

チョ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(改変 *cry1F*, *cry1Ab*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507×MON810×NK603, OECD UI: DAS-01507-1×MON-00810-6×MON-00603-6) (*B.t. Cry1F* maize line 1507、MON810 及びNK603 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の概要	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
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1) 供与核酸に関する情報	5
(2) ベクターに関する情報	13
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	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 ...	19
(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
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	21
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
(1) 使用等の内容	28
(2) 使用等の方法	28
(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	28
(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	28
(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	28
(6) 国外における使用等に関する情報	29
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	30
1 競合における優位性	30
2 有害物質の産生性	31
3 交雑性	33
4 その他の性質	34
第三 生物多様性影響の総合的評価	35
緊急措置計画書	37
参考文献	39
別紙リスト	39

第一種使用規程承認申請書

5

平成 22 年 7 月 16 日

農林水産大臣 山田 正彦 殿
環境大臣 小沢 鋭仁 殿

10

氏名
デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔

申請者

15

住所

東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

20

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	チョウ目害虫抵抗性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 (改変 <i>cry1F</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>pat</i> , <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (1507×MON810×NK603, OECD UI: DAS-01507-1 × MON-00810-6 × MON-00603-6) (<i>B.t.</i> Cry1F maize line 1507、MON810 及び NK603 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	—

25

生物多様性影響評価書の概要

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 (OECD, 2003)

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

DAS-01507-1 : Hi-II

MON-00810-6 : A188×B73

MON-00603-6 : AW×CW

25

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの原産地は、メキシコ、中米又は南米とされる (OECD, 2003)。国内外の自然環境下で、現在トウモロコシが自生している既知の地域はない。

30

(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

トウモロコシは、9000年前に南部メキシコで栽培植物化されたと考えられており、コロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、世界へと伝播し、現在では広く栽培され、食品、飼料等として利用されている (OECD, 2003)。

40

トウモロコシは、我が国においても長い栽培の歴史がある。我が国へは、天正年間(1580年頃)に、ポルトガル人が伝えたのが最初であるとされており、九州、四国や本州で栽培されるようになった。明治時代に北海道開拓使によって、近代的品種が米国から輸入されるようになり、現在では、北海道から九州まで広く栽培されている (戸澤, 2005)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

栽培地域：

5 我が国における 2008 年のトウモロコシの栽培面積は、青刈りトウモロコシ（デ
ント種又はフリント種）が 9 万 800ha、スイートコーンが 2 万 5,800ha で、主な
栽培地域はいずれも北海道である（農林水産省, 2009）。国外では、主に温暖地域
で栽培され（OECD, 2003）、主要生産国は、米国、中国及びブラジルである
（FAOSTAT, 2010）。

10

栽培方法：

15 米国を代表とする大規模な機械化された近代的方法から、古くから南米アンデ
ス高地等で行われている、種子を手で播くような伝統的な方法まで、様々な方法
で栽培されている。我が国では、平均気温が 10～14℃に達する 4 月上旬～5 月
中下旬に、栽植密度 10 アール当たり 6,500～9,000 株、播種深度約 3cm で播種し、
発芽後に中耕、除草、培土等の管理を行う。子実用トウモロコシは、水分含量が
26～28%になった時期に収穫するのが好ましく、サイレージ用（青刈り）トウモ
ロコシは、黄熟期に茎葉全体を収穫する（菊池, 1987）。

20

流通実態：

25 コメ、コムギとともに世界三大穀物の一つとされている。2007 年の世界総生産
量は約 7 億 8,810 万トンであり、最大の生産国は米国で、世界総生産量の 42%を
占めている（FAOSTAT, 2010）。種子のデンプン構成による分類では、デント種、
フリント種、スイート種等があり、その内、デント種が世界的な生産の主流であ
る（戸澤, 2005）。貿易統計（財務省貿易統計, 2009）によると、2008 年に我が国
は約 1,650 万トンを輸入しており、その 99%にあたる約 1,630 万トンは米国から
である。

用途：

30 種子は主に飼料として利用され、食品、工業分野では、デンプン、コーングリ
ッツ、コーンオイル及びエタノールの原料として利用される。青刈りした茎葉は
飼料として利用される。スイートコーンは生食用又は缶詰となる（菊池, 1987）。

(3) 生理学的及び生態学的特性

35

イ 基本的特性

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

40

トウモロコシの発芽最低温度は10～11℃、最適温度は33℃である（農業技術大系, 2004）。トウモロコシは古くから栽培植物化され、自然環境で生存する能力を

5 失った。前年に収穫された種子は、越冬し翌年に発芽するが、本体は、雑草としては生存できない。成長点が地上に出てから（5～7葉期）6～8時間以上、零度以下の外気にさらされると生存できない。温帯域での晩春の軽い霜により葉やけを起こすが、霜で損傷を受けた葉の部分は成熟するまで残っているため、致命的な損傷にはならない。成熟に必要な湿度と霜の降りない日数などの条件が揃えば、温帯域でよく育つ（OECD, 2003）。

ハ 捕食性又は寄生性

10 —

ニ 繁殖又は増殖の様式

15 ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌穂から脱粒し、散布される可能性は低い（OECD, 2003）。また、種子の休眠性はほとんどないとされ（CFIA, 1994）、種子の寿命は、種子水分 12%、温度 10℃、相対湿度 55%以内の条件で 6～8年である（農業技術大系, 2004）。

20

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

自然条件下で種子以外に植物体を再生しうる組織又は器官は知られていない。

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ずる特性を有する場合はその程度

30 典型的な風媒花で、他殖率は 95～99%である（農業技術大系, 2004）。交雑可能な近縁野生種としてテオシント及び *Tripsacum* 属があるが、自然条件における *Tripsacum* 属との交雑は起こらない。テオシントはメキシコ及びグアテマラに自生し、*Tripsacum* 属は米国、中米及び南米に自生するが（OECD, 2003）、これらの我が国における自生は報告されていない。アポミクシスの特性を有するとの報告はない。

35

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

40 一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている（OECD, 2003）。晴天の場合、午前 10 時～11 時頃に花粉の放出が最も盛んとなり、午後になると激減する（菊池, 1987）。花粉の寿命は、通常 10～30 分で、好適条件ではさらに長い（CFIA, 1994）。花粉は球形で、直径は約 90～100 μm である（Pleasant *et al.*, 2001）。受粉は主に風媒によって行われる（OECD, 2003）。

我が国においてトウモロコシほ場周辺のヒマワリとイヌホウズキ葉上に堆積する花粉量を測定した結果、ほ場端から 1m で約 160 粒/cm²、5m で 20 粒/cm²、10m では 10 粒/cm²以下であった (Shirai and Takahashi, 2005)。北米における試験では、トウワタ(*Asclepias syriaca*)葉上に堆積した花粉密度は、ほ場端から 1m で 35.4 粒/cm²、2m で 14.2 粒/cm²、3m で 5~20 粒/cm²、4-5m で 8.1 粒/cm²、10m は 1 粒/cm²であった (Hansen-Jesse and Obrycki, 2000 ; Pleasants *et al.*, 2001)。

ホ 病原性

10 —

へ 有害物質の産生性

15 トウモロコシにおいて、野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

20 —

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

25 チョウ目害虫抵抗性及び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 (改変 *cry1F*, *cry1Ab*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507 × MON810 × NK603, OECD UI: DAS-01507-1×MON-00810-6×MON-00603-6) (以下、「本スタック系統」という。) は、下記の 3 つの遺伝子組換えトウモロコシを、従来の交雑育種法により交配して育成した品種である。

30 本スタック系統は、一代雑種品種 (F1) として商品化されるため、収穫される種子には遺伝的分離により本スタック系統の親系統それぞれの導入遺伝子の組合せからなるトウモロコシが含まれる。

35 (a) チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グル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) (「DAS-01507-1」)

40 (b) チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* L.)(MON810, OECD UI : MON-00810-6) (「MON-00810-6」)

(c) 除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(NK603, OECD UI : MON-00603-6) (「MON-00603-6」)

本スタック系統の親系統である DAS-01507-1 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/1507ap.pdf) は、米国ダウ・アグロサイエンス社と米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が共同開発し、
5 MON-00810-6 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/MON810ap.pdf 及び USDA (1996)) 及び MON-00603-6 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/NK603ap.pdf 及び USDA (2000)) は米国モンサント社が開発した。各親系統には、以下の遺伝子が導入されている。

- 10 DAS-01507-1 : チョウ目害虫抵抗性を付与するための改変 *cry1F* 遺伝子及び除草剤グルホシネート耐性を付与するための *pat* 遺伝子
MON-00810-6 : チョウ目害虫抵抗性を付与するための *cry1Ab* 遺伝子
MON-00603-6 : 除草剤グリホサート耐性を付与するための *cp4 epsps* 遺伝子

15 イ 構成及び構成要素の由来

親系統の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1～表 3 (7～9ページ) に示した。

20 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

25 供与核酸の各構成要素の機能を表 1～表 3 (7～9ページ) に示した。

表 1 DAS-01507-1 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット		
<i>UBIZM1(2) Promoter</i>	1.98	<i>Z. mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター* (イントロン及び5'非翻訳領域を含む)。
改変 <i>cry1F</i>	1.82	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の改変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塩基配列が改変され、アミノ酸配列の604番目のフェニルアラニンがロイシンに置換されている。
<i>ORF25PolyA Terminator</i>	0.72	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi5955由来の転写を停止するためのターミネーター。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>CAMV35S Promoter</i>	0.53	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。
<i>pat</i>	0.55	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノ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塩基配列が改変されている。改変によるアミノ酸配列の変化はない。
<i>CAMV35S Terminator</i>	0.21	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。

* 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。

表 2 MON-00810-6 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>cry1Ab</i> 遺伝子発現カセット		
E35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に構成的に目的遺伝子を発現させる。
hsp70 イントロン	0.80	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
<i>cry1Ab</i>	3.46	土壌中に存在する <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の <i>Cry1Ab</i> 蛋白質をコードする遺伝子。
NOS 3'	0.26	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット (挿入遺伝子の解析の結果、MON-00810-6 中には挿入されていない)		
E35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に構成的に目的遺伝子を発現させる。
hsp70 イントロン	0.8	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP 2	0.31	<i>Arabidopsis</i> の <i>epsps</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列の N 末端配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.4	<i>Agrobacterium</i> 由来の、5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子に基づいた合成配列。グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。
NOS 3'	0.26	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。
<i>GOX</i> 遺伝子発現カセット (挿入遺伝子の解析の結果、MON-00810-6 中には挿入されていない)		
E35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に構成的に目的遺伝子を発現させる。
hsp70 イントロン	0.80	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP 1	0.26	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>rubisco</i> 遺伝子の small subunit 1A の葉緑体輸送ペプチド配列の N 末端。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>GOX</i>	1.3	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) に基づいた合成配列。 <i>GOX</i> 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	0.26	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアダニル化シグナルを含む。

表 3 MON-00603-6 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット①		
P-ract1	0.9	イネ由来のアクチン1遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を構成的に発現させる。
ract1 intron	0.5	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子を発現させる。
CTP 2	0.2	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配列である。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.4	<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。
NOS 3'	0.3	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA由来のノパリン合成酵素(NOS)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。
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット②		
E35S	0.6	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に構成的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 Intron	0.8	トウモロコシの熱ストレス蛋白質(heat shock protein)遺伝子のイントロン。ZmHsp70イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP2	0.22	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配列である。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.36	<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。
NOS 3'	0.26	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA由来のノパリン合成酵素(NOS)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。

- 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

5

- a. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

Bt 蛋白質：

10 改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質を含む Bt 蛋白質は、一般に害虫の中腸細胞で特異的受容体に結合して細胞に小孔を形成し、中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示す (Schnepf *et al.*, 1998)。Bt 蛋白質は、殺虫対象とする昆虫相に特異性を有する (白井, 2003)。

改変 Cry1F 蛋白質：

15 改変 Cry1F 蛋白質は、*B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来 δ -エンドトキシンであり、殺虫性結晶蛋白質 (Bt 蛋白質) の一種である。

20 改変 Cry1F 蛋白質は、European corn borer (ヨーロッパアワノメイガ、*Ostrinia nubilalis*)、Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*)、Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) 等のチョウ目昆虫に高い殺虫活性を有し、チョウ目昆虫以外の哺乳類、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、非標的生物に対して毒性は認められなかった (EPA, 2005)。

Cry1Ab 蛋白質：

25 Cry1Ab 蛋白質は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来 Bt 蛋白質の一種である。本蛋白質の機能は改変 Cry1F 蛋白質と同じであるが、害虫の中腸細胞における受容体が異なる (Hua *et al.*, 2001)。

30 Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目害虫である European corn borer, Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*), Southern cornstalk borer (*Diatraea crambidoides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm, Stalk borer (*Papaipema nebris*) に殺虫活性を有し、チョウ目以外の哺乳類、鳥類、コウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目昆虫等、非標的生物に対して毒性は認められていない (USDA, 1995)。

35

改変 Cry1F 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質の同時発現によるチョウ目害虫の殺虫効果：

40 改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質はいずれも、チョウ目害虫に殺虫活性を有する。一般に、1 種類の殺虫剤を利用し続けた場合、耐性害虫が発生することが知られている。しかしながら、本スタック系統において発現する改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質の中腸細胞における受容体はそれぞれ異なる (Hua *et al.*, 2001)。したがって、チョウ目害虫がこれら 2 つの蛋白質に同時に耐性を得る可能性は低くなるため、どちらかの蛋白質だけの場合に比べ、耐性害虫の出現を低くすることが期

待される。

PAT 蛋白質：

5 除草剤グルホシネートは、その活性成分である *L*-グルホシネートにより、グルタミン合成酵素活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。PAT 蛋白質は、*L*-グルホシネートをアセチル化し、無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。

CP4 EPSPS 蛋白質：

10 除草剤グリホサートは、植物中の芳香族アミノ酸合成経路であるシキミ酸経路中の 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)の活性を阻害するため、植物中に芳香族アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる。CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性を有し、シキミ酸経路が阻害されないため、植物に除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

15

b. 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の相同性

20 改変 Cry1F、Cry1Ab、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質と、既知アレルギー蛋白質との構造相同性について、データベース (CP4 EPSPS 蛋白質は AD_2010、TOX_2010 及び PRT_2010、その他蛋白質は FARRP10) を用いたアミノ酸配列相同性検索を 2010 年に行った結果、既知のアレルギー蛋白質との構造相同性はないことが確認されている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

宿主の持つ代謝系を変化させる可能性について、各発現蛋白質について検討した。

5

Cry 蛋白質

改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質が酵素活性を有することは報告されていない。

PAT 蛋白質

10 PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や、*D*-グルホシネートを基質としない (OECD, 1999)。

CP4 EPSPS 蛋白質

15 EPSPS は、芳香族アミノ酸を合成するシキミ酸経路における律速酵素ではなく、CP4 EPSPS 蛋白質が産生されることにより、EPSPS 活性が高まったとしても、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。実際、除草剤グリホサート耐性遺伝子組換え作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の芳香族アミノ酸含量は非組換え作物との間で相違のないことが確認されている (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/NK603ap.pdf) 。

20

EPSPS は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)と特異的に反応する。S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、その反応性は S3P の 200 万分の 1 であり、生体内で基質として反応するとは考え難い (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/NK603ap.pdf) 。

25

30

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5

親系統の作出に用いたベクターは、以下のとおりである。

DAS-01507-1 : 大腸菌 (*Escherichia coli*) プラスミド pUC19 から構築された
プラスミド PHP8999 (図 1、14ページ)。

10

MON-00810-6 : 大腸菌 プラスミド pUC119 から構築されたプラスミド
PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 (図 2、15ページ)。

MON-00603-6 : 大腸菌 プラスミド pUC119 から構築されたプラスミド
PV-ZMGT32 (図 3、16ページ)。

ロ 特性

15

① ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いたプラスミドの塩基数は、以下のとおりである。

DAS-01507-1 (PHP8999) : 9,504 bp

20

MON-00810-6 : PV-ZMBK07 は 7,794 bp、PV-ZMGT10 は 9,427 bp

MON-00603-6 (PV-ZMGT32) : 9,307 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

25

親系統の選抜マーカーとして、以下の遺伝子が利用された。これらマーカー遺
伝子は、親系統に導入されていないことが確認されている。

DAS-01507-1 : カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 遺伝子)

MON-00810-6 : β -D-ガラクトシダーゼ (*LacZ* 蛋白質) の部分的コード配列
(*LacZ* 遺伝子) 及びカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子
(*nptII* 遺伝子)

30

MON-00603-6 : カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 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

35

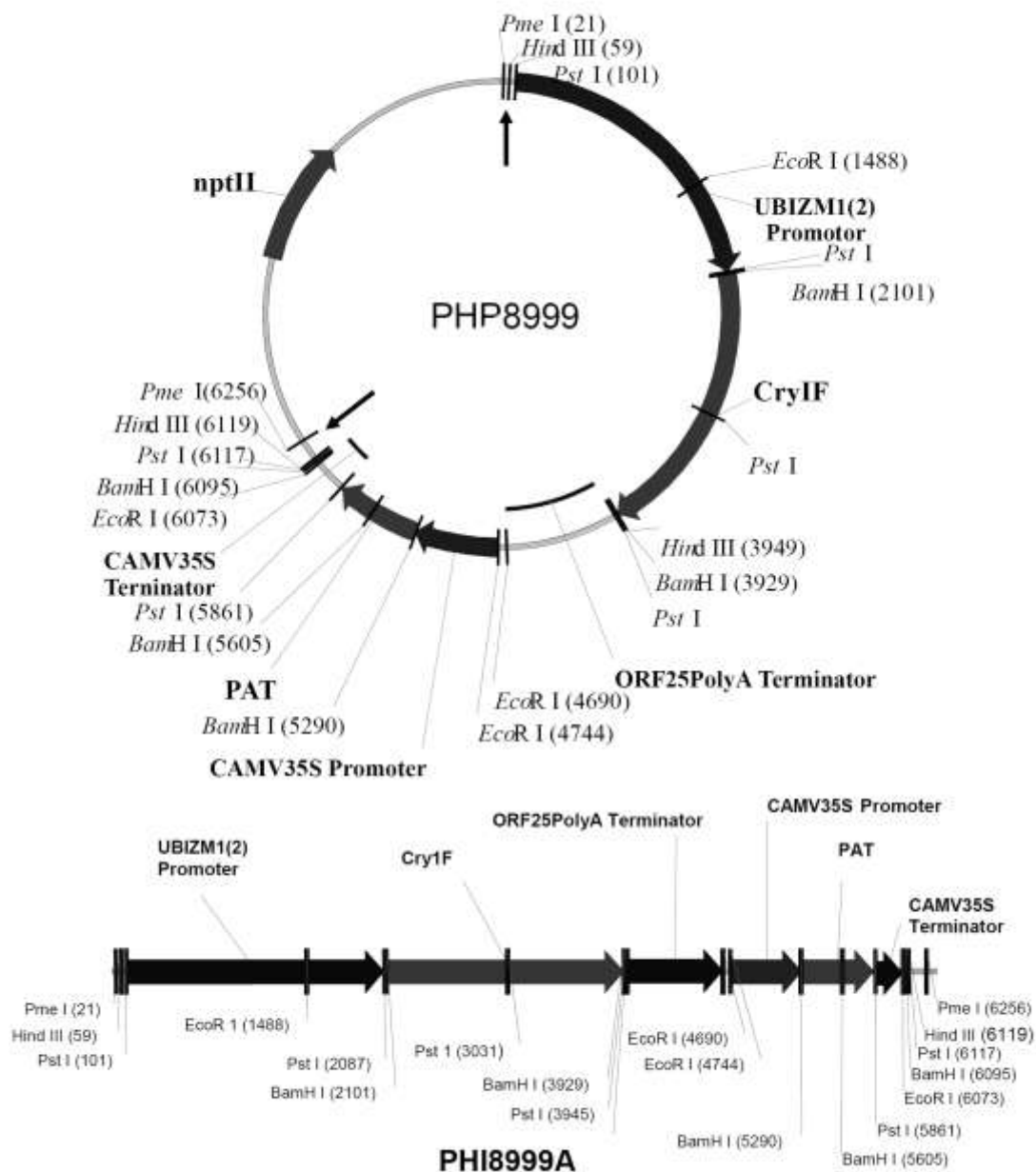
これらベクターに感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5

親系統 DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の作出に用いた供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位を、図 1～図 3 (14～16ページ) に示した。



10 図 1 プラスミド PHP8999* (上図) 及び挿入 DNA 領域 PHI8999A (下図) の構成
* DAS-01507-1 の作出に用いたベクター

プラスミド PHP8999 を制限酵素 *Pme* I で処理し (上図 2 箇所) の位置で切断、直鎖状 DNA 断片である PHI8999A (下図) を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

15

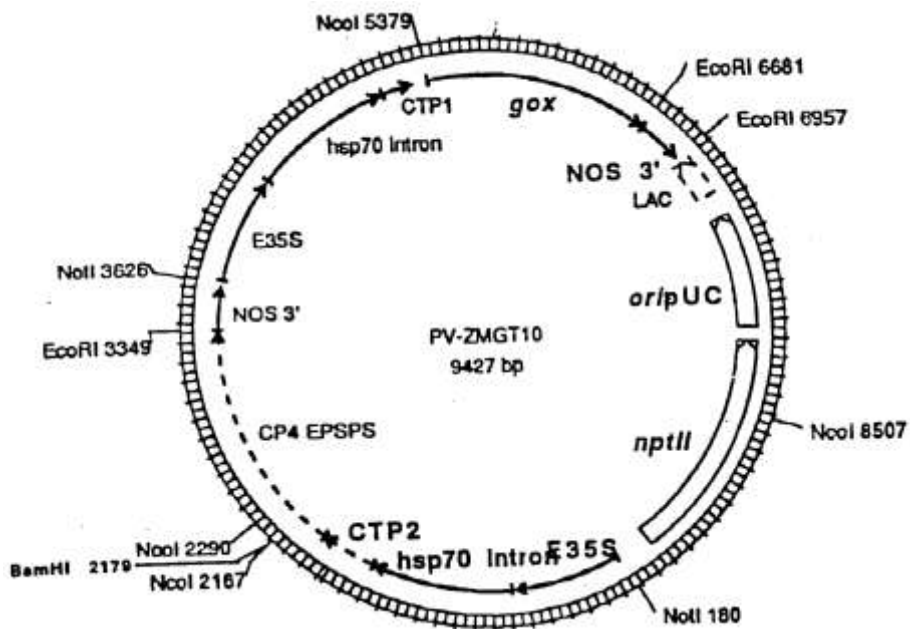
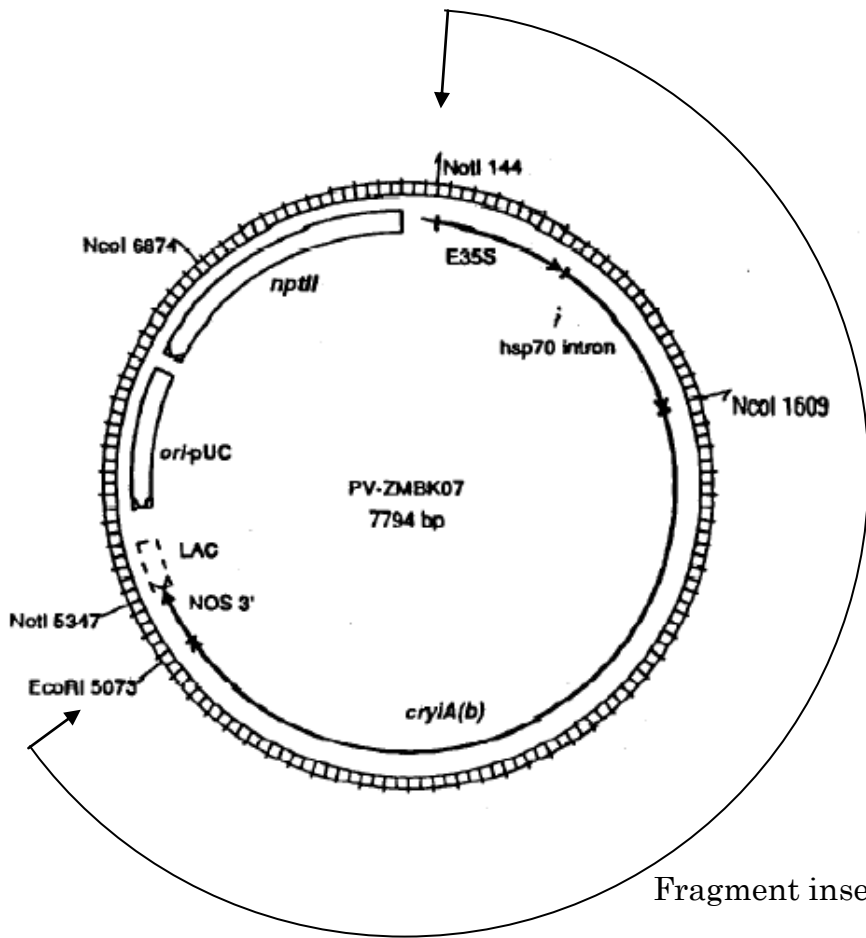
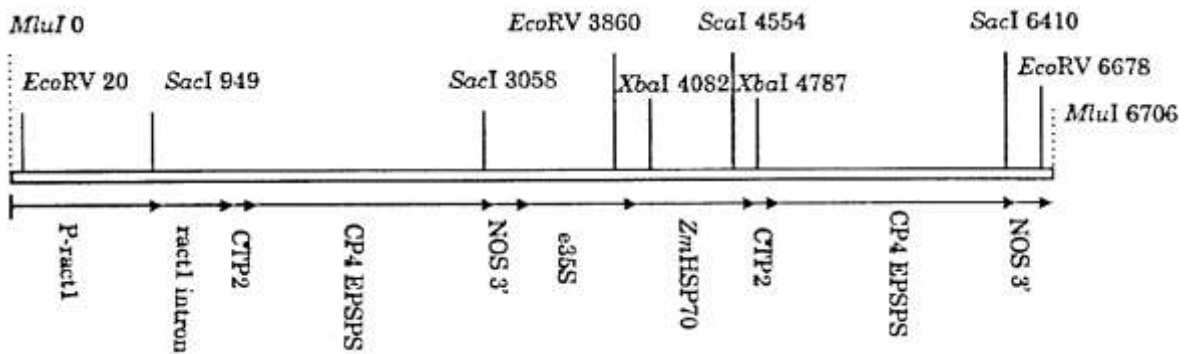
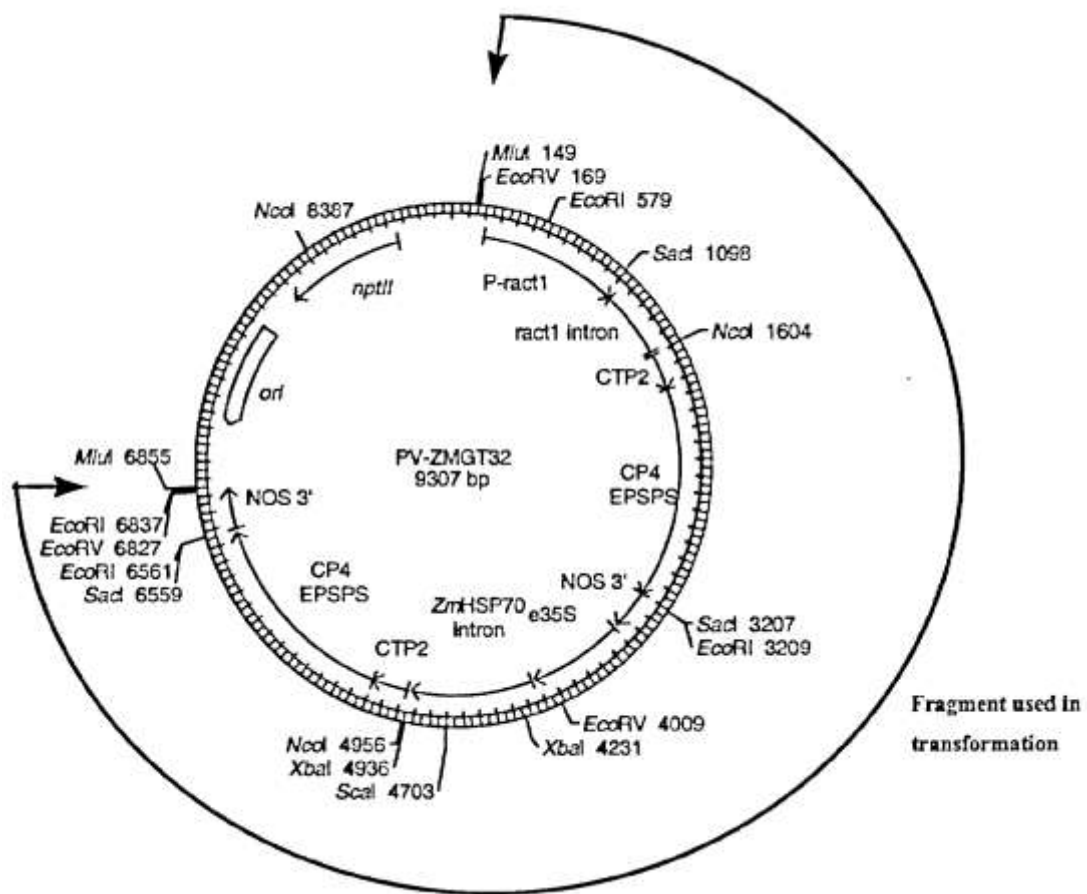


図 2 プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10* の構成

5

* MON-00810-6 の作出に用いたベクター。

実際に宿主に移入されたのは、「Fragment inserted」の領域。



5

図 3 プラスミド PV-ZMGT32* (上図) 及び挿入 DNA 領域 PV-ZMGT32L (下図) の構成

* MON-00603-6 の作出に用いたベクター

10

プラスミド PV-ZMGT32 を制限酵素 *Mlu*I で処理し (上図 2 箇所の矢印の位置で切断)、直鎖状 DNA 断片である PV-ZMGT32L (下図) を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入は、いずれもパーティクルガン法が用いられた。

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方法

10 核酸が移入された細胞は、以下を加えた培地で培養することにより選抜された。

DAS-01507-1：グルホシネート

MON-00810-6 及び MON-00603-6：グリホサート

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

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

25

本スタック系統は、交雑育種法により DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 を交配して作出した。その経過を、図 4（18ページ；社外秘情報につき非開示）に示した。また、我が国におけるこれら親系統の承認状況は、表 4（18ページ）のとおりである。

(社外秘情報につき非開示)

図 4 本スタック系統の育成経過

5

表 4 我が国における親系統及び本スタック系統の承認状況

系 統	食 品	飼 料	環 境
DAS-01507-1	2002 年	2003 年	2005 年
MON-00810-6	2001 年	2003 年	2004 年
MON-00603-6	2001 年	2003 年	2004 年
本スタック系統	—*	—*	2010 年申請

* 本スタック系統に DAS-59122-7 を加えた DAS-01507-1×DAS-59122-7×MON-00810-6×MON-00603-6 系統 (4 種掛け合わせ品種) の申請を行っている。4 種掛け合わせ品種の食品及び飼料の安全性確認には、本スタック系統の確認が含まれる。

10

飼料については、2009 年に 4 種掛け合わせ品種の安全性確認が終了しており、本スタック系統の安全性も同時に確認された。

(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

DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の形質はメンデルの法則に従って伝達され、移入された核酸の複製物は、トウモロコシ染色体ゲノム上に存在することが確認されている。

10 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

DAS-01507-1 :

15 サザンブロット分析の結果、それぞれ 1 コピーの改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットがトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

20 なお、導入 DNA の塩基配列解析により、導入 DNA の 5'末端領域に改変 *cry1F* 遺伝子配列の一部が、5'末端及び 3'末端領域に *pat* 遺伝子配列の一部が、そして、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。

MON-00810-6 :

25 サザンブロット分析の結果、1コピーの *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な PV-ZMBK07 由来の DNA 断片がトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

30 なお、トウモロコシのゲノム中に挿入されたのは PV-ZMBK07 由来の Cry1Ab 蛋白質発現に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子や PV-ZMGT10 由来の *CP4 EPSPS* 遺伝子と *GOX* 遺伝子の発現カセットは存在しないことがサザンブロット分析により確認された。核酸が移入された細胞がグリホサートを添加した培地で選抜されたにもかかわらず (第一.2.(3).ハ.①、17ページ)、サザンブロット分析で *CP4 EPSPS* 遺伝子が挿入されていなかったのは、再分化個体の次世代で挿入遺伝子の分離が起きたためである可能性が考えられた (生物多様性影響評価書の概要、2004)。

MON-00603-6 :

40 サザンブロット分析の結果、1コピーの PV-ZMGT32L (2つの *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットから成る) がトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

なお、挿入遺伝子の 3'末端近傍に *P-ract1* の 217bp の断片が逆方向に移入され

ているが、この断片が新たな蛋白質の産生に関与していないことがウエスタンブロット分析により確認されている。また、*E35S*により誘導される *cp4 epsps* 遺伝子の塩基が MON-00603-6 作出時に変化し、CP4 EPSPS 蛋白質を構成するアミノ酸の 1 つが変化している。しかしながら、このアミノ酸は EPSPS 蛋白質ファミリーの活性に必須の 7 つのアミノ酸には含まれていないこと、この変化は蛋白質の活性部位及び三次元構造に影響を及ぼさないこと、元の蛋白質と酵素活性や免疫反応性が同等であることより、蛋白質の構造と機能は変化していないと考えられた。

5

10 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

本スタック系統の親系統の発現安定性は、以下の方法で確認した。

20 DAS-01507-1 : ELISA 法による改変 Cry1F 及び PAT 蛋白質の発現確認、チョウ目害虫抵抗性の生物検定、除草剤グルホシネート散布試験

MON-00810-6 : チョウ目害虫抵抗性の生物検定

MON-00603-6 : 除草剤グリホサート散布試験

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

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

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

検出の方法 :

35 各親系統 (DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6) のリアルタイム定量 PCR 法による系統特異的検出方法が、European Commission ウェブサイトに公開されている (Joint Research Centre, 2005~2006)。

感度 :

40 DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の定量限界は、いずれも 0.1% である。

信頼性：

DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の検出の方法については、European Network of GMO Laboratories 加盟のそれぞれ 14、14 及び 12 ヶ所の試験機関において、それぞれ 2、3 及び 2 反復で試験が行われ、信頼性が確認されている。

本スタック系統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又は植物体 1 個体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 本スタック系統に付与された特性は、DAS-01507-1 由来の改変 *cry1F* 遺伝子及び MON-00810-6 由来の *cry1Ab* 遺伝子によるチョウ目害虫抵抗性、DAS-01507-1 由来の *pat* 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性、並びに MON-00603-6 由来の *cp4 epsps* 遺伝子による除草剤グリホサート耐性である。

20 これら遺伝子により産生される蛋白質の機能的な相互作用の可能性について、害虫抵抗性蛋白質間、除草剤耐性蛋白質間、並びに害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質間の 3 つの観点から検討した。

害虫抵抗性蛋白質間での機能的な相互作用について

25

改変 Cry1F 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質は、いずれもチョウ目害虫に殺虫効果を示すが、害虫の中腸細胞においてそれぞれ異なる受容体に特異的に結合する (Hua *et al.*, 2001)。このことから、害虫抵抗性蛋白質が持つ殺虫効果の特異性には、蛋白質の構造が関与しており、そのような特異性に関与する領域に変化が生じなければ、標的昆虫に対する効果に影響を及ぼすことはないと考えられる。

30

以上に加え、これまでに承認されたスタック系統において、害虫抵抗性蛋白質が相乗的な効果を示したとの報告はないことから、本スタック系統において各親系統の殺虫効果が相加的に高まることは有り得るが、お互いの作用に影響を及ぼし合うことによる相乗効果や拮抗作用が生じることは考え難い。

35

除草剤耐性蛋白質間での機能的な相互作用について

除草剤グルホシネートの活性成分 *L*-グルホシネートは、グルタミン合成酵素活性を阻害する。PAT 蛋白質は高い基質特異性を有し、*L*-グルホシネートは基質とするが、*D*-グルホシネートや他のアミノ酸は基質としない (OECD, 1999)。一方、CP4 EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸 (トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン) 合成経路であるシキミ酸経路中の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の活性を有する。EPSPS の基質となるのは、ホスホエノー

40

ルピルビン酸塩(PEP)、シキミ酸-3-リン酸塩(S3P) 及びシキミ酸だけである。このように、PAT 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質の基質及び作用は異なり、関与する代謝経路も互いに独立しているため、予期しない代謝物が生じることは考え難い。

5 害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質間での機能的な相互作用について

害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質は、それぞれの有する機能が異なるため、相互に影響する可能性は考え難い。また、これまでに承認されたスタック系統において、害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質が相互作用したとの報告はない。

10

実際に、親系統由来の発現蛋白質の本スタック系統における相互作用について検討するため、本スタック系統、親系統及び非組換えトウモロコシを用い、チョウ目害虫であるヨーロッパアワノメイガに対する抵抗性、並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性を調査した。

15

ヨーロッパアワノメイガに対する抵抗性

本スタック系統、親系統 (DAS-01507-1、MON-00810-6) 及び非組換えトウモロコシの葉でヨーロッパアワノメイガの幼虫を飼育し、食害率を観察した (別紙; 社外秘情報につき非開示)。その結果、本スタック系統でのヨーロッパアワノメイガの幼虫による葉の食害率は、両親系統との間に統計学的有意差は認められなかった (表 5、23ページ)。

20

表 5 本スタック系統のヨーロッパアワノメイガ幼虫による葉の食害率

供試植物	食害率
本スタック系統	0.0010 ± 0.0033 a
対照 親系統 DAS-01507-1	0.0046 ± 0.0081 a
対照 親系統 MON-00810-6	0.0097 ± 0.0162 a
(参考) 非組換えトウモロコシ	0.3841 ± 0.1286 b

n=20、平均値±標準偏差。

- 5 試験条件：各系統を 2008 年から 2009 年にかけて米国の温室で栽培し、4 葉期（V4 期）の葉を採取し、葉片で孵化したてのヨーロッパアワノメイガの幼虫を 48 時間飼育。1 反復につき 2 サンプル、計 10 反復で行った。
- 10 評価方法：食害率は、葉片ごとにデジタル画像を作成することによって測定を行った。食害を受けていない組織をピクセル数で表し、そのピクセル数を全対照（幼虫を飼育していない）葉片の平均ピクセル数で割った値を算出した。その値を 1 から引いて、食害率（0～1）を計算した。食害率を逆正弦変換した値を統計解析に用いた。
- 異なる英文字間に統計学的有意差あり（逆正弦変換した値を用いた分散分析及び Tukey 法による一対比較、P<0.05）。

15

除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性

- 20 本スタック系統、親系統 DAS-01507-1、親系統 MON-00810-6（参考）及び非組換えトウモロコシに除草剤グルホシネートを散布し、薬害を観察した（別紙；社外秘情報につき非開示）。また、本スタック系統、親系統 MON-00603-6 及び非組換えトウモロコシに除草剤グリホサートを散布し、薬害を観察した（別紙；社外秘情報につき非開示）。その結果、本スタック系統の薬害は、対照の各親系統との間に統計学的有意差は認められなかった（表 6 及び表 7、24 ページ）。

表 6 除草剤グルホシネート散布による本スタック系統と親系統の薬害

供試植物	薬害程度 (%)			
	非散布	通常量 ¹⁾	16 倍量	32 倍量
本スタック系統	0 ± 0	0 ± 0 a ²⁾	2.36 ± 3.16 a	13.2 ± 14.8 a
対照 親系統 DAS-01507-1	0 ± 0	0 ± 0 a	2.78 ± 3.62 a	21.0 ± 12.2 a
(参考) 親系統 MON-00810-6	0 ± 0	4.87 ± 6.83 b	100 ± 0 b	100 ± 0 b
(参考) 非組換えトウモロコシ	0 ± 0	5.89 ± 6.15 b		

n=15、平均値±標準偏差。

試験条件 : 2008 年から 2009 年にかけて米国の温室で各系統 5 個体を栽培し、2 葉期 (V2 期) に除草剤を散布した。試験は 3 反復で行った。

評価方法 : 散布後 7、13 及び 21 日目に、0% (全く影響を受けていない) から 100% (完全に枯死している) のスケールで薬害程度 (葉のクロロシス、ネクロシス又は白化の程度) を目視で判定した。分散分析及び各除草剤の散布量 (通常量、16 倍、32 倍) ごとの Sidak 法 (Westfall *et al.*, 2006) による多重検定を行った。

1) 散布量は、通常量 : 0.458 kg active ingredient (a.i.)/ha、16 倍量 : 7.30 kg a.i./ha、32 倍量 : 15.5 kg a.i./ha。なお、16 倍及び 32 倍の薬量での散布は、除草剤耐性レベルを評価する目的で実施したものであり、商業栽培におけるこのような薬量での散布は想定していない。

2) 同一列の異なる英文字間に統計学的有意差 (P<0.05) あり。

表 7 除草剤グリホサート散布による本スタック系統と親系統の薬害

供試植物	薬害程度 (%)			
	非散布	通常量 ¹⁾	16 倍量	32 倍量
本スタック系統	0 ± 0	0 ± 0 a ²⁾	1.67 ± 2.38 a	1.67 ± 2.39 a
対照 親系統 MON-00603-6	0 ± 0	0 ± 0 a	1.67 ± 2.38 a	1.67 ± 2.38 a
(参考) 非組換えトウモロコシ	0 ± 0	98.2 ± 3.87 b		

n=15、平均値±標準偏差。

試験条件 : 2008 年から 2009 年にかけて米国の温室で各系統 5 個体を栽培し、2 葉期 (V2 期) に除草剤を散布した。試験は 3 反復で行った。

評価方法 : 散布後 7、13 及び 21 日目に、0% (全く影響を受けていない) から 100% (完全に枯死している) のスケールで薬害程度 (葉のクロロシス、ネクロシス又は白化の程度) を目視で判定した。分散分析及び各除草剤の散布量 (通常量、16 倍、32 倍) ごとの Sidak 法 (Westfall *et al.*, 2006) による多重検定を行った。

1) 散布量は、通常量 : 1.19 kg acid equivalent (a.e.)/ha、16 倍量 : 17.8 kg a.e./ha、32 倍量 : 36.6 kg a.e./ha。なお、16 倍及び 32 倍の薬量での散布は、除草剤耐性レベルを評価する目的で実施したものであり、商業栽培におけるこのような薬量での散布は想定していない。

2) 同一列の異なる英文字間に統計学的有意差 (P<0.05) あり。

以上、親系統に付与された形質は、本スタック系統においても変化しておらず、親系統由来の遺伝子が本スタック系統において発現することによる相互作用はないと考えられた。したがって、本スタック系統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な相違について、我が国で行われた親系統の隔離ほ場試験結果

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/1507ap.pdf、http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/MON810ap.pdf 及び http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/NK603ap.pdf) に基づき評価した。

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

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、表 8 (26ページ) に記載した項目について親系統 (DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6) と非組換えトウモロコシを用いて調査した。その結果、DAS-01507-1 の発芽率及び雌穂径、MON-00810-6 の稈長、並びに MON-00603-6 の百粒重については、それぞれ用いた 2 品種の組換え体品種のうち 1 品種に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が、もう 1 品種に有意差は認められていない。

b 生育初期における低温又は高温耐性

DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 は、生育初期における低温処理によって、非組換えトウモロコシと同様に萎縮、萎凋又は枯死したことが確認されている。

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、冬季には通常枯死し、越冬することは知られていない。また、収穫後に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、DAS-01507-1 を米国のほ場で栽培し収穫時に観察した結果、いずれも枯れたことが確認されている。また、MON-00810-6 及び MON-00603-6 についても、隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっている事が観察されている。

d 花粉の稔性及びサイズ

DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の花粉を染色、観察した結果、花粉の稔性、サイズ又は形態において、非組換えトウモロコシとの間に相違のないことが確認されている。

表 8 形態及び生育の特性調査項目

	DAS-01507-1	MON-00810-6	MON-00603-6
発芽率	○*	○	○
発芽揃い	○	○	○
雄穂抽出期	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○
開花始期	○	○	—
開花終期	○	○	—
開花期間	○	○	—
成熟期	○	○	○
草姿又は草型	○	○	○
分けつ数	○	○	○
雌穂(総)数	○	○	○
有効雌穂数	○	○	—
粒色及び粒形	○	○	○
稈長	○	○*	○
着雌穂高	○	○	○
雌穂長	○	○	○
雌穂径	○*	○	○
粒列数	○	○	○
一列粒数	○	○	○
百粒重	○	○	○*
地上部生体重 (生重量、植物重)	○	○	○

○：調査を行った項目

—：調査を行わなかった項目

5

*：試験に用いた同一イベントの2品種のうち、1品種に非組換え

トウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた項目

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

10

種子の生産量：②. a (25ページ) に示した調査において、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数及び百粒重を調査した。その結果、DAS-01507-1 の雌穂径及びMON-00603-6 の百粒重については、それぞれ用いた2品種の組換え体品種のうち1品種に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が、もう1品種に有意差は認められていない。

15

脱粒性：トウモロコシの雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌穂から脱粒し、散布される可能性は低い(OECD, 2003)。DAS-01507-1、MON-00810-6及びMON-00603-6に自然条件での脱粒性は観察されていない。

20

発芽率：DAS-01507-1、MON-00810-6及びMON-00603-6から収穫した種子の発芽率調査の結果、非組換えトウモロコシとの間で相違のないことが確認されている。

休眠性：トウモロコシ種子の休眠性はほとんどないとされている（CFIA, 1994）。上記の発芽率試験において、DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の発芽率は高く、非組換えトウモロコシとの相違も認められなかった。

5

f 交雑率

宿主であるトウモロコシと自然交雑可能な近縁野生種（テオシント）は、我が国においては自生していないため、交雑率試験は行われなかった。

10

g 有害物質の産生性

DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 について、鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験が行われた。その結果、DAS-01507-1 の鋤込み試験及び後作試験におけるレタスの生体重は、2 品種の組換え体品種のうち 1 品種に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が、レタスの発芽率に有意差が認められず、用いたもう 1 品種については有意差が認められていない。

15

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 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

10 —

(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

15 —

(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

20 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

25 —

(6) 国外における使用等に関する情報

5 DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 の国外における承認状況は、
表 9 (29ページ) のとおりである。

表 9 国外における親系統及び本ストック系統の承認状況

申請国	申請先	目的	承認年			
			DAS-01507-1	MON-00810-6	MON-00603-6	本ストック系統
米国	農務省 (USDA)	無規制裁培	2001年	1996年	2000年	—
	食品医薬品庁 (FDA)	食品、飼料	2001年 ¹⁾	1996年 ¹⁾	2000年 ¹⁾	2010年 ²⁾
カナダ	食品検査庁 (CFIA)	環境安全性、飼料	2002年	1997年	2001年	2009年 ²⁾
	保健省 (HC)	食品	2002年	1997年	2001年	2009年 ²⁾
EU	食品安全機関 (EFSA)	食品、飼料、輸入	2006年	2008年	2004年	申請予定
オーストラリア/ ニュージーランド	食品基準機関 (FSANZ)	食品 (輸入)	2003年	2000年	2002年	通知予定

1) 確認終了年。

2) 通知年。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 本スタック系統は、交雑育種法により DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6 を交配して作出した。改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質には、酵素活性がないと考えられる。また、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質はともに高い基質特異性を有し、両蛋白質はいずれも機能及び基質が異なっている。したがって、これら親系統由来の改変 Cry1F、Cry1Ab、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質が、本スタック系統において相互に影響を及ぼすことは考え難い。

10 実際に、本スタック系統のチョウ目害虫抵抗性、並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性の特性は、いずれも親系統 (DAS-01507-1、MON-00810-6 又は MON-00603-6) と同程度であった (第一. 2.(6).①、21ページ)。

15 したがって、本スタック系統については、親系統が有する形質を併せ持つこと以外に評価すべき形質の変化はないと考えられるため、生物多様性影響の評価は、親系統の諸形質を個別に調査した結果を基に実施した。

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

従来、トウモロコシが我が国において野生化したという報告はない。

25 本スタック系統の親系統 (DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6) を用いた隔離ほ場試験において諸特性 (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) を指標として評価が行われた結果、一部の特性において、各親系統 2 品種の組換え体品種のうち 1 品種に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が、もう 1 品種には有意差が認められず、他の特性にも有意差が認められていないため (第一. 2.(6).②. a~e、25~27ページ)、これらは競合における優位性を高めるような相違ではないと考えられた。

35 本スタック系統には、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているが、我が国の自然環境下でチョウ目害虫による食害は、トウモロコシが我が国で生育することを困難にさせる主な要因ではない。したがって、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生させ、競合における優位性を高めるとは考え難い。

40 また、本スタック系統には、*pat* 遺伝子及び *cp4 epsps* 遺伝子により除草剤グルホシネート及びグリホサートに対する耐性が付与されているが、これら除草剤が散布されることが想定され難い自然環境下では、除草剤耐性形質が本スタック系統の競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上、本スタック系統に関して、競合における優位性に起因して生物多様性影

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

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

影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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

トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

25

本スタック系統に産生される改変 Cry1F、Cry1Ab、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質に、既知アレルゲン蛋白質との間でアミノ酸配列の相同性は認められていない（第一.2.(1).ロ.②、10ページ）。

30

実際、本スタック系統の親系統（DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6）を用いた隔離ほ場試験において、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を実施した結果、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相違は認められなかった（第一.2.(6).②.g、27ページ）。したがって、本スタック系統中においても意図しない有害物質が産生されることは考え難い。

35

本スタック系統で発現する改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目害虫に対して殺虫活性を有する。そこで、これら蛋白質が影響を及ぼす可能性のある我が国の野生動植物等について検討を行った。

Cry 蛋白質による影響を受ける可能性のある野生動植物等

5 改変 Cry1F 蛋白質の場合、European corn borer、Fall armyworm、Beet
armyworm 等のチョウ目昆虫に、Cry1Ab 蛋白質は、European corn borer、
Southwestern corn borer、Southern cornstalk borer、Sugarcane cornstalk borer、
Corn earworm、Fall armyworm、Stalk borer 等のチョウ目昆虫に高い殺虫活性
を有し、チョウ目昆虫以外の哺乳類、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、非標的生物に対する毒性は認められていない。

10 本スタック系統を栽培した場合、ほ場周辺に生息するチョウ目昆虫が、本スタ
ック系統を直接摂食する可能性、又はその飛散花粉を食餌植物とともに摂食する
可能性がある。したがって、有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性の
ある野生動植物として、チョウ目昆虫が特定された。

15 (2) 影響の具体的内容の評価

20 改変 Cry1F 蛋白質のチョウ目害虫に対する殺虫活性を調査するため、Cry1F 蛋
白質を人工飼料に混合し投与した結果、標的害虫である European corn borer、
Fall armyworm 及び Beet armyworm に対する LC₅₀ (半数致死濃度) は、それぞ
れ 0.58 μg/g、2.49 μg/g 及び 7.8 μg/g 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、LC₅₀
値は試験を行った最高濃度である 30 μg/g より大きかった。

25 Cry1Ab 蛋白質を産生する MON-00810-6 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結果、非組換えトウモロコシと比べ有意な差が 2,000
~4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた。なお、花粉摂食開始 5 日後の LC₅₀ は、
2,300 粒/cm² であった。

30 本スタック系統を用いた生物検定の結果、European corn borer の幼虫による葉
の食害率は、本スタック系統と DAS-01507-1 との間、及び本スタック系統と
MON-00810-6 の間で、いずれも相違がなかった。したがって、チョウ目昆虫が本
スタック系統により受ける影響は、親系統 DAS-01507-1 及び MON-00810-6 と同
程度であると考えられた。

35 (3) 影響の生じやすさの評価

40 本スタック系統栽培ほ場の周辺に生息する非標的チョウ目昆虫種が、本スタッ
ク系統の飛散花粉を摂食する可能性について、トウモロコシほ場周辺の植物の葉
に堆積した花粉量の調査結果を基に検討した。

我が国においてトウモロコシほ場周辺のヒマワリとイヌホウズキ葉上に堆積す
る花粉量を測定した結果、ほ場端から 1m で約 160 粒/cm²、5m で 20 粒/cm²、10m

では 10 粒/cm²以下であった (Shirai and Takahashi, 2005)。北米における試験では、トウワタ (*Asclepias syriaca*) 葉上に堆積した花粉密度は、ほ場端から 1m で 35.4 粒/cm²、2m で 14.2 粒/cm²、3m で 5~20 粒/cm²、4-5m で 8.1 粒/cm²、10m では 1 粒/cm²であった (Hansen-Jesse and Obrycki, 2000 ; Pleasants *et al.*, 2001)。

トウモロコシほ場周辺の堆積花粉量と LC₅₀ 値から推定すると、DAS-01507-1 栽培ほ場から 10m 地点における改変 Cry1F 蛋白質量は、オオカバマダラに対する LC₅₀ 値の約 460 万分の 1 となる (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/1507ap.pdf)。また、ヤマトシジミの生存率に影響の見られた MON-00810-6 の花粉密度 2,000 粒となるのは、ほ場から 20m 以内の地点であることが、モデル式から推定されている (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/MON810ap.pdf)。

以上、本スタック系統から飛散した花粉をチョウ目昆虫種が摂食し影響を受ける可能性は、ほ場から 10m 離れると低く、50m 離れるとほとんど無視できると考えられた。本スタック系統を直接摂食する可能性のある、又はその飛散花粉を食餌植物とともに摂食する可能性のあるチョウ目昆虫種がトウモロコシ栽培ほ場周辺に局所的に生息するとの報告はない。したがって、チョウ目昆虫種が個体群レベルで本スタック系統による影響を受ける可能性は低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上、本スタック系統の有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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

宿主であるトウモロコシが、我が国において野生化した事例はなく、また自然交雑可能な近縁野生種であるテオシントの自生も報告されていない。このため、本スタック系統の交雑性に起因して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

—

(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

5 影響を受ける可能性のある野生動植物が特定されなかったことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

10 上記の他に、生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる性質はないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 本スタック系統は、交雑育種法により DAS-01507-1、MON-00810-6 及び
MON-00603-6 を交配して作出した。改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質に酵素活性
があるとは考え難い。また、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質はともに高い基質特異
性を有し、両蛋白質はいずれも機能及び基質が異なっている。これら親系統由来
10 の改変 Cry1F、Cry1Ab、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋白質が、本スタック系統にお
いて相互に影響を及ぼすことは考え難い。実際に、本スタック系統のチョウ目害
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の特性は、いず
れも親系統(DAS-01507-1、MON-00810-6 又は MON-00603-6)と同程度であった。

15 本スタック系統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から分離した後代のスタック系統においても同様に、発現蛋白
質の機能的な相互作用はなく、新たに獲得されたそれぞれの性質は変化しないと
考えられた。

20 したがって、本スタック系統については、親系統が有する形質を併せ持つこと
以外に評価すべき形質の変化はないと考えられるため、生物多様性影響の評価は、
親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

25 トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) は、我が国において長年にわ
たり使用されてきた。これまでに我が国においてトウモロコシが野生化し、野生
動植物の生息又は生育に影響を及ぼしたという報告はない。

30 競合における優位性に関し、親系統の諸特性の評価を行ったが、競合における優
位性を高めるような相違は認められていない。

35 本スタック系統には、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているが、チョウ
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で生育することを困難に
させる主な要因ではない。さらに、本スタック系統には、*pat* 遺伝子及び *cp4 epsps*
30 遺伝子により除草剤グルホシネート及びグリホサートに対する耐性が付与されて
いるが、自然環境下でこれら除草剤が散布されることは想定され難い。したがって、
これら形質が本スタック系統の競合における優位性を高めるとは考えにくい。

35 以上、本スタック系統及び本スタック系統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当該トウモロコシから分離した後代系統のスタック
系統は、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。

40 トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産
生するとの報告はない。

本スタック系統に産生される改変 Cry1F、Cry1Ab、PAT 及び CP4 EPSPS 蛋
白質に、既知アレルゲンとの間で相同性は認められなかった。また、後作試験、

鋤込み試験及び土壌微生物相試験の結果、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相違は認められていない。

5 本スタック系統で発現する改変 Cry1F 及び Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目害虫に対して殺虫活性を有する。このことから、有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物として、チョウ目昆虫を特定した。しかしながら、特定されたチョウ目昆虫種が本スタック系統から飛散した花粉を摂食し影響を受ける可能性は、ほ場から 10m 離れると低く、50m 離れるとほとんど無視できると考えられた。本スタック系統を直接摂食する、又はその飛散花粉を摂食する可能性のあるチョウ目昆虫種が本スタック系統栽培ほ場周辺に局所的に生息するとは考え難いため、個体群レベルで本スタック系統の影響を受ける可能性は低いと考えられた。

15 以上、本スタック系統及び本スタック系統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当該トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統は、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。

20 我が国にトウモロコシと自然交雑可能な野生植物は自生していない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

25 以上、本スタック系統及び本スタック系統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当該トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統を第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

緊急措置計画書

平成 22 年 7 月 16 日

5 氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

10

15 チョ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 (改変 *cry1F*, *cry1Ab*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507×MON810×NK603, OECD UI: DAS-01507-1×MON-00810-6×MON-00603-6) (以下、「本スタック系統」という。) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、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には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

20

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

25 弊社内に緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部、バイオテクノロジー事業部）の部門長等から構成される。危機対策本部が、本スタック系統の開発者である米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、バイオテクノロジー事業部長が副責任者となる。

30

(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

5 弊社は、本スタック系統の開発者である米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、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

15 米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、米国における本スタック系統種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、科学的根拠に基づき、本スタック系統が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、弊社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

20

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

25 科学的根拠に基づき、本スタック系統が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社とともに、日本向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して本件を通知する。また、我が国の栽培者等に対して本件を通知する。

30

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

35 科学的根拠に基づき、本スタック系統が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、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連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

参考文献

(社外秘情報につき非開示)

5

別紙リスト

(社外秘情報につき非開示)