

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mcry3Aa2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5) 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渓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 (*Zea mays* subsp. *Mexicana*) 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溪谷がある。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 度に至る範囲でトウモロコシは栽培され、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、ロシア等である。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。現在、米国は世界第一のトウモロコシ生産国であり、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を中心に栽培されている。

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。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、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℃で、最低発芽温度及び最低生育温度は6～10℃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℃から30℃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。

ロ、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。トウモロコシに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アオシロト (*Zea mays* subsp. *Mexicana*) 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 日目から 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。

ハ、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は知られていない。

ニ、その他の情報

これまでのところ、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外に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

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mcry3Aa2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR604, OECD UI: SYN-IR604-5) (以下、「本組換え体」という。)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に示した通りである。

表1 プラスミド pZM26 の各構成要素のサイズ、由来及び機能

遺伝要素	サイズ (bp)	由来及び機能
害虫抵抗性遺伝子カセット		
<i>MTL</i> プロモーター	2556	このプロモーターはトウモロコシの <i>metallothionein</i> 遺伝子に由来している。Corn Rootwormはトウモロコシの根を食害するため、 <i>MTL</i> プロモーターを使って根で目的遺伝子の発現を高める。
改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子 (<i>mcry3Aa2</i>)	1797	この遺伝子は、胞子を形成する一般的なグラム陽性土壌微生物である <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3Aa2</i> 遺伝子を、遺伝子の発現を高めるように改変した。この遺伝子が産生する改変 <i>Cry3Aa2</i> 蛋白質はコウチュウ目昆虫に殺虫活性がある。
<i>Nos</i> ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域で転写ターミネーター及びmRNAのポリアダニル化シグナルを含む。機能はmRNAの転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導することである。
選択マーカー遺伝子カセット		
<i>ZmUbiInt</i> プロモーター	1993	このプロモーターはトウモロコシの <i>polyubiquitin</i> 遺伝子由来で、単子葉植物の植物体全体での発現を高める。
<i>PMI</i> 遺伝子	1176	この遺伝子は Phosphomannose isomerase をコードする <i>E. coli</i> 由来の遺伝子で、マンノースをフルクトースに変換させる。

Nos ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域で転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。機能は mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導することである。
-------------	-----	---

ロ、構成要素の機能

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

本組換え体の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を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

改変Cry3Aa2蛋白質：

改変 *cry3Aa2* 遺伝子が産生する改変 Cry3Aa2 蛋白質が Corn Rootworm 等のコウチュウ目昆虫の幼虫に摂取されると、幼虫の消化管内が中性のため完全に消化できず特定のペプチド（コアトキシン）が残る。このペプチドと腸管の特異的受容体が結合して、幼虫の消化管粘膜壁に作用し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。

Cry3A蛋白質は、コウチュウ目以外の昆虫にはほとんど殺虫活性を示さないことが知られている。さらに、Cry3Aファミリーに属する蛋白質の一つであるCry3Aa2蛋白質については、米国のトウモロコシ栽培における主要害虫であるコウチュウ目昆虫Corn Rootworm に特異的に殺虫活性があることが知られている。

実際に、米国シンジェンタ社の室内実験において、コウチュウ目 (*Coleoptera*)、チョウ目 (*Lepidoptera*)、ハエ目 (*Diptera*) の昆虫に対する改変Cry3Aa2蛋白質の殺虫活性を調査している。それぞれの一齢幼虫に500~600 μ g/mlの改変Cry3Aa2蛋白質を人工餌で与えたところ、チョウ目、ハエ目には殺虫活性は示さず、コウチュウ目についても、調査を行った6種のうち4種 (Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)、Northern Corn Rootworm (*Diabrotica longicornis barberi*)、Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)、Banded Cucumber Beetle (*Diabrotica balteata*)) に殺虫活性を示すことが確認されている。なお、同じCorn Rootwormでも、

Southern Corn Rootworm (*Diabrotica undecimpunctata*)には活性を示さなかった。

これらのことから、改変Cry3Aa2蛋白質の殺虫活性のスペクトラムは極めて狭い範囲であると考えられた。

コウチュウ目昆虫以外にも、ハチ、ミミズ、魚類、鳥類、哺乳類等の非標的生物に対し改変Cry3Aa蛋白質が影響を与えるかどうか試験をした結果、影響は見られなかった。

なお、人間を含めた哺乳類は、胃液が強酸性で改変Cry3Aa2蛋白質を消化できること、また、例えばこのペプチド（コアトキシン）が残ったとしても当該ペプチドの受容体が腸管にないことから、生体に影響はないと考えられる。

アレルギー性情報に関しては、公開データベースに登録されている塩基配列情報を基に、改変 *cry3Aa2* 遺伝子が産生する改変Cry3Aa2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査した。その結果、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。

PMI 蛋白質：

この遺伝子は PMI 蛋白質 (Phosphomannose isomerase) をコードする *E. coli* 由来の遺伝子で、PMI 蛋白質はマンノースをフル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できないが、*PMI* 遺伝子を持った細胞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* 遺伝子とともに蛋白質細胞内に導入されたことが確認できる。

PMI 蛋白質は自然界にも広く存在し、植物ではトウモロコシでの存在は確認されていないが、大豆等では確認されている。

なお、*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。

アレルギー性情報に関しては、公開データベースに登録されている塩基配列情報を基に、*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

改変 Cry3Aa2 蛋白質の酵素活性はない事が知られており、PMI 蛋白質は組換え体と対照種を用いた米国における各種圃場試験及び成分分析結果に差異が認められなかったことから代謝に関与する酵素作用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基本ベクターは大腸菌 *Escherichia coli* 由来のプラスミドである。

ロ、特性

ベクター pZM26 の塩基数は 13811bp である。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。本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換え体の作出には、大腸菌 *Escherichia coli* 由来のベクターを基に、害虫抵抗性遺伝子カセット及び選択マーカー遺伝子カセットを連結したプラスミド pZM26 を構築し、アグロバクテリウム法により核酸を宿主に移入した。

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。

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の方法

アグロバクテリウム法でプラスミドを導入後、マンノースを含有する培地中で形質転換細胞から植物体を再生した。

トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを摂取して成長エネルギーに変換できないが、*PMI* 遺伝子を持った細胞は成長することができる。*PMI* 遺伝子はマンノースをフルクトースに変換させる機能を持つ。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し、マンノース溶液で培養することにより、*PMI* 遺伝子を持った細胞はマンノースを利用して成長することができるため目的遺伝子が細胞内に導入されたことが確認できる。

② アグロバクテリウム菌体の残存の有無

遺伝子導入後、培養細胞の培地中に抗生物質セフトキシンを添加してアグロバクテリウム菌を除去し、残存がないことを確認している。

③ 育成の経過及び系統樹

アグロバクテリウム法でプラスミドを導入後、*PMI* 遺伝子を有するカルスを選抜し、改変 Cry3Aa2 蛋白質の発現を解析し、安定して改変 Cry3Aa2 蛋白質が発現する組換え体を初代 MIR604 の親株（本組換え体親株）とした。さらに、広範囲の地域で栽培可能な中生品種であるデント種の優良系統との交配を行い、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（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

細胞内に移入された核酸は、遺伝分離の試験結果において、メンデルの法則に従って安定して遺伝することが確認されていることから、染色体上に存在していると考えられる。

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

サザンブロッティングにより挿入遺伝子の存在を調べた結果、改変 *cry3Aa2* 遺伝子及び *PMI* 遺伝子は1コピー存在し、安定して伝達されていることを確認した。

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

米国の野外ほ場で、Corn Rootworm (CRW) に対する抵抗性試験を行なった。CRWが最も発生するトウモロコシの6葉期にWestern Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) の一齢幼虫をトウモロコシの根に放飼し、トウモロコシの根部の被害度を調査した。その結果、組換え体の根部の被害は比較的少なかったものの、対照品種の根部被害は甚大であったことより、目的遺伝子の導入によりコウチュウ目昆虫への抵抗性が付与されていることを確認した (写真1)。



組換え体

対照品種

写真1 コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ

PMI遺伝子の発現については、マンノースを唯一の炭素源とする培地で培養することによりPMI蛋白質を発現した細胞のみが成長することができるため、組換え体選別の過程でマーカ一遺伝子の導入を確認した。組換え体における改変Cry3Aa2蛋白質の発現量を部位別及び生育期別に調べた。その結果、改変Cry3Aa2蛋白質は生育期を通して、根部では2.1~3.5 $\mu\text{g/g}$ 、葉の組織では3.5~5.4 $\mu\text{g/g}$ 、子実では0.8~1.4 $\mu\text{g/g}$ の濃度で検出された。花粉では検出限界以下であった。また、PMI蛋白質は根部で0.2~0.6 $\mu\text{g/g}$ であった。葉の組織で

は0.1~0.34 $\mu\text{g/g}$ で萎凋期で検出限界以下 (ND) であった。子実では0.8~1.0 $\mu\text{g/g}$ のPMI蛋白質が検出された。花粉では検出限界以下 (ND) であった。

ホ、ウイルス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ことから、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、サザンブロットティングの結果より、ゲノムDNAをKpnI制限酵素で切断し、改変 *cry3Aa2* (1797bp) をプローブとしてハイブリダイゼーションさせ、6kbのバンドが検出されることから確認できる。目的遺伝子の産生する改変 *Cry3Aa2* 蛋白質は、ELISA法で定量可能である。ELISA法の検出限界は0.01 $\mu\text{g/g}$ である。

なお、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、組換え体の一般環境中での栽培使用等のために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

宿主に新たに付与された特性は、改変 *cry3Aa2* 遺伝子の発現により生成された改変 *Cry3Aa2* 蛋白質によるCorn Rootworm (CRW) 等のコウチュウ目害虫に対する抵抗性及びPMI遺伝子の発現により生成されたPMI蛋白質によるマンノースの利用性が付与されたことである。

ロ、以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、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

2002年は米国の野外ほ場4ヶ所で、2003年はアイオワ州の野外ほ場で、組換え体とその対照品種を使用して生理学的又は生態学的特性についての調査を行った。

①形態及び生育の特性

アイオワ州のほ場試験で、形態特性（稈長、雌穂長、雌穂数、穀粒/雌穂、雌穂の重量、雌穂の直径、1列粒数等）及び生育特性（発芽率、発芽日までの日数、開花期、成熟期等）を調査した。これらの特性のうち、発芽日までの日数、穀粒/雌穂、雌穂長、雌穂の重量、雌穂の直径及び1列粒数で統計的有意差が認められたものの、その他の項目で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

2003年、米国で、組換え体と対照品種を用い、生育初期における低温耐性についての試験を実施した。2～3葉期の幼苗を材料とし、冬季を想定した低温条件下（昼間12℃、夜間2℃）で調査を行った。低温耐性について組換え体と対照品種との間に差はないと判断した。

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ために、成熟後さらに栄養繁殖したり、再度結実して種子を生産しない。また、これまで、米国でのほ場試験に使用したほ場を翌年に観察した場合でも、残存して生育している組換え体の成体は確認されていない。

④花粉の稔性及びサイズ

2004年、米国のほ場試験において、組換え体と対照品種の花粉のサイズ、形状及び稔性を比較した結果、両者の間に相違は見られなかった。

⑤種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量調査として、米国のほ場で組換え体と対照品種を栽培し、穀粒の収量を比較した。その結果、組換え体と対照品種との間に相違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、組換え体とその対照品種共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われているため、自然条件下での脱粒性は見られないと判断した。

休眠性に関しては、米国のほ場試験で採取した組換え体と対照品種の種子を収穫後直ちに温室内で播種したところ、組換え体、対照品種共に 100%の発芽率であったことから、休眠性は極めて浅いと判断した。

⑥交雑性

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

改変 *cry3Aa2* 遺伝子産物である改変 Cry3Aa2 蛋白質を使用してアイオワ州の土壤（微砂質埴壤土）を採取し、感受性の高い Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) の幼虫を用いて死亡率を調べた。その結果、改変 Cry3Aa2 蛋白質の土壤中での半減期は約 10 日であった。

なお、参考として、米国のほ場において行われた試験結果を以下に示す。

後作試験として、組換え体及び対照品種を栽培後、ほ場から採取した表層土をポットに入れ、レタスを播種してその発芽率を調査した。また、鋤込み試験として、組換え体及び対照品種を栽培後、その土壤に植物体を鋤き込み、それぞれをポットに入れ、レタス種子の発芽率を調査した。その結果、組換え体と対照品種との間で統計学的有意差は検出されなかった。土壤微生物相の試験として、組換え体及び対照品種を栽培後、ほ場から採取した表層土について、好気性細菌、嫌気性細菌、放射菌、*Pseudomonas* 属細菌及び窒素固定菌の数を調査した。その結果、組換え体と対照品種との間で統計学的有意差は検出されなかった。

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

別添の「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た。これらの試験の結果、本組換え体は米国における安全性評価試験において、導入遺伝子が発現しコウチュウ目害虫抵抗性及びPMI蛋白質の産生の特性が付与されたこと以外に、非組換え体との相違は認められなかった。

第2 項目ごとの生物多様性影響評価

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。

米国のほ場で組換え体と対照品種の生態及び生育特性について比較検討を行った結果、これら特性のいくつかの調査項目（発芽日までの日数、穀粒数/雌穂、雌穂の長さ、雌穂の重量、雌穂の直径及び1列粒数）で差異が認められ、組換え体は対照品種に比べて有意に低い値を示す傾向が見られた。一方、野生植物との競合における優位性に関与すると考えられる特性（種子の生産量及び脱粒性、発芽率、休眠性、生育初期の低温耐性）について調査を行った結果、本組換え体と対照品種との間で、有意な差は認められなかった。特に、収穫後直ちに播種した本組換え体の種子の発芽率が100%であったために休眠性は極めて浅いと考えられること、生育初期の低温耐性にも本組換え体と対照品種との間で差異が認められないことから、ほ場にこぼれ落ちた種子が発芽しても越冬して自生化することはないと考えられた。よって、本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判断した。

本組換え体では、導入された改変Cry3Aa2 蛋白質の発現により、コウチュウ目昆虫への抵抗性を付与されており、Corn Rootwormに強い殺虫活性を示すことが確認されている。しかし、わが国においてはCorn Rootwormの生息は知られておらず、この形質は競合における優位性を高める主な要因とはならないと考えられる。

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した。

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。

本組換え体に付与された非意図的な有害物質の産生性について、詳細な調査は本隔離ほ場試験において行う。参考として、2004年のアイオワ州のほ場で行った試験結果を示すと、後作試験、鋤込み試験（栽培跡土壌を用いた）、土壌微生物相の調査の結果からは、組換え体と対照品種との間で統計学的有意差は検出されなかった。

本組換え体は、導入された改変 *cry3Aa2* 遺伝子の発現により、米国におけるトウモロコシ栽培の主要害虫であるコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 *Cry3Aa2* 蛋白質を産生する。米国で行われた調査結果からは、4種のコウチュウ目昆虫 Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)、Northern Corn Rootworm (*Diabrotica longicornis barberi*)、Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) 及び Banded Cucumber Beetle (*Diabrotica balteata*) に対する殺虫活性が確認されている。わが国においてはこれらのコウチュウ目昆虫種の生息は確認されていないが、本組換え体を使用した場合に、その他のコウチュウ目昆虫種に何らかの影響を与える可能性は否定できない。

以上のことから、有害物質の産生性により影響を受ける可能性のある野生動物として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫種を特定し、以下に検討することとした。

(2) 影響の具体的内容の評価

米国のほ場試験の結果から、改変 Cry3Aa2 蛋白質は、Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)、Northern Corn Rootworm (*Diabrotica longicornis barberi*)、Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) 及び Banded Cucumber Beetle (*Diabrotica balteata*) に対して殺虫活性が確認されている。このうち、最も高い感受性を示した Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) に改変 Cry3Aa2 蛋白質を食餌へ混合して与えた結果、144 時間後の半数致死濃度 (LC50) は $1.4 \mu\text{g/ml}$ であることが確認されている。

(3) 影響の生じやすさの評価

わが国のコウチュウ目昆虫が本組換え体の産生する改変 Cry3Aa2 蛋白質に曝露される経路としては、①植物体を直接食害した場合、②花粉飛散により食餌植物と共に摂食される場合、③土壤中に鋤込まれた植物体やそこから溶出した蛋白質を腐植質と共に摂食される場合の3つが考えられた。

上記の経路によりコウチュウ目昆虫が影響を受ける可能性について、その生息場所に関する情報を基に、環境省レッドリスト掲載種を例に検討を行った。

環境省レッドリストの2000年改訂版には、日本で絶滅のおそれがあるコウチュウ目昆虫種は84種であり、その絶滅危惧種I類としては27種、絶滅危惧種II類としては20種、準絶滅危惧種としては37種が記載されている。これら絶滅のおそれのある種とされている種が生息又は生育する場所は、山地・湿地・湿原/塩性湿地・河川/湖沼・干潟/マングローブ林等であった。このことから、レッドリスト記載種のうち、トウモロコシの栽培ほ場周辺に限り生息する可能性のあるコウチュウ目昆虫種は存在しないと推測されることから、①、③の経路により個体群で影響を受ける可能性のある種が存在する可能性は極めて低いと考えられた。また、コウチュウ目昆虫の普通種についても、同様に、トウモロコシ栽培ほ場やその周辺のみで生育しているとは考え難い。

次に、②の経路、すなわち本組換え体の花粉飛散によりコウチュウ目昆虫種が影響を受ける可能性を検討した。米国におけるほ場試験において、本組換え体の各部位での改変 Cry3Aa2 蛋白質の発現量を調査した結果、花粉での改変 Cry3Aa2 蛋白質の発現は検出限界 ($0.01 \mu\text{g/g}$) 以下であった。このことから、コウチュウ目昆虫が花粉飛散により影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

また、改変 Cry3Aa2 蛋白質を土壤に混入した試験から、改変 Cry3Aa2 蛋白質の土壤中での半減期は約10日であることが報告されている。

これらのことから、わが国に生息するコウチュウ目昆虫種が改変 Cry3Aa2 蛋白質に曝露されることで、個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従い、当該隔離ほ場において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

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、我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自生することは知られていない。

競合における優位性については、形態及び生育特性に関するいくつかの項目で、本組換え体と対照品種との間で差異が認められたが、いずれにおいても、組換え体は対照品種に比べて低い値を示した。また、野生植物との競合性に関して特に重要な調査項目において有意な差異は認められていない。収穫種子の発芽率は極めて高いことから休眠性は極めて浅いと考えられ、また、生育初期の低温特性は対照品種と同様に低いことから、ほ場にこぼれた落ちた種子が万一発芽しても越冬して自生化するとは考えられず、本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、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は知られていない。本組換え体では、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry3Aa2 蛋白質産生性が付与されている。しかし、その殺虫スペクトルは極めて狭く、米国で行われた試験結果からは、コウチュウ目昆虫の4種 Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)、Northern Corn Rootworm (*Diabrotica longicornis barberi*)、Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) 及び Banded Cucumber Beetle (*Diabrotica balteata*) に殺虫活性が確認されている。わが国ではこれらのコウチュウ目昆虫の生息は確認されていない。

コウチュウ目昆虫が本組換え体の産生する改変 Cry3Aa2 蛋白質に曝露される経路としては、植物体を直接食害した場合、花粉飛散により食餌植物と共に摂食する場合、土壤中に鋤込まれた植物体やそこから溶出した蛋白質を腐植質と共に摂食する場合が考えられる。わが国におけるコウチュウ目昆虫が影響を受ける可能性について、環境省レッドリスト掲載種を例に検討を行った。これらの種が生息又は生育する場所は、山地・湿地・湿原／塩性湿地・河川／湖沼・干潟／マングローブ林等であることから、トウモロコシの栽培ほ場やその周辺に限り生育し、個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。また、コウチュウ目昆虫の普通種についても、トウモロコシの栽培ほ場やその周辺のみで生育しているとは考え難く、コウチュウ目昆虫種が個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

さらに、本組換え体の花粉での改変 Cry3Aa2 蛋白質の発現量は、検出限界値以下であることが確認されていることから、わが国においてコウチュウ目昆虫が花粉における改変 Cry3Aa2 蛋白質の発現により影響を受ける可能性は、極めて低いと考えられた。

なお、アイオワ州の土壌で調べた改変Cry3Aa2蛋白質の土壌中での半減期は約10日と短く、土壌中で急速に分解されたことから、土壌中のコウチュウ目昆虫が影響を受ける可能性は低いと考えられた。

以上から、本組換え体を第一種使用規程に従い隔離ほ場で使用する限りにおいては、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。

交雑性に関しては、我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と判断された。

上記の評価結果を踏まえ、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した。