資 料 4

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (NK603×T25, OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6×ACS-ZMØØ3-2)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……3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報……3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報……3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況……3
① 和名、英名及び学名……3
② 宿主の品種名又は系統名……3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域……3
(2) 使用等の歴史及び現状……3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史……3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途……4
(3) 生理学的及び生態学的特性……4
イ 基本的特性……5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件……5
ハ 捕食性又は寄生性……5
ニ 繁殖又は増殖の様式……5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命……5
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性……5
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……6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命……6
ホ 病原性……6
ヘ 有害物質の産生性……6
ト その他の情報……7
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報……7
(1) 供与核酸に関する情報……7
イ 構成及び構成要素の由来……7
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……13
③　宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容……14
(2)　ベクターに関する情報……15
イ　名称及び由来……15
ロ　特性……15
①　ベクターの塩基数及び塩基配列……15
②　特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能……15
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……15
(3)　遺伝子組換え生物等の調製方法……16
イ　宿主内に移入された核酸全体の構成……16
ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法……16
ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過……16
①　核酸が移入された細胞の選抜の方法……16
②　核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無……16
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……16
(4)　細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性……19
①　移入された核酸の複製物が存在する場所……19
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……19
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……20
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……20
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……20
(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……21
(6)　宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違……21
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……21
②　以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度……25
a　形態及び生育の特性……26
b　生育初期における低温又は高温耐性……26

c　成体の越冬性又は越夏性……27
d　花粉の稔性及びサイズ……27
e　種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率……27
f　交雑率……27
g　有害物質の産生性……28
3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報……28
(1)　使用等の内容……28
(2)　使用等の方法……28
(3)　承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法……28
(4)　生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置……28
(5)　実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果……28
(6)　国外における使用等に関する情報……29
第二　項目ごとの生物多様性影響の評価……30
1　競合における優位性……30
(1)　影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……30
(2)　影響の具体的内容の評価……31
(3)　影響の生じやすさの評価……31
(4)　生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……31
2　有害物質の産生性……31
(1)　影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……31
(2)　影響の具体的内容の評価……32
(3)　影響の生じやすさの評価……32
(4)　生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……32
3　交雑性……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……33
(3)　影響の生じやすさの評価……33
(4)　生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……33
4　その他の性質……33
第三　生物多様性影響の総合的評価……34
【引用文献】……35
緊 急 措 置 計 画 書……36

第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 7 月 21 日

農林水産大臣　石破 茂 殿
環境大臣　斉藤 鉄夫 殿

申請者
氏名　　日本モンサント株式会社
代表取締役社長　山根 精一郎　印
住所　　東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(NK603×T25, OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6×ACS-ZMØØ3-2)
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　宿主の品種名又は系統名

NK603: 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*)のデント種であり、品種名はAW×CW である。

T25: 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*)のデント種である組織培養由来系統 He/89 (文献 2)である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの原産地については、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 3)。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 3; 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4; 文献 1)。

国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づくと、2007 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 6 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,502 万 ha、中国が 2,807 万 ha、ブラジルが 1,383 万 ha、メキシコが 780 万 ha、インドが 777 万 ha、ナイジェリアが 470 万 ha、インドネシアが 345 万 ha となっている(文献 5)。

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、2007 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,600 ha で収穫量は約 25 万 6,700 トン(文献 6)であり、2007 年における青刈りデントコーンの作付面積は約 8 万 6,100ha で、収穫量は約 454 万 1,000 トンである(文献 6)。

わが国は 2008 年に海外から約 1,645 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 1,187 万トン、食品・工業用として約 457 万トン、そして栽培用として約 1,712 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 778 トン、米国が 354 トン、オーストリアが 143 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 当たり 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 4)。

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) 生理学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 4)。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 4)。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℃に達するまで発芽せず、腐敗し枯死する(文献 3; 文献 4)。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又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.) 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ァ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、グァテマラの 3 地域に大別されている(文献 3; 文献 4; 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 4)。また、トウモロコシのアポミクシスの報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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 13)。花粉は球形で、1 粒当たりの重量は約 6.4×10^{-7}g であり(文献 14)、直径は 90～100μm 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 4)。

ホ 病原性

－

ヘ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育又は生息に影

響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

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

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (NK603, OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6) (以下、「NK603」とする。)と除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(*pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25, OECD UI: ACS-ZMØØ3-2) (以下、「T25」とする。) を従来の交雑育種法を用いて交配させた除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6 ×ACS-ZMØØ3-2)（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 NK603 と T25 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 NK603 と T25 の調製等に関する情報について概要などを記載した。

(1)　供与核酸に関する情報

イ　構成及び構成要素の由来

NK603及びT25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、図 1 及び図 2(p8~9)と表 1 及び表 2(p10~12)に示したとおりである。

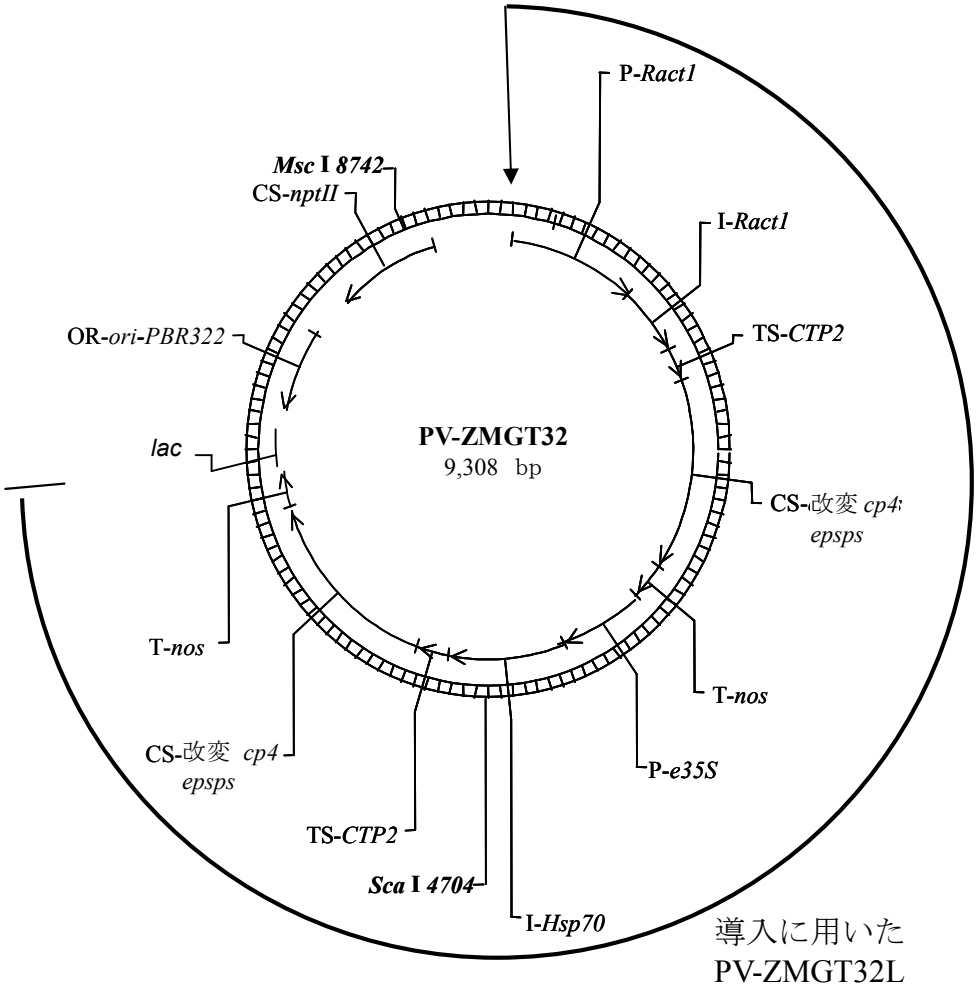

図 1　　NK603 の作出に用いたプラスミド PV-ZMGT32[1]

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

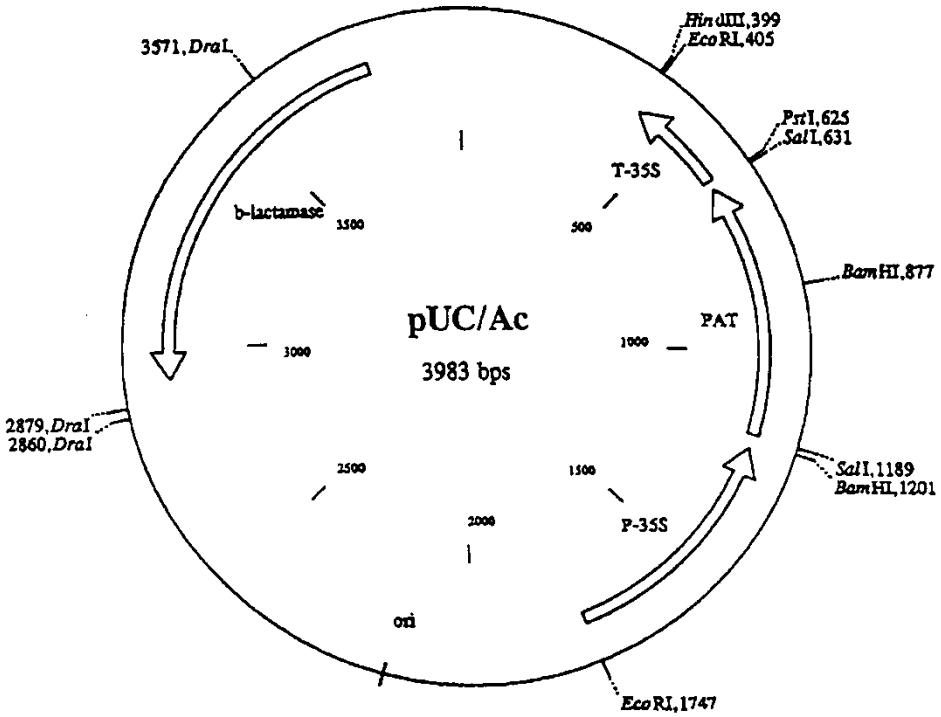

図 2 T25 の作出に用いたプラスミド pUC/Ac[2]

[2]本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する

表 1　NK603 の作出に用いた PV-ZMGT32 の各構成要素のサイズ、及び由来及び機能[3]

構成要素	由来及び機能
改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセット①	
P[注1]-*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(文献 16)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I[注2]-*Ract1*	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(文献 17)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
TS[注3]-*CTP 2*	シロイヌナズナの *epsps* 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 18)。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 *cp4 epsps*	*Agrobacterium* 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 19; 文献 20)。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]-*nos*	*A. tumefaciens* T-DNA 由来のノパリン合成酵素(*nos*)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 21)。
改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセット②	
P-*e35S*	二重エンハンサー領域(文献 22)を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA(文献 23)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。
I-*Hsp70*	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(文献 24)。
TS-*CTP2*	シロイヌナズナの *epsps* 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 18)。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS-改変 *cp4 epsps*	*Agrobacterium* 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 19; 文献 20)。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-*nos*	*A. tumefaciens* T-DNA 由来のノパリン合成酵素(*nos*)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 21)。

5

表 1　　NK603 の作出に用いた PV-ZMGT32 の各構成要素のサイズ、及び由来及び機能[3]

(つづき)

その他(植物体には存在していない)	
lac	*lacI* コード領域の一部(文献 25)、*lac* プロモーター(文献 26)、*lacZ* コード領域の一部からなる配列で、ラクトースを加水分解し、選抜マーカーとして用いられる β-ガラクトシダーゼを発現する(文献 27)。
OR [注6]*-ori- PBR 322*	pBR322から単離された複製開始領域であり、*E.coli* においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 28)。
nptII	*Escherichia coli* のトランスポゾン Tn5 に由来するホスホトランスフェラーゼ II(NPTII)をコードする配列(文献 29)で、ネオマイシン耐性及びカナマイシン耐性を付与する。この領域は Tn5 由来の *ble* 遺伝子の一部を含み(文献 30)、*nptII* プロモーター、ベータラクタマーゼ終結配列によって調節され、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 31)。

注1 P – promoter（プロモーター)
注2 I – intron（イントロン）
注3 TS – targeting sequence（ターゲティング配列）
注4 CS – coding sequence（コーディング配列）
注5 T – transcript termination sequence（転写終結配列）
注6 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　T25 の作出に用いた pUC/Ac 中の各構成要素のサイズ、及び由来及び機能[4]

構成要素	由来及び機能
pat カセット	
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA プロモーター。植物中で *pat* 遺伝子を構成的に発現させる(文献 23)。
pat	*Streptomyces viridochromogenes* 由来で、PAT 蛋白質をコードし、グルホシネート耐性を付与する(文献 32)。
T-35S	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA ターミネーター。転写を終結させ、転写産物のポリアデニル化を行わせる。(文献 33)
その他(植物体では発現していない)	
bla	*E. coli* 由来のアンピシリン耐性遺伝子で、細菌中のみでβ-ラクタマーゼを発現する。(文献 28)
ori-pUC	pUC18 の複製起点(ColE1)。プラスミドの複製を開始させる。(文献 34)

[4]本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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

NK603 及び T25 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p10)及び表 2(p12)に示した。

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

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

NK603 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。なお、NK603 には、グリホサートに対する耐性を増強するため、改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセットが 2 つ導入されている。

植物に除草剤グリホサートを散布すると 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。NK603 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。

NK603 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかデータベース(GenBank, EMBL, PIR, RCSB PDB, SwissProt)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。

【PAT 蛋白質】

作物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光合成等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素

が中心的役割を果たしているが、植物に除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害され、アンモニアが蓄積し植物は枯死に至る。

導入された *pat* 遺伝子はホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素(PAT)を産生し、この酵素は、グルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアは蓄積されず、グルホシネートを散布しても組換え作物が枯死しない。

なお、*S. viridochromogenes* から得た野生型 *pat* 遺伝子は、植物にあまり見られない多量の G：C（グアニン：シトシン）を含むため、導入された *pat* 遺伝子は野生型 *pat* 遺伝子の配列を植物で使用されるコドンに適合するように改変したものである。また、この改変により生じる PAT 蛋白質のアミノ酸配列は変化していない。

pat 遺伝子配列を EMBL データベース、また、PAT タンパク質のアミノ酸配列を SwissProt データベースにより相同性検索を行った。その結果、いずれにおいても様々な種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示しておらず、既知のアレルゲンとの相同性も認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

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(文献 35; 文献 36)。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 37)、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、文献 37 の論文を元に計算すると、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。

PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である *L* 型ホスフィノトリシン(*L* 型アミノ酸に分類)をアセチル化するが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において *L* 型ホスフィノトリシンのアセチル化以外は実質的に転移反応を生じさせることはない(文献 38)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害される

ことはなかった(文献 39)。これらのことから、PAT 蛋白質がグルホシネートに対して高い基質特異性を有するため、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

(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。

NK603：*E. coli* 由来のプラスミド pUC 119 などをもとに構築された PV-ZMGT32
T25：*E. coli* 由来のプラスミド pUC 18 などをもとに構築された pUC/Ac

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。

NK603：PV-ZMGT32；9,308 bp
T25：pUC/Ac；3,983 bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

NK603 の作出に用いられた PV-ZMGT32 は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(文献 29)。

T25 の作出に用いられた pUC/Ac は、選抜マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を持つ。また、pUC/Ac に存在する全ての遺伝子は、その特性が明らかにされており、既知の有害な塩基配列を含まない。

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-ZMGT32 の感染性は知られていない。
pUC/Ac 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

NK603 及び T25 の作出のために宿主内に移入されたプラスミド・ベクターの構成要素は表 1(p10)及び表 2(p12)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(p8)及び図 2(p9)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内の移入については以下の方法を用いて行った。
NK603：パーティクルガン法
T25：ポリエチレングリコール法

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抜の方法

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。
NK603：除草剤グリホサート
T25：除草剤グルホシネート

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の菌体の残存の有無

NK603 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。

T25 ではポリエチレングリコール法によって 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。

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

NK603 は、黄色デントコーン系の商用品種及び種々の品種と交配、選抜育種を行った。

T25 は、黄色デントコーン系の商用品種及び種々の品種と交配、選抜育種を行った。

本スタック系統トウモロコシは、NK603 と T25 の自殖系統を両親とする一代雑種品種である(図 3, p18)。

NK603 及び T25 のわが国における申請・認可状況は以下の表 3 (p17)に示したとお

りである。

表 3　NK603 及び T25 のわが国における申請・認可状況

	食品	飼料	環境
NK603	2001 年 3 月 安全性確認	2003 年 3 月 安全性確認	2004 年 11 月 第一種使用規程承認
T25	2001 年 3 月 安全性確認	2003 年 3 月 安全性確認	2004 年 11 月 第一種使用規程承認
本スタック系統トウモロコシ	2009 年 7 月 申請済み	2009 年 8 月 届出済み	2009 年 7 月 申請済み

【NK603×T25 の育成の経過】

[社外秘情報につき非開示]

図 3　NK603 系統×T25 系統の育成図

(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

以下に記載した方法については、NK603、T25 ともに 2004 年 11 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)の承認を受けた際に確認されている。

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

NK603 及び T25 の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認されている。

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

【NK603】

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、NK603 のゲノミック DNA 中の 1 ヵ所に、改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセット①及び②からなる導入遺伝子領域が 1 コピー存在することが確認された。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。

また NK603 においては、その 3'末端近傍には ract1 プロモーターの 217bp の断片が導入遺伝子の 3'末端近傍に逆方向で存在していることがサザンブロット分析及び 3'末端の塩基配列を分析することにより明らかになった。

なお、NK603 における導入遺伝子の 3'末端近傍の ract1 プロモーターの 217bp の断片に関連して、strand-specific RT-PCR を行ったところ、導入遺伝子の ract1 プロモーター又は 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 において改変 CP4 EPSPS 蛋白質のみが認められ、NK603 の導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、ターミネーターの上流に停止コドンが保存されているためと考えられたため、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、2004 年 11 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。

また、NK603 の導入遺伝子において e35S プロモーターで誘導される改変 *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 プロモーターによって発現する改変 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、N 末端から 214 番目のプロリンは EPSPS 蛋白質ファミリーの活性に必須の 7 つのアミノ酸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 蛋白質と改変 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蛋白質と改変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。

【T25】

サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、T25 のゲノム DNA 中の 1 ヵ所に、pUC/Ac が 1 コピー存在することが確認された。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。

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

NK603、T25 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。

NK603 : 育成の過程で除草剤グリホサート散布を行い、グリホサート耐性が付与されていることを複数世代で確認した。

T25 : 育成の過程で除草剤グルホシネート散布を行い、グルホシネート耐性が付与されていることを複数世代で確認した。

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

NK603 の作出に用いられた PV-ZMGT32 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。

T25 の形質転換に使用したベクター上には、伝達性にかかわる因子は存在しないため、当該伝達性はない。

(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

NK603 及び T25 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は各親系統に由来する以下の特性が付与されている。

NK603：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
T25：導入遺伝子に由来する PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

NK603 系統中で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS はシキミ酸合成経路の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大したとしても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている(文献 35; 文献 36)。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 37)、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、文献 37 の論文を元に計算すると、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られない。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

T25 で発現する PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である *L* 型ホスフィノトリシン(*L* 型アミノ酸に分類)をアセチル化するが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において *L* 型ホスフィノトリシンのアセチル化以外は実質的に転移反応を生じさせることはない(文献 38)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった(文献 39)。これらのことから、PAT 蛋白質がグルホ

シネートに対して高い基質特異性を有するため、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

したがってNK603系統とT25系統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可能性は低いと考えられる。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

実際に、各親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示していないことを確認するため、米国モンサント・カンパニーにおいて本スタック系統トウモロコシを供試して以下のとおりグリホサート(製剤名: Roundup WeatherMAX)及びグルホシネート(製剤名: Liberty)を用いた除草剤耐性の生物検定を行った。

【除草剤グリホサートを用いた生物検定】

除草剤グリホサート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、NK603及び非組換えトウモロコシを各 5 個体ずつ温室にてポット栽培し(1 個体/区×5 反復)、2~4 葉期に除草剤グリホサート(製品名: Roundup WeatherMAX)を散布してから 10 日後に除草剤による植物体の傷害程度を 0(傷害は認められない)～10(ほぼ全体が傷害により枯死している)の 11 段階で調査した。なお、有効成分(遊離酸)としては 0.84kg acid equivalent/ha は通常の散布量、27.0 kg acid equivalent/ha は通常の 32 倍の散布量である。表中において傷害程度を平均値±標準誤差で示した。

調査の結果、いずれの散布量においても本スタック系統トウモロコシと NK603 との間で除草剤による傷害の程度に統計学的な有意差は認められなかった(*t* 検定、有意水準 5%)(表 4,表 5, p23)。したがって、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、親系統を掛け合わせることにより変化していないと結論された。

表 4　本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度調査結果(除草剤による植物体の傷害程度[1]の平均値±標準誤差) (n=5 反復)[5]

供試サンプル	散布量	
	0.84kg acid equivalent/ha[2]	27.0 kg acid equivalent /ha[3]
本スタック系統トウモロコシ	0.0 ± 0.0　A[4]	2.0 ± 0.3　A
NK603	0.0 ± 0.0　A	2.2 ± 0.2　A
非組換えトウモロコシ	9.8 ± 0.2　B	10.0 ± 0.0　B

1 0：傷害なし、1~9：葉面積の約 10~90%が白化、黄化及び/あるいは壊死している、10：葉面積の 100%が傷害を受け枯死している。

2　通常の散布量

3　通常の 32 倍の散布量

4　同一列において、異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(*t* 検定、有意水準 5%)。

表 5　本スタック系統トウモロコシの除草剤グリホサート散布による傷害程度調査結果の P 値　(n=5 反復)[6]

比較	散布量	
	0.84kg acid equivalent /ha[1]	27.0 kg acid equivalent /ha[2]
本スタック系統トウモロコシ 対 NK603	1.0000	0.4643
本スタック系統トウモロコシ 対非組換えトウモロコシ	<0.0001	<0.0001
NK603 対非組換えトウモロコシ	<0.0001	<0.0001

1 通常の散布量

2 通常の 32 倍の散布量

[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

[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

【除草剤グルホシネートを用いた生物検定】

除草剤グルホシネート耐性については、本スタック系統トウモロコシ、T25、及び非組換えトウモロコシを各 5 個体ずつ温室にてポット栽培し(1 個体/区×5 反復)、2~4 葉期に除草剤グルホシネート(製品名: Liberty)を散布してから 10 日後に除草剤による植物体の傷害程度を 0(傷害は認められない)～10(ほぼ全体が傷害により枯死している)の 11 段階で調査した。なお、有効成分(グルホシネート)としては、0.54kg active ingredient/ha は通常の散布量、17.0 kg active ingredient /ha は通常の 32 倍の散布量である。表中において傷害程度を平均値±標準誤差で示した。

調査の結果、いずれの散布量においても本スタック系統トウモロコシと T25 との間で除草剤による傷害の程度に統計学的な有意差は認められなかった(*t* 検定、有意水準 5%)(表 6,表 7, p24)。したがって、本スタック系統トウモロコシの除草剤グルホシネート耐性は、親系統を掛け合わせることにより変化していないことが確認された。

表 6　本スタック系統トウモロコシの除草剤グルホシネート散布による傷害程度調査結果[1] (除草剤による植物体の傷害程度[1] の平均値±標準誤差) (n=5 反復)[7]

供試サンプル	散布量			
	0.54kg active ingredient /ha[2]		17.0 kg active ingredient /ha[3]	
本スタック系統トウモロコシ	0.0 ± 0.0	A[4]	2.8 ± 0.2	A
T25	0.4 ± 0.4	A	3.0 ± 0.3	A
非組換えトウモロコシ	5.0 ± 0.0	B	9.4 ± 0.2	B

1　0：傷害なし、1~9：葉面積の約 10~90%が白化、黄化及び/あるいは壊死している、10：葉面積の 100%が傷害を受け枯死している。

2　通常の散布量

3　通常の 32 倍の散布量

4　同一列において、異なる英文字の平均値間には統計学的有意差が認められた(*t* 検定、有意水準 5%)。

表 7　本スタック系統トウモロコシの除草剤グルホシネート散布による傷害程度調査結果の P 値　(n=5 反復)[8]

比較	散布量	
	0.54kg active ingredient /ha[1]	17.0 kg active ingredient /ha[2]
本スタック系統トウモロコシ 対 T25	0.2149	0.4301
本スタック系統トウモロコシ 対非組換えトウモロコシ	<0.0001	<0.0001
T25 対非組換えトウモロコシ	<0.0001	<0.0001

1 通常の散布量

[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

[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 通常の 32 倍の散布量

以上のことから、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間で相互作用はなく、導入した遺伝子によって新たに獲得されたそれぞれの性質は、本スタック系統トウモロコシにおいて変化していないと結論された。

したがって、本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統である NK603 及び T25 を個別に調査した結果に基づき評価した。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度[9]

NK603 については、2 種類のハイブリッド品種 NK603-A 及び NK603-B を供試した[10]。

[9]本項目中の以下に続く a-g に記載された NK603 の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、T25 の情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する

[10] NK603-A, NK603-B は、同一のイベントである。

a　形態及び生育の特性

NK603 及び T25 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシとの間で、以下の表 8 (p26)に示した項目について調査を行った。

その結果、NK603 の NK603-B において百粒重に統計学的有意差が認められた。

表 8　NK603 及び T25 の形態及び生育の特性調査の結果

	NK603-A	NK603-B	T25
発芽揃い	○	○	○
発芽率	○	○	○
雄穂抽出期	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○
稈長	○	○	○
草型	○	○	○
分けつ数(分げつ数)	○	○	○
着雌穂高	○	○	○
成熟期	○	○	○
雌穂数	○	○	○
有効雌穂数	○	○	○
粒列数	○	○	○
一列粒数	○	○	○
百粒重	○	○*	○
収穫期の地上部重(生重量)	○	○	○
雌穂長	○	○	○
雌穂径	○	○	○
粒色	○	○	○
粒形	○	○	○

○：調査を行っている。

－：調査を行っていない。

* 統計学的有意差が認められた (別添資料 1 の表 3-2, p17)。

b　生育初期における低温又は高温耐性

NK603 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 1 の表 3-4, p24)。

T25 及び対照の非組換えトウモロコシを 4℃定温器中で低温処理し、生育状況を観察した結果、一様に伸長成長が阻害された。また、冬季のほ場に放置された幼植物体はすべてが枯死し、両者の間に相違は見られなかった。(別添資料 2 の p15)

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 NK603 において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 NK603 において観察した。

実際に T25 において隔離ほ場試験の終了時には結実後、隔離ほ場にそのまま放置した T25 は冬季の寒さで自然に枯死した。

d　花粉の稔性及びサイズ

NK603 及び T25 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ないことが確認されている(別添資料 1 の表 3-3 及び写真, p21~p22；別添資料 2 の p13~14)

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、NK603 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、第一-2(6)-ロ-①に記載したの種子の生産量に関わる諸形質を比較した結果、NK603 の NK603-B において百粒重に統計学的有意差が認められた (別添資料 1 の表 3-2, p17)。

種子の粒列数、一列粒数及び百粒重について T25 と対照の非組換えトウモロコシとを比較したが、同等の数値を示した。よって、種子の生産量に統計的な有意差は認められなかった。(別添資料 2 の p12)

脱粒性については、NK603 及び T25 とそれぞれ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、脱粒性は極めて低いと考えられる。したがって、脱粒性の試験は行っていない。

発芽率について、NK603、T25 及び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、また、98%以上の高い発芽率を示したことから種子の休眠性も認められなかった (別添資料 1 の表 3-4, p24；別添資料 2 の p14)。

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 NK603、

T25 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。

NK603 及び T25 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、それぞれの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(別添資料 1 の表 3-5~表 3-7, p26~p28; 別添資料 2 の p17)。

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

―

(6) 国外における使用等に関する情報

NK603 及び T25 の諸外国における申請･認可状況は以下の表 9(p29)に示したとおりである。

表 9 NK603 及び T25 の諸外国における申請・認可状況

	FDA	USDA	Health Canada	CFIA
NK603	2000 年 10 月 安全性確認	2000 年 8 月 安全性確認	2001 年 2 月 安全性確認	2001 年 3 月飼料･環境の 安全性確認
T25	1995 年 12 月 安全性確認	1995 年 6 月 安全性確認	1997 年 4 月 安全性確認	1996 年 5 月環境の安全性 確認 1997 年 3 月飼料の安全性 確認

FDA: 米国食品医薬品局
USDA: 米国農務省
Health Canada: カナダ厚生省
CFIA: カナダ食品検査局

NK603 及び T25 のわが国における申請・認可状況は以下の表 10(p29)に示したとおりである。

表 10 NK603 及び T25 のわが国における申請・認可状況

	食品	飼料	環境
NK603	2001 年 3 月 安全性確認	2003 年 3 月 安全性確認	2004 年 11 月 第一種使用規程承認
T25	2001 年 3 月 安全性確認	2003 年 3 月 安全性確認	2004 年 11 月 第一種使用規程承認
本スタック系統 トウモロコシ	2009 年 7 月 申請済み	2009 年 8 月 届出済み	2009 年 7 月 申請済み

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価[11]

本スタック系統トウモロコシはNK603とT25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、改変CP4 EPSPS蛋白質及びPAT蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を持ち、独立して作用していることが知られている。また、これらの蛋白質は、第一-2-(6)-①で述べたようにそれぞれ高い基質特異性を有する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。よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

実際に生物検定を行った結果、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及び除草剤グルホシネート耐性はそれぞれの親系統と同程度であり、各親系統由来の発現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。

したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、NK603及びT25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NK603及びT25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、NK603-Bにおいて百粒重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が認められた。しかし、百粒重以外の競合における優位性に関する諸形質では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ず、また、もう一方のNK603-Aにおいては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ず、この百粒重の違いのみで競合における優位性が高まるとは考えにくい。したがって、この差異は競合における優位性を高めるほどの影

[11]本項目中で第一の2-(6)-①に記載されたNK603 x T25の試験結果及び第一の2-(6)-②のa-gに記載されたNK603の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、第一の2-(6)-②のa-gに記載されたT25の試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する

響を及ぼすような差異ではないと判断された。

また、T25 と対照の非組換えトウモロコシとの間では、競合における優位性にかかわるいずれの項目においても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改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質の基質特異性は高いため、それぞれ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は除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに耐性を持つが、グリホサート及びグルホシネ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及びグルホシネ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。

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。NK603 で発現している改変 CP4 EPSPS 蛋白質については、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(文献 35; 文献 36)。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 37)、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、文献 37 の論文を元に計算すると、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られない。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、NK603 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。

T25 で発現する PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である *L* 型ホスフィノトリシン(*L* 型アミノ酸に分類)をアセチル化するが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない(文献 38)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった(文献 39)。したがって、PAT 蛋白質が原因で、T25 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。

実際に NK603 及び T25 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、いずれの試験においても有害物質の産生性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性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において、導入遺伝子に関連して野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある非意図的な有害物質は産生されないと判断された。

よって、本スタック系統トウモロコシにおいて、有害物質の産生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 NK603、T25 の自殖系統から、交雑育種法により作出され、NK603、T25 の特性を併せ持つ。第一-2-(6)-①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 CP4 EPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。したがって、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、親系統である NK603 及び T25 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 NK603 及び T25 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-a～e で述べた項目の一部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。

本スタック系統トウモロコシは、NK603 由来の改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性及び T25 由来の PAT 蛋白質の発現による除草剤グルホシネート耐性が付与されている。しかし、自然条件下においては、グリホサート及びグルホシネートを散布されることが想定しにくいため、これらの除草剤に耐性を有す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。

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。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び PAT 蛋白質及びについては基質特異性が高いことから、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 NK603 及び T25 における有害物質の産生性については、後作試験、土壌微生物相試験及び鋤込み試験により調査した結果、いずれの試験においても有害物質の産生性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。

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

平成21年7月21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除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (NK603×T25, OECD UI: MON-ØØ6Ø3-6×ACS-ZMØØ3-2) (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おそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

日本モンサント株式会社　　平成21年7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、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

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

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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本スタック系統トウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシは、環境中で生存しないように不活化する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合、直ちに農林水産省や環境省に報告する。