

乾燥耐性、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cspB*, *cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460 × MON89034 × NK603, OECD UI: MON-87460-4 × MON-89034-3 × MON-00603-6) (MON87460, MON89034 及び NK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。) に関する生物多様性影響評価書申請書等の概要

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	5
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	6
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じ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	7
へ 有害物質の産生性	7
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	8
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	8
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質 の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らか となっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨	19
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	22
(2) ベクターに関する情報	23
イ 名称及び由来	23
ロ 特性	23
① ベクターの塩基数及び塩基配列	23
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	23
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	24
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	24
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	24
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	24
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	25
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	25
② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバク テリウムの菌体の残存の有無	25
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	25
(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	28
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	28
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	28
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	30
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	30
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 生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の 有無及び程度	30

(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	30
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	30
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	30
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	41
i.	通常栽培で灌漑を行う試験.....	41
a	形態及び生育の特性	41
b	生育初期における低温又は高温耐性	42
c	成体の越冬性又は越夏性	43
d	花粉の稔性及びサイズ	43
e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	43
f	交雑率.....	44
g	有害物質の産生性	44
ii.	通常栽培で灌漑を行わない試験.....	44
a	形態及び生育の特性	44
b	種子の生産量及び脱粒性	45
iii.	栽培管理を行わない試験.....	45
a	形態及び生育の特性	45
b	種子の生産量及び脱粒性	45
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	46
(1)	使用等の内容.....	46
(2)	使用等の方法.....	46
(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	46
(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	46
(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	46
(6)	国外における使用等に関する情報.....	46
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	49
1	競合における優位性	49
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	49
(2)	影響の具体的内容の評価.....	51
(3)	影響の生じやすさの評価.....	51
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	52

2	有害物質の産生性	52
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	52
(2)	影響の具体的内容の評価.....	54
(3)	影響の生じやすさの評価.....	54
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	55
3	交雑性	55
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	56
(2)	影響の具体的内容の評価.....	56
(3)	影響の生じやすさの評価.....	56
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	56
4	その他の性質	56
第三	生物多様性影響の総合的評価	57
	参考文献	60
	緊急措置計画書	70
	別添資料リスト	73

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 11 月 22 日

5 農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 細野 豪志 殿

10 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

15 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	乾燥耐性、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 <i>cspB</i> , <i>cry1A.105</i> , 改変 <i>cry2Ab2</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis)(MON87460 × MON89034 × NK603, OECD UI: MON-87460-4 × MON-89034-3 × MON-00603-6) (MON87460, MON89034 及びNK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15 ② 宿主の品種名又は系統名

親系統の遺伝子導入に用いた品種は以下のとおりである。

MON87460 は品種 LH59 を用いた。

20

MON89034 は品種 LH172 を用いた。

NK603 は品種 AW × CW を用いた。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

原産地については決定的な説はなく、米国の南西部、メキシコ、中米及び南米にかけての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源とする説がある (OECD, 2003)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

30

(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

35

トウモロコシの栽培起源は今から 9,000 年前とされている (OECD, 2003)。その後、人類の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 1500 年~200 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが出現し、メキシコ、メソアメリカの地から南北アメリカ大陸の各地に伝播した。長い栽培の歴史の中でフリント、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。わが国へは天正 7 年 (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 (菊池, 1987)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

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 (OECD, 2003; 菊池, 1987)。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

10

国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づく、2009 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 3,246 万 ha、中国が 3,048 万 ha、ブラジルが 1,379 万 ha、インドが 840 万 ha、

15

メキシコが 720 万 ha、インドネシアが 425 万 ha、フィリピンが 268 万 ha となっている (FAOSTAT, 2010)。

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用のスイートコーンがあり、2010 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 2,200ha で、収穫量は約 464 万トンであり (農林水産省, 2011)、

20

2009 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,500 ha で、収穫量は約 23 万 5,900 トンである (農林水産省, 2010)。

わが国は 2010 年に海外から約 1,618 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 1,132 万トン、食品・工業用として約 486 万トン、そして栽培用として約 2,407 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 941 トン、ニュージーランドが 339 トン、チリが 301 トンとなっている (財務省, 2011)。

25

30

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。北海道から九州に至る慣行播種期は、4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 10a 当たり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、

35

なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、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は一代雑種品種 (F1) であ

るため、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

5 イ 基本的特性

—

10 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

10

トウモロコシ種子の発芽の最低温度は 10~11°C、最適温度は 33°C とされている。実際に播種されるのは 13~14°C 以上である (中村, 2001a)。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 (瀧澤, 1981)。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 (柿本ら, 2001)。これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の 1.6 ~ 2.0 倍になったときに幼根 (初生根または種子根) が抽出し、子実発芽となる (戸澤, 2005)。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 (千葉, 1980)。

20

現在のトウモロコシは長期の栽培作物化により作られた作物であるため、自然条件下における自生能力を失っている (OECD, 2003)。

25 ハ 捕食性又は寄生性

25

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

30 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。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、自然条件下における自生能力を失っており、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 (OECD, 2003)。種子の休眠性は知られていない。また、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987; 中村, 2001a)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0°C 以

35

下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12%、温度 10°C、相対湿度 55%以内に保つことが必要である (OECD, 2003; 中村, 2001a)。

- 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

10 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じる特性を有する場合はその程度

15 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、95~99%は他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家受粉も可能である (OECD, 2003; 千藤, 2001; 農学大事典編集委員会, 1987)。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
20 *Tripsacum* 属である。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*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、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラに大きく三分されている (柿本, 1981)。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告
25 されていない。

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

30 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 (柿本ら, 2001; 中村, 2001b)。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、環境により大きく異なる (中村, 2001b)。花粉の 1 粒当たりの重量は約 3.4×10^{-7} g であり (松井ら, 2003)、球形で直径は 90~100µm である (Raynor et al., 1972)。トウモロコシは風媒による受粉が主
35 であり、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附着して発芽し、24 時間以内に受精を完了する (OECD, 2003)。また、トウモロコシの花粉は風により飛散するが、隔離距離は、林、高層建築物などの遮蔽物の有無などにより異なり、200~400m とされている (千藤, 2001)。

ホ 病原性

—

5 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。

10 ト その他の情報

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るが、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。

15 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460, OECD UI: MON-87460-4) (以下「MON87460」という。)、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」という。)及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays*(L.) Iltis) (NK603, OECD UI: MON-00603-6) (以下「NK603」という。)を従来の交雑育種法を用いて交配させたスタック系統 (OECD UI: MON-87460-4 × MON-89034-3 × MON-00603-6) (以下「本スタック系統トウモロコシ」という。)は、親系統である MON87460、MON89034 及び NK603 の 3 つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。また、本スタック系統トウモロコシは一代雑種品種 (F1) として商品化されることから、収穫される種子には遺伝的分離により本スタック系統トウモロコシの親系統それぞれへの導入遺伝子の組合せからなるスタック系統トウモロコシが含まれる。以下では MON87460、MON89034 及び NK603 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

35 イ 構成及び構成要素の由来

MON87460、MON89034 及び NK603 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来は、それぞれ図 1~図 3 (p9~11)及び表 1~表 3

(p12~18) に示したとおりである。

ロ 構成要素の機能

- 5 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

MON87460、MON89034 及び NK603 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、それぞれ表 1~表 3 (p12~18) に示したとおりである。

10 そのうち、目的遺伝子である改変低温ショック蛋白質 B (改変 *cspB*) 遺伝子、*cryIA.105* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の詳細については、それぞれ表 1~表 3 (p12~18) に記載した。

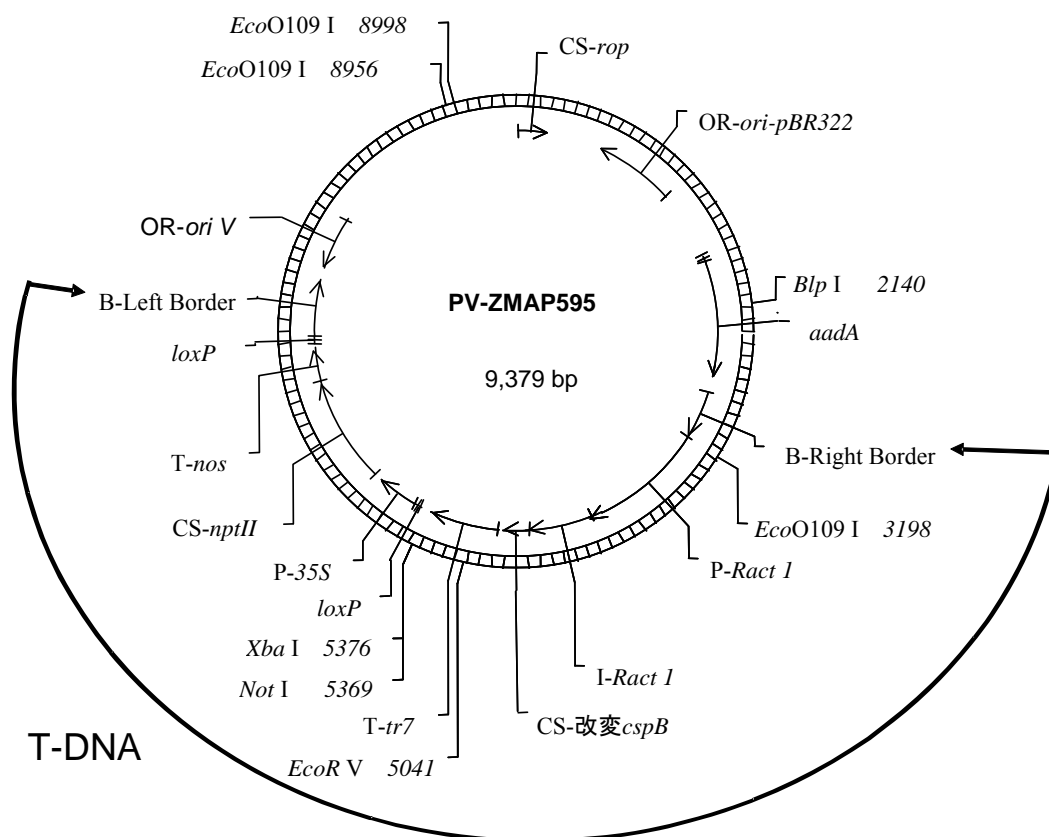
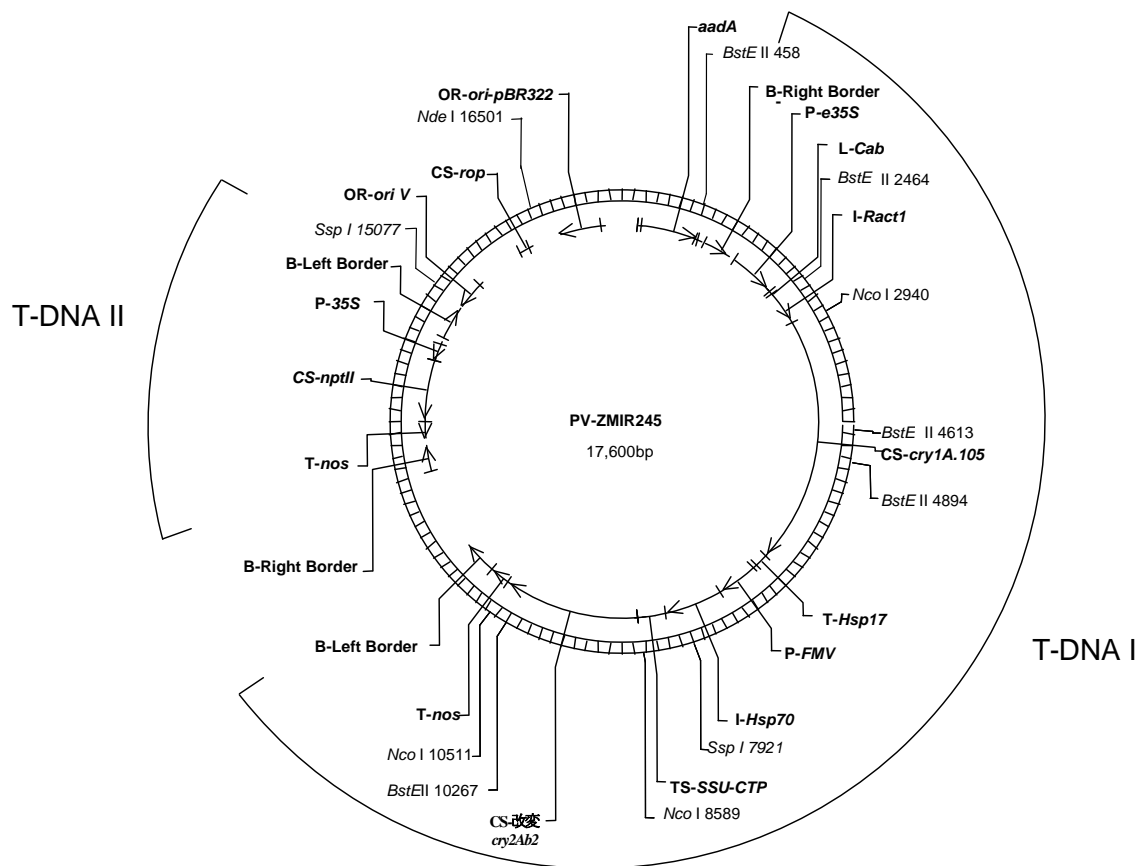


図 1 MON87460 の作出に用いられた PV-ZMAP595 のプラスミドマップ¹

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



5

図 2 MON89034 の作出に用いられた PV-ZMIR245 のプラスミドマップ²
 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。

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

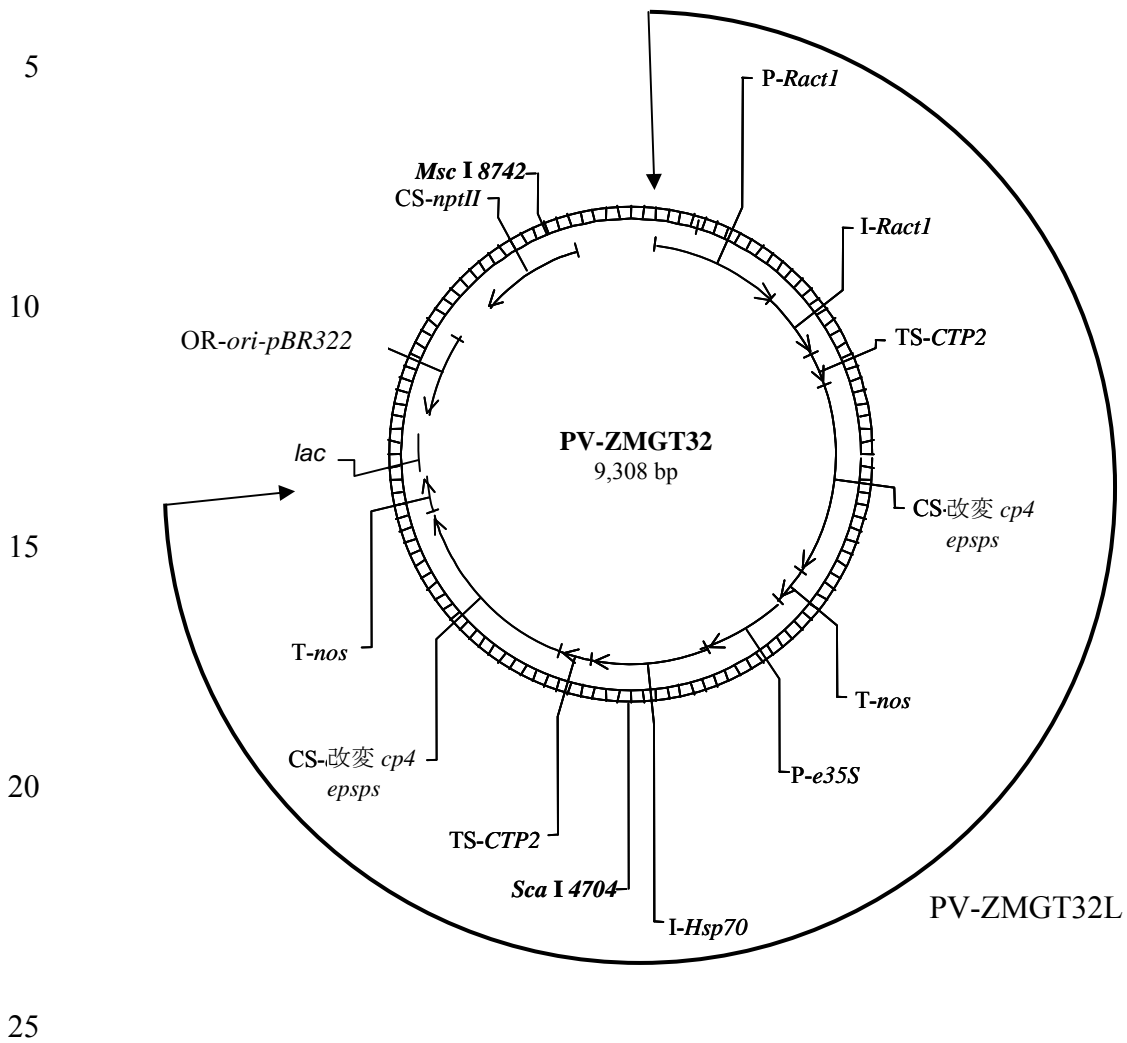


図 3 NK603 の作出に用いられた PV-ZMGT32 のプラスミドマップ³

³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 MON87460 の作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能⁴

構成要素	由来及び機能
外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
CS ^{注1} -rop	<i>Escherichia 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 (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
OR ^{注2} -ori-pBR322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
aadA	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 (Fling et al., 1985)。 (GenBank accession X03043)
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T-DNA 領域	
B ^{注3} -Right Border	<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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
P ^{注4} - <i>Ract1</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のプロモーターとリーダー配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の転写をあらゆる組織で恒常的に誘導する。
I ^{注5} - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy et al., 1991)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

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

表 1 MON87460 の作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

T-DNA 領域(続き)	
CS-改変 <i>cspB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 由来の改変低温ショック蛋白質 B (改変 CSPB) をコードする遺伝子 (Willimsky et al., 1992)。詳細は第一-2-(1)-ロ-②に示した。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
T ^{注6} - <i>tr7</i>	<i>A. tumefaciens</i> 由来の転写 7 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Dhaese et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>loxP</i> ^{注7}	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ (DNA 組換え酵素) が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
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 (Odell et al., 1985)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
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 (Beck et al., 1982)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にネオマイシン及び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 (Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
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' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(Russell et al., 1992)。

表 1 MON87460 の作出に用いた PV-ZMAP595 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

T-DNA 領域(続き)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
B-Left Border	<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着点である (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列
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>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列

注¹CS – Coding Sequence (コーディング配列)

5 注²OR – Origin of Replication (複製開始領域)

注³B – Border (境界配列)

注⁴P – Promoter (プロモーター)

注⁵I – Intron (イントロン)

注⁶T – 3' nontranslated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences.

10 (3' 末端非翻訳終止配列及びポリアダニル化シグナル配列)

注⁷*loxP* – *nptII* 遺伝子は MON87460 の形質転換体の選抜マーカーとして使用した。MON87460 の開発開始当時、EU における遺伝子組換え作物の安全性評価機関である EFSA(欧州食品安全機関)などが抗生物質耐性マーカー遺伝子の代用となる新しい選抜方法の開発と使用を促していたため、MON87460 は Cre リコンビナーゼによって認識される *loxP* 組換え部位を使用して *nptII* 遺伝子カセットを除去するよう設計された。その後、EFSA によって、遺伝子組換え作物中の *nptII* 遺伝子が、ヒト及び家畜の健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断した声明が公表されたため (EFSA, 2004)、MON87460 については、*nptII* 遺伝子カセットの除去は行われなかった。

表 2 MON89034 の作出に用いた PV-ZMIR245 の各構成要素の由来及び機能⁵

構成要素	由来及び機能
T-DNA I 領域	
B ^{注1} -Right Border	<i>A. 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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
P ^{注2} - <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(Kay et al., 1987) を持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35SRNA (Odell et al., 1985) 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' 末端非翻訳リーダ領域。目的遺伝子の発現を活性化させる (Lamppa et al., 1985)。
I ^{注4} - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)由来のアクチン遺伝子のイントロン(McElroy et al., 1991)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
CS ^{注5} - <i>cry1A.105</i>	Cry1A.105 蛋白質をコードする遺伝子。詳細は第一-2-(1)-ロ-②に示した。
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、ポリアダニル化を誘導する (McElwain and Spiker, 1989)。
P- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus 由来の 35S プロモーター (Rogers, 2000)。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 (Brown and Santino, 1995)。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ソ 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 (Matsuoka et al., 1987)。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 (Widner and Whitely, 1989)。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' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する (Bevan et al., 1983)。
B-Left Border	<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 (Barker et al., 1983)。

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

表 2 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)

構成要素	由来及び機能
T-DNA II 領域	
B-Right Border	<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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
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' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983)。
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 (Beck et al., 1982)。ネオマイシンフォスフ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 (Fraley et al., 1983)。
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 (Odell et al., 1985)。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	<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 (Barker et al., 1983)。
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 (Stalker et al., 1981)。
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 (Giza and Huang, 1989)。
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 (Sutcliffe, 1979)。
<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 (Fling et al., 1985)。

注¹ B – border (境界配列)

5 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)

10 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)

表 3 NK603 の作出に用いた PV-ZMGT32L の各構成要素の由来及び機能⁶

構成要素	由来及び機能
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット①	
P ^{注1} - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>) 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 (McElroy et al., 1990)。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} - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy et al., 1991)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
TS ^{注3} - <i>CTP 2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 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 (Klee et al., 1987)。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 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 1997)。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' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する (Bevan et al., 1983)。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット②	
P- <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域 (Kay et al., 1987) を持つ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35SRNA (Odell et al., 1985) 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- <i>Hsp70</i>	トウモロコシの熱ショック蛋白質 70 遺伝子のイントロン。 <i>ZmHsp70</i> イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる (Rochester et al., 1986)。
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 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 (Klee et al., 1987)。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
CS-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 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 1997)。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- <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' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する (Bevan et al., 1983)。

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

表 3 NK603 の作出に用いた PV-ZMGT32L の各構成要素の由来及び機能 (続き)

その他(植物体には存在していない)	
<i>lac</i>	<i>lacI</i> コード領域の一部 (Farabaugh, 1978)、 <i>lac</i> プロモーター (Dickson et al., 1975)、 <i>lacZ</i> 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 (Shuman and Silhavy, 2003)。
OR ^{注6} - <i>ori</i> - <i>pBR 322</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 (Sutcliffe, 1979)。
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子 (Beck et al., 1982)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する。 <i>E. coli</i> 等の細菌中のベクターの選抜マーカーとしても用いられる (Herrmann et al., 1978)。

注¹ P – promoter (プロモーター)

5 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)

10

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

5 【改変低温ショック蛋白質 B (改変 CSPB)】

MON87460 中で発現する改変 CSPB は、土壤細菌である *Bacillus subtilis* に由来している。

10 改変 CSPB は RNA に結合し、RNA の二次構造を解消することが知られている。また、核や細胞質に局在し、分裂組織に多く存在することが知られている。これらのことは細菌の Cold Shock Protein (CSP) 及び植物の Cold Shock Domain (CSD) を含む蛋白質においても認められており (Fusaro et al., 2007; Sasaki et al., 2007; Chaikam and Karlson, 2008)、改変 CSPB がストレス応答経路に作用し MON87460 に乾燥耐性を付与することを示唆している。環境が制御
15 された温室試験における土壤水分を制限した条件下において、MON87460 の光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II における量子効率是对照の非組換えトウモロコシと比較し向上していることが確認された。また、ほ場における試験結果から、MON87460 は土壤水分を制限した条件下において、光合成産物を効率よく雌穂に配分することにより、対照の非組換えトウモロコシと比較し高い雌穂の乾燥重、一穂当たりの穀粒数、収量及び収穫指数を示すことが確認された。これらのことから改変 CSPB は土壤水分を制限した条件下において、RNA シャペロンとして機能することにより、MON87460 の成長及び発達を維持し、収量の減少を抑制することが示された。

20 25 また、改変 *cspB* 遺伝子は様々な環境ストレスに対して耐性を示すことが報告されている (Castiglioni et al., 2008)。しかし、成体における乾燥、低温、高温及び塩耐性試験の結果、MON87460 は改変 CSPB を発現することにより乾燥に対する耐性を有するものの、低温、高温、塩に対して耐性を有しているとは考えられないと結論された。

30 なお、改変 CSPB のアミノ酸配列は、土壤中に広く分布する土壤細菌である *B. subtilis* に由来する野生型 CSPB と比較して、N 末端から 2 番目のロイシンがバリンに改変されている。これはクローニングのための制限酵素切断部位を付加するためである。

【NPTII 蛋白質】

35

形質転換体の選抜のために導入された抗生物質耐性マーカー遺伝子である *nptII* 遺伝子は大腸菌のトランスポゾン Tn5 由来であり、コードされる NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質(カナマイシン等)をリン酸化して不活

化することによってこれらの抗生物質に耐性を示し、結果としてカナマイシンの培地への添加によって形質転換細胞の選抜が可能となる (Beck et al., 1982; Nap et al., 1992; Shaw et al., 1993)。

5 一害虫抵抗性蛋白質⁷—

【Cry1A.105 蛋白質】

MON89034 の作出に用いた *cry1A.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。

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コーンイヤールーム (*Helicoverpa zea*) (MacRae et al., 2005)、ブラックカットワーム (タマヤナガ) (*Agrotis ipsilon*) (MacRae, 2005)、フォールアーミーワーム (ツマジロクサヨトウ) (*Spodoptera frugiperda*) (MacRae, 2005)、サウスウエスタンコーンボローラー (*Diatraea grandiosella*) (MacRae, 2005)、ヨーロピアンコーンボローラー (ヨーロッパアワノメイガ) (*Ostrinia nubilalis*) (MacRae et al., 2006a) 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 (Richards, 2006a; Richards, 2006b) やテントウムシ (Paradise, 2006a) などの益虫に対しては殺虫活性を示さなかった。

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 蛋白質】

⁷土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. 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 (Hofmann et al., 1988; Slaney et al., 1992; Van Rie et al., 1990)。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。例えば、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 (de Maagd et al., 2001; Masson et al., 2002)。

5 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
10 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クワーム (MacRae et al.,
2006a)、フォールアーミーワーム (MacRae et al., 2006b)、及びヨーロッパン
コーンボラー(MacRae et al., 2006a) 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 (MacRae et al., 2006b) に対しては殺虫活性を示さなかった。
また、チョウ目害虫以外のミツバチ (Maggi, 2000b; Maggi, 2000a) やテントウ
ムシ (Paradise, 2006b) などの益虫に対しても、殺虫活性を示さなかったこと
10 から、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。

15 なお、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 CP4 EPSPS 蛋白質】

20 植物はグリホサート进行处理すると 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。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
25 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。

30 なお、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。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。

35 親系統で発現する改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質、改変
Cry2Ab2 蛋白質及び改変 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 (AD8、AD 2009、GenBank、
EMBL、PIR、SwissProt 等) 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は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

【改変 CSPB】

5 CSPB を含む細菌由来の CSP は RNA に非特異的に結合し、RNA シャペロンとして働いていると考えられている (Herschlag, 1995; Jiang et al., 1997)。このため、CSP は翻訳が抑制されるような条件下でも翻訳が行われるようにサポートする役割をもつ (Graumann et al., 1997)。CSPB は転写を直接誘導するような機能は持っておらず (Schindler et al., 1999; Weber et al., 2001)、CSPB が
10 酵素活性を持つとの報告はない。

したがって、MON87460 中で改変 CSPB が発現することにより、改変 CSPB が酵素として働き新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。

【NPTII 蛋白質】

15

NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である (Shaw et al., 1993)。NPTII 蛋白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応に
20 のみ関与していることが報告されている (Price et al., 1974; Davies and Smith, 1978; Davies, 1986)。さらに、NPTII 蛋白質の構造活性学的な検討の結果、NPTII 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化 (例：水酸基を除去する、アミノ基を改変する等) により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている (Price et al.,
25 1974)。

したがって、MON87460 中で NPTII 蛋白質が発現することにより、新規の代謝産物が生じることはないと考えられる。

【Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質】

30

Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、いずれも *B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質(Bt 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 (OECD, 2007)、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ない。よ
35 って、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の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】

5 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
10 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 (Gruys et al., 1992)、これら以
外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキ
ミ酸である。しかし、EPSPS のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の
起り易さを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、
15 EPSPS のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS の S3P との反応特異性の約 200
万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS の基質として反応す
る可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変
化させることはないと考えられる。

15 (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。
20 MON87460: *E. coli* 由来のベクター-pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築
された PV-ZMAP595
MON89034: *E. coli* 由来のベクター-pBR322 (Sutcliffe, 1979) をもとに構築され
た PV-ZMIR245
NK603: *E. coli* 由来のベクター-pUC119 (Vieira and Messing, 1987) をもとに構
25 築された PV-ZMGT32

ロ 特性

30 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。

MON87460: PV-ZMAP595; 9,379 bp
MON89034: PV-ZMIR245; 17,600 bp
35 NK603: PV-ZMGT32; 9,308 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

選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。
MON87460: カナマイシンやネオマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *nptII* 遺伝子及びスペクチノマイシンやストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子

5 MON89034: スペクチノマイシンやストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子

NK603: カナマイシンやネオマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *nptII* 遺伝子

10 なお、上述した中で、MON87460 にのみ *nptII* 遺伝子が導入されているが、それ以外の抗生物質耐性遺伝子は宿主には導入されていない。

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

15 PV-ZMAP595、PV-ZMIR245 及び PV-ZMGT32 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

20 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

MON87460、MON89034 及び NK603 のそれぞれ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PV-ZMAP595、PV-ZMIR245 及び PV-ZMGT32 の構成要素はそれぞれ表 1~表 3 (p12~18) 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、それぞれ図 1~図 3 (p9~11) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30 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。

MON87460: アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-ZMAP595 の T-DNA 領域を移入した。

MON89034: アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-ZMIR245 の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域を移入した。その後、T-DNA II 領域を分離により除去した。

35 NK603: パーティクルガン法によりプラスミド・ベクターPV-ZMGT32 の一部である PV-ZMGT32L を移入した。

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抜の方法

5 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。

MON87460: パロモマイシン

MON89034: パロモマイシン

NK603: グリホサート

10 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

MON87460 及び MON89034 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った。なお、MON87460 及び
15 MON89034 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 MON87460 及び MON89034 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。なお、NK603 においては、宿主への核酸の導入はパーティクルガン法により行ない、アグロバクテリウム法は用いていない。

20

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

25 MON87460 は、再分化個体である R₀ 世代を従来トウモロコシ品種 LH59 と交配させた後、自殖した。R₁ 世代において改変 CSPB の発現、カナマイシンへの耐性及び導入遺伝子のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代を導入遺伝子の解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として MON87460 を選抜した。

30

MON89034 は、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。その後、導入遺伝子や Cry1A.105 蛋白質及び改変
35 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、病害虫感受性など) などから総合的に判断して MON89034 が選抜された。

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し、1997年より系統選抜の評価を開始し、1997~1999年にかけて延べ103カ所のほ場にて形態及び生育特性などについて調査を行った。また、改変CP4 EPSPS蛋白質の発現及び導入遺伝子の分析等を行い、最終的に優良系統を選抜した。

5

【MON87460 × MON89034 × NK603 の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、MON87460、MON89034 及びNK603 の自殖系統を親とする一代雑種品種である (図 4, p27)。

10

【社外秘のため非開示】

5

10

15

20

25 図 4 本スタックシステムトウモロコシの育成例

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 MON87460、MON89034 及び NK603 の導入遺伝子はトウモロコシゲノム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

10

【MON87460】

15 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON87460 のトウモロコシゲノム中の 1 ヲ所に導入遺伝子が 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。

なお、MON87460 の塩基配列の解析を行った結果、導入遺伝子の右側境界領域 (PV-ZMAP595 の 2,816~3,172 bp) 及びそれに続く P-Ract1 領域の上流 733 bp (PV-ZMAP595 の 3,205~3,937 bp)の欠損が認められた。

20

【MON89034】

25 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON89034 のトウモロコシゲノム中の 1 ヲ所に導入遺伝子が 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。

30 なお、MON89034 の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。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考えられた。

35

【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

5 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217 bp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。

10 なお、この3'末端近傍の217 bp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長い転写産物が見つかった。しかし、NK603 においては改変 CP4 EPSPS 蛋白質のみが認められ、改変 CP4 EPSPS 蛋白質を含むフュージョン蛋白質は検出されなかった。これは、ターミネーターをリードスルーした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。以上のことから、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）の承認を受けた。

20 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）。

30 L214P に関して、N末端から214番目のプロリンはEPSPS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の活性部位及び三次元構造に影響を及ぼさないこと、L214P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。

35 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。

- 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

MON87460、MON89034 及び NK603 は全て 1 コピーなので該当しない。

5

- 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。

10

MON87460: ELISA 法による蛋白質の発現確認

MON89034: ウェスタンブロット分析による蛋白質の発現確認

NK603: 育成の過程で除草剤グリホサート散布を行い、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が複数世代で発現していることを確認した。

15

- 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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

MON87460、MON89034 及び NK603 に移入された核酸の配列には伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

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

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 PCR により、MON87460、MON89034 及び NK603 それぞれを特異的に検出することが可能である。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。

25

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

30

- 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。

35

MON87460: 導入遺伝子に由来する改変 CSPB による乾燥耐性

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

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

MON87460 で発現する改変 CSPB は *B. subtilis* に由来しており、CSPB を含む細菌由来の CSP は RNA に非特異的に結合し、RNA シャペロンとして働いていると考えられている (Herschlag, 1995; Jiang et al., 1997)。CSPB は転写を直接誘導するような機能は持っておらず (Schindler et al., 1999; Weber et al., 2001)、CSPB が酵素活性を持つとの報告はない。また、MON87460 で発現する改変 CSPB も RNA シャペロンとして働くことが知られており、転写を直接誘導したり、酵素活性を有するとの報告はない。

また、選択マーカーとして MON87460 に導入された NPTII 蛋白質は、基質特異性が高いことが知られている (Price et al., 1974; Davies and Smith, 1978; Davies, 1986)。

MON89034 で発現する Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質は、*B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質 (Bt 蛋白質) である。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 (OECD, 2007)、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ない。また、Bt 蛋白質である Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質は、ヨーロッパアンコーンボーラーやフォールアーミーワーム等のチョウ目昆虫の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体と結合し、殺虫活性を示すことから、チョウ目昆虫に選択的な殺虫スペクトルを持つ。これまでに、同じ目に分類される昆虫に対して活性を持つ Bt 蛋白質同士を組み合わせることにより、その殺虫スペクトルが他の目に広がったという事例は Bt 製剤を含めても報告されていない。このことから、本スタック系統トウモロコシにおいても殺虫スペクトルは広がることはないと考えられる。

また、NK603 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、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である。EPSPS は基質特異性が高く、シキミ酸合成経路の律速酵素ではないことから、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現することにより 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発現する改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していると考えられる。

上述したとおり、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する改変 CSPB は直接転写を誘導したり、酵素活性を持っておらず、RNA への結合も非特異的であることから、特定の形質のみを増減させること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において発現する改変 CSPB が、チョウ目害虫抵抗性及

5 び除草剤グリホサート耐性を特異的に変化させるとは考えにくい。また、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する NPTII 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たない又は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。

10 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。

15 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、2006~2007年に本スタック系統トウモロコシと MON87460 において収量に変化していないこと、2007年に本スタック系統トウモロコシと MON89034 においてチヨウ目害虫抵抗性が変化していないこと及び2007年に本スタック系統トウモロコシと NK603 において除草剤グリホサート耐性が変化していないことを調査した。

【収量】

20 従来の伝統的な交配手法を用いて MON87460、MON89034 及び NK603 を掛け合わせるにより収量に変化していないかどうか確認するため、本スタック系統トウモロコシ、MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシ (HCL301 × LH59) を適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下で栽培し、収量を比較した。なお、供試した本スタック系統トウモロコシ及び MON87460 の遺伝的背景は HCL301 × LH59 である。

30 2006~2007年にチリの4ヵ所のほ場(カレラ・デ・タンゴ(CT)、コリナ(CL)、ルンブレラス(LUM)、クィロタ(QUI))において、本スタック系統トウモロコシ、MON87460、対照の非組換えトウモロコシ及び商業栽培品種各4品種を適切な土壤水分条件下及び土壤水分を制限した条件下においてそれぞれ3反復で栽培した。適切な土壤水分条件下のプロットでは最適な収量を得られるよう適度に灌漑を行い、土壤水分を制限した条件下のプロットでは後期栄養生長期(V10)から初期生殖生長期(R2)にかけて灌漑を抑制し乾燥ストレスを与えた(表4, p34)。乾燥ストレスがかかっていたかどうかの指標は、土壤水分を制限した条件下における商業栽培品種の収量が適切な土壤水分条件下における収量より15%以上減少していることとした。15%以上の減少を基準とした理由は、毎年中等度の乾燥ストレスによりトウモロコシの収量が15%程度減少するとの報告による(Barker et al., 2005)。さらに、絹糸抽出期までの日数、着雌穂高及び稈長の減少もトウモロコシにおける乾燥

5 ストレスの指標と報告されているため (Campos et al., 2006)、それらの項目についても観察した。その結果、CT、CL 及び LUM のほ場における土壤水分を制限した条件下の商業栽培品種の収量は適切な土壤水分条件下の商業栽培品種の収量と比較して 15%以上の減少を示し、その他の形態特性も生育障害を示した。しかしながら、QUI のほ場における土壤水分を制限した条件下の商業栽培品種の収量は適切な土壤水分条件下の商業栽培品種の収量と比較して 15%以上の減少を示さず、その他の形態特性も生育障害を示さなかった (表 5, p35)。そのため、QUI のほ場は全ほ場を通しての統計処理には含めなかった。3つのほ場で栽培された全ての系統を用いて線形混合モデルによる ANOVA を行った後、ANOVA で算出される最小 2 乗平均を用いて Fisher's LSD により本スタック系統トウモロコシ、MON87460、対照の非組換えトウモロコシ 3 群間の比較を行った。

15 その結果、本スタック系統トウモロコシと MON87460 の収量は、適切な土壤水分条件下ではそれぞれ 13.7 MT/ha と 13.9 MT/ha、土壤水分を制限した条件下ではそれぞれ 7.9 MT/ha と 7.2 MT/ha であった (表 6, p36)。なお、いずれの水分条件下においても本スタック系統トウモロコシと MON87460 の収量に統計学的有意差は認められなかった ($p>0.05$) (表 7, p36)。

表 4 適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下における栽培期間中の累積灌漑量 (2006-2007 年、チリ)⁸

月	灌漑量 (インチ)							
	CL ¹		CT ¹		LUM ¹		QUI ¹	
	適切な土壌水分条件下	土壌水分を制限した条件下	適切な土壌水分条件下	土壌水分を制限した条件下	適切な土壌水分条件下	土壌水分を制限した条件下	適切な土壌水分条件下	土壌水分を制限した条件下
12月	0.9	0.9	2.8	3.8	2.8	2.8	1.9	1.9
1月	10.3	10.3	9.4	9.4	9.4	9.4	10.3	10.3
2月	8.5	4.7	8.5	2.8	8.5	2.8	8.5	1.9
3月	9.4	5.6	10.3	6.6	10.3	6.6	9.4	5.6
4月	2.8	2.8	2.8	2.8	1.9	2.8	1.9	1.9
5月	0	0	0	0	0	0	0	0
合計灌漑量	31.9	24.3	33.8	25.4	32.9	24.4	32.0	21.6

栽培期間中降雨は観測されなかった。

¹ チリ試験ほ場: CL = コリナ; CT = カレラ・デ・タンゴ; LUM = ルンブレラス; QUI = クイロタ

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

表 5 適切な土壌水分条件下及び土壌水分を制限した条件下における商業栽培品種の形態及び生育の特性 (2006-2007 年、チリ)⁹

形態及び生育の特性	CL ¹		CT ¹		LUM ¹		QUI ¹	
	土壌水分を		土壌水分を		土壌水分を		土壌水分を	
	適切な土壌 水分条件下	制限した 条件下	適切な土壌 水分条件下	制限した 条件下	適切な土壌 水分条件下	制限した 条件下	適切な土壌 水分条件下	制限した 条件下
50%絹糸抽出期まで								
の日数	63.1	63.8	66.2	67.3	70.3	73.7*	67.7	67.1
着雌穂高(インチ)	63.4	50.9*	55.0	46.0	50.4	41.8*	63.5	63.4
稈長(インチ)	110.7	79.7*	105.9	92.1	97.9	75.0*	112.0	112.8
収量 (ブッシェル/ エーカー)	185.5	82.3*	236.5	152.3*	213.9	94.4*	203.1	196.3
収量減少率(%)		56%		36%		56%		3%

線形混合モデルによる ANOVA により算出される最小 2 乗平均を用いて Fisher's LSD により統計処理を行った (n=3, 3 反復/ ほ場) (p ≤ 0.05 で有意)。

* 各ほ場内で適切な土壌水分条件下と土壌水分を制限した条件下の間に統計学的有意差が認められたこと示す(p ≤ 0.05)。

¹ チリ試験ほ場: CL = コリナ; CT = カレラ・デ・タンゴ; LUM = ルンブレラス; QUI = クィロタ

⁹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、MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシの収量の平均値及び標準誤差 (2006-2007 年、チリ)^{1 10}

水分条件	供試体	平均値±標準誤差 (bu/acre)	平均値±標準誤差 (MT/ha)
適切な土壤水分条件 下	本スタック系統トウモロコシ	218.6±9.02	13.7±0.57
	MON87460	220.7± 7.87	13.9±0.49
	対照の非組換えトウモロコシ	220.0±10.19	13.8±0.64
土壤水分を制限した 条件下	本スタック系統トウモロコシ	125.4±15.84	7.9±0.99
	MON87460	114.5±16.04	7.2±1.01
	対照の非組換えトウモロコシ	86.7±14.17	5.4±0.89

¹CT、CL 及び LUM のほ場における結果

表 7 本スタック系統トウモロコシ、MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシの収量の対比較の結果¹¹

比較	水分条件	P-値
本スタック系統トウモロコシ vs. MON87460	適切な土壤水分条件下	0.875
	土壤水分を制限した条件下	0.411
本スタック系統トウモロコシ vs. 対照の非組換えトウモロコシ	適切な土壤水分条件下	0.916
	土壤水分を制限した条件下	0.009
MON87460 vs. 対照の非組換えトウモロコシ	適切な土壤水分条件下	0.958
	土壤水分を制限した条件下	0.048

線形混合モデルによる ANOVA により算出される最小 2 乗平均を用いて Fisher's LSD により統計処理を行った (n=9、3 反復/ ほ場、3 ほ場) (p≤0.05 で有意)。

¹⁰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

¹¹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

【チョウ目害虫抵抗性】

従来の伝統的な交配手法を用いて MON87460、MON89034 及び NK603 を掛け合わせることにより、MON89034 系統由来のチョウ目害虫抵抗性が変化していないかどうか確認するため、トウモロコシの代表的なチョウ目害虫であるフォールアーミーワーム (*Spodoptera frugiperda*) による食害程度を評価することにより本スタック系統トウモロコシのチョウ目害虫抵抗性を MON89034 及び対照の非組換えトウモロコシと比較した。この試験では同じ条件下で 2 回の実験を行い、2 回の実験のデータを合わせて解析を行った。試験には、本スタック系統トウモロコシ、MON89034 及び対照の非組換えトウモロコシ (HCL301 × LH59) を供試し、各 12 個体 (3 個体/区 × 2 反復 × 2 実験) で試験を行った。なお、供試した本スタック系統トウモロコシ及び MON89034 の遺伝的背景は HCL301 × LH59 である。

5 葉期にフォールアーミーワームの 1 齢幼虫を接種し (25 頭/個体)、フォールアーミーワーム接種後 7 日目に Leaf Damage Ratings (LDR; 葉部食害程度) を Davis ら (1992) のスケールに基づき 0 (食害無) ~9 (食害甚) の 10 段階で調査した。このスケールでは、0 の評価は食害が観察されないことを表し、9 の評価は葉に細長い傷や様々な大きさの穴があるような深刻な食害があることを表している。分散の不均一性のため統計処理を行う前にデータをランク変換した。変換されたデータを用いて線形混合モデルによる ANOVA を行った後、Fisher's Protected LSD による多重比較検定を行った。

その結果、本スタック系統トウモロコシ及び MON89034 におけるチョウ目害虫の食害の程度はいずれも 0.33 であり (表 8, p38)、統計学的有意差は認められなかった ($p>0.05$) (表 9, p38)。

表 8 本スタック系統トウモロコシ、MON89034 及び対照の非組換えトウモロコシの葉部食害程度 (LDR) の平均値及び標準誤差 (SEM)¹²

供試サンプル	葉部食害程度 (LDR) ¹ の平均値 ± 標準誤差
本スタック系統トウモロコシ	0.33 ± 0.19
MON89034	0.33 ± 0.14
対照の非組換えトウモロコシ	6.17 ± 0.29

¹ 接種後 7 日目に、葉部食害程度を Davis ら (1992) のスケールに基づき評価した。このスケールでは、0 の評価は食害が観察されないことを表し、9 の評価は葉に細長い傷や様々な大きさの穴があるような深刻な食害があることを表す。

表 9 本スタック系統トウモロコシ、MON89034 及び対照の非組換えトウモロコシの葉部食害程度の対比較の結果¹³

比較	P-値
本スタック系統トウモロコシ vs. MON89034	0.969
本スタック系統トウモロコシ vs. 対照の非組換えトウモロコシ	< 0.001
MON89034 vs. 対照の非組換えトウモロコシ	< 0.001

線形混合モデルによる ANOVA を行った後、Fisher's Protected LSD による多重比較検定を行った (n=4、3 個体/区、4 反復) (p ≤ 0.05 で有意)。

¹²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

¹³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

【除草剤グリホサート耐性】

従来の伝統的な交配手法を用いて MON87460、MON89034 及び NK603 を掛け合わせることにより、NK603 系統由来の除草剤グリホサート耐性が変化していないことを確認するため、除草剤グリホサート散布試験を行った。本スタック系統トウモロコシ、NK603 及び対照の非組換えトウモロコシ (HCL301 × LH59) を各 5 個体ずつ温室にてポット栽培し (1 個体/区 × 5 反復)、試験を行った。なお、供試した本スタック系統トウモロコシ及び NK603 対照の非組換えトウモロコシの遺伝的背景は HCL301 × LH59 である。

4 葉期に除草剤グリホサート (製品名: Roundup WeatherMAX) を無散布、或いは異なる 2 濃度 (0.84 kg acid equivalent¹⁴ (a.e.)/ha (通常の散布量)、或いは 27 kg a.e./ha (通常の 32 倍の散布量)) の濃度で散布した。除草剤グリホサート散布後 7 日目及び 14 日目に除草剤による植物体の薬害程度を 0 (薬害は認められない) ~ 10 (ほぼ全体が薬害により枯死している) のスケールに基づき 11 段階で調査した。データを用いて線形混合モデルによる ANOVA を行った後、Fisher's Protected LSD による多重比較検定を行った。なお、散布後 14 日目の結果については、データにばらつきがないため統計処理は行わなかった。

散布後 7 日目の統計処理の結果、本スタック系統トウモロコシと NK603 との間でいずれの散布量及び観察時においても除草剤による薬害の程度に統計学的な有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (表 10~表 11, p40)。

¹⁴ acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分の塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

表 10 本スタック系統トウモロコシ、NK603 及び対照の非組換えトウモロコシの除草剤グリホサート散布 (通常の散布量¹ 及び通常の 32 倍の散布量²) による薬害程度^{3 15}

測定日	通常の散布量			通常の 32 倍の散布量		
	本スタック系統 トウモロコシ	NK603	非組換え トウモロコシ	本スタック系統 トウモロコシ	NK603	非組換え トウモロコシ
散布後 7 日目	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	8.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	8.2 ± 0.20
散布後 14 日目	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00

数値は平均値±標準誤差を表している。

¹ 通常の散布量は、0.84 kg a.e./ha である。

² 通常の 32 倍の散布量は、27 kg a.e./ha である。

³ 評価は 0 (薬害は認められない) ~ 10 (ほぼ全体が薬害により枯死している) のスケールに基づいて行った。

表 11 散布後 7 日目における本スタック系統トウモロコシ、NK603 及び対照の非組換えトウモロコシの薬害程度の対比較の結果¹⁶

散布量	比較	p-値
通常の散布量	本スタック系統トウモロコシ vs. NK603	1.000
	本スタック系統トウモロコシ vs. 対照の非組換えトウモロコシ	<0.001
	NK603 vs. 対照の非組換えトウモロコシ	<0.001
通常の 32 倍の散布量	本スタック系統トウモロコシ vs. NK603	1.000
	本スタック系統トウモロコシ vs. 対照の非組換えトウモロコシ	<0.001
	NK603 vs. 対照の非組換えトウモロコシ	<0.001

線形混合モデルによる ANOVA を行った後、Fisher's Protected LSD による多重比較検定を行った (n=5、1 個体/ 区、5 反復) (p ≤ 0.05 で有意)。

¹⁵ 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

¹⁶ 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

以上のことから、それぞれの親系統で発現する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。

5 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 MON87460、MON89034 及び NK603 を個別に調査した結果に基づき評価した。

10 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¹⁷

本スタック系統トウモロコシの親系統である MON87460、MON89034 及び NK603 のわが国における生物多様性影響評価を以下に記載した。

15

i. 通常栽培で灌漑を行う試験

a 形態及び生育の特性

20 MON87460、MON89034 及び NK603 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 12 (p42) に示した項目について調査を行った。

その結果、MON87460 の開花期において違いが認められた (別添資料 1 の表 3, p12)。なお、MON89034 及び NK603 では統計学的有意差は認められなかった (別添資料 3 の表 2, p8;別添資料 4 の表 3-2, p17)。

25

¹⁷本項目中の以下に続く i の a~g、ii の a~b、及び iii の a~b 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 12 MON87460、MON89034 及び NK603 の形態及び生育の特性調査の結果¹⁸

	MON87460	MON89034	NK603
発芽揃い	○	○	○
発芽株数	—	○	—
発芽率	○	○	○
雄穂抽出期	○	○	○
絹糸抽出期	○	○	○
開花始め	○	—	—
開花期	○*	○	—
稈長	○	○	○
稈径	—	○	—
草型	○	○	○
分けつ数	○	○	○
着雌穂高	○	○	○
成熟期	○	○	○
収穫期の地上部重	○	○	○
粒形	○	○	○
粒色	○	○	○

○：調査を行っている。

—：調査を行っていない。

5 * 統計学的有意差又は違いが認められた。

b 生育初期における低温又は高温耐性

10 MON87460 の低温耐性試験は 4 段階の温度条件 (最適温: 30°C/22 °C (日中/夜間)、軽度の低温: 20°C/ 15°C、中度の低温: 15°C/10°C、重度の低温: 4°C/4°C) において行った。その結果、MON87460 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萎縮した (別添資料 2 の Table 2, p17)。
 15 なお、最適温条件下において人工気象室に移動後 4 日目の生育段階と 8 日目の生育段階及び乾燥重について統計学的有意差が認められた (別添資料 2 の Table 2, p17)。

MON89034 及び 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萎縮もしくは枯死した (別添資料 3 の図 6-2, p14; 別添資料 4 の表 3-4, p24)。

¹⁸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

c 成体の越冬性又は越夏性

5 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。再生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確認した。

d 花粉の稔性及びサイズ

10 MON87460、MON89034 及び NK603 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 の図 6, p15; 別添資料 3 の図 8-1~図 8-2, p19; 別添資料 4 の表 3-3 及び写真 3-4a~b, p21~22)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

15 MON87460、MON89034 及び NK603 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 13 (p43) に示した項目について調査を行った。

20 その結果、MON89034 の雌穂径及び一穂着粒数及び NK603 の百粒重において統計学的有意差が認められた (別添資料 3 の表 2, p8 及び表 6, p20; 別添資料 4 の表 3-2, p17)。なお、MON87460 では統計学的有意差は認められなかった (別添資料 1 の表 4, p17)。

表 13 MON87460、MON89034 及び NK603 の種子の生産量の調査の結果¹⁹

	MON87460	MON89034	NK603
雌穂数	○	○	○
有効雌穂数/ 総有効雌穂数	○	○	○
雌穂長	○	○	○
雌穂径	○	○*	○
一穂着粒数	○	○*	—
粒列数	○	○	○
一列粒数	—	○	○
百粒重	○	○	○*

○：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。

25

¹⁹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

脱粒性について、MON87460、MON89034 及び NK603 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、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

5 休眠性及び発芽率について、MON87460、MON89034 及び NK603 とそれぞれの対照の非組換えトウモロコシの発芽率の調査を行った結果、差異はなく、種子の休眠性は認められなかった (別添資料 1 の表 4~表 5, p17; 別添資料 3 の表 3~表 4, p16; 別添資料 4 の表 3-4, p24)。

10 f 交雑率

わが国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 MON87460、MON89034 及び NK603 の交雑率の試験は行わなかった。

15 g 有害物質の産生性

MON87460、MON89034 及び NK603 について、土壤微生物相試験、鋤込み試験、後作試験を行った。その結果、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 1 の表 6~8, p19; 別添資料 3 の表 7~表 9, p23; 別添資料 4 の表 3-5~表 3-7, p26~p28)。

ii. 通常栽培で灌漑を行わない試験

25 わが国の環境下における、MON87460 の乾燥耐性能を評価するため、MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシを通常栽培で灌漑を行わない条件において栽培し、a 形態及び生育の特性、b 種子の生産量と脱粒性について調査を行った。

30 a 形態及び生育の特性

MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシについて、形態及び生育の特性に関する項目 (14 項目: 発芽揃い (月日)、発芽率 (%)、雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、開花始め (月日)、開花期 (月日)、稈長 (cm)、着雌穂高 (cm)、分けつ数、草型、成熟期 (月日)、収穫期の地上部重 (kg)、粒型、粒色) について調査した。その結果、統計処理を行った項目(発芽率、稈長、着雌穂高、分けつ数、収穫期の地上部重)では、着雌穂高において MON87460 と対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 1 の表 9, p25)。ま

た、統計処理を行わなかった項目（発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花始め、開花期、草型、成熟期、粒型、粒色）では、開花始めにおいて MON87460 と対照の非組換えトウモロコシとの間で違いが認められた（別添資料 1 の表 9, p25）。

5

b 種子の生産量及び脱粒性

MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する項目（総有効雌穂数、雌穂長（cm）、雌穂径（cm）、粒列数、一穂着粒数、百粒重（g））を調査した。その結果、総有効雌穂数、雌穂長、一穂着粒数において MON87460 と対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた（別添資料 1 の表 10, p28）。

10

15

脱粒性について、MON87460 と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。

iii. 栽培管理を行わない試験

20

25

MON87460 の自生能力を評価するため、灌漑、施肥、病虫害駆除、雑草管理などの栽培管理を行わない条件下において MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、a 形態及び生育の特性、b 種子の生産量及び脱粒性について調査を行った。その結果、雑草の繁茂、無施肥による栄養分の欠乏、乾燥ストレス、害虫による食害等のストレスを受け、MON87460 の全 33 個体中 18 個体、対照の非組換えトウモロコシの全 33 個体中 26 個体が枯死しており、生存数は極端に減少していた（別添資料 1 の表 13, p35）。また、全 33 個体の合計有効雌穂数は MON87460 では 9 本、対照の非組換えトウモロコシでは 2 本しか認められなかった（別添資料 1 の表 13, p35）。そのため、試験結果について統計処理は行わなかった。

30

a 形態及び生育の特性

35

MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシについて、形態及び生育の特性に関する項目（5 項目：発芽揃い（月日）、発芽率（%）、稈長（cm）、成熟期（月日）、収穫期の地上部重（kg））について調査した。その結果、MON87460 と対照の非組換えトウモロコシの間に違いはないと考えられた（別添資料 1 の表 14, p36）。

b 種子の生産量及び脱粒性

MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する項目（総有効雌穂数、雌穂長(cm)、雌穂径(cm)、粒列数、一穂着粒数）を調査した。その結果、総有効雌穂数及び一穂着粒数において MON87460 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異が認められた（別添資料 1 の表 15, p38）。

5

脱粒性について、MON87460 と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。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

10

(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、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

15

(2) 使用等の方法

—

20

(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

—

25

(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。

30

(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

—

35

(6) 国外における使用等に関する情報

MON87460、MON89034 及び NK603 の諸外国における申請・認可状況は以下の表 14 (p47) に示したとおりである。

表 14 本スタック系統トウモロコシの国外の主要栽培国及び輸入国における申請及び認可状況

5

10

【社外秘につき非開示】

以下に MON87460、MON89034 及び NK603 のわが国における申請・認可状況を記載した表 15 (p48)。

5 表 15 本スタック系統トウモロコシのわが国における申請及び認可状況

2012年2月現在

	食品	飼料	環境
MON87460	2011年6月 安全性確認	2011年9月 安全性確認	2012年2月 第一種使用規程承認
MON89034	2007年11月 安全性確認	2007年10月 安全性確認	2008年1月 第一種使用規程承認
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
本スタック系統 トウモロコシ	2011年9月 安全性確認	2011年9月 安全性確認	2011年11月 申請

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²⁰

1 競合における優位性

5 本スタック系統トウモロコシは MON87460、MON89034 及び NK603 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

10 第一-2-(6)-① (p30~41)で述べたとおり、改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Bt 蛋白質 (Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有していることから、独立して作用していると考えられる。また、これらの蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たないか又は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。

15 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収量、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性はそれぞれの親系統と同程度であることから、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。

20 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、MON87460、MON89034 及び NK603 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

25 (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るが、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。

30 本スタック系統トウモロコシの親系統である MON87460、MON89034 及び NK603 の競合における優位性に関わる諸形質として、通常栽培で灌漑を行う条件下におい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 (第一-2-(6)-②-i-a~e, p41~44)。その結果、MON87460 の
35 開花期、低温耐性試験の最適温条件下における人工気象室に移動後 4 日目の生育段階と 8 日目の生育段階及び乾燥重、MON89034 の雌穂径、一穂着粒数、

²⁰本項目中で、第一の 2-(6)-②の i の a~g、ii の a~b、及び iii の a~b 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

及びNK603の百粒重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。

5 しかし、MON87460と対照の非組換えトウモロコシの間に違い又は統計学的有意差が認められた項目（開花期、低温耐性試験の最適温条件下における人工気象室に移動後4日目の生育段階と8日目の生育段階及び乾燥重）において、MON87460と対照の非組換えトウモロコシの平均値の差はわずかであった。また、MON89034と対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差が認められた項目（雌穂径及び一穂着粒数）において、MON89034の平均値は従来のトウモロコシにおける変動の範囲内であった。さらに、NK603と対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差の認められた項目（百粒重）
10 において、供試した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が認められなかった。

15 これらのことから、認められた違い又は統計学的有意差は競合における優位性を高めるほどの差ではないと考えられる。

20 また、MON87460の競合における優位性に関わる諸形質として、通常栽培で灌漑を行わない条件下において、形態及び生育の特性、種子の生産量及び脱粒性について調査を行った（第一-2-(6)-②-ii-a~b, p44~45）。その結果、開花始め、着雌穂高、総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数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。総有効雌穂数、雌穂長及び一穂着粒数等、種子の生産量において認められた統計学的有意差は、例年と比べると少雨で気温も高く、後期栄養生長期から収穫にかけて降雨が激減し、乾燥ストレス条件下におかれたMON87460の乾燥耐性能が働いたためと考えられた。

25 さらに、MON87460の競合における優位性に関わる諸形質として、栽培管理を行わない条件下において、形態及び生育の特性、種子の生産量及び脱粒性について調査を行った（第一-2-(6)-②-iii-a~b, p45）。なお、雑草の繁茂、無施肥による栄養分の欠乏、乾燥ストレス、害虫による食害等のストレスにより、MON87460の全33個体中18個体、対照の非組換えトウモロコシの全33
30 個体中26個体が枯死しており、生存数は極端に減少していた。また、全33個体の合計有効雌穂数はMON87460では9本、対照の非組換えトウモロコシでは2本しか認められなかった。そのため、試験結果について統計処理は行わなかった。調査の結果、種子の生産量における総有効雌穂数及び一穂着粒数においてMON87460と対照の非組換えトウモロコシの間に違いが認められ
35 た。しかし、上述のようにMON87460及び対照の非組換えトウモロコシの調査個体の多くは雑草の繁茂や害虫による食害などにより枯死しており、有効雌穂もわずかにしか認められなかった。このことから、MON87460の生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく

低下していることが確認された。

5 本スタック系統トウモロコシには、MON87460 中で発現する改変 CSPB による乾燥耐性が付与されているが、乾燥、低温、高温及び塩耐性試験の結果
10 MON87460 は乾燥耐性以外の低温、高温、塩に対して耐性を有していないことが確認されている。また、MON87460 の越冬性、脱粒性及び休眠性において、対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められていない。さらに、MON87460 の生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認されている。これらの結果から、
15 MON87460 は乾燥以外のストレス耐性能において従来のトウモロコシ品種と同等であり、わが国の自然条件下での自生能力は従来のトウモロコシ品種と比べて高まっていないと考えられた。よって、種子の生産量の差異やその他の差異により、MON87460 の競合の優位性が従来のトウモロコシ品種より高まることはない
20 と判断された。これらのことから、わが国の自然条件下において MON87460 が複数世代にわたり自生したり、他の植物を駆逐するとは考えられず、その競合における優位性は従来のトウモロコシ品種を上回ることはない
25 と判断された。

また、本スタック系統トウモロコシには、MON89034 中で発現する 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の形質
30 が付与されているが、これらの害虫による食害のみが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要因ではないことから、これらの形質の付与のみで栽培作物であるトウモロコシを自然条件下で自生し、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改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による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
35 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
30 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

35 —

(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

5 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。

2 有害物質の産生性

10 (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るが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

15 本スタック系統トウモロコシで発現している改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は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。

20 MON87460 で発現する改変 CSPB は RNA シャペロンとして働くことが知られており、転写を直接誘導したり、酵素活性を有するとの報告はない。また、選択マーカーとして MON87460 に導入された NPTII 蛋白質は、基質特異性が高いことが知られている (Price et al., 1974; Davies and Smith, 1978; Davies, 1986)。

25 MON89034 で発現している Bt 蛋白質については、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。

30 また、NK603 で発現している改変 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と考えられる。

35 以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していると考えられる。また、本スタック系統トウモロコシにおいて発現する改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ酵素活性を持たない、又は高い基質特異性を有することから植物代謝経路に作用して有害物質を産生することはないと判断された。

実際に、MON87460、MON89034 及び NK603 において、後作試験、土壤微生物相試験及び鋤込み試験を行った (第一-2-(6)-②-i-g, p44)。その結果、いずれの試験においてもこれら親系統の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はないと考えられる。

本スタック系統トウモロコシにおいては、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を持つ Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質が発現している。そこで、以下に本スタック系統トウモロコシで発現しているこれらの Bt 蛋白質が、わが国の野生動植物等に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

【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。

実際に、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質を用いて生物検定を行ったところ、いずれの蛋白質も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。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は考えられた。特に MON89034 から飛散した花粉を食餌する場合には、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、「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、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うち、1) 幼虫の活動期 (摂食期) とトウモロコシの開花期 (5 月下旬から 9 月上旬) の関係、2) 幼虫の食餌植物の生育地域とトウモロコシの栽培地域から判断した幼虫の食餌植物がトウモロコシの花粉と接触する可能性、の 2 点から絞込みを行った結果、以下の 12 種が特定された。

絶滅危惧 I 類: タイワンツバメシジミ、シルビアシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、ミツモンケンモン

絶滅危惧 II 類: ヒメシロチョウ、ツマグロキチョウ、ミヤマシジミ、コヒョ
ウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ
準絶滅危惧: ヒョウモンチョウ

5 **【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
等の特定】**

10 本スタック系統トウモロコシは Bt 蛋白質である Cry1A.105 蛋白質及び改変
Cry2Ab2 蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物
等としては親系統である MON89034 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 12 種
が挙げられた。

15

(2) 影響の具体的内容の評価

【MON89034 の影響の具体的内容の評価】

20 MON89034 の花粉中では、Cry1A.105 蛋白質と改変 Cry2Ab2 蛋白質が、そ
れぞれ 3.5 µg/g fwt と 0.12 µg/g fwt で発現していることがすでに確認されてい
る。

【本スタック系統トウモロコシの影響の具体的内容の評価】

25

ポット試験による生物検定の結果から、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抵抗性は MON89034 と同程度であることが確
認された (表 8~表 9, p38)。よって、チョウ目昆虫が本スタック系統トウモロ
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、親系統であ
る MON89034 と同程度であると考えられる。

30

(3) 影響の生じやすさの評価

35 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 12 種のチョ
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。

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 (Shirai and Takahashi, 2005)。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 5 m 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

5

また、北米でも全 7 ヲ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 (Pleasants et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1 m、2 m、4-5 m 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。

10

さらに、Sears ら (2000)も、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 1 m 及び 5 m 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であったと報告している。

15

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 12 種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 10 m 以上離れると極めて低くなると結論された。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 10 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。

20

25

したがって、特定された 12 種のチョウ目昆虫が MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 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た。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。

30

(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。

35

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

5 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。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の自生は報告されていない。

以上のことから、交雑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

10

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 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

25

—

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 MON87460、MON89034 及び NK603 の自殖系統から交雑育種法により作出され、MON87460、MON89034 及び NK603 の特性を併せ持つ。第一-2-(6)-① (p30~41) 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 CSPB、NPTII 蛋白質、Bt 蛋白質 (Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が相互に作用するとは考えにくい。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、MON87460、MON89034 及び NK603 の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。

競合における優位性：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が、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である MON87460、MON89034 及び NK603 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-i-a~e (p41~44) 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、これらの差異は質的及び量的に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た。

本スタック系統トウモロコシは、MON87460 由来の改変 CSPB の発現による乾燥耐性、MON89034 由来の Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性、及び 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が付与されている。

MON87460 は付与された乾燥耐性により、通常栽培で灌漑を行わない条件下及び栽培管理を行わない条件下において、対照の非組換えトウモロコシと比較し種子の生産量が高いことが確認されている。しかし、MON87460 は乾燥以外の低温、高温、塩に対して耐性を有していないことが確認されており、さらに、越冬性、脱粒性及び休眠性において、対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められていない。また、MON87460 の生存能力は、栽培管理を行わない条件下では、栽培管理を行う条件下と比べ著しく低下していることが確認されている。これらの結果から、MON87460 はわが国の自然条件下での自生能力は従来のトウモロコシ品種と比べて高まっていないと考えられた。

よって、わが国の自然条件下において MON87460 が複数世代にわたり自生したり、他の植物を駆逐するとは考えられず、その競合における優位性は従来のトウモロコシ品種を上回ることはないと判断された。

また、チョウ目害虫による食害のみが、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要因ではないことから、チョウ目害虫抵抗性の形質の付与のみで栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、

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、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。

5 以上のことから、本スタック系統トウモロコシ並びに MON87460、MON89034 及び NK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの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。

10 有害物質の産生性：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、わが国で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改変 CSPB、NPTII 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質、改変 Cry2Ab2 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている。

15 改変 CSPB は RNA シャペロンとして働くことが知られており、転写を直接誘導したり、酵素活性を有するとの報告はない。また、NPTII 蛋白質は、基質特異性が高いことが知られている。Bt 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と考えられる。さらに、改変 CP4 EPSPS 蛋白質については基質特異性が高いことが知られている。これらのことから、これらの蛋白質が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。

20 実際に MON87460、MON89034 及び NK603 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ている。その結果、第一-2-(6)-②-i-g (p44) 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は認められなかった。

25 一方、MON89034 中で発現する Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry2Ab2 蛋白質により影響を受ける可能性のある野生動植物として、チョウ目昆虫を特定して検討を行った。

30 しかし、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の栽培ほ場やその周辺に局所的に生息しているとは考えにくく、特定されたチョウ目昆虫が本スタック系統トウモロコシで発現している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た。

35 以上のことから、本スタック系統トウモロコシ並びに MON87460、MON89034 及び NK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの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。

交雑性：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*

属の自生は報告されていない。このことから、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。

- 5 よって、総合的評価として、本スタック系統トウモロコシ並びに MON87460、MON89034 及び NK603 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該トウモロコシから分離した後代系統のもの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。

10

参考文献

- 5 Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 10 Barker, T., H. Campos, M. Cooper, D. Dolan, G. Edmeades, J. Habben, J. Schussler, D. Wright and C. Zinselmeier. 2005. Improving Drought Tolerance in Maize. Pages 173-253 in *Plant Breeding Reviews*. Volume 25. J. Janick (ed.). John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- 15 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 5,633,435, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- 20 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Brown, S.M. and C.G. Santino. 1995. Enhanced expression in plants. Patent 5,424,412, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 25 Campos, H., M. Cooper, G.O. Edmeades, C. Löffler, J.R. Schussler and M. Ibañez. 2006. Changes in drought tolerance in maize associated with fifty years of breeding for yield in the U.S. Corn Belt. *Maydica* 51: 369-381.
- 30 Castiglioni, P., D. Warner, R.J. Bensen, D.C. Anstrom, J. Harrison, M. Stoecker, M. Abad, G. Kumar, S. Salvador, R. D'Ordine, S. Navarro, S. Back, M. Fernandes, J. Targolli, S. Dasgupta, C. Bonin, M.H. Luethy and J.E. Heard. 2008. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147: 446-455.
- 35 Chaikam, V. and D. Karlson. 2008. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, Cell and Environment* 31: 995-1006.
- Davies, J. 1986. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying

enzymes. Pages 474-489 in *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V. Lorian (ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

- 5 Davies, J. and D.I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annual Review of Microbiology* 32: 469-518.
- 10 Davis, F.M., S.S. Ng and W.P. Williams. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station Technical Bulletin 186: 1-9.
- 15 de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.
- 20 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 25 Dhaese, P., H. De Greve, J. Gielen, J. Seurinck, M. Van Montagu and J. Schell. 1983. Identification of sequences involved in polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2: 419-426.
- 30 Dickson, R.C., J. Abelson, W.M. Barnes and W.S. Reznikoff. 1975. Genetic regulation: The lac control region. *Science* 187: 27-35.
- 35 EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N° EFSA-Q-2003-109). *The EFSA Journal* 48: 1-18. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/opinion_gmo_05_en1.0.pdf
- FAOSTAT. 2010. Production, crops, maize and maize green. Area harvested, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/default.aspx> [Accessed October 16, 2010].
- Farabaugh, P.J. 1978. Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274: 765-769.
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7

gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

- 5 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- 10 Fusaro, A.F., S.N. Bocca, R.L.B. Ramos, R.M. Barrôco, C. Magioli, V.C. Jorge, T.C. Coutinho, C.M. Rangel-Lima, R. De Rycke, D. Inzé, G. Engler and G. Sachetto-Martins. 2007. AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta* 225: 1339-1351.
- 15 Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 20 Graumann, P., T.M. Wendrich, M.H.W. Weber, K. Schröder and M.A. Marahiel. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology* 25: 741-756.
- 25 Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 30 Herrmann, R., K. Neugebauer, H. Zentgraf and H. Schaller. 1978. Transposition of a DNA sequence determining kanamycin resistance into the single-stranded genome of bacteriophage ϕ d. *Molecular and General Genetics* 159: 171-178.
- Herschlag, D. 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 20871-20874.
- 35 Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Biochemistry* 85: 7844-7848.

- Jiang, W., Y. Hou and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 196-202.
- 5 Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- 10 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- 15 Lamppa, G.K., G. Morelli and N.-H. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1370-1378.
- 20 MacRae, T.C. 2005. Insecticidal activity of the Cry1A.105 *Bacillus thuringiensis* protein against five lepidopteran pests of corn. Monsanto Technical Report MSL-20056. St Louis, Missouri.
- 25 MacRae, T.C., C.R. Brown and S.L. Levine. 2005. Evaluation of the potential for interactions between the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry1A.105 and Cry2Ab2. Monsanto Technical Report MSL-19859. St Louis, Missouri.
- 30 MacRae, T.C., C.R. Brown and S.L. Levine. 2006a. Evaluation of potential for interactions between the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry1A.105, Cry2Ab2, and Cry3Bb1. Monsanto Technical Report MSL-20270. St. Louis, Missouri.
- 35 MacRae, T.C., C.R. Brown and S.L. Levine. 2006b. Spectrum of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2 protein. Monsanto Technical Report MSL-20229. St. Louis, Missouri.
- Maggi, V.L. 2000a. Evaluation of the dietary effect(s) of insect protection protein 2 on honey bee larvae. Monsanto Technical Report MSL-16175. St Louis, Missouri.
- Maggi, V.L. 2000b. Evaluation of the dietary effect(s) of insect protection protein 2 on adult honey bees (*Apis mellifera* L.). Monsanto Technical Report MSL-16176. St Louis, Missouri.

- 5 Masson, L., B.E. Tabashnik, A. Mazza, G. Préfontaine, L. Potvin, R. Brousseau and J.-L. Schwartz. 2002. Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 68: 194-200.
- 10 Matsuoka, M., Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka, Y. Ozeki and N. Yamamoto. 1987. Nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from maize. Journal of Biochemistry 102: 673-676.
- 15 McElroy, D., W. Zhang, J. Cao and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. The Plant Cell 2: 163-171.
- 20 McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jenes and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. Molecular and General Genetics 231: 150-160.
- 25 McElwain, E.F. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. Nucleic Acids Research 17: 1764.
- 30 Nap, J.-P., J. Bijvoet and W.J. Stiekema. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. Transgenic Research 1: 239-249.
- 35 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.
- 40 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Organisation of Economic Co-operation and Development, , Paris, France.
- 45 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 50 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M.

Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

5

Paradise, M.S. 2006a. Evaluation of potential dietary effects of Cry1A.105 protein on the ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). Monsanto Technical Report MSL-20150. St Louis, Missouri.

10 Paradise, M.S. 2006b. Evaluation of potential dietary effects of Cry2Ab2 protein on the ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). Monsanto Technical Report MSL-20151. St Louis, Missouri.

15 Pleasants, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, H.R. Mattila, J.E. Foster, P. Clark and G.D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 98: 11919-11924.

20 Price, K.E., J.C. Godfrey and H. Kawaguchi. 1974. Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. Pages 191-307 in *Advances in Applied Microbiology*. Volume 18. D. Perlman (ed.). Academic Press, New York, New York.

25 Raynor, G.S., E.C. Ogden and J.V. Hayes. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* 64: 420-427.

30 Richards, K.B. 2006a. Evaluation of the dietary effect(s) of a Cry1A.105 protein on adult honeybees (*Apis mellifera* L.). Monsanto Technical Report MSL-20354. St Louis, Missouri.

Richards, K.B. 2006b. Evaluation of the dietary effect(s) of a Cry1A.105 protein on honeybee larvae (*Apis mellifera* L.). Monsanto Technical Report MSL-20249. St Louis, Missouri.

35 Rochester, D.E., J.A. Winer and D.M. Shah. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, *hsp70*. *The EMBO Journal* 5: 451-458.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office,

Washington, D.C.

- Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- 5
- Sasaki, K., M.-H. Kim and R. Imai. 2007. *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364: 633-638.
- 10
- Schindler, T., P.L. Graumann, D. Perl, S. Ma, F.X. Schmid and M.A. Marahiel. 1999. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis* - Stability and dynamics *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 3407-3413.
- 15
- Sears, M.K., D.E. Stanley-Horn and H.R. Matilla. 2000. Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- 20
- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare and G.H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews* 57: 138-163.
- 25
- Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- 30
- Shuman, H.A. and T.J. Silhavy. 2003. The art and design of genetic screens: *Escherichia coli*. *Nature Reviews Genetics* 4: 419-431.
- 35
- Slaney, A.C., H.L. Robbins and L. English. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIII A: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 9-18.
- 35
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*,

Cold Spring Harbor, New York.

- 5 Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele and H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1378-1385.
- 10 Vieira, J. and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 153: 3-11.
- Weber, M.H.W., A.V. Volkov, E. Fricke, M.A. Marahiel and P.L. Graumann. 2001. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *Journal of Bacteriology* 183: 6435-6443.
- 15 Widner, W.R. and H.R. Whitely. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *Journal of Bacteriology* 171: 965-974.
- 20 Willimsky, G., H. Bang, G. Fischer and M.A. Marahiel. 1992. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *Journal of Bacteriology* 174: 6326-6335.
- 25 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.
- 30 柿本陽一. 1981. トウモロコシの起源と特性. I 植物としての分類, 類縁関係. 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 35 柿本陽一, 山田実. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの起源と特性. III 植物としての特性. Pages 34-38 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 環境省自然環境局野生生物課. 2006. 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 - 財団法人 自然環境研究センター, 東京.

- 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳, 東京.
- 財務省. 2011. 財務省貿易統計. 財務省.
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed May 2, 2011].
- 5
- 千藤茂行. 2001. トウモロコシ. トウモロコシの品種生態. IV 採取. 転作全書. Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 10 瀧澤康孝. 1981. 子実用トウモロコシの栽培. II 栽培の実際. Pages 124-143 in 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 15 千葉浩三. 1980. 図集・作物栽培の基礎知識. 栗原浩, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 戸澤英男. 2005. トウモロコシ -歴史・文化、特性・栽培、加工・利用-. 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 20 中村茂文. 2001a. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. I 種子と発芽. Pages 41-43 in 転作全書. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 25 中村茂文. 2001b. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. III 生殖生長期の生理, 生態. Pages 50-53 in 転作全書. Volume 3. 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 30 農学大事典編集委員会. 1987. 13. 食用作物. トウモロコシ. Pages 536-541 in 第2次増訂改版 農学大事典. 野口ら (eds.). 株式会社 養賢堂, 東京.
- 35 農林水産省, 大臣官房統計部. 2010. 平成 21 年産 秋冬野菜、指定野菜に準ずる野菜等の作付け面積、収穫量及び出荷量. 農林水産省. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou09.pdf [Accessed October 16, 2010].
- 農林水産省, 大臣官房統計部. 2011. 平成 22 年産飼料作物の収穫量(牧草、青刈りとうもろこし及びソルゴー). 農林水産省. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_siryuu_10.pdf [Accessed May 2, 2011].

- 5 松井正春, 齊藤修. 2003. III 農業環境技術研究所における Bt トウモロコシ緊急調査. 4. Bt 組換えトウモロコシ花粉中の Bt トキシンの検出 2. 生物検定による検出. Pages 55-62 in 農業環境研究叢書 第 14 号 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価. 独. 農業環境技術研究所 (ed.). 独立行政法人 農業環境技術研究所, つくば.
- 10 丸山寛治. 1981. トウモロコシの品種生態. I 品種の基本特性. Pages 83-89 in 畑作全書. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

緊急措置計画書

平成23年11月22日

- 5 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
- 10 第一種使用規程の承認を申請している乾燥耐性、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤
グリホサート耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, 改変 *cp4*
epsps, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87460 × MON89034 × NK603, OECD
UI: MON-87460-4 × MON-89034-3 × MON-00603-6) (以下、「本スタック系統トウモ
15 せからなるスタック系統トウモロコシ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。

20

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

平成23年11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 油糧作物担当課長
	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

5 *: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

10 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のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

15 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

20 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及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統の組合せからなる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

5 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及び後代分離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及び本スタック系統トウモロコシの親系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統トウモロコシが、環境中で生存しないように不活化する。

10

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

15 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、直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別添資料リスト

- 5 別添資料 1 乾燥耐性トウモロコシ(改変 *cspB*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MON87460, OECD UI: MON-87460-4) の隔離ほ場における生物多様性影
響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 10 別添資料 2 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Drought Tolerant Corn
MON87460 Under Growth Chamber Conditions in 2008 (MSL0021509) (社外
秘)
- 15 別添資料 3 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: MON89034-3)の隔離ほ
場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 20 別添資料 4 除草剤グリホサートの影響を受けない組換えトウモロコシ NK603
系統の模擬的環境利用における環境安全性評価 (社外秘)