

高リシン及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ
(*cordapA*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis.)
(LY038 × MON 810, OECD UI: REN- 000 38-3 × MON-00810-6)
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
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理的及び生態学的特性	2
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	4
(1) 供与核酸に関する情報	4
(2) ベクターに関する情報	14
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	15
(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	28
(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	32
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	33
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	49
(1) 使用等の内容	49
(2) 使用等の方法	49
(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	49
(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	49
(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	49
(6) 国外における使用等に関する情報	49
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	52
1 競合における優位性	52
2 有害物質の産生性	54
3 交雑性	60
4 その他の性質	60
第三 生物多様性影響の総合的評価	62
[引用文献]	65
緊急措置計画書	67

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 1 月 18 日

農 林 水 産 大 臣 松岡 利勝 殿
環 境 大 臣 若林 正俊 殿

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

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	高リシン及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>cordapA</i> , <i>cryIAb</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Ittis) (LY038×MON 810, OECD UI:REN-000 38-3×MON-00810-6)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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. 一般にトウモロコシの学名は *Zea mays* L.(英名は maize)であるが、近年、トウモロコシの近縁種である一年生テオシントが *Z. mays* に分類された結果、トウモロコシはその亜種として *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis として分類されるようになった(文献 1)。

ロ. 宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays* subsp. *mays* (L.)Iltis)で、デント種を用いた。

ハ. 原産地については、ほぼ米国の南西部、メキシコ、中米あるいは南米にかけての地域と考えられるが、決定的な説はなく、これら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原とする説がある(文献 1)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている(文献 1)。その後、原住民の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 3000 年~1500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになり、南北アメリカ大陸の各地に伝播し、その伝播の過程でさらにデント、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(文献 2)。わが国へは天正年間(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。

ロ. 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(文献 2; 文献 1)。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(文献 3; 文献 1)。文献 4 の統計情報に基づく、2005 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 5 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,000 万 ha、中国が 2,600 万 ha、ブラジルが 1,100 万 ha、メキシコが 800 万 ha、インドが 740 万 ha、ナイジェリアが 460 万 ha、南アフリカが 340 万 ha となっている(文献 4)。なお、同統計情報に基づく 2005 年のわが国における栽培面積は 2 万 8,000ha であった。

わが国は海外から約 1,600 万トンのトウモロコシを飼料用、食品用、栽培用として輸入している。飼料用は約 1,100 万トン、食品用は約 500 万トンで主な用途は澱粉、異性化糖である。

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。播種適期は寒地から温暖地までは 5 月、一部の暖地では 4 月から 6 月までである。適正栽植密度は 10a あたり 6,000~8,000 本である。雑草防除のため、生育初期に除草剤散布や 2~3 回の中耕・培土作業を行う。雌穂の抽出より 35~45 日後の黄熟期に地上部を収穫する(文献 3)。

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種子のほとんど全ては一代雑種品種(F1)なので、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

トウモロコシ種子の発芽適温は 32~36℃、最低発芽温度及び最低生育温度は 6~10℃であり、実際には 13~14℃以上の時期が播種適期とされ、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(文献 3)。また、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(文献 3)。これら温度条件等の他、デント種の場合は種子重量の 70%の水を吸うと発芽する(文献 5)。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(文献 5)。

現在のトウモロコシは栽培作物として高度に人為的に作られた作物であり、自然条件下で野生種として繁殖し、生存するための能力は失われている(文献 6; 文献 1)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

①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(文献 1)。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、野生として生き残る能力を失っており、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。種子の休眠性は極めて低い。また、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が10℃に達するまで発芽せず、腐敗し枯死する(文献2; 文献3)。また、仮に発芽しても生長点が地上部に出る初期生育時(5~7葉期)に、0℃以下で6~8時間以上の条件下におかれると生存できない(文献1)。種子の寿命は常温保存では短く、2年目から発芽率が低下する。

②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。

③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、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である(文献1; 文献7)。トウモロコシと交雑可能なのは、*Zea mays*の別亜種である一年生のテオシント(*Zea mays* subsp. *mexicana*)、及び *Tripsacum* 属であるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない(文献1)。テオシントはメキシコとグアテマラにのみ自然分布しており、一方、*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、そして、この属の生育の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラの3地域に大別されている(文献2; 文献3; 文献1; 文献8)。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない(文献9; 文献3)。

④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。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2時間から8日までの幅がある(文献10)。花粉は球形で、直径は90~100µmである(文献11)。風媒による他家受粉が主であるが普通のほ場で1~5%の自家受粉が起きる。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(文献1)。また、トウモロコシ花粉が飛散する距離は、林、山などの遮蔽物の有無、風向きなどで異なるが、およそ300~500mとされている(文献3)。

ホ 病原性

—

ヘ 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また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

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

高リシントウモロコシ (*cordapA*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (LY038, OECD UI: REN- 000 38-3) (以下、LY038 とする) とチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON810, OECD UI: MON-00810-6) (以下、MON810 とする) を交雑育種法を用いて交配させた高リシン及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cordapA*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI: REN- 000 38-3×MON-00810-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」とする) は、親系統である LY038 と MON810 の 2 つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では LY038 と MON810 の調製等に関する情報について個別に述べた。

LY038 は飼料用である。従来、トウモロコシを原料とする一般的な飼料は、動物の成長に必須であるリシン等のアミノ酸が不足しており、家畜を適切に生育させるためにはリシン等の添加が必要である(文献 12; 文献 13; 文献 14)が、LY038 の開発により、家畜用飼料に添加するリシンの量の軽減、あるいは添加を不要とし、従来よりも高濃度のリシンを含むトウモロコシを直接家畜用飼料として供給することができるようになる。実際に本組換えトウモロコシを含む飼料をブロイラーに与えた 42 日間の肥育試験を行ったところ、予想されたとおり、非組換えトウモロコシを含む合成リシン無添加の飼料と比較して発育成績等が向上したこと、また、その発育成績は非組換えトウモロコシに合成リシンを加えた飼料と同程度であったことが確認された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 8)。

(1) 供与核酸に関する情報

【LY038 の供与核酸に関する情報】

イ 構成及び構成要素の由来

LY038 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、p6 の図 1 及び p7 の表 1 に記載したとおりである。

ロ 構成要素の機能

① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸

の構成要素それぞれの機能

LY038 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、p7 の表 1 に記載したとおりである。

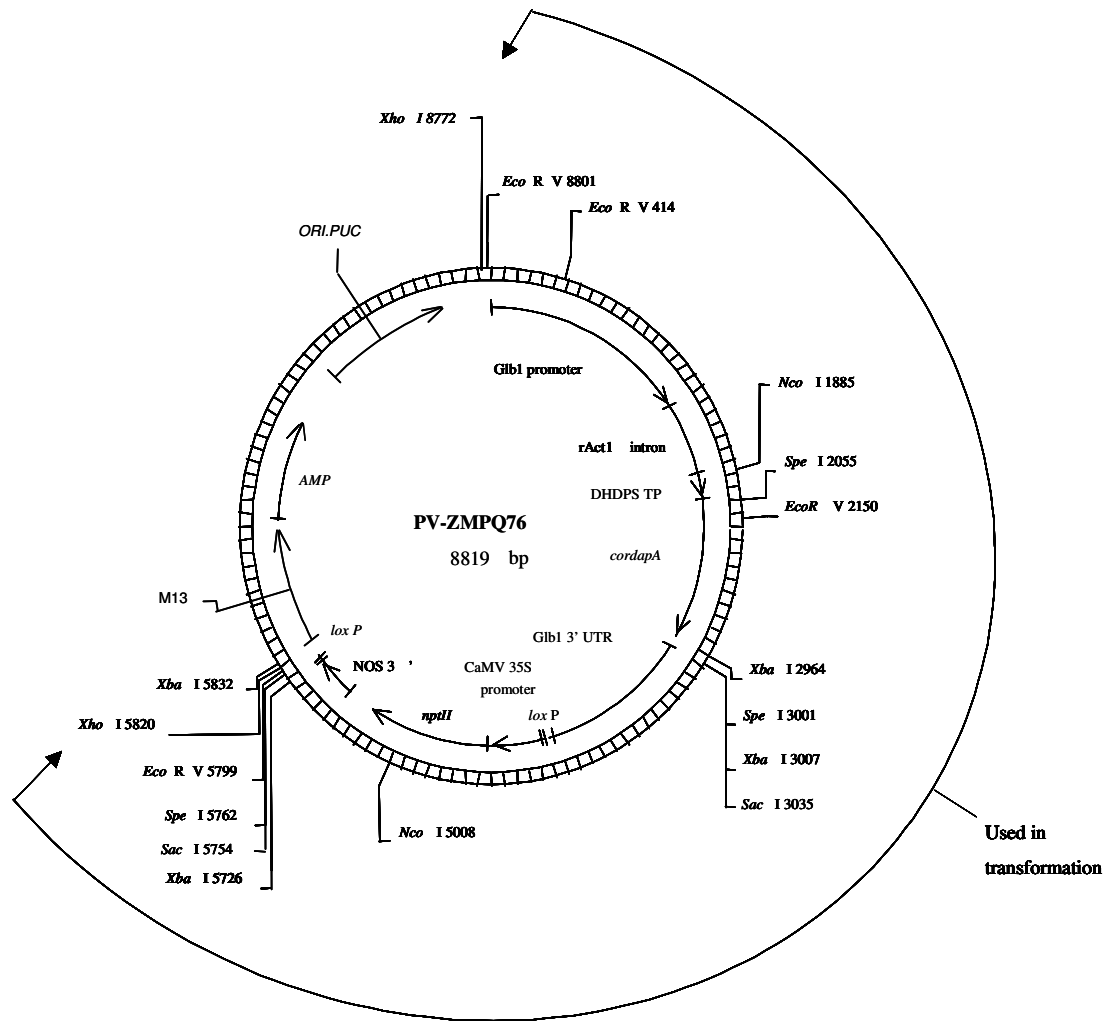


図 1 本組換えトウモロコシの作出に用いたプラスミド・ベクターPV-ZMPQ76 (旧表記名：PV-ZMCTB331)¹

上記の図中、制限酵素 *Xho*I で切断・精製した *AMP* 遺伝子領域のプラスミド外骨格領域を含まない PV-ZMPQ76 の線状プラスミド(図中の矢印で示した領域)が本組換えトウモロコシの作出に用いられた。

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 LY038 の作出に用いた PV-ZMPQ76(旧表記名：PV-ZMCTB331)の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
<i>cordapA</i> 遺伝子発現カセット	
Glb1 Promoter	トウモロコシの Globulin 1(Glb1)遺伝子由来のプロモーター領域で、目的遺伝子を主に穀粒で発現させる(文献 15)。
rAct1 intron	イネ・アクチン遺伝子由来のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 16)。
mDHDPS TP	トウモロコシのジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子の中で、DHDPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列(文献 17)。目的蛋白質を色素体へと輸送する。
<i>cordapA</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> のリシン生合成経路におけるジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子のコード領域で、リシンによるフィードバック阻害を受けない酵素をコードしている(文献 18)。
Glb1 3' UTR	トウモロコシの Globulin 1(Glb1)遺伝子由来の 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(文献 15)。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット(育成過程で Cre-lox システムにより除去している。)	
<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>loxP</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(文献 19)。
CaMV 35S promoter	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(文献 20)。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
<i>nptII</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする(文献 21)。この遺伝子がトウモロコシ中で発現するとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く。
<i>ble</i>	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部である(文献 22)が、ブレオマイシン耐性は付与しない。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアデニル化を誘導する(文献 23)。
その他の領域(LY038 には存在しない。)	
M13	バクテリオファージ M13 の複製開始点(文献 24)。バクテリオファージ中での複製を可能にする。
AMP	大腸菌(<i>E. coli</i>)由来の β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター領域及びコード領域で、大腸菌(<i>E. coli</i>)においてアンピシリン耐性を付与する(文献 25)
ORI.PUC	<i>E. coli</i> などの細菌で DNA の複製を可能にするプラスミド複製開始点(文献 25)。

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。

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

LY038 で発現するジヒドロジピコリン酸合成酵素(以下 cDHDPS と記載する) (*cordapA*) 遺伝子は、今日商業的にリシンを発酵製造する際に、一般に利用されているグラム陽性菌 *Corynebacterium glutamicum* より単離された遺伝子で、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードしており、その塩基配列及びアミノ酸配列は明らかにされている(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p18~19 参照)。なお、*cordapA* 遺伝子発現カセットのプロモーターには、目的遺伝子の発現を穀粒中で特異的に高めるためにトウモロコシ由来の *Glb1* 遺伝子の *Glb1* プロモーターが用いられている(文献 15)。また、*cordapA* 遺伝子には植物のアミノ酸生合成の場である色素体で機能するように、その上流にトウモロコシの mDHDPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列(mDHDPS TP)が組み込まれている(文献 17、p6 の図 1 及び p7 の表 1 参照)。

C. glutamicum 由来の cDHDPS は p9 の図 2 に示すように、アスパラギン酸セミアルデヒドとピルビン酸からジヒドロジピコリン酸を合成する反応を触媒する(文献 26; 文献 27)。

なお、cDHDPS 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、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

ジヒドロジピコリン酸はその後複数の酵素反応を経た後、最終的にリシンが合成される。その際、トウモロコシの内在性 mDHDPS は、リシン蓄積によってフィードバック阻害を受け、ジヒドロジピコリン酸の生成量の制御が起こるが、cDHDPS はリシン蓄積によるフィードバック阻害を受け難いため(文献 28)、ジヒドロジピコリン酸の生成量が高まる(p9 の図 2)。この結果、LY038 では、子実中の遊離リシン産生量が従来のトウモロコシよりも増えることになる(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p26、1-4 項参照)。また、遊離リシン産生量が増えることにより、リシンの代謝産物であるサッカロピンと α -アミノアジピン酸の量が増加する。

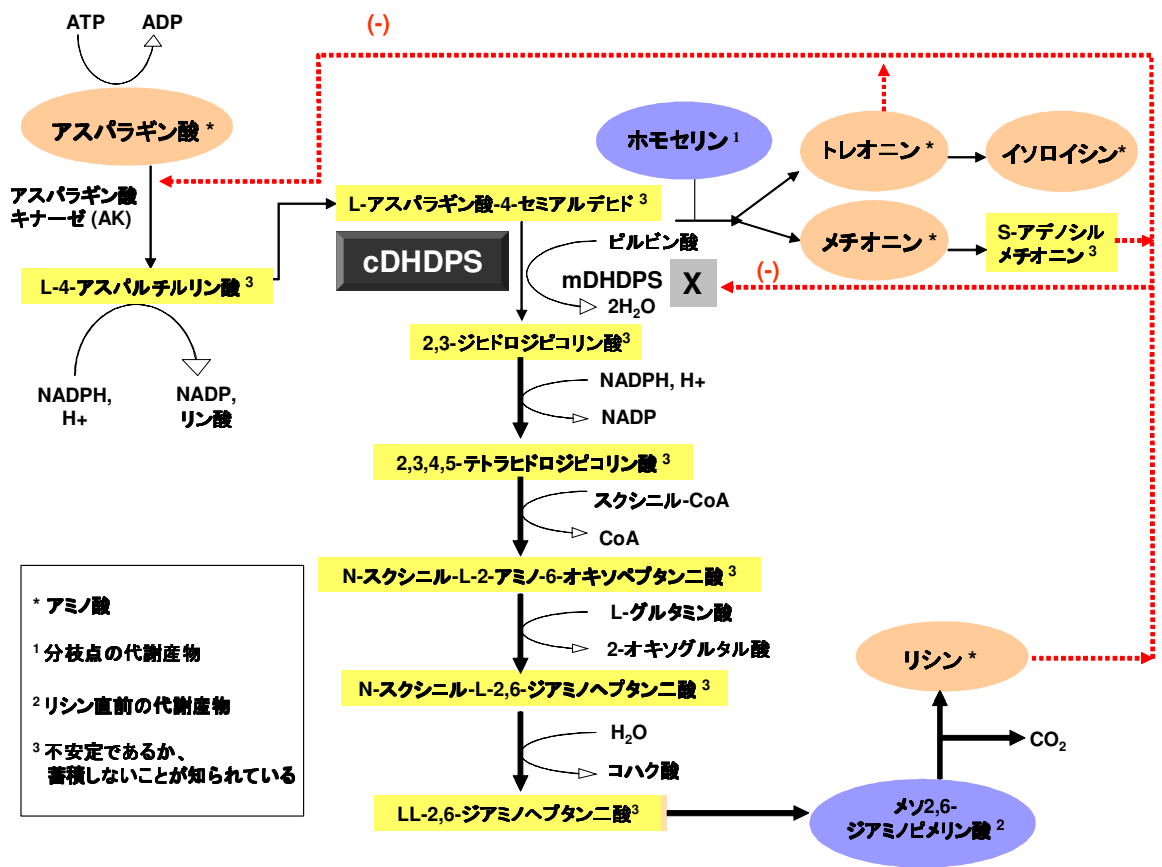


図 2 リシン合成経路³

(-); リシンによるフィードバック阻害

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。

cDHDPS の基質はアスパラギン酸セミアルデヒド(以下、ASA)とピルビン酸である。この cDHDPS の基質特異性について、他の微生物の DHDPS について得られている知見に基づき以下のように考察した。

(a) 大腸菌(*E. coli*)において DHDPS の一方の基質である ASA を他の類似化合物(グルタミン酸セミアルデヒド、N-アセチルアスパラギン酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒド、ジピコリン酸)に、また、もう一方の基質であるピルビン酸を他の類似化合物(オキサロ酢酸、ホスホエノールピルビン酸)にそれぞれ置き換えて DHDPS との反応を調べたところ、いずれの場合も DHDPS とは反応しなかった(文献 29)。同様に、*Bacillus licheniformis* において DHDPS の一方の基質である ASA を他の類似化合物(アスパラギン酸、ジピコリン酸、アデニル酸、アシルグリシン)に置き換えても DHDPS とは反応しなかった(文献 30)。以上のことから微生物の DHDPS と基質である ASA やピルビン酸との特異性は高いと考えられた。

(b) 表 2 (p11)に示すように DHDPS 蛋白質の動力的パラメーターが大きく異なるのは、cDHDPS がリシンによるフィードバック阻害を受けない点のみである。これと比較して K_m^{pyr} に関しては *C. glutamicum* と *E. coli* の間で、 K_m^{ASA} に関しては *C. glutamicum* と *Bacillus licheniformis* のとの間で、それぞれ動力的パラメーターが同程度であると考えられた。

(c) すでに明らかにされている *E. coli* の DHDPS の構造(文献 31; 文献 32; 文献 33)と cDHDPS の構造(文献 34)を比較したところ、基質結合部位はいずれも同じであり、また三次構造も互いに類似していた。

以上の(a)~(c)より、cDHDPS の基質特異性も他の微生物由来の DHDPS と同様に高いと考えられた。

表 2 DHDPS 蛋白質の動力的パラメーター⁴

DHDPS 蛋白質の由来	動力的パラメーター		
	K_m^{pyr} (mM)	K_m^{ASA} (mM)	IC_{50}^{Lys} (mM)
<i>E.coli</i> ¹	0.20	0.12	~0.40
<i>Bacillus licheniformis</i> ²	n/d	0.765	n/d
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ³	0.32	0.70	659

K_m^{pyr} : 酵素反応における初速度が最大速度 V_{max} の 1/2 になる時の基質(ここではピルビン酸)の濃度。この値が小さいほど基質への親和性が高い⁴。

K_m^{ASA} : 酵素反応における初速度が最大速度 V_{max} の 1/2 になる時の基質(ここでは ASA)の濃度。

IC_{50}^{Lys} : アンタゴニスト単独による反応を 50%阻害するアンタゴニストの濃度⁵、ここではリシンによって各 DHDPS が 50%フィードバック阻害を受けるリシンの濃度。

¹ 文献 29, ² 文献 30, ³ 文献 34, ^{4,5} 文献 35

n/d – not determined

一方、LY038 の作出において、形質転換細胞の選抜マーカー遺伝子として、*nptII* (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II : neomycin phosphotransferase type II) 遺伝子が用いられたが、後述するように LY038 の後代では、*nptII* 遺伝子発現カセット領域は存在しない(p28 の第一 2(4) 参照)。なお、その遺伝子の発現した産物であるネオマイシンフォスホトランスフェラーゼ II (NPTII) は、ATP を利用してカナマイシン及びネオマイシン並びにパロモマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質をリン酸化して不活化する。

【MON810 の供与核酸に関する情報】

イ 構成及び構成要素の由来

MON810 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、p12 の図 3 及び p13 の表 3 に記載したとおりである。

ロ 構成要素の機能

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

MON810 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、p13 の表 3 に示したとおりである。

⁴ 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。

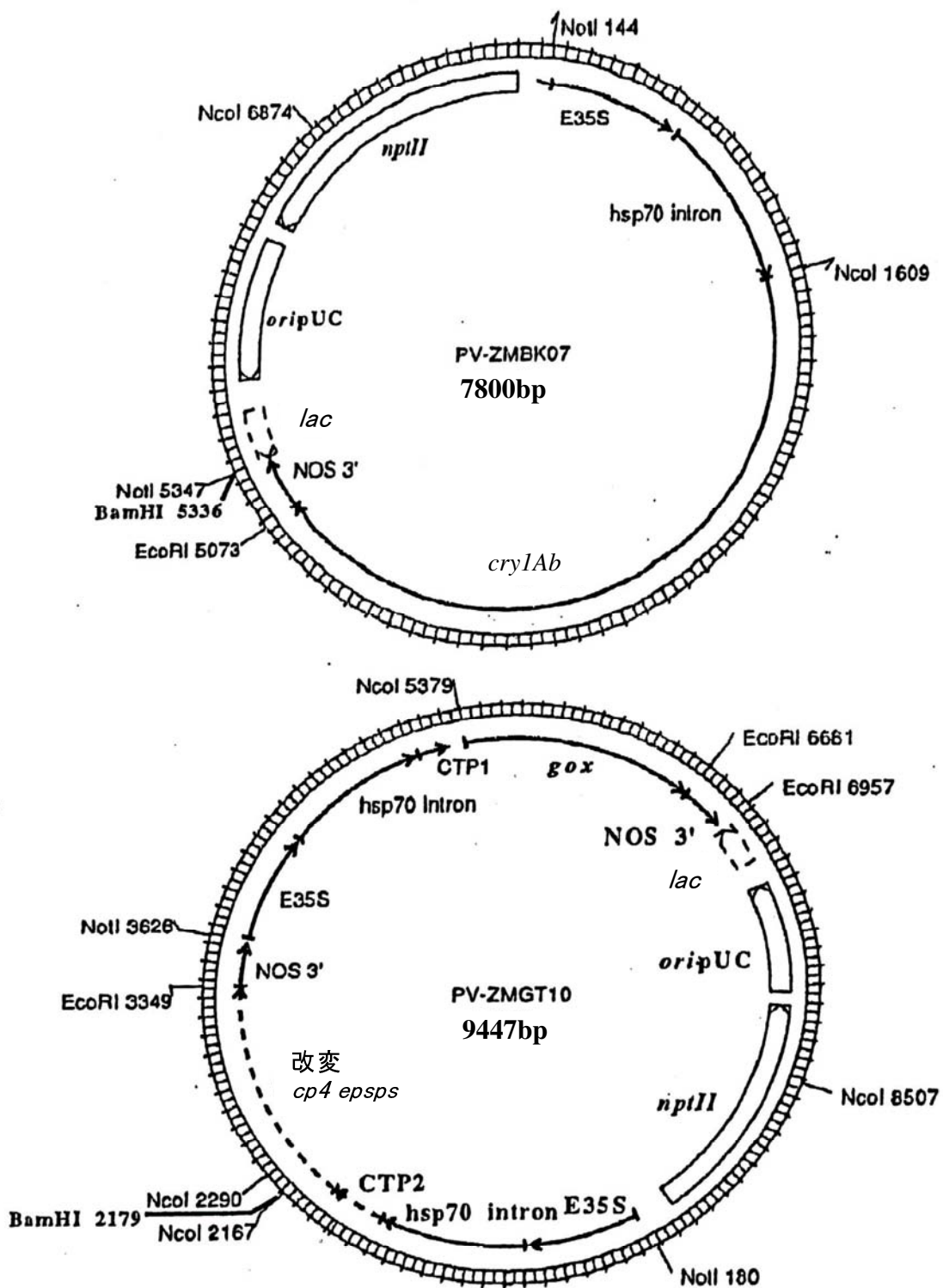


図 3 MON810 の作出に用いたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 ⁵

⁵ 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 3 MON810 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の各構成要素・由来及び機能⁶

構成要素	由来及び機能
<i>cry1Ab</i> 遺伝子カセット	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 20)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 36)。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質(heat shock protein)遺伝子のイントロン。hsp70 intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 37)。
<i>cry1Ab</i>	土壤中に存在する <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の Cry1Ab 蛋白質をコードする遺伝子(文献 38)。機能の詳細については p14 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (文献 39)。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 20)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 36)を持つ。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 37)。
CTP2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である(文献 40)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ目的蛋白質を輸送する。なお、この領域の上流には、シロイヌナズナ中で EPSPS 蛋白質をコードする <i>epsps</i> 遺伝子由来の 67bp の非翻訳領域が存在する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(文献 41; 文献 42)。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (文献 39)。
<i>gox</i> 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 20)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 36)。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 37)
CTP 1	シロイヌナズナ由来の rubisco の small subunit 1A 遺伝子の中で、rubisco small subunit 1A の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である(文献 43)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ目的蛋白質を輸送する。
<i>Gox</i>	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素(glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) 由来の変異体 v247 の C 末端をコードする配列(文献 44)。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を集結させ、ポリアデニル化を誘導する (文献 39)。
それ以外の構成要素(PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通)(MON810 中には挿入されていなかった)	
<i>Lac</i>	β -D-ガラクトシダーゼ又は Lac 蛋白質の部分的コード配列(文献 45)。 β -ガラクトシドを分解して β -ガラクトースを生成する。
ori-pUC	大腸菌プラスミド pUC (文献 55)の複製開始領域を含むセグメント。大腸菌プラスミドの複製を開始する。
<i>nptII</i>	原核生物のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホストトランスフェラーゼ II をコードする。この遺伝子が微生物内で発現されるとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く(文献 21)。

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は帰属する。

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

MON810 でチョウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である *cry1Ab* 遺伝子は、土壌中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、コードされる Cry1Ab 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫である European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) に対する殺虫活性を有する(文献 46)。European corn borer の食害部位は植物体地上部全般である。Cry1Ab 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す(文献 47; 文献 48)。*B.t.* 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能していると考えられた。

Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目昆虫にのみ殺虫活性を示し、チョウ目以外の昆虫に対しては殺虫活性を持たない。また、この Cry1Ab 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培における重要害虫であるチョウ目の European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*), Southern cornstalk borer (*Diatraea crambidoides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), Stalk borer (*Papaipema nebris*) に対して殺虫活性を示すことが知られている(文献 49; 文献 50; 文献 51; 文献 52; 文献 53)。これらの内、*O. nubilalis* と同属の *O. furnacalis* は日本のトウモロコシ栽培における主要チョウ目害虫として知られている(文献 54)。

Cry1Ab 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、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて比較したところ、既知アレルゲンとの類似性は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

LY038 の作出に用いられたベクターは、pGEM (Promega Corporation, Madison, WI) をもとに構築された。

MON810 の作出に用いられたベクターは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pUC119 などをもとに構築された(文献 55)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

LY038 の作出に用いられた PV-ZMPQ76 の全塩基数は、8,819 bp である。本プラスミド・ベクターの全塩基配列は、LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 2 に示した。

MON810 の作出に用いられた PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の全塩基数はそれぞれ、7,800 bp、9,447 bp である。*cry1Ab* 遺伝子の塩基配列は MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p808(2 枚目)の FIGURE 1 に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

LY038 の作出に用いられた PV-ZMPQ76 は選抜マーカー遺伝子として、*E. coli* のアンピシリン耐性を付与する β -ラクタマーゼを発現する *AMP* 遺伝子を持つ(文献 25)。

MON810 の作出に用いられた PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 はいずれも選抜マーカー遺伝子としてカナマイシン／ネオマイシン耐性遺伝子(*nptII* 遺伝子)を持つ(文献 21)。

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

PV-ZMPQ76, PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の感染性はいずれも知られていない。

(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

LY038 の作出のために構築されたプラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 は、*E. coli* のプラスミドの構築・選抜及び維持・増殖のために必要な選抜マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性を付与する β -ラクタマーゼを発現する *AMP* 遺伝子領域が含まれるが、遺伝子導入には *cordapA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子の発現に必要な DNA 領域を、PV-ZMPQ76 から制限酵素 *XhoI* で切断・精製した線状プラスミドを用いている(p6 の図 1 参照)。したがって、宿主内に移入された線状プラスミドにおいて、*AMP* 遺伝子を含むプラスミド外骨格領域は含まれていない。

この制限酵素 *Xho*I で切断・精製した線状プラスミドは、*cordapA* 遺伝子発現カセット([*Glb1*Promoter]-[*rAct1* intron]-[*mDHDPS* TP]-[*cordapA*]-[*Glb1* 3' UTR])と *nptII* 遺伝子発現カセット([*loxP*]- [CaMV 35S Promoter]-[*nptII*]-[*ble*]-[NOS 3']-[*loxP*])から構成される。なお、*nptII* 遺伝子発現カセットの両端の *loxP* は、バクテリオファージ P1 由来のトポイソメラーゼである Cre リコンビナーゼによって認識される塩基配列である(p7 の表 1 参照)。

MON810 の作出には、*nptII* 遺伝子を持つ pUC119 由来のベクターを元に、① *cryIAb* 遺伝子カセット ([E35S]-[*hsp70* intron]-[*cryIAb*]-[NOS3']) を連結したプラスミド PV-ZMBK07、ならびに② 改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセット ([E35S]-[*hsp70* intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS3']) と *gox* 遺伝子カセット ([E35S]-[*hsp70* intron]-[CTP1]-[*gox*]-[NOS3']) を連結したプラスミド PV-ZMGT10 を構築し、この 2 つをベクターとして用いた。なお、PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 のプラスミドマップは、図 3(p12)に記載した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

LY038 の作出では、制限酵素 *Xho*I で切断・精製した *AMP* 遺伝子領域のプラスミド外骨格領域を含まない PV-ZMPQ76 の、*cordapA* 遺伝子発現カセット([*Glb1* Promoter]-[*rAct1* intron]-[*m-DHDPS* TP]-[*cordapA*]-[*Glb1* 3' UTR])と *nptII* 遺伝子発現カセット([*loxP*]-[CaMV 35S Promoter]-[*nptII*]-[*ble*]-[NOS 3']-[*loxP*])から構成される線状プラスミドを、パーティクルガン法によって、デント種に属する自殖系統である H99 に導入した。

MON810 の作出では、プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の混合物をパーティクルガン法によって、デント種に分類される自殖系統 A188 X B73 の F2 世代に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【LY038 の育成の経過】

①核酸が移入された細胞の選択の方法

遺伝子を導入したカルスを、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、カナマイシン等と同じアミノグリコシド系抗生物質であるパロモマイシンを添加した培地で形質転換細胞の選抜を行い、選抜カルスから植物体を再分化させ、*cordapA* 遺伝子由来の *cDHDPS* 蛋白質を発現する再生個体を選抜した。

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

LY038 ではパーティクルガン法によってプラスミドを導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

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

パロモマイシン添加培地上で再生させた個体の中から[社外秘]を選抜し、これを生育させた後、従来品種[社外秘]の自殖系統と交配させた雑種後代を作出した(p20 の図 4 の[社外秘])を作出した。次に導入遺伝子中の *nptII* 遺伝子発現カセット領域を取り除くことを目的として、この雑種後代([社外秘])と他の組換えトウモロコシ(Cre event)と交配して[社外秘]世代を作出した。この Cre event では、*cre* 遺伝子発現カセットよりバクテリオファージ P1 由来のトポイソメラーゼである Cre リコンビナーゼを発現する。

Cre リコンビナーゼは LY038 作出に用いた線状プラスミドに存在する *loxP* 塩基配列中の組換え部位を認識して切断するため、導入遺伝子中の *nptII* 遺伝子カセット領域を削除することが出来る(p23 の図 6)。この Cre-*lox* システムを用いて植物においてターゲットとする遺伝子を除去する方法は、トウモロコシ、タバコ、トマトで行われており、ターゲットとする遺伝子が正確に除去されていることが確認されている(文献 56; 文献 57; 文献 58; 文献 19)。その後自殖を行うと、[社外秘]世代の植物体には *cre* 遺伝子を持つ個体と持たない個体の両者が存在するため、サザンブロット法及び PCR 法により、*cre* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*cordapA* 遺伝子の有無を確認した。この時点で *cordapA* 遺伝子のみを持つ個体を選抜し、それ以外の個体(すなわち *cre* 遺伝子または *nptII* 遺伝子のどちらか一方でも持つ個体及び *cordapA* 遺伝子を持たない個体)は、開花前に廃棄した。

したがって、[社外秘]世代以降の LY038 中には *cre* 遺伝子と *nptII* 遺伝子を持つ個体は存在しない。LY038 の商品化系統の作出においては、上記の[社外秘]世代における選抜個体の自殖により *cordapA* 遺伝子をホモ化した[社外秘]を育種母本として用いた(p20 の図 4)。

この[社外秘]世代を自殖あるいは従来品種と掛け合わせることにより、きょうだい系統を作出した。これらきょうだい系統を自殖あるいは従来品種と掛け合わせることにより作出した雑種をほ場試験や遺伝子解析に供試した(試験に用いた世代の詳細については p20 の図 4 参照)。

LY038 の承認申請の対象は、[社外秘]世代で選抜された *cordapA* 遺伝子カセットのみを有する分離個体とその後代である。

また、Cre event の作出に用いた PV-ZM003 のプラスミド図を p21 の図 5 に、PV-ZM003 の構成要素の由来と機能は p22 の表 4 に示した。さらに、Cre event の作出における DNA の導入では、アグロバクテリウム法を用いて PV-ZM003 の *cre* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域をトウモロコシ細胞に導入した。なお、残存するアグロバクテリウム除去のためカルベニシリンを(文献 59)、形質転換されていない個体除去のためパロモマイシンを、それぞれ培地に添加して培養を行った。

【Cre event の分子分析】

Cre event の挿入遺伝子を解析するために、[社外秘]世代に Cre event を掛け合わせた一代目である[社外秘]世代において、サザンブロット分析を行った。その結果、Cre event のゲノム DNA 中には、*cre* 遺伝子発現カセットと *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域が 1 コピー、そして *nptII* コード領域と NOS 3' からなる遺伝子断片が 1 コピー存在することが明らかとなった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の Figure 6 (p14)~Figure 13 (p21))。また、Cre event の作出に用いられた PV-ZM003 の T-DNA 領域以外の領域については Cre event 中に挿入されていないことが確認された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の Figure 13 (p21))。

さらに、この Cre event における T-DNA 領域 1 コピーと *nptII* コード領域と NOS 3' からなる遺伝子断片 1 コピーは、いずれも[社外秘]以降の後代には存在しないことを複数世代のサザンブロット分析によって確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p22 Figure 14)。また、PV-ZM003 の T-DNA 領域以外の領域が存在しないことも複数世代のサザンブロット分析によって確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p61 の Figure 22)。本サザンブロット分析の詳細は LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 に記載した。

【Cre event の生育特性】

Cre event (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 5 の *cre* positive isoline)の生育特性について、2001 年に 9 項目(初期苗立ち数、播種後 21 日目の生育程度、最終苗立ち数、稈長、50%絹糸抽出期播種後日数、挫折型倒伏株割合、転び型倒伏株割合、不毛株割合、100 粒重)を調査した。対照には、自殖の際に分離した挿入遺伝子を含まない個体(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 5 の *cre* negative isoline)を用いた。その結果、いずれの調査項目においても、*cre* positive isoline と *cre* negative isoline との間で統計学的有意差は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 5 の Table 1)。

以上の結果から、cre positive isoline の生育特性は対照の cre negative isoline と同等であると考えられた。

LY038 のわが国における申請状況は以下のとおりである。

- 2003 年 4 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画(栽培を含む)は同指針に適合していることが確認された。
- 2005 年 2 月 厚生労働省に「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2005 年 3 月 農林水産省に「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2006 年 1 月 農林水産省及び環境省に「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」に基づく第一種使用規程承認申請を行った。

[社外秘につき非開示]

図 4 高リシントウモロコシ LY038 の育成図

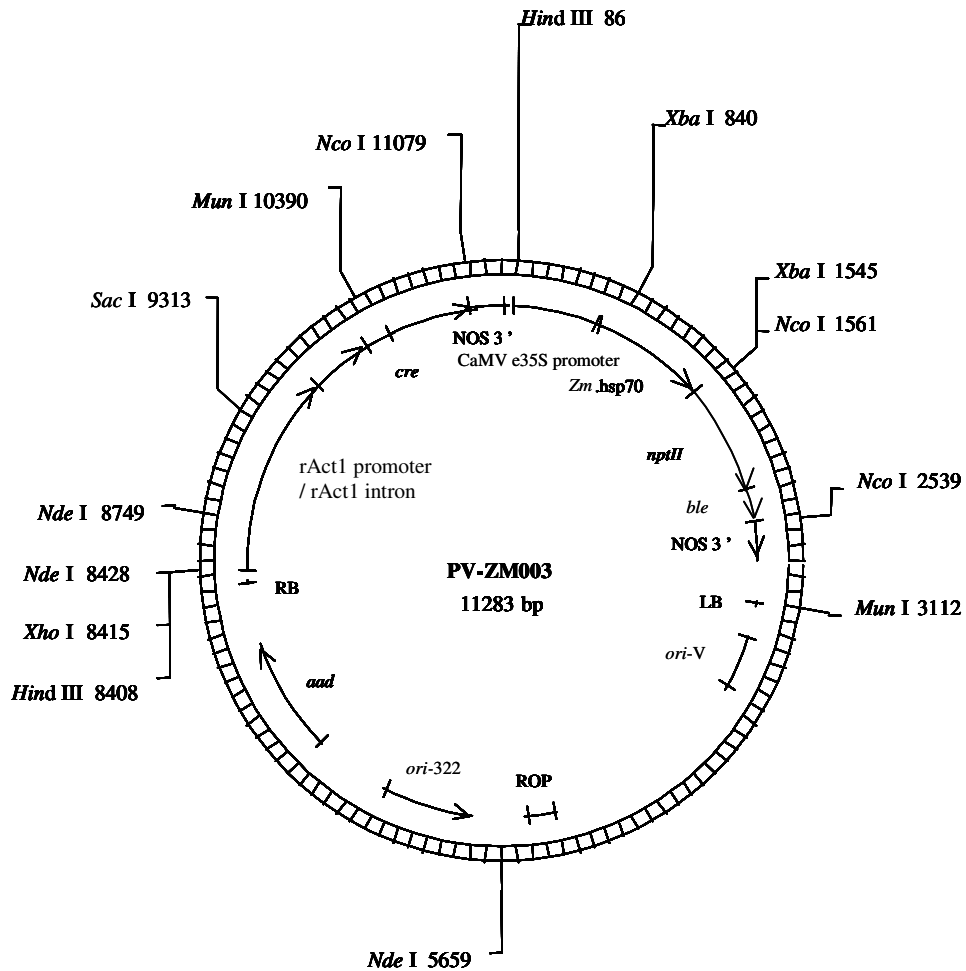


図 5 Cre event の作出に用いられた PV-ZM003⁷

RB(右境界配列)から LB(左境界配列)までの領域をアグロバクテリウム法によってトウモロコシ細胞に導入し、Cre event が作出された。なお、Cre event の作出に用いられたこの PV-ZM003 由来の T-DNA 領域(*cre* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセット)及びその他の領域が LY038 に存在しないことは、サザンブロット分析により確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p53 の Figure 14~p57 の Figure 18、LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p22 の Figure 14)。

⁷ 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 4 Cre event の作出に用いた PV-ZM003 の各構成要素の由来及び機能⁸

構成要素	由来及び機能
<i>cre</i> 遺伝子発現カセット(LY038 には存在しない。)	
rAct1 promoter/ rAct1 intron	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域及びイントロン。プロモーター領域は目的遺伝子を全身で恒常的に発現させる(文献 16)。イントロンはスプライシングの効率を高めることによって目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 16; 文献 60)。
<i>cre</i>	バクテリオファージ P1 のトポイソメラーゼ Cre リコンビナーゼ(rec3) 遺伝子のコード領域(文献 61)。リコンビナーゼが 2 つの loxP 部位(p11 の表 2)を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(文献 62)。
NOS 3'	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアダニル化を誘導する(文献 23)。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット(LY038 には存在しない。)	
CaMV e35S promoter	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域で(文献 20)、エンハンサー領域(文献 63)を含む。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
Zm.hsp70	トウモロコシの <i>hsp 70</i> 遺伝子のイントロンで、遺伝子の転写レベルを一定に保つ(文献 37)。
<i>nptII</i>	大腸菌(<i>E. coli</i>)のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホストランスフェラーゼ II をコードする(文献 21)。この遺伝子がトウモロコシ中で発現するとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く。
<i>ble</i>	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部である(文献 22)が、ブレオマイシン耐性は付与しない。
NOS 3'	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアダニル化を誘導する(文献 23)。
その他の領域(LY038 には存在しない。)	
LB	Ti プラスミド pTi15955 に由来する左境界配列の DNA 断片(文献 64)。左境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。
<i>ori-V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された ABI <i>Agrobacterium</i> の一部分であり(文献 65)、ベクターに自律増殖能を付与する。
ROP	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数維持のためのプライマー蛋白質を抑制するコード配列(文献 66)。
<i>ori-322</i>	pBR322 に由来する複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> 内でプラスミドを維持する(文献 25)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 由来の、アミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター及びコード領域。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する(文献 67)。(GenBank accession X03043)
RB	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列の DNA 断片。右境界配列は、 <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(文献 68)。

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は帰属する。

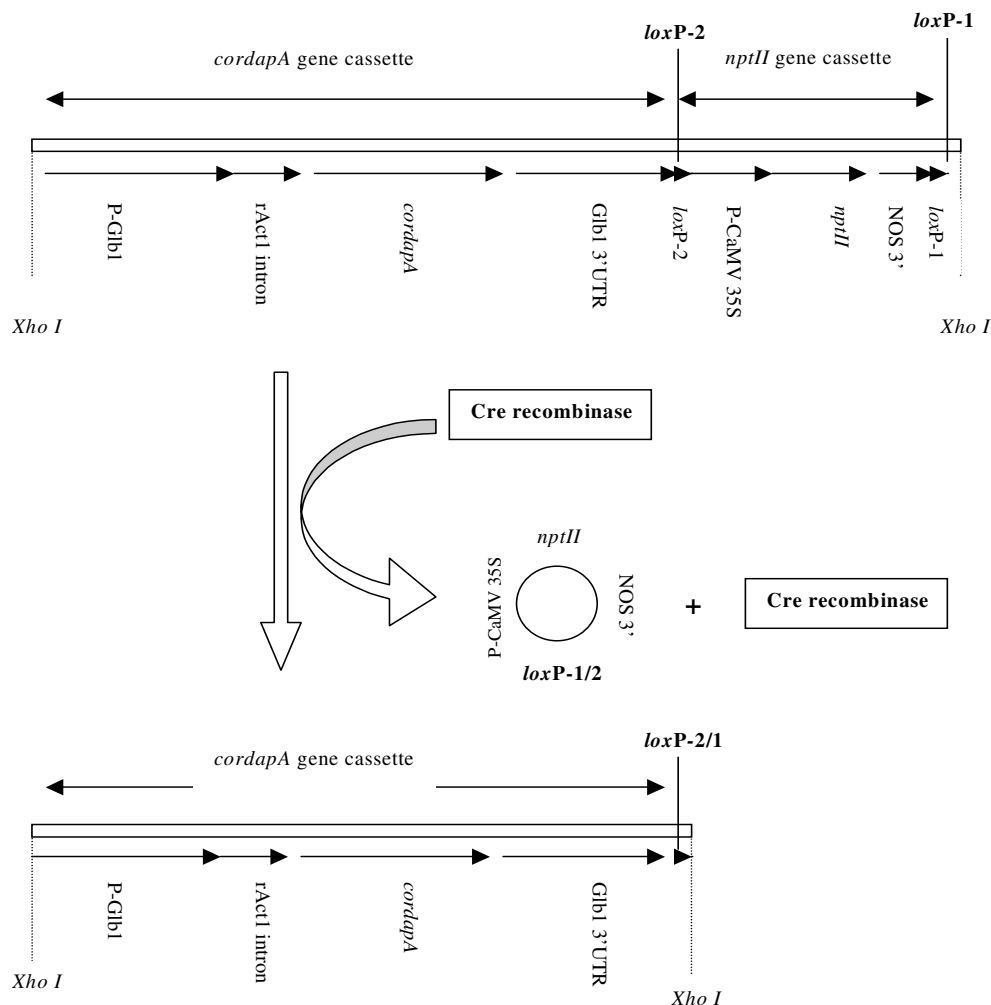


図 6 Cre-loxP による *nptII* 遺伝子発現カセット除去の模式図⁹

PV-ZMPQ76(p6 の図 1)の *Xho I*₈₇₂₂ から時計回りに *Xho I*₅₈₂₀ までの領域約 5.9 kb を形質転換によってトウモロコシゲノム中に組み込んだ。形質転換体を *cre* 遺伝子カセットを含む個体と交配させることにより、*nptII* 遺伝子カセットが除去される。図に示した環状 *nptII* 遺伝子カセット及び *Cre* リコンビナーゼはその後の自殖によって除去される。[社外秘]世代の植物体には *cre* 遺伝子を持つ個体と持たない個体の両者が存在するため、PCR 法並びにサザンプロット法により、*cre* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*cordapA* 遺伝子の有無を確認した。この時点で *cre* 遺伝子と *nptII* 遺伝子を持たず、かつ *cordapA* 遺伝子を持つ個体のみを選抜し、それ以外の個体(すなわち *cre* 遺伝子または *nptII* 遺伝子を持つ個体及び *cre* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子を持つ個体)は、開花前に廃棄した。その結果、LY038 に導入されたのは *cordapA* 遺伝子と *loxP* 1/2 部位のみとなり、*nptII* 遺伝子カセット及び *cre* 遺伝子カセットは LY038 には存在しない。このことはサザンプロット分析で確認している。

Cre-loxP 組換え系の機構については既に明らかにされており(文献 62; 文献 69; 文献 56)、以下に概要を記載する。*Cre-loxP* 組換え系は 38.5 kDa の *Cre* リコンビナーゼ及び除去したい直鎖状 DNA の両端に連結された二つの *loxP* 認識配列から成る。各 *loxP* 配列は、8 bp のスペーサー配列を 13 bp の逆方向反復配列 2 つが挟み込む合計 34 bp からなる(文献 70)。*Cre* リコンビナーゼが 13 bp の逆方向反復配列を認識し、各 *loxP* 部位の真ん中に存在する 8 bp のスペーサー配列間の組換えを触媒する。その結果、除去したい直鎖状 DNA の両端に各 *loxP* 部位の半分が連結した状態で直鎖状 DNA が環状になって切り出され、ゲノム上には各 *loxP* 部位の残りの半分(*loxP*-1/2)が残る。

⁹ 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。

【MON810 の育成の経過】

①核酸が移入された細胞の選択の方法

PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、グリホサートを含む培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て Cry1Ab 蛋白質の発現を解析した。なお、MON810 のサザンブロットによる挿入遺伝子解析の結果、*nptII* 遺伝子、改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された(MON810 生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p22 の図 4)。MON810 に改変 *cp4 epsps* 遺伝子が挿入されていなかったにもかかわらずグリホサートで選抜されたのは、再分化個体([社外秘])の次世代([社外秘])で挿入遺伝子に関して分離が起きたためである可能性が考えられた。しかし、MON810 は害虫抵抗性トウモロコシとして選抜が進められ、再分化個体の次世代でグリホサート検定及びサザンブロット分析は行われなかったため、理由は特定されなかった。

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

MON810 ではパーティクルガン法によってプラスミドを導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

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

1992 年より系統選抜の評価を開始し、1993～1995 年にかけてほ場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。そして、1994 年に行った米国 6 ヶ所のほ場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、Cry1Ab 蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行った(試験に用いた系統については p25 の図 7 を参照)。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて 1997 年から一般商業栽培が実施されている。MON 810 の承認申請の対象は、[社外秘]世代で選抜された *cry1Ab* 遺伝子カセットを有する個体とその後代である。

[社外秘につき非開示]

図 7 MON810 の育成図

MON810 のわが国における認可状況は以下のとおりである。

- 1996年3月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画（加工用及び飼料用としての利用）は同指針に適合していることが確認された。
- 1996年10月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、同指針に適合していることが確認された。
- 1997年5月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第4章」に基づき、食品利用について、同指針に適合していることが確認された。
- 1997年6月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用について、同指針に適合していることが確認された。
- 2001年3月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」に基づき、食品利用としての安全性が確認された。
- 2001年5月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画（栽培を含む）は同指針に適合していることが確認された。
- 2003年3月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性が確認された。
- 2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、同指針に適合していることが確認された。
- 2004年6月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程の承認を受けた。(食用また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ついて)

【LY038×MON810の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、LY038 と MON810 の自殖系統を交雑育種法を用いて作出した(図 8, p27)。

[社外秘につき非開示]

図 8 本スタック系統トウモロコシ LY038×MON810 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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

LY038 の挿入遺伝子はメンデルの法則にしたがって次世代に遺伝していることから、染色体上に存在する(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 7)。

MON810 の挿入遺伝子はメンデルの法則にしたがって次世代に遺伝していることから、染色体上に存在する(別添資料 1)。

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

LY038 のサザンブロット解析の結果、ゲノム中の 1ヶ所に 1 コピーの完全な *cordapA* 遺伝子発現カセットが組み込まれていることが確認された (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p32 及び p39~43 及び LY038 生物多様性影響別添資料 4 の p44~48 参照)。また、*nptII* 遺伝子発現カセット領域、プラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 のその他の領域、及び、[社外秘]世代で交配に用いた組換えトウモロコシ Cre event(作出に用いた PV-ZM003 を p21 の図 5 に、PV-ZM003 の構成要素の由来と機能を p22 の表 4 に示した)に由来する T-DNA 領域(*cre* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセット)及びその他の領域は存在しないことが確認された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p32 及び p44~52、LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p49~57、及び LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 参照)。さらに挿入遺伝子は複数世代において安定的に遺伝していることも示された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p58 の Figure 19 及び p59 の Figure 20)。Cre event に由来する T-DNA 領域については複数世代を経過した後も調査を行い、検出されないことを確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p22)。また、PV-ZM003 の T-DNA 領域以外のその他の領域が存在しないことも複数世代のサザンブロット分析によって確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p61)。LY038 における挿入遺伝子の模式図を、p30 の図 9 に示した。

MON810 のサザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON810 のゲノムの 1ヶ所に 1 コピーの *cryIAb* 遺伝子発現に必要な PV-ZMBK07 由来の DNA 断片が組み込まれていることが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p21 の図 3)。この解析結果及び塩基配列の解析結果から明らかになった挿入遺伝子の模式図を図 10 (p31)に示した。また、挿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(p20 の図 4 の右肩に ^d印のついた世代)におけるサザンブロット分析によって示された(MON810 の生物多様性影響評価書別添資料 2 の p26 の図 6 及び別添資料 3 の p37 の図 2)。

なお、MON810 のサザンブロット分析による挿入遺伝子解析の結果、トウモロコシのゲノム中に挿入されたのは PV-ZMBK07 由来の *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子や PV-ZMGT10 由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子と *gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p22 の図 4 及び p23 の図 5)。MON810 における挿入遺伝子の模式図を、p31 の図 10 に示した。

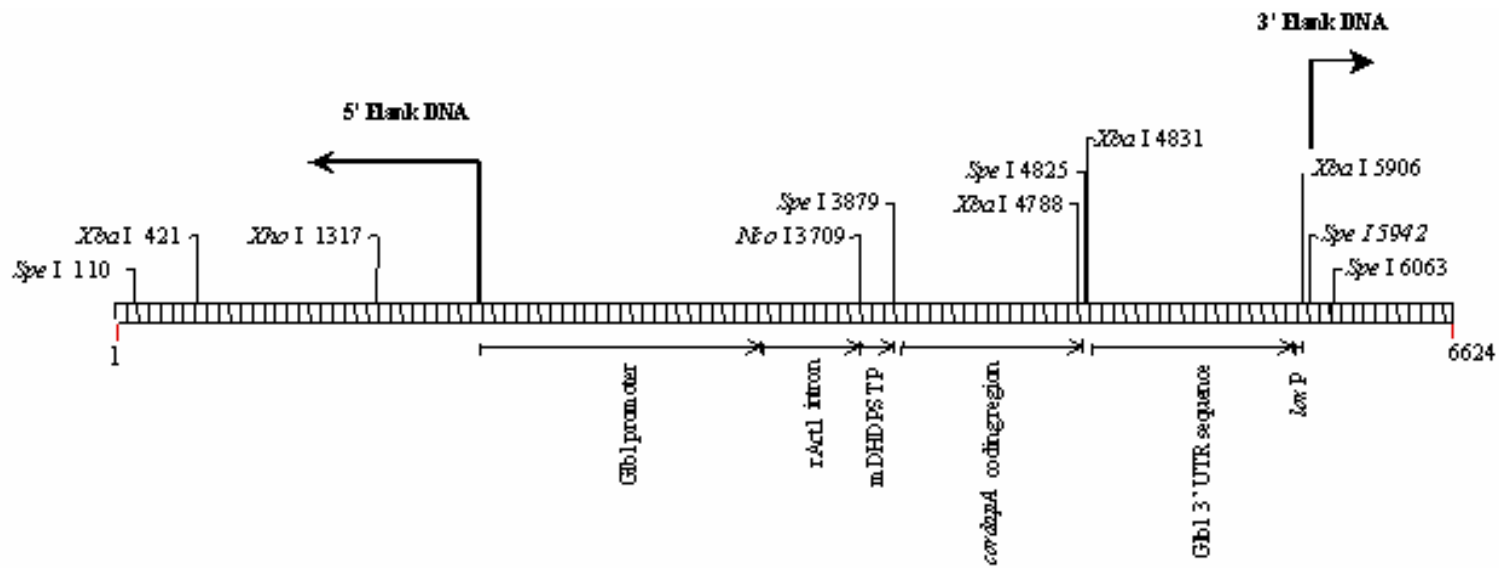


図 9 LY038 の挿入遺伝子地図の模式図及び制限酵素切断模式図¹⁰

¹⁰ 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。

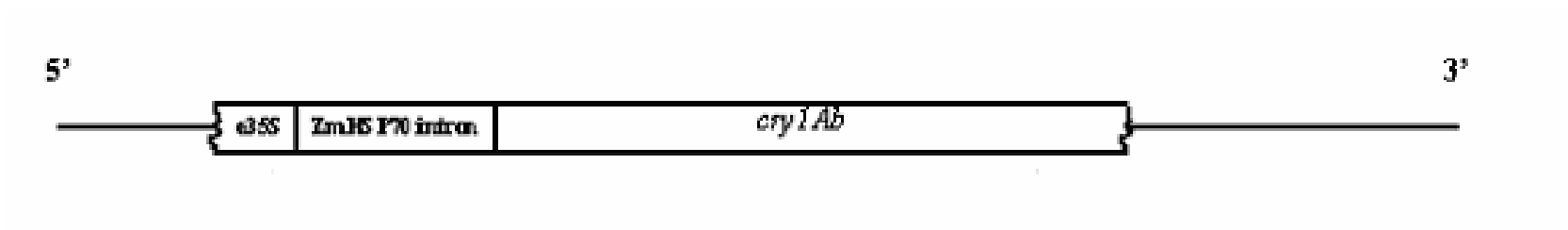


図 10 MON810 の挿入遺伝子地図¹¹

¹¹ 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。

ハ 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

LY038、MON810 とともに 1 コピーなので該当しない。

ニ (6)のイ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

LY038 の複数の世代種子から蛋白質を抽出し、cDHDPS 蛋白質に特異的なポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット分析を行なった。その結果、ウエスタンブロット分析を行ったすべての世代種子で cDHDPS 蛋白質の分子量と一致するバンドが示され、目的とする形質が安定的に発現していることが確認された (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p5 の図 3 参照)。

MON810 においては、チョウ目害虫への抵抗性を複数世代で安定して発現していることを生物検定により選抜の過程で確認した。

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

LY038 の作出に用いられた PV-ZMPQ76、及び MON810 の作出に用いられた PV-ZMBK07、PV-ZMBK10 は自律増殖が可能な宿主域が *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、自然界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

LY038 を検出及び識別するための方法としては、挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより、LY038 を特異的に検出可能である (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p63～68 参照)。

MON810 の検出及び識別するための方法としては、農林水産省のホームページ (http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm) に標準分析法が公表されている (MON810 生物多様性影響評価書の別添資料 4)。

本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するためには、上記の方法をトウモロコシの種子一粒ごとに行う必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統トウモロコシは親系統である LY038 と MON810 に挿入された遺伝子により、cDHDPS 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。

第一の 2(1)口で述べたとおり、LY038 で発現する cDHDPS 蛋白質は基質特異性が高いと考えられることから、リシン合成経路におけるリシン及びその二次代謝産物であるサッカロピンと α -アミノアジピン酸の量が増加する以外、その他の代謝経路が影響を受けることはないと考えられた。LY038 の成分分析において、遊離リシン及びその二次代謝産物であるサッカロピンと α -アミノアジピン酸の量が従来品種の変動の範囲を超えて増加した以外はいずれの成分も従来品種の変動の範囲におさまっていたこと、LY038 の形態・生育特性試験において対照の Null 型個体と比べて特に差異は認められなかったことは、上記の結論を支持しているものと考えられた。

一方、MON810 系統で発現する Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能しているため、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられた。MON810 の成分分析において、いずれの成分も従来品種の変動の範囲におさまっていたこと、MON810 の形態・生育特性試験において対照の非組換えトウモロコシと比べて特に差異は認められなかったことは、上記の結論を支持しているものと考えられた。

以上のように本スタック系統の親品種である LY038 は宿主の代謝系の一部であるリシン合成経路に改変を加えているが、もう一方の親品種である MON810 中で発現する Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系に影響を与えないことから、LY038 と MON810 を交雑育種法により掛け合わせたとしても、cDHDPS 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質が相互に影響を与えることはなく、本スタック系統トウモロコシにおける遊離リシン量及びチョウ目害虫抵抗性は、親系統である LY038 や MON810 と比較して変化は生じないと考えられた。

実際に確認するため、本スタック系統トウモロコシに含まれる遊離リシン濃度の分析をアルゼンチンで行った。その結果、本スタック系統トウモロコシの遊離リシンの濃度は cDHDPS 蛋白質を単独で発現する LY038 と比較して統計学的有意差はないことが確認された (表 5, p34)。また、チョウ目害虫抵抗性についてはアルゼンチンのトウモロコシ栽培におけるチョウ目害虫である Corn earworm (*Helicoverpa zea*)を対象として生物検定を行った。その結果、本スタック系統トウ

モロコシの Corn earworm による食害は Cry1Ab 蛋白質を単独で発現する MON810 と比較して統計学的有意差はないことが確認された(表 6, p34)。

以上の結果から、本スタック系統トウモロコシ中で発現するこれらの蛋白質は、それぞれ独立して作用していると考えられた。よって、第二の項目ごとの生物多様性影響評価の際に用いる本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの相違に関する情報については、以下に示す LY038、MON810 の諸形質を個別に調査した結果を引用することとした。

表 5 本スタック系統トウモロコシの成分分析による穀粒中の遊離リシン濃度($\mu\text{g/g dwt}$)の調査結果¹²

	遊離リシン濃度 ($\mu\text{g/g dwt}$) (平均値 \pm S.E.)
LY038×MON810	1,515 \pm 50
LY038	1,439 \pm 50
LY038(-)	25 \pm 53

アルゼンチンの 4 カ所のほ場から穀粒を収穫して成分分析に供試した (3 反復/ほ場、2001/2002)。統計処理を行った結果、LY038 x MON810 と LY038 との間に分散分析による統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$)。

dwt = 乾燥重量 (dry weight)

表 6 本スタック系統トウモロコシの生物検定によるチョウ目害虫(*Helicoverpa zea*, Corn earworm)に対する食害の程度の調査¹³

	食害の程度 (平均値 \pm S.E.)
LY038 × MON810	0.14 \pm 0.01
LY038(-) × MON810	0.13 \pm 0.03
LY038(-)	2.68 \pm 0.04

LY038 × MON810、LY038(-) × MON810、LY038(-)をアルゼンチンのほ場で栽培した(4 反復/ほ場、2002/2003)。植物体が R4 期に各反復から無作為に選んできた 20 個体を用いて *Helicoverpa zea* (corn earworm) による食害の程度の調査を行った。食害の程度は 0-3 の数字で表した (0: 食害は認められず、幼虫も存在しない 1: 穀粒の第一層に少量の食害が認められる 2: 穀粒の第二層及び第三層に食害が認められる 3: 穀粒の第四層あるいはそれ以上の層に食害が認められる)。統計処理を行った結果、LY038 × MON810 と LY038(-) × MON810 との間で統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$)。

¹² 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。

¹³ 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。

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

① LY038 の *cordapA* 遺伝子の発現により付与された生理学的または生態学的特性の内容

2002 年に米国で行った 5 ヲ所の栽培ほ場(3 反復/供試トウモロコシ/ほ場)から収穫した穀粒を用いて、リシン、遊離リシン及びリシン合成後の下流代謝産物(p40 の図 11)を分析した。対照には、LY038 の育成過程において分離により得られた Null 型トウモロコシを用い、また、各分析値の比較参考のため、各ほ場で同時に栽培された商業トウモロコシ品種(20 品種)も分析に供試した。

その結果、導入された *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって LY038 の穀粒中で総アミノ酸量に対するリシンの含有率(%)及び遊離リシン量($\mu\text{g/g dwt}$)が高まり、また、それによって予想されたようにリシンの代謝産物であるサッカロピン(saccharopine)と α -アミノアジピン酸(α -aminoadipic acid)の量も有意に増加していることが示された(p41 の表 7 及び表 8)。なお、同様にリシンの代謝産物であるピペコリン酸(pipecolic acid)含量についても、その値は商業品種の分析値の範囲内であったが、対照の Null 型トウモロコシと比べて約 2 倍に増加していることが認められた。(p41 の表 7)。

また、リシン以外の総アミノ酸量に関しては、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニンにおいて対照の Null 型トウモロコシと比較して統計学的有意差が認められた(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 10)。しかしながら、これら統計学的有意差の認められたアミノ酸の分析値の範囲は同時に栽培された 20 品種の非組換え商業品種の許容区間(99%T.I.)におさまっていたことから(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 10)、LY038 のリシン以外のアミノ酸量は、従来品種の変動の範囲内であると判断された。

以上の結果から、LY038 では *cordapA* 遺伝子から発現する cDHDPS 蛋白質によって、穀粒中で従来のトウモロコシの範囲を超えて総アミノ酸量に対するリシンの含有率及び遊離リシン含量が高まり、また、それによってリシン合成後の下流代謝産物であるサッカロピン、 α -アミノアジピン酸及びピペコリン酸の量も従来のトウモロコシ以上に増加する特性が付与されたことが確認された。

LY038 において増加しているサッカロピン、 α -アミノアジピン酸、ピペコリン酸の野生動物に対する影響を評価するために肥育試験、文献調査、そして急性毒

性試験を行い、その結果を以下に記載した。

【肥育試験】

サッカロピン、 α -アミノアジピン酸、ピペコリン酸が蓄積している LY038 を含む飼料（以下、LY038 飼料とする）、LY038 と同量の総リシン量を含むように合成リシンを添加した対照の Null 型トウモロコシの飼料(以下、LY038(-)L 飼料とする)、同様に合成リシンを添加した非組換え商業品種の飼料（以下、商業品種 L 飼料とする）、合成リシン無添加の対照の Null 型トウモロコシの飼料(以下、LY038(-)NL 飼料とする)、及び合成リシン無添加の非組換え商業品種を含む飼料（以下、商業品種 NL 飼料とする）をそれぞれ、ブロイラーに 42 日間給与し、発育成績 24 項目、試験終了後の各身体部位の重量 13 項目、胸肉と腿肉の成分 6 項目を調べた (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 8 の表 1~3)。

その結果、いずれの試験項目においても LY038 飼料と対照の LY038(-)L 飼料との間で統計学的有意差は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 8 の表 1~3)。また、参考として同時に供試した商業品種 L 飼料と LY038 飼料との比較では、処理後胸肉重量/処理後全重量(%)で統計学的有意差が認められたものの、それ以外のすべての項目において統計学的有意差は認められなかった。

統計学的有意差の認められた処理後胸肉重量/処理後全重量(%)においては、LY038 飼料と対照の LY038(-)L 飼料との間では統計学的有意差は認められなかったことから、この差異が LY038 の飼料としての安全性に影響を及ぼすものではないと考えられた。

以上のことから、LY038 飼料は、対照である LY038(-)L 飼料と比較して同等であり、LY038 に存在するサッカロピン、 α -アミノアジピン酸、ピペコリン酸が、ブロイラーの生育に影響を及ぼしているとは考えにくいと判断した。

【文献調査】

i. サッカロピン

サッカロピンはリシンがリシンケトグルタル酸リダクターゼと反応することによって生合成される(p40 の図 11)。また、サッカロピンはアスパラガス(4 $\mu\text{g/g}$ FW) やレタス(4 $\mu\text{g/g}$ FW)(文献 71)、マッシュルーム(102 $\mu\text{g/g}$) (文献 72)、ブロッコリー (122 $\mu\text{g/g}$ DW)*、カリフラワー(97 $\mu\text{g/g}$ DW)*などに存在することが確認されている。

* Monsanto 社内データ

サッカロピンに関しては、リシンを含有する通常の食品や飼料を摂取したヒトや家畜の体内では、体内にサッカロピンが産生されていると考えられるが、サッカロピンの代謝率は高く、その結果としてヒトや家畜の体内には蓄積しないと考えられる(文献 73)。すなわち、LY038 において増加したサッカロピンを飼料として摂取する量とヒトや家畜がサッカロピン分解酵素(Saccharopine dehydrogenase; SDH)によって分解することが可能と考えられるサッカロピンの量を比較すると、ヒトや家畜の肝臓にはLY038 由来のサッカロピンを分解するのに十分な量のSDHが存在すると考えられた(p42 の表 9)。このSDHの量はFellow らが実験結果に基づき24時間分に換算した値であるが、一日の中でSDHの量が多少上下することがあったとしても、分解可能なサッカロピンの量は、LY038 から一日に摂取するサッカロピンの量と比較するとヒトは約48.7万倍、ブタは約36倍、ウシの場合は56倍のサッカロピン分解活性を持っていることから、依然として高い分解活性は維持されていると考えられた。

なお、実際に家畜でサッカロピンが検出されたという報告はいくつかあるが、その検出量は低く(文献 74; 文献 75)、先に挙げたFellow らによる「サッカロピンは動物の体内には蓄積しないと考えられる。」という考察を支持しているものと考えられた。以上のことから、LY038 を飼料として動物あるいは家畜が摂取したとしても、動物あるいは家畜は急速にサッカロピンを分解するため、その安全性は確保されていると考えられた。

ii. α -アミノアジピン酸

α -アミノアジピン酸は、サッカロピンが α -アミノアジピン酸セミアルデヒドに代謝された後、この α -アミノアジピン酸セミアルデヒドがアミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと反応することにより生合成される(p40 の図 11)。また、 α -アミノアジピン酸はレンズ豆(7.90 $\mu\text{g/g}$ FW)、エンドウマメ(3.1 $\mu\text{g/g}$ FW)、レタス(3.2 $\mu\text{g/g}$ FW)(文献 76; 文献 77)、ブロッコリー(490 $\mu\text{g/g}$ DW)*、カリフラワー(175 $\mu\text{g/g}$ DW)*、サヤインゲン(141 $\mu\text{g/g}$ DW)*、マッシュルーム(637 $\mu\text{g/g}$ DW)*などに存在することが確認されている。

α -アミノアジピン酸に関しては、文献 78 の報告(文献 78)をもとにリシンを含む基礎飼料(含まれるリシン総量は1.15%)を摂取した体重10.5 kgのブタの各組織に含まれると考えられる α -アミノアジピン酸の量を算出すると、204.72 mg となり(p43 の表 10)、ブタは普段から基礎飼料に含まれるリシンを代謝する結果これだけの量の α -アミノアジピン酸に曝露されていると考えられる。一方、この試験に

* Monsanto 社内データ

用いた基礎飼料中に含まれるトウモロコシをすべて LY038 から摂取すると仮定すると、基礎飼料を摂取していた時と比較して新たに 21.8 mg の α -アミノアジピン酸を摂取すると考えられた。この増加分の 21.8 mg の α -アミノアジピン酸の毒性影響については次のように考察した。

文献 78 の別の実験では、基礎飼料(含まれるリシン総量は 1.15%)を与えられたブタの血漿中の α -アミノアジピン酸の量は 16 nmol/ml であったのに対して、基礎飼料にさらに 1.15%のリシンを添加した飼料(含まれるリシン総量は 2.30%)を与えられた場合には、ブタの血漿中の α -アミノアジピン酸量は 108 nmol/ml へと約 6.8 倍に増加していた。しかし、ブタの体重増加、飼料摂取量、飼料効率のいずれにおいても統計学的有意差は認められなかった(文献 78)。このことから、前述の基礎飼料を与えられた結果ブタが暴露されると予想される α -アミノアジピン酸 204.72 mg の約 11%増加の 21.8 mg の α -アミノアジピン酸を新たに摂取したとしても、毒性影響を及ぼすとは考えにくいと判断した。

iii. ピペコリン酸

ピペコリン酸は、ピペリジン-6-カルボン酸がピペリジン-6-カルボン酸レダクターゼと反応することにより生合成される(p40 の図 11)。また、ピペコリン酸はアズキ(16.94 μ g/g)、インゲンマメ(43.42 μ g/g)、ブロッコリ(12.25 μ g/g)、キャベツ(19.23 μ g/g)、カリフラワー(10.57 μ g/g)、じゃがいも(2.43 μ g/g)などに存在することが確認されている(文献 79)。

ピペコリン酸に関しては、実際に、ピペコリン酸をラットに体重 1 kg 当たり 300 ~330 mg の割合で投与しても特に毒性影響は認められなかったという報告がある(文献 80)。この投与量を家畜が LY038 を摂食した際に摂取すると予想されるピペコリン酸の量と比較した。成熟したブタ(体重 70~115 kg)が一日に約 3 kg の配合飼料を摂食し(文献 81)、うちトウモロコシの配合割合 55.8%(文献 82)をすべて LY038 から摂取すると仮定すると、ブタが一日に LY038 の穀粒から摂取するピペコリン酸の量は約 0.845 mg と算出された¹⁴。以上のことからラットに有害な影響が認められなかった最大投与量 330 mg/kg は、ブタが一日に LY038 から摂食するであろうピペコリン酸の約 391 倍に相当する。

以上の結果から、サッカロピン、 α -アミノアジピン酸、ピペコリン酸は動物の生育に影響を及ぼすとは考えにくい、と判断した。

【急性毒性試験】

¹⁴ $(35.35 \times 3,000(\text{g}) \times 0.558)/70 = 845 \mu\text{g} = 0.845 \text{ mg}/1\text{kg body weight}, 330/0.845 = 391$

ピペコリン酸に関しては、上記のようにラットを用いた毒性情報が文献調査により得られているため、毒性情報が得られなかったサッカロピンと α -アミノアジピン酸についてマウスを用いた急性毒性試験を行った。

i. サッカロピン

マウスに対しサッカロピンを 50、150、450、2,000 mg/kg の 4 用量で強制経口投与した。その結果最大投与量である 2,000 mg/kg でも、マウスに有害な影響は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 11-a)。

この結果をもとに毒性影響の認められなかった 2,000 mg/kg のサッカロピンは、家畜(ブタを例とした)が LY038 から一日に摂取すると予想される量の何倍になるかを計算した。

米国のほ場試験で収穫された LY038 の穀粒において認められたサッカロピン量の最大値は 818.42 μ g/g dwt であった (p41 の表 7)。成熟したブタ(体重 70 kg)は一日に約 3 kg の配合飼料(文献 81)を摂食する。配合飼料中のトウモロコシの含有量 55.8 % (文献 82)をすべて LY038 から摂取すると仮定すると、ブタが一日に LY038 の穀粒から摂取するサッカロピンの量は、体重 1 kg 当たり約 19.6 mg と算出された¹⁵。以上のことから今回マウスに有害な影響が認められなかった最大投与量 2,000 mg/kg は、ブタが一日に LY038 から摂食するであろうサッカロピンの約 102 倍に相当する。

ii. α -アミノアジピン酸

マウスに対し α -アミノアジピン酸を 50、150、450、2,000 mg/kg の 4 用量で強制経口投与した。その結果最大投与量である 2,000 mg/kg でも、マウスに有害な影響は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 11-b)。

以上の結果をもとに毒性影響の認められなかった 2,000 mg/kg の α -アミノアジピン酸は、家畜(ブタを例とした)が LY038 から一日に摂取すると予想される量の何倍になるかを計算した。

米国のほ場試験で収穫された LY038 の穀粒において認められた α -アミノアジピン酸量の最大値は 89.32 μ g/g dwt であった(p41 の表 7)。成熟したブタ(体重 70 kg)は一日に約 3 kg の配合飼料(文献 81)を摂食する。配合飼料中のトウモロコシの含

¹⁵ $(818.42 \times 3000(\text{g}) \times 0.558) / 70 = 19,571 \mu\text{g} = 19.6 \text{ mg} / 1\text{kg body weight}, 2000 / 19.6 = 102$

有量 55.8 % (文献 82) をすべて LY038 から摂取すると仮定すると、ブタが一日に LY038 の穀粒から摂取する α -アミノアジピン酸の量は、体重 1 kg 当たり約 2.1 mg と算出された¹⁶。以上のことから今回マウスに有害な影響が認められなかった最大投与量 2,000 mg/kg は、ブタが一日に LY038 から摂食するであろう α -アミノアジピン酸の約 936 倍に相当する。

以上の結果から、サッカロピンと α -アミノアジピン酸はマウスに対して毒性影響を及ぼさないことが確認された。

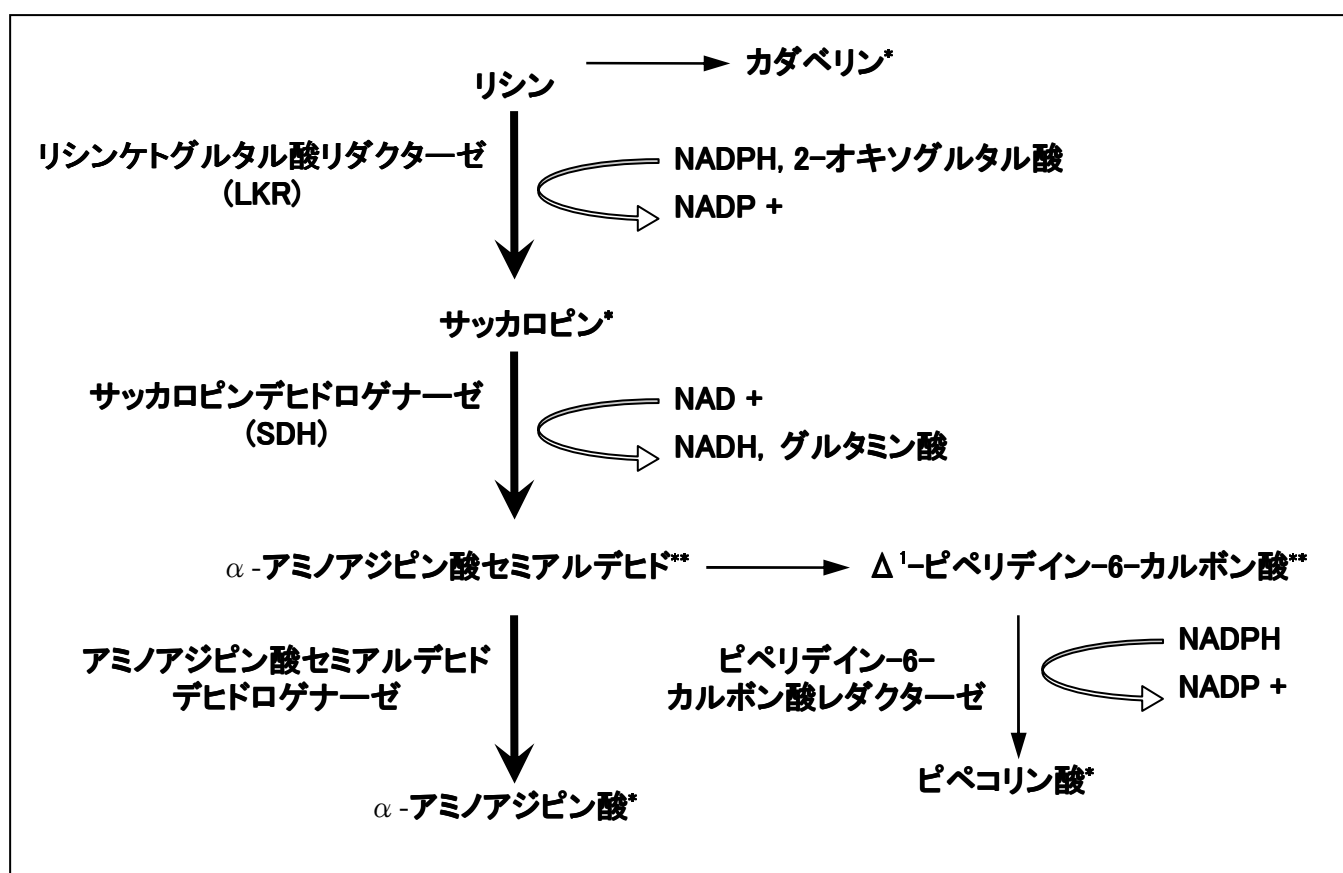


図 11 リシン合成後の代謝経路(文献 83)¹⁷

* 分析したリシン合成後の代謝産物

** 不安定であることが知られているため、成分分析は行わなかった。

¹⁶ $(89.32 \times 3000(\text{g}) \times 0.558) / 70 = 2,136 \mu\text{g} = 2.136 \text{ mg/1kg body weight}, 2000 / 2.136 = 936$

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。

表 7 LY038 の穀粒中の遊離リシン、リシン及び関連代謝産物の分析結果¹⁸

成分 (単位) ¹	LY038 平均値 ± S.E. ² (範囲) ³	対照 平均値 ± S.E. (範囲)	p-値	商業品種 (範囲) [99% T.I. ⁴]
リシン (% total AA)	3.81 ± 0.14 (3.08 - 4.50)	2.70 ± 0.14 (2.14 - 3.23)	<0.001	(2.38 - 4.07) [1.85, 4.29]
遊離リシン (µg/g dwt)	1351.13 ± 109.52 (921.86 - 1696.61)	25.99 ± 3.18 (18.39 - 40.21)	<0.001	(14.69 - 108.52) [0, 104.89]
L-ピペコリン酸 (µg/g dwt)	28.72 ± 1.37 (22.37 - 35.35)	14.96 ± 1.58 (10.06 - 21.82)	<0.001	(2.71 - 42.15) [0, 45.15]
サッカロピン (µg/g dwt)	650.29 ± 36.40 (499.30 - 818.42)	5.88 ± 0.90 (2.75 - 8.26)	<0.001	(2.71 - 20.85) [0, 23.00]
参考： 茎葉中のリシン (% total prot. dwt)	4.70 ± 0.21 (4.00 - 6.46)	4.54 ± 0.21 (3.70 - 5.94)	0.379	(3.28 - 6.11) [3.17, 5.56]

米国 5 カ所のほ場から穀粒及び茎葉を収穫して成分分析に供試した (3 反復/ほ場、2002 年)

- 1 total AA = 総アミノ酸量、dwt = 乾物量、total prot = 総蛋白量
- 2 S.E. = 標準誤差
- 3 分析値の最小-最大値
- 4 95% の信頼限界で商業品種集団の 99% が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は 0 に設定した。

表 8 LY038 の穀粒における α-アミノアジピン酸の分析結果¹⁹

ほ場	LY038 平均値(µg/g DW) ² (範囲)	対照 平均値(µg/g DW) (範囲)	商業品種 平均値(µg/g DW) (範囲)
1	82.34 (78.58 - 89.32)	6.33 (6.19 - 6.46)	8.76 (5.59 - 13.45)
2	39.65 (36.59 - 42.41)	定量限界以下 (-- --)	定量限界以下 (-- --)
3	50.66 (46.56 - 54.68)	定量限界以下 (-- --)	定量限界以下 (-- --)
4	59.93 (44.62 - 67.74)	定量限界以下 (-- --)	8.59 (7.83 - 9.36)
5	50.36 (48.27 - 51.79)	定量限界以下 (-- --)	定量限界以下 (-- --)
平均	56.59 (36.59 - 89.32)	6.33 (6.19 - 6.46)	8.73 (5.59 - 13.45)

- 1 対照及び商業品種のほとんどが定量限界以下であったため、統計処理は行わなかった。
- 2 DW = 乾物重

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。

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 9 ヒトや動物におけるサッカロピン分解可能量²⁰

	SDH による サッカロピン分解量 (g /whole liver/day)	LY038 由来の サッカロピンの 一日推定摂取量 (g/day)	配合飼料中の トウモロコシ以外の 主要成分由来の サッカロピン推定摂取量
ブタ	39 ^a	1.09 ^b	15.8 mg/day ^e
ウシ	131 ^a	2.35 ^c	63.6 mg/day ^f
ヒト	114 ^a	0.000234 ^d	87 mg/day ^g

a 文献 84

b 成熟したブタ(体重 70～115 kg)が一日に約 3 kg の配合飼料を摂食し(文献 81)、うちトウモロコシの含有量 55.8%(文献 85)をすべて LY038 から摂取すると仮定した。

3 kg 配合飼料×トウモロコシ含有量 0.558 × 650.29 mg/kg 穀粒 = 1.09 g サッカロピン/day

c 成熟したウシがトウモロコシの穀粒を飼料として 1 日に約 9 kg の配合飼料を摂食し(文献 86)、うちトウモロコシの含有量 40.1%(文献 85)をすべて LY038 から摂取すると仮定した。

9 kg 配合飼料×トウモロコシ含有量 0.401× 650.29 mg/kg 穀粒 = 2.35 g サッカロピン/day.

d LY038 におけるサッカロピンの分析値 650.29 μg/g dwt, トウモロコシ・加工品の一日摂取量 = 0.4g fwt, トウモロコシの穀粒の水分 8.9%より計算すると、日本人のサッカロピンの一人一日推定摂取量は 234 μg となる。0.4 x (100-8.9)/100 = 0.36 g dwt, 0.36 g dwt x 650.29 μg/g dwt = 234 μg, これを g に換算すると、0.000234 g となる。

e ブタが摂食する配合飼料 3 kg のうち、トウモロコシ以外の成分は、3 x (1-0.558) = 1.32 kg である。推定サッカロピン量は、12 x 1.32 = 15.8 mg と算出される。

f ウシが摂食する配合飼料 9 kg のうち、トウモロコシ以外の成分は、9x (1-0.441) = 5.30 kg である。推定サッカロピン量は、12 x 5.3 = 63.6 mg と算出される。

g 文献 86 に記載されている主要な各食品(穀類、豆類、野菜類、果実類、きのこ類、魚介類、肉類、乳類など)に存在するサッカロピン量を文献値等から算出した。各食品に該当する文献値がない場合には、文献値等がある比較的近い食品のと同程度のサッカロピン量であると仮定して算出した。

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。

表 10 リシンを含む基礎飼料を摂取したブタの各組織における α -アミノアジピン酸の検出量及び LY038 由来基礎飼料中に含まれる α -アミノアジピン酸量²¹

(体重 10.5kg の幼ブタが一日に 1,057g の基礎飼料(Basal diet)を摂取するという実験データ(文献 78)に基づいて計算した。)

	各組織の全体重に占める割合 ⁽¹⁾	α -アミノアジピン酸検出量 ⁽²⁾	各組織における α -アミノアジピン酸の総重量	基礎飼料中の LY038 由来の α -アミノアジピン酸量
血漿	5.00 %	35 nmol/ml	2.13 mg ⁽³⁾	—
肝臓	1.14 %	2,268 nmol/g	31.48 mg ⁽⁴⁾	—
腎臓	0.36 %	769 nmol/g	3.38 mg ⁽⁵⁾	—
筋肉	49.00 %	281 nmol/g	167.73 mg ⁽⁶⁾	—
合計	—	—	204.72 mg	21.77 mg ⁽⁷⁾

(1) 農林水産省の統計ダイジェスト(文献 87)などを参考にした。

(2) 文献 78

(3) 血漿中の α -アミノアジピン酸【分子量 116.16 すなわち 1 mol = 116.16g】の算出。血漿 1 ml 中の α -アミノアジピン酸の量は、 $35 \times 10^{-9} \times 116.16 = 4,066 \times 10^{-9} \text{ g}$ となる。体重 10.5 kg 中の血漿量は、 $10,500 \text{ g} \times 0.05 = 525 \text{ g}$ となる。したがって、血漿中に含まれる α -アミノアジピン酸の総量は、 $4,066 \times 10^{-9} \times 525 = 2.13 \times 10^{-3} \text{ g} = 2.13 \text{ mg}$ となる。

(4) 肝臓中の α -アミノアジピン酸量の算出。腎臓 1g 中の α -アミノアジピン酸の量は、 $2,268 \times 10^{-9} \times 116.16 = 2.63 \times 10^{-4} \text{ g}$ となる。体重 10.5 kg 中の肝臓重量は、 $10,500 \text{ g} \times 0.0114 = 119.7 \text{ g}$ となる。したがって肝臓中に含まれる α -アミノアジピン酸の総量は、 $2.63 \times 10^{-4} \times 119.7 = 314.8 \times 10^{-4} \text{ g} = 31.48 \text{ mg}$ となる。

(5) 腎臓中の α -アミノアジピン酸量の算出。腎臓 1g 中の α -アミノアジピン酸の量は、 $769 \times 10^{-9} \times 116.16 = 8.93 \times 10^{-5} \text{ g}$ 、体重 10.5 kg 中の腎臓重量は $10,500 \times 0.0036 = 37.8 \text{ g}$ となる。したがって腎臓中に含まれる α -アミノアジピン酸の量は $8.93 \times 10^{-5} \times 37.8 = 3.376 \times 10^{-3} \text{ g} = 3.38 \text{ mg}$ となる。

(6) 筋肉中の α -アミノアジピン酸量の算出。筋肉 1 g 中の α -アミノアジピン酸の量は、 $281 \times 10^{-9} \times 116.16 = 3.26 \times 10^{-5} \text{ g}$ 、体重 10.5 kg 中の筋肉重量は $10,500 \times 0.49 = 5,145 \text{ g}$ となる。したがって筋肉中に含まれる α -アミノアジピン酸の量は $3.26 \times 10^{-5} \times 5,145 = 16,773 \times 10^{-5} \text{ g} = 167.73 \times 10^{-3} \text{ g} = 167.73 \text{ mg}$

(7) $1,057$ (摂取する飼料の重量) $\times 0.364$ (トウモロコシ由来飼料の含有率) $\times 56.59\mu\text{g}$ (LY038 1g 中の α -アミノアジピン酸測定値) $= 21,772 \mu\text{g} = 21.77 \text{ mg}$

²¹ 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。

② MON810 の *cry1Ab* 遺伝子の発現により付与された生理学的または生態学的特性の内容

MON810 では、*cry1Ab* 遺伝子によってコードされる Cry1Ab 蛋白質が発現することによって、米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガの食害に対する抵抗性が付与され、アワノメイガによる食害が減少することが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p35)。

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²²

LY038 に属する系統である LY038-A 及び LY038-B 並びにその対照系統として Cont-38A 及び Cont-38B を供試して、2003 年に日本モンサント株式会社の河内研究農場にて隔離ほ場試験を行った。LY038-A 及び LY038-B は、LY038 の育成世代の[社外秘]世代目を、2つの異なる非組換えトウモロコシ自殖系統とそれぞれ交配して得られた2つの F1 雑種である(p20 の図 4 参照)。対照系統である Cont-38A 及び Cont-38B は、LY038 の[社外秘]世代において分離によって得られた Null 型トウモロコシを、2つの異なる非組換えトウモロコシ自殖系統と交配して得られた F1 雑種である(p20 の図 4 参照)。なお、Null 型トウモロコシのゲノム中に *cordapA* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*cre* 遺伝子が存在しないことはサザンブロット法及び PCR 法により確認した(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 4 の p44 の Figure 5～p62 の Figure 23)。

MON810 に属する系統である MON810AX 及び MON810BX、並びにその対照系統として MON810AC 及び MON810BC を供試して、1996 年及び 2001～2002 年に農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。MON810AX 及び MON810BX は p25 の図 7 の系統図に示すように、同じ MON810 の初代(R0)から異なる育種過程によって作出された交配後代系統である。対照系統である MON810AC 及び MON810BC は、MON810AX 及び MON810BX と遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

① 形態及び生育の特性

LY038 の形態及び生育に関する特性として評価した 19 項目(発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、粒色、百粒重、粒形及び

²² 本項目中の以下に続く①～⑦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。

収穫期の植物重)のうち、供試組換えトウモロコシ LY038-A では、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A との間で、稈長、着雌穂高、雌穂径及び粒列数に統計学的有意差が認められ($p < 0.05$)、もう一方の供試組換えトウモロコシ LY038-B においては、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、粒列数及び百粒重に統計学的有意差が認められたが($p < 0.05$)、それ以外の項目では差異は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p6~14 参照)。それぞれの組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシとの間で差異が認められた各評価項目の平均値は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシ(MON863 系統、MON810 系統、NK603 系統、DLL25 系統、MON88001 系統、MON88012 系統及び MON88017 系統)で、対照として用いた非組換えトウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれも従来トウモロコシにおける変動の範囲内であった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p8 の表 2 参照)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花始、開花終、開花期間、成熟期、草型、分けつ数、雌穂総数、有効雌穂数、稈長、着雌穂高、雌穂の粒色と粒形、収穫時の生体重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で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(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p32 の表 2、別添資料 3 の p15~19)。稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。一方、組換えトウモロコシ MON810AX と対照の非組換えトウモロコシ MON810AC の間で統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。

② 生育初期における低温又は高温耐性

組換えトウモロコシ LY038-A と対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B と対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B とともに、3 葉期の苗を 5℃条件下に 22 日間静置した結果、完全に枯死しており、枯死程度に差異は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p19~21 参照)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(最高気温 12~14℃、最低気温 2℃) を評価したが、すべての展開葉が低温処理開始後 21 日目に萎凋症状を示し、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20)。

③ 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。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっていることを LY038 及び対照の Null 型トウモロコシ、MON810 及び対照の非組換えトウモロコシにおいて観察した。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

組換えトウモロコシ LY038-A と対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B と対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、いずれも花粉稔性率に統計学的有意差は認められず高い花粉稔性を示し(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p16 の表 3 参照)、また、花粉の形態・大きさにも相違は観察されなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p17～18 参照)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉の大きさを 0.1%ニュートラルレッド溶液及びヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20～23)。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

LY038 の種子の生産量としては、きょうだい交配して収穫した雌穂の一穂着粒数を調査したが、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、一穂着粒数に統計学的有意差が認められた($p < 0.05$) (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p16 の表 3 参照)。しかし、もう一方の組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A との間では相違は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p16 の表 3 参照)。なお、組換えトウモロコシ LY038-B の一穂着粒数は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシ(MON863 系統、MON810 系統、NK603 系統、DLL25 系統、MON88001 系統、MON88012 系統及び MON88017 系統)で、対照に用いた Null 型トウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を、従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれも従来トウモロコシにおける変動の範囲内であった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p16 の表 3 参照)。

MON810 の種子の生産量としては、きょうだい交配して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、全ての項目において、MON810 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 (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p32 の表 3、別添資料 3 の p17 ~19 の第 6~10 表、p20 の(3))。

脱粒性については、LY038 とその対照の Null 型トウモロコシ、MON810 とその対照の非組換えトウモロコシはいずれも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

LY038 の収穫種子の発芽率に関して、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、もう一方の組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、いずれも統計学的有意差は認められなかった (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p22 の表 4 参照)。両組換えトウモロコシとも 95%以上と高い発芽率を示しており、種子休眠性は認められなかった。

MON810 の収穫種子を播種して 4 日後の発芽率において、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なく、種子の休眠性は認められなかった (MON810 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p20)。

⑥ 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、親系統である LY038、MON810 の交雑率の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

【LY038 の有害物質の産生性】

栽培前及び栽培後の土壌中の細菌数、放線菌数及び糸状菌数に関して、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、統計学的有意差は認められなかった (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p24 の表 5 参照)。

また、ハツカダイコンを用いた植物体鋤込み試験において、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロ

コシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、ハツカダイコンの発芽率、生体重及び乾物重に、統計学的有意差は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p25 の表 6 参照)。

さらに、LY038 に挿入されている *cordapA* 遺伝子は、目的遺伝子を主に穀粒で発現させる *Glb1 promoter* により制御されていることから、穀粒中で意図しない有害物質が産生される可能性が懸念された。そこで、新たに LY038 及び対照の Null 型トウモロコシの穀粒を用いた鋤込み試験も行った。その結果、LY038 とその対照の Null 型トウモロコシとの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重及び乾物重に、統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$) (LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 9 の p3 の表 2 参照)。

一方、ハツカダイコンを用いた後作試験において、組換えトウモロコシ LY038-A の栽培土壌とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A の栽培土壌との間で、ハツカダイコンの発芽率、生体重、及び乾物重のすべての項目において統計学的有意差は認められなかった。一方、組換えトウモロコシ LY038-B の栽培土壌とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B の栽培土壌との間では、ハツカダイコンの乾物重に統計学的有意差が認められたが、発芽率及び生体重には統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$)(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p26 の表 7 参照)。

なお、本後作試験では有意差が認められなかったものの、検定植物であるハツカダイコン(品種名 ; アイシクル)の発芽率が、LY038 で明らかに低くなっていると判断された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p26 の表 7 参照)。この理由としては、本後作試験に用いたハツカダイコン(品種名 ; アイシクル)の発芽特性が元々均一でなかったことが考えられた。そこで、事前に 5 品種のハツカダイコン(シラサギ、コメット、アイシクル、ホワイトミニ、フレンチブラックファースト)を用いて発芽試験を行い、最も発芽揃いの良かったフレンチブラックファーストを用いて再度後作試験を行った(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 9 の p2 の表 1 参照)。さらに、ポットへの給水は表面灌水ではなく、下部からの吸い上げる形で行い、反復数も 3 反復から 4 反復に増やした。

その結果、LY038 と対照の Null 型トウモロコシの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重、乾物重には統計学的有意差は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 9 の p4 の表 3 参照)。

【MON810 の有害物質の産生性】

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行ったが、全ての項目で統計学的有意差は認められなかった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p26 の第 13-1~13-2 表、p28 の第 14 表、p29 の第 15 表、p42 の表 5、表 6)。

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

(2) 使用等の方法

—

(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

申請書に添付した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

米国では、*B.t.* 蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で、*B.t.* 蛋白質を発現する遺伝子組換えトウモロコシを栽培する際には緩衝区を設定している。本スタック系統トウモロコシの栽培時には、*B.t.* 蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で *B.t.* 蛋白質を生成しないトウモロコシ品種を栽培する緩衝区を、栽培区の一部に設定して栽培する予定である。

LY038 の諸外国における認可状況は以下のとおりである。

- 2005 年 10 月 米国食品医薬品局(FDA)より食品・飼料の安全性認可を受けた。
- 2006 年 2 月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。
- 2006 年 7 月 カナダ食品検査局(CFIA)より飼料及び環境の安全性認可を受けた。
- 2006 年 7 月 カナダ厚生省(HC)より食品の安全性認可を受けた。

MON810 の諸外国における認可状況は以下のとおりである。

- 1996 年 3 月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。
- 1996 年 8 月 米国環境保護庁(EPA)より Cry1Ab 蛋白質に対する残留農薬基準値の設定免除の認可を受けた。
- 1996 年 9 月 米国食品医薬品局(FDA)より食品・飼料の安全性認可を受けた。
- 1997 年 1 月 カナダ食品検査局(CFIA)より飼料・環境の安全性認可を受けた。
- 1997 年 2 月 カナダ厚生省(HC)より食品の安全性認可を受けた。

なお、LY038 のわが国における申請状況は以下のとおりである。

- 2003 年 4 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画(栽培を含む)は同指針に適合していることが確認された。2005 年 2 月厚生労働省に「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2005 年 3 月 農林水産省に「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2006 年 1 月 農林水産省及び環境省に「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」に基づく第一種使用規程承認申請を行った。

MON810 のわが国における認可状況は以下のとおりである。

- 1996 年 3 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画(加工用及び飼料用としての利用)は同指針に適合していることが確認

- された。
- 1996年10月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、同指針に適合していることが確認された。
- 1997年5月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第4章」に基づき、食品利用について、同指針に適合していることが確認された。
- 1997年6月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用について、同指針に適合していることが確認された。
- 2001年3月 厚生労働省より「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」に基づき、食品利用としての安全性が確認された。
- 2001年5月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場における組換え体利用計画(栽培を含む)は同指針に適合していることが確認された。
- 2003年3月 農林水産省より「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性が確認された。
- 2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、同指針に適合していることが確認された。
- 2004年6月 農林水産省及び環境省より遺伝子組み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に基づく第一種使用規定の承認を受けた。(食用また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ついて)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²³

本スタック系統トウモロコシは、LY038 と MON810 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、LY038 と MON810 の特性を併せ持つ。第一 2(1)口で述べたとおり、cDHDPS 蛋白質の基質特異性は高いと考えられ、また Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられる。実際に本スタック系統トウモロコシの遊離リシン量は親系統である LY038 と同程度であることが成分分析によって、チョウ目害虫抵抗性については親系統である MON810 と同程度であることが生物検定によって、それぞれ確認されている。したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、LY038、MON810 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

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

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り、これまでトウモロコシが自然環境下で自生した例は報告されていない。

LY038 の隔離ほ場において、形態及び生育に関する特性として評価した 19 項目のうち、供試組換えトウモロコシ LY038-A では、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A との間で、稈長、着雌穂高、雌穂径及び粒列数に統計学的有意差が認められ、もう一方の供試組換えトウモロコシ LY038-B においては、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、粒列数及び百粒重に統計学的有意差が認められた(p44 の第一 2(6)口①参照)。また、一穂着粒数に関して、組換えトウモロコシ LY038-B で統計学的有意差が認められた(p46～47 の第一 2(6)口⑤参照)。それぞれの組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシとの間で差異が認められた各評価項目の平均値は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシの対照として用いた Null 型トウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を、従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれもその変動の範囲内であった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p8 の表 2 及び p16 の表 3 参照)。このことから、組換えトウモロコシ LY038-A と LY038-B で差異が認められた各特性も、従来トウモロコシの変動の範囲を超えるものではないと判断され、これらの差異によって競合における優位性が高まることは考えにくい。

²³ 本項目中で、第一の 2-(6)の①～⑦に記載された試験結果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。

一方、収穫種子の発芽率に関して、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、もう一方の組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、いずれも統計学的有意差は認められなかった(p46~47 の第一 2(6)ロ⑤参照)。両組換えトウモロコシとも 95%以上と高い発芽率を示しており、結論として種子休眠性は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p22 の表 4 参照)。

上記以外の生育初期における低温感受性、成体の越冬性ならびに花粉の稔性及びサイズに、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で相違は認められなかった(p45~46 の第一 2(6)ロ②~④参照)。

MON810 の隔離ほ場では、形態及び生育に関する特性として評価した項目のうち、稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。一方、組換えトウモロコシ MON810AX と対照の非組換えトウモロコシ MON810AC との間で統計学的有意差は認められなかった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。しかし、稈長以外の競合にける優位性に関わる諸形質では MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められなかったことから、この形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

以上のように、本スタック系統トウモロコシの親系統である LY038 と MON810 は対照の Null 型トウモロコシあるいは対照の非組換えトウモロコシとの間に上記の項目において統計学的有意差が認められた。しかし、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異ではないと判断されている。また、第一 2(1)ロで述べたとおり、本スタック系統トウモロコシ中で発現する cDHDPS 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質は、それぞれ独立して作用していると考えられた。したがって、親系統である LY038 と MON810 を交雑育種法により作出された本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に、競合における優位性にかかわる差異が認められる可能性は極めて低いと判断された。

本スタック系統トウモロコシでは、導入された *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって、穀粒中で特異的に遊離リシン含量が高まり、また、それによってリシン合成後の二次代謝産物の量も増加することが確認された(p41 の表 7 参照)が、上記のわが国における隔離ほ場試験及び米国におけるほ場試験結果から、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関する各特性は、従来トウ

モロコシの変動の範囲内であることが示されている。

また、本スタック系統トウモロコシはチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるトウモロコシが、本形質が付与されたことによって自然条件下で自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいても、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

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

【LY038 の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

LY038 を栽培した土壌中の土壌微生物相評価試験及びハツカダイコンを用いた植物体鋤込み試験において、対照の Null 型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(p47~48 の第一 2(6)ロ⑦参照)。

さらに、穀粒を用いた鋤込み試験の結果でも、LY038 とその対照の Null 型トウモロコシとの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重及び乾物重に、統計学的有意差は認められなかった(p<0.05) (p47~48 の第一 2(6)ロ⑦参照)。

一方、ハツカダイコンを用いた後作試験において、組換えトウモロコシ LY038-A の栽培土壌では、ハツカダイコンの発芽率、生体重及び乾物重の全ての項目において統計学的有意差は認められなかった。一方、組換えトウモロコシ LY038-B の栽培土壌では、ハツカダイコンの発芽率及び生体重には統計学的有意差は認められなかったが、乾物重で組換えトウモロコシ LY038-B と対照の Null 型トウモロコシ Cont-B との間で統計学的有意差が認められた(p47~48 の第一 2(6)ロ⑦参照)。

しかしながら、①組換えトウモロコシ LY038-A と対照の Null 型トウモロコシ Cont-A の栽培土壌におけるハツカダイコンの乾物重では差異が認められなかったこと、②生体重では LY038-A と Cont-A との間及び LY038-B と Cont-B との間のいずれにおいても差異が認められなかったことから、LY038 で有害物質の産生性が高まっているとは考えにくい。

なお、本後作試験では有意差が認められなかったものの、検定植物であるハツカダイコン(品種名; アイシクル)の発芽率が、LY038 で低くなっているのは明らかであると判断された(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 6 の p26 の表 7 参照)。そこで、発芽揃いの良かったフレンチブラックファーストを用いて再度後作試験を行った結果、LY038 と対照の Null 型トウモロコシの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重、及び乾物重に統計学的有意差は認められなかった(LY038 生物多様性影響評価書の別添資料 9 の p4 の表 3 参照)。

以上のように、土壌微生物相試験、鋤込み試験、後作試験において差異が認められなかったことから、LY038 が野生植物や土壌微生物に有害な影響を及ぼすとは考えにくい。

また、第一 2(6)イで述べたように、LY038 においては目的であるリシン含量に加えて、その二次代謝産物であるサッカロピンと α -アミノアジピン酸が商業品種の範囲を超えて増加していた。また、同様にリシンの二次代謝産物であるピペコリン酸についても商業品種の範囲内ではあるものの、対照の Null 型トウモロコシと比較して約 2 倍に増加していた。

そこで、リシンの二次代謝産物であるサッカロピン、 α -アミノアジピン酸そして、ピペコリン酸の野生動物に及ぼす影響について、第一 2(6)イに示したように、肥育試験、文献調査、急性毒性試験により評価した。

その結果、① ブロイラー肥育試験でこれらの物質が毒性影響を及ぼすと示唆するような結果は得られず、② 文献調査によってこれらの物質は様々な植物に存在し、ヒトや家畜はこれらの物質の食経験があると考えられた。さらに、③ サッカ

ロピンと α -アミノアジピン酸は今回新たに行ったマウスの急性毒性試験により、ピペコリン酸はラットの急性毒性の文献情報により、いずれも毒性影響がないことが示唆された。以上の①～③の結果を総合的に判断して、これらの二次代謝産物は野生動物に対しても毒性影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。

【MON810 の影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

MON810 には Cry1Ab 蛋白質の発現によってトウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているため、MON810 の植物体を摂食することにより影響を受ける野生動植物等としては、トウモロコシの植物体を摂食するアワノメイガ等のチョウ目昆虫が想定されているが、これらはトウモロコシの害虫であるので、ここでは対象としていない。一方、MON810 から飛散した花粉により影響を受ける野生動植物等としては、MON810 の花粉が幼虫の食餌植物と共に摂食され、幼虫が影響を受ける可能性のある、わが国に生息するチョウ目昆虫があげられた。

「改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—5 昆虫類(2006)」を用いて、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ栽培の影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているチョウ目昆虫の特定を行った。1)幼虫の活動期(摂食期)と MON810 の開花期の関係、2)幼虫の食餌植物と花粉の接触の可能性、の2点から絞込みを行い、ヒメシロチョウ (*Leptidea amurensis*)、ツマグロキチョウ (*Eurema laeta betheseba*)、シルビアシジミ (*Zizina otis emelina*)、ミヤマシジミ (*Lycaeides argyrognomon*)、ヒョウモンモドキ (*Melitaea scotosia*)、ウスイロヒョウモンモドキ (*Melitaea regama*)、コヒョウモンモドキ (*Mellicta ambigua nippona*)、ヒメヒカゲ(2 亜種) (*Coenonympha oedippus arothius* 及び *Coenonympha oedippus annulifer*)、ウラナミジャノメ (*Ypthima motschulskyi nipponica*)、ミツモンケンモン (*Cymatophoropsis trimaculata*)の 11 種(2 亜種を含む)を特定した。

【本スタック系統トウモロコシの影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

本スタック系統トウモロコシは Cry1Ab 蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物としては、親系統である MON810 の生物多様性影響評価書で特定された種と同じであると考えられる。

よって、本スタック系統トウモロコシの花粉の飛散により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、MON810 で特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)の計 13 種(2 亜種を含む)が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

表 6 (p34)に示したように、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫 (メイガ科の *Diatraea saccharalis* (Southwestern corn borer)) に対する抵抗性に対する殺虫活性は、MON810 と同程度だった。したがって、本スタック系統トウモロコシの花粉飛散による非標的昆虫への影響は、MON810 の花粉による生物検定の結果より評価した。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫ヤマトシジミ (*Zizeeria maha argia*)の 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、MON810 の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率と対照に非組換え体の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率との間で、有意な差が 2,000 及び 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p32~34)。

(3) 影響の生じやすさの評価

MON810 とそれらの対照の非組換えトウモロコシ間で、花粉飛散に影響を与える要因である花粉の量、形状及びサイズについて比較した結果、統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20~23)。

MON810 について、ヤマトシジミの生存率に影響の出た花粉密度 2,000 及び 4,000 粒/cm² となるほ場からの距離を推定したところ、4,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 10m、2,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 20m となった(文献 88)。

MON810 の影響を受ける可能性のある野生動植物として前述のチョウ目 11 種(2 亜種を含む)が特定された。

表 11 (p59)にこれらの幼虫の食餌植物と食餌植物の主な生育場所をまとめた(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 5 の p74~78、文献 89)。こうした食餌植物は野原、山地など広範な地域で生育している。

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。仮に生育したとしても、その個体数は、ほ場で栽培されるトウモロコシと比較して極めて少ないために、その花粉飛散が非標的チョウ目昆虫に及ぼす影響は無視できるものと考えられた。また、前述のチョウ目昆虫 11 種 (2 亜種を含む) はこぼれ落ちの想定される畜舎や道路を主な生息域としていない。さらに、今回未調査であるその他のチョウ目昆虫に関しても同様に、これらの昆虫

がトウモロコシが栽培されているほ場やその近辺のみに生息しているとは考えにくいことから、個体群で影響を受ける可能性はきわめて低いと判断された。

なお、MON810 について、今後の育種により今回試験に用いた系統とは花粉の飛散時期、飛散量が異なる系統が育成される可能性があるが、花粉を用いた生物検定においては *B.t.* 蛋白質に対して最も感受性の高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常的气象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、品種・系統が異なっても今回想定した影響を大きく超えるようなことはないと考えられる。

表 11 非標的昆虫が食餌する植物の生育場所²⁴

	食餌植物	食餌植物の主な生育場所	
1	ヒメシロチョウ	ツルフジバカマ	山野の草原、道ばた、海岸の林縁
2	ツماغロキチョウ	カワラケツメイ	川原、土手、道ばたの草地
3	シルビアンシジミ	ミヤコグサ、ヤハズソウ、コマツナギ	野原、道ばた、鉄道線路、土手、海岸
4	ミヤマシジミ	コマツナギ	野原、土手、海岸
5	ヒョウモンモドキ	タムラソウ、ノアザミ、ノハラアザミ、キセルアザミ	山野、草原、湿地
6	ウスイロヒョウモンモドキ	オミナエシ、カノコソウ	山地の草地及び湿地
7	コヒョウモンモドキ	クガイソウ	山地の草地
8	ヒメヒカゲ(2亜種)	ヒカゲスゲ、ヒメカンスゲ、アオスゲ、ススキ	疎林地、林地、草原
9	ウラナミジャノメ	カヤツリグサ科、イネ科	草地、林地、海岸
10	ミツモンケン	クロツバラ、クロウメモドキ	山地、高原
	参考文献：	文献90	
		文献89	

²⁴ 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) 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、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシと交雑可能なのは、*Zea mays* 種に含まれ、*Zea 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 (*Zea mays* subsp. *mexicana*) 及び *Tripsacum* 属であるが、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り、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して、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

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

【LY038 を摂食した野生動物を介して間接的に生物多様性が生ずる可能性】

仮に本組換えトウモロコシを野生動物が常に摂食した場合は、第一 2(6)イで述べたブロイラーと同様に、野生動物の生育が促進される可能性が考えられる。

- ① しかしながら、第一の 2(p4)でも述べたように、LY038 は飼料用のトウモロコ

シとして開発され、また飼料用トウモロコシであるデントコーンの我が国における栽培は青刈り利用がほとんどである(文献 91)。

- ② 仮に輸入された LY038 の種子が輸送中にこぼれ落ちたとしても、栽培作物として高度に人為的に作られた現在のトウモロコシが我が国の自然環境下において生育する可能性は極めて低い。

したがって、LY038 の穀粒を野生動物が摂食する機会は極めて少なく、特定の野生動物の生育に影響を生ずる可能性は低いと考えられた。

以上から、LY038 により、間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

本スタック系統トウモロコシでは LY038 と同様に遊離リシン量が高まっていることから、ブロイラーに対しても LY038 と同様の効果があると考えられ、野生動物の生育が促進される可能性が示唆されたが、LY038 と同様、本スタック系統の穀粒を野生動物が摂食する機会は極めて少なく、特定の野生動物の生育に影響を生ずる可能性は低いと考えられ、本スタック系統トウモロコシによって間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統トウモロコシは、LY038 の自殖系統と MON810 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、LY038、MON810 の特性を併せ持つ。第一の 2(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシにおける cDHDPS 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。したがって、親系統である LY038、MON810 の生物多様性影響の評価の結果を用いて本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価を行った。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。本スタック系統トウモロコシの親である LY038、MON810 の競合における優位性にかかわる諸形質を比較検討した。

また、LY038 と対照の Null 型トウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質を比較検討したところ、稈長、着雌穂高、雌穂径、粒列数、百粒重及び一穂着粒数に関して統計学的有意差が認められたものの、これら以外の競合における優位性に関する諸形質で相違は認められなかった。また、差異の認められた上記の諸形質は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシの対照として用いた Null 型トウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれもその変動の範囲内にあり、従来トウモロコシの変動の範囲を超えるものではないと判断され、これらの差異によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

MON810 においては稈長で統計学的有意差が認められた。しかし、この差異は競合における優位性を高めるほどの差異でもないと判断されている。

本スタック系統トウモロコシでは、導入された *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって、穀粒中で特異的に遊離リシン含量が高まり、また、それによってリシン合成後の二次代謝産物の量も増加することが確認されたが、上記のわが国における隔離ほ場試験及び米国におけるほ場試験結果から、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関する各特性は、従来トウモロコシの変動の範囲内であることが示されている。

また、本スタック系統トウモロコシはチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるトウモロコシが、本形質が付与されたことによって自然条件下で自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競

合における優位性を持つとは考えられない。

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

LY038 と対照の Null 型トウモロコシとの間で、有害物質産生性の有無を土壤微生物相試験、植物体鋤込み試験、及び、栽培土壌を用いた後作試験により比較検討した結果、土壤微生物相試験及び植物体鋤込み試験では差異は認められなかったが、後作試験において、組換えトウモロコシ LY038-B でハツカダイコンの乾物重に統計学的有意差が認められた。しかしながら、①LY038-A と対照の Cont-A の栽培土壌におけるハツカダイコンの乾物重では差異が認められなかったこと、②生体重では LY038-A と Cont-A との間及び LY038-B と Cont-B との間のいずれにおいても差異が認められなかった。

さらに、穀粒を用いた鋤込み試験を行った結果でも、LY038 とその対照の Null 型トウモロコシとの間で、差異は認められなかった。

また、前述の後作試験では有意差が認められなかったものの、検定植物であるハツカダイコン(品種名 ; アイシクル)の発芽率が、LY038 で低くなっているのは明らかであると判断された。そこで、発芽揃いの良かった品種フレンチブラックファーストを用いて再度後作試験を行った結果、LY038 と対照の Null 型トウモロコシの間で、差異は認められなかった。

以上のように、土壤微生物相試験、鋤込み試験、後作試験において差異が認められなかったことから、LY038 が野生植物や土壤微生物に有害な影響を及ぼすとは考えにくい。

LY038 ではリシン及びその二次代謝産物であるサッカロピン、 α -アミノアジピン酸、ピペコリン酸が高まっていることから、これらの物質の生物多様性影響評価を行った。その結果、文献調査、マウス急性毒性試験、ブロイラーの肥育試験によってこれらの物質が野生動物に毒性影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。

MON810 において有害物質の産生性の有無を、鋤込み試験、後作試験、土壤微生物相試験で評価した。その結果、MON810 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。

また、わが国において、MON810 の花粉の飛散により生息もしくは生育に影響を受ける可能性のある野生動植物として特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)

への影響を調べたが、MON810 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の20m 以内と推定された。非標的コウチュウ目昆虫と非標的チョウ目昆虫がトウモロコシほ場近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。

以上から、MON810 が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。さらに、花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考える最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはないと判断された。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が生ずるおそれはないと判断された。

わが国ではトウモロコシと交雑可能なテオシント及び*Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

また、LY038 ではリシン含量が高まっているため、仮に LY038 を野生動物が摂食した場合は、野生動物の生育が促進される可能性が考えられた。しかし、LY038 を野生動物が摂食する機会は極めて低いと考えられることから、LY038 が我が国で栽培されたとしても LY038 が間接的に生物多様性に影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。

本スタック系統トウモロコシでは LY038 と同様に遊離リシン量が高まっていることから、ブロイラーに対しても LY038 と同様の効果があると考えられたが、LY038 と同様、本スタック系統の穀粒を野生動物が摂食する機会は極めて少なく、特定の野生動物の生育に影響を生ずる可能性は低いと考えられ、本スタック系統トウモロコシによって間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシを第一種使用規程にしたが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判断した。

[引用文献]

[社外秘につき非開示]

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成19年1月18日

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

第一種使用規程の承認を申請している高リシン及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cordapA*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI: REN- 000 38-3 × MON-00810-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、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は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

- 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は以下に示すとおりである。

平成 19 年 1 月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 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) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、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

弊社は生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

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

弊社は具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成19年1月18日

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

第一種使用規程の承認を申請している高リシン及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cordapA*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI: REN- 000 38-3 × MON-00810-6)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、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は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

- 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は以下に示すとおりである。

平成 19 年 1 月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 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) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、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

弊社は生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

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

弊社は具体的措置として、特定された問題に応じ、本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。