

乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MON87460, OECD UI: MON-87460-4)に関する
生物多様性影響評価書申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	3
第一 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帯	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	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	5
ハ 捕食性又は寄生性	5
ニ 繁殖又は増殖の様式	5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	5
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織 又は器官からの出芽特性	5
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交 雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	6
ホ 病原性	6
ヘ 有害物質の産生性	6
ト その他の情報	7
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
(1) 供与核酸に関する情報	8
イ 構成及び構成要素の由来	8
ロ 構成要素の機能	8
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	8
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	13
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	35
(2) ベクターに関する情報.....	37
イ 名称及び由来	37
ロ 特性	37
① ベクターの塩基数及び塩基配列	37
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	37
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	37
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	37
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	37
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	38
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	38
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	38
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	38
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	38
(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	40
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	40
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	41
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	41
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	42
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 植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び 程度	45
(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	45
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	45
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	45

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	49
i.	通常栽培で灌漑を行う試験	50
a	形態及び生育の特性	50
b	生育初期における低温又は高温耐性	50
c	成体の越冬性又は越夏性	51
d	花粉の稔性及びサイズ	51
e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	51
f	交雑率	52
g	有害物質の産生性	52
ii.	通常栽培で灌漑を行わない試験	52
a	形態及び生育の特性	53
b	種子の生産量及び脱粒性	53
iii.	栽培管理を行わない試験	54
a	形態及び生育の特性	54
b	種子の生産量及び脱粒性	54
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	55
(1)	使用等の内容	55
(2)	使用等の方法	56
(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	56
(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	56
(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	56
(6)	国外における使用等に関する情報	56
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	58
1	競合における優位性	58
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	58
(2)	影響の具体的内容の評価	61
(3)	影響の生じやすさの評価	61
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	61
2	有害物質の産生性	61
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	61
(2)	影響の具体的内容の評価	63
(3)	影響の生じやすさの評価	63
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	63

3	交雑性	63
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	63
(2)	影響の具体的内容の評価.....	63
(3)	影響の生じやすさの評価.....	63
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	63
4	その他の性質	63
第三	生物多様性影響の総合的評価	64
参考文献	67
緊急措置計画書	75

用語リスト

AtGRP2	<i>Arabidopsis</i> (シロイヌナズナ) 由来のグリシンリッチ蛋白質
CL	チリのほ場、首都州コリナ (Colina)
CSD	低温ショックドメイン (Cold Shock Domain)
CSP	低温ショック蛋白質 (Cold Shock Protein)
CSPA	<i>E. coli</i> 由来の低温ショック蛋白質 A
<i>cspB</i>	<i>B. subtilis</i> 由来の低温ショック蛋白質 B をコードする遺伝子
CSPB	<i>B. subtilis</i> 由来の低温ショック蛋白質 B
CT	チリのほ場、首都州カレラ・デ・タンゴ (Calera de Tango)
ELISA	酵素免疫検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay)
FASTA	蛋白質間又は DNA 間の配列を比較するためのアルゴリズム
LUM	チリのほ場、首都州ルンブレラス (Lumbreras)
OsCSP1	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来の低温ショック蛋白質 1
OsCSP2	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来の低温ショック蛋白質 2
OECD	経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development)
QUI	チリのほ場、バルパライソ州クイロタ (Quillota)
WCSP1	コムギ (Wheat) 由来の低温ショック蛋白質 1
WHAN	米国のほ場、カリフォルニア州ハラン・ノース (Harlan North)
WHAS	米国のほ場、カリフォルニア州ハラン・サウス (Harlan South)
YBAP	米国のほ場、カリフォルニア州バリ奥斯 (Barrios)

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 3 月 8 日

5 農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 松本 龍 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	乾燥耐性トウモロコシ(改変 <i>cspB</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-8746Ø-4)
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

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.) Ittis

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は LH59 である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

原産地については決定的な説はなく、米国の南西部、メキシコ、中米及び南米にかけての複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起源とする説がある(OECD, 2003)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

25

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

30

トウモロコシの栽培起源は今から 9,000 年前とされている(OECD, 2003)。その後、人類の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 1500 年~200 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが出現し、メキシコ、メソアメリカの地から南北アメリカ大陸の各地に伝播した。長い栽培の歴史の中でフリント、デント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられている。わが国へは天正 7 年(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い(菊池, 1987)。

35

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる(OECD, 2003; 菊池, 1987)。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能である(OECD, 2003; 丸山, 1981)。

国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づく、2009 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,246 万 ha、中国が 3,048 万 ha、ブラジルが 1,379 万 ha、インドが 840 万 ha、メキシコが 720 万 ha、インドネシアが 425 万 ha、フィリピンが 268 万 ha となっている(FAOSTAT, 2010)。

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用のスイートコーンがあり、2009 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 2,300ha で、収穫量は約 465 万トンであり(農林水産省, 2010a)、2009 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,500 ha で、収穫量は約 23 万 5,900 トンである(農林水産省, 2010b)。

わが国は 2009 年に海外から約 1,629 万トンのトウモロコシを飼料用、食品・工業用、そして栽培用として輸入している。その内訳は、飼料用として約 1,151 万トン、食品・工業用として約 477 万トン、そして栽培用として約 2,143 トンである。なお、栽培用として輸入している上位 3 カ国を挙げるとフランスが 876 トン、米国が 413 トン、オーストリアが 270 トンとなっている(財務省, 2010)。

わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。北海道から九州に至る慣行播種期は、4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 10a 当たり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い(瀧澤, 1981)。

なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、現在、一般に栽培用として市販されているトウモロコシのほとんどは一代雑種品種(F1)であるため、収穫種子が翌年に栽培用として播種されることは一般的でない。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—
ロ 生息又は生育可能な環境の条件

- 5 トウモロコシ種子の発芽の最低温度は 10~11°C、最適温度は 33°C とされている。実際に播種されるのは 13~14°C 以上である(中村, 2001a)。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である(瀧澤, 1981)。また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である(柿本ら, 2001)。これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の 1.6 ~ 2.0 倍になったときに幼根 (初生根または種子根) が抽出し、子実発芽となる (戸澤, 2005)。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む土壌が適し、pH5.5~8.0 の範囲で栽培可能である(千葉, 1980)。
- 10
- 15 現在のトウモロコシは長期の栽培作物化により作られた作物であるため、自然条件下における自生能力を失っている(OECD, 2003)。

ハ 捕食性又は寄生性

20 —

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

- 25 完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒性はない。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である(OECD, 2003)。種子の休眠性は知られていない。また、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する(菊池, 1987; 中村, 2001a)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0°C 以下の外気にさらされると生存できない(OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12%、温度 10°C、相対湿度 55%以内に保つことが必要である(OECD, 2003; 中村, 2001a)。
- 30
- 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

トウモロコシは栄養繁殖はせず、種子繁殖する。自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

- 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じる特性を有する場合はその程度

10 トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、95~99%は他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家受粉も可能である(OECD, 2003; 千藤, 2001; 農学大辞典編集委員会, 1987)。トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* 種に含まれ *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis の亜種として分類される一年生のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*) 及び *Tripsacum* 属である。トウモロコシはテオシントと自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東南部、コロンビアからボリビアにかけてのアンデス東側の低地、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラに大きく三分されている(柿本, 1981)。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

- 20 ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの一本の雄穂には1,200~2,000個の小穂があり、1,600万~3,000万個の花粉粒を形成する(柿本ら, 2001; 中村, 2001b)。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では24時間以内であるが、環境により大きく異なる(中村, 2001b)。
25 花粉の1粒当たりの重量は約 3.4×10^{-7} g であり(松井ら, 2003)、球形で直径は90~100 μ m である (Raynor *et al.*, 1972)。トウモロコシは風媒による受粉が主であり、雄穂の開花によって飛散した花粉は、雌穂から抽出した絹糸に付着して発芽し、24時間以内に受精を完了する(OECD, 2003)。また、トウモロコシの花粉は風により飛散するが、隔離距離は、林、高層建築物などの遮蔽物の有無などにより異なり、200~400m とされている(千藤, 2001)。
30

ホ 病原性

—

35

へ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育又は生息

に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

ト その他の情報

- 5 トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

- 10 一般的にトウモロコシの収量は、乾燥ストレスに対して強い影響を受けることが知られている。特に開花期及び登熟期における乾燥ストレスは、穀粒の形成を妨げ収量を減少させることが知られている(Boyer and Westgate, 2004; Claassen and Shaw, 1970)。モンサント・カンパニーはトウモロコシの乾燥ストレス条件下における収量の減少を抑制するため、乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-87460-4) (以下、「本組換えトウモロコシ」という)を開発した。

- 15 本組換えトウモロコシは、目的遺伝子である改変低温ショック蛋白質 B 遺伝子(改変 *cspB* 遺伝子)の発現により、後期栄養生長期から初期生殖生長期における土壌水分を制限した条件下において収量の減少を抑制することが確認されている(表 4, p21; 別添資料 1 の Table 8, p36)。その一方で、適切な土壌水分条件下での本組換えトウモロコシの収量は、対照の非組換えトウモロコシと同程度であった(表 3, p20; 別添資料 1 の Table 6, p34)。また、本組換えトウモロコシの土壌水分を制限した条件下での収量は適切な土壌水分条件下での収量と比較すると減少することが確認されている(表 3, p20; 表 4, p21; 25 別添資料 1 の Table 6, p34 及び Table 8, p36)。

- 本組換えトウモロコシの乾燥耐性能は、土壌細菌である *Bacillus subtilis* 由来の改変 *cspB* 遺伝子がコードする改変低温ショック蛋白質 B (改変 CSPB)によって付与されている。細菌中の CSPB については多くの研究がなされており、CSPB は乾燥などのストレス条件下で RNA 上に形成された 2 本鎖を解消することにより、RNA を安定化させ、それらの翻訳を助け、細胞が正常な機能を保てるよう助ける RNA シャペロンとして働いている(Graumann *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999) (第一-2-(1)-ロ-②-i, p13~14)。

- 35 本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB も同様に RNA に結合することにより(別添資料 2 の Figure 7~10, p38~41)、乾燥ストレス条件下において植物の細胞機能を保つよう助けることが示唆された。その結果として、本組換えトウモロコシ中の改変 CSPB は、乾燥ストレスによる光合成速度、気孔コンダクタンス及び光化学系 II における量子効率などの生理学的能力及び光合

成産物を穀粒に配分する効率への影響を最小限にとどめ(別添資料 3; 別添資料 4)、雌穂における穀粒数の減少を防ぎ、その結果として収量の減少を抑制することが示唆された(別添資料 4)。

- 5 水不足は作物の収量を減少させる大きな要因の一つになっており、乾燥ストレス条件下でも収量を安定させることは環境面においても社会経済面においても有益なことである。北米では穀物の収量が減少した場合の原因の約 4 割が、水不足によるものであるとの報告がなされている(Boyer, 1982)。

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

(1) 供与核酸に関する情報

20 イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 1(p9)及び表 1(p10~12)に示した。

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

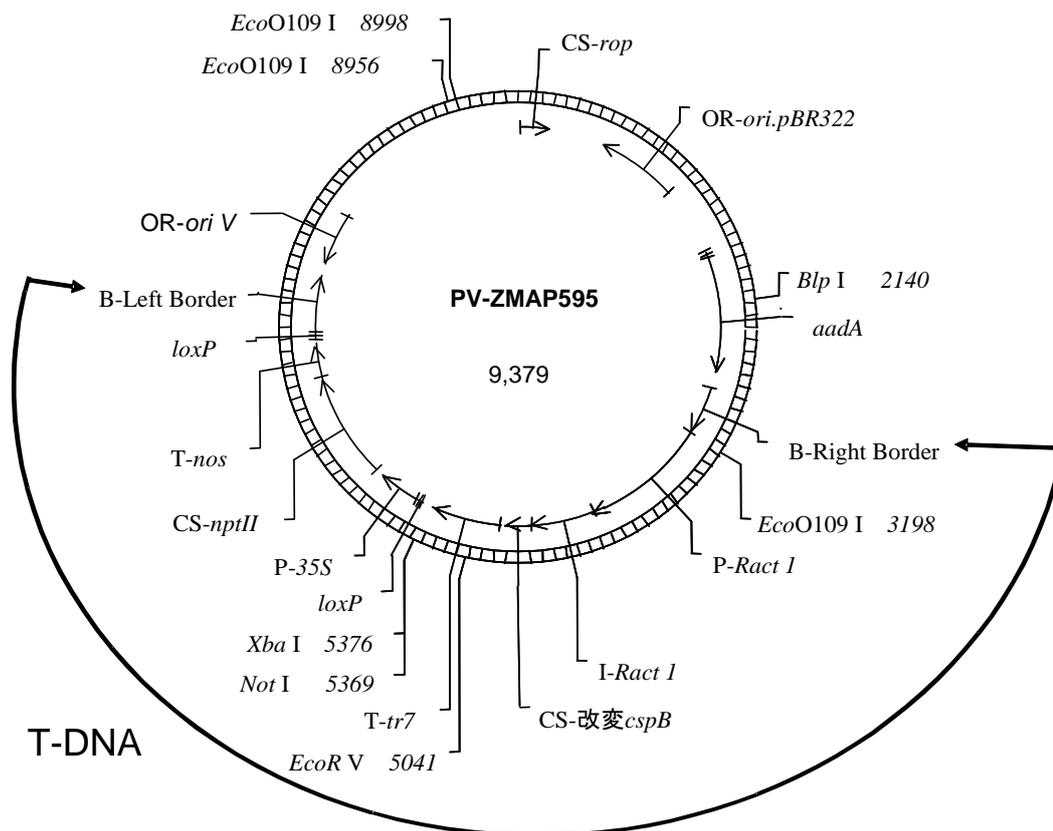
ロ 構成要素の機能

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

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表

1(p10~12)に示した。

5



10

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

15

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

表 1 PV-ZMAP595 の構成並びに構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS ^{注1} - <i>rop</i>	<i>Escherichia coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列 (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注2} - <i>ori.pBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-nucleotidyltransferase の細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与する (Fling <i>et al.</i> , 1985)。 (GenBank accession X03043)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-DNA 領域	
B ^{注3} -Right Border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注4} - <i>Ract1</i>	<i>Oryza sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のプロモーターとリーダー配列 (McElroy <i>et al.</i> , 1990)。目的遺伝子の転写をあらゆる組織で恒常的に誘導する。
I ^{注5} - <i>Ract1</i>	<i>O. sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy <i>et al.</i> , 1991)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 PV-ZMAP595 の構成並びに構成要素の由来及び機能 (続き)

T-DNA 領域 (続き)	
CS-改変 <i>cspB</i>	<i>B. subtilis</i> 由来の改変 CSPB をコードする遺伝子 (Willimsky <i>et al.</i> , 1992)。詳細は第一-2-(1)-ロ-②に示した。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T ^{注6} - <i>tr7</i>	<i>A. tumefaciens</i> 由来の転写 7 遺伝子の 3' 非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>loxP</i> ^{注7}	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する (Russell <i>et al.</i> , 1992)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域 (Odell <i>et al.</i> , 1985)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS- <i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子 (Beck <i>et al.</i> , 1982)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (<i>nos</i>) 遺伝子の 3' 非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(Russell <i>et al.</i> , 1992)。

表 1 PV-ZMAP595 の構成並びに構成要素の由来及び機能 (続き)

T-DNA 領域 (続き)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列 (25bp) をふくむ DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終着点である (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR-ori V	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注¹CS – Coding Sequence (コーディング配列)

注²OR – Origin of Replication (複製開始領域)

5 注³B – Border (境界配列)

注⁴P – Promoter (プロモーター)

注⁵I – Intron (イントロン)

注⁶T – 3' nontranslated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences.

(3 末端非翻訳終止配列及びポリアダニル化シグナル配列)

10 注⁷*loxP* – *nptII* 遺伝子は MON87460 系統の形質転換体の選抜マーカーとして使用した。MON87460 系統の開発開始当時、EU における遺伝子組換え作物の安全性評価機関である EFSA(欧州食品安全機関)などが抗生物質耐性マーカー遺伝子の代用となる新しい選抜方法の開発と使用を促していたため、MON87460 系統は Cre リコンビナーゼによって認識される *loxP* 組換え部位を使用して *nptII* 遺伝子カセットを除去するよう設計された。その後、EFSA によって、遺伝子組換え作物中の *nptII* 遺伝子が、ヒト及び家畜の健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断した声明が公表されたため(EFSA, 2004)、MON87460 系統については、*nptII* 遺伝子カセットの除去は行われなかった。

20

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

5 【改変 CSPB】

改変 CSPB は RNA シャペロンとして働き、土壌水分を制限した条件下において、光合成産物を、発達中の雌穂に分配するなど重要な生理的機能を保持することにより、収量の減少を抑制することが確認された。

10 以下に本組換えトウモロコシで発現する改変 CSPB の機能を記載した。

i. 細菌及び植物における低温ショック蛋白質(CSP)の機能

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

20 一般に細菌中で発現する RNA は、多様な環境ストレス条件下において二次構造を形成し、その結果として蛋白質の合成が減少することにより、正常な細胞機能が阻害されることが知られている(図 2 の①, p14) (Graumann *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997)。しかし、CSP は RNA に結合することにより(Cristofari and Darlix, 2002)、RNA の二次構造を解消し、翻訳を安定させ、細胞機能を向上させる(Graumann *et al.*, 1997) RNA シャペロンとして働いていると考えられている (図 2 の②, p14)。また、RNA シャペロンは RNA の二次構造を解消する際に必要であるが、RNA の一次構造を維持する働きはないことが報告されている(Cristofari and Darlix, 2002)。

30 なお、CSP は最初に単離されたものが低温処理によって誘導されたことから低温ショック蛋白質(CSP)と命名されたが、細菌の CSP ファミリーには最適温度条件下においても発現しているもの(Graumann *et al.*, 1997)や、別の種類の環境ストレスに応答して細胞の機能を保つ働きを持つものも知られている (Anderson *et al.*, 2006; Etchegaray *et al.*, 1996)。

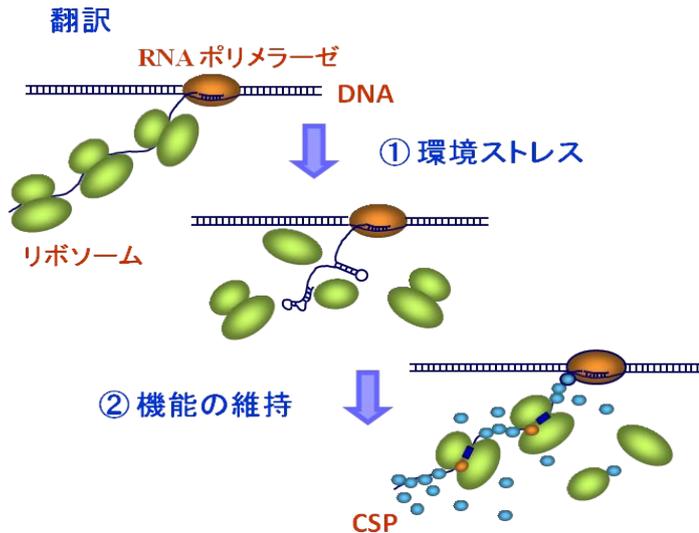


図 2 一般的なCSPの機能³

5 また、植物においても CSD を含む蛋白質はマルチドメイン蛋白質として存在することが知られている。これらの CSD を含む蛋白質は細菌の CSP と極めて類似しており、環境ストレス時に RNA に結合し、ストレス条件下における細胞機能の維持を助ける RNA シャペロンとしての機能を有すると考えられている (Chaikam and Karlson, 2008; Fusaro *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; and
10 2006; Nakaminami *et al.*, 2005)。

実際にコムギ由来の核酸結合蛋白質である WCSP1 は、*E. coli* 由来の CSPA と類似した構造を有しており (Karlson *et al.*, 2002)、WCSP1 の発現量は *E. coli* 由来の CSPA の発現量と同様に低温ストレス条件下においては増加するが、乾燥、高温及び塩ストレス条件下においては変動しないことが報告されている (Karlson *et al.*, 2002)。このことから、この二つの蛋白質は *in vivo* において同様の機能を持つと推察されている (Karlson *et al.*, 2002)。さらに、CSD を含むシロイヌナズナ由来の蛋白質である AtGRP2 は、低温ストレス条件下で発現が誘導され、開花時期や種子形成の決定に関わっていることが報告されている (Fusaro *et al.*, 2007)。また、CSD を含むイネ由来の蛋白質である OsCSP1
15 及び OsCSP2 が同定されており、これらの蛋白質も低温ストレス条件下において発現が誘導され、核酸に結合し、生殖組織及び分裂組織に蓄積することで細胞機能の維持を助けられていると考えられる (Chaikam and Karlson, 2008)。

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

³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

上述したように、細菌の CSP 及び植物の CSD を含む蛋白質は RNA シャペロンとして働くことにより、環境ストレス耐性を付与すると考えられている。細菌 CSP が植物に環境ストレスに対する耐性能を与えるかどうか確認するため、*B. subtilis* 由来の改変 *cspB* 遺伝子をシロイヌナズナ及びイネに導入し、環境

5 環境ストレス耐性能力を評価した。
その結果、シロイヌナズナは低温に対して耐性を示し、イネは低温、高温、乾燥に対して耐性を示した(Castiglioni *et al.*, 2008)。しかし、イネにおいては、全ての個体が同一の環境ストレス耐性能を示すわけではなく、三つ全ての環境

10 ストレスに対して耐性を示す個体もあれば、一つあるいは二つの環境ストレスにしか耐性を示さない個体も確認された(Castiglioni *et al.*, 2008)。
このイネにおける結果から、改変 CSPB はいくつかの環境ストレスに対して耐性を付与することが確認されたが、付与される耐性能はイベントにより異なることが示された。このイベント特異的な環境ストレス耐性様式は導入箇所の影響によるものと考えられた。実際に、導入遺伝子の作用が導入箇所

20 iii. 本組換えトウモロコシで発現する改変 CSPB の機能

改変 CSPB の本組換えトウモロコシ内での機能を以下のように調査した。

まず、本組換えトウモロコシ中で発現する改変 CSPB が、*B. subtilis* 中の CSPB と同様に RNA シャペロンとして働いているか調査した。*in vitro* における試験結果より、本組換えトウモロコシ中の改変 CSPB は植物の RNA に結合

30 することが示され (別添資料 2 の Figure 7~10, p38~41)、細菌の CSP や植物の CSD を含む蛋白質と同様に RNA に結合することが示された (別添資料 2 の Figure 9~10, p40~41) 。また、改変 CSPB は *in vitro* で RNA シャペロンとしての共通の機能である核酸の二次構造を解消すること(Cristofari and Darlix, 2002)が確認された。しかし、変異を加え核酸への結合機能を欠損した CSPB (CSPB_F30R 及び CSPB_F30A)は核酸に結合せず二次構造を解消できないことが示された(別添資料 2 の Table 1, p31)。さらに、実際にヒスチジンで標識した改変 CSPB を発現するトウモロコシの葉サンプルから、この改変 CSPB と内在性 RNA の複合体が免疫沈降により確認された(別添資料 2 の Figure 11, p42)。

さらに、細胞内レベルで改変 CSPB は本組換えトウモロコシの子葉鞘の細胞質及び核の両方に分布しているが、液胞、ミトコンドリア、葉緑体には存在しないことから、細菌及び植物中の CSD を含む蛋白質と同様の局在性を持

つことが確認された(別添資料 2 の Figure 6, p37)。

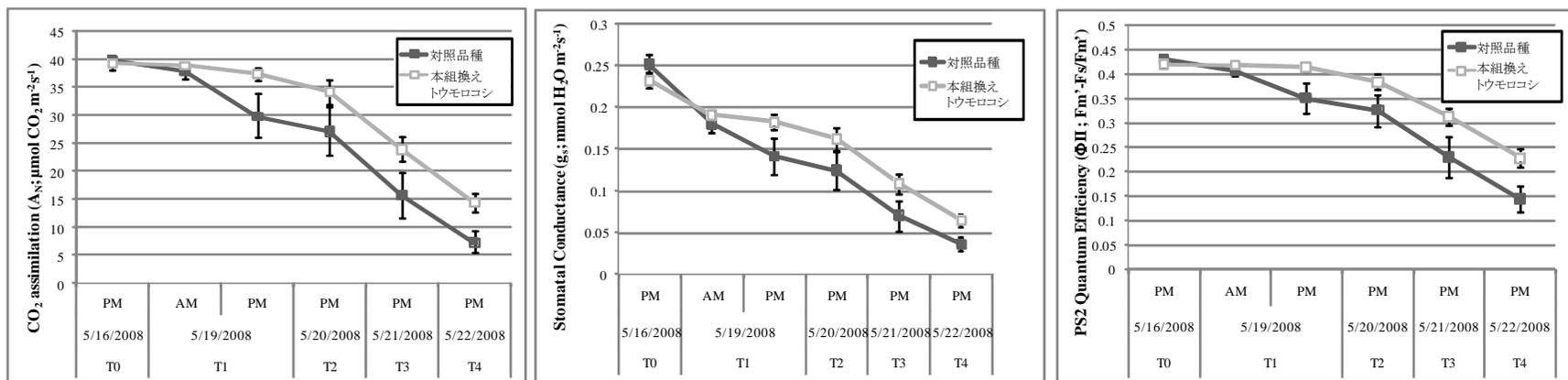
このことから、改変 CSPB は本組換えトウモロコシ中で RNA シャペロンとして働いていると判断された。

5 iv. 温室における本組換えトウモロコシの生理学的特性

米国のコネチカット州の温室において改変 CSPB が本組換えトウモロコシの生理学的特性に及ぼす影響について調査した。

10 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの 5 葉期(V5)から 6 日間、灌漑を中断し、その間の生理学的特性を調査した結果、本組換えトウモロコシにおける気孔コンダクタンス、光合成速度、光化学系 II における量子効率などの生理学的特性が土壌水分を制限した条件下において対照の非組換えトウモロコシと比較し向上していることが確認された(図 3, p17; 別添資料 3 の Figures 1, p6, Figure 2, p6 及び Figure 4, p8)。

15



A. 光合成速度

B. 気孔コンダクタンス

C. 光化学系IIにおける量子効率

5 図 3 温室での土壌水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの生理学的機能の比較 (2008年、米国)⁴

5 葉期(V5)から6日間、灌漑を中断し調査を行った。

A. 光合成速度は、1m²当たり1秒間における推定二酸化炭素純同化率 (単位: μmol) で示した。

B. 気孔コンダクタンスは、1m²当たり1秒間における水蒸気の放出量 (単位: mmol) で示した。

C. 光化学系IIにおける量子効率は、光化学系IIにより媒介される電子伝達の流れを示した。

10 なお、X軸の測定日はA~Cのグラフに共通してT0が土壌水分の制限前、T1~T4が土壌水分の制限期間中を示す。

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

v. 土壤水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシが収量の減少を抑制する要因の解析

2006-2007 年にチリの 4 ヲ所のほ場(首都州コリナ(CL), 首都州カレラ・デ・
5 タンゴ(CT), 首都州ルンブレラス(LUM)、バルパライソ州クィロタ(QUI))にお
いて、2 種の土壤水分条件(適切な土壤水分条件及び土壤水分を制限した条件)
を設け試験を行い、初期生育程度、苗立ち数、開花日までの日数、緑度保持
10 度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、転び型倒伏株数、挫折型倒伏株数、最終
個体数、穀粒中の水分含量、穀粒の重量、収量について調査を行った。全ほ
場を通して統計処理を行う際、以下の 3 つの条件を全て満たすほ場を供試す
ることとした。

1. 灌漑量及び降水量の記録が水分を適切に管理していたことを示してお
り、異なる 2 種の灌漑処理を行っていたほ場。
- 15 2. 望まれる適切な土壤水分条件及び土壤水分を制限した条件が土壤水分
のモニタリングによって裏づけされているほ場。土壤水分が直接測定
できない際は、同時に栽培した商業栽培品種の形態及び生育が土壤水
分を制限したことによる影響を受けていること。
- 20 3. 同時に栽培した商業栽培品種の形態及び生育の特性において適切な土
壤水分条件と土壤水分を制限した条件を比較し、土壤水分を制限した
条件下で収量が少なくとも 15%の減少を示したほ場。なお、稈長及び
着雌穂高の減少及び絹糸抽出期の遅れについても調査を行い、それら
を補足的なデータとして扱った。

4 ヲ所のほ場のうち QUI のほ場は上記の条件 3 を満たさなかったため(表 2,
25 p19; 別添資料 1 の Table 5, p33)、CL、CT 及び LUM のほ場の結果を解析に用
いることとした。

調査の結果、適切な土壤水分条件下における本組換えトウモロコシと対照
の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった (表 3,
30 p20; 別添資料 1 の Table 6, p34)。一方、本組換えトウモロコシは後期栄養生
長期から初期生殖生長期における土壤水分を制限した条件下において、最終
的な収量の減少を抑制することが確認された (表 4, p21; 別添資料 1 の Table
8, p36)。しかし、土壤水分を制限した条件下で生育させた本組換えトウモロ
コシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量以外の形態及び生育の特性に
統計学的有意差は認められなかった(表 4, p21; 別添資料 1 の Table 8, p36)。

35

表 2 適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下における商業栽培品種の形態及び生育の特性 (2006-2007 年、チリ)⁵

形態及び生育の特性	CL		CT		LUM		QUI	
	適切な 土壌水分	土壌水分 を制限	適切な 土壌水分	土壌水分 を制限	適切な 土壌水分	土壌水分 を制限	適切な 土壌水分	土壌水分 を制限
50%絹糸抽出期までの日数	63.1	63.8	66.2	67.3	70.3	73.7*	67.7	67.1
着雌穂高(インチ)	63.4	50.9*	55.0	46.0	50.4	41.8*	63.5	63.4
稈長(インチ)	110.7	79.7*	105.9	92.1	97.9	75.0*	112.0	112.8
収量(ブッシェル/エーカー)	185.5	82.3*	236.5	152.3*	213.9	94.4*	203.1	196.3
収量減少率(%)		56%		36%		56%		3%

* 各ほ場内で適切な土壌水分条件下と土壌水分を制限した条件下の間に統計学的有意差が認められたこと示す(p≤0.05)。

5

⁵本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 3 適切な土壌水分条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの形態及び生育の特性の比較 (2006-2007 年、チリ)⁶

形態及び生育の特性	平均値		商業栽培品種の範囲 ¹	
	本組換えトウモロコシ	対照品種	最小値	最大値
初期生育程度 ²	4.9	4.7	4.3	6.0
苗立ち数 (本/プロット)	76.1	73.0	71.0	80.0
50%雄穂開花期までの日数(日)	66.8	66.7	65.0	74.3
50%絹糸抽出期までの日数(日)	65.2	65.3	62.7	71.0
緑度保持度 ³	2.4	2.9	1.0	6.7
着雌穂高 (インチ)	55.9	52.8	46.1	69.1
稈長 (インチ)	101.1	99.0	94.4	116.4
落下雌穂数 (個/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
転び型倒伏株数 (本/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
挫折型倒伏株数 (本/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
最終個体数 (本/プロット)	75.2	74.0	71.3	79.3
穀粒中の水分含量 (%)	14.8	15.2	10.1	20.2
1ブッシェル当たりの穀粒の重量 (ポンド/ブッシェル)	56.4	55.8	54.0	61.2
収量 (ブッシェル/エーカー)	220.7	220.0	166.7	248.4
[MT/ha] ⁵	[13.9]	[13.8]	[10.5]	[15.6]

n=3

5 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった (分散分析、 $p \leq 0.05$)。

¹ 商業栽培品種の範囲は CL、CT、LUM のほ場で栽培された商業栽培品種から計算された。

² 初期生育程度は 0-9 の段階で評価され、0 は植物体が死んでおり、9 は生育程度が良い。

³ 緑度保持度は 0-9 の段階で評価され、0 は植物体全体が枯れ上がっており、9 は植物体全体が緑である。

10

⁴ データにばらつきが認められなかったため、統計処理は行われなかった。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの平均値の間に差異は認められなかったため、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと同等であると考えられた。

⁵ 収量はブッシェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

15

⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 4 土壌水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの形態及び生育の特性の比較 (2006-2007 年、チリ)⁷

形態及び生育の特性	平均値		商業栽培品種の範囲 ¹	
	本組換えトウモロコシ	対照品種	最小値	最大値
初期生育程度 ²	5.0	4.8	4.0	6.0
苗立ち数 (本/プロット)	76.8	75.7	67.3	80.7
50%雄穂開花期までの日数(日)	67.4	68.1	65.7	75.0
50%絹糸抽出期までの日数(日)	67.3	66.8	63.3	74.3
緑度保持度 ³	4.3	4.7	1.0	7.0
着雌穂高 (インチ)	48.0	45.1	40.0	60.5
稈長 (インチ)	83.9	78.1	64.9	96.8
落下雌穂数 (個/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
転び型倒伏株数 (本/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
挫折型倒伏株数 (本/プロット) ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0
最終個体数 (本/プロット)	76.7	75.1	71.3	80.7
穀粒中の水分含量 (%)	19.5	21.3	9.6	25.5
1 ブッシェル当たりの穀粒の重量 (ポンド/ブッシェル)	56.7	56.0	51.3	62.2
収量 (ブッシェル/エーカー) [MT/ha] ⁵	114.5* [7.2]	86.7 [5.4]	56.4 [3.5]	167.6 [10.5]

n=3

- 5 約 10 葉期(V10)から水熟期(R2)にかけて土壌水分を制限し、調査を行った。
*本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (分散分析、 $p \leq 0.05$)。
- ¹ 商業栽培品種の範囲は CL、CT、LUM のほ場で栽培された商業栽培品種から計算された。
- ² 初期生育程度は 0-9 の段階で評価され、0 は植物体が死んでおり、9 は生育程度が良い。
- 10 ³ 緑度保持度は 0-9 の段階で評価され、0 は植物体全体が枯れ上がっており、9 は植物体全体が緑である。
- ⁴ データにばらつきが認められなかったため、統計処理は行われなかった。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの平均値の間に差異は認められなかったため、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと同等であると考えられた。
- 15 ⁵ 収量はブッシェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

さらに、土壌水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシの収量減少が抑制される要因を調査するために、2009年に米国カリフォルニア州ヨロ郡の3ヵ所のほ場(ハラン・サウス(WHAS)、ハラン・ノース(WHAN)、バリオス(YBAP))において、2種の灌漑処理(適切な土壌水分条件及び土壌水分を制限した条件)を設け試験を行った。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下において栽培した。

土壌水分の制限はトウモロコシの収量が最も乾燥ストレスの影響を受けるとされている後期栄養生長期から初期登熟期(約10葉期から乳熟期)(Boyer and Westgate, 2004; Claassen and Shaw, 1970)にかけて灌漑をしないことで行った。調査項目はチリで調査した形態及び生育の特性(初期生育程度、苗立ち数、開花日までの日数、着雌穂高、稈長、緑度保持度、最終個体数、収量)に加えて、より詳細に収量の減少を抑制する要因の解析を行うために収量構成要素(雌穂の乾燥重、茎葉の乾燥重、地上部の乾燥重、雌穂当たりの穀粒数、千粒重、雌穂数、収穫指数)、土壌水分の制限期間中の植物の生長過程(葉、茎葉、地上部及び雌穂の乾燥重、雌穂径、葉面積)、生理学的特性(葉及び茎の水ポテンシャル、光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系IIにおける量子効率)について調査を行った。

当該試験は本組換えトウモロコシが土壌水分を制限した条件下において収量の減少を抑制する要因について解析することが目的であるため、各ほ場において土壌水分が制限されていること、及び土壌水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシの収量の減少が抑制されていることが必要となる。全ほ場を通して統計処理を行う際、以下の2つの条件を満たすほ場を供試することとした。

1. 水分処理効果—土壌水分を制限した条件下における対照の非組換えトウモロコシの収量が、適切な土壌水分条件下における対照の非組換えトウモロコシの収量と比較し15%以上減少を示しているほ場。
2. 導入遺伝子効果—土壌水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシの収量が対照の非組換えトウモロコシの収量と比較し有意に高い($p \leq 0.05$)ほ場。

3ヵ所全てのほ場の対照の非組換えトウモロコシにおいて、土壌水分を制限したことによる15%以上の収量減少が認められた(表5, p25; 別添資料4のTable 6, p46)。しかし、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量に統計学的有意差の認められたのはWHASとYBAPの2ヵ所のほ場であったので、それら2ヵ所のほ場のデータを解析に用いることとした(表6, p25; 別添資料4のTable 7, p46)。

収量構成要素の調査の結果、適切な土壤水分条件下において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量に統計学的有意差は認められなかった(表 7, p26; 別添資料 4 の Table B.1., p70)。一方、前述したように、土壤水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で収量に統計学的有意差が認められた($p < 0.05$)。土壤水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシの収量(7.6MT/ha)は対照の非組換えトウモロコシの収量(6.8MT/ha)と比較して約 11.8%有意に高いことが確認された($p \leq 0.05$) (表 8, p27; 別添資料 4 の Table 8, p47)。また、土壤水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシの雌穂当たりの穀粒数(386.8 粒)は、対照の非組換えトウモロコシの雌穂当たりの穀粒数(354.5 粒)と比較して約 9.1%有意に高いことが確認された($p \leq 0.05$) (表 8, p27; 別添資料 4 の Table 8, p47)。このことから、土壤水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収量における差異(約 11.8%)は、雌穂当たりの穀粒数の差異(約 9.1%)に起因していると考えられた。

土壤水分を制限した条件下において本組換えトウモロコシの収量減少が抑制される要因を調査するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの収穫指数を比較した。一般に、地上部の全乾物重に対する穀粒重の比率である収穫指数を求めることにより、光合成により生産した産物(光合成産物)を穀粒に配分する効率を評価することができる(Sinclair, 1998)。適切な環境で栽培されたトウモロコシの収穫指数は約 0.50 であることが知られており(Meghji *et al.*, 1984; Russell, 1985; Tollenaar, 1989)、乾燥ストレスにより収穫指数が減少することが知られている (DeLougherty and Crookston, 1979)。この収穫指数の減少は、乾燥ストレス条件下において光合成産物の穀粒への配分が滞ることを示しており、したがって収量も減少する(DeLougherty and Crookston, 1979)。土壤水分を制限した条件下における、本組換えトウモロコシの収穫指数(0.40)は対照の非組換えトウモロコシの収穫指数(0.37)より有意に高いことが確認された($p \leq 0.05$) (表 8, p27; 別添資料 4 の Table 8, p47)。本組換えトウモロコシの収穫指数が対照の非組換えトウモロコシの収穫指数より 8.1%高かったことから、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシより効率的に光合成産物を穀粒に配分していると考えられた。

さらに、土壤水分を制限した条件下における雌穂の乾燥重及び地上部の乾燥重が本組換えトウモロコシでは対照の非組換えトウモロコシと比較し有意に重いのに対し($p \leq 0.05$)、茎葉の乾燥重が本組換えトウモロコシでは対照の非組換えトウモロコシと比較し軽い傾向にあることから、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと比較して、光合成産物を雌穂全体に効率的に配分していることが示された(表 8, p27; 別添資料 4 の Table 8, p47)。

このことは、土壌水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシの茎葉の乾燥重が対照の非組換えトウモロコシと比較し有意に低いのに対し($p \leq 0.05$) (図 4, p28; 別添資料 4 の Figure 5, p35)、本組換えトウモロコシの雌穂径が対照の非組換えトウモロコシと比較し有意に大きいことから ($p \leq 0.05$) (図 5, p29; 別添資料 4 の Figure 7, p37) 確認することができる。

5 以上のことから、本組換えトウモロコシは土壌水分を制限した条件下で光合成産物を効率よく穀粒及び雌穂に配分することにより、収量の減少の抑制をもたらしていると考えられた。

10 しかしながら、当該試験における生理学的特性の調査の結果、土壌水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率において一貫した差異は認められなかった(図 6, p30; 図 7, p31; 図 8, p32; 別添資料 4 の Figure 9~11, p39~41)。前述(第一-2-(1)-ロ-②-iii)の温室において認められた

15 差異が(図 3, p17; 別添資料 3 の Figures 1, p6, Figure 2, p6 及び Figure 4, p8)、当該試験では差異が認められなかった原因としては、これらの生理学的な調査項目が土壌水分、気温、蒸散圧などの変化に影響を受けやすく (Beadle *et al.*, 1993)、ほ場ではこれらの条件が温室と比べて不安定であるためと考えられた。

20 以上のことから、本組換えトウモロコシは土壌水分を制限した条件下で収量の減少を抑制することが確認された。また、本組換えトウモロコシは雌穂の乾燥重、着雌穂高、稈長、収穫指数が有意に高いことから、栄養生長を維持し、光合成産物を効率よく穀粒に分配していることが示された。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現する改変 **CSPB** は光合成産物を雌穂及び

25 穀粒に効率よく配分することにより収量の減少を抑制していると考えられた。

表 5 条件 1—水分処理効果：土壌水分を制限した条件下及び適切な水分処理条件下における対照の非組換えトウモロコシの収量の比較 (2009 年、米国)⁸

試験カ所	処理	対照品種の収量 (MT/ha) ¹	収量の差 (%)	総灌漑量 (mm)	総灌漑量の差 (mm)
YBAP	土壌水分を制限	6.0	-52%	339	-156
	適切な土壌水分	12.5		495	
WHAS	土壌水分を制限	8.3	-30%	258	-324
	適切な土壌水分	11.8		582	
WHAN	土壌水分を制限	8.4	-31%	249	-281
	適切な土壌水分	12.1		530	

YBAP: n=28、WHAS 及び WHAN: n=14

5 約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)にかけて土壌水分の制限を行い、調査を行った。

¹収量はブッシュェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

10 表 6 条件 2—導入遺伝子効果：土壌水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの収量の比較 (2009 年、米国)⁹

試験カ所	収量 (MT/ha) ¹	
	本組換えトウモロコシ	対照品種
YBAP	*6.5	6.0
WHAS	*9.6	8.3
WHAN	8.6	8.4

YBAP: n=28、WHAS 及び WHAN: n=14

約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)にかけて土壌水分の制限を行い、調査を行った。

*本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (分散分析、 $p \leq 0.05$)。

15

¹収量はブッシュェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

⁹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 7 適切な土壤水分条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの形態及び生育の特性並びに収量構成要素の比較 (2009年、米国)¹⁰

形態及び生育の特性	YBAP 及び WHAS の結果	
	本組換えトウモロコシ	対照品種
初期生育程度 ¹	2.82	2.86
苗立ち数(本/プロット)	85.6	85.2
50%雄穂抽出期までの日数 ²	62.6	62.9
50%絹糸抽出期までの日数 ²	62.7	63.0
絹糸抽出から開花までの日数 ²	0.1	0.1
着雌穂高 (cm)	*161.1	154.4
稈長 (cm)	*293.8	289.2
緑度保持度 ³	7.5	7.7
最終個体数(本/プロット)	85.7	85.1
雌穂の乾燥重 (g/プロット)	*16113	15666
茎葉の乾燥重 (g/プロット)	9632	9448
地上部の乾燥重 (g/プロット)	25724	25138
一穂着粒数 (粒/雌穂)	535.9	520.0
千粒重 (g)	283.0	285.6
雌穂数 (個/プロット)	84.1	83.3
収穫指数 ⁴	0.50	0.49
収量 (MT/ha) ⁵	12.5	12.1

5 n=42

*本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (分散分析、 $p \leq 0.05$)。

¹ 初期生育程度は 1-5 の段階で評価され、1 は生育程度が良く、5 は生育程度が悪い。

² 50%雄穂抽出期までの日数、50%絹糸抽出期までの日数、絹糸抽出期から開花までの日数は

10 YBAP のほ場でのみで観察した。

³ 緑度保持度は 1-10 の段階で評価され、1 は植物体全体が枯れ上がっており、10 は植物体全体が緑である。

⁴ 収穫指数はプロット内の穀粒重とプロット内の地上部重との比率として計算した。

⁵ 収量はブッシェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

15

¹⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 8 土壌水分を制限した条件下における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの形態及び生育の特性並びに収量構成要素の比較 (2009年、米国)¹¹

形態及び生育の特性	YBAP 及び WHAS の結果	
	本組換え トウモロコシ	対照品種
初期生育程度 ¹	2.48	2.62
苗立ち数(本/プロット)	85.5	85.5
50%雄穂抽出期までの日数 ²	63.3	63.2
50%絹糸抽出期までの日数 ²	64.8	65.0
絹糸抽出から開花までの日数 ²	1.5	1.8
着雌穂高 (cm)	*157.5	151.8
稈長 (cm)	*262.2	259.2
緑度保持度 ³	6.6	6.6
最終個体数(本/プロット)	84.5	85.0
雌穂の乾燥重 (g/プロット)	*10104	9260
茎葉の乾燥重 (g/プロット)	8950	9132
地上部の乾燥重 (g/プロット)	*19053	18392
一穂着粒数 (粒/雌穂)	*386.8	354.5
千粒重 (g)	260.4	257.4
雌穂数 (個/プロット)	76.1	75.6
収穫指数 ⁴	*0.40	0.37
収量 (MT/ha) ⁵	*7.6	6.8

5 n=42

約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)にかけて土壌水分を制限し、調査を行った。

*本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (分散分析、 $p \leq 0.05$)。

¹ 初期生育程度は 1-5 の段階で評価され、1 は生育程度が良く、5 は生育程度が悪い。

10 ² 50%雄穂抽出期までの日数、50%絹糸抽出期までの日数、絹糸抽出期から開葯までの日数は YBAP のほ場でのみで観察した。

³ 緑度保持度は 1-10 の段階で評価され、1 は植物体全体が枯れ上がっており、10 は植物体全体が緑である。

⁴ 収穫指数はプロット内の穀粒重とプロット内の地上部重との比率として計算した。

15 ⁵ 収量はブッシュェル/エーカーから MT/ha へ換算した。

¹¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

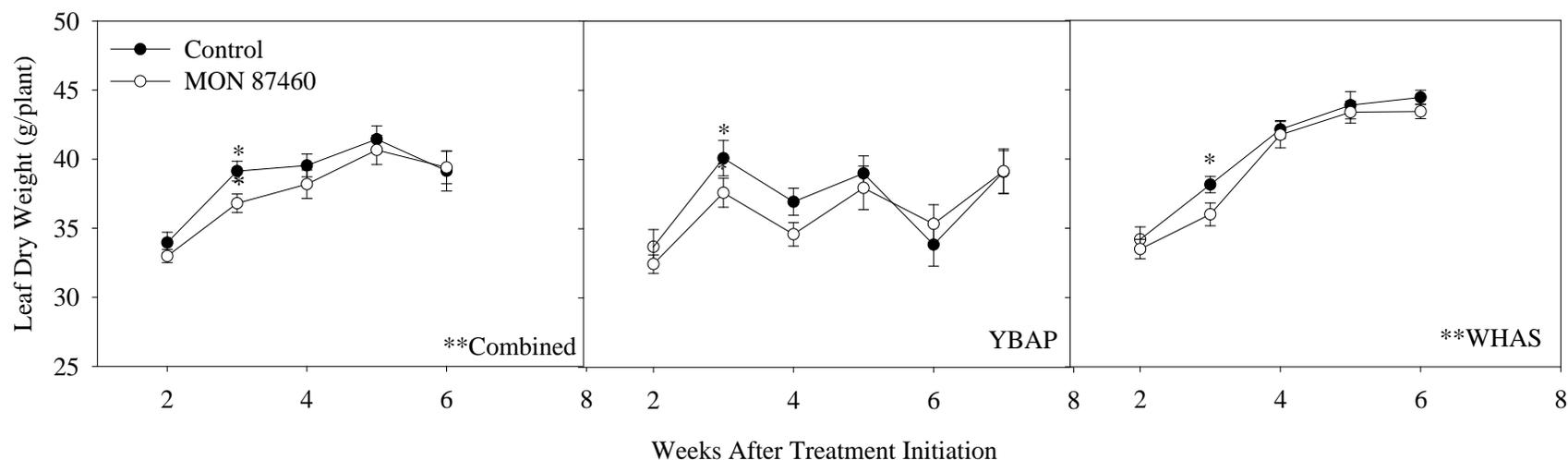


図 4 土壤水分を制限した条件下における葉の乾燥重の推移 (2009 年、米国)¹²

- 全ほ場(Combined)、バリオス(YBAP)、ハラン・サウス(WHAS)における、土壤水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシ(○)及び対照の非組換えトウモロコシ(●)の葉の乾燥重の経時的変化を示した。土壤水分の制限期間中の 2 週目から 7 週目まで毎週プロットから 2~4 本の植物体サンプルを採取し測定を行った。各値は平均値 ±1 × 標準誤差を示している。
- *は各測定日において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。
- **は各ほ場における全ての測定日の平均値において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの葉の乾燥重の平均値は、全ほ場では 37.9g vs. 38.8g であり、WHAS では 39.6g vs. 40.6 g であった。土壤水分の制限は約 8 葉期(V8)に開始され、開花は土壤水分の制限開始から約 3~4 週間後であった。

¹²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

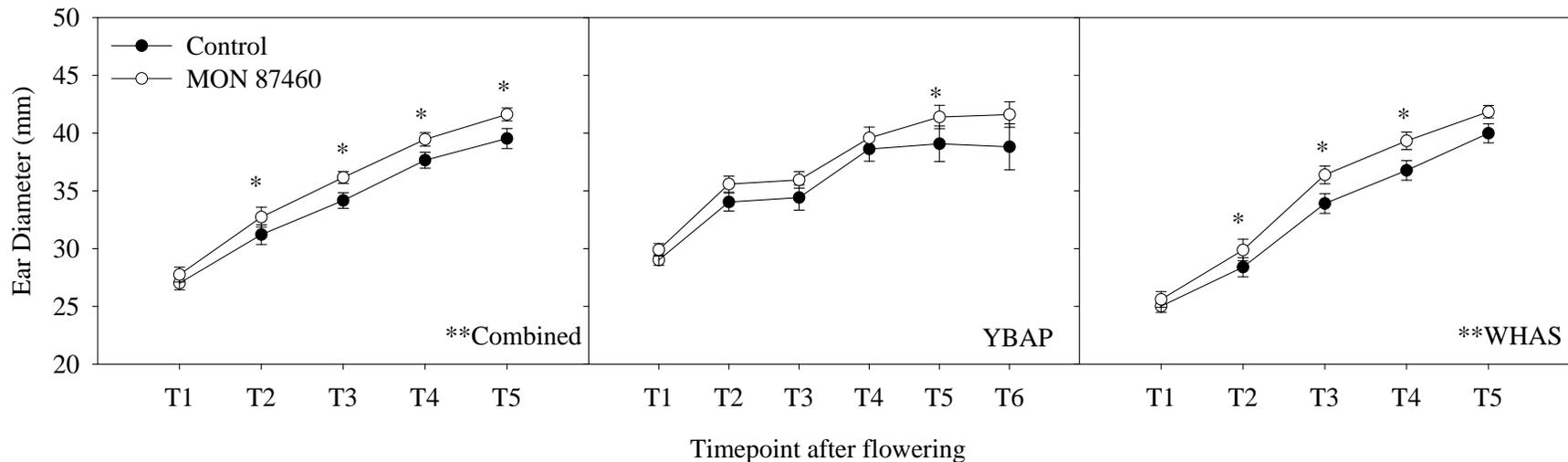


図 5 土壤水分を制限した条件下における雌穂径の推移 (2009 年、米国)¹³

全ほ場(Combined)、バリオス(YBAP)、ハラン・サウス(WHAS)における、土壤水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシ(o)及び対照の非組換えトウモロコシ(●)の雌穂径の経時的变化を示した。各値は平均値 $\pm 1 \times$ 標準誤差を示している。

- 5 *は各測定日において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。
 **は各ほ場における全ての測定日の平均値において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの雌穂径の平均値は、全ほ場では 36.0 mm vs. 34.1 mm であり、WHAS では 34.6 mm vs. 32.8 mm であった。

- 10 T1 は開花から約 3~4 日後であり、開花から約 18~19 日後まで週 2 回雌穂径を測定した。調査は土壤水分の制限開始後約 4~7 週の間に行われている。雌穂径の測定は同じ雌穂を経時的に測定することが可能であるため、雌穂の乾燥重の測定と比較して測定の精度をより向上することができる。また測定のため雌穂を切り落とす必要がないので、より多くの植物体から測定することができる。

¹³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

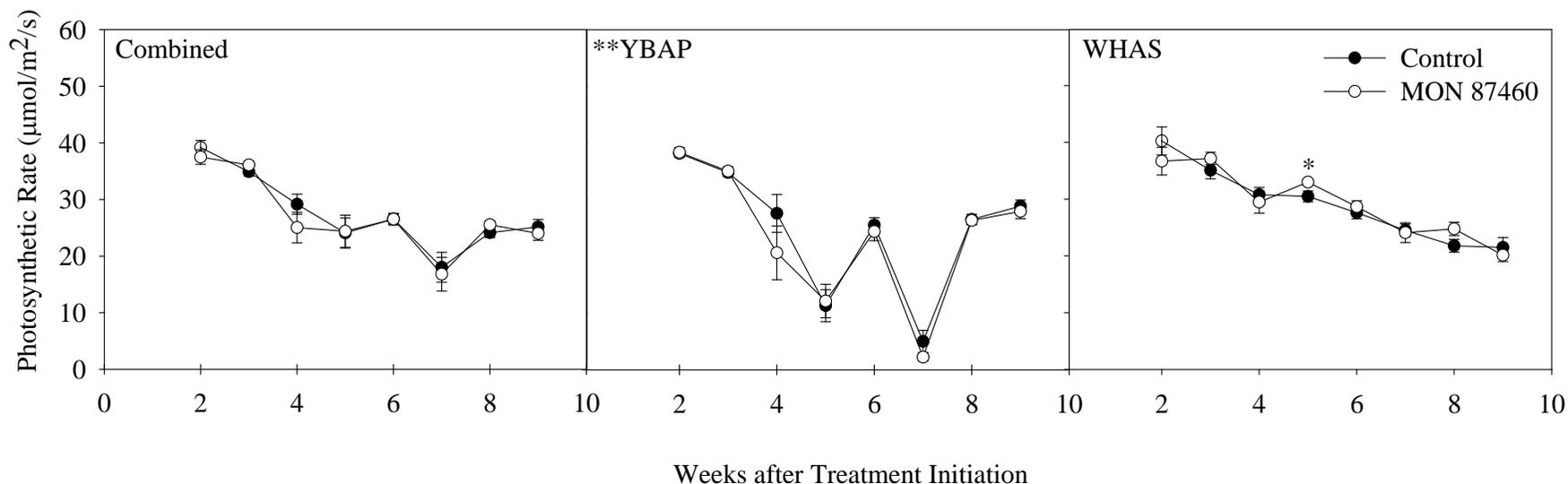


図 6 土壤水分を制限した条件下における光合成速度の推移 (2009 年、米国)¹⁴

5 全ほ場(Combined)、バリオス(YBAP)、ハラン・サウス(WHAS)における、土壤水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシ(○)及び対照の非組換えトウモロコシ(●)の光合成速度の経時的変化を示した。各値は平均値 $\pm 1 \times$ 標準誤差を示している。

*は各測定日において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。

**は各ほ場における全ての測定日の平均値において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの光合成速度の平均値は、YBAP で $25.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ vs. $27.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。

10 土壤水分の制限は約 8 葉期(V8)に開始され、開花は土壤水分の制限開始から約 3~4 週間後であった。測定期間中、2~7 週は土壤水分の制限期間であり、8~9 週は植物体の蒸発散量が 100%になるよう灌漑された期間である。

¹⁴本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

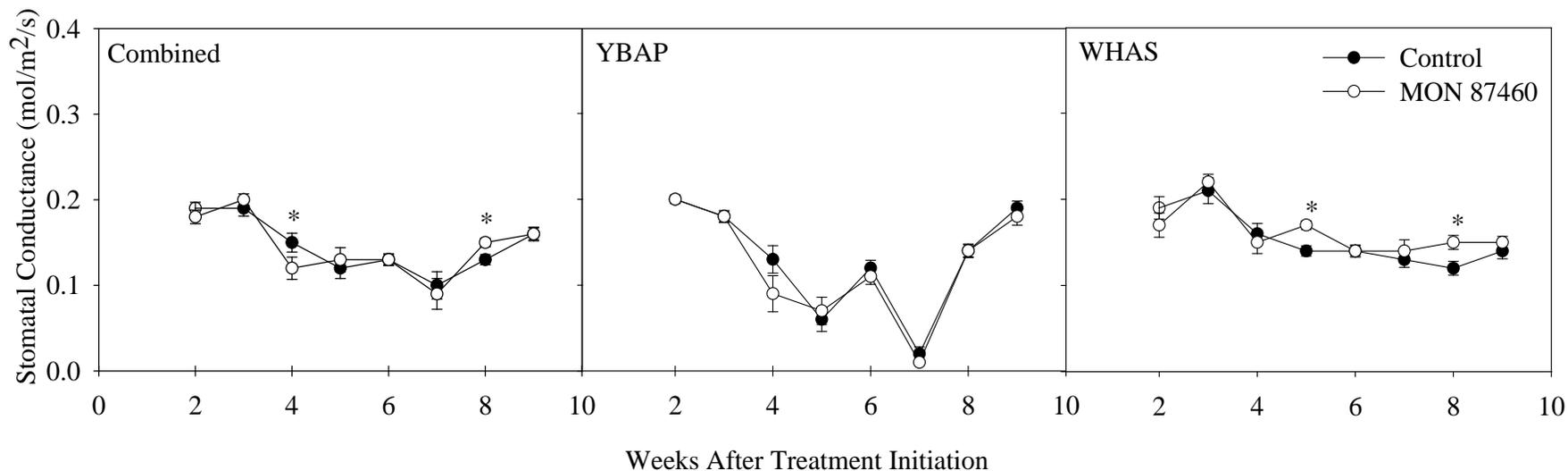


図 7 土壤水分を制限した条件下における気孔コンダクタンスの推移 (2009年、米国)¹⁵

5 全ほ場(Combined)、バリオス(YBAP)、ハラン・サウス(WHAS)における、土壤水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシ(○)及び対照の非組換えトウモロコシ(●)の気孔コンダクタンスの経時的変化を示した。各値は平均値 ± 1 × 標準誤差を示している。

*は各測定日において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。

土壤水分の制限は約 8 葉期(V8)に開始され、開花は土壤水分の制限開始から約 3~4 週間後であった。

測定期間中、2~7 週は土壤水分の制限期間であり、8~9 週は植物体の蒸発散量が 100%になるよう灌漑された期間である。

¹⁵本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

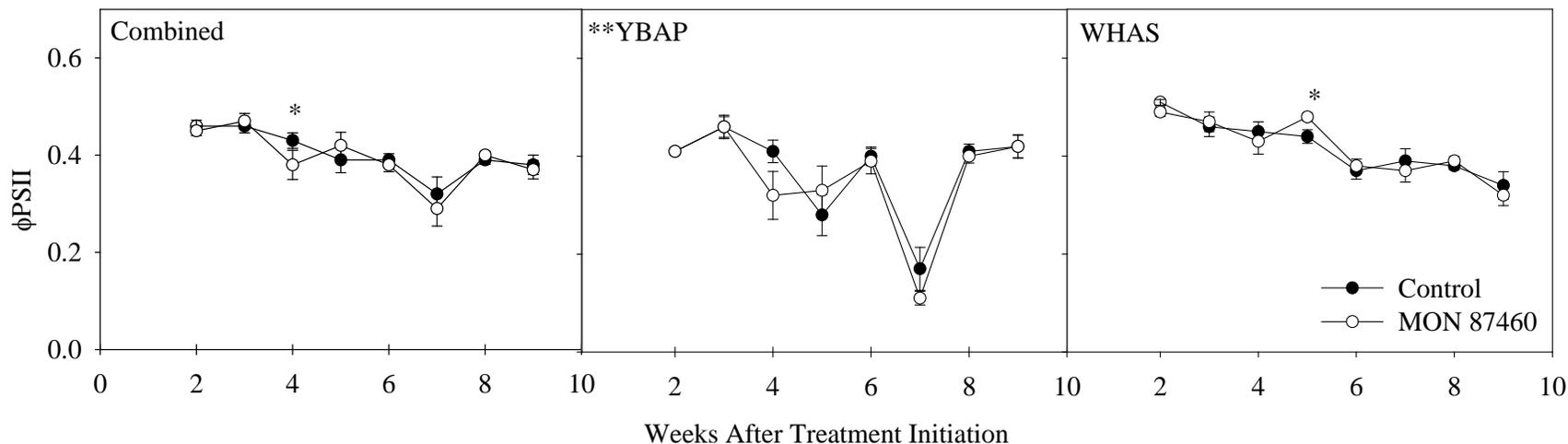


図 8 土壤水分を制限した条件下における光化学系IIにおける量子効率の推移 (2009年、米国)¹⁶

全ほ場(Combined)、バリオス(YBAP)、ハラン・サウス(WHAS)における、土壤水分を制限した条件下の本組換えトウモロコシ(○)及び対照の非組換えトウモロコシ(●)の光化学系 II における量子効率の経時的変化を示した。各値は平均値 ±1×標準誤差を示している。

5 *は各測定日において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。

**は各ほ場における全ての測定日の平均値において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたことを示す。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの光合成速度の平均値は、YBAP で 0.37 vs. 0.39 であった。

土壤水分の制限は約 8 葉期(V8)に開始され、開花は土壤水分の制限開始から約 3~4 週間後であった。測定期間中、2~7 週は土壤水分の制限期間であり、8~9 週は植物体の蒸発散量が 100%になるよう灌漑された期間である。

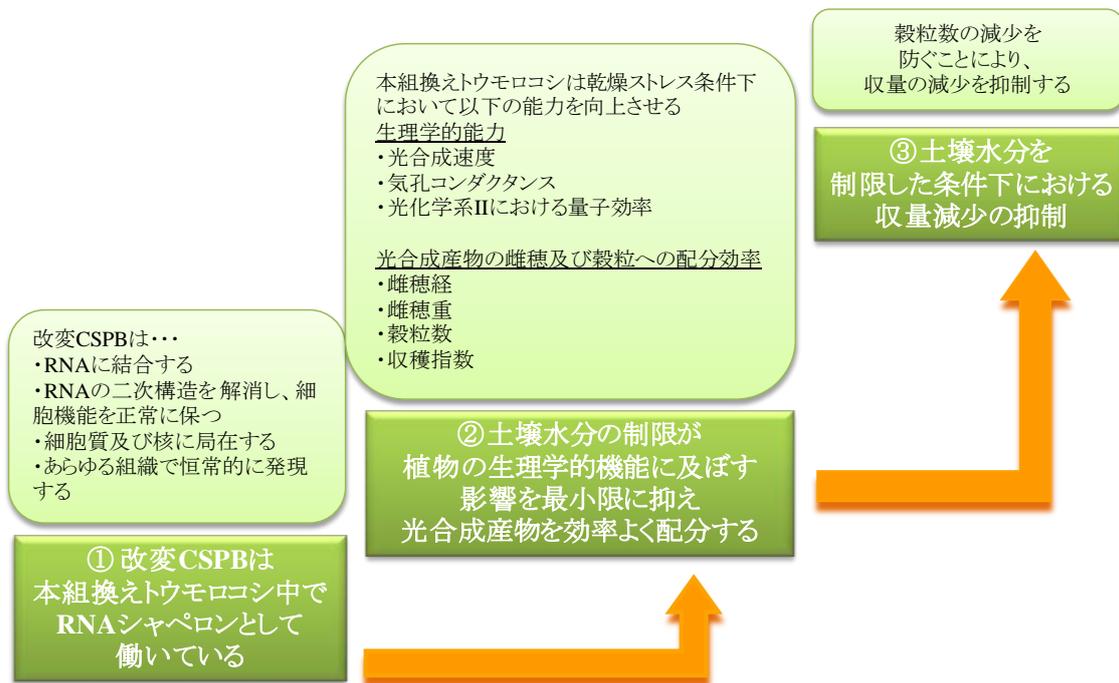
10

¹⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

vi. 改変 CSPB の機能の結論

これまでの研究から、改変 CSPB は RNA に結合し、RNA の二次構造を解消することが知られている。また、核や細胞質に局在し、分裂組織に多く存在することが知られている(別添資料 2)。これらのことは細菌の CSP 及び植物の CSD を含む蛋白質においても認められており(Chaikam and Karlson, 2008; Fusaro *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007)、改変 CSPB がストレス応答経路に作用し本組換えトウモロコシに乾燥耐性を付与することを示唆している。環境が制御された温室試験における土壌水分を制限した条件下において、本組換えトウモロコシの光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率是对照の非組換えトウモロコシと比較し向上していることが確認された(別添資料 3)。また、2009 年にカリフォルニア州のほ場における試験結果から、本組換えトウモロコシは土壌水分を制限した条件下において、光合成産物を効率よく配分することにより、対照の非組換えトウモロコシと比較し高い雌穂の乾燥重、一穂当たりの穀粒数、収量及び収穫指数を示すことが確認された(別添資料 4)。これらのことから改変 CSPB は土壌水分を制限した条件下において、RNA シャペロンとして機能することにより、本組換えトウモロコシの生長及び発達を維持し、収量の減少を抑制することが示された(図 9, p34)。

20



5 図 9 本組換えトウモロコシ中で発現する改変CSPBの機能¹⁷

改変 CSPB が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース(AD8)を用いて FASTA 型アルゴリズムにより比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は共有して

10 いないかった。

【NPTII 蛋白質】

形質転換体の選抜のために導入された抗生物質耐性マーカー遺伝子である *nptII* 遺伝子は

15 *nptII* 遺伝子は大腸菌のトランスポゾン Tn5 由来であり、コードされる NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質(カナマイシン等)をリン酸化して不活化することによってこれらの抗生物質に耐性を示し、結果としてカナマイシンの培地への添加によって形質転換細胞の選抜が可能となる(Beck *et al.*, 1982; Nap *et al.*, 1992; Shaw *et al.*, 1993)。

20 最近の研究結果によると、NPTII 蛋白質は既知のアレルゲン、毒素、あるいは動物やヒトに副作用を与えるその他の蛋白質との相同性がないと結論づけられている(Hileman and Astwood, 2000; McCoy and Silvanovich, 2005)。NPTII

¹⁷本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース (AD 2009) を用いて FASTA 型アルゴリズムにより比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は共有していなかった。

5

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 CSPB】

10 CSPB を含む細菌由来の CSP は RNA に非特異的に結合し、RNA シャペロンとして働いていると考えられている (Herschlag, 1995; Jiang *et al.*, 1997) 。このため、CSP は翻訳が抑制されるような条件下でも翻訳が行われるようにサポートする役割をもつ (Graumann *et al.*, 1997) 。CSPB は転写を直接誘導するような機能は持っておらず (Schindler *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001)、CSPB が
15 酵素活性を持つとの報告はない。

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

20 **【NPTII 蛋白質】**

NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である (Shaw *et al.*, 1993) 。NPTII 蛋白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、
25 ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている (Davies, 1986; Davies and Smith, 1978; Price *et al.*, 1974) 。さらに、NPTII 蛋白質の構造活性学的な検討の結果、NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な
30 変化(例：水酸基を除去する、アミノ基を改変する等)により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている (Price *et al.*, 1974) 。

したがって、本組換えトウモロコシ中で NPTII 蛋白質が発現することにより、新規の代謝産物が生じることはないと考えられる。

35 **【改変 CSPB + NPTII 蛋白質】**

上述したように、改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有している。また、NPTII 蛋白質は基質特異性が高く、改変 CSPB が NPTII

蛋白質の基質となるようなアミノグリコシド系構造を有さないことから、これら蛋白質はそれぞれ独立して作用していると考えられ、植物体内において相互に影響する可能性はないと考えられる。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現している 2 種類の蛋白質によって、トウモロコシに新規の代謝産物が産生されることはないと考えられた。

実際に、本組換えトウモロコシ中で改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質が発現することにより、新規の代謝産物が産生されることがないかどうか調査した(別添資料 6)。調査にあたっては、2006-2007 年にチリの 3 ヲ所のほ場(首都州カレラ・デ・タンゴ(CT)、首都州コリナ(CL)、首都州ランブレラス(LUM))において適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下で栽培された本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから収穫された地上部及び穀粒を分析に供試した。適切な土壤水分条件下の試験区は適度に灌漑を行い、土壤水分を制限した条件下の試験区は後期栄養生長期から初期生殖生長期(約 10 葉期から水熟期)にかけて灌漑を抑制した。また、参考として全てのほ場で 4 つの商業品種を同時に栽培し、分析に供試した。

トウモロコシの地上部における構成成分として、一般成分(灰分、炭水化物、水分、蛋白質、総脂質)、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)、カルシウム及びリンの 9 項目について測定を行った。また、トウモロコシの穀粒における構成成分として、一般成分(5 項目: 灰分、炭水化物、水分、蛋白質、総脂質)、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)、総食物繊維(TDF)、無機質(9 項目: カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛)、アミノ酸(18 項目)、脂肪酸(22 項目)、ビタミン(6 項目: 葉酸、ナイアシン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン E)、栄養阻害物(2 項目: フィチン酸及びラフィノース)、二次代謝産物(3 項目: フェルラ酸、*p*-クマル酸及びフルフラール)の 68 項目について測定を行った。そのうち穀粒における脂肪酸(14 種)、ナトリウム及びフルフラールは定量限界値以下であったため、地上部 9 項目及び穀粒 52 項目について分析を行った。

全ほ場を通して分析を行った結果、適切な土壤水分条件下の穀粒における総脂質とマグネシウムにおいて本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$)。また、土壤水分を制限した条件下の地上部における総脂質、穀粒における 20:1 エイコセン酸において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$)。しかし、これら有意差の認められた項目の本組換えトウモロコシにおける平均値は、いずれも同時に栽培した従来トウモロコシ品種の分析値から計算された許容区間(99% T.I.)におさまっていた(別添

資料 6)。

5 以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質がトウモロコシに新たな代謝産物を産生させることはないと考えられた。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10

本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-ZMAP595 は、*E. coli* 由来のベクター pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

ロ 特性

15

① ベクターの塩基数及び塩基配列

20

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

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

25

大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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

30

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

35

宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素は表 1(p10~11)に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による

切断部位に関しては、図 1(p9)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- 10 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

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

- 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 カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。なお、本組換えトウモロコシにアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に本組換えトウモロコシを移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

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

30 形質転換された再分化個体(R₀)を従来トウモロコシ品種 LH59 と交配させた後、自殖した。R₁ 世代において改変 CSPB の発現、カナマイシンへの耐性、及び導入遺伝子のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代を導入遺伝子の解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として MON87460 系統を選抜した。

35 本組換えトウモロコシの育成図を図 10 に(p39)示した。なお、本申請の対象は、R₄ 世代及び R₄ 世代から派生する全ての後代交配種である。

5

10

15

【社外秘につき非開示】

20

25

図 10 本組換えトウモロコシの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

- 5 本組換えトウモロコシの導入遺伝子が染色体に存在するかどうかを調査するために本組換えトウモロコシの複数世代を供試し、カイ二乗検定による統計分析を行った。
- 10 改変 *cspB* 遺伝子をヘテロで有する本組換えトウモロコシ(LH59 R₀ 世代)を自殖し LH59 R₁ 世代を作出した上、この LH59 R₁ 世代において改変 *cspB* 遺伝子をホモで有する個体を自殖して LH59 R₂ 世代を作出した。さらに、LH59 R₄ 世代に HCL301 を戻し交配することにより(LH59 R₄ × HCL301) BC₃F₁ 世代を作出し、LH59 R₄ 世代に HCL105 を戻し交配することにより(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₂ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₃ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₄F₁ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₅F₁ 世代を作出した。
- 15 (LH59 R₄ × HCL301) BC₃F₁ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₄F₁ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₅F₁ 世代は 1 世代前で陽性ヘテロ個体を選抜し従来トウモロコシ品種と交配することにより作出しているため、その分離比は 1:1 (陽性:陰性) であることが期待された。また、(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₂ 世代は 1 世代前で陽性ヘテロ個体を選抜し自殖することにより作出しているため、その分離比は 1:2:1 (陽性ホモ:陽性ヘテロ:陰性) であることが期待された。さらに、(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₃ 世代は 1 世代前で陽性ホモ個体を選抜し自殖することにより作出しているため、陽性ホモ個体のみであることが期待された。
- 20 PCR 分析により行った分離様式の結果を表 9(p41) に示した。LH59 R₁ 世代、(LH59 R₄ × HCL301) BC₃F₁ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₂ 世代、(LH59 R₄ × HCL105) BC₄F₁ 世代及び(LH59 R₄ × HCL105) BC₅F₁ 世代において実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計的な有意差は見られなかった(表 9, p41; 別添資料 7 の Table 1, p5)。また、LH59 R₂ 世代及び(LH59 R₄ × HCL105) BC₃F₃ 世代においては、前の世代のホモ個体を自殖しているため、全てに改変 *cspB* 遺伝子が存在していた。このことから、MON87460 系統中の改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットはメンデルの法則にしたがって後代に分離していることから本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。
- 30

表 9 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の分離比¹⁸

世代	検定植物数	実測値 ¹		期待値		X ² ²	Probability ($\alpha=0.05$)
		+	-	+	-		
LH59 R ₁	36	26	10	27	9	0.148	NS
LH59 R ₂	89	89	0	89	0	Fixed	—
(LH59 R ₄ ×HCL301)BC ₃ F ₁	178	84	94	89	89	0.562	NS
(LH59 R ₄ ×HCL105)BC ₃ F ₂	154	124	30	115.5	38.5	2.502	NS
(LH59 R ₄ ×HCL105)BC ₃ F ₃	474	474	0	474	0	Fixed	—
(LH59 R ₄ ×HCL105)BC ₄ F ₁	80	44	36	40	40	0.800	NS
(LH59 R ₄ ×HCL105)BC ₅ F ₁	82	44	38	41	41	0.439	NS

¹ +/-; 改変 *cspB* 遺伝子の有/無

5 ² カイ二乗=3.841 ($\alpha = 0.05$, 自由度=1)

NS (not significant); 有意差なし

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

10

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中の1ヵ所に1コピーのT-DNA領域が組み込まれていることが確認された(別添資料 8 の Figure 5, p41)。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されていないことも確認した(別添資料 8 の Figure 6, p42)。

15

その一方で、塩基配列の解析を行った結果、導入遺伝子の右側境界領域(PV-ZMAP595 の 2,816~3,172bp)及びそれに続く P-Ract1 領域の上流 733bp (PV-ZMAP595 の 3,205~3,937bp)の欠損が認められた(別添資料 8 の Figure 18, p54~55)。

20

さらに導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代((LH59 R₂×LH244)F₁、(LH59 R₃×LH244)F₁、(LH59 R₃×LH244)F₂、LH59 R₄、(LH59 R₄×HCL301)F₁、(LH59 R₄×HCL301)F₂、(LH59 R₄×HCL301)BC₃F₁)におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料 8 の Figure 14, p50)。

25

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

1 コピーなので該当しない(別添資料 8 の Figure 5, p41)。

¹⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

- 5 ELISA 法により、本組換えトウモロコシの複数世代((LH59 R₂×LH244)F₁、(LH59 R₃×LH244)F₁、(LH59 R₃×LH244)F₂、LH59 R₄、(LH59 R₄×HCL301)F₁、(LH59 R₄×HCL301)F₂、(LH59 R₄×HCL301)BC₃F₁)において改変 CSPB が安定して発現していることが確認された(別添資料 9 の Table 1, p14)。
- 10 2006-2007 年にチリの 3 ヲ所のほ場(首都州カレラ・デ・タンゴ(CT)、首都州コリナ(CL)、首都州ルンブレラス(LUM))において、適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下(各 3 反復)で栽培した本組換えトウモロコシの様々な組織での改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した(別添資料 10)。適切な土壤水分条件下のプロットは適度に灌漑を行い、
- 15 土壤水分を制限した条件下のプロットは後期栄養生長期から初期生殖生長期(約 10 葉期(V10)~水熟期(R2))にかけて灌漑を抑制した。
- 適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下における各組織での改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質の発現量を表 10 及び表 11(p43~44)に記載した(別添資料 10 の Table 1~5, p27~32)。改変 CSPB は適切な土壤水分条件下にお
- 20 いても土壤水分を制限した条件下においても各組織において発現していることが確認された。また、改変 CSPB の発現量は生育するにつれて減少することが確認された。

表 10 適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下での本組換えトウモロコシの各組織における改変CSPBの発現量(2006-2007年、チリ)¹⁹

組織 ¹	適切な土壤水分条件下		土壤水分を制限した条件下		定量限界/ 検出限界 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)	
	改変 CSPB (標準偏差) ² 範囲 ³		改変 CSPB (標準偏差) 範囲			
	($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁴	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁵	($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重)		
葉	0.50 (0.19)	2.8 (1.0)	0.50 (0.20)	2.8 (0.95)	0.015/0.0069	
(OSL-1)	0.28 - 0.80	1.7 - 4.5	0.26 - 0.80	1.7 - 4.2		
葉	0.48 (0.18)	2.6 (1.2)	0.47 (0.15)	2.6 (1.0)		0.015/0.0069
(OSL-2)	0.21 - 0.69	0.96 - 3.8	0.23 - 0.62	1.1 - 3.6		
葉	0.13 (0.10)	0.56 (0.48)	0.11 (0.073)	0.45 (0.32)	0.015/0.0069	
(OSL-3)	0.023 - 0.33	0.10 - 1.5	0.023 - 0.25	0.086 - 1.1		
葉	0.10 (0.041)	0.39 (0.13)	0.11 (0.054)	0.44 (0.17)	0.015/0.0069	
(OSL-4)	0.040 - 0.14	0.18 - 0.58	0.050 - 0.20	0.22 - 0.69		
根	0.13 (0.029)	1.3 (0.29)	0.14 (0.034)	1.5 (0.43)	0.0020/0.0018	
(OSR-1)	0.079 - 0.18	0.79 - 1.8	0.10 - 0.20	0.95 - 2.2		
根	0.086 (0.025)	0.86 (0.25)	0.10 (0.015)	0.82 (0.092)	0.0020/0.0018	
(OSR-2)	0.070 - 0.13	0.70 - 1.4	0.082 - 0.12	0.74 - 0.95		
根	0.061 (0.012)	0.49 (0.12)	0.054 (0.012)	0.41 (0.13)	0.0020/0.0018	
(OSR-3)	0.035 - 0.075	0.27 - 0.62	0.036 - 0.076	0.24 - 0.63		
根	0.045 (0.012)	0.31 (0.076)	0.058 (0.016)	0.40 (0.087)	0.0020/0.0018	
(OSR-4)	0.032 - 0.067	0.22 - 0.45	0.036 - 0.084	0.28 - 0.52		
地上部	0.32 (0.11)	3.2 (0.98)	0.30 (0.092)	2.9 (0.84)	0.0045/0.0043	
(OSWP-1)	0.18 - 0.52	1.8 - 4.8	0.20 - 0.42	1.8 - 3.8		
地上部	0.19 (0.036)	2.3 (0.54)	0.18 (0.046)	2.2 (0.61)	0.0045/0.0043	
(OSWP-2)	0.12 - 0.24	1.4 - 3.0	0.12 - 0.25	1.4 - 3.1		
地上部	0.10 (0.042)	0.89 (0.34)	0.091 (0.032)	0.71 (0.25)	0.0045/0.0043	
(OSWP-3)	0.065 - 0.17	0.59 - 1.4	0.067 - 0.15	0.44 - 1.1		
地上部	0.11 (0.026)	0.67 (0.16)	0.13 (0.037)	0.70 (0.16)	0.0045/0.0043	
(OSWP-4)	0.076 - 0.17	0.48 - 0.98	0.10 - 0.20	0.55 - 1.0		
根	0.0052 (0.0018)	0.039 (0.015)	0.011 (0.0039)	0.076 (0.029)	0.0020/0.0018	
(初期黄熟期)	0.0026 - 0.0088	0.017 - 0.068	0.0056 - 0.016	0.035 - 0.12		
根	0.0040 (0.0017)	0.031 (0.015)	0.0067 (0.0051)	0.052 (0.040)	0.0020/0.0018	
(収穫直後)	0.0026 - 0.0073	0.020 - 0.061	0.0026 - 0.017	0.019 - 0.14		
地上部	0.026 (0.0041)	0.11 (0.018)	0.035 (0.0078)	0.15 (0.040)	0.0045/0.0043	
(初期黄熟期)	0.018 - 0.034	0.077 - 0.14	0.022 - 0.047	0.087 - 0.22		
茎葉	0.011 (0.0023)	0.033 (0.0070)	0.021 (0.010)	0.072 (0.033)	0.0045/0.0043	
(収穫直後)	0.0071 - 0.014	0.018 - 0.040	0.011 - 0.036	0.035 - 0.12		
絹糸	0.073 (0.019)	0.82 (0.28)	0.13 (0.048)	1.1 (0.38)	0.0075/0.0047	
(開花期)	0.050 - 0.12	0.50 - 1.5	0.054 - 0.22	0.49 - 1.8		
花粉	18 (5.6)	25 (7.4)	18 (6.5)	27 (10)	0.050/0.045	
(開花期)	7.0 - 24	8.9 - 33	12 - 31	18 - 48		
穀粒	0.041 (0.012)	0.048 (0.014)	0.033 (0.0067)	0.038 (0.0079)	0.0038/0.0017	
(成熟期)	0.028 - 0.065	0.033 - 0.075	0.021 - 0.045	0.024 - 0.053		

¹OSL, OSR, OSWP-1: 2~4 葉期、OSL, OSR, OSWP-2: 6~8 葉期、OSL, OSR, OSWP-3: 10~12 葉期、OSL, OSR, OSWP-4: ~出穂期

² 平均値と標準偏差は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織ごとに計算されている (OSR-2 と収穫後の根を除いて、適切な土壤水分条件下 n=9 及び土壤水分を制限した条件下 n=9。OSR-2 は適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下で n=6、収穫後の根は適切な土壤水分条件下で n=6 とする)。

³ 最小値と最大値は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織ごとに求められた。

⁴ 蛋白質の重量 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) は組織の新鮮重 (g) に対する蛋白質の量 (μg) で表されている。

⁵ 蛋白質の重量 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) は組織の乾燥重 (g) に対する蛋白質の量 (μg) で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重因子で除算して求めた。

¹⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 11 適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下での本組換えトウモロコシの各組織におけるNPTII蛋白質の発現量(2006-2007年、チリ)²⁰

組織 ¹	適切な土壌水分条件下		土壌水分を制限した条件下		定量限界 / 検出限界 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
	NPTII 蛋白質 (標準偏差) ² 範囲 ³		NPTII 蛋白質 (標準偏差) 範囲		
	($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ⁴	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁵	($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重)	
葉 (OSL-1)	0.42 (0.23) 0.15 - 0.85	2.4 (1.3) 0.84 - 5.0	0.46 (0.18) 0.16 - 0.68	2.6 (0.98) 0.98 - 4.0	0.047/0.0090
根 (OSR-1)	0.051 (0.0083) 0.041 - 0.064	0.51 (0.083) 0.41 - 0.64	0.046 (0.0075) 0.035 - 0.057	0.48 (0.097) 0.39 - 0.64	0.0075/0.0043
茎葉 (初期黄熟期)	0.037 (0.0041) 0.031 - 0.044	0.16 (0.020) 0.13 - 0.19	0.039 (0.0048) 0.034 - 0.048	0.17 (0.028) 0.14 - 0.22	0.0056/0.0024
穀粒 (成熟期)	<LOQ(N/A) ⁶ <LOD-0.0057	N/A (N/A) N/A	<LOQ (N/A) <LOD-0.0051	N/A (N/A) N/A	0.0047/0.0024

¹OSL, OSR-1: 2~4 葉期

5 ² 平均値と標準偏差は全てのは場で採取されたそれぞれの組織ごとに計算されている (OSL-1 の土壌水分を制限した条件下を除いて、適切な土壌水分条件下 n=9 及び土壌水分を制限した条件下 n=9。OSL-1 は土壌水分を制限した条件下において n=8)。

³ 最小値と最大値は全てのは場で採取されたそれぞれの組織ごとに求められた。

⁴ 蛋白質の重量 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) は組織の新鮮重 (g) に対する蛋白質の量(μg)で表されている。

10 ⁵ 蛋白質の重量 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) は組織の乾燥重 (g) に対する蛋白質の量(μg)で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重因子で除算して求めた。

⁶N/A – Not applicable (該当しない)

15

²⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

- ⑤ 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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 プラスミド・ベクターPV-ZMAP595 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* と *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物に対する伝達性はない。

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

PCR 法による検出が可能である(別添資料 11)。本法はトウモロコシ 150 粒中に 1 粒本組換えトウモロコシが存在していれば検出可能である。本法の信頼性については 1 粒の本組換えトウモロコシを含む 150 粒のトウモロコシ群 87 サンプル及び本組換えトウモロコシを含まない 150 粒のトウモロコシ群 88

15

- (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

20

第一-2-(1)-ロ-②-ii に記載したように、改変 *cspB* 遺伝子は様々な環境ストレスに対して耐性を示すことが報告されている(Castiglioni *et al.*, 2008)。そのため、乾燥ストレス以外の環境ストレス条件下においても収量減少の抑制又はその他の特性において耐性を表す可能性が考えられた。そこで、環境条件が一定となる人工気象室において、本組換えトウモロコシの低温ストレス耐性、高温ストレス耐性、塩ストレス耐性について調査を行った。なお、乾燥ストレス耐性の調査も陽性対照として試験に加えた。これらの環境ストレス処理は、ほ場において本組換えトウモロコシが乾燥ストレスによる収量の減少を抑制することが確認された際と同じ後期栄養生長期(V10)から初期生殖生長期(R3)に行った。また、一般に、人工気象室における試験においては収量構成要素に関する信頼性のあるデータを採取することは困難である(Ainsworth *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2006)。しかし、本組換えトウモロコシは乾燥ストレス条件下において生理学的機能が向上していることが認められている。そのため、生理学的機能をストレス耐性の指標として調査を行った。

25

30

35

試験は 2010 年にモンサント・カンパニー(米国)の温室及び人工気象室において行った。全ての試験において栽培条件及びストレス条件を一定にするため、植物体を温室で栽培し約 8 葉期(V8)に人工気象室に移動させ、約 10 葉期

(V10)から乳熟期(R3)までストレス処理を行った。また、ストレス処理は最適条件を含め3段階の条件で行った。

i. 乾燥耐性試験 (別添資料 12)

5

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの乾燥耐性を比較するために、約10葉期(V10)から乳熟期(R3)まで3段階の土壤水分の制限(ポット、土、植物体及び水分の合計重量(最適条件との水分比)、最適:9.5kg(100%)、軽度の土壤水分の制限:7.7kg(67%)、重度の土壤水分の制限:5.9kg(33%))を行い、調査を行った。土壤水分の制限前、土壤水分の制限中及び収穫時に形態特性(草丈、生育段階、茎葉の新鮮重及び乾燥重、雌穂の新鮮重及び乾燥重、穀粒数及び絹糸抽出から開葯までの日数)及び生理学的特性(光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系IIにおける量子効率)について調査を行った。

10

15

その結果、最適な土壤水分条件下においては、絹糸抽出から開葯までの日数に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 12 の Table 2, p10)。統計学的有意差の認められた絹糸抽出から開葯までの日数の平均値は、本組換えトウモロコシでは0.1日、対照の非組換えトウモロコシでは-0.3日であった。

20

軽度に土壤水分を制限した条件下においては、土壤水分の制限期間中(7~36日目)の気孔コンダクタンス及び光化学系IIにおける量子効率の平均値に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 12 の Table 3, p11)。統計学的有意差の認められた土壤水分の制限期間を通じた気孔コンダクタンス及び光化学系IIにおける量子効率の平均値は、本組換えトウモロコシが $0.13 \text{ mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ 及び 0.40 、対照の非組換えトウモロコシが $0.11 \text{ mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ 及び 0.37 であり、どちらも本組換えトウモロコシが高かった(気孔コンダクタンス及び光化学系IIにおける量子効率は数値が大きいほど活性が高いことを示す)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと比較し高い傾向を示した(別添資料 12 の Table 3, p11 及び Figure 1~3, p12~14)。

25

30

重度に土壤水分を制限した条件下においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に全ての項目で統計学的有意差は認められなかった。しかし、生理学的特性において、本組換えトウモロコシは対照の非組換えトウモロコシと比較し高い傾向を示した(別添資料 12 の Table 3, p11 及び Figure 1~3, p12~14)。

35

以上のことから、本組換えトウモロコシは改変 CSPB を発現することにより、今回の試験条件下において生理学的機能の減少を抑制していると考えられた。

ii. 低温耐性試験 (別添資料 13)

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの低温耐性を比較するために、約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)まで 3 段階の低温処理(日中温度/夜間温度、最適 : 30°C/22°C、軽度の低温 : 20°C/15°C、重度の低温 : 12°C/5°C (開始から 11 日間は 15°C /12°C))を行い、調査を行った。低温処理前、低温処理中及び収穫時に形態特性(草丈、生育段階、茎葉の新鮮重及び乾燥重、雌穂の新鮮重及び乾燥重、穀粒数及び絹糸抽出から開葯までの日数)及び生理学的特性(光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率)について調査を行った。

その結果、最適温度条件下では本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に全ての項目で統計学的有意差は認められなかった。

軽度の低温条件下においては、28 日目の光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 13 の Table 3, p13~14)。統計学的有意差の認められた 28 日目の光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率の平均値は、本組換えトウモロコシがそれぞれ 26.20 mol CO₂/m²/s、0.14 mol H₂O/m²/s、0.35、対照の非組換えトウモロコシがそれぞれ 31.70 mol CO₂/m²/s、0.19 mol H₂O/m²/s、0.40 であり、どれも本組換えトウモロコシが低かった(光合成速度、気孔コンダクタンス及び光化学系 II における量子効率は数値が大きいほど活性が高いことを示す)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシが低温耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった(別添資料 13 の Table 3, p13~14)。

重度の低温条件下においては、21 日目、28 日目、35 日目の草丈において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 13 の Table 2, p11~12)。統計学的有意差の認められた 21 日目、28 日目、35 日目の草丈の平均値は、それぞれ本組換えトウモロコシが 162.9 cm、164.8 cm、167.6 cm、対照の非組換えトウモロコシが 158.3 cm、160.1 cm、162.7 cm であり、いずれも本組換えトウモロコシが高かった。しかし、収穫時である 42 日目では統計学的有意差は認められなかった。また、草丈において統計学的有意差の認められた 21 日目、28 日目、35 日目における生理学的特性においては統計学的有意差は認められず、本組換えトウモロコシが低い値を示す傾向にあった(別添資料 13 の Table 3, p13~14)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシが低温耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった(別添資料 13 の Table 3, p13~14)。

このことから、今回の試験条件下においては、本組換えトウモロコシが低温耐性を有することを示唆するような結果は得られなかった。

iii. 高温耐性試験 (別添資料 14)

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの高温耐性を比較するために、約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)まで 3 段階の高温処理(日中温度/夜間温度、最適 : 30°C/22°C、軽度の高温 : 35°C/35°C、重度の高温 : 40°C/40°C)を行い、調査を行った。高温処理前、高温処理中及び収穫時に形態特性(草丈、生育段階、茎葉の新鮮重及び乾燥重、雌穂の新鮮重及び乾燥重、穀粒数及び絹糸抽出から開葯までの日数)及び生理学的特性(光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率)について調査を行った。

その結果、最適温度条件下では本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に全ての項目で統計学的有意差は認められなかった。

軽度の高温条件下においては、14 日目の気孔コンダクタンスに本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 14 の Table 3, p12~13)。統計学的有意差の認められた 14 日目の気孔コンダクタンスの平均値は、本組換えトウモロコシが $0.16 \text{ mol H}_2\text{O/m}^2/\text{s}$ 、対照の非組換えトウモロコシが $0.21 \text{ mol H}_2\text{O/m}^2/\text{s}$ であり、本組換えトウモロコシが低かった(気孔コンダクタンスは数値が大きいほど活性が高いことを示す)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシが高温耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった。

重度の高温条件下においては、35 日目の光化学系 II における量子効率に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 14 の Table 3, p12~13)。統計学的有意差の認められた 35 日目の光化学系 II における量子効率の平均値は、本組換えトウモロコシが 0.13 、対照の非組換えトウモロコシが 0.24 であり、本組換えトウモロコシが低かった(光化学系 II における量子効率は数値が大きいほど活性が高いことを示す)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシが高温耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった。

このことから、今回の試験条件下においては、本組換えトウモロコシが高温耐性を有することを示唆するような結果は得られなかった。

iv. 塩耐性試験 (別添資料 15)

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの塩耐性を比較するために、約 10 葉期(V10)から乳熟期(R3)まで 3 種の塩処理(ポットに与えた塩溶液のモル濃度、最適 : 0M、軽度の塩 : 0.2M、重度の塩 : 0.4M)を行い、調査を行った。塩処理前、塩処理中及び収穫時に形態特性(草丈、生育段階、茎葉の新鮮重及び乾燥重、雌穂の新鮮重及び乾燥重、穀粒数及び絹糸抽出から

開葯までの日数)及び生理学的特性(光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率)について調査を行った。

5 その結果、最適条件下においては、雌穂の新鮮重及び雌穂の乾燥重に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 15 の Table 2, p10)。統計学的有意差の認められた雌穂の新鮮重及び雌穂の乾燥重の平均値は、本組換えトウモロコシが 596.4g 及び 254.1g、対照の非組換えトウモロコシが 510.1g 及び 218.5g であり、本組換えトウモロコシが重かった。

10 軽度の塩条件下においては、21 日目の光化学系 II における量子効率に本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 15 の Table 3, p11)。統計学的有意差の認められた 21 日目の光化学系 II における量子効率の平均値は、本組換えトウモロコシが 0.25、対照の非組換えトウモロコシが 0.32 であり、本組換えトウモロコシが低かった(光化学系 II における量子効率は数値が大きいほど活性が高いことを示す)。生理学的特性において、本組換えトウモロコシが塩耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった。

15 重度の塩条件下においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に全ての項目で統計学的有意差は認められなかった。また、生理学的特性において、本組換えトウモロコシが塩耐性を獲得したことを示すような傾向は認められなかった。

20 このことから、今回の試験条件下においては、本組換えトウモロコシが塩耐性を有することを示唆するような結果は得られなかった。

25 以上の結果から、本組換えトウモロコシは改変 CSPB を発現することにより乾燥に対する耐性を有するものの、低温、高温、塩に対して耐性を有しているとは考えられないと結論された。

30 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²¹

35 本組換えトウモロコシのわが国における生物多様性影響評価を行うため、通常栽培で灌漑を行う試験、通常栽培で灌漑を行わない試験、栽培管理を行わない試験を行った。

²¹本項目中の以下に続く i の a~g、ii の a-b、及び iii の a-b に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

i. 通常栽培で灌漑を行う試験

通常栽培で灌漑を行う試験は 2010 年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において行った。試験には本組換えトウモロコシの(LH59 R₅ × HCL301) F₁ 世代を供試し (図 10, p39) 、対照の非組換えトウモロコシとしては本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景をもつ LH59 × HCL301 を供試した。なお、低温耐性試験についてはモンサント・カンパニー (米国) において試験を実施し、本組換えトウモロコシの(LH59 R₄ × HCL301) F₁ 世代を供試した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、形態及び生育の特性に関する項目(14 項目：発芽揃い(月日)、発芽率(%)、雄穂抽出期(月日)、絹糸抽出期(月日)、開花始め(月日)、開花期(月日)、稈長(cm)、着雌穂高(cm) 、分けつ数、草型、成熟期(月日)、収穫期の地上部重(kg)、粒型、粒色)について調査した。評価は、種苗登録のための農林水産植物種類別審査基準を参考に行った。

その結果、統計処理を行った項目(発芽率、稈長、着雌穂高、分けつ数、収穫期の地上部重)では、全てにおいて本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 16 の表 3, p12)。また、統計処理を行わなかった項目(発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花始め、開花期、草型、成熟期、粒型、粒色)では、開花期を除く全ての項目において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に違いは認められなかった(別添資料 16 の表 3, p12)。開花期は本組換えトウモロコシが 7 月 30 日、対照の非組換えトウモロコシが 7 月 31 日であり、本組換えトウモロコシが 1 日早かった。

b 生育初期における低温又は高温耐性

生育初期における低温耐性試験はモンサント・カンパニー(米国)の人工気象室において実施した(別添資料 17)。3 葉期の本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを 4 段階の温度条件(最適温: 30°C/22°C (日中/夜間)、軽度の低温: 20°C/ 15°C、中度の低温: 15°C/10°C、重度の低温: 4°C/4°C)で 8 日間生育させ、調査を行った。低温処理前、低温処理後 4 日目及び 8 日目に草丈、生育段階、クロロフィル、草勢について、低温処理後 8 日目に新鮮重及び乾燥重について調査を行った。

その結果、最適温条件下において人工気象室に移動後 4 日目の生育段階と、

8 日目の生育段階及び乾燥重において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた($p \leq 0.05$) (別添資料 17 の Table 2, p17)。しかし、本試験の低温条件下において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に全ての項目で統計学的有意差は認められなかった(別添資料 17 の Table 2, p17)。

統計学的有意差の認められた最適温条件下における人工気象室に移動後 4 日目の生育段階は、本組換えトウモロコシが 3.6 葉期、対照の非組換えトウモロコシが 3.3 葉期であり、8 日目の生育段階は本組換えトウモロコシが 4.5 葉期、対照の非組換えトウモロコシが 4.1 葉期であり、移動後 8 日目の乾燥重は本組換えトウモロコシが 2.8g、対照の非組換えトウモロコシが 2.4g だった。

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、冬季には通常自然に枯死する。再生長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に、隔離ほ場の越冬性試験区において生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを成熟期の後も引き続き生育させ、2010 年 11 月 8 日に供試個体の観察を行ったが、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシともに枯死していた(別添資料 16 の図 5, p14)。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシともに高い花粉稔性を示しており、その稔性に大きな違いは認められなかった。また花粉の形態や大きさにも違いは認められなかった(別添資料 16 の図 6, p15)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する項目(総有効雌穂数、雌穂長(cm)、雌穂径(cm)、粒列数、一穂着粒数、百粒重(g))を調査した。

その結果、全ての項目において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 16 の表 4, p17)。

脱粒性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを収穫時に目視で苞皮に包まれているか否か、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも、収穫時の種子は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また苞皮を取り除いた後の脱粒性も共に難脱粒性であり、種子の脱粒性における違いは認められなかった(別添資料 16 の表 4, p17)。

5

休眠性及び発芽率については、収穫後 15 日目の種子をシャーレ上に静置し、25°C に設定した恒温器内での発芽個体数を経時的に計測した。

その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシはいずれも高い発芽率を示し、その発芽率に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 16 の表 4 及び表 5, p17)。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシにおいて休眠性は認められなかった。

10

f 交雑率

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

15

g 有害物質の産生性

本組換えトウモロコシから土壤微生物或いは植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験、後作試験を行った。その結果、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 16 の表 6~表 8, p19)。

20

25

ii. 通常栽培で灌漑を行わない試験

わが国の環境下における、本組換えトウモロコシの乾燥耐性能を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを通常栽培で灌漑を行わない条件において栽培し、a 形態及び生育の特性、b 種子の生産量と脱粒性について調査を行った。本試験は 2010 年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において行った。試験には本組換えトウモロコシの(LH59 R₅ × HCL301) F₁ 世代を供試し (図 10, p39)、対照の非組換えトウモロコシとしては本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景をもつ LH59 × HCL301 を供試した。なお、試験地における 7 月及び 8 月の降水量の合計値は、1979 年から 2000 年の平均値で 237.5mm であるのに対し、2010 年では 65.0mm であった (別添資料 16 の別紙 1)。

30

35

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、形態及び生育の特性に関する項目(14項目：発芽揃い(月日)、発芽率(%)、雄穂抽出期(月日)、絹糸抽出期(月日)、開花始め(月日)、開花期(月日)、稈長(cm)、着雌穂高(cm)、分けつ数、草型、成熟期(月日)、収穫期の地上部重(kg)、粒型、粒色)について調査した。評価は、種苗登録のための農林水産植物種類別審査基準を参考に行った。

その結果、統計処理を行った項目(発芽率、稈長、着雌穂高、分けつ数、収穫期の地上部重)では、着雌穂高において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた(別添資料 16 の表 9, p25)。また、統計処理を行わなかった項目(発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花始め、開花期、草型、成熟期、粒型、粒色)では、開花始めにおいて本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で違いが認められた(別添資料 16 の表 9, p25)。統計学的有意差の認められた着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが 99.2 cm、対照の非組換えトウモロコシが 91.8 cm であり、本組換えトウモロコシが高かった。開花始めは本組換えトウモロコシが 7 月 30 日、対照の非組換えトウモロコシが 7 月 31 日であり、本組換えトウモロコシが 1 日早かった。

b 種子の生産量及び脱粒性

種子の生産量を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する項目(総有効雌穂数、雌穂長(cm)、雌穂径(cm)、粒列数、一穂着粒数、百粒重(g))を調査した。

その結果、総有効雌穂数、雌穂長、一穂着粒数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた(別添資料 16 の表 10, p28)。統計学的有意差が認められた総有効雌穂数の平均値は本組換えトウモロコシが 9.00 本、対照の非組換えトウモロコシが 6.50 本であり、本組換えトウモロコシが多かった。雌穂長の平均値は本組換えトウモロコシが 16.46 cm、対照の非組換えトウモロコシが 15.11 cm で、本組換えトウモロコシが長かった。一穂着粒数の平均値は本組換えトウモロコシが 249.85 粒、対照の非組換えトウモロコシが 159.88 粒で、本組換えトウモロコシが多かった。

脱粒性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを収穫時に目視で苞皮に包まれているか否か、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも、収穫時の種子は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また苞皮を取り除いた後の脱粒性も共に難脱粒性であり、種子の脱粒性における違いは認められなかった(別添資料 16 の表 10, p28)。

5

iii. 栽培管理を行わない試験

本組換えトウモロコシの自生能力を評価するため、灌漑、施肥、病虫害駆除、雑草管理などの栽培管理を行わない条件下において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、a 形態及び生育の特性、b 種子の生産量及び脱粒性について調査を行った。本試験は 2010 年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において行った。試験には本組換えトウモロコシの(LH59 R₅ × HCL301) F₁ 世代を供試し (図 10, p39)、対照の非組換えトウモロコシとしては本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景をもつ LH59 × HCL301 を供試した。

10

15

20

その結果、雑草の繁茂、無施肥による栄養分の欠乏、乾燥ストレス、害虫による食害等のストレスを受け、本組換えトウモロコシの全 33 調査個体中 18 個体、対照の非組換えトウモロコシの全 33 個体中 26 個体が枯死しており、生存数が極端に減少していた (別添資料 16 の表 13, p35)。また、全 33 調査個体の合計有効雌穂数は本組換えトウモロコシでは 9 本、対照の非組換えトウモロコシでは 2 本しか認められなかった(別添資料 16 の表 13, p35)。そのため、試験結果について統計処理は行わなかった。

a 形態及び生育の特性

25

30

形態及び生育の特性を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、形態及び生育の特性に関する項目(5 項目：発芽揃い(月日)、発芽率(%), 稈長(cm)、成熟期(月日)、収穫期の地上部重(kg))について調査した。評価は、種苗登録のための農林水産植物種類別審査基準を参考に行った。

その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に違いはないと考えられた(別添資料 16 の表 14, p36)。

b 種子の生産量及び脱粒性

35

種子の生産量を評価するため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する項目(総有効雌穂数、雌穂長(cm)、雌穂径(cm)、粒列数、一穂着粒数)を調査した。

その結果、総有効雌穂数及び一穂着粒数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に差異が認められた(別添資料 16 の表 15, p38)。総有効雌穂数の平均値は本組換えトウモロコシが 3.00 本、対照の非組換えトウモロコシが 0.67 本であり、本組換えトウモロコシが多かった。一穂着粒数の平均値も本組換えトウモロコシが 38.46 粒、対照の非組換えトウモロコシが 19.13 粒で、本組換えトウモロコシが多かった。

脱粒性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを収穫時に目視で苞皮に包まれているか否か、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも、収穫時の種子は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また苞皮を取り除いた後の脱粒性も共に難脱粒性であり、種子の脱粒性における違いは認められなかった(別添資料 16 の表 15, p38)。

なお、本組換えトウモロコシの自生能力を調査するため、米国の 4 カ所のほ場(イリノイ州、インディアナ州、ルイジアナ州、ネブラスカ州)において調査を行った。灌漑、施肥、病虫害駆除、雑草管理などの栽培管理を行わない条件下において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、苗立ち数、生育段階、草勢、草丈、開葯期間、絹糸抽出期間、最終個体数、雌穂数、及び穀粒数について調査を行った。なお、通常、種子のこぼれ落ちは収穫後に起こることが多いため、試験には F1 種子から収穫された F2 種子を供試した。

その結果、全てのほ場における全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。また、インディアナ州のほ場以外では雌穂及び穀粒は得られなかった(別添資料 18 の Table 5, p21~22)。インディアナ州のほ場から収穫された本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの F3 種子について発芽調査を行ったところ、いずれの種子も発芽せず、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから発芽能力をもつ種子の形成は確認されなかった(別添資料 18 の Table 10, p26)。

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

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

—

- 20 (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの国外における申請状況は表 12(p56)のとおりである。

- 25 表 12 本組換えトウモロコシの国外の主要栽培国及び輸入国における申請及び認可状況

30

【社外秘につき非開示】

35

5 なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は表 13(p57)のと
おりである。

表 13 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況

10

【社外秘につき非開示】

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²²

1 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

10 改変 *cspB* 遺伝子は様々な環境ストレスに対して耐性を示すことが報告されていることから、本組換えトウモロコシが乾燥以外の環境ストレスに対し耐性を示すか温室及び人工気象室において調査した。その結果、今回行った試験の範囲では、本組換えトウモロコシは改変 *CSPB* を発現することにより乾燥に対する耐性を有するものの、低温、高温、塩に対して耐性を有しているとは考えられないと判断された。

15 20 また、本組換えトウモロコシの生物多様性影響評価を行うため、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを通常栽培で灌漑を行う条件で栽培し調査を行った。この試験に加え、本組換えトウモロコシの乾燥耐性を調査するために通常栽培で灌漑を行わない試験、さらにその自生能力を調査するために栽培管理を行わない試験も行った。

25 通常栽培で灌漑を行う試験において、競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率)について調査を行った(第一-2-(6)-②-i-a~e)。その結果、形態及び生育の特性における開花期において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に違いが認められた。また、生育初期における低温耐性試験の適温条件下において人工気象室に移動後 4 日目の生育段階と、8 日目の生育段階及び乾燥重において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた。

30 開花期は本組換えトウモロコシが 7 月 30 日、対照の非組換えトウモロコシが 7 月 31 日であり、本組換えトウモロコシが 1 日早かった(第一-2-(6)-②-i-a, p50)。しかし、その違いは 1 日であるため、開花期における差異は競合における優位性を高めるものではないと判断された。

35 生育初期における低温耐性試験の適温条件下(30°C/22 °C (日中/夜間))にお

²²本項目中で、第一の 2-(6)-②の i の a~g、ii の a~b、及び iii の a~b に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

いて人工気象室に移動後4日目の生育段階と、8日目の生育段階及び乾燥重において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた(第一-2-(6)-②-i-b, p50)。移動後4日目の生育段階は本組換えトウモロコシが3.6葉期、対照の非組換えトウモロコシが3.3葉期であり、移動後8日目の生育段階は本組換えトウモロコシが4.5葉期、対照の非組換えトウモロコシが4.1葉期であり、移動後8日目の乾燥重は本組換えトウモロコシが2.8g、対照の非組換えトウモロコシが2.4gだった(第一-2-(6)-②-i-b, p50)。しかし、これら統計学的有意差の認められた本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの差はわずかであり、同時期に調査した他の項目(草丈、生育段階、クロロフィル、草勢及び新鮮重)に統計学的有意差は認められなかった。したがって、適温条件下において認められた有意差は導入遺伝子によるものではないと考えられた。また、低温条件下では統計学的有意差は認められなかったことから本組換えトウモロコシの幼植物体は低温耐性を有していないと判断された。

15

通常栽培で灌漑を行わない試験において、競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、種子の生産量及び脱粒性)について調査を行った(第一-2-(6)-②-ii-a~b)。その結果、形態及び生育の特性における着雌穂高において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められ、開花始めにおいて違いが認められた。また、種子の生産量における総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた。

20

統計学的有意差の認められた着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが99.2 cm、対照の非組換えトウモロコシが91.8 cmであり、本組換えトウモロコシが高かった(第一-2-(6)-②-ii-b, p53)。しかし、着雌穂高において認められた差異は小さく、この程度の差が競合における優位性を高めることはないと判断された。

25

開花始めは本組換えトウモロコシが7月30日、対照の非組換えトウモロコシが7月31日であり、本組換えトウモロコシが1日早かった(第一-2-(6)-②-ii-a, p53)。しかし、その違いは1日であるため、開花始めにおける差異は競合における優位性を高めるものではないと判断された。

30

総有効雌穂数の平均値は本組換えトウモロコシが9.00本、対照の非組換えトウモロコシが6.50本であり、本組換えトウモロコシが多かった(第一-2-(6)-②-ii-b, p53)。雌穂長の平均値は本組換えトウモロコシが16.46 cm、対照の非組換えトウモロコシが15.11 cmで、本組換えトウモロコシが長かった(第一-2-(6)-②-ii-b, p53)。一穂着粒数の平均値は本組換えトウモロコシが249.85粒、対照の非組換えトウモロコシが159.88粒で、本組換えトウモロコシが多かった(第一-2-(6)-②-ii-b, p53)。

35

総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数における統計学的有意差は、例年と比べると少雨で気温も高く、特に後期栄養生長期から収穫にかけて(2010年7月中旬から9月上旬)降雨が激減し、乾燥ストレス条件下におかれた本組換えトウモロコシの乾燥耐性能が働いたためと考えられた。なお、試験地における7月及び8月の降水量の合計値は、1979年から2000年の平均値で237.5mmであるのに対し、2010年では65.0mmであった(別添資料16の別紙1)。

さらに、本組換えトウモロコシの競合における優位性を調査するため、栽培管理を行わない試験を行った。

栽培管理を行わない試験において、競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、種子の生産量及び脱粒性)について調査を行った(第一-2-(6)-②-iii-a~b)。なお、雑草の繁茂、無施肥による栄養分の欠乏、乾燥ストレス、害虫による食害等のストレスにより、本組換えトウモロコシの全33調査個体中18個体、対照の非組換えトウモロコシの全33個体中26個体が枯死しており、生存数が極端に減少していた。また、全33調査個体の合計有効雌穂数は本組換えトウモロコシでは9本、対照の非組換えトウモロコシでは2本しか認められなかった。そのため、試験結果について統計処理は行わなかった(第一-2-(6)-②-iii, p54)。調査の結果、種子の生産量における総有効雌穂数及び一穂着粒数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に違いが認められた。

総有効雌穂数の平均値は本組換えトウモロコシが3.00本、対照の非組換えトウモロコシが0.67本であり、本組換えトウモロコシが多かった(第一-2-(6)-②-iii-b, p54)。一穂着粒数の平均値も本組換えトウモロコシが38.46粒、対照の非組換えトウモロコシが19.13粒であり、本組換えトウモロコシが多かった(第一-2-(6)-②-iii-b, p54)。

本組換えトウモロコシの調査個体の多くは雑草の繁茂や害虫による食害などにより枯死しており、収穫時における生存率は全調査個体の約45.5%であった。また、有効雌穂も全調査個体の約27.3%にしか認められなかった。なお、本組換えトウモロコシは、総有効雌穂数と一穂着粒数において対照の非組換えトウモロコシより高い値を示した。

本組換えトウモロコシの生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認された。

これらのことから、本組換えトウモロコシは付与された乾燥耐性により、通常栽培で灌漑を行わない条件下及び栽培管理を行わない条件下において、対照の非組換えトウモロコシと比較し種子の生産量が高いことが確認された。

しかし、本組換えトウモロコシは今回行った試験の範囲では乾燥耐性以外の低温、高温、塩に対して耐性を有していないことが確認された。また、越

冬性、脱粒性及び休眠性において、対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。本組換えトウモロコシの生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認された。これらの結果から、本組換えトウモロコシは乾燥以外のストレス耐性能において従来のトウモロコシ品種と同等であり、わが国の自然条件下での自生能力は従来のトウモロコシ品種と比べて高まっていないと考えられた。よって、隔離ほ場試験で観察された種子の生産量の差異やその他の差異により、本組換えトウモロコシの競合の優位性が従来のトウモロコシ品種より高まることはないと判断された。

5

10

これらのことから、わが国の自然条件下において本組換えトウモロコシが複数世代にわたり自生したり、他の植物を駆逐するとは考えられず、その競合における優位性は従来のトウモロコシ品種を上回ることはないと判断された。

15

以上のことから、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

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

以上のことから、本組換え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。

30

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

35

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

本組換えトウモロコシ中では、乾燥耐性を付与する改変 **CSPB** が発現して

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

また、本組換えトウモロコシは *nptII* 遺伝子の発現により NPTII 蛋白質の産生性が付与されているが、NPTII 蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、当該蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していないことが確認されている(第一-2-(1)-ロ-②)。NPTII 蛋白質の作用機作から、宿主の持つ代謝系を変化させることはなく、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

実際に、有害物質の産生性については、土壌微生物相試験、鋤込み試験、後作試験により比較検討したが、差異は認められなかった(第一-2-(6)-②-i-g)。

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

実際に、本組換えトウモロコシ中で改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質が発現することにより、新規の代謝産物が産生されることがないかどうか構成成分を分析することにより調査した(第一-2-(1)-ロ-③)。調査にあたっては、2006-2007 年にチリの 3 ヶ所のほ場(首都州カレラ・デ・タンゴ(CT)、首都州コリナ(CL)、首都州ランブレラス(LUM))において適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下で栽培された本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから収穫された地上部及び穀粒を分析に供試した。

その結果、いくつかの項目で統計学的有意差が認められたが、いずれの値も同時に調査を行った従来トウモロコシ品種の分析値から計算された許容区間(99%T.I.)におさまっていた(第一-2-(1)-ロ-③)。そのため、本組換えトウモロコシに導入された改変 CSPB 及び NPTII 蛋白質がトウモロコシに新たな代謝産物を産生させるようなことはない判断された。

以上のことから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5 (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

10

以上のことから、本組換え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。

3 交雑性

15

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

20

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

25

—

(3) 影響の生じやすさの評価

30

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35

以上のことから、本組換えトウモロコシは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

—

40

第三 生物多様性影響の総合的評価²³

競合における優位性：トウモロコシは、わが国において長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

- 5 本組換えトウモロコシを供試して行った試験の結果、乾燥以外の低温、高温、塩に対して耐性を有しているとは考えられないと判断された。

本組換えトウモロコシの競合における優位性を調査するため、通常栽培で灌漑を行う条件下における試験、通常栽培で灌漑を行わない試験、栽培管理を行わない試験を行った。

- 10 通常栽培で灌漑を行う試験では、形態及び生育の特性、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、開花期において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で違いが認められた。しかし、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの開花期の差は1日であったため、開花期における差異は競合における優位性を高めるものではないと判断された。

- 15 通常栽培で灌漑を行わない試験では、形態及び生育の特性、種子の生産量、脱粒性について調査を行った。その結果、着雌穂高、開花始め、総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で差異が認められた。しかし、着雌穂高において認められた差異は小さく、競合における優位性を高めることはないと判断された。また、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの開花期の差は1日であったため、開花期における差異は競合における優位性を高めるものではないと判断された。総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数において認められた差異は本組換えトウモロコシの乾燥耐性能が働いたためと考えられた。

- 20 栽培管理を行わない試験では、形態及び生育の特性、種子の生産量及び脱粒性について調査を行った。その結果、試験区内の多くの調査個体は雑草の繁茂、無施肥による栄養分の欠乏、乾燥、害虫による食害等のストレスを受け、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの調査個体は大幅に減少し、種子の生産量も大幅に減少していた。なお、本組換えトウモロコシの総有効雌穂数及び一穂着粒数は対照の非組換えトウモロコシより多かった。本組換えトウモロコシの生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認された。

- 35 これらのことから、本組換えトウモロコシは付与された乾燥耐性により、通常栽培で灌漑を行わない条件下及び栽培管理を行わない条件下において、対照の非組換えトウモロコシと比較し種子の生産量が高いことが確認された。

²³本項目中で、第一の2-(6)-②のiのa~g、iiのa~b、及びiiiのa~bに記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

しかし、本組換えトウモロコシは今回の試験の範囲では乾燥以外の低温、高温、塩に対して耐性を有していないことが確認されており、さらに、越冬性、脱粒性及び休眠性において、対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。また、本組換えトウモロコシの生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認された。これらの結果から、本組換えトウモロコシは乾燥以外の低温、高温、塩耐性能については従来のトウモロコシ品種と同等であり、わが国の自然条件下での自生能力は従来のトウモロコシ品種と比べて高まっていないと考えられた。よって、隔離ほ場試験で観察された種子の生産量の差異やその他の差異により、本組換えトウモロコシの競合の優位性が従来のトウモロコシ品種より高まることはないと判断された。

よって、わが国の自然条件下において本組換えトウモロコシが複数世代にわたり自生したり、他の植物を駆逐するとは考えられず、その競合における優位性は従来のトウモロコシ品種を上回ることはないと判断された。

15

以上のことから、本組換え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。

有害物質の産生性：トウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されておらず、また、わが国で長期間の使用経験がある。本組換えトウモロコシ中では、乾燥耐性を付与する改変 **CSPB** が発現しているが、当該蛋白質は既知アレルギーと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている。また、改変 **CSPB** の作用機作から、宿主の持つ代謝系を変化させることはなく、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。また、本組換えトウモロコシは *nptII* 遺伝子の発現により **NPTII** 蛋白質の産生性が付与されているが、**NPTII** 蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、当該蛋白質は既知アレルギーと構造的に類似性のある配列を共有していないことが確認されている。また、**NPTII** 蛋白質の作用機作から、宿主の持つ代謝系を変化させることはなく、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

実際に、有害物質の産生性については、土壌微生物相試験、鋤込み試験、後作試験により比較検討したが、差異は認められなかった。

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

実際に、適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下で栽培された

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから収穫された地上部及び穀粒の構成成分を比較した結果、本組換えトウモロコシに導入された改変CSPB及びNPTII蛋白質がトウモロコシに新たな代謝産物を産生させるようなことはないと判断された。

- 5 以上のことから、本組換え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：わが国ではトウモロコシの近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。このことから、本組換えトウモロコシは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。
- 10

- よって、総合的評価として、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に生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。
- 15

参考文献

- Ainsworth, E.A., P.A. Davey, C.J. Bernacchi, O.C. Dermody, E.A. Heaton, D.J. Moore, P.B. Morgan, S.L. Naidu, H.S.Y. Ra, X.G. Zhu, P.S. Curtis and S.P. Long. 2002. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology* 8: 695-709.
- Anderson, K. L., C. Roberts, T. Disz, V. Vonstein, K. Hwang, R. Overbeek, P. D. Olson, S. J. Projan and P. M. Dunman. 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *Journal of Bacteriology* 188: 6739-6756.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Beadle, C.L., M.M. Ludlow and J.L. Honeysett. 1993. Water relations. Pages 113-128 in *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhar-Nordenkampf, et al. (eds.). Chapman and Hall, London, England.
- Beck, E., G. Ludwig, E. A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- Bevan, M, W.M Barnes and M-D Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Boyer, J. S. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science* 218: 443-448.
- Boyer, J. S. and M. E. Westgate. 2004. Grain yields with limited water. *Journal of Experimental Botany* 55: 2385-2394.
- Butaye, K.M.J., B.P.A. Cammue, S.L. Delauré and M.F.C. De Bolle. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding* 16: 79-91.
- Castiglioni, P., D. Warner, R. J. Bensen, D. C. Anstrom, J. Harrison, M. Stoecker, M. Abad, G. Kumar, S. Salvador, R. D'Ordine, S. Navarro, S. Back, M. Fernandes,

- J. Targolli, S. Dasgupta, C. Bonin, M. H. Luethy and J. E. Heard. 2008. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147: 446-455.
- 5
- Chaikam, V. and D. Karlson. 2008. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, Cell and Environment* 31: 995-1006.
- Claassen, M.M. and R.H. Shaw. 1970. Water deficit effects on corn. II. Grain components. *Agronomy Journal* 62: 652-655.
- 10
- Cristofari, G. and J.-L. Darlix. 2002. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 223-268.
- 15
- Davies, J. 1986. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. Pages 474-489 in *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V. Lorian (ed.). Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- Davies, J. and D. I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annual Review of Microbiology* 32: 469-518.
- 20
- De Bolle, M.F.C. , K.M.J. Butaye, W.J.W. Coucke, I.J.W.M. Goderis, P.F.J. Wouters, N. van Boxel, W.F. Broekaert and B. P. A. Cammue. 2003. Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 165: 169-179.
- 25
- DeLougherty, R.L. and R.K. Crookston. 1979. Harvest index of corn affected by population density, maturity rating, and environment. *Agronomy Journal* 71: 577-580.
- 30
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 35
- Dhaese, P., H. De Greve, J. Gielen, J. Seurinck, M. Van Montagu and J. Schell. 1983. Identification of sequences involved in polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2: 419-426.

- EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (question N° EFSA-Q-2003-109). The EFSA Journal 48: 1-18.
5 http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/opinion_gmo_05_en1,0.pdf
f.
- Etchegaray, J.-P., P. G. Jones and M. Inouye. 1996. Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, *cspA* and *cspB*, of *Escherichia coli*.
10 Genes Cells 1: 171-178.
- FAOSTAT. 2010. Production, Crops, Maize and Maize green, Area Harvested, 2009. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. <http://faostat.fao.org/default.aspx> [Accessed October 16, 2010].
15
- Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-*O* nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Reseach 13: 7095-7106.
- 20 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 80: 4803-4807.
- 25 Fusaro, A. F., S. N. Bocca, R. L.B. Ramos, R. M. Barrôco, C. Magioli, V. C. Jorge, T. C. Coutinho, C. M. Rangel-Lima, R. De Rycke, D. Inzé, G. Engler and G. Sachetto-Martins. 2007. AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. Planta 225:
30 1339-1351.
- Giza, P. E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.
- 35 Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. W. Weber, K. Schröder and M. A. Marahiel. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. Molecular Microbiology 25: 741-756.

- Herschlag, D. 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 20871-20874.
- 5 Hileman, R. E. and J. D. Astwood. 2000. Bioinformatics Analysis of NPTII Protein Sequence Utilizing Toxin and Public Domain Genetic Databases. Monsanto Technical Report MSL-16800. St. Louis, MO.
- 10 Jiang, W., Y. Hou and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 196-202.
- 15 Karlson, D., K. Nakaminami, T. Toyomasu and R. Imai. 2002. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277: 35248-35256.
- 20 Kim, J. Y., S. J. Park, B. Jang, C.-H. Jung, S. J. Ahn, C.-H. Goh, K. Cho, O. Han and H. Kang. 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal* 50: 439-451.
- Long, S.P., E.A. Ainsworth, A.D.B. Leakey, J. Nosberger and D.R. Ort. 2006. Food for thought: Lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* 312: 1918-1921.
- 25 McCoy, R. L. and A. Silvanovich. 2005. Updated Bioinformatics Evaluation of the NPTII Protein Utilizing the AD5 Database. Monsanto Technical Report MSL-19895. St. Louis, MO.
- 30 McElroy, D., W. Zhang, J. Cao and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2: 163-171.
- 35 McElroy, D., A. D. Blowers, B. Jenes and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* 231: 150-160.
- Meghji, M.R., J. W. Dudley, R. J. Lambert and G. F. Sprague. 1984. Inbreeding depression, inbred and hybrid grain yields, and other traits of maize genotypes representing three eras. *Crop Science* 24: 545-549.

- Nakaminami, K., K. Sasaki, S. Kajita, H. Takeda, D. Karlson, K. Ohgi and R. Imai. 2005. Heat stable ssDNA/RNA-binding activity of a wheat cold shock domain protein. *FEBS Letters* 579: 4887-4891.
- 5 Nakaminami, Kentaro, Dale T. Karlson and Ryozo Imai. 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 103: 10122-10127.
- 10 Nap, J.-P., J. Bijvoet and W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Research* 1: 239-249.
- Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 15 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Organisation of Economic Co-operation and Development, , Paris, France.
- 20 Price, K.E., J.C. Godfrey and H. Kawaguchi. 1974. Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. Pages 191-307 in *Advances in Applied Microbiology*. Volume 18. 1974/01/01 Edition. D. Perlman (ed.). Academic Press, New York.
- 25 Raynor, G.S., E.C. Ogden and J.V. Hayes. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* 64: 420-427.
- Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- 30 Russell, W.A. 1985. Evaluations for plant, ear and grain traits of maize cultivars representing seven eras of breeding. *Maydica* 30: 85-96.
- 35 Sasaki, K., M.H. Kim and R. Imai. 2007. Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364: 633-638.
- Schindler, T., P. L. Graumann, D. Perl, S. Ma, F. X. Schmid and M. A. Marahiel. 1999. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis* - Stability and dynamics *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 3407-3413.

- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare and G.H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews* 57: 138-163.
- 5
- Sinclair, T.R. 1998. Historical Changes in Harvest Index and Crop Nitrogen Accumulation. *Crop Science* 38: 638-643.
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 10
- Sutcliffe, J. G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- 15
- Tollenaar, M. 1989. Genetic improvement in grain yield of maize hybrids grown in Ontario from 1959 to 1988. *Crop Science* 29: 1365-1371.
- 20
- Van Leeuwen, W., T. Ruttink, A.W.M. Borst-Vrenssen, L.H.W. van der Plas and A. R. van der Krol. 2001. Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 949-959.
- 25
- Weber, M. H. W., A. V. Volkov, E. Fricke, M. A. Marahiel and P. L. Graumann. 2001. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *Journal of Bacteriology* 183: 6435-6443.
- 30
- Willimsky, G., H. Bang, G. Fischer and M. A. Marahiel. 1992. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *Journal of Bacteriology* 174: 6326-6335.
- 35
- Zambryski, P, A Depicker, K Kruger and H.M Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.
- 柿本陽一. 1981. トウモロコシの起源と特性. I 植物としての分類, 類縁関係. 畑

作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

5 柿本陽一, 山田実. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの起源と特性. III 植物としての特性. Pages 34-38 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳, 東京.

10 財務省 . 2010. 財務省貿易統計 . 財務省 . <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed October 16, 2010].

15 千藤茂行. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの品種生態. IV 採取. 転作全書. Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

20 瀧澤康孝. 1981. 子実用トウモロコシの栽培. II 栽培の実際. Pages 124-143 in 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

千葉浩三. 1980. 図集・作物栽培の基礎知識. 栗原浩, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

25 戸澤英男. 2005. トウモロコシ -歴史・文化、特性・栽培、加工・利用-. 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

30 中村茂文. 2001a. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. I 種子と発芽. Pages 41-43 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

中村茂文. 2001b. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. III 生殖生長期の生理, 生態. Pages 50-53 in 転作全書. Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

35 農学大辞典編集委員会. 1987. 13. 食用作物. トウモロコシ. Pages 536-541 in 第2次増訂改版 農学大辞典. 野口ら (eds.). 株式会社 養賢堂, 東京.

農林水産省, 大臣官房統計部. 2010a. 平成 21 年産飼料作物の収穫量(牧草、青刈

りとうもろこし及びソルゴー). 農林水産省 .
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_siryuu_09.pdf [Accessed October 16, 2010].

- 5 農林水産省, 大臣官房統計部. 2010b. 平成 21 年産 秋冬野菜、指定野菜に準ずる野菜等の作付け面積、収穫量及び出荷量. 農林水産省 .
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou09.pdf [Accessed October 16, 2010].
- 10 松井正春, 斉藤修. 2003. III 農業環境技術研究所における Bt トウモロコシ緊急調査. 4. Bt 組換えトウモロコシ花粉中の Bt トキシンの検出 2. 生物検定による検出. Pages 55-62 in 農業環境研究叢書 第 14 号 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価. 独. 農業環境技術研究所 (ed.). 独立行政法人 農業環境技術研究所, つくば.
- 15 丸山寛治. 1981. トウモロコシの品種生態. I 品種の基本特性. Pages 83-89 in 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

20

緊急措置計画書

平成23年3月8日

5

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

10

第一種使用規程の承認を申請している乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-87460-4) (以下、「本組換え体」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

15

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

日本モンサント株式会社

平成23年3月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

5 *: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

10 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

15 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、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取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
5 ための具体的な措置の内容

- 10 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、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体が環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換え体は、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

- 15 弊社は、信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、直ちに農林水産省消費・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。

乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis)

(MON87460, OECD UI: MON-87460-4)の別添資料リスト

- 5
- 別添資料 1 Phenotypic Evaluation and Ecological Interactions of Drought Tolerant Corn MON87460 Under Well-Watered and Water-Limited Conditions in Chilean Field Trials During 2006-2007 (MSL0021857) (社外秘)
- 10
- 別添資料 2 Amended Report for MSL0021590: Cold Shock Protein B (CSPB) Interaction with RNA and Expression in MON 87460 (MSL0021728) (社外秘)
- 別添資料 3 Physiological Responses of MON87460 Compared to the Control Under Water-Limited Conditions in the Greenhouse (MSL0021719) (社外秘)
- 15
- 別添資料 4 Amended Report for MSL0023062 Efficacy, Mode of Action, and Physiological Assessments of MON87460 Under Water-Limited Conditions in U.S. Field Trials in 2009 US 2009 (MSL0023227) (社外秘)
- 20
- 別添資料 5 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cspB* 遺伝子から推定した改変 CSPB のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 6 Amended Report for MSL0021180: Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON 87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production (MSL0021754) (社外秘)
- 25
- 別添資料 7 Assessment of Insert Segregation for MON87460 (07-RA-B3-01) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0020487: Molecular Analysis of Corn MON87460 (MSL0022131) (社外秘)
- 30
- 別添資料 9 Assessment of the Presence of CSPB Protein in Grain Samples from Multiple Generations of MON 87460 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MSL0021623) (社外秘)
- 別添資料 10 Amended Report for MSL0021185: Assessment of the CSPB and NPTII Protein Levels in Tissues of Drought Tolerant Corn MON 87460 Produced in a 2006-2007 Chilean Field Trial under Well-Watered and

Water-Limited Conditions (MSL0021731) (社外秘)

- 別添資料 11 Corn Mon87460 EndPoint TaqMan PCR for 150 seed pools
(BQ-QC-10719-01) (社外秘)
- 5 別添資料 12 Assessment of the Effect of Drought Stress on the Drought Tolerant
Corn MON87460 under Growth Chamber Conditions (Study #
PLC-09-607) (社外秘)
- 別添資料 13 Assessment of the Effect of Cold Stress on the Drought Tolerant Corn
MON87460 under Growth Chamber Conditions (Study # PLC-10-332)
(社外秘)
- 10 別添資料 14 Assessment of the Effect of Heat Stress on the Drought Tolerant Corn
MON87460 under Growth Chamber Conditions (Study # PLC-10-184)
(社外秘)
- 別添資料 15 Assessment of the Effect of Salt Stress on the Drought Tolerant Corn
MON87460 under Growth Chamber Conditions (Study # PLC-10-043)
(社外秘)
- 15
- 別添資料 16 乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MON87460, OECD UI: MON-8746Ø-4) の隔離ほ場における生物
多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 別添資料 17 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Drought Tolerant Corn
MON87460 Under Growth Chamber Conditions in 2008
(MSL0021509) (社外秘)
- 20
- 別添資料 18 Assessment of Survival of Drought Tolerant Corn MON87460 in
Unmanaged Environments During 2008 (MSL0021997) (社外秘)
- 25