

|                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>mpp75Aa1.1</i>, <i>vpb4Da2</i>, <i>DvSnf7.1</i>, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON95275, OECD-UI: MON-95275-7) 申請書等の概要</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 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  |
| ① 和名、英名及び学名 .....                                                | 3  |
| ② 宿主の品種名又は系統名 .....                                              | 3  |
| ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域 .....                                      | 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  |
| (3) 生理学的及び生態学的特性 .....                                           | 5  |
| イ 基本的特性 .....                                                    | 5  |
| ロ 生息又は生育可能な環境の条件 .....                                           | 5  |
| ハ 捕食性又は寄生性 .....                                                 | 6  |
| ニ 繁殖又は増殖の様式 .....                                                | 6  |
| ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命 .....                                      | 6  |
| ② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性 .....                 | 6  |
| ③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生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  |
| 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 .....                                             | 10 |
| イ 構成及び構成要素の由来 .....                                              | 10 |
| ロ 構成要素の機能 .....                                                  | 12 |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 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 .....                                           | 12 |
| 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 .....             | 19 |
| ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容 .....                                                                     | 29 |
| (2) ベクターに関する情報 .....                                                                              | 30 |
| イ 名称及び由来 .....                                                                                    | 30 |
| ロ 特性 .....                                                                                        | 30 |
| ① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....                                                                            | 30 |
| ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 .....                                                                  | 30 |
| 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 .....                                                        | 31 |
| (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....                                                                          | 31 |
| イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....                                                                          | 31 |
| ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....                                                                          | 31 |
| ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 .....                                                                           | 31 |
| ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 .....                                                                          | 31 |
| 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 .....                                                  | 31 |
| 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 ..... | 32 |
| (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 .....                                                        | 34 |
| ① 移入された核酸の複製物が存在する場所 .....                                                                        | 34 |
| 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 .....                                              | 36 |
| 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 .....                                                  | 39 |
| 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 .....                                          | 39 |
| 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 .....                              | 42 |
| (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 .....                                                       | 42 |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違                                                | 43 |
| 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                             | 43 |
| 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* | 43 |
| a 形態及び生育の特性                                                             | 44 |
| b 生育初期における低温耐性                                                          | 44 |
| c 成体の越冬性                                                                | 44 |
| d 花粉の稔性及びサイズ                                                            | 45 |
| e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率                                                   | 45 |
| f 交雑率                                                                   | 46 |
| g 有害物質の産生性                                                              | 46 |
| 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報                                                   | 46 |
| (1) 使用等の内容                                                              | 46 |
| (2) 使用等の方法                                                              | 46 |
| (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                                 | 47 |
| (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                            | 47 |
| (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                           | 47 |
| (6) 国外における使用等に関する情報                                                     | 47 |
| 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価*                                                     | 49 |
| 1 競合における優位性                                                             | 49 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定                                               | 49 |
| (2) 影響の具体的内容の評価                                                         | 49 |
| (3) 影響の生じやすさの評価                                                         | 50 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断                                               | 50 |
| 2 有害物質の産生性                                                              | 50 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定                                               | 50 |
| (2) 影響の具体的内容の評価                                                         | 55 |
| (3) 影響の生じやすさの評価                                                         | 55 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断                                               | 57 |
| 3 交雑性                                                                   | 57 |
| (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定                                               | 57 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| (2) 影響の具体的内容の評価 .....           | 57 |
| (3) 影響の生じやすさの評価 .....           | 57 |
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 ..... | 57 |
| 4 その他の性質 .....                  | 57 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価 .....          | 58 |
| 参考文献 .....                      | 61 |
| 緊急措置計画書 .....                   | 73 |
| 別添資料リスト .....                   | 75 |

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

2023 年 12 月 8 日

農林水産大臣 宮下 一郎 殿

5 環境大臣 伊藤 信太郎 殿

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 坂田 耕平

10 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、  
15 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     | コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ ( <i>mpp75Aa1.1</i> , <i>vpb4Da2</i> , <i>DvSnf7.1</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON95275, OECD-UI: MON-95275-7) |
| 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

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)。

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。

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、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。

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

### ・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 (OECD, 2003; 戸澤, 2005)。

国連食糧農業機関 (FAO) によると、2021 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 2 億 587 万 ha であり、上位国は、中国 4,336 万 ha、米国 3,456 万 ha、ブラジル 1,902 万 ha、インド 986 万 ha、アルゼンチン 815 万 ha である (FAO, 2023)。

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、2022 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 6,300 ha で (農林水産省, 2023a)、2022 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 1,300 ha である (農林水産省, 2023b)。

### ・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。

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)。

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

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。2021 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、45.2 %が飼料 (7.1%の蒸留粕を含む)、28.8 %がエタノール製造、16.3 %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, 2022)。

我が国では、2022 年に約 1,526 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 1,067 万トンが飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる (財務省, 2023)。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, 2023c)。

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

#### イ 基本的特性

—

#### 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)。

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℃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℃に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987; 中村, 2001)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0℃以下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12 %、温度 10℃、相対湿度 55 %以内に保つことが必要である (中村, 2001; OECD, 2003)。

- 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。

- ③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

トウモロコシは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。

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、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  $\mu\text{m}$  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は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 ヲ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 (Pleasants 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。

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又は生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

#### 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

5 コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mpp75Aa1.1*, *vpb4Da2*, *DvSnf7.1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON95275, OECD UI: MON-95275-7) (以下「本組換えトウモロコシ」とする。) は、コーンルートワーム (*Diabrotica* spp.) に対する効果的な防除方法を農家に提供するために作出された。

10 本組換えトウモロコシでは、*Brevibacillus laterosporus* 由来の *Mpp75Aa1.1* 蛋白質<sup>1</sup>、*Bacillus thuringiensis* 由来の *Vpb4Da2* 蛋白質<sup>1</sup> 及び *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物においてウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*, 以下「WCRW」とする。) の *DvSnf7* 遺伝子と一致するように設計された逆方向反復配列から発現する二本鎖 RNA (以下「*DvSnf7* dsRNA」とする。) が産生されることにより、コウチュウ目の標的害虫に対する抵抗性が付与される。なお、*Mpp75Aa1.1* 蛋白質は生物検定試験においてチョウ目昆虫への活性を示したが (第一の 2-(1)-ロ-②, p21~26)、ほ場環境においてチョウ目害虫に対する実用的な防除効果は認められていない。

20 なお、後述 (第一の 2-(1)-イ, p10~11) のとおり、本組換えトウモロコシにおいて発現し殺虫活性を付与する *DvSnf7* dsRNA の塩基配列は、既に第一種使用規程の承認を受けているコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*DvSnf7*, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) (承認日：2016 年 8 月 26 日) (以下「MON87411 系統」とする。) において発現し殺虫活性を付与する dsRNA の塩基配列と同一である。

<sup>1</sup> 本組換えトウモロコシにおいて発現する *Mpp75Aa1.1* 蛋白質及び *Vpb4Da2* 蛋白質は、過去に *Cry75Aa1.1* 蛋白質及び *Vip4Da2* 蛋白質 (又は *Vip4Ba1* 蛋白質) と命名されていた。これら 2 つの蛋白質が属する分類上の区分について、新旧の名称と構造的類似性に基づく再分類の背景が文献 (Crickmore et al., 2021) に詳述されている。

## (1) 供与核酸に関する情報

### イ 構成及び構成要素の由来

- 5       本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を図 2 (p13) 及び表 1 (p14~18) に示した。

#### 【*mpp75Aa1.1* 遺伝子】

- 10       *mpp75Aa1.1* 遺伝子から発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質は、グラム陽性の内生孢子形成細菌の 1 種 *B. laterosporus* に由来する殺虫性蛋白質である (Bowen et al., 2021)。 *B. laterosporus* は土壌、岩、埃、淡水や海水など幅広い環境に存在している (Rui, 2013; Panda et al., 2014; Nivetha and Jayachandran, 2017)。 *B. laterosporus* において産生される Mpp75Aa1 蛋白質の前駆体は、その N 末端に 23 アミノ酸の膜輸送シグナルペプチドを有しており、このペプチドは *B. laterosporus* において膜輸送の後に蛋白質の本体から切り離される。この 23 アミノ酸の膜輸送シグナルペプチドは細菌のシグナルペプチドであり植物中では切り離しが起こらないと考えられたため、当該ペプチドをコードする DNA 配列は、本組換えトウモロコシに導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子では取り除かれている。また、当該遺伝子の発現における蛋白質への翻訳を確実にするために、コード配列の 5'末端にメチオニンが付加されている。

20       本組換えトウモロコシにおいて発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。

#### 【*vpb4Da2* 遺伝子】

- 25       *vpb4Da2* 遺伝子から発現する Vpb4Da2 蛋白質は、 *B. thuringiensis* に由来する殺虫性蛋白質である。本組換えトウモロコシにおいて発現する Vpb4Da2 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。

#### 【*DvSnf7.1* 抑制カセット】

- 30       本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットには WCRW に由来する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列が逆方向反復で存在し、その転写産物において *DvSnf7* 遺伝子の部分配列に対応した dsRNA である *DvSnf7* dsRNA (240 bp) が形成される。この逆方向反復配列の構成及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列 (順方向配列及び逆方向配列の両方) の DNA 配列は、既に第一種使用規程の承認を受けている MON87411 系統に導入された *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と同一である。
- 35       さらに、本組換えトウモロコシに殺虫活性をもたらす *DvSnf7* dsRNA の塩基配

列についても、MON87411 系統において発現する dsRNA の塩基配列と同一である。しかしながら、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットの完全長の転写産物と MON87411 系統の *DvSnf7* 抑制カセットの完全長の転写産物との間に見られる唯一の違いは、リーダー配列である (図 1, p11)。本組換えトウモロコシでは、害虫抵抗性の効果の向上を目的として *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写レベルを高めるために<sup>2</sup>、MON87411 系統とは異なるリーダー配列を用いている。MON87411 系統のリーダー配列は 9 塩基である。一方、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) におけるリーダー配列は 55 塩基であり、このうち 7 塩基については MON87411 系統の *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物 (RNA) と共通で、48 塩基が本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットに特異的な配列である。リーダー配列以外の全ての RNA 配列は本組換えトウモロコシと MON87411 系統の間で同一であり、その中には殺虫活性をもたらす dsRNA を形成する逆方向反復配列 (*DvSnf7* 遺伝子の部分配列) も含まれる。

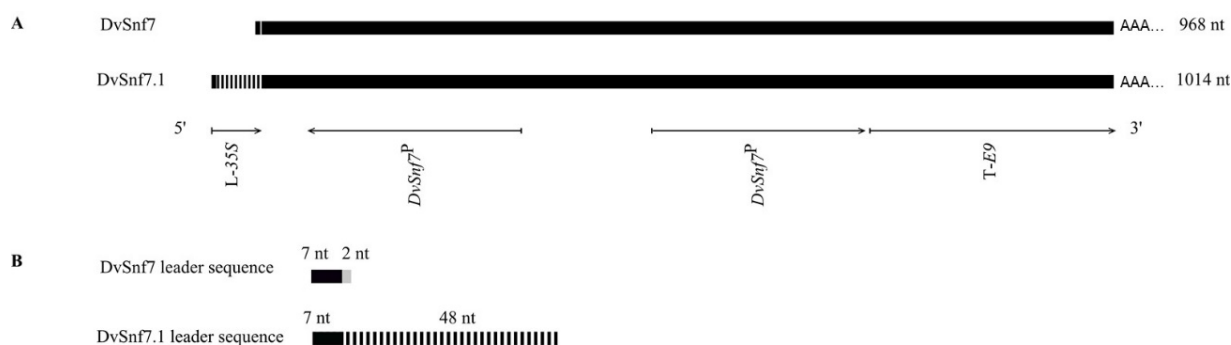


図 1 *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物 (RNA) と *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) との比較\*

(A) MON87411 系統で発現する *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物 (RNA) と本組換えトウモロコシで発現する *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の比較。両者の配列は、リーダー配列を除いて同一である。なお、いずれの転写産物についても、末端のポリ A 配列 (鎖長は未同定) を図中に「AAA...」と表記している。(B) *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物と *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物におけるリーダー配列の比較。図中の 5'側における黒塗りの箇所は *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物と *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物との間で共通している配列であり、灰色の箇所は *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物に特異的な配列、縞模様の箇所は *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物に特異的な配列を示している。なお、本図におけるスケールは、実際の配列の長さを反映したものではない。

<sup>2</sup> 本組換えトウモロコシの根における *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物の発現量は  $5.1 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/g}$  FW であり (表 8, p42)、MON87411 系統の根における *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物の発現量 ( $3.15 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/g}$  FW) (日本モンサント株式会社, 2015) と比べて高い値であった。

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た供与核酸の構成要素の機能を表 1 (p14~18) に示した。



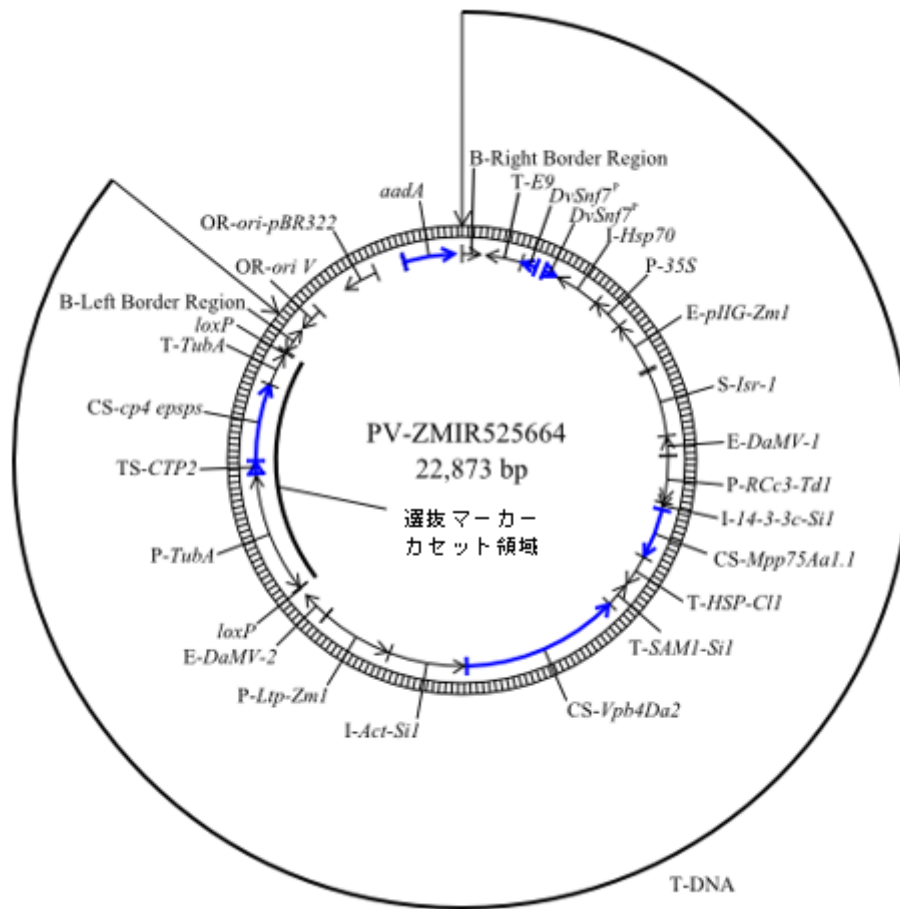


図2 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 のプラスミドマップ\*

本組換えトウモロコシの育成の過程で、T-DNA 領域が導入された  $R_2$  世代の個体を Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ遺伝子組換えトウモロコシ系統と交配させ、PV-ZMIR525664 の T-DNA 領域のうち、2つの *loxP* 配列に挟まれる選抜マーカーカセット領域 (P-*TubA*、TS-CTP2、CS-*cp4 epsps*、T-*TubA* 及び *loxP* 配列の1つ) 及び Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した (第一の2-(3)-ハ-③, p32)。なお、図中の *DvSnf7* に付された「p」の表記は、遺伝子の部分配列であることを示している。

10

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能\*

| 構成要素                                | プラスミド中の位置   | 由来及び機能                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA 領域                            |             |                                                                                                                                                                          |
| B <sup>1</sup> -Right Border Region | 1-331       | <i>Rhizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。               |
| Intervening sequence                | 332-436     | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                        |
| T <sup>2</sup> -E9                  | 437-1,069   | エンドウ ( <i>Pisum sativum</i> ) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアダデニル化を誘導する。                       |
| Intervening sequence                | 1,070-1,098 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                        |
| DvSnf7 <sup>P</sup>                 | 1,099-1,338 | <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。 |
| Intervening sequence                | 1,339-1,488 | 転写産物において当該配列内で対合しないように設計された、ループ部分の配列。                                                                                                                                    |
| DvSnf7 <sup>P</sup>                 | 1,489-1,728 | <i>D. virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。         |
| Intervening sequence                | 1,729-1,764 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                        |
| I <sup>3</sup> -Hsp70               | 1,765-2,568 | トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) 由来の <i>hsp70</i> 遺伝子のイントロン及びその近傍領域に存在するエクソン配列であり、熱ショック蛋白質 (HSP70) をコードする (Rochester et al., 1986)。遺伝子発現の制御に関わる (Brown and Santino, 1997)。     |
| Intervening sequence                | 2,569-2,574 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                        |
| P <sup>4</sup> -35S                 | 2,575-3,150 | 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)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。                                                                                       |

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 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   | 由来及び機能                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E <sup>5</sup> - <i>pIIIG-Zm1</i>   | 3,151-4,066 | トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) に由来し、物理的インピーダンス誘導蛋白質をコードする <i>pIIIG</i> 遺伝子のエンハンサー配列 (Huang et al., 1998)。植物細胞内での転写を高める。                                         |
| Intervening sequence                | 4,067-4,072 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                          |
| S <sup>6</sup> - <i>Isr-1</i>       | 4,073-5,291 | 隣接する遺伝子が互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化するためのスペーサーとして設計された非コード配列 (Casini et al., 2014) (GenBank accession: MT611522)。                                                   |
| Intervening sequence                | 5,292-5,312 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                          |
| E- <i>DaMV-1</i>                    | 5,313-5,634 | ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。                                                                       |
| Intervening sequence                | 5,635-5,647 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                          |
| P- <i>RCc3-Td1</i>                  | 5,648-6,478 | ガマガラス ( <i>Tripsacum dactyloides</i> ) 由来の <i>RCc3</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611509)。植物細胞内での転写を誘導する。 |
| I- <i>14-3-3c-Si1</i>               | 6,479-6,583 | アワ ( <i>Setaria italica</i> ) の <i>14-3-3c</i> 遺伝子のイントロン配列であり (GenBank accession: MT611514)、遺伝子発現の制御に関わる (Rose, 2008)。                                     |
| Intervening sequence                | 6,584-6,604 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                          |
| CS <sup>7</sup> - <i>mpp75Aa1.1</i> | 6,605-7,492 | <i>Brevibacillus laterosporus</i> 由来の <i>Mpp75Aa1.1</i> 蛋白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Bowen et al., 2021)。                                            |
| Intervening sequence                | 7,493-7,509 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                          |
| T- <i>HSP-Cl1</i>                   | 7,510-8,070 | ハトムギ ( <i>Coix lacryma-jobi</i> ) の熱ショック蛋白質をコードする <i>Hsp</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611516)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。      |

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 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     | 由来及び機能                                                                                                                                        |
|----------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Intervening sequence | 8,071-8,096   | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| T-SAM1-Sil           | 8,097-8,531   | アワ ( <i>S. italica</i> ) の S-アデノシルメチオニン合成酵素 1 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611517)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。        |
| Intervening sequence | 8,532-8,538   | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| CS-vpb4Da2           | 8,539-11,352  | <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の Vpb4Da2 蛋白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Yin et al., 2020)。                                               |
| Intervening sequence | 11,353-11,378 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| I-Act-Sil            | 11,379-12,743 | アワ ( <i>S. italica</i> ) のアクチン遺伝子のイントロン配列 (Rose, 2008) (GenBank accession: MT611515)。遺伝子発現の制御に関わる。                                            |
| Intervening sequence | 12,744-12,751 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| P-Ltp-Zml            | 12,752-14,045 | トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) の脂質輸送蛋白質遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611508)。植物細胞における転写を誘導する。        |
| E-DaMV-2             | 14,046-14,541 | ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。                                                          |
| Intervening sequence | 14,542-14,685 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| loxP                 | 14,686-14,719 | バクテリオファージ P1 由来の loxP 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。                                                                 |
| Intervening sequence | 14,720-14,725 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                             |
| P-TubA               | 14,726-16,906 | イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) の $\alpha$ チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター、5'末端非翻訳リーダー及びイントロンの配列 (Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。 |

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 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<br>中の位置 | 由来及び機能                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Intervening sequence       | 16,907-16,910 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |
| TS <sup>8</sup> -CTP2      | 16,911-17,138 | シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |
| CS- <i>cp4 epsps</i>       | 17,139-18,506 | <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 (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       | 18,507-18,513 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |
| T- <i>TubA</i>             | 18,514-19,095 | イネ ( <i>O. sativa</i> ) の $\alpha$ チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Jeon et al., 2000)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。                                              |
| Intervening sequence       | 19,096-19,101 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |
| <i>loxP</i>                | 19,102-19,135 | バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。                                                                                           |
| Intervening sequence       | 19,136-19,170 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |
| B-Left Border Region       | 19,171-19,612 | <i>R. radiobacter (A. tumefaciens)</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。                                                                          |
| 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       | 19,613-19,698 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |
| OR <sup>9</sup> -ori V     | 19,699-20,095 | 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       | 20,096-20,717 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                                                              |

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 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<br>中の位置 | 由来及び機能                                                                                                                                          |
|----------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| OR-ori-pBR322        | 20,718-21,306 | pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>Escherichia coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。                                                               |
| Intervening sequence | 21,307-21,840 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                               |
| <i>aadA</i>          | 21,841-22,729 | トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。 |
| Intervening sequence | 22,730-22,873 | DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。                                                                                                               |

<sup>1</sup> B-Border (境界配列)

5 <sup>2</sup> T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

<sup>3</sup> I-Intron (イントロン)

<sup>4</sup> P-Promoter (プロモーター)

<sup>5</sup> E-Enhancer (エンハンサー)

<sup>6</sup> S-Spacer (スペーサー)

10 <sup>7</sup> CS-Coding Sequence (コード配列)

<sup>8</sup> TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

<sup>9</sup> OR-Origin of Replication (複製開始領域)

<sup>P</sup> Partial sequence (部分配列)

15 \* T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット領域 (P-*TubA*、TS-*CTP2*、CS-*cp4 epsps*、T-*TubA* 及び *loxP* 配列の 1 つ) は、本組換えトウモロコシには存在しない。なお、本組換えトウモロコシに存在する構成要素のみを、別添資料 9 の Appendix Table 2 (p44~46) に示している。

- 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 【Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質】

Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質はいずれも細菌由来の殺虫性蛋白質である。当該蛋白質の分類、作用機序、殺虫スペクトラム及び既知のアレルゲンとの類似性の有無について以下に述べる。

### 1) 分類

これまでに多種の殺虫性蛋白質が *B. thuringiensis* から同定されており、1998 年以降、体系的な分類により、Cry、Cyt、Vip 等へのグループ化がなされてきた (Crickmore et al., 1998; Crickmore, 2021)。しかし、近年は *B. thuringiensis* 以外の細菌からも殺虫性蛋白質が同定されていることから、これらの多様な殺虫性蛋白質も網羅しつつ、それぞれの蛋白質の構造上の特徴を反映した新たな命名法の確立が望まれていた。このような背景のもと、殺虫性蛋白質の構造上の分類を反映した新たな命名法が、従来の命名法の関係性を保ちつつ、2020 年 7 月に考案された (BPPRC, 2021; Crickmore et al., 2021)。

殺虫性蛋白質の旧命名法では、*B. thuringiensis* から単離され、かつ孢子形成過程において結晶化する蛋白質の一群を、Cry 蛋白質のグループとして分類していた (Crickmore et al., 1998)。この Cry 蛋白質のグループに属する蛋白質の多くは感受性昆虫の中腸上皮細胞膜上に  $\alpha$  ヘリックスの膜貫通小孔を形成することにより殺虫活性を示す  $\alpha$ -膜孔形成蛋白質 ( $\alpha$ -Pore Forming Protein:  $\alpha$ -PFP) である。 $\alpha$ -PFP の代表例としては、遺伝子組換え作物への導入によりチョウ目害虫への抵抗性を付与する Cry1 蛋白質及び Cry2 蛋白質や、コウチュウ目害虫への抵抗性を付与する Cry3 蛋白質が挙げられる (Adang et al., 2014)。殺虫性蛋白質の新命名法においては、これら  $\alpha$ -PFP に属する殺虫性蛋白質は、その共通する構造上の特徴により、単離された細菌の種類を問わず「Cry」と呼称されるクラスに分類されている。

また、殺虫性蛋白質の旧命名法において Cry 蛋白質のグループに分類されていた蛋白質には、 $\beta$  バレルの膜貫通小孔を形成することにより殺虫活性を示す  $\beta$ -膜孔形成蛋白質 ( $\beta$ -Pore Forming Protein:  $\beta$ -PFP) も存在する。これまでに、 $\beta$ -PFP に属する Cry35Ab1 蛋白質を導入することでコウチュウ目害虫抵抗性を付与した遺伝子組換えトウモロコシ (4114 系統、承認日: 2015 年 2 月 19

日) や、 $\beta$ -PFP に属する改変 Cry51Aa2 蛋白質を導入することでカメムシ目害虫、アザミウマ目害虫及びコウチュウ目害虫抵抗性を付与した遺伝子組換えワタ (MON88702 系統、承認日: 2019 年 2 月 20 日) が開発されている。殺虫性蛋白質の新命名法においては、 $\beta$ -PFP の殺虫性蛋白質はその  $\beta$ -PFP に共通した構造上の特徴に加え、さらに細かな構造上の違いも考慮し、新たに設置されたクラスに再分類されている (Crickmore et al. (2021) の Table 1)。例えば、旧命名法における Cry35Ab1 蛋白質は、新命名法において「Tpp」と呼称されるクラスに分類され、Tpp35Ab1 に改名された。また、旧命名法における改変 Cry51Aa2 蛋白質は、新命名法において「Mpp」と呼称されるクラスに分類され、Mpp51Aa2 に改名された。

本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質は、旧命名法では Cry75Aa1 蛋白質と呼称されていたが、新命名法では、上述した Mpp51Aa2 と同じ「Mpp」に分類される蛋白質として、「Mpp75Aa1.1」に改名された。

さらに、殺虫性蛋白質の旧命名法では、*B. thuringiensis* が栄養成長期に産生する殺虫性の膜孔形成蛋白質を、Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) のグループに分類していた。このうち Vip3 のファミリーに属する Vip3A 蛋白質は、遺伝子組換えトウモロコシ (MIR162 系統、承認日: 2010 年 6 月 11 日) 及びワタ (COT102 系統、承認日: 2012 年 9 月 4 日) に導入されており、チョウ目害虫抵抗性をもつ遺伝子組換え作物として商品化されている。旧命名法において Vip のグループに分類されていた蛋白質のうち、Vip3 ファミリーに属する蛋白質は新命名法においても「Vip」と呼称されるクラスに分類された一方で、特徴的な構造をもつその他の蛋白質は新たに設置された「Vpa」又は「Vpb」と呼称されるクラスに再分類されている (Crickmore et al. (2021) の Table 1)。本組換えトウモロコシに導入された Vpb4Da2 蛋白質は、旧命名法において Vip4Da2 (又は Vip4Ba1 蛋白質) と呼称されており、新命名法においては「Vpb」のクラスのうち  $\beta$ -PFP である Vpb4 のファミリーとして、「Vpb4Da2 蛋白質」に改名された。

表 2 Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の新旧名称\*

| 旧命名法                            | 新命名法         | 蛋白質の由来及び生化学的特徴                                       |
|---------------------------------|--------------|------------------------------------------------------|
| Cry75Aa1 蛋白質                    | Mpp75Aa1 蛋白質 | <i>B. laterosporus</i> に由来<br>生化学的な特徴: $\beta$ -PFP  |
| Vip4Da2 蛋白質<br>(又は Vip4Ba1 蛋白質) | Vpb4Da2 蛋白質  | <i>B. thuringiensis</i> に由来<br>生化学的な特徴: $\beta$ -PFP |



## 2) 作用機序

前述のとおり、殺虫活性をもつ膜孔形成蛋白質には Cry 蛋白質や Vip 蛋白質等の構造上の違いをもつグループが存在するが、これらを含めた殺虫活性をもつ膜孔形成蛋白質の作用機序は広範囲に研究されており、多くの文献により報告されている (Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; OECD, 2007; Vachon et al., 2012; Chakroun et al., 2016)。感受性昆虫の体内に取り込まれた当該蛋白質は、昆虫消化管内の生理条件下において、特異的な蛋白質分解酵素により部分的に分解され、殺虫活性をもつ蛋白質分解酵素耐性のコア蛋白質へと変換される。その後、コア蛋白質は昆虫の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体へ結合し、細胞膜に小孔を形成することで細胞溶解を引き起こし、その結果として中腸組織に損傷を与え、感受性昆虫に対して殺虫活性を示す (Bravo et al., 2013; Deist et al., 2014)。なお、これまでに Cry 蛋白質や Vip 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物の摂取が、哺乳類や鳥類、両生類、爬虫類に対して悪影響を及ぼしたことはない (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

本組換えトウモロコシにおいて発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、他の殺虫活性をもつ膜孔形成蛋白質と同様の作用機序をもつ。すなわち、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、WCRW の消化管内の特異的な蛋白質分解酵素により部分的に分解してコア蛋白質に変換され、WCRW の中腸上皮細胞膜上で発現する受容体への結合を介し殺虫活性を発揮することが示されている (Kouadio et al., 2021a; Kouadio et al., 2021b)。

## 3) 殺虫スペクトラム

Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の殺虫スペクトラムを調べるため、*E. coli* で発現させた当該蛋白質を混餌投与し、生物検定を行った (別添資料 2 及び別添資料 3)。この生物検定では、本組換えトウモロコシを含む栽培作物を直接的又は間接的に摂食する可能性のある非標的生物種を、栽培作物周辺に生息する生物の機能群<sup>3</sup> (植食者、天敵 (捕食者、寄生者)、花粉媒介者、分解者; 図 3, p25) に基づいて選定し、8 つの目 (コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目及びナガミミズ目) に分類される計 20 種の指標生物を供試した。

このように栽培作物周辺に生息する生物の機能群から指標生物を選定して、

<sup>3</sup> 栽培作物周辺の生態系において、非標的生物種、特に非標的節足動物は、植食者、天敵、花粉媒介者、分解者等の機能を有するため、害虫抵抗性作物の環境影響評価を行う際にこれらの非標的生物種が影響を受けるか調査される (Romeis et al., 2013)。

それらの指標生物への活性から非標的生物への影響を調査する手法は、殺虫剤を散布した際の環境影響評価にも用いられている (EPA, 1998; Romeis et al., 2013; Wach et al., 2016)。また、既に第一種使用規程の承認を受けているチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (承認日: 2016 年 11 月 25 日) やカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 系統等の害虫抵抗性が付与された遺伝子組換え作物の非標的生物に対する活性も、本手法を用いて調査されている。なお、現存する昆虫種の約 9 割が、今回の蛋白質の生物検定に供試した昆虫目のうち 5 つの昆虫目 (コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目) に属すると報告されている (Stork, 2018)。

上述のとおり選定した計 20 種の生物種を供試した生物検定の結果を、機能群ごとに以下に記載する。生物検定の結果 (表 3, p26 及び表 4, p27)、EC<sub>50</sub> (半数影響濃度) 又は LC<sub>50</sub> (半数致死濃度) が推定された場合には、感受性を有する生物種であると判定した。なお、Mpp75Aa1.1 蛋白質の生物検定に供試したグラウンドビートル (*Poecilus cupreus*)、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 及びクサカゲロウ (*Chrysoperla rufilabris*) 並びに Vpb4Da2 蛋白質の生物検定に供試したサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) では死亡又は成長阻害が観察されたものの、供試濃度の範囲内に EC<sub>50</sub> 又は LC<sub>50</sub> が定まらなかったため、感受性を有すると判定するとともに、EC<sub>50</sub> 又は LC<sub>50</sub> の数値に不等号記号を付した (表 3, p26 及び表 4, p27)。

#### <植食者>

作物を直接食餌する植食者の指標生物種として、コウチュウ目 4 種、チョウ目 4 種、カメムシ目 2 種及びハエ目 1 種の計 11 種を選定した。このうち、トウモロコシを食害することが知られているのは、コウチュウ目に属する WCRW とチョウ目に属するツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*)、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) 及びヨーロッパアンコーンボーラー (*Ostrinia nubilalis*) である。

Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属する WCRW と、チョウ目に属するツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*)、アメリカタバコガ (*H. zea*)、ソイビーンルーパー (*Chrysodeixis includens*) 及びヨーロッパアンコーンボーラー (*O. nubilalis*) が感受性を示した (表 3, p26)。

また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属する WCRW 及びサザンコーンルートワーム (*D. undecimpunctata howardi*) と、ハエ目に属するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) が感受性を示した (表 4, p27)。

<天敵(捕食者、寄生者)>

植食者を捕食又は植食者に寄生する天敵の指標生物種として、コウチュウ目 2 種、カメムシ目 2 種、ハチ目 1 種及びアミメカゲロウ目 1 種の計 6 種を選定した。

Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属するグラウンドビートル (*P. cupreus*) と、アミメカゲロウ目に属するクサカゲロウ (*C. rufilabris*) が感受性を示した (表 3, p26)。

また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、供試されたいずれの昆虫種も感受性を示さなかった (表 4, p27)。

<花粉媒介者>

作物の花粉を運んで受粉させる花粉媒介者の指標生物種として、ハチ目のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を選定した。

Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、セイヨウミツバチ (*A. mellifera*) の幼虫は感受性を示したが、成虫は感受性を示さなかった (表 3, p26)。

また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、セイヨウミツバチ (*A. mellifera*) の幼虫及び成虫はいずれも感受性を示さなかった (表 4, p27)。

<分解者>

有機物の分解及びそれを補助する分解者の指標生物種として、トビムシ目のオオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) 及びナガミミズ目のアンドレツリミミズ (*Eisenia andrei*) の 2 種を選定した。

摂餌試験による生物検定の結果、オオフォルソムトビムシ (*F. candida*) 及びアンドレツリミミズ (*E. andrei*) はいずれも、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に対して感受性を示さなかった (表 3, p26 及び表 4, p27)。

さらに、Mpp75Aa1.1 蛋白質については、その殺虫スペクトラムの広さに鑑みて、不完全変態昆虫に対する潜在的な殺虫活性を入念に確認するための追加試験として、バッタ目に分類されるカマドコオロギ (*Gryllodes sigillatus*) を供試した生物検定を実施した (別添資料 4)。その結果、カマドコオロギは最大供試濃度である 500 µg/g diet において感受性を示さなかった (表 3, p26)。

以上の生物検定の結果を要約すると、Mpp75Aa1.1 蛋白質に対してはコウチュウ目、チョウ目、ハチ目 (幼虫) 及びアミメカゲロウ目の昆虫において感受性が認められ、Vpb4Da2 蛋白質に対してはコウチュウ目及びハエ目の昆虫において感受性が認められた。

- 5        このように複数の目にまたがって活性を示す殺虫性蛋白質については既に報告がある。例えば、Cry2Aa 蛋白質はチョウ目、ハエ目及びカメムシ目に対して殺虫活性を示し (de Maagd et al., 2001; van Frankenhuyzen, 2009)、Cry3Aa 蛋白質はコウチュウ目、カメムシ目及びハチ目に対して殺虫活性を示すことが知られている (van Frankenhuyzen, 2009)。また、既に第一種使用
- 10        規程の承認を受けている MON88702 系統において発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質は、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に対して殺虫活性を示すことが確認されている。

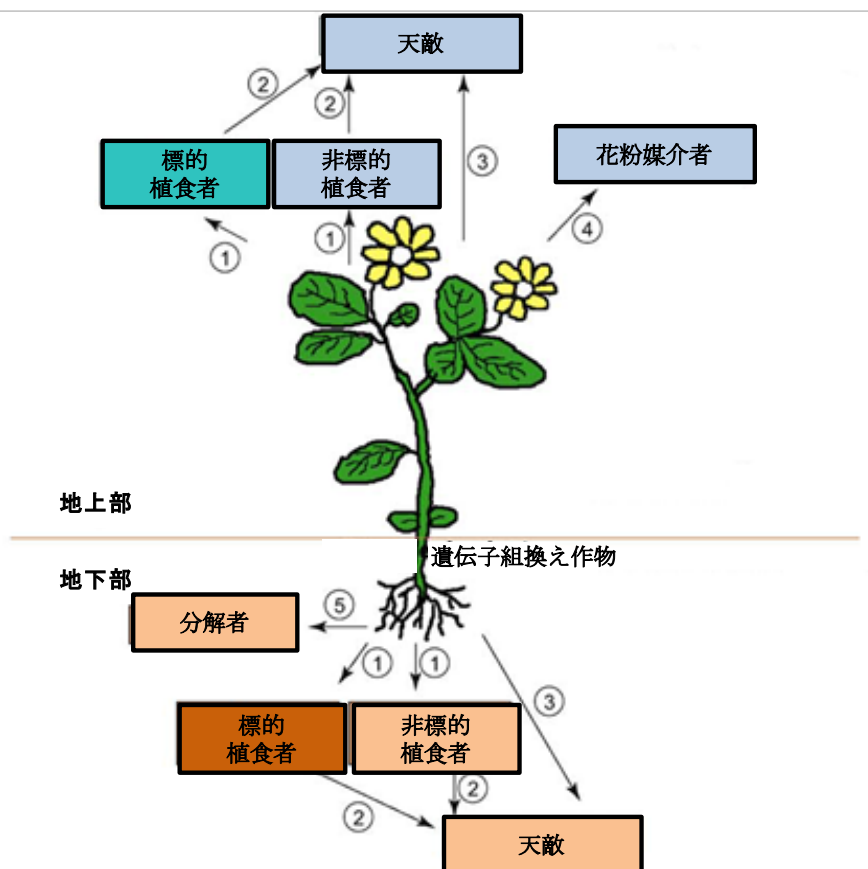


図3 栽培作物周辺に生息する生物の機能群とその曝露経路 (Kos et al. (2009) の Figure 1 を一部改変)\*

今回、生物検定に供試した昆虫種が属する機能群は下記のとおりである。

① 作物を直接食餌する植食者

WCRW (標的昆虫)

サザンコーンルートワーム

コロラドハムシ

ウエスタンターニッシュドプラントバグ

アメリカタバコガ

ネオトロピカルブラウンスティンクバグ

ヨーロピアンコーンボーラー

インゲンテントウ

ソイビーンルーパー

ツマジロクサヨトウ

ネッタイシマカ

② 植食者を捕食又は植食者に寄生する天敵

インシディアスフラワーバグ

ユーロフィドワスプ

ピンクスポットドレディビートル

ビッグアイドバグ

クサカゲロウ

グラウンドビートル

③ 蜜や花粉などの植物組織の摂食を介した影響(地上部)、又は植物体周辺の土壌との接触を介した影響を受ける天敵(地下部)

インシディアスフラワーバグ

ピンクスポットドレディビートル

ビッグアイドバグ

クサカゲロウ

グラウンドビートル

④ 作物の花粉を運んで受粉させる花粉媒介者

セイヨウミツバチ

⑤ 有機物の分解及びそれを補助する分解者

オオフォルソムトビムシ

アンドレツリミミズ

表3 Mpp75Aa1.1 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性\*

| 目                      | 科                        | 種 <sup>1</sup>                                                  | 機能群           | EC <sub>50</sub> 、LC <sub>50</sub> 又は最大供試濃度 (µg/mL diet) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------|
| コウチュウ目<br>Coleoptera   | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | ウエスタンコーンルー トワーム<br>(WCRW) <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> | 植食者<br>(標的昆虫) | 5.4 (EC <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>                     |
|                        | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | サザンコーンルー トワーム<br><i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>      | 植食者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
|                        | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | コロラドハムシ<br><i>Leptinotarsa decemlineata</i>                     | 植食者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
|                        | テントウムシ科<br>Coccinellidae | インゲンテントウ<br><i>Epilachna varivestis</i>                         | 植食者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
|                        | テントウムシ科<br>Coccinellidae | ピンクスポッテッドレディビートル<br><i>Coleomegilla maculata</i>                | 捕食者           | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
|                        | オサムシ科<br>Carabidae       | グラウンドビートル<br><i>Poecilus cupreus</i>                            | 捕食者           | < 250 (LC <sub>50</sub> ) <sup>4,5</sup>                 |
| チョウ目<br>Lepidoptera    | ヤガ科<br>Noctuidae         | ツマジロクサヨトウ<br><i>Spodoptera frugiperda</i>                       | 植食者           | > 500 (EC <sub>50</sub> ) <sup>6</sup>                   |
|                        | ヤガ科<br>Noctuidae         | アメリカタバコガ<br><i>Helicoverpa zea</i>                              | 植食者           | 2.7 (EC <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>                     |
|                        | ヤガ科<br>Noctuidae         | ソイビーンルーパー<br><i>Chrysodeixis includens</i>                      | 植食者           | 59 (EC <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>                      |
|                        | ツトガ科<br>Crambidae        | ヨーロッパコンボウ<br><i>Ostrinia nubilalis</i>                          | 植食者           | 130 (EC <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>                     |
| カメムシ目<br>Hemiptera     | カスミカメムシ科<br>Miridae      | ウエスタンターニッシュドプラント<br>バグ <i>Lygus hesperus</i>                    | 植食者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
|                        | カメムシ科<br>Pentatomide     | ネオトロピカルブラウンスティンク<br>バグ <i>Euschistus heros</i>                  | 植食者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
|                        | ハナカメムシ科<br>Anthracoridae | インシディアスフラワーバグ<br><i>Orius insidiosus</i>                        | 捕食者           | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
|                        | オオメナガカメムシ科<br>Geocoridae | ビッグアイドバグ<br><i>Geocoris punctipes</i>                           | 捕食者           | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
| ハエ目<br>Diptera         | カ科<br>Culicidae          | ネッタイシマカ<br><i>Aedes aegypti</i>                                 | 植食者           | 340 <sup>3</sup>                                         |
| バッタ目<br>Orthoptera     | コオロギ科<br>Gryllidae       | カマドコオロギ<br><i>Gryllodes sigillatus</i>                          | 植食者/<br>捕食者   | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
| ハチ目<br>Hymenoptera     | ミツバチ科<br>Apidae          | セイヨウミツバチ (幼虫)<br><i>Apis mellifera</i> (larva)                  | 花粉媒介者         | 50.7 (LC <sub>50</sub> ) <sup>4,7</sup>                  |
|                        | ミツバチ科<br>Apidae          | セイヨウミツバチ (成虫)<br><i>Apis mellifera</i> (adults)                 | 花粉媒介者         | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
|                        | ヒメコバチ科<br>Eulophidae     | ユーロフィドワスプ<br><i>Pediobius foveolatus</i>                        | 寄生者           | 500 <sup>3</sup>                                         |
| アミメカゲロウ目<br>Neuroptera | クサカゲロウ科<br>Chrysopidae   | クサカゲロウ<br><i>Chrysoperla rufilabris</i>                         | 捕食者           | > 500 (LC <sub>50</sub> ) <sup>4,8</sup>                 |
| トビムシ目<br>Collembola    | ツチトビムシ科<br>Isotomidae    | オオフォルソムトビムシ<br><i>Folsomia candida</i>                          | 分解者           | 500 <sup>3,4</sup>                                       |
| ナガミミズ目<br>Haplotaxida  | ツリミミズ科<br>Lumbricidae    | アンドレツリミミズ<br><i>Eisenia andrei</i>                              | 分解者           | 500 <sup>3,9</sup>                                       |

1 セイヨウミツバチ (成虫)、ユーロフィドワスプ及びアンドレツリミミズを除く生物種では、幼虫を供試した。

2 6段階の供試濃度で7日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

3 最大供試濃度 (ネッタイシマカは 340 µg/mL diet、それ以外の生物種は 500 µg/mL diet) で感受性が認められなかった。

4 単位は µg/g diet。

5 死亡が確認されており、LC<sub>50</sub> (半数致死濃度) は当該昆虫種に対する最小供試濃度 (250 µg/mL diet) よりも小さい。

6 成長阻害が観測されたが、EC<sub>50</sub> (半数影響濃度) は最大供試濃度よりも大きい。

7 5段階の供試濃度で21日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

8 死亡が確認されたが、LC<sub>50</sub>は最大供試濃度よりも大きい。

9 単位は µg/g soil DW。

表 4 Vpb4Da2 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性\*

| 目                      | 科                        | 種 <sup>1</sup>                                                 | 機能群           | EC <sub>50</sub> 、LC <sub>50</sub> 又は<br>最大供試濃度<br>(µg/mL diet) |
|------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| コウチュウ目<br>Coleoptera   | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | ウエスタンコーンルートワーム<br>(WCRW) <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> | 植食者<br>(標的昆虫) | 4.2 (EC <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>                            |
|                        | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | サザンコーンルートワーム<br><i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>      | 植食者           | > 500 (EC <sub>50</sub> ) <sup>3</sup>                          |
|                        | ハムシ科<br>Chrysomelidae    | コロラドハムシ<br><i>Leptinotarsa decemlineata</i>                    | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | テントウムシ科<br>Coccinellidae | インゲンテントウ<br><i>Epilachna varivestis</i>                        | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | テントウムシ科<br>Coccinellidae | ピンクスポッテッドレディビートル<br><i>Coleomegilla maculata</i>               | 捕食者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
|                        | オサムシ科<br>Carabidae       | グラウンドビートル<br><i>Poecilus cupreus</i>                           | 捕食者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
| チョウ目<br>Lepidoptera    | ヤガ科<br>Noctuidae         | ツマジロクサヨトウ<br><i>Spodoptera frugiperda</i>                      | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | ヤガ科<br>Noctuidae         | アメリカタバコガ<br><i>Helicoverpa zea</i>                             | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | ヤガ科<br>Noctuidae         | ソイバーンルーパー<br><i>Chrysodeixis includens</i>                     | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | ツトガ科<br>Crambidae        | ヨーロッパコーンボラー<br><i>Ostrinia nubilalis</i>                       | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
| カメムシ目<br>Hemiptera     | カスミカメムシ科<br>Miridae      | ウエスタンターニッシュドプラント<br>バグ <i>Lygus hesperus</i>                   | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | カメムシ科<br>Pentatomide     | ネオトロピカルブラウンスティンク<br>バグ <i>Euschistus heros</i>                 | 植食者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
|                        | ハナカメムシ科<br>Anthracoridae | インシディアスフラワーバグ<br><i>Orius insidiosus</i>                       | 捕食者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
|                        | オオメナガカメムシ科<br>Geocoridae | ビッグアイドバグ<br><i>Geocoris punctipes</i>                          | 捕食者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
| ハエ目<br>Diptera         | カ科<br>Culicidae          | ネッタイシマカ<br><i>Aedes aegypti</i>                                | 植食者           | 140 (LC <sub>50</sub> ) <sup>6</sup>                            |
| ハチ目<br>Hymenoptera     | ミツバチ科<br>Apidae          | セイヨウミツバチ (幼虫)<br><i>Apis mellifera</i> (larva)                 | 花粉媒介者         | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
|                        | ミツバチ科<br>Apidae          | セイヨウミツバチ (成虫)<br><i>Apis mellifera</i> (adults)                | 花粉媒介者         | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
|                        | ヒメコバチ科<br>Eulophidae     | ユーロフィドワスプ<br><i>Pediobius foveolatus</i>                       | 寄生者           | 500 <sup>4</sup>                                                |
| アミメカゲロウ目<br>Neuroptera | クサカゲロウ科<br>Chrysopidae   | クサカゲロウ<br><i>Chrysoperla rufilabris</i>                        | 捕食者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
| トビムシ目<br>Collembola    | ツチトビムシ科<br>Isotomidae    | オオフォルソムトビムシ<br><i>Folsomia candida</i>                         | 分解者           | 500 <sup>4,5</sup>                                              |
| ナガミミズ目<br>Haplotaxida  | ツリミミズ科<br>Lumbricidae    | アンドレツリミミズ<br><i>Eisenia andrei</i>                             | 分解者           | 500 <sup>4,7</sup>                                              |

1 セイヨウミツバチ (成虫)、ユーロフィドワスプ及びアンドレツリミミズを除く生物種では、幼虫を供試した。

2 6段階の供試濃度で7日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

3 成長阻害が観測されたが、混餌できる蛋白質の量に限界が生じたため EC<sub>50</sub> を推定できなかった。

4 最大供試濃度 (500 µg/mL diet) で感受性が認められなかった。

5 単位は µg/g diet。

6 8段階の供試濃度で5日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

7 単位は µg/g soil DW。

#### 4) 既知のアレルゲンとの類似性の有無

5 Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質が既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、AD\_2021<sup>4</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。

#### 【DvSnf7 dsRNA】

10

本組換えトウモロコシに導入された *DvSnf7.1* 抑制カセットには、WCRW がもつ *Snf7* 遺伝子のエクソンのうち 240 bp と一致するように設計された逆方向反復配列が存在し、その転写産物として DvSnf7 dsRNA が形成される。この DvSnf7 dsRNA は、本組換えトウモロコシを摂食した WCRW の中腸において RNAi (RNA 干渉) を誘導し、オートファジー<sup>5</sup>経路に関与する *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで細胞の恒常性を妨げることにより、殺虫活性を示す。この点について以下に概説する。

20 前述(第一の 2-(1)-イ, p10~11)のとおり、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットに含まれる *DvSnf7* 遺伝子の部分配列は、その転写産物において 240 bp の dsRNA を形成するものであり、その塩基配列は既に第一種使用規程の承認を受けている MON87411 系統において発現する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と同一である。さらに、本組換えトウモロコシにおいて発現する DvSnf7 dsRNA の塩基配列についても、MON87411 系統において発現する dsRNA の塩基配列と同一である。

25 DvSnf7 dsRNA により生じる RNAi の作用機序は MON87411 系統の評価において既に確認されており、その評価において、*in vitro* で合成した DvSnf7 dsRNA は、WCRW による摂食を通じて WCRW の細胞に取り込まれた後、WCRW の RNAi 機構に認識され、WCRW 内在性 *DvSnf7* 遺伝子から発現する mRNA を分解し、オートファジーに関わる DvSNF7 蛋白質の発現を抑制することを報告し

<sup>4</sup>AD\_2021: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,348件のアミノ酸配列が含まれる (2021年2月1日更新)。

<sup>5</sup>一般的に、真核生物の細胞では不要になった細胞小器官及び蛋白質を分解する自食作用 (オートファジー) が存在しており、細胞恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている (Fader and Colombo, 2009)。*Snf7* 遺伝子がコードする SNF7 蛋白質は、塩基性の N 末端及び酸性の C 末端と共に、 $\alpha$ ヘリックスがコイル状に巻きついているコイルドコイル構造ドメインを有し (Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006)、上記オートファジー経路においてリソソームで分解する膜蛋白質の選別に関与する ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-III 複合体の構成蛋白質である (Teis et al., 2008; Vaccari et al., 2009; Kim et al., 2011)。



ている (日本モンサント株式会社, 2015)。また、*in vitro* で合成した *DvSnf7* dsRNA を混餌投与した生物検定において、供試されたコウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の計 14 種の昆虫のうち、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫のみに活性を示すことを確認しており、  
5 標的害虫である WCRW 及び WCRW の近縁種であるサザンコーンルートワームに対する LC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 4.4ng/ml 及び 1.2ng/ml であると報告している (日本モンサント株式会社, 2015)。さらに、コウチュウ目、チョウ目、ハチ目、ハエ目、カメムシ目、バッタ目及びミジンコ目の代表的な節足動物 18 種のゲノムデータベースにおいて、*DvSnf7* 遺伝子のオーソログである配列に対して WCRW  
10 の *DvSnf7* 遺伝子の部分配列との配列相同性を調査した結果、21 塩基長での一致は認められなかったことを報告している (日本モンサント株式会社, 2015)。

以上のことから、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットから発現する *DvSnf7* dsRNA は、WCRW による摂食を通じて細胞に取り込まれた後、WCRW における *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制し、殺虫活性を示す。また、その  
15 殺虫活性は、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫のみに発揮される。

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

#### 20 【Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質】

Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は酵素活性をもたないため、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

#### 【*DvSnf7* dsRNA】

25 *DvSnf7* 遺伝子の部分配列はトウモロコシの内在性遺伝子に該当するものではなく、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝子配列であるため、*DvSnf7* dsRNA が宿主の遺伝子の発現を抑制することはないと考えられる。

実際にトウモロコシの転写産物データベースを用いて、トウモロコシの転写産物の塩基配列と *DvSnf7* dsRNA の塩基配列との間で 21 塩基長の一致が存在するか相同性検索を行なった結果、トウモロコシ由来の転写産物と *DvSnf7* dsRNA との間に該当する配列の一致は存在しないことが確認された (別添資料  
30 5)。

また、dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため (Kozak,  
35 1989)、*DvSnf7* dsRNA から新たな蛋白質が発現する可能性は極めて低い。

これらのことから、*DvSnf7* dsRNA が宿主の代謝系を変化させることはない

と考えられる。

【Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA 間の相互作用の可能性】

- 5 先述のとおり、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、他の殺虫活性をもつ膜孔形成蛋白質と同様の作用機序を有し、それぞれの標的昆虫に対して特異的に作用し、独立して殺虫効果を示す (第一の 2-(1)-ロ-②, p19~29)。また、DvSnf7 dsRNA は、RNAi 機構を介してコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科昆虫に対する特異的な殺虫効果を発揮する (第一の 2-(1)-ロ-②, p19~29) ことから、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の作用機序と DvSnf7 dsRNA の作用機序は全く異なっており、Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA は、それぞれ独立した作用機序により殺虫効果を示していると考えられる。

- 10 これらのことから、本組換えトウモロコシにおいて Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA が相互作用することは考え難く、相互作用によって宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

## (2) ベクターに関する情報

### 20 イ 名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築した。詳細を表 1 (p14~18) に記載した。

25

### ロ 特性

#### 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た PV-ZMIR525664 の全塩基数は 22,873 bp である。なお、PV-ZMIR525664 の塩基配列を別添資料 6 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-ZMIR525664 の構成要素を表 1 (p14~18) 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を図 2 (p13) に示した。

#### 15 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMIR525664 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非遺伝子組換えトウモロコシ(以下「非組換えトウモロコシ」とする。)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-ZMIR525664 を含む *Rhizobium radiobacter* (*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 F<sub>4</sub> 世代の種子<sup>6</sup>において、形質転換に用いた PV-ZMIR525664 の外側骨格領域を標的とし

35

---

<sup>6</sup>バルクにした収穫種子の中からランダムに約50粒取り、DNAを抽出しPCR分析に用いた。

た PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMIR525664 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 7 の Table 1, p12)。このことから、本組換えトウモロコシには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

5

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

10 形質転換された再分化個体 ( $R_0$ ) 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 領域をホモで有し、外側骨格領域をもたない個体を PCR により選抜した。選抜された  $R_2$  世代の個体を、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配し、Cre/lox 法<sup>7</sup>により、T-DNA 領域から選抜マーカーカセット (P-*TubA*、TS-*CTP2*、CS-*cp4 epsps* 及び T-*TubA*) 配列及び片方の loxP 配列が除去された領域 (以下「導入遺伝子」とする。)のみを有する  $F_1$  世代を作出した。その後、 $F_1$  個体を自殖して得られた  $F_2$  世代において、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない 1 個体を選抜した。したがって、本組換えトウモロコシの  $F_3$  世代以降には、Cre リコンビナーゼ発現カセットは存在しない (第一の 2-(4)-②, p36~38)。  $F_2$  世代の選抜個体を自殖して得られた  $F_3$  世代において、導入遺伝子をホモで有する 1 個体を選抜した後、当該選抜個体を自殖し、 $F_4$  世代を得た。

20

本組換えトウモロコシの育成図を図 4 (p33) に示した。なお、本申請の対象は、 $F_4$  世代及び  $F_4$  世代から派生する全ての交雑後代系統である。

25

---

<sup>7</sup> Cre/lox法では、2つのloxと呼ばれる標的配列の間に位置するDNA配列及び片方のlox配列が、Creリコンビナーゼによってゲノムから切り出される (Hare and Chua, 2002; Zhang et al., 2003)。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

図 4 本組換えトウモロコシの育成図

20

【社外秘につき非開示】

#### (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導入遺伝子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  $F_4F_2$ 、 $F_4F_3$  及び  $F_4F_4$  世代 (図 4, p33) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 8)。

10       分離比検定に供試する世代を作出するために、導入遺伝子をホモで有する  $F_4$  世代を、導入遺伝子をもたないトウモロコシ系統 HCL617 と従来育種法を用いて交配し、導入遺伝子をヘミで有する  $F_4F_1$  世代を得た。その後、 $F_4F_1$  世代を自殖し、得られた  $F_4F_2$  世代のうち導入遺伝子をヘミで有する個体を自殖し  $F_4F_3$  世代を、さらに、 $F_4F_3$  世代のうち導入遺伝子をヘミで有する個体を自殖し  $F_4F_4$  世代を得た。 $F_4F_2$ 、 $F_4F_3$  及び  $F_4F_4$  世代において、Real-Time TaqMan PCR により導入遺伝子の分離比を確認した。

15       その結果、実測値とメンデルの分離法則に基づく期待値の間に統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子は同法則に矛盾せずに遺伝していることが確認された (表 5, p35)。したがって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

表 5 本組換えトウモロコシの育成過程における導入遺伝子の分離様式\*

| 世代 <sup>1</sup>               | 供試個体数 | 実測値<br>ホモ陽性<br>個体数 | 実測値<br>ヘミ陽性<br>個体数 | 実測値<br>陰性<br>個体数 | メンデルの分離法則に基づく分離比の期待値：1:2:1 |                    |                  |          |                  |
|-------------------------------|-------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------------|--------------------|------------------|----------|------------------|
|                               |       |                    |                    |                  | 期待値<br>ホモ陽性<br>個体数         | 期待値<br>ヘミ陽性<br>個体数 | 期待値<br>陰性<br>個体数 | $\chi^2$ | p 値 <sup>2</sup> |
| F <sub>4</sub> F <sub>2</sub> | 350   | 87                 | 169                | 94               | 87.50                      | 175                | 87.50            | 0.69     | 0.708            |
| F <sub>4</sub> F <sub>3</sub> | 293   | 63                 | 152                | 78               | 73.25                      | 146.50             | 73.25            | 1.95     | 0.377            |
| F <sub>4</sub> F <sub>4</sub> | 302   | 75                 | 147                | 80               | 75.50                      | 151                | 75.50            | 0.38     | 0.828            |

<sup>1</sup> 実測値は、Real-Time TaqMan PCR により、導入遺伝子の有無を確認した。

5 <sup>2</sup> 各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  $\alpha = 0.05$ )。

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挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子の塩基配列並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケンス (NGS, Next Generation Sequencing) 解析<sup>8</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 9)。

10

NGS 解析では、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から抽出したゲノムをランダムに断片化し、断片の両端から約 150 bp ずつの塩基配列 (リード) をシーケンスするペアエンド法により、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度<sup>9</sup>75 以上) で解析した。その結果、本組換えトウモロコシ (F<sub>4</sub> 世代) では 251.9 Gb (冗長度平均値 253)、対照の非組換えトウモロコシでは 560.3 Gb (冗長度平均値 235) の塩基配列がそれぞれ解析された (別添資料 9 の Appendix Table 3, p47)。

15

解析した本組換えトウモロコシ (F<sub>4</sub> 世代) の塩基配列を PV-ZMIR525664 の塩基配列とアライメント<sup>10</sup>した結果、導入遺伝子の全ての配列が検出されていることを確認した。さらに、T-DNA 領域のうち導入遺伝子領域に大量のリードがマッピングされた一方で、外側骨格領域や選抜マーカークセット領域には、ごく少数のリードのみがマッピングされた (別添資料 9 の Appendix Figure 5, p53)。これらごく少数のリードは、ゲノム DNA の調製中に混入した環境に遍在する細菌に由来すると考えられ、このような散発的かつ少数のリードの検出は過去にも報告されている (Zastrow-Hayes et al., 2015)。これらのことから、本組換えトウモロコシに意図した導入遺伝子が挿入されていること及び PV-ZMIR525664 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。

20

25

<sup>8</sup>NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクス解析により、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>9</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>10</sup>Bowtie 2 v2.3.5.1 (Langmead and Salzberg, 2012) により、30 bp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。



本組換えトウモロコシ (F<sub>4</sub> 世代) における導入遺伝子の挿入箇所数を決定するため接合領域の解析を行った結果、本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定された (別添資料 9 の p29)。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 9 の Appendix Figure 32, p120~122, 末尾の confidential attachment に収録)。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 9 の p 29)。

さらに、解析した本組換えトウモロコシ (F<sub>4</sub> 世代) の全塩基配列を Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統の形質転換に用いたベクター PV-ZMOO513642 (別添資料 9 の Appendix Figure 2, p50) の塩基配列と照合した。その結果、本組換えトウモロコシには PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないことを確認した (別添資料 9 の Appendix Figure 6, p54)。

以上の解析から、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 か所に 1 コピーの導入遺伝子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を確認した。

また、本組換えトウモロコシ (F<sub>4</sub> 世代) 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、目的の遺伝子が導入されていることを確認した (別添資料 9 の Appendix Figure 8, p56~61 及び Appendix Figure 9, p62~94, いずれも末尾の confidential attachment に収録)。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 5 (p38) に示した。

さらに複数世代 (F<sub>4</sub>、F<sub>4</sub>F<sub>1</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>5</sub>F<sub>1</sub> 及び F<sub>6</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、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることを確認した (別添資料 9 の p34)。

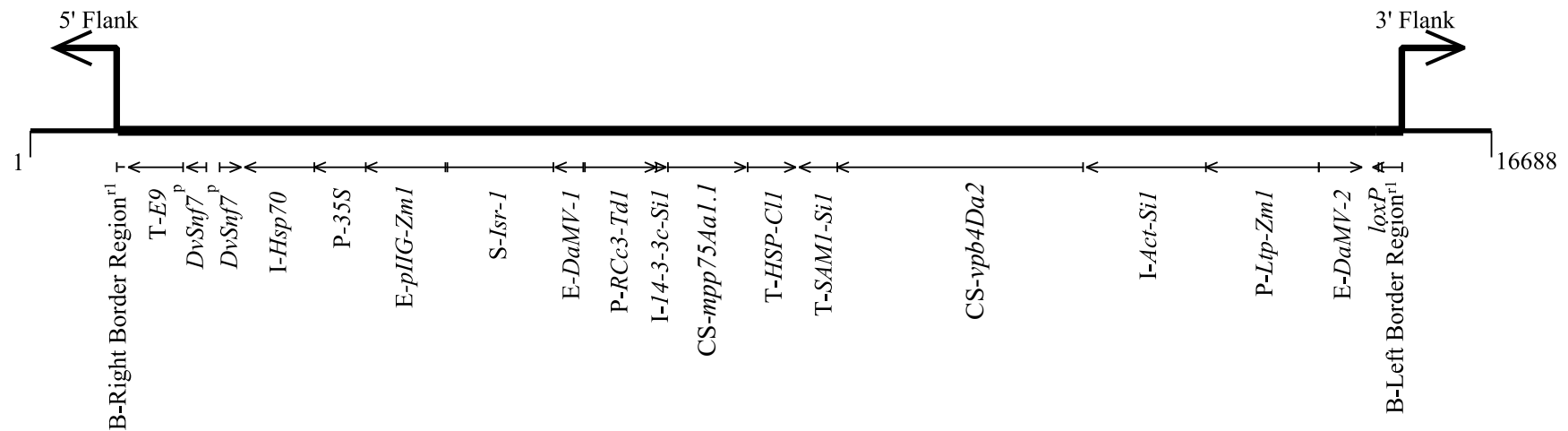


図5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図\*

- 5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示す。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す。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の導入遺伝子が PV-ZMIR525664 と一致した配列で導入されている。図中の「rl」の表記は、本組換えトウモロコシに導入された B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が PV-ZMIR525664 と比較して短くなっていることを意味する。また、図中の *DvSnf7* に付された「p」の表記は遺伝子の部分配列であることを示す。

- ③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

1 コピーのため該当しない (別添資料 9 の p29)。

5

- ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

10 本組換えトウモロコシの複数世代 (F<sub>4</sub>、F<sub>4</sub>F<sub>1</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>5</sub>F<sub>1</sub> 及び F<sub>6</sub> 世代) の種子において、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質が安定して発現していることを、ウェスタンブロット分析により確認した (別添資料 10 の Figure 2 及び Figure 3, p15 及び p16)。

15 本組換えトウモロコシにおいて、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物は、完全長若しくは部分的に切断された RNA、又はさらに短く切断され形成された低分子干渉 RNA (siRNA) の形態で存在している。そこで、本組換えトウモロコシの複数世代 (F<sub>4</sub>、F<sub>4</sub>F<sub>1</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>5</sub>F<sub>1</sub> 及び F<sub>6</sub> 世代) の葉において、完全長又は部分的に切断された RNA の存在を、高分子量 RNA を検出するためのノーザンブロット分析により、また、siRNA の存在を、低分子量 RNA を検出するためのノーザンブロット分析により確認し、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物が安定して発現していることを確認した (別添資料 11 の Figure 3 及び Figure 4, p17 及び p18)。

25 また、2019 年に米国の 5 か所 (アイオワ州、イリノイ州 2 か所、インディアナ州及びミズーリ州) で行ったほ場試験において本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、種子及び花粉のサンプルを採取し、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の発現量を ELISA 法、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現量を QuantiGene アッセイによりそれぞれ分析した (別添資料 12; 別添資料 13)。その結果、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質については花粉以外の組織での発現を確認し、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物については全ての組織での発現を確認した (表 6~表 8, p41~42)。

35 なお、上述した高分子量の RNA を検出するためのノーザンブロットの結果では、予想された完全長の転写産物 (~1.4 kb) に加えて、6 kb を超えるサイズの転写産物が全ての供試世代で検出されている (別添資料 11 の Figure 3, p17)。これらの本組換えトウモロコシの転写産物 (RNA) を詳細に確認するため、一本鎖特異的 RNA 分解酵素により処理した場合、予想どおり 240 bp の *DvSnf7*

dsRNA のみが検出されている (別添資料 14 の Figure 2, p16)。このことは、*DvSnf7.1* 抑制カセットの RNA の発現を確認したノーザンブロット分析において検出された完全長の転写産物及び 6 kb を超えるサイズの転写産物のうち、RNAi の作用機序をもたらす dsRNA として存在するものは予想された 240 bp の dsRNA のみであり、他の dsRNA が存在しないことを示している。また、6 kb を超えるサイズの転写産物の塩基配列を解析した結果、3 種類の転写産物の存在が確認され、それらはいずれも *DvSnf7.1* 抑制カセットのリーダー配列、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列 (逆方向反復配列)、ターミネーター及び導入遺伝子近傍のトウモロコシゲノム配列を含むものであった (別添資料 15 の Figure 2, p26)。このことから、6 kb を超えるサイズの転写産物は、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写におけるリードスルーに起因して生じたものであると考えられる。リードスルーによって生じる転写産物は植物の内在性遺伝子においても検出されており、これが通常の遺伝子発現において生じうる現象であることが報告されている (Xing et al., 2010)。

また、真核生物では、転写産物の 5'キャップ構造をリボソームが認識することにより翻訳が始まり、その際、リボソームの小サブユニットは mRNA をスキャンし、dsRNA が生じている箇所では二本鎖を解消するが、逆方向反復配列により 20 bp 以上の長さの dsRNA が生じている場合にはスキャンを進めることができず、翻訳が止まることが知られている (Kozak, 1989)。本組換えトウモロコシにおいて検出された 6 kb を超えるサイズの転写産物では、240 bp の *DvSnf7* dsRNA が形成され、この dsRNA の存在が転写産物の翻訳を阻害すると考えられることから、*DvSnf7.1* 抑制カセットの完全長の転写産物と同様に、これら 6 kb を超えるサイズの転写産物がペプチドや蛋白質へ翻訳されることは考え難い。なお、念のため当該転写産物の配列に対して開始コドンの解析を行い、得られた潜在的なペプチドの配列をクエリー配列としてバイオインフォマティクス解析<sup>11</sup>を実施した。その結果、既知のアレルゲンとの相同性をもつ配列は存在しなかった (別添資料 15)。

<sup>11</sup> AD\_2021のデータベースを用いてバイオインフォマティクス解析を実施した。AD\_2021はCOMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,348件のアミノ酸配列が含まれる (2021年2月1日更新)。

表 6 本組換えトウモロコシの組織中における Mpp75Aa1.1 蛋白質の発現量 (2019 年、米国)\*

| 組織  | 生育段階 <sup>1</sup> | 平均値 (SE)<br>範囲 (μg/g DW) <sup>2</sup> | LOQ/LOD<br>(μg/g DW) <sup>3</sup> |
|-----|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 葉   | 2～4 葉期            | 100 (7.0)<br>43 – 200                 | 0.125/0.023                       |
| 根   | 2～4 葉期            | 35 (4.3)<br>11 – 84                   | 0.125/0.053                       |
| 地上部 | 黄熟期               | 16 (0.76)<br>12 – 25                  | 0.125/0.039                       |
| 種子  | 成熟期               | 1.3 (0.086)<br>0.67 – 1.9             | 0.125/0.065                       |
| 花粉  | 雄穂抽出期<br>～絹糸抽出期   | <LOQ (NA <sup>4</sup> )<br>NA – NA    | 0.125/0.043                       |

<sup>1</sup> 各組織の採取時における生育段階

<sup>2</sup> 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。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各組織の値を基に計算している (n=20)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD = limit of detection (検出限界)。

<sup>4</sup> NA=該当なし

10 表 7 本組換えトウモロコシの組織中における Vpb4Da2 蛋白質の発現量 (2019 年、米国)\*

| 組織  | 生育段階 <sup>1</sup> | 平均値 (SE)<br>範囲 (μg/g DW) <sup>2</sup> | LOQ/LOD<br>(μg/g DW) <sup>3</sup> |
|-----|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 葉   | 2～4 葉期            | 39 (1.8)<br>19 – 51                   | 0.313/0.110                       |
| 根   | 2～4 葉期            | 14 (1.3)<br>3.4 – 26                  | 0.313/0.128                       |
| 地上部 | 黄熟期               | 3.3 (0.13)<br>2.5 – 4.8               | 0.313/0.124                       |
| 種子  | 成熟期               | 1.2 (0.086)<br>0.42 – 1.9             | 0.157/0.067                       |
| 花粉  | 雄穂抽出期<br>～絹糸抽出期   | <LOQ (NA <sup>4</sup> )<br>NA – NA    | 0.157/0.082                       |

<sup>1</sup> 各組織の採取時における生育段階

<sup>2</sup> 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。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各組織の値を基に計算している (n=20)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

<sup>3</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD = limit of detection (検出限界)。

<sup>4</sup> NA=該当なし

表 8 本組換えトウモロコシの組織中における *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現量 (2019 年、米国)\*

| 組織  | 生育段階 <sup>1</sup> | 平均値 (SE)<br>範囲 (μg/g FW) <sup>2</sup>                                                            | 平均値 (SE)<br>範囲 (μg/g DW) <sup>3</sup>                                                           | LOQ/LOD<br>(μg/g FW) <sup>4</sup>                 |
|-----|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 葉   | 2～4 葉期            | $7.2 \times 10^{-3}$ ( $0.51 \times 10^{-3}$ )<br>$4.3 \times 10^{-3} - 15 \times 10^{-3}$       | $48 \times 10^{-3}$ ( $3.4 \times 10^{-3}$ )<br>$29 \times 10^{-3} - 100 \times 10^{-3}$        | $3.7 \times 10^{-4}$<br>/ $0.85 \times 10^{-4}$   |
| 根   | 2～4 葉期            | $5.1 \times 10^{-3}$ ( $1.0 \times 10^{-3}$ )<br>$0.41 \times 10^{-3} - 18 \times 10^{-3}$       | $46 \times 10^{-3}$ ( $9.4 \times 10^{-3}$ )<br>$3.8 \times 10^{-3} - 166 \times 10^{-3}$       | $1.3 \times 10^{-4}$<br>/ $0.30 \times 10^{-4}$   |
| 地上部 | 黄熟期               | $6.0 \times 10^{-3}$ ( $0.75 \times 10^{-3}$ )<br>$2.1 \times 10^{-3} - 13 \times 10^{-3}$       | $20 \times 10^{-3}$ ( $2.5 \times 10^{-3}$ )<br>$7.1 \times 10^{-3} - 42 \times 10^{-3}$        | $0.81 \times 10^{-4}$<br>/ $0.18 \times 10^{-4}$  |
| 種子  | 成熟期               | $0.24 \times 10^{-3}$ ( $0.019 \times 10^{-3}$ )<br>$0.099 \times 10^{-3} - 0.40 \times 10^{-3}$ | $0.28 \times 10^{-3}$ ( $0.021 \times 10^{-3}$ )<br>$0.11 \times 10^{-3} - 0.46 \times 10^{-3}$ | $0.21 \times 10^{-4}$<br>/ $0.047 \times 10^{-4}$ |
| 花粉  | 雄穂抽出期<br>～絹糸抽出期   | $0.27 \times 10^{-3}$ ( $0.052 \times 10^{-3}$ )<br>$0.055 \times 10^{-3} - 0.85 \times 10^{-3}$ | $0.47 \times 10^{-3}$ ( $0.091 \times 10^{-3}$ )<br>$0.097 \times 10^{-3} - 1.5 \times 10^{-3}$ | $0.26 \times 10^{-4}$<br>/ $0.059 \times 10^{-4}$ |

<sup>1</sup> 各組織の採取時における生育段階

<sup>2</sup> RNA の発現量を、組織の新鮮重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。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各組織の値を基に計算している (n=20。ただし、花粉については LOQ 未満であった 3 サンプルを除く n=17)。SE=標準誤差、FW=新鮮重。

<sup>3</sup> RNA の発現量を、組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。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各組織の値を基に計算している (n=20。ただし、花粉については LOQ 未満であった 3 サンプルを除く n=17)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

<sup>4</sup> LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD = limit of detection (検出限界)。各組織の LOD 及び LOQ は、QuantiGene アッセイのトウモロコシの総 RNA 量における LOD 及び LOQ と、組織ごとの総 RNA 量の平均値及び希釈係数をもとに算出した。

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

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

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に結合可能なプライマーセットを利用して、Real-Time Quantitative TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 16; 別添資料 17)。

本 PCR 法の検出限界は 5 コピーであり、このコピー数は供試 DNA 量を 100 ng とする条件においてゲノム DNA 量比で 0.014%に相当する (別添資料 17, p4, p10~11)。

5 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 17)。

## (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

10 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

15 本組換えトウモロコシへ導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子、*vpb4Da2* 遺伝子及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列は、それぞれ Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び *DvSnf7* dsRNA を発現することにより、いずれもコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

20 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\*

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、*mpp75Aa1.1* 遺伝子、*vpb4Da2* 遺伝子及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列が導入されている。

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

30 2022 年から 2023 年にかけて、バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場 (以下「本隔離ほ場」とする。) 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 F<sub>5</sub>F<sub>1</sub> (LH244 × HCL617) 世代を供試した (図 4, p33)。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」とする。)。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b, p44) は、2023 年にバイエルグループ (米国) 35 の人工気象室において実施した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、8項目(雄穂抽出期(月日)、絹糸抽出期(月日)、稈長(cm)、着雌穂高(cm)、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。稈長(cm)、着雌穂高(cm)及び収穫期の地上部重(g)については統計解析を行い、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。

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、いずれにおいても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料18の表3, p10)。また、統計解析を行わなかった5項目(雄穂抽出期(月日)、絹糸抽出期(月日)、成熟期(月日)、粒型、粒色)においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に違いは認められなかった(別添資料18の表3, p10)。

b 生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性試験は、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、6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11日目及び20日目に草丈を調査するとともに、低温処理開始後20日目の個体について乾燥重を測定し、草丈及び乾燥重について統計解析を行った。

その結果、草丈及び乾燥重のいずれにおいても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料19のTable 4, p12及びTable 5, p13)。

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。結実後に再成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換えトウモロコシについて、我が国の冬期(2023年1月10日)における生育



状況を観察した結果、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 18 の図 5, p11)。

d 花粉の稔性及びサイズ

5

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酢酸カーミン溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを調査した。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 18 の図 6 及び表 4, p12)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

15 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 (mm)、粒列数、一列粒数、百粒重 (g)) を調査した。

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 18 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、統計解析は行わなかった。

25

脱粒性：

脱粒性については、本組換えトウモロコシ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。

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 18 の図 7, p14)、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 18 の表 5, p14)。

35

休眠性及び発芽率：

休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で栽培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 19 日目の種子をシャーレ上に静置し、25℃ に設定した恒温器内での発芽種子数を計測した。

- 5        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、いずれも 100.0 % であり、分散が 0 であったため、統計解析は行わなかった (別添資料 18 の表 5, p14)。

#### f 交雑率

10

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

15

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。

- 20        その結果、後作試験におけるハツカダイコンの乾燥重においてのみ、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に統計学的有意差が認められた (別添資料 18 の表 6~8, p16)。ハツカダイコンの乾燥重の平均値は、本組換えトウモロコシ区が 0.9 g、対照の非組換えトウモロコシ区が 0.7 g であり、本組換えトウモロコシ区の方が高かった。

### 25    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

- 30        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

—

35

(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

—

5

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

10

(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

—

15

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの海外における申請状況は表 9 (p47) のとおりである。

20

表 9 本組換えトウモロコシの海外における申請状況\*

2023 年 12 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       | 2023年1月               | —        |
| カナダ食品検査庁 (CFIA)                | 環境・飼料    | 2023年1月               | —        |
| 米国農務省 (USDA)                   | 環境       | 2023年8月 <sup>12</sup> | —        |
| 米国食品医薬品庁 (FDA)                 | 食品・飼料    | 2021年11月              | 2023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       | 2022年11月              | 2023年10月 |

25 なお、本組換えトウモロコシの我が国における申請状況は以下のとおりである (表 10, p48)。

<sup>12</sup> 規制ステータス評価 (Regulatory Status Review) の第一段階 (RSRステップ1) が2023年5月に終了したことを受けて、RSRの第二段階 (RSRステップ2) である植物病害虫リスク評価 (Plant Pest Risk Assessment) の申請を行った。

表 10 本組換えトウモロコシの我が国における申請及び認可状況\*

2023 年 12 月現在

| 機関        | 内容               | 申請時期     | 承認時期    |
|-----------|------------------|----------|---------|
| 厚生労働省     | 食品 <sup>13</sup> | 2023年9月  | —       |
| 農林水産省     | 飼料 <sup>14</sup> | 2023年6月  | —       |
| 農林水産省・環境省 | 環境（第一種使用規程：隔離ほ場） | 2021年9月  | 2022年5月 |
| 農林水産省・環境省 | 環境（第一種使用規程：一般使用） | 2023年11月 | —       |

5

<sup>13</sup> 食品衛生法に基づく。

<sup>14</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。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価\*

### 1 競合における優位性

#### 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、栽培化の過程で雑草性や自生能力、すなわち非農耕地で人間の手助けなく繁殖し、個体群を存続させる能力を失っている (OECD, 2003; Nakai et al., 2015; 後藤ら, 2018)。我が国においても、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。自生能力をもたない栽培作物を宿主とした遺伝子組換え作物が競合における優位性を獲得するには、まず自生能力を獲得することが必要であり、それには自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている (後藤ら, 2018)。

15 本組換えトウモロコシには、Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及びDvSnf7 dsRNA によってコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これは上述した自生能力に必須の特性に関与する形質ではない。このことから、この形質の付与により栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

25 実際に、競合における優位性に関わる諸形質として、本組換えトウモロコシの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我が国の隔離ほ場において (第一の 2-(6)-②-a, c~e, p44~46)、また、生育初期における低温耐性 (第一の 2-(6)-②-b, p44) 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、いずれの項目においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった。

30 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。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

35 —

### (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、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。

10

## 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

15 トウモロコシは我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。

20 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った(第一の 2-(6)-②-g, p46)。その結果、後作試験におけるハツカダイコンの乾燥重においてのみ、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に統計学的有意差が認められたものの、以下の理由から、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ものではないと考えられた。

25 1) ハツカダイコンの乾燥重の平均値において、本組換えトウモロコシ区(0.9 g)は対照の非組換えトウモロコシ区(0.7 g)よりも高かった。

2) ハツカダイコンの乾燥重において、本組換えトウモロコシ区のハツカダイコンの乾燥重の範囲(0.51 g~1.23 g)は、対照の非組換えトウモロコシ区のハツカダイコンの乾燥重の範囲(0.44 g~1.19 g)と部分的に重複していた。

30 3) ハツカダイコンの発芽率においては、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区のいずれも高く、両試験区の間には統計学的有意差は認められなかった。

35 本組換えトウモロコシ中で発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、いずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている(第一の 2-(1)-ロ-②, p28)。加えて Mpp75Aa1.1 蛋白質及び

Vpb4Da2 蛋白質はいずれも酵素活性をもたないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p29~30)。

また、本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝子配列を標的としていること、トウモロコシ由来の転写産物との間で相同性は見出されなかったこと及び dsRNA から新たな蛋白質が発現する可能性は極めて低いことから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p29~30)。さらに、第一の 2-(1)-ロ-③ (p29~30) に記載のとおり、本組換えトウモロコシにおいて Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA が相互作用することは考え難く、相互作用によって宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

そのため、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある野生動植物等について、以下に個別に検討を行った。

本組換えトウモロコシ中で発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質を高濃度で食餌させた生物検定の結果、コウチュウ目 (植食者/天敵)、チョウ目 (植食者)、ハエ目 (植食者)、アミメカゲロウ目 (天敵) 及びハチ目の幼虫 (花粉媒介者) に対する殺虫活性が認められた (第一の 2-(1)-ロ-②, p21~27)。よって、これらの昆虫目に属する昆虫が、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に曝露された場合に影響を受ける可能性が考えられた。そこで、上述した 5 つの昆虫目に対して想定される曝露経路を以下に考察し、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質への曝露が生じ得るかを検討した。

栽培作物周辺に生息する生物が、遺伝子組換えトウモロコシ中で発現する殺虫性蛋白質に曝露される場合、その生物の機能群に応じて、下記 (a) ~ (e) の 5 つの潜在的な曝露経路が考えられる。

潜在的な曝露経路 (曝露対象の生物が属する機能群)

- (a) ほ場内 (地上) で植物体や花粉を食餌 (植食者)
- (b) 植物体や花粉を食餌した昆虫を捕食 (天敵)
- (c) ほ場内 (地下) で植物体を食餌 (植食者及び分解者)
- (d) ほ場外へ飛散した花粉への曝露 (植食者及び天敵)
- (e) ほ場で採集され、ほ場外の巣に持ち帰られた花粉を食餌 (花粉媒介者の

## ハナバチ<sup>15)</sup>

上記に示した曝露経路のうち経路 (a) (b) (c) を通じた非標的昆虫への影響は、ほ場内に限定されるものであり、慣行農業における殺虫剤散布等による防除の影響<sup>16)</sup>を超えるものではないと考えられる。なお、経路 (b) に関しては、ほ場内の植物体や花粉を食餌した非感受性の昆虫がほ場外へ移動し、その昆虫を天敵 (捕食者) が捕食することで、植物体や花粉に由来する殺虫性蛋白質に曝露されることも生じうる。しかしながら、植食者は食料となる栽培作物が豊富に存在するほ場内にとどまることが知られている。また、*B. thuringiensis* に由来する殺虫性蛋白質が遺伝子組換え植物で発現し、これが非感受性の植食者に摂取された場合に、植食者の体内における殺虫性蛋白質の濃度は遺伝子組換え植物における濃度と比べて低いことが報告されている (Eisenring et al., 2017; Kim et al., 2021; Meissle et al., 2021)。さらに、植食者が遺伝子組換え植物の食餌を止めると、植食者の体内における遺伝子組換え作物由来蛋白質の濃度は迅速に低下することが知られている (Meissle et al., 2021)。したがって、ほ場内で本組換えトウモロコシを食餌した非感受性の植食者がほ場外で天敵に捕食される可能性は低く、仮に捕食されたとしても天敵が本組換えトウモロコシ由来の Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の影響を受ける可能性は低いと考えられる。

以上のことから、本組換えトウモロコシについて起こりうる主要な曝露経路が花粉の飛散である<sup>17)</sup>ことを念頭に、上記に示した曝露経路のうちほ場外に飛散した花粉による曝露経路 (d) (e) を通じて、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の曝露が生じ得るかを検討した。本組換えトウモロコシの花粉における Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2

<sup>15)</sup> ミツバチはほ場のトウモロコシから花粉を収集し、これを巣に持ち帰り、幼虫に餌として与えることが知られているが、幼虫の餌に占める花粉の割合は小さい (Babendreier et al., 2004)。他のハナバチの昆虫種が同様の行動をとる可能性があるが、肉食性のハチや寄生バチがこのような行動をとることは考えにくい。

<sup>16)</sup> Mpp75Aa1.1蛋白質及びVpb4Da2蛋白質の両者又はいずれかに対して感受性が認められたコウチュウ目、チョウ目、ハエ目、アミメカゲロウ目及びハチ目に属する昆虫のうち、チョウ目及びハエ目に属する昆虫は、現在我が国においてトウモロコシ (子実、未成熟トウモロコシ、ヤングコーン及び飼料用トウモロコシを含む) を適用作物とする殺虫剤の適用作物として登録されている (日本植物防疫協会, 2022)。これらの殺虫剤のうち、例えば長野県病害虫防除所が提示するトウモロコシの防除基準 (長野県, 2023) に掲載のあるシペルメトリン乳剤 (農林水産省, 2023d) やMEP乳剤 (農林水産省, 2023e) は、トウモロコシでは主にチョウ目害虫の防除に利用されるが、他作物ではコウチュウ目及びハエ目害虫等に適用を有する上、ハエ目、アミメカゲロウ目及びハチ目を含む天敵への影響も報告されており (日本生物防除協議会, 2022)、複数目にまたがる殺虫活性を有している。

<sup>17)</sup> チョウ目害虫抵抗性トウモロコシの安全性評価の事例として、検討すべき主要な曝露経路は花粉の飛散であることが報告されている (Anderson et al., 2021)。



蛋白質の発現量は、定量限界未満であり (表 6 及び表 7, p41)、上述のとおり経路 (d) (e) はどちらも花粉を介した曝露であることから、ほ場周辺の生物種が Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に曝露され悪影響が生じるとは考えにくい。以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質により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 (表 11, p54)。

他方、DvSnf7 dsRNA については、上述した潜在的な曝露経路のうち(a) (b) (c) に関して慣行農業の影響を超えないという点は Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質と同様である<sup>18</sup>が、DvSnf7.1 抑制カセットの転写産物の発現が花粉において確認されていることから、花粉の曝露により影響を受ける可能性のある生物種を、その殺虫スペクトラムをもとに検討した。

DvSnf7 dsRNA は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に活性を示す (第一の 2-(1)-ロ-②, p28~29)。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある野生動植物等として、我が国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた (表 11, p54)。

以上のことから、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性のある昆虫目として、我が国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた (表 11, p54)。

コウチュウ目昆虫のうち、環境省レッドリスト 2020 (環境省, 2020) に掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種について、「わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価」(山本ら, 2003) 及び「第 4 次レッドリストの改訂に伴う評価の確認について」(農林水産省, 2013) を参考にして、種の生息地・生息環境・食餌から、本組換えトウモロコシの花粉を食餌することにより影響を受ける可能性のある昆虫種を検討した。その結果、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として、表 12 (p55) に示した 4 種を特定した。

<sup>18</sup> 経路 (b) に関して、DvSnf7 dsRNA が植物体を摂取した植食者体内において残存し、植物体での発現レベル以上の濃度で蓄積することを示唆する知見は確認されていない (Ivashuta et al., 2015; Bachman et al., 2016)。さらに、昆虫は内在性の dsRNA 増幅機構を有していないことから、植食者の捕食を介した dsRNA への天敵の曝露は限定的である (Bachman et al., 2016)。

表 11 本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質、DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある昆虫目の特定結果\*

|                | ハザードの特定                           | 曝露量の検討                                                |                         | 影響を受ける可能性のある昆虫目の特定                |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|                | 生物検定で当該蛋白質又は dsRNA への感受性を示した昆虫目   | ほ場外においてトウモロコシ組織への曝露が生じ得る昆虫目 <sup>a)</sup>             | 花粉における当該蛋白質又は dsRNA の発現 | ほ場外で当該蛋白質又は dsRNA に曝露される可能性がある昆虫目 |
| Mpp75Aa1.1 蛋白質 | コウチュウ目<br>チョウ目<br>アミメカゲロウ目<br>ハチ目 | コウチュウ目 (花粉)<br>チョウ目 (花粉)<br>アミメカゲロウ目 (花粉)<br>ハチ目 (花粉) | 無 <sup>b)</sup>         | 無                                 |
| Vpb4Da2 蛋白質    | コウチュウ目<br>ハエ目                     | コウチュウ目 (花粉)<br>ハエ目 (花粉)                               | 無 <sup>b)</sup>         | 無                                 |
| DvSnf7 dsRNA   | コウチュウ目                            | コウチュウ目 (花粉)                                           | 有                       | コウチュウ目                            |

<sup>a)</sup> ほ場内の影響は慣行農業による殺虫剤散布等の防除の影響を超えるものではないため、検討の対象から除外した。

5 <sup>b)</sup> 定量限界未満の発現量

表 12 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫

| 和名             | 学名                            | 生息地、生息環境                                                       | 食餌                    |
|----------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 絶滅危惧 IA 類 (CR) |                               |                                                                |                       |
| アオノネクイハムシ      | <i>Donacia frontalis</i>      | 本州 (兵庫県)。発見地の青野ヶ原では絶滅した可能性がある。また、これ以外の産地も記録されていない。生息環境は丘陵地の湿地。 | カヤツリグサ科<br>ハリイ類       |
| 絶滅危惧 II 類 (VU) |                               |                                                                |                       |
| オキナワサビカミキリ     | <i>Diboma costata</i>         | 九州、屋久島、種子島、トカラ列島、奄美諸島、沖縄諸島、先島諸島。                               | イネ科タケ類                |
| 準絶滅危惧 (NT)     |                               |                                                                |                       |
| アカガネネクイハムシ     | <i>Donacia hirtihumeralis</i> | 本州 (青森県、岩手県、栃木県、茨城県)。本州固有種。生息環境はため池。                           | カヤツリグサ科<br>フトイ        |
| キンイロネクイハムシ     | <i>Donacia japana</i>         | 北海道、本州、九州。生息環境はため池、水路。                                         | ミクリ科ミクリ類。成虫はスゲ類に訪花する。 |

本表における昆虫種の生息地、生息環境及び食餌の情報は、大林ら (2007)、野尻湖昆虫グループ (1985)、林 (2005) 及び林 (2012) の知見に基づいて記載した。

5

## (2) 影響の具体的内容の評価

DvSnf7 dsRNA の具体的な影響を以下に述べる。

- 10 *in vitro* で合成した DvSnf7 dsRNA を用いた生物検定において、標的害虫である WCRW 及び WCRW の近縁種であるサザンコーンルートワームに対する LC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 4.4 ng/ml 及び 1.2 ng/ml であると報告されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p28~29)。

## 15 (3) 影響の生じやすさの評価

- 20 第二の 2-(1) (p50~55) で特定されたコウチュウ目昆虫が、本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌することで受ける可能性のある影響の生じやすさについて、トウモロコシほ場周辺に飛散する花粉量に関する国内外の文献報告をもとに評価した。

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*) の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、ほ場の縁から 5 m 離れた場合の最大花粉堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm<sup>2</sup>、イヌホオズキの葉で 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 7.4 粒/cm<sup>2</sup> へと減少していた (Shirai and Takahashi, 2005)。また、北米全 7 か所のトウモロコシほ場周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度を調査した結果、トウモロコシほ場から 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>、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 (Pleasants et al., 2001)。

これらの報告に基づけば、トウモロコシほ場周辺に堆積する花粉量はほ場から離れるほど低下し、10 m 離れると 10 粒/cm<sup>2</sup> 以下になると考えられる。

したがって、特定されたコウチュウ目昆虫種が本組換えトウモロコシの花粉に継続的に曝露される可能性は、トウモロコシほ場の周辺数 m 以内に限定され、10 m を超えると花粉への曝露はほとんど無くなると考えられた。

特定されたコウチュウ目昆虫の生息地及び食餌 (表 12, p55) の点から、これらの昆虫種がトウモロコシほ場周辺に局所的に生息しているとは考え難い。

他方、これらの昆虫種の生息環境に水生生息地が含まれることから、その水生生息地がトウモロコシ畑と隣接した場合、水面に飛散した本組換えトウモロコシの花粉が水系で濃縮し、それらの花粉を食餌することでこれらの昆虫種が影響を受ける可能性が考えられた。しかし、トウモロコシ花粉の細胞壁は薄く、その多くは蒸留水中において数秒で破裂し、細胞質などの細胞内物質は水中へ流出することが報告されている (Human and Nicolson, 2003) ことから、本組換えトウモロコシの花粉についても、着水した花粉は破裂し、水系で濃縮する可能性は低いと考えられる。また、花粉の細胞内物質の流出に伴い DvSnf7 dsRNA が水中に拡散したとしても、水系において DvSnf7 dsRNA は急速に分解するために残存しないことが報告されている (Fischer et al., 2017)。加えて、水系には核酸分解酵素を産生する DNA 及び RNA 加水分解細菌が一般的に存在しており (Tabata et al., 1993)、流出した DvSnf7 dsRNA は速やかに生分解されると考えられる。したがって、特定されたコウチュウ目昆虫が、水生生息域において花粉を食餌することにより影響を受ける可能性は低いと考えられる。以上のことから、特定された 4 種のコウチュウ目昆虫種が、本組換えトウモロコシ由来の DvSnf7 dsRNA に曝露することにより、個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシは、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。

5

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

10

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。我が国では、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。

15

(2) 影響の具体的内容の評価

—

20

(3) 影響の生じやすさの評価

—

25

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシは、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。

30

4 その他の性質

—

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

- 5 トウモロコシは、栽培化の過程で自生能力を失っており、我が国においても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。栽培作物であるトウモロコシが自生能力を獲得するには、自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている。

- 10 本組換えトウモロコシには、Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及びDvSnf7 dsRNAによってコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これは上記特性に関与する形質ではない。このことから、この形質の付与により、栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

- 15 実際に、競合における優位性に関わる諸形質として、本組換えトウモロコシの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、いずれの項目においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった。

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

20

有害物質の産生性：

トウモロコシは我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。

- 25 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、後作試験におけるハツカダイコンの乾燥重においてのみ、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に統計学的有意差が認められた。検討の結果、ハツカダイコンの乾燥重の平均値は対照の非組換えトウモロコシ区よりも本組換えトウモロコシ区で高く、本組換えトウモロコシ区のハツカダイコンの乾燥重の範囲は対照の非組換えトウモロコシ区のハツカダイコンの乾燥重の範囲と部分的に重複していた。また、ハツカダイコンの発芽率は本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区のいずれにおいても高く、両試験区の上に統計学的有意差は認められなかったことから、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ものではないと考えられた。

35

本組換えトウモロコシ中で発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質

はいずれも酵素活性をもたないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる。また、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質はいずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている。本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA は、コウチュウ目

5 ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝子配列を標的としていること、トウモロコシ由来の転写産物との間で相同性は見出されなかったこと及び dsRNA から新たな蛋白質が発現する可能性は極めて低いことから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる。

- 10 さらに、本組換えトウモロコシにおいて Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA が相互作用することは考え難く、相互作用によって宿主の代謝系を変化させ有害物質を産生することはないと考えられる。

- Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質を食餌させた生物検定の結果、コウチュウ目 (植食者/天敵)、チョウ目 (植食者)、ハエ目 (植食者)、アミメカゲロウ目 (天敵) 及びハチ目の幼虫 (花粉媒介者) に対する殺虫活性が認められた。これら 5 つの昆虫目に対して想定される曝露経路を検討した結果、「(a) ほ場内 (地上) で植物体や花粉を食餌 (植食者)」 「(b) 植物体や花粉を食餌した昆虫を捕食 (天敵)」 「(c) ほ場内 (地下) で植物体を食餌 (植食者及び分解者)」 の曝露経路を通じた非標的昆虫への影響は、慣行農業における殺虫剤散布等による防除の影響を超えるものではないと考えられた。一方で、「(d) ほ場外へ飛散した花粉への曝露 (植食者及び天敵)」 「(e) ほ場で採集され、ほ場外の巣に持ち帰られた花粉を食餌 (花粉媒介者のハナバチ)」 の曝露経路に関しては、本組換えトウモロコシの花
- 15 粉における Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の発現量が定量限界未満であることから、これらの曝露経路において悪影響が生じるとは考えにくい。以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質により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
- 25

- 他方、DvSnf7 dsRNA については、上述した潜在的な曝露経路のうち(a)(b)(c) に関して慣行農業の影響を超えないという点は Mpp75Aa1.1 蛋白質及び
- 30 Vpb4Da2 蛋白質と同様であるが、DvSnf7 抑制カセットの転写産物の発現が花粉において確認されていることが異なる。また、DvSnf7 dsRNA はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に活性を示す。このことから、本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある野生動植物等として、我が国に生息するコウチュウ目昆虫の絶滅危惧種及び準
- 35 絶滅危惧種 (計 4 種) を特定した。

トウモロコシ栽培ほ場周辺に堆積する花粉量は、ほ場から離れるほど低下し、

10 m 離れると 10 粒/cm<sup>2</sup> 以下となることが報告されている。したがって、特定されたコウチュウ目昆虫の生存に影響を与える量の花粉に継続的に曝露される可能性は、トウモロコシほ場の周辺数 m 以内に限定され、10 m を超えると花粉への曝露はほとんど無くなると考えられた。また、生態的知見を鑑みれば、特定されたコウチュウ目昆虫がトウモロコシほ場周辺に局所的に生息しているとは考えがたい。

また、本組換えトウモロコシの花粉が、特定されたコウチュウ目昆虫の水生生息地の水面に飛散した場合も、トウモロコシの花粉は水中で速やかに破裂するため水系で濃縮する可能性は低く、花粉の破裂に伴い水中に拡散した DvSnf7 dsRNA も速やかに分解し残存しないと考えられることから、これらのコウチュウ目昆虫が、水生生息域に飛散した花粉を介して DvSnf7 dsRNA に曝露する可能性は低いと考えられた。以上のことから、特定されたコウチュウ目昆虫が、本組換えトウモロコシ由来の DvSnf7 dsRNA に曝露することにより個体群レベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

したがって、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。

#### 交雑性：

我が国において、トウモロコシと自然交雑可能な近縁野生種の自生について報告はないため、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。したがって、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。

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、我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

- Adang, M.J., N. Crickmore and J.L. Jurat-Fuentes. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology* 47: 39-87.
- Anderson, J., P. Bachman, A. Burns, S. Chakravarthy, L. Goodwin, L. Privalle, S. Song and N. Storer. 2021. Streamlining data requirements for the environmental risk assessment of genetically modified (GM) crops for cultivation approvals. *Journal of Regulatory Science* 9: 26-37.
- Babendreier, D., N. Kalberer, J. Romeis, P. Fluri and F. Bigler. 2004. Pollen consumption in honey bee larvae: A step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35: 293-300.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell* 3: 271-282.
- Bachman, P.M., K.M. Huizinga, P.D. Jensen, G. Mueller, J. Tan, J.P. Uffman and S.L. Levine. 2016. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81: 77-88.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.

Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2007b. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 2007/0124836 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

5

Bowen, D., Y. Yin, S. Flasiński, C. Chay, G. Bean, J. Milligan, W. Moar, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, A. Howe, T. Ciche, K. Turner, M. Pleau, J. Zhang, J.-L. Kouadio, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2021. Cry75Aa (Mpp75Aa) insecticidal proteins for controlling the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), isolated from the insect-pathogenic bacterium *Brevibacillus laterosporus*. Applied and Environmental Microbiology 87: e02507-02520.

10

BPPRC. 2021. Bacterial Pesticidal Proteins. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center. <https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/> [Accessed July 27, 2021].

15

Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnology 6: 17-26.

20

Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Casini, A., G. Christodoulou, P.S. Freemont, G.S. Baldwin, T. Ellis and J.T. MacDonald. 2014. R2oDNA designer: Computational design of biologically neutral synthetic DNA sequences. ACS Synthetic Biology 3: 525-528.

25

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].

30

Chakroun, M., N. Banyuls, Y. Bel, B. Escriche and J. Ferré. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 80: 329-350.

35

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-

regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. The EMBO Journal 3: 1671-1679.

Crickmore, N. 2021. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) [Accessed July 28, 2021].

Crickmore, N., C. Berry, S. Panneerselvam, R. Mishra, T.R. Connor and B.C. Bonning. 2021. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. Journal of Invertebrate Pathology 186: 107438.

Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.

de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics 17: 193-199.

Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. Toxins (Basel) 6: 3005-3027.

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.

Eisenring, M., J. Romeis, S.E. Naranjo and M. Meissle. 2017. Multitrophic Cry-protein flow in a dual-gene Bt-cotton field. Agriculture, Ecosystems and Environment 247: 283-289.

EPA. 1998. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, April 1998 Final. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Fader, C.M. and M.I. Colombo. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. Cell Death and Differentiation 16: 70-78.

FAO. 2023. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed September 12, 2023].

- Fischer, J.R., F. Zapata, S. Dubelman, G.M. Mueller, J.P. Uffman, C. Jiang, P.D. Jensen and S.L. Levine. 2017. Aquatic fate of a double-stranded RNA in a sediment--water system following an over-water application. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 727-734.
- 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.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636.
- Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.
- Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Huang, Y.-F., W.R. Jordan, R.A. Wing and P.W. Morgan. 1998. Gene expression induced by physical impedance in maize roots. *Plant Molecular Biology* 37: 921-930.
- Human, H. and S.W. Nicolson. 2003. Digestion of maize and sunflower pollen by the spotted maize beetle *Astylus atromaculatus* (Melyridae): Is there a role for osmotic shock? *Journal of Insect Physiology* 49: 633-643.
- Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
- Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice  $\alpha$ -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.

- Kim, D.-W., H. Sung, D. Shin, H. Shen, J. Ahnn, S.-K. Lee and S. Lee. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells* 31: 585-592.
- 5 Kim, Y.-J., S. Kloos, J. Romeis and M. Meissle. 2021. Effects of mCry51Aa2-producing cotton on the non-target spider mite *Tetranychus urticae* and the predatory bug *Orius majusculus*. *Journal of Pest Science* 94: 351-362.
- 10 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.
- 15 Kos, M., J.J.A. van Loon, M. Dicke and L.E.M. Vet. 2009. Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in Biotechnology* 27: 621-627.
- 20 Kouadio, J.-L., S. Duff, M. Aikins, M. Zheng, T. Rydel, D. Chen, E. Bretsnyder, C. Xia, J. Zhang, J. Milligan, A. Evdokimov, J. Nageotte, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021a. Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a putative beta-pore forming protein from *Brevibacillus laterosporus* active against the western corn rootworm. *PLOS ONE* 16: e0258052.
- 25 Kouadio, J.-L., M. Zheng, M. Aikins, D. Duda, S. Duff, D. Chen, J. Zhang, J. Milligan, C. Taylor, P. Mamanella, T. Rydel, C. Kessenich, T. Panosian, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021b. Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. *PLOS ONE* 16: e0260532.
- 30 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- 35 Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.

- Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. *Russian Journal of Genetics* 43: 1413-1414.
- 5 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
- 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.
- 10 Meissle, M., S. Kloos and J. Romeis. 2021. Fate of multiple Bt proteins from stacked Bt maize in the predatory lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Pollution* 268: 115421.
- 15 Nakai, S., K. Hoshikawa, A. Shimono and R. Ohsawa. 2015. Transportability of confined field trial data from cultivation to import countries for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Transgenic Research* 24: 929-944.
- 20 NCGA. 2022. World of Corn 2022. <https://www.ncga.com/world-of-corn> [Accessed February 2, 2023].
- Nivetha, L. and H. Jayachandran. 2017. Isolation and identification of *Brevibacillus lactosporum* from soil and evaluation of their antibiotic properties. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4: 93-98.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series

on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- 5 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™ 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.
- 10 Panda, A.K., S.S. Bisht, S. DeMondal, N. Senthil Kumar, G. Gurusubramanian and A.K. Panigrahi. 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: A short review. *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 623-639.
- 15 Peck, J.W., E.T. Bowden and P.D. Burbelo. 2004. Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins. *Biochemical Journal* 377: 693-700.
- 20 Pleasants, 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.
- Rochester, D.E., J.A. Winer and D.M. Shah. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO Journal* 5: 451-458.
- 25 Romeis, J., A. Raybould, F. Bigler, M.P. Candolfi, R.L. Hellmich, J.E. Huesing and A.M. Shelton. 2013. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. *Chemosphere* 90: 901-909.
- 30 Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 326: 277-290.
- 35 Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler

and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.

5 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.

10 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.

15 Stork, N.E. 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? Annual Review of Entomology 63: 31-45.

20 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

25 Tabata, M., Y. Takada, M. Sato, J. Suzuki and S. Suzuki. 1993. Distributions of DNA and RNA hydrolyzing bacteria in lakes and their extracellular nuclease production. Japanese Journal of Limnology 54: 117-123.

Teis, D., S. Saksena and S.D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. Developmental Cell 15: 578-589.

30 Vaccari, T., T.E. Rusten, L. Menut, I.P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark and D. Bilder. 2009. Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. Journal of Cell Science 122: 2413-2423.

35 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. Journal of Invertebrate Pathology 111: 1-12.



van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.

5 Wach, M., R.L. Hellmich, R. Layton, J. Romeis and P.G. Gadaleta. 2016. Dynamic role and importance of surrogate species for assessing potential adverse environmental impacts of genetically engineered insect-resistant plants on non-target organisms. *Transgenic Research* 25: 499-505.

10 Winter, V. and M.-T. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *TRENDS in Plant Science* 11: 115-123.

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.

15 Xing, A., B.P. Moon, K.M. Mills, S.C. Falco and Z. Li. 2010. Revealing frequent alternative polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant transcription terminators. *Plant Biotechnology Journal* 8: 772-782.

Yin, Y., S. Flasiński, W. Moar, D. Bowen, C. Chay, J. Milligan, J.-L. Kouadio, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, J. Zhang, G. Mueller, C. Preftakes, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2020. A new *Bacillus thuringiensis* protein for Western corn rootworm control. *PLoS ONE* 15: e0242791.

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.

30 Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *The Plant Genome* 8: 1-15.

35 Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson.

2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1157-1168.
- 5 Ruiu, L. 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects* 4: 476-492.
- Ivashuta, S., Y. Zhang, B.E. Wiggins, P. Ramaseshadri, G.C. Segers, S. Johnson, S.E. Meyer, R.A. Kerstetter, B.C. McNulty, R. Bolognesi and G.R. Heck. 2015. Environmental RNAi in herbivorous insects. *Rna* 21: 840-850.
- 10 大林延夫・新里達也 2007 日本産カミキリムシ 東海大学出版会
- 柿本陽一・山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 III 植物としての特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京
- 15 環境省 2020 環境省レッドリスト 2020 令和2年3月27日公表 環境省自然環境局 野生生物課 希少種保全推進室 (編) (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/113628.pdf>) [Accessed July 28, 2021]
- 20 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
- 25 財務省 2023 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed September 12, 2023]
- 千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採取 転作全書 第三巻 雑穀 社団法人 農山漁村文化協会 東京
- 30 瀧澤康考 2001 子実用トウモロコシの栽培 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京
- 35 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

- 長野県 2023 令和 5 年農作物病害虫・雑草防除基準 4 普通作物 3. とうもろこし  
(スイートコーンを含む) <https://www.pref.nagano.lg.jp/bojo/nouyaku/bojokijun/documents/4-3.pdf> [Accessed November 8, 2023]
- 5
- 中村茂文 2001 生育のステージと生理、生態 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁  
村文化協会 東京
- 西尾剛 2002 新農学実験マニュアル 改訂版第 3 版 株式会社ソフトサイエンス  
社
- 10
- 日本植物防疫協会 2022 農薬適用一覧表 2022 年版 日本植物防疫協会 東京
- 日本生物防除協議会 2022 天敵等に対する農薬の影響目安の一覧表 第 28 版
- 15 [http://www.biocontrol.jp/\\_src/sc2429/tenteki\\_ver.28\\_jan-2022\\_sattyuzai\\_web.pdf](http://www.biocontrol.jp/_src/sc2429/tenteki_ver.28_jan-2022_sattyuzai_web.pdf)  
[Accessed November 8, 2023]
- 日本モンサント株式会社 2015 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*DvSnf7*, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays*  
(L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) 申請書等の概要
- 20 [http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info\\_id=1780&ref\\_no=1](http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1780&ref_no=1)  
[Accessed September 12, 2023]
- 農林水産省 2013 平成 24 年度第 7 回生物多様性影響評価検討会総合検討会 資料  
25 9 農作物分科会における検討の結果 (第 4 次レッドリストの改訂に伴う評価の確認について) [https://warp.da.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/10205286/www.s.affrc.go.jp/docs/committee/diversity/130228/pdf/siryō\\_9.pdf](https://warp.da.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/10205286/www.s.affrc.go.jp/docs/committee/diversity/130228/pdf/siryō_9.pdf) [Accessed November 15, 2023]
- 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  
30 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 <https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-63.pdf> [Accessed September 5, 2023]
- 35

- 農林水産省 2023a 令和 4 年産作物統計 (普通作物・飼料作物・工芸農作物) 2023 年 8 月 31 日 公 開 <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=00001200060> [Accessed September 5, 2023]
- 5
- 農林水産省 2023b 農林水産統計 作物統計調査 令和 5 年 8 月 30 日公表 [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_yasai/attach/pdf/index-37.pdf](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/attach/pdf/index-37.pdf) [Accessed September 5, 2023]
- 10
- 農林水産省 2023c 飼料をめぐる情勢 令和 5 年 8 月公表 [https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryo/](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/) [Accessed September 12, 2023]
- 15
- 農林水産省 2023d 農薬登録情報提供システム アグロスリン乳剤 <https://pesticide.maff.go.jp/agricultural-chemicals/details/16589> [Accessed November 8, 2023]
- 20
- 農林水産省 2023e 農薬登録情報提供システム 住化スミチオン乳剤 <https://pesticide.maff.go.jp/agricultural-chemicals/details/4962> [Accessed November 8, 2023]
- 25
- 野尻湖昆虫グループ 1985 アトラス・日本のネクイハムシー化石同定への手引きー 野尻湖昆虫グループ 大阪
- 林成多 2005 日本産ネクイハムシ図鑑ー全種の解説ー 月刊むし 408: 2-18
- 林成多 2012 日本のネクイハムシ 月刊むし・昆虫図説シリーズ 2 むし社 東京
- 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
- 山本勝利・大黒俊哉・松村雄 2003 5. わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価 農業環境研究叢書 第 14 号 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価 農業環境技術研究所 (編) 養賢堂 東京 pp.62-81
- 35

## 緊急措置計画書

2023年12月8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 坂田 耕平  
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コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mpp75Aa1.1, vpb4Da2, DvSnf7.1, Zea mays subsp. mays (L.) Itis*) (MON95275, OECD-UI: MON-95275-7) (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。

2023年12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<br>東京都千代田区丸の内一丁目6番5号<br>(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 企業広報部長 クロップサイエンス ビジネスパートナー                               |
| 【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 サイトリーダー                         |

\*：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おそれが示唆された場合、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。

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mpp75Aa1.1*, *vpb4Da2*, *DvSnf7.1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)(MON95275, OECD-UI: MON-95275-7) の  
別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の推定アミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Mpp75Aa1.1 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000993) (社外秘)
- 別添資料 3 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Vpb4Da2 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000994) (社外秘)
- 別添資料 4 An Evaluation of the Potential Dietary Effects of Mpp75Aa1.1 Protein on the Tropical House Cricket, *Gryllodes sigillatus* (F. Walker) (Orthoptera: Gryllidae) Under Laboratory Test Conditions (M-830769-01-1) (社外秘)
- 別添資料 5 Bioinformatic Evaluation of the DvSnf7 Sequence against the *Zea Mays* transcriptome (TRR0000547) (社外秘)
- 別添資料 6 Amended from TRR0000886: Global Module: Plasmid Molecular Information Study for pMON356756 (PV-ZMIR525664) (TRR0001013) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended from TRR0000858: PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 95275 (TRR0001018) (社外秘)
- 別添資料 8 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect Protected Maize MON 95275 Across Three Generations (MSL0030830) (社外秘)
- 別添資料 9 Amended from TRR0001330: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON 95275 (M-820233-02-1) (社外秘)
- 別添資料 10 Demonstration of the Presence of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Proteins in Maize Grain Samples Across Multiple Generations of MON 95275 (TRR0000780) (社外秘)

- 別添資料 11 Amended from TRR0000901: Demonstration of the Presence or Absence of DvSnf7.1 Transcripts in Maize Leaf Tissues Across Multiple Generations of MON 95275 (TRR0001019) (社外秘)
- 別添資料 12 Assessment of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Protein Levels in Maize Leaf, Root, Forage, Grain, Pollen Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Field Sites of United States Field Trials During 2019 (TRR0000722) (社外秘)
- 別添資料 13 Assessment of DvSnf7.1 RNA Levels in OSL1, OSR1, Forage, Grain, and Pollen Maize Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Sites in the United States Field Trials during 2019 (TRR0000653) (社外秘)
- 別添資料 14 Amended from TRR0000902: Northern Blot Analysis of DvSnf7.1 RNA Expression in MON 95275 (TRR0001020) (社外秘)
- 別添資料 15 Amended from TRR0000719: Characterization of DvSnf7.1 Read-through Transcripts in Maize MON 95275 (TRR0001021) (社外秘)
- 別添資料 16 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 95275 (社外秘)
- 別添資料 17 In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 95275” for Global Submissions (社外秘)
- 別添資料 18 コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mpp75Aa1.1*, *vpb4Da2*, DvSnf7.1, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON95275, OECD UI: MON-95275-7) 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 19 Assessment of the Effect of Cold Stress on Growth of MON 95275 Maize in 2023 under Controlled Environmental Conditions (M-841545-01-1) (社外秘)