

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.)  
Iltis)(Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	3
第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
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	5
ニ、繁殖又は増殖の様式	5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	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	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ず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	6
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	7
(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	9
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(食品としてのアレルギー性を除く)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	10
③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	12
イ、	名称及び由来	13
ロ、	特性	13
①	ベクターの塩基数及び塩基配列	13
②	特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能	13
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	13
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	13
イ、	宿主内に移入された核酸全体の構成	13
ロ、	宿主内に移入された核酸の移入方法	14
ハ、	遺伝子組換え生物等の育成の経過	14
①	核酸が移入された細胞の選抜の方法	14
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	14
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	14
(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	14
①	移入された核酸の複製物が存在する場所	14
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	15
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	15
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	15
⑤	ウイルス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
(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	16
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	16
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	16
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 .....	16
a 形態及び生育の特性.....	16
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	16
c 成体の越冬性.....	16
d 花粉の稔性及びサイズ.....	17
米国シンジェンタ社の温室において栽培した本組換え体及び非組換え体の花 粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色して顕微鏡下で観察した結果、花 粉の稔性及びサイズに本組換え体と対照の非組換え体との間で有意差は 認められなかった（別紙 11）。 .....	17
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	17
f 交雑率.....	17
g 有害物質の産生性.....	17
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	18
(1) 使用等の内容.....	18
(2) 使用等の方法.....	18
(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.....	19
(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.....	19
(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.....	19
(6) 国外における使用等に関する情報.....	19
第 2 項目ごとの生物多様性影響評価.....	20
1. 競合における優位性.....	20
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	20
(2) 影響の具体的内容の評価.....	21
(3) 影響の生じやすさの評価.....	21
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	21
2. 有害物質の産生性.....	21
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	21
(2) 影響の具体的内容の評価.....	22
(3) 影響の生じやすさの評価.....	22
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	23
3. 交雑性.....	23

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	23
(2) 影響の具体的内容の評価	23
(3) 影響の生じやすさの評価	24
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	24
4. その他	24
第3 生物多様性影響の総合的評価	25
引用文献	27
緊急措置計画書	28

# 第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 1 月 9 日

5 農林水産大臣 石破 茂 殿  
環境大臣 斉藤 鉄夫 殿

10 氏名 シンジェンタシード株式会社  
申請者 代表取締役社長 大伴 秀郎  
住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

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	コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ ( <i>ecry3.1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1)
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	所在地：静岡県島田市神座138番地 名称：シンジェンタジャパン株式会社研究部中央研究所 神座サイト隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 24 年 3 月 31 日まで  1 隔離ほ場の施設 (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。 (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。 (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しているとともに、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。

- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。

## 2 隔離ほ場での作業要領

- (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。
- (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。
- (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、除雄又は雄穂の袋掛けを行う。
- (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。
- (7) (1)から(6)まで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。

# 生物多様性影響評価書

## 第1 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：トウモロコシ

英名：maize、corn

学名：*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis

##### 15 ② 宿主の品種又は系統名

宿主は、トウモロコシのデント種に属する自殖系統(NP2222)である。

##### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

トウモロコシの栽培起源種は現存せず(文献 1)、国内及び国外の自然環境におけるトウモロコシの自生は報告されていない。

25 なお、トウモロコシの起源に関与すると考えられる近縁種として、トウモロコシと交雑可能なテオシント(*Zea* 属)とトリプサクム(*Tripsacum* 属)の存在が知られている(文献 2)。テオシントとトリプサクムはメキシコとグアテマラを中心に、米国南部から南米にかけて自生しているが(文献 2)、我が国においてこれらの近縁種が自生しているという報告はない。

#### (2) 使用等の歴史及び現状

30

##### ①r 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35 トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある(文献 2)。考古学的検証に基づく、最初にトウモロコシが出現したのは紀元前 6800~5000 年頃であり、紀元前 5000~3000 年頃には本格的な栽培が始まったと考えられている。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播する過程で人為的な選抜が行われ、デント、ポップ、スイ

ート、フリントのような変異種が生じたと考えられる。1492年のコロンブスのアメリカ大陸発見によってヨーロッパに導入され、その後、ヨーロッパから中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。

- 5 日本へは天正年間(1573～1591年)にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、江戸時代には主食の代用あるいは間食として、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた(文献1)。また、明治時代になって北海道へ米国からデント種とフリント種が新たに導入され、全国的に栽培が普及した(文献1)。

## 10 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシの栽培地域はおよそ北緯58度から南緯40度に至る範囲で栽培されている。主な栽培国は、米国、中国、ブラジル、メキシコ、インド、南アフリカ、ルーマニア等である。国連食糧農業機関の統計(文献3)によると、2007年におけるトウモロコシの世界総栽培面積は1億5,787万ヘクタールで、その上位3カ国は米国(3,502万ヘクタール)、中国(2,807万ヘクタール)及びブラジル(1,383万ヘクタール)となっている。また、同年の世界総生産量は7億8,479万トンで、その上位3カ国は栽培面積と同じく、米国(3億3,203万トン)、中国(1億5,197万トン)及びブラジル(5,159万トン)であった。米国を始めとする主要栽培国では、大型機械を利用した大規模栽培が行われている。

20 世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ、イリノイ、ネブラスカ及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されており、2007年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、45.9%が飼料、24.7%がエタノール製造、18.9%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(文献4)。

25 一方、我が国における2007年度のトウモロコシの栽培面積は、青刈りトウモロコシ(デント種)が8万6,100ヘクタールで(文献5)、子実収穫を目的とした栽培はほとんど行われていない。このうち、青刈りトウモロコシの栽培面積における上位3都道府県は、北海道(3万8,300ヘクタール)、宮崎県(6,790ヘクタール)及び岩手県(5,210ヘクタール)であった。

30 財務省貿易統計(文献6)によると、我が国は2007年に約1,663万トンのトウモロコシ子実を輸入している。また、輸入トウモロコシ子実のうちの約1,185万トンは飼料用であり、残りは食品用、工業用及び栽培用と考えられる。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている(文献6)。

35

## (3) 生理学的及び生態学的特性



## イ、基本的特性

—

### 5 ロ、生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは長い年月の間に栽培作物として馴化された結果、自然環境における生存能力を失った作物であり(文献 2)、その栽培は温暖な気温と適度な降水量のある地域に適している(文献 7)。

10

栽培可能地域は低温と無霜期間によって設定され、夏の平均気温が 21～27℃で無霜期間が 120～180 日の地域が最適であり、夏の平均気温が 19℃以下で平均夜温が 13℃以下になる地域では栽培されない(文献 1)。雨量については、年間降雨量が 250～5,000 mm の地域で、無灌漑栽培では夏季に 150 mm の降雨量が確保できる地域とされる(文献 1)。なお、

15

トウモロコシの種子の発芽適温は 33℃程度で、発芽の最低温度は 10～11℃であり、実際の栽培では 13～14℃以上で播種が行われる(文献 1)。

## ハ、捕食性又は寄生性

20

—

## 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

25

トウモロコシの種子は雌穂に着生し、また、雌穂は苞皮で覆われているため、自然に脱粒することはない、ヒトの介在なしに種子が自然条件下で広範囲に散布されることはない(文献 2)。種子の休眠性は極めて低い。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ため、発芽する前に腐敗し枯死する(文献 1、文献 8)。

30

### 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

トウモロコシは種子繁殖する夏作一年生植物であり、種子以外に自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官を持たない(文献 2)。

35

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

5 トウモロコシは風媒受粉植物で一般に95%程度の高殖率を示すが、自家不和合性はないので自殖も行う(文献1)。トウモロコシは近縁野生種であるテオシントと交雑することが報告されているが、我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているという報告はない(文献8)。また、アポミクシスについての報告はない。

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10

トウモロコシは雌雄異花序で、稈の頂部に雄穂を1本、中央側部に雌穂を1~3本着生する。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(文献9)。

15 トウモロコシの花粉の稔性は花粉の充実度により観察され、花粉の形状は楕円~円形で直径は90~120 μm程度である(文献1)。受粉は風媒によって行われ、ほとんどの場合は他花受粉であるが、自家不和合性はないので自殖もわずかに生じる(文献1)。受粉が風媒に依存しているため、その受粉機会の多少は種子の生産量に影響する(文献10)。

20 一般に、雄穂の開花は出穂のおよそ3日後に始まり、開花期間は盛夏で8~9日、花粉の飛散日数は4~10日間であり、一方、雌穂の絹糸抽出は雄穂開花のおよそ1日後に始まり、抽出期間は5~6日である(文献1)。花粉は開花後に風によって飛散し、その飛散距離は300~500mとされるが、大部分はほ場内に落下する(文献9)。一般に花粉の寿命は環境条件によって大きく異なるが、トウモロコシの場合、盛夏のほ場条件下で24時間  
25 以内である(文献9)。

ホ、病原性

—

30

へ、有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

35

ト、その他の情報

—

## 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

5

#### イ、構成及び構成要素の由来

10 コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1) (以下「本組換え体」という。)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を表 1 (7~9 ページ)に示した。また、ベクターの塩基配列を別紙 1 に示した。

表 1 本組換え体の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子カセット		
CMP プロモーター	346	<i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> 由来のプロモーター領域で、目的遺伝子を恒常的に発現させる (文献 11、文献 12)。本プロモーターによる遺伝子の発現レベルは、 <i>Cauliflower mosaic virus</i> 由来の 35S プロモーターやトウモロコシのエビキチン遺伝子由来の <i>Ubi1</i> プロモーターと同程度が高いことが確認されている (文献 12)。なお、 <i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> は <i>Cauliflower mosaic virus</i> と同じ <i>Caulimoviridae</i> に属しており、その宿主としては <i>Cestrum parqui</i> 、 <i>Cestrum elegans</i> 、 <i>Nicotiana clevelandii</i> が知られているが、トマト等他の植物に対する感染性は知られていない (文献 13)。また、 <i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> は他の <i>Caulimoviridae</i> と同様に環状二本鎖 DNA ゲノムを有しており、本プロモーターの下流からポリシストロニック RNA を形成する (文献 12)。
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子	1,962	<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子は、トウモロコシのコウチュウ目害虫であるコーンルートワームに殺虫活性を示す <i>eCry3.1Ab</i> 蛋白質をコードする遺伝子である。本遺伝子は、以下の 2 つの <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の <i>cry</i> 遺伝子断片 (改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子と <i>cry1Ab</i> 遺伝子) で構成されている。既知の <i>Cry</i> 蛋白質におけるドメイン構造に基づくと (文献 14、文献 15)、5' 末端側からコードされる蛋白質のドメイン I、II 及びドメイン III の一部 (計 459 個のアミノ酸配列、後述する VR1~CB3) は改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子由来で、残りのドメイン III と 3' 末端側配列 (計 173 個のアミノ酸配列、後述する VR4~VR6) は <i>cry1Ab</i> 遺伝子由来である (図 1、9 ページ)。

		<p>改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子 :</p> <p><i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3Aa2</i> 遺伝子 (文献 15) を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列(文献 16)とし、また、コーンルートワームに対する殺虫活性を高めるようにカテプシン G プロテアーゼ認識配列を導入した改変遺伝子(文献 17)。我が国ですでに承認されたコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5)に導入されたもの。</p> <p><i>cry1Ab</i> 遺伝子 :</p> <p><i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株由来の <i>cry1Ab</i> 遺伝子(文献 18)を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列になるように一部の塩基を変更した遺伝子 (文献 19)。我が国ですでに承認されたチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (Event 176, OECD UI: SYN-EV176-9)に導入されたもの。</p>
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる(文献 20)。
<i>pmi</i> 遺伝子カセット		
ZmUbiInt プロモーター	1,993	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域を含むプロモーターで、目的遺伝子を恒常的に発現させる(文献 21)。
<i>pmi</i> 遺伝子	1,176	マンノースリン酸イソメラーゼ(Phosphomannose isomerase)(以下「PMI 蛋白質」という。)を産生する大腸菌( <i>Escherichia coli</i> )K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子で、遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられた(文献 22)。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる(文献 20)。
その他の領域(以下「外骨格領域」という。)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA のレフトボーター領域(文献 23)。
<i>spec</i>	789	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn7 のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子( <i>aadA</i> )(文献 24)。エリスロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与するため、ベクターの選抜マーカーとして用いられた。
<i>virG</i>	726	<i>A. tumefaciens</i> 由来の pAD1289 由来の T-DNA の転移に関与する領域。 <i>virG</i> の形質が恒常的に発現されるように一部変更されている(文献 25)。

repA	1,074	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来の pVS1 のレプリコン(DNA の複製を制御する最小機能複製単位)領域。 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子(文献 26)。
VS1 ori	405	<i>Pseudomonas</i> 属細菌のプラスミド pVS1 由来の複製起点共通配列。 <i>A. tumefaciens</i> における複製起点 (文献 27)。
ColE1 ori	807	大腸菌由来のプラスミドの複製起点(文献 28)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA のライトボーダー領域(文献 29)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

	ドメイン I				ドメイン II			ドメイン III				
	VR1	CB1	VR2	CB2	VR3	CB3	VR4	CB4	VR5	CB5	VR6	
もともなった Cry 蛋白質												
改変 Cry3Aa2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Cry1Ab	▨											
構築されたキメラ Cry 蛋白質												
eCry3.1Ab	■	■	■	■	■	■	▨					

5

図 1 eCry3.1Ab 蛋白質の模式図

eCry3.1Ab 蛋白質は、ドメイン I、II 及びドメイン III の一部(VR1~CB3)は改変 Cry3Aa2 蛋白質、ドメイン III の残りの部分 (VR4~VR6)は Cry1Ab 蛋白質に由来する。

■ : 改変 Cry3Aa2 蛋白質

10 ▨ : Cry1Ab 蛋白質

ロ、構成要素の機能

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

本組換え体の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、表 1 (7~9 ページ)に示した。

- 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(食品としてのアレルギー性を除く)を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

## 5 eCry3.1Ab蛋白質

### 1) 開発の目的;

トウモロコシ栽培におけるコウチュウ目害虫の防除のため、改変 Cry3Aa2 蛋白質を発現するコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5) (以下「MIR604」という。)が開発された。しかし、現在普及している遺伝子組換えトウモロコシには抵抗性害虫の出現は知られていないものの、MIR604 のみを長期間栽培した場合、改変 Cry3Aa2 蛋白質に対する抵抗性を獲得したコウチュウ目害虫が発生する可能性がある。これに対し、害虫抵抗性蛋白質を多く発現する品種や異なる性質の蛋白質を発現する品種を作成することにより、抵抗性害虫の出現を抑制できると考えられる。そのため、標的昆虫において改変 Cry3Aa2 蛋白質とは異なる中腸のレセプターに結合し、異なるイオンチャンネルを形成する蛋白質を使用し、異なる性質の蛋白質を発現する品種を作成すれば、抵抗性害虫の発生を防止する手段の一つとなる。そこで新規蛋白質の開発に着手し、eCry3.1Ab 蛋白質を選抜した。

### 2) 構造;

Cry1 や Cry3 蛋白質を含む大部分の Cry 蛋白質には、Conserved Block(以下「CB」という。)と呼ばれる高いアミノ酸配列の相同性を示す領域(文献 14)と、Variable Region(以下「VR」という。)と呼ばれる多様性に富んだ配列の領域とが存在する(図 1、9ページ)。CB 構造の保持が Cry の基本的特性の維持には重要と考えられることから、これらの構造を保持したまま、改変 Cry3Aa2 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質を置換してキメラ蛋白質を作成し、コウチュウ目害虫への殺虫活性を持つ eCry3.1Ab 蛋白質を選抜した(別紙 2)。

これまでの研究から、既知の Cry 蛋白質は 3つのドメインからなる類似した立体構造を有することが知られている(文献 30、文献 37、文献 38、文献 39)。各ドメインの機能としては、ドメイン I はイオンチャンネルの形成、ドメイン II 及びドメイン III はレセプターの認識及び結合に関与すると考えられている(文献 36)。eCry3.1Ab 蛋白質作出にあたっては Cry1Ab 蛋白質と改変 Cry3Aa2 蛋白質の各ドメインを組み合わせてその効果を調査した。その結果、Cry1Ab 蛋白質と改変 Cry3Aa2 蛋白質の組み合わせを eCry3.1Ab 蛋白質と逆にした蛋白質(ドメイン I の VR1 からドメイン III の CB3 が Cry1Ab 蛋白質由来で、ドメイン III の VR4 からドメイン III の CB5 が改変 Cry3Aa2 蛋白質由来)はチョウ目のヨーロッパアンコーンボラー(*Ostrinia nubilalis*)に殺虫活性を示し、コウチュウ目のウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera*)に殺虫活性を示さなかった(別紙 2)。

### 3) 特性：

eCry3.1Ab 蛋白質の殺虫活性及びその特性を検証するため、A)コウチュウ目、チョウ目昆虫及びその他の非標的生物への生物効果及び B) eCry3.1Ab 蛋白質と従来の Cry 蛋白質とのコウチュウ目昆虫のレセプターに対する結合性の比較を行った。

5

A) コウチュウ目、チョウ目昆虫及びその他の非標的生物への生物効果

eCry3.1Ab 蛋白質の食餌試験の結果、ウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*) (別紙 5-2)、ノーザンコーンルートワーム(*Diabrotica longicornis barberi*) (別紙 2) 及びコロラドポテトビートル(コロラドハムシ)(*Leptinotarsa decemlineata*) (別紙 5-1)といったコウチュウ目昆虫に殺虫活性を持つことが確認された。

10

一方、eCry3.1Ab 蛋白質は、コウチュウ目昆虫のサザンコーンルートワーム(*D. undecimpunctata howardi*) (別紙 2)、テントウムシ(*Coleomegilla maculata*) (別紙 5-3)、ハチ目昆虫のミツバチ(*Apis mellifera*)に対しては殺虫活性を示さなかった (別紙 5-5)。また、eCry3.1Ab 蛋白質の一部はチョウ目昆虫に殺虫活性を示す Cry1Ab 蛋白質由来であるが、本組換え体は Cry1Ab 蛋白質感受性チョウ目昆虫種を含めたチョウ目昆虫に対する殺虫活性を示さなかった(別紙 5-4)。さらに、急性経口毒性試験により、eCry3.1Ab 蛋白質がマウスに対して毒性影響がないことを確認した(別紙 6)。

15

なお、上述の通り eCry3.1Ab 蛋白質の組み合わせを逆にした蛋白質(VR1 から CB3 が Cry1Ab 由来で、VR4 から CB5 が改変 Cry3Aa2 蛋白質由来)はチョウ目のヨーロピアンコーンボラー(*Ostrinia nubilalis*)に殺虫活性を示し、コウチュウ目のウエスタンコーンルートワーム(*D. virgifera*)に殺虫活性を示さなかった (別紙 2)。

20

これらのことから、eCry3.1Ab 蛋白質は、コウチュウ目に特異的な殺虫活性をもつことが明らかとなった。

25

B) eCry3.1Ab 蛋白質と従来の Cry 蛋白質とのコウチュウ目昆虫のレセプターに対する結合性の比較

上述の通り、標的昆虫において Cry 蛋白質は部分消化され、中腸表面の特異的なレセプターに結合してイオンチャネルを形成することにより、消化器官に損傷を与えて標的昆虫を死に至らしめることが知られている。

30

eCry3.1Ab 蛋白質についても、改変 Cry3Aa2 蛋白質やその他の Cry 蛋白質と同様に部分消化されること、改変 Cry3Aa2 蛋白質と同様にコウチュウ目の中腸のレセプターに結合し、イオンチャネルを形成することを確認した(別紙 3、別紙 4)。

35

以上の結果から、eCry3.1Ab 蛋白質は特定のコウチュウ目のみに殺虫活性を持ち、改変

Cry3Aa2 蛋白質とは異なるレセプターに作用することが確認された。したがって、eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 蛋白質に対する抵抗性害虫を防ぐ手段として有効であることが示唆された。

- 5 また、eCry3.1Ab 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや Cry 蛋白質以外の毒性蛋白質と相同性を持たないことを、公的に利用可能なデータベース(FARRP Allergen Database 及び NCBI Entrez Protein database)を用いた相同性検索によって確認した。

## 10 PMI 蛋白質

- E.coli* 由来の PMI 蛋白質(Phosphomannose isomerase)をコードする遺伝子で、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸との異性化を可逆的に触媒することで、形質転換細胞の選抜を可能とする(文献 22)。通常、トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、*pmi* 遺伝子を持つ細胞はマンノースを利用して生長することができる。このため、*pmi* 遺伝子を選抜マーカーとして一緒に植物細胞に導入し、マンノースを含む培地で培養することにより、目的遺伝子が *pmi* 遺伝子とともに細胞内に導入されたことが確認できる(文献 22)。PMI 蛋白質はヒトの消化器官も含めて自然界に広く存在し(文献 40～文献 43)、植物においてはトウモロコシでは確認されていないが、ダイズ等において存在が確認されている(文献 44～文献 46)。

- 植物の *pmi* 遺伝子が産生する PMI 蛋白質は微生物が産生する PMI 蛋白質と同等であると米国環境保護庁(EPA)により評価され、*pmi* 遺伝子が産生する PMI 蛋白質は植物及び微生物のいずれの場合であっても EPA の残留基準規制から除外されている(2005 年 5 月 14 日)。

- また、PMI 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒性蛋白質と相同性を持たないことを、公的に利用可能なデータベース(FARRP Allergen Database 及び NCBI Entrez Protein database)を用いた相同性検索によって確認した。

30

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

- ecry3.1Ab* 遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質からなり、従来の Cry 蛋白質と同様の構造及び機能を持つと考えられることから、従来の Cry 蛋白質と同様、eCry3.1Ab 蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくい。そのため、宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられる。また、PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸との異性化を可逆的に触媒する酵素蛋白質であ



り、その反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、他の天然基質は知られていない(文献 47)。

5 以上のことから、導入された遺伝子が宿主の持つ代謝経路を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

## (2) ベクターに関する情報

### イ、名称及び由来

10

本組換え体の作出に用いたベクターは pSYN12274 である。このベクターは大腸菌由来の pUC19 等を基に構築された。

### ロ、特性

15

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターの塩基数は11,769 bpであり、その塩基配列は明らかにされている(別紙1)。

#### 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

ベクターpSYN12274には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、スペクチノマイシン耐性を発現する *spec* 遺伝子が含まれるものの、本組換え体中にこの遺伝子は導入されていない。

25

#### 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

ベクターpSYN12274中に感染性を示すような配列はない。

## 30 (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

### イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

35 本組換え体の作出に用いたベクターpSYN12274 の T-DNA 領域である RB と LB の間の 2 つの遺伝子発現カセット(*ecry3.1Ab* 遺伝子カセットと *pmi* 遺伝子カセット)が宿主に移入された。

## ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法によって、ベクターpSYN12274のT-DNA領域をトウモロコシの未熟胚に移入した。

5

## 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

10 ベクターpSYN12274 を含むアグロバクテリウムをトウモロコシの未熟胚と共存培養接種し、その後、未熟胚をマンノース添加培地で培養することによって形質転換細胞を選抜した。

15 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

20 遺伝子導入後、培地中に抗生物質セフトキシンを添加して形質転換に用いたアグロバクテリウムを除去した後、再生個体についてベクターpSYN12274 の外骨格領域に存在する *spec* 遺伝子に対する PCR を行った。その結果 *spec* 遺伝子は確認されなかったことから、菌体の残存はないと考えられた。

25 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

遺伝子導入後に選抜した細胞から植物体を再分化させて馴化し、その植物体を温室で栽培した。その後、TaqMan PCR 分析(文献 48)を行い、*ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子の存在が確認された T0 植物体を選抜した。

30 本組換え体については、食品として安全性審査のための申請を厚生労働省に、飼料としての安全性審査のための申請を農林水産省に、順次行う予定である。

### (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

35 ① 移入された核酸の複製物が存在する場所

分離比による安定性評価の結果より、本組換え体の挿入遺伝子である *ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子はどちらもメンデルの法則に従い、複数世代にわたって伝達されたことから、

*ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子は染色体上に存在すると考えられる(別紙 7)。

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

5

本組換え体の複数世代から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクター-pSYN12274 の T-DNA 領域及び外骨格領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った(別紙 8)。

- 10 その結果、T-DNA 領域をプローブに用いた場合、複数世代で 1 コピーの T-DNA が挿入されていることを示す同一のバンドが検出された。そのため、複数世代にわたり 1 コピーの *ecry3.1Ab* 遺伝子カセット及び *pmi* 遺伝子カセットが安定して伝達されていることが示され、各世代における挿入遺伝子の同一性が確認された。外骨格領域をプローブに用いた場合、いずれの世代においてもバンドは検出されなかった。

15

以上の結果から、本組換え体には 1 コピーのベクター-pSYN12274 の T-DNA 領域がゲノムの 1 カ所に挿入されており、後代へ安定して伝達していることが確認された。

- 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

20

—

- 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

25

米国シンジェンタ社の温室において、本組換え体の複数世代を栽培し、eCry3.1Ab 蛋白質及び PMI 蛋白質の発現量を ELISA 法により測定した。その結果、複数世代において、eCry3.1Ab 蛋白質と PMI 蛋白質が安定して発現していることが示された。

30

以上のことから、本組換え体における eCry3.1Ab 蛋白質と PMI 蛋白質の発現は、個体間及び世代間で安定的に発現していることが確認された。

- ⑤ ウイルス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

35

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

サザンブロット解析による特異的な検出及び識別が可能である(別紙 8)。

5

(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

10

本組換え体には *ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子が導入され、それぞれ eCry3.1Ab 蛋白質と PMI 蛋白質を発現している。eCry3.1Ab 蛋白質はコウチュウ目害虫抵抗性を付与し、コウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワームに対し、抵抗性を示すことが米国のほ場生物検定試験で確認されている。一方、PMI 蛋白質は本組換え体の形質転換時の選抜マーカーで、本組換え体はマンノースを炭素源として利用できる。

15

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

20 a 形態及び生育の特性

2007 年に米国の 5 カ所のほ場、2008 年に米国の 12 カ所のほ場において発芽苗数、初期生育程度、50%絹糸抽出積算温度、50%開花積算温度、後期生育程度、稈長、着雌穂高、収穫種子重量及び収量の調査を行った。その結果、2007 年の試験では 50%開花積算温度及び稈長以外、2008 年の試験では収量以外の全ての調査項目で、本組換え体と非組換え体との間に有意差は認められなかった(別紙 10)。有意差の認められた 50%開花積算温度は本組換え体が 1230、非組換え体が 1247、稈長は本組換え体が 216 cm、非組換え体が 210 cm、収量は本組換え体が 9627.0 kg/ha、非組換え体が 8801.5 kg/ha であった。

25

30 b 生育初期における低温又は高温耐性

米国シンジェンタ社の温室にて本組換え体と非組換え体を播種後に、冬季を想定した設定の人工気象器に移し、生育状況を観察した結果、本組換え体と非組換え体のどちらも移動後に枯死した。

35

c 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死する。成熟後に栄養繁殖する

という報告や再度結実して種子を生産するという報告はなされていない。また、これまで米国で実施されたほ場試験において、本組換え体は非組換え体と同様に成熟後に枯死することが観察されている。

#### 5 d 花粉の稔性及びサイズ

米国シンジェンタ社の温室において栽培した本組換え体及び非組換え体の花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色して顕微鏡下で観察した結果、花粉の稔性及びサイズに本組換え体と対照の非組換え体との間で有意差は認められなかった（別紙 11）。

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：

15 米国で実施したほ場試験での収量調査が行われたが、本組換え体と非組換え体との間で有意差は認められなかった（別紙 10）。

脱粒性：

20 トウモロコシの種子は雌穂に着生し、雌穂は苞皮で覆われているため、自然に脱粒することはない（文献 2）。実際に米国で行われたほ場試験において本組換え体も非組換え体と同様に苞皮で覆われていることが観察されており、自然条件下での脱粒は観察されていない。

休眠性及び発芽率：

25 米国にて休眠性試験は行っていない。発芽率については本組換え体と非組換え体との間で有意差は認められなかった（別紙 12）。なお、確認のため隔離ほ場において、収穫種子の発芽率の調査を行うことで休眠性の確認を行う予定である。

#### f 交雑率

30 我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているとの報告はないことから、交雑率の試験は行わなかった。

#### g 有害物質の産生性

35 本組換え体における有害物質の産生性について、米国シンジェンタ社の温室において本組換え体と非組換え体を成熟期までポットで栽培し、その植物体と栽培土壌を用いて以下の試験を実施した。

後作試験：

植物体栽培後の各土壌にハツカダイコンを播種し発芽率及び乾燥重を測定した。その結果、本組換え体と非組換え体との間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった(別紙13)。

5 鋤込み試験：

各植物体の葉及び茎を収穫、乾燥、細断した後に、土壌と混和してハツカダイコンを播種し、発芽率及び乾燥重を測定した。その結果、本組換え体と非組換え体との間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった(別紙13)。

10 なお、確認のため、隔離ほ場試験において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施する予定である。

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

15 (1) 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

(2) 使用等の方法

20 所在地：静岡県島田市神座138番地

名称：シンジェンタジャパン株式会社 研究部 中央研究所  
神座サイト 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成23年3月31日まで

25 隔離ほ場の施設

- 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。
- 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。
- 30 3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換え体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、当該トウモロコシの隔離ほ場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、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。

35 隔離ほ場での作業要領

- 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。
- 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、本

組換え体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鋤込む等により、確実に不活化する。
- 5 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、除雄又は雄穂の袋掛けを行う。
- 10 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。
- 7) 1)から 6)まで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。

15

(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

—

- 20 (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

添付の「緊急措置計画書」を参照。

- 25 (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

—

- 30 (6) 国外における使用等に関する情報

本組換え体に関して、2003年から2008年までに米国においてはほ場試験が実施されている。なお、米国では2010年に米国農務省(USDA)に対する無規制栽培(商業栽培)の許可申請と、米国食品医薬局(FDA)に対する食品及び飼料としての利用申請をそれぞれ行う予定である。

35

## 第2 項目ごとの生物多様性影響評価

### 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

トウモロコシは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

10 本組換え体と対照となる非組換え体の競合における優位性に関わる諸形質として、2007年及び2008年に米国において、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、脱粒性及び発芽率を検討した(本評価書の第1.2.(6).②、16ページ)。その結果、2007年の試験では50%開花積算温度及び稈長で、2008年の試験では収量で本組換え体と非組換え体との間に有意差が認められたものの、  
15 それ以外の項目では有意差は認められなかった。なお、有意差の認められた50%開花積算温度は本組換え体が1230、非組換え体が1247、稈長は本組換え体が216 cm、非組換え体が210 cm、収量は本組換え体が9627.0 kg/ha、非組換え体が8801.5 kg/haであった。なお、2008年の試験では収量に10%以上の差異が見られた。その原因として栽培時に多  
20 量の雨が降ったため殺虫剤が流出したことで、非組換え体がコウチュウ目害虫の食害を受けたためと考えられる。

しかし、有意差が見られた形質について栽培年度間で一貫した整合性が見られなかったことから、これらの差異が導入した遺伝子によりもたらされたものとは考えにくい。よって、本組換え体において競合における優位性が高まることはないと考えられる。

25

本組換え体には eCry3.1Ab 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害は、トウモロコシが我が国の自然環境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、抵抗性が付与されても本組換え体において競合における優位性が高まることはないと考えられる。

30

さらに、本組換え体では導入された *pmi* 遺伝子の発現によって PMI 蛋白質を発現して、マンノースを炭素源として利用することができるが、我が国の自然条件下においてはマンノース以外の炭素源も存在することから、この形質を有することにより本組換え体において競合における優位性が高まることはないと考えられる。

35

以上のことから、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場での本組換え体の使用に関し、競合における優位性に関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、本組換え体は、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の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がないと判断された。

15

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

20 宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性については、米国において鋤込み試験及び後作試験を実施したが、本組換え体と非組換え体との間で有意差は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). ②、16  
25 ページ)。

本組換え体において *ecry3.1Ab* 遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質は、改変 Cry3Aa2 及び Cry1Ab 蛋白質からなり、従来 of Cry 蛋白質と同様の構造、機能を持つことから、従来 of Cry 蛋白質と同様、酵素活性を持つとは考えにくい。また、選抜マーカーとして導入された *pmi* 遺伝子によって発現する PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に特異的で他の天然基質は知られていない。よって、本組換え体において産生される eCry3.1Ab 蛋白質や PMI 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられた。なお、eCry3.1Ab 蛋白質及び PMI 蛋白質が既知アレルゲンや毒性蛋白質と相同性を持たないことを、それぞれデータベース検索によ  
35 って確認している(本評価書の第 1. 2. (1).ロ. ②、10ページ)。

本組換え体には eCry3.1Ab 蛋白質産生性が付与されている。eCry3.1Ab 蛋白質は、ウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*) (別紙 5-2)、ノーザンコーン

- ルートワーム(*Diabrotica longicornis barberi*) (別紙 2) 及びコロラドポテトビートル(コロラドハムシ)(*Leptinotarsa decemlineata*) (別紙 5-1) といったコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示すことから、本組換え体を我が国の隔離ほ場で栽培した際に、飛散した花粉が周辺の食餌植物に堆積し、それを摂食したコウチュウ目昆虫の幼虫が何らかの影響を受ける、もしくは生育している本組換え体を直接摂食する可能性が考えられる。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等としてコウチュウ目昆虫が特定された。

## (2) 影響の具体的内容の評価

- 10 米国で行われた分析から、本組換え体における eCry3.1Ab 蛋白質の発現量は、花粉においては検出限界値(0.08 µg/g 乾燥重)以下である。一方、標的コウチュウ目昆虫であるウエスタンコーンルートワームに対する eCry3.1Ab 蛋白質の LC<sub>50</sub> 値は 40 µg/ml であることが示されている(別紙 5)。

- 15 これらの分析値に基づき、本組換え体の花粉における発現量を検出限界値の 0.08 µg/g とし、一般的な花粉 1 粒当たりの重量を約  $6.4 \times 10^{-7}$  g(文献 49)として以下のように計算すると、感受性昆虫であるウエスタンコーンルートワームで毒性影響を生じるには、約 7 億 8 千万粒/匹の花粉が必要となる。

- 20 計算式：

影響を及ぼす花粉粒数 = (eCry3.1Ab 蛋白質の LC<sub>50</sub> 値 = 40 µg) ÷ {花粉 1 粒当たりの eCry3.1Ab 蛋白質量 = (花粉 1 g 当たりの eCry3.1Ab 量 = 0.08 µg) × (花粉 1 粒重量 =  $6.4 \times 10^{-7}$  g)}

- 25 (3) 影響の生じやすさの評価

本組換え体から飛散した花粉をコウチュウ目昆虫が摂食する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周辺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。

- 30

- 我が国において、トウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ(*Helianthus annuus*)とイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)の葉への花粉の堆積密度の調査が行われている。調査の結果、トウモロコシほ場の縁(0 m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm<sup>2</sup>、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm<sup>2</sup>であった。しかし、ほ場から 5 m 離れると花粉の最大堆積密度はそれぞれ 19.6 粒/cm<sup>2</sup>と 22.2 粒/cm<sup>2</sup>に減少していた。ヒマワリについては 5 m 以上離れた場合についても調査されているが、10 m 離れると花粉堆積密度は全て 10 粒/cm<sup>2</sup>以内であった(文献 50)。

北米でも、トウモロコシほ場周辺のトウワタ(*Asclepias syriaca*)について、堆積した花粉密度についての調査が行われている。調査の結果、トウモロコシほ場から 1 m、2 m、4 ~5 m 離れるごとに、花粉の堆積密度は平均で 35.4 粒/cm<sup>2</sup>、14.2 粒/cm<sup>2</sup>、8.1 粒/cm<sup>2</sup>へと減少することが明らかとなっている(文献 51)。さらに、カナダのトウモロコシほ場周辺のトウワタの葉上に堆積した花粉密度が調査され、ほ場の縁から 1 m 及び 5 m 離れた地点での堆積密度は、それぞれ平均で 28 粒/cm<sup>2</sup> 及び 1.4 粒/cm<sup>2</sup> であったと報告されている(文献 52)。

これらの調査結果から、トウモロコシほ場周辺に堆積する花粉量は、トウモロコシほ場から 10 m 以上離れると極めて低くなると考えられた。本組換え体から飛散した花粉を食餌植物とともに摂食する可能性のあるコウチュウ目昆虫が、本組換え体の栽培ほ場周辺に局所的に生育しているとは考えにくいこと、さらに本組換え体花粉での eCry3.1Ab 蛋白質の発現量が極めて低いことから、コウチュウ目昆虫が個体群レベルで本組換え体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。

また、本組換え体を直接摂食する可能性のあるコウチュウ目昆虫についても、本組換え体の栽培ほ場周辺に局所的に生育しているとは考えにくいことから、コウチュウ目昆虫が個体群レベルで本組換え体を直接摂食することによる影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

#### (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、本組換え体は、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の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がないと判断された。

### 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

トウモロコシは近縁野生種であるテオシントと自然交雑可能であるが、我が国には交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、交雑性によっ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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

10 4. その他

上記の他に、本組換え体に関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断された。

### 第3 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：トウモロコシは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。本組換え体と対照の非組換え体との間で、2007年及び2008年に米国において、競合における優位性に関わる諸形質(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、脱粒性及び発芽率)を比較検討した。その結果、2007年の試験では50%開花積算温度及び稈長で、2008年の試験では収量で本組換え体と非組換え体との間で有意差が認められたものの、それ以外の項目では有意差は認められなかった。しかし、有意差が見られた形質について栽培年度間で一貫した整合性が見られなかったことから、これらの差異が導入した遺伝子によりもたらされたものとは考えにくい。また、本組換え体は導入遺伝子によって、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する eCry3.1Ab 蛋白質及びマンノースを炭素源として利用できる PMI 蛋白質を産生しているが、両形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

したがって、本組換え体は、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の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がないと判断された。

有害物質の産生性：トウモロコシは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。本組換え体と対照の非組換え体との間で、有害物質の産生性を比較検討するため、米国において鋤込み試験及び後作試験を実施したが、いずれも有意差は認められなかった。本組換え体において導入遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 及び Cry1Ab 蛋白質からなり、従来の Cry 蛋白質と同様の構造、機能を持つことから、従来の Cry 蛋白質と同様、酵素活性を持つとは考えにくい。同様に、選抜マーカーとして導入された *pmi* 遺伝子によって発現する PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で他の天然基質は知られていない。したがって、両蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられた。また、eCry3.1Ab 蛋白質は、ウェスタンコーンルートワーム、ノーザンコーンルートワーム及びコロラドポテトビートルといったコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示すことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等としてコウチュウ目昆虫が特定されたが、本組換え体の花粉飛散によるコウチュウ目昆虫への影響を考察したところ、毒性影響を生じるには約7億8千万粒の花粉が必要と推定された。トウモロコシの花粉飛散堆積密度に関する情報、さらに本組換え体花粉での eCry3.1Ab 蛋白質の発現量が極めて低いことから、本組換え体の花粉飛散によりコウチュウ目昆虫が個体群レベルで影響を受ける可能性は考えにくい。また、本組換え体を直接摂食する可能性のあるコウチュウ目昆虫についても、本組換え体の栽培ほ場周辺に局所的に生育しているとは考えにくいことから、コウチュウ目昆虫が個体群レベルで本組換え体を直接摂食すること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、本組換え体は、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の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がないと判断された。

- 5 交雑性：我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種の自生は報告されていない。  
したがって、本組換え体は交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

- 10 以上のことから、本組換え体は、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の付随する行為の範囲内では、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

引用文献

社外秘により非開示

# 緊急措置計画書

平成 21 年 1 月 9 日

氏名 シンジェンタシード株式会社  
代表取締役社長 大伴 秀郎  
住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1) (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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定のために関係機関への協力等を必要に応じて行う。更に、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

## 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

個人名・所属は個人情報につき非開示。

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

試験栽培の担当者から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行なう。

## 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

本組換え体の使用に伴い生物多様性影響を生ずるおそれがあると認めた場合には、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使用等をしている者に連絡するとともに、弊社のホームページにおいて情報提供を行い、問い合わせ専用窓口を設置する。

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



具体的な措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実施する。

#### 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換え体が我が国において生物多様性影響を及ぼすおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。