

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 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *cry1F*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Iltis*)(Bt11×MIR162×*B.t. Cry1F* maize line 1507×GA21, OECD UI : SYN-BT011-1×SYN-IR162-4×DAS-01507-1×MON-00021-9) (Bt11, MIR162, *B.t. Cry1F* maize line 1507 及び GA21 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

目 次

第一種使用規程承認申請書	1
住所等変更報告書	2
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 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	2
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
イ、基本的特性	4
ロ、生息又は生育可能な環境の条件	4
ハ、捕食性又は寄生性	4
ニ、繁殖又は増殖の様式	4
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	4
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	5
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	5
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	5
ホ、病原性	6

へ、有害物質の産生性.....	6
ト、その他の情報.....	6
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	6
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
イ、構成及び構成要素の由来.....	6
¹⁾ 構成的プロモーター: 植物体の全体において、目的遺伝子を発現させるプロモーター。.....	9
ロ、構成要素の機能.....	10
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.....	10
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性(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.....	10
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	13
(2) ベクターに関する情報.....	14
イ、名称及び由来.....	14
ロ、特性.....	14
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	14
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	15
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.....	15
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	15
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成.....	15
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法.....	16
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	16
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	16
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.....	16
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.....	16
(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.....	18
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	18
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.....	18

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.....	19
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.....	19
⑤ ウイルスの感染その他の経路を經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.....	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.....	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	20
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.....	20
したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 を個別に調査した結果に基づき評価した。.....	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.....	25
a 形態及び生育の特性.....	26
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	28
c 成体の越冬性又は越夏性.....	28
d 花粉の稔性及びサイズ.....	28
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	28
f 交雑率.....	29
g 有害物質の産生性.....	29
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	29
(1) 使用等の内容.....	29
(2) 使用等の方法.....	29
(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.....	29
(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.....	29
(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2 項目ごとの生物多様性影響の評価	31
1. 競合における優位性.....	32
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
(2) 影響の具体的内容の評価.....	33
(3) 影響の生じやすさの評価.....	33
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
2. 有害物質の産生性.....	33
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	33
(2) 影響の具体的内容の評価.....	35
(3) 影響の生じやすさの評価.....	37
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	38
3. 交雑性.....	38
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
(2) 影響の具体的内容の評価.....	38
(3) 影響の生じやすさの評価.....	38
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	38
4. その他の性質.....	38
第3 生物多様性影響の総合的評価.....	40
引用文献	43
緊急措置計画書.....	44

第一種使用規程承認申請書

平成 22 年 4 月 6 日

農林水産大臣 赤松 広隆 殿
 5 環境大臣 小沢 鋭仁 殿

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 村田 興文
 10 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	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>cry1Ab</i> , 改変 <i>vip3A</i> , <i>cry1F</i> , <i>pat</i> , <i>mEPSPS</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt11 × MIR162 × <i>B.t.</i> Cry1F maize line 1507 × GA21, OECD UI : SYN-BTØ11-1 × SYN-IR162-4 × DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØØ21-9) (Bt11, MIR162, <i>B.t.</i> Cry1F maize line 1507 及び GA21 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	—

住所等変更報告書

平成22年7月1日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課 御中

氏名 シンジェンタジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 村田 興文 印
住所 東京都中央区晴海一丁目8番10号
オフィスタワーX

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、平成22年4月6日付けで申請した第一種使用規程承認申請書の氏名及び住所について、次のとおり変更が生じたので報告します。

変更前の氏名及び住所 シンジェンタシード株式会社
代表取締役社長 村田 興文
千葉県香取郡多古町高津原向ノ台401-2
変更後の氏名及び住所 シンジェンタジャパン株式会社
代表取締役社長 村田 興文
東京都中央区晴海一丁目8番10号オフィスタワーX

変 更 し た 日 平成22年7月1日
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 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *cry1F*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(Bt11×MIR162×*B.t.* *Cry1F* maize line 1507×GA21, OECD UI : SYN-BT011-1×SYN-IR162-4×DAS-01507-1×MON-00021-9)
(Bt11, MIR162, *B.t.* *Cry1F* maize line 1507及びGA21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。)

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 宿主の品種名又は系統名

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000

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 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *cry1F*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11×MIR162×*B.t. Cry1F maize line 1507*×GA21, OECD UI:SYN-BT011-1×SYN-IR162-4×DAS-01507-1×MON-00021-9) (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。)は、以下の4つのトウモロコシを、従来の交雑育種法により掛け合わせることで作出された。

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

25 (改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI:SYN-BT011-1) (以下「Bt11」という。)

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ

(改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI:SYN-IR162-4) (以下「MIR162」という。)

30 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) (以下「Cry1F line 1507」という。)

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ

35 (*mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (GA21, OECD UI:MON-00021-9) (以下「GA21」という。)

本評価書中に記載した内容については、各親系統の申請時に提出した情報を参照している。なお、GA21に関しては、シンジェンタ社の独自データ及び国際特許公開情報(文献 1)を参照した。

5

親系統である Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 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。それぞれの作出には以下の系統が使用された。

- 10 Bt11 : E89 系統
MIR162 : NP2499/NP2500 系統
Cry1F line 1507 : A188/B73 系統
GA21 : AT 系統(文献 1)

- 15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの栽培起源種は現存せず(文献 2)、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。

- 20 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 3)。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 3、文献 4)、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。

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、メキシコ及び中米の複数地域説、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 3)。考古学的検証に基づくと、最初にトウモロコシが出現したのは紀元前 6800
35 文献 4)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポッ

プ、スイート、フリントのような多数の変異種が生じたと考えられる(文献 4)。1492年のアメリカ大陸発見後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した(文献 5)。

5 我が国へは天正年間(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、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた(文献 5)。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 5)。

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、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。国際連合食糧農業機関(FAO)の統計によると、2008 年におけるトウモロコシの世界総栽培面積は 1 億 6,102 万ヘクタールで、その上位 3 カ国は米国(3,183 万ヘクタール)、
15 中国(2,988 万ヘクタール)及びブラジル(1,445 万ヘクタール)であった(文献 6)。また、同年の世界総生産量は 8 億 2,271 万トンで、その上位 3 カ国は栽培面積と同じく、米国(3 億 0,738 万トン)、中国(1 億 6,604 万トン)及びブラジル(5,902 万トン)であった(文献 6)。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
20 ている。

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州、イリノイ州、ネブラスカ州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いる。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
25 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 7)。

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、青刈りのサイレー
ジ用トウモロコシ(デント種)が 8 万 6,100 ヘクタール、生食用の未成熟トウモロコシ
30 (スイート種)が 2 万 5,600 ヘクタールであった(文献 8)。栽培面積における上位 3 都道府県は、青刈りのサイレージ用トウモロコシでは、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)、生食用の未成熟トウモロコシでは、北海道(9,070 ヘクタール)、千葉県(1,900 ヘクタール)及び長野県(1,510 ヘクタール)であった。

35

財務省貿易統計によると、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(文献 9)。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・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 10)。

5

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

10 —

ロ、生息又は生育可能な環境の条件

15 トウモロコシ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る(文献 3)。栽培に適しているのは、夏の平均気温が 21～27℃で無霜期間が 120～180 日の地域であり、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 2)。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 2)。なお、トウモロコシの種子の発芽適温は 33℃程度、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 2)。

20

ハ、捕食性又は寄生性

—

25

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

30 トウモロコシの種子は雌穂に着生するが、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拡散することはない(文献 3)。種子の休眠性は極めて低い。また、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する(文献 2)。

35

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 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 3)。

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

10 トウモロコシは他殖率 95%程度であるが、自家和合性のため自家受粉も行う(文献 11)。トウモロコシは近縁野生種であるテオシント及びトリプサカムと交雑可能であり、テオシントとは自然交雑が報告されているが、トリプサカムとの交雑は極めて困難で自然交雑は報告されていない(文献 4)。なお、我が国にはトウモロコシと交雑可能なこれら野生種が自生しているという報告はない。また、アポミクシスについての
15 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

20 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 11)。

25 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 2)。受粉は風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉であるが、自家不和合性はないので自殖もわずかに生じる(文献 2)。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 12)。

30 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 日である(文献 2)。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 2)。

35 我が国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ(*Helianthus annuus*)及びイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、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/cm²、イヌホオズ

キの葉では 71.1 粒/cm²であった(文献 13)。また、ほ場から 5 m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm²以内であった(文献 13)。花粉の寿命は環境条件によって大きく異なるが、盛夏のほ場条件下では 24 時間以内である(文献 11)。

ホ、病原性

—

10

ヘ、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報告されていない。

15

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

本スタック系統トウモロコシは、親系統である4つの組換えトウモロコシに由来するチョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性を有する。また、本スタック系統トウモロコシは一代雑種品種(F1)として商品化されることから、収穫される種子には遺伝的分離により本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれの導入遺伝子の組合せからなるスタック系統トウモロコシが含まれる。以下にBt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の調製等に関する情報の概要等を記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

30

イ、構成及び構成要素の由来

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 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～表 4(7～10 ページ)に示した。

35

表 1 Bt11 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
35S promoter	カリフラワーモザイクウイルス CM1841 株由来で、 <i>Dde I</i> ・ <i>Dde I</i> 断片として得られた。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)を恒常的に発現させる(文献 14)。
IVS6-ADH1	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S(<i>Adh1-S</i>)遺伝子(文献 15)由来のイントロン。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物における目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)の発現量を高めるために用いられた(文献 16)。
改変 <i>cry1Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株の <i>Cry1Ab</i> 蛋白質をコードする <i>cry1Ab</i> 遺伝子について、 <i>Cry1Ab</i> 蛋白質の有する殺虫活性に関与しない C 末端コード領域を一部欠失させ、また、GC 含量を変更し植物における発現量を高めるように塩基配列を改変した。ただし、 <i>Cry1Ab</i> 蛋白質のコア蛋白質のアミノ酸配列に変更はない。
NOS term	<i>Agrobacterium 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 のポリアデニル化シグナルを含む(文献 17、文献 18)。この配列により目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)の転写が終結される。
除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
35S promoter	カリフラワーモザイクウイルス <i>Cabb-s</i> 株由来で、 <i>AluI</i> ・ <i>DdeI</i> 断片として得た。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子(<i>pat</i>)を恒常的に発現させる(文献 19)。
IVS2-ADH1	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S(<i>Adh1-S</i>)遺伝子(文献 15)由来のイントロンである。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物中において目的遺伝子(<i>pat</i>)の発現量を高めるために用いられた(文献 16)。
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> の <i>PAT</i> 蛋白質をコードする遺伝子である。 <i>PAT</i> 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を植物に付与することから、遺伝子導入の際、組換え体を選抜するためのマーカーとして使用された。 <i>pat</i> 遺伝子は GC 含量を変更し植物における発現量を高めるように塩基配列が改変された。ただし、この改変により発現する <i>PAT</i> 蛋白質のアミノ酸配列は変更されていない(文献 20)。
NOS term	<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 のポリアデニル化シグナルを含む(文献 17、文献 18)。この配列により目的遺伝子(<i>pat</i>)の転写が終結される。
その他の領域(以下「外骨格領域」という。)	
構成要素	由来及び機能
ColE1 ori	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)プラスミド pUC18(文献 21、文献 22)由来の複製開始領域で、バクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点。
<i>amp^R</i>	大腸菌(<i>E. coli</i>)由来で、機能は β -ラクタマーゼをコードし、抗生物質アンピシリン耐性を付与する(文献 22)。

(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ジャパン株式会社に帰属する)

表 2 MIR162 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	由 来 及 び 機 能
チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット	
ZmUbiInt	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(1,010bp)を含むプロモーターで目的遺伝子を単子葉植物全組織で恒常的に発現させる(文献 23)。
改変 vip3A	一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である <i>B. thuringiensis</i> AB88 株由来の <i>vip3A</i> 遺伝子(文献 24)を、植物における発現に適したコドン(文献 25)に改変した遺伝子。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す改変 Vip3A 蛋白質をコードする。改変 Vip3A 蛋白質では、そのアミノ酸配列の 284 番目のアミノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。また、MIR162 で発現している改変 Vip3A 蛋白質では、284 番目のアミノ酸置換に加えて、形質転換体作成時の変異により 129 番目のメチオニンがイソロイシンに置換されている。
iPEPC9	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列。目的遺伝子の発現を高めるために用いた(文献 26)。
35S	カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA 由来のポリアデニル化配列(文献 27)。
選抜マーカー遺伝子カセット	
ZmUbiInt	前述と同じ。
<i>pmi</i>	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。)を産出する大腸菌(<i>E. 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 28)。
NOS	<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 (文献 29)。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる(文献 30)。
外骨格領域	
LB	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミド (文献 29)由来の T-DNA レフトボーダー領域(文献 31)。
<i>Spec</i>	大腸菌(<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 32)。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た。
Cos	大腸菌(<i>E. coli</i>)へのプラスミドの移入及び大腸菌(<i>E. coli</i>)におけるプラスミドの自己複製に必要なラムダファージの直鎖 DNA の付着末端領域(文献

	33)。
ColE1 ori	大腸菌(<i>E. coli</i>)由来のバクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点(文献 34)。
RB	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミド (文献 29)由来の T-DNA ライトボーダー領域(文献 35)。

(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ジャパン株式会社に帰属する)

表 3 Cry1F line 1507 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
<i>UBIZM1(2) Promoter</i>	<i>Zea mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター ¹⁾ (イントロン及び5'非翻訳領域を含む)(文献 36)。
<i>cry1F</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来のCry1F 蛋白質をコードする遺伝子。植物における発現を高めるため、最適化されている(GenBank AAA22347)。
<i>ORF25PolyA Terminator</i>	<i>A. tumefaciens</i> pTi5955 由来の転写を停止するためのターミネーター(文献 37)。
除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
<i>CAMV35S Promoter</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の35S 構成的プロモーター ¹⁾ (文献 38)。
<i>Pat</i>	<i>S. 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、最適化されている(文献 39)。
<i>CAMV35S Terminator</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するための35S ターミネーター(文献 38)。

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

表 4 GA21 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

除草剤グリホサート耐性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
Act promoter + intron	植物体全体で目的遺伝子の転写開始を誘導するイネのアクチン1遺伝子のプロモーターで、転写効率を高める働きをもつ第一イントロン領域までを含む(文献 40)。

sssu+mssu (以下「OTP」 という。)	ヒマワリのリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ (RuBisCo) 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列(sssu)と、トウモロコシの <i>RuBisCo</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列(mssu)からなる optimized transit peptide(OTP)配列で、目的遺伝子である <i>mEPSPS</i> 遺伝子によって発現する mEPSPS 蛋白質を、その作用の場である葉緑体に輸送する働きをもつ(文献 41)。
<i>mEPSPS</i>	トウモロコシの 5-エノール-ピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素(EPSPS) 遺伝子の突然変異によって得られた遺伝子(文献 42)で、除草剤グリホサートによって活性阻害を受けない 5-エノール-ピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素(mEPSPS)をコードし、野生型 EPSPS のアミノ酸配列における 102 番目のトレオニンがイソロイシンに、また、106 番目のプロリンがセリンに変わっている(文献 1)。
NOS	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニル化配列で、転写を終結させる働きをもつ(文献 17)。
外骨格領域	
構成要素	由 来 及 び 機 能
<i>amp</i>	バクテリオファージ M13 由来の lacI の一部配列、プロモーターplac 及び β-ガラクトシダーゼあるいは lacZ 蛋白質をコードする一部配列からなる lac 配列(文献 22)及び大腸菌(<i>E. coli</i>)のプラスミド pBR322 由来のアンピシリン耐性を付与する β-ラクタマーゼ遺伝子(<i>bla</i>)からなり(文献 43)、β-ラクタマーゼを発現することで構築プラスミドを含む大腸菌(<i>E. coli</i>)を選抜・維持する。
<i>ori-puc</i>	大腸菌(<i>E. coli</i>) のプラスミド pUC19 由来の複製開始領域で、大腸菌(<i>E. coli</i>)においてプラスミドの自律増殖能を付与する(文献 35)。

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

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、それぞれ表 1～表 4(7～10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

【害虫抵抗性蛋白質】

5 土壌細菌である *B. thuringiensis* から単離された殺虫活性蛋白質は、それぞれ特異的な昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種が殺虫活性蛋白質を摂取して消化すると、コア蛋白質となり標的昆虫の腸管上皮細胞の受容体に結合し、イオンバランスを乱して腸管上皮細胞を破壊し、その結果、消化プロセスが阻害されて殺虫活性を示すことが示唆されている(文献 44)。この作用機作は Cry1Ab 蛋白質、Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質と同様である。

改変 Cry1Ab 蛋白質 :

10 改変 Cry1Ab 蛋白質とコア蛋白質のアミノ酸配列が同一の Cry1Ab 蛋白質の殺虫活性については、カナダ政府のデータベース(文献 45)に詳細な調査結果が掲載されており、トウモロコシ栽培における主要害虫であるチョウ目昆虫のヨーロッパアンコーンボーラー(ヨーロッパアワノメイガ) (*Ostrinia nubilalis*)、コーンイヤールーム(アメリカタバコガ) (*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (*Spodoptera frugiperda*)等に殺虫活性を示す。一方、Cry1Ab 蛋白質はチョウ目以外の昆虫には殺虫活性がないか極めて低い。

改変 Vip3A 蛋白質 :

20 改変Vip3A蛋白質は米国のトウモロコシ栽培で発生するチョウ目害虫であるフォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (*S. frugiperda*)、コーンイヤールーム(アメリカタバコガ) (*H. zea*)及びブラックカットワーム(タマナヤガ) (*A. ipsilon*)等に対して高い殺虫活性を示す。なお、Cry1Ab蛋白質が殺虫活性を示すチョウ目昆虫のヨーロッパアンコーンボーラー(ヨーロッパアワノメイガ) (*O. nubilalis*)や、オオカバマダラ (*Danaus plexippus*)に対しては殺虫活性を示さない(文献 46)。

25 Leeら(文献 46)は、Vip3A蛋白質とCry1Ab蛋白質が互いに競合せずに中腸上皮刷子縁膜小胞(brush border membrane vesicles ; BBMV)へ結合することを報告している。さらに、感受性チョウ目昆虫種であるタバコホーンワーム(タバコスズメガ) (*Manduca sexta*)のBBMVにおいて、Cry1Ab蛋白質の受容体として知られるアミノペプチダーゼ様及びカドヘリン様分子に、Vip3A蛋白質が結合しないことも明らかにした(文献 46)。以上のように、Vip3A蛋白質の作用機作はCry蛋白質と同様と考えられるものの、Vip3A蛋白質とCry1Ab蛋白質では受容体が異なることが示されている(文献 46)。

35 なお、改変Vip3A蛋白質は一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である *B. thuringiensis* AB88株のVip3A蛋白質と比べてそのアミノ酸配列の284番目のアミ

ノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。さらに、MIR162で発現している
改変Vip3A蛋白質では、284番目のアミノ酸置換に加えて、形質転換体作成時の変
異により129番目のメチオニンがイソロイシンに置換されている。

5 Cry1F蛋白質：

Cry1F 蛋白質の殺虫効果を調べるため、蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*)中で
産生させたCry1F 蛋白質を人工飼料に混合し、米国において農業上の害虫と見な
されている15 種類のチョウ目昆虫に混餌投与した。15 種類のチョウ目昆虫のう
ち、6 種は米国でのトウモロコシ栽培において、9 種はワタ、ダイズ、カノーラ等、
10 その他の作物栽培において害虫と見なされている。上記6 種のトウモロコシ栽培に
おける害虫のうち、Cry1F line 1507 の標的害虫であるヨーロッパコーンボラ
ー(ヨーロッパアワノメイガ) (*O. nubilalis*)、フォールアーミーワーム(ツマジロク
サヨトウ) (*S. frugiperda*)及びビートアーミーワーム(シロイチモンジヨトウ)
(*Spodoptera exigua*)に対する効果は高いものであったが、残り3 種の害虫(サウス
15 ウェスタンコーンボラー (*Diatraea grandiosella*)、ブラックカットワーム(タマ
ナヤガ) (*Agrotis ipsilon*)及びボールワーム)に対する効果は低いものであった。一
方、農業上の害虫とはされていないオオカバマダラ(*D. plexippus*)についても試験
を行ったが、試験を行った最高濃度においてもオオカバマダラの死亡率は対照区と
20 同等であった。これらの結果から、他のBt 蛋白質と同様に(文献 47)、Cry1F 蛋
白質の殺虫効果は特異性が高く、一部の昆虫にのみ効果を持つことが示された。

チョウ目昆虫以外にも、哺乳類、鳥類、魚類、コウチュウ目、ハチ目、アミメ
カゲロウ目、トビムシ目昆虫等について試験を行ったが、Cry1F 蛋白質は、試験
を行ったすべての非標的生物に対し毒性を持たないことが確認された(文献 48)。

25 【除草剤耐性蛋白質】

PAT 蛋白質：

除草剤グルホシネートは植物のグルタミン酸合成酵素を阻害するため、植物は細
胞内のアンモニアの蓄積によって枯死するが、PAT蛋白質が発現した場合にはグル
ホシネートをアセチル化し、不活性化するためにグルタミン酸合成酵素の阻害が起
30 こらない。

mEPSPS 蛋白質：

除草剤グリホサートは、植物の芳香族アミノ酸合成経路の一部であるシキミ酸経
路の5-エノール-ピルビルシキミ酸3-リン酸合成酵素(EPSPS)の活性を阻害し、芳
35 香族アミノ酸合成を止めることで植物を枯死させる非選択性茎葉処理型除草剤で

ある(文献 49)。 *mEPSPS* 遺伝子がコードする *mEPSPS* 蛋白質は除草剤グリホサートの存在下でも *EPSPS* 活性を示し、植物内在性 *EPSPS* に代わって芳香族アミノ酸の合成を可能とすることによって除草剤グリホサート耐性を付与する。

5 【選抜マーカー】

PAT 蛋白質：

除草剤グルホシネートは植物のグルタミン酸合成酵素を阻害するため、植物は細胞内のアンモニアの蓄積によって枯死するが、PAT蛋白質が発現した場合にはグルホシネートをアセチル化し、不活性化するためにグルタミン合成酵素の阻害が起こらない。

PMI 蛋白質：

pmi 遺伝子は PMI 蛋白質(Phosphomannose isomerase)をコードする大腸菌(*E. coli*)由来の遺伝子であり、PMI 蛋白質はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する機能を有する。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成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目的遺伝子と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、*pmi* 遺伝子とともに目的遺伝子を有する形質転換細胞の選抜が可能となる(文献 28)。PMI 蛋白質はトウモロコシには存在しないが、ヒトの消化器官も含めて自然界に広く存在し、植物ではダイズ等において存在が確認されている。

なお、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質、*mEPSPS* 蛋白質及び PMI 蛋白質が既知アレルゲンと相同性を持たないことが、公的に利用可能なデータベース(SWISS-PROT、FARRP 等)を用いた相同性検索によって確認されている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

30 改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が酵素活性を持つという報告はない。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

PAT 蛋白質は L-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外に PAT 蛋白質の基質と

なる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。よって、PAT 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 mEPSPS 蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。よって、mEPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10 PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない(文献 53)。よって、PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

15

イ、名称及び由来

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の作出に用いられたプラスミドは以下のとおりである。

20

Bt11 : 大腸菌(*E. coli*)由来のpUC18を基に構築されたpZO1502

MIR162 : pSB12(文献 54)を基に構築されたpNOV1300

Cry1F line 1507 : 大腸菌(*E. coli*)由来のpUC19を基に構築されたPHP8999

GA21 : 大腸菌(*E. coli*)由来のpUC19を基に構築された pDPG434

25

ロ、特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

30 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の作出に用いられたプラスミドの塩基数は以下のとおりであり、これらのプラスミドの構成要素の塩基配列は明らかにされている。

Bt11 : pZO1502、7,240 bp

35 MIR162 : pNOV1300、14,405 bp

Cry1F line 1507 : PHP8999、9,504 bp

GA21 : pDPG434、6,128 bp (文献1)

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

5

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の作出に用いられたプラスミドに含まれる特定の機能を有する塩基配列は、以下の抗生物質耐性マーカー遺伝子である。なお、いずれの抗生物質耐性マーカー遺伝子も宿主には導入されていない。

10 Bt11 : *amp^R*遺伝子、アンピシリン耐性

MIR162 : *spec*遺伝子、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

Cry1F line 1507 : *nptII* 遺伝子、カナマイシン耐性

GA21 : *amp^R*遺伝子、アンピシリン耐性(文献 1)

15

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

20 Bt11、Cry1F line 1507及びGA21の作出に用いられたpZO1502、PHP8999及びpDPG434に感染性を示すような配列があるという報告はない。また、MIR162の作出に用いられたpNOV1300には、大腸菌(*E. coli*)へのプラスミドの移入を可能とするラムダファージ由来の付着末端領域であるcosが存在するが、ラムダファージの大腸菌(*E. coli*)以外の宿主は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

25

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の宿主内に移入された核酸は以下のとおりである。

30

Bt11 : pZO1502 を制限酵素 *NotI* で切断して *amp^R* 遺伝子を削除した部分

MIR162 : 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(害虫抵抗性遺伝子カセットと選抜マーカー遺伝子カセット)

Cry1F line 1507 : 2 つの遺伝子発現カセット(害虫抵抗性遺伝子カセットと除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット)が Cry1F line 1507 に

35

移入された。

GA21 : pDPG434 を制限酵素 *NotI* で切断して得られた、除草剤耐性遺伝子カセット(Act promoter+intron/OTP/*mEPSPS*/NOS)のみからなる DNA 断片(文献 1)

5

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入方法は、それぞれ以下のとおりである。

10 Bt11 : エレクトロポレーション法

MIR162 : アグロバクテリウム法

Cry1F maize line 1507 : パーティクルガン法

GA21 : パーティクルガン法(文献 1)

15 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

形質転換細胞の選抜は、それぞれ以下を添加した培地で行った。

20

Bt11 : グルホシネート

MIR162 : マンノース

Cry1F line 1507 : グルホシネート

GA21 : グリホサート(文献 1)

25

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

30 MIR162 においては遺伝子導入後、培養細胞の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。その後、再分化した植物体に PCR を行い、プラスミドの外骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子を含まない個体を選抜したことから、菌体の残存はないと考えられる。

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

5 本スタック系統トウモロコシは、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である **Bt11**、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシである **MIR162**、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である **Cry1F line 1507** 及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシである **GA21** を用いて、交雑育種法により作出された。なお、我が国における **Bt11**、**MIR162**、**Cry1F line 1507** 及び **GA21** の申請及び承認状況は表 5 (18ページ)のとおりである。

表 5 我が国における Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の申請及び承認状況

	食品	飼料	環境
Bt11	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2007年4月 第一種使用規程承認
MIR162	2010年1月 安全性確認	2010年6月 安全性確認	2010年6月 第一種使用規程承認
Cry1F line 1507	2002年7月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2005年3月 第一種使用規程承認
GA21	2003年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2005年11月 第一種使用規程承認
本スタック系統 トウモロコシ	2010年5月 安全性確認	2010年6月 安全性確認	2010年4月 申請

5 (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

10 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認されている。

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

15 Bt11、MIR162 及び Cry1F line 1507 においては、サザンブロット分析によって導入遺伝子が染色体上に1コピー存在し、複数世代において安定して伝達されることが確認されている。

20 GA21 においては、サザンブロット分析によって導入遺伝子が染色体上の1カ所に存在し、移入された除草剤耐性遺伝子カセット (Act promoter + intron/OTP/mEPSPS/NOS)断片に由来する6つの連続的領域からなること、また、これらが複数世代において安定して伝達されることが確認されている。

- 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

5

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

発現の安定性については以下のように確認した。

10

Bt11 : ELISA 法による蛋白質の発現確認、チョウ目害虫を用いた生物検定、除草剤グルホシネート散布試験

MIR162 : ELISA 法による蛋白質の発現確認、チョウ目害虫を用いた生物検定

15

Cry1F line 1507 : ELISA 法による蛋白質の発現確認、チョウ目害虫を用いた生物検定、除草剤グルホシネート散布試験

GA21 : 除草剤グリホサート散布試験

- 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

20

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21に移入された核酸に伝達を可能とする配列は含まれていない。したがって、移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

- 25 (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

Bt11及びGA21の定量的PCR法による系統特異的検出方法が、European Commissionにより公開されている。定量限界値は、ゲノムDNAの濃度比で、Bt11は0.08 %以上、GA21は0.04 %以上である(文献 55、文献 56)。また、MIR162の検出方法としてゲノムDNA7.5 µgを制限酵素で切断後、改変 *vip3A* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析の結果より確認できる。Cry1F line 1507 の検出及び識別の方法として、Cry1F line 1507 に特異的な塩基配列をプライマーとして用いた、RT(Real Time)-PCR 法による定量キットが、GeneScanEurope社(ドイツ、フライブルグ)によって販売されている。

35

本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するには、上記の方法をトウモロコシの種子 1 粒ごとに行う必要がある。

(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

本スタック系統トウモロコシに付与された特性は以下のとおりである。

10

Bt11：導入遺伝子に由来する改変 Cry1Ab 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及び PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

MIR162：導入遺伝子に由来する改変 Vip3A 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及び PMI 蛋白質による選抜マーカー特性

15

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

GA21：導入遺伝子に由来する mEPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性

改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は、感受性昆虫種に摂取され消化されると標的昆虫の腸管上皮細胞の受容体に結合することが知られているが、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられる。また、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が酵素活性を持つという報告はないことから、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が発現しても新たに感受性となる昆虫種が生じることはないと考えられた。また、複数の害虫抵抗性蛋白質を発現するスタック系統が害虫抵抗性に関して相乗的効果を示した報告はない。

PAT 蛋白質は L-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外に PAT 蛋白質の基質となる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。また、mEPSPS 蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。さらに、PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース

35

-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない(文献 53)。よって、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

- 5 上記のように、本スタック系統トウモロコシにおいて発現している改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は特異性が異なり、酵素活性を持つという報告はないこと、PAT 蛋白質は非常に基質特異性が高いこと、mEPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応すること及び 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あることから、これらの蛋白質が機能的な相互作用を示すことはないと考えられる。

- 15 実際に、各親系統由来の発現蛋白質が機能的な相互作用を示していないことを確認するため、本スタック系統トウモロコシを供試して以下の調査を行った。なお、非組換えトウモロコシとして、試験に用いた本スタック系統トウモロコシと同じ遺伝的背景(NP2222×5XH751)を持つトウモロコシを供試した。

【チョウ目害虫を用いた生物検定】

チョウ目害虫抵抗性については、Cry1Ab 蛋白質及び Cry1F 蛋白質の対象害虫であるヨーロッパコンボラーと改変 Vip3A 蛋白質の対象害虫であるフォールアーミーワームを用いて食害程度の調査を行った。

ヨーロッパコンボラーによる食害程度については、本スタック系統トウモロコシ、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及び非組換えトウモロコシを2009年に米国の3カ所の温室で栽培し、その食害程度を調査した。ヨーロッパコンボラーの10 齢幼虫をトウモロコシの6～8葉期に接種し、15～19日後に食害程度を目視で観察した。

調査の結果、イリノイ州の試験において本スタック系統トウモロコシとCry1F line 1507 の間に有意差が見られた。しかし、ミネソタ州及びアイオワ州では本スタック系統トウモロコシとBt11及びCry1F line 1507 の間で有意差は認められず(F検定後のLSD、 $p<0.05$)(表 6、p22)、一貫した整合性は見られなかった。したがって、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫(ヨーロッパコンボラー)に対する殺虫活性は、親系統を掛け合わせるにより実質的には変化していないと考えられる。

20 表 6 本スタック系統トウモロコシにおけるチョウ目害虫(ヨーロッパコンボラー)による植物体の食害程度

試験場所	本スタック系統トウモロコシ		Bt11		MIR162		Cry1F line 1507		非組換えトウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ミネソタ州 スタントン	1.4 c ¹	0.4	1.5 c	0.4	5.5 b	0.3	1.5 c	0.4	7.3 a	0.5
アイオワ州 スレーター	2.0 b	0.0	2.0 b	0.0	7.9 a	0.9	2.0 b	0.0	8.5 a	0.3
イリノイ州 ブルーミントン	1.5 c	0.3	1.7 c	0.2	7.4 a	0.1	1.9 b	0.1	7.4 a	0.2

食害程度の調査は、いずれも 5 植物体、4 反復で実施した。

1: 食害程度は 9 段階スケール(1(食害無)～9(食害甚))に基づいて評価した(文献 57)。

25 2: 統計については試験場所ごとに実施しており、同じ英文字の平均値間には有意差がない(F 検定後の LSD、 $p<0.05$)。

(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ジャパン株式会社に帰属する)

フォールアーミーワームによる食害程度については、本スタック系統トウモロコシ、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び非組換えトウモロコシを 2009 年に米国の 3 カ所の温室で栽培し、その食害程度を調査した。フォールアーミーワームの 1 齢幼虫をトウモロコシの 5~7 葉期に接種し、10~11 日後に食害程度を目視で観察した。

5

調査の結果、ミネソタ州の試験において本スタック系統トウモロコシとMIR162 の間に有意差が見られた。しかし、アイオワ州及びイリノイ州では本スタック系統トウモロコシとMIR162 の間で有意差は認められず(F検定後のLSD、 $p<0.05$)(表 7、p 23)、一貫した整合性は見られなかった。したがって、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫(フォールアーミーワーム)に対する殺虫活性は、親系統を掛け合わせることでにより実質的には変化していないと考えられる。

10

表 7 本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫(フォールアーミーワーム)による食害程度

試験場所	本スタック系統トウモロコシ		Bt11		MIR162		Cry1F line 1507		非組換えトウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ミネソタ州 スタントン	1.2 e ¹	0.2	5.2 b	0.3	2.2 d	0.9	3.5 c	0.4	8.7 a	0.4
アイオワ州 スレーター	1.0 d	0.0	6.1 b	0.4	1.0 d	0.0	4.4 c	0.3	9.0 a	0.1
イリノイ州 ブルーミントン	1.9 d	0.2	6.2 b	0.5	2.0 d	0.1	2.9 c	0.1	8.3 a	0.2

15

食害程度の調査は、いずれも 5 植物体、4 反復で実施した。

1: 食害程度は 9 段階スケール(1(食害無)~9(食害甚))に基づいて評価した(文献 58)。

2: 統計については試験場所ごとに実施しており、同じ英文字の平均値間には有意差がない(F 検定後の LSD、 $p<0.05$)。

(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ジャパン株式会社に帰属する)

20

【除草剤グルホシネートを用いた生物検定】

除草剤グルホシネート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、Bt11、Cry1F line 1507 及び非組換えトウモロコシを 2008 年に米国の温室で栽培し、除草剤による
 5 薬害程度を調査した。トウモロコシの 2 葉期に、グルホシネートを有効成分とする除草剤(製品名：リバティ™)を、467 g active ingredient (a.i.)/ha(通常の散布量)、1868 g a.i./ha (通常の 4 倍の散布量)及び 3736 g a.i./ha (通常の 8 倍の散布量)で散布し、散布後 10 日目に薬害程度を目視で観察した。

10 調査の結果、本スタック系統トウモロコシの薬害程度は Bt11 と比べて有意に低かったが、その程度は Cry1F line 1507 と同等であった(表 8、24ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グルホシネートに対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

15 表 8 本スタック系統トウモロコシの除草剤グルホシネート散布による薬害程度

除草剤散布量 (g a.i./ha)	薬害程度 (%) ¹							
	本スタック系統 トウモロコシ		Bt11		Cry1F line 1507		非組換え トウモロコシ	
	平均値	標準 偏差	平均値	標準 偏差	平均値	標準 偏差	平均値	標準 偏差
467	0.17 g ²	0.9	0.47 g	1.3	0.0 g	0.0	76.33 b	5.1
1868	5.0 f	0.0	9.93 e	2.0	5.47 f	1.3	100.0 a	0.0
3736	11.63 d	2.3	19.43 c	3.0	11.4 d	2.3	100.0 a	0.0

薬害程度の調査は、いずれも 10 植物体、3 反復で実施した。

1: トウモロコシの系統ごとに無散布区を設け、無散布区の植物体の薬害程度を 0 %(健全)として比較することで、除草剤散布区の薬害程度を 0 %(健全)から 100 %(完全枯死)と判定した。

2: 同じ英文字の平均値間には有意差がない(Student-Newman-Keuls 検定、p<0.05)。

20 (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ジャパン株式会社に帰属する)

【除草剤グリホサートを用いた生物検定】

除草剤グリホサート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、GA21 及び非組換えトウモロコシを 2008 年に米国の温室で栽培し、除草剤による薬害程度を調査した。トウモロコシの 2 葉期に、グリホサートを有効成分とする除草剤(製品名：タッチダウントータル™)を、840 g acid equivalent (a.e.)/ha (通常の散布量)、3360 g a.e./ha (通常の 4 倍の散布量)及び 6720 g a.e./ha (通常の 8 倍の散布量)で散布し、散布後 19 日目に薬害程度を目視で観察した。

調査の結果、本スタック系統トウモロコシと GA21 の間で除草剤による薬害程度に有意差は見られなかった(表 9、25ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサートに対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

表 9 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による薬害程度

除草剤散布量 (g.a.e./ha)	薬害程度 (%) ¹					
	本スタック系統 トウモロコシ		GA21		非組換え トウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
840	0.57 d ²	1.2	0.57 d	1.1	100.0 a	0.0
3360	18.8 c	8.7	17.2 c	10.1	100.0 a	0.0
6720	29.0 b	8.1	28.0 b	7.1	100.0 a	0.0

薬害程度の調査は、いずれも 10 植物体、3 反復で実施した。

1: トウモロコシの系統ごとに無散布区を設け、無散布区の植物体の薬害程度を 0 % (健全)として比較することで、除草剤散布区の薬害程度を 0 % (健全)から 100 % (完全枯死)と判定した。

2: 同じ英文字の平均値間には有意差がない(Student-Newman-Keuls 検定、 $p < 0.05$)。

(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ジャパン株式会社に帰属する)

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

したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 を個別に調査した結果に基づき評価した。

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

- 5 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21とそれぞれの対照の非組換えトウモロ
コシとの間で、表 10 (27ページ)に示した項目について日本の隔離ほ場で調査を行っ
た。その結果、MIR162の稈長、Cry1F line 1507 の発芽率及び雌穂径を除く全ての
調査項目で有意差は見られないか、あるいは同程度であった。なお、Cry1F line 1507
10 について有意差は見られたものの、試験に供試した2つの品種において一貫した傾向
は見られなかった(別紙1、2、3、4 ; 社外秘情報につき非開示)。

表 10 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の形態及び生育の特性調査実施項目

	Bt11	MIR162	Cry1F line 1507	GA21
発芽始め	—	○	—	○
発芽揃い	○	○	○	○
発芽率	○	○	○	○
雄穂抽出期	○	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○	○
開花始	○	—	—	○
開花終	○	—	—	○
開花期間	○	—	—	—
稈長	○	○	○	○
草型	○	○	○	○
分けつ数	○	○	○	○
着雌穂高	○	○	○	○
成熟期	○	○	○	○
雌穂数(雌穂総数)	○	—	○	○
有効雌穂数	○	○	○	○
雌穂長	○	○	○	○
雌穂径	○	○	○	○
粒列数	○	○	○	○
一列粒数	○	○	○	○
粒色	○	○	○	○
百粒重	○	○	○	○
粒形	○	○	○	○
収穫期の地上部新鮮重	○	○	○	—
収穫期の生体重(植物体の全重量)	—	—	—	○

○：調査を行っている。

—：調査を行っていない。

b 生育初期における低温又は高温耐性

5 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 は、それぞれの対照の非組換えトウモロコシと同様に、生育初期における低温処理によって萎縮もしくは枯死した(別紙 1、2、3、4 ; 社外秘情報につき非開示)。

c 成体の越冬性又は越夏性

10 トウモロコシは夏型一年生作物であり、子実の成熟に伴って成体は枯れ上がり枯死する。成熟後に栄養生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い。実際に隔離ほ場試験の終了時には結実後の枯死が始まっていることを確認した。

15 d 花粉の稔性及びサイズ

20 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシについて、花粉を染色し顕微鏡下で観察した結果、稔性(染色による花粉の充実度)、形状及びサイズに相違は見られなかった(別紙 1、2、3、4 ; 社外秘情報につき非開示)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

25 種子の生産量に関して、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、種子の生産量に関わる諸形質を比較した結果、Cry1F line 1507 の雌穂径において有意差が認められた。なお、Cry1F line 1507 について有意差は見られたものの、試験に供試した2つの品種において一貫した傾向は見られなかった(別紙1、2、3、4 ; 社外秘情報につき非開示)。

30 脱粒性に関して、トウモロコシの種子は雌穂に着生しており、加えて、雌穂が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 3)。Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 も対照の非組換えトウモロコシと同様に、収穫時の雌穂は苞皮に覆われていた。

35 収穫種子の発芽率に関して、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 のいずれ

れにおいても対照の非組換えトウモロコシと同程度であった(別紙 1、2、3、4；社外秘情報につき非開示)。そのため、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の休眠性が非組換えトウモロコシと大きく異なる可能性は低いと考えられた。

5 f 交雑率

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、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 とともに交雑率の試験は行わなかった。

10

g 有害物質の産生性

Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 について、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、Cry1F line 1507 を除いて、いずれの試験においても
15 対照の非組換えトウモロコシとの間で有意差は見られなかった。なお、Cry1F line 1507 の後作試験及び鋤込み試験におけるレタスの生体重に有意差が認められたものの、試験に供試した2つの品種において一貫した傾向は見られなかった(別紙1、2、3、4；社外秘情報につき非開示)。

20 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

食用又は飼料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
25 に付随する行為。

(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

35

(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。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

5

(6) 国外における使用等に関する情報

10 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の諸外国における申請・承認状況は表 11(30ページ)に示したとおりである。

表 11 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の諸外国における申請・承認状況

	FDA	USDA	Health Canada	CFIA
Bt11	1996年5月 安全性確認	1996年1月 安全性確認	1996年8月 安全性確認	1996年6月 安全性確認
MIR162	2008年12月 安全性確認	2007年8月 申請	2007年11月 安全性確認	2007年11月 安全性確認
Cry1F line 1507	2001年5月 安全性確認	2001年6月 安全性確認	2002年10月 安全性確認	2002年10月 安全性確認
GA21	1998年2月 安全性確認	1997年11月 安全性確認	1999年5月 安全性確認	1998年7月 安全性確認

15 FDA：米国食品医薬品庁

USDA：米国農務省

Health Canada：カナダ保健省

CFIA：カナダ食品検査庁

20 なお、我が国における Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の申請・承認状況は表 5(18ページ)のとおりである。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統トウモロコシは、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 から、交雑育種法により作出された。

5

第 1.2 (6) ①(20~21 ページ)で述べたとおり、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられる。また、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が酵素活性を持つという報告はないことから、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が発現しても新たに感受性となる昆虫種が生じることはないと考えられた。また、複数の害虫抵抗性蛋白質を発現するスタック系統が害虫抵抗性に関して相乗的効果を示した報告はない。

15 PAT 蛋白質は L-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外に PAT 蛋白質の基質となる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。また、mEPSPS 蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。さらに、PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない(文献 53)。よって、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

25

上記のように、本スタック系統トウモロコシにおいて発現している改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は特異性が異なり、酵素活性を持つという報告はないこと、PAT 蛋白質は非常に基質特異性が高いこと、mEPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応すること及び 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あることから、これらの蛋白質が機能的な相互作用を示すことはないと考えられる。

35 実際に、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性は、それぞれの親系統と同程度であった。よって、各親系統

由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内で相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。

5 したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

1. 競合における優位性

10

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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、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。

15

本スタック系統トウモロコシの親系統であるBt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、一部で対照の非組換えトウモロコシとの間に有意差が認められたが、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異ではなかった。

20

本スタック系統トウモロコシには、チョウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、チョウ目昆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、この形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。

25

本スタック系統トウモロコシには、除草剤グルホシネート及びグリホサートへの耐性が付与されているが、グルホシネート及びグリホサート散布が想定しにくい我が国の自然環境下で、この性質により競合における優位性が高まるとは考えにくい。

30

さらに、本スタック系統トウモロコシにはマンノースを炭素源として利用可能とする PMI 蛋白質の産生性が付与されているが、マンノース以外の炭素源が存在することから、我が国の自然条件下において、この形質を有することにより競合における優

35

位性が高まるとは考えられない。

したがって、これら付与された性質により競合における優位性が高まるとは考えにくい。

5

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

(2) 影響の具体的内容の評価

10

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

25

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与える有害物質の産生性は知られていない。

30 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507及びGA21において、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験においてもこれら親系統の有害物質の産生性が高まっていることを示唆するような差異は認められなかった。よって、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

35 本スタック系統トウモロコシで発現している改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋

白質、Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が、既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている。

5 改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられる。また、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が酵素活性を持つという報告はないことから、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が発現しても新たに感受性となる昆虫種が生じることはないと考えられた。また、複数の害虫抵抗性蛋白質
10 を発現するスタック系統が害虫抵抗性に関して相乗的効果を示した報告はない。

PAT 蛋白質は L-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外に PAT 蛋白質の基質となる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。また、mEPSPS 蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。さらに、PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告され
15 ていない(文献 53)。よって、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

上記のように、本スタック系統トウモロコシにおいて発現している改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は特異性が異なり、酵素活性を持つという報告はないこと、PAT 蛋白質は非常に基質特異性が高いこと、mEPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応すること及び 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あることから、これらの蛋白質が機能的な相互作用を示すことはないと考えられる。
25

30

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある意図しない有害物質が産生される可能性はないと考えられた。そこで、以下に本スタック系統トウモロコシで発現しているチョウ目昆虫に殺虫活性を持つ蛋白質が、我が国の野生動植物等に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

35

【Bt11、MIR162 及び Cry1F line 1507 の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

5 Bt11 には改変 Cry1Ab 蛋白質の産生性が、Cry1F line 1507 には Cry1F 蛋白質が
付与されている。Cry1Ab 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は、米国におけるトウモロコシ栽
培上の重要害虫であるヨーロッパアワノメイガ (*O. nubilalis*)、フォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (*S. frugiperda*)等のチョウ
目昆虫に対して高い殺虫活性及び特異性を示すことが確認されている。また、MIR162
10 には改変 Vip3A 蛋白質の産生性が付与されている。Vip3A 蛋白質は、米国における
トウモロコシ栽培上の重要害虫であるフォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ)
(*S. frugiperda*)、コーンイヤールーム(アメリカタバコガ) (*H. zea*)及びブラックカット
ワーム(タマナヤガ) (*A. ipsilon*)等のチョウ目昆虫に対して高い殺虫活性及び特異性
を示すことが確認されている(文献 46)。したがって、Bt11、MIR162 及び Cry1F line
15 1507 を栽培した場合に、生育している植物体を直接摂食する、もしくは飛散した花
粉を食餌植物とともに摂食するチョウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性がある。

そこで、Bt11、MIR162 及び Cry1F line 1507 によって影響を受ける可能性のある野生動植物等として、チョウ目昆虫を特定した。

20 【本スタック系統トウモロコシの影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

本スタック系統トウモロコシは改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F
蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物等としては、親系
統である Bt11、MIR162 及び Cry1F line 1507 の生物多様性影響評価で特定された
25 種と同じであると考えられる。

よって、本スタック系統トウモロコシにより何らかの影響を受ける可能性がある種
としてチョウ目昆虫が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

30

【Bt11 の影響の具体的内容の評価】

本スタック系統トウモロコシの親系統であり、改変 Cry1Ab 蛋白質を発現する Bt11
の隔離ほ場試験において、Bt 蛋白質に対する感受性が高く、集団飼育がしやすいチ
ョウ目昆虫のヤマトシジミ (*Zizeeria maha argia*)1 齢幼虫に、Bt11 花粉を 500~4,000
35 粒/cm² の花粉密度で摂食させて死亡率を調査した。その結果、摂食開始から 7 日後ま

での間にヤマトシジミの半数個体の致死が観測された花粉密度は 2,000~4,000 粒/cm²であった。

【MIR162 の影響の具体的内容の評価】

5

改変 Vip3A 蛋白質に最も高い感受性を示すブラックカットワームに、改変 Vip3A 蛋白質を異なる濃度で人工食餌の表面に塗布し 5 日間与えた結果、ブラックカットワームの LC50 値(半数致死濃度)は、改変 Vip3A 蛋白質の表面塗布濃度が 17.1 ng/cm² の場合であった(文献 46)。

10

よって、MIR162 の殺虫活性を最大限に見積もった場合の影響を評価するために、MIR162 の花粉における発現量を 47.85 µg/g 新鮮重と想定し、また、一般的な花粉 1 粒当たりの重量を約 6.4x10⁻⁷ g であるとする(文献 59)、MIR162 に高い感受性を示すチョウ目昆虫であるブラックカットワームは、MIR162 の約 558 粒/cm² の花粉に

15

曝露されると毒性影響を受けると考えられた。

$$\text{影響を与える花粉粒数/cm}^2 = [\text{LC50 改変 Vip3A 蛋白質量} = 17.1 \text{ ng/cm}^2] / [\text{花粉 1 粒当たりの改変 Vip3A 蛋白質量} = (\text{花粉 1 g 当たりの改変 Vip3A 蛋白質量} = 47.85 \text{ µg/g 新鮮重}) \times (\text{花粉 1 粒重量} = 6.4 \times 10^{-7} \text{ g})]$$

20

【Cry1F line 1507 の影響の具体的内容の評価】

Cry1F 蛋白質を産生する Cry1F line 1507 を用いた隔離ほ場試験において、その花粉を用いてヤマトシジミを供試し、生物検定を行った。Cry1F line 1507 の花粉と非組換えトウモロコシの花粉をヤマトシジミ 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、100 粒/cm² の花粉密度において、5 日後に死亡率 50% を超えることが確認された。

25

【本スタック系統トウモロコシの影響の具体的内容の評価】

30

生物検定の結果から、本スタック系統トウモロコシのヨーロッパアンコーンボーラーに対する抵抗性は、Bt11及びCry1F line 1507と同程度であることが確認され(表 6、22ページ)、フォールアーミーワームに対する抵抗性は、MIR162と同程度であることが確認された(表 7、23ページ)。よって、チョウ目昆虫が本スタック系統トウモロコ

シから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、親系統である Bt11、MIR162 及び Cry1F line 1507 と同程度であると考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

5

本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を、特定されたチョ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。

- 10 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(文献 13)。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/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm²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/cm² と 22.2 粒/cm² に減少していた。
- 15 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/cm² 以内であった(文献 13)。

- 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、堆積した花粉密度の調査が行われている(文献 60)。調査の結果、トウモロコシほ場から 1 m、
- 20 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/cm²、14.2 粒/cm²、8.1 粒/cm² へと減少することが明らかとなっている。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 1m 及び 5m 離れた地点での堆積密度は、それぞれ平均で 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm² であったと報告されている(文献 61)。このように、我が国で行われたトウモロコシほ場周辺での花粉
- 25 堆積密度に関する調査結果と同様の結果が、北米で行われた調査からも得られている。

- 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、50m 以上離れるとほとんど無視できると結論された。本スタック系統トウモロコシを直接摂食する可能性のある、もしくは本スタック系統トウモロコシ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チョウ目昆虫が、本スタック系統トウモロコシの栽培ほ場から半径 50m の範囲に局所的に生育しているとは考えにくい。このことから、チョウ目昆虫が個体群レベルで本スタック系統トウモロコシを直接摂食することによる影響を受ける可能性、もしくは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。

35

したがって、特定されたチョウ目昆虫が、Bt11 由来の改変 Cry1Ab 蛋白質、MIR162 由来の改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F line 1507 由来の Cry1F 蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。よって、本スタック系統トウモロコシに起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと結論された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生じ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

15

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、我が国にはこの近縁野生種は自生しておらず、自然交雑の可能性はないことから、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

25

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

4. その他の性質

35 上記の他に、本スタック系統トウモロコシに関して生物多様性影響の評価を行うべ

き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

本スタック系統トウモロコシは、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 から、交雑育種法により作出された。

5

本スタック系統トウモロコシにおいて、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられる。また、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が酵素活性を持つという報告はないことから、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質が発現しても新たに感受性となる昆虫種が生じることはないと考えられた。また、複数の害虫抵抗性蛋白質を発現するスタック系統が害虫抵抗性に関して相乗的効果を示した報告はない。

15 PAT 蛋白質は L-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外に PAT 蛋白質の基質となる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。また、mEPSPS 蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。さらに、PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない(文献 53)。よって、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

25

上記のように、本スタック系統トウモロコシにおいて発現している改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質は特異性が異なり、酵素活性を持つという報告はないこと、PAT 蛋白質は非常に基質特異性が高いこと、mEPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) と特異的に反応すること及び 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あることから、これらの蛋白質が機能的な相互作用を示すことはないと考えられる。

35 実際に、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性は、それぞれの親系統と同程度であった。よって、各親系統

由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内で相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。

5 また、本スタック系統トウモロコシにおいて、各親系統由来の発現蛋白質の機能間に相互作用が認められなかったことから、本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシにおいても同様に発現蛋白質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。

10 したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

競合における優位性：宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシが、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。

15 本スタック系統トウモロコシの親系統である Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の競合における優位性に関わる諸形質の調査の結果、いずれも対照の非組換えトウモロコシとの間で、競合における優位性に影響を及ぼすような差異は認められなかった。

20 また、本スタック系統トウモロコシは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を持つものの、これらの形質によって我が国の自然環境下で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、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起
25 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。

有害物質の産生性：宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシにおいて、野生動物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

30 Bt11、MIR162、Cry1F line 1507 及び GA21 の鋤込み試験、後作試験、土壤微生物相試験より、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられた。

35 改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質、mEPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質が既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている。さらに、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられた。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、野生動物等に影響を及ぼす可能性のある意図しない

有害物質が産生される可能性はないと考えられた。

一方、改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び Cry1F 蛋白質によって影響を受ける可能性のある野生動植物等として、チョウ目昆虫を特定して検討を行った。しかし、本来自然生態系に生息しているチョウ目昆虫が本スタック系統トウモロコシの栽培ほ場やその周辺に局所的に生育しているとは考えにくい。よって、特定されたチョウ目昆虫が個体群レベルで本スタック系統トウモロコシ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、本スタック系統及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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は自生していないことから、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

15

以上のことから、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、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判断した。

20

引用文献

社外秘により非開示

緊急措置計画書

平成 22 年 4 月 6 日

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

10 第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシ
ネット及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *cry1F*, *pat*,
mEPSPS, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11×MIR162×*B.t.*
Cry1F maize line 1507×GA21, OECD UI: SYN-BT011-1×SYN-IR162-4×
DAS-01507-1×MON-00021-9) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」という。)
15 並びに Bt11、MIR162、*B.t.* Cry1F maize line 1507 及び GA21 のうち 2 系統や
3 系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの第一種使用等において、生物多
様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置
を執ることとする。

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

個人名・所属は個人情報につき非開示。

25 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本スタック系統トウモロコシの開発者である米国シンジェンタシード社と
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。

30 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

弊社は米国シンジェンタシード社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取
引ルートへ本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統
のうち 2 系統や 3 系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの適切な管理、取
35 扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

5 科学的根拠に基づき、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、弊社は米国シンジェンタシード社とともに、本スタック系統トウモロコシ及び後代分離系統トウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統
10 トウモロコシが、環境中で生存しないように不活化する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれがあると認め
15 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報告する。