

資料1

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
MON87701 系統

平成 30 年 11 月 13 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	1 0
資料 2 . 審査データの概要	1 1
資料 3 . 緊急措置計画書	5 9

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.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30年2月8日付けで承認申請のあった「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 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、土壌微生物由来の改変*cry1Ac*遺伝子を導入して作出している。

本組換えダイズは、改変*cry1Ac*遺伝子の発現により生産される改変Cry1Ac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。

なお、本組換えダイズについては、輸送経路沿いでのモニタリングの実施を条件として平成25年2月25日付けで承認したところであるが、今般、4年間のモニタリング結果を踏まえ、モニタリングの実施を除いて再度申請があったところ。

(参考) これまでの審査経緯

日付	事項	備考
平成30年 2月 8日	第一種使用規程承認申請受理	
平成30年 2月22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30年 7月 4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30年 9月21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30年10月29日	学識経験者からの意見提出	
平成30年11月13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-GMIR9 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* 遺伝子及び *cry1Ac* 遺伝子のそれぞれ一部塩基配列を組み合わせることで作製された改変 *cry1Ac* 遺伝子（改変 *Cry1Ac* 蛋白質をコード）が組み込まれている。この遺伝子を含む 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サザンブロット分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

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、これまでに自然環境下で雑草化したとの報告はない。

2007 年から 2010 年にかけて、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、種子の発芽率についてのみ統計学的有意差が認められた。種子の発芽率は、我が国の隔離ほ場で収穫された種子及び米国のほ場で収穫された種子を試験に用いた。その結果、我が国の隔離ほ場で収穫された種子の発芽率については、本組換えダイズと宿主の非組換えダイズとの間で統計学的有意差が認められなかったが、米国のほ場で収穫された種子は、本組換えダイズと宿主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。このため、認められた統計学的有意差は、米国のほ場で収穫された種子の品質に起因するものと考えられた。本組換えダイズにはチョウ目害虫抵抗性が付与されているが、この要因のみで、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

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

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。

本組換えダイズが産生する改変 **Cry1Ac** 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、改変 **Cry1Ac** 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改変 **Cry1Ac** 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種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種又は準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫が局所的に生息する可能性は低く、ダイズに食餌を依存している程度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ため、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に食餌を依存している程度は極めて低いと考えられるほか、(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

宿主が属する生物種である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改変 *cry1Ac* 遺伝子と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改変 *cry1Ac* 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。そこで、

- (1)本組換えダイズ由来の改変 *cry1Ac* 遺伝子がツルマメの競合性を高める可能性(ハザード)、
- (2)輸送中にこぼれ落ちた本組換えダイズの種子が生育した後にツルマメと交雑する可能性(曝露量)、

の2点について、影響の生じやすさの評価を行った。

(1)については、

- ① ツルマメはチョウ目昆虫以外の多くの生物から食害を受けており、チョウ目昆虫による食害程度は **2%** 以下であったことが報告されていること
- ② ツルマメは補償作用が働くことにより **50%** の葉を失った場合でも、葉の欠損のない場合と同等の莢数及び種子数を維持でき、食害程度はツルマメの種子生産性に影響を及ぼすほどのものではないと報告されていること
- ③ ツルマメは生育初期の暑さと乾燥、草刈、周辺に生育する雑草種との競合といった様々な要因によって生育を制限されていること
- ④ ダイズとツルマメの雑種及びその後代は、ダイズの遺伝子がある割合で有することにより、自然環境への適応にツルマメと比べ不利となり、淘汰されること

から、交雑したとしてもその雑種がわが国の自然条件に適応していく可能性は極めて低く、チョウ目害虫抵抗性形質のみで雑種の競合性がツルマメより高まることはないと考えられた。

(2)については、

- ① これまでの生物多様性影響評価で、統計情報等を基に、**a.**わが国に輸入されたダイズ種子が輸送中にこぼれ落ちる可能性、**b.**輸送中にこぼれ落ちたダイズ種子が生育する可能性、**c.**こぼれ落ちから生育したダイズが、ツルマメと隣接して生育し、交雑する可能性に基づく暴露量評価が行われその結果から、輸入されたダイズ種子が輸送中にこぼれ落ちた後に生育し、ツルマメと交雑する可能性は極めて低いと結論されており、これらの情報を基に港湾から飼料工場までの輸送中にこぼれ落ち、開花まで生育し交雑したツルマメに結実する交雑種子数は最大**0.75**粒と試算されている。
- ② 輸入ダイズの輸送経路沿いのモニタリング結果等に基づき暴露量評価を行った。**2013** から **2016** 年にわたって調査した輸入ダイズの輸送経路沿いのモニタリング結果から、こぼれ落ちは輸送経路の始点である港湾付近に限定される一方で、ツルマメ集団は港湾から離れた場所でのみ確認された。このことから、こぼれ落ちたダイズとツルマメが隣接して生育する可能性は低いと考えられた。さらに隣接したとしても、両者が交雑する可能性は低いことが報告されていることから、暴露量は低いと結論づけられた。また農林水産省により **2009** 年から **2016** 年にダイズ輸入実績港 **10** 港のダイズ陸揚げ地点から半径 **5km** の地域を対象にしたダイズ及びツルマメの調査が行われた。その結果、遺伝子組換えダイズの生育地点は、陸揚げ地点の近傍の道路沿いであることが多く、その生育には各年度の連続性がないことから輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し生育範囲は拡大していないと考えられた。ツルマメと組換えダイズ両者が確認された鹿島港においても、生育場所は重複しておらず交雑体も確認されなかった。これらのことから、ツルマメの生育に組換えダイズが影響を及ぼす可能性及び導入遺伝子がツルマメに移行する可能性は低いと結論された。以上により、組換えダイズが輸送中にこぼれ落ちた後に生育しツルマメと交雑し、その個体が生育する可能性は極めて低く、想定した暴露量を超えることはないと確認された。

上記より、ハザードについて、交雑したとしてもその交雑種の競合性がツルマメより高まることはないと考えられ、暴露量について、こぼれ落ちた後に生育する可能性は低く、さらに生育した場合でもツルマメと隣接して生育する可能性は低いと考えられ、仮に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その交雑率は極めて低いことから、本組換えダイズとツルマメとの交雑種子が発生する可能性は極めて低いと考えられた。

以上のことから、本組換えダイズ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、種子の発芽率において統計科学的有意差は認められたが、これは、本調査に供した種子の品質に起因するものと考えられ、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改変 **Cry1Ac** 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、改変 **Cry1Ac** 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モニタリング結果等に基づき、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。

なお、本組換えダイズについては、輸送経路におけるこぼれ落ちの実態が不明であったことから、輸送経路沿いでのモニタリングの実施を条件として平成25年に生物多様性影響評価を行った。4年間のモニタリング調査の結果、輸送経路沿いで本組換えダイズのこぼれ落ちは港湾付近に限定されたことから、モニタリングの実施を除いた申請があった。モニタリング調査結果等を含め、改めて生物多様性影響評価を行った結果、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。

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 30 年 2 月 8 日

農林水産大臣 齋藤 健 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役 ダビッド・ブランコ 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 (改変 <i>cry1Ac</i> , <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI : MON-87701-2)
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	—

資料2：審査データの概要（審査に使用した評価データ）

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 A5547 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、わが国に分布しているのはツルマメのみであり、*G. gracilis* の分布は認められていない (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991)。なお、ツルマメは、中国、韓国、日本、台湾及びロシアに分布しており (OECD, 2000)、わが国においては北海道、本州、四国及び九州に分布し、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道ばたに自生している (沼田ら, 1975; 浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 大橋, 1999)。また、北海道、東北、四国で行われたツルマメの自生地に関する調査では、主に河川流域で自生地が多く確認されている (河野ら, 2004; 菊池ら, 2005; 猿田ら, 2007; 山田ら, 2008; 猿田ら, 2009; 友岡ら, 2009)。

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

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、2014 年の全世界におけるダイズの栽培面積は、約 11,772 万 ha であり、上位国を挙げると米国が約 3,342 万 ha、ブラジルが約 3,027 万 ha、アルゼンチンが約 1,925 万 ha、インドが約 1,091 万 ha となっている。なお、同統計情報に基づく 2014 年のわが国における栽培面積は、約 13.2 万 ha であった (FAOSTAT, 2017)。

b. 栽培方法

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)。

c. 流通実態及び用途

2016 年のわが国におけるダイズの輸入量は、約 288 万トンであり、そのうちの

資料2：審査データの概要

約70%が米国から、約18%がブラジルから輸入されている(財務省, 2017)。

輸入されたダイズがわ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。2015年には、全輸入ダイズの69.3%に当たる約225万トンが搾油用、3.5%に当たる約10.2万トンが飼料用、29.6%に当たる約96万トンが食品用(搾油用を除く)として用いられている(農林水産省, 2018a)。

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(2006~2015年)(植物防疫所, 2017)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, 2018a)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, 2017)。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、わ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、袋または箱詰めされる。また、わが国における採種については、最近まで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)のみで行われていた。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(2011年当時)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℃以上を要し25℃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)。

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℃、最低発芽温度及び最低生育温度は2~4℃

であり、10℃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℃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)。

本組換えダイズの宿主であるA5547は米国において、およそ北緯36度から37度の栽培地域に適した品種(Maturity Group V)に分類される(Wiebold, 2002; Graphic Maps, 2012)。この栽培地域において、Maturity Group Vに分類される品種は5月初旬から播種される。また、6月下旬が開花期にあたり(Lee et al., 2005)、開花が始まる最も早い時期の日長時間は約14.5時間であることが報告されている(Lammi, 2008)。

なお、わが国において、ダイズが雑草化した事例はこれまで報告されていない。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ダイズの種子は、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A5547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)。

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はこれまでのところない。

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

ダイズ ($2n=40$) と交雑可能な近縁野生種として、わが国に分布しているのは、*G. soja* (和名: ツルマメ、 $2n=40$) のみである (沼田ら, 1975; 日本雑草学会, 1991; OECD, 2000)。ツルマメは、北海道、本州、四国及び九州に分布するツル性の一年生植物で、主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、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近い集団からツルマメの収集を行った中に、オオバツルマメのような形態的中間型を示す個体は見つかっていないという報告があることから (阿部ら, 2001)、仮にこのような形態的中間型の個体がわが国で自生していたとしても、その生育範囲はかなり限られていることが予想される。

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、ツルマメ間の他家受粉率に関しても、秋田県雄物川流域で約13%という高い他家受粉率を示す集団が発見されたとの報告がある (Fujita et al., 1997)。この集団から採取されたツルマメの1胚珠当たりの花粉数は平均で600~700粒で、この数は典型的な自家受粉植物と他家受粉植物の1胚珠当たりの平均的な花粉数 (Cruden, 1977) の間に位置していた。この高い他家受粉率の原因が、雄物川流域特有の環境条件によるものなのか、若しくは集団内の遺伝的特性によるものなの

かは明らかにされていない。なお、雄物川流域のツルマメの集団は、護岸工事等による環境の攪乱が行われておらず、集団サイズが大きく、訪花昆虫にとっては非常に魅力的な食料供給源であり、このツルマメ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ヵ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: Gls/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~2016 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, 2012; 農林水産省, 2013; 農林水産省, 2014; 農林水産省, 2015; 農林水産省, 2017; 農林水産省, 2018b)。また、わが国と同様に、ツルマメの自生地域であり、かつ除草剤グリホサート耐性ダイズを輸入している韓国において、2000 年に広範囲の地域から採取された 243 系統のツルマメに除草剤グリホサートを散布したところ、全ての系統が枯死し、除草剤グリホサート耐性ダイズとツルマメの交雑体は確認されなかったと報告されている (Kim et al., 2003)。

従来ダイズとツルマメの雑種形成及びその後のダイズからツルマメへの遺伝子浸透に関しては、わが国において経時的な調査が行われている。2003 年から 2006 年にかけて、ツルマメと従来ダイズの雑種が、どの程度自生地において形成されているかを確認するために、日本各地のダイズ畑周辺で栽培ダイズとツルマメとの中間体が探索されている。その結果、調査した 58 地点 (秋田県 8 地点、茨城県 7 地点、愛知県 4 地点、広島県 6 地点、佐賀県 33 地点) のうち、秋田県の 1 地点及び佐賀県の 5 地点から、形態的にダイズとツルマメの中間的な特徴を持つ 17 個体の中間体が発見され、その後、マイクロサテライトマーカーにより、これらの中間体は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、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がある割合で有することにより、自然環境に適応するのに不利になっている可能性がある。Kuroda ら (2010) は 2003~2006 年に行った中間体の調査で発見された 17 個体の中間体の後代が速やかに自然環境から消失していた理由として、1) F_1 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)。

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)。また、広島産ツルマメとダイズ品種「フクユタカ」、青森産ツルマメとダイズ品種「リュウホウ」との F_1 雑種を、国内 3 地点で管理栽培し、その種子生産量、莢数、種子の越冬率 (12 月下旬から 4~5 月まで土中に埋めた種子の発芽率及び休眠種子の割合) を親であるツルマメと比較した結果、 F_1 雑種の種子生産量、莢数はツルマメよりも少なく、 F_1 雑種に実った種子の越冬率はツルマメよりも低いことを報告している (Kuroda et al., 2013)。さらに、Kubo ら (2013) は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の雑種について、種子の低温耐性 (4°C で 3 ヶ月間保存した種子の発芽率及び発芽個体の生存率) 並びに形態生育特性を調査した結果、雑種は親系統のダイズやツルマメと同等かそれらの中間的性質を示したと報告している。

さらに、上述の広島産ツルマメとダイズ品種「フクユタカ」との F_1 雑種から得られた F_2 雑種種子について調査した結果に基づくシュミレーションの結果、雑種後代がダイズ由来の種子生産性及び休眠性に関連する QTL を雑種が有する場合、競合において不利になりダイズからツルマメへの遺伝子浸透が生じる可能性が低下することを示している (Kitamoto et al., 2012)。

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

—

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。

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、それぞれ数カ所のツルマメ個体群を定期調査地点として選定し、2011年及び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

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するために、2011年から2013年に茨城県及び佐賀県において、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が行われている。その結果、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、バッタ目昆虫、並びにその他の生物及び病害等と比較して低かった(Goto et al., 2016)。

また、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が行われている。その結果、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(Goto et al., 2016)。

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 Cry1Ac 蛋白質を産生するチョウ目害虫抵抗性ダイズ (改変 *cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI: MON-87701-2) (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改変 Cry1Ac 蛋白質は、ベルベットビーンキャタピラー(ビロードマメケムシ) (*Anticarsia gemmatalis*)、ソイビーンルーパー (*Pseudoplusia includens*)、ソイビーンアクシルボーラー(*Epinotia aporema*)及びサンフワルーパー(*Rachiplusia nu*)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 1 及び表 1 に示した。

なお、本組換えダイズに導入された *cry1Ac* 遺伝子から発現する Cry1Ac 蛋白質は野生型 (Genbank accession M11068)と比べて7カ所のアミノ酸が置換されている。また、N末端側に CTP1 蛋白質由来の4アミノ酸が結合している (別添資料 1)。よって、本組換えダイズに導入された *cry1Ac* 遺伝子は「改変 *cry1Ac* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 Cry1Ac 蛋白質」とする。

また、本組換えダイズ作出の過程において選抜マーカーとして導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS)は植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来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、本組換えダイズに挿入された *cp4 epsps* 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とする。ただし、本組換えダイズは、R₁世代において通常の散布量よりも低薬量での除草剤グリホサート散布を行い、除草剤による傷害を受けた個体のみを選抜することによって、遺伝的分離により改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体のみを選抜している (図 3)。

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。

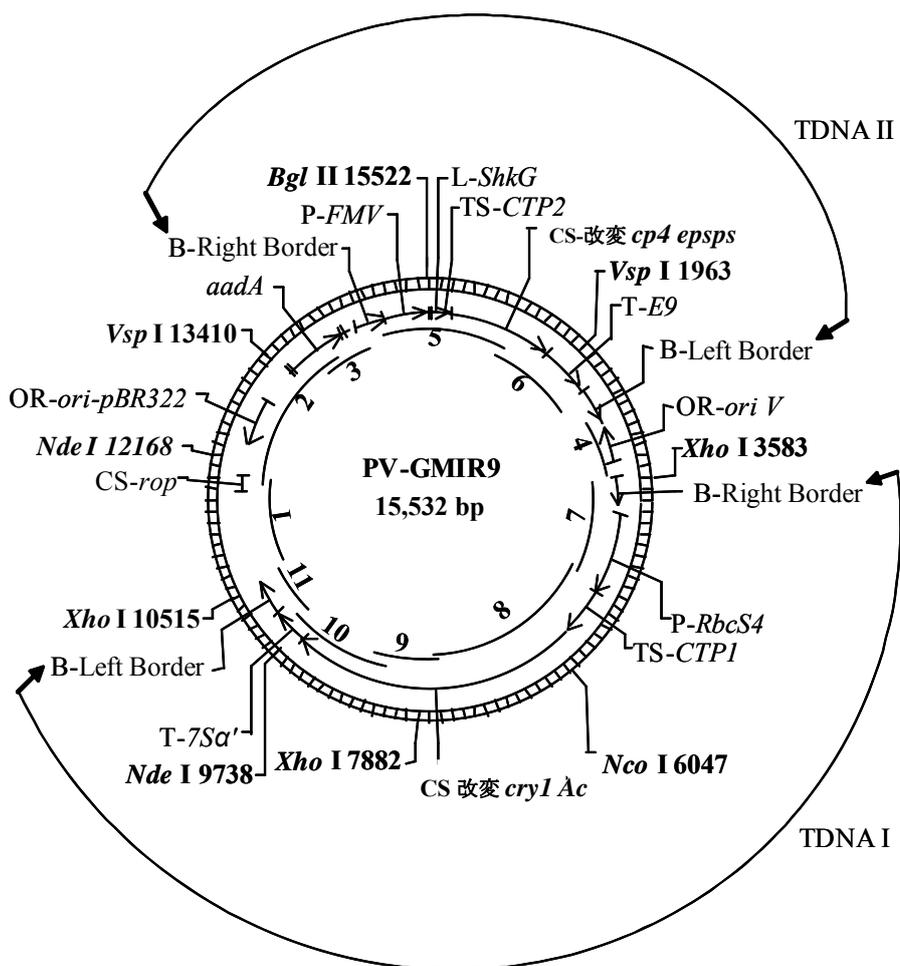


図 1 本組換えダイズの作出に用いられた PV-GMIR9 のプラスミドマップ

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。

表 1 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	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。プラスミド中の位置 15,532 から続く)		
Intervening Sequence	1-14	DNA のクローニングの際に利用された配列。
L ^{注1} - <i>ShkG</i>	15-81	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 蛋白質をコードしている <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) の <i>ShkG</i> 遺伝子の 5' 末端非翻訳領域 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。遺伝子発現の調節に関与する。
TS ^{注2} - <i>CTP2</i>	82-309	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。
CS ^{注3} -改変 <i>cp4-epsps</i>	310-1,677	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。発現する蛋白質のアミノ酸配列は、 <i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来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。
Intervening Sequence	1,678-1,719	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注4} - <i>E9</i>	1,720-2,362	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>rbcS2</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	2,363-2,409	DNA クローニングの際に利用された配列。
B ^{注5} -Left Border	2,410-2,851	<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)。
外側骨格領域 (本組換えダイズには存在しない)		
Intervening Sequence	2,852-2,937	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注6} - <i>ori V</i>	2,938-3,334	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> おいてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	3,335-3,595	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹L -Leader(リーダー配列);注²TS - Targeting Sequence(ターゲティング配列);注³CS - Coding Sequence(コード配列);注⁴T - Transcription Termination Sequence(転写終結配列);注⁵B - Border(境界配列);注⁶OR - Origin of Replication(複製開始領域);注⁷P - Promoter(プロモーター)

表 1 供与核酸の構成並びに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-DNA I 領域		
B-Right Border	3,596-3,952	<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	3,953-4,061	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注7} - <i>RbcS4</i>	4,062-5,784	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター及びリーダー配列 (Krebbers et al., 1988b; 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>CTPI</i>	5,785-6,048	<i>A. thaliana</i> の <i>RbcS4</i> 遺伝子に由来する輸送ペプチドをコードする配列 (Krebbers et al., 1988a)。改変 Cry1Ac 蛋白質を葉緑体へ輸送する。
CS- 改変 <i>cry1Ac</i>	6,049-9,585	<i>B. thuringiensis</i> に由来する改変 Cry1Ac 蛋白質をコードする配列 (Fischhoff and Perlak, 1996)。改変 Cry1Ac 蛋白質は、 <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> HD-73 株から産生される野生型の Cry1Ac 蛋白質と比較して7つのアミノ酸が異なる。
Intervening Sequence	9,586-9,594	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-7S α'	9,595-10,033	<i>G. max</i> のダイズ 7S α' 種子貯蔵蛋白質をコードする <i>Sphas1</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する (Schuler et al., 1982)。
Intervening Sequence	10,034-10,069	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border	10,070-10,511	<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)。

表 1 供与核酸の構成並びに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
外側骨格領域 (本組換えサイズには存在しない)		
Intervening Sequence	10,512-11,786	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-rop	11,787-11,978	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop))のコード配列であり、 <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	11,979-12,405	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pBR322	12,406-12,994	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	12,995-13,524	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-aadA	13,525-14,413	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。
Intervening Sequence	14,414-14,549	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-DNA II (本組換えサイズ中には存在しない。表の先頭続く)		
B-Right Border	14,550-14,906	<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)。
Intervening Sequence	14,907-14,939	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-FMV	14,940-15,503	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	15,504-15,532	DNA クローニングの際に利用された配列。

- 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

【改変 *cry1Ac* 遺伝子】

本組換えダイズには、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*由来の改変Cry1Ac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)。

本組換えダイズに導入された改変*cry1Ac*遺伝子は*cry1Ab*遺伝子の最初の1,398塩基 (アミノ酸配列では1~466番目) (Perlak et al., 1990) と*cry1Ac*遺伝子の1,399~3,534番目 (アミノ酸配列では467~1178番目)の塩基 (Adang et al., 1985; Fischhoff and Perlak, 1996) を結合させることにより構築した (図 2)。なお、*cry1Ab*遺伝子の最初の1,398塩基は既に植物体内での発現量を高める目的で塩基配列にサイレント変異を加えてあり、この部分において、野生型Cry1Ac蛋白質 (Adang et al., 1985; Genbank accession M11068) とアミノ酸配列が6アミノ酸だけ異なる。また、*cry1Ac* 遺伝子の1,399~3,534番目については、植物体内での発現を高める目的で塩基配列にサイレント変異を新たに導入した。また、この部分において、野生型Cry1Ac蛋白質とアミノ酸配列が1アミノ酸だけ異なる。これは766番目のアミノ酸であり、遺伝子のクローニングに用いた*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株がもともと有していたアミノ酸変異であると考えられた (図 2のb)。よって、改変*cry1Ac*遺伝子から発現する改変Cry1Ac蛋白質は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株から産生される野生型Cry1Ac蛋白質と比較して7つのアミノ酸が異なるが、これらの置

換は既に第一種使用の承認 (平成16年11月22日) を受けているチョウ目害虫抵抗性ワタ (*cry1Ac, Gossypium hirsutum* L.) (531, OECD UI : MON-00531-6) 中で発現している改変Cry1Ac蛋白質と同一である。また、本組換えダイズ中で発現する改変Cry1Ac蛋白質は上述の7つのアミノ酸の置換に加え、N末端側にCTP1に由来する4アミノ酸が付加されている (別添資料 1)。

本組換えダイズで発現する改変Cry1Ac蛋白質の推定アミノ酸配列と、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株から生産される野生型Cry1Ac蛋白質の推定アミノ酸配列との相同性は99.1%である。

Cry1A蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を持つことが知られている (Crickmore et al., 1998)。また、Cry1Ac蛋白質に分類される蛋白質は95%の相同性の範囲内で多様性を持っており (Crickmore et al., 1998)、*B. thuringiensis* から同定されたCry1Ac蛋白質にいくつかの変異型が存在することも知られている (Von Tersch et al., 1991)。上述したように、本組換えダイズで発現する改変Cry1Ac蛋白質と*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株が生産する野生型Cry1Ac蛋白質との相同性は99.1%であり、Cry1Ac蛋白質がもともと有する95%以上の相同性の範囲内であるため、改変Cry1Ac蛋白質のチョウ目昆虫に対する殺虫スペクトラムは自然界に存在するCry1Ac蛋白質と同等と考えられる。なお、Cry1Ac蛋白質は変異型や由来に関わらずチョウ目昆虫以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことを文献調査により確認した (表 2)。また、チョウ目昆虫の中でも種によってCry1Ac蛋白質に対する感受性には差があることが知られている (表 3)。

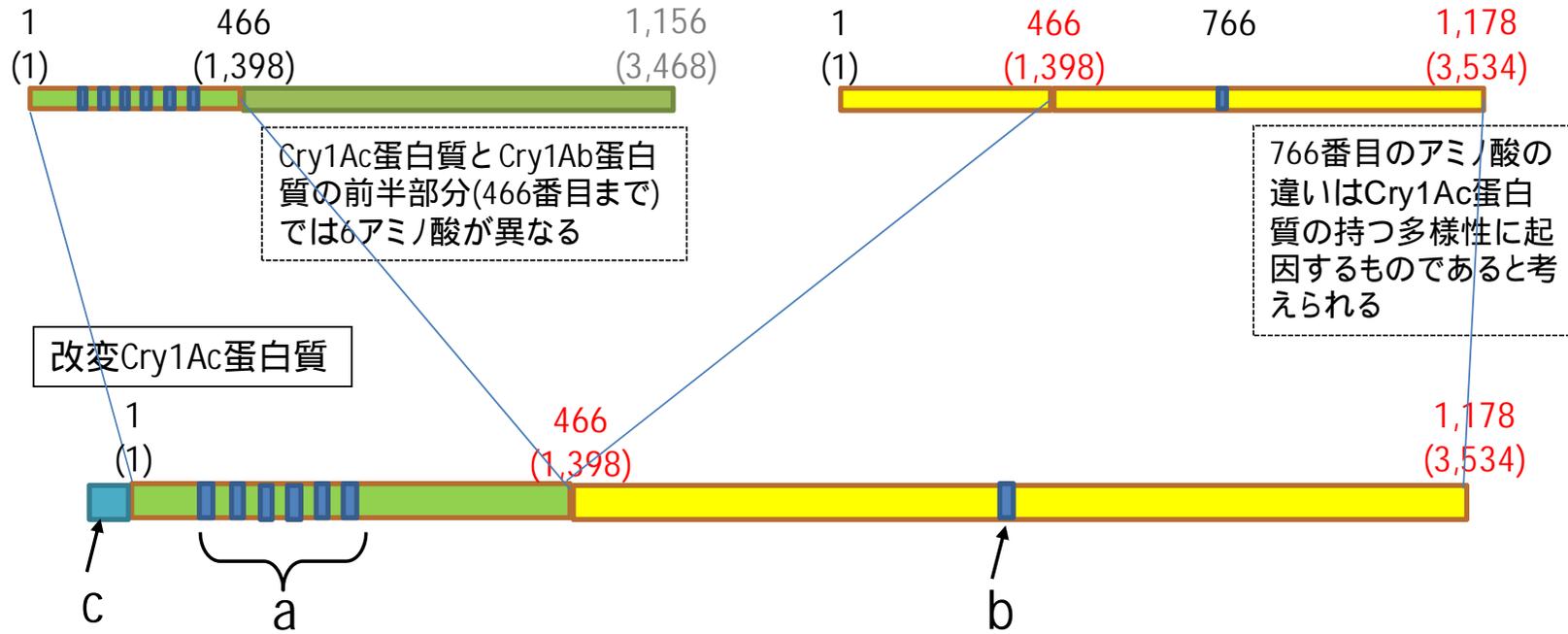
本組換えダイズは、チョウ目害虫による被害の深刻な熱帯及び亜熱帯に属する主に南米の地域において、現在チョウ目害虫防除のために使用されている殺虫剤の使用量を軽減するか無くすことを目標として育成された。実際に、南米でのダイズ栽培における主要チョウ目害虫であるベルベットビーンキャタピラー (ピロードマメケムシ) (*Anticarsia gemmatalis*)、ソイビーンルーパー (*Pseudoplusia includes*)、ソイビーンアクシルボーラー (*Epinotia aporema*) 及びサンフラワールーパー (*Rachiplusia nu*) に対して殺虫活性を示すことが観察されている (

別添資料 2、別添資料 3 及び別添資料 4)。

なお、本組換えダイズ中で産生される改変 Cry1Ac 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_2017²を用いて、FASTA型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸配列によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった

² AD_2017: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource、2017 年 2 月 9 日) に登録されている配列から構成されるデータベースで、1,970 件のアミノ酸配列が含まれる。



- 6つの違いは改変Cry1Ac蛋白質の前半部分の由来であるCry1Ab蛋白質と野生型のCry1Ac蛋白質の間のアミノ酸配列の違いによるものである
- 766番目のアミノ酸の違いは*B. thuringiensis* のCry1Ac蛋白質の持つ多様性に起因するものである
- 改変Cry1Ac蛋白質のN末端側にCTP1に由来する4アミノ酸が付加されている

図 2 改変 Cry1Ac 蛋白質の構築方法

表 2 MON87701 における目別に見た Cry1Ac 蛋白質の殺虫活性³

目	殺虫活性	調査した種の数	感受性を持つ種の数
Lepidoptera (チョウ目)	+	47	46
Diptera (ハエ目)	-	1	0
Coleoptera (コウチュウ目)	-	8	0
Neuroptera (アミメカゲロウ目)	-	1	0
Hymenoptera (ハチ目)	-	6	0
Hemiptera (カメムシ目)	-	6	0
Isoptera (シロアリ目)	-	1	0
Blattaria (ゴキブリ目)	-	1	0
Collembola (トビムシ目)	-	2	0
Acari (ダニ目)	-	2	0
Haplotaaxida (ナガミミズ目)	-	1	0

³ 75 報の文献調査より作成した(文献については別添資料 5 参照)。

表3 Cry1Ac蛋白質の殺虫スペクトラム

学名	慣用名	LC ₅₀ (µg/ml diet)	95% Confidence Interval	参考文献
本組換えダイズの標的昆虫				
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	ベルベットビーンキャタピラー (ビロードマメケムシ)	0.039	0.012 - 0.094	Travalini et al. (2003)
<i>Pseudoplusia includes</i>	ソイビーンルーパー	0.21-0.48	0.16 - 0.65	Luttrell et al. (1999)
<i>Epinotia aporema</i>	ソイビーンアクシルボーラー	0.45	0.32 - 0.58	Bledig et al. (2001)
<i>Rachiplusia nu</i>	サンフラワールーパー	0.27	-	Bledig et al. (2001)
その他のチョウ目昆虫				
<i>Manduca sexta</i> (L.)	タバコホーンワーム (タバコスズメガ)	0.036	0.028 - 0.048	MacIntosh et al. (1990)
<i>Trichoplusia ni</i> (Hübner)	キャベツルーパー (イラクサギンウワバ)	0.09	0.018 - 0.18	MacIntosh et al. (1990)
		0.31	0.23-0.61	Moar et al. (1990)
<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	タバコバッドワーム	1	0.55 - 2.35	MacIntosh et al. (1990)
<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	コーンイヤールーム	10	6.4 - 24.8	MacIntosh et al. (1990)
<i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel)	ブラックカットワーム (タマヤナガ)	18	10.36 - 36.1	MacIntosh et al. (1990)
		>200	-	Gilliland et al. (2002)
		202.5	-	Lu and Yu (2008)
<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner)	ヨーロピアンコーンボーラー (ヨーロッパアワノメイガ)	37	17.8 - 115.9	MacIntosh et al. (1990)
<i>Spodoptera exigua</i> (Hübner)	ビートアーミーワーム (シロイチモジヨトウ)	44	41.9 - 46.4	MacIntosh et al. (1990)

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

(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-GMIR9 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-GMIR9 の全塩基数は、15,532bp 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

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。

(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本プラスミド・ベクターの構成要素を表 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と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-GMIR9 をアグロバクテリウム法によって非組換えダイズ品種 A5547 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 A5547 の幼芽の頂端分裂組織と PV-GMIR9 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、グリホサート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R₅世代において、形質転換に用いた PV-GMIR9 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-GMIR9 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 6)。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 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、通常の散布量よりも低薬量での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。これによりグリホサートによって傷害を受けた個体のみを T-DNA II 領域 (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 領域を持たない R₁ 個体において、さらに TaqMan PCR 法により T-DNA I 領域 (改変 *cryIac* 遺伝子発現カセットを含む領域) 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 MON87701 系統を選抜した。

本組換えダイズの育成図を図 3 に示した。なお、本申請の対象は、R₅ 世代及び R₅ 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

【社外秘につき非開示】

図 3 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

本組換えダイズの導入遺伝子が染色体に存在するかどうかを調べるため、導入遺伝子をホモで有する本組換えダイズ (R₅ 世代) を改変 *cry1Ac* 遺伝子を持たないダイズ品種 (MSOY8329) と交配して F₁ 個体を作成した。この F₁ 個体を自殖して得られた F₂ 世代を作成した。さらに、F₂ 世代のうち改変 *cry1Ac* 遺伝子をヘテロで持つ 1 個体を自殖することにより F₃ 世代を作成した。これら F₂ 及び F₃ 世代について、導入遺伝子の遺伝子型を TaqMan PCR 法により調査し、分離比の検定を行った。その結果、導入遺伝子の分離比は、メンデルの法則に従うと仮定して期待される 1:2:1 の分離比に適合していた (表 4; 別添資料 7 の Table2)。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ていると考えられる。

表 4 本組換えダイズの F₂ 及び F₃ 世代における導入遺伝子の分離比

世代	供試 個体数	1:2:1 分離			期待値 +/+	期待値 +/-	期待値 -/-	χ^2	p 値
		実測値 +/+	実測値 +/-	実測値 -/-					
F ₂	297	79	148	70	74.25	148.50	74.25	0.5	0.76
F ₃	263	73	121	69	65.75	131.50	65.75	1.8	0.41

¹F₃ 世代は、F₂ 世代のうちヘテロ接合体である 1 個体を自殖することで得られた

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

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 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれており (別添資料 8 の Figure 4~6)、複数世代 (R₄、R₅、R₆、R₈ 及び R₉ 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ている (別添資料 8 の Figure 14)。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ている (別添資料 8 の Figure 7~9)。

- 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 8 の Figure 4~6)。

- 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 (R₄、R₅、R₆、R₈ 及び R₉ 世代)にわたり改変 Cry1Ac 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 9 の Figure2)。

また、2007 年に米国の 5 ヶ所のほ場 (アラバマ州、アーカンソー州、ジョージア州、イリノイ州及びノースカロライナ州)において、3 反復で栽培した本組換えダイズの葉 (Over-season leaf, OSL)、根、地上部、種子での改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 5; 別添資料 10)。なお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: 6~8 葉期、OSL-3: 10~12 葉期、OSL-4: 14~16 葉期)。また、米国の 1 ヶ所のほ場 (イリノイ州)で 1 反復で育成した本組換えダイズの花粉 (葯を含む) 中での改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量も測定した。

その結果、改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量の平均値は葉で最も高く (30~53 µg/g fwt)、次いで地上部 (8.1µg/g fwt)、種子 (4.2µg/g fwt)、花粉 (2.3µg/g fwt) の順であった。なお根における改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量は検出限界以下 (LOD=0.347µg/g fwt)であった (表 5; 別添資料 10)。

また、育成の過程において、改変 Cry1Ac 蛋白質の発現を各世代で確認しながら選抜を行った。

表 5 MON87701 系統の葉、根、地上部、種子及び花粉/葯における改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量 (2007 年、米国)

組織の種類 ⁹	Cry1Ac µg/g fwt 平均 (SD) ^{1,3}	範囲 ⁴ (µg/g fwt)	Cry1Ac µg/g dwt 平均 (SD) ²	範囲 (µg/g dwt)	定量限界値 /検出限界値 (µg/g fwt)
OSL-1	30(8.5)	12-40	220(70)	110-350	2.5/0.74
OSL-2	38(16)	18-80	260(100)	130-500	2.5/0.74
OSL-3	34(17)	14-77	240(110)	94-480	2.5/0.74
OSL-4	53(36)	15-110	340(290)	78-960	2.5/0.74
根	< LOD	< LOD	NA ⁵	NA ⁵	0.4/0.347
地上部	8.1(7.2)	2.5-26	29(28)	8.2-95	2.0/0.55
収穫種子	4.2(0.73)	3.1-5.0	4.7(0.79)	3.4-5.7	1.0/0.47
花粉/葯 ⁶	2.3(0.58)	1.8-3.1	NA ⁷	NA ⁷	ND ⁸

1. 蛋白質発現量は、組織重量 (g)あたりの蛋白質重量 (µg)を新鮮重 (fwt)あたりで表した
2. 蛋白質発現量は、乾燥重 (dwt)あたりにおける µg/g として表した。乾燥重値は、新鮮重 (fwt)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
3. 平均値及び標準偏差 (SD)は、各組織について算出した (OSL-1: n=13、地上部: n=14、花粉/葯: n=4、それ以外は n=15)
4. 最小値及び最大値は、各組織について算出した
5. 新鮮重あたりで検出限界以下の場合、乾燥重あたりに換算しなかった
6. 試料量が少ないため、花粉/葯の評価には精度を確認していないが、最適化を行った ELISA 法を用いた
7. 花粉/葯は試料量が少ないため、乾燥重あたりへの換算は行わなかった
8. 花粉/葯は試料量が少ないため、検出限界 (LOD)及び定量限界 (LOQ)は求めなかった
9. OSL1~4 は、OSL1: 3~4 葉期、OSL2: 6~8 葉期、OSL3: 10~12 葉期及び OSL4: 14~16 葉期を表し、それぞれの時期に葉のサンプルを採取した。また地上部は R6 期 (子実肥大期)の植物体を採取した

- 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 11)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応あたり 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 91 粒の本組換えダイズ及び 44 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 11)。

- (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改変 *cry1Ac* 遺伝子は改変 Cry1Ac 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

2009 年から 2010 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 R₉ 世代を供試した (図 3)。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 A5547 を用いた。なお、生育初期における低温耐性及び花粉の稔性及びサイズについてはモンサント・カンパニー (米国) において試験を実施した。

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, 2012a) を参考に、20 項目 (発芽始め、発芽期、発芽揃い、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、草型、収穫期の植物重、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。その結果、統計処理を行った項目 (発芽率、主茎長、主茎節数、分枝数、最下着莢節位高、収穫期の植物重) では、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認められた (別添資料 12 の表 2)。発芽率は本組換えダイズで 71.3%、対照の非組換えダイズで 76.0%であり、本組換えダイズの方が低かった。

また、統計処理を行わなかった項目 (発芽始め、発芽期、発芽揃い、小葉の形、毛茸の多少、開花始め、開花終わり、伸育型、成熟期、草型、収穫種子の形状 (粒色、粒揃い及び粒形)) では、発芽揃いを除く全ての項目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は認められなかった。なお、本組換えダイズ、対照の非組換えダイズともに発芽率が発芽揃いの定義である 80%に達しなかったためその時期を観測することができなかった (別添資料 12 の表 2)。

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 2007 年にモンサント・カンパニー (米国)の人工気象室において実施した。生育初期における低温耐性試験は、播種後 19 日目の本組換えダイズ、対照の非組換えダイズ A5547 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 20 日間栽培した後、草勢、主茎長、生育段階、生体重及び乾燥重について調査を行った。統計処理を草勢、主茎長、生体重及び乾燥重に関して行い、生育段階に関しては、供試個体の生育状況を把握するための指標であるため、結果の記載にとどめた。

その結果、いずれの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の間で統計学的有意差は認められなかった (別添資料 13 の Table 4)。また、本組換えダイズと対照の非組換えダイズの生育段階は、ともに V4-5 であったので違いはないと考えられた (別添資料 13 の Table 4)。

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。2010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12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ヨウ素ヨードカリ溶液で染色し、花粉の稔性(充実度)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(充実度)に違いは認められなかった。また、花粉の形態や大きさにも違いは認められなかった(別添資料12の図7)。

また、2007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(充実度)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14のTable2、Figure1)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

生産性：

本隔離ほ場で同一条件で栽培され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(稔実莢数、一株あたりの粗粒重、一株あたりの精粒重、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、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なかった(別添資料12の表3)。

脱粒性：

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し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、種子の裂莢性における違いは認められなかった(別添資料12の表3)。

休眠性及び発芽率：

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静置し、25℃に設定した恒温器内で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 91.7%及び 94.4%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 12 の表 3 及び表 4)。

f 交雑率

本組換えダイズと対照の非組換えダイズの間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当たる本組換えダイズの発現蛋白質の有無を指標とした。

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、南東あるいは北西に隣接するプロットの本組換えダイズとは 1.65m の距離があった (別添資料 12 の図 2)。なお、このプロットには開花期には防虫網はかけていなかった。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 1 粒ごとに確認した。

本試験に供試した 480 粒の中に、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 12)。

g 有害物質の産生性

本組換えダイズから土壌微生物あるい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に土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽株数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 12 の表 5~表 7)。

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

—

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

—

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

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

—

(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 6)。

表 6 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及び認可状況

2018年6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	2009年3月	2011年10月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2009年5月	2010年8月
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2009年6月	2010年10月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2009年6月	2010年10月
欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料	2010年5月	2012年2月
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2009年8月	2010年9月

なお、本組換えダイズのわが国における申請状況は、表 7 のとおりである。

表 7 本組換えダイズのわが国における申請及び認可状況

2018年6月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ⁴	2010年6月	2011年3月
農林水産省	飼料 ⁵	2010年6月	2011年9月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ⁶ : 隔離ほ場)	2008年12月	2009年7月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 : 一般使用)	2012年7月	2013年2月

⁴ 食品衛生法に基づく。

⁵ 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。

⁶ 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.
- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker and D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34: 376-378.
- 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. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Beard, B.H. and P.F. Knowles. 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Science* 11: 489-492.
- Bledig, S., R. Dobert, L. Harrison, G. Head, T. MacRae and S. Zampierin. 2001. Integrated pest management for insect-protected soybean in Argentina. Monsanto Technical Report MSL-17422. St. Louis, Missouri.
- 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.

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 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.

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.

FAOSTAT. 2017. World soybean area harvested 2014. Rome, Italy.
<http://faostat3.fao.org/home/E> [Accessed November 24, 2017].

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.

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.

- Garber, R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *Journal of the American Society of Agronomy* 18: 967-970.
- Gilliland, A., C.E. Chambers, E.J. Bone and D.J. Ellar. 2002. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1509-1515.
- 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.
- Goto, H., H. Shimada, J.M. Horak, A. Ahmad, M.B. Baltazar, T. Perez, A.M. McPherson, D. Stojšin, A. Shimono and R. Ohsawa. 2016. Characterization of Natural and Simulated Herbivory on Wild Soybean (*Glycine soja* Seib. et Zucc.) for Use in Ecological Risk Assessment of Insect Protected Soybean. *PLOS one* 11: e0151237. doi:0151210.0151371/journal.pone.0151237.
- 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.
- 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.
- Kitamoto, N., A. Kaga, Y. Kuroda and R. Ohsawa. 2012. A model to predict the frequency of integration of fitness-related QTLs from cultivated to wild soybean. *Transgenic Research* 21: 131-138.
- 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.
- Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988a. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.
- Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988b. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.
- Kubo, A., M. Aono, N. Nakajima, T. Nishizawa, M. Tamaoki and H. Saji. 2013. Characterization of hybrids between wild and genetically modified glyphosate-tolerant soybeans. *Plant Biotechnology* 30: 335-345.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D. Vaughan. 2010. The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Molecular Ecology* 19: 2346-2360.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2008. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Science* 48: 1071-1079.
- Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, H. Yano, T. Yoshitake, S. Kato and D. Vaughan. 2013. QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated soybeans in experimental fields. *Ecology and Evolution* 3: 2150-2168.
- Lammi, J. 2008. Online-Photoperiod Calculator. <http://www.sci.fi/~benefon/sol.html> [Accessed May 10, 2012].
- Lee, C.D., D.B. Egli and J.H. Herbek. 2005. Predicting soybean first flowering date. University of Kentucky Cooperative Extension Service, Lexington, Kentucky. <http://www.uky.edu/Ag/CornSoy/Newsletters/cornsoy5-1.pdf> [Accessed July 5, 2012].
- Lu, Q. and H. Yu. 2008. Study on the toxicity difference and mechanisms of two Bt proteins in *Agrotis ypsilon*. Dissertation for the master degree in agriculture. Northeast Agricultural University, Harbin, China.
- Luttrell, R.G., L. Wan and K. Knighten. 1999. Variation in susceptibility of noctuid

(lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 92: 21-32.

MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P.L. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff and R.L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. Journal of Invertebrate Pathology 56: 258-266.

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.

Moar, W.J., L. Masson, R. Brousseau and J.T. Trumble. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Applied and Environmental Microbiology 56: 2480-2483.

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.

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 for 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.

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 ReadyTM 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.

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.

Pathan, M.A., J.B. Sinclair and R.D. McClary. 1989. Effects of *Cercospora kikuchii* on soybean seed germination and quality. *Plant Disease* 73: 720-723.

Perlak, F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate and D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.

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.

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.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

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.

Schuler, M.A., E.S. Schmitt and R.N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for the a and a' subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucleic Acids Research* 10: 8225-8244.

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.

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.

Travalini, C., R.B. Silva, J.B. Schmidt and C. Omoto. 2003. Baseline susceptibility of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* in Brazil. It is unpublished paper.

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.

Von Tersch, M.A., H.L. Robbins, C.S. Jany and T.B. Johnson. 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: Gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. Applied and Environmental Microbiology 57: 349-358.

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

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].

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.

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.

Zorrilla, G., A.D. Knapp and D.C. McGee. 1994. Severity of phomopsis seed decay, seed

quality evaluation, and field performance of soybean. *Crop Science* 34: 172-177.

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

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・亘理 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.

環境省 2017a 環境省レッドリスト2017 平成29年3月31日公表

<http://www.env.go.jp/nature/kisho/hozen/redlist/MOERedlist2017.pdf>

環境省 2017b チョウ目害虫抵抗性ダイズ (改変*cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI: MON-87701-2) 生物多様性影響評価検討会での検討の結果

http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1590&ref_no=2

[Accessed November 7, 2017]

環境省 2017c チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ (改変*cry1F*, 改変*cry1Ac*, *pat*, *Glycine max* (L.) Merr.) (DAS81419, OECD UI: DAS-81419-2) 生物多様性影響評価検討会での検討の結果

http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1790&ref_no=2

[Accessed November 7, 2017]

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

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— 植物資源探索導入調査報告書 20: 11-17.

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

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

財務省 2017 財務省貿易統計

<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed January 13, 2017]

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.

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 2017 2015 (平成27) 年植物検疫統計

<http://www.pps.go.jp/TokeiWWW/Pages/report/index.xhtml> [Accessed Jan 11, 2017]

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>

日本モンサント株式会社 2016 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 2016年6月1日公表
http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/demo2015/Documents/BtRR2Y_Monitoring%20Report_160126_for%20webpage.pdf

日本モンサント株式会社 2017 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 2017年3月31日公表
http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/Documents/BtRR2Y_MonitoringReport_Web_170127.pdf

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

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/21_kekka.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 農林水産植物種類別審査基準 大豆 2012年4月公表
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1307.pdf>

資料2：審査データの概要

農林水産省 2012b 「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 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

農林水産省 2015 「平成26年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 平成27年10月29日公表
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/h26_houkoku.pdf

農林水産省 2017 「平成27年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 平成29年1月10日公表
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/170110-1.pdf>

農林水産省 2018a 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/attach/pdf/index-20.pdf [Accessed on Feb. 6, 2018]

農林水産省 2018b 「平成28年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について 平成30年2月6日公表
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-134.pdf>

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

資料2：審査データの概要

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・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

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

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 本組換えダイズの作出に用いられた改変 *cry1Ac* 遺伝子から推定した改変 *Cry1Ac* 蛋白質のアミノ酸配列
- 別添資料 2 Efficacy of Soybean Lines Expressing TIC107 and *Cry2Ab2*-U.S. 2002 Field and Screenhouse trials. (MSL-18350)
- 別添資料 3 *Bt* soybean Screenhouse and Field Efficacy Trials--Argentina 2002-2003. (MSL-18808)
- 別添資料 4 *Bt* Soybean Screenhouse and Field Efficacy Trials-U.S. 2003. (MSL-19120)
- 別添資料 5 *Cry1Ac* Insecticidal Activity Spectrum
- 別添資料 6 Summary of PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium* Used to Produce Insect-Protected MON 87701 soybean
- 別添資料 7 Heritability and Stability of Genes Present in Insect-Protected Soybean MON 87701 across Multiple Generations
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0022176: Molecular Analysis of Insect-Protected Soybean MON 87701 (MSL0022327)
- 別添資料 9 Western Blot Analysis of *Cry1Ac* Protein in MON 87701 Soybean Leaf across Multiple Generations in Support of a Japan Stage III Application (MSL0021419)
- 別添資料 10 Amended Report for MSL0021531: Assessment of the *Cry1Ac* Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87701 Produced in U.S. Field Trials During 2007 (MSL0022409)
- 別添資料 11 Soybean MON87701 EndPoint TaqMan PCR for Single Seed (BQ-QC-10725-01)
- 別添資料 12 チョウ目害虫抵抗性ダイズ(改変 *cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI: MON87701-2) 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

資料2：審査データの概要

- 別添資料 13 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Insect-Protected Soybean MON87701 under Growth Chamber Conditions(MSL0021174)
- 別添資料 14 Viability and Morphology Evaluation of Pollen from Insect-Protected Soybean MON87701 Produced in a U.S. Field Trial During 2007 (MSL0021055)
- 別添資料 15 環境省レッドリスト 2017 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定
- 別添資料 16 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 17 モニタリング結果報告書

資料3 . 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 30 年 2 月 8 日

氏名 日本モンサント株式会社
 代表取締役 ダビッド・ブランコ
 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 (改変 *cry1Ac*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87701, OECD UI : MON-87701-2) (以下、「本組換えダイズ」という。) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

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

平成30年2月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 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 バイオ規制・環境部 業務調整課 課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 規制調整課 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 バイオ規制・環境部 申請・登録課 課長

*: 管理責任者 (個人名は個人情報により非公開)

資料3. 緊急措置計画書

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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、種子生産、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。

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

弊社は、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ダイズの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

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、本組換えダイズ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ダイズに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信頼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。