

除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(T14, OECD UI :ACS-ZM002-1) 生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
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	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
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	7
(2) ベクターに関する情報	11
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	11
(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	13
(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	16
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	16
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	19
(2) 使用等の方法	19
(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	19
(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	19
(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	19
(6) 国外における使用等に関する情報	19
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	21
2 有害物質の産生性	22
3 交雑性	24
4 その他の性質	24
第三 生物多様性影響の総合的評価	24
引用文献	27
緊急措置計画書	31

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 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ローレンス ユー 印
住所 東京都港区高輪4丁目10番8号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (pat, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (T14, OECD UI :ACS-ZM002-1)
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、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 和名、英名及び学名

イネ科トウモロコシ属トウモロコシ

英名：Maize、Corn

学名：*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis

ロ 宿主の品種

宿主は、ハンガリーの Cereal Breeding Institute で開発された、デント種 (var. *indentata*) に属する組織培養由来系統 He/89 (Mórocz *et al.*,1990) である。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの起源は今なお不明確な点が多く、これまでいろいろな説が提起されているが、1895年に Ascherson が唱えた「テオシントを人間が選抜して栽培植物化したものである」というテオシント起源説 (Mangelsdorf and Reeves,1939) が現在では最も広く受け入れられている (Beadle,1986; de Wet and Harlan,1972; Doebley and Stec,1991; Doebley,1990; Galinat,1977; Iltis and Doebley,1980; Goodman,1988; Kato,1984; Kato and López,1990; Timothy *et al.*,1979; OECD,2003)。また、メキシコ中南部と中央アメリカが主な原産地の一つであると考えられている (Vavilov,1951; Smith,1995; Harlan,1992; OECD,2003)。

現在のトウモロコシは長い間栽培作物化されており、人が介在することなしには繁殖することはできないため、雑草としては生存できない (OECD,2003)。トウモロコシの近縁種として、テオシント (*Zea mays* subsp. *mexicana*) とトリプサカム属 (*Tripsacum*,2n=36) がある。テオシントはメキシコとグアテマラの渓谷及びメキシコ高地に自然分布しているが、米国のコーンベルト地帯、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア及びアジアには自生していない。また、トリプサカム属は多年生植物で、16種あるトリプサカム属のうち、*Tripsacum floridanum* はフロリダ南端に、*Tripsacum australe* と他の2種は南米に、そして、それ以外の12種はテオシントの自生地域と同じメキシコ

とグアテマラに分布している (Mangelsdorf,1986)。尚、メキシコには 40 種以上のトウモロコシの在来栽培種があり (Wellhausen *et al.*, 1952)、南北アメリカにはおよそ 250 種の在来の栽培種がある (Goodman and Brown,1988)。

尚、我が国の自然環境下において、近縁野生種の分布は報告されていない (井上,1989; Doebley,1990)。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシに関連する遺物が大量に出土した遺跡の代表としてメキシコのテワカン溪谷がある。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、原始的なトウモロコシの穂が出土してくる。紀元前 5000 年~3000 年の頃には本格的な農耕がはじまったと考えられており、穂は原始的であるが大きくなっている。紀元前 1500 年~200 年の間になると、穂は非常に大きくなって、現在のような多条列の立派な栽培型になった (MacNeish,1964)。また、南北アメリカ大陸へはメキシコ、メソアメリカの地から各地に伝播して行き、伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート、フリント種などの多数の変異種が生じたと考えられている (トウモロコシの生産と利用,1987)。さらに、コロンブスの新大陸発見により、スペインを通してヨーロッパに導入され、世界に広まっていった (Goodman,1988)。

我が国へのトウモロコシの伝播は、天正年間 (1579 年) にポルトガル人によって、長崎あるいは四国にフリント種が導入されたのが最初であるとされている。さらに明治時代にデント種とフリント種が米国から北海道に入り、全国に伝播した。以後、主として九州の阿蘇山麓、東海の富士山麓、長野、北関東地方で栽培されてきた。

古くからの用途は子実の飼料としての利用、生食用、山間地における準主食としての利用等があげられる。しかし我が国ではイネ、コムギ、アワ、ソバ等の穀物が豊かに実り、しかもトウモロコシの栽培には適さない高湿度の気候であったため、食用穀物としては定着しなかった。

また、子実用及び飼料用トウモロコシの栽培面積は第 2 次世界大戦後急速に減少し、現在では大部分を輸入に依存している (トウモロコシの生産と利用,1987)。一方、青刈りのサイレージ用トウモロコシは畜産の急速な増加に伴い需要が増加し、現在では何とか自給している。

また、昭和 23 年頃からトウモロコシを原料とする澱粉工業が興り急速な成長を遂げたのをはじめ、繊維工業、製造工業、食品工業等の加工用途に広く使用されるようになった (転作全書 第三巻, 2001)。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシは小麦、イネと並ぶ三大穀物の一つであり、2003年には全世界で6億3571万tが生産された。その主な生産国は米国(2億5691万t)、中国(1億1418万t)、ブラジル(4747万t)、メキシコ(1965万t)、アルゼンチン(1550万t)、インド(1470万t)、フランス(1162万t)、インドネシア(1082万t)、イタリア(976万t)であった(農林水産統計,2004)。

現在、米国は世界第一位のトウモロコシ生産国であり、インディアナ、オハイオ、イリノイ、アイオワ及びミズーリ州のコーンベルトと呼ばれる地域を中心に栽培されている。

先進国では一般的に雨量が豊富で肥沃な土壌地帯で栽培される(Morris,1998)。大量の技術投入が集中的に行われ、商業生産者が大規模な機械栽培をしている。

一方、開発途上国の状況は様々で、ラテンアメリカの大半の国では小規模単位で栽培されており、メキシコでは半数以上の生産者は技術投入や改良品種も使用していない(OECD,2003)。しかし、ブラジル、アルゼンチン及びチリでは商業生産者が技術投入して大規模栽培をしている点で先進国に似ているところがある。アジアでは、中国が生産の中心であり、収量は米国に次いで第2位だが、一軒あたりの農地は狭く、改良品種の使用や技術投入も少ない(Morris,1998)。

国外におけるトウモロコシの利用として、先進国では、トウモロコシを主に飼料及び産業用製品の原料として利用しており、米国やEUの育種家は、飼料産業向けの農業形質と高果糖コーンシロップ、燃料用アルコール、スターチ、グルコース、デキストロース生産などの産業的遺伝形質に目標を置いている(Tsaftaris,1995)。また、ラテンアメリカの大半の国及びアフリカのサハラ以南では主食であり、アジアでは一般的に家畜の飼料に利用されている(Morris,1998)。

我が国においては、東北地方、長野では早くから機械化が進み、北海道でも戦前は西欧式の畜力プラウ農法であったが戦後すぐに機械化されている(転作全書 第三巻, 2001)。トウモロコシは食品・工業用としても用いられるが、飼料用が圧倒的に多い。2003年の我が国の飼料用の青刈トウモロコシ(デント種)の生産量は456万tであった(農林水産統計, 2004)。また、2003年の飼料用のトウモロコシの輸入量は1257万tであり、輸入元国別では、米国が1166万tで全体の93%を占め、次いで中国61万t、アルゼンチン29万t、ブラジル1万tであった(アグロトレードハンドブック,2004)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

一般に、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る。種子は低温・多湿条件下では発芽遅延を起こし、多くの場合発芽する前に腐敗、枯死する（畑作全書, 1981）。また、成長点が地上に出てから（5～7葉齢）6～8時間以上、0℃以下の冷気にさらされると生存できない（OECD,2003）。

発芽には 10℃以上の温度と適度な水分が必要であるが、トウモロコシはかなり乾燥した条件下でも発芽する。カリフォルニアの乾燥地においてスイート種を用いて行った試験では、土壤の萎凋点（砂土 8.6%、粘土 14.9%）よりわずかに土壤水分が多ければ 80%以上が発芽することが報告されている（転作全書 第三巻, 2001）。

ハ 捕食性又は寄生性

—

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

トウモロコシ粒は穂軸に堅く付き、雌穂全体は苞葉に包まれているため、個々の種子が自然に脱粒して拡散することはない（OECD,2003）。

種子の休眠性は極めて浅く、土壤温度が 10℃に達すると発芽する。子実の寿命は呼吸による酵素活性に影響され、呼吸速度は主として温度と湿度に関係する。相対湿度が 55%以下では呼吸は少ないが、65%を超えると呼吸量が急増し、子実の活力が急減する。子実水分 12%、温度 10℃、相対湿度 55%以内に保たれた条件下では、6～8年保存することが可能である（転作全書 第三巻, 2001）。

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

自然条件下において植物体を再生しうる組織は種子のみである（転作全書 第三巻, 2001）。

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

トウモロコシは本来 100%他家受精の作物種であるが（OECD, 2003）、自家不和合性を持たないため（転作全書 第三巻, 2001）、5%程度の自殖が認められることがある。

交雑可能な近縁野生種としてテオシント属とトリプサカム属があげられる。トウモロコシと一年生テオシントとは生殖的適合性が大きく、稔性の雑種を生み出している (Wilkes,1977)。しかし、テオシントの自生地域はメキシコとグアテマラに限られており (Sanchez-Gonzalez and Ruiz-Corral,1997; OECD,2003)、地理的分離、開花時期、成長特性、生殖器構造などの因子からみても、自然交雑性は低いと考えられる (Doebly,1984)。また、一部のトウモロコシとテオシントの間には不和合性があり、雑種形成が困難である (Evans and Kermicle,2001)。一方、トリプサカム属の種 (*T.dactyloides*, *T.floridanum*, *T.lanceolatum*, *T.pilosum*) はトウモロコシと極めて稀に交雑するが、雑種は生殖不能になる確率が高く、遺伝学的にも不安定である (Mangelsdorf,1974)。また、トリプサカム属とトウモロコシの染色体数が異なることから、交叉率が極めて低下するとの報告がある (Galinat, 1988)。

尚、我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種の存在は確認されていない (井上,1989; Doebly,1990)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの雄穂で作られる花粉の量は 1800 万花粉粒と推測される (Kiesselbach,1980; OECD,2003)。成熟した花粉は直径 90~120 μ m、平均 100 μ m である (転作全書 第三巻, 2001)。花粉は主として風で運ばれる (OECD,2003)。また、花粉源から 200m離れた地点では交雑率は 0.003%となり、交雑の可能性は極めて低くなる (Luna *et al.*,2001)。花粉の寿命は環境によって大きく異なるが、盛夏のほ場条件下では 24 時間以内に生殖能力を失う (転作全書 第三巻, 2001)。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、他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性は報告されていない。

ト その他の情報

—

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

除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis, T14, OECD UI :ACS-ZM002-1) (以下「組換え体トウモロコシ T14」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を参照。

表1 ベクター中の供与核酸の構成、位置、サイズ、由来及び機能

構成要素 (略号)	ベクター中の 位置	サイズ (bps)	由来及び機能
改変型 <i>pat</i> カセット			
P-35S	1746~1217	531	カリフラワーモザイクウイルス由来35S RNAプロモーター。植物中で改変 <i>pat</i> 遺伝子を構成的に発現させる (Odell <i>et al.</i> , 1985)。
改変型 <i>pat</i>	1188~637	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来で、PAT蛋白質をコードしグルホシネート耐性を付与する (Eckes <i>et al.</i> , 1989)。尚、本遺伝子は天然 <i>pat</i> 遺伝子を植物に適合するように改変したものである*。
T-35S	618~412	207	カリフラワーモザイクウイルス由来35S RNAターミネーター。転写を終結させ、転写産物のポリアデニル化を行わせる (Pietrzak <i>et al.</i> , 1986)。
その他			
<i>bla</i>	3783~2923	861	<i>E. coli</i> 由来のアンピシリン耐性遺伝子で、細菌中のみでβ-ラクタマーゼを発現する (Sutcliffe, 1978)。
ori-pUC	2714~2164	551	pUC18の複製起点 (ColE1)。プラスミドの複製を開始させる (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

* *Streptomyces viridochromogenes* から得た天然の *pat* 遺伝子は、植物にあまり見られない多量の G:C (グアニン:シトシン) を含むため、導入された改変型 *pat* 遺伝子は天然の *pat* 遺伝子の配列を植物で使用されるコドンに適合するように改変したものである。また、この改変により生産する酵素のアミノ酸配列は変化していない (Eckes *et al.*, 1989; USDA 1995)。改変型 *pat* 遺伝子の配列構造を図1 (p.8) に示した。

図1 改変型 *pat* 遺伝子塩基配列と天然の *pat* 遺伝子塩基配列の比較

ロ 構成要素の機能

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

組換え体トウモロコシ T14 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表1 (p.7) を参照。

- ② 目的遺伝子及び選択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

【改変型 *pat* 遺伝子】

作物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、植物に除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害され、アンモニアが蓄積し植物は枯死に至る。

一方、改変型 *pat* 遺伝子を導入された植物体では、ホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (PAT) が産生され、この酵素の働きでグルホシネートはアセチル化されて N-アセチルグルホシネートに変化する。これにより、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用は回避され、植物体中にアンモニアは蓄積されず、グルホシネートを散布しても枯死することはない (図2、p.10)。

PAT 蛋白質の人や動物に対する毒性は報告されておらず、GENBANK データベースに登録されている全ての蛋白質のアミノ酸配列との同一性検索において、種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な同一性は示していない (OECD, 1999)。また、PAT 蛋白質の物理化学的、生化学的特性を既知のアレルゲンと比較した結果、本蛋白質がアレルギー誘発性を有する可能性は極めて低いと考えられた (USEPA, 1997)。

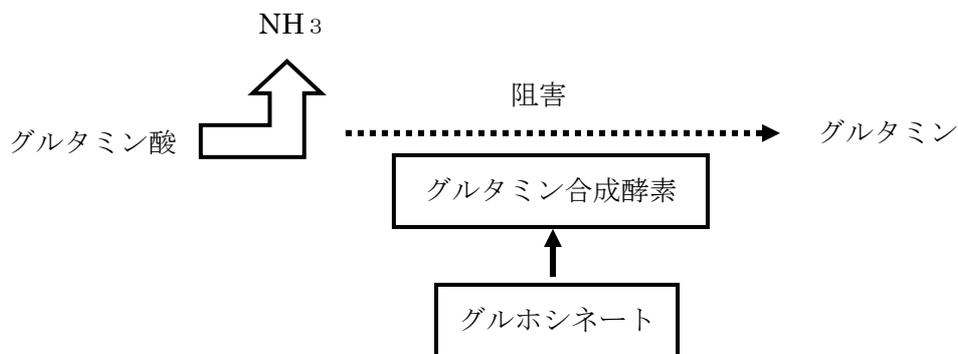
更に、改変型 *pat* 遺伝子配列を EMBL データベース (European Molecular Biology Laboratory, Germany, Release 40.0 1994 年9月) に公表されている全てのヌクレオチドの配列と比較した。また、PAT 蛋白質について、SWISSPROT データベース (Geneva, Switzerland, Release 30.0 from September 1994) により同一性検索を行った。その結果、いずれにおいても種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な同一性は示しておらず、既知のアレルゲンとの同一性は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変型 *pat* 遺伝子が産生する PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない (Thompson *et al.*,1987)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった (Wehrmann *et al.*,1996; OECD,1999)。これらのことから、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の持つ代謝経路への影響はないと考えられる。

A) 通常の植物

除草剤グルホシネートによってグルタミン合成酵素が阻害されるため、アンモニアが蓄積し植物は枯死する。



B) 組換え体植物

PAT 蛋白質により除草剤グルホシネートがアセチル化されて N-アセチルグルホシネートになるため、グルタミン合成酵素は阻害されないようになり、アンモニアが蓄積されず植物は成長を続けることができる。

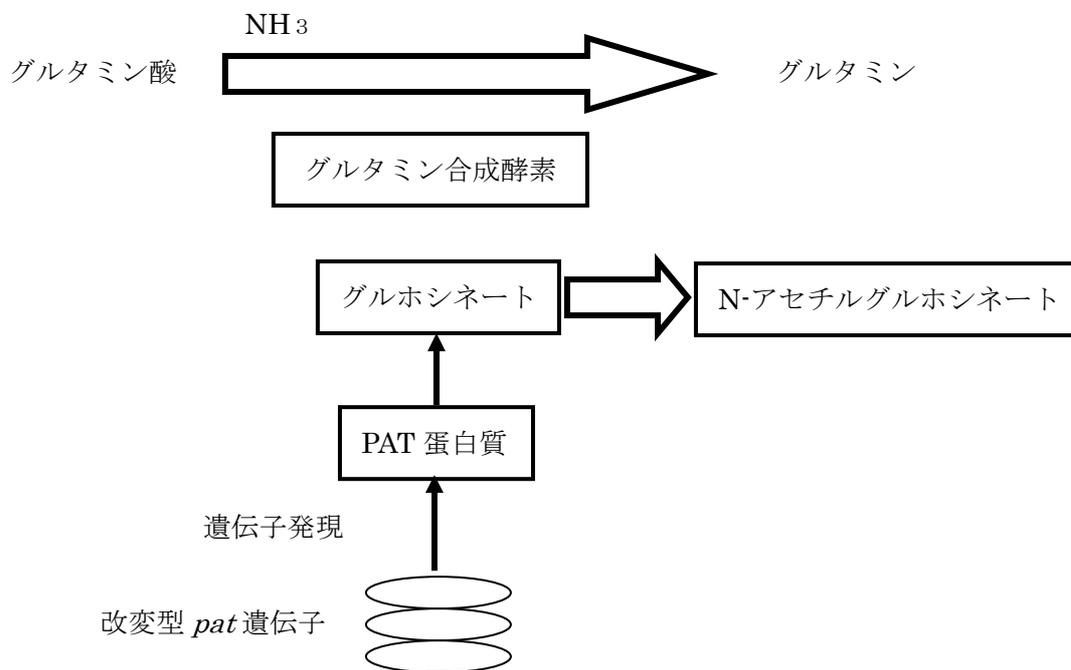


図2 改変型 *pat* 遺伝子産物による除草剤グルホシネート耐性のメカニズム
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

組換え体トウモロコシ T14 の作出に用いられたベクターは、pUC/Ac (Pietrzak *et al.*,1986) である。このベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) K12 株由来の pUC18 から作成された pDH51 の 35S プロモーターとターミネーターの間の Sal I 切断位置に改変型 *pat* 遺伝子を挿入したものである。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

組換え体トウモロコシ T14 の作出に用いた pUC/Ac の全塩基数は 3,983bp である。また、pUC/Ac の塩基配列を別添資料 1 に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

【*bla* 遺伝子】

pUC/Ac はアンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子及び自立的複製の起点となる *ori*-pUC を含む (表 1, p.7)。

bla 遺伝子は大腸菌を用いてベクターを構築する際に選抜マーカーとして用いたが、この遺伝子は植物で機能するプロモーターを持たないため、植物では発現しない。

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

pUC/Ac は伝達性をもたないため、感染性はない。また、pUC/Ac は、自立増殖可能な宿主域が大腸菌と数種のグラム陰性菌に限られていることが知られている。

(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

pUC/Ac 上にある 2 個所の EcoR I 切断部位 (405bp と 1747bp) に挟まれた改変型 *pat* 遺伝子カセット【[P-35S] - [PAT] - [T-35S]】以外の部分は、pDH51 の基となった pUC18 である。pUC/Ac 全体の構成を図 3 (p.12) に示した。

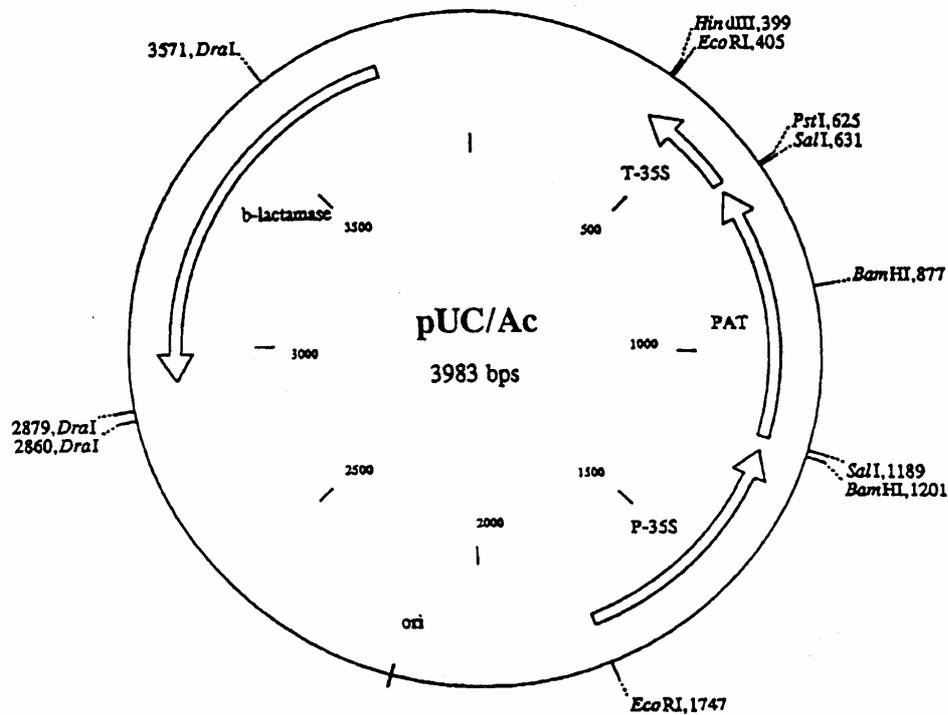


図3 組換え体トウモロコシ T14 の形質転換に用いたベクターpUC/Ac

PAT は改変型 *pat* 遺伝子、b-lactamase は *bla* 遺伝子を示す。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

pUC/Ac を組織培養由来系統 He/89 のプロトプラスト培養溶液と混合し、ポリエチレングリコール法により形質転換を行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

形質転換後、20～50 個のプロトプラストからなる微小コロニーの形成後、0.5mM グルホシネートを含む選択培地に移し、形質転換細胞中よりグルホシネート耐性を示して生育を続けるカルスを選抜した。選抜されたカルスより M6roc et al. (1990) の方法によって植物体に再分化させた。

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

本項目は該当しない。

- 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及び系統樹

再分化させた幼植物体を順化、鉢出し、環境制御温室にて育成した。このようにして得られた組換え体トウモロコシ T14 に、花粉親として非組換え優良近交系統を交配し、導入した遺伝子以外の遺伝的背景がこの優良近交系統と類似する系統群を育成した。

尚、系統樹を図 4 に示した。

【我が国における承認状況】

- 1996 年に農林水産省より「農林水産分野における組換え体利用のための指針」に基づき、隔離ほ場試験の承認が得られた。
- 1997 年 3 月 7 日に農林水産省より「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手続き」に基づき、飼料利用としての安全性が確認された。さらに 2002 年の法制化に伴い再評価が行われ、2003 年 3 月 27 日に安全性が確認された。
- 1997 年 5 月 26 日に厚生省（現 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が確認された。さらに 2000 年の法制化に伴い再評価が行われ、2001 年 3 月 30 日に安全性が確認された。
- 1997 年 12 月 9 日に農林水産省より「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、我が国への輸入（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。

社外秘情報につき非開示

図 4 組換え体トウモロコシ T14 の育成経過

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

改変型 *pat* 遺伝子の導入世代である T14（当代）を戻し交配して育成した BC1 世代を用いて除草剤グルホシネートの散布試験を行ったところ、耐性と感受性個体の割合は 1 : 1 の分離比を示し

た（別添資料 3, p.2, Table.IV.1）。また、組換え体トウモロコシ T14 のゲノム DNA を用いたサザンブロット分析の結果から、移入された核酸が染色体上に挿入されていることが確認された（別添資料 3, p.21）。

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

移入された核酸のコピー数を調べるため、組換え体トウモロコシ T14 から分離したゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析及び種々のプライマーで PCR 解析を行った。その結果、組換え体トウモロコシ T14 の染色体上に 3 コピーのベクター pUC/Ac 由来 DNA が導入されていることが示唆された（別添資料 2, p.7, 図 4）。

この 3 コピーにおいて 35S プロモーターから改変型 *pat* 遺伝子までは遺伝子構成に相違はないが、それ以外の部分に関してはそれぞれのコピーに構成の相違が認められた。[①35S ターミネーターの 5'末端から *bla* 遺伝子の 5'末端までに、比較的小さい欠失があり、*bla* 遺伝子の 3'領域が消失しているコピー]、次に[②35S ターミネーターの 5'末端から *bla* 遺伝子の 5'末端までに比較的大きな欠失があり、*bla* 遺伝子の 3'領域の部分が消失しているコピー]、更に[③35S ターミネーターの 5'末端から *bla* 遺伝子の 5'末端までは欠失がなく完全であり、*bla* 遺伝子内に未知の配列の挿入が推定されるが、*bla* 遺伝子が完全に挿入されているコピー]の存在が確認された。

尚、前述の[③]のコピーにおいて、*bla* 遺伝子内に挿入された未知の配列に関して、シーケンスによりその塩基配列を明らかにした（別添資料 2, p.8, 図 5）。その結果、*bla* 遺伝子配列内の 104bp の配列がタンデムリピート化していた。このリピート化によって *bla* 遺伝子内にナンセンス突然変異が生じたため、この *bla* 遺伝子は機能を失っているものと考えられる。

これらの 3 コピーに含まれる *bla* 遺伝子はいずれも不完全な配列であるため、植物体において機能しないと考えられる。*bla* 遺伝子をプローブとして、組換え体トウモロコシ T14 の葉から抽出した RNA についてノーザンブロット分析を行ったが、*bla* 遺伝子の転写産物は検出されなかった（別添資料 3, p.24, Figure.IV.13, Lane.1）。また、*bla* 遺伝子産物である β -ラクタマーゼ活性に関しても葉、根及び種子から抽出された粗蛋白で ^{14}C 標識ペニシリンを分解する活性測定がなされたが、いずれの組織においても活性は検出限界以下であった（別添資料 3, p.27, Figure.IV.12）。これらのことから、組換え体トウモロコシ T14 において *bla* 遺伝子は機能していないことが確認された。

挿入された核酸の複数世代での安定性を確認するため、組換え体トウモロコシ T14 の当代及び 5 回戻し交配を経た BC5 世代から得た DNA について、サザンブロット分析を行った。この分析では、ゲノム DNA を EcoR I 又は BamH I で切断し、アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンメンブランに移した後に、DNA を ^{32}P 標識改変型 *pat* 遺伝子（552bp Sal I フラグメント）とハイ

ブリダイズさせた。そのハイブリダイズのパターンから世代を経ても変化していないことが示され、挿入された核酸の複数世代での安定性が確認された(別添資料 3, p.21, Figure IV.10, Lane 1~6)。

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

サザンブロット分析及び PCR 解析により 3 コピーの挿入遺伝子がトウモロコシゲノムに導入されたことが示唆されており、推定される構成図を別添資料 2, p.7, 図 4 に示したが、詳細な位置関係は明らかでない。しかし、サザンブロット分析において組換え体トウモロコシ T14 当代と BC5 世代で同じバンドパターンが得られていることから(別添資料 3, p.21, Figure IV.10, Lane 1~6)、各コピーは簡単には分離しない位置関係にあると推定される。

ニ 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

平成 9 年度に北海道農業試験場の隔離温室内において、組換え体トウモロコシ T14 とその対照品種である LH202×LH172 (以下、「非組換え体」とする。)をバットに播種し、発芽・生育した幼植物にグルホシネートを処理した結果、非組換え体は全個体が除草剤の影響を受けて枯死したのに対し、組換え体トウモロコシ T14 は全個体が生存したことが確認された(別添資料 5, p.3, 4)。

組換え体トウモロコシ T14 及びその対照品種として LH82 品種の葉から抽出した全 RNA について、改変型 *pat* 遺伝子をプローブとしてノーザンブロット分析を行った結果、組換え体トウモロコシ T14 において改変型 *pat* 遺伝子の転写産物の存在が確認されたが、非組換え体においては検出されなかった。このことから組換え体トウモロコシ T14 において改変型 *pat* 遺伝子が発現していることが確認された(別添資料 3, p.25, Figure IV.14, Lane.1 及び 3)。

また、1992 年以降に米国で行われた安全性試験において、組換え体トウモロコシ T14 の根、葉、茎、成熟花粉及び成熟種子を用い、各部位における PAT 蛋白質の酵素活性を測定した。その結果、PAT 蛋白質の活性は葉で最も高く、種子中では低く、花粉では検出限界値以下であった。よって、緑色組織において改変型 *pat* 遺伝子が発現し、活性のある PAT 蛋白質が作られていることが確認された(別添資料 3, p.10, Table IV.4)。このことから、35S プロモーターの支配によりこれらの組織において構成的に発現が誘導されていることが示唆された。

さらに、米国において 1993 年に 6 地区、1994 年に 3 地区において組換え体トウモロコシ T14 の栽培が行われ、収穫された。各地区から収穫された組換え体トウモロコシ T14 由来の飼料である牛馬用飼い葉 (forage)、家畜用飼い葉 (fodder)、サイレージ及び穀粒における PAT 蛋白質含量について ELISA 法を用いて測定した。PAT 蛋白質含量は栽培地および年によって変動したが、各

飼料において PAT 蛋白質の存在が確認された（別添資料 3, p.10-11, Table.IV.5）。

以上から、組換え体トウモロコシ T14 の PAT 蛋白質の自然条件下における世代間及び個体間での発現の安定性が確認された。

ホ ウイルス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

組換え体トウモロコシ T14 の作出に使用したベクター上には伝達性に関わる因子は存在しないため、当該ベクターに伝達性はない。

（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

組換え体トウモロコシ T14 に導入されている挿入核酸の周辺配列を利用した 21mer のプライマーを用いた PCR 法によって、組換え体トウモロコシ T14 を特異的に識別することができる。50ng の DNA を用いることで、ほぼ 100%を検出できたことから、組換え体トウモロコシ T14 の種子や植物体が極少量あれば検出及び識別は可能である。反復試験において高い再現性のある結果が得られている（別添資料 6）。

（6） 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

組換え体トウモロコシ T14 は、移入された改変型 *pat* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示す。

ロ 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

平成 9 年（1997 年）に北海道農業試験場にて隔離ほ場試験を行い、組換え体トウモロコシ T14 と非組換え体を比較した（別添資料 5）。

① 形態及び生育の特性

生育調査として、輸入した種子の発芽期及び発芽率、雄穂抽出期、雄穂開花期、絹糸抽出期、収穫日、収穫時熟度、倒伏、すす紋病、ごま葉枯病発生率について平均値において比較した。そ

の結果、輸入した種子の発芽率は、非組換え体は97%に対し組換え体トウモロコシ T14 は79%で、組換え体トウモロコシ T14 が劣っていた。また、絹糸抽出期が非組換え体に比べやや遅く、熟度の進みもやや遅い傾向が認められた。その他の項目に関しては、同等であった（別添資料 5, p.2, 表 1）。

収穫時調査として、稈長、着雌穂高、稈径、全葉数、葉長、葉幅、着穂葉位、不稔個体割合、穂芯長、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数について比較した。その結果、平均値において、いずれも同等又は組換え体トウモロコシ T14 がやや低い値を示す傾向が見られた（別添資料 5, p.2, 表 2）。

収量調査として、生収量【茎葉、雌穂、総体 (kg/10a)】、乾物収量【茎葉、雌穂、子実、総体 (kg/10a)】、乾物率【茎葉、雌穂、総体 (%)】、乾雌穂重割合及び百粒重について比較した。その結果、全ての項目において、組換え体トウモロコシ T14 は非組換え体より低い傾向が見られた（別添資料 5, p.2, 表 3）。

② 生育初期における低温耐性

植物体の生育初期における低温耐性に関する試験は行っていない。しかし、種子の低温耐性については試験を行ったため、参考とした。多湿土壌条件のワグネルポットに組換え体トウモロコシ T14 及び非組換え体の種子を各 150 粒（50 粒×3 反復）埋込み、-0.2℃で 82 日間低温処理後、25℃で 7 日間発芽を調査した。その結果、組換え体トウモロコシ T14 は 0%、非組換え体は 1.3%で、非組換え体に僅かに発芽する種子が認められたものの、いずれも種子の低温耐性は極めて低かった（別添資料 5, p.2, 表 1）。

③ 成体の越冬性

本項目の試験は行っていない。

④ 花粉の稔性及びサイズ

組換え体トウモロコシ T14 に付与された形質は除草剤グルホシネート耐性のみであり、交雑する近縁野生種が存在しないことから、本項目の試験は行っていない。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する項目として、乾物収量（子実）及び百粒重について比較した結果、い

ずれについても平均値において組換え体トウモロコシ T14 が非組換え体より少ない傾向を示した（別添資料 5, p.2, 表 3）。

トウモロコシ粒は穂軸に堅く付き、雌穂全体は苞葉に包まれているため、個々の種子が自然に脱粒して拡散することはない（OECD,2003）。また、組換え体トウモロコシ T14 及び非組換え体の種子は、いずれも穂軸にしっかりと付いて苞葉に包まれていたことを確認しており、脱粒性は極めて低いと考えられた。

我が国の隔離ほ場では、栽培した植物体から収穫した種子を用いた発芽率及び休眠性の試験は行っていないため、1994 年に米国の 2 ヶ所で行われた試験結果を参考とした。組換え体トウモロコシ T14 と非組換え体の収穫種子の発芽率は 92.7～96.3%といずれも極めて高かった（別添資料 4, p.2, 表 I）。

休眠性については試験を行っていないが、米国におけるこれまでのほ場試験及び栽培経験において、組換え体トウモロコシ T14 が高い休眠性を示すことは報告されていない。尚、トウモロコシの休眠性は極めて浅く、温度が 10℃以上であればかなり乾燥した条件下でも発芽することが報告されている（転作全書 第三巻、2001）。また、トウモロコシ種子は低温・多湿条件下では発芽遅延を起し、多くの場合発芽する前に腐敗、枯死することが知られている（畑作全書, 1981）。

⑥ 交雑率

我が国において交雑可能な近縁野生種は生育していない。従って、交雑率の試験は行っていない。

⑦ 有害物質の産生性

本項目の試験は行っていないが、組換え体トウモロコシ T14 が我が国において生育する可能性は、栽培用種子に混入して輸入されたものが栽培されるか、又は運搬の途中でこぼれ落ち、発芽、生育する場合が考えられる。しかし、組換え体トウモロコシ T14 は 1999 年を最後に栽培が中止されてから 5 年以上経過しており、今後も栽培されることはないことから、輸入する栽培用種子に混入する可能性は極めて低いと考えられる。また、トウモロコシは人が介在することなしには生存できない（OECD,2003）ため、仮に意図しない混入があり、運搬の途中でこぼれ落ちたとしても、自生することは考え難い。さらに、米国におけるほ場試験及びこれまでの商業栽培の経験においても、組換え体トウモロコシ T14 が有害物質を産生したとする報告はされていない。これらのことから、有害物質の産生性による影響が生ずる可能性はないと判断した。

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、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

尚、今後我が国及び海外のいずれにおいても、組換え体トウモロコシ T14 の栽培が行われることはない。

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

緊急措置計画書を参照。

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

平成9年（1997年）に北海道農業試験場にて隔離ほ場試験を行った（別添資料5）。

(6) 国外における使用等に関する情報

組換え体トウモロコシ T14 の商業栽培のための種子生産は1996年に米国で開始され、1997年に終了した。組換え体トウモロコシ T14 の商業栽培が行われたのは1997年から1999年の3年間であったが、1998年冬及び1999年春に種子の買戻しを実施し、回収された種子は全て焼却処分した。組換え体トウモロコシ T14 は契約栽培を行っていたため、販売した種子は極めて高い確率で回収されたと考えられる。また、種子生産は1997年に終了しており、仮に農家が1999年以降も種子を保持していたとしても、時間の経過に伴い種子の品質は劣化するため、商業栽培に使用す

るとは考えられず、農家にとって買戻しに応じない利点は見出せない。

商業的栽培の最終年の1999年における組換え体トウモロコシ T14 の作付け面積は、米国のトウモロコシ全作付け面積の0.06%であった。また、組換え体トウモロコシ T14 の商業栽培は米国においてのみ行われ、収穫された穀粒は全て米国内で使用され海外に輸出されることはなかった。また、2000年以降組換え体トウモロコシ T14 の作付けはいずれの国においても全く行われておらず、現在種子は廃棄されて存在しないため、将来において作付けされる可能性はない。さらに、1998年以降は種子生産も行われていないため、いずれの国においても、組換え体トウモロコシ T14 の商業栽培、販売及び流通が行われることはない。

国外における承認状況（表2）及び組換え体トウモロコシ T14 の作付け総面積とその生産量（表3）を表に示した。尚、我が国においては2, (3), ハ, ③に記した通り、1997年3月7日に農林水産省より飼料利用としての安全性について、また、1997年5月26日に厚生省（現 厚生労働省）より食品利用としての安全性についてそれぞれ確認されている。

表2 国外における組換え体トウモロコシ T14 の承認状況

国名	承認機関	承認時期	承認内容
米国	米国農務省 (USDA)	1995年6月	環境安全確認
	連邦食品医薬品局 (FDA)	1995年12月	食品・飼料安全
カナダ	カナダ農業食品局	1996年5月	環境安全確認
		1997年3月	飼料安全
	カナダ厚生省	1997年4月	食品安全

表3 米国における組換え体トウモロコシ T14 の作付け総面積とその生産量

年	トウモロコシ全作付け面積(ha) ¹⁾	T14の作付け面積概算値(ha) ²⁾	トウモロコシ全生産量(トン) ¹⁾	T14の生産量概算値(トン) ³⁾
1997	29,409,000	88,227	233,867,008	745,518
1998	29,376,000	⁴⁾ 117,504	247,882,000	992,909
1999	28,525,000	16,187	239,548,992	136,780
小計 (1997-1999)	87,310,000	221,918	721,298,000	1,875,207
2000	29,316,000		251,854,000	
2001	27,845,910		241,484,864	
2002	28,050,280		228,805,088	
2003	28,789,240		256,904,560	
総計 (1997-2003)	201,311,430	221,918	1,700,346,512	1,875,207

1) FAOSTAT (<http://apps.fao.org/faostat>)

2) 作付けられたトウモロコシが、全て収穫されたと仮定した場合の概算の作付け面積のヘクタールデータをヘクタール値に換算した。

3) 1997年から2003年のトウモロコシ全作付け面積の総計と全生産量の総計から換算したヘクタール当たりの収穫量(8.45ト/ha)を、T14の作付け面積の概算値に掛けて算出した値である。

4) 当該年度の作付け面積のデータはないが、トウモロコシ作付け面積の多くても0.4%の割合で作付けされたという情報に基づき推定した値である。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

尚、米国において飼料用としての安全性は確認されているが、食品としての安全性が確認され

ていない遺伝子組換え体トウモロコシであるスターリンクについて、2000年に我が国において食品から検出されたとの指摘を受け、同年に米国において回収を実施し、さらに2000年4月輸入分から、農林水産省肥飼料検査所（現 独立行政法人 肥飼料検査所）においてスターリンクの飼料用トウモロコシへの混入について検査を開始した。その結果、調査開始から3年が経過した2003年の下半期では検査した全ての検体で混入は見られなかった（別添資料7: 組換え体利用飼料の検査結果について）。

2000年の米国におけるスターリンクの作付け面積は137,960 ha（米国におけるトウモロコシ作付け総面積の0.43%）であった【別添資料7: スターリンクコーン（飼料用）に関する対応について】。一方、組換え体トウモロコシT14は1998年及び1999年の作付け面積を合計しても133,691 ha（米国における1999年のトウモロコシ全作付け面積の0.47%）であり、2000年のスターリンクの作付け面積と同等である。さらに、組換え体トウモロコシT14はスターリンクより1年前に回収されている。以上から、組換え体トウモロコシT14の我が国への混入はスターリンクの混入率を下回ることが推定され、今後はさらに低下すると考えられる。

第二 項目ごとの生物多様性影響評価

宿主が属する分類学上の種であるトウモロコシ（*Zea mays subsp.mays* (L.) Iltis）は、我が国において長期にわたる使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、宿主と相違が見られた点について考慮することとする。

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

競合における優位性に関する形質として、形態及び生育の特性、種子の低温耐性、種子の生産量及び脱粒性について、隔離ほ場において組換え体トウモロコシT14と非組換え体とを比較した（別添資料5）。また、我が国では隔離ほ場において栽培された植物体から収穫した種子の休眠性及び発芽率の調査は行っていないため、米国において行われた試験結果を参考とした（別添資料4, p.2, 表I）。

形態及び生育の特徴に関する形質として、生育調査【発芽期、発芽率、雄穂抽出期、雄穂開花期、絹糸抽出期、収穫日、収穫時熟度、倒伏、すす紋病、ごま葉枯病発生率】（別添資料5, p.2, 表1）、収穫時調査【稈長、着雌穂高、稈径、全葉数、葉長、葉幅、着穂葉位、不稔個体割合、穂芯長、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数】（別添資料5, p.2, 表2）、収量調査【生収量、乾物収量、乾物率、乾雌穂重割合、百粒重】（別添資料5, p.2, 表3）について、平均値において比較した。その結果、組換え体トウモロコシT14は、生育調査において、本試験のために輸入された種子の発芽率が非組換え体に比べてやや低く、絹糸抽出期及び熟度の進みもやや遅い傾向が認められた（別添資料5, p.2, 表1）。また、収穫時調査では、平均値において、いずれの項目も同等又は組換え体トウモロコシT14がやや低い値を示す傾向が見られた（別添資料5, p.2, 表2）。さらに、収量調査

では、全ての項目において組換え体トウモロコシ T14 は非組換え体より低い傾向が認められた（別添資料 5, p.2, 表 3）。また、種子の生産量に関する形質である子実の乾物収量及び百粒重について組換え体トウモロコシ T14 は非組換え体より低い値を示し、種子の生産量は非組換え体に劣る傾向が見られた。このように、組換え体トウモロコシ T14 は非組換え体と比較して一部に差がみられているが、これらの差によって競合における優位性を高めることは考えられない。

また、種子の低温耐性試験では組換え体トウモロコシ T14 種子の発芽は認められず、非組換え体で僅かに発芽する種子が認められたものの、種子の低温耐性は同等であると考えられた（別添資料 5, p.2, 表 1）。脱粒性についても両者に相違がないことが隔離ほ場において確認されている。尚、米国で行われた試験においても、組換え体トウモロコシ T14 と非組換え体の種子の発芽率はいずれも同等であった。また、米国におけるこれまでのほ場試験及び商業栽培の経験において、組換え体トウモロコシ T14 の種子が高い休眠性を示すことは報告されていない。

従って、組換え体トウモロコシ T14 は種子の生産量、脱粒性、発芽率及び休眠性に関して、競合において優位に作用することはないと考えられる。

また、組換え体トウモロコシ T14 は改変型 *pat* 遺伝子の発現により除草剤グルホシネート耐性を示すが、除草剤グルホシネートが散布されることが想定し難い自然条件下において、本形質が競合において優位に作用することは考え難い。

以上から、競合における優位性に関して、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の判断

以上から、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

2 有害物質の産生性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

組換え体トウモロコシ T14 は改変型 *pat* 遺伝子産物である PAT 蛋白質を新たに生産するが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しているため、基質である L-グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考えられない。従って、PAT 蛋白質がトウモロコシの代謝経路に影響して野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質を産生する可能性はないと考えられる。

また、本酵素の人や動物に対する毒性は報告されておらず、GENBANK データベースに登録されている全蛋白質配列との相同性検索において、種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示していないことが確認されている (OECD,1999)。更に、改変型 *pat* 遺伝子配列を EMBL データベースに公表されている全てのヌクレオチドの配列と比較した。また、PAT 蛋白質について、SWISSPROT データベースにより相同性検索を行った。その結果、いずれにおいても種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示しておらず、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

尚、組換え体トウモロコシ T14 は 1997 年から 3 年に渡り商業栽培の経験があるが、これまでに野生動植物等に影響を及ぼすような有害物質の産生性は報告されていない。また、組換え体トウモロコシ T14 は 1999 年を最後に栽培が中止されてから 5 年以上経過しており、今後も栽培されることはない。よって、我が国において生育するとすれば、極めて低い確率で栽培用種子に混入したものが栽培されるか、又は、運搬の途中でこぼれ落ち、発芽する場合に限られる。しかし、組換え体トウモロコシ T14 の種子生産は 1997 年に終了しており、さらに 1998 年冬及び 1999 年春には販売した栽培用種子の買戻しを実施しているため、輸入する栽培用種子に混入する可能性は極めて低いと考えられる。また、トウモロコシは自然環境下において人の介入なしには生存できないため (OECD,2003)、仮に意図せず混入し、運搬の途中でこぼれ落ちたとしても、自生することは考え難い。これらのことから、有害物質の産生性による生物多様性影響が生ずる可能性はないと判断した。

以上から、有害物質の産生性に関して、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の判断

以上から、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

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

我が国において、トウモロコシと交雑可能な近縁野生種は存在しない。よって、交雑性に関して、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の判断

以上から、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4 その他の性質

その他に、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組換え体トウモロコシ T14 の形質はないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

トウモロコシは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、これまでに自然環境下で自生した例は報告されていない。また、トウモロコシが我が国の生物多様性に影響を及ぼしたとする報告もない。

競合における優位性に関する形質として、形態及び生育の特性、種子の低温耐性、種子の生産量及び脱粒性について、隔離ほ場において組換え体トウモロコシ T14 と非組換え体を比較した。また、隔離ほ場では、栽培された植物体から収穫した種子の発芽率の調査を行っていないため、この形質については米国において行われた試験結果を参考とした。これらの試験の結果、形態及び生育の特性、種子の低温耐性及び種子の生産量に関して、組換え体トウモロコシ T14 は平均値において全体的に非組換え体よりも低い傾向が認められた。しかし、これらの差によって組換え体トウモロコシ T14 が競合における優位性を高める可能性は考えられない。尚、米国における試験では、組換え体トウモロコシ T14 と非組換え体の種子の発芽率はいずれも同等であり、これまでの米国におけるほ場試験及び商業栽培の経験において、組換え体トウモロコシ T14 の種子が高い休眠性を示すことは報告されていない。

また、組換え体トウモロコシ T14 は改変型 *pat* 遺伝子の発現により除草剤グルホシネート耐性を示すが、除草剤グルホシネートが選択圧とならない自然条件下では競合において優位性を高めるとは考えられない。

従って、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

組換え体トウモロコシ T14 に導入された改変型 *pat* 遺伝子により産生される PAT 蛋白質は、高い基質特異性を有しているため、宿主であるトウモロコシの代謝経路に影響して野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質を産生する可能性はないと考えられる。また、PAT 蛋白質の人や動物に対する毒性も報告されておらず、米国でのほ場試験及び 3 年間の商業栽培においても、これまでに有害物質の産生性は報告されていない。さらに、トウモロコシは自然環境下において人の介入なしに生存できないため、仮に意図せず混入し、運搬の途中でこぼれ落ちたとしても、自生することはないと考えられる。

従って、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

また、我が国においてトウモロコシと交雑性のある近縁野生植物等はなく、交雑性に起因して生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

尚、組換え体トウモロコシ T14 は 1997 年から 1999 年にわたり、総計で約 22 万 ha の栽培が米国において行われたが、1998 年冬と 1999 年春に組換え体トウモロコシ T14 の栽培用種子の買戻しを行い、回収した種子は全て焼却処分した。また、2000 年以降はいずれの国においても栽培は行われていない。従って、組換え体トウモロコシ T14 の穀粒が混入して輸入される可能性は極めて低いと考えられる。また、年月を経るごとにその可能性はさらに低くなるものと推測される。

また、我が国に輸入されるトウモロコシ栽培用種子の生産は、他の種類の花粉交雑による汚染をさけるため一般のトウモロコシから隔離して栽培され、他品種の汚染がないように管理されている。従って、このように隔離して栽培される栽培用種子の生産過程において組換え体トウモロ

コシ T14 が混入する可能性は極めて低いと考えられる。

尚、今後我が国において組換え体トウモロコシ T14 の栽培を行う予定はない。また、組換え体トウモロコシ T14 を他社にライセンスすることはない。

以上のことから総合的に評価し、組換え体トウモロコシ T14 を第一種使用規程に従って使用した場合、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

引用文献

アグロトレードハンドブック (2004) ジェトロ

Beadle, G.F. (1986) The origin of corn. *Scientific American* 254(8): 80-86.

de Wet, J.M.J. and J.R. Harlan (1972) Origin of maize. The tripartite hypothesis. *Euphytica* 21: 271-279.

Doebley, J.F. (1984) Maize Introgression into Teosinte—a Reappraisal. *Annals Missouri Botanical Gardens* 71: 1100-1113

Doebley, J. (1990) Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience* 40(6):443-448

Doebley, J. and A. Stec. (1991) Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129: 285-295.

Eckes, P., Vijtewaal, B., Donn, G. (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricine in plants. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 13D:334

Evans, M.M.S. and J.L. Kermicle. (2001) Teosinte crossing barrier1, a locus governing hybridization on teosinte with maize. *Theor. Appl. Genet.* 103:259-265.

Galinat, W.C. (1977) The origine of corn. In: G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). *Corn and Corn Improvement*. Amer. Soc. Agron. Madison, WI. Pp 1-47.

Galinat, W.C. (1988) The origin of corn. In: G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). *Corn and Corn Improvement*. Agronomy Monographs No. 18. American Society of Agronomy, Madison, WI. pp. 1-31.

Goodman, M.M. (1988) The history and evolution of maize. *CRC Critical Rev. Plant Sci.* 7(3):197-220.

Goodman, M.M. and W.L. Brown. (1988) Races of corn. In: G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). *Corn and Corn Improvement*. Agronomy Monographs No. 18. American Society of Agronomy: Madison, WI. pp. 33-79.

Harlan, J.R. (1992) *Crops and man*. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Madison, WI. USA. 284 pp. Second edition.

畑作全書 雑穀類 農文協編 (1981)

Iltis, H.H. and J.F. Doebley (1980) Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. Amer. J. Bot. 67(6): 994-1004.

井上康昭 (1989) 長大型飼料作物 トウモロコシ. 植物遺伝資源集成 2. pp.620-634 松尾孝嶺監修. 講談社

Kato, Y., T.A. (1984) Chromosome morphology and the origin of maize and its races. Evol. Biol. 17: 219-253.

Kato, Y., T.A. and A. López R. (1990) Chromosome knobs of the perennial teosintes. Maydica 35: 125-141.

Kiesselbach, T.A. (1980) The structure and reproduction of corn. Reprint of the 1949, Research Bulletin No.161 from the Agricultural Experiment Station, University of Nebraska Press. Lincoln, NE.p.93.

Luna, S.V., J.Figueroa M., B.baltazar M., R.Gomez L., R.Townsend and J.B.Schoper (2001) Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. Crop Science 41:1551-1557

MacNeish, R.S. (1964) The Origins of New World Civilization, Scientific American, Vol.211.

Mangelsdorf, P.C. (1974) Corn Its Origin, Evolution and Improvement. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

Mangelsdorf, P.C. (1986) The origin of corn. Scientific American (August issue)pp.80-86.

Mangelsdorf, P.C. and R.G. Reeves (1939) The origin of Indian corn and its relatives. Texas Agric. Expt. Sta. Bull. 574

Mórocz, S., Donn, G., Nemeth, J., Dudits, D. (1990) An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. Theoretical and Applied Genetics 80:721-726.

Morris, M.L. (1998) Overview of the world maize economy. In: M.L.Morris(ed.). Maize Seed Industries in Developing Countries. Lynne Rienner Publishers, Inc. and CIMMYT, Int.pp. 13-34.

農林水産統計 (2004) 農林水産省統計部

Odell J.T., Nagy F, Chua N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* Vol. 313 (6005):810-2

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

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

Pietrzak,M., Shillito, D.S., Hohn, T., Potrykus, I. (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Research* 14:5857-5868.

Sánchez-González, J.J. and J.A., Ruiz-Corral. (1997) Distribución del teocintle en México. In: J.A. Serratos, M.C. Willcox and F. Castillo (eds.). Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico. CIMMYT, México, D.F.

Smith, B.D. (1995) The emergence of Agriculture. Scientific American Library, New York. 231 pp.

Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.75, No.8,pp,3737-3741.

Thompson, C.J., Rao movva, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J., Lauwereys,M., Gotterman, J. (1987) Characterization of the herbicide resistance gene bar from streptomyces hygrosopicus. *The EMBO Journal*, 6,2519-2523

転作全書 第三卷 雑穀 (2001) 農文協

Timothy, D.H., C.S. Levings III, D.R. Pring, M.F. Conde and J.L. Kermicle. (1979) Organelle DNA variation and systematic relationships in the genus *Zea*: Teosinte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9): 4220-4224.

トウモロコシの生産と利用 (1987) 菊池一徳 著 株式会社 光琳

Tsaftaris,A.S. (1995) The biology of maize (*Zea mays*,L.). Document XI/754/95 European Commission.

United States Department of Agriculture. (1995) Environmental Assessment and Determination of Non-regulated Status – Petition Number 94-357-01P (for glufosinate resistant corn).

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1997a) Phosphinothricin Acetyltransferase and the Genetic Material Necessary for Its Production in All Plants-Exemption from the Requirement of a Tolerance on All Raw Agricultural Commodities. Federal Register: April 11,1997,Volume 62,No.70pp,17717-17720

Vavilov, N.I. (1951) The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated from the Russian by K. Starr Chester. The Ronald Press Co. New York. 94 pp.

Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A. (1996) The Similarities of *bar* and *pat* Gene Products Make Them Equally Applicable for Plant Engineers. Nature Biotechnology. 14:1274-8.

Wellhausen,E.J., L.M.Robert, and E.Hernandez X. (1952) Races of maize in Mexico. Bussey Inst., Harvard Univ., Cambridge.

Wilkes,H.G. (1977) Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. Economic Botany 31:245-293

Yanisch-Perron,C.,Vieira, J. and Mseeing,J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sezuences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33(1):103-19

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 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪四丁目 10 番 8 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*pat, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis)、(T14, OECD UI :ACS-ZM002-1) (以下、「組換え体トウモロコシ T14」とする。)の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合とは、組換え体トウモロコシ T14 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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は組換え体トウモロコシ T14 穀粒の我が国への輸入業者、我が国において組換え体トウモロコシ T14 穀粒を配給した業者、輸入した組換え穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記

2で明らかにした組換え体トウモロコシT14穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて組換え体トウモロコシT14穀粒を我が国に配給している、又はその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれの確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、組換え体トウモロコシT14を不活性化する措置か、さもなくば組換え体トウモロコシT14の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出された組換え体トウモロコシT14の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的に正当性のある評価に基づき、組換え体トウモロコシ T14 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

別添資料の一覧

- 別添資料 1 : プラスミド pUC/Ac の塩基配列 (社外秘情報につき非公開)
- 別添資料 2 : 組換え体トウモロコシ T14 に移入された核酸の複製物のコピー数について (社外秘情報につき非公開)
- 別添資料 3 : Molecular Characterization of Transformation Events T14 and T25 (社外秘情報につき非公開)
- 別添資料 4 : グルホシネート耐性トウモロコシ品種 T14 及び T25 の農業的特性及び組成分析 (社外秘情報につき非公開)
- 別添資料 5 : 遺伝子組換えトウモロコシの隔離圃場における野外試験報告書 (社外秘情報につき非公開)
- 1 目的
 - 2 試験方法
 - 1) 供試材料
 - 2) 播種期
 - 3) 試験設計
 - 4) 調査方法
 - 3 試験経過の概要
 - 1) 気象の概要
 - 2) 生育の概況
 - 4 試験成績
 - 5 結果及び考察
- 別添資料 6 : イベント識別方法 (社外秘情報につき非公開)
- 別添資料 7 : 「組換え体利用飼料の検査結果について (農林水産省・安全局)」及び「スターリンクコーン (飼料用) に関する対応について (畜産局流通課)」

「組換え体利用飼料の検査結果について」

平成 16 年 6 月 23 日 農林水産省消費・安全局 プレスリリース
http://www.maff.go.jp/www/press/cont2/20040623press_5.pdf

「スターリンクコーン (飼料用) に関する対応について」

平成 12 年 11 月 8 日 畜産局流通飼料課 プレスリリース
<http://www.maff.go.jp/work/001108tikusan-1.pdf>