

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ  
 (*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-098140-6,  
 OECD UI : DP-098140-6) の生物多様性影響評価書の概要

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 .....	6
(1) 供与核酸に関する情報 .....	6
(2) ベクターに関する情報 .....	17
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	18
(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 ..	20
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 .....	25
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
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の 方法 .....	30
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止 するための措置 .....	30
(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 .....	30
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	32
1 競合における優位性 .....	32
2 有害物質の産生性 .....	33
3 交雑性 .....	34
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 .....	37
緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合及び栽培目的の場合） .....	38

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 3 月 11 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿  
環境大臣 鴨下 一郎 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ ( <i>gat4621, zm-hra, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) <i>litis</i> ) (DP-098140-6, OECD UI : DP-098140-6)
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	—

## 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

(The International Plant Names Index, 2004)

15

###### ② 宿主の品種名又は系統名

宿主の品種名は米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社が育成したトウモロコシ自殖系統 PHWVZ である。

20

###### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

国内外において、自然環境下でトウモロコシが自生している既知の地域はない。

25

##### (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

30

トウモロコシの原産地は、一般的に紀元前 5000 年頃の中南米であると考えられている。また、植物学的起源については、メキシコ、グアテマラ、ホンジュラス地域で雑草として生育しているテオシント (*teosinte*, *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrader) Iltis) から派生したと言われている (菊池, 1987)。1492 年のコロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、アフリカ大陸そしてアジアへと伝播し、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 (農学大事典, 1994)。

35

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、ポルトガル人が四国に伝えたのが最初であると言われており、その後、九州や本州でも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 (菊池, 1987)。

40

## 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 主な栽培地域は、北海道、岩手県、熊本県、宮崎県等で、その 40%を北海道が占めている。国外では、米国、中国、ブラジル、ロシア等を中心に、北緯 55 度から南緯 40 度に至る広い範囲で栽培されている（農学大事典, 1994）。

栽培方法：

- 10 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ような伝統的な方法まで、様々な方法で栽培されている（菊池, 1987）。栽培には、基本的に他の作物とも共通の方法が取られ、播種用畑の調整（耕起、整地）、播種、除草剤散布、中耕、除草、収穫という工程からなる（菊池, 1987）。

15

流通実態：

- 20 コメ、コムギと共に世界三大穀物の一つと言われている。2006 年の世界総生産量は約 6 億 9,520 万トンであり、最大の生産国は米国で、世界総生産量の 38%を占めている（FAO Statistical Database, 2007）。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, 2007）によると、2006 年に我が国は約 1,690 万トンを輸入しており、その 96%にあたる約 1,630 万トンは米国からである。

25

用途：

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）。

30

### (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

- 35 単子葉植物のイネ科作物に属する 1 年生草本である（染色体数： $n=10$ ）。 $C_4$  植物であり光合成能力が高いこと、発達した根系により肥料吸収能力が強いことから、種子の生産性は著しく高い。また、種子中の成分やその含有量の幅が広く実用的用途が広い（菊池, 1987）。

40

稈長は、通常 100~360cm（14~19 節）であるが、1m 未満（9~12 節）や 4m を超すもの（20 節以上）もある。雌雄異花同株の植物で、稈の頂部に総状花序の雄穂をつけ、中位節の葉腋に雌穂を着生する。雄穂は 1 本の中央穂状花序と十数本の側穂状花序からなり、約 2,000 個の小穂をつける。雌穂は、1 節に 1 穂であ

るが、2~3穂着生するものもある。また、雌穂は20~40 cmの円筒又は円錐形で、数枚の苞葉に包まれた穂軸に、2の倍数列(8~20列)の雌性小穂をつける。雌穂の各雌性小穂から花柱と柱頭を苞葉の先端から抽出し、受粉・受精を行って種子を稔実する。種子の大部分は内胚乳で占められ、その中心部に胚があり幼芽が形成されている。胚は全粒の11~12%を占め、その約35%が脂肪である。葉は各節に互生し、葉鞘、葉身、葉舌からなる。根には種子根、永久根、支根がある。永久根はクラウンより伸び出て地下30~60 cmまで分布し、養水分の吸収を行う(農業技術体系, 2004)。

5

10      ロ  生息又は生育可能な環境の条件

温暖で適度な降水量があり、日射量の多い気候に適する。生育最適温度は20℃~30℃とされている。気温が10℃以下に下がるとほとんど生長せず、生育後期にマイナス3℃以下になると枯死する。出穂前後の1ヶ月間は最も水分を必要とし、干ばつによる害を受けやすい。基本的に、どのような土壌でも生育可能であるが、肥沃で、透水性、通気性に優れた土壌を好む(農学大事典, 1994)。

15

ハ  捕食性又は寄生性

20      ー

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

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)、種子の寿命は低温乾燥下では長く、高温多湿下では短いとされている。

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

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。

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

40

風媒受粉植物であり、98~99%は他家受粉であるが、自家不和合性はないため自家受粉も行う。自然交雑可能な近縁野生種としてテオシントがあるが(農学大事典, 1994)、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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

5 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)。花粉の稔性は、乾燥、高温による影響を受ける。花粉は球形で、直径は約 90～100  $\mu\text{m}$  である。受粉は風媒によって行われる。

10 花粉の飛散距離は、最大で 800 m とされている (第 2 回 「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1: 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方 3. トウモロコシ)。花粉の堆積密度に関する調査結果によると、最大堆積花粉数の累積値は、ほ場の端では約 15,000 粒/ $\text{cm}^2$  と推計される。さらに 10 m 離れた場所では約 4,000 粒/ $\text{cm}^2$  と約 1/4 となる。この値は、ほ場からの距離別に堆積する花粉密度の推定最大値であり、確率的に 20 年に一度の頻度でしか起こり得ないような風速条件下での推定値である (Kawashima *et al.*, 2004)。実際の野外に  
15 おいて花粉の飛散・堆積程度を調べた実験では、葉上に堆積した花粉密度は、ほ場から 3 m 離れると累積最大値で 35 粒/ $\text{cm}^2$  (Hansen-Jesse and Obrycki, 2000)、2 m の場合では 14.2 粒/ $\text{cm}^2$  であった (Pleasant *et al.*, 2001)。

20 花粉の寿命は、通常 10 分～30 分程度であるが、気温及び湿度の条件を整えば、30 分以上といわれている (CFIA, 1994)。

ホ 病原性

—

25

へ 有害物質の産生性

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

30

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 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤<sup>1)</sup>耐性トウモロコシ (*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-098140-6, OECD UI: DP-098140-6) (以下、本組換えトウモロコシと表記) における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (7ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列は別紙 1 の図 3 に示した。

15

#### 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

供与核酸の各構成要素の機能を表 1 (7ページ) に示した。

---

<sup>1)</sup> アセト乳酸合成酵素阻害剤としては、チフェンスルフロンメチルやトリベヌロンメチル等がある。

表 1 供与核酸の構成及び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>gat4621</i> (改変 <i>gat</i> ) 遺伝子発現カセット		
<i>ubiZM1</i> プロモーター	900	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 の転写開始のためのプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>ubiZM1</i> 5' UTR	83	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 の 5'非翻訳領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>ubiZM1</i> イントロン	1,009	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>gat4621</i> (改変 <i>gat</i> )	444	<i>Bacillus licheniformis</i> の 3 つの株 (ST401 株、B6 株及び DS3 株) 由来の <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を基に、遺伝子を制限酵素処理し、PCR 法によりランダムに再構築する技術を用いて作製された改変型グリホサート <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (改変 <i>gat</i> : 以下、 <i>gat4621</i> 遺伝子と表記) (Castle <i>et al.</i> , 2004、GenBank Accession No: CS022547)。除草剤グリホサートを <i>N</i> -アセチル化する <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (改変 <i>GAT</i> : 以下、 <i>GAT4621</i> 蛋白質と表記) をコードする。
<i>pinII</i> ターミネーター	316	バレイショ由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子 ( <i>pinII</i> ) における転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。
<i>zm-hra</i> (改変 <i>als</i> ) 遺伝子発現カセット*		
CaMV 35 S エンハンサー	438	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の転写を促進する働きを持つエンハンサー領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; O'Dell <i>et al.</i> , 1985)。本遺伝子発現カセットには、タンデムに 3 つのエンハンサーが挿入されている。
<i>zm-als</i> プロモーター	661	トウモロコシのアセト乳酸合成酵素遺伝子 ( <i>zm-als</i> ) (GenBank Accession No: X63553) の転写開始のためのプロモーター領域 (Fang <i>et al.</i> , 1992)。
<i>zm-hra</i> (改変 <i>als</i> )	1,917	トウモロコシ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子 ( <i>zm-als</i> ) を、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないように改変した遺伝子 (改変 <i>als</i> : 以下、 <i>zm-hra</i> 遺伝子と表記) で、ZM-HRA 蛋白質前駆体をコードする。改変により、内在性アセト乳酸合成酵素蛋白質の 165 番目のプロリンがアラニンに、542 番目のトリプトファンがロイシンに置換されている。
<i>pinII</i> ターミネーター	311	バレイショ由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子 ( <i>pinII</i> ) における転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。

\* *zm-hra* 遺伝子発現カセットと *gat4621* 遺伝子発現カセットは、プラスミド PHP24279 の T-DNA 領域に逆方向で挿入されている。

5 (本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)



- 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

#### A 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

##### a GAT4621 蛋白質

GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化活性（以下、グリホサート *N*-アセチル化活性と表記）を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼで、147 個のアミノ酸からなり、分子量は約 17kDa である。本蛋白質のアミノ酸配列を別紙 1 の図 1 に示した。

除草剤グリホサートは、植物におけるシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（EPSPS）活性を阻害する。その結果、芳香族アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる（図 1、11 ページ）。これに対し、GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えるため、除草剤グリホサートに対する耐性を植物に付与する。この GAT4621 蛋白質をコードする遺伝子は、以下に示す方法で作出した。

##### a-1 GAT4621 蛋白質をコードする遺伝子の作出

まず、グリホサート *N*-アセチル化活性を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼの探索を行った。グリホサート *N*-アセチル化活性の指標には、マススペクトル法により測定した *N*-アセチルグリホサート量を用いた。その結果、デュポン社保有のバチルス属微生物の中から、グリホサート *N*-アセチル化活性を示した *B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株を選抜し、それぞれのゲノム DNA から *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングした。これら 3 つの遺伝子を植物に導入したが、除草剤グリホサートに対する耐性を付与することはできなかった。

そこで、*N*-アセチルトランスフェラーゼの活性を高めるために、*N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の改変を行った。既に実用化されており、植物に除草剤グリホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質も *N*-アセチルトランスフェラーゼであることから、改変に当たっては、本蛋白質の活性レベルを参考にした。PAT 蛋白質のグリホシネートに対する  $k_{cat}/K_M$  値<sup>2)</sup>は  $20,400 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  で、野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの約 5,000 倍の活性を示すことが報告されている

<sup>2)</sup>  $k_{cat}$  は酵素反応速度定数を、 $K_M$  は基質に対する親和性を、 $k_{cat}/K_M$  値は基質に対する触媒効率を示す。

(Siehl *et al.*, 2005)。したがって、本改変においても、*B. licheniformis* 株の野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの約 5,000 倍の活性を改変の目標とした。

5 改変は、クローニングした上記 3 つの *B. licheniformis* 株の野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を用い、以下の DNA シャッフリング法で行った (Castle *et al.*, 2004; Keenan *et al.*, 2005)。

1) クローニングした遺伝子を制限酵素で部分消化し、プライマーを添加しない PCR で増幅した後、もととなった遺伝子の両端部分をプライマーとした PCR を行い遺伝子を再構築した。

10 2) 再構築した遺伝子を大腸菌に導入し、グリホサート *N*-アセチル化活性を示すコロニーを選抜した。

3) 選抜したコロニーのうち、高い *N*-アセチル化活性を示すクローンを複数選抜し、遺伝子をクローニングした。

15 部位特異的変異による遺伝子改変も加えながら、1)~3)の工程を 11 回繰り返した結果、目標の活性を持つ改変型 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*gat4621* 遺伝子) を選抜した。本遺伝子の塩基配列を別紙 1 の図 3 に示した。

*gat4621* 遺伝子が発現する GAT4621 蛋白質は、もとの野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼの 3,700~5,500 倍の活性を示す ( $k_{cat}/K_M$  値=6,719 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>)

20 3)。本蛋白質は、野生型 *N*-アセチルトランスフェラーゼと 75~78%のアミノ酸配列相同性を有する (別紙 1 の図 1)。

#### a-2 GAT4621 蛋白質の除草剤耐性の確認

25 GAT4621 蛋白質によって、植物に十分な除草剤グリホサート耐性が付与されることを確認するため、本組換えトウモロコシにおける除草剤グリホサート耐性レベルを、米国の温室において評価した。その結果、農薬登録で認められている最大使用量に加えて、その 16 倍及び 32 倍の薬量で除草剤グリホサートを散布した場合でも、本組換えトウモロコシにおいて薬害は認められなかった (表 2、9ページ)。

表 2 除草剤グリホサート散布による薬害程度 (社外秘)

#### b ZM-HRA 蛋白質

35 *zm-hra* 遺伝子は、トウモロコシのアセト乳酸合成酵素遺伝子 (*zm-als*; Fang *et al.*, 1992) に部位特異的変異を起こさせ、アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないように改変された ZM-HRA 前駆体蛋白質をコードする遺伝子である。改変の結果、トウモロコシ内在性アセト乳酸合成酵素蛋白質の 165 番目のプロリンがアラニンに、542 番目のトリプトファンがロイシンに置換されている (別紙 1 の図 2)。 *zm-hra* 遺伝子がコードする ZM-HRA 前駆体蛋白質は、その N 末端にア

3)  $k_{cat}$  値、 $K_M$  値の測定方法及び算出方法は、別紙 2 の 2.3.2 を参照。

ミノ酸 40 個の葉緑体移行配列を含む。この葉緑体移行配列は、葉緑体への移行に伴って切断除去される。その結果、本組換えトウモロコシ中では最終的に、598 個のアミノ酸からなる分子量 65kDa の成熟型 ZM-HRA 蛋白質（以下、ZM-HRA 蛋白質と表記）として存在する（別紙 1 の図 2）。

5

アセト乳酸合成酵素阻害剤は、植物中の分枝アミノ酸合成に関与する内在性アセト乳酸合成酵素の活性を特異的に阻害するため、植物中にバリン、ロイシン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる（図 2、12 ページ）。ZM-HRA 蛋白質はアセト乳酸合成酵素阻害剤の存在下でも活性を示し、分枝アミノ酸合成経路が阻害されないことから、植物にアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する（図 2、12 ページ）。

10

B 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

15

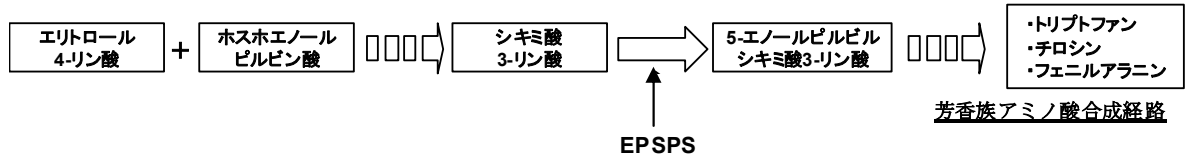
GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質と既知のアレルゲンとの構造相同性を検討するため、ネブラスカ大学の Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) が提供するアレルゲンデータベース (FARRP7 database) と、FASTA34 アルゴリズム (Pearson, 2000) を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。本データベース中には、1,251 件の既知アレルゲンのアミノ酸配列が含まれる。本データベースを用いて統計解析を行った結果、両蛋白質と相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。

20

また、既知毒性蛋白質との構造相同性を検討するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から入手可能な蛋白質アミノ酸配列データベースと、blastp アルゴリズム (NCBI, 2006; version 2.2.13) を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。本データベースを用いて統計解析を行った結果、両蛋白質と統計学的に有意な相同性を示す既知の毒性蛋白質は認められなかった。

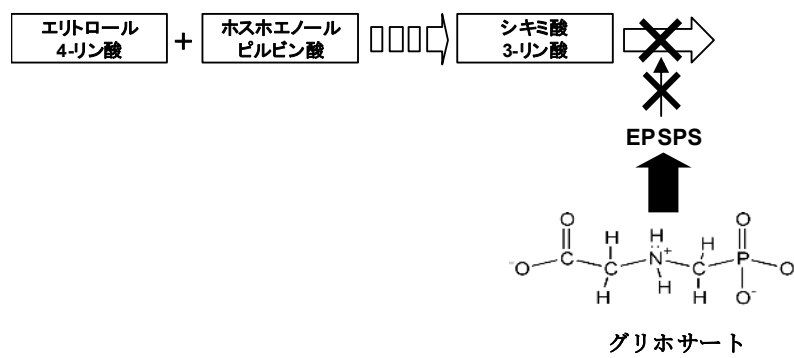
25

i) 非組換えトウモロコシへの除草剤非散布時



5

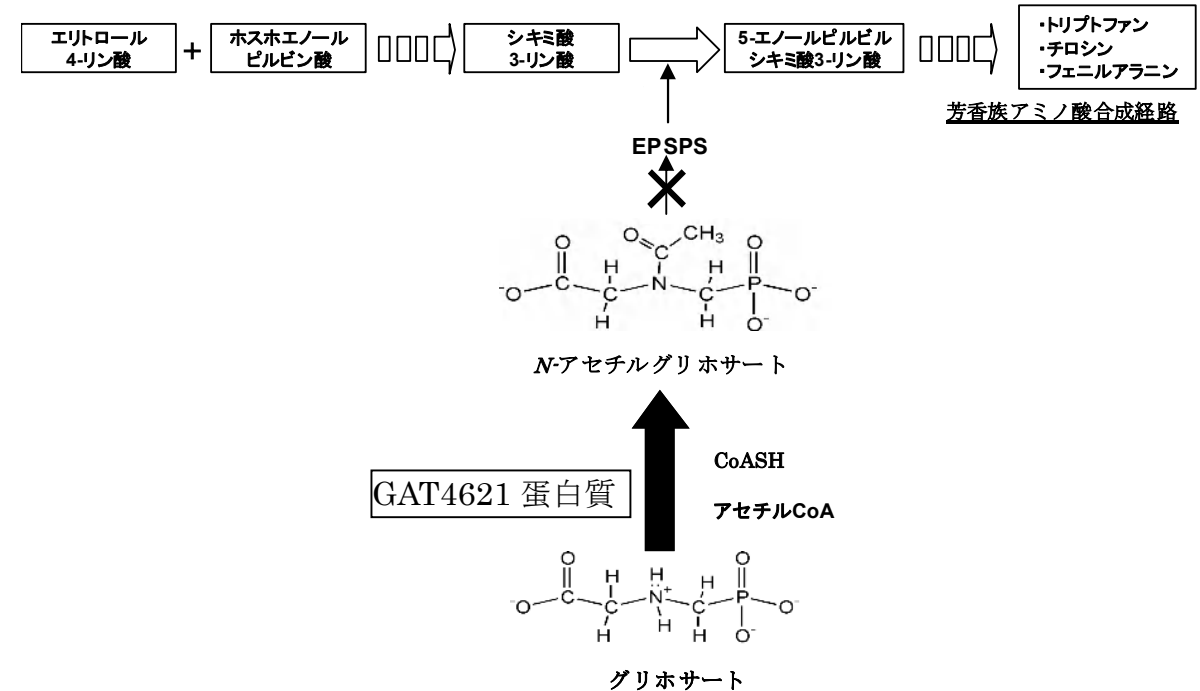
ii) 非組換えトウモロコシへの除草剤グリホサート散布時



10

15

iii) 本組換えトウモロコシへの除草剤グリホサート散布時



20

25

30

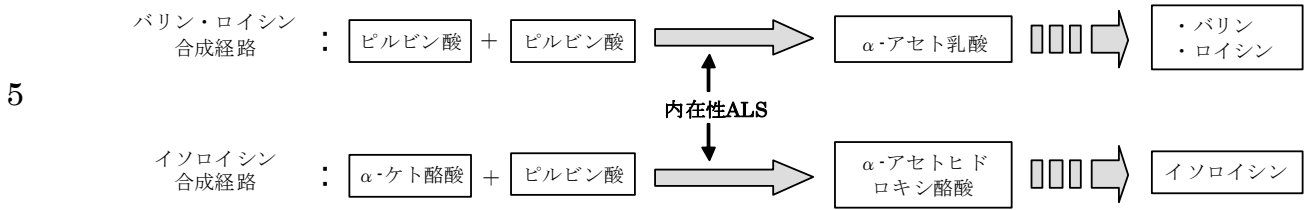
図 1 GAT4621 蛋白質の作用機作

- i) EPSPS は、5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸の合成に関わる酵素であり、5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸は、トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸の合成に用いられる。
- ii) 非組換えトウモロコシにおいては、除草剤グリホサートにより EPSPS 活性が阻害される結果、芳香族アミノ酸が合成できなくなり植物は枯死する。
- iii) 本組換えトウモロコシにおいては、GAT4621 蛋白質が除草剤グリホサートの *N*-アセチル化を触媒し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えるため、トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸合成が可能になる。
- (本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

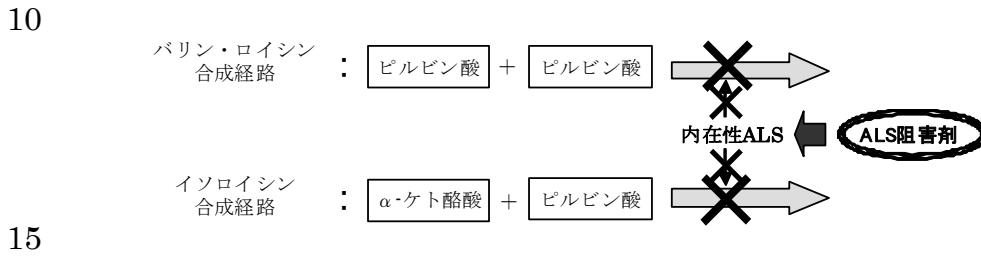
35

40

i) 非組換えトウモロコシへの除草剤非散布時



ii) 非組換えトウモロコシへのアセト乳酸合成酵素阻害剤散布時



iii) 本組換えトウモロコシへのアセト乳酸合成酵素阻害剤散布時

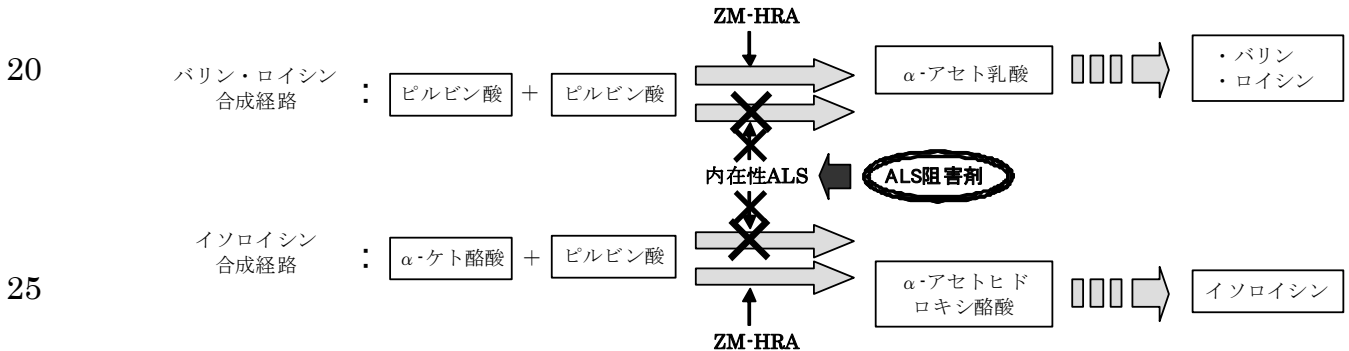


図 2 ZM-HRA 蛋白質の作用機作

- 30
- 35
- i) 植物の内在性アセト乳酸合成酵素 (ALS) は、バリン、ロイシン及びイソロイシンの分枝アミノ酸を合成する。
  - ii) 非組換えトウモロコシでは、ALS がアセト乳酸合成酵素阻害剤 (ALS 阻害剤) により阻害され、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成されず枯死する。
  - iii) 本組換えトウモロコシでは ZM-HRA 蛋白質が産生され、ALS 阻害剤の影響を受けないため、分枝アミノ酸合成が可能となる。
- (本図に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5 宿主の持つ代謝系を変化させる可能性について、GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質個々の評価を行い、さらに、両蛋白質の産生が相互に影響する可能性について評価した。

A GAT4621 蛋白質

10 GAT4621 蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させるかどうかについて、はじめに、蛋白質の高次構造をもとに基質となり得る化合物の推定を行った。次に、可能性があると考えられた低分子化合物について触媒活性を測定して確認した。さらに、種子及び地上部植物体を分析し、アミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成を変化させないことを確認した。

15

GAT4621 蛋白質の基質となり得る化合物

20 蛋白質の高次構造から基質となり得る化合物を検討するに当たり、既に研究が行われている GAT4602 蛋白質の評価結果 (Siehl *et al.*, 2005) を参考とした。GAT4602 蛋白質は、GAT4621 蛋白質と 91% のアミノ酸配列相同性を有し、グリホサート *N*-アセチル化触媒活性を示す *N*-アセチルトランスフェラーゼである。また、GAT4602 蛋白質の活性中心の 4 つのアミノ酸残基は GAT4621 蛋白質でも保存されている (Shiel *et al.*, 2007)。したがって、GAT4602 蛋白質の評価結果をもとに、GAT4621 蛋白質の基質となり得る化合物を推定できると考えた。

25

30 GAT4602 蛋白質においては、除草剤グリホサートの *N*-アセチル化反応の活性中心は当該蛋白質の内部奥にあり、除草剤グリホサートは内部に取り込まれ、そこに補酵素のアセチル CoA が結合して反応する (Siehl *et al.*, 2007 ; Keenan *et al.*, 2005)。このことは、除草剤グリホサートのような低分子化合物のみが、立体障害を受けずに活性中心に到達し本蛋白質の基質となり得ること、すなわち高分子化合物が本蛋白質の基質となる可能性の低いことを示唆している。したがって、高分子化合物は GAT4602 蛋白質の基質にならないと推定した。

35 しかしながら、*N*-アセチルトランスフェラーゼは、生体内高分子アミンである蛋白質の N 末端アミノ酸、ヒストン等のアミノ酸側鎖をアセチル化することが知られている (生化学辞典, 1998)。そこで、実際に生体内高分子アミン類に対する GAT4602 蛋白質の基質特異性を評価したが、生体内高分子アミンであるヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン及び tRNA は GAT4602 蛋白質の基質とはならなかった (Siehl *et al.*, 2005)。したがって、GAT4621 蛋白質においても、同様に高分子化合物は基質にならないと推定した。

40

なお、*N*-アセチルトランスフェラーゼは、生体内低分子アミンもアセチル化することが知られているため (生化学辞典, 1998)、D-グルコサミン、セロトニン、

アントラニレート、オルニチン、プリン、ピリミジン塩基についても評価したが、これら低分子アミンも GAT4602 蛋白質の基質とならなかった (Siehl *et al.*, 2005)。したがって、GAT4621 蛋白質においても、同様に上記の低分子アミンは基質とならないと推定した。

5

#### GAT4621 蛋白質の基質となることが考えられた低分子化合物に対する触媒活性の測定

10 次に、GAT4621 蛋白質の基質となることが考えられた低分子化合物に対する触媒活性を、GAT4621 蛋白質により測定した。本実験では検出力を高めるために、*N*-アセチル化反応における反応産物である coenzyme A を 30 分間蓄積させた量で判定した。基質には、遊離アミノ酸 (21 種)、農薬 (除草剤、殺虫剤及び殺菌剤 20 種)、抗生物質 (カナマイシンやアンピシリン等、10 種) を用いた。

15 その結果、対照として用いたグリホサートの他、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、セリン及びグリシンの 5 種のアミノ酸に対して触媒活性が認められた (別紙 3 の表 1~3)。しかしながら、その中で比較的高い coenzyme A の蓄積量を認めたアスパラギン酸とグルタミン酸においても、その蓄積量はグリホサートの場合の約 3%であった。

20

そこで、生体内でも GAT4621 蛋白質によって上記 5 種のアミノ酸がアセチル化されるかを調べるため、前述の  $k_{cat}/K_M$  値の測定 (本文第一. 2. (1) . ロ. ②、8 ページ) で用いた反応液に 100mM KCl を加え、生体内に近いイオン強度条件にした反応液を用い、触媒活性の測定を行った。本試験においては、グリホサートと構造が類似する 4 種類の化合物も基質として用いた。その結果、GAT4621 蛋白質のグリホサートに対する  $k_{cat}/K_M$  値が  $1,063 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  であったのに対し、アスパラギン酸及びグルタミン酸に対しては  $12.1 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  と  $8.32 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  であった。また、トレオニンとセリンに対しては  $0.605 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  以下で、グリシン及びグリホサート類似化合物に対しては触媒活性が認められなかった (別紙 3 の表 4)。

30

#### 本組換えトウモロコシ中の *N*-アセチルアミノ酸の分析

35 上述のように、生体内に近い反応条件で、GAT4621 蛋白質がアミノ酸に対して触媒活性を有することが認められたため、本組換えトウモロコシの種子及び地上部植物体を用いて *N*-アセチルアミノ酸の分析を行った。

その結果、種子中においては分析した 5 種の、また、地上部植物体においては分析した 2 種の *N*-アセチルアミノ酸について、非組換えトウモロコシと比べ統計学的に有意 ( $P$  値 $<0.05$ ) な増加が認められた (表 3、表 4、15 ページ)。しかしながら、種子の場合、その含有量は、最も多かった *N*-アセチルアスパラギン酸においても  $0.403 \text{ mg/g}$  で、次に多かった *N*-アセチルグルタミン酸においては  $0.079 \text{ mg/g}$ 、他の *N*-アセチルアミノ酸量は  $0.003 \text{ mg/g}$  未満であった。また、地上

40

部植物体では、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸の含有量は、それぞれ 0.65mg/g と 0.0932mg/g であった。

表 3 本組換えトウモロコシ種子中の遊離 *N*-アセチルアミノ酸 (社外秘)

5

表 4 本組換えトウモロコシ地上部植物体中の遊離 *N*-アセチルアミノ酸 (社外秘)

#### 本組換えトウモロコシ中のアミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成

10

上述のように、本組換えトウモロコシ中で 5 種の *N*-アセチルアミノ酸の増加が認められたことから、これらの増加が種子及び地上部植物体におけるアミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成に影響を与えないかどうか調べた。

15

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) の認められたアミノ酸は種子のトリプトファンだけであり、その値もトウモロコシの文献値の範囲内であった (表 5、表 6、16ページ)。

20

遊離アミノ酸について統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) が認められたのは、種子においては *L*-ヒスチジン及び *L*-アルギニン、地上部植物体においてはエタノールアミンだけであった (表 7、表 8、16ページ)。種子中の *L*-ヒスチジンの含有量は、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシでそれぞれ 0.0468 mg/g 及び 0.0379mg/g、*L*-アルギニンでは 0.247 mg/g 及び 0.116 mg/g、地上部植物体のエタノールアミンでは 0.191mg/g 及び 0.126 mg/g であった。これらの値について、FDR<sup>4)</sup>を考慮した統計処理を行った結果、いずれの遊離アミノ酸でも統計学的有意差は認められなかった。

25

---

4) False Discovery Rate (誤りの発見率; Benjamini and Hochberg, 1995)。同一のサンプル (この場合は種子や地上部植物体) の複数の分析項目 (この場合はアミノ酸や遊離アミノ酸の各分析項目) について、それぞれ  $P<0.05$  の有意差検定を行うと、分析項目が増えるにしたがい、誤って有意差があると判断する、擬陽性の割合が増す。このような場合には FDR の方法を適用すると、擬陽性の割合を制御して有意差検定を行うことができる。



表 5 本組換えトウモロコシの種子中のアミノ酸組成 (社外秘)

表 6 本組換えトウモロコシの地上部植物体中のアミノ酸組成 (社外秘)

5

表 7 本組換えトウモロコシ種子中の遊離アミノ酸組成 (社外秘)

表 8 本組換えトウモロコシ地上部植物体中の遊離アミノ酸組成 (社外秘)

10 なお、野生動物が本組換えトウモロコシを摂取した場合を想定し、上記 5 種の *N*-アセチルアミノ酸の増加が影響を与えないかどうかについて、ブロイラーの飼養試験及びラットの 90 日経口投与毒性試験により検討した。その結果、本文第二. 2. (1) (33 ページ) に述べるように、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと栄養学的及び毒性学的に同等であることが示された。

15

## B ZM-HRA 蛋白質

20 ZM-HRA 蛋白質は、内在性 ALS 蛋白質と同様、分枝アミノ酸合成経路で作用する (図 2、12 ページ)。このうち、バリン・ロイシン合成経路においては、内在性 ALS 蛋白質は、バリンによるフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによるフィードバック制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼが、イソロイシンによるフィードバック制御を受けることが知られている (生化学辞典, 1998)。したがって、内在性 ALS 及び ZM-HRA 蛋白質が同時に分枝アミノ酸合成経路で作用した場合において、フィードバック制御が働き、これらの分枝アミノ酸含有量が増加することはないと考えられる。

25

30 実際に、本組換えトウモロコシの種子及び地上部植物体中のアミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成の分析を行った結果、非組換えトウモロコシとの間で、バリン、ロイシン及びイソロイシンに統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) は認められなかった (表 5~表 8、16 ページ)。

30

## C GAT4621 及び ZM-HRA 蛋白質が相互に影響する可能性

35 GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートのアセチル化に関与する蛋白質であり、ZM-HRA 蛋白質は分枝アミノ酸合成に関与する遺伝子である (本文第一. 2. (1). ロ. ②~③、8~16 ページ)。したがって、両蛋白質は機能及び基質が異なっており、相互に影響をおよぼすとは考え難い。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

5

本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターは、プラスミド PHP24279 である (図 3、18ページ)。

### ロ 特性

10

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド PHP24279 の塩基数は 50,371 bp である。T-DNA 領域 (7,440 bp) の塩基配列を別紙 1 の図 3 に示した。

15

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

特定の機能を有する塩基配列として、プラスミド PHP24279 の外骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子、*tetA* 遺伝子及び *spc* 遺伝子がある。これらの遺伝子は、それぞれ抗生物質のテトラサイクリン (tetracycline) 及びスペクチノマイシン (spectinomycin) に対する耐性を付与する。本抗生物質耐性マーカーは、微生物中でベクターを増殖させる際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するために用いた。これらの抗生物質耐性遺伝子を含む外骨格領域は、宿主には導入されていない (別紙 4)。

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

プラスミド単独での感染を可能とする配列はプラスミド PHP24279 には含まれていない。したがって、プラスミド PHP24279 自体に感染性はない。

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

5

プラスミド PHP24279 における供与核酸全体の構成を図 3 (18ページ) に示した。

図 3 プラスミド PHP24279 における供与核酸の構成及び制限酵素切断地図  
(社外秘)

10

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

15

宿主への核酸の導入は、アグロバクテリウム形質転換法により行った (Zupan and Zambryski, 1995 and 1997)。

#### ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

20

本組換えトウモロコシの作出から選抜・育成の過程は以下のとおりである。

##### ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

25

図 4 (19ページ) に示したように、除草剤グリホサート及び抗生物質カルベシニリンを用い、形質転換体を選抜した。

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

30

形質転換カルス選抜時の培地中に、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質のカルベニシリンを添加してアグロバクテリウムを除去した。アグロバクテリウムが除去されたことは、カルスの一部をカルベニシリンを含まない培地で培養して確認した。また、後代においても同菌体の残存がないことを PCR 分析により確認した。

35

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

40

本組換えトウモロコシの育成経過を図 5 (19ページ) に示した。本組換えトウモロコシの承認申請の範囲は、図 5の育成経過における T0 以降である。



(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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

gat4621 遺伝子の分離比

10 本組換えトウモロコシの BC0 世代及び BC1 世代 (図 5、19ページ) を用い、除草剤グリホサート耐性を指標として *gat4621* 遺伝子の分離比を検定した。その結果、表 9 (20ページ) に示すように、*gat4621* 遺伝子は、メンデルの法則に従い安定して伝達していることが確認された。

表 9 除草剤グリホサート耐性を指標とした *gat4621* 遺伝子の分離比\*

供試世代	実測値		期待値		P 値
	耐性個体数	感受性個体数	耐性個体数	感受性個体数	
BC0	82	80	81	81	0.88
BC1	59	56	57.5	57.5	0.78

15 \* BC0 世代及び BC1 世代の種子をそれぞれ播種し、4 葉期に除草剤グリホサート(薬量:0.876 kg ae/ha) を散布した。*gat4621* 遺伝子がゲノムの 1 ヶ所に存在する場合の分離比の期待値を 1:1 として  $\chi^2$  検定を行った。  
(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

zm-hra 遺伝子の分離比

20

本組換えトウモロコシの BC2 及び BC3 世代 (図 5、19ページ) を用い、PCR 分析で *zm-hra* 遺伝子を有する個体数を計測し、分離比を検定した。その結果、表 10 (20ページ) に示すように、*zm-hra* 遺伝子は、メンデルの法則に従い安定して伝達していることが確認された。

25

表 10 PCR 分析による *zm-hra* 遺伝子の分離比\*

供試世代	個体数実測値		個体数期待値		P 値
	<i>zm-hra</i> 遺伝子あり	<i>zm-hra</i> 遺伝子なし	<i>zm-hra</i> 遺伝子あり	<i>zm-hra</i> 遺伝子なし	
BC2	51	48	49.5	49.5	0.84
BC3	52	45	48.5	48.5	0.54

30 \* BC2 及び BC3 世代個体を栽培し、各個体から葉を採取しゲノム DNA を抽出して、*zm-hra* 遺伝子について PCR 分析を行った。*zm-hra* 遺伝子がゲノムの 1 ヶ所に存在する場合の分離比の期待値を 1:1 として  $\chi^2$  検定を行った。  
(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

これらのことから移入された核酸が、トウモロコシ染色体ゲノム上に存在することが示された。

5 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

本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子のコピー数及び複数世代における伝達の安定性を確認するため、サザンブロット分析を行った（別紙4）。

10 分析には、2006年に米国で栽培した BC1 世代及び BC0S2 世代の 2 世代（図 5、19ページ）を用いた。各世代の植物 4 個体の葉サンプルからゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *EcoR* V 又は *Spe* I で切断した。プローブには、*gat4621* 遺伝子領域及び *zm-hra* 遺伝子領域を用いた。

15 制限酵素 *EcoR* V は、プラスミド PHP24279 の T-DNA 領域に 1 ヶ所の切断認識部位を持ち、*gat4621* 遺伝子発現カセット側と *zm-hra* 遺伝子発現カセット側に切断する（図 6、22ページ）。したがって、本組換えトウモロコシに完全な T-DNA の 1 コピーが導入された場合、*gat4621* 遺伝子プローブ及び *zm-hra* 遺伝子プローブではそれぞれ、3,800bp 以上及び 3,700bp 以上の特異的なバンドがそれぞれ 1  
20 つずつ検出される。

制限酵素 *Spe* I は、プラスミド PHP24279 の T-DNA の両側末端近くの 2 ヶ所を切断し、T-DNA 両末端の *pinII* ターミナーを含まない 6,773bp の T-DNA 断片を生じる（図 6、22ページ）。本組換えトウモロコシに完全な T-DNA の 1  
25 コピーが導入された場合、各々の遺伝子をプローブにすることで、いずれも 6,773bp のバンドが 1 つずつ検出される。

*zm-hra* 遺伝子はトウモロコシの *zm-als* 遺伝子由来のため、本遺伝子をプローブに用いたサザンブロット分析では、トウモロコシの内在性 *als* 遺伝子由来のバンドも検出される。  
30

サザンブロット分析の要約を表 11（22ページ）に示した。

35 *EcoR* V で切断した場合は、いずれのプローブにおいても、想定されたバンドがそれぞれ 1 つずつ検出された。プラスミド PHP24279 の T-DNA から想定された最小断片サイズよりいずれも大きかったことから、1 コピーの完全な *gat4621* 遺伝子発現カセットと *zm-hra* 遺伝子発現カセットが、本組換えトウモロコシに導入されたことが示された。

40 *Spe* I では、いずれのプローブの場合にも、陽性対照で検出された 6,773bp のバンドサイズと一致するバンドが 1 つずつ検出された（表 11、22ページ）。この結果から、本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子はプラスミド PHP24279 の完全な T-DNA 領域であることが示された。

5 以上、本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子は、1 コピーの完全な *gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子発現カセットからなるプラスミド PHP24279 の T-DNA 領域であることが示された。また、BC1 世代及び BC0S2 世代におけるサザンブロット分析結果は一致しており、本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子が複数世代にわたり安定的に伝達されていることが示された。

表 11 サザンブロット分析結果の要約

プローブ	制限酵素	予想される断片長 (bp) <sup>1)</sup>	検出された断片長 (bp) <sup>2)</sup>	参照先 <sup>3)</sup>
<i>gat4621</i>	<i>EcoR V</i>	>3,800	約 6,100	別紙 4 の図 4
	<i>Spe I</i>	6,773	6,773	別紙 4 の図 6
<i>zm-hra</i>	<i>EcoR V</i>	>3,700	>8,600	別紙 4 の図 5
	<i>Spe I</i>	6,773	6,773	別紙 4 の図 7

1) プラスミド PHP24279 の T-DNA の 1 コピーが本組換えトウモロコシのゲノムに導入された場合、  
10 用いた制限酵素とプローブの組合せで特異的に検出が想定される DNA 断片の大きさ。なお、ボーダー領域の DNA 断片の大きさは、100bp 単位に切り上げた。

2) 導入遺伝子として特異的に検出された DNA 断片の大きさ。陰性対照に見られるバンドは除いた。

3) 別紙 4 における図の番号を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

15 図 6 サザンブロット分析に基づく本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子模式図 (社外秘)

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

サザンブロット分析の結果、本組換えトウモロコシには複数コピーが存在していないことを確認している (本文第一.2 (4) ②、21 ページ)。

25 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 GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が、本組換えトウモロコシ中で安定して産生されることを、除草剤散布試験及び ELISA 分析により確認した。散布試験は、BC0 x PH1CA 世代及び BC0S1 x PH1CA 世代 (図 5、19 ページ) を用いて 2006 年に行った。

## 除草剤散布試験

5 除草剤グリホサート、アセト乳酸合成酵素阻害剤の散布又は両剤の混合散布を行った結果、両世代において薬害は観察されなかった（表 12、23ページ）。このことから、付与された除草剤耐性形質が、複数世代にわたり安定的に遺伝していることが確認された。

表 12 除草剤散布による薬害程度の比較<sup>1)</sup>

散布薬剤 \ 供試世代	本組換え トウモロコシ (BC0 x PH1CA)	非組換え トウモロコシ	本組換え トウモロコシ (BC0S1 x PH1CA)	非組換え トウモロコシ
除草剤グリホサート <sup>2)</sup>	0	100±0	0	100±0
アセト乳酸 合成酵素阻害剤 <sup>3)</sup>	0	13±6	0	25±6
除草剤グリホサート + アセト乳酸 合成酵素阻害剤	0	100±0	0	100±0
薬剤非散布	0	0	0	0

- 10 1) n=4、平均値±標準誤差。1プロット当たり5個体の4反復を用い、4葉期に散布した。薬害程度は、散布後21日目に0%（健全）から100%（完全枯死）の間で目視評価した。
- 2) 除草剤グリホサートは0.876kg ae/haの薬量で散布した。
- 3) アセト乳酸合成酵素阻害剤にはチフェンスルフロンメチルとトリベヌロンメチルを用い、ともに26.25g ai/haの薬量で混合して散布した。

15 （本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある）

加えて、これまでの育成過程においても、温室やほ場で、除草剤グリホサート散布に対する耐性検定を行い、安定した除草剤グリホサート耐性を示すことを確認した。

20

## ELISA 分析

25 除草剤散布直前に両世代の4葉期の葉組織を採取し、ELISA分析を行った結果、GAT4621蛋白質とZM-HRA蛋白質が、両世代で安定的に産生していることを確認した（表 13、24ページ）。



表 13 本組換えトウモロコシの葉における GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質の産生量

蛋白質量* (ng/mg 乾物重)	BC0 x PH1CA 世代 (n=19)	BC0S1 x PH1CA 世代 (n=20)
GAT4621 蛋白質	34 ± 2 (5.8 - 49)	34 ± 1 (24 - 48)
ZM-HRA 蛋白質	7.2 ± 0.4 (4.3 - 11)	6.9 ± 0.3 (4.1 - 9.5)

\* 平均値±標準誤差 (最小値-最大値)

5 (本表に記載された情報に係る権利及び責任はデュポン(株)にある)

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

10 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。

(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

15 ① 検出及び識別の方法

本組換えトウモロコシの検出及び識別には、葉又は種子から抽出した 40 及び 12ng のゲノム DNA を鋳型とし、以下の条件で PCR 法を行う。

- 20
- ・ プライマー：ポリユビキチン遺伝子のイントロン領域と *gat4621* 遺伝子の境界領域を増幅するプライマー対 (別紙 1 の図 4)
  - ・ アニーリング温度：55°C
  - ・ サイクル回数：35 回

25 アガロース電気泳動において、*gat4621* 遺伝子発現カセットに特異的な 203bp のバンドが確認される。

② 感度

30 葉又は種子から抽出したゲノム DNA をサンプルとした場合の検出限界は、それぞれ 40pg (0.1%) 及び 120pg (1%) である。

③ 信頼性

35 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのそれぞれ 5 個体の葉及び種子を用いて分析を行った結果、本法に再現性があることを確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 5 ① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本組換えトウモロコシは、*gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子の導入により、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を有する。

10 除草剤グリホサートは、雑草の生育期に散布する茎葉処理型除草剤であり、生育している雑草はほぼ完全に防除することができるが、散布時に未発芽の雑草(後発雑草)は防除できない。アセト乳酸合成酵素阻害剤は土壌処理兼茎葉処理型除草剤であり、除草剤グリホサートでは防除できない後発雑草の防除が可能である。

15 以上のことから、両除草剤の混合散布ができれば、散布時に生育している雑草のみならず、後発雑草も防除可能となり、1度の散布で従来よりも効果的に雑草防除を行うことができる。特に後発雑草が多く認められるほ場において、このような混合散布が可能になれば、雑草防除管理に要する人件費や燃料代を軽減できる利点がある。また、一般に農地で1種類の除草剤散布を続けた場合、まれに突然変異による耐性雑草が発生することが知られているが、雑草が2種類の除草剤に対する耐性を同時に獲得する可能性は非常に低い。したがって、両除草剤の混合散布は、1種類だけの除草剤散布に比べ、耐性雑草が出現する確率を低くできるものと期待される。

- 25 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

30 本組換えトウモロコシの BC1S1 x PH1CA 世代(図 5、19ページ)を用い、2007年、我が国の独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所において隔離ほ場試験を実施し、本組換えトウモロコシと宿主の属する分類学上の種との間の相違について評価した(別紙 5)。対照として本組換えトウモロコシの育成過程で挿入遺伝子の分離によって得た Null 系統に、自殖系統 PH1CA をかけ合わせて得た世代 BC1S1 x PH1CA null を用いた(図 5、19ページ)。

- 35 a 形態及び生育の特性

40 農林水産省によるトウモロコシの特性分類調査基準を参考に、播種日、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、草型、分けつ数、成熟期、粒色、粒形、稈長、着雌穂高、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、百粒重、地上部生体重の計 19 項目について 5 反復で調査した。統計処理が可能な項目については、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t 検定を行った。

その結果、いずれの形質においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差 ( $P < 0.05$ ) あるいは相違は認められなかった (表 14、26ページ)。

5 表 14 形態及び生育の特性 (社外秘)

b 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えトウモロコシの生育初期における低温耐性について検討した。

10

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの収穫種子を、1プロット当たり 10 粒ずつポットに播種した。発芽後、1ポット 3 本立てとし、植物体を 3~4 葉期まで温室で育成した。その後、組換え体隔離ほ場内 (試験時の平均気温  $4^{\circ}\text{C}$ 、平均最低気温  $-1^{\circ}\text{C}$  であった) へ移し、7、14、19 日目にポットごとに低温による障害程度を目視により 7 段階で評価した。評価は、ほ場における 1プロットを 1 反復とする 5 反復で行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t-検定を行った。

15

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの植物体はともに低温処理 19 日目に枯死し、両者間で生育初期における低温耐性レベルに相違がないことを確認した (表 15、26ページ)。

20

表 15 低温処理における障害程度の比較 (低温耐性) (社外秘)

25

c 成体の越冬性又は越夏性

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの植物体を収穫期以降も収穫せずには場で栽培を続け、植物体の生育状況を目視観察し、成体の越冬性を検討した。

30

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの植物体は 10 月下旬にいずれも枯死し、両者間に程度の相違は観察されなかった。

35 d 花粉の稔性及びサイズ

出穂前の本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの各プロットから 6 本ずつ雄穂を採取し、切り穂にして一定期間置き、葯から花粉を採集した。花粉を酢酸カーミン液で染色し写真撮影した。1プロットサンプル当たり 1,500 個以上の花粉のうち、染色が確認された割合を算出した。花粉サイズについては、1プロットサンプル当たり 10 個の花の長径を計測した。本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t-検定を行った。

40

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの花粉はいずれも99%以上が染色され、両者間で染色率に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (表 16、27ページ)。花粉のサイズ (長径) においても両者間で統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (表 16、27ページ)。

5

以上、本組換えトウモロコシの花粉の稔性及びサイズは、非組換えトウモロコシと相違がないことが示された。

表 16 染色された花粉の割合及び花粉の直径 (社外秘)

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

種子の生産量に関する指標として、粒列数、一列粒数及び百粒重を調査したが、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で、これらの項目に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (表 14、26ページ)。したがって、本組換えトウモロコシの種子の生産量は、非組換えトウモロコシと相違がないことが示された。

20

脱粒性：

収穫時のトウモロコシ雌穂はいずれも苞皮に覆われており、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの脱粒性はともに「難」であり、両者の間に相違は認められなかった。

25

発芽率：

種子を1プロット当たり60粒採取し、収穫後数時間以内にポットに播種して温室で栽培し、播種20日後に発芽率の調査を行った。試験は、ほ場における1プロットを1反復とする5反復で行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間でt検定を行った。

30

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシのいずれの種子も93%以上の発芽率を示し、両者間で統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (表 17、27ページ)。

35

表 17 収穫種子の発芽率 (社外秘)

休眠性：

40

トウモロコシ種子の休眠性はほとんどないと言われている (CFIA, 1994)。上記発芽率の試験において、収穫後数時間以内の種子を播種して発芽率を調査した結果、いずれのトウモロコシにおいても90%以上の発芽率であったことから、本組換えトウモロコシも非組換えトウモロコシと同様、休眠性がないものと考えた (表 17、27ページ)。

以上の結果から、本組換えトウモロコシの種子の生産量、脱粒性及び発芽率は、非組換えトウモロコシと相違がないことが示された。また、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと同様に休眠性がないものと考えた。

## 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、我が国においては生育していない。したがって、交雑の可能性はないため、交雑率については調査を行わなかった。

10

## g 有害物質の産生性

トウモロコシが生物多様性に影響を与える有害物質を産生するという報告はない。

15

本組換えトウモロコシには、GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長や土壤微生物に有害な影響を与えることは報告されていない。そこで、有害物質の非意図的な産生がないことを確認するため、以下の試験を行った。

20

### 根から分泌され他の植物に影響を与えるもの（後作試験）

収穫期において、試験区の各プロット当たり 4 植物体の株元周囲 20~30cm から根圏土壌を採取した。植物残渣を取り除き混和した後、各プロットの土壌をそれぞれ 20 個のポット（幅 6cm×6cm、深さ 5.5cm）に詰めた。検定作物としてハツカダイコン（品種：アイシクル）を 1 ポット当たり 1 粒播種して発芽率を調査し、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの栽培土壌の間で t-検定を行った。また、14 日間温室内（設定 20℃）で生育させた後、植物体を採取して乾物重量を測定した。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 5 反復で行った。20 ポットごとに発芽した植物体乾物重の平均値を 1 反復の値とし、栽培土壌の間で t-検定を行った。

25

30

その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの栽培土壌間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾物重に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（表 18、28ページ）。

35

表 18 後作試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重（社外秘）

米国においても、2006 年に根圏土壌法（Iqubal *et al.*, 2004）により、レタスの発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを指標として、根から分泌され他の植物体に影響を与える内因性物質の産生性を調査した。その結果、上記の試験と同様に、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で各指標に統計学的有意差は認められなかった（除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウ

40

モロコシの生物多様性影響評価書の概要，[http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_098140\\_6ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_098140_6ap.pdf)。

5 以上、本組換えトウモロコシにおいても非組換えトウモロコシと同様、根から分泌され他の植物に影響を与えるような有害物質の産生性はないと考えた。

#### 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるもの（鋤込み試験）

10 収穫期の植物体の地上部を各プロットより採取して乾燥粉末を調製した。これを育苗用培土に0.5% (w/w) の割合で混和して、1プロット当たり20個のポット（直径6.5cm、深さ8cm）に詰めた。検定作物としてハツカダイコン（品種：アイシクル）を1ポット当たり1粒播種して発芽率を調査し、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの鋤込み土壌の間でt-検定を行った。また、播種後14日間温室内（設定20℃）で生育させた後、植物体を採取して乾物重量を測定した。  
15 試験は、ほ場における1プロットを1反復とする5反復で行った。20ポットごとに発芽した植物体乾物重の平均値を1反復の値とし、鋤込み土壌の間でt-検定を行った。

20 その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの植物体鋤込み土壌間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾物重に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（表19、29ページ）。

表19 鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重（社外秘）

25 米国においても、2006年にサンドイッチ法（Fujii *et al.*, 2003 and 2004、農業環境研究成果情報、1997）により、レタスの発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを指標として、枯死した後に他の植物に影響を与える内因性物質の産生性について調査した。その結果、上記の試験と同様、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で各指標に統計学的有意差は認められなかった（除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシの生物多様性影響評価書の概要，[http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_098140\\_6ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_098140_6ap.pdf)）。  
30

35 以上、本組換えトウモロコシにおいても非組換えトウモロコシと同様、枯死した後に他の植物に影響を与える内因性有害物質の産生性はないと考えた。

#### 根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの（土壌微生物相試験）

40 収穫期に、各プロット4植物体の株元から土壌を採取し、プロットごとに混和した。滅菌水を加え $10^{-3}$ から $10^{-6}$ までの土壌希釈液を作成し、希釈平板法により、25℃で静置培養した。培地は、細菌及び放線菌の場合、PTYG培地を、また糸状菌についてはローズベンガル培地を用い、それぞれ7日間及び3日間培養した。試験は、ほ場における1プロットを1反復とする5反復で行い、本組換えトウモ

ロコシ及び非組換えトウモロコシの栽培土壌における細菌数、糸状菌数及び放線菌数を計測し、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t-検定を行った。

- 5        その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの栽培土壌間における細菌数、糸状菌数及び放線菌数に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (表 20、30ページ)。

10        このことから、根から分泌され土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性に、両者間で相違は認められなかった。

表 20 採取土壌中の細菌数、糸状菌数及び放線菌数 (社外秘)

### 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

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。

20

#### (2) 使用等の方法

—

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

—

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

「緊急措置計画書」を参照 (38ページ)。

#### 35 (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

—

#### 40 (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシを用いたほ場における栽培試験を、米国の延べ 22 ヶ所において 2005 年から 2006 年に実施した。

5 なお、表 2 (9ページ) の試験において、本組換えトウモロコシにおける除草剤グリホサート耐性レベルを、農薬登録で認められている最大使用量に加えて、その 16 倍及び 32 倍の薬量で除草剤グリホサートを散布して評価した。この 16 倍及び 32 倍の薬量での散布は、除草剤グリホサート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。

本組換えトウモロコシの申請は、下記の表 (社外秘) に示した国で行った。

10 我が国においては、2007 年 5 月に第一種使用等 (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) が承認された。2007 年 5 月から 12 月に、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所にて隔離ほ場試験を実施した。また、2008 年 1 月、厚生労働省に食品としての安全性の確認申請を、2008 年 2 月、農林水産省に飼料としての安全性の確認申請をそれぞれ  
15 行っている。



## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 トウモロコシ(*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) は、長年にわたり食品・飼料・加工用として海外より輸入されており、我が国においても食品・飼料用として栽培されている。このような輸入や栽培の歴史を通じて、我が国においてトウモロコシが野生化し、野生動植物の生育に影響をおよぼしたという報告はない。本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの比較により、影響が生ずる可能性について以下に考察した。

10

### 1 競合における優位性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15

トウモロコシに関し、我が国において野生化したという報告はない。

20

我が国で実施した隔離ほ場試験において、本組換えトウモロコシの諸特性、すなわち、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について評価を行ったが、非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(本文第一. 2. (6). ②. a~e、25~27ページ)。米国で行ったほ場試験においても、本組換えトウモロコシの諸特性は非組換えトウモロコシと同程度であった(除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシの生物多様性影響評価書の概要, [http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_098140\\_6ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_098140_6ap.pdf))。

25

なお、本組換えトウモロコシには除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性が付与されている。しかしながら、自然条件下でこれらの除草剤が散布されることは想定され難い。

30

以上、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。

35

#### (2) 影響の具体的内容の評価

—

#### (3) 影響の生じやすさの評価

40

—

#### (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、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。

### 2 有害物質の産生性

10

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシにおいて、生物多様性に影響を与えるような有害物質の産生は報告されていない。

15

本組換えトウモロコシの有害物質の産生性に関し、我が国の隔離ほ場試験において、栽培土壌を用いた後作試験、収穫後の植物を用いた鋤込み試験及び栽培土壌中の微生物相試験を実施した。その結果、後作試験及び鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率及び乾物重、土壌微生物相試験における細菌数、糸状菌数及び放線菌数において、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった（本文第一． 2． (6)． ②． g、28ページ）。

20

なお、本組換えトウモロコシで発現する GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が有害物質であるという報告はなく、既知アレルゲン及び既知の毒性蛋白質との相同性も認められていない（本文第一． 2． (1)． ロ． ②、8ページ）。さらに、両蛋白質の機能や基質は異なり、両蛋白質の産生が相互に影響をおよぼすことは考え難い（本文第一． 2． (1)． ロ． ③、13ページ）。

25

また、本組換えトウモロコシでは5つの *N*-アセチルアミノ酸の有意な増加が認められた。これらの *N*-アセチルアミノ酸は、非組換えトウモロコシ中にも存在するものであり、有害物質であるとの報告もない。本組換えトウモロコシのアミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成について検討した結果、それらの量は非組換えトウモロコシの変動の範囲内であり、*N*-アセチルアミノ酸の増加は、植物体内で合成されるアミノ酸及び遊離アミノ酸の種類及び量に影響をおよぼすものではないことが示された。さらに、野生動物が本組換えトウモロコシを摂取した場合を想定して、ブロイラーの飼養試験及びラットの90日経口投与毒性試験により検討した。

30

35

ブロイラーの飼養試験は、本組換えトウモロコシ又は非組換えトウモロコシを含む飼料を、ブロイラーの初生雛から42日間給餌して実施した。その結果、生体重、死亡率、飼料要求率並びに肝臓、腎臓及び器官の重量割合において、本組換えトウモロコシを含む飼料と非組換えトウモロコシを含む飼料を給餌したブロイラー間に、相違は認められなかった（別紙6）。

40

5 ラットの90日経口投与毒性試験は、本組換えトウモロコシ又は非組換えトウモロコシを含む飼料をラットに13週間給餌して実施した。その結果、体重、体重増加量、摂餌量、食餌効率、一般状態及び死亡数、眼科学的検査、神経行動学的検査、臨床病理学的検査、臓器重量割合、剖検所見及び顕微鏡所見において、本組換えトウモロコシを含む飼料と非組換えトウモロコシを含む飼料を給餌したラット間に、相違は認められなかった（別紙7）。

10 これらのブローラーの飼養試験及びラットの90日経口投与毒性試験結果から、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと栄養学的及び毒性学的に同等であることが示されたことから、*N*-アセチルアミノ酸の有意な増加が、野生動植物等に対して有害な影響をおよぼすとは考え難い。

15 以上、有害物質の産生性に関して、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。

15 (2) 影響の具体的内容の評価

—

20 (3) 影響の生じやすさの評価

—

25 (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、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。

30 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

35 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、交雑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

40 —

(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

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。

10

4 その他の性質

本組換えトウモロコシにおいて、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かった。

15

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

5 宿主であるトウモロコシ (*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、野生動植物の生育に影響をおよぼしたという報告はない。

10 競合における優位性に関して、我が国の隔離ほ場試験において評価した結果、本組換えトウモロコシの諸特性は非組換えトウモロコシと統計学的有意差あるいは相違のないことが示された。本組換えトウモロコシには、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性が付与されているが、自然条件下でこれらの除草剤が散布されることは想定され難い。

15 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、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。

20 トウモロコシについて、生物多様性に影響を与えるような有害物質の産生は報告されていない。有害物質の産生性について、我が国の隔離ほ場試験により、栽培土壌を用いた後作試験、収穫後の植物を用いた鋤込み試験及び栽培土壌中の微生物相試験を実施した。その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった。

25 本組換えトウモロコシで産生される GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が有害物質であるという報告はなく、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質とのアミノ酸配列の相同性も認められていない。

30 また、非組換えトウモロコシに比べて増加した 5 つの *N*-アセチルアミノ酸についても、これらが有害物質であるとの報告もない。分析の結果、この増加は植物体内で合成されるアミノ酸及び遊離アミノ酸の種類及び量に影響をおよぼすものではないことが示された。さらに、ブロイラーの飼養試験及びラットの 90 日経口投与毒性試験においても、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと栄養学的及び毒性学的に同等であることが示された。これらのことから、*N*-アセチルアミノ酸の有意な増加が、野生動植物等に対して有害な影響をおよぼすとは考え難い。

35 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、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。

40 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。

以上、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

参考文献

【社外秘情報につき非開示】

5

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合及び栽培目的の場合）

平成 20 年 3 月 11 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 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ（*gat4621, zm-hra, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis）（DP-098140-6, OECD UI : DP-098140-6）（以下、本組換えトウモロコシと表記）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）の部門長から構成される。危機対策本部が、本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレット・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 2 第一種使用等の状況の把握の方法

35 弊社は、本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレット・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。

35

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

40 米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、米国における本組換えトウモロコシ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、本組換えトウモロコシ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。

5 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。

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

10

科学的根拠に基づき、本組換えトウモロコシ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。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

20 科学的根拠に基づき、本組換えトウモロコシ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、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。