

コウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
(*cry3Bb1*, *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON863 × MON810 ×
NK603, OECD UI : MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON-00603-6) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

- 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報
 - (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況・・・・・・・・ 2
 - (2) 使用等の歴史及び現状・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
 - (3) 生理学的及び生態学的特性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
 - 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報
 - (1) 供与核酸に関する情報・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
 - (2) ベクターに関する情報・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
 - (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
 - (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・・ 16
 - (5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違・・・・・・・・ 18
 - 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
 - (2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響
を防止するための措置・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
 - (3) 国外における使用等に関する情報・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
- ### 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
 - 2 有害物質の産生性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26
 - 3 交雑性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
 - 4 その他の性質・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
- ### 第三 生物多様性影響の総合的評価・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

緊急措置計画書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 4 月 20 日

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

氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座 4-10-10
銀座山王ビル 8F

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

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	コウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(<i>cry3Bb1</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON863 × MON810 × NK603, OECD UI: MON-ØØ863-5 × MON-ØØ81Ø-6 × MON-ØØ6Ø3-6)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 一般にトウモロコシの学名は *Zea mays* L. であるが、近年、トウモロコシの近縁種である一年生テオシントが *Z. mays* に分類された結果、トウモロコシはその亜種として *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis として分類されるようになった。

ロ 宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays*)で、デント種に属する。

ハ 原産地については、ほぼ米国の南西部、メキシコ、中米あるいは南米にかけての地域と考えられるが、決定的な説はなく、これら複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起原とする説がある。尚、わが国における自然分布の報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている。その後、原住民の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 3000 年～1500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになり、南北アメリカ大陸の各地に伝播し、その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられている。日本へは天正年間(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い。

ロ 現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能である。国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2002 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 2,800 万 ha、中国が 2,500 万 ha、ブラジルが 1,200 万 ha、メキシコが 700 万 ha、インドが 600 万 ha、ナイジェリアが 400 万 ha、南アフリカが 300 万 ha となっている。尚、同統計情報に基づく 2002 年の日本における栽培面積は約 3 万 ha であった。

日本は海外から約 1,600 万トンのトウモロコシを飼料用、食品用として輸入している。

飼料用は約 1,100 万トン、食品用は約 500 万トンで主な用途は澱粉、異性化糖である。

わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は寒地から温暖地までは 5 月、一部の暖地では 4 月から 6 月までである。適正栽植密度は 10a あたり 6,000～8,000 本である。雑草防除のため、生育初期に除草剤散布や 2～3 回の中耕・培土作業を行う。雌穂の抽出より 35～45 日後の黄熟期に地上部を収穫する。

尚、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、一般に栽培用として市販されているトウモロコシのほとんど全ては一代雑種品種(F1)なので、収穫種子が翌年に栽培用として播種されることは一般的でない。

(3) 生理的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシ種子の発芽適温は 32～36℃、最低発芽温度及び最低生育温度は 6～10℃であり、実際には 13～14℃以上の時期が播種適期とされ、品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である。また、一般に短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である。これら温度条件等の他、デント種の場合は種子重量の 70%の水を吸うと発芽する。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む壤土が適し、pH5.5～8.0 の範囲で栽培可能である。

現在のトウモロコシは栽培作物として高度に人為的に作られた作物であり、自然条件下で植物として繁殖し、生存するための能力は失われている。

ロ 繁殖又は増殖の様式

完熟した種子は雌穂の包皮で覆われており、自然の脱粒性はない。トウモロコシは長い間栽培植物化されていたために、野生として生き残る能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である。種子の休眠性は極めて低く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壤温度が 10℃に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する。また、仮に発芽しても生長点が地上部に出る初期生育時(5～7 葉期)に、0℃以下で 6～8 時間以上の条件下におかれると生存できない。種子の寿命は常温保存では短く、2 年目から発芽率が低下する。

トウモロコシは栄養繁殖はせず、種子繁殖する。自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他

自家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である。トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない。テオシントはメキシコとグアテマラにのみ自然分布しており、一方、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東南部、コロンビアからボリビアにかけてのアンデス東側の低地、そして、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラの3地域に大別されている。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

トウモロコシの一本の雄穂には1,200~2,000個の小穂があり、1,600万~3,000万個の花粉粒を形成する。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では24時間以内であるが、環境により2時間から8日までの幅がある。花粉は球形で、直径は90-100 μ mである。風媒による他家受粉が主であるが普通のほ場で1~5%の自家受粉が起きる。雄穂の開花によって飛散した花粉は、雌穂から抽出した絹糸に付着して発芽し、24時間以内に受精を完了する。また、トウモロコシ花粉が飛散する距離は、林、山などの遮蔽物の有無、風向きなどで異なるが、およそ300~500mとされている。

八 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育または生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

二 その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON863, OECD UI: MON-00863-5)(以下、MON863 とする)とチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON810, OECD UI: MON-00810-6)(以下、MON810 とする)の2つの組換えトウモロコシ同士を従来の交雑育成法を用いて交配した後自殖を繰り返して作出された自殖系統(以下、MON863 × MON810 の自殖系統と称する)を作出し、この MON863 × MON810 の自殖系統と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-00603-6)(以下、NK603 とする)を従来の交雑育成法を用いて交配させた交配後代品種(*cry3Bb1*, *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI No.: MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON-00603-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」とする)は、親系統である MON863、MON810、NK603 の3つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では MON863、MON810、NK603 の調製等に関する情報について個別に述べた。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

MON863 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 に示したとおりである。尚、本組換えトウモロコシには野生型 *cry3Bb1* 遺伝子を改変した *cry3Bb1* 遺伝子を導入しており、以下この遺伝子を「改変型 *cry3Bb1* 遺伝子」、及び発現する蛋白質を「改変型 Cry3Bb1 蛋白質」と称する。

MON810 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 2 に示したとおりである。

NK603 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 3 に示したとおりである。

ロ 構成要素の機能

MON863 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 に示した。MON810 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 に示した。NK603 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 3 に示した。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子】

MON863 でコウチュウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である改変型 *cry3Bb1* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* に由来し、コードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する corn rootworm (*Diabrotica* sp.) に対する殺虫活性を示す。改変型 Cry3Bb1 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。*B.t.* 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。

改変型 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属 (*Leptinotarsa*, *Diabrotica*) に分類される Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decimlineata*) と corn rootworm のみに対して殺虫活性を示す。この 2 属の昆虫種との同属近縁種は日本には生息していない。

なお、改変型 Cry3Bb1 蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と 98.9% の相同性を有しており、殺虫スペクトラムの解析はすべて本改変型 Cry3Bb1 蛋白質を用いて行っている。

改変型 Cry3Bb1 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【*nptII* 遺伝子】

MON863 で形質転換体の選抜のために導入された抗生物質耐性マーカー遺伝子である *nptII* (neomycin phosphotransferase type II) 遺伝子は大腸菌(*Escherichia coli*)のトランスポゾン Tn5 由来で、コードされる NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質(カナマイシン等)をリン酸化して不活化することによってこれらの抗生物質に耐性を示し、結果としてカナマイシンの培地への添加によって形質転換細胞の選抜が可能となる。

NptII 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、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【*cryIAb* 遺伝子】

MON810 でチョウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である *cryIAb* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、コードされる Cry1Ab 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)に対する殺虫活性を有する。アワノメイガの食害部位は植物体地上部全般である。Cry1Ab 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。*B.t.* 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。

Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目昆虫にのみ殺虫活性を示し、チョウ目以外の昆虫に対しては殺虫活性を持たない。また、この Cry1Ab 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培における重要害虫であるチョウ目の European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*), Southern cornstalk borer (*Diatraea crambidoides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), Stalk borer (*Papaipema nebris*) に対して殺虫活性を示すことが知られている。これらの内、*O. nubilalis* と同属の *O. furnacalis* は日本のトウモロコシ栽培における主要チョウ目害虫として知られている。

Cry1Ab 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、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【*cp4 epsps* 遺伝子】

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。NK603 の目的遺伝子である *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に關与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトロソソ酸-7-リン酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)から、EPSP と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

CP4 EPSPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子+*cry1Ab* 遺伝子】

Cry1Ab 蛋白質が属する Cry1A ファミリーと改変型 Cry3Bb1 蛋白質が属する Cry3 ファミリーは、それぞれチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫という異なる目に分類される昆虫種の幼虫に対して特異的に殺虫活性を示すことが、1960 年から生物農薬として使用されている *B.t.* 製剤の知見からも知られている。

また、両蛋白質とも標的昆虫の中腸上皮細胞の特異的受容体と結合して消化プロセスを阻害するという作用機作は共通しているが、チョウ目昆虫とコウチュウ目昆虫の幼虫における中腸内の pH は、それぞれアルカリ性(pH 10.5 ~ pH 11.0)と中性(pH 6.5 ~ pH 7.0)であり、両蛋白質は異なる化学条件でそれぞれ殺虫活性を發揮している。

更に、Cry1Ab 蛋白質と同じ Cry1A ファミリーに属する Cry1Ac 蛋白質と、改変型 Cry3Bb1 蛋白質と同じ Cry3 ファミリーに属する Cry3Aa 蛋白質に対して感受性を示さない非標的昆虫は、これら 2 つの異なるファミリーに属する *B.t.* 蛋白質を混合して与えた場合でも、変わらず非感受性のままであり、Cry1Ac 蛋白質と Cry3A 蛋白質に同時に暴露されることによる相乗的な影響を受けないことが確認されている(表 4)。従って、本掛け合わせトウモロコシ中には親系統由来の Cry1Ab 蛋白質と改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、それらが互いの非標的昆虫に対して相乗効果的に殺虫活性を示す可能性はきわめて低いと考えられた。

表 1 MON863 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR13L の各構成要素及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>cry3Bb1</i> 遺伝子カセット	
4-AS1	4 コピーの AS-1 要素とカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーターの一部を含むプロモーター。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
wt CAB	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳領域。目的遺伝子の発現量を高める。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。目的遺伝子の発現量を高める。
改変型 <i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> の、改変型 Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子。機能の詳細については p6 に記載した。
LacZ	-d-ガラクトシダーゼまたは lacZ 蛋白質をコードする部分配列。
tahsp 17 3'	コムギの熱ショック蛋白質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
<i>nptII</i> 遺伝子カセット	
35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。
<i>nptII</i>	原核生物のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホ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、形質転換の選択マーカーとして働く。
Ble	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部。この遺伝子が微生物内で発現するとブレオマイシン耐性が付与される。ただし MON863 において本遺伝子は、Ble 蛋白質の N 末端の 50 アミノ酸をコードするが、ブレオマイシン耐性は付与しない。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の 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、転写を終結させ、mRNA のポリアデニル化を誘導する。

表 2 MON810 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の各構成要素・由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>cryIAb</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。
Hsp70 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。hsp70 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>cryIAb</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。機能の詳細については p7 に記載した。
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、ポリアダニル化を誘導する。
<i>Cp4 epsps</i> 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていない)	
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。
Hsp70 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。Hsp70 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	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。目的遺伝子を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>Cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
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、ポリアダニル化を誘導する。
GOX 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていない)	
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。
Hsp70 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。Hsp70 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。
CTP 1	シロイヌナズナ由来の rubisco の small subunit 1A 遺伝子の中で、rubisco small subunit 1A 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。
GOX	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素(glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) 由来の変異体 v247 の C 末端をコードする配列。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> 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 の転写を集結させ、ポリアダニル化を誘導する。
上記以外の構成要素 (PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通)(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていない)	
<i>LacZ</i>	-D-ガラクトシダーゼ又は LacZ 蛋白質の部分的コード配列。 -ガラクトシドを分解して -ガラクトースを生成する。
Ori-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。大腸菌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 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホ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、形質転換の選択マーカーとして働く。

表 3 挿入に用いた PV-ZMGT32L の各構成要素・由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-ract1	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	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。目的遺伝子の発現量を高める。
CTP 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。
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。機能の詳細については p8 に記載した。
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>cp4 epsps</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。
ZmHsp70 Intron	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	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。
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。機能の詳細については p8 に記載した。
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。

表4 Cry1 及び Cry3 蛋白質の異なる昆虫種に対する殺虫活性を調査した結果(MacIntosh らの論文をもとに作成した。)

	Cry1Ab ⁽¹⁾	Cry1Ac ⁽²⁾	Cry3A ⁽³⁾	Cry1Ac + Cry3A ⁽⁴⁾
Cockroach (<i>Blatella germanica</i>)	-	-	-	-
Alfalfa weevil (<i>Hypera postica</i>)	-	-	-	-
Cotton boll weevil (<i>Antonomus grandis</i>)	-	-	-	-
Horseradish flea beetle (<i>Phyllotreta armoraciae</i>)	-	-	-	-
Southern corn rootworm (<i>Diabrotica undecimpunctata howardii</i>)	-	-	-	-
Japanese beetle (<i>Popilla japonica</i>)	-	-	-	-
Colorado potato beetle (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	-	-	+	+
Mosquito (<i>Aedes aegypti</i>)	-	-	-	-
Green peach aphid (<i>Myzus persicae</i>)	-	-	-	-
Termite (<i>Reticulitermes flavipes</i>)	-	-	-	-
Beet armyworm (<i>Spodoptera exigua</i>)	+	+	-	+
Black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)	+	+	-	+
Cabbage looper (<i>Trichoplusia ni</i>)	+	+	-	+
Corn earworm (<i>Heliothis zea</i>)	+	+	-	+
European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	+	+	-	+
Tobacco budworm (<i>Heliothis virescens</i>)	+	+	-	+
Tobacco hornworm (<i>Manduca sexta</i>)	+	+	-	+
Spider mite (<i>Tetranychus urticae</i>)	-	-	-	-

1- Cry1Ab 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 µg/ml になるように調整して昆虫種に与えた。

2- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 µg/ml になるように調整して昆虫種に与えた。

3- Cry3A 蛋白質の濃度が人工飼料中で 500 µg/ml になるように調整して昆虫種に与えた。

4- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 µg/ml、Cry3A 蛋白質が 500 µg/ml になるように調整して昆虫種に与えた。

+ 検定幼虫の死亡率が 25% 以上であった試験区

- 検定幼虫の死亡率が 25% 以下であった試験区

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

MON863、MON810、NK603 の作出に用いられたベクターはいずれも、大腸菌 (*Escherichia coli*)由来のプラスミド pUC 119 である。

ロ 特性

MON863、MON810、NK603 の作出に用いられたベクターはいずれも、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてトランスポゾン Tn5 由来のカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子(*nptII* 遺伝子)を持つ。本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

表1、表2、表3を参照のこと。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

MON863 の作出では、直鎖状 DNA 断片である PV-ZMIR13L をパーティクルガン法によって、デント種に分類されるトウモロコシ自殖系統 A634 細胞に導入した。

MON810 の作出では、プラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の混合物をパーティクルガン法によって、デント種に分類されるトウモロコシ自殖系統 A188 X B73 の F2 世代に導入した。

NK603 の作出では、直鎖状 DNA 断片である PV-ZMGT32L をパーティクルガン法によって、デント種に分類されるトウモロコシ品種 AW x CW に導入した。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【MON863 の育成の経過】

PV-ZMIR13L を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、カナマイシンを添加した培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て改変型 Cry3Bb1 蛋白質の発現を解析した。

MON863 ではパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

1997 年より系統選抜の評価を開始し、1998～1999 年にかけて圃場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。そして、1999 年に行ったイリノイ州の 1ヶ所の圃

場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、Cry3Bb1 蛋白質の発現、導入遺伝子の分析等を行った。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて 2003 年から一般商業栽培が始められている。

MON863 のわが国における認可の状況は以下の通りである。

- 2001 年 5 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 2002 年 2 月 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の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2003 年 3 月 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確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2003 年 4 月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。

【MON810 の育成の経過】

PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、グリホサートを含む培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て Cry1Ab 蛋白質の発現を解析した。尚、MON810 のサザンプロットによる挿入遺伝子解析の結果、*nptII* 遺伝子、*cp4 epsps* 遺伝子、*GOX* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された。MON810 に *cp4 epsps* 遺伝子が挿入されていなかったにもかかわらずグリホサートで選抜されたのは、再分化個体の次世代で挿入遺伝子に関して分離が起きたためである可能性が考えられた。しかし、MON810 は害虫抵抗性トウモロコシとして選抜が進められ、再分化個体の次世代でグリホサート検定及びサザンプロット分析は行われなかったため、理由は特定されなかった。

MON810 はパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

1992 年より系統選抜の評価を開始し、1993～1995 年にかけて圃場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。そして、1994 年に行った米国 6 ケ所の圃場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、Cry1Ab 蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行った。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて 1997 年から一般商業栽培が始められている。

MON810 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- 1996年10月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 1997年5月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 1997年6月 農林水産省より「組換え体利用資料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001年3月 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の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2003年3月 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確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。

【NK603 の育成の経過】

PV-ZMGT32L を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、グリホサートを含む培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て CP4 EPSPS 蛋白質の発現を解析した。

本組換えトウモロコシはパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

1997年より系統選抜の評価を開始し、1997～1999年にかけて延べ103ヶ所の圃場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。これらの圃場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、CP4 EPSPS 蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行った。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて2001年から一般商業栽培が始められている。

NK603 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- 2001年3月 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の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2001年3月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001年5月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)及び栽培について、指針への適合性が確認された。

2002年3月 食品、飼料、環境へ提出した挿入遺伝子に関する追加資料が、上記の安全性認可の判断を変えるものではないことの確認を受けた。

2003年3月 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確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

【MON863 × MON810 × NK603 の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、MON863 と MON810 の 2 つの組換えトウモロコシ同士を従来の交雑育種法を用いて交配した後自殖を繰り返して作出された自殖系統(以下、MON863 × MON810 の自殖系統と称する)と NK603 の自殖系統を従来の交雑育種法を用いて作出した。

(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

【MON863 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON863 のサザンプロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON863 のゲノムの 1 ヶ所に 1 コピーの改変型 *cry3Bb1* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子発現に必要な PV-ZMIR13L 由来の DNA 断片が組み込まれていることが確認された。また、挿入された DNA 断片上の改変型 *cry3Bb1* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子は安定して後代に遺伝し、発現していることが複数世代におけるサザンプロット分析及びウエスタンプロット分析によって示された。また、コウチュウ目害虫への抵抗性も複数世代で安定して発現していることを生物検定により選抜の過程で確認している。

【MON810 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON810 のサザンプロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON810 のゲノムの 1 ヶ所に 1 コピーの *cry1Ab* 遺伝子発現に必要な PV-ZMBK07 由来の DNA 断片が組み込まれていることが確認された。また、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンプロット分析によって示された。また、チョウ目害虫への抵抗性も複数世代で安定して発現していることを生物検定により選抜の過程で確認している。

尚、MON810 のサザンプロット分析による挿入遺伝子解析の結果、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* 遺伝子発現に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子や PV-ZMGT10 由来の *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確認された。

【NK603 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

NK603 に関して、2002 年 3 月に安全性確認が既になされた挿入遺伝子に関する追加資料を含めた、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は以下の通りである。

NK603 のサザンプロット分析による挿入遺伝子の解析及び 3'末端の塩基配列の分析の結果、NK603 のゲノムの 1 ヶ所に 1 コピーの *cp4 epsps* 遺伝子カセット二つを含む PV-ZMGT32 由来の DNA 断片が組み込まれていることが確認され、その 3'末端近傍には P-ract1 の 217bp の断片が挿入遺伝子の 3'末端近傍に逆方向で存在していることが明らかになった。また、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンプロット分析によって示された。さらに、CP4 EPSPS 蛋白質の発現も、グリホサート散布試験により複数世代で安定して発現していることを選抜の過程で確認している。

なお、この挿入遺伝子の 3'末端近傍の P-ract1 の 217bp の断片に関連して、この領域で転写産物が作られているかを確認するため strand-specific RT-PCR を行ったところ、挿入遺伝子の *ract1* プロモーターまたは E35S プロモーターのいずれかから始まって NOS 3'ターミネーターをリードスルーしていると考えられる転写産物が見つかった。しかし、NK603 における CP4 EPSPS 蛋白質のポリクローナル抗体を用いたウエスタンプロット分析から検出されたのは約 46kDa の CP4 EPSPS 蛋白質であり、これよりも大きな蛋白質は検出されなかった。ターミネーターのリードスルーは植物中では一般的に起こること、また、転写産物から翻訳されるのは停止コドンがあるため単一の蛋白質であることが報告されている。よって NK603 において CP4 EPSPS 蛋白質のみが認められたのは、NK603 の挿入遺伝子でターミネーターをリードスルーする転写産物においても、転写終結シグナルの上流に停止コドンが保存されているためと考えられ、このリードスルーは安全性評価に影響を与えないと結論された。

また、NK603 の挿入遺伝子において E35S プロモーターで誘導される *cp4 epsps* 遺伝子中のコード領域の 5'末端から 456 番目及び 641 番目の塩基がそれぞれ、植物発現用プラスミド中の塩基と比較してチミン(T)からシトシン(C)に変化していた。このうち、456 番目の塩基の変化はアミノ酸の変化には結びつかないが、641 番目の塩基の変化により E35S によって発現する CP4 EPSPS 蛋白質において N 末端から 214 番目のアミノ酸が元の CP4 EPSPS 蛋白質ではロイシンだったのが、プロリンに変わることが判明した(この蛋白質を以下、L214P という)。

L214P に関して、EPSPS 蛋白質ファミリーの活性に必須の 7 つのアミノ酸は L214P においても保存されていて N 末端から 214 番目のプロリンはこの 7 つのアミノ酸残基には含まれていないこと、このアミノ酸の変化は EPSPS 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、L214P 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質の酵素活性や免疫反応性が同等であることより、L214P 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質の構造と機能は同等であると考えられた。

L214P が既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

この塩基の変化は複数の世代で確認されており、安定して後代に遺伝していることが認められた。

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統トウモロコシは親系統である MON863、MON810、NK603 に挿入された遺伝子により、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、NptII 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。第一の 2-(1)-口で述べたように、改変型 Cry3Bb1 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質は前述したように酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。また、CP4 EPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではないことが示唆されていること、また、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物中の芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されていることから、宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。さらに、Cry3Bb1 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高い。以上のことから、これら 3 つの蛋白質が相互に作用するとは考えにくい。

実際に確認するため、本スタック系統トウモロコシにおけるコウチュウ目害虫抵抗性及びチョウ目害虫抵抗性については米国で標的害虫である western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) 及びアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) を対象としたポット試験による生物検定を、除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウルトラ)耐性については米国でのラウンドアップの散布試験を行った。その結果、本スタック系統トウモロコシの western corn rootworm に対する抵抗性は、Cry3Bb1 蛋白質を単独で発現する MON863 と同程度で、統計学的有意差は認められなかった(表 5)。次に、本スタック系統トウモロコシのアワノメイガに対する抵抗性は、Cry1Ab 蛋白質を単独で発現する MON810 と同程度で、統計学的有意差は認められなかった(表 6)。さらに、本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート耐性は、CP4 EPSPS 蛋白質を単独で発現する NK603 とほぼ同程度であった(表 7)。以上の結果から、これらの蛋白質の発現の程度は、掛け合わせによっても相互に影響し合わないことが示唆された。

以上のことから、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であるトウ

モロコシとの相違については、MON863、MON810、NK603 の諸形質を個別に調査した結果を用いて想定した。

表 5 MON863 × MON810 × NK603 の交配後代品種の生物検定によるコウチュウ目害虫 western corn rootworm に対する被害度調査結果

交配後代品種	根部食害程度 (NIS)	個体間の NIS のばらつき
MON863 × MON810 × NK603	0.16	0.04
MON863	0.14	0.02
非組換え体	2.80	0.07

表 6 MON863 × MON810 × NK603 の交配後代品種の生物検定によるチョウ目害虫アワノメイガに対する被害度調査結果

交配後代品種	葉部食害程度 (LDR)	個体間の LDR のばらつき
MON863 × MON810 × NK603	0.20	0.13
MON810	0.11	0.11
非組換え体	5.30	0.37

【表 5、6 について】

各交配後代品種につき 10 個体をポット栽培し、2 葉期に western corn rootworm の卵を接種し、4 葉期にさらにアワノメイガの 1 齢幼虫を接種した。アワノメイガ接種後 21 日目にアワノメイガによる食害程度を一般的な評価方法である leaf damaging rate (LDR) に従って、0(食害無)～9(食害甚：葉の大部分が食害されている)の 10 段階で調査した。個体間の LDR のばらつきの欄の数値は、本試験における個体間の LDR のばらつきをみるために、LDR の数値を標準誤差を算出する式にあてはめて算出したものである。

その後、ポットから植物体を取り出して土をていねいに除き、western corn rootworm による食害の程度を nodal injury score (NIS) を用いて評価した。本方法は米国で corn rootworm の食害程度を評価する際に、様々な研究機関によって利用されている一般的な方法である。corn rootworm はまず下位の節(通常は第 5 節)から生えている冠根、次にその上位の節(通常は第 6 節、次に第 7 節)から生えている冠根、と順に食害していくことから、この方法では、この食害の程度を 0.00 から 3.00 までの連続的な数値として表している。例えば食害程度が 2.80 の場合、第 5 節と第 6 節は完全に食害されており、第 7 節の 80% が食害されている状態を表す。個体間の NIS のばらつきの欄の数値は、本試験における個体間の NIS のばらつきをみるために、NIS の数値を標準誤差を算出する式にあてはめて算出したものである。

表 7 MON863 × MON810 × NK603 の交配後代品種の除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウルトラ)散布による生物検定の結果

交配後代品種	生育阻害度(%)
MON863 × MON810 × NK603	5
NK603	5
非組換え体	100

各交配後代品種につき 10 個体をポット栽培し、栽培開始後 13 日目に除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウルトラ)を散布した。グリホサート散布後 10 日目に生育阻害度(10 個体全体における成育阻害の程度)を目観察で評価した。

イ MON863 では、改変型 *cry3Bb1* 遺伝子によってコードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現することにより、米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫である corn rootworm の食害に対する抵抗性が付与され、western corn rootworm による食害が減少することが確認された。corn rootworm はトウモロコシの根を食害するが、MON863 では改変型 Cry3Bb1 蛋白質は植物体の各部位で恒常的に発現している。

MON810 では、*cry1Ab* 遺伝子によってコードされる Cry1Ab 蛋白質が発現することによって、米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガの食害に対する抵抗性が付与され、アワノメイガによる食害が減少することが確認された。アワノメイガはトウモロコシの地上部全般を食害するが、MON810 では Cry1Ab 蛋白質は植物体の各部位で恒常的に発現している。また、サザンプロット分析の結果、MON810 では *nptII* 遺伝子、*cp4 epsps* 遺伝子は MON810 には存在せず、これら遺伝子に由来する形質の発現は認められなかった。

NK603 では、*cp4 epsps* 遺伝子によってコードされる CP4 EPSPS 蛋白質が植物体の各部位で恒常的に発現することによって本組換えトウモロコシには、除草剤グリホサートに対する耐性が付与される。実際に確認したところ、非組換えトウモロコシが除草剤グリホサートの影響を受けて枯死したのに対して、NK603 は正常に生育した。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、NPTII 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質が植物体の各部位で恒常的に発現していると考えられる。

ロ MON863 に属する系統である MON863AX、MON863BX 及び MON863CX 並びにその対照系統として MON863AC、MON863BC 及び MON863CC を供試し、2000 年に日

本モンサント河内研究農場にて、2002年には農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。MON863AX、MON863BX及びMON863CXは、R0個体から異なる育種過程によって作出され、同じ交配組み合わせから得られた遺伝的な背景が同等の交配後代系統であり、供試した組換えトウモロコシがMON863系統であることをサザンプロット分析により確認した。対照系統であるMON863AC、MON863BC及びMON863CCはMON863AX、MON863BX及びMON863CXと遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

MON810に属する系統であるMON810AX及びMON810BX、並びにその対照系統としてMON810AC及びMON810BCを供試して、1996年及び2001～2002年に農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。MON810AX及びMON810BXは同じR0個体から異なる育種過程によって作出された交配後代系統である。対照系統であるMON810AC及びMON810BCは、MON810AX及びMON810BXと遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

NK603に属する系統であるNK603-A及びNK603-B、並びにその対照系統としてCont-A及びCont-Bを供試して2000年に日本モンサント河内研究農場にて隔離ほ場試験を行った。NK603-A及びNK603-Bは同じR0個体から異なる育種過程によって作出された交配後代系統である。対照系統であるCont-A及びCont-BはNK603-A及びNK603-Bと遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

形態及び生育の特性

MON863とその対照である非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、成熟期、草型、分けつ数、雌穂総数、有効雌穂数、稈長、着雌穂高、収穫時の生体重の評価を行ったが、全ての項目でMON863とその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。

MON810と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、成熟期、草型、分けつ数、雌穂総数、有効雌穂数、稈長、着雌穂高、収穫時の生体重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で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。稈長において組換えトウモロコシMON810BXと対照の非組換えトウモロコシMON810BCの間で統計学的有意差が認められ、MON810BXの稈長の平均値は248.1cm、MON810BCは229.3cmであった。

NK603と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、有効雌穂数、収穫期の生体重の評価を行ったが、全ての項目で統計学的有意差は認めら

れなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に稈長で統計学的有意差が認められる可能性があるが、その他の形態及び生育の特性については、宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

生育初期における低温又は高温耐性

MON863 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(4)を評価したが、低温処理開始後 14 日目にほぼすべての個体が枯死し、MON863 と対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(最高気温 12~14、最低気温 2)を評価したが、すべての展開葉が低温処理開始後 21 日目に萎凋症状を示し、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった。

NK603 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(気温 4)を評価したが、いずれも低温処理開始後 14 日目にはほぼ完全に枯死し、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、低温耐性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死する。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に、親系統である MON863, MON810, NK603 において、隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっている事を観察した。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

花粉の稔性及びサイズ

MON863 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉のサイズをヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON863 と対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉のサイズを 0.1%ニュートラルレッド溶液及びヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められな

かった。

NK603 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉のサイズをヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、NK603 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、花粉の稔性及び大きさについては宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

MON863 で Sib-mating して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、全ての項目において、MON863 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

MON810 で Sib-mating して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、全ての項目において、MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

NK603 で Sib-mating して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、100 粒重を除く全ての項目において、NK603 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。100 粒重において組換えトウモロコシ NK603-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、NK603-B の 100 粒重の平均値は 33.6g、Cont-B は 35.1g だった。一方、組換えトウモロコシ NK603-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。

脱粒性については、MON863、MON810、NK603 とそれらの対照の非組換えトウモロコシは共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。

MON863 の収穫種子の播種後 10 日目の発芽率において、MON810 は収穫種子の播種後 4 日目の発芽率において、NK603 は収穫種子の播種後 10 日目の発芽率において、それぞれ組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも高く、両者に差異は認められず、種子の休眠性は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に 100 粒重で統計学的有意差が認められる可能性があるが、その他の種子の生産量、脱粒性、休眠性については、宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

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、親系統である MON863、MON810、NK603 では交雑性の試験は行わなかった。

有害物質の産生性

MON863 と対照の非組換えトウモロコシ、MON810 と対照の非組換えトウモロコシ、及び NK603 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験を行ったが、全ての項目で MON863 と対照の非組換えトウモロコシとの間、MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間、NK603 と対照の非組換えトウモロコシとの間のいずれにおいても統計学的有意差は認められなかった。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、有害物質の産生性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間に差異はないと考えられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

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

別添の緊急措置計画書を参照。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国では、B.t.蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で、B.t.蛋白質を発現する遺伝子組換えトウモロコシを栽培する際には緩衝区を設定している。本スタック系統トウモロコシの栽培時における緩衝区の設定は、チョウ目及びコウチュウ目抵抗性トウモロコシ(MON810×MON863)と同様に、本スタック系統トウモロコシを栽培するほ場面積中の20%にB.t.蛋白質を生成しないトウモロコシ品種を栽培する予定である。

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、MON863 と MON810 を交配した後自殖を繰り返して作出された自殖系統(以下、MON863 × MON810 の自殖系統と称する)と NK603 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、MON863、MON810、NK603 の特性を併せ持つ。第一の 2-(1)-ロ- で述べたとおり、Cry3Bb1 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず宿主の代謝系とは独立して機能しており、また CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼさないことから、本スタック系統トウモロコシではこれら 3 つの蛋白質が相互に作用することはないと考えられる。従って、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、MON863、MON810、NK603 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があり、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

本スタック系統トウモロコシの親系統である MON863、MON810、NK603 において競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、交雑性)を比較検討したが、MON810 における稈長と NK603 における 100 粒重を除く全ての項目で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。

稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった。しかし、この差異はわずかであるため、この稈長の違いのみによって競合における優位性が高くなるとは考えられない。

また、競合における優位性において、繁殖性に関わる形質の一つである 100 粒重で組換えトウモロコシ NK603-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、NK603-B の 100 粒重の平均値は 33.6g、Cont-B は 35.1g だった。しかし、その他の繁殖性に関わる諸形質(雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数)において、組換えトウモロコシ NK603-B と対照の非組換えトウモロコシの間では統計学的有意差が認められなかったことから、この 100 粒重の違いによって繁殖性に関わる競合における優位性が高くなるとは考えにくい。

本スタック系統トウモロコシはチョウ目害虫抵抗性及びコウチュウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、

人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるトウモロコシが、本形質が付与されたことによって自然条件下で自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

本スタック系統トウモロコシは除草剤グリホサートに耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のように、本スタック系統トウモロコシにおいては、稈長及び 100 粒重において差異が認められる可能性があり、チョウ目害虫抵抗性、コウチュウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはない判断された。

従って、本スタック系統トウモロコシにおいても、競合における優位性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

-

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本スタック系統トウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

(2) 影響を受ける可能性のある動植物等の特定

トウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されておらず、また、日本に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

本スタック系統トウモロコシの親系統である MON863、MON810、NK603 について、有

害物質の産生性の有無を鋤き込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行い比較検討したが、有害物質の産生性に関して差異は認められなかった。従って、親系統である MON863、MON810、NK603 では、これらの物質の産生性については導入遺伝子により影響を受けることはなく、宿主との間に差異はないことが確認された。

このことから、本スタック系統トウモロコシにおいてもこれらの物質の産生性に宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシと差異はないと考えられる。

NK603 は除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)-ロ- に述べたように、CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。したがって、NK603 において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。

MON863 には改変型 Cry3Bb1 蛋白質の発現によってトウモロコシの根を食害する主要コウチュウ目害虫である western corn rootworm に対する抵抗性が付与されているため、影響を受ける野生動植物としては、改変型 Cry3Bb1 蛋白質に対して感受性を示す標的害虫と同属近縁種のコウチュウ目昆虫であると考えられた。これまでのところ、改変型 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*, *Diabrotica*)に分類される Colorado potato beetle と western corn rootworm に殺虫活性を示すが、その他の昆虫に殺虫活性を示すことは確認されておらず、殺虫スペクトラムが極めて狭いことが示されている。なお、これまでのところ、Colorado potato beetle、western corn rootworm 及びそれらと同属の近縁種がわが国に生息しているという報告はない事が文献調査により示された。ただし、未調査のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す可能性もあることから、以下の検討を行った。なお、トウモロコシの植物体の摂食を通じて影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫としては、スジコガネ、ヒメコガネ、マルクビクシコメツキ等の害虫としてリストアップされているもののみが考えられるため、植物体の摂食を通じた影響については、ここでは以下の評価の対象とはしないこととする。

まず、「環境省レッドリスト(日本の絶滅のおそれのある野生生物)」の 2000 年改訂版に記載されたコウチュウ目種について、MON863 の花粉が飛散した食餌植物を摂食することにより影響を受ける可能性があるかを、それぞれの種の食性・生息場所・行動習性・分布地域等から調査した。その結果、環境省レッドリスト記載種の中には、MON863 の花粉飛散によって、生息に影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫は存在しないと判定され

た。

更に、環境省レッドリスト記載種以外に、地域的に重要と見なされているコウチュウ目昆虫を「昆虫類の多様性保護のための重要地域（日本昆虫学会自然保護委員会編集）」、第1集(1999)、第2集(2000)、第3集(2002)からリストアップし、レッドリストの場合と同様に、それぞれの種について、食性・生息場所・行動習性・分布地域等から、MON863 の花粉による影響を受ける可能性があるかを調査した。その結果、幼虫が地上部の葉を摂食すること、食草がトウモロコシ栽培地の周辺にも分布していること、飛散花粉量の程度及び昆虫種の感受性によっては何らかの影響をうける可能性があること等を考慮に入れて、オオヨモギハムシ・ハナウドゾウムシ・ヤマトアザミテントウの3種が特定された。尚、一般的に第1齢から第2齢幼虫までが *B.t.* 蛋白質に対して感受性を示し、それ以降は非感受性になるため、本文献調査では幼虫のみを対象として行った。

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

MON810 には Cry1Ab 蛋白質の発現によってトウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているため、MON810 の植物体を摂食することにより影響を受ける野生動植物等としては、トウモロコシの植物体を摂食するアワノメイガ等のチョウ目昆虫が想定されているが、これらはトウモロコシの害虫であるので、ここでは対象としていない。一方、MON810 から飛散した花粉により影響を受ける野生動植物等としては、MON810 の花粉が幼虫の食餌植物と共に摂食され、幼虫が影響を受ける可能性のある、わが国に生息するチョウ目昆虫があげられた。

「環境省レッドリスト(2000年改訂版)」を用いて、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ栽培の影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているチョウ目昆虫の特定を行った。1)幼虫の活動期(摂食期)と本遺伝子組換えトウモロコシの開花期の関係、2)幼虫の食餌植物と花粉の接触の可能性、の2点から絞込みを行い、ヒメシロチョウ (*Leptidea amurensis*)、ツマグロキチョウ (*Eurema laeta betheseba*)、シルビアシジミ (*Zizina otis emelina*)、ミヤマシジミ (*Lycaeides argyrognomon*)、ヒョウモンモドキ (*Melitaea scotosia*)、ウスイロヒョウモンモドキ (*Melitaea regama*)、コヒョウモンモドキ (*Mellicta ambigua nippona*)、ヒメヒカゲ(2亜種) (*Coenonympha oedippus arothius* 及び *Coenonympha oedippus annulifer*)、ウラナミジャノメ (*Ypthima motschulskyi nipponica*)、ミツモンケンモン (*Cymatophoropsis trimaculata*)の11種(2亜種を含む)を特定した。

尚、本スタック系統トウモロコシは Cry1Ab 蛋白質と改変型 Cry3Bb1 蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物としては、親系統である MON810 と MON863 の生物多様性影響評価書で特定された種と同じであると考えられる。尚、前述したように、NK603 において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。

よって、本スタック系統トウモロコシの花粉の飛散により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、MON863 で特定されたコウチュウ目昆虫 3 種及び MON810 で特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)の計 13 種(2 亜種を含む)が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

ポット試験による生物検定の結果では、本スタック系統トウモロコシの western corn rootworm に対する殺虫活性は、MON863 を単独発現する交配後代品種と同程度だった。また、本スタック系統トウモロコシのアワノメイガに対する殺虫活性は、MON810 を単独発現する交配後代品種と同程度だった。従って、本スタック系統トウモロコシの花粉飛散による非標的昆虫への影響は、MON810 並びに MON863 の花粉による生物検定の結果より評価した。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫ヤマトシジミ(*Zizeeria maha argia*)の 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、MON810 の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率と対照に非組換え体の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率との間で、有意な差が 2,000 及び 4,000 粒/cm²の花粉密度で認められた。

MON863 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫Colorado potato beetleの孵化後 24 時間以内の幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、有意な差が 2,000 及び 4,000 粒/cm²の花粉密度で認められた。

(3) 影響の生じやすさの評価

MON810 並びに MON863 とそれらの対照の非組換えトウモロコシ間で、花粉飛散に影響を与える要因である花粉の量、形状及びサイズについて比較した結果、統計学的有意差は認められなかった。

MON810 並びに MON863 において、ヤマトシジミと Colorado potato beetle の生存率に影響の出た花粉密度 2,000 ~ 4,000 粒/cm² を、ほ場からの距離とトウモロコシ花粉の落下数(最大堆積花粉数)の関係を表す川島らのモデル式($y=14791\exp(-0.158x + 0.00275x^2 - 0.0000183x^3)$)に導入した結果、MON810 並びに MON863 の花粉が 4,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 10m、2,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 20m と推定された。

MON810 と MON863 の影響を受ける可能性のある野生動植物として前述のチョウ目 11 種(2 亜種を含む)並びにコウチュウ目昆虫 3 種が特定された。表 8 にこれらの幼虫の食餌植物と食餌植物の主な生育場所をまとめた。こうした食餌植物は野原、山地など広範な地域で生育しており、トウモロコシが栽培されるほ場やその近辺を主な生育域としていない。

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。仮に生育したとしても、その個体数は、ほ場で栽培されるトウモロコシと比較して極めて少ないために、その花粉飛散が非標的チョウ目昆虫や非標的コウチュウ目昆虫に及ぼす影響は無視できるものと考えられた。また、前述のチョウ目昆虫 11 種（2 亜種を含む）とコウチュウ目昆虫 3 種はこぼれ落ちの想定される畜舎や道路を主な生息域としていない。さらに、今回未調査であるその他のチョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫に関しても同様に、これらの昆虫がトウモロコシが栽培されているほ場やその近辺のみに生息しているとは考えにくいことから、個体群で影響を受ける可能性はきわめて低いと判断された。

尚、MON863、MON810 について、今後の育種により今回試験に用いた系統とは花粉の飛散時期、飛散量が異なる系統が育成される可能性があるが、花粉を用いた生物検定においては *B.t.* 蛋白質に対して最も感受性の高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、品種・系統が異なっても今回想定した影響を大きく超えるようなことはないと考えられる。

表 8 非標的昆虫が食餌する植物の生育場所

		食餌植物	食餌植物の主な生育場所
1	ヒメシロチョウ	ツルフジバカマ	山野の草原、道ばた、海岸の林縁
2	ツماغロキチョウ	カワラケツメイ	川原、土手、道ばたの草地
3	シルビアンシジミ	ミヤコグサ、ヤハズソウ、コマツナギ	野原、道ばた、鉄道線路、土手、海岸
4	ミヤマシジミ	コマツナギ	野原、土手、海岸
5	ヒョウモンモドキ	タムラソウ、ノアザミ、ノハラアザミ、キセルアザミ	山野、草原、湿地
6	ウスイロヒョウモンモドキ	オミナエシ、カノコソウ	山地の草地及び湿地
7	コヒョウモンモドキ	クガイソウ	山地の草地
8	ヒメヒカゲ(2亜種)	ヒカゲスゲ、ヒメカンスゲ、アオスゲ、ススキ	疎林地、林地、草原、
9	ウラナミジャノメ	カヤツリグサ科、イネ科	草地、林地、海岸
10	ミツモンケン	クロツバラ、クロウメモドキ	山地、高原
11	オオヨモギハムシ	フキ類	山地の道端
		ヒヨドリバナ類	山地、湿地、川原
12	ハナウドゾウムシ	ハナウド類	山地
13	ヤマトアザミテントウ	アザミ類	草地、林地、湿地、海岸、川原
		ナス科(野生種)	山地、道端、草地、湿地、林地、畑地
		バレイシヨ	畑地

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

MON810 並びに MON863 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種及び非標的コウチュウ目昆虫種がトウモロコシほ場の近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。

CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。したがって、NK603 において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。

以上から、本スタック系統トウモロコシの親系統である MON863、MON810、NK603 はそれぞれ有害物質の産生性に起因して生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

さらに、MON810 と MON863 の花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異や掛け合わせによる雑種強勢による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはないと考えられる。尚、親系統の有する導入遺伝子はそれぞれ独立に機能し、その産物は相互作用することはないため、本スタック系統トウモロコシにおいて導入遺伝子により従来の交配後代品種でみられる範囲を超える雑種強勢が起こることはないと判断された。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシが非標的チョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫へ影響を及ぼす可能性は親系統である MON810 及び MON863 と同様に極めて低いと考えられる。

従って、本スタック系統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じるおそれはないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本スタック系統トウモロコシは、交雑性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換えトウモロコシの性質は、上記の他にはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統トウモロコシは、MON863 と MON810 を交配した後自殖を繰り返して作出された自殖系統と NK603 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、MON863、MON810、NK603 の特性を併せ持つ。第一の 2-(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシにおける改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。従って、親系統である MON863、MON810、NK603 の生物多様性影響の評価の結果を用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行った。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。また、MON863、MON810、NK603 とそれらの対照である非組換えトウモロコシとの間で競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した。その結果、稈長と 100 粒重を除くすべての項目で統計学的有意差は認められなかった。MON810 における稈長と NK603 における 100 粒重で統計学的有意差が認められたものの、それ以外の競合における優位性において繁殖に関する諸形質で統計学的有意差は認められなかった。以上のように、本スタック系統トウモロコシにおいては、稈長及び 100 粒重において差異が認められる可能性があり、チョウ目害虫抵抗性、コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはない判断された。以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

MON863、MON810、NK603 において有害物質の産生性の有無を、鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験で評価したが、差異は認められなかった。また、わが国において、MON810 と MON863 の花粉の飛散により生息もしくは生育に影響を受ける可能性のある野生動植物として特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)とコウチュウ目昆虫 3 種への影響を調べたが、MON810 と MON863 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種と非標的コウチュウ目昆虫がトウモロコシほ場近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。以上から、MON810 並びに MON863 が有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。さらに、花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考える最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはない判断された。また、CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。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生じるおそれはないと判断された。

わが国ではトウモロコシの近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本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

場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成16年5月18日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎
住所 東京都中央区銀座4-10-10
銀座山王ビル8階

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性トウモロコシコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性トウモロコシ(*cry3Bb1*, *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON863 × MON810 × NK603, OECD UI: MON-00863-5 × MON810-6 × MON-00603-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。
個人名・所属は個人情報につき非公開
- 2 第一種使用等の状況の把握の方法
弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。
- 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法
生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。
- 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容
具体的措置として、特定された問題に応じ、本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。
- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制
生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成16年4月20日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎
住所 東京都中央区銀座4-10-10
銀座山王ビル8階

第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性トウモロコシ(*cry3Bb1*, *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON863 × MON810 × NK603, OECD UI: MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON-00603-6)(以下、「本スタック系統トウモロコシ」という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。
個人名・所属は個人情報につき非開示
- 2 第一種使用等の状況の把握の方法
弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。
- 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法
生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。
- 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容
具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること、必要に応じて本スタック系統トウモロコシが日本に輸入されないようにすること等、必要な措置を実行する。
- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制
生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。