

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ
(*cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis.)
(MON 88017×MON 810, OECD UI: MON-88017-3×MON-00810-6)
申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理的及び生態学的特性	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1) 供与核酸に関する情報	5
(2) ベクターに関する情報	17
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	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	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	32
(1) 使用等の内容	32
(2) 使用等の方法	32
(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	32
(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	32
(5) 実験室等での使用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	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	34
1 競合における優位性	34
2 有害物質の産生性	36
3 交雑性	46
4 その他	47
第三 生物多様性影響の総合的評価	48
引用文献	50
緊急措置計画書	51

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 10 月 19 日

農 林 水 産 大 臣 島 村 宜 伸 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 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	除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays (L.) Iltis</i>)(MON 88017 × MON 810, OECD UI: MON-88017-3 × 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	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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. 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。

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*)で、デント種に属する。

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)。尚、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)。日本へは天正年間(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)。国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づく、2002 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 2,800 万 ha、中国が 2,500 万 ha、ブラジルが 1,200 万 ha、メキシコが 700 万 ha、インドが 600 万 ha、ナイジェリアが 400 万 ha、南アフリカが 300 万 ha となっている(文献 4)。尚、同統計情報に基づく 2002 年の日本における栽培面積は約 3 万 ha であった。

日本は海外から約 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)。

尚、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、現在、一般に栽培用として市販されているトウモロコシのほとんど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、一般に短日植物であり、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壤土が適し、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、自然条件下で植物として繁殖し、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包皮で覆われており、自然の脱粒性はない(文献 1)。トウモロコシは長い間栽培植物化されていたために、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く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する(文献 2; 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°C 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)。トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*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 90-100 μm 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

—

へ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育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

除草剤グリホサート及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON 88017, OECD UI: MON-88017-3)(以下、MON 88017 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) (MON 810, OECD UI: MON-00810-6)(以下、MON 810 とする)を従来の交雑育種法を用いて交配させた除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI: MON-88017-3×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 MON 88017 と MON 810 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 MON 88017 と MON 810 の調製等に関する情報について個別に述べた。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

MON 88017 の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 1(p7)及び表 1(p8~9)に示したとおりである。また、構成要素の塩基配列は MON 88017 の生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p32~33 及び p50~54 に記載されている。尚、本組換えトウモロコシには野生型 *cp4 epsps* 遺伝子を改変した *cp4 epsps* 遺伝子及び野生型 *cry3Bb1* 遺伝子を改変した *cry3Bb1* 遺伝子を導入しており、以下この遺伝子を「改変型 *cp4 epsps* 遺伝子」及び「改変型 *cry3Bb1* 遺伝子」、発現する蛋白質を「改変型 Cry3Bb1 蛋白質」及び「改変型 CP4 EPSPS 蛋白質」と称する。

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図 2(p10)及び表 2(p11)に示したとおりである。

cryIAb 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。

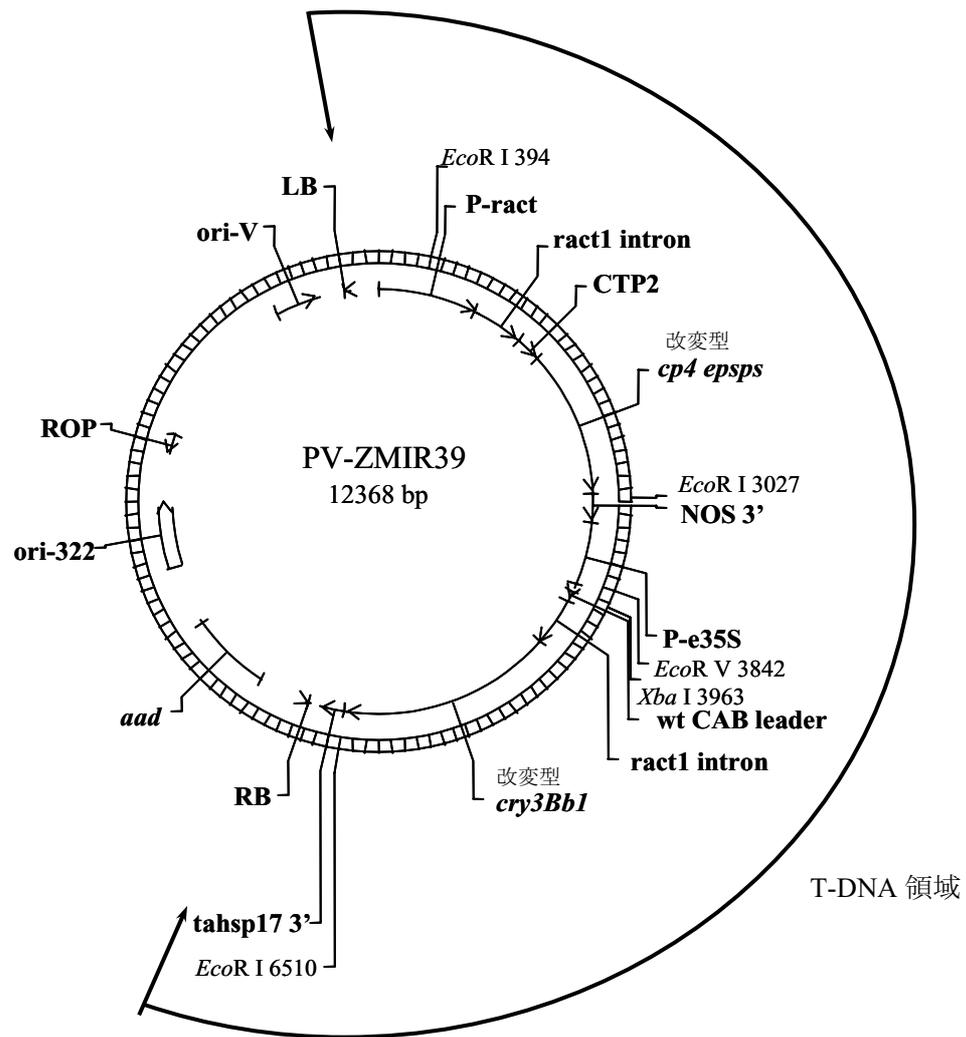


図1 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39¹

¹ 本図に記載された情報に係る権利およ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 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素・由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
改変型 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-ract	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる(文献 9)。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。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 12)。
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塩基配列(文献 13)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ、CP4 EPSPS 蛋白質を輸送する。
改変型 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(文献 14; 文献 15)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関しては N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。機能の詳細については p12~13 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 16)。
改変型 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子カセット	
P-e35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター(文献 17)。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。
wt CAB leader	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 18)。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。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 12)。
改変型 <i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> の改変した Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子(文献 19)。MON 863 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一ヶ所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON 863 ではグリシンであるのに対して MON 88017 ではアスパラギン酸である。機能詳細については p13~14 を参照。
tahsp 17 3'	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 20)。

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

表 1 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素・由来及び機能(続き)³

T-DNA 領域以外の構成要素	
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>Agrobacterium 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 21)。
<i>aad</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の、Tn7 アデニルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する(文献 22)。
ori-322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E.coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 23)。
ROP	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマータンパク質を抑制するコーディング配列(文献 24)。
ori-V	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 25)。
LB	Ti プラスミド pTi15955 に由来する左境界配列の DNA 断片。左境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 26)。

³ 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。

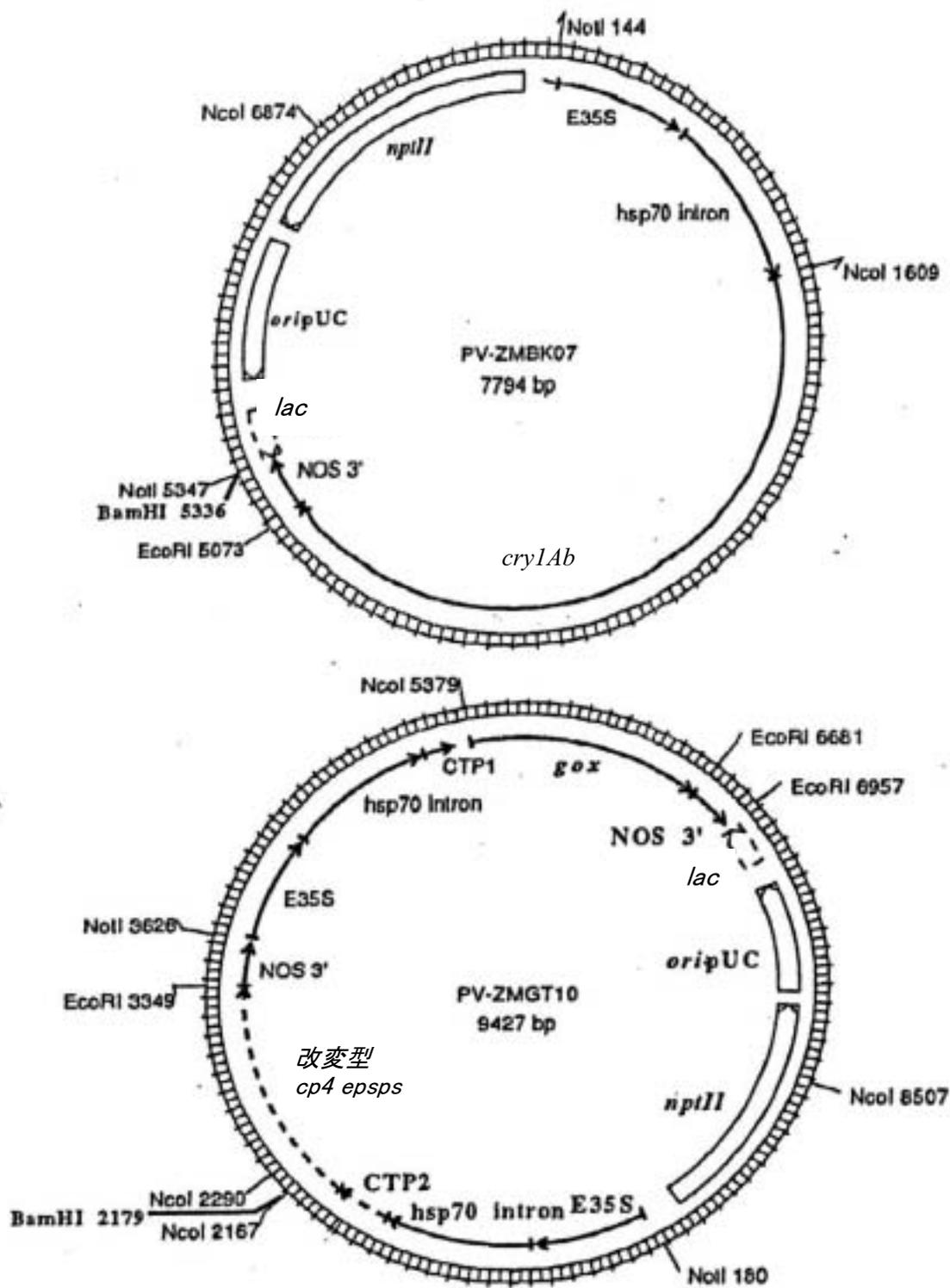


図 2 MON810 の作出に用いたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10⁴

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

表 2 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⁵

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 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)。
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。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 28)。
<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 29)。機能の詳細については p14~15 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 16)。
改変型 <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 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)を持つ。
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。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 28)。
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 13)。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。
改変型 <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 14; 文献 15)。
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 16)。
<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 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)。
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 28)
CTP 1	シロイヌナズナ由来の <i>rubisco</i> の small subunit 1A 遺伝子の中で、 <i>rubisco</i> 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 30)。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 31)。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 16)。
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 32)。 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 33)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、ネオマイシンホスホ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 34)。

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

ロ 構成要素の機能

MON 88017 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p8~9)に示した。MON 810 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2(p11)に示した。

【改変型 *cp4 epsps* 遺伝子】

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する(文献 35; 文献 36)。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変型 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変型 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する(文献 37)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である(文献 38; 文献 36)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate, DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている(文献 39; 文献 40)。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており(文献 41)、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている(文献 42; 文献 43; 文献 44; 文献 45)。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸 (PEP)とシキミ酸-3-リン酸 (S3P)から、EPSP と無機リン酸 (Pi)を生ずる

可逆反応を触媒する酵素であり(文献 46)、これらの基質と特異的に反応することが知られている(文献 47)。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

②改変型 CP4 EPSPS 蛋白質が、既知の接触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、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子】

①コウチュウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である改変型 *cry3Bb1* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* に由来し、コードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する corn rootworm (*Diabrotica* sp.)(以下 CRW とする)に対する殺虫活性を示す。改変型 Cry3Bb1 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 48; 文献 49; 文献 50)。

Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*, *Diabrotica*)に分類される Colorado potato beetle(*Leptinotarsa decimlineata*) (以下 CPB とする)と CRW のみに対して殺虫活性を示す(MON 88017 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p108 の Table 1)。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していることはこれまで報告されていないことが文献調査により示された(MON 88017 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p54 の表 10, 文献 51)。

なお、改変型 Cry3Bb1 蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、98%以上の相同性を有している(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 2 の p20 の図 5-2)。コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON 863 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質と MON 88017 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一ヶ所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON 863 ではグリシンであるのに対して本組換えトウモロコシではアスパラギン酸である。実際にはほ場における殺虫効果は MON 88017 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質を用いて行っている。

②改変型 Cry3Bb1 蛋白質が既知の接触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をデータベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用

いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

【*cry1Ab* 遺伝子】

①MON810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、土壤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(Frankenhuzen, 1993)。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 48; 文献 50)。*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。

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 52; 文献 53; 文献 54; 文献 55; 文献 56)。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 57)。

②Cry1Ab 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、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子+*cry1Ab* 遺伝子】

改変型 Cry3Bb1 蛋白質が属する Cry3 ファミリーと Cry1Ab 蛋白質が属する Cry1A ファミリーは、それぞれコウチュウ目昆虫及びチョウ目昆虫という異なる目に分類される昆虫種の幼虫に対して特異的に殺虫活性を示すことが、1960 年から生物農薬として使用されている *B.t.* 製剤の知見からも知られている。

また、両蛋白質とも標的昆虫の中腸上皮細胞の特異的受容体と結合して消化プロセスを阻害するという作用機作は共通しているが、チョウ目昆虫とコウチュウ目昆虫の幼虫における中腸内の pH は、それぞれアルカリ性(pH 10.5~pH 11.0)と

中性(pH 6.5~pH 7.0)であり、両蛋白質は異なる化学条件でそれぞれ殺虫活性を発揮している(文献 58)。

更に、MacIntosh らの報告によると、表 3(p16)に示したように Cry1Ab 蛋白質と同じ Cry1A ファミリーに属する Cry1Ac 蛋白質と、改変型 Cry3Bb1 蛋白質と同じ Cry3 ファミリーに属する Cry3Aa 蛋白質に対して感受性を示さない非標的昆虫は、これら 2 つの異なるファミリーに属する *B.t.* 蛋白質を混合して与えた場合でも、変わらず非感受性のままであり、Cry1Ac 蛋白質と Cry3A 蛋白質に同時に暴露されることによる相乗的な影響を受けないことが報告されている(文献 59)。従って、従来の交雑育成法を用いて交配された交配後代品種である本スタック系統トウモロコシ中には親系統由来の Cry1Ab 蛋白質と改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、それらが互いの非標的昆虫に対して相乗効果的に殺虫活性を示す可能性はきわめて低いと考えられた。

表 3 Cry1 及び Cry3 蛋白質の異なる昆虫種に対する殺虫活性を調査した結果
(MacIntosh らの論文等をもとに作成した。)

	Cry1Ab ⁽¹⁾	Cry1Ac ⁽²⁾	Cry3A ⁽³⁾	Cry1Ac + Cry3A ⁽⁴⁾
Cockroach (<i>Blatella germanica</i>)	-	-	-	-
Alfalfa weevil (<i>Hypera postica</i>)	-	-	-	-
Cotton boll weevil (<i>Antonomus grandis</i>)	-	-	-	-
Horseradish flea beetle (<i>Phyllotreta armoraciae</i>)	-	-	-	-
Southern corn rootworm (<i>Diabrotica undecimpunctata howardii</i>)	-	-	-	-
Japanese beetle (<i>Popilla japonica</i>)	-	-	-	-
Colorado potato beetle (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	-	-	+	+
Mosquito (<i>Aedes aegypti</i>)	-	-	-	-
Green peach aphid (<i>Myzus persicae</i>)	-	-	-	-
Termite (<i>Reticulitermes flavipes</i>)	-	-	-	-
Beet armyworm (<i>Spodoptera exigua</i>)	+	+	-	+
Black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)	+	+	-	+
Cabbage looper (<i>Trichoplusia ni</i>)	+	+	-	+
Corn earworm (<i>Heliothis zea</i>)	+	+	-	+
European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	+	+	-	+
Tobacco budworm (<i>Heliothis virescens</i>)	+	+	-	+
Tobacco hornworm (<i>Manduca sexta</i>)	+	+	-	+
Spider mite (<i>Tetranychus urticae</i>)	-	-	-	-

- 1- Cry1Ab 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 2- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 3- Cry3A 蛋白質の濃度が人工飼料中で 500 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 4- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml、
Cry3A 蛋白質が 500 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
- + 検定幼虫の死亡率が 25%以上であった試験区
- 検定幼虫の死亡率が 25%以下であった試験区

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

MON 88017 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 pBR322 などをもとに構築された(文献 23)。MON 810 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 33)。

ロ 特性

MON 88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 の全塩基数は 12,368bp であり、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与するための *aad* 遺伝子を持つ(文献 22)。本ベクターの感染性は知られていない。

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 7,794 bp、9,427 bp であり、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてトランスポゾン Tn5 由来のカナマイシン／ネオマイシン耐性遺伝子(*nptII* 遺伝子)を持つ。本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

MON 88017 の作出には、上記の *aad* 遺伝子を持つ pBR322 などをもとに、プラスミドベクター PV-ZMIR39 を構築した。宿主内に移入された本ベクター中の T-DNA 領域は、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子カセット [P-ract]-[ract1 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3'] 及び改変型 *cry3Bb1* 遺伝子カセット [P-e35S]-[wt CAB leader]-[ract1 intron]-[*cry3Bb1*]-[tahsp17 3'] で構成される。尚、PV-ZMIR39 のプラスミドマップは、p6 の図 1 に記載した。

MON810 の作出には、上記の *nptII* 遺伝子を持つ pUC119 由来のベクターを元に、① *cry1Ab* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[*cry1Ab*]-[NOS3']) を連結したプラスミド PV-ZMBK07、ならびに②改変型 *cp4 epsps* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3']) と *gox* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP1]-[*gox*]-[NOS 3']) 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。尚、PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 のプラスミドマ

ップは、p9の図2に記載した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

MON 88017の作出では、プラスミドベクターPV-ZMIR39中のT-DNA領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される品種であるA x HiIIに導入した。

MON 810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トウモロコシ自殖系統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

【MON 88017の育成の経過】

①MON 88017の開発は1999年から始まった。アグロバクテリウム法によりプラスミドベクターPV-ZMIR39中のT-DNA領域をA x HiIIに導入した後、グリホサートを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得て、改変型Cry3Bb1蛋白質の発現をELISA分析によって検定し、グリホサート耐性と害虫抵抗性の付与された系統を選抜した。

②この際、形質転換カルスをカルベニシリンを含む培地で培養した後、これら抗生物質を含まない再生培地に移して培養することによって、アグロバクテリウムの残存性がないことを確認している(文献60)。

③2000～2001年にかけて延べ169ヶ所のほ場試験を行い、最終商品化系統を選抜するとともに、その環境安全性を評価した(試験に用いた系統についてはp20の図3を参照)。

MON 88017のわが国における認可状況は以下の通りである。

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の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。

2004年8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程(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)の審査を終了した。

【MON810 の育成の経過】

①PV-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。尚、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、改変型 *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 に改変型 *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(R0)の次世代(BC0F1)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。

②MON810 はパーティクルガン法によって DNA 断片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。

③1992 年より系統選抜の評価を開始し、1993～1995 年にかけて圃場試験を行って、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 ヶ所の圃場試験において、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 p20 の図 4 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始められている。

MON810 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- 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、指針への適合性が確認された。
- 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」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 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、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 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確認を受けた。
- 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確認を受けた。
- 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、指針への適合性が確認された。

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)

【MON 88017×MON 810 の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、MON 88017 と MON 810 の自殖系統を従来の交雑育種法を用いて作出した(p20 の図 5)。

社外秘につき非開示

図 3 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 の育成図

社外秘につき非開示

図 4 組換えトウモロコシ MON 810 の育成図

社外秘につき非開示

図 5 スタック系統トウモロコシ MON 88017×MON 810 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

【MON 88017 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON 88017 のサザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中1ヶ所に1コピーのT-DNA領域が組み込まれていることが確認された(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料2のAppendix IIIのp13のFigure 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6(p22)に示した。更に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(用いた世代についてはp20の図3の*印のついた系統を参照)におけるサザンブロット分析によって示された(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料3のp26の図3-4)。また、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性も複数世代で安定して発現していることを選抜の過程でグリホサート散布試験及びCry3Bb1蛋白質の抗体を用いたELISA法により確認している。

【MON 810 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

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*cry1Ab* 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7(p23)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(p22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)。また、チョウ目害虫への抵抗性も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ている。

尚、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由来の改変型*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)。

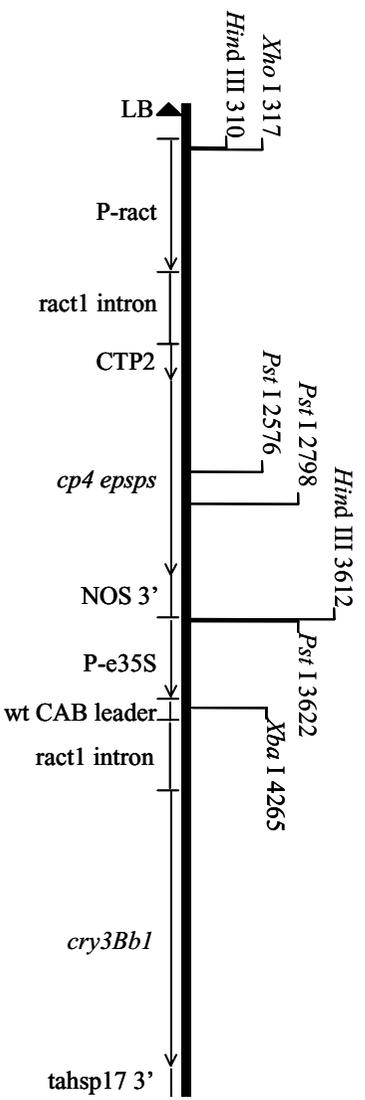


図 6 MON 88017 の挿入遺伝子地図⁶

⁶ 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は帰属する。

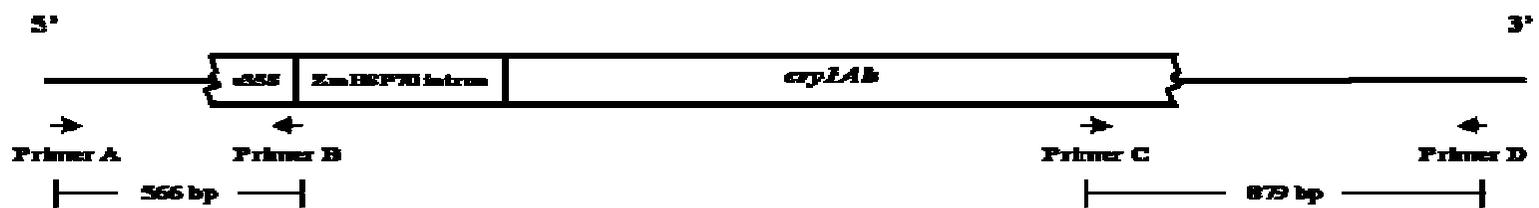


図7 MON 810 の挿入遺伝子地図⁷

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。