

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps, cry3Bb1, Zea mays subsp. mays (L.) Itis*)(MON88017, OECD UI: MON-88Ø17-3)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..... 2

(2) 使用等の歴史及び現状..... 2

(3) 生理学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

(1) 供与核酸に関する情報..... 4

(2) ベクターに関する情報..... 8

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 8

(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... 9

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 10

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容..... 11

(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..... 12

(3) 国外における使用等により得られた情報..... 12

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性..... 12

2 有害物質の産生性..... 13

3 交雑性..... 17

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 18

緊急措置計画書..... 19

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 4 月 6 日

農 林 水 産 大 臣 亀 井 善 之 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 殿

申請者 氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座 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コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>cp4 epsps, cry3Bb1, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) <i>Ilitis</i>)(MON88017, OECD UI: MON-88Ø17-3)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

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.) Iltis 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在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しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である。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 μm 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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps, cry3Bb1, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis.)(MON88017, OECD UI: MON-88Ø17-3)(以下、「本組換えトウモロコシ」とする)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表 1(p5~6)に示したとおりである。尚、本組換えトウモロコシには野生型 *cry3Bb1* 遺伝子を改変した *cry3Bb1* 遺伝子を導入しており、以下この遺伝子を「改変型 *cry3Bb1* 遺伝子」、及び発現する蛋白質を「改変型 Cry3Bb1 蛋白質」と称する。

表 1 導入に用いたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素及び機能

構成要素	サイズ (Kbp)	由来及び機能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット		
P-ract	0.93	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる。
ract1 intron	0.46	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、目的遺伝子の発現を活性化させる。
CTP2	0.23	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 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塩基配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.37	<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。機能の詳細については p8-9 に記載した。
NOS 3'	0.26	<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。
改変型 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子カセット		
P-e35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
wt CAB leader	0.07	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる。
ract1 intron	0.46	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、目的遺伝子の発現を活性化させる。
改変型 <i>cry3Bb1</i>	1.96	<i>Bacillus thuringiensis</i> の、改変した Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子。機能詳細については p9 を参照。
tahsp 17 3'	0.23	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

T-DNA の外骨格領域		
RB	0.02	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列の DNA 断片。右境界配列は、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される。
<i>Aad</i>	0.79	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の、Tn7 アデニルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する。
ori-322	0.63	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E.coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
ROP	0.19	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマータンパク質を抑制するコーディング配列。
ori-V	0.39	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
LB	0.02	Ti プラスミド pTi15955 に由来する左境界配列の DNA 断片。左境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。

□ 構成要素の機能

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(p5～6)に示した。

【*cp4 epsps* 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。*cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS 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-heptulosonate-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、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)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。これらのことは EPSPS 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。また、EPSPS 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、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。

CP4 EPSPS 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。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子】

コウチュウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である改変型 *cry3Bb1* 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. *kumamotoensis* に由来し、コードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する corn rootworm (*Diabrotica* sp.)(以下 CRW とする)に対する殺虫活性を示す。改変型 Cry3Bb1 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。

改変型 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属 (*Leptinotarsa*, *Diabrotica*) に分類される Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decimlineata*) (以下 CPB とする) と CRW のみに対して殺虫活性を示す。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していることはこれまで報告されていないことが文献調査により示された。

なお、改変型 Cry3Bb1 蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、98% 以上の相同性を有している。実際にほ場における殺虫効果は改変型 Cry3Bb1 蛋白質を用いて行っている。

改変型 Cry3Bb1 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を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

本組換えトウモロコシの作出に用いられたベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pBR322 等である。

ロ 特性

ベクターの全塩基数は 12,368bp である。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スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与するための *aad* 遺伝子を持つ。本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

上記の pBR322 由来ベクター等をもとに本組換えトウモロコシの作出に用いたプラ

スミドベクターPV-ZMIR39 を構築した。

宿主内に移入された本ベクター中の T-DNA 領域は、*cp4 epsps* 遺伝子カセット [P-ract]-[ract1 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3'] 及び改変型 *cry3Bb1* 遺伝子カセット [P-e35S]-[wt CAB leader]-[ract1 intron]-[*cry3Bb1*]-[tahsp17 3'] で構成される。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドベクターPV-ZMIR39 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品種である A x F1 雑種 HiII に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換えトウモロコシの開発は 1999 年から始まった。アグロバクテリウム法によりプラスミドベクターPV-ZMIR39 中の T-DNA 領域を A x F1 雑種 HiII に導入した後、グリホサートを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得て、改変型 *Cry3Bb1* 蛋白質の発現を ELISA 分析によって検定し、グリホサート耐性と害虫抵抗性の付与された系統を選抜した。

この際、形質転換カルスをカルベニシリンとパロモマイシンを含む培地で培養した後、これら抗生物質を含まない再生培地に移して培養することによって、アグロバクテリウムの残存性がないことを確認している。

2000~2001 年にかけて延べ 169 ヶ所のほ場試験を行い、最終商品化系統を選抜するとともに、その環境安全性を評価した。

わが国では 2003 年 4 月に、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)及び栽培認可を受けている。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

サザンプロット分析による挿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 1 ヶ所に 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。また、T-DNA 領域内の *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変型 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットの完全性は各遺伝子発現カセットの構成要素をプローブに用いて解析した。*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの場合は、P-ract + ract1 intron、CTP2 + *cp4 epsps*、NOS 3' の各構成要素をプローブとして用いて解析した。一方、改変型 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットの場合は、P-e35S、wt CAB leader + ract1 intron、改変型 *Cry3Bb1*、tahsp17 3' の各構成要素をプローブとして用いて解析した。その結果、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変型 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットの各構成要素は、完全な状態で挿入されており、*aad* 遺伝子等を含む T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されていなかった。更に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及びコウチュウ目害虫抵抗性も複数世代で安定して発現しているこ

とを選抜の過程でグリホサート散布試験及び Cry3Bb1 蛋白質の抗体を用いた ELISA 法により確認している。

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ *cp4 epsps* 遺伝子によってコードされる CP4 EPSPS 蛋白質が植物体の各部位で発現することによって本組換えトウモロコシには、除草剤グリホサートに対する耐性が付与された。実際に確認したところ、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、組換えトウモロコシは正常に生育した。また、改変型 *cry3Bb1* 遺伝子によってコードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現することにより、米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫である CRW の食害に対する抵抗性が付与され、CRW による食害が減少する。CRW はトウモロコシの根を食害するが、本組換えトウモロコシでは改変型 Cry3Bb1 蛋白質は茎葉、葉、花粉、根で恒常的に発現している。

ロ 本組換えトウモロコシに属する系統である MON88017-A 及び MON88017-B(以下 017-A 及び 017-B と称する)並びにその対照系統として Cont-A 及び Cont-B を供試して隔離ほ場試験を行った。017-A 及び 017-B は同じ本組換えトウモロコシの初代 (R0) から異なる育種過程によって作出された F1 ハイブリッドである。対照系統である Cont-A 及び Cont-B は 017-A 及び 017-B と遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの F1 ハイブリッドである。

形態及び生育の特性

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、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、収穫期の植物重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で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 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の稈長の平均値は 226.9 cm、Cont-B は 233.4 cm だった。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。

生育初期における低温又は高温耐性

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幼苗の低温耐性(5)を評価したが、24 日後にほぼすべての個体が枯死し、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低温耐性に差異は認められなかった。

成体の越冬性又は越夏性

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

花粉の稔性及びサイズ

花粉の稔性（充実度）と花粉の大きさを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、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に差異は認められなかった。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量としては、Sib-mating 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、粒形を調査したが、雌穂径を除く全ての項目において、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は認められなかった。雌穂径において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の雌穂径の平均値は 44.0 mm、Cont-B は 45.7 mm だった。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。脱粒性については、組換え体とその対照の非組換え体は共に、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。収穫種子を播種して 10 日後の発芽率において、組換え体と非組換え体との間で統計学的有意差はなく、種子の休眠性は認められなかった。

交雑率

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

有害物質の産生性

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、土壤微生物相試験、後作試験、鋤き込み試験を行ったが、鋤き込み試験における検定植物ハツカダイコンの生体重を除く全ての項目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との間に統計学的有意差は認められなかった。鋤き込み試験における検定植物ハツカダイコンの生体重において組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A との間で統計学的有意差が認められ、017-A の生体重平均値は 7.17 g、Cont-A は 8.38 g だった。

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

米国において 2001 年に行われたほ場試験において、形態及び生育特性、病害虫感受性、繁殖に関する特性についての観察が行われているが、形態及び生育特性における苗立ち程度及び成苗数を除くすべての評価項目において組換えトウモロコシ MON88017 と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。統計学的有意差の認められた苗立ち程度および成苗数に関して、組換えトウモロコシ MON88017 と対照の非組換えトウモロコシの平均値の差は 10% 以内と小さかった。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

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

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、発芽率、休眠性及び脱粒性を比較検討した。その結果、稈長及び雌穂径を除く全ての項目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との間で、差異は認められなかった。稈長及び雌穂径において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められた。稈長において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の稈長の平均値は 226.9 cm、Cont-B は 233.4 cm だった。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。雌穂径において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の雌穂径の平均値は 44.0 mm、Cont-B は 45.7 mm だった。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。しかし、稈長及び雌穂径以外の競合における優位性に関わる諸形質で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との間で差異は認められなかったことから、これらの形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本組換えトウモロコシは除草剤グリホサート耐性を有するが、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。また、本組換えトウモロコシはコウチュウ目害虫の殺虫成分改変型 Cry3Bb1 蛋白質を産生する性質を有しているが、この形質によって競合における優位性が高まるとは考えられない。

以上のように本組換えトウモロコシにおいては稈長の差及び雌穂径の差が認められ、またグリホサート耐性及びコウチュウ目昆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合うとは考えにくい。従ってこれらの形質をすべ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、競合における優位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。

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

トウモロコシは日本に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験があり、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。

有害物質の産生性の有無に関して、鋤き込み、後作、土壌微生物相試験を行い比較検討した。その結果、鋤き込み試験において、組換えトウモロコシ017-Aとその対照である非組換えトウモロコシ系統Cont-Aの間でハツカダイコンの生体重に統計学的有意差が認められ、017-Aで7.17g、Cont-Aで8.38gであった。それ以外の評価項目において

は、差異は認められなかった。

017-A と同時に隔離ほ場試験に供試していた組換えトウモロコシ 001-A、012-A では、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの生体重に統計学的有意差は認められなかった。001-A、012-A と 017-A 系統はいずれも同じ遺伝子を導入した組換えトウモロコシであることから、017-A で観察された生体重の差異は導入遺伝子によるものではないと判断された。また、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの発芽率や後作試験・土壌微生物相試験では 017-A と Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。以上のことから、組換えトウモロコシ 017-A において観察されたハツカダイコンの生体重の差異は 017-A において有害物質の産生性が増大したことによるとは考えにくいと判断された。従って、組換えトウモロコシ 017-A において有害物質の産生性が高まっているとは考えにくい。

本組換えトウモロコシは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 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、p8 に示したように、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と考えられている。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)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、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と判断された。

また、本組換えトウモロコシには改変型 Cry3Bb1 蛋白質の発現によってトウモロコシの根を食害する主要コウチュウ目害虫である CRW に対する抵抗性が付与されているため、影響を受ける野生動植物としては、改変型 Cry3Bb1 蛋白質に対して感受性を示す標的害虫と同属近縁種のコウチュウ目昆虫であると考えられた。これまでのところ、改変型 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*、*Diabrotica*) に分類される CPB と CRW に殺虫活性を示すが、その他の昆虫に殺虫活性を示すことは確認されておらず、殺虫スペクトラムが極めて狭いことが示されている。なお、これまでのところ、CPB、CRW 及びそれらと同属の近縁種はわが国に生息しているという報告はないことが文献調査により示された。ただし、未調査のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す可能性もあることから、以下の検討を行った。なお、トウモロコシの植物体の摂食を通じて影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫としては、スジコガネ、ヒメコガネ、マルクビクシコメツキ等の害虫としてリストアップされているもの(農林有害動物・昆虫名鑑(日本応用動物昆虫学会編)、1987)のみが考えられるため、植物体の摂食を通じた影響については、ここでは以下の評価の対象とはしないこととする。

まず、「環境省レッドリスト(日本の絶滅のおそれのある野生生物)」の 2000 年改訂版

に記載された絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているコウチュウ目種について、本組換えトウモロコシの花粉飛散により影響を受ける可能性があるかを、それぞれの種の食性・生息場所・行動習性・分布地域等から調査した。その結果、環境省レッドリスト記載種の中には、本組換えトウモロコシの花粉飛散によって、生息に影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫は存在しないと判定された。

更に、環境省レッドリスト記載種以外に、地域的に重要と見なされているコウチュウ目昆虫を「昆虫類の多様性保護のための重要地域(日本昆虫学会自然保護委員会編集)」第1集(1999)、第2集(2000)、第3集(2002)からリストアップし、レッドリストの場合と同様に、それぞれの種について、食性・生息場所・行動習性・分布地域等から、本組換えトウモロコシの花粉による影響を受ける可能性があるかを調査した。その結果、オオヨモギハムシ・ハナウドゾウムシ・ヤマトアザミテントウの3種の幼虫が地上部の葉を摂食し、食草もトウモロコシ栽培地の周辺にも分布しているため、飛散花粉量の程度及び昆虫種の感受性によっては、何らかの影響をうける可能性がある昆虫種として特定された。尚、一般的に第1齢から第2齢幼虫までが *B.t.* 蛋白質に対して感受性を示し、それ以降は非感受性になるため、本文献調査では幼虫のみを対象として行った。

尚、土壌中に生息している可能性のあるコウチュウ目昆虫種(オサムシ科、ヒメマキムシ科、ケシクスイムシ科、コガネムシ科、ハネカクシ科)に対して、Cry3Bb1 蛋白質が影響を及ぼさないことが米国におけるほ場試験で確認されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

前述のように、本組換えトウモロコシの花粉の飛散によって影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫が3種特定されたが、現在までに我が国では、コウチュウ目昆虫を用いた生物検定法が確立されていないことから、米国本社に依頼して現在までに改変型 Cry3Bb1 蛋白質に対して最も高い感受性を示すことが知られている標的害虫の Colorado Potato Beetle(以下 CPB と称する)を用いて生物検定を行った。

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫 CPB の孵化後 24 時間以内の幼虫に摂食させて死亡率を比較したところ、有意な差が 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた。しかし、2,000 粒/cm² の花粉密度でも死亡率が比較的高い数値であったため、日本に生息するコウチュウ目昆虫に対する影響を評価する際の指標値は 2,000 粒/cm² とした。また、花粉摂食開始 7 日後の LC₅₀ (半数致死濃度) は 4,380 粒/cm² であった。

(3) 影響の生じやすさの評価

本組換えトウモロコシと対象の非組換えトウモロコシの間で、花粉飛散に影響を与える要因である花粉の量、形状及び大きさ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。

上記のように本組換えトウモロコシの花粉量が対照の非組換えトウモロコシと相違がないことから、CPBの生存率に影響の出た花粉密度 2,000 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)の関係を表す川島ら(2000)のモデル式($y=14791\exp(-0.158x + 0.00275x^2 - 0.0000183x^3)$)に入れ、花粉飛散が影響を与える距離を計算した。なお、このモデル式は通常の気象条件ではこれ以上の堆積はないという最大値を示している。その結果、本組換えトウモロコシの花粉が 2,000 粒/cm²の濃度で堆積するのは最大 20mと推定された。

オオヨモギハムシ・ハナウドゾウムシ・ヤマトアザミテントウの食餌植物と食餌植物の主な生育場所をまとめた結果(p18 の表 2)、こうした食餌植物は野原、山地など広範な地域で生息しており、トウモロコシが栽培されるほ場やその近辺のみを生息域としていない事が判明した。仮にこれらのコウチュウ目昆虫が、生存率に影響を与える密度の花粉に曝露される範囲内に偶発的に移動したとしても、それらはごく少数であるため、個体群で影響をうける可能性は極めて低いと判断された。今回未調査であるその他のコウチュウ目昆虫に関しても同様に、個体群で影響を受ける可能性は極めて少ないと判断された。

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コウチュウ目昆虫に影響を及ぼすとは考えにくいと判断された。また、前述のコウチュウ目昆虫 3 種はその食餌植物の生育場所より、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と考えられる。

尚、本組換えトウモロコシについて、今後の育種により今回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、CPB を用いた生物検定においては感受性の最も高い孵化後 24 時間以内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ことはないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本組換えトウモロコシ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。このようなほ場近傍には、環境省レッドリスト記載種は生息していないと考えられた。さらに地域的重要種の中に何らかの影響をうける可能性がある昆虫種としてオオヨモギハムシ・ハナウドゾウムシ・ヤマトアザミテントウの 3 種が特定されたが、これらはトウモロコシが栽培されるほ場やその近辺のみを生息域としていない為に、仮にこれらのコウチュウ目昆虫が本組換えトウモロコシの花粉飛散による影響を受けるとしても少数個体のレベルであり、個体群で影響をうける可能性は極めて少ないと判断

された。また、その他のコウチュウ目昆虫に関しても同様に、トウモロコシほ場近辺に主に生息していないことから、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。

表 2 非標的昆虫が食餌する植物の生育場所

	食餌植物等	食餌植物の主な生育場所
1 オオヨモギハムシ	フキ類 ヒヨドリバナ類	山地の道端 山地、湿地、川原
2 ハナウドゾウムシ	ハナウド類	山地
3 ヤマトアザミテントウ	アザミ類 ナス科(野生種) バレイショ	草地、林地、湿地、海岸、川原 山地、道端、草地、湿地、林地、畑地 畑地
参考文献：日本の野生植物（平凡社）		

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、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

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組換え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

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。また、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの競合における優位性にかかわる諸形質を比較検討したところ、稈長及び雌穂径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。稈長及び雌穂径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ことから、稈長及び雌穂径の違いのみで競合における優位性が高まるとは考えにくい。また、CP4 EPSPS 蛋白質と改変型 Cry3Bb1 蛋白質を有することによって競合における優位性が高まるとは考えにくい。したがって、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した。

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの有害物質産生性の有無を、鋤き込み試験、後作試験、土壌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、本組換えトウモロコシ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コウチュウ目昆虫 3 種への影響を調べたが、本組換えトウモロコシ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、また、本来自然生態系に生息している非標的コウチュウ目昆虫種がトウモロコシほ場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、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。

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ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本組換え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（食用・飼料用に供する場合）

平成16年4月6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コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MON88017, OECD UI: MON-88017-3)(以下、「本組換えトウモロコシ」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、本組換え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、輸入された本組換え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組換え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、必要に応じて本組換え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。

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成16年4月6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コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MON88017, OECD UI:MON-88017-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」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、本組換え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、本組換え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組換えトウモロコシがあった場合はそれ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。