

耐熱性 α -アミラーゼ産生並びにチョウ目及びバチルス目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ(改変*amy797E*, 改変*cry1Ab*, 改変*cry3Aa2*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (3272×Bt11×MIR604×GA21, OECD UI : SYN-E3272-5×SYN-BT011-1×SYN-IR604-5×MON-00021-9) (3272, Bt11, MIR604及びGA21それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。) 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.....	2
第1 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
① 和名、英名及び学名	2
② 宿主の品種名又は系統名	2
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
イ、基本的特性.....	5
ロ、生息又は生育可能な環境の条件.....	5
ハ、捕食性又は寄生性.....	5
ニ、繁殖又は増殖の様式.....	5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	5
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性.....	5
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度.....	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	6
ホ、病原性.....	7
ヘ、有害物質の産生性.....	7
ト、その他の情報.....	7
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7

(1) 供与核酸に関する情報	7
イ、構成及び構成要素の由来.....	7
ロ、構成要素の機能	12
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	12
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(食品としてのアレルギー性を除く。)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	12
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	15
(2) ベクターに関する情報	16
イ、名称及び由来.....	16
ロ、特性.....	16
① ベクターの塩基数及び塩基配列	16
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	17
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.....	17
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	17
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成.....	17
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法.....	18
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過	18
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	18
② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無.....	18
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.....	19
(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	19
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	19
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性	20
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別.....	20
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性.....	20

⑤ ウイ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	20
(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.....	21
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	21
① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容	21
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	27
a 形態及び生育の特性.....	27
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	29
c 成体の越冬性又は越夏性	29
d 花粉の稔性及びサイズ	29
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	29
f 交雑率.....	30
g 有害物質の産生性.....	30
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	30
(1) 使用等の内容.....	30
(2) 使用等の方法.....	30
(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.....	30
(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.....	31
(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.....	31
(6) 国外における使用等に関する情報	31
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価	32
1. 競合における優位性.....	32
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
(2) 影響の具体的内容の評価.....	33
(3) 影響の生じやすさの評価.....	34
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	34
2. 有害物質の産生性	34
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
(2) 影響の具体的内容の評価.....	36

(3) 影響の生じやすさの評価.....	36
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
3. 交雑性.....	38
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
(2) 影響の具体的内容の評価.....	38
(3) 影響の生じやすさの評価.....	38
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	38
4. その他の性質.....	38
第3 生物多様性影響の総合的評価	39
引用文献	41
緊急措置計画書.....	42

第一種使用規程承認申請書

平成21年7月21日

5 農林水産大臣 石破 茂 殿
環境大臣 齊藤 鉄夫 殿

氏名 シンジェンタシード株式会社
代表取締役社長 大伴 秀郎

申請者

10

住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台401-2

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。

15

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>耐熱性α-アミラーゼ産生並びにチョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ（改変 <i>amy797E</i>, 改変 <i>cry1Ab</i>, 改変 <i>cry3Aa2</i>, <i>pat</i>, <i>mEPSPS</i>, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (3272 × Bt11 × MIR604 × GA21, OECD UI : SYN-E3272-5 × SYN-BT011-1 × SYN-IR604-5 × MON-00021-9) (3272, Bt11, MIR604及びGA21それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>—</p>

生物多様性影響評価書

第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：トウモロコシ

英名：maize、corn

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

15 ② 宿主の品種名又は系統名

耐熱性 α -アミラーゼ産生並びにチョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ(改変*amy797E*, 改変*cry1Ab*, 改変*cry3Aa2*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (3272×Bt11×MIR604×GA21, OECD UI : SYN-E3272-5×SYN-BT011-1×SYN-IR604-5×MON-00021-9) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」という。)は、以下の4つのトウモロコシを、従来の交雑育種法により掛け合わせることで作出された。

25 耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ

(改変*amy797E*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.)Iltis) (3272, OECD UI : SYN-E3272-5) (以下、「3272」という。)

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

(改変*cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp.*mays* (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI : SYN-BT011-1) (以下、「Bt11」という。)

30

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ

(改変*cry3Aa2*, *Zea mays* subsp.*mays* (L.)Iltis) (MIR604, OECD UI : SYN-IR604-5) (以下、「MIR604」という。)

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ

(*mEPSPS*, *Zea mays* subsp.*mays* (L.) Iltis) (GA21, OECD UI : MON-00021-9) (以下、「GA21」という。)

35

親系統である3272、Bt11、MIR604及びGA21の宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Z. mays*)のデント種である。それぞれの作出には以下の系統が使用された。

5

3272 : NP2499/NP2500系統

Bt11 : E89系統

MIR604 : NP2499/NP2500系統

GA21 : AT系統 (文献 1)

10

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの栽培起源種は現存せず(文献 2)、国内及び国外の自然環境におけるトウモロコシの自生は報告されていない。

15

なお、トウモロコシの起源に関与すると考えられる近縁種として、トウモロコシと交雑可能なテオシント(*Zea*属)とトリプサクム(*Tripsacum*属)の存在が知られている(文献 3)。テオシントとトリプサクムはメキシコとグアテマラを中心に、米国南部から南米にかけて自生しているが(文献 3、文献 4)、我が国においてこれらの近縁種が自生しているという報告はない。

20

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

25

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中米の複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある(文献 3)。考古学的検証に基づく、最初にトウモロコシが出現したのは紀元前6800

30

～5000年頃であり、紀元前5000～3000年頃に栽培が始まったと考えられている(文献 4)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような多数の変異種が生じたと考えられる(文献 4)。1492年のアメリカ大陸発見後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した(文献 5)。

35

我が国へは天正年間(1573～1591年)にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた(文献 5)。また、明治時代になって北海道へ米国からデント種とフリント種が新たに導入され、全国的に栽培が普及した(文献 5)。

5

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシの栽培地域はおよそ北緯58度から南緯40度に至る範囲で、主な栽培国は、米国、中国、ブラジル、メキシコ、インド、南アフリカ、ルーマニア等である。国際連合食糧農業機関(FAO)の統計によると、2007年におけるトウモロコシの世界総栽培面積は1億5,787万ヘクタールで、その上位3カ国は米国(3,502万ヘクタール)、中国(2,807万ヘクタール)及びブラジル(1,382万ヘクタール)であった(文献 6)。また、同年の世界総生産量は7億8,479万トンで、その上位3カ国は栽培面積と同じく、米国(3億3,203万トン)、中国(1億5,197万トン)及びブラジル(5,159万トン)であった(文献 6)。米国を始めとする主要栽培国では、大型機械を利用した大規模栽培が行われている。

世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2007年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、45.9 %が飼料、24.7 %がエタノール製造、18.9%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(文献 7)。

一方、我が国における2007年度のトウモロコシの栽培面積は、青刈りのサイレージ用トウモロコシ(デント種)が8万6,100ヘクタール、生食用の未成熟トウモロコシ(スイート種)が2万5,600ヘクタールであった(文献 8)。栽培面積における上位3都道府県は、青刈りのサイレージ用トウモロコシでは、北海道(3万8,300ヘクタール)、宮崎県(6,790ヘクタール)及び岩手県(5,210ヘクタール)、生食用の未成熟トウモロコシでは、北海道(9,070ヘクタール)、千葉県(1,900ヘクタール)及び長野県(1,510ヘクタール)であった。

30

財務省貿易統計によると、我が国は2007年に約1,663万トンのトウモロコシ子実を輸入している(文献 9)。輸入トウモロコシ子実のうちの約1,185万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている(文献 10)。

35

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

5 —

ロ、生息又は生育可能な環境の条件

10 トウモロコシは長い年月の間に栽培作物として馴化された結果、自然環境における生存能力を失った作物である(文献 3)。栽培に適しているのは、夏の平均気温が21～27℃で無霜期間が120～180日の地域であり、夏の平均気温が19℃以下で平均夜温が13℃以下になる地域では栽培されない(文献 2)。雨量については、年間降雨量が250～5,000 mmの地域で、無灌漑栽培では夏季に150 mmの降雨量が確保できる地域とされる(文献 2)。なお、トウモロコシの種子の発芽適温は33℃程度、発芽の最低温度は15 10～11℃であり、実際の栽培では13～14℃以上で播種が行われる(文献 2)。

ハ、捕食性又は寄生性

—

20

ニ、繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

25 トウモロコシの種子は雌穂に着生するが、雌穂は苞皮で覆われているため、自然に脱粒することはなく、ヒトの介在なしに種子が自然条件下で広範囲に拡散することはない(文献 3)。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壤温度が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)。

30

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

35 トウモロコシは種子繁殖する夏作一年生植物であり、種子以外に自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官を持たない(文献 3)。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

5 トウモロコシは他殖率95%程度であるが、自家和合性のため自家受粉も行う(文献 11)。トウモロコシは近縁野生種であるテオシント及びトリプサカムと交雑可能であり、テオシントとは自然交雑が報告されているが、トリプサカムとの交雑は極めて困難で自然交雑は報告されていない(文献 4)。なお、我が国にはトウモロコシと交雑可能なこれら野生種が自生しているという報告はない。また、アポミクシスについての
10 報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、稈の頂部に雄穂を1本、中央側部に雌穂を1~3本着
15 生する。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(文献 11)。

トウモロコシの花粉の稔性は花粉の充実度により観察され、花粉の形状は楕円~円
20 形で直径は90~120 μm 程度である(文献 2)。受粉は風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉であるが、自家不和合性はないので自殖もわずかに生じる(文献 2)。受粉が風媒に依存しているため、その受粉機会の多少は種子の生産量に影響する(文献 12)。

一般に、雄穂の開花は出穂のおよそ3日後に始まり、開花期間は盛夏で8~9日であ
25 る(文献 2)。一方、雌穂の絹糸抽出は雄穂開花のおよそ1日後に始まり、抽出期間は5~6日である(文献 2)。

我が国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ(*Helianthus annuus*)及びイヌ
30 ホオズキ(*Solanum nigrum*)葉へのトウモロコシ花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁(0 m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で81.7粒/cm²、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm²であった(文献 13)。また、ほ場から5 m離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で19.6粒/cm²、イヌホオズキの葉で22.2粒/cm²、ほ場から10 m離れた場合はヒマワリの葉で10粒/cm²以内であった(文献 13)。花粉の寿命は環境条件によって大きく異なるが、盛夏のほ場条件下では24時間以内である(文献 11)。

35

ホ、病原性

—

5 ヘ、有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、野生動植物等の生育又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は報告されていない。

10 ト、その他の情報

—

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

15

本スタック系統トウモロコシは、親系統である4つの組換えトウモロコシに由来する耐熱性 α -アミラーゼ産生性、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性を有する。また、本スタック系統トウモロコシは一代雑種品種(F1)として商品化されることから、収穫される種子には遺伝的分離により

20 本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれの導入遺伝子の組合せからなるスタック系統トウモロコシが含まれる。以下に3272、Bt11、MIR604及びGA21の調製等に関する情報の概要等を記載した。なお、GA21に関しては、シンジェンタ社の独自データ及び国際特許公開情報(文献 1)を参照した。

25 (1) 供与核酸に関する情報

イ、構成及び構成要素の由来

3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素

30 の由来を表 1～表 4 (8～12ページ)に示した。

表 1 3272の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
改変 <i>amy797E</i> 遺伝子発現カセット	
GZeinプロモーター	トウモロコシの27 kDa貯蔵蛋白質(γ -ゼイン)遺伝子由来の胚乳特異的プロモーター配列で(文献 14)、目的遺伝子をトウモロコシ種子の胚乳組織で特異的に発現させるために用いられた。
改変 <i>amy797E</i> 遺伝子	好熱古細菌 <i>Thermococcales</i> 目由来の α -アミラーゼ遺伝子(文献 15)で、耐熱性 α -アミラーゼ蛋白質(以下、改変AMY797E α -アミラーゼ)を産生する。改変 <i>amy797E</i> 遺伝子の塩基配列はトウモロコシにおける発現に適したコドン(文献 16)に置換されている。また、改変 <i>amy797E</i> 遺伝子のN末端には、トウモロコシの γ -ゼイン輸送シグナルペプチドを付加している。これは、目的蛋白質を小胞体内腔へ輸送するための配列である(文献 17)。一方、C末端には、小胞体保留シグナルを付加している(文献 18)。これらの付加配列により、発現した α -アミラーゼは胚乳細胞の小胞体に蓄積されると考えられる。
PEPC9 intron#9	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9配列(文献 19)で、目的遺伝子の発現を高めるために用いられた。
35Sターミネーター	カリフラワーモザイクウイルスの35S RNA由来のポリアデニル化配列(文献 20)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiIntプロモーター	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域を含むプロモーターで、目的遺伝子を単子葉植物全組織で恒常的に発現させる(文献 21)。
<i>pmi</i> 遺伝子	マンノースリン酸イソメラーゼ(phosphomannose isomerase) (以下、「PMI蛋白質」)を産出する大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)由来の <i>manA</i> 遺伝子で(文献 22)、遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられた(文献 23)。
NOSターミネーター	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニル化配列(文献 24)。
T-DNAの外骨格領域	
LB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のT-DNAの左側境界配列(LB)で、植物ゲノムへのT-DNA領域の組み込みに必要(文献 25)。
<i>spec</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)由来のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素を産出する <i>aadA</i> 遺伝子で、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する細菌選抜マーカー遺伝子(文献 26)。
VS1ori	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来の複製起点共通配列。 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> における複製開始領域(文献 27)。
ColE1ori	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)由来の、大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)におけるプラス

	ミドの複製起点領域(文献 28)。
<i>virG</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のVirGN54Dで、 <i>Agrobacterium</i> 法による効率的な植物の形質転換に必要な遺伝子(文献 29)。
<i>repA</i>	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のレプリコン(DNAの複製を制御する最小機能複製単位)領域で、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子(文献 30)。
RB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のT-DNAの右側境界配列(RB)で、植物ゲノムへのT-DNA領域の組み込みに必要(文献 31)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

表 2 Bt11の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
35S promoter	カリフラワーモザイクウイルスCM1841株由来で、 <i>Dde I</i> ・ <i>Dde I</i> 断片として得られた。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)を恒常的に発現させる(文献 32)。
IVS6-ADH1	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ1S(<i>Adh1-S</i>)遺伝子(文献 33)由来のイントロン。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物における目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)の発現量を高めるために用いられた(文献 34)。
改変 <i>cry1Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1株のCry1Ab蛋白質をコードする <i>cry1Ab</i> 遺伝子について、Cry1Ab蛋白質の有する殺虫活性に関与しないC末端コード領域を一部欠失させ、また、GC含量を変更し植物における発現量を高めるように塩基配列を改変した。ただし、Cry1Ab蛋白質のコア蛋白質のアミノ酸配列に変更はない。
NOS term	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及びmRNAのポリアデニル化シグナルを含む(文献 24、文献 35)。この配列により目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i>)の転写が終結される。
除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
35S promoter	カリフラワーモザイクウイルスCabb-s株由来で、 <i>AluI</i> ・ <i>DdeI</i> 断片として得た。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子(<i>pat</i>)を恒常的に発現させる(文献 20)。
IVS2-ADH1	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ1S(<i>Adh1-S</i>)遺伝子(文献 33)由来のイントロンである。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物中において目的遺伝子(<i>pat</i>)の発現量を高めるために用いられた(文献 34)。
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> のPAT蛋白質をコードする遺伝子である。PAT蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を植物に付与することから、遺

	伝子導入の際、組換え体を選抜するためのマーカーとして使用された。 <i>pat</i> 遺伝子はGC含量を変更し植物における発現量を高めるように塩基配列が改変された。ただし、この改変により発現するPAT蛋白質のアミノ酸配列は変更されていない(文献 36)。
NOS term	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域で転写ターミネーター及びmRNAのポリアデニル化シグナルを含む(文献 24、文献 35)。この配列により目的遺伝子(<i>pat</i>)の転写が終結される。
その他の領域	
構成要素	由来及び機能
ColE1 ori	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)プラスミドpUC18(文献 37、文献 38)由来の複製開始領域で、バクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点。
<i>amp^R</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)由来で、機能はβ-ラクタマーゼをコードし、抗生物質アンピシリン耐性を付与する(文献 38)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

表 3 MIR604の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

害虫抵抗性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
<i>MTL</i>	このプロモーターはトウモロコシのメタロチオネイン遺伝子由来で、標的とするコウチュウ目害虫であるコーンルートワームがトウモロコシの根を食害するため、根での目的遺伝子の転写の開始を誘導するのに適したプロモーターとして用いた。
改変 <i>cry3Aa2</i>	胞子を形成する一般的なグラム陽性土壌細菌である <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3Aa2</i> 遺伝子のGC含量を変更し植物における発現量を高めるように塩基配列を改変し、また、コーンルートワームに対する活性を高めるように、カテプシンGプロテアーゼ認識配列を導入した改変遺伝子で、改変Cry3Aa2蛋白質をコードしている。
<i>Nos</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域で、転写を終結させてポリアデニル化を誘導する。
選抜マーカー遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
ZmUbiInt	このプロモーターはトウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来で、単子葉植物の植物体全体で目的遺伝子の転写開始を誘導する。
<i>pmi</i>	この遺伝子は 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来の 遺伝子 で、PMI 蛋白質 (Phosphomannose isomerase) をコードする。PMI 蛋白質はマンノース6-リン酸とフルクトース6-リン酸を可逆的に相互変換する酵素であり、本酵素の導入によりマンノースを炭素源として利用できるようになる。形質転換細

	胞の選抜のために用いられた。
<i>Nos</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域で、転写を終結させてポリアデニル化を誘導する。
その他の領域	
構成要素	由来及び機能
<i>Spec</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のトランスポゾンTn7由来のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 <i>aadA</i> 。この遺伝子は、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を与えるため、バクテリア選抜マーカーとして使用。
<i>VS1 ori</i>	<i>Pseudomonas</i> 属細菌のプラスミドpVS1由来で、複製起点共通配列。 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 中でプラスミドの複製開始点として機能する。
<i>ColE1 ori</i>	バクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点。
LB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ノパリンTi-プラスミド由来のT-DNAレフトボーダー領域。
RB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ノパリンTi-プラスミド由来のT-DNAライトボーダー領域。
<i>VirG</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来、T-DNAの転移に関与する領域。
<i>RepA</i>	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のpVS1複製蛋白質で、植物に寄生するグラム陰性菌中でpVS1複製の一端を担う。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

表 4 GA21の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能

除草剤耐性遺伝子カセット	
構成要素	由来及び機能
Act promoter + intron	植物体全体で目的遺伝子の転写開始を誘導するイネのアクチン1遺伝子由来プロモーターで、転写効率を高める働きをもつ第一イントロン領域までを含む(文献 39)。
sssu + mssu (以下「OTP」という。)	ヒマワリのリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ(RuBisCo)遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列(sssu)と、トウモロコシのRuBisCo遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列(mssu)からなるoptimized transit peptide(OTP)配列で、目的遺伝子である <i>mEPSPS</i> 遺伝子によって発現する <i>mEPSPS</i> 蛋白質を、その作用の場である葉緑体に輸送する働きをもつ(文献 40)。
<i>mEPSPS</i>	トウモロコシの5-エノール-ピルビルシキミ酸3-リン酸合成酵素(EPSPS)遺伝子の突然変異によって得られた遺伝子(文献 41)で、除草剤グリホサートによって活性阻害を受けない5-エノール-ピルビルシキミ酸3-リン酸合成酵

	素(mEPSPS)をコードし、野生型EPSPSのアミノ酸配列における102番目のトレオニンがイソロイシンに、また、106番目のプロリンがセリンに変わっている(文献 1)。
NOS	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニル化配列で、転写を終結させる働きをもつ(文献 24)。
外骨格領域(GA21中には含まれない)	
構成要素	由来及び機能
<i>amp</i>	バクテリオファージM13由来の <i>lacI</i> の一部配列、プロモーター <i>plac</i> 及びβ-ガラクトシダーゼあるいは <i>lacZ</i> 蛋白質をコードする一部配列からなる <i>lac</i> 配列(文献 38)及び大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のプラスミドpBR322由来のアンピシリン耐性を付与するβ-ラクタマーゼ遺伝子(<i>bla</i>)から成り(文献 42)、β-ラクタマーゼを発現することで構築プラスミドを含む大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)を選抜・維持する。
<i>ori-puc</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のプラスミドpUC19由来の複製開始領域で、大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)においてプラスミドの自律増殖能を付与する(文献 28)。

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

3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、それぞれ表 1～表 4 (8～12ページ)に示した。

- 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(食品としてのアレルギー性を除く。)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

【耐熱性α-アミラーゼ】

- 15 改変AMY797E α-アミラーゼ :

改変AMY797E α-アミラーゼは、澱粉のデキストリン、マルトース及びグルコースへの加水分解を触媒するα-アミラーゼ(EC 3.2.1.1)(文献 43)に分類される酵素である。α-アミラーゼはトウモロコシ種子中にも含まれており、発芽の際に急激に活性上昇することが知られている(文献 44)。発芽時にはα-アミラーゼによって胚乳中の澱粉が分解され、その後の胚の生長に使用される。

20

5 5 改変*amy797E*遺伝子のプロモーターにはGZeinが用いられており、また、トウモロコシ由来のγ-ゼインシグナル配列がN-末端に、小胞体保留シグナル配列がC-末端にそれぞれ付加されていることから(文献 45)、発現する改変AMY797E α-アミラーゼはトウモロコシ胚乳内の小胞体に蓄積すると考えられる(文献 17 ; 文献 18)。

10 3272は、主としてトウモロコシを原料としたエタノール生産を効率的に行うために開発された。従来、トウモロコシ穀粒の乾燥粉末を利用してエタノールを生産する場合、水を加えた粉末を高温処理して澱粉を溶解し、微生物の培養液から抽出した耐熱性α-アミラーゼを添加して澱粉を液化する。3272では好熱古細菌 *Thermococcales* 由来の耐熱性の高い改変AMY797E α-アミラーゼをトウモロコシ種子中で特異的に発現させているため、澱粉の液化工程で3272種子を従来のトウモロコシ種子に混合することにより、工程作業の簡略化・低コスト化が期待される。

15 【害虫抵抗性蛋白質】

20 土壤細菌である *Bacillus thuringiensis* から単離されたBt蛋白質は、それぞれ特異的な昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種がBt蛋白質を摂取して消化すると、コア蛋白質となり標的昆虫の腸管上皮細胞の受容体に結合し、イオンバランスを乱して腸管上皮細胞を破壊し、その結果、消化プロセスが阻害されて殺虫活性を示すことが示唆されている(文献 46)。この作用機作はCry1Ab蛋白質及びCry3Aa2蛋白質で同様である。

改変Cry1Ab蛋白質：

25 Cry1Ab蛋白質の殺虫活性については、カナダ政府のデータベース(文献 47)に詳細な調査結果が掲載されており、トウモロコシ栽培における主要害虫であるチョウ目昆虫のヨーロッパアンコーンボラー(ヨーロッパアワノメイガ) (*Ostrinia nubilalis*)、コーンイヤールーム(アメリカタバコガ) (*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (*Spodoptera frugiperda*)等に殺虫活性を示す。一方、Cry1Ab蛋白質はチョウ目以外の昆虫には殺虫活性がないか極めて低い。

30

改変Cry3Aa2蛋白質：

35 改変*cry3Aa2*遺伝子については、宿主であるトウモロコシでの発現が高まるようGC含量を変更するため塩基配列が改変されている。また、標的コウチュウ目害虫であるコーンルートワームに対する殺虫効果を高めるために、Cry3Aa2蛋白質の108～110番目のアミノ酸配列であるバリン-セリン-セリンに相当する部分が、カテプシンG

プロテアーゼ認識配列であるアラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニンの4アミノ酸となるように塩基配列が改変されている。この改変により、改変Cry3Aa2蛋白質はコーンルートワームの中腸内において、カテプシンGプロテアーゼ認識配列の4番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのC末端側で切断され、コア蛋白質となる。しかし、この改変部分以外のアミノ酸配列は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 由来のCry3Aa2蛋白質のアミノ酸配列と同じである。

改変Cry3Aa2蛋白質は4種のコウチュウ目昆虫(ウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*)、ノーザンコーンルートワーム(*Diabrotica longicornis barberi*)、コロラドポテトビートル(コロラドハムシ)(*Leptinotarsa decemlineata*)、バンデッドキューカンバービートル(*Diabrotica balteata*))に殺虫活性を示した。一方、それ以外のコウチュウ目昆虫であるサザンコーンルートワーム(ジュウイチホシウリハムシ)(*Diabrotica undecimpunctata*)及びコットンボールウィービル(ワタミゾウムシ)(*Anthonomus grandis*)には活性を示さなかった。また、Cry3Aa2蛋白質はコウチュウ目以外の昆虫には殺虫活性がないか極めて低い。

【除草剤耐性蛋白質】

PAT蛋白質：

除草剤グルホシネートは植物のグルタミン酸合成酵素を阻害するため、植物は細胞内のアンモニアの蓄積によって枯死するが、PAT蛋白質が発現した場合にはグルホシネートをアセチル化し、不活性化するためにグルタミン合成酵素の阻害が起こらない。したがって、PAT蛋白質を発現する植物は除草剤グルホシネート耐性を示すことから、PAT蛋白質はBt11を選抜するためのマーカーとして利用された。

mEPSPS蛋白質：

除草剤グリホサートは、植物の芳香族アミノ酸合成経路の一部であるシキミ酸経路の5-エノール-ピルビルシキミ酸3-リン酸合成酵素(EPSPS)の活性を阻害し、芳香族アミノ酸合成を止めることで植物を枯死させる非選択性茎葉処理型除草剤である(文献48)。mEPSPS遺伝子がコードするmEPSPS蛋白質は除草剤グリホサートの存在下でもEPSPS活性を示し、植物内在性EPSPSに代わって芳香族アミノ酸の合成を可能とすることによって除草剤グリホサート耐性を付与する。

【選抜マーカー】

PMI蛋白質：

*pmi*遺伝子はPMI蛋白質(Phosphomannose isomerase)をコードする大腸菌(*Escherichia coli*)由来の遺伝子であり、PMI蛋白質はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する機能を有する。通常、トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、*pmi*遺伝子を持つ細胞はマンノースを利用して成長することができる。このため、*pmi*遺伝子を選抜マーカーとして目的遺伝子と一緒に植物細胞に導入し、マンノースを含む培地で培養することにより、*pmi*遺伝子とともに目的遺伝子を有する形質転換細胞の選抜が可能となる(文献 23)。PMI蛋白質はトウモロコシには存在しないが、ヒトの消化器官も含めて自然界に広く存在し、植物ではダイズ等において存在が確認されている。

10

アレルギー性については、それぞれの蛋白質について、公的に利用可能なデータベース(SWISS-PROT、FARRP等)を用いてアミノ酸配列の相同性検索を行った。その結果、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質は既知アレルギーと相同性を持たなかった。一方、改変AMY797E α -アミラーゼは、ワモンゴキブリ(*Periplaneta americana*)に特異的な既知アレルギー(Per a 3アレルギー)との間で、8個のアミノ酸残基からなる同一の配列がみられた。しかし、この配列はPer a 3アレルギーのIgE結合エピトープ配列(文献 49)とは一致しないことから、改変AMY797E α -アミラーゼが同様のアレルギーとなる可能性は極めて低いと推測された。その他、既知のアレルギーと構造的に相同な配列は認められなかった。

15

20

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変AMY797E α -アミラーゼは、3272において穀粒胚乳内の小胞体に局所的に蓄積されると考えられるが、基質である澱粉は穀粒中のプラスチド内に澱粉粒として存在する。改変AMY797E α -アミラーゼと基質となる澱粉は、細胞内の異なる部位に存在するため、細胞が破壊されない限りは改変AMY797E α -アミラーゼによる澱粉分解は生じないと考えられる。実際に3272の構成成分を分析した結果、穀粒の澱粉含量は対照の非組換えトウモロコシと同程度であった。また、改変AMY797E α -アミラーゼの常温における酵素活性は非常に低い。発芽及び初期生育について、10~40°Cの温度条件下で3272と対照の非組換えトウモロコシを観察した結果、いずれの条件下でも有意差は見られなかった。よって、改変AMY797E α -アミラーゼが宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

25

30

改変Cry1Ab蛋白質及び改変Cry3Aa2蛋白質が酵素活性を持つという報告はない。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 PAT蛋白質はL-フォスフィノトリシン(除草剤グルホシネート)及びジメチルフォスフィノトリシンに非常に高い基質特異性を持ち、これ以外にPAT蛋白質の基質となる他の蛋白質もしくはアミノ酸は報告されていない(文献 50)。よって、PAT蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10 mEPSPS蛋白質はシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり(文献 51)、ホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)と特異的に反応することが報告されている(文献 52)。よって、mEPSPS蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

15 PMI蛋白質は、マンノース6-リン酸とフルクトース6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない(文献 53)。よって、PMI蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

20

イ、名称及び由来

3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられたプラスミドは以下のとおりである。

25

3272 : 大腸菌(*Escherichia coli*)由来のpBluescript SK+を基に構築されたpNOV7013

Bt11 : 大腸菌(*Escherichia coli*)由来のpUC18を基に構築されたpZO1502

MIR604 : 大腸菌(*Escherichia coli*)由来のpUC19を基に構築されたpZM26

30 GA21 : 大腸菌(*Escherichia coli*)由来のpUC19を基に構築された pDPG434

ロ、特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

35

3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられたプラスミドの塩基数は以下のとおりであり、これらのプラスミドの構成要素の塩基配列は明らかにされている。

3272 : pNOV7013、11,439 bp

5 Bt11 : pZO1502、7,240 bp

MIR604 : pZM26、13,811 bp

GA21 : pDPG434、6,128 bp (文献 1)

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10

3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられたプラスミドに含まれる特定の機能を有する塩基配列は、以下の抗生物質耐性マーカー遺伝子である。なお、いずれの抗生物質耐性マーカー遺伝子も宿主には導入されていない。

15 3272 : *spec*遺伝子、ストレプトマイシン・エリスロマイシン・スペクチノマイシン耐性

Bt11 : *amp^R*遺伝子、アンピシリン耐性

MIR604 : *spec*遺伝子、ストレプトマイシン・エリスロマイシン・スペクチノマイシン耐性

20 GA21 : *amp^R*遺伝子、アンピシリン耐性(文献 1)

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

25 3272、Bt11、MIR604及びGA21の作出に用いられたpNOV7013、pZO1502、pZM26及びpDPG434に感染性を示すような配列があるという報告はない。

(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

30

3272、Bt11、MIR604及びGA21の宿主内に移入された核酸は以下のとおりである。

3272 : T-DNA領域であるRBとLBの間の2つの遺伝子発現カセット(改変*amy797E*遺伝子発現カセットと選抜マーカー遺伝子カセット)

35 Bt11 : pZO1502を制限酵素*NotI*で切断して*amp^R*遺伝子を削除した部分

MIR604 : T-DNA領域であるRBとLBの間の2つの遺伝子発現カセット(害虫抵抗性遺伝子カセットと選抜マーカー遺伝子カセット)

GA21 : pDPG434を制限酵素 *NotI* で切断して得られた、除草剤耐性遺伝子カセット (Act promoter+intron/OTP/*mEPSPS/NOS*)のみからなるDNA断片(文献1)

5

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入方法は、それぞれ以下のとおりである。

10 3272 : アグロバクテリウム法

Bt11 : エレクトロポレーション法

MIR604 : アグロバクテリウム法

GA21 : パーティクルガン法(文献 1)

15 ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換細胞の選抜は、それぞれ以下を添加した培地で行った。

20

3272 : マンノース

Bt11 : グルホシネート

MIR604 : マンノース

GA21 : グリホサート(文献 1)

25

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

30 3272及びMIR604においては遺伝子導入後、培養細胞の培地中に抗生物質セフトキシシンを添加して形質転換に用いたアグロバクテリウムを除去した。その後、再分化した植物体にPCRを行い、プラスミドの外骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子を含まない個体を選抜したことから、菌体の残存はないと考えられる。

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

5 本スタック系統トウモロコシは、耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシである3272、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であるBt11、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシであるMIR604及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシであるGA21を用いて、交雑育種法により作出された。なお、我が国における3272、Bt11、MIR604及びGA21の申請及び承認状況は表 5 (19ページ)のとおり
10 である。

表 5 我が国における3272、Bt11、MIR604及びGA21の申請及び承認状況

	食品	飼料	環境
3272	2007年12月 申請	2007年11月 申請	2006年10月 申請
Bt11	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2007年4月 第一種使用規程承認
MIR604	2007年8月 安全性確認	2007年8月 安全性確認	2007年8月 第一種使用規程承認
GA21	2003年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2005年11月 第一種使用規程承認
本スタック系統 トウモロコシ	2009年 申請予定	2009年 確認予定	2009年7月 申請

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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

3272、Bt11、MIR604及びGA21の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認さ
20 れている。

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

3272、Bt11及びMIR604においては、サザンブロット分析によって導入遺伝子が染色体上に1コピー存在し、複数世代において安定して伝達されることが確認されている。

GA21においては、サザンブロット分析によって導入遺伝子が染色体上の1カ所に存在し、移入された除草剤耐性遺伝子カセット (Act promoter + intron/OTP/*mEPSPS/NOS*)断片に由来する6つの連続的領域からなること、また、これらが複数世代において安定して伝達されることが確認されている。

- ③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

15 —

- ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

20 発現の安定性については以下のように確認した。

3272 : ELISA法による蛋白質の発現確認

Bt11 : ELISA法による蛋白質の発現確認、チョウ目害虫を用いた生物検定、除草剤グルホシネート散布試験

25 MIR604 : ELISA法による蛋白質の発現確認、コウチュウ目害虫を用いた生物検定

GA21 : 除草剤グリホサート散布試験

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝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

30

3272、Bt11、MIR604及びGA21に移入された核酸に伝達を可能とする配列は含まれていない。したがって、移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

(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

3272、Bt11、MIR604及びGA21の定量的PCR法による系統特異的検出方法が、European Commissionにより公開されている(文献 54;文献 55;文献 56;文献 57)。

5 定量限界値は、ゲノムDNAの濃度比でそれぞれ以下のとおりである。

3272 : < 0.09% (文献 54)

Bt11 : 0.08%以上 (文献 55)

MIR604 : < 0.09% (文献 56)

10 GA21 : 0.04%以上 (文献 57)

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、1つの種子又は植物体を上述の方法で分析し、いずれの分析でも陽性の結果が出た場合、本スタック系統トウモロコシであることが確認できる。

15

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

20

本スタック系統トウモロコシに付与された特性は以下のとおりである。

3272 : 導入遺伝子に由来する改変AMY797E α -アミラーゼによる耐熱性 α -アミラーゼ産生性及びPMI蛋白質による選抜マーカー特性

25 Bt11 : 導入遺伝子に由来する改変Cry1Ab蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及びPAT蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

MIR604 : 導入遺伝子に由来する改変Cry3Aa2蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性及びPMI蛋白質による選抜マーカー特性

GA21 : 導入遺伝子に由来するmEPSPS蛋白質による除草剤グリホサート耐性

30

第1.2(1)ロ、③(15~16ページ)で述べたとおり、改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質は、それぞれ異なる作用機作を持ち、独立して作用していると考えられる。よって、これらの蛋白質はSchrijverら(文献 58)が述べている相互作用についての検討が
35 必要な蛋白質には相当しないと考えられた。また、本スタック系統トウモロコシにお

いて発現する改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質は、それぞれ宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が宿主の代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

10 実際、各親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示していないことを確認するため、本スタック系統トウモロコシを供試して以下の調査を行った。

【耐熱性 α -アミラーゼの産生】

15 耐熱性 α -アミラーゼの産生性については、本スタック系統トウモロコシ及び3272を2007年に米国イリノイ州ブルーミントンのほ場で栽培し、成熟期の穀粒における改変AMY797E α -アミラーゼの発現量をELISA法で調査した。

20 調査の結果、本スタック系統トウモロコシと3272の間で改変AMY797E α -アミラーゼの発現量に有意差は見られなかった(表 6、22ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシの耐熱性 α -アミラーゼ産生性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

表 6 本スタック系統トウモロコシの穀粒における改変AMY797E α -アミラーゼの発現量

分析組織 ¹	本スタック系統トウモロコシ		3272		P値 ²
	平均値 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重)	標準偏差	平均値 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重)	標準偏差	
穀粒	1322.68	188.33	1492.41	169.52	0.215

ELISA法による発現量の調査は、2植物体、5反復で実施した。

¹ 穀粒以外の組織(葉・根・花粉)における改変AMY797E α -アミラーゼの発現量は、いずれも検出限界値以下であることを開花期の組織で確認した。

² 分散分析による統計処理を行い、F検定における確率が5%未満($p < 0.05$)を有意とした。

30 (本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

【チョウ目害虫を用いた生物検定】

チョウ目害虫抵抗性については、本スタック系統トウモロコシ、**Bt11**及び非組換えトウモロコシを2007年に米国の2カ所のほ場で栽培し、対象害虫であるヨーロッパアンコーンボラーの食害程度を調査した。米国のトウモロコシ栽培において、主要標的害虫のヨーロッパアンコーンボラーは2世代続けて発生するため、第1世代試験では、ヨーロッパアンコーンボラーの1齢幼虫(150匹/植物体)をトウモロコシの6～8葉期に接種し、14日後に葉の食害程度を目視で観察した。一方、第2世代試験では、ヨーロッパアンコーンボラーの1齢幼虫(200匹/植物体)をトウモロコシの開花期に接種し、約45日後に植物体あたりの穂軸食入痕長、雌穂食害長及び茎における食入痕長を調査した。

調査の結果、本スタック系統トウモロコシと**Bt11**の間で植物体の食害程度に有意差は見られなかった(表 7、24ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

表 7 本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫(ヨーロッパアンコーンボラー)による植物体の食害程度

調査項目		本スタック系統 トウモロコシ		Bt11		非組換え トウモロコシ	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ミネソタ州	第1世代試験： 葉の食害程度 ¹	1.0 a ²	0.00	1.0 a	0.00	3.3 b	0.61
	第2世代試験： 穂軸食入痕(cm)	0.0 a	0.00	0.1 a	0.10	3.2 b	0.57
	第2世代試験： 雌穂食害長(cm)	0.1 a	0.08	0.0 a	0.00	0.9 b	0.31
	第2世代試験： 茎の食入痕長(cm)	0.2 a	0.10	0.8 a	1.19	18.6 b	4.78
イリノイ州	第1世代試験： 葉の食害程度 ¹	1.0 a	0.00	1.0 a	0.00	4.7 b	1.15
	第2世代試験： 穂軸食入痕長(cm)	0.2 a	0.17	0.2 a	0.12	1.9 b	0.23
	第2世代試験： 雌穂食害長(cm)	0.3 a	0.29	0.4 a	0.10	1.7 b	0.40
	第2世代試験： 茎の食入痕長(cm)	1.7 a	1.33	1.2 a	1.03	22.9 b	2.62

食害程度の調査は、いずれも10植物体、3反復で実施した。

¹ 葉の食害程度は以下の9段階スケールに基づいて調査した(文献 59)。

- 5
- 1 食害が認められないか、軽微な食害痕(2~3の小さなスポットのみ)が認められる。
 - 2 全て2mm以下の小さな食害痕で被害が1枚か2枚の葉に認められる。
 - 3 小さな穿入痕が3枚以上の葉に認められる。
 - 4~8 食害面積の拡大に基づく。
 - 9 葉は大きく損傷し、食害が実質的に葉脈まで及ぶ。
- 10 ² 統計については調査項目ごとに実施しており、各調査項目において、同じ英文字の平均値間には有意差がない(F検定後のLSD、p=0.05)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

15 【コウチュウ目害虫を用いた生物検定】

- コウチュウ目害虫抵抗性については、本スタック系統トウモロコシ、MIR604及び非組換えトウモロコシを2007年に米国の2カ所のほ場で栽培し、対象害虫であるウエスタンコーンルートワームによる根の食害程度を調査した。ミネソタ州のほ場では、
- 20 ウエスタンコーンルートワームの卵(1500個/植物体)をトウモロコシの2~3葉期に接種し、絹糸抽出期に根の食害程度を目視で観察した。一方、イリノイ州のほ場では、ウエスタンコーンルートワームの卵が土壌中に存在するほ場に、トウモロコシが2~3

葉期の時点で卵が孵化するようにトウモロコシを栽培し、絹糸抽出期に根の食害程度を目視で観察した。

5 調査の結果、本スタック系統トウモロコシとMIR604の間で根の食害程度に有意差は見られなかった(表 8、25ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシのコウチュウ目害虫に対する抵抗性は、親系統を掛け合わせることにより変化していないことが確認された。

10 表 8 本スタック系統トウモロコシのコウチュウ目害虫(ウエスタンコーンルートワーム)による根の食害程度

調査項目	根の食害程度 ¹					
	本スタック系統 トウモロコシ		MIR604		非組換え トウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ミネソタ州 スタントン	0.44 a ²	0.37	1.26 ab	0.72	2.21 b	0.13
イリノイ州 ブルーミントン	0.09 a	0.02	0.10 a	0.02	0.63 b	0.13

食害程度の調査は、いずれも6植物体、3反復で実施した。

¹ 根の食害程度は、ウエスタンコーンルートワームによる根の損傷程度を、0.01(損傷がないか、1つないしは2つの軽微な表面的食害が認められる)~3.00(食害が3つの根節間全てに及んでいる)の間で16段階に分類する方法で調査した(文献 60)。

15 ² 統計については調査項目ごとに実施しており、各調査項目において、同じ英文字の平均値間には有意差がない(F検定後のLSD、p=0.05)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

20 【除草剤グルホシネートを用いた生物検定】

除草剤グルホシネート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、Bt11及び非組換えトウモロコシを2008年に米国の温室で栽培し、除草剤による薬害程度を調査した。トウモロコシの2葉期(播種後10~12日目)に、グルホシネートを有効成分とする
25 除草剤(製品名:リバティ™)を、467g active ingredient (a.i.)/ha(通常散布量)、1868g a.i./ha(通常散布量の4倍)及び3736g a.i./ha(通常散布量の8倍)で散布し、散布後12日目に薬害程度を目視で観察した。

30 調査の結果、本スタック系統トウモロコシとBt11の間で除草剤による薬害程度に有意差は見られなかった(表 9、26ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシ

の除草剤グリホシネートに対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

表 9 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホシネート散布による薬害程度

除草剤散布量 (g a.i./ha)	薬害程度(%) ¹					
	本スタック系統 トウモロコシ		Bt11		非組換え トウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
467	0.0 a ²	0.0	0.0 a	0.0	68.0 d	2.8
1868	7.7 b	0.8	9.3 b	0.8	97.3 e	1.6
3736	16.0 c	2.2	15.8 c	2.8	100 f	0.0

5 薬害程度の調査は、いずれも10植物体、3反復で実施した。

¹ トウモロコシの系統ごとに無散布区を設け、無散布区の植物体の薬害程度を0%(健全)として比較することで、除草剤散布区の薬害程度を0%(健全)から100%(完全枯死)と判定した。

² 同じ英文字の平均値間には有意差がない(Student-Newman-Keuls検定、p=0.05)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に
10 帰属する)

【除草剤グリホサートを用いた生物検定】

15 除草剤グリホサート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、GA21及び非組換えトウモロコシを2008年に米国の温室で栽培し、除草剤による薬害程度を調査した。トウモロコシの2葉期(播種後10~12日目)に、グリホサートを有効成分とする除草剤(製品名：タッチダウントータル™)を、840g acid equivalent (a.e.)/ha(通常散布量)、3360g a.e./ha(通常散布量の4倍)及び6720g a.e./ha(通常散布量の8倍)で散布し、散布後19日目に薬害程度を目視で観察した。

20

調査の結果、本スタック系統トウモロコシとGA21の間で除草剤による薬害程度に有意差は見られなかった(表 10、27ページ)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサートに対する抵抗性は、親系統を掛け合わせるにより変化していないことが確認された。

25

表 10 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による薬害程度

除草剤散布量 (g a.e./ha)	薬害程度(%) ¹					
	本スタック系統 トウモロコシ		GA21		非組換え トウモロコシ	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
840	2.7 a ²	1.5	2.7 a	1.5	95.8 d	1.2
3360	16.2 b	2.0	13.7 b	4.3	100 e	0.0
6720	20.3 c	1.3	19.3 c	0.8	100 e	0.0

薬害程度の調査は、いずれも10植物体、3反復で実施した。

¹ トウモロコシの系統ごとに無散布区を設け、無散布区の薬害程度を0%(健全)として比較することで、除草剤散布区の薬害程度を0%(健全)から100%(完全枯死)と判定した。

5 ² 同じ英文字の平均値間には有意差がない(Student-Newman-Keuls検定、p=0.05)。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタシード株式会社に帰属する)

10 以上のことから、それぞれの親系統で発現する蛋白質間で相互作用はなく、導入した遺伝子によって新たに獲得されたそれぞれの性質は、本スタック系統トウモロコシにおいて変化していないと結論された。

15 したがって、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生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である3272、Bt11、MIR604及びGA21を個別に調査した結果に基づき評価した。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

20 a 形態及び生育の特性

25 3272、Bt11、MIR604及びGA21とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、表 11 (28ページ)に示した項目について調査を行った。その結果、全ての調査項目で有意差は見られないか、あるいは同程度であった(別紙1、3～8ページ、表1～4；別紙2、4～8ページ、第2～11表；別紙3、3～8ページ、表2～5；別紙4、2～6ページ、表1～21)。

表 11 3272、Bt11、MIR604及びGA21の形態及び生育の特性調査実施項目

	3272	Bt11	MIR604	GA21
発芽揃い	○	○	○	○
発芽率	○	○	○	○
雄穂抽出期	○	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○	○
開花始	—	○	—	—
開花終	—	○	—	—
開花期間	—	○	—	—
稈長	○	○	○	○
草型	○	○	○	○
分けつ数	○	○	○	○
着雌穂高	○	○	○	○
成熟期	○	○	○	○
雌穂数(雌穂総数)	○	○	○	○
有効雌穂数	○	○	○	○
雌穂長	○	○	○	○
雌穂径	○	○	○	○
粒列数	○	○	○	○
一列粒数	○	○	○	○
粒色	○	○	○	○
百粒重	○	○	○	○
粒形	○	○	○	○
収穫期の地上部新鮮重	○	○	○	—
収穫期の生体重(植物体の全重量)	—	—	—	○

○：調査を行っている。

—：調査を行っていない。

b 生育初期における低温又は高温耐性

3272、Bt11、MIR604及びGA21は、それぞれの対照の非組換えトウモロコシと同様に、生育初期における低温処理によって萎縮もしくは枯死した(別紙1、11ページ；別紙2、9～10ページ及び29ページ、写真5；別紙3、10～11ページ、図6；別紙4、8ページ)。

c 成体の越冬性又は越夏性

10

トウモロコシは夏型一年生作物であり、子実の成熟に伴って成体は枯れ上がり枯死する。成熟後に栄養生殖するという報告や、再度結実して種子を生産するという報告はない。実際に隔離ほ場試験の終了時には結実後の枯死が始まっていることを確認した。

15

d 花粉の稔性及びサイズ

3272、Bt11、MIR604及びGA21とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシについて、花粉を染色し顕微鏡下で観察した結果、稔性(染色による花粉の充実度)、形状及びサイズに相違は見られなかった(別紙1、9～10ページ、図6及び表5；別紙2、8～9ページ及び27～28ページ、写真3～4；別紙3、9～10ページ、図5及び表6；別紙4、7ページ)。

20

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

25

種子の生産量に関して、3272、Bt11、MIR604及びGA21とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、種子の生産量に関わる諸形質を比較した結果、有意差は見られなかった(別紙1、6～10ページ、表3～5；別紙2、6～8ページ、第6～10表；別紙3、6～10ページ、表4～6；別紙4、5～7ページ、表17～22)。

30

脱粒性に関して、トウモロコシの種子は雌穂に着生しており、加えて、雌穂が苞皮で覆われているため、自然に脱粒することはない(文献 3)。3272、Bt11、MIR604及びGA21も対照の非組換えトウモロコシと同様に、収穫時の雌穂は苞皮に覆われていた。

35

発芽率に関して、3272、Bt11、MIR604及びGA21の播種用種子及び収穫種子のいずれにおいても対照の非組換えトウモロコシと同程度であった(別紙1、3～4ページ及び9～10ページ、図7、表1及び表5；別紙2、4ページ及び9ページ、第2表；別紙3、3～4ページ及び9～10ページ、表2及び表6；別紙4、2～3ページ及び7～8ページ、表2及び表23)。休眠性については、播種用種子及び収穫種子の発芽率において対照の非組換えトウモロコシとの間で同程度であったことから、3272、Bt11、MIR604及びGA21の休眠性が非組換えトウモロコシと大きく異なる可能性は低いと考えられた。

f 交雑率

10

我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているとの報告はないことから、3272、Bt11、MIR604及びGA21の交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

15

3272、Bt11、MIR604及びGA21について、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験においても対照の非組換えトウモロコシとの間で有意差は見られなかった(別紙1、12～14ページ、表6～8；別紙2、10～14ページ及び32～34ページ、第13～15表及び第25～27表；別紙3、12～15ページ、表7～9；別紙4、8～11ページ、表24～35)。

20

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

25

食用又は飼料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

30

—

(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

35

—

(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

5 「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

10 —

(6) 国外における使用等に関する情報

15 3272、Bt11、MIR604及びGA21の諸外国における申請・承認状況は表 12 (31ページ)に示したとおりである。

表 12 3272、Bt11、MIR604及びGA21の諸外国における申請・承認状況

	FDA	USDA	Health Canada	CFIA
3272	2007年8月 安全性確認	2005年10月 申請	2008年3月 安全性確認	2008年3月 安全性確認
Bt11	1996年5月 安全性確認	1996年1月 安全性確認	1996年8月 安全性確認	1996年6月 安全性確認
MIR604	2007年1月 安全性確認	2007年3月 安全性確認	2007年6月 安全性確認	2007年7月 安全性確認
GA21	1998年2月 安全性確認	1997年11月 安全性確認	1999年5月 安全性確認	1998年7月 安全性確認

FDA：米国食品医薬品庁

USDA：米国農務省

20 Health Canada：カナダ保健省

CFIA：カナダ食品検査庁

なお、我が国における3272、Bt11、MIR604及びGA21の申請・承認状況は表 5 (19ページ)のとおりである。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統トウモロコシは、3272、Bt11、MIR604及びGA21から、交雑育種法により作出された。

5

第1.2(6)①(21～27ページ)で述べたとおり、改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質は、それぞれ異なる作用機作を持ち、独立して作用していることから、Schrijverら(文献58)が述べている相互作用についての検討が必要な蛋白質には相当しないと
10 考えられる。また、これらの蛋白質はそれぞれ宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が宿主の代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

実際に、本スタック系統トウモロコシの耐熱性 α -アミラーゼの発現量、また、チ
15 ョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性は、それぞれの親系統と同程度であった。よって、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内で相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。

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、3272、Bt11、
20 MIR604及びGA21の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

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

25

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

本スタック系統トウモロコシの親系統である3272、Bt11、MIR604及びGA21の競
30 合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、3272、Bt11、MIR604及びGA21ともに対照の非組換えトウモロコシとの間で、競合における優位性に影響を及ぼすような差異は認められなかった。

35

本スタック系統トウモロコシには、3272中で発現する改変AMY797E α -アミラーゼ産生性が付与されている。 α -アミラーゼは澱粉の加水分解を触媒して発芽に関わる酵素であるが、改変AMY797E α -アミラーゼは穀粒胚乳内の小胞体に局所的に蓄積されると考えられる一方、基質である澱粉は穀粒中のプラスチド内に澱粉粒として存在する。実際に3272の構成成分を分析した結果、穀粒の澱粉含量は対照の非組換えトウモロコシと同程度であった。また、改変AMY797E α -アミラーゼは耐熱性を有するものの、常温における酵素活性は非常に低く、10~40℃の温度条件下で3272と対照の非組換えトウモロコシの発芽及び初期生育を観察した結果、いずれの条件下でも有意差は見られなかった。これらのことから、発現する改変AMY797E α -アミラーゼが本スタック系統トウモロコシの代謝や自然条件下における発芽特性に影響を与える可能性は極めて低い。よって、改変AMY797E α -アミラーゼ産生性の付与により、我が国の自然条件下において本スタック系統トウモロコシの競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本スタック系統トウモロコシには、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、チョウ目及びコウチュウ目昆虫による食害はトウモロコシが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではないこと、さらに、我が国ではコーンルートワームの生息は報告されていないことから、この性質を有することにより競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本スタック系統トウモロコシには、除草剤グルホシネート及びグリホサートへの耐性が付与されているが、グルホシネート及びグリホサート散布が想定しにくい我が国の自然環境下で、この性質により競合における優位性が高まるとは考えにくい。

さらに、本スタック系統トウモロコシにはマンノースを炭素源として利用可能とするPMI蛋白質の産生性が付与されているが、マンノース以外の炭素源が存在することから、我が国の自然条件下において、この性質を有することにより競合における優位性が高まるとは考えられない。

したがって、これら付与された性質により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、本スタック系統トウモロコシについて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

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10 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

15 宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

20 3272、Bt11、MIR604及びGA21において、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験でも対照の非組換えトウモロコシとの間で有意差が見られなかった。よって、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

25 本スタック系統トウモロコシで発現している改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質については、既知アレルゲンとのアミノ酸配列の構造相同性検索の結果から、アレルギー性を持つ可能性は極めて低いと考えられる。

30 改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質は、その局在性や蛋白質の特性から、それぞれ宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられた。したがって、これらの蛋白質が原因で、親系統である3272、Bt11、MIR604及びGA21中に有害物質が産生されることはないと考えられる。

35 以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある意図しない有害物質が産生される可能性はないと考えられた。そこで、以下に本スタック系統トウモロコシで発現しているチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫に殺虫活性を持つBt蛋白質が、我が国の野生動植物等に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

【Bt11の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

5 Bt11には改変Cry1Ab蛋白質の産生性が付与されている。Cry1Ab蛋白質は、米国におけるトウモロコシ栽培上の重要害虫であるヨーロッパコーンボラー (*Ostrinia nubilalis*)、コーンイヤーム(アメリカタバコガ) (*Helicoverpa zea*)、フ
10 ォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (*Spodoptera frugiperda*)等のチョウ目昆虫に対して高い殺虫活性及び特異性を示すことが確認されている。したがって、Bt11を栽培した場合に、生育している植物体を直接摂食する、もしくは飛散した花粉を食餌植物とともに摂食するチョウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性がある。

そこで、Bt11によって影響を受ける可能性のある野生動植物等として、チョウ目昆虫を特定した。

【MIR604の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

15

MIR604には改変Cry3Aa2蛋白質の産生性が付与されている。生物検定試験により、改変Cry3Aa2蛋白質は4種のコウチュウ目昆虫(ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*)、ノーザンコーンルートワーム (*Diabrotica longicornis barberi*)、コロラドポテトビートル(コロラドハムシ) (*Leptinotarsa decemlineata*)、バンデッドキューカンバービートル(*Diabrotica balteata*))に殺虫活
20 性を有することが示されている。したがって、MIR604を栽培した場合に、生育している植物体を直接摂食する、もしくは飛散した花粉を食餌植物とともに摂食するコウチュウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性がある。

25 そこで、MIR604によって影響を受ける可能性のある野生動植物等として、コウチュウ目昆虫を特定した。

【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等の特定】

30 本スタック系統トウモロコシはBt蛋白質である改変Cry1Ab蛋白質及び改変Cry3Aa2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等としては、親系統であるBt11及びMIR604の生物多様性影響評価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により何らかの影響を受ける可能性がある種
35 としては、Bt11で特定されたチョウ目昆虫及びMIR604で特定されたコウチュウ目昆虫が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

【Bt11の影響の具体的内容の評価】

5

本スタック系統トウモロコシの親系統であり、改変Cry1Ab蛋白質を発現するBt11の隔離ほ場試験において、Bt蛋白質に対する感受性が高く、集団飼育がしやすいチョウ目昆虫のヤマトシジミ(*Zizeeria maha argia*)1齢幼虫に、Bt11花粉を500~4,000粒/cm²の花粉密度で摂食させて死亡率を調査した。その結果、摂食開始から7日後までの間にヤマトシジミの半数個体の致死が観測された花粉密度は2,000~4,000粒/cm²であった。

10

【MIR604の影響の具体的内容の評価】

15

本スタック系統トウモロコシの親系統であるMIR604の生物検定において、改変Cry3Aa2蛋白質への感受性が高いウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*)に対する殺虫活性を調査した結果、ウエスタンコーンルートワームの半数致死濃度は1.4 µg改変Cry3Aa2蛋白質/ml人工餌であった。

20

【本スタック系統トウモロコシの影響の具体的内容の評価】

生物検定の結果から、本スタック系統トウモロコシのヨーロッパンコーンボーラーに対する抵抗性は、Bt11と同程度であることが確認された(表 7、24ページ)。また、本スタック系統トウモロコシのウエスタンコーンルートワームに対する抵抗性は、MIR604と同程度であることが確認された(表 8、25ページ)。よって、チョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫が本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、親系統であるBt11及びMIR604と同程度であると考えられる。

25

30

(3) 影響の生じやすさの評価

本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を、特定されたチョウ目昆虫が摂食する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周辺に生育する植物の葉に実際に堆積する花粉量を調査することにより推定した。

35

我が国において、トウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ(*Helianthus annuus*)とイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)の葉への花粉の堆積密度の調査が行われている(文献

13)。調査の結果、トウモロコシほ場の縁(0 m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で81.7粒/cm²、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm²であった。しかし、ほ場から5 m離れると花粉の最大堆積密度はそれぞれ19.6粒/cm²と22.2粒/cm²に減少していた。ヒマワリについては5 m以上離れた場合についても調査されているが、10 m離れると花粉堆積密度は全て10粒/cm²以内であった(文献 13)。

北米でも、トウモロコシほ場周辺のトウワタ(*Asclepias syriaca*)について、堆積した花粉密度の調査が行われている(文献 61)。調査の結果、トウモロコシほ場から1 m、2 m、4~5 m離れるごとに、花粉の堆積密度は平均で35.4粒/cm²、14.2粒/cm²、8.1粒/cm²へと減少することが明らかとなっている。さらに、カナダのトウモロコシほ場周辺のトウワタの葉上に堆積した花粉密度が調査され、ほ場の縁から1m及び5m離れた地点での堆積密度は、それぞれ平均で28粒/cm²及び1.4粒/cm²であったと報告されている(文献 62)。このように、我が国で行われたトウモロコシほ場周辺での花粉堆積密度に関する調査結果と同様の結果が、北米で行われた調査からも得られている。

15

これらの調査結果から、トウモロコシほ場周辺に堆積する花粉量は、トウモロコシほ場から10 m以上離れると極めて低く、50m以上離れるとほとんど無視できると結論された。本スタック系統トウモロコシを直接摂食する可能性のある、もしくは本スタック系統トウモロコシから飛散した花粉を食餌植物とともに摂食する可能性のあるチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫が、本スタック系統トウモロコシの栽培ほ場から半径50mの範囲に局所的に生育しているとは考えにくい。このことから、チョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫が個体群レベルで本スタック系統トウモロコシを直接摂食することによる影響を受ける可能性、もしくは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。

25

したがって、特定されたチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫が、Bt11由来の改変Cry1Ab蛋白質及びMIR604由来の改変Cry3Aa2蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。よって、本スタック系統トウモロコシに起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと結論された。

30

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

35

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

5 トウモロコシは近縁野生種であるテオシントと自然交雑可能であるが、我が国にはこの近縁野生種は自生しておらず、自然交雑の可能性はないことから、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

10

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本スタック系統トウモロコシは、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

25 上記の他に、本スタック系統トウモロコシに関して生物多様性影響の評価を行うべき性質はないと判断された。

第3 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、3272、Bt11、MIR604及びGA21から、交雑育種法により作出された。

5

本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質はその特性や作用機作から、宿主の代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

10 実際には、本スタック系統トウモロコシの耐熱性 α -アミラーゼの発現量、また、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性は、それぞれの親系統と同程度であった。よって、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内で相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。

15 また、本スタック系統トウモロコシにおいて、各親系統由来の発現蛋白質間に相互作用が認められなかったことから、本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシにおいても同様に発現蛋白質間での相互作用はなく、新たに獲得されたそれぞれの性質は変化しないと考えられた。

20 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、3272、Bt11、MIR604及びGA21の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

競合における優位性：宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

25 本スタック系統トウモロコシの親系統である3272、Bt11、MIR604及びGA21の競合における優位性に関わる諸形質の調査の結果、いずれも対照の非組換えトウモロコシとの間で、競合における優位性に影響を及ぼすような差異は認められなかった。

30 また、本スタック系統トウモロコシは耐熱性 α -アミラーゼ産生性、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性を持つものの、これらの形質によって我が国の自然環境下で競合における優位性が高まるとは考えにくい。

したがって、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

35

有害物質の産生性：宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシにおいて、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

3272、Bt11、MIR604及びGA21の鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験より、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられた。

5 改変AMY797E α -アミラーゼ、改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry3Aa2蛋白質、PAT蛋白質、mEPSPS蛋白質及びPMI蛋白質がアレルギー性を持つ可能性は極めて低く、さらに、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられた。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある意図しない有害物質が産生される可能性はないと考えられた。

10 一方、改変Cry1Ab蛋白質及び改変Cry3Aa2蛋白質によって影響を受ける可能性のある野生動植物等として、チョウ目及びコウチュウ目昆虫を特定して検討を行った。しかし、本来自然生態系に生息しているチョウ目及びコウチュウ目昆虫が、本スタック系統トウモロコシの栽培ほ場やその周辺に局所的に生育しているとは考えにくい。よって、特定されたチョウ目及びコウチュウ目昆虫が個体群レベルで本スタック系統トウモロコシによる影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

15 したがって、本スタック系統及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

20 交雑性：我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、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。

25 以上のことから、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代系統のスタック系統トウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

30

引用文献

社外秘により非開示

緊急措置計画書

平成21年7月21日

5 氏名 シンジェンタシード株式会社
代表取締役社長 大伴 秀郎
住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台401-2

10 第一種使用規程の承認を申請している耐熱性 α -アミラーゼ産生並びにチョウ目
及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性ト
ウモロコシ (改変*amy797E*, 改変*cry1Ab*, 改変*cry3Aa2*, *pat*, *mEPSPS*, *Zea*
15 *mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (3272×Bt11×MIR604×GA21, OECD
UI : SYN-E3272-5×SYN-BT011-1×SYN-IR604-5×MON-00021-9) (以下、
「本スタック系統トウモロコシ」という。) 並びに3272、Bt11、MIR604及びGA21
のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの第一種使用等
において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場
合、以下の措置を執ることとする。

20 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

個人名・所属は個人情報につき非開示。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

25

弊社は、本スタック系統トウモロコシの開発者である米国シンジェンタシード社と
連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

弊社は米国シンジェンタシード社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取
引ルートへ本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統
のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシの適切な管理、取扱
35 いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

5 科学的根拠に基づき、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、弊社は米国シンジェンタシード社とともに、本スタック系統トウモロコシ及び後代分離系統トウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシ及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統や3系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシが、環境中で生存しないように不活化する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、我が国において生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省及び環境省に報告する。