

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) 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 .....	7
イ 基本的特性 .....	7
ロ 生息又は生育可能な環境の条件 .....	7
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 .....	9
ホ 病原性 .....	10
ヘ 有害物質の産生性 .....	10
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 .....	10
(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 .....	15

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.....	15
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨.....	26
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.....	36
イ 名称及び由来.....	36
ロ 特性.....	36
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	36
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	36
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.....	36
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	36
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	36
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	37
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	37
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	37
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.....	37
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.....	37
(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.....	40
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	40
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.....	42
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.....	46
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.....	46
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.....	51

(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.....	51
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	51
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.....	51
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.....	52
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	53
(1) 使用等の内容.....	53
(2) 使用等の方法.....	53
(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.....	54
(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.....	55
(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.....	55
(6) 国外における使用等に関する情報.....	55
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	57
1 競合における優位性.....	57
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	57
(2) 影響の具体的内容の評価.....	57
(3) 影響の生じやすさの評価.....	57
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	58
2 有害物質の産生性.....	58
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	58
(2) 影響の具体的内容の評価.....	59
(3) 影響の生じやすさの評価.....	59
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	59
3 交雑性.....	59
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	59
(2) 影響の具体的内容の評価.....	59
(3) 影響の生じやすさの評価.....	60
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	60
4 その他の性質.....	60
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	61

参考文献.....	63
緊急措置計画書.....	71
隔離ほ場試験計画書.....	73
別添資料リスト.....	86

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 30 年 6 月 20 日

5 農林水産大臣 齋藤 健 殿  
環境大臣 中川 雅治 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社  
申請者 代表取締役 ダビッド・ブランコ 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ ( 改変 <i>dmo, pat, ft_t</i>, 改変 <i>cp4 epsps, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis ) (MON87429, OECD UI : MON-87429-9)</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：日本モンサント株式会社隔離ほ場  使用期間：承認日から平成 36 年 5 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入りを防止するため、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及び管理責任者の氏名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照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照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、意図せずに本遺伝子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>

	<ul style="list-style-type: none"><li>(5) 本遺伝子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。</li><li>(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。</li><li>(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。</li><li>(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。</li></ul>
--	--

## 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  
20 20  
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、2016 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9 千万 ha であり、上位国は、中国 3,895 万 ha、米国 3,511 万 ha、ブラジル 1,496 万 ha、インド 1,020 万 ha、メキシコ 760 万 ha  
25 25  
である (FAO, 2017)。

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、2016 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 3,400ha で (農林水産省, 2017a)、2015 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,000ha である (農林水産省, 2017b)。  
30 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。

5 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。

10 北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 10a あたり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い(瀧澤, 2001)。

15 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種 (F<sub>1</sub>) 品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

・流通実態及び用途

20 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。2016 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.0%が飼料 (7.6%の蒸留粕を含む)、28.9%がエタノール製造、15.3%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった (NCGA, 2017)。

25 わが国では、2017 年に約 1,531 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 1,012 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, 2018)。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)。

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

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

5

—

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

10 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)。

15 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)。

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

#### ハ 捕食性又は寄生性

25

—

#### 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

30

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

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

35 種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い (戸澤, 2005)。氷点下

の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45℃以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている (Wych, 1988)。

さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃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

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

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

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

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

なお、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。

#### ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

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

15 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)。

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/cm<sup>2</sup>、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm<sup>2</sup>であった(Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から5m離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で19.6粒/cm<sup>2</sup>、イヌホオズキの葉では22.2粒/cm<sup>2</sup>、ほ場から10m離れた場合はヒマワリの葉で10粒/cm<sup>2</sup>以内であった(Shirai and Takahashi, 2005)。

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

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/cm<sup>2</sup>及び1.4粒/cm<sup>2</sup>であったと報告している(Sears et al., 2000)。

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

ホ 病原性

—

5 ヘ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育または生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

10 ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシの、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, 2017c)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

20 モンサント・カンパニーは、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うこと及び雑草防除のために複数の除草剤に対する耐性を付与することを目的として、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ(改変*dmo*, *pat*, *ft\_t*, 改変*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)を作出した。

30 本組換えトウモロコシには改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。トウモロコシを含む単子葉植物で花粉における低い活性が報告されている 35S プロモーター (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005) と雄性組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列により、本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉では発現しないか、発現してもその量はわずかである(表 6, p50)。一方で、本組換えトウモロコシの栄養組織及び雌性組織では、除草剤グリホサート耐性を付与する (Yang et al., 2018 の Figure 3D) のに十分な量の改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現している。

5 上述のように、本組換えトウモロコシの花粉では改変 CP4 EPSPS 蛋白質は  
発現しないか、発現してもその量はわずかであり、除草剤グリホサートを本  
組換えトウモロコシの雄穂形成初期 (8 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 頃) に 2  
10 回散布すると、稔性を有する花粉の形成が阻害される (Yang et al., 2018 の  
Figure 3H)。なお、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現様式を利用した  
遺伝子組換え作物で、同様に除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤  
グリホサート耐性の形質をもつ遺伝子組換えトウモロコシが、すでにカルタ  
ヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている (除草剤グリホサート誘発  
10 性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (MON87427, OECD UI:  
MON-87427-7) (承認日：2013 年 5 月 23 日))。この系統は、第一種使用等の内  
容で使用した場合、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断  
されている。

15 この本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用するこ  
とにより、図 1 (p12) に示すように本組換えトウモロコシからハイブリッド品  
種の種子を効率的に生産することが可能となる。

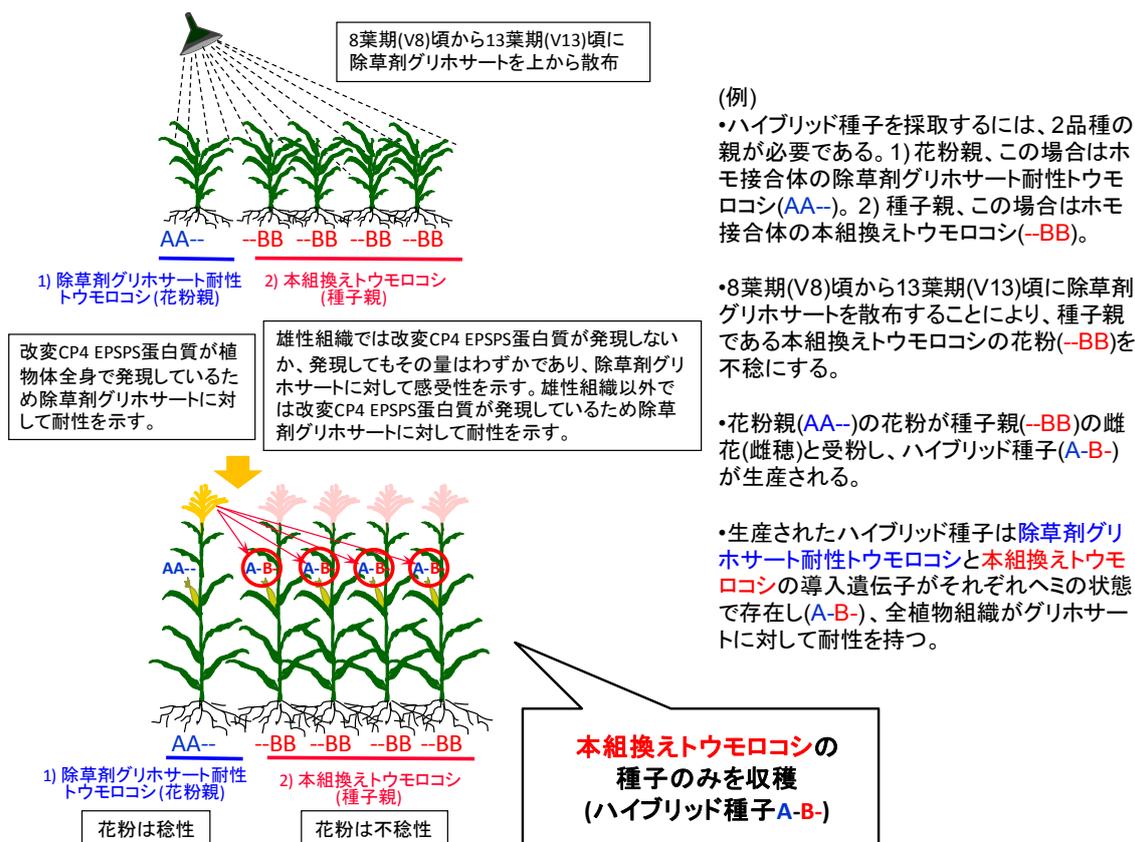


図1 本組換えトウモロコシを用いた効率的なハイブリッド種子の採種方法<sup>1</sup>

AA- (花粉親) の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、-BB (種子親) で用いられている 35S プロモーターと異なり、恒常的な転写を誘導するプロモーターである。このため、AA- (花粉親) では改変 CP4 EPSPS 蛋白質が雄性組織を含め植物体全身で発現する。

本組換えトウモロコシには改変 *dmo* 遺伝子から発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。また、*pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質により、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。さらに、*ftt* 遺伝子から発現する FT\_T 蛋白質によりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

<sup>1</sup> 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。

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 5 (p21) 及び表 1 (p22~25) に示した。

5 本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノ  
オキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO 蛋白質」とする。) の  
アミノ酸配列は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質  
の アミノ酸配列と比較して、葉緑体輸送ペプチド APG6 の切断を容易にする  
10 目的で N 末端側から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。  
よって、本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺  
伝子」とする。また、本組換えトウモロコシでは、改変 *dmo* 遺伝子発現カセ  
ットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、APG6 由来  
の アミノ酸が全て切り離されたもの及び APG6 由来の 1 アミノ酸 (システイン)  
15 が N 末端に付加されたものの 2 種類の改変 DMO 蛋白質が生じる。本組換え  
トウモロコシで発現するこれら 2 種類の改変 DMO 蛋白質を「改変 MON87429  
DMO 蛋白質」と総称する。なお、一般的に輸送ペプチドは、前駆蛋白質を目的  
の葉緑体へ輸送した後、正確に切り離されるが (Della-Cioppa et al., 1986)、  
輸送ペプチドの一部が残った状態の蛋白質が葉緑体に存在する例も報告されて  
20 いる (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007)。

20 本組換えトウモロコシに導入された *pat* 遺伝子から発現するホスフィノス  
リシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (phosphinothricin *N*-acetyltransferase: 以下、「PAT 蛋白質」とする。) のアミノ酸配列は、プロセッシングにより N 末端  
側から 1 番目のメチオニンが取り除かれている以外、*Streptomyces*  
*viridochromogenes* 由来の野生型 PAT 蛋白質と同一のものである (以下、「PAT  
25 蛋白質」とする。)。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くの蛋白質  
で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。

30 本組換えトウモロコシには、土壌細菌 *Sphingobium herbicidovorans* 由来の  
R-2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子 (R-2,4-  
Dichlorophenoxypropionate dioxygenase, *Rdpa*) を改変したものが導入されている。  
この改変 *Rdpa* 遺伝子から発現する蛋白質のアミノ酸配列は、酵素反応速度を  
上げ、同時にトウモロコシ栽培地域の夏季の気温による影響を受けずに蛋白

質が活性を保つように改変され (別添資料 10 の Table 1 及び Figure 4)、野生型 RdpA 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、30 ヲ所のアミノ酸置換<sup>2</sup>がある。この改変 *Rdpa* 遺伝子から発現する蛋白質は **F**OPs and **T**wo, Four-D (2,4-D) tolerant, variant **T** (以下、「FT\_T 蛋白質」とする。) と呼ばれている (別添資料 10)。よって、本組換えトウモロコシに導入された改変 *Rdpa* 遺伝子を「*ft\_t* 遺伝子」、発現する蛋白質を「FT\_T 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 FT\_T 蛋白質の推定アミノ酸配列と、野生型 RdpA 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は約 89%である。また、本組換えトウモロコシでは、*ft\_t* 遺伝子発現カセットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、葉緑体輸送ペプチド MDH 由来の 1 アミノ酸 (アラニン) が N 末端に付加されている。なお、前述したとおり、一般的に輸送ペプチドは、前駆蛋白質を目的の葉緑体へ輸送した後、正確に切り離されるが (Della-Cioppa et al., 1986)、輸送ペプチドの一部が残った状態の蛋白質が葉緑体に存在する例も報告されている (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007)。

15

本組換えトウモロコシに導入された *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。よって、本組換えトウモロコシに導入された *cp4 epsps* 遺伝子を「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。

20

本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

25

---

<sup>2</sup> 30 ヲ所の置換場所について、開始コドンに相当するメチオニンを1番目として、アミノ酸の位置を示した。6番目のセリンがトレオニン、9番目のセリンがトレオニン、10番目のグルタミンがアスパラギン、11番目のアルギニンがリシン、12番目のフェニルアラニンがチロシン、13番目のグルタミン酸がアルギニン、14番目のアルギニンがフェニルアラニン、16番目のアラニンがアスパラギン酸、82番目のロイシンがイソロイシン、103番目のグリシンがセリン、105番目のバリンがフェニルアラニン、130番目のアスパラギン酸がグルタミン酸、134番目のヒスチジンがチロシン、145番目のトレオニンがセリン、169番目のアルギニンがリシン、178番目のグルタミンがトレオニン、180番目のアルギニンがトリプトファン、209番目のグリシンがバリン、210番目のセリンがトレオニン、213番目のリシンがアルギニン、214番目のグリシンがアラニン、217番目のバリンがシステイン、224番目のアルギニンがリシン、226番目のグルタミン酸がグルタミン、235番目のプロリンがセリン、246番目のアルギニンがリシン、289番目のグリシンがアラニン、291番目のバリンがアスパラギン酸、292番目のアルギニンがリシン、294番目のアラニンがセリン。

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  
5 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  
(p22~25) に示した。

10 本組換えトウモロコシに導入された 4 つの遺伝子発現カセット (改変 *dmo*,  
*pat*, *ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*) のうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは組織特異  
的発現様式を示す。この発現様式を可能にしているのは、改変 *cp4 epsps* 遺  
伝子発現カセットに存在するカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロ  
15 モーター及び *mts-siRNA* の標的配列であり (図 2, p16)、本組換えトウモロコシ  
中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉においては発現しないか、発現しても微  
量であるのに対し、栄養組織及び雌性組織においては十分な量を発現してい  
る。この CaMV 35S プロモーターによる制御と *mts-siRNA* の標的配列による制  
御について、以下に記載する。

【CaMV 35S プロモーターによる制御】

20

本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、CaMV 35S プロモーター  
により発現する。CaMV 35S プロモーターは、一般的に目的遺伝子を全組  
織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and  
Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物におい  
25 ては、花粉における CaMV 35S プロモーターの活性はごくわずかであること  
が報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。

## 【mts-siRNA の標的配列による制御】

RNA 干渉 (RNAi) は、植物を含む真核生物において内在性遺伝子の発現調節のために広く保存されている機構であり (Fire et al., 1998; Jones-Rhoades et al., 2006)、micro RNA (miRNA) 及び small interfering RNA (siRNA) により誘導される (Carthew and Sontheimer, 2009)。Yang らによって報告されているトウモロコシ内在性の雄性組織特異的低分子干渉 RNA (**male tissue specific small interfering RNA**) (以下、「mts-siRNA」という。) は、雄穂において内在性遺伝子の発現調節をしていると考えられる (Yang et al., 2018)。

本組換えトウモロコシでは、導入した改変 *cp4 epsps* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域に 201 塩基長の mts-siRNA の標的配列を付加することで (図 2, p16)、上述の内在性の mts-siRNA による RNAi 機構を利用し、雄穂で転写される改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を組織特異的に分解する。

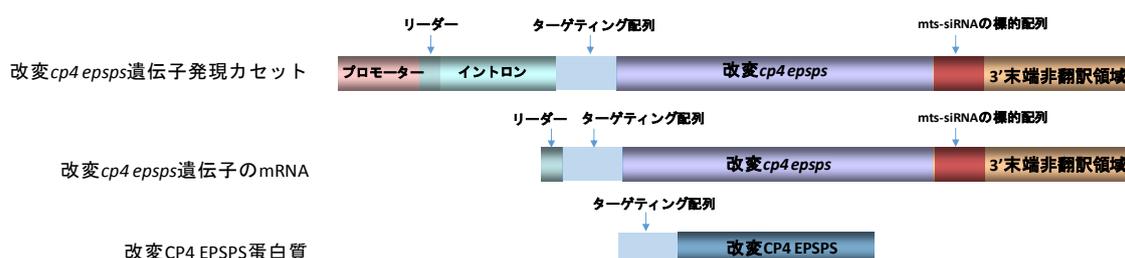


図 2 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の模式図<sup>3</sup>

本組換えトウモロコシの雄穂中で mts-siRNA がどのように改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を分解するか作用機作を、内在性の mts-siRNA による RNAi 機構とともに図 3 (p18) の中の番号に沿って説明する。

以下の図 3 (p18) の最初の 5 つのステップは、これまでに判明している siRNA による RNAi 機構 (Gorski et al., 2017) をもとに、従来トウモロコシにおける内在性の mts-siRNA のプロセスを示している。

<sup>3</sup> 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。

ステップ 1 : 内在性の mts-siRNA 遺伝子から mts-siRNA 前駆体 RNA が産生される。

5

ステップ 2 : mts-siRNA 前駆体 RNA が Dicer (DCL4) と呼ばれる酵素に切断され、mts-siRNA が産生される。

ステップ 3 : ステップ 1~2 とは独立して、内在性の標的遺伝子から mts-siRNA の標的配列をもつ mRNA (以下、「標的配列をもつ内在性遺伝子の mRNA」とする。) が転写される。

10

ステップ 4 : ステップ 2 で産生された mts-siRNA が RNAi-induced silencing complex (RISC) と結合し、ステップ 3 で産生された標的配列をもつ内在性遺伝子の mRNA と結合する。

15

ステップ 5 : ステップ 4 の mRNA は RISC により切断される。この mRNA の切断箇所は、3'末端がポリアデニル化されておらず、5'末端にもキャップ構造がないことから、3'-5'及び 5'-3'エキソリボヌクレアーゼにより分解される。このプロセスにより mRNA の蛋白質への翻訳が阻害される。

本組換えトウモロコシでは、上記の内在性 siRNA による RNAi 機構を利用し、標的配列をもつ改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する mRNA が分解される。以下の 3 ステップは本組換えトウモロコシの雄穂特異的に起こるプロセスを示している。

20

ステップ 6 : 改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA が有する mts-siRNA の標的配列に、mts-siRNA が配列特異的に結合し、RISC により mRNA が切断される。

25

ステップ 7 : この mRNA の切断箇所は、3'末端がポリアデニル化されておらず、5'末端にもキャップ構造がないことから、3'-5'及び 5'-3'エキソリボヌクレアーゼにより分解される。

30

ステップ 8 : 上述のプロセスによって改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA から蛋白質への翻訳が阻害されるため、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、雄穂においては発現しないか、発現しても微量である。

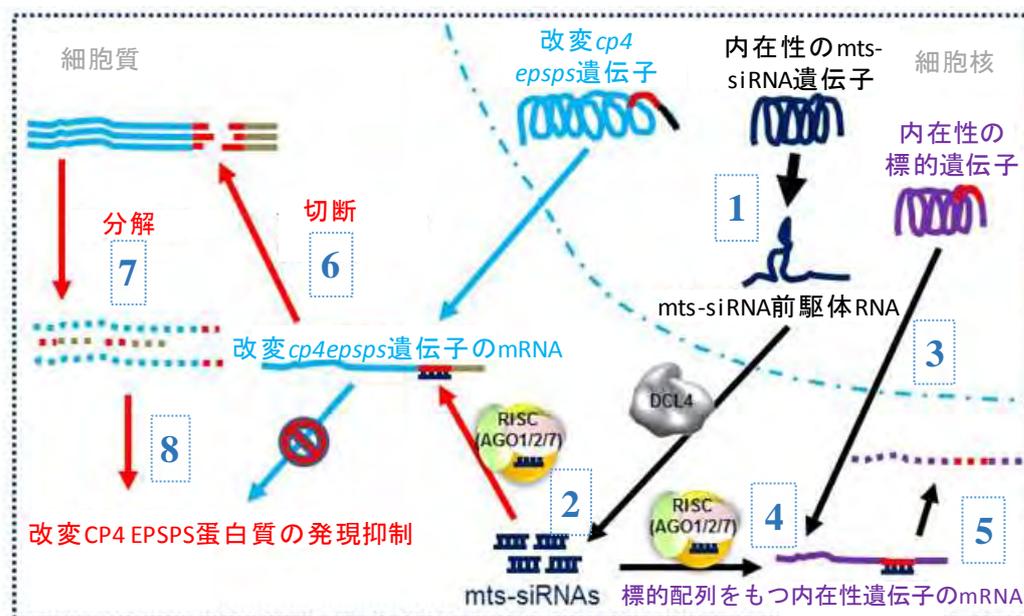


図3 本組換えトウモロコシの雄穂における mts-siRNA の標的配列による遺伝子の発現調節 (Yang et al., 2018 より改変)<sup>4</sup>

5 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットに組み込んだ mts-siRNA の標的配列は 201 塩基長であり (図 2, p16)、トウモロコシ内在性の配列に由来する。この配列の選定方法の詳細が Yang ら (2018) により報告されている。概要を以下に記載した。

1) トウモロコシの雄穂で特異的に発現する複数の siRNA (mts-siRNA) を見出し、2) トウモロコシにおいてこれらの mts-siRNA の標的となる可能性のある配列を特定、3) これらの配列情報をもとに、mts-siRNA の標的配列を複数 3'末端非翻訳領域にもつ遺伝子 EU974548 を選定、4) EU974548 が幅広いトウモロコシ系統間で保存されている遺伝子であることを確認、5) EU974548 に由来する 201 塩基長の配列を選定した。

15

<sup>4</sup> 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。

また、Yang ら (2018) は、本組換えトウモロコシの雄穂特異的に改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が 3'末端非翻訳領域で切断されていることを確認するために、切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA からの相補的 DNA (complementary DNA: 以下、「cDNA」とする。) を 5'RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) 法<sup>5</sup>により解析した。その結果、切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物は、雄穂のみで確認され (図 4 のパネル右, レーン T1~T4, p20)、葉及び雌穂では確認されなかった (図 4 のパネル右, レーン L, E, p20)。また、完全長の改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 2.1 kb の cDNA 増幅産物が供試された全ての組織 (葉、雌穂、雄穂) で発現していた (図 4 のパネル左, レーン L, E, T1~T4, p20)。

この結果は、雄穂における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現様式を調べた結果と一致していると考えられた。改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現は、雄穂の葯壁と花糸で確認されたが、小孢子母細胞とタペート細胞では発現が確認されなかった (別添資料 2 の Figure1, p10~11)。なお、タペート細胞は花粉成熟期まで小孢子及び花粉に養分を供給し、小孢子は細胞分裂を行い花粉となる (Goldberg et al., 1993; Huang et al., 2009)。また、一般的にタペート細胞が破壊されることにより花粉が不稔になることが知られている (Goldberg et al., 1993)。

さらに、Yang ら (2018) が切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物を塩基配列解析した結果、切断箇所は改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの 3'末端非翻訳領域に付加した *mts-siRNA* の標的となる相補的な配列中であることが確認され (Yang et al., 2018 の Figure 2B)、切断は *mts-siRNA* の標的配列内でのみ起こっていることが確認された。

---

<sup>5</sup> 5'RACE法とは、mRNAの未知領域を決定する際に用いられる手法。3'末端側の配列が既知の mRNA から cDNA を合成し、5'末端側の配列を PCR で増幅。PCR の増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認。増幅産物をクローニングし、塩基配列解析を行うことで、未知の 5'末端側領域の配列を決定。

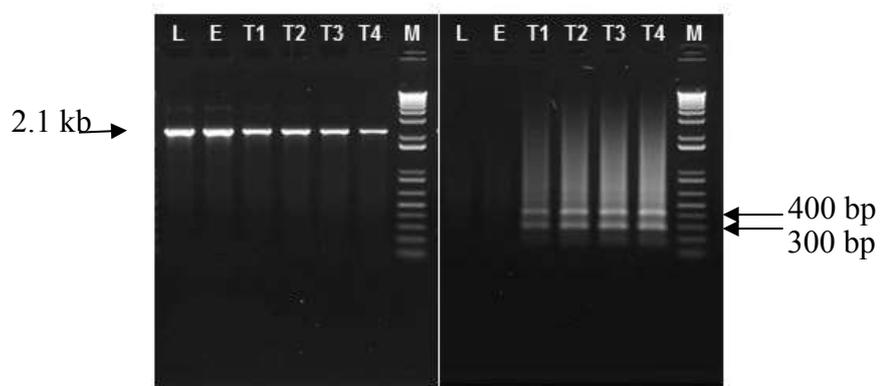


図 4 本組換えトウモロコシにおける改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA の配列特異的切断 (5'RACE 法) (Yang et al., 2018 の Figure 2A より転載)<sup>6</sup>

5 左のパネル：完全長の改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 2.1 kb の cDNA 増幅産物

右のパネル：切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を示す 300 bp と 400 bp の cDNA 増幅産物

10 L: 葉 (6 葉期)、E: 雌穂 (雄穂抽出期)、T1: 雄穂 (6 葉期)、T2: 雄穂 (8 葉期)、T3: 雄穂 (10 葉期)、T4: 雄穂 (12 葉期)、M: 分子量マーカー

<sup>6</sup> 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。

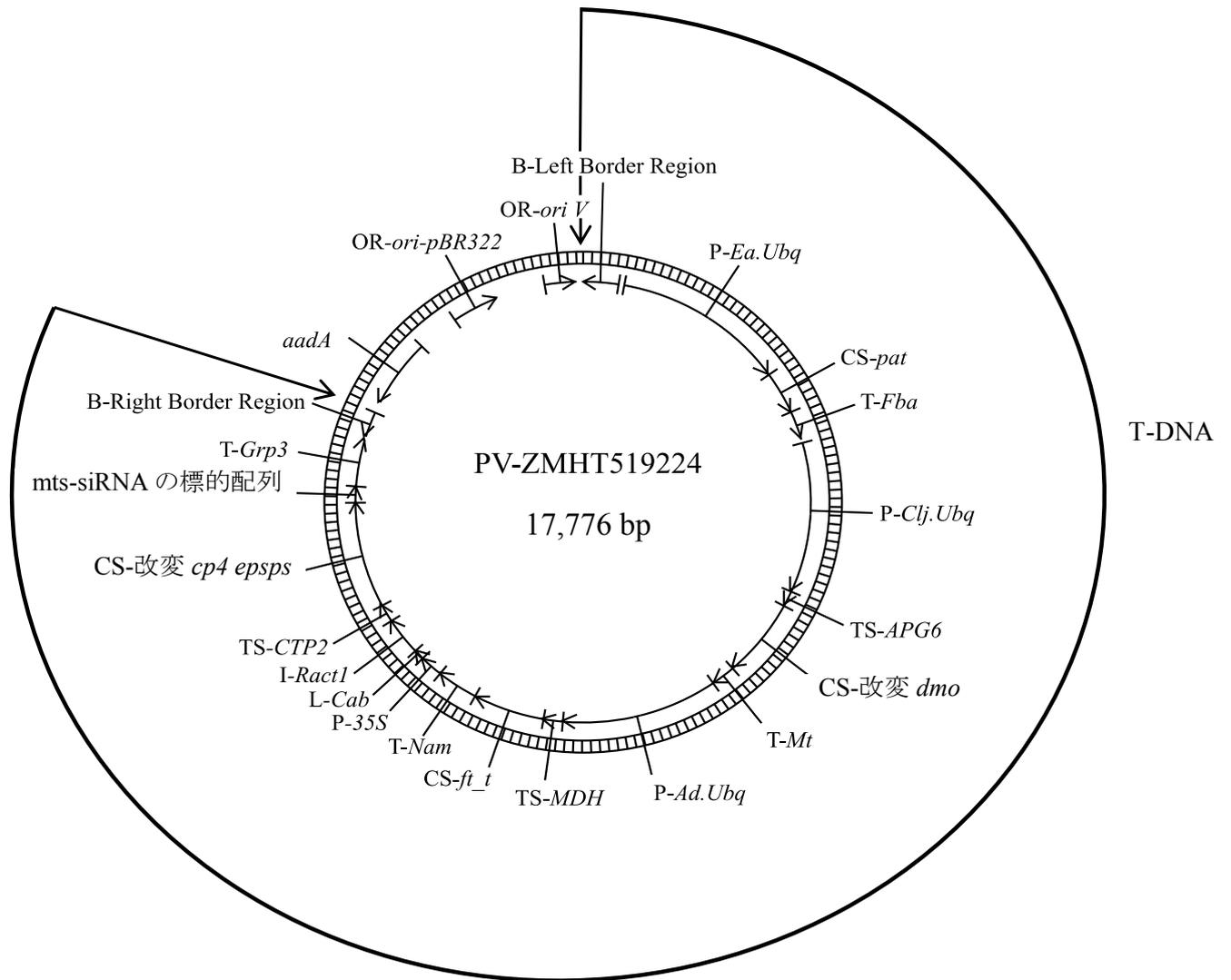


図5 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT519224 のプラスミドマップ<sup>7</sup>

<sup>7</sup> 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-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能<sup>8</sup>

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B <sup>注1</sup> -Left Border Region	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P <sup>注2</sup> - <i>Ea.Ubq</i>	<i>Triplidium ravennae</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026095)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS <sup>注3</sup> - <i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)
T <sup>注4</sup> - <i>Fba</i>	アワ ( <i>Setaria italica</i> ) 由来のフルクトースビスリン酸アルドラーゼ ( <i>Fba</i> ) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH026101)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Clj.Ubq</i>	ジュズダマ ( <i>Coix lacryma-jobi</i> ) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026097)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

<sup>8</sup> 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-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
TS <sup>注5</sup> - <i>APG6</i>	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来の熱ショック蛋白質 (Hsp101) ホモログの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Albino and pale green 6 (Apg6)</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: NM_121549)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS-改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
T- <i>Mt</i>	イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) のメタロチオネイン様蛋白質をコードする <i>OsMt</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026099)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
P- <i>Ad.Ubq</i>	ダンチク ( <i>Arundo donax</i> ) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域の配列及びイントロン (GenBank Accession: MH026096)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
TS- <i>MDH</i>	シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のリンゴ酸デヒドロゲナーゼの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Mdh</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: BT000621)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>ft_t</i>	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> に由来する <i>Rdpa</i> 遺伝子の改変バージョンから発現するFOPs及び2,4-Dジオキシゲナーゼ (FOPs and 2,4-D dioxygenase version T: FT_T)。アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性を付与する (Müller et al., 2006; 別添資料 10)。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
T-Nam	イネ ( <i>O. sativa</i> ) のno apical meristem (Nam) 蛋白質ドメインの3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026100)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
P-35S	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)。一般的に目的遺伝子を全組織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物においては、花粉における活性はごくわずかであることが報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
L <sup>注6</sup> -Cab	コムギ ( <i>Triticum aestivum</i> ) の葉緑素a/b結合蛋白質のリーダー配列 (Lamppa et al., 1985)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
I <sup>注7</sup> -Ract1	イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン1蛋白質をコードしているact1遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
TS-CTP2	シロイヌナズナ ( <i>A. 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ShkG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-改変cp4 epsps	<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aroA (epsps) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMHT519224 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
mts-siRNAの標的配列	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) に由来するEU974548遺伝子のcDNAの改変された3'末端非翻訳領域の部分配列で、雄性組織特異的低分子干渉RNAの標的配列を含む (Brodersen and Voinnet, 2006; Yang et al., 2018)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
T-Grp3	イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) のグリシンリッチRNA結合蛋白質 (GRP3) をコードする遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH026098)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾンTn7由来の3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列。
OR <sup>注8</sup> -ori-pBR322	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	DNAクローニングの際に利用された配列。
OR-ori V	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	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 P - Promoter (プロモーター)

注3 CS - Coding Sequence (コード配列)

注4 T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注5 TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注6 L - Leader (リーダー配列)

注7 I - Intron (イントロン)

注8 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相同性を有する場合はその旨

5

### 【改変 MON87429 DMO 蛋白質】

本組換えトウモロコシは、*S. maltophilia*由来の改変 $dmo$ 遺伝子が導入されており、改変MON87429 DMO蛋白質を発現している。改変MON87429 DMO蛋白質は、本組換えトウモロコシに除草剤ジカンバ耐性を付与する。

10

除草剤ジカンバは合成オーキシシン系の除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。

15

本組換えトウモロコシで産生される改変 MON87429 DMO 蛋白質は、ジカンバを脱メチル化する酵素である。ジカンバはこの酵素の働きで脱メチル化されると、除草活性のない DCSA (3,6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) となる (Chakraborty et al., 2005)。この働きにより植物に除草剤ジカンバ耐性を付与する (図 6, p26)。

20

実際に、改変  $dmo$  遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ及びタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。なお、DMO 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 (スタック系統は除く) は、3 系統 (ダイズ、ワタ及びトウモロコシ) 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、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

25

<ジカンバの不活性化>

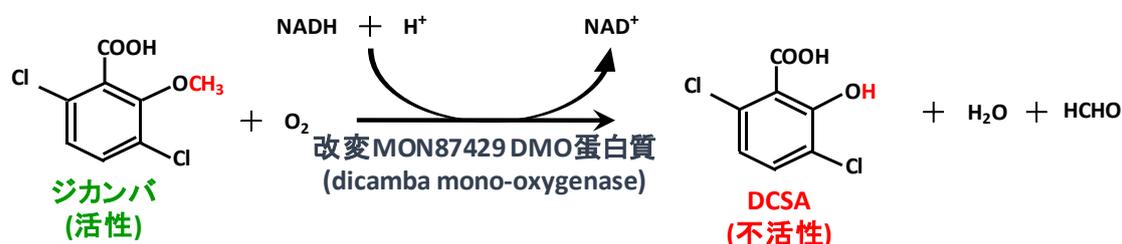


図 6 改変 MON87429 DMO 蛋白質の基質と代謝産物<sup>9</sup>

<sup>9</sup> 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。

## 【PAT 蛋白質】

本組換えトウモロコシには、*S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されており、PAT 蛋白質を発現する。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988)。

除草剤グルホシネートは、グルタミン合成酵素と結合することにより除草活性を発揮する。グルタミン合成酵素は光呼吸により生成されたアンモニアを植物に同化させる主要酵素である。グルホシネートがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が阻害されて、植物体内にアンモニアが蓄積し、枯死する (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986)。

本組換えトウモロコシから産生される PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素の働きでアセチル化されると、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートとなる (図 7, p27)。*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素と結合できないため、光呼吸を阻害せず、アンモニア蓄積が回避される。本組換えトウモロコシは、PAT 蛋白質の産生により、除草剤グルホシネートが散布されても枯死しない。

なお、同じ作用機作を示す PAT 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 (スタック系統は除く) は、現在までに 4 作物 28 系統 (トウモロコシでは 11 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、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

### ＜グルホシネートの不活性化＞

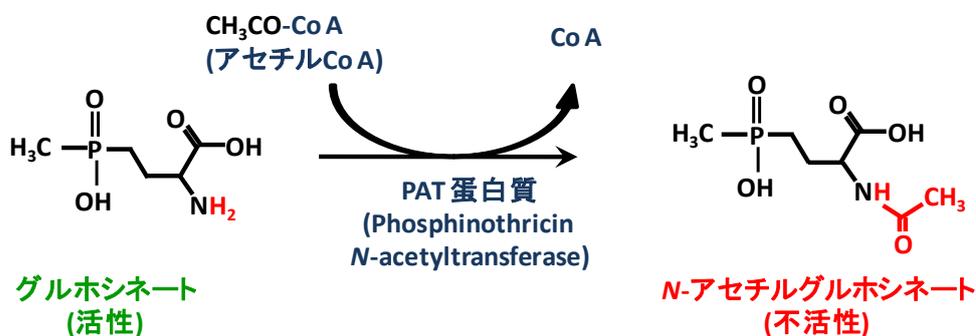


図 7 PAT 蛋白質の基質と代謝産物<sup>10</sup>

<sup>10</sup> 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。

## 【FT\_T 蛋白質】

5 本組換えトウモロコシには *ft\_t* 遺伝子から発現する FT\_T 蛋白質により、アリルオキシアルカノエート系除草剤への耐性が付与されている。アリルオキシアルカノエート系除草剤とは、2 つの除草剤グループ (アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤であるアリルオキシプロピオン酸系除草剤 (FOPs) 及び合成オーキシシン系除草剤) の中で、アリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤を指す。

10 本組換えトウモロコシに導入された *ft\_t* 遺伝子は *S. herbicidovorans* 由来の *Rdpa* 遺伝子を改変したものであり、FT\_T 蛋白質は野生型の RdpA 蛋白質と比較して酵素反応速度が上がっており、トウモロコシ栽培地域の夏季の気温による影響を受けずに高い活性を示す (別添資料 10)。

15 RdpA 蛋白質は  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性、非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼであり、2 つの除草剤グループ (ACCase 阻害剤である FOPs 及び合成オーキシシン系除草剤) のうちでアリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤を除草活性のない化合物に変換する反応を触媒することで (Müller et al., 2006)、除草剤耐性を付与することが報告されている。同様に FT\_T 蛋白質も  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性、非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼであり、 $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下において、FOPs の 1 つであるキザロホップに酸素を導入する酸化反応を触媒することにより、除草活性のないキザロホップフェノールとピルビン酸に変換する。この反応において  $\alpha$ -ケトグルタル酸はコハク酸に変換され、二酸化炭素が放出される (図 8, p29)。また、FT\_T 蛋白質は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下において合成オーキシシン系除草剤の 1 つである 2,4-D に酸素を導入する酸化反応を触媒することにより、2,4-D を除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換し、 $\alpha$ -ケトグルタル酸はコハク酸に変換され、二酸化炭素が放出される (図 8, p29)。

20

25

<キザロホップ (左) 及び 2,4-D (右) の不活性化>

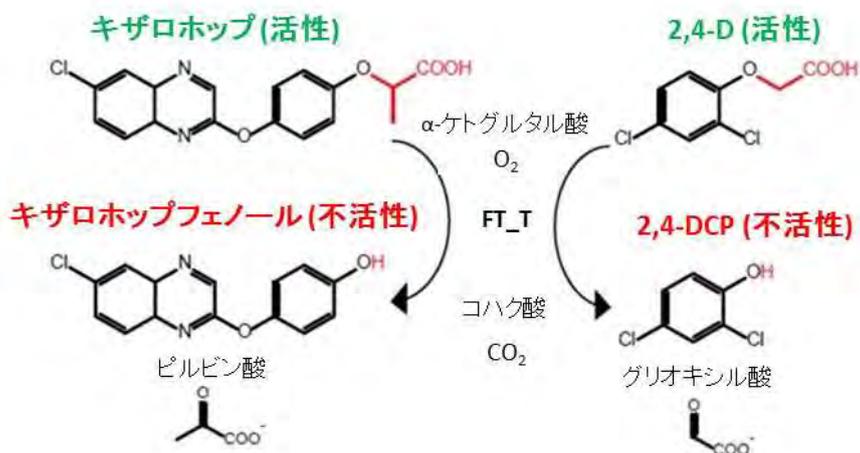


図 8 FT\_T 蛋白質の基質と代謝産物<sup>11</sup>

5

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えトウモロコシには *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。除草剤グリホサートは植物内在性の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の 1 つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) を阻害し、細胞死を引き起こす (Franz et al., 1997)。一方で、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、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現様式を利用した遺伝子組換え作物で、同様に除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性の形質をもつ遺伝子組換えトウモロコシがすでに、カルタヘナ法

<sup>11</sup> 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。

に基づき第一種使用規程の承認を受けている (除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (MON87427, OECD UI: MON-87427-7) (承認日: 2013年5月23日))。この系統は、第一種使用等の内容で使用した場合、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断

5

<既知のアレルゲンとの相同性検索>

10 改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 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を判断するため、AD\_2018<sup>12</sup>に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

15

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

#### 【改変 MON87429 DMO 蛋白質】

20 DMO 蛋白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009) から、構造的にジカンバに類似した化合物 (カルボキシル基 (-COOH)、メトキシ基 (-OCH<sub>3</sub>) 及びクロロ基 (-Cl) を含むフェニル環をもつ化合物) は、DMO 蛋白質の基質となる可能性があると考えられたが、トウモロコシにおいて、クロ

25 ロ基を含むフェニル環をもつ化合物は報告されていない。また、クロロ基を含むフェニル環をもつ化合物は、植物及び他の真核生物において、その存在は比較的まれであることが知られている (Gribble, 2010)。次に、クロロ基はないが、カルボキシル基及びメトキシ基を含むフェニル環をもつ化合物が検討されたが、その中で植物に存在している化合物中で最も構造的にジカンバ

30 に類似している *o*-アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) でも DMO 蛋白質によって代謝されないことが確認されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

なお、本組換えトウモロコシ中で発現している改変 MON87429 DMO 蛋白質

<sup>12</sup> AD 2018: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource, 2018年2月9日) に登録されている配列から構成されるデータベースで、2,038件のアミノ酸配列が含まれる。

質は、野生型の DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端側から 2 番目にロイシンが挿入されている。この挿入に加え、APG6 由来のアミノ酸が全て切り離されたもの及び N 末端に 1 アミノ酸が付加されたものの 2 種類の改変 DMO 蛋白質が存在する。しかし、N 末端側から 2 番目のアミノ酸の位置及び APG6 由来の 1 アミノ酸は、DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れているため、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の基質特異性に影響しないと考えられた。

これらのことから、改変 MON87429 DMO 蛋白質はジカンバに対して高い基質特異性を有しており、改変 MON87429 DMO 蛋白質がジカンバ以外の化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

#### 【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質が他の L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが競合アッセイにおいて示されている。さらに、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。これらのことから PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有しており、PAT 蛋白質がグルホシネート以外の化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

#### 【FT\_T 蛋白質】

これまでの RdpA 蛋白質の研究から (Müller et al., 2006)、FT\_T 蛋白質は、2 つの除草剤グループ (FOPs 及び合成オーキシシン系除草剤) の中でアリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤に高い特異性を示すと考えられた。

そこで、FT\_T 蛋白質が宿主の内在性化合物を代謝するかどうかを確認する基質反応性試験を行った。試験には、FT\_T 蛋白質が代謝する可能性のある基質として、既存の基質と構造的に類似し、FT\_T 蛋白質の活性部位に適合する化合物を供試した。供試した化合物の選定は、以下の 2 つのステップ

により行った (別添資料 10)。ステップ 1 では、トウモロコシを含めた作物中で既に同定されている低分子化合物が網羅されているデータベース NAPRALERT<sup>13</sup> (Bisson et al., 2016) を用い、ジクロロプロップ (dichlorprop, DCP) と構造的に相同性を有する化合物をスクリーニングした。DCP はアリルオキシアルカノエート系除草剤の中で最も基本的な構造を有しているため、アリルオキシアルカノエート系除草剤の代表として選定した。ステップ 2 では、ステップ 1 で選ばれた化合物が FT\_T 蛋白質の活性部位に結合するかのドッキングシミュレーションを行った。その結果、合計 38 の化合物が選ばれた。ステップ 1 と 2 で選ばれた 38 の化合物のうち、標準品が市販されており入手可能な 31 の化合物を FT\_T 蛋白質との基質反応性試験 (*in vitro* 酵素アッセイ) に供試した。

その結果、FT\_T 蛋白質は 31 の化合物のいずれに対しても、活性を示さなかった (別添資料 10 の Figure S6 のパネル d, p38 及び Table S1, p51)。一方、ポジティブコントロールとして用いた 11 の除草剤に対しては、全て活性を示した (別添資料 10 の Figure S6 のパネル d, p38 及び Table S1, p51)。

以上の結果から、FT\_T 蛋白質は 2 つの除草剤グループ (FOPs 及び合成オーキシシン系除草剤) の中でアリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤に高い特異性を示し、それ以外の化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

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、反応の起こりやすさを示す特異性

<sup>13</sup> NAPRALERTは植物を含む生物由来の抽出物や天然の化合物についての情報を集めたデータベースである。 <https://www.napralert.org/> [更新日：2016年3月1日]

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。

#### 【改変 MON87429 DMO 蛋白質+PAT 蛋白質+FT\_T 蛋白質+改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はいずれも基質特異性が高く、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。よって、本組換えトウモロコシで発現しているこれら蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

さらに、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA の標的配列を有することが宿主の代謝系に影響を及ぼすか確認するため、①~② (p33~35) の考察を行った。

#### ① 改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA から二次的 siRNA が産生される可能性

植物では、一次的 siRNA が結合した RISC によって切断された mRNA 断片を鋳型として二次的 siRNA が産生されることがある。二次的 siRNA は隣接する組織及び離れた組織に伝播し、相補的な配列をもつ遺伝子の発現を抑制するという報告がある (Borges and Martienssen, 2015)。本組換えトウモロコシでも、雄穂で転写された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA により切断され、その切断された断片を鋳型として二次的 siRNA が産生される。そして、その二次的 siRNA が隣接する組織及び離れた組織に伝播し、相補的な配列をもつ遺伝子の発現を抑制する懸念がある。そこで、雄穂で転写された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が、mts-siRNA により切断されたのちに二次的 siRNA を産生する可能性について以下に検討した。

第一の 2-(1)-ロ-① (p17) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの雄穂において、mts-siRNA により改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA は切断される。この切断箇所は、3'末端がポリアデニル化されておらず、5'末端にもキャップ構

造がないことから、3'-5'及び5'-3'エキソリボヌクレアーゼにより分解される。このように、ほとんどの切断産物はエキソリボヌクレアーゼ等による分解経路の対象となるものの、完全に分解されない mRNA の断片は、二次的 siRNA を産生する可能性がある。

5       そこで、雄穂で転写された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA により切断された配列から、二次的 siRNA が産生されている可能性を調べるために、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシ (LH244) から採取した葉、根、雄穂、雌穂における低分子量の RNA を対象にしたノーザンブロット分析を行った。プローブは改変 *cp4 epsps* 遺伝子の  
10       mRNA の全長を網羅し、かつ mts-siRNA とのクロスハイブリダイゼーションを防ぐため mts-siRNA の標的配列を含まないように設計した。

      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のサンプルにおいても改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA 由来の低分子 RNA は、検出されなかった (Yang et al., 2018 の Figure 2C の中段のパネル)。  
15       なお、供試したサンプルにおいて低分子 RNA が適切に抽出されていることを確認するため、同メンブレンを用いてトウモロコシ内在性の低分子 RNA (miR159) を対象としてノーザンブロット分析を行ったところ、全てのサンプルからバンドが検出された (Yang et al., 2018 の Figure 2C の下段のパネル)。以上のことから、本組換えトウモロコシにおいて、改変 *cp4 epsps* 遺伝子から  
20       転写された mRNA に由来する二次的 siRNA が産生されている可能性は極めて低いと考えられた。

      また、上述したように、仮に雄穂で転写された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA から二次的 siRNA が産生された場合、二次的 siRNA は別の組織に伝  
25       播し、相補的な配列をもつ遺伝子の発現を抑制する。そのため、その二次的 siRNA により発現が抑制される可能性がもっとも高いのは、雄穂以外の組織に存在する改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA であると考えられる。しかしながら、本組換えトウモロコシの葉及び雌穂組織において、改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA の切断は起こっていないことが  
30       確認されている (図 4, p20)。さらに、本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、種子で改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現していること (表 6, p50)、及び栄養生長期の植物体が除草剤グリホサート耐性を示すことも確認している (Yang et al., 2018 の Figure 3D)。

      これらの結果及び上述したノーザンブロット分析結果により、本組換えトウモロコシにおいて、改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写された mRNA に由来する二次的 siRNA が産生されている可能性は極めて低いと考えられた。  
35

② *mts-siRNA* の標的配列と相同性を有するトウモロコシ内在性遺伝子の mRNA 量への影響

5 改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写される mRNA が *mts-siRNA* の標的配列を有することが、内在性遺伝子の mRNA 量に影響を及ぼしていないか調べるために、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を有する内在性遺伝子の mRNA 量を測定した。まず、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を示すトウモロコシ内在性遺伝子を BLAST により検索した。その結果、7つの推定遺伝子が相同性を示した (Yang et al., 2018)。いずれの遺伝子も膜蛋白質をコードしていると考えられ、また、セリン取り込み輸送体と相同性がみられた。これらの輸送体は、セリン由来の2つの脂質、スフィンゴ脂質及びホスファルジルセリンの合成を促進すると考えられている。

10 次に、これら7つの推定遺伝子の雄穂における mRNA 量を2種類の定量 RT-PCR (TaqMan と SYBR グリーン<sup>14</sup>) により測定した (Yang et al., 2018)。これら推定遺伝子の mRNA 量は非常に低く、互いに高い配列相同性を示すため、個別の mRNA に対して試験設計をすることはできなかった。そのため、複数の遺伝子の mRNA 量を同時に測定した。7つのうち2つの遺伝子の mRNA 量は TaqMan を用い、7つのうち6つの遺伝子の mRNA 量はまとめて SYBR グリーンを用いて測定した。なお、7つのうち1つの遺伝子の mRNA 量は両法で測定された。

15 その結果、*mts-siRNA* の標的配列と相同性を有する7つの内在性の推定遺伝子の mRNA 量に関して、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (Yang et al., 2018 の Figure S3 のパネル A (TaqMan) とパネル B (SYBR グリーン))。 *mts-siRNA* の標的配列と相同性を有することで選ばれた推定遺伝子に対して影響が認められなかったことから、内在性の他の遺伝子の mRNA 量にも影響を与えないと考えられた。なお、除草剤グリホサート無散布の本組換えトウモロコシにおいて、花粉を含めて異常な形態は観察されなかったこと (Yang et al., 2018 の Figure 3B 及び 3C) も、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が *mts-siRNA* の標的配列を有することが内在性遺伝子の mRNA 量に影響を与えないという上述の結論を支持している。

以上の①~② (p33~35) から、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が *mts-*

<sup>14</sup> SYBRグリーンの蛍光色素は、配列非特異的に二本鎖DNAに結合する。SYBRグリーンの蛍光色素が二本鎖DNAに結合すると蛍光を発する。この蛍光強度は、増幅DNAの生成量に比例する。

siRNA の標的配列を有することにより宿主の代謝系を変化させること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

10 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMHT519224 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p22~25) に記載した。

ロ 特性

15 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-ZMHT519224 の全塩基数は 17,776bp である。なお、PV-ZMHT519224 の塩基配列は別添資料 3 に記載した。

20

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

30 本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

35 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-ZMHT519224 の構成要素は 表 1 (p22~25)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 5 (p21)に示した。

## 5 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMHT519224 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。

## 10 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

15 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-ZMHT519224 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有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

25 カルベニシリン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 R<sub>3</sub> 世代の種子<sup>15</sup>において、形質転換に用いた PV-ZMHT519224 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-ZMHT519224 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 4)。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 (別添資料 4 の Table 1, p11)。

### 30 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

形質転換された再分化個体 (R<sub>0</sub>) を自殖し、R<sub>1</sub> 世代を作出した。R<sub>1</sub> 世代に

<sup>15</sup>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。

において、1 コピーの T-DNA 領域を有し、外側骨格領域を持たない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に最終的に本組換えトウモロコシを選抜した。

5 本組換えトウモロコシの育成図を図 9 (p39) に示した。なお、本申請の対象は、 $R_3$  世代及び  $R_3$  世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

図9 本組換えトウモロコシの育成図

20

【社外秘につき非開示】

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 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代 (図 9, p39) 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 5)。

10 試験に供試する BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R<sub>0</sub>) を自殖し、その後代である R<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、2 回の自殖により R<sub>3</sub> 世代を作出した。そして T-DNA 領域をホモで有する R<sub>3</sub> 世代を T-DNA 領域を持たないトウモロコシ系統 RP と交配して T-DNA 領域をヘミで有する R<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。さらに R<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

15 T-DNA 領域をヘミで有する BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代において Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

20 T-DNA 領域をヘミで有する BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代と RP を交配して BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代を作出した。BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代において、Real-Time TaqMan PCR により T-DNA 領域の分離比を確認した。

25 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遺伝していることが確認された (表 2, p41)。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2 本組換えトウモロコシの育成過程における T-DNA 領域の分離様式<sup>16</sup>

世代 <sup>1</sup>	供試 個体数	実測値 陽性 個体数	実測値 陰性 個体数	1:1 の分離			
				期待値 陽性 個体数	期待値 陰性 個体数	$\chi^2$	p 値 <sup>2</sup>
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	309	148	161	154.50	154.50	0.55	0.460
BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	236	112	124	118.00	118.00	0.61	0.435
BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	216	97	119	108.00	108.00	2.24	0.134

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

5 <sup>2</sup> BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 及び BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 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)。

---

<sup>16</sup> 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、コピー数及び外側骨格配列の有無並びに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 (NGS (Next Generation Sequencing)) 解析<sup>17</sup> 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 6)。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った解析の結果を述べる。

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 150bp ずつの塩基配列を冗長度<sup>18</sup> 75 以上になるような条件で解析している (図 10 の①, p44)。次に、解析した約 150bp の塩基配列 (リード) 全てを導入用プラスミドの塩基配列と照合<sup>19</sup>する (図 10 の②, p44)。この結果において導入用プラスミドと相同性があるリードを選び出し、この選び出されたリードにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 10 の②, p44)。さらに、導入用プラスミドと相同性をもつリードを選抜し、導入用プラスミド配列に対してアライメントすることで、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, p44)。仮に 1 コピーの導入遺伝子がゲノムの 1 ヲ所に存在する場合には、導入遺伝子の配列の一部とこれに隣接する植物ゲノム配列の両方を含む接合領域が 2 つ (導入遺伝子の両端) 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 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塩基配列及びコピー数を確定することができる。

30 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の R<sub>3</sub> 世代で 265.8Gb (冗長度 108)、対照の非組換えトウモロコシで 286.4Gb (冗長度 121) の塩基配列を解析することができた (別添資料 6 の Appendix Table 3, p43)。本組換え

<sup>17</sup> NGS解析は、Illumina社のNextSeqテクノロジーを用い、ペアエンド法にて行った。まず、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フラグメント化し、各フラグメントの両端から150bpずつの塩基配列を決定する (別添資料 6)。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領域の導入箇所数と非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

<sup>18</sup> 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。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、その中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

<sup>19</sup> FASTA型アルゴリズムにより、30bp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。

トウモロコシでは 2 つの接合領域が特定され (別添資料 6 の p26)、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 6 の Appendix Figure 25, p91~93)。対照の非組換えトウモロコシでは、接合領域は

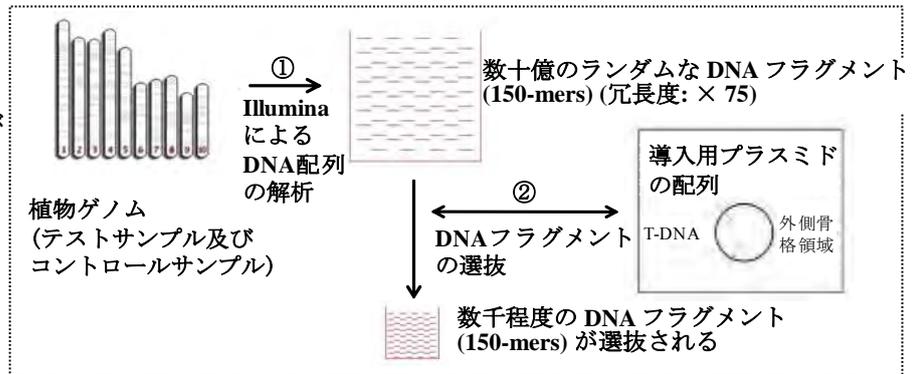
5 さらに、本組換えトウモロコシから得られたリードについて、PV-ZMHT519224 の配列と同一であるかを 1 塩基ごとに調べた。その結果、T-DNA I 領域では、冗長度の中央値が 108、最低冗長度が 47 で全領域にわたってリードが検出されていた (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p48)。また、外側骨格領域と相同性をもつリードが含まれていないことが示された (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p48)。このことから、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており、外側骨格領域は挿入されていないことが確認された。

10 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 6 の Appendix Figure 5, p49、Appendix Figure 6, p50~54 及び Appendix Figure 7, p55~73)。

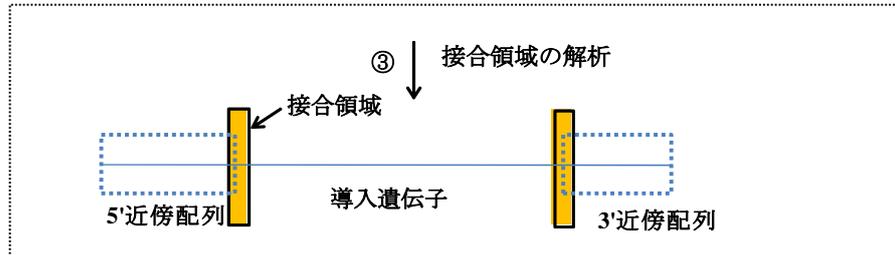
15 以上をまとめると、NGS 解析により本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており、外側骨格領域は挿入されていないことが示された。また、導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列は PV-ZMHT519224 の T-DNA 領域と同一であることが確認された。

20 さらに複数世代 (R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>F<sub>1</sub>、R<sub>4</sub> 及び R<sub>5</sub> 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS 解析において、T-DNA 領域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 6, p30)。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 (p45) に示した。

**Step 1:**  
シーケンス解析  
のためのDNAフラ  
グメントの作製及び  
選抜



**Step 2:**  
導入遺伝子数の  
決定



5

図 10 NGS 解析の解析手法の概念図 (Kovalic et al., (2012)より改変)<sup>20</sup>

<sup>20</sup> 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。

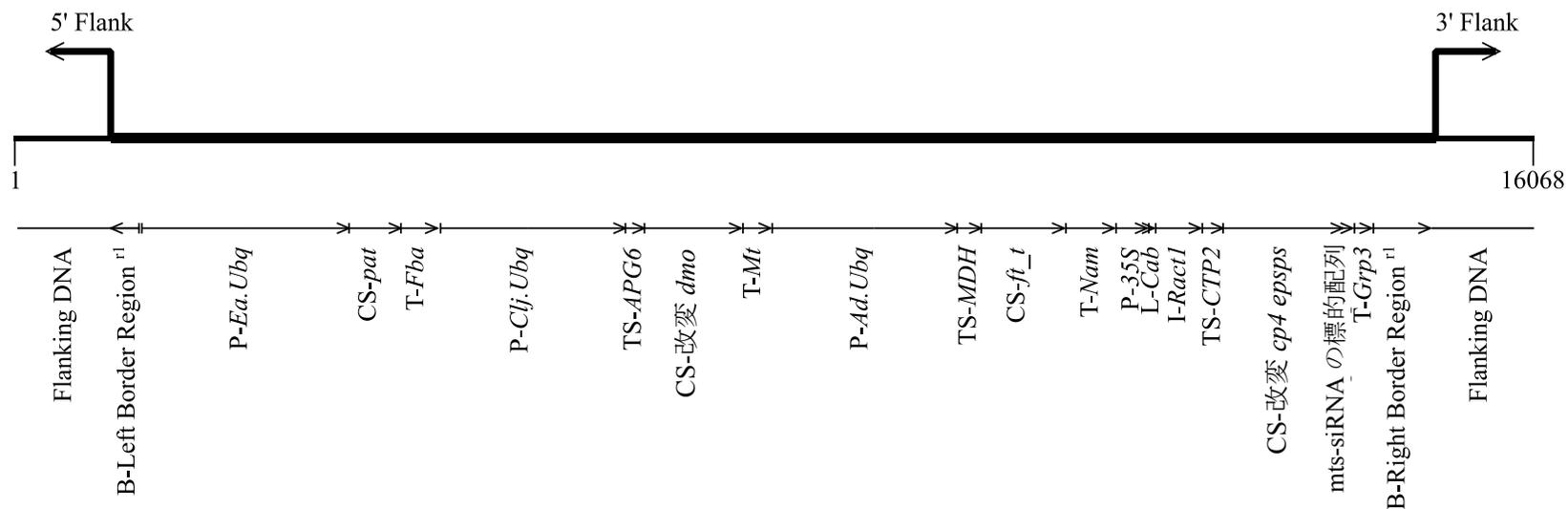


図 11 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図<sup>21</sup>

- 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。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の T-DNA 領域が PV-ZMHT519224 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 T-DNA 領域における B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が PV-ZMHT519224 と比較して短くなっていることを意味する。

<sup>21</sup> 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6のp26)。

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(R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>F<sub>1</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>4</sub>F<sub>1</sub>及びR<sub>5</sub>世代)にわたり、改変MON87429 DMO蛋白質、PAT蛋白質、FT\_T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7のFigure 2~5, p14~17)。

15 また、2017年に米国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、マルチプレックスイムノアッセイ<sup>22</sup>(改変MON87429 DMO蛋白質、PAT蛋白質、改変CP4 EPSPS蛋白質)及びELISA法(FT\_T蛋白質)により発現量を分析した(別添資料8)。その結果、本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、種子及び花粉における改変  
20 MON87429 DMO蛋白質、PAT蛋白質、FT\_T蛋白質、改変CP4 EPSPS蛋白質の発現が確認された(表3~表6, p47~50)。

---

<sup>22</sup> マルチプレックスイムノアッセイは1回の測定で複数の蛋白質を同時に定量する。このハイスループットテクノロジーはELISAで得られるものと同等の分析結果を効率的に得ることが出来る。

表3 本組換えトウモロコシの組織中における改変 MON87429 DMO 蛋白質の発現量 (2017年、米国)<sup>23</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 ( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> ( $\mu\text{g/g DW}$ )
葉 (OSL1) <sup>4</sup>	2~4葉期	35 (2.4) 31 – 42	0.14
根 (OSR1) <sup>5</sup>	2~4葉期	1.3 (0.15) 0.89 – 1.6	0.14
地上部	黄熟期	36 (4.7) 28 – 49	0.14
種子	成熟期	5.4 (0.23) 4.8 – 6.0	0.14
花粉	花粉放出期	2.3 (0.80) 1.4 – 4.7	0.14

<sup>1</sup>各組織を採取した生育段階。

5 <sup>2</sup>蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの  $\mu\text{g}$  で表されている。平均値、標準誤差及び範囲 (最小値–最大値) は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 4 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> limit of quantitation (LOQ) = 定量限界

<sup>4</sup> OSL=over season leaf (葉)

10 <sup>5</sup> OSR=over season root (根)

<sup>23</sup> 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 4 本組換えトウモロコシの組織中における PAT 蛋白質の発現量 (2017 年、米国)<sup>24</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 ( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> ( $\mu\text{g/g DW}$ )
葉 (OSL1) <sup>4</sup>	2~4葉期	6.5 (0.17) 6.1 – 6.8	0.03
根 (OSR1) <sup>5</sup>	2~4葉期	0.98 (0.042) 0.89 – 1.1	0.03
地上部	黄熟期	3.7 (0.52) 2.6 – 5.0	0.03
種子	成熟期	1.8 (0.031) 1.7 – 1.9	0.03
花粉	花粉放出期	9.0 (3.8) 4.6 – 20	0.03

5 <sup>1</sup>各組織を採取した生育段階。

<sup>2</sup>蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの  $\mu\text{g}$  で表されている。平均値、標準誤差及び範囲 (最小値–最大値) は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 4 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

<sup>3</sup> limit of quantitation (LOQ) = 定量限界

10 <sup>4</sup> OSL=over season leaf (葉)

<sup>5</sup> OSR=over season root (根)

<sup>24</sup> 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5 本組換えトウモロコシの組織中における FT\_T 蛋白質の発現量 (2017 年、米国)<sup>25</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 ( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>2</sup>	LOQ/LOD <sup>3</sup> ( $\mu\text{g/g DW}$ )
葉 (OSL1) <sup>4</sup>	2~4葉期	370 (19) 320 – 400	0.078/0.050
根 (OSR1) <sup>5</sup>	2~4葉期	9.6 (1.4) 6.9 – 13	0.078/0.012
地上部	黄熟期	120 (14) 98 – 160	0.078/0.008
種子	成熟期	64 (1.1) 62 – 67	0.078/0.029
花粉	花粉放出期	140 (6.6) 120 – 150	0.078/0.078

5 <sup>1</sup>各組織を採取した生育段階。

<sup>2</sup>蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの  $\mu\text{g}$  で表されている。平均値、標準誤差及び範囲 (最小値–最大値) は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 4 反復)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

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

10 <sup>4</sup> OSL=over season leaf (葉)

<sup>5</sup> OSR=over season root (根)

<sup>25</sup> 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6 本組換えトウモロコシの組織中における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量 (2017年、米国)<sup>26</sup>

組織	生育段階 <sup>1</sup>	平均値 (SE) 範囲 ( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>2</sup>	LOQ <sup>3</sup> ( $\mu\text{g/g DW}$ )
葉 (OSL1) <sup>4</sup>	2~4葉期	62 (1.2) 60 - 65	0.11
根 (OSR1) <sup>5</sup>	2~4葉期	6.4 (0.45) 5.3 - 7.3	0.11
地上部	黄熟期	9.4 (0.80) 8.0 - 11	0.30
種子	成熟期	0.97 (0.23) 0.54 - 1.4	0.34
花粉	花粉放出期	0.13 (0.0023) 0.13 - 0.14	0.11

5 <sup>1</sup>各組織を採取した生育段階。

<sup>2</sup>蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの  $\mu\text{g}$  で表されている。平均値、標準誤差及び範囲 (最小値-最大値) は採取されたそれぞれの組織で計算されている (花粉を除く全ての組織で 4 反復。花粉については定量限界値未満となった 2 反復を除き、定量限界値以上となった 2 反復について計算)。SE=標準誤差, DW=乾燥重

10 <sup>3</sup> limit of quantitation (LOQ) = 定量限界

<sup>4</sup> OSL=over season leaf (葉)

<sup>5</sup> OSR=over season root (根)

<sup>26</sup> 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。

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

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

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、EndPoint TaqMan PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 9)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~20 ng であることが推奨されており、葉の一部を用いて検定できる。

15

本法の再現精度については、40 サンプルの本組換えトウモロコシ及び 80 サンプルの非組換えトウモロコシを用いて確認試験を行った (別添資料 9 の p7)。

(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改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。この本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用することにより本組換えトウモロコシからハイブリッド品種の種子を効率的に生産することが可能となる。

30

また、本組換えトウモロコシへ導入された改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ft\_t* 遺伝子から発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質により、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート及びアリアルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。そのため、本組換えトウモロコシに薬害を生じさせずに、これら複数の除草剤を用いて雑草を効果的に防除することが可能となる。

35

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

5 本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 LH244 であり、導入遺伝子は改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子である。

10 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。

本組換えトウモロコシには、改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。

15 第一の2-(1)-ロ-③ (p30~33) に記載したように、改変MON87429 DMO蛋白質、PAT蛋白質及びFT\_T蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、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。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対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。したがって、改変CP4 EPSPS蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。

30 また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p33) に記載したように、いずれも基質特異性が高く、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立していることから、本組換えトウモロコシで発現している改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

35 さらに、本組換えトウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子から転写される mRNA は 3'末端非翻訳領域に *mts-siRNA* の標的配列を有する。第一の 2-(1)-ロ-③ (p33~36) に記載したように、雄穂で *mts-siRNA* により切断された改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA から二次的 siRNA が産生されている可能

性は極めて低いこと、及びトウモロコシ内在性遺伝子の mRNA 量に影響する可能性は極めて低いことが示されている。したがって、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が *mts-siRNA* の標的配列を有することにより宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。

5 よって、導入遺伝子である改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子による影響が、目的とした宿主の生理学的特性である除草剤ジカンバ耐性、除草剤グルホシネート耐性、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性並びに除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性以外に及ぶとは予想されない。

10

したがって、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た。

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

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

30

名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 36 年 5 月 31 日まで

##### 1. 隔離ほ場の施設

35

(1) 部外者の立入りを防止するため、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及び管理責任者

の氏名を明示した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同時に、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。

## 2. 隔離ほ場での作業要領

- 10
- (1) 本組換えトウモロコシ及び比較対照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。
  - (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照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。
  - (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。
  - 20 (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。
  - (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。
  - 25 (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 なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添の試験計画書の図 1 (p8) に示した。

- (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

35 —

- (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

これまで本組換えトウモロコシについて 2014~2018 年間に米国及びアルゼンチンにおいて延べ 125 ヲ所のは場試験が行われているが (表 7, p56)、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。

15

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 8 (p56) のとおりである。

20

表7 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<sup>27</sup>

年	ほ場の数	国
2014	3	米国
2014/2015	2	アルゼンチン
2015	17	米国
2015/2016	5	アルゼンチン
2016	35	米国
2016/2017	4	アルゼンチン
2017	46	米国
2017/2018	13	アルゼンチン

5

表8 本組換えトウモロコシの海外における申請予定<sup>28</sup>

2018年12月現在

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

<sup>27</sup> 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。

<sup>28</sup> 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。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一の 2-(6)-② (p52~53) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性、導入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 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。

20 本組換えトウモロコシは、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、及びア  
リルオキシアルカノエート系除草剤に耐性をもつ。また、本組換えトウモロ  
コシには改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現により、除草剤グリホサート誘発性  
雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、これらの  
除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において除草剤誘発性雄性不稔及  
び除草剤耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

25 以上のこと及び本組換えトウモロコシが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、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。

#### 30 (2) 影響の具体的内容の評価

—

#### (3) 影響の生じやすさの評価

35 —

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

5 以上のことから、本組換えトウモロコシは、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、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考えられた。

## 2 有害物質の産生性

### 10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは 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は報告されていない。

15 本組換えトウモロコシ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87429 DMO蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与するFT\_T蛋白質並びに除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性を付与する改変CP4 EPSPS蛋白質が発現しているが、DMO蛋白質、PAT蛋白質、FT\_T蛋白質及びCP4 EPSPS蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これらの蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された (第一の2-(1)-ロ-②, p30)。

25 第一の 2-(1)-ロ-③ (p30~31) に示したように、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。また、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。実際、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対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。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。

5 以上のこと及び本組換えトウモロコシが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10

(3) 影響の生じやすさの評価

—

15

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本組換えトウモロコシは、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、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。

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

25

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。

30 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

—

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、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

10 4 その他の性質

—

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一の 2-(6)-② (p52~53) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性、導入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。

#### 競合における優位性：

10 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は、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、及びアリルオキシアルカノエート系除草剤に耐性をもつ。また、本組換えトウモロコシ  
15 には改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。しかし、これらの除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において除草剤誘発性雄性不稔及び除草剤耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

20 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、競合における優位性に起因する生物多様性を生ずるおそれはないと判断された。

#### 有害物質の産生性：

25 本組換えトウモロコシ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87429 DMO 蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する FT\_T 蛋白質並びに除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性を付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び CP4  
30 EPSPS 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これらの蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された。

改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び FT\_T 蛋白質が宿主の代謝系に  
35 作用して有害物質を産生するとは考えにくい。また、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。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。

5

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、有害物質の産生性に起因する生物多様性を生ずるおそれはないと判断された。

10

交雑性：

わが国において、トウモロコシと交雑可能な近縁野生種の自生について報告はないため、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、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。

15

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。

20

## 参考文献

Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.

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.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.

Bisson, J., J. McAlphine, J. Graham and G.F. Pauli. 2016. NAPRALERT, from an historical information silo to a linked resource able to address the new challenges in natural products chemistry and pharmacognosy. *CEUR Workshop Proceedings* 1747.

Borges, F. and R.A. Martienssen. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 727-741.

Brodersen, P. and O. Voinnet. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22: 268-280.

Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.

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].

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.

Clark, S.E. and G.K. Lamppa. 1992. Processing of the precursors for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystem II and photosystem I during import and in an organelle-free assay. *Plant Physiology* 98: 595-601.

Cornejo, M.-J., D. Luth, K.M. Blankenship, O.D. Anderson and A.E. Blechl. 1993. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 23: 567-581.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.

Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-*enol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.

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.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.

FAO. 2017. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/E> [Accessed February 19, 2018].

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

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Pages 521-535 in *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society, Washington, D.C.

Goldberg, R.B., T.P. Beals and P.M. Sanders. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *The Plant Cell* 5: 1217-1229.

Gorski, S.A., J. Vogel and J.A. Doudna. 2017. RNA-based recognition and targeting: Sowing the seeds of specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 215-228.

Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.

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.

Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Stanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assay. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.

Heck, G.R., C.L. Armstrong, J.D. Astwood, C.F. Behr, J.T. Bookout, S.M. Brown, T.A. Cavato, D.L. DeBoer, M.Y. Deng, C. George, J.R. Hillyard, C.M. Hironaka, A.R. Howe, E.H. Jakse, B.E. Ledesma, T.C. Lee, R.P. Lirette, M.L. Mangano, J.N. Mutz, Y. Qi, R.E. Rodriguez, S.R. Sidhu, A. Silvanovich, M.A. Stoecker, R.A. Yingling and J. You. 2005. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event. *Crop Science* 44: 329-339.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*,

strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

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

Holtorf, S., K. Apel and H. Bohlmann. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29: 637-646.

Huang, M.-D., F.-J. Wei, C.-C. Wu, Y.-I.C. Hsing and A.H.C. Huang. 2009. Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiology* 149: 694-707.

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

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

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

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

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.

Luna, S.V., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper.

2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41: 1551-1557.

Müller, T.A., M.I. Zavodszky, M. Feig, L.A. Kuhn and R.P. Hausinger. 2006. Structural basis for the enantiospecificities of *R*- and *S*-specific phenoxypropionate/ $\alpha$ -ketoglutarate dioxygenases. *Protein Science* 15: 1356-1368.

Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142.

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.

Meinzel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* 8: 626-649.

NCGA. 2017. World of corn 2017. National Corn Growers Association, Chesterfield, Missouri. <http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2017.pdf> [Accessed April 21, 2017].

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.

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.

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<sup>TM</sup> 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.

Pleasant, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, H.R. Mattila, J.E. Foster, P. Clark and G.D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on

milkweeds in and near cornfields. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 11919-11924.

Sears, M.K., D.E. Stanley-Horn and H.R. Matilla. 2000. Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.

Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudaeschnia 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.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.

Terada, R. and K. Shimamoto. 1990. Expression CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. Molecular and General Genetics 220: 389-392.

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Zeitschrift für Naturforschung C 39: 500-504.

Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.

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.

Yang, H., Y. Qi, M.E. Goley, J. Huang, S. Ivashuta, Y. Zhang, O.C. Sparks, J. Ma, B.M. van Scoyoc, A.L. Caruano-Yzermans, J. King-Sitzes, X. Li, A. Pan, M.A. Stoecker, B.E. Wiggins and M.J. Varagona. 2018. Endogenous tassel-specific small RNAs-mediated RNA interference enables a novel glyphosate-inducible male sterility system for commercial production of hybrid seed in *Zea mays* L. PLoS ONE 13: e0202921.

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.

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

菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京

財務省 2018 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed Feb. 19, 2018]

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 社団法人 農山漁村文化協会 東京

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

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

西尾剛 2002 新農学実験マニュアル 改訂版第 3 版、 株式会社ソフトサイ  
エンス社

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 Apr. 23 2015]

農林水産省 2017a 平成28年産作物統計 (普通作物・飼料作物・工芸農作物)  
平成29年6月16日公表 ([https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&stat\\_infid=000031589177&lid=000001173263](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&stat_infid=000031589177&lid=000001173263))  
[Accessed Feb. 19 2018]

農林水産省 2017b 平成28年産野菜生産出荷統計 平成29年11月27日公表  
([https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&stat\\_infid=000031645267&lid=000001196823](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&stat_infid=000031645267&lid=000001196823))  
[Accessed Feb. 19 2018]

農林水産省 2017c 「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 Apr. 16 2018].

農林水産省 2018 飼料をめぐる情勢 平成30年1月公表  
([http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryo/attach/pdf/index-203.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/attach/pdf/index-203.pdf)) [Accessed  
Apr. 18, 2018]

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

## 緊急措置計画書

平成 30 年 6 月 20 日

氏名 日本モンサント株式会社  
代表取締役 ダビッド・ブランコ  
住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays subsp. mays* (L.) *Iltis*) (MON87429, OECD UI : MON-87429-9) (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。

平成30年 6 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 取締役社長 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号 (電話番号 03-6264-4790)
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 業務調整課 課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 規制調整課 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 バイオ規制・環境部 申請・登録課 課長

\* : 管理責任者

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農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

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

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

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。

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに  
除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及び  
グリホサート耐性トウモロコシ MON87429 の  
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

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

日本モンサント株式会社隔離ほ場

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

図 12 (p80) 参照

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】 (日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部)

2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】 (日本モンサント株式会社 取締役社長)

### III. 試験期間

承認日から平成 36 年 5 月 31 日まで

### IV. 試験概要

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及び管理責任者を明示するための標識、洗い場を設置している (図 13, p81)。

### V. 使用面積等

#### 1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m<sup>2</sup>

#### 2. 試験に使用する面積

約 1,000 m<sup>2</sup>

#### 3. 試験区の配置図

図 14 (p82) 参照

### VI. 隔離ほ場の周辺環境

#### 1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 15, p83)。

#### 2. 周辺の土地利用状況

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

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

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 9 (p75) 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 2018 年 4 月 2 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](http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view)）。

表 9 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<sup>29</sup>

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(℃)	(℃)	(℃)	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1988～2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1月	54.2	3.1	9.2	-2.4	2.2	183.9
2月	54.9	4	9.9	-1.4	2.5	167.4
3月	110.1	7.3	13.0	1.9	2.9	166.8
4月	110.9	12.7	18.5	7.3	3.2	171.6
5月	119.9	17.4	22.5	13.0	3.2	164.0
6月	145.4	20.5	25.1	16.9	2.7	119.1
7月	117.1	24.1	28.9	20.6	2.6	147.6
8月	118.7	25.6	30.8	22.0	2.5	177.0
9月	185.3	22.1	26.9	18.5	2.6	129.4
10月	185.0	16.4	21.6	12.0	2.2	134.3
11月	88.5	10.5	16.5	5.2	1.9	147.1
12月	49.2	5.4	11.8	-0.3	2.0	175.5
年	1343.9	14.1	19.6	9.5	2.5	1887.7

<sup>29</sup> 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。

## 5. 台風の襲来歴

### ① 平年値

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越地方への台風接近数<sup>30</sup>の平年値(1981年~2010年の30年平均)は、3.1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2018年4月2日：<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>)。

### ② 過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

関東甲信地方に台風が接近し<sup>30</sup>、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15m/sを超えた個数<sup>31</sup>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5個(2011年9月、2012年6月、2013年10月、2016年8月、2017年10月)<sup>32</sup>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2018年4月2日)。

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。
  - ・ 補強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。

---

<sup>30</sup> 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300km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](http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)

<sup>31</sup> 台風の強風域の定義が平均風速15m/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/knownp/haichi2.html>)

<sup>32</sup> 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15m/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15m/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

過去にほ場が冠水したことはない。

## 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）

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、100 年~200 年に 1 回程度起こる大雨により洪水が生じた場合に、水深 1.0~2.0 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 2018 年 4 月 18 日：<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/page/page000262.html>）。

## 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。

## 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

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。

## VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図 16 (p84) 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。

### 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。

### 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。

- (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及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- (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。

### 5. 作業要領

- (1) 本組換えトウモロコシ及び比較対照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。
- (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照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。
- (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。

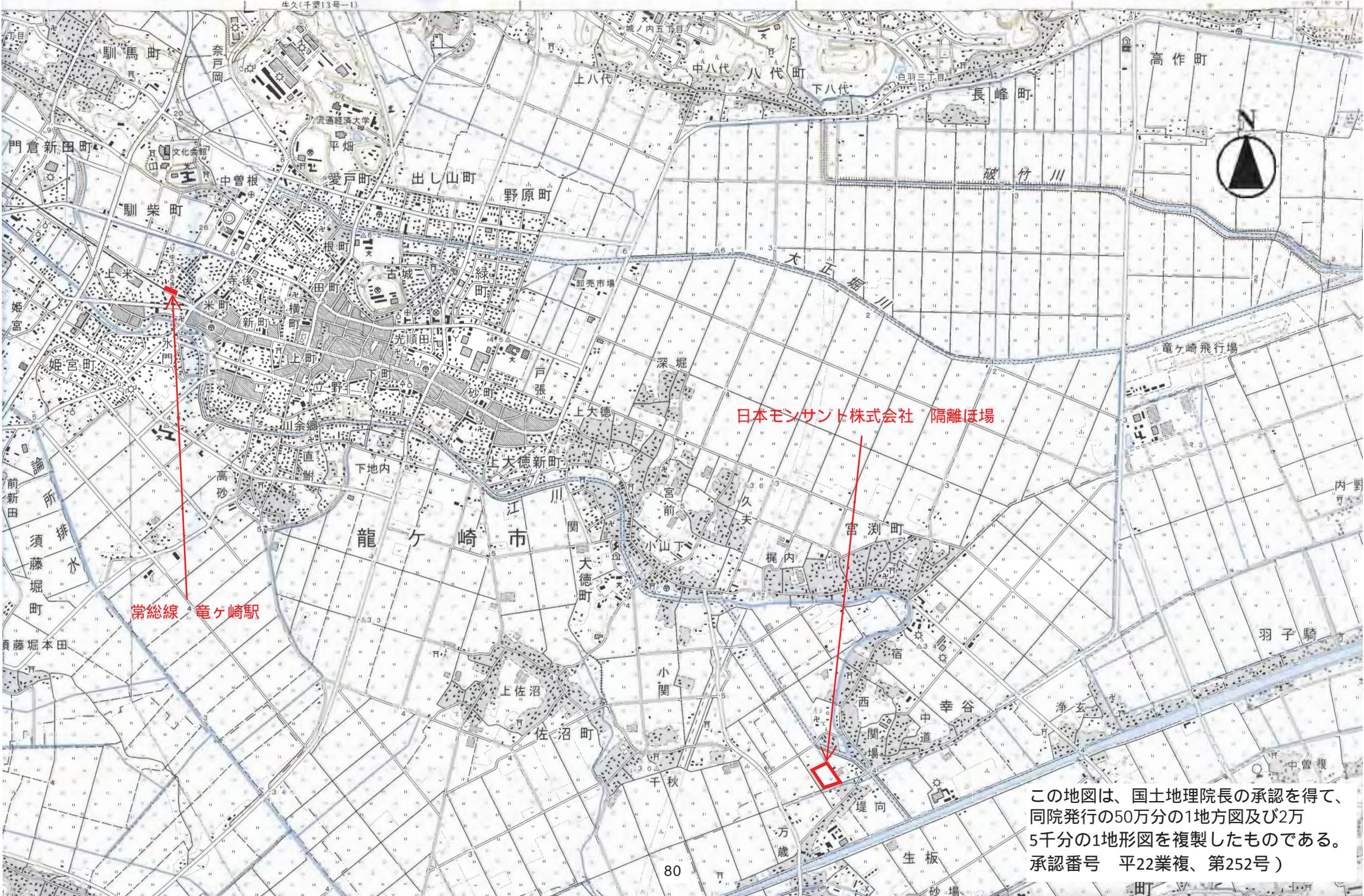
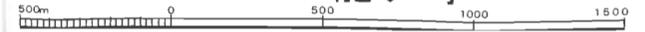
- (7) (1)から(6)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

以上

図 12 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置 (赤線で示した箇所)

1:25,000

龍ヶ崎



日本モンサント株式会社 隔離ほ場

常総線 竜ヶ崎駅

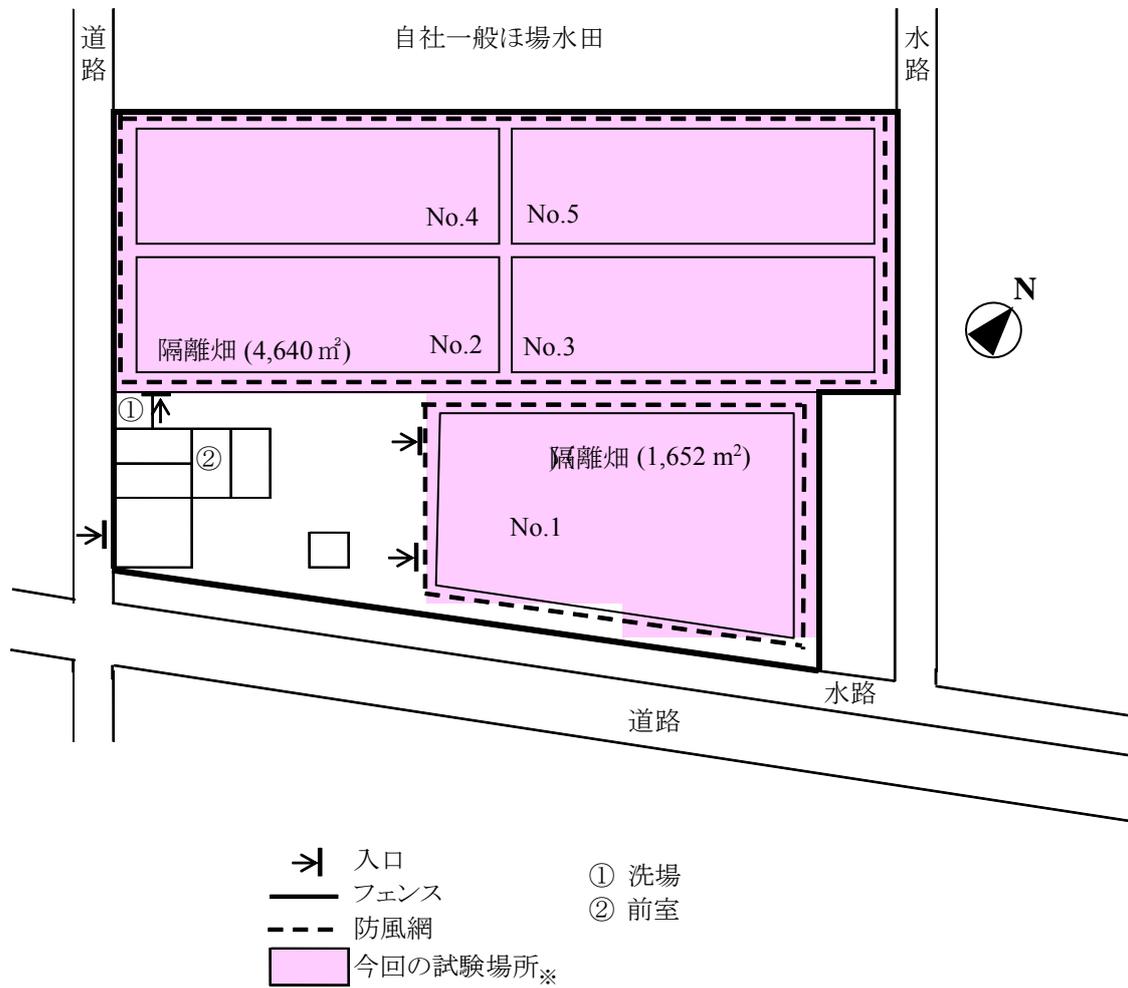
この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。承認番号 平22業複、第252号)



図 13 隔離ほ場の設備<sup>33</sup>

- ① 立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識
- ② 洗い場

<sup>33</sup> 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。

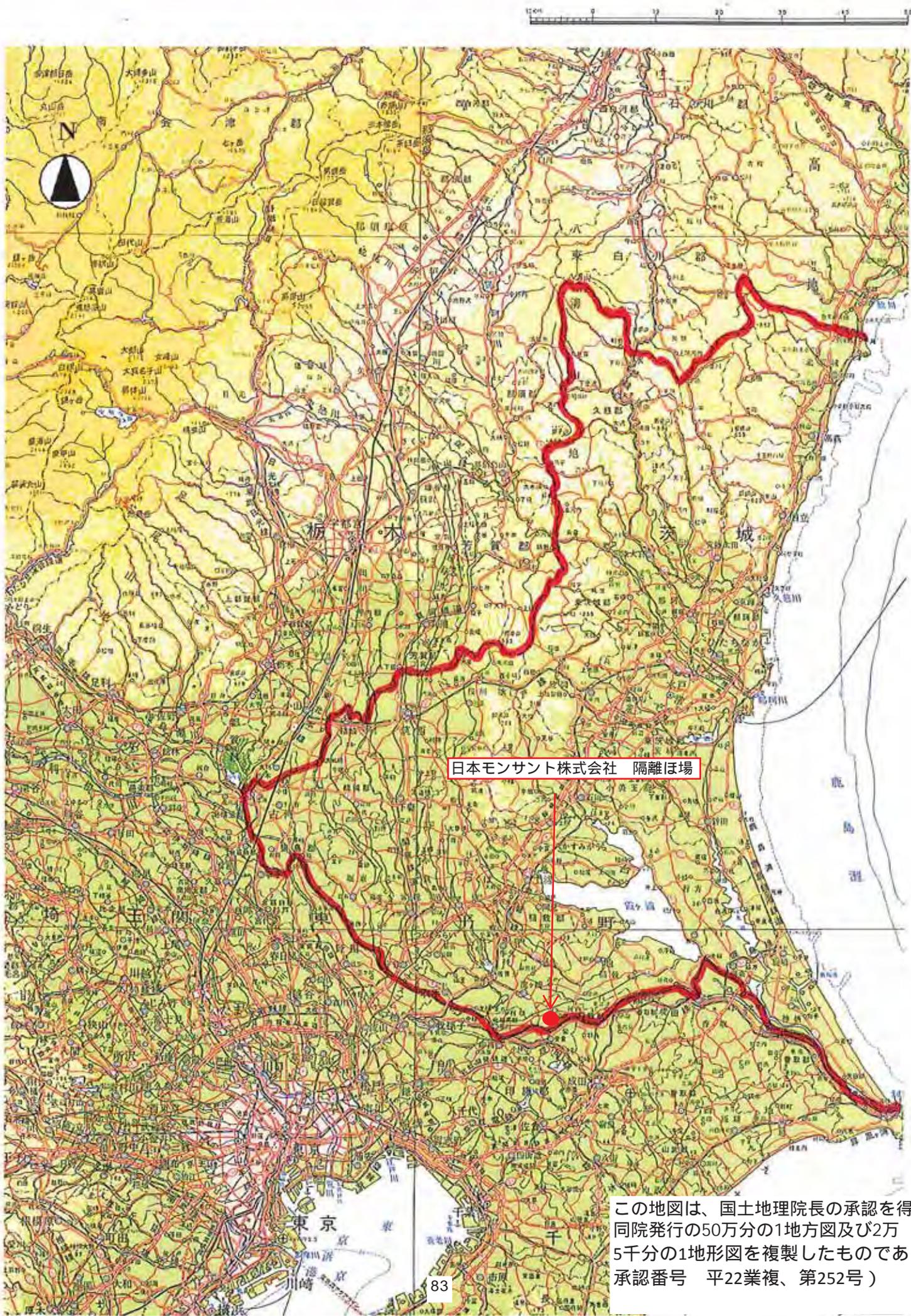


※上記試験場所のうち約 1,000 m<sup>2</sup>の面積において栽培予定。

図 14 試験区の配置図<sup>34</sup>

<sup>34</sup> 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15 日本モンサント株式会社 隔離ほ場の位置



日本モンサント株式会社 隔離ほ場

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。(承認番号 平22業複、第252号)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2015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				→								
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←	←	←
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				→								
	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ	→											

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2016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	遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←	←	←	←
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←	←	←	←
No.2	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
No.3	非遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←	←	←	←
No.4	非遺伝子組換え ワタ					←	←	←	←	←	←	←	←
No.5													

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2017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	遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←	←	←	←
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え 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	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											←	←
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											←	←

図 16 隔離ほ場における栽培履歴<sup>35</sup>

<sup>35</sup> 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。

## 第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、  
アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ  
(改変 *dmo*, *pat*, *ft\_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis )  
(MON87429, OECD UI : MON-87429-9) の

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 *dmo* 遺伝子、  
*pat* 遺伝子、*ft\_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子から推定した  
改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT\_T 蛋白質及び  
改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 CP4 EPSPS Protein Immunolocalization in MON 87429 Anthers  
(SCR-2018-0265) (社外秘)
- 別添資料 3 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT519224 (社外秘)
- 別添資料 4 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium*  
*tumefaciens* Used to Produce MON 87429 (MSL0029145) (社外秘)
- 別添資料 5 Amended from MSL0029565: Segregation Analysis of the T-DNA  
Insert in Herbicide Tolerant Maize MON 87429 Across Three  
Generations (MSL0029841) (社外秘)
- 別添資料 6 Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Maize for Japan  
Stage III Field Trial (MSL0029281) (社外秘)
- 別添資料 7 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, DMO, PAT and  
FT\_T Proteins in Maize Grain Samples across Multiple Generations  
of MON 87429 (SCR-2018-0155) (社外秘)
- 別添資料 8 Assessment of DMO, PAT (*pat*), FT\_T, and CP4 EPSPS Protein  
Levels in Maize Tissues Collected from MON 87429 Produced in a  
United States Field Trial During 2017 (MSL0029096) (社外秘)
- 別添資料 9 Summary of Method for Detecting the Presence of the Corn  
MON 87429 Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue  
(SCR-2018-0325) (社外秘)

別添資料 10

Larue, C.T., M. Goley, L. Shi, A.G. Evdokimov, O.C. Sparks, C. Ellis, A.M. Wollacott, T.J. Rydel, C.E. Halls, B.S. Van, J.R. Nageotte, X. Fu, S.M.G. Duff, A.M. Adio, J.A. Haas, M. Zheng, E.J. Sturman, G.J. Bean and M.J. Varagona. 2018. Development of robust FOP and synthetic Auxin herbicide tolerance traits for GE crops (社外秘)