

チヨウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (改変 *cry1Ab*,  
改変 *vip3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11 × MIR162, OECD  
UI : SYN-BT011-1 × SYN-IR162-4)の申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書 .....	1
生物多様性影響評価書.....	2
第 1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	2
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 .....	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	2
和名、英名及び学名 .....	2
宿主の品種名又は系統名 .....	2
国内及び国外の自然環境における自生地域.....	2
(2) 使用等の歴史及び現状 .....	3
国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	3
主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途 .....	3
(3) 生理学的及び生態学的特性 .....	4
イ、基本的特性.....	4
ロ、生息又は生育可能な環境の条件.....	4
ハ、捕食性又は寄生性 .....	5
ニ、繁殖又は増殖の様式 .....	5
種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命 .....	5
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
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
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 .....	7
ト、その他の情報 .....	7
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 .....	7
(1) 供与核酸に関する情報 .....	8
イ、構成及び構成要素の由来 .....	8
ロ、構成要素の機能.....	11
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	

他の供与核酸の構成要素それぞれの機能.....	11
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
宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....	14
(2) ベクターに関する情報 .....	14
イ、名称及び由来 .....	14
ロ、特性 .....	15
ベクターの塩基数及び塩基配列 .....	15
特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	15
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.....	15
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	15
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成 .....	15
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法 .....	16
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....	17
核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....	17
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 .....	17
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 .....	17
(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.....	18
移入された核酸の複製物が存在する場所 .....	18
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.....	18
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.....	18
(6)の    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
ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動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.....	19

(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 .....	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	19
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 .....	19
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
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	21
(1) 使用等の内容.....	21
(2) 使用等の方法.....	22
(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 .....	22
(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 .....	22
(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.....	22
(6) 国外における使用等に関する情報.....	22
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	24
1. 競合における優位性.....	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	24
(2) 影響の具体的内容の評価.....	24
(3) 影響の生じやすさの評価.....	24
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	24
2. 有害物質の産生性 .....	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	25
(2) 影響の具体的内容の評価.....	25
(3) 影響の生じやすさの評価.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	25
3. 交雑性 .....	25
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	25
(2) 影響の具体的内容の評価.....	25
(3) 影響の生じやすさの評価.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	25
4. その他の性質.....	25

第3 生物多様性影響評価の総合的評価.....	26
引用文献.....	27
緊急措置計画書.....	34
資料のリスト.....	36

# 第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 7 月 26 日

農林水産大臣 林 芳正 殿  
環境大臣 石原 伸晃 殿

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・ティッツェ  
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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (改変 <i>cry1Ab</i> , 改変 <i>vip3A</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt11 × MIR162, OECD UI : SYN-BTØ11-1 × SYN-IR162-4)
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

### 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

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

宿主の品種名又は系統名

親系統の宿主はイネ科 (*Gramineae*) トウモロコシ属 (*Zea*) のトウモロコシ (*Z. mays*) デント種である。それぞれの作出には以下の系統が使用された。

20

Bt11：HE89

MIR162：NP2499/NP2500

国内及び国外の自然環境における自生地域

25

トウモロコシの野生種とみられる植物は現存せず(山田, 1986)、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。

30

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) とトリプサカム (*Tripsacum* 属) の存在が知られている (OECD, 2003)。テオシントとトリプサカムはメキシコやグアテマラ等に広範囲に自生しており、トリプサカムはさらに米国南部や南米でも認められているが (菊池, 1987、OECD, 2003)、わ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。

## (2) 使用等の歴史及び現状

### 5 国内及び国外における第一種使用等の歴史

10 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  
15 メキシコ南部単独説がある(OECD, 2003)。考古学的検証に基づくと、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(菊池, 1987)。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(菊池, 1987、戸澤, 2005)。1492 年のアメリカ大陸発見後、  
20 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(戸澤, 2005)。

わが国へは 1573～1591 年頃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(戸澤, 2005)。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(戸澤, 2005)。

### 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

25 トウモロコシの栽培地域はおよそ北緯 60 度から南緯 40 度に至る範囲である(戸澤, 2005)。国際連合食糧農業機関(FAO)の統計によると、2011 年におけるトウモロコシの世界総栽培面積は 1 億 7,040 万ヘクタールで、その上位 3 カ国は米国(3,399 万ヘクタール)、中国(3,356 万ヘクタール)及びブラジル(1,322 万ヘクタール)であった(FAO, 2013)。また、同年の世界総生産量は 8 億 8,346 万トンで、その上位 3 カ国は栽培面積と同じく、米国(3 億 1,392 万トン)、中国(1 億 9,290 万トン)及びブラジル(5,566 万トン)であった(FAO, 2013)。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。2012 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、  
5 48.7%が飼料(9.2%の蒸留粕を含む)、30.8%がエタノール製造、8.4%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(NCGA, 2013)。

一方、わが国における 2012 年度のトウモロコシの栽培面積は、青刈りトウモロコシ(デント種)が 9 万 2,600 ヘクタールであった(農林水産省, 2013)。栽培面積に  
10 における上位 3 都道府県は、北海道(4 万 8,800 ヘクタール)、宮崎県(5,970 ヘクタール)及び岩手県(5,150 ヘクタール)であった(農林水産省, 2013)。

財務省貿易統計によると、わが国は 2012 年に約 1,489 万トンのトウモロコシを輸入している(財務省, 2013)。輸入トウモロコシのうちの約 1,066 万トンは飼料用  
15 であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている(配合飼料供給安定機構, 2013)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

20

#### イ、基本的特性

—

#### 25 ロ、生息又は生育可能な環境の条件

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(OECD, 2003)。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  
30 以下で平均夜温が 13 以下になる地域では栽培されない(山田, 1986)。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(山田, 1986)。なお、トウモロコシ種子の発芽の

最適温度は 33 程度、最低温度は 10~11 であるとされ、実際の栽培では 13~14 以上で播種が行われる(中村, 1986)。

#### 八、捕食性又は寄生性

5

—

#### 二、繁殖又は増殖の様式

#### 10 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

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い、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(OECD, 2003)。種子の休眠性は極めて低い。また、種子水分 12%、温度 15 10、相対湿度 55%以内の条件下で、種子は 6~8 年保存できる(中村, 1986)。

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

20 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(OECD, 2003)。

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

25

トウモロコシは他家受粉率が 95%程度であるが、自家受粉も可能である(柿本及び山田, 1986)。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(菊池, 1987)。なお、わが国には 30 トウモロコシと交雑可能なこれら野生種が自生しているという報告はない。また、アポミクシスについての報告はない。

## 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で、雌花は葉腋について1~3本の雌穂を形成し、雄穂は茎の先端につく(角田ら, 2000)。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(OECD, 2003)。

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる(西尾, 2002)。トウモロコシの花粉の形状は楕円~円形で(Knowlton, 1922)、直径は90~120  $\mu\text{m}$ 程度である(中村, 1986)。受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である(戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐための隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400 mとされている(千藤, 2001)。

雄穂は抽出すると3~5日で開花し、開花始めから終わりまでの期間は盛夏で一般に8~9日である(中村, 1986)。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(中村, 1986)。わ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*)の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/ $\text{cm}^2$ 、イヌホオズキの葉では71.1粒/ $\text{cm}^2$ であった(Shirai and Takahashi, 2005)。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/ $\text{cm}^2$ 、イヌホオズキの葉では22.2粒/ $\text{cm}^2$ 、ほ場から10 m離れた場合はヒマワリの葉で10粒/ $\text{cm}^2$ 以内であった(Shirai and Takahashi, 2005)。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(CFIA, 2012)。

25

ホ、病原性

30

## 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。

5

## ト、その他の情報

—

## 10 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

15 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11 × MIR162, OECD UI : SYN-BTØ11-1 × SYN-IR162-4) (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。)は、以下の2つの遺伝子組換えトウモロコシを、従来の交雑育種法により掛け合わせることで作出された。

- 20 a. チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI : SYN-BTØ11-1) (以下「Bt11」という。)
- b. チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI: SYN-IR162-4) (以下「MIR162」という。)

25 本スタック系統トウモロコシは、親系統に由来するチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性を有する。2つの異なるチョウ目害虫抵抗性蛋白質を発現させることで、標的となるチョウ目害虫の範囲を広げることや、これらの蛋白質に対する抵抗性害虫の出現を抑制することが期待される。

30 本評価書中に記載した内容は、親系統の生物多様性影響評価書を参照しており、以下に、親系統である Bt11 と MIR162 の調製等に関する情報の概要を記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

イ、構成及び構成要素の由来

5 親系統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、それぞれ表 1 及び表 2 (8 ~ 11 ページ)に示した。

表 1 Bt11 の作出に用いられた pZO1502 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kb)	由 来 及 び 機 能
チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット		
35S promoter	0.51	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)CM1841 株由来で、 <i>Dde</i> - <i>Dde</i> 断片として得られた。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i> )を恒常的に発現させる(Gardner <i>et al.</i> , 1981)。
IVS6-ADH1	0.47	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S( <i>Adh1-S</i> )遺伝子(Freeling and Bennett, 1985)由来のイントロンである。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物における目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i> )の発現量を高めるために用いられた(Mascarenhas <i>et al.</i> , 1990)。
改変 <i>cry1Ab</i>	1.85	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株の <i>Cry1Ab</i> 蛋白質をコードする <i>cry1Ab</i> 遺伝子の、 <i>Cry1Ab</i> 蛋白質の有する殺虫活性に関与しない C 末端コード領域を一部欠失させ、また、植物における発現量を高めるように塩基配列を改変した。ただし、この改変によるコア蛋白質のアミノ酸配列に変更はない(社内報告書 1、社外秘につき非開示)。
NOS term	0.25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む(Depicker <i>et al.</i> , 1982、Bevan <i>et al.</i> , 1983)。この配列により目的遺伝子(改変 <i>cry1Ab</i> )の転写が終結される。

除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット		
35S promoter	0.42	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)Cabb-s 株由来で、 <i>AluI-DdeI</i> 断片として得た。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子( <i>pat</i> )を恒常的に発現させる (Franck <i>et al.</i> , 1980)。
IVS2-ADH1	0.18	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S( <i>Adh1-S</i> )遺伝子 (Freeling and Bennett, 1985)由来のイントロンである。 <i>Adh1-S</i> イントロンは植物中において目的遺伝子( <i>pat</i> )の発現量を高めるために用いられた(Mascarenhas <i>et al.</i> , 1990)。
<i>pat</i>	0.55	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> の PAT 蛋白質をコードする遺伝子である。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を植物に付与することから、遺伝子導入の際、組換え体を選抜するためのマーカーとして使用された。 <i>pat</i> 遺伝子は植物における発現量を高めるために一部の塩基配列が改変された。ただし、この改変により発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は変更されていない (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
NOS term	0.25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む (Depicker <i>et al.</i> , 1982、Bevan <i>et al.</i> , 1983)。この配列により、目的遺伝子( <i>pat</i> )の転写が終結される。
その他の領域		
ColE1 ori	0.67	大腸菌( <i>Escherichia coli</i> )プラスミド pUC18(Vieira and Messing, 1987、Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)由来の複製開始領域で、バクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点。
<i>amp<sup>R</sup></i>	0.86	大腸菌( <i>Escherichia coli</i> )由来で、機能はβ-ラクタマーゼをコードし、抗生物質アンピシリン耐性を付与する (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。

(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 2 MIR162 の作出に用いられた pNOV1300 の各構成要素の由来及び機能

遺伝要素	サイズ (bp)	由来及び機能
害虫抵抗性遺伝子カセット		
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 (1,010bp)を含むプロモーターで目的遺伝子を単子葉植物全組織で恒常的に発現させる(Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
改変 <i>vip3A</i> 遺伝子	2,370	一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である <i>Bacillus thuringiensis</i> AB88 株由来の <i>vip3A</i> 遺伝子(Estruch <i>et al.</i> , 1996)を、植物における発現に適したコドン(Murray <i>et al.</i> , 1989)に改変した遺伝子。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す改変 Vip3A 蛋白質をコードする。改変 Vip3A 蛋白質では、そのアミノ酸配列の 284 番目のアミノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。また、MIR162 で発現している改変 Vip3A 蛋白質では、形質転換体作成時に 129 番目のメチオニンがイソロイシンに置換されている。
iPEPC9	108	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列(GenBank® Accession No. X15239)。目的遺伝子の発現を高めるために用いた(Matsuoka and Minami, 1989)。
35S ターミネーター	70	カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA 由来のポリアデニル化配列(Franck <i>et al.</i> , 1980)。
選抜マーカー遺伝子カセット		
ZmUbiInt プロモーター	1,993	前述と同じ。
<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」)を産出する大腸菌( <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(Negrotto <i>et al.</i> , 2000)。

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(GenBank® Accession No. V00087)(NCBI, 2006)。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
その他の領域(以下、「外骨格領域」と記す。)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミド (GenBank Accession Number J01825)(NCBI, 2006)由来の T-DNA レフトボーター領域(Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
<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> )(GenBank Accession Number X03043)(Fling <i>et al.</i> , 1985)。ストレプトマイシン、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た。
cos	432	<i>E. coli</i> へのプラスミドの移入及び <i>E. coli</i> におけるプラスミドの自己複製に必要なラムダファージの直鎖 DNA の付着末端領域 (Sanger <i>et al.</i> , 1982)。
ColE1 ori	807	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点(Itoh and Tomizawa, 1979)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミド (GenBank Accession Number J01825)(NCBI, 2006)由来の T-DNA ライトボーター領域(Wang <i>et al.</i> , 1984)。

(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)

#### ロ、構成要素の機能

- 5 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

親系統の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、それぞれ表 1及び表 2 (8～11ページ)に示した。

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

5 a 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

【害虫抵抗性蛋白質】

10 改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質はいずれも殺虫性蛋白質(Bt 蛋白質)である。土壌細菌である *B. thuringiensis* から単離された各 Bt 蛋白質は、それぞれ特異的な昆虫種に対して殺虫活性を示す。これら Bt 蛋白質を感受性昆虫種が摂取して消化すると、コア蛋白質となり標的昆虫の腸管上皮細胞の受容体に結合し、イオンバランスを乱して腸管上皮細胞を破壊し、その結果、消化プロセスが阻害されて殺虫活性を示すことが示唆されている(de Maagd *et al.*, 2001)。

15 改変 Cry1Ab 蛋白質：

20 Bt11で発現する改変Cry1Ab蛋白質とコア蛋白質のアミノ酸配列が同一のCry1Ab蛋白質は、トウモロコシ栽培における主要害虫であるチョウ目昆虫のヨーロッパアンコーンボラー(ヨーロッパアワノメイガ)(*Ostrinia nubilalis*)及びコーンイヤールーム(アメリカタバコガ)(*Helicoverpa zea*)等に殺虫活性を示す一方、チョウ目以外の昆虫には殺虫活性がないか極めて低い(Canadian Forest Service, 2006)。さらに、非標的昆虫、哺乳類、鳥類、魚類等、試験を行ったすべての非標的生物に対して毒性を示さないことが確認されている(EPA, 2010)。

改変 Vip3A 蛋白質：

25 MIR162で発現する改変Vip3A蛋白質は米国のトウモロコシ栽培で発生するチョウ目害虫であるフォールアームワーム、コーンイヤールーム及びブラックカットワーム(タマナヤガ)(*Agrotis ipsilon*)等に対して高い殺虫活性を示す。一方、Cry1Ab蛋白質が殺虫活性を示すチョウ目昆虫のヨーロッパアンコーンボラーや、オオカバマダラ(*Danaus plexippus*)に対しては殺虫活性を示さない。  
30 また、改変Vip3A蛋白質は、非標的昆虫、哺乳類、鳥類、魚類等、試験を行ったすべての非標的生物に対して毒性を示さないことが確認されている(EPA, 2009)。

なお、Vip3A蛋白質とCry1Ab蛋白質は異なる受容体に結合することが示されている(Lee *et al.*, 2003)。

## 5 【除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質】

PAT 蛋白質：

10 Bt11 で発現する PAT 蛋白質(ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ)は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。除草剤グルホシネートは、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成するグルタミン合成酵素を阻害し、その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物を枯死させる。PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。

PMI 蛋白質：

15 MIR162 で発現する *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一緒に植物細胞に導入し、マンノースを含む培地で培養することにより、*pmi* 遺伝子とともに目的遺伝子を有する形質転換細胞の選抜が可能となる(Negrotto *et al.*, 2000)。PMI 蛋白質はトウモロコシには存在しないが、ヒトの消化器官も含めて自然界に広く存在し、植物ではダイズ等において存在が確認されている。

25

b 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の相同性

30 改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質のアミノ酸配列が既知のアレルゲンのアミノ酸配列と相同性を持たないことを、2012年に FARRP(Food Allergy Research and Resource Program)のデータベースを用いて確認している。

## 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5 改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質はいずれも Bt 蛋白質である。これらの Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており(OECD, 2007)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10 PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L-ホスフィノスリシン (L-アミノ酸)をアセチル化することで、植物に対して毒性のない N-アセチル-L-グルホシネートへと代謝するが、他の L-アミノ酸をアセチル化することはなく、特に構造の類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどない(Thompson *et al.*, 15 1987)。また、各種アミノ酸が過剰に存在する条件下においても PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転移反応が阻害されることはなく、グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有することが報告されている(OECD, 1999)。よって、その基質特異性の高さから、PAT 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

20 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(Freeze, 2002)。よって、PMI 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

25

### (2) ベクターに関する情報

#### イ、名称及び由来

30 親系統の作出に用いられたプラスミドは以下のとおりである。

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

MIR162 : pSB12(Komari *et al.*, 1996)を基に構築されたpNOV1300

## ロ、特性

### 5 ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いられたプラスミドの塩基数は以下のとおりである。

Bt11 : 7,240 bp (pZO1502)

10 MIR162 : 14,405 bp (pNOV1300)

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

15 選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。なお、  
いずれの抗生物質耐性マーカー遺伝子も宿主には導入されていない。

Bt11 : *amp<sup>R</sup>*遺伝子、アンピシリン耐性

MIR162 : *spec*遺伝子、ストレプトマイシン・スペクチノマイシン耐性

20 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

親系統の作出に用いられたpZO1502及びpNOV1300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

25

#### イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

親系統に移入された核酸全体の構成図を、それぞれ図 1 及び図 2(16 ページ)に示した。

30

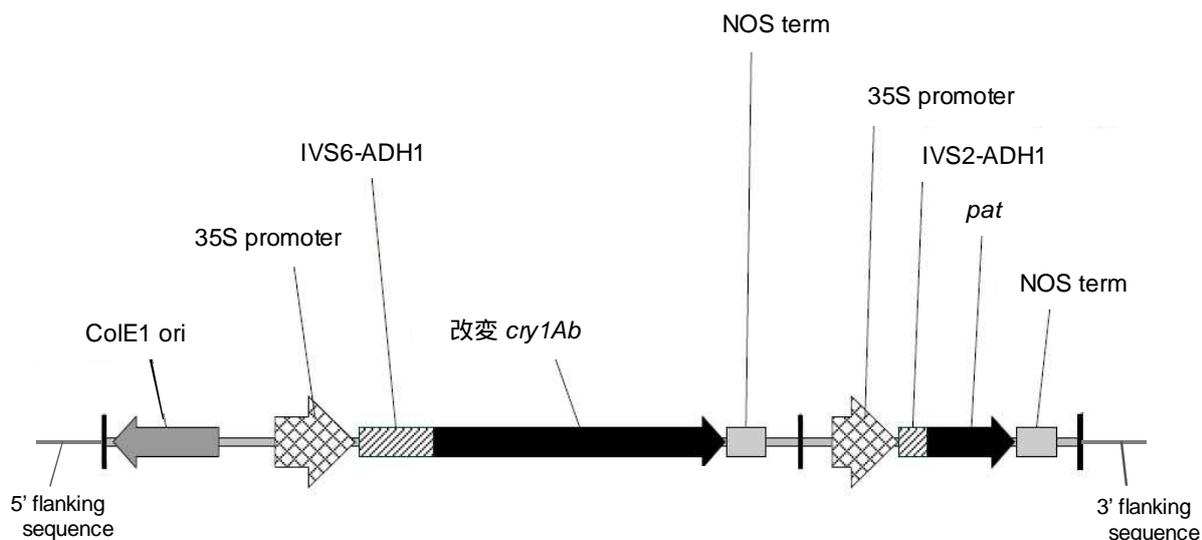
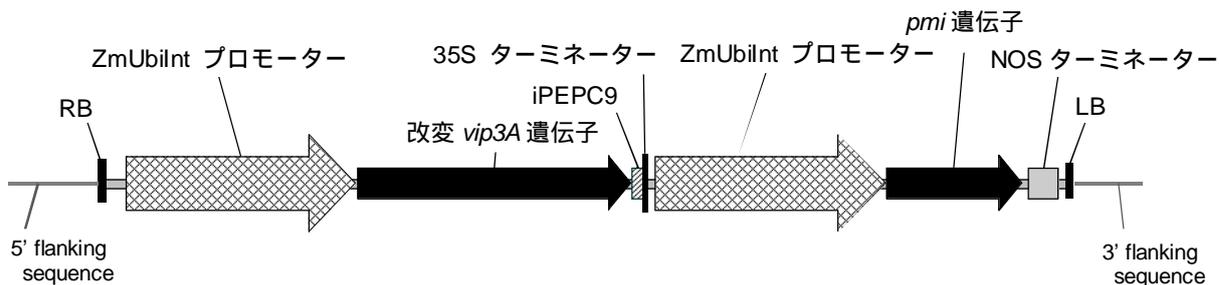


図 1 Bt11 に移入された核酸全体の構成図

(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)



5

図 2 MIR162 に移入された核酸全体の構成図

(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)

## 10 口、宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入方法は以下のとおりである。

Bt11 : エレクトロポレーション法

15 MIR162 : アグロバクテリウム法

## 八、遺伝子組換え生物等の育成の経過

### 核酸が移入された細胞の選抜の方法

5 形質転換細胞の選抜は、以下を添加した培地で行った。

Bt11：除草剤グルホシネート

MIR162：マンノース

10 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

アグロバクテリウム法を用いた MIR162 では、形質転換後に抗生物質セフトキシムを添加した培地で細胞培養し、遺伝子導入に用いたアグロバクテリウムを除去した。その後、再分化した植物体及び複数の後代において PCR 分析を行い、プラスミドの外骨格領域に含まれる抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことを確認しており、アグロバクテリウムの菌体の残存はないと考えられる。

20 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

本スタック系統トウモロコシは、Bt11及びMIR162を親系統とし、交雑育種法により作出された。本スタック系統トウモロコシの育成例を図 3(17ページ)に示した。25 なお、わが国におけるこれら親系統の申請及び承認状況は表 3(18ページ)のとおりである。

社外秘情報により非開示

30

図 3 本スタック系統トウモロコシの育成図

表 3 わが国における親系統の申請及び承認状況

2013年7月現在

系統名	食品 <sup>1)</sup>	飼料 <sup>2)</sup>	環境 <sup>3)</sup>
Bt11	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認	2007年4月 第一種使用規程承認
MIR162	2010年1月 安全性確認	2010年6月 安全性確認	2010年6月 第一種使用規程承認

1) 食品衛生法に基づく。

2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

5 3) 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基づく。

(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

10 移入された核酸の複製物が存在する場所

親系統の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認されている。

15 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

親系統に関しては、サザンブロット分析によって導入遺伝子がいずれも染色体上に1コピー存在し、複数世代において安定して伝達されることが確認されている(社内報告書2及び3、社外秘につき非開示)。

20 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

25

(6)の 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

親系統の発現の安定性については、以下のように親系統の評価で確認されている。

5

Bt11：ELISA 法による蛋白質の発現確認(社内報告書 2、社外秘につき非開示)、  
チョウ目害虫を用いた生物検定(社内報告書 2、社外秘につき非開示)

MIR162：ELISA 法による蛋白質の発現確認(社内報告書 4、社外秘につき非開示)、  
チョウ目害虫を用いた生物検定(社内報告書 5、社外秘につき非開示)

10

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

15 親系統に移入された核酸の配列には、伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その他の経路を經由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

20 親系統の定量的PCR法による系統特異的検出方法は、European Commissionのウェブサイト公開されている(European Commission, 2013)。定量限界値は、ゲノムDNAの濃度比でBt11及びMIR162のいずれも0.08%以上である(European Commission, 2013)。

25 なお、本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するには、上記の方法をトウモロコシの種子 1 粒ごとに適用する必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

30 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

本スタック系統トウモロコシに付与された親系統の特性は以下のとおりである。

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

MIR162：導入遺伝子に由来する改変 Vip3A 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及び PMI 蛋白質による選抜マーカー特性

5

以下、これらの蛋白質の機能的な相互作用の可能性について、害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質の観点から検討した。

#### 10 害虫抵抗性蛋白質間での機能的な相互作用について

本評価書第 1. 2. (1). 口. 及び (12～14 ページ)に記載したように、Bt 蛋白質である改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質は、感受性昆虫に対して特異的に作用し、独立して殺虫活性を示すと考えられる。また、これら発現蛋白質が酵素活性を持つという報告はないことから、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。したがって、本スタック系統トウモロコシにおいて各親系統が有する殺虫効果が相加的に高まることはあり得るが、お互いの作用に影響を及ぼし合うことによる相乗効果や拮抗作用が生じることは考えにくい。

15

#### 除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質間での機能的な相互作用について

本評価書第 1. 2. (1). 口. 及び (12～14 ページ)に記載したように、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質はいずれも酵素活性を有するものの、基質特異性が高く、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。したがって、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考えにくい。

20

#### 害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質間での機能的な相互作用について

害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質は、それぞれの有する機能が異なる。さらに、( )害虫抵抗性蛋白質が酵素活性を持つという報告はないこと、( )除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質はいずれも基質特異性が高く、それぞれ基質も異なることから、宿主の代謝系を変化させたり、相互に影響を及ぼす可能性は考えにくい。

30

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

したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である Bt11 及び MIR162 を個別に調査した結果に基づき評価した。

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

10

各親系統の生物多様性影響評価は終了しており、以下の生理学的又は生態学的特性について、親系統とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で相違がないことが確認されている。なお、生理学的及び生態学的特性に関する情報は日本版バイオセーフティークリアリングハウスホームページ<sup>1</sup>から参照できる。

15

- a 形態及び生育の特性
- b 生育初期における低温又は高温耐性
- c 成体の越冬性又は越夏性
- d 花粉の稔性及びサイズ
- 20 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- f 交雑率
- g 有害物質の産生性

### 3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

25

#### (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。

30

---

<sup>1</sup>以下のリンク先に直接アクセスすることで閲覧可能。

Bt11 : [https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info\\_id=906&ref\\_no=1](https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=906&ref_no=1)

MIR162 : [https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info\\_id=1493&ref\\_no=1](https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=1493&ref_no=1)

(2) 使用等の方法

5 (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

10 (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

「緊急措置計画書」を参照。

15 (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

20 (6) 国外における使用等に関する情報

親系統の諸外国における申請・承認状況は表 4(23 ページ)に示したとおりである。

25

表 4 親系統の諸外国における申請・承認状況

2013年7月現在

申請先	FDA	USDA	Health Canada	CFIA
目的	食品、飼料	無規制裁培	食品	環境安全性、 飼料
Bt11	1996年 安全性確認	1996年 安全性確認	1996年 安全性確認	1996年 安全性確認
MIR162	2008年 安全性確認	2010年 安全性確認	2010年 安全性確認	2010年 安全性確認

FDA：米国食品医薬品庁

USDA：米国農務省

5 Health Canada：カナダ保健省

CFIA：カナダ食品検査庁

なお、わが国における親系統の申請・承認状況は表 3(18 ページ)のとおりである。

## 第 2 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統トウモロコシは、親系統である Bt11 及び MIR162 から交雑育種法により作出された。

5

本評価書第 1. 2. (1). 口. 及び (12~14 ページ)に記載したように、これら親系統で発現する害虫抵抗性蛋白質(改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質)、除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質(PAT 蛋白質、PMI 蛋白質)はそれぞれ異なる機能を持つ。また、改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質が発現しても感受性昆虫に特異的に作用し、殺虫効果に相乗効果や拮抗作用が生じることはないと考えられる。さらに、これらの蛋白質が酵素活性を持つという報告はなく、加えて PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質については高い基質特異性を有することから、親系統由来のいずれの蛋白質も宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

15 したがって、本スタック系統トウモロコシにおいて、親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示さないと考えられることから、それぞれの性質が変化することはないと判断した。そこで、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響評価は、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

20 以下の「1. 競合における優位性」、「2. 有害物質の産生性」、「3. 交雑性」について、資料 1 及び 2 のとおり、各親系統において生物多様性影響を生ずるおそれはないと結論されている。そのため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、有害物質の産生性及び交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25

### 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
- (2) 影響の具体的内容の評価
- (3) 影響の生じやすさの評価
- 30 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

## 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
- (2) 影響の具体的内容の評価
- (3) 影響の生じやすさの評価
- 5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

## 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
- (2) 影響の具体的内容の評価
- 10 (3) 影響の生じやすさの評価
- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

## 4. その他の性質

15

### 第3 生物多様性影響評価の総合的評価

本スタック系統トウモロコシは、親系統である Bt11 及び MIR162 から交雑育種法により作出された。

5

本スタック系統トウモロコシの親系統で発現する害虫抵抗性蛋白質(改変 Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質)、除草剤耐性及び選抜マーカー蛋白質(PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質)は、それぞれ異なる機能を持つ。また、これら害虫抵抗性蛋白質が発現しても感受性昆虫に特異的に作用し、殺虫効果に相乗効果や拮抗作用が生じることはないと考えられる。さらに、親系統由来のいずれの蛋白質も、酵素活性を持たない又は高い基質特異性を有することから、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

10

15

これらのことから、本スタック系統トウモロコシについて、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響は、各親系統の生物多様性影響評価に基づいて評価できると判断した。

20

各親系統において、競合における優位性、有害物質の産生性及び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ていることから、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断した。

## 引用文献

- 5 Bevan, M., Barnes, W.M. and Chilton, M.D. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 369-385.
- Canadian Forest Service (2006) The *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity database.  
10 [http://www.glf.forestry.ca/bacillus/lep\\_sum.cfm?lang=eng](http://www.glf.forestry.ca/bacillus/lep_sum.cfm?lang=eng)  
(2013年5月29日閲覧)
- CFIA (2012) The biology of *Zea mays*. (L.) (Maize).  
15 <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818>  
367  
(2013年5月29日閲覧)
- 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.  
20
- de Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-199.  
25
- 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.  
30
- EPA (2009) Biopesticides registration action document. *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa20 insecticidal protein and the genetic material necessary for its production (via elements of vector pNOV1300) in event MIR162 maize (OECD unique identifier: SYN-IR162-4).  
35 [http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/reg\\_actions/registration/decisio](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/decisio)

n\_G-118\_3-Apr-09.pdf  
(2013 年 5 月 29 日閱覽)

5 EPA (2010) Biopesticides registration action document. Cry1Ab and Cry1F  
*Bacillus thuringiensis* (Bt) Corn Plant-Incorporated Protectants.  
<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/cry1f-cry1ab-brad.pdf>  
(2013 年 5 月 29 日閱覽)

10 Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. and Koziel,  
M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal  
protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5389-5394.

15 European Commission (2013) European Union Reference Laboratory for GM  
Food and Feed (EU-RL GMFF). GMOMETHODS: EU Database of  
Reference Methods for GMO Analysis.  
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>  
(2013 年 5 月 29 日閱覽)

20 FAO (2013) FAOSTAT, Food and Agriculture Organization (of the United  
Nations).  
<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>  
(2013 年 5 月 29 日閱覽).

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 Res.* 13: 7095-7106.

30 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980) Nucleotide  
sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21: 285-294.

Freeling, M. and Bennett, D.C. (1985) Maize Adh1. *Ann. Rev. Genet.*  
19:297-323.

35 Freeze, H.H. (2002) Phosphomannose isomerase. 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.

- 5 Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R.J. and  
Messing, J. (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone  
of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acid  
Res.* 9: 2871-2888.
- 10 Itoh, T. and Tomizawa, J. (1979) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA  
by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. *Cold Spring  
Harb. Symp. Quant. Biol.* 43: 409-417.
- 15 Knowlton, H.E. (1922) Studies in pollen, with special reference to longevity.  
Cornell University agricultural experiment station. Ithaca, NY.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro T. (1996) Vectors  
carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants  
mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants  
free from selection markers. *Plant J.* 10: 165-174.
- 20 Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. and Chen, J.-S. (2003) The mode  
of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A  
differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:  
4648-4657.
- 25 Mascarenhas, D., Mettler, I.J., Pierce, D.A. and Lowe, H.W. (1990)  
Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize.  
*Plant Mol. Biol.* 15: 913-920.
- 30 Matsuoka, M. and Minami, E. (1989) Complete structure for the gene  
phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur. J Biochem.* 181:  
593-598.
- 35 Murray, E.E., Lotzer, J. and Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes.  
*Nucleic Acids Res.* 17: 477-498.

NCBI (2006) Entrez Nucleotide Database, including GenBank.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

- 5 NCGA (2013) World of corn. Unlimited Possibilities. National Corn Growers Association.  
[http://www.worldofcorn.com/NCGA\\_WorldofCorn\\_Metric.pdf](http://www.worldofcorn.com/NCGA_WorldofCorn_Metric.pdf)  
(2013年5月29日閲覧).
- 10 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 Rep.* 19: 798-803.
- 15 OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 11. ENV/JM/MONO(99)13.
- 20 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.
- 25 OECD (2007) Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, No. 42. ENV/JM/MONO(2007)14.
- 30 Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. and Petersen, G.B. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. *J. Mol. Biol.* 162: 729-773.
- 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

35

- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523.
- 5 Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 153: 3-11.
- 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  
10 determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase  
15 gene from *Streptomyces viridochromogenes* TU494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and  
20 pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- 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.  
25
- 柿本陽一及び山田実 (1986) トウモロコシの起源と特性. 農業技術体系 作物編 7, 追録第 8 号. 農山漁村文化協会, 基礎編 pp. 28-28 の 5.
- 菊池一徳 (1987) トウモロコシの生産と利用, 光琳.
- 30 財務省 (2013) 貿易統計  
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>  
(2013 年 5 月 29 日閲覧)
- 35 千藤茂行 (2001) トウモロコシ. トウモロコシの品種生態. IV 採取. 転作全書.

35 Volume 3. 雑穀. 農山漁村文化協会, pp. 96-102.

角田公正, 星川清親, 石井龍一 (2000) 作物入門, 実教出版.

- 5 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.

中村茂文 (1986) 生育のステージと生理, 生態. 農業技術体系 作物編 7, 追録第 8 号. 農山漁村文化協会, 基礎編 pp. 30-53.

10

西尾剛 (2002) 新農学実験マニュアル 改訂第 3 版、株式会社ソフトサイエンス社.

農林水産省(2013) 政府統計の総合窓口. 作物別作付(栽培)面積 (2013年3月14日公表). 7-3 飼肥料作物作付(栽培)面積 青刈りとうもろこし 計.

- 15 [http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020103.do?\\_toGL08020103\\_&listID=000001108528&requestSender=dsearch](http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020103.do?_toGL08020103_&listID=000001108528&requestSender=dsearch)  
(2013年5月29日閲覧)

配合飼料供給安定機構 (2013) 配合飼料・混合飼料の生産動向.

- 20 <http://mf-kikou.lin.gr.jp/>  
(2013年5月29日閲覧)

山田実 (1986) トウモロコシの起源と特性. 農業技術体系 作物編 7, 追録第 8 号. 農山漁村文化協会, 基礎編 pp. 15-27.

25

社内報告書 1: Bt11、Nucleotide Sequence of Plasmid pZO1502 as Determined in 2004. (社内報告書)(社外秘につき非開示)

- 30 社内報告書 2: 米国における Bt11 系統トウモロコシの安全評価試験の要約(社内報告書)(社外秘につき非開示)

社内報告書 3: MIR162、挿入遺伝子のコピー数及び複数世代における挿入遺伝子の安定性(社内報告書)(社外秘につき非開示)

- 35 社内報告書 4: MIR162、ELISA による蛋白質の発現量測定(社内報告書)(社外秘に

つき非開示)

社内報告書 5 : MIR162、本組換え体を用いた標的昆虫に対する抵抗性試験(社内報告書)(社外秘につき非開示)

5

## 緊急措置計画書

平成 25 年 7 月 26 日

5 氏名 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・ティツツエ  
 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

10 第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシ  
 ネット耐性トウモロコシ(改変 *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, *pat*, *Zea mays* subsp.  
*mays* (L.) Iltis) (Bt11 × MIR162, OECD UI : SYN-BTØ11-1 ×  
 SYN-IR162-4) (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  
 15 より、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、以下  
 の措置を執ることとする。

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

生物多様性影響管理委員会委員名簿 (平成 25 年 7 月現在)

氏名	所属	電話番号
(管理責任者)	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社 コーポレートアフェアーズ	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 神座サイト	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 神座サイト	

20 (個人名・職名・電話番号は個人情報により非開示)

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

5

## 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

10 弊社は米国シンジェンタ社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者等の取引ルートへ本スタック系統トウモロコシの適切な管理、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

15

本スタック系統トウモロコシの第一種使用等により、わが国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、弊社は米国シンジェンタ社とともに、本スタック系統トウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシが、環境中で生存しないように不活化する。

20

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 本スタック系統トウモロコシの第一種使用等により、わが国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に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。

## 資料のリスト

- 資料1 5 生物多様性影響評価検討会での検討結果「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (改変*cry1Ab, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI : SYN-BTØ11-1)」  
(総合検討会における検討日：2006年12月19日)
- 資料2 10 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (改変*vip3A, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI: SYN-IR162-4)」  
(総合検討会における検討日：2008年8月21日)