

除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.)
(MON87708, OECD UI : MON-87708-9) 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.....	3
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 宿主の品種名又は系統名.....	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.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
イ 基本的特性.....	5
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.....	6
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	6
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性.....	6
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じる特性を有する場合はその程度.....	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	8
ホ 病原性.....	8
ヘ 有害物質の産生性.....	8
ト その他の情報.....	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	9
(1) 供与核酸に関する情報.....	10
イ 構成及び構成要素の由来.....	10
ロ 構成要素の機能.....	11
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.....	11
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	16
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	21
(2) ベクターに関する情報	30
イ 名称及び由来	30
ロ 特性	30
① ベクターの塩基数及び塩基配列	30
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	30
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	31
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	31
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	31
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	31
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	31
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	31
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	31
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	32
(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	34
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	34
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	36
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	38
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	38
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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	40
(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	40
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	40

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	40
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.....	40
	a 形態及び生育の特性	41
	b 生育初期における低温又は高温耐性.....	41
	c 成体の越冬性又は越夏性.....	41
	d 花粉の稔性及びサイズ	42
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	42
	f 交雑率.....	43
	g 有害物質の産生性	43
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	44
(1)	使用等の内容.....	44
(2)	使用等の方法.....	44
(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.....	44
(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.....	44
(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.....	44
(6)	国外における使用等に関する情報	44
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	46
1	競合における優位性.....	46
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	46
(2)	影響の具体的内容の評価	47
(3)	影響の生じやすさの評価	47
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	47
2	有害物質の産生性.....	47
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	47
(2)	影響の具体的内容の評価	50
(3)	影響の生じやすさの評価	50
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	50
3	交雑性.....	51
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	51
(2)	影響の具体的内容の評価	51

(3) 影響の生じやすさの評価	51
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	54
4 その他の性質	54
第三 生物多様性影響の総合的評価	55
参考文献	57
緊急措置計画書	65
除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 <i>dmo</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(MON87708, OECD UI : MON-87708-9) の別添資料リスト	68

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 10 月 13 日

農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 細野 豪志 殿

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

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

遺伝子組換え生物 等の種類の名称	除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 <i>dmo</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87708, OECD UI : MON-87708-9)
遺伝子組換え生物 等の第一種使用等 の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、 運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物 等の第一種使用等 の方法	—

生物多様性影響評価書

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

① 和名、英名及び学名

10

和名：ダイズ

英名：soybean

学名：*Glycine max* (L.) Merr.

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3525 である。

③ 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ほかに、野生種として *G. soja* (和名：ツルマメ) や *G. gracilis* も含まれる (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あるいは *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 (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1975)。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、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端に自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1975; 大橋, 1999)。

25

30

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)。

35

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ダイズの起源地域は中国東北部で、紀元前 1100 年頃にこの地域で栽培化されたと推定され、その後、中国南部、東南アジア、朝鮮及び日本へ栽培が広がったと考えられる (昆野, 1987)。わが国へは弥生時代に渡来、栽培が始まったと考えられている (山内ら, 1992)。

5

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2009 年の全世界におけるダイズの栽培面積は約 9,937 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,091 万 ha、ブラジルが約 2,175 万 ha、アルゼンチンが約 1,677 万 ha、インドが約 979 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2009 年のわが国における栽培面積は約 14.5 万 ha であった (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/567/Default.aspx#anchor>)。

2010 年のわが国におけるダイズの輸入量は約 346 万トンであり、そのうちの約 71%が米国から輸入されている (財務省貿易統計、<http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm>)。2009 年におけるダイズの国内生産量は約 23 万トンであり、国内消費仕向量^[1] は約 367 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 11.5 万トン、種子用が約 0.7 万トン、加工用 (ダイズ油・脱脂ダイズ・味噌・醤油用) が約 265.5 万トン、減耗量^[2] が約 6.8 万トン、食品用^[3] が約 82.3 万トンとなっている (農林水産省「平成 21 年度食料需給表」、<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fbs-fy21d.pdf>)。

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

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

^[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。2009 年は、輸出量は約 0 万トン、在庫は約 5 万トン減であったため、 $23+339-0+5=367$ (万トン) が国内消費仕向量となる。

^[2] 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。

^[3] 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。

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、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)。

5

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

10 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し、ある時間以上の暗期が花芽分化に必要で、温度は 15°C 以上を必要として 25°C 前後までは高いほど促進的に働き、短日高温では促進効果が大きい、長日高温では促進効果がないか、かえって遅れることがある (昆野, 1987)。

20

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

25 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、生育期間中 18~28°C 程度、多照で適度の降雨のあることが望ましいとされているが、今日のダイズ品種では日長感受性が細かく分化して各種の気候に対する適応性が高くなっており、赤道直下のインドネシアから北緯 60°のスウェーデンでも栽培可能である (昆野, 1987)。

30 遺伝子導入に用いた宿主である A3525 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 III) に分類される (Graphic Maps, 2008; Wiebold, 2002)。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の日長時間は約 15 時間である (Lammi, 2008)。

35 なお、わが国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されていない。

ハ 捕食性又は寄生性

—

5

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

10 ダイズの種子は裂莢した際に地表に落下する。わが国で栽培されるダイズの裂莢性には品種間差があるが、ダイズが大規模に栽培され、収穫が機械化されている米国などでは、ほとんどの品種が難裂莢性であり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 A3525 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)。

15

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

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

20

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じる特性を有する場合はその程度

25

30 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 (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1975; (OECD, 2000)。ツルマメは北海道、本州、四国、九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1975; 大橋, 1999)。

30

35 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より 800

35

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、その生育する範囲はかなり限られていることが予想される。

- 5 ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯し、受粉が完了する。さらに、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、通常のは場条件で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。

- 15 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、ダイズ間の他家受粉率については、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズは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、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。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、あるいは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事などによる環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメの集団の周辺では花粉を媒介する昆虫である
- 20 ミツバチやクマバチなど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りの環境には、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)。

- 30 ダイズとツルマメは、上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 (2006) はツルマメとダイズの開花時期は異なるため、一般にダイズ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 (2008) は、関東地方では両者の開花には一ヶ月ほどの差がみられるとしている。また、Nakayama and Yamaguchi (2002) 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 (Gls/93-J-01) をそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その

自然交雑率を調査した。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 個の種子を生育し、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 個体認められたことから、その交雑率は 0.73%と報告している (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

5 また、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隣接して栽培し、ツルマメ個体の収穫種子 32,502 粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は 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の 11,860 粒の中から見つかったと報告されている (Mizuguti et al., 2009)。

10

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ダイズの花には 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) との報告がある。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 μm 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の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では、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 7.0 m で交雑率 0.040%、2002 年は 2.8 m で 0.08%、2003 年は 0.7~10.5 m まで調査したが交雑は認められず、2004 年は 3.5 m 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。

25

ホ 病原性

—

30 へ 有害物質の産生性

ダイズにおいて、自然条件下で野生動植物等の生育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。

35 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。

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、除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) に対する耐性が付与されたジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON87708, OECD UI: MON-87708-9) (以下、「本組換えダイズ」という。) を作出した。

10 従来のダイズでは、除草剤ジカンバの散布は播種前における雑草茎葉処理及び収穫前処理 (ダイズの乾燥と雑草防除により収穫作業を容易にする目的) に限られていた。しかし、本組換えダイズは除草剤ジカンバに対して抵抗性を持ったためジカンバの散布適期幅が広がり、播種前から生殖初期 (R1 期: 開花始) までの生育期における処理が可能となる。なお、本組換えダイズが商品化された
15 際に予定されている本組換えダイズに対する除草剤ジカンバの使用体系を表 1 (p9) に示した。

表 1 本組換えダイズに対する除草剤ジカンバの使用体系¹

	発芽前処理	茎葉処理		
		ダイズ 3 葉期	ダイズ 6 葉期	ダイズ開花初期
最大使用体系	1.12 kg a.e./ha ²⁾	0.56 kg a.e./ha	散布しない	0.56 kg a.e./ha
通常 の雑草種 に対する 推奨使用体系	0.56 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	散布しない	散布しない
難防除雑草種 に対する 推奨使用体系 ¹⁾	0.56 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	0.28 kg a.e./ha	散布しない

20 ¹⁾ 雑草の発生時期が遅い場合を含む。

²⁾ a.e.; acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤の有効成分は塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

25

¹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

除草剤ジカンバは 95 種以上の一年生及び二年生雑草を効果的に防除し、100 種を超える多年生の広葉及び木本の植物種の生育を抑制する。また、除草剤ジカンバは除草剤グリホサートでは防除が難しいシロザ (*Chenopodium album*) やアメリカツノクサネム (*Sesbania exaltata*) などの広葉雑草も効果的に防除できる。さらに、除草剤ジカンバはブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*) やオオホナガアオゲイトウ (*Amaranthus palmeri*) など除草剤グリホサートに抵抗性を持つ雑草も含めたジカンバ以外の除草剤に抵抗性を持つ広葉雑草を効果的に防除できる。

10

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

15 本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 1 (p12) 及び表 2 (p13~15) に示した。

20 なお、本組換えダイズに導入された *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO 蛋白質」とする。) は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列 (Herman et al., 2005) と比較して、N 末端配列から 1 番目のメチオニンの直後にアラニンが挿入されている (Behrens et al., 2007)。また、DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列の b² 番目のアミノ酸 (本組換えダイズで発現している改変 DMO 蛋白質では c³ 番目) がトリプトファンからシステインへ置換されている。このアミノ酸置換は野生型 *dmo* 遺伝子を PCR によって増幅した際に非意図的に生じたものである (Behrens et al., 2007)。よって、本組換えダイズに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」とする。なお、本組換えダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセットから発現される前駆蛋白質のプロセッシングにより、本組換えダイズ中では 2 種類の改変 DMO 蛋白質が発現している。詳細は第一の 2 (1) ロ ② 及び図 5 (p19 及び p24) に後述する。本組換えダイズ中で発現している 2 種類の改変 DMO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示す。

30 また、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。したがって、本組換えダイズに導入された *cp4 epsps* 遺伝子を「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とする。た

²社外秘につき非開示

³社外秘につき非開示

だし、本組換えダイズは、R1 世代において除草剤グリホサートを通常の散布量よりも低薬量で散布し、除草剤による傷害を受けた個体、つまり遺伝的分離により改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体を選抜した (図 9, p33)。

5 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

10 本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 1 (p12) 及び表 2 (p13~15) に示した。

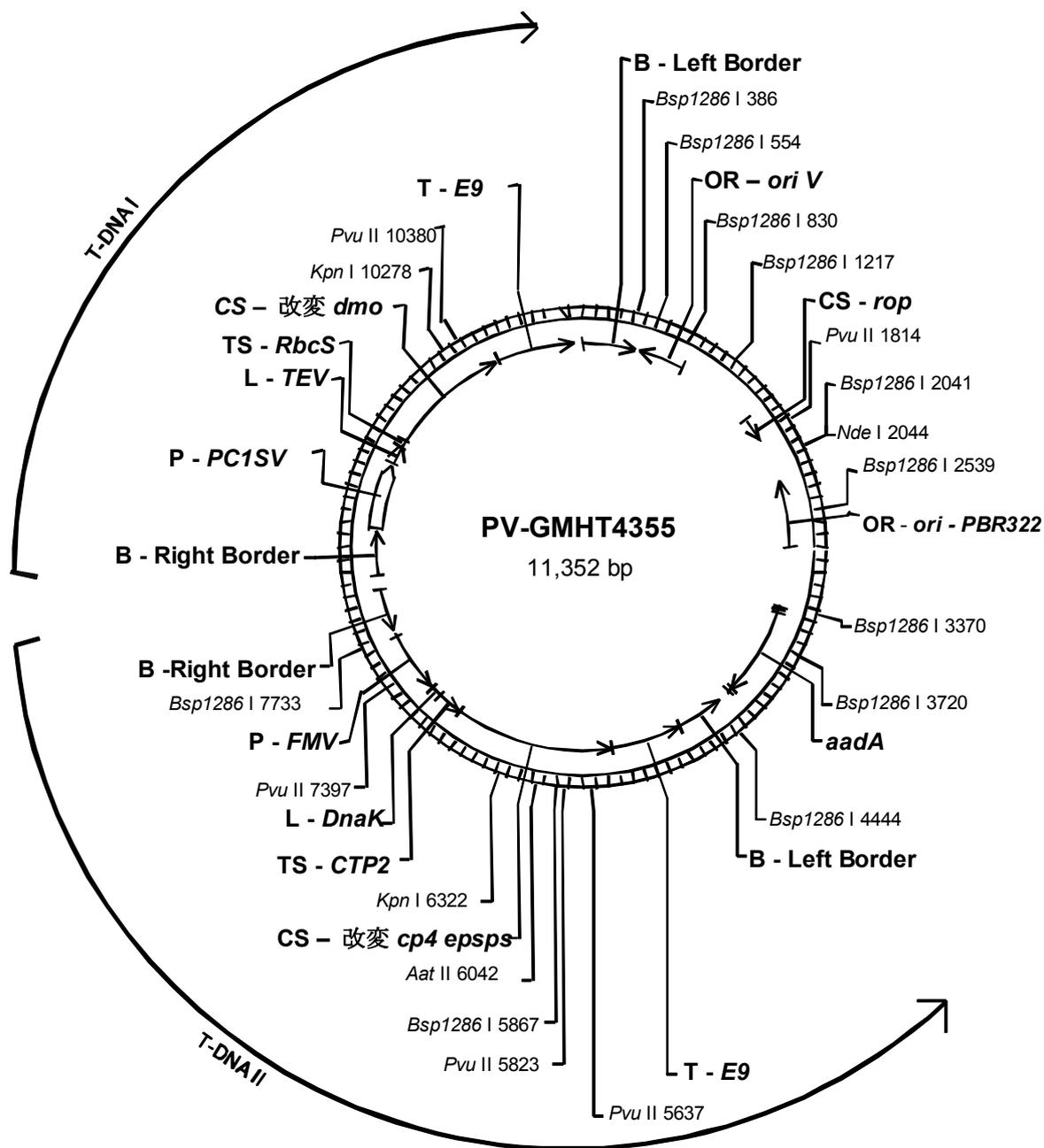


図 1 PV-GMHT4355 のプラスミドマップ⁴

5 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。

⁴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 2 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能⁵

構成要素	由来及び機能
T-DNA I	
B ^{注1} -Right Border Region	<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	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>PCISV</i>	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の全ゲノムの転写によって生じる完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) の転写を誘導するプロモーター (Maiti and Shepherd, 1998)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
L ^{注3} - <i>TEV</i>	Tobacco Etch virus (TEV) 由来の 5'末端非翻訳領域 (Niepel and Gallie, 1999)。遺伝子発現の調節に関与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注4} - <i>RbcS</i>	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子 (<i>RbcS</i>) に由来し、輸送ペプチドから成熟蛋白質の N 末端から 24 アミノ酸までをコードする配列 (Fluhr et al., 1986)。改変 DMO 前駆蛋白質を葉緑体へ輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注5} -改変 <i>dmo</i>	<i>S. maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシゲナーゼのコード配列 (Herman et al., 2005; Wang et al., 1997)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注6} - <i>E9</i>	<i>P. sativum</i> (エンドウ) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	<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)。

⁵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 2 (続き) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
プラスミド外側骨格配列 (本組換えダイズには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注7} -ori V	広宿主域プラスミド RK2 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 (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-rop	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコード配列。 <i>E. coli</i> 中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	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pBR322	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	DNA クローニングの際に利用された配列。
aadA	トランスポゾン Tn7 由来の 3' (9)-O-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。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-DNA II (本組換えダイズには存在しない)	
B-Left Border Region	<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	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-E9	<i>P. sativum</i> (エンドウ) のリブローソム-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。 mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-改変 cp4 epsps	<i>Agrobacterium</i> CP4 株の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードする <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Barry et al., 1997; Padgett et al., 1996)。

表 2 (続き) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
TS-CTP2	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) 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 (Herrmann, 1995; Klee et al., 1987)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
L-DnaK	<i>Petunia hybrid</i> (ペチュニア) の <i>Hsp70</i> 遺伝子に由来する 5'末端非翻訳領域リーダー配列 (Rensing and Maier, 1994)。遺伝子の発現の調節に関与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-FMV	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーター (Rogers, 2000)。植物細胞内での転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	<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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
プラスミド外側骨格配列 (本組換えサイズには存在しない)	
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹ B -border (境界配列)

注² P-promoter (プロモーター)

5 注³ L-leader (リーダー配列)

注⁴ TS-targeting sequence (ターゲティング配列)

注⁵ CS-coding sequence (コード配列)

注⁶ T-3' non-translated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences (3'末端非翻訳転写終結配列及びポリアデニル化シグナル配列)

10 注⁷ OR-origin of replication (複製開始領域)

- 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

5 【改変 *dmo* 遺伝子】

本組換えダイズは、*S. maltophilia* 由来の改変*dmo*遺伝子が導入されており改変DMO蛋白質を発現している。改変DMO蛋白質は、本組換えダイズに除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) 耐性を付与している。*S. maltophilia* は湿潤環境や土壌及び植物に偏在するグラム陰性細菌であり (Denton and Kerr, 1998)、DI-6株は土壌より単離された (Krueger et al., 1989)。

DMO蛋白質はジカンバから除草活性のないDCSA (3,6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) への脱メチル反応を触媒する酵素で (Chakraborty et al., 2005)、この働きにより植物にジカンバ耐性を付与する (図 2, p17)。実際に、本組換えダイズの作出に用いられたものとまったく同じ改変*dmo*遺伝子発現カセット ([P-*PCISV*]-[L-*TEV*]-[TS-*RbcS*]-[CS-改変*dmo*]-[T-*E9*]) をダイズ、トマト、シロイヌナズナ並びにタバコに対し導入したところこれらの植物に除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。

DMO蛋白質は Rieske 型非ヘム鉄オキシゲナーゼ (Rieske-type non-heme iron oxygenase) の一種であり、還元酵素、フェレドキシンとともに三成分酸化還元系を構成する。これら 3 つの蛋白質は他の多くのオキシゲナーゼと同様に酸化還元系において共役的に働き、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NADH) から酸素へ電子を運び、電子アクセプター基質 (この場合は除草剤ジカンバ) の脱メチル反応を触媒する (Behrens et al., 2007)。この酸化還元系を図 2 (p17) に示した。

30

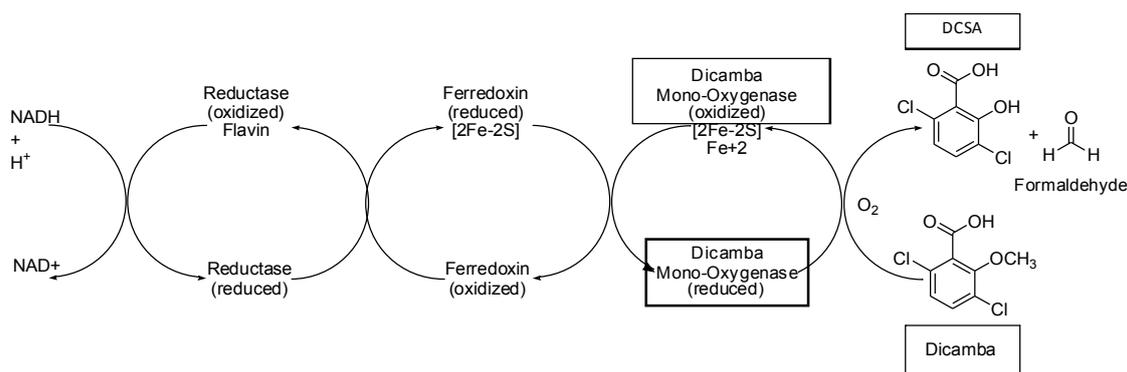


図 2 DMO 蛋白質の三成分酸化還元系⁶

5 図は NADH から DMO 蛋白質までの電子伝達系であり、ジカンバの脱メチル反応により DCSA が生成される。

10 DMO 蛋白質の結晶構造は、C 末端側にヒスチジンタグが付加された DMO 蛋白質⁷ を用いて解析されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO 蛋白質の結晶構造は 3 つの DMO 蛋白質単量体からなる三量体であることが明らかとなっている (図 3, p18)。それぞれの単量体は Rieske [2Fe-2S] クラスタを含む Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと非ヘム鉄センターを含む非ヘム鉄センタードメインを有している (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。これら

15 のドメインは全ての Rieske 型モノオキシゲナーゼに共通して存在し、電子伝達に関与する主要なドメインであることが知られている (Ferraro et al., 2005)。

NADH から運ばれた電子は、ダイズ内在性の還元酵素とフェレドキシンを介して末端 DMO 蛋白質へ伝達される (図 2, p17)。この電子が酸素を還元的に活性化し、ジカンバの脱メチル反応を触媒する。電子伝達は隣接する単量体の間で起こるため、DMO 蛋白質は単量体同士の間隔と配置が正しくなるよう三量体を形成する必要がある (D'Ordine et al., 2009)。単量体内では Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと非ヘム鉄センタードメインの距離が離れているため、電子伝達が起こらない (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

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。

⁷結晶構造解析に供試された DMO 蛋白質は、C 末端側にヒスチジンタグが付加されていること、及びクローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したために N 末端側から 2 番目の位置にアラニンが挿入されていることを除けば、野生型 DMO 蛋白質と同じ配列である。

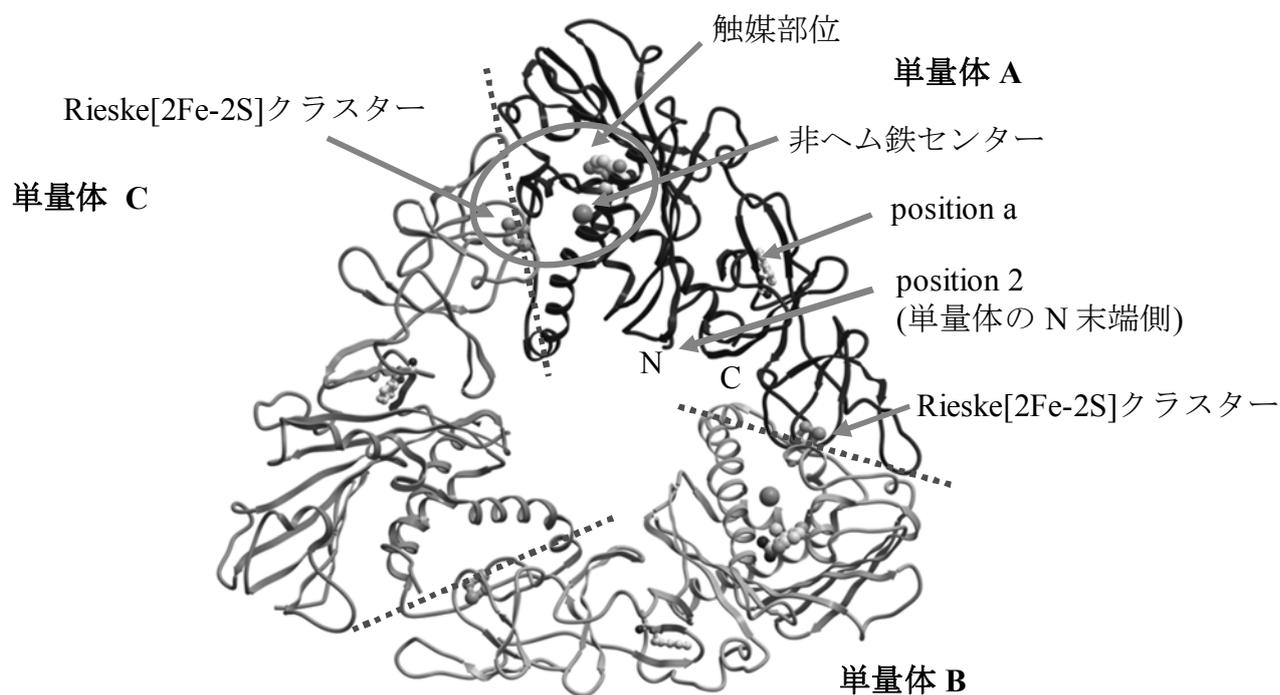


図 3 DMO 蛋白質の結晶構造⁸

- DMO 蛋白質の結晶構造かつ活性型である三量体の模式図 (D'Ordine et al., 2009)。非ヘム鉄
- 5 センターを含む非ヘム鉄センタードメイン、N 末端と C 末端、Rieske[2Fe-2S] クラスタ
- を含む Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインなどの特徴的な構造を単量体 A に記した。単量体
- A と単量体 C が形成する触媒部位は青い丸で囲っている。また、単量体 C の Rieske [2Fe-2S]
- 10 クラスタも矢印で記した。電子移動は隣接する単量体間で起こるため、単量体 C の Rieske
- [2Fe-2S] クラスタドメインと単量体 A の非ヘム鉄センタードメインとの間で電子移動が
- 15 起こる。赤い点線は、隣接している非ヘム鉄センタードメインと Rieske [2Fe-2S] クラスタ
- ドメインの各サブユニット間で電子移動が起こる接合部分を表しており、単量体同士の
- 境界線上を示している。なお、結晶構造解析に供試された DMO 蛋白質は野生型 DMO 蛋白質
- や改変 DMO 蛋白質ではなく、C 末端側にヒスチジンタグが付加されており、N 末端側から
- 2 番目の位置にアラニンが挿入されている (アミノ酸配列の改変については図 5 (p24)
- を参照) 【社外秘につき非開示】

⁸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

本組換えダイズ中での改変 DMO 蛋白質の発現様式について詳述すると、本組換えダイズには、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットが導入されており、このカセットから前駆蛋白質 (以下、「改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質」とする。) が発現する。改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質は、改変 DMO 蛋白質の N 末端側に 84 個のアミノ酸が付加しているプロセシング前の蛋白質である。N 末端側の 84 個のアミノ酸からなるペプチドのうち、57 個のアミノ酸はエンドウのリブロー

5
10
15

ース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットの chloroplast transit peptide (葉緑体輸送ペプチド。以下、「CTP」とする。) 由来であり、24 個のアミノ酸は葉緑体への輸送の効率を高めるエンドウのリブロー

ース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット (以下、「RbcS」とする。) の N 末端から 24 個のアミノ酸から構成されている (Behrens et al., 2007; Comai et al., 1988)。残りの 3 個のアミノ酸は intervening sequence によってコードされており、クローニングの際に用いられた (表 2, p13~15)。

本組換えダイズの種子からの抽出物をウエスタンブロット分析により解析したところ、2 本の免疫反応性のあるバンドが検出された。これらのバンドについてさらなる分析を行ったところ、図 4 (p20) に示すように改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質から輸送ペプチドが切り離された完全長蛋白質と、本来であれば切り離されるはずの輸送ペプチドが残った蛋白質の 2 つの形態の蛋白質が存在することが明らかになった。

N 末端側のアミノ酸配列の解析により、検出された 2 本のバンドのうち低分子量のバンドの蛋白質は CTP、RbcS の 24 個のアミノ酸及び intervening sequence にコードされる 3 個のアミノ酸が切り離されたものであることが分かった (図 4, p20)。CTP、RbcS 及び intervening sequence に加え、メチオニンアミノペプチダーゼによる N 末端プロセシングによって改変 DMO 蛋白質のメチオニン残基

20
25

が取り除かれているが、これはあらゆる生物に共通して起こるものである (Arfin and Bradshaw, 1988; Bradshaw et al., 1998)。この蛋白質は分子量 39.8 kDa の 339 個のアミノ酸からなる 1 本鎖ポリペプチドである。以下、この形態の蛋白質を「改変 MON87708 DMO 蛋白質」とする (図 4, p20)。

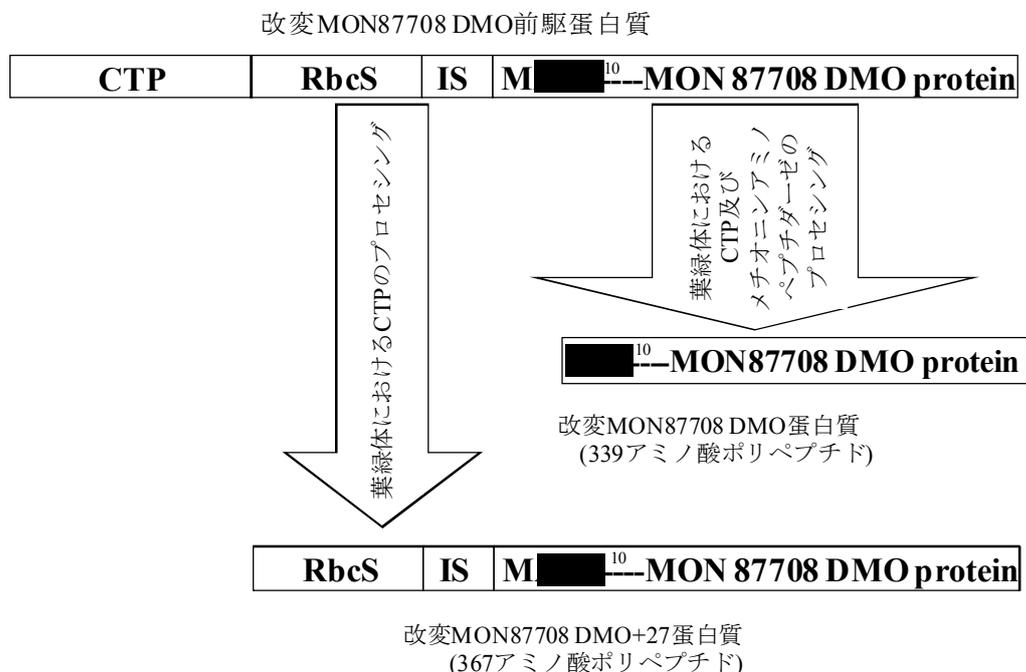
一方、高分子量 (約 42 kDa) の蛋白質は、RbcS 及び intervening sequence に由来する 27 個のアミノ酸が切り離されずに N 末端に残った改変 MON87708 DMO 蛋白質である。改変 MON87708 DMO 蛋白質では N 末端のメチオニンがプロセシングされるが、この形態の蛋白質ではプロセシングされていないため、結果として 367 個のアミノ酸ポリペプチドとなる (図 4, p20)。以下、この形態の蛋白質を「改変 MON87708 DMO+27 蛋白質」とする。

なお、CTP が切断される部位を予測する目的で開発されたアルゴリズム (Emanuelsson et al., 1999) を用いて改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質のアミノ酸配列の解析を行ったところ、CTP の切り離しが可能な部位は 2 ヶ所存在しており、1 ヶ所の切断部位で切断された場合には 84 個のアミノ酸が切り離された改変 MON87708 DMO 蛋白質となり、もう 1 ヶ所の切断部位で切断された場合には

35
40

27 個のアミノ酸が連結された改変 MON87708 DMO+27 蛋白質となるという結果

が得られた。つまり、本組換えダイズ中に存在する改変 DMO 蛋白質は 2 つの形態を持つことが示唆された。



5

図 4 改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質のプロセッシング⁹

本組換えダイズで産生される改変 MON87708 DMO 前駆蛋白質には、葉緑体輸送ペプチド (CTP) の 57 個のアミノ酸、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 (RbcS) の N 末端側から 24 個のアミノ酸及び intervening sequence (IS) にコードされる 3 個のアミノ酸が付加されている。M¹⁰ は N 末端側のアミノ酸配列を表す。葉緑体での前駆蛋白質のプロセッシングにより、CTP、RbcS、IS 及び N 末側端のメチオニン (M) が切り離され、改変 MON87708 DMO 蛋白質となる (339 アミノ酸)。また、CTP だけが切り離される別のプロセッシングが起き改変 MON87708 DMO+27 蛋白質となった場合、そのアミノ酸数は、改変 MON87708 DMO 蛋白質に N 末端側がメチオニンアミノペプチダーゼによるプロセッシングを受けなかったため残ったメチオニン (M)(1 個のアミノ酸) と RbcS 及び IS のうちの 27 個のアミノ酸を足した 367 アミノ酸となる。

10

15

以上の結果から、本組換えダイズには、27 個のアミノ酸が付加されておらず N 末端のメチオニンが取り除かれた DMO 蛋白質 (改変 MON87708 DMO 蛋白質) と、27 個のアミノ酸が付加され、N 末端のメチオニンが取り除かれていない DMO 蛋白質 (改変 MON87708 DMO+27 蛋白質) とが存在していることが示された。

20

⁹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は帰属する

¹⁰社外秘につき非開示

以降、この評価書において改変 DMO 蛋白質とは、改変 MON87708 DMO 蛋白質と改変 MON87708 DMO+27 蛋白質の両方を指すこととする。

5 前述 (p17) したように、本組換えダイズが除草剤ジカンバに対して耐性を持つためには、本組換えダイズ内で発現する改変 DMO 蛋白質が本組換えダイズ内で三量体を形成する必要がある。本組換えダイズが除草剤ジカンバに対する耐性を持つこと、及び本組換えダイズから精製された改変 DMO 蛋白質にジカンバに対する脱メチル化酵素活性が確認されていること (別添資料 2-C の Figure 2, p6) から、本組換えダイズ内においても DMO 蛋白質三量体が形成され、機能していると考えられた。以降、本組換えダイズ中に含まれる単量体である改変 MON87708 DMO 蛋白質、単量体である改変 MON87708 DMO+27 蛋白質及びこれら単量体の組み合わせにより形成される三量体を総称して「改変 MON87708 DMO」とする。

15 改変 MON87708 DMO が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、改変 MON87708 DMO+27 蛋白質のアミノ酸配列 (別添資料 1) についてアレルゲンデータベース (AD_2010¹¹) を用いて FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。改変 MON87708 DMO 蛋白質のアミノ酸配列は改変 MON87708 DMO+27 蛋白質のアミノ酸配列に含まれるため、改変 MON87708 DMO 蛋白質について既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められないと考えられた。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

25

改変 MON87708 DMO が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかを検討した。

30 一般的に酵素の基質特異性は、酵素触媒反応に必要な構造の有無によって定まる。DMO 蛋白質のジカンバへの特異性は触媒部位で起こる特定の相互作用によるものである (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO 蛋白質によるジカンバ代謝の際の結晶構造解析の結果によると、ジカンバのカルボキシル基と塩素原子が DMO 蛋白質の触媒部位に位置するアミノ酸と作用する (Dumitru et al., 2009)。カルボキシル基は DMO 蛋白質の触媒部位において、アミノ酸と 6 つ

¹¹AD_2010: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで 1,471 配列が含まれる。

の水素結合を形成している。この水素結合は、酵素と基質の結合に重要な役割を果たしている。一方、ジカンバのクロロ基は基質を正しい位置に安定させる役割を持つ。これらの相互作用は DMO 蛋白質結晶解析において DMO 蛋白質の触媒部位にジカンバが存在するときに確認されている。したがって、ジカンバのベンゼン環だけでなく、これらの化学基も、触媒作用に必要な基質の正しい配置に非常に重要な役割を果たすことが示されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。なお、D'Ordine et al. (2009) 及び Dumitru et al. (2009) において解析が行われた DMO 蛋白質は、野生型 DMO 蛋白質の N 末端側から 2 番目にアラニンが挿入され、C 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (以下、「C 末端 his-DMO 蛋白質」とする。)(図 5, p24)。

上述の DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究から、構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) は DMO 蛋白質の基質となる可能性がある。改変 MON87708 DMO の基質特異性の確認のため、米国において、1) 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A~C)、2) ダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 D) を行った (表 3, p23)。

なお、試験ごとに供試材料が異なることから、まず以下の I で供試材料について記述した。次に II では試験結果の概要について記載し、III では改変 MON87708 DMO の基質特異性、及び改変 MON87708 DMO が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかどうかについて考察した。

表 3 改変 MON87708 DMO の基質特異性に関する試験¹²

目的	試験	試験内容	供試材料	参照図表
各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験	A	各種除草剤散布試験 (<i>in vivo</i>)	本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズ A3525	本評価書の表 4 (p29) 本評価書の図 6 (p25) 本評価書の表 5 (p30) 別添資料 2-A の Table 3 (p12)
	B	2,4-D の DMO 蛋白質による代謝試験 (<i>in vitro</i>)	N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質 (大腸菌で産生・精製)	別添資料 2-A の Figure 3 (p16)
	C	DMO 蛋白質の結晶に対する 2,4-D の結合性試験 (<i>in vitro</i>)	C 末端 his-DMO 蛋白質 (大腸菌で産生・精製)	本評価書の図 7 (p27)
ダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験	D	ダイズ内在性化合物の DMO 蛋白質による代謝試験 (<i>in vitro</i>)	N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質 (大腸菌で産生・精製) 改変 MON87708 DMO (本組換えダイズの種子から抽出・精製)	本評価書の図 8 (p28) 別添資料 2-B の Figure 1, p4 別添資料 2-B の Figure 3~5 (p10~12) 別添資料 2-C の Figure 3 (p7)

I. 供試材料について

5

試験 A (*in vivo*) には本組換えダイズと対照の非組換えダイズ A3525 を供試した。試験 B~D (*in vitro*) の試験に供試した DMO 蛋白質は 3 種類存在する。このうち、B・D の試験に供試した DMO 蛋白質は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質の N 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (以下、「N

10

末端 his-野生型 DMO 蛋白質」とする。)(図 5, p24)。一方、C の試験に供試した C 末端 his-DMO 蛋白質は野生型 DMO 蛋白質の N 末端側から 2 番目にアラニンが挿入され、C 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (図 5, p24)。

15

したがって、*in vitro* の試験に供試した DMO 蛋白質 2 種と、本組換えダイズ中で発現している改変 DMO 蛋白質との違いは、ヒスチジンタグの有無と、アミノ酸配列の N 末端側から 2 番目のアラニンの有無と、c¹³ 番目のアミノ酸がトリブ

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

¹³社外秘につき非開示

トファンカシステインかの違いのみである (図 5, p24)。2 番目及び c¹⁴番目のアミノ酸やヒスチジンタグの位置は DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れており (図 3, p18)、またヒスチジンタグは一般的に蛋白質の構造には影響しないといわれていることから (Carson et al., 2007)、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の基質特異性や *in vitro* での試験結果には影響しないと考えられた。なお、試験 D には、基質特異性の解析に用いた DMO 蛋白質と同様の特異性を改変 MON87708 DMO が持つかを評価するために、本組換えダイズの種子から抽出した改変 MON87708 DMO も供試した。

10

【社外秘につき非開示】

15

図 5 野生型 DMO 蛋白質、改変 MON87708 DMO 蛋白質及び改変 MON87708 DMO+27 蛋白質と、試験 A~D に供試した DMO 蛋白質とのアミノ酸配列の比較

20

25

【社外秘につき非開示】

30

¹⁴社外秘につき非開示

II. 試験の結果

II-1. 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A~D)

A. 各種除草剤散布試験 (*in vivo*)

5 本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズ品種 A3525 を供試し、作用機作の異なる 8 グループ 20 種の除草剤の散布試験を行った (表 4, p29)。米国の温室において栽培した発芽前又は 2-3 葉期のダイズ各系統 10 個体に対し、各除草剤を 2 段階の散布薬量で散布し、散布後 20 日目から 21 日目の間に除草剤による傷害程度を調査して除草剤耐性を評価した。

10 その結果、本組換えダイズは供試した除草剤 20 種のうち、除草剤ジカンバに対し強い耐性を示した。さらに、同じ人工オーキシシン型除草剤である 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、2-メチル-4-クロロフェノキシ酢酸 (MCPA) 及び 2,4-ジクロロフェノキシ酪酸 (2,4-DB)(図 6, p25) に対して弱い耐性を示した (別添資料 2-A の Table 3, p 12; 表 5, p30)。それ以外の除草剤に対しては、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で除草剤による傷害程度に差は認められなかった。

15 以上のことから、改変 MON87708 DMO は除草剤ジカンバを代謝することが確認された。また、2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB を代謝している可能性が示唆された。

20

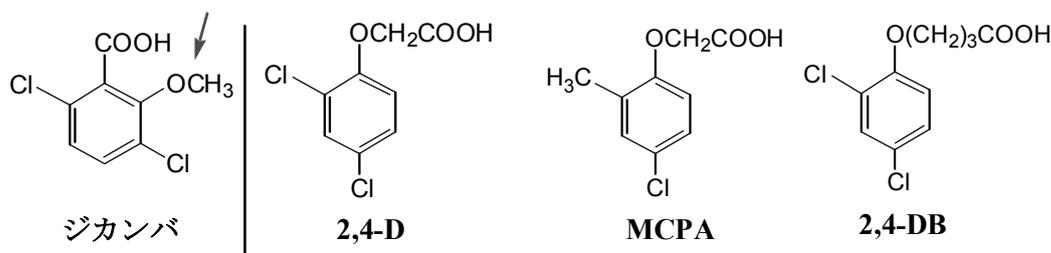


図 6 ジカンバ及び本組換えダイズが弱い耐性を示したオーキシシン型除草剤¹⁵
赤い矢印は DMO 蛋白質により取り除かれるメチル基を示す。

25

B. 2,4-D の DMO 蛋白質による代謝試験 (*in vitro*)

試験 A において本組換えダイズが弱い耐性を示した人工オーキシシン型除草剤 3 種のうち、最もジカンバと化学構造が類似している 2,4-D を用いて、DMO 蛋白質がジカンバ以外の除草剤を代謝するかを評価した。DMO 蛋白質はジカンバの酸化的 O-脱メチル化反応を触媒するので、もし DMO 蛋白質が 2,4-D に対して活性があるなら酸化的 O-脱アルキル化反応を触媒し、2,4-ジクロロフェノール

30

¹⁵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

(2,4-DCP) が生成されると考えられた。そこで、2,4-D を N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質と反応させ、2,4-DCP やその他の化合物が生成されるかどうか、LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行った。

5 その結果、いずれの分析においても 2,4-D の減少は見られず、また 2,4-DCP やその他の化合物も検出されなかった (別添資料 2-A の Figure 3, p16)。

したがって、N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質は 2,4-D を代謝しないと考えられた。また、試験 A において本組換えダイズが 2,4-D に弱い耐性を示したにも関わらず、N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質は 2,4-D を代謝しないことから、2,4-D が DMO 蛋白質の触媒部位に結合し、それによって植物体に作用する 2,4-D の除草剤成分が減少する可能性が考えられたので、次に試験 C を行った。

C. DMO 蛋白質の結晶に対する 2,4-D との結合性試験 (*in vitro*)

DMO 蛋白質が 2,4-D と結合するかを評価するために、ジカンバ及び 2,4-D の溶液に C 末端 his-DMO 蛋白質の結晶を浸漬し構造解析を行った。

15 その結果、2,4-D は C 末端 his-DMO 蛋白質に低い親和性を示し結合したが、触媒部位での配置がジカンバとは異なっていた (図 7, p27)。前述したように、ジカンバのカルボキシル基と塩素原子 (クロロ基) の両方が DMO 蛋白質の触媒部位にあるアミノ酸と相互作用し、基質であるジカンバが DMO 蛋白質の触媒部位に位置するようはたらく (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。2,4-D はクロロ基を有するため C 末端 his-DMO 蛋白質に結合できるが、クロロ基の位置がジカンバとは異なるために活性部位に正しく結合できず、結果として 2,4-D は C 末端 his-DMO 蛋白質に代謝されないと考えられた。2,4-D が試験に供試されたのは、本組換えダイズが弱い耐性を示した 3 種類の人工オーキシシン型除草剤 (2,4-D, 2,4-DB, MCPA) の中で最も構造的にジカンバに類似していたからである (図 6, p25)。2,4-DB 及び MCPA では DMO 蛋白質との代謝試験及び結合性試験を行わなかったが、これらの化合物は構造的に 2,4-D と酷似しているため、DMO 蛋白質と結合することはあっても DMO 蛋白質によって代謝される可能性は低いと考えられる。

よって、本組換えダイズが 2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB に対して弱い耐性を示した理由は、改変 MON87708 DMO がこれらの除草剤成分を代謝したからではなく、これらの除草剤成分が改変 MON87708 DMO に結合することで植物体に作用する除草剤の有効成分が減少したためと考えられた。

15 以上のことから、DMO 蛋白質は基質のジカンバに対して高い特異性をもち、他の構造が類似している除草剤を代謝して新たな代謝産物を産生することはなく、
35 いことが確認された。

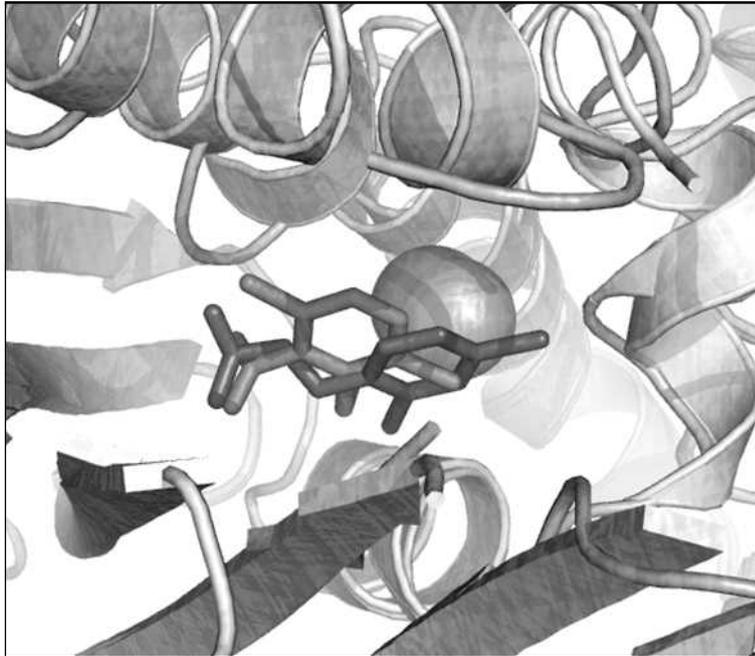


図 7 C 末端 his-DMO 蛋白質の触媒部位におけるジカンバと 2,4-D の配置¹⁶

緑色はジカンバ分子、青色は 2,4-D 分子を示す。なお、ジカンバと 2,4-D は同時には結合しない。

5

II-2. ダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 D)

D. ダイズ内在性化合物の DMO 蛋白質による代謝試験 (in vitro)

- 10 上述 (p21~22) したように、DMO 蛋白質の基質になり得る化合物は構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) のみであると考えられた。また、試験 C の結果から、クロロ基も基質として重要であると
- 15 考えられた。ダイズは多くのフェノール化合物を含んでいるが (Janas et al., 2000; Kim et al., 2006)、ダイズ中の塩化芳香族化合物は知られていない。さらに、塩化芳香族化合物は植物及び他の真核生物においてもその存在は限定的である
- (Gribble, 1998; 2004; Wishart, 2010; Wishart et al., 2009)。よって、ダイズ内在性化合物のうち構造的にジカンバに類似し、かつメトキシ及びフェニルカルボキシル部分を有する化合物として特定することができた 5 種 (*o*-アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸及びシナピン酸) を供試し、DMO 蛋白質による
- 20 代謝試験を行った (別添資料 2-B の Figure 1, p4; 図 8, p28)。

上記の内在性化合物をそれぞれ N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含む反応溶液と N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含まない反応溶液に添加してインキュベートした後、反応溶液の LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行い、添加した化合物が

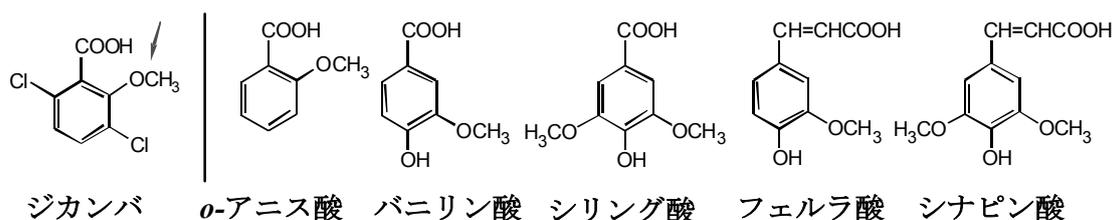
¹⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

減少するか、又は DMO 蛋白質により他の化合物が生成されるかどうかを調査した。その結果、いずれの分析においてもジカンバは減少したが 5 種の内在性化合物の減少は見られず、その他の化合物も検出されなかった (別添資料 2-B の Figure 3~5, p10~12)。

- 5 なお、本組換えダイズの種子から改変 MON87708 DMO を抽出し、最もジカンバと構造的類似性を有する内在性化合物である *o*-アニス酸と反応させた。その結果、*o*-アニス酸は改変 MON87708 DMO により代謝されなかった (別添資料 2-C の Figure 3, p7)。この結果より改変 MON87708 DMO においても、触媒部位に基質が正しく配置されるためにはクロロ基が必要であることが確認された。
- 10 また、供試された DMO 蛋白質におけるアミノ酸配列のわずかな違いは、改変部位が DMO 蛋白質の触媒部位から離れているため、基質特異性に影響しないと考えられた (図 3, p18)。

以上の結果から、改変 MON87708 DMO がダイズ内在性化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することはないと考えられた。

15



20 図 8 DMO 蛋白質を用いて *in vitro* で供試したジカンバ及び潜在的な内在性基質¹⁷

赤い矢印は DMO 蛋白質により取り除かれるメチル基を示す。

25 III. 改変 MON87708 DMO の基質特異性及び改変 MON87708 DMO の宿主の持つ代謝系への影響の考察

以上の各種除草剤と DMO 蛋白質及び改変 MON87708 DMO との基質反応性試験 (試験 A~C)、及びダイズ内在性化合物と DMO 蛋白質及び改変 MON87708 DMO との基質反応性試験 (試験 D) の結果から、改変 MON87708 DMO が除草剤ジカンバ以外の化合物を代謝し、宿主であるダイズの代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断された。

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

表 4 本組換えダイズに対する各種除草剤散布試験に供試した除草剤¹⁸

除草剤活性成分	除草剤の種類 (作用機作) ¹
ジカンバ	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-D	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-DB	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
MCPA	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
トリクロピル	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
クロピラリド	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
ピクロラム	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
アラクロール	クロロアセトアミド系 (超長鎖脂肪酸合成阻害)
アセトクロール	クロロアセトアミド系 (超長鎖脂肪酸合成阻害)
アトラジン	トリアジン系 (光化学系 II 阻害)
リニュロン	ウレア系 (光化学系 II 阻害)
オキシフルオルフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
ラクトフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
クロリムロン	スルホニルウレア系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
クロロスルフロン	スルホニルウレア系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
ハロスルフロン	スルホニルウレア系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
イマザピル	イミダゾリノン系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
トリフルラリン	ジニトロアニリン系 (紡錘体微小管形成阻害)
パラコート	ビピリジリウム系 (光化学系 I 電子転換)
グリホサート	グリシン系 (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素阻害)

¹(HRAC, 2009)

¹⁸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 5 ジカンバ、2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB の散布試験結果

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

(2) ベクターに関する情報

25

イ 名称及び由来

本組換えダイズの作出に用いられたベクターPV-GMHT4355 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

30

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

35

本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMHT4355 の全塩基数は 11,352bp である。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

40

E. coli における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

本ベクターの感染性は知られていない。

5

(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

10 宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 2 (p13~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p12) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

15

プラスミド・ベクターPV-GMHT4355 をアグロバクテリウム法によって、非組換えダイズ品種 A3525 の胚から切り取った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

20

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

25 非組換えダイズ品種 A3525 の胚から採取した分裂組織とプラスミド・ベクターPV-GMHT4355 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサートを追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。

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

30 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、形質転換に用いたプラスミド・ベクターPV-GMHT4355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プラスミド・ベクターの外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 3)。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。

35

- 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

5

形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において通常の散布量よりも低薬量で除草剤グリホサート散布を行い改変 *cp4 epsps* 遺伝子の有無に関するスクリーニングを行った。ここでグリホサートによって傷害を受けた個体のみを T-DNA II (改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む領域) を持たない個体として選抜した。ここで選抜した T-DNA II を持たない R1 個体において、さらにインベーター分析¹⁹ 及びサザンブロット分析により、T-DNA I (改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを含む領域) を 1 コピーのみホモで有する個体を選抜した。選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えダイズを選抜した。

10

15

本組換えダイズの育成図を図 9 (p33) に示した。なお、第一種使用規程の承認対象の範囲は、本組換えダイズの R3 及び R3 世代から派生する全ての後代交配種である。

¹⁹インベーター分析は、遺伝的変異の検出や遺伝子の定量的な分析を行うためのシグナル増幅技術である。インベーター分析は Invader[®]法と呼ばれる切断過程に基づいて検出が行われ、PCR による遺伝子増幅を必要としない。この切断過程では、構造を特異的に認識する Cleavase[®]と呼ばれる酵素によって標的遺伝子配列が切断される。標的遺伝子配列が切断されると蛍光が生じ、これを検出する。なお、Invader[®]及び Cleavase[®]は、Third Wave Technologies 社の登録商標である。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

20

25

30

図 9 本組換えダイズの育成図

35

【社外秘につき非開示】

40

45

(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

- 5 本組換えダイズの導入遺伝子が染色体上に存在するかどうかを確認するため、ホモ接合性の本組換えダイズのR4世代と改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを持たないダイズ品種とを従来の方法で交配し、ヘテロ接合性のF1世代を作出した。このF1世代を自殖し、F2世代を作出した。次にF2世代の個体についてインバーダー分析により改変 *dmo* 遺伝子発現カセットの有無を調べ、ヘテロ接合性のF2
- 10 個体を選抜して自殖し、F3世代を作出した。その後、ヘテロ接合性のF3個体を選抜して自殖し、F4世代を作出した。このようにして作出したF3及びF4世代を用いて、インバーダー分析によって本組換えダイズ中の改変 *dmo* 遺伝子発現カセットの分離比の検定を接合性に基づいて行った (表 6, p35; 別添資料 4)。この場合の改変 *dmo* 遺伝子発現カセットの分離比は、メンデルの法則に従い
- 15 1:2:1 (ホモ接合性++:ヘテロ接合性+-:ホモ接合性--)と予想された。
- その結果、F3及びF4世代では分離比の実測値と期待値との間に、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。したがって本組換えダイズの導入遺伝子は染色体上に存在し、メンデルの法則に従って後代に遺伝していると考えられた。

表 6 本組換えダイズの育成過程における改変 *dmo* 遺伝子の分離様式²⁰

世代 ¹	供試 個体数 ²	実測値			1:2:1 の分離比の期待値			χ^2	p 値 ³
		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		
F3	118	29	52	37	29.5	59	29.5	2.7	0.253
F4	343	83	171	89	85.75	171.5	85.75	0.2	0.899

- ¹ F3 及び F4 世代は、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットをヘテロで持つそれぞれの親世代 (F2 及び F3 世代) を自殖することにより得られた。
- 5 F3, F4 世代の個体はそれぞれ 2 個体の親世代から得られた。
- ² 改変 *dmo* 遺伝子発現カセットの有無をインベーター分析によって調べた。
- ³ 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 ($p \leq 0.05$)。

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

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

- 5 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えダイズのゲノム中1カ所に1コピーのT-DNA I領域が組み込まれており (別添資料 5の Figure 3~5, p36~38)、複数世代 (R2~R6 世代) にわたり安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 5の Figure 15, p50)。また、外側骨格領域及びT-DNA II領域は導入されていないことが確認された (別添資料 5の Figure 6~9, p39~42)。
- なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を図 10 (p37) に示した。

10

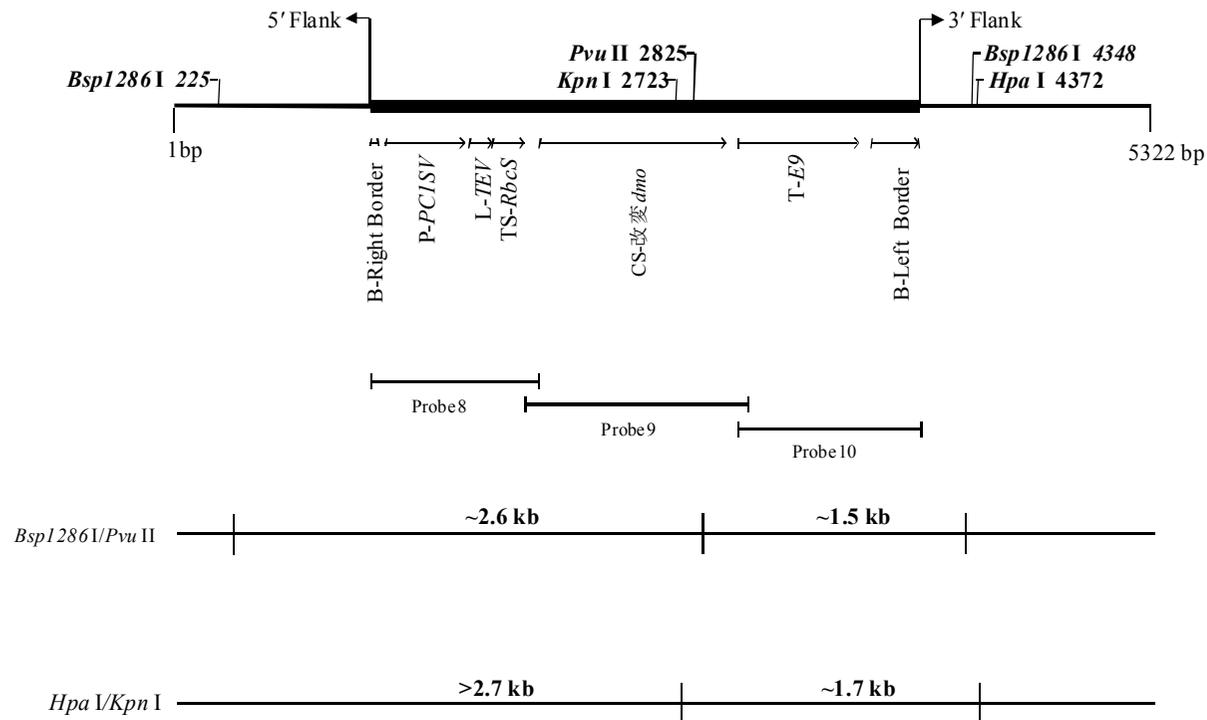


図 10 本組換えダイズの導入遺伝子地図²¹

5

図の上段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。この地図には導入遺伝子内の構成要素及びサザンブロット分析に用いた制限酵素切断部位を地図と相対的な位置とともに記載した。図の中段には、別添資料5のFigure 1 (p34) に示した T-DNA I プローブの相対サイズ及び位置を示した。図の下段は各制限酵素で切断した後に予想される DNA 断片のサイズを示した。矢印 (→) により導入遺伝子末端と導入遺伝子の 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、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。

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

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

1 コピーなので該当しない (別添資料 5 の Figure 3~5, p36~38)。

5

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えダイズの複数世代 (R2~R6 世代) にわたり改変 MON87708 DMO が安定して発現していることが確認された (別添資料 6 の Figure 2, p17)。

15 また、2008 年に米国の 5 カ所 (アイオワ州 1 カ所、イリノイ州 2 カ所、インディアナ州 1 カ所、ペンシルバニア州 1 カ所) のほ場において、3 反復で育成した本組換えダイズの葉 (over-season leaf: OSL 1~4)、根、地上部及び種子での改変 MON87708 DMO の発現量を ELISA 法により測定した (別添資料 7 の Table 1, p16)。全てのほ場の各反復から葉 (over-season leaf: OSL 1~4)、根、地上部及び種子を採取した。葉のサンプリングは異なる生育ステージで 4 回行った (OSL-1: 3-4 葉期、OSL-2: 5-8 葉期、OSL-3: 開花期-12 葉期、OSL-4: 子実肥大初期-16 葉期)。

20 なお、この試験で用いた ELISA 法は改変 MON87708 DMO、すなわち改変 MON87708 DMO 蛋白質、改変 MON87708 DMO+27 蛋白質及びこれらの組合せにより形成される三量体の全てを検出するため、ここでの発現量は改変 MON87708 DMO の合計で表されている。

25 ELISA 法による測定の結果、本組換えダイズの葉、根、地上部及び種子における改変 MON87708 DMO の発現が確かめられた (表 7, p39)。

30 以上の結果から、本組換えダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子は、複数の世代に安定して遺伝しており、また、それら後代で改変 MON87708 DMO が発現していることが示された。

表 7 本組換えダイズの葉、根、地上部及び種子における改変 MON87708 DMO の発現量 (2008 年、米国)²²

組織の種類 ⁸	改変 MON87708 DMO ¹		改変 MON87708 DMO ¹		LOQ/LOD (µg/g 新鮮重) ^{6,7}
	平均値 (SD) ² (µg/g 新鮮重) ³	範囲 ⁴ (µg/g 新鮮重)	平均値 (SD) ² (µg/g 乾燥重) ⁵	範囲 (µg/g 乾燥重)	
OSL-1	3.1 (1.9)	0.87 – 6.8	17 (7.7)	6.2 – 29	0.63/0.20
OSL-2	5.2 (2.6)	1.4 – 9.8	31 (13)	12 – 54	0.63/0.20
OSL-3	6.0 (2.2)	3.5 – 11	44 (14)	25 – 71	0.63/0.20
OSL-4	16 (12)	4.6 – 43	69 (46)	23 – 180	0.63/0.20
根	1.9 (0.73)	1.2 – 3.6	6.1 (2.1)	3.9 – 11	0.031/0.015
地上部	12 (2.5)	7.0 – 17	53 (18)	25 – 84	0.63/0.10
種子	43 (7.7)	31 – 55	47 (8.7)	34 – 59	1.3/0.21

¹ 改変 MON87708 DMO の合計を表す (つまり、2 種類のプロセッシングされた蛋白質の形態とこれらの組み合わせにより形成される三量体)。

5 ² 平均値及び標準偏差 (SD) を算出した (n=15)(1 サンプル/反復、3 反復/ほ場で 5 ほ場)。

³ 蛋白質発現量を新鮮重ベースで組織重量 (g) 当たりの蛋白質重量 (µg) で表した。

⁴ 最小値及び最大値は、各組織ごとに算出した。

⁵ 蛋白質発現量を µg/g 乾燥重で表した。乾燥重は、µg/g 新鮮重を水分分析データから得た乾燥重変換係数で割って算出した。

10 ⁶ 定量限界 (LOQ) は *E. coli* 産生の標準 DMO 蛋白質の最も低い濃度に基づき計算された。“ng/ml” は各希釈係数及び組織に対する緩衝液の比率を用いて“µg/g 新鮮重”に変換された。

⁷ 検出限界 (LOD) は対照の非組換えダイズの各組織ごとに測定した平均値に標準偏差の 3 倍を加えたものである。検出限界値の“ng/ml” は各希釈係数及び組織に対する緩衝液の比率を用いて“µg/g 新鮮重”に変換された。

15 ⁸ 各組織は以下の生育段階で採取した。

OSL-1: V3-V4 (3葉期~4葉期)

OSL-2: V5-V8 (5葉期~8葉期)

OSL-3: R2-V12 (開花期~12葉期)

OSL-4: R5-V16 (子実肥大初期~16葉期)

根: R6 (子実肥大期)

地上部: R6 (子実肥大期)

種子: R8 (成熟期)

20

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

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播されるおそれがある場合は、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配列を含まないため、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 8)。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、種子 1 粒を用いて検定できる。

本法の再現精度については 46 粒の本組換えダイズ及び 92 粒の非組換えダイズを用いて確認試験を行った (別添資料 8)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズへ導入された改変 *dmo* 遺伝子は改変 MON87708 DMO を発現することにより、除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。

25 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²³

30 2010 年から 2011 年にかけて日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において本組換えダイズの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えダイズの R6 世代を供試した (図 9, p33)。対照の非組換えダイズとしては、本組換えダイズの遺伝子導入母本である A3525 を用いた。

²³本項目中の以下に続く a-g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

a 形態及び生育の特性

形態及び生育に関する特性を比較するため、種苗登録のための種苗特性分類表調査項目を参考に、19項目（発芽始め、発芽期、発芽揃い、発芽個体数、発芽率、小葉の形、毛茸の多少、開花始め、開花終わり、伸育型、成熟期、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、収穫期の地上部重、収穫種子の形状（粒色、粒揃い及び粒形））について評価を行った。統計処理を発芽率、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、収穫期の地上部重に関して行い、発芽始め、発芽期、発芽揃い、発芽個体数、小葉の形、毛茸の多少、開花始め、開花終わり、伸育型、成熟期、収穫種子の形状（粒色、粒揃い及び粒形）に関しては統計処理を行わなかった。その結果、発芽率において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が見られた。また、発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが認められた（別添資料 9の表3, p12）。

15

発芽率は、本組換えダイズでは99.2%、対照の非組換えダイズでは100%であった。発芽揃いについては、本組換えダイズでは6月22日、対照の非組換えダイズでは6月23日であり、差は1日であった（別添資料 9の 表3, p12）。

20 b 生育初期における低温又は高温耐性

生育初期における低温耐性試験は、2008年に米国の温室において、播種後21日目の本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3525 及び従来商業品種 6品種の幼苗を日中 15°C/夜間 8°C に設定した人工気象室で 23日間栽培したのち、草勢、主茎長、生育ステージ、生体重及び乾燥重について比較した。その結果、統計処理を行った項目（草勢、主茎長、生体重及び乾燥重）について本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目（生育ステージ）についても本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で違いは認められなかった（別添資料 10の Table 4, p21）。

30

c 成体の越冬性又は越夏性

本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを成熟期の後も引き続き生育させ、わが国の冬期における生育状況を観察した。2011年1月5日に越冬性試験区において供試個体の観察を行ったが、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれも枯死していた（別添資料 9の図 7, p15）。

35

d 花粉の稔性及びサイズ

5 本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから採取した花粉をヨウ素ヨードカリ溶液で染色し、花粉の稔性及びサイズを比較した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズの花粉稔性に違いは認められなかった。また、花粉の形態やサイズにも違いは認められなかった (別添資料 9 の 図 8, p16)。

10 また 2008 年に米国のイリノイ州のほ場で栽培された本組換えダイズと対照の非組換えダイズから花粉を採取し、その稔性率及びサイズを調査した。その結果、花粉の稔性率及びサイズに統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の Table 2, p15 及び Figure 1, p16) 。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

15 本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズについて、種子の生産量に関する項目 (一株当たりの稔実莢数、一株当たりの粗粒重、一株当たりの精粒重、百粒重) を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、一株当たりの粗粒重及び百粒重において、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 9 の表 4, p18)。一株当たりの粗粒重は、本組換えダイズでは 54.7 g、対照の非組換えダイズでは 51.0 g であり、本組換えダイズのほうが高かった。百粒重は本組換えダイズでは 20.6 g、対照の非組換えダイズでは 19.6 g であり、本組換えダイズのほうが高かった (別添資料 9 の表 4, p18)。

25 裂莢性については、本隔離ほ場で生育した本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズを成熟期に収穫し、植物体をビニールハウス内で自然乾燥させた後に裂莢の程度を観察した。その結果、本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズのいずれも難裂莢性であり、種子の裂莢性に違いは認められなかった (別添資料 9 の表 4, p18)。

35 休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で生育した本組換えダイズと対照の非組換えダイズの収穫直後の種子をシャーレに置床して、25°C でインキュベートし、発芽個体数を経時的に調査した。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの発芽率はそれぞれ 98.5%、98.0% と高く、統計学的有意差は認められず、本組換えダイズと対照の非組換えダイズにおいて休眠性は認められなかった (別添資料 9 の表 4, p18)。

f 交雑率

5 本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間
の交雑率を調査するために、本組換えダイズを花粉親とし、対照の非組換えダイズの収穫種子における交雑体の発生頻度を調査した。なお、交雑体の判定については花粉親にあたる本組換えダイズの除草剤ジカンバ耐性を指標とした。

10 本隔離ほ場試験の形態・生育特性調査区で栽培された対照の非組換えダイズ区の本組換えダイズに隣接する条（両端各 3 株を除く）から種子を採種した。これらの非組換えダイズは、南東又は北西に隣接する本組換えダイズとは 1.65m の距離があった（別添資料 9 の図 3, p6）。なお、このプロットでは開花期に防虫網をかけていなかった。収穫種子から無作為に選出した 500 粒を温室においてポットに播種し、本葉第 2~3 葉期に生長した時点で、除草剤ジカンバを薬量 0.56 kg a.e./ha²⁴ の濃度で散布した。除草剤散布後 22 日目に生存個体数を確認した。
15 本試験に供試した 500 粒のうち、除草剤ジカンバ散布から 22 日後の生存個体数は 0 個体であり、本調査において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に交雑は認められなかった（別添資料 9, p19）。

g 有害物質の産生性

20

本組換えダイズから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重において本組換えダイズ区と対照の非組換えダイズ区との間に統計学的有意差は
25 認められなかった（別添資料 9 の表 6~表 8, p20）。

また、除草剤ジカンバ散布下における本組換えダイズの有害物質の産生性を調査するため、3 葉期に除草剤ジカンバを 0.56 kg a.e./ha の濃度で散布した本組換えダイズを供試して土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、本組換えダイズの除草剤ジカンバ散布区及び対照のジカンバ無散布区の間で、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率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（別添資料 9 の表 9~表 11, p27）。
30

²⁴散布濃度は、本組換えダイズが商品化された際に予定されている本組換えダイズに対する除草剤ジカンバの使用体系のうち、茎葉処理 1 回の最大使用量である 0.56 kg a.e./ha とした。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

10 —

(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

15 —

(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

20 申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用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

25 —

(6) 国外における使用等に関する情報

30 本組換えダイズの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は以下のとおりである(表 8, p 45)。

表 8 本組換えダイズの国外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請及び認可状況

5

10

【社外秘につき非開示】

15

なお、本組換えダイズのわが国における申請状況は以下のとおりである (表 9, p45)。

20

表 9 本組換えダイズのわが国における申請及び認可状況

申請時期	承認時期	機関	内容
2009年6月	2010年6月	農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程：隔離ほ場)
2012年1月	—	厚生労働省	食品
2012年1月	—	農林水産省	飼料
2011年10月	—	農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程：一般使用)

25

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²⁵

1 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ダイズがこれまで北米において栽培以外で見ら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¹⁰の自然条件下で雑草化した例は報告されていない。

競合における優位性に関わる諸形質のうち形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率(第一の2-(6)-②-a-e, p41~42)を本隔離ほ場試験において調査した結果、発芽率、一株¹⁵当たりの粗粒重及び百粒重において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に統計学的有意差が見られた。また、統計処理を行わなかった項目では、発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが認められた。また、生育初期における低温耐性及び花粉の稔性及びサイズを米国において調査した結果、統計処理を行った項目では本組換えダイズと対照の非組²⁰換えダイズとの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなかった項目についても本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で違いは認められなかった(第一の2-(6)-②-b, p41)。

発芽率は、本組換えダイズでは99.2%、対照の非組換えダイズでは100%であ²⁵った。いずれも極めて高い発芽率を示しており、本試験で認められた発芽率の差が競合における優位性を高めることはないと考えられた。

発芽揃いについては、本組換えダイズが6月22日、対照の非組換えダイズが6月23日であり、本組換えダイズが1日早かった。しかし、その差はわずかであり、また発芽始めに違いは認められなかった。よって、この差異により競合³⁰における優位性が高まることはないと考えられる。

一株当たりの粗粒重の平均値は、本組換えダイズでは54.7g、対照の非組換えダイズでは51.0gであり、本組換えダイズのほうが高かった。しかし、本組換えダイズの一株当たりの粗粒重の平均値は、本隔離ほ場で2006年~2009年に行われた栽培試験における従来ダイズの一株当たりの粗粒重の範囲(29.8~57.8³⁵g)²⁶に収まっていた。百粒重の平均値は、本組換えダイズでは20.6g、対照の非

²⁵本項目中で、第一の2-(6)-②のa-gに記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

²⁶過去に実施した組換えダイズ [MON89788 系統 (2006年)、MON87769 系統 (2008年)、MON87701 系統 (2009年)、MON87705 系統 (2009年)] の隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えダイズの調査結果に基づく平均値の最小値と最大値を示した。

組換えダイズでは 19.6 g であり、本組換えダイズのほうが高かった。しかし、本組換えダイズの百粒重の平均値は、本隔離ほ場で 2006 年~2009 年に行われた栽培試験における従来ダイズの百粒重の範囲 (18.5~24.9 g)²⁷ に収まっていた。また、これまでに報告されている従来ダイズの百粒重の範囲内 (12.5~21.8 g)(Csanádi et al., 2001; De Bruin and Pedersen, 2009) であった。これらのことから、本試験において認められた一株当たりの粗粒重及び百粒重の差異により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

10 本組換えダイズには改変 MON87708 DMO の発現により除草剤ジカンバ耐性が付与されているが、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下においてジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

15 以上のことから、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。

15

(2) 影響の具体的内容の評価

—

20 (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

25

以上のことから、本組換えダイズは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

30

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

35

ダイズ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。

²⁷過去に実施した組換えダイズ [MON89788 系統 (2006 年)、MON87769 系統 (2008 年)、MON87701 系統 (2009 年)、MON87705 系統 (2009 年)] の隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えダイズの調査結果に基づく平均値の最小値と最大値を示した。

本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験（第一の 2-(6)-②-g, p43）により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

5

本組換えダイズ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87708 DMO 蛋白質及び改変 MON87708 DMO+27 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された（第一の 2-(1)-ロ-②, p16~21）。さらに、第一の 2-(1)-ロ-③（p21~30）に示したように、改変 MON87708 DMO はジカンバに対し基質特異性を有し、ジカンバと構造的に類似するダイズ内在性物質を基質とすることがないため、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。したがって、改変 MON87708 DMO が原因で、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と判断された。

10

15

本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布した際には、図 2（p17）に示したように改変 MON87708 DMO の作用によって除草剤ジカンバの脱メチル反応が触媒され、3,6-DCSA とホルムアルデヒドと水が産生される。このため、本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布した際に生じるホルムアルデヒド及び DCSA により野生動植物等に影響が及ぶ可能性について、本隔離ほ場試験の結果とこれまでの知見とから以下に考察した。

20

まず、本隔離ほ場試験において、除草剤ジカンバ散布下における本組換えダイズの有害物質の産生性を評価するため、除草剤ジカンバを散布した本組換えダイズを供試し、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、本組換えダイズの除草剤ジカンバ散布区及び対照のジカンバ無散布区の間で、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率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（別添資料 9 の表 9~表 11, p27）。

25

30

次に、本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布した場合に産生されるホルムアルデヒド及び DCSA が野生動植物等に影響を与えるかについて以下に考察した。

35

ホルムアルデヒドは粘膜に対し刺激性のある有害物質として知られている（IPCS, 1989）。ホルムアルデヒドは自然のプロセス及び人為的発生の結果として、環境中に広く存在している。自然の発生源としては主として大気中における炭化水素の酸化が挙げられる。人為的発生源としては、ホルムアルデヒドは工業的に大量に生産・使用されているほか、自動車排気ガスや木材の燃焼が挙げられる。通常人為的発生源から離れた大気中には $0.1\sim 2.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、人間が活動している場所では $7\sim 12\mu\text{g}/\text{m}^3$ のホルムアルデヒドが含まれる（IPCS, 1989）。ホルムアルデヒドは土壌若しくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中におい

40

ては速やかに拡散し、また酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられている (IPCS, 1989)。また、ホルムアルデヒドはほとんど全ての生物種において1炭素化合物の代謝過程の中間体として生体内に存在している。実際に、ホルムアルデヒドは多くの植物種で検出されており、その濃度は最大

5 713 mg/kg との報告もある (Adrian-Romero et al., 1999)。食品でも同様にホルムアルデヒド濃度の報告があり、果物や野菜といった生鮮食品では 1~98 mg/kg 程度含まれていると報告されている (IPCS, 1989; Trézl et al., 1997)。

上述したように、ホルムアルデヒドはほとんど全ての生物種において生体内に存在していることから、ほとんどの生物はホルムアルデヒドを代謝する能力

10 を持つと考えられる。植物におけるホルムアルデヒド代謝能については、Giese et al. (1994) がオリヅルランの植物組織から得た抽出物を用いてホルムアルデヒドを代謝する酵素であるホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を測定している。その結果、 K_m 値は $30\mu\text{M}$ (約 0.9mg/kg) であり、オリヅルランは1時間の間に生

15 鮮組織 1g 当たり $12.8\mu\text{g}$ (12.8mg/時間/kg) のホルムアルデヒドを代謝する能力を有することが明らかとなった (Giese et al., 1994)。コムギ、トウモロコシ、スギナの抽出物においてもホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素活性はオリヅルランと同等と考えられる (Giese et al., 1994)。また、ダイズにおいても、振盪培養組織を用いた試験でホルムアルデヒドが代謝され、有機酸やアミノ酸として同化されることが確認されている (Giese et al., 1994)。したがって本組換えダイズに除草剤ジカンバを散布し、本組換えダイズ体内で仮にホルムアルデヒド

20 が産生されたとしても植物体内で代謝され、植物体外には放出されないと考えられる。

仮に本組換えダイズの開花初期に 0.56 kg a.e./ha の除草剤ジカンバを散布した場合に、本組換えダイズ植物体において生成されるホルムアルデヒド量の最大

25 値を以下の仮定に基づき試算した。

仮定 1. ダイズの群落により畦間は完全に覆われている状態であり、散布したジカンバの全量がダイズ植物体に付着する。

仮定 2. ダイズに付着したジカンバの 50%量が、瞬間的にダイズ植物体に吸収され、ホルムアルデヒドに分解される。

30 仮定 3. ジカンバ由来のホルムアルデヒドは生成されている間に代謝によって減少しない。

仮定 4. ダイズの栽植密度は $100,000$ 本/エーカー ($247,105$ 本/ha)、ダイズ 1 植物体当たりの重量は 30g とした。

以上の条件での本組換えダイズの植物体中におけるホルムアルデヒド濃度の最大

35 値は、ダイズ植物体 1 kg 当たり 5.13mg と試算された²⁸。しかし、この値は上述した数種の植物種での最大濃度 (713 mg/kg)(Adrian-Romero et al., 1999) と比較して低く、また生鮮食品で報告されている濃度 ($1\sim 98\text{mg/kg}$)(IPCS, 1989; Trézl et al.,

²⁸ 計算式は以下のとおりである。

$560(\text{g a.e./ha}) \times 0.5 = 221.04$ (ジカンバの分子量) $\times 30.03$ (ホルムアルデヒドの分子量) $= 247105.4$ 本/ha $= 0.030\text{ kg/本} \times 1000\text{ mg/g} = 5.13\text{ mg/kg}$

1997) の範囲内であった。除草剤ジカンバ散布によって本組換えダイズで産生されるレベルのホルムアルデヒドを含む植物体は野生条件下でも存在しており、野生動物が摂食したとしても影響は無いと考えられる。

5 以上をまとめると、ホルムアルデヒドは環境中に広く存在し、土壌若しくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中においては酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられる。また、本組換えダイズに除草剤ジカンバ散布を行った場合に、植物体内でホルムアルデヒドが産生されたとしても、植物体内で吸収、代謝されるため植物体外に放出されるとは考えにくい。除草剤ジカンバ散布時の本組換えダイズ中のホルムアルデヒド濃度を仮に計算したところ、数種の植物種や生鮮食品で報告されているホルムアルデヒド濃度よりも低かった。よって、本組換えダイズの栽培時に、本組換えダイズに対して除草剤ジカンバを散布し、本組換えダイズ中でホルムアルデヒドが仮に産生されたとしても、野生動植物が影響を受けることはないと考えられた。

15 DCSA は除草剤ジカンバがダイズや土壌、家畜で代謝されて生じる代謝産物として知られている。米国環境保護庁 (EPA) による除草剤ジカンバの RED²⁹ (Reregistration Eligibility Decision、農薬再登録確認書) のリスク評価過程において、DCSA の安全性も既に評価されており、その結果、安全であると判断されている (U.S. EPA, 2009)。また、DCSA の毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている (FAO, 2011)。

よって、改変 MON87708 DMO と除草剤ジカンバの反応により産生される DCSA とホルムアルデヒドのいずれも、野生動植物等に影響を与えるものではないと考えられた。以上のことから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

30

(3) 影響の生じやすさの評価

—

35 (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。

²⁹農薬再登録確認書: EPA は連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法 (FIFRA) のもと、1984 年 11 月以前に登録された農薬について安全性の再評価を続けている。再評価された後に農薬再登録確認書が発行される。

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

5

第一の 1-(3)-ニ-③ (p6~8) に記載したように、ダイズと交雑可能な近縁野生種としてわが国に分布しているのはツルマメのみである (日本雑草学会, 1991; 沼田ら, 1997; (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。

10

(2) 影響の具体的内容の評価

15

ダイズとその近縁野生種であるツルマメ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、本組換えダイズに関しても、ツルマメと交雑した場合は雑種が形成されると考えられる。また、当該雑種からツルマメへの戻し交配を経て、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子がツルマメの集団中に浸透していく可能性も否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

20

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、ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯して受粉が完了する上に、開花期の後半にはほとんどの花が開花することなく蕾のまま受精する閉花受精を行うため (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。さらに、吉村ら (2006) はツルマメとダイズの開花時期は異なるため、一般にダイズ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 (2008) は、関東地方では両者の開花には一ヵ月ほどの差がみられるとしている。実際、日本固有の栽培品種でありツルマメと開花期が重複する丹波黒とツルマメをそれぞれ 30 個体

25

30

ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調べた結果、得られた 686 個体のツルマメの後代の中にダイズとツルマメの雑種であると判断された後代が 5 個体確認されており、その交雑率は 0.73%と報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

35

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遺伝子組換えダイズとツルマメを 5 cm 離して栽培し、ツルマメ個体の収穫種子 32,502 粒を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子数は 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の 11,860 粒の中から見つかったと報告されている (Mizuguti et al., 2009)。さらに、農業環境技術研究所は 2006 年及び 2007 年に、上述の 5 cm 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 10 m 離してツルマメを栽培する試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、ダイズとツルマメを 5 cm 離して栽培した試験区における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 粒であり、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験よりより長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であった。一方で、2 m から 10 m 離して栽培した試験区におけるダイズと自然交雑した交雑種子数は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒であり、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、6 m 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、一般的に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可能性は極めて低いと考えられた。

本組換えダイズとツルマメとの交雑性に関する試験は行っていない。しかしながら、本隔離ほ場試験において本組換えダイズと対照の非組換えダイズとを隣接した試験区で栽培し、本組換えダイズを花粉親としたときの自然交雑率を調査したところ、交雑は認められず (第一の 2-(6)-②-f, p43)、本調査における交雑率はこれまでに報告されているダイズ品種間の自然交雑率 (0.03~6.32%)(Abud et al., 2003; Ahrent and Caviness, 1994; Beard and Knowles, 1971; Caviness, 1966; Cutler, 1934; Garber and Odland, 1926; Ray et al., 2003; Weber and Hanson, 1961; Woodworth, 1922) を超えるものではないと考えられた。また、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で生殖に関わる形質を比較した場合、花粉の稔性及びサイズ (第一の 2-(6)-②-d, p42) において違いは認められなかった。一方、種子の生産性 (第一の 2-(6)-②-e, p42) において一株当たりの粗粒重及び百粒重の 2 項目で有意差が認められた。しかし、統計学的有意差が認められた一株当たりの粗粒重及び百粒重について、本組換えダイズの平均値はこれまでに本隔離ほ場で試験栽培された従来ダイズの一株当たりの粗粒重の範囲 (29.8~57.8g) 及び百粒重の範囲 (18.5~24.9g) 内であった。このことから、本組換えダイズの生殖特性は従来ダイズの変動の範囲内であり、本組換えダイズの生殖特性にはツルマメとの交雑性に影響を与えるような違いはないと考えられる。

したがって、本組換えダイズとツルマメとの交雑性は従来ダイズとツルマメとの交雑率と同様に極めて低いと考えられた。

以上のことから、本組換えダイズがわが国で自生するツルマメと交雑する可能性は極めて低いと判断された。

仮に本組換えダイズとツルマメが自然交雑した場合でも、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子がツルマメ集団中に遺伝子浸透していくには、F1 雑種やその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。

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、経時的な調査も含め、研究が行われている。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型が探索されている。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、これらの中間体は全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となった(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地点を除いて翌年には中間体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 et al. (2003)も「ダイズにおいて作物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。

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ており、自然環境に適応したツルマメとは遺伝的、形態的、生理学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の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においては、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(Chen and Nelson, 2004; Oka, 1983)。

Kurodaは2003年~2006年に行った中間体の調査の結果、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。さらに、従来ダイズ由来の遺伝子のツルマメ集団中への浸透が確認されなかった理由として、1)硬実種子の割合が少ないため冬季に吸水した結果、種子が腐るあるいは発芽しても寒さにより枯死する、2)種子が越冬しても発芽後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)。

以上の文献報告より、仮に交雑が起こって雑種ができたとしてもその雑種及

びその雑種後代は、ダイズの遺伝子がある割合で有すことにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されることが考えられる。したがって、雑種及びその雑種後代がツルマメとの交雑を繰り返すことにより、ツルマメにダイズの遺伝子が浸透する可能性は極めて低いと考察された。

5

本組換えダイズにおいて、競合における優位性に関わる形質に違いは認められなかった。したがって、仮に本組換えダイズがツルマメと交雑したとしてもその雑種や後代が自然環境への適応においてツルマメと比べ不利となる点に違いはないと考えられる。したがって、雑種及びその雑種後代がツルマメとの交雑を繰り返すことにより、ツルマメに本組換えダイズの遺伝子が浸透する可能性は、従来ダイズと同様に極めて低いと考察された。

10

このことから、仮に本組換えダイズとツルマメの雑種が形成され、その雑種が改変 MON87708 DMO によりジカンバ耐性を付与されたとしても、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下において、ジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、形成された雑種の競合性がツルマメより高まるとは考えにくく、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 遺伝子が、ツルマメ集団中に遺伝子浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

15

20

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と推定される。さらに、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、本組換えダイズ由来の改変 *dmo* 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考えられた。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。

25

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えダイズは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

30

4 その他の性質

35

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：ダイズは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
5
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。本組換えダイズと
対照の非組換えダイズとの間で競合における優位性に関わる諸形質のうち形態
及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒
性、休眠性及び発芽率を本隔離ほ場試験において比較検討した結果、発芽率、
10
一株当たりの粗粒重及び百粒重において本組換えダイズと対照の非組換えダイ
ズとの間に統計学的有意差が見られた。また、統計処理を行わなかった項目で
は、発芽揃いにおいて本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間に違いが
認められた。また、生育初期における低温耐性及び花粉の稔性及びサイズを米
15
国において調査した結果、統計処理を行った項目では本組換えダイズと対照の
非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められず、統計処理を行わなか
った項目についても本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で違いは認め
られなかった。

検討の結果、発芽率については統計学的有意差はあったが、本組換えダイズ、
対照の非組換えダイズのいずれも極めて高い発芽率を示していることから、こ
20
の差が競合における優位性を高めることはないと判断された。発芽揃いにつ
いては、本組換えダイズのほうが対照の非組換えダイズに比べ 1 日早かったが、
発芽揃いの 1 日の差によって競合における優位性が高まることはないと判断さ
れた。また、一株当たりの粗粒重については、本組換えダイズのほうが対照の
25
非組換えダイズに比べ重かったが、本組換えダイズの一株当たりの粗粒重の平
均値は、本隔離ほ場で 2006 年~2009 年に行われた栽培試験における従来ダイズ
の一株当たりの粗粒重の範囲 (29.8~57.8 g) に収まっていた。百粒重については、
本組換えダイズのほうが対照の非組換えダイズに比べ重かったが、本組換えダ
イズの百粒重の平均値は、本隔離ほ場で 2006 年~2009 年に行われた栽培試験に
30
おける従来ダイズの百粒重の範囲 (18.5~24.9 g) に収まっていた。また、これま
でに報告されている従来ダイズの百粒重の範囲内 (12.5~21.8 g) であった。この
ことから、本試験において認められた一株当たりの粗粒重及び百粒重の差異に
より競合における優位性が高まることはないと判断された。よって、上述した
項目において認められた有意差及び違いにより、競合における優位性が高まる
ことはないと判断された。

本組換えダイズには改変 MON87708 DMO の発現による除草剤ジカンバ耐性
35
が付与されているが、ジカンバを散布されることが想定しにくい自然条件下に
おいて、ジカンバ耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられ
ない。

したがって、本組換えダイズは競合における優位性に起因する生物多様性影
響を生ずるおそれはないと判断された。

40
有害物質の産生性：ダイズに関して、これまでに有害物質の産生性は報告さ
れていない。本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で、有害物質の産

生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討したが、統計学的有意差は認められなかった。

5 本組換えダイズ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87708 DMO が発現しているが、DMO 蛋白質が有害物質であるとする報告はなく、既知アレルギーと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。また、改変 MON87708 DMO はジカンバに対して基質特異性を有するため、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。

10 本組換えダイズに対し除草剤ジカンバを散布した際には、改変 MON87708 DMO によって除草剤ジカンバの脱メチル反応が触媒され、ホルムアルデヒドと 3,6-DCSA が生じる。除草剤ジカンバ散布下における本組換えダイズの有害物質の産生性を評価したところ、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験において、除草剤ジカンバ散布区、無散布区との間で統計学的有意差は認められなかった。

15 また、ホルムアルデヒドは植物において日常的に産生されているものである。本組換えダイズで除草剤ジカンバの散布によって生じるホルムアルデヒドの量は、植物種あるいは生鮮食品 (野菜・果物を含む) に含まれるホルムアルデヒドの量の範囲を超えるものではなかったことから、野生動植物等が影響を受けることは無いと考えられた。

20 DCSA は EPA による除草剤ジカンバの RED のリスク評価過程において安全性が既に評価されており、またその毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている。よって、DMO 蛋白質と除草剤ジカンバの反応により産生される DCSA とホルムアルデヒドのいずれも、野生動植物に影響を与えるものではないと考えられた。

25 これらのことから、本組換えダイズは除草剤ジカンバ散布下においても野生動植物に影響を与えるものではないと結論された。

したがって、本組換えダイズは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

30 交雑性：交雑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、その交雑率も低いことが知られている。また、本組換えダイズの種子の生産量 (収量)、花粉の稔性及びサイズなど生殖に関わる形質の調査結果から、本組換えダイズの交雑性は従来ダイズと同様に低いと推測された。さらに、仮に、本組
35 換えダイズとツルマメが交雑した場合であっても本組換えダイズとツルマメの雑種がツルマメの集団中に優占的に浸透していく可能性は極めて低いと考えられた。

40 以上のことから、本組換えダイズは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本組換えダイズを第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

- 5 Abel, G.H. 1970. Storage of Soybean Pollen for Artificial Crossing. Agronomy Journal
62: 121-123.
- 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 Abud, S., P.I. Mello de Souza, C.T. Moreira, S.R.M. Andrade, A.V. Ulbrich, G.R. Vianna, E.L. Rech and F.J. Lima Aragão. 2003. Gene flow in transgenic soybean in the Cerrado region, Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38: 1229-1235.
- 15 Adrian-Romero, M., G. Blunden, B.G. Carpenter and E. Tyihák. 1999. HPLC quantification of formaldehyde, as formaldemethone, in plants and plant-like organisms. Chromatographia 50: 160-166.
- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. Crop Science 34: 376-378.
- 20 Arfin, S.M. and R.A. Bradshaw. 1988. Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells. Biochemistry 27: 7979-7984.
- 25 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.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 5,633,435, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 30 Beard, B.H. and P.F. Knowles. 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. Crop Science 11: 489-492.
- 35 Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. Science 316: 1185-1188.
- 40 Bradshaw, R.A., W.W. Brickey and K.W. Walker. 1998. N-terminal processing: The methionine aminopeptidase and N^α-acetyl transferase families. Trends in Biochemical Sciences 23: 263-267.
- 45 Carson, M., D.H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette and L.J. DeLucas. 2007. His-tag impact on structure. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography 63: 295-301.

- Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6: 211-212.
- 5 Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
- 10 Chen, Y. and R.L. Nelson. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. *Crop Science* 44: 316-325.
- 15 Comai, L., N. Larson-Kelly, J. Kiser, C.J.D. Mau, A.R. Pokalsky, C.K. Shewmaker, K. McBride, A. Jones and D.M. Stalker. 1988. Chloroplast transport of a ribulose biphosphate carboxylase small subunit-5-enolpyruvyl 3-phosphoshikimate synthase chimeric protein requires part of the mature small subunit in addition to the transit peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 15104-15109.
- 20 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.
- 25 Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- 30 Csanádi, G., J. Vollmann, G. Stift and T. Lelley. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 912-919.
- 35 Cutler, G.H. 1934. A simple method for making soybean hybrids. *Journal of the American Society of Agronomy* 26: 252-254.
- 40 D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiński and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
- 45 De Bruin, J.L. and P. Pedersen. 2009. Growth, Yield, and Yield Component Changes among Old and New Soybean Cultivars. *Agronomy Journal* 101: 124-130.
- Denton, M. and K.G. Kerr. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 57-80.
- 45 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.

- Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
- 5 Emanuelsson, O., H. Nielsen and G. von Heijne. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978-984.
- 10 FAO. 2011. Pesticide residues in food 2010. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. FAO Plant Production and Protection Paper 200. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/Default.aspx#ancor> [Accessed April 5, 2012].
- 15 Ferraro, D.J., L. Gakhar and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 175-190.
- 20 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.
- Fluhr, R., P. Moses, G. Morelli, G. Coruzzi and N.-H. Chua. 1986. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *The EMBO Journal* 5: 2063-2071.
- 25 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.
- 30 Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 18: 967-970.
- Giese, M., U. Bauer-Doranth, C. Langebartels and H. Sandermann. 1994. Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiology* 104: 1301-1309.
- 35 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.
- 40 Graphic Maps. 2008. North America. Worldatlas, Galveston, Texas. <http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> [Accessed May 10, 2012].
- 45 Gribble, G.W. 1998. Naturally occurring organohalogen compounds. *Accounts of Chemical Research* 31: 141-152.
- Gribble, G.W. 2004. Natural organohalogens: A new frontier for medicinal agents?

Journal of Chemical Education 81: 1441-1449.

- 5 Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. The Journal of Biological Chemistry 280: 24759-24767.
- 10 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907-919.
- 15 IPCS. 1989. Formaldehyde. Environmental Health Criteria 89. International Programme on Chemical Safety. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm#SectionNumber:1.4> [Accessed May 17, 2012].
- 20 Janas, K.M., M. Cvikrová, A. Paągiewicz and J. Eder. 2000. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. Plant Physiology and Biochemistry 38: 587-593.
- 25 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.
- 30 Kim, E.H., S.H. Kim, J.I. Chung, H.Y. Chi, J.A. Kim and I.M. Chung. 2006. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. European Food Research and Technology 222: 201-208.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 Krueger, J.P., R.G. Butz, Y.H. Atallah and D.J. Cork. 1989. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. Journal of Agricultural and Food Chemistry 37: 534-538.
- 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.
- 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.

- Lammi, J.J. 2008. Online-Photoperiod Calculator. <http://www.sci.fi/~benefon/sol.html> [Accessed May 10, 2012].
- 5 Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73: 9080-9088.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Palmer, R.G. 2000. Genetics of four male-sterile, female-fertile soybean mutants. *Crop Science* 40: 78-83.
- 40 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.
- 45 Ray, J.D., T.C. Kilen, C.A. Abel and R.L. Paris. 2003. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environmental Biosafety Research* 2: 133-138.
- Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein

- family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.
- Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 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.
- 10 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 15 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.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- 20 Trézl, L., A. Csiba, S. Juhász, M. Szentgyörgyi, G. Lombai and L. Hullán. 1997. Endogenous formaldehyde level of foods and its biological significance. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A* 205: 300-304.
- 25 U.S. EPA. 2009. Reregistration eligibility decision for dicamba and associated salts. June 8, 2006, as amended June 17, 2009. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- 30 Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1623-1626.
- Weber, C.R. and W.D. Hanson. 1961. Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. *Crop Science* 1: 389-392.
- 35 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].
- 40 Wishart, D.S. 2010. Human Metabolome Database Version 2.5. www.hmdb.ca [Accessed June 2, 2010].
- 45 Wishart, D.S., C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J.A. Cruz, E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhtudinov, L. Li, H.J. Vogel and I. Forsythe.

2009. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* 37: D603-D610.
- 5 Woodworth, C.M. 1922. The extent of natural cross-pollination in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 14: 278-283.
- 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.
- 10 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.
- 15
- 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 pp. 62
- 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
- 20
- 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 pp.211
- 25
- 栗原 浩・蓮原 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
- 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
- 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
- 35
- 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
- 財務省 2011 財務省貿易統計
<http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm> [Accessed May, 2011]
- 40

- 島本 義也・福士 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.
- 5 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.
- 日本雑草学会(編) 1991 第Ⅱ編 雑草名. 改訂・雑草学用語集 日本雑草学会 東京 pp. 67
- 10 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 pp. 107
- 農林水産省 2011 平成 21 年度食料需給表(確定値)
- 15 <http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/pdf/fbs-fy21d.pdf> [Accessed May, 2012]
- 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
- 20 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
- 吉村泰幸 2008 遺伝子組換え植物と野生種との交雑率評価—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ポジウム講演要旨 遺伝子組換え植物の生態系影響と管理 —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
- 25 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 30 23 集 pp.22-23

緊急措置計画書

5

平成23年10月3日

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

10

15 第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87708, OECD UI : MON-87708-9) (以下、「本組換え体」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

平成23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 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

*: 管理責任者

5

2 第一種使用等の状況の把握の方法

10

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

15

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

5 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

10 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を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 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体が環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換え体は、環境中で生存しないように不活化する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

20 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可能性が示唆された場合、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。

除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON87708,
OECD UI : MON-87708-9) の別添資料リスト

- 5 別添資料 1 本組換えダイズの作出に用いられた改変 *dmo* 遺伝子から推定した改変 MON87708 DMO+27 のアミノ酸配列 (社外秘)
- 10 別添資料 2-A Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) When Different Herbicides are Applied to MON 87708 and Conventional Soybean (RAR-09-500)(社外秘)
- 別添資料 2-B Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates (RPN-10-365)(社外秘)
- 15 別添資料 2-C Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme from MON 87708 Using *o*-Anisic Acid as a Substrate (RPN-10-499)(社外秘)
- 20 別添資料 3 Summary of PCR Analysis to Confirm the Absence of Agrobacterium Used To Produce Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 (社外秘)
- 別添資料 4 Revised Summary: Heritability and Stability of the *dmo* Expression Cassette in Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Across Multiple Generations (RPN-08-505)(社外秘)
- 25 別添資料 5 Amended Report for MSL0022670: Molecular Analysis of Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 (MSL0023278)(社外秘)
- 別添資料 6 Western Blot Analysis of DMO Protein in Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Leaf Across Multiple Generations Produced in the Greenhouse During 2007 and 2008 (MSL0021459)(社外秘)
- 30 別添資料 7 Assessment of Total DMO Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87708 Produced in United States Field Trials During 2008 (MSL0022510)(社外秘)
- 35 別添資料 8 A) Soybean GM_A92205 EndPoint TaqMan PCR with *PUB* Internal Control for Single Seed (BQ-QC-10711-01)(社外秘)

B) Supplemental File for BQ-QC-10711-01 Soybean GM_A92205
EndPoint TaqMan PCR with *PUB* Internal Control for Single Seed (社
外秘)

- 5 別添資料 9 除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.)
Merr.)(MON87708, OECD UI: MON-87708-9) の隔離ほ場におけ
る生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 10 別添資料 10 An Assessment of the Effect of Cold Stress on the Growth of
Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 under Growth Chamber
Conditions (MSL0021852)(社外秘)
- 15 別添資料 11 Viability and Morphology Evaluation of Pollen from
Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Produced in a U.S. Field
Trial During 2008 (MSL0021880)(社外秘)
- 別添資料 12 モニタリング結果報告書 (社外秘)