

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ
(*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-Ø9814Ø-6,
OECD UI: DP-Ø9814Ø-6) の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書の概要	
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
(2) 使用等の歴史及び現状.....	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
(1) 供与核酸に関する情報	7
(2) ベクターに関する情報	16
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
(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 ...	21
(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	28
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	29
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	35
(1) 使用等の内容	35
(2) 使用等の方法	35
(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.....	36
(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.....	36
(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	36
(6) 国外における使用等に関する情報	36
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	38
1 競合における優位性	38
2 有害物質の産生性.....	39
3 交雑性.....	40
4 その他の性質.....	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
参考文献	43
緊急措置計画書.....	46
別紙一覧.....	48

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 11 月 16 日

農林水産大臣 松岡 利勝 殿
環 境 大臣 若林 正俊 殿

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

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

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (<i>gat4621, zm-hra, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (DP-098140-6, OECD UI: DP-098140-6)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：栃木県那須塩原市千本松 768 番地 名称：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 21 年 3 月 31 日まで</p> <p>1．隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。</p> <p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすいところに掲げている。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えトウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風林を設置している。</p> <p>2．隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えトウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤き込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、非意図的に本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。</p> <p>(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるにいたった場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。</p>

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響評価に当り収集した情報

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

イ 分類学上の位置付け

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：Corn, maize

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

(The International Plant Names Index, 2004)

ロ 宿主の品種名又は系統名

宿主にはパイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が育成したトウモロコシ自殖系統 PH09B に由来する自殖系統 PHWVZ を用いた。

八 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、トウモロコシが自生している地域は、国内外ともに知られていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

現在トウモロコシの原産地について決定的な説はないが、一般的には紀元前5000年頃の中南米が起源と考えられている。また、植物学的起源についても決定的な説はないが、育種過程で、メキシコ、グアテマラ、ホンジュラス地域で雑草として生育しているテオシント (*teosinte*, *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrader) Iltis) から派生したとする説が有力とされている(菊池, 1987)。1492年のコロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、アフリカ大陸そしてアジアへと伝播し、現在では広く栽培され、食品、飼料等として利用されている(農学大事典, 1994)。

トウモロコシは、我が国においても長い栽培の歴史がある。我が国への伝来は、天正年間(1580年頃)に、ポルトガル人が四国に伝えたのが最初であると言われており、その後、九州や本州でも栽培されるようになった。明治時代に、北海道開拓使によって、近代的品種が米国から輸入されるようになり、現在で

は、北海道から九州まで、広く栽培されている（菊池, 1987）。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシの主な栽培地域は北海道、岩手県、熊本県、宮崎県等である。栽培面積が最も大きいのは北海道で、全体の約40%を占める。国外においては、米国、中国、ブラジル、ロシア等を中心に、北緯55度から南緯40度に至る広い範囲で栽培されている（農学大事典, 1994）。

トウモロコシは、米国を代表的な例とする、大規模な機械化された近代的方法から、古くから南米アンデス高地等で行われているような伝統的な方法まで、多種多様な方法で栽培されている（菊池, 1987）。

トウモロコシはコメ、コムギと共に世界三大穀物の一つと言われている。2005年の世界総生産量は約7億135万トンである。最大の生産国は米国で、全世界の生産量の40%を占めている（FAO Statistical Database, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>）。トウモロコシは、大きく分けてスイートコーンとデントコーンに分類することができる。スイートコーンは、食用及び缶詰用等として利用されており、デントコーンは、飼料用及び加工用等として利用されている。2005年の統計によれば、我が国は約1,665万トンのトウモロコシを輸入しており、ほぼ100%がデント種である。輸入量の94%にあたる約1,568万トンが米国からの輸入であり、2005年に輸入されたトウモロコシのうち、約1,221万トンが飼料用として用いられ（財務省貿易統計, <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>）、残りが澱粉や油等の原料に加工されている。輸入されたトウモロコシは、そのほとんどが、ベルトコンベアで直接港に隣接している食品・飼料の加工工場に運ばれる。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

トウモロコシは単子葉植物のイネ科作物に属する1年生草本である（染色体数は、 $n=10$ ）。 C_4 植物であり光合成能力が高いこと、及び根系が発達しているため強い肥料吸収能力を有していることから、穀物用作物としての子実の生産性は、著しく高い。また、子実中の炭水化物や蛋白質、油脂の成分や含有量が多種多様であり実用的用途が広い（菊池, 1987）。

トウモロコシの稈長は、通常100~360cm（14~19節）であるが、1m未満のもの（9~12節の）や4mを越すもの（20節以上）まである。トウモロコシは雌雄異花の風媒花で、稈の頂部に雄穂をつけ総状花を形成し、中位節の葉腋に雌穂を着生する。雌穂数は、1節に1穂が普通であるが、品種によっては2~3穂

着生するものもある。雄性花序は、1本の中央穂状花序と十数本の側穂状花序からなり、2個ずつ対をなして小穂が配列する。雌穂花序は、通常20~40cmで、円筒または円錐形をしている。数枚の苞葉に包まれた穂軸に、2の倍数列(8~20列)の雌性小穂をつける。各列には、40~50粒稔実する。トウモロコシの雌穂は、その形状から絹糸と呼ばれ、その長い雌穂のどの部分からでも受精することが可能である。種子の大部分は、内胚乳で占められ、その中心部に胚があり幼芽が形成されている。胚は、全粒の11~12%を占め、その内、約35%が脂肪である。葉は、各節に互生し、葉鞘、葉身、葉舌からなる。根には、種子根、永久根、支根がある。永久根は、クラウンより伸び出て、地下30~60cmまで分布し、養水分の吸収を行う(農学大辞典、1994)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、温暖で適度な降水量があり、日射量の多い気候に適する。生育最適温度は20~30とされている。気温が10以下に下がるとほとんど生長せず、生育後期にマイナス3以下になると枯死する。出穂前後の1ヶ月間は最も水分の消費量が多く、干ばつによる害を受けやすい(農学大事典、1994)。

基本的に、どのような土壌でも栽培が可能であるが、肥沃で、透水性、通気性に優れた土壌を最も好む。最適土壌pHは6.0~6.5で、pHの調整のために炭酸カルシウムが施肥されている。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

トウモロコシの雌穂は苞皮で覆われているため、自然に種子が脱粒し、拡散する可能性は極めて低い(OECD, 2003)。

トウモロコシ種子に休眠性はない。発芽の最低温度は6~11で、最高は42~43、最適温度は33とされている(農学大事典、1994)。上述のように、自然に種子が脱粒する可能性は極めて低く、仮に脱粒した場合でも、土壌中での種子の寿命は短く、翌年の春に発芽する可能性は極めて低い。

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

トウモロコシには、これらの特性は知られていない。

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

トウモロコシは種子繁殖を行い、98～99%が他家受粉である。自家不和合性は知られていない。また、我が国ではトウモロコシと交雑可能な近縁野生種(テオシント)は知られていない(農学大事典, 1994)。また、アポミクシスの特性を有するとする報告はない。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

雄穂あたりの花粉の生産量は、およそ1,800万粒と推定されている(OECD, 2003)。花粉は球形で、直径はおよそ90～100 μm である。受粉は風媒によって行われる。花粉の飛散距離は、最大で200～800mとされている(第2回「第1種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料5-1:栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方3. トウモロコシ)。トウモロコシ花粉の堆積密度を調べたいいくつかの研究によれば、トウモロコシの開花期間中、同一方向に絶えず秒速3mの風が吹き続けたと仮定した時、その風下における最大堆積花粉数の累積値は、ほ場から10m離れた場所では約4,000粒/cm²と推計され、畑端の約15,000粒/cm²の約1/4となる。この値は、ほ場からの距離別に堆積する花粉密度の推定最大値で、調査対象地域において、確率的に20年に一度の頻度でしか起こりえないような風速条件下での推定値であり、これ以上の堆積はないという限界値を示している(Kawashima *et al.*, 2004)。実際に、野外において花粉の飛散・堆積程度を調べた実験では、葉上に堆積した花粉密度は、ほ場から3m離れると最大35粒/cm²(累積)になり(Hansen & Obrycki, 2000)、2m離れると14.2粒/cm²になる(Pleasantら, 2001)と報告されている。

花粉は通常、乾燥、高温に弱く、水分を失うと稔性に影響するため、開花後は速やかに受粉する必要がある。晴天の場合、午前10時～11時頃が花粉の放出が最も盛んとなり、午後になると激減する(菊池, 1987)。

トウモロコシの花粉の寿命は、通常10分～30分程度であるが、気温及び湿度の条件が整えば、30分以上と言われている(CFIA, 1994)。

ホ 病原性

—

ヘ 有害物質の産生性

自然条件下で、周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有

害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤¹⁾耐性トウモロコシ (*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-098140-6, OECD UI : DP-098140-6) (以下、本組換えトウモロコシと表記) における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (8ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列は別紙 1 に示した。

ロ 構成要素の機能

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

供与核酸の各構成要素の機能は表 1 (8ページ) に示した。

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

表 1 供与核酸の構成及び構成要素の由来

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>gat4621</i> (改変 <i>gat</i>) 遺伝子発現カセット		
<i>ubiZM1</i> Promoter	900	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 の転写開始のためのプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)
<i>ubiZM1</i> 5' UTR	83	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 の 5'非翻訳領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)
<i>ubiZM1</i> Intron	1,009	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)
<i>gat4621</i> (改変 <i>gat</i>)	444	<i>Bacillus licheniformis</i> 由来の <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼを基に、グリホサートへの <i>N</i> -アセチル化活性を高めるように、塩基配列を改変して作製されたグリホサート <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(改変 <i>gat</i> : 以下、 <i>gat4621</i> と表記) (Castle <i>et al.</i> , 2004; Siehl <i>et al.</i> , 2005; Keenan <i>et al.</i> , 2005、 GenBank Accession No: AY597417)。147 個のアミノ酸から成る約 17kDa の改変 GAT (以下、GAT4621 と表記) 蛋白質をコードする。
<i>pinII</i> Terminator	316	バレイショ由来のプロテアーゼインヒビター-II 遺伝子 (<i>pinII</i>) における転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)
<i>zm-hra</i> (改変 <i>als</i>) 遺伝子発現カセット*		
CaMV 35 S Enhancer	438	Cauliflower Mosaic Virus 由来の転写を促進する働きを持つエンハンサー領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; O'Dell <i>et al.</i> , 1985)。本遺伝子発現カセットには、タンデムに 3 つのエンハンサーの繰り返し挿入されている。
<i>zm-als</i> Promoter	662	トウモロコシのアセト乳酸合成酵素遺伝子 (<i>zm-als</i>) (accession number X63553) の転写開始のためのプロモーター領域 (Fang <i>et al.</i> , 1992)
<i>zm-hra</i> (改変 <i>als</i>)	1,917	<i>zm-als</i> 遺伝子由来の改変遺伝子 (改変 <i>als</i> : 以下、 <i>zm-hra</i> と表記)。本遺伝子は 638 個のアミノ酸から成る約 69kDa の改変 ALS(以下、ZM-HRA と表記)蛋白質をコードする。なお、アミノ酸 39 個の葉緑体移行配列を含む (Fang <i>et al.</i> , 1992)
<i>pinII</i> Terminator	311	バレイショ由来のプロテアーゼインヒビター-II 遺伝子 (<i>pinII</i>) における転写を停止するためのターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)

* *zm-hra* (改変 *als*) 遺伝子発現カセットは、*gat4621* (改変 *gat*) 遺伝子発現カセットと逆方向で挿入されている。

(本表に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は、デュポン㈱にある)

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

gat4621 遺伝子

本組換えトウモロコシに導入された改変 *gat* (以下、*gat4621* と表記) 遺伝子は、*Bacillus licheniformis* 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼの塩基配列を基に、グリホサートに対する *N*-アセチル化触媒活性を高めるように改変した遺伝子であり、改変 GAT (以下、GAT4621 と表記) 蛋白質をコードしている (Castle *et al.*, 2004 ; Siehl *et al.*, 2005; Keenan *et al.*, 2005)。 *B. licheniformis* は、日本、米国、カナダ、ヨーロッパにおいて食品用酵素 (アルファアミラーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、ヘミセルラーゼ等) の生産に利用されているグラム陽性細菌である。 *gat4621* 遺伝子の塩基配列及び GAT4621 蛋白質のアミノ酸配列を別紙 1 に示した。

除草剤グリホサートは、植物中のトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの芳香族アミノ酸合成に關与するシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の活性を阻害する。その結果、これらの芳香族アミノ酸が合成されなくなり植物を枯死させる (図 1、11ページ)。 *gat4621* 遺伝子より産生される GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変えることで、植物にグリホサートへの耐性を付与する (図 1、11ページ)。

グリホサートに対する酵素活性を k_{cat} / K_M を目安として比較したところ、 *B. licheniformis* 由来の改変前の *N*-アセチルトランスフェラーゼ蛋白質は、 $k_{cat} / K_M = 1.21 \sim 1.79 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であったのに対し、GAT4621 蛋白質では、 $k_{cat} / K_M = 6,719 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と、約 3,700 ~ 5,500 倍まで酵素活性が高められていた。実際に、米国において 19 箇所のほ場試験が行われているが、本組換えトウモロコシは、除草剤グリホサートに対し、高い耐性を持つことが示されている。なお、 k_{cat} は酵素反応速度定数を、 K_M は基質に対する親和性を示す。

zm-hra 遺伝子

本組換えトウモロコシに導入された改変 *als* (以下、*zm-hra* と表記) 遺伝子はトウモロコシのアセト乳酸合成酵素 (*zm-als*) 遺伝子由来であり、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けない改変 ALS (以下、ZM-HRA と表記) 蛋白質をコードしている (Fang *et al.*, 1992)。 *zm-hra* 遺伝子の塩基配列及び ZM-HRA 蛋白質のアミノ酸配列を別紙 1 に示した。

除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は、植物中のロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成に關与するアセト乳酸合成酵素 (ALS) 活性を阻害

する。その結果、これらの分枝アミノ酸が合成されなくなり、植物を枯死させる(図 2、12ページ)。 *zm-hra* 遺伝子により産生される ZM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けず、本剤の存在下でも ALS 活性を示すので、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成が可能となり、植物に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与される(図 2、12ページ)。なお、改変 *als* 遺伝子を利用した組換え作物の作出は、すでにダイズやイネで報告されている

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5ap.pdf、
http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/AD41ap.pdf)

GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が、既知のアレルゲン蛋白質と相同性を有さないことを確認するために、ネブラスカ大学の Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) が提供するアレルゲンデータベース (FARRP6 database, Release 6, 2006 年 1 月版) を用いてアミノ酸配列を比較した。本データベース中には、1,541 件の既知アレルゲン及び推定アレルゲンのアミノ酸配列が含まれる。その結果、両蛋白質において有意な相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、既知毒性タンパク質との間で相同性を持たないことを確認するため、Genbank、Swiss-Prot、PIR、Protein Research Foundation 及び Protein Data Bank の公的データベースを統合して構築した、重複のない登録蛋白質アミノ酸配列から成るデータベースを用いた検索も行った。その結果、両蛋白質において既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。

除草剤グリホサートは雑草の生育期に散布する茎葉処理型除草剤であり、一方の除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤は雑草の発生前から発生初期に散布する土壌処理兼茎葉処理型除草剤である。今日、両除草剤は日本及び米国を始め、世界中で使用されている。 *gat4621* 遺伝子の導入による除草剤グリホサート耐性、及び、 *zm-hra* 遺伝子の導入による除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与されたトウモロコシの栽培によって、栽培農家は異なる特性を持つ 2 つの除草剤を有効に利用することができ、雑草防除における幅広い選択肢を提供することになると期待されている。

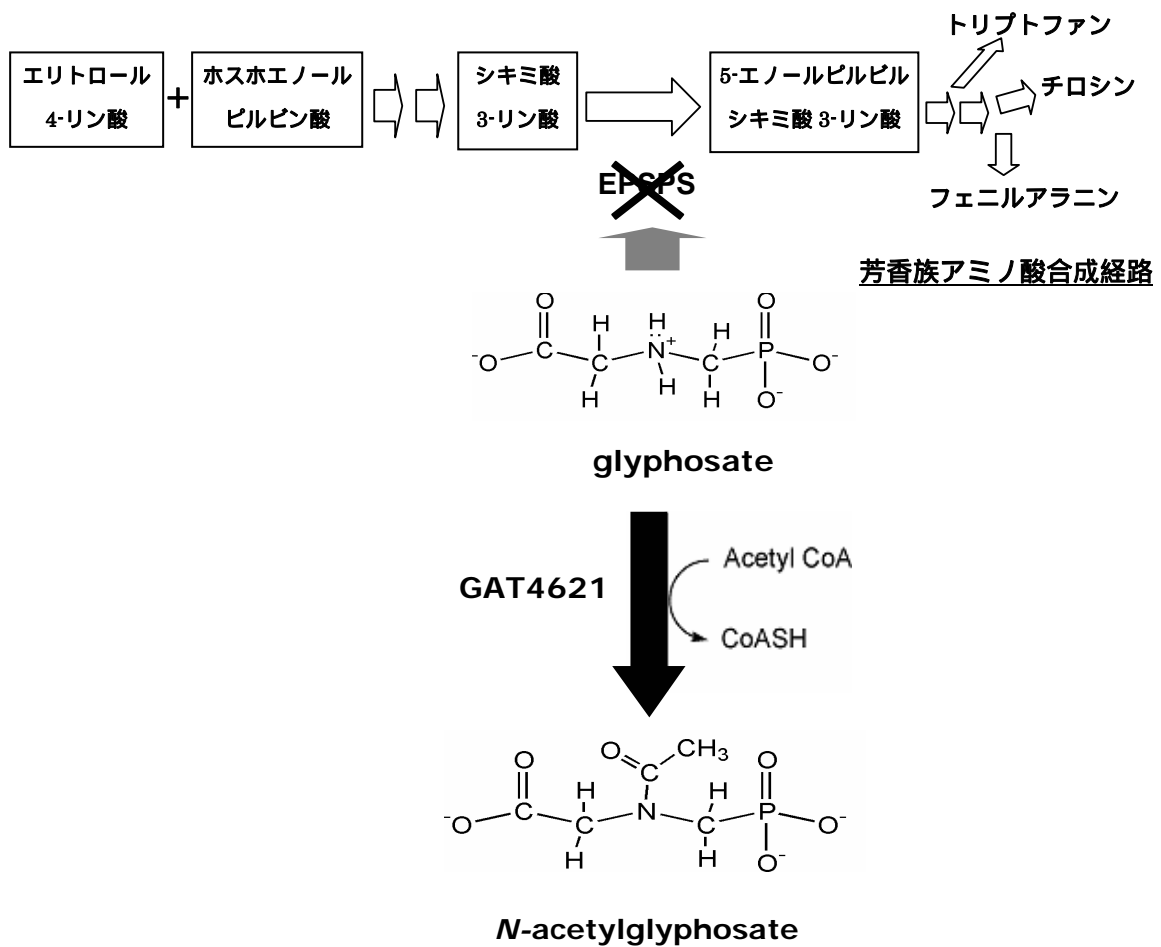


図 1 GAT4621 蛋白質の作用機作

除草剤グリホサートにより EPSPS 活性が阻害されると、芳香族アミノ酸が合成できなくなり植物は枯死する。一方、GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変える。そのため、芳香族アミノ酸の合成が可能となる。

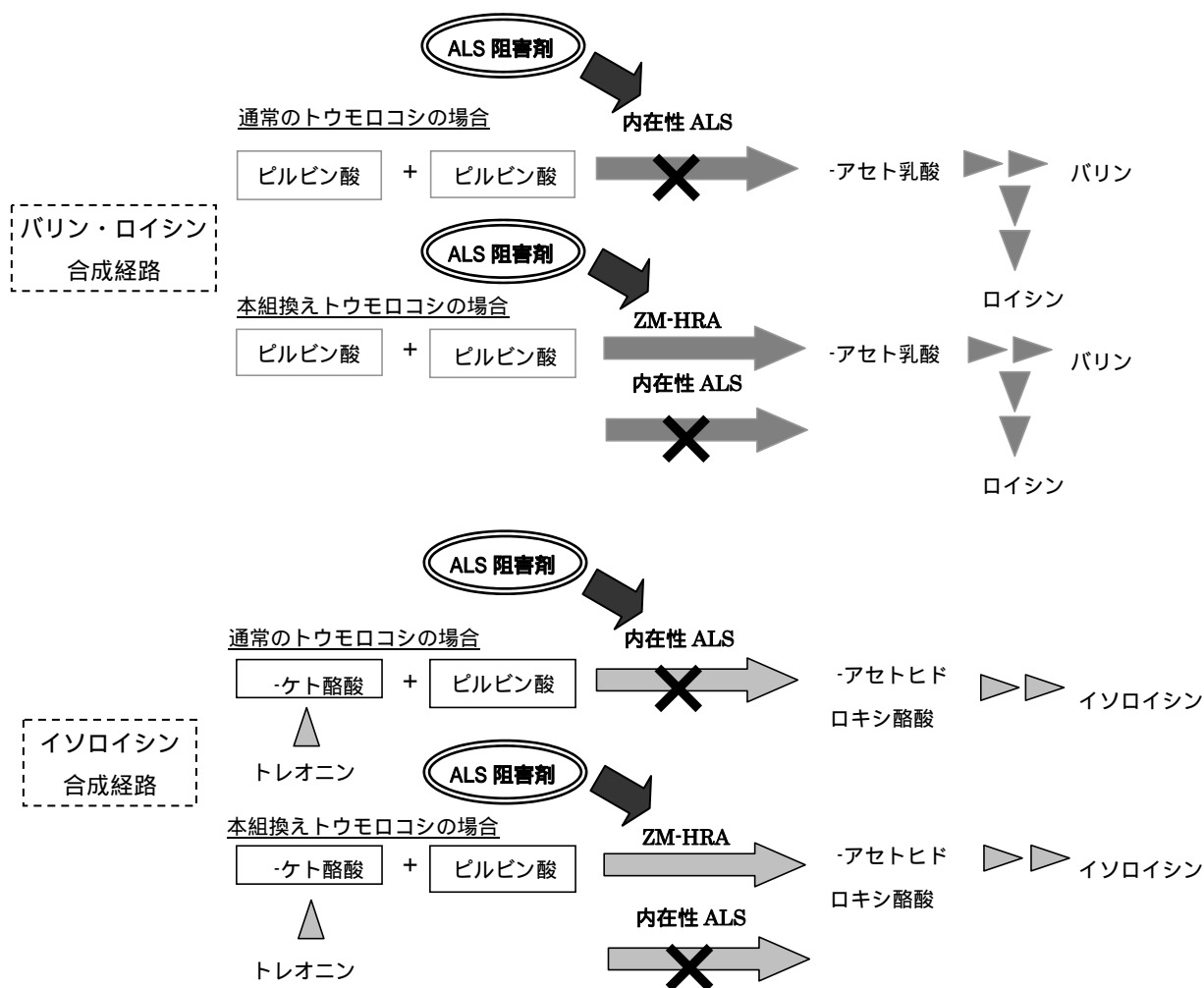


図 2 ZM-HRA タンパク質の作用機作

植物の内在性アセト乳酸合成酵素 (ALS) は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤 (ALS 阻害剤) によって阻害され、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸合成ができなくなり植物は枯死する。一方、本組換えトウモロコシの場合のように ZM-HRA が存在すると、除草剤 ALS 阻害剤の影響を受けないので、バリン、ロイシン、イソロイシンの分枝アミノ酸の合成が可能となる。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

gat4621 遺伝子

本組換えトウモロコシに導入された *gat4621* 遺伝子が産生する GAT4621 蛋白質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。一般に *N*-アセチルトランスフェラーゼは、蛋白質の *N* 末端アミノ酸や生体アミン化合物である遊離アミノ酸及びヒストンのアミノ酸側鎖ならびに抗生物質等をアセチル化することが知られている（生化学辞典、1998）。GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化活性を高めるように改変された蛋白質で、微生物由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼに比べて、グリホサートに対する活性が約 5,000 倍に高められている。

GAT4621 蛋白質と高いホモロジーを持つ GAT4601 及び GAT4602 蛋白質²⁾ の結晶構造解析の結果から、グリホサートに対する *N*-アセチル化反応の活性中心は当該蛋白質の内部奥にあることが示されている（Keenan ら、2005）。このことから、グリホサート等の低分子化合物のみが、立体障害を受けずに当該蛋白質の活性中心に到達して本蛋白質の基質となり得ること、即ち、高分子化合物は本蛋白質の基質となる可能性が低いことが示唆された。実際、GAT4602 蛋白質を用いた研究で、生体内アミン類であるヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン、tRNA といった高分子に対して *N*-アセチル化活性は全く認められていない（Siehl ら、2005）。これらを踏まえて、パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社によって、本組換えトウモロコシで産生される GAT4621 蛋白質の基質特異性について評価が行われた（別紙 2 参照）。

(1) *N*-アセチル化活性の測定

まず、GAT4601 蛋白質では、遊離アミノ酸に対して弱い反応性が認められたことから、GAT4621 蛋白質においても遊離アミノ酸を基質とした *N*-アセチル化反応を測定した。測定は、*N*-アセチル化反応に関与する補酵素のアセチル CoA の反応産物である coenzyme A の 30 分間の蓄積量を指標として行った。その結果、アスパラギン酸及びグルタミン酸、トレオニン、セリン、グリシンの 5 つのアミノ酸において、弱い活性が認められた。これらの活性は、大きいものでもグリホサートを基質とした時の活性の 3%程度であった。

一方、同様に coenzyme A の蓄積量を指標として、合計 20 種類の除草剤や殺

²⁾ 既に報告されている GAT4601 及び GAT4602 蛋白質は、いずれも GAT4621 蛋白質とアミノ酸レベルで 91%のホモロジーを有している。一方、グリホサートに対する活性は、約 1,000 倍から 1,300 倍まで高められている（除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ（DP-356043-5）概要書：http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5ap.pdf）。

虫剤、殺菌剤及び合計 10 種類の抗生物質(カナマイシンやアンピシリン等)(を基質として、GAT4621 蛋白質の *N*-アセチル化活性を測定した。その結果、触媒活性は全く認められなかった。

(2) k_{cat}/K_m 値の測定

上記で弱い *N*-アセチル化活性が認められた 5 つの遊離アミノ酸について、これらを基質として GAT4621 蛋白質の k_{cat}/K_m 値を測定した。その結果、最も高い触媒活性を示したアスパラギン酸についても、 k_{cat}/K_m 値は、 $12.1 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であり、グリホサートに対する k_{cat}/K_m 値の $1,063 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ の百分の一程度であった。

さらに、グリホサートと構造が極めて類似する化合物 4 種類を基質として GAT4621 蛋白質の活性を見たところ、触媒活性は全く認められなかった。

これらの結果から、GAT4621 蛋白質は、グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられた。

(3) アミノ酸組成の分析

GAT4621 蛋白質は、グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられるが、上述のように 5 種類の遊離アミノ酸に弱い反応性が認められたことから、本組換えトウモロコシがアミノ酸合成系に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、本組換えトウモロコシの種子及び葉におけるアミノ酸組成の分析を行った。その結果、本組換えトウモロコシの種子では、グリシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、アルギニンにおいて統計学的な有意差が見られたが、全て文献値の範囲内であった。また、葉では、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、バリンを除いて有意差が見られた。しかし、GAT4621 蛋白質と弱い反応性が認められた 5 種類の遊離アミノ酸の内、トレオニンを除いてアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシンに有意差は認められなかった。以上の結果を総合的に判断した結果、GAT4621 蛋白質が本組換えトウモロコシの代謝系に影響を及ぼすとは考えにくい(表 2、社外秘)。

加えて、米国においてこれまで延べ 19 箇所のほ場試験を行っているが、目的とした形質が本組換えトウモロコシに付与されている以外に非組換えトウモロコシとの相違は報告されていない。また、本申請のために米国で行われた生物多様性影響評価試験においても非組換えトウモロコシとの相違は認められていない(本文 2 (6) 口、29 ページ)。これらのことから、GAT4621 蛋白質が本組換えトウモロコシの代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

今回、初期の分析において特に葉組織においては、生体防御反応に關与する

グルタチオンの前駆体となるシステインなどの含硫アミノ酸組成に有意差が認められたことから、アミノ酸組成について、今後さらに詳細な分析を行う予定である。

表 2 本組換えトウモロコシの種子及び葉組織におけるアミノ酸組成分析結果
(社外秘)

zm-hra 遺伝子

zm-hra 遺伝子がコードする ZM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって活性阻害される内在性アセト乳酸合成酵素(ALS)の代わりに、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成経路で作用する(図 2、12 ページ)。分枝アミノ酸合成経路のうち、バリン・ロイシン合成経路においては、バリンにより ALS がフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによる ALS のフィードバック制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによりフィードバック制御されることが知られている(生化学辞典, 1998)。したがって、仮に ZM-HRA 蛋白質により ALS の触媒活性が高まり、その結果、分枝アミノ酸合成量が高まったとしても、フィードバック制御が働くことにより、特定のアミノ酸のみの含有量が高まるとは考え難い。実際に、本組換えトウモロコシの種子におけるバリン及びイソロイシン、葉組織におけるバリンの分枝アミノ酸組成において、対照の非組換えトウモロコシとの間で相違は認められなかった(表 2、社外秘)。このことから、ZM-HRA 蛋白質の産生が本組換えトウモロコシのアミノ酸合成系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

なお、*gat4621* 遺伝子は、除草剤グリホサートのアセチル化に關与する遺伝子であり、一方、*zm-hra* 遺伝子は分枝アミノ酸合成に關与する遺伝子であることから、両遺伝子の発現が相互に影響するとは考え難い。米国で行われたほ場試験及び生物多様性影響評価試験(本文 2 (6) の口、30 ページ) においても、雌穂長を除いて調査を行った全ての項目において本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で相違は認められなかった。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

gat4621 遺伝子発現カセット及び *zm-hra* 遺伝子発現カセットが導入されたプラスミド PHP24279 (図 3、社外秘) は、pSB1 (Komari et al. 1996) を基に構築された。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド PHP24279 の塩基数は 50,373 bp である。この内の T-DNA 領域 (7,442 bp) の塩基配列を別紙 1 に示した。

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド PHP24279 の T-DNA 領域外の外骨格領域には、微生物中でベクターが増殖する際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するための抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*tetA* 及び *spc*) が含まれている。*tetA* 遺伝子は、抗生物質のテトラサイクリン (tetracycline) に対する耐性を付与し、*spc* 遺伝子は、抗生物質のスペクチノマイシン (spectinomycin) に対する耐性を付与する。なお、これらの抗生物質耐性遺伝子を含む外骨格領域は、宿主には導入されていないことが確認されている (本文 2 (4) 参照、22 ページ)。

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

構築されたプラスミド PHP24279 の T-DNA の外骨格領域には、アグロバクテリウムを介して植物への感染を可能とし、その T-DNA 領域の植物ゲノムへの組込みに関与する *vir* 領域が存在するが、プラスミド単独での感染を可能とする配列はプラスミド PHP24279 には含まれておらず、このことから、プラスミド PHP24279 自体に感染性はないと考えられる。

(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

プラスミド PHP24279 における供与核酸全体の構成は図 3 (社外秘) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-Ø9814Ø-6, OECD UI: DP-Ø9814Ø-6) は、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社によって開発された遺伝子組換えトウモロコシである。その作出から選抜・育成の過程は以下のとおりである。

核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換体の選抜の過程は図 4 (19ページ) に示した。

アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

アグロバクテリウムの除去は、形質転換カルス選抜時の培地中に β -ラクタム系抗生物質であるカルベニシリンを添加して行った。後代系統にアグロバクテリウムの菌体の残存は認められていない。

育成の経過及び系統樹

本組換えトウモロコシの育成経過は図 5 (社外秘) に示した。

なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用の申請のほか、食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行う予定である。

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

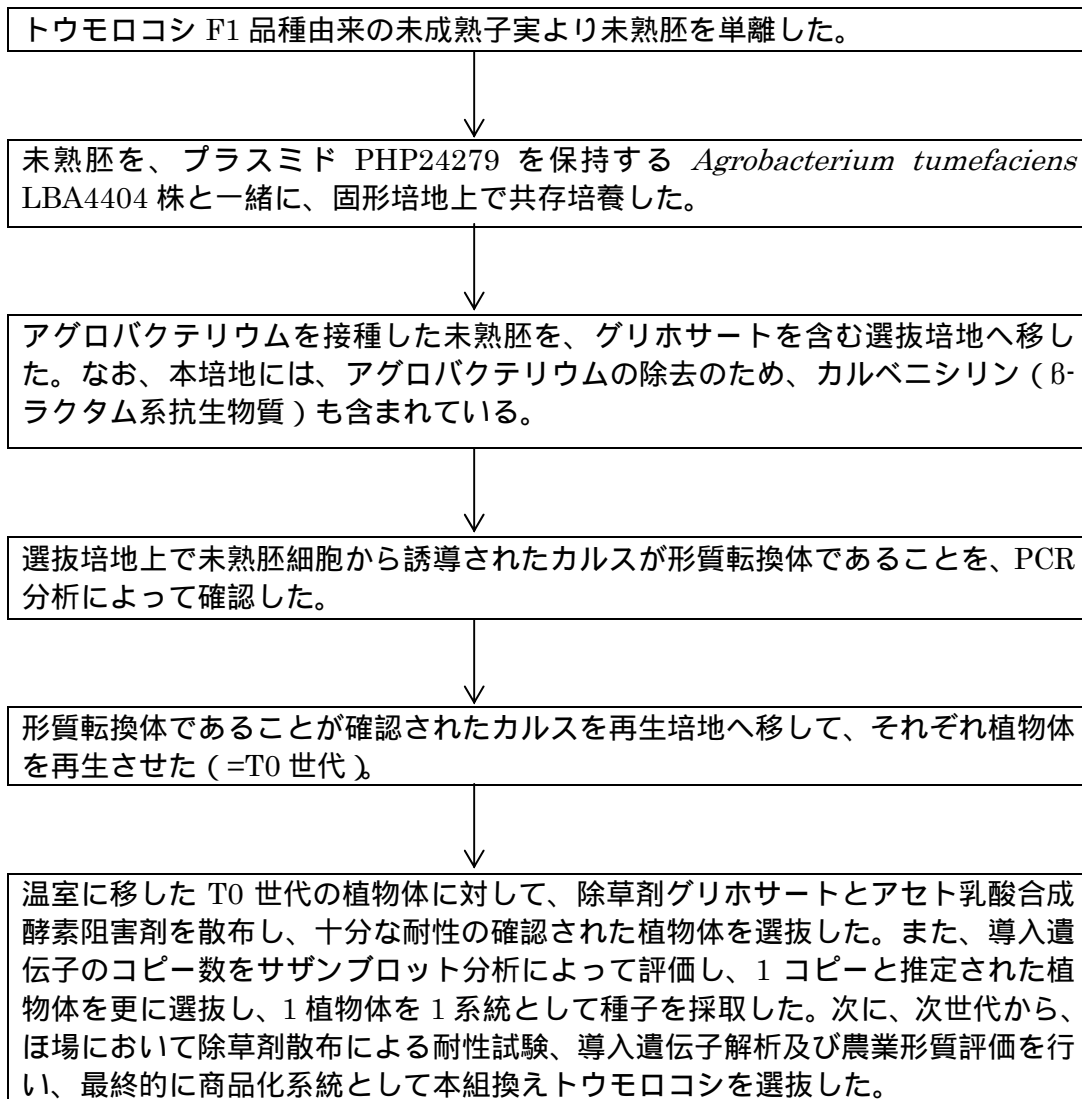


図 4 プラスミド PHP24279 の宿主への導入及び本組換えトウモロコシの選抜過程

（本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある）

[育成図]

5

図 5 本組換えトウモロコシの育成過程（社外秘）

供試世代	対照品種	評価	本文中参照箇所
<u>T0</u>		プラスミドの外骨格が存在しないことの確認に供試した世代	2(4)口、21ページ
<u>F1, BC1F1</u>		導入遺伝子の分離比の確認に供試した世代	2(4)イ、21ページ
<u>BC1F1, F3</u>		挿入遺伝子のサザンブロット分析に供試した世代	2(4)口、21ページ
<u>F1*1, F1*3</u>	当該系統の分離により遺伝子が脱落した個体由来の系統	除草剤散布試験及び ELISA 分析に供試した世代	2(4)二、24ページ
<u>F1*3</u>	当該系統の分離により遺伝子が脱落した個体由来の系統	米国において農業形質評価試験及び有害物質産生性に供試した世代	2(6)口、29ページ 2(6)口、33ページ
<u>T3</u>		アミノ酸組成分析に供試した世代	2(1)口、13ページ
<u>F1*2</u>		隔離ほ場試験に使用予定の世代	

(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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

導入された核酸は、表 3 に示すようにメンデルの法則に従って安定して遺伝することが確認されていることから、トウモロコシ染色体ゲノム上に存在する。

表 3 F1 及び BC1F1 世代における導入遺伝子の分離比の解析

供試世代	グリホサート耐性種子数	グリホサート感受性の種子数	グリホサート耐性種子数の期待値	グリホサート感受性種子数期待値	P 値
F1	82	80	81	81	0.88
BC1F1	59	56	57.5	57.5	0.78

* F1 及び BC1F1 より供試された種子を播種し、V4 期に除草剤グリホサートを(0.876 kg ae/ha) の濃度で散布した。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン株にある)

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

本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子のコピー数及び複数世代における伝達の安定性について、BC1F1 及び F3 の 2 つの世代を用いて、サザンブロット分析によって確認した。

本組換えトウモロコシの BC1F1 及び F3 世代の植物体 4 個体の葉のサンプルから各々ゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *EcoR* V または *Spe* I で切断した。プローブには、PCR によって digoxigenin (DIG) をラベルした *gat4621* 遺伝子領域、及び *zm-hra* 遺伝子領域の 2 つを用いた。制限酵素 *EcoR* V は、プラスミド PHP24279 の T-DNA 領域において 1 ヶ所の切断認識部位を持ち、*gat4621* 遺伝子発現カセット側と *zm-hra* 遺伝子発現カセット側に分割する。したがって、本組換えトウモロコシに完全な T-DNA の 1 コピーが導入されたと仮定した場合、*gat4621* 遺伝子プローブでは 3,800bp 以上の、*zm-hra* 遺伝子プローブでは 3,700bp 以上の、特異的なバンドがそれぞれ 1 つ検出される。

一方、制限酵素 *Spe* I は、プラスミド PHP24279 の T-DNA の両側末端近くの 2 ヶ所を切断し、T-DNA 両末端の *pinII* Terminator を含まない 6,775bp の T-DNA 断片を生じる。本組換えトウモロコシに完全な T-DNA の 1 コピーが導入されたと仮定した場合、*gat4621* 遺伝子または *zm-hra* 遺伝子をプローブに用いると、いずれも 6,775bp の特異的なバンドが 1 つ検出される。

なお、*zm-hra* 遺伝子はトウモロコシの *zm-als* 遺伝子由来であり、したがって、*zm-hra* 遺伝子をプローブに用いたサザンブロット分析では、トウモロコシの内在性 *als* 遺伝子由来の非特異的なバンドも検出される。そこで、遺伝子導入母本品種の元となった、2 つの非組換えトウモロコシ自殖系統の抽出ゲノム DNA を陰性対照として、また、非組換えトウモロコシ自殖系統の抽出ゲノム DNA に、プラスミド PHP24279 を加えたものを陽性対照として本分析に用いた（別紙 3、図 5 及び図 6）。

サザンブロット分析の要約を表 4（23ページ）に、また、その詳細を別紙 3（表 1 及び表 2）に示した。サザンブロット分析の結果、ゲノム DNA を *EcoRV* で切断して *gat4621* 遺伝子をプローブとした場合は、本組換えトウモロコシの BC1F1 及び F3 世代において、約 6,100bp のバンドが 1 つ検出された。一方、*zm-hra* 遺伝子をプローブとした場合は、8600bp 以上のサイズの特異的バンドが 1 つ検出された（表 4、23ページ）。検出された特異的バンドの大きさは、導入遺伝子が完全な T-DNA の 1 コピーと仮定した場合に検出される予想される最小バンドサイズより大きかったことから、1 コピーの完全な PHP24279 の T-DNA が、本組換えトウモロコシに導入されたことが示唆された。

一方、ゲノム DNA を *Spe I* で切断して *gat4621* 遺伝子または *zm-hra* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析では、本組換えトウモロコシの BC1F1 及び F3 世代において、陽性対照で検出された 6,775bp といずれも大きさが一致する特異的なバンドが 1 つ検出された（表 4、23ページ）。この結果からも、1 コピーのプラスミド PHP24279 の完全な T-DNA 領域が、本組換えトウモロコシに導入されたことが支持された。

また、BC1F1 及び F3 の 2 世代において、*gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子をプローブとしてサザンブロット分析で検出された特異的なバンドの大きさは両世代間で一致しており、複数世代にわたり導入遺伝子が安定的に伝達されていることが確認された。

なお、本組換えトウモロコシの T0 世代において、プラスミド PHP24279 の *tetA* 遺伝子、*spc* 遺伝子、*virG* 遺伝子、並びに T-DNA の左側境界（LB）外側領域と右側境界（RB）外側領域をそれぞれ増幅するプライマー対を用いたリアルタイム定性 PCR 分析を行った。その結果、抗生物質耐性マーカー遺伝子（*tetA* 及び *spc*）等から成るプラスミド PHP24279 の T-DNA 外骨格領域は、本組換えトウモロコシのゲノムに挿入されていないことが確認されている。

表 4 サザンブロット分析結果の要約

プローブ	制限酵素	期待される断片長 (bp) ¹	検出された断片長 (bp) ²	参照先 ³
<i>gat4621</i>	<i>EcoR</i> V	>3,800	約 6,100	別紙 3、図 3
	<i>Spe</i> I	6,775	6,775	別紙 3、図 4
<i>zm-hra</i>	<i>EcoR</i> V	>3,700	>8,600	別紙 3、図 5
	<i>Spe</i> I	6,775	6,775	別紙 3、図 6

1： プラスミド PHP24279 の T-DNA の 1 コピーが本組換えトウモロコシのゲノムに導入された場合、用いた制限酵素処理とプローブの組合せで特異的に検出が予想される DNA 断片の大きさ。

2： 期待される断片長及び分子量マーカーに基づく、導入遺伝子として特異的に検出された DNA 断片の大きさ。陽性対照に見られるバンドは除いた。

3： 別紙 3 における図の番号を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

図 6 サザンブロット分析に基づく本組換えトウモロコシに於ける導入遺伝子の模式図 (社外秘)

八 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

サザンブロット分析の結果から、本組換えトウモロコシ中には、*gat4621* 遺伝子発現カセットと *zm-hra* 遺伝子発現カセットからなるプラスミド PHP24279 の T-DNA 領域が 1 コピー導入されたことが示されており、したがって、本項目は該当しない。

二 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について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

本組換えトウモロコシに導入された *gat4621* 遺伝子によって産生する GAT4621 蛋白質と *zm-hra* 遺伝子によって産生する ZM-HRA 蛋白質が、後代でも安定して産生されることを、除草剤散布試験及び ELISA 分析によって確認した。分析は、2006 年に米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社において、本組換えトウモロコシの F1*¹ 及び F1*³ の複数世代を用いて行われた。

その結果、F1*¹ 及び F1*³ の両世代とも、除草剤グリホサート、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤、及び両剤を混合して散布した場合に対して 21 日後においても薬害は認められず、複数世代にわたり除草剤耐性形質が安定的に遺伝していることが確認された (図 7、26 ページ及び図 8、27 ページ)。

表 5 除草剤散布による薬害程度の比較

散布薬剤 ¹ / 供試世代	本組換えトウモロコシ ² (F1*1)	非組換えトウモロコシ ²
グリホサート	0	100 ± 0 ³
アセト乳酸合成酵素阻害剤	0	12.5 ± 6.4
グリホサート + アセト乳酸合成酵素阻害剤	0	100 ± 0
薬剤非散布	0	0
処理 ¹ / 供試世代	本組換えトウモロコシ ² (F1*3)	非組換えトウモロコシ ²
グリホサート	0	100 ± 0
アセト乳酸合成酵素阻害剤	0	25 ± 6.4
グリホサート + アセト乳酸合成酵素阻害剤	0	100 ± 0
薬剤非散布	0	0

1：除草剤グリホサートは 0.876kg ae/ha の薬量で、また、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤にはフェンルフィン系とトリパロキシメチルを混合してともに 26.25g ai/ha の薬量で、トウモロコシが 4 葉期 (V4) に達した時点でそれぞれ散布した。

2：散布試験は 4 反復 (5 植物体/反復) で行い、上記はその平均値を示している。なお、薬害程度は散布後 21 日目に 0% (健全) から 100% (完全枯死) の間で目視評価した。

3：標準誤差を示す。

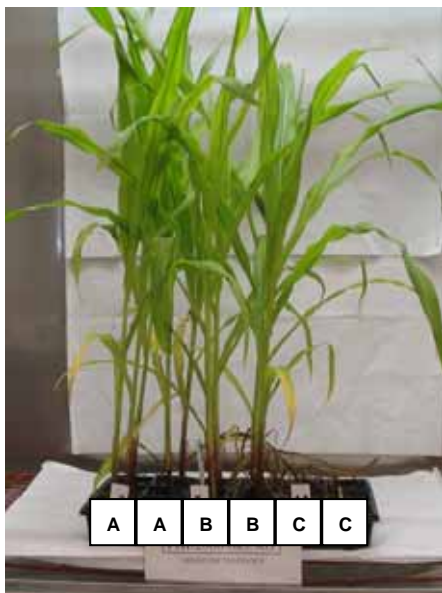
(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)



除草剤グリホサート散布区



除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤散布区



除草剤グリホサート +
アセト乳酸合成酵素阻害剤散布区



無散布区

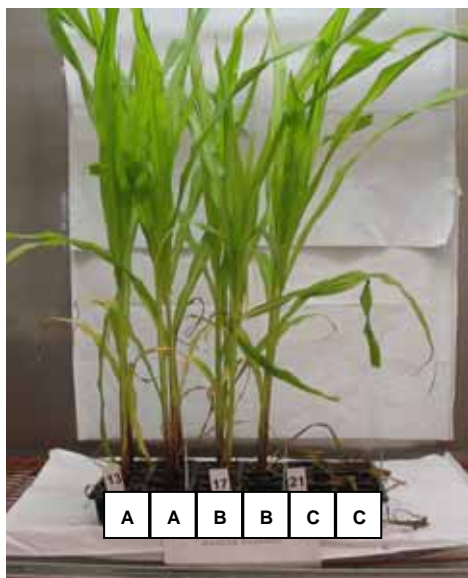
図 7 F1*1 世代を供試した除草剤散布試験 (散布後 21 日目)

A : 本組換えトウモロコシ

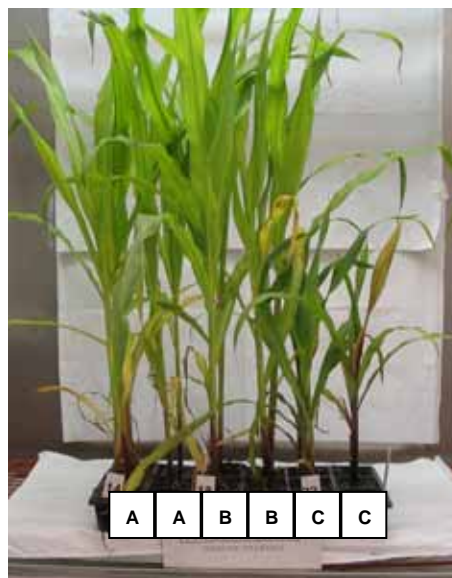
B : 商品化しない別系統の組換えトウモロコシ

C : 非組換えトウモロコシ

(本図に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)



除草剤グリホサート散布区



除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤散布区



除草剤グリホサート+
アセト乳酸合成酵素阻害剤散布区



無散布区

図 8 F1*3 世代を供試した除草剤散布試験 (散布後 21 日目)

- A : 本組換えトウモロコシ
- B : 商品化しない別系統の組換えトウモロコシ
- C : 非組換えトウモロコシ

(本図に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

また、除草剤散布直前に、F1*1 及び F1*3 世代の 4 葉期の植物体より葉組織を採取し、ELISA 分析を行ったところ、GAT4621 蛋白質と ZM-HRA 蛋白質が、両世代において安定的に産生していることが確認された（表 6、28 ページ）。

さらに、これまで T0 世代から、2006 年時点で最も世代の進んでいる BC3F1 及び F3 世代に至るまで、温室またはほ場で、除草剤グリホサート散布による耐性検定を行っているが、各世代で安定した除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を示すことを確認している。

表 6 本組換えトウモロコシ の葉における GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質の産生量

	F1*1 世代 ^{1,3}	F1*3 世代 ^{2,3}
GAT4621 蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	34 ± 2.1 (5.8 - 49)	34 ± 1.4 (24 - 48)
ZM-HRA 蛋白質量 (ng/mg 乾物重)	7.2 ± 0.4 (4.3 - 11)	6.9 ± 0.3 (4.1 - 9.5)

1 : n=19 2 : n=20

3 : 上段は分析値の平均値及び標準誤差を示す。下段のカッコ内は分析値の最小値・最大値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

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

移入された核酸は、伝達を可能とする配列を含まない。よって伝達性はない。

(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

方 法

葉または種子から抽出したゲノム DNA を鋳型とし(葉の抽出ゲノム DNA は 40ng、種子の抽出ゲノム DNA の場合は 12ng をそれぞれ用いる)、トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域と *gat4621* 遺伝子の接合領域を増幅するプライマー対を用いて、アニーリング温度 55°C、サイクル回数 35 回で PCR を行う。アガロース電気泳動により、*gat4621* 遺伝子発現カセットに特異的な 203bp のバンドが検出される。

感 度

本組換えトウモロコシのゲノム DNA サンプルを希釈し、一定の非組換えトウモロコシのゲノム DNA サンプルへ混入して PCR を行ったところ、葉の抽出ゲノム DNA をサンプルとした場合の検出限界は 40pg(0.1%)であった。一方、種子の抽出ゲノム DNA をサンプルとした場合の検出限界は 120pg (1%)であった。

信頼性

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのそれぞれ異なる 5 個体の葉及び種子を供試し、再現性を確認した。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えトウモロコシには、*gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子が導入され、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。*gat4621* 遺伝子の発現により産生される GAT4621 蛋白質は、グリホサートを *N*-アセチル化することによって、活性を持たない *N*-アセチルグリホサートに変えることができ、その結果、植物体にグリホサートに対する耐性を付与する(図 1、11ページ)。一方、*zm-hra* 遺伝子の発現により産生される ZM-HRA 蛋白質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって活性を阻害される植物内在性 ALS に代わって、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成に参与し、その結果、植物体に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する(図 2、12ページ)。

実際に、米国で行われた温室試験やほ場試験において、本組換えトウモロコシが除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の散布に対し、枯死することなく生育することを確認している(本文 2 (4) 二、24ページ)。

ロ 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

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を検討するため、2006 年に米国において、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社によって、本組換えトウモロコシの F1*3、及び遺伝的背景の近い同系統のハイブリッド(非組換えトウモロコシ)を対照として、以下のからの項目に関する評価が行われた。

形態及び生育の特性

米国アイオワ州で行われたほ場試験において、形態及び生育の特性として、発芽揃い、50%開花期、50%絹糸抽出期、着雌穂高、雌穂の周囲長、雌穂長、草型、分けつ数、稈長、成熟期、雌穂数、脱粒性、一列粒数、粒列数、一雌穂あたり穀粒数、穀粒色、穀粒形及び百粒重を調査した。調査は1反復10個体として、3反復で行った。その結果、雌穂長では、統計学的有意差が見られた。その他の項目については、評価を行ったすべての項目について、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった（表7）。

表7 形態及び生育の特性

農業形質	本組換えトウモロコシ ¹	非組換えトウモロコシ ¹	P-値
発芽揃い	良好	良好	NC ⁴
50%開花期(日) ²	62	62	0.28
50%絹糸抽出期(日) ²	64	62	0.17
着雌穂高(m) ³	1.1	1.1	0.69
雌穂の周囲長(cm)	16	17	0.33
雌穂長(cm)	17	18	0.012 ⁵
草型	アップライト	アップライト	NC
分けつ数	0	0	NC
稈長(m)	2.9	2.9	0.71
成熟期(日) ²	122	117	0.20
雌穂数	1	1	NC
脱粒性	難	難	NC
一列粒数	34	37	0.16
粒列数	15	15	0.34
一雌穂あたり穀粒数	485	537	0.10
穀粒色	黄色	黄色	NC
穀粒型	デント	デント	NC
百粒重(g)	34	32	0.21

1: n=30

2: 播種後経過日数。

3: 地際から最上位雌穂着生節までの長さ。

4: 数的評価でないか、または、測定値に差が認められなかったため、統計的処理を行わなかったことを示す。

5: 5%水準で有意差あり。1%水準では、有意差は認められない。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

生育初期における低温耐性

温室においてポット播種した V3 期の本組換えトウモロコシ及び非組換えト

ウモロコシ（1 植物体/反復×10 植物体）を、12 で 12 時間（明）及び 2 で 12 時間（暗）に設定した人工気象器に入れ、低温処理後 7 日目、14 日目及び 21 日目に、低温障害の程度をスケール 1 から 9 の 9 段階で目視評価した。なお、低温障害は、生育障害、萎凋、倒伏、葉の退色及びネクロシス等から総合的に判断し評価した。その結果、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと同程度の障害を示し、7 日目、14 日目及び 21 日目のそれぞれで、両者に統計学的な有意差（P-値<0.05）は認められず（表 8、31 ページ）、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシとの間で低温感受性に差は認められなかった。

表 8 低温処理における傷害程度の比較（幼苗）

	低温処理後 日数	本組換え トウモロコシ ²	非組換え トウモロコシ ²	P-値
低温障害 の程度 ¹	7 日目	3.93 ± 0.71 (3 - 4)	3.53 ± 0.70 (3 - 4)	0.71
	14 日目	4.70 ± 0.68 (4 - 5)	4.33 ± 0.68 (4 - 5)	0.72
	21 日目	5.77 ± 0.71 (5 - 6)	5.70 ± 0.71 (5 - 6)	0.95

1：障害の程度は以下の 9 段階で目視評価した。

1=健全、2=植物体の約 1～15%の部分で傷害が認められる、3=植物体の約 16～30%の部分で傷害が認められる、4=植物体の約 31～45%の部分で傷害が認められる、5=植物体の約 46～60%の部分で傷害が認められる、6=植物体の約 66～75%の部分で傷害が認められる、7=植物体の約 76～90%の部分で傷害が認められる、8=植物体の約 91～99%の部分で傷害が認められる、9=完全枯死。

2：n=10 カッコ内は、目視評価の最小値、最大値を示す。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある）

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ので、成体で越冬することは知られていない。確認のため、生体の越冬性については、隔離ほ場試験で調査する予定である。

花粉の稔性及びサイズ

ほ場で栽培した植物体の開花期に花粉を採取し、花粉の稔性及びサイズについて観察を行った。花粉をヨードカリ溶液（0.15%ヨウ素、0.5%ヨウ化カリウム、12.5%酢酸、37.5%イソプロパノール）及び 0.1%ニュートラルレッド溶液で染色して顕微鏡下で観察し、花粉の直径及び染色されている花粉数の調査を行った。3 個体から採取した花粉をまとめたものを 1 反復として、3 反復で行った。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシ両者とも 95%

以上の稔性を示し、差は認められなかった。また、花粉のサイズにおいても、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの直径はそれぞれ 90 μm 及び 94 μm であり、両者間で統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの花粉稔性に差はないと考えられた。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に係る特性として、米国で行われたほ場試験において、粒列数、1 列粒数、一雌穂あたり穀粒数及び百粒重が調査され、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった（表 7、30ページ）。

収穫時のトウモロコシ雌穂はいずれも苞皮に覆われており、自然条件下で種子が脱粒することはない。本組換えトウモロコシも対照の非組換えトウモロコシと同様に雌穂が苞皮に覆われており、脱粒性は難で同程度であることが示されている（表 7）。加えて、これまでに米国において実施されたほ場試験を通じて自然条件下での脱粒は観察されていない。

また、休眠性にかかわる調査として種子の発芽能力を評価した。本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの種子を、それぞれ 50 粒ずつポットに播種し、それぞれ 4 ポットを 25 の恒温器に 5 日間静置した後、発芽率を観察した。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの発芽率は 100% であり、両者の発芽率に相違は認められなかった（表 9、32ページ）。なお、これとは別に 10 の低温で発芽試験を行った場合に見られた非組換えトウモロコシの未発芽の種子（200 個中 2 個）について塩化テトラゾリウム染色を行い、生存の有無を確認した結果、いずれの種子も染色されず生物活性がなかったことから、未発芽種子は死滅していることが確認された。

以上の結果から、本組換えトウモロコシの種子発芽能力は非組換えトウモロコシと同程度で、低温条件下でもほぼ 100% に近い発芽率を示し、種子の休眠性についても非組換えトウモロコシと同程度に極めて低いことが確認された。

表 9 本組換えトウモロコシ種子の発芽率（25 ）

	本組換えトウモロコシ	対照の非組換えトウモロコシ
発芽率（%） ¹	100	100

1：播種後 5 日目の観察で、発芽率は両者ともほぼ 100% と良好であったため、発芽率は 4 ポット合計（200 粒）で評価した。

（本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある）

交雑率

宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種（テオシント）は、我が国においては生育していないため、本項目については調査を行わなかった。

有害物質の産生性

根から分泌され他の植物体に影響を与える内因性物質の産生性調査（根圏土壌法）

トウモロコシには、周辺の植物に影響を与えるような有害物質を根から分泌していることは知られていない。本組換えトウモロコシには、GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質が産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。確認のため本組換えトウモロコシにおいて、根から分泌されて周辺植物の生長に影響を及ぼす有害物質産生について、Iqbal ら（2004）が確立した根圏土壌法により確認した。

本組換えトウモロコシ（F1*³）と対照の非組換えトウモロコシの供試土壌は、米国アイオワ州 Johnston の栽培試験ほ場から、開花期に採取した。Iqbal ら（2004）の方法に従い、トウモロコシ植物体の株元から深さ最大 20cm 程度で土壌採取用ボーラー（長さ 45cm × 内径 1.9cm）を用いて土壌を抜き取り、抜き取られた土壌の表層 6cm を除いて根圏土壌として採取した。本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシのそれぞれ 4 つの栽培プロットから、1 プロットあたり 4 ヶ所で土壌を採取してこれを混和し、1 プロット 1 反復の検定用土壌サンプルとした。

6 穴培養プレート（ウェル直径：3.5cm）の各ウェルに、乾重量で 3g の土壌サンプルを入れ、そこに 5mL の 0.5%（w/v）寒天を添加し混和して固めた。次に 3.2mL の 0.5% 寒天培地を重層し、冷えて固まった後、その表面にレタス種子を 5 粒置床した。その後、25℃、暗黒条件下で 60 時間培養し、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを測定した。なお、本検定試験は 12 反復（3 サンプル/プロット × 4 プロット）で行った。

その結果、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さのいずれにおいても、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差（ $P < 0.05$ ）は認められなかった（表 10、34 ページ）。

以上のように、根から分泌されて周辺の植物に影響を与えるような有害物質の産生性について、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間に有意差は認められなかった。なお、わが国での隔離ほ場試験においても、確認のために再度評価を行う予定である。

表 10 レタスの生育調査結果（根圏土壌法）

	本組換えトウモロコシ ¹	非組換えトウモロコシ ¹	P-値
幼根の長さ (mm)	19.3 ± 2.2 ² (6.7 – 30.2)	20.9 ± 2.1 (10.9 – 31.5)	0.62
胚軸の長さ (mm)	10.0 ± 1.2 (2.9 – 17.2)	11.6 ± 1.1 (5.7 – 15.9)	0.32
発芽率 (%)	86.7 ± 4.9 (40 – 100)	93.3 ± 2.8 (80 – 100)	0.27

1: n=12

2: ±は標準誤差を示す。カッコ内は、測定値の最小値、最大値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える内因性物質の産生性調査（サンドイッチ法）

トウモロコシには、後作物に影響を与えるような内因性物質の産生性は知られていない。確認のため、本組換えトウモロコシにおいて、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与える内因性物質の産生の有無について、Fujii ら（2003 and 2004）の確立したサンドイッチ法により確認した。

検定用試料として、米国アイオワ州 Johnston の栽培試験ほ場から、本組換えトウモロコシ（F1*³）と対照の非組換えトウモロコシの葉を開花期に採取した。採取した葉は約 1cm 角に裁断して凍結乾燥した。サンプル 50mg を秤量して、6 穴培養プレート（ウェル直径：3.5cm）の各ウェルに入れ、5mL の 0.5% 寒天を添加して固めた。その後、更に 5mL の 0.5% 寒天に重層し、固まった後、その表面にレタスの種子を 5 粒置床した。25℃、暗黒条件下で 60 時間培養し、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さを測定した。なお、本検定試験は 12 反復で行った。

その結果、発芽率、幼根の長さ及び胚軸の長さのいずれにおいても、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差（P<0.05）は認められなかった（表 11、35 ページ）。なお、陽性対照として用いたゼラニウム処理区では、レタスの幼根の長さは 2.1 ± 0.12、胚軸の長さは 4.1 ± 0.47 であった。このように著しい阻害が認められたことから、試験は適切に行われたと考えられる。

以上のように、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるような有害物質の産生性について本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間に有意差は認められなかった。なお、さらに確認のため、我が国での隔離ほ場試験においても、再度評価を行う予定である。

表 11 レタスの生育調査結果（サンドイッチ法）

	本組換えトウモロコシ ¹	非組換えトウモロコシ ¹	P-値
幼根の長さ (cm)	9.0 ± 0.5 ² (5.0 - 11.3)	8.6 ± 0.4 (6.3 - 10.7)	0.57
胚軸の長さ (cm)	10.9 ± 0.7 (5.7 - 14.3)	9.5 ± 0.6 (6.4 - 12.7)	0.13
発芽率 (%)	95 ± 3.6 (60 - 100)	90 ± 3.0 (80 - 100)	0.34

1 : n=12

2 : ±は標準誤差を示す。カッコ内は、測定値の最小値、最大値を示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

土壌微生物相評価試験

トウモロコシにおいて、根から分泌されて土壌微生物相に影響を及ぼすような有害物質の産生について、これまでに報告はないが、念のため、我が国での隔離ほ場試験で土壌微生物相への影響評価を行う予定である。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

隔離ほ場所在地：栃木県那須塩原市千本松 768 番地（郵便番号 329-2749）

名称：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所

ほ場使用期間：承認日～平成 21 年 3 月 31 日

隔離ほ場の施設

- (イ) 部外者の立ち入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (ロ) 隔離ほ場であること、部外者は立ち入り禁止であること及び管理者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。
- (ハ) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えトウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

- (二) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風林を設置している。

隔離ほ場での作業要領

- (イ) 本組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
 - (ロ) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、遺伝子組換えトウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。
 - (ハ) (ロ)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤き込む等により、確実に不活化する。
 - (ニ) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、非意図的に本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
 - (ホ) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
 - (ヘ) (イ)から(ホ)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
 - (ト) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるにいたった場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。
- (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
-
- (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
- 申請書の別添資料「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
-
- (6) 国外における使用等に関する情報

2005年から2006年にかけて、米国の延べ19箇所のは場において試験を行ったが、目的とした形質が本組換えトウモロコシに付与されている以外に非組換えトウモロコシとの相違は報告されていない。米国においては、2007年に米

国食品医薬品局（FDA）へ食品及び飼料としての安全性の申請を、米国農務省（USDA）へ無規制裁培許可の申請を行う予定である。

なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用の申請のほか、食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行う予定である。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

トウモロコシ(*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) は、長年にわたり食品・飼料・加工等の用途として海外より輸入されてきた。また、生食用やサイレージ用として我が国でも栽培されている。我が国における長い栽培の歴史の中で、トウモロコシが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はないことから、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えトウモロコシと非組換え体とを比較して影響が高まっているか否かを考察することとする。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

2006年に米国において、野生植物との競合における優位性に寄与すると考えられる特性(形態及び生育特性、種子の生産性、脱粒性、発芽率、休眠性、生育初期の低温耐性等)について、ほ場及び温室で評価が行われたが、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、以下の項目を除いて相違は認められなかった(第1の1.(6).口、29ページ)。

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの雌穂長に統計学的有意差が認められた(表7、30ページ)。本組換えトウモロコシ雌穂長の平均値は、17cmであったのに対して非組換えトウモロコシの雌穂長の平均値は、18cm(5.6%の差)であった。5%水準で本組換えトウモロコシの雌穂長が短い傾向が認められたが、このことにより競合における優位性が高まるとは考えにくい。その他の形質については、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシで統計学的有意差は認められなかった。隔離ほ場試験及び海外におけるほ場試験においてさらに検証する予定である。

また、本組換えトウモロコシには、*gat* 遺伝子の導入による除草剤グリホサート耐性と、*zm-hra* 遺伝子の導入による除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性が付与されている。しかし、自然環境下でこれらの除草剤が使用されることは想定されにくいことから、両除草剤への耐性の付与によって、本組換えトウモロコシの野生植物との競合性における優位性が高まるとは考えにくい。

以上のことから、本組換えトウモロコシの隔離ほ場での第一種使用等に際して、競合における優位性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—
(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

隔離ほ場で第一種使用等を行うに際して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシには、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。本組換えトウモロコシにおいて GAT4621 蛋白質と ZM-HRA 蛋白質が産生されているが、GAT4621 蛋白質が分類される *N*-アセチルトランスフェラーゼ及び ZM-HRA が分類される ALS は、微生物や植物に一般的に認められる酵素であり、植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。両蛋白質において、相同性を示す既知及び推定アレルゲンは認められなかった。また、既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。

なお、米国において確認のため、根圏土壌法及びサンドイッチ法を用いた他の植物への影響評価を行い、有害物質の産生性について検討した。その結果、いずれの試験においても、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で有意差は認められなかった（第 1 の 1. (6) .口. 、33ページ）。

以上のことから、本組換えトウモロコシにおいて意図しない有害物質は産生されていないと考えられ、第一種使用規程に従い、隔離ほ場で第一種使用等を行うに際して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価
—

(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

第一種使用規程に従って、本組換えトウモロコシの隔離ほ場での第一種使用等を行うにあたり、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

宿主であるトウモロコシに関して、我が国における定着の事例がなく、また交雑可能な近縁野生種（テオシント）が自生していることは知られていない。このため、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断された。

以上のことより、本組換えトウモロコシの交雑性に起因して生物多様性影響が生ずる恐れはないと判断された。

4 その他の性質

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

第三 生物多様性影響の総合的評価

本組換えトウモロコシには、*Bacillus licheniformis* 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼの塩基配列を基に、除草剤グリホサートの触媒活性を高めるように改変した遺伝子である *gat4621* 遺伝子と、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays*) の *als* 遺伝子由来で、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないように改変した *zm-hra* 遺伝子が導入され、その結果、本組換えトウモロコシは除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けずに生育する。

本組換えトウモロコシについて、競合における優位性、交雑性、有害物質の産生性の3つの観点から、生物多様性影響の評価を行った。

野生植物との競合における優位性に関しては、優位性に寄与すると考えられる特性(形態及び生育特性、種子の生産性、脱粒性、発芽率、休眠性、生育初期の低温耐性等)について、2006年に米国において評価が行われた。その結果、それらの特性に関して、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で相違は認められなかった。なお、本組換えトウモロコシでは *gat4621* 遺伝子による GAT4621 蛋白質と *zm-hra* 遺伝子による ZM-HRA 蛋白質が産生され、除草剤グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。しかし、自然環境下でこれらの除草剤が使用されることは想定されにくいいため、本組換えトウモロコシに付与された両除草剤に対する耐性が、自然環境に生息する野生植物と競合して優位性を発揮することはないと考えられる。

以上のことから、本組換えトウモロコシと宿主トウモロコシとの間に競合における優位性はないと考えられ、隔離ほ場での第一種使用等に際し、野生植物に対して競合における優位性を示すことはない判断された。

トウモロコシに関して、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生は知られていない。なお、本組換えトウモロコシでは GAT4621 蛋白質と ZM-HRA 蛋白質が産生されているが、これらの蛋白質が、植物の生長に有害な影響を与えることは報告されていない。本組換えトウモロコシにおいて、意図しない有害物質が産生されていないことを確認するため、本組換えトウモロコシの植物体や栽培土壌を用いた生物検定を行った。その結果、検定植物の成長に本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシ間で差は認められなかった。

また、本組換えトウモロコシで産生する GAT4621 蛋白質は除草剤グリホサートに対して極めて高い基質特異性を示し、もう1つの産生蛋白質である ZM-HRA 蛋白質についても、分枝アミノ酸合成経路におけるフィードバック制御を受けていることが示されており、宿主の持つ代謝系に影響を及ぼす可能性

は低く、加えて、両者は独立した代謝経路等に関わる酵素蛋白質であることから相互に影響することも考え難い。これらのことは、アミノ酸組成分析や、これまでに実施されたほ場試験あるいは多様性影響評価試験を通じて、本組換えトウモロコシに目的の形質が付与された以外に、対照の非組換えトウモロコシとの間で相違が認められなかったことから支持され、したがって、宿主の代謝系に対する意図しない影響はないと考えられた。

また、本組換えトウモロコシの交雑性に関して、宿主であるトウモロコシの我が国における定着の事例はなく、また、交雑可能な近縁野生種が自生していることも知られていない。したがって、本組換えトウモロコシの隔離ほ場での第一種使用等に際し、我が国の環境下で野生植物種と交雑するおそれはないと判断された。

以上のことから、本組換えトウモロコシの隔離ほ場での第一種使用等に際して、本組換えトウモロコシで産生される GAT4621 蛋白質及び ZM-HRA 蛋白質に起因して、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

以上のことから、本組換えトウモロコシの隔離ほ場での第一種使用等に際し、競合における優位性、交雑性、ならびに有害物質の産生性に起因して、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., and Ryan, C.A. 1989. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plant Cell* 1: 115-122.
- Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Duck, N.B., Wong, J. Liu, D., and Lassner, M.W. 2004. Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304: 1151-1154.
- CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 1994.
(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.shtml#A12>)
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Bio.* 18(4): 675-689.
- 第2回 「第一種使用規程承認 組換え作物栽培実験指針」検討会資料5 - 1 : 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方3 . トウモロコシ
- FAO Statistical Database, 2006.<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>
- Fang, L.Y., Gross, P.R., Chen, C.-H., and Lillis, M. 1992. Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Mol. Bio.* 18(6): 1185-1187.
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., and Hirth, L. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21(1): 285-294.
- Fujii, Y., Parves, S.S., Parvez, M.M., Ohmae, Y., and Iida, O. 2003. Screening of 239 medical plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and Management* 3: 233-241
- Fujii, Y., Shibuya, T., Nakatani, K., Itani, I., Hiradate, S., and Parvez, M. M, O. 2004. Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biology and Management* 4: 19-23
- Hansen-Jesse, L., and J.J. Obrycki. 2000. Field deposition of Bt transgenic corn

pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125: 241-248.

ILSI . 2003. ILSI Crop Composition Database (<http://www.cropcomposition.org>).

いもち病及び白葉枯病抵抗性イネ (AD41) 概要書
http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/AD41ap.pdf)

Iowa Gold Catalog 1994. Iowa Department of Agriculture and Land Stewardship. 1993 Catalog.

Iowa Gold Catalog 1997. Iowa Department of Agriculture and Land Stewardship. 1996 Catalog.

Iqubal, Z., Furubayashi, A., and Fujii, Y., 2004. Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants. *Weed Biology and Management* 4: 43-48

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (DP-356043-5) 概要書 :
http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_356043_5a.p.pdf

Kawashima, S., Matsuo, K., Du, M., Takahashi, Y., Inoue, S., and S. Yonemura. 2004. An algorithm for estimating potential deposition of corn pollen for environmental assessment. *Environ. Biosafety Res.* 3: 197-207.

Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J., and Willmitzer, L. 1986. Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.* 14: 5641-5650.

Keenan , R.J. , Daniel L. Siehl ,Rebecca Gorton , and Linda A. Castle. 2005
DNA shuffling as a tool for protein crystallization. *PNAS* ,vol. 102 ,no. 25 ,8887-8892

Komari et al. 1996 Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.

菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用: 227-243. 株式会社 光琳.

農学大事典 第2次増訂改版 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 1994: 537-541.
株式会社 養賢堂発行.

O'Dell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

OECD. 2002. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 6: Consensus Document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites.

OECD. 2003. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27: Consensus Document of the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).
([http://www.oelis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2003\)11](http://www.oelis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2003)11))

Pleasant, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., D. Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, T.L., and G. D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *PNAS*, Oct 9;98(21): 11919-24.

生化学辞典 第3版. 1998. 監修 今堀和友、山川民夫. 東京化学同人.

Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D., and Lassner, M.W. 2005. Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Manag. Sci.* 61: 235-240.

The International Plant Names Index. 2004. (<http://www.ipni.org/index.html>).

Watson, S.A. 1982. Corn: Amazing maize. General Properties. pp3-29 in CRC Handbook of Proceeding and Utilization in Agriculture, vol II, Part 1 Plant Products. I.A.Wolf (ed) CRC Press Inc., Florida

財務省貿易統計. 2005. (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>)

Zupan, J.R., and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107: 1041-1047.

Zupan J.R., and Zambryski, P. 1997. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 279-295.

緊急措置計画書

平成 18 年 11 月 16 日

氏名 デュボン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔

住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (*gat4621, zm-hra, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-0098140-6, OECD UI : DP-0098140-6) (以下、本組換えトウモロコシと表記) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

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

本組換えトウモロコシが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合に、第一種使用等を行う栽培試験責任者は、弊社内に設置されている生物多様性影響管理委員会に報告を行う。また、弊社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部、バイオテクノロジー事業部）の部門長から構成される。危機対策本部が、生物多様性影響管理委員会、栽培試験責任者、並びに本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等を行っている栽培試験者と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

3. 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき認められた場合には、栽培試験者へ直接連絡を取り、口頭で伝える。

また必要に応じて、ホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件につ

いて通知する。

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

科学的根拠に基づき、本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、直ちに栽培試験を中止し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場内において鋤き込む等、不活化又は拡散防止のための必要な措置を取る。

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、本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (*gat4621*,
zm-hra, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-Ø9814Ø-6, OECD UI:
DP-Ø9814Ø-6) 別紙一覧

- 別紙 1 プラスミド PHP24279 の T-DNA 領域の塩基配列及び GAT4621 蛋白質、
ZM-HRA 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘情報につき非開示)
- 別紙 2 GAT4621 蛋白質の基質特異性評価 (社外秘情報につき非開示)
- 別紙 3 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 (社外秘情報につき非開示)
- 別紙 4 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ
(DP-Ø9814Ø-6) の隔離ほ場栽培試験計画 (社外秘情報につき非開示)