

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1A.105, cry2Ab2, Zea mays subsp. mays* (L.) Ittis)
(MON 89034)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	
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
(3) 生理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	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	10
(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	16
(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	17
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	17
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	19
(1) 使用等の内容	19
(2) 使用等の方法	19
(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	20
(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	20
(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	20
(6) 国外における使用等に関する情報	20
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	21
1 競合における優位性	21
2 有害物質の産生性	22
3 交雑性	25
4 その他の性質	26
第三 生物多様性影響の総合的評価	26
引用文献	28
緊急措置計画書	29

第一種使用規程承認申請書

平成 17 年 11 月 2 日

農 林 水 産 大 臣 中 川 昭 一 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	チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>cry1A.105</i> , <i>cry2Ab2</i> , <i>Zea mays subsp. mays</i> (L.) Iltis) (MON 89034)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字堤向 4475-2 名称：日本モンサント隔離ほ場 使用期間：平成 18 年 4 月 1 日から平成 19 年 1 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、7,836 m ² の隔離ほ場の外周を囲むように約 1.5m のフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入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、見やすい所に掲げている。 (3) 土、本組換えトウモロコシの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄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に、排水系統

には沈殿槽、網等を設置している。

2 隔離ほ場の作業要領

- (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。
- (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。
- (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すき込む等により確実に不活化する。
- (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、意図せず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。
- (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

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(英名: **Maize**)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(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*)で、デント種に属する。

ハ. 原産地については、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と、2004 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4800 万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,000 万 ha、中国が 2,570 万 ha、ブラジルが 1,240 万 ha、メキシコが 800 万 ha、インドが 700 万 ha となっている(文献 4)。尚、同統計情報に基づく 2004 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 1,650 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 1,200 万トン、食品用は約 450 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ところ、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℃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℃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 90-100µm 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

—

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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1A.105*, *cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON 89034) (以下、「本組換えトウモロコシ」という)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(p11)および表 1(p12~13)に示した。

ロ 構成要素の機能

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p12~13)に示した。

【*cry1A.105*】

- ① Bt 蛋白質は微生物農薬として 40 年以上使用されており (文献 12; 文献 13; 文献 14; 文献 15)、標的昆虫に対する作用機作についても既によく知られている。Bt 蛋白質は標的昆虫により経口摂取されると、中腸内でコア蛋白質に限定分解される。その後コア蛋白質は、中腸上皮細胞膜上の特異的受容体と結合することにより、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として中腸上皮細胞が破壊され、標的昆虫は消化プロセスを阻害されて死に至る (文献 16; 文献 17)。

また、これまでの研究から、Bt 蛋白質は異なる機能を持つ複数のドメインから構成され、それぞれのドメインが持つ機能も明らかにされている。例えば、Cry1A 蛋白質は、ドメイン I、II、III と C 末端ドメインにより構成されており、ドメイン I は、消化プロセスを阻害する陽イオン選択的小孔の形成、ドメイン II は特異的な受容体の認識、ドメイン III は受容体との結合性、そして C 末端ドメインは、Bt 蛋白質の結晶構造に関与していることが明らかにされている(文献 18; 文献 19)。

近年、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせることで、標的昆虫に対する

殺虫活性を高めた Bt 製剤が開発されており(文献 20; 文献 21; 文献 22)、既に Cry1Ac 蛋白質と Cry1F 蛋白質のドメインを組み合わせた微生物農薬(Lepinox WDG, Ecogen Inc.)も市販されている(文献 20; 文献 21)。このように、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせるにより、殺虫活性が高まるのは、殺虫活性を発揮する要因である 1) 3 次構造の改変、2) 昆虫のメンブレン(膜)レセプターの認識及び結合、3) オリゴマー形成あるいは昆虫の中腸内皮におけるチャンネル形成、等のいずれかあるいは複数の能力が高まるためであると考えられる(文献 23)。尚、このような Bt 蛋白質間でのドメインの組み替えは、自然界でも Bt 蛋白質が多様性を獲得する過程において起こっていることが明らかになっている (文献 18; 文献 19)。

本組換えトウモロコシの作出に用いられた Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質のドメイン I と II、Cry1F 蛋白質のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインにより構成されており、Cry1A.105 蛋白質と Cry1Ac 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質そして Cry1F 蛋白質とのアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 93.6%, 90.0%, 76.7%である(別添資料 1 の p36 の Table4)。

Cry1A.105 蛋白質を構成する Cry1Ac 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質は、土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*、Cry1F 蛋白質は、*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に由来し、これらの Bt 蛋白質がチョウ目以外の昆虫に対して殺虫活性を持たないことは、実験室内及びほ場での試験等により既に明らかにされている(e.g., 文献 24; 文献 25; 文献 26; 文献 27; 文献 28; 文献 29)。尚、これら 3 種類の Bt 蛋白質は、それぞれ既に第一種使用規程の承認がなされているチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.)(531, OECD UI: MON-ØØ531-6)、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* L.)(MON810, OECD UI: MON-00810-6)(以下 MON810 とする)、そしてチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI: DAS-Ø15 Ø7-1) 中で発現している。

実際に、Cry1A.105 蛋白質を用いて給餌試験を行ったところ、Cry1A.105 蛋白質はトウモロコシの主要チョウ目害虫である Corn earworm (CEW, *Helicoverpa zea*), fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*), black cutworm (BCW, *Agrotis epsilon*), European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*)に対して殺虫活性を示したが、チョウ目昆虫以外の非標的昆虫であるコウチュウ目の southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*)とカメムシ目の western tarnished plant bug (*Lygus hesperus*)に対しては殺虫活性を示さなかった (別添資料 1 の p41 の Table5)。このことから試験を行った範囲では、Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラムは、構成要素である Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質と同様にチョウ目昆虫以外には広がらないことが示唆された。

尚、Cry1A.105 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 の p38 の Figure 7 に示した。

- ② Cry1A.105 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 cry2Ab2 遺伝子】

- ① cry2Ab2 遺伝子がコードする Cry2Ab2 蛋白質は、土壌中に一般的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、Cry2Ab、CryIIB、CryB2 または CryIIAb とも呼ばれている(文献 30; 文献 31; 文献 32)。本組換えトウモロコシに導入した改変型 Cry2Ab2 蛋白質は、クローニングの際に制限酵素切断部位を挿入したため、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端から 2 番目のアミノ酸の後にアスパラギン酸が 1 つ挿入されているが、その他のアミノ酸配列は野生型と同一である。この改変型 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端に CTP の C 末端の 3 アミノ酸が付着していると推定されたが、この部分に関してアミノ酸配列の決定には至っていない。なお、標的昆虫に対する生物検定はこの CTP が付着している改変型 Cry2Ab2 蛋白質を用いて行った。改変型 Cry2Ab2 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 の p39 の Figure 8 に示した。

改変型 Cry2Ab2 蛋白質は、Cry1A.105 蛋白質と同様にトウモロコシの主要害虫である Corn earworm (CEW, *Helicoverpa zea*), fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*), black cutworm (BCW, *Agrotis epsilon*), European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*) に対して殺虫活性を示すが、非標的昆虫であるコウチュウ目の southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*)とカメムシ目の western tarnished plant bug (*Lygus hesperus*)に対しては殺虫活性を示さないことが既に明らかになっている(別添資料 1 の p41 の Table5)。更に、改変型 Cry2Ab2 蛋白質はミツバチ(*Apis mellifera* L.)の幼虫及び成虫、花粉媒介昆虫であるクサカゲロウ(*Chrysoperla carnea*)、捕食昆虫である寄生性膜翅目昆虫(*Nasonia vitripennis*)、そしてサカハチテントウ (*Hippodamia convergens*) などに対しても殺虫活性を示さないことが既に明らかとなっている(文献 33; 文献 34; 文献 35; 文献 36; 文献 37)。なお、サカハチテントウは我が国にも生育するジュウサンホシテントウ(*Hippodamia tredecimpunctata timberlakei*)の近縁種である。

尚、本組換えトウモロコシ中で発現している改変型 Cry2Ab2 蛋白質は既に第一種使用規程の承認を受けているチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (15985, OECD UI : MON-15985-7)(以下 15985 とする)中で発現している改変型 Cry2Ab2 蛋白質と同一であり、上記したトウモロコシの主要害虫の他にも、ワタ

栽培における主要チョウ目害虫である Tobacco budworm (*Heliothis virescens*)、Pink bollworm(*Pectinophora gossypiella*)、Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*)、Soybean Looper (*Pseudoplusia includens*)などにも殺虫活性を示すことが既に明らかとなっている。

- ② 改変型Cry2Ab2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(SwissPort, GenPept, PIR, GenBank/EMBL)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。

【cry1A.105 遺伝子+改変型 cry2Ab2 遺伝子】

本組換えトウモロコシは、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質を同時に発現することにより、既に第一種使用規程の承認がなされているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON810 と比べて、標的チョウ目昆虫に対する抵抗性が高まっている。実際に、MON810 と比較した場合、特に南米でのトウモロコシ栽培において深刻な被害をもたらしている fall armyworm(FAW, *Spodoptera frugiperda*)及び、Corn earworm (CEW, *Helicoverpa zea*)に対して MON 810 でも抵抗性はあったが、MON 89034 ではより優れた殺虫効果を示すことが観察されている。更に、本組換えトウモロコシは、MON810 と同様にトウモロコシ栽培におけるの主要害虫である European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*)、Southwestern corn borer (SWCB, *Diatraea grandiosella*)、そして Southern constalk borer (SCB, *Diatraea crambidoides*)に対して抵抗性を示すことが観察された。

また、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質は、それぞれに感受性を示す標的昆虫に対して相乗的に殺虫効果を示すことはないことが既に確認されている(別添資料 2 の p14 の Table 1 及び p15 の Table 2)。尚、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質の感受性昆虫に対する相互作用については、既に学術紙に公表されている Tabashnik の作成した以下の計算式を用いて考察した(文献 38)。

$$LC_{50(Cry1A.105 + Cry2Ab2)} = [(0.5 \div LC_{50(Cry1A.105)}) + (0.5 \div LC_{50(Cry2Ab2)})]^{-1}$$

本組換えトウモロコシのように、殺虫スペクトラムがほとんど重複している Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質(別添資料 1 の p41 の Table 5)を同時に発現させることにより、本組換えトウモロコシに対して感受性を示す標的チョウ目害虫は、2 種類の Bt 蛋白質に対して抵抗性を獲得しない限り、本組換えトウモロコシに対する抵抗性を獲得することは出来ない。このことから本組換えトウモロコシは、1 種類の Bt 蛋白質を単独で発現する Bt トウモロコシと比べて、抵抗性昆虫が発生する確率をより一層低く出来ると期待されている。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミドベクターPV-ZMIR245 は、大腸菌 (*Escherichia coli*)由来のベクターpBR322 (文献 39)などをもとに構築された。

ロ 特性

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR245 の塩基数は 17,600 bp である。大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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

宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素は表 1(p12~13)に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1(p11)に示した。

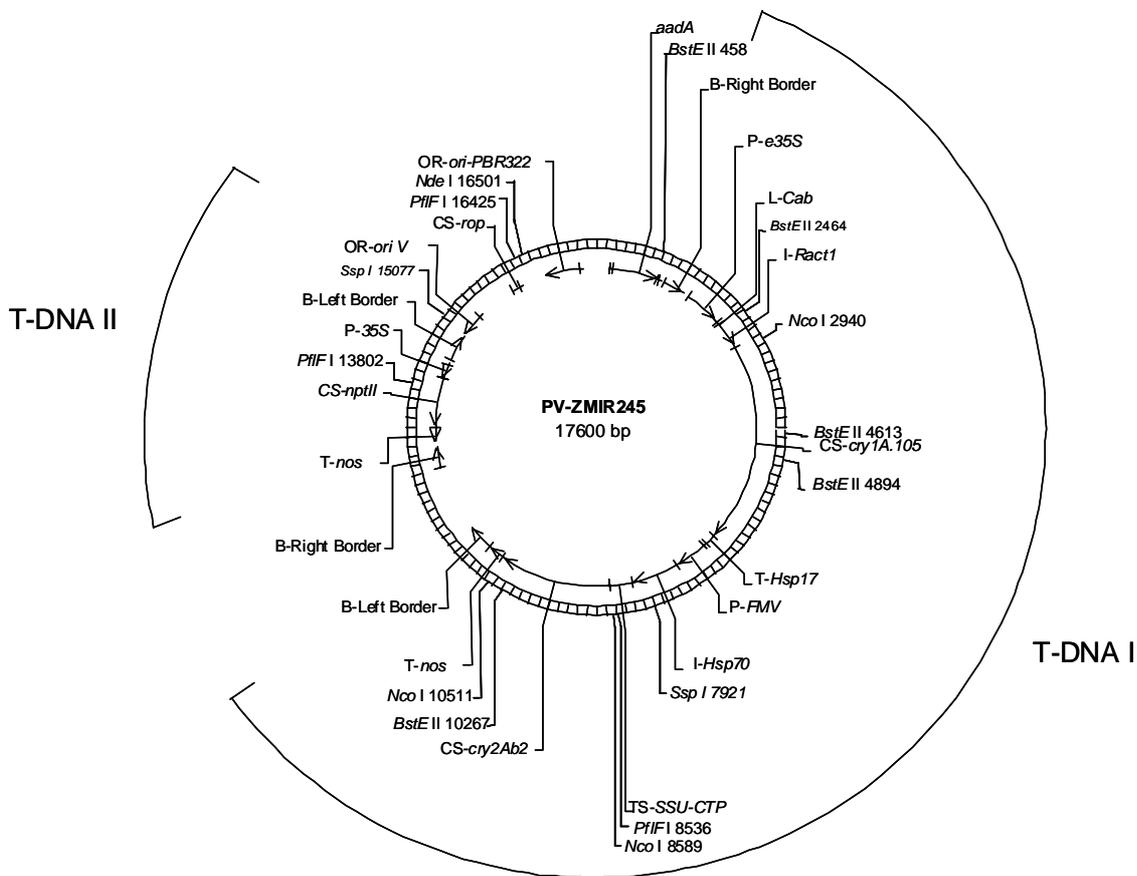


図 1 本組換えトウモロコシ MON 89034 系統の作出に用いられた PV-ZMIR245 のプラスミドマップ¹

本組換えトウモロコシの育成過程では、上図の T-DNA I 領域は持つが、T-DNA II 領域は持たない個体を選抜した。

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 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素 ^{注1}	由来及び機能
<i>cryIA.105</i> 遺伝子カセット (T-DNA I に含まれる)	
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 40)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
L-Cab	コムギのクロロフィル II a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳領域のリーダー配列(文献 41)。目的遺伝子の発現を最適化する。
I-Ract1	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、目的遺伝子を発現させる(文献 42)
CS- <i>cryIA.105</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> が発現する Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質、Cry1Ac 蛋白質の配列を組み合わせた蛋白質をコードする遺伝子(モンサント社データ)。詳細は p4~6 に記載した。
T-Hsp17	コムギの熱ショック蛋白質 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 43)。
改変型 <i>cry2Ab2</i> 遺伝子カセット (T-DNA I に含まれる)	
P-FMV	Figwort mosaic virus の 35S プロモーター(文献 44)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I-Hsp70	トウモロコシの hsp70(熱ショック蛋白質)遺伝子の第一イントロン(文献 45)。目的遺伝子の発現を最適化する。
TS-SSU-CTP	トウモロコシのリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットの輸送ペプチドで、第一イントロン配列を含む(文献 46)。下流に連結した蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>cry2Ab2</i> (改変型 <i>cry2Ab2</i> 遺伝子)	<i>Bacillus thuringiensis</i> に由来する改変型 Cry2Ab2 蛋白質をコードする遺伝子(文献 47)。詳細は p4~6 に記載した。
T-nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 48)。

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 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能 (続き)³

構成要素 ^{注1}	由来及び機能
<i>nptII</i> 遺伝子カセット (T-DNA II に含まれる。本組換えトウモロコシの後代には存在しない。)	
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(文献 49)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
CS- <i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(Beck <i>et al.</i> , 1982)。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(文献 50)。
T-nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 48)。
その他の構成要素	
B-Right Border (右境界配列)	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(25bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <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 51)。
B-Left Border (左境界配列)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、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 52)。
OR- <i>oriV</i>	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 53)。
CS- <i>rop</i>	<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蛋白質を抑制するコーディング配列(文献 54)。
OR- <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 39)。

注 1

B—Border (境界配列)

P—Promoter (プロモーター)

L—Leader (リーダー配列)

I—Intron (イントロン)

TS—Targeting Sequence (ターゲティング配列)

CS—Coding Sequence (コーディング配列)

T—3' nontranslated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequence (3 末端非翻訳終止配列、及びポリアデニル化シグナル配列)

OR—Origin of Replication (複製開始領域)

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。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMIR245 の中の二つの T-DNA 領域(T-DNA I, T-DNA II)をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種 LH172 の未熟胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- ① アグロバクテリウム法により PV-ZMIR245 を LH172 の組織切片に導入した後、培地上でアグロバクテリウムと共存培養して再生個体を得た。
- ② 再生個体をカルベニシリンとパロモマイシンを含む培地に移して培養した。カルベニシリンは、残存するアグロバクテリウムの除去に用いられ(文献 55)、パロモマイシンは、形質転換されていない個体の除去に用いられた。
- ③ R1 世代(p13 の図 1 の LH172BC0F₁)において、*nptII* 遺伝子 (T-DNAII に含まれる)を持つ個体をサザンブロット分析及び ELISA 法により特定し、廃棄した。
- ④ 挿入遺伝子や Cry1Ac.105 蛋白質及び改変型 Cry2Ab2 蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外ほ場での実際の害虫抵抗性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病害虫感受性など)などから総合的に判断して MON 89034 系統が選抜された(試験に用いた世代については p15 の図 2 を参照)。

[社外秘につき非開示]

図 2 チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON 89034 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

MON 89034 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(別添資料1のp97のTable 6)、染色体上に存在する。

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

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の1ヶ所に1コピーのT-DNA I領域が組み込まれていることが確認された(別添資料1のp55のFigure 12)。また、T-DNA IとT-DNA II領域以外の外側骨格領域とT-DNA II領域(*nptII*遺伝子発現カセットを含む)は挿入されておらず(別添資料1のp64~66のFigure 21~23)、T-DNA I領域内の*cryIA.105*遺伝子発現カセット及び改変型*cry2Ab2*遺伝子発現カセットも全ての構成要素が組み込まれていることが確認された(別添資料1のp56~63のFigure 13~20)。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におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料1のp90~91のFigure 36~37)。

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

1コピーなので該当しない(別添資料1のp55、Figure 12)。

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

本組換えトウモロコシの葉及び花粉中でのCry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質の発現量をELISA法により分析した。その結果、Cry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質の発現量は、成熟葉(I期)において平均値40 µg/g生重及び36 µg/g生重で、その発現量の範囲は26~56 µg/g生重及び18~51 µg/g生重であった(別添資料1のp103のTable 8)。また、Cry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質の花粉における発現量は、平均値4.4 µg/g生重及び0.29 µg/g生重で、その発現量の範囲は2.5~6.3 µg/g生重及び0.24~0.36 µg/g生重であった(別添資料1のp103のTable 8)。尚、Cry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質が発現していることは、各世代での選抜の過程で確認している。

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

プラスミド PV-ZMIR245 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* と *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られており、自然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

サザンブロット分析による特異的な検出、識別が可能であり、その検出感度については、約 10 μ g のゲノミック DNA を用いれば検出可能である。尚、PCR による検出・同定方法に関しては、現在開発中である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ. *cryIA.105* 遺伝子から発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変型 *cry2Ab2* 遺伝子から発現する改変型 Cry2Ab2 蛋白質は本組換えトウモロコシの全組織中で恒常的に発現している。

ロ. ⁴ モンサント社は 2004 年に米国の 3 箇所のほ場(インディアナ州、ミネソタ州、ミズーリ州)において各 3 反復で、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについてはほ場試験を行った。ほ場試験を行うにあたっては、①形態及び生育の特性、②生育初期における低温または高温耐性、④花粉の稔性及びサイズ、⑤種子の生産性、休眠性及び発芽率、⑥有害物質の産生性について評価を行った。

① 形態及び生育の特性

14 項目(初期成育程度、苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数、緑度保持度⁵、着雌穂高、稈長、脱穂率、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、穀粒中の水分含量、植物体の重量、収量)について、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態特性及び生育の特性を調査した(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。

その結果、インディアナ州のほ場において苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外は本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。なお、インディアナ州のほ場において苗立ち数の平均値は、本組換えトウモロコシが 72.3 個体、対照の非組換えトウモロコシは 76.7 個体であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。雄穂開花期播種後日数の平均値は、本組

⁴ 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。

⁵ R6 期における植物体全体の緑色の程度

換えトウモロコシが 66.0 日、対照の非組換えトウモロコシが 64.3 日であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。絹糸抽出期播種後日数の平均値は本組換えトウモロコシが 66.0 日、対照の非組換えトウモロコシが 64.3 日であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。

② 生育初期における低温又は高温耐性

生育初期における低温耐性試験を、昼間 12℃、夜間 5℃の条件で行ったが、この条件下では本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとで統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の p112 の Table 12)。

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、本組換えトウモロコシにおいて、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観察する予定である。

④ 花粉の稔性及びサイズ

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの間で、花粉の稔性及びサイズに統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の p117 の Table 14)。また、花粉の形態・大きさにも差異は認められなかった(別添資料 1 の p118 の Figure 43)。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを用いて種子の生産量(収量)の調査を行ったが、両者の間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。

脱粒性については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシは共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。

米国のアイオワ州 1 ほ場及びイリノイ州 2 ほ場(JR 及び MN)にて収穫された本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシ種子を用いて発芽率の調査を行ったが、両者の間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料 1 の p122 の Table 16)。

⑥ 交雑性

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、本組換えトウモロコシでは交雑性

の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

米国の温室において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で鋤き込み試験及び後作試験を行い、他の植物の生育に影響を及ぼす意図しない有害物質が産生されていないか調査を行ったが、全ての項目で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった(別添資料1のp126のTable18)。確認のため、隔離ほ場試験において鋤き込み、後作、土壌微生物相試験を行う予定である。

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

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板 4717

名称：日本モンサント隔離ほ場

使用期間：平成18年4月1日から平成19年1月31日まで

1 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入りを防止するために、7,836 m²の隔離ほ場の外周を囲むように約1.5mのフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入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、見やすい所に掲げている。
- (3) 土、本組換えトウモロコシの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄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に、排水系統には沈殿槽、網等を設置している。

2 隔離ほ場の作業要領

- (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。
- (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。
- (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すき込む等により確実に不活化する。

- (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、意図せず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。
- (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

尚、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料3として示した。

(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

これまで2002～2005年の間に米国、アルゼンチン、カナダにおいて延べ131ヶ所のほ場において試験が行われているが(別添資料1のp11のTable 1)、非組換えトウモロコシと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

尚、本組換えトウモロコシに関しては、(以下社外秘)。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価⁶

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条件下で自生した例は報告されていない。

本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因する生物多様性影響については、米国の 3 箇所のほ場および米国の温室で実施した試験の結果に基づき、以下のとおり評価した。

競合における優位性に関わる諸形質について、第一、2-(6)の①形態及び生育の特性、②生育初期における低温または高温耐性、③成体の越冬性又は越夏性、④花粉の稔性及びサイズ、⑤種子の生産性、脱粒性、休眠性及び発芽率に記載したように比較検討した。その結果、インディアナ州のほ場において苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。苗立ち数の平均値は、本組換えトウモロコシでは 72.3 個体、対照の非組換えトウモロコシでは 76.7 個体であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。雄穂開花期播種後日数の平均値は、本組換えトウモロコシが 66.0 日、対照の非組換えトウモロコシが 64.3 日であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。絹糸抽出期播種後日数の平均値は本組換えトウモロコシが 66.0 日、対照の非組換えトウモロコシが 64.3 日であった(別添資料 1 の p106~107 の Table 10)。その他の評価項目においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

なお、苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数において統計学的有意差が認められたが、これらはいずれも 3 箇所のほ場のうちの 1 箇所のみであり、その他の 2 箇所のほ場では統計学的有意差は認められなかったことから、この差異が挿入遺伝子によるものとは考えにくい。また、苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数のいずれも本組換えトウモロコシで観察された値は参考品種として栽培された従来品種の値の範囲内であり(苗立ち数=73.3~74.7 個体、雄穂開花期播種後日数=65.7~67.0 日、絹糸抽出期播種後日数=65.7~66.7 日)、従来品種の変動の範囲を超えるものではなかった。また、これらの差異のみで競合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は、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は

⁶ 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。また、本項目の 2.(2)の第二パラグラフ及び第三パラグラフに記載された生物検定の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。

明らかにされていないが、非組換えトウモロコシとの間に大きな相違はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと考えられた。

(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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されておらず、また、わが国に導入された1579年以來、長期間の使用経験がある。

2005年に米国の温室で行われた鋤き込み試験及び後作試験では、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に有害物質の産生性に起因するような差異は認められなかった(別添資料1のp126のTable18)。

本組換えトウモロコシではチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すCry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質が発現している。実際に、Cry1A.105蛋白質及びCry2Ab2蛋白質を用いて給餌試験を行ったところ、両蛋白質ともはトウモロコシの主要害虫であるCorn earworm (CEW, *Helicoverpa zea*), fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*), black cutworm (BCW, *Agrotis epsilon*), European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*)に対して殺虫活性を示したが、チョウ目昆虫以外の非標的昆虫であるコウチュウ目のsouthern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*)とカメムシ目のwestern tarnished plant bug (*Lygus hesperus*)に対しては殺虫活性を示さなかった(別添資料1のp41のTable5)。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、我が国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

チョウ目昆虫が本組換えトウモロコシ中で発現する当該蛋白質に暴露される経路としては、以下の3つが想定された。

- ①生育している本組換えトウモロコシを直接食餌した場合
- ②土壌中に鋤きこんだ本組換えトウモロコシの残渣を食餌した場合
- ③本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合

生育している本組換えトウモロコシを直接食餌する可能性のあるチョウ目昆虫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(*Ostrinia nubilalis*)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。

土壌中に鋤き込んだ本組換えトウモロコシの残渣を食餌するチョウ目昆虫については、これまでに知られている限り、土壌中に生息するチョウ目昆虫の幼虫は、土壌中にいる間は越冬するために冬眠状態にあるか、何も摂食しない休眠状態にある。このことから、まず越冬する為に冬眠状態にあるか、何も摂食しない休眠状態にあるチョウ目昆虫の幼虫が、土壌中に鋤き込まれた本組換えトウモロコシの残渣を摂食する可能性はほとんどないものと考えられた。仮に、土壌中に鋤き込んだ本組換えトウモロコシの残渣を食餌するチョウ目昆虫が隔離ほ場内に生息していたとしても、このチョウ目昆虫が隔離ほ場内のみならず局所的に生息しているとは考えにくく、何らかの影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫は特定されなかった。

本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌する場合についても、隔離ほ場周辺にある特定のチョウ目昆虫種が局所的に生息している可能性は極めて低いが、本組換えトウモロコシの花粉中で発現するCry1A.105蛋白質及び改変型Cry2Ab2蛋白質によりチョウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性は否定できない。そこで、「環境省レッドリスト(2000年改訂版)」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チョウ目昆虫の特定を行った。1)幼虫の活動期(摂食期)と本遺伝子組換えトウモロコシの開花期の関係、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

米国で行った野外試験の際に、本組換えトウモロコシの花粉中での Cry1A.105 蛋白質及び改変型 Cry2Ab2 蛋白質の発現量を調査した結果、それぞれ $4.4 \mu\text{g/gfw}$ と $0.29 \mu\text{g/gfw}$ であった(別添資料 1 の p103 の Table8)。

また、一般的な花粉 1 粒あたりの重量は約 $6.4 \times 10^{-7} \text{g}$ であり、本組換えトウモロコシの花粉の直径は平均値で約 $91.8 \mu\text{m}$ であることが明らかになっている(別添資料 1 の p117 の Table14)。

更に、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質それぞれと、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質を 1:1 の割合で混合したものを人工飼料に異なる濃度で混合して、両蛋白質に対して高い感受性を持つ European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*) と感受性のあまり高くない Corn earworm (CEW, *Helicoverpa zea*) にそれぞれ 7 日間と 12 日間与えた。試験終了後、ECB 及び CEW の LC_{50} (供試幼虫の半数が死亡する濃度)、 MIC_{50} (供試幼虫の半数の 1 回目の脱皮が阻害される濃度) 及び 3IC_{50} (供試幼虫の半数が 3 齢まで生育出来なくなる濃度) を調査した結果、いずれの値も Cry1A.105 蛋白質を単独で与えた場合が最も低く、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質を同時に与えた場合より殺虫活性が高いことが示された(別添資料 2 の Table1)。尚、Cry1A.105 蛋白質を単独で与えた ECB の LC_{50} は $0.55 \mu\text{g of toxin / ml diet}$ 、改変型 Cry2Ab2 蛋白質を単独で与えた ECB の LC_{50} は $4.02 \mu\text{g of toxin / ml diet}$ 、Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質を 1 : 1 の割合で混合したものを与えた ECB の LC_{50} は $1.01 \mu\text{g of toxin / ml diet}$ であった(別添資料 2 の Table1)。

本来、本組換えトウモロコシは Cry1A.105 蛋白質と改変型 Cry2Ab2 蛋白質の両方を発現しているが、上記のように標的チョウ目昆虫は Cry1A.105 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質を混合した場合と比べて、Cry1A.105 蛋白質を単独で摂取した場合の方が高い感受性を示す。従って、本組換えトウモロコシが殺虫活性を最大限発揮した場合の影響を評価する為に、本組換えトウモロコシ中における改変型 Cry2Ab2 蛋白質の花粉中での発現量 $0.29 \mu\text{g/gfw}$ と Cry1A.105 の発現量の $4.4 \mu\text{g/gfw}$ の合計 $4.69 \mu\text{g/gfw}$ が全て殺虫活性の高い Cry1A.105 蛋白質として発現していると想定した。

以上の条件から、換算すると現在知られている中で最も本組換えトウモロコシに対して感受性の高いチョウ目昆虫である ECB は、本組換えトウモロコシの約 $1,700 \text{粒/cm}^2$ ⁷ の花粉に暴露されると毒性影響を受けると考えられた。

⁷ 本組換えトウモロコシの花粉飛散による最大の影響を考慮するため、本組換えトウモロコシ中における改変型 Cry2Ab2 蛋白質の花粉中での発現量 $0.29 \mu\text{g/gfw}$ と Cry1A.105 の発現量の $4.4 \mu\text{g/gfw}$ の合計 $4.69 \mu\text{g/gfw}$ が全て殺虫活性の高い Cry1A.105 蛋白質として発現したと仮定して以下の試算を行った。花粉 1 粒あたりの Cry1A.105 の発現量は、 $4.69 \mu\text{g} \times 6.4 \times 10^{-7} \text{g}$ (1 粒当たりの重量) = $3.002 \times 10^{-12} \text{g}$ である。Cry1A.105 の LC_{50} は 1 ml 当たり $0.55 \mu\text{g}$ であるから、 LC_{50} に相当する Cry1A.105 蛋白質を発現する花粉量は、 $0.55 \mu\text{g} \div 3.002 \times 10^{-12} \text{g} =$ 約 182,000 粒となる。花粉が 1 層のみ堆積すると仮定すると、 1cm^2 当たりの花粉堆積数は、 $182,000 \times 91.8 \mu\text{m}$ (花粉の直径) = 約 1,700 粒となる。

(3) 影響の生じやすさの評価

トウモロコシほ場の風下側に落下する花粉密度については、既に調査されており、この推定値は、一定方向に強い風速(3m/秒)の風が開花期間中吹き続けるとして求めたものであり、通常的气象条件ではこれ以上の堆積はないという考えに基づいている(文献 56)。この推定ではほ場から離れるに従って堆積花粉数は減少し、ほ場から 10m 離れると約 4,000 粒/cm²、20 m 離れると約 1,800 粒/cm²、30m 離れると約 900 粒/cm²、40 m 離れると約 700 粒/cm²に減少することが示されている。

また、既に述べたように現在知られているチョウ目昆虫の中で本組換えトウモロコシに対して最も高い感受性が高いことが予想される ECB は、約 1,700 粒/cm²の密度の本組換えトウモロコシの花粉を摂取した場合に毒性影響を受けることが推定されている。

以上のことから、我が国に生息するチョウ目昆虫が本組換えトウモロコシから飛散する花粉によって影響を受ける可能性があるのは、最大でも本組換えトウモロコシから約 30 m の範囲であることが推定された。本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種が本組換えトウモロコシから半径 30 m の範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本組換えトウモロコシから飛散する花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

従って、我が国においては本組換えトウモロコシの花粉を用いた生物検定は行っていないが、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、本組換えトウモロコシから飛散する花粉に暴露されることにより、特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)及び、その他の我が国に生息するチョウ目昆虫が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。

(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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。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

以上から、本組換えトウモロコシは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主のトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。競合における優位性に関わる諸形質 14 項目(初期成育程度、苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数、緑度保持度、着雌穂高、稈長、脱穂率、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、穀粒中の水分含量、植物体の重量、収量)について、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態特性及び生育の特性を米国の3箇所のほ場及び温室試験を行って調査した結果、インディアナ州のほ場において苗立ち数、雄穂開花期播種後日数、絹糸抽出期播種後日数において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、その他の評価項目においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められなかった。これら統計学的有意差の認められた項目はいずれも3ヶ所のほ場のうちの1ヶ所のみであり、その他の2ヶ所のほ場では統計学的有意差は認められなかったことから、この差異が挿入遺伝子によるものとは考えにくい。また、有意差の認められたほ場での本組換え体の値は、従来品種の変動の範囲内であったことから、この差異のみで競合における優位性が高まるとは考えにくい。

従って、本組換えトウモロコシは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかに

されていないが、非組換えトウモロコシとの間に大きな相違は無いと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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有害物質の産生性に関わる諸形質を、米国の温室で行った鋤き込み試験、後作試験によって比較検討したが、差異は認められなかった。

また、わが国において、本組換えトウモロコシの花粉の飛散による影響の可能性が特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)への影響を考察したが、本組換えトウモロコシの花粉が影響する範囲は、本組換えトウモロコシから周辺の 30m 以内と推定され、また、本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種が本組換えトウモロコシ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。

従って、本組換えトウモロコシは、我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

わが国ではトウモロコシの近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

【引用文献】

[社外秘情報につき非開示]

緊急措置計画書

平成 17 年 11 月 2 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 4 丁目 10 番 10 号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1A.105*, *cry2Ab2*, *Zea mays subsp. mays* (L.) Itis) (MON 89034) (以下、本組換え体という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる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。尚、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とは、本組換え体に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 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は以下に示す通りである。

平成 17 年 11 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 東京都中央区銀座 4 丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部
	日本モンサント株式会社 河内研究農場
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 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

第一種使用等の状況は、日本モンサント隔離ほ場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

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

具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われ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及び環境省に報告する。