

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ  
(改変 *dmo, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)  
(MON87419, OECD UI : MON-87419-8) 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帯.....                                      | 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.....                                                 | 6  |
| ニ 繁殖又は増殖の様式.....                                                | 6  |
| ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....                                      | 6  |
| 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..... | 7  |
| ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....                               | 7  |
| ホ 病原性.....                                                      | 8  |
| ヘ 有害物質の産生性.....                                                 | 8  |
| ト その他の情報.....                                                   | 8  |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....                                      | 9  |
| (1) 供与核酸に関する情報.....                                             | 9  |
| イ 構成及び構成要素の由来.....                                              | 9  |
| ロ 構成要素の機能.....                                                  | 11 |
| 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 .....                                                                           | 11 |
| 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 .....               | 16 |
| ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....                                                                       | 18 |
| (2) ベクターに関する情報 .....                                                                                | 20 |
| イ 名称及び由来 .....                                                                                      | 20 |
| ロ 特性 .....                                                                                          | 20 |
| ① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....                                                                              | 20 |
| ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 .....                                                                    | 20 |
| 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 .....                                                          | 21 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....                                                                            | 21 |
| イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....                                                                            | 21 |
| ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....                                                                            | 21 |
| ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....                                                                             | 21 |
| ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....                                                                            | 21 |
| 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 .....                                                    | 21 |
| 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 ..... | 22 |
| (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 .....                                                          | 24 |
| ① 移入された核酸の複製物が存在する場所 .....                                                                          | 24 |
| 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 .....                                                | 26 |
| 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 .....                                | 33 |
| (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.....                                                                     | 33 |
| (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....                                                | 33 |
| 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 .....                            | 33 |
| 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 ..... | 34 |
| a 形態及び生育の特性 .....                                                            | 35 |
| b 生育初期における低温耐性 .....                                                         | 35 |
| c 成体の越冬性 .....                                                               | 36 |
| d 花粉の稔性及びサイズ .....                                                           | 36 |
| e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 .....                                                  | 36 |
| f 交雑率 .....                                                                  | 37 |
| g 有害物質の産生性 .....                                                             | 37 |
| 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....                                                   | 38 |
| (1) 使用等の内容.....                                                              | 38 |
| (2) 使用等の方法.....                                                              | 38 |
| (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.....                                 | 38 |
| (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.....                            | 39 |
| (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.....                           | 39 |
| (6) 国外における使用等に関する情報.....                                                     | 39 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....                                                      | 41 |
| 1 競合における優位性 .....                                                            | 41 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....                                               | 41 |
| (2) 影響の具体的内容の評価.....                                                         | 42 |
| (3) 影響の生じやすさの評価.....                                                         | 42 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....                                               | 42 |
| 2 有害物質の産生性 .....                                                             | 43 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....                                               | 43 |
| (2) 影響の具体的内容の評価.....                                                         | 44 |
| (3) 影響の生じやすさの評価.....                                                         | 44 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....                                               | 44 |
| 3 交雑性.....                                                                   | 44 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定..... | 44 |
| (2) 影響の具体的内容の評価.....           | 45 |
| (3) 影響の生じやすさの評価.....           | 45 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断..... | 45 |
| 4 その他の性質.....                  | 45 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価.....          | 46 |
| 引用文献.....                      | 48 |
| 緊急措置計画書.....                   | 56 |
| 別添資料リスト.....                   | 58 |

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 10 月 19 日

5 農林水産大臣 森山 裕 殿  
環境大臣 大塚 珠代 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 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 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     | 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ (改変 <i>dmo, pat, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Ittis) (MON87419, OECD UI : MON-87419-8) |
| 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

10

##### ① 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：corn, maize

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

15

##### ② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は LH244 である。

20

##### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの野生種と見られる植物は現存せず (山田, 2001)、国外の自然環境におけるトウモロコシの自生は報告されていない。

25

なお、トウモロコシの起源に関与すると考えられる近縁種として、トウモロコシと交雑可能な *Zea* 属のテオシントと *Tripsacum* 属のトリプサクムの存在が知られている (OECD, 2003)。テオシントとトリプサクムはメキシコとグアテマラ等に広範囲に自生しており、トリプサクムはさらに米国東部、南部から南米でも認められている (山田, 2001; OECD, 2003)。

30

わが国の自然環境下において、トウモロコシ及びその近縁種の自生については、これまでのところ報告はない。

##### (2) 使用等の歴史及び現状

##### ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培

起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づくと、最初に  
5 トウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7,000~5,000 年頃であり、紀元前 3,400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001; 戸澤, 2005)。1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。  
10 わが国へは 1573~1591 年頃にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた。また、明治時代になって北海道へ米国からデント種とフリント種が新たに導入され、全国的に栽培が普及した (戸澤, 2005)。

## 15 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

### ・主たる栽培地域

現在、トウモロコシは、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能であり、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、  
20 全世界で広く栽培されている (OECD, 2003; 戸澤, 2005)。

国連食糧農業機関 (FAO) によると、2013 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 8 千万 ha であり、上位国は、米国 3,548 万 ha、中国 3,632 万 ha、ブラジル 1,528 万 ha、インド 950 万 ha、メキシコ 710 万 ha である (FAO, 2015)。

25 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スイートコーンがあり、2014 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 1,900ha で (農林水産省, 2015a)、2013 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,400ha である (農林水産省, 2014a)。

### 30 ・栽培方法

海外では、米国をはじめとする主要栽培国において、大型機械を利用した大規模栽培が行われている。

一方、わが国では、飼料用トウモロコシを中心に栽培が行われており、慣行栽培法は次のとおりである。

35 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、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い(瀧澤, 2001)。

5 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種(F1)品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

#### ・流通実態及び用途

10 世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。

2014年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.4%が飼料(7.6%の蒸留粕を含む)、30.5%がエタノール製造、12.9%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(NCGA, 2013)。

15 わが国では、2014年に約1,504万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約1,040万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる(財務省, 2015)。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2015b)。

20 また、飼料用トウモロコシは、発芽可能な状態で輸入されるものが多いが、加熱・圧ぺんすること等が関税制度の下、義務づけられている(農林水産省, 2014b)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

25

—

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

30 トウモロコシは、長い年月の間に栽培植物として馴化された結果、自然条件下における自生能力を失った作物である(OECD, 2003)。

トウモロコシ種子の発芽の最低温度は10~11℃、最適温度は33℃とされている。実際に播種されるのは13~14℃以上である(中村, 2001)。

35 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, 2001)。

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(日長反応性)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(初生根又は種子根)が伸長し、子実発芽となる(戸澤, 2005)。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH5.0~8.0の範囲で栽培可能である(戸澤, 2005)。

## ハ 捕食性又は寄生性

—

10

## ニ 繁殖又は増殖の様式

### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

15 完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

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)。

20 種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い(戸澤, 2005)。氷点下の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45℃以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている(Wych, 1988)。

25 さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壤温度が10℃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, 2001)。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℃以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℃、相対湿度55%以内に保つことが必要である(中村, 2001; OECD, 2003)。

30

### 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

35 トウモロコシは栄養繁殖せず、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

5 トウモロコシは雌雄同株の一年生作物で、主として風媒によって受粉する作物であり 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、自家不和合性は知られておらず、自家受粉も可能である (千藤, 2001; OECD, 2003)。

10 トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* に含まれトウモロコシの近縁野生種である一年生のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*)、及び *Tripsacum* 属植物である。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* 属植物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* 属植物の分布地域は北アメリカ東部、南部から南米となっている (山田, 2001; OECD, 2003)。

15 なお、わが国におけるトウモロコシと交雑可能なテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種の自生については、報告はない。また、受精を伴わない繁殖能力を有する種子の生産 (アポミクシス) についての報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

20 トウモロコシは雌雄異花序で、雌花は葉腋について 1~3 本の雌穂を形成し、雄穂は茎の先端につく (柿本ら, 2001; OECD, 2003)。雄穂は抽出すると 3~5 日で開花し、開花始めから終わりまでの期間は盛夏で一般に 8~9 日である (中村, 2001)。一方、雌穂の絹糸抽出は雄穂開花のおよそ 1 日後に始まり、抽出始めから抽出揃いまでの期間は 5~6 日である (中村, 2001)。一本の雄穂には  
25 1,200~2,000 個の小穂があり、一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている (OECD, 2003)。

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる (西尾, 2002)。花粉の形状は球形で、直径は 90~120 $\mu$ m 程度である (中村, 2001)。

30 受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である (戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐため隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400m とされている (千藤, 2001)。

35 わが国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁 (0m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm<sup>2</sup>、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm<sup>2</sup>であった (Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から 5m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm<sup>2</sup>、

イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm<sup>2</sup>、ほ場から 10m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm<sup>2</sup>以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

5 また、北米でも全 7 ヶ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 (Pleasant et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1m、2m、4~5m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm<sup>2</sup>、14.2 粒/cm<sup>2</sup>、そして 8.1 粒/cm<sup>2</sup> へと減少していくことが明らかとなっている。

10 さらに、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 1m 及び 5m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm<sup>2</sup> 及び 1.4 粒/cm<sup>2</sup> であったと報告している (Sears et al., 2000)。

花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い (CFIA, 2012)。平均的な花粉は大気中に飛散した 2 時間後にはその発芽能力を 100 % 失うという報告もある (Luna et al., 2001)。

15

ホ 病原性

—

20 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。

25 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の、わが国の畑以外での生育については、熊本県内の港湾で 1 個体のみ報告されている (農林水産省, 2014b)。

30

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは、除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) 及び除草剤グルホシネート (2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl) butanoic acid: 2-アミノ-4-(ヒドロキシメチルホスフィニル) ブタン酸) に対する耐性が付与された除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ (改変 *dmo*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87419, OECD UI: MON-87419-8) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を作出した。

本組換えトウモロコシには *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子と *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。本組換えトウモロコシは、*dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO 蛋白質」とする。) により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されており、*pat* 遺伝子から発現するホスフィノスリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (phosphinothricin *N*-acetyltransferase: 以下、「PAT 蛋白質」とする。) により、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシ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図 1 (p11) 及び表 1 (p12~15) に示した。

本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子から発現する DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、葉緑体輸送ペプチド (chloroplast transit peptide、以下、「CTP」とする。) の切断を容易にする目的で *N* 末端側から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。よって、本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」とする。また、本組換えトウモロコシでは、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、CTP4 由来の 12 アミノ酸又は 7 アミノ酸が付加された 2 種類の改変 DMO 蛋白質が生じる。本組換えトウモロコシで発現するこれら 2 種類の改変 DMO 蛋白質を「改変 MON87419 DMO 蛋白質」と総称する。なお、一般的に輸送ペプチドは、前駆蛋白質を目的の葉緑体へ輸

送した後、正確に切り離されるが (Della-Cioppa et al., 1986)、一部の輸送ペプチドが残った状態の蛋白質が葉緑体に存在する例も報告されている (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007b)。

- 5       本組換えトウモロコシに導入された *pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は、プロセッシングにより N 末端側から 1 番目のメチオニンが取り除かれている以外、*S. viridochromogenes* 由来の野生型 PAT 蛋白質と同一のものである (以下、「PAT 蛋白質」とする。)。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くの蛋白質で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。
- 10

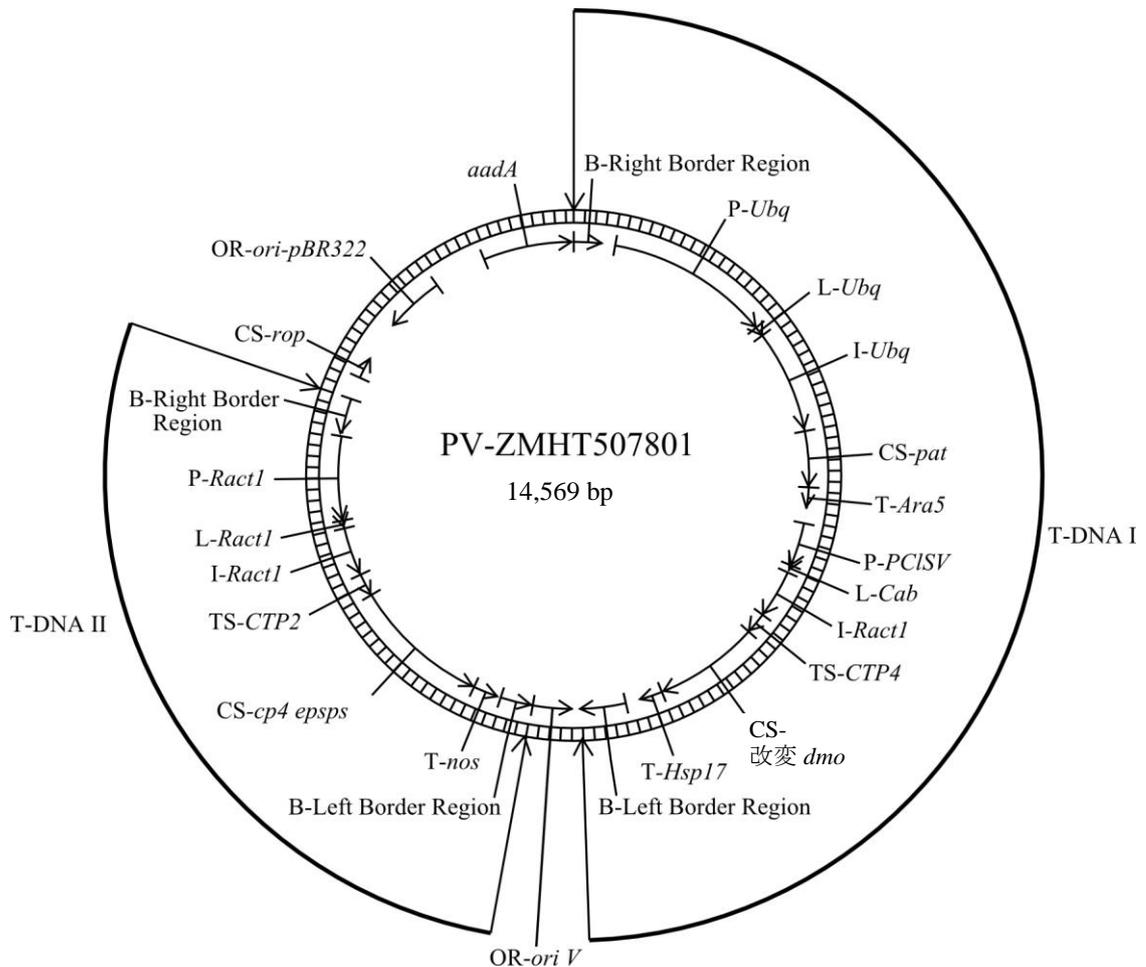
本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 MON87419 DMO 蛋白質と PAT 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

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

5

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1 (p12~15) に示した。



10

図1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT507801 のプラスミドマップ<sup>1</sup>

本組換えトウモロコシの育成過程で、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。

<sup>1</sup> 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 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT507801 の各構成要素の由来及び機能<sup>2</sup>

| 構成要素                                 | プラスミド中の位置 (bp) | 由来及び機能                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA I 領域                           |                |                                                                                                                                                                                  |
| B <sup>注1</sup> -Right Border Region | 1-285          | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。                                                        |
| Intervening Sequence                 | 286-410        | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                            |
| P <sup>注2</sup> - <i>Ubq</i>         | 411-2,054      | <i>Andropogon gerardii</i> 由来 (Flasinski, 2015) のユビキチン遺伝子のプロモーター配列 (Joung and Kamo 2006)。恒常的に目的遺伝子を発現させる。                                                                        |
| L <sup>注3</sup> - <i>Ubq</i>         | 2,055-2,153    | <i>A. gerardii</i> 由来のユビキチン遺伝子の 5'末端非翻訳リーダー配列 (Joung and Kamo 2006)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                                                             |
| I <sup>注4</sup> - <i>Ubq</i>         | 2,154-3,195    | <i>A. gerardii</i> 由来のユビキチン遺伝子のイントロン配列 (Joung and Kamo 2006)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                                                                    |
| Intervening Sequence                 | 3,196-3,200    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                            |
| CS <sup>注5</sup> - <i>pat</i>        | 3,201-3,752    | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)。               |
| Intervening Sequence                 | 3,753-3,760    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                            |
| T <sup>注6</sup> - <i>Ara5</i>        | 3,761-3,973    | イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) 由来の $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター ( <i>Ara5</i> ) (GenBank, 2015) をコードしている <i>ARA5B</i> 前駆体遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列。mRNA のポリアダニル化を誘導し、転写の終結を調節する (Hunt, 1994)。 |
| Intervening Sequence                 | 3,974-4,120    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                            |
| P- <i>PCISV</i>                      | 4,121-4,553    | Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) のプロモーター (Maiti and Shepherd, 1998)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。                                        |
| Intervening Sequence                 | 4,554-4,558    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                            |

<sup>2</sup> 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 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT507801 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 構成要素                            | プラスミド中の位置 (bp) | 由来及び機能                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA I 領域 (続き)                 |                |                                                                                                                                                                                                 |
| L- <i>Cab</i>                   | 4,559-4,619    | コムギ ( <i>Triticum aestivum</i> ) の葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5' 末端非翻訳領域のリーダー配列 (Lamppa et al., 1985)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                                                       |
| Intervening Sequence            | 4,620-4,635    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |
| I- <i>Ract1</i>                 | 4,636-5,115    | イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                                     |
| Intervening Sequence            | 5,116-5,124    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |
| TS <sup>注7</sup> - <i>CTP4</i>  | 5,125-5,340    | ペチュニア ( <i>Petunia hybrida</i> ) 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列及び 5' 末端非翻訳領域のリーダー配列 (Gasser et al., 1988; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |
| CS-改変 <i>dmo</i>                | 5,341-6,363    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。                                                                |
| Intervening Sequence            | 6,364-6,393    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |
| T- <i>Hsp17</i>                 | 6,394-6,603    | コムギ ( <i>T. aestivum</i> ) 由来の熱ショック蛋白質 (Hsp17) の 3' 末端非翻訳領域の配列 (McElwain and Spiker, 1989)。転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。                                                                                |
| Intervening Sequence            | 6,604-6,765    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |
| B-Left Border Region            | 6,766-7,207    | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。                                                                                                            |
| Intervening Sequence            | 7,208-7,293    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |
| OR <sup>注8</sup> - <i>ori V</i> | 7,294-7,690    | 広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中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            | 7,691-7,696    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                                           |

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT507801 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 構成要素                            | プラスミド中の位置 (bp) | 由来及び機能                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA II 領域 (本組換えトウモロコシには存在しない) |                |                                                                                                                                                                                     |
| B-Left Border Region            | 7,697-8,015    | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。                                                                                                |
| Intervening Sequence            | 8,016-8,045    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                               |
| T- <i>nos</i>                   | 8,046-8,298    | <i>A. tumefaciens</i> pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 ( <i>nos</i> ) の 3'末端非翻訳領域の配列で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。                                        |
| Intervening Sequence            | 8,299-8,313    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                               |
| CS- <i>cp4 epsps</i>            | 8,314-9,681    | <i>Agrobacterium</i> sp. CP4 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 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> ( <i>epsps</i> ) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。 |
| TS- <i>CTP2</i>                 | 9,682-9,909    | シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。      |
| Intervening Sequence            | 9,910-9,918    | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                               |
| I- <i>Ract1</i>                 | 9,919-10,396   | イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                         |
| L- <i>Ract1</i>                 | 10,397-10,476  | イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のリーダー配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。                                                                      |
| P- <i>Ract1</i>                 | 10,477-11,317  | イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のプロモーター配列 (McElroy et al., 1990)。恒常的に目的遺伝子を発現させる。                                                                    |
| Intervening Sequence            | 11,318-11,343  | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                                                               |
| B-Right Border Region           | 11,344-11,700  | <i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。                                                                      |

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT507801 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない) |               |                                                                                                                                                     |
|----------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Intervening Sequence       | 11,701-11,926 | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                               |
| CS- <i>rop</i>             | 11,927-12,118 | ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer ( <i>rop</i> )) のコード配列であり、 <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。 |
| Intervening Sequence       | 12,119-12,545 | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                               |
| OR- <i>ori-pBR322</i>      | 12,546-13,134 | pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。                                                                            |
| Intervening Sequence       | 13,135-13,664 | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                               |
| <i>aadA</i>                | 13,665-14,553 | トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。     |
| Intervening Sequence       | 14,554-14,569 | DNA クローニングの際に利用された配列。                                                                                                                               |

注<sup>1</sup>B - Border (境界配列)

注<sup>2</sup>P - Promoter (プロモーター)

注<sup>3</sup>L - Leader (リーダー配列)

注<sup>4</sup>I - Intron (イントロン)

注<sup>5</sup>CS - Coding Sequence (コード配列)

注<sup>6</sup>T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注<sup>7</sup>TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注<sup>8</sup>OR - Origin of Replication (複製開始領域)

- 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 MON87419 DMO 蛋白質】

本組換えトウモロコシは、*S. maltophilia*由来の改変*dmo*遺伝子が導入されており、改変MON87419 DMO蛋白質を発現している。改変MON87419 DMO蛋白質は、本組換えトウモロコシに除草剤ジカンバ耐性を付与する。

10 除草剤ジカンバは合成オーキシンの除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。

本組換えトウモロコシで産生される改変 MON87419 DMO 蛋白質は、ジカンバを脱メチル化する酵素である。ジカンバはこの酵素の働きで脱メチル化されると、除草活性のないDCSA (3,6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) となる (Chakraborty et al., 2005)。この働きにより植物に除草剤ジカンバ耐性を付与する (図 2, p17)。

15 実際に、改変 *dmo* 遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ及びタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007a)。なお、DMO 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統 (スタック系統は除く) には、除草剤ジカンバ耐性ダイズ (MON87708, OECD UI: MON-87708-9) (承認日: 2013年10月31日) (以下、「MON87708」という。) 及び除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (MON88701, OECD UI: MON-88701-3) (承認日: 2015年1月30日) (以下、「MON88701」という。) 25 があり、いずれの系統もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

<ジカンバ不活性化>

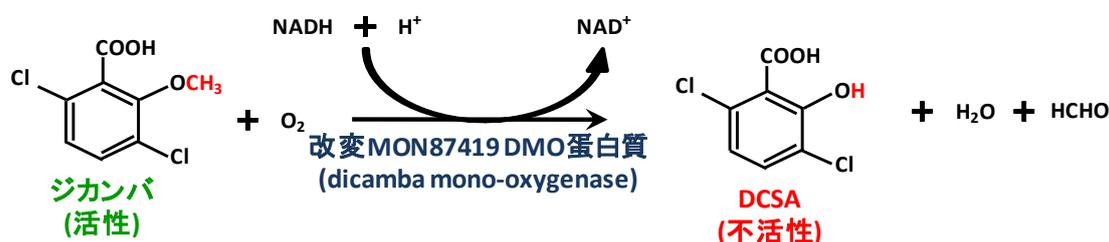


図2 改変 MON87419 DMO 蛋白質の基質と代謝物<sup>3</sup>

改変 MON87419 DMO 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か、AD\_2014<sup>4</sup>を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する8つのアミノ酸によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

## 10 【PAT 蛋白質】

本組換えトウモロコシには、*S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されており、PAT 蛋白質を発現する。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988)。

15 除草剤グルホシネートは、グルタミン合成酵素と結合することにより除草活性を発揮する。グルタミン合成酵素は光呼吸により生成されたアンモニアを植物に同化させる主要酵素である。グルホシネートがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が阻害されて、植物体内にアンモニアが蓄積し、枯死する (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and  
20 Wild, 1986)。

本組換えトウモロコシから産生される PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素の働きでアセチル化されると、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートとなる (図 3, p18)。 *N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素と結合できないため、光呼吸を阻害せず、アンモニア蓄積が回避される。本組換えトウモロコシは、PAT 蛋白質の産生により、除草剤グルホシネートが散布されても枯死しない。

<sup>3</sup>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。

<sup>4</sup>AD\_2014: FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2014) から得られた配列をもとに作成したデータベースで、2014年1月の時点で、1,706件のアミノ酸配列が含まれる。

5 なお、同じ作用機序を示す PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用等の内容で使用した場合、生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断されている系統は、現在までに 4 作物 24 系統 (トウモロコシでは 14 系統) があり、いずれの系統もそれぞれの第一種

5 使用等の内容で使用した場合、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

<グルホシネート不活性化>

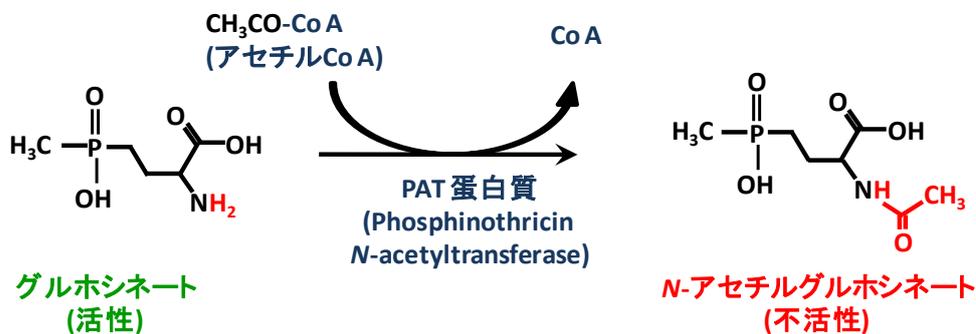


図 3 PAT 蛋白質の基質と代謝物<sup>5</sup>

15 PAT 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か AD\_2014 を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

20 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 MON87419 DMO 蛋白質】

25 DMO 蛋白質は、ジカンバを脱メチル化することにより植物に除草剤ジカンバ耐性を付与する。DMO 蛋白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009) から、構造的にジカンバに類似した化合物 (カルボキシル基、メトキシ基及びクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物) は、DMO 蛋白質の基質とな

<sup>5</sup> 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。

る可能性があると考えられたが、トウモロコシにおいて、クロロ基を含むフェニル環を持つ化合物は報告されていない。また、クロロ基を含むフェニル環を持つ化合物は、植物及び他の真核生物において、その存在は比較的まれであることが知られている (Gribble, 2010)。次に、クロロ基はないが、カルボキシル基及びメトキシ基を含むフェニル環を持つ化合物が検討されたが、その中で植物に存在している化合物中で最も構造的にジカンバに類似している *o*-アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) でも DMO 蛋白質によって代謝されないことが確認されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

また、一般的に、単子葉植物は双子葉植物よりもオーキシシンに対する感受性が低いことが知られている。実際に、単子葉植物であるトウモロコシは、除草剤ジカンバや 2,4-D などの合成オーキシシン系除草剤にある程度の耐性を有することが報告されている (Hatzios and Penner, 1982; Kansas State University, 2015)。しかし、DMO 蛋白質はカルボキシル基、メトキシ基及びクロロ基の全てを含むフェニル環を持つ化合物のみ代謝するため、構造の異なるジカンバ以外の合成オーキシシン系除草剤を代謝するとは考えられない。さらに、トウモロコシにおいて、クロロ基を含むフェニル環を持つ内在性化合物は報告されていない。そのため、改変 MON87419 DMO 蛋白質が合成オーキシシン系除草剤の代謝系と相互作用し、新たな代謝産物を産生することはないと考えられた。

なお、本組換えトウモロコシ中で発現している改変 MON87419 DMO 蛋白質は、野生型の DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端に結合している CTP4 由来の 12 アミノ酸又は 7 アミノ酸及び N 末端側から 2 番目にロイシンの付加がある。しかし、CTP4 由来の 12 アミノ酸又は 7 アミノ酸及び 2 番目のアミノ酸の位置は、DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れているため、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の基質特異性に影響しないと考えられた。

これらのことから、改変 MON87419 DMO 蛋白質はジカンバに対して高い基質特異性を有しており、改変 MON87419 DMO 蛋白質がジカンバ以外の化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### 【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質が他の

L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが競合アッセイにおいて示されている。さらに、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。これらのことから PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有しており、PAT 蛋白質がグルホシネート以外の化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

10 また、改変 MON87419 DMO 蛋白質と PAT 蛋白質の酵素反応は異なり、それぞれの基質の構造も全く異なる。よって、本組換えトウモロコシで発現している改変 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

15 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

20 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT507801 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などを基に構築された。詳細は表 1 (p12~15) に記載した。

ロ 特性

25 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT507801 の全塩基数は 14,569bp である。なお、PV-ZMHT507801 の塩基配列は、別添資料 2 に記載した。

30

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

35 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が外側骨格領域に存在している。また、形質転換個体の選抜マーカーとして、除草剤グリホサートに対する耐性を付与す

る *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子が T-DNA II 領域に存在している。いずれの遺伝子も T-DNA I 領域外に存在している。

- 5 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

本ベクターの感染性は知られていない。

- 10 (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

15 宿主内に移入された PV-ZMHT507801 の構成要素は、表 1 (p12~15) 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は、図 1 (p11) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

20 PV-ZMHT507801 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって、非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

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

非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞から採取した分裂組織と PV-ZMHT507801 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、除草剤グリホサートを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

- 30 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

35 カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えトウモロコシの R4F1 世代の

種子<sup>6</sup>において、形質転換に用いたPV-ZMHT507801の外側骨格領域を標的としたPCR分析を行ったところ、本組換えトウモロコシにはPV-ZMHT507801の外側骨格領域は存在しなかった(別添資料3のTable 1, p11)。このことから、本組換えトウモロコシには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

5

- 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

10

形質転換された再分化個体(R0)を自殖し、R1世代を作出した。R1世代において、1コピーのT-DNA I領域を有し、T-DNA II領域を持たない個体をPCR及びサザンブロット分析により選抜した。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に最終的に商品化系統として本組換えトウモロコシを選抜した。

15

本組換えトウモロコシの育成図を、図4(p23)に示した。なお、本申請の対象は、R3世代及びR3世代から派生する全ての交雑後代系統である。

---

<sup>6</sup>収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約20粒取り、DNAを抽出しPCR分析に用いた。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図4 本組換えトウモロコシの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 本組換えトウモロコシの T-DNA I 領域 (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセット) が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの TI: BC1F1、TI: BC2F1、TI: BC2F2 世代において、T-DNA I 領域の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 4)。

10 試験に供試する 3 世代 (TI: BC1F1、TI: BC2F1、TI: BC2F2; 図 4, p23) を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域をホモで有し、T-DNA II 領域を持たない個体を選抜した。その後、2 回の自殖により R3 世代を作出した。そして T-DNA I 領域をホモで有する R3 世代を T-DNA I 領域を持たない非組換えトウモロコシ系統 RP と交配して T-DNA I 領域をヘテロで有する R3F1 (RP×LH244 R3) 世代を作出した。さらに R3F1  
15 (RP×LH244 R3) 世代と RP を交配して TI: BC1F1 世代を作出した。TI: BC1F1 世代において End-Point TaqMan PCR 法により T-DNA I 領域の分離比を確認した。

20 T-DNA I 領域をヘテロで有する TI: BC1F1 世代と RP を交配して TI: BC2F1 世代を作出した。TI: BC2F1 世代において除草剤グルホシネート散布により T-DNA I 領域の分離比を確認した。

T-DNA I 領域をヘテロで有する TI: BC2F1 世代を自殖し、TI: BC2F2 世代を作出した。TI: BC2F2 世代において、Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA I 領域の分離比を確認した。

25 これら TI: BC1F1、TI: BC2F1 及び TI: BC2F2 世代において行われた Real-Time TaqMan PCR 法及び End-Point TaqMan PCR 法による T-DNA 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。

30 その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せず遺伝していることが確認された (表 2, p25)。したがって、本組換えトウモロコシの T-DNA I 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表2 本組換えトウモロコシにおける T-DNA I 領域の分離比<sup>7</sup>

| 世代                     | 供試<br>個体数 | 実測値           |           | 1:1 の分離比の期待値  |           |          |                  |
|------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|----------|------------------|
|                        |           | 陽性・ヘテロ<br>個体数 | 陰性<br>個体数 | 陽性・ヘテロ<br>個体数 | 陰性<br>個体数 | $\chi^2$ | p 値 <sup>4</sup> |
| TI: BC1F1 <sup>1</sup> | 126       | 64            | 62        | 63            | 63        | 0.03     | 0.859            |
| TI: BC2F1 <sup>2</sup> | 381       | 192           | 189       | 190.5         | 190.5     | 0.02     | 0.878            |

| 世代                     | 供試<br>個体数 | 実測値          |               |           | 1:2:1 の分離比の期待値 |               |           |          |                  |
|------------------------|-----------|--------------|---------------|-----------|----------------|---------------|-----------|----------|------------------|
|                        |           | 陽性・ホモ<br>個体数 | 陽性・ヘテロ<br>個体数 | 陰性<br>個体数 | 陽性・ホモ<br>個体数   | 陽性・ヘテロ<br>個体数 | 陰性<br>個体数 | $\chi^2$ | p 値 <sup>4</sup> |
| TI: BC2F2 <sup>3</sup> | 164       | 48           | 83            | 33        | 41             | 82            | 41        | 2.77     | 0.251            |

<sup>1</sup> 実測値は End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

<sup>2</sup> 実測値は除草剤グルホシネート散布により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

<sup>3</sup> 実測値は Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

<sup>4</sup> TI: BC1F1、TI: BC2F1、TI: BC2F2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p<0.05)。

<sup>7</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

② 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

本組換えトウモロコシに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、  
5 T-DNA II 領域及び外側骨格配列の有無並びに導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術<sup>8</sup>及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)<sup>9</sup> 並びに導入遺伝子領域の PCR 分析及び塩基配列解析を実施した (別添資料 5)。以下に、本解析の手法及び本組換えトウモロコシを用いて行った解析の結果を述べる。  
10

NGS では、フラグメント化したゲノム配列から約 100bp の塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて解析することで、平均冗長度<sup>10</sup> 75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 5, p28 の ①)。  
15 次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの全塩基配列と照合<sup>11</sup>する (図 5, p28 の ②)。この結果において導入用プラスミドとの相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出された DNA フラグメントにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 5, p28 の ②)。さらに、JSA において、DNA フラグメントの塩基配列の一部のみが連続して導入用プラスミドと一致するものを、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列の重複性を比較解析することで、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 5 の③, p28)。仮に 1 コピーの導入遺伝子がゲノムの 1 カ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et  
20

<sup>8</sup>次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析はNGSのうちIlluminaを用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

<sup>9</sup>次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSAでは、まず、NGSにより本組換えトウモロコシのゲノムの全領域に相当する配列をフラグメントとして増幅し、これらのフラグメントにおいて得られた100 bpの配列情報を用い、JSAによってT-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

<sup>10</sup>冗長度: 特定の DNA (ゲノム DNA 又は遺伝子) に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。

<sup>11</sup>BLAST検索において、*E*-score (expectation score; 期待値) が $1 \times 10^{-5}$ 以下、且つ30bp以上の領域で96.7%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を、PCR 分析及び塩基配列解析により調べることで、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

5       本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノムを NGS/JSA に供試した結果、本組換えトウモロコシの R3 世代で 324.5Gb (平均冗長度<sup>12</sup> 135)、対照の非組換えトウモロコシ (LH244) で 281.7Gb (平均冗長度<sup>12</sup> 118) の塩基配列が得られた (別添資料 5 の Appendix Table 3, p45) ことから、本解析において十分な冗長度<sup>13</sup>が確保されていることが確認された。  
10       本組換えトウモロコシでは、2 つの接合領域が特定され (図 6, p29; 別添資料 5 の p29)、これらはそれぞれ T-DNA I 領域の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 5 の Figure 4, p50~56)。対照の非組換えトウモロコシでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 5 の p29)。さらに、本組換えトウモロコシから得られた全ての DNA フラグメントについて、PV-ZMHT507801  
15       の全配列との相同性を調べた結果、T-DNA I 領域以外の配列との相同性は認められなかったことから、T-DNA II 領域及び外側骨格領域が含まれていないことが示された (別添資料 5 の補足資料の Figure 1, p1)。

      また、本組換えトウモロコシにおいて検出された接合領域及び T-DNA I 領域を含む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA I 領域のみが導入されていることが確認された (別添資料 5 の Appendix  
20       Figure 5, p57、Appendix Figure 6, p58~61 及び Appendix Figure 7, p62~70)。

      以上をまとめると、NGS/JSA において検出された接合領域は、T-DNA I 領域に起因する接合領域のみであり、PV-ZMHT507801 の T-DNA II 領域及び外側骨格領域<sup>14</sup>との相同性を持つ接合領域は認められなかったことから、T-DNA I 領域以外の T-DNA II 領域及び外側骨格領域は挿入されていないことが確認された。また、T-DNA I 領域の PCR 分析及び塩基配列解析により、導入された T-DNA I の塩基配列は PV-ZMIR10871 の T-DNA I 領域と同一であ  
25       

---

<sup>12</sup> トウモロコシゲノムに1コピーで存在する*pd3*遺伝子について調べた冗長度の平均値を指標として、本解析が冗長度75以上で行われていることを確認している。

<sup>13</sup> 冗長度75以上のNGS/JSAによって遺伝子組換えサイズの導入遺伝子を十分に検出できることが報告されている (Kovalic et al., 2012)。また、本解析は、0.1ゲノム等量 (冗長度12) 及び1ゲノム等量 (冗長度122) のPV-ZMHT507801が存在する場合に、そのプラスミド配列のそれぞれ 99.43%及び100%を検出する感度を有することが示されている (別添資料 5のAppendix Table 4, p46)。

<sup>14</sup> 別添資料 5の補足資料のFigure 1 (p1) において示されている「backbone」の結果は、導入用プラスミドPV-ZMHT507801のT-DNA II 領域及び外側骨格領域の両方を含む配列と照合したものである。

ることが確認された。

よって、本組換えトウモロコシのゲノム中1カ所に1コピーのT-DNA I領域が導入遺伝子として組み込まれており、T-DNA II領域及び外側骨格領域は挿入されていないことが確認された。

5

さらに複数世代 (R3、R3F1、R4、R4F1、R5 世代) の本組換えトウモロコシを対象にしたNGS/JSAにおいて、T-DNA I領域が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料5, p32~34)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図6 (p29) に示した。

10

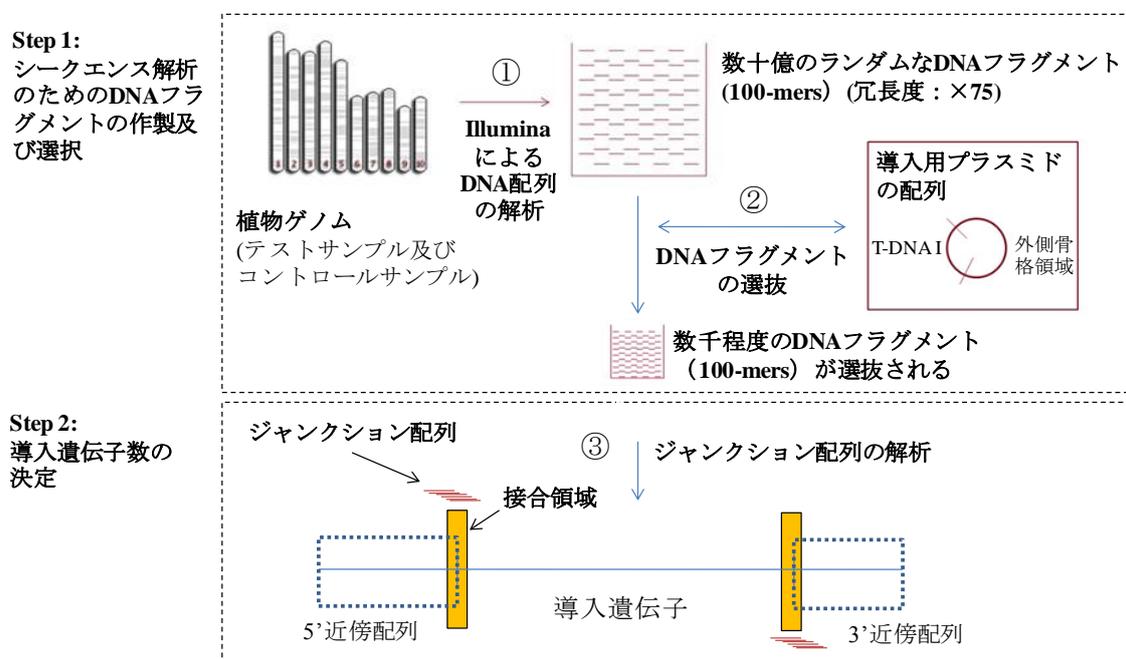


図5 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)<sup>15</sup>

15

<sup>15</sup>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。

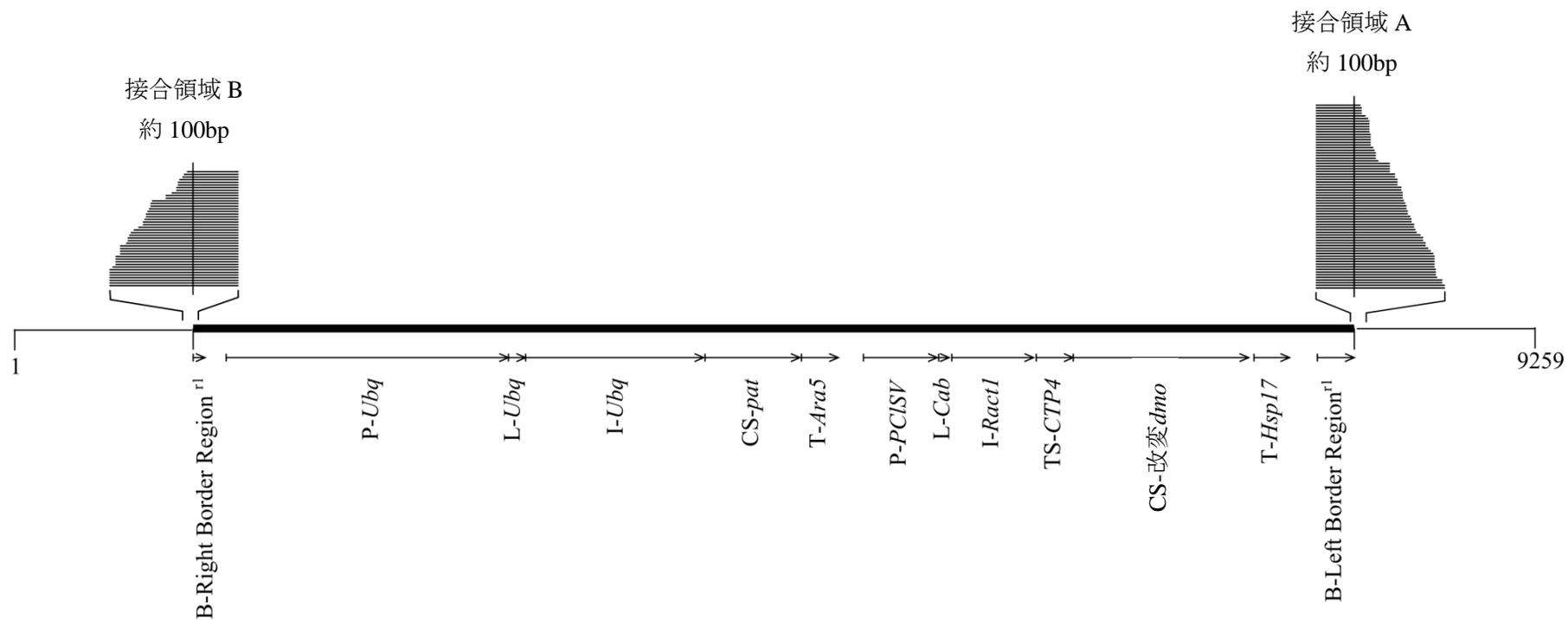


図 6 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図<sup>16</sup>

- 5 図は本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。導入遺伝子内の矢印(→)により、本組換えトウモロコシ中の構成要素の配列の方向を示した。図中の rl は、B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が本組換えトウモロコシにおいて PV-ZMIR507801 と比較してそれぞれ約 200bp 程度短くなっていることを意味する。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。

<sup>16</sup>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。

- 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

1 コピーなので該当しない (別添資料 5 の p28~32)。

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代 (R3、  
R3F1、R4、R4F1 及び R5 世代) にわたり改変 MON87419 DMO 蛋白質及び  
PAT 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 6 の Figure  
2~3, p17~18)。

15 また、2013 年に米国の 5 ヶ所 (アイオワ州、インディアナ州、カンザス州、  
ネブラスカ州、ペンシルバニア州) のほ場において、4 反復で生育した本組  
換えトウモロコシの葉、根、地上部及び種子での改変 MON87419 DMO 蛋白質  
及び PAT 蛋白質の発現量を、ELISA により分析した (別添資料 7)。その結  
果、本組換えトウモロコシの葉、根、地上部及び種子において、改変  
20 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現が確認された (表 3~表 4,  
p31~32; 別添資料 7 の Table 1~2, p18~19)。

表3 本組換えトウモロコシの葉、根、地上部及び種子における改変MON87419 DMO蛋白質の発現量(2013年、米国)<sup>17</sup>

| 組織 <sup>1</sup> | 生育段階 <sup>2</sup> | 平均値(標準偏差)<br>範囲<br>( $\mu\text{g/g}$ 新鮮重) <sup>3</sup> | 平均値(標準偏差)<br>範囲<br>( $\mu\text{g/g}$ 乾燥重) <sup>4</sup> | 定量限界値/<br>検出限界値<br>( $\mu\text{g/g}$ 新鮮重) |
|-----------------|-------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 葉<br>(OSL1)     | 3葉期               | 3.7 (0.77)<br>1.9-5.1                                  | 26 (6.6)<br>13-37                                      | 0.157/0.027                               |
| 根<br>(OSR1)     | 3葉期               | 0.81 (0.16)<br>0.58-1.1                                | 7.4 (1.4)<br>5.0-11                                    | 0.125/0.038                               |
| 地上部             | 黄熟期               | 1.8 (0.62)<br>1.0-3.7                                  | 6.0 (2.7)<br>3.1-14                                    | 0.157/0.024                               |
| 種子              | 成熟期               | 0.17 (0.044)<br>0.13-0.29                              | 0.19 (0.048)<br>0.14-0.31                              | 0.125/0.022                               |

<sup>1</sup> OSL=over season leaf (葉)、OSR=over season root (根)

5 <sup>2</sup> 採取した各組織の生育段階

<sup>3</sup> 蛋白質の発現量は、平均値及び標準偏差(括弧内に示す)で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の新鮮重1g当たりの $\mu\text{g}$ で表されている。平均値、標準偏差及び範囲(最小値 - 最大値)は、全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている(種子を除く全ての組織で20反復。種子は9反復が定量限界値未満であったため、11反復。)

10 <sup>4</sup> 蛋白質の発現量は、平均値及び標準偏差(括弧内に示す)で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の乾燥重1g当たりの $\mu\text{g}$ で表されている。乾燥重は、新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。

<sup>17</sup>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 4 本組換えトウモロコシの葉、根、地上部及び種子における PAT 蛋白質の発現量 (2013 年、米国)<sup>18</sup>

| 組織 <sup>1</sup> | 生育段階 <sup>2</sup> | 平均値 (標準偏差)<br>範囲<br>(µg/g 新鮮重) <sup>3</sup> | 平均値 (標準偏差)<br>範囲<br>(µg/g 乾燥重) <sup>4</sup> | 定量限界値/<br>検出限界値<br>(µg/g 新鮮重) |
|-----------------|-------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
| 葉<br>(OSL1)     | 3 葉期              | 1.5 (0.35)<br>1.1-2.4                       | 11 (2.7)<br>7.0-17                          | 0.094/0.043                   |
| 根<br>(OSR1)     | 3 葉期              | 0.84 (0.18)<br>0.49-1.3                     | 7.7 (1.3)<br>4.7-11                         | 0.094/0.037                   |
| 地上部             | 黄熟期               | 1.6 (0.50)<br>0.92-2.3                      | 5.0 (1.6)<br>2.8-8.5                        | 0.094/0.014                   |
| 種子              | 成熟期               | 0.85 (0.25)<br>0.50-1.4                     | 0.93 (0.27)<br>0.56-1.6                     | 0.094/0.007                   |

5 <sup>1</sup> OSL=over season leaf (葉)、OSR=over season root (根)

<sup>2</sup> 採取した各組織の生育段階

<sup>3</sup> 蛋白質の発現量は、算術平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の新鮮重1g当たりのµgで表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全ての反復で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (20反復)。

10

<sup>4</sup> 蛋白質の発現量は、算術平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の乾燥重1g当たりのµgで表されている。乾燥重は、新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。

<sup>18</sup>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。

- 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

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、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。

- (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

10 本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 8; 別添資料 9, p15)。

本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.04% である (別添資料 9, p7 及び p16~17)。

15 本 PCR 法の信頼性については米国モンサント・カンパニーと米国 SGS Brookings 社において検証され、確認されている (別添資料 9, p13 及び p21~23)。

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

- 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

25 本組換えトウモロコシへ導入された改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子は改変 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質を発現することにより、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

30 除草剤ジカンバは 95 種以上の一年生及び二年生雑草を効果的に防除し、100 種を超える多年生の広葉及び木本の植物種の生育を抑制する。従来トウモロコシは、除草剤ジカンバに対して元来ある程度の耐性を有しており、米国では播種後から発芽までと発芽後から 8 葉期までの生育期に除草剤ジカンバの散布が認められている。しかし、実際の農業現場では、除草剤ジカンバによる従来トウモロコシの薬害 (生育遅延、奇形葉、倒伏) が生ずることが知られているため、散布時期や散布濃度が制約されている。これに対して、本  
35 組換えトウモロコシは除草剤ジカンバに対して十分な耐性を持つため、薬害を生じさせずに除草剤ジカンバの散布が可能となる。

除草剤グルホシネートは、約 120 種の広葉及びイネ科雑草を防除する広域接触型非選択的除草剤である。元来、トウモロコシは除草剤グルホシネートに対する耐性を持たない。しかし、本組換えトウモロコシは除草剤グルホシネートに対して耐性を持つため、薬害を生じさせずに除草剤グルホシネートの散布が可能となる。

また、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートは、ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*)、ヒメムカシヨモギ (*Conyza canadensis*) やオオホナガアオゲイトウ (*Amaranthus palmeri*) など除草剤グリホサートに抵抗性を持つ雑草も防除可能である。

- 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<sup>19</sup>

本組換えトウモロコシに移入されている核酸の複製物は、「農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え植物に係る第一種使用規程の承認の申請について」（平成19年12月10日付け19消安第8999号、環自野発第071210001号農林水産省消費・安全局長、農林水産省農林水産技術会議事務局長、林野庁長官、環境省自然環境局長通知 最終改正平成26年12月5日付け26消安第3762号、26農会第802号、26林整研第179号、環自野発第1412051号農林水産省消費・安全局長、農林水産省農林水産技術会議事務局長、林野庁長官、環境省自然環境局長通知）第3の1の(6)に定める、わが国の隔離ほ場における情報収集を行なわなくとも、海外での栽培試験結果等の情報を用いて、わが国における生物多様性影響評価が可能な遺伝子組換えトウモロコシである以下の要件 (①及び②) を満たしていることが、2015年1月27日に開催された生物多様性影響評価検討会農作物分科会において、確認された。

- ① 査読を受けた論文の公表や関連する国の検討会等での複数の専門家による共通認識等により、作用機序が明らかであると認められるもの
- ② 移入された核酸の複製物により付与される性質が生じさせる可能性のある生物多様性影響の程度が、既に第一種使用規程の承認を受けているトウモロコシの生物多様性影響と同程度又は超えないと認められるもの

<sup>19</sup>本項目中の以下に続く a~g 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。

したがって、米国のほ場における栽培試験データ及び温室試験データの評価、又は論理的考察を行うことにより、以下の項目に関する本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の相違について記載した。

5

#### a 形態及び生育の特性

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態及び生育に関する特性を比較するため、2013年に米国の8カ所<sup>20</sup>のほ場において13項目(苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、緑色保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、種子中の水分含量、1ブッシェル当たりの種子の重量、収量)を調査した(別添資料10)。なお、参考品種として各ほ場に4品種の商業栽培品種を供試し、各ほ場において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを4反復で栽培した。

上記の13項目について統計処理を行った結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと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(別添資料10のTable 2, p5)。

#### b 生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性試験は、2013年に米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種4品種の幼苗(3葉期)を、日中12°C/夜間5°Cの低温条件で栽培した。低温処理開始後9日目に生育段階及び草丈を調査し、低温処理開始後20日目に生育段階、草丈、新鮮重及び乾燥重を調査した。統計処理を草丈、新鮮重及び乾燥重に関して行い、生育ステージに関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。

その結果、いずれの項目においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差や違いは認められなかった(別添資料11のTable 2, p6)。

---

<sup>20</sup> アーカンソー州、イリノイ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州、ペンシルバニア州(2カ所)、ウィスコンシン州

c 成体の越冬性

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、種子を生産したりすることはない。実際に、2013年に米国のは場で実施した栽培試験において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも収穫時に枯死していることを確認した(別添資料12のFigure 1~2, p2~3)。

10 d 花粉の稔性及びサイズ

15 米国の1ヵ所(インディアナ州)のは場で2013年に栽培された本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種4品種から花粉を採取し、その稔性(充実度)及びサイズを調査した。その結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと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(別添資料13のTable 2, p14)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

20 生産量：

第一の2-(6)-②-a (p35)に記載したとおり、収量に関しては、本組換えトウモロコシと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 脱粒性：

脱粒性については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシはともに、2014年の米国のは場での収穫期に、雌穂は苞皮に覆われており、脱粒性は商業品種と変わるものではなかった(別添資料14)。

30 休眠性及び発芽率：

35 種子の休眠性及び発芽率について、2013年に米国の3ヵ所(アーカンソー州、ネブラスカ州、ペンシルバニア州)のは場にて収穫された本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種4品種の種子を4反復各約100粒ずつ温室にて播種し、Association of Official Seed Analysts (AOSA)が推奨している20°C 16時間/30°C 8時間(20°C/30°C)の温度条件で発芽率の調査を行った(別添資料15)。発芽種子と非発芽種子につ

いて計測し、非発芽種子については、枯死種子率、吸水膨潤状態種子率 (viable firm-swollen) 及び硬実種子率に分けて測定した。また、発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定した。わが国における隔離ほ場試験では、収穫種子を用い、25°C の温度条件で発芽試験を行っている。このため、AOSA が推奨する 20°C/30°C の温度条件は、わが国における発芽試験の温度条件と近い条件であると考えられる。

20°C/30°C の温度条件における発芽試験の結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの正常発芽率はそれぞれ 98.8%、98.2%といずれも高く、正常発芽率を含む全ての項目で統計学的有意差は認められなかった (別添資料 15 の Table 3, p23)。

なお、米国では、収穫種子の発芽特性を多様な温度条件でより詳細に調査する目的で、AOSA が推奨する 20°C/30°C の温度条件に加え、その他の 6 つの温度条件 (5°C、10°C、20°C、30°C、10°C 16 時間/20°C 8 時間 (10°C/20°C) 及び 10°C 16 時間/30°C 8 時間 (10°C/30°C)) においても発芽試験を行っている。これら 6 つの温度条件では、10°C、30°C 及び 10°C/20°C の 3 つの温度条件で、発芽率と枯死種子率の項目において、本組換えトウモロコシと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 (別添資料 15 の Table 3, p23)。

10°C、30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下での発芽率は、本組換えトウモロコシが 99.0%、99.6%、99.7% で、対照の非組換えトウモロコシが 97.3%、98.8%、97.9% であり、本組換えトウモロコシの発芽率のほうが高かった。

10°C、30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下での枯死種子率は、本組換えトウモロコシが 0.4%、0.4%、0.3% で、対照の非組換えトウモロコシが 1.8%、1.3%、2.1% であり、本組換えトウモロコシの枯死種子率のほうが低かった。

#### f 交雑率

日本にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

#### g 有害物質の産生性

本組換えトウモロコシから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、2013 年に米国の温室で栽培した本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び 6 品種の商業栽培品種、

並びにこれらを栽培した土壌を用いて、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。

5 土壌微生物相試験の結果、土壌微生物の菌数について本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 16 の Table 1, p5)。

10 鋤込み試験及び後作試験については、米国において検定植物 (ハツカダイコン) の発芽株数、生育段階、草丈、新鮮重及び乾燥重を測定した。これらの調査項目のうち、わが国における隔離ほ場試験の際にも計測を行っているハツカダイコンの発芽株数及び乾燥重においては、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 17 の Table 1, p5)。

15 なお、米国における鋤込み試験及び後作試験の調査項目のうち、わが国における隔離ほ場試験の際に計測を行っていない調査項目 (生育段階、草丈及び新鮮重) では、鋤込み試験の生育段階において有意差が認められた。本組換えトウモロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階 (5.8 葉期) は、対照の非組換えトウモロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階 (6.7 葉期) よりも遅れていた (別添資料 17 の Table 1, p5)。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

20

#### (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。

25

#### (2) 使用等の方法

—

#### 30 (3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

—

- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

5

- (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

—

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は、以下のとおりである(表 5, p40)。

15

表5 本組換えトウモロコシの海外における申請予定<sup>21</sup>

2016年6月現在

| 機関                             | 安全性審査の種類 | 申請時期            | 承認時期            |
|--------------------------------|----------|-----------------|-----------------|
| カナダ保健省 (Health Canada)         | 食品       | 2014年11月        | 2016年2月         |
| カナダ食品検査庁 (CFIA)                | 環境・飼料    | 2014年11月        | 2016年2月         |
| 米国農務省 (USDA)                   | 環境       | 2015年4月         | 2016年3月         |
| 米国食品医薬品庁 (FDA)                 | 食品・飼料    | 2015年5月         | 2016年3月         |
| オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) | 食品       | ■ <sup>22</sup> | ■ <sup>21</sup> |

5

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は以下のとおりである(表6, p40)。

10

表6 本組換えトウモロコシのわが国における申請状況<sup>23</sup>

2016年6月現在

| 機関        | 内容                               | 申請時期            | 承認時期            |
|-----------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| 厚生労働省     | 食品 <sup>24</sup>                 | ■ <sup>25</sup> | ■ <sup>23</sup> |
| 農林水産省     | 飼料 <sup>26</sup>                 | ■ <sup>23</sup> | ■ <sup>23</sup> |
| 農林水産省・環境省 | 環境(第一種使用規程 <sup>27</sup> : 一般使用) | 2015年10月        | —               |

<sup>21</sup> 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。

<sup>22</sup> 社外秘につき非開示。

<sup>23</sup> 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。

<sup>24</sup> 食品衛生法に基づく。

<sup>25</sup> 社外秘につき非開示。

<sup>26</sup> 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

<sup>27</sup> 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。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価<sup>28</sup>

本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシの生物多様性影響を海外での栽培試験結果等を用いて評価した。

5

### 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

10 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 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質 (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 (充実度) 及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 (第一の 2-(6)-②-a~e, p35~37)) を米国のほ場及び温室において調査した。その結果、休眠性及び発芽率に関する項目において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。

20 米国で行った発芽試験のうち、わが国における隔離ほ場試験で採用している 25°C の温度条件に最も近い 20°C/30°C の温度条件では、本組換えトウモロコシと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が、これ以外の温度条件のうち、10°C、30°C 及び 10°C/20°C の 3 つの温度条件で統計学的有意差が認められた。

25 10°C、30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下での発芽率は、本組換えトウモロコシが、99.0%、99.6%、99.7% で、対照の非組換えトウモロコシが 97.3%、98.8%、97.9% であり、本組換えトウモロコシの発芽率のほうが高かった。

30 10°C、30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下での枯死種子率は、本組換えトウモロコシが、0.4%、0.4%、0.3% で、対照の非組換えトウモロコシが 1.8%、1.3%、2.1% であり、本組換えトウモロコシの枯死種子率のほうが低かった。

しかし、どの条件においても発芽率と枯死種子率における違いの程度は小さく、また、30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下では、本組換えトウモロコシの発

---

<sup>28</sup>本項目中で、第一の2-(6)-①の a~g 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。

芽率及び枯死種子率の平均値は、商業品種の範囲内であった。10°Cでの本組換えトウモロコシの発芽率(99.9%)は、本試験の商業品種の範囲(90.0% - 98.5%)外であったが、過去に行った同様の発芽試験(Woodrum and Rosenbaum, 2004; Woodrum, 2005)における商業品種の発芽率の範囲(69.0% ~ 100% 及び 82.0% ~ 100%)内に収まっていた。加えて、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも97%を超えていたこと、AOSAの推奨する温度条件を含め他の4つの温度条件ではその差異が認められなかったことから、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの発芽能力が大きく異なっていることはないと考えられた。また、休眠性を獲得したことの指標である硬実種子率は、すべての温度条件において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシで共に0%であった。よって、本試験で認められた発芽率と枯死種子率の違いが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

15 本組換えトウモロコシは、改変MON87419 DMO蛋白質及びPAT蛋白質の発現により除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに高い耐性を持つが、これらの除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

20 以上のことから、競合における優位性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

## (2) 影響の具体的内容の評価

25 —

## (3) 影響の生じやすさの評価

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、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考えられた。

35

## 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

- 5 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。

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作  
10 試験(第一の2-(6)-②-g, p37)を米国の温室において行った。その結果、米国で行った試験項目のうち、わが国における隔離ほ場試験の際に調査を行う項目(発芽株数及び乾燥重)では、統計学的有意差は認められなかった。しかし、それ以外の項目(生育段階、草丈及び新鮮重)では、鋤込み試験におけるハツカダイコンの生育段階においてのみ統計学的有意差が認められた。本組換えトウモ  
15 ロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階(5.8葉期)は、対照の非組換えトウモロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階(6.7葉期)よりも遅かった(別添資料17のTable 1, p5)。しかしながら、鋤込み試験におけるハツカダイコンの新鮮重及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった(別添資料17のTable 1, p5)。また、本組換えトウモロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階の範囲は5~7葉期であり、従来の商業栽培品種を鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階の範囲(5~8葉期)と変わるものではなかった(別添資料17のTable 2, p6)。このことから、鋤込み試験において認められたハツカダイコンの生育段階の違いは、本組換えトウモロコシにおいて有害物質の産生性が高まったことにより生じたものではないと考えられた。  
25

本組換えトウモロコシ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87419 DMO 蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両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た(第一の2-(1)-ロ-②, p16~18)。  
30

第一の2-(1)-ロ-③(p18~20)に示したように、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質である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がたく、宿主の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられた。同様に、改変 MON87419 DMO 蛋白質はジカンバに対し基質特  
35

異性を有し、ジカンバと構造的に類似するトウモロコシ内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して新たに有害物質を産生することはないと考えられた。

5 また、トウモロコシは除草剤ジカンバや2,4-Dなどの合成オーキシシン系除草剤にある程度の耐性を有することが知られている (Hatzios and Penner, 1982; Kansas State University, 2015)。しかし、上述したようにトウモロコシ中にはクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物は報告されていないため、改変MON87419 DMO蛋白質が内在性オーキシシン代謝経路に存在する化合物を含めトウモロコシ内在性化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することはないと考えられた。

10 また、それぞれの酵素反応が異なること、それぞれの基質の構造が全く異なることから、本組換えトウモロコシで発現している改変MON87419 DMO蛋白質及びPAT蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

15 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

20

## (3) 影響の生じやすさの評価

## 25 (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考えられた。

## 30 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

35 トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属植物と *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が可能なものはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

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

5       —

(3) 影響の生じやすさの評価

10       —

(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、本組換えトウモロコシは、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。

15

4 その他の性質

—

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

5 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。

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質（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（充実度）及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）、を検討した。その結果、米国で行った発芽試験のうち、わが国における  
10 隔離ほ場試験で採用している 25°C の温度条件に最も近い 20°C/30°C の温度条件では、本組換えトウモロコシと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が、これ以外の温度条件では、10°C、30°C 及び 10°C/20°C の 3 つの温度条件で統計学的有意差が認められた。

検討の結果、発芽率と枯死種子率における違いの程度は小さかった。また、  
15 30°C 及び 10°C/20°C の温度条件下では、本組換えトウモロコシの発芽率及び枯死種子率の平均値は、商業品種の範囲内であった。10°C での本組換えトウモロコシの発芽率（99.9%）は、本試験の商業品種の範囲（90.0% - 98.5%）外であったが、過去に行った同様の発芽試験（Woodrum and Rosenbaum, 2004; Woodrum, 2005）における商業品種の発芽率の範囲（69.0% ~ 100% 及び 82.0% ~ 100%）内に  
20 収まっていた。加えて、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも 97% を超えていたこと、AOSA の推奨する温度条件を含め他の 4 つの温度条件ではその差異が認められなかったことから、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの発芽能力が大きく異なっていることはないと考えられた。また、休眠性を獲得したことの指標である硬実種子率は、すべての温度条件において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウ  
25 モロコシで共に 0% であった。よって、本試験で認められた発芽率と枯死種子率の違いが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

よって、本試験で認められた発芽率と枯死種子率の違いが本組換えトウモロ  
30 コシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

本組換えトウモロコシは、改変 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに高い耐性を持つが、これらの除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

35 したがって、本組換えトウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性：

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。

- 5 土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験の結果、米国で行った試験項目のうち、わが国における隔離ほ場試験の際に調査を行う項目では、統計学的有意差は認められなかった。しかし、それ以外の項目では、鋤込み試験におけるハツカダイコンの生育段階においてのみ、本組換えトウモロコシ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。しかしながら、新鮮重及び乾燥重に統計学的有意差が認められなかったこと、及び本組換えトウモロコシを鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階の範囲が、従来の商業栽培品種を鋤込んだ培土で栽培したハツカダイコンの生育段階の範囲と変わるものではなかったことから、本試験のハツカダイコンの生育段階において認められた違いは本組換えトウモロコシにおいて有害物質の産生性が高まったことによるものではないと考えられた。
- 15 本組換えトウモロコシ中では、除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87419 DMO 蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両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た。
- 20 改変 MON87419 DMO 蛋白質は除草剤ジカンバに対し高い基質特異性を有し、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートに対して高い基質特異性を有しているため、改変 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネート以外の化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することで、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。
- 25 したがって、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：

- 30 わが国において、トウモロコシと交雑可能な近縁野生種は無いため、影響を受ける可能性のある野生動植物種は特定されない。したがって、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。

- 35 以上のことから、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

## 引用文献

Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.

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.

Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007a. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007b. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.

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.

CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-1/eng/1330985739405/1330985818367>) [Accessed Jul 13 2015].

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.

Clark, S.E. and G.K. Lamppa. 1992. Processing of the precursors for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystem II and photosystem I during import and in an organelle-free assay. *Plant Physiology* 98: 595-601.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.

Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.

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.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.

FAO. 2015. Food and Agriculture Organization statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> [Accessed Sep 1 2015].

Flasiniski, S. 2015. Plant regulatory elements and uses thereof. Patent US 9,062,316 B2, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

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.

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.

Gasser, C.S., J.A. Winter, C.M. Hironaka and D.M. Shah. 1988. Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *Journal of Biological Chemistry* 263: 4280-4287.

GenBank. 2015. OJ1779\_B07.106 allergen RA5B precursor [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. [Accessed Jul 13 2015]

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.

Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.

Hatzios, K.K. and D. Penner. 1982. Metabolic reactions and pathways of herbicide metabolism. Pages 15-31 in *Metabolism of Herbicides in Higher Plants: Issues and Concepts in Contemporary Biology*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

Joung, Y.H. and K. Kamo. 2006. Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus*. *Plant Cell Rep* 25: 1081-1088.

Kansas State University. 2015. 2015 chemical weed control for field crops, pastures, rangeland, and noncropland. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas.

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.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

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.

Luna, S.V., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41: 1551-1557.

Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.

Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142.

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.

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.

Meinzel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* 8: 626-649.

NCGA. 2013. The world of corn. National Corn Growers Association, Chesterfield, Missouri.

OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.27. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.

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<sup>TM</sup> 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.

Pleasant, 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 of America* 98: 11919-11924.

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.

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.

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. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Zeitschrift für Naturforschung C 39: 500-504.

Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.

Woodrum, C.L. 2005. Dormancy and Germination Evaluation of Insect-Protected Corn MON 89034 and MON 89597 for an Assessment of Equivalence and Weed Potential Using Seed Produced at Three U.S. Sites During 2004. Monsanto Technical Report MSL-19779. St. Louis, Missouri.

Woodrum, C.L. and E.W. Rosenbaum. 2004. Dormancy and Germination Evaluation of Insect-Protected Corn MON 8 10 Using Seed Produced During 2002. Monsanto Technical Report MSL-19270. St. Louis, Missouri.

Wych, R.D. 1988. Production of hybrid seed corn. Pages 565-607 in Corn and Corn Improvement. Third Edition. G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

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.

柿本陽一・山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京

財務省 2015 財務省貿易統計

(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed Sep1 2015].

千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採取 転作全書 第三巻 雑穀 社団法人 農山漁村文化協会 東京

瀧澤康考 2001 子実用トウモロコシの栽培 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

戸澤英男 2005 トウモロコシ ー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー 農山漁村文化協会 東京

中村茂文 2001 生育のステージと生理、生態 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

西尾剛 2002 新農学実験マニュアル 改訂版第3版、株式会社ソフトサイエンス社

農林水産省 2007 農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え植物に係る第一種使用規程の承認の申請について (通知). ([http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/notification\\_maff\\_191210\\_plant\\_rev.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/notification_maff_191210_plant_rev.pdf)) [Accessed Jul 13 2015]

農林水産省 2014a 平成25年産野菜出荷統計 平成26年12月15日公表 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001128458>) [Accessed Sep 1 2015]

農林水産省 2014b 飼料用トウモロコシの流通・加工実態調査結果報告書 平成26年3月26日公表 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140326-01.pdf>) [Accessed Jul 13 2015].

農林水産省 2015a 平成 26 年耕地及び作付面積統計 平成 27 年 4 月 17 日公表 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129531>) [Accessed Sep 1 2015]

農林水産省 2015b 飼料をめぐる情勢 平成 27 年 4 月公表 ([http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1\\_siry/pdf/04\\_meguji\\_illust\\_all.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siry/pdf/04_meguji_illust_all.pdf)) [Accessed Sep 1 2015]

山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

## 緊急措置計画書

平成 27 年 10 月 19 日

氏名 日本モンサント株式会社  
代表取締役社長 山根 精一郎  
住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, Zea mays subsp. mays* (L.) Itis) (MON87419, OECD UI: MON-87419-8) (以下「本組換えトウモロコシ」という。) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

平成27年10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<br>東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号<br>(電話番号 03-6264-4790) |
|      | 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 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 申請業務管理・運営課 課長                                |
|      | 日本モンサント株式会社 広報部 部長                                                 |
|      | 日本モンサント株式会社 広報部                                                    |

\*: 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、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。

## 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内

容を周知するための方法

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

## 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続する

ための具体的な措置の内容

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え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組換えトウモロコシに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信頼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可能性が示唆された場合、そのことを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

- 別添資料 1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子から推定した改変 MON87419 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT507801 (社外秘)
- 別添資料 3 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 87419 (MSL0025656) (社外秘)
- 別添資料 4 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Herbicide Tolerant Corn MON 87419 Across Three Generations (MSL0025519) (社外秘)
- 別添資料 5 Amended Report for MSL0025438: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Corn MON 87419 (MSL0025902) (社外秘)
- 別添資料 6 Demonstration of the Presence of DMO and PAT Proteins in Maize Seed Samples across Multiple Generations of MON 87419 (MSL0025597) (社外秘)
- 別添資料 7 Assessment of DMO and PAT Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from Maize MON 87419 Produced in United States Field Trials During 2013 (MSL0025758) (社外秘)
- 別添資料 8 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87419 (社外秘)
- 別添資料 9 Amended Report for In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON87419” using a 200 ng Total DNA Load and 25 µl Reaction Volume (VOP-2014-0413) (社外秘)
- 別添資料 10 Phenotypic Evaluation of Maize MON 87419 in 2013 U.S. Field Trials (MSL0026020) (社外秘)

- 別添資料 11      Assessment of the Effect of Cold Stress on Growth of Maize MON87419 in 2013 under Controlled Environmental Conditions (MSL0025566) (社外秘)
- 別添資料 12      Post-Season Senescence of Maize MON 87419 in a 2013 U.S. Field Trial (PLC-2013-0019) (社外秘)
- 別添資料 13      Pollen Viability and Morphology Evaluation of Maize MON 87419 Grown in a 2013 U.S. Field Trial (MSL0025678) (社外秘)
- 別添資料 14      Husk Coverage and Shattering Evaluation of Maize MON 87419 in a 2014 U.S. Field Trial (PLC-2014-0089) (社外秘)
- 別添資料 15      Amended Report for MSL0026040: Dormancy and Germination Evaluation of Maize MON 87419 Using Seed Produced at U.S. Field Sites (MSL0026134) (社外秘)
- 別添資料 16      Summary Report for the Enumeration of Soil Microorganisms from a Greenhouse Study Assessing Potential Residual Effects from MON 87419 Maize (MSL0025562) (社外秘)
- 別添資料 17      Residual Effects Evaluation of Maize MON 87419 (MSL0025647) (社外秘)