

【正誤表】塩基配列情報の更新による生物多様性影響評価書における変更箇所（下線赤字部分）

平成28年5月26日

変更する項目	誤	正
第一.2.(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	この挿入遺伝子は、i)プロモーター5'末端の一部を欠く <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセット1コピー、ii)完全長 <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセット <u>3</u> コピー、iii) <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセットの一部、iv) <i>rac1</i> プロモーターの一部からなることが判明した。 ^a	この挿入遺伝子は、i)プロモーター5'末端の一部を欠く <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセット 1 コピー、ii)完全長 <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセット <u>2</u> コピー、iii) <i>mEPSPS</i> 遺伝子カセットの一部、iv) <i>rac1</i> プロモーターの一部からなることが判明した。 ^b

a: i)から iv)を合わせて合計 6 コピー。

b: i)から iv)を合わせて合計 5 コピー。

除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*mEPSPS*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (GA21 x MON 810, OECD UI: MON-00021-9xMON-00810-6)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価の概要	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理的及び生態学的特性	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	4
(1) 供与核酸に関する情報	4
(2) ベクターに関する情報	6
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	7
(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	14
(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
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	15
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	19
(1) 使用等の内容	19
(2) 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	19
(3) 国外における使用等に関する情報	20
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	21
1 競合における優位性	21
2 有害物質の産生性	22
3 交雑性	26
4 その他の性質	27
第三 生物多様性影響の総合的評価	28
緊急措置計画書	30

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 8 月 18 日

農林水産大臣 亀井善之 殿
環境大臣 小池百合子 殿

氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座 4-10-10
銀座山王ビル 8F

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>mEPSPS</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (GA21 × MON810, OECD UI: MON-00021-9 × MON-00810-6)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

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

ロ．宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays*)で、デント種に属する。

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

(2) 使用等の歴史及び現状

イ．トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている。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。日本へは天正年間(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い。

ロ．現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる。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。国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2002 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 2,800 万 ha、中国が 2,500 万 ha、ブラジルが 1,200 万 ha、メキシコが 700 万 ha、インドが 600 万 ha、ナイジェリアが 400 万 ha、南アフリカが 300 万 ha となっている。尚、同統計情報に基づく 2002 年の日本における栽培面積は約 3 万 ha であった。

日本は海外から約 1,600 万トンのトウモロコシを飼料用、食品用、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。

尚、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、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 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。また、一般に短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である。これら温度条件等の他、デント種の場合は種子重量の70%の水を吸うと発芽する。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む壤土が適し、pH5.5~8.0の範囲で栽培可能である。

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

ロ 繁殖又は増殖の様式

完熟した種子は雌穂の包皮で覆われており、自然の脱粒性はない。トウモロコシは長い間栽培植物化されていたために、野生として生き残る能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である。種子の休眠性は極めて低く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が10℃に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する。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。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す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。トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*Tripsacum* 属との自然交雑は知ら

れていない。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。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。

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。花粉は球形で、直径は90-100 μ mである。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。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。

八 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。

二 その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(*mEPSPS*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(GA21, OECD UI: MON-00021-9)(以下、GA21 とする)とチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cryIAb*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MON810, OECD UI: MON-00810-6)(以下、MON810 とする)を従来 of 交雑育成法を用いて交配させた交配後代品種(*mEPSPS*, *cryIAb*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (GA21 \times MON 810, OECD UI: MON-00021-9 \times MON-00810-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」とする)は、親系統であるGA21とMON810の2つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。したがって、以下ではGA21とMON810の調製等に関する情報について個別に述べた。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

GA21の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図1及び表1に示したとおりである。

MON810の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図2及び表2に示したとおりである。

□ 構成要素の機能

GA21 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 に示した。MON810 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 に示した。

【*mEPSPS* 遺伝子】

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。GA21 に導入されている *mEPSPS* 遺伝子は、トウモロコシが元々持つ *EPSPS* 遺伝子を改変したものである。この *mEPSPS* 蛋白質は EPSPS 蛋白質と比べて、グリホサートに対する感受性は下がるが、それ以外は機能的に同等であることが示されている。また、*mEPSPS* 蛋白質はグリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するための生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトロン酸-7-リン酸 (3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate, DAHP) 合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、GA21 の食品/飼料安全性の評価の過程で、組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から、EPSP と無機リン酸 (Pi) を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

mEPSPS 蛋白質が、既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

【*cryIAb* 遺伝子】

MON810 でチョウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である *cry1Ab* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、コードされる Cry1Ab 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)に対する殺虫活性を有する。アワノメイガの食害部位は植物体地上部全般である。Cry1Ab 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。*B.t.* 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立している。

Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目昆虫にのみ殺虫活性を示し、チョウ目以外の昆虫に対しては殺虫活性を持たない。また、この Cry1Ab 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培における重要害虫であるチョウ目の European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*), Southern cornstalk borer (*Diatraea crambidoides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), Stalk borer (*Papaipema nebris*) に対して殺虫活性を示すことが知られている。これらの内、*O. nubilalis* と同属の *O. furnacalis* (アワノメイガ) は日本のトウモロコシ栽培における主要チョウ目害虫として知られている。

Cry1Ab 蛋白質が、既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

GA21 及び MON810 の作出に用いられたプラスミドベクターはいずれも、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のベクター pUC 19 などをもとに構築された。

ロ 特性

GA21 の作出に用いたベクター pDPG434 は、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子 (*bla* 遺伝子)、大腸菌での複製を可能にする複製開始領域である ori-pUC、大腸菌でのクローニングの際に選抜マーカーとして使用される lacZ より構成される。各構成要素の詳細は表 1 に記載した。本ベクターの全塩基数は 6,128 bp である。本ベクターの感染性は知られていない。

MON810 の作出に用いたベクター PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 はいずれも大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてトランスポゾン Tn5 由来のカナマイシン / ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 遺伝子)、大腸菌での複製を可能にする複製開始領域である ori-pUC、大腸菌でのクローニングの際に選抜マーカーとして使用される lacZ より構成される。各構成要素の詳細は表 1 に記載した。ベクターの全塩基数は PV-ZMBK07 が 7,794 bp、PV-ZMGT10 が 9,427 bp である。これらの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

GA21 の作出に用いられたプラスミドベクターpDPG434 の構成要素は表 1 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては図 1 に示した。

MON810 の作出に用いられたプラスミドベクターPV-ZMBK07 及びPV-ZMGT10 の構成要素は表 2 に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては図 2 に示した。

導入に用いた *NotI* 断片
(*mEPSPS* 遺伝子発現カセット)

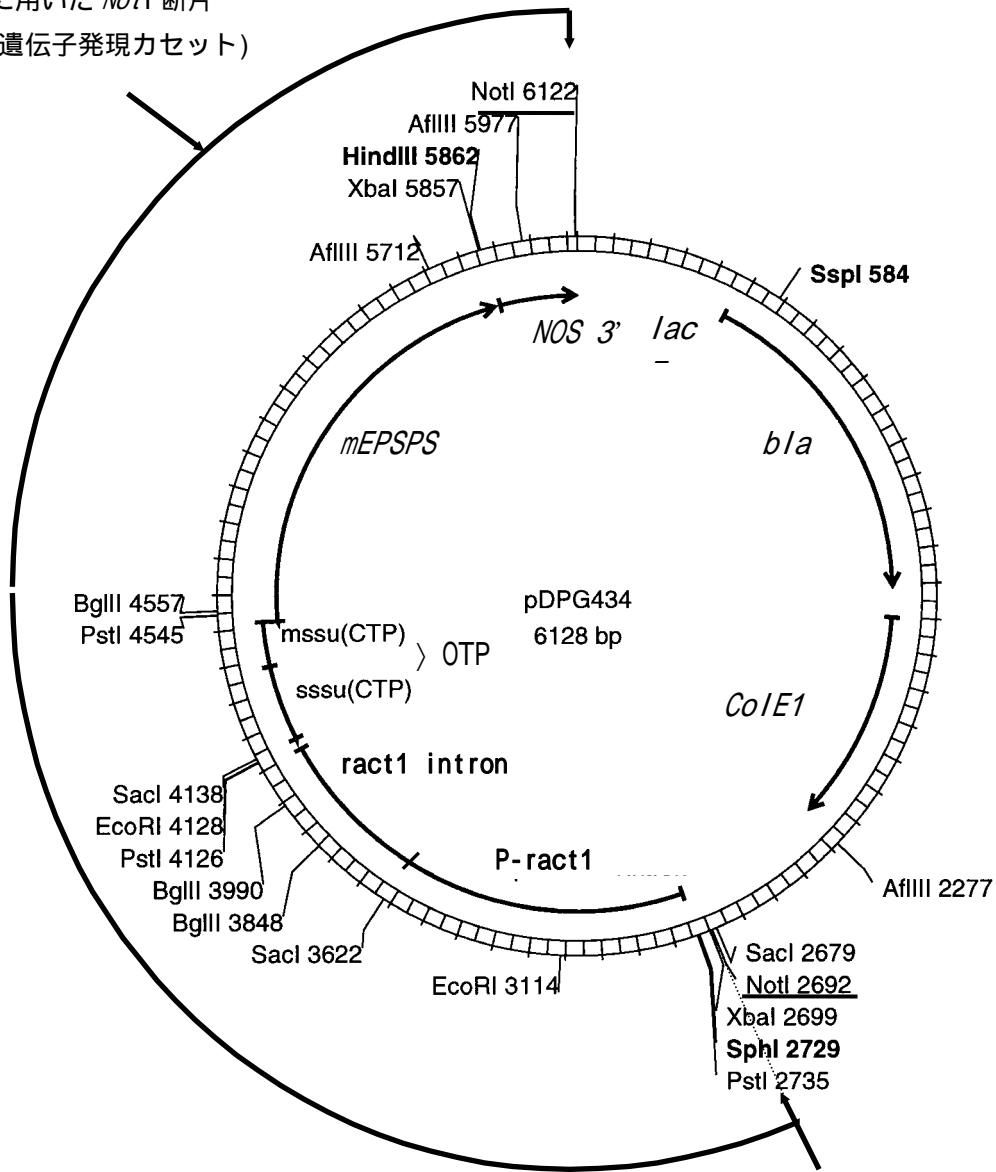


図 1 GA21 の作出に用いられたプラスミド pDPG434

表 1 GA21 の作出に用いられた pDPG434 の *NotI* 断片の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
P-ract	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子の発現量を高める(McElroy <i>et al.</i> , 1990)
Ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子を発現させる(McElroy <i>et al.</i> , 1990)
OTP	ヒマワリ(<i>Helianthus annuus</i>)とトウモロコシ(<i>Zea mays</i>)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)の N 末端にある葉緑体輸送ペプチド(CTP)配列をもとに作成された OTP 配列(Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。mEPSPS 蛋白質を芳香族アミノ酸合成の場である葉緑体に運ぶ。
mEPSPS	トウモロコシ(<i>Zea mays</i>)の 5-エノール-ピルピルシキミ酸 3-リン酸合成酵素(EPSPS)遺伝子を部位特異的突然変異により改変した遺伝子(Lebrun <i>et al.</i> , 1991; Padgett <i>et al.</i> , 1993)。機能の詳細については p5 ~ 6 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。

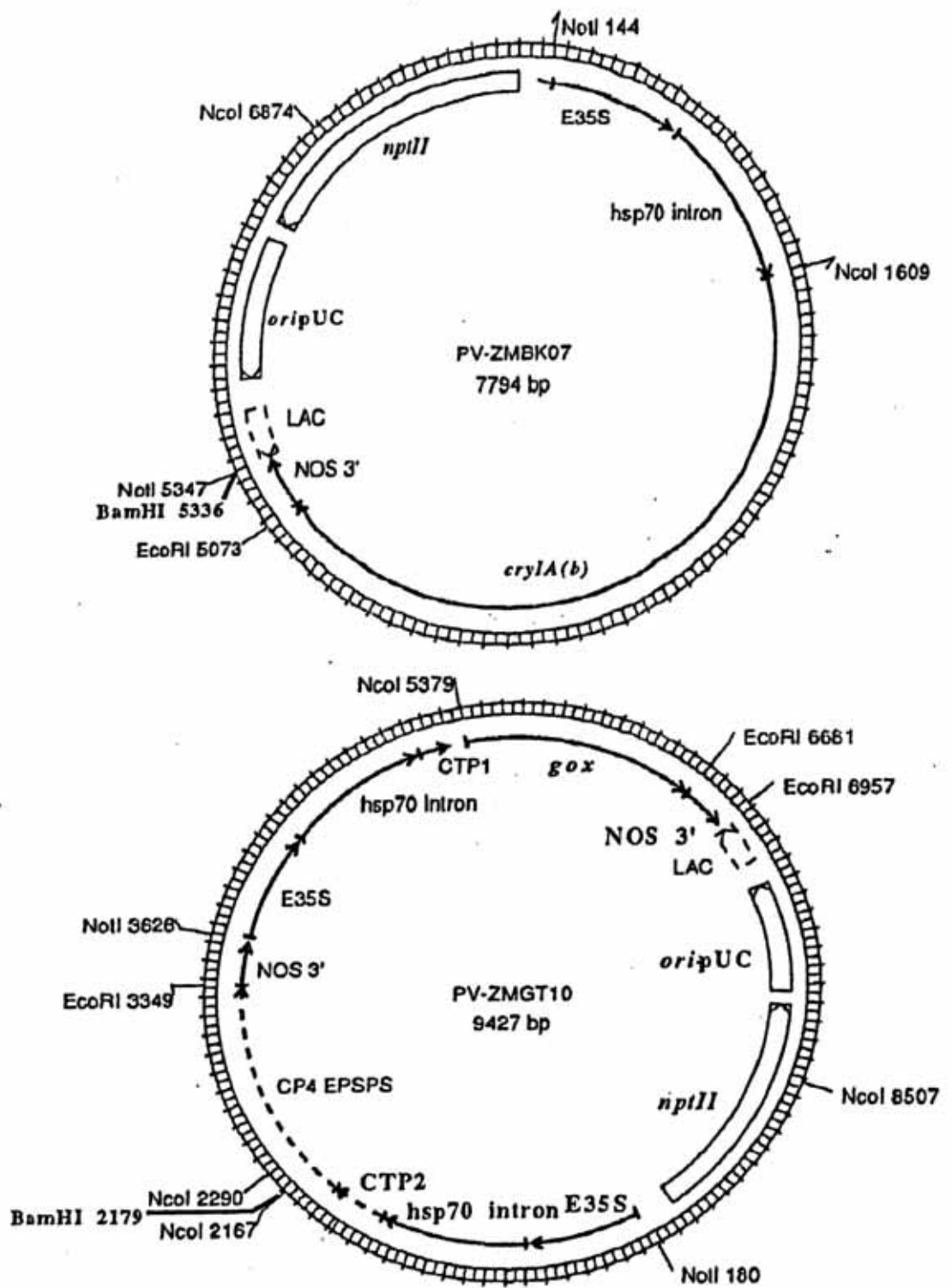


図 2 MON810 の作出に用いたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10

表 2 MON810 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の各構成要素・由来及び機能

構成要素	由来及び機能
Cry1Ab 遺伝子カセット	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。
Hsp70 イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
Cry1Ab	土壤中に存在する <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の Cry1Ab 蛋白質をコードする遺伝子。機能の詳細については p6 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
cp4 epsps 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。
hsp70 イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質(heat shock protein)遺伝子のイントロン。Hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP2	シロイヌナズナの epsps 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である。目的遺伝子を葉緑体へと輸送する。
cp4 epsps	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
Gox 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。
hsp70 イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP 1	シロイヌナズナ由来の rubisco の small subunit 1A 遺伝子の中で、rubisco small subunit 1A の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Gox	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) 由来の変異体 v247 の C 末端をコードする配列。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を集結させ、ポリアデニル化を誘導する。
上記以外の構成要素(PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通)(MON810 中には挿入されていなかった)	
lacZ	-D-ガラクトシダーゼ又は LacZ 蛋白質の部分的コード配列。 -ガラクトシドを分解して -ガラクトースを生成する。
ori-pUC	大腸菌プラスミド pUC の複製開始領域を含むセグメント。大腸菌プラスミドの複製を開始する。
nptII	原核生物のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする。この遺伝子が微生物内で発現されるとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

GA21 の作出では、プラスミド pDPG434 のうち、直鎖状断片である *NotI* 断片(図 1 の矢印で示した部分)をパーティクルガン法によって、デント種に分類される胚培養カルスに由来する再生系統に導入した。

MON810 の作出では、プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の混合物をパーティクルガン法によって、デント種に分類されるトウモロコシ自殖系統に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【GA21 の育成の経過】

pDPG434 の *NotI* 断片を導入したカルスをグリホサート添加培地で培養して組換え体を選抜し、植物体を再生させ、ELISA 及びグリホサート耐性の検定により遺伝子が導入された系統を選抜した。

GA21 ではパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

1992 年より系統選抜の評価を開始し、1994～1997 年にかけて圃場試験を行って、優良系統を選抜し、導入遺伝子の解析と遺伝子の発現程度を分析するとともに、形態及び生育特性などについて調査を行った。それらの結果に基づいて、米国で認可を受けて 1998 年から一般商業栽培が行われている。

GA21 のわが国における認可の状況は以下の通りである。

- 1998 年 12 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)及び栽培について、指針への適合性が確認された。
- 1999 年 11 月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性評価指針第 4 章」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 1999 年 12 月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用について、指針への適合性が確認された。
- 2003 年 3 月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2003 年 3 月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 2005 年 6 月 農林水産省及び環境省より「遺伝子組換え生物の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に基づき、「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」について審査中。

【MON810 の育成の経過】

PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、グリホサートを含む培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て Cry1Ab 蛋白質の発現を解析した。尚、MON810 のサザンブロットによる挿入遺伝子解析の結果、*nptII* 遺伝子、*cp4 epsps* 遺伝子、*gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された。MON810 に *cp4 epsps* 遺伝子が挿入されていなかったにもかかわらずグリホサートで選抜されたのは、再分化個体(R0)の次世代(BC0F1)で挿入遺伝子に関して分離が起きたためである可能性が考えられた。しかし、MON810 は害虫抵抗性トウモロコシとして選抜が進められ、再分化個体の次世代でグリホサート検定及びサザンブロット分析は行われなかったため、理由は特定されなかった。

MON810 はパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

1992 年より系統選抜の評価を開始し、1993～1995 年にかけて圃場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。そして、1994 年に行った米国 6 ヶ所の圃場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、Cry1Ab 蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行った。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて 1997 年から一般商業栽培が始められている。

MON810 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- 1996 年 10 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 1997 年 5 月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 1997 年 6 月 農林水産省より「組換え体利用資料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001 年 3 月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2003 年 3 月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2003 年 4 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。
- 2004 年 6 月 農林水産省及び環境省より「遺伝子組換え生物の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に基づき、「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」について承認を受けた。

【GA21 × MON810 の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、GA21 と MON810 の 2 つの組換えトウモロコシ同士を従来の交雑育種法を用いて作出した。

(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

【GA21 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

GA21 のサザンプロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、GA21 における挿入遺伝子がゲノム中の 1 ヶ所に組み込まれていることが確認された。さらに詳細な分析を PCR による塩基配列解析及びサザンプロット分析等によって行ったところ、この挿入遺伝子は、i) プロモーター-5'末端の一部を欠く *mEPSPS* 遺伝子カセット 1 コピー、ii) 完全長 *mEPSPS* 遺伝子カセット 3 コピー、iii) *mEPSPS* 遺伝子カセットの一部、iv) *ract* プロモーターの一部からなることが判明した。

iii)の *mEPSPS* 遺伝子カセットの一部は、*ract* プロモーター、*ract1* intron、OTP、*mEPSPS* 遺伝子の始めの 289bp を含み、終結コドンで終わる切断型 *mEPSPS* 遺伝子であり、予想よりも短い mRNA が産生される可能性が懸念されたため、ノーザンプロット分析を行ったところ、この切断型 *mEPSPS* 遺伝子は検出可能な量の RNA を生成しないことが明らかとなった。さらに、ウエスタンプロット分析により、GA21 における *mEPSPS* 蛋白質のバンドは、完全長の *mEPSPS* 蛋白質から予想されるサイズの 1 本のみであることが明らかにされている。

iv)の *ract* プロモーターの一部は、*ract* プロモーターのみを含み、イントロン開始部位の前で切断され、3'末端でトウモロコシのゲノム DNA に融合している。挿入遺伝子の 3'末端下流に隣接するトウモロコシゲノム DNA の塩基配列から 2 つのオープンリーディングフレームである ORF-1(97 アミノ酸)及び ORF-2(19 アミノ酸)が推定された。ノーザンプロット分析を行ったところ、この 3'末端下流のトウモロコシのゲノム DNA 配列に由来する RNA は検出されなかった。

また、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが、複数世代におけるサザンプロット分析によって示された。また、除草剤グリホサート耐性も複数世代で安定して発現していることを選抜の過程で確認している。

【MON810 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON810 のサザンプロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON810 のゲノムの 1 ヶ所に 1 コピーの *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な PV-ZMBK07 由来の DNA 断片が組み込まれていることが確認された。また、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンプロット分析によって示された。また、チョウ目害虫への抵抗性も複数世代で安定して発現していることを生物検定により選抜の過程で確認している。

尚、MON810 のサザンプロット分析による挿入遺伝子解析の結果、トウモロコシのゲノム中に挿入されたのは PV-ZMBK07 由来の *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な領域のみで、

nptII 遺伝子や PV-ZMGT10 由来の *cp4 epsps* 遺伝子と *gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された。

(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

GA21 を検出及び識別するための方法としては、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た定性的 PCR 法を開発しており、本法により GA21 を特異的に検出可能である。

MON810 の検出及び識別するための方法としては、現在、http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm に標準分析法が公表されている。

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、上述の 2 方法をトウモロコシの種子 1 粒毎について行う必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統トウモロコシは親系統である GA21 と MON810 に挿入された遺伝子により、mEPSPS 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。第一の 2-(1)-口で述べたように、Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。同じく、mEPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではない事が示唆されている事、また、GA21 の食品/飼料安全性の評価の過程で、組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されていることから、宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。さらに、mEPSPS 蛋白質は基質特異性が高い。以上のことから、これら 2 つの蛋白質が相互に作用するとは考えにくい。

実際に確認するため、本スタック系統トウモロコシにおける除草剤グリホサート耐性については、米国のほ場でグリホサート散布試験を行った。その結果、本スタック系統トウモロコシはグリホサート耐性を発現していることが確認された(表 3)。また、本スタック系統トウモロコシにおけるチョウ目害虫抵抗性については、ほ場においてチョウ目害虫による食害程度を調査した。その結果、本スタック系統トウモロコシにおいてチョウ目害虫抵抗性を発現していることが確認された(表 4)。

以上のことから、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相違については、GA21 と MON810 の諸形質を個別に調査した結果を用いて想定した。

表 3 GA21 x MON810 の交配後代品種に対する除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウルトラ)散布による除草剤耐性検定

交配後代品種	除草剤グリホサート耐性率(%) ¹	
	4 葉期散布	8 葉期散布
GA21 x MON810	100	97
GA21	100	100

¹ 除草剤グリホサートは、4 葉期あるいは 8 葉期に、推奨される散布量の上限である製剤量 32 oz/A(= 250ml/10a)を散布し、およそ 7~10 日後に黄化度を観察した。各交配後代品種 1 条 1 反復として 6 反復で生物検定を行い、除草剤グリホサート無散布区との黄化度の比較から耐性率を評価した。

表 4 GA21 x MON810 の交配後代品種の生物検定によるチョウ目害虫に対する被害度調査結果

交配後代品種	害虫被害度 ¹		
	食入痕数 (個)	食入痕の長さ (cm)	幼虫数 (匹)
GA21 x MON810	0.0	0.0	0.0
MON810	0.0	0.0	0.0

¹ ほ場においてチョウ目害虫による食入痕形成の有無、食入痕の長さ及び幼虫の有無を観察した。同時に行った試験ではないが、同等の条件下における非組換え体における食入痕の長さは 15~30 cm 程度である。

イ . GA21 では、*mEPSPS* 遺伝子によってコードされる mEPSPS 蛋白質が植物体の各部位で恒常的に発現することによって除草剤グリホサートに対する耐性が付与される。実際に葉及び穀粒で mEPSPS 蛋白質の発現を確認し、また、非組換えトウモロコシが除草剤グリホサートの影響を受けて枯死したのに対して、GA21 は正常に生育したことを確認した。

MON810 では、*cry1Ab* 遺伝子によってコードされる Cry1Ab 蛋白質が発現することによって、米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガの食害に対する抵抗性が付与され、アワノメイガによる食害が減少することが確認された。アワノメイガはトウモロコシの地上部全般を食害するが、MON810 では Cry1Ab 蛋白質は植物体の各部位で恒常的に発現している。また、サザンプロット分析の結果、MON810 では *nptII* 遺伝子、*cp4 epsps* 遺伝子、*gox* 遺伝子は MON810 には存在せず、これら遺伝子に由来する形質の発現は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、mEPSPS 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が植物体の各部位で恒常的に発現していると考えられる。

ロ . GA21 並びにその対照系統として育成に用いた戻し交雑品種(以下、C2 とする)を供試して 1998 年に農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。

MON810 に属する系統である MON810AX 及び MON810BX、並びにその対照系統として MON810AC 及び MON810BC を供試して、1996 年及び 2001 ~ 2002 年に農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。

形態及び生育の特性

GA21 とその対照である非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草姿または草型、分げつ数、着雌穂高、成熟期、着雌穂数、有効雌穂総数、収穫時の生体重の評価を行ったところ、全ての項目で差異は認められなかった。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、成熟期、草型、分げつ数、雌穂総数、有効雌穂数、稈長、着雌穂高、収穫時の生体重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった。

生育初期における低温又は高温耐性

GA21 の隔離ほ場試験で生育初期における低温耐性試験は行っていないが、1994 ~ 1997 年にかけて米国で行われた野外試験や 1998 年から行われている商業栽培において、収穫時にほ場内でこぼれ落ちた後に幼植物まで生育した GA21 が、越冬して春先まで生存していたという報告はされていない。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性（最高気温 12～14℃、最低気温 2℃）を評価したが、すべての展開葉が低温処理開始後 21 日目に萎凋症状を示し、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、低温耐性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

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、親系統である GA21, MON810 において、隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっていることを観察した。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

GA21 に付与された形質は除草剤耐性のみであり、花粉の飛散によって影響を及ぼさないと考えられたこと、また、交雑する近縁野生種がないことから調査していない。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉のサイズを 0.1% ニュートラルレッド溶液及びヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、花粉の稔性及びサイズについては宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

GA21 で兄弟交配して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、粒列数及び 100 粒重を除く全ての項目において、GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。したがって種子の生産量に関して、GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差がないことが推察された。

粒列数及び 100 粒重については、今回の試験に用いた種子がインブレッドであったため、着粒数が少なく、適切な調査を行えなかった。

MON810 で兄弟交配して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、全ての項目において、MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。したがって種子の生産量に関して MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差がないことが推察された。

脱粒性については、GA21、MON810 とそれらの対照の非組換えトウモロコシは共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。

GA21 の隔離ほ場試験で収穫種子の発芽率の調査は行っていないが、1994～1997 年に米

国で行ったほ場試験及び 1998 年以降に行われている商業栽培において、GA21 の収穫後に、こぼれ落ちた種子が発芽して生育したとみられる個体数が非組換え体とで差があったという報告はされていない。このことから、GA21 の種子の休眠性と発芽率も対照の非組換えトウモロコシと同様に低いと考えられた。

MON810 は収穫種子の播種後 4 日目の発芽率において非組換え体との間で差はなく、種子の休眠性は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について、宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

交雑性

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、親系統である GA21、MON810 では交雑性の試験は行わなかった。

有害物質の産生性

GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、後作試験、土壤微生物相試験を行ったが、全ての項目で GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。また、GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、鋤き込み試験を行ったが、全ての項目で GA21 と対照の非組換えトウモロコシとの間に際際は認められなかった。さらに、GA21 は 1998 年より米国等において商業栽培が行われているが、GA21 を収穫後、GA21 の植物体を鋤き込み、翌年同じほ場でダイズやコムギを栽培しているが、生育阻害が認められたという報告はない。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験を行ったが、全ての項目で MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、有害物質の産生性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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) 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。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国では、*B.t.*蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で、*B.t.*蛋白質を発現する遺伝子組換えトウモロコシを栽培する際には緩衝区を設定している。本スタック系統トウモロコシの栽培時における緩衝区としては、親系統である MON810 と同様に、本スタック系統トウモロコシを栽培するほ場面積中の20%に*B.t.*蛋白質を生成しないトウモロコシ品種を栽培することになっている。

第二 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GA21 とMON810 を掛け合わせた交配後代品種であり、GA21 とMON810 の特性を併せ持つ。第一の2-(1)-口 で述べたとおり、mEPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼさず、また Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能していることから、本スタック系統トウモロコシではこれら2つの蛋白質が相互に作用することはないと考えられる。従って、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、GA21 とMON810 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

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

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

本スタック系統トウモロコシの親系統であるGA21、MON810において競合における優位性に関わる諸形質(第一、2-(6)- ~ を参照)を比較検討したが、MON810における稈長を除く全ての項目で対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は248.1cm、MON810BC は229.3cmであった。しかし、この差異はわずかであるため、この稈長の違いのみによって競合における優位性が高くなるとは考えられない。

本スタック系統トウモロコシは除草剤グリホサートに耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

本スタック系統トウモロコシはチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるトウモロコシが、本形質が付与されたことによって自然条件下で自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

以上のように、本スタック系統トウモロコシにおいては、稈長において差異が認められる可能性があり、チョウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競

合における優位性が高まることはない」と判断された。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、競合における優位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い。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本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じ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動植物等の特定

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

本スタック系統トウモロコシの親系統であるGA21について、有害物質の産生性の有無を後作試験、土壤微生物相試験、鋤き込みを行い比較検討したが、有害物質の産生性に関して差異は認められなかった(第一の2-(6)、参照)。また、米国のほ場においてGA21を収穫後、GA21の植物体を鋤き込み、翌年同じほ場でダイズやコムギを栽培したが、生育阻害が認められたという報告はない。また、本スタック系統トウモロコシのもう一方の親系統であるMON810について、有害物質の産生性の有無を鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験を行い比較検討したが、有害物質の産生性に関して統計学的有意差は認められなかった(第一の2-(6)、参照)。従って、親系統であるGA21及びMON810では、これらの物質の産生性については導入遺伝子により影響を受けることはなく、宿主との間に差異はないと考えられた。

このことから、本スタック系統トウモロコシにおいてもこれらの物質の産生性に宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシと差異はないと考えられる。

GA21は除草剤グリホサートに対する耐性を付与するmEPSPS蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の2-(1)-ロ- に

記載したように、mEPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、GA21 の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、mEPSPS 蛋白質が原因で、GA21 中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

したがって、GA21 において有害物質の産生性に起因する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。

MON810 にはCry1Ab 蛋白質の発現によってトウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているため、MON810 の植物体を摂食する事により影響を受ける野生動植物等としてはトウモロコシの植物体を摂食するアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)等のチョウ目昆虫が想定されているが、これらはトウモロコシの害虫であるので、ここでは対象としていない。一方、MON810 から飛散した花粉により影響を受ける野生動植物としては、MON810 の花粉が幼虫の食餌植物と共に摂食され、幼虫が影響を受ける可能性のあるわが国に生息するチョウ目昆虫があげられた。

「環境省レッドリスト(2000年改訂版)」を用いて、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ栽培の影響を受ける可能性が否定できないチョウ目昆虫の特定を行った。1)幼虫の活動期(摂食期)と本遺伝子組換えトウモロコシの開花期の関係、2)幼虫の食餌植物と花粉の接触の可能性、の2点から絞込みを行い、ヒメシロチョウ (*Leptidea amurensis*)、ツマグロキチョウ (*Eurema laeta betheseba*)、シルビアシジミ (*Zizina otis emelina*)、ミヤマシジミ (*Lycaeides argyrognomon*)、ヒヨウモンモドキ (*Melitaea scotosia*)、ウスイロヒヨウモンモドキ (*Melitaea regama*)、コヒヨウモンモドキ (*Mellicta ambigua nippona*)、ヒメヒカゲ(2亜種) (*Coenonympha oedippus arothius* 及び *Coenonympha oedippus annulifer*)、ウラナミジャノメ (*Ypthima motschulskyi nipponica*)、ミツモンケンモン (*Cymatophoropsis trimaculata*)の11種(2亜種を含む)を特定した。

本スタック系統トウモロコシはmEPSPS 蛋白質とCry1Ab 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としては、親系統であるMON810の生物多様性影響評価書で特定される種と同じであると考えられる。尚、前述したように、GA21において有害物質の産生性に起因する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。

よって、本スタック系統トウモロコシの花粉の飛散により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、MON810で特定されたチョウ目昆虫11種(2亜種を含む)が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

表4の生物検定の結果で示したように、本スタック系統トウモロコシの標的昆虫に対する殺虫活性は、親系統であるMON810と差異は認められなかった。従って、本スタック系統トウモロコシの花粉飛散による非標的昆虫への影響は、MON810の花粉による生物検定の結果より評価した。

MON810と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫ヤマトシジミ(*Zizeeria maha argia*)の1齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、MON810の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率と対照に非組換え体の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率の間で、有意な差が2,000及び4,000粒/cm²の花粉密度で認められた。

(3) 影響の生じやすさの評価

MON810とその対照の非組換えトウモロコシ間で、花粉飛散に影響を与える要因である花粉の量、形状及びサイズについて比較した結果、統計学的有意差は認められなかった。

MON810において、ヤマトシジミの生存率に影響の出た花粉密度2,000及び4,000粒/cm²を、ほ場からの距離とトウモロコシ花粉の落下数(最大堆積花粉数)の関係を表すKawashimaらのモデル式($y=14791\exp(-0.158x+0.00275x^2-0.0000183x^3)$)に導入した結果、MON810の花粉が4,000粒/cm²の濃度で堆積するのは最大10m、2,000粒/cm²の濃度で堆積するのは最大20mと推定された。

MON810の影響を受ける可能性のある野生動植物として前述のチョウ目11種(2亜種を含む)が特定された。表5にこれらの幼虫の食餌植物と食餌植物の主な生育場所をまとめた。こうした食餌植物は野原、山地など広範な地域で生育している。

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。仮に生育したとしても、その個体数は、ほ場で栽培されるトウモロコシと比較して極めて少ないために、その花粉飛散が非標的チョウ目昆虫に及ぼす影響は無視できるものと考えられた。また、前述のチョウ目昆虫11種(2亜種を含む)はこぼれ落ちの想定される畜舎や道路を主な生息域としていない。さらに、今回未調査であるその他のチョウ目昆虫に関しても同様に、これらの昆虫がトウモロコシが栽培されているほ場やその近辺のみに生息しているとは考えにくいことから、個体群で影響を受ける可能性はきわめて低いと判断された。

尚、MON810について、今後の育種により今回試験に用いた系統とは花粉の飛散時期、飛散量が異なる系統が育成される可能性があるが、花粉を用いた生物検定においては*B.t.*蛋白質に対して最も感受性の高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、品種・系統が異なっても今回想定した影響を大きく超えるようなことはないと考えられる。

表 5 非標的昆虫が食餌する植物の生育場所

		食餌植物	食餌植物の主な生育場所
1	ヒメシロチョウ	ツルフジバカマ	山野の草原、道ばた、海岸の林縁
2	ツماغロキチョウ	カワラケツメイ	川原、土手、道ばたの草地
3	シルビアンシジミ	ミヤコグサ、ヤハズソウ、コマツナギ	野原、道ばた、鉄道線路、土手、海岸
4	ミヤマシジミ	コマツナギ	野原、土手、海岸
5	ヒョウモンモドキ	タムラソウ、ノアザミ、ノハラアザミ、キセルアザミ	山野、草原、湿地
6	ウスイロヒョウモンモドキ	オミナエシ、カノコソウ	山地の草地及び湿地
7	コヒョウモンモドキ	クガイソウ	山地の草地
8	ヒメヒカゲ(2亜種)	ヒカゲスゲ、ヒメカンスゲ、アオスゲ、ススキ	疎林地、林地、草原、
9	ウラナミジャノメ	カヤツリグサ科、イネ科	草地、林地、海岸
10	ミツモンケン	クロツバラ、クロウメモドキ	山地、高原
	参考文献：	MON810生物多様性影響評価書の別添資料4のp74-78	
		日本の野生植物（平凡社）	

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

mEPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。したがって、GA21 において有害物質の産生性に起因する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。

MON810 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種がトウモロコシほ場の近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。

以上から、本スタック系統トウモロコシの親系統である GA21 及び MON810 はそれぞれ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。

さらに、MON810 の花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異や掛け合わせによる雑種強勢による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはないと考えられる。尚、親系統の有する導入遺伝子はそれぞれ独立に機能し、その産物は相互作用することはないと考えられるため、本スタック系統トウモロコシにおいて導入遺伝子により従来の交配後代品種でみられる範囲を超える雑種強勢が起こることはないと判断された。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシが非標的チョウ目昆虫へ影響を及ぼす可能性は親系統である MON810 と同様に極めて低いと考えられる。

従って、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。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本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

生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本スタック系統トウモロコシの性質は、上記の他にはないと判断された。

第三 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GA21 とMON810 を掛け合わせた交配後代品種であり、本スタック系統トウモロコシはGA21 並びにMON810 の特性を併せ持つ。第一の2-(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシにおける mEPSPS 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。従って、親系統 GA21 と MON810 の生物多様性影響の評価の結果を用い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を行った。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。また GA21 及び MON810 とそれらの対照である非組換えトウモロコシと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、MON810 の稈長を除くすべての項目で統計学的有意差は認められなかった。MON810 における稈長において統計学的有意差が認められたものの、それ以外の競合における優位性に関する諸形質で統計学的有意差は認められなかった。以上のように、本スタック系統トウモロコシにおいては、稈長において差異が認められる可能性があり、除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響しあうとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはない判断された。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を生ずるおそれはないと判断された。

GA21 の有害物質の酸性の有無を後作試験、土壤微生物試験、鋤き込みを行い比較検討したが、差異は認められなかった。また、米国のほ場においてGA21 を収穫後、GA21 の植物体を鋤き込み、翌年同じほ場でダイズやコムギを栽培したが、生育阻害が認められたという報告はない。一方、MON810 の有害物質の産生性の有無を、鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験で評価したが、差異は認められなかった。また、わが国において、MON810 の花粉の飛散により生息もしくは生育に影響を受ける可能性のある野生動植物として特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)への影響を調べたが、MON810 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種の主な生息域はトウモロコシほ場近辺ではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。以上から、有害物質の産生性に関して、GA21 及び MON810 が生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。さらに、花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはない判断された。また、mEPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。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。

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

よって、総合的評価として、本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生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成16年8月18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 4-10-10
銀座山王ビル 8階

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mEPSPS*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (GA21 × MON810, OECD UI: MON-00021-9 × MON-00810-6)(以下、「本スタック系統トウモロコシ」という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。

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、本スタック系統トウモロコシ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スタック系統トウモロコシ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。

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成16年8月18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 4-10-10
銀座山王ビル 8階

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mEPSPS*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (GA21 × MON810, OECD UI: MON-00021-9 × MON-00810-6)(以下、「本スタック系統トウモロコシ」という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。

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、輸入された本スタック系統トウモロコシ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スタック系統トウモロコシ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、必要に応じて本スタック系統トウモロコシ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。