

収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
 (*zmm28, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
 (DP202216, OECD UI: DP-202216-6) 申請書等の概要

目次

| | |
|---|----|
| 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 |
| 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 |
| (2) 使用等の歴史及び現状 | 3 |
| (3) 生理学的及び生態学的特性 | 5 |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 | 8 |
| (1) 供与核酸に関する情報 | 8 |
| (2) ベクターに関する情報 | 16 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 | 18 |
| (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 | 19 |
| (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 | 22 |
| (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 | 22 |
| 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 | 26 |
| (1) 使用等の内容 | 26 |
| (2) 使用等の方法 | 26 |
| (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 | 26 |
| (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 | 26 |
| (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 | 26 |
| (6) 国外における使用等に関する情報 | 26 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 | 28 |
| 1 競合における優位性 | 28 |
| 2 有害物質の産生性 | 29 |
| 3 交雑性 | 30 |
| 4 その他の性質 | 31 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価 | 32 |
| 参考文献 | 33 |
| 緊急措置計画書 | 40 |
| 添付資料一覧 | 42 |

第一種使用規程承認申請書

令和2年11月25日

農林水産大臣 野上 浩太郎 殿

環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏名 デュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 藤井 茂樹
住所 東京都千代田区永田町二丁目11番1号

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 | 収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (<i>zmm28, pat, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (DP202216, OECD UI: DP-202216-6) |
| 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.) Ittis

15 ② 宿主の品種名又は系統名

宿主は、イネ科 (*Poaceae*) トウモロコシ属 (*Zea*) のトウモロコシ (*Z. mays*) のデント種で、系統名は PH17AW 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

我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。

(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、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

40

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。

5 我が国へは 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）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

10 ・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、全世界で広く栽培されている（戸澤, 2005、OECD, 2003）。

15 国連食糧農業機関（FAO）によると、2018 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 4,213 万 ha、米国 3,308 万 ha、ブラジル 1,612 万 ha、インド 920 万 ha、アルゼンチン 714 万 ha である（FAO, 2020）。

20 現在、我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、2018 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 4,600ha で（農林水産省, 2019a）、同年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 3,100ha である（農林水産省, 2019b）。

25 ・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、我が国では、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。

30 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 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）。

35 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（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。

40 ・流通実態及び用途

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。2019 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、48.0%が飼料（8.7%の蒸留粕を含む）、29.5%がエタノール製造、12.6%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, 2020）。

我が国では、2019年に約1,598万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1,141万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, 2020)。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, 2020)。

5 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)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

10 イ 基本的特性

—

15 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)。

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)。

20 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)。

25 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、pH5.0~8.0の範囲で栽培可能である(戸澤, 2005)。

30 ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

35 ・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。

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)。

40 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)。

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)。

- ・ 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また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。

- ・ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

トウモロコシは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)。

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)。

なお、我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。

- ・ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、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)。

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 μm 程度である (中村, 2001)。

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)。

我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/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm²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/cm²、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm²、ほ場から 10m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm²以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

また、北米でも全 7 カ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/cm²、14.2 粒/cm²、そして 8.1 粒/cm²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 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/cm²及び 1.4 粒/cm²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

—

へ 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、我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

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*zmm28, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP202216, OECD UI: DP-202216-6) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (9 ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列を添付資料 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

供与核酸の構成要素それぞれの機能を表 1 (9 ページ) に示した。

表 1. 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

| 構成要素 | サイズ (bp) | 由来及び機能 |
|-----------------|-----------------------|--|
| T-DNA領域 | | |
| その他 | Right Border (RB) | 25 アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)) 由来のTiプラスミド (pTi) のT-DNA領域の右側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。 |
| | Ti Plasmid Region | 152 アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) のpTi由来の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。 |
| | <i>loxP</i> | 34 バクテリオファージ P1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位 (Dale and Ow, 1990)。 |
| | <i>attB4</i> | 21 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。 |
| zmm28 遺伝子発現カセット | <i>zm-gos2</i> プロモーター | 860 トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来の翻訳開始因子 <i>gos2</i> 遺伝子のプロモーター領域 (U.S. Patent 9115203)。植物体内での構成的発現を誘導する。 |
| | <i>ubiZM1</i> イントロン | 1,013 トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。 |
| | <i>attB1</i> | 24 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway [®] クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)。 |
| | <i>zmm28</i> | 857 トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のMADSボックス転写因子をコードする遺伝子 (Münster <i>et al.</i> , 2002、Pařenicová <i>et al.</i> , 2003)。5'側及び3'側領域にそれぞれ60 bp及び41 bpの非翻訳領域を含む。 |
| | <i>attB2</i> | 24 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway [®] クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)。 |
| | <i>pinII</i> ターミネーター | 308* ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子 (<i>pinII</i>) のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。 |
| その他 | <i>attB3</i> | 21 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。 |
| | <i>loxP</i> | 34 バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位 (Dale and Ow, 1990)。 |

**pat* 遺伝子発現カセットに用いた *pinII* ターミネーターより 5'側の 3 bp が短い。

表 1. 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

| 構成要素 | サイズ (bp) | 由来及び機能 | |
|-------------------------|-------------------------|--|--|
| T-DNA 領域 | | | |
| <i>pat</i> 遺伝子発現カセット | <i>ubiZM1</i> プロモーター | 900 | トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。 |
| | <i>ubiZM1</i> 5'UTR | 83 | トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子の5' 非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。 |
| | <i>ubiZM1</i> イントロン | 1,013 | トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。 |
| | FRT1 | 48 | 出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 由来の Flp リコンビナーゼ標的的部位 (Proteau <i>et al.</i> , 1986)。 |
| | <i>pat</i> | 552 | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) をコードする遺伝子 (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。トウモロコシでの発現を最適化するため、塩基配列中の GC 含量を高めるよう改変されているが、産生される PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。 |
| <i>pinII</i> ターミネーター | 311 | ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子 (<i>pinII</i>) のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。 | |
| その他 | FRT87 | 48 | 出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) 由来の改変型 Flp リコンビナーゼ標的的部位 (Tao <i>et al.</i> , 2007)。 |
| | Ti Plasmid Region | 57 | アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) の pTi 由来の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。 |
| | Left Border (LB) | 25 | アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の pTi の T-DNA 領域の左側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。 |

表 1. 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

| 構成要素 | サイズ (bp) | 由来及び機能 | |
|--------------------------------|------------------|--------|---|
| プラスミド外側骨格領域（本組換えトウモロコシには存在しない） | | | |
| その他 | <i>spc</i> | 789 | 細菌由来のスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子（Fling <i>et al.</i> , 1985）。 |
| | <i>colE1 ori</i> | 370 | 大腸菌由来の DNA 複製起点（Tomizawa <i>et al.</i> , 1977）。 |
| | <i>cos</i> | 14 | バクテリオファージλ由来の付着末端（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>tetR</i> | 651 | 細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の調節遺伝子（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>tetA</i> | 1,200 | 細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>trfA</i> | 1,149 | 細菌由来のトランス作用複製因子の遺伝子（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>oriT</i> | 112 | 細菌由来の DNA 伝達起点（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>ctl</i> | 6,271 | 細菌由来のセントラルコントロールオペロン領域（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>oriV</i> | 711 | 細菌由来の DNA 複製起点（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>virD1</i> | 444 | アグロバクテリウム（ <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |
| | <i>virC1</i> | 695 | |
| | <i>virC2</i> | 609 | |
| | <i>virG</i> | 804 | |
| | <i>virB</i> | 9,436 | |
| | <i>colE1 ori</i> | 370 | 大腸菌由来の DNA 複製起点（Tomizawa <i>et al.</i> , 1977）。 |
| | <i>cos</i> | 14 | バクテリオファージλ由来の付着末端（Komari <i>et al.</i> , 1996）。 |

- 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 a. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

本組換えトウモロコシには、*zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されている。以下に、各遺伝子がコードする蛋白質の機能を記載した。

10 ZMM28 蛋白質

zmm28 遺伝子はトウモロコシ (*Z. mays*) 内在性遺伝子であり、植物中で構成的に発現させたスクリーニング調査において収量増加に関わる有用遺伝子として同定され、続く検討試験においても収量増加の特性を付与することが確認された (Wu *et al.*, 2019)。2014 年から 2016 年にかけて米国にて実施した収量調査の結果では、平均収量が対照トウモロコシと比較し有意に増加していた (表 2、12 ページ)。

表 2 DP202216 と対照トウモロコシの収量の比較

| 年 | N ¹⁾ | 平均収量 (kg/ha) | | 差 (kg/ha) [95%信頼区間] | P 値 ²⁾ |
|------|-----------------|--------------|----------|------------------------|-----------------------|
| | | DP202216 | 対照トウモロコシ | | |
| 2014 | 185 | 13,351 | 12,956 | 395 [232 - 559] | <0.0001 ³⁾ |
| 2015 | 302 | 12,579 | 12,435 | 144 [31 - 257] | 0.0129 ³⁾ |
| 2016 | 331 | 13,094 | 12,924 | 169 [38 - 308] | 0.0148 ³⁾ |
| まとめ | 818 | 12,975 | 12,761 | 213 [132 - 301] | <0.0001 ³⁾ |

20 ハイブリッド 31 品種 (熟期 104 日から 112 日) を用い、38 の異なる環境 (米国アーカンサス州、カリフォルニア州、イリノイ州、インディアナ州、アイオワ州、カンザス州、ミズーリ州、ネブラスカ州及びテキサス州のほ場) において収量調査を実施。

¹⁾ 本組換えトウモロコシと対照トウモロコシを比較したペア数 (ほ場数×ハイブリッド品種数×反復数)。

²⁾ 統計解析：線形混合モデル

25 ³⁾ 統計学的有意差あり (P 値<0.05)

zmm28 遺伝子がコードする ZMM28 蛋白質は 251 個のアミノ酸からなり、分子量は約 28 kDa である。ZMM28 蛋白質の推定アミノ酸配列はトウモロコシ内在性 ZMM28 蛋白質 (GenBank Accession NP_001105155.1) と一致する (添付資料 2)。このため、ZMM28 蛋白質は内在性 ZMM28 蛋白質が関与する経路に作用すると考えられる。

30 ZMM28 蛋白質は遺伝子の発現を調節する MADS ボックス転写因子ファミリーに属し (Münster *et al.*, 2002、De Bodt *et al.*, 2003)、さらに当該ファミリーのうち MIKC タイプに分類される (De Bodt *et al.*, 2003)。MIKC タイプは、N 末端にある MADS ドメインと、それに続く Intervening (I) ドメイン、ケラチン様

(K) ドメイン及び C 末端ドメインから構成される (図 1、13 ページ; Pařenicová *et al.*, 2003)。

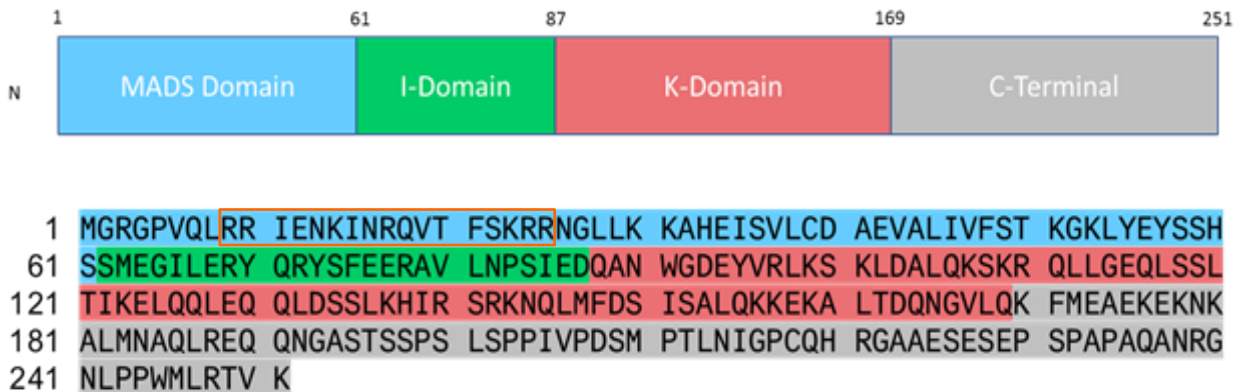


図 1. MIKC タイプの MADS ボックス転写因子の構造及び ZMM28 蛋白質のアミノ酸配列

SeqNLS (Machine Learning & Evolution Laboratory, <http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>)を用いて予測された核局在シグナルの位置を四角囲いで示した。

また、アミノ酸配列から ZMM28 蛋白質は MADS ドメイン内に核局在シグナル¹⁾を有していると考えられる (図 1 の下図、13 ページ)。実際に ZMM28 蛋白質は、細胞内において核に局在していることが確認されている (Wu *et al.*, 2019)。これらのことから、本組換えトウモロコシにおいて、ZMM28 蛋白質は転写因子として機能していると考えられる。

本組換えトウモロコシにおいては、*zmm28* 遺伝子発現カセットにトウモロコシ由来 *zm-gos2* プロモーターを用い、ZMM28 蛋白質を早期かつ増加して発現させている。内在性の ZMM28 蛋白質は 6 葉期から発現し始め 11 葉期にピークを迎え種子の登熟期にかけて継続して発現する。一方で本組換えトウモロコシにおける *zmm28* 遺伝子の発現は非組換えトウモロコシよりも早期の生育ステージ (2 葉期から 5 葉期) から発現し始める。実際に、本組換えトウモロコシにおける ZMM28 蛋白質は非組換えトウモロコシよりも早期の生育段階 (4 葉期) から発現し、6 葉期から糊熟期の各生育段階において発現量が増加することが報告されている (Wu *et al.*, 2019)。

このような ZMM28 蛋白質の早期発現及び発現増加は、初期栄養成長期における本組換えトウモロコシの生長を促す。実際に、植物のバイオマスと初期の生長 (草丈、葉のバイオマス、総葉面積) に関連する表現型について本組換えトウモロコシ及び対照のトウモロコシで測定した (Wu *et al.*, 2019)。この結果、本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、2 葉期から 7 葉期の各生育ステージにおける草丈が有意に高くなっていた。さらに、本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、8 葉期における葉の乾燥重量については 11%、絹

¹⁾ タンパク質の核内への直接輸送を担うアミノ酸配列。

糸抽出期における総葉面積については 4%増加していた (Wu *et al.*, 2019)。

5 また、光合成は作物の収量を決定する上で重要な要素であり、バイオマスの蓄積や子実の成長及び発達に不可欠な同化物質を産生する。そこで、本組換えトウモロコシ及び対照のトウモロコシの光合成効率について測定するために、光合成
10 に関連する表現型の測定を行った (Wu *et al.*, 2019)。その結果、本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、11 葉期の葉における光合成速度 (二酸化炭素交換速度及び光合成電子伝達速度) が顕著に増加していた。また、糊熟期の葉における異なる光強度 (photosynthetic photon flux density; PPFD) に対する光合成効率を調査した結果、本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、複数の光強度において光合成効率が増加しており、その差は飽和 PPFD レベルで最も顕著であった。さらに、光合成に関与する酵素活性について 11 葉期の葉にて調査した結果、本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、
15 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素及びピルビン酸リン酸ジキナーゼの酵素活性が統計的に有意に増加していた (Wu *et al.*, 2019)。

さらに、作物の収量を増加させるためのメカニズムとして、窒素の利用促進が挙げられる (Yadav *et al.*, 2017)。そこで、本組換えトウモロコシ及び対照のトウモロコシにおける窒素吸収及び窒素同化量について調査した (Wu *et al.*, 2019)。
20 その結果、窒素吸収において本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し、有意な増加 (16%) が示された。また、窒素同化量についても本組換えトウモロコシでは対照のトウモロコシと比較し有意な差が見られ、葉で 10%、根で 23% の増加が見られた。さらに、窒素代謝酵素である硝酸レダクターゼの葉における活性についても 4 葉期及び 11 葉期のどちらにおいても顕著な増加が見られ、上述
25 の窒素吸収及び窒素同化量の増加の結果と一致していた (Wu *et al.*, 2019)。

上述した表現型エンドポイントを用いた作用機序の特徴付けに加えて、本組換えトウモロコシにおける ZMM28 蛋白質の分子的な作用機序の評価を行った (Wu *et al.*, 2019)。

30 潜在的な MADS ボックス蛋白質の相互作用パートナーを同定する目的で、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング及び二分子蛍光相補性 (BiFC) 法を用いた実験を行った結果、ZMM28 蛋白質と相互作用する可能性のある蛋白質として、MADS ボックス SEP のメンバー及び AG のクレードに属する蛋白質が同定された (Wu *et al.*, 2019)。これらの蛋白質は、他の蛋白質と相互作用し四量体を形成することが知られている (Theißen and Saedler, 2001)。また、これらの蛋白質は相互作用することにより、DNA 結合及び標的遺伝子の転写が促進されることから、網羅的な遺伝子発現解析及び MADS ボックス蛋白質の DNA 結合認識配列である CArG (CA rich G) 結合モチーフの同定により、本組換えトウモロコシにおける ZMM28 蛋白質の直接的な標的遺伝子を探索した (Wu *et al.*, 2019)。
35
40 RNA シークエンス解析により本組換えトウモロコシの葉において発現量の変化が見られた遺伝子を調査したところ、発現増加している遺伝子が 192 個、発現減少している遺伝子が 64 個同定された。次に、これらの転写産物について、遺伝子オントロジーのカテゴリーに当てはめたところ、11 個のカテゴリーに分けられた

(表 3、15 ページ ; 添付資料 3 の Table 1)。

表 3. 本組換えトウモロコシにおける遺伝子オントロロジーのエンリッチメント解析の結果

| GO term | カテゴリー | 説明 |
|------------|-------|--|
| GO:0015979 | P | photosynthesis |
| GO:0009765 | P | photosynthesis, light harvesting |
| GO:0019684 | P | photosynthesis, light reaction |
| GO:0033013 | P | tetrapyrrole metabolic process |
| GO:0034357 | C | photosynthetic membrane |
| GO:0044436 | C | thylakoid part |
| GO:0009579 | C | thylakoid |
| GO:0004222 | F | metalloendopeptidase activity |
| GO:0006091 | P | generation of precursor metabolites and energy |
| GO:0005975 | P | carbohydrate metabolic process |
| GO:0018130 | P | heterocycle biosynthetic process |

5 ¹ GO Term のカテゴリー : P= biological process (生物学的プロセス) , F= molecular function (分子機能) , C = cellular component (細胞の構成要素)

10 これらの遺伝子オントロロジーのエンリッチメント解析の結果から、ZMM28 蛋白質の標的として、光合成における集光経路、前駆体代謝物とエネルギーの生成、炭水化物の代謝プロセスに関与する遺伝子が同定された。これらの結果は、本組換えトウモロコシにて観測された表現型と一致しており、光合成及び炭素同化に関連した遺伝子の発現が収量増加の潜在能力の強化に関与していることが示唆された (Wu *et al.*, 2019)。

15 このように、ZMM28 蛋白質の早期発現及び発現増加により、光合成や窒素代謝効率の向上及び初期の栄養成長が促進されることで収量増加の潜在能力が向上したトウモロコシが得られると考えられる。

PAT 蛋白質

20 PAT 蛋白質をコードする *pat* 遺伝子は、トウモロコシでの発現を最適化するため、*S. viridochromogenes* 由来 *pat* 遺伝子の塩基配列を改変した遺伝子である。産生される PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。

25 除草剤グルホシネートは、その活性成分である L-グルホシネートによりグルタミン合成酵素活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。PAT 蛋白質は、L-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変え無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する (OECD, 2002)。

30

b. 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の相同性

5 Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) データベース²⁾(2019年1月版)を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った。その結果、ZMM28蛋白質及びPAT蛋白質と相同性を示すアレルゲンは認められなかった(添付資料4、添付資料5)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

10 ZMM28蛋白質の構成的発現により期待される特性は収量増加であり、ZMM28蛋白質はトウモロコシ内在性蛋白質であることから、ZMM28蛋白質により本組換えトウモロコシの構成成分及び代謝物にトウモロコシの種としての範囲を超えた変化が生じるとは考え難い。

15 PAT蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒する酵素であり、基質特異性を有する(OECD, 1999)。このことから、PAT蛋白質により本組換えトウモロコシの構成成分及び代謝物にトウモロコシの種としての範囲を超えた変化が生じるとは考え難い。

20 また、ZMM28蛋白質及びPAT蛋白質それぞれの作用機作は独立していることから、相互に影響することは考えにくい。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

25 本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターはプラスミドPHP40099であり(図2、18ページ)、アグロバクテリウム(*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*))等由来のプラスミドpSB1から作製された(Komari *et al.*, 1996)。

30 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

35 プラスミドPHP40099の塩基数は50,401 bpであり、T-DNA領域の塩基数は7,470 bpで、その塩基配列は添付資料1に示したとおりである。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

40 プラスミドPHP40099の外側骨格領域には、選抜マーカーとして抗生物質スペクチノマイシン耐性(*spc*)遺伝子及びテトラサイクリン耐性(*tetA*)遺伝子が含

²⁾ Health and Environmental Science Institute (HESI) 及び Protein Allergenicity Technical Committee (PATC) によるデータベース (<http://comparedatabase.org>)、保持配列数 2,038。

まれる。これら遺伝子は、微生物中でベクターを増殖させる際、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するために必要なマーカーとして機能する。しかしながら、これら抗生物質耐性遺伝子は、T-DNA 領域の外側に位置するため、宿主には導入されない。

- 5 実際には、T₁世代（図 3、18 ページ）の葉³⁾及び T₃世代（図 3、18 ページ）の種子⁴⁾から抽出した各ゲノム DNA を用い、それぞれ Southern by Sequence (SbS) 分析⁵⁾（第一.2.(4).②、20 ページ；添付資料 6）及び外側骨格 5 領域（LB の外側領域、*spc*、*tetA*、*virG*、RB の外側領域）を対象とした PCR 分析（添付資料 7）を行った結果、抗生物質耐性遺伝子を含むこれらの外側骨格領域が本組換えトウモロコシに導入されていないことを確認した。
- 10

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

- 15 宿主に導入された T-DNA 領域に感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性はない。

³⁾ 構成要素領域を含む導入用プラスミド PHP40099 の特異的配列を対象としたプローブセットを用いた SbS 分析により導入遺伝子の移入が確認された 6 個体。

⁴⁾ 本組換えトウモロコシ特異的プライマーペアを用いた PCR 分析により導入遺伝子の移入が確認された 10 粒。

⁵⁾ キャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた解析手法。断片化した植物ゲノム全体から、特異的なプローブセットを用いて任意の配列（ここでは導入用プラスミドの構成要素由来の配列）を含む DNA 断片を選択的に回収（キャプチャー）し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を行う。本法を用いることにより、挿入された DNA 断片及びその近傍の塩基配列情報が得られる（Zastrow-Hayes *et al*, 2015）。

(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

5

本組換えトウモロコシの作出に用いたプラスミド PHP40099 における供与核酸の構成を図 2 (18 ページ) に示した。

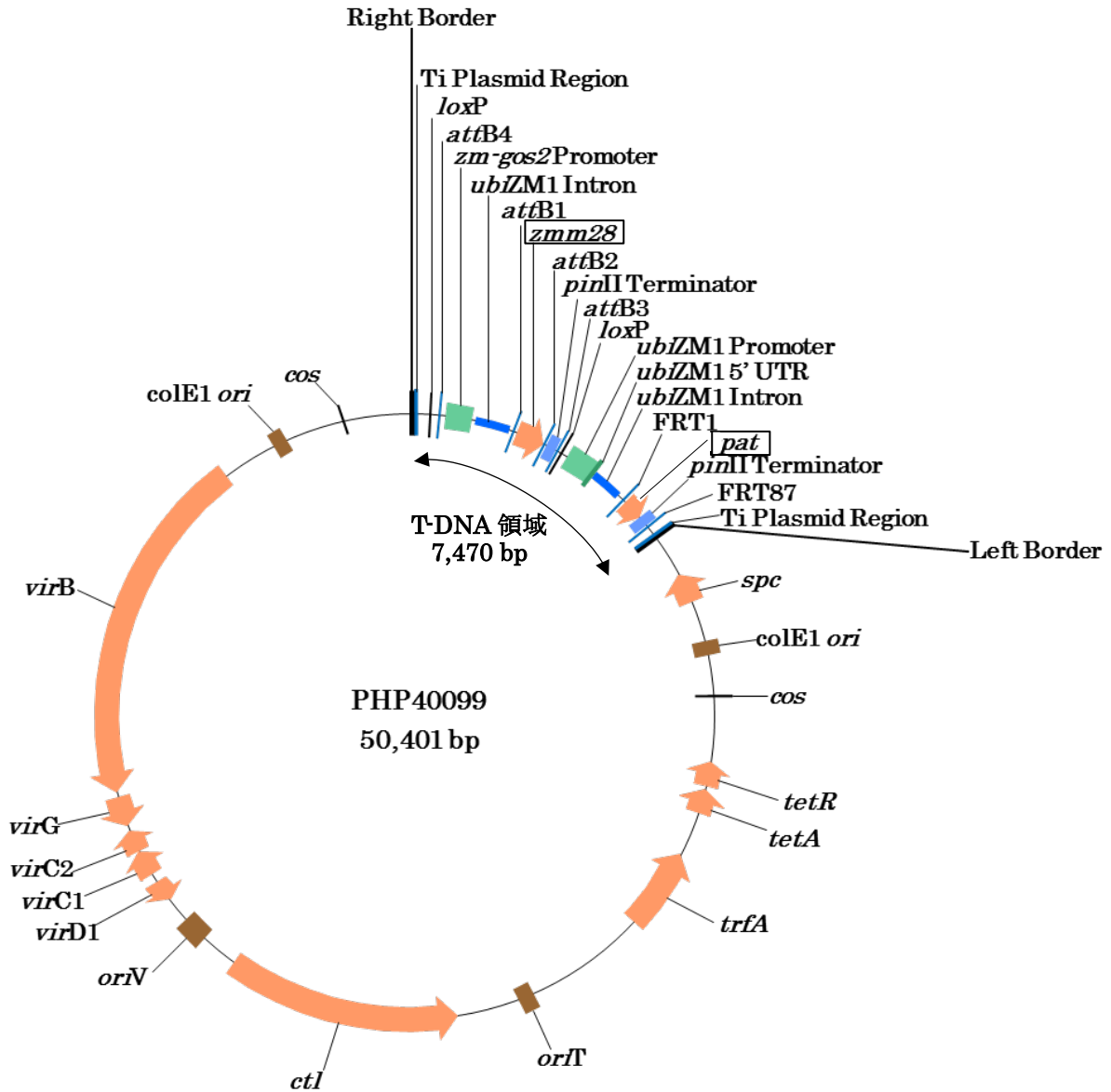


図 2. プラスミド PHP40099 における供与核酸の構成
本組換えトウモロコシに導入した遺伝子を四角囲いで示した。

10

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた。

5 ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

10 核酸が移入された細胞は、除草剤グルホシネートを添加した培地で胚を生育させることにより選抜した。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

15 上述①の培地にカルベニシリンを添加し、アグロバクテリウムを除去した。さらに、本組換えトウモロコシの T₁世代の葉及び T₃世代の種子から抽出した DNA 中にプラスミド PHP40099 の外側骨格領域は認められず（添付資料 6；添付資料 7）、アグロバクテリウムの菌体の残存はないと考えられる。

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

25 本組換えトウモロコシの育成経過は図 3（18 ページ）のとおりであり、本図中に、該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を示した。承認対象の範囲は、T₁世代以降である。

30

（社外秘情報につき非開示）

図 3. 本組換えトウモロコシの育成経過

35

(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 移入した核酸は、植物染色体に取り込まれると、メンデルの法則に従い分離する。導入遺伝子の分離比を検討するため、本組換えトウモロコシの T₂、F₁*¹、BC₁F₁、BC₃F₃及び BC₃F₆世代 (図 3、18 ページ) の 3 葉期の葉からゲノム DNA を抽出し、PCR 分析を行った (添付資料 8)。PCR 分析には、各導入遺伝子特異的プライマーペア並びに系統特異的プライマーペア及び対応するプローブを用い、*zmm28* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び核酸の移入の有無を確認した。系統特異的 PCR 分析では、移入された核酸と 5'側トウモロコシゲノムとの接合部を増幅する本組換えトウモロコシ特異的プライマーペアを用いた。その結果、いずれの世代においても、遺伝子が導入されている個体 (陽性個体) と遺伝子が導入されていない個体 (陰性個体) の分離比は、それぞれ期待される分離比から有意に異なるものではなかった。

15 以上のように、導入遺伝子はメンデルの法則に矛盾することなく伝達され、移入された核酸の複製物は、トウモロコシ染色体上に存在することが確認された (表 4、19 ページ)。

20

表 4. PCR 分析を指標とした導入遺伝子の分離比

| 世代 | サンプル数 | 期待される分離比 | 分析結果 | | P 値 |
|--------------------------------|-------|-------------|------|------|--------|
| | | 陽性個体 : 陰性個体 | 陽性個体 | 陰性個体 | |
| T ₂ | 100 | 3 : 1 | 80 | 20 | 0.2482 |
| F ₁ * ¹ | 100 | 1 : 1 | 54 | 46 | 0.4237 |
| BC ₁ F ₁ | 100 | 1 : 1 | 42 | 58 | 0.1096 |
| BC ₃ F ₃ | 100 | ホモ接合体 | 100 | 0 | — |
| BC ₃ F ₆ | 100 | ホモ接合体 | 100 | 0 | — |

統計解析 : カイ二乗検定。

25 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

30 本組換えトウモロコシに移入された導入遺伝子のコピー数を調べるため、8 個体の T₁ 世代 (図 3、18 ページ) の葉から抽出したゲノム DNA を用いて、SbS 分析を行った。約 400 bp にランダムに断片化した本組換えトウモロコシのゲノム DNA から、構成要素領域を含む導入用プラスミド PHP40099 の特異的配列を対象としたプローブセット (各全長 70~74 bp) を用いて、PHP40099 由来の配列を含む DNA 断片を選択的に回収し、次世代シーケンサーを用いて解析した (添付資料 6)。その結果、試験に用いた 8 個体のうち 6 個体が組換え体であり、いずれの組換え体においても T-DNA 領域由来の配列とゲノムとの接合部は 2 つ特定され、それぞれ T-DNA 領域の 5'末端及び 3'末端とゲノムとの接合部であった。このこ

35

とから、意図した T-DNA 領域が本組換えトウモロコシゲノム中に 1 コピー移入されていることが確認された。また、得られた DNA 断片中に PHP40099 の外骨格領域由来の配列は含まれておらず、T-DNA 領域だけがゲノムに挿入されていることが確認された。

5 また、F₁*³ 世代 (図 3、18 ページ) の DNA を用いて、挿入された DNA 全体及びその近傍の塩基配列を Sanger 法により決定した結果、Right Border 領域に 22bp の欠失及び Left Border 領域に 12bp の欠失が認められたが、その他の挿入 DNA 領域は意図したとおりゲノム中に挿入されており、塩基の欠損等は生じていないことが確認された (添付資料 9)。

10 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については、各導入遺伝子の配列をプローブとしたサザンブロット分析を、T₁、T₂、BC₁F₁、BC₃F₃ 及び BC₃F₆ の 5 世代 (図 3、18 ページ) において実施することにより確認した (添付資料 10)。

15 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

—

20 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

25 ZMM28 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現の安定性について、2017 年に米国アイオワ州の温室で栽培した本組換えトウモロコシ T₂ 世代及び F₁*¹ 世代 (図 3、18 ページ) の 9 葉期の葉、2017 年に北米 6 カ所 (米国のアイオワ州、インディアナ州、ミズーリ州、ネブラスカ州、ペンシルバニア州及びカナダのオンタリオ州) のほ場で栽培した本組換えトウモロコシ F₁*³ 世代 (図 3、18 ページ) の 9 葉期の葉及び根、絹糸抽出期の花粉並びに完熟期の種子を用い ELISA 法による分析を行った (添付資料 11、添付資料 12)。その結果、本組換えトウモロコシの 9 葉期の葉において、各世代のいずれの個体にも ZMM28 蛋白質及び PAT 蛋白質が産生されており、個体間及び世代間の発現の安定性が確認された (表 5、21 ページ)。なお、本組換えトウモロコシの 9 葉期の根、絹糸抽出期の花粉及び完熟期の種子における ZMM 蛋白質の産生量は低く、定量限界値を下回る個体もあった。また、PAT 蛋白質については、本組換えトウモロコシの 9 葉期の根、絹糸抽出期の花粉及び完熟期の種子において、いずれの個体にも PAT 蛋白質が産生されていた (表 5、21 ページ)。

表 5. 本組換えトウモロコシにおける各蛋白質の産生量
(ng / mg 乾物重)

| 遺伝子産物 | 世代 | 分析部位 | 定量下限値 | 平均値±標準偏差 (最小値-最大値) | |
|-----------|----------------------------------|------|--------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | | | | 本組換えトウモロコシ | 非組換えトウモロコシ |
| ZMM28 蛋白質 | T ₂ ¹⁾ | 葉 | 0.027 | 0.28±0.058 (0.19 - 0.34) | 0.16±0.023 (0.14 - 0.19) |
| | F ₁ * ^{1 1)} | 葉 | 0.027 | 0.40±0.024 (0.37 - 0.43) | 0.31±0.025 (0.28 - 0.35) |
| | F ₁ * ^{3 2)} | 葉 | 0.054 | 0.28±0.18 (0.066 - 0.72) | 0.21±0.13 (0.060 - 0.56) |
| | | 根 | 0.027 | 0.031±0.018 (<0.027 - 0.078) | 0.019±0.011 (<0.027 - 0.051) |
| | | 花粉 | 0.028 | 0.015±0.029 (<0.028 - 0.028) | ND (<0.028) |
| | | 種子 | 0.0069 | 0.012±0.0070 (<0.0069 - 0.029) | ND (<0.0069) |
| PAT 蛋白質 | T ₂ ¹⁾ | 葉 | 0.11 | 86±5.4 (78 - 90) | / |
| | F ₁ * ^{1 1)} | 葉 | 0.11 | 55±4.6 (48 - 60) | |
| | F ₁ * ^{3 2)} | 葉 | 0.11 | 20±8.2 (9.6 - 46) | |
| | | 根 | 0.054 | 17±9.2 (0.072 - 30) | |
| | | 花粉 | 0.22 | 76±10 (66 - 110) | |
| | | 種子 | 0.054 | 15±3.2 (7.5 - 21) | |

1) 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシ、各 n = 5。

5 2) 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシ、各 n = 24。

- 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達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、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

検出及び識別の方法：

10 本組換えトウモロコシは、系統特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイム PCR 法による検出及び識別が可能である（添付資料 13）。

感度：

15 本法の検出限界値は、非組換えトウモロコシのゲノム DNA に対する本組換えトウモロコシのゲノム DNA の混入率として 0.01%である（添付資料 13）。

信頼性：

独立した研究室 5 箇所において再現性が得られている（添付資料 13）。

- 20 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 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に付与された特性は、*zmm28* 遺伝子による収量増加及び *pat* 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性である。

30 第一の 2-(1)-ロ-②に記載したように、ZMM28 蛋白質の早期発現及び発現増加により、光合成や窒素代謝効率の向上及び初期の栄養成長が促進されることで収量増加の潜在能力が向上したトウモロコシが得られる。

35 なお、本組換えトウモロコシにおける RNA シークエンス解析において発現量の変化が見られた遺伝子には、ストレス応答や二次代謝物の生成等に潜在的に関与すると考えられる遺伝子も含まれていた（添付資料 3 の Table 2）。これらの遺伝子はストレス応答や二次代謝物の生成を含む複数の Gene Ontology Term を有しているが、遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析（adjusted $p < 0.05$ ）において、ストレス耐性や二次代謝産物の生成に関する特定の機能カテゴリーは示されなかった。一方で、RNA シークエンス解析により発現量の変化が見られた遺伝子の中には、アブシジン酸の生合成経路の酵素であるゼアキサンチンエポキシダーゼ活性に潜在的に関与すると考えられる遺伝子等も含まれていた（添付資料 3 の Table 2）。しかしながら、これらは、上述のとおり、遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析において特定の機能カテゴリーには分類されなかった。さらに、2019 年にデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社の遺伝子組換え農作物隔離ほ場において種子の休眠性への影響を調査した結果、本組換えトウモロコシ及び

非組換えトウモロコシから収穫した種子の発芽率はいずれも高く、統計学的有意差 (P<0.05) も認められなかった (添付資料 14、9 ページ)。加えて、追加の試験として、露地における種子の休眠性についても調査した結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのいずれの種子も全て発芽したことから (添付資料 14、9 ページ)、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの種子の休眠性に差異は無いと考えられた。また、2017 年に米国及びカナダの 12 ヶ所のほ場で実施した栄養構成成分分析及び農業的特性の調査の結果から、本組換えトウモロコシは従来のトウモロコシと同等であると判断された (添付資料 15)。このことから、これらのストレス応答や二次代謝物の生成等に潜在的に関与すると考えられる遺伝子の発現量の変化により、競合における優位性が高まったり、有害物質を産生したりする可能性は低いと考えられる。

また、PAT 蛋白質の発現により本組換えトウモロコシに除草剤グルホシネートに対する耐性の形質が付与されたことを確認するため、本組換えトウモロコシ T₂ 世代及び F₁*¹ 世代 (図 3、18 ページ) について、播種 20 日後に除草剤グルホシネート 0.45 kg a.i.⁶⁾/ha (通常量) を散布し、散布 5 日後に耐性の有無を目視により調査した (添付資料 16)。その結果、除草剤グルホシネートに対する耐性を有することが確認された (表 6、23 ページ)。

表 6. 本組換えトウモロコシに付与されたグルホシネート耐性の調査結果

| 調査項目 | | 本組換え トウモロコシ | 非組換え トウモロコシ |
|-------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| T ₂ | 耐性個体数 / 供試個体数 | 80 / 80 | 0 / 20 |
| F ₁ * ¹ | 耐性個体数 / 供試個体数 | 54 / 54 | 0 / 46 |

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

次の a~g の項目を指標として、本組換えトウモロコシと宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無を確認するため、2019 年にデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社の遺伝子組換え農作物隔離ほ場において本組換えトウモロコシの栽培試験を行った (添付資料 14)。試験には本組換えトウモロコシの F₁*³ 世代 (図 3、18 ページ) 及び対照として同様の遺伝的背景を有する非組換えトウモロコシ PHR1J×PHW2Z 系統を用いた。

a 形態及び生育の特性

発芽率、発芽揃い日、雄穂の抽出期、絹糸の抽出期、葉の着生角度、着雌穂高、分けつ数、稈長 (雄穂の穂首までの長さ)、地上部重、雌穂の数、雌穂の直径、雌穂の長さ、粒の色及び粒質について調査した (添付資料 14、6 ページ)。

その結果、いずれの調査項目についても、本組換えトウモロコシと非組換え

⁶⁾ active ingredient (活性主成分)

トウモロコシとの間に相違はなかった。

b 生育初期における低温耐性

5 2019年11月5日に、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシをポットに播種し、温室内で栽培後、2~3葉期(12月2日)にポットを露地に移した。露地栽培7日後(12月9日)に観察した結果、いずれの個体も枯死していた(添付資料14、10ページ)。

c 成体の越冬性

10 6月5日に播種した本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを、成熟後の2019年10月10日に観察した結果、いずれの個体も枯死していた(添付資料14、6ページ)

d 花粉の稔性及びサイズ

15 花粉の充実度(ヨード・ヨードカリ液染色率)及び長径を調査した結果、いずれも本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差($P<0.05$)は認められなかった(添付資料14、14ページ)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

20 種子の生産量について、雌穂の粒列数、一列粒数及び百粒重を調べた結果、いずれも本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差($P<0.05$)は認められなかった(添付資料14、6ページ)。

脱粒性について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのいずれについても、収穫時に種子の脱粒は認められなかった(添付資料14、6ページ)。

25 休眠性及び発芽率について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシから収穫した種子を、吸水させた脱脂綿上に室温で静置し発芽個体数を計測した。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも高く、統計学的有意差($P<0.05$)も認められなかった。また、本組換えトウモロコシの露地における種子の休眠性について追加調査した。本組換え
30 トウモロコシ及び非組換えトウモロコシから収穫した種子を10月16日に防鳥網内の露地に播種し発芽個体数を計測した。その結果、いずれの種子も全て発芽したことから、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの種子の休眠性に差異は無いと考えられた。また、発芽した植物体はいずれも12月4日
35 までに枯死した(添付資料14、9ページ)。

f 交雑率

我が国にトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているとの報告はないことから、交雑率の調査は行わなかった。

g 有害物質の産生性

40 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの有害物質の産生性を比較するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験により検討した。

後作試験：

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを栽培した後の土壌を用いて検定作物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した（添付資料 14、11 ページ）。

- 5 その結果、いずれについても、本組換えトウモロコシ栽培後土壌と非組換えトウモロコシ栽培後土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった。

鋤込み試験：

- 10 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの葉身及び葉鞘を培土に添加した土壌で検定作物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した（添付資料 14、12 ページ）。

- 15 その結果、いずれについても、本組換えトウモロコシ鋤込み土壌と非組換えトウモロコシ鋤込み土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった。

土壌微生物相試験：

- 20 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを栽培した後の土壌における微生物数（細菌数、放線菌数及び糸状菌数）を計測した（添付資料 14、13 ページ）。

その結果、いずれについても、本組換えトウモロコシ栽培後土壌と非組換えトウモロコシ栽培後土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

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国外における申請状況は、表 7 (27 ページ) のとおりである。

表 7 国外における申請状況

(2021年1月現在)

| 申請国 | 目的 | 申請/承認年月 | 申請先 |
|------------------|----------------|------------|--------------------------------|
| 米国 | 無規制裁培 | 2020年12月承認 | 米国農務省 (USDA) |
| カナダ | 環境安全性、飼料としての利用 | 2020年9月承認 | カナダ食品検査庁 (CFIA) |
| | 食品としての利用 | 2020年9月承認 | カナダ保健省 (HC) |
| オーストラリア・ニュージーランド | 食品としての利用 | — | オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) |
| EU | 食品・飼料としての利用 | — | 欧州食品安全機関 (EFSA) |

—：社外秘情報につき非開示

- 5 なお、我が国においては、2020年9月に飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行っている。また、2020年12月に食品としての安全性確認申請を厚生労働省に行っている。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 宿主であるトウモロコシは、我が国において長年にわたる使用実績がある。したがって、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの比較により、影響が生ずる可能性について考察した。

1 競合における優位性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 植物が自然環境下で他の植物と競合するためには、当該植物が自然環境下で自生する、すなわち人の手を借りずに繁殖し、群落を維持することが必要である。植物の自生には種子の脱粒性及び休眠性が重要であるが、栽培作物であるトウモロコシは栽培化の過程でこれらの特性を失っており、自生することができない (OECD, 2003、後藤ほか, 2018)。これまでに、我が国においてトウモロコシが自生することは報告されていない。

20 本組換えトウモロコシでは、ZMM28 蛋白質の構成的発現により収量増加が期待され、PAT 蛋白質の発現により除草剤グルホシネート耐性が付与されている。

ZMM28 蛋白質の構成的発現により、光合成や炭水化物の生合成過程に関わる遺伝子発現の変化及び初期の栄養成長期における本組換えトウモロコシの生長が促進されることで収量増加が期待されるが、いずれも上記特性に関与する形質ではない。

25 また、本組換えトウモロコシは PAT 蛋白質の発現により除草剤グルホシネートに対する耐性を有するものの、当該除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において、PAT 蛋白質により本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まるとは考え難い。実際、これまでも PAT 蛋白質を有する除草剤グルホシネート耐性トウモロコシは生物多様性影響評価を経ているが、競合における優位性を高める特性に変化が生じたとの報告はない。

30 さらに、既に第一種使用規程の承認を受けている PAT 蛋白質を有する除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ中で内在性 ZMM28 蛋白質と PAT 蛋白質は共存しているが、これまでにこれらトウモロコシにおいて競合における優位性を高める特性に変化が生じたとの報告はない。このため、本組換えトウモロコシにおいても意図した収量増加及び除草剤グルホシネート耐性の特性を超えた新たな特性が付与されるとは考え難い。

40 また、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸特性（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、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）について隔離ほ場で調査した結果、非組換えトウモロコシとの間で相違は認められなかった。加えて、2017 年に米国及びカナダの 12 ヶ所のほ場で実施した農業的特性の調査の結果、本組換えトウモロコシにおいて競合における優位性を高めるような特性は認められなかった（添付資料 15）。

したがって、これら付与された特性により本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになることはなく、競合における優位性が高まることもないと考えられた。

5 以上のことから、本組換えトウモロコシの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

10 —

(3) 影響の生じやすさの評価

15 —

(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の競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

20

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

25

トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

30 本組換えトウモロコシ中には、*zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子により ZMM28 蛋白質及び PAT 蛋白質が産生される。

ZMM28 蛋白質は、既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められず（第一.2. (1) .ロ.②、12 ページ）、また、本組換えトウモロコシの構成成分及び代謝物にトウモロコシの種としての範囲を超えた変化が生じることも考え難い（第一.2. (1) .ロ.③、16 ページ）。

35 PAT 蛋白質は、既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められず（第一.2. (1) .ロ.②、12 ページ）、PAT 蛋白質が野生動植物に対して有害性を示すとの報告はない（OECD, 1999, CERA-ILSI, 2011）。また、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒する酵素であり、基質特異性を有する（第一.2. (1) .ロ.③、16 ページ）。このため、PAT 蛋白質が宿主の代謝経路を変化させることは考え難く、PAT 蛋白質により本組換えトウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとは考え難い。

40

さらに、既に第一種使用規程の承認を受けているPAT蛋白質を有する除草剤グ

ルホシネート耐性トウモロコシ中で内在性ZMM28蛋白質とPAT蛋白質は共存しているが、これまでこれらトウモロコシにおいて予期しない代謝物が生じたとの報告はない。

5 実際、隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの調査においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に有意な差は認められなかった（第一.2. (6) .②.g、25ページ）。また、2017年に米国及びカナダの12ヶ所のほ場で実施した栄養構成成分分析の結果、本組換えトウモロコシは従来のトウモロコシと同等であると判断された（添付資料15）。このため、本組換えトウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとは考え難い。

10 なお、グルホシネート散布時、PAT 蛋白質により *N*-アセチル-L-グルホシネートが産生される。しかしながら、本代謝産物の動物に対する毒性はグルホシネートより低く（食品安全委員会, 2013）、農薬取締法の下、グルホシネートの分析対象化合物の一つとしてトウモロコシにおける残留基準値が定められ、農薬登録により安全な使用方法が定められ、人畜及び環境に対する安全性が確保されている（日本食品化学研究振興財団, 2020）。

20 以上のことから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生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

—

(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の有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

35 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

40 宿主であるトウモロコシが、我が国において野生化した事例はなく、また交雑可能な近縁野生種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の自生も報告されていない。このため、本組換えトウモロコシの交雑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

—

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の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

—

20

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 トウモロコシは、我が国において長年にわたり使用されてきたが、これまでに我が国において野生化し、野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼしたという報告はない。

10 本組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸特性（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、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）について評価を行った結果、本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。

15 また、本組換えトウモロコシにおいて ZMM28 蛋白質の構成的発現により期待される特性は収量増加であるが、この形質の付与が本組換えトウモロコシを自然環境中で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考え難い。加えて、本組換えトウモロコシは、PAT 蛋白質により除草剤グルホシネートに対する耐性も付与されているが、自然環境下で当該除草剤が散布されることは想定され難い。さらに、ZMM28 蛋白質及び PAT 蛋白質が相互に影響する可能性も考え難く、意図した収量増加及び除草剤耐性の特性の範囲を超えた新たな特性が付与されることも考え難い。

20 これらのことから、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 従来、トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。本組換えトウモロコシ中に産生される ZMM28 蛋白質はトウモロコシ内在性蛋白質であることから、野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとは考え難い。また、PAT 蛋白質が野生動植物に対して有害性を示すとの報告はない。さらに、ZMM28 蛋白質及び PAT の相互作用により予期しない代謝物が生じる可能性も考え難い。実際に、隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの調査においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に有意な差は認められなかった。

30 これらのことから、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。

35 我が国において、トウモロコシと交雑可能な野生植物はなく、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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。

40 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、我が国における生物多様性影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *The Plant Cell* 1: 115-122.
- 5
- CERA-ILSI. (2011). A review of the environmental safety of the PAT protein: Center for environmental risk assessment. ILSI Research Foundation. *Environmental Biosafety Research*. 10: 73-101
- 10
- CFIA. (2012). *The Biology of Zea mays* (L.) (Maize). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367>).
- 15
- Accessed on July 28th, 2020.
- Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Research*. 14: 2111-2120.
- 20
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 18: 675-689.
- 25
- Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*. 91: 79-85.
- 30
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y. and Theißen, G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in Plant Science* 8(10): 475-483.
- FAO. (2020). FAOSTAT. (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>).
- 35
- Accessed on July 28th, 2020.
- Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3" (9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.
- 40

- Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.
- 5 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2(4): 571-589.
- Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14(14): 5641-5650.
- 10 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal* 10: 165-174.
- 15 Luna, S.V., Figueroa, J.M., Baltazar, B.M., Gomez, R.L., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science*, 41, 1551-1557.
- 20 Münster, T., Deleu, W., Wingen, L.U., Ouzunova, M., Cacharrón, J., Faigl, W., Werth, S., Kim, J.T.T., Saedler, H. and Theißen, G. (2002). Maize MADS-Box Genes Galore. *Maydica* 47: 287-301.
- NCGA. (2020). World of Corn 2020.
25 (<http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2020.pdf>).
Accessed on July 28th, 2020.
- OECD. (1999). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology
30 No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide.
ENV/JM/MONO(99)13.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
Accessed on July 28th, 2020.
- 35 OECD. (2002). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology
No. 25: Module II: Phosphinothricin. ENV/JM/MONO(2002)14.
(<http://www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf>).
Accessed on July 28th, 2020.
- 40 OECD. (2003). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology,
No. 27: Consensus document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).
ENV/JM/MONO 11.
(<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815758.pdf>).

Accessed on July 28th, 2020.

- 5 Parěnicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J.,
Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. and
Colombo, L. (2003). Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete
MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the
MADS World. *The Plant Cell* 15: 1538-1551.
- 10 Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E.,
Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, P. and Jones, G.D. (2001). Corn pollen
deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States*, 98, 11919-11924.
- 15 Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA
sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP
protein of yeast in vitro. *Nucleic Acids Research*. 14(2): 4787-4802.
- 20 Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E. and Matilla, H.R. (2000). Preliminary report on
the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario.
Ecological Impact of Bt corn Pollen on the Monarch Butterfly, March 2000.
([http://cera-
gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/articles/searsreport.pdf](http://cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/articles/searsreport.pdf)).
Accessed on April 23rd, 2015.
- 25 Shirai, Y. and Takahashi, M. (2005). Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-
target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Applied Entomology and
Zoology*, 40 (1), 151-159.
- 30 Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT
recombination sites and methods of use. World Intellectual Property
Organization. Application No.PCT/US2006/027380.
- 35 Theißen, G., Saedler, H. (2001). Plant biology: Floral quartets. *Nature* 409: 469-
471.
- Tomizawa, J-I., Ohmori, H. and Bird, R.E. (1977). Origin of replication of colicin
E1 plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 1865-
1869.
- 40 Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Puhler, A.
(1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase
gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in
Nicotiana tabacum. *Gene*. 70(1): 25-37.

- 5 Wu, J., Lawit, S.J., Weers, B., Sun, J., Mongar, N., Van Hemert, J., Melo, R., Meng, X., Rupe, M., Clapp, J., Haug Collet, K., Trecker, L., Roesler, K., Peddicord, L., Thomas, J., Hunt, J., Zhou, W., Hou, Z., Wimmer, M., Jantes, J., Mo, H., Liu, L., Wang, Y., Walker, C., Danilevskaya, O., Lafitte, H.R., Schussler, J.R., Shen, B. and Habben, J.E. (2019). Overexpression of *zmm28* increases maize grain yield in the field. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116 (47): 23850 -23858.
- 10 Wych, R.D. (1988). Production of hybrid seed corn. In G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.), Corn and Corn Improvement (3rd ed.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc.: 565-607.
- 15 Yadav, M.R., Kumar, R., Parihar, C.M., Yadav, R.K., Jat, S.L., Ram, H., Meena, R.K., Singh, M., Birbal, Verma A.P., Ghoshand, A., Jat, M.L. (2017). Strategies for improving nitrogen use efficiency: A review. Agricultural Reviews 38: 29-40.
- 20 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddeloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A Robust Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. The Plant Genome 8: 1-15.
- 25 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.
- 30 菊池一徳. (1987). “トウモロコシの生産と利用”. 光琳. 東京.
- 後藤秀俊, 黒川俊二, 笠井美恵子, 福田美雪, 高橋靖幸, 井上公一, 中井秀一, 山根精一郎, 津田麻衣, 大澤良. (2018). “遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察”. 育種学研究. 20: 105-114
- 35 財務省. (2020). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on July 28th, 2020.
- 40 食品安全委員会. (2013). 農薬評価書 グルホシネート (第3版) .
(<http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20130612154&fileId=201>).
Accessed on July 28th, 2020.
- 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.

- 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.
- 5 戸澤英男. (2005). “トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—”. 農山漁村文化協会.
- 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.
- 10 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.
- 日本食品化学研究振興財団. (2018). 農薬等の基準値 品目名：グルホシネート.
(http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=18900).
Accessed on July 28th, 2020.
- 15 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 on July 28th, 2020.
- 20 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.
(<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-63.pdf>).
- 25 Accessed on July 28th, 2020.
- 農林水産省. (2019a). 平成 30 年産作物統計（普通作物・飼料作物・工芸農作物） 令和元年 8 月 9 日公表.
(https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20180&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001125936&cycle_facet=tclass1%3Atclass2%3Acycle).
- 30 Accessed on July 28th, 2020.
- 35 農林水産省. (2019b). 平成 30 年産野菜生産出荷統計 令和元年 12 月 9 日公表.
(https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001135323&cycle_facet=tclass1%3Atclass2%3Acycle).
- 40 Accessed on July 28th, 2020.
- 農林水産省. (2020). 飼料をめぐる情勢 令和 2 年 7 月公表.
(http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/index.html).

Accessed on July 28th, 2020.

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.

5

緊急措置計画書

令和2年11月25日

氏名 デュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社
代表取締役社長 藤井 茂樹
住所 東京都千代田区永田町二丁目11番1号

収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*zmm28, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Iltis*) (DP202216, OECD UI: DP-202216-6) (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、今後、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

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

弊社は緊急措置に適切に対応するための社内委員会を速やかに設置する。社内委員会の構成メンバーを以下の表にまとめた。

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社と連絡を取り、第一種使用等の状況について情報収集を行う。

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

米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、米国における本組換えトウモロコシ種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、本連絡体制により、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、弊社のホームページ等、国内の適切な媒体を通して、一般に広く知らせる。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置をとり、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、弊社は、米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社とともに、我が国向けに輸出している穀物取扱い業者、種子取扱い業者及び我が国の栽培者等に対して本件を連絡する等の適切な措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、弊社は、速やかに農林水産省消費・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連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

添付資料一覧

1. Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP40099 (社外秘)
- 5 2. ZMM28 蛋白質及び内在性 ZMM28 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
3. Description of Experimental Design and Analysis for Differentially Expressed Genes (社外秘)
- 10 4. Comparison of the Amino Acid Sequence of the ZMM28 Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens (社外秘)
5. Comparison of the Amino Acid Sequence of the PAT Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens (社外秘)
- 15 6. Southern-by-Sequencing Analysis of DP-2Ø2216-6 Maize (社外秘)
7. Backbone DNA Analysis by PCR (社外秘)
- 20 8. Segregation Analysis and Tissue Production of Multiple Maize Generations Containing Event DP-2Ø2216-6 (社外秘)
9. Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-2Ø2216-6 Maize (社外秘)
- 25 10. Characterization of DP-2Ø2216-6 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (社外秘)
11. Protein Expression Analysis (社外秘)
- 30 12. Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-2Ø2216-6: U.S. and Canada Test Sites (社外秘)
13. Development and Validation of an Event-specific Quantitative Real-time PCR (qPCR) Detection Method for Maize Event DP-2Ø2216-6 (社外秘)
- 35 14. 隔離ほ場試験報告書 (社外秘)
15. Nutrient Composition and Agronomic Characteristics of a Maize Line Containing Event DP-2Ø2216-6: U.S. and Canada Test Sites (社外秘)
- 40 16. Greenhouse-based Herbicide Efficacy (社外秘)