

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

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
① 和名、英名及び学名	4
② 宿主の品種名又は系統名	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ 基本的特性	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	6
ハ 捕食性又は寄生性	7
ニ 繁殖又は増殖の様式	7
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	7
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	8
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	8
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
ホ 病原性	9
へ 有害物質の産生性	9
ト その他の情報	10
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	11
(1) 供与核酸に関する情報	12
イ 構成及び構成要素の由来	12
ロ 構成要素の機能	14
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	14
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	20
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	30
(2) ベクターに関する情報	31
イ 名称及び由来	31
ロ 特性	31
① ベクターの塩基数及び塩基配列	31
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	31
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	31
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	31
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	31
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	32
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	32
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	32
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	32
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	32
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	35
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	35
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性	37
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	40
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	40
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	43
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	44
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	44

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容	44
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	44
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	45
(1) 使用等の内容	45
(2) 使用等の方法	45
(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	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	47
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	47
(6) 国外における使用等に関する情報	47
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	49
1 競合における優位性	49
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	49
(2) 影響の具体的な内容の評価	49
(3) 影響の生じやすさの評価	50
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	50
2 有害物質の産生性	50
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	50
(2) 影響の具体的な内容の評価	54
(3) 影響の生じやすさの評価	55
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	55
3 交雑性	56
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	56
(2) 影響の具体的な内容の評価	56
(3) 影響の生じやすさの評価	56
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	56
4 その他の性質	56
第三 生物多様性影響の総合的評価	57
参考文献	59
緊急措置計画書	70
隔離ほ場試験計画書	72

別添資料リスト	85
---------------	----

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

2021年9月30日

農林水産大臣 野上 浩太郎 殿
環境大臣 小泉 進次郎 殿

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

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>mpp75Aa1.1</i>, <i>vpb4Da2</i>, <i>DvSnf7.1</i>, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON95275, OECD-UI: MON-95275-7)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名称：バイエルクロップサイエンス株式会社 隔離ほ場 使用期間：承認日から 2026 年 5 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示した標識を見やすい所に掲げている。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。</p>

	<p>(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(7) (1)から(6)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	---

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

10

① 和名、英名及び学名

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。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

25

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

30

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

(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
5 5
と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001; 戸澤, 2005)。1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。
10

わが国へは 1573~1591 年頃にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた。また、明治時代になって北海道へ米国からデント種とフリント種が新たに導入され、全国的に栽培が普及した (戸澤, 2005)。
15

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

・主たる栽培地域

現在、トウモロコシは、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能
20 20
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、2019 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9,720 万 ha であり、上位国は、中国 4,128 万 ha、米国 3,295 万 ha、ブラジル 1,752 万 ha、インド 903 万 ha、アルゼンチン 723 万 ha
25 25
である (FAO, 2020)。

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、2019 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 4,700 ha で (農林水産省, 2020)、同年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 3,000 ha である (農林水産省, 2020)。
30

・栽培方法

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

一方、わが国では、飼料用トウモロコシを中心に栽培が行われており、慣行栽培法は次のとおりである。
35

北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も

多い。適正栽植密度は10 aあたり6,000~8,000本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に2~3回行う。収穫期は9月下旬から10月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い(瀧澤, 2001)。

- 5 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種(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。

10 ・流通実態及び用途

15 世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2019年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.1%が飼料(7.4%の蒸留粕を含む)、26.6%がエタノール製造、17.5%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(NCGA, 2021)。

20 わが国では、2020年に約1,576万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約1,162万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる(財務省, 2021)。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2018)。

20 また、飼料用トウモロコシは、発芽可能な状態で輸入されるものが多いが、加熱・圧ぺんすること等が関税制度の下、義務づけられている(農林水産省, 2014)。

25 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—

30

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、長い年月の間に栽培植物として馴化された結果、自然条件下における自生能力を失った作物である(OECD, 2003)。

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

品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である(瀧澤, 2001)。

また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性(日長反応性)は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である(柿本ら, 2001)。

- 5 これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の1.6~2.0倍になったときに幼根(初生根又は種子根)が抽出し、子実発芽となる(戸澤, 2005)。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH 5.0~8.0の範囲で栽培可能である(戸澤, 2005)。

10 ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

15

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

- 20 トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である(OECD, 2003)。

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

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

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

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

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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)。

35

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる (西尾, 2002)。花粉の形状は球形で、直径は 90~120 μm 程度である (中村, 2001)。

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

5 わが国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁 (0 m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/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
10 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm²以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

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

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

花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い (CFIA, 2012)。平均的な花粉は大気中に飛散した 2 時間後にはその発芽能力を 100 % 失うという報告もある (Luna et al., 2001)。

25 ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

30

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

- 5 これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシの、わが国の畑以外での生育については、2013年に熊本県内の港湾周辺で1個体、2015年に鹿児島県内の港湾周辺で1個体の計2個体報告されている(農林水産省, 2014; 農林水産省, 2017)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

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

10 本組換えトウモロコシでは、*Brevibacillus laterosporus* 由来の *Mpp75Aa1.1* 蛋白質¹、*Bacillus thuringiensis* 由来の *Vpb4Da2* 蛋白質¹ 及び *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物においてウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*, 以下、「WCRW」とする。) の *DvSnf7* 遺伝子と一致するように設計された逆方向反復配列から発現する二本鎖 RNA (dsRNA) が産生されることにより、コウチュウ目の標的害虫に対する抵抗性が付与される。なお、*Mpp75Aa1.1* 蛋白質は生物検定試験においてチョウ目昆虫への活性を示したが (第一の 2-(1)-ロ-②, p22~27)、ほ場環境においてチョウ目害虫に対する実用的な防除効果は認められていない。

15

また、後述 (第一の 2-(1)-イ, p12) のとおり、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットには、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列が逆方向反復で存在するため、その転写産物において 240 bp の二本鎖 RNA (以下、「*DvSnf7* dsRNA」とする。) が形成される。この逆方向反復配列の構成及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列 (順方向配列及び逆方向配列の両方) の DNA 配列は、過去に第一種使用等の承認がなされているコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*DvSnf7*, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) (承認日: 2016年8月26日) (以下、「MON87411 系統」とする。) において発現する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と同一である。さらに、
20
25 本組換えトウモロコシに殺虫活性を付与する *DvSnf7* dsRNA の塩基配列についても、上述した承認済みの MON87411 系統において発現する dsRNA の塩基配列と同一である。

¹ 本組換えトウモロコシにおいて発現する *Mpp75Aa1.1* 蛋白質及び *Vpb4Da2* 蛋白質は、過去に *Cry75Aa1.1* 蛋白質及び *Vip4Da2* 蛋白質 (又は *Vip4Ba1* 蛋白質) と命名されていた。これら 2 つの蛋白質が属する分類上の区分について、新旧の名称と構造的類似性に基づく再分類の背景が文献 (Crickmore et al., 2020) に詳述されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

- 5 本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 2 (p15) 及び表 1 (p16~19) に示した。

【*mpp75Aa1.1* 遺伝子】

10 *mpp75Aa1.1* 遺伝子から発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質は、*B. laterosporus*²に由来する殺虫性蛋白質である。*B. laterosporus* において産生される Mpp75Aa1 蛋白質の前駆体は、その N 末端に 23 アミノ酸の膜輸送シグナルペプチドを有しており、このペプチドは *B. laterosporus* において膜輸送の後に蛋白質の本体から切り離される。この 23 アミノ酸の膜輸送シグナルペプチドは細菌のシグナルペプチドであり植物中では切り離しが起こらないと考えられたため、当該

15 ペプチドをコードする DNA 配列は、本組換えトウモロコシに導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子では取り除かれている。また、当該遺伝子の発現における蛋白質への翻訳を確実にするために、メチオニンが付加されている。

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

20

【*vpb4Da2* 遺伝子】

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

25

【*DvSnf7.1* 抑制カセット】

本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットには WCRW (*D. virgifera virgifera*) に由来する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列が逆方向反復で存在し、その転写産物において *DvSnf7* 遺伝子の部分配列の dsRNA (*DvSnf7* dsRNA) (240 bp) が

30 形成される。この逆方向反復配列の構成及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列 (順方向配列及び逆方向配列の両方) の DNA 配列は、過去に第一種使用等の承認がなされている MON87411 系統に導入された *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と同一である。さらに、本組換えトウモロコシに殺虫活性をもたらす *DvSnf7* dsRNA の塩

² *B. laterosporus* はグラム陽性の内生孢子形成細菌の 1 種である (Bowen 2021)。*B. laterosporus* 土壌細菌として知られており、他にも岩や埃、淡水及び海水から単離されている (Nivetha and Jayachandran, 2017; Panda et al., 2014; Ruiu, 2013)

基配列についても、上述した MON87411 系統において発現する dsRNA の塩基配列と同一である。一方で、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットの完全長の転写産物と MON87411 系統の *DvSnf7* 抑制カセットの完全長の転写産物との間に見られる唯一の違いは、リーダー配列である (図 1, p13)。本組換えトウモロコシでは、害虫抵抗性の効果の向上をめざして *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写レベルを高めるために³、MON87411 系統とは異なるリーダー配列が用いられている。本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) におけるリーダー配列は 55 塩基であり、このうち 7 塩基については MON87411 系統の *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物 (RNA) と共通で、48 塩基が本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットに特異的な配列である。よって、リーダー配列以外の全ての RNA の配列は本組換えトウモロコシと MON87411 系統の間で同一であり、その中には殺虫活性をもたらす dsRNA を形成する逆方向反復配列 (*DvSnf7* 遺伝子の部分配列) も含まれる。

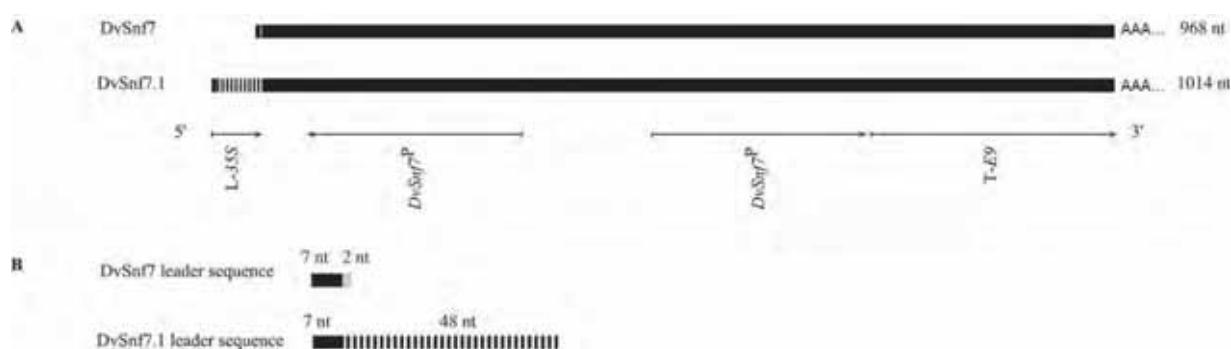


図 1 *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物 (RNA) と *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) との比較⁴

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

³ 本組換えトウモロコシの根における *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物の発現量は 5.1×10^{-3} $\mu\text{g/g}$ FW であり (表 8, p43)、MON87411 系統の根における *DvSnf7* 抑制カセットの転写産物の発現量 (3.15×10^{-3} $\mu\text{g/g}$ FW) (日本モンサント株式会社, 2015) と比べて高い値であった。

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

ロ 構成要素の機能

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

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の機能は、表 1 (p16~p19) に示した。

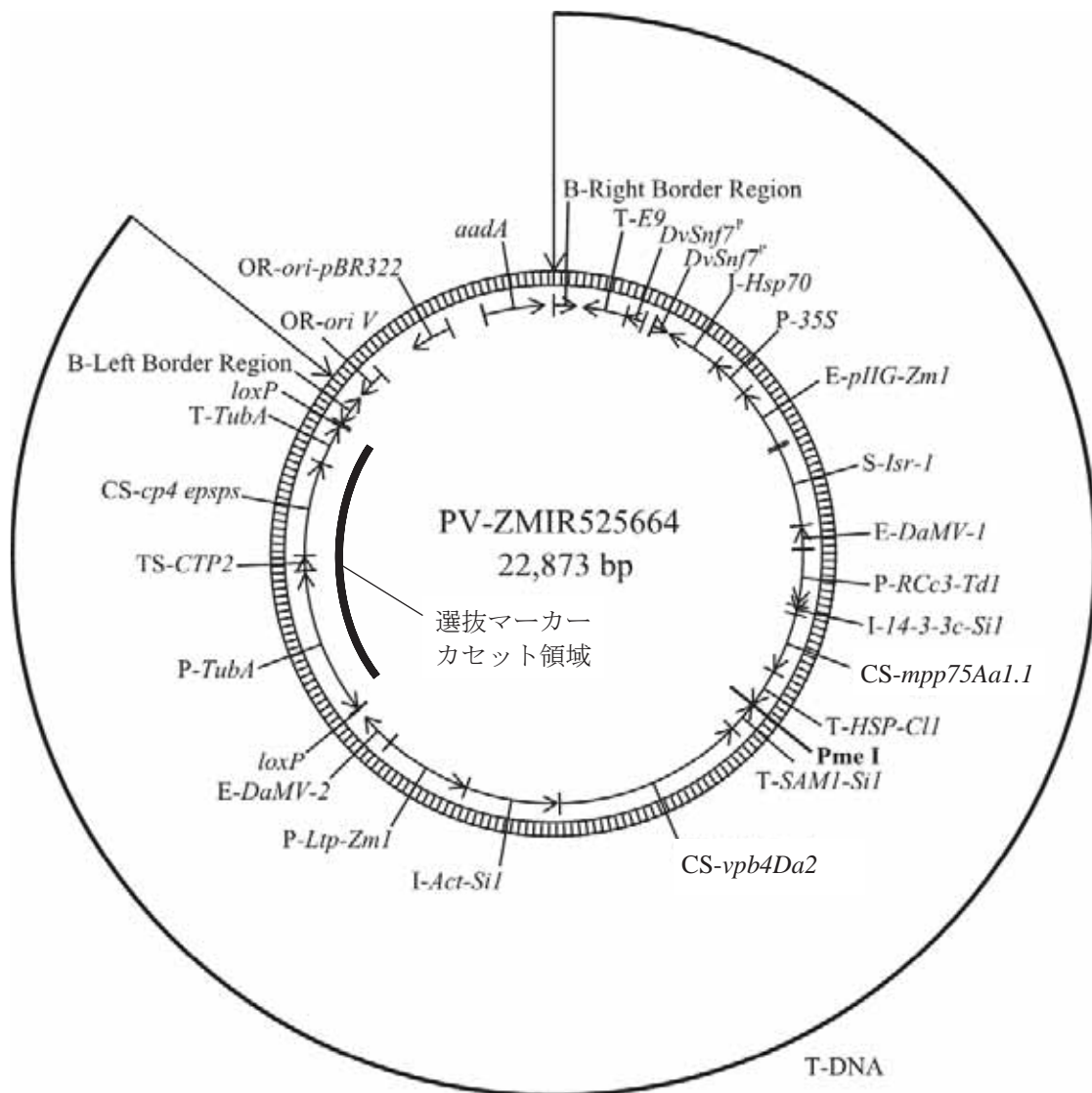


図2 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 のプラスミドマップ⁵

本組換えトウモロコシの育成の過程で、T-DNA 領域が導入された R₂ 世代の個体を
 5 Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配させることによ
 り、PV-ZMIR525664 の T-DNA 領域のうち、2つの loxP 配列に挟まれる選抜マーカーカ
 セット領域 (P-TubA、TS-CTP2、CS-cp4 epsps、T-TubA 及び loxP 配列の 1つ) を除去し、
 同領域及び Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した (第一の 2-(3)-
 10 ハ-③, p32)。なお、図中の DvSnf7 に付された「p」の表記は、遺伝子の部分配列である
 ことを示している。

⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会
 社に帰属する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能⁶

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNA 領域		
B ¹ -Right Border Region	1-331	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening sequence	332-436	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ² -E9	437-1,069	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening sequence	1,070-1,098	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>DvSnf7^P</i>	1,099-1,338	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。
Intervening sequence	1,339-1,488	転写産物において当該配列内で対合しないように設計された、ループ部分の配列。
<i>DvSnf7^P</i>	1,489-1,728	<i>D. virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。
Intervening sequence	1,729-1,764	DNA クローニングの際に利用された配列。
I ³ - <i>Hsp70</i>	1,765-2,568	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来の <i>hsp70</i> 遺伝子のイントロン及びその近傍領域に存在するエクソン配列であり、熱ショック蛋白質 (HSP70) をコードする (Rochester et al., 1986)。遺伝子発現の制御に関わる (Brown and Santino, 1997)。
Intervening sequence	2,569-2,574	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ⁴ -35S	2,575-3,150	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域 (Odell et al., 1985)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
E ⁵ - <i>pIIIG-Zm1</i>	3,151-4,066	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) に由来し、物理的インピーダンス誘導蛋白質をコードする <i>pIIIG</i> 遺伝子のエンハンサー配列 (Huang et al., 1998)。植物細胞内での転写を高める。
Intervening sequence	4,067-4,072	DNA クローニングの際に利用された配列。

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

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)⁶

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
S ⁶ - <i>Isr-1</i>	4,073-5,291	隣接する遺伝子が互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化するためのスペーサーとして設計された非コード配列 (Casini et al., 2014) (GenBank accession: MT611522)。
Intervening sequence	5,292-5,312	DNA クローニングの際に利用された配列。
E- <i>DaMV-1</i>	5,313-5,634	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。
Intervening sequence	5,635-5,647	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>RCc3-Tdl</i>	5,648-6,478	ガマグラス (<i>Tripsacum dactyloides</i>) 由来の <i>RCc3</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611509)。植物細胞内での転写を誘導する。
I- <i>14-3-3c-Sil</i>	6,479-6,583	アワ (<i>Setaria italica</i>) の <i>14-3-3c</i> 遺伝子のイントロン配列であり (GenBank accession: MT611514)、遺伝子発現の制御に関わる (Rose, 2008)。
Intervening sequence	6,584-6,604	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ⁷ - <i>mpp75Aa1.1</i>	6,605-7,492	<i>Brevibacillus laterosporus</i> 由来の Mpp75Aa1.1 蛋白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Bowen et al., 2021)。
Intervening sequence	7,493-7,509	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>HSP-ClI</i>	7,510-8,070	ハトムギ (<i>Coix lacryma-jobi</i>) の熱ショック蛋白質をコードする <i>Hsp</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611516)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	8,071-8,096	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>SAM1-Sil</i>	8,097-8,531	アワ (<i>S. italica</i>) の S-アデノシルメチオニン合成酵素 1 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611517)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	8,532-8,538	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>vpb4Da2</i>	8,539-11,352	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の Vpb4Da2 蛋白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Yin et al., 2020)。
Intervening sequence	11,353-11,378	DNA クローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)⁶

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
I- <i>Act-Sil</i>	11,379-12,743	アワ (<i>S. italica</i>) のアクチン遺伝子のイントロン配列 (Rose, 2008) (GenBank accession: MT611515)。遺伝子発現の制御に関わる。
Intervening sequence	12,744-12,751	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Ltp-Zml</i>	12,752-14,045	トウモロコシ (<i>Z. maize</i>) の脂質輸送蛋白質遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611508)。植物細胞における転写を誘導する。
E- <i>DaMV-2</i>	14,046-14,541	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。
Intervening sequence	14,542-14,685	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>loxP</i>	14,686-14,719	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening sequence	14,720-14,725	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>TubA</i>	14,726-16,906	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 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 (Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
Intervening sequence	16,907-16,910	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ⁸ - <i>CTP2</i>	16,911-17,138	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>cp4 epsps</i>	17,139-18,506	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
Intervening sequence	18,507-18,513	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-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)⁶

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-TubA	18,514-19,095	イネ (<i>O. sativa</i>) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Jeon et al., 2000)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	19,096-19,101	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>loxP</i>	19,102-19,135	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening sequence	19,136-19,170	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	19,171-19,612	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)		
Intervening sequence	19,613-19,698	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ⁹ -ori V	19,699-20,095	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening sequence	20,096-20,717	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pBR322	20,718-21,306	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening sequence	21,307-21,840	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	21,841-22,729	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening sequence	22,730-22,873	DNA クローニングの際に利用された配列。

¹ B-Border (境界配列)

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

5 ³ I-Intron (イントロン)

⁴ P-Promoter (プロモーター)

⁵ E-Enhancer (エンハンサー)

⁶ S-Spacer (スペーサー)

⁷ CS-Coding Sequence (コード配列)

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

⁹ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

^P Partial sequence (部分配列)

* T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット領域 (P-TubA、TS-CTP2、CS-*cp4 epsps*、T-TubA 及び *loxP* 配列の 1 つ) は、本組換えトウモロコシには存在しない。なお、本組換えトウモロコシに存在する構成要素のみを、別添資料 10 の Appendix Table 2 (p43~45) に示している。

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

5 【Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質】

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

10

1) 分類

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

20

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

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

35

日) や、 β -PFP に属する Cry51Aa2 蛋白質を導入することでカメムシ目害虫、アザミウマ目害虫及びコウチュウ目害虫抵抗性を付与した遺伝子組換えワタ (MON88702 系統、承認日：2019 年 2 月 20 日) が開発されている。殺虫性蛋白質の新命名法においては、 β -PFP の殺虫性蛋白質はその β -PFP としての共通した構造上の特徴に加え、さらに細かな構造上の違いも考慮し、新たに設置されたクラスに再分類されている (Crickmore et al., 2020 の Table 1)。例えば、旧命名法における Cry35Ab1 蛋白質は、新命名法において「Tpp」のクラスに分類され、その呼称は Tpp35Ab1 に改名された。また、旧命名法における Cry51Aa2 蛋白質は、新命名法において「Mpp」のクラスに分類され、その呼称は Mpp51Aa2 に改名された。

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

さらに、殺虫性蛋白質の旧命名法では、*B. thuringiensis* が栄養成長期に産生する殺虫性の膜孔形成蛋白質を、Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) のグループに分類していた。このうち Vip3 のファミリーに属する Vip3A 蛋白質は、遺伝子組換えトウモロコシ (MIR162 系統、承認日：2010 年 6 月 11 日) 及びワタ (COT102 系統、承認日：2012 年 9 月 4 日) に導入されており、チョウ目害虫抵抗性をもつ遺伝子組換え作物として商品化されている。旧命名法において Vip のグループに分類されていた蛋白質のうち、Vip3 ファミリーに属する蛋白質は新命名法においても「Vip」と呼称されるクラスに分類された一方で、特徴的な構造をもつその他の蛋白質は新たに設置された「Vpa」や「Vpb」のようなクラスに再分類されている (Crickmore et al., 2020 の Table 1)。本組換えトウモロコシに導入された Vpb4Da2 蛋白質は、旧命名法において Vip4Da2 (又は Vip4Ba1 蛋白質) と呼称されており、新命名法においては「Vpb」のクラスのうち β -PFP である Vpb4 のファミリーとして、「Vpb4Da2 蛋白質」に改名された。

表 2 Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の新旧名称⁷

旧命名法	新命名法	主な特徴
Cry75Aa1 蛋白質	Mpp75Aa1 蛋白質	<i>B. laterosporus</i> に由来 生化学的な特徴：β-PFP
Vip4Da2 蛋白質 (又は Vip4Ba1 蛋白質)	Vpb4Da2 蛋白質	<i>B. thuringiensis</i> に由来 生化学的な特徴：β-PFP

5 2) 作用機序

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

20 本組換えトウモロコシにおいて発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、他の殺虫活性をもつ膜孔形成蛋白質と同様の作用機序をもつ。すなわち、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質は、消化管の特異的な蛋白質分解酵素により部分的に分解してコア蛋白質に変換され、WCRW の中腸上皮細胞膜上で発現する受容体への結合を介し殺虫活性を発揮することが示されている (別添資料 2 及び別添資料 3)。

25

3) 殺虫スペクトラム

Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の殺虫スペクトラムを調べるため、*E. coli* で発現させた当該蛋白質を混餌投与し、生物検定を行った (別添資料 4 及び別添資料 5)。この生物検定では、本組換えトウモロコシを含む栽培作物

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

を直接的又は間接的に摂食する可能性のある非標的生物種を、栽培作物周辺に生息する生物の機能群⁸ (植食者、天敵 (捕食者、寄生者)、花粉媒介者、分解者; 図 3, p26) に基づいて選定し、8つの目 (コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目及びビナガミミズ目) に分類される計 20 種の指標生物を供試した。

5 このように栽培作物周辺に生息する生物の機能群から指標生物を選定して、それらの指標生物への活性から非標的生物への影響を調査する手法は、殺虫剤を散布した際の環境影響評価にも用いられている (EPA, 1998; Romeis et al., 2013; Wach et al., 2016)。また、過去に第一種使用等の承認がなされている
10 チョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (承認日: 2016年11月25日) やカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *cry51Aa2*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88702, OECD UI: MON-88702-4) (承認日: 2019年2月20日) (以下、「MON88702系統」とする。) のような害虫抵抗性の遺
15 伝子組換え作物の非標的生物に対する活性も、この手法を用いて調査されてきた。なお、現存する昆虫種の約 9 割が、当該蛋白質の生物検定に供試した昆虫目のうち 5 つの昆虫目 (コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目) に属すると報告されている (Stork, 2018)。

 上述のとおり選定された生物種 (計 20 種) を供試した生物検定の結果を、
20 機能群ごとに以下に記載する。この生物検定の結果 (表 3, p27 及び表 4, p28) において EC₅₀ (半数影響濃度) 又は LC₅₀ (半数致死濃度) が推定された場合には、感受性を有する生物種であると判定した。なお、Mpp75Aa1.1 蛋白質の生物検定に供試したグラントビートル、ツマジロクサヨトウ及びクサカゲロウ並びに Vpb4Da2 蛋白質の生物検定に供試したサザンコーンルートワームで
25 は死亡又は成長阻害が観察されたものの、供試濃度の範囲内に EC₅₀ 又は LC₅₀ が定まらなかったため、感受性を有すると判定しつつ、EC₅₀ 又は LC₅₀ の数値に不等号記号を付した (表 3, p27 及び表 4, p28)。

<植食者>

30 作物を直接食餌する植食者の指標生物種として、コウチュウ目 4 種、チョウ目 4 種、カメムシ目 2 種及びハエ目 1 種の計 11 種を選定した。このうち、トウモロコシを食害することが知られているのは、コウチュウ目に属する WCRW (*D. virgifera virgifera*) とチョウ目に属するツマジロクサヨトウ

⁸ 栽培作物周辺の生態系において、非標的生物種、特に非標的節足動物は、植食者、天敵、花粉媒介者、分解者等の機能を有するため、害虫抵抗性作物の環境影響評価を行う際にこれらの非標的生物種が影響を受けるか調査される (Romeis et al., 2013)。

(*Spodoptera frugiperda*)、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) 及びヨーロッパアンコーンボローラー (*Ostrinia nubilalis*) である。

5 Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属する WCRW (*D. virgifera virgifera*) と、チョウ目に属するツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*)、アメリカタバコガ (*H. zea*)、ソイビーンルーパー (*Chrysodeixis includens*) 及びヨーロッパアンコーンボローラー (*O. nubilalis*) が感受性を示した (表 3, p27)。

10 また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属する WCRW (*D. virgifera virgifera*) 及びサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) と、ハエ目に属するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) が感受性を示した (表 4, p28)。

<天敵 (捕食者、寄生者)>

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

20 Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、コウチュウ目に属するグランドビートル (*Poecilus cupreus*) と、アミメカゲロウ目に属するクサカゲロウ (*Chrysoperla rufilabris*) が感受性を示した (表 3, p27)。

また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、供試されたいずれの昆虫種も Vpb4Da2 蛋白質に対して感受性を示さなかった (表 4, p28)。

<花粉媒介者>

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

Mpp75Aa1.1 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、セイヨウミツバチ (*A. mellifera*) の幼虫は Mpp75Aa1.1 蛋白質に対して感受性を示したが、成虫は感受性を示さなかった (表 3, p27)。

30 また、Vpb4Da2 蛋白質の摂餌試験による生物検定の結果、セイヨウミツバチ (*A. mellifera*) の幼虫と成虫のいずれも Vpb4Da2 蛋白質に対して感受性を示さなかった (表 4, p28)。

<分解者>

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

摂餌試験による生物検定の結果、オオフォルソムトビムシ (*F. candida*) 及びアンドレツリミミズ (*E. andrei*) はいずれも、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に対して感受性を示さなかった (表 3, p27 及び表 4, p28)。

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

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

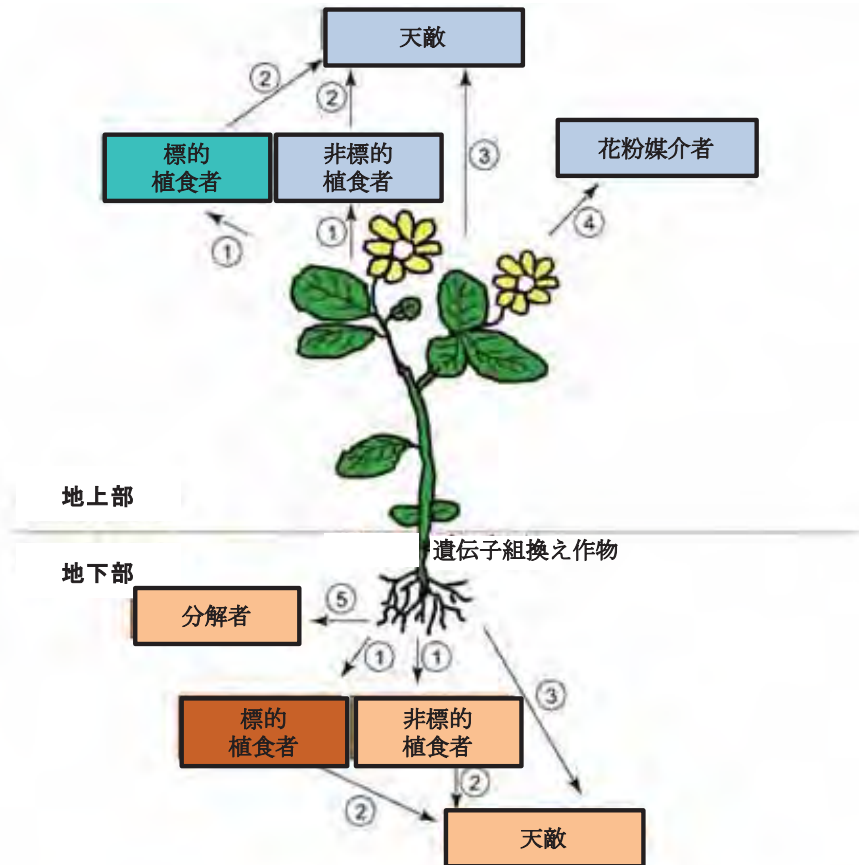


図3 栽培作物周辺に生息する生物の機能群とその曝露経路 (Kos et al., (2009)より改変)⁹

今回、生物検定に供試した昆虫種が属する機能群は下記のとおりである。

- | | |
|---|------------|
| ① 作物を直接食餌する植食者 | |
| WCRW (標的昆虫) | ヨーロッパコンボラー |
| サザンコーンルートワーム | インゲンテントウ |
| コロラドハムシ | ソイビーンルーパー |
| ウエスターターニッシュドプラントバグ | ツマジロクサヨトウ |
| アメリカタバコガ | ネッタイシマカ |
| ネオトロピカルブラウスティンクバグ | |
| ② 植食者を捕食又は植食者に寄生する天敵 | |
| インシディアスフラワーバグ | ビッグアイドバグ |
| ユーロフィドワズブ | クサカゲロウ |
| ピンクスポッテッドレディビートル | グランドビートル |
| ③ 蜜や花粉などの植物組織の摂食を介した影響(地上部)、又は植物体周辺の土壌との接触を介した影響を受ける天敵(地下部) | |
| インシディアスフラワーバグ | クサカゲロウ |
| ピンクスポッテッドレディビートル | グランドビートル |
| ビッグアイドバグ | |
| ④ 作物の花粉を運んで受粉させる花粉媒介者 | |
| セイヨウミツバチ | |
| ⑤ 有機物の分解及びそれを補助する分解者 | |
| オオフォルソムトビムシ | |
| アンドレッリミミズ | |

⁹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表3 Mpp75Aa1.1 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性¹⁰

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

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

2 EC₅₀ (半数影響濃度) は、6段階の供試濃度で7日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

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

4 死亡が確認されており、LC₅₀ (半数致死濃度) は当該昆虫種に対する最小供試濃度 (250 µg/mL diet) よりも小さい。

5 成長阻害が観測されたが、EC₅₀は最大供試濃度よりも大きい。

6 セイヨウミツバチの幼虫については、5段階の供試濃度で21日間の給餌試験を実施した結果から LC₅₀を推定した。

7 死亡が確認されたが、LC₅₀は最大供試濃度よりも大きい。

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

表4 Vpb4Da2 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性¹¹

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

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

2 EC₅₀ (半数影響濃度) は、6段階の供試濃度で7日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

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

4 成長阻害が観測されたが、混餌できる蛋白質の量に限界が生じたため EC₅₀ を推定できなかった。

5 ネットアイシマカについては、5段階の供試濃度で5日間の給餌試験を実施した結果から LC₅₀ (半数致死濃度) を推定した。

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

4) 既知のアレルゲンとの類似性の有無

5 Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質が既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、AD_2019¹²に登録されている既知の s アレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

【DvSnf7 dsRNA】

10

本組換えトウモロコシに導入された *DvSnf7.1* 抑制カセットには、WCRW がもつ *Snf7* 遺伝子のエクソンのうち 240 bp と一致するように設計された逆方向反復配列が存在し、その転写産物では dsRNA (DvSnf7 dsRNA) が形成される。この DvSnf7 dsRNA は、本組換えトウモロコシを摂食した WCRW の中腸において RNAi (RNA 干渉) を誘導し、オートファジー¹³経路に関与する *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで細胞の恒常性を妨げることにより、殺虫活性を示す。この点について以下に概説する。

15 前述 (第一の 2-(1)-イ, p12) のとおり、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットに含まれる *DvSnf7* 遺伝子の部分配列は、その転写産物において 240 bp の dsRNA を形成するものであり、その塩基配列は過去に第一種使用等の承認がなされている MON87411 系統において発現する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と同一である。さらに、本組換えトウモロコシの DvSnf7 dsRNA の塩基配列についても、上述した MON87411 系統において発現する dsRNA の塩基配列と同一である。

25 DvSnf7 dsRNA により生じる RNAi の作用機序は良く知られており、WCRW による摂食を通じて WCRW の RNAi 機構に認識され、WCRW 内在性 *DvSnf7* 遺伝子から発現する mRNA を分解し、オートファジーに関わる DvSNF7 蛋白質の

¹²AD_2019: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,081件のアミノ酸配列が含まれる (2019年2月20日更新)。

¹³一般的に、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)。 *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)。

5 発現を抑制することが報告されている (日本モンサント株式会社, 2015)。また、*in vitro* で合成した *DvSnf7 dsRNA* を混餌投与した生物検定において、供試されたコウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の計 14 種の昆虫のうち、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫のみに活性を示すことが確認されており、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 であると報告されている (日本モンサント株式会社, 2015)。さらに、コウチュウ目、チョウ目、ハチ目、ハエ目、カメムシ目、バッタ目及びミジンコ目の代表的な節足動物 18 種のゲノムデータベースにおいて、*DvSnf7* 遺伝子のオーソログである配列に対して WCRW の *DvSnf7* 遺伝子の部分配列との配列相同性を調査した結果、21 塩基長での一致は認められなかった (日本モンサント株式会社, 2015)。

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

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

20 【Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質】

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

【*DvSnf7 dsRNA*】

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

30 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塩基配列と *DvSnf7 dsRNA* の塩基配列との間で 21 塩基長の一致が存在するか相同性検索を行なった。その結果、トウモロコシ由来の転写産物において、*DvSnf7 dsRNA* 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 6)。

35 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 dsRNA* から新たな蛋白質が発現する可能性は極めて低い。これらのことから、*DvSnf7 dsRNA* が宿主の代謝系を変化させることはないと考え

られる。

(2) ベクターに関する情報

5 イ 名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR525664 は、プラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p16~19) に記載した。

10

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR525664 の全塩基数は 22,873 bp である。なお、PV-ZMIR525664 の塩基配列は別添資料 7 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する
25 情報

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

30

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-ZMIR525664 の構成要素は表 1 (p16~19) 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は、図 2 (p15) に示した。

35

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMIR525664 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

5

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

10 非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞から採取した分裂組織と PV-ZMIR525664 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、除草剤グリホサートを含む培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

15 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

20 カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えトウモロコシの F₄ 世代の種子¹⁴において、形質転換に用いた PV-ZMIR525664 の外側骨格領域を標的とした PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMIR525664 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 8 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。

25 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

30 形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、R₁ 世代を作出した。R₁ 世代において、1 コピーの T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域をもたない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。選抜された R₂ 世代の個体を、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選抜マーカーカセット (P-*TubA*、TS-*CTP2*、CS-*cp4 epsps* 及び T-*TubA*) 及び loxP 配列の 1 つが除去された F₁ 世代を作出し

¹⁴バルクにした収穫種子の中からランダムに約50粒取り、DNAを抽出しPCR分析に用いた。

た。Cre/lox 法では、2つの *lox* と呼ばれる標的配列の間に位置する DNA 配列及び片方の *lox* 配列が、Cre リコンビナーゼによってゲノムから切り出される (Hare and Chua, 2002; Zhang et al., 2003)。以下、PV-ZMIR525664 の T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット及び *loxP* 配列の 1 つが除去された領域を「本組換えトウモロコシに導入された T-DNA 領域」又は「導入遺伝子」という。その後、F₁ 個体を自殖して得られた F₂ 世代において、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない 1 個体を選抜した。したがって、本組換えトウモロコシの F₃ 世代以降には、Cre リコンビナーゼ発現カセットは存在しない (第一の 2-(4)-②, p37~39)。F₂ 世代の選抜個体を自殖して得られた F₃ 世代において、導入遺伝子をホモで有する 1 個体を選抜した。F₃ 世代の選抜個体を自殖し、F₄ 世代を得た。

本組換えトウモロコシの育成図を図 4 (p34) に示した。なお、本申請の対象は、F₄ 世代及び F₄ 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

15

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20 図4 本組換えトウモロコシの育成図

【社外秘につき非開示】

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 本組換えトウモロコシの導入遺伝子が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの F₄F₂、F₄F₃ 及び F₄F₄ 世代 (図 4, p34) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 9)。

10 分離比検定に供試する世代を作出するために、導入遺伝子をホモで有する F₄ 世代を、導入遺伝子をもたないトウモロコシ系統 HCL617 と従来育種法を用いて交配し、導入遺伝子をヘミで有する F₄F₁ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₁ 世代を自殖し、F₄F₂ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₂ 世代を自殖し、F₄F₃ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₃ 世代を自殖し、F₄F₄ 世代を得た。F₄F₂、F₄F₃ 及び F₄F₄ 世代において、Real-Time TaqMan PCR により導入遺伝子の分離比を確認した。

15 その結果、実測値と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伝していることが確認された (表 5, p36)。したがって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

表 5 本組換えトウモロコシの育成過程における導入遺伝子の分離様式¹⁵

世代 ¹	供試個体数	1:2:1 分離						χ ²	p 値 ²
		実測値 ホモ陽性 個体数	実測値 ヘミ陽性 個体数	実測値 陰性個体数	期待値 ホモ陽性 個体数	期待値 ヘミ陽性 個体数	期待値 陰性個体数		
F ₄ F ₂	350	87	169	94	87.50	175	87.50	0.69	0.708
F ₄ F ₃	293	63	152	78	73.25	146.50	73.25	1.95	0.377
F ₄ F ₄	302	75	147	80	75.50	151	75.50	0.38	0.828

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

² 各世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

¹⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子の塩基配列、並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケンス (NGS, Next Generation Sequencing) 解析¹⁶ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 10)。

10

NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150 bp ずつの塩基配列を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度¹⁷75 以上) で解析している。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノムを NGS 解析に供試した結果、本組換えトウモロコシ (F₄ 世代) で 251.9 Gb (冗長度中央値 253)、対照の非組換えトウモロコシで 560.3 Gb (冗長度中央値 235) の塩基配列が解析された (別添資料 10 の Appendix Table 3, p46)。

15

解析した塩基配列全てを PV-ZMIR525664 の塩基配列と照合¹⁸した結果、本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定された (別添資料 10 の p28)。これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 10 の Appendix Figure 32, p119~121)。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 10 の p 28)。さらに、導入遺伝子の冗長度は中央値が 253、最低値が 22 であり、導入遺伝子の全ての配列が検出されていることが確認された (別添資料 10 の Appendix Figure 5, p52)。またこの解析からは、本組換えトウモロコシには、PV-ZMIR525664 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことも確認された (別添資料 10 の Appendix Figure 5, p52)。

20

25

さらに、解析した塩基配列全てを Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統の形質転換に用いたベクター PV-ZMOO513642 (別添資料 10 の Appendix Figure 2, p49) の塩基配列と照合した。その結果、本組換

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

¹⁷冗長度: ゲノム上のすべての塩基に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。その中央値が 75 以上であればすべての挿入 DNA を検出することが可能であることが報告されており本試験では 1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

¹⁸Bowtie 2 v2.3.5.1 (Langmead and Salzberg, 2012)により、30 bp以上の領域で96.6%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

えトウモロコシには PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないことが確認された (別添資料 10 の Appendix Figure 6, p53)。

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

10 また、本組換えトウモロコシにおいて検出された導入遺伝子、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の遺伝子が導入されていることが確認された (別添資料 10 の Appendix Figure 8, p55~60 及び Appendix Figure 9, p61~93)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図 5 (p39) に示した。

15 さらに複数世代 (F₄、F₄F₁、F₅、F₅F₁ 及び F₆ 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS 解析において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 10 の p33)。

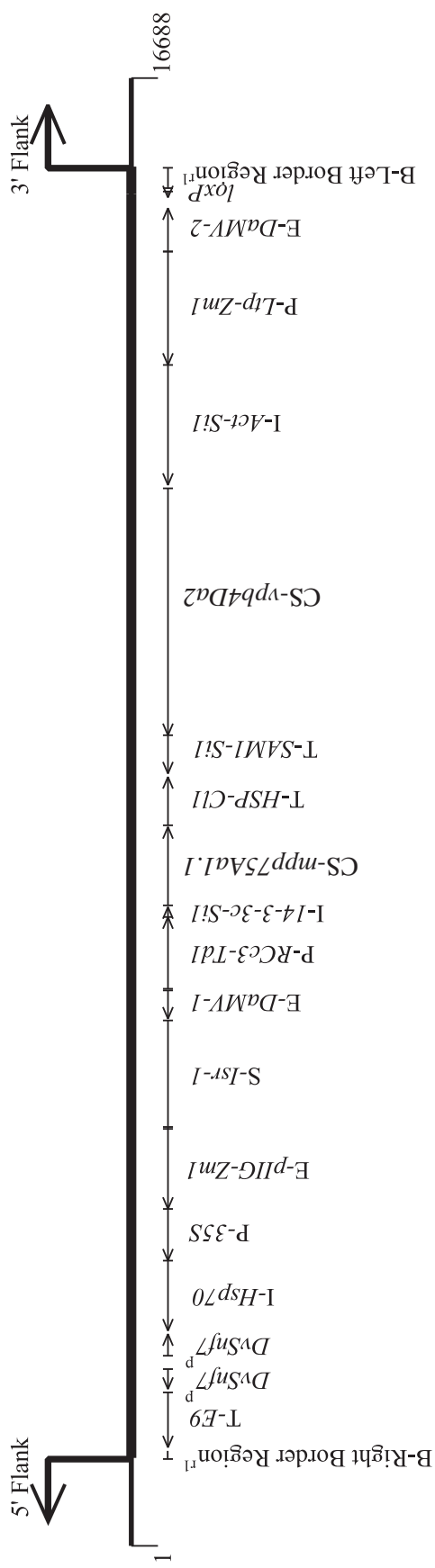


図5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図¹⁹

5 本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えトウモロコシ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。図上部の直角に曲がった矢印は、導入遺伝子と近傍配列の境界を示している。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の導入遺伝子が **PV-ZMIR525664** と一致した配列で導入されている。図中の「rl」の表記は、本組換えトウモロコシに導入された **B-Right Border Region** 及び **B-Left Border Region** が **PV-ZMIR525664** と比較して短くなっていることを意味する。また、図中の **DvSnf7** に付された「P」の表記は遺伝子の部分配列であることを示している。

¹⁹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 10 の p27)。

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

10 本組換えトウモロコシの複数世代 (F₄、F₄F₁、F₅、F₅F₁ 及び F₆ 世代) の種子において Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質が安定して発現していることが、ウエスタンブロット分析により確認された (別添資料 11 の Figure 2 及び Figure 3, p15 及び p16)。これに加え、本組換えトウモロコシの複数世代 (F₄、F₄F₁、F₅、F₅F₁ 及び F₆ 世代) の葉において、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物である完全長の RNA 及び siRNA が安定して発現していることが、ノーザンブロット分析により確認された (別添資料 12 の Figure 3 及び Figure 4, p17 及び p18)。

20 また、2019年に米国の5ヵ所 (アイオワ州、イリノイ州2ヵ所、インディアナ州及びミズーリ州) で行ったほ場試験において本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、種子及び花粉のサンプルを採取し、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の発現量を ELISA 法、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現量を QuantiGene アッセイによりそれぞれ分析した (別添資料 13; 別添資料 14)。その結果、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質については花粉以外の組織で発現が確認され、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物については全ての組織で発現が確認された (表 6~表 8, p42~43)。

30 なお、上述した発現解析のうち、本組換えトウモロコシの複数世代における *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現を確認したノーザンブロット分析では、高分子の RNA を検出するためのノーザンブロットにおいて、完全長の転写産物 (~1.4 kb) を示すバンドとその分解物であると思われるバンドが予想どおりに観察され (別添資料 12 の Figure 3, p17)、低分子の RNA を検出するためのノーザンブロットにおいて siRNA が予想どおり確認された (別添資料 12 の Figure 4, p18)。このうち、高分子の RNA を検出するためのノーザンブロットの結果では、予想された完全長の転写産物 (~1.4 kb) に加えて、6 kb を超えるサイズの転写産物が全ての供試世代で検出されている (別添資料 10 の

Figure 3, p17)。これらの本組換えトウモロコシの転写産物(RNA)を詳細に確認するため、一本鎖特異的 RNA 分解酵素により処理した場合、予想どおり 240 bp の *DvSnf7* dsRNA のみが検出されている (別添資料 15 の Fig 2, p16)。このことは、*DvSnf7.1* 抑制カセットの RNA の発現を確認したノーザンブロット分析において検出された完全長の転写産物及び 6 kb を超えるサイズの転写産物のうち、RNAi の作用機序をもたらす dsRNA として存在するものは予想された 240 bp の dsRNA のみであり、他の dsRNA が存在しないことを示している。また、6 kb を超えるサイズの転写産物の塩基配列を解析した結果、3 種類の転写産物の存在が確認され、それらは *DvSnf7.1* 抑制カセットのリーダー配列、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列 (逆方向反復配列)、ターミネーター及び導入遺伝子近傍のトウモロコシゲノム配列を含むものであった。このことから、6 kb を超えるサイズの転写産物は、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写におけるリードスルーに起因して生じたものであると考えられる。リードスルーによって生じる転写産物は植物の内在性遺伝子においても検出されており、これが通常の遺伝子発現において生じうる現象であることが報告されている (Xing et al., 2010)。

DvSnf7.1 抑制カセットの完全長の転写産物と同様に、これら 6 kb を超えるサイズの転写産物がペプチドや蛋白質をコードするとは考えられない。その理由として、dsRNA の存在がリボソームによる転写産物のスキニングを阻害して翻訳を妨げることが知られている (Kozak, 1989)。真核生物では、転写産物の 5'キャップ構造をリボソームが認識することにより翻訳が始まる。リボソームの小サブユニットは mRNA をスキャンし、dsRNA が生じている箇所では二本鎖を解消するが、逆方向反復配列により 20 bp 以上の長さの dsRNA が生じている場合にはスキャンを進めることができず、翻訳が止まることが知られている (Kozak, 1989)。本組換えトウモロコシにおいて検出された 6 kb の転写産物では 240 bp の *DvSnf7* dsRNA が形成されることから、この dsRNA の存在が転写産物の翻訳を阻害すると考えられる。

しかしながら、念のため当該転写産物の配列に対して開始コドンの解析を行い、その結果として得られた潜在的なペプチドの配列をクエリー配列としてバイオインフォマティクス解析²⁰を実施した。その結果、既知のアレルゲンとの相同性をもつ配列は存在しなかった (別添資料 16)。以上のことは、当該転写産物から非意図的なペプチドや蛋白質が生じて安全性に影響を及ぼすことはないことを示している。

²⁰ AD_2021のデータベースを用いてバイオインフォマティクス解析を実施した。AD_2021は COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,348件のアミノ酸配列が含まれる (2021年2月1日更新)。

表 6 本組換えトウモロコシの組織中における Mpp75Aa1.1 蛋白質の発現量 (2019年、米国)²¹

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

¹ 各組織の採取時における生育段階

5 ² 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 – 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

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

⁴ NA=該当なし

10 表 7 本組換えトウモロコシの組織中における Vpb4Da2 蛋白質の発現量 (2019年、米国)²²

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

¹ 各組織の採取時における生育段階

15 ² 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 – 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

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

⁴ NA=該当なし

²¹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

表 8 本組換えトウモロコシの組織中における *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現量 (2019 年、米国)²³

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

¹ 各組織の採取時における生育段階

5 ² RNA の発現量は、組織の新鮮重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 – 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復。ただし、花粉について LOQ 未満であった 3 つのサンプルは除く)。SE=標準誤差、FW=新鮮重。

10 ³ RNA の発現量は、組織の乾燥重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 – 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復。ただし、花粉について LOQ 未満であった 3 つのサンプルは除く)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

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

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

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

²³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

(5) 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

5 本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、EndPoint TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 17)。検定に用いる葉の DNA 量は、PCR の 1 反応当たり 5~20 ng であることが推奨されている。

10 本法の再現精度は、50 サンプルの本組換えトウモロコシ及び 200 サンプルの非組換えトウモロコシを用いて確認されている (別添資料 17 の p9)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

15 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

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

25 ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 LH244 であり、*mpp75Aa1.1* 遺伝子、*vpb4Da2* 遺伝子及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列が導入されている。

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

35 本組換えトウモロコシには、*mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子が導入されており、それぞれ Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質を発現する。これらの殺虫性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いる (第一の 2-(1)-ロ-②, p22)。また、これまでのところ Cry 蛋

白質や Vip のような殺虫性蛋白質が他の機能を有するとの報告はない。したがって、これらの蛋白質が酵素活性をもつとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 また、本組換えトウモロコシで発現する DvSnf7 dsRNA については、トウモロコシ内在性の転写産物の配列との間に相同性が認められなかったことから、宿主であるトウモロコシの遺伝子の発現を抑制して代謝系を変化させることはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p30)。

よって、導入した *mpp75Aa1.1* 遺伝子、*vpb4Da2* 遺伝子及び DvSnf7 dsRNA による影響が、目的とした宿主の生理学的特性以外に及ぶとは予想されない。

10

以上のことから、本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると考えられる。

15

なお、本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

①形態及び生育の特性、②成体の越冬性、③花粉の稔性及びサイズ、④種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、⑤有害物質の産生性

20

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

25

隔離ほ場における栽培、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

30

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地
名称：バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場
使用期間：承認日から 2026 年 5 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

35

(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示するための標識を見やすい所に掲げている。

5 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

10 2. 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

15 (3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤込む等により、確実に不活化する。

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外
20 に持ち出されることを防止する。

(5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。

(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

25 (7) (1) から (6) までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。

(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

30 (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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

5

- (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

—

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

15 これまで本組換えトウモロコシについて 2016~2021 年の間に米国及びアルゼンチンにおいて延べ 205 カ所のほ場試験が行われているが (表 9, p47)、対照の非組換えトウモロコシと比較して生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

なお、本組換えトウモロコシの海外における申請予定は表 10 (p48) のとおりである。

20

表 9 国外において本組換えトウモロコシのほ場試験を行ったほ場の数及び国²⁴

年	ほ場の数	国
2016	2	米国
2017	38	米国
2018	63	米国
2018/2019	6	アルゼンチン
2019	68	米国
2020	21	米国
2021	7	米国

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

表 10 本組換えトウモロコシの海外における申請予定²⁵

2021年11月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	【申請予定】
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	【申請予定】
米国農務省 (USDA)	環境	【申請予定】
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	【申請予定】
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	【申請予定】

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

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一の 2-(6)-② (p44~45) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

10 1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

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

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

(2) 影響の具体的内容の評価

—

35

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

10

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

20 本組換えトウモロコシ中において発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA の作用は特異的であり、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p30)。また、Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質はいずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p29)。

25 本組換えトウモロコシ中で発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質を高濃度で食餌させた生物検定の結果、コウチュウ目 (植食者/天敵)、チョウ目 (植食者)、ハエ目 (植食者)、アミメカゲロウ目 (天敵) 及びハチ目の幼虫 (花粉媒介者) に対する殺虫活性が認められた (第一の 2-(1)-ロ-②, p22~27)。よって、これらの昆虫目に属する昆虫が、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に曝露された場合に影響を受ける可能性が考えられた。そこで、上述した 5 つの昆虫目に対して想定される曝露経路を以下に考察し、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質への曝露が生じうるかを検討した。

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

潜在的な曝露経路 (曝露対象の生物が属する機能群)

- (a) ほ場内 (地上) で植物体や花粉を食餌 (植食者)
- (b) 植物体や花粉を食餌した昆虫を捕食 (天敵)
- (c) ほ場内 (地下) で植物体を食餌 (植食者及び分解者)
- 5 (d) ほ場外へ飛散した花粉への曝露 (植食者及び天敵)
- (e) ほ場で採集され、ほ場外の巣に持ち帰られた花粉を食餌 (花粉媒介者のハナバチ²⁶⁾)

上記に示した曝露経路のうち経路 (a) (b) (c) については、非標的昆虫への影響はほ場内に限定されるものであり、その影響は慣行農業による殺虫剤散布等の防除の影響²⁷を超えるものではないと考えられる。なお、経路 (b) に関して厳密に述べると、ほ場内の植物体や花粉を食餌した非感受性の昆虫がほ場外へ移動し、その昆虫を天敵 (捕食者) が捕食することで、植物体や花粉に由来する殺虫性蛋白質に曝露されることも生じうる。しかしながら、植食者は食料となる栽培作物が豊富に存在するほ場内にとどまることが知られている。また、*B. thuringiensis* に由来する Cry 蛋白質が組換え植物で発現し、これが非感受性の植食者に摂取された場合に、植食者の体内における Cry 蛋白質の濃度は組換え植物における濃度と比べて低いことが報告されている (Eisenring et al., 2017; Kim et al., 2021; Meissle et al., 2021)。さらに、植食者が遺伝子組換え植物の食餌を止めると、植食者の体内における遺伝子組換え作物由来蛋白質の濃度は迅速に低下することが知られている (Meissle et al., 2021)。したがって、ほ場内で本組換えトウモロコシを食餌した非感受性の植食者がほ場外で天敵に捕食される可能性は低く、仮に捕食されたとしても天敵が本組換えトウモロコシ由来の Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の影響を受ける可能性は低いと考えられる。

以上のことから、本組換えトウモロコシについて起こりうる主要な曝露経路が花粉の飛散である²⁸ことを念頭に、上記に示した曝露経路のうちほ場外に飛散した花粉による曝露経路 (d) (e) を通じて、本組換えトウモロコシで発

²⁶ ミツバチはほ場のトウモロコシから花粉を収集し、これを巣に持ち帰り、幼虫に餌として与えることが知られているが、幼虫の餌に占める花粉の割合は小さい (Babendreier et al., 2004)。他のハナバチの昆虫種が同様の行動をとる可能性があるが、肉食性のハチや寄生バチがこのような行動をとることは考えにくい。

²⁷ 現在わが国でトウモロコシに適用登録されている殺虫剤の中には、単剤で8つの昆虫目 (コウチュウ目、チョウ目、ハエ目、ハチ目、アミメカゲロウ目に加え、カメムシ目、アザミウマ目、バッタ目) に殺虫活性をもつものが存在する (FAMIC, 2021; 日本生物防除協議会, 2019; 農林水産省, 2021)。

²⁸ チョウ目害虫抵抗性トウモロコシの安全性評価の事例として、検討すべき主要な曝露経路は花粉の飛散であることが報告されている (Anderson et al., 2021)。

現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の曝露が生じ得るかを検討した。本組換えトウモロコシの花粉における Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の発現量は、定量限界値未満であり (表 6 及び表 7, p42)、上述のとおり経路 (d) (e) はどちらも花粉を介した曝露であることから、ほ場周辺の生物種が Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質に曝露され悪影響が生じるとは考えにくい。以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質により影響を受ける可能性のある野生動物等は特定されなかった (表 11, p53)。

5

10

一方で、本組換えトウモロコシにおいて発現する DvSnf7 dsRNA については、上述した潜在的な曝露経路のうち(a) (b) (c) に関して慣行農業の影響を越えないという点は Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質と同様であるが、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物の発現が花粉において確認されていること (表 8, p43) が異なる。そのため、DvSnf7 dsRNA については、花粉の曝露により影響を受ける可能性のある生物種を、その殺虫スペクトラムをもとに検討した。

15

20

DvSnf7 dsRNA は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に活性を示す (第一の 2-(1)-ロ-②, p29~30)。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある野生動物等として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた (表 11, p53)。

以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質、Vpb4Da2 蛋白質及び DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある昆虫目として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた (表 11, p53)。

25

30

コウチュウ目昆虫のうち、環境省レッドリスト 2020 (環境省, 2020)に掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種について、「わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価」(山本ら, 2003)を参考にし、種の生息地・生息環境・食餌から、本組換えトウモロコシの花粉を食餌することにより影響を受ける可能性のある昆虫種を検討した。その結果、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として、表 11 (p54) に示した 4 種を特定した。

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

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

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

^{b)} 定量限界値未満の発現量

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

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

出典：(大林ら, 2007) 日本産カミキリムシ. 東海大学出版会

- 5 (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—
野尻湖昆虫グループ
(林, 2005) 日本産ネクイハムシ図鑑—全種の解説—. 月刊むし No. 408, p2~18
(林, 2012) 日本のネクイハムシ. むし社

10

(2) 影響の具体的内容の評価

15 本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットには *DvSnf7* 遺伝子の部分配列が逆方向反復で存在し、その転写産物において形成される *DvSnf7 dsRNA* がコウチュウ目昆虫への殺虫活性をもたらす。*DvSnf7 dsRNA* の具体的な影響を以下に述べる。

20 *in vitro* で合成した *DvSnf7 dsRNA* を用いた生物検定において、標的害虫である WCRW 及び WCRW の近縁種である SCRW に対する LC₅₀ 値は、それぞれ 4.4 ng/ml 及び 1.2 ng/ml であると報告されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p29~30)。

なお、本組換えトウモロコシの *DvSnf7.1* 抑制カセットから発現する *DvSnf7 dsRNA* の配列は、承認済みの MON87411 系統において発現する *DvSnf7 dsRNA* の配列と同一である。

(3) 影響の生じやすさの評価

5 第二の 2-(1) (p50~54) で特定されたコウチュウ目昆虫が本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌することで受けうる影響の生じやすさについて、トウモロコシほ場周辺に飛散する花粉量に関する国内外の文献報告をもとに評価した。

10 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*) の葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁から 5 m 離れた場合の最大花粉堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉で 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 7.4 粒/cm²へと減少していた (Shirai and Takahashi, 2005)。

15 また、北米ではより大規模な調査が行われている。全 7 ヶ所のトウモロコシほ場周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度を調査した結果、トウモロコシほ場から 1 m、2 m、4 ~ 5 m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、8.1 粒/cm²へと減少していくことが明らかとなっている (Pleasants et al., 2001)。

20 これらの報告に基づけば、トウモロコシほ場周辺に堆積する花粉量はほ場から離れるほど低下し、10 m 離れると 10 粒/cm²以下になると考えられる。

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

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

30 以上のことから、特定された 4 種のコウチュウ目昆虫種が、本組換えトウモロコシ由来の DvSnf7 dsRNA により、集団のレベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

5

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

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

(2) 影響の具体的内容の評価

—

15

(3) 影響の生じやすさの評価

—

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

25

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

第一の 2-(6)-② (p44~45) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験
5 で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いず
に評価した。

競合における優位性：

トウモロコシは、栽培化の過程で自生能力を失っており、わが国においても
10 これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。栽培作
物であるトウモロコシが自生能力を獲得するには、自生能力に必須の特性である
種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている。

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

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

20

有害物質の産生性：

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

本組換えトウモロコシ中では Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質が発現
25 しているが、いずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないこと
が確認されている。Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質を食餌させた生物
検定の結果、コウチュウ目 (植食者/天敵)、チョウ目 (植食者)、ハエ目 (植食者)、
アミメカゲロウ目 (天敵) 及びハチ目の幼虫 (花粉媒介者) に対する殺虫活性が認
められた。これら 5 つの昆虫目に対して想定される曝露経路を検討した結果、
30 「(a) ほ場内 (地上) で植物体や花粉を食餌 (植食者)」 「(b) 植物体や花粉を食餌
した昆虫を捕食 (天敵)」 「(c) ほ場外へ飛散した花粉への曝露 (植食者及び天敵)」
の曝露経路における影響は、慣行農業による殺虫剤散布等の防除の影響を超える
ものではないと考えられた。一方で、「(d) ほ場外へ飛散した花粉への曝露
(植食者及び天敵)」 「(e) ほ場で採集され、ほ場外の巣に持ち帰られた花粉を食
35 餌 (花粉媒介者のハナバチ)」 の曝露経路に関しては、本組換えトウモロコシの
花粉における Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質の発現量が定量限界値未

満であることから、これらの曝露経路において悪影響が生じるとは考えにくい。以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質により影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

- 5 一方で、本組換えトウモロコシにおいて発現する DvSnf7 dsRNA については、上述した潜在的な曝露経路のうち(a) (b) (c) に関して慣行農業の影響を越えないという点は Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質と同様であるが、DvSnf7 抑制カセットの転写産物の発現が花粉において確認されている。また、DvSnf7 dsRNA はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に活性を示す。
- 10 このことから、本組換えトウモロコシ中で発現する DvSnf7 dsRNA により影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫の絶滅危惧種及び準絶滅危惧種(計4種)を特定した。

トウモロコシ栽培ほ場周辺に堆積する花粉量は、ほ場から離れるほど低下し、10 m 離れると 10 粒/cm²以下となることが報告されている。したがって、特定されたコウチュウ目昆虫の生存に影響を与えうる量の花粉に継続的に曝露される可能性は、トウモロコシほ場の周辺数 m 以内に限定され、10 m を超えると花粉への曝露はほとんど無くなると考えられた。また、生態的知見を鑑みれば、特定されたコウチュウ目昆虫がトウモロコシほ場周辺に局所的に生息しているとは考えがたい。

- 20 以上のことから、特定されたコウチュウ目昆虫が、本組換えトウモロコシ由来の DvSnf7 dsRNA により集団のレベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

したがって、本組換えトウモロコシは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25

交雑性：

- わが国において、トウモロコシと自然交雑可能な近縁野生種の自生について報告はないため、影響を受ける可能性のある野生動植物種は特定されない。したがって、本組換えトウモロコシは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずる
- 30 おそれはないと判断された。

以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

35

参考文献

- Adang, M.J., N. Crickmore and J.L. Jurat-Fuentes. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology* 47: 39-87.
- Anderson, J., P. Bachman, A. Burns, S. Chakravarthy, L. Goodwin, L. Privalle, S. Song and N. Storer. 2021. Streamlining data requirements for the environmental risk assessment of genetically modified (GM) crops for cultivation approvals. *Journal of Regulatory Science* 9: 26-37.
- Babendreier, D., N. Kalberer, J. Romeis, P. Fluri and F. Bigler. 2004. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35: 293-300.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell* 3: 271-282.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.
- Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2007b. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 2007/0124836 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

- Bowen, D., Y. Yin, S. Flasiński, C. Chay, G. Bean, J. Milligan, W. Moar, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, A. Howe, T. Ciche, K. Turner, M. Pleau, J. Zhang, J.-L. Kouadio, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2021. Cry75Aa (Mpp75Aa) insecticidal proteins for controlling the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), isolated from the insect-pathogenic bacterium *Brevibacillus laterosporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 87: e02507-02520.
- 5
- BPPRC. 2021. Bacterial Pesticidal Proteins. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center. <https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/> [Accessed July 27, 2021].
- 10
- Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology* 6: 17-26.
- 15
- Bowen, D., Y. Yin, S. Flasiński, C. Chay, G. Bean, J. Milligan, W. Moar, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, A. Howe, T. Ciche, K. Turner, M. Pleau, J. Zhang, J.L. Kouadio, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2021. Cry75Aa (Mpp75Aa) Insecticidal Proteins for Controlling the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), Isolated from the Insect-Pathogenic Bacterium
- 20 *Brevibacillus laterosporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 87 (5): 1-17.
- Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 25
- Casini, A., G. Christodoulou, P.S. Freemont, G.S. Baldwin, T. Ellis and J.T. MacDonald. 2014. R2oDNA designer: Computational design of biologically neutral synthetic DNA sequences. *ACS Synthetic Biology* 3: 525-528.
- CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].
- 30
- Chakroun, M., N. Banyuls, Y. Bel, B. Escriche and J. Ferré. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 329-350.
- 35

- Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 5
- Crickmore, N. 2021. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ [Accessed July 28, 2021].
- Crickmore, N., C. Berry, S. Panneerselvam, R. Mishra, T.R. Connor and B.C. Bonning.
10 2020. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology. In Press*: 107438.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum
15 and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813.
- de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.
- 20 Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins (Basel)* 6: 3005-3027.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied
25 Genetics* 1: 561-573.
- Eisenring, M., J. Romeis, S.E. Naranjo and M. Meissle. 2017. Multitrophic Cry-protein flow in a dual-gene Bt-cotton field. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 247: 283-289.
- 30
- EPA. 1998. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, April 1998 Final. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Fader, C.M. and M.I. Colombo. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: Two closely
35 related partners. *Cell Death and Differentiation* 16: 70-78.

- FAMIC 2021 農薬抄録及び評価書等 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/>) [Accessed October 4, 2021]
- 5 FAO. 2020. FAOSTAT. (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>) [Accessed January 26, 2021].
- 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.
- 10 Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636.
- Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.
- 15 Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- 20 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.
- 25 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
- Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.
- 30 Kim, D.-W., H. Sung, D. Shin, H. Shen, J. Ahnn, S.-K. Lee and S. Lee. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells* 31: 585-592.
- 35

- Kim, Y.-J., S. Kloos, J. Romeis and M. Meissle. 2021. Effects of mCry51Aa2-producing cotton on the non-target spider mite *Tetranychus urticae* and the predatory bug *Orius majusculus*. *Journal of Pest Science* 94: 351-362.
- 5 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.
- 10 Kos, M., J.J.A. van Loon, M. Dicke and L.E.M. Vet. 2009. Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in Biotechnology* 27: 621-627.
- 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
15 next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary
20 structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
- Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. *Russian Journal of Genetics* 43: 1413-1414.
- 25 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
- Luna, S.V., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen
30 control. *Crop Science* 41: 1551-1557.
- Meissle, M., S. Kloos and J. Romeis. 2021. Fate of multiple Bt proteins from stacked Bt maize in the predatory lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Pollution* 268: 115421.
- 35 Nakai, S., K. Hoshikawa, A. Shimono and R. Ohsawa. 2015. Transportability of confined

field trial data from cultivation to import countries for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Transgenic Research* 24: 929-944.

5 Nivetha. L and H. Jayachandran. 2017. Isolation and Identification of *Brevibacillus lactosporum* From Soil and Evaluation of their Antibiotic Properties. *Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4 (6): 93-98

NCGA. 2021. World of Corn 2021. National Corn Growers Association, Chesterfield, Missouri. <https://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2021.pdf> [Accessed July 27, 2021].

10

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 for 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/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. 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 Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

30 Panda, A.K., S.S. Bisht, S.D. Mondal, N.S. Kumar, G. Gurusubramanian and A.K. Panigrahi. 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek (Journal of Microbiology)* 105 (4): 623-639

35 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.

- 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.
- 5
- 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.
- Romeis, J., A. Raybould, F. Bigler, M.P. Candolfi, R.L. Hellmich, J.E. Huesing and A.M. Shelton. 2013. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. *Chemosphere* 90: 901-909.
- 10
- Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 326: 277-290.
- 15
- Ruiu, 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Insects* 4 (3): 476-492
- Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- 20
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- 25
- 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.
- 30
- Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudaeschnia zizeeria maha*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 35

- Stork, N.E. 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology* 63: 31-45.
- 5 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- 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 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.
- 20 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.
- van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- 25 Wach, M., R.L. Hellmich, R. Layton, J. Romeis and P.G. Gadaleta. 2016. Dynamic role and importance of surrogate species for assessing potential adverse environmental impacts of genetically engineered insect-resistant plants on non-target organisms. *Transgenic Research* 25: 499-505.
- 30 Winter, V. and M.-T. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *TRENDS in Plant Science* 11: 115-123.
- 35 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.

- Xing, A., B.P. Moon, K.M. Mills, S.C. Falco and Z. Li. 2010. Revealing frequent alternative polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant transcription terminators. *Plant Biotechnology Journal* 8: 772-782.
- 5 Yin, Y., S. Flasiński, W. Moar, D. Bowen, C. Chay, J. Milligan, J.-L. Kouadio, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, J. Zhang, G. Mueller, C. Preftakes, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2020. A new *Bacillus thuringiensis* protein for Western corn rootworm control. *PLoS ONE* 15: e0242791.
- 10 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, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson.
15 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1157-1168.
- 大林延夫・新里達也 2007 日本産カミキリムシ 東海大学出版会
- 20 柿本陽一・山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 III 植物としての特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京
- 環境省 2020 環境省レッドリスト2020 令和2年3月27日公表 環境省自然環境局 野生生物課 希少種保全推進室 (編)
25 (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/113628.pdf>) [Accessed July 28, 2021]
- 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 後藤秀俊・黒川俊二・笠井美恵子・福田美雪・高橋靖幸・井上公一・中井秀一・山根精一郎・津田麻衣・大澤良 2018 遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察 育種学研究 20: 105-114
30
- 財務省 2021 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed May 7, 2021].
35
- 千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採取 転作全書 第三巻 雑穀 社

団法人 農山漁村文化協会 東京

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

5

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

10 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

15 日本生物防除協議会 2021 天敵等に対する農薬の影響目安の一覧表 (<http://www.biocontrol.jp/Tenteki.html>) [Accessed October 4, 2021]

20 日本モンサント株式会社. 2015. コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*DvSnf7*, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) 申請書等の概要. http://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1780&ref_no=1 [Accessed July 28, 2021].

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

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

35 農林水産省 2018 飼料をめぐる情勢 平成30年11月公表 (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/index.html) [Accessed November 21, 2018]

農林水産省 2020 飼料月報 令和元年度4月～3月 農林水産省生産局畜産部飼

料 課 (https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/cyosa/attach/pdf/kako-66.pdf) [Accessed October 1, 2020]

5 農林水産省 2021 農薬の審査報告書 (更新日：令和3年4月1日) 消費・安全局
農産安全管理課農薬対策室 (https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_sinsa/index.html)
[Accessed October 4, 2021]

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
— 野尻湖昆虫グループ

10

林 成多 2005 日本産ネクイハムシ図鑑—全種の解説— 月刊むし 408: 402-418

林 成多 2012 日本のネクイハムシ むし社

15 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

山本勝・大黒俊・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 独立行政法人農業環境

20 技術研究所 第 14 号

緊急措置計画書

2021年9月30日

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

第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*mpp75Aa1.1, vpb4Da2, DvSnf7.1, Zea mays subsp. mays (L.) Ittis*) (MON95275, OECD-UI: MON-95275-7) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

2021年9月現在

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

*: 責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 第一種使用等の状況は、バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を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

15

20 具体的措置として、本組換えトウモロコシを隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換えトウモロコシの放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換えトウモロコシが隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 弊社は信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、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。

隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

5 I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場

10

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

15 3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

20

図 8 (p81) 参照

II. 責任者等

25 1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】(バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部)

30 2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】(バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場長)

35

III. 試験期間

承認日から 2026 年 5 月 31 日まで

5 IV. 施設概要

部外者の立入を防止するためのフェンス (高さ 1.6 m)、立入禁止であることを明示するための標識、洗い場を設置している (図 7, p80)。

10 V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

15

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

20 3. 試験区の配置図

図 8 (p81) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

25

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 9, p82)。

2. 周辺の土地利用状況

30 隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路 (隔離ほ場のフェンスから約 2.5 m の距離) として利用されている。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

5 隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域 (国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等) はない。なお、上記の自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約 15 km である。

4. 気象条件

10 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ崎市大徳町) における気象データの平年値を表 13 (p74) に示した (気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス 2021 年 7 月 30 日 :

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view)。

15

表 13 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ崎市大徳町) における気象データの平年値

要素	降水量	平均気温	日最高気温	日最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020
資料年数	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
1月	55.4	3.3	9.4	-2.3	2.4	190.8
2月	52.9	4.3	10.2	-1.2	2.7	172.3
3月	103.3	7.8	13.5	2.3	3.0	174.3
4月	109.0	13.0	18.6	7.5	3.4	178.4
5月	122.6	17.8	22.9	13.5	3.2	179.9
6月	135.1	21.0	25.4	17.5	2.8	125.7
7月	128.1	24.6	29.4	21.2	2.7	155.7
8月	99.4	25.8	30.9	22.2	2.6	183.5
9月	182.8	22.5	27.2	18.8	2.7	133.9
10月	212.8	16.9	21.8	12.6	2.4	134.0
11月	87.5	10.9	16.7	5.6	2.0	148.4
12月	53.4	5.5	11.7	0.0	2.1	169.1
年	1352.8	14.5	19.8	9.8	2.7	1927.9

5. 台風の襲来暦

① 平年値

5

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信地方への台風接近数²⁹の平年値(1991年~2020年の30年平均)は、3.3個である(気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス2021年7月30日)：

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html。

10

② 過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

15

関東甲信地方に台風が接近し²⁹、かつ隔離ほ場最寄の観測地点(茨城県龍ヶ崎アメダス観測所)において日ごとの最大風速が15 m/sを超えた個数³⁰を隔離ほ場周辺への台風の接近個数とした。過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数は、合計8個(2011年9月、2012年6月、2013年10月、2016年8月、2017年10月、2018年10月、2019年9月、2019年10月)³¹であった(気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス2021年7月30日)。

20

台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
- ・ 補助支柱などの資材は常に準備しておき、気象情報により取り付ける。

また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

25

²⁹ 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都(島しょ部を除く)、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から300 km以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている。

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

³⁰ 台風の強風域の定義が平均風速15 m/sであることによる。

(気圧配置 台風に関する用語(気象庁)：

http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html)

³¹ 過去の気象データ検索(気象庁：<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>)から、地点として龍ヶ崎を選択し、さらに関東甲信越地方に台風が接近した年月を選択。該当年月における日ごとの最大風速が15 m/sを超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が15 m/sを超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にはほ場が冠水したことはない。

5 7. 過去 10 年における強風の経験とその程度・頻度

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け (策定されている場合)

10

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、想定最大規模降雨によって河道 (利根川・小貝川・霞ヶ浦) が氾濫した場合、水深 0.5~3.0 m となると想定されている (茨城県河内町ホームページ洪水ハザードマップ、アクセス 2021 年 7 月 30 日 : <http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/page/page000262.html>)。

15

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

鳥獣害の被害報告はない。

20 VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

25 なし。

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

わが国には交雑可能な近縁野生種は存在しない。

30

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

35 隔離ほ場における栽培履歴は図 10 (p83) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

5

3. 栽培終了後の利用計画 (ボランティア植物の監視を含む)

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、本組換えトウモロコシの栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

10

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

隔離ほ場は下記(1)~(4)の設備を備えている。

15

(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示した標識を見やすい所に掲げている。

20

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

25

5. 作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

30

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤込む等により、確実に不活化する。

35

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

- (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 5 (7) (1) から (6)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

10

以上

地理院地図
GSI Maps

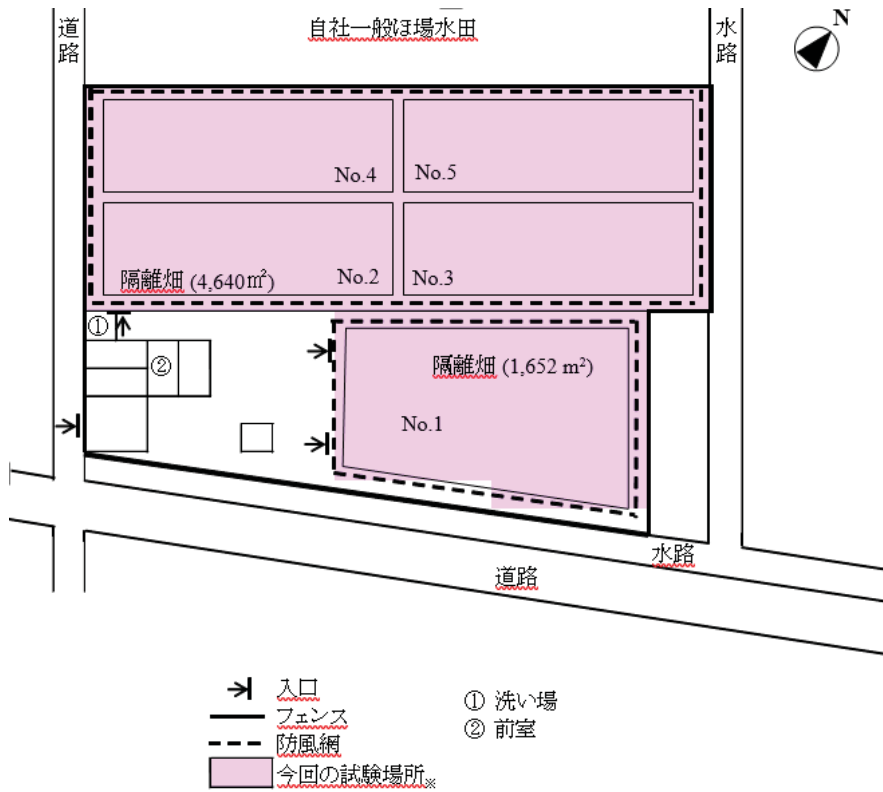


図6 バイエルクロップサイエンス株式会社 隔離ほ場の位置



図 7 隔離ほ場の設備³² (左) 立入禁止であることを明示するための標識、(右) 洗い場

³² 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。



※上記試験場所のうち約 1,000 m²の面積において栽培予定。

図 8 試験区の配置図³³

³³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

地理院地図
GSI Maps

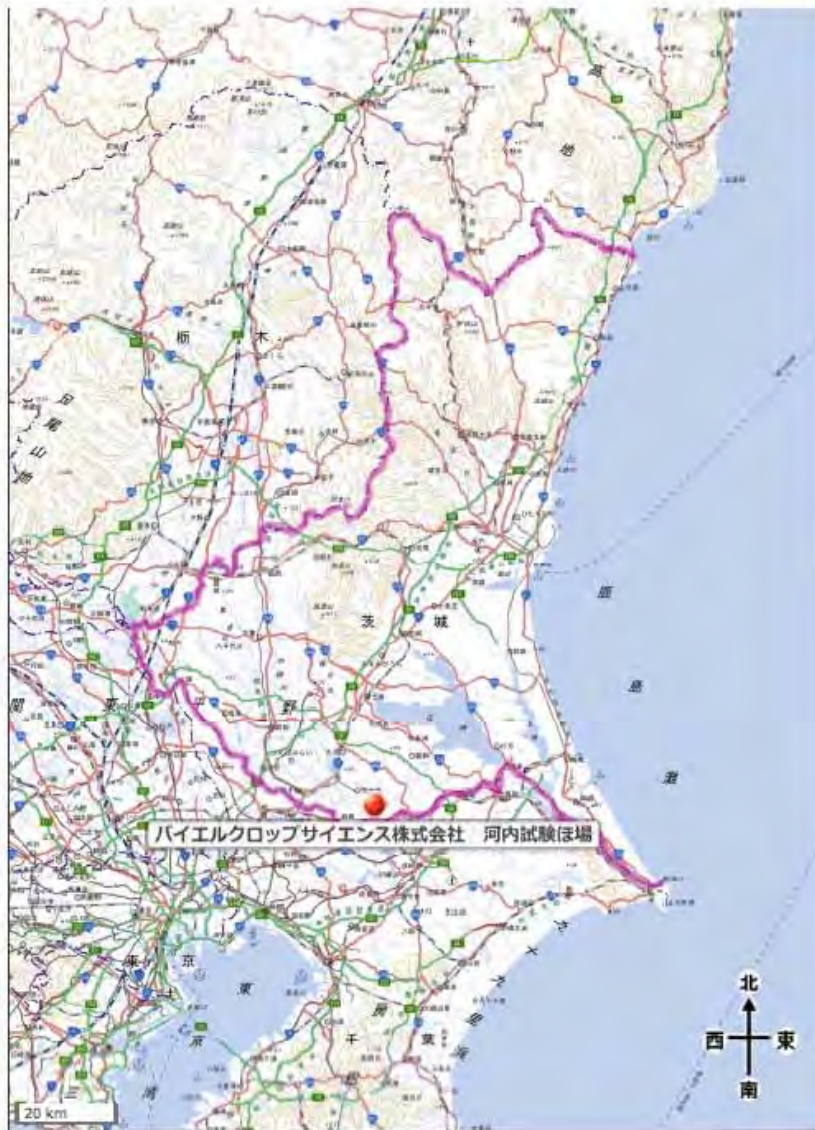


図9 隔離ほ場の位置 (広域図)

ほ場 No.	作物	栽培期間(2018年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	非遺伝子組換え ダイズ						←	→					
	遺伝子組換え ダイズ						←	→					
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.2	非遺伝子組換え ライムギ		→									←	
No.3	非遺伝子組換え ライムギ		→									←	
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
No.4	非遺伝子組換え ライムギ		→									←	
No.5	遺伝子組換え ワタ					→							
	非遺伝子組換え ワタ					→							
	非遺伝子組換え ライムギ				→							←	

ほ場 No.	作物	栽培期間(2019年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	非遺伝子組換え ダイズ						←	→					
	遺伝子組換え ダイズ						←	→					
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←							
	遺伝子組換え トウモロコシ					←							
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	

ほ場 No.	作物	栽培期間(2020年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	遺伝子組換え スイートコーン					←	→						
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	→					
	非遺伝子組換え ダイズ						←	→					
	遺伝子組換え ダイズ						←	→					
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え ナタネ											←	
	遺伝子組換え ナタネ											←	
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え ナタネ											←	
	遺伝子組換え ナタネ											←	
No.4	非遺伝子組換え トウモロコシ		→										
	遺伝子組換え トウモロコシ		→										
	非遺伝子組換え テンサイ						←						
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	

図 10 隔離ほ場における栽培履歴³⁴

³⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

第二部 隔離ほ場での試験計画

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

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 *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子から推定した Mpp75Aa1.1 蛋白質及び Vpb4Da2 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Kouadio, J.-L., S. Duff, M. Aikins, M. Zheng, T. Rydel, D. Chen, E. Bretsnyder, J. Zhang, J. Milligan, A. Evdokimov, J. Nageotte, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021a. Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a western corn rootworm active beta-pore forming protein from *Brevibacillus laterosporus*. PLoS ONE. Manuscript.
- 別添資料 3 Kouadio, J.-L., M. Zheng, M. Aikins, J. Zhang, D. Chen, D. Duda, S. Duff, J. Milligan, C. Taylor, P. Mamanella, R. Timothy, C. Kessenich, T. Panosian, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021b. Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. PLoS ONE. Manuscript.
- 別添資料 4 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Mpp75Aa1.1 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000993) (社外秘)
- 別添資料 5 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Vpb4Da2 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000994) (社外秘)
- 別添資料 6 Bioinformatic Evaluation of the DvSnf7 Sequence against the *Zea Mays* transcriptome (TRR0000547) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended from TRR0000886: Global Module: Plasmid Molecular Information Study for pMON356756 (PV-ZMIR525664) (TRR0001013) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended from TRR0000858: PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 95275 (TRR0001018) (社外秘)

- 別添資料 9 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect Protected Maize MON_95275 Across Three Generations (MSL0030830) (社外秘)
- 別添資料 10 Amended from TRR0000885: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON 95275 (TRR0001014) (社外秘)
- 別添資料 11 Demonstration of the Presence of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Proteins in Maize Grain Samples Across Multiple Generations of MON_95275 (TRR0000780) (社外秘)
- 別添資料 12 Amended from TRR0000901: Demonstration of the Presence or Absence of DvSnf7.1 Transcripts in Maize Leaf Tissues Across Multiple Generations of MON 95275 (TRR0001019) (社外秘)
- 別添資料 13 Assessment of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Protein Levels in Maize Leaf, Root, Forage, Grain, Pollen Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Field Sites of United States Field Trials During 2019 (TRR0000722) (社外秘)
- 別添資料 14 Assessment of DvSnf7.1 RNA Levels in OSL1, OSR1, Forage, Grain, and Pollen Maize Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Sites in the United States Field Trials during 2019 (TRR0000653) (社外秘)
- 別添資料 15 Amended from TRR0000902: Northern Blot Analysis of DvSnf7.1 RNA Expression in MON 95275 (TRR0001020) (社外秘)
- 別添資料 16 Amended from TRR0000719: Characterization of DvSnf7.1 Read-through Transcripts in Maize MON 95275 (TRR0001021) (社外秘)
- 別添資料 17 Summary of Method for Detecting the Presence of the Corn MON 95275 Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (TRR0000895) (社外秘)