

高リシン(lysine)トウモロコシ
(*cordapA*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(LY038, OECD UI: REN-00038-3)
の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理的及び生態学的特性	3
イ 基本的特性	3
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	3
ハ 捕食性又は寄生性	3
ニ 繁殖又は増殖の様式	3
ホ 病原性	4
ヘ 有害物質の産生性	4
ト その他の情報	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1) 供与核酸に関する情報	5
イ 構成及び構成要素の由来	5
ロ 構成要素の機能	8
(2) ベクターに関する情報	11
イ 名称及び由来	11
ロ 特性	11
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	11
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	11
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	12
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	12
(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
イ 移入された核酸の複製物が存在する場所	19
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	19
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	19
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	19
ホ ウィ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	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	23
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	23

イ	移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容	23
ロ	遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違	31
	形態及び生育の特性	32
	生育初期における低温又は高温耐性	32
	成体の越冬性又は越夏性	32
	花粉の稔性及びサイズ	32
	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	33
	交雑率	33
	有害物質の産生性	33
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	34
(1)	使用等の内容	34
(2)	使用等の方法	34
(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	34
(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	35
(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	35
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	36
1	競合における優位性	36
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	36
(2)	影響の具体的な内容の評価	37
(3)	影響の生じやすさの評価	37
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
2	有害物質の産生性	37
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	37
(2)	影響の具体的な内容の評価	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
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)	影響の具体的な内容の評価	39
(3)	影響の生じやすさの評価	39
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	39
4	その他の性質	39
第三	生物多様性影響の総合的評価	40
	引用文献	42
	緊急措置計画書	43

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 1 月 10 日

農 林 水 産 大 臣 中 川 昭 一 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 殿

申請者 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 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	高リシン(lysine)トウモロコシ (<i>cordapA</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (LY038, OECD UI : REN-00038-3)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

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

ロ．宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays*)で、デント種に属する自殖系統である耐倒伏性の H99 を用いた。

ハ．原産地については、ほぼ米国の南西部、メキシコ、中米あるいは南米にかけての地域と考えられるが、決定的な説はなく、これら複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起原とする説がある(文献 1)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ．トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている(文献 1)。その後、原住民の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 3000 年～1500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになり、南北アメリカ大陸の各地に伝播し、その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられている(文献 2)。わが国へは天正年間(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い。

ロ．現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる(文献 2; 文献 1)。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能である(文献 3; 文献 1)。国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2005 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 5 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,000 万 ha、中国が 2,600 万 ha、ブラジルが 1,100 万 ha、メキシコが 800 万 ha、インドが 740 万 ha、ナイジェリアが 460 万 ha、南アフリカが 340 万 ha となっている(文献 4)。なお、同統計情報に基づく 2005 年のわが国における栽培面積は 2 万 8,000ha であった。

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

わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期

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

なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくところ、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、もともと短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である(文献3)。これら温度条件等その他、デント種の場合は種子重量の70%の水を吸うと発芽する(文献5)。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む土壌が適し、pH5.5~8.0の範囲で栽培可能である(文献5)。

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

ハ 捕食性又は寄生性

-

ニ 繁殖又は増殖の様式

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒性はない(文献1)。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、野生として生き残る能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である。種子の休眠性は極めて低い。また、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が10℃に達するまで発芽せず、腐敗し枯死する(文献2; 文献3)。また、仮に発芽しても生長点が地上部に出る初期生育時(5~7葉期)に、0℃以下で6~8時間以上の条件下におかれると生存できない(文献1)。種子の寿命は常温保存では短く、2年目から発芽率が低下する。

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。

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である(文献 1; 文献 7)。トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Zea mays* 種に含まれ *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis の亜種として分類される一年生のテオシント(*Zea mays* subsp. *mexicana*)、及び *Tripsacum* 属であるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*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)。

トウモロコシの一本の雄穂には 1,200 ~ 2,000 個の小穂があり、1,600 万 ~ 3,000 万個の花粉粒を形成する。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では 24 時間以内であるが、環境により 2 時間から 8 日までの幅がある(文献 10)。花粉は球形で、直径は 90-100 μ m 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

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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

高リシン(lysine)トウモロコシ(*cordapA*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(LY038, OECD UI : REN-00038-3) (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、p6 の図 1 及び p7 の表 1 に記載した通りである。

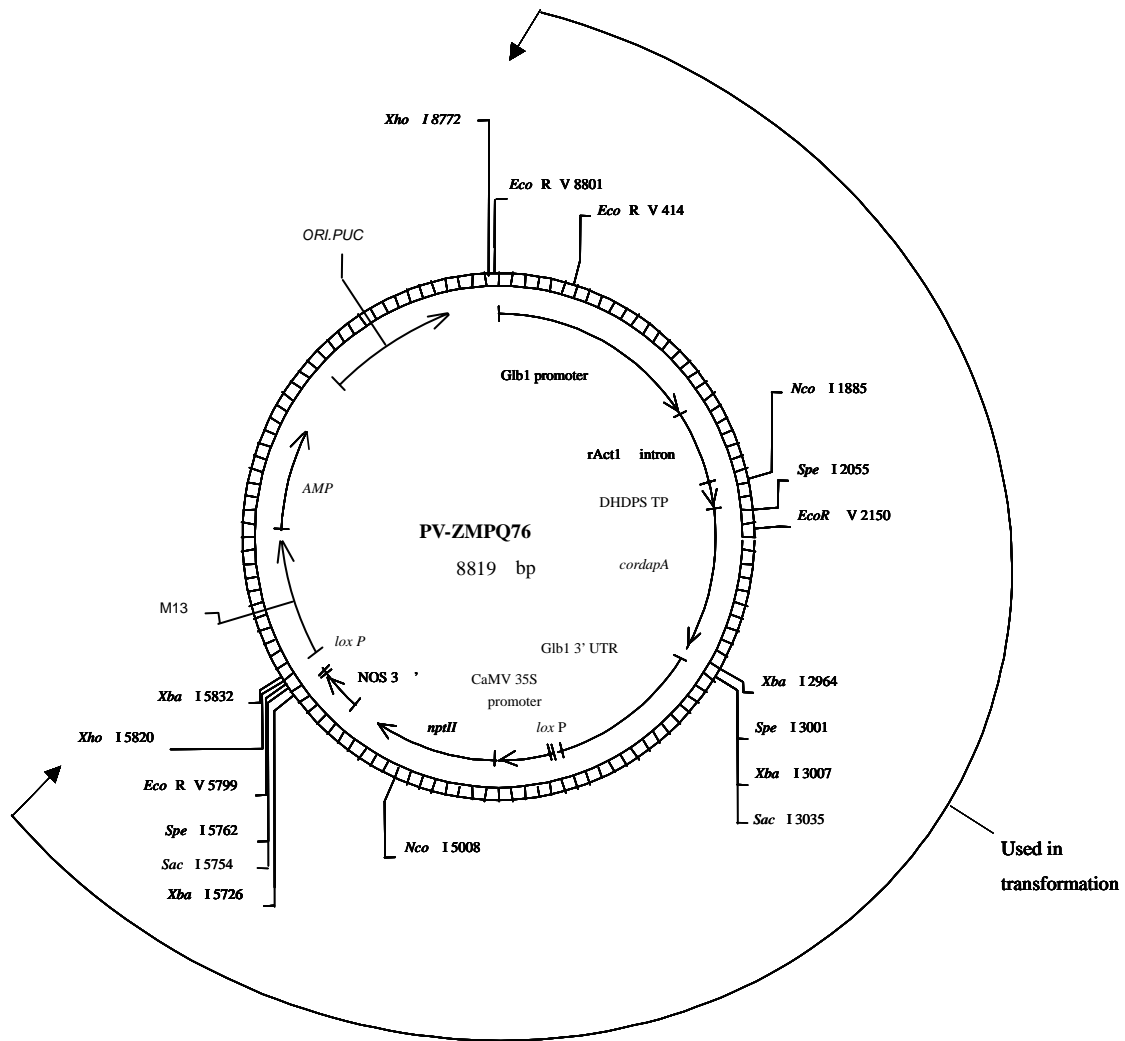


図 1 本組換えトウモロコシのの作出に用いたプラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 (旧表記名 : PV-ZMCTB331)¹

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

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMPQ76(旧表記名：PV-ZMCTB331)の各構成要素の由来及び機能¹

構成要素	由来及び機能
<i>cordapA</i> 遺伝子発現カセット	
Glb1 Promoter	トウモロコシの Globulin 1(Glb1)遺伝子由来のプロモーター領域で、目的遺伝子を主に穀粒で発現させる(文献 15)。
rAct1 intron	イネ・アクチン遺伝子由来のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 16)。
mDHDPS TP	トウモロコシのジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子の中で、DHDPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列(文献 17)。目的蛋白質を色素体へと輸送する。
<i>cordapA</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> のリシン生合成経路におけるジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子のコード領域で、リシンによるフィードバック阻害を受けない酵素をコードしている(文献 18)。
Glb1 3' UTR	トウモロコシの Globulin 1(Glb1)遺伝子由来の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(文献 15)。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット(育成過程で Cre-lox システムにより除去している。)	
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>loxP</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(文献 19)。
CaMV 35S promoter	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(文献 20)。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
<i>nptII</i>	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする(文献 21)。この遺伝子がトウモロコシ中で発現するとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く。
<i>ble</i>	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部である(文献 22)が、ブレオマイシン耐性は付与しない。
その他の領域(本組換えトウモロコシには存在しない。)	
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアダニル化を誘導する(文献 23)。
M13	バクテリオファージ M13 の複製開始点(文献 24)。バクテリオファージ中での複製を可能にする。
AMP	大腸菌(<i>E. coli</i>)由来の β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター領域及びコード領域で、大腸菌(<i>E. coli</i>)においてアンピシリン耐性を付与する(文献 25)
ORI.PUC	<i>E. coli</i> などの細菌で DNA の複製を可能にするプラスミド複製開始点(文献 25)。

¹ 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。

□ 構成要素の機能

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、p7の表1に記載した通りである。

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

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

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

なお、cDHDPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて FASTA 型アルゴリズムによって比較したが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

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

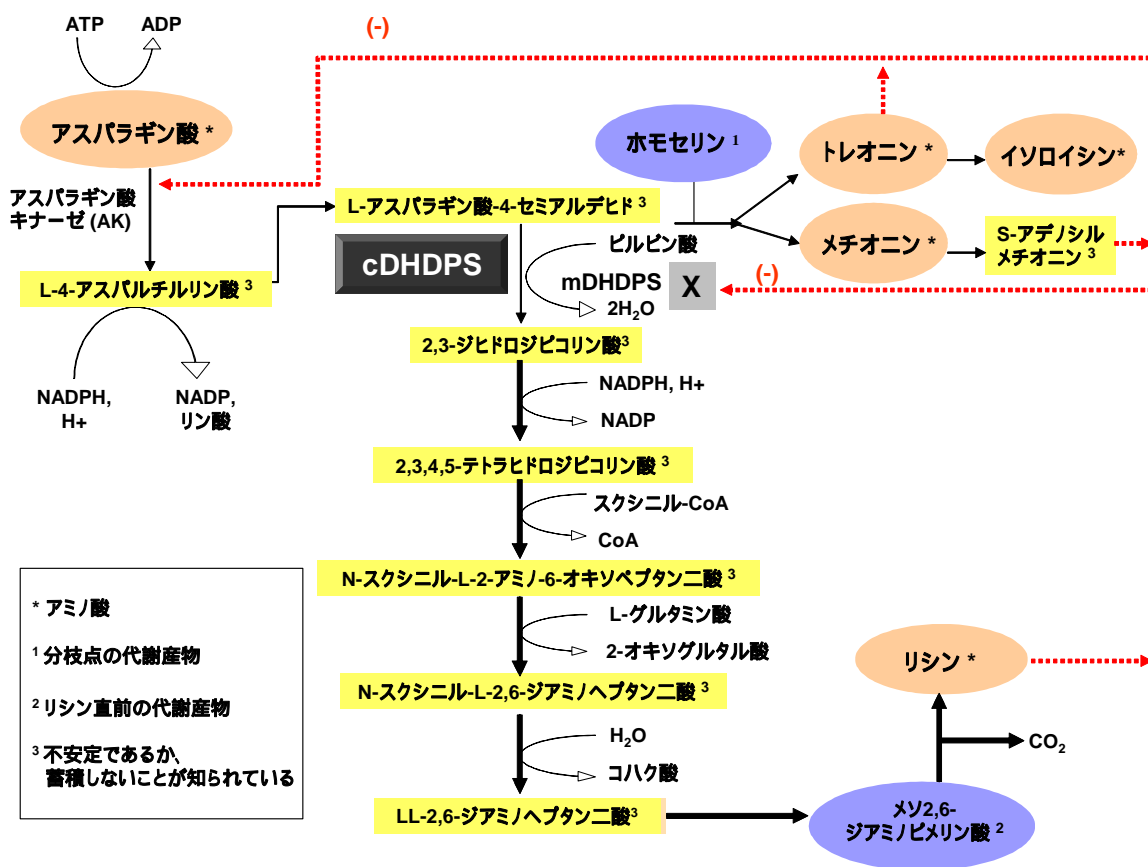


図 2 リシン合成経路²

(-); リシンによるフィードバック阻害

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

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

(a) 大腸菌 (*Escherichia coli*) において DHDPS の一方の基質である ASA を他の類似化合物(グルタミン酸セミアルデヒド、N-アセチルアスパラギン酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒド、ジピコリン酸)に、また、もう一方の基質であるピルビン酸を他の類似化合物(オキサロ酢酸、ホスホエノールピルビン酸)にそれぞれ置き換えて DHDPS との反応を調べたところ、いずれの場合も DHDPS とは反応しなかった(文献 69)。同様に、*Bacillus licheniformis* において DHDPS の一方の基質である ASA を他の類似化合物(アスパラギン酸、ジピコリン酸、アデニル酸、アリルグリシン)に置き換えても DHDPS とは反応しなかった(文献 29)。以上のことから微生物の DHDPS と基質である ASA やピルビン酸との特異性は高いと考えられた。

(b) 表 2(p10)に示すように DHDPS 蛋白質の動力的パラメーターが大きく異なるのは、cDHDPS がリシンによるフィードバック阻害を受けない点のみである。これと比較して K_m^{PYR} に関しては *C. glutamicum* と *E. coli* の間で、 K_m^{ASA} に関しては *C. glutamicum* と *Bacillus licheniformis* のとの間で、それぞれ動力的パラメーターが同程度であると考えられた。

(c) すでに明らかにされている *E. coli* の DHDPS の構造(文献 30; 文献 31; 文献 33)と cDHDPS の構造(文献 34)を比較したところ、基質結合部位はいずれも同じであり、また三次構造も互いに類似していた。

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

表 2 DHDPS 蛋白質の動力的パラメーター³

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

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

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

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

¹ 文献 69, ² 文献 29, ³ 文献 70, ^{4,5} 文献 71

n/d – not determined

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。

一方、本組換えトウモロコシの作出において、形質転換細胞の選抜マーカー遺伝子として、*nptII* (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II)neomycin phosphotransferase type II)遺伝子が用いられたが、後述するように本組換えトウモロコシの後代では、*nptII* 遺伝子発現カセット領域は存在しない(p19 の第一 2(4)口参照)。なお、その遺伝子産物であるネオマイシンフォスホトランスフェラーゼ II(NPTII)は、ATP を利用してカナマイシン及びネオマイシン並びにパロモマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質をリン酸化して不活化する。

(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ベクターは、pGEM (Promega Corporation, Madison, WI)をもとに構築された。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMPQ76 の全塩基数は、8,819 bp である。本プラスミド・ベクターの全塩基配列は、別添資料 2 に示した。

特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

本ベクターは選抜マーカー遺伝子として、*E. coli* のアンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼを発現する *AMP* 遺伝子を持つ(文献 25)。

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

なお、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

本組換えトウモロコシの作出のために構築されたプラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 (旧表記名：PV-ZMCTB331)は、*E. coli* でのプラスミドの構築・選抜及び維持・増殖のために必要な選抜マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼを発現する *AMP* 遺伝子領域が含まれるが、遺伝子導入には *cordapA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子の発現に必要な DNA 領域を、PV-ZMPQ76 から制限酵素 *XhoI* で切断・精製した線状プラスミドを用いている(p6 の図 1 参照)。したがって、宿主内に移入された線状プラスミドにおいて、*AMP* 遺伝子を含むプラスミド外骨格領域は含まれていない。

この制限酵素 *XhoI* で切断・精製した線状プラスミドは、*cordapA* 遺伝子発現カ

セット([Glb1Promoter]-[rAct1 intron]-[mDHDPS TP]-[cordapA]-[Glb1 3' UTR])と *nptII* 遺伝子発現カセット([loxP]- [CaMV 35S Promoter]-[*nptII*]- [ble]-[NOS 3']-[loxP])から構成される。なお、*nptII* 遺伝子発現カセットの両端の *loxP* は、バクテリオファージ P1 由来のトポイソメラーゼである Cre リコンビナーゼによって認識される塩基配列である(p7 の表 1 参照)。

□ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【本組換えトウモロコシの育成の経過】

核酸が移入された細胞の選択の方法

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

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

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

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

パロモマイシン添加培地上で再生させた個体の中から R0 を選抜し、これを生育させた後、従来品種[社外秘]の自殖系統と交配させて[社外秘]世代を作出した。次に導入遺伝子中の *nptII* 遺伝子発現カセット領域を取り除くことを目的として、[社外秘]世代(p15 の図 3)で他の組換えトウモロコシ(Cre event)と交配した。この Cre event では、*cre* 遺伝子発現カセットよりバクテリオファージ P1 由来のトポイソメラーゼである Cre リコンビナーゼを発現する。

Cre リコンビナーゼは本組換えトウモロコシ作出に用いた線状プラスミドに存在する *loxP* 塩基配列中の組換え部位を認識して切断するため、導入遺伝子中の

nptII 遺伝子カセット領域を削除することが出来る(p18 の図 5)。この Cre-lox システムを用いて植物においてターゲットとする遺伝子を除去する方法は、トウモロコシ、タバコ、トマトで行われており、ターゲットとする遺伝子が正確に除去されていることが確認されている(文献 34; 文献 35; 文献 35; 文献 19)。その後自殖を行うと、[社外秘]世代の植物体には *cre* 遺伝子を持つ個体と持たない個体の両者が存在するため、サザンプロット法及び PCR 法により、*cre* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*cordapA* 遺伝子の有無を確認した。この時点で *cordapA* 遺伝子のみを持つ個体を選抜し、それ以外の個体(すなわち *cre* 遺伝子または *nptII* 遺伝子のどちらか一方でも持つ個体及び *cordapA* 遺伝子を持たない個体)は、開花前に廃棄した。

したがって、[社外秘]世代以降の本組換えトウモロコシ中には *cre* 遺伝子と *nptII* 遺伝子を持つ個体は存在しない。本組換えトウモロコシの商品化系統の作出においては、上記の[社外秘]世代における選抜個体の自殖により *cordapA* 遺伝子をホモ化した[社外秘]を育種母本として用いた(p15 の図 3)。

この[社外秘]世代を自殖あるいは従来品種と掛け合わせるにより、きょうだい系統を作出した。これらきょうだい系統を自殖あるいは従来品種と掛け合わせるにより作出した雑種をほ場試験や遺伝子解析に供試した(試験に用いた世代の詳細については p15 の図 3 参照)。

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

また、Cre event の作出に用いた PV-ZM003 のプラスミド図を p16 の図 4 に、PV-ZM003 の構成要素の由来と機能は p17 の表 3 に示した。さらに、Cre event の作出における DNA の導入では、アグロバクテリウム法を用いて PV-ZM003 の *cre* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域をトウモロコシ細胞に導入した。なお、残存するアグロバクテリウム除去のためカルベニシリンを(文献 36)、形質転換されていない個体除去のためパロモマイシンを、それぞれ培地に添加して培養を行った。

【Cre event の分子分析】(別添資料 3)

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

さらに、この Cre event における T-DNA 領域 1 コピーと *nptII* コード領域と NOS 3' からなる遺伝子断片 1 コピーは、いずれも[社外秘]以降の後代には存在しないことを複数世代のサザンプロット分析によって確認した(別添資料 3 の p22 Figure 14)。また、PV-ZM003 の T-DNA 領域以外の領域が存在しないことも複数世代のサザン

プロット分析によって確認した(別添資料 4 の p61 の Figure 22)。本サザンプロット分析の詳細は別添資料 3 に記載した。

【Cre event の生育特性】(別添資料 5)

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

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

本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は以下の通りである。

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

[社外秘に付き非開示]

図 3 高リシントウモロコシ LY038 の育成図

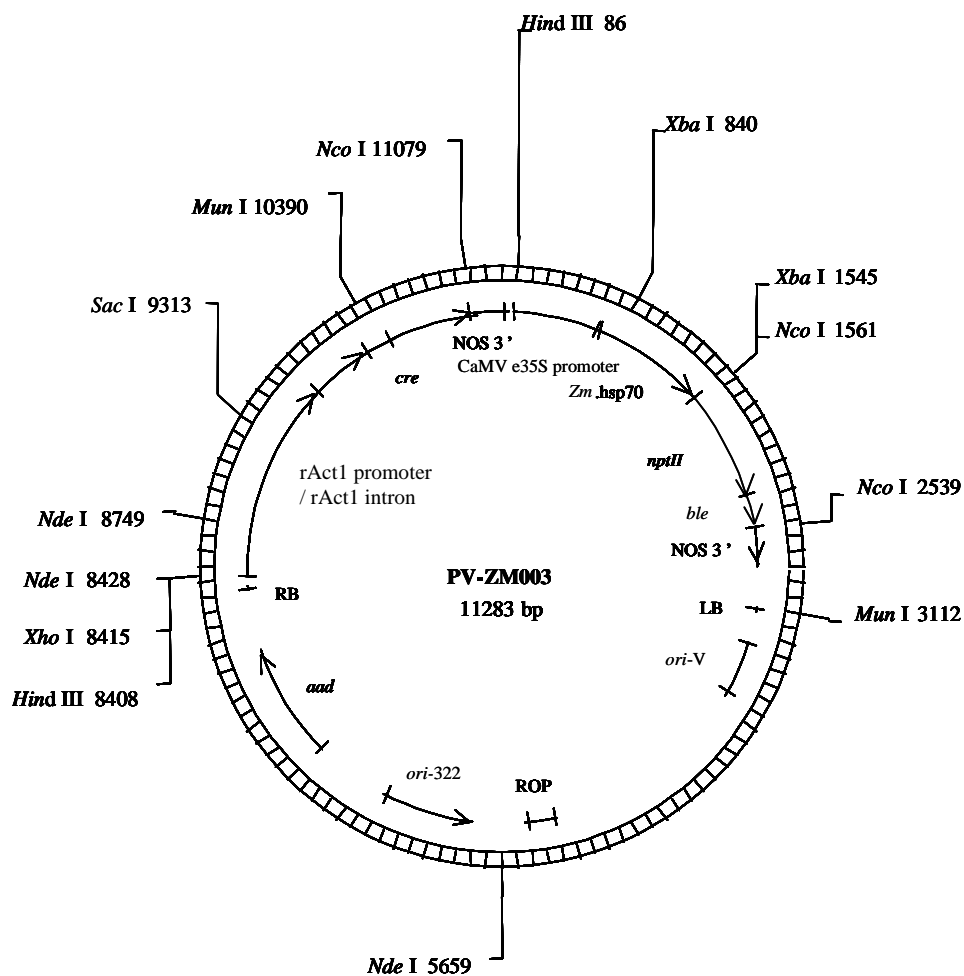


図 4 Cre event の作出に用いられた PV-ZM003⁴

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

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

表 3 Cre event の作出に用いた PV-ZM003 の各構成要素の由来及び機能⁵

構成要素	由来及び機能
<i>cre</i> 遺伝子発現カセット(LY038 には存在しない。)	
rAct1 promoter/ rAct1 intron	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域及びイントロン。プロモーター領域は目的遺伝子を全身で恒常的に発現させる(文献 16)。イントロンはスプライシングの効率を高めることによって目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 16; 文献 37)。
<i>cre</i>	バクテリオファージ P1 のトポイソメラーゼ Cre リコンビナーゼ(rec3) 遺伝子のコード領域(文献 38)。リコンビナーゼが 2 つの <i>loxP</i> 部位(p10 の表 2)を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(文献 39)。
NOS 3'	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアダニル化を誘導する(文献 23)。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット(LY038 には存在しない。)	
CaMV e35S promoter	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域で(文献 20)、エンハンサー領域(文献 40)を含む。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
Zm.hsp70	トウモロコシの <i>hsp 70</i> 遺伝子のイントロンで、遺伝子の転写レベルを一定に保つ(文献 72)。
<i>nptII</i>	大腸菌(<i>E. coli</i>)のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする(文献 21)。この遺伝子がトウモロコシ中で発現するとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く。
<i>ble</i>	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部である(文献 22)が、ブレオマイシン耐性は付与しない。
NOS 3'	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアダニル化を誘導する(文献 23)。
その他の領域(LY038 には存在しない。)	
LB	Ti プラスミド pTi15955 に由来する左境界配列の DNA 断片(文献 41)。左境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。
<i>ori-V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された ABI <i>Agrobacterium</i> の一部分であり(文献 42)、ベクターに自律増殖能を付与する。
ROP	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数維持のためのプライマー蛋白質を抑制するコード配列(文献 43)。
<i>ori-322</i>	pBR322 に由来する複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> 内でプラスミドを維持する(文献 25)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 由来の、アミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター及びコード領域。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する(文献 44)。(GenBank accession X03043)
RB	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列の DNA 断片。右境界配列は、 <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 45)。

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

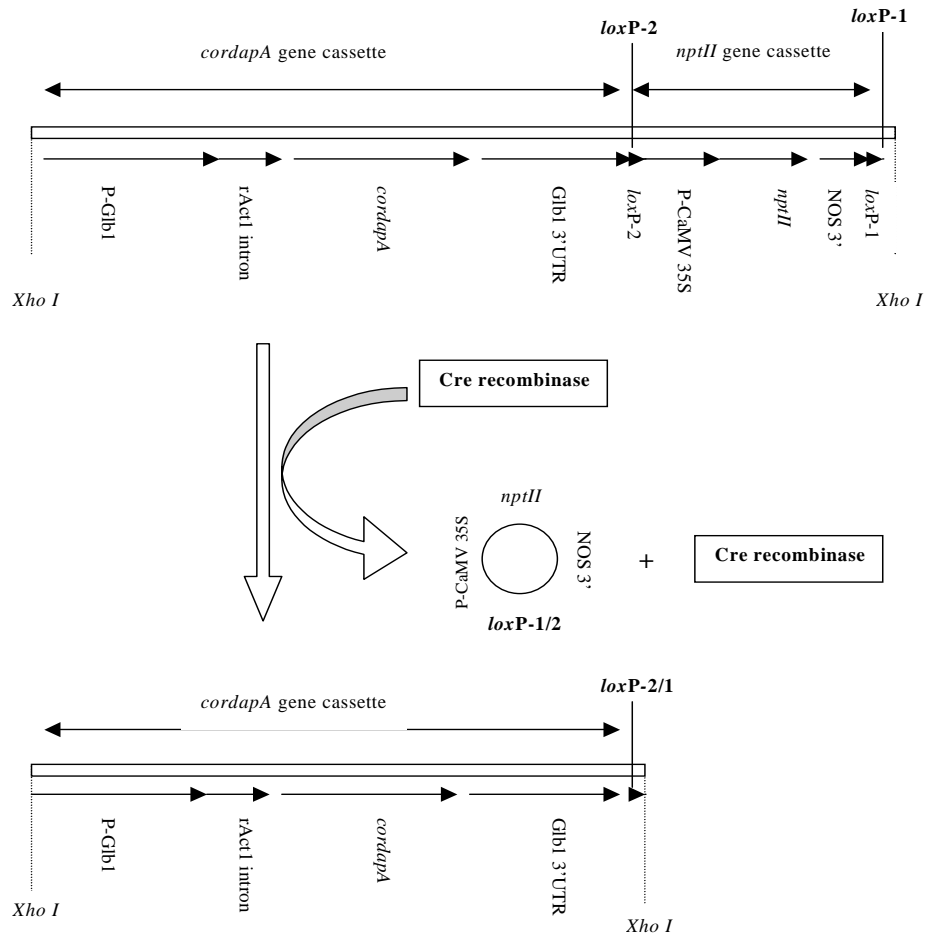


図 5 Cre-loxP による *nptII* 遺伝子発現カセット除去の模式図⁶

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

Cre-loxP 組換え系の機構については既に明らかにされており(文献 39; 文献 46; 文献 34)、以下に概要を記載する。Cre-loxP 組換え系は 38.5 kDa の Cre リコンビナーゼ及び除去したい直鎖状 DNA の両端に連結された二つの *loxP* 認識配列から成る。各 *loxP* 配列は、8 bp のスペーサー配列を 13 bp の逆方向反復配列 2 つが挟み込む合計 34 bp からなる(文献 47)。Cre リコンビナーゼが 13 bp の逆方向反復配列を認識し、各 *loxP* 部位の真ん中に存在する 8 bp のスペーサー配列間の組換えを触媒する。その結果、除去したい直鎖状 DNA の両端に各 *loxP* 部位の半分が連結した状態で直鎖状 DNA が環状になって切り出され、ゲノム上には各 *loxP* 部位の残りの半分(*loxP*-1/2)が残る。

⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

(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

本組換えトウモロコシの挿入遺伝子はメンデルの法則にしたがって次世代に遺伝していることから、染色体上に存在する(別添資料 7)。

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

本組換えトウモロコシのサザンプロット解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中の 1ヶ所に 1コピーの完全な *cordapA* 遺伝子発現カセットが組み込まれていることが確認された(別添資料 1 の p32 及び p39~43 及び別添資料 4 の p44~48 参照)。また、*nptII* 遺伝子発現カセット領域、プラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 のその他の領域、及び、[社外秘]世代で交配に用いた組換えトウモロコシ Cre event(作出に用いた PV-ZM003 の図を p16 の図 4 に、PV-ZM003 の構成要素の由来と機能を p17 の表 3 に示した)に由来する T-DNA 領域(*cre* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセット)及びその他の領域は存在しないことが確認された(別添資料 1 の p32 及び p44~52、別添資料 4 の p49~57、及び別添資料 3 参照)。さらに挿入遺伝子は複数世代において安定的に遺伝していることも示された(別添資料 4 の p58 の Figure 19 及び p59 の Figure 20)。Cre event に由来する T-DNA 領域については複数世代を経過した後も調査を行い、検出されないことを確認した(別添資料 3 の p22)。また、PV-ZM003 の T-DNA 領域以外のその他の領域が存在しないことも複数世代のサザンプロット分析によって確認した(別添資料 4 の p61)。

なお、本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子の模式図を、p22 に図 6 として示した。

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。

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

以上の結果から、本組換えトウモロコシに導入された *cordapA* 遺伝子は後代に安定して遺伝しており、それらの後代で cDHDPS 蛋白質が発現していることが示された。

また、2002年に米国の5箇所のほ場から採取したサンプルを用いて、ELISA法によって本組換えトウモロコシにおけるcDHDPS蛋白質の発現量を測定したところ、穀粒、茎葉、根、及び花粉でのcDHDPS蛋白質の平均発現量はそれぞれ24、0.25、0.14、0.43 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重であった(p20の表4)。また、異なる生育ステージに採取した葉(OSL-1 = V2-V4生育期、OSL-2 = V6-V7生育期、OSL-3 = V11-V12生育期、OSL-4 = V13-V18生育期)におけるcDHDPS蛋白質の発現量は検出限界以下であった。このことから、*cordapA* 遺伝子の発現は穀粒に特異的であることが確認された。

表4 本組換えトウモロコシにおけるcDHDPS蛋白質の発現量^{a 7}

分析試料	cDHDPS 平均値 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) (標準偏差値)	範囲 ² ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)	LOQ / LOD ³ ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
穀粒	24 (9.1)	13 – 43	0.044 / 0.021
葉茎	0.25 (0.21)	0.034 – 0.79	0.0025 / 0.00056
根	0.14 (0.23)	0.011 – 0.62	0.0050 / 0.0050
花粉	0.43 (0.14)	0.27 – 0.67	0.025 / 0.0052
OSL-1 ⁴	< LOD	–	0.038 / 0.013
OSL-2 ⁴	< LOD	–	0.038 / 0.013
OSL-3 ⁴	< LOD	–	0.038 / 0.013
OSL-4 ⁴	< LOD	–	0.038 / 0.013

a 米国5箇所のほ場から採取したサンプルについてELISA法により測定した。対照のNull型トウモロコシから採取したサンプルからはcDHDPS蛋白質は検出されなかった。

b 分析値の最小 - 最大値

c LOQ = 定量限界値、LOD = 検出限界値

d OSL-1 = V2-V4生育期 (2葉期 ~ 4葉期)、OSL-2 = V6-V7生育期 (6葉期 ~ 7葉期)、OSL-3 = V11-V12生育期 (11葉期 ~ 12葉期)、OSL-4 = V13-V18生育期 (13葉期 ~ 18葉期)、の各生育期間中の伸葉を試料とした。生育期間の定義には文献48を参考とした。

⁷ 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。

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

PV-ZMPQ76は自律増殖が可能な宿主域が*E. coli*などのグラム陰性菌に限られており、自然界において野生動植物に対する伝達性はない。

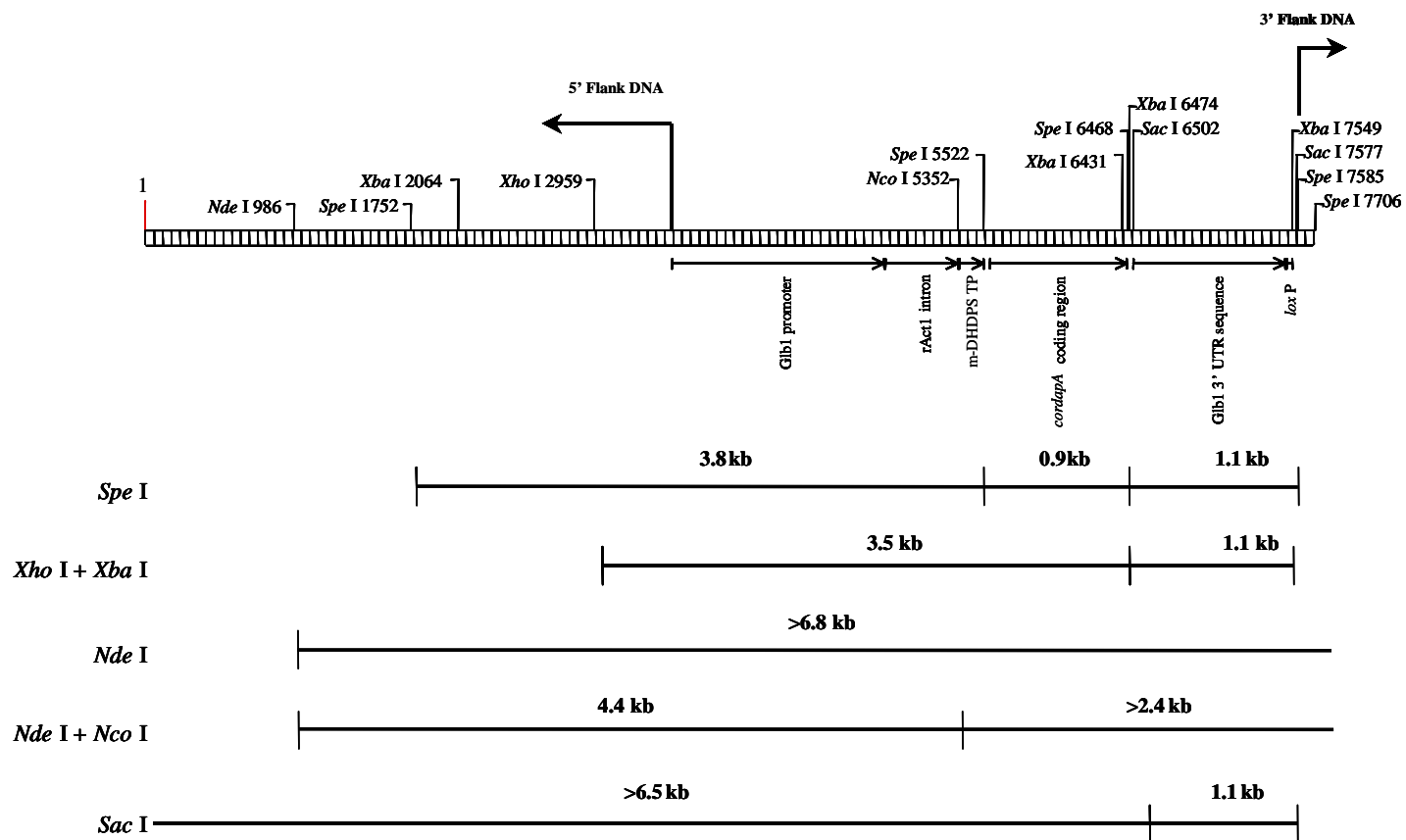


図 6 サザンブロット分析に基づく本組換えトウモロコシにおける挿入遺伝子の模式図(上段)⁸

下段：各制限酵素処理によって得られる挿入遺伝子を含む DNA 断片の長さ(別添資料 1 の p32 参照)

⁸ 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

(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

挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより、本組換えトウモロコシを特異的に検出可能である(別添資料 4 の p63 ~ 68 参照)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

2002 年に米国で行った 5 カ所の栽培圃場(3 反復/供試トウモロコシ/圃場)から収穫した穀粒を用いて、リシン、遊離リシン及びリシン合成後の下流代謝産物(p28 の図 7)を分析した。対照には、本組換えトウモロコシの育成過程において分離により得られた Null 型トウモロコシを用い、また、各分析値の比較参考のため、各圃場で同時に栽培された商業トウモロコシ品種(20 品種)も分析に供試した。

その結果、導入された *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって本組換えトウモロコシの穀粒中で総アミノ酸量に対するリシンの含有率(%)及び遊離リシン量($\mu\text{g/g dwt}$)が高まり、また、それによって予想されたようにリシンの代謝産物であるサッカロピン(saccharopine)と γ -アミノアジピン酸(γ -aminoadipic acid)の量も有意に増加していることが示された(p29 の表 5 及び表 6)。なお、同様にリシンの代謝産物であるピペコリン酸(pipecolic acid)含量についても、その値は商業品種の分析値の範囲内であったが、対照の Null 型トウモロコシと比べて約 2 倍に増加していることが認められた(p29 の表 5)。

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

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

本組換えトウモロコシにおいて増加しているサッカロピン、 γ -アミノアジピン酸、ピペコリン酸の野生動物に対する影響を評価する為に肥育試験、文献調査、そして急性毒性試験を行い、その結果を以下に記載した。

【肥育試験】(別添資料 8)

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

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

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

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

【文献調査】

1. サッカロピン

サッカロピンはリシンがリシンケトグルタル酸リダクターゼと反応することによって生合成される(p28 の図 7)。また、サッカロピンはアスパラガス(4 $\mu\text{g/g}$ FW)やレタス(4 $\mu\text{g/g}$ FW)(文献 49)、マッシュルーム(102 $\mu\text{g/g}$)(文献 50)、ブロッコリー(122 $\mu\text{g/g}$ DW)*、カリフラワー(97 $\mu\text{g/g}$ DW)*などに存在することが確認されている。

サッカロピンに関しては、リシンを含有する通常の食品や飼料を摂取したヒト

* Monsanto 社内データ

や家畜の体内では、体内にサッカロピンが産生されていると考えられるが、Fellowらが述べているように、サッカロピンの代謝率は高く、その結果としてヒトや家畜の体内には蓄積しないと考えられる(文献 51)。すなわち、本組換えトウモロコシにおいて増加したサッカロピンを飼料として摂取する量とヒトや家畜がサッカロピン分解酵素(Saccharopine dehydrogenase; SDH)によって分解することが可能と考えられるサッカロピンの量を比較すると、ヒトや家畜の肝臓には本組換えトウモロコシ由来のサッカロピンを分解するのに十分な量のSDHが存在すると考えられた(p30 の表 7)。このSDHの量はFellowらが実験結果に基づき24時間分に換算した値であるが、一日の中でSDHの量が多少上下することがあったとしても、分解可能なサッカロピンの量は、本組換えトウモロコシから一日に摂取するサッカロピンの量と比較するとヒトは約48.7万倍、ブタは約36倍、ウシの場合は56倍のサッカロピン分解活性を持っていることから、依然として高い分解活性は維持されていると考えられた。

なお、実際に家畜でサッカロピンが検出されたという報告はいくつかあるが、その検出量は低く(文献 52; 文献 53)、先に挙げたFellowらによる「サッカロピンは動物の体内には蓄積しないと考えられる。」という考察を支持しているものと考えられた。以上のことから、本組換えトウモロコシを飼料として動物あるいは家畜が摂取したとしても、動物あるいは家畜は急速にサッカロピンを分解するため、その安全性は確保されていると考えられた。

2. -アミノアジピン酸

-アミノアジピン酸は、サッカロピンが -アミノアジピン酸セミアルデヒドに代謝された後、この -アミノアジピン酸セミアルデヒドがアミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと反応することにより生合成される(p28 の図 7)。また、 -アミノアジピン酸はレンズ豆(7.90 µg/g FW)、エンドウマメ(3.1 µg/g FW)、レタス(3.2 µg/g FW)(文献 54; 文献 55)、ブロッコリー(490 µg/g DW)*、カリフラワー(175 µg/g DW)*、サヤインゲン(141 µg/g DW)*、マッシュルーム(637 µg/g DW)*などに存在することが確認されている。

-アミノアジピン酸に関しては、報告(文献 56)をもとにリシンを含む基礎飼料(含まれるリシン総量は1.15%)を摂取した体重10.5 kgのブタの各組織に含まれると考えられる -アミノアジピン酸の量を算出すると、204.72 mg となり(p31 の表 8)、ブタは普段から基礎飼料に含まれるリシンを代謝する結果これだけの量の -アミノアジピン酸に曝露されていると考えられる。一方、この試験に用いた基礎飼料中に含まれるトウモロコシをすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮

定すると、基礎飼料を摂取していた時と比較して新たに 21.8 mg の β -アミノアジピン酸を摂取すると考えられた。この増加分の 21.8 mg の β -アミノアジピン酸の毒性影響については次のように考察した。

別の実験では、基礎飼料(含まれるリシン総量は 1.15%)を与えられたブタの血漿中の β -アミノアジピン酸の量は 16 nmol/ml であったのに対して、基礎飼料にさらに 1.15%のリシンを添加した飼料(含まれるリシン総量は 2.30%)を与えられた場合には、ブタの血漿中の β -アミノアジピン酸量は 108 nmol/ml へと約 6.8 倍に増加していた。しかし、ブタの体重増加、飼料摂取量、飼料効率のいずれにおいても統計学的有意差は認められなかった(文献 56)。このことから、前述の基礎飼料を与えられた結果ブタが暴露されると予想される β -アミノアジピン酸 204.72 mg の約 11%増加の 21.8 mg の β -アミノアジピン酸を新たに摂取したとしても、毒性影響を及ぼすとは考えにくいと判断した。

3. ピペコリン酸

ピペコリン酸は、ピペリジン-6-カルボン酸がピペリジン-6-カルボン酸レダクターゼと反応することにより生合成される(p28 の図 7)。また、ピペコリン酸はアズキ(16.94 μ g/g)、インゲンマメ(43.42 μ g/g)、ブロッコリ(12.25 μ g/g)、キャベツ(19.23 μ g/g)、カリフラワー(10.57 μ g/g)、ジャガイモ(2.43 μ g/g)などに存在することが確認されている(文献 57)。

ピペコリン酸に関しては、実際に、ピペコリン酸をラットに体重 1 kg 当たり 300 ~ 330 mg の割合で投与しても特に毒性影響は認められなかったという報告がある(文献 58)。この投与量を家畜が本組換えトウモロコシを摂食した際に摂取すると予想されるピペコリン酸の量と比較した。成熟したブタ(体重 70 ~ 115 kg)が一日に約 3 kg の配合飼料を摂食し(文献 59)、うちトウモロコシの配合割合 55.8%(文献 60)をすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮定すると、ブタが一日に本組換えトウモロコシの穀粒から摂取するピペコリン酸の量は約 0.845 mg と算出された⁹。以上のことからラットに有害な影響が認められなかった最大投与量 330 mg/kg は、ブタが一日に本組換えトウモロコシから摂食するであろうピペコリン酸の約 391 倍に相当する。

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

【急性毒性試験】

⁹ $(35.35 \times 3,000(\text{g}) \times 0.558) / 70 = 845 \mu\text{g} = 0.845 \text{ mg}/1\text{kg body weight}, 330 / 0.845 = 391$

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

1. サッカロピン

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

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

米国のは場試験で収穫された本組換えトウモロコシの穀粒において認められたサッカロピン量の最大値は 818.42 $\mu\text{g/g}$ dwt であった (p29 の表 5)。成熟したブタ(体重 70 kg)は一日に約 3 kg の配合飼料(文献 59)を摂食する。配合飼料中のトウモロコシの含有量 55.8 % (文献 60)をすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮定すると、ブタが一日に本組換えトウモロコシの穀粒から摂取するサッカロピンの量は、体重 1 kg 当たり約 19.6 mg と算出された¹⁰。以上のことから今回マウスに有害な影響が認められなかった最大投与量 2,000 mg/kg は、ブタが一日に本組換えトウモロコシから摂食するであろうサッカロピンの約 102 倍に相当する。

2. β -アミノアジピン酸

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

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

米国のは場試験で収穫された本組換えトウモロコシの穀粒において認められた β -アミノアジピン酸量の最大値は 89.32 $\mu\text{g/g}$ dwt であった(p29 の表 5)。成熟したブタ(体重 70 kg)は一日に約 3 kg の配合飼料(文献 59)を摂食する。配合飼料中のトウモロコシの含有量 55.8 % (文献 60)をすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮定すると、ブタが一日に本組換えトウモロコシの穀粒から摂取する β -アミノアジピン酸の量は、体重 1 kg 当たり約 2.1 mg と算出された¹¹。以上の

¹⁰ $(818.42 \times 3000(\text{g}) \times 0.558)/70 = 19,571 \mu\text{g} = 19.6 \text{ mg}/1\text{kg body weight}$, $2000/19.6 = 102$

¹¹ $(89.32 \times 3000(\text{g}) \times 0.558)/70 = 2,136 \mu\text{g} = 2.136 \text{ mg}/1\text{kg body weight}$, $2000/2.136 = 936$

ことから今回マウスに有害な影響が認められなかった最大投与量 2,000 mg/kg は、ブタが一日に本組換えトウモロコシから摂食するであろう γ -アミノアジピン酸の約 936 倍に相当する。

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

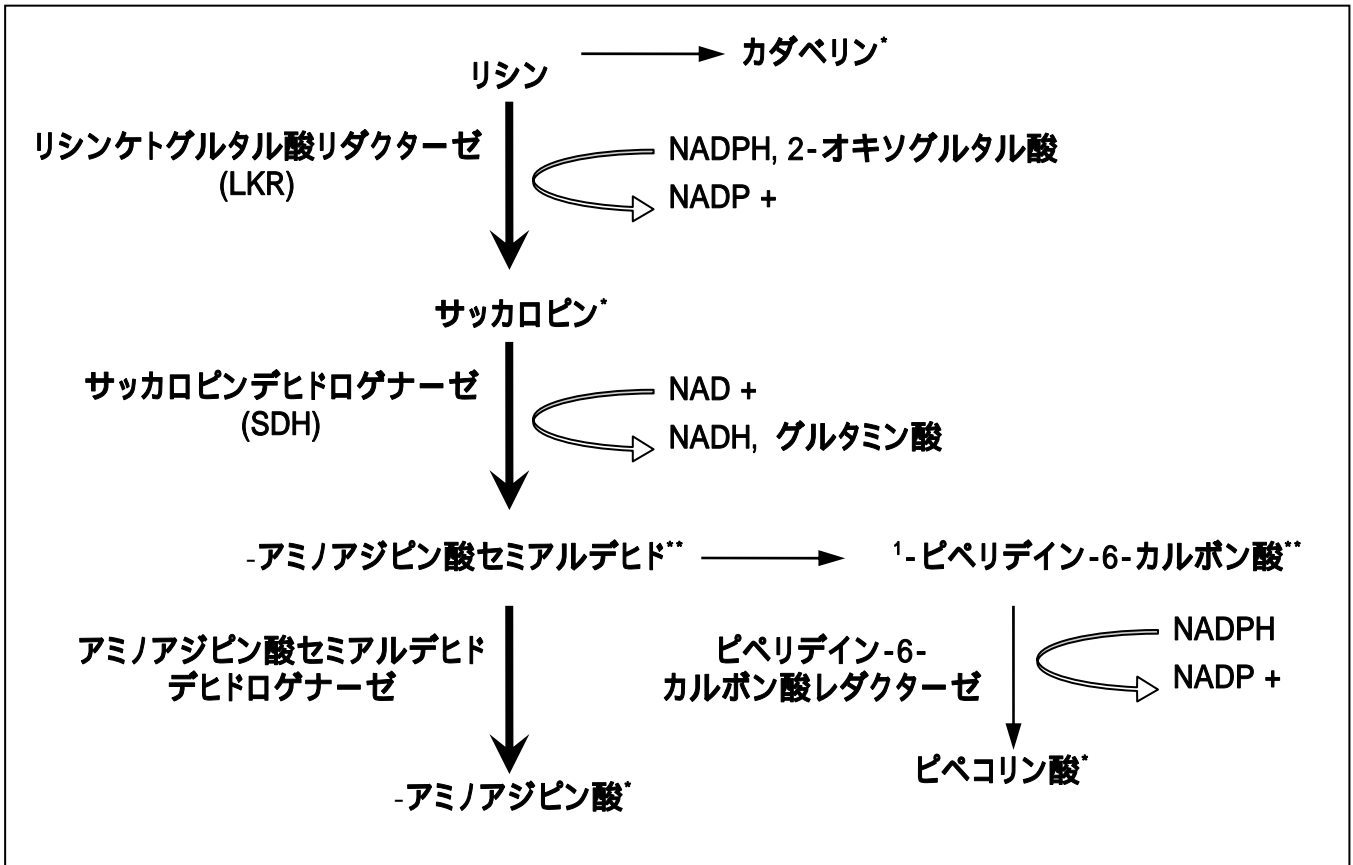


図 7 リシン合成後の代謝経路(文献 61)¹²

* 分析したリシン合成後の代謝産物

** 不安定であることが知られているため、成分分析は行わなかった。

¹² 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 5 穀粒中の遊離リシン、リシン及び関連代謝産物の分析結果¹³

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

1 total AA = 総アミノ酸量、dwt = 乾物量、total prot = 総タンパク量

2 S.E. = 標準誤差

3 分析値の最小 最大値

4 95% の信頼限界で商業品種集団の 99% が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は 0 に設定した。

表 6 本組換えトウモロコシの穀粒における -アミノアジピン酸の分析結果^{14, (1)}

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

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

(2) DW = 乾物重

¹³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹⁴ 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 7 ヒトや動物におけるサッカロピン分解可能量¹⁵

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

a 文献 62

b 成熟したブタ(体重 70 ~ 115 kg)が一日に約 3 kg の配合飼料を摂食し(文献 59)、うちトウモロコシの含有量 55.8%(文献 63)をすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮定した。

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

c 成熟したウシがトウモロコシの穀粒を飼料として 1 日に約 9 kg の配合飼料を摂食し(文献 64)、うちトウモロコシの含有量 40.1%(文献 63)をすべて本組換えトウモロコシから摂取すると仮定した。

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

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

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

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

g 文献 65 に記載されている主要な各食品(穀類、豆類、野菜類、果実類、きのこ類、魚介類、肉類、乳類など)に存在するサッカロピン量を文献値等から算出した。各食品に該当する文献値がない場合には、文献値等がある比較的近い食品のと同程度のサッカロピン量であると仮定して算出した。

¹⁵ 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 8 リシンを含む基礎飼料を摂取したブタの各組織における γ -アミノアジピン酸の検出量及び本組換えトウモロコシ由来基礎飼料中に含まれる γ -アミノアジピン酸量¹⁶

(体重 10.5kg の幼ブタが一日に 1,057g の基礎飼料(Basal diet)を摂取するという実験データ(文献 56)に基づいて計算した。)

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

(1) 農林水産省の統計ダイジェスト(文献 66)などを参考にした。

(2) 文献 56

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

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

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

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

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

口 ¹⁷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

本組換えトウモロコシに属する系統である LY038-A 及び LY038-B 並びにその対照系統として Cont-38A 及び Cont-38B を供試して、2003 年に日本モンサント株式会社の河内研究農場にて隔離ほ場試験を行った。LY038-A 及び LY038-B は、本組換えトウモロコシの育成世代の[社外秘]世代目を、2 つの異なる非組換えトウモロ

¹⁶ 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

¹⁷ 本項目中の以下に続く ~ 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。

コシ自殖系統とそれぞれ交配して得られた2つのF1雑種である(p15の図3参照)。対照系統である Cont-38A 及び Cont-38B は、本組換えトウモロコシの[社外秘]世代において分離によって得られた Null 型トウモロコシを、2つの異なる非組換えトウモロコシ自殖系統と交配して得られた F1 雑種である(p15の図3参照)。なお、Null 型トウモロコシのゲノム中に *cordapA* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*cre* 遺伝子が存在しないことはサザンブロット法及び PCR 法により確認した(別添資料4の p44 の Figure 5 ~ p62 の Figure 23)。

形態及び生育の特性

形態及び生育に関する特性として評価した19項目(発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、粒色、百粒重、粒形及び収穫期の植物重)のうち、供試組換えトウモロコシ LY038-A では、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A との間で、稈長、着雌穂高、雌穂径及び粒列数に統計学的有意差が認められ($p < 0.05$)、もう一方の供試組換えトウモロコシ LY038-B においては、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、粒列数及び百粒重に統計学的有意差が認められたが($p < 0.05$)、それ以外の項目では差異は認められなかった(別添資料6の p6 ~ 14 参照)。それぞれの組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシとの間で差異が認められた各評価項目の平均値は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシ(MON863 系統、MON810 系統、NK603 系統、DLL25 系統、MON88001 系統、MON88012 系統及び MON88017 系統)で、対照として用いた非組換えトウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれも従来トウモロコシにおける変動の範囲内であった(別添資料6の p8 の表2参照)。

生育初期における低温又は高温耐性

組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B と、3葉期の苗を5条件下に22日間静置した結果、完全に枯死しており、枯死程度に差異は認められなかった(別添資料6の p19 ~ 21 参照)。

成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死する。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっていることを本組換えトウモロコシ及び対照の Null 型トウモロコシにおいて観察した。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

花粉の稔性及びサイズ

組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B と

の間で、いずれも花粉稔性率に統計学的有意差は認められず高い花粉稔性を示し(別添資料 6 の p16 の表 3 参照)、また、花粉の形態・大きさにも相違は観察されなかった(別添資料 6 の p17~18 参照)。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

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

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

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

交雑率

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

有害物質の産生性

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

また、ハツカダイコンを用いた植物体鋤込み試験において、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、ハツカダイコンの発芽率、生体重及び乾物重に、統計学的有意差は認められなかった(別添資料 6 の p25 の表 6 参照)。

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

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

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

その結果、本組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重、乾物重には統計学的有意差は認められなかった(別添資料 9 の p4 の表 3 参照)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

-

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

-

- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

- (5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

- (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの諸外国における認可状況は以下の通りである。

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

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は以下の通りである。

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

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹⁸

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があり、これまでトウモロコシが自然環境下で自生した例は報告されていない。

隔離ほ場において、本組換えトウモロコシの形態及び生育に関する特性として評価した 19 項目のうち、供試組換えトウモロコシ LY038-A では、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A との間で、稈長、着雌穂高、雌穂径及び粒列数に統計学的有意差が認められ、もう一方の供試組換えトウモロコシ LY038-B においては、対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、粒列数及び百粒重に統計学的有意差が認められた(p32 の 参照)。また、一穂着粒数に関して、組換えトウモロコシ LY038-B で統計学的有意差が認められた(p33 の 参照)。それぞれの組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシとの間で差異が認められた各評価項目の平均値は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシの対照として用いた Null 型トウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を、従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれもその変動の範囲内であった(別添資料 6 の p8 の表 2 及び p16 の表 3 参照)。このことから、組換えトウモロコシ LY038-A と LY038-B で差異が認められた各特性も、従来トウモロコシの変動の範囲を超えるものではないと判断され、これらの差異によって競合における優位性が高まることは考えにくい。

一方、収穫種子の発芽率に関して、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、もう一方の組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で、いずれも統計学的有意差は認められなかった(p33 の 参照)。両組換えトウモロコシとも 95%以上と高い発芽率を示しており、結論として種子休眠性は認められなかった(別添資料 6 の p22 の表 4 参照)。

上記以外の生育初期における低温感受性、成体の越冬性ならびに花粉の稔性及びサイズに、組換えトウモロコシ LY038-A とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38A、及び、組換えトウモロコシ LY038-B とその対照の Null 型トウモロコシ Cont-38B との間で相違は認められなかった(p32 の 、 及び 参照)。

本組換えトウモロコシでは、導入された *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって、穀粒中で特異的に遊離リシン含量が高まり、また、それによってリシン合成後の二次代謝産物の量も増加することが確認された(p29 の表 5 参照)が、上記のわが国における隔離ほ場試験及び米国におけるほ場試験結果から、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関する各特性は、従来トウモロコシ

¹⁸ 本項目中で、第一の 2-(6)口.の ~ 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。

の変動の範囲内であることが示されている。

以上のことから、本組換えトウモロコシに関して、競合における優位性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本組換えトウモロコシを栽培した土壌中の土壌微生物相評価試験及びハツカダイコンを用いた植物体鋤込み試験において、対照の Null 型トウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった(p33 の 参照)。

さらに、穀粒を用いた鋤込み試験の結果でも、本組換えトウモロコシとその対照の Null 型トウモロコシとの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重及び乾物重に、統計学的有意差は認められなかった(p<0.05) (別添資料 9 の p3 の表 2 参照)。

一方、ハツカダイコンを用いた後作試験において、組換えトウモロコシ LY038-A の栽培土壌では、ハツカダイコンの発芽率、生体重及び乾物重の全ての項目において統計学的有意差は認められなかった。一方、組換えトウモロコシ LY038-B の栽培土壌では、ハツカダイコンの発芽率及び生体重には統計学的有意差は認められなかったが、乾物重で組換えトウモロコシ LY038-B と対照の Null 型トウモロコシ Cont-B との間で統計学的有意差が認められた(p33 の 参照)。

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

なお、本後作試験では有意差が認められなかったものの、検定植物であるハツカダイコン(品種名; アイシクル)の発芽率が、本組換えトウモロコシで低くなって

いるのは明らかであると判断された(別添資料 6 の p26 の表 7 参照)。そこで、発芽揃いの良かったフレンチブレックファーストを用いて再度後作試験を行った結果、本組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシの間で、ハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重、及び乾物重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 9 の p4 の表 3 参照)。

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

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

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

その結果、ブローラー肥育試験でこれらの物質が毒性影響を及ぼすと示唆するような結果は得られず、文献調査によってこれらの物質は様々な植物に存在し、ヒトや家畜はこれらの物質の食経験があると考えられた。さらに、サッカロピンと γ -アミノアジピン酸は今回新たに行ったマウスの急性毒性試験により、ピペコリン酸はラットの急性毒性の文献情報により、いずれも毒性影響がないことが示唆された。以上の ~ の結果を総合的に判断して、これらの二次代謝産物は野生動物に対しても毒性影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。よって、有害物質の産生性に関して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシと交雑可能なのは、*Zea mays* 種に含まれ、*Zea mays* subsp. *mays* (L.)

Iltis の亜種として分類される一年生のテオシント(*Zea mays* subsp. *mexicana*)及び *Tripsacum* 属であるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみであり、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

4 その他の性質

【本組換えトウモロコシを摂食した野生動物を介して間接的に生物多様性影響が生ずる可能性】

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

しかしながら、第一の 2.(p5)でも述べたように、本組換えトウモロコシは飼料用のトウモロコシとして開発され、また飼料用トウモロコシであるデントコーンの我が国における栽培は青刈り利用がほとんどである(文献 68)

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

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

以上から、本組換えトウモロコシにより、間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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。本組換えトウモロコシと対照の Null 型トウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質を比較検討したところ、稈長、着雌穂高、雌穂径、粒列数、百粒重及び一穂着粒数に関して統計学的有意差が認められたものの、これら以外の競合における優位性に関する諸形質で相違は認められなかった。また、差異の認められた上記の諸形質は、これまでに隔離ほ場試験が行なわれた組換えトウモロコシの対照として用いた Null 型トウモロコシにおける平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、いずれもその変動の範囲内にあり、従来トウモロコシの変動の範囲を超えるものではないと判断され、これらの差異によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。本組換えトウモロコシでは *cordapA* 遺伝子で発現する cDHDPS 蛋白質によって、穀粒中で特異的に遊離リシン含量が高まり、また、それによってリシン合成後の二次代謝産物量も増加しているが、上記のわが国における隔離ほ場試験及び米国におけるけほ場試験結果から、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関する各特性は従来トウモロコシの変動の範囲内であることが示されている。以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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

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

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

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

本組換えトウモロコシではリシン及びその二次代謝産物であるサッカロピン、 β -アミノアジピン酸、ピペコリン酸が高まっていることから、これらの物質の生物多様性影響評価を行った。その結果、文献調査、マウス急性毒性試験、プロイ

ラーの肥育試験によってこれらの物質が野生動物に毒性影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。

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

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

また、本組換えトウモロコシではリシン含量が高まっているため、仮に本組換えトウモロコシを野生動物が摂食した場合、本組換えトウモロコシが間接的に生物多様性影響を及ぼすかどうかについて考察した。

その結果、本組換えトウモロコシを野生動物が摂食する機会は極めて低いと考えられることから、本組換えトウモロコシが我が国で栽培されたとしても本組換えトウモロコシが間接的に生物多様性に影響を及ぼすとは考えにくいと結論した。

よって、総合的評価として、本組換えトウモロコシを第一種使用規程にしたがって使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

[引用文献]

社外秘に付き非開示

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成18年1月10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高リシン(lysine)トウモロコシ(*cordapA*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (LY038, OECD UI: REN-00038-3)(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。

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 18 年 1 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 住所 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

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

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

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること、必要に応じて本組換え体が日本に輸入さ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や環境省に報告する。

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成18年1月10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高リシン(lysine)トウモロコシ(*cordapA*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(LY038, OECD UI : REN-00038-3)(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。

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 18 年 1 月現在

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

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

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

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

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