

チョウ目害虫抵抗性並びに
 除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ
 (改変 *cry1F*, *pat*, *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp.
mays (L.) Iltis)
 (1507×MON810×MIR162×NK603, OECD UI:
 DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ81Ø-6×SYN-IR162-4×MON-ØØ6Ø3-6)
 (*B.t. Cry1F* maize line 1507、MON810、MIR162 及び NK603 それぞ
 れへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから
 分離した後代系統のもの (既に第一種使用規程の承認を受けたものを除
 く。)を含む。)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の概要	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(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	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	15
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	16
(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	23
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	25
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
(1) 使用等の内容	28
(2) 使用等の方法	28
(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	28
(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	28
(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	28
(6) 国外における使用等に関する情報	29
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	30
1 競合における優位性	30
2 有害物質の産生性	31
3 交雑性	31
第三 生物多様性影響の総合的評価	32
参考文献	33
緊急措置計画書	38
資料一覧	40

第一種使用規程承認申請書

平成 24 年 8 月 29 日

農林水産大臣 郡司 彰 殿
環境大臣 細野 豪志 殿

氏名
デュボン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
申請者
住所
東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 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	チョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 <i>cry1F</i> , <i>pat</i> , <i>cry1Ab</i> , 改変 <i>vip3A</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (1507×MON810×MIR162×NK603, OECD UI: DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ81Ø-6×SYN-IR162-4×MON-ØØ6Ø3-6) (<i>B.t.</i> <i>Cry1F</i> maize line 1507、MON810、MIR162 及び NK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの（既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。）を含む。)
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

5

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

10 ① 和名、英名及び学名

和名：トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

② 宿主の品種名又は系統名

親系統の宿主は、イネ科 (*Gramineae*) トウモロコシ属 (*Zea*) のトウモロコシ (*Z. mays*) のデント種である。親系統の作出に使った品種は以下のとおりである。

20

DAS-01507-1 : Hi-II

MON-00810-6 : A188×B73

SYN-IR162-4 : NP2499/NP2500

MON-00603-6 : AW×CW

25

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの原産地は、メキシコ、中米又は南米等と考えられている (OECD, 2003)。現在、自然環境下でトウモロコシが自生している地域は、国内外のいずれにおいても知られていない。

30

(2) 使用等の歴史及び現状

35 ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシは、9000年前にメキシコ南部で栽培植物化したと考えられている。その後、コロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、世界へと伝播し、現在では広く栽培され、食品、飼料等として利用されている (OECD, 2003)。

40

トウモロコシの栽培には、我が国においても長い歴史がある。我が国へは、天正年間 (1580年頃) にポルトガル人が伝えたのが最初であるとされており、九州、四国や本州で栽培されるようになった。明治時代、北海道開拓使によって、デン

ト種及びフリント種が米国より導入され、現在では北海道から九州まで広く栽培されている（戸澤, 2005）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

栽培地域：

我が国における 2011 年の青刈りトウモロコシ（デント種又はフリント種）の栽培面積は 9 万 2,700ha で、主な栽培地域は北海道である（農林水産省, 2012）。国外では、主に温暖地域で栽培され（OECD, 2003）、主要生産国は、米国、中国及びブラジルである（FAO, 2012）。

10

栽培方法：

米国を代表とする大規模で機械化された近代的方法から、古くから南米アンデス高地等で行われている種子を手で播くような伝統的な方法まで、様々な方法で栽培されている。我が国では、平均気温が 10～14℃に達する 4 月上中旬～5 月中下旬に、栽植密度 6,500～9,000 株/10 アール、播種深度約 3cm で播種し、発芽後に中耕、除草、培土等の管理を行う。子実用トウモロコシは、水分含量が 26～28% になった時期に収穫するのが好ましく、サイレージ用（青刈り）トウモロコシは、黄熟期に茎葉全体を収穫する（菊池, 1987）。

20

流通実態：

コメ、コムギとともに世界三大穀物の一つとされている。2010 年の世界総生産量は約 8 億 4,440 万トンであり、最大の生産国は米国で、世界総生産量の 37% を占めている（FAO, 2012）。デント種が生産の主流である（戸澤, 2005）。

25

2011 年に我が国は約 1,530 万トンを輸入しており、その 90% にあたる約 1,380 万トンは米国からである（財務省, 2012）。

用途：

子実は主に飼料として利用され、食品、工業分野では、デンプン、コーングリッツ、コーンオイル及びエタノールの原料として利用される。青刈りした茎葉は飼料として利用される。スイート種は生食用又は缶詰用となる（菊池, 1987）。

30

(3) 生理学的及び生態学的特性

35

イ 基本的特性

—

40

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシの発芽最低温度は 10～11℃、最適温度は 33℃である（中村, 2001）。トウモロコシは栽培植物化されるようになった後、自然環境で生存する能力を失

った。種子が越冬し翌年に発芽することもあるが、本体は自然環境中では定着しない。成長点が地上に出た 5~7 葉期に 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。また、遅霜により葉やけを起こすが、致命的な損傷には至らない。温帯域で、適度な湿度と霜の降りない日数等の条件が揃えば良く生育する (OECD, 2003)。

5

ハ 捕食性又は寄生性

—

10

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

15

雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌穂から脱粒する可能性は低く、種子の拡散には人間の仲介が必要である (OECD, 2003)。また、種子の休眠性は極めて低い (CFIA, 1994)。種子の寿命は、種子水分 12%、温度 10°C、相対湿度 55%以下の条件で 6~8年である (中村, 2001)。

20

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

自然条件下で種子以外に植物体を再生しうる組織又は器官は知られていない。

25

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

30

典型的な風媒花で、他殖率は 95~99%である (千藤, 2001)。交雑可能な近縁野生種として、トウモロコシの亜種であるテオシント及び *Tripsacum* 属がある。テオシントはメキシコ及びグアテマラに自生し、トウモロコシと近接する場合、自然環境下で交雑する。*Tripsacum* 属は米国、中米及び南米に自生するが、自然環境下でトウモロコシと交雑することはない (OECD, 2003)。テオシント及び *Tripsacum* 属が我が国において自生することは報告されていない。アポミクシスの特性を有するとの報告はない。

35

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

40

一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている (OECD, 2003)。晴天の場合、午前 10 時~11 時頃に花粉の放出が最も盛んとなり、午後になると激減する (菊池, 1987)。花粉の寿命は通常 10~30 分で、好適条件下では長くなる (CFIA, 1994)。花粉は球形で、直径は約 90~100µm である (Pleasant et al., 2001)。受粉は主に風媒によって行われる (OECD, 2003)。

我が国においてトウモロコシほ場周辺のヒマワリ (*Helianthus annuus*) とイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉上に堆積する花粉量を測定した結果、ほ場端から 1m で約 160 粒/cm²、5m で 20 粒/cm²、10m では 10 粒/cm²以下であった (Shirai and Takahashi, 2005)。北米における試験では、トウワタ (*Asclepias syriaca*) 葉上に堆積した花粉密度は、ほ場端から 1m で 35.4 粒/cm²、2m で 14.2 粒/cm²、3m で 5~20 粒/cm²、4~5m で 8.1 粒/cm²、10m は 1 粒/cm²であった (Hansen-Jesse and Obrycki, 2000; Pleasants *et al.*, 2001)。また、交雑を防止するために必要な隔離距離は、周囲の林や高層建築物などの遮蔽物の有無によって異なり、200~400m とされている (千藤, 2001)。

5

10

ホ 病原性

—

15

ヘ 有害物質の産生性

トウモロコシに、野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

20

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

5 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cry1F*, *pat*, *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507 × MON810 × MIR162 × NK603, OECD UI: DAS-01507-1×MON-00810-6×SYN-IR162-4×MON-00603-6)

10 (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。) は、下記の4系統の遺伝子組換えトウモロコシを、従来の交雑育種法により交配し作出した品種である。

 本スタック系統トウモロコシは、一代雑種品種 (F1) として商品化されるため、収穫される子実には、遺伝的分離により本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれの導入遺伝子の組合せからなるトウモロコシが含まれる。

- 15
- (a) チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI : DAS-01507-1) (以下「DAS-01507-1」という。)
 - (b) チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* L.)(MON810, OECD UI : MON-00810-6) (以下「MON-00810-6」という。)
 - (c) チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MIR162, OECD UI : SYN-IR162-4) (以下「SYN-IR162-4」という。)
 - (d) 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)(NK603, OECD UI : MON-00603-6) (以下「MON-00603-6」という。)
- 25

 本スタック系統トウモロコシの親系統である DAS-01507-1 (USDA, 2000a; 申請書等の概要, 2004a) は、米国ダウ・アグロサイエンス社と米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が共同開発したものであり、MON-00810-6 (USDA, 1996; 申請書等の概要, 2004b) 及び MON-00603-6 (USDA, 2000b; 申請書等の概要, 2004c) は米国モンサント社、SYN-IR162-4 (USDA, 2007; 生物多様性影響評価書の概要, 2008) は、スイスのシンジェンタ社が開発したものである*。

30

* 各親系統の申請書等の概要又は生物多様性影響評価書の概要の参照方法：

1. 日本版バイオセーフティクリアリングハウスウェブサイトにおける「LMO 検索」ページ <https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenSearch.do> を開く
2. 「生物名」に「トウモロコシ」を入力し、「検索・閲覧」を選択
3. 該当する系統の「生物名」から「トウモロコシ」を選択
4. 「添付資料」を選択
5. 「資料 1」を選択

各親系統には、以下の遺伝子が導入されている。

DAS-01507-1 : チョウ目害虫抵抗性を付与するための改変 *cry1F* 遺伝子及び除草剤グリホシネート耐性を付与するための *pat* 遺伝子

5 MON-00810-6 : チョウ目害虫抵抗性を付与するための *cry1Ab* 遺伝子

SYN-IR162-4 : チョウ目害虫抵抗性を付与するための改変 *vip3A* 遺伝子及び選抜マーカー特性を付与するための *pmi* 遺伝子

MON-00603-6 : 除草剤グリホサート耐性を付与するための改変 *cp4 epsps* 遺伝子

10

イ 構成及び構成要素の由来

親系統の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1～表 4 (8～11 ページ) に示した。

15

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

20

供与核酸の各構成要素の機能を表 1～表 4 (8～11 ページ) に示した。

表 1 DAS-01507-1 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット		
UBIZM1(2) Promoter	1.98	<i>Zea mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター* (イントロン及び5'非翻訳領域を含む)。
改変 <i>cry1F</i>	1.82	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来のCry1F蛋白質をコードする遺伝子。植物における発現を高めるため、最適化されている。
ORF25PolyA Terminator	0.72	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi5955由来の転写を停止するためのターミネーター。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
CAMV35S Promoter	0.53	カリフラワーモザイクウイルス由来の35S構成的プロモーター*。
<i>pat</i>	0.55	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィントリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子。植物における発現を高めるため、最適化されている。
CAMV35S Terminator	0.21	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するための35Sターミネーター。

* 構成的プロモーター：植物体の全体において、目的遺伝子を発現させるプロモーター。

表 2 MON-00810-6 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>cry1Ab</i> 遺伝子カセット	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>hsp70</i> イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。 <i>hsp70</i> イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
<i>cry1Ab</i>	土壌中に存在する <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の Cry1Ab 蛋白質をコードする遺伝子。
NOS 3'	<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 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット (挿入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシ中には挿入されていなかった。)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>hsp70</i> イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。 <i>hsp70</i> イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP2	<i>Arabidopsis</i> の <i>EPSPS</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列の N 末端配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> 由来の、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子に基づいた合成配列。グリホサートに高い耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。
NOS 3'	<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。
<i>gox</i> 遺伝子カセット (挿入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシ中には挿入されていなかった。)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>hsp70</i> イントロン	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。 <i>hsp70</i> イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP1	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>rubisco</i> 遺伝子の small subunit 1A の葉緑体輸送ペプチド配列の N 末端。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>gox</i>	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) に基づいた合成配列。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。
外骨格 (PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通) (挿入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシ中には挿入されていなかった。)	
<i>lacZ</i>	β -D-ガラクトシダーゼ又は LacZ 蛋白質の部分的コード配列。基質の Xgal が β -D-ガラクトシダーゼによって分解されることにより青色を呈し、大腸菌でのクローニング時の選抜マーカーとして用いられる。
<i>ori</i> -pUC	大腸菌プラスミド pUC の複製開始領域を含むセグメント。プラスミドの複製を開始する。
<i>nptII</i>	原核生物のトランスポゾン Tn5 より分離された遺伝子で、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードする。この遺伝子が微生物内で発現されるとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選抜マーカーとして働く。

表 3 SYN-IR162-4 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

遺伝要素	サイズ (bp)	由来及び機能
害虫抵抗性遺伝子カセット		
ZmUbiInt プロモーター	1,993	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域 (1,010bp) を含むプロモーターで目的遺伝子を単子葉植物全組織で恒常的に発現させる。
改変 <i>vip3A</i> 遺伝子	2,370	一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である <i>Bacillus thuringiensis</i> AB88株由来の <i>vip3A</i> 遺伝子を、植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す改変Vip3A蛋白質をコードする。改変Vip3A蛋白質では、そのアミノ酸配列の284番目のアミノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。また、本組換え体で発現している改変Vip3A蛋白質では、形質転換体作成時に129番目のメチオニンがイソロイシンに置換されている。
iPEPC9	108	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列。目的遺伝子の発現を高めるために用いた。
35S ターミネーター	70	カリフラワーモザイクウイルスの35S RNA由来のポリアデニル化配列。
選抜マーカー遺伝子カセット		
ZmUbiInt プロモーター	1,993	前述と同じ。
<i>pmi</i> 遺伝子	1,176	マンノースリン酸イソメラーゼ (phosphomannose isomerase) (以下「PMI蛋白質」という。)を産出する大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12株由来の <i>manA</i> 遺伝子で、遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられた。
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNAの転写を終結させる。
その他の領域 (以下「外側骨格領域」という。)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリンTi-プラスミド由来のT-DNA レフトボーダー領域。
<i>spec</i>	789	<i>E. coli</i> のトランスポゾンTn7 のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 (<i>aadA</i>)。ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与するため、ベクターの選抜マーカーとして用いた。
cos	432	<i>E. coli</i> へのプラスミドの移入及び <i>E. coli</i> におけるプラスミドの自己複製に必要なラムダファージの直鎖DNAの付着末端領域。
ColE1 ori	807	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリンTi-プラスミド由来のT-DNA ライトボーダー領域。

表 4 MON-00603-6 の作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット①		
P-ract1	0.9	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	0.5	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、目的遺伝子を発現させる。
CTP2	0.2	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配列である。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	1.4	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	0.3	<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 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット②		
E35S	0.6	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 Intron	0.8	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。ZmHsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
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配列である。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	1.37	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	0.25	<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。

- 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 a. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

【害虫抵抗性蛋白質】

10 DAS-01507-1 に産生される改変 Cry1F 蛋白質、MON-00810-6 に産生される
Cry1Ab 蛋白質及び SYN-IR162-4 に産生される改変 Vip3A 蛋白質は、いずれも
Bacillus thuringiensis 由来の殺虫性蛋白質(以下「Bt 蛋白質」という。)であり、
チョウ目昆虫に対し高い殺虫活性を示す。Bt 蛋白質は、一般に害虫の中腸細胞に
15 小孔を形成し、中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示す (Schnepf *et al.*,
1998; Lee *et al.*, 2003)。改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋
白質はそれぞれ特異的な受容体に結合して機能するため、殺虫対象とする昆虫相
に特異性を有する (白井, 2003; Lee *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes *et al.*, 2006)。

改変 Cry1F 蛋白質 :

20 改変 Cry1F 蛋白質は、*B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来 δ -エンドトキシンで
ある。ヨーロッパアワノメイガ (European corn borer、*Ostrinia nubilalis*)、フ
ォールアーミーワーム (Fall armyworm、*Spodoptera frugiperda*)、ビートアー
ミーワーム (Beet armyworm、*Spodoptera exigua*) 等のチョウ目昆虫に高い殺
虫活性を有し、チョウ目昆虫以外のコウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目及
びトビムシ目等の昆虫、並びに哺乳類、鳥類、魚類等の非標的生物に対する毒性
25 は認められていない (EPA, 2010)。

Cry1Ab 蛋白質 :

30 Cry1Ab 蛋白質は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来 δ -エンドトキシンで
ある。ヨーロッパアワノメイガ、サウスウエスタンコーンボーラー (Southwestern
corn borer、*Diatraea grandiosella*)、サザンコーンストークボーラー (Southern
cornstalk borer、*Diatraea crambidoides*)、コーンイヤールーム (Corn earworm、
Helicoverpa zea)、フォールアーミーワーム、ストークボーラー (Stalk borer、
Papaipema nebris) 等のチョウ目昆虫に殺虫活性を有し、チョウ目以外のコウチ
ュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目及びトビムシ目等の昆虫、並びに哺乳類、鳥
35 類、魚類等の非標的生物に対する毒性は認められていない (EPA, 2010)。

改変 Vip3A 蛋白質 :

40 改変 Vip3A 蛋白質は、*B. thuringiensis* AB88 株に由来する細胞外分泌蛋白質
である。ブラックカットワーム (Black cutworm、*Agrotis ipsilon*)、フォールア
ーミーワーム及びコーンイヤールーム等のチョウ目昆虫に高い殺虫活性を有し、
チョウ目以外のコウチュウ目、ハチ目、カメムシ目、アミメカゲロウ目及びトビ
ムシ目等の昆虫、並びに哺乳類、鳥類、魚類等の非標的生物に対する毒性は認め
られていない (USDA, 2007)。

【除草剤耐性蛋白質】

PAT 蛋白質：

5 除草剤グルホシネートは、その活性成分である L-グルホシネートにより、グルタミン合成酵素の活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。DAS-01507-1 に産生される PAT 蛋白質は、L-グルホシネートをアセチル化し無毒化することで、植物にグルホシネートに対する耐性を付与する (OECD, 2002)。

10 改変 CP4 EPSPS 蛋白質：

15 除草剤グリホサートは、植物中の芳香族アミノ酸合成経路であるシキミ酸経路中の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号：E.C.2.5.1.19、以下「EPSPS 蛋白質」という。) の活性を阻害するため、植物中に芳香族アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる。MON-00603-6 に産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも酵素活性を有し、シキミ酸経路が阻害されないため、植物に除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

【選抜マーカー】

20 PMI 蛋白質：

25 トウモロコシはマンノースを炭素源として利用できない。SYN-IR162-4 に産生される PMI 蛋白質はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換し、炭素源としてマンノースを利用することを可能とする。このため、本蛋白質を選抜マーカーとして利用した。PMI 蛋白質はトウモロコシには存在しないが、ヒトの消化器官及びダイズ等の植物に広く存在することが確認されている。

b. 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の相同性

30 データベースを用いて、改変 Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、PMI 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質と既知アレルギーとのアミノ酸配列相同性を検索した¹⁾。その結果、これら蛋白質と既知のアレルギーとの間に、相同性はないことが確認された。

35

¹⁾ 改変 Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質：データベース FARRP 12.0、2012 年 5 月検索。
Cry1Ab 蛋白質：データベース NCBI Release 181.0、2011 年 7 月検索。
改変 CP4 EPSPS 蛋白質：データベース AD_2011、TOX_2011 及び PRT_2011、2011 年 2 月検索。
改変 Vip3A 蛋白質及び PMI 蛋白質：データベース FARRP 12.0、2012 年 4 月検索。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

Bt 蛋白質：

5 改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質は、いずれも *B. thuringiensis* 由来の Bt 蛋白質である。Bt 蛋白質の機能についてはこれまでに多くの研究がなされており、標的昆虫の中腸細胞に小孔を形成し、破壊することにより殺虫活性を示すと考えられているが (OECD, 2007; Lee *et al.*, 2003)、酵素活性を有するとの報告はない。

10 PAT 蛋白質：

15 PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの活性成分 L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する。しかし、本蛋白質は L-グルホシネートの鏡像異性体である D-グルホシネート、L-グルホシネートと特に構造の類似した L-グルタミン酸及び他の L-アミノ酸を基質としない。また、過剰の各種アミノ酸の存在下でも本蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応は阻害されない。以上のことから、PAT 蛋白質は L-グルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられている (OECD, 1999)。

改変 CP4 EPSPS 蛋白質：

20 改変 CP4 EPSPS 蛋白質は EPSPS 蛋白質と同一の機能を有する。EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を合成するシキミ酸経路における律速酵素ではなく、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が産生されることにより EPSPS 蛋白質の活性が高まったとしても、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、除草剤グリホサート耐性遺伝子組換え作物 (ナタネ、ワタ、
25 ダイズ及びトウモロコシ) の芳香族アミノ酸含量は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 (CFIA, 1995; Nida *et al.*, 1996; Padgett *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 2002)。

30 また、EPSPS 蛋白質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩 (以下「PEP」という。) 及びシキミ酸-3-リン酸塩 (以下「S3P」という。) と特異的に反応する。S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、反応の起こり易さを示す特異性係数 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、S3P との反応特異性の 200 万分の 1 に過ぎず、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は低い (Gruys *et al.*, 1992)。

35 PMI 蛋白質：

PMI 蛋白質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸の可逆的な相互変換を触媒する酵素蛋白質である。PMI 蛋白質による反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は報告されていない (Freeze, 2002)。

40

以上のことから、これら蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は低い。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5 親系統の作出に用いたベクターは、以下のとおりである。

DAS-01507-1 : *E. coli* プラスミド pUC19 から構築されたプラスミド PHP8999 (図 1、17 ページ)。

MON-00810-6 : *E. coli* プラスミド pUC119 から構築されたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 (図 2、18 ページ)。

10 SYN-IR162-4 : *E. coli* プラスミド pSB12 から構築されたプラスミド pNOV1300 (図 3、19 ページ)。

MON-00603-6 : *E. coli* プラスミド pUC119 から構築されたプラスミド PV-ZMGT32 (図 4、20 ページ)。

15 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いたプラスミドの塩基数は、以下のとおりである。

20 DAS-01507-1 : 9,504 bp (PHP8999)

MON-00810-6 : 7,800 bp (PV-ZMBK07) 及び 9,447 bp (PV-ZMGT10)

SYN-IR162-4 : 14,405 bp (pNOV1300)

MON-00603-6 : 9,308 bp (PV-ZMGT32)

25 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

ベクターの選抜マーカーとして、以下の遺伝子が利用された。これらマーカー遺伝子は、親系統に導入されていないことが確認されている。

DAS-01507-1 : カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 遺伝子)

30 MON-00810-6 : β -D-ガラクトシダーゼ (LacZ 蛋白質) の部分的コード配列 (*lacZ* 遺伝子) 及び

カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 遺伝子)

SYN-IR162-4 : ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spec* 遺伝子)

35 MON-00603-6 : β -D-ガラクトシダーゼ (LacZ 蛋白質) の部分的コード配列 (*lacZ* 遺伝子) 及び

カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII* 遺伝子)

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 SYN-IR162-4 の作出に用いたベクターpNOV1300 には、*E. coli* へのプラスミドの移入を可能とするラムダファージ由来の付着末端領域である *cos* が存在するが、ラムダファージの *E. coli* 以外の宿主は知られていない。また、他のベクターに感染性はない。

10 (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

15 親系統 DAS-01507-1、MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 の作出に用いた供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位を、図 1～図 4 (17～20 ページ) に示した。

20

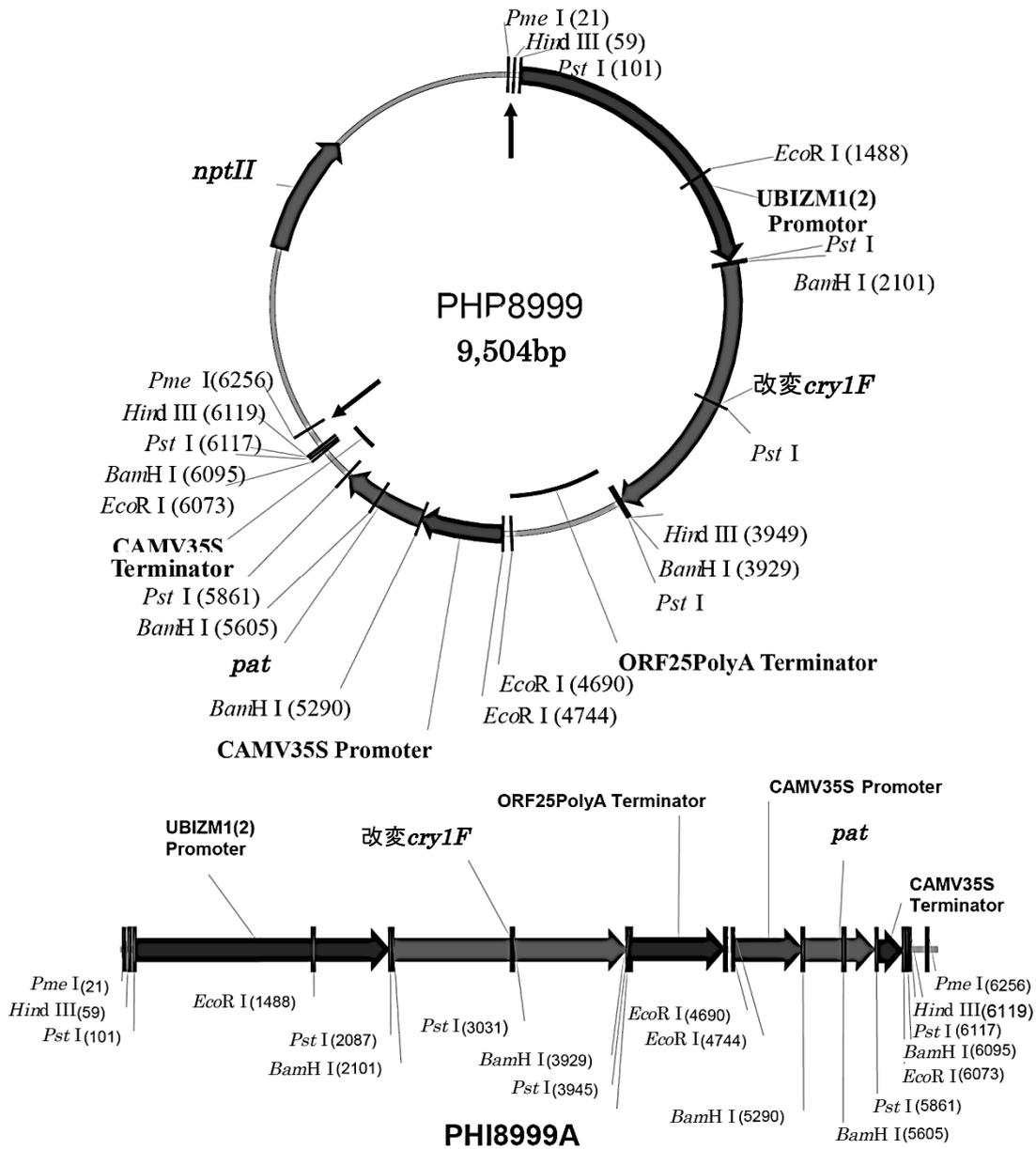


図 1 プラスミド PHP8999* (上図) 及び挿入 DNA 領域 PHI8999A (下図) の構成

* DAS-01507-1 の作出に用いたベクター

プラスミド PHP8999 を制限酵素 *Pme* I で処理し (上図 2 箇所の矢印の位置で切断)、直鎖状 DNA 断片である PHI8999A (下図) を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

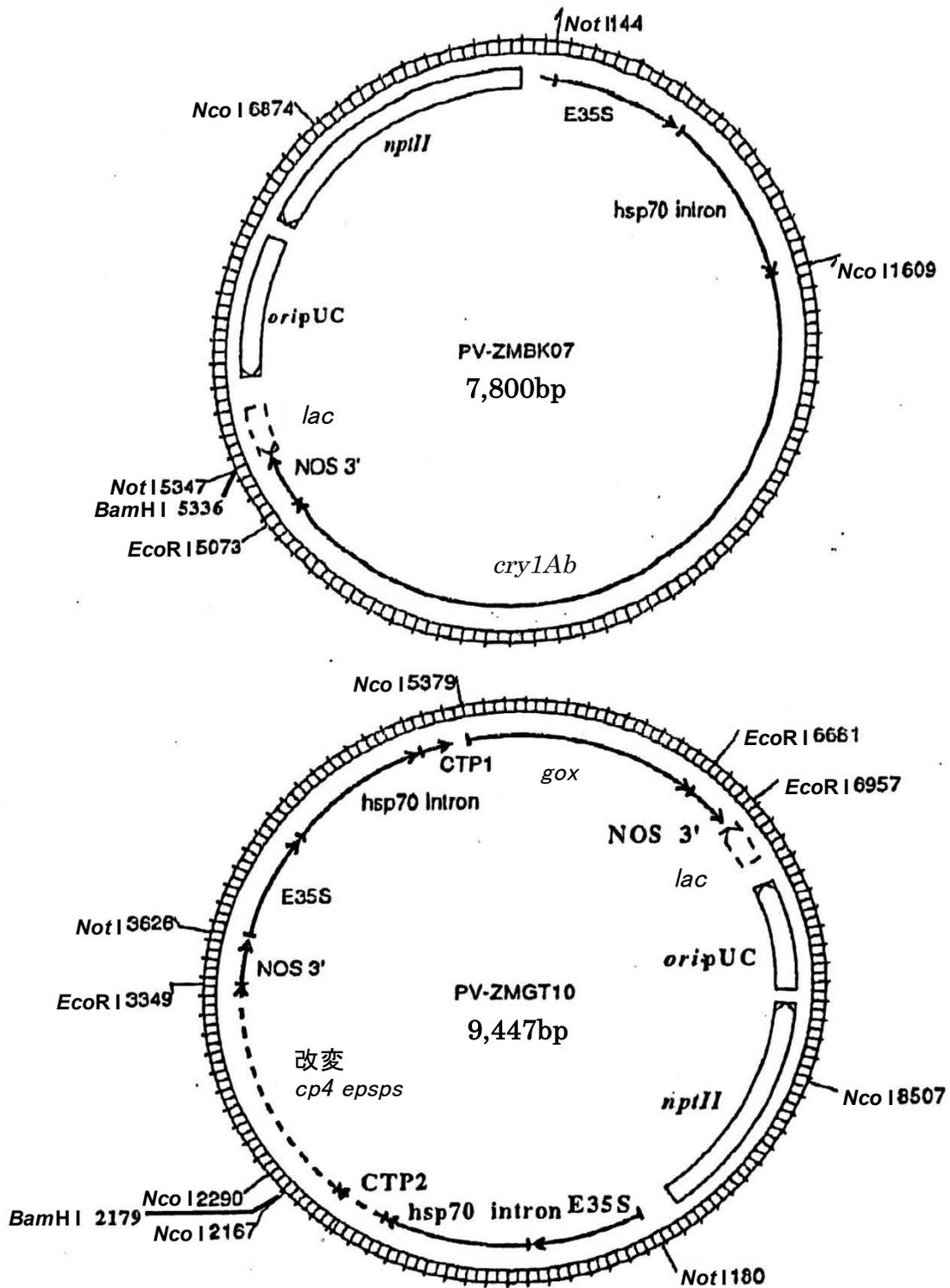


図 2 プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10* の構成

* MON-00810-6 の作出に用いたベクター

環状プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 を混合し、そのまま宿主への遺伝子導入に用いた。実際に挿入されたのは PV-ZMBK07 の *cry1Ab* 発現カセット (表 2、9 ページ) のみであることが確認されている (第一.2.(4).②、23 ページ)。

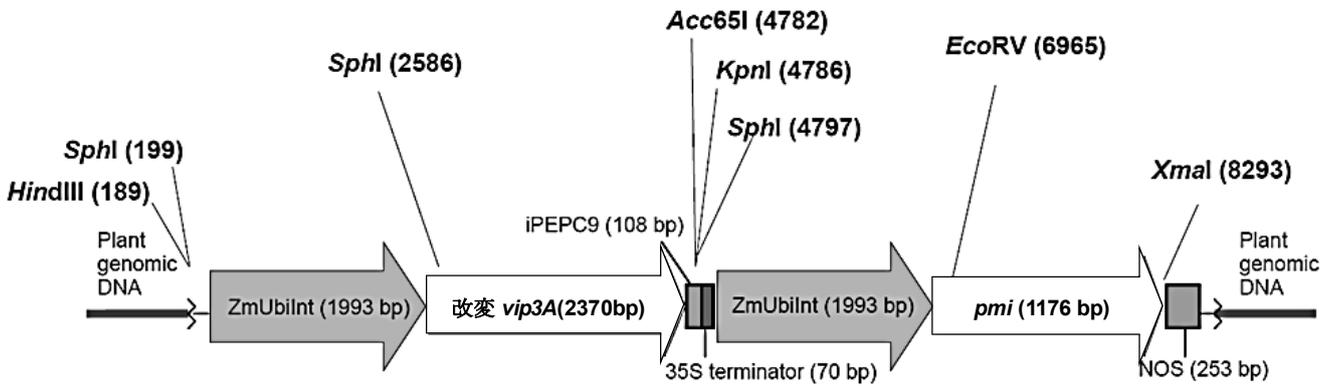
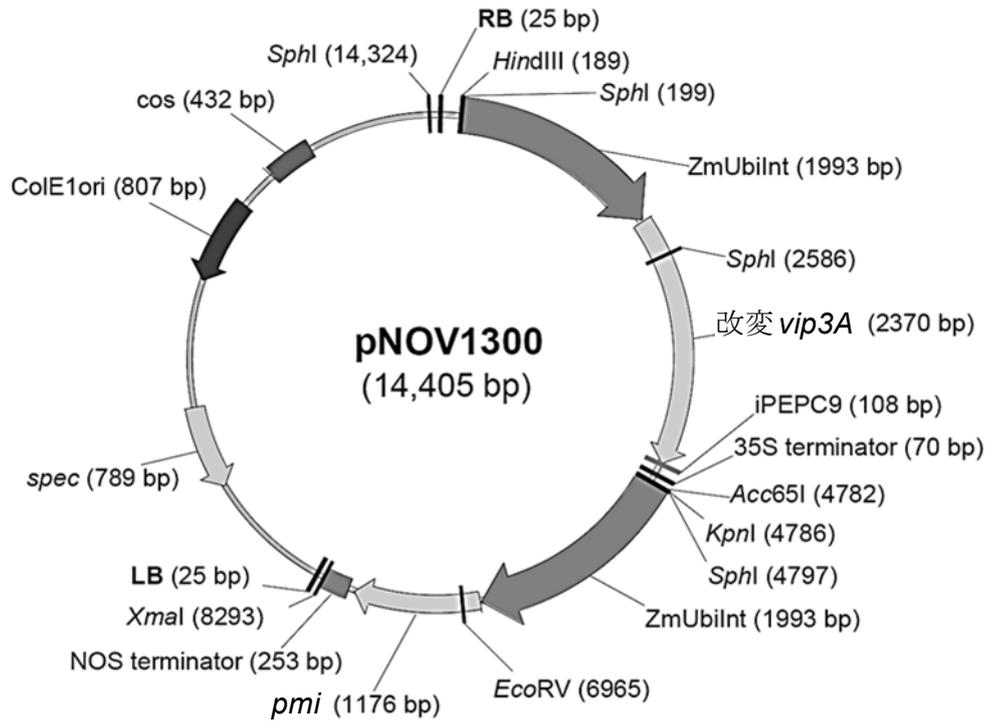


図 3 プラスミド pNOV1300* (上図) 及び挿入された T-DNA 領域 (下図) の構成

* SYN-IR162-4 の作出に用いたベクター

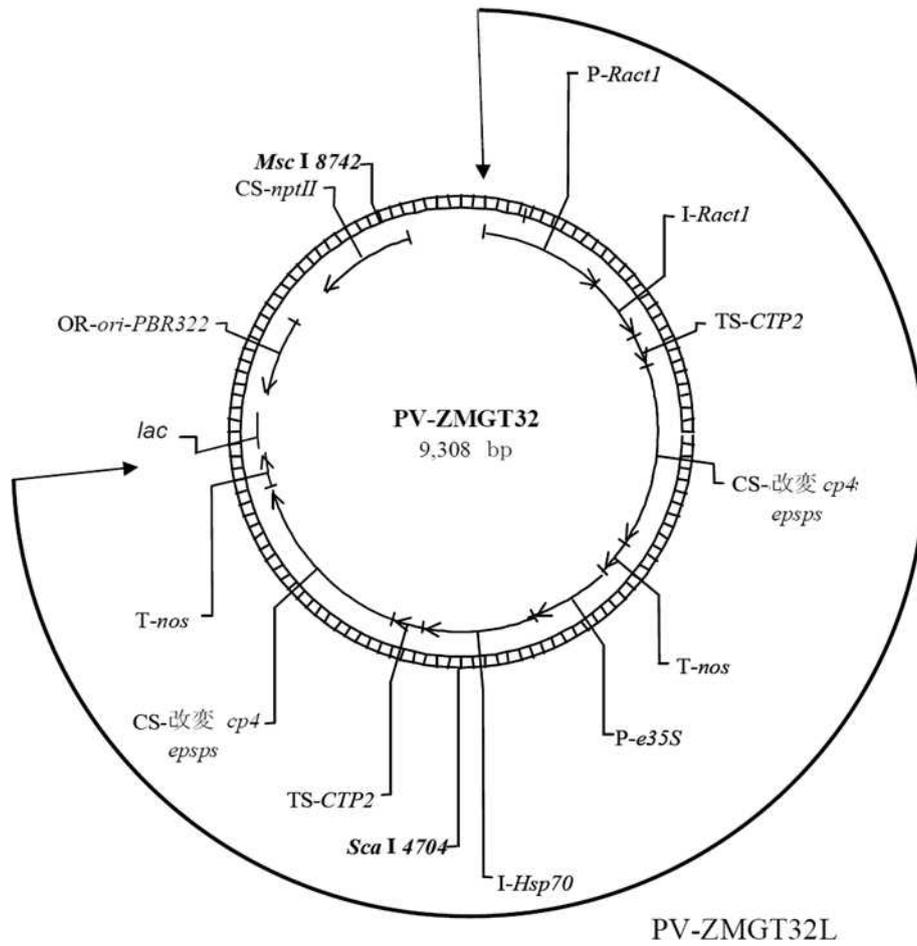


図 4 プラスミド PV-ZMGT32*の構成

* MON-00603-6 の作出に用いたベクター

プラスミド PV-ZMGT32 を制限酵素 *Mlu*I で処理し、直鎖状 DNA 断片である PV-ZMGT32L を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

5 宿主内への核酸の移入は、DAS-01507-1、MON-00810-6 及び MON-00603-6
ではパーティクルガン法、SYN-IR162-4 についてはアグロバクテリウム法が用
いられた。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

10 ① 核酸が移入された細胞の選抜方法

核酸が移入された細胞は、以下を添加した培地で培養することにより選抜され
た。

DAS-01507-1 : 除草剤グルホシネート

MON-00810-6 : 除草剤グリホサート

15 SYN-IR162-4 : マンノース

MON-00603-6 : 除草剤グリホサート

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

25 アグロバクテリウム法を用いて作出した SYN-IR162-4 については、マンノース
培地にセフトキシムを添加し、アグロバクテリウムを除去した。確認のため、
再分化した植物体について PCR を行ったが、プラスミドの外側骨格領域に含まれ
る抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*spec* 遺伝子) は検出されなかった。以上のこと
から、菌体の残存はないと考えられる。

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

35 本スタック系統トウモロコシは、交雑育種法により DAS-01507-1、
MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 を交配して作出した。その経
過を図 5 (22 ページ) に示した。また、我が国におけるこれら親系統の承認状況
は、表 5 (22 ページ) のとおりである。

40

(社外秘情報につき非開示)

5

図 5 本スタック系統トウモロコシの育成例

10 表 5 我が国における親系統及び本スタック系統トウモロコシの承認状況

系 統	食 品 ¹⁾	飼 料 ²⁾	環 境 ³⁾
DAS-01507-1	2002年 7月 8日	2003年 3月 27日	2005年 3月 2日
MON-00810-6	2001年 3月 30日	2003年 3月 27日	2004年 6月 1日
SYN-IR162-4	2010年 1月 21日	2010年 6月 1日	2010年 6月 11日
MON-00603-6	2001年 3月 30日	2003年 3月 27日	2004年 11月 22日
本スタック系統	2012年申請	2012年届出	2012年申請

1)食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）

2)飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）

3)遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)

(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 DAS-01507-1、MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 の形質はメンデルの法則に従って伝達され、移入された核酸の複製物は、トウモロコシ染色体ゲノム上に存在することが確認されている。

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

各親系統における導入遺伝子のコピー数及び伝達の安定性について、サザンブロット分析が行われている。

15 DAS-01507-1 :

それぞれ 1 コピーの改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットがトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

20 なお、導入 DNA の塩基配列解析により、導入 DNA の 5'末端領域に改変 *cry1F* 遺伝子配列の一部が、5'末端及び 3'末端領域に *pat* 遺伝子配列の一部が、また、3'末端領域に ORF25PolyA Terminator 配列の一部が含まれていることが確認された。しかしながら、ノーザンブロット分析により、これらの遺伝子断片は mRNA へ転写されておらず、機能していないことが確認されている。

25 MON-00810-6 :

1 コピーの *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な PV-ZMBK07 由来の DNA 断片がトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

30 なお、トウモロコシのゲノム中に挿入されたのは PV-ZMBK07 由来の *Cry1Ab* 蛋白質の産生に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子や PV-ZMGT10 由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子と *gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことがサザンブロット分析により確認されている。

SYN-IR162-4 :

35 それぞれ 1 コピーの改変 *vip3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子がトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

MON-00603-6 :

40 1 コピーの PV-ZMGT32L (2つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む) がトウモロコシゲノムに挿入され、後代に安定して遺伝することが確認されている。

なお、挿入遺伝子の 3'末端近傍に *P-Ract1* の 217bp の断片が逆方向に移入されているが、この断片が新たな蛋白質の産生に関与していないことがウエ

スタンプロット分析により確認されている。また、P-e35Sにより誘導される
改変 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基が MON-00603-6 作出時に変化し、改変 CP4
EPSPS 蛋白質を構成するアミノ酸の 1 つが変化している。しかしながら、こ
5 のアミノ酸は EPSPS 蛋白質ファミリーの活性に必須なアミノ酸には含まれ
ていないこと、この変化は蛋白質の活性部位及び三次元構造に影響を及ぼさ
ないこと、元の蛋白質と酵素活性や免疫反応性が同等であることより、蛋白
質の構造と機能は変化していないと考えられた。

- 10 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

- 15 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

本スタック系統トウモロコシの親系統の発現安定性は、以下の方法で確認した。

20 DAS-01507-1 : チョウ目害虫抵抗性の生物検定、除草剤グルホシネート
散布試験、ELISA 法による蛋白質の産生の確認

MON-00810-6 : チョウ目害虫抵抗性の生物検定

SYN-IR162-4 : チョウ目害虫抵抗性の生物検定、ELISA 法による蛋白質
の産生の確認

25 MON-00603-6 : 除草剤グリホサート散布試験

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

30 移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その
他の経路を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

35 検出の方法 :

European Commission ウェブサイトに公開されている各親系統(DAS-01507-1、
MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6) のリアルタイム定量 PCR 法
による系統特異的検出方法 (Joint Research Centre, 2012)。

40

感度：

DAS-01507-1、MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 の系統特異的検出方法の定量限界は、それぞれ 0.08、0.1、0.08 及び 0.1%であることが確認されている。

5

信頼性：

DAS-01507-1、MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 の系統特異的検出方法の信頼性は、European Network of GMO Laboratories 加盟のそれぞれ 14、14、12 及び 12 ヶ所の試験機関の共同試験により確認されている。

10

本スタック系統トウモロコシの検出及び識別は、1 つの種子又は植物体を上述の方法で分析する。

15 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

20 本スタック系統トウモロコシには各親系統に由来する以下の特性が付与されている。

DAS-01507-1 : 改変 *cry1F* 遺伝子によるチョウ目害虫抵抗性及び
pat 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性

25 MON-00810-6 : *cry1Ab* 遺伝子によるチョウ目害虫抵抗性

SYN-IR162-4 : 改変 *vip3A* 遺伝子によるチョウ目害虫抵抗性

MON-00603-6 : 改変 *cp4 epsps* 遺伝子による除草剤グリホサート耐性

30 なお、SYN-IR162-4 には選抜マーカーとして *pmi* 遺伝子が導入されている。

これら遺伝子により産生される蛋白質の機能的な相互作用の可能性について、害虫抵抗性蛋白質間及び除草剤耐性蛋白質間の各観点から考察した。

害虫抵抗性蛋白質間での機能的な相互作用

35 改変 *Cry1F* 蛋白質、*Cry1Ab* 蛋白質及び改変 *Vip3A* 蛋白質はチョウ目害虫に殺虫効果を示す(第一. 2. (1).ロ.②、12 ページ)。害虫抵抗性蛋白質が持つ殺虫効果の特異性には、蛋白質の構造が関与しており、そのような特異性に関与する領域に変化が生じなければ、標的害虫に対する効果に影響を及ぼすことはないと考えられる。

40 これらのことから、本スタック系統トウモロコシにおいて害虫抵抗性蛋白質が互いに影響を及ぼし合うことはないと考えられ、各害虫抵抗性蛋白質の殺虫効果又は殺虫スペクトルが相乗的に高まる又は広がることは考え難い。

除草剤耐性蛋白質間での機能的な相互作用

- 5 PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質のいずれも酵素活性を有する。PAT 蛋白質の基質は L-グルホシネート、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の基質は PEP 及び S3P であり、各蛋白質の基質は異なる。しかも、それぞれの基質と特異的に反応することが知られている。また、関与する代謝経路も互いに独立している (第一. 2. (1). 口.③、14 ページ)。したがって、両蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質間での機能的な相互作用

- 10 害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質は作用機作が独立しており、相互に影響を及ぼす可能性は考え難い。

その他の蛋白質との機能的な相互作用

- 15 SYN-IR162-4 には選抜マーカーとして *pmi* 遺伝子も導入されているが、本遺伝子により産生される PMI 蛋白質はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する。その活性はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、他の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。このことから、上述の害虫抵抗性蛋白質及び除草剤耐性蛋白質と PMI 蛋白質が相互に作用する可能性は考え難い。

- 20 以上のことから、各親系統由来の蛋白質間で相互作用を示すことは考え難く、導入した遺伝子によって各親系統に新たに付与された性質は、本スタック系統トウモロコシにおいても変化していないと結論された。

- 25 したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種との間の生理学的又は生態学的特性の相違については、各親系統における評価結果に基づき評価した。

- 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

5 各親系統の生物多様性影響評価は終了しており、下記 a~g の生理学的又は生態学的特性の観点から評価した結果、各親系統はいずれも宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシの範囲にあると判断されている*。

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

15

*各親系統の生物多様性影響評価の参照方法は、本評価書 6 ページの脚注に記載した。

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

- 5 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) 使用等の方法

10 —

(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

15 —

(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

20 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

25 —

(6) 国外における使用等に関する情報

DAS-01507-1、MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 の国外における承認状況は、表 6 (下の 29 ページ) のとおりである。

5

表 6 国外における親系統及び本スタック系統トウモロコシの承認状況

申請国	申請先	目的	承認年				
			DAS-01507-1	MON-00810-6	SYN-IR162-4	MON-00603-6	本スタック系統
米 国	農務省 (USDA)	無規制栽培	2001	1996	2010	2000	— 1)
	食品医薬品庁 (FDA)	食品、飼料	2001 ²⁾	1996 ²⁾	2008 ²⁾	2000 ²⁾	2012 届出済
	環境保護庁 (EPA)	環境	2001	1995	2008	2000	2012 申請済
カナダ	食品検査庁 (CFIA)	環境、飼料	2002	1997	2010	2001	2012 届出済
	保健省 (HC)	食品	2002	1997	2010	2001	— 1)
E U	食品安全機関 (EFSA)	食品、飼料 (輸入)	2006	1998	2012	2004	2014 申請予定
オーストラリア / ニュージーランド	食品基準機関 (FSANZ)	食品 (輸入)	2003	2000	2009	2002	2012 届出済

1) 承認済み系統から作出されたスタック系統については、新たな承認及び届出を必要としない。

2) 確認終了年。

10

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統トウモロコシは、交雑育種法により DAS-01507-1、
MON-00810-6、SYN-IR162-4 及び MON-00603-6 を交配して作出した。

5

親系統に産生される各 Bt 蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）と比較し、本スタック系統トウモロコシに産生されるこれら Bt 蛋白質の殺虫効果の特異性に関与する領域に変化が生じているとは考え難く、標的害虫に対する効果に変化はないと考えられる。加えて、各 Bt 蛋白質は互いに独立して機能することから相互作用が生じることも考え難い。また、Bt 蛋白質には酵素活性がないため、宿主の代謝系に影響を及ぼすことは考え難い。

10

本スタック系統トウモロコシに産生される PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質は酵素活性を有するが、いずれも基質特異性を有し、関連する代謝経路も互いに独立していることから、宿主の代謝系に影響を及ぼしたり、予期しない代謝物が生じることは考え難い。

15

害虫抵抗性蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）、除草剤耐性蛋白質（PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質）及び選抜マーカーである PMI 蛋白質は作用機作が独立しており、相互に影響を及ぼすことは考え難い。

20

このように、本スタック系統トウモロコシについては、親系統が有する形質を併せ持つこと以外に形質の変化はないと考えられる。

したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。以下の「1 競合における優位性」、「2 有害物質の産生性」、「3 交雑性」の各項目について、資料 1~4 のとおり、各親系統において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ている。このため、本スタック系統トウモロコシにより、競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

25

30

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

35

(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

40

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

5 (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
10

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

15 (2) 影響の具体的内容の評価

(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

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 親系統に産生される各 Bt 蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）と比較し、本スタック系統トウモロコシに産生されるこれら Bt 蛋白質の殺虫効果の特異性に関与する領域に変化が生じているとは考え難く、標的害虫に対する効果に変化はないと考えられる。加えて、各 Bt 蛋白質は互いに独立して機能することから相互作用が生じることも考え難い。また、Bt 蛋白質には酵素活性がないため、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

10 本スタック系統トウモロコシに産生される PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び PMI 蛋白質は酵素活性を有するが、いずれも基質特異性を有し、関連する代謝経路も互いに独立していることから、宿主の代謝系に影響を及ぼしたり、予期しない代謝物が生じることは考え難い。

15 害虫抵抗性蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）、除草剤耐性蛋白質（PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質）及び選抜マーカーである PMI 蛋白質は作用機作が独立しており、相互に影響を及ぼすことは考え難い。

このように、本スタック系統トウモロコシについては、親系統が有する形質を併せ持つこと以外に形質の変化はないと考えられる。

20 したがって、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価を実施した結果、本スタック系統トウモロコシ及び親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代のスタック系統トウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

25

参考文献

- 5 CFIA. (1994). The biology of *Zea mays* (L.). Canadian Food Inspection Agency.
(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.pdf>).
Accessed on February 8th, 2012.
- 10 CFIA. (1995). Determination of environmental safety of Monsanto Canada Inc.'s
roundup herbicide-tolerant *Brassica napus* canola line GT73.
Canadian Food Inspection Agency.
(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dd/dd9502e.shtml>)
Accessed on June 5th, 2012.
- 15 EPA. (2010). Biopesticide Registration Action Document. Cry1Ab and Cry1F
Bacillus thuringiensis (Bt) Corn Plant -Incorporated Protectants.
United States Environmental Protection Agency.
(<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/cry1f-cry1ab-brad.pdf>).
Accessed on April 2nd, 2012.
- 20 FAO. (2012). FAOSTAT. (<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>).
Accessed on February 21th, 2012.
- 25 Freeze, H. H. (2002). Phosphomannose isomerase. Handbook of
glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K.
and Fukuda, M., Eds. Springer-Verlag, Tokyo and New York, pp. 595-599.
- 30 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.
- 35 Hansen-Jesse, L.C., and Obrycki, J.J. (2000). Field deposition of Bt transgenic
corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*. 125: 241-248.
- 40 Joint Research Centre.
Quantitative PCR method for detection of maize event TC1507.
Quantitative PCR method for detection of maize event MON810.
Quantitative PCR method for detection of maize event MIR162.
Quantitative PCR method for detection of maize event NK603.
(http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/query.do?db=gmometh&query=id%3AQT-eve-zm*).
Accessed on March 10th, 2012.

- Jurat-Fuentes, J.L. and Adang M.J. (2006). The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry*. 45: 9688-9695.
- 5 菊池一徳. (1987). トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳. pp.16-17, 55, 59, 66-68.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. and Chen J-S. (2003). The Mode of Action of the Bacillus Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4648-4657.
- 10 中村茂文. (2001). トウモロコシ - 生育のステージと生理、生態. 雑穀. 転作全書第三卷. 農文協. 東京. pp.42-43.
- 15 Nida, D.L., Patzer, S., Harvey, P., Stipanovic, R., Wood, R. and Fuchs, R.L. (1996). Glyphosate-tolerant cotton: the composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44: 1967-1974.
- 20 日本版バイオセーフティクリアリングハウス.
申請書等の概要. (2004a). チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1)申請書等の概要.
- 25 申請書等の概要. (2004b). チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* L.) (MON810, OECD UI : MON-ØØ81Ø-6)申請書等の概要.
- 申請書等の概要. (2004c). 除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(NK603, OECD UI : MON-ØØ6Ø3-6)申請書等の概要.
- 30 生物多様性影響評価書の概要. (2008). チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MIR162, OECD UI : SYN-IR162-4)の生物多様性影響評価書の概要.
- 35 (<https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenSearch.do>) Accessed on March 7th, 2012.
- 農林水産省. (2012). 平成 23 年産飼肥料作物の作付 (栽培) 面積 (http://www.maff.go.jp/j/tokei/sokuhou/menseki_siryou_11/).
40 Accessed on April 6th, 2012.

- OECD. (1999). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
- 5 Organization for Economic Cooperation and Development.
([http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(99\)13&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(99)13&doclanguage=en)).
Accessed on February 8th, 2012.
- 10 OECD. (2002). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 25. MODULE II: PHOSPHINOTHRICIN. ENV/JM/MONO(2002)14.
Organization for Economic Cooperation and Development.
([http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2002\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2002)14&doclanguage=en)).
15 Accessed on February 8th, 2012.
- OECD. (2003). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27. Consensus Document of the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11.
- 20 Organization for Economic Cooperation and Development.
([http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2003\)11&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2003)11&doclanguage=en)).
Accessed on February 8th, 2012.
- 25 OECD. (2007). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Protein. ENV/JM/MONO(2007)14.
Organization for Economic Cooperation and Development.
- 30 (<http://www.oecd.org/dataoecd/36/61/46815888.pdf>).
Accessed on June 5th, 2012.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R., and Fuchs, R.L. (1996). The Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean
35 Seeds is Equivalent to That of Conventional Soybeans. *The Journal of Nutrition*. 126(3): 702-716.
- Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., D. Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, P., and Jones, G.D. (2001). Corn pollen
40 deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 11919-24.

- Ridley, W.P., Sidhu, R.S., Pyla, P.D., Nemeth, M.A., Breeze, M.L., and Astwood, J.D. (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(25): 7235-7243.
- 5
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3) : 775-806.
- 10
- 千藤茂行. (2001). トウモロコシ - トウモロコシの品種生態. 雑穀. 転作全書第三巻. 農文協. 東京. pp. 98-99.
- 15
- 白井洋一. (2003). 害虫抵抗性遺伝子組換え作物が非標的昆虫に及ぼす影響: 現在までの研究事例. 日本応用動物昆虫学会誌 47: 1-11.
- 20
- Shirai, Y. and Takahashi, M. (2005). Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Applied Entomology and Zoology*. 40(1) : 151-159.
- 25
- 戸澤英夫. (2005). トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用— .農文協. pp. 58-59, 88, 127-130.
- 30
- USDA. (1996). Petition for Determination of Nonregulated Status : Additional YieldGuard™ Corn (*Zea mays* L.) Lines with the *cryIA(b)* Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. United States Department of Agriculture. (http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/96_01701p.pdf). Accessed on February 8th, 2012.
- 35
- USDA. (2000a). Petition for Determination of Nonregulated Status *B.t.Cry1F* Insect-Resistant, Glufosinate-Tolerant Maize Line 1507. United States Department of Agriculture. (http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/00_13601p.pdf). Accessd on March 7th, 2012
- 40
- USDA. (2000b). Request for Extension of Determination of Nonregulated Status to the Additional Regulated Article : Roundup Ready Corn Line NK603. United States Department of Agriculture. (http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/00_01101p.pdf). Accessed on February 8th, 2012.

USDA. (2007). Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant MIR162 Maize. United States Department of Agriculture. (http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/07_25301p.pdf).

Accessed on February 8th, 2012.

5 財務省. (2012). 財務省貿易統計. (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).

Accessed on February 8th, 2012.

緊急措置計画書

平成 24 年 8 月 29 日

5 氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 天羽 稔
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

10

15

20

チョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cry1F*, *pat*, *cry1Ab*, 改変 *vip3A*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507 × MON810 × MIR162 × NK603, OECD UI: DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ81Ø-6×SYN-IR162-4×MON-ØØ6Ø3-6) (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。) 及び親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代のスタック系統トウモロコシの第一種使用等において、今後、科学的根拠に基づき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には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

25

弊社内に緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長、副社長を副本部長とし、各部門の部門長等から構成される (38 ページ)。危機対策本部が、本スタック系統トウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。

30

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

35

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本スタック系統トウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

40

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

5 米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、米国における本スタック系統トウモロコシ種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、科学的根拠に基づき、本スタック系統トウモロコシ及び親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代のスタック系統トウモロコシ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、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使い、関係各者と連絡を取る。

10 また必要に応じて、弊社のホームページ等、国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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とり、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

20 科学的根拠に基づき、本スタック系統トウモロコシ及び親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって本スタック系統トウモロコシから分離した後代のスタック系統トウモロコシ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、弊社は、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社とともに、我が国向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して本件を通知する。また、我が国の栽培者等に対して本件を通知する。

25 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

30 科学的根拠に基づき、本スタック系統トウモロコシ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、弊社は、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

35

資料一覧

- 5 資料 1 学識経験者の意見. チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1).
【承認日】 2005年3月2日.
- 10 資料 2 学識経験者の意見. チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* L.) (MON810, OECD UI:MON-ØØ81Ø-6).
【承認日】 2004年6月1日.
- 15 資料 3 学識経験者の意見. チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI:SYN-IR162-4).
【承認日】 2010年6月11日.
- 資料 4 学識経験者の意見. 除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (NK603, OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6).
【承認日】 2004年11月22日.