

資料2

遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の
承認申請に係る審査報告書

チョウ目害虫抵抗性ダイズ
MON87751 系統

平成 28 年5月 17 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目 次

| | 頁 |
|-----------------------------------|----|
| 1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論 | 1 |
| 2. 審査の概要 | 2 |
| 〈審査参考資料〉 | |
| 資料 1. 第一種使用規程承認申請書 | 9 |
| 資料 2. 審査データの概要 | 10 |
| 資料 3. モニタリング計画書 | 69 |
| 資料 4. 緊急措置計画書 | 75 |

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. A registration authority outside of Japan should not grant a registration on the basis of an evaluation unless it has first received authorization for such use from the owner of the data submitted to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan or has received the data on which the summaries are based, either from the owner of the data or from a second party that has obtained permission from the owner of the data for this purpose.

1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

日本モンサント株式会社より、平成27年8月18日付けで承認申請のあった「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統（以下「本組換えダイズ」という。）」について、生物多様性影響評価を行った。

本組換えダイズは、細菌由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2AB2* 遺伝子を導入して作出している。

本組換えダイズは、*cry1A.105* 遺伝子の発現により生産される Cry1A.105 蛋白質及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の発現により産生される改変 Cry2Ab2 蛋白質の働きにより、食餌する特定のチョウ目害虫に対して殺虫作用を示してその被害を軽減し生育できるものである。

審査の概要は、本報告書の2のとおりである。学識経験者からは、本組換えダイズを承認申請のあった第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であるとの意見をj得ている。

これらの結果に基づいて、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(参考) これまでの審査経緯

| 日付 | 事項 | 備考 |
|-------------|-------------------------------|------|
| 平成27年 8月18日 | 第一種使用規程承認申請受理 | |
| 平成27年 9月 1日 | 生物多様性影響評価検討会農作物分科会における審査（第1回） | 非公開※ |
| 平成27年11月 6日 | 生物多様性影響評価検討会農作物分科会における審査（第2回） | 非公開※ |
| 平成28年 1月21日 | 生物多様性影響評価検討会農作物分科会における審査（第3回） | 非公開※ |
| 平成28年 2月15日 | 生物多様性影響評価検討会総合検討会における審査 | 公開 |
| 平成28年 2月26日 | 学識経験者からの意見提出 | |
| 平成28年 5月17日 | 審査報告書とりまとめ | |

※ 開発企業の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため。

2. 審査の概要

本組換えダイズは、大腸菌由来のプラスミド pBR322 をもとに構築されたプラスミド PV-GMIR13196 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入し作出されている。

本組換えダイズには、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1Ab* 遺伝子、*cry1F* 遺伝子及び *cry1Ac* 遺伝子のそれぞれ一部塩基配列を組み合わせて作製された *cry1A.105* 遺伝子（Cry1A.105 蛋白質をコード）及び改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする改変 *cry2Ab2* 遺伝子が組み込まれている。これら 2 つの遺伝子を含む T-DNA 領域が染色体上に 1 コピー組み込まれており、複数世代にわたり安定して伝達されていることが遺伝子の分離様式及びバイオインフォマティクス解析により確認されている。また、目的の遺伝子が複数世代にわたり安定して発現していることがウエスタンブロット法及び ELISA 法により確認されている。

以上より、本組換えダイズに関して、生物多様性影響を生じさせる可能性のある性質である、(1) 競合における優位性、(2) 有害物質の産生性、(3) 交雑性、の 3 つの項目について評価を行った。

(1) 競合における優位性

ダイズは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでに自然環境下で雑草化したとの報告はない。

2014 年及び 2015 年に我が国の隔離ほ場において、本組換えダイズ及び宿主の非組換えダイズを栽培し、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性・サイズ及び種子の生産量、脱粒性、休眠性、発芽率等について調査した。また、米国の人工気象室において、本組換えダイズ及び宿主の非組換えダイズを栽培し、生育初期における低温耐性を調査した。

隔離ほ場試験の結果、主茎長、最下着莢節位高及び一株当たりの粗粒重について統計学的有意差が認められた。このうち、本組換えダイズの主茎長及び最下着莢節位高については、非組換えダイズの種内品種間変動の範囲内にあった。また、一株当たりの粗粒重については、有意差は認められたものの、精粒重、百粒重等の粗粒重以外の種子の生産量に関する項目で差異は認められなかった。

これらのことから、認められた差異が、本組換えダイズの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

以上より、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本組換えダイズを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(2) 有害物質の産生性

ダイズは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでにダイズが有害物質を産生したとの報告はない。

本組換えダイズが産生する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性の配列を持たないことが確認されている。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考え難い。

実際に、鋤込み試験及び後作試験を行ったところ、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について本組換えダイズ及び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なかった。また、土壌微生物相試験を行ったところ、細菌、放線菌及び糸状菌数について本組換えダイズ及び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なかった。

本組換えダイズが産生する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すが、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認されている。このため、影響を受ける可能性が否定できない野生動植物として、我が国に生息する絶滅危惧又は準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫 17 種が特定された。特定されたチョウ目昆虫に対する影響に関して、

- ① 本組換えダイズをチョウ目昆虫が直接食餌する場合
- ② 本組換えダイズから飛散した花粉をチョウ目昆虫が食餌する場合
- ③ 本組換えダイズがツルマメと交雑して雑種を形成し、チョウ目害虫抵抗性を獲得した雑種及びその後代をチョウ目昆虫が食餌する場合

の 3 つのケースについて評価を行った。

その結果、

- ① については、輸入された本組換えダイズ種子が輸送中にこぼれ落ちたあとに生育する場所は、輸送道路の近傍となることが予想されるが、このような場所に絶滅危惧又は準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫が生息し、当該ダイズを食餌する可能性は極めて低いと考えられること
- ② については、ダイズの花粉は産出量が少なく、かつ粘着性を有し飛散する可能性が低いと、特定されたチョウ目昆虫が本組換えダイズの花粉を食餌する可能性は極めて低いと考えられること
- ③ については、特定されたチョウ目昆虫がツルマメのみを食餌するとは考えられないほか、(3) 交雑性で後述するとおり、我が国に輸入された本組換えダイズが輸送中にこぼれ落ちたあとに生育し、ツルマメとの雑種が生じ、その後代が存続していく可能性は極めて低いと考えられ、当該ツルマメを特定されたチョウ目昆虫が食餌する可能性は極めて低いと考えられることから特定されたチョウ目昆虫が個体群レベルで影響を受けるとは考え難い。

以上より、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本組換えダイズを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(3) 交雑性

ダイズの近縁野生種としてはツルマメが知られており、影響を受ける可能性のある野生動植物としてツルマメが特定された。

我が国の自然環境下において本組換えダイズとツルマメが交雑し、本組換えダイズに導入されている *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子はその雑種及びその後代に浸透することによって、当該遺伝子がツルマメ集団に定着することが考えられる。

しかしながら、

- ① ダイズとツルマメは自殖性植物であり、かつ我が国において開花期が重複することは稀であること
- ② ツルマメの開花期と重複する晩生のダイズ品種を人為的に交互に植栽した場合であっても、その交雑率は0.73%にすぎないとの報告があること
- ③ 実際、隔離ほ場試験において本組換えダイズと宿主の非組換えダイズとの交雑種子は認められなかったこと

から、我が国の自然環境下において、本組換えダイズ由来の *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子がツルマメ集団に浸透し定着することは考え難い。

他方、本組換えダイズとの交雑によりツルマメがチョウ目昆虫に対する抵抗性を獲得した場合には、チョウ目昆虫の食害が抑制され、ツルマメの競合における優位性が高まる可能性が考えられる。

しかしながら、

- ① ツルマメは一般的にチョウ目昆虫の食害以外にも他の植物との競合や昆虫・動物による食害、ヒトによる除草の影響等を受け、個体群が形成されていること
- ② チョウ目昆虫による食害がツルマメの種子生産性への影響を評価するため、ツルマメの10%、25%及び50%の摘葉を行ったが、無処理区と比較して莢数及び種子数の減少が認められなかったこと

から、チョウ目昆虫抵抗性を獲得したのみでは、競合における優位性が高まるとは考え難い。

なお、ダイズの積み下ろし港から飼料工場までの限定したモデルルートを設定し、我が国に輸入されたダイズ種子が輸送中にこぼれ落ち、輸送道路近傍に自生して、ツルマメと交雑する可能性を検討したが、そのような交雑により生じる種子数は年間最大0.75粒と試算された。

以上のことから、本組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は低く、また、仮に交雑が生じたとしてもそれら雑種種子が生育する可能性は極めて低いと考えられることから、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本組換えダイズを使用する限り本組換えダイズは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそ

れはないと判断した。

(4) 結論

ダイズは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでに自然環境下で雑草化したとの報告はない。

我が国の隔離ほ場及び米国の人工気象室において、本組換えダイズ及び宿主の非組換えダイズについて、競合における優位性に関わる諸形質を調査した結果、数項目で有意差は認められたが、ダイズの種内品種間変動の範囲内にあり、本組換えダイズの競合における優位性が高まることはないと考えられた。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物質の特定はされず、競合における優位性に起因して、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

宿主が属する生物種であるダイズは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでにダイズが有害物質を産生したとの報告はない。

本組換えダイズで発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性の配列を持たないことが確認されている。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考え難い。

我が国の隔離ほ場において、鋤込み試験及び後作試験を行ったところ、本組換えダイズ及び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なかった。また、土壌微生物相試験を行ったところ、細菌、放線菌及び糸状菌数について本組換えダイズ及び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なかった。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物質は特定されず、有害物質の産生性に起因して生物多様性が生ずるおそれはないと判断した。

また、交雑性については、ダイズの近縁野生種としてはツルマメが知られており、影響を受ける可能性のある野生動植物としてツルマメが特定されたが、使用内容を輸入、流通、加工等(栽培を除く)に限定し、ダイズ及びツルマメの交雑性に関する情報及び輸入ダイズのこぼれ落ちによる試算結果に基づき、交雑性に起因して生物多様性が生ずるおそれはないと判断された。

以上より、本組換えダイズを申請された第一種使用規程(栽培を除く)に従って使用した場合、我が国における生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断した。

なお、当該評価の前提とした状況の変化及び本組換えダイズの生育状況を把握するため、第一種使用規程に申請者による本組換えダイズ等のモニタリングが位置づけられている。本組換えダイズが我が国に輸入される場合には、当該第一種使用規程に則って申請者がモニタリングを実施する。

モニタリングの結果、本組換えダイズとツルマメの交雑体が確認された場合若しくはトラックの横転等により、通常の運搬により生じうると想定されるこぼれ落ちの範囲を超える本組換えダイズの散逸が確認された場合には緊急措置計画書に基づき、申請者が生物多様性影響を効果的に防止する措置を講じる。

〈審查參考資料〉

資料1. 第一種使用規程承認申請書

一般使用(食用・飼料用としての輸入、流通等(栽培を除く))の承認を受けるために申請者から提出された申請書類。

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 8 月 18 日

農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 望月 義夫 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 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 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 | チョウ目害虫抵抗性ダイズ (<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)(MON87751, OECD UI : MON-87751-7) |
| 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、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 | 別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する |

資料 2 : 審査データの概要 (評価に使用したデータ)

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名 : ダイズ

英名 : soybean

学名 : *Glycine max* (L.) Merr.

② 宿主の品種名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は A3555 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

資料 2 : 審査データの概要

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

(2) 使用等の歴史及び現状

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 1,100 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)。我が国へは弥生時代に渡来し、栽培が始まったと考えられている (山内, 1992)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

a. 主たる栽培地域

国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報によると、2013 年の全世界におけるダイズの栽培面積は、約 11,127 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,070 万 ha、ブラジルが約 2,786 万 ha、アルゼンチンが約 1,942 万 ha、インドが約 1,220 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2013 年の我が国における栽培面積は、約 12.9 万 ha であった (FAOSTAT, 2015)。

b. 栽培方法

我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にくくなる。また病害虫の防除は、ダイズの栽培で最も大切な作業の一つであり、生育初期の害虫に対しては早めに薬剤散布を行う。収穫は、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)。

資料 2 : 審査データの概要

c. 流通実態及び用途

2013 年の我が国におけるダイズの輸入量は、約 276 万トンであり、そのうちの約 60 %が米国から、約 24%がブラジルから輸入されている (財務省, 2015)。

輸入されたダイズが我が国で使用される際の用途は、1) 搾油用、2) 飼料用及び 3) 食品用 (搾油用を除く、以下同じ。) に大別される。2013 年には、全輸入ダイズの 69.2%に当たる約 191 万トンが搾油用、3.8%に当たる約 10.4 万トンが飼料用、33.9%に当たる約 94 万トンが食品用 (搾油用を除く) として用いられている (農林水産省, 2015)。

なお、海外から輸入される栽培用ダイズ種子は 32 キロから 50 トン (2004~2013 年) (植物防疫所, 2015) と変動は大きいものの、国産種子 (年間 6,000 トン (農林水産省, 2015) と比べるとごくわずかである。

輸入される栽培用種子の大半は中国産である (植物防疫所, 2015)。海外における種子生産の際には異品種の混入を避けるために隔離措置がとられており、我が国に輸入される際には、コンテナにバラ積みされることはなく、袋あるいは箱詰めされる。また、我が国における採種については、主要農作物種子法に基づき審査を受けた採種ほ場 (指定種子生産ほ場) のみで行われる。指定種子生産ほ場は、異品種の混入を避けるために隔離され、異株は抜き取られることとなっており、また生産された種子についても異品種の混入の有無を審査することとなっている。審査の際の異品種の混入はないことが条件とされている (農林水産省生産局農産部穀物課聞き取り)。

(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ずる (OECD, 2000)。茎は、主茎と分枝に分けられ、主茎節の複葉の葉腋から分枝が伸長し、また、根は一般に空中窒素固定能を有する根粒菌の寄生によって根粒を着生する (後藤, 1995)。花には 1 本の雌ずいがあり、その基部の子房に 1~5 個の胚珠を内蔵しており、子房は受粉後に肥大して莢を形成する (後藤, 1995)。また、ダイズの花芽分化には日長と温度が大きく影響する。花芽分化には、ある時間以上の暗期が必要で、温度は 15 °C 以上を要し 25 °C 前後までは高いほど促進的に働く。短日高温では開花を促進する効果は大きいですが、長日高温では促進効果がないか、かえって遅れることがある (昆野, 1987)。

資料 2 : 審査データの概要

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ダイズ種子の発芽適温は 30~35 °C、最低発芽温度及び最低生育温度は 2~4 °C であり、10 °C 以下での発芽は極めて悪い (昆野, 1987)。ダイズの栽培適地は、生育期間中 18~28 °C 程度、多照で適度の降雨があることが望ましいとされているが、今日のダイズ品種では日長感応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 度のスウェーデンでも栽培可能である (昆野, 1987)。

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

なお、我が国において、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

該当なし

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は、裂莢した際に地表に落下する。我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等では、ほとんどの品種が難裂莢性であり裂莢性の程度は低い。今回、遺伝子導入に用いた宿主である A3555 もまた難裂莢性であることが認められている。

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

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

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

資料 2 : 審査データの概要

はこれまでのところない。

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

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

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我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 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我が国で自生していたとしても、その生育範囲はかなり限られていることが予想される。

次に、ダイズとツルマメの自殖性及び他殖性の程度に関して述べる。ダイズとツルマメは、通常開花前に開葯し、受粉が完了する上に、開花期の後半は、ほとんどの花が開花しない閉花受粉であるため (阿部ら, 2001)、どちらも典型的な自殖性植物であると考えられている。これまでに、通常のほ場条件でダイズ同士における他家受粉率は 0.03~3.62% (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。

しかし、ダイズの家受粉率は条件によっては上昇することもある。例えば、ダイズの開花期にミツバチの巣箱をダイズほ場の中心に設置した場合、平均で 2.96~7.26% となり、局所的には 19.5% に達したと報告されている (Abrams et al., 1978)。また、ツルマメ間の家受粉率についても、秋田県雄物川流域で約 13% という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (Fujita et al., 1997)。この集団から採取されたツルマメの 1 胚珠当たりの花粉数は平均で 600~700 粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の 1 胚珠当たりの平均的な花粉数 (Cruden, 1977) の間に位置していた。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域

資料 2 : 審査データの概要

特有の環境条件によるものなのか、若しくは集団内の遺伝的特性によるものなのかは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事等による環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメ集団の周辺では花粉を媒介する昆虫であるミツバチやクマバチ等が頻繁に観察されていた。このことから、このツルマメ集団の周辺の環境には、他家受粉を引き起こす要因が通常よりも多く存在していたと考えられる (Fujita et al., 1997)。

ダイズとツルマメは、前述したようにいずれも閉花受粉を行う自殖性植物である。さらに、吉村ら (2006) は、ツルマメとダイズの開花時期は異なるため、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 1 ヶ月ほどの差が見られるとしている。なお、ツルマメの開花時期について、岩手県では 8 月上旬から 9 月中旬との報告がある (須田ら, 1995)。また、加賀ら (2006) は、青森及び広島で採取されたツルマメ系統を秋田県、茨城県、広島県の 3 地点で栽培したところ、その開花期は 8 月中旬から 9 月中旬であったと報告している。

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 (品種名 : GIs/93-J-01) を 50 cm 間隔でそれぞれ 30 個体ずつ交互に植えて、その自然交雑率を調査した。自然交雑実験終了後に結実したツルマメから採種された 686 個の種子から植物体を生育させ、調査した結果、ダイズとツルマメの雑種であると判断された植物体が 5 個体認められたことから、その交雑率は 0.73% と報告されている (Nakayama and Yamaguchi, 2002)。

また、農業環境技術研究所において、2005 年に除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを 5 cm 離して異なる 3 つの播種日で栽培し、ツルマメ個体の収穫種子を調査したところ、ダイズと自然交雑した交雑種子は、それぞれの播種日で 7,814 粒中 0 粒、12,828 粒中 0 粒及び 11,860 粒中 1 粒であり、この交雑種子は、ダイズの播種時期をずらして両種の開花最盛期を最も近くした群から見つかったと報告されている (Mizuguti et al., 2009)。

さらに、2006 年及び 2007 年には、除草剤グリホサート耐性の遺伝子組換えダイズのプロット (4 条 (10 個体/条)) の間にツルマメ 3 個体を網状の壁に沿わせて栽培した場合の自然交雑率が調査されている (吉村, 2008)。その結果、ダイズと自然交雑した交雑種子数は、2006 年の試験では 44,348 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では 25,741 粒中 35 粒であったと報告されている (吉村, 2008)。また、農業環境技術研究所は、2006 年及び 2007 年に、前述の 5 cm 離して栽培する試験区に加え、遺伝子組換

資料 2 : 審査データの概要

えダイズから 2、4、6、8 及び 10 m 離してツルマメを栽培した試験区を設定し、その自然交雑率を調査している。その結果、自然交雑した交雑種子は、2006 年の試験では 68,121 粒中 0 粒、ダイズとツルマメの開花期間の重複が 2006 年の試験より長くなった 2007 年の試験では、66,671 粒中 3 粒であった。なお、2007 年の試験において見られた 3 粒の交雑個体については、2、4 及び 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、ダイズとツルマメ集団が隣接して生育し、かつ開花期が重なり合う場合は低頻度で交雑しうるが、そのような特殊な条件の場合でも、ダイズとツルマメが交雑する頻度は極めて低いと考えられた。

実際に、1996 年以降、約 20 年間除草剤グリホサート耐性ダイズが輸入されているが、農林水産省による遺伝子組換え植物実態調査 (2009 年~2013 年) のダイズ輸入実績港 10 港での調査の結果では、ダイズ陸揚げ地点から半径 5 km 以内において除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は認められなかった (農林水産省, 2011a; 農林水産省, 2011b; 農林水産省, 2012a; 農林水産省, 2013; 農林水産省, 2014)。また、我が国と同様に、ツルマメの自生地域であり、かつ除草剤グリホサート耐性ダイズを輸入している韓国において、2000 年に広範囲の地域から採取された 243 系統のツルマメに除草剤グリホサートを散布したところ、全ての系統が枯死し、除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は確認されなかったと報告されている (Kim et al., 2003)。

従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、我が国において経時的な調査が行われている。2003 年から 2006 年にかけて、ツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間体が探索されている。その結果、調査した 58 地点 (秋田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点) のうち、秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 地点から、形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ 17 個体の中間体が発見され、その後、マイクロサテライトマーカーにより、これらの中間体は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になったと報告されている (Kuroda et al., 2010)。

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

資料 2 : 審査データの概要

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、従来ダイズに由来する遺伝子のツルマメ集団中への浸透は確認されなかった (Kuroda et al., 2008)。同様に、Stewart ら (2003) も「ダイズから野生種への遺伝子浸透に関する分子学的事実はない」と述べている。

このように、ダイズとツルマメの雑種の生存が制限される理由として、雑種自体の競合性の低下が考えられる。ダイズは人為的な栽培環境に適応進化し、自然環境で生育していくための形質を失っている可能性が考えられる。実際に、自然環境に適応したツルマメと栽培作物であるダイズでは形態的及び生態的特性に大きな違いがある。したがって、雑種及び雑種後代が栽培作物であるダイズの遺伝子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ツルマメの親系統とともに播種した後で、それらの定着の様子を 3 年間追跡調査した結果、雑種系統の定着率は親系統であるツルマメと比較して明らかに劣っていたことが示されている (Oka, 1983)。さらに、従来ダイズとツルマメの雑種や両者の中間の表現形を示す個体において、休眠性、倒伏性、裂莢性はツルマメに比べ低下していることが報告されている (Oka, 1983; Chen and Nelson, 2004)。

上述したように、Kuroda ら (2010) は 2003~2006 年に行った中間体の調査の結果、17 個体の中間体を発見しているが、雑種後代は速やかに自然環境から消失していたと報告している。その理由として、1) F1 雑種の休眠性は種子親であるツルマメの形質によって決定されるため土壤中で生存するが、雑種後代種子では硬実種子の割合が減少するため冬期に種子が腐るか、又は発芽しても寒さにより枯死する、2) 雑種後代の種子が越冬して発芽しても、その競合性はツルマメより低いために他の植物との競合に勝てず淘汰される、の 2 つを挙げている (Kuroda et al., 2010)。

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遺伝子組換えダイズを用いた非組換えダイズとの交雑試験を行った。その結果、交雑が観測された最長距離での交雑率は花粉親からの距離が、2001 年は 7.0 m で交雑率 0.040%、2002 年は 2.8 m で 0.08%、2003 年は

資料 2 : 審査データの概要

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 (Yoshimura et al., 2006)。

ホ 病原性

該当なし

ヘ 有害物質の産生性

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

ト その他の情報

① ダイズと交雑可能な近縁野生種であるツルマメの生育を制限する要因

一般的に、自然条件下で自生する植物体の群落は他の植物との競合、非生物的環境との相互作用、昆虫や動物による食害及び人間活動の影響といったいくつかの要因によって制限されている (Tilman, 1997)。

ツルマメの生育を制限する要因に関して、出芽したツルマメを個体識別し、その生存・死亡状況を約 2 週間間隔で観察した結果、生育初期には、暑さと乾燥により多数死亡し、生き残った個体も草刈で大きな損傷を受けて死亡したと報告されている (中山ら, 2000)。

また、Oka (1983) は、ツルマメの生育は、周辺に生育する雑草種の影響を受けていると述べている。また、羽鹿ら (2003) は、ツルマメの自生場所は河原や工事現場など常に攪乱が生じているところで、生息環境が元々不安定な上、都市近郊などでは自生地が開発で破壊されたりするケースもあり、消滅する個体群も少なくない、と報告している。さらに、遷移の進んだ自生地ではイネ科植物などの雑草との競合により消えつつある個体群も見られ、攪乱が生じた後ツルマメが増殖を繰り返すことが可能な期間はかなり短い印象を受けたと報告している (羽鹿ら, 2003)。

② ツルマメを摂食するチョウ目昆虫

ツルマメを摂食するチョウ目昆虫については、農業・食品産業技術総合研究機構が、東北地方、関東地方、中国四国地方、九州地方の国内 4 地域において、それぞれ数ヵ所のツルマメ個体群を定期調査地点として選定し、2011 年及び 2012 年のツルマメ生育期間 (5 月~11 月) 及び 2012 年のツルマメ発芽期~初期生育

資料2：審査データの概要

期(4~5月)に調査を行っている(安田ら, 2014)。その結果、66種のチョウ目昆虫の幼虫が、ツルマメを食餌していたことが確認された。

③ ツルマメに対する昆虫等の生物の食害程度及び食害が種子生産性に及ぼす影響(別添資料1)

生育中期から成熟期のツルマメが、昆虫等の生物から受ける食害程度を明らかにし、その食害程度がツルマメの種子生産性に及ぼす影響を評価するために、自生するツルマメがチョウ目昆虫から受ける食害程度の調査、及びチョウ目昆虫の食害を模した摘葉処理試験を行った(別添資料1)。

2011年から2013年に茨城県及び佐賀県において、自然環境下においてツルマメ集団がチョウ目昆虫から受ける食害程度を把握するため、自生するツルマメ集団がチョウ目昆虫を含む生物から受ける食害・傷害程度を調査した。

調査の結果、ツルマメはチョウ目以外の多くの生物により食害及び傷害を受けていることが明らかとなった。また、ツルマメが受ける食害・傷害程度は環境要因を含めた様々な要因に影響を受けていると考えられたが、チョウ目昆虫による食害程度は、異なる環境及び年次においてもコウチュウ目昆虫、チョウ目昆虫、ツルマメに食害を及ぼすその他の生物及び病害等と比較して低かった(別添資料1)。

次に、チョウ目昆虫による食害が、ツルマメの種子生産性に与える影響を評価するため、チョウ目昆虫の食害を模した摘葉処理試験を行った(別添資料1)。

試験の結果、R1~R2期(開花始~開花期)にツルマメの10、25及び50%の葉を取り除いた場合でも、無処理区と比較して莢数及び種子数の減少は認められなかった。

以上のことから、チョウ目昆虫による食害程度はツルマメの生育速度及び種子生産性に影響を及ぼすものではないと考えられた。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

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

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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えダイズの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 4 及び表 1 に示したとおりである。

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

まず、*cry1A.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質について記載する。本組換えダイズ中で発現する Cry1A.105 蛋白質は 1,181 個のアミノ酸からなる。3 つのドメインを持ち、分子量は約 133 kDa である。Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質又は Cry1Ac 蛋白質¹由来のドメイン I 及び II、Cry1F 蛋白質由来のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質由来の C 末端ドメインからなるキメラ蛋白質である (図 1)。Cry1Ac 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、及び Cry1F 蛋白質は土壌細菌 *B. thuringiensis* に由来する殺虫蛋白質で、作用機構については、一般的な Bt 蛋白質と同一である。

cry1A.105 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、標的であるチョウ目害虫に対する殺虫活性を高めるため、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせることにより作製された。このような Bt 蛋白質間でのドメインの組換えは自然界でも起こることが知られており、このドメインの組換えによって Bt 蛋白質は多様性を獲得したと報告されている (de Maagd et al., 2001; de Maagd et al., 2003)。この報告後、分子生物学的手法を用いたドメインの組換えにより、Cry1 蛋白質のチョウ目害虫に対する殺虫活性の特異性を高めるよう改良した Bt 蛋白質が開発さ

¹Cry1Ab 蛋白質と Cry1Ac 蛋白質のドメイン I と II のアミノ酸配列相同性は 100%であった。

資料 2 : 審査データの概要

れている (Baum, 1998; Baum et al., 1999)。また、既に第一種使用の承認 (2006 年 4 月 10 日) を受けているチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ (*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5) で発現する Cry1F 蛋白質も、複数の Bt 蛋白質のドメイン又は配列を組み合わせたキメラ蛋白質である (Gao et al., 2006)。Cry1A.105 蛋白質のドメイン I 及び II はそれぞれ Cry1Ab 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のアミノ酸配列と 100%の相同性を持つ。ドメイン III は Cry1F 蛋白質のドメイン III との相同性が 99%である。また、C 末端ドメインは、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインとの相同性が 100%である (別添資料 2 の Figure 3, 図 1)。

なお、Cry1A.105蛋白質とCry1Ac蛋白質、Cry1Ab蛋白質及びCry1F蛋白質それぞれとの相同性は、93.6%、90.0%及び76.7%である。

本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質には、発現蛋白質を葉緑体に移動させる目的で、5'末端に葉緑体輸送ペプチド (CTP) であるRbcS4をコードする塩基配列が付加されている。RbcS4は葉緑体へCry1A.105蛋白質前駆体を輸送した後、蛋白質分解酵素により切断される。本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質のN末端アミノ酸配列解析の結果から、既に第一種使用の承認 (2008年1月31日) を受けているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI : MON-89034-3) (以下、「MON89034」とする。) で発現するCry1A.105蛋白質と比較して4アミノ酸が付加されていることが確認された (図 2)。この4アミノ酸を除き、本組換えダイズで発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列と、MON89034で発現するCry1A.105蛋白質の推定アミノ酸配列の相同性は100%であった (図 2)。N末端に追加されていた4アミノ酸は、標的昆虫への特異性と殺虫活性に関わるトリプシン耐性コア蛋白質に含まれていないため、本組換えダイズ中で発現するCry1A.105蛋白質の殺虫活性及びその特異性に影響はないものと考えられた。

資料 2 : 審査データの概要

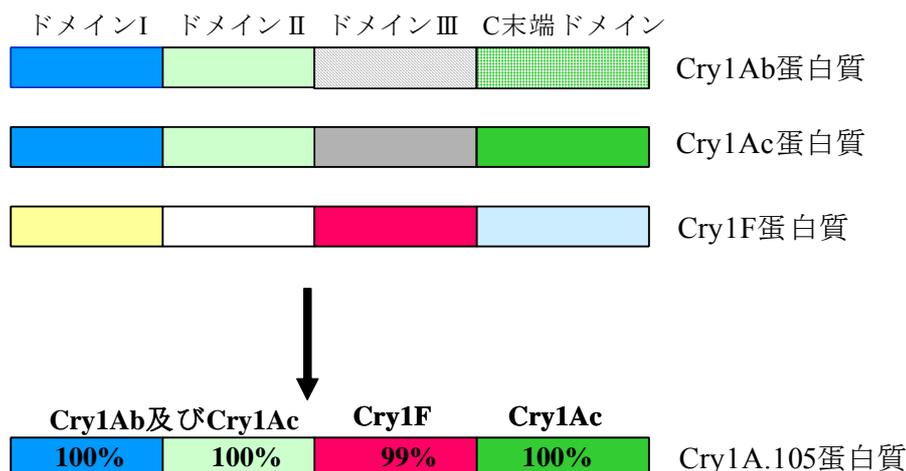


図 1 本組換えダイズにおいて発現している Cry1A.105 蛋白質の構造
 *Cry1A.105 蛋白質の各ドメインの色分けは、それぞれのドメインが同じ色で示した上
 段の Cry 蛋白質に由来することを示す。

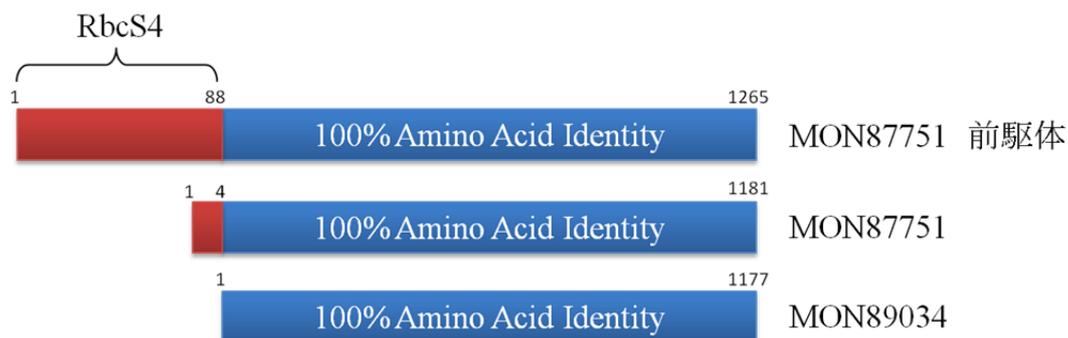


図 2 本組換えダイズ及び MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質のアミノ酸配列の概略図

次に、*cry2Ab2* 遺伝子がコードする Cry2Ab2 蛋白質について記載する。

Cry2Ab2 蛋白質をコードする *cry2Ab2* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-263 株の CryIIB と呼ばれるオープンリーディングフレームに由来するが (Donovan, 1991)、植物中での発現を高めるためにコドンが最適化されている (Fischhoff and Perlak, 1996)。本組換えダイズ中で発現する Cry2Ab2 蛋白質には、制限酵素切断部位を挿入する目的で、N 末端から 2 番目にアスパラギン酸が挿入されている。よって、本組換えダイズに導入された *cry2Ab2* 遺伝子を「改変 *cry2Ab2* 遺伝子」とし、発現する Cry2Ab2 蛋白質を「改変 Cry2Ab2 蛋白質」とする。

資料 2 : 審査データの概要

本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列は、MON89034 中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列と 100%一致する。本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質には、発現蛋白質を葉緑体に移動させる目的で N 末端に CTP2 が付加されている。Rbcs4 同様、CTP2 は葉緑体へ改変 Cry2Ab2 蛋白質前駆体を輸送した後、蛋白質分解酵素により切断される。本組換えダイズで発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端アミノ酸配列解析の結果、野生型 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端と比較して、CTP2 とともに N 末端から 15 アミノ酸が切断されていることが確認された (別添資料 2 の Figure 1, 図 3)。これは、改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端が一般的な細胞質プロセシングペプチド (SPP) によってプロセシングを受けた結果によるものと考えられた (Richter and Lamppa, 1998)。MON89034 で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質は、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端に 3 アミノ酸が付加されている (U.S. EPA, 2010)。結果的に、本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質は、MON89034 で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質よりも 18 アミノ酸短くなっていることが確認された (図 3)。しかし、本組換えダイズで発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の切断された N 末端のアミノ酸は、標的昆虫への特異性と殺虫活性に関わるトリプシン耐性コア蛋白質には含まれていないため、本組換えダイズ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫活性及びその特異性に影響はないものと考えられる。

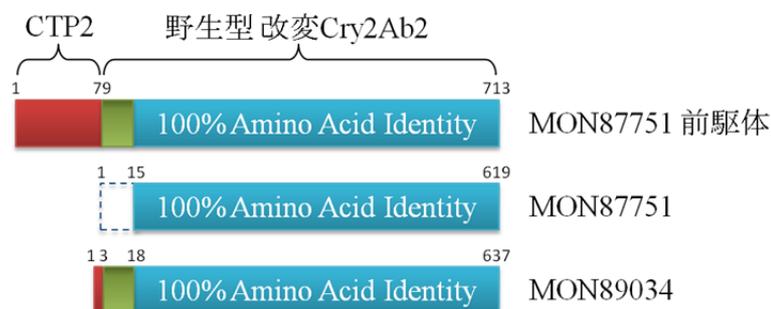


図 3 本組換えダイズ及び MON89034 中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列の概略図

本組換えダイズにおいて発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 3 に示した。

資料 2 : 審査データの概要

ロ 構成要素の機能

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

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

資料 2 : 審査データの概要

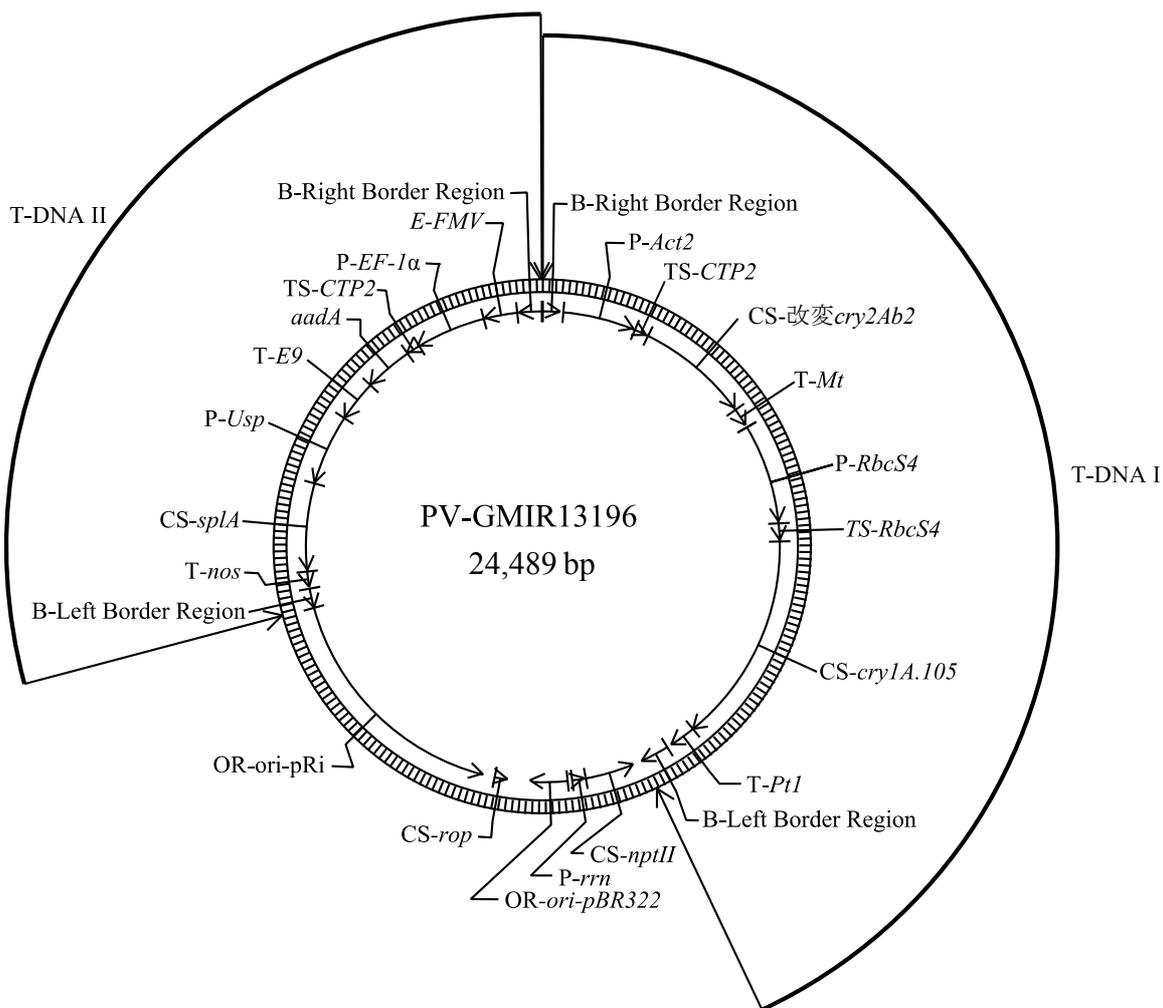


図 4 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 のプラスミドマップ

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。

資料 2 : 審査データの概要

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

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|--------------------------------------|-------------|--|
| T-DNAI 領域 | | |
| B ^{注1} -Right Border Region | 1-285 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。 |
| Intervening Sequence | 286-337 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P ^{注2} - <i>Act2</i> | 338-1,545 | シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>act2</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン (An et al., 1996)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 1,546-1,555 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| TS ^{注3} - <i>CTP2</i> | 1,556-1,783 | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 Cry2Ab2 蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |
| Intervening Sequence | 1,784-1,792 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS ^{注4} -改変 <i>cry2Ab2</i> | 1,793-3,697 | <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする配列で、チョウ目昆虫に対する抵抗性を付与する (Donovan, 1991)。 |
| Intervening Sequence | 3,698-3,700 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T ^{注5} - <i>Mt</i> | 3,701-4,000 | イネ (<i>Oryza sativa</i>) のメタロチオネイン様蛋白質をコードする <i>Mt</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で (GenBank, 2014)、mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。 |
| Intervening Sequence | 4,001-4,045 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P- <i>RbcS4</i> | 4,046-5,768 | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター及びリーダー配列 (Krebbbers et al., 1988; De Almeida et al., 1989)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。 |
| TS- <i>RbcS4</i> | 5,769-6,032 | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列 (Wong et al., 1992)。Cry1A.105 蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |

資料2：審査データの概要

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

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|--------------------------------------|---------------|--|
| CS- <i>cryIA.105</i> | 6,033-9,566 | <i>B. thuringiensis</i> の Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質のコード配列で、殺虫活性を示すキメラ蛋白質をコードする (U.S. EPA, 2010)。 |
| Intervening Sequence | 9,567-9,569 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>PtI</i> | 9,570-9,969 | タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) のリン酸トランスポーターをコードする <i>PTI</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で (Liu et al., 1998)、mRNA のポリアデニル化を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 9,970-10,088 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| B-Left Border Region | 10,089-10,530 | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。 |
| 外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 10,531-10,739 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS- <i>nptII</i> | 10,740-11,534 | <i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。 |
| P- <i>rrn</i> | 11,535-11,759 | <i>A. tumefaciens</i> のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。細菌内での恒常的な転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 11,760-11,835 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR ^{注6} - <i>ori-pBR322</i> | 11,836-12,424 | pBR322 由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。 |
| Intervening Sequence | 12,425-12,851 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS- <i>rop</i> | 12,852-13,043 | ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (<i>rop</i>)) のコード配列であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。 |
| Intervening Sequence | 13,044-13,231 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR- <i>ori-pRi</i> | 13,232-17,345 | プラスミド pRi に由来する複製開始領域 (Ye et al., 2011)。 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。 |
| Intervening Sequence | 17,346-17,352 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |

資料 2 : 審査データの概要

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

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|-----------------------------|---------------|---|
| T-DNAII 領域 (本組換えダイズには存在しない) | | |
| B-Left Border Region | 17,353-17,671 | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列 (Barker et al., 1983)。 |
| Intervening Sequence | 17,672-17,703 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>nos</i> | 17,704-17,956 | <i>A. tumefaciens</i> pTi 由来のノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域で (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)、ポリアデニル化を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 17,957-17,972 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS- <i>splA</i> | 17,973-19,430 | <i>A. tumefaciens</i> C58 株に由来し、スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースホスホリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper et al., 1999)。 |
| Intervening Sequence | 19,431-19,442 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P- <i>Usp</i> | 19,443-20,621 | ソラマメ (<i>Vicia faba</i>) 由来の種子蛋白質をコードするリーダー配列の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列 (Bäumlein et al., 1991)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 20,622-20,672 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>E9</i> | 20,673-21,315 | エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) 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>rbcS</i> 遺伝子ファミリーの 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 21,316-21,330 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>aadA</i> | 21,331-22,122 | トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-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) のコード配列 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。 |
| TS- <i>CTP2</i> | 22,123-22,350 | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |

資料2：審査データの概要

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

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|------------------------------|---------------|---|
| Intervening Sequence | 22,351-22,359 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P- <i>EF-1α</i> | 22,360-23,507 | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1α</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に關与する (Axelos et al., 1989)。 |
| Intervening Sequence | 23,508-23,530 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| E ^{注7} - <i>FMV</i> | 23,531-24,067 | Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。 |
| Intervening Sequence | 24,068-24,117 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| B-Right Border Region | 24,118-24,474 | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。 |
| 外側骨格配列 (本組換えダイズには存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 24,475-24,489 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |

注¹B- Border (境界配列)

注²P- Promoter (プロモーター)

注³TS- Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁴CS- Coding Sequence (コード配列)

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

注⁶OR- Origin of Replication (複製開始領域)

注⁷E- Enhancer (エンハンサー領域)

5

資料 2 : 審査データの概要

- 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

【*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

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

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

Cry蛋白質は、プロトトキシン (毒前駆体) として産生され、標的とする昆虫体内で結晶封入体から蛋白質分解酵素により活性を持つコア蛋白質へと変換され、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合することにより、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示す (Vachon et al., 2012)。この特異的受容体は、鳥類や哺乳類といった非標的生物には存在しないため、Bt蛋白質がこれらの生物に対して影響を及ぼすとは考えにくい (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

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

第一の 2-(1)-イに記載したように、本組換えダイズ中で産生されるCry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は MON89034 中で産生されるCry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と非常に高い相同性を持つ。さらに、本組換えダイズ中で産生されるCry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のトリプシン耐性コアドメインのアミノ酸配列は MON89034 のCry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と 100%一致する。

実際に、本組換えダイズ中で産生されるCry1A.105 蛋白質及び改変

資料 2 : 審査データの概要

Cry2Ab2 蛋白質と MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫活性を比較するため、*E. coli* で調製した蛋白質を用いてコーンイヤールーム (*H. zea*) への混餌投与による生物検定を行った (別添資料 4; 別添資料 5)。その結果、本組換えダイズ及び MON89034 中で発現している Cry1A.105 蛋白質のコーンイヤールーム (*H. zea*) に対する EC₅₀ (半数効果濃度) は同等であり、その平均値はそれぞれ 0.0042 µg/ml diet 及び 0.0040 µg/ml diet であった (別添資料 4 の Table 1)。また、本組換えダイズ及び MON89034 中で発現している改変 Cry2Ab2 蛋白質のコーンイヤールーム (*H. zea*) に対する EC₅₀ も同等であり、その平均値はそれぞれ 0.065 µg/ml diet 及び 0.079 µg/ml diet であった (別添資料 5 の Table 1)。よって、以下に記載する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、MON89034 中で産生される蛋白質を用いて得られたものを用いた。

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

さらに、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が相乗的に殺虫効果を示すかどうかについて、両 Bt 蛋白質に対して感受性を示す 2 種のチョウ目昆虫 (ヨーロピアンコーンボローラー (*Ostrinia nubilalis*) 及びコーンイヤールーム (*H. zea*)) を用いて調査が行われている (Hunter, 2007; U.S. EPA, 2010)。その結果、両蛋白質は拮抗作用及び相乗作用を示すことはなく、標的昆虫及び非標的生物に対して非意図的な作用を示すことはないことが確認されている (U.S. EPA, 2010)。したがって、本組換えダイズで発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質も拮抗作用及び相乗作用を示すことはなく、標的昆虫及び非標的生物に対して非意図的な作用を示すことはないと考えられる。

なお、本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か、AD_2013² を用いて、FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知のア

²FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2013) か

資料 2 : 審査データの概要

レルゲンと類似の配列は認められなかった。

ら得られた配列をもとに作成したデータベースで、2013年1月の時点で、1,630件のアミノ酸配列が含まれる。

資料 2 : 審査データの概要

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

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

(U.S. EPA, 2010)より抜粋。

「>/<」の付いた数値は検定に用いた中で最も低い又は高い濃度を示す。

¹ 最大投与量 100 µg/mL を与えた時の致死率は 42%であった。

² 最小投与量 50 µg/mL を与えた時の致死率は 61%であった。

資料 2 : 審査データの概要

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

| 科 | 種 | 蛋白質 | 投与日数 | 投与方法 | 最大投与量 ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet) | NOEC ($\mu\text{g/mL}$ 又は g diet) |
|----------------------------|--|------------|------|------|--|---|
| コウチュウ目 (Coleoptera) | | | | | | |
| ゾウムシ科 (Curculionidae) | ワタミハナゾウムシ (<i>Anthonomus grandis grandis</i>) | Cry1A.105 | 7 | 表面滴下 | 100 | >100 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 7 | 表面滴下 | 100 | >100 |
| ハムシ科 (Chrysomelidae) | ジュウイチホシウリハムシ (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>) | Cry1A.105 | 5 | 表面滴下 | 100 | >100 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 5 | 表面滴下 | 100 | >100 |
| テントウムシ科 (Coccinellidae) | スポットドレディビートル (テントウ ムシの一種) (<i>Coleomegilla maculata</i>) | Cry1A.105 | 20 | 混餌 | 240 | >240 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 20 | 混餌 | 120 | >120 |
| ハチ目 (Hymenoptera) | | | | | | |
| ヒメバチ科 (Ichneumonidae) | バンデットカタピラーパラサイト (<i>Ichneumon promissorius</i>) | Cry1A.105 | 21 | 混餌 | 240 | >240 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 21 | 混餌 | 100 | >100 |
| ミツバチ科 (Apidae) | セヨウミツバチ (成虫) (<i>Apis mellifera</i>) | Cry1A.105 | 18 | 混餌 | 550 | >550 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 19 | 混餌 | 68 | >68 |
| | セイヨウミツバチ (幼虫) (<i>Apis mellifera</i>) | Cry1A.105 | 18 | 表面滴下 | 1100 | >1100 ¹ |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 12 | 表面滴下 | 100 | >100 ² |
| カメムシ目 (Hemiptera) | | | | | | |
| アブラムシ科 (Aphididae) | モモアカアブラムシ (<i>Myzus persicae</i>) | Cry1A.105 | 5 | 混餌 | 80 | >80 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 5 | 表面滴下 | 80 | >80 |
| カスミカメムシ科 (Miridae) | ウエスタンターニッシュドプラントバグ (<i>Lygus hesperus</i>) | Cry1A.105 | 5 | 混餌 | 80 | >80 |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 5 | 表面滴下 | 80 | >80 |
| ハナカメムシ科 (Anthocoridae) | インシディアスフラワーバグ (<i>Orius insidiosus</i>) | Cry1A.105 | 14 | 混餌 | 240 | 120 ³ |
| | | 改変 Cry2Ab2 | 14 | 混餌 | 100 | >100 |

(U.S. EPA, 2010) より抜粋。

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

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

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

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

該当なし

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

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

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR13196 の全塩基数は、24,489 bp である。なお、PV-GMIR13196 の塩基配列は別添資料 6 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

本ベクターには、感染性の知られている配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-GMIR13196 の構成要素を、表 1 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 4 及び図 7 に示し

た。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

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

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

カルベニシリン、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は除去されている。さらに、本組換えダイズの R7 世代の種子³において、形質転換に用いた PV-GMIR13196 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えダイズには PV-GMIR13196 の外側骨格領域は存在しなかった(別添資料 7 の Table 1)。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。

³収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 60 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

資料 2 : 審査データの概要

- 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

形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、R1 世代を作出した。R1 世代において、Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNAII 領域を持たず T-DNAI 領域をホモで有する個体を選抜した。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。

本組換えダイズの育成図を図 5 に示した。なお、本申請の対象は、R3 世代及び R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

資料 2 : 審査データの概要

【社外秘につき非開示】

図 5 本組換えダイズの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

本組換えダイズの T-DNAI 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えダイズの F2、F3 及び F4 世代 (図 5) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 8)。

試験に供試する F2、F3 及び F4 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNAI 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、T-DNAI 領域をホモで有する R1 世代を自殖することにより R2 世代を作出した。さらに、R2 世代を自殖することにより R3 世代を作出した。T-DNAI 領域をホモで有する本組換えダイズの R3 世代を、*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子のいずれも持たないダイズ品種 MonSoy8329 と従来育種法を用いて交配し、T-DNAI 領域をヘテロで有する F1 世代を作出した。得られた F1 世代を自殖し、F2 世代を作出した。さらに得られた F2 世代で、T-DNAI 領域をヘテロで有する個体を Real-Time TaqMan PCR 法により選抜し、再度自殖を行って F3 世代を作出した。この F3 世代においても Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNAI 領域の有無を確認し、T-DNAI 領域をヘテロで有する個体を自殖することにより F4 世代を作出した。作出した F4 世代においても、Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNAI 領域の有無を確認した。これら F2、F3 及び F4 世代において行われた Real-Time TaqMan PCR 法による T-DNAI 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。

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

資料 2 : 審査データの概要

表 4 本組換えダイズの育成過程における導入遺伝子の分離様式

| 世代 ¹ | 供試 個体数 ² | 観測値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数 | 観測値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体 数 | 観測値 導入遺伝子 陰性個体数 | 1:2:1 分離 | | | | |
|-----------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------|------------------|
| | | | | | 期待値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数 | 期待値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体 数 | 期待値 導入遺伝子 陰性個体数 | χ^2 | p 値 ³ |
| F2 ¹ | 152 | 39 | 72 | 41 | 38 | 76 | 38 | 0.47 | 0.79 |
| F3 ¹ | 214 | 49 | 114 | 51 | 53.5 | 107 | 53.5 | 0.95 | 0.62 |
| F4 ¹ | 204 | 58 | 105 | 41 | 51 | 102 | 51 | 3.01 | 0.22 |

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

²「供試個体数」は、アッセイにより接合性を観察することができた総個体数である。

³F2、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<0.05)。

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

本組換えダイズに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、外側骨格配列及び T-DNAII 領域の有無及び導入遺伝子の複製数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術⁴及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)⁵ 並びに導入遺伝子領域の PCR 分析及び塩基配列解析を実施した (別添資料 9)。以下に、本解析の手法及び本組換えダイズを用いて行った解析の結果を述べる。

NGS では、植物ゲノムを約 100 bp の DNA フラグメントに断片化し、この DNA フラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina) を用いて解析することで、冗長度⁶ 75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 6 の①)。次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの塩基配列と照合⁷する (図 6 の②)。この結果において導入用プラスミドと相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出された DNA フラグメントにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 6 の②)。さらに、JSA において、導入用プラスミドとの相同性がある配列及び相同性がない配列の両方を持つものを、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列において重複する領域を並べることで、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 6 の③)。仮に 1 コピーの導入遺伝子

⁴次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

⁵NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。

NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えダイズのゲノムの全領域に相当する配列を 100 bp 程度のフラグメントとして増幅し、次に、これらのフラグメントを JSA によって T-DNA 領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

⁶冗長度: 特定の DNA (ゲノム DNA 又は遺伝子) に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。

⁷BLAST 検索において、*E*-score (expectation score; 期待値) が 1×10^{-5} 以下かつ 30 bp 以上の領域で 96.7%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

資料 2 : 審査データの概要

が核ゲノムの 1 ヲ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及び塩基配列解析により調べることで、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

本組換えダイズ及び対照の非組換えダイズから抽出したゲノムを NGS/JSA に供試した結果、本組換えダイズの R3 世代で 104.4 Gb (平均冗長度 75)、対照の非組換えダイズで 167.1 Gb (平均冗長度 126) の塩基配列を解析することができた (別添資料 9 の Appendix, Table 3)。本組換えダイズでは 2 つの接合領域が特定され (図 7; 別添資料 9)、これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 9 の Figure 4)。対照の非組換えダイズでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 9)。さらに、本組換えダイズから得られた全ての DNA フラグメントについて、導入用プラスミド PV-GMIR13196 の配列との相同性を調べた結果、外側骨格領域及び T-DNAII 領域が含まれていないことが示された (別添資料 9 の補足資料 Figure 3)。このことから、本組換えダイズの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNAI 領域が組み込まれており、外側骨格領域及び T-DNAII 領域は挿入されていないことが確認された。

また、本組換えダイズにおいて検出された接合領域及び導入遺伝子を含む領域を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNAI 領域が導入されていることが確認された (別添資料 9 の Appendix Figure 5, Appendix Figure 6 及び Appendix Figure 7)。

以上のことから、本組換えダイズの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNAI 領域が組み込まれていることが確認された。また、NGS/JSA において検出された接合領域は、導入遺伝子に起因する接合領域のみであり (図 7; 別添資料 9)、PV-GMIR13196 の T-DNAII 領域及び外側骨格領域⁸との相同性を持つジャンクション配列は認められなかった (別添資料 9 の追加資料の Figure 3) ことから、T-DNAI 領域以外の外側骨格領域及び T-DNAII 領域は挿入されていないことが確認された。また、導入遺伝子領域の PCR

⁸別添資料 9 の追加資料の Figure 3 において示されている「backbone」の結果は、PV-GMIR13196 の T-DNAII 領域及び外側骨格領域の両方を含む配列と照合した結果である。

資料 2 : 審査データの概要

分析及び塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列は導入用プラスミド PV-GMIR13196 の T-DNA I 領域と同一であることが確認された。

さらに複数世代 (R3~R7 世代) の本組換えダイズを対象にした NGS/JSA において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 9)。なお、本組換えダイズにおける導入遺伝子の模式図を図 7 に示した。

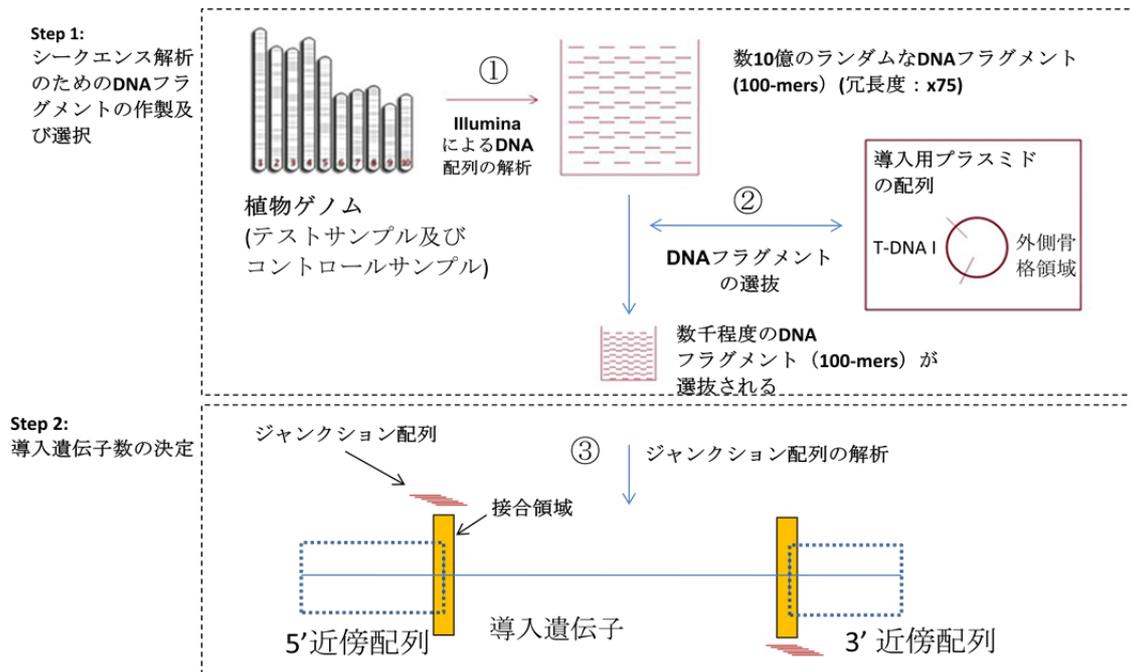


図 6 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)

資料 2 : 審査データの概要

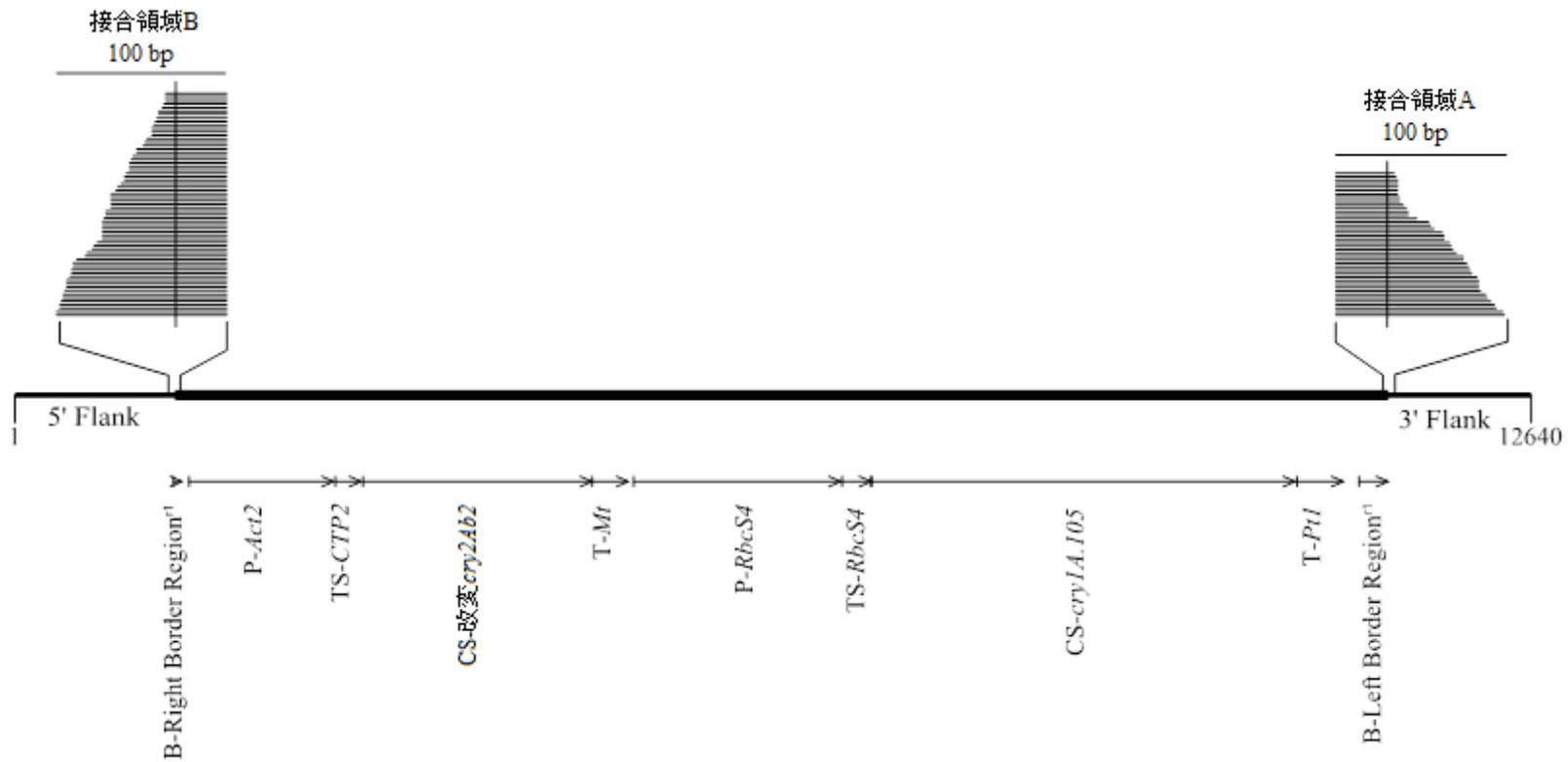


図 7 本組換えダイズの導入遺伝子図

図は、本組換えダイズ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図下段の導入遺伝子内の矢印 (→) により、本組換えダイズ中の構成要素の配列の方向を示した。図中の rl は、B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が本組換えダイズにおいて PV-GMIR13196 と比較して短くなっていることを意味する。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。

資料 2 : 審査データの概要

- 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 9)。

- 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

ウエスタンブロット分析により、本組換えダイズの複数世代 (R3~R7 世代) にわたり Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 10 の Figure 2 及び Figure 3)。

また、2012 年に米国の 5 ヶ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州、カンザス州、ノースカロライナ州及びペンシルバニア州) において、4 反復で栽培した本組換えダイズの葉 (Over-season leaf, OSL)、根、地上部、種子での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量を ELISA により分析した (表 5 及び表 6; 別添資料 11)。また、米国の 1 ヶ所のほ場 (イリノイ州) で、1 反復で栽培した本組換えダイズの花粉 (葯を含む) 中での Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量も測定した (表 5 及び表 6; 別添資料 11)。

その結果、本組換えダイズの葉、地上部、種子及び花粉/葯において、Cry1A.105 蛋白質の発現が確認された。なお、根における Cry1A.105 蛋白質の発現量は検出限界値以下であった (表 5; 別添資料 11 の Table 1)。また、本組換えダイズの葉、根、地上部、種子及び花粉/葯において、改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現が確認された (表 6; 別添資料 11 の Table 2)。

資料2：審査データの概要

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

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

¹ OSL = over-season leaf (葉)

² 各組織を採取した生育段階。V3~V4：3~4 葉期、V5~V7：5~7 葉期、R2：開花期、R3：莢伸長初期、R6：子実肥大期、R8：成熟期

³ 蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1 g 当たりの μg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限-上限) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (OSL1 は 1 サンプルで LOD 未満だったため n=19、それ以外は n=20。花粉は n=1)。N/A = 該当しない。

⁴ 蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。

⁵ N.D. = Not determined. 花粉/葯は得られたサンプル量が限られていたため、検出限界値を設定することができなかった。

資料2：審査データの概要

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

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

¹OSL = over-season leaf (葉)

²各組織を採取した生育段階。V3~V4：3~4葉期、V5~V7：5~7葉期、R2：開花期、R3：莢伸長初期、R6：子実肥大期、R8：成熟期

³蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限-上限) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (OSL1 は 1 サンプルで LOD 未満だったため n=19、それ以外は n=20。花粉は n=1)。N/A = 該当しない。

⁴蛋白質発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1g 当たりの μg で表されている。花粉を除き、乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。

⁵N.D. = Not determined. 花粉/葯は得られたサンプル量が限られていたため、検出限界値を設定することができなかった。

資料 2 : 審査データの概要

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

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

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えダイズは、本組換えダイズに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 12)。

本 PCR 法の検出限界値は、ゲノム DNA 量比で 0.040%である (別添資料 13)。

本 PCR 法の信頼性については、米国モンサント・カンパニーと米国 BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 13)。

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えダイズへ導入された *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質を発現することにより、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

- 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

2014 年から 2015 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 (以下、「本隔離ほ場」とする。) 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 R7 世代を供試した (図 5)。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 A3555 を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b) は 2013 年に米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において試験を実施した。

資料 2 : 審査データの概要

a. 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を比較するため、登録出願品種審査要領に基づく農林水産植物種類別審査基準「大豆審査基準」(農林水産省, 2012b)を参考に、10項目(小葉の形、開花始め(月日)、開花終わり(月日)、成熟期(月日)、主茎長(cm)、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高(cm)、収穫期の一株当たりの地上部重(g)、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。統計処理を主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高及び収穫期の本株当たりの地上部重に関して行い、小葉の形、開花始め、開花終わり、成熟期、収穫種子の形状(粒色、粒揃い及び粒形)に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。統計処理を行った5項目(主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高及び収穫期の一株当たりの地上部重)では、主茎長及び最下着莢節位高において本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差が認められた(別添資料14の表3)。主茎長は、本組換えダイズが104.2 cm、対照の非組換えダイズが108.7 cmであった。最下着莢節位高は、本組換えダイズが10.3 cm、対照の非組換えダイズが8.0 cmであった。

また、統計処理を行わなかった5項目(小葉の形、開花始め、開花終わり、成熟期、収穫種子の形状)では、開花始めに違いが認められた。開花始めは、本組換えダイズが7月8日、対照の非組換えダイズが7月4日であった(別添資料14の表3)。

b. 生育初期における低温

生育初期における低温耐性試験は、米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。播種後13日目の本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A3555 及び従来商業品種4品種の幼苗を、日中15°C/夜間8°Cに設定した人工気象室で栽培した。低温処理開始後10日目に主茎長及び生育段階を調査した。また、低温処理開始後20日目の個体は、主茎長、生育ステージ、生体重及び乾燥重について調査を行った。統計処理を主茎長、生体重及び乾燥重に関して行い、生育ステージに関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。

その結果、いずれの項目においても本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間には統計学的有意差や違いは認められなかった(別添資料15のTable 2)。

c. 成体の越冬性

資料 2 : 審査データの概要

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、我が国の冬期における生育状況を観察した。2015 年 1 月 6 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 14 の図 6)。

d. 花粉の稔性及びサイズ

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、Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれにおいても本組換えダイズ及び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なかった (別添資料 14 の図 7 及び表 4)。

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

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 4 項目 (一株当たりの稔実莢数、一株当たりの粗粒重 (g)、一株当たりの精粒重 (g)、百粒重 (g)) 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においてのみ、本組換えダイズと対照の非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 14 の表 5)。一株当たりの粗粒重の平均値は、本組換えダイズが 64.9 g、対照の非組換えダイズが 58.8 g であった (別添資料 14 の表 5)。また、それ以外の種子の生産量に関する項目では、統計学的有意差は認められなかった。

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目視で裂莢有無やその程度を観察した。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 14 の表 5)。

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及び対照の非組換えダイズの収穫後 19 日目の種子をシャーレ上に静置し、25 °C に設定した恒温器内での発芽個体数を数えた。その結果、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの収穫種子の発芽率はそれぞれ 98.5%、97.0%といずれも高く、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 14 の表 5)。

f. 交雑率

本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間で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

資料 2 : 審査データの概要

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発現蛋白質を指標とした。

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うち、本組換えダイズと隣接する条 (両端各 3 株を除く) から種子を採種した。これらの対照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 1.65 m の距離があった (別添資料 14 の図 2)。なお、このプロットでは開花期に防虫網を掛けていなかった。収穫種子から無作為に選出した 480 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、葉における発現蛋白質の有無をラテラルフロー法により検定した。

本試験に供試した 480 粒のうち、発現蛋白質が検出されたものは存在しなかったため、本調査において交雑は認められなかった (別添資料 14)。

g. 有害物質の産生性

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認められなかった (別添資料 14 の表 6~表 8)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、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

別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する。

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

別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。

資料 2 : 審査データの概要

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

「緊急措置計画書」を参照。

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

該当なし

資料2：審査データの概要

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えダイズの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は、以下のとおりである(表7)。

表7 本組換えダイズの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況

2016年1月現在

| 機関 | 安全性審査の種類 | 申請時期 | 承認時期 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|
| 米国農務省 (USDA) | 環境 | 2013年11月 | 2014年10月 |
| 米国食品医薬品庁 (FDA) | 食品・飼料 | 2013年11月 | 2015年5月 |
| カナダ保健省 (Health Canada) | 食品 | 2013年9月 | 2014年10月 |
| カナダ食品検査庁 (CFIA) | 環境・飼料 | 2013年9月 | 2014年10月 |
| 欧州食品安全機関 (EFSA) | 食品・飼料 | 2014年9月 | 審査中 |
| オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) | 食品 | 2015年1月 | 2016年1月 |

なお、本組換えダイズの我が国における申請状況は、表8のとおりである。

表8 本組換えダイズの我が国における申請及び認可状況

2016年1月現在

| 機関 | 内容 | 申請時期 | 承認時期 |
|-----------|----------------------------------|--------------------|---------|
| 厚生労働省 | 食品 ⁹ | ■■■■ ¹⁰ | — |
| 農林水産省 | 飼料 ¹¹ | ■■■■ | — |
| 農林水産省・環境省 | 環境(第一種使用規程 ¹² : 隔離ほ場) | 2013年10月 | 2014年5月 |
| 農林水産省・環境省 | 環境(第一種使用規程: 一般使用) | 2015年8月 | 審査中 |

⁹ 食品衛生法に基づく。

¹⁰ 社外秘につき非開示。

¹¹ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

¹² 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく。

参考文献

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.

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.

Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: 376-378.

An, Y.-Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* 10: 107-121.

Anderson, W.P. 1996. Weed ecology. Pages 27-38 in *Weed Science: Principles and Applications*. Third Edition. West Publishing Company, St. Paul, Minnesota.

Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.

Bäumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassüner, M. Van Montagu, D. Inzé and U. Wobus. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Molecular and General Genetics* 225: 459-467.

Baker, H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 1-24.

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.

Baum, J.A. 1998. Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection* 79: 127-130.

Baum, J.A., T.B. Johnson and B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. Pages 189-209 in *Methods in Biotechnology: Biopesticides: Use and Delivery*. Volume 5. F.R. Hall and J.J. Menn (eds.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research* S2: 91-92.

Beard, B.H. and P.F. Knowles. 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Science* 11: 489-492.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.

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

Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6: 211-212.

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

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.

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

資料 2 : 審査データの概要

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

Cutler, G.H. 1934. A simple method for making soybean hybrids. *Journal of the American Society of Agronomy* 26: 252-254.

de Alencar, E.R., L.R.D.A. Faroni, A.F. de Lacerda Filho, L.G. Ferreira and M.R. Meneghetti. 2006. Influence of different storage conditions on soybean grain quality. Pages 30-37 in 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Campinas, São Paulo, Brazil.

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

de Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H.E. Schnepf. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37: 409-433.

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

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

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

FAOSTAT. 2015. World soybean area harvested 2013. Rome, Italy.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> [Accessed January 13, 2015].

Fischhoff, D.A. and F.J. Perlak. 1996. Synthetic plant genes. Patent 5,500,365, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

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

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

Gao, Y., K.J. Fencil, X. Xu, D.A. Schwedler, J.R. Gilbert and R.A. Herman. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F δ -endotoxin expressed in transgenic cotton plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 829-835.

Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 18: 967-970.

GenBank. 2014. "Terminator Mt.". National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Accessed October 21, 2014].

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

Graphic Maps. 2012. North America. Worldatlas, Galveston, Texas. <http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/na.htm> [Accessed May 10, 2012].

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

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

Hunter, M.J. 2007. Review of "Evaluation of potential interactions between the

資料 2 : 審査データの概要

Bacillus thuringiensis proteins Cry1A.105, Cry2Ab2, and Cry3Bb1" for Monsanto's MON 89034 X MON 88017 maize MRID 469513-05 & 469513-06. U.S.

Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.

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

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

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

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.

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

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

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.

資料 2 : 審査データの概要

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.

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

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

Lusas, E.W. 2004. Soybean Processing and Utilization. Pages 949-1045 in Boerma HR, Specht JE (eds) *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, ASA, CSSA and SSSA. Third Edition., Madison, Wisconsin.

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

Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management* 2: 25-30.

Nickson, T.E. 2008. Planning Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: Problem Formulation for Stress-Tolerant Crops. *Plant Physiology* 147: 494-502.

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.

OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation of Economic Co-operation and Development,

Paris, France.

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.

Palmer, R.G. 2000. Genetics of four male-sterile, female-fertile soybean mutants. *Crop Science* 40: 78-83.

Palmer, R.G., M.C. Albertsen and H. Heer. 1978. Pollen production in soybeans with respect to genotype, environment, and stamen position. *Euphytica* 27: 427-433.

Pigott, C.R. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 255-281.

Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.

Radosevich, S., J. Holt and C. Ghersa. 1997. Weed demography and population dynamics. *Weed ecology: implications for management*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Ramteke, R., D. Singh and P. Maulidharan. 2012. Selecting soybean (*Glycine max*) genotypes for insertion height of the lowest pod, the useful trait for combine harvester. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 82: 511-515.

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.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.

Richter, S. and G.K. Lamppa. 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7463-7468.

資料 2 : 審査データの概要

- Roberts, A., D. Yann, R. Alan, B. Patrick and G. Alan. 2013. Environmental risk assessment of GE plants under low-exposure conditions. *Transgenic Research* doi:10.1007/s11248-013-9762-z
- Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.
- Schapaugh, W.T. 1997. Selection of soybean varieties. Pages 4-7 in *Soybean Production Handbook*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- 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 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- Tilman, D. 1997. Mechanisms of plant competition. Pages 239-261 in *Plant Ecology*. Second Edition. M.J. Crawley (ed.). Blackwell Science, Ltd., Oxford, England.
- U.S. EPA. 2010. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division, Washington D.C.
- Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.

資料 2 : 審査データの概要

Weber, C.R. and W.D. Hanson. 1961. Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. *Crop Science* 1: 389-392.

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

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].

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

Woodworth, C.M. 1922. The extent of natural cross-pollination in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 14: 278-283.

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

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

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.

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

資料2：審査データの概要

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

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・亙理 俊次・富成 忠夫 (編) 平凡社 東京 p.211

加賀秋人・黒田洋輔・友岡憲彦・Duncan Vaughan・大澤良・佐治光・田部井豊 2006 (2) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の環境拡散リスクと植物多様性影響評価に関する研究 ⑤ダイズとツルマメの雑種後代の適応度に関する研究 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究 pp. 145-155.

河野雄飛・高田吉丈・湯本節三 2004 東北地域における野生大豆(ツルマメ)の収集 一岩手県内北上川および北部河川流域一 植物資源探索導入調査報告書 20: 11-17.

環境省 2012 第4次レッドリスト昆虫類 平成24年8月28日公表 http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html

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

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

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

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

昆野 昭晨 2001 生育のステージと生理、生態 II 栄養生長の生理、生態. 転作全書2: ダイズ・アズキ 農山漁村文化協会 東京 pp. 50-67

資料 2 : 審査データの概要

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

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

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

財務省 2015 財務省貿易統計
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed Feb 20, 2015]

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.

植物防疫所 2015 2013(平成25)年植物検疫統計
<https://www.pps.go.jp/TokeiWWW/view/report/index.html> [Accessed Jan 15, 2015]

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

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.

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

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

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 p. 67

資料2：審査データの概要

日本モンサント株式会社 2014 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2014年7月1日公表 <http://www.monsanto.com/global/jp/newsviews/Documents/140701.pdf>

日本モンサント株式会社 2015 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ダイズの第一種使用規程に基づくモニタリングの結果 2015年6月29日公表 <http://www.monsanto.com/global/jp/newsviews/Documents/150629.pdf>

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

農林水産省. 2011a 「平成21年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について平成23年1月7日公表
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/21kekka.pdf

農林水産省. 2011b 「平成 22 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について平成 23 年 10 月 14 日公表
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/22_natane.pdf

農林水産省. 2012a 「平成 23 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について平成 24 年 9 月 12 日公表
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/120912-02.pdf>

農林水産省 2012b 農林水産植物種類別審査基準 大豆
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf> [Accessed September 3, 2013]

農林水産省 2013 「平成24年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について平成25年9月24日公表
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/pdf/24_kekka.pdf

農林水産省 2014 「平成25年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について平成26年11月21日公表
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h25_kekka.pdf

資料2：審査データの概要

農林水産省 2015 大豆関連データ集 11 大豆の需要動向
http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/pdf/011.pdf [Accessed on Jan. 13, 2015]

羽鹿 牧太・高橋 浩司・平賀勸 2003 房総半島におけるツルマメの探索・収集 植物資源探索導入調査報告書 19: 7-15.

安田 耕司・加賀 秋人・榊原 充隆・菊池 彰夫・菊地 敦志・高田 吉丈・水谷 信夫・松村 正哉・大木 信彦 2014 第2編 第1章 (3) 遺伝子組換え Bt ダイズの生物多様性影響評価手法の開発 新農業展開ゲノムプロジェクト -GMO 評価・管理領域- pp. 471-478

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

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

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

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

資料 2 : 審査データの概要

別添資料リスト(社外秘)

- 別添資料 1 Characterication of natural and simulated herbivore on wild soybean (*Glycine soja* Seib. Et Zucc.) for use in ecological risk assessment of insect protected soybean
- 別添資料 2 本組換えダイズ中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と MON89034 中で産生される Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列の比較
- 別添資料 3 本組換えダイズの作出に用いられた *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子から推定した Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列
- 別添資料 4 Comparison of the Functional Activity of two *E. coli*-Produced Cry1A.105 Protein Lots (10000776 and 11349124) Against a Susceptible Lepidopteran Species (MSL0025113)
- 別添資料 5 Comparison of the Functional Activity of two *E. coli*-Produced Cry2Ab2 Protein Lots (11346423 and 11351673) Against a Susceptible Lepidopteran Species (MSL0025112)
- 別添資料 6 Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR13196
- 別添資料 7 Amended Report for MSL0025644: PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON 87751 (MSL0025667)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0025106: Segregation Analysis of the Coding Sequences Present in Insect Protected Soybean MON 87751 Across Multiple Generations (MSL0025712)
- 別添資料 9 Amended Report for MSL0025901: Molecular Characterization of Insect Protected Soybean (MON 87751) (MSL0027271) (社外秘)
- 別添資料 10 Amended Report for MSL0024813: Demonstration of the Presence of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Proteins in Soybean Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87751 (MSL0025695) (社外秘)

資料 2 : 審査データの概要

- 別添資料 11 Amended Report for MSL0024805: Assessment of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87751 Produced in U.S. Field Trials during 2012 (MSL0025199)
- 別添資料 12 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87751
- 別添資料 13 In House Validation Summary for “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87751”
- 別添資料 14 チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) 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
- 別添資料 15 Assessment of the Effect of Cold Stress on Soybean MON 87751 under Growth Chamber Conditions (MSL0024840) (社外秘)
- 別添資料 16 環境省第 4 次レッドリスト昆虫類掲載の滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫のうち、「有害物質の産生性」に係る生物多様性影響評価において影響を受ける可能性が否定できない種の特特定
- 別添資料 17 わが国に輸入されたダイズ種子の量及びその使用形態に関する情報並びに輸送中にこぼれ落ちた後に生育したダイズがツルマメと交雑することで発生する交雑種子数の試算
- 別添資料 18 モニタリング結果報告書

資料3. モニタリング計画書

申請に係る第一種使用等によりツルマメ等への影響の有無等を具体的に調査する計画を定めた書類。

モニタリング計画書

平成 27 年 8 月 18 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 東京都中央区京橋二丁目5番18号

1. 実施体制及び責任者

実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

| | |
|------|--|
| 社内委員 | |
| * | 日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区京橋二丁目5番 18 号 (電話番号 03-6264-4790) |
| | 日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部申請業務管理・運営課 課長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 |

*：管理責任者（個人名は個人情報により非公開）

2. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称及び項目

- (1) 名称 ダイズ(*Glycine max*)及びツルマメ(*Glycine soja*)
- (2) 項目 チョウ目害虫抵抗性ダイズ(*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (以下「本組換えダイズ」という。)及び本組換えダイズとツルマメとの交雑体

資料3. モニタリング計画書

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

(1) モニタリングを実施する場所

以下の考え方に従い調査場所を設定する。ただし、前年の調査において、ダイズの生育が確認された調査場所及びツルマメの大規模な群落が確認された場所については、優先的に調査場所として設定するものとする。

- ① 輸入ダイズ(油脂用、飼料用等の加工用途を目的として輸入されるダイズであって発芽可能なもの。以下同じ。)が運搬される港湾から加工場への主要な道路のうち、以下の基準に従い、こぼれ落ちによる輸入ダイズの環境中への散逸の可能性が特に高いと考えられる道路を少なくとも3ルート選定する。

【選定基準】

- ア 文献及び5の(2)のダイズの輸入・流通に関するヒアリング結果等により、輸入ダイズの環境中への散逸が大きいと考えられる道路。
- イ 港湾における輸入ダイズの取扱量の大きさと港湾から加工場までの距離から、輸入ダイズの環境中への散逸が大きいと考えられる道路。

- ② 選定した調査対象道路を車や徒歩等によって回り、以下の基準に従い、港湾から加工場に向かう車線の道路端から幅 10m で、かつ、車道 2.5km ごとに長さの総計が 100m を上回るよう調査場所を設定する¹。

【選定基準】

- ア ダイズ及びツルマメの生育適地であるものと考えられる河川敷と草本の生育している空き地、及びダイズがこぼれ落ちやすいと考えられる道路の湾曲部。ただし、これらの場所が私有地、中央分離帯等のため調査が困難と認められる場合には対象外とする。

- ③ ②の調査場所に加え、加工場周辺について、その立地等を勘案し、可能な範囲で調査場所を選定する。

¹道路脇に歩道が設置されている場合、トラックからこぼれ落ちたダイズがアスファルト上を転がったり、跳ねたりすることが想定されるが、その外側の土の部分や草本などが生育しているところでは跳ねる事が想定されないため、歩道幅を考慮し、道路端から 10m までを調査することとした。

本組換えダイズの生物多様性影響評価において行った特定の原料発港から飼料工場までの道路周辺におけるダイズ陸揚地点からの半径 10 km 内の解析において、輸送経路沿いの面積のうち、ダイズ及びツルマメの生育適地である河川敷の面積割合は 0.4%であった。さらに、河川敷に次いで生育の可能性が高いと考えられる空き地、駐車場、耕作放棄地等(草有り)の土地の面積を加えた場合でもその割合は約 3.5%であった。そこで、道路の長さ 2.5km ごとに 100m(4%)を調査することとした。

資料3. モニタリング計画書

(2) 対象となる野生動植物等の生息又は生育状況

以下の手順により、(1)の調査場所内における本組換えダイズ、本組換えダイズとツルマメの交雑体及びツルマメの生息又は生育状況の確認を行う。

- ① ダイズの生育状況を調査する。なお、この際に、調査場所の立地等を勘案し、必要に応じ、ツルマメの大規模な群落について調査を行う。
- ② ダイズの生育が認められた場合、別紙に定める方法により、当該ダイズが本組換えダイズであるか否かを確認する。
- ③ 当該ダイズが本組換えダイズであることが確認された場合には、確認場所から半径10m以内²のツルマメの生息又は生育状況を調査する。
- ④ ツルマメの生育が認められる場合には、別紙に定める方法により本組換えダイズとの交雑体であるか否かを確認する。

ただし、モニタリング開始初年度から継続して調査を実施している調査場所で、初めて本組換えダイズの生育が確認された場合には、本組換えダイズとの交雑体であるか否かの確認は行わない。そして翌年、同じ調査場所を調査し、ツルマメの生育が確認された場合には、ダイズの生育状況の如何を問わず、別紙に定める方法により確認したツルマメが本組換えダイズとの交雑体であるか否かを確認する³。

4. モニタリングの期間

モニタリングの実施期間は、本組換えダイズが日本に輸入される期間及び輸入停止後の一定期間とする。

5. 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

(1) 実施時期及び頻度

ツルマメ及びダイズの開花時期を勘案し、3.(1)で設定した場所において年1回調査を実施するものとする。

(2) その他

年1回、穀物卸業者、食品製造業等の関連団体からヒアリングを行い、以下に掲げる、ダイズの輸入・流通に関する情報を収集するものとする。

²第1種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(平成16年2月24日付け15農会第1421号)における、ダイズの同種栽培作物等との隔離すべき距離に基づき設定した。

³ダイズとツルマメが交雑した場合、結実した種子が発芽するのは交雑が発生した年の翌年となる。モニタリング開始初年度から継続して調査を実施している調査場所では、本組換えダイズの生育が初めて確認された年の翌年に交雑体が発生する可能性があるが、その年に交雑体が生じることはない。

資料3. モニタリング計画書

- ① 輸入港毎のダイズ種子の輸入数量に関する情報
- ② 輸入ダイズ種子が、港湾からトラックで輸送され、使用される可能性のある加工場の名称、場所、及び各加工場でのダイズ種子の使用数量
- ③ 上記②の輸送に関し、輸入ダイズ種子をトラックに積みこむ港湾の場所
- ④ 上記②の輸送に関し、その輸送形態

6. モニタリング結果の解析の方法

ダイズの生育状況、本組換えダイズの確認個体数・場所、ツルマメの生育状況、ダイズの輸入・流通等の情報を、承認時及びモニタリングを開始した以降の情報と比較し、傾向を分析する。

7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

モニタリング調査を実施した翌年1月末までに、別表の様式に従い、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（以下「農林水産省及び環境省」という。）に対し報告を行う。

8. その他必要な事項

(1) モニタリング実施要領の作成

モニタリングの実施に当たっては、具体的な調査場所、時期、手順等をまとめたモニタリング実施要領を農林水産省及び環境省と協議の上、作成するものとする。

(2) モニタリング計画書の見直し

本組換えダイズの生育状況や輸入状況等のヒアリングにより得られる状況の変化を踏まえ、必要に応じ、農林水産省及び環境省と協議の上、本計画書を見直すものとする。

(3) モニタリングの結果の公表

モニタリングの結果は、開示されることにより特定の者に不当な利益又は不利益をもたらすおそれがあるものと判断される情報を除き、公開するものとする。

試料の採取及び検査方法

1. 試料の採取方法

調査場所ごとに、ダイズ及びツルマメの個体数を記録する。ダイズについては生育を確認した全個体を採取し、生育を確認した本組換えダイズの周囲(半径 10 m 内)に生育するツルマメについては、1地点(※)あたり 10 個体を上限として採取する。

採取にあたっては、他の個体とのコンタミネーションを避けるよう、必要な対応をとることとする。

※ 1 地点とは、本組換えダイズ 1 個体の生育地点を中心とした半径 10m 内とする。

2. 試料の検査方法

採取したダイズ及びツルマメについては、形態的特徴により植物種名を確定する。

本組換えダイズ又は本組換えダイズとツルマメとの交雑体か否かについては、分析キットにより改変 Cry2Ab2 蛋白質の有無を検査し、判定を行う。分析キットは、免疫クロマトグラフ法により改変 Cry2Ab2 蛋白質の有無を分析するものであって、その精度が確認されているものとする。

資料3. モニタリング計画書

別表

モニタリング結果報告書

年 月 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長
環境省自然環境局野生生物課長

氏名 (名称)
住所

チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (以下「本組換えダイズ」という。) の第一種使用規程に基づくモニタリングの結果を以下に報告します。

| 項 目 | 内 容 |
|---|-----|
| 1. 実施体制 | |
| 2. 調査時期 | |
| 3. 実施場所 | |
| 4. 調査方法 | |
| 5. 調査結果 (1) ダイズの生育個体数及び生育場所 (2) 本組換えダイズの生育個体数及び生育場所 (3) ツルマメの生育場所及び生育規模 (ツルマメの採種個体数) (4) 本組換えダイズとの交雑体の個体数及び生育場所 (5) ダイズの輸入・流通に関する情報 (6) モニタリング結果の解析結果 | |
| 6. その他 | |

備考

- ・ 位置情報等、関連資料を添付する。
- ・ 記載項目が多数ある場合には、別紙を用いて整理する。

資料4. 緊急措置計画書

申請に係る第一種使用等により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に、申請者自らが可能な範囲で行う生物多様性影響を効果的に防止するための措置を定めた申請書類。

緊急措置計画書

平成 27 年 8 月 18 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 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI : MON-87751-7) (以下「本組換えダイズ」という。)の第一種使用等において、1. に記載した緊急措置を講ずるための実施体制の責任者は、2. に示す方法に基づき第一種使用等の状況の把握を行った結果、(1) 本組換えダイズとツルマメの交雑体が確認された場合、もしくは(2)トラックの横転等により、通常の運搬により生じうると想定されるこぼれ落ちの範囲を超える本組換えダイズの環境中への散逸が確認された場合において、3. に示す方法により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し、4. に示す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を講ずる。

資料4. 緊急措置計画書

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。

実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

| 社内委員 | |
|------|--|
| * | 日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区京橋二丁目5番18号 (電話番号 03-6264-4790) |
| | 日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請業務管理・運営課 課長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 |

*: 管理責任者（個人名は個人情報により非公開）

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 本組換えダイズとツルマメとの交雑体

第一種使用規程において定めるモニタリング計画書に基づき、輸入ダイズ（油脂用、飼料用等の加工用途を目的として輸入されるダイズであって発芽可能なもの。以下同じ。）が運搬される道路沿いにおいて調査を実施し、本組換えダイズとツルマメの交雑体の有無を確認する。

(2) トラックの横転等により、通常の運搬により生じうると想定されるこぼれ落ちの範囲を超える本組換えダイズの環境中への散逸

新聞報道等による情報収集及び業者等からの情報提供により、事故状況を把握する。

(1) 又は(2)の事案の発生を把握した場合には、直ちにその旨を農林水産省消費・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（以下「農林水産省及び環境省」という。）に報告する。

資料4. 緊急措置計画書

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

緊急措置の発生状況に応じ、農林水産省及び環境省と協議した上で、周知する者、内容及び手法を決定する。

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

農林水産省及び環境省と協議した上で、以下に記載する措置を講じるものとする。

(1)2. (1)の事案が確認された場合には、直ちに確認された交雑体及び周辺に自生するツルマメを伐採し不活化する。

(2)2. (2)の事案が確認された場合には、現場に落下・放置された貨物は通常、回収、保管される。すなわち、トラックの横転等により通常の運搬により生じうると想定されるこぼれ落ちの範囲を超える本組換えダイズ的环境中への散逸があった場合でも、その多くは既に回収されているものと考えられるが、当該種子が適切に回収されているか、直ちに現地において確認を行う。仮に回収漏れ又は回収が行われていない場合は、回収を行う。

(3) (1)又は(2)の応急措置を講じた後、一定期間、発生地周辺におけるダイズ、本組換えダイズ及び本組換えダイズとツルマメの交雑体の有無に関する調査を実施する。当該調査の手法、期間、規模等の内容は農林水産省及び環境省と協議の上、決定する。当該結果は毎年取りまとめ、農林水産省及び環境省に報告するものとし、当該内容に基づき、両省と協議の上、翌年の調査内容を決定する。

なお、調査結果については、開示されることにより特定の者に不当な利益又は不利益をもたらすおそれがあるものと判断される情報を除き、公開するものとする。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

緊急措置を執るべき状況が生じた場合には、上述のとおり、農林水産省及び環境省へ報告するとともに緊密な連絡体制を構築する必要がある。

このため、1. で規定する管理責任者は、この命に当たらせる専任の連絡員を任命し、連絡員が常に最新の情報を把握した上で、農林水産省及び環境省からの問い合わせに対応可能となるよう、社内体制を構築するものとする。