

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ(改変 *dmo, pat, ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) 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の概要.....	3
5	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
10	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	3
	(2) 使用等の歴史及び現状.....	3
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	3
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
15	(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
	イ 基本的特性.....	5
20	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
25	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ず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
30	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.....	11
35	イ 構成及び構成要素の由来.....	11
	ロ 構成要素の機能.....	13

	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.....	13
	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 .....	24
5	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....	28
	(2) ベクターに関する情報 .....	32
	イ 名称及び由来.....	32
	ロ 特性 .....	32
10	① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....	32
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	32
	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.....	33
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	33
15	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....	33
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....	33
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....	33
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....	33
	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 .....	33
20	③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過.....	34
	(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.....	36
25	① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	36
	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 .....	38
	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 .....	41
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.....	41
	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.....	44
35	(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 .....	44

	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	44
	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 .....	44
5	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 .....	45
	a 形態及び生育の特性.....	45
	b 生育初期における低温耐性 .....	46
	c 成体の越冬性 .....	46
10	d 花粉の稔性及びサイズ.....	46
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 .....	47
	f 交雑率 .....	48
	g 有害物質の産生性 .....	48
	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	49
15	(1) 使用等の内容.....	49
	(2) 使用等の方法.....	49
	(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 .....	49
20	(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 .....	49
	(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 .....	49
	(6) 国外における使用等に関する情報.....	49
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	51
25	1 競合における優位性 .....	51
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	51
	(2) 影響の具体的内容の評価 .....	52
	(3) 影響の生じやすさの評価 .....	52
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	52
30	2 有害物質の産生性.....	52
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	52
	(2) 影響の具体的内容の評価 .....	53
	(3) 影響の生じやすさの評価 .....	54
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	54
35	3 交雑性 .....	54
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	54

	(2) 影響の具体的内容の評価 .....	54
	(3) 影響の生じやすさの評価 .....	54
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 .....	54
	4 その他の性質 .....	54
5	第三 生物多様性影響の総合的評価 .....	55
	参考文献 .....	57
	緊急措置計画書 .....	65
	別添資料リスト .....	67
10	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

2020年5月25日

農林水産大臣 江藤 拓 殿  
環境大臣 小泉 進次郎 殿

5

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社  
申請者 代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ 印  
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

10

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。

15

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 <i>dmo, pat, ft_t</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Itis ) (MON87429, OECD UI : MON-87429-9)
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の概要

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

###### ① 和名、英名及び学名

10

和名：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。

###### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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。

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)。

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報告はない。

30

##### (2) 使用等の歴史及び現状

###### ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの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、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、  
紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、  
5 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  
20 中心に、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、2016 年における全世界のトウモロコ  
シの栽培面積は約 1 億 9 千万 ha であり、上位国は、中国 3,898 万 ha、米国  
3,511 万 ha、ブラジル 1,496 万 ha、インド 1,020 万 ha、メキシコ 760 万 ha で  
ある (FAO, 2018)。

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、2017 年の青刈りデントコー  
ンの作付面積は約 9 万 4,800 ha で (農林水産省, 2018a)、同年のスイートコー  
ンの作付面積は約 2 万 2,700 ha である (農林水産省, 2018b)。

### 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 10 a あたり 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と、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 (F<sub>1</sub>) 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。2017 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.3 %が飼料(8.7%の蒸留粕を含む)、30.1 %がエタノール製造、13.5 %が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった

15       (NCGA, 2018)。

わが国では、2017年に約 1,531 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 1,037 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, 2018)。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,

20       2018c)。

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, 2014)。

### 25       (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ   基本的特性

—

30

#### ロ   生息又は生育可能な環境の条件

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)。

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

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)。

- 5 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) が抽出し、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、pH 5.0~8.0 の範囲で栽培可能である (戸澤, 2005)。

## 10 ハ 捕食性又は寄生性

—

## ニ 繁殖又は増殖の様式

15

### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

- 20 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)。

- 25 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°C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)。

- 30 さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987; 中村, 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°C 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°C、相対湿度 55 % 以内に保つことが必要である (中村, 2001; OECD, 2003)。

- 35 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

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ない。

- 5 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

10 トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、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)。

15 トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* 種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* 属である。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東部、南部から南米となっている (山田, 2001; OECD, 2003)。

20 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

25 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 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)。

30 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  $\mu\text{m}$  程度である (中村, 2001)。

35 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の隔離距離は、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、200~400 m とされている (千藤, 2001)。

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 (0 m) 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 5 m 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 10 m 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)。

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 1 m、2 m、4~5 m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/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。

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 1 m 及び 5 m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/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)。

#### ホ 病原性

—

#### 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また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。

#### 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、2013 年に熊本県内の港湾周辺で 1 個体、2015 年に鹿児島県内の港湾周辺で 1 個体の計 2 個体報告されている (農林水産省, 2014; 農林水産省, 2017)。

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 バイエルグループ<sup>1</sup>は、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うこと及び効果的な雑草防除のために複数の除草剤に対する耐性を付与することを目的として、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo*, *pat*, *ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を作出した。

10 本組換えトウモロコシには改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。トウモロコシを含む単子葉植物で花粉における低い活性が報告されている 35S プロモーター (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005) と雄性組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列により、本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉では発現しないか、発現してもその量はわずかになる。一方で、本組換えトウモロコシの栄養組織及び雌性組織では、除草剤グリホサート耐性を付与する (Yang et al. (2018) の Figure 3D) のに十分な量の改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現している。上述のように、本組換えトウモロコシの花粉では改変 CP4 EPSPS 蛋白質は発現しないか、発現してもその量はわずかであり、除草剤グリホサートを本組換えトウモロコシの雄穂形成初期 (8 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 頃) に 2 回散布すると、稔性を有する花粉の形成が阻害される (Yang et al. (2018) の Figure 3H)。

25 なお、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現様式を利用した遺伝子組換え作物で、同様に除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性の形質をもつ遺伝子組換えトウモロコシが、すでに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 (除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87427, OECD UI: MON-87427-7) (承認日: 2013 年 5 月 23 日) (以下、「MON87427 系統」という。))。この系統は、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。

---

<sup>1</sup> バイエルグループは、バイエルグループのすべての子会社及び関連会社、モンサント・カンパニーとその関連会社の総称である。

本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用することにより、図 1 (p10) に示すように本組換えトウモロコシからハイブリッド品種の種子を効率的に生産することが可能となる。

5 また、本組換えトウモロコシには改変 *dmo* 遺伝子から発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。また、*pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質により、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。さらに、*ft\_t* 遺伝子から発現する FT\_T 蛋白質によりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。

10

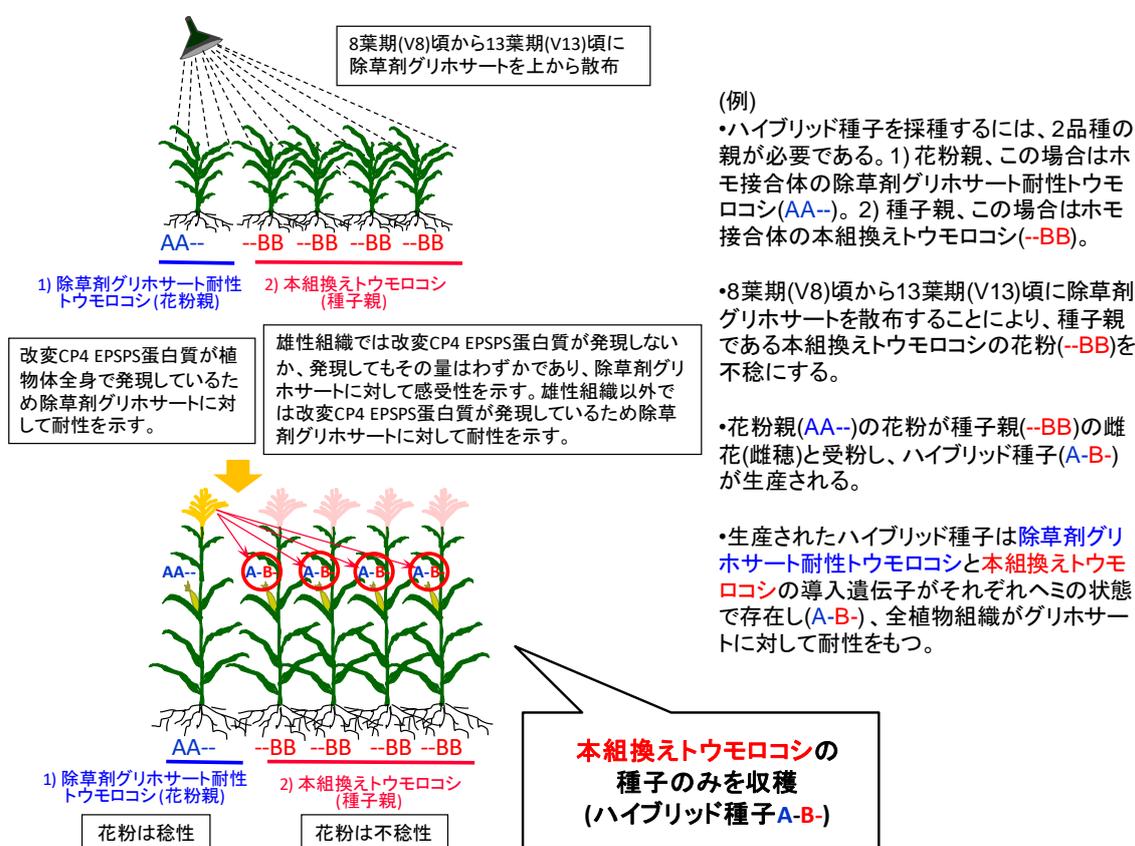


図 1 本組換えトウモロコシを用いた効率的なハイブリッド種子の採種方法<sup>2</sup>

AA- (花粉親) の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、--BB (種子親) で用いられている 35S プロモーターと異なり、恒常的な転写を誘導するプロモーターである。このため、AA- (花粉親) では改変 CP4 EPSPS 蛋白質が雄性組織を含め植物体全身で発現する。

15

<sup>2</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

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構成及び構成要素の由来は、図 5 (p19) 及び表 1 (p20~23) に示した。

10 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。) の  
アミノ酸配列は、*Stenotrophomonas 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 APG6 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」  
15 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、APG6 由来のアミ  
ノ酸が全て切り離されたもの及び APG6 由来の 1 アミノ酸 (システイン) が N  
末端に付加されたものの 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 MON87429 DMO  
20 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)、輸送ペ  
プチドの一部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., 2007)。

25 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。) 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、*Streptomyces*  
*viridochromogenes* 由来の野生型 PAT 蛋白質と同一のものである (以下、「PAT  
30 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)。

35 本組換えトウモロコシに導入された *ft\_t* 遺伝子は、土壌細菌 *Sphingobium*  
*herbicidovorans* 由来の R-2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸ジオキシゲナー  
ゼ遺伝子 (R-2,4-Dichlorophenoxypropionate dioxygenase, *Rdpa*) を改変したもので  
あり、野生型 *RdpA* 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、30 カ所のアミノ酸置換

<sup>3</sup>がある。この改変 *Rdpa* 遺伝子から発現する蛋白質は **FOPs and T**wo, Four-D (2,4-D) tolerant, variant **T** (以下、「FT\_T 蛋白質」とする。) と呼ばれている (Larue et al., 2019)。この改変により、FT\_T 蛋白質は野生型の RdpA 蛋白質と比較して除草剤 2,4-D に対する酵素反応速度と基質親和性が改良されていること  
5 に加え、トウモロコシ栽培地域の夏季の気温においても酵素活性を維持する (Larue et al., 2019)。よって、本組換えトウモロコシに導入された改変 *Rdpa* 遺伝子を「*ft\_t* 遺伝子」、発現する蛋白質を「FT\_T 蛋白質」とする。なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する FT\_T 蛋白質の推定アミノ酸配列と、野生型 RdpA 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は約 89% である。また、本組換えトウ  
10 モロコシでは、*ft\_t* 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、葉緑体輸送ペプチド MDH 由来の 1 アミノ酸 (アラニン) が N 末端に付加されている。なお、前述したとおり、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)、輸送ペプチドの一部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., 2007)。  
15

本組換えトウモロコシに導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。本組換えトウモロコシでは、完全長の改変 CP4 EPSPS 蛋白質 (455 アミノ酸) と最初のメチオニンが切り離された改変 CP4 EPSPS 蛋白質 (454 アミノ酸) が生じる。以下、両蛋白質を総称して「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。  
20

本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。  
25

---

<sup>3</sup> 30カ所の置換場所について、開始コドンに相当するメチオニンを1番目として、アミノ酸の位置を示した。6番目のセリンがトレオニン、9番目のセリンがトレオニン、10番目のグルタミンがアスパラギン、11番目のアルギニンがリシン、12番目のフェニルアラニンがチロシン、13番目のグルタミン酸がアルギニン、14番目のアルギニンがフェニルアラニン、16番目のアラニンがアスパラギン酸、82番目のロイシンがイソロイシン、103番目のグリシンがセリン、105番目のバリンがフェニルアラニン、130番目のアスパラギン酸がグルタミン酸、134番目のヒスチジンがチロシン、145番目のトレオニンがセリン、169番目のアルギニンがリシン、178番目のグルタミンがトレオニン、180番目のアルギニンがトリプトファン、209番目のグリシンがバリン、210番目のセリンがトレオニン、213番目のリシンがアルギニン、214番目のグリシンがアラニン、217番目のバリンがシステイン、224番目のアルギニンがリシン、226番目のグルタミン酸がグルタミン、235番目のプロリンがセリン、246番目のアルギニンがリシン、289番目のグリシンがアラニン、291番目のバリンがアスパラギン酸、292番目のアルギニンがリシン、294番目のアラニンがセリン。

ロ 構成要素の機能

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

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 (p20~23) に示した。

10 本組換えトウモロコシに導入された 4 つの遺伝子発現カセット (改変 *dmo*, *pat*, *ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*) のうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットから発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は組織特異的に発現する。すなわち、本組換えトウモロコシ中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉においては発現しないか、発現しても微量であるのに対し、栄養組織及び雌性組織においては除草剤グリホサート耐性を付与するのに十分な量で発現している。これは、改変 *cp4 epsps*  
15 遺伝子発現カセットに存在するカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター及びトウモロコシ内在性の雄性組織特異的低分子干渉 RNA (**male tissue specific small interfering RNA**) (以下、「mts-siRNA」という。) の標的配列に起因する (図 2, p14)。この CaMV 35S プロモーターによる制御と mts-siRNA の標的配列による制御について、以下に記載する。

20

【CaMV 35S プロモーターによる制御】

25 本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、CaMV 35S プロモーターにより発現する。CaMV 35S プロモーターは、一般的に目的遺伝子を全組織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物においては、花粉における CaMV 35S プロモーターの活性はごくわずかであることが報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。

## 【mts-siRNA の標的配列による制御】

RNA 干渉 (RNAi) は、植物を含む真核生物において内在性遺伝子の発現調節のために広く保存されている機構であり (Fire et al., 1998; Jones-Rhoades et al., 2006)、micro RNA (miRNA) 及び small interfering RNA (siRNA) により誘導される (Carthew and Sontheimer, 2009)。Yang ら (2018) によって報告されている mts-siRNA は、雄穂において内在性遺伝子の発現調節をしていると考えられる。

本組換えトウモロコシでは、導入した改変 *cp4 epsps* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域に 201 塩基長の mts-siRNA の標的配列を付加することで (図 2, p14)、上述のトウモロコシの雄穂で特異的に発現する mts-siRNA による RNAi 機構を利用し、雄穂で転写される改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を組織特異的に分解する。

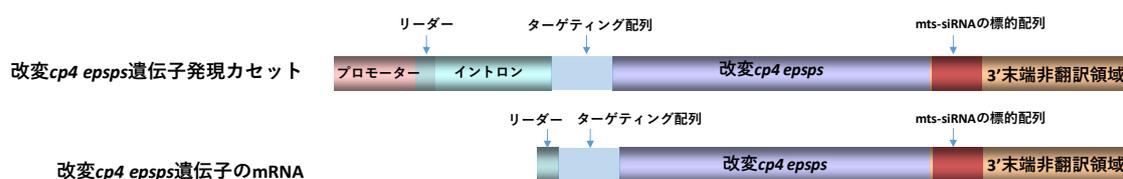


図 2 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA の模式図<sup>4</sup>

201 塩基長の mts-siRNA の標的配列が、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの 3'末端非翻訳領域に付加されている。

本組換えトウモロコシの雄穂中で mts-siRNA がどのように改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を分解するか作用機作を、内在性の mts-siRNA による RNAi 機構とともに図 3 (p16) の中の番号に沿って説明する。

以下の図 3 (p16) の最初の 5 つのステップは、これまでに判明している siRNA による RNAi 機構 (Gorski et al., 2017) をもとに、従来トウモロコシにおける内在性の mts-siRNA のプロセスを示している。

ステップ 1 : 内在性の mts-siRNA 遺伝子から mts-siRNA 前駆体 RNA が産生

<sup>4</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

される。

ステップ 2 : mts-siRNA 前駆体 RNA が Dicer (DCL4) と呼ばれる酵素に切断され、mts-siRNA が産生される。

5                   ステップ 3 : ステップ 1~2 とは独立して、内在性の標的遺伝子から mts-siRNA の標的配列 (図 3 の赤線部分) をもつ mRNA (以下、「標的配列をもつ内在性遺伝子の mRNA」とする。) が転写される。

10                   ステップ 4 : ステップ 2 で産生された mts-siRNA が RNA-induced silencing complex (RISC) と結合し、ステップ 3 で産生された標的配列をもつ内在性遺伝子の mRNA と結合する。

15                   ステップ 5 : ステップ 4 の標的配列をもつ内在性遺伝子の mRNA は RISC により切断される。この mRNA の切断箇所は、3'末端がポリアデニル化されておらず、5'末端にもキャップ構造がないことから、3'-5'及び 5'-3'エキソリボヌクレアーゼにより分解される。このプロセスにより mRNA の蛋白質への翻訳が阻害される。

20                   本組換えトウモロコシでは、上記の内在性 siRNA による RNAi 機構を利用し、標的配列をもつ改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する mRNA が分解される。以下の 3 ステップは本組換えトウモロコシの雄穂特異的に起こるプロセスを示している。

25                   ステップ 6 : 改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA が有する mts-siRNA の標的配列を、mts-siRNA が配列特異的に認識し、mRNA の切断が誘導される。

                  ステップ 7 : 切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA の切断箇所は、3'末端がポリアデニル化されておらず、5'末端にもキャップ構造がないことから、3'-5'及び 5'-3'エキソリボヌクレアーゼにより分解される。

30                   ステップ 8 : 上述のプロセスによって改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA から翻訳される蛋白質量が減少するため、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、雄穂においては発現しないか、発現しても微量である。

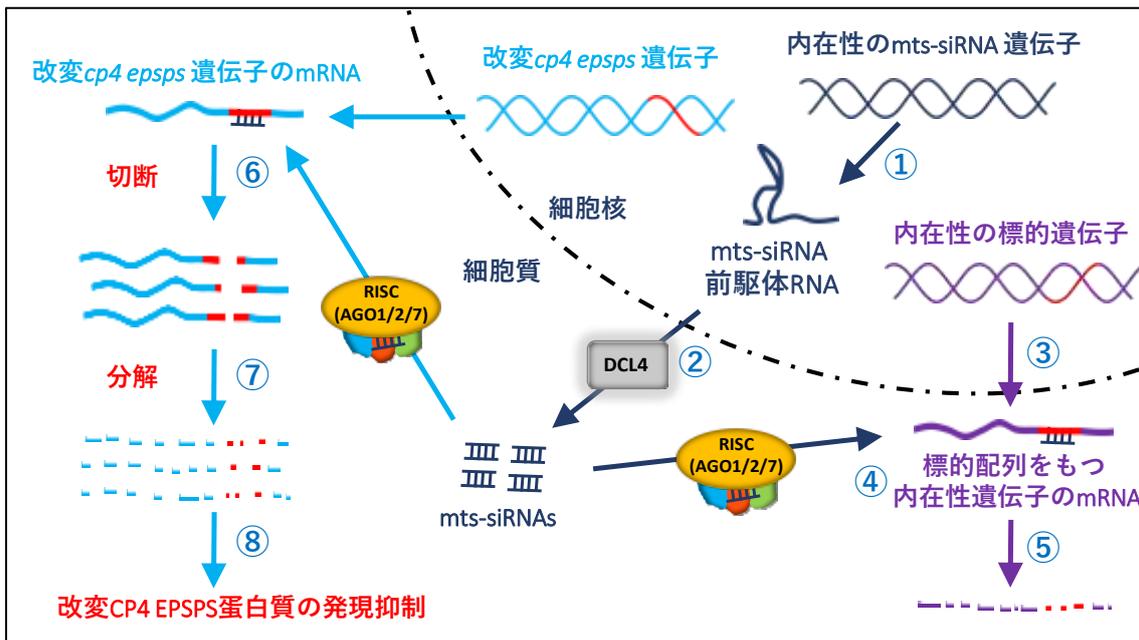


図3 本組換えトウモロコシの雄穂における mts-siRNA の標的配列による遺伝子の発現調節 ((Yang et al., 2018)より改変)<sup>5</sup>

5 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットに組み込んだ mts-siRNA の標的配列は 201 塩基長であり (図 2, p14)、トウモロコシ内在性の配列に由来する。この配列の選定方法の詳細が Yang ら (2018) により報告されている。概要を以下に記載した。

1) トウモロコシの雄穂で特異的に発現する複数の siRNA (mts-siRNA) を見出し、2) トウモロコシにおいてこれらの mts-siRNA に認識される配列を特定、  
 10 3) これらの配列情報をもとに、mts-siRNA に認識される配列を複数 3'末端非翻訳領域にもつ遺伝子 EU974548 を選定、4) EU974548 が幅広いトウモロコシ系統間で保存されている遺伝子であることを確認、5) EU974548 に由来する 201 塩基長の配列を選定した。

15

また、Yang ら (2018) は、本組換えトウモロコシの雄穂特異的に改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が 3'末端非翻訳領域で切断されていることを確認するために、切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA からの相補的 DNA (complementary DNA: 以下、「cDNA」とする。)を 5'RACE (**R**apid

<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バイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

5 **Amplification of cDNA Ends**) 法<sup>6</sup>により解析した。その結果、切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物は、雄穂のみで確認され (図 4 のパネル右, レーン T1~T4, p18)、葉及び雌穂では確認されなかった (図 4 のパネル右, レーン L, E, p18)。また、完全長の改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 2.1 kb の cDNA 増幅産物が供試された全ての組織 (葉、雌穂、雄穂) で発現していた (図 4 のパネル左, レーン L, E, T1~T4, p18)。

10 この結果は、雄穂における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現様式を調べた結果と一致していると考えられた。改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現は、雄穂の葯壁と花糸で確認されたが、小孢子母細胞とタペート細胞では発現が確認されなかった (別添資料 2 の Figure1, p10~11)。なお、タペート細胞は花粉成熟期まで小孢子及び花粉に養分を供給し、小孢子は細胞分裂を行い花粉となる (Goldberg et al., 1993; Huang et al., 2009)。また、一般的にタペート細胞が破壊されることにより花粉が不稔になることが知られている (Goldberg et al., 1993)。

15 さらに、Yang ら (2018) が切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物を塩基配列解析した結果、切断箇所は改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの 3'末端非翻訳領域に付加した *mts-siRNA* の標的となる相補的な配列中であることが確認され (Yang et al. (2018) の Figure 2B)、切断は *mts-siRNA* の標的配列内でのみ起っていることが確認された。

20

---

<sup>6</sup> 5'RACE法とは、mRNAの未知領域を決定する際に用いられる手法。3'末端側の配列が既知の mRNA から cDNA を合成し、5'末端側の配列を PCR で増幅。PCR の増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認。増幅産物をクローニングし、塩基配列解析を行うことで、未知の 5'末端側領域の配列を決定する。

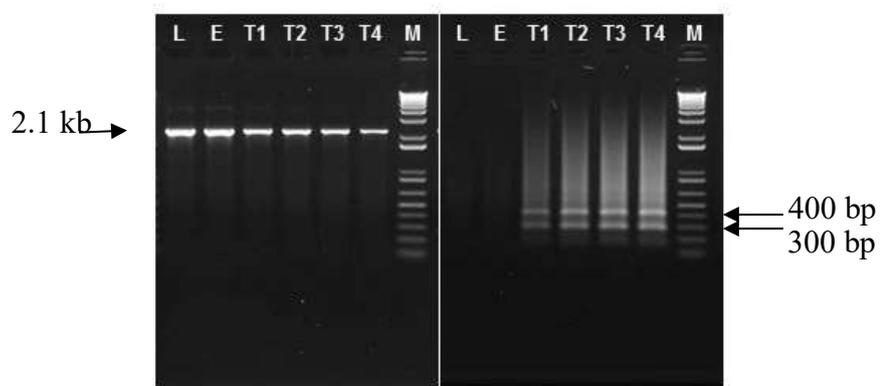


図 4 本組換えトウモロコシにおける改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA の配列特異的切断 (5'RACE 法) (Yang et al. (2018) の Figure 2A より転載)<sup>7</sup>

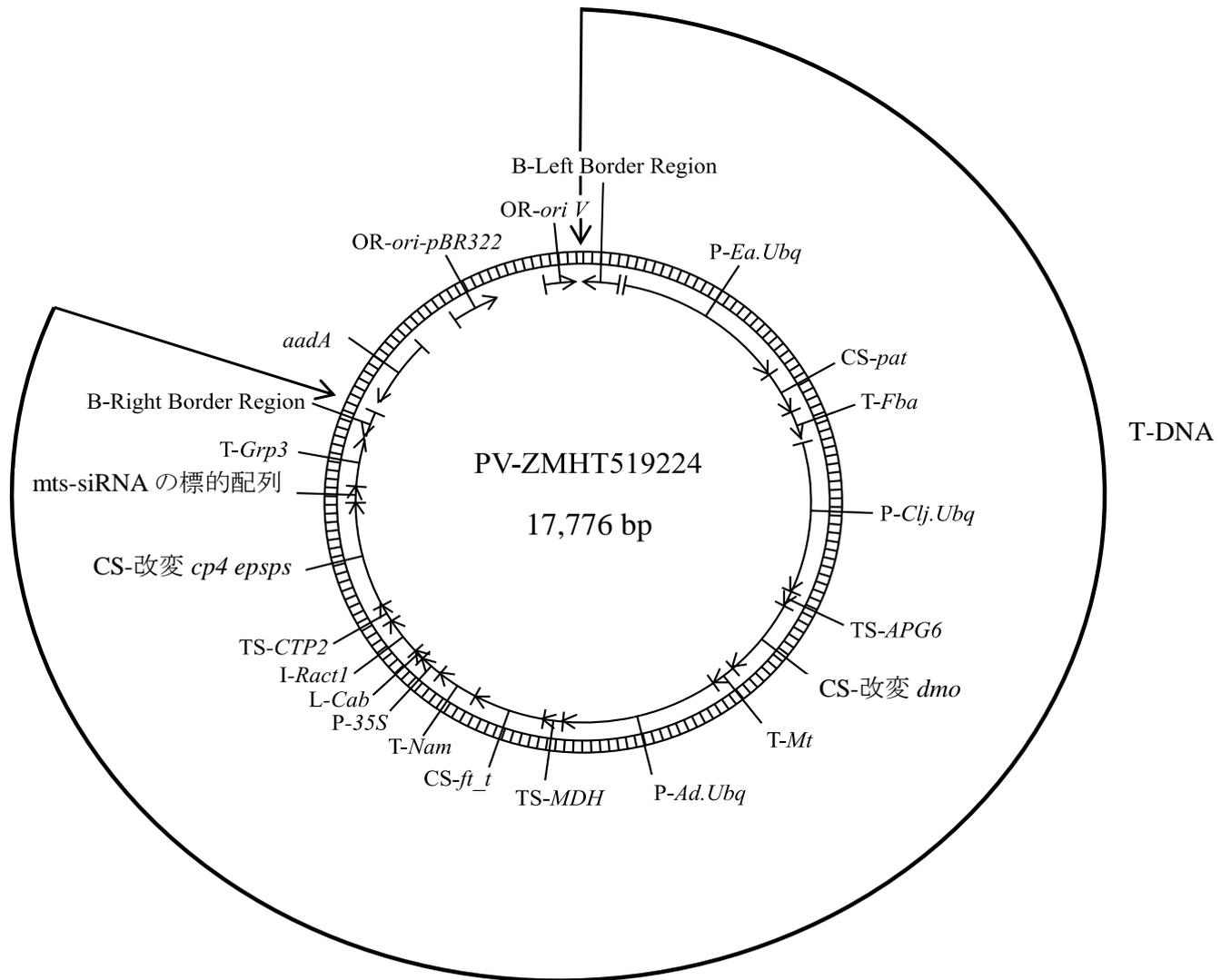
5 左のパネル：完全長の改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 2.1 kb の cDNA 増幅産物。なお、PCR 伸長時間は 130 秒。

右のパネル：切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物。なお、PCR 伸長時間は 25 秒。

L: 葉 (6 葉期)、E: 雌穂 (雄穂抽出期)、T1: 雄穂 (6 葉期)、T2: 雄穂 (8 葉期)、T3: 雄穂 (10 葉期)、T4: 雄穂 (12 葉期)、M: 分子量マーカー

10

<sup>7</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。



5 図5 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT519224 のプラスミドマップ<sup>8</sup>

<sup>8</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能

9

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA 領域		
B <sup>注1</sup> -Left Border Region	1-442	<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左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	443-513	DNA クローニングの際に利用された配列。
P <sup>注2</sup> - <i>Ea.Ubq</i>	514-2,695	<i>Erianthus ravennae</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026095)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	2,696-2,700	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS <sup>注3</sup> - <i>pat</i>	2,701-3,252	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィンオキシド N-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)。
T <sup>注4</sup> - <i>Fba</i>	3,253-3,629	アワ ( <i>Setaria italica</i> ) 由来のフルクトースビスリン酸アルドラーゼ ( <i>Fba</i> ) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH026101)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	3,630-3,691	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Clj.Ubq</i>	3,692-5,617	ジュズダマ ( <i>Coix lacryma-jobi</i> ) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026097)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	5,618-5,627	DNA クローニングの際に利用された配列。

<sup>9</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
TS <sup>注5</sup> -APG6	5,628-5,831	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来の熱ショック蛋白質 (Hsp101) ホモログの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Albino and pale green 6 (Apg6)</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: NM_121549)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS-改変 <i>dmo</i>	5,832-6,854	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 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	6,855-6,862	DNAクローニングの際に利用された配列。
T- <i>Mt</i>	6,863-7,162	イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) のメタロチオネイン様蛋白質をコードする <i>OsMt</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026099)、転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	7,163-7,170	DNAクローニングの際に利用された配列。
P- <i>Ad.Ubq</i>	7,171-9,127 (merged)	ダンチク ( <i>Arundo donax</i> ) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026096)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	9,128-9,140	DNAクローニングの際に利用された配列。
TS- <i>MDH</i>	9,141-9,383	シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のリンゴ酸デヒドロゲナーゼの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Mdh</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: BT000621)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>ft_t</i>	9,384-10,271	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> に由来する <i>Rdpa</i> 遺伝子の改変バージョンから発現する FOPs 及び 2,4-D ジオキシゲナーゼ (FOPs and 2,4-D dioxygenase version T: FT_T)。アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性を付与する (Müller et al., 2006; Larue et al., 2019)。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
Intervening Sequence	10,272-10,286	DNAクローニングの際に利用された配列。
T- <i>Nam</i>	10,287-10,803	イネ ( <i>O. sativa</i> ) のno apical meristem ( <i>Nam</i> ) 蛋白質ドメインの3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026100)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	10,804-10,809	DNAクローニングの際に利用された配列。
P-35S	10,810-11,133	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35S プロモーター領域 (Odell et al., 1985)。一般的に目的遺伝子を全組織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物においては、花粉における活性はごくわずかであることが報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。
Intervening Sequence	11,134-11,155	DNAクローニングの際に利用された配列。
L <sup>注6</sup> - <i>Cab</i>	11,156-11,216	コムギ ( <i>Triticum aestivum</i> ) の葉緑素a/b結合蛋白質のリーダー配列 (Lamppa et al., 1985)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
Intervening Sequence	11,217-11,232	DNAクローニングの際に利用された配列。
I <sup>注7</sup> - <i>Ract1</i>	11,233-11,712	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	11,713-11,721	DNAクローニングの際に利用された配列。
TS- <i>CTP2</i>	11,722-11,949	シロイヌナズナ ( <i>A. 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。
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	11,950-13,317	<i>Agrobacterium</i> 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。
Intervening Sequence	13,318-13,323	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-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
mts-siRNAの標的配列	13,324-13,524	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) に由来するEU974548 遺伝子のcDNAの改変された3'末端非翻訳領域の部分配列で、雄性組織特異的低分子干渉RNAの標的配列を含む (Brodersen and Voinnet, 2006; Yang et al., 2018)。
Intervening Sequence	13,525-13,532	DNAクローニングの際に利用された配列。
T-Grp3	13,533-14,143	イネ ( <i>O. sativa</i> ) のグリシンリッチRNA結合蛋白質 (GRP3) をコードする遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026098)、転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	14,144-14,184	DNAクローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	14,185-14,515	<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)。
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	14,516-14,659	DNAクローニングの際に利用された配列。
aadA	14,660-15,548	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾンTn7由来の3''(9)-O-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	15,549-16,082	DNAクローニングの際に利用された配列。
OR <sup>注8</sup> -ori-pBR322	16,083-16,671	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	16,672-17,293	DNAクローニングの際に利用された配列。
OR-ori V	17,294-17,690	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	17,691-17,776	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> CS - Coding Sequence (コード配列)

注<sup>4</sup> T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注<sup>5</sup> TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注<sup>6</sup> L - Leader (リーダー配列)

注<sup>7</sup> I - Intron (イントロン)

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 MON87429 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MON87429 DMO蛋白質を発現している。改変MON87429 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シン系の除草剤であり、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)。

15

本組換えトウモロコシで産生される改変 MON87429 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 6, p24)。

20

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., 2007)。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) は、3 系統 (ダイズ、ワタ及びトウモロコシ) 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。

25

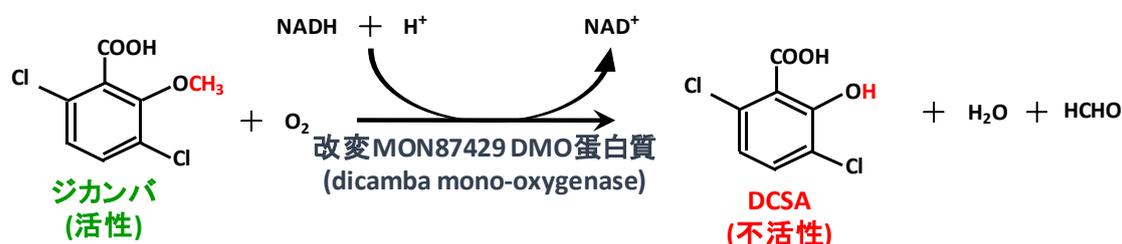


図 6 改変 MON87429 DMO 蛋白質の基質と代謝産物<sup>10</sup>

<sup>10</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

## 【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)。

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 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 7, p25)。*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。

なお、同じ作用機作を示す 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規程の承認を受けている系統 (スタック系統は除く) は、2020 年 3 月 13 日 (調査時点) までに 4 作物 26 系統 (トウモロコシでは 11 系統) 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。

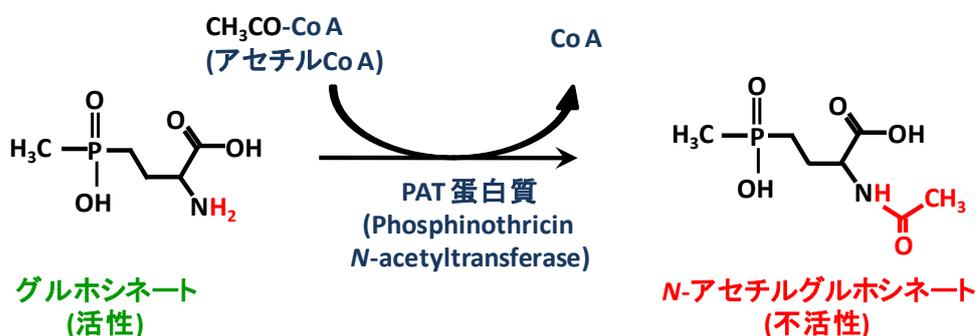


図 7 PAT 蛋白質の基質と代謝産物<sup>11</sup>

<sup>11</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

## 【FT\_T 蛋白質】

本組換えトウモロコシには *ft\_t* 遺伝子から発現する FT\_T 蛋白質により、アリルオキシアルカノエート系除草剤への耐性が付与されている。アリルオキシアルカノエート系除草剤とは、2 つの除草剤グループ (アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤であるアリルオキシプロピオン酸系除草剤 (FOPs) 及び合成オーキシシン系除草剤) の中で、アリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤を指す。

本組換えトウモロコシに導入された *ft\_t* 遺伝子は *S. herbicidovorans* 由来の *Rdpa* 遺伝子を改変したものであり、FT\_T 蛋白質は野生型の RdpA 蛋白質と比較して酵素反応速度が上がっており、トウモロコシ栽培地域の夏季の気温による影響を受けずに高い活性を示す (Larue et al., 2019)。

RdpA 蛋白質は  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性、非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼであり、2 つの除草剤グループ (ACCase 阻害剤である FOPs 及び合成オーキシシン系除草剤) のうちでアリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤を除草活性のない化合物に変換する反応を触媒することで (Müller et al., 2006)、除草剤耐性を付与することが報告されている。同様に FT\_T 蛋白質も  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性、非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼであり、 $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下において、FOPs の 1 つであるキザロホップに酸素を導入する酸化反応を触媒することにより、除草活性のないキザロホップフェノールとピルビン酸に変換する。この反応において  $\alpha$ -ケトグルタル酸はコハク酸に変換され、二酸化炭素が放出される (図 8, p27)。また、FT\_T 蛋白質は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下において合成オーキシシン系除草剤の 1 つである 2,4-D に酸素を導入する酸化反応を触媒することにより、2,4-D を除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換し、 $\alpha$ -ケトグルタル酸はコハク酸に変換され、二酸化炭素が放出される (図 8, p27)。

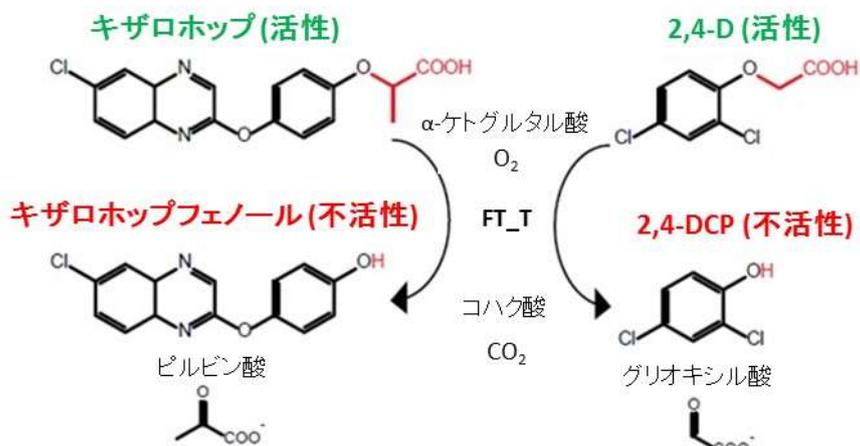


図 8 FT\_T 蛋白質の基質と代謝産物<sup>12</sup>

5

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えトウモロコシには *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサート誘発性  
 10 雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。除草剤グリホサートは植物内在性の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の 1 つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) を阻害し、細胞死を引き起こす (Franz et al., 1997)。一方で、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活  
 15 性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

なお、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現様式を利用した遺伝子組  
 20 換え作物で、同様に除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性の形質をもつ遺伝子組換えトウモロコシ MON87427 系統がすでに、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。この系統は、第

<sup>12</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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。

＜既知のアレルゲンとの相同性検索＞

5 改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 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どうかを判断するため、AD\_2018<sup>13</sup>に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

10

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

#### 【改変 MON87429 DMO 蛋白質】

15

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 (-COOH)、メトキシ基 (-OCH<sub>3</sub>) 及びクロロ基 (-Cl) を含むフェニル環をもつ化合物) は、DMO 蛋白質の基質とな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も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もつ化合物は、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も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)。

20

25

30 なお、本組換えトウモロコシ中で発現している改変 MON87429 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 末端側から 2 番目にロイシンが挿入されている。この挿入に加え、APG6 由来のアミノ酸が全て切り離されたもの及び N 末端に 1 アミノ酸が付加されたものの 2 種類の改変 DMO 蛋白質が存在する。しかし、N 末端側から 2 番目のアミノ酸の位置及び APG6 由来の 1 アミノ酸は、DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に

<sup>13</sup> AD\_2018: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) に登録されている配列から構成されるデータベースで、2,038件のアミノ酸配列が含まれる(2018年2月9日更新)。

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。

5 以上のことから、改変 MON87429 DMO 蛋白質が内在性化合物を代謝して、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

### 【PAT 蛋白質】

10 PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い特異性を有することが知られている。グルホシネートの除草剤活性はL体のアミノ酸であるL-ホスフィノスリシンによるものであるが、その他のL体アミノ酸は、PAT 蛋白質によりアセチル化されることはない。グルホシネート、高濃度のL体アミノ酸及びPAT 蛋白質を供試した競合アッセイでは、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化の阻害は認められなかった (Wehrmann et al., 1996)。最近の代謝プロファイリングにおいて、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の老化した葉からの抽出物中で2つのアミノ酸 (アミノアジピン酸とトリプトファン) の PAT (*bar*) を介した非特異的なアセチル化が報告されているが (Christ et al., 2017)、トウモロコシでこのような事例は報告されていない。したがって、PAT 蛋白質は、グルホシネートの除草剤成分である L-ホスフィノスリシンに対して高い基質特異性を有しており、PAT 蛋白質が内在性化合物を代謝して、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。また、PAT 蛋白質を発現する複数の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシにおいて、PAT 蛋白質はトウモロコシの代謝経路に影響を及ぼすことはない判断されている。

25

### 【FT\_T 蛋白質】

30 これまでの RdpA 蛋白質の研究から (Müller et al., 2006)、FT\_T 蛋白質は、2つの除草剤グループ (FOPs 及び合成オーキシシン系除草剤) の中でアシルオキシアルカノエート基をもつ除草剤に高い特異性を示すと考えられた。

35 そこで、FT\_T 蛋白質が宿主の内在性化合物を代謝するかどうかを確認する基質反応性試験を行った。試験には、FT\_T 蛋白質が代謝する可能性のある基質として、既存の基質と構造的に類似し、FT\_T 蛋白質の活性部位に適合する化合物を供試した。供試した化合物の選定は、以下の 2 つのステップにより行った (別添資料 3)。ステップ 1 では、トウモロコシを含めた作物中

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500

で既に同定されている低分子化合物が網羅されているデータベース NAPRALERT<sup>14</sup> (Bisson et al., 2016) を用い、ジクロロプロップ (dichlorprop, DCP) と構造的に相同性を有する化合物をスクリーニングした。DCP をスクリーニングの指標とした理由は、DCP がアシルオキシアルカノエート系除草剤の中で最も基本的な構造を有しているためである。ステップ 2 では、ステップ 1 で選ばれた化合物が FT\_T 蛋白質の活性部位に結合するかのドッキングシミュレーションを行った。その結果、合計 38 の化合物が選ばれた。ステップ 1 と 2 で選ばれた 38 の化合物のうち、標準品が市販されており入手可能な 32 の化合物を FT\_T 蛋白質との基質反応性試験 (*in vitro* 酵素アッセイ) に供試した。

32 の化合物に対する FT\_T 蛋白質の活性とネガティブコントロール (ブランク) に対する FT\_T 蛋白質の活性を比較した結果、2 つの化合物 (2-methoxy-4-prop-2-enylphenol 及び 2,7-dimethoxynaphthalene) に統計学的有意差が認められた (別添資料 3 の Table 2, p14~16)。しかし、これら 2 つの化合物に対する FT\_T 蛋白質の活性はネガティブコントロールに対する活性よりも低い値であった。そのため、FT\_T 蛋白質は 32 の化合物のいずれに対しても、活性がないことが示された。

以上の結果から、FT\_T 蛋白質が内在性化合物を代謝して、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下、「S3P」という。) と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こりやすさを示す特異性定数 (Specificity constant)  $k_{cat}/K_m$  の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸と

<sup>14</sup> NAPRALERTは植物を含む生物由来の抽出物や天然の化合物についての情報を集めたデータベースである。 <https://www.napralert.org/>[更新日：2016年3月1日]

の反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5

【改変 MON87429 DMO 蛋白質+PAT 蛋白質+FT\_T 蛋白質+改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

10 改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はいずれも基質特異性が高く、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。よって、本組換えトウモロコシで発現しているこれら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

さらに、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が *mts-siRNA* の標的配列を有することが宿主の代謝系に影響を及ぼすかどうか考察を行うために、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を有するトウモロコシ内在性遺伝子の mRNA 量を測定し、内在性遺伝子の mRNA 量に影響を及ぼしていないか調べた。

20 まず、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を示すトウモロコシ内在性遺伝子を BLAST により検索した。その結果、7 つの推定遺伝子が相同性を示した (Yang et al., 2018)。いずれの遺伝子も膜蛋白質をコードしていると考えられ、また、セリン取り込み輸送体と相同性がみられた。これらの輸送体は、セリン由来の 2 つの脂質、スフィンゴ脂質及びホスファルジルセリンの合成を促進すると考えられている。

25 次に、これら 7 つの推定遺伝子の雄穂における mRNA 量を 2 種類の定量 RT-PCR (TaqMan と SYBR グリーン<sup>15</sup>) により測定した (Yang et al., 2018)。これら推定遺伝子の mRNA 量は非常に低く、互いに高い配列相同性を示すため、個別の mRNA に対して試験設計をすることはできなかった。そのため、複数の  
30 の遺伝子の mRNA 量を同時に測定した。7 つのうち 2 つの遺伝子の mRNA 量は TaqMan を用い、7 つのうち 6 つの遺伝子の mRNA 量はまとめて SYBR グリーンを用いて測定した。なお、7 つのうち 1 つの遺伝子の mRNA 量は両法で測定された。

その結果、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を有する 7 つの内在性の推定遺

<sup>15</sup> SYBR グリーンの蛍光色素は、配列非特異的に二本鎖 DNA に結合する。SYBR グリーンの蛍光色素が二本鎖 DNA に結合すると蛍光を発する。この蛍光強度は、増幅 DNA の生成量に比例する。

伝子の mRNA 量に関して、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は認められなかった (Yang et al. (2018) の Figure S3 のパネル A (TaqMan) とパネル B (SYBR グリーン))。よって、mts-siRNA の標的配列と相同性を有することで選ばれた推定遺伝子に対して影響が認められなかったことから、内在性の他の遺伝子の mRNA 量にも影響を与えないと考えられた。なお、除草剤グリホサート無散布の本組換えトウモロコシにおいて、花粉を含めて異常な形態は観察されなかったこと (Yang et al. (2018) の Figure 3B 及び 3C) も、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA の標的配列を有することが内在性遺伝子の mRNA 量に影響を与えないという上述の結論を支持している。

以上のことから、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA の標的配列を有することにより宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

15

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

20 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT519224 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p20~23) に記載した。

### ロ 特性

25

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

30 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT519224 の全塩基数は 17,776 bp である。なお、PV-ZMHT519224 の塩基配列は別添資料 4 に記載した。

#### 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 *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

5 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

10 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-ZMHT519224 の構成要素は 表 1 (p20~23) 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に関しては、図 5 (p19) に示した。

15

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMHT519224 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

20

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

25 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-ZMHT519224 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

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 R<sub>3</sub> 世代の種子<sup>16</sup>において、形質転換に用いた PV-ZMHT519224 の外側骨格領域を標的と

35

<sup>16</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。

した PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMHT519224 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 5)。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 (別添資料 5 の Table 1, p11)。

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 ( $R_0$ ) を自殖し、 $R_1$  世代を作出した。 $R_1$  世代において、1 コピーの T-DNA 領域を有し、外側骨格領域をもたない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。こうして得られた  $R_1$  個体の後代から、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 9 (p35) に示した。なお、本申請の対象は、 $R_3$  世代及び  $R_3$  世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図9 本組換えトウモロコシの育成図

25

【社外秘につき非開示】

30

(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 領域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 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代 (図 9, p35) において、導入遺伝子の分離比について、有意水準 5% としたカイ二乗検定による統計解析を行った (別添資料 6)。

10

試験に供試する BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R<sub>0</sub>) を自殖し、その後代である R<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、2 回の自殖により R<sub>3</sub> 世代を作出した。そして T-DNA 領域をホモで有する R<sub>3</sub> 世代を T-DNA 領域をもたないトウモロコシ系統 RP と交配して T-DNA 領域をヘミで有する R<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。さらに R<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

15

T-DNA 領域をヘミで有する BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

20

T-DNA 領域をヘミで有する BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代において、Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

25

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, p37)。したがって、本組換えトウモロコシの T-DNA 領域は染色体上に存在していると考えられた。

30

表2 本組換えトウモロコシの育成過程における T-DNA 領域の分離様式<sup>17</sup>

世代 <sup>1</sup>	供試 個体数	実測値 陽性 個体数	実測値 陰性 個体数	1:1 の分離			
				期待値 陽性 個体数	期待値 陰性 個体数	$\chi^2$	p 値 <sup>2</sup>
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	309	148	161	154.50	154.50	0.55	0.460
BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	236	112	124	118.00	118.00	0.61	0.435
BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	216	97	119	108.00	108.00	2.24	0.134

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

5 <sup>2</sup> BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 5%)。

<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バイエルクロップサイエンス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

5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子のコピー数及び配列同一性、ベクター由来の非意図的な配列の有無、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 (NGS (Next Generation Sequencing)) 解析<sup>18</sup> 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 7)。

10

NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150 bp ずつの塩基配列を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度<sup>19</sup> 75 以上) で解析している。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 解析に供試した結果、本組換えトウモロコシの R<sub>3</sub> 世代で  
15 265.8 Gb (冗長度中央値 108)、対照の非組換えトウモロコシ (LH244) で 286.4 Gb (冗長度中央値 121) の塩基配列が解析された (別添資料 7 の Appendix Table 3, p46)。

解析した塩基配列全てを PV-ZMHT519224 の塩基配列と照合<sup>20</sup> し、PV-ZMHT519224 の配列に対してアライメントした結果、本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定され (別添資料 7 の p28; Appendix Figure 4, p51)、  
20 これらはそれぞれ導入遺伝子の 5'及び 3'末端を含む配列であった (別添資料 7 の Appendix Figure 29, p98~100)。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 7 の p28)。

さらに、解析した塩基配列全てを PV-ZMHT519224 配列に対してアライメントした結果において、T-DNA 領域の冗長度中央値は 108、最低値が 47 であり、T-DNA 領域の全ての配列が検出されていることが確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 4, p51)。

また、この解析からは、本組換えトウモロコシには PV-ZMHT519224 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことが確認された (別添資料 7 の  
30 Appendix Figure 4, p51)。

<sup>18</sup> NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロット法と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS解析においては、フラグメント化した大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、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配列並びに非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

<sup>19</sup>冗長度: ゲノム上のすべての塩基に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。その中央値が 75 以上であればすべての挿入 DNA を検出することが可能であることが報告されており (Kovalic et al., 2012)、本試験では 1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

<sup>20</sup> FASTA型アルゴリズムにより、30bp以上の領域で96.6%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

以上の解析から、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことが確認された。

5        また、本組換えトウモロコシにおいて検出された導入遺伝子、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の T-DNA 領域が導入されていることが確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 5, p52、Appendix Figure 6, p53~57 及び Appendix Figure 7, p58~76)。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 10 (p40) に示した。

10

さらに複数世代 (R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>F<sub>1</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 及び R<sub>5</sub> 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS 解析において、T-DNA 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 7, p32; Appendix Figure 4 及び 12~15, p51、81~84)。

15

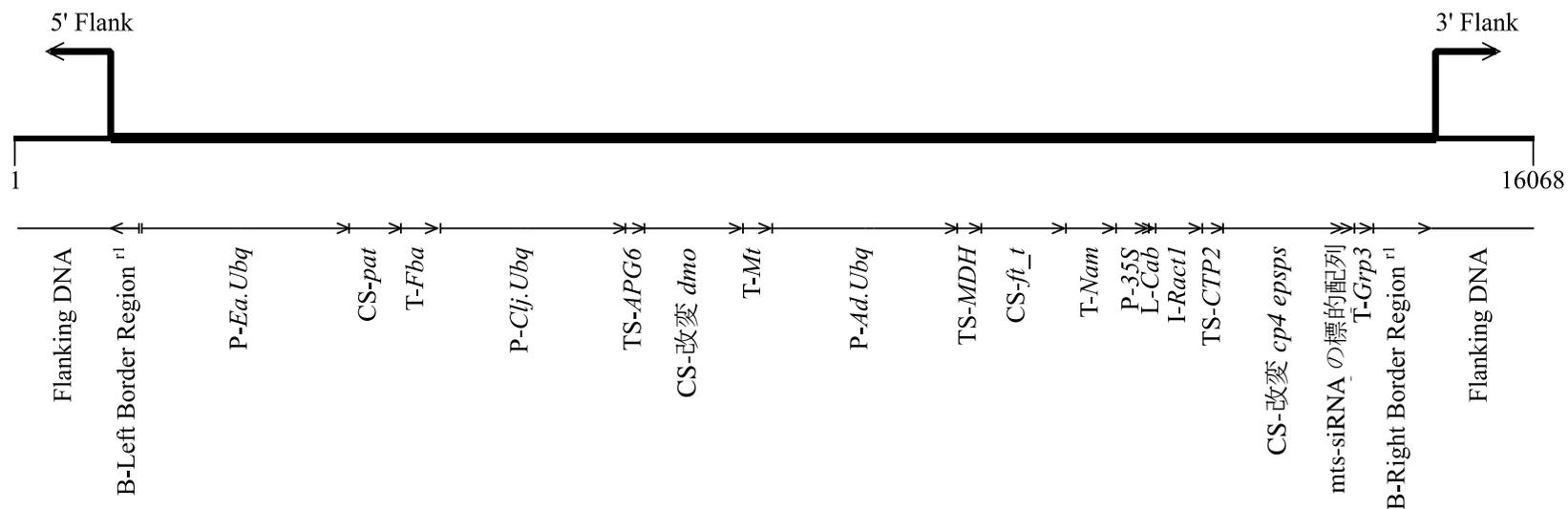


図 10 本組換えトウモロコシの導入遺伝子の模式図<sup>21</sup>

- 5 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。図は本組換えトウモロコシ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。図上部の直角に曲がった矢印は、導入遺伝子と近傍配列の境界を示している。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の T-DNA 領域は PV-ZMHT519224 と一致した配列で導入されており、B-Right Border Region<sup>rl</sup>及び B-Left Border Region<sup>rl</sup>は本組換えトウモロコシにおいて導入用プラスミド PV-ZMHT519224 と比較して短くなっている。

<sup>21</sup> 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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

5 1コピーなので該当しない(別添資料7のp28)。

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(R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>F<sub>1</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>4</sub>F<sub>1</sub>及びR<sub>5</sub>世代)にわたり、改変MON87429 DMO蛋白質、PAT蛋白質、FT\_T蛋白質及び改変CP4 EPSPS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8のFigure 2~5, p17~20)。

15 また、2017年に米国の5カ所(アイオワ州、インディアナ州、オハイオ州、ネブラスカ州及びイリノイ州)で行ったほ場試験において、本組換えトウモロコシの地上部、種子、葉及び根のサンプルを採取し、マルチプレックスイムノアッセイ<sup>22</sup>により発現量を分析した(別添資料9)。その結果、本組換えトウモ  
20 蛋白質、FT\_T蛋白質及び改変CP4 EPSPS蛋白質の発現が確認された(表3~表6, p42~43)。

---

<sup>22</sup> マルチプレックスイムノアッセイは1回の測定で複数の蛋白質を同時に定量する。このハイスループットテクノロジーはELISAで得られるものと同等の分析結果を効率的に得ることができる。

表3 本組換えトウモロコシの各組織における改変 MON87429 DMO 蛋白質の発現量 (2017年、米国)<sup>23</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> (µg/g DW)
地上部	黄熟期	21 (1.6) 9.1-32	0.14
種子	成熟期	2.4 (0.15) 1.3-3.6	0.14
葉	2~4葉期	35 (2.3) 16-55	0.14
根	2~4葉期	2.3 (0.27) 1.0-5.2	0.14

<sup>1</sup>採取した各組織の生育段階

5 <sup>2</sup>蛋白質の発現量は、平均値及び標準誤差 (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。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全てのほ場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 (全ての組織で 20 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)

10 表4 本組換えトウモロコシの各組織における PAT 蛋白質の発現量 (2017年、米国)<sup>24</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> (µg/g DW)
地上部	黄熟期	1.3 (0.067) 0.71-1.8	0.03
種子	成熟期	0.84 (0.066) 0.32-1.5	0.03
葉	2~4葉期	5.8 (0.40) 2.9-9.8	0.03
根	2~4葉期	2.0 (0.15) 0.40-3.1	0.03

<sup>1</sup>採取した各組織の生育段階

15 <sup>2</sup>蛋白質の発現量は、平均値及び標準誤差 (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。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全てのほ場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 (全ての組織で 20 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)

<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バイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>24</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表5 本組換えトウモロコシの各組織における FT\_T 蛋白質の発現量(2017年、米国)<sup>25</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> (µg/g DW)
地上部	黄熟期	97 (5.2) 56-140	0.036
種子	成熟期	47 (3.6) 19-79	0.036
葉	2~4葉期	440 (25) 210-670	0.036
根	2~4葉期	41 (4.1) 7.2-82	0.036

<sup>1</sup>採取した各組織の生育段階

5 <sup>2</sup>蛋白質の発現量は、平均値及び標準誤差(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。各組織の平均値、標準誤差及び範囲(最小値 - 最大値)は、全てのほ場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(全ての組織で 20 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)

10 表6 本組換えトウモロコシの各組織における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量(2017年、米国)<sup>26</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> (µg/g DW)
地上部	黄熟期	7.6 (0.50) 4.0-11	0.30
種子	成熟期	0.63 (0.028) 0.41-0.85	0.34
葉	2~4葉期	54 (3.2) 30-82	0.11
根	2~4葉期	10 (1.7) 3.4-29	0.11

<sup>1</sup>採取した各組織の生育段階

15 <sup>2</sup>蛋白質の発現量は、平均値及び標準誤差(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。各組織の平均値、標準誤差及び範囲(最小値 - 最大値)は、全てのほ場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(全ての組織で 20 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)

<sup>25</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>26</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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 10; 別添資料 11, p5)。

15

本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.007 % である (別添資料 11, p10~11)。

本 PCR 法の信頼性については米国バイエルグループと米国 Eurofins BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 11, p14~18)。

(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 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。この本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用することにより本組換えトウモロコシからハイブリッド品種の種子を効率的に生産することが可能となる。

30

また、本組換えトウモロコシへ導入された改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ft\_t* 遺伝子から発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質により、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート及びアリアルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。そのため、本組換えトウモロコシに薬害を生じさせずに、これら複数の除草剤を用いて雑草を効果的に防除することが可能となる。

35

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>27</sup>

5 本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 LH244 であり、導入遺伝子は改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子である。

10 宿主であるトウモロコシについて、わが国に交雑可能な近縁野生種は存在しない。

15 2019 年から 2020 年にかけて、日本モンサント株式会社河内研究農場<sup>28</sup>の隔離ほ場 (以下、「本隔離ほ場」という。)において本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験を行った。隔離ほ場試験には、本組換えトウモロコシの R<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (LH244 × HCL617) 世代を供試した (図 9, p35)。対照の非組換えトウモロコシとしては、本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景をもつ品種 LH244 × HCL617 を用いた (以下、「対照の非組換えトウモロコシ」という。)。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b, p46) は、2018 年にバイエルグループ (米国) の人工気象室において実施した。

20

#### a 形態及び生育の特性

25 形態及び生育の特性を評価するため、9 項目 (雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、稈長 (cm)、着雌穂高 (cm)、分けつ数、成熟期 (月日)、収穫期の地上部重 (g)、粒型、粒色) について調査した。

30 稈長 (cm)、着雌穂高 (cm) 及び収穫期の地上部重 (g) について統計解析を行い、雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、成熟期 (月日)、粒型、粒色に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計解析を行わなかった。なお、分けつ数については、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全ての個体において分けつの発生した個体がなく、分散が 0 であったため、統計解析は行わなかった。

稈長 (cm)、着雌穂高 (cm)、及び収穫期の地上部重 (g) について統計解析を行った結果、着雌穂高においてのみ、本組換えトウモロコシと対照の非組換

<sup>27</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バイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>28</sup> 所在地：茨城県稲敷郡河内町生板 4717 番地 (現バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場)

えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 12の表3, p11)。着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが103.2 cm、対照の非組換えトウモロコシが106.8 cmであった (別添資料 12の表3, p11)。また、統計解析を行わなかった6項目 (雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、分けつ数、  
5 成熟期 (月日)、粒型、粒色) 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の間に違いは認められなかった (別添資料 12の表3, p11)。

#### b 生育初期における低温耐性

10 生育初期における低温耐性試験は、米国のバイエルグループの人工気象室において実施した。生育初期における低温耐性を比較するために、3 葉期の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 品種の幼苗を日中 12°C/夜間 5°C に設定した人工気象室で栽培した。低温処理開始後 10 日目及び 19 日目に草丈を調査した。また、低温処理開始後 19 日目  
15 の個体は、乾燥重の測定も行った。草丈及び乾燥重について統計解析を行った。

その結果、草丈及び乾燥重の項目共に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で統計学的有意差は認められなかった (別添資料 13の Table 2, p5)。  
20

#### c 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、通常は、結実後、冬季に自然に枯死する。結実後に再生長して栄養繁殖することや、種子を生産することはない。実際に、本隔離ほ場で生育させた本組換えトウモロコシ及び対照の非組  
25 換えトウモロコシについて、わが国の冬季における生育状況を観察した。2020 年 1 月 14 日に越冬性試験区において栽培された個体を観察した結果、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枯死していた (別添資料 12 の図 5, p12)。

30

#### d 花粉の稔性及びサイズ

本隔離ほ場で生育し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から採取した花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及び  
35 サイズを調査した。これらの項目について統計解析を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれの項目においても、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との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の図 6 及び表 4, p13)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

5

生産量：

本隔離ほ場で生育し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について、種子の生産量に関する 6 項目 (有効雌穂数、雌穂長 (cm)、雌穂径 (cm)、粒列数、一列粒数、百粒重 (g)) を調査した。

10

有効雌穂数を除く項目について統計解析を行った結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシ及び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 12 の表 5, p14)。なお、有効雌穂数については、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全ての個体が 1 つの有効雌穂を有しており、分散が 0 であったため、統計解析は

15

脱粒性：

脱粒性については、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成熟期に、目視で雌穂の種子が苞皮に包まれているか否か、及び、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

20

その結果、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、成熟期に雌穂の種子は苞皮に包まれており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また、苞皮を取り除いた後の雌穂も難脱粒性であり (別添資料 12 の図 7, p15)、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種子の脱粒性における違いは認められなかった (別添資料 12 の表 5, p14)。

25

休眠性及び発芽率：

休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で生育し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の収穫後 13 日目の種子をシャーレ上に静置し、25°C に設定した恒温器内での発芽種子数を計測した。

30

その結果、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収穫種子の発芽率は、それぞれ 99.0 % と 100.0 % であり、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の表 5, p14)。

35

f 交雑率

5 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

10 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、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。

15 その結果、土壤微生物相試験の細菌数においてのみ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の間で統計学的有意差が認められた。細菌数の平均値は本組換えトウモロコシ区が  $3.49 \times 10^7$  CFU/g、対照の非組換えトウモロコシ区が  $4.32 \times 10^7$  CFU/g であり、本組換えトウモロコシ区の方が少なかった (別添資料 12 の表 6, p17)。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

5 食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

#### (2) 使用等の方法

10 —

(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

15 —

(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

20 申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(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

25 —

#### (6) 国外における使用等に関する情報

30 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表7(p50)のとおりである。

表7 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予定<sup>29</sup>

2020年7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	2019年1月	—
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2019年1月	—
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2019年2月	—
米国農務省 (USDA)	環境	2019年6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	2019年10月	—

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8, p50)。

10 表8 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況<sup>30</sup>

2020年7月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 <sup>31</sup>	【申請予定】	—
農林水産省	飼料 <sup>32</sup>	【申請予定】	—
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程 <sup>33</sup> : 隔離ほ場)	2018年6月	2019年5月
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程: 一般使用)	2020年5月	—

<sup>29</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>30</sup> 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>31</sup> 食品衛生法に基づく。

<sup>32</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>33</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>34</sup>

### 1 競合における優位性

5

#### (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

競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した(第一の 2-(6)-②-a, c~e, p45~48)。その結果、統計解析を行った項目では、形態及び生育の特性に関する項目の着雌穂高においてのみ、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。また、生育初期における低温耐性(第一の 2-(6)-②-b, p46)をバイエルグループ(米国)の人工気象室において調査した結果、草丈及び乾燥重の項目共に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は認められなかった。

20

25

着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが 103.2 cm、対照の非組換えトウモロコシが 106.8 cm であり、本組換えトウモロコシの方が低い値を示した。しかし、本組換えトウモロコシの着雌穂高の平均値(103.2 cm)は、中井ら(2015)によって報告されている非組換えトウモロコシ品種<sup>35</sup>の着雌穂高の平均値の範囲(71.1 ~ 135.2 cm)に収まっていた。このことから、本組換えトウモロコシにおいて認められた着雌穂高の値は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であると考えられた。

30

本組換えトウモロコシは、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、及びアリロキシアルカノエート系除草剤に耐性をもつ。また、本組換えトウモロ

<sup>34</sup> 本項目中で、第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

<sup>35</sup> 過去に実施した組換えトウモロコシ [DLL25系統(1998年)、NK603系統(2000年)、MON863系統(2000年)、MON810系統(1996年、2001年)、MON88001系統(2002年)、MON88012系統(2002年)、MON88017系統(2002年)、LY038系統(2004年)、MON89034系統(2006年)、MON87460系統(2010年)、MON87427系統(2010年)]の隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシの調査結果に基づく平均値の最小値と最大値

5 コシには改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、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誘発性雄性不稔及び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。

以上のことから、競合における優位性に起因する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。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

15 (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

20 以上のことから、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ずるおそれはないと判断された。

2 有害物質の産生性

25 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生は報告されていない。

30 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、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験（第一の 2-(6)-②-g, p48）を行った。その結果、土壤微生物相試験の細菌数においてのみ、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で統計学的有意差が認められた。

35 細菌数の平均値は、本組換えトウモロコシ区が  $3.49 \times 10^7$  CFU/g、対照の非組換えトウモロコシ区が  $4.32 \times 10^7$  CFU/g であり、本組換えトウモロコシ区の

方が少なかった。しかし、本組換えトウモロコシ区の細菌数の範囲 ( $2.77 \times 10^7 \sim 4.46 \times 10^7$  CFU/g) は、対照の非組換えトウモロコシ区の細菌数の範囲 ( $3.29 \times 10^7 \sim 6.15 \times 10^7$  CFU/g) と部分的に重複しており、細菌数の桁数も同じであることから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性が高まっていることを示すような違いではないと考えられた。

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 MON87429 DMO蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与するFT\_T蛋白質並びに除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性を付与する改変CP4 EPSPS蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質は有害物質としては知られておらず、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, p28)。

第一の 2-(1)-ロ-③ (p28~31) に示したように、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、これらの蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際、これまでにバイエルグループが開発した除草剤グリホサート耐性作物 (トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ、テンサイ) の食品及び飼料の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含有量に対照の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (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判断された。

10 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

15 トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の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。

20 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(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

30 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を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

35

—

### 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間で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、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）を比較検討した結果、形態及び生育の特性に関する項目の着雌穂高においてのみ、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。検討の結果、本組換えトウモロコシの着雌穂高の平均値は、文献で報告されている非組換えトウモロコシ品種の着雌穂高の平均値の範囲に収まっていたことから、本組換えトウモロコシにおいて認められた着雌穂高の

10 値は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であると考えられた。

本組換えトウモロコシは、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、及びアリルオキシアルカノエート系除草剤に耐性をもつ。また、本組換えトウモロコシには改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、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誘発性雄性不稔及び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。

15 20

以上のことから、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ずるおそれはないと判断された。

25

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。

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、有害物質の産生性の有無を、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結果、土壤微生物相試験の細菌数においてのみ、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で統計学的有意差が認められた。検討の結果、本組換えトウモロコシ区の細菌数の範囲は対照の非組換えトウモロコシ区の細菌数の範囲と部分的に重複しており、それらの細菌数の桁数も同じであることから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性が高まっている

30 35

ことを示すような違いではないと考えられた。

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 MON87429 DMO 蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する FT\_T 蛋白質並びに除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性を付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質は有害物質としては知られておらず、

5

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。

改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、

これらの蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

10

15

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判断された。

20 交雑性：

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ないため、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。

25

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。

## 参考文献

- 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. Padgette 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. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.
- Bisson, J., J. McAlphine, J. Graham and G.F. Pauli. 2016. NAPRALERT, from an historical information silo to a linked resource able to address the new challenges in natural products chemistry and pharmacognosy. *CEUR Workshop Proceedings* 1747.
- Brodersen, P. and O. Voinnet. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22: 268-280.
- Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- 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-l/eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].
- 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.
- Christ, B., R. Hochstrasser, L. Guyer, R. Francisco, S. Aubry, S. Hörtensteiner and J.-K. Weng. 2017.

Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. *Nature Plants* 3: 937-945.

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.

Cornejo, M.-J., D. Luth, K.M. Blankenship, O.D. Anderson and A.E. Blechl. 1993. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 23: 567-581.

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. Flasinski 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-*enol*pyruvylshikimate-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. 2018. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed October 23, 2018].

Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

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.

Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Pages 521-

535 in Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington, D.C.

Goldberg, R.B., T.P. Beals and P.M. Sanders. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *The Plant Cell* 5: 1217-1229.

Gorski, S.A., J. Vogel and J.A. Doudna. 2017. RNA-based recognition and targeting: Sowing the seeds of specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 215-228.

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

Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.

Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Stanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assay. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.

Heck, G.R., C.L. Armstrong, J.D. Astwood, C.F. Behr, J.T. Bookout, S.M. Brown, T.A. Cavato, D.L. DeBoer, M.Y. Deng, C. George, J.R. Hillyard, C.M. Hironaka, A.R. Howe, E.H. Jakse, B.E. Ledesma, T.C. Lee, R.P. Lirette, M.L. Mangano, J.N. Mutz, Y. Qi, R.E. Rodriguez, S.R. Sidhu, A. Silvanovich, M.A. Stoecker, R.A. Yingling and J. You. 2005. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event. *Crop Science* 44: 329-339.

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. *Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

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

Holtorf, S., K. Apel and H. Bohlmann. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29: 637-646.

Huang, M.-D., F.-J. Wei, C.-C. Wu, Y.-I.C. Hsing and A.H.C. Huang. 2009. Analyses of advanced

rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiology* 149: 694-707.

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

Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel and B. Bartel. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.

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. Padgette 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.

Larue, C.T., M. Goley, L. Shi, A.G. Evdokimov, O.C. Sparks, C. Ellis, A.M. Wollacott, T.J. Rydel, C.E. Halls, B. Van Scoyoc, X. Fu, J.R. Nageotte, A.M. Adio, M. Zheng, E.J. Sturman, G.S. Garvey and M.J. Varagona. 2019. Development of enzymes for robust aryloxyphenoxypropionate and synthetic auxin herbicide tolerance traits in maize and soybean crops. *Pest Management Science* <https://doi.org/10.1002/ps.5393>.

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.

Müller, T.A., T. Fleischmann, J.R. van der Meer and H.-P.E. Kohler. 2006. Purification and characterization of two enantioselective  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases, RdpA and SdpA, from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4853-4861.

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.

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

NCGA. 2018. World of corn 2018. National Corn Growers Association, Chesterfield, Missouri. [http://www.worldofcorn.com/pdf/NCGA\\_WOC2018.pdf](http://www.worldofcorn.com/pdf/NCGA_WOC2018.pdf) [Accessed October 23, 2018].

Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

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 for 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.

Terada, R. and K. Shimamoto. 1990. Expression CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Molecular and General Genetics* 220: 389-392.

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.

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.

Yang, H., Y. Qi, M.E. Goley, J. Huang, S. Ivashuta, Y. Zhang, O.C. Sparks, J. Ma, B.M. van Scoyoc, A.L. Caruano-Yzermans, J. King-Sitzes, X. Li, A. Pan, M.A. Stoecker, B.E. Wiggins and M.J. Varagona. 2018. Endogenous tassel-specific small RNAs-mediated RNA interference enables a novel glyphosate-inducible male sterility system for commercial production of hybrid seed in *Zea mays* L. *PLoS ONE* 13: e0202921.

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 2018 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed October 23, 2018]

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 農山漁村文化協会 東京

瀧澤康孝 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

中井秀一・干川奏・山根精一郎・下野綾子・大澤良 2015 日本における隔離ほ場試験による遺伝子組換えトウモロコシの生物多様性影響評価の実例 育種学研究 17: 1-15

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 改訂第3版 株式会社ソフトサイエンス社 神奈川

農林水産省 2014 「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 April 23, 2015]

農林水産省 2017 「平成27年度 トウモロコシ生育等実態調査」の結果について 平成29年3月22日公表 <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170322.html> [Accessed March 22, 2017]

農林水産省 2018a 平成 29 年産作物統計 (普通作物・飼料作物・工芸農作物) 平成 30 年 7 月 26 日 公 表 <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20170&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001112815>  
[Accessed October 23, 2018]

農林水産省 2018b 平成 29 年産野菜生産出荷統計 平成 30 年 11 月 12 日公表  
<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20170&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001121095>  
[Accessed November 21, 2018]

農 林 水 産 省 2018c 飼 料 を め ぐ る 情 勢 平 成 30 年 11 月 公 表  
[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryu/index.html](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/index.html) [Accessed November 21, 2018]

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

2020年5月25日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社  
代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ  
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) (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。

2020年5月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 クロップサイエンス部門広報 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場長

\*: 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、バイエルグループ<sup>36</sup>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がある関係各者から情報収集を行う。

## 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、バイエルグループと連絡をとり、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、バイエルグループの協力のもと、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。

---

<sup>36</sup> バイエルグループは、バイエルグループのすべての子会社及び関連会社、モンサント・カンパニーとその関連会社の総称である。

## 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、*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子から推定した改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 CP4 EPSPS Protein Immunolocalization in MON 87429 Anthers (SCR-2018-0265) (社外秘)
- 別添資料 3 Specificity of the FT\_T Enzyme for Potential Endogenous Substrates (MSL0030303) (社外秘)
- 別添資料 4 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT519224 (社外秘)
- 別添資料 5 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 87429 (MSL0029145) (社外秘)
- 別添資料 6 Amended from MSL0029565: Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Herbicide Tolerant Maize MON 87429 Across Three Generations (MSL0029841) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended from MSL0028866: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Maize (MON 87429) (MSL0030619) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0029498: Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, DMO, PAT and FT\_T Proteins in Maize Grain Samples across Multiple Generations of MON 87429 (MSL0030646) (社外秘)
- 別添資料 9 Amended Report for MSL0029693: Assessment of DMO, PAT (*pat*), FT\_T and CP4 EPSPS Protein Levels in Maize Tissues Collected from MON 87429 Produced in United States Field Trials During 2017 (MSL0030257) (社外秘)
- 別添資料 10 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87429 (社外秘)

- 別添資料 11 In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87429” for Global Submissions (VOP-2018-0006) (社外秘)
- 別添資料 12 除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, ft\_t*, 改変 *cp4 epsps, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI : MON-87429-9) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 別添資料 13 Assessment of the Effect of Cold Stress on Growth of Maize MON 87429 in 2018 under Controlled Environmental Conditions (MSL0030142) (社外秘)