資料２－２

除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（OECD UI：ACS-ZMØØ3-2）
生物多様性影響評価書の概要

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

１　宿主または宿主の属する分類学上の種に関する情報

（１）分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ　和名、英名及び学名

イネ科トウモロコシ属トウモロコシ
英名：Maize、Corn
学名：*Zea mays* subsp.*mays* (L.) Iltis

ロ　宿主の品種

宿主の品種は、デント種(var. *indentata*)に属する組織培養由来系統 He/89 である。

ハ　国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの起原はいまなお不明確な点が多く、今までいろいろな説が提起されているが、「テオシントを人間が選抜して栽培植物化したものである」というテオシント起原説が現在では最も広く受け入れられている。

現在のトウモロコシは長い間栽培作物化されているため、人が介在することなしには繁殖することはできず、雑草としては生存できない。トウモロコシの近縁植物として、テオシント（*Zea mays* subsp.*mexicana*）とトリプサクム属（*Tripsacum*,2n=36）があり、テオシントはメキシコとグァテマラの渓谷及びメキシコ高地に自然分布しているが、米国のコーンベルト地帯、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア及びアジアには自生していない。トリプサクム属は多年生植物で、16 種あるトリプサクム属のうち、*Tripsacum floridanum* はフロリダ南端に、*Tripsacum australe* と他の 2 種は南米に、そして、それ以外の 12 種はテオシントの自生地域と同じメキシコとグァテマラに分布している。

メキシコには 40 種以上のトウモロコシの在来の栽培種があり南北アメリカには大体250 種の在来の栽培種がある。

なお、我が国における自然分布の報告はない。

（２）使用等の歴史及び現状

イ　国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシに関連する遺物が大量に出土した遺跡の代表としてメキシコのテワカン渓谷がある。最初にトウモロコシが出現したのは紀元前 6800～5000 年頃であり、原始的なトウモロコシの穂が出土してくる。紀元前 5000 年～3000 年の頃には本格的な農耕がはじまったと考えられており、穂は原始的であるが大きくなっている。紀元前 1500 年～200 年の間になると、穂は非常に大きくなって、現在のような多条列の立派な栽培型になった。南北アメリカ大陸へはメキシコ、メソアメリカの地から各地に伝播していった。また、その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート、フリント種などの多数の変異種が生じたと考えられている。コロンブスの新大陸発見により、スペインを通してヨーロッパに導入され、世界に広まっていった。

日本へのトウモロコシの伝播は、天正年間（1579 年）にポルトガル人によって、長崎あるいは四国にフリント種が導入されたのが最初であるとされている。さらに明治時代にデント種とフリント種が米国から北海道に入り、日本中に伝播した。以後、主として九州の阿蘇山麓、東海の富士山麓、長野、北関東地方で栽培されてきた。

古くからの用途は子実の飼料としての利用、生食用、山間地における準主食としての利用等があげられる。しかし日本ではイネ、コムギ、アワ、ソバ等の穀物が豊かに実り、しかもトウモロコシの栽培には適さない高湿度の気候であったので、食用穀物としては結局定着しなかった。

また、子実用及び飼料用トウモロコシの栽培面積は第２次世界大戦後急速に減少し、現在では大部分を輸入に依存している。一方、青刈りのサイレージ用トウモロコシは畜産の急速な増加にともない増加を続け、現在では何とか自給している。

また、昭和 23 年頃からトウモロコシを原料とする澱粉工業がおこり急速な成長をとげたのをはじめ、繊維工業、製造工業、食品工業等の加工用途に広く使用されるようになった。

ロ　主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシは小麦、イネと並ぶ三大穀物の一つであり、米国、メキシコ、アルゼンチン、ブラジル、ヨーロッパ、インド、中国、南アフリカなどの広範な地域で栽培されて

いる。2002 年における全世界での生産量は 6 億 259 万 t で、その生産高の上位 5 ヶ国は、米国（2 億 2881 万 t）、中国（1 億 2318 万 t）、ブラジル（3548 万 t）、メキシコ（1750 万 t）、そしてフランス（1601 万 t）である。

現在、米国は世界第一位のトウモロコシ生産国であり、インディアナ、オハイオ、イリノイ、アイオワ及びミズーリ州のコーンベルトと呼ばれる地域を中心に栽培されている。

先進国では一般的に雨量が豊富で肥沃な土壌地帯で栽培される。大量の技術投入が集中的に行われ、商業生産者が大規模な機械栽培をしている。

一方、開発途上国の状況は様々で、ラテンアメリカの大半の国では小規模単位で栽培されており、メキシコでは半数以上の生産者は技術投入や改良品種も使用していない。しかし、ブラジル、アルゼンチン及びチリでは商業生産者が技術投入して大規模栽培をしている点で先進国に似ているところがある。アジアでは、中国が生産の中心であり、収量は米国に次いで第 2 位だが、一軒あたりの農地は狭く、改良品種の使用や技術投入も少ない。

日本においては、東北地方、長野では早くから機械化が進み、北海道では戦前は西欧式の畜力プラウ農法であったが戦後すぐに機械化されている。

日本においては食用としてスイートコーンが 2002 年概算で 28 万 t、飼料用の青刈トウモロコシは 487 万 t が収穫されている。また、日本は 2002 年に、トウモロコシを 1640 万 t 輸入し、その内、飼料用は 1232 万 t であった。主な輸入先は米国、ブラジル、中国、アルゼンチンの順である。

先進国では、トウモロコシを主に飼料及び産業用製品の原料として利用しており、米国や EU の育種家は、飼料産業向けの農業形質と高果糖コーンシロップ、燃料用アルコール、スターチ、グルコース、デキストロース生産などの産業的遺伝形質に目標を置いている。

ラテンアメリカの大半の国及びアフリカのサハラ以南では主食であり、アジアでは一般的に家畜の飼料に利用されている。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ　基本的特性

―

ロ　生息または生育可能な環境の条件

一般に、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る。種子は低温・多湿条件下では、発芽遅延をおこして、多くの場合、発芽する前に腐敗、枯死する。また、成長点が地上に出てから（5～７葉齢）6～8 時間以上、0℃以下の外気にさらされると生存できない。

発芽には 10℃以上の温度と適度な水分が必要であるが、トウモロコシはかなり乾燥した条件下でも発芽する。カリフォルニアの乾燥地においてスイート種を用いて行った試験では、土壌の萎凋点（砂土 8.6%、粘土 14.9%）よりわずかに土壌水分が多ければ 80%以上が発芽することを示した。

ハ　捕食性または寄生性

―

ニ　生殖または増殖の様式

①　種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

1 本の大きな穂にトウモロコシ粒がぎっしり詰まって穂軸にしっかりとついており、脱粒性は極めて低いと考えられる。しかもトウモロコシ粒は苞葉に包まれた穂の状態では発芽が可能な条件下で地上に落下しても、多くの場合、発芽する前に腐敗してしまう。たとえ発芽しても、穂全体の数百という多数のトウモロコシ粒から発芽することになるので、競合が激しくなり、結実に至るまで生育することは不可能である。

種子の休眠性は極めて浅く、土壌温度が 10℃に達すると発芽する。

子実の寿命は呼吸による酵素活性に影響され、呼吸速度は主として温度と湿度に関係する。相対湿度が 55%以下では呼吸は少ないが、65%を超えると呼吸量が急増し、子実の活力が急減する。子実水分 12%、温度 10℃、相対湿度 55%以内に保たれた条件下では、6～8 年保存することが可能である。

②　栄養繁殖の様式及び自然条件における出芽特性

自然条件下において植物体を再生しうる組織は種子だけである。

③　自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁種との交雑性

トウモロコシは本来 100%他家受精の作物種である。また、自家不和合性は持たない。

交雑可能な近縁種としてテオシント属とトリプサクム属があげられる。トウモロコシと一年生テオシントとは生殖的適合性が大きく、稔性の雑種を生み出している。しかし、テオシントの自生地域は限られており、地理的分離、開花時期、成長特性、生殖器構造などの因子からみても、自然交雑性は低いと考えられる。また、一部のトウモロコシとテオシントとの間には不和合性があり、雑種形成が困難である。

さらに、トリプサクム属の種（*T.dactyloides, T.floridanum, T.lanceolatum, T.pilosum*）はトウモロコシと非常に稀に交雑できるが、雑種は生殖不能になる確率が高く、遺伝学的にも不安定である。また、トリプサクム属とトウモロコシの染色体数が異なることから、交雑率が極めて低下するとの報告がある。

④　花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの雄穂で作られる花粉の量は、1800 万花粉粒と推測される。成熟した花粉は直径 90～120μ、平均 100μである。花粉は風で運ばれ、花粉源から 200m離れた地点では交雑率は 0.003%となり、交雑の可能性は非常に低くなる。花粉の寿命は環境によって大きく異なるが、盛夏のほ場条件下では 24 時間以内に生殖能力を失う。

ホ　病原性

―

ヘ　有害物質の生産性

トウモロコシにおいて、他の野生動植物等の生育または生息に影響を及ぼす有害物質の生産は報告されていない。

ト　その他の情報

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

2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

（1）　供与核酸に関する情報

イ　構成及び構成要素の由来

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）（以下「組換え体トウモロコシ T25」とする。）の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、表 1 を参照。

表１　ベクターpUC/Ac 中の供与核酸の構成要素の位置、サイズ、及び機能

構成要素(略号)	ﾍﾞｸﾀｰ中の位置	ｻｲｽﾞ(Kbp)	由来及び機能
pat カセット			
P-35S	1746～1217	0.52	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。
Pat	1188～637	0.53	*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。
T-35S	618～412	0.20	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。
その他			
Bla	3783～2923	0.86	*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。
oli-pUC	2164～2714	0.55	pUC18の複製起点（ColE1）。プラスミドの複製を開始させる。

Streptomyces viridochromogenes から得た天然の *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、導入された合成 *pat* 遺伝子は天然の *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、この改変により生産する酵素のアミノ酸配列は変化していない。

ロ　構成要素の機能

①　供与核酸の構成要素それぞれの機能

組換え体トウモロコシ 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

（p.6）を参照。

② 目的遺伝子及び選択マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及びアレルギー性の有無

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。

導入された合成 *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。（図 1、p.8）

合成 *pat* 遺伝子が産生する PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示すことが確認されている。また、PAT 蛋白質を過剰の各種アミノ酸の存在下においても、他の各種アミノ酸に対してアセチル基転移反応を起こすことはなく、グルホシネートに対してのみ特異的に反応した。このことから、PAT 蛋白質が高い基質特異性を有することが示唆された。

さらに、合成 *pat* 遺伝子配列を EMBL データベース（European Molecular Biology Laboratory, Germany, Rlease 40.0 1994 年 9 月）に公表されている全てのヌクレオチドの配列と比較した。また、PAT 蛋白質配列について、SWISSPROT データベース（Geneva, Switzerland, Release 30.0　1994 年 9 月）により相同性検索を行った。その結果、いずれにおいても種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示しておらず、既知の毒素又はアレルゲンとの相同性も認められなかった。

また、PAT 蛋白質の物理化学的、生化学的特性を既知のアレルゲンと比較した結果、本蛋白がアレルギー誘発性を有する可能性はきわめて低いと考えられた。

bla 遺伝子はアンピシリン耐性を付与する遺伝子で、大腸菌を用いてプラスミドを構築する際に選択マーカーとして用いたもので、この遺伝子は植物で機能するプロモーターを持たないため、植物では発現しない。なお、*bla* 遺伝子はトウモロコシゲノムに挿入される際に分断されたため、組換え体に機能を有することはないことが確認されている。

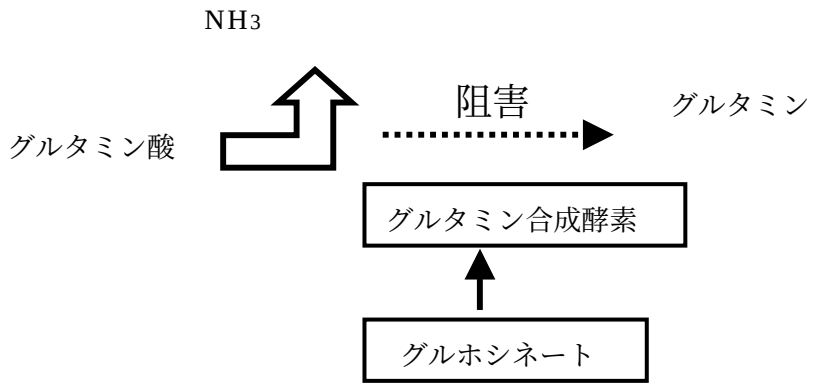
③ 宿主の持つ代謝系への影響

PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しているので、グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考えられない。よって、宿主のもつ代謝経路へ影響はないと考

えられる。

a)　通常の植物

除草剤グルホシネートによってグルタミン合成酵素が阻害されるためにアンモニアが蓄積し植物は枯死する。



b）　組換え体植物

PAT蛋白質により除草剤グルホシネートがアセチル化されN-アセチルグルホシネートになることによってグルタミン合成酵素は阻害されないようになり、アンモニアが蓄積されず植物は成長を続けることができる。

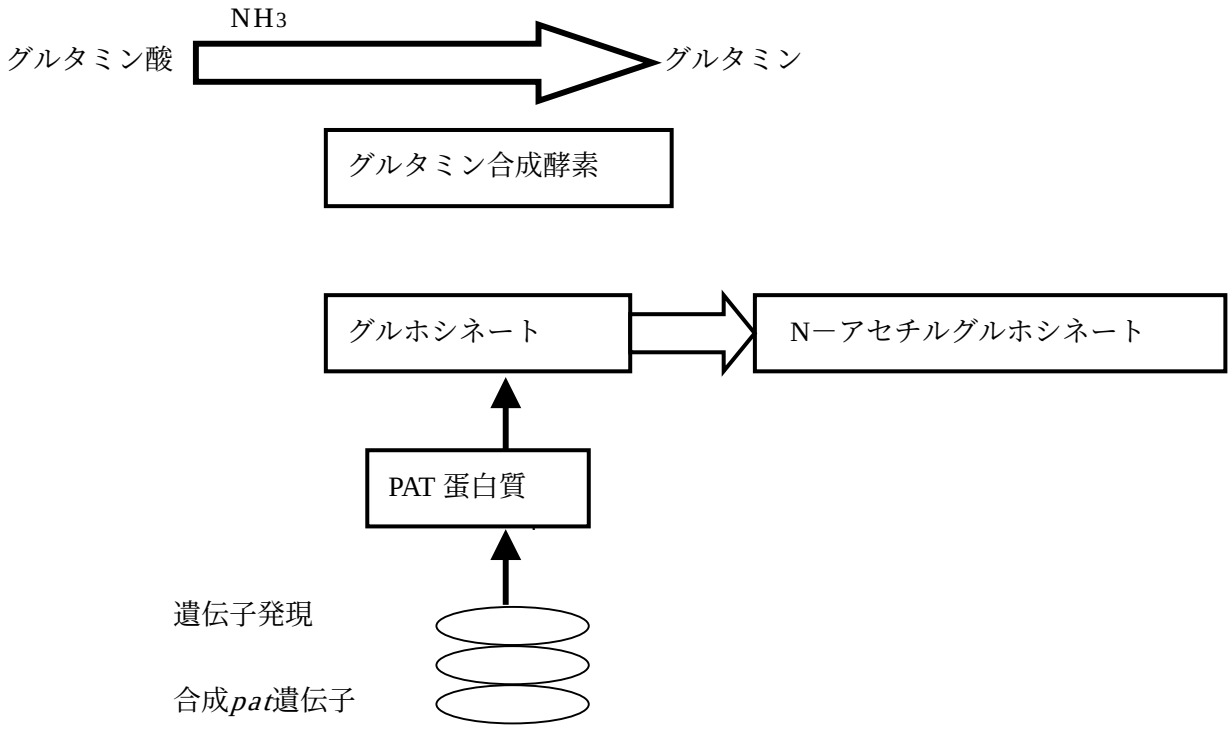


図１　合成 *pat* 遺伝子産物よる除草剤グルホシネート耐性のメカニズム

（2） ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

組換え体トウモロコシ T25 の作出に用いられたベクターは、大腸菌 *Escherichia coli* K12 株由来の pUC18 から作成された pDH51 の 35S プロモーターとターミネーターの間の SalⅠ切断位置に合成 *pat* 遺伝子を挿入したプラスミド pUC/Ac である。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pUC/Ac のプラスミド地図を示した（図 2）。

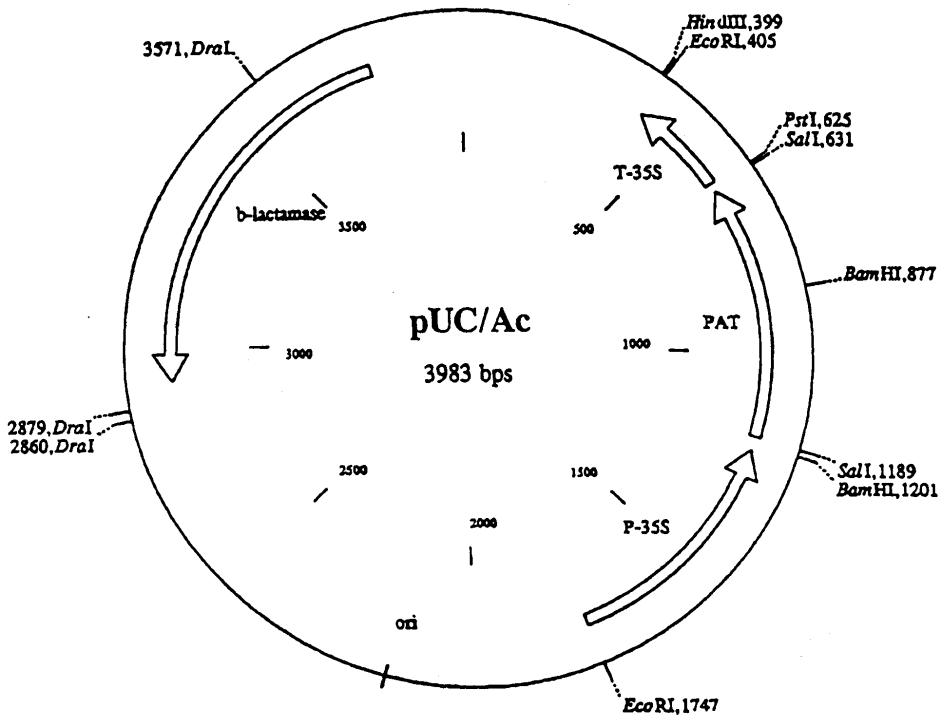


図 2 組換え体トウモロコシ T25 の形質転換に用いたベクターpUC/Ac

② 特定の機能を有する塩基配列の有無及びその機能

プラスミド 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

プラスミド pUC/Ac は伝達性をもたないため、感染性はない。また、ベクターpUC18は、自立増殖可能な宿主域が大腸菌と数種のグラム陰性菌に限られていることが知られている。

（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

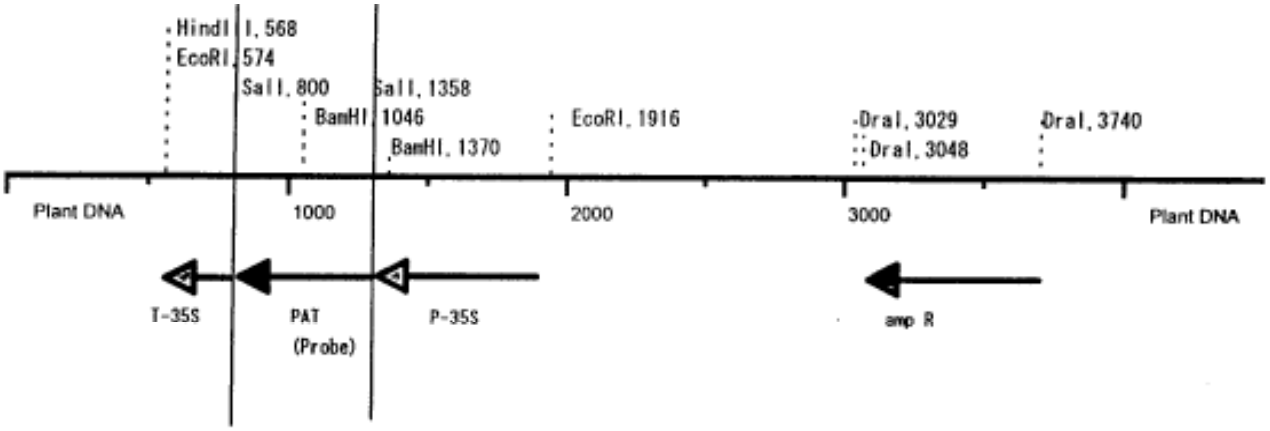


図 3 挿入遺伝子構成図

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

組織培養由来系統 He/89 のプロトプラストを使い、ポリエチレングリコール法により遺伝子の導入を行った。

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方法

形質転換後、20～50 個のプロトプラストからなる微小コロニーの形成後、固形培地に移し、除草剤グルホシネートによって選抜後、植物体に再分化させた。

②　アグロバクテリウム菌体の残存の有無

本項目は該当しない。

③　育成の経過及び系統樹

組換え体トウモロコシ T25 と黄色デントコーン系の商用品種及び弊社保有の品種と交配、選抜育種を行った。

（４）　細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ　移入された核酸の複製物が存在する場所

組換え体トウモロコシ T25 を戻し交配すると、グルホシネート耐性に関して 1:1 の分離比を示した。また、ゲノム DNA を用いたサザンブロット分析の結果、移入された核酸の複製物は染色体上に挿入されていることが示唆された（「ロ　移入された核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性」を参照)。

ロ　移入された核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性

移入された核酸のコピー数を調べるため、サザンブロット分析を行った。組換え体トウモロコシ T25 から分離した 15μg の DNA を BamHⅠ（レーン１)、EcoRⅠ（レーン２)、DraⅠ（レーン３)、HindⅢ（レーン４）及び SalⅠ（レーン５）で切断した。サイズマーカーとして PstⅠで切断したバクテリオファージλDNA を使用し、プローブとして ^{32}P で標識した合成 *pat* 遺伝子（552bp の SalⅠ断片）を使用した（図 4)。

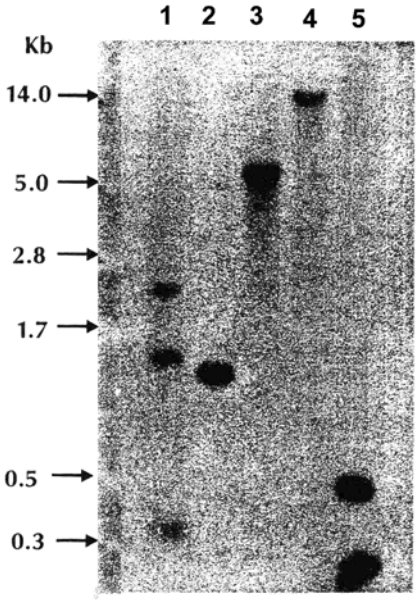


図 4　組換え体トウモロコシ T25 のコピー数を示すサザンブロット分析

BamHⅠ（レーン１）では 0.3kbp 及び 1.5kbp の２本のバンドが検出された。この 0.3kbp バンドはプラスミド pUC/Ac の内部より切り出されたフラグメントである。1.5kpb バンドは、組み込まれたベクター部分の切断から隣接植物 DNA 中の BamHⅠによる切断部位に由来する。この１本の 1.5kbp バンドは合成 *pat* 遺伝子カセットが植物ゲノムに１コピー組み込まれていることを裏付ける証拠である。2.5kbp にもバンドが見られるが、このバンドは BamHⅠによる不完全な切断に由来する。

EcoRⅠ（レーン２）では、予想された 1.3kbp のフラグメントが検出され、これはベクターpUC/Ac の合成 *pat* 遺伝子のカセット（35S プロモーター・*pat*・35S ターミネーター）が導入されていることを示している。

DraⅠ（レーン３） における約 5kb の１本のバンドはベクター及び隣接植物 DNA の各１ヵ所の DraⅠ部位の切断に由来する。

HindⅢ（レーン４）における約 14kb の１本のバンドはベクター及び隣接植物 DNA の各１ヵ所の HindⅢ部位の切断に由来する。

SalⅠ（レーン 5）では 0.5kbp のベクター内部のフラグメントだけが検出された。

合成 *pat* 遺伝子の内部に切断サイトのない SalI、EcoRI、DraⅠ及び HindⅢによる切断物中にバンドが 1 本だけが検出されたこと、また BamHI 切断物からは予想されるバンドが検出されることは、１コピーの pUC/Ac が植物ゲノムに組み込まれていることを裏づける証拠である。これらの結果から推定される挿入遺伝子の模式図を図 3(p.10)に示した。

挿入された核酸の数世代での安定性を確認するため、組換え体トウモロコシ T25 との戻し交配から得られた 3 世代後のトウモロコシについて、サザンブロット分析を行った。この分析では、ゲノムを EcoR Ⅰまたは BamH Ⅰで切断し、アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンメンブランに移した後に、DNA を ^{32}P 標識合成 *pat* 遺伝子（552bp Sal Ⅰフラグメント）とハイブリダイズさせた。ブロットのオートラジオグラフィーを図 5（p.14）に示す。図 5 は、そのハイブリダイズのパターンが世代を経ても変化していないことを示しており、挿入された核酸の数世代での安定性が証明された。

また、*bla* 遺伝子はトウモロコシゲノムに挿入される際に 2 つに分断され、一部消失しており、*bla* 遺伝子断片の 5 ’ 末端に 35S プロモーター様配列が位置している。しかし、分断された *bla* 遺伝子及び 35S プロモーター様配列はいずれも不完全なものであり、これらの配列によって移入された植物体において *bla* 遺伝子を発現することは考えられない。このことを確認するため、組換え体トウモロコシ T25 より抽出した RNA について *bla* 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析を行い、*bla* 遺伝子の転写物が含まれていないことを確認した。さらに、活性のある蛋白に転写・翻訳されていないことを確認するため、組換え体トウモロコシ T25 のβ-ラクタマーゼ活性測定を実施した結果、β-ラクタマーゼ活性は検出限界以下であった。これらのことから、組換え体トウモロコシ T25 に移入された不完全な *bla* 遺伝子及び 35S プロモーター様配列は機能していないことが確認された。

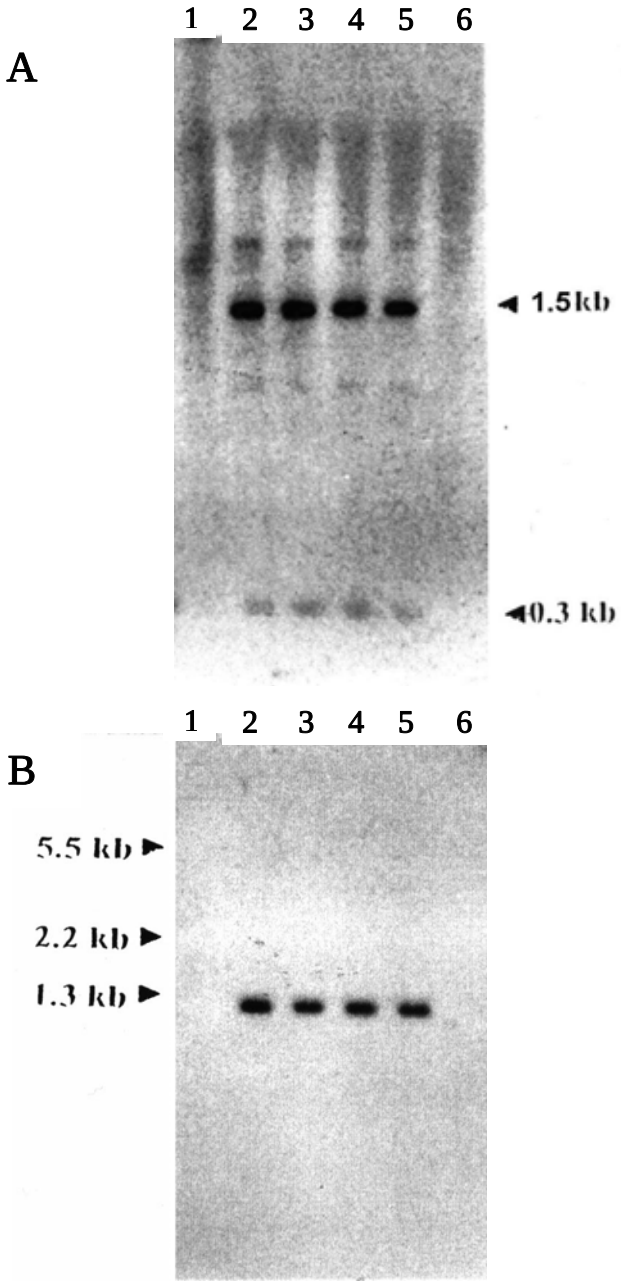


図 5　組換え体トウモロコシ T25 の安定性を示すサザンブロット分析

A は BamHⅠにて切断

B は EcoRⅠにて切断

レーン１：非組換え体トウモロコシ He/89（宿主品種）

レーン２：組換え体トウモロコシ T25（T_0 世代）

レーン 3～5：T_0 世代の組換え体トウモロコシに３回戻し交配を行い得られた各個体

レーン 6：非組換え商用品種

ハ　染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらの位置関係

本項目は該当しない。

ニ　移入された核酸の複製物の発現により付与された特性についての発現の安定性

隔離ほ場試験において、バットに播種したトウモロコシからの幼植物にグルホシネートを処理した結果、組換え体は全て生存し、非組換え体は全て枯死した。さらに、18 個体の組換え体トウモロコシ T25 にグルホシネートを散布して観察した結果、100%のグルホシネート耐性を示し、自然条件下での発現の安定性が確認された。

また、1992 年以降に米国で行われた安全性試験において、組換え体トウモロコシ T25 の根、葉、茎、成熟花粉及び成熟種子を用い、各部位における PAT 蛋白質の酵素活性を測定した。その結果、PAT 蛋白質活性は葉で最も高く、種子中では低く、花粉では検出されなかった。

ホ　移入された核酸の野生動植物に対する伝達性の有無及び程度

形質転換に使用したベクター上には伝達性に関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ならびにそれらの感度及び信頼性

組換え体トウモロコシ T25 に導入されている挿入 DNA の周辺配列を利用した 22bp のプライマーを用いた PCR 法によって、組換え体トウモロコシ T25 を特異的に識別することができる。20～50ng の DNA を用いることで、ほぼ 100%を検出できたことから、組換え体トウモロコシ T25 の種子や植物体が極少量あれば検出及び識別は可能である。また、反復試験において高い再現性の結果が得られている。

実際の組換え体トウモロコシ T25 の育種において、本 PCR 法は有効に利用されている。

（6）　宿主または宿主の属する分類学上の種との相違

イ　移入された核酸の発現により付与された特性

組換え体トウモロコシ T25 は、移入された合成 *pat* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネート耐性を示す。PAT 蛋白質による除草剤耐性メカニズム

は図１（p.8）に示した。

ロ　宿主または宿主の属する分類学上の種との相違

農林水産分野における組換え体利用のための指針適合確認を終え、平成 15 年度に独立行政法人 農業技術研究機構 畜産草地研究所 草地研究センターで隔離ほ場試験を行った。

①　形態及び生育の特性

発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草型、分げつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、粒色、百粒重、粒形、および収穫期の生重量において、組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとで比較した。その結果、いずれにおいても有意差は認められなかった。

②　生育初期における低温耐性

組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとの間で低温耐性の比較を行った。両幼植物を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数日で全てが枯死し、両者の間に相違は見られなかった。

③　成体の越冬性

トウモロコシは１年生植物であり、結実後、隔離ほ場にそのまま放置した組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシは共に冬季の寒さで自然に枯死した。

④　花粉の稔性及びサイズ

花粉の形状に関して顕微鏡下で観察した。また、花粉をアセトカーミンで染色し、顕微鏡下で花粉の充実度を観察して稔性を検討した。花粉の直径および花粉の稔性において、組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシはほぼ同等の数値を示し、両者の間に有意差は観察されなかった。

⑤　種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の粒列数、一列粒数及び百粒重について組換え体トウモロコシ T25 と非組換

え体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。

トウモロコシの種子は苞葉に包まれ、また、穂軸にしっかりと付いており、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。

収穫種子の発芽性試験において、組換え体トウモロコシ T25 及び非組換え体トウモロコシの発芽性は直ちに発芽を開始し、また、いずれもほぼ 100%の発芽性を示したことから、休眠性がないことが推測された。

⑥　交雑性

日本において交雑可能な近縁野生種は生育していない。したがって、交雑性の試験は行っていない。

⑦　有害物質の産生性

組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとの間で、有害物質の産生性について、根から分泌され他の生物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては植物残滓を用いた鋤き込み試験、また、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものについては根圏土壌における土壌微生物相試験を行った。後作試験及び鋤き込み試験において、供試作物として用いたダイコンの葉の長さ、生重量、乾重量をそれぞれ測定した結果、いずれにおいても有意差は認められなかった。また、土壌微生物相への影響試験において、細菌数、放線菌数および糸状菌数について、両者の間で有意差は認められなかった。

3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

（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）　第一種使用等の開始後における情報収集の方法

―

（4）　生物多様性影響を防止するための処置

緊急措置計画書を参照。

（5）　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

1997 年に北海道農業試験場において、隔離ほ場試験を行った。また、2003 年度に独立行政法人　農業技術研究機構　畜産草地研究所　草地研究センターの隔離ほ場において、隔離ほ場試験を行った。

（6）　国外における使用等に関する情報

国外における使用等に関する情報を表２（p.19）に示した。

表２　国外における使用等に関する情報

国名	承認機関	承認時期	承認内容
米国	米国農務省（USDA）	1995 年 6 月	環境安全確認
	連邦食品医薬品局（FDA）	1995 年 12 月	食品・飼料安全
カナダ	カナダ農業食品局	1996 年 5 月	環境安全確認
		1997 年 3 月	飼料安全
	カナダ厚生省	1997 年 4 月	食品安全
EU	ヨーロッパ委員会 環境保護総局	1998 年 8 月	輸入承認
		1998 年 7 月	栽培承認
	英国	1997 年 2 月	飼料安全（コーングルテンの輸入のみ）
		2004 年 3 月	栽培承認
	ヨーロッパ委員会 保健消費者保護総局	1998 年 1 月	食品安全（油、デンプン、加熱加工食品、ドライミリング画分を用いた発酵食品のみ）
スイス	スイス連邦保健局	1998 年 10 月	輸入飼料安全（コーングルテンのみ）
ブルガリア	農業省	1999 年 7 月	食品・飼料・栽培安全
アルゼンチン	農牧バイオテクノロジー諮問国家委員会	1998 年 2 月	環境安全（規制外確認）
	国立食料農業 品質安全サービス	1998 年 6 月	食品･飼料安全

第二　項目ごとの生物多様性影響評価

宿主が属する分類学上の種のトウモロコシ（*Zea mays* subsp.*mays* (L.) Iltis）は、我が国において長期にわたる使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、宿主と相違が見られた点について考慮することとする。

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

競合における優位性に関る形質として、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、種子の生産性及び発芽率について組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとを比較した結果、いずれにおいても特に相違は認められなかった。

組換え体トウモロコシ T25 は除草剤グルホシネート耐性の形質を有するため、本除草剤が頻繁に散布されている環境下においては生存における優位性を示す。しかし、自然環境下では前述のような除草剤の使用はないので、この形質により競合における優位性を高めるとは考えられない。

したがって、競合における優位性について、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の判断

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響が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

組換え体トウモロコシ T25 は合成 *pat* 遺伝子産物である PAT（phosphinothricin acetyltransferase）蛋白質を新たに生産するが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しているので、基質である L-グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考えられない。したがって、PAT 蛋白質がトウモロコシの代謝経路に影響して野生動植物等に対する有害物質を生産する可能性はないと思われる。

また、合成 *pat* 遺伝子配列について EMBL データベースで、さらに、PAT 蛋白質配列については SWISSPROT データベースでそれぞれ相同性検索を行った。その結果、いずれにおいても種々の種由来の PAT 蛋白質以外に有意な相同性は示しておらず、既知の毒素又はアレルゲンとの相同性も認められなかった。よって、PAT 蛋白質が有害物質として野生動植物等に影響を及ぼすとは考えられない。

さらに、有害物質の産生性に関する試験として行った後作試験、及び作物残滓鋤き込み試験において、ダイコンの葉の長さ、生重量、乾重量に組換え体と非組換え体の間で有意差は認められなかった。また、土壌微生物相への影響試験においても、細菌数、放線菌数、糸状菌数に組換え体と非組換え体の間で有意差は認められなかった。

したがって、組換え体トウモロコシ T25 は有害物質の産生性を獲得していないと考えられ、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の判断

以上のことから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が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

宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種としてテオシントが報告されているが日本には自生していない。

また、隔離ほ場試験において、組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとの花粉の稔性に関する花粉の形状、直径、充実度及び種子の発芽率を比較した結果、すべての形質において両者の間に統計的な有意差は認められなかったことから、交雑性に関して組換え体トウモロコシ T25 と非組換え体トウモロコシとは同等であると考えられる。

以上のことから、交雑性について、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の判断

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4　その他

上記のほかに、生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる組換え体トウモロコシ T25 の性質はないと判断される。

第三　生物多様性影響の総合的評価

トウモロコシはわが国において長期にわたる使用実績があり、これまでに自然環境下で自生した例は報告されていない。また、交雑可能な近縁植物は、わが国には自生していない。

組換え体トウモロコシ T25 は、除草剤グルホシネート耐性を示すが、それ以外の形質は非組換え体と同等であると考えられる。したがって、除草剤グルホシネートが選択圧とならない自然環境下では、競合における優位性に起因して、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

組換え体トウモロコシ T25 に導入された合成 *pat* 遺伝子から産生される PAT 蛋白質は高い基質特異性を有するため、トウモロコシの代謝経路に影響して野生動植物等に対する有害物質を産生する可能性はないと思われる。また、本蛋白質は既知の毒素及びアレルゲンとの相同性も示していない。さらに、後作、鋤き込み、土壌微生物相への影響についても非組換え体トウモロコシと同等であると考えられる。したがって、有害物質の産生性に起因して、生物多様影響が生ずるおそれはないと判断された。

また、日本においてトウモロコシと交雑性のある近縁野生植物はなく、さらに、組換え体トウモロコシ T25 の花粉の稔性が非組換え体トウモロコシと同等であることから、交雑性に起因して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

以上のことから総合的に評価し、組換え体トウモロコシ T25 が、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。