

乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)  
(MON87460, OECD UI: MON-87460-4)申請書等の概要

5	第一種使用規程承認申請書	1
	生物多様性影響評価書	4
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
10	① 和名、英名及び学名	4
	② 宿主の品種名又は系統名	4
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
	(2) 使用等の歴史及び現状	4
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
15	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
	(3) 生理的及び生態学的特性	5
	イ 基本的特性	5
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
	ハ 捕食性又は寄生性	6
20	ニ 繁殖又は増殖の様式	6
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
	② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	6
25	③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度	6
	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	7
	ホ 病原性	7
	ヘ 有害物質の産生性	7
30	ト その他の情報	7
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
	(1) 供与核酸に関する情報	8
	イ 構成及び構成要素の由来	8
	ロ 構成要素の機能	9
35	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	9

	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	14
	③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	19
5	(2)	ベクターに関する情報	20
	イ	名称及び由来	20
	ロ	特性	20
	①	ベクターの塩基数及び塩基配列	20
	②	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	21
10	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	21
	(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	21
	イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	21
	ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	21
15	ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過	21
	①	核酸が移入された細胞の選抜の方法	21
	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	21
20	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	22
	(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	24
25	①	移入された核酸の複製物が存在する場所	24
	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	24
	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	24
30	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	24
	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	25
35	(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

	(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	25
		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 .....	25
5		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 .....	28
		a 形態及び生育の特性 (別添資料 3).....	28
		b 生育初期における低温又は高温耐性 (別添資料 17; 別添資料 18) .....	28
10		c 成体の越冬性又は越夏性 .....	28
		d 花粉の稔性及びサイズ (別添資料 20) .....	28
		e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 (別添資料 3; 別添資料 21).....	29
		f 交雑率.....	29
15		g 有害物質の産生性 (別添資料 22) .....	29
3		3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	30
	(1)	使用等の内容.....	30
	(2)	使用等の方法.....	30
20	(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 .....	31
	(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 .....	31
	(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 .....	31
25	(6)	国外における使用等に関する情報.....	31
第二		項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	32
1		1 競合における優位性.....	32
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	32
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	33
30	(3)	影響の生じやすさの評価.....	33
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	33
2		2 有害物質の産生性.....	33
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	33
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	34
35	(3)	影響の生じやすさの評価.....	34
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	34

3	交雑性.....	34
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	34
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	35
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	35
5	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	35
4	その他の性質.....	35
第三	生物多様性影響の総合的評価.....	36
	参考文献.....	38
	緊急措置計画書.....	39

10

第一種使用規程承認申請書

5

平成 19 年 12 月 25 日

農 林 水 産 大 臣 若 林 正 俊 殿  
環 境 大 臣 鴨 下 一 郎 殿

10

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

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	乾燥耐性トウモロコシ(改変 <i>cspB</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-87460-4)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 24 年 1 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置するとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p>

	<p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 本遺伝子組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。</p> <p>(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	---

## 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

#### 10 ① 和名、英名及び学名

一般にトウモロコシの学名は *Zea mays* L. (英名: maize) であるが、近年、トウモロコシの近縁種である一年生テオシントが *Z. mays* に分類された結果、トウモロコシはその亜種として *Z. mays subsp. mays* (L.) Iltis として分類されるようになった(文献 1)。

15

#### ② 宿主の品種名又は系統名

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*)で、デント種を用いた。遺伝子導入に用いた品種名は LH59 である。

20

#### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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。

25

##### (2) 使用等の歴史及び現状

#### 30 ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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、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。

35

#### ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

40

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)。

5

国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2007 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 6 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,502 万 ha、中国が 2,807 万 ha、ブラジルが 1,383 万 ha、メキシコが 780 万 ha、インドが 777 万 ha、ナイジェリアが 470 万 ha、インドネシアが 345 万 ha となっている(文献 4)。

10

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)。

15

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 165 トンとなっている(文献 7)。

20

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 当たり 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)。

25

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。

30

### (3) 生理的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

35

—

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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ている。品種や地域によって栽培時期

40

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)。

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)。

## 10 ハ 捕食性又は寄生性

—

## 15 ニ 繁殖又は増殖の様式

### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

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°C に達するまで発芽しないため、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°C 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。

### 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。

### 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)。

5  
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 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粒当たりの重量は約 $3.4 \times 10^{-7}$ gであり(文献14)、直径は90~100 $\mu$ 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  
15 とされている(文献3)。

ホ 病原性

—

20  
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又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。

25  
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。

30  
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

一般的にトウモロコシの収量は、乾燥ストレスに対して強い影響を受けることが知られている。特に開花期及び登熟期における乾燥ストレスは、穀粒の形成を妨げ収量を減少させることが知られている(文献16; 文献17)。モンサント・カンパニーはトウモロコシの乾燥ストレス条件下における収量の減少を抑制するため、乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-87460-4) (以下、「本組換えトウモロコシ」という)を開発した。

40 本組換えトウモロコシは、目的遺伝子である改変低温ショック蛋白質 *B* 遺伝子(改変 *cspB* 遺伝子)の発現により、後期栄養生長期から初期生殖生長期における乾燥ストレスによる収

量の減少を抑制することが確認された(別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7; 別添資料 2 の Table 5, p10)。その一方で、通常の水分条件下での本組換えトウモロコシの収量は、対照の非組換えトウモロコシと同程度であった(別添資料 2 の Table 6, p11; 別添資料 3 の Table 1, p4~5)。また、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス条件下での収量は通常の水分条件下での収量と比較すると減少することが確認された(別添資料 2 の Table 9, p14)。

本組換えトウモロコシの乾燥耐性能は、土壌細菌である *Bacillus subtilis* 由来の改変 *cspB* 遺伝子がコードする改変低温ショック蛋白質 B (改変 CSPB)によって付与されている。細菌中の CSPB については多くの研究がなされており、CSPB は乾燥などのストレス条件下で RNA 上に形成された 2 本鎖を解消することにより、RNA を安定化させ、それらの翻訳を助け、細胞が正常な機能を保てるよう助ける RNA シャペロンとして働いている(文献 18; 文献 19)。

本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB も同様に RNA に結合することにより(別添資料 4 の Figure 7~10, p38~41)、乾燥ストレス条件下において植物体の細胞機能を保つよう助けることが示唆された。その結果として、本組換えトウモロコシ中の改変 CSPB は、乾燥ストレスによる光合成速度、気孔コンダクタンス及び光化学系 II により媒介される電子伝達の量子効率などの植物生理学的能力への影響を最小限にとどめ(別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 5 の Figure 1~4, p6~8)、雌穂における穀粒数の減少を防ぎ(別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7)、その結果として収量の減少を抑制することが示唆された(別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7; 別添資料 2 の Table 5, p10)。

水不足は作物の収量を減少させる大きな要因の一つになっており、乾燥ストレス条件下でも収量を安定させることは環境面においても社会経済面においても有益なことである。北米ではトウモロコシの収量が減少した場合の原因の約 4 割が、水不足によるものであるとの報告がなされている(文献 20)。

また、トウモロコシはアフリカにおいても広く栽培されている主要作物であり、3 億人以上の人々がトウモロコシを主な食料資源としている。アフリカでの乾燥ストレスによるトウモロコシ収量への影響を解決するために、Water Efficient Maize for Africa (WEMA; <http://www.aatf-africa.org>)と呼ばれる官民パートナーシップが結成され、アフリカのために乾燥耐性トウモロコシ品種を開発していくこととなった。WEMA はアフリカの遺伝資源をもとに、高度な品種改良と遺伝子組換え技術によって収量の増加を提供していく。育種により年間の収量を 1%以上、遺伝子組換え技術により年間の収量を 8~10%増加させることを目標としている。本組換えトウモロコシも技術提供が予定されている乾燥耐性トウモロコシ品種の一つである。

35

#### (1) 供与核酸に関する情報

##### イ 構成及び構成要素の由来

40 本組換えトウモロコシ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

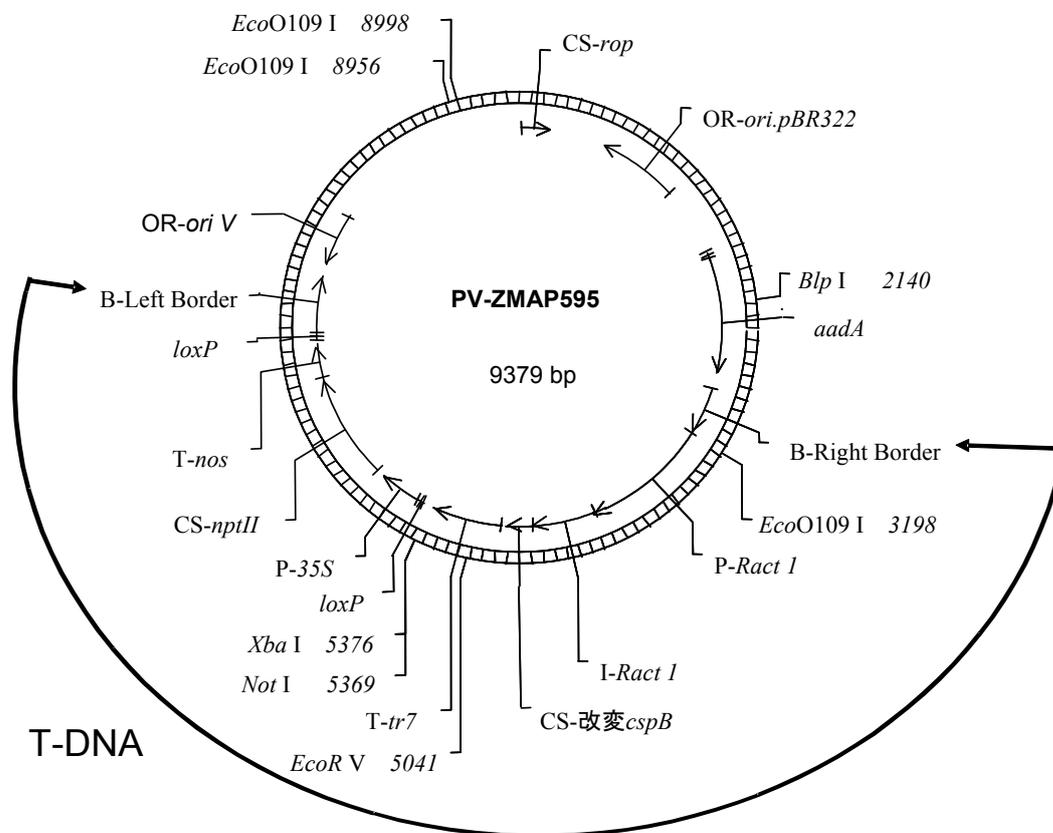
1(p10)及び表 1(p11~13)に示した。

5 なお、本組換えトウモロコシで発現する改変 CSPB のアミノ酸配列は、土壤中に広く分布する土壌細菌である *B. subtilis* に由来する野生型 CSPB と比較して、N末端から2番目のロイシンがバリンに改変されている。これはクローニングのための制限酵素切断部位を付加するためである。改変 CSPB の推定アミノ酸配列は別添資料 6 の図 1 に記載した。よって、本組換えトウモロコシに導入された *cspB* 遺伝子は、「改変 *cspB* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 CSPB」とする。

10 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

15 本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p11~13)に示した。



5

図 1 本組換えトウモロコシ MON87460 の作出に用いられた PV-ZMAP595 のプラスミドマップ<sup>1</sup>

10

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

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能<sup>2</sup>

構成要素	由来及び機能
<b>外側骨格領域</b>	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS <sup>注1</sup> - <i>rop</i>	<i>Escherichia 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 21)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR <sup>注2</sup> - <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> においてプラスミドに自律増殖能を付与する(文献 22)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<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 23)。(GenBank accession X03043)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<b>T-DNA 領域</b>	
B <sup>注3</sup> -Right Border	<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 24)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P <sup>注4</sup> - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のプロモーターとリーダー配列 (文献 25)。目的遺伝子を発現させる。
I <sup>注5</sup> - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン (文献 25)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

5

<sup>2</sup>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 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

<b>T-DNA 領域(続き)</b>	
CS-改変 <i>cspB</i>	改変 CSPB をコードする遺伝子(文献 26)。詳細は第一-2-(1)-ロ-②に示した。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T <sup>注6</sup> - <i>tr7</i>	<i>A. tumefaciens</i> 由来の転写 7 遺伝子の 3'非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する(文献 27)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>loxP</i> <sup>注7</sup>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(文献 28)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
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 29)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS- <i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(文献 30)。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II をコードし、植物にネオマイシン及び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 31)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノバリン合成酵素( <i>nos</i> )遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 32)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

<b>T-DNA 領域(続き)</b>	
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(文献 28)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	<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 33)。
<b>外側骨格領域</b>	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR-ori <i>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 34)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

5

注<sup>1</sup>CS – coding sequence (コーディング配列)

注<sup>2</sup>OR – Origin of Replication (複製開始領域)

注<sup>3</sup>B – Border (境界配列)

注<sup>4</sup>P – Promoter (プロモーター)

10 注<sup>5</sup>I – Intron (イントロン)

注<sup>6</sup>T – 3' nontranslated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences

(3 末端非翻訳終止配列及びポリアダニル化シグナル配列)

注<sup>7</sup>*loxP* – *nptII* 遺伝子は MON87460 の形質転換体の選抜マーカーとして使用した。本組換えトウモロコシの開発開始当時、EU における遺伝子組換え作物の安全性評価機関である欧州食品安全機関(European Food Safety Authority; EFSA)などが抗生物質耐性マーカー遺伝子の代用となる新しい選抜方法の開発と使用を促していたため、本組換えトウモロコシは Cre リコンビナーゼによって認識される *loxP* 組換え部位を使用して *nptII* 遺伝子カセットを除去するよう設計された。その後、EFSA によって、遺伝子組換え作物中の *nptII* 遺伝子が、ヒト及び家畜の健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断した声明が公表されたため(文献 35)、本組換えトウモロコシについては、*nptII* 遺伝子カセットの除去は行われなかった。

20

- 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同一性を有する場合はその旨

5

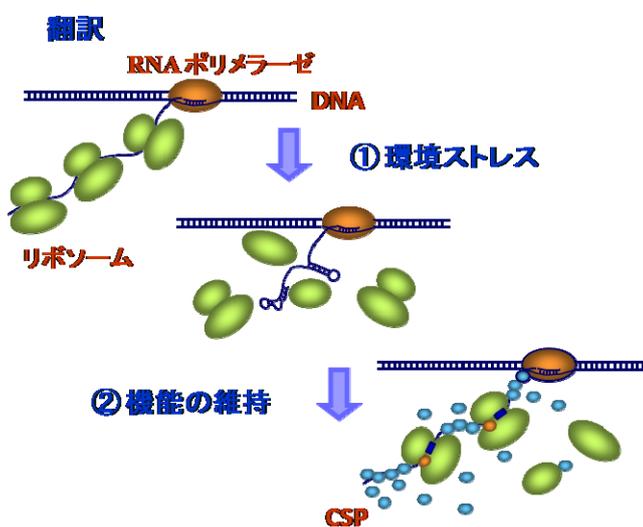
### 【改変 CSPB】

本組換えトウモロコシは、改変 CSPB の発現により、後期栄養生長期から初期生殖生長期の乾燥ストレスによる収量の減少を抑制することが確認された。

10 以下に本組換えトウモロコシに導入した改変 CSPB の機能を記載した。

#### i. 細菌及び植物における低温ショック蛋白質(CSP)の機能

15 本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB は、土壌細菌である *B. subtilis* に由来している。この改変 CSPB は、CSP ファミリーに分類されており、RNA に結合する低温ショックドメイン(CSD)と呼ばれる配列を保存していることが知られている。



20

一般に細菌中で発現する RNA は、多様な環境ストレス条件下において二次構造を形成し、その結果として蛋白質の合成が減少することにより、正常な細胞機能が阻害されることが知られている(文献 19; 文献 36; 図 2

25

30 の①, p14)。しかし、CSP は RNA に結合することにより(文献 37)、RNA の二次構造を解消し、翻訳を安定させ、細胞機能を向上させる(文献 19)RNA シャペロンとして働いていることが知られている(図 2 の②, p14)。

30

なお、CSP は最初に単離されたものが低温処理によって誘導されたことから低温ショック蛋白質(CSP)と命名されたが、細菌の CSP ファミリーには最適温度条件下においても発現しているもの(文献 19)や、別の種類の環境ストレスに応答して細胞の機能を保つ働きを持つものも知られている(文献 38; 文献 39)。

35

また、植物においても CSD を含む蛋白質はマルチドメイン蛋白質として存在することが知られている(文献 40)。これらの CSD を含む蛋白質は細菌 CSP と極めて類似しており、環境ストレス時に RNA に結合し、ストレス条件下における細胞機能の維持を助ける RNA シ

<sup>3</sup>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

ャペロンとしての機能を有すると考えられている(文献41; 文献42; 文献43; 文献44; 文献45)。

5 実際にはコムギ由来の核酸結合蛋白質である WCSP1 は、*E. coli* 由来の CSPA と類似した構造を有しており(文献46)、WCSP1 の発現量は *E. coli* 由来の CSPA の発現量と同様に低温ストレス条件下においては増加するが、乾燥、高温及び塩ストレス条件下においては変動しないことが報告されている(文献46)。このことから、この二つの蛋白質は *in vivo* において同様の機能を持つと推察されている(文献46)。さらに、CSD を含むシロイヌナズナ由来の蛋白質である AtGRP2 は、低温ストレス条件下で発現が誘導され、開花時期や種子形成の決定に関わっていることが報告されている(文献45)。また、CSD を含むイネ由来の蛋白質  
10 である OsCSP1 及び OsCSP2 が特定されており、これらの蛋白質も低温ストレス条件下において発現が誘導され、核酸に結合し、生殖組織及び分裂組織に蓄積することで細胞機能の維持を助けられていると考えられる(文献44)。

## ii. 改変 *cspB* 遺伝子を導入したシロイヌナズナ及びイネにおける環境ストレス耐性能

15

上述したように、細菌の CSP 及び植物の CSD を含む蛋白質は RNA シャペロンとして働くことから、これらを他の植物種に導入することにより、環境ストレス耐性能を付与する可能性が示唆された。そこで、細菌 CSP が植物に環境ストレスに対する耐性能を与えるかどうか確認するために、*B. subtilis* 由来の改変 *cspB* 遺伝子をシロイヌナズナ及びイネに導  
20 入した。その結果、シロイヌナズナは低温に対して耐性を示すことが確認された(文献47)。

また、イネにおいては、低温、高温、そして乾燥ストレスに対して耐性を示す個体が獲得された。しかし、イネにおいては、全ての個体が同一の環境ストレス耐性能を示すわけではなく、三つ全ての環境ストレスに対して耐性を示す個体もあれば、一つあるいは二つの環境ストレスにしか耐性を示さない個体も確認された(文献47)。このことから、改変  
25 CSPB はいくつかの環境ストレスに対して耐性を付与することが確認されたが、付与される耐性能はイベントにより異なることが示された。このイベント特異的に付与される環境ストレス耐性能の原因として、目的遺伝子の導入カ所による違いが考えられた。実際に、導入遺伝子の作用が導入カ所により影響を受けることが知られている(文献48; 文献49; 文献50)。このことから、改変 CSPB はいくつかの環境ストレスに対して耐性を付与するが、  
30 その環境ストレス耐性能は導入遺伝子の導入カ所により異なることが考えられた。

## iii. 本組換えトウモロコシで発現する改変 CSPB の機能

改変 CSPB の本組換えトウモロコシ内での機能を以下のように調査した。

35

まず、本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB が、*B. subtilis* 中の CSPB と同様に本組換えトウモロコシ中で RNA シャペロンとして働いているかを調査した。

*in vitro* における試験結果より、改変 CSPB は細菌の CSP や植物の CSD を含む蛋白質と同様に RNA に結合することが確認された(別添資料4の Figure 7~10, p38~41)。また、改変  
40 CSPB は RNA シャペロンとしての共通の機能(文献37)である核酸の二次構造を解消するこ

とが確認されたが(別添資料 4 の Table 1, p31)、変異を加え核酸への結合機能を欠損した CSPB は核酸に結合せず二次構造を解消できないことが示された(文献 47; 別添資料 4 の Table 1, p31)。さらに、実際にヒスチジンで標識した改変 CSPB を発現するトウモロコシを用いた *in vivo* の試験においても改変 CSPB はトウモロコシの内在性 RNA と特異的に結合

5

していることが確認された(別添資料 4 の Figure 11, p42)。  
さらに、細胞内レベルで改変 CSPB は本組換えトウモロコシの子葉鞘の細胞質及び核の両方に分布しているが、液胞、ミトコンドリア、葉緑体には存在しないことから、細菌及び植物中の CSD を含む蛋白質と同様の局在性を持つことが確認された(文献 47; 別添資料 4 の Figure 6, p37)。

10

このことから、改変 CSPB は本組換えトウモロコシ中で RNA シャペロンとして働いていると判断された(図 3 の①, p18)。

次に改変 CSPB が本組換えトウモロコシの生理学的特性に及ぼす影響について調査した。

15

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの灌漑を 5 葉期(V5)から 6 日間抑制し、その間の生理学的特性を調査した結果、本組換えトウモロコシでは乾燥ストレス条件下において光合成速度、気孔コンダクタンス及び光化学系 II により媒介される電子伝達の量子効率などの植物生理学的能力が向上していることが確認された(別添資料 5 の Figure 1~4, p6~8)。

20

さらに、2003 年のカンザス州の試験において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの灌漑を 8 葉期(V8)から 14 日間抑制し、その間の生理学的特性及び葉の伸長速度を調査した結果、本組換えトウモロコシの葉の伸長速度は対照の非組換えトウモロコシと比較して 22.1%高いことが確認され、気孔コンダクタンス、光合成速度、蒸散量も本組換えトウモロコシで一様に上昇しており、生理学的機能が向上していることが示された(別添資料 1 の Table 1, p6)。

25

以上の結果から、本組換えトウモロコシは改変 CSPB の発現により、乾燥ストレス条件下における生理学的能力が向上していることが確認された(図 3 の②, p18)。

30

トウモロコシは一般に、乾燥ストレス条件下における生理学的能力の向上が、雌穂当たりの穀粒数の増加及び収量の増加へつながっていることが広く知られている(文献 51; 文献 52; 文献 53; 文献 54; 文献 55; 文献 56)。そこで、乾燥ストレス条件下における本組換えトウモロコシの収量を調査した。

35

その結果、改変 CSPB を発現する本組換えトウモロコシの収量は、後期栄養生長期から初期生殖生長期(V8~R2)での乾燥ストレス条件下において、対照の非組換えトウモロコシの収量と比較して約 9.6~32.1%高いことが確認された(表 2, p17; 別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7; 別添資料 2 の Table 5, p10)。この乾燥ストレス条件下における本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収量の差異は、雌穂当たりの穀粒数の差異に起因していることが確認された(表 2, p17; 別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7)。

40

しかし、乾燥ストレス条件下における本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量以外の形態特性に統計学的有意差は認められず(別添資料 2 の Table 5, p10)、

通常的水分条件下においても、本組換えトウモロコシが収量を高めることはないことが確認された(別添資料 2 の Table 6, p11; 別添資料 3 の Table1, p4~5)。

表 2 乾燥ストレス条件下での本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収量性の差異概要<sup>4</sup>

実施年	試験場所	乾燥ストレス			収量に関する項目 (対照の非組換えトウモロコシとの差異)	参照先
		開始	期間	程度		
2003 年 <sup>1</sup>	米国 (1 箇所; KS)	8 葉期 (V8)	14 日間	灌漑を抑制した。 なお、開発初期の試験であったため灌漑量は測定していない。	二百粒重 (+3.9%) 雌穂当たりの穀粒数 (+12.9%) 1 区当たりの雌穂数 (+0.9%) 収量 (+16.4%)	別添資料 1 の Table 1, p6
2007 年	米国 (1 箇所; CA)	7 葉期 (V7)	水熟期(R2) まで	灌漑量を通常より 25%以上抑制した。	五十粒重 (+3.0%) 雌穂当たりの穀粒数 (+8.5%)* 収量 (+9.6%)*	別添資料 1 の Table 3, p7
2006- 2007 年	チリ (3 箇所; CL, CT, LUM)	10 葉期 (V10)	水熟期(R2) まで	灌漑量を通常より 40~60%抑制した。	収量 (+32.1%)*	別添資料 2 の Table 5, p10

\*本組換えトウモロコシと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。

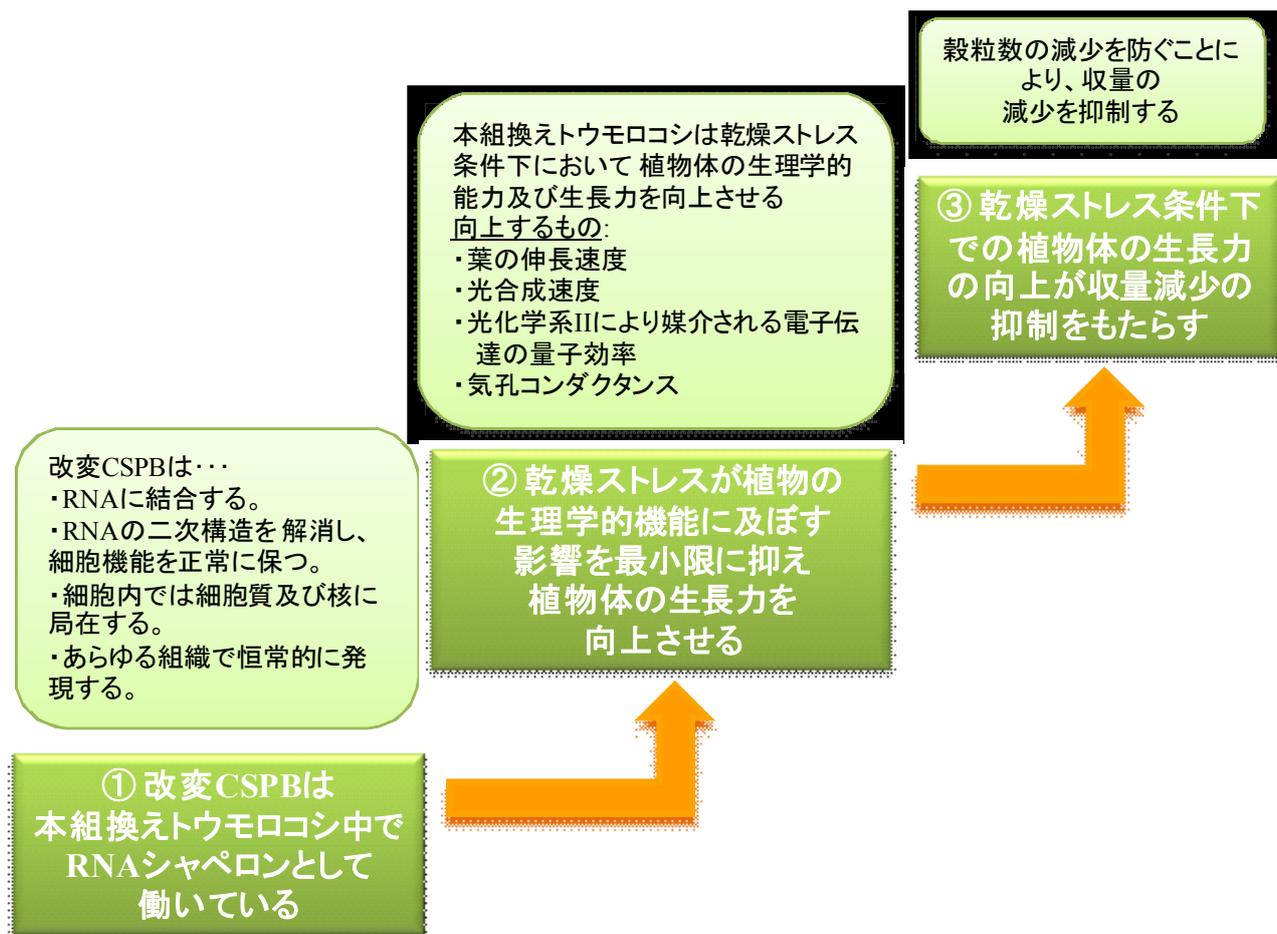
KS: カンザス、 CA; カリフォルニア、

CL; コリナ、 CT; カレラ・デ・タンゴ、 LUM; ルンブレラス

<sup>1</sup> 対照の非組換えトウモロコシに Null 型トウモロコシを供試した。Null 型トウモロコシは本組換えトウモロコシと同じ再分化の過程を経た後、分離により導入遺伝子が抜け落ちた個体である。このことは、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で認められた収量の差異が培養変異によるものではないことを示している。なお、Null 型トウモロコシを供試した試験については別添資料 7 を参照。

以上のことから、本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB は RNA シャペロンとして働くことにより、乾燥ストレス条件下において細胞の機能を正常に保ち、その結果として本組換えトウモロコシの生理学的能力を向上させていると示唆された(図 3 の①及び②, p18)。また、この生理学的機能の向上により、本組換えトウモロコシは乾燥ストレス条件下における雌穂当たりの穀粒数、さらには収量の減少を抑制すると考えられた(図 3 の③, p18)。

<sup>4</sup>本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する



5 図 3 本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB の機能<sup>5</sup>

野生型 *cspB* 遺伝子の宿主である *B. subtilis* は、自然界に遍在する土壌微生物であり、その病原性及び毒性は知られていない(文献 57; 文献 58)。また、*B. subtilis* は米国食品医薬品局(FDA)により食品中に使用される酵素を製造する微生物として GRAS<sup>6</sup>(Generally Recognized As Safe)に指定されている(文献 59)。さらに、*B. subtilis* はダイズを発酵させて納豆を製造する際に使用される納豆菌としても知られており、わが国でも多くの食経験がある(文献 57; 文献 60)。

15 改変 CSPB 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(ALLERGEN 5, ALLPEPIDES, AD8)(文献 61)を用いて FASTA 型アルゴリズムによって比較したところ、既知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つ

<sup>5</sup>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

<sup>6</sup> GRAS とは FDA の指定する専門機関に対して毒性試験やアレルギーなどの試験データを提出し、「食品及び飲料として用いる上で一般に安全と認められるもの」として安全性が認められたものである。

た。

### 【NPTII 蛋白質】

5 形質転換体の選抜のために導入された抗生物質耐性マーカー遺伝子である *nptII* 遺伝子は大腸菌のトランスポゾン Tn5 由来であり、コードされる NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質(カナマイシン等)をリン酸化して不活化することによってこれらの抗生物質に耐性を示し、結果としてカナマイシンの培地への添加によって形質転換細胞の選抜が可能となる(文献 30; 文献 62; 文献 63)。

10

最近の研究結果によると、NPTII 蛋白質は既知のアレルゲン、毒素、あるいは動物やヒトに副作用を与えるその他の蛋白質との相同性がないと結論づけられている(文献 64; 文献 65)。NPTII 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(ALLERGEN 5, ALLPEPTIDES, AD8) (文献 61)を用いて FASTA 型アルゴリズム及び ALLERGENSEARCH によって比較したところ、既知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。

15

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

### 20 【改変 CSPB】

CSPB を含む細菌由来の CSP は RNA に非特異的に結合し、RNA シャペロンとして働いていると考えられている (文献 66; 文献 36)。このため、CSP は翻訳が抑制されるような条件下でも翻訳が行われるようにサポートする役割をもつ (文献 19)。

25 CSPB は転写を直接誘導するような機能は持っておらず(文献 18; 文献 67)、CSPB が酵素活性を持つとの報告はない。

したがって、本組換えトウモロコシ中で改変 CSPB が発現することにより、新規の代謝系が生じたり、改変 CSPB が酵素として働くことによって新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。

30

### 【NPTII 蛋白質】

NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である(文献 63)。NPTII 蛋白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている(文献 68; 文献 69; 文献 70)。さらに、NPTII 蛋白質の構造活性学的な検討の結果、NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化(例：水酸基を除去する、アミノ基を改変する等)により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている(文献 68)。以上のことから、NPTII 蛋白質は宿主の持つ代謝系を変化させること

35

40

はないことが示唆された。

### 【改変 CSPB+NPTII 蛋白質】

5 上述したように、CSPB 及び NPTII 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有している。また、NPTII 蛋白質は基質特異性が高く、CSPB が NPTII 蛋白質の基質となるようなアミノグリコシド系構造を有さないことから、これら蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられ、植物体内において相互に影響する可能性はないと考えられる。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現している 2 種類の蛋白質によって、トウモロコシに新規の代謝系が生じたり新規の代謝産物が産生されることはないと考えられた。

10 実際に、本組換えトウモロコシ中で改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質が発現することにより、新規の代謝系が生じたり新規の代謝産物が産生されるかどうかを調査するために、2006-2007 年にチリの 3 ヶ所(コリナ、カレラ・デ・タンゴ及びルンブレラス)のほ場において通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを生育させ、植物体及び収穫種子の構成成分を調査した。植物体においては、15 主要成分及び無機成分合わせて 9 項目(別添資料 8 の Table 1A~1B, p7~8)について調査を行った。また収穫種子においては、主要成分として 8 項目(別添資料 8 の Table 2A~2B, p9~10)、無機成分として 8 項目(別添資料 8 の Table 3A~3B, p11~12)、アミノ酸組成として 18 項目(別添資料 8 の Table 4A~4B, p13~16)、脂肪酸組成として 8 項目(別添資料 8 の Table 5A~5B, 20 p17~18)、ビタミンとして 6 項目(別添資料 8 の Table 6A~6B, p19~20)、抗栄養素と二次代謝産物として 4 項目(別添資料 8 の Table 7A~7B, p21~22)について分析を行った。

その結果、植物体においては乾燥ストレス条件下の脂質において統計学的有意差が認められ( $p<0.05$ )、収穫種子においては通常の水分条件下の脂質、マグネシウム、乾燥ストレス条件下のエイコセン酸について統計学的有意差が認められた( $p<0.05$ ) (別添資料 8)。しかし、25 いずれの値も同時に調査を行った 12 種の商業栽培品種の範囲内であった(別添資料 8)。

以上のことから、本組換えトウモロコシに導入された改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質がトウモロコシに新規の代謝系を生じさせたり新たな代謝産物を産生させることはないと考えられた。

## 30 (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-ZMAP595 は、*E. coli* 35 由来のベクター pBR322(文献 22)などをもとに構築された。

### ロ 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

40

本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミド・ベクターPV-ZMAP595 の塩基数は 9,379 bp 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

5

大腸菌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 *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

10 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

15

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は表 1(p11~13)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(p10)に示した。

20

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMAP595 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種 LH59 の未熟胚細胞に導入した。

25

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

従来トウモロコシ品種 LH59 の未熟胚細胞から脱分化したカルスとプラスミド・ベクターPV-ZMAP595 を含む *A.tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、カルベニシリン及びパロモマイシンを添加した組織培養培地で細胞の選抜を行った。その際、パロモマイシンによって形質転換していない個体を除去した。

35

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

カルベニシリン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。なお、本組換えトウモロコシにアグロバクテリウム菌体が残存し

40

ていないことは、カルベニシリン無添加の培地に本組換えトウモロコシを移した後に、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。

- 5      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

10      再分化個体である R0 世代を従来トウモロコシ品種 LH59 と交配させた。この個体の後代  
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  
MON87460 系統を選抜した。

15      本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子の発現の安定性、そして  
わが国で隔離ほ場試験を行う予定の世代は、図 4(p23)の育成図に記載した。なお、本評価  
書における本組換えトウモロコシ MON87460 系統とは、R0 個体及びその後代の全てを指  
す。

5

10

[社外秘につき非開示]

15

20

図 4 本組換えトウモロコシの育成図<sup>7</sup>

25

---

<sup>7</sup>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

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えトウモロコシの導入遺伝子はメンデルの法則にしたがって次世代に遺伝していることから(別添資料 9 の Table 1, p4)、染色体上に存在する。

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

10

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された(別添資料 10 の Figure 5, p41)。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されておらず(別添資料 10 の Figure 6, p42)、T-DNA 領域内の改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットは全ての構成要素が組み込まれていることが確認された(別添資料 10 の Figure 7~13, p43~49)。さらに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(LH59 R4、(LH59 R2×LH244)F<sub>1</sub>、(LH59 R3×LH244)F<sub>1</sub>、(LH59 R3×LH244)F<sub>2</sub>、(LH59 R4×[社外秘のため非開示])F<sub>1</sub>、(LH59 R4×[社外秘のため非開示])F<sub>2</sub>、TI: (RP×BC2F<sub>1</sub>)BC3F<sub>1</sub>)におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料 10 の Figure 14, p50)。

20

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

25

1 コピーなので該当しない(別添資料 10 の Figure 5, p41)。

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

ELISA 法により、本組換えトウモロコシの複数世代((LH59 R2×LH244)F<sub>1</sub>、(LH59 R3×LH244)F<sub>1</sub>、(LH59 R3×LH244)F<sub>2</sub>、LH59 R4、(LH59 R4×[社外秘のため非開示])F<sub>1</sub>、(LH59 R4×[社外秘のため非開示])F<sub>2</sub>、(RP×BC2F<sub>1</sub>)BC3F<sub>1</sub>)において改変 CSPB が安定して発現していることを確認した(別添資料 11)。

35

米国の 3 ヲ所のほ場(アイオワ州、インディアナ州、カンザス州)において、乱塊法に従って 3 反復で生育した本組換えトウモロコシの葉、根及び種子での改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。

その結果、改変 CSPB の葉(OSL-1)における発現量は、平均値が 0.48 µg/g fwt で、その発現量の範囲は 0.36~0.74µg/g fwt であった(別添資料 12 の Table 1, p16)。また、改変 CSPB の根(OSR-2)における発現量は、平均値が 0.090 µg/gfwt で、その発現量の範囲は 0.042~0.16µg/g

40

fwtであった(別添資料 12 の Table 1, p16)。さらに、改変 CSPB の種子における発現量は、平均値が 0.060 µg/g fwt で、その発現量の範囲は 0.039~0.084µg/g fwt であった(別添資料 12 の Table 1, p16)。また、生育の過程において、改変 CSPB が安定して発現していることを各世代で確認しながら選抜を行った。

5

さらに NPTII 蛋白質についても葉及び種子での発現量を ELISA 法により分析した。その結果、NPTII 蛋白質の葉(OSL-1)における発現量は、平均値が 0.34 µg/g fwt で、その発現量の範囲は 0.22~0.54µg/g fwt であった(別添資料 12 の Table 1, p16)。さらに、NPTII 蛋白質の種子における発現量は、検出限界値(0.0024µg/g fwt )以下であった(別添資料 12 の Table 1, p16)。

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

プラスミド・ベクターPV-ZMAP595 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* と *A. tumefaciens* 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に対する伝達性はない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

20

PCR 法による検出が可能である(別添資料 13)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

25

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

i. 成体における環境ストレス耐性

30

第一-2-(1)-ロ-②-ii に記載したように、改変 *cspB* 遺伝子は様々な環境ストレスに対して耐性を示すことが報告されている(文献 47)。そのため、本組換えトウモロコシも乾燥ストレス以外の環境ストレスに対して耐性を示す可能性が考えられた。そこで、本組換えトウモロコシの成体における高温及び塩耐性について調査を行った。

35

なお、第一-2-(1)-ロ-②-iii に記載したように、本組換えトウモロコシは後期栄養生長期から初期生殖生長期の乾燥ストレス条件下において、収量及び雌穂当たりの穀粒数が対照の非組換えトウモロコシと比較して高まっているが、それ以外の形態特性に関しては一貫した差異は認められなかった。よって、本組換えトウモロコシの高温及び塩ストレスに対する耐性の有無を、収量及び雌穂当たりの穀粒数を指標として調査した。

40

その結果、高温及び塩ストレス条件下において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量及び雌穂あたりの穀粒数に統計学的有意差は認められなかった。

また、その他の形態特性に関しても同様に本組換えトウモロコシがそれらのストレスに対して耐性を獲得したことを示唆するような一貫した差異は得られなかった(別添資料 14 の Table 1, p6; 別添資料 15 の Table 1, p6~7)。

5 なお、高温耐性試験における本組換えトウモロコシの雌穂当たりの穀粒数及び収量は対  
照の非組換えトウモロコシと比較して、統計学的な有意差は認められなかったものの増加  
していた。そのため、高温ストレス耐性を含め、本組換えトウモロコシの環境ストレス耐  
性をより確実に把握するために、隔離ほ場試験期間中に更なる環境ストレス耐性試験を行  
い、本組換えトウモロコシの生理学的及び形態学的な環境ストレス耐性能を調査する予定  
である。

10

表 3 高温及び塩ストレス条件下での本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収量性の差異概要<sup>8</sup>

	実施年	試験カ所	ストレス			収量に関する項目 (対照の非組換えトウモロコシとの差異)	参照先
			開始	期間	程度		
高温	2008年	米国 (1カ所; TX)	開花期(雄穂抽出期から雌穂抽出期まで(VT-R1))		最高気温が35°C以上 <sup>1</sup>	1区当たりの雌穂数 (+0.4%) 穀粒重 (-1.1%) 千粒重 (-0.1%) 雌穂当たりの穀粒数 (+9.6%) 収量 (+11.8%)	別添資料 14のTable 1, p6
塩	2008年	米国 (1カ所; AR)	1-2葉期 (V1-2)	完熟期 (R6)まで	低度 (4-6 dS/m <sup>2</sup> )	1区当たりの雌穂数 (+7.9%) 穀粒重 (-0.3%) 雌穂当たりの穀粒数 (-12.0%) 収量 (+3.0%)	別添資料 15のTable 1, p6~7
					中度 (7-9 dS/m)	1区当たりの雌穂数 (-0.63%) 穀粒重 (+0.5%) 雌穂当たりの穀粒数 (-1.5%) 収量 (-5.1%)	
					重度 (≥10 dS/m)	1区当たりの雌穂数 (-29.6%) 穀粒重 (-0.3%) 雌穂当たりの穀粒数 (+12.5%) 収量 (-14.3%)	

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

TX: テキサス州、AR: アーカンソー州

15 <sup>1</sup>開花期の温度が35°Cを超過するとトウモロコシの収量に悪影響を与えることが知られている(文献71)。

<sup>2</sup>dS/m—電気伝導率(導電率)。電気伝導のしやすさを表す。数値が高いほど電気伝導しやすく、塩濃度が高いことを示す。

<sup>8</sup>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

## ii. 生育初期における環境ストレス耐性

生育初期においても本組換えトウモロコシが乾燥、低温、高温及び塩ストレスに対して耐性を有しているかを調査した。その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間でいくつかの項目において統計学的有意差が認められた。しかし、実際に本組換えトウモロコシがそれらの耐性を獲得したことを示唆するような一貫した差異は得られなかった(別添資料 16 の Table 2, p5; 別添資料 17 の Table 1, p5; 別添資料 18 の Table 1, p5; 別添資料 19 の Table 2, p5)。

## 10 iii. 乾燥ストレス耐性

第一-2-(1)-ロ-②-iii に記載したように、本組換えトウモロコシは後期栄養生長期から初期生殖生長期での乾燥ストレス条件下において、対照の非組換えトウモロコシと比較して収量が約 9.6~32.1%高いことが確認されている(表 2, p17; 別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7; 別添資料 2 の Table 5, p10)。

しかし、乾燥ストレス条件下における本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量以外の形態特性に関しては、調査を行ったチリの 3 箇所のは場で一貫した差異は認められなかった(別添資料 2 の Table 7, p12)。また、通常的水分条件下においては、本組換えトウモロコシで発現している改変 CSPB が収量を高めることはないことが確認された(別添資料 2 の Table 6, p11; 別添資料 3 の Table 1, p4~5)。

さらに、本組換えトウモロコシを通常的水分条件下及び乾燥ストレス条件下で生育させた場合の収量を比較した結果、乾燥ストレス条件下での本組換えトウモロコシの収量は通常的水分条件下で生育させた場合の収量と比較して約 48%減少していた(別添資料 2 の Table 9, p14)。なお、対照の非組換えトウモロコシでは、乾燥ストレス条件下での収量は通常的水分条件下での収量と比較して約 61%減少していた(別添資料 2 の Table 9, p14)。また、4 葉期(V4)の植物体では、本組換えトウモロコシは乾燥ストレスに対して対照の非組換えトウモロコシと同程度の傷害を受けていることが確認された(別添資料 16 の Table 2, p5)。この結果から、本組換えトウモロコシは乾燥ストレスに対してある程度の感受性を持つことが確認された。

第一-2-(1)-ロ-②-ii に記載したように、改変 CSPB はいくつかの植物種に対して複数の環境ストレス耐性を付与することが報告されているが、改変 CSPB を導入した遺伝子組換え植物が耐性を示す環境ストレスの種類や耐性レベルは、導入する植物種や作出されたイベントにより異なることが明らかとない(文献 47)。また、植物におけるストレス応答蛋白質は宿主とは別の植物種に導入した場合、異なる環境ストレスに対して耐性能を付与することが報告されている(文献 72; 文献 73)。

よって、本組換えトウモロコシが乾燥ストレス以外の環境ストレスに対して明確な耐性を示さなかったのは、遺伝子組換え植物の耐性を示す環境ストレスの種類や耐性レベルが遺伝子の導入される植物種及び作出されるイベントにより異なることが要因であると考えられた。

- 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<sup>9</sup>

5 a 形態及び生育の特性 (別添資料 3)

10 米国の 3 ヶ所のほ場(アイオワ州、インディアナ州、カンザス州)において、通常の水分条件下における本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態特性及び生育の特性を比較するために、14 項目(初期生育程度、苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、緑度保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、穀粒中の水分含量、1 m<sup>3</sup>当たりの穀粒の重量、収量)について調査を行った。また、参考として合計 12 種(各ほ場につき 4 品種)の商業栽培品種が同時に調査された。

15 その結果、カンザス州のほ場で収量において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた( $\alpha=0.05$ ) (別添資料 3 の Table 1, p4~5)。統計学的有意差が認められたカンザス州のほ場における収量の平均値は、本組換えトウモロコシが対照の非組換えトウモロコシよりも低かった(10.0 MT/ha, 11.4 MT/ha)。

20 本組換えトウモロコシにおける収量の平均値 10.0 t/ha は、同じカンザス州のほ場で栽培された 4 種の商業栽培品種の範囲内(10.6~11.6 MT/ha)に収まっていなかった。

20 b 生育初期における低温又は高温耐性 (別添資料 17; 別添資料 18)

25 生育初期における低温耐性及び高温耐性について調査を行った。その結果、いくつかの項目において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。しかし、統計学的有意差の認められた項目は与えたストレスの程度や観察時期により異なっており、本組換えトウモロコシが低温及び高温耐性を獲得したことを示唆するような傾向は認められなかった(別添資料 17; 別添資料 18)。

30 c 成体の越冬性又は越夏性

35 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。再生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、アメリカのほ場において生育状況を観察したが、本組換えトウモロコシ及び対照のトウモロコシともに枯死していることを確認した。なお、隔離ほ場試験において本組換えトウモロコシの越冬性を観察する予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ (別添資料 20)

<sup>9</sup>本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

米国のイリノイ州のほ場で通常の水分条件下において栽培された本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシから花粉を採取し、その稔性及びサイズを調査した。その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの間で、花粉の稔性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 20 の Table 1, p3)。また、花粉の形態にも差異は認められなかった(別添資料 20 の Figure 1~2, p4)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 (別添資料 3; 別添資料 21)

種子の生産量については第一-2-(6)-②-a に記載したとおり、通常の水分条件下で行った米国の 3 ヶ所のほ場試験(アイオワ州、インディアナ州、カンザス州)のうち、カンザス州のほ場で収量において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた( $\alpha=0.05$ ) (別添資料 3 の Table 1, p4~5)。統計学的有意差が認められたカンザス州のほ場における収量の平均値は、本組換えトウモロコシが対照の非組換えトウモロコシよりも低かった(10.0 MT/ha, 11.4 MT/ha)。また、本組換えトウモロコシにおける収量の平均値 10.0 t/ha は、同じカンザス州のほ場で栽培された 4 種の商業栽培品種の範囲内(10.6~11.6 MT/ha)に収まっていなかった。

脱粒性については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシはともに、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。

種子の休眠性及び発芽率について、米国のアイオワ州、イリノイ州及びカンザス州における通常の水分条件下のほ場にて収穫された本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び 9 種の商業栽培品種の種子を 4 ヶ月間約 24°C で保管した後、温室にて播種し、休眠性と発芽率の調査を行った。発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子については硬実種子率、枯死種子率及び吸水膨潤状態(viable firm-swollen)の種子率に分けて測定した。その結果、全ての項目において統計学的有意差は認められなかった(別添資料 21 の Table 1, p4)。なお、隔離ほ場試験において本組換えトウモロコシの休眠性を観察する予定である。

f 交雑率

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性 (別添資料 22)

米国の温室において通常の水分条件下で本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来の商業栽培品種をポットにて生育させ、その植物体及び土を用いて鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、検定植物であるレタスの発芽株数、生育段階、草丈、新鮮重、乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 22 の Table 2~3, p21~22)。なお、隔離ほ場試験において鋤込み、後作、土壌微生物相試験を行う予定である。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

5

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

#### (2) 使用等の方法

10

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 24 年 1 月 31 日まで

##### 1 隔離ほ場の施設

15

(1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

20

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴などに付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本遺伝子組換えトウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。

25

##### 2 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組遺伝子換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

30

(2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

(3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。

35

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

(5) 本遺伝子組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。

40

(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

- (7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

5 なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料 23-A の図 2(p3)に示した。

(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

10 —

(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

15 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

20 (6) 国外における使用等に関する情報

これまで 2002~2008 年間に米国、アルゼンチン、チリ、カナダにおいて延べ 452 ヲ所のほ場において試験が行われているが、非組換えトウモロコシと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

25 なお、本組換えトウモロコシに関しては、2008 年 12 月に米国食品医薬品局(FDA)へ食品及び飼料利用のための申請を、2009 年 2 月に米国農務省(USDA)へ無規制裁培(商業栽培)のための申請を行った。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価<sup>10</sup>

### 1 競合における優位性

5

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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。

10

本組換えトウモロコシは、後期栄養生長期から初期生殖生長期(V8~R2)の乾燥ストレスでは、対照の非組換えトウモロコシと比較して、その後の収量が約 9.6~32.1%高いことが確認された(別添資料 1 の Table 1, p6; 別添資料 1 の Table 3, p7; 別添資料 2 の Table 5, p10)。しかし、本組換えトウモロコシの収量は通常の水分条件下では高まっておらず、その他の形態特性にも統計学的有意差は認められなかった(別添資料 2 の Table 6, p11; 別添資料 3 の Table 1, p4~5)。また、乾燥ストレス条件下での本組換えトウモロコシの収量は通常の水分条件下での収量と比較して約 48%減少しており、対照の非組換えトウモロコシでは、乾燥ストレス条件下での収量は通常の水分条件下での収量と比較して約 61%減少していた(別添資料 2 の Table 9, p14)。このことから本組換えトウモロコシは依然として乾燥ストレスに対してある程度の感受性を持っていることが確認された。

20

また、本組換えトウモロコシの低温、高温、塩ストレスに対する耐性能を調査した結果、本組換えトウモロコシが、低温、高温、塩ストレスに対して耐性を獲得したことを示すような差異は、今回行った調査の範囲では認められなかった(別添資料 14 の Table 1, p6; 別添資料 15 の Table 1, p6~7; 別添資料 17 の Table 1, p5; 別添資料 18 の Table 1, p5; 別添資料 19 の Table 2, p5)。

25

さらに、競合性が高く、優占化する傾向にある雑草は、いくつかの特性(例; 休眠性、脱粒性、種子散布機構など)のうち 1 つ又はそれ以上を有することが知られている(文献 74; 文献 75)。また、トウモロコシは倒伏することにより種子がほ場に残ると、自生し、他の作物の生育に影響を与えることが知られている(文献 76; 文献 77)。しかし、休眠性、脱粒性、倒伏性において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった(第一-2-(6)-②)。また、種子散布機構には、動物や鳥に付着するフックのような莢を持つもの、風散布のための冠毛を持つもの、自動的に種子をはじくものなどがある(文献 74)。これらの特性は、いずれも種子が容易に離脱することが前提であるが、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシは収穫時に雌穂が苞皮に覆われており、脱粒性がないことが確認されている(第一-2-(6)-②-e)。このことから、本組換えトウモロコシの種子散布機構は対照の非組換えトウモロコシと比較し変化していないと判断された。

35

<sup>10</sup>本項目中で、第一の 2-(6)-②-a~g に記載された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に帰属する

以上のことから本組換えトウモロコシに付与された程度の乾燥ストレス耐性能のみで、栽培作物であるトウモロコシが、わが国の自然条件下で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と判断された。

5

さらに、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、本組換えトウモロコシがわが国の自然条件下で自生する可能性は極めて低いと結論された。

10 以上のことから、本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

## (2) 影響の具体的内容の評価

15 —

## (3) 影響の生じやすさの評価

—

20

## (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25 以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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

### (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るが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

35 本組換えトウモロコシ中では、乾燥耐性を付与する改変 CSPB が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている(第一-2-(1)-ロ-②)。また、改変 CSPB は、乾燥などのストレス条件下で RNA 上に形成された 2 本鎖を解消することにより RNA を安定化させ、細胞機能を正常な状態に保つよう助けると示唆された。そのため、宿主の持つ代謝系を変化させることはないと考えられることから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

40 また、本組換えトウモロコシは *nptII* 遺伝子の発現により NPTII 蛋白質の産生性が付与さ

れているが、NPTII 蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していないことが確認されている(第一-2-(1)-ロ-②)。

5 実際には、有害物質の産生性については、鋤込み試験、後作試験を行った結果、意図しない有害物質の産生性はないと判断された(別添資料 22 の Table2~3, p21~22)。

10 また CSPB 及び NPTII 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有している。また、NPTII 蛋白質は基質特異性が高く、CSPB が NPTII 蛋白質の基質となるようなアミノグリコシド系構造を有さないことから、これら蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられ、植物体内において相互に影響する可能性はないと考えられる。

15 実際には、2006-2007 年にチリの 3 ヶ所(コリナ、カレラ・デ・タンゴ及びルンブレラス)のほ場において通常の水分条件及び乾燥ストレス条件下で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを生育させ、植物体及び収穫種子の構成成分を調査した(別添資料 8)。その結果、いくつかの項目で統計学的有意差が認められたが、いずれの値も同時に調査を行った 12 種の商業栽培品種の範囲内であった。そのため、本組換えトウモロコシに導入された改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質がトウモロコシに新規の代謝系を生じさせたり新たな代謝産物を産生させるようなことはないと判断された。

20 以上のことから、本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

## (2) 影響の具体的内容の評価

25 —

## (3) 影響の生じやすさの評価

30 —

## (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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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

40

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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10

(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

15

以上から、本組換えトウモロコシは、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。

4 その他の性質

20

—

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主のトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。

5

本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB は、乾燥などのストレス条件下で RNA 上に形成された二本鎖を解消することにより、RNA を安定化させ、細胞が正常な機能を保てるよう助ける。よって、この改変 CSPB が発現することで、後期栄養生長期から初期生殖生長期の乾燥ストレス条件下では本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと比較して収量の減少の程度を抑制することが可能となる。

10

実際に本組換えトウモロコシは後期栄養生長期から初期生殖生長期(V8~R2)に乾燥ストレスを与えると、対照の非組換えトウモロコシと比較して、収量が約 9.6~32.1%高いことが確認された。しかし、本組換えトウモロコシの収量は通常の水分条件下では高まっておらず、その他の形態特性に統計学的有意差は認められなかった。また、乾燥ストレス条件下での本組換えトウモロコシの収量は通常の水分条件下で生育させた場合の収量と比較して減少しており、本組換えトウモロコシは依然として乾燥ストレスに対してある程度の感受性を持っていることが確認された。

15

また、本組換えトウモロコシの低温、高温、塩ストレスに対する耐性能を調査した結果、本組換えトウモロコシが、低温、高温、塩ストレスに対して耐性を獲得したことを示すような差異は、今回行った調査の範囲では認められなかった。

20

このことから、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で認められた乾燥ストレス条件下における収量の差異のみで競合における優位性が高まるとは考えにくいと判断された。

25

また、本組換えトウモロコシは *nptII* 遺伝子の発現により NPTII 蛋白質の産生性が付与されているが、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を有することによりわが国の自然条件下において競合における優位性は高まらないと考えられる。

30

さらに、競合性が高く、優占化する傾向にある雑草は、いくつかの特性(例; 休眠性、脱粒性、種子散布機構など)のうち 1 つ又はそれ以上を有することが知られている(文献 74; 文献 75)。また、トウモロコシは倒伏することにより種子がほ場に残ると、自生し、他の作物の生育に影響を与えることが知られている(文献 76; 文献 77)。しかし、休眠性、脱粒性、倒伏性において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった(第一-2-(6)-②)。また、種子散布機構には、動物や鳥に付着するフックのような莢を持つもの、風散布のための冠毛を持つもの、自動的に種子をはじくものなどがある(文献 74)。これらの特性は、いづれも種子が容易に離脱することが前提であるが、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシは収穫時に雌穂が苞皮に覆われており、脱粒性がないことが確認されている(第一-2-(6)-②-e)。このことから、本組換えトウモロコシの種子散布機構は対照の非組換えトウモロコシと比較し変化していないと判断された。

35

40

これらのことから、本組換えトウモロコシに付与された形質は乾燥耐性能のみであり、この形質みでこれまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシがわが国の自然条件下で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と判断された。さらに、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場を使用する範囲内では、本組換えトウモロコシがわが国の自然条件下で自生する可能性は極めて低いと結論された。

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 年以來、長期間の使用経験がある。本組換えトウモロコシ中では、乾燥耐性を付与する改変 CSPB が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。さらに、改変 CSPB の作用機作から、宿主の持つ代謝系を変化させることはなく、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、本組換えトウモロコシは *nptII* 遺伝子の発現により NPTII 蛋白質の産生性が付与されているが、NPTII 蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していないことが確認されている(第一-2-(1)-ロ-②)。

実際に、有害物質の産生性については、鋤込み試験、後作試験を行った結果、意図しない有害物質の産生性はないと判断された。

また CSPB 及び NPTII 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有している。また、NPTII 蛋白質は基質特異性が高く、CSPB が NPTII 蛋白質の基質となるようなアミノグリコシド系構造を有さないことから、これら蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられ、植物体内において相互に影響する可能性は低いと考えられる。

実際に、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下で生育させ、同一条件下での植物体及び収穫種子の構成成分を比較した結果、本組換えトウモロコシに導入された改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質がトウモロコシに新規の代謝系を生じさせたり新たな代謝産物を産生させるようなことはないと考えられた。

以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

[社外秘につき非開示]

5

# 緊急措置計画書

平成 19 年 12 月 25 日  
一部変更：平成 20 年 12 月 1 日

5

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

10

第一種使用規程の承認を申請している乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON 87460, OECD UI: MON-87460-4) (以下「本組換え体」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

15

- 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。

20

平成 20 年 12 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

\*： 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

## 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 実験従事者に直接口頭で伝える。

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

15 具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

## 20 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。