

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ
(*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MON89034, OECD UI: MON-89034-3)
申請書等の概要

第一	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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
(2)	使用等の歴史及び現状	1
(3)	生理的及び生態学的特性	2
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1)	供与核酸に関する情報	5
(2)	ベクターに関する情報	14
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	14
(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	22
(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	26
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	26
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	29
(1)	使用等の内容	29
(2)	使用等の方法	29
(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	29
(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	29
(5)	実験室等での使用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	30
(6)	国外における使用等に関する情報	30
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	31
1	競争における優位性	31
2	有害物質の産生性	32
3	交雑性	37
4	その他の性質	37
第三	生物多様性影響の総合的評価	38
	引用文献	40
	緊急措置計画書	41

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 6 月 6 日

農林水産大臣 赤城 徳彦 殿
環境大臣 若林 正俊 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	チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ. 和名、英名及び学名

一般にトウモロコシの学名は *Zea mays* L. (英名: maize) 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(文献 1)。

ロ. 宿主の品種名

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(*Z. mays*)で、デント種に属する従来トウモロコシ品種 LH172 を用いた。

ハ. 国内及び国外の自然環境における自生地域

原産地については、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(文献 1)。なお、我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. 国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている(文献 1)。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(文献 2)。我が国へは天正年間(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. 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

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(文献2; 文献1)。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(文献3; 文献1)。

国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2005 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 5 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,300 万 ha、中国が 2,600 万 ha、ブラジルが 1,160 万 ha、インドが 780 万 ha、メキシコが 700 万 ha、ナイジェリアが 375 万 ha、インドネシアが 360 万 ha、アルゼンチンが 340 万 ha となっている(<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>)。なお、同統計情報に基づく我が国における栽培面積は 11 万 ha であった。

現在、我が国で栽培されているトウモロコシは統計上、生食用のスイートコーンと飼料用青刈りデントコーンがあり、2005 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,900 ha で収穫量は約 25 万 900 トン(文献4)であり、2006 年における青刈りデントコーンの作付面積は約 8 万 4,400ha で、収穫量は約 429 万トンである(文献5)。

我が国は 2006 年に海外から約 1,690 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 1,240 万トン、食品・工業用として約 450 万トン、そして栽培用として約 1,800 トンである。なお、栽培用として輸入している上位 3 カ国を挙げるとフランスが 847 トン、チリが 289 トン、米国が 189 トンとなっている(文献6)。

我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(文献3)。

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、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 基本的特性

—

ロ 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(文献3)。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、早生品種ほど鈍感である(文献3)。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(文献7)。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(文献7)。

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、自然条件下で野生種として繁殖し、生存するための能力は失われている(文献8; 文献1)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

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(文献1)。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、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い。また、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が10℃に達するまで発芽せず、腐敗し枯死する(文献2; 文献3)。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(文献1)。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。

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または器官からの出芽特性

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。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である(文献1; 文献9)。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(文献1)。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(文献2; 文献3; 文献1; 文献10)。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(文献11; 文献3)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの一本の雄穂には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(文献12)。花粉は球形で、1粒あたりの重量は約 6.4×10^{-7} g であり(文献13)、直径は90~100 μ m である(文献14)。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(文献1)。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(文献3)。

ホ 病原性

—

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。

ト その他の情報

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

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cryIA.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」とする)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 4(p15)および表 4(p16~17)に示した。

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

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 4(p16~17)に示した。そのうち、目的遺伝子である *cryIA.105* 遺伝子と改変 *cry2Ab2* 遺伝子の詳細については以下に記載した。

【*cryIA.105* 遺伝子】

本組換えトウモロコシの作出に用いられた *cryIA.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質のドメイン I と II、Cry1F 蛋白質のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインにより構成されており(図 1, p7)、Cry1A.105 蛋白質に対する Cry1Ac 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質、そして Cry1F 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 93.6%、90.0%、76.7%である(表 1, p7)。

なお、この Cry1A.105 蛋白質を構成する 3 種類の Bt 蛋白質は、それぞれ既に第一種使用規程の承認がなされているチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cryIAc*, *Gossypium hirsutum* L.)(531, OECD UI: MON-00531-6)(以下 531 とする)、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cryIAb*, *Zea mays* L.)(MON810, OECD UI: MON-00810-6)(以下 MON810 とする)、そして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(*cryIF*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI:

DAS-Ø15Ø7-1)(以下 1507 とする) 中で発現している。

Bt 蛋白質は微生物農薬として 40 年以上安全に使用されており(文献 15; 文献 16; 文献 17)、標的昆虫に対する作用機作についても既に明らかにされている(文献 18; 文献 19)。また、これまでの研究から Bt 蛋白質は異なる機能を持つ複数のドメインから構成され、それぞれのドメインが持つ機能も明らかにされている。例えば、Cry1A 蛋白質は、ドメイン I、II、III と C 末端ドメインにより構成されており、ドメイン I は、消化プロセスを阻害する陽イオン選択的小孔の形成、ドメイン II は特異的な受容体の認識、ドメイン III は受容体との結合性、そして C 末端ドメインは、Bt 蛋白質の結晶構造に関与していることが明らかにされている(文献 20; 文献 21)。

前述したように本組換えトウモロコシの作出に用いた *cryIA.105* 遺伝子がコードする Cry1A.105 蛋白質は、Cry1Ab 蛋白質のドメイン I と II、Cry1F 蛋白質のドメイン III、Cry1Ac 蛋白質の C 末端ドメインにより構成される合成 Bt 蛋白質であり (図 1, p7)、異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせることにより標的昆虫に対する殺虫活性を高める目的で開発された。

近年、このように異なる Bt 蛋白質のドメインを組み合わせることにより標的昆虫に対する殺虫活性を高めた Bt 製剤が開発されており(文献 22; 文献 23; 文献 24)、既に Cry1Ac 蛋白質と Cry1F 蛋白質のドメインを組み合わせた微生物農薬(Lepinox WDG, Ecogen Inc.)も市販されている(文献 22; 文献 23)。

また、既に第一種使用規程の承認を受けているチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ(*cryIF*, *cryIAc*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.)(281×3006, OECD UI : DAS-24236-5×DAS-21023-5)(以下 281×3006 とする)中で発現する Cry1F 蛋白質も Cry1F 蛋白質、Cry1C 蛋白質、そして Cry1Ab 蛋白質のドメインあるいは配列を組み合わせた合成蛋白質である(文献 25)。

さらに、このような Bt 蛋白質間でのドメインの組換えは、自然界でも Bt 蛋白質が長年の進化の過程で多様性を獲得していく際に起こっていることが報告されている (文献 20; 文献 21; 文献 26)。

Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、人工飼料に混合した Cry1A.105 蛋白質を 5 種類のチョウ目昆虫を含む 15 種類の昆虫種に混餌投与することにより調査を行った。

その結果、Cry1A.105 蛋白質は、トウモロコシの主要チョウ目害虫である Corn earworm(CEW; *Helicoverpa zea*)、Black cutworm(BCW; *Agrosis epsilon*)、Fall armyworm(FAW; *Spodoptera frugiperda*)、Southwestern corn borer (SWCB; *Diatraea grandiosella*)、European corn borer(ECB; *Ostrinia nubilalis*)の幼虫に対して殺虫活性を示したが、チョウ目昆虫以外のミツバチやテントウムシなどの益虫に対しては殺虫活性を示さなかった(表 2, p8)。

以上のことから、Cry1A.105 蛋白質は構成要素である Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋

白質及び Cry1Ac 蛋白質と同様にチョウ目害虫のみに選択的に殺虫活性を示し、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認された。

なお、*cry1A.105* 遺伝子の DNA 配列は別添資料 1 に示した。

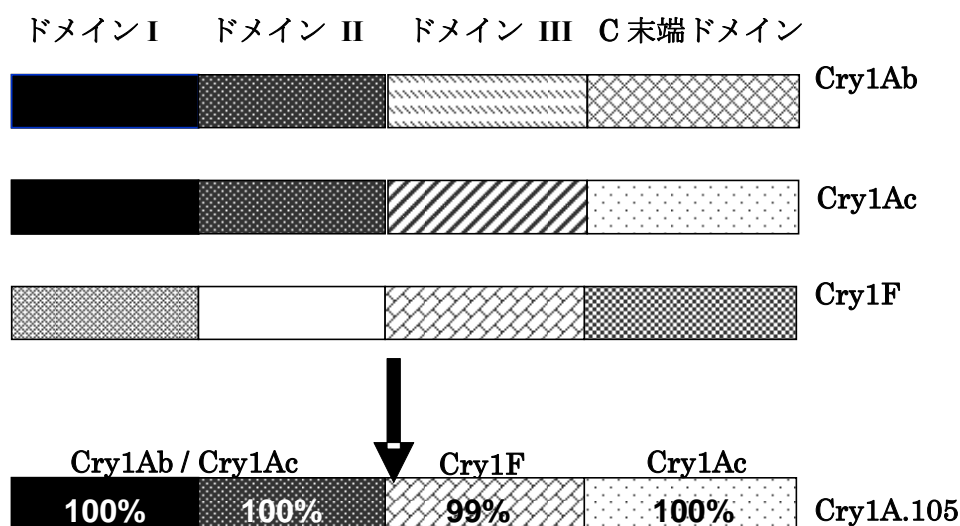


図 1 Cry1A.105 蛋白質の構造¹

柄が異なればドメインの由来が異なることを示している。

表 1 Cry1A.105、Cry1Ac、Cry1Ab そして Cry1F 蛋白質間でのアミノ酸配列の相同性²

ドメイン	Cry1A.105 蛋白質との アミノ酸配列の相同性(%)		
	Cry1Ac	Cry1Ab	Cry1F
I	100	100	57
II	100	100	37
III	57	46	99
C-末端	100	92	93
全体	93.6	90	76.7

¹ 本図に記載された情報にかか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 本表に記載された情報にかか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 2 Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラム³

目	科	英名(学名)	Insect Stage	LC ₅₀ (µg/mL or g diet) ^a	参考文献
Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	Corn Earworm (<i>Helicoverpa zea</i>)	幼虫	15	文献 27
		Black Cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)	幼虫	33	文献 28
		Fall Armyworm (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	幼虫	6.9	文献 28
	Crambidae (ツガ科)	Southwestern Corn Borer (<i>Diatraea grandiosella</i>)	幼虫	37	文献 28
		European Corn Borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	幼虫	0.43	文献 29
Collembola (トビムシ目)	Isotomidae (ツチトビムシ科)	Collembola (<i>Folsomia candida</i>)	若虫	>80 ^b	文献 30
Coleoptera (コウチュウ目)	Curculinoidea (ゾウムシ科)	Boll Weevil (<i>Anthonomus grandis grandis</i>)	幼虫	>100	文献 31
	Chrysomelidae (ハムシ科)	Southern Corn Rootworm (<i>Diabrotica unecimpunctata howardi</i>)	幼虫	>100	文献 31
	Coccinellidae (テントウムシ科)	Spotted Lady Beetle (<i>Coleomegilla maculata</i>)	幼虫	>240	文献 32
Hymenoptera (ハチ目)	Ichneumonidae (ヒメバチ科)	Parasitic wasp (<i>Ichneumon promissorius</i>)	成虫	>240	文献 33
	Apidae (ミツバチ科)	European Honey Bee (<i>Apis mellifera</i>)	成虫	>550	文献 34
		European Honey Bee (<i>Apis mellifera</i>)	幼虫	>11µg/cell	文献 35
Hemiptera (カメムシ目) 亜目: Homoptera	Aphididae (アブラムシ科)	Green Peach Aphid (<i>Myzus persicae</i>)	成虫/若虫	>80	文献 31
Hemiptera (カメムシ目) 亜目: Heteroptera	Miridae (カスミカメムシ科)	Western Tarnished Plant Bug (<i>Lygus hesperus</i>)	若虫	>80	文献 31
	Anthocoridae (ハナカメムシ科)	Insidious Flower Bug (<i>Orius insidiosus</i>)	若虫	>240	文献 36

^a 「>」の付いた数値は検定に用いた中で最も高い濃度を示す。

^b 本組換えトウモロコシの凍結乾燥された葉を用いて検定が行われた。

³ 本表に記載された情報にかか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。

【改変 cry2Ab2 遺伝子】

本組換えトウモロコシ中で発現している改変 Cry2Ab2 蛋白質のアミノ酸配列は既に第一種使用規程の承認を受けているチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (15985, OECD UI : MON-15985-7)(以下 15985 とする)中で発現している改変 Cry2Ab2 蛋白質と同一である。

野生型 *cry2Ab2* 遺伝子は、土壌中に一般的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、*cry2Ab*、*cryIIb*、*cryB2* または *cryIIAb* とも呼ばれている(文献 37; 文献 38; 文献 39)。本組換えトウモロコシ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質は、クローニングの際に制限酵素切断部位を挿入したため、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端のメチオニン(図 2, p10、野生型の M)の後にアスパラギン酸が 1 つ挿入されているが(図 2, p10 中の D)、その他のアミノ酸配列は野生型と同一である。

また、本組換えトウモロコシ中に導入された改変 *cry2Ab2* 遺伝子の 5' 末端側には、目的蛋白質を色素体に輸送する chloroplast transit peptide(CTP, 葉緑体輸送ペプチド)をコードする塩基配列が付加してあるため、改変 Cry2Ab2 蛋白質は N 末端側に CTP が連結された形で産生されている。通常、この CTP は色素体に目的蛋白質が輸送された後、プロテアーゼにより目的蛋白質から切り離され、速やかに分解される(文献 40)。CTP の推定アミノ酸配列には、CTP の全長 79 アミノ酸残基のうち、C 末端から 32 番目と 3 番目のアミノ酸 (図 2, p10) にプロテアーゼによる推定認識部位(メチオニン)が存在しており、どちらかの部位で CTP が切断されていることが予想された。実際に本組換えトウモロコシにおいても CTP と改変 Cry2Ab2 蛋白質の間が切断されているかどうか調査したが、本組換えトウモロコシ中の改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端配列は、化学修飾を受けたためと考えられる原因により解析を行うことが出来ず、その結果として CTP の切断部位を特定することが出来なかった。

そこで、まず最初に CTP のアミノ酸配列の C 末端から 3 番目のメチオニンで CTP が切断されていると仮定した場合に改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端側に残留する CTP 由来の 3 アミノ酸を付加した改変 Cry2Ab2 蛋白質(図 2, p10)を *Escherichia coli* で発現させた。この蛋白質を、SDS-PAGE により本組換えトウモロコシ中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質と比較した結果、その分子量は同等であると判断された(図 3, p11)。以上の結果から、本組換えトウモロコシ中では、CTP 由来の 3 アミノ酸が N 末端側に付加した形で改変 Cry2Ab2 蛋白質が機能していると判断され、以下に記載した昆虫種に対する生物検定はこの CTP が付着している改変 Cry2Ab2 蛋白質を用いて行った。

改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、人工飼料に混合した改変 Cry2Ab2 蛋白質を、4 種類のチョウ目昆虫を含む 15 種類の昆虫種に混餌投与するこ

とにより調査を行った。

その結果、改変 Cry2Ab2 蛋白質は、試験に用いた 4 種類の主要チョウ目害虫の中で Corn earworm(CEW; *Helicoverpa zea*)、Fall armyworm(FAW; *Spodoptera frugiperda*)、及び European corn borer(ECB; *Ostrinia nubilalis*)の幼虫に対して殺虫活性を示したが、Black cutworm(BCW; *Agrotis. epsilon*)に対しては殺虫活性を示さなかった(表 3, p12)。また、チョウ目害虫以外のミツバチやテントウムシなどの益虫に対しても、殺虫活性を示さなかったことから(表 3, p12)、改変 Cry2Ab2 蛋白質は特定のチョウ目害虫のみに選択的に殺虫活性を示し、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認された。

なお、改変 cry2Ab2 遺伝子の DNA 配列は別添資料 1 に示した。

MON89034	M-Q-A¹-M-D² - N-S-V-L-N
<i>E. coli</i>	M-Q-A¹-M-D² - N-S-V-L-N
野生型	-M- - N-S-V-L-N

1 M-Q-A – chloroplast transit peptides (CTP)由来の推定アミノ酸

2 D – クローニングのために付加されたアミノ酸

図 2 本組換えトウモロコシ、*E.coli*、そして *B. thuringiensis* 中でそれぞれ発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の N 末端推定アミノ酸配列⁴

⁴ 本図に記載された情報にかか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。

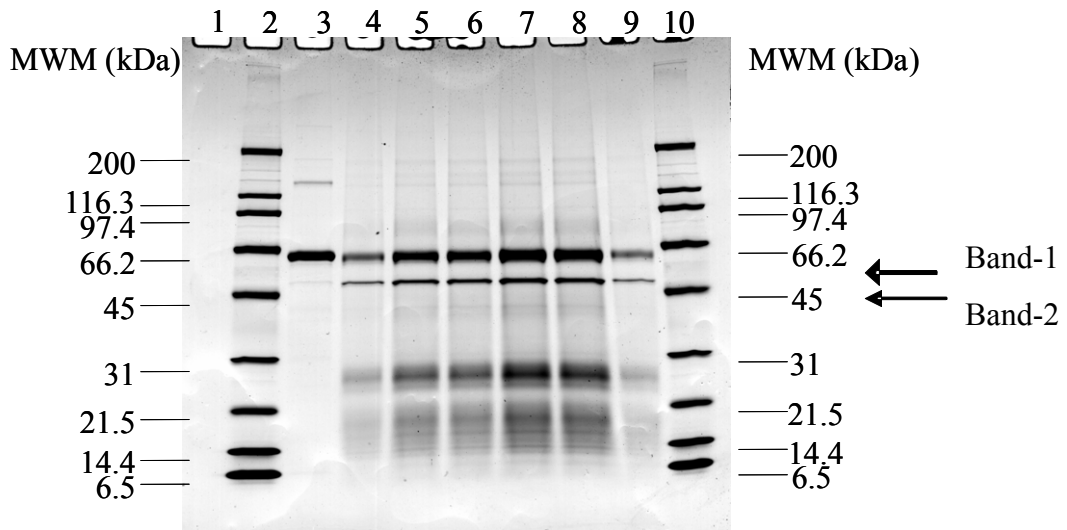


図 3 本組換えトウモロコシ及び *E. coli* 中で発現する改変 Cry2Ab2 蛋白質の SDS-PAGE による分子量の比較⁵

本組換えトウモロコシ及び *E. coli* 中の改変 Cry2Ab2 蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動後、Brilliant Blue G-Colloidal stain により染色された。Band-1 は完全長の改変 Cry2Ab2 蛋白質、Band-2 は改変 Cry2Ab2 蛋白質の分解断片。

- | | |
|--------|--|
| レーン 1 | ブランク (0 μ g) |
| レーン 2 | 分子量マーカー (4.5 μ g) |
| レーン 3 | CTP 由来の 3 アミノ酸が付加した改変 Cry2Ab2 蛋白質(1 μ g) |
| レーン 4 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(1 μ g) |
| レーン 5 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(2 μ g) |
| レーン 6 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(2 μ g) |
| レーン 7 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(3 μ g) |
| レーン 8 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(3 μ g) |
| レーン 9 | 本組換えトウモロコシの改変 Cry2Ab2 蛋白質(1 μ g) |
| レーン 10 | 分子量マーカー (4.5 μ g) |

⁵ 本図に記載された情報にかか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 3 改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラム⁶

目	科	英名(学名)	Insect Stage	LC ₅₀ (µg/mL or g diet) ^a	参考文献
Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	Corn Earworm (<i>Helicoverpa zea</i>)	幼虫	9.9	文献 29
		Black Cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)	幼虫	>100 ^b	文献 41
		Fall Armyworm (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	幼虫	<50 ^c	文献 41
	Crambidae (ツトガ科)	European Corn Borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	幼虫	1.5	文献 29
Collembola (トビムシ目)	Isotomidae (ツチトビムシ科)	Collembola (<i>Folsomia candida</i>)	若虫	>70 ^d	文献 30
Coleoptera (コウチュウ目)	Curculinoidae (ゾウムシ科)	Boll Weevil (<i>Anthonomus grandis grandis</i>)	幼虫	>100	文献 41
	Chrysomelidae (ハムシ科)	Southern Corn Rootworm (<i>Diabrotica unecimpunctata howardi</i>)	幼虫	>100	文献 41
	Coccinellidae (テントウムシ科)	Spotted Lady Beetle (<i>Coleomegilla maculata</i>)	幼虫	>120	文献 42
Hymenoptera (ハチ目)	Ichneumonidae (ヒメバチ科)	Parasitic wasp (<i>Ichneumon promissorius</i>)	成虫	>100	文献 43
		Parasitic wasp (<i>Nasonia vetripennis</i>)	成虫	>4500	文献 44
	Apidae (ミツバチ科)	European Honey Bee (<i>Apis mellifera</i>)	成虫	>68	文献 45
		European Honey Bee (<i>Apis mellifera</i>)	幼虫	>0.6µg/cell	文献 46
Hemiptera (カメムシ目) 亜目: Homoptera	Aphididae (アブラムシ科)	Green Peach Aphid (<i>Myzus persicae</i>)	成虫/若虫	>80	文献 41
Hemiptera (カメムシ目) 亜目: Heteroptera	Miridae (カスミカメムシ科)	Western Tarnished Plant Bug (<i>Lygus hesperus</i>)	若虫	>80	文献 41
	Anthocoridae (ハナカメムシ科)	Insidious Flower Bug (<i>Orius insidiosus</i>)	若虫	>100	文献 47

^a 「>」の付いた数値は検定に用いた中で最も高い濃度を示す。「<」の付いた数値は検定に用いた中で最も低い濃度を示す。

^b 最大投与量 100µg/mL が与えられた際の致死率は 42%であった。

^c 最少投与量 50 µg/mL が与えられた際の致死率は 61%であった。

^d 本組換えトウモロコシの凍結乾燥された葉を用いて検定が行われた。

⁶ 本表に記載された情報にかか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。

【*cry1A.105* 遺伝子 + 改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

本組換えトウモロコシは、*Cry1A.105* 蛋白質と改変 *Cry2Ab2* 蛋白質を同時に発現することにより、標的チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。実際に 2003 年から 2004 年にかけて米国、プエルトリコ、及びアルゼンチンで行われた本組換えトウモロコシの主要チョウ目害虫(*European corn borer*, *Southwestern corn borer*, *Corn earworm*, *Sugarcane borer*(SCB; *Diatraea saccharalis*), *Fall armyworm*)に対する抵抗性試験において、本組換えトウモロコシは、調査された全てのチョウ目害虫に対して抵抗性を示すことが確認されている。また、第一世代のチョウ目害虫抵抗性トウモロコシである MON810 と比較した場合、特に米国南部でのトウモロコシ栽培において深刻な被害をもたらしている *Fall armyworm* 及び *Corn earworm* に対して、より優れた抵抗性を示すことも確認されている(別添資料 2 の p14~18 の Figure1, 2, 3, 6, 7, 9, 10)。

また、*Cry1A.105* 蛋白質と改変 *Cry2Ab2* 蛋白質は、いずれも、*Corn earworm*, *Fall armyworm*, 及び *European corn borer* に対して殺虫活性を持つことが確認されているが(表 2, p8 及び表 3, p12)、このように殺虫スペクトラムがある程度重複している 2 つの蛋白質を同時に発現させることにより、本組換えトウモロコシに対して感受性を示す標的チョウ目害虫は、2 種類の Bt 蛋白質に対して非感受性にならない限り、本組換えトウモロコシに対する非感受性を獲得することは出来ない。このことから本組換えトウモロコシは、1 種類の Bt 蛋白質を単独で発現する Bt トウモロコシと比べて、非感受性害虫が発生する確率をより一層低く出来ると期待されている。

なお、*Cry1A.105* 蛋白質と改変 *Cry2Ab2* 蛋白質は、この両 Bt 蛋白質に対して感受性を示す標的チョウ目害虫に対して相乗的に殺虫効果を示すことはないことが既に確認されている(別添資料 3 の p14 の Table 1 及び p15 の Table 2)。

さらに、マイコトキシンは発癌性物質として知られているアフラトキシンやオクラトキシン A などを含むカビ毒の総称であり、チョウ目害虫の食害跡に発生することで知られているが、本組換えトウモロコシはチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されていることから、このようなマイコトキシンの発生を抑え、トウモロコシの食品及び飼料利用としての安全性をより高めることが期待されている。

- 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(食品としてのアレルギー性を除く)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

Cry1A.105 蛋白質及び改変 *Cry2Ab2* 蛋白質が、既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(GenBank, EMBL, PIR, PDB, SwissProt を含む)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。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミドベクターPV-ZMIR245は、*E. coli*由来のベクターpBR322(文献48)などをもとに構築された。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えトウモロコシの作出に用いられたPV-ZMIR245の塩基数は17,600 bpである。また、PV-ZMIR245の塩基配列は別添資料1に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

*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

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

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表4(p16~17)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4(p15)に示した。

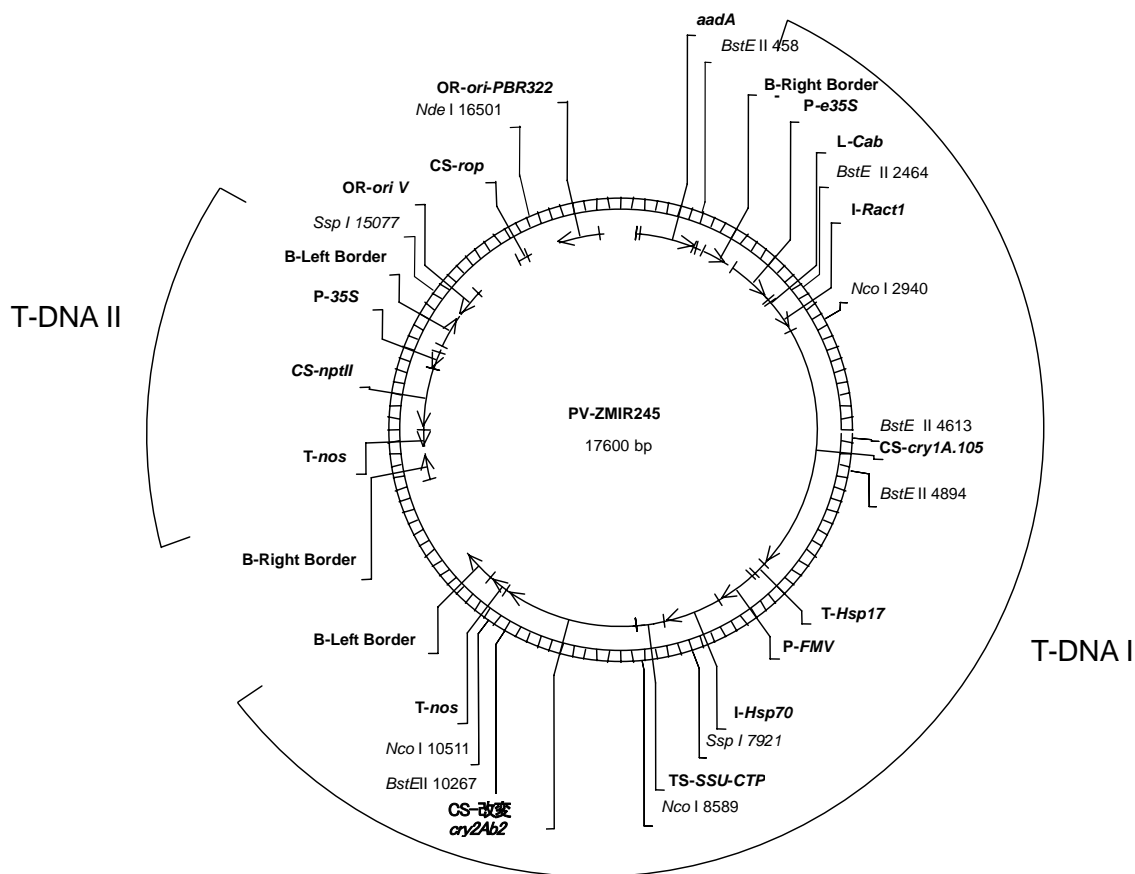


図 4 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR245 のプラスミドマップ⁷

本組換えトウモロコシの育成過程では、上図の T-DNA I 領域は持つが、T-DNA II 領域は持たない個体を選抜した。

⁷ 本図に記載された情報にかか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 4⁸ 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNAI 領域	
B ^a -Right Border (右側境界領域)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 49)。
P ^b - <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(文献 50)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA(文献 51)のプロモーターと 9bp リーダー配列。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
L ^c - <i>Cab</i>	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 52)。
I ^d - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 53)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS ^e - <i>cry1A.105</i>	Cry1A.105 蛋白質をコードする遺伝子。詳細は第一の 2-(1)-ロ-①に示した。
T ^f - <i>Hsp17</i>	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(文献 54)
P ^b - <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus 由来の 35S プロモーター(文献 55)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I ^d - <i>Hsp70</i>	トウモロコシ熱ショック蛋白質 70 遺伝子の第 1 イントロン(文献 56)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS ^g - <i>SSU-CTP</i>	トウモロコシのリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットの輸送ペプチドで、第 1 イントロン配列を含む(文献 57)。下流に連結した蛋白質を色素体へと輸送する。
CS ^e -改変 <i>cry2Ab2</i>	<i>B. thuringiensis</i> に由来する改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする遺伝子(文献 58)。詳細は第一の 2-(1)-ロ-①に示した。
T ^f - <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'非転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(文献 59)。
B ^a -Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 60)。

^aB – border (境界配列)

^bP – promoter (プロモーター)

^cL – leader (リーダー配列)

^dI – intron (イントロン)

^eCS – coding sequence (コーディング配列)

^fT – transcript termination sequence (転写終結配列)

^gTS – targeting sequence (ターゲティング配列)

表 4⁸ 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能
(続き)

構成要素	由来及び機能
T-DNA II 領域	
B-Right Border (右側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA の右側境界配列(24bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 49)。
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3'転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 59)。
CS- <i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(文献 61)。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(文献 62)。
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(文献 51)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
B-Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 60)。
外側骨格領域	
OR ^a - <i>ori V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 63)。
CS- <i>rop</i>	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列(文献 64)
OR ^a - <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 48)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-nucleotidyltransferase の細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与する(文献 65)。

^aOR – Origin of Replication (複製開始領域)

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。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

2 つの独立した T-DNA 領域(T-DNA I 領域、T-DNA II 領域)を持つ発現ベクター PV-ZMIR245 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 LH172 の未熟胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選択の方法

2 つの独立した T-DNA 領域(T-DNA I 領域、T-DNA II 領域)を持つ発現ベクター PV-ZMIR245 を導入して得られた R₀ 個体をパロモマイシンを含む培地に移して、T-DNAI 領域と T-DNAII 領域の両方が挿入された個体、あるいは T-DNAII 領域のみが挿入された個体(R₀)を選抜した(図 5, p20)。

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菌体の残存の有無

培地へカルベニシリンを添加することによりアグロバクテリウムの除去を行なった(文献 66)。

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

再分化個体である R₀ 世代を他の従来トウモロコシ品種 LH172 と交配させた LH172BC0F₁ 世代の中から、T-DNAII 領域が分離し、T-DNAI 領域のみを持つ個体を PCR 法により選抜した。その際、T-DNAII 領域を持つ個体は廃棄した(図 5, p20)。

その後、挿入遺伝子や Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現量の解析によりさらに選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外ほ場での実際の害虫抵抗性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病虫害感受性など)などから総合的に判断して本組換えトウモロコシが選抜された(試験に用いた世代については p21 の図 6 を参照)。なお、本評価書における本組換えトウモロコシ MON89034 とは、LH172BC0F₁ 世代において T-DNA II 領域が分離し T-DNA I 領域のみを持つことを PCR によって確認した個体及びその後代の全てを指している。

本組換えトウモロコシの我が国における申請状況は以下のとおりである。

- 2006年5月 農林水産省・環境省より「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」に基づき、第一種使用規程(隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)の承認を受けた。
- 2007年2月 厚生労働省に「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2007年2月 農林水産省に「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」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。

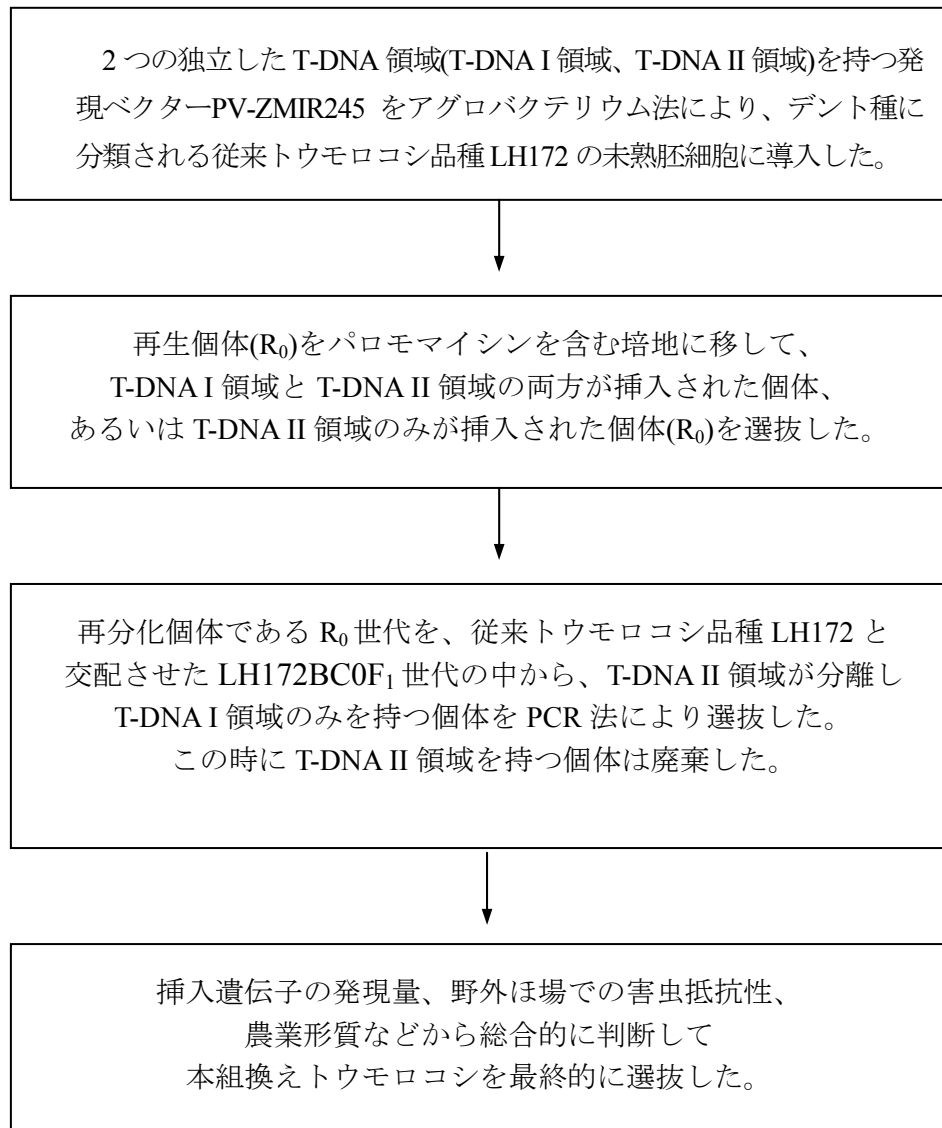


図 5 本組換えトウモロコシの選抜方法⁹

⁹ 本図に記載された情報にかか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。

[社外秘に付き非開示]

図 6 本組換えトウモロコシの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ. 移入された核酸の複製物が存在する場所

本組換えトウモロコシのLH172BC0F₁世代に自殖を繰り返すことにより得られた3世代(LH172BC0F₂世代、LH172BC0F₃世代、LH172BC0F₄世代)及びLH172BC0F₁世代に商業栽培品種LH172を掛け合わせたLH172BC1F₁世代、さらにはこのLH172BC1F₁世代を自殖して得られたLH172BC1F₂世代の計5世代を用いて2つのBt蛋白質の発現の有無と分離様式を調査した。

その結果、全ての世代において実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計的な有意差は認められなかった(表 5, p22)。

よって、本組換えトウモロコシの挿入遺伝子はメンデルの法則にしたがって次世代に遺伝していることから、染色体上に存在することが確認された。

表 5 本組換えトウモロコシの後代の分離比¹⁰

世代	検定植物数	実測値		期待値		X ²
		+	-	+	-	
LH172BC0F ₂	11	7	4	8.25	2.75	0.2727
LH172BC0F ₃	24	24	0	24	0	Fixed +
LH172BC0F ₄	30	30	0	30	0	Fixed +
LH172BC1F ₁	28	13	15	14	14	0.0357
LH172BC1F ₂ ^a	24	20	4	18	6	0.5
LH172BC1F ₂ ^a	24	17	7	18	6	0.0556

+ ; 蛋白質の発現あり

- ; 蛋白質の発現なし

^a ; 同じLH172BC1F₂世代の異なる集団からサンプリングしている。

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

サザンブロット分析の結果、本組換えトウモロコシ中のゲノミックDNA中の1箇所に*cryIA.105* 遺伝子発現カセットと改変*cry2Ab2* 遺伝子発現カセットからなるT-DNA I領域が1コピー存在することが明らかとなった(図 7, p24 ; 詳細は別添資料4)。さらに、外側骨格領域とT-DNA II領域を含めたその他の非意図的な断片が本組換えトウモロコシ中に

¹⁰ 本表に記載された情報にかか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。

挿入されていないことも確認された(図 7, p24 ; 詳細は別添資料 4)。

なお、挿入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*cryIA.105* 遺伝子の発現を制御する P-*e35S* の 5'末端領域とそれに隣接する右側境界領域が、相同組換えにより T-DNA II 領域内の左側境界領域と *nptII* 遺伝子の発現を制御する P-35S の 5'末端領域と置き換わっていることが明らかとなった(図 8, p25)。しかしながら、この相同組換えは蛋白質をコードする領域中では起こっておらず、最も近いオープンリーディングフレームである Cry1A.105 蛋白質のコード領域についても、Cry1A.105 蛋白質が各組織で正常に発現していることが確認されていることから(別添資料 5 の p17 の Figure2)、この相同組換えにより新たなオープンリーディングフレームは形成されていないと結論された。

さらに、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示された(別添資料 4 の p56 の Figure17)。

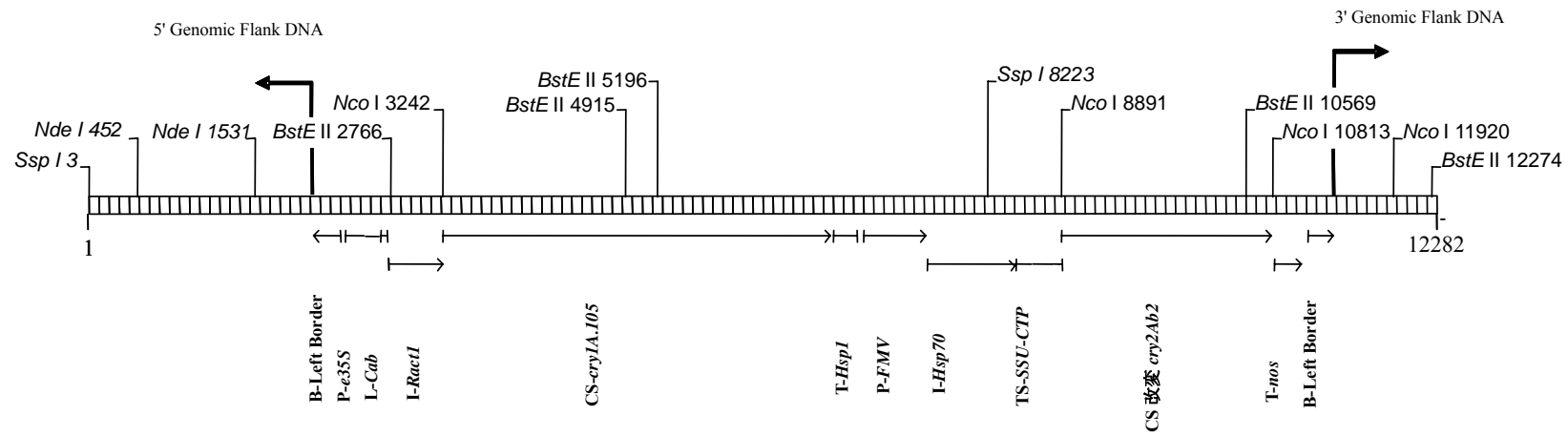


図 7 本組換えトウモロコシの挿入遺伝子地図¹¹

¹¹ 本図に記載された情報にかか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。

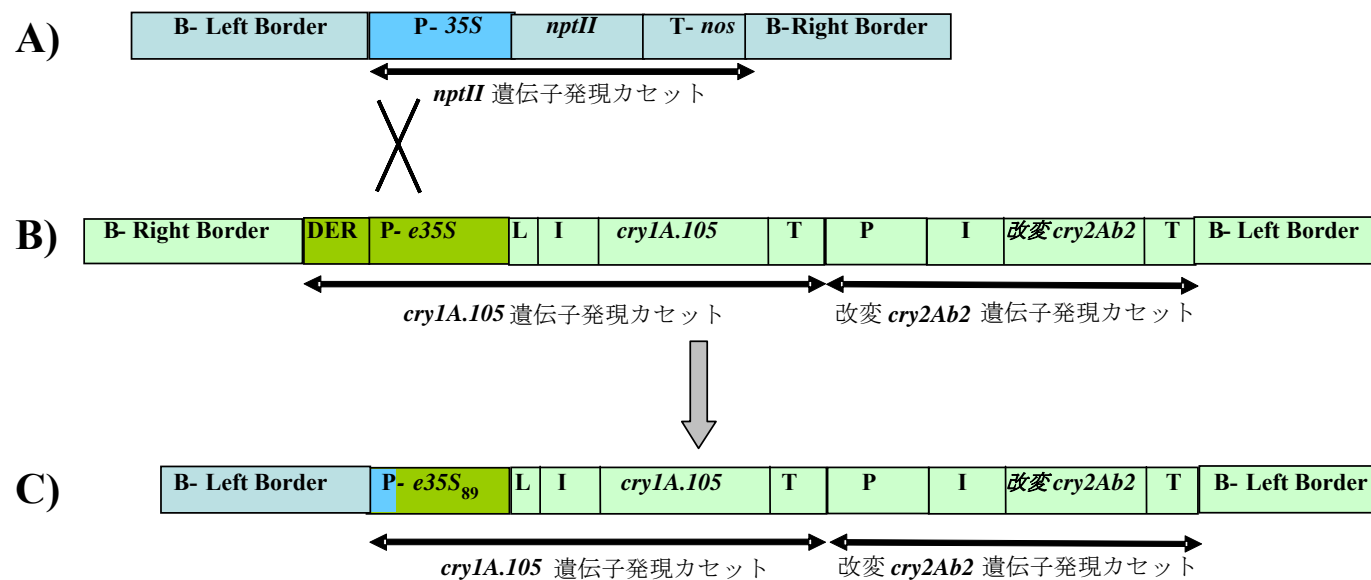


図 8 挿入遺伝子の 5'末端領域における相同組換えに関する概要¹²

- A) プラスミド・ベクターPV-ZMIR245 における T-DNA II 領域
- B) プラスミド・ベクターPV-ZMIR245 における T-DNA I 領域
- C) 本組換えトウモロコシにおける T-DNA I 領域

DER = 二重エンハンサー領域; L = リーダー配列; I = インtron配列; P = プロモーター; T = ターミネーター.

図はプラスミド・ベクターPV-ZMIR245 内の T-DNA I 領域と T-DNA II 領域の P-e35S と P-35S の間で起こったと推定される相同組換えについて示している。相同組換えの結果、本組換えトウモロコシにおいて形成された改変 P-e35S(P-e35S₈₉)は、二重エンハンサー領域(DER)を欠損している。

¹² 本図に記載された情報にかか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。

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

1 コピーなので該当しない。

ニ. (6)のイ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

本組換えトウモロコシの複数世代における Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現の安定性を確認するために、本組換えトウモロコシの 6 世代(LH172BC0F₃、LH172BC0F₄、LH172BC0F₅、LH172BC0F₆、[LH172BC0F₇ x LH198]F_{1H}、TI:BC1:F₁xRP)においてウエスタンブロット分析を行った。その結果、分析に供試した全ての世代で Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現していることが確認された(別添資料 5 の p17, 18 の Figure2, 3)。なお、それぞれのウエスタンブロット分析において本組換えトウモロコシから完全長の Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質の他に異なるサイズのバンドが検出されたが、これらは全て対照の非組換えトウモロコシからも検出されていた。よって、これらのバンドは全てトウモロコシの内在性蛋白質と交差反応した結果、検出されたものと結論された。

ホ. 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

プラスミド PV-ZMIR245 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* と *A. tumefaciens* などのグラム陰性菌に限られており、自然において野生動植物に対する伝達性はない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより、本組換えトウモロコシを特異的に検出可能である(別添資料 4 の p59 の Figure20)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

本組換えトウモロコシに挿入されている *cry1A.105* 遺伝子と改変 *cry2Ab2* 遺伝子はそれぞれ Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質を発現することにより、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている(別添資料 2 の p14~18 の Figure1~10)。

ロ.¹³ 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

本組換えトウモロコシとその対照の非組換えトウモロコシを供試して、2006年に日本モンサント株式会社の河内研究農場にて隔離ほ場試験を行った(別添資料6)。供試材料として、本組換えトウモロコシの [LH172BC0F₇ x LH198]F_{1H} 世代を、対照の非組換えトウモロコシには、供試する組換えトウモロコシ系統と遺伝的背景が類似している LH172 x LH198 系統を用いた(図6, p21)。

① 形態及び生育の特性

形態及び生育に関する特性を比較するために、19項目(発芽揃い、発芽株数、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花時期、稈長、稈径、草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、有効雌穂数、収穫期の地上部重、雌穂長、雌穂径、粒色、粒形)について調査を行った。その結果、雌穂径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が認められたが(P=0.02)、それ以外の項目では差異は認められなかった。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で有意差が認められた雌穂径の平均値は、それぞれ5.1cmと5.0cmであった(別添資料6のp8の表2)。

なお、これまでに実施した組換えトウモロコシ(MON863系統、MON810系統、NK603系統、DLL25系統、MON88001系統、MON88012系統、MON88017系統及びLY038系統)の隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシから得られた平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、有意差の認められた本組換えトウモロコシの雌穂径の平均値(5.1cm)は、従来トウモロコシにおける変動の範囲内(3.6–5.8cm)であった(別添資料6のp8の表2)。

② 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを、第4葉期になるまで成育させた後(別添資料6のp13の図6-1)、5℃(12時間日長)に設定した人工気象室に移し生育状況の調査を行った。

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は共に、人工気象室へ移してから35日後には枯死しており、その程度に差異はなかった(別添資料6のp14の図6-2)。

③ 成体の越冬性又は越夏性

¹³ 本項目中の以下に続く①～⑦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帰属する。

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、2006年の11月7日に生育状況を観察したが、本組換えトウモロコシ及び対照のトウモロコシともに枯死しており、その程度に差異は認められなかった(別添資料6のp15の図7)。

④ 花粉の稔性及びサイズ

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相違は観察されなかった(別添資料6のp19の図8-1, 8-2)。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

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種子の生産量(一穂着粒数、粒列数、一列粒数、百粒重)を比較した結果、一穂着粒数において統計学的有意差が認められたが($P=0.03$)、それ以外の項目では差異は認められなかった(別添資料6のp20の表6)。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意差が認められた一穂着粒数の平均値は、それぞれ663.6粒と592.1粒であった(別添資料6のp20の表6)。

なお、これまでに実施した組換えトウモロコシ(MON863系統、MON810系統、NK603系統、DLL25系統、MON88001系統、MON88012系統、MON88017系統及びLY038系統)の隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシから得られた平均値の最小値・最大値を従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、有意差の認められた本組換えトウモロコシの一穂着粒数の平均値は、従来トウモロコシにおける変動の範囲内(549.2 - 728.6粒)であった(別添資料6のp20の表6)。

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、収穫時の種子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脱粒性も共に難脱粒性であった。

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から収穫した種子の発芽試験を、1反復60粒の3反復で経時的に調査することで、収穫種子の休眠性の有無を確認した。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の種子は播種後5日以内にほぼ全て発芽し(別添資料6のp16の表3)、最終発芽株数についても統計学的有意差は認められなかった(別添資料6のp16の表4)。なお、本組換えトウモロコシにおいて1粒だけ発芽しない種子が認められたが、この種子はカビにより腐敗していることが確認された。

⑥ 交雑性

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、本組換えトウモロコシでは交雑

性の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

本組換えトウモロコシから土壌微生物相に影響を及ぼすような有害物質が産生されているかを確認するために、土壌微生物相試験を行った。

その結果、本組換えトウモロコシあるいは対照の非組換えトウモロコシを栽培した土壌中の細菌数、放線菌数及び糸状菌数に統計学的有意差は認められなかった(別添資料6のp23の表7)。

本組換えトウモロコシの地上部から周辺の植物相に影響を及ぼすような有害物質が産生されているかを確認するために、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成植物体の地上部を用いた鋤込み試験を行った。

その結果、本組換えトウモロコシあるいは対照の非組換えトウモロコシの成植物体を鋤込んだ土壌に播種したハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料6のp23の表8)。

本組換えトウモロコシの地下部から周辺の植物相に影響を及ぼすような有害物質が産生されているかを確認するために、後作試験を行った。

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収穫時に採取した土壌に播種したハツカダイコンの発芽株数、草丈、生体重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料6のp23の表9)。

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) 使用等の方法

—

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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

- (5) 実験室等での使用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諸外国における申請状況は以下のとおりである。

- 2006年10月 米国食品医薬品局(FDA)に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。
- 2006年10月 米国農務省(USDA)に無規制裁培(商業栽培)のための申請を行った。
- 2006年11月 カナダ食品検査局(CFIA)に飼料・環境の安全性審査の申請を行った。
- 2006年11月 カナダ厚生省(Health Canada)に食品としての安全性審査の申請を行った。
- 2007年8月 米国食品医薬品局(FDA)より食品・飼料としての安全性認可を受けた。

なお、本組換えトウモロコシの我が国における申請状況は以下のとおりである。

- 2006年5月 農林水産省・環境省より「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」に基づき、第一種使用規程(隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)の承認を受けた。
- 2007年2月 厚生労働省に「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。
- 2007年2月 農林水産省に「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」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。

第二¹⁴項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 1579 年に我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。

本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因する生物多様性影響については、本隔離ほ場で実施した試験の結果に基づき、以下のとおり評価した。

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)(p27～28, 第一 2-(6) ロ ①～⑤)を比較検討した。

その結果、形態及び生育の特性として評価した 19 項目のうち、雌穂径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が認められたが(P=0.02)、それ以外の項目では差異は認められなかった。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で有意差が認められた雌穂径の平均値は、それぞれ 5.1cm と 5.0cm であった(別添資料 6 の p8 の表 2)。

また、種子の生産量に関する特性として評価した 4 項目のうち、一穂着粒数において、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が認められたが(P=0.03)、それ以外の項目では差異は認められなかった(別添資料 6 の p20 の表 6)。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意差が認められた一穂着粒数の平均値は、それぞれ 663.6 粒と 592.1 粒であった(別添資料 6 の p20 の表 6)。

なお、これまでに実施した組換えトウモロコシの隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシから得られた平均値の最小値・最大値を、従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、有意差の認められた本組換えトウモロコシの雌穂径及び一穂着粒数の平均値は、従来トウモロコシにおける変動の範囲内であった。

このことから、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認められた雌穂径及び一穂着粒数における差異で競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本組換えトウモロコシには、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、トウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、こ

¹⁴ 本項目中で、第一の 2-(6)ロ.の①～⑦に記載された試験結果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。

の形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性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に関して、競合における優位性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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。

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

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、我が国に導入された1579年以来、長期間の使用経験がある。

本組換えトウモロコシ中ではチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すCry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質が発現しているが、両蛋白質ともに既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている(第一の2-(1)-ロ-②, p13)。また、Cry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能しているため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することは無いと考えられた。実際に、有害物質の産生性については、土壌微生物相試験、鋤込み試験、後作試験を行った結果、いずれの試験項目においても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6のp23の表7~9)。よって、意図しない有害物質の産生性はないと考えられた。

本組換えトウモロコシ中で発現するCry1A.105蛋白質及び改変Cry2Ab2蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。実際に、Cry1A.105蛋白質及びCry2Ab2蛋白質は、

白質を用いて生物検定を行ったところ、両蛋白質ともにトウモロコシの主要チョウ目害虫に対して殺虫活性を示したが、それ以外の昆虫種に対しては殺虫活性を持たないことが確認されている(表 2, p8 及び表 3, p12)。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、我が国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

本組換えトウモロコシを我が国で栽培した場合、我が国に生息するチョウ目昆虫が本組換えトウモロコシに暴露される経路としては、生育している本組換えトウモロコシを直接食餌する、もしくは本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌する場合は考えられた。

生育している本組換えトウモロコシを直接食餌する可能性のあるチョウ目昆虫としてはトウモロコシの植物体を摂食する European corn borer 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。

本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌する場合については、本組換えトウモロコシの花粉中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質によりチョウ目昆虫に何らかの影響を与える可能性は否定できない。そこで、「改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—5 昆虫類(2006)」を用いて、本組換えトウモロコシを我が国で栽培した場合に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。

(2) 影響の具体的内容の評価

本組換えトウモロコシの花粉中では、Cry1A105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質が、それぞれ 3.5 μ g/g fwt と 0.12 μ g/g fwt で発現していることが既に確認されている(別添資料 6 の p5)。

また、第 1 の 2(1)ロ①に記載したように、本組換えトウモロコシの主要チョウ目害虫に対する抵抗性を、既に第一種使用規程の承認を受けている MON810 と比較した結果、本組換えトウモロコシは Fall armyworm 及び Corn earworm に対して、より優れた抵抗性を示すことが確認されている(別添資料 2 の p14~18 の Figure1, 2, 3, 6, 7, 9, 10)。

これらのことから、特定された 11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫種が、本組換

えトウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、MON810 よりも高まっていることが示唆された。

(3) 影響の生じやすさの評価

本組換えトウモロコシから飛散した花粉を特定された11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫が食餌する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周りに生育する植物の葉に実際に堆積する花粉量を調査することにより推定した。

表 6(p36)に示すように、我が国においてはヒマワリ(*Helianthus annuus*)とイヌホオズキ(*Solanum nigrum*)の葉を用いて、トウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度の調査が行われている(文献 67)。

調査の結果、トウモロコシ畑の縁(0m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で81.7粒/cm²、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm²であった。しかし、畑から5m離れると花粉の最大堆積密度は、それぞれ19.6粒/cm²と22.2粒/cm²に減少していた。さらに、ヒマワリについては5m以降も調査されているが、10m離れると花粉堆積密度は全て10粒/cm²以内であった(表 6, p36)。

また、北米でも全7箇所のトウモロコシ畑周辺で、延べ1,700本以上のトウワタ(*Asclepias syriaca*)を用いて花粉堆積密度の調査が行われている(文献 68)。調査の結果、トウモロコシ畑から1m、2m、4-5m離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は35.4粒/cm²、14.2粒/cm²、そして8.1粒/cm²へと減少していくことが明らかとなっている(表 7, p36)。

さらに、カナダにおいてもトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度の調査が行われており、ほ場の縁から1m及び5m離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均28粒/cm²及び1.4粒/cm²であった(文献 69、表 8, p36)。

このように、我が国で行われたトウモロコシ畑周辺での花粉堆積密度に関する調査結果と同様の結果が、北米で大規模に行われた調査からも得られていることが明らかとなった。

よって、これらの調査結果から本組換えトウモロコシから飛散した花粉を、特定された11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫がある程度まとまって食餌する可能性は、トウモロコシ畑から10m以上離れると極めて低く、50m以上離れるとほとんど無視できると結論された。また、本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種が本組換えトウモロコシから半径50mの範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本組換えトウモロコシから飛散する花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

なお、本組換えトウモロコシ中で発現するCry1A.105蛋白質については、第1の2(1)ロ①に記載したように、殺虫スペクトラムの決定に深く関与しているドメインIIとIIIが、それぞれ既に第一種使用規程の承認を受けているMON810と1507中で発現するCry1Ab蛋白質とCry1F蛋白質に由来すること、さらにCry1Ac蛋白質との

アミノ酸配列の相同性が93.6%であることなどから、Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラムは、その構成要素である Cry1Ab 蛋白質、Cry1F 蛋白質及び Cry1Ac 蛋白質の殺虫スペクトラムを大きく超えることはないと考えられている。

実際に、本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1A.105 蛋白質のチョウ目昆虫に対する殺虫活性を半数致死濃度(LC₅₀)で評価したところ、構成要素である Bt 蛋白質と同様に、一部のチョウ目昆虫(Corn earworm、Fall armyworm、European corn borer)に対しては高い殺虫活性を示したが、その他のチョウ目昆虫に対する殺虫活性は低いことが確認されている(表 2, p8)。

さらに、本組換えトウモロコシにおいて発現している Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は、感受性を示すチョウ目昆虫に対して相乗的に殺虫効果を示さず、Cry1A.105 蛋白質を単独で摂取した場合の方が高い感受性を示すことが確認されている(別添資料 3 の p14 の Table 1 及び p15 の Table 2)。

(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。

表 6 日本で行われたトウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度調査(文献 67)

場所	ほ場面積	植物	ほ場からの距離に対する堆積密度の範囲(粒/cm ²)				
			0m	1m	2m	5m	10m
日本 (筑波)	49m ²	ヒマワリ	4.7 - 81.7	2.8 - 155.4	0.6 - 84.1	0.0 - 19.6	0.0 - 7.4
		イヌホオズキ	3.3 - 71.1	4.5 - 150.3	0.7 - 145.5	0.0 - 22.2	—

表 7 北米で行われたトウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度調査 (文献 68)

場所	ほ場面積	植物	ほ場からの距離に対する平均堆積密度(粒/cm ²)			
			0m	1m	2m	4-5m
北米 米国 (メリーランド)	8ha	トウワタ				
			63.1	35.4	14.2	8.1
カナダ (オンタリオ)	4.8-17.2ha (6箇所)					

表 8 カナダで行われたトウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度調査(文献 69)

場所	ほ場面積	植物	ほ場からの距離に対する平均堆積密度(粒/cm ²)		
			-1~0 m	0~1 m	5 m
カナダ (オンタリオ)	<20 ha ^a (4箇所)	トウワタ	78	28	1.4

^a 調査した4箇所のほ場は全て20ha以下であった。

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。

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主のトウモロコシは、我が国において長期間の使用経験がある。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、形態及び生育の特性として評価した 19 項目のうち、雌穂径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が認められたが ($P=0.02$)、それ以外の項目では差異は認められなかった。また、種子の生産量に関する特性として評価した 4 項目のうち、一穂着粒数において、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が認められたが ($P=0.03$)、それ以外の項目では差異は認められなかった。なお、これまでに実施した組換えトウモロコシの隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシから得られた平均値の最小値・最大値を、従来トウモロコシの変動範囲として比較した場合、有意差の認められた本組換えトウモロコシの雌穂径及び一穂着粒数の平均値は、従来トウモロコシにおける変動の範囲内であった。このことから、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認められた雌穂径及び一穂着粒数における差異で競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本組換えトウモロコシには、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、トウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、この形質の付与が栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性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に関して、競合における優位性に起因して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。

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、我が国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

本組換えトウモロコシ中ではチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現しているが、両蛋白質ともに既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p13)。また、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系から独立して機能しているため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することは無いと考えられた。実際に、有害物質の産生性については、土壌微生物相試験、鋤込み試験、後作試験を行った結果、いずれの試験項目においても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。よって、意図しない有害物質の産生性はないと考えられた。

本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、

チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すことが明らかとなっている。このことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、「改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—5 昆虫類(2006)」を用いて、11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫を特定した。

本組換えトウモロコシの標的チョウ目昆虫に対する抵抗性を、既に第一種使用規程の承認を受けている MON810 と比較した結果、本組換えトウモロコシは Fall armyworm 及び Corn earworm に対して、MON810 より優れた抵抗性を示すことが確認された。よって、特定された 11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫種が、本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌した場合に影響を受ける可能性は、MON810 よりも高まっていることが示唆された。

しかし、本組換えトウモロコシから飛散した花粉を特定された 11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫が食餌する可能性について考察した結果、特定された 11種(2亜種を含む)のチョウ目昆虫がある程度まとまって花粉を食餌する可能性は、トウモロコシ畑から 10m 以上離れると極めて低く、50m 以上離れるとほとんど無視できると結論された。また、本来自然生態系に生息している非標的チョウ目昆虫種が本組換えトウモロコシから半径 50 m の範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本組換えトウモロコシから飛散する花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

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。

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

よって、総合的評価として、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

【引用文献】

[社外秘に付き非開示]

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成19年6月6日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎

住所 東京都中央区銀座4丁目10番10号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3) (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。

- 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とおりである。

平成19年6月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 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) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) 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

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体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 (栽培目的の場合)

平成19年6月6日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎

住所 東京都中央区銀座4丁目10番10号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3) (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。

- 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とおりである。

平成19年6月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 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) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場部長
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) 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

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

具体的措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体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。