

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.) Ittis)(MON87427, OECD UI: MON-87427-7)
に関する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.....	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性.....	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	5
ハ 捕食性又は寄生性.....	5
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	5
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.....	6
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じる特性を有する場合はその程度.....	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	6
ホ 病原性.....	7
ヘ 有害物質の産生性.....	7
ト その他の情報.....	7
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	7
(1) 供与核酸に関する情報	10
イ 構成及び構成要素の由来.....	10
ロ 構成要素の機能.....	14
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.....	14
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.....	16
(2)	ベクターに関する情報.....	17
	イ 名称及び由来.....	17
	ロ 特性.....	17
	① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	17
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	17
	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
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	18
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	18
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	18
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	18
	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.....	18
	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
(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.....	21
	① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	21
	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
	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.....	22
	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
	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 動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及 び程度.....	25
(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.....	25
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	25
	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.....	25
	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.....	30
	a 形態及び生育の特性.....	30
	b 生育初期における低温又は高温耐性.....	30
	c 成体の越冬性又は越夏性.....	31
	d 花粉の稔性及びサイズ.....	31
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	31
	f 交雑率.....	32
	g 有害物質の産生性.....	32
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	32
	(1) 使用等の内容.....	32
	(2) 使用等の方法.....	33
	(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.....	33
	(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.....	33
	(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.....	33
	(6) 国外における使用等に関する情報.....	34
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	35
	1 競合における優位性.....	35
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	35
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	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
	2 有害物質の産生性.....	36
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	36
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	37
	(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
	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.....	38
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	38
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	38
	4 その他の性質.....	38
第三	生物多様性影響の総合的评价.....	39
参考文献	41
緊急措置計画書	48

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 6 月 17 日

農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 松本 龍 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 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 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.) Ittis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7)
遺伝子組換え生物 等の第一種使用等 の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物 等の第一種使用等 の方法	—

生物多様性影響評価書

第一 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

① 和名、英名及び学名

10

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.) Ittis

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は【社外秘につき非開示】×HiIIである。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

原産地については決定的な説はなく、米国の南西部、メキシコ、中米及び南米にかけての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 (OECD, 2003)。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

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

30

トウモロコシの栽培起源は今から 9,000 年前とされている (OECD, 2003)。その後、人類の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 1500 年~200 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが出現し、メキシコ、メソアメリカの地から南北アメリカ大陸の各地に伝播した。長い栽培の歴史の中でフリント、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。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 (菊池, 1987)。

35

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5 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 (OECD, 2003; 菊池, 1987)。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 (OECD, 2003; 丸山, 1981)。

10 国連食糧農業機関 (FAO) の統計情報に基づくと、2009 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4,000 万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,246 万 ha、中国が 3,048 万 ha、ブラジルが 1,379 万 ha、インドが 840 万 ha、メキシコが 720 万 ha、インドネシアが 425 万 ha、フィリピンが 268 万 ha となっている (FAOSTAT, 2010)。

15

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは、統計上の分類では、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2010 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 2,200 ha で、収穫量は約 464 万トンであり(農林水産省, 2011)、2009 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,500 ha で、収穫量は約 23 万 5,900 トンである (農林水産省, 2010)。

20

わが国は 2010 年に海外から約 1,618 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 1,132 万トン、食品・工業用として約 486 万トン、そして栽培用として約 2,407 トンである。なお、栽培用トウモロコシのわが国への輸入量で上位 3 カ国を挙げると、フランスが 941 トン、ニュージーランドが 339 トン、チリが 301 トンとなっている (財務省, 2011)。

25

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。北海道から九州に至る慣行播種期は、4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 10 a 当たり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い (瀧澤, 1981)。

30

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、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) であるため、

35

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) 生理学的及び生態学的特性

5 イ 基本的特性

—

10 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

10

トウモロコシ種子の発芽の最低温度は 10~11°C、最適温度は 33°C とされている。実際に播種されるのは 13~14°C 以上である (中村, 2001a)。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、トウモロコシは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 (菊池, 1987; 瀧澤, 1981)。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、早生種ほど鈍感である (柿本ら, 2001)。これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の 1.6 ~ 2.0 倍になったときに幼根 (初生根または種子根) が抽出し、子実発芽となる (戸澤, 2005)。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 (千葉, 1980)。

20

現在のトウモロコシは長期の栽培作物化により作られた作物であるため、自然条件下における自生能力を失っている (OECD, 2003)。

25 ハ 捕食性又は寄生性

25

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

30 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。トウモロコシは長い間栽培植物として利用されてきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、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 (OECD, 2003)。種子の休眠性は知られていない。また、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達し、適度な水分条件を伴うまで

発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987; 中村, 2001a)。また、トウモロコシは仮に発芽しても、生長点が地上に出た後、6~8時間以上 0°C 以下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12%、温度 10°C、相対湿度 55%以内に保つことが必要である (OECD, 2003; 中村, 2001a)。

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。

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じる特性を有する場合はその程度

15 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、95~99%は他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家受粉も可能である (OECD, 2003; 千藤, 2001; 農学大辞典編集委員会, 1987)。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.) Iltis 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。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントの分布地域はメキシコからグアテマラにかけてであり、*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、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラに大きく三分されている (柿本, 1981)。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。

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1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 (柿本ら, 2001; 中村, 2001b)。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、環境により大きく異なる (中村, 2001b)。花粉の1粒当たりの重量は約 3.4×10^{-7} g であり (松井ら, 2003)、球形で直径は90~100 μm である (Raynor et al., 1972)。トウモロコシは風媒による受粉が主で

あり、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 (OECD, 2003)。また、トウモロコシの花粉は風により飛散するが、隔離距離は、林、高層建築物などの遮蔽物の有無などにより異なり、200~400m とされている (千藤, 2001)。

5

ホ 病原性

—

10 へ 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

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が自然条件下で自生した例は報告されていない。

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.) *litis*) (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 (表 3, p24; 別添資料 2 の Table 1, p17, Table 2, p18 及び Table 3, p19)。本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、雄性生殖組織であるタペート細胞及び小孢子においては発現しないか、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 3, p24; 別添資料 2 の Table 1, p17, Table 2, p18

及び Table 3, p19)。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 (Goldberg et al., 1993; Huang et al., 2009)、小孢子は細胞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 (Goldberg et al., 1993)。

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では改変 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) 頃から 13 葉期 (V13) 頃にかけて散布すると、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 4, p27; 表 5, p29; 図 5, p27)。
10 通常、雄穂は 8 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 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が発達する時期に除草剤グリホサートが確実に散布されるように、8
15 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 頃にかけて、2 回の散布を推奨している。また、本組換えトウモロコシの栄養組織及び雌性生殖組織は改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現しているため (表 3, p24; 別添資料 2 の Table 1, p17, Table 2, p18 及び Table 3, p19)、これらの組織が除草剤グリホサート散布の影響を受けることはない。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 (p9) 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。
20

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。
25

一般的に、種子親の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、従来の除雄作業の場合、純度の高いハイブリッド種子を生産するには、その作業を短時間で行わなければならない。そのうえ、除雄作業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作業を行わなければならない。多大な労働力が必要である。
30

ハイブリッド種子を生産するためのもう 1 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が必要となり、雄性不稔の遺伝子と環境条件によっては、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
35

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。

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、より効率的なハイブリッド種子生産が可能となる。また、除草剤グリホサートの散布によって除雄が行える時期は、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。

さらに、現在行われている除草剤グリホサートの雑草防除のための農薬使用基準表示の散布適期である初期栄養生長期に、除草剤グリホサートを散布することで、雑草防除を行うことができる。その理由は、この散布時期ではトウモロコシは初期栄養生長期であり、雄性生殖組織がまだ発達しておらず、除草剤グリホサート散布が本組換えトウモロコシの花粉形成には影響を与えないためである。

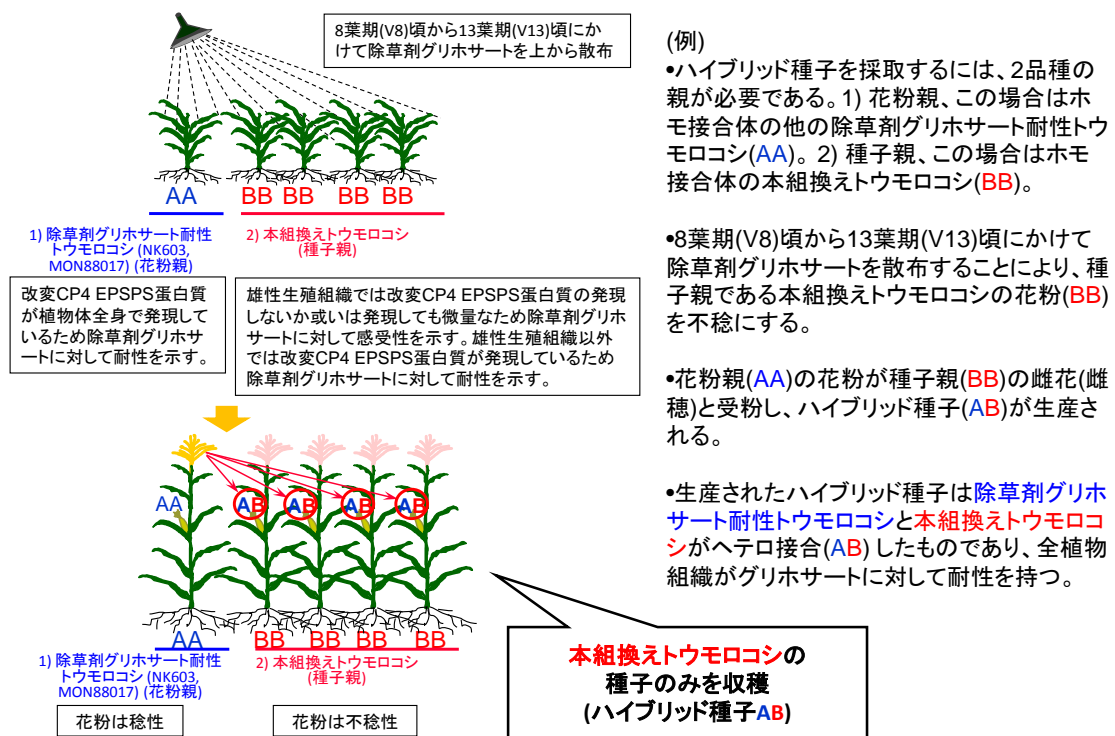


図 1 本組換えトウモロコシを用いた効率的なハイブリッド種子の採種方法¹

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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

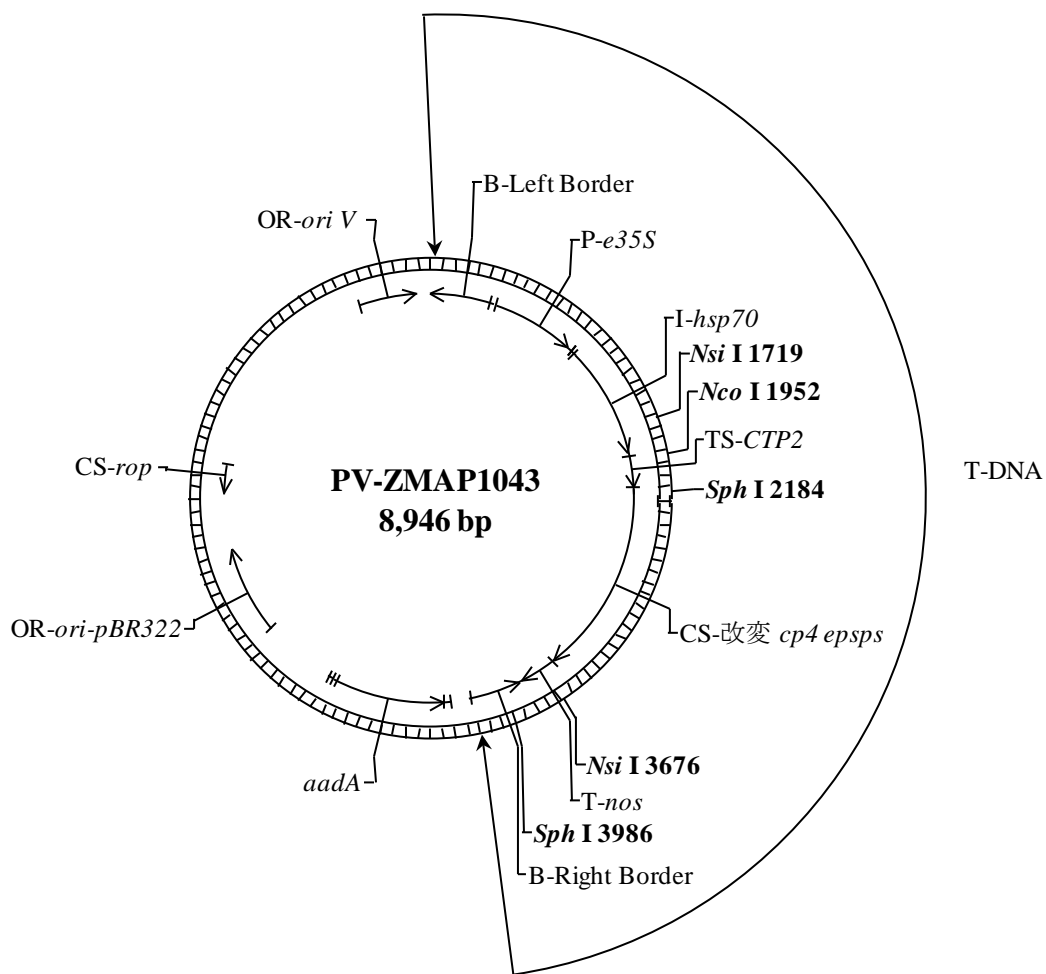
5

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 (p11) 及び表 1 (p12~11) に示した。

10

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 *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。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。

15



5

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²

²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

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³

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 (Barker et al., 1983)。
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 (Hamilton et al., 1992) カリフラワーモザイクウイルス (CaMV 35S) のプロモーター (Odell et al., 1985) 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, p15; McPherson and Kay, 1994)、組織特異的な発現様式を変えることなく転写活性が高められている。 <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 (CaJacob et al., 2004)。
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 (Brown and Santino, 1997)。
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 (Klee et al., 1987)。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>) 遺伝子のコード配列 (Barry et al., 2001; Padgett et al., 1996a)。
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 (Bevan et al., 1983)。
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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。

³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 (Fling et al., 1985)。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} -ori-pBR322	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 (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS-rop	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 (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR-ori V	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 (Stalker et al., 1981)。
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

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

5

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 (p12~11) 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。このプロモーターとイントロンについて、以下に記載する。

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。

20 CaMV 35Sプロモーターは、一般的に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 (Benfey and Chua, 1989a; Terada and Shimamoto, 1990; Williamson et al., 1989; Yang and Christou, 1990)。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⁴の発現量は微量であったことが報告されている (Sunilkumar et al., 2002; Wilkinson et al., 1997)。特にトウモロコシの花粉におけるCaMV 35Sプロモーターの活性はごくわずかであることが報告されている (Hamilton et al., 1992)。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として、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る (Eyal et al., 1995)。

30 この CaMV 35S プロモーターは、ドメイン A 及びドメイン B から構成されている (図 3, p15; Benfey et al., 1989b)。ドメイン A には、プロモーターとしての役割を持つ配列及びプロモーター活性を高める機能を有する配列が最低 1 つ含まれている。ドメイン B には、プロモーター活性を高める機能を有す

⁴一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 (King and Stansfield, 1997)。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。

る配列が複数含まれている (Benfey et al., 1989b; Fang et al., 1989; Odell et al., 1985)。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* プロモーターとの違いはドメイン B を 1 つ多く有していることのみ
 5 である (図 3, p15; McPherson and Kay, 1994)。このことから、*CaMV35S* プロモーターと比べ、*e35S* プロモーターの転写活性は高められているが、その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
 10 ことが確認されている (CaJacob et al., 2004)。

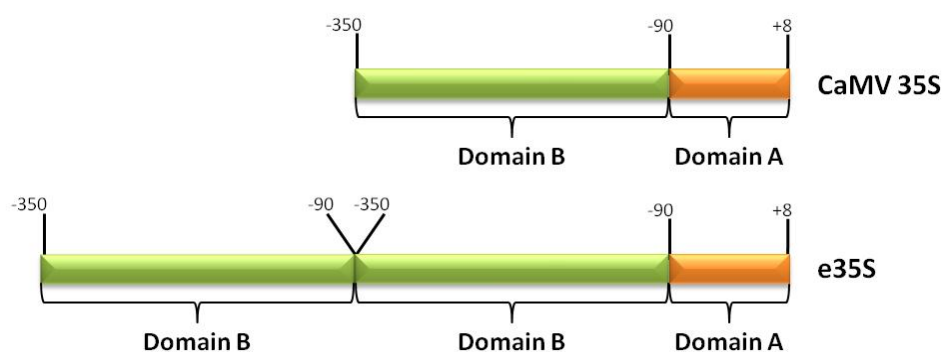


図 3 *CaMV35S*プロモーター及び*e35S*プロモーターの比較⁵

15 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 (Brown and Santino, 1997)、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 (Callis et al., 1987)。
 20

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程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、
 25 新規のものではない (別添資料 4)。

⁵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

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

5 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1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) を阻害し、細胞死を引き起こす (Franz et al., 1997)。本組換えトウモロコシは導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサートに耐性を持つ。

10

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_2010)⁶ を用いてFASTA型アルゴリズムと連続する8つのアミノ酸による相同性検索を行ったが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

15

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生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の1つであり、植物中では葉緑体又は色素体に存在する (della-Cioppa et al., 1986)。シキミ酸経路は植物が固定する炭素の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 (Haslam, 1974; 1993)。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過程が中間代謝物質や最終生成物によって阻害・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 (Hermann and Somerville, 1983; Weiss and Edwards, 1980)。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 (Padgett et al., 1996b; Ridley et al., 2002)。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 (Smart et al., 1985)、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、アルファルファ、テンサイ) の食品及

30

⁶ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) AllergenOnline database (FARRP, 2009) に登録されている配列からなるデータベースで、2009年12月の時点で1,471件のアミノ酸配列が含まれる。

び飼料の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、芳香族アミノ酸含有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。

5

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 (Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys et al., 1992)。これら以外に唯一 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。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。

10

15

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

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 は、*E. coli* 由来のベクター pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

25

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

30

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

35

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。

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

5 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

10

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 (p12~11) 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 (p11) に示した。

15 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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。

20

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

25

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。

30

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

35

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。

- 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

5

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。

10

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及びわが国で隔離ほ場試験に用いられた世代については、図 4 (p20) の育成図に記載した。なお、本申請の対象は、【社外秘につき非開示】BC3F4 世代及び【社外秘につき非開示】BC3F4 世代から派生する全ての後代交配種である。

15

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

25 図 4 本組換えトウモロコシの育成図

30

【社外秘につき非開示】

(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査するため、本組換えトウモロコシの複数世代において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した。

10 試験に供試する3世代(図4, p20)を作出するために、まず改変 *cp4 epsps* 遺伝子をホモで有する本組換えトウモロコシの【社外秘につき非開示】BC3F4世代を、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない従来商業品種【社外秘につき非開示】と交配して TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC0F1 世代を作出した。得られた TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC0F1 世代に対し、【社外秘につき非開示】を反復親とした戻し交配を行い、TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC1F1 世代を作出した。さらに、TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC1F1 世代で改変 *cp4 epsps* 遺伝子をヘテロで有する個体を除草剤グリホサート散布により選抜し、再度戻し交配を行って TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F1 世代を作出した。最後に、TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F1 世代で改変 *cp4 epsps* 遺伝子をヘテロで有する個体を除草剤グリホサート散布により選抜し、自殖することで TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F2 世代を作出した。

15 上記3世代(TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC1F1 世代、TI:【社外秘につき非開示】] BC2F1 世代及び TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F2 世代)において、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の有無を除草剤グリホサート散布により確認した分離比を用いてカイ二乗検定を行った。TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC1F1 世代及び TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F1 世代は、1世代前で改変 *cp4 epsps* 遺伝子をヘテロで有する個体を改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない【社外秘につき非開示】と交配することにより作出しているため、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の分離比の期待値は 1:1 であると考えられた。また、TI:【社外秘につき非開示】BC3F4] BC2F2 世代は 1 世代前で改変 *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により作出しているため、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の分離比の期待値は 3:1 であると考えられた。

30 カイ二乗検定の結果、分析を行った3世代において実測値と期待値の間に統計学的有意差は認められなかった(表2, p22; 別添資料5)。よって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

35

表 2 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の分離比⁷

供試世代	供試 ¹ 個体数	実測値 ²		期待値		χ^2	p 値 ³
		陽性	陰性	陽性	陰性		
TI:[【社外秘につき非開示】BC3F4]BC1F1	238	109	129	119	119	1.68	0.194
TI:[【社外秘につき非開示】BC3F4]BC2F1	290	145	145	145	145	0.00	1.000
TI:[【社外秘につき非開示】BC3F4]BC2F2	1107	820	287	830	277	0.50	0.476

¹ TI: [【社外秘につき非開示】BC3F4]BC1F1 世代の 238 個体は 3 個体の親世代、TI: [【社外秘につき非開示】BC3F4]BC2F1 世代の 290 個体は 2 個体の親世代、TI: [【社外秘につき非開示】BC3F4]BC2F2 世代の 1107 個体は 6 個体の親世代から得られた。

² 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の有無を調べるために、播種後 14 日後に除草剤グリホサート(1.89 kg a. e./ha) を散布し、5 日後に枯死しなかったものを陽性、枯死したものを陰性と判断した。

³ 上記 3 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p \leq 0.05$)。

- 10 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

15 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, p38~40)。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, p41)。

20 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】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 及び [【社外秘につき非開示】BC3F7 × 【社外秘につき非開示】] F1) におけるサザンブロット分析により確認された (別添資料 6 の Figure 14, p49)。

- 25 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, p38~40)。

⁷ 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

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

5 ウェ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が確認された (別添資料 7 の Figure 1, p15)。

10

米国の 5 ヶ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州、イリノイ州、インディアナ州及びネブラスカ州) において、それぞれ 3 反復で生育した本組換えトウモロコシの様々な組織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。そのうちインディアナ州のほ場における 1
15 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おそれがあったため、分析には供試しなかった。したがって、計 14 サンプルを分析に供試した。本組換えトウモロコシの各組織での改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を表 3 (p24) に記載した (別添資料 2 の Table 1, p17, Table 2, p18 及び Table 3, p19)。

20 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, p17)。この判定不能であった 2 サンプルでは、分析を 2 回行ったところ、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を算出することができなかった。微量の改変 CP4 EPSPS 蛋白質が 6 サンプルの花粉で認められた理由として、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 蛋白質が発現していた可能性 (CaJacob et al., 2004; Hamilton et al., 1992) が考えられた。

25

表 3 米国ほ場における本組換えトウモロコシの各組織の改変CP4 EPSPS蛋白質発現量 (2008年、米国)⁸

組織 ¹	生育段階 ²	播種後日数	改変 CP4 EPSPS 蛋白質 (標準偏差) 範囲		検出限界/ 定量限界 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
			($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ³	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ⁴	
葉 (OSL-1)	2~5 葉期	20-28	100 (21) 75 - 140	680 (170) 400 - 940	0.069/0.137
葉 (OSL-2)	6~8 葉期	32-46	83 (25) 30 - 110	410 (130) 130 - 560	0.069/0.137
葉 (OSL-3)	10~12 葉期	41-67	61 (19) 35 - 95	290 (74) 210 - 410	0.069/0.137
葉 (OSL-4)	雄穂抽出期	54-73	95 (30) 17 - 140	370 (120) 70 - 520	0.069/0.137
穀粒	収穫期	118-182	3.6 (0.73) 2.6 - 5.3	4.2 (0.89) 2.8 - 6.2	0.16/0.228
			< LOD (NA) NA	< LOD (NA) NA	
花粉 ⁵	受粉期	58-81	0.49 (0.36) 0.18 - 1.1	0.87 (0.70) 0.25 - 2.2	0.099/0.137
絹糸	受粉期	58-76	9.4 (0.97) 8.1 - 11	100 (12) 90 - 120	0.121/0.137
地上部	黄熟期	83-116	38 (14) 8.3 - 57	120 (48) 21 - 200	0.069/0.137
茎葉	成熟期	124-180	14 (6.3) 5.9 - 26	43 (27) 13 - 98	0.069/0.137
根 (OSR-1)	2~5 葉期	22-28	18 (5.3) 8.1 - 27	140 (46) 58 - 210	0.033/0.068
根 (OSR-2)	6~8 葉期	32-46	16 (6.8) 8.3 - 29	110 (62) 48 - 240	0.033/0.068
根 (OSR-3)	10~12 葉期	41-67	12 (4.3) 4.9 - 19	73 (28) 22 - 110	0.033/0.068
根 (OSR-4)	雄穂抽出期	54-73	15 (5.7) 5.6 - 23	83 (36) 23 - 140	0.033/0.068
根 (初期黄熟期)	初期黄熟期	83-116	15 (5.2) 8.6 - 24	72 (23) 39 - 100	0.033/0.068
根 (収穫直後)	成熟期	124-180	16 (8.3) 5.9 - 29	72 (37) 26 - 130	0.033/0.068
地上部 (OSWP-1)	2~5 葉期	22-28	50 (8.3) 37 - 66	500 (190) 310 - 840	0.069/0.137
地上部 (OSWP-2)	6~8 葉期	32-46	46 (7.6) 33 - 58	360 (42) 300 - 420	0.069/0.137
地上部 (OSWP-3)	10~12 葉期	41-67	43 (7.1) 28 - 56	380 (78) 230 - 500	0.069/0.137
地上部 (OSWP-4)	雄穂抽出期	54-73	37 (6.3) 23 - 47	240 (42) 160 - 340	0.069/0.137

¹ OSL= over-season leaf (葉); OSR= over-season root (根); OSWP= over-season whole plant (地上部)

5 ² 採取した各組織の生育段階

10 ³ 蛋白質の発現量は平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織ごとに計算されている (根 (初期黄熟期) と花粉を除いて、全ての組織で n=14。根 (初期黄熟期) は n=11。花粉は n=6)。NA: Not Applicable (該当しない); LOD=limit of detection (検出限界)

⁴ 蛋白質の発現量は平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1g 当たりの μg で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重因子で除算して求めた。NA: Not Applicable (該当しない); LOD=limit of detection (検出限界)

15 ⁵ 全てのほ場の本組換えトウモロコシ花粉の改変 CP4EPSPS 蛋白質の発現量は検出限界以下 (上段; n=6) 若しくは非常に微量であった (下段; n=6)。2カ所のほ場からの花粉サンプルは、結果が不明確であったため計算には含めなかった。

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

- 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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10 本組換えトウモロコシはPCR法による検出及び識別が可能である（別添資料8）。

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て、葉の一部（リーフディスク）を用いて検定できる。

15 本法の信頼性を確認するにあたり、1植物体から3つのリーフディスクを採取し、それらを本法により3回分析することで、植物体が本組換えトウモロコシもしくは非組換えトウモロコシかどうかを確認した。次に、本組換えトウモロコシと確認された1～3植物体のリーフディスクから45サンプルを、同じく非組換えトウモロコシと確認された1～3植物体のリーフディスクから45サンプルを採取し、それらをさらに本法で分析した。その結果、本組換えトウモロコシ45サンプル中44サンプルが陽性、1サンプルが偽陰性反応を示したのに対し、非組換えトウモロコシ45サンプル中44サンプルが陰性、1サンプルが偽陽性反応を示した。これらの偽陰性率及び偽陽性率は許容基準である5%以内に収まっていたため、偽陰性及び偽陽性反応を示した2サンプルについてはさらなる検証は行わなかった。

- 25 (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

30 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。

【花粉稔性及び花粉総数の確認】

5 本組換えトウモロコシの除草剤グリホサート散布後における雄性不稔を確認
10 するため、2010年に米国の温室において、除草剤グリホサート散布後における
花粉稔性及び花粉総数について調査を行った。試験にはHC50 BC6F4 世代を供
試した (図 4, p20)。除草剤グリホサートを散布しなかった場合、除草剤グリホ
15 サートの通常の散布量 (0.84 kg a.e.⁹/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、そして 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) に散布した場合の本組換えトウモロコシ
の花
20 花粉稔性及び花粉総数を評価した (別添資料 9)。各個体の雄穂から採取した
5つの小花をAlexander染色 (Alexander, 1969) による花粉稔性の調査に供試し、
残り全ての小花を花粉総数 (可稔及び不稔の全ての花粉) の調査に供試した
(別添資料 9)。花粉の稔性は、Alexander染色後に顕微鏡下で観察された花粉に
15 対する可稔花粉の割合 (%) で評価した。また、花粉総数の調査のため、各個体
の雄穂から採取した小花 (花粉稔性の調査で使用した小花を除く) の花粉の一
部を抽出、計数し、その花粉数を基に雄穂全体の花粉総数を算出した。

調査の結果、花粉稔性及び花粉総数において、除草剤グリホサートを散布し
20 なかった本組換えトウモロコシと除草剤グリホサートを 3 葉期 (V3) に散布し
た本組換えトウモロコシの間に統計学的有意差は認められなかった ($p>0.05$)。
しかし、花粉稔性及び花粉総数において、除草剤グリホサートを散布しなかつ
た本組換えトウモロコシと 3 葉期 (V3)、8 葉期 (V8) 及び 10 葉期 (V10) に散
25 布した本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 ($p<0.05$) (表
4, p27)。また、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
花粉稔性を図 5 (p27) に示した。顕微鏡下において、Alexander 染色した稔性花粉は紫色
に染色され円形に膨らんで見え (図 5, p27: A 及び B)、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た (図 5, p27: C)。

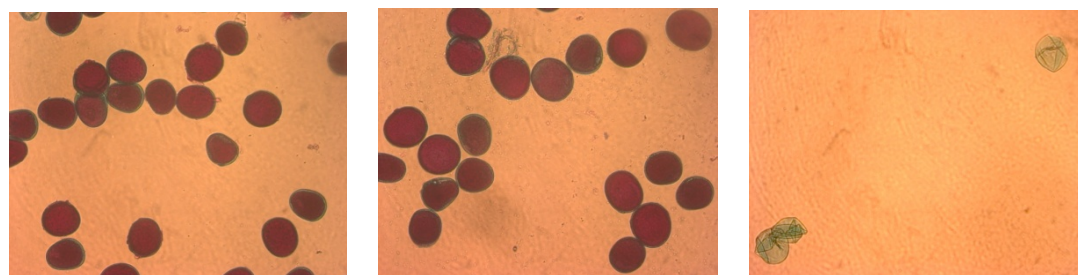
⁹ a.e.; acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤は、有効成分がそのままの形で存在する場合と、塩の形で存在する場合とがある。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

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花粉稔性 (%) 及び花粉総数の調査¹⁰

花粉特性	本組換え トウモロコシ 無散布		本組換え トウモロコシ 3葉期 (V3) に散布		本組換え トウモロコシ 3葉期 (V3)、8葉期 (V8) 及び10葉期 (V10) に散布	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
花粉稔性 (%)	96.9	1.1	90.7	5.3	0.0*	0.0
花粉総数	2,515,000	96,640	2,781,111	209,459	1,188,571*	151,743

1 個体/プロット、10 反復、n=10

- 5 *除草剤グリホサート無散布の本組換えトウモロコシと3葉期 (V3)、8葉期 (V8) 及び10葉期 (V10) に散布の本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ことを示す (p<0.05)。



10 A. 無散布 B. V3 に散布 C. V3、V8 及び V10 に散布

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)¹¹

- A. 除草剤グリホサートを散布しなかった。
 B. 通常量の除草剤グリホサート (0.84 kg a.e./ha) を3葉期 (V3) に散布した。
 15 C. 通常量の除草剤グリホサート (0.84 kg a.e./ha) を3葉期 (V3)、8葉期 (V8) 及び10葉期 (V10) に散布した。

【葯の突出率による花粉稔性の確認】

20

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。

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

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

出は花粉の稔性の指標として用いられており、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 (Beckett, 1971)。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。

5

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ければ花粉が飛散することはない。

本組換えトウモロコシの花粉の稔性を確認するため、2010年に米国の温室で除草剤グリホサート散布後における葯の突出率について調査を行った。試験には HC50 BC6F4 世代を供試した (図 4, p20)。除草剤グリホサートを散布しなかった場合、除草剤グリホサートの通常の散布量 (0.84 kg a.e. /ha) を 3 葉期 (V3) のみに散布した場合、そして 3 葉期 (V3) に加えて 8 葉期 (V8) 及び 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の稔性を、葯の突出から導き出した葯の突出率を用いて評価した (別添資料 9)。

10

15

調査の結果、除草剤グリホサートを散布しなかった場合と除草剤グリホサートを 3 葉期 (V3) のみに散布した場合は、葯の突出率が全ての調査時期において 100% であり、植物体は可稔であることが示された。一方、3 葉期 (V3)、8 葉期 (V8) 及び 10 葉期 (V10) に散布した場合の本組換えトウモロコシの葯の突出率は 0% であり、雄性不稔であることが示された (表 5、p29)。

20

表 5 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¹²

除草剤グリホサート散布時期	葯の突出率 平均値 ^{1,2,3} (%)		
	観察時期		
	S90 ⁴	S90 + 3 ⁵	S90 + 6 ⁶
無散布	100	100	100
3 葉期 (V3) に散布	100	100	100
3 葉期 (V3)、8 葉期 (V8) 及び 10 葉期 (V10) に散布	0	0	0

¹1 個体/プロット、10 反復、n=10

²葯突出率の平均値は、計算式 ($[(LP \times 0.25) + (MP \times 0.5) + (HP \times 1.0)] / \text{個体数} \times 100\%$) により求めた。

5 式中の LP (Light Partial) は 1 個体当たり 10 以下の葯の突出が確認された個体数、MP (Medium partial) は 1 個体当たり 11 以上の葯の突出が確認されたもので全体の葯の突出が 25%未満の個体数、HP (Heavy partial) はプロット中 25%以上の葯の突出が確認された個体数を示す (別添資料 9)。

³葯の突出率の平均値は、各除草剤グリホサート散布時期において、全ての個体で計算された。

⁴S90: 90%以上の個体に絹糸の抽出が認められた日

10 ⁵S90 + 3: S90 から 3 日後にあたる日

⁶S90 + 6: S90 から 6 日後にあたる日

15 以上の結果から、花粉稔性、花粉総数及び葯の突出率において、除草剤グリホサートを散布しなかった本組換えトウモロコシと除草剤グリホサートを 3 葉期 (V3) に散布した本組換えトウモロコシの間に差異は認められず、3 葉期 (V3) の本組換えトウモロコシに除草剤グリホサートを散布することが雄性不稔を誘発することはないということが示された。また、花粉稔性、花粉総数及び葯の突出率において、除草剤グリホサートを散布しなかった本組換えトウモロコシと除草剤グリホサートを 3 葉期 (V3)、8 葉期 (V8) 及び 10 葉期 (V10) に計 3 回散布した本組換えトウモロコシの間に差異が認められ、本組換えトウモロコシに 8 葉期 (V8) 及び 10 葉期 (V10) に除草剤グリホサートを散布した場合、雄性不稔となることが確認された。

¹²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

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¹³

5

2010年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えトウモロコシの【社外秘につき非開示】BC3F7×【社外秘につき非開示】F1世代を供試し(図4, p20)、対照の非組換えトウモロコシとしては、本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景を持つ【社外秘につき非開示】を用いた。なお、低温耐性試験については、2009年にモンサント・カンパニー(米国)の人工気象室において試験を実施した。

10

a 形態及び生育の特性

15

形態及び生育の特性を比較するため、12項目(発芽揃い(月日)、発芽率(%)、雄穂抽出期(月日)、絹糸抽出期(月日)、稈長(cm)、着雌穂高(cm)、分けつ数、草型、成熟期(月日)、収穫期の地上部重(kg)、粒型、粒色)について調査した。評価は、種苗登録のための農林水産植物種類別審査基準を参考に行った。

20

その結果、収穫期の地上部重においてのみ、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(別添資料10の表3, p10)。収穫期の地上部重の平均値は、本組換えトウモロコシが0.72 kg、対照の非組換えトウモロコシが0.78 kgであり、本組換えトウモロコシの方が低かった(別添資料10の表3, p10)。

25

b 生育初期における低温又は高温耐性

30

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(新鮮重、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、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,

¹³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
会社に帰属する

p19)。

c 成体の越冬性又は越夏性

5 トウモロコシは夏型一年生植物であり、通常は、結実後、冬季に自然に枯死する。再生長して栄養繁殖することや、種子を生産することはない。実際に、隔離ほ場の越冬性試験区で生育させた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を成熟期の後も引き続き生育させ、2010年11月8日に供試個体の観察を行ったが、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
10 ともに枯死していた (別添資料 10 の図 5, p12)。

d 花粉の稔性及びサイズ

15 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ともに高い花粉稔性を示しており、その稔性に大きな違いは認められなかった。また花粉の形態や大きさにも違いは認められなかった (別添資料 10 の図 6, p13)。

また、2008年に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。その結果、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)。花粉の稔性の平均値は、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%であり、本組換えトウモロコシの値の方が高く、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)。なお、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)。
20
25

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

30 種子の生産量を評価するため、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ついて、6項目 (総有効雌穂数、雌穂長 (cm)、雌穂径 (cm)、粒列数、一列粒数、百粒重 (g)) を調査した。

その結果、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に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 4, p14)。
35

脱粒性については、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収穫時に、目視で苞皮に包まれているか否か、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

5 その結果、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いずれも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また苞皮を取り除いた後の雌穂も難脱粒性であり、種子の脱粒性における違いは認められなかった (別添資料 10 の表 4, p14)。

10 休眠性及び発芽率については、収穫後 15 日目の種子をシャーレ上に静置し、25°C に設定した恒温器内での発芽個体数を経時的に計測した。

その結果、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いずれも高い発芽率を示し、その発芽率に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 4 及び表 5, p14~15)。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシにおいて休眠性は認められなかった。

15

f 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。

20

g 有害物質の産生性

25 本組換えトウモロコシから土壤微生物或いは植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験、後作試験を行った。その結果、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試験区の間で、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 6~8, p17)。

30

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、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

35

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

—

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの国外における申請状況は表 6 (p34) のとおりである。

5 表 6 本組換えトウモロコシの国外の主要栽培国及び輸入国における申請及び認可状況

10

【社外秘につき非開示】

15

20

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は表 7 (p34) のとおりである。

25 表 7 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況

30

【社外秘につき非開示】

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹⁴

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るが、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 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、成体の越冬性、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）について調査を行った（第一の 2-(6)-②-a~e, p30~29）。

15 その結果、わが国で実施した隔離ほ場試験の調査項目のうち、収穫期の地上部重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（別添資料 10 の表 3, p10）。また、米国で実施した花粉の試験の調査項目のうち、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（別添資料 12 の Table 2, p11）。

20 わが国で実施した隔離ほ場試験における収穫期の地上部重の平均値は、本組換えトウモロコシが 0.72 kg、対照の非組換えトウモロコシが 0.78 kg であり、本組換えトウモロコシの方が低かった（別添資料 10 の表 3, p10）。しかしながら、形態及び生育の特性並びに種子の生産量において、収穫期の地上部重以外の調査項目で有意差が認められなかったことから、収穫期の地上部重で認められた差異が競合における優位性を高めるものではないと判断された。

25 米国で実施した花粉の試験における花粉の稔性の平均値は、本組換えトウモロコシが 99.7%、対照の非組換えトウモロコシが 98.9% であり、本組換えトウモロコシの方が高かった。しかしながら、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
30 高い程度であったことから、花粉稔性において認められたこの程度の差が競合における優位性を高めるものではないと判断された。

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。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

¹⁴本項目中で、第一の 2-(6)-②の 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

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、
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
5 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 3, p24; 別添資料 2 の Table1, p17, Table2, p18 及び Table3,
p19)。しかし、除草剤グリホサートが散布されることが想定されにくい自然
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 以上のことから、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

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

以上のことから、本組換えトウモロコシは競合における優位性に起因する
生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25

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

30 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。

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、有害物質
の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検
35 討した結果、全ての項目において統計学的有意差は認められなかった (第一
の 2-(6)-②-g, p32; 別添資料 10)。

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 (第一の 2-(1)-ロ-②, p16)。また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p16) 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) の食品及び飼料の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含有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。

15

以上のことから、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

20

—

(3) 影響の生じやすさの評価

25

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

30

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

35

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いない。

以上のことから、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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

15

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。

20

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価¹⁵

競合における優位性：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が、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシで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、成体の越冬性、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）について調査を行った。その結果、わが国で実施した隔離ほ場試験の調査項目のうち、収穫期の地上部重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。また、米国で実施した花粉の試験の調査項目のうち、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。

わが国で実施した隔離ほ場試験における収穫期の地上部重の平均値は、本組換えトウモロコシが 0.72 kg、対照の非組換えトウモロコシが 0.78 kg であり、本組換えトウモロコシの方が低かった。しかしながら、形態及び生育の特性並びに種子の生産量において、収穫期の地上部重以外の調査項目で有意差が認められなかったことから、収穫期の地上部重で認められた差異が競合における優位性を高めるものではないと判断された。

米国で実施した花粉の試験における花粉の稔性の平均値は、本組換えトウモロコシが 99.7%、対照の非組換えトウモロコシが 98.9% であり、本組換えトウモロコシの方が高かった。しかしながら、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ことから、花粉稔性において認められたこの程度の差が競合における優位性を高めるものではないと判断された。

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。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胞子では改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現がないか、発現しても微量であるのに対し、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が散布されることが想定され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

¹⁵本項目中で、第一の 2-(6)-②の 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

を高めるとは考えにくい。

以上のことから、本組換えトウモロコシは競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

- 5 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、わが国で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との間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験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。
- 10 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く、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。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
- 15 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）の食品及び飼料の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含有量に対照の非組換え作物との間で相違のないこ
- 20 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。

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

- 25 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。このことから、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。

- 30 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結論された。

参考文献

- Alexander, M.P. 1969. Differential Staining of Aborted and Non Aborted Pollen. *Stain Technology* 44:117-122
- 5
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 10
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Beckett, J.B. 1971. Classification of Male-Sterile Cytoplasm in Maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* 11: 724-727.
- 15
- Benfey, P.N. and N. Chua. 1989a. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174-181.
- 20
- Benfey, P.N., L. Ren and N. Chua. 1989b. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *European Molecular Biology Organization Journal* 8: 2195-2202.
- 25
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 30
- CaJacob, C.A., P. Feng, G.R. Heck, M.F. Alibhai, D. Sammons and S.R. Padgett. 2004. Engineering resistance to herbicides. Pages 353-372 in *Handbook of Plant Biotechnology*. P. Christou and H. Klee (eds.). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- 35
- Callis, J., M. Fromm and V. Walbot. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes & Development* 1: 1183-1200.

- della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Frayley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6873-6877.
- 5
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.
- 10
- Eyal, Y., C. Curie and S. McCormick. 1995. Pollen Specificity Elements Reside in 30 bp of the Promimal Promoters of Two Pollen-Expressed Genes. The Plant Cell 7: 373-384.
- 15
- Fang, R., F. Nagy, S. Sivasubramaniam and N. Chua. 1989. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. The Plant Cell 1: 141-150.
- 20
- FAOSTAT. 2010. Production, Crops, Maize and Maize green, Area Harvested, 2009. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. <http://faostat.fao.org/default.aspx> [Accessed May 2].
- 25
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-o-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Reseach 13: 7095-7106.
- 30
- Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington, D.C.
- 35
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.
- Goldberg, R.B., T.P. Beals and P.M. Sanders. 1993. Anther Development: Basic Principles and Practical Applications. The Plant Cell 5: 1217-1229.
- Gruys, K.J., Walker, M. C. and Sikorski, J. A.. 1992. Substrate synergism and the

steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.

- 5 Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Stanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.
- Haslam, E. 1974. *The shikimate-pathway*. John Wiley and sons.
- 10 Haslam, E. 1993. *Shikimic Acid: Metabolism and metabolites*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Hermann, K.M. and R.L. Somerville. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in *In Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. Addeson, Waley,. K.M. Hermann and R.L. Somerville (eds.).
15 Addeson, Waley, Reading, Massachusetts.
- Huang, M.-D., F.-J. Wei, C.-C. Wu, Y. Hsing and A.H.C. Huang. 2009. Analyses of
20 Advanced Rice Anther Transcriptomes Reveal Global Tapetum Secretory Functions and Potential Proteins for Lipid Exine Formation. *Plant Physiology* 149: 694-707.
- King, R.C. and W.D. Stansfield. 1997. *A dictionary of genetics*. 5th Edition. Oxford University Press, Inc., Newyork, Newyork.
- 25 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics*. 210: 437-442.
- 30 Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 239: 1142-1150.
- 35 Mcpherson, J.C. and R. Kay. 1994. Method for enhanced expression of a protein. Patent 5,359,142, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

- Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 5 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 10 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996a. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready[®] gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agriculture, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. S. Duke (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 15 Padgett, S.R., N.B. Taylor, D.L. Nida, M.R. Bailey, J. MacDonald, L.R. Holden and R.L. Fuchs. 1996b. The Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean Seeds is Equivalent to That of Conventional Soybeans. *Journal of Nutrition* 126: 702-716.
- 20 Raynor, G.S., E.C. Ogden and J.V. Hayes. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* 64: 420-427.
- 25 Ridley, W.P., R.S. Sidhu, P.D. Pyla, M.A. Nemeth, M.L. Breeze and J.D. Astwood. 2002. Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That of Conventional Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7235-7243.
- 30 Smart, C. C., Johanning, D., Muller, G., and Amrhein, N. 1985. Selective overproduction of 5-Enolpyruvylshikimate acide 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem* 160: 16338-16346.
- 35 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- Sunilkumar, G., Mohr, L. Lopata-Finch, E. C. Emani and K.S. Rathore. 2002. Developmental and Tissue-specific Expression of CaMV35S Promoter in

Cotton as Revealed by GFP. *Plant Molecular Biology* 50: 463-474.

- 5 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor, New York.
- Terada, R. and K. Shimamoto. 1990. Expression of CaMV 35SGUS gene in transgenic rice plants. *Molecular and General Genetics* 220: 389-392.
- 10 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. *The Biosynthesis of Aromatic Compounds: Regulation of the shikimate pathway*. John Wiley and Sons, New York.
- Wilkinson, J.E., D. Twell and K. Lindsey. 1997. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 48: 264-275.
- 15 Williamson, J.D., M.E. Hirsch-Wyncott, B.A. Larkins and S.B. Gelvin. 1989. Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 90: 1570-1576.
- 20 Yang, N.-S. and P. Christou. 1990. Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Developmental Genetics* 11: 289-293.
- Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.
- 25 柿本陽一. 1981. トウモロコシの起源と特性. I 植物としての分類, 類縁関係. 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 30 柿本陽一, 山田実. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの起源と特性. III 植物としての特性. Pages 34-38 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 35 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳, 東京.

- 財務省 . 2011. 財務省貿易統計 . 財務省 .
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed May 2].
- 5 千藤茂行. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの品種生態. IV 採取. 転作全書.
Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協
会, 東京.
- 10 瀧澤康孝. 1981. 子実用トウモロコシの栽培. II 栽培の実際. Pages 124-143 in 畑
作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁
村文化協会, 東京.
- 15 千葉浩三. 1980. 図集・作物栽培の基礎知識. 栗原浩, 社団法人 農山漁村文化協
会, 東京.
- 20 戸澤英男. 2005. トウモロコシ -歴史・文化、特性・栽培、加工・利用-. 社団法
人 農山漁村文化協会, 東京.
- 25 中村茂文. 2001a. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. I 種子と発芽.
Pages 41-43 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社
団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 30 中村茂文. 2001b. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. III 生殖生長期の
生理, 生態. Pages 50-53 in 転作全書. Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協
会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 35 農学大辞典編集委員会. 1987. 13. 食用作物. トウモロコシ. Pages 536-541 in 第2
次増訂改版 農学大辞典. 野口ら (eds.). 株式会社 養賢堂, 東京.
- 30 農林水産省, 大臣官房統計部. 2011. 平成 22 年産飼料作物の収穫量 (牧草、青刈
りとうもろこし及びソルゴー). 農林水産省 .
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_siryuu_10.pdf [Accessed May 2].
- 35 農林水産省, 大臣官房統計部. 2010. 平成 21 年産 秋冬野菜、指定野菜に準ずる
野菜等の作付け面積、収穫量及び出荷量. 農林水産省 .
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou09.pdf [Accessed May 2].

5 松井正春, 斉藤修. 2003. III 農業環境技術研究所における Bt トウモロコシ緊急調査. 4. Bt 組換えトウモロコシ花粉中の Bt トキシンの検出 2. 生物検定による検出. Pages 55-62 in 農業環境研究叢書 第 14 号 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価. 独. 農業環境技術研究所 (ed.). 独立行政法人 農業環境技術研究所, つくば.

10 丸山寛治. 1981. トウモロコシの品種生態. I 品種の基本特性. Pages 83-89 in 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

緊急措置計画書

平成 23 年 6 月 17 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.) Ittis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7) (以下「本組換え体」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

日本モンサント株式会社

平成 23 年 6 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 油糧作物担当課長
	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

*: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から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

10

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

15 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

20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体が環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換え体は、環境中で生存しないように不活化する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 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消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

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) の別添資料リスト

- 5
- 別添資料 1 CP4 EPSPS Immunolocalization Study in MON 87427 (社外秘)
- 別添資料 2 Assessment of CP4 EPSPS Protein Level in Corn Tissues Collected
10 from MON 87427 Produced in U.S. Field Trials During 2008
(MSL0022370) (社外秘)
- 別添資料 3 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cp4 epsps* 遺伝子
から推定した改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 4 除草剤グリホサート耐性トウモロコシ NK603 の導入遺伝子地図
(社外秘)
- 15 別添資料 5 Heritability and Stability of Coding Sequences Present in MON 87427
Across Multiple Generations (RPN-09-275) (社外秘)
- 別添資料 6 Molecular Characterization of MON 87427 (MSL0021822) (社外秘)
- 別添資料 7 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Corn Leaf and
20 Seed Samples of MON 87427 Across Multiple Generations by Western
Blot Analysis (MSL0022026) (社外秘)
- 別添資料 8 Corn RHS HAM027 Event Specific EndPoint TaqMan PCR
(BQ-QC-10456-01) (社外秘)
- 別添資料 9 MON 87427 Pollen Viability, Total Pollen Number and Anther
Extrusion 2010 North America (RAR-10-404) (社外秘)
- 25 別添資料 10 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) の隔離ほ場における生物
多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 別添資料 11 Assessment of the Effect of Cold Stress on the Growth of MON 87427
30 Under Growth Chamber Conditions (MSL0022023) (社外秘)

別添資料 12 Pollen Viability and Morphology Evaluation of MON 87427 in a U.S.
Field Trial During 2008 (MSL0021913) (社外秘)