

半矮性トウモロコシ (GA20ox_SUP, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4)申請書等の概要
--

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
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	10
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	10
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	15
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	31
(2) ベクターに関する情報	33
イ 名称及び由来	33
ロ 特性	33
① ベクターの塩基数及び塩基配列	33
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	33
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	33
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	34
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	34
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	34
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	34
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	34
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	34
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	35
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	37
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	37
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	37
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	41
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	41
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	43
(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	43
(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	44
a 形態及び生育の特性	44
b 生育初期における低温耐性	45
c 成体の越冬性	45
d 花粉の稔性及びサイズ	46
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	46
f 交雑率	47
g 有害物質の産生性	47
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	47
(1) 使用等の内容	47
(2) 使用等の方法	48
(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	48
(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	48
(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	48
(6) 国外における使用等に関する情報	48
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	50
1 競合における優位性	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	51
(3) 影響の生じやすさの評価	51
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	52
2 有害物質の産生性	52
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	52
(2) 影響の具体的内容の評価	53
(3) 影響の生じやすさの評価	53
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	53
3 交雑性	53
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	54
(2) 影響の具体的内容の評価	54

(3) 影響の生じやすさの評価	54
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	54
4 その他の性質	54
第三 生物多様性影響の総合的評価	55
参考文献	57
緊急措置計画書	67
別添資料リスト	69

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

2024 年 7 月 10 日

5 農林水産大臣 坂本 哲志 殿
環境大臣 伊藤 信太郎 殿

10 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 大島 美紀
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15 第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	半矮性トウモロコシ (<i>GA20ox_SUP</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) <i>Ilitis</i>) (MON94804, OECD UI: MON-948Ø4-4)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は HCL301 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。

25

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

30

我が国の自然環境下において、トウモロコシ及びその近縁種の自生について報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの

複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づく
と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、
紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、
5 南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、
スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001;
戸澤, 2005)。1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによっ
てスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びア
ジアの各地域に伝播した。

10 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)。

15 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

・主たる栽培地域

現在、トウモロコシは、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能
であり、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国等を中
20 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、2022 年における全世界のトウモロコ
シの栽培面積は約 2 億 347 万 ha であり、上位国は、中国 4,307 万 ha、米国
3,205 万 ha、ブラジル 2,104 万 ha、インド 996 万 ha、アルゼンチン 877 万 ha
である (FAO, 2024)。

25 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 (農林水産省, 2023b)、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, 2023a)。

30 ・栽培方法

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

一方、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。

35 北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も
多い。適正栽植密度は 10 a 当たり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄

せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い (瀧澤, 2001)。

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

・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。2022 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.2%が飼料 (8.3%の蒸留粕を含む)、29.6%がエタノール製造、13.8%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, 2023)。

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 1,145 万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる (財務省, 2024)。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, 2024)。

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)。

ハ 捕食性又は寄生性

10

—

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)。

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

25 さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 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)。

30 ② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

35

トウモロコシは栄養繁殖せず、種子繁殖する。自然条件において植物体を

再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はない。

- 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

5

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)。

10

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

15

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。

20

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

25

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

30

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる (西尾, 2002)。

花粉の形状は球形で、直径は 90~120 μm 程度である (中村, 2001)。

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

35

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

また、北米 7 か所のトウモロコシほ場周辺において延べ 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/cm²、14.2 粒/cm²、8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている (Pleasants et al., 2001)。

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

バイエルグループは、半矮性トウモロコシ (*GA20ox_SUP*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4) (以下「本組換えトウモロコシ」とする。) を作出した。

本組換えトウモロコシには、トウモロコシ内在性のジベレリン (GA) 20 酸化酵素遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) を標的とするように設計された逆方向反復配列を発現する *GA20ox_SUP* 抑制カセットが含まれている。この抑制カセットから発現する逆方向反復配列をもつ転写産物 (以下「*GA20ox_SUP* RNA」とする。) は、RNA 干渉 (RNAi) 機構により認識され、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する。この抑制により、茎の GA 含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。以降、本組換えトウモロコシに付与された形質である短稈を半矮性と呼ぶ。

トウモロコシ栽培における倒伏は生産者が毎年直面する主要な課題の 1 つであり、倒伏による推定年間収量損失は、総収量の 5~20%にあたるとの報告がある (Tirado et al., 2021)。本組換えトウモロコシは半矮性 (短稈) という形質により、強風による倒伏被害の軽減が期待できる。

また、従来のトウモロコシ栽培では、稈長が農業機械の噴霧器の高さに達した後に農業機械が畑に入ると植物体を傷つける可能性があるため、生育中期以降に入ることはいできない。しかし、短稈の本組換えトウモロコシを使用する場合、生育中後期においても農業機械を使用できるため、生育段階や病害虫の発生状況に応じて、肥料や農薬を正確に施用することが可能になる。例えば、生育後期に殺菌剤を散布する際に、従来のトウモロコシ栽培では飛行機を使用した空中散布を行っているが、本組換えトウモロコシの栽培では生育後期であっても農業機械を使用し、必要に応じて正確に散布することができる。また、従来のトウモロコシ栽培では、生育期間中の肥料窒素分の流亡を加味した量の窒素を播種前又は生育初期に予め施肥するが、本組換えトウモロコシの栽培では、前述したように生育中後期であっても農業機械で畑に入れるため、植物が最も窒素を必要とする時に必要な量を正確に施肥することが可能となる。そのため、本組換えトウモロコシは肥料や農薬のより最適化された施用を通じて、環境の持続可能性を促進することが期待されている。

なお、本組換えトウモロコシと同様に、植物体内の GA 含有量を低下させる

ことで半矮性の形質がもたらされた遺伝子組換えイネが、すでにカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている (半矮性イネ (*OsGA2ox1*, *Oryza sativa* L.) (G-3-3-22) (承認日：2005 年 5 月 25 日))。当該系統には、活性型 GA を不活性化させる GA2 酸化酵素遺伝子が導入されており、この遺伝子の発現により活性型 GA 含有量を低下させることによって、半矮性の形質が付与されている。この系統を第一種使用等の内容 (農業生物資源研究所¹内のほ場に限定) で使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている (農業生物資源研究所, 2004)。

10 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を図 1 (p11) 及び表 1 (p12~14) に示した。

なお、本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットに含まれる *GA20ox_SUP* 配列の構成の詳細については、第一の 2-(1)-ロ-②-2-(2) (p18~22) に記載した。

20

ロ 構成要素の機能

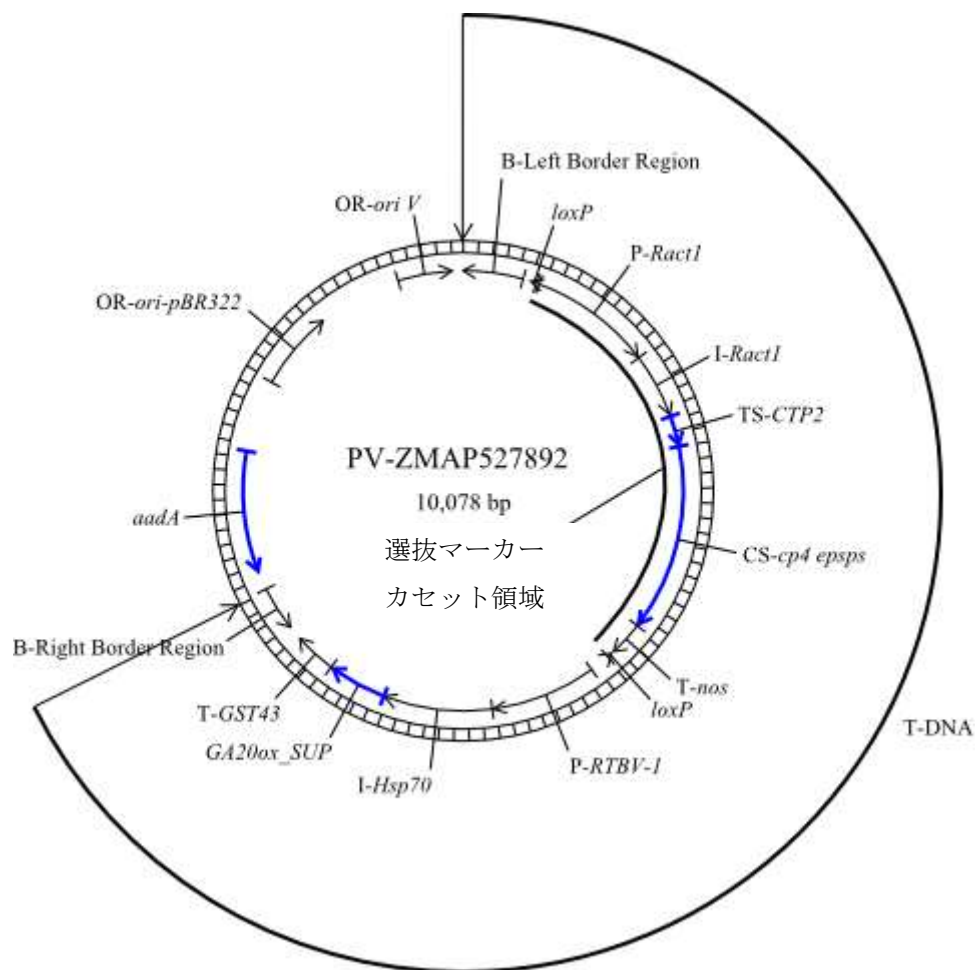
① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

25

本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の機能を表 1 (p12~14) に示した。

30

¹ 現在は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) に統合されている (<https://www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/>)。



5 図1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 のプラスミドマップ²

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 R₂ 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-ZMAP527892 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-Ract1、I-Ract1、TS-CTP2、CS-cp4 epsps、T-nos 及び loxP 配列の 1 つ) 及び Cre

10 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, p35)。

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

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能³

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B ¹ -Left Border Region	<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左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening sequence	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>	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	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 ² - <i>Ract1</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー (McElroy et al., 1990)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
I ³ - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening sequence	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 ⁴ - <i>CTP2</i>	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 ⁵ - <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
Intervening sequence	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 ⁶ - <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来のノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている <i>nos</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening sequence	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。

³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
<i>loxP</i>	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	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>P-RTBV-1</i>	イネツングロ桿菌状ウイルス (RTBV) 由来のプロモーター及びリーダーで主に維管束の師部組織 (Yin and Beachy, 1995) 及びトウモロコシの節間において転写を誘導する (Paciorek et al., 2022)。なお、 <i>RTBV-1</i> プロモーターは野生型 <i>RTBV</i> の ORF4 の後半部分を含むが、ORF4 の開始アミノ酸であるメチオニンは含まない。したがって、 <i>RTBV-1</i> プロモーターから蛋白質が発現することはないと考えられる。
Intervening sequence	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>I-Hsp70</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来の熱ショック蛋白質 (HSP70) をコードする <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の一部 (Rochester et al., 1986)。遺伝子発現の制御に関わり、植物における発現を高める (Brown and Santino, 1997)。
<i>GA20ox_SUP</i>	ジベレリン (GA) 20 酸化酵素 3 及び 5 をコードするトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の <i>GA20ox3</i> 遺伝子及び <i>GA20ox5</i> 遺伝子のコード配列 (Song et al., 2011) に由来する 21 塩基長配列及びその逆方向反復配列並びに <i>GA20ox_SUP</i> の primary micro RNA (pri-miRNA) の基本骨格構造となるイネ (<i>O. sativa</i>) 由来の 3 つの <i>Osa-miR1425</i> フラグメント (Lacombe et al., 2008) により構成されている配列であり (図 4, p20)、 <i>GA20ox_SUP</i> 抑制カセットの一部を形成する (GenBank accession: OL473856)。
Intervening sequence	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>T-GST43</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の複数の 3'末端非翻訳領域の配列を基に作製された 3'末端非翻訳領域 (To et al., 2021)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	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-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)	
Intervening sequence	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>	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening sequence	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 ⁷ -ori- <i>pBR322</i>	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	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-ori <i>V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 (Stalker et al., 1981)。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening sequence	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。

- 5 ¹ B-Border (境界配列)
- ² P-Promoter (プロモーター)
- ³ I-Intron (イントロン)
- ⁴ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)
- ⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)
- 10 ⁶ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)
- ⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)
- * T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット領域 (P-*Ract1*、I-*Ract1*、TS-CTP2、CS-*cp4 epsps*、T-*nos* 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。また、本組換えトウモロコシに B-Right Border Region は導入されていない。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 5 の Appendix Table 2 (p42) に示している。
- 15

- 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

本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* RNA は、RNAi 機構に認識され、トウモロコシ内在性の *GA20* 酸化酵素遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の発現を抑制する。この抑制により、本組換えトウモロコシの茎において活性型 *GA* 含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。

10

本組換えトウモロコシの *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA が半矮性 (短稈) を付与する作用機序を、以下の3項目に分けて説明する。

15

1. *GA* の植物中での一般的な役割とその生合成経路
2. 標的遺伝子の選定とその発現を抑制する「micro RNA (miRNA) 利用による遺伝子発現抑制カセット」の設計
3. 標的遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序

20

1. *GA* の植物中での一般的な役割とその生合成経路

25

GA は、成長に関わる重要な植物ホルモンであり、茎伸長、種子発芽、葉の生育、花成等、様々な植物の発生過程の調節に参与している (Achard and Genschik, 2009; Nelissen et al., 2012)。 *GA* の生合成は多くの植物種で研究されており、複数の酵素 (*ent*-コパリルニリン酸合成酵素 (CPS)、*ent*-カウレン合成酵素 (KS)、*ent*-カウレン酸化酵素 (KO)、*ent*-カウレン酸酸化酵素 (KAO)、*GA13* 酸化酵素 (*GA13ox*)、*GA20* 酸化酵素 (*GA20ox*)、*GA3* 酸化酵素 (*GA3ox*)、*GA2* 酸化酵素 (*GA2ox*)) によって触媒される (Yamaguchi, 2008) (図 2, p16)。そのままの形で生理活性を示す活性型 *GA* は、図 2 (p16) に示すように、トランスゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) から合成される。多くの植物種で同定されている主要な活性型 *GA* は *GA₁* 及び *GA₄* である (Binenbaum et al., 2018)。トウモロコシにおいて *GA₁* 及び *GA₄* は、節間伸長を含む成長や発生過程の調節に関与することが知られている (Phinney, 1985; Nelissen et al., 2012; Zhang et al., 2020)。

30

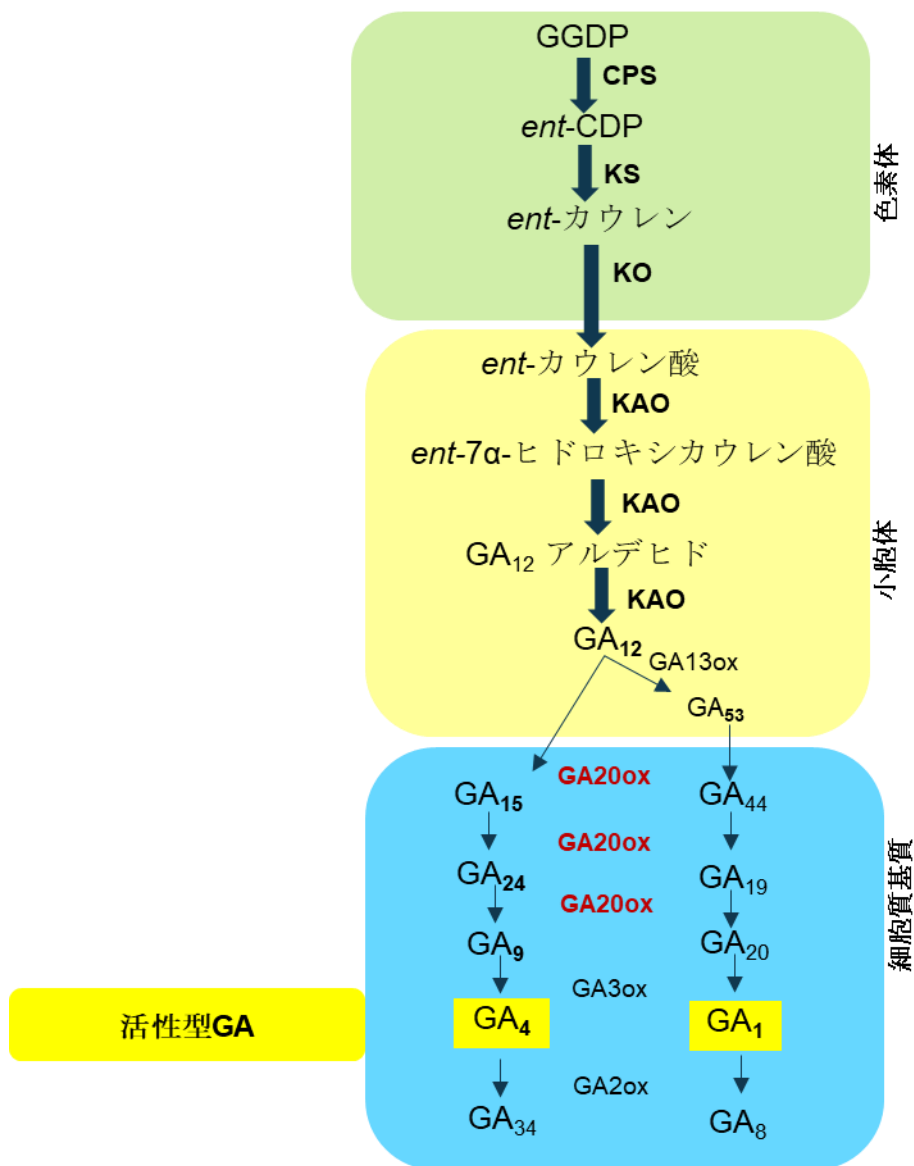


図2 植物における GA 生合成経路

GGDP: トランスゲラニルゲラニルニリン酸; *ent*-CDP: *ent*-コパリルニリン酸; CPS: *ent*-コパリルニリン酸合成酵素; KS: *ent*-カウレン合成酵素; KO: *ent*-カウレン酸化酵素; KAO: *ent*-カウレン酸酸化酵素; GA13ox: GA13 酸化酵素; GA3ox: GA3 酸化酵素; GA2ox: GA2 酸化酵素; GA20ox (赤字): 本組換えトウモロコシで発現抑制される *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子が含まれる *GA20ox* 遺伝子ファミリーがコードする GA20 酸化酵素

10 出典: Binenbaum et al. (2018) の Figure 1 を改変

2. 標的遺伝子の選定とその発現を抑制する「miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセット」の設計

5 (1) 標的とする内在性遺伝子の選定

これまでに GA 経路において矮化を引き起こす多くのアレルがトウモロコシにおいて同定されたが、極度の矮化や多面発現により望ましくない表現型が生じるため、トウモロコシの育種や商品化では利用されていない (Fujioka et al., 1988; Bensen et al., 1995; Cassani et al., 2009; Wang et al., 2013; Chen et al., 2014; 10 Awale and McSteen, 2023)。また、トウモロコシの GA 欠損変異体の多数で、雌穂に葯 (両性花) が形成される等の花器官への影響が報告されているが (Bensen et al., 1995; Chen et al., 2014)、両性花では種子生産性が低下する可能性がある。以上のことから、主に茎等の栄養組織における GA 生合成に重要な GA 生合成酵素遺伝子を標的遺伝子として選定することとした。

15

GA20 酸化酵素 (GA20ox) (図 2, p16) は、活性型 GA (GA₁ 及び GA₄) を合成する GA 生合成経路の最終段階における重要な酵素の 1 つである。緑の革命に貢献した半矮性イネ品種の原因遺伝子が、イネの GA20ox 遺伝子 (*OsGA20ox2* (*sd1*)) であり、この遺伝子の機能喪失型変異が半矮性を引き起こすことが知られている (Sasaki et al., 2002)。この半矮性イネでは、草丈は低くなるが収量は変わらず、花の形成及び受精も正常であった (Sasaki et al., 2002)。トウモロコシでは、5 つの *ZmGA20ox* 遺伝子が同定されている (Song et al., 2011)。これに加えて、Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)⁴ (Portwood et al., 2019) では、さらに 4 つの推定 *ZmGA20ox* 遺伝子の存在が示唆されている。公開されているトウモロコシ遺伝子の転写プロファイルデータベース (Winter et al., 2007; Sekhon et al., 2011) によると、これら 9 つの *ZmGA20ox* 遺伝子の中で 25 *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子からの転写産物 (mRNA) は、生殖組織と比べ栄養組織で高い発現量を示す⁵。バイエル社の保有するトウモロコシ系統においても、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の栄養組織における高い mRNA 発現量が認められた (Paciorek et al., 2022 の Figure 1 (a), p3)。なお、*ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーの系統発生分析において、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子がイネにおける緑の革命に寄与した *OsGA20ox2* (*sd1*) 遺伝子と高い配列相同性を共有していることが明らかになっており、これら 3 つの遺伝子は同じクレード (分岐群) に属する (Song et al., 2011)。以上のことから、

30

⁴ <https://www.maizegdb.org>

⁵ http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi

ZmGA20ox3 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子を標的遺伝子として、これらの発現を抑制することにより、生殖組織に影響を与えることなく、茎の節間で活性型 GA 含有量を低下させ、稈長が短くなることが期待された。

5 (2) *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を特異的に抑制するための miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセットの設計

前項 (1) で選定した標的遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の発現を RNAi 機構によって抑制するために、miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセットを新たに開発した。RNAi は、植物を含む真核生物において内在性遺伝子の発現調節のために広く保存されている機構であり (Fire et al., 1998; Jones-Rhoades et al., 2006)、miRNA 及び small interfering RNA (siRNA) により誘導される (Carthew and Sontheimer, 2009)。

10 本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物は、植物における miRNA の生合成過程を経て、成熟 miRNA になる。この植物における miRNA の生合成過程 (Siomi and Siomi, 2009; Borges and Martienssen, 2015) を図 3 (p19) に示し、図の番号に対応した miRNA の生合成過程を以下に叙述する。

- ステップ 1: miRNA 配列は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写される。
- 20 ステップ 2: 転写産物 (RNA) は、primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれるステムループ構造を形成する。
- ステップ 3: pri-miRNA は Dicer Like 1 (DCL1) と呼ばれる酵素により切断され、precursor miRNA (pre-miRNA) となる。
- ステップ 4: pre-miRNA は DCL1 によりさらに切断され、二本鎖の成熟 miRNA となる。
- 25 ステップ 5: DCL1、アルゴノート蛋白質 1 (AGO1)、複数の二本鎖 RNA 結合蛋白質 (dsRBD) 及び二本鎖の成熟 miRNA により RNA-induced silencing complex (RISC) が形成される。
- ステップ 6: RISC 内で二本鎖の成熟 miRNA は、標的 mRNA 認識にかかわる miRNA (ガイド鎖) と、分解される miRNA* (パッセンジャー鎖) に分けられる。
- 30 ステップ 7: この一本鎖成熟 miRNA (ガイド鎖) は、AGO1 に取り込まれる。
- ステップ 8: miRNA を取り込んだ AGO1 複合体は、標的 mRNA 上に存在するガイド鎖と相補的な配列領域に結合し、標的 mRNA を分解する。これにより標的遺伝子から産生される蛋白質が特異的に減少する。
- 35

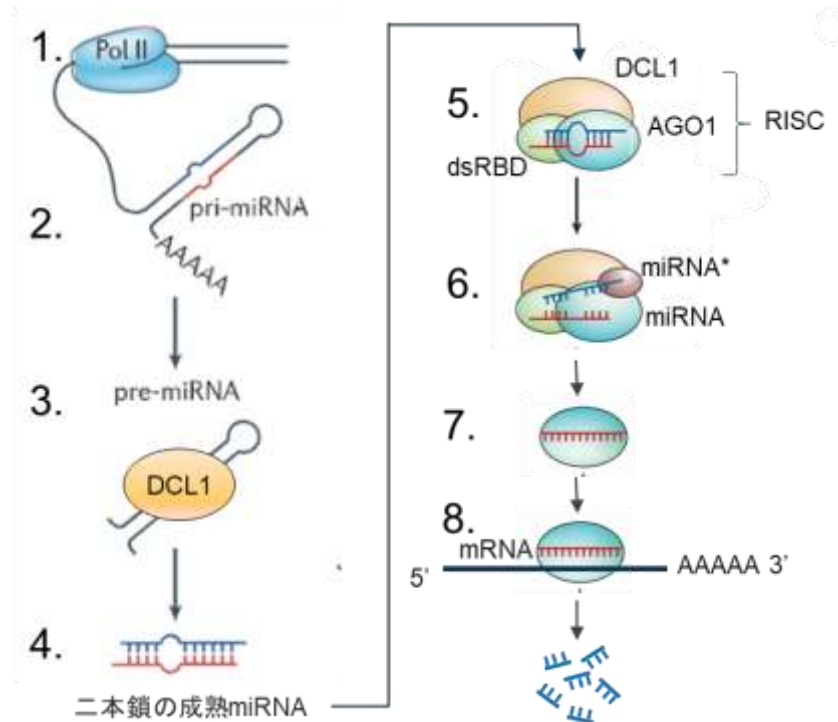


図3 植物における miRNA の生合成過程

出典: Borges and Martienssen (2015) の Figure 1 及び Siomi and Siomi (2009) の Figure 2 を改変

5

GA20ox_SUP 抑制カセットは、標的遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の発現のみを正確に抑制し、他の遺伝子の発現を抑制しないように設計されており、*RTBV-1* プロモーター、*Hsp70* イントロン、*GA20ox_SUP* 配列及び *GST43* ターミネーターで構成されている (表 1, p13)。*RTBV-1* プロモーターは、主に維管束の師部組織 (Yin and Beachy, 1995) 及び節間において転写を誘導する (Paciorek et al., 2022)。稈長と直接的に関連する節間において、*GA20ox_SUP* 抑制カセットを転写させ、そこから産生される miRNA により標的遺伝子の発現を抑制するため及び生殖組織への影響を最小限に抑えるために利用される。*GA20ox_SUP* 配列は、pri-miRNA (以下「*GA20ox_SUP* の pri-miRNA」とする。)の基本骨格構造となるイネの配列と、21 塩基長の成熟 miRNA (以下「*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA」とする。)となるトウモロコシの配列により構成されている (図 4, p20)。

10

15

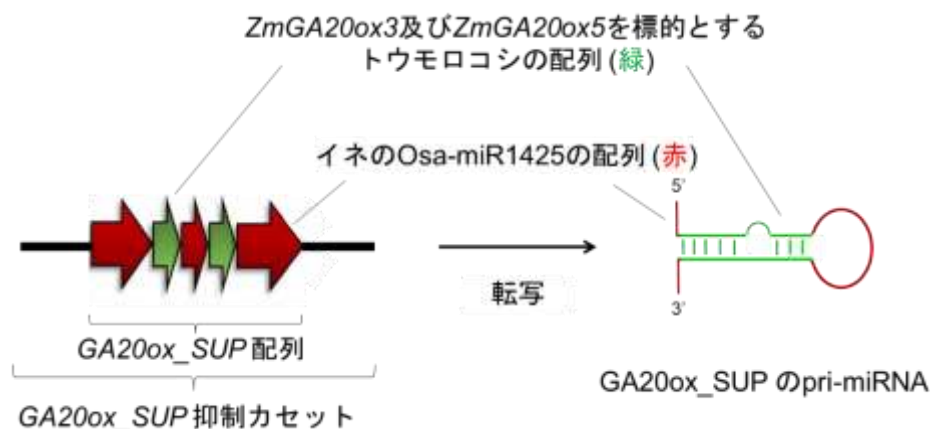


図 4 GA20ox_SUP 配列の構成と GA20ox_SUP の pri-miRNA の設計⁶

GA20ox_SUP の成熟 miRNA の設計にあたっては、まず ZmGA20ox3 遺伝子
 5 及び ZmGA20ox5 遺伝子の配列を他の ZmGA20ox 遺伝子ファミリーメンバーの
 配列とアライメントした。そして、miRNA が他の ZmGA20ox 遺伝子の発現を
 抑制しないように、ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子と同一配列又は
 最小のミスマッチを有する相同配列である一方で (脚注 11, p32)、他の
 ZmGA20ox 遺伝子ファミリーメンバーの配列とのミスマッチを最大化した 21
 塩基長以上の配列を miRNA 標的領域候補として特定した。次に、最小自由エ
 ネルギー⁷や GC 含量 (%) 等の複数のパラメーターを選定基準 (脚注 11, p32) と
 して使用し、複数の miRNA 標的領域候補の中から 1 か所の標的領域
 (ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子のコード領域に存在する 21 塩基長
 配列) を選定した。この標的領域の配列を基に GA20ox_SUP の成熟 miRNA の
 15 配列を設計した (Reynolds et al., 2004; Allen et al., 2005; Schwab et al., 2006)。

GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、ZmGA20ox3 遺伝子の転写配列と完全な相補
 性を持ち、ZmGA20ox5 遺伝子の転写配列と 1 塩基のミスマッチをもつように
 設計された (図 5, p21)。この 1 塩基のミスマッチは miRNA とその標的転写産
 物のペアリングに重要な miRNA 認識部位のシード領域 (図 5 の黒い枠, p21) の
 外にあるため、標的遺伝子 (ZmGA20ox3 及び ZmGA20ox5) の発現抑制効率は同
 20 等になると予測された (Paciorek et al., 2022)。

なお、ZmGA20ox 遺伝子ファミリーメンバーに共通するドメインとして
 2OG-FeII_Oxy ドメインがあり、選定された GA20ox_SUP の成熟 miRNA の標

⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会
 社に帰属する。

⁷ 二次構造の安定性の計算であり、二本鎖RNAの対になる塩基 (G:C、G:U、A:U等) と対に
 ならない塩基 (ループ配列) の強度に影響される。

的領域は、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子から発現する蛋白質の 2OG-FeII_Oxy ドメインをコードする領域に存在する (図 6, p22)。保存性が高いドメイン領域を標的とした場合であっても、配列の多様性に着目して標的領域を選定し、その配列を基に miRNA の配列を設計することで、特異的に RNAi を誘導することが可能である。このため、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子以外の *ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーメンバーは、GA20ox_SUP の成熟 miRNA によって発現が抑制されないと予測された。

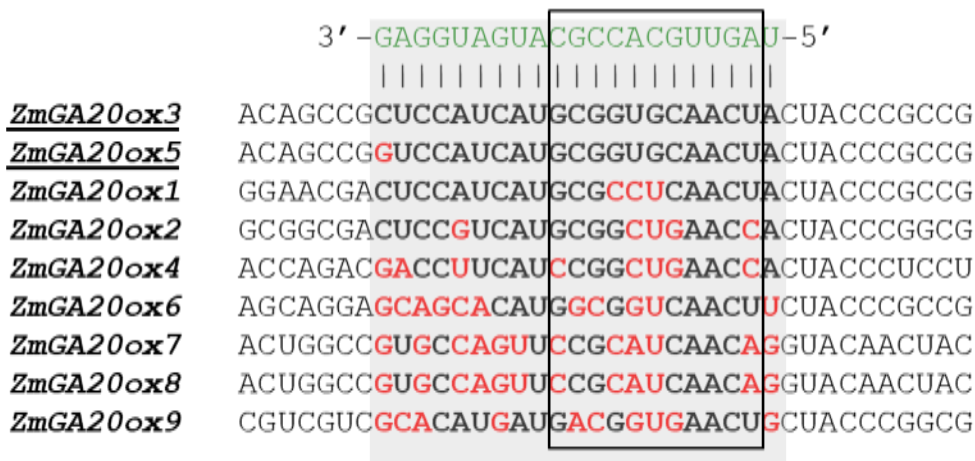


図 5 GA20ox_SUP の成熟 miRNA の配列とトウモロコシで同定された 9 つの *ZmGA20ox* 遺伝子の転写配列とのアライメント

緑色で表記した配列は GA20ox_SUP の成熟 miRNA を示す。灰色のエリア内は、GA20ox_SUP の成熟 miRNA とアライメントする領域 (miRNA による効率的な発現抑制のためには高い相補性が必要とされる領域) を示し、黒の枠内は miRNA 認識部位のシード領域 (ミスマッチが許容されない領域) を示す。赤色で表記した塩基は GA20ox_SUP の成熟 miRNA とのミスマッチを、下線は 2 つの標的遺伝子をそれぞれ示す。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 1 (c), p3 を改変

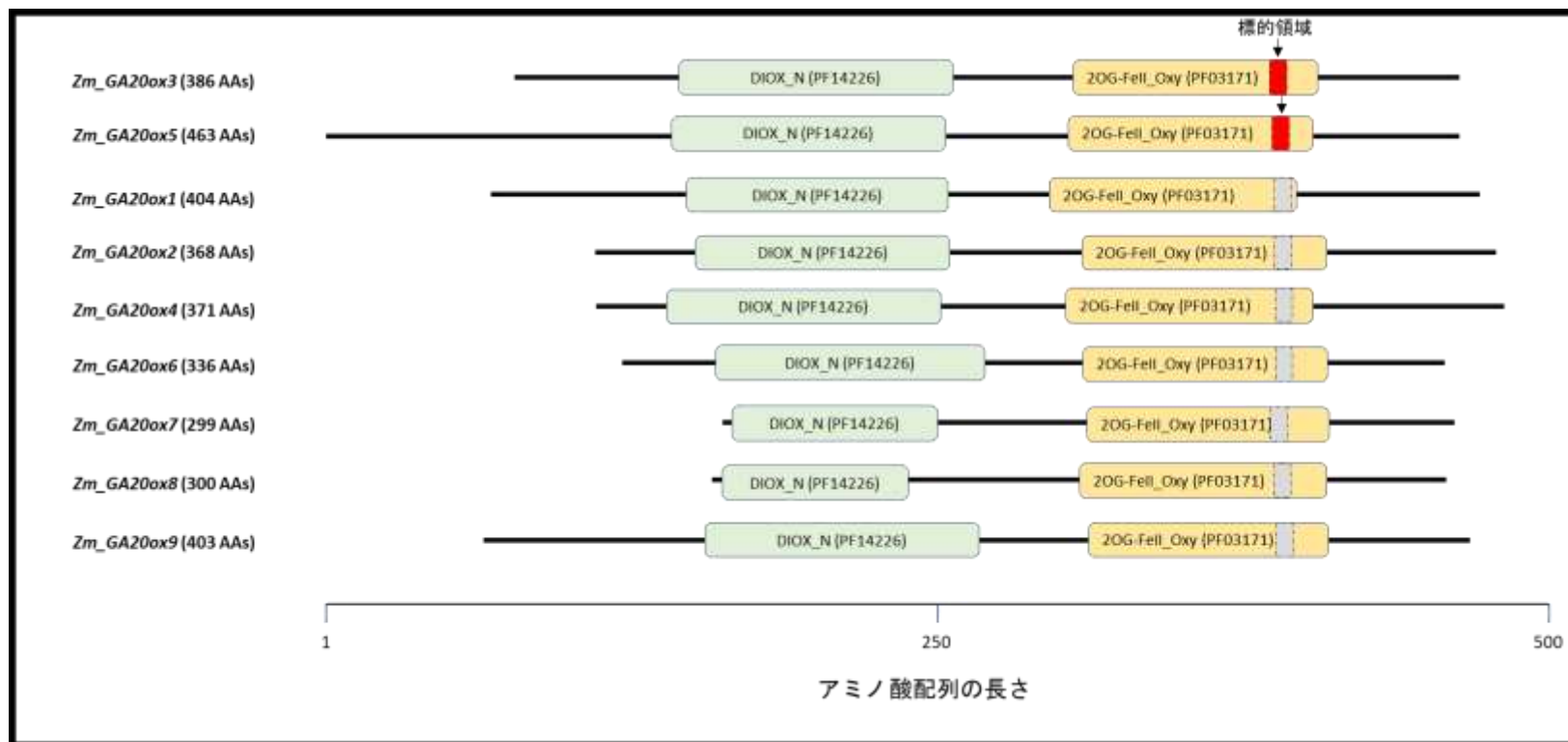


図6 9つの *ZmGA20ox* 遺伝子から発現する蛋白質の模式図⁸

GA20ox_SUP の成熟 miRNA の標的領域 (赤色) は、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の転写配列において、これらの遺伝子から発現する蛋白質の 2OG-FeII_Oxy ドメインをコードする領域に存在する。図 5 (p21) で示した他の非標的の *ZmGA20ox* 遺伝子の転写配列とアライメントした領域は灰色で示す。

⁸ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

3. 標的遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序

本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットの標的
5 遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序は、Paciorek ら (2022) により明
らかにされており、以下の (1)~(3) に詳述した。なお、Paciorek ら (2022) は、
GA20ox_SUP 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシ (以下本項にお
いて「遺伝子組換えトウモロコシ」とする。) 2 系統⁹と、*GA20ox_SUP* 抑制カ
10 セットを有さない対照の遺伝子組換えトウモロコシ (以下本項において「対照
品種」とする。) を米国イリノイ州の 2 か所のほ場で 2019 年及び 2020 年に栽
培し、栄養組織 (例：茎の節間、葉) 及び生殖組織 (例：花粉、絹糸、雄穂、雌
穂、穀粒) からデータを収集した (Paciorek et al., 2022)。

(1) 標的遺伝子の発現抑制

15 *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA が、遺伝子組換えトウモロコシの茎の節間及び
葉で産生されていることがノーザンブロッティングにより確認された
(Paciorek et al., 2022 の Figure 1 (d), p3)。この *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA による
内在性の標的遺伝子の発現抑制を明らかにするため、*ZmGA20ox3* 遺伝子と
ZmGA20ox5 遺伝子の mRNA 発現量を、qRT-PCR を使用して測定した。その結
20 果、両標的遺伝子の発現抑制が試験に供試された茎の節間を含むほぼ全ての
組織で確認された (Paciorek et al., 2022 の Figure 2, p4 及び Figure S2)。
GA20ox_SUP の成熟 miRNA は茎の節間及び葉で多く産生されるが、ほぼ全ての
組織において様々なレベルで産生されている可能性があり、このことが、
茎の節間と葉に加え生殖組織でも確認された両標的遺伝子の発現抑制を説明
25 しないと考えられた。

また、標的遺伝子の発現抑制の特異性を実証するため、2つの標的遺伝子に
最も近い相同遺伝子である *ZmGA20ox1* 遺伝子の mRNA 発現量を、栄養組織及
び生殖組織で測定した。その結果、供試したほぼ全ての組織において
ZmGA20ox1 遺伝子の mRNA 発現量に統計学的に有意な影響は観察されなかつ
30 た (Paciorek et al., 2022 の Figure S3)。また、統計学的に有意な発現量の低下が

⁹ 組換え系統1として、*GA20ox_SUP*抑制カセットを有する本組換えトウモロコシと商業品
種とのハイブリッドを、組換え系統2として、*GA20ox_SUP*抑制カセットを有する実験系統
と商業品種とのハイブリッドを用いた。両系統は*GA20ox_SUP*抑制カセットのゲノムへの
挿入位置が異なる。なお、この商業品種には、Bt蛋白質 (改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry2Ab
蛋白質、Cry1A.105蛋白質及び改変Cry3Bb1蛋白質) 及び改変CP4 EPSPS蛋白質をコードする
遺伝子が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサー
ト耐性が付与されている。また、対照品種にも同じBt蛋白質及び改変CP4 EPSPS蛋白質を
コードする遺伝子が導入されている。

認められた組織も、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシのうち一方のみで認められたものであり、一貫した変化ではなかった。

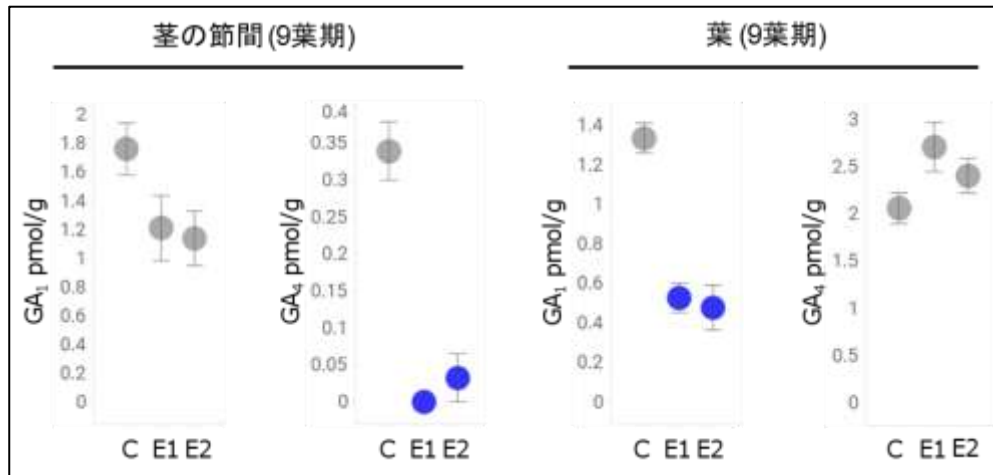
この結果により、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA による遺伝子発現抑制は、標的とする ZmGA20ox3 遺伝子及び
5 ZmGA20ox5 遺伝子に特異的であることが確認された (Paciorek et al., 2022)。

(2) 活性型 GA 含有量の低下

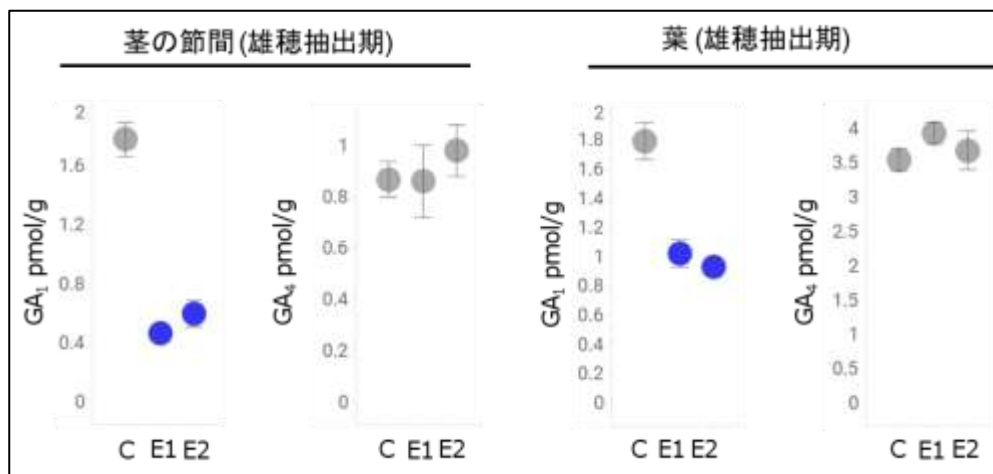
ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現抑制による内在性の主要な活性型 GA (GA₁ 及び GA₄) 含有量への影響を確認するため、栄養組織及び生殖
10 組織における GA₁ 及び GA₄ 含有量 (pmol/g) を分析した (Paciorek et al., 2022)。
その結果、栄養組織における GA₁ 含有量 (9 葉期の葉、雄穂抽出期の茎の節間と葉) 及び GA₄ 含有量 (9 葉期の茎の節間) では、2 系統の遺伝子組換えトウモ
ロコシにおいて、対照品種と比較して統計学的に有意な低下が認められた一
方 (図 7A 及び B, p25)、生殖組織 (花粉、絹糸、雄穂、雌穂及び穀粒) における
15 GA₁ 及び GA₄ 含有量ではそのような低下は認められなかった (図 8, p26)。

ZmGA20ox3 遺伝子と ZmGA20ox5 遺伝子の発現抑制が、試験に供試された茎の節間を含むほぼ全ての組織で確認された (3.-(1), p23) が、茎の節間と葉にお
いてのみ活性型 GA 含有量に統計学的に有意な低下が認められた。その理由と
して、①RTBV-1 プロモーターにより GA20ox_SUP 抑制カセットの転写が茎の
20 節間と葉における維管束組織においてより強く誘導されたこと、②
ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の mRNA 発現量は生殖組織と比べ茎
の節間と葉を含む栄養組織で高いため、茎の節間と葉では発現抑制の効果が
顕著に表れたこと、及び③GA20ox_SUP の成熟 miRNA により発現が抑制され
ない他の ZmGA20ox 遺伝子の機能により生殖組織における活性型 GA 含有量が
25 維持されたこと、が考えられた。

A



B



5

図7 遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種の栄養組織における GA₁ 及び GA₄含有量

分散分析 (ANOVA) を用いて解析し、ANOVA により算出された推定値を用いた T 検定により有意差検定を行った。遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを青色で示し、統計学的有意差が認められなかったものを灰色で示す。各組織の平均値、標準誤差は、米国イリノイ州のほ場で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算している (花粉：5 個体から採取した花粉を 1 サンプルとし 10 反復 ($n=10$)、他の組織はプロット当たり 3 個体を 1 サンプルとし 10 反復 ($n=10$))。エラーバーは標準誤差を表す。C - 対照品種、E1 - 組換え系統 1、E2 - 組換え系統 2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 3, p5 を改変

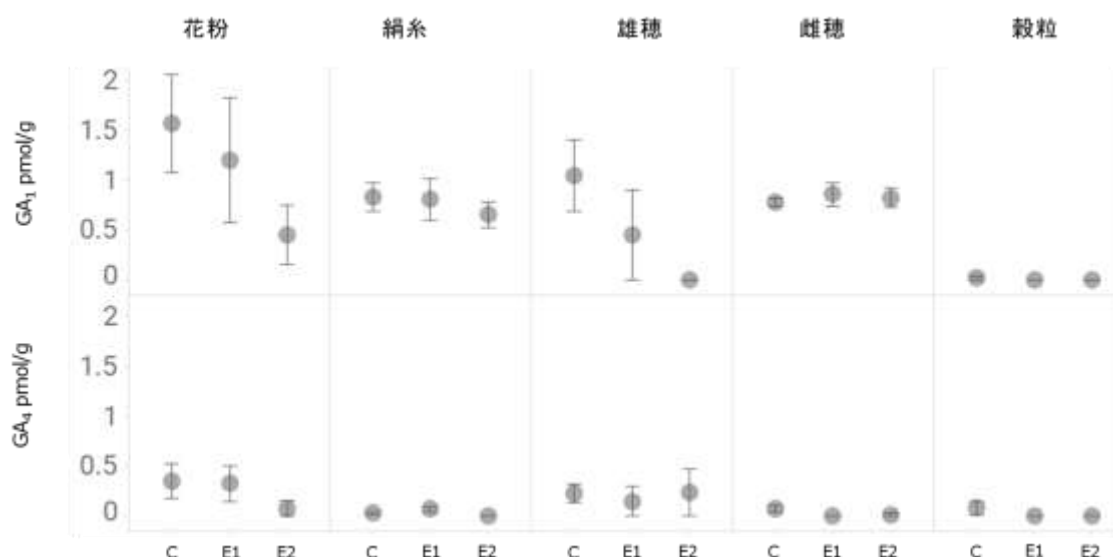


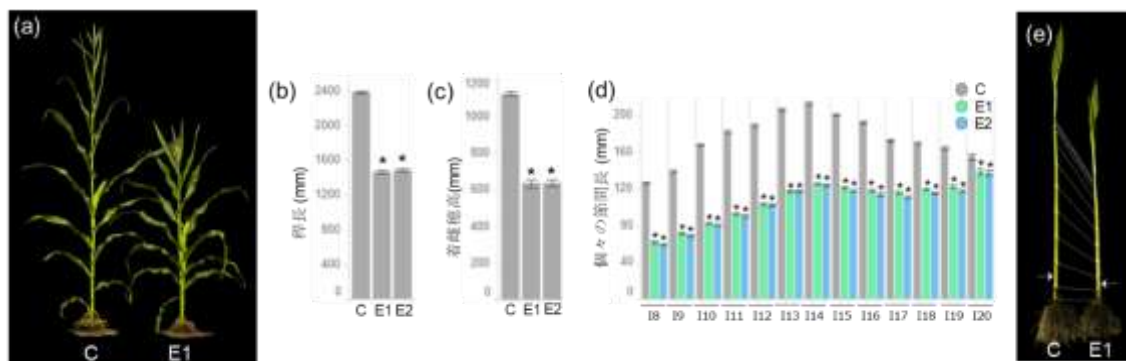
図8 遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種の生殖組織における GA₁ 及び GA₄ 含有量

- 5 分散分析 (ANOVA) を用いて解析し、ANOVA により算出された推定値を用いた T 検定により有意差検定を行った。このグラフに示している全ての値において、遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) は認められなかった。エラーバーは標準誤差を表す。各組織の平均値、標準誤差は、米国イリノイ州のほ場で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算している (花粉：5 個体から採取した花粉を 1 サンプルとし 10 反復 ($n=10$)、他の組織はプロット当たり 3 個体を 1 サンプルとし 10 反復 ($n=10$))。C - 対照品種、E1 - 組換え系統 1、E2 - 組換え系統 2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure S4 を改変

15 (3) 短稈化

茎の節間における活性型 GA 含有量の低下による表現型での意図した変化 (短稈) を確認するため、R2 生育段階での茎の節間長、着雌穂高及び稈長を測定した。その結果、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシは、いずれも対照品種と比較して、茎の節間長が縮まり稈長が約 3 分の 2 になっていること (図 9 (b), p27) 及び稈長が短くなることに伴い着雌穂高も低くなっていることが確認された (図 9 (c), p27)。なお、節間数と着雌穂節位に変化は認められなかったことから、遺伝子組換えトウモロコシの茎における器官形成に変化はなかったことが示された (Paciorek et al., 2022)。



5 図9 遺伝子組換えトウモロコシの形態特性 (米国イリノイ州ジャージービル (ILJE) のほ場で栽培)

R2 生育段階における遺伝子組換えトウモロコシと対照品種の (a) 代表的イメージ画像、
 (b) 稈長、(c) 着雌穂高及び (d) 個々の節間長の比較。(e) V9 生育段階における遺伝子組
 換えトウモロコシと対照品種の代表的イメージ画像。(b)、(c) 及び (d) におけるアスタ
 リスクは、遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) が
 認められたことを示し、エラーバーは標準誤差を表す。(d) における I8~I20 は、連続す
 10 る節間の番号付けを示す。(e) における破線は同じ節を示し、矢印は細胞レベルの検証
 に使用された節間を示す。C -対照品種、E1 -組換え系統 1、E2 -組換え系統 2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 4, p5 及び Figure 6, p7 を改変

15

上記の表現型における節間長の変化のメカニズムを細胞レベルで検証する
 ため、V9 生育段階における節間 (図 9 (e), p27) の表皮細胞及び柔細胞の縦幅を
 測定した。その結果、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシは、いずれも対照品
 種と比較して、両細胞の縦幅がともに減少していることが確認された
 20 (Paciorek et al., 2022 の Figure 6 (d) 及び (e), p7)。これらの結果は、両細胞の縦
 幅の減少が個々の節間長を縮め、その結果、植物全体の稈長が短くなったこ
 とを示唆している (Paciorek et al., 2022)。また、この細胞レベルの観察結果は、
 GA 欠損変異体で報告された他の研究結果と一致している (Huang et al., 2010;
 25 Liu et al., 2018; Chen et al., 2019)。このことは、GA 依存性細胞伸長の抑制が、
 個々の節間長を縮めることに寄与する主要なメカニズムであり、それが短稈
 に繋がることを示唆している。

上述した活性型 GA 含有量の低下による意図した変化である短稈に加えて、①その他の栄養組織及び②生殖組織において、意図していない変化が生じていないことを確認するため、GA との関連性が報告されている特性を中心に調査した。

5

① その他の栄養組織における変化

3.-(2) (p22) に記載したように、茎の節間に加えて、遺伝子組換えトウモロコシの葉においても活性型 GA 含有量の低下が認められたことから (図 7A 及び B, p25)、葉の表現型への影響を確認するために葉幅、葉長、総葉面積及び葉の総数を測定した。その結果、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシは、いずれも対照品種と比較して、葉幅がわずかに増加し、葉長が短くなっていることが確認された (Paciorek et al., 2022 の Figure 4 (j) 及び (i), p5)。他方、総葉面積及び葉の総数に変化は認められなかった (Paciorek et al., 2022 の Figure 4 (k) 及び (e), p5)。

15

また、トウモロコシにおいて GA 処理は分げつの程度に影響を与える可能性があり (Rood, 1985)、トウモロコシの GA シグナル伝達変異体では分げつの増加が報告されている (Cassani et al., 2009)。しかし、遺伝子組換えトウモロコシを 2019 年と 2020 年に米国のほ場で試験栽培した結果、分げつの程度に一貫した差異は認められなかった (Paciorek et al., 2022)。

20

② 生殖組織における変化

3.-(2) (p24) に記載したように、遺伝子組換えトウモロコシの生殖組織において活性型 GA 含有量の変化は認められず (図 8, p26)、また、両性花は生じることなく雌穂は正常な形態を示していることが確認された (図 10, p29)。さらに、遺伝子組換えトウモロコシにおける生殖成長特性と収量構成要素への影響を評価するため、雄穂抽出期及び絹糸抽出期、雌穂面積、雌穂径、雌穂長、穀粒数、一粒重を測定した。その結果、ほぼ全ての項目において、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的に有意な変化はなく、一部有意な変化が認められた項目 (絹糸抽出期、雌穂面積、雌穂長、一粒重) においても、ほ場間で一貫した差異は認められなかった (表 2 の (a) 及び (b), p30)。

30

また、2 系統の遺伝子組換えトウモロコシの苗立ち数は、対照品種と同等であり (Paciorek et al., 2022 の Figure S7)、正常な発芽を示した。

35

以上のことから、遺伝子組換えトウモロコシでは、表皮細胞と柔細胞の縦幅の減少が個々の節間長を縮め、その結果、稈長が短くなったと考えられる。また、葉幅及び葉長の変化が生じたものの、葉においても活性型 GA 含有量の低下が認められていたことから、係る変化は予想されたものであり、また、総葉面積に影響を与えなかった。一方で、生殖組織において意図しない形態変化は認められなかった。

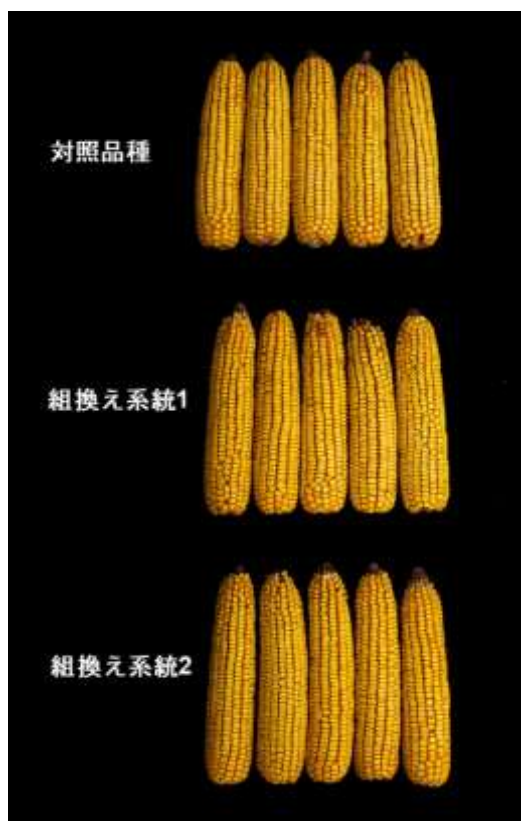


図 10 ほ場で育てた対照品種と 2 系統の遺伝子組換えトウモロコシから採取された R6 生育段階における雌穂の形態

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure S6 を改変

表 2 2 か所のは場で育てた遺伝子組換えトウモロコシの生殖成長特性と第一雌穂の収量構成要素

(a)					
特性	場所	系統	組換え系統の 平均値	対照品種の 平均値	p-値
雄穂抽出 期 (日数)	ILJE	E1	68.3	68.5	0.651
		E2	68.0	68.5	0.212
	ILMN	E1	66.7	66.5	0.679
		E2	65.8	66.5	0.512
絹糸抽出 期 (日数)	ILJE	E1	68.0	68.0	0.955
		E2	67.8	68.0	0.657
	ILMN	E1	66.0	66.9	0.292
		E2	64.5	66.9	0.048*

(b)					
特性	場所	系統	組換え系統の 平均値	対照品種の 平均値	p-値
雌穂面積 (cm ²)	ILJE	E1	83.9	81.0	0.045*
		E2	83.1	81.0	0.122
	ILMN	E1	87.5	86.8	0.720
		E2	83.7	86.8	0.195
雌穂径 (cm)	ILJE	E1	5.3	5.3	0.874
		E2	5.2	5.3	0.906
	ILMN	E1	5.2	5.1	0.478
		E2	5.1	5.1	0.579
雌穂長 (cm)	ILJE	E1	18.9	18.3	0.008*
		E2	18.7	18.3	0.080
	ILMN	E1	19.8	19.6	0.605
		E2	19.1	19.6	0.214
穀粒数	ILJE	E1	587.4	602.2	0.572
		E2	624.2	602.2	0.435
	ILMN	E1	696.6	662.8	0.177
		E2	652.0	662.8	0.698
一粒重 (mg)	ILJE	E1	387.3	364.7	0.078
		E2	355.8	364.7	0.513
	ILMN	E1	329.2	345.2	0.013*
		E2	336.1	345.2	0.198

- 5 (a) 播種から 50%の個体で雄穂抽出が観察された日までの日数及び播種から 50%の個体で絹糸抽出が観察された日までの日数、(b) 遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種における収量構成要素の特性。

雌穂面積：一方向から撮影した画像の表面積で、穀粒がついた領域と穀粒がつかなかった領域の両方を含む、雌穂に属する全てのピクセルの面積。雌穂径：識別された最も長い雌穂の垂直軸のセンチメートル単位の距離。雌穂長：識別された最も長い雌穂の水平軸のセンチメートル単位の距離

- 10

アスタリスクは、対照品種と遺伝子組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差 ($p<0.05$) が認められたことを示す。ILJE：米国イリノイ州ジャージービル、ILMN：米国イリノイ州モンマス、E1 -組換え系統 1、E2 -組換え系統 2。

- 15 出典: Paciorek et al. (2022) の Table 1, p6 を改変

4. 本組換えトウモロコシの *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA が半矮性を付与する作用機序のまとめ

20

GA20ox_SUP の成熟 miRNA の産生から短稈にいたる作用機序を以下にまとめた。*GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する (3.-(1), p23~24)。この抑制によって、茎における活性型 GA 含

有量が低下することにより (3.-(2), p24~26)、茎の節間における表皮細胞と柔細胞の縦幅が減少し、節間が狭まった結果、稈長が短くなる (3.-(3), p26~27)。

また、茎の節間に加えて、葉においても GA₁ 含有量の低下が認められ、葉幅のわずかな増加と葉長の縮小が観察されたものの (3.-(3)-①, p28)、GA は細胞分裂及び細胞伸長も促進することが知られており、GA₁ 含有量の低下が認められた葉において、係る変化は予想されたものであり、また、総葉面積に影響を与えなかった。

なお、上述したように、遺伝子組換えトウモロコシでは、生殖組織における活性型 GA 含有量の変化は認められず (3.-(2), p24)、生殖成長特性と収量構成要素のいずれにおいても、対照品種との間に一貫した差異は認められていない (3.-(3)-②, p28~30)。

以上のことから、GA20ox_SUP 抑制カセットは、GA20ox_SUP の成熟 miRNA の産生により、茎における活性型 GA 含有量を低下させることで、意図した半矮性 (短稈) を付与すると考えられた。また、葉幅及び葉長の変化が認められたが、係る変化も GA20ox_SUP の成熟 miRNA の産生により葉における活性型 GA 含有量が低下したことによるものと考察された。一方で、GA20ox_SUP 抑制カセットは生殖組織における形態変化を起こさないことも確認された。

なお、miRNAを含むRNAがアレルギー性や毒性をもつという報告はなく、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品局 (FDA) により GRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている (FAO-WHO, 1991; U.S. FDA, 1992)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

GA は、成長に関わる重要な植物ホルモンであり、茎伸長、種子発芽、葉の生育、花成等、様々な植物の発生過程の調節に関与している (Achard and Genschik, 2009; Nelissen et al., 2012)。GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、GA 生合成経路の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現を特異的に抑制する。そのため、影響を受ける代謝系はトウモロコシ内在性 ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子に関与する既存の GA 生合成経路

であると考えられる。実際に、これらの標的遺伝子の発現抑制により活性型 GA 含有量が低下した栄養組織では、節間や稈長が短くなり、葉幅と葉長に変化が認められたが、活性型 GA 含有量の変化が認められなかった生殖組織においては、生殖成長特性と収量構成要素に一貫した差異は認められていない。

- 5 なお、GA20 酸化酵素 (GA20ox) は活性型 GA 含有量を決定する重要な酵素であるため (Oikawa et al., 2004)、イネやトウモロコシの GA 変異体で示されているように GA20ox 遺伝子ファミリーが影響を受けた場合、GA 前駆体の含有量に変化することが考えられる (Spielmeyer et al., 2002; Zhang et al., 2020)。しかし、GA 前駆体は生理活性をもたず、生理活性をもつためには、活性型 GA に変換される必要がある (Hedden and Phillips, 2000; Olszewski et al., 2002; Sponsel, 2003)。そのため、GA 前駆体の含有量の変化による代謝系への影響は活性型 GA 含有量の変化による影響に包含されると考えられる。

- 15 また、上述したように、GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を特異的に抑制するように設計されており、標的遺伝子に最も近い相同遺伝子である *ZmGA20ox1* 遺伝子の mRNA 発現量に影響がないことが確認されている。

- 20 さらに、トウモロコシの転写産物データベース¹⁰を用いて、トウモロコシ中の転写産物の配列と GA20ox_SUP の成熟 miRNA との間で相同性検索¹¹を行った。その結果、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の転写産物¹²以外のトウモロコシ由来の転写産物には、GA20ox_SUP の成熟 miRNA により発現が抑制され得る他の配列は存在しないことが確認された (別添資料 1)。

そのため、標的遺伝子以外の宿主の遺伝子の発現を抑制することはないと考

¹⁰ NCBI に登録されているトウモロコシの転写産物 (GCF_902167145.1_Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0_cds_from_genomic.fna、ダウンロード日: 2020年9月3日) から抽出されたデータベースであり、57,578の配列を含む。

¹¹ 基準: ①ギャップがない場合のミスマッチ数は4つ以下、又はギャップ(2つ以上不可)がある場合のミスマッチ数は3つ以下。②G: Uペアリングは「2分の1」のミスマッチと見なすが、係るミスマッチ数は5つ以下。③GA20ox_SUPの成熟miRNA自体の配列及び同配列に相同する領域配列にあるギャップ数は1つ以下。④ギャップは1塩基長以下。⑤GA20ox_SUPの成熟miRNA配列の10番目及び11番目の塩基におけるミスマッチ又はギャップは不可。⑥GA20ox_SUPの成熟miRNAの5'末端側最初の12塩基におけるミスマッチ数は2つ (又は1つのミスマッチと1つのギャップ) 以下。⑦ViennaRNA-2.4.18 (Lorenz et al., 2011) を使用して計算した場合に、GA20ox_SUPの成熟miRNAの配列及びその相同配列で構成された二重鎖の最小自由エネルギーを、GA20ox_SUPの成熟miRNAの配列及びその完全相同配列で構成された二重鎖の最小自由エネルギーで割った値は0.75より大。

¹² NCBIデータベースで特定されたジベレリン20酸化酵素3及び4の配列は、それぞれ MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>) のジベレリン20酸化酵素5及び3の配列と同一である。そのため、本文で記載の*ZmGA20ox3*遺伝子がコードするジベレリン20酸化酵素3は、別添資料 1ではジベレリン20酸化酵素4と記載されている。同様に、本文で記載の*ZmGA20ox5*遺伝子がコードするジベレリン20酸化酵素5は、別添資料 1ではジベレリン20酸化酵素3と記載されている。

えられた。

以上のことから、GA20ox_SUPの成熟miRNAの産生によって既存のGA生合成経路における代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるものではないと考えられた。

5

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10

本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) 等をもとに構築した。詳細を表 1 (p12~14) に記載した。

15

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

20

本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の全塩基数は 10,078 bp である。なお、PV-ZMAP527892 の塩基配列を別添資料 2 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

25

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

30

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5

宿主内に移入された PV-ZMAP527892 の構成要素を表 1 (p12~14) 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 1 (p11) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10

PV-ZMAP527892 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 HCL301 の成熟胚細胞に導入した。

15 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

20

非組換えトウモロコシ品種 HCL301 の成熟胚と PV-ZMAP527892 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB32 株を共存培養した後、除草剤グリホサートを含む培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

25

カルベニシリン、セフトキシム及びチメンチ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 F₄ 世代の種子¹³において、形質転換に用いた PV-ZMAP527892 の外側骨格領域を標的とした PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMAP527892 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 3 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を確認した。

30

¹³ 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に用いた。

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

5 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 (HCL301 Cre 系統) と交配し、Cre/lox 法¹⁴により、T-DNA 領域から選抜マーカーカセット領域 (P-*Ract1*、I-*Ract1*、
10 TS-CTP2、CS-*cp4 epsps*、T-*nos* 及び *loxP* 配列の 1 つ) 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、
15 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, p37)。 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。

本組換えトウモロコシの育成図を図 11 (p36) 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。

20

¹⁴ 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

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図 11 本組換えトウモロコシの育成図

25

【社外秘につき非開示】

30

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 本組換えトウモロコシの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 F₄ 世代を供試してバイオインフォマティクス
解析を行った (別添資料 4)。この解析では、本組換えトウモロコシの導入遺
伝子の 5'及び 3'末端近傍配列をクエリー配列として、FASTA 型アルゴリズム
10 によりトウモロコシのゲノムデータベース (ZMA_2022¹⁵) に対して相同性検
索を行った。その結果、本組換えトウモロコシの導入遺伝子はゲノムの 1 番
染色体に座乗していることを確認した (別添資料 4 の Figure 2, p10)。

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

15 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、NGS 解析¹⁶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 5)。

20 NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150 bp
ずつの塩基配列 (リード) を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度¹⁷75 以上) で
解析している。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから
抽出したゲノムを NGS 解析に供試した結果、本組換えトウモロコシ (F₄ 世代)
25 で 277.0 Gb (冗長度平均値 156)、対照の非組換えトウモロコシで 212.1 Gb (冗
長度平均値 102) の塩基配列が解析された (別添資料 5 の Appendix Table 3, p43)。

本組換えトウモロコシ (F₄ 世代) に由来するリードを PV-ZMAP527892 の塩

¹⁵ ZMA_2022: トウモロコシのリファレンスゲノム (GenBank *Zea mays* reference genome, GCF_902167145.1_Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0、ダウンロード日: 2022年1月18日) から抽出されたデータベースである。

¹⁶ NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロット法と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS解析においては、フラグメント化した大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及び配列並びに非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

¹⁷ 冗長度: ある特定の塩基に対して独立してシーケンスされた回数。冗長度が 75 以上であれば全ての導入遺伝子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、推定平均冗長度が 75 以上になる条件で解析を行っている。

基配列とアライメント¹⁸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が確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 5, p49)。さらに、意図する T-DNA 領域に大量のリードがマッピングされた一方で、外側骨格領域には少数のリードのみがマッピングされた (別添資料 5 の Appendix Figure 5, p49)。

5 このうち、*P-Ract1* 領域における複数のリードのマッピング及び *I-Hsp70* 領域に見られる冗長さの増加は、同様の結果が、対照の非組換えトウモロコシ HCL301 系統を PV-ZMAP527892 の塩基配列に対して照合した場合にも確認されており (別添資料 5 の Appendix Figure 18, p75)、PV-ZMAP527892 の塩基配列とトウモロコシ内在性塩基配列の一致によるものであって、この領域に

10 おける導入遺伝子内での重複を示すものではないと考えられた。また、左側境界配列 (B-Left Border Region) においてマッピングされたリード (別添資料 5 の Appendix Figure 5, p49) は、少数かつ不均一であり、また接合領域の存在を示すような配列情報も有していなかったことから、T-DNA 領域の二次的な挿入を示すものではないと考えられた。さらに、*OR-ori-pBR322* 領域等においてわずかなリードがマッピングされたが、このリードの検出は、ゲノム

15 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マッピング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は PV-ZMAP527892 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことを確認

20 した。

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 5 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 5 の Appendix Figure 37, p94~95 , 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 5 の p29)。

25

続いて、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 の配列が、本組換えトウモロコシに挿入されていないことを確認するため、本組換えトウモロコシ (F₄ 世代) に由来するリードを PV-ZMOO513642 (別添資料 5 の Appendix Figure 2, p46) の塩基配列と照合した。その結果、左側境界配列 (B-Left Border Region)

30

¹⁸ Bowtie2 v2.3.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012) を使用して、解析した塩基配列をアライメントした。Bowtie2でフラグメントの片側の配列に対するアライメントを行う場合、30 bp 以上の相同性を検出基準としている。

において一定数のリードが、*P-Ract1* 領域において少数のリードが、*OR-ori-pBR322* 領域及び *Intervening sequence* 領域 (DNA クローニングの際に利用された配列) においてわずかなリードがそれぞれマッピングされた (別添資料 5 の Appendix Figure 6, p50)。これらのうち、左側境界配列におけるマッピングは、
5 *PV-ZMAP527892* と *PV-ZMOO513642* が共通の左側境界配列を有していることから、予想されたものであった。また、*P-Ract1* 領域におけるマッピングは、対照の非組換えトウモロコシ HCL301 系統と *PV-ZMOO513642* を照合した場合にも確認されており (別添資料 5 の Appendix Figure 20, p77)、トウモロコシ内在性配列との一致を示すものと考えられた。また、*OR-ori-pBR322* 領域等におけるマッピングは、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マッピング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は *PV-ZMOO513642* に由来する配列は存在しないことを確認した。

15 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。

20 また、本組換えトウモロコシ (F_4 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 5 の Appendix Figure 8, p52~53 及び Appendix Figure 9, p54~64, 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 12
25 (p40) に示した。

さらに計 5 世代¹⁹ (図 11 の注釈 2, p36) 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 5 の p34)。

¹⁹ 別添資料 5 においては F_4 、 F_4F_1 、 F_5 、 F_5F_1 及び F_6 と表記されている。

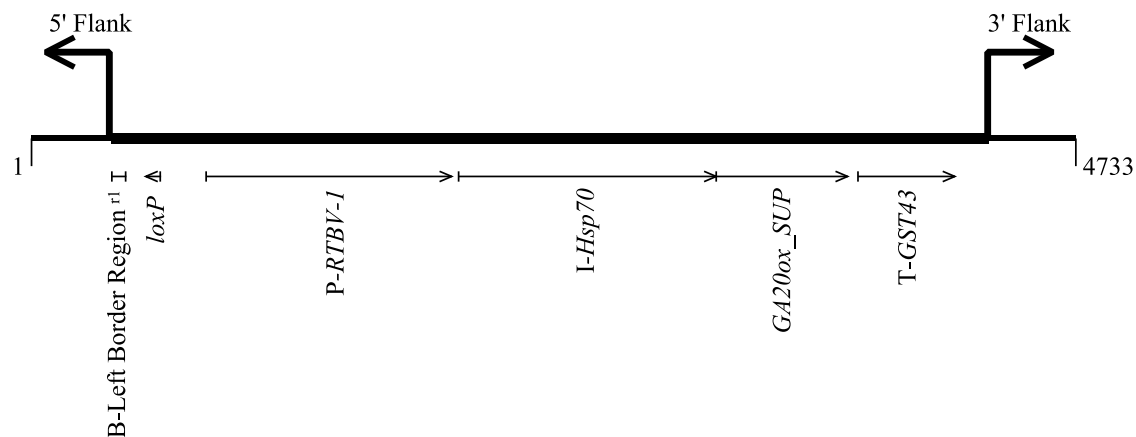


図 12 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図²⁰

- 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している。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の導入遺伝子は **PV-ZMAP527892** 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-Left Border Region** が **PV-ZMAP527892** と比較して短くなっていることを意味する。また、本組換えトウモロコシに **B-Right Border Region** は導入されていない。

10

²⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーのため該当しない (別添資料 5 の p29)。

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計 5 世代²¹ (図 11 の注釈 3, p36) の葉において GA20ox_SUP 抑制カセットの転写産物 (GA20ox_SUP の pri-miRNA 及び成熟 miRNA) が安定して産生されていることを、ノーザンブロットイングにより確認した (別添資料 6 の Figure 3 及び Figure 4, p20~21)。

15 また、本組換えトウモロコシの F₁ 世代 (図 11 の注釈 6, p36) における GA20ox_SUP の pri-miRNA 及び成熟 miRNA の部位別の産生を半定量的ノーザンブロットイングにより測定した (別添資料 7)。試験には、葉、根、茎、地上部及び穀粒を供試した。このうち、葉、根、茎及び地上部は 2021 年に米国で行った温室試験において採取し、穀粒は 2019/2020 年に米国の 1 か所 (ハワイ州) のほ場から採取した。

20 その結果、本組換えトウモロコシの葉、根、茎及び地上部においては、GA20ox_SUP の pri-miRNA の予想サイズである約 0.9 kb のバンド及び GA20ox_SUP の成熟 miRNA の予想サイズである約 21 塩基のバンドを検出し (表 3, p42)、GA20ox_SUP の pri-miRNA 及び成熟 miRNA がともに産生されていることを確認した。また、本組換えトウモロコシの穀粒においては、約 0.9 kb
25 のバンドを検出せず、約 21 塩基のバンドのみ検出した (表 3, p42)。

²¹ 別添資料 6においてはF4、F4F1、F5、F5F1及びF6と表記されている。

表 3 半定量的ノーザンブロッティングによる本組換えトウモロコシにおける *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物の発現解析 (要約)²²

転写産物 (予想サイズ)	組織	生育段階	転写産物の検出の有無 (約 10 µg の総 RNA 当 たりのバンドの強度)	参照図 (いずれも別添 資料 7 内の図)
GA20ox_SUP の pri-miRNA (約 0.9 kb)	葉	3~4 葉期	有 (10 pg ~ 25 pg の間)	Figure 2A のレ ーン 4, p26
	根	3~4 葉期	有 (5 pg ~ 10 pg の間)	Figure 4A のレ ーン 4, p28
	茎	10~12 葉期	有 (50 pg ~ 75 pg の間)	Figure 6A のレ ーン 4, p30
	地上部	黄熟期	有 (25 pg ~ 50 pg の間)	Figure 8A のレ ーン 4, p32
	穀粒	成熟期	無 (5 pg 未満)	Figure 10A の レーン 4, p34
GA20ox_SUP の 成熟 miRNA (約 21 塩基)	葉	3~4 葉期	有 (10 pg ~ 25 pg の間)	Figure 3A のレ ーン 2, p27
	根	3~4 葉期	有 (2.5 pg ~ 5 pg の間)	Figure 5A のレ ーン 2, p29
	茎	10~12 葉期	有 (25 pg ~ 50 pg の間)	Figure 7A のレ ーン 2, p31
	地上部	黄熟期	有 (10 pg ~ 25 pg の間)	Figure 9A のレ ーン 2, p33
	穀粒	成熟期	有 (2.5 pg ~ 5 pg の間)	Figure 11A の レーン 2, p35

²² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、Real-Time Quantitative TaqMan PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 8; 別添資料 9)。

15 本 PCR 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% である (別添資料 9, p4, p10~11)。

本 PCR 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 9)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

25 第一の 2-(1)-ロ-②-4 (p30~31) に記載のとおり、本組換えトウモロコシに導入された GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、標的の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現を抑制する。これにより、茎の活性型 GA 含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して節間が狭まり、その結果、本組換えトウモロコシの稈長が短くなる。また、葉における活性型 GA 含有量の低下により、葉幅がわずかに増加し葉長が短くなるものの、係る変化は総葉面積に影響を与えない。

30

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²³

5 本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 HCL301 であり、GA20ox_SUP 抑制カセットが導入されている。

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。

10

2023 年から 2024 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 F₁ 世代 (図 11 の注釈 7, p36) を供試した。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 HCL301 × 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, p45) は、2023 年にバイエルグループ (米国) の人工気象室において実施した。

15

20

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。

25

その結果、本組換えトウモロコシへの付与を意図した形質である短稈 (本組換えトウモロコシ: 146.6 cm、対照の非組換えトウモロコシ: 225.7 cm) 及びそれに伴う着雌穂高の低下 (本組換えトウモロコシ: 60.3 cm、対照の非組換えトウモロコシ: 106.6 cm) が認められた (別添資料 10 の表 3, p10)。一方で、意図した形質に関連しない収穫期の地上部重においては、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別

30

²³ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

添資料 10 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 10 の表 3, p10)。

- 5 よって、本隔離ほ場試験においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に、意図した形質に関わる項目を除き、形態及び生育の特性に関する項目に差異は確認されなかった。

b 生育初期における低温耐性

10

生育初期における低温耐性試験は、米国のバイエルグループの人工気象室において実施した。生育初期における低温耐性を比較するために、3 葉期の本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種 4 品種の幼苗を日中 12°C/夜間 5°C に設定した人工気象室で栽培した。低温処理開始後 11 日目及び 19 日目に草丈を調査するとともに、低温処理開始後 19 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。

- 15 その結果、処理前、低温処理後 11 日目、低温処理後 19 日目の草丈において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた。処理前の草丈の平均値は本組換えトウモロコシが 10.5 cm、対照の非組換えトウモロコシが 12.6 cm、低温処理後 11 日目の草丈の平均値は本組換えトウモロコシが 14.1 cm、対照の非組換えトウモロコシが 16.8 cm、低温処理後 19 日目の草丈の平均値は本組換えトウモロコシが 15.7 cm、対照の非組換えトウモロコシが 17.3 cm であり、いずれも本組換えトウモロコシの方が低かった (別添資料 11 の Table 3~Table 4, p11~12)。

- 25 また、乾燥重においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の Table 4, p12)。

c 成体の越冬性

30

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 (2024 年 1 月 9 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 10 の図 5, p11)。

35

d 花粉の稔性及びサイズ

本隔離ほ場で生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから採取した花粉を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と対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の図 6 及び表 4, p12)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

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、有効雌穂数を除く項目について統計解析を行ったところ、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 5, p14)。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。

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 10 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 10 の表 5, p14)。

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 13 日目の種子をシャーレ上に静置し、25°C に設定した恒温器内での発芽種子数を計測した。

- 5 その結果、収穫種子の発芽率において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 5, p14)。

f 交雑率

10

我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は自生していないため、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、鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率においてのみ、本組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌と対照の非組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌との間に統計学的有意差が認められた (別添資料 10 の表 6~8, p16)。発芽率の平均値は、本組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌が 100%、対照の非組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌が 94.2%であり、本組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌の方が高い値を示した。
- 25

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

- 30 (1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

—

5

(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

—

10

(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。

15

(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

—

20

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は表 4 (p49) のとおりである。

25

表 4 本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況²⁴

2024 年 9 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	2022年7月	2024年2月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2022年7月	2024年2月
米国農務省 (USDA)	環境	2022年5月	2023年6月 ²⁵
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2023年1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	2023年8月	—

5 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 5, p49)。

表 5 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²⁶

2024 年 9 月現在			
機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²⁷	2024年後半	—
農林水産省	飼料 ²⁸	2023年10月	—
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程：隔離ほ場)	2022年4月	2023年5月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程：一般使用)	2024年7月	—

10

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

²⁵ 米国農務省 (USDA) による規制ステータス評価 (Regulatory Status Review) の第一段階 (RSRステップ1) の結果、規制対象にあたらないと判断された。

²⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²⁷ 食品衛生法に基づく。

²⁸ 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²⁹

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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)。

本組換えトウモロコシには、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA により、茎における活性型 GA 含有量が低下することで、半矮性 (短稈) が付与されている。また、第一の 2-(1)-ロ-②-3-(3)-① (p28) に記載したとおり、茎と同様に活性型 GA 含有量が低下した葉組織では、葉幅がわずかに増加し葉長が短くなるが、総葉面積に影響はない。

この2つの形態変化のうち、半矮性 (短稈) により、本組換えトウモロコシでは、強風条件下等におけるほ場内での倒伏被害が軽減される。しかし、短稈は前述した自生能力に必須の特性 (種子の脱粒性、休眠性) に関与する形質ではない。このことから、この半矮性を付与されたことのみが要因で、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、我が国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生することを可能にするとは考えにくい。また、葉組織において認められた変化については、総葉面積に影響はないため、本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

なお、GA は種子の発芽を促進するため、種子における活性型 GA 含有量が低下している場合には種子の休眠性が高まる可能性がある。しかし、GA20ox_SUP 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシの穀粒では、

²⁹ 本項目中で、第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

活性型 GA 含有量に統計学的に有意な低下は認められなかったことから、本組換えトウモロコシの種子の休眠性は高まらないと考えられた。

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調査した結果(第一の 2-(6)-②-a, c~e, p44~46)、本組換えトウモロコシへの付与を意図した形質である短稈及びそれに伴う着雌穂高の低下が認められた。一方で、意図した形質に関連しないそれ以外の項目においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった。

また、生育初期における低温耐性(第一の 2-(6)-②-b, p45)をバイエルグループ(米国)の人工気象室にて調査した結果、草丈において、処理前、低温処理後 11 日目及び低温処理後 19 日目に、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められ、いずれも本組換えトウモロコシの方が低かった。第一の 2-(1)-ロ-②-3-(2) (p24~25)に記載のとおり、GA20ox_SUP 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシでは、栄養組織における活性型 GA 含有量の低下が認められているため、これらの本組換えトウモロコシにおける草丈の低下は、予想されたものである。また、乾燥重においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

よって、本隔離ほ場試験及び人工気象室での調査においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に、本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まっていることを示す差異は確認されなかった。

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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

2 有害物質の産生性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは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。

15 第一の 2-(1)-ロ-③ (p31~33) に記載のとおり、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて GA 生合成経路の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現を特異的に抑制する。そのため、影響を受ける代謝系はトウモロコシ内在性 ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子が関与する既存の GA 生合成経路であると考えられた。実際に、これらの標的遺伝子の抑制により活性型 GA 含有量が低下した栄養組織では、節間や稈長が短くなり、葉幅と葉長に変化が認められたが、活性型 GA 含有量の変化が認められない生殖組織においては、生殖成長特性と収量構成要素のいずれにおいても一貫した差異は認められなかった。

25 また、本組換えトウモロコシが産生する GA20ox_SUP の成熟 miRNA については、ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の転写産物以外にはトウモロコシ内在性転写産物の配列との間に相同性が認められなかったことから、宿主であるトウモロコシの上記標的遺伝子以外の遺伝子の発現を抑制して標的以外の代謝系を変化させることはないと考えられた (第一の 2-(1)-ロ-③, 30 p31~33)。

以上のことから、GA20ox_SUP の成熟 miRNA の産生によって既存の GA 生合成経路における代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるものではないと考えられた。

35 よって、導入した GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

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、隔離ほ場試験において、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った (第一の 2-(6)-②-g, p47) 結果、鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率を除く全ての項目において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。加えて、鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率で認められた統計学的有意差についても、本組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌 (平均値 100%) の方が、対照の非組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌 (同 94.2%) に比べて高い値を示したことから、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。

したがって、本隔離ほ場試験においては、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性を示唆するような差異は確認されなかった。

以上のことから、有害物質の産生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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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。

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

5 トウモロコシと交雑可能な近縁種は *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* 属の自生は報告されていない。

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある
野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

10

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本組換えトウモロコシは、交雑性に起因する生物多様性
影響を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

25

—

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、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA により半矮性 (短稈) が付与されている。しかし、半矮性は前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、この半矮性を付与されたことのみが要因で、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、我が国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生することを可能にするとは考えにくい。

- 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、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調査した結果、本組換えトウモロコシへの付与を意図した形質である短稈及びそれに伴う着雌穂高の低下が認められた。一方で、意図した形質に関連しないそれ以外の項目に関して統計学的有意差や違いは認められなかった。また、生育初期における低温耐性を調査した結果、処理前、
20 低温処理後 11 日目及び低温処理後 19 日目の草丈は、いずれも本組換えトウモロコシの方が低く、栄養組織における活性型 GA 含有量の低下に起因すると考えられた。乾燥重においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

- 25 よって、本隔離ほ場試験及び人工気象室での調査においては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に、本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まっていることを示す差異は確認されなかった。

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。

- 30 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。

- 35 GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、トウモロコシ内在性の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現を特異的に抑制するように設計されている。

また、本組換えトウモロコシが産生する GA20ox_SUP の成熟 miRNA につい

ては、トウモロコシ内在性転写産物の配列との間に相同性が認められなかったことから、宿主であるトウモロコシの上記標的遺伝子以外の遺伝子の発現を抑制して標的以外の代謝系を変化させることはないと考えられた。

5 以上のことから、GA20ox_SUPの成熟miRNAの産生により、新規の代謝産物が生じるものではないと考えられた。

よって、導入したGA20ox_SUP抑制カセットから産生されるGA20ox_SUPの成熟miRNAが原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

10 実際に、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結果、鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率を除く全ての項目において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められず、加えて、鋤込み試験におけるハツカダイコンの発芽率で認められた統計学的有意差についても、本組換えトウモロコシの地上部を鋤き込んだ土壌の方が、対照の非組換えトウモロコシを鋤き込んだ土壌に比べて高い発芽率を示したことから、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。

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。

20

交雑性：

我が国において、トウモロコシと交雑可能な近縁野生種の自生について報告はないため、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物種等は特定されなかった。

25

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。

30 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

- Achard, P. and P. Genschik. 2009. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* 60: 1085-1092.
- Allen, E., Z. Xie, A.M. Gustafson and J.C. Carrington. 2005. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Awale, P. and P. McSteen. 2023. Hormonal regulation of inflorescence and intercalary meristems in grasses. *Current Opinion in Plant Biology* 76: 102451.
- 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.
- Bensen, R.J., G.S. Johal, V.C. Crane, J.T. Tossberg, P.S. Schnable, R.B. Meeley and S.P. Briggs. 1995. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *The Plant Cell* 7: 75-84.
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Binenbaum, J., R. Weinstain and E. Shani. 2018. Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends in Plant Science* 23: 410-421.
- Borges, F. and R.A. Martienssen. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Molecular Cell Biology* 16: 727-741.
- Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and

siRNAs. *Cell* 136: 642-655.

Cassani, E., E. Bertolini, F. Cerino Badone, M. Landoni, D. Gavina, A. Sirizzotti and R. Pilu. 2009. Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the *dwarf8* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement* 24: 375-385.

CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].

Chen, Y., M. Hou, L.J. Liu, S. Wu, Y. Shen, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D.R. McCarty and B. Tan. 2014. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiology* 166: 2028-2039.

Chen, Z., Y. Liu, Y. Yin, Q. Liu, N. Li, X. Liu, X. Li, C. Guo and D. Hao. 2019. Development of dwarfish and yield-effective GM maize through passivation of bioactive gibberellin. *Transgenic Research: Associated with the International Society for Transgenic Technologies (ISTT)* 28: 589-599.

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.

FAO-WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology, report of joint FAO/WHO consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

FAO. 2024. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed January 29, 2024].

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

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7

gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

Fujioka, S., H. Yamane, C.R. Spray, M. Katsumi, B.O. Phinney, P. Gaskin, J. Macmillan and N. Takahashi. 1988. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (*D8*) of maize accumulates native gibberellins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 9031-9035.

Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.

Hedden, P. and A.L. Phillips. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.

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

Huang, J., D. Tang, Y. Shen, B. Qin, L. Hong, A. You, M. Li, X. Wang, H. Yu, M. Gu and Z. Cheng. 2010. Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics* 37: 23-36.

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

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang,

Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. 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.

Lacombe, S., H. Nagasaki, C. Santi, D. Duval, B. Piégu, M. Bangratz, J.-C. Breitler, E. Guiderdoni, C. Brugidou, J. Hirsch, X. Cao, C. Brice, O. Panaud, W.M. Karlowski, Y. Sato and M. Echeverria. 2008. Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity on the genomic organisation and expression of miRNA genes in rice. *BMC plant biology* 8: 123.

Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.

Liu, C., S. Zheng, J. Gui, C. Fu, H. Yu, D. Song, J. Shen, P. Qin, X. Liu, B. Han, Y. Yang and L. Li. 2018. *Shortened basal internodes* encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. *Molecular Plant* 11: 288-299.

Lorenz, R., H. Bernhart Stephan, C. Höner zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, F. Stadler Peter and L. Hofacker Ivo. 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* 6: 26-26.

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.

McElroy, D., W. Zhang, J. Cao and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2: 163-171.

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.

NCGA. 2023. WORLD OF CORN 2023. <https://ncga.com/world-of-corn-iframe/pdf/WOC-2023.pdf> [Accessed January 29, 2024].

Nelissen, H., B. Rymen, Y. Jikumaru, K. Demuynck, M.v. Lijsebettens, Y. Kamiya, D. Inzé and G.T.S. Beemster. 2012. A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Current Biology* 22: 1183-1187.

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.

Oikawa, T., M. Koshioka, K. Kojima, H. Yoshida and M. Kawata. 2004. A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Molecular Biology* 55: 687-700.

Olszewski, N., T.P. Sun and F. Gubler. 2002. Gibberellin signalling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: s61-s80.

Paciorek, T., B.J. Chiapelli, J.Y. Wang, M. Paciorek, H. Yang, A. Sant, D.L. Val, J. Boddu, K. Liu, C. Gu, L.F. Brzustowski, H. Wang, E.M. Allen, C.R. Dietrich, K.M. Gillespie, J. Edwards, A. Goldshmidt, A. Neelam and T.L. Slewinski. 2022. Targeted suppression of gibberellin biosynthetic genes *ZmGA20ox3* and *ZmGA20ox5* produces a short stature maize ideotype. *Plant biotechnology journal*.

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 ReadyTM 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.

Phinney, B.O. 1985. Gibberellin A₁ dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biologia plantarum* 27: 172-179.

Pleasant, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, H.R. Mattila, J.E. Foster, P. Clark and G.D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11919-11924.

Portwood, J.L., 2nd, M.R. Woodhouse, E.K. Cannon, J.M. Gardiner, L.C. Harper, M.L. Schaeffer, J.R. Walsh, T.Z. Sen, K.T. Cho, D.A. Schott, B.L. Braun, M. Dietze, B. Dunfee, C.G. Elsik, N. Manchanda, E. Coe, M. Sachs, P. Stinard, J. Tolbert, S. Zimmerman and C.M. Andorf. 2019. MaizeGDB 2018: The maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic acids research* 47: D1146-D1154.

Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall and A. Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22: 326-330.

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.

Rood, S.B. 1985. Application of gibberellic acid to control tillering in early-maturing maize. *Canadian journal of plant science* 65: 901-911.

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.

Sasaki, A., M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano and M. Matsuoka. 2002. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701-702.

Schwab, R., S. Ossowski, M. Riester, N. Warthmann and D. Weigel. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.

Sekhon, R.S., H. Lin, K.L. Childs, C.N. Hansey, C. Robin Buell, N. De Leon and S.M. Kaeppler. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant journal* 66: 553-563.

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.

Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.

Song, J., B. Guo, F. Song, H. Peng, Y. Yao, Y. Zhang, Q. Sun and Z. Ni. 2011. Genome-

wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. *Gene* 482: 34-42.

Spielmeyer, W., M.H. Ellis and P.M. Chandler. 2002. Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective *Gibberellin 20-Oxidase* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9043-9048.

Sponsel, V.M. 2003. Gibberellins. *Encyclopedia of Hormones*. H.L. Henry and A.W. SNorman (eds.). Academic Press, New York.

Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.

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

Tirado, S.B., C.N. Hirsch and N.M. Springer. 2021. Utilizing temporal measurements from UAVs to assess root lodging in maize and its impact on productivity. *Field Crops Research* 262.

To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant biotechnology traits. *Frontiers in Plant Science* 12.

U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register*: 22984-23005.

Wang, Y., D. Deng, H. Ding, X. Xu, R. Zhang, S. Wang, Y. Bian, Z. Yin and Y. Chen. 2013. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant Dwarf11 (*D11*) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence. *PloS one* 8: e66466.

Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson and N.J. Provart. 2007. An

"Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS ONE 2: e718-e718.

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.

Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology 59: 225-251.

Yin, Y.H. and R.N. Beachy. 1995. The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Journal 7: 969-980.

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.

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.

Zhang, J., X. Zhang, R. Chen, L. Yang, K. Fan, Y. Liu, G. Wang, Z. Ren and Y. Liu. 2020. Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of *Gibberellin-Oxidase20-3* using CRISPR/Cas9. Frontiers in Plant Science 11: 1-9.

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.

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

菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京

菊池文雄 2005 半矮性 植物育種学辞典 培風館 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

財務省 2024 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>

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

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

独立行政法人 農業生物資源研究所 2004 半矮性イネ (*OsGA2ox1*, *Oryza sativa* L.) (G-3-3-22) 申請書等の概要 https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=327&ref_no=1 [Accessed March 31, 2022]

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

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

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

農林水産省 2014 飼料用トウモロコシの流通・加工実態調査結果報告書 平成26年3月26日公表 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140326-01.pdf>) [Accessed April 23, 2015]

農林水産省 2017 「平成27年度 トウモロコシ生育等実態調査」の結果について 平成29年3月22日公表 (<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-63.pdf>)

[Accessed May 11, 2022]

農林水産省 2023a 農林水産統計 作物統計調査 令和 5 年 8 月 30 日公表 農林水産省 2023

https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/sakkyou_yasai/r4/shitei_yasai_akifuyu/index.html [Accessed March 27, 2024]

農林水産省 2023b 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]

農林水産省 2024 飼料をめぐる情勢 (イラスト版) (令和 6 年 3 月) 農林水産省 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/ [Accessed May 8, 2024]

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

緊急措置計画書

2024年7月10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 大島 美紀
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半矮性トウモロコシ (GA20ox_SUP, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4) (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。

2024年7月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 社外広報マネジャー
【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、穀物取扱業者等使用の可能性がある関係各者から情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

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

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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、バイエルグループの協力のもと、本組換えトウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えトウモロコシに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別添資料リスト

- 別添資料 1 Bioinformatic evaluation of the GA20ox_SUP mature miRNA sequence against the *Zea mays* transcriptome (TRR0001151) (社外秘)
- 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP527892 (社外秘)
- 別添資料 3 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 94804 (TRR0001333) (社外秘)
- 別添資料 4 Bioinformatic Evaluation of the MON 94804 Insertion Site Utilizing the ZMA_2022 Database (M-813989-01-2) (社外秘)
- 別添資料 5 Amended from M-811545-03-1: Molecular Characterization of Short Stature Maize MON 94804 (M-811545-04-1) (社外秘)
- 別添資料 6 Demonstration of the Presence or Absence of GA20ox_SUP Transcripts in Maize Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 94804 (M-822071-01-1) (社外秘)
- 別添資料 7 Analysis of Transcripts from GA20ox_SUP Suppression Cassette in OSL1, OSR1, Stalk, Forage, and Grain Maize Tissues Collected from MON 94804 (M-814626-01-1) (社外秘)
- 別添資料 8 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 94804 (社外秘)
- 別添資料 9 In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 94804” for Global Submissions (社外秘)
- 別添資料 10 半矮性トウモロコシ (GA20ox_SUP, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験報告書 (社外秘)
- 別添資料 11 Assessment of the Effect of Cold Stress on Growth of MON 94804 Maize in 2023 under Controlled Environmental Conditions (M-846399-01-1) (社外秘)