regras para análise de semente. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 365p.（ブラジル農務省. 種子試験法）

Brasileiro, A. C. M., Tourneur, C., Lepre, J. C., Combes, V., and Jouanin, L. (1992) Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. Transgenic Research. 1: 133-141.

Brugnera, A., Lopes, P. V. L., Porazzi, L. A., and Oliveira, E. R. (2006) Competição de cultivares de soja avaliados em diferentes regiões do cerrado safra 2005/2006. Fundação BA. pp. 1-5.（2005-2006 年のブラジルのさまざまな地域でのダイズ栽培品種の特性について）

Caviness, C.E. (1966) Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. Crop Sci. 6:211. http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/chap4/soy.html.

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

Garner, W. W. and Allard, H. A. (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction of plants. J. Agric. Res. 18:553-606.

Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T. A. (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. Nature. 367:654-657.

Haughn, G. E. and Somerville, C. (1986) Sulfonylurea-resitant mutants of *Arabidopsis thaliana.* Mol. Gne. Genet. 204: 430-434.

Haughn, G. E. and Somerville, C. (1990) A mutation causing imidazolinone resitance maps to the *csr1* locus of *Arabidopsis thaliana.* Plant Physiol. 92: 1081-1085.

Hymowitz, T. and Newell, C.A. (1981) Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. Econ. Bot. 37: 371-379.

Johnson, R.R. (1987) Crop management. In: Soybeans: Improvement, production, and uses, 2nd edition, J.R. Wilcox (ed.), pp. 355-390, Agron. Monogr. 16. ASA, CSSA, and SSSA Publishers, Madison, WI, USA.

Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73.

Lee, L., Laramore, C. L., Day, P. R., and Tumer, N. E. (1996) Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts. Crop science 36: 401-406.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nakayama, Y. and Yamaguchi, H. (2002) Natural hybridaization 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.

Newhouse, K.E., Smith, W.A., Starrett, M.A., Schaefer, T.J. and Singh, B.K. (1992) Tolerance of imidazolinone herbicides in wheat. Plant Physiol. 100:882-886.

OECD (2000) Organization for Economic Cooperation and Development, Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. ENV/JM/MONO(2000)9. http://www.oecd.org.

Pang, S.S., Duggleby, R.G., and Guddat, L.W. (2002) Crystal Structure of Yeast Acetohydroxyacid Synthase: A Target for Herbicidal Inhibitors J. Molec. Biol. 317:249-262.

Sanford, J.C., Smith, F.D., and Russell, J.A. (1993) Optimizing the biolistics process for different biological applications. Methods Enzymol. 217:483-509.

Sathasivan, K., Haughn, G. W., and Murai, N. (1990) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. Nucl. Acids Res. 18:2188.

Sato, S., Katoh, N., Iwai, S., and Hagimori, M. (1998). Establishment of reliable methods of *in vitro* pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). Euphytica. 103:29-33.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988). A bateriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. Nucl. Acids Res. 16:7583-7600.

Smith, K. and Huyser, W. (1987) World distribution and significance of soybean. In: Soybeans: Improvement, production, and uses, 2nd edition, J.R. Wilcox (ed.), pp. 1-22, Agron. Monogr. 16. ASA, CSSA, and SSSA Publishers, Madison, WI, USA.

Soy Stats (2007) A website with worldwide soybean production, use, and export information. American Soybean Association. http://www.soystats.com.

Spackman, D.H., Stein W.H., and Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1190-1206.

Spies, J.R. (1967) Determination of tryptophan in proteins. Anal. Chem. 39:1412-1416.

Stidham, M.A. and Singh, B.K. (1991) Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. *In*: The imidazolinone herbicides. Chapter 6; D. Shaner and S. O'Connor (eds.). pp. 71-90, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Uemachi, T., Kato, Y., and Nishio, T. (2004). Comparison of decorative and non-decorative flowers in *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. Scientia Horticulaturae 102:325-334.

USDA Federal Noxious Weed List (as of June 30, 2006). http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/weeds/downloads/weedlist2006.pdf

Varco, J.J. (1999) Nutrition and fertility requirements. In: Soybean production in the mid-south. L.G. Heatherly and H.F. Hodges (eds.), pp. 53-70. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Wesley, R.A. (1999) Double cropping wheat and soybeans. In: Soybean production in the mid-south. L.G. Heatherly and H.F. Hodges (eds.), pp. 157-170. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Wilcox, J.R. (2004) World distribution and trade of soybean. In: Soybeans: Improvement, production, and uses, 3rd edition, H.R. Boerma and J.E. Specht (eds.), pp. 1-14, Agron. Monogr. 16. ASA, CSA, and SSSA Publishers, Madison, WI, USA.

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

新編農学大事典. 山崎耕宇 久保祐雄 西尾敏彦 石原 邦監修. (2004). 466-475. 株式会社養賢堂発行.

独立行政法人農業環境技術研究所研究成果 平成 18 年度(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. 23: 22-23.

農林水産省、食料需給表. http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/index.html

モニタリング計画書

平成 20 年 3 月 11 日

氏名　BASFアグロ株式会社
代表取締役社長　ハンス･ヨアヒム･ローエ
住所　東京都港区六本木一丁目4番30号
六本木 25 森ビル 23 階

イ. 実施体制及び責任者

現時点での実施体制及び責任者は表 1 に示すとおりである。

表 1. モニタリング実施体制（平成 20 年 3 月現在）

氏名	所属機関･職名
*	BASF アグロ株式会社　開発登録本部
	BASF アグロ株式会社　開発登録本部
	BASF アグロ株式会社　開発登録本部
	BASF アグロ株式会社　開発登録本部

*　管理責任者

ロ. 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*）

ハ. 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 10 m[注)]の範囲内においてモニタリングを実施する。

注）農林水産省　第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針（改正後）を参照。

ニ. モニタリングの期間

本組換えダイズの栽培期間中に実施する。

ホ. 実施機関、頻度その他のモニタリングの方法

1) 本組換えダイズの栽培期間中に、隔離ほ場周辺 10 m 以内でのツルマメの生育の有無を調べる。
2) 隔離ほ場周辺 10 m 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、ツルマメ 1 集団あたり最低 50 粒の種子をサンプリングする。
3) 1）により、ツルマメの生育が認められない場合は、さらに隔離ほ場から 50 m 内調査可能な範囲において 2）と同様の作業を行う。

4) 採取した種子を播種し、発芽後約 3 週間後にイミダゾリノン系除草剤を散布することにより、改変 *csr1-2* 遺伝子がツルマメに移行しているかについて解析する。

ヘ. モニタリング結果の解析方法

交雑検定結果をもとに、本組換えダイズとツルマメとの距離による自然交雑率を調べる。

ト. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリング及びその解析結果は、「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」における第一種使用規程の最終申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

チ. その他必要な事項

モニタリング期間中に採取されたツルマメ中に本組換えダイズとの交雑によって、当該遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

なお、独立行政法人農業環境技術研究所組換え体隔離ほ場周辺は、土壌生成調査実験ほ場、農薬試験果樹園、生態系保存実験ほ場となっている。別添資料 7 として隔離ほ場周辺配置図及び、別添資料 6 として隔離ほ場内地図を示した。

緊急措置計画書

平成 20 年 3 月 11 日

氏名　BASF アグロ株式会社
代表取締役社長　ハンス・ヨアヒム・ローエ

住所　東京都港区六本木一丁目4番 30 号
六本木 25 森ビル 23 階

第一種使用規程の承認を申請しているイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)。以下「本組換えダイズ」という) の第一種使用において、生物多様性影響が生じる可能性が示唆された場合、当社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、危険性を軽減する方法の決定に対する協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性やそれが起こり得る確率から判断して、生物多様性影響が生じる危険性があると科学的に判断された場合には、当該影響を効果的に抑制するため、特定された問題に応じて以下のことを行う。

1.　第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

社内に緊急措置に対応するために速やかに危機対策本部を設置する。以下のメンバーで構成する(平成 20 年 3 月現在)。

役割	氏名 (所属)	会社名
		BASF アグロ株式会社
		BASF ジャパン株式会社
		BASF アグロ株式会社
		BASF アグロ株式会社
		BASF アグロ株式会社
		BASF アグロ株式会社
		BASF アグロ株式会社
		BASF アグロ株式会社

危機対策本部は、栽培実験責任者、栽培実験者及び本組換えダイズの開発者である BASF プラントサイエンス社との円滑な連絡確保に努める。

2.　第一種使用等の状況把握方法

第一種使用等を行っている栽培実験者と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報の収集を行う。

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

本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に確認された場合には、国内においては、栽培に従事している担当者及び隔離ほ場施設の担当窓口に連絡を取り、口頭又は文書で緊急措置の内容を伝える。必要に応じて、自社ウェブサイト等のメディアを通じて一般に通知する。また、BASF プラントサイエンス社の緊急連絡体制ネットワークを通じて諸外国の関係する団体及び個人に連絡を行う。

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

本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に確認された場合には、直ちに栽培実験を中止する。すきこみや焼却によって本組換えダイズを不活化し、隔離ほ場内から外部に拡散させないための措置をとる。

また、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ拡散していないこと等を確認する等の必要な措置を講じる。

5.　農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

本組換えダイズが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に確認された場合には、速やかに危機対策本部事務局より農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ(改変 *csr1-2, Glycine max* (L.) Merr.)
(CV127, OECD UI: BPS-CV127-9)
別添資料一覧

別添資料 1. 改変 *csr1-2* 遺伝子発現カセットを含むインサート及び隣接ダイズゲノム DNA 塩基配列 [社外秘情報につき非開示]

別添資料 2. 改変 AHAS のアミノ酸配列 [社外秘情報につき非開示]

別添資料 3. サザンブロット分析方法 [社外秘情報につき非開示]

別添資料 4. ブラジル 6 箇所のほ場試験結果 [社外秘情報につき非開示]

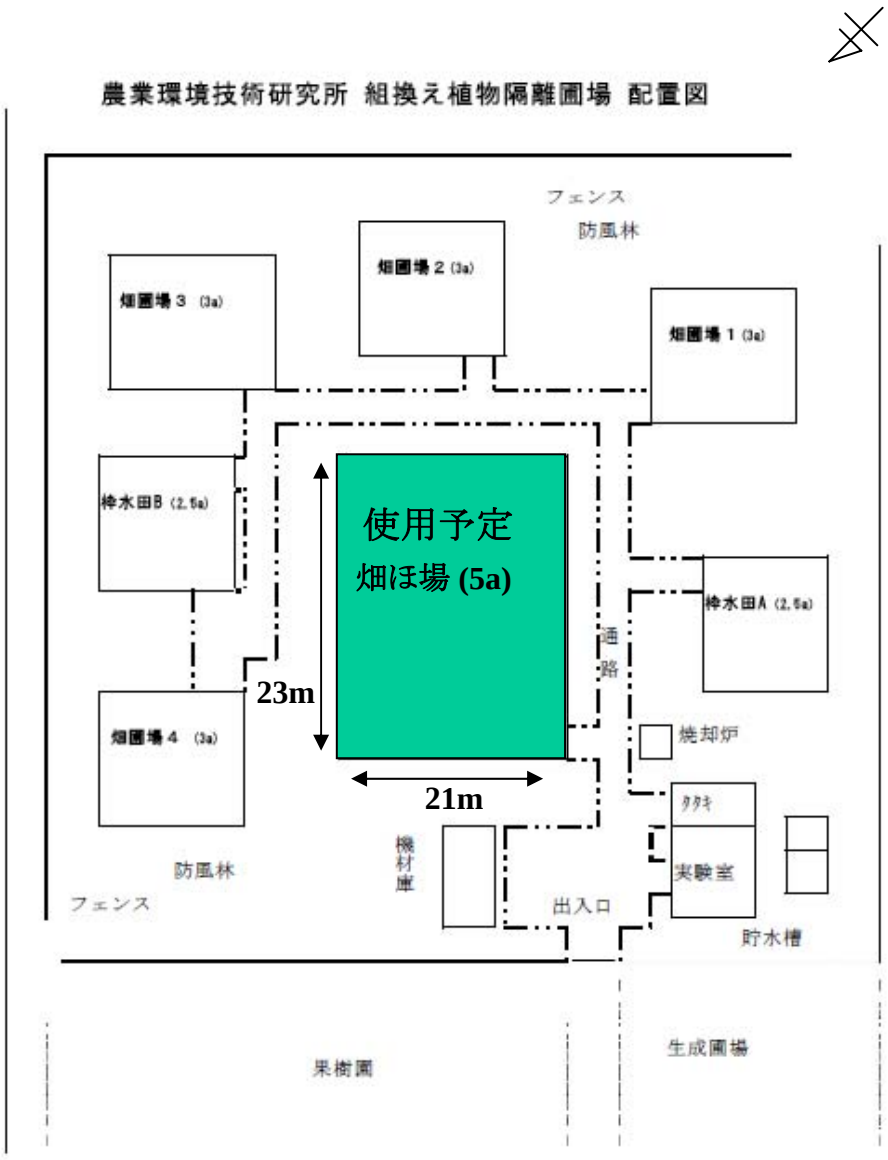
別添資料 5. 低温処理による生育写真及び播種後 28 日目におけるダイコン生育写真 [社外秘情報につき非開示]

別添資料 6. 独立行政法人農業環境技術研究所 隔離ほ場内地図

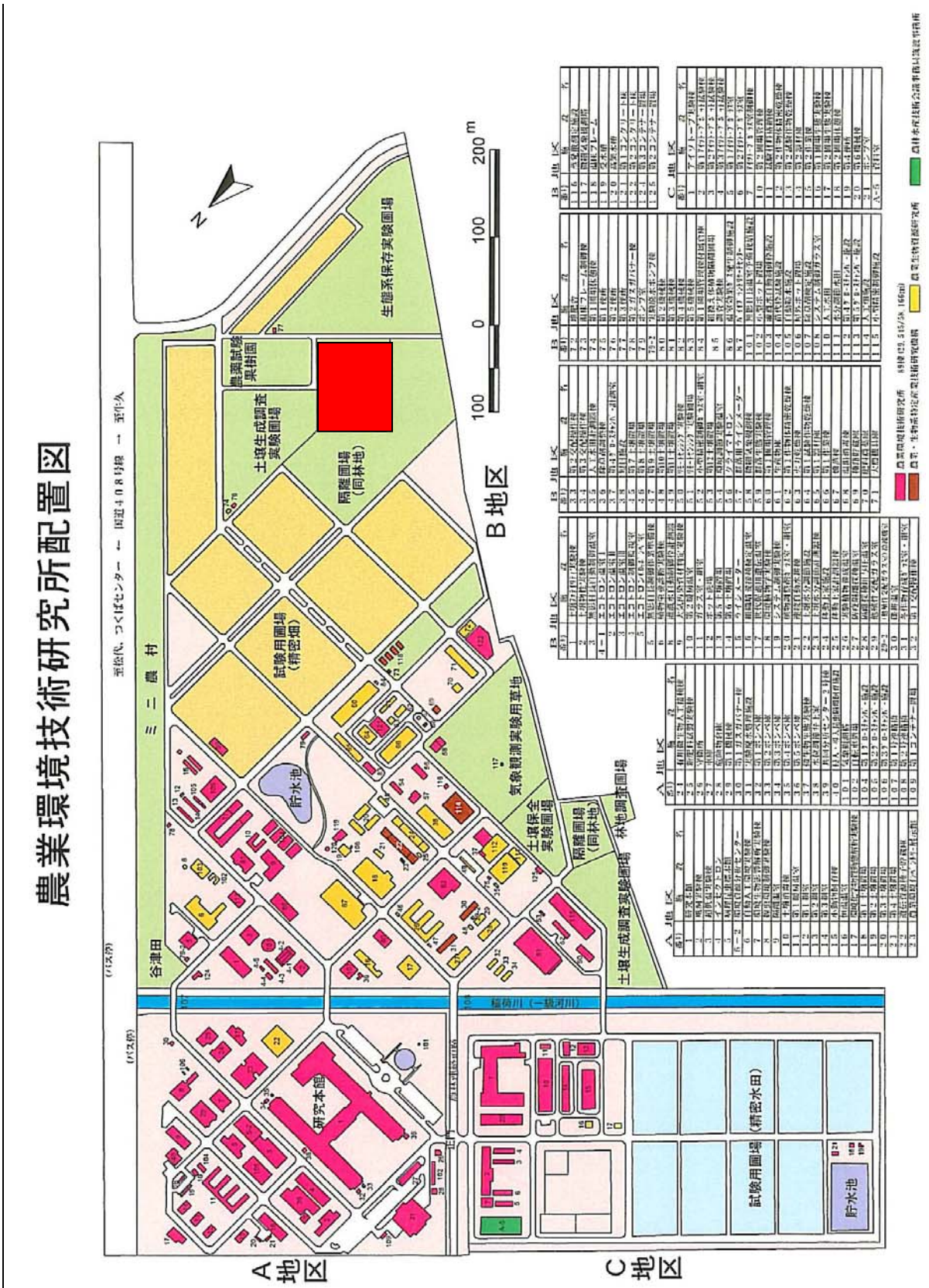
別添資料 7. 独立行政法人農業環境技術研究所 配置図

別添資料 6. 独立行政法人 農業環境技術研究所 隔離ほ場内地図

- 使用予定のほ場を緑で示した(5a:21m×23m)。
- 本隔離ほ場は部外者の立ち入りを防止するために、8,178m^2 の隔離ほ場の外周を囲むように高さ 2m20cm(土中に 62cm の隔壁埋め込み)のフェンスを設置している。
- フェンスの周りには防風林を設置している。



Atsec61

別添資料 7. 独立行政法人 農業環境技術研究所配置図

別添資料 6 の隔離ほ場全体(8,178m^2)を赤で示した。