

チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *cry1F*, *pat*, 改変 *cp4 epsps*, 改変 *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MON89034×*B.t.* Cry1F maize line 1507×MON88017×*B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI: MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-88017-3×DAS-59122-7) (MON89034, *B.t.* Cry1F maize line 1507, MON88017 及び *B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。)

申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
① 和名、英名及び学名	2
② 宿主の品種名又は系統名	2
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	2
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	3
(3) 生理的及び生態学的特性	4
イ 基本的特性	4
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	4
ハ 捕食性又は寄生性	4
ニ 繁殖又は増殖の様式	4
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	4
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	5
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度	5
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	5
ホ 病原性	6
ヘ 有害物質の産生性	6

ト	その他の情報	6
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1)	供与核酸に関する情報	7
イ	構成及び構成要素の由来	7
ロ	構成要素の機能	18
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	18
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	18
③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	23
(2)	ベクターに関する情報	24
イ	名称及び由来	24
ロ	特性	24
①	ベクターの塩基数及び塩基配列	24
②	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	24
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	25
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	25
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	25
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	25
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過	25
①	核酸が移入された細胞の選抜の方法	25
②	核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無	26
③	核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過及び系統樹	26
(4)	細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	29
①	移入された核酸の複製物が存在する場所	29
②	移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性	29
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	29
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	30
	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	30
(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	30
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	31
	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	31
	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	37
	a 形態及び生育の特性	37
	b 生育初期における低温又は高温耐性	37
	c 成体の越冬性又は越夏性	37
	d 花粉の稔性及びサイズ	38
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	38
	f 交雑率	38
	g 有害物質の産生性	40
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	40
(1)	使用等の内容	40
(2)	使用等の方法	40
(3)	承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法	40
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	40
(5)	実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	41
(6)	国外における使用等に関する情報	41
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	43
1	競合における優位性	43
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
(2)	影響の具体的内容の評価	44
(3)	影響の生じやすさの評価	44
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44
2	有害物質の産生性	45
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	45

(2)	影響の具体的内容の評価.....	48
(3)	影響の生じやすさの評価.....	49
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	50
3	交雑性.....	50
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	50
(2)	影響の具体的内容の評価.....	51
(3)	影響の生じやすさの評価.....	51
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	51
4	その他.....	51
第三	生物多様性影響の総合的評価.....	52
引用文献	56
緊急措置計画書	57

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 10 月 28 日

農林水産大臣 石破 茂 殿

5 環境大臣 斉藤 鉄夫 殿

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
 代表取締役 フィリップ・ファイル 印
 住所 東京都品川区東品川 2 丁目 2 番 24 号

10 申請者

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 印
 住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ(<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , <i>cry1F</i> , <i>pat</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , 改変 <i>cry3Bb1</i> , <i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) <i>Iltis</i>)(MON89034× <i>B.t.</i> <i>Cry1F</i> maize line 1507×MON88017× <i>B.t.</i> <i>Cry34/35Ab1</i> Event DAS-59122-7, OECD UI: MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-88017-3×DAS-59122-7)(MON89034, <i>B.t.</i> <i>Cry1F</i> maize line 1507, MON88017 及び <i>B.t.</i> <i>Cry34/35Ab1</i> Event DAS-59122-7 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

20

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：Corn, maize

学名：*Zea mays* subsp. *mays*(L.) Iltis

15 ② 宿主の品種名又は系統名

親系統の宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Z. mays*)の、デント種である。親系統の作出に使った品種名は以下のとおりである。

20 MON89034 : LH172

B.t. Cry1F maize line 1507:A188×B73 の Hi-II

MON88017 : 実験用交配雑種【自殖系統 A×F1 雑種 Hi-II】

B.t. Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7:A188×B73 の Hi-II

25 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

30 原産地については、米国の南西部、メキシコ、中米あるいは南米にかけての地域と考えられるが、決定的な説はなく、これら複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起原とする説がある(文献 1)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

(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

35

トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている(文献 1)。その後、

5 5 原住民の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 3000 年～1500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになり、南北アメリカ大陸の各地に伝播し、その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられている(文献 2)。わが国へは天正 7 年(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

10 現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる(文献 2; 文献 1)。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能である(文献 3; 文献 1)。

15 国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2006 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 5 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,130 万 ha、中国が 2,640 万 ha、ブラジルが 1,260 万 ha、メキシコが 770 万 ha、インドが 760 万 ha、ナイジェリアが 380 万 ha、インドネシアが 340 万 ha、アルゼンチンが 310 万 ha となっている(文献 4)。なお、同統計情報に基づくわが国におけるトウモロコシの栽培面積は 11 万 ha であった。

20 現在、わが国で栽培されているトウモロコシは統計上、生食用のスイートコーンと飼料用青刈りデントコーンがあり、2006 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,400 ha で収穫量は約 23 万 1,400 トン(文献 5)であり、2006 年における青刈りデントコーンの作付面積は約 8 万 6,100ha で、収穫量は約 454 万トンである(文献 6)。

25 わが国は 2007 年に海外から約 1,533 万トンのトウモロコシを飼料用、食品・工業用、そして栽培用として輸入している。その内訳は、飼料用として約 1,206 万トン、食品・工業用として約 456 万トン、そして栽培用として約 1,533 トンである。なお、栽培用として輸入している上位 3 カ国を挙げるとフランスが 720 トン、オーストリアが 188 トン、米国が 30 165 トンとなっている(文献 7)。

35 わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は寒地から温暖地までは 5 月、一部の暖地では 4 月から 6 月までである。適正栽植密度は 10a あたり 6,000～8,000 本である。雑草防除のため、生育初期に除草剤散布や 2～3 回の中耕・培土作業を行う。雌穂の抽出より 35～45 日後の黄熟期に地上部を収穫する(文献 3)。

なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、一般に栽培用として市販されているトウモロコシのほとんどは一代雑種品種(F1)なので、収穫種子が翌年に栽培用として播種されることは一般的でない。

5

(3) 生理的及び生態学的特性

イ 基本的特性

10 —

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15 トウモロコシ種子の発芽適温は 32～36℃、最低発芽温度及び最低生育温度は 6～10℃であり、実際には 13～14℃以上の時期が播種適期とされ、品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である(文献 3)。また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である(文献 3)。これら温度条件等の他、デント種の場合は種子重量の 70%の水を吸うと発芽する(文献 8)。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む土壌が適し、pH5.5～8.0 の範囲で栽培可能である(文献 8)。

20

現在のトウモロコシは栽培作物として高度に人為的に作られた作物であり、自然条件下で野生種として繁殖し、生存するための能力は失われている(文献 9; 文献 1)。

25 ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

30

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒性はない(文献 1)。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、野生として生き残る能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である。種子の休眠性は極めて低い。また、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃に達するまで発芽しない

35

ため、自然状態では腐敗し枯死する(文献 2; 文献 3)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0℃以下の外気にさらされると生存できない(文献 1)。種子の寿命は常温保存では短く、2 年目から発芽率が低下する。

5 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

トウモロコシは栄養繁殖はせず、種子繁殖する。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があるという報告はこれまでのところない。

10

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

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である(文献 1; 文献 10)。トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* 種に含まれ *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis の亜種として分類される一年生のテオシント(*Z. mays* subsp. *mexicana*)、及び *Tripsacum* 属であるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない(文献 1)。テオシントはメキシコとグアテマラにのみ自然分布しており、一方、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東南部、コロンビアからボリビアにかけてのアンデス東側の低地、そして、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラの 3 地域に大別されている(文献 2; 文献 3; 文献 1; 文献 11)。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない(文献 12; 文献 3)。

25

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの一本の雄穂には 1,200~2,000 個の小穂があり、1,600 万~3,000 万個の花粉粒を形成する。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では 24 時間以内であるが、環境により 2 時間から 8 日までの幅がある(文献 13)。花粉は球形で、1 粒あたりの重量は約 6.4×10^{-7} g であり(文献 14)、直径は 90~100 μ m である(文献 15)。風媒による他家受粉が主であるが普通のほ場で 1~5%の自家受粉が起きる。雄穂の開花によって飛散した花粉は、雌穂から抽出した絹糸に付着して発芽し、24 時間以内に受精を完了する(文献 1)。また、トウモロコシ花粉が飛散する距離は、林、山などの遮蔽物の有無、風向きなどで異なるが、およそ 300~500m とされている(文献 3)。

35

ホ 病原性

—

5

ヘ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育または生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

10

ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。

15

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

20 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」という。)、
25 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホシネート耐性トウモロコシ(*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI: DAS-01507-1)(以下「Cry1F line 1507」という。)、
30 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, 改変 *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis.)(MON88017, OECD UI: MON-88017-3) (以下「MON88017」という。)とコウチュウ目害虫抵抗性及び除草
35 剤グリホシネート耐性トウモロコシ(*cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(*B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI: DAS-59122-7)(以下「Event DAS-59122-7」という。)を従来の交雑育種法を用いて交配させた交配後代品種(OECD UI: MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-88017-3×DAS-59122-7)(以下「本スタック系統トウモロコシ」という。)は、親系統である MON89034、Cry1F line 1507、
MON88017 及び Event DAS-59122-7 の 4 つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。また、本スタック系統トウモロコシは一代雑種品種(F1)として商品化されることから、収穫される種子には遺伝的分離により本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せからなるスタック系統トウモロコシが含まれる。以下では MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の調製等に関する情報について概要等を記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

- 5 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来は、それぞれ図 1～図 4 (p8～11)及び表 1～表 4 (p12～17)に示したとおりである。

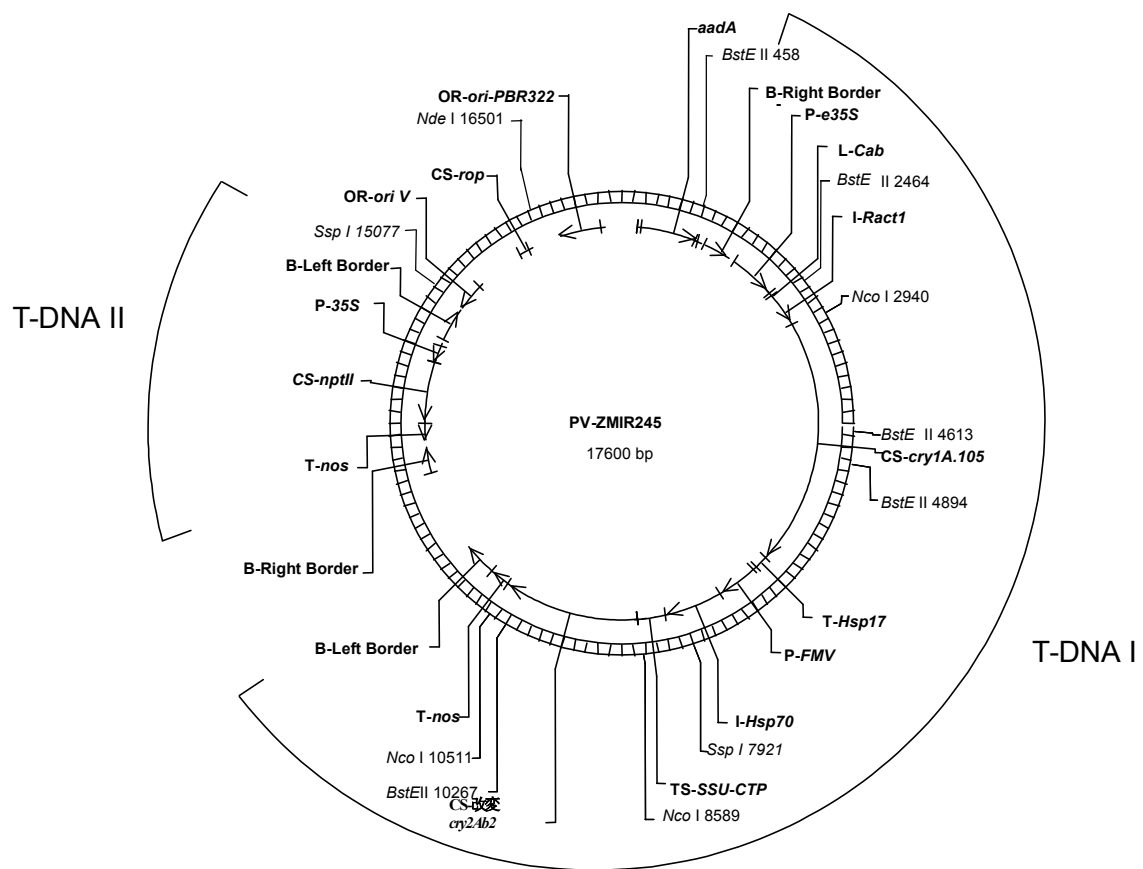


図 1 MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 のプラスミドマップ¹

MON89034 の育成過程では、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。

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

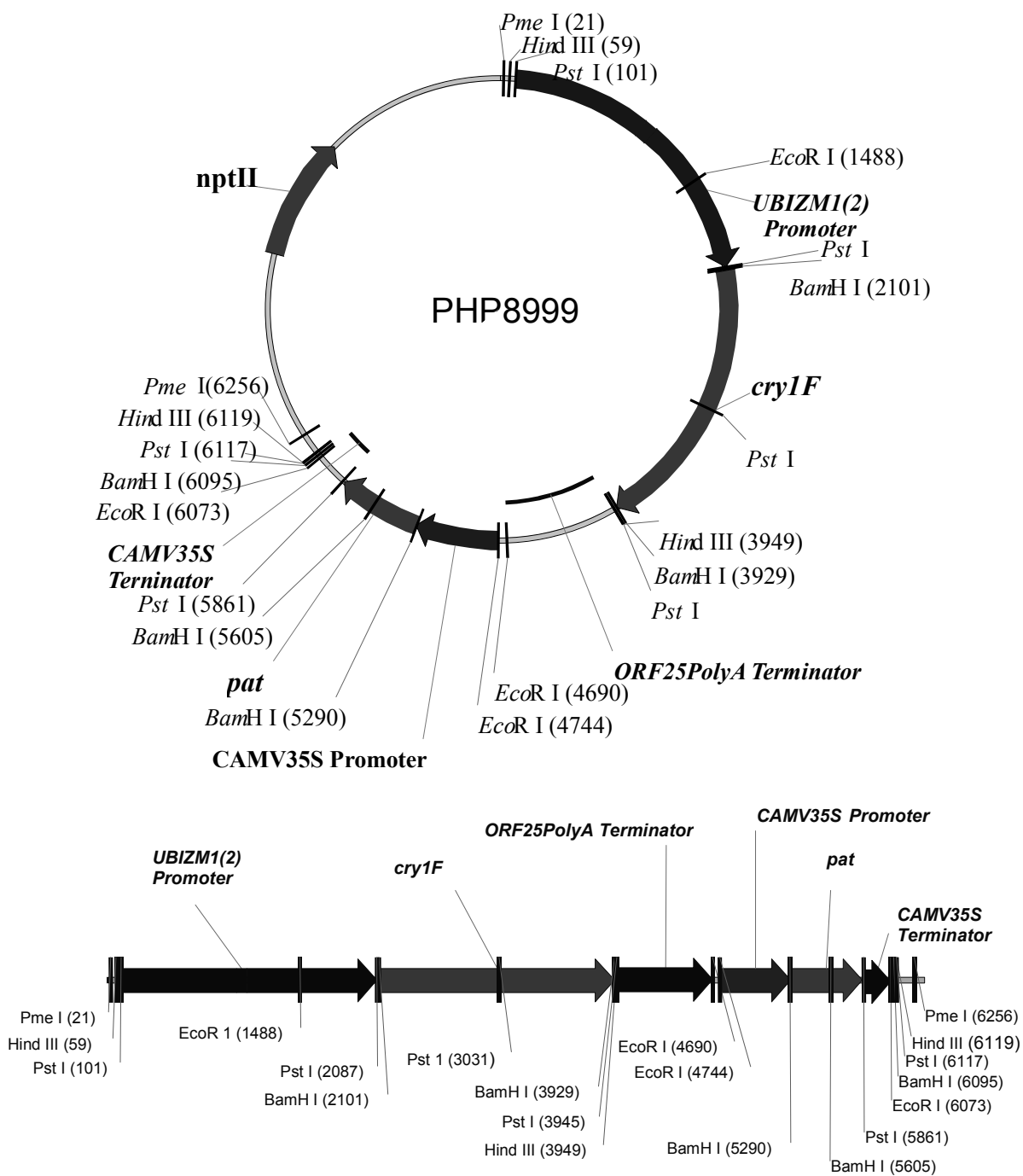


図 2 Cry1F line 1507 の作出に用いられた PHP899 のプラスミドマップ及び挿入 DNA 領域²

²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社に帰属する

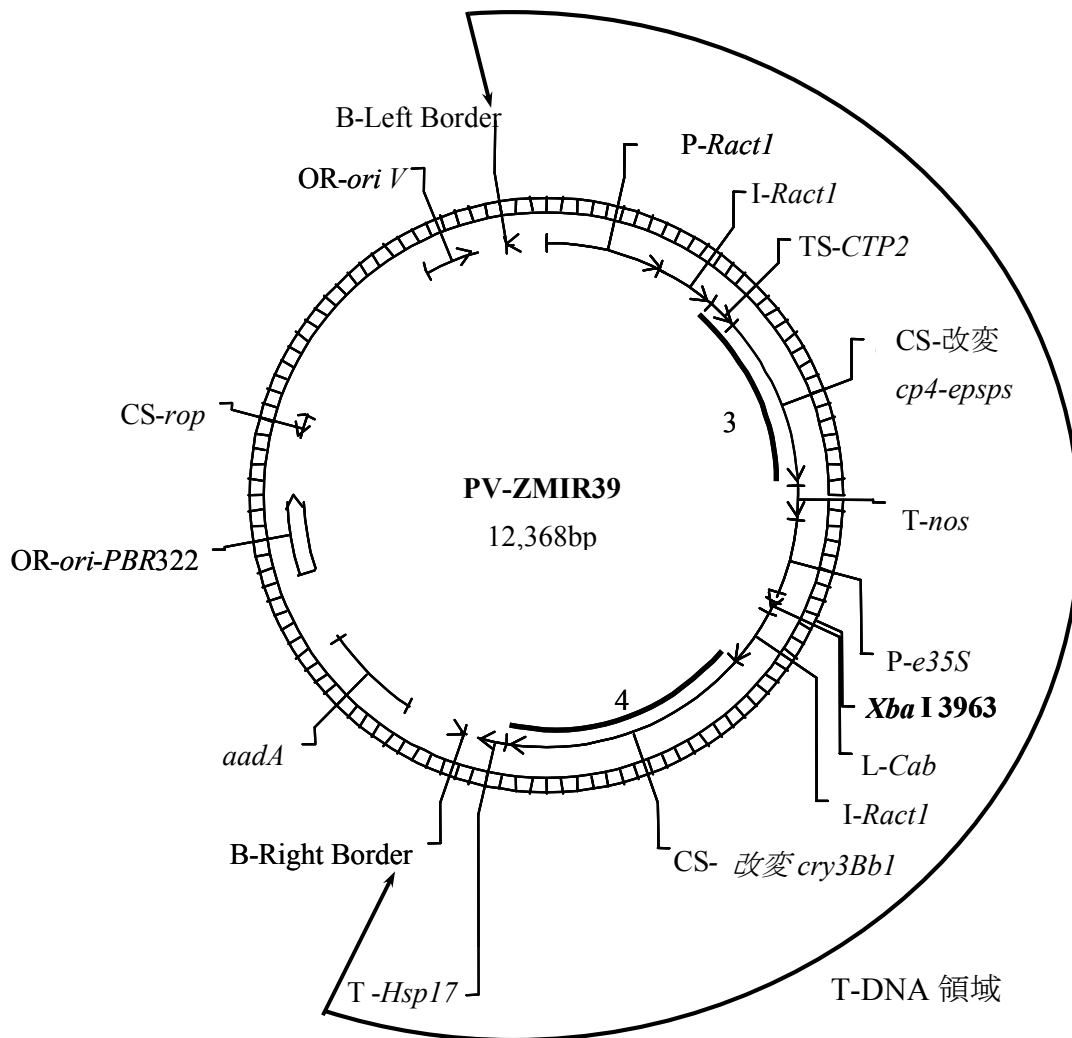


図 3 MON88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 のプラスミドマップ³

³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

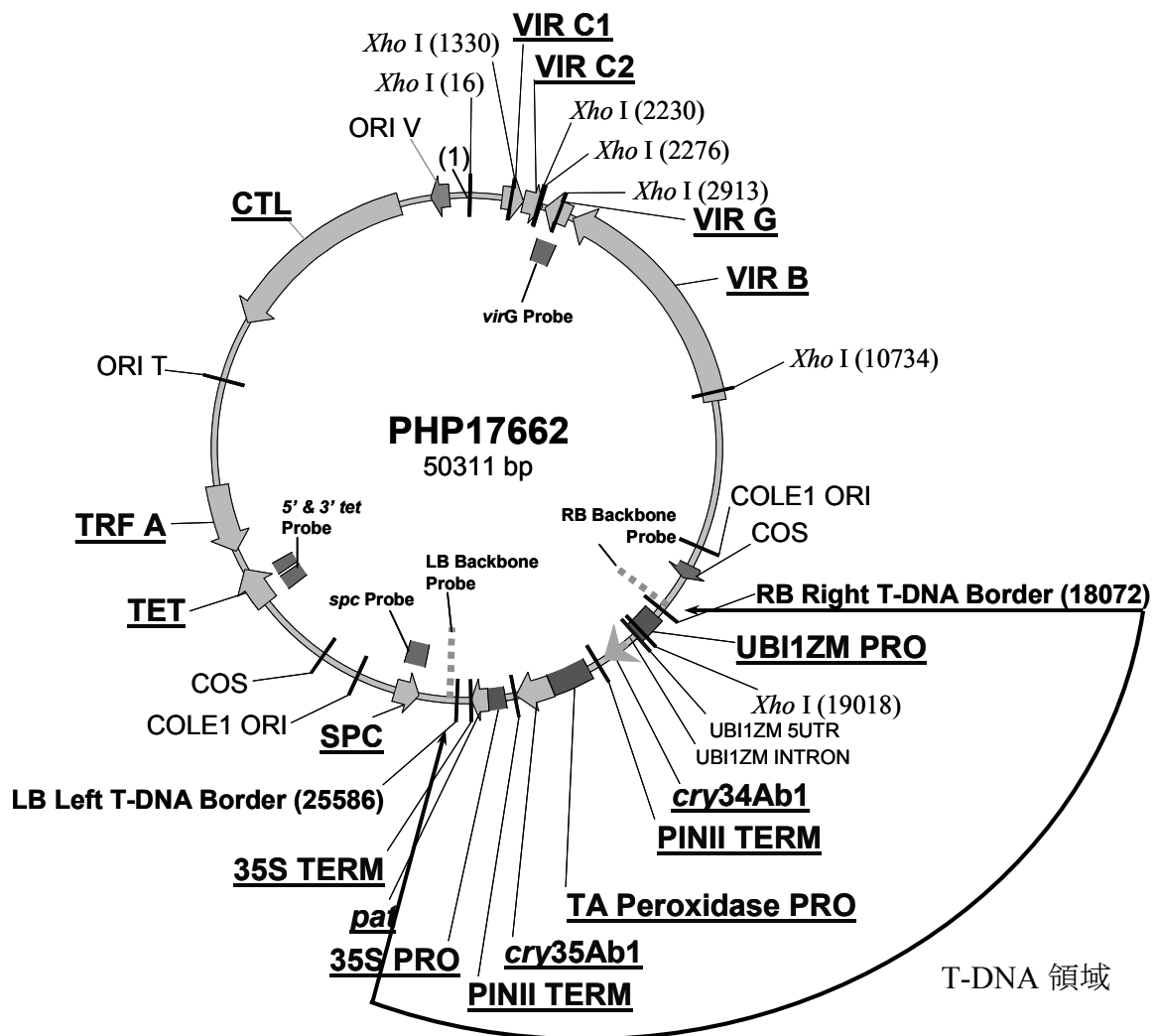


図 4 Event DAS-59122-7 の作出に用いられた PHP17662 のプラスミドマップ⁴

⁴本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社に帰属する

表 1 MON89034 の作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能⁵

構成要素	由来及び機能
T-DNA I 領域	
B ^{注1} -Right Border (右側境界領域)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 16)。
P ^{注2} - <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(文献 17)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA(文献 18)のプロモーターと 9bp リーダー配列。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
L ^{注3} - <i>Cab</i>	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダ領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 19)。
I ^{注4} - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS ^{注5} - <i>cry1A.105</i>	Cry1A.105 蛋白質をコードする遺伝子。詳細は第一の 2-(1)-ロ-①に示した。
T ^{注6} - <i>Hsp17</i>	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(文献 21)
P- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus 由来の 35Sプロモーター(文献 22)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I- <i>Hsp70</i>	トウモロコシ熱ショック蛋白質 70 遺伝子の第 1 イントロン(文献 23)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS ^{注7} - <i>SSU-CTP</i>	トウモロコシのリブ羅斯 1,5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットの輸送ペプチドで、第1イントロン配列を含む(文献 24)。下流に連結した蛋白質を色素体へと輸送する。
CS-改変 <i>cry2Ab2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> に由来する改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする遺伝子(文献 25)。クローニングの際に用いる制限酵素切断部位を付加するため、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端のメチオニンの後にアスパラギン酸が 1 つ挿入されている。
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'非転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(文献 26)。
B-Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 27)。

表 1 MON89034 の作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能(続き)⁵

構成要素	由来及び機能
T-DNA II 領域	
B-Right Border (右側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA の右側境界配列(24bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 16)。
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 26)。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(文献 28)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(文献 29)。
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(文献 18)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
B-Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 27)。
外側骨格領域	
OR ^{注8} - <i>ori V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 30)。
CS- <i>rop</i>	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列(文献 31)
OR- <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 32)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-nucleotidyltransferase の細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与する(文献 33)。

注¹ B – border (境界配列)

注² P – promoter (プロモーター)

注³ L – leader (リーダー配列)

注⁴ I – intron (イントロン)

注⁵ CS – coding sequence (コーディング配列)

注⁶ T – transcript termination sequence (転写終結配列)

注⁷ TS – targeting sequence (ターゲティング配列)

注⁸ OR – Origin of Replication (複製開始領域)

⁵本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 2 Cry1F line 1507 の作出に用いた PHP8999 の各構成要素の由来及び機能⁶

構成要素	由来及び機能
<i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット	
<i>UBIZM1(2) Promoter</i>	<i>Z. mays</i> 由来のコピキチン構成的プロモーター ¹⁾ (イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)(文献 34)。
<i>cry1F</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の Cry1F 蛋白質をコードする遺伝子。植物における発現を高めるため、最適化されている (GenBank AAA22347)。
<i>ORF25PolyA Terminator</i>	<i>A. tumefaciens</i> pTi5955 由来の転写を停止するためのターミネーター(文献 27)。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>CAMV35S Promoter</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S 構成的プロモーター ¹⁾ (文献 35)。
<i>Pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT 蛋白質)をコードする遺伝子。植物における発現を高めるため、最適化されている(文献 36)。
<i>CAMV35S Terminator</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するための 35S ターミネーター(文献 35)。

¹⁾構成的プロモーター: 植物体の全体において、目的遺伝子を発現させるプロモーター。

⁶本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社に帰属する

表 3 MON88017 の作出に用いた PV-ZMIR39 の各構成要素の由来及び機能⁷

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
P ^{注1} - <i>Ract1</i>	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる(文献 20)。
I ^{注2} - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS ^{注3} - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列(文献 37)。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS ^{注4} -改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(文献 38; 文献 39)。植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されている。
T ^{注5} - <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'非転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 26)。
P- <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(文献 17)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA(文献 18)のプロモーターと 9bp リーダー配列。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
L ^{注6} - <i>Cab</i>	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 19)。
I- <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS-改変 <i>cry3Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子(文献 40)。MON863 の改変 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一部所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON863 ではグリシンであるのに対して MON88017 ではアスパラギン酸である。
T- <i>Hsp17</i>	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 21)。

表 3 MON88017 の作出に用いた PV-ZMIR39 の各構成要素の由来及び機能(続き)⁷

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域	
B ^{注7} -Right Border (右側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 16)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-nucleotidyltransferase の細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与する(文献 33)。
OR ^{注8} - <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 32)。
CS- <i>rop</i>	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列(文献 31)。
OR- <i>ori-V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 30)。
B-Left Border (左側境界領域)	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列(文献 31)

注¹ P – promoter (プロモーター)

注² I – intron (イントロン)

注³ L – leader (リーダー配列)

注⁴ TS – targeting sequence (ターゲティング配列)

注⁵ CS – coding sequence (コーディング配列)

注⁶ T – transcript termination sequence (転写終結配列)

注⁷ B – border (境界配列)

注⁸ OR – Origin of Replication (複製開始領域)

⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 4 Event DAS-59122-7 の作出に用いた PHP17662 の各構成要素の由来及び機能⁸

構成要素	由来及び機能
<i>cry34Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>UBIIZM PRO</i>	<i>Z. mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター ¹⁾ (イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)
<i>cry34Ab1</i>	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 蛋白質をコードする遺伝子
<i>PIN II TERM</i>	<i>Solanum tuberosum</i> 由来の 転写を停止するためのプロテアーゼインヒビター II ターミネーター(イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>TA Peroxidase PRO</i>	根における発現が知られている <i>Triticum aestivum</i> 由来のペルオキシダーゼプロモーター(GenBank X53675 の 45-1342 塩基配列)
<i>cry35Ab1</i>	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 蛋白質をコードする遺伝子
<i>PIN II TERM</i>	<i>S. tuberosum</i> 由来の 転写を停止するためのプロテアーゼインヒビター II ターミネーター(イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>35S PRO</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S 構成的プロモーター ¹⁾
<i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT 蛋白質)をコードする遺伝子
<i>35S TERM</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するための 35S ターミネーター

¹⁾ 構成的プロモーター: 植物体の全体において、目的遺伝子を発現させるプロモーター。

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

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

5

MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、それぞれ表 1～表 4 (p12～17)に示したとおりである。そのうち、目的遺伝子である *cry1A.105* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、*cry1F* 遺伝子、*pat* 遺伝子、改変 *cp4 epsps* 遺伝子、改変 *cry3Bb1* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の詳細については、それぞれ表 1～表 4 (p12～17)に記載した。

10

- 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

15

—害虫抵抗性蛋白質⁹—

【Cry1A.105 蛋白質】

20

MON89034 の作出に用いた *cry1A.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質のドメイン I と II、Cry1F 蛋白質のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインにより構成される合成 Bt 蛋白質であり、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせることにより標的昆虫に対する殺虫活性を高める目的で開発された。

25

Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、人工飼料に混合した Cry1A.105 蛋白質を 5 種類のチョウ目昆虫を含む 15 種類の昆虫種に混餌投与することにより調査を行った。その結果、Cry1A.105 蛋白質は、トウモロコシの主要チョウ目害虫である

⁹土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* の産生する Bt 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示すことが知られている(文献 41; 文献 42; 文献 43)。また、これまでの研究から Bt 蛋白質は複数のドメインから構成され、各ドメインが持つ機能も明らかにされている。例えば、Bt 蛋白質は、ドメイン I、II、III と C 末端ドメインにより構成されており、ドメイン I は消化プロセスを阻害する陽イオン選択的小孔の形成、ドメイン II は特異的な受容体の認識、ドメイン III は受容体との結合性、そして C 末端ドメインは Bt 蛋白質の結晶構造に関与していることが明らかにされている(文献 44; 文献 45)。

コーンイヤールーム(*Helicoverpa zea*)(文献 46)、ブラックカットワーム(タマヤナガ)
(*Agrotis ipsilon*)(文献 47)、フォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ)(*Spodoptera*
frugiperda)(文献 47)、サウスウエスタンコーンボーラー (*Diatraea grandiosella*) (文献
47)、ヨーロッパアンコーンボーラー(ヨーロッパアワノメイガ)(*Ostrinia nubilalis*)(文献 48)
5 の幼虫に対して殺虫活性を示したが、チョウ目昆虫以外のミツバチ(文献 49, 文献 50)
やテントウムシ(文献 51)などの益虫に対しては殺虫活性を示さなかった。

以上のことから、Cry1A.105 蛋白質は構成要素である Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質
及び Cry1Ac 蛋白質と同様にチョウ目害虫のみに選択的に殺虫活性を示し、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た。

10

【改変 Cry2Ab2 蛋白質】

MON89034 の作出に用いた改変 *cry2Ab2* 遺伝子がコードする改変 Cry2Ab2 蛋白質
は、クローニングの際に用いる制限酵素切断部位を付加するため、野生型
15 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端のメチオニンの後にアスパラギン酸が 1 つ挿入され
ている。

改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、人工飼料に混合した改変
Cry2Ab2 蛋白質を、4 種類のチョウ目昆虫を含む 15 種類の昆虫種に混餌投与するこ
とにより調査を行った。その結果、改変 Cry2Ab2 蛋白質は、試験に用いた 4 種類の主
20 要チョウ目害虫の中でコーンイヤールーム(文献 48)、フォールアーミーワーム(文献 52)、
及びヨーロッパアンコーンボーラー(文献 48)の幼虫に対して殺虫活性を示したが、ブラッ
クカットワーム(文献 52)に対しては殺虫活性を示さなかった。また、チョウ目害虫以外
のミツバチ(文献 53, 文献 54)やテントウムシ(文献 55)などの益虫に対しても、殺虫活
性を示さなかったことから、改変 Cry2Ab2 蛋白質は特定のチョウ目害虫のみに選択的
25 に殺虫活性を示し、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
れた。

【Cry1A.105 蛋白質+改変 Cry2Ab2 蛋白質】

MON89034 は、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質を同時に発現することに
より、標的チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。実際に 2003 年から 2004
年にかけて米国、プエルトリコ、及びアルゼンチンで行われた MON89034 の主要チョ
ウ目害虫{ヨーロッパアンコーンボーラー、サウスウエスタンコーンボーラー、コーンイヤ
ールーム、シュガーケーンボーラー(サトウキビメイガ)(*D. saccharalis*)、フォールアー
35 ーワーム}に対する抵抗性試験において、MON89034 は、調査された全てのチョウ目
害虫に対して抵抗性を示すことが確認されている。

また、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は、いずれもコーンイヤールーム、
フォールアーミーワーム、及びヨーロッパンコーンボーラーに対して殺虫活性を持つこ
とが確認されているが、このように殺虫スペクトラムがある程度重複している2つの蛋白
質を同時に発現させることにより、MON89034 に対して感受性を示す標的チョウ目害
5 虫は、2 種類の Bt 蛋白質に対して非感受性にならない限り、MON89034 に対する非
感受性を獲得することは出来ない。このことから MON89034 は、1 種類の Bt 蛋白質を
単独で発現する Bt トウモロコシと比べて、非感受性害虫が発生する確率をより一層低
く出来ると期待されている。

10 なお、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は、この両 Bt 蛋白質に対して感受
性を示す標的チョウ目害虫に対して相乗的に殺虫活性を示すことはないことが
MON89034 の生物多様性影響評価の際に確認されている。

【Cry1F 蛋白質】

15 Cry1F 蛋白質の殺虫効果を調べるため、蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*)中で産
生させた Cry1F 蛋白質を人工飼料に混合し、米国において農業上の害虫と見なされ
ている 15 種類のチョウ目昆虫に混餌投与した。15 種類のチョウ目昆虫のうち、6 種は
米国でのトウモロコシ栽培において、9 種はワタ、ダイズ、カノーラ等、その他の作物裁
培において害虫と見なされている。上記 6 種のトウモロコシ栽培における害虫のうち、
20 Cry1F line 1507 の標的害虫であるヨーロッパンコーンボーラー、フォールアーミーワ
ーム及びビートアーミーワーム(シロイチモンジヨトウ)(*Spodoptera exigua*)に対する効果は
高いものであったが、残り 3 種の害虫(サウスウエスタンコーンボーラー、ブラックカット
ワーム及びボールワーム)に対する効果は低いものであった。一方、農業上の害虫と
はされていないオオカバマダラ(*Danaus plexippus*)についても試験を行ったが、試験を
25 行った最高濃度においてもオオカバマダラの死亡率は対照区と同等であった。これら
の結果から、他の Bt 蛋白質と同様に(文献 56)、Cry1F 蛋白質の殺虫効果は特異性
が高く、一部の昆虫にのみ効果を持つことが示された。

30 チョウ目昆虫以外にも、哺乳類、鳥類、魚類、コウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ
目、トビムシ目昆虫等について試験を行ったが、Cry1F 蛋白質は、試験を行ったすべ
ての非標的生物に対し毒性を持たないことが確認された(文献 57)。

【改変 Cry3Bb1 蛋白質】

35 改変 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウ
モロコシの根を食害するコーンルートワーム(*Diabrotica* sp.)に対する殺虫活性を示
す。

5 改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*, *Diabrotica*)に分類されるコロラドポテトビートル(コロラドハムシ) (*Leptinotarsa decimlineata*)とコーンルートワームのみに対して殺虫活性を示す(別添資料 2 の表 10, p54)。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息して

いることはこれまで報告されていないことが文献調査により示された(文献 58)。
なお、改変 Cry3Bb1 蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、6 カ所のアミノ酸が置換されている。そのうち 1 カ所はクローニングの際に制限酵素切断部位を付加したため、他の 5 カ所は殺虫活性を増強するために改変されている。

10 【Cry34Ab1 蛋白質 + Cry35Ab1 蛋白質】

15 Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の機能を調べるために行った試験において、Cry34Ab1 蛋白質はリン脂質膜に対する細孔形成蛋白質として働き、Cry35Ab1 蛋白質は細孔を拡大し、膜の透過性を増大させることが示唆されている(パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社 社内データ)。in vivo 試験で、Cry34Ab1 蛋白質は、
20 単独でもコーンルートワームに対して活性を持つが、Cry35Ab1 蛋白質と一緒に存在すると Cry34Ab1 蛋白質を単独で用いた際の効果と比較し、最大でおよそ 8 倍の効果を示すことが確認されている(文献 59)。なお、Cry35Ab1 蛋白質単独では、コーンルートワームに対して活性を示さない。Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を産生して
25 いる組換えトウモロコシをコーンルートワーム幼虫に摂食させ、免疫組織化学的手法により中腸組織の形態変化を観察したところ、非組換えトウモロコシを摂食した幼虫においては何ら異常は観察されなかったが、組換え体を摂食した幼虫では、中腸細胞に腫大、空胞化、細胞膜の泡状化及び溶解などの細胞死を示す現象が観察された。この結果は、他の Bt 蛋白質と同様に、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の標
30 的器官が中腸であることを示している(文献 60)。

一般的に、Bt 蛋白質の殺虫効果は非常に特異性が高いことが知られており(文献 56)、実際に、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の混合物を供試して行なわれた、米国のトウモロコシ栽培における 6 種の害虫に対する殺虫効果を調べた試験において、当該蛋白質も特定の害虫に対してのみ殺虫効果を持つことが示されている(文
35 献 61)。試験を行った 6 種の害虫の中で特に効果が高かったのは、コウチュウ目害虫であるノーザンコーンルートワーム(*Diabrotica barberi*)とウエスタンコーンルートワーム(*D. virgifera virgifera*)の 2 種の幼虫についてで、同じコーンルートワームの仲間であるサザンコーンルートワーム(*D. undecimpunctata howardi*)に対する効果はノーザンコーンルートワームやウエスタンコーンルートワームよりも低いものであった。チョウ目害虫であるヨーロッパアンコーンボラー、コーンイヤールーム、ブラックカットワーム、さらにコウチュウ目害虫のウエスタンコーンルートワームの成虫については、試験を行った

最高濃度でも死亡した個体は認められなかった。

コーンルートワーム以外の非標的コウチュウ目昆虫に対する影響の有無を調べるために、テントウムシ2種(*Hippodamia convergens* 及び *Coleomegilla maculata*)を供試して生物検定を行った(文献 61)。供試した2種のテントウムシのうち、*H. convergens* は、
5 わが国にも生息するジュウサンホシテントウ(*H. tredecimpunctata timberlakei* Capra)の近縁種である(文献 62)。*C. maculata* は北米に広く生息する益虫で、トウモロコシの花粉も食べることが知られている(文献 63)が、近縁種がわが国に生息していることは知られていない。生物検定の結果、検定を行った最高濃度でも、*H. convergens* の成虫に対して何ら影響は観察されなかった。*C. maculata* の幼虫に対しては、生体重の減少
10 が認められたものの、検定を行った最高濃度でも死亡した個体は認められなかった。

コウチュウ目昆虫以外にも、哺乳類(文献 64; 文献 65; 文献 66)、鳥類(文献 67)、魚類(文献 68)、チョウ目昆虫(文献 61)、ハチ目昆虫(文献 61)、アミメカゲロウ目(文献 61)、カメムシ目(文献 61)等について試験を行ったが、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、試験を行ったすべての非標的生物に対し毒性を持たないことが確認された。

15

—除草剤耐性蛋白質—

【PAT 蛋白質】

20 PAT 蛋白質(ホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ)は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。除草剤グルホシネートは、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成するグルタミン合成酵素を阻害し、その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物を枯死させる。PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性
25 を付与する。除草剤グルホシネートは非選択性の除草剤で、1剤で幅広い雑草に対して防除効果を示す。日本、米国を始め、世界中で安全に使用されている。*pat* 遺伝子の導入により、トウモロコシ畑でも本除草剤を雑草防除に使用することが可能となり、農家に雑草防除のための選択肢を提供することが期待されている。

30 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

MON88017 で発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* CP4 株より単離された遺伝子で、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS)をコードしており、除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように野生型 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を
35

加えたものであり、アミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されているのみである。

5 植物はグリホサート処理すると 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS)(E.C.2.5.1.19)が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。MON88017 の目的遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

10

親系統で発現する Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質、Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかデータベース(GenBank, EMBL, PIR, PDB, SwissProt 等)を用いて比較したところ、既知

15 アレルゲンと構造的に類似性のある配列は共有していなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

20 Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、いずれも *B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質(Bt 蛋白質)である。これらの Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており(文献 69)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告は無い。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

25

PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L 型ホスフィトリシン(L 型アミノ酸に分類)をアセチル化するが、他の L 型アミノ酸をアセチル化することはなく、特に構造の類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどない(文献 70)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転

30 移反応は阻害されることがないことから、グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有することが報告されている(文献 70)。よって、その基質特異性の高さから、PAT 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

35 改変 CP4 EPSPS と機能的に同一である EPSPS は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ

酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS は基質であるホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)と特異的に反応することが知られており(文献 71)、これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているシキミ酸は、その反応性が S3P の 200 万分の一であることから、生体内で基質として反応するとは考えにくい。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

10 イ 名称及び由来

親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターは以下のとおりである。

- MON89034: *E. coli* 由来のベクターpBR322 をもとに構築された PV-ZMIR245
- Cry1F line 1507: *E. coli* 由来のベクターpUC19 をもとに構築された PHP8999
- 15 MON88017: *E. coli* 由来のベクターpBR322 をもとに構築された PV-ZMIR39
- Event DAS-59122-7: *A. tumefaciens* 由来のベクターpSB1 をもとに構築された PHP17662

ロ 特性

20

① ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターの塩基数は以下のとおりである。

- MON89034: PV-ZMIR245; 17,600 bp
- 25 Cry1F line 1507: PHP8999; 9,504 bp
- MON88017: PV-ZMIR39; 12,368bp
- Event DAS-59122-7: PHP17662; 50,311 bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

30

選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。なお、いずれの抗生物質耐性遺伝子も宿主には導入されていない。

- MON89034: スペクチノマイシンやストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子
- Cry1F line 1507: カナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子
- 35 MON88017: スペクチノマイシンやストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子
- Event DAS-59122-7: テトラサイクリン耐性を付与する *tet* 遺伝子及びスペクチノマ

イシシ耐性を付与する *spc* 遺伝子

- 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

5

PV-ZMIR245、PHP8999、PV-ZMIR39 及び PHP17662 の感染性はいずれも知られていない。

- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

10

- イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のそれぞれの
作出のために宿主内に移入されたプラスミド・ベクター PV-ZMIR245、PHP8999、
15 PV-ZMIR39 及び PHP17662 の構成要素はそれぞれ表 1～表 4(p12～17)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、それぞれ図 1～図 4 (p8～11)に示した。

- ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

20

宿主内への核酸の移入については以下の方法を用いて行った。

MON89034: アグロバクテリウム法

Cry1F line 1507: パーティクルガン法

MON88017: アグロバクテリウム法

25 Event DAS-59122-7: アグロバクテリウム法

- 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

30

形質転換細胞の選抜は、以下を添加した培地を用いて行った。

MON89034: パロモマイシン

Cry1F line 1507: グルホシネート

MON88017: グリホサート

35 Event DAS-59122-7: グルホシネート

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

MON89034、MON88017 及び Event DAS-59122-7 において、培地へカルベニシリンを添加することによりアグロバクテリウムの除去を行った(文献 72)。なお、MON89034 及び MON88017 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に MON89034 及び MON88017 を移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。また、Event DAS-59122-7 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に Event DAS-59122-7 を移した後に、植物体を顕微鏡下で観察することにより確認した。なお、Cry1F line 1507 は、宿主への核酸の導入はパーティクルガン法により行ない、アグロバクテリウムは用いていない。

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

MON89034 は、再分化個体である R0 世代を他の従来トウモロコシ品種 LH172 と交配させた LH172BC0F1 世代の中から、T-DNAII 領域が分離し、T-DNAI 領域のみを持つ個体を PCR 法により選抜した。その際、T-DNAII 領域を持つ個体は廃棄した。

その後、導入遺伝子や Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量の解析によりさらに選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外ほ場での実際の害虫抵抗性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病虫害感受性など)などから総合的に判断して MON89034 が選抜された。

Cry1F line 1507 は、再生させた植物体の葉の一部を採取し、PCR 法によって導入遺伝子の有無及び、ELISA 法により Cry1F 蛋白質が産生されていることの確認を行った。さらに、ヨーロッパアンコーラーの幼虫に対する抵抗性の有無を検査し、抵抗性が認められた植物とそれと同系の繁殖系統を交配し、組換え体当代(T0)の種子を得た。野外ほ場におけるヨーロッパアンコーラー抵抗性及び農業形質から総合的に判断し、Cry1F line 1507 を選抜した。

MON88017 は、2000～2001 年にかけて延べ 169 ヲ所のほ場試験を行い、最終商品化系統を選抜するとともに、その環境安全性を評価した。

Event DAS-59122-7 は、再生させた植物体の葉の一部を採取し、PCR 法によって導

入遺伝子の有無及び ELISA 法により Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を確認した。さらに、コーンルートワームに対する抵抗性の有無を検査し、抵抗性が認められた植物とそれと同系の繁殖系統を交配し、組換え体当代(T0)の種子を得た。野外ほ場におけるコーンルートワーム抵抗性及び農業形質から総合的に判断し、Event 5 DAS-59122-7 を選抜した。

以下に MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のわが国における申請・認可状況を記載した(表 5, p27)。

10 表 5 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のわが国における申請・認可状況

	食品	飼料	環境
MON89034	2007年11月 安全性確認	2007年10月 安全性確認	2008年1月 第一種使用規程承認
Cry1F line 1507	2002年7月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2005年3月 第一種使用規程承認
MON88017	2005年10月 安全性確認	2006年3月 安全性確認	2006年4月 第一種使用規程承認
Event DAS-59122-7	2005年10月 安全性確認	2006年3月 安全性確認	2006年4月 第一種使用規程承認
本スタック系統 トウモロコシ	2008年12月 安全性確認	2008年11月 安全性確認	2008年10月 申請

【MON89034×MON88017×Cry1F line 1507×Event DAS-59122-7 の育成の経過】

15 本スタック系統トウモロコシは、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の自殖系統を親とする一代雑種品種である(図 5, p28)。

【社外秘に付き非開示】

5

10

15

20 図 5 MON89034×Cry1F line 1507×MON88017×Event DAS-59122-7 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

5 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の導入遺伝子はトウモロコシゲノム上に存在することが確認されている。

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

10

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のトウモロコシゲノム中の 1 ヶ所にそれぞれの目的遺伝子が 1 コピー存在することが確認された。また、導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示された。

15

なお、MON89034 の導入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*cry1A.105* 遺伝子の発現を制御する P-*e35S* の 5'末端領域とそれに隣接する右側境界領域が、相同組換えにより T-DNA II 領域内の左側境界領域と *nptII* 遺伝子の発現を制御する P-35S の 5'末端領域と置き換わっていることが明らかとなった。しかしながら、この相同組換えは蛋白質をコードする領域中では起こっておらず、最も近いオープンリーディングフレームである Cry1A.105 蛋白質のコード領域についても、Cry1A.105 蛋白質が各組織で正常に発現していることが確認されていることから、この相同組換えにより新たなオープンリーディングフレームは形成されていないと考えられた。

20

また、Cry1F line 1507 へ導入された核酸の塩基配列解析を行った結果、導入された核酸の 5'末端領域に *cry1F* 遺伝子配列の一部が、5'末端及び 3'末端領域に *pat* 25 遺伝子配列の一部が、3'末端領域に *ORF25PolyA Terminator* 配列の一部が含まれていることが確認されたが、ノーザンブロット解析により mRNA への転写は行なわれておらず、これらの遺伝子断片は機能していないことが確認されている。

25

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

30

MON89034、Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 は全て 1 コピーなので該当しない。

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

発現の安定性については以下のように確認した。

- 5 MON89034: ウェスタンブロット分析による蛋白質の発現確認
Cry1F line 1507: ELISA 法による蛋白質の発現確認、及びチョウ目害虫を用いた生物検定と除草剤グルホシネート散布試験
MON88017: 除草剤グリホサート散布試験及び ELISA 法による蛋白質の発現確認
Event DAS-59122-7: ELISA 法による蛋白質の発現確認、及びコウチュウ目害虫を用いた生物検定と除草剤グルホシネート散布試験
10

- 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

- 15 MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 及び MON88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物等に対する伝達性はない。また、Cry1F line 1507 及び Event DAS-59122-7 に移入された核酸は、伝達を可能とする配列を含まないため伝達性はない。

20

- (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

- 25 MON89034 を検出及び識別するための方法としては、導入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより、MON89034 を特異的に検出可能である。

- 30 Cry1F line 1507 の検出及び識別の方法として、Cry1F line 1507 に特異的な塩基配列をプライマーとして用いた、RT(Real Time)-PCR 法による定量キットが、GeneScan Europe 社(ドイツ、フライブルグ)によって販売されている(カタログ番号: 512 12023 10)。さらに、Cry1F 蛋白質及び PAT 蛋白質に対するポリクローナル抗体を用いた ELISA 法が開発されている。Cry1F 蛋白質の検出用キットは、Strategic Diagnostics 社(米国デラウェア州、ニューワーク)によって販売されている(カタログ番号: 7000018)。また、PAT 蛋白質の検出用キットは、EnviroLogix 社(米国メイン州、ポートランド)によって販売されている(カタログ番号: AP 014)。
35

MON88017 を検出及び識別するための方法としては、導入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより特異的に検出可能である。

5 Event DAS-59122-7 の検出及び識別の方法として、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質に対するポリクローナル抗体を用いた定量 ELISA 法が開発されている。

本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するためには、上記の方法をトウモロコシの種子一粒ごとに行う必要がある。

10

(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

15

本スタック系統トウモロコシには各親系統に由来する以下の特性が付与されている。

MON89034: 導入遺伝子に由来する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性

20

Cry1F line 1507: 導入遺伝子に由来する Cry1F 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及び PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

MON88017: 導入遺伝子に由来する改変 CP4 EPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性

25

Event DAS-59122-7: 導入遺伝子に由来する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性及び PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

それぞれの親系統で発現する Bt 蛋白質(Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質)は、
30 *B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質(Cry)である。感受性昆虫の中腸内で Bt 蛋白質は限定分解されコア蛋白質となる。コア蛋白質は中腸上皮細胞膜上の特異的受容体と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、その結果として中腸上皮細胞が破壊され、感受性昆虫は消化プロセスを阻害されて死に至る(文献 41; 文献 43)。Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては
35 数多くの研究がなされており(文献 69)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告は無い。よって、Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられない。

また、Cry1F line 1507 及び Event DAS-59122-7 中で発現する PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有することが報告されている(文献 70)。

さらに、MON88017 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高いこと、
5 また、シキミ酸合成経路の律速酵素ではないために EPSPS 活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられる。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する Bt 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していると考えられる。よって、これらの蛋白質は(文献 73)の述べている相互作用について
10 の検討が必要な蛋白質には相当しないと考えられた。

また、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する Bt 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たない、あるいは高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。
15 よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

20

実際に、各親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示していないことを確認するため、米国モンサント・カンパニーにおいて 2007 年に本スタック系統トウモロコシを供試して以下のとおりチョウ目害虫及びコウチュウ目害虫を用いた害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及び除草剤グリホサートを用いた除草剤耐性の生物検定を行った。

25

【チョウ目害虫を用いた生物検定】

チョウ目害虫抵抗性については、本スタック系統トウモロコシ、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシ(XE6001)を各
30 12 個体ずつポット栽培し(3 個体/区×2 反復×2 試験)、5~6 葉期にフォールアーマーワーム(FAW, *Spodoptera frugiperda*)の 1 齢幼虫を接種した(25 頭/個体)。フォールアーマーワーム接種後、9 日目に Leaf Damage Ratings(LDR; 葉部食害程度)を 0(食害無)~9(食害甚: 葉の大部分が食害されている)の 10 段階で調査した(文献 74)。分散の不
均一性のため統計処理を行う前にデータをランク変換し、変換されたデータについて
35 統計処理を行った。

調査の結果、本スタック系統トウモロコシと MON89034 及び Cry1F line 1507 の間で

葉部食害程度に統計学的有意差は認められなかった(Tukey's Test、有意水準5%)(表 6, p33)。したがって、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

5 表 6 本スタック系統トウモロコシの生物検定によるチョウ目害虫フォールアーミーワーム(fall armyworm (FAW); *S. frugiperda*)に対する被害度¹調査結果(n=4 反復)¹⁰

供試サンプル	葉部食害程度(LDR)±標準誤差	
本スタック系統トウモロコシ	1.08 ± 0.08	A ²
MON89034	1.08 ± 0.08	A
Cry1F line 1507	1.42 ± 0.16	A
MON88017	7.50 ± 0.17	B
Event DAS-59122-7	7.58 ± 0.08	B
非組換えトウモロコシ	7.25 ± 0.25	B

¹ 0: 食害なし、1: 少数の葉に少量の針先程度の穴や虫食い穴がある、2: 少数の葉に少量の虫食い穴がある、3: 数枚の葉において虫食い穴がよく見られる、4: 数枚の葉において虫食い穴と伸展した食痕が見られる、5: 数枚の葉において伸展した食痕が見られる、6: 数枚の葉において2.5cm程度の伸展した食痕が見られる、7: 葉面積の2分の1が食害されている、8: 葉面積の3分の2が食害されている、9: 葉の大部分が食害されている。

² 異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(Tukey's Test、有意水準5%)。

【コウチュウ目害虫を用いた生物検定】

15

コウチュウ目害虫抵抗性については、本スタック系統トウモロコシ、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシ(XE6001)を各 12 個体ずつポット栽培し(3 個体/区×4 反復)、3~4 葉期にウエスタンコーンルートワーム(WCRW, *Diabrotica virgifera virgifera*)の卵(930 個/ポット)を接種した。

20

ウエスタンコーンルートワーム接種後、約 3 週目に食害の程度を文献 75 が考案した Nodal Injury Score (NIS; 根部食害程度)を用いて評価した。この方法では、食害の程度を 0.00(食害無)~3.00(食害甚)までの数値で表している。0.25 以下の数値(一節目の 25%以下が食害されている状態)は最低限の食害程度を表しており、3.00 は 3 つあるいはそれ以上の節がすべて食害されている状態を表している。分散の不均一性のため統計処理を行う前にデータをランク変換し、変換されたデータについて統計処理

25

¹⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社及び日本モンサント株式会社に帰属する

を行った。

調査の結果、本スタック系統トウモロコシと MON88017 の間及び本スタック系統トウモロコシと Event DAS-59122-7 の間でそれぞれ統計学的有意差が認められた (Tukey's Test、有意水準 5%)(表 7, p34)。しかし、観察された根部食害程度の差異は
5 わずかであり、それぞれの Bt 蛋白質が正常に作用した結果であると考えられた。

表 7 本スタック系統トウモロコシの生物検定によるコウチュウ目害虫ウエスタンコーン
ルートワーム(western corn rootworm (WCRW); *D. virgifera virgifera*)に対する被害度
1 調査結果(n=4 反復)¹¹

供試サンプル	根部食害程度(NIS)±標準誤差
本スタック系統トウモロコシ	0.04 ± 0.00 A ²
MON88017	0.24 ± 0.04 B
Event DAS-59122-7	0.26 ± 0.05 B
MON89034	1.89 ± 0.01 C
Cry1F line 1507	2.10 ± 0.07 D
非組換えトウモロコシ	1.97 ± 0.03 CD

10 ¹ 0.00: 食害なし、1.00:1 節あるいは1 節と同程度の根が食害を受けている、2.00:2 節あるいは
2 節と同程度の根が食害を受けている、3.00:3 節以上の根が食害を受けている。

² 異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(Tukey's Test、有意水準 5%)。

【除草剤グルホシネートを用いた生物検定】

15

除草剤グルホシネート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、MON89034、
Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシ
(XE6001)を各 5 個体ずつ温室にてポット栽培し(1 個体/区×5 反復)、4~5 葉期に除草
剤グルホシネート(製品名: Liberty)を散布してから 10 日後に除草剤による植物体の
20 障害程度を 0(傷害は認められない)~10(ほぼ全体が障害により枯死している)の 11
段階で調査した。なお、グルホシネート散布量 2.5L Liberty/ha(0.54kg active
ingredient (a.i.)/ha)は通常の散布量、80L Liberty/ha(17.0 kg a.i./ha)は通常の 32 倍の
散布量である。表中において障害程度を平均値±標準誤差で示した。

25 調査の結果、本スタック系統トウモロコシと Cry1F line 1507 及び Event
DAS-59122-7 との間で除草剤による障害の程度に統計学的な有意差は認められな

¹¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社及び日本
モンサント株式会社に帰属する

かった(Tukey's Test、有意水準 5%)(表 8, p35)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート耐性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

5 表 8 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度調査結果(除草剤による植物体の傷害程度¹の平均値±標準誤差)(n=5 反復)¹²

供試サンプル	散布量			
	2.5 L/ha		80 L/ha	
本スタック系統トウモロコシ	0.0 ± 0.0	A ²	1.8 ± 0.2	A
Cry1F line 1507	0.0 ± 0.0	A	1.6 ± 0.2	A
Event DAS-59122-7	0.0 ± 0.0	A	2.0 ± 0.0	A
MON89034	7.6 ± 0.5	B	8.8 ± 0.4	B
MON88017	9.0 ± 0.3	C	8.4 ± 0.2	B
非組換えトウモロコシ	8.0 ± 0.3	BC	8.0 ± 0.5	B

¹ 0: 傷害なし、1~9: 葉面積の約 10~90%が白化、黄化及びあるいは壊死している、10: 葉面積の 100%が傷害を受け枯死している。

² 同一列において、異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(Tukey's Test、有意水準 5%)。

10

【除草剤グリホサートを用いた生物検定】

除草剤グリホサート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、MON89034、
 15 Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシ
 (XE6001)を各 5 個体ずつ温室にてポット栽培し(1 個体/区×5 反復)、4~5 葉期に除草
 剤グリホサート(製品名: Roundup WeatherMAX)を散布してから 10 日後に除草剤による
 植物体の障害程度を 0(傷害は認められない)~10(ほぼ全体が障害により枯死して
 いる)の 11 段階で調査した。なお、グリホサート散布量 2.1L Roundup/ha(0.84kg acid
 20 equivalent/ha)は通常の散布量、68L Roundup/ha(27.0 kg acid equivalent/ha)は通常の
 32 倍の散布量である。表中において障害程度を平均値±標準誤差で示した。

調査の結果、通常の散布量において本スタック系統トウモロコシと MON88017 との
 間で除草剤による障害の程度に統計学的な有意差は認められなかった(Tukey's Test、
 有意水準 5%)(表 9, p36)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサー

¹²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社及び日本
 モンサント株式会社に帰属する

ト耐性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないと結論された。

表 9 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度調査結果 (除草剤による植物体の傷害程度¹の平均値±標準誤差) (n=5 反復)¹³

供試サンプル	散布量			
	2.1L/ha		68 L/ha	
本スタック系統トウモロコシ	0.4 ± 0.2	A ²	2.0 ± 0.0	A
MON88017	0.2 ± 0.2	A	1.2 ± 0.4	A
MON89034	8.6 ± 0.2	B	9.8 ± 0.2	B
Cry1F line 1507	9.8 ± 0.2	C	10.0 ± 0.0	B
Event DAS-59122-7	9.8 ± 0.2	C	10.0 ± 0.0	B
非組換えトウモロコシ	9.4 ± 0.4	BC	10.0 ± 0.0	B

5 ¹ 0: 傷害なし、1~9: 葉面積の約 10~90%が白化、黄化及び/あるいは壊死している、10: 葉面積の 100%が傷害を受け枯死している。

² 同一列において、異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(Tukey's Test、有意水準 5%)。

10 以上のことから、それぞれの親系統で発現する蛋白質間で相互作用はなく、導入した遺伝子によって新たに獲得されたそれぞれの性質は、本スタック系統トウモロコシにおいて変化していないと結論された。

15 したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 を個別に調査した結果に基づき評価した。

¹³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社及び日本モンサント株式会社に帰属する

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¹⁴

5 a 形態及び生育の特性

MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、以下の表 10 (p39) に示した項目について調査を行った。

10 その結果、MON89034 の雌穂径及び一穂着粒数、Cry1F line 1507 の発芽率及び雌穂径、MON88017 の稈長及び雌穂径、及び Event DAS-59122-7 の稈長において統計学的有意差が認められた。しかし、これらの項目は、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは供試した 2 種類の兄弟系統であるハイブリッド品種のうち 1 品種でしか統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の表 2, p8; 別添資料 3 の表 2～表 11, p11～15; 別添資料 2 の表 2-1 及び表 2-2, 15 p30～31; 別添資料 4 の表 2～表 21, p13～24)。

b 生育初期における低温又は高温耐性

20 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 は、対照の非組換えトウモロコシと同様に、生育初期における低温処理によって萎縮もしくは枯死した(別添資料 1 の図 6-2, p14; 別添資料 3 の写真 6, p13; 別添資料 2 の表 4, p42; 別添資料 4 の表 25 及び写真 11, p32 及び 33)。

25 c 成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死する。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に隔離ほ場試験の終了時には結実後の枯死が始まっていることを確認した。

¹⁴ 本項目中の以下に続く a-g に記載された MON89034 及び MON88017 の情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に、Cry1F line 1507 及び Event DAS-59122-7 の情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社に帰属する

d 花粉の稔性及びサイズ

MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 は、対照の非組換えトウモロコシと同様に高い花粉稔性を示しており、花粉の形態や大きさにも相違はないことが確認されている(別添資料 1 の図 8-1 及び図 8-2, p19; 別添資料 3 の写真 4 及び写真 5, p11~12; 別添資料 2 の表 3 及び写真, p38~40; 別添資料 4 の写真 8 及び写真 9, p26~27)。

10 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量について、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、第一-2-(6)-②-a (p37)に記載した種子の生産量にかかわる諸形質を比較した結果、MON89034 の雌穂径及び一穂着粒数、Cry1F line 1507 の雌穂径、並びに MON88017 の雌穂径において統計学的有意差が認められた。しかし、これらの項目は、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは供試した 2 種類の兄弟系統であるハイブリッド品種のうち 1 品種でしか統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の表 6, p20; 別添資料 3 の表 6~表 10, p8~9; 別添資料 2 の表 2-1 及び表 2-2, p30~p31; 別添資料 4 の表 10~表 18, p18~22)。

脱粒性について、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017、Event DAS-59122-7 及びそれぞれの対照の非組換えトウモロコシはいずれも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

25 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシの発芽率の調査を行った結果、差異はなく、種子の休眠性は認められなかった(別添資料 1 の表 3 及び表 4, p16; 別添資料 3 の表 2 及び表 13, p5 及び 12; 別添資料 2 の表 4, p42; 別添資料 4 の表 2 及び表 23, p13 及び 29)。

f 交雑率

35 日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、親系統である MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の交雑率の試験は行われなかった。

表 10 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の形態及び生育の特性調査の結果

	MON89034	Cry1F line 1507	MON88017	Event DAS-59122-7
発芽揃い	○	○	○	○
発芽株数	○	—	—	—
発芽率	○	○*	○	○
雄穂抽出期	○	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○	○
開花時期	○	—	—	—
開花始期	—	○	—	○
開花終期	—	○	—	○
開花期間	—	○	—	○
花器の形状	—	—	—	○
稈長	○	○	○*	○*
稈径	○	—	—	—
草型(草姿)	○	○	○	○
分けつ数	○	○	○	○
着雌穂高	○	○	○	○
成熟期	○	○	○	○
雌穂数 (雌穂総数)	○	○	○	—
有効雌穂数	○	○	—	○
一穂着粒数	○*	—	○	—
粒列数	○	○	○	○
一列粒数	○	○	○	○
百粒重	○	○	○	○
収穫期の地上 部重(植物重) (収穫時の地上 部生体重)	○	○	○	○
雌穂長	○	○	○	○
雌穂径	○*	○*	○*	○
粒色	○	○	○	○
粒形	○	○	○	○

○：調査を行っている。

—：調査を行っていない。

- 5 * 統計学的有意差が認められた。しかし、これらの項目は、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは供試した2種類の兄弟系統であるハイブリッド品種のうち1品種でしか統計学的有意差は認められなかった(別添資料1の表2, p8; 別添資料3の表2～表11, p5～9; 別添資料2の表2-1及び表2-2, p30～31; 別添資料4の表2～表21, p13～24)。

g 有害物質の産生性

5 トウモロコシについては、周辺の植物や土壌微生物に影響を与えるような有害物質を根から分泌することは知られていない。また、枯死した後に他の植物に影響を与えるような他感物質が産生されることも知られていない。

10 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 について、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験を行った結果、Cry1F line 1507 の後作試験及び鋤込み試験におけるレタスの生体重とMON88017の鋤込み試験におけるハツカダイコンの生体重に統計学的有意差が認められた。しかし、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは統計学的有意差が認められたのは供試した2種類
15 種類の兄弟系統であるハイブリッド品種のうち1品種のみであった(別添資料1の表7、表8及び表9, p23; 別添資料3の表14-1～表14-4及び表15～表16, p16及び18; 別添資料2の表5～表7, p44～45 及び p47; 別添資料5の表1～表6, p6～7)。

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

20

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

(2) 使用等の方法

25

—

(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

30

—

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

35

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

5 -

(6) 国外における使用等に関する情報

10 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の諸外国における申請・認可状況は以下の表 11 (p41)に示したとおりである。

表 11 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の諸外国における申請・認可状況

	FDA	USDA	Health Canada	CFIA
MON89034	2007年8月 安全性確認	2008年7月 安全性確認	2008年5月 安全性確認	2008年6月 安全性確認
Cry1F line 1507	2001年5月 安全性確認	2001年6月 安全性確認	2002年10月 安全性確認	2002年10月 安全性確認
MON88017	2005年1月 安全性確認	2006年1月 安全性確認	2006年2月 安全性確認	2006年2月 安全性確認
Event DAS-59122-7	2004年10月 安全性確認	2005年10月 安全性確認	2005年11月 安全性確認	2005年11月 安全性確認

FDA: 米国食品医薬品局

15 USDA: 米国農務省

Health Canada: カナダ厚生省

CFIA: カナダ食品検査局

以下に MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のわが国における申請・認可状況を記載した(表 12, p42)。

5 表 12 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 のわが国における申請・認可状況

	食品	飼料	環境
MON89034	2007年11月 安全性確認	2007年10月 安全性確認	2008年1月 第一種使用規程承認
Cry1F line 1507	2002年7月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2005年3月 第一種使用規程承認
MON88017	2005年10月 安全性確認	2006年3月 安全性確認	2006年4月 第一種使用規程承認
Event DAS-59122-7	2005年10月 安全性確認	2006年3月 安全性確認	2006年4月 第一種使用規程承認
本スタック系統 トウモロコシ	2008年12月 安全性確認	2008年11月 安全性確認	2008年10月 申請

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹⁵

本スタック系統トウモロコシは MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

5

第一-2-(6)-①(p31～p37)で述べたとおり、Bt 蛋白質(Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質)、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していることから、これらの蛋白質は(文献 73)の述べている相互作用についての検討が必要な蛋白質には相当しないと考えられる。また、これらの蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たないかあるいは高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

10

15

実際に生物検定を行った結果、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性、及び除草剤グリホサート耐性はそれぞれの親系統と同程度であり、コウチュウ目害虫抵抗性については親系統よりもその程度は高まっていたが、認められた差異はわずかであり、それぞれの Bt 蛋白質が正常に作用した結果であると考えられることから、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内において相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

20

したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

25

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

30

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があり、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

¹⁵本項目中で第一の 2-(6)-②の a-g に記載された MON89034 及び MON88017 の試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社、Cry1F line 1507 及び Event DAS-59122-7 の試験結果に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社に帰属する

本スタック系統トウモロコシの親系統である MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 において項目の一部で対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた。しかし、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異ではないと判断された。

10 本スタック系統トウモロコシには、MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質と Cry1F line 1507 中で発現する Cry1F 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性の形質、並びに MON88017 中で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質と Event DAS-59122-7 中で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これらの害虫による食害はトウモロコシがわが国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、これらの形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。また、本スタック系統トウモロコシは PAT 蛋白質の発現による除草剤グルホシネート耐性及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性を有するが、グルホシネート及びグリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグルホシネート及びグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシに関して、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

30 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35

以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起因する生

物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されておらず、また、わが国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

10 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 において、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験を行った結果、いずれの試験においてもこれら親系統の有害物質の産生性が高まっていることを示唆するような差異は認められなかった。よって、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

15

本スタック系統トウモロコシで発現しているいずれの蛋白質も既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 で発現している Bt 蛋白質については、酵素活性を持たないと考えられ、宿主の代謝系から独立して機能しているため宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することは無いと考えられた。また、Cry1F line 20 1507 及び Event DAS-59122-7 で発現している PAT 蛋白質については、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有していること、植物の生長に悪影響を及ぼさないこと、及び動物に対して毒性を持たないことが報告されている。したがって、PAT 蛋白質が原因で、Cry1F line 1507 及び 25 Event DAS-59122-7 中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。さらに、MON88017 で発現している改変 CP4 EPSPS 蛋白質については、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS は基質であるホスホエノールピ 30 ルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)と特異的に反応することが知られており(文献 71)、これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているシキミ酸は、その反応性が S3P の 200 万分の一であることから、生体内で基質として反応するとは考えられない。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、MON88017 中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

35

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、導入遺伝子に関連して野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある非意図的な有害物質は産生されないと判断さ

れた。そこで、以下に本組換えスタック系統トウモロコシで発現しているチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を持つ Bt 蛋白質が、わが国の野生動植物等に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

5 【MON89034 及び Cry1F line 1507 の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

MON89034 で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質、並びに Cry1F line 1507 で発現する Cry1F 蛋白質はチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。

10 実際、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び Cry1F 蛋白質を用いて生物検定を行ったところ、いずれの蛋白質もトウモロコシの主要チョウ目害虫に対して殺虫活性を示したが、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。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

15

MON89034 及び Cry1F line 1507 をわが国で栽培した場合、わが国に生息するチョウ目昆虫が MON89034 及び Cry1F line 1507 に暴露される経路としては、生育している MON89034 及び Cry1F line 1507 を直接食餌する、もしくは MON89034 及び Cry1F line 1507 から飛散した花粉を食餌する場合は考えられた。

20 特に MON89034 及び Cry1F line 1507 から飛散した花粉を食餌する場合には、MON89034 の花粉中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質並びに Cry1F line 1507 の花粉中で発現する Cry1F 蛋白質によりチョウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性は否定できない。

25 そこで、「(文献 76)」を用いて、MON89034 及び Cry1F line 1507 をわが国で栽培した場合に影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているチョウ目昆虫のうち、1) 幼虫の活動期(摂食期)とトウモロコシの開花期(5 月下旬から 9 月上旬)の関係、2) 幼虫の食餌植物の生育地域とトウモロコシの栽培地域から判断した幼虫の食餌植物がトウモロコシの花粉と接触する可能性、の 2 点から絞込みを行った結果、以下の 12 種が特定された。

30

絶滅危惧 I 類: タイワンツバメシジミ、シルビアシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、ミツモンケンモン

絶滅危惧 II 類: ヒメシロチョウ、ツマグロキチョウ、ミヤマシジミ、コヒョウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ

35

準絶滅危惧: ヒョウモンチョウ

【MON88017 及び Event DAS-59122-7 の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

- 5 MON88017 中で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質並びに Event DAS-59122-7 中で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質はコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。
- 10 これまでのところ、MON88017 で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*, *Diabrotica*)に分類されるコロラドポテトビートルとコーンルートワームに殺虫活性を示すが、その他の昆虫に殺虫活性を示すことは確認されておらず(別添資料 2 の p52~54)、殺虫スペクトラムが極めて狭いことが示されている(別添資料 2 の表 10, p54)。また、Event DAS-59122-7 で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、コウチュウ目害虫であるコーンルートワームに対してのみ殺虫効果を示すことが明らかとなっている。
- 15 これまでのところ、コロラドポテトビートル、コーンルートワーム及びそれらと同属の近縁種がわが国に生息しているという報告はないことが文献調査により示された(別添資料 2 の表 10, p54)。ただし、未調査のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す可能性もあることから、以下の検討を行った。
- 20 標的及び非標的生物が MON88017 で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質並びに Event DAS-59122-7 中で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の影響を受ける経路としては、トウモロコシの生育期に植物体を直接摂食する可能性、トウモロコシの花粉飛散により影響を受ける可能性、並びに刈り取られた後に土壤中に鋤き込まれたトウモロコシの植物体を摂食する可能性が考えられた。
- 25 上記の可能性について検討をした結果、オオヨモギハムシ(*Oreina angusticollis*)・ハナウドゾウムシ(*Catapionus viridimetallicus*)・ヤマトアザミテントウ(*Honosepilachna niponica*)の 3 種の幼虫が地上部の葉を摂食し、食草もトウモロコシ栽培地の周辺にも分布しているため、飛散花粉量の程度及び昆虫種の感受性によっては、何らかの影響をうける可能性がある昆虫種として特定された。

30

【本スタック系統トウモロコシの影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

- 35 本スタック系統トウモロコシは Bt 蛋白質である Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物等としては親系統である MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の生物多様性

影響評価で特定された種と同じであると考えられる。

よって、本スタック系統トウモロコシの花粉の飛散により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、MON89034 及び Cry1F line 1507 で特定されたチョウ目昆虫 12 種並びに MON88017 及び Event DAS-59122-7 で特定されたコウチュウ目昆虫 3 種が
5 挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

【MON89034 の影響の具体的内容の評価】

10

MON89034 の花粉中では、Cry1A105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質が、それぞれ 3.5µg/g fwt と 0.12µg/g fwt で発現していることがすでに確認されている。また、MON89034 の主要チョウ目害虫に対する抵抗性を、すでに第一種使用規程の承認を受けている MON810 と比較した結果、MON89034 はフォールアーマーワーム及びコーンイヤールームに対して、より優れた抵抗性を示すことが確認されている。これらのこと
15 から、チョウ目昆虫種が、MON89034 から飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、MON810 よりも高まっていることが示唆された。

【Cry1F line 1507 の影響の具体的内容の評価】

20

Cry1F 蛋白質を産生する Cry1F line 1507 を用いた隔離ほ場試験において、その花粉を用いてヤマトシジミ(*Zizeeria maha argia*)を供試し、生物検定を行った。Cry1F line 1507 の花粉と非組換えトウモロコシの花粉をヤマトシジミ 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、100 粒/cm² の花粉密度において、5 日後に死亡率 50%を超える
25 ことが確認された。また、16 種類のチョウ目昆虫に混餌投与して生物検定を行ったところ、Cry1F 蛋白質はヨーロッパアンコーンボラー、フォールアーマーワーム、ビートアーマーワームなど一部の農業上の害虫にのみ殺虫活性を示し、Cry1F 蛋白質の特異性の高さが確認された。

【MON88017 の影響の具体的内容の評価】

30

MON88017 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫コロラドポテトビートルの孵化後 24 時間以内の幼虫に摂食させて死亡率を比較したところ、有意な差が 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた。また、花粉摂食開始 7 日後の LC₅₀(半数致死濃度)は 4,380 粒/cm² であった。
35

【Event DAS-59122-7 の影響の具体的内容の評価】

Event DAS-59122-7 で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の混合物を供試して、3 種のコーンルートワーム幼虫に対する殺虫効果を調べた。その結果、
5 Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質はノーザンコーンルートワーム及びウエスタンコーンルートワームに対して高い殺虫効果(LC₅₀ は、それぞれ 5.56µg ai/cm² 及び 44.5µg ai/cm²)を示したが、サザンコーンルートワームに対する LC₅₀ は 343µg ai/cm² であった。

10 【本スタック系統トウモロコシの影響の具体的内容の評価】

ポット試験による生物検定の結果から、本スタック系統トウモロコシのフォールアーミーワームに対する抵抗性は MON89034 及び Cry1F line 1507 と同程度であることが確認された(表 6, p33)。また、本スタック系統トウモロコシのウエスタンコーンルートワーム
15 に対する抵抗性は、MON88017 及び Event DAS-59122-7 よりも高まっていることが明らかになったが、認められた差異はわずかであり、それぞれの Bt 蛋白質が正常に作用した結果であると考えられた(表 7, p34)。よって、チョウ目昆虫が本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、親系統である MON89034 及び Cry1F line 1507 と同程度であると考えられる。また、コウチュウ目昆虫
20 が本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、親系統である MON88017 及び Event DAS-59122-7 よりも高まっていると考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

25

本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が食餌する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周りに生育する植物の葉に実際に堆積する花粉量を調査することにより推定した。

わが国においてはヒマワリ(*Helianthus annuus*)とイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)の葉
30 を用いて、トウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度の調査が行われている(文献 77)。調査の結果、トウモロコシ畑の縁(0m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm² であった。しかし、畑から 5m 離れると花粉の最大堆積密度は、それぞれ 19.6 粒/cm² と 22.2 粒/cm² に減少していた。さらに、ヒマワリについては 5m 以降も調査されているが、10m 離れると花粉堆積密度は全て 10 粒/
35 cm² 以内であった。

また、北米でも全 7 ヶ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ

(*Asclepias syriaca*)を用いて花粉堆積密度の調査が行われている(文献 78)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1m、2m、4-5m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、そして 8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている。

さらに、(文献 79)も、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度を調査しており、ほ場の縁から 1m 及び 5m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm² であったと報告している。

このように、わが国で行われたトウモロコシ畑周辺での花粉堆積密度に関する調査結果と同様の結果が、北米で大規模に行われた調査からも得られていることが明らかとなった。よって、これらの調査結果から本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫がある程度まとまって食餌する可能性は、トウモロコシ畑から 10 m 以上離れると極めて低く、50 m 以上離れるとほとんど無視できると結論された。また、本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種が本スタック系統トウモロコシから半径 50 m の範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本スタック系統トウモロコシから飛散する花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

したがって、特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F line 1507 由来の Cry1F 蛋白質、MON88017 由来の改変 Cry3Bb1 蛋白質並びに Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。よって、本スタック系統トウモロコシに起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5

(3) 影響の生じやすさの評価

—

10 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタックシステムトウモロコシは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

15 4 その他

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統トウモロコシは MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

5

第一-2-(6)-①(p31～37)で述べたとおり、Bt 蛋白質(Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、Cry1F 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質)、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していることから、これらの蛋白質は(文献 73)の述べている相互作用についての検討が必要な蛋白質には相当しないと考えられる。また、これらの蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たないあるいは高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

10

15

実際に生物検定を行った結果、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性、及び除草剤グリホサート耐性はそれぞれの親系統と同程度であり、コウチュウ目害虫抵抗性については親系統よりもその程度は高まっていたが、認められた差異はわずかであり、それぞれの Bt 蛋白質が正常に作用した結果であると考えられることから、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内において相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

20

また、上述のように親系統を全て掛け合わせた本スタック系統トウモロコシにおいて、各親系統由来の発現蛋白質間に相互作用が認められなかったことから、本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシにおいても同様に発現蛋白質間での相互作用はなく、新たに獲得されたそれぞれの性質は変化しないと考えられる。

25

したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

30

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。本スタック系統トウモロコシの親である MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 について、競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した結果、第一-2-(6)-②-a～e(p37～エラー! ブックマークが定義されていません。)で述べた項目の一部において対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学

35

的有意差が認められた。しかし、これらの差異は質的及び量的に競合における優位性を高めるほどの差異ではないと判断されている。

また、本スタック系統トウモロコシ中で発現するいずれの蛋白質も宿主の代謝系とは独立して機能し、相互に作用することはないと考えられる。したがって、親系統である

5 MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 から交雑育種法により作出された本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に、競合における優位性にかかわる差異が認められる可能性は極めて低いと判断された。

本スタック系統トウモロコシは、MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変

10 Cry2Ab2 蛋白質と Cry1F line 1507 由来の Cry1F 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性、MON88017 由来の改変 Cry3Bb1 蛋白質と Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性、Cry1F line 1507 及び Event DAS-59122-7 由来の PAT 蛋白質の発現による除草剤グルホシネート耐性、並びに MON88017 由来の改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、チョウ目害虫あるいはコウチュウ目害虫による食害は、トウモロコシがわが国の自然条件下において生育することを困難にさせる主要因ではないことから、チョウ目害虫及びコウチュウ目害虫抵抗性の形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。また、グルホシネート及びグリホサートを散布されることが想定し

15 にくい自然条件下において、これらの除草剤に耐性を有することが競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは競合における優位性に起因する

25 生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

トウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されておらず、また、わが国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

本スタック系統トウモロコシで発現しているいずれの蛋白質も既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。また、Bt 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能していると考えられること、及び PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質については基質特異性が高いことなどから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することは無いと考えられた。実際に MON89034、Cry1F line 1507、MON88017 及び Event DAS-59122-7 における有害物質の産生性について、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験により調査している。その結果、第一-2-(6)-②-g(p40)で述べた項目の一部において対照の非組換えトウモロコ

30

35

シとの間に統計学的有意差が認められたが、いずれの親系統トウモロコシにおいても有害物質の産生性が高まっていることを示唆するものではなかった。

MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質、並びに Cry1F line 1507 中で発現する Cry1F 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すことが明らかとなっている。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として 12 種のチョウ目昆虫を特定した。また、MON88017 中で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質並びに Event DAS-59122-7 中で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示すことが明らかとなっている。このことから、何らかの影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫として 3 種のコウチュウ目幼虫を特定した。

本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉により生息もしくは生育に影響を受ける可能性のある野生動植物として特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫への影響を調べた結果、特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫がある程度まとまって花粉を食餌する可能性は、トウモロコシ畑から 10m 以上離れると極めて低く、50m 以上離れるとほとんど無視できると結論された。また、本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種及び非標的コウチュウ目昆虫種が本スタック系統トウモロコシから半径 50 m の範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本スタック系統トウモロコシから飛散する花粉により影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

したがって、特定された 12 種のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が本スタック系統トウモロコシで発現している蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

なお、本スタック系統トウモロコシで発現しているいずれの Bt 蛋白質もトウモロコシの主要チョウ目害虫及びコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示したが、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。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

わが国ではトウモロコシの近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統ト

ウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシを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判断した。

引用文献

【社外秘に付き非開示】

緊急措置計画書

平成20年10月28日

5

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役 フィリップ・ファイル
住所 東京都品川区東品川2丁目2番24号

10

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎
住所 東京都中央区銀座4丁目10番10号

15

ダウ・ケミカル日本株式会社及び日本モンサント株式会社(以下「両社」という。)は、第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ(*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *cry1F*, *pat*, 改変 *cp4 epsps*, 改変 *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Iltis*)(MON89034×*B.t.* *Cry1F* maize line 1507×MON88017×*B.t.* *Cry34/35Ab1* Event DAS-59122-7, OECD UI: MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-88017-3×DAS-59122-7) (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。)並びに MON89034、*B.t.* *Cry1F* maize line 1507、MON88017 及び *B.t.* *Cry34/35Ab1* Event DAS-59122-7 のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、

25

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

ダウ・ケミカル日本株式会社

平成20年10月現在

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 代表取締役 東京都品川区東品川 2 丁目 2 番 24 号
*	ダウ・ケミカル日本株式会社 ダウ・アグロサイエンス 事業部門研究開発本部
	ダウ・ケミカル日本株式会社 広報部
	ダウ・ケミカル日本株式会社 ダウ・アグロサイエンス 事業部門業務部

5

日本モンサント株式会社

平成20年10月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

*: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

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

10

両社は、ダウ・アグロサイエンス社及びモンサント・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スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの適切な管理、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。

15

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

20

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、両社は、ダウ・アグロサイエンス社及びモンサント・カンパニーの協力のもと、本スタック系統トウモロコシ及び後代分離系統トウモロコシ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スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシは、環境中で生存しないように不活化する。

25

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

30

両社は、信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、直ちに農林水産省や環境省に報告する。