

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.) Ittis)
 (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) 申請書等の概要

| | |
|--|----|
| 第一種使用規程承認申請書 | 1 |
| 生物多様性影響評価書 | 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じる特性を有する場合はその程 度 | 6 |
| ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命 | 7 |
| ホ 病原性 | 8 |
| ヘ 有害物質の産生性 | 8 |
| ト その他の情報 | 8 |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 | 9 |
| (1) 供与核酸に関する情報 | 9 |
| イ 構成及び構成要素の由来 | 9 |
| ロ 構成要素の機能 | 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..... | 16 |
| ③ | 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容..... | 56 |
| (2) | ベクターに関する情報..... | 59 |
| イ | 名称及び由来..... | 59 |
| ロ | 特性..... | 59 |
| ① | ベクターの塩基数及び塩基配列..... | 59 |
| ② | 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能..... | 59 |
| 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..... | 59 |
| (3) | 遺伝子組換え生物等の調製方法..... | 59 |
| イ | 宿主内に移入された核酸全体の構成..... | 59 |
| ロ | 宿主内に移入された核酸の移入方法..... | 59 |
| ハ | 遺伝子組換え生物等の育成の経過..... | 60 |
| ① | 核酸が移入された細胞の選抜の方法..... | 60 |
| 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..... | 60 |
| 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..... | 60 |
| (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..... | 62 |
| ① | 移入された核酸の複製物が存在する場所..... | 62 |
| 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..... | 64 |
| 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..... | 68 |
| 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..... | 68 |
| 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のある場合は、当該伝達性の有無及び程度..... | 75 |
| (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..... | 75 |
| (6) | 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... | 75 |

| | | |
|-----|---|----|
| 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..... | 75 |
| 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..... | 75 |
| a | 形態及び生育の特性 | 76 |
| b | 生育初期における低温耐性 | 76 |
| c | 成体の越冬性 | 77 |
| d | 花粉の稔性及びサイズ | 77 |
| e | 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 | 77 |
| f | 交雑率..... | 78 |
| g | 有害物質の産生性 | 78 |
| 3 | 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 | 79 |
| (1) | 使用等の内容..... | 79 |
| (2) | 使用等の方法..... | 79 |
| (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 | 79 |
| (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 | 79 |
| (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 | 79 |
| (6) | 国外における使用等に関する情報..... | 79 |
| 第二 | 項目ごとの生物多様性影響の評価 | 81 |
| 1 | 競合における優位性 | 81 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定..... | 81 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価..... | 82 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価..... | 82 |
| (4) | 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断..... | 82 |
| 2 | 有害物質の産生性 | 82 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定..... | 82 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価..... | 86 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価..... | 86 |
| (4) | 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断..... | 88 |
| 3 | 交雑性 | 88 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定..... | 88 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価..... | 88 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価..... | 88 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断..... | 88 |
| 4 その他の性質..... | 88 |
| 第三 生物多様性影響の総合的評価..... | 89 |
| 引用文献..... | 92 |
| 緊急措置計画書..... | 111 |
| 別添資料リスト..... | 113 |

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 7 月 17 日

5 農林水産大臣 林 芳正殿
環境大臣 望月 義夫 殿

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

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

| | |
|---------------------|--|
| 遺伝子組換え生物等の種類 の名称 | 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 (<i>DvSnf7</i> , 改変 <i>cry3Bb1</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容 | 食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為 |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法 | — |

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は LH244 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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

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)。

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

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

5 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。

わが国へは 1573～1591 年頃にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた。また、明治

10 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

15 ・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、2013 年における全世界のトウモロコシの

20 栽培面積は約 1 億 8 千万 ha であり、上位国は、米国 3,548 万 ha、中国 3,632 万 ha、ブラジル 1,528 万 ha、インド 950 万 ha、メキシコ 710 万 ha である (FAO, 2015)。

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2015 年の青刈りデントコーンの作付

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

・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。

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

北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中～下旬から 5 月中～下旬が最も多い。適正栽植密度は 10a 当たり 6,000～8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2～3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬

35 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

5 世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2014年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.4%が飼料(7.6%の蒸留粕を含む)、30.5%がエタノール製造、12.9%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(NCGA, 2015)。

10 わが国では、2014年に約1,504万トンのトウモロコシを輸入している(財務省, 2015)。輸入トウモロコシのうちの約1,040万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる。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(配合飼料供給安定機構, 2014)。

15 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, 2015b)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

20

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

25 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)。

30 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)。

35 これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の1.6~2.0倍になったときに幼根(初生根又は種子根)が伸長し、子実発芽となる(戸澤, 2005)。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、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

—

5 ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

10 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)。

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

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

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

30 トウモロコシは栄養繁殖せず、種子繁殖する。自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

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

35 トウモロコシは雌雄同株の一年生作物で、主として風媒によって受粉する作物であり 95~99 %は他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性は知られておらず、自家受粉も可能である (千藤, 2001; OECD, 2003)。

トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* に含まれトウモロコシの近縁野生種である一年生のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*) 及び *Tripsacum* 属植物である。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属植物との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*Tripsacum* 属植物の分布地域は北アメリカ東部、南部から南米となっている (山田, 2001; OECD, 2003)。

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

10

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)。

15

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隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400m とされている (千藤, 2001)。

20

わが国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁 (0m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/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 10m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm² 以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

25

また、北米でも全 7 カ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度の調査が行われている (Pleasants et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1m、2m、4~5m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、そして 8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている。

30

さらに、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密

度を調査しており、ほ場の縁から 1m 及び 5m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm² であったと報告している (Sears et al., 2000)。

花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い (CFIA, 2012)。

- 5 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

- 10 —

ヘ 有害物質の産生性

- 15 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

- 20 これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシの、わが国の畑以外での生育については、熊本県内の港湾で 1 個体のみ報告されている (農林水産省, 2014b)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 米国では、現在 1,760 万 ha のトウモロコシ畑がコーンルートワーム等 *Diabrotica* 属に属する昆虫 (corn rootworm; *Diabrotica* spp.) (以下、「CRW」という。) によって被害を受けている。CRW によるトウモロコシへの食害は甚大な経済損失を与えており、毎年 CRW 防除のために 10 億ドルを超える費用が発生している (Marra et al., 2012)。

10 モンサント・カンパニーは RNA 干渉 (RNAi) 技術及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によりコウチュウ目害虫抵抗性並びに改変 CP4 EPSPS 蛋白質により除草剤グリホサート耐性を付与したトウモロコシ (*DvSnf7*, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を開発した。本組換えトウモロコシには、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) (以下、
15 「WCRW」という。) の細胞機能の維持に必要不可欠である *Snf7* 遺伝子 (以下、「*DvSnf7* 遺伝子」という。) のエクソンの部分配列 240 塩基 (以下、「*DvSnf7* 遺伝子断片」という。) が、逆方向反復の形で導入されている。この逆方向反復配列からの転写産物は二本鎖 RNA (dsRNA) (以下、「*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA」という。) を形成する。*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は本組換え
20 トウモロコシの経口摂食を通じて CRW の細胞内に取り込まれた後、RNAi を誘導し、*DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで殺虫活性を示す。

なお、本組換えトウモロコシは、前述した RNAi に加えて改変 *cry3Bb1* 遺伝子が導入されており、改変 Cry3Bb1 蛋白質を発現することで、同じコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与されている。このように異なる作用機作を持つ RNAi と Bt 蛋白質により CRW に対する殺虫活性を付与することで、CRW が本組換えトウモロコシに対して抵抗性を獲得するリスクを軽減することが期待されている。

(1) 供与核酸に関する情報

30

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 1 (p11) 及び表 1 (p12~15) に示した。

35

本組換えトウモロコシに導入された *cry3Bb1* 遺伝子から発現する Cry3Bb1

蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、6 カ所のアミノ酸が置換されている。そのうち 1 カ所¹はクローニングの際に制限酵素切断部位を付加する目的で、他の 5 カ所²は殺虫活性を増強する目的で改変された。

5 また、*cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium sp.* CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

10 したがって、本組換えトウモロコシに導入された *cry3Bb1* 遺伝子及び *cp4 epsps* 遺伝子を、それぞれ「改変 *cry3Bb1* 遺伝子」及び「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質もそれぞれ「改変 Cry3Bb1 蛋白質」及び「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は、それぞれ別添資料 1 及び別添資料 2 に示した。

15

ロ 構成要素の機能

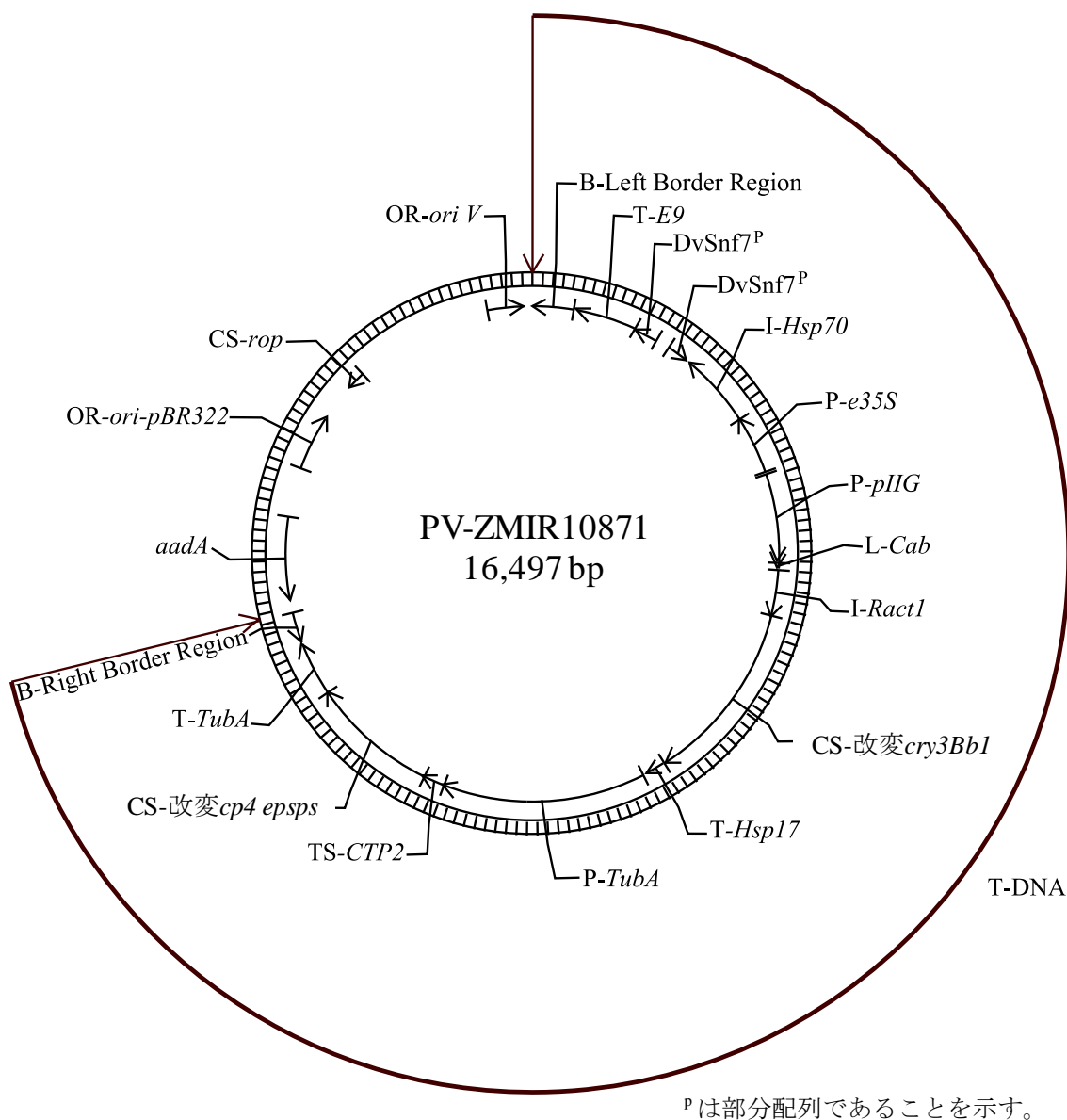
- ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

20

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

¹N 末端から 2 番目にアラニンが挿入

²N 末端から 232 番目のアミノ酸がヒスチジンからアルギニンへ、N 末端から 312 番目のアミノ酸がセリンからロイシンへ、N 末端から 314 番目のアミノ酸がアスパラギンからトレオニンへ、318 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリシンへ、349 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンへ置換されている。



5 図 1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR10871 のプラスミドマップ³

³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 の各構成要素の由来及び機能⁴

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|---|-------------|---|
| T-DNA 領域 | | |
| B ^{注1} -Left Border Region | 1-442 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界領域を含む配列 (Barker et al., 1983)。 |
| Intervening Sequence | 443-485 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T ^{注2} -E9 | 486-1,118 | <i>Pisum sativum</i> (エンドウ) のリブロース-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> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。 |
| Intervening Sequence | 1,119-1,147 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>DvSnf7^p</i> ^{注3} | 1,148-1,387 | <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007; Baum et al., 2011)。ESCRT-III 複合体の SNF7 サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。 |
| Intervening Sequence | 1,388-1537 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>DvSnf7^p</i> | 1,538-1,777 | <i>D. virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007; Baum et al., 2011)。ESCRT-III 複合体の SNF7 サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。 |
| Intervening Sequence | 1,778-1,813 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| I ^{注4} - <i>Hsp70</i> | 1,814-2,617 | <i>Zea mays</i> (トウモロコシ) の熱ショック蛋白質遺伝子 (<i>hsp70</i>) の 1 番目のイントロンとその近傍エクソンの一部 (Rochester et al., 1986)。目的遺伝子の発現箇所での発現活性を高める (Brown and Santino, 1997)。 |

⁴本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|-------------------------------------|-------------|---|
| P ^{注5} - <i>e35S</i> | 2,618-3,238 | カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA のプロモーター (Odell et al., 1985)。2重のエンハンサー領域 (Kay et al., 1987) を有しており、植物細胞における転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 3,239-3,264 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P- <i>pIIIG</i> | 3,265-4,213 | <i>Z. mays</i> (トウモロコシ) の物理的インピーダンス誘導蛋白質をコードする <i>pIIIG</i> 遺伝子配列のプロモーター領域 (Huang et al., 1998)。植物細胞における転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 4,214-4,219 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| L ^{注6} - <i>Cab</i> | 4,220-4,280 | <i>Triticum aestivum</i> (コムギ) の葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5' 末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる (Lamppa et al., 1985)。 |
| Intervening Sequence | 4,281-4,296 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| I- <i>Ract1</i> | 4,297-4,776 | <i>Oryza sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy et al., 1990)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる。 |
| Intervening Sequence | 4,777-4,785 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS ^{注7} -改変 <i>cry3Bb1</i> | 4,786-6,747 | <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子で、コウチュウ目昆虫に対する抵抗性を付与する (English et al., 2000)。 |
| Intervening Sequence | 6,748-6,766 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>Hsp17</i> | 6,767-6,976 | <i>T. aestivum</i> (コムギ) の熱ショック蛋白質 17 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (McElwain and Spiker, 1989)。 |
| Intervening Sequence | 6,977-7,024 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|--------------------------------|---------------|---|
| P- <i>TubA</i> | 7,025-9,205 | <i>O. sativa</i> (イネ) の α 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 (Qin et al., 1997; Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。 |
| Intervening Sequence | 9,206-9,209 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| TS ^{注8} - <i>CTP2</i> | 9,210-9,437 | <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。 |
| CS-改変 <i>cp4 epsps</i> | 9,438-10,805 | <i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子。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、除草剤グリホサート耐性を付与する (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。 |
| Intervening Sequence | 10,806-10,812 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>TubA</i> | 10,813-11,394 | <i>O. sativa</i> (イネ) の α 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。転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する (Qin et al., 1997; Jeon et al., 2000)。 |
| Intervening Sequence | 11,395-11,412 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| B-Right Border Region | 11,413-11,743 | <i>A. tumefaciens</i> に由来する右側境界領域を含む DNA 断片。T-DNA を伝達する際に利用される (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。 |

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

| 構成要素 | プラスミド中の位置 | 由来及び機能 |
|--------------------------------------|---------------|--|
| 外側骨格領域 (本組換えトウモロコシ中には存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 11,744-11,879 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>aadA</i> | 11,880-12,768 | 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及びコード配列並びに 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 | 12,769-13,298 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR ^{注9} - <i>ori-pBR322</i> | 13,299-13,887 | pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。 |
| Intervening Sequence | 13,888-14,314 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS- <i>rop</i> | 14,315-14,506 | ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。 |
| Intervening Sequence | 14,507-16,014 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR- <i>ori V</i> | 16,015-16,411 | 広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> 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 | 16,412-16,497 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |

注¹ B-Border (境界配列)

注² T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

5 注³ P-Partial sequence (部分配列)

注⁴ I-Intron (イントロン)

注⁵ P-Promoter (プロモーター)

注⁶ L-Leader (リーダー配列)

注⁷ CS-Coding Sequence (コード配列)

10 注⁸ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁹ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と同一性を有する場合はその旨

5

I. 【*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA】

DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の機能について、まず「i. 一般的な RNAi の機構 (p16)」の項目で一般論としての RNAi の機構について述べる。次に、「ii. *DvSnf7* 遺伝子断片を導入した本組換えトウモロコシの作用機作 (p17~24)」の項目で、本組換えトウモロコシで発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA がどのような作用機作を有しているのかについてを述べる。さらに、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA のスペクトラム及び特異性を決定する要因について「iii. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異性 (p25~42)」において説明する。また、非標的生物への影響については「iv. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の土壌微生物に対する影響 (p43~45)」及び「v. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の脊椎動物に対する影響 (p45~49)」で詳細に述べる。

i. 一般的な RNAi の機構

20

RNAi は真核生物において遺伝子発現調節のために一般的に起こる機構である。RNAi が起こる過程では、まず、dsRNA がリボヌクレアーゼ III に分類される Dicer と呼ばれる酵素により切断され、21~25 塩基の低分子干渉 RNA (siRNA) が形成される (Hammond, 2005; Siomi and Siomi, 2009)。次に、siRNA が RNAi-induced silencing complex (RISC) と結合し、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する。さらに、RISC が持つエンドヌクレアーゼによって、siRNA と結合した mRNA が分解されることにより、mRNA の蛋白質への翻訳が阻害されることとなる (Hammond, 2005; Siomi and Siomi, 2009)。RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制を効率的かつ安定して誘導できることから特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている (Kusaba, 2004)。

30

近年、dsRNA を発現する遺伝子組換え植物を昆虫に経口摂食させることで、昆虫の内在性遺伝子の発現を RNAi により抑制することが可能であることが確認され、RNAi が有望な害虫防除法として利用しうることが提言されている (Baum et al., 2007; Whyard et al., 2009)。具体的には、特定の昆虫の必須機能に関わる蛋白質をコードする遺伝子の発現を特異的に抑制することによって、特異的な殺虫活性を付与することができる (Baum et al., 2007; Whyard et al., 2009)。

35

ii. *DvSnf7* 遺伝子断片の逆方向反復配列を導入した本組換えトウモロコシの作用機作

5 1. 経口摂取された dsRNA が *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制する作用機作

本組換えトウモロコシには、WCRW の細胞機能の維持に必要不可欠である *DvSnf7* 遺伝子断片を逆方向反復の形で導入している。その結果、この逆方向反復配列からは *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 形成が確認されている (別添資料 3 の Figure 1, p4)。

また、*in vitro* で合成した *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に経口摂取させた場合、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が WCRW の RNAi 機構に認識され、*DvSnf7* 遺伝子から発現する mRNA を分解し、DvSNF7 蛋白質の発現を抑制すること (以下、「*DvSnf7* 遺伝子の発現抑制」という。) が Real-Time RT-PCR 法及びウエスタンブロット分析により確認されている (図 2, p19) (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1) の Figure 3, p6)。

これらのことから、本組換えトウモロコシで発現する *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は、WCRW によって摂食された後、中腸細胞内に取り込まれ *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制が起こることによって WCRW に殺虫活性をもたらすと考えられる (図 3, p20)。

因みに、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA のみを発現する別の遺伝子組換えトウモロコシ系統が WCRW に対して抵抗性を示すことも確認されている (別添資料 4 の Figure 1, p4)。

なお、本組換えトウモロコシ中には、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA に加えて、その dsRNA に由来する siRNA も産生されていることが確認されている (別添資料 5 の Table 1, p6)。

WCRW の中腸細胞には塩基長によって取り込む RNA の選別機構が存在しているとされ、60 塩基対 (bp) 以上の dsRNA のみを効率的に中腸細胞に取り込むことが明らかになっている (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1))。 *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 由来の 21bp の siRNA を高濃度で投与した WCRW の生物検定及び中腸細胞蛍光イメージングにより、WCRW の中腸細胞に効率的に取り込まれる可能性が低いこと (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1) の Figure 2-A., p5) 及び WCRW に対して殺虫活性を示さないことが確認されている (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1) の Figure 2-B., p5)。これらのことから、本組換えトウモロコシ中で産生されている *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 由来の siRNA は WCRW の殺虫活性には関与していないと考えられた。

因みに、siRNA のような低分子 RNA は植物中ではメチル化修飾され、安定性が高まるとの報告がある (Ji and Chen, 2012)。しかし、メチル化修飾した siRNA

を用いて上記と同様の試験を行った結果、メチル化修飾した siRNA も WCRW において中腸細胞への効率的な取り込みの可能性が低く、WCRW に対して殺虫活性を示さないことを確認した (別添資料 6 の Figure 1, p6 及び Figure 3, p8)。

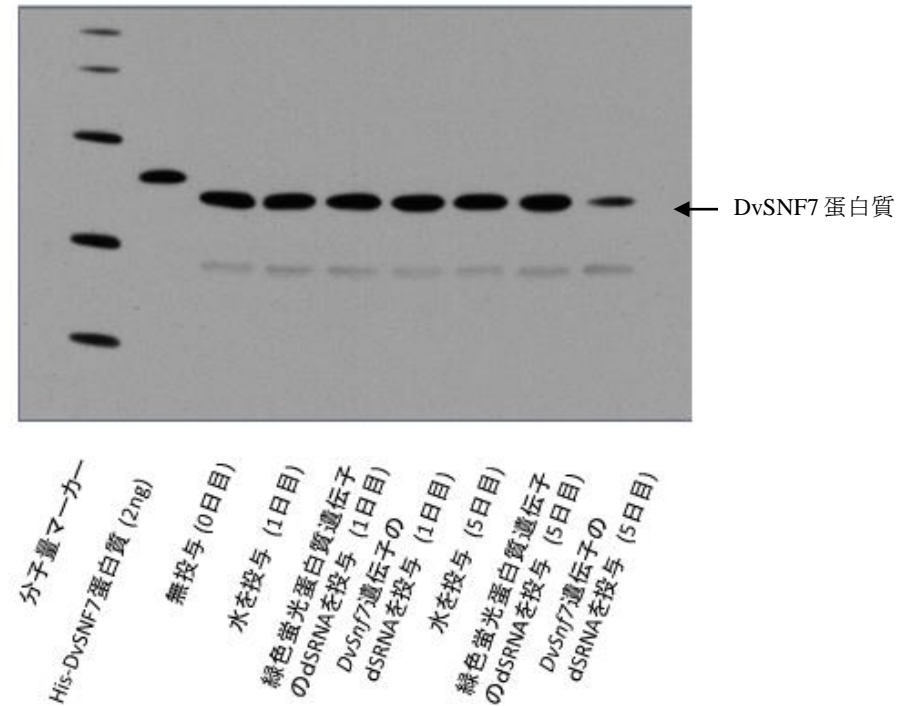
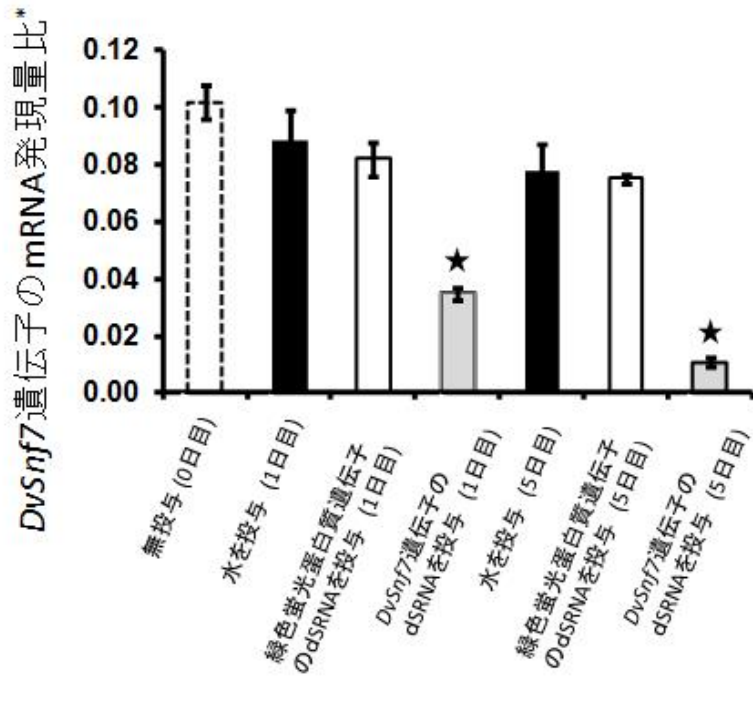
5 なお、経口摂取された *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は、WCRW の中腸細胞だけでなくその他の体組織においても *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制を誘導し、全身へ伝搬している現象が観察されている (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1))。このように細胞が細胞外から dsRNA を取り込み、取り込んだ dsRNA を近隣の細胞へと拡散する全身への伝搬 (systemic spread) と呼ばれる機構が存在することは
10 以前から知られている (Huvenne and Smaghe, 2010)。

 全身への伝搬は線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* で 1998 年に報告された機構で、*C. elegans* 以外にも、コウチュウ目、チョウ目、ハエ目及びバッタ目に属する様々な昆虫で dsRNA の細胞内への注入又は dsRNA の経口摂取によって引き起こされるとの報告がある (Bucher et al., 2002; Tomoyasu and Denell,
15 2004; Dong and Friedrich, 2005; Turner et al., 2006; Tian et al., 2009; Alves et al., 2010; Li et al., 2011b)。しかしながら、経口摂取された dsRNA の細胞への取り込み及び全身への伝搬のメカニズムに関しては、いまだ解明に至っていない (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1))。

 また、dsRNA の長さ及び RNAi の全身への伝搬の他にも、標的とする遺伝子の選択、dsRNA 配列、摂取する dsRNA 量、遺伝子発現抑制の持続性に関わる機構、昆虫の生育段階等の様々な要因が経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導に影響を及ぼしていることが知られている (Huvenne and Smaghe, 2010)。
20

 以上をまとめると、本組換えトウモロコシ中では、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA
25 が発現しており、標的昆虫である WCRW が本組換えトウモロコシを摂食した後、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は効率的に中腸細胞内に取り込まれ、RNAi の機構を通じて WCRW の細胞機能の維持に必要不可欠な役割を果たしている *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制が起こる。同時に中腸細胞に取り込まれた dsRNA は全身への伝搬機構により、その他の体組織へ拡散し、RNAi 機構を通じて *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制が起こると考えられる。これらのことにより、WCRW に殺虫活性をもた
30 らすと考えられる (図 3, p20)。

 また、本組換えトウモロコシで産生されている *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA に由来する siRNA は、WCRW の中腸細胞の RNA の選別機構の存在によって取り込まれる可能性は低く、WCRW に対して殺虫活性を有するとは考え難い。



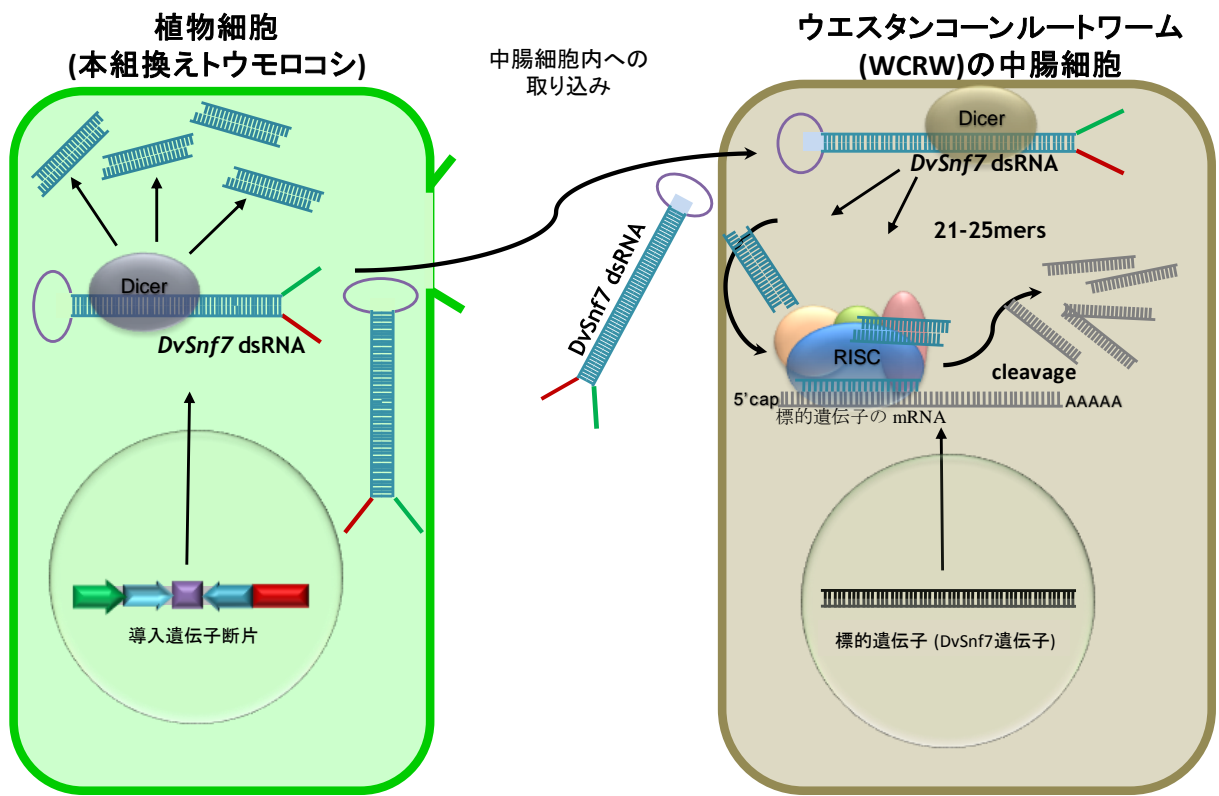
*DvSnf7遺伝子の発現量をWCRW由来の標準遺伝子 (チューブリンをコードする遺伝子) の発現量で補正した比

★コントロール (水を投与した群及び緑色蛍光蛋白質遺伝子のdsRNAを投与した群) と比較して統計学的有意差あり (t検定; p<0.05)

5 DvSnf7遺伝子断片のdsRNA投与1日目から、DvSnf7遺伝子のmRNA量の低下が見られ (左側のグラフ)、それによって引き起こされるDvSNF7蛋白質量の低下は投与5日目には観察された (右側の図)。

図 2 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA を経口摂取した WCRW の全身組織での DvSnf7 遺伝子の mRNA レベル (左: Real-Time RT-PCR 法) 及び DvSNF7 蛋白質の発現抑制 (右: ウェスタンブロット分析) (Bolognesi et al., (2012) (添付文献 1))⁵

⁵本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する



5 図3 経口摂取された *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA による WCRW の中腸細胞中での *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制 (模式図)⁶

⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

2. *DvSnf7*遺伝子の発現が抑制されることによりWCRWが死に至るまでの作用機作

5 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、エンドソームを通じて不要となった蛋白質の細胞内への取り込み、輸送、選別及び分解を行うことで細胞恒常性を保っている (Fader and Colombo, 2009)。

10 *Snf7*遺伝子がコードするSNF7蛋白質は、中性のN末端及び酸性のC末端と共に、 α 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細胞膜中の受容体蛋白質等をリソソームで分解するか否かの選別に関与する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)。

15 因みに、酵母、ショウジョウバエ属昆虫、*C. elegans*、シロイヌナズナ、イネ及びヒトにもSNF7蛋白質に分類される蛋白質が存在していることが報告されている (Winter and Hauser, 2006)。これらSNF7蛋白質の生物間での相同性に関して、植物とヒトではSNF7蛋白質アミノ酸配列の相同性は30%から
20 57%程度であり、酵母とヒトではその相同性は約50%程度であることが報告されている (Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006)。また、二次構造分析によるとSNF7蛋白質の基本構造及び機能は、真核生物間で保存されていることが示唆されている (Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006)。このようにSNF7
25 蛋白質は多くの生物に存在しており (Tu et al., 1993; Gao et al., 1999; Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006; Lee et al., 2007; Kim et al., 2011)、細胞機能の維持に必要不可欠な蛋白質と考えられる。

上記のように、SNF7蛋白質はオートファジー経路に関与するESCRT-III 複合体の一部を構成している蛋白質として知られている。図4のA (p24) では通常
30 の昆虫細胞におけるオートファジー経路を示す (図4のA, p24; Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2) のFigure 5, p7)。以下に図4のA (p24) の中の番号に沿って、通常
の昆虫細胞におけるオートファジー経路を説明する。

1. 細胞膜上でユビキチンが結合した蛋白質 (ユビキチン化蛋白質) のエンドサイトーシスが起り、被膜小胞によりそれらの蛋白質は初期エンドソームへと輸送される (Raiborg and Stenmark, 2009)。
35
2. 初期エンドソームで、ユビキチン化蛋白質はESCRT経路 (ESCRT-0、I、II 及びIII複合体) を経ることにより脱ユビキチン化が行われ、遊離したユビキチンは再び細胞膜中の蛋白質へと運ばれる (Raiborg and Stenmark,

2009)。

3. 脱ユビキチン化された蛋白質を内包する初期エンドソームの一部が出芽し、多小胞体 (MVB) となり、続いて後期エンドソームを形成する (Raiborg and Stenmark, 2009)。
- 5 4. 後期エンドソームがリソソームと融合した場合 (オートリソソーム) はリソソームでの分解が行われる (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。昆虫細胞内には細胞小器官又は不要になった蛋白質などを内包する自食作用胞 (オートファゴソーム) が別途形成されている (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。
- 10 5. 後期エンドソーム、リソソーム及びオートファゴソームの3つが融合し、オートリソソームを形成することでオートファジーを誘導する。なお、オートファジーは細胞が飢餓の状態の場合に起こりやすい (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。

15 多くの高等生物において、上記のようなオートファジー経路による不要となった細胞小器官及び蛋白質の分解は、様々な生理及び病理的状态を制御するために重要なプロセスである (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。また、一般的に真核細胞にとって受容体蛋白質はシグナル伝達を制御していることから、細胞膜中の受容体蛋白質をエンドサイトーシスにより選別していくことは、恒常性を保つために必須の機能である。細胞の増殖や成長を制御する Notchシグナル伝達及び上皮成長因子シグナル伝達などを含むいくつかの経路に関わる受容体はESCRT経路により選別されていることも報告されている (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。

25 *DvSnf7*遺伝子がコードするDvSNF7蛋白質は、上記の一般的なSNF7蛋白質と同様に、WCRWの細胞においてもESCRT-III複合体の一部を構成している蛋白質であり、WCRWのESCRT-III複合体も初期エンドソームでのユビキチン化蛋白質の脱ユビキチン化、後期エンドソーム又はオートファゴソームとリソソームとの融合に関連しているとされている (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2))。このことから、図4のB (p24) で示すように経口摂取された*DvSnf7* 30 遺伝子断片のdsRNA によって*DvSnf7*遺伝子の発現抑制が生じた場合、脱ユビキチン化が起こらず、また、後期エンドソーム又はオートファゴソームとリソソームとの融合が起こらず、本来オートファジーにより分解されるべき不要となった蛋白質が細胞に蓄積される (Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献2) 35 のFigure 5, p7)。

以上をまとめると、*DvSnf7*遺伝子がコードするDvSNF7蛋白質の働きは一般的なSNF7蛋白質と同様に、WCRWの細胞機能の維持に必要不可欠である。本

組換えトウモロコシの摂食を通じて摂取された*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAによって、WCRW中の*DvSnf7*遺伝子の発現抑制が生じた場合、細胞の恒常性が損なわれ、WCRWは死に至ると推察された。

A. 通常の昆虫細胞

B. *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制が生じている WCRW の細胞

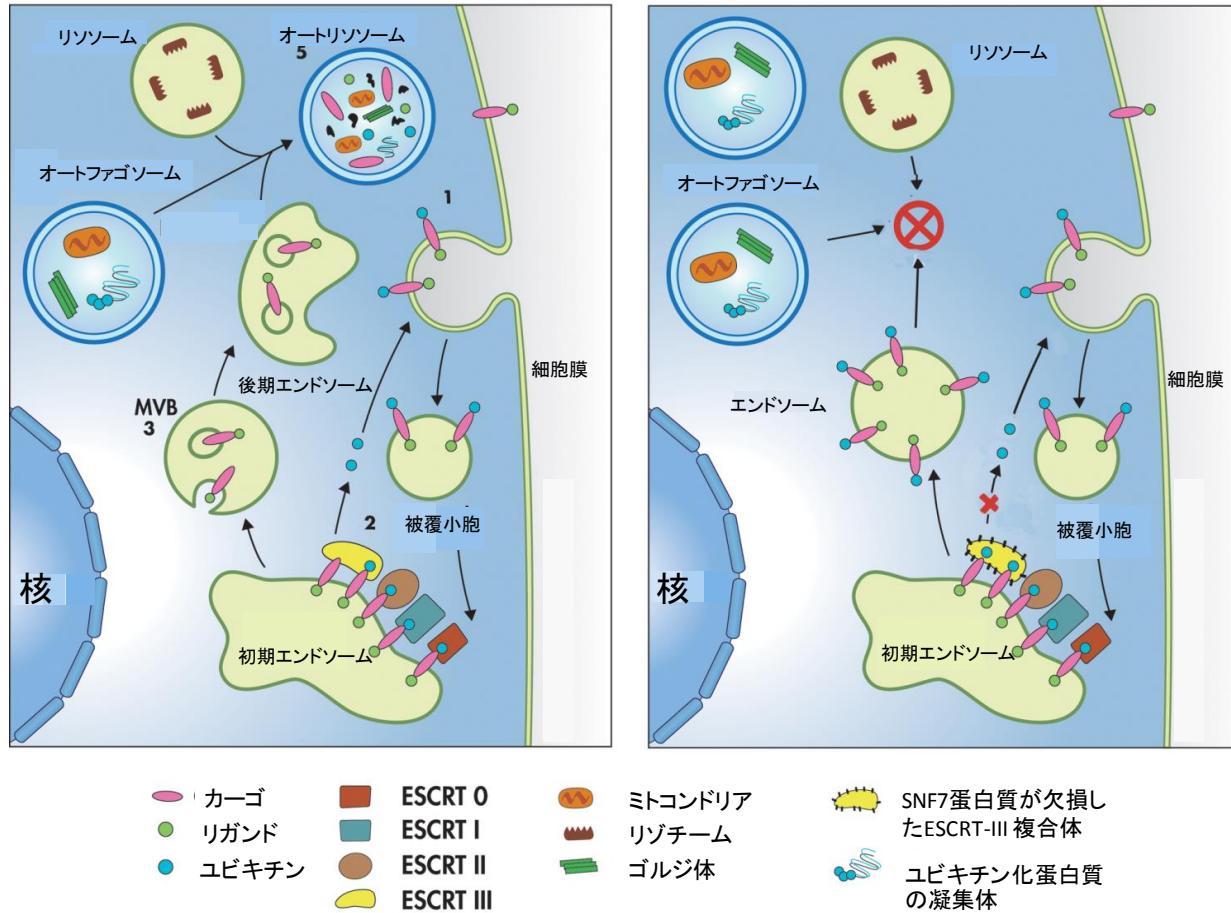


図4 A.通常の昆虫細胞及びB. *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制が生じている WCRW の細胞におけるオートファジー経路 Ramaseshadri et al., (2013) (添付文献 2) より改変⁷

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

iii. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異性

1. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラム

5

DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムを調べるため、WCRW との系統学的関連性を基に選んだ昆虫に対する殺虫活性を調査した (別添資料 7)。

10

コウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目 10 科で代表的な 14 種の昆虫 (表 2, p27) に対して、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の混餌投与による生物検定を行った。試験ではコウチュウ目内の *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の特異性を明確にするために、コウチュウ目で 4 科に属する 7 種を供試した。その中には、標的害虫の WCRW 及び WCRW の近縁種であるサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (以下、「SCRW」という。) も含まれており、それらの昆虫に対する殺虫活性は 12 日間の混餌投与による生物検定で確認された。

15

混餌投与に供試したのは *in vitro* で合成した *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA で、これを 5,000ng/mL diet までの濃度範囲で試験した。この濃度は、本組換えトウモロコシ中で発現される *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の濃度 (表 10, p69~70) と比べると 2~3 桁程度高い濃度となっている。このように、本生物検定は、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が非標的害虫の成長、発育及び生存に影響を及ぼす可能性を評価するために十分な投与期間で継続的に *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を投与するように設計された。

20

その結果、非標的昆虫と考えられるコロラドポテトビートル (*Leptinotarsa decemlineata*) (以下、「CPB」という。) を含むコウチュウ目 5 種、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目について、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA による成長、発育及び生存への影響は認められず、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科 (Galerucinae) に属する WCRW 及び SCRW に対してのみ活性を示すことが確認された。WCRW および SCRW の LC₅₀ (半数致死濃度) は、それぞれ 4.4ng/mL diet 及び 1.2ng/mL diet であった (表 2, p27; 別添資料 7 の Table 3, p39)。なお、ハムシ科にはヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科を含む計 12 亜科が存在しているが、WCRW が属するヒゲナガハムシ亜科は、系統学的にはハムシ科の亜科の中で CPB が属するハムシ亜科と最も近縁であることが知られている (Gómez-Zurita et al., 2007)。

25

30

これらの結果から、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、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に限定されていると考えられた。なお、今回生物検定を行ったコウチュウ目、チョウ目、ハチ目、カメムシ目の 4 目 10 科で代表的な 14 種の

35

昆虫のうち、10種は同種又は同属種がわが国に生息している (表 2, p27) が、標的昆虫である CRW はわが国に生息していない (中根ら, 1963)。

表2 *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫スペクトラム (様々な昆虫の当該 dsRNA への感受性)⁸

| 目 | 科 | 亜科 | 学名 | LC ₅₀ ^a 又は 最大濃度 ^b (ng/mL diet) | 殺虫活性* | 日本での 生息の有無 |
|---|-----------------------------|---------------------------------|---|---|-------|---------------|
| カメムシ目 (Hemiptera) | ハナカメムシ科 (Anthocoridae) | ハナカメムシ亜科 (Anthocorinae) | <i>Orius insidiosus</i> | 5,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| ハチ目 (Hymenoptera) | ヒメコバチ科 (Eulophidae) | Entedoninae 亜科 (Entedoninae) | <i>Pediobius foveolatus</i> | 3,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | コガネコバチ科 (Pteromalidae) | コガネコバチ亜科 (Pteromalinae) | <i>Nasonia vitripennis</i> (キョウソヤドリコバチ) | 5,000 ^b | 無 | 生息 |
| チョウ目 (Lepidoptera) | ヤガ科 (Noctuidae) | モンヤガ亜科 (Noctuinae) | <i>Spodoptera frugiperda</i> | 500 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | | タバコガ亜科 (Heliothinae) | <i>Helicoverpa zea</i> | 5,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | ツトガ科 (Crambidae) | ノメイガ亜科 (Pyraustinae) | <i>Ostrinia nubilalis</i> | 5,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | カイコガ科 (Bombycidae) | カイコガ亜科 (Bombycinae) | <i>Bombyx mori</i> (カイコ) | 5,000 ^b | 無 | 生息 |
| コウチュウ目 (Coleoptera) | オサムシ科 (Carabidae) | ゴモクムシ亜科 (Harpalinae) | <i>Poecilus chalcites</i> | 5,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | テントウムシ科 (Coccinellidae) | テントウムシ亜科 (Coccinellinae) | <i>Coleomegilla maculate</i> (スポットドレディビートル (テントウムシの一種)) | 3,000 ^b | 無 | × |
| | | マダラテントウムシ亜科 (Epilachninae) | <i>Epilachna varivestis</i> (インゲンテントウ) | 3,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | ゴミムシダマシ科 (Tenebrionidae) | ゴミムシダマシ亜科 (Tenebrioninae) | <i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ) | 5,000 ^b | 無 | 生息 |
| | ハムシ科 (Chrysomelidae) | ハムシ亜科 (Chrysomelinae) | CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) | 5,000 ^b | 無 | × |
| | | ヒゲナガハムシ亜科 (Galerucinae) | SCRW (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>) | 1.2 ^a | 有 | × |
| WCRW (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>) | 4.4 ^a | | 有 | × | | |

*当該 dsRNA に対する各昆虫の感受性を 12 日間の混餌投与による生物検定で調査した。コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する種だけに殺虫活性を示した (別添資料 7)。

^a LC₅₀=半数致死濃度; ^b 投与された最大濃度

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

さらに、上記のように *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の直接混餌投与による生物検定を行った 14 種の昆虫以外にも、WCRW に近縁のヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科に属する 5 種 (*Acalymma vittatum*、*Ceratoma trifurcate*、
5 *Galerucella calamriensis*、*Microtheca ochroloma* 及び *Chrysolina quadrigemina*; 表 3, p30) への *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を間接的に調査することで、より詳細な殺虫スペクトラムの検討を行った (Bachman et al., (2013) (添付文献 3))。

これらの 5 種の昆虫については、生物検定を行うための飼育方法が確立して
10 いないため、直接混餌投与による生物検定を行うことができない。そのため、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を直接これら 5 種に与える代わりに、これら 5 種由来の *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を、飼育方法が確立している WCRW に与え、WCRW への殺虫活性の有無を観察することで、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA のこれら 5 種に対する殺虫活性の可能性を検討した。

このように飼育方法が確立していない昆虫種に対する殺虫活性を予測する
15 ための間接混餌投与試験手法については既に文献で報告されている事例がある (Baum et al., 2007; Whyard et al., 2009; Burand and Hunter, 2013)。実際に WCRW 及び CPB にお互いの *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を与えて、間接混餌投与試験を行い、この手法の検証を行った (Bachman et al., (2013) (添付文献 3))。
20 なお、表 2 (p27) に示すように *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は WCRW に対しては殺虫活性を示すが、CPB に対しては殺虫活性を示さないことが、直接混餌投与試験により既に確認されている。間接混餌投与試験の結果、WCRW に *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を与えた場合に殺虫活性が認められたが、CPB 由来の *Snf7* 遺伝子断片 (*LdSnf7* 遺伝子断片) の dsRNA を与えた場合には殺虫
25 活性は認められなかった (Bachman et al., (2013) (添付文献 3) の Fig. 1)。一方で、CPB に *LdSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を与えた場合に殺虫活性が認められたが、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を与えた場合には殺虫活性は認められなかった (Bachman et al., (2013) (添付文献 3) の Fig. 1)。この結果は直接混餌投与試験の結果と一致していることから、飼育方法が確立していない昆虫種に
30 関してはこの間接混餌投与試験を用いれば *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を調べるのが可能であると考えられた。

本試験では、まず *A. vittatum*、*C. trifurcate*、*M. ochroloma*、*G. calamriensis* 及び *C. quadrigemina* の *Snf7* 遺伝子のうち、WCRW 由来の *DvSnf7* 遺伝子断片
35 に相当する配列を塩基配列解析により特定した。次に、*DvSnf7* 遺伝子断片と最も相同性が高い配列の dsRNA を *in vitro* で合成し、この dsRNA を最大 5,000ng/mL diet までの濃度で WCRW に 12 日間混餌投与した。

試験の結果、ヒゲナガハムシ亜科に属する *A. vittatum*、*C. trifurcate* 及び *G. calamriensis* 由来の *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に与えたところ、生存率はそれぞれ 8%、15%及び 13%であり、WCRW に対して殺虫活性を示すことが確認された (表 3, p30; Bachman et al., (2013) (添付文献 3) の Table 3)。

5 一方で、ハムシ亜科に属する *M. ochroloma* 及び *C. quadrigemina* 由来の *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に与えたところ、生存率は 72%及び 88%であり、WCRW に対して殺虫活性を示さなかった (表 3, p30; Bachman et al., (2013) (添付文献 3) の Table 3)。これらの結果から、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は WCRW と同じハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する *A. vittatum*、
10 *C. trifurcate* 及び *G. calamriensis* に殺虫活性を示すと考えられた。しかし、同じハムシ科であっても、ハムシ亜科に属する *M. ochroloma* 及び *C. quadrigemina* に対しては殺虫活性を示さないと考えられた。

15 以上の結果は、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫スペクトラムを調べた直接混餌投与試験の結果 (表 2, p27; 別添資料 7 の Table 3, p39) と一致し、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫スペクトラムがコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に限定されるとの考えを支持している。

表 3 ヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科に属する 5 種の *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を 12 日間にわたり WCRW に混餌投与試験を行った結果⁹

| <i>Snf7</i> 遺伝子断片の合成 に用いた昆虫種名 (亜科名) | 投与 濃度 (ng/mL) | 対照 検定数 | 対照 生存 個体数 | 対照 ¹ 生存率 (%) | dsRNA 処理 検定数 | dsRNA 処理 生存 個体数 | dsRNA 処理 ² 生存率 (%) | p 値 ³ | 殺虫 活性 | 21 塩基長の 一致の有無 ⁴ |
|--|---------------------|-----------|-----------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------|--|------------------|----------|-------------------------------|
| <i>Acalymma vittatum</i> (ヒゲナガハムシ亜科) | 1,000 | 96 | 86 | 90 | 101 | 8 | 8 | <0.0001 | 有 | 有 |
| <i>Ceratoma trifurcata</i> (ヒゲナガハムシ亜科) | 500 | 106 | 81 | 76 | 108 | 16 | 15 | <0.0001 | 有 | 有 |
| <i>Galerucella calamriensis</i> (ヒゲナガハムシ亜科) | 5,000 | 89 | 79 | 89 | 93 | 12 | 13 | <0.0001 | 有 | 有 |
| <i>Microtheca ochroloma</i> (ハムシ亜科) | 500 | 106 | 81 | 76 | 106 | 76 | 72 | 0.5311 | 無 | 無 |
| <i>Chrysolina quadrigemina</i> (ハムシ亜科) | 5,000 | 103 | 97 | 94 | 103 | 91 | 88 | 0.2165 | 無 | 無 |

¹ dsRNA を含まない餌を与えた WCRW

² 各種の *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA を与えた WCRW

5 ³ *Snf7* 遺伝子断片の dsRNA 処理群と対照群の生存個体数及び非生存個体数について、フィッシャーの正確率検定により統計処理を行った (p<0.05 で有意)。

⁴ 表中の 5 種由来の *Snf7* 遺伝子断片配列中で、*DvSnf7* 遺伝子断片配列と 21 塩基の長さで一致した配列の有無

⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

2. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異的な殺虫活性を決定する要因

5 a. *DvSnf7* 遺伝子断片の標的昆虫内の遺伝子に対する配列特異性

前項までに記載したように、*DvSnf7* 遺伝子断片の 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のみ殺虫活性を示すことが明らかになった。*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異性を決定する要因の1つとして、標的昆虫内の内在性遺伝子配列に対する特異性が挙げられる。今回、標的とした内在性遺伝子である *Snf7* 遺伝子は、真核生物間に幅広く保存されているが (Tu et al., 1993; Gao et al., 1999; Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006; Lee et al., 2007; Kim et al., 2011)、多くの種間で保存されている遺伝子を標的とした場合
10 であっても、内在性遺伝子配列の多様性に着目して dsRNA の配列を設計することにより、標的昆虫への特異的な殺虫活性を発揮することが報告
15 されている (Whyard et al., 2009)。

DvSnf7 遺伝子は4つのエクソン及び3つのイントロンで構成されており、そのオープンリーディングフレームは663bpの長さを有している (別添資料8のFigure 1)。本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を構成する塩基配列は、この *DvSnf7* 遺伝子のエクソン1から3にかけての配列で、オープンリーディングフレームの151から
20 390番目の配列に相当する (別添資料8のFigure 1)。

この配列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の *Snf7* 遺伝子間では高い相同性を有するが、それ以外の生物の *Snf7* 遺伝子とは相同性が低い部位を選定している。
25

実際に、*DvSnf7* 遺伝子断片の配列が WCRW と同じコウチュウ目昆虫の *Snf7* 遺伝子の配列とどの程度の相同性を有するかを調べるため、バイオインフォマティクス解析を行った (表4, p33; 表5, p36; 別添資料10) (Bachman et al., (2013) (添付文献3))。以下に詳細を記載する。
30

WCRW に系統学的に近縁であるコウチュウ目昆虫9種を選び、これらの昆虫に内在する *Snf7* 遺伝子中で WCRW 由来の *DvSnf7* 遺伝子断片に相当する配列を塩基配列解析により特定した (Bachman et al., (2013) (添付文献3) のTable 2)。次に、これらの配列と *DvSnf7* 遺伝子断片の配列の間の相同性を調査した (Bachman et al., (2013) (添付文献3))。その結果、近縁の昆虫9種から特定した配列は、WCRW と系統学的に離れれば離れる
35

5 ほど*DvSnf7*遺伝子断片の配列との相同性が低くなり、コウチュウ目ハムシ科に属する昆虫でさえも亜科間では明確な差異があることが明らかになった (表4, p33) (Bachman et al., (2013) (添付文献3), Table 2)。また、ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫において経口摂取されたdsRNAがRNAiを誘導するには連続した21塩基以上の配列の相同性が必要であることが報告されているが (Bolognesi et al., (2012) (添付文献1); Bachman et al., (2013) (添付文献3))、ヒゲナガハムシ亜科に最も近縁なハムシ亜科の昆虫の*Snf7*遺伝子であっても、*DvSnf7*遺伝子断片と21塩基長で一致する配列は存在しないことも確認された (表4, p33) (Bachman et al., (2013) (添付文献3))。これらの結果は、前述した*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAの殺虫活性を調べるための生物検定の結果と一致している (表4, p33; 別添資料7) (Bachman et al., (2013) (添付文献3))。

15 なお、Bachmanら (2013) が調査したヒゲナガハムシ亜科に最も近縁な昆虫種 (表4, p33) の*Snf7*遺伝子の配列の中には、*DvSnf7*遺伝子断片に対して19塩基長まで連続して一致する配列は存在したが、20塩基長まで連続して一致する配列は確認されなかった。そこで、*DvSnf7*遺伝子断片と20塩基長まで連続して一致する*Snf7*遺伝子の配列を持つ昆虫に対する*DvSnf7*遺伝子断片の殺虫活性の有無を調査するために、*DvSnf7*遺伝子断片と20塩基長の一致を1つ有するハエ目の*Drosophila pseudoobscura*の*Snf7*遺伝子 (表5, p36) から合成したdsRNAを用い、間接混餌投与試験により殺虫活性を調査した (別添資料9)。12日間の間接混餌投与試験後、WCRWの生存率及び体重を調査した結果、WCRWの生存率及び体重に対する影響は認められなかった (別添資料9)。

25 以上のことから、*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAがRNAiを誘導するには連続した21塩基以上の配列の相同性が必要であることが推察された。

30 なお、ハムシ科に属する亜科の分類は、ほとんどの生物間で高度に保存されているリボソーム小ユニットのRNA配列を比較する分子系統解析を用いて決定されている (図 5, p34) (Clark et al., 2001; Gómez-Zurita et al., 2007; Hunt et al., 2007; Gillespie et al., 2008)。この分子系統解析を用いて決定された分類は、表4に示した*DvSnf7*遺伝子断片の配列との相同性検索の結果とも一致していたことから、系統的にWCRWから遠縁になればなるほど*Snf7*遺伝子の*DvSnf7*遺伝子との相同性も低下し、連続した21塩基以上の配列の一致を示す可能性は低いと考えられた (図 5, p34)。

表 4 *DvSnf7* 遺伝子断片の配列とコウチュウ目ハムシ科及びゴミムシダマシ科に属する昆虫種の内在の *Snf7* 遺伝子断片の配列を比較した結果及び生物検定による殺虫活性の有無¹⁰

| 目名、科名及び亜科名 | <i>Snf7</i> 遺伝子断片の配列を特定した昆虫種名 | <i>DvSnf7</i> 遺伝子断片配列との相同性 (%) | 21 塩基長の一致 ¹ | 殺虫活性 ² |
|---------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------|-------------------|
| コウチュウ目 ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科 | WCRW | 100.0 | 221 | 有 |
| | SCRW | 98.8 | 186 | 有 |
| | <i>A. vittatum</i> | 95.0 | 69 | 有 ⁴ |
| | <i>C. trifurcata</i> | 90.8 | 18 | 有 ⁴ |
| | <i>G. calamriensis</i> | 90.8 | 3 | 有 ⁴ |
| コウチュウ目 ハムシ科ハムシ亜科 | CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) | 78.3 | 0, (14 塩基) ³ | 無 |
| | <i>C. quadrigemina</i> | 82.1 | 0, (19 塩基) ³ | 無 ⁴ |
| | <i>M. ochroloma</i> | 79.6 | 0, (19 塩基) ³ | 無 ⁴ |
| コウチュウ目 ゴミムシダマシ科 ゴミムシダマシ亜科 | <i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ) | 72.1 | 0, (11 塩基) ³ | 無 |

¹ 表中の各種由来の *Snf7* 遺伝子断片配列中で、*DvSnf7* 遺伝子断片配列と 21 塩基の長さで一致した配列の数

5 ² 生物検定 (表 2, p27; 別添資料 7) において *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を調べた昆虫に関しては、殺虫活性の有無も参考として記載した。

³ 表中の種の *Snf7* 遺伝子配列が *DvSnf7* 遺伝子断片配列と 21 塩基長の完全一致を含まない場合は、バイオインフォマティクス解析により得られた最長の配列の長さを記載した。なお、Bachman ら (2013) は、20 塩基長の一致が昆虫に対して殺虫活性を示すか否かの検証を行っていないが、表中の種の *Snf7* 遺伝子配列には 20 塩基長の一致はなかった。

10 ⁴ これらの昆虫種については実験室内における飼育方法が確立していないため、dsRNA の混餌投与による生物検定を行なうことは困難である。そのため、間接混餌投与試験により、これら昆虫種の当該 dsRNA への感受性の有無を調べた (表 3, p30) (Bachman et al., (2013) (添付文献 3), Table 3)。

¹⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

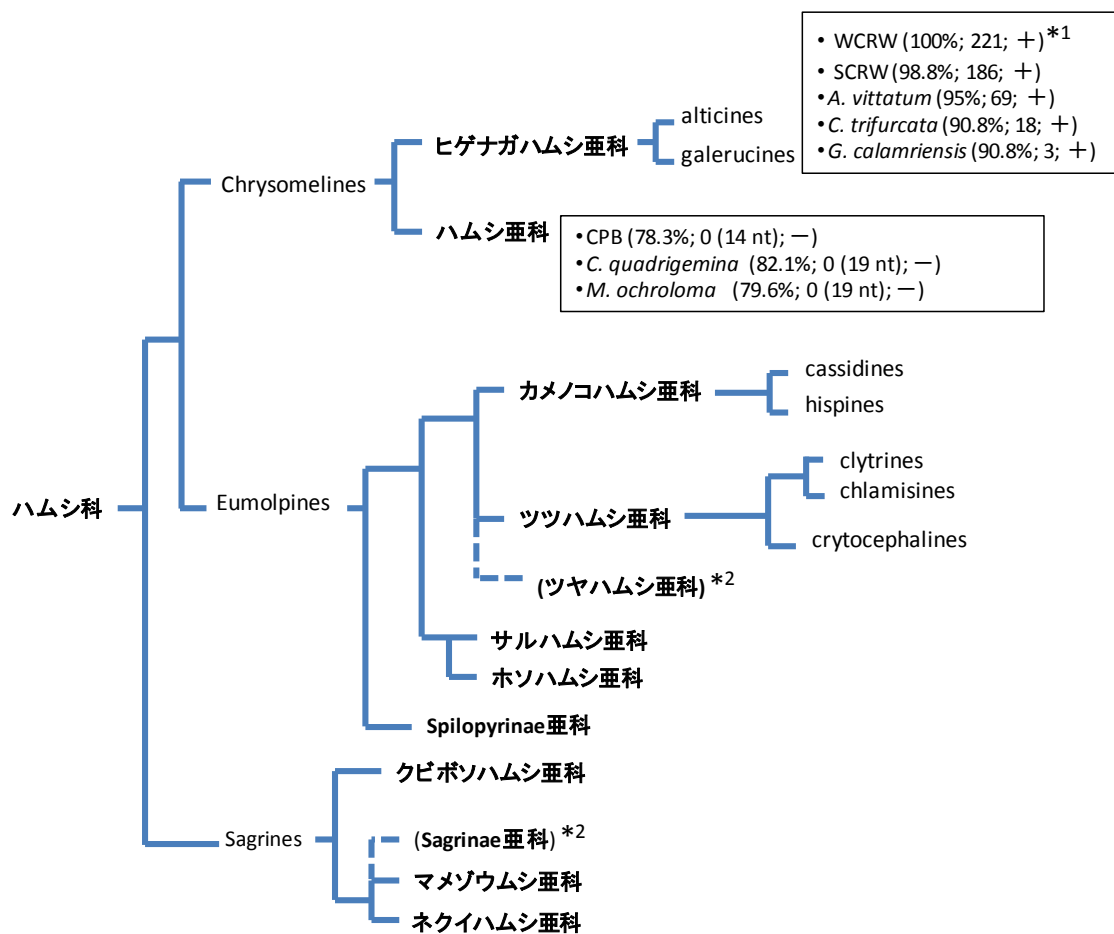


図 5 Gomez-Zurita ら (2007) を基に作成したハムシ科に属する亜科の系統図¹¹

5 *1 括弧内には左から、*DvSnf7* 遺伝子断片との相同性 (%), 21 塩基長の一致の数 (0 個の場合は最長の塩基数) 及び殺虫活性の有 (+) 無 (-) を記載した。

*2 Gomez-Zurita ら (2007) の報告では、ツヤハムシ亜科及び *Sagrinae* 亜科は実際に調査されていないが、それぞれツツハムシ亜科及びマメゾウムシ亜科に関連していると考えられている。

¹¹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

実際に、コウチュウ目ハムシ科以外にも、コウチュウ目ゴミムシダマシ科、また系統学的にコウチュウ目に近縁であるチョウ目、ハチ目、ハエ目、カメムシ目及びバッタ目 (Savard et al., 2006) 並びにミジンコ目の各目の代表的な節足動物18種を選び、これらの種に内在する*Snf7*遺伝子中においてもWCRW由来の*DvSnf7*遺伝子断片に相当する配列を一般に公開されているゲノムデータベース情報¹²を基に特定した (別添資料10)。そして、これらの配列と*DvSnf7*遺伝子断片の配列との相同性を調査した (別添資料10)。

その結果、これらの種の*Snf7*遺伝子断片の配列は*DvSnf7*遺伝子断片の配列と最大でも73%の相同性にとどまり、*DvSnf7*遺伝子断片と21塩基長での一致は認められなかった (表5, p36; 別添資料10のTable 1, p7)。

なお、本調査に用いた18種のうちコウチュウ目、チョウ目及びハチ目の各目の代表的な3種 (*Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*及び*Nasonia vitripennis*) に加え、カメムシ目の代表的な種である*Orius insidiosus*は、既に前述した生物検定により*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAに対する感受性を示さないことが確認されている (表2, p27; 表5, p36)。

以上の2つのバイオインフォマティクス解析の結果 (表4, p33; 表5, p36) から、WCRW由来の*DvSnf7*遺伝子断片の配列は、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の*Snf7*遺伝子間では極めて高い相同性を有しているが、それ以外の昆虫の*Snf7*遺伝子とは同じハムシ科であっても相同性が低いことが確認された。さらに、これらのバイオインフォマティクス解析の結果は、前述した生物検定で示された「*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAは、標的昆虫であるWCRWと同じハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫にのみ特異的な殺虫活性を示す。」という結果を支持するものであった。

¹² 2012年11月の時点でNational Center for Biotechnology Information (NCBI) が公開しているWhole Genome Shotgun (WGS) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/>) 及び UniGene (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/>) の配列データベースから得られた塩基配列情報である。

表5 *DvSnf7* 遺伝子断片の配列とコウチュウ目ハムシ科以外の7つの目に属する昆虫18種の内在の *Snf7* 遺伝子断片の配列を比較した結果及び生物検定による殺虫活性の有無¹³

| 目名 | <i>Snf7</i> 遺伝子断片の配列を特定した種名 | <i>DvSnf7</i> 遺伝子断片の配列との相同性 (%) | 21 塩基長の一致 ¹ | 殺虫活性 ² |
|--------|---|---------------------------------|------------------------|-------------------|
| コウチュウ目 | <i>Tribolium castaneum</i> ³ (コクヌストモドキ) | 72.4 ⁴ | 0, (11 塩基) | 無 |
| チョウ目 | <i>Bombyx mori</i> ³ (カイコ) | 66.0 | 0, (15 塩基) | 無 |
| チョウ目 | <i>Danaus plexippus</i> (オオカバマダラ) | 65.7 | 0, (10 塩基) | — |
| チョウ目 | <i>Manduca sexta</i> (タバコスズメガ) | 61.9 | 0, (8 塩基) | — |
| ハチ目 | <i>Apis mellifera</i> ³ (セイヨウミツバチ) | 72.5 | 0, (13 塩基) | — |
| ハチ目 | <i>Bombus terrestris</i> (セイヨウオオマルハナバチ) | 72.9 | 0, (12 塩基) | — |
| ハチ目 | <i>Megachile rotundata</i> | 65.1 | 0, (11 塩基) | — |
| ハチ目 | <i>Nasonia vitripennis</i> ³ (キョウソヤドリコバチ) | 71.2 | 0, (14 塩基) | 無 |
| ハチ目 | <i>Solenopsis invicta</i> (ヒアリ) | 66.9 | 0, (18 塩基) | — |
| ハエ目 | <i>Aedes aegypti</i> (ネッタイシマカ) | 68.4 | 0, (11 塩基) | — ⁵ |
| ハエ目 | <i>Anopheles gambiae</i> ³ (ガンビエハマダラカ) | 67.5 | 0, (12 塩基) | — ⁵ |
| ハエ目 | <i>Drosophila melanogaster</i> ³ (キイロショウジョウバエ) | 72.6 | 0, (9 塩基) | — ⁵ |
| ハエ目 | <i>Drosophila pseudoobscura</i> | 70.5 | 0, (20 塩基) | 無 ^{5,6} |
| ハエ目 | <i>Drosophila sechellia</i> | 70.4 | 0, (12 塩基) | — ⁵ |
| ハエ目 | <i>Drosophila yakuba</i> | 59.1 | 0, (8 塩基) | — ⁵ |
| カメムシ目 | <i>Acyrtosiphon pisum</i> ³ (エンドウヒゲナガアブラムシ) | 72.5 | 0, (12 塩基) | — |
| バッタ目 | <i>Locusta migratoria</i> ³ (トノサマバッタ) | 70.9 | 0, (12 塩基) | — |
| ミジンコ目 | <i>Daphnia pulex</i> (ミジンコ) | 67.5 | 0, (14 塩基) | — |

¹ 表中の各種由来の *Snf7* 遺伝子断片配列中で、*DvSnf7* 遺伝子断片配列と 21 塩基の長さで一致した配列の数を示した。また、表中の種の *Snf7* 遺伝子配列が *DvSnf7* 遺伝子断片配列と 21 塩基長の完全一致を含まない場合は、最長の配列の長さを記載した。

5 ² 生物検定 (表 2, p27; 別添資料 7) において *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を調べた昆虫に関しては、殺虫活性の有無も参考として記載した。また、生物検定を行っていないものに関しては、「—」と表記した。

³ Savard ら (2006) が系統学的関係性を研究するために用いたモデル昆虫種 (Savard et al., 2006)

⁴ 一般に公開されているデータベースを用いて算出した相同性のため、表 4 (p33) (Bachman et al., (2013) (添付文献 3) の Table 2) に記載の値と若干の差異がある。

10 ⁵ ハエ目ショウジョウバエ属の昆虫 (*Drosophila* spp.) は dsRNA のみを経口摂取した場合には dsRNA に対して感受性を示さず、幼虫を陽イオンリポソームに内包された dsRNA を含む溶液に浸した場合に dsRNA に対し感受性を示すことが知られている (Whyard et al., 2009)。

⁶ *D. pseudoobscura* に関しては、dsRNA の混餌投与による生物検定を行なうことは困難であるため、間接混餌投与試験により当該 dsRNA への感受性の有無を調べた (別添資料 9)。

¹³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

b. 経口摂取された dsRNA が昆虫に対して殺虫活性を示すためのその他の条件

5 配列特異性に加えて、経口摂取された dsRNA の昆虫に対する殺虫活性を妨げる物理的及び生化学的な障壁が存在する。これらの障壁は昆虫の属する目により様々なものが存在する。例えば、食性及び食餌、口内又は中腸の核酸分解酵素による dsRNA の分解、細胞への dsRNA の取り込み機構並びに経口摂取された dsRNA への感受性の程度がある
10 (Furusawa et al., 1993; Arimatsu et al., 2007a; Arimatsu et al., 2007b; Rodriguez-Cabrera et al., 2010; Terenius et al., 2011; Liu et al., 2013; Luo et al., 2013; Christiaens et al., 2014; Wynant et al., 2014)。これらの障壁が存在するため、全ての昆虫が経口摂取された dsRNA に対して感受性を示すわけではない (Huvenne and Smaghe, 2010)。

15

コウチュウ目昆虫

経口摂取された dsRNA に対してコウチュウ目昆虫が、比較的高い感受性を示すことが報告されている (Huvenne and Smaghe, 2010) (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。Baum らは、コウチュウ目、ハエ目、
20 カメムシ目、ハチ目及びチョウ目の昆虫に対して特定の遺伝子を dsRNA を用いて抑制する実験を行っており、コウチュウ目昆虫が他の目に属する昆虫と比べて非常に低い濃度の dsRNA で遺伝子発現が抑制されることを示した (図 6, p40) (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。特に CRW に関しては、中腸抽出物で dsRNA が分解されないことが確認されており、このことが経口摂取した dsRNA に CRW が強い感受性を示す要因の 1 つであると推察されている (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。さらに、WCRW において経口摂取した dsRNA が中腸まで分解されずに達していることが確認されている (Ivashuta et al., 2015)。一方、コウ
25 チュウ目以外の目に属す昆虫は経口摂取を通して遺伝子発現を抑制するためにはコウチュウ目昆虫に投与された濃度の約 1,000 倍程度の dsRNA が必要だった (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。しかしながら、コウチュウ目昆虫全てが、経口摂取された dsRNA に対して高い感受性を持つわけではなく、コウチュウ目昆虫であっても *T. castaneum* のように経口摂取された dsRNA への感受性が低い (Whyard et al., 2009)
30 又は *Anthonomus grandis* のようにほとんど感受性がないとされる種も存在する (Baum et al., 2007; Whyard et al., 2009)。また、Baum らは、中腸内環境 (特に中腸内の核酸分解酵素及び pH) が経口摂取された dsRNA の

35

安定性に重要で、高い感受性にも関連していることを示唆しており、V-ATPase¹⁴をコードする遺伝子の dsRNA (400bp) に WCRW 中腸からの抽出物を pH7.4 及び pH10.5¹⁵の2つの条件下で加える実験を行ったところ、dsRNA はこれら2つの pH 条件下で分解されずに残っていたと報告している (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。

5

チョウ目昆虫

チョウ目昆虫の dsRNA への感受性についてはばらつきがあり、チョウ目昆虫で殺虫活性を示すためにはコウチュウ目昆虫と比べてより高濃度の dsRNA の経口摂取が必要とされることが報告されている (図 6, p40) (Huvenne and Smaghe, 2010; Terenius et al., 2011) (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。また、チュウ目昆虫に関しても、Baum らは必須の蛋白質である V-ATPase をコードする遺伝子の dsRNA (400bp) にフォールアミーワームの中腸からの抽出物を pH7.4 及び pH10.5 の2つの条件下で加える実験を行っている (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。しかしながら、フォールアミーワームの中腸からの抽出物の場合は、2つの pH 条件下で dsRNA は分解され、特にチョウ目昆虫の中腸内の一般的な pH であるアルカリ性の pH10.5 では速やかに分解されたと報告されている (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。さらに、チョウ目昆虫のタバコスズメガ (*Manduca sexta*) の血リンパ中で dsRNA を分解する核酸分解酵素が見つかっている (Garbutt et al., 2013)。

10

15

20

ハエ目及びハチ目昆虫

ハエ目及びハチ目昆虫の dsRNA への感受性についてもばらつきがあり、ハエ目及びハチ目昆虫で殺虫活性を示すためにはコウチュウ目昆虫と比べてより高濃度の dsRNA の経口摂取が必要とされることが報告されている (図 6, p40) (Coy et al., 2012; Singh et al., 2013; Vander Meer and Choi, 2013; Zhao and Chen, 2013)。また、ハエ目ショウジョウバエ属の昆虫 (*Drosophila* spp.) は dsRNA のみを経口摂取した場合には dsRNA に対して感受性を示さず、幼虫を陽イオンリポソームに内包された dsRNA を含む溶液に浸した場合に dsRNA に対し感受性を示すことが知られている (Whyard et al., 2009)。

25

30

¹⁴ 真核生物の多くの生体膜に存在し、水素イオンを運ぶことで膜内外の pH を調整している酵素である (Whyard et al., 2009)。

¹⁵ pH7.4 及び pH10.5 はそれぞれコウチュウ目昆虫とチョウ目昆虫の中腸内の一般的な pH 値であることが知られている (Terra, 1990)。

カメムシ目昆虫

カメムシ目昆虫の dsRNA への感受性についてもばらつきがあり、カメムシ目昆虫で殺虫活性を示すためにはコウチュウ目昆虫と比べてより高濃度の dsRNA の経口摂取が必要とされることが報告されている (図 6, p40) (Chen et al., 2010; Li et al., 2011a; Wuriyanghan et al., 2011; Mao and Zeng, 2012) (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))。カメムシ目のミドリカスミガメ (*Lygus lineolaris*) に関する近年の研究で、唾液中に存在する核酸分解酵素は dsRNA を短時間で分解するため、ミドリカスミガメが dsRNA を経口摂取しても遺伝子発現が抑制されることはないと報告されている (Allen and Walker, 2012)。また、Christiaens et al. (2014) はカメムシ目アブラムシ科に属する昆虫で、唾液だけでなく、血リンパ中にも dsRNA を分解する核酸分解酵素が存在していることを報告している。

その他の昆虫

バッタ目に属する昆虫は dsRNA を分解する核酸分解酵素を中腸内に有しており、この核酸分解酵素が経口摂取された dsRNA の殺虫活性を妨げる障壁として機能していると考えられている。しかしながら、バッタ目に属する昆虫は体内に直接注射された dsRNA によって遺伝子抑制又は死に至ることが報告されている (Wynant et al., 2012; Kwon et al., 2013; Luo et al., 2013)。

以上の知見から、コウチュウ目昆虫のように経口摂取された dsRNA が分解されずに中腸細胞内に効率的に取り込まれる事例は他の昆虫目では稀であると考えられた。また、同じコウチュウ目昆虫の中でも、経口摂取された dsRNA への感受性が低い又は示さない種も存在することが明らかとなっている。

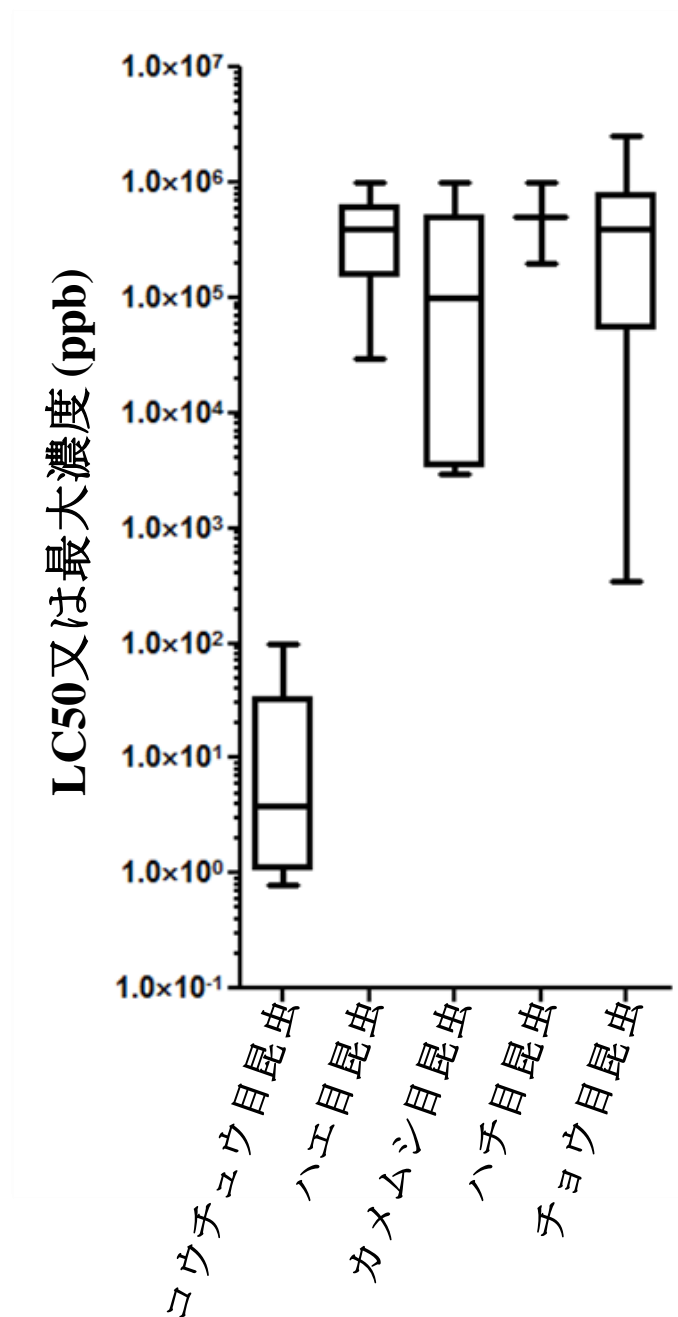


図 6 コウチュウ目、ハエ目、カメムシ目、ハチ目及びチョウ目昆虫間の経口摂取された dsRNA に対する感受性の比較 (Baum and Roberts, (2014) (添付文献 5))¹⁶

- 5 各箱は LC₅₀ 又は投与濃度の第 1 四分位数 (25% quantile) から第 3 四分位数 (75% quantile) まで表しており、箱中の線は中央値を表している。箱から伸びる各ひげは最小又は最大値まで伸びている。

¹⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

3. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異性のまとめ

- 5 *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムを調べるため、WCRW との分類学的関連性を基に選んだ 14 種の昆虫に対する殺虫活性を試験した結果、*DvSnf7* 遺伝子断片の 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のみ活性を示すことが確認された (第一-2-(1)-ロ-②-iii-1, p25~30)。
- 10 経口摂取された *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が WCRW に対して特異的な殺虫活性を示すまでの経路を以下にまとめた。
- DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は、
- ① 本組換えトウモロコシの経口摂取を通じて、WCRW の消化器官内に入り、中腸に到達する (第一-2-(1)-ロ-②-ii, p16~24)。
- 15 ② WCRW の中腸細胞に効率的に取り込まれる (第一-2-(1)-ロ-②-ii, p16~24)。
- ③ 配列特異的な RNAi 機構を通じて、標的である *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制し、WCRW に対して殺虫活性を示す (第一-2-(1)-ロ-②-iii-2-a, p31~36)。
- 20 この③の段階では、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の配列は、ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する標的昆虫の *Snf7* 遺伝子と連続する 21 塩基以上の一致を有するため、RNAi 機構を通じてこれらの *Snf7* 遺伝子発現を抑制する (第一-2-(1)-ロ-②-iii-2-a, p31~36)。
- 25 ハムシ科以外の非標的昆虫に関しては、①及び②の段階で、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が中腸細胞に達する前に分解される又は中腸細胞内に効率的に取り込まれないなどの物理的及び生化学的な障壁 (第一-2-(1)-ロ-②-iii-2-b, p37~40) が存在するため、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が殺虫活性を示す可能性は低いと考えられる。
- 30 また、仮に①及び②の条件を満たし、中腸細胞に取り込まれたとしても、③の段階において、当該 dsRNA はハムシ科以外の非標的昆虫の *Snf7* 遺伝子配列と殺虫活性を示すほどの相同性を有している可能性は低く (第一-2-(1)-ロ-②-iii-2-a, p31~36)、*Snf7* 遺伝子の発現抑制が起こるとは考えにくい。
- さらに、経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導に関しては、dsRNA
- 35 の長さ、RNAi の全身的伝搬、標的とする遺伝子の選択、dsRNA 配列、摂取する dsRNA 量、遺伝子発現抑制の持続性に関わる機構、昆虫の成長段階等の様々な要因も影響を及ぼすと考えられる (第一-2-(1)-ロ-②-ii, p16~24)。

5 上述した点に加えて、第二の 2-(1) 有害物質の産生性 (p82~88) に記載しているように、ハムシ科以外の非標的昆虫が、本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA によって影響を受けるには、本組換えトウモロコシの経口摂取を通じて当該 dsRNA に曝露される必要がある。

10 以上のことから、本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。

iv. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の土壌微生物に対する影響

5 前述したように本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。

10 実際に *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が、土壌に生息する生物に対して非意図的な活性を示さないことを確認するため、1. *DvSnf7* 遺伝子断片の配列と土壌に生息する真核生物7種の遺伝子配列との相同性検索、及び2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壌における土壌微生物相試験を行った。

1. *DvSnf7* 遺伝子断片の配列と土壌に生息する真核生物7種の遺伝子配列との相同性検索

15

本解析を行うにあたって、分類学及び土壌生態系での役割を基に、土壌中に生息する真核生物7種 (表 6, p45; 別添資料11のTable 1, p4) を選んだ。これらの真核生物7種はそれぞれ系統的に離れており、土壌に生息する真核生物の中でも大部分を占めているアメーバ、藻類又は菌類の代表的な種となっている。また、これら7種は表 6 (p45) に記載しているように、土壌生態系で重要かつ多様な役割を担っている。

20

本解析では、まず真核生物7種の内在性の *Snf7* 遺伝子中において *DvSnf7* 遺伝子断片に相当する配列を一般に公開されているゲノムデータベース情報¹を基に特定した。そして、これらの配列と *DvSnf7* 遺伝子断片の配列の間の相同性を調査した (別添資料11)。その結果、これら真核生物7種の *Snf7* 遺伝子断片の配列は *DvSnf7* 遺伝子断片の配列と 53.8% を超える相同性を示すことはなかった。また、同じデータベース中で *DvSnf7* 遺伝子断片と 21塩基長で一致する配列がないことも確認された (表 6, p45; 別添資料11のTable 5, p9)。

25

したがって、これら真核生物7種において *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が RNAi を誘導するとはないと考えられた。

30

なお、真核生物である菌類は RNAi 機構を有している (Dang et al., 2011)。しかし、原核生物である細菌などは RNAi 機構とは異なる CRISPR/Cas システムと呼ばれる防御機構を有している (van der Oost and Brouns, 2009)。このことから、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が土壌中に存在する細菌などに対して影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

35

2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壌における土壌微生物相試験

5 本組換えトウモロコシによる土壌微生物への影響を調べるために、2014年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場において収穫時に採取した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栽培土壌を供試して土壌微生物相試験を行った (第一の 2-(6)-②-g, p78; 別添資料 12)。

本試験では、収穫時に採取した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に存在する細菌、放線菌及び糸状菌の菌数を計測した。

10 その結果、細菌、放線菌及び糸状菌の菌数に関して、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間で統計学的有意差は認められなかった (第一の 2-(6)-②-g, p78; 別添資料 12)。

したがって、本組換えトウモロコシが土壌微生物に影響を与える可能性は低いと考えられた。

15 なお、前述したとおり (第一-2-(1)-ロ-②-iii, p25~42)、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されていると考えられている。また、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おいて経口摂取された dsRNA が RNAi を誘導するには連続した 21 塩基以上の配列の相同性が必要であり、系統的にヒゲナガハムシ亜科から遠縁になればなるほど、*Snf7* 遺伝子の *DvSnf7* 遺伝子との相同性も低下していくこと及び *DvSnf7* 遺伝子断片と連続した 21 塩基以上の配列の相同性を持つ *Snf7* 遺伝子を持つ昆虫はハムシ科属する一部の昆虫に限定されていることが明らかになっている。したがって、ハムシ科に属する一部の昆虫に特異的に活性を示す *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が、節足動物とは系統的にかけ離れた土壌微生物に対して意図しない影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

30 以上の1. *DvSnf7* 遺伝子断片の配列と土壌に生息する代表的な真核生物7種の遺伝子配列を比較する相同性検索、及び2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壌における土壌微生物相試験の結果から、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は土壌に生息する生物に対して非意図的な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

表 6 *DvSnf7* 遺伝子断片の配列と土壤に生息する真核生物 7 種の遺伝子配列との相同性検索のまとめ¹⁷

| 種名 | 分類 | 土壤生態系での役割 | 21 塩基長の一致 ¹ |
|------------------------------------|----------------|------------------|------------------------|
| <i>Acanthamoeba castellanii</i> | アメーバゾア | バクテリア食真菌 | 0 |
| <i>Blumeria graminis</i> | 子嚢菌 (病原性真菌) | 植物病原菌 | 0 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 緑藻植物 | 光合成生物 | 0 |
| <i>Laccaria bicolor</i> | 担子菌 | 外生菌根菌 | 0 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 担子菌 (病原性真菌) | 白腐病菌 リグニンの分解者 | 0 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 担子菌 (酵母) | 鉄を含む 有機物の生産者 | 0 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 繊毛虫 | バクテリア食真菌 | 0 |

5 ¹表中の真核生物の塩基配列データベース中で、*DvSnf7*遺伝子断片配列 (240塩基) と21塩基の長さで一致した配列の数

v. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の脊椎動物に対する影響

10

前述したように、本組換えトウモロコシ中で発現している*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAの殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。しかし、念のため*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAが、ヒトを含む脊椎動物に対して非意図的な

15

1. 経口摂取したdsRNAによるRNAiの誘導を妨げる様々な障壁、
2. RNAを含む作物を安全に食してきた歴史、
3. 本組換えトウモロコシ中の*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAの発現量の3つの観点から考察した。

20

1. 経口摂取した dsRNA による RNAi の誘導を妨げる様々な障壁

脊椎動物は、以下に示すように経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導を妨げる様々な障壁を有することから、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が遺伝子の発現に影響を及ぼすことはないと考えられる。

25

- a. 唾液、胃液、腸液、膵臓分泌液及び血管中に存在する核酸分解酵素

¹⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

ヒトを含めた脊椎動物は経口摂取されたRNAを分解する多くの分解酵素(唾液、胃液、腸液及び血清中の分解酵素等)を持っており、一般的にそれらの分解酵素は核酸の塩基配列にかかわらず、体内に入る全ての核酸に対して機能していると考えられる(Petrick et al., 2013)。ヒトを含む哺乳類に経口摂取されたdsRNAは、まず唾液中に存在するリボヌクレアーゼによって分解され(Park et al., 2006)、その後も胃中の酸性条件下で分解されることが知られている(Loretz et al., 2006; Akhtar, 2009; O'Neill et al., 2011)。また、胃腸管腔、消化液及び膵臓分泌液中の核酸分解酵素並びに胆汁塩も経口摂取されたRNAを分解し、RNAiの誘導を妨げる障壁になっていると考えられる(Loretz et al., 2006; O'Neill et al., 2011)。さらに血管中にも核酸分解酵素が存在している(Houck, 1958)。

なお、消化に関わる酵素の構造や機能に関しては、全ての脊椎動物で共通しており、哺乳類と同じように魚類、両生類、爬虫類及び鳥類も核酸を分解する核酸分解酵素を有している(Stevens and Hume, 1995)。したがって、哺乳類に存在する経口摂取されたRNAに対する障壁が魚類、両生類、爬虫類及び鳥類などの脊椎動物にも存在していると考えられる。

b. 細胞内へのdsRNAの取り込みを妨げる障壁

仮にdsRNAが唾液、胃液、腸液及び血管中で分解されなかったとしても、細胞内に取り込まれない限りは標的とする遺伝子の発現を抑制することはできない。一般的にRNAのような分子量が大きく、親水性の物質は腸上皮組織の細胞膜を透過することができず、このことも経口摂取されたRNAによるRNAi誘導を妨げる物理的な障壁となっている(Sioud, 2005; Akhtar, 2009; O'Neill et al., 2011)。250nMの高い濃度でsiRNAを培養細胞中に導入する実験では、トランスフェクション試薬などを用いなければsiRNAを培養細胞内へ導入することはできないことが報告されている(Lingor et al., 2004)。さらに仮に細胞内に入ったとしても、外来のRNAは細胞のエンドサイトーシス及びリソソームによって隔離・分解されることも知られている(Gilmore et al., 2004; Sioud, 2005)。

c. RNAの細胞内への運搬に関する数多くの研究

細胞内へのRNAの取り込みに関しては、その高い特異性からRNAオリゴヌクレオチドなどのRNAiメカニズムを通して効果を発揮する核酸医薬品の開発に関心が集まり、核酸医薬品の開発のため数多くの研究がなされている。しかし、全身組織へRNAを運搬することが未だに課題として

残っている (Behlke, 2006; Nguyen et al., 2008; Vaishnav et al., 2010; O'Neill et al., 2011)。RNAオリゴヌクレオチドの全身組織への運搬は難しく、核酸医薬品の開発を妨げる大きな要因の1つとなっており、オリゴヌクレオチドを用いた治療では、化学修飾により安定な状態に保つための徹底した処置を施した場合、特殊な脂溶性の運搬体を用いて製剤化した場合又はその両方を用いた場合にのみ効能が認められている (Behlke, 2006)。例えば、マウスのアポ蛋白質の遺伝子を標的とし、薬品で安定化させたsiRNAを静脈注射で50mg/kg投与した場合でも、抑制効果は認められなかったことが報告されている (Soutschek et al., 2004)。この50mg/kgという量は、本組換えトウモロコシの摂食を通じて摂取するdsRNA量と比べると非常に多い量である。この報告以外にも細胞内へのRNAの取り込みに関する数多くの研究がなされているが、これまでのところ特殊な条件下以外で脊椎動物の細胞が効率的にRNAを取り込んだという報告はなく、細胞内へのRNAの取り込みがRNAiメカニズムにおける大きな障壁であることが知られている。よって、本組換えトウモロコシを摂食することでヒトを始めとする脊椎動物を含めた標的とする昆虫以外の動物等への影響は考えにくい。

2. dsRNAを含む作物を安全に食してきた歴史

RNAiによる遺伝子発現抑制は、食品及び飼料として消費されている植物及び動物を含む真核生物で自然発生的に起こる普遍的な現象であり、従来の作物中でもRNAによる内在性の遺伝子発現調節が特定の形態形成に参与している (Kusaba et al., 2003; Tuteja et al., 2004; Della Vedova et al., 2005)。また、インゲンマメ、コショウ及びオオムギのような食用作物にはウイルス感染によって生じたdsRNAが存在していることも知られている (Fukuhara et al., 2006)。さらに、日常的に数十億の人々に安全に消費されているイネ子実中にも低分子RNAが存在し、その一部はヒトの細胞周期調整、成長因子、シグナル伝達、代謝酵素及び転写因子などの重要な遺伝子配列と100%の相同性を有していると報告されている (Ivashuta et al., 2009)。これらの低分子RNAは元々はdsRNAからRNAi機構によって生産されたと考えられ、イネ子実中にこれらの低分子RNAのもとになったdsRNAも存在していることを裏付けている。これらのことから、ヒトの重要な遺伝子配列と一致する配列を有するRNAはイネ子実に限らず、その他の作物にも存在していると考えられ、ヒトを含む脊椎動物はdsRNAを安全に食してきた長い歴史があるといえる (Heisel et al., 2008; Ivashuta et al., 2009; Jensen et al., 2013)。

L. Zhangら(2012a)は、経口摂取されたRNAによるRNAiの誘導を報告し

ている。マウスに未調理のイネ子実を大量（ヒトの摂取量に換算すると、調理したイネ子実を約 33kg/day 摂取した場合と同程度）に摂取させた後、マウスの血清及び肝臓中でイネ由来の複数の miRNA を検出し、検出された miRNA の 1 つである miR168a と相同性を示す遺伝子がコードする低比重リポ蛋白質 (LDL) 受容体に付随する蛋白質 (LDLRAP1) の発現量がマウス体内で減少し、血漿中の LDL コレステロールが増加したと報告している (Zhang et al., 2012a)。L. Zhang ら (2012a) はこれらの結果から、植物中の miRNA は配列の相同性をもとに動物の遺伝子発現に関与しており、この現象が一般的である可能性があるとして示唆している。また、Heinemann ら (2013) は L. Zhang ら (2012a) の論文を引用し、現在の RNAi を応用した遺伝子組換え食品の安全性審査手法が不十分であると主張している。

しかしながら、これらの主張には、遺伝子組換え食品中の短い dsRNA が従来の食品中に既に存在している dsRNA よりもヒトに悪影響を及ぼすような危険性を有していることを示す科学的根拠がないとして、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) のような公的機関によって異議が唱えられた (FSANZ, 2013)。また、既に述べたとおり植物中の dsRNA を含む核酸の経口摂取に対する安全性への懸念は存在せず、既存の遺伝子組換え食品の安全性審査手法は本組換えトウモロコシのような RNAi を応用した遺伝子組換え食品に対しても適用できると考えられる。下記にその根拠となる研究及び報告をまとめた。

- Y. Zhang ら (2012b)¹⁸ は miR168a を含む低分子 RNA が植物由来であるにもかかわらず動物由来の低分子 RNA として公開データベースに数多く登録されていることを報告している。特に miR168a は哺乳動物の RNA データベース中で非常に多く登録されている。この結果から、L. Zhang ら (2012a) の試験でマウス組織に見つかった miR168a はイネに由来するものではない可能性が示唆され、経口摂取された RNA によるマウス体内での RNAi の誘導に関しては疑問が生じている (Zhang et al., 2012b)。
- L. Zhang ら (2012a) の報告を検証する試験も行われているが、L. Zhang ら (2012a) が報告している結果は再現されなかった (Dickinson et al., 2013)。Dickinson ら (2013) がマウスに miR168a を食餌を通じて与えた試験では、食餌によって LDL コレステロールの増減に関連する LDLRAP1 蛋白質の発現量に変化は認められなかった。また、LDL コレステロール量はイネ子実を多く含む食餌ではわずかに変化があったが、栄養的に偏りが無い食餌では変化はなかった (Dickinson et al., 2013)。これらのことから、L. Zhang ら (2012a) の試験結果は miR168a によって引き起こされたというよりも、遺伝子発現及び蛋白質発現の変動性並びに食餌間の栄養的な差異によるもの

¹⁸Zhang et al. (2012a) の著者と Zhang et al. (2012b) の著者は同姓だが、まったくの別人である。

だと考えられた (Dickinson et al., 2013)。この Dickinson ら (2013) の結論は、前述の経口摂取から RNA による RNAi の誘導に関する課題を報告している先行研究とも一致している (Loretz et al., 2006; O'Neill et al., 2011)。

- 5 • Snow ら (2013) はヒト、マウス及びミツバチの食餌には相当量の miRNA が含まれているにもかかわらず、体内組織に吸収される RNA 量は限定的で、RNAi を誘導できる RNA 量をはるかに下回る量であると報告している。
- 同様に、Witwer ら (2013) は霊長類に miRNA を豊富に含んだ食餌を与える実験を行い、血液中の miRNA の有無を調査したが、これらの miRNA が血液中に存在することを示す証拠はなかったと結論している。
- 10 • Tosar ら (2014) は L. Zhang ら (2012a) の実験結果はサンプル汚染により生じた可能性を示唆し、L. Zhang ら (2012a) が導き出した結論を疑問視している (Tosar et al., 2014)。
- さらに他の研究者、研究機関及び規制機関は RNAi 技術を応用した遺伝子組換え作物に関しても、現在の安全性評価の枠組みの適用を支持している
- 15 (Parrott et al., 2010; ILSI-CERA, 2011; FSANZ, 2013)。

3. 本組換えトウモロコシにおける *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の発現量

前述したように RNA のような核酸は植物中には普遍的に存在しており、1
20 例をあげると、ダイズの種子に含まれる総 RNA 量は平均 407.3 µg/g 乾燥重 (範囲: 274.7-986.6 µg/g) 及び 21bp~24bp の siRNA 量は平均 0.66 µg/g 乾燥重と報告されている (Ivashuta et al., 2009)。一方、本組換えトウモロコシ穀粒中の *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の平均発現量は 0.000104 µg/g 乾燥重 (表 10, p69~70) であり、本組換えトウモロコシ穀粒における *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の発現量
25 は植物中に存在する siRNA 量と比較すると非常に低い値である。

4. 結論

脊椎動物に関しては、経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導を妨げる
30 様々な障壁を有している。また、RNA のような核酸は動植物中には普遍的に存在していることから、脊椎動物は、これまでに様々な RNA を安全に食してきた長い歴史があるといえる。さらに、本組換えトウモロコシ穀粒中の *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の平均発現量は 0.000104 µg/g 乾燥重であり、一般的に摂取する植物由来の食物に含まれる RNA 量と比較して極微量となっている。したがって、脊椎動物が本組換えトウモロコシから *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を
35 摂取したとしても、様々な障壁により dsRNA は速やかに分解され、摂取した脊椎動物の体内において *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が RNAi を誘導する可能性は極めて低いと考えられる。

vi. アレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性

5 一般的にdsRNAは、構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため (Kozak, 1989)、*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAが新たな蛋白質を発現する可能性は極めて低い。そのため、アレルギー性を有することはないと考えられる。

10 II. 【改変 Cry3Bb1 蛋白質】

改変 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する CRW に対する殺虫活性を示す (表 7, p51)。

15 改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科のそれぞれに属する CPB と CRW に対して殺虫活性を示すが (Head et al., 2001; U.S. EPA, 2010)、その他の昆虫に殺虫活性を示すという報告はない。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していないこと (中根ら, 1963) が示されている。

20 なお、改変 Cry3Bb1 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統には、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (MON863, OECD UI : MON-ØØ863-5) (承認日 : 2004 年 6 月 1 日) (以下、「MON863」という。)、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (MON88017, OECD UI : MON-88Ø17-3) (承認日 : 2005 年 4 月 10 日) (以下、「MON88017」という。) があり、いずれの系統もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、生物多様性に影響が生じるおそれはないと判断されている。

改変 Cry3Bb1 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するかどうか AD_2013¹⁹を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知アレルゲンと類似性は認められなかった。

¹⁹AD_2013 : Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、2013 年 1 月の時点で 1,630 件のアミノ酸配列が含まれる。

表7 改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラム (様々な昆虫の改変 Cry3Bb1 蛋白質への感受性)*

| 目 | 科 | 亜科 | 学名 | LC ₅₀ ^a 又は最大濃度 ^b (µg/mL diet) | 殺虫活性* | 日本での 生息の有無 |
|--------------------------|-----------------------------|---|--|---|-------|---------------|
| Hemiptera (カメムシ目) | Anthocoridae (ハナカメムシ科) | Anthocorinae (ハナカメムシ亜科) | <i>Orius insidiosus</i> | 930 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| Collembola (トビムシ目) | Isotomidae (ツチトビムシ科) | Proisotominae (ヒメツチトビムシ亜科) | <i>Folsomia candida</i> | 872.5 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| Neuroptera (アミメカゲロウ目) | Chrysopidae (クサカゲロウ科) | Chrysopinae (クサカゲロウ亜科) | <i>Chrysopa carnea</i> | 8,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| Hymenoptera (ハチ目) | Apidae (ミツバチ科) | Apinae (ミツバチ亜科) | <i>Apis mellifera</i> (セイウミツバチ) | 360 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | Pteromalidae (コガネコバチ科) | Pteromalinae (コガネコバチ亜科) | <i>Nasonia vitripennis</i> (キョウソヤドリコバチ) | 400 ^b | 無 | 生息 |
| Lepidoptera (チョウ目) | Crambidae (ツトガ科) | Pyraustinae (ノメイガ亜科) | <i>Ostrinia nubilalis</i> | 200 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | Noctuidae (ヤガ科) | Heliothinae (タバコガ亜科) | <i>Helicoverpa zea</i> | 200 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| Coleoptera (コウチュウ目) | Curculionidae (ゾウムシ科) | Dryophthorinae (キクイサビゾウムシ亜科) | <i>Sitophilus oryzae</i> (ココゾウムシ) | 200 ^b | 無 | 生息 |
| | | Anthonominae (ハナゾウムシ亜科) | <i>Anthonomus eugeni</i> | 200 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | | | <i>Anthonomus grandis</i> | 50 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科) | Tenebrioninae (ゴミムシダマシ亜科) | <i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ) | 200 ^b | 無 | 生息 |
| | Coccinellidae (テントウムシ科) | Coccinellinae (テントウムシ亜科) | <i>Hippodamia convergens</i> (コンバージェントレディビートル (テントウムシの一種)) | 8,000 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | | | <i>Coleomegilla maculata</i> (スポットレッドレディビートル (テントウムシの一種)) | MON 863 Pollen at 93 µg/g pollen | 無 | × |
| | Carabidae (オサムシ科) | Harpalinae (ゴモクムシ亜科) | <i>Poecilus chalcites</i> | 930 ^b | 無 | 同属種は生息 |
| | Bruchidae (マメゾウムシ科) | Bruchinae (マメゾウムシ亜科) | <i>Callosobruchus maculatus</i> (ヨツモンマメゾウムシ) | 200 ^b | 無 | 生息 |
| Chrysomelidae (ハムシ科) | Chrysomelinae (ハムシ亜科) | CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) | 2.7 ^a | 有 | × | |
| | Galerucinae (ヒゲナガハムシ亜科) | CRW (<i>Diabrotica virgifera</i>) | 75 ^a | 有 | × | |

*コウチュウ目ハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科の2つの亜科に属する種に殺虫活性を示した。

^aLC₅₀=半数致死濃度; ^b 投与された最大濃度

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

III. 【*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA + 改変 Cry3Bb1 蛋白質】

5 改変 Cry3Bb1 蛋白質のような Bt 蛋白質の作用機作については数多くの研究が
なされている (OECD, 2007)。Cry 蛋白質は、プロトトキシン (毒前駆体) として
10 産生され、標的とする昆虫体内で結晶封入体から蛋白質分解酵素により活性を
持つコア蛋白質へと変換され、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合するこ
とにより、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として昆
虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示すことが報告されている (Vachon et
15 al., 2012)。一方、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は核酸レベルで作用し、RNAi 機
構を通して殺虫活性を示すため、Bt 蛋白質とは全く異なった作用機作を有して
いる。これらの作用機作の違いは、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1
蛋白質の殺虫効果が認められる時間にも影響している。そのため、相互作用を
20 調査する生物検定においては、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1
蛋白質間の殺虫効果が認められるまでの時間差も考慮に入れ、試験を設計する
必要がある。

Levine ら (2015) は、SCRW に *DvSnf7* 遺伝子断片の一本鎖 RNA (968 塩基)²⁰ 及
び改変 Cry3Bb1 蛋白質をそれぞれ混餌投与した場合、いずれの場合でも 3 日後
には成長阻害が観察され始め、12 日後には投与群の 80% の個体で成長阻害が認
められたことを報告している (図 7, p55) (Levine et al., (2015) (添付文献 4) の
Figure 2-A, p8)。その一方で、殺虫効果は、改変 Cry3Bb1 蛋白質を混餌投与した
場合に 2 日後に、当該 RNA を混餌投与した場合に 6 日後に観察され始め、予想
されたように改変 Cry3Bb1 蛋白質を混餌投与した場合のほうが、当該 RNA を混
餌投与した場合よりも 4 日間程度早いという結果が確認された (図 7, p55))
25 (Levine et al., (2015) (添付文献 4) の Figure 2-B, p8)。つまり、当該 RNA 及び改変
Cry3Bb1 蛋白質を同時に投与した場合、当該 RNA の殺虫効果が観察される前に
改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫効果が現れてしまい、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1
蛋白質間の相互作用は観察できなくなってしまう (Levine et al., (2015) (添付文
献 4))。

30 そこで、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質の間で効果が認められるまでに
時間差のある致死濃度ではなく、時間差が小さい成長阻害を生じさせる濃度を指
標とした生物検定により、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質間の相互作用の有
無を確認した (Levine et al., (2015) (添付文献 4))。

²⁰ 当該 RNA (968 塩基) は *DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットから転写される RNA を *in vitro* で合
成したもので、*DvSnf7* 遺伝子断片を逆方向反復の形で有し、*DvSnf7* 遺伝子断片及び *Intervening
Sequence* の他に *hsp70* イントロン及び *E9* ターミネーターの部分配列も含んでいる。当該 RNA
(968 塩基) は、合成後に二本鎖 RNA (dsRNA) を形成していると考えられる。実際に、WCRW
及び SCRW に対する殺虫活性は *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA と同等であることが確認されてい
る (別添資料 7; 別添資料 24)。

本試験では WCRW ではなく、SCRW に当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質を混餌投与している。これは SCRW が WCRW と同じヒゲナガハムシ亜科に属し、比較的実験室での飼育がしやすく (Marrone et al., 1985)、成長が早いので成長阻害を観察するのに適しているためである。また、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質をそれぞれの GI₃₅ 値 (Growth Inhibition; 対照と比較して SCRW の平均体重を 35%抑制する濃度) で人工飼料に混和したもの、同様に GI₅₀ 値、GI₆₅ 値で混和したもの、合計 3 つの濃度条件 (それぞれ低反応、中反応及び高反応) を設定した。これら 3 つの濃度条件で、改変 Cry3Bb1 蛋白質、当該 RNA 及びこれら両方を SCRW (3 反復) に 12 日間混餌投与した後、成長阻害の程度を評価するため、生存している SCRW の数及びその合計重量を調査した (図 8, p55) (Levine et al., (2015) (添付文献 4) の Figure 3, p10)。さらに、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び当該 RNA それぞれの GI₃₅ 値、GI₅₀ 値及び GI₆₅ 値から、相加反応モデル (Faust et al., 2000) を構築し、各濃度条件下で当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質が相加的に作用した場合の GI 値 (GI 期待値) を予測した (図 8, p55) (Levine et al., (2015) (添付文献 4) の Figure 3, p10)。こうして算出された GI 期待値を実際に当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質と一緒に混餌投与した際に観察された GI 値 (GI 観測値) と統計学的に比較した。

その結果、3 つの濃度条件下において GI 観測値と GI 期待値との間に統計学的有意差は認められなかった ($p>0.05$; 図 8, p55) (Levine et al., (2015) (添付文献 4) の Figure 3, p10)。したがって、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質と一緒に混餌投与した GI 観測値は、当該 RNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質と比較して相加的に変化していることを示すものであると確認された。

以上のことから、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は相互作用を示さないことが明らかになった。

なお、*DvSnf7* 遺伝子断片の RNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質との相互作用の可能性を調査した Levine et al., 2015 の評価を確認するために、追加の解析を行った。この解析方法では、 $A+B$ (相加作用モデル) と $A+B+A*B$ (交互作用モデル) という 2 つの回帰分析のモデルを設定し、観測値との適合度を AIC (Akaike's Information Criterion) として算出し、2 つのモデルを比較した。AIC は相対的評価であり、AIC が小さいモデルの方がデータとの適合度が高いモデルであると解釈される。

その結果、相加作用モデルの AIC は -64.44、交互作用モデルの AIC は -63.88 であった。また、相加作用モデルの AICc は -62.62、交互作用モデルの AICc は -61.02 であった。相加作用モデルと交互作用モデルの AIC 間、AICc 間の差はわずかであり、いずれもモデルの適合度に関して議論出来る程の差は認められなかった。

複数のモデルが同等の当てはまりを示す場合には、最もパラメーターが少ないモデルによってなされるべき、という節約の原理 (オッカムの剃刀) に基づき、交互作用モデルを選ぶ必要はないと考えられた (別添資料 13 の Table 1, p6)。この結果

は、*DvSnf7*遺伝子断片のRNAと改変Cry3Bb1蛋白質は相加的に作用していることを示したLevine et al., 2015の結果を支持するものであった。

- 5 さらに、第一の 2-(1)-ロ-② (p16~51) に記載のとおり、本組換えトウモロコシにおいて発現する *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は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と考えられる。また、それぞれ有する機能が異なることから、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質が有する殺虫効果が相加的に高まることはありうるが、機能的な
- 10 相互作用を示す可能性は低いと考えられた。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトラムはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には拡がらないと結論された。

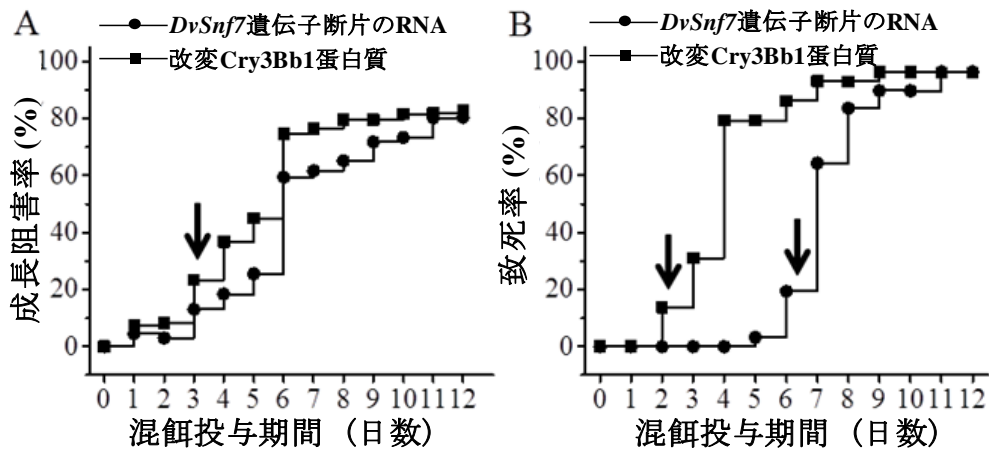


図 7 SCRW への 12 日間の混餌投与による生物検定での *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA (968 塩基) (●) と改変 Cry3Bb1 蛋白質 (■) の成長阻害 (A) 及び致死効果 (B) の比較²¹

- 5 (A) 図中の矢印は有意な成長阻害が現れ始めた時点を示している。成長阻害 (A) 効果に関しては、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質それぞれを GI₈₀ 値 (当該 RNA: 0.012µg/ml diet、改変 Cry3Bb1 蛋白質: 25µg/ml diet) で混餌投与した。
- 10 (B) 図中の矢印は有意な致死が現れ始めた時点を示している。致死率 (B) 効果に関しては、当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質それぞれを LC₉₅ 値 (当該 RNA: 0.050µg/ml diet、改変 Cry3Bb1 蛋白質: 250µg/ml diet) で混餌投与した。

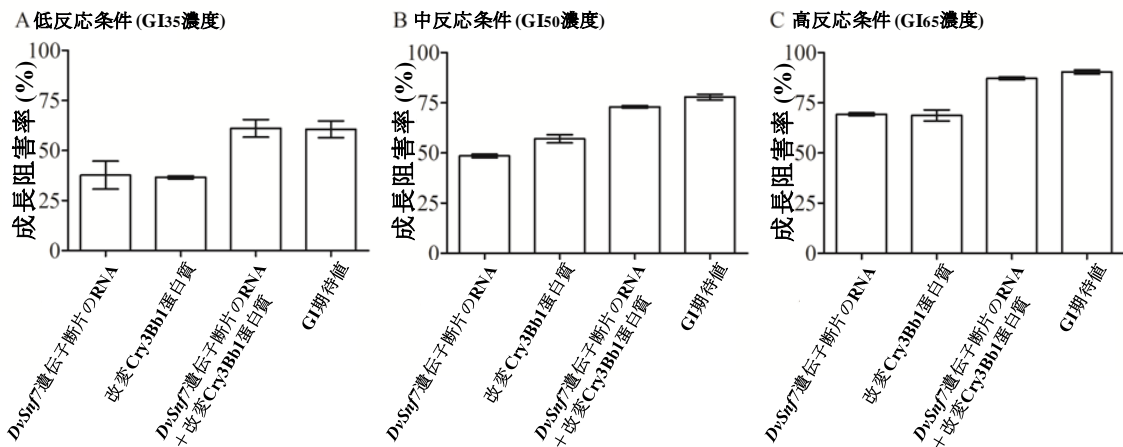


図 8 SCRW への 12 日間の混餌投与による生物検定での *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA (968 塩基) と改変 Cry3Bb1 蛋白質の GI 観測値及び GI 期待値の比較²¹

15 GI₃₅ 値 (低反応)、GI₅₀ 値 (中反応) 及び GI₆₅ 値 (高反応) の 3 つの濃度条件下での改変 Cry3Bb1 蛋白質、当該 RNA 及びこれら両方の GI 観測値とその標準誤差を示した。また、各濃度条件下で当該 RNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質が相加的に作用した場合の GI 値 (GI 期待値) を予測した。

²¹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社には帰属する

IV. 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えトウモロコシで発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium*
5 CP4 株より単離された遺伝子で、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成
酵素 (CP4 EPSPS) をコードしており、除草剤グリホサートに高い耐性を持つ
改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。植物はグリホサートを処理すると 5-エノ
ールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下
10 「EPSPS 蛋白質」という。) が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳
香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。しかし、改変 *cp4 epsps* 遺伝
子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活
性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキ
ミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

なお、CP4 EPSPS 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物でありカルタヘナ法
15 に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統 (スタック系統は除く) は
現在までに 6 作物 15 系統 (トウモロコシでは 3 系統) があり、いずれの系統
もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、生物多様性に影響が生じ
るおそれはないと判断されている。

20 改変 CP4 EPSPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有
するかどうか AD_2013 を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つの
アミノ酸によって比較したが、既知アレルゲンと類似性は認められなかった。

25 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA】

30 *DvSnf7* 遺伝子断片はトウモロコシの内在性遺伝子ではなく、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、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、トウモロコシ中の
転写産物の配列と *DvSnf7* 遺伝子断片の配列との間で 21 塩基長で一致する塩
基配列が存在するか相同性検索を行なった。その結果、トウモロコシ由来の
35 転写産物において、*DvSnf7* 遺伝子断片の配列と 21 塩基長で一致する配列は存
在しないことが確認された (別添資料 11)。

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,
1989)、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が新たな蛋白質を発現する可能性は極め

て低い。これらのことから、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

【改変 Cry3Bb1 蛋白質】

5

改変 Cry3Bb1 蛋白質は *Bacillus thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質 (Bt 蛋白質) の 1 つである。Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており (OECD, 2007)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

10

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

15

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下、「S3P」という。) と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

20

25

30

【*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA + 改変 Cry3Bb1 蛋白質 + 改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

35

上記のとおり、本組換えトウモロコシで発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有していることから、独立して作用していると考えられる。また、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 配列は、改変 *cry3Bb1* 遺伝子、改変 *cp4 epsps* 遺伝子及びトウモロコシ内在性の遺伝子の配列とは 21 塩基長の一致を有さないため、RNAi によりこれら遺伝子の発現を抑制するとは考えにくい。実際に、

- 本組換えトウモロコシ中の改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現は確認されている (表 11~表 12, p71~74; 別添資料 20 の Table 1~2, p18~21)。さらに、これらの発現産物はそれぞれ、蛋白質を産生しない、酵素活性を持たない又は高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。したがって、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が、植物体内において相互に影響する可能性はないと考えられる。
- 5

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR10871 は、*Escherichia coli* 由来のベクター pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

ロ 特性

10 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR10871 の塩基数は 16,497bp である。なお、PV-ZMIR10871 の塩基配列は別添資料 14 に記載した。

15 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

E. coli における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

20

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

本ベクターの感染性は知られていない。

25

(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

30 宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は (p12~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 1 (p11) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

35

PV-ZMIR10871 の中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

5 従来トウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚を PV-ZMIR10871 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、未成熟胚をグリホサート及びカルベニシリンを添加した組織培養培地へ移した。形質転換している個体を選抜するために除草剤グリホサートを使用した。

10 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は除去されている。さらに、本組換えトウモロコシの R4F1
15 世代の種子²²において、形質転換に用いた PV-ZMIR10871 の外側骨格領域を標的とした Taqman PCR 分析を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMIR10871 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 15 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。

20

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

25 分裂細胞から培地上で再分化させて得られた再分化個体 (R0) を土壌に移植した。その後、合計 5 回の自殖により導入遺伝子をホモ化し、選抜された個体の後代を解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えトウモロコシを選抜した。

30 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子の発現の安定性及びわが国で隔離ほ場試験に供試する予定の世代については図 9 (p61) の育成図に記載した。なお、本申請の対象は、LH244 R4 世代及び LH244 R4 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

²² 収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 20 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

5

10

15

【社外秘につき非開示】

20

図 9 本組換えトウモロコシの育成図

25

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えトウモロコシの T-DNA 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの TI:BC2F1 世代、TI:BC2F2 世代及び TI:BC3F1 世代において、T-DNA 領域の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 16)。

10 試験に供試する TI:BC2F1 世代 (図 9, p61) を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜し、自殖することで R2 世代を作出した。その後さらに 2 回の自殖をすることで、R4 世代を作出した。T-DNA 領域をホモで有する本組換えトウモロコシの R4 世代を *DvSnf7* 遺伝子断片、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子のい
15 ずれも持たない反復親 (F1266Z) と従来育種法を用いて交配し、T-DNA 領域をヘテロで有する R4F1 (F1266Z × LH244) 世代を作出した。得られた R4F1 世代に対し反復親 (F1266Z) と戻し交配を行い、TI:BC1F1 世代を作出した。さらに得られた TI:BC1F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を End-Point TaqMan PCR 法により選抜し、再度戻し交配を行って TI:BC2F1 世代
20 を作出した。また、TI:BC2F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を自殖することで BC2F2 世代を作出し、並びに TI:BC2F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を反復親と戻し交配することで TI:BC3F1 世代を作出した。

25 これら TI:BC2F1 世代、TI:BC2F2 世代及び TI:BC3F1 世代において End-Point TaqMan PCR 法又は Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA 領域の有無を確認し、分離比を算出し、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。

その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せずに遺
30 伝していることが確認された (表 8, p63; 表 9, p63)。したがって、本組換えトウモロコシの T-DNA 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表 8 本組換えトウモロコシの BC2F1 及び BC3F1 世代における T-DNA 領域の分離比²³

| 世代 | 供試個体数 | 実測値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数 | 実測値 導入遺伝子 陰性個体数 | 1:1 分離 | | | |
|-----------------------|-------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|----------|------------------|
| | | | | 期待値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数 | 期待値 導入遺伝子 陰性個体数 | χ^2 | p-値 ² |
| TI:BC2F1 ¹ | 351 | 172 | 179 | 175.50 | 175.50 | 0.14 | 0.709 |
| TI:BC3F1 ¹ | 223 | 104 | 119 | 111.50 | 111.50 | 1.01 | 0.315 |

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

² 上記 2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p < 0.05$)。

5

表 9 本組換えトウモロコシの BC2F2 世代における T-DNA の分離比²³

| 世代 | 供試 個体数 | 実測値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数 | 実測値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数 | 実測値 導入遺伝子 陰性個体数 | 1:2:1 分離 | | | | |
|-----------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|----------|------------------|
| | | | | | 期待値 導入遺伝子 陽性・ホモ個体数 | 期待値 導入遺伝子 陽性・ヘテロ個体数 | 期待値 導入遺伝子 陰性個体数 | χ^2 | p-値 ² |
| TI:BC2F2 ¹ | 623 | 152 | 314 | 157 | 155.75 | 311.50 | 155.75 | 0.12 | 0.942 |

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

² BC2F2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p < 0.05$)。

²³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

5 本組換えトウモロコシに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、
外側骨格配列の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べる
ために、次世代シーケンス技術²⁴及びバイオインフォマティクスによる導入
10 遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence
Analysis: NGS/JSA)²⁵ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及びシーケンス解析を
実施した (別添資料 17)。以下に、本解析の手法及び本組換えトウモロコシを
用いて行なった解析の結果を述べる。

NGS では、植物ゲノムを約 100bp の DNA フラグメントに断片化し、この
DNA フラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina) を用いて
15 解析することで、冗長度²⁶ 75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析することが
できる (図 10 の①, p66)。次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入
用プラスミドの塩基配列と照合²⁷する (図 10 の②, p66)。この結果において導
入用プラスミドと相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出さ
れた DNA フラグメントにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を
20 確認する (図 10 の②, p66)。さらに、JSA において、導入用プラスミドとの
相同性がある配列及び相同性がない配列の両方をもつ DNA フラグメントを、
導入遺伝子と植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、
このジャンクション配列において重複する領域を並べることで、導入遺伝子
と植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 10 の③, p66)。仮に 1 コピーの導
25 入遺伝子がゲノムの 1 カ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される
(Kovalic et al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を

²⁴ 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

²⁵ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えトウモロコシのゲノムの全領域に相当する配列を 100bp 程度のフラグメントとして増幅し、次に、これらのフラグメントを JSA によって T-DNA 領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

²⁶ 冗長度: 特定の DNA (ゲノム DNA 又は遺伝子) に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。

²⁷ BLAST 検索において、*E*-score が 1×10^{-5} 以下且つ 30bp 以上の領域で 96.7%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

PCR 及び塩基配列解析により調べることで、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

5 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノムを NGS/JSA に供試した結果、本組換えトウモロコシの R4 世代で 334.9 Gb (平均冗長度 125)、対照の非組換えトウモロコシで 346.9 Gb (平均冗長度 126) の塩基配列を解析することができた (別添資料 17 の Appendix Table 3, p45)。本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定され (図 11, p67)、これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 17 の Appendix Figure 4 の Panel C, p57~58)。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 17 の p29)。さらに、本組換えトウモロコシから得られた全ての DNA フラグメントについて、導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の配列との相同性を調べた結果、外側骨格領域が含まれていないことが示された (別添資料 17 の補足資料 Figure3, p5)。このことから、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており、外側骨格領域は挿入されていないことが確認された。

15 20 また、本組換えトウモロコシにおいて検出された接合領域及び導入遺伝子を含む領域を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA 領域が導入されていることが確認された (別添資料 17 の Appendix Figure 5, p59、Appendix Figure 6, p60~64 及び Appendix Figure 7, p65~79)。

25 以上のことから、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された。また、NGS/JSA において検出された接合領域は、導入遺伝子に起因する接合領域のみであり (図 11, p67)、PV-ZMIR10871 の外側骨格領域との相同性を持つジャンクション配列は認められなかった (別添資料 17 の追加資料の Figure 3) ことから、外側骨格領域は挿入されていないことが確認された。また、導入遺伝子領域の PCR 分析及び塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列は導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の T-DNA 領域と同一であることが確認された。

30 さらに複数世代 (R4、R4F1、R5、R5F1 及び R6 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS/JSA において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 17 の p32~34)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図 11 (p67) に示した。

35

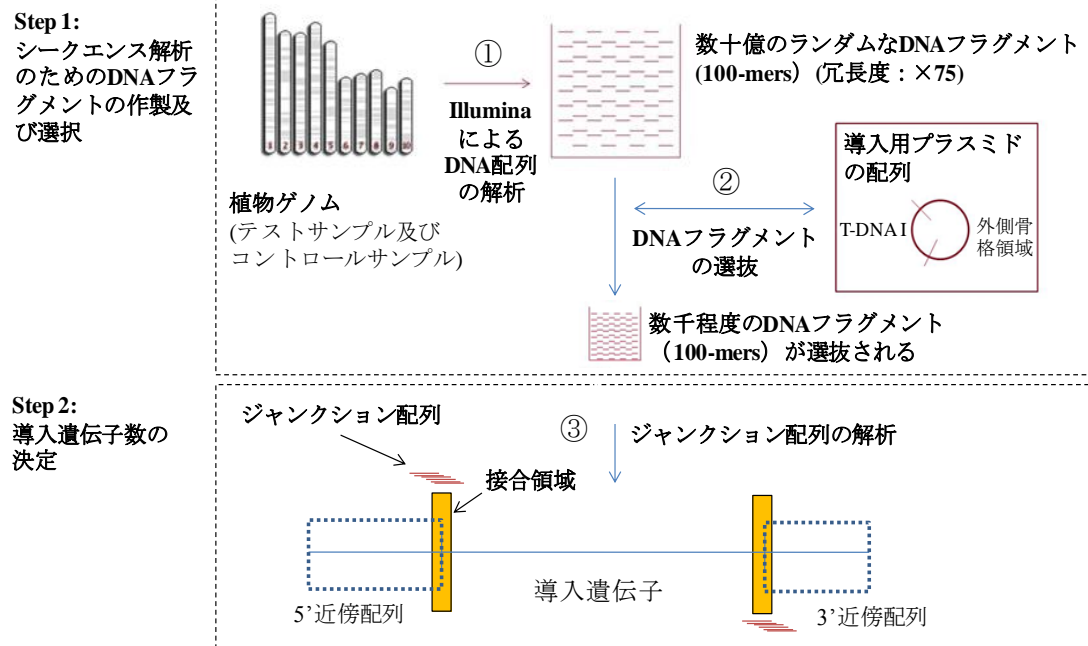


図 10 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)²⁸

²⁸本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

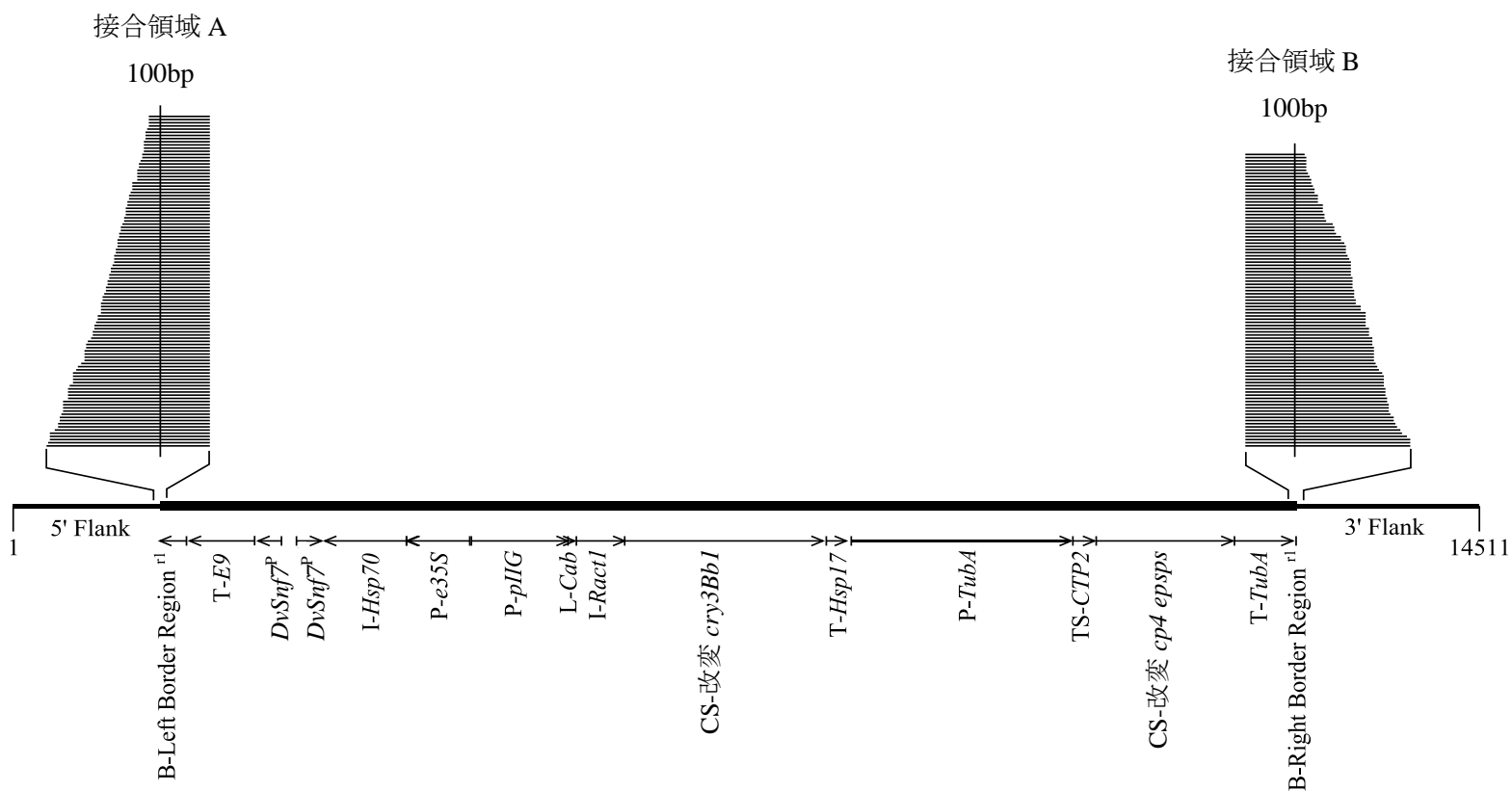


図 11 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図²⁹

- 5 図は本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。導入遺伝子内の矢印 (→) により、本組換えトウモロコシ中の構成要素の配列の方向を示した。図中の rl は、**B-Right Border Region** 及び **B-Left Border Region** が本組換えトウモロコシにおいて PV-ZMIR10871 と比較して短くなっていることを意味する。また、^P は部分配列であることを意味する。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。

²⁹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 17 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 ウェスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代 (R4、R4F1、R5、R5F1 及び R6 世代) において改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 18 の Figure 2~3, p17~18)。

15 また、2011 年から 2012 年にかけてアルゼンチンのブエノスアイレス州の 5 ヲ所において 4 反復で生育した本組換えトウモロコシの葉 (over-season leaf; OSL1~4)、根 (over-season root; OSR1~4)、地上部 (over-season whole plant; OSWP1~4)、成熟期の茎葉、成熟期の根、黄熟期の根、黄熟期の地上部、穀粒、花粉及び絹糸を採取し、*DvSnf7* 遺伝子断片の RNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び
20 改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を QuantiGene[®] Plex 2.0 Assay³⁰又は ELISA に
より分析した (別添資料 19; 別添資料 20)。その結果、本組換えトウモロコシ
の全ての組織において、当該 RNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS
蛋白質の発現が確認された (表 10~表 12, p69~74; 別添資料 19 の Table 1,
p18~21; 別添資料 20 の Table 1~2, p18~21)。

25

³⁰Quantigene[®] Plex 2.0 Assay は、磁気ビーズ及び配列特異的なプローブなどを用いて標的の RNA を捉え、蛍光発光を検出することにより、その発現量を測定する手法である。なお、本分析では *DvSnf7* 遺伝子断片 (240 塩基) をプローブとして用いている。また、トウモロコシの各組織から抽出した RNA には dsRNA も含まれるが、本分析では dsRNA を全て一本鎖に変性した後に発現量を測定している。

表 10 本組換えトウモロコシの各組織における *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の発現量
(2011-2012 年、アルゼンチン)³¹

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 平均値 (標準偏差) 範囲 [$\mu\text{g/g}$ 新鮮重] ³ | 平均値 (標準偏差) 範囲 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥重] ⁴ | 検出限界値/ 定量限界値 [$\mu\text{g/g}$ 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---|---|---|
| 葉 (OSL1) | 3-4 葉期 | 12.6×10^{-3} (2.11×10^{-3}) $8.53 \times 10^{-3} - 16.6 \times 10^{-3}$ | 73.9×10^{-3} (14.5×10^{-3}) $43.3 \times 10^{-3} - 103 \times 10^{-3}$ | $0.129 \times 10^{-3}/$ 0.566×10^{-3} |
| 葉 (OSL2) | 6-8 葉期 | 13.2×10^{-3} (4.08×10^{-3}) $7.77 \times 10^{-3} - 20.1 \times 10^{-3}$ | 67.3×10^{-3} (19.4×10^{-3}) $37.1 \times 10^{-3} - 98.9 \times 10^{-3}$ | $0.114 \times 10^{-3}/$ 0.502×10^{-3} |
| 葉 (OSL3) | 10-13 葉期 | 10.3×10^{-3} (1.89×10^{-3}) $6.19 \times 10^{-3} - 12.8 \times 10^{-3}$ | 44.6×10^{-3} (8.51×10^{-3}) $27.5 \times 10^{-3} - 58.8 \times 10^{-3}$ | $0.106 \times 10^{-3}/$ 0.468×10^{-3} |
| 葉 (OSL4) | 14 葉期- 絹糸抽出期 | 14.4×10^{-3} (6.71×10^{-3}) $5.40 \times 10^{-3} - 33.8 \times 10^{-3}$ | 56.9×10^{-3} (28.5×10^{-3}) $22.1 \times 10^{-3} - 153 \times 10^{-3}$ | $0.110 \times 10^{-3}/$ 0.482×10^{-3} |
| 根 (OSR1) | 3-4 葉期 | 3.15×10^{-3} (1.79×10^{-3}) $1.74 \times 10^{-3} - 8.00 \times 10^{-3}$ | 23.9×10^{-3} (15.1×10^{-3}) $12.5 \times 10^{-3} - 67.0 \times 10^{-3}$ | $0.029 \times 10^{-3}/$ 0.128×10^{-3} |
| 根 (OSR2) | 6-8 葉期 | 2.32×10^{-3} (0.758×10^{-3}) $0.928 \times 10^{-3} - 3.76 \times 10^{-3}$ | 16.3×10^{-3} (4.84×10^{-3}) $6.62 \times 10^{-3} - 25.7 \times 10^{-3}$ | $0.021 \times 10^{-3}/$ 0.093×10^{-3} |
| 根 (OSR3) | 10-13 葉期 | 1.81×10^{-3} (0.749×10^{-3}) $0.942 \times 10^{-3} - 4.00 \times 10^{-3}$ | 10.2×10^{-3} (4.77×10^{-3}) $5.13 \times 10^{-3} - 24.3 \times 10^{-3}$ | $0.020 \times 10^{-3}/$ 0.088×10^{-3} |
| 根 (OSR4) | 14 葉期- 絹糸抽出期 | 1.28×10^{-3} (0.471×10^{-3}) $0.530 \times 10^{-3} - 2.40 \times 10^{-3}$ | 6.84×10^{-3} (2.67×10^{-3}) $2.66 \times 10^{-3} - 13.0 \times 10^{-3}$ | $0.015 \times 10^{-3}/$ 0.067×10^{-3} |
| 地上部 (OSWP1) | 3-4 葉期 | 10.5×10^{-3} (4.25×10^{-3}) $6.78 \times 10^{-3} - 23.1 \times 10^{-3}$ | 84.8×10^{-3} (43.8×10^{-3}) $51.1 \times 10^{-3} - 213 \times 10^{-3}$ | $0.078 \times 10^{-3}/$ 0.345×10^{-3} |
| 地上部 (OSWP2) | 6-8 葉期 | 8.54×10^{-3} (3.54×10^{-3}) $5.01 \times 10^{-3} - 16.0 \times 10^{-3}$ | 55.1×10^{-3} (23.1×10^{-3}) $33.0 \times 10^{-3} - 106 \times 10^{-3}$ | $0.054 \times 10^{-3}/$ 0.239×10^{-3} |
| 地上部 (OSWP3) | 10-13 葉期 | 3.53×10^{-3} (1.17×10^{-3}) $2.03 \times 10^{-3} - 5.89 \times 10^{-3}$ | 25.5×10^{-3} (9.53×10^{-3}) $13.0 \times 10^{-3} - 45.9 \times 10^{-3}$ | $0.027 \times 10^{-3}/$ 0.119×10^{-3} |
| 地上部 (OSWP4) | 14 葉期- 絹糸抽出期 | 3.16×10^{-3} (1.03×10^{-3}) $1.89 \times 10^{-3} - 5.37 \times 10^{-3}$ | 18.5×10^{-3} (6.27×10^{-3}) $10.3 \times 10^{-3} - 32.2 \times 10^{-3}$ | $0.028 \times 10^{-3}/$ 0.123×10^{-3} |

³¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 10 本組換えトウモロコシの各組織における *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の発現量 (2011-2012 年、アルゼンチン) (続き)

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 平均値 (標準偏差) 範囲 [$\mu\text{g/g}$ 新鮮重] ³ | 平均値 (標準偏差) 範囲 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥重] ⁴ | 検出限界値/ 定量限界値 [$\mu\text{g/g}$ 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---|---|---|
| 根 | 黄熟期 | 0.536×10^{-3} (0.295×10^{-3}) $0.086 \times 10^{-3} - 1.07 \times 10^{-3}$ | 2.37×10^{-3} (1.29×10^{-3}) $0.425 \times 10^{-3} - 4.61 \times 10^{-3}$ | $0.013 \times 10^{-3}/$ 0.059×10^{-3} |
| 地上部 | 黄熟期 | 1.28×10^{-3} (0.361×10^{-3}) $0.601 \times 10^{-3} - 2.31 \times 10^{-3}$ | 4.26×10^{-3} (1.26×10^{-3}) $2.00 \times 10^{-3} - 7.72 \times 10^{-3}$ | $0.036 \times 10^{-3}/$ 0.157×10^{-3} |
| 根 | 成熟期 | 0.353×10^{-3} (0.203×10^{-3}) $0.127 \times 10^{-3} - 0.947 \times 10^{-3}$ | 1.39×10^{-3} (0.815×10^{-3}) $0.478 \times 10^{-3} - 3.68 \times 10^{-3}$ | $0.015 \times 10^{-3}/$ 0.065×10^{-3} |
| 茎葉 | 成熟期 | 0.310×10^{-3} (0.077×10^{-3}) $0.190 \times 10^{-3} - 0.449 \times 10^{-3}$ | 0.677×10^{-3} (0.201×10^{-3}) $0.401 \times 10^{-3} - 1.04 \times 10^{-3}$ | $0.047 \times 10^{-3}/$ 0.207×10^{-3} |
| 花粉 | 雄穂抽出期— 絹糸抽出期 | 0.103×10^{-3} (0.069×10^{-3}) $0.056 \times 10^{-3} - 0.224 \times 10^{-3}$ | 0.134×10^{-3} (0.090×10^{-3}) $0.073 \times 10^{-3} - 0.292 \times 10^{-3}$ | $0.013 \times 10^{-3}/$ 0.057×10^{-3} |
| 絹糸 | 絹糸抽出期 | 0.530×10^{-3} (0.190×10^{-3}) $0.215 \times 10^{-3} - 0.893 \times 10^{-3}$ | 5.42×10^{-3} (2.05×10^{-3}) $1.99 \times 10^{-3} - 9.03 \times 10^{-3}$ | $0.004 \times 10^{-3}/$ 0.019×10^{-3} |
| 穀粒 | 成熟期 | 0.091×10^{-3} (0.028×10^{-3}) $0.049 \times 10^{-3} - 0.153 \times 10^{-3}$ | 0.104×10^{-3} (0.033×10^{-3}) $0.056 \times 10^{-3} - 0.175 \times 10^{-3}$ | $0.008 \times 10^{-3}/$ 0.036×10^{-3} |

¹ OSL= over-season leaf (葉); OSR= over-season root (根); OSWP= over-season whole plant (地上部)

² 採取した各組織の生育段階

- 5 ³ *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の発現量は組織の新鮮重 1g 当たりの μg で算出されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は 5 ヶ所全てのほ場で採取されたそれぞれの組織で計算されている (根 (成熟期)、茎葉、花粉及び穀粒を除いて、全ての組織で n=20。根 (成熟期) は n=19、茎葉は n=16、花粉は n=5 及び穀粒は n=18)。なお、花粉の 2 サンプルにおける発現量は検出限界値 (LOD) 未満であり、その他の根 (成熟期)、茎葉、花粉及び穀粒のサンプルは定量限界値 (LOQ) 未満であった。
- 10 ⁴ *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の発現量は組織の乾燥重 1g 当たりの μg で算出されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は 5 ヶ所全てのほ場で採取されたそれぞれの組織で計算されている (根 (成熟期)、茎葉、花粉及び穀粒を除いて、全ての組織で n=20。根 (成熟期) は n=19、茎葉は n=16、花粉は n=5 及び穀粒は n=18)。なお、花粉の 2 サンプルにおける発現量は検出限界値 (LOD) 未満であり、その他の根 (成熟期)、茎葉、花粉及び穀粒のサンプルは定量限界値 (LOQ) 未満であった。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。
- 15

表 11 本組換えトウモロコシの各組織における改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現量
(2011-2012 年、アルゼンチン)³²

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 播種後日数 | 平均値 (標準偏差) 範囲 | 平均値 (標準偏差) 範囲 | 定量限界値/ 検出限界値 [µg/g 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| | | | [µg/g 新鮮重] ³ | [µg/g 乾燥重] ⁴ | |
| 葉 (OSL1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 45 (9.0) 31 - 64 | 270 (65) 160 - 390 | 0.035/0.006 |
| 葉 (OSL2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 40 (7.8) 26 - 56 | 210 (40) 120 - 270 | 0.035/0.006 |
| 葉 (OSL3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 40 (7.9) 21 - 52 | 170 (35) 92 - 220 | 0.035/0.006 |
| 葉 (OSL4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 56 (19) 31 - 89 | 220 (63) 130 - 340 | 0.035/0.006 |
| 根 (OSR1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 25 (4.6) 16 - 32 | 180 (43) 130 - 280 | 0.035/0.028 |
| 根 (OSR2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 16 (4.0) 9.4 - 25 | 120 (24) 67 - 170 | 0.035/0.028 |
| 根 (OSR3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 15 (4.0) 9.6 - 24 | 84 (21) 54 - 130 | 0.035/0.028 |
| 根 (OSR4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 14 (3.3) 9.0 - 21 | 75 (19) 43 - 120 | 0.035/0.028 |
| 地上部 (OSWP1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 44 (4.9) 33 - 53 | 340 (49) 250 - 460 | 0.035/0.008 |
| 地上部 (OSWP2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 30 (5.3) 21 - 40 | 190 (30) 130 - 270 | 0.035/0.008 |
| 地上部 (OSWP3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 20 (6.8) 9.2 - 33 | 140 (39) 59 - 210 | 0.035/0.008 |
| 地上部 (OSWP4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 20 (4.8) 12 - 29 | 120 (28) 71 - 170 | 0.035/0.008 |
| 茎葉 | 成熟期 | 136-155 | 10 (6.2) 1.9 - 19 | 21 (13) 4.7 - 44 | 0.035/0.008 |
| 根 | 成熟期 | 136-155 | 4.8 (3.1) 0.76 - 12 | 19 (13) 3.0 - 50 | 0.035/0.028 |
| 根 | 黄熟期 | 101-111 | 7.9 (3.5) 2.6 - 15 | 36 (16) 13 - 66 | 0.035/0.028 |
| 地上部 | 黄熟期 | 101-111 | 12 (4.9) 5.5 - 23 | 39 (17) 18 - 75 | 0.035/0.008 |

³²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 11 本組換えトウモロコシの各組織における改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現量 (2011-2012 年、アルゼンチン) (続き)

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 播種後日数 | 平均値 (標準偏差) 範囲 [μg/g 新鮮重] ³ | 平均値 (標準偏差) 範囲 [μg/g 乾燥重] ⁴ | 定量限界値/ 検出限界値 [μg/g 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---------|--|--|-------------------------------|
| 穀粒 | 成熟期 | 139-154 | 3.5 (0.45) 2.7 – 4.4 | 4.0 (0.56) 3.1 – 5.1 | 0.035/0.007 |
| 花粉 | 雄穂抽出期 – 絹糸抽出期 | 65-80 | 29 (3.0) 23 – 34 | 36 (4.0) 30 – 42 | 0.035/0.018 |
| 絹糸 | 絹糸抽出期 | 65-81 | 16 (3.8) 8.5 – 23 | 160 (37) 89 – 220 | 0.035/0.010 |

¹ OSL= over-season leaf (葉); OSR= over-season root (根); OSWP= over-season whole plant (地上部)

5 ² 採取した各組織の生育段階

³ 蛋白質の発現量は算術平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 – 最大値) は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織で計算されている (全ての組織で n=20)。

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

表 12 本組換えトウモロコシの各組織における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量
(2011-2012 年、アルゼンチン)³³

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 播種後日数 | 平均値 | 平均値 | 定量限界値/ 検出限界値 [μg/g 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---------|---|---|-------------------------------|
| | | | (標準偏差) 範囲 [μg/g 新鮮重] ³ | (標準偏差) 範囲 [μg/g 乾燥重] ⁴ | |
| 葉 (OSL1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 7.1 (0.83) 5.8 - 9.0 | 42 (5.9) 33 - 55 | 0.137/0.071 |
| 葉 (OSL2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 7.0 (0.64) 6.0 - 7.9 | 36 (3.1) 29 - 39 | 0.137/0.071 |
| 葉 (OSL3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 7.4 (0.78) 6.4 - 8.9 | 32 (3.8) 27 - 42 | 0.137/0.071 |
| 葉 (OSL4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 7.8 (0.85) 6.6 - 9.5 | 31 (3.5) 24 - 37 | 0.137/0.071 |
| 根 (OSR1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 6.5 (0.86) 4.4 - 8.0 | 48 (6.6) 38 - 63 | 0.068/0.033 |
| 根 (OSR2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 5.2 (1.0) 3.8 - 7.1 | 37 (7.0) 23 - 48 | 0.068/0.033 |
| 根 (OSR3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 5.6 (0.84) 4.0 - 7.1 | 31 (4.7) 24 - 37 | 0.068/0.033 |
| 根 (OSR4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 5.7 (0.80) 4.2 - 7.1 | 30 (4.8) 20 - 38 | 0.068/0.033 |
| 地上部 (OSWP1) | 3-4 葉期 | 21-22 | 8.1 (0.90) 6.6 - 9.8 | 63 (6.7) 54 - 76 | 0.137/0.070 |
| 地上部 (OSWP2) | 6-8 葉期 | 35-44 | 5.6 (0.94) 3.4 - 7.4 | 36 (5.8) 21 - 46 | 0.137/0.070 |
| 地上部 (OSWP3) | 10-13 葉期 | 50-55 | 4.6 (1.1) 2.3 - 6.6 | 33 (6.2) 21 - 45 | 0.137/0.070 |
| 地上部 (OSWP4) | 14 葉期 - 絹糸抽出期 | 59-78 | 4.3 (0.87) 2.9 - 5.5 | 25 (5.0) 17 - 32 | 0.137/0.070 |
| 茎葉 | 成熟期 | 136-155 | 1.0 (0.60) 0.30 - 2.1 | 2.2 (1.2) 0.59 - 4.9 | 0.137/0.070 |
| 根 | 成熟期 | 136-155 | 1.4 (0.69) 0.49 - 2.6 | 5.4 (2.9) 1.8 - 11 | 0.068/0.033 |

³³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 12 本組換えトウモロコシの各組織における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量 (2011-2012 年、アルゼンチン) (続き)

| 組織 ¹ | 生育段階 ² | 播種後日数 | 平均値 (標準偏差) 範囲 [μg/g 新鮮重] ³ | 平均値 (標準偏差) 範囲 [μg/g 乾燥重] ⁴ | 定量限界値/ 検出限界値 [μg/g 新鮮重] |
|-----------------|-------------------|---------|--|--|-------------------------------|
| 根 | 黄熟期 | 101-111 | 2.2 (0.81) 1.1 – 4.1 | 10 (3.7) 5.1 – 19 | 0.068/0.033 |
| 地上部 | 黄熟期 | 101-111 | 2.4 (0.71) 1.5 – 3.8 | 8.0 (2.3) 5.2 – 13 | 0.137/0.070 |
| 穀粒 | 成熟期 | 139-154 | 1.7 (0.27) 1.4 – 2.7 | 1.9 (0.31) 1.6 – 3.1 | 0.228/0.152 |
| 花粉 | 雄穂抽出期 – 絹糸抽出期 | 65-80 | 15 (1.9) 12 – 19 | 19 (2.8) 16 – 24 | 0.137/0.099 |
| 絹糸 | 絹糸抽出期 | 65-81 | 4.0 (0.69) 3.1 – 5.1 | 40 (5.0) 32 – 49 | 0.137/0.121 |

¹ OSL= over-season leaf (葉); OSR= over-season root (根); OSWP= over-season whole plant (地上部)

5 ² 採取した各組織の生育段階

³ 蛋白質の発現量は算術平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 – 最大値) は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織で計算されている (茎葉を除いて、全ての組織で n=20。茎葉は n=19)。なお、茎葉の 1 サンプルにおける発現量は定量限界値 (LOQ) 未満であった。

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

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のある場合は、当該伝達性の有無及び程度

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

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 21)。

15 本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.04% である (別添資料 22, p11)。

本 PCR 法の信頼性については米国モンサント・カンパニーと米国 BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 22, p13~15)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

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

25 本組換えトウモロコシへ導入された *DvSnf7* 遺伝子断片は、CRW に対して殺虫活性を示す *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA を発現し、CRW に対する抵抗性を付与する。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、それぞれ改変 *Cry3Bb1* 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現することにより、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサート耐性を付与する。

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³⁴

35 トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

³⁴本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

2014年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場（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 R4F1 (HCL645 × LH244) 世代を供試した (図 9, p61)。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持つ HCL645 × LH244 を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験（第一の 2-(6)-②-b, p76) は 2012 年に米国の人工気象室において試験を実施した。

10 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、9 項目（雄穂抽出期（月日）、絹糸抽出期（月日）、稈長（cm）、着雌穂高（cm）、分げつ数、成熟期（月日）、収穫期の地上部重（kg）、粒型、粒色）について調査した。

15 統計処理を稈長（cm）、着雌穂高（cm）、分げつ数及び収穫期の地上部重（kg）に関して行い、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、統計処理を行わなかった。

20 その結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった（別添資料 12 の表 3, p10）。

b 生育初期における低温耐性

25 生育初期における低温耐性試験は、2012 年に米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。播種後 14 日目（約 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 の低温条件で栽培した。低温処理開始前及び低温処理開始後 10 日目に生育段階及び草丈を調査し、低温処理開始後 19 日目の個体は生育段階、草丈、新鮮重及び乾燥重について調査を行った（1 個体/反復、10 反復）。統計処理を草丈（cm）、新鮮重（g）及び乾燥重（g）に関して行い、生育段階に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。

35 その結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった（別添資料 23 の Table 2, p6）。

c 成体の越冬性

5 トウモロコシは夏型一年生植物であり、通常は、結実後、冬季に自然に枯死する。再生長して栄養繁殖することや、種子を生産することはない。実際に、本隔離ほ場で生育させた本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを成熟期の後も引き続き生育させ、わが国の冬季における生育状況を観察した。2014年11月19日に越冬性試験区において栽培された個体を観察した結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも枯死していた (別添資料 12 の図 5, p12)。

d 花粉の稔性及びサイズ

15 本隔離ほ場で生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから採取した花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれの項目においても本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の図 6, p13 及び表 4, p13)。

20

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量：

25 本隔離ほ場で生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、種子の生産量に関する 6 項目 (有効雌穂数、雌穂長 (cm)、雌穂径 (cm)、粒列数、一列粒数、百粒重 (g)) を調査した。

これらの項目について統計処理を行った結果、雌穂径においてのみ、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 12 の表 5, p14)。雌穂径の平均値は、本組換えトウモロコシが 4.6cm、対照の非組換えトウモロコシが 4.5cm であり、本組換えトウモロコシの方の値が高かった (別添資料 12 の表 5, p14)。

30

脱粒性：

35 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、目視で苞皮に包まれているか否か、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

れも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、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、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で種子の脱粒性における違いは認められなかった (別添資料 12 の表 5, p14)。

5

休眠性及び発芽率：

休眠性及び発芽率については、収穫後 16 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個体数を計測した。

10 その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収穫種子の発芽率はそれぞれ 100% と 99.5% といずれも高く、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の表 5, p14)。

f 交雑率

15 日本には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

20 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。

25 その結果、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区の間で、土壤微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の表 6~8, p17)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

5

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

(2) 使用等の方法

10

—

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

15

—

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

20

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

25

—

(6) 国外における使用等に関する情報

30

本組換えトウモロコシの海外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 13 (p80) のとおりである。

表 13 本組換えトウモロコシの海外における申請予定³⁵

2016年1月現在

| 機関 | 安全性審査の種類 | 申請時期 | 承認時期 |
|------------------------------------|----------|----------|----------|
| 米国食品医薬品庁 (FDA) | 食品・飼料 | 2013年11月 | 2014年10月 |
| 米国農務省 (USDA) | 環境 | 2013年10月 | 2015年10月 |
| カナダ保健省 (Health Canada) | 食品 | 2013年11月 | 2015年10月 |
| カナダ食品検査庁 (CFIA) | 環境・飼料 | 2013年11月 | 2015年10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 | 2014年7月 | 2015年8月 |
| 欧州食品安全機関 (EFSA) | 食品・飼料 | 2015年2月 | 審査中 |

5

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は表 14 (p80) のとおりである。

表 14 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況³⁶

10

2016年1月現在

| 機関 | 内容 | 申請時期 | 承認時期 |
|-----------|-----------------------------------|---------|-----------------|
| 厚生労働省 | 食品 ³⁷ | 2015年4月 | ■ ³⁸ |
| 農林水産省 | 飼料 ³⁹ | 2015年4月 | ■ ³⁷ |
| 農林水産省・環境省 | 環境 (第一種使用規程 ⁴⁰ : 隔離ほ場) | 2013年3月 | 2014年4月 |
| 農林水産省・環境省 | 環境 (第一種使用規程: 一般使用) | 2015年9月 | — |

³⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

³⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

³⁷ 食品衛生法に基づく。

³⁸ 社外秘につき非開示

³⁹ 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。

⁴⁰ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価⁴¹

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

トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。

10

競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した (第一の 2-(6)-②-a, c~e, p76~78)。その結果、統計処理を行った項目では、種子の生産量に関する項目において、雌穂径で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。また、統計処理を行わなかった項目においては、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, p76) を米国において調査した結果、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で統計学的有意差は認められなかった。

15

20

雌穂径の平均値は、本組換えトウモロコシが 4.6cm、対照の非組換えトウモロコシが 4.5cm であり、本組換えトウモロコシの方が値が高かった (別添資料 12 の表 5, p14)。しかし、本組換えトウモロコシの雌穂径の平均値 (4.6 cm) は、1998 年~2010 年に実施された計 11 系統の遺伝子組換えトウモロコシの隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシ品種の雌穂径の平均値の範囲 (3.6~5.3 cm) (中井ら, 2015) に収まっていた。このことから、本組換えトウモロコシにおいて認められた雌穂径の値は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であると判断された。

25

30

本組換えトウモロコシには、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害のみがトウモロコシがわが国の自然条件下において生育を制限する要因ではない。本組換えトウモロコシの隔離ほ場及び米国の人工気象室における試験において、第一の 2-(6)-②-b, c, e (p76~77) の項目に記載

35

⁴¹本項目中で、第一の 2-(6)-②-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日本モンサント株式会社に帰属する

した本組換えトウモロコシの自然環境下における生存に關与する形質 (b. 生育初期における低温耐性、c. 成体の越冬性、e. 種子の脱粒性、休眠性及び発芽率) に違いがなかったことから、コウチュウ目害虫抵抗性の形質のみが付与されることで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を高めるとは考えにくい。

また、本組換えトウモロコシは改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上のことから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(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、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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験 (第一の 2-(6)-②-g, p78) を行った。その結果、調査したいずれの項目においても、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区と

の間に統計学的有意差は認められなかった。

5 本組換えトウモロコシ中では、コウチュウ目ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に対して殺虫活性を示す*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAが発現しているが、一般的にdsRNAは、構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため (Kozak, 1989)、*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAが新たな蛋白質を発現する可能性は極めて低い。そのため、アレルギー性を有することはないと考えられる。また、第一の2-(1)-ロ-③ (p56) に記載のとおり、*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAはトウモロコシ内在性遺伝子のmRNAとの相同性は低く、トウモロコシ内在性遺伝子の発現を抑制するとは考えにくいこと、dsRNAによって新たな蛋白質が発現するとは考えにくいことから、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た。

10 15 20 25 30 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

また、本組換えトウモロコシ中では、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、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, p50)。また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p56) に記載のとおり、改変 Cry3Bb1 蛋白質は、酵素活性を持たないため、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た。

さらに、本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと類似性のある配列を有さないことが確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p56)。また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p57) に示したように、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことが確認されている。これまでにモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物 (トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ、テンサイ) の食品及び飼料の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含有量に对照の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。さらに、第一の 2-(1)-ロ-③ (p57) に記載のとおり、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の基質特異性は非常に高く、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た。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

35 本組換えトウモロコシで発現する *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は、第一の 2-(1)-ロ-② (p17~36) に記載のとおり、経口摂取した CRW に対して殺虫活性を示すが、その殺虫活性スペクトラムは極めて狭く、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に限定されていると考えら

れる。

また、改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科にそれぞれ属する CPB と CRW のみに対して殺虫活性を示し (Head et al., 2001; U.S. EPA, 2010)、その他の昆虫に殺虫活性を示すという報告はない。なお、この 2 属の昆虫種と同属近縁種がわが国に生息していない (中根ら, 1963) ことは文献調査により示されている。

さらに、第一の 2-(1)-ロ-② (p52~55) に記載のとおり、本組換えトウモロコシ中で発現している *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して相乗的に殺虫活性を示したり、殺虫スペクトラムを拡げることはないと考えられた。

したがって、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトラムはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には拡がらないと考えられた。

以上のことから、本組換えトウモロコシにより何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた。

環境省第 4 次レッドリスト (環境省, 2012b) に掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種のコウチュウ目昆虫について、山本ら (2003) を参考にし、種の食性・生息場所・分布地域から、本組換えトウモロコシの花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより影響を受ける可能性を検討した。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 15 (p85) に示した 4 種を特定した。

表 15 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⁴²

| 和名 (科名及び亜科名) | 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 (ハムシ科ネクイハムシ亜科) | <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。 | カヤツリグサ科ハリイ類 |
| 絶滅危惧 II 類 (VU) | | | |
| オキナワサビカミキリ (カミキリ科フトカミキリ亜科) | <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 (ハムシ科ネクイハムシ亜科) | <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。 | カヤツリグサ科フトイ |
| キンイロネクイハムシ (ハムシ科ネクイハムシ亜科) | <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。 |

5 *環境省第4次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012b), に掲載された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について、小島ら (1969); 上野ら (1984); 林ら (1984); 野尻湖昆虫グループ (1985); 福井県 (2002); 島根県 (2004); 栃木県 (2005); 日外アソシエーツ (2005); 林ら (2005); 環境省 (2006); 大林ら (2007); 中根ら (2007); 環境省 (2010); 日外アソシエーツ (2011); 環境省 (2012a); 林ら (2012) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) トウモロコシの花粉又は鋤込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の2点から絞込みを行った。

⁴² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

(2) 影響の具体的内容の評価

5 *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の標的害虫である WCRW 及び WCRW の近縁種である SCRW に対する LC₅₀ 値は、それぞれ 4.4ng/ml 及び 1.2ng/ml である (表 2, p27; 別添資料 7 の Table 3, p39)。また、改変 Cry3Bb1 蛋白質に対して最も高い感受性を示すことが知られている CPB に対する改変 Cry3Bb1 蛋白質の LC₅₀ は 2.7µg/ml である (表 7, p51) (Head et al., 2001; U.S. EPA, 2010)。

10

(3) 影響の生じやすさの評価

15 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の花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより影響を受ける可能性について下記のように検討した (表 15, p85)。

本組換えトウモロコシから飛散した花粉を特定された 4 種のコウチュウ目昆虫が食餌する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周りに生育する植物の葉に実際に堆積する花粉量を文献情報を基に推定した。

20 わが国においてはヒマワリ (*Helianthus annuus*) とイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) の葉を用いて、トウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度の調査が行われている (Shirai and Takahashi, 2005)。調査の結果、トウモロコシ畑の縁 (0m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm² であった。しかし、畑から 5m 離れると花粉の最大堆積密度は、
25 それぞれ 19.6 粒/cm² と 22.2 粒/cm² に減少していた。さらに、ヒマワリについては 5m 以降も調査されているが、10m 離れると花粉堆積密度は全て 10 粒/cm² 以内であった。

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
30 (Pleasants et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1m、2m、4~5m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、そして 8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている。

さらに、Sears ら (2000) も、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度を調査しており、ほ場の縁から 1m 及び 5m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm² であったと報告している (Sears et al., 2000)。

このように、わが国で行われたトウモロコシ畑周辺での花粉堆積密度に関する調

査結果と同様の結果が、北米で大規模に行われた調査からも得られていることが明らかとなった。よって、これらの調査結果から本組換えトウモロコシから飛散した花粉を特定された4種のコウチュウ目昆虫がある程度まとまって食餌する可能性は、トウモロコシ畑から10m以上離れると極めて低く、50m以上離れるとほとんど無視できると考えられた。

また、土壌中も含めて自然生態系に生息している非標的コウチュウ目昆虫種が本組換えトウモロコシから半径50mの範囲に局所的に生息しているとは考えにくく、個体群レベルで本組換えトウモロコシから飛散する花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

また、特定された4種のコウチュウ目昆虫は表15(p85)に記載のとおり、すべて植食性であり、その生息環境はいずれも100%水生ではないものの、水生生息地及びその周辺において観察される(表15, p85)。4種のコウチュウ目昆虫の水生生息地がトウモロコシ畑と隣接し、水面に飛散した本組換えトウモロコシの花粉が食餌する植物の周辺で濃縮した場合、これら4種のコウチュウ目昆虫が花粉を食餌することにより影響を受ける可能性が考えられる。

しかし、花粉は水中において破裂し、細胞内物質が流出することが知られている(Human and Nicolson, 2003)。Humanらの文献では、トウモロコシの花粉粒の細胞壁は薄く、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を水中へと流出することが報告されている(Human and Nicolson, 2003)。このことから、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。仮に濃縮したとしても、細胞内の物質の流出に伴い、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は水中に拡散されることが考えられる。水系には豊富に核酸分解酵素があるため(Tabata et al., 1993)、流出した *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA は、分解されることが考えられる。なお、RNA を分解する RNA 分解酵素を産生する RNA 分解細菌は、わが国の湖沼の水には一般的に存在することが報告されている(Tabata et al., 1993)。同様に、水系における Cry 蛋白質の分解性も報告されている(Prihoda and Coats, 2008; Li et al., 2013)。以上のことから、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する可能性は低いと考えられ、仮に濃縮したとしても細胞内の物質の流出に伴い *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は水中に拡散され、その後分解されることが考えられることから、4種のコウチュウ目昆虫は、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* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質に曝露さ

れることにより、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。

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

10 3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属植物と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

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

20 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

25

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

4 その他の性質

35

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

- 5 トウモロコシは 1579 年にわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。
- 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの間で競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した。その結果、雌穂径においてのみ、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。また、生育初期における低温耐性を米国において調査した結果、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の間で統計学的有意差は認められなかった。
- 10
- 15 検討の結果、雌穂径の平均値については、本組換えトウモロコシの方が高い値を示したが、1998 年~2010 年に実施された計 11 系統の遺伝子組換えトウモロコシの隔離ほ場試験において、対照として用いられた非組換えトウモロコシ品種の雌穂径の平均値の範囲に収まっていたことから、本組換えトウモロコシにおいて認められた雌穂径の値は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であると判断された。
- 20
- 本組換えトウモロコシには、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害のみがトウモロコシがわが国の自然条件下において生育を制限する要因ではない。また、本組換えトウモロコシの隔離ほ場及び米国の人工気象室における試験において、本組換えトウモロコシの自然環境下における生存に關与する形質 (b. 生育初期における低温耐性、c. 成体の越冬性、e. 種子の脱粒性、休眠性及び発芽率) に違いがなかったことから、コウチュウ目害虫抵抗性の形質の付与のみで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を高めるとは考えにくい。
- 25
- 30 また、本組換えトウモロコシは改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるとは考えにくい。
- 35 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。

有害物質の産生性：

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

5 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結果、調査したいずれの項目においても、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった。

10 本組換えトウモロコシで発現する *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA はトウモロコシ内在性遺伝子の mRNA との相同性は低く、トウモロコシ内在性遺伝子の発現を抑制するとは考えにくいこと、また蛋白質が発現するとは考えにくいことから、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た。

15 本組換えトウモロコシ中では、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、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。また、改変 Cry3Bb1 蛋白質は、酵素活性を持たないため、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た。

20 本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、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。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は高い基質特異性を有することから、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

したがって、本組換えトウモロコシにおいて意図しない有害物質の産生性はないと考えられた。

25 本組換えトウモロコシ中で発現する *DvSnf7* 遺伝子断片の 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対して、また改変 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目ハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科にそれぞれ属する CPB と CRW に対して殺虫活性を示すことが明らかとなっている。さらに *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して相乗的に殺虫活性を示したり、殺虫スペクトラムを拡げることはないと考えられた。
30 したがって、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトラムはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には拡げられないと考えられた。これらのことから、本組換えトウモロコシの花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、「環境省第 4 次レッドリスト (2012b)」を用いて、4 種のコウチュウ目昆虫を特定した。
35

引用文献

- 5 Akhtar, S. 2009. Oral delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *Journal of Drug Targeting* 17: 491-495.
- Allen, M.L. and W.B. Walker. 2012. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology* 58: 391-396.
- 10 Alves, A.P., M.D. Lorenzen, R.W. Beeman, J.E. Foster and B.D. Siegfried. 2010. RNA interference as a method for target-site screening in the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Insect Science* 10: 1-16.
- 15 Arimatsu, Y., T. Furuno, Y. Sugimura, M. Togoh, R. Ishihara, M. Tokizane, E. Kotani, Y. Hayashi and T. Furusawa. 2007a. Purification and properties of double-stranded rna degrading nuclease, dsrnase, for the digestive juice of the silkworm, *bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and sericology* 76: 57-62.
- 20 Arimatsu, Y., E. Kotani, Y. Sugimura and T. Furusawa. 2007b. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 176-183.
- 25 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.
- 30 Bachman, P.M., R. Bolognesi, W.J. Moar, G.M. Mueller, M.S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J.P. Uffman, J. Warren, B.E. Wiggins and S.L. Levine. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research* 22: 1207-1222.
- 35 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.

5 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. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.

10 Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2011. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 7,943,819 B2, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

15 Baum, J.A. and J.K. Roberts. 2014. Progress towards RNAi-mediated insect pest management. *Advances in Insect Physiology* 47: 249-295.

Behlke, M.A. 2006. Progress towards *in vivo* use of siRNAs. *Molecular Therapy* 13: 644-670.

20 Bolognesi, R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J.G. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G. Heck and G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* 7: e47534.

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

30 Bucher, G., J. Scholten and M. Klingler. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology* 12: R85-R86.

Burand, J.P. and W.B. Hunter. 2013. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, . *Journal of Invertebrate Pathology* 112 Supplement 1: S68-S74.

35 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].

- 5 Chen, J., D. Zhang, Q. Yao, J. Zhang, X. Dong, H. Tian and W. Zhang. 2010. Feeding-based RNA interference of a *trehalose phosphate synthase* gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology* 19: 777-786.
- Christiaens, O., L. Swevers and G. Smaghe. 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53: 307-314.
- 10 Clark, T.L., J. Meinke and J.E. Foster. 2001. Molecular phylogeny of Diabrotica beetles (Coleoptera:Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 10.: 303–314.
- 15 Clark, T.L., J. Meinke and J.E. Foster. 2001. Molecular phylogeny of Diabrotica beetles (Coleoptera:Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 10.: 303–314.
- 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. *EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 20 Coy, M.R., N.D. Sanscrainte, K.C. Chalaire, A. Inbert, I. Maayan, E. Glick, N. Paldi and J.J. Becnel. 2012. Gene silencing in adult aedes aegypti mosquitoes through oral delivery of double-stranded rna. *Journal of Applied Entomology* 136: 02/22/2012.
- 25 Dang, Y., Q. Yang, Z. Xue and Y. Liu. 2011. RNA interference in fungi: Pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell* 10: 1148-1155.
- Della Vedova, C.B., R. Lorbiecke, H. Kirsch, M.B. Schulte, K. Scheets, L.M. Borchert, B.E. Scheffler, U. Wienand, K.C. Cone and J.A. Birchler. 2005. The dominant inhibitory chalcone synthase allele *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics* 170: 1989-2002.
- 30 Della Vedova, C.B., R. Lorbiecke, H. Kirsch, M.B. Schulte, K. Scheets, L.M. Borchert, B.E. Scheffler, U. Wienand, K.C. Cone and J.A. Birchler. 2005. The dominant inhibitory chalcone synthase allele *C2-Idf* (*Inhibitor diffuse*) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics* 170: 1989-2002.
- 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.
- 35 Dickinson, B., Y. Zhang, J.S. Petrick, G. Heck, S. Ivashuta and W.S. Marshall. 2013.

- Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology* 31: 965-967.
- 5 Dong, Y. and M. Friedrich. 2005. Nymphal RNAi: Systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology* 5: 25.
- English, L.H., S.M. Brussock, T.M. Malvar, J.W. Bryson, C.A. Kulesza, F.S. Walters, S.L. Slatin, M.A. Von Tersch and C. Romano. 2000. Nucleic acid segments encoding modified *Bacillus thuringiensis* coleopteran-toxic crystal proteins. Patent 6,060,594,
10 U.S. Patent Office, 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.
- 15 FAO. 2015. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/E> [Accessed April 23, 2015].
- Faust, M., R. Altenburger, T. Backhaus, W. Bödeker, M. Scholze and L.H. Grimme. 2000. Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *Journal of Environmental Quality* 29: 1063-1068.
20
- 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.
- 25 FSANZ. 2013. Response to Heinemann et al on the regulation of GM crops and foods developed using gene silencing. Food Standards Australia New Zealand, Canberra, Australia.
- 30 Fukuhara, T., R. Koga, N. Aoki, C. Yuki, N. Yamamoto, N. Oyama, T. Udagawa, H. Horiuchi, S. Miyazaki, Y. Higashi, M. Takeshita, K. Ikeda, M. Arakawa, N. Matsumoto and H. Moriyama. 2006. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Archives of Virology* 151: 995-1002.
- 35 Furusawa, T., E. Takayama and Y. Hayashi. 1993. Double-stranded ribonuclease activity in the digestive juice and midgut of the silkworm, *bombyx mori* *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*: 104 (104).

- Gómez-Zurita, J., T. Hunt, F. Koplaku and A.P. Vogler. 2007. Recalibrated tree of leaf beetles (Chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores. *PLoS One* 2: e360.
- 5
- Gao, F.-B., J.E. Brenman, L.Y. Jan and Y.N. Jan. 1999. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. *Genes & Development* 13: 2549-2561.
- 10
- Garbutt, J.S., X. Bellés, E.H. Richards and S.E. Reynolds. 2013. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: Evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology* 59: 171-178.
- 15
- Gillespie, J.J., D.W. Tallamy, E.G. Riley and A.I. Cognato. 2008. Molecular phylogeny of rootworms and related galerucine beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zoologica Scripta* 37.: 195–222.
- Gilmore, I.R., S.P. Fox, A.J. Hollins, M. Sohail and S. Akhtar. 2004. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *Journal of Drug Targeting* 12: 315-340.
- 20
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 25
- Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 30
- Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* 579: 5822-5829.
- Head, G., M. Pleau, S. Sivausupramanian and T. Vaughn. 2001. Insecticidal spectrum of activity for Cry3Bb protein *in vitro*. Monsanto Technical Report C3NTO. St. Louis, Missouri.
- 35
- Heinemann, J.A., S.Z. Agapito-Tenzen and J.A. Carman. 2013. A comparative

evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. *Environment International* 55: 43-55.

5 Heisel, S.E., Y. Zhang, E. Allen, L. Guo, T.L. Reynolds, X. Yang, D. Kovalic and J.K. Roberts. 2008. Characterization of unique small RNA populations from rice grain. *PLoS One* 3: e2871.

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

Houck, J.C. 1958. The microdetermination of ribonuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 73: 384-390.

15 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.

20 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.

25 Hunt, T., J. Bergsten, Z. Levkanicova, A. Papadopoulou, O.S. John, R. Wild, P.M. Hammond, D. Ahrens, M. Balke, M.S. Caterino, J. Gómez-Zurita, I. Ribera, T.G. Barraclough, M. Bocakova, L. Bocak and A.P. Vogler. 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318: 1913-1916.

Huvenne, H. and G. Smagghe. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* 56: 227-235.

30 ILSI-CERA. 2011. Problem formulation for the environmental risk assessment of RNAi plants. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment, Washington, D.C.

35 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: 1-11.

- Ivashuta, S.I., J.S. Petrick, S.E. Heisel, Y. Zhang, L. Guo, T.L. Reynolds, J.F. Rice, E. Allen and J.K. Roberts. 2009. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and Chemical Toxicology* 47: 353-360.
- 5
- Jensen, P.D., Y. Zhang, B.E. Wiggins, J.S. Petrick, J. Zhu, R.A. Kerstetter, G.R. Heck and S.I. Ivashuta. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4: 90-97.
- 10
- Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.
- 15
- Ji, L. and X. Chen. 2012. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Research* 22: 624-636.
- Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- 20
- Kim, D.-W., H. Sung, D. Shin, H. Shen, J. Ahn, S.-K. Lee and S. Lee. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells* 31: 585-592.
- 25
- 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.
- 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.

Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139-143.

5

Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura and T. Nishio. 2003. *Low glutelin content1*: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *The Plant Cell* 15: 1455-1467.

10

Kwon, D.H., J.H. Park and S.H. Lee. 2013. Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105: 69-75.

15

Lamppa, G.K., G. Morelli and N.-H. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1370-1378.

20

Lee, J.-A., A. Beigneux, S.T. Ahmad, S.G. Young and F.-B. Gao. 2007. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current Biology* 17: 1561-1567.

25

Levine, S.L., J. Tan, G.M. Mueller, P.M. Bachman, P.D. Jensen and J.P. Uffman. 2015. Independent action between DvSnf7 RNA and Cry3Bb1 protein in southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* and Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *PLoS ONE* 10: e0118622.

30

Li, J., Q. Chen, Y. Lin, T. Jiang, G. Wu and H. Hua. 2011a. Rna interference in nilaparvata lugens (homoptera: delphacidae) based on dsrna ingestion. *Pest Management Science* 67.

Li, X., M. Zhang and H. Zhang. 2011b. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS ONE* 6: e17788.

35

Li, Y.-L., J. Du, Z.-X. Fang and J. You. 2013. Dissipation of insecticidal Cry1Ac protein and its toxicity to nontarget aquatic organisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 10864-10871.

- Lingor, P., U. Michel, U. Schöll, M. Bähr and S. Kügler. 2004. Transfection of "naked" siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 315: 1126-1133.
- 5 Liu, J., G. Smagghe and L. Swevers. 2013. Transcriptional response of bmtoll9-1 and rnai machinery genes to exogenous dsrna in the midgut of *bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 59: 646-654.
- Loretz, B., F. Föger, M. Werle and A. Bernkop-Schnürch. 2006. Oral gene delivery:
10 Strategies to improve stability of pDNA towards intestinal digestion. *Journal of Drug Targeting* 14: 311-319.
- 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
15 control. *Crop Science* 41: 1551-1557.
- Luo, Y., X. Wang, D. Wang, D. Yu, B. Chen and L. Kang. 2013. Differential responses of migratory locusts to systemic rna interference via double-stranded rna injection and feeding. *Insect Molecular Biology* 22: 574-583.
20
- Mao, J. and F. Zeng. 2012. Feeding-based rna interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *acyrthosiphon pisum*. *PloS One* 7: 1160-1166.
- Marra, M.C., N.E. Piggott and B.K. Goodwin. 2012. The impact of corn rootworm protected biotechnology traits in the United States. *AgBioForum* 15: 217-230.
25
- Marrone, P.G., F.D. Ferri, T.R. Mosley and L.J. Meinke. 1985. Improvements in laboratory rearing of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpuncta howardi* Barber (Coleoptera: Chrysomelidae), on an artificial diet and corn. *Journal of Economic Entomology* 78: 290-293.
30
- 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.
- 35 McElwain, E.F. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Research* 17: 1764.

NCGA. 2015. World of corn 2015. <http://www.ncga.com/upload/files/documents/pdf/publications/WOC-2015.pdf> [Accessed Apr. 23, 2015].

- 5 Nguyen, T., E.M. Menocal, J. Harborth and J.H. Fruehauf. 2008. RNAi therapeutics: An update on delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 10: 158-167.
- O'Neill, M.J., L. Bourre, S. Melgar and C.M. O'Driscoll. 2011. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: Physiological barriers and preclinical models. *Drug*
10 *Discovery Today* 16: 203-218.
- 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.
- 15 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.27. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 20 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/FOOD(2007)14. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 25 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.
- 30 Park, N.J., Y. Li, T. Yu, B.M.N. Brinkman and D.T. Wong. 2006. Characterization of RNA in saliva. *Clinical Chemistry* 52: 988-994.
- 35 Parrott, W., B. Chassy, J. Ligon, L. Meyer, J. Petrick, J. Zhou, R. Herman, B. Delaney and M. Levine. 2010. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1773-1790.

- 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.
- 5 Petrick, J.S., B. Brower-Toland, A.L. Jackson and L.D. Kier. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176.
- 10 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.
- 15 Prihoda, K.R. and J.R. Coats. 2008. Fate of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry3Bb1 protein in a soil microcosm. *Chemosphere* 73: 1102-1107.
- Qin, X., S. Gianì and D. Breviario. 1997. Molecular cloning of three rice α -tubulin isotypes: Differential expression in tissues and during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1354: 19-23.
- 20 Raiborg, C. and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458: 445-452.
- 25 Ramaseshadri, P., G. Segers, R. Flannagan, E. Wiggins, W. Clinton, O. Ilagan, B. McNulty, T. Clark and R. Bolognesi. 2013. Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. *PLoS ONE* 8: e54270.
- 30 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.
- Rodriguez-Cabrera, L., D. Trujillo-Bacallao, O. Borrás-Hidalgo, D.J. Wright and C. Ayra-Pardo. 2010. RNAi-mediated knockdown of a spodoptera fugiperda trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a bacillus thuringiensis Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*.
- 35

- Savard, J., D. Tautz, S. Richards, G. Weinstock, R. Gibbs, J. Werren, H. Tettelin and M. Lercher. 2006. Phylogenomic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of Holometabolous insects. *Genomic Research* 16: 1334-1338.
- 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
10 lycaenid butterfly, *Pseudaugeria maha*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- Singh, A.D., S. Wong, C.P. Ryan and S. Whyard. 2013. Oral delivery of double-stranded rna in larvae of the yellow fever mosquito, *aedes aegypti*: implications
15 for pest mosquito control. *Journal of Insect Science* 13: 0031-0048.
- Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
- 20 Sioud, M. 2005. On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2: 639-651.
- Snow, J.W., A.E. Hale, S.K. Isaacs, A.L. Baggish and S.Y. Chan. 2013. Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA biology* 10:
25 1107-1116.
- Soutschek, J., A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Röhl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D.
30 Bumcrot, V. Kotliansky, S. Limmer, M. Manoharan and H.-P. Vornlocher. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the
35 region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.

- Stevens, C.E. and I.D. Hume. 1995. Digestion of carbohydrate, lipids, and protein and the absorption of end products. Pages 152-187 in Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- 5
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.
- 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.
- 10
- 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.
- 15
- Terenius, O., A. Papanicolaou, J.S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J.-L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F. Chevalieri, D.P. Collinge, C.M. Crava, R.A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A.S. Gandhe, H.S. Gatehouse, L.N. Gatehouse, J.M. Giebultowicz, I. Gómez, C.J.P. Grimmelikhuijzen, A.T. Groot, F. Hauser, D.G. Heckel, D.D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J.J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M.R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P.J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki, M. Papakonstantinou, A. Popadic, M.V. Rajam, S. Saenko, R.M. Simpson, M. Soberón, M.R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C.W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J. Nagaraju, R.H. ffrench-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swelters and G. Smagghe. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. Journal of Insect Physiology 57: 231-245.
- 20
- 25
- 30
- Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. Annual Review Entomology 35: 181-200.
- 35
- Tian, H., H. Peng, Q. Yao, H. Chen, Q. Xie, B. Tang and W. Zhang. 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. PLoS ONE 4: e6225.

- Tomoyasu, Y. and R.E. Denell. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* 214: 575-578.
- 5 Tosar, J.P., C. Rovira, H. Naya and A. Cayota. 2014. Mining of public sequencing databases supports a non-dietary origin for putative foreign miRNAs: Underestimated effects of contamination in NGS. *RNA* 20: 754-757.
- 10 Tu, J., L.G. Vallier and M. Carlson. 1993. Molecular and genetic analysis of the SNF7 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135: 17-23.
- Turner, C.T., M.W. Davy, R.M. MacDiarmid, K.M. Plummer, N.P. Birch and R.D. Newcomb. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 15: 15 383-391.
- Tuteja, J.H., S.J. Clough, W.-C. Chan and L.O. Vodkin. 2004. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* 16: 819-835.
- 20 U.S. EPA. 2010. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (Vector PV-ZMIR13L) in MON 863 corn (OECD Unique Identifier: MON-ØØ863-5); and *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (Vector PV-ZMIR39) in MON 88017 Corn (OECD Unique Identifier: MON-88Ø17-3). U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division, Washington, D.C.
- 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.

- Vaishnav, A.K., J. Gollob, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougerolles and J. Maraganore. 2010. A status report on RNAi therapeutics. *Silence* 1: 14.
- 5 van der Oost, J. and S.J. Brouns. 2009. RNAi: Prokaryotes get in on the act. *Cell* 139: 863-865.
- Vander Meer, R.K. and M.Y. Choi. 2013. Formicidae (ant) control using double-stranded rna constructs. US Patent 8575328 B2.
- 10 Whyard, S., A.D. Singh and S. Wong. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 824-832.
- Winter, V. and M.-T. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *TRENDS in Plant Science* 11: 115-123.
- 15 Witwer, K.W., M.A. McAlexander, S.E. Queen and R.J. Adams. 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA biology* 10: 1080-1086.
- 20 Wuriyangan, H., C. Rosa and B.W. Falk. 2011. Oral delivery of double-stranded rnas and sirnas induces rnai effects in the potato/tomato psyllid, *bactericerca cockerelli*. *PloS One* 6: 1026-1037.
- 25 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.
- 30 Wynant, N., D. Santos, R. Verdonck, J. Spit, P. Van Wielendaele and J. Vanden Broeck. 2014. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded rna degrading enzymes present in the gus of the desert locust, *schistocera gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 46: 1-8.
- 35 Wynant, N., H. Verlinden, B. Breugelmans, G. Simonet and J. Vanden Broeck. 2012. Tissue-dependence and sensitivity of the systemic rna interference response in the

- desert locust, *schistocera gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42: 911-917.
- 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.
- Zhang, L., D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai, Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang, J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen and C.-Y. Zhang. 2012a. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 22: 107-126.
- Zhang, Y., B.E. Wiggins, C. Lawrence, J. Petrick, S. Ivashuta and G. Heck. 2012b. Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics* 13: 381.
- Zhao, L. and J. Chen. 2013. Double stranded rna constructs to control ants. United States Patent Application Publication Pub No: US2013/0078212 A1.
- 上野俊一・野澤良彦・佐藤正孝 1984 原色日本甲虫図鑑 (II) 保育社
- 大林延夫・新里達也 編著 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 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京
- 環境省 2006 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 -レッドデータブック - 5 昆虫類自然環境研究センター
- 環境省 2010 改訂レッドリスト付属説明資料昆虫類平成 22 年 3 月 http://www.biodic.go.jp/rdb/explanatory_pdf/21insect.pdf [Accessed Sep, 2012]
- 環境省 2012a 第 4 次レッドリスト昆虫類 http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20554&hou_id=15619 [Accessed Sep, 2012]

- 環境省 2012b 生物多様性情報システム絶滅危惧種情報検索
http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html [Accessed Sep, 2012]
- 5 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 小島圭三・林匡夫 1969 原色日本昆虫生態図鑑 I 保育社 大阪
- 財務省 2015 財務省貿易統計
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed Apr. 23, 2015]
- 10 島根県 2004 しまねレッドデータブック
<http://www1.pref.shimane.lg.jp/contents/rdb/rdb2/cnt/cnt99b.html> [Accessed Oct, 2012]
- 15 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
- 千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採取 転作全書 第三巻 雑
 穀 農山漁村文化協会 東京
- 20 戸澤英男 2005 トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用— 農山漁
 村文化協会 東京
- 栃木県 2005 レッドデータブックとちぎ
<http://www.pref.tochigi.lg.jp/shizen/sonota/rdb/index.html> [Accessed Sep, 2012]
- 25 中井秀一・干川奏・山根精一郎・下野綾子・大澤良 2015 日本における隔離
 ほ場試験による遺伝子組換えトウモロコシの生物多様性影響評価の実例. 育種
 学研究 17 pp.1-15
- 30 中根猛彦・大林一夫・野村鎮・黒沢良彦 1963 原色昆虫大図鑑 II 甲虫篇 北
 隆館 東京
- 中根猛彦・大林一夫・野村鎮・黒沢良彦 2007 新訂・原色昆虫大図鑑 II 甲虫
 編 北隆館 東京
- 35 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
- 5 日外アソシエーツ編 2005 昆虫レファレンス事典 I 日外アソシエーツ
日外アソシエーツ編 2011 昆虫レファレンス事典 II 日外アソシエーツ
- 10 農林水産省 2014a 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
- 農林水産省 2014b 平成 25 年産野菜生産出荷統計 平成 26 年 12 月 15 日公表
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001128458> [Accessed Apr, 23, 2015]
- 15 農林水産省 2015a 飼料をめぐる情勢 平成 27 年 4 月公表
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siryu/pdf/04_meguji_illust_all.pdf
[Accessed Apr. 23, 2015]
- 20 農林水産省 2015b 平成 26 年耕地及び作付面積統計 平成 27 年 4 月 17 日公
表 <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129531> [Accessed Apr. 23,
2015]
- 25 野尻湖昆虫グループ 1985 アトラス・日本のネクイハムシ化石同定への手
引きー 野尻湖昆虫グループ
- 配合飼料供給安定機構 2014
<http://mf-kikou.lin.gr.jp/> [Accessed Feb. 25 2014].
- 30 林匡夫・木元新作・森本桂 1984 原色日本甲虫図鑑 (IV) 保育社 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 pp2-18
- 林成多 2012 日本のネクイハムシ むし社
- 35 福井県 2002 福井県レッドデータブック (動物編)
<http://www.erc.pref.fukui.jp/gbank/rdb/rdbindex.html> [Accessed Sep, 2012]

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

- 5 山本勝利・大黒俊哉・松村雄 2003 III 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 独立行政法人農業環境技術研究所 茨城 pp. 62-81

緊急措置計画書

平成27年7月17日

5

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

10 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) (以下「本組換え体」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。

15

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。

20 平成27年7月現在

| 社内委員 | |
|------|--|
| * | 日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区京橋二丁目5番18号 (電話番号 03-6264-4823) |
| | 日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請業務管理・運営課 課長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 |

*: 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

容を周知するための方法

10

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、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。

15 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

20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体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体に対し、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

25

弊社は、信憑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。

30

別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cry3Bb1* 遺伝子から推定した改変 Cry3Bb1 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
5
- 別添資料 2 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cp4 epsps* 遺伝子から推定した改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 3 Northern Blot Analysis of DvSnf7 RNA Expression in MON 87411 (RAR-2013-0213) (社外秘)
10
- 別添資料 4 Field Corn Rootworm Efficacy Data of MON 87411, DvSnf7, MON 88017, and Control Maize Grown in the U.S. in 2012 (RPN-2013-0244) (社外秘)
15
- 別添資料 5 Assessment of LMW DvSnf7 Transcript Levels in MON 87411 (RAR-2013-0461) (社外秘)
- 別添資料 6 Analysis of Methylated siRNA Uptake and Activity in Western Corn Rootworm (RAR-2013-0245) (社外秘)
20
- 別添資料 7 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of the dsRNA DvSnf7 Against a Range of Insect Taxa (MSL0024483) (社外秘)
25
- 別添資料 8 WCR DvSnf7 Gene Structure and DvSnf7 Predicted Amino Acid Sequence (社外秘)
- 別添資料 9 An Evaluation of the Biological Activity of dsRNAs Containing Single 19 nt, 20 nt, and 21 nt Matches Against the Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) DvSnf7 Ortholog in 12-Day Diet Bioassays (MSL0026256) (社外秘)
30
- 別添資料 10 A Comparative Bioinformatics Analysis of the Snf7 Ortholog in Representative Arthropods (RAR-2013-0005) (社外秘)
35
- 別添資料 11 Bioinformatic Comparison of the 240 Nucleotide DvSnf7 Sequence with

Eukaryotic Soil Microorganism and *Zea mays* Sequence Databases
(RAR-2013-0260) (社外秘)

- 5 別添資料 12 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) 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)
- 10 別添資料 13 Additional Analysis Using Akaike's Information Criterion to Support the Conclusion of No Toxicological Interaction Between the Cry3Bb1 Protein and DvSnf7RNA (MSL0027233) (社外秘)
- 別添資料 14 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR10871 (社外秘)
- 15 別添資料 15 PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON 87411 (MSL0025553) (社外秘)
- 別添資料 16 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87411 Across Three Generations (MSL0024728) (社外秘)
- 20 別添資料 17 Amended Report for MSL0025314: Molecular Characterization of MON 87411 (MSL0025845) (社外秘)
- 別添資料 18 Demonstration of the Presence of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Proteins in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87411 (MSL0024801) (社外秘)
- 25 別添資料 19 Assessment of DvSnf7 RNA Levels in Maize Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (MSL0024697) (社外秘)
- 30 別添資料 20 Assessment of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Protein Levels in Corn Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (MSL0024586) (社外秘)
- 35 別添資料 21 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for MON 87411 (社外秘)

- 5 別添資料 22 In-House Validation Summary for “A Recommended Procedure for Real- Time Quantitative TaqMan PCR for MON 87411 using 109 bp Event- Specific product at the 3’ End” (社外秘)
- 別添資料 23 Assessment of the Effect of Cold Stress on Maize MON 87411 under Controlled Environment Conditions in 2012 (MSL0024455) (社外秘)
- 10 別添資料 24 Characterization of DvSnf7 RNA Extracted from MON 87411 and Comparison of the Molecular and Functional Properties of Plant-Produced and *in vitro*-Produced DvSnf7 RNA (MSL0025263) (社外秘)