

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
住所等変更報告書	2
生物多様性影響評価書	3
第 1 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
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯	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	6
ヘ、有害物質の産生性	6
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.....	16
(2) ベクターに関する情報	17
イ、名称及び由来.....	17
ロ、特性.....	17
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	17
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	18
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成.....	18
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法.....	19
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過	19
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	19
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.....	19
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	20
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	20
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.....	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	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	21
a 形態及び生育の特性.....	22
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	22
c 成体の越冬性	22
d 花粉の稔性及びサイズ.....	22
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	22
f 交雑率	23
g 有害物質の産生性.....	23
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	24
(1) 使用等の内容	24
(2) 使用等の方法	24
(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	24
(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	24
(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	24
(6) 国外における使用等に関する情報	24
第 2 項目ごとの生物多様性影響評価	26
1. 競合における優位性	26
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26
(2) 影響の具体的内容の評価	26
(3) 影響の生じやすさの評価	26
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	27
2. 有害物質の産生性	27
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	27
(2) 影響の具体的内容の評価	27
(3) 影響の生じやすさの評価	28
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	28
3. 交雑性	29
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29
(2) 影響の具体的内容の評価	29

(3) 影響の生じやすさの評価	29
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	29
4. その他	29
第 3 生物多様性影響の総合的評価	30
引用文献	32
緊急措置計画書	37

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 9 月 13 日

5

農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
 環境大臣 細野 豪志 殿

10

申請者 氏名 シンジェンタジャパン株式会社
 代表取締役社長 村田 興文
 住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
 オフィスタワーX

15

20 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	コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>ecry3.1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1)
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	—

25

住所等変更報告書

平成23年10月12日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課 御中

氏名 シンジェンタジャパン株式会社
 申請者 代表取締役社長 ステファン・ティツェ 印
 住所 東京都中央区晴海一丁目8番10号
 オフィスタワーX

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、平成23年9月13日付けで申請した第一種使用規程承認申請書の氏名及び住所について、次のとおり変更が生じたので報告します。

変更前の氏名及び住所	シンジェンタジャパン株式会社 代表取締役社長 村田 興文 東京都中央区晴海一丁目8番10号オフィスタワーX
変更後の氏名及び住所	シンジェンタジャパン株式会社 代表取締役社長 ステファン・ティツェ 東京都中央区晴海一丁目8番10号オフィスタワーX
変更した日	平成23年10月1日
遺伝子組換え生物等の種類の名称	コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>ecry3.1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1)

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 宿主の品種又は系統名

宿主は、トウモロコシのデント種に属する自殖系統(NP2222)である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

トウモロコシの野生種とみられる植物は現存せず(文献 1)、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。

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 2)。テオシントとトリプサクムはメキシコやグアテマラ等に広範囲に自生しており、トリプサクムはさらに米国南部や南米でも認められているが(文献 2、文献 3)、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。

30 (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

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、メキシコ及び中央アメリカで栽培化されたとする説、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 2)。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 6800~5000 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 3)。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、フリントのような変異種が生じたと考えられる(文献 3、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 4)。

5

我が国へは天正年間(1573～1592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 4)。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 4)。

10

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北緯 55 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、2009 年におけるトウモロコシの世界総栽培面積は 1 億 5,863 万ヘクタールで、その上位 3 カ国は米国(3,221 万ヘクタール)、中国(3,120 万ヘクタール)及びブラジル(1,379 万ヘクタール)であった(文献 5)。また、同年の世界総生産量は 8 億 1,882 万トンで、その上位 3 カ国は栽培面積と同じく、米国(3 億 3,301 万トン)、中国(1 億 6,411 万トン)及びブラジル(5,123 万トン)であった(文献 5)。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。2009 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、42.5%が飼料、32.1%がエタノール製造、15.7%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 6)。

一方、我が国における 2010 年のトウモロコシの栽培面積は、青刈りトウモロコシが 9 万 2,200ヘクタールで、その上位 3 都道府県は、北海道(4 万 6,700ヘクタール)、宮崎県(6,150ヘクタール)及び岩手県(5,240ヘクタール)であった(文献 7)。

30

財務省貿易統計によると、我が国は 2010 年に約 1,619 万トンのトウモロコシを輸入している(文献 8)。輸入トウモロコシのうちの約 1,132 万トンは飼料用であり、残りは食品用、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 9)。

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 2)。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 1)。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 1)。なお、
15 トウモロコシの種子の発芽適温は 33℃程度で、発芽の最低温度は 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 1)。

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 2)。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、発芽の最低温度は 10~11℃であり、温度が低いと菌や土壌菌に侵されやすくなる(文献 1、文献 4)。

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

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 2)。

35

- 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 90%程度である(文献 4)。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 3)。なお、我が国にはトウモロコシと交雑可能なこれら近縁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報告はない。

- 10 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 本着生する。一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている(文献 2)。

15 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~円形で直径は 90~120 μm 程度である(文献 1)。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(文献 4)。

20 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 日である(文献 1)。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、抽出始めから抽出揃いまでの期間は 5~6 日である(文献 1)。

25 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*)及びイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)葉へのトウモロコシの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 10)。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は 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 10)。花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い(文献 11)。

30 ホ、病原性

—

35 へ、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。

ト、その他の情報

—

5 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

10

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI : SYN-05307-1) (以下「本組換え体」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を表 1 (7~9 ページ)に示した。また、ベクターの塩基配列を別紙 1(社外秘情報につき非開示)に示した。

15

表 1 本組換え体の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子カセット		
CMP プロモーター	346	<i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> 由来のプロモーター領域で、目的遺伝子を恒常的に発現させる(文献 12)。本プロモーターによる遺伝子の発現レベルは、 <i>Cauliflower mosaic virus</i> 由来の 35S プロモーターやトウモロコシのユビキチン遺伝子由来の <i>Ubi1</i> プロモーターと同程度か高いことが確認されている(文献 13)。なお、 <i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> は <i>Cauliflower mosaic virus</i> と同じ <i>Caulimoviridae</i> に属しており、その宿主としては <i>Cestrum parqui</i> 、 <i>C. elegans</i> 、 <i>Nicotiana glauca</i> が知られているが、トマト等他の植物に対する感染性は知られていない(文献 14)。また、 <i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> は環状二本鎖 DNA ゲノムを有しており、本プロモーターの下流からポリシストロニック RNA を形成する(文献 14)。
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子	1,962	<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子は、トウモロコシのコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す <i>eCry3.1Ab</i> 蛋白質をコードする遺伝子である。本遺伝子は、以下の 2 つの <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の <i>cry</i> 遺伝子断片(改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子と <i>cry1Ab</i> 遺伝子)で構成されている。既知の <i>Cry</i> 蛋白質におけるドメイン構造に基づく(文献 15)、5'末端側からコードされる蛋白質のドメイン I、II 及びドメイン III の一部(計 459 個のアミノ酸配列)は改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子由来で、残りのドメイン III と 3'末端側配列(計 172 個

		<p>のアミノ酸配列)は <i>cry1Ab</i> 遺伝子由来である(図 1、10 ページ)。なお、本遺伝子産物である eCry3.1Ab 蛋白質の N 末端には、合成ポリリンカー配列と改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子の 5'末端に由来する 22 個のアミノ酸配列も含まれる(図 2、11 ページ)。</p> <p>改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子： <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3Aa2</i> 遺伝子(文献 16)を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列(文献 17)とし、また、コーンルートワームに対する殺虫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(文献 18)。我が国ですでに承認されたコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5)に導入されたもの。</p> <p><i>cry1Ab</i> 遺伝子： <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株由来の <i>cry1Ab</i> 遺伝子(文献 19)を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列になるように(文献 17)一部の塩基を変更した遺伝子(文献 20)。なお、<i>cry1Ab</i> 遺伝子を改変した改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子が我が国ですでに承認された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(Event 176, OECD UI: SYN-EV176-9)に導入された。</p>
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる(文献 21)。
<i>pmi</i> 遺伝子カセット		
ZmUbiInt プロモーター	1,993	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、目的遺伝子を恒常的に発現させる(文献 22)。
<i>pmi</i> 遺伝子	1,176	マンノースリン酸イソメラーゼ(Phosphomannose isomerase)(以下「PMI 蛋白質」という。)を産生する大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子で、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	253	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる(文献 21)。
その他の領域		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA のレフトボーダー領域(文献 24)。

<i>spec</i>	789	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn7 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>)(文献 25)。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ため、ベクターの選抜マーカーとして用いられた。
<i>virG</i>	726	<i>A. tumefaciens</i> 由来の pAD1289 由来の T-DNA の転移に関与する領域。 <i>virG</i> の形質が恒常的に発現されるように一部変更されている(文献 26)
<i>repA</i>	1,074	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来の pVS1 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。 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子(文献 27)。
VS1 ori	405	<i>Pseudomonas</i> 属細菌のプラスミド pVS1 由来の複製起点共通配列。 <i>A. tumefaciens</i> における複製起点(文献 28)。
ColE1 ori	807	大腸菌由来のプラスミドの複製起点(文献 29)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA のライトボーダー領域(文献 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ジャパン株式会社に帰属する)

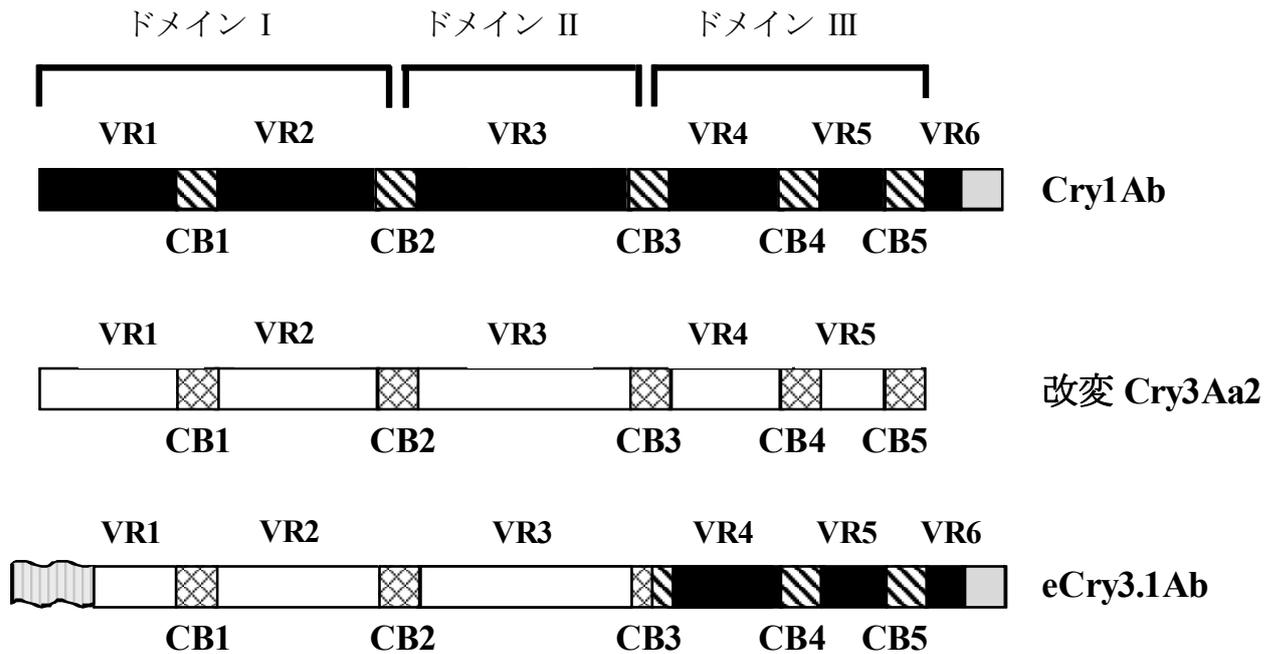


図 1 eCry3.1Ab 蛋白質中のアミノ酸残基の起源を示す模式図

Cry1Ab : ■は Cry1Ab 蛋白質の変able領域 1~6(VR1~VR6)を示し、▨は Cry1Ab 蛋白質の保存領域 1~5(CB1~CB5)を示す。□は Cry1Ab 蛋白質のテール領域を示す。

改変 Cry3Aa2: □は改変 Cry3Aa2 蛋白質の変able領域 1~5(VR1~VR5)を示し、▨は改変 Cry3Aa2 蛋白質の保存領域 1~5(CB1~CB5)を示す。

eCry3.1Ab : eCry3.1Ab 蛋白質の▩は eCry3.1Ab 蛋白質に特有な N 末端のアミノ酸である。eCry3.1Ab 蛋白質は、CB1 から CB3 が改変 Cry3Aa2 蛋白質に、CB3 以降が Cry1Ab 蛋白質に由来する。

(本図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ジャパン株式会社に帰属する)

ロ、構成要素の機能

- 5 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

本組換え体の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、表 1(7~9 ページ)に示した。

- 10 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

eCry3.1Ab蛋白質

15

1) 開発の目的；

トウモロコシ栽培におけるコウチュウ目害虫の防除のため、改変 Cry3Aa2 蛋白質を発現するコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5) (以下「MIR604」という。)が開発された。しかし、MIR604 のみを長期間栽培した場合、改変 Cry3Aa2 蛋白質に対する抵抗性を獲得したコウチュウ目害虫が発生する可能性がある。これに対し、異なる害虫抵抗性蛋白質を発現する品種を作成することにより、抵抗性害虫の出現を抑制できると考えられる。そのため、標的昆虫において改変 Cry3Aa2 蛋白質とは異なる中腸のレセプターに結合する蛋白質を発現する品種を作成すれば、抵抗性害虫の発生を防止する手段の一つとなる。そこで新規蛋白質の開発に着手し、eCry3.1Ab 蛋白質を選抜した。

20

25

2) 構造；

Cry1 や Cry3 蛋白質を含む大部分の Cry 蛋白質には、Conserved Block(以下「CB」という。)と呼ばれる高いアミノ酸配列の相同性を示す領域(文献 15)と、Variable Region(以下「VR」という。)と呼ばれる多様性に富んだ配列の領域とが存在する(図 1、10ページ)。CB 構造の保持が Cry の基本的特性の維持には重要と考えられることから、これらの構造を保持したまま、改変 Cry3Aa2 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質を置換してキメラ蛋白質を作成し、コウチュウ目害虫への殺虫活性を持つ eCry3.1Ab 蛋白質を選抜した(文献 31)。eCry3.1Ab 蛋白質は、CB1 から CB3 が改変 Cry3Aa2 蛋白質に、CB3 以降が Cry1Ab 蛋白質に由来するため(図 1、10ページ)、従来の Cry 蛋白質と同様の立体構造及び基本的特性を持つと考えられる。

30

35

また、これまでの研究から、既知の Cry 蛋白質は3つのドメインからなる類似した立体

構造を有することが知られている(文献 32、文献 33、文献 34、文献 35)。eCry3.1Ab 蛋白質においては、ドメイン I、II 及びドメイン III の一部(CB3 まで)がコウチュウ目害虫に殺虫活性を持つ改変 Cry3Aa2 蛋白質に由来し、ドメイン III の一部以降(CB3 から)がチョウ目害虫に殺虫活性を持つ Cry1Ab 蛋白質に由来しており、これらのドメイン構造も保持されている(図 1、10ページ)。

各ドメインの機能としては、ドメイン I はイオンチャネルの形成、ドメイン II 及びドメイン III はレセプターへの結合に関与すると考えられている(文献 32、文献 34、文献 36)。eCry3.1Ab 蛋白質作出にあたっては Cry1Ab 蛋白質と改変 Cry3Aa2 蛋白質の各ドメインを組み合わせてその効果を調査した。その結果、Cry1Ab 蛋白質と改変 Cry3Aa2 蛋白質の組み合わせを eCry3.1Ab 蛋白質と逆にした蛋白質(ドメイン I の VR1 からドメイン III の CB3 が Cry1Ab 蛋白質由来で、ドメイン III の CB3 からドメイン III の CB5 が改変 Cry3Aa2 蛋白質由来)はチョウ目のヨーロッパンコーンボラー(*Ostrinia nubilalis*)に殺虫活性を示し、コウチュウ目のウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*)に殺虫活性を示さなかった(文献 31)。よって、eCry3.1Ab 蛋白質でもドメイン II 及びドメイン III の一部(CB3 まで)が標的昆虫の特定のレセプターとの認識及び結合に主に関与し、eCry3.1Ab 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫に特異的な殺虫活性を持つと考えられた。

3) 特性 ;

eCry3.1Ab 蛋白質の殺虫活性及びその特性を検証するため、A)コウチュウ目、チョウ目昆虫及びその他の非標的生物への生物効果及び B) eCry3.1Ab 蛋白質と従来の Cry 蛋白質とのコウチュウ目昆虫のレセプターに対する結合性の比較を行った。

A) コウチュウ目、チョウ目昆虫及びその他の非標的生物への生物効果

eCry3.1Ab 蛋白質の食餌試験の結果、ウエスタンコーンルートワーム(*D. virgifera virgifera*)、ノーザンコーンルートワーム(*D. longicornis barberi*)及びコロラドポテトビートル(コロラドハムシ)(*Leptinotarsa decemlineata*)といったコウチュウ目昆虫に殺虫活性を持つことが確認された(別紙2 ; 社外秘情報につき非開示)。また、2008年に米国で行われたほ場試験においても、本組換え体がコウチュウ目害虫抵抗性を示すこと(表2、15ページ)、本組換え体が改変Cry3Aa2蛋白質を発現するMIR604と同様にウエスタンコーンルートワームに対して強い抵抗性を示すことを確認した(表3、16ページ)。さらに、eCry3.1Ab蛋白質の標的コウチュウ目昆虫であるウエスタンコーンルートワームに対するeCry3.1Ab蛋白質のLC₅₀値は40 µg/mlであることが示された(別紙3 ; 社外秘情報につき非開示)。一方、eCry3.1Ab 蛋白質は、コウチュウ目昆虫のサザンコーンルートワーム(*D. undecimpunctata*)、テントウムシ(*Coleomegilla maculata*)、ハネカクシ (*Aleochara bilineata*)、オサムシ(*Poecilus cupreus*) に対する殺虫活性を示さなかった(別紙2 ; 社外秘情報につき非開示)。さらに、eCry3.1Ab蛋白質の一部はチョウ目昆虫に殺虫活性を示すCry1Ab蛋白質由来であるが、本組換え体はCry1Ab蛋白質感受性チョウ目昆虫種を含めた

チョウ目昆虫に対する殺虫活性を示さなかった(別紙2；社外秘情報につき非開示)。

また、eCry3.1Ab 蛋白質が非標的生物であるウズラ、マウス、ミツバチ、エビ及びナマズに対して毒性影響がないことを確認した(別紙 2；社外秘情報につき非開示)。

5

なお、上述の通り eCry3.1Ab 蛋白質の組み合わせを逆にした蛋白質(VR1 から CB3 が Cry1Ab 由来で、CB3 から CB5 が改変 Cry3Aa2 蛋白質由来)はチョウ目のヨーロッパアンコーンボラー(*O. nubilalis*)に殺虫活性を示し、コウチュウ目のウエスタンコーンルートワーム(*D. virgifera virgifera*)に殺虫活性を示さなかった(文献 31)。

10

これらのことから、eCry3.1Ab 蛋白質は、コウチュウ目に特異的な殺虫活性を持つことが明らかとなった。

B) eCry3.1Ab 蛋白質と従来の Cry 蛋白質とのコウチュウ目昆虫のレセプターに対する結合性の比較

15

標的昆虫において Cry 蛋白質は部分消化され、中腸表面の特異的なレセプターに結合してイオンチャネルを形成することにより、消化器官に損傷を与えて標的昆虫を死に至らしめることが知られている。

20

eCry3.1Ab 蛋白質についても、改変 Cry3Aa2 蛋白質やその他の Cry 蛋白質と同様に部分消化されること、改変 Cry3Aa2 蛋白質と同様にコウチュウ目の中腸のレセプターに結合し、殺虫活性を示すことが確認されている(文献 37)。また、eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 蛋白質とは異なる中腸のレセプターに結合することが確認されている(文献 37)。

25

以上の結果から、eCry3.1Ab 蛋白質は特定のコウチュウ目のみに殺虫活性を持ち、改変 Cry3Aa2 蛋白質とは異なるレセプターに作用することが確認された。したがって、eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 蛋白質に対する抵抗性害虫を防ぐ手段として有効であることが示唆された。

表 2 米国のほ場試験における本組換え体のウエスタンコーンルートワームによる被害程度(2008年)

ほ場	本組換え体		非組換え体		P 値 ²⁾
	平均 ¹⁾	標準偏差	平均	標準偏差	
ミネソタ州スタントン	0.04	0.03	2.69	0.37	0.0056*
イリノイ州グッドフィールド	0.06	0.01	2.81	0.10	0.0004*
イリノイ州ブルーミントン	0.06	0.005	2.46	0.18	0.0018*
イリノイ州シャーリー	0.06	0.01	1.42	0.40	0.026*

試験は3反復で行われ(n=3)、1反復当たり6個体を調査した。土壌中にウエスタンコーンルートワームが存在するほ場において植物体を栽培し、絹糸抽出期にトウモロコシ根部を回収し、被害程度の調査を行った。

5

1) 被害の程度は、以下のように分類し評価した。

被害の程度	詳細
0.01	損傷がないか、1つないし2つの軽微な表面的食害が根に認められる
0.02	3つ以上の軽微な表面的食害及び4つ以下の中程度の食害が根に認められる
0.05	5つ以上の重度の食害が認められるが噛み切られた根は認められない
0.10	1本の根が3.8cm以下に噛み切られている
0.25	2本以上の根が3.8cm以下に噛み切られている
0.50	節0.50個に相当する根が噛み切られている
～	0.25きざみで被害程度を評価
3.00	節3.00個に相当する根が噛み切られている

2) ほ場ごとに本組換え体と非組換え体との間で F-test を行い、P 値が 0.05 未満の場合、有意差ありとし、アスタリスクを記した。

10 (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ジャパン株式会社に帰属する)

表 3 米国のほ場試験における本組換え体及び MIR604 のウエスタンコーンルートワーム成虫数調査(2008 年)

	合計成虫数(匹)		相対生存数 ¹⁾	有意差の有無 ²⁾
	平均	標準偏差		
本組換え体	0.6	0.89	0.06	b
MIR604	14.0	7.62	1.45	b
非組換え体	963.6	329.78	100	a

試験は 5 反復で行われ(n=5)、1 反復当たり 64 個体が栽培された。トウモロコシ 1~2 葉期に、ウエスタンコーンルートワームの卵を畝に沿って 0.3 m 当たり 1,380 個となるように土壤に接種し、接種 7 週間後から約 1 ヶ月間ウエスタンコーンルートワームの成虫数を調査した。

1) 非組換え体区において生存するウエスタンコーンルートワームの成虫の数を 100 とした場合の、相対生存数。

2) 本組換え体、MIR604 及び非組換え体の間で LSD 検定を行い、P 値が 0.05 未満の場合、有意差ありとし異なる英文字を記した。

10 (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ジャパン株式会社に帰属する)

また、eCry3.1Ab 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや Cry 蛋白質以外の毒性蛋白質と相同性を持たないことを、公的に利用可能なデータベース(FARRP Allergen Database(2010)及び NCBI Entrez Protein database(2010))を用いた相同性検索によって

15 確認した。

PMI 蛋白質

20 *pmi* 遺伝子は PMI 蛋白質(Phosphomannose isomerase)をコードする大腸菌(*E. 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生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共に植物細胞に導入し、

25 マンノースを含む培地で培養することにより、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)。

また、PMI 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒性蛋白質と相同性を持たないことを、公的に利用可能なデータベース(FARRP Allergen Database(2010)及び NCBI

30 Entrez Protein database(2010))を用いた相同性検索によって確認した。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

ecry3.1Ab 遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 蛋白質及び

Cry1Ab 蛋白質からなり、従来の Cry 蛋白質と同様の構造及び機能を持つと考えられることから、従来の Cry 蛋白質と同様、eCry3.1Ab 蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくい。そのため、宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられる。また、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 38)。よって、PMI 蛋白質が宿主の代謝に影響を与えることはないと考えられる。

10 以上のことから、導入された遺伝子が宿主の持つ代謝経路を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

15

本組換え体の作出に用いたベクターは pSYN12274 である。このベクターは大腸菌由来の pUC19 等を基に構築された。

ロ、特性

20

① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターの塩基数は11,769 bpであり、その塩基配列は明らかにされている(別紙1; 社外秘情報につき非開示)。

25

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

30 ベクターpSYN12274には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を発現する *specI* 遺伝子が含まれるものの、本組換え体中にこの遺伝子は導入されていない。

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

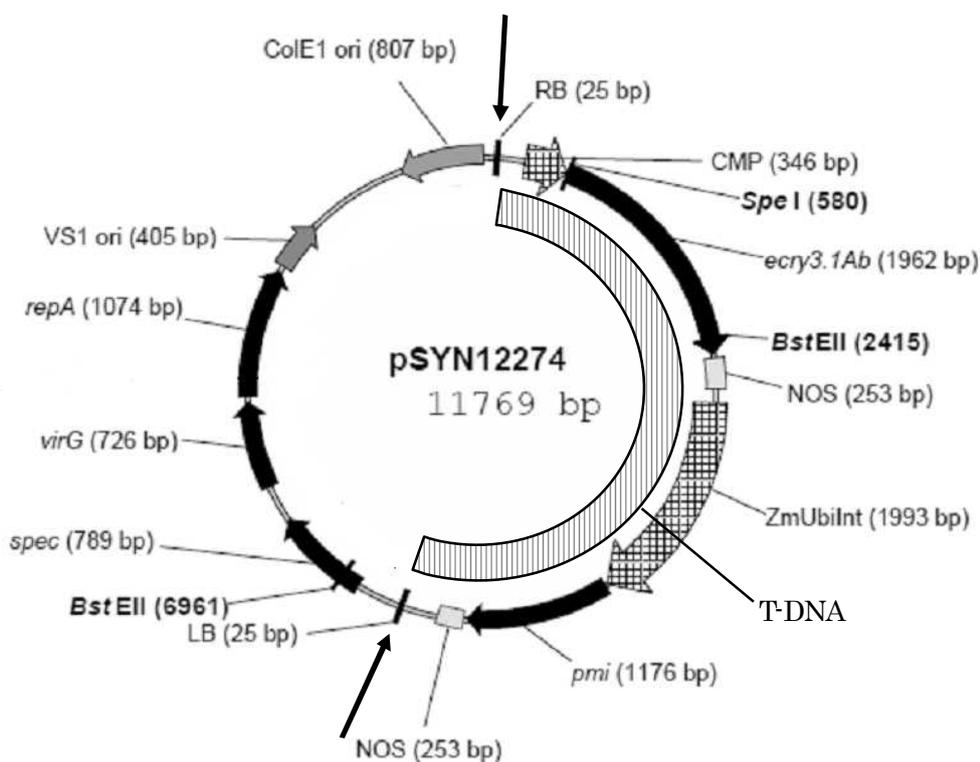
ベクターpSYN12274中に感染性を示すような配列はない。

35

(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

- 5 本組換え体の作出に用いたベクターpSYN12274 の各構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位を図 3(18ページ)に示した。



10

図 3 本組換え体の作出に用いたベクターpSYN12274 の模式図

- 15 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(*ecry3.1Ab* 遺伝子カセットと *pmi* 遺伝子カセット)が本組換え体に移入された。

(本図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ジャパン株式会社に帰属する)

20

25

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法により移入した。

5

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

10 ベクターpSYN12274 を含むアグロバクテリウムをトウモロコシの未熟胚と共存培養し、その後、未熟胚をマンノース添加培地で培養することによって形質転換細胞を選抜した。

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

15

遺伝子導入後、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後、再分化した個体についてベクターpSYN12274 の外骨格領域に存在する *spec* 遺伝子に対する PCR を行った。その結果 *spec* 遺伝子は確認されなかったことから、菌体の残存はないと考えられた。

20

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

25 選抜細胞から植物体を再分化させて馴化し、その植物体を温室で栽培した。その後、TaqMan PCR 分析(文献 39)を行い、*ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子の存在が確認された T0 植物体を選抜した。

30 なお、我が国においては、2010年6月に農林水産省及び環境省によって、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、第一種使用等(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)が承認された。また、厚生労働省に食品としての安全性審査のための申請を、農林水産省に飼料としての安全性審査のための申請を、いずれも2011年7月に行った。

35

(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

5 分離比による安定性評価の結果より、本組換え体の挿入遺伝子である *ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子はどちらもメンデルの法則に従い、複数世代にわたって伝達されたことから、*ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子は染色体上に存在することが確認された(別紙 4; 社外秘情報につき非開示)。

10 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

本組換え体の複数世代から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクター pSYN12274 の T-DNA 領域及び外骨格領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った(別紙 5; 社外秘情報につき非開示)。

その結果、T-DNA 領域をプローブに用いた場合、複数世代で 1 コピーの T-DNA が挿入されていることを示す同一のバンドが検出された。そのため、複数世代にわたり 1 コピーの *ecry3.1Ab* 遺伝子カセット及び *pmi* 遺伝子カセットが安定して伝達されていることが示され、各世代における挿入遺伝子の同一性が確認された。また、外骨格領域をプローブに用いた場合、いずれの世代においてもバンドは検出されなかった。

以上の結果から、本組換え体には 1 コピーのベクター pSYN12274 の T-DNA 領域がゲノムの 1 ヲ所に挿入されており、後代へ安定して伝達していることが確認された。

25 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

—

30 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

35 米国シンジェンタ社の温室において、本組換え体の複数世代を栽培し、生育ステージに応じて各組織別にサンプルを採取し、eCry3.1Ab 蛋白質及びPMI蛋白質の発現量をELISA法により測定した。その結果、eCry3.1Ab蛋白質の複数世代における発現量の平均値の範囲は、葉で83.40~93.67 µg/g乾燥重、根で23.88~35.39 µg/g乾燥重であり、花粉では検出限界値(0.08 µg/g乾燥重)以下であった(別紙6; 社外秘情報につき非開示)。一方、PMI蛋白質

質の複数世代における発現量の平均値の範囲は、葉で1.77～1.95 µg/g乾燥重、根で1.05～1.19 µg/g乾燥重、花粉では18.96～25.58 µg/g乾燥重であった(別紙6；社外秘情報につき非開示)。

5 以上のことから、本組換え体におけるeCry3.1Ab蛋白質とPMI蛋白質の発現は、個体間及び世代間で安定的に発現していることが確認された。

⑤ ウイルス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

10

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

15

挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた、0.1 ng の本組換え体の DNA を検出可能な PCR による識別法が開発されている(別紙 7、別紙 8；社外秘情報につき非開示)。なお、当該識別法は、挿入遺伝子の 3'側とそれに続くトウモロコシゲノムを増幅するプライマーを用いた系統特異的検出方法であり、自社研究所以外に Eurofins GeneScan USA において信頼性が確認されている。

20

(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

25

本組換え体には *ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子が導入され、それぞれ eCry3.1Ab 蛋白質と PMI 蛋白質を発現している。eCry3.1Ab 蛋白質はコウチュウ目害虫抵抗性を付与し、コウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワームに対し、抵抗性を示すことが米国

30

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

35

本組換え体とその対照となる非組換え体を使用し、シンジェンタジャパン株式会社 開発本部 中央研究所神座サイトにて、2010年に隔離ほ場試験を実施した。なお、隔離ほ場

試験の詳細については別紙 9(社外秘情報につき非開示)に示した。

a 形態及び生育の特性

5

形態及び生育の特性として、発芽経過、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、着雌穂高、草型、成熟期、収穫期の新鮮重、分けつ数、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、一穂粒数、百粒重、粒色及び粒形について、本組換え体と対照の非組換え体との比較調査を行った。その結果、本組換え体と非組換え体との間に有意差あるいは相違は認められなかった(別紙 9 ; 社外秘情報につき非開示)。

10

b 生育初期における低温又は高温耐性

本組換え体と対照の非組換え体において、生育初期における低温耐性についての試験を実施した。2 葉期となった植物体を材料とし、冬季を想定した低温条件下での生育状況を観察した結果、本組換え体と非組換え体のどちらも同様に低温処理による葉の黄化や壊死斑が見られ、著しい生育抑制が観察された(別紙 9 ; 社外秘情報につき非開示)。以上の結果から、本組換え体と対照となる非組換え体との間に低温耐性に関する相違は認められなかった。

15

20

c 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死する。成熟後に栄養繁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。また、隔離ほ場試験において、本組換え体は対照の非組換え体と同様に成熟後に枯死することが観察されている(別紙 9 ; 社外秘情報につき非開示)。

25

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換え体と対照の非組換え体の花粉をアセトカーミン溶液で染色し顕微鏡下で観察した結果(別紙 9 ; 社外秘情報につき非開示)、本組換え体と非組換え体の花粉の稔性及びサイズに有意差又は相違は認められなかった。

30

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

35

種子の生産量 :

種子の生産量について、有効雌穂数、粒列数、一列粒数、一穂粒数及び百粒重を調査した結果、本組換え体と対照の非組換え体との間に有意差は認められなかった(別紙 9 ; 社外

秘情報につき非開示)。

脱粒性：

- 5 トウモロコシの種子は雌穂に着生し、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い(文献 2)。本組換え体も対照の非組換え体と同様に苞皮で覆われていることが観察されており、自然条件下での脱粒は観察されていない(別紙 9; 社外秘情報につき非開示)。

休眠性及び発芽率：

- 10 収穫種子の発芽率に関して、本組換え体と対照の非組換え体の種子の発芽率に有意差は認められなかった(別紙 9; 社外秘情報につき非開示)。そのため、本組換え体の休眠性が非組換え体と大きく異なる可能性は低いと考えられた。

f 交雑率

- 15 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、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

- 20 我が国の自然環境下における有害物質の産生性を調査するため、鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験を行った。また、土壌昆虫相への影響も調査した。

鋤込み試験：

- 25 収穫期の葉と茎の乾燥粉末5 gを、850 gの粒状培土と混合後、ポットに詰めてハツカダイコン種子を1ポット当たり1粒播種した。播種9日後に発芽率、2週間後に収穫して乾燥重を測定した結果、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について本組換え体区と対照の非組換え体区との間に有意差は認められなかった(別紙9; 社外秘情報につき非開示)。

後作試験：

- 30 各試験区のトウモロコシの根域土壌を採取して混和後ポットに詰め、ハツカダイコン種子を1ポット当たり1粒播種した。播種10日後に発芽率、2週間後に収穫して乾燥重を測定した結果、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について本組換え体区と対照の非組換え体区との間に有意差は認められなかった(別紙9; 社外秘情報につき非開示)。

- 35 土壌微生物相試験：

本組換え体及び対照の非組換え体の収穫時の栽培土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌数、細菌数及び放線菌数を計測した。その結果、糸状菌数、細菌数及び放線菌数につ

いて本組換え体区と非組換え体区との間に有意差は認められなかった(別紙9；社外秘情報につき非開示)。

土壌昆虫相試験：

- 5 本組換え体及び対照の非組換え体の試験区において、生長期から収穫期にかけて捕獲昆虫相を落とし穴法で調査した。また、生長期及び収穫期に根圏土壌を採取し昆虫相を調査した。その結果、本組換え体と非組換え体との間に大きな相違は認められなかった(別紙9；社外秘情報につき非開示)。

10 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

- 15 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

(2) 使用等の方法

—

20

- (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

—

- 25 (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

添付の「緊急措置計画書」を参照。

- 30 (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

—

- 35 (6) 国外における使用等に関する情報

米国では、2011年4月に米国環境保護庁(EPA)に対して eCry3.1Ab 蛋白質の残留基準値設定の免除申請を行った。また、2010年11月に米国農務省(USDA)に対して無規制裁

培(商業栽培)の許可申請を行った。2011年1月に米国食品医薬局(FDA)に対して食品及び飼料としての利用申請をそれぞれ行った。

第 2 項目ごとの生物多様性影響評価

1. 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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。

10 隔離ほ場試験において、本組換え体と対照となる非組換え体の競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、休眠性及び発芽率の調査を行った(本評価書の第 1.2.(6).②、a~e、21~23 ページ)。その結果、本組換え体と非組換え体との間に有意差又は相違は認められなかった。

15

本組換え体には eCry3.1Ab 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、コウチュウ目害虫による食害は、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から、この形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考

20 えにくい。

さらに、本組換え体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、我が国の自然条件下において本組換え体がマンノースを主な炭素源にすることは考えられないことから、この形質を有することにより競合における優位性

25 が高まるとは考えられない。

以上のことから、本組換え体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。

30 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

35

—

(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、本組換え体は、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。

5

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

10 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及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性については、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験及び土壌昆虫相試験を行った結果、本組換え体と非組換え体との間で有意差又は相違は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). ②、g、23～24 ページ)。よって、意図しない有害物質の産生はないと考えられる。また、本組換え体で発現している eCry3.1Ab 蛋白質及び PMI 蛋白質が既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている(本評価書の第 1. 2. (1).ロ、②、12 ページ)。

20 本組換え体において発現している eCry3.1Ab 蛋白質は、改変 Cry3Aa2 及び Cry1Ab 蛋白質からなり、従来の Cry 蛋白質と同様の構造、機能を持つことから、従来の Cry 蛋白質と同様、酵素活性を持つとは考えにくい。また、本組換え体において発現している 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
25 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 38)。よって、本組換え体において産生される eCry3.1Ab 蛋白質や PMI 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられる。

本組換え体には eCry3.1Ab 蛋白質産生性が付与されている。eCry3.1Ab 蛋白質は、ウ
30 エスタンコーンルートワーム(*D. virgifera virgifera*)、ノーザンコーンルートワーム(*D. longicornis barberi*)及びコロラドポテトビートル(コロラドハムシ)(*L. decemlineata*)といったコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示すことから(別紙 2; 社外秘情報につき非開示)、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が特定された。

35 (2) 影響の具体的内容の評価

eCry3.1Ab 蛋白質の標的コウチュウ目昆虫であるウエスタンコーンルートワームに対する eCry3.1Ab 蛋白質の LC₅₀ 値は 40 µg/ml であることが示されている(別紙 3; 社外秘

情報につき非開示)。

(3) 影響の生じやすさの評価

- 5 本組換え体から飛散した花粉をコウチュ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。

10 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。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
15 であった(文献 10)。

20 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、堆積した花粉密度についての調査が行われている。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(文献 40)。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 1 m 及び 5 m 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 41)。

25 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いと結論された。本組換え体を直接摂食する可能性のある、もしくは本組換え体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コウチュウ目昆虫が、本組換え体の栽培ほ場から半径 10 m の範囲に局所的に生育しているとは考えにくい。また、花粉での eCry3.1Ab 蛋白質の発現量は検出限界値以下であり(本評価書の第 1.2.(4).④、20 ページ)、殺虫活性は低いと考えられる。これらのことから、コウチュウ目昆虫が個体群レベルで本組換え体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。
30

35 (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、本組換え体は、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

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。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(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、本組換え体は、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

25 上記の他に、本組換え体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

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。

- 5 本組換え体と対照となる非組換え体の競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、休眠性及び発芽率の調査を行った。その結果、本組換え体と非組換え体との間に有意差又は相違は認められなかった。また、本組換え体は導入遺伝子によって、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する eCry3.1Ab 蛋白質及びマンノースを炭素源として
- 10 利用できる PMI 蛋白質を産生しているが、両形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

したがって、本組換え体は、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。

- 15 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 飼込み試験、後作試験、土壌微生物相試験及び土壌昆虫相試験を行った結果、本組換え体と非組換え体との間で有意差又は相違は認められなかった。よって、意図しない有害物質の産生はないと考えられた。また、本組換え体において導入遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質は改変 Cry3Aa2 及び Cry1Ab 蛋白質からなり、従来の Cry 蛋白質と同様の構造、機能を持つことから、従来の Cry 蛋白質と同様、酵素活性を持つとは考えにくい。同様に、選抜マーカーとして導入された *pmi* 遺伝子によって発現する PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で他の天然基質は知られて
- 25 いない。したがって、両蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられた。

- 一方、eCry3.1Ab 蛋白質によって影響を受ける可能性のある野生動物等として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コウチュウ目昆虫が本組換え体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。また、花粉での eCry3.1Ab 蛋白質の発現量は検出限界値以下であり殺虫活性は低いと考えられることから、特定されたコウチュウ目昆虫が個体群レベルで本組換え体による影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。
- 30

したがって、本組換え体は、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。

- 35 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の自生は報告されていない。

したがって、本組換え体は、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。

以上のことから、総合的評価として、本組換え体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。

引用文献

文献 1 : 農山漁村文化協会(1986) 農業技術体系 作物編 7, 追録第 8 号.

文献 2 : OECD (2003) CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF *ZEA MAYS* SUBSP. *MAYS* (MAIZE). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27. ENV/JM/MONO(2003)11.

文献 3 : 菊池一徳 (1987) トウモロコシの生産と利用, 光琳.

文献 4 : 戸澤英男 (2005) トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—, 農山漁村文化協会.

文献 5 : FAO (2011) FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>(2011年8月5日閲覧)

文献 6 : NCGA (2010) WORLD OF CORN. National Corn Growers Association. <http://ncga.com/files/pdf/WOC2010.pdf> (2011年5月11日閲覧)

文献 7 : 農林水産省 (2011) 農林水産統計データ. <http://www.maff.go.jp/j/tokei/index.html>(2011年5月11日閲覧)

文献 8 : 財務省貿易統計 (2011) <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>(2011年8月5日閲覧)

文献 9 : 配合飼料供給安定機構 (2011) <http://mf-kikou.lin.gr.jp/>(2011年5月11日閲覧)

文献 10 : Shirai, Y and Takahashi, M. (2005) Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*, *Appl. Entomol. Zool.* 40:151-159.

文献 11 : CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 1994. The biology of *Zea mays*. (L.) (Maize). (<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.pdf>) (2012年2月2日閲覧)

文献 12 : Hohn, T., Stavolone, L., De Haan, P., Ligon, H., and Kononova, M. (2007)

Cestrum yellow leaf curling virus promoters. U.S. Patent No.7,166,770.
Washington DC: U.S. patent Office.

- 文献 13: Stavolone, L., Kononova, M., Pauli, S., Ragozzino, A., de Haan, P., Milligan, S., Lawton, K, and Hohn, T. (2003) Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops. *Plant Mol Biol.* 53:663-673.
- 文献 14: Stavolone, L., Ragozzino, A., and Hohn, T. (2003) Characterization of Cestrum yellow leaf curling virus: a new member of the family *Caulimoviridae*. *J. Gen. Virol.* 84:3459-3464.
- 文献 15 : Höfte, H., and Whiteley, H. (1989) Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- 文献 16: Sekar, V., Thompson, D. V., Maroney, M. J., Bookland, R. G., and Adang, M. J. (1987) Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7036-7040.
- 文献 17 : Murray, E. E., Lotzer, J., and Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res.* 17:477-498.
- 文献 18 : Chen, E., and Stacy, C. (2003) Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefor. World Intellectual Property Organization. WO/2003/018810.
- 文献 19 : Geiser, M., Schweizer, S., and Grimm, C. (1986) The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *kurstaki* HD1 *Gene* 48:109-118.
- 文献 20 : Koziel, M.G., Desai, N.M., Lewis, K.S., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S.V., Crossland, L.D., Wright, M.S., Merlin, E.J., Launis, K.L., Rothstein, S.J., Bowman, C.G., Dawson, J.L., Dunder, E.M., Pace, G.M., and Suttie, J.L. (1997) Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize.

Ciba-Geigy, assignee. U.S. Patent No. 5,625,136. Washington, DC: U.S. Patent Office.

- 文献 21 : Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., and Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573.
- 文献 22 : Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- 文献 23 : Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R., and Hansen, G. (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19: 798-803.
- 文献 24 : Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., and Goodman, H.M. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:361-370.
- 文献 25 : Fling, M.E., Kopf, J., and Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 文献 26 : Hansen, G., Das, A., and Chilton, M. -D. (1994) Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7603-7607.
- 文献 27 : Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'gara, F., and Haas, D. (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in Gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact* 13:232-237.
- 文献 28 : Itoh, Y., Watson, J., Haas, D., and Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220.

- 文献 29 : Itoh, T., and Tomizawa, J. (1979) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology*. 43:409-417.
- 文献 30 : Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
- 文献 31 : Hart, H., Chen, J. S., Sacy, C., and Walters, F. (2008) Insecticidal Proteins. World Intellectual Property Organization. WO/2008/121633.
- 文献 32 : de Maagd, R. A., Bravo, A., and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genet.* 17: 193-199.
- 文献 33 : Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. -L., Brousseau, R., and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- 文献 34 : Pigott, C. R., and Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- 文献 35 : Li, J., Carroll, J., and Ellar, D. J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- 文献 36 : Schnepf, E. , Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- 文献 37 : Walter, F. S, deFontes, C. M., Hart, H., Warren, G. W., and Chen, J. S. (2010) Lepidopteran-Active Variable-Region Sequence Imparts Coleopteran Activity in eCry3.1Ab, an Engineered *Bacillus thuringiensis* Hybrid Insecticidal Protein. *Applied and Environmental Microbiol.* 76: 3082-3088

- 文献 38 : Freeze, H.H. (2002) Phosphomannose isomerase. *In:* Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds; Springer-Verlag, Tokyo and New York, pp. 595-599.
- 文献 39 : Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., and Hansen, G. (2001) Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques* 31:136-140.
- 文献 40 : Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., Dively, M. K., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P., and Jones, G. D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 11919-11924.
- 文献 41 : Sears, M. K., Stanly-Horn, D. E., and Mattila, H. (2000). Preliminary report on the ecological impact of BT corn pollen on the monarch butterfly in Ontario. Prepared for the Canadian Food Inspection Agency and Environment Canada.

緊急措置計画書

平成 23 年 9 月 13 日

氏名 シンジェンタジャパン株式会社
代表取締役社長 村田 興文
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (Event 5307, OECD UI: SYN-05307-1) (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のために関係機関への協力等を必要に応じて行う。更に、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

生物多様性影響管理委員会委員名簿 (平成 23 年 9 月現在)

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

弊社は、本組換え体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等の取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱い等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

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、本組換え体が環境中に放出されないよう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組換え体が、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消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。