

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
(改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
5 (MON87427, OECD UI: MON-87427-7)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.....	4
10	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	4
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	4
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	4
	① 和名、英名及び学名.....	4
	② 宿主の品種名又は系統名.....	4
15	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	4
	(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	4
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	5
	(3) 生理学的及び生態学的特性.....	6
20	イ 基本的特性.....	6
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	6
	ハ 捕食性又は寄生性.....	6
	ニ 繁殖又は増殖の様式.....	6
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	6
25	② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しう る組織又は器官からの出芽特性.....	7
	③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種 との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合は その程度.....	7
30	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	7
	ホ 病原性.....	8
	ヘ 有害物質の産生性.....	8
	ト その他の情報.....	8
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	8
35	(1) 供与核酸に関する情報.....	10
	イ 構成及び構成要素の由来.....	10
	ロ 構成要素の機能.....	15

	①	目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能.....	15
5	②	目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性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.....	16
	③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	17
	(2)	ベクターに関する情報.....	18
	イ	名称及び由来.....	18
	ロ	特性.....	18
10	①	ベクターの塩基数及び塩基配列.....	18
	②	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	18
	③	ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報.....	18
	(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	18
15	イ	宿主内に移入された核酸全体の構成.....	19
	ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法.....	19
	ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	19
	①	核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	19
20	②	核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無.....	19
	③	核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過.....	19
25	(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.....	22
	①	移入された核酸の複製物が存在する場所.....	22
	②	移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性.....	22
30	③	染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別.....	23
	④	(6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性.....	23
35	⑤	ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度.....	24

	(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.....	24
	(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	24
5	①	移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容.....	24
	②	以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度.....	27
	a	形態及び生育の特性 (別添資料 10).....	27
10	b	生育初期における低温又は高温耐性 (別添資料 11).....	29
	c	成体の越冬性又は越夏性.....	29
	d	花粉の稔性及びサイズ (別添資料 12).....	29
	e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 (別添資料 10; 別添資料 13).....	30
15	f	交雑率.....	30
	g	有害物質の産生性 (別添資料 14).....	30
3		遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	31
	(1)	使用等の内容.....	31
	(2)	使用等の方法.....	31
20	(3)	承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法.....	32
	(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.....	32
25	(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.....	32
	(6)	国外における使用等に関する情報.....	32
第二		項目ごとの生物多様性影響の評価.....	33
1		競合における優位性.....	33
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	33
30	(2)	影響の具体的な内容の評価.....	35
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	35
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	35
2		有害物質の産生性.....	35
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	35
35	(2)	影響の具体的な内容の評価.....	36
	(3)	影響の生じやすさの評価.....	36

	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	36
3	交雑性.....	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) 影響の具体的内容の評価.....	37
5	(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
4	その他の性質.....	37
第三	生物多様性影響の総合的評価.....	38
	参考文献.....	40
10	緊急措置計画書.....	41

第一種使用規程承認申請書

5

平成 21 年 10 月 23 日

農 林 水 産 大 臣 赤 松 広 隆 殿
環 境 大 臣 小 沢 鋭 仁 殿

10

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	東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 <i>cp4 epsps</i>, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 25 年 1 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置していると同時に、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、</p>

	<p>意図せずに本組遺伝子換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <ul style="list-style-type: none">(5) 本遺伝子組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。(7) (1)から(6)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
--	---

生物多様性影響評価書

第一 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

10

① 和名、英名及び学名

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：Corn, maize

学名：*Zea mays* subsp. *mays*(L.) Iltis

15

② 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*)に属するトウモロコシ(*Z. mays*)の、デント種である。遺伝子導入に用いた品種名は【社外秘につき非開示】×HiIIである。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの原産地については、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源とする説がある(文献1)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

25

(2) 使用等の歴史及び現状

30

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシの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

35

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7年(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。

5 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

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も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、2007年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約1億6千万haであり、上位国を挙げると米国が3,502万ha、中国が2,807万ha、ブラジルが1,383万ha、メキシコが780万ha、インドが777万ha、ナイジェリアが470万ha、インドネシアが345万haとなっている(文献4)。

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは統計上、生食用のスイートコーンと飼料用青刈りデントコーンがあり、2007年のスイートコーンの作付面積は約2万5,600haで収穫量は約25万6,700トン(文献5)であり、2008年における青刈りデントコーンの作付面積は約9万800haで、収穫量は約493万トンである(文献6)。

わが国は2008年に海外から約1,645万トンのトウモロコシを飼料用、食品・工業用、そして栽培用として輸入している。その内訳は、飼料用として約1,187万トン、食品・工業用として約457万トン、そして栽培用として約1,712トンである。なお、栽培用として輸入している上位3カ国を挙げるとフランスが778トン、米国が354トン、オーストリアが143トンとなっている(文献7)。

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当たり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、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。

5 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—

10

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15 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ている。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、トウモロコシは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8)。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8)。

20

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9;文献1)。

25

ハ 捕食性又は寄生性

—

30 ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

35 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℃に達するまで発芽しないため、自然状態では腐敗し枯死する(文献 2; 文献 3)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0℃以下の外気にさらさ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。

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

10 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。

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

20 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 10)。トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* 種に含まれ *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Itis の亜種として分類される一年生のテオシント(*Z. 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 11)。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない(文献 12; 文献 3)。また、トウモロコシのアポミクシスの報告はない。

30 ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

35 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 13)。花粉は球形で、1 粒当たりの重量は約 3.4×10^{-7} g であり(文献 14)、直径は 90~100 μ m である(文献 15)。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)。

5

ホ 病原性

—

10 ヘ 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又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。

15 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。

20 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは、育種現場でのハイブリッド種子の生産をより効率的に行うことを目的として、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427(改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)を開発した。

本組換えトウモロコシには、改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。この改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せ (*e35S-hsp70*)によって制御されているため、本組換えトウモロコシ中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は組織特異的な発現様式を示す。本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、タペート細胞及び小孢子においては発現しないか或いは発現しても微量であるのに対し(別添資料 1 の Figure 1, p3)、栄養組織及び雌性生殖組織においては除草剤グリホサート耐性を付与するのに十分な量を発現している(表 4, p27;別添資料 2 の Table 1, p11)。なお、タペート細胞は花粉完成終期まで小孢子及び花粉に養分を供給し(文献 16; 文献 17)、小孢子は小孢子分裂

を行い花粉となる。また、一般的にタペート細胞を破壊することにより花粉が不稔になることが知られている(文献 16)。

5 上述のように、本組換えトウモロコシのタペート細胞及び小孢子は改変 CP4 EPSPS 蛋白質は発現しないか或いは発現しても微量であるため、除草剤グリホサート
10 を本組換えトウモロコシの雄穂形成初期に 2 回、8 葉期(V8)頃と 10 葉期(V10)頃に散布すると、吸収移行性の有効成分グリホサートが植物体全体に行渡り、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現がないか或いは微量であるタペート細胞及び小孢子の活動が阻害されることにより、稔性を有する花粉の形成が阻害される(表 3, p25; 図 5, p26)。通常タペート細胞及び小孢子は 8 葉期(V8)頃から 10 葉期(V10)頃にかけて発達する。しかし、ほ場においては環境要因によりトウモロコシの生育段階にずれが生じることがある。そのため、全てのトウモロコシ個体において、タペート細胞及び小孢子の発達する時期に確実に除草剤グリホサートが散布されるように、8 葉期(V8)頃と 10 葉期(V10)頃の 2 回散布を推奨している。

15 一方、本組換えトウモロコシの栄養組織及び雌性生殖組織においては改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現しているため、これらの組織は除草剤グリホサートに耐性を示す(表 4, p27; 別添資料 2 の Table 1, p11)。したがって、通常のグリホサート耐性トウモロコシと同様に、雑草防除を行うための慣行散布適期に除草剤グリホサートの規定薬量を本組換えトウモロコシに散布することで、雑草防除を行うことができる。

20 この本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用することにより、図 1(p10)に示すように本組換えトウモロコシからハイブリッド品種の種子を効率的に生産することが可能となる。

25 育種現場でハイブリッド種子を生産する際の問題点の 1 つは、種子親の雄花が花粉親の雄花と同時期に花粉を産生することであり、この条件下で花粉親と種子親を確実に交配させるためには、種子親の花粉を取り除く必要がある。

一般的に、種子親から花粉を取り除くための方法としては、種子親の雄穂を除去する除雄が挙げられる。しかし、従来の除雄操作の場合、純度の高いハイブリッド種子を生産するには、除雄を短時間で行わなければならない。そのうえ、除雄操作には多くの人手が必要である。さらに、確実に目的のハイブリッド種子を生産するためには複数回に渡って観察及び除雄操作を行わなければならないことが多い。

35 ハイブリッド種子を生産するためのもう一つの方法としては、細胞質雄性不稔技術の利用が挙げられる。しかし、種子親に雄性不稔を付与するには育種的に多大な労力を必要とするうえ、遺伝子と環境条件によって雄性不稔性の発現

にばらつきがみられるため、結果的に除雄操作が必要となる場合がある。さらに、雄性不稔を付与できるトウモロコシ品種の範囲も限られている。

5 本組換えトウモロコシをハイブリッド種子の生産方法として使用する利点は、上述した従来の方法と比較して、労働力の軽減、純度の高いハイブリッド種子の生産、環境要因の影響を受けにくいことなどが挙げられ、より効率的にハイブリッド種子の生産が可能となる。また、除草剤グリホサートの散布が行える時期も、従来の除雄操作に比べて長く、ゆとりを持って作業を行うことが可能となる。

10

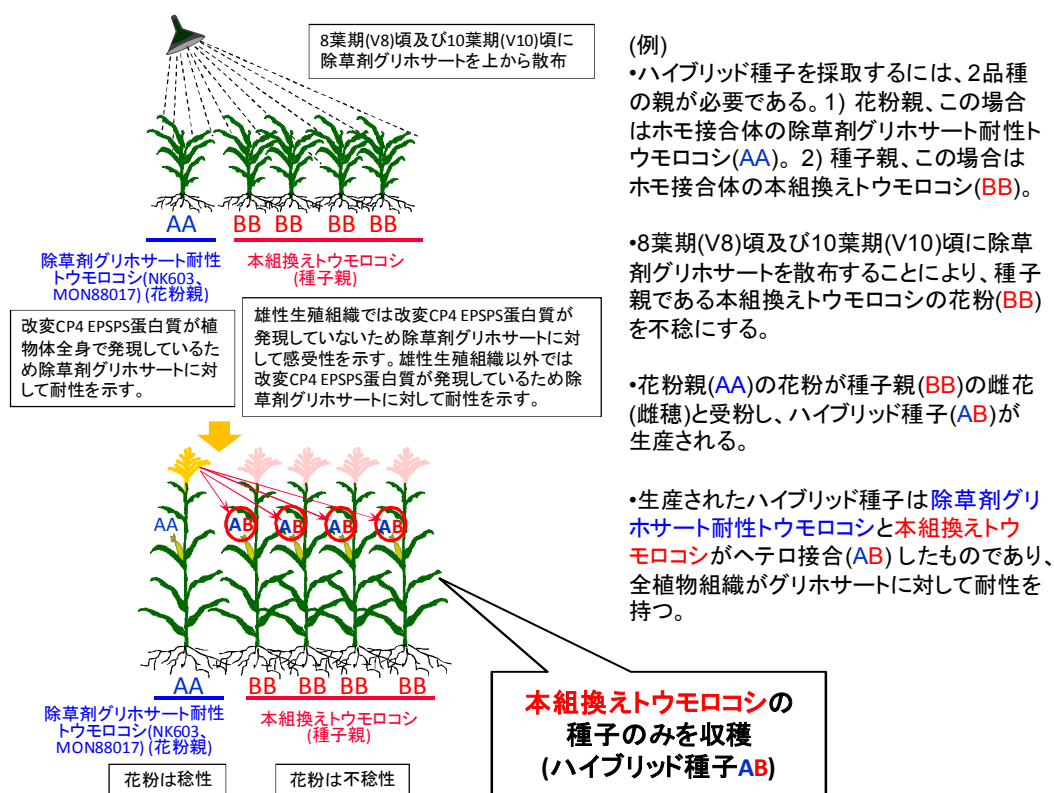


図1 本組換えトウモロコシを用いた効率的なハイブリッド種子の採種方法¹

15 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

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。

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及び構成要素の由来は、図 2(p12)及び表 1 (p13~14)に示した。

- 5 なお、本組換えトウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。したがって、本組換えトウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。
- 10 なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 3 に示した。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

25

30

図 2 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP1043 のプラスミド
マップ

35

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP1043 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B ^{注1} -Left Border	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界領域を含む <i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来にする DNA 断片。(文献 18)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注2} - <i>e35S</i>	トウモロコシの花粉での活性がわずかである(文献 19)カリフラワーモザイクウイルス(CaMV 35S)のプロモーター(文献 20)をもとに作成されたプロモーター。CaMV 35S プロモーターの活性を高める機能を有するドメインをタンデムの状態で2つ有しているため(図 3; 文献 21)、組織特異的な発現様式を変えることなく転写活性が高まっている。 <i>e35S</i> プロモーターも CaMV 35S プロモーターと同様にトウモロコシの花粉及びタペート細胞での活性が低いことが確認されている(文献 22)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
I ^{注3} - <i>hsp70</i>	<i>Z. mays</i> (トウモロコシ)の熱ショック蛋白質遺伝子(<i>hsp70</i>)のイントロン(文献 23)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
TS ^{注4} - <i>CTP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)遺伝子(<i>ShkG</i>)の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列(文献 24)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS ^{注5} -改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS)をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>)遺伝子のコーディング配列(文献 25; 文献 26)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T ^{注6} - <i>nos</i>	転写を終結させポリアデニル化を誘導する <i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域(文献 27)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Right Border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界領域を含む <i>A. tumefaciens</i> に由来の DNA 断片。(文献 28; 文献 29)。

²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 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP1043 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ(アミノグリコシド改変酵素)の細菌プロモーター及びコーディング配列並びに 3'非翻訳領域(文献 30)。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。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注7} - <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 31)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS- <i>rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコーディング配列であり、 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する(文献 32)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR- <i>ori V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 33)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注¹ B-Border(境界配列)

5 注² P-Promoter(プロモーター)

注³ I-Intron(イントロン)

注⁴ TS-Targeting Sequence(ターゲティング配列)

注⁵ CS-Coding Sequence(コーディング配列)

注⁶ T-Transcription Termination Sequence(転写終結配列)

10 注⁷ OR-Origin of Replication(複製開始領域)

ロ 構成要素の機能

- 5 ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換え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表 1 (p13~14)に示した。

- 10 本組換えトウモロコシには、改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。この改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せ(*e35S-hsp70*)によって制御されているため、本組換えトウモロコシ中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は組織特異的な発現様式を示す。以下にプロモーターとイントロンに関し記載した。

- 15 本組換えトウモロコシの *e35S* プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターをもとに作成されている。

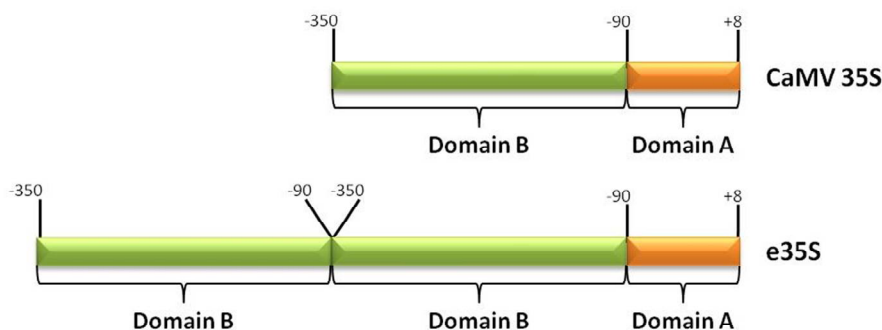
- CaMV 35S プロモーターは、一般的には目的遺伝子を全組織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが、複数の文献において全ての細胞や組織で常に発現させるわけではないことが報告されている(文献 34; 文献 35; 文献 36; 20 文献 37)。また、様々な植物種において、CaMV 35S プロモーターを使用した際に、花粉におけるレポーター遺伝子³の発現量は微量であったことが報告されている(文献 38; 文献 39)。特にトウモロコシの花粉において、CaMV 35S プロモーターがごくわずかな活性しかないことが報告されている(文献 19)。CaMV 35S プロモーターを用いた際に花粉での発現が微量である理由は、CaMV 35S プロモーターの配列中に花粉特異的な発現を制御するシス作用エレメントが存在しないことが考えられていた(文献 40)。

- この CaMV 35S プロモーターは、ドメイン A 及び B から構成されている(図 3, p16; 文献 41)。ドメイン A は、プロモーターとしての役割を持つ配列及び最低 1 つのプロモーター活性を高める機能を有する配列を持つ。ドメイン B もまた、複 30 数のプロモーター活性を高める機能を有する配列を持つ(文献 41; 文献 42; 文献 20)。一方で、本組換えトウモロコシに用いられている *e35S* プロモーターは、ドメイン A の上流にドメイン B をタンデムの状態で 2 つ有しており、CaMV35S プロモータ

³一般的にレポーター遺伝子は容易に可視及び測定可能な産物を生成する(文献 43)。レポーター遺伝子は様々なプロモーターの発現様式を証明するために使用される。あるプロモーター領域をレポーター遺伝子の配列に結合させることにより、様々な細胞においてその発現様式を特定することができる。

一との違いはドメインBを1つ多く有していることのみである(図3, p16; 文献21)。このことから、この2つのプロモーターの相違は転写活性のみであり、組織特異的な発現様式は変わらないと考えられる。実際に本組換えトウモロコシと同一の *e35S* プロモーターを用いて形質転換を行ったトウモロコシの花粉及びタペー

5 ト細胞では、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量が微量であったことが確認されている(文献 22)。



10 図3 CaMV35Sプロモーター及び *e35S* プロモーターの比較⁴

図中の数値はCaMV35Sプロモーターの転写開始部位に応じている。

また、本組換えトウモロコシに *hsp70* イントロンを導入した目的は、本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現様式を変化させることなく(文献 23)、

15 栄養組織及び雌性組織における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現を高めるためである(文献 44)。

なお、本組換えトウモロコシの作出に用いられた *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せ(*e35S-hsp70*)は、すでに第一種使用規定の承認を受けた他の遺伝子組換え作物(NK603 及び MON810)においても使用されており、新規のものではない(別添資料 4)。

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と同一性を有する場合はその旨

25

除草剤グリホサートは植物内在性の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

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。

素(EPSPS)を阻害し、細胞死を引き起こす(文献 45)。本組換えトウモロコシは *Agrobacterium* CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードする改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサートに耐性を持つ。

5

改変 CP4 EPSPS 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、アレルゲンデータベース(AD_2009⁵) (文献 46)を用いて FASTA 型アルゴリズムによって比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は共有していなかった。

10

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

EPSPS 蛋白質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、植物中では葉緑体又は色素体に存在する(文献 47)。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(文献 48; 文献 49)。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-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から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(文献 50; 文献 51)。このことは EPSPS 蛋白質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、したがって、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(文献 52; 文献 53)。実際に、通常の 40 倍の EPSPS 蛋白質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(文献 54)、加えて、モンサント・カンパニーがこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品及び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。これらのことは EPSPS 蛋白質が本経路における律速酵素ではないことを支持している。

30

また、EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)から、EPSP と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり(文献 55)、これらの基質と特異的に反応することが知られている(文献 56)。これら以外

⁵ 2009 年 1 月の時点で登録されている 1,386 の既知のアレルゲンのアミノ酸配列からなるデータベース(FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (文献 57))。

に唯一 EPSPS 蛋白質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、Gruys らの論文を元に計算すると、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。

- 5 以上のことから、植物 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断される。

(2) ベクターに関する情報

10

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プラスミド・ベクター PV-ZMAP1043 は、*E. coli* 由来のベクター pBR322(文献 31)などをもとに構築された。

15

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

- 20 本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-ZMAP1043 の塩基数は 8,946 bp である。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

- 25 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

- 30 ③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

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

35

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5 宿主内に移入された本プラスミドベクターの構成要素は表 1 (p13~14)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(p12)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10 PV-ZMAP1043 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種【社外秘につき非開示】×HiII の未成熟胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

15 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

20 従来トウモロコシ品種【社外秘につき非開示】×HiII の未成熟胚をプラスミド・ベクターPV-ZMAP1043 を含む *A.tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、未成熟胚をグリホサート及びカルベニシリンを添加した組織培養培地へ移した。形質転換している個体を選抜するために除草剤グリホサートを使用した。

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

25 カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。なお、本組換えトウモロコシにアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に本組換えトウモロコシを移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

30

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

35 分裂細胞から培地上で再分化させて得られた再分化個体(R0)を土壤に移植した。この R0 個体に従来トウモロコシ品種【社外秘につき非開示】を掛け合わせ F1 雑

種を作出し、その後 3 回戻し交配を繰り返した。その過程で除草剤グリホサートへの耐性を確認した。自殖により導入遺伝子をホモ化し、選抜された個体の後代を解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えトウモロコシ系統を選抜した。

- 5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子の発現の安定性、そしてわが国で隔離ほ場試験を行う予定の世代は、図 4(p21)の育成図に記載した。なお、本評価書における本組換えトウモロコシ MON87427 系統とは、R0 個体及びその後代の全てを指す。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

25

30

図4 本組換えトウモロコシの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えトウモロコシの導入遺伝子が染色体に存在するかどうかを調べるため、改変 *cp4 epsps* 遺伝子をホモで有する本組換えトウモロコシの LH198 BC3F4 世代を、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たないトウモロコシ品種(【社外秘のため非開示】)と交配して TI:[RP×LH198 BC3F4]BC0F1 世代を作出した。得られた BC0F1 世代に対し LH198 BC3F4 世代と交配した改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たないトウモロコシ品種(【社外秘のため非開示】)を反復親として戻し交配を行い、TI:BC1F1 世代を作出した。得られた TI:BC1F1 世代で改変 *cp4 epsps* 遺伝子をヘテロで有する個体を選抜し、再度戻し交配を行って TI:BC2F1 世代を作出した。TI:BC2F1 世代において改変 *cp4 epsps* 遺伝子をヘテロで有する個体を選抜し自殖することで得られた TI:BC2F2 世代において改変 *cp4 epsps* 遺伝子の有無を除草剤散布により分離比の検定を行った(別添資料 5)。

10

15

その結果、TI:BC2F2 世代において実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかった(表 2, p22; 別添資料 5 の Table 1, p6)。よって、本組換えトウモロコシの導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、染色体上に存在していると考えられる。

20

表 2 本組換えトウモロコシの TI:BC2F2 世代における改変 *cp4 epsps* 遺伝子の分離比⁶

供試世代	供試個体数	実測値		期待値		χ^2	p 値
		陽性	陰性	陽性	陰性		
TI:BC2F2	1107	820	287	830	277	0.5062	>0.05

25

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

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された(別添資料 6 の Figure 4~6, p25~27)。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されていないことが確認された(別添資料 6 の Figure 7, p28)。さらに導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(【社外秘につき非開示】)

30

⁶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。

BC3F3、【社外秘につき非開示】BC3F4、[【社外秘につき非開示】BC3F7×【社外秘につき非開示】JF1)におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料 6 の Figure 8, p29)。

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

1 コピーなので該当しない(別添資料 6 の Figure 4~6, p25~27)。

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

ウエスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代(【社外秘につき非開示】BC3F3、【社外秘につき非開示】BC3F4、【社外秘につき非開示】BC3F6、【社外秘につき非開示】BC3F7、[【社外秘につき非開示】BC3F7×【社外秘につき非開示】JF1)において改変 CP4 EPSPS 蛋白質が安定して発現していることを確認した(別添資料 7 の Figure 1, p10)。

米国の 5 カ所のほ場において 3 反復で生育した本組換えトウモロコシの葉、
20 種子及び花粉のサンプルを採取し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。そのうち 1 カ所のほ場における 1 プロットのサンプルについては、他のイベントが混入している恐れがあったため、分析には供試しなかった。よって、計 14 サンプルを分析に供試した。ELISA 分析の結果、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の平均値及び範囲(括弧内に示す)は、葉(OSL-1: 2 葉期
25 (V2)~4 葉期(V4))で 100 µg/g fwt (75~140 µg/g fwt)、種子で 3.6 µg/g fwt (2.6~5.3 µg/g fwt)であった。花粉における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の平均値及び範囲は、全 14 サンプルのうち 6 サンプルで検出限界値以下、6 サンプルで 0.49 µg/g fwt (0.18~1.1 µg/g fwt)、2 サンプルで判定不能であった(別添資料 2 の Table 1, p11)。この判定不能であった 2 サンプルでは 2 回の分析において、1 回目は改変 CP4 EPSPS 蛋白質が検出されたが、2 回目は検出限界値以下であったため平均値は出せなかった。6 サンプルの花粉において、微量の発現が認められた理由は、花粉採取の際に改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する葯が混入したか、花粉において微量の改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現した可能性(文献 19; 文献 22)が考えられた。

35

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 プラスミド・ベクターPV-ZMAP1043 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* と *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物に対する伝達性はない。

- (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

10

PCR 法による検出が可能である(別添資料 8)。本法は葉の一部の検定を行うのに十分な感度を有する。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10ng であることが推奨されている。本法の信頼性については 44 個体以上の本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを用いて分析を行い、確認した(別添資料 8)。

15

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

20

本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は組織特異的な発現様式を示す。そのため、本組換えトウモロコシは除草剤グリホサート散布により雄性不稔となるが栄養組織及び雌性生殖組織は除草剤グリホサート耐性を示す。本組換えトウモロコシの特性を確認するため、以下の試験を行った。

25

- i. 花粉の稔性

【葯の突出率による確認】

30

除草剤グリホサート散布による、本組換えトウモロコシの花粉の稔性を調査するために、葯の突出率に関する調査を行った。

35

一般的に、トウモロコシの育種家やハイブリッド種子の生産現場では葯の突出を花粉の稔性の指標として用いており、葯の突出の欠如は一般的に細胞質雄性不稔植物の花粉の不稔を判断するために用いられている(文献 58)。本組換えトウモロコシは雄穂形成初期の除草剤グリホサート散布により細胞質雄性不稔

と同様に稔性のある花粉の形成が阻害されることから、葯の突出の欠如により本組換えトウモロコシの有効性を調査した。

なお、葯の突出はトウモロコシが花粉を飛散させるまでの過程の一部であり、葯の突出が起こらないと花粉が飛散することはない。

5

2008年に米国の5ヵ所のほ場(イリノイ州2ヵ所、アイオワ州、ミシガン州、ネブラスカ州)で除草剤グリホサート散布後における葯の突出率に関する調査を行った。除草剤グリホサートの通常の散布量(0.84 kg a.e.⁷/ha)を、除草のための慣行散布適期である3葉期(V3)のみに散布した場合と、3葉期(V3)に加えて、雄穂形成初期である8葉期(V8)及び10葉期(V10)に2回散布した場合の本組換えトウモロコシの花の花粉の稔性を、葯の突出から導き出した葯突出率を用いて評価した(別添資料9)。なお、葯突出率は植物群(プロット)中の受粉可能な植物体の割合を示している。調査に際しては、平均して20%以上の葯突出率を示すものは可稔とし、平均して0.5%以下のものを不稔とした。

15 調査の結果、除草剤グリホサートを慣行散布適期のみに散布した場合は、葯突出率が全ての調査時期において20%を超えていたのに対して、慣行散布時期に加えて、雄穂形成初期に2回散布した場合の本組換えトウモロコシの葯突出率は0.0%であり(表3, p25)、本組換えトウモロコシは雄穂形成初期である8葉期(V8)及び10葉期(V10)に2回除草剤グリホサートを散布することにより自家受粉する可能性が低くなることが示された。

表3 本組換えトウモロコシの除草剤グリホサート散布による葯突出率調査⁸

除草剤グリホサート散布時期	葯突出率 平均値 ¹² (%)		
	観察時期		
	S90 ³	S90 + 3 ⁴	S90 + 6 ⁵
WC ⁶	34.9	41.9	35.7
WC+SS1 ⁷ +SS2 ⁸	0.0	0.0	0.0

¹ 82個体/プロット、2反復、n=10

² 計算式【社外秘につき非開示】により求めた。式中の【以下社外秘】(別添資料9)。

25 ³ S90: 90%以上の個体に絹糸の抽出が認められる

⁴ S90 + 3: S90から3日後

⁵ S90 + 6: S90から6日後

⁶ 除草剤グリホサートの慣行散布適期(3葉期(V3))

⁷ 雄穂形成初期における1回目の除草剤グリホサート散布(8葉期(V8))

30 ⁸ 雄穂形成初期における2回目の除草剤グリホサート散布(10葉期(V10))

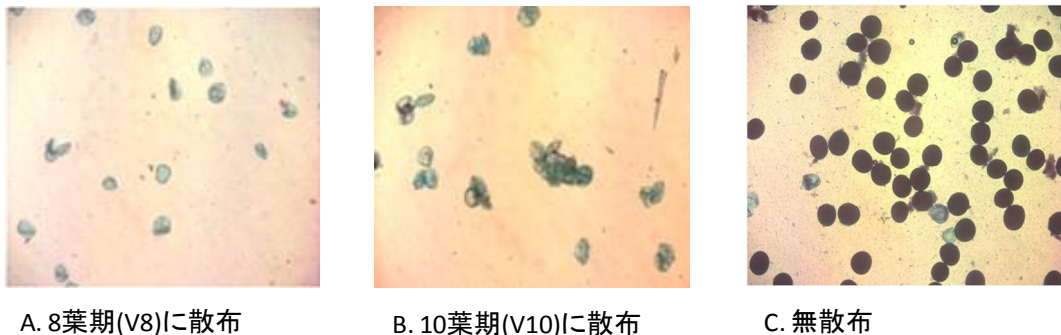
⁷ a.e.; acid equivalent(酸換算)。除草剤製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分の塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

⁸ 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。

【Alexander 染色による確認】

2009年に米国の温室において、除草剤グリホサートを散布した場合と散布し
5 なかった場合の本組換えトウモロコシの花粉の稔性について調査を行った。除
草剤グリホサートの通常の散布量(0.84 kg a.e./ha)を8葉期(V8)に散布した場合、
10葉期(V10)に散布した場合、除草剤グリホサートを散布しなかった場合、そ
れぞれの本組換えトウモロコシの葯を採取し、Alexander染色(文献59)した本組
10 換えトウモロコシの葯内の花粉稔性を顕微鏡下で調査した。なお、顕微鏡下
において稔性花粉は紫色に染色され円形で膨らんで見えるが、不稔性花粉は染色
されないか青緑色に染色され縮んで見える。

調査の結果、除草剤グリホサートを8葉期(V8)又は10葉期(V10)に散布した
場合の本組換えトウモロコシの花粉は不稔であった(図5, p26: A及びB)。一方、
除草剤グリホサートを散布しなかった場合の本組換えトウモロコシの花粉はほ
15 ぼ稔性を有していた(図5, p26: C)。



20 図5 除草剤グリホサート処理後の本組換えトウモロコシの花粉(Alexander 染
色)⁹

A. 通常量の除草剤グリホサート(0.84 kg a.e./ha)を8葉期(V8)に散布した。

B. 通常量の除草剤グリホサート(0.84 kg a.e./ha)を10葉期(V10)に散布した。

C. 除草剤グリホサートを散布しなかった。

25 ii. 除草剤グリホサート耐性能

2008年に米国の4カ所のほ場(イリノイ州2カ所、アイオワ州、ミシガン州)
で本組換えトウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度の調査を行

⁹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。

った。除草剤グリホサートの通常の散布量(0.84 kg a.e./ha)を、除草のための慣行散布適期である3葉期(V3)のみに散布した場合と、3葉期(V3)に加えて、雄穂形成初期である8葉期(V8)及び10葉期(V10)に2回散布した場合の本組換えトウモロコシ全体の傷害程度を調査した。

- 5 その結果、いずれの散布条件においても本組換えトウモロコシにおける平均傷害程度はプロット全体で2%以下と非常に低かった。よって、本組換えトウモロコシが除草剤グリホサートに耐性を示すことが証明された(表4, p27)。

表4 本組換えトウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度調査¹⁰

除草剤グリホサート散布時期	平均値(%) ¹²
WC ³	0.9
WC+SS1 ⁴ +SS2 ⁵	1.8

10 ¹82 個体/プロット、2 反復、n=8

² 傷害程度は 0~100%で評価され、0%は傷害がなく、100%はプロット内の植物体が完全に枯死していることを示す。

³ 除草剤グリホサートの慣行散布適期(3葉期(V3))

⁴ 雄穂形成初期における1回目の除草剤グリホサート散布(8葉期(V8))

15 ⁵ 雄穂形成初期における2回目の除草剤グリホサート散布(10葉期(V10))

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度¹¹

20

a 形態及び生育の特性 (別添資料 10)

2008年に米国の3ヵ所のは場(インディアナ州、ペンシルベニア州、アイオワ州)において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態特性及び生育の特性を比較するために、14項目(初期生育程度、苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、緑色保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、穀粒中の水分含量、1ブッシェル当たりの穀粒の重量、収量)について調査を行った。また、参考品種として各は場に4品種の商業栽培品種を供試し、試験は3反復で行った。なお、本試験の調査個体に除草剤グリホサートの散布は行っていない。

25

30

調査の結果、初期生育程度、苗立ち数、緑色保持度、転び型倒伏株数及び収

¹⁰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。

¹¹本項目中の以下に続く a-g 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。

量においていくつかのほ場で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p < 0.05$) (別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

5 初期生育程度に関しては、3カ所中1カ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは2.3、対照の非組換えトウモロコシでは1.7であった(初期生育程度は1-9の9段階で評価され、1が最も良く、9が最も悪い)。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(初期生育程度; 1.3~3.0)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

10

15 苗立ち数に関しては、3カ所中1カ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは73.3本/プロット、対照の非組換えトウモロコシでは94.3本/プロットであった。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(苗立ち数; 70.0~75.7本/プロット)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

20 緑色保持度に関しては、3カ所中1カ所(インディアナ州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは7.0、対照の非組換えトウモロコシでは3.3であった(緑色保持度は1-9の9段階で評価され、1は90~100%の緑色保持度、9は0~19%の緑色保持度)。さらに、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲(緑色保持度; 3.7~5.0)を外れていた(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

25 転び型倒伏株数に関しては、3カ所中1カ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは0.0本/プロット、対照の非組換えトウモロコシでは0.7本/プロットであった。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(転び型倒伏株数; 0.0~0.3本/プロット)であった(別添資料 10
30 の Table 2, p6~7)。

35 収量に関しては、3カ所中2カ所(インディアナ州及びアイオワ州)のほ場で統計学的有意差が認められた。インディアナ州においては、本組換えトウモロコシでは7.6 MT/ha、対照の非組換えトウモロコシでは10.3 MT/haであった。しかし、本組換えトウモロコシの値はインディアナ州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(収量; 6.1~8.4 MT/ha)であった(別添資料

10 の Table 2, p6~7)。アイオワ州においては、本組換えトウモロコシでは 10.5 MT/ha、対照の非組換えトウモロコシでは 13.9 MT/ha であった。さらに、本組換えトウモロコシの値はアイオワ州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲(収量; 8.1~9.8 MT/ha)を外れていた(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

b 生育初期における低温又は高温耐性 (別添資料 11)

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の生育初期における低温耐性を比較するために、3 葉期の植物体を昼間 12°C、夜間 5°C の条件で 20 日間生育させた後、草丈、生育段階、生育勢及び地上部重(生体重、乾燥重)について調査を行った。また参考として、4 種の商業栽培品種についても同時に調査した。

その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料 11 の Table 4, p19)。

c 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。再生長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。なお、隔離ほ場試験の終了時に本組換えトウモロコシの越冬性を観察する予定である。

d 花粉の稔性及びサイズ (別添資料 12)

米国のミズーリ州のほ場で栽培された本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシから花粉を採取し、その稔性及びサイズを調査した。なお、本試験では除草剤グリホサートの散布は行っていない。

調査の結果、花粉の稔性において本組換えトウモロコシ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が認められた($p < 0.05$) (別添資料 12 の Table 2, p11)。花粉の稔性に関しては、本組換えトウモロコシでは 99.7%、対照の非組換えトウモロコシでは 98.9%であった。本組換えトウモロコシの値は、参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲(99.2~99.6%)を外れていた(別添資料 12 の Table 2, p11)。

花粉のサイズに統計学的有意差は認められなかった(別添資料 12 の Table 2, p11; 別添資料 12 の Figure 1~3, p12~13)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率(別添資料 10; 別添資料 13)

第一-2-(6)-②-a に記載したとおり、収量に関しては、3 カ所中 2 カ所(イン
5 ディアナ州及びアイオワ州)のほ場で統計学的有意差が認められた。インディアナ
州においては、本組換えトウモロコシでは 7.6 MT/ha、対照の非組換えトウモロ
コシでは 10.3MT/ha であった。しかし、本組換えトウモロコシの値はインディ
アナ州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲内(収
10 量; 6.1~8.4 MT/ha)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。アイオワ州におい
ては、本組換えトウモロコシでは 10.5 MT/ha、対照の非組換えトウモロコシでは
13.9 MT/ha であった。さらに、本組換えトウモロコシの値はアイオワ州のほ場
で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲(収量; 8.1~9.8 MT/ha)
を外れていた(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

15 脱粒性については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシは
ともに、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。

種子の休眠性及び発芽率について、米国のイリノイ州のほ場にて収穫された
20 本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種 4 品種
より収穫した種子を 4 反復各約 100 粒ずつ温室にて播種し、休眠性と発芽率の
調査を行った。温度条件は 20°C 16 時間/30°C 8 時間とした。発芽種子につい
ては正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子については枯死種子率、
吸水膨潤状態種子率(viable firm-swollen)及び硬実種子率に分けて測定した。そ
25 の結果、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(別添資料
13 の Table 1, p4)。なお、隔離ほ場試験においても本組換えトウモロコシの種子
の休眠性を観察する予定である。

f 交雑率

30

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。

g 有害物質の産生性(別添資料 14)

35

米国の温室において本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及

び従来の商業栽培品種を用いて鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、検定植物であるレタスの発芽株数、生育段階、草丈、新鮮重、乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 14 の Table 2, p20)。なお、隔離ほ場試験において鋤込み、後作、土壌微生物相試験を行う予定である。

5

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

10 隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

15 名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 25 年 1 月 31 日まで

1 隔離ほ場の施設

20 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

25 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴などに付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置していると同時に、本組換えトウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風網を設置している。また、播種時には防鳥糸などを用いた鳥害防止策を講じる。

30 2 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

35 (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離

ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。

- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 5 (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (7) (1)から(6)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 10 (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添資料 15 の図 2(p3)に示した。

15

- (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

—

20

- (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。

25

- (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

—

30

- (6) 国外における使用等に関する情報

これまで 2005~2009 年の間に米国、アルゼンチンにおいて延べ 249 ヲ所のほ場において試験が行われているが、非組換えトウモロコシと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

35

なお、本組換えトウモロコシは【以下社外秘】

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹²

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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。

10

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率; 第一-2-(6)-②-a~e)を調査した。その結果、初期成育程度、苗立ち数、緑色保持度、転び型倒伏株数及び収量においていくつかのほ場で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p<0.05$)(別添資料 10 の Table 2, p6~7)

15

初期生育程度に関しては、3カ所中1カ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは2.3、対照の非組換えトウモロコシでは1.7であった(初期生育程度は1-9の9段階で評価され、1が最も良く、9が最も悪い)。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(初期生育程度; 1.3~3.0)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

20

苗立ち数に関しては、3カ所中1カ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは73.3本/プロット、対照の非組換えトウモロコシでは94.3本/プロットであった。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種4種の平均値の範囲内(苗立ち数; 70.0~75.7本/プロット)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

25

30

緑色保持度に関しては、3カ所中1カ所(インディアナ州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは7.0、対照の非組換えトウモロコシでは3.3であった(緑色保持度は1-9の9段階で評価され、1は90~100%の緑色保持度、9は0~19%の緑色保持度)。さらに、本組換えトウモロコシの値はペン

¹²本項目中で、第一-2-(6)-②-a~g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。

シルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の範囲(緑色保持度; 3.7~5.0)を外れていた(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。しかし、インディアナ州以外の 2 ヲ所のほ場(ペンシルベニア州、アイオワ州)において統計学的有意差は認められず、この差異は一貫したものではなかった。

- 5 転び型倒伏株数に関しては、3 ヲ所中 1 ヲ所(ペンシルベニア州)のほ場で統計学的有意差が認められ、本組換えトウモロコシでは 0.0 本/プロット、対照の非組換えトウモロコシでは 0.7 本/プロットであった。しかし、本組換えトウモロコシの値はペンシルベニア州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の範囲内(転び型倒伏株数; 0.0~0.3 本/プロット)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。

- 10 収量に関しては、3 ヲ所中 2 ヲ所(インディアナ州及びアイオワ州)のほ場で統計学的有意差が認められた。インディアナ州においては、本組換えトウモロコシでは 7.6 MT/ha、対照の非組換えトウモロコシでは 10.3 MT/ha であった。しかし、本組換えトウモロコシの値は同じインディアナ州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲内(収量; 6.1~8.4 MT/ha)であった(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。アイオワ州においては、本組換えトウモロコシでは 10.5 MT/ha、対照の非組換えトウモロコシでは 13.9 MT/ha であった。さらに、本組換えトウモロコシの値は同じアイオワ州のほ場で参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲(収量; 8.1~9.8 MT/ha)を外れていた(別添資料 10 の Table 2, p6~7)。しかし、本組換えトウモロコシの値(10.5 MT/ha)は対照の非組換えトウモロコシの値(13.9 MT/ha)より低かった。

- 15 花粉の稔性に関しては、本組換えトウモロコシでは 99.7%、対照の非組換えトウモロコシでは 98.9%であった。本組換えトウモロコシの値は、参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲(99.2~99.6%)を外れていた(別添資料 12 の Table 2, p11)。しかし、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの値はどちらも高く、その差異は 1%未満であり、本組換えトウモロコシの値は商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲よりわずかに高い程度であった(別添資料 12 の Table 2, p11)。

- 30 以上のことから、上述した項目において認められた有意差により、本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まるとは考えにくい。また、わが国における本組換えトウモロコシの競合における優位性については、本隔離ほ場試験においても確認する。

- 35 本組換えトウモロコシには改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せ(*e35S-hsp70*)によ

って制御されているため、本組換えトウモロコシ中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は組織特異的な発現様式を示す。本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、タペート細胞及び小孢子においては発現しないか或いは発現しても微量であるのに対し(別添資料 1 の Figure 1, p3)、栄養組織及び雌性生殖組織において
5 は除草剤グリホサート耐性を付与するのに十分な量を発現している(表 4, p27; 別添資料 2 の Table 1, p11)。しかし、除草剤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除草剤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にくい。

10 以上のこと及び本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

15

—

(3) 影響の生じやすさの評価

20

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25 以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

30

(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るが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

35

本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに耐性を持つ改変 CP4

EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている(第一-2-(1)-ロ-②)。また、第一-2-(1)-ロ-③に示したように、改変 CP4 EPSPS 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ことが確認されている。これまでにモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物(トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ、テンサイ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含量に対照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。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

実際に、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの有害物質の産生性の有無を鋤込み試験及び後作試験(第一-2-(6)-②-g)により比較検討した結果、統計学的有意差は認められなかった(別添資料 14 の Table 2, p20)。このことから、意図しない有害物質の産生性はないと判断された。

以上のこと及び本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

(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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

5 トウモロコシの近縁種は *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。わが国では、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。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本組換えトウモロコシは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

25 —

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 競合における優位性；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非組換えトウモロコシの間で競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した結果、いくつかの有意差が認められた。しかし、これら観察された統計学的有意差により、競合における優位性が高まるとは考えにくい。また、わが国における本組換えトウモロコシの競合における優位性については、本隔離ほ場試験において確認する。

10 本組換えトウモロコシには改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。本組換えトウモロコシの改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せ(*e35S-hsp70*) によって制御されているため、稔性を有する花粉形成に関与するタペート細胞及び小孢子では改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現がないか或いは微量であるが、栄養組織及び雌性組織においては除草剤グリホサート耐性を付与するのに十分な改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現している。しかし、除草剤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除草剤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にくい。

15 したがって、本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25 有害物質の産生性；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、わが国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、改変 CP4 EPSPS 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ことが確認されている。

30 実際に、鋤込み試験及び後作試験の結果から、本組換えトウモロコシによる意図しない有害物質の産生性はないと判断された。

35 したがって、本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

交雑性；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いない。

- 5 したがって、本組換えトウモロコシを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

- 10 よって、総合的評価として、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

【社外秘につき非開示】

5

緊急措置計画書

平成 21 年 10 月 23 日

5

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 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

10

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誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7) (以下「本組換え体」という。)の法的に認められた範囲の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

15

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とおりである。

20

平成 21 年 10 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 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 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	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
	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

5 第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

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 実験従事者に直接口頭で伝える。

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

15 具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

20 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省及び環境省に報告する。

25