

チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, 改変 *cp4 epsps*, 改変 *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034×MON88017, OECD UI: MON-89034-3×MON-88017-3)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	
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
① 和名、英名及び学名	2
② 宿主の品種名	2
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	2
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	3
(3) 生理的及び生態学的特性	3
イ 基本的特性	3
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	4
ハ 捕食性又は寄生性	4
ニ 繁殖又は増殖の様式	4
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	4
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	4
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	5
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	5
ホ 病原性	5
ヘ 有害物質の産生性	5
ト その他の情報	5
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
イ 構成及び構成要素の由来	6
ロ 構成要素の機能	13
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	13
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	17
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	17
(2) ベクターに関する情報	18

イ 名称及び由来	18
ロ 特性	18
① ベクターの塩基数及び塩基配列	18
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	18
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	18
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	18
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	18
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	19
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	19
① 核酸が移入された細胞の選択の方法	19
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	19
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	19
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	22
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	22
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製数世代における伝達の安定性	22
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	22
④ (6)の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	22
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	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	23
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	23
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	23
② 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	28
a. 形態及び生育の特性	28
b. 生育初期における低温又は高温耐性	28
c. 成体の越冬性又は越夏性	28
d. 花粉の稔性及びサイズ	29
e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	29
f. 交雑率	29
g. 有害物質の産生性	29
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	30
(1) 使用等の内容	30

(2) 使用等の方法	30
(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	30
(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	30
(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	33
1 競合における優位性	33
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	33
(2) 影響の具体的内容の評価	34
(3) 影響の生じやすさの評価	34
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	34
2 有害物質の産生性	34
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
(2) 影響の具体的内容の評価	37
(3) 影響の生じやすさの評価	38
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	39
3 交雑性	39
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	39
(2) 影響の具体的内容の評価	40
(3) 影響の生じやすさの評価	40
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	40
4 その他の性質	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
【引用文献】	44
緊急措置計画書	45

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 4 月 11 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿
環境大臣 鴨下 一郎 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	チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (<i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , 改変 <i>cry3Bb1</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) <i>Iltis</i>) (MON89034×MON88017, OECD UI: MON-89034-3×MON-88017-3)
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

① 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)。

② 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、デント種を用いた。

③ 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、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

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)。わが国へは天正年間(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。

② 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、2006 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 3,130 万 ha、中国が 2,640 万 ha、ブラジルが 1,260 万 ha、メキシコが 770 万 ha、インドが 760 万 ha、ナイジェリアが 380 万 ha、インドネシアが 340 万 ha、アルゼンチンが 310 万 ha となっている(文献4)。なお、同統計情報に基づくわが国における栽培面積は 11 万 ha であった。

現在、わ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5)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6)。

わが国は 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7)。

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(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°C、最低発芽温度及び最低生育温度は6~10°Cであり、実際には13~14°C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8)。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8)。

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9; 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°C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°C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10)。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.) Itis 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11)。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない(文献12; 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、1,600万~3,000万个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13)。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14)、直径は90~100 μ m である(文献15)。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

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) (以下、MON89034 とする) と除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, 改変 *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis.) (MON88017, OECD UI: MON-88017-3) (以下、MON88017 とする) を従来の交雑育種法を用いて交配させた交配後代品種 (OECD UI: MON-89034-3×MON-88017-3) (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 MON89034 と MON88017 の2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 MON89034 と MON88017 の調製等に関する情報について概要等を記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

MON89034 及び MON88017 の作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来について、それぞれ図 1(p7) と表 1(p9~10) 及び図 2(p8) と表 2(p11~12) に示した。

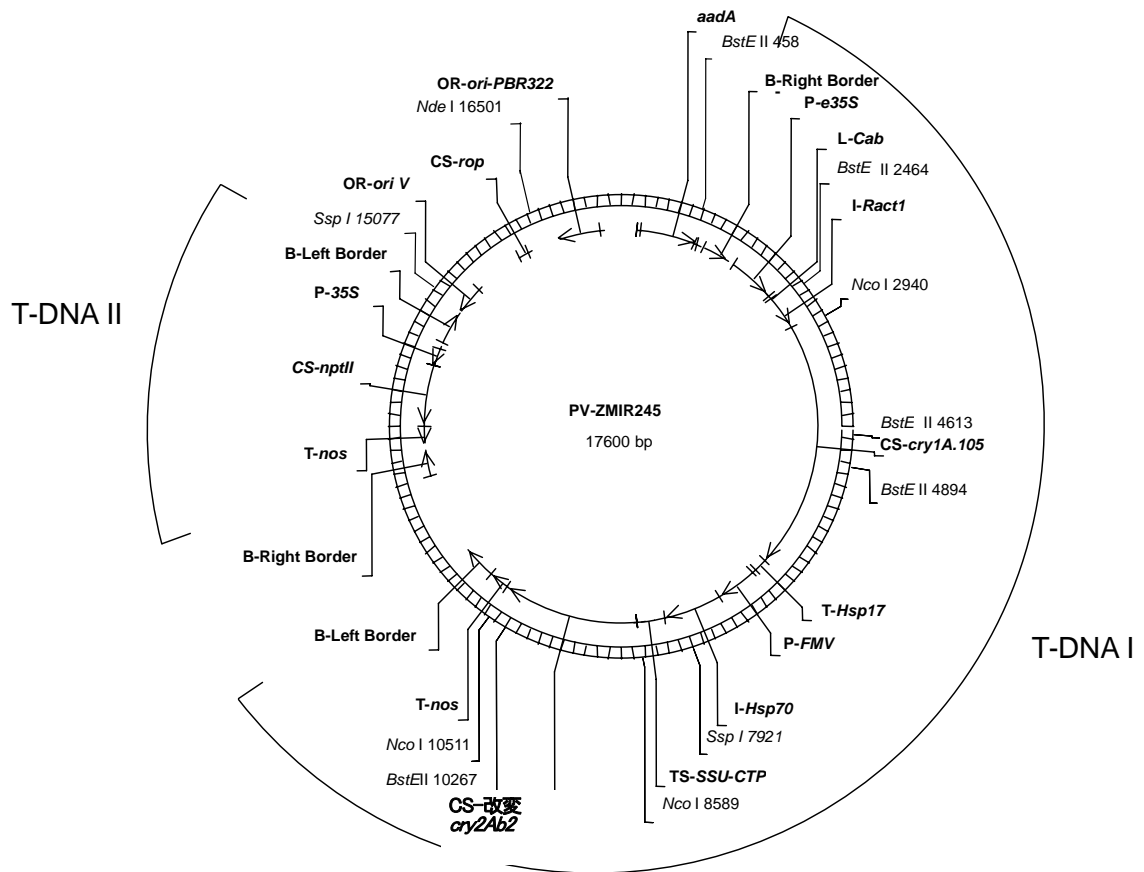


図 1 MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 のプラスミドマップ¹

MON89034 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。

¹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

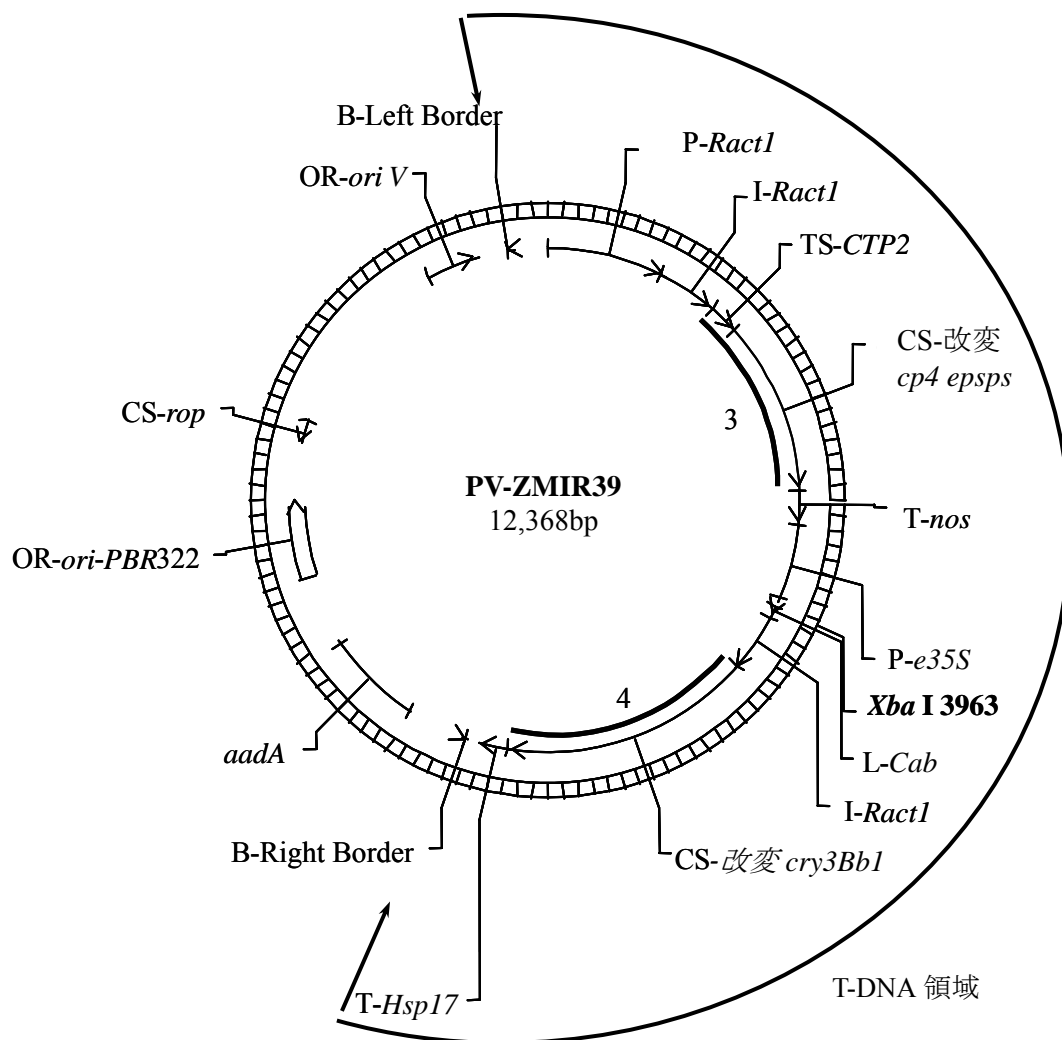


図 2 MON88017 の作出に用いた PV-ZMIR39 のプラスミドマップ²

²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 MON89034 の作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能³

構成要素	由来及び機能
T-DNA I 領域	
B ^{注1} -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 16)。
P ^{注2} - <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(文献 17)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA(文献 18)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 ^{注3} - <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 19)。
I ^{注4} - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS ^{注5} - <i>cryIA.105</i>	Cry1A.105 蛋白質をコードする遺伝子。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 蛋白質である。
T ^{注6} - <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、ポリアデニル化を誘導する(文献 21)
P- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus 由来の 35S プロモーター(文献 22)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I- <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 23)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS ^{注7} - <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 24)。下流に連結した蛋白質を色素体へと輸送する。
CS-改変 <i>cry2Ab2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> に由来する改変 Cry2Ab2 蛋白質をコードする遺伝子(文献 25)。クローニングの際に用いる制限酵素切断部位を付加するため、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端のメチオニンの後にアスパラギン酸が 1 つ挿入されている。
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'非転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 26)。
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 27)。

表 1 MON89034 の作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能(続き)³

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 16)。
T-nos	<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 26)。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(文献 28)。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 29)。
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 18)。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 27)。
外側骨格領域	
OR ^{注8} - <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 30)。
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 31)
OR- <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 32)。
<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 33)。

注1 B – border (境界配列)

注2 P – promoter (プロモーター)

注3 L – leader (リーダー配列)

注4 I – intron (イントロン)

注5 CS – coding sequence (コーディング配列)

注6 T – transcript termination sequence (転写終結配列)

注7 TS – targeting sequence (ターゲティング配列)

注8 OR – Origin of Replication (複製開始領域)

³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 2 MON88017 の導入に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素及び機能⁴

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
P ^{注1} - <i>Ract1</i>	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(文献 20)。
I ^{注2} - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS ^{注3} - <i>CTP2</i>	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塩基配列(文献 34)。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS ^{注4} -改変 <i>cp4 epsps</i>	<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(文献 35; 文献 36)。植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されている。
T ^{注5} - <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、ポリアデニル化を誘導する(文献 26)。
P- <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(文献 17)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)35SRNA(文献 18)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 ^{注6} - <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 19)。
I- <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 20)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS-改変 <i>cry3Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子(文献 37)。MON863 の改変 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一ヶ所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON863 ではグリシンであるのに対して MON88017 ではアスパラギン酸である。
T- <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、ポリアデニル化を誘導する(文献 38)。

表2 MON88017 の導入に用いたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素及び機能（続き）⁴

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域	
B ^{注7} -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 16)。
<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 33)。
OR ^{注8} -ori-PBR322	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 32)。
CS-rop	<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タンパク質を抑制するコーディング配列(文献 31)。
OR-ori-V	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 30)。
B-Left Border (左側境界領域)	<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 31)

注1 P – promoter (プロモーター)

注2 I – intron (イントロン)

注3 L – leader (リーダー配列)

注4 TS – targeting sequence (ターゲティング配列)

注5 CS – coding sequence (コーディング配列)

注6 T – transcript termination sequence (転写終結配列)

注7 B – border (境界配列)

注8 OR – Origin of Replication (複製開始領域)

⁴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 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

MON89034 及び MON88017 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p9~10)及び表 2(p11~12)に示した。そのうち、目的遺伝子である *cryIA.105* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の詳細については以下に記載した。

土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* の産生する Bt 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ことが知られている(文献 39; 文献 40; 文献 41)。また、これまでの研究から Bt 蛋白質は複数のドメインから構成され、各ドメインが持つ機能も明らかにされている。Bt 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 42; 文献 43)。

【*cryIA.105* 遺伝子】

MON89034 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、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(別添資料 1)。

Cry1A.105 蛋白質の殺虫スペクトラムについては、トウモロコシの主要チョウ目害虫であるコーンイヤールーム(*Helicoverpa zea*)、ブラックカットワーム (タマヤナガ) (*Agrotis ipsilon*)、フォールアーミーワーム (ツマジロクサヨトウ) (*Spodoptera frugiperda*)、サウスウエスタンコーンボラー (*Diatraea grandiosella*)、ヨーロピアンコーンボラー (ヨーロッパアワノメイガ) (*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 3, p15)。

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。

【改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

MON89034 の作出に用いた改変 *cry2Ab2* 遺伝子がコードする改変 Cry2Ab2 蛋白質は、クローニングの際に用いる制限酵素切断部位を付加するため、野生型 Cry2Ab2 蛋白質と比較して N 末端のメチオニンの後にアスパラギン酸が 1 つ挿入されている。

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コーンイヤールーム、フォールアーミーワーム、及びヨーロピアンコーンボラーの幼虫に対して殺虫活性を示したが、ブラックカットワームに対しては殺虫活性を示さなかった(表 3, p15)。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, p15)、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。

表 3 Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の殺虫スペクトラム⁵

目	科	英名(学名)	Insect Stage	Cry1A.105 LC ₅₀ ^a	参考文献	Cry2Ab2 LC ₅₀ ^a	参考文献
チョウ目 (Lepidoptera)	ヤガ科(Noctuidae)	コーンイヤールーム(<i>Helicoverpa zea</i>)	幼虫	15	文献 44	9.9	文献 46
		ブラックカットワーム(タマヤナガ) (<i>Agrotis ipsilon</i>)	幼虫	33	文献 45	>100 ^b	文献 54
		フォールアーミーワーム(ツマジロクサヨトウ) (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	幼虫	6.9	文献 45	<50 ^c	文献 54
	ツトガ科(Crambidae)	サウスウエスタンコーンボローラー (<i>Diatraea grandiosella</i>)	幼虫	37	文献 45	—	—
		ヨーロッパコーンボローラー(ヨーロッパアワノメイガ) (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	幼虫	0.43	文献 46	1.5	文献 46
トビムシ目 (Collembola)	ツチトビムシ科(Isotomidae)	オオフォルソムトビムシ (<i>Folsomia candida</i>)	若虫	>80 ^d	文献 47	>70 ^d	文献 47
コウチュウ目 (Coleoptera)	ゾウムシ科(Curculinoidae)	ボウルウィーヴィル(ワタミハナゾウムシ) (<i>Anthonomus grandis grandis</i>)	幼虫	>100	文献 48	>100	文献 54
	ハムシ科(Chrysomelidae)	サザンコーンルートワーム (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>)	幼虫	>100	文献 48	>100	文献 54
	テントウムシ科 (Coccinellidae)	スポットレディービートル (<i>Coleomegilla maculata</i>)	幼虫	>240	文献 49	>120	文献 55
ハチ目 (Hymenoptera)	ヒメバチ科 (Ichneumonidae)	バンデッドカタピラーパラサイト (<i>Ichneumon promissorius</i>)	成虫	>240	文献 50	>100	文献 56
		ジュエルワズブ(キョウノヤドリコバチ) (<i>Nasonia vitripennis</i>)	成虫	—	—	>4500	文献 57
	ミツバチ科(Apidae)	ヨーロッパミツバチ(<i>Apis mellifera</i>)	成虫	>550	文献 51	>68	文献 58
		ヨーロッパミツバチ(<i>Apis mellifera</i>)	幼虫	>11µg/cell	文献 52	>0.6µg/cell	文献 59
カメムシ目 (Hemiptera) ヨコバイ亜目 (Homoptera)	アブラムシ科(Aphididae)	グリーンピーチアフィッド(モモアカアブラムシ) (<i>Myzus persicae</i>)	成虫/ 若虫	>80	文献 48	>80	文献 54
カメムシ目 (Hemiptera) カメムシ亜目 (Heteroptera)	カスミカメムシ科 (Miridae)	ウエスタンターニッシュプラントバグ (<i>Lygus hesperus</i>)	若虫	>80	文献 48	>80	文献 54
	ハナカメムシ科 (Anthocoridae)	インディアスフラワーバグ(<i>Orius insidiosus</i>)	若虫	>240	文献 53	>100	文献 60

^a 単位は µg/mL or g diet を用いた。「>」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 MON89034 の凍結乾燥された葉を用いて検定が行われた。

⁵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

【*cry1A.105* 遺伝子+改変 *cry2Ab2* 遺伝子】

MON89034 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 MON89034 の主要チョウ目害虫 {ヨーロッパアンコーンボラー、サウスウエスタンコーンボラー、コーンイヤールーム、シュガーコーンボラー (サトウキビメイガ) (*Diatraea saccharalis*)、フォールアーミーワーム} に対する抵抗性試験において、MON89034 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、*Cry1A.105* 蛋白質と改変 *Cry2Ab2* 蛋白質は、いずれも、コーンイヤールーム、フォールアーミーワーム、及びヨーロッパアンコーンボラーに対して殺虫活性を持つことが確認されているが(表 3, p15)、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、MON89034 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、MON89034 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 MON89034 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活性を示すことはないことがすでに確認されている(別添資料 2 の p14 の Table 1 及び p15 の Table 2)。

【改変 *cry3Bb1* 遺伝子】

改変 *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コーンルートワーム(*Diabrotica* sp.)に対する殺虫活性を示す。

改変 *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*)に分類されるコロラドポテトビートル(コロラドハムシ) (*Leptinotarsa decimlineata*)とコーンルートワーム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がわが国に生息していることはこれまで報告されていないことが文献調査により示された(文献 61)。

なお、改変 *Cry3Bb1* 蛋白質は野生型 *Cry3Bb1* 蛋白質と比較して、6 箇所のアミノ酸が置換されている。そのうち 1 箇所はクローニングの際に制限酵素切断部位を付加したため、他の 5 箇所は殺虫活性を増強するために改変されている。

【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

MON 88017 で発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* CP4 株より単離された遺伝子で、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしており、除草剤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。改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現量を高めるために野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように野生型 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものであり、アミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されているのみである。

植物はグリホサートを処理すると 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)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。MON88017 の目的遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤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。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 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合成が正常に機能して生育することができる。

- 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

MON89034 で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質、MON88017 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質が、既知の接触アレルギー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, SwissProt を含む)を用いて比較したところ、既知アレルギー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

Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は *B. thuringiensis* に由来する Bt 蛋白質と呼ばれる結晶体の殺虫性蛋白質である。これらの Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており(文献 62)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告は無い。よって、Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の持つ代謝系を変化させることはないと考えられる。

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 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。また、EPSPS は基質である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)と特異的に反応することが知られており(文献 63)、これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているシキミ酸は、その反応性が S3P の 200 万分の一であることから、生体内で基質として反応するとは考えにくい。したがっ

て、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

以上のことから、植物 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断される。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターは以下のとおりである。

MON89034 : *E. coli* 由来のベクター pBR322 をもとに構築された PV-ZMIR245

MON88017 : *E. coli* 由来のベクター pBR322 をもとに構築された PV-ZMIR39

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られたプラスミド・ベクターの塩基数は以下のとおりである。

MON89034 : PV-ZMIR245 ; 17,600 bp

MON88017 : PV-ZMIR39 ; 12,368bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 及び MON88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 は *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

PV-ZMIR245 及び PV-ZMIR39 の感染性はいずれも知られていない。

(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

MON89034 及び MON88017 の作出のために宿主内に移入されたプラスミド・ベクタ

一の構成要素は表 1 (p9~10)及び表 2 (p11~12)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 1(p7)及び図 2(p8)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入については以下の方法を用いて行った。

MON89034：アグロバクテリウム法

MON88017：アグロバクテリウム法

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

形質転換細胞の選抜は以下を添加した培地を用いて行った。

MON89034：パロモマイシン

MON88017：グリホサート

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

MON89034 及び MON88017 において、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 64)。なお、MON89034 及び MON88017 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に MON89034 あるいは MON88017 を移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

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

MON89034 では、T-DNAI 領域のみを持つ個体を PCR 法により選抜した。

その後、導入遺伝子や 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などから総合的に判断して MON89034 が選抜された。

MON88017 では、2000~2001 年にかけて延べ 169 ヶ所のほ場試験を行い、最終商品化系統を選抜するとともに、その環境安全性を評価した。

MON89034 のわが国における申請状況は以下のとおりである。

- 2007年10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續」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2007年11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續き」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2008年1月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程（食用また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について）の承認を受けた。

MON88017 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- 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、同指針に適合していることが確認された。
- 2005年10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續き」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2006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續」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2006年4月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程（食用また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について）の承認を受けた。

【MON89034×MON88017の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、MON89034 と MON88017 の自殖系統を両親とする一代雑種品種である（図 3, p21）。

【社外秘に付き非開示】

図 3 MON89034×MON88017 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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

MON89034 及び MON88017 について、カイ二乗検定を用いて発現の有無及び分離様式について調査を行った結果、統計学的有意差は認められなかった。よって、MON89034 及び MON88017 の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認された。

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

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON89034 及び MON88017 のゲノミック DNA 中の 1 箇所、それぞれ T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域が 1 コピー存在することが確認された。また、導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示された。

さらに、MON89034 においては外側骨格領域と T-DNA II 領域を含めたその他の非意図的な断片が MON89034 中に挿入されていないことも確認された。なお、導入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*cry1A.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(別添資料 3)。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、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。

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

MON89034、MON88017 とともに 1 コピーなので該当しない。

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

発現の安定性については以下のように確認した。

MON89034：ウエスタンブロット分析による蛋白質の発現確認

MON88017：除草剤グリホサート散布試験及び ELISA 法による蛋白質の発現確認

- 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

MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 及び MON88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 は、自律増殖可能な宿主域が *E. coli* などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物等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

MON89034 及び MON88017 を検出及び識別するための方法としては、導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特異的に検出可能である。

本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するためには、上記の方法をトウモロコシの種子一粒ごとに行う必要がある。

- (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

本スタック系統トウモロコシに付与された特性は、以下のとおりである。

MON89034 : 導入遺伝子に由来する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性

MON88017 : 導入遺伝子に由来する改変 CP4 EPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性

MON89034 で発現する Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質及び MON88017 で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質は *B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質である。感受性昆虫の中腸内で Bt 蛋白質は限定分解されコア蛋白質となる。コア蛋白質は中腸上皮細胞膜上の特異的受容体と結合することにより中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として中腸上皮細胞が破壊され、感受性昆虫は消化プロセスを阻害されて死に至る(文献 39;文献 41)。Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており(文献 62)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告は無い。以上のことから、Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、植物代謝経路に影響を及ぼすことはない判断された。

同様に、MON88017 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高いこと、また、シキミ酸合成経路の律速酵素ではないために EPSPS 活性が増大しても本経路の

最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことから、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

また、チョウ目昆虫に殺虫活性を示す 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活性を示すことはないことが確認されている(別添資料 2 の p14 の Table 1 及び p15 の Table 2)。

Bt 蛋白質が昆虫に殺虫活性を示すには、その昆虫が Bt 蛋白質の結合できる特異的レセプターを持ち、かつ中腸内の pH と酵素条件が Bt 蛋白質が機能しうるような特定の条件を満たす必要がある。しかしチョウ目昆虫とコウチュウ目昆虫では中腸内の pH 条件が異なっている(文献 62)。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す Bt 蛋白質(Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質) とコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す Bt 蛋白質(改変 Cry3Bb1 蛋白質)ではお互いに異なる化学的条件下で機能を発揮しており、相互に作用するとは考えにくい。

さらに、相互作用する可能性が示唆される蛋白質、つまり2つの蛋白質が一組となることで作用する蛋白質、または同一のレセプターに結合するような蛋白質等でなければ、蛋白質の相互作用についての検討の必要性はほとんどないといわれている(文献 65)。このことから、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する Bt 蛋白質と改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、文献 65 で述べられている相互作用についての検討が必要な蛋白質には相当しないと考えられる。

以上のことから、MON89034 と MON88017 を交配させることにより作出した本スタック系統トウモロコシにおいても、これらの発現蛋白質が相互作用を示し、植物代謝経路に新たな影響を及ぼすとは考えにくい。

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チョウ目害虫抵抗性については米国でフォールアーミーワームを対象としたポット試験による生物検定を行った。その結果、本スタック系統トウモロコシと、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質のみを発現する MON89034 との間でチョウ目害虫抵抗性に統計学的有意差はないことが確認された(表 4, p26)。また、改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性についてはコウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワーム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耐性についてはグリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウェザーマックス)の散布試験による生物検定をいずれも米国で行った。その結果、本スタック系統トウモロコシと、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質のみを発現する MON88017 との間で除草剤グリホサート耐性ならびにコウチュウ目害虫抵抗性に統計学的有意差はないことが確認された(表 5 及び表 6, p26~27)。

以上の結果から、本スタック系統トウモロコシ中で発現するこれらの蛋白質は、それぞれ独立して作用していると考えられた。よって、第二の項目ごとの生物多様性影響評

価の際に用いる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関する情報については、以下に示す MON89034、MON88017 の諸形質を個別に調査した結果を引用することとした。

表 4 本スタック系統トウモロコシの生物検定によるチョウ目害虫フォールアーミーワームに対する被害程度調査結果(平均値±95%信頼区間)⁶

供試サンプル	葉部食害程度(LDR)±95%信頼区間
MON89034×MON88017	3.17±0.54 a ¹
MON89034	2.63±0.68 a
MON88017	8.67±0.23 b
非組換え体	9.00±0.00 b

¹ Tukey's Testによる多重比較検定を行った。その結果、各評価項目において、異なる英文字の平均値間には有意差が見られた(有意水準 5%)。

本スタック系統トウモロコシ MON89034×MON88017、MON89034、MON88017、及び非組換え体を各12個体ずつポット栽培し(3個体/反復×4反復)、6葉期にフォールアーミーワームの1齢幼虫を接種した(54個体/ポット)。フォールアーミーワーム接種後14日目にフォールアーミーワームによる葉部食害程度をGuthrieらが考案した評価方法にしたがって、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(文献66)。

表 5 本スタック系統トウモロコシの生物検定によるコウチュウ目害虫ウエスタンコーンルートワーム (*D. virgifera*)に対する被害程度調査結果(平均値±95%信頼区間)⁷

供試サンプル	根部食害程度(NIS)±95%信頼区間
MON89034×MON88017	0.29±0.13 a ¹
MON88017	0.18±0.08 a
MON89034	2.23±0.12 b
非組換え体	2.03±0.12 b

¹ Tukey's Testによる多重比較検定を行った。その結果、各評価項目において、異なる英文字の平均値間には有意差が見られた(有意水準 5%)。

本スタック系統トウモロコシ MON89034×MON88017、MON88017、MON89034、及び非組換え体を各12個体ずつポット栽培し(3個体/反復×4反復)、5葉期にウエスタンコーンルートワームの卵(720個/ポット)を接種した。ウエスタンコーンルートワーム接種後21日目にポットから植物体を取り出して土をていねいに除き、ウエスタンコーンルートワームによる食害の程度を Oleson と Tollefson が考案した nodal injury score (NIS)を用いて評価した(文献67)。一般的にコーンルートワームはまず下位の節(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(食害無)~3.00(食害甚:3つの節がすべて食害されている)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。

⁶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

⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 6 本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウェザーマックス)散布による傷害程度調査結果(平均値±95%信頼区間)⁸

試験サンプル	散布量							
	0.0 kg a.e./ha		0.84 kg a.e./ha		13.44kg a.e./ha ¹		26.88kg a.e./ha ¹	
	7 日目 ¹	14 日目 ¹	7 日目 ²	14 日目 ¹	7 日目 ²	14 日目 ¹	7 日目 ²	14 日目 ¹
MON89034 ×MON88017	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00 a	0.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00 a	1.0 ± 0.00	1.9 ± 0.32 a	1.0 ± 0.00
MON88017	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00 a	0.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00 a	1.0 ± 0.00	1.8 ± 0.44 a	1.0 ± 0.00
MON89034	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	7.8 ± 0.44 b	10.0 ± 0.00	8.6 ± 0.41 a	10.0 ± 0.00	7.9 ± 0.32 b	10.0 ± 0.00
非組換え体	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	8.0 ± 0.45 b	10.0 ± 0.00	8.4 ± 0.46 a	10.0 ± 0.00	8.0 ± 0.00 b	10.0 ± 0.00

¹ データにばらつきが認められなかったため、統計処理は行われなかった。

² Tukey's Test による多重比較検定を行った。その結果、各評価項目において、異なる英文字の平均値間には有意差が見られた(有意水準 5%)。

本スタック系統トウモロコシ MON89034×MON88017、MON88017、MON89034、及び非組換え体を各 8 個体ずつポット栽培し、4 葉期に除草剤グリホサート(製品名ラウンドアップ・ウェザーマックス)を散布してから 7 日後及び 14 日後に除草剤による植物体の障害程度を、0(傷害は認められない)~10(ほぼ全体が障害により枯死している)の 11 段階で調査した。なお、グリホサート散布量 0.84kg acid equivalent (a.e.)/ha は通常の散布量、13.44kg a.e./ha は通常の 16 倍の散布量、26.88kg a.e./ha は通常の 32 倍の散布量である。

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

② 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⁹

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、親系統である MON89034 及び MON88017 のわが国で実施された隔離ほ場試験結果に基づき評価を行った。

なお、MON88017 については平成 13 年 3 月 29 日に配布された「兄弟系統の安全性審査の考え方」に基づいて、2 種類のハイブリッド品種 017-A 及び 017-B を供試した。MON89034 については、「兄弟系統の安全性の考え方」が改正された後に隔離ほ場試験を行っているので、1 品種を供試した。

a. 形態及び生育の特性

MON89034 及び MON88017 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、形態及び生育の特性として発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、百粒重、粒色、粒形、収穫期の地上部重について調査を行った。さらに、MON89034 では、発芽株数、開花時期、稈径、有効雌穂数、一穂着粒数について調査を行った。

その結果、MON89034 において雌穂径及び一穂着粒数、MON88017 の 017-B において稈長及び雌穂径に統計学的有意差が認められた。しかし、これらの項目は、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは供試 2 種類のハイブリッド品種のうち 1 品種でしか統計学的有意差は認められなかった(別添資料 4 の p8 の表 2、別添資料 5 の p30 の表 2-1 及び p31 の表 2-2)。

b. 生育初期における低温又は高温耐性

MON89034 及び MON88017 は、対照の非組換えトウモロコシと同様に、生育初期における低温処理によって枯死しており、その程度に差異はなかった(別添資料 4 の p14 の図 6-2、別添資料 5 の p42 の表 4)。

c. 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、隔離ほ場試験の終了時には結実後の枯死が始まっていることを MON89034 及び MON88017 において観察した。(別添資料 4 の p15 の図 7、別添資料 5 の p42 の表 4)。

⁹本項目中の以下に続く a-g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

d. 花粉の稔性及びサイズ

MON89034 及び MON88017 は、対照の非組換えトウモロコシと同様に高い花粉稔性を示しており、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 4 の p19 の図 8-1, 8-2、別添資料 5 の p38 の表 3 及び p39~40 の写真)。

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量について、MON89034 及び MON88017 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、第一-2-(6)-ロ-①に記載した種子の生産量にかかわる諸形質を比較した結果、MON89034 において雌穂径及び一穂着粒数、MON88017 の 017-B において雌穂径に統計学的有意差が認められた。しかし、これらの項目は、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であるか、あるいは供試 2 種類のハイブリッド品種のうち 1 品種でしか統計学的有意差は認められなかった(別添資料 4 の p20 の表 6、別添資料 5 の p30 の表 2-1 及び p31 の表 2-2)。

脱粒性については、MON89034 及び対照の非組換えトウモロコシ、MON88017 とその対照の非組換えトウモロコシはいずれも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。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。

発芽率について、MON89034 及び MON88017 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で発芽試験を行った結果、統計学的有意差はなく、種子の休眠性は認められなかった(別添資料 4 の p16 の表 3 及び表 4、別添資料 5 の p42 の表 4)。

f. 交雑率

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、親系統である MON89034、MON88017 の交雑率の試験は行わなかった。

g. 有害物質の産生性

トウモロコシについては、周辺の植物や土壌微生物に影響を与えるような有害物質を、根から分泌することは知られていない。また、枯死した後に他の植物に影響を与えるような他感物質が産生されることも知られていない。

MON89034 及び MON88017 について、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験を行った結果、MON88017 の鋤込み試験におけるハツカダイコンの生体重において

017-A で統計学的有意差が認められた。しかし、従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であった (別添資料 4 の p23 の表 7-9、別添資料 5 の p44~45 及び p47 の表 5-7)。

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

MON89034 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・飼料の安全性確認を受けた。

なお、MON89034 のわが国における申請状況は以下のとおりである。

2007年10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。

2007年11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き」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

2008年1月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程（食用また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について）の承認を受けた。

MON88017 の諸外国における申請状況は以下のとおりである。

2005年1月 米国食品医薬品局(FDA)より食品・飼料としての安全性確認を受けた。

2006年1月 米国農務省(USDA)より無規制裁培(商業栽培)のための安全性確認を受けた。

2006年2月 カナダ食品検査局(CFIA)より飼料・環境の安全性確認を受けた。

2006年2月 カナダ厚生省(Health Canada)より食品としての安全性確認を受けた。

MON88017 のわが国における認可状況は以下の通りである。

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、同指針への適合性が確認された。

2005年10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き」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

2006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

2006年4月

安全性確認を受けた。

農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程（食用また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について）の承認を受けた。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹⁰

本スタック系統トウモロコシは MON89034 と MON88017 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

第一-2-(6)-①で述べたとおり、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼすおそれはないと考えられること、同じチョウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は相互作用を示さないことが確認されていること、チョウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Bt 蛋白質とコウチュウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Bt 蛋白質は、異なる pH 条件で殺虫活性を発揮することから相互に作用するとは考えにくいこと、Bt 蛋白質と改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、文献 65 で述べている相互作用についての検討が必要な蛋白質には該当しないこと、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性はそれぞれの親系統と同程度であったことから、これらの蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内において相互に影響する可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

以上のことから、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、MON89034、MON88017 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

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 MON89034 及び MON88017 の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、競合における優位性に影響を及ぼすような差異は認められなかった。

本スタック系統トウモロコシ中で発現する Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質は酵素活性を持たないと考えられ宿主の代謝系とは独立して機能し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の基質特異性は高いため、それぞれ

¹⁰本項目中で、第一の 2-(6)-②.の a-g 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

独立して作用していると考えられた。また、本スタック系統トウモロコシには、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及び改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これらの害虫による食害は、トウモロコシがわ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。さらに、本スタック系統トウモロコシは除草剤グリホサート耐性を有するが、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。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシに関して、競合における優位性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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、わが国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

MON89034 及び MON88017 において、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験を行った結果、いずれの試験においても有害物質の産生が高まっていることを示唆するような差異は認められなかった。よって、本スタック系統トウモロコシにおいても意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

本スタック系統トウモロコシで発現しているいずれの蛋白質も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。(第一-2-(1)-ロ-②, p17)。また、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は、酵素活性を持たないと考えられ、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。さらに、第一-2-(1)-ロ-③ (p17) に示したように、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられているため、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

【MON89034 の影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定】

MON89034 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、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

MON89034 をわが国で栽培した場合、わが国に生息するチョウ目昆虫が MON89034 に暴露される経路としては、生育している MON89034 を直接食餌する、もしくは MON89034 から飛散した花粉を食餌する場合が考えられた。

生育している MON89034 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ヨーロッパンコーンボラー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。

MON89034 から飛散した花粉を食餌する場合については、MON89034 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、文献 68 を用いて、MON89034 をわ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。その結果、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*)、ウラナミシヤノメ (*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。

【MON88017 の影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

MON88017 で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質は、コーンルートワームに対する抵抗性が付与されている。このことから、影響を受ける野生動植物としては、コウチュウ目昆虫が考えられた。これまでのところ、改変 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目昆虫種の中でコロラドポテトビートルとコーンルートワーム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(別添資料 5 の p52~54)、殺虫スペクトラムが極めて狭いことが示されている(別添資料 5 の p54 の表 10)。なお、これまでのところ、コロラドポテトビートル、コーンルートワーム及びそれらと同属の近縁種はわが国に生息しているという報告はないことが文献調査により示された(別添資料 5 の p54 の表 10)。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。

標的及び非標的生物が改変 Cry3Bb1 蛋白質の影響を受ける経路としては、トウモロコシの生育期に植物体を直接摂食する可能性、トウモロコシの花粉飛散により影響を受ける可能性、並びに刈り取られた後に土壤中に鋤き込まれたトウモロコシの植物体を摂食する可能性が考えられた。

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 (*Anomala testaceipes*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*)、マルクビクシコメツキ (*Malanotus fortnumi*) 等の害虫としてリストアップされているもの(文献 69)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。

MON88017 から飛散した花粉を食餌する場合については、文献 68 に記載された絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているコウチュウ目種について、MON88017 の花粉飛散により影響を受ける可能性があるかを調査した。その結果、環境省レッドリスト記載種の中には、MON88017 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断された。

さらに、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、MON88017 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、オオヨモギハムシ (*Oreina angusticollis*)・ハナウドゾウムシ (*Catapionus viridimetallicus*)・ヤマトアザミテントウ (*Honosepilachna niponica*) の 3 種の幼虫が地上部の葉を摂食し、食草もトウモロコシ栽培地の周辺にも分布しているため、

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昆虫種として特定された。なお、一般的に第 1 齢から第 2 齢幼虫までが Bt 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。

また、土壤中に鋤き込まれた植物体を摂食する可能性についても検討した。その結果、文献 68 に記載されている 84 種(絶滅危惧種 I 類 27 種、絶滅危惧種 II 類 20 種、準絶滅危惧 37 種)のコウチュウ目昆虫の生息場所は山地・湿地・湿原、河川・湖沼等であった。このことからレッドリストに記載されたコウチュウ目昆虫が、トウモロコシ畑内及び畑周辺に生息し、畑土壤中に鋤き込まれたトウモロコシの植物体を摂食する可能性は低いと考えられた。したがって、MON88017 の植物体を摂食することによる影響を受ける可能性がある種は特定されなかった。

なお、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、ケシクスイムシ科、コガネムシ科、ハネカクシ科)に対して、改変 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(文献 70)。

よって MON88017 をわが国で栽培した場合に何らかの影響をうける可能性のある昆虫としては、オオヨモギハムシ(*O. angsticollis*)、ハナウドゾウムシ(*C. viridimetallicus*)、ヤマトアザミテントウ(*H. niponica*)の 3 種が特定された。

【本スタック系統トウモロコシの影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

本スタック系統トウモロコシは Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、改変 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物としては親系統である MON89034 及び MON88017 の生物多様性影響評価で特定された種と同じであると考えられる。

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、MON89034 で特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む) 及び MON88017 で特定されたコウチュウ目昆虫 3 種が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

表 4(p26)及び表 5 (p26)の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フォールアーミーワームに対する殺虫活性は MON89034 と、

ウエスタンコーンルートワームに対する殺虫活性は MON88017 と同程度であった。したがって、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 MON89034、MON88017 の個別の調査結果より評価した。

MON89034 の花粉中では、Cry1A105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質が、それぞれ 3.5 $\mu\text{g/g}$ fwt と 0.12 $\mu\text{g/g}$ fwt で発現していることがすでに確認されている(別添資料 4 の p5)。

また、第一-2-(1)-ロ-①に記載したように、MON89034 の主要チョウ目害虫に対する抵抗性を、すで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、MON89034 はフォールアーマーワーム及びコーンイヤールワームに対して、より優れた抵抗性を示すことが確認されている。

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、MON89034 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。

MON88017 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コロラドポテトビートルの孵化後 24 時間以内の幼虫に摂食させて死亡率を比較したところ、有意な差が 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた。また、花粉摂食開始 7 日後の LC₅₀ (半数致死濃度) は 4,380 粒/cm² であった。

(3) 影響の生じやすさの評価

本スタック系統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)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュ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。

わ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 71)。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。

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 72)。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。

さらに、カナダの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を調査しており、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 であったという報告がされている(文献 73)。

このように、わ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スタック系統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)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュ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 10 m 以上離れると極めて低く、50 m 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スタック系統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、個体群レベルで本スタック系統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。

したがって、特定された 11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び MON88017 由来の改変 Cry3Bb1 蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断され、よって本スタック系統トウモロコシに起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

(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ず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 *Zea* 属に分類されるテオシント及び *Tripsacum* 属の植物であるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、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、本スタックシステム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

本スタック系統トウモロコシは MON89034 と MON88017 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

第一-2-(6)-①で述べたとおり、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼすおそれはないと考えられること、同じチョウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は相互作用を示さないことが確認されていること、チョウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Bt 蛋白質とコウチュウ目昆虫に対し殺虫活性を示す Bt 蛋白質は異なる pH 条件で殺虫活性を発揮するため相互に作用するとは考えにくいこと、Bt 蛋白質と改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、文献 65 で述べられている相互作用についての検討が必要な蛋白質には該当しないこと、本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性はそれぞれの親系統と同程度であったことから、これらの蛋白質が本スタック系統トウモロコシの植物体内において相互に影響を受ける可能性は低く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

以上のことから、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、MON89034、MON88017 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

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。本スタック系統トウモロコシの親である MON89034 及び MON88017 について、競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した結果、第一-2-(6)-②で述べた項目において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。しかし、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異ではないと判断されている。

また、本スタック系統トウモロコシ中で発現するいずれの蛋白質も宿主の代謝系とは独立して機能し、相互に作用することはないと考えられた。したがって、親系統である MON89034 と MON88017 から交雑育種法により作出された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間に、競合における優位性にかかわる差異が認められる可能性は極めて低いと判断された。

本スタック系統トウモロコシは、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と、改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、チョウ目害虫あるいはコウチュウ目害虫による食害は、トウモロコシがわ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。また、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。

以上のことから、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、わが国に導入された 1579 年以来、長期間の使用経験がある。

MON89034 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、MON88017 中では除草剤グリホサート耐性を付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質とコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry3Bb1 蛋白質を発現しているが、いずれの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 (第一-2-(1)-ロ-②, p17)。また、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は、いずれも宿主の代謝系から独立して機能しており、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、MON89034 及び MON88017 における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。

MON89034 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、文献 68 を用いて、11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫を特定した。

また、MON88017 中で発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュ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コウチュウ目昆虫として「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)を用いて、3 種のコウチュウ目幼虫を特定した。

本スタック系統トウモロコシから飛散した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 11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫への影響を調べた結果、特定された 11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が花粉を食餌する可能性は、ほとんど無視できると結論された。また、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個体群レベルで本スタック系統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。

したがって、特定された 11 種(2 亜種を含む)のチョウ目昆虫及び 3 種のコウチュウ目昆虫が MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び MON88017 由来の改変 Cry3Bb1 蛋白質に曝露されることにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと判断され、よって本スタック系統トウモロコシに起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

なお、本スタック系統トウモロコシで発現しているいずれの Bt 蛋白質もトウモロコシの主要チョウ目害虫及びコウチュ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。

以上のことから、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ず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。

【引用文献】

【社外秘につき非開示】

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成20年4月11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 東京都中央区銀座四丁目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及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, 改変*cp4 epsps*, 改変*cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON89034 × MON88017, OECD UI: MON-89034-3 × MON-88017-3) (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通りである。

平成20年4月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目10番10号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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20年4月11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 東京都中央区銀座四丁目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及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変*cry2Ab2*, 改変*cp4 epsps*, 改変*cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON89034 × MON88017, OECD UI: MON-89034-3 × MON-88017-3) (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通りである。

平成20年4月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目10番10号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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。