

耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ (*amy797E*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(3272, OECD UI: SYN-E3272-5) の生物多様性影響評価書の概要

第1 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) 分類学上の位置付及び自然環境における分布状況

イ、和名、英名及び学名

和名：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、宿主の品種又は系統名

デント種 (var. *indentata*) に属する黄色デント種である。

ハ、国内及び国外の自然環境における自生地域

現在、トウモロコシの原産地についての決定的な説はないが、一般的には紀元前5000年頃のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられている。その耕種作物的起源について、育種過程でテオシント (*Zea mays* subsp. *mexicana*) から派生したとする説が有力とされている。メキシコのテワカン溪谷を中心に中央アメリカ、ペルー、ボリビアには近縁野生種テオシントが自生しているが、わが国の自然環境下で近縁野生種が自生しているという報告はない。

(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いる。紀元前 5000 年～3000 年頃には本格的な農耕が始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 年頃には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、メソアメリカから各地に伝播した。その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート、フリント種等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、世界に広まった。現在、トウモロコシを主食としている地域は、南米とアジアの一部にみられるだけで、その他の地域では主食とされていない。トウモロコシの 90% 以上は、飼料として使用されている。

日本へは天正 7 年 (1579 年) にポルトガル人によって長崎か、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て以来、長年にわたり栽培、使用されている。わが国ではトウモロコシの子実の大部分は飼料として、残りは食品として食用油、澱粉等に使用されている。

ロ、主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

現在、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培され、主な生産国は、米国、中国、メキシコ、ブラジル、アルゼンチン、フランス、ルーマニア、ロシア等で、栽培方法は栽培規模、地域によって異なっている。米国を初めとする多くの国では生産コストを引き下げるため、大型機械を使用して大規模栽培を行っている。2003 年の全世界での生産量は 6 億 99 万トンで、その上位 5 カ国は米国 (2 億 2,777 万トン)、中国 (1 億 2,130 万トン)、ブラジル (4,450 万トン)、メキシコ (1,928 万トン)、そしてフランス (1,644 万トン) である。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、大規模な機械栽培をしている。一方、ブラジル、アルゼンチン、チリを除く大半の開発途上国では、小規模単位で栽培されている。アジアでは中国が生産の中心で、今後、品種改良等の技術導入が期待されている。

日本においては、東北地方や長野では早くから機械化栽培されており、北海道では戦後すぐに機械化されている。現在、わが国でのトウモロコシの栽培は、青刈りのサイレージ用トウモロコシ (デント種) として 9 万 ha、未成熟トウモロコシ (スイート種) として 2 万 8 千 ha で、トウモロコシの種子の生産はほとんど行われていない。

2004年、日本にはトウモロコシの穀粒として約1,680万トン輸入されると予測されている。その主な輸入先は米国、ブラジル、中国、アルゼンチンである。全体の輸入量のうち1,230万トンは飼料用である。残りの450万トンは、スターチやグリッツとして食用や工業用原料等として多岐にわたる用途に使用されている。

一方、日本への輸出量が多く、世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がイリノイ、インディアナ、アイオワ、カンザス、ミシガン、ミネソタ、ミズーリ、ネブラスカ、オハイオ、サウスダコタ及びウィスコンシン州のコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。栽培されたトウモロコシの用途は、57%が飼料用、19%が輸出用、11%が燃料用エタノール生産用である。なお、米国では環境保護と石油使用量削減の観点からエタノール混合ガソリン(ガスホール)が広く流通しており、2004年5月時点での燃料用エタノールの年間生産容量は12.59百万キロリットルとなっている。エタノール製造のための植物原料としては、トウモロコシ、米、ソルガム、大麦、小麦、馬鈴薯等が利用可能であるが、米国ではトウモロコシが他の作物に比べて澱粉源として安価であることから最も使用されている。

(3)生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

—

ロ、生息又は生息可能な環境の条件

トウモロコシの種子の発芽適温は32~36°Cで、最低発芽温度及び最低生育温度は6~10°Cである。トウモロコシは、温暖な気温と適度な降水量のある場所での栽培に適しており、発芽から生育に適した温度はおよそ10°C~30°Cである。

トウモロコシは、生育期には十分な降雨を必要とする作物である。米国のコーンベルト地帯では、生育期には月間100mm以上の降雨が望ましいとされている。

トウモロコシは、熱帯サバンナ気候地帯が原産地とされているが、過度の高温と低水分の地帯はトウモロコシの栽培には適さない。すなわち、土壌が水を吸収しやすい状態であることが重要であり、有機質を含み、十分湿っていて、空気が十分に含まれ

て、トウモロコシの根が良好に接触できるように十分に細かくなっている状態が望ましい。

ハ、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、自然の脱粒性はない。

種子は雌穂の苞皮で覆われており、自然条件下では広範囲に種子が散布されることはない。

種子の休眠性は極めて低く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する。

②栄養繁殖の様式

トウモロコシは種子繁殖性で、夏作一年生植物である。トウモロコシは種子以外に植物体を再生しうる組織または器官はない。

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

トウモロコシは他殖率 95%程度であるが、自家和合性のため、自家受粉も行う。トウモロコシは近縁野生種のテオシントと交雑することが報告されているが、わが国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は存在しない。

④花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、稈の頂部に雄穂を 1 本、中央側部に雌穂を 1~3 本着生する。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。

トウモロコシの花粉の稔性は、花粉の充実度により観察され、ほとんど風媒による他殖性である。その受精能力によって、種子の生産量に影響がある。

花粉の形状は楕円～円形で、直径は約 100 μm である。

雄穂は出穂後 1～5 日すると開花し、開花開始後 2 日目～4 日目頃が開花盛期となる。1 品種全体の開花期は長くて 10 日前後である。雌穂は雄穂の出穂後に絹糸を抽出する。花粉は開葯後、風によって飛散し、大部分はほ場内に落下する。花粉の飛散距離は 300～500m である。

花粉の寿命は、一般に乾燥条件下では長いとされるが、地面への落下や降雨で不活性化され、盛夏のほ場条件下では 24 時間以内である。

二、有害物質の産生性

これまでのところ、トウモロコシによる、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産生性は知られていない。

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

耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ (*amy797E*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (3272, OECD UI: SYN-E3272-5) (以下、「本組換え体」という) の作出に用いた供与核酸及び構成要素の由来は、表 1 に示す通りである。

表 1 : 本組換え体作出のための供与核酸の構成及び構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
目的遺伝子 (<i>amy797E</i> 遺伝子) カセット		
<i>prGZein-01</i>	677	トウモロコシの 27kDa 種子貯蔵蛋白質 (γ -ゼイン) 遺伝子由来のプロモーター領域である。このプロモーターは、目的遺伝子 (<i>amy797E</i>) をトウモロコシ種子の胚乳組織で特異的に発現させる。
<i>amy797E</i>	1383	好熱古細菌 <i>Thermococcales</i> 由来の α -アミラーゼ遺伝子の N 末端及び C 末端にアミノ酸配列を付加したものである。N 末端には、トウモロコシの γ -ゼイン輸送シグナルペプチドであるアミノ酸配列を付加している。これは、目的蛋白質を小胞体内腔へ輸送するための配列である。C 末端には、小胞体保留シグナルであるアミノ酸配列を付加している。これらの付加配列により、発現した α -アミラーゼは胚乳細胞の小胞体に蓄積されると考えられる。なお、 <i>amy797E</i> は、当該細菌由来の α -アミラーゼ遺伝子のコード領域を、トウモロコシでの発現に適したコドンに改変したものである。
<i>iPEPC9-01</i>	108	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン #9 である。目的遺伝子の発現効果を高める。
<i>T35s-08</i>	70	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来のターミネーター配列である。機能はポリアデニル化配列の付加である。
選抜マーカー (<i>PMI</i> 遺伝子) カセット		
<i>prUbi1-10</i>	1993	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモーター領域で、最初のイントロンを含む。単子葉植物の細胞で構成的に発現する。
<i>cPMI-01</i>	1176	大腸菌由来の <i>PMI</i> をコードする遺伝子である。発現すると、マンノース-6-リン酸のフルクトース-6-リン酸への異性化反応を触媒する。本組換え体作出のための選抜マーカーとして導入した。
<i>tNOS-05-01</i>	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター領域である。機能はポリアデニル化配列の付加である。
その他の領域		

<i>cSpec-03</i>	789	大腸菌のトランスポゾンTn7由来のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 <i>aadA</i> である。この遺伝子は、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を与えるため、バクテリア選抜マーカーとして使用される。
<i>oVS1-02</i>	405	シュードモナスのプラスミド pVS1 由来で、複製起点共通配列である。 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> の複製開始点として機能する。
<i>oCOLE-06</i>	807	大腸菌由来の、バクテリア中でプラスミドの複製を開始させる複製起点である。
LB	25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ノパリン ti - プラスミド由来の T - DNA レフトボーダー領域である。
RB	25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ノパリン ti - プラスミド由来の T - DNA ライトボーダー領域である。
<i>cVirG-01</i>	726	アグロバクテリウム由来の、T - DNA の転移に関与する領域である。
<i>cRepA-01</i>	1074	シュードモナス由来の pVS1 複製蛋白質で、植物に寄生するグラム陰性菌中で pVS1 複製の一端を担う。

ロ、構成要素の機能

①目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカー、その他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換え体作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、表 1 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

α-アミラーゼ（Amy797E 蛋白質）

α-アミラーゼは、1,4-グルコシド結合の開裂を触媒し、澱粉をデキストリン、マルトース、グルコースに加水分解する酵素である。この酵素は、動物（唾液、膵液、血液、尿など）・植物（イネ、コムギ、ダイズなど）・微生物（細菌、放線菌、カビなど）等、自然界に元来広く分布する。トウモロコシ種子中にも含まれており、発芽の

際に急激に活性上昇することが知られている。発芽時、 α -アミラーゼによって胚乳中の澱粉の分解が起こり、生成された糖が、その後の胚の生長に使用される。

本組換え体は、トウモロコシを原料としたエタノール生産を目的として作出された。トウモロコシからエタノールを生産する場合、澱粉を糖に変換する際に α -アミラーゼを添加する。このプロセスでは、高温（100℃前後）かつ pH が約 4.5 以下になり通常の α -アミラーゼでは活性が低下するため、カルシウム添加（ α -アミラーゼの構造を保つためにカルシウムイオンが必要）と pH 調整（pH 6 前後）により反応条件を整える必要がある。本組換え体では、トウモロコシ種子中に好熱古細菌 *Thermococcales* 由来の耐熱性の高い α -アミラーゼ（Amy797E 蛋白質）を発現させているため、本組換え体トウモロコシ種子を通常のトウモロコシ種子に数%混合することによって、エタノール製造の際のカルシウム添加と pH 調整作業に必要なコストの削減が期待できる。また、耐熱性 α -アミラーゼの生産において、微生物の発酵による場合は、培養液から耐熱性 α -アミラーゼを抽出精製する必要があることから、トウモロコシで直接発現させる方がコストの面で利点がある。

Thermococcales 由来の α -アミラーゼについては、その安全性に関する報告もなされている。また、本組換え体種子の α -アミラーゼは澱粉の液化温度である 75℃～95℃でも高い活性があり、由来となった *Thermococcales* と同じく耐熱性が高いこと、エタノール生産プラントにおいて従来用いられてきた細菌由来の α -アミラーゼと同等以上の澱粉分解活性を有していることが、実験結果より示されている。

また、*amy797E* 遺伝子を制御するプロモーター *prGZein-01* は、トウモロコシ胚乳組織における特異的な遺伝子発現を制御する。さらに、N 末端及び C 末端の付加配列により、*amy797E* 遺伝子から発現した α -アミラーゼは、胚乳内細胞の小胞体内膜に蓄積すると考えられる。

アレルギー性に関しては、導入した耐熱性 α -アミラーゼ、すなわち Amy797E 蛋白質の 80 個のアミノ酸配列を、公開データベースに登録されている既知のアレルゲン蛋白質のアミノ酸配列情報と比較した結果、明らかな構造相同性は認められなかった。

ホスホマンノースイソメラーゼ（PMI 蛋白質）

本組換え体の育成過程では、選抜マーカーとして *PMI* 遺伝子を用いており、抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子を選抜マーカーとしては用いていない。

この遺伝子は *E. coli* 由来で、ホスホマンノースイソメラーゼ（PMI 蛋白質）をコ

ードする。PMI 蛋白質はマンノースをフラクトースに変換させる機能を有する。通常、トウモロコシを含むほとんどの植物はマンノースを摂取して成長エネルギーに変換することはできないが、PMI 遺伝子を持った植物はマンノースを利用し成長することができる。このため、PMI 遺伝子を目的遺伝子のマーカーとして一緒に植物細胞に導入することで、マンノース溶液で培養することにより、目的遺伝子が PMI 遺伝子とともに細胞内に導入されたことが確認できる。

なお、PMI 蛋白質は自然界にも広く存在し、植物では大豆等での存在が確認されている。PMI 遺伝子が産生する PMI 蛋白質は微生物が産生する PMI 蛋白質と同等であると米国環境保護庁 (EPA) より評価され、PMI 遺伝子が産生する PMI 蛋白質は EPA の残留基準規制から除外されている。

公開データベースに登録されているアミノ酸配列情報を基に、PMI 遺伝子が産生する PMI 蛋白質と既知のアレルゲン蛋白質との相同性について調べた結果、既知のアレルゲン蛋白質に対して構造相同性は認められなかった。

③宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

本組換え体中では、*prGZein-01* プロモーター及び上述した N 末端及び C 末端に付加配列を持つ *amy797E* 遺伝子により生成される耐熱性 α -アミラーゼは、トウモロコシ胚乳内の小胞体に蓄積すると考えられる。一方、トウモロコシ種子中に元来含まれる澱粉は、胚乳内のアミロプラスト中で合成され、プラスチド内に澱粉粒として蓄積される。従って、本組換え体中で発現した耐熱性 α -アミラーゼと基質となる澱粉は、細胞内で異なる部位に存在することから、細胞が破壊されない限り、耐熱性 α -アミラーゼによる澱粉分解は生じないと考えられる。

また、トウモロコシ種子中に元来含まれる α -アミラーゼは、発芽の際に急激に活性上昇して胚乳中の澱粉を分解し、胚の生育に必要なエネルギーを供給する。したがって、本組換え体と対照品種との発芽特性（発芽率や発芽までの日数等）を比較したところ、両者に差がみられなかった。

以上のことから、導入された遺伝子は宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないものと考えられる。

(2)ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

本組換え体の作出に用いたベクターは、大腸菌*Escherichia coli*由来のプラスミドである。

ロ、特性

①ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターの塩基数は11439 bpである。

②特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

ベクターは挿入遺伝子領域外には、微生物中でベクターを増殖する際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するための抗生物質耐性マーカーが含まれ、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、スペクチノマイシン耐性をもつ。しかし、これら抗生物質耐性マーカー領域は、本組換え体内には導入されていないと考えられる。

③ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクター中には、感染性を示すような配列はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された核酸全体の構成は表 1 に示した。

ベクターのT-DNA領域（RBとLB間の領域）には、目的遺伝子（*amy797E* 遺伝子）カセット及び選抜マーカー（*PMI* 遺伝子）カセットが挿入されている。

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法を用い、プラスミドのT-DNA領域（耐熱性 α -アミラーゼをコードする *amy797E* 遺伝子とホスホマンノースイソメラーゼをコードする *PMI* 遺伝子を含む）をトウモロコシ未熟胚へ導入した。

ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

プラスミド導入後、マンノースを唯一の炭素源とする培地上で培養することで、*PMI* 蛋白質発現個体のみを選抜し、植物体に再分化させた。その後、これら再生個体を PCR で解析して *amy797E*、*PMI* 遺伝子の存在を確認し、両遺伝子が組み込まれた植物のみを温室で栽培した。

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

遺伝子導入後、培養細胞の培地中に抗生物質セフトキシシンを添加してアグロバクテリウムを除去したことから、菌体の残存は無いと考えられる。

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

組換え体植物体のうち、安定して耐熱性 α -アミラーゼが発現する組換え体を親株とし、広範囲の地域で栽培可能な中生品種である優良系統と交雑を行った。その後、米国農務省の認可のもとで、耐熱性 α -アミラーゼ産生能を有する系統のほ場試験を行い、それぞれの形質調査を行った。

(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（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

後代の分離比を調べた結果、メンデルの法則に従い、複数世代にわたり細胞内に移入した核酸は安定して遺伝することから、染色体上に存在すると考えられる。

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

サザンブロット解析により挿入遺伝子の存在を調べた。その結果、*amy797E* 遺伝子及び *PMI* 遺伝子はそれぞれ 1 コピー存在すること、また、少なくとも 3 世代で安定して伝達されていることが確認された。

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

—

ニ、(6) のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

選抜過程で組換え体を PCR で解析して *amy797E*、*PMI* 遺伝子の存在を確認し、両遺伝子を安定して発現した組換え体を用いて、温室試験及びほ場試験を実施した。さらに、目的遺伝子の発現により、耐熱性 α -アミラーゼ及び *PMI* 蛋白質が後代品種でも安定して産生されることを ELISA 法で確認した。

ホ、ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

目的遺伝子の存在は、ゲノム DNA を制限酵素で切断後、*amy797E* プローブを用いてハイブリダイゼーションしたサザンブロットティングの結果より確認できる。目的遺伝子の発現により産生される耐熱性 α -アミラーゼは、ELISA 法で定量可能である。なお、ELISA 法の検出限界は $0.01 \mu\text{g/g}$ であった。

イベントを特定できる PCR 法による検出・識別方法に関しては、本組換え体の一般環境中での使用等のための申請の際に提出する。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

移入された核酸の複製物の発現により宿主に新たに付与された特性は、耐熱性 α -アミラーゼ及びホスホマンノースイソメラーゼ(PMI)の産生性である。

α -アミラーゼは、1,4-グルコシド結合の開裂を触媒する酵素であり、澱粉をデキストリン、マルトース、グルコースに加水分解する。本組換え体には古細菌の一種、*Thermococcales* 由来の *amy797E* 遺伝子を導入し、これによりトウモロコシ植物体自体に耐熱性 α -アミラーゼを発現させた。なお、本組換え体で発現した耐熱性 α -アミラーゼの活性を、市販の α -アミラーゼ (*Bacillus licheniformis* 由来) と比較した結果、ほぼ同等との結果が得られている。

また、PMI は *E. coli* 由来の PMI をコードする遺伝子であり、PMI はマンノース-6-リン酸のフルクトース-6-リン酸への異性化反応を触媒する。よって本遺伝子が発現した細胞はマンノースを唯一の炭素源とする培地中で生育できるようになるため、本組換え体作出のための選抜マーカーとして使用した。

ロ、以下に掲げる生理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

①形態及び生育の特性

2003年に米国の4州(6ヶ所)の野外ほ場で、稈長、着雌穂高、収量、穀粒重量、発芽率、花器の形状、開花始期及び開花終期、花粉稔性、初期生育の調査を行った。組換え体とそれらの遺伝子が導入されていない対照品種とを比較した結果から、競合における優位性が高まるような相違は認められなかった。

2003年、アイオワ州とハワイ州の2ヶ所のほ場で、発芽率、発芽までの日数、花粉50%放出までの日数、絹糸抽出までの日数、雄穂枝数、雄穂数、雌穂数、雌穂成熟期、雌穂長、雌穂直径、粒列数、一列粒数、雌穂重量、百粒重を調査した。一部の試験結果(アイオワ州の粒列数と一列粒数の結果、ハワイ州の雌穂重量と発芽率の結果)で

有意差が認められたものの、これらの差異により組換え体の競合における優位性が、対照品種に比べて高まることはないと推測された。

また、米国での温室試験では、発芽率、発芽までの日数、花粉 50%放出までの日数、絹糸抽出までの日数、雄穂小穂数、雄穂数、雌しべ外観、花粉重量、成熟日、収穫までの日数、雌穂長、雌穂直径、粒列数、一列粒数、雌穂重量、百粒重、粒数/雌穂について調査した。交配 2 での粒数/雌穂で有意差が認められたが、それ以外の項目では、組換え体と対照品種との間で有意差は認められなかった。

②生育初期における低温又は高温耐性

米国の温室で 2~3 葉期にまで育てた幼苗を、照明 10~11℃で 12 時間、暗黒 0~1℃で 12 時間というサイクルにセットしたインキュベーター内に移動し、生育を観察した。その結果、生育停止や枯死が起きたものの、組換え体と対照品種で低温耐性に相違は見られなかった。

③成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死する。成熟後にさらに栄養繁殖したり、再度結実して種子を生産したりするという報告はなされていない。また、これまでのところ、米国においてはほ場試験を行った試験ほ場を翌年に観察したところ、残存して生育している組換え体成体は確認されていない。

④花粉の稔性及びサイズ

2004 年、米国のほ場で組換え体及び対照品種の花粉のサイズ、形状及び稔性を比較した結果、差異は認められなかった。

⑤種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、2003 年のほ場試験で組換え体と対照品種について収量調査を行った。収量調査の結果、組換え体と対照品種との間に有意差は見られなかったことから種子の生産量についても相違はないものと判断した。

脱粒性については、組換え体、対照品種共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。また収穫時に雌穂を軽く握り脱粒性を調査

した結果、宿主との相違は見られなかった。

発芽率については、ハワイ州で行った試験結果は、組換え体が 88%であったのに対し、対照品種では 60%と低い値であった。しかし、ハワイ州以外のほ場試験及び温室試験では、宿主との発芽率に有意差は認められなかった。

休眠性については、発芽率が全体的に高いこと、特に組換え体と対照品種の種子を温室内で 120 粒ずつ播種したところ、どちらも全ての種子で発芽したことから、休眠性は極めて浅いと判断した。

⑥交雑率

わが国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生していないので試験をしていない。

⑦有害物質の産生性

2004 年、米国のほ場で組換え体及び対照品種の栽培後の土壌を苗床に入れてレタスを播種し、発芽率と初期生育を比較した（後作試験）。さらに、栽培後の土壌にそれぞれの植物体を鋤き込み、苗床で同様の調査を行った（鋤き込み試験）。その結果、どちらの試験においても組換え体と対照品種との間に有意差は認められなかった。

さらに、組換え体と対照品種の土壌微生物に対する影響を比較したが、特に差異は認められなかった。

なお、今回のほ場試験で有害物質の産生性に関し、わが国の自然環境においての影響を調べる。

3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報

(1)使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2)使用等の方法

所在地：栃木県那須塩原市千本松768番地
(郵便番号329-2794)

名称： 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所
隔離ほ場

使用期間：平成 17 年 5 月 1 日～平成 18 年 3 月 31 日

隔離ほ場の施設：

- 1) 部外者の立ち入りを防止するため、金網のフェンスを隔離ほ場の周囲に設置している。
- 2) ほ場試験を開始するまでに、試験栽培を行う隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること、及び管理責任者を明示した標識を見やすいところに掲げる。
- 3) 使用した機械、器具、又は作業に従事した者の靴等に付着した組換え農作物を洗浄するための洗い場等の設備、組換え農作物のほ場外への流出を防止するための排水溝や浄化槽等を備えている。
- 4) 隔離ほ場周辺は雑木林が囲み、強風を防ぐことができ、花粉の飛散を減少させる防風林の役目を果たしている。
- 5) 隔離ほ場内で栽培した組換え農作物等を処分する焼却炉を備えている。

隔離ほ場の作業要領：

- 1) 組換え農作物及び比較対照農作物以外の植物の隔離ほ場内における生育は最小限に抑える。
- 2) 組換え農作物（隔離ほ場内で栽培した組換え農作物以外の植物であって、当該組換え農作物との区別がつきにくいものを含む。）を隔離ほ場外に運搬する場合には密閉容器を用い、又保管は鍵の掛かる場所で行うことで組換え農作物の漏出を防止する。
- 3) 組換え農作物の栽培が終了した後は、当該組換え農作物を隔離ほ場内において鋤き込み、又は抜き取り焼却処分することで速やかに不活化する。
- 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、又は作業に従事した者の靴等に付着した組換え農作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止するため、洗い場でよく洗浄する。
- 5) 隔離ほ場及びそれに付随する設備（フェンス、排水溝、浄化槽等）が十分な機能を発揮するよう管理する。
- 6) 第一種使用等をする作業者に、生物多様性影響を効果的に防止するための教育訓練を行い、隔離ほ場の作業要領を遵守させる。
- 7) 生物多様性影響のおそれがあると認められたときには、「緊急措置計画書」に第 3 の 5) の (3) に基づき定められる生物多様性影響を効果的に防止するた

めの緊急措置を確実に講ずるよう周知徹底をはかる。

(3) 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

「緊急措置計画書」を参照。

(4) 国外における使用等に関する情報

米国では、米国農務省（USDA）の認可を得て、2002年よりほ場試験を開始し、2004年まで継続実施している。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシについては長期の使用経験があり、わが国の自然環境下で自生することが知られていない。

これまでに米国のは場で組換え体と対照品種の形態及び生育特性について比較検討を行った結果から、一部の試験結果（アイオワ州の粒列数と一列粒数、ハワイ州の雌穂重量と発芽率）で有意差が認められたものの、発芽までの日数、花粉50%放出までの日数、絹糸抽出までの日数、雄穂枝数、雄穂数、雌穂数、雌穂成熟期、雌穂長、雌穂直径、粒列数、一列粒数、雌穂重量、百粒重稈長、着雌穂高、収量、穀粒重量、花器の形状、開花始期及び開花終期、花粉稔性、初期生育について、組換え体と対照品種との間で有意差は認められなかった。特に、これらの形質の内、種子の発芽率が高いことから休眠性は極めて浅いと考えられ、また、生育初期の低温耐性は対照品種と同様に低いことが確認されており、は場にこぼれ落ちた種子が生育に適した条件で発芽しても越冬して自生化するとは考え難い。従って、競合における優位性が高まることはないと判断された。

また、本組換え体は移入された遺伝子の発現により耐熱性 α -アミラーゼの産生性を付与されているが、この形質により自然条件下で競合における優位性が高まるとは考え難い。同様に、本組換え体はPMI蛋白質を産生するものの、この形質が本組換え体の競合における優位性を高めるとも考え難い。

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従い隔離ほ場で第一種使用等を行う限りにおいては、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されないと考えられた。

(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

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ことから、競合における優位性に関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。

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の特定

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシについては長期の使用経験があり、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性については、米国において、後作試験、植物体の鋤き込み試験、土壌微生物相の調査を実施したが、組換え体と対照品種との間で有意差は認められなかった。

本組換え体は、移入された遺伝子により耐熱性 α -アミラーゼ産生性を付与されているが、 α -アミラーゼは動物（唾液、涙液、血液、尿など）・植物（イネ、コムギ、ダイズなど）・微生物（細菌、放線菌、カビなど）等、自然界に元来広く分布する酵素であり、 α -アミラーゼ自身の毒性は知られていない。よって本組換え体での発現により、野生動植物に影響を与えるとは考え難い。また、 α -アミラーゼにより澱粉が加水分解されたとしても、生成物である糖類により影響を受ける野生動植物がいるとは考え難い。

さらに、プロモーターの関係上、耐熱性 α -アミラーゼは本組換え体の穀粒（胚乳）のみで発現する。よって、仮に耐熱性 α -アミラーゼの摂食が昆虫等に何らかの影響を与えると想定したとしても、耐熱性 α -アミラーゼは花粉や茎・葉・根等では発現せず、苞皮に覆われた雌穂中の胚乳のみで発現することから、昆虫等が影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

同様に、本組換え体は移入された *PMI* 遺伝子の発現により *PMI* 蛋白質を産生するが、本蛋白質もまた動物・植物・微生物等、自然界に広く存在する酵素であり、*PMI* 蛋白質

質自身の有毒性は知られていない。よって、本酵素もまた野生動植物に影響を与えるとは考え難い。

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従い隔離ほ場で第一種使用等を行う限りにおいては、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されないと考えられた。

(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

有害物質の産生性に関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ことから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

トウモロコシは近縁野生種のアオシロと自然交雑することが報告されているが、わが国では交雑可能な近縁野生種は自生しておらず交雑の可能性はないことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断された。

以上のことより、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。

第3 生物多様性影響の総合的評価

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシについては長期の使用経験があり、わが国の自然環境下での自生や、有害物質の産生性については知られていない。

競合における優位性に関しては、これまでに米国のほ場で組換え体と対照品種の形態及び生育特性について比較検討を行った結果から、一部の試験結果（粒列数、一列粒数、雌穂重量及び発芽率）で有意差が認められたものの、発芽までの日数、花粉50%放出までの日数、絹糸抽出までの日数、雄穂枝数、雄穂数、雌穂数、雌穂成熟期、雌穂長、雌穂直径、粒列数、一列粒数、雌穂重量、百粒重稈長、着雌穂高、収量、穀粒重量、花器の形状、開花始期及び開花終期、花粉稔性、初期生育について、組換え体と対照品種と間で有意差は認められなかった。特にこれら形質のうち種子の発芽率が高いことから休眠性は極めて浅いと考えられ、また、生育初期の低温耐性は対照品種と同様に低いことが確認されており、ほ場にこぼれ落ちた種子が生育に適した条件で発芽しても越冬して自生化するとは考えられず、組換え体の競合における優位性が高まることはない判断された。

有害物質の産生性に関しては、本組換え体は耐熱性 α -アミラーゼ産生性を付与されているものの、 α -アミラーゼは自然界に広く存在する酵素であり、有毒性などは知られていない。同様に、本組換え体は移入されたPMI遺伝子の発現によりPMI蛋白質を産生するが、本蛋白質もまた自然界に広く存在する酵素であり、PMI蛋白質の有毒性などは知られていない。よって、これらの遺伝子の発現により野生動植物に影響を与えるとは考え難い。

さらに、有害物質の産生性に関しては、米国において、後作試験、植物体鋤き込み試験、土壌微生物相の調査を実施したが、組換え体と対照品種との間で有意差は認められなかった。

交雑性に関しては、わが国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は自生しておらず、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはない判断された。

上記の評価結果を踏まえて、本組換え体を第一種使用規程に従い当該隔離ほ場で第一種使用等を行う限りにおいて、わが国において生物多様性影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。