

絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ
(*ATHB17, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1)
申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
ハ 捕食性又は寄生性	6
ニ 繁殖又は増殖の様式	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる 組織又は器官からの出芽特性	6
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との 交雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程 度	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	7
ホ 病原性	8
ヘ 有害物質の産生性	8
ト その他の情報	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ 構成及び構成要素の由来	9
ロ 構成要素の機能	10
① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーそ	

②	の他の供与核酸の構成要素それぞれの機能.....	10
③	目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨.....	15
③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	57
(2)	ベクターに関する情報.....	58
イ	名称及び由来.....	58
ロ	特性.....	58
①	ベクターの塩基数及び塩基配列.....	58
②	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	58
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.....	58
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	58
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成.....	58
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法.....	59
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	59
①	核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	59
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.....	59
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.....	59
(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.....	61
①	移入された核酸の複製物が存在する場所.....	61
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.....	63
③	染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別.....	68
④	(6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性.....	68
⑤	ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度.....	70
(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.....	70

(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	70
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.....	70
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.....	71
a	形態及び生育の特性.....	71
b	生育初期における低温耐性.....	72
c	成体の越冬性.....	72
d	花粉の稔性及びサイズ.....	72
e	種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	73
f	交雑率.....	73
g	有害物質の産生性.....	74
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	75
(1)	使用等の内容.....	75
(2)	使用等の方法.....	75
(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.....	75
(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.....	75
(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.....	75
(6)	国外における使用等に関する情報.....	75
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価.....	77
1	競合における優位性.....	77
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	77
(2)	影響の具体的内容の評価.....	78
(3)	影響の生じやすさの評価.....	78
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	78
2	有害物質の産生性.....	79
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	79
(2)	影響の具体的内容の評価.....	79
(3)	影響の生じやすさの評価.....	80
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	80
3	交雑性.....	80
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	80
(2)	影響の具体的内容の評価.....	80

(3) 影響の生じやすさの評価.....	80
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	80
4 その他の性質	80
第三 生物多様性影響の総合的評価	81
引用文献	83
緊急措置計画書	92
別添資料リスト	94

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 28 年 9 月 5 日

5 農林水産大臣 山本 有二 殿
環境大臣 山本 公一 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ (ATHB17, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は LH244 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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

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と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7,000~5,000 年頃であり、紀元前 3,400 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。

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

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

15 ・主たる栽培地域

現在、トウモロコシは、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能であり、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、全世界で広く栽培されている (OECD, 2003; 戸澤, 2005)。

20 国連食糧農業機関 (FAO) によると、2013 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 8 千万 ha であり、上位国は、米国 3,548 万 ha、中国 3,632 万 ha、ブラジル 1,528 万 ha、インド 950 万 ha、メキシコ 710 万 ha である (FAO, 2015)。

現在、わが国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2014 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 1,900 ha で (農林水産省, 2015)、2013 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,400 ha である (農林水産省, 2014a)。

・栽培方法

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

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

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

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

(F1) 品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

・流通実態及び用途

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

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

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

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

20

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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

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

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

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

35 これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の1.6~2.0倍になったときに幼根（初生根又は種子根）が抽出し、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

—

5 ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

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

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

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

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

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。

30

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

35 トウモロコシは雌雄同株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。

10 ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

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

受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である (戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐため隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400 m 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^2 、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/ cm^2 であった (Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から 5 m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/ cm^2 、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/ cm^2 、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/ cm^2 以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

また、北米でも全 7 ヲ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度の調査が行われている (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 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/ cm^2 、14.2 粒/ cm^2 、そして 8.1 粒/ cm^2 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 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

—

10

へ 有害物質の産生性

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

15

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、熊本県内の港湾で 1 個体のみ報告されている (農林水産省, 2014b)。

20

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *ATHB17* 遺伝子の導入により、絹糸抽出期 (R1) における高雌穂バイオマス
5 トウモロコシ MON87403 (*ATHB17*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を開発した。

本組換えトウモロコシでは、*ATHB17* 遺伝子が転写された後、mRNA レベルでのスプライシングを受けることでアミノ酸の一部が欠失した *ATHB17* 蛋白質 (以下、「*ATHB17*Δ113 蛋白質」という。) が発現することにより、生殖生長
10 初期の雌穂バイオマスが増大する。なお、生殖生長初期の雌穂バイオマスは雌穂重として評価することができる。

トウモロコシでは、生殖生長期に葉で生産された同化産物のほとんどが雌穂に蓄積される (Ritchie et al., 1997)。生殖生長初期に雌穂重や雌穂のサイズが増大
15 することで、より多くの同化産物が雌穂に蓄積し、生産性の向上の機会がもたらされる。このことは、生殖成長初期の雌穂重と収穫期の種子数との間に正の相関があること (Fisher and Palmer, 1983; Severini et al., 2011) により示唆されている。また、米国で2年間にのべ30箇所のほ場で、*ATHB17* 遺伝子を導入した組換えトウモロコシ5品種を栽培した結果、対照品種と比較して平均で0.27 t/ha
20 (収量の約2%に相当) の増収が認められている (Leibman et al., 2014)。

なお、本組換えトウモロコシは、より安定した多収性品種の開発を目的として、将来的に多収性の非組換え優良品種や他の組換え系統と掛合わせを行う予定である。

25 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の
30 由来は、図1(p11)及び表1(p12~14)に示した。

本組換えトウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子はシロイヌナズナに由来する。本組換えトウモロコシでは、mRNA レベルでのスプライシング¹を

¹ スプライシング部位となる RNA 配列は、単子葉植物であるトウモロコシと双子葉植物であるシロイヌナズナの間で異なる (Goodall and Filipowicz, 1991)。*ATHB17* 遺伝子において、コード領域の N 末端から 113 番目のアミノ酸に相当する箇所には、単子葉植物のスプライシング部位となる配列が存在する。このため、トウモロコシでは、*ATHB17* の mRNA が単子葉植物に特異的なスプライシングを受ける。その結果として、シロイヌナズナでは完全長の *ATHB17* 蛋白質が

受けることで、シロイヌナズナで発現する完全長の ATHB17 蛋白質と比較して N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した ATHB17 Δ 113 蛋白質が発現する。

なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する ATHB17 Δ 113 蛋白質の推定アミノ酸配列は、別添資料 1 の Figure 1 (p1) に示した。

5

ロ 構成要素の機能

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

10

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

発現するのに対して、トウモロコシでは N 末端の 113 アミノ酸が欠失した ATHB17 蛋白質 (即ち ATHB17 Δ 113 蛋白質) が発現する。

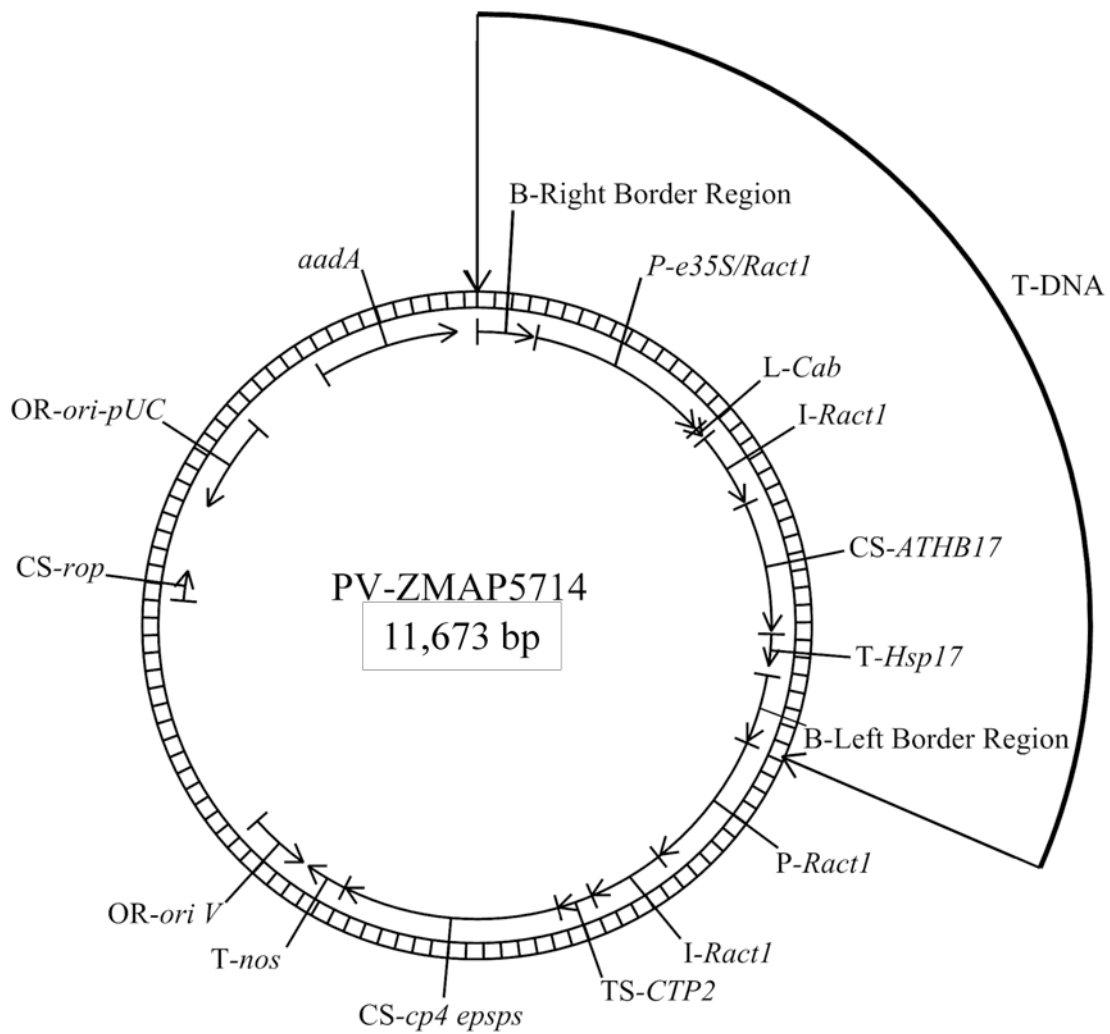


図1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP5714 のプラスミドマップ²

² 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-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能³

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNA 領域		
B ^{注1} -Right Border Region	1-357	<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	358-375	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>e35S/Ract1</i>	376-1,556	二重エンハンサー領域を持つ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35SRNA プロモーター (Kay et al., 1987) とイネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のプロモーター (McElroy et al., 1990) からなる、キメラプロモーター。恒常的に目的遺伝子を発現させる。
Intervening Sequence	1,557-1,561	DNA クローニングの際に利用された配列。
L ^{注3} - <i>Cab</i>	1,562-1,622	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) の葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳領域のリーダー配列 (Lamppa et al., 1985)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
Intervening Sequence	1,623-1,638	DNA クローニングの際に利用された配列。
I ^{注4} - <i>Ract1</i>	1,639-2,118	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	2,119-2,130	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注5} - <i>ATHB17</i>	2,131-2,958	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来のホメオドメイン-ロイシンジッパーファミリーのクラス II (HD-Zip II) に属する <i>ATHB17</i> 蛋白質をコードする遺伝子 (Ariel et al., 2007)。標的遺伝子の発現を抑制する転写因子として機能すると考えられる。本遺伝子をトウモロコシに導入した場合、単子葉植物に特有のスプライシング (p22 参照) によって、コード配列のうち N 末端側の 113 個のアミノ酸に相当する領域が欠失した mRNA が産生されることが、 <i>ATHB17</i> RNA のシーケンス解析で確認されている (別添資料 5)。また、本組換えトウモロコシで発現する <i>ATHB17</i> 蛋白質 (<i>ATHB17Δ113</i> 蛋白質) において 113 個のアミノ酸が欠失していることは、ウエスタンブロット解析の結果において確認されている (別添資料 16 の Figure 2, p17)。 <i>ATHB17Δ113</i> 蛋白質では、その N 末端に存在するはずのリプレッションドメインが欠失しているため、内在性 HD-Zip II 蛋白質に対してドミナント・ネガティブ作用が生じ、HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の発現抑制を解除すると考えられる (第一の 2-(1)-ロ-②-2-1), p19~21)。

³ 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-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
Intervening Sequence	2,959-2,971	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注6} - <i>Hsp17</i>	2,972-3,181	コムギ (<i>T. aestivum</i>) の熱ショック蛋白質 (Hsp17) の 3'末端非翻訳領域の配列 (McElwain and Spiker, 1989)。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	3,182-3,234	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	3,235-3,676	<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領域を含む配列 (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシ中には存在しない)		
Intervening Sequence	3,677-3,682	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>P-Ract1</i>	3,683-4,603	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のプロモーター配列 (McElroy et al., 1990)。恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>I-Ract1</i>	4,604-5,081	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	5,082-5,090	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注7} - <i>CTP2</i>	5,091-5,318	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 <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。
<i>CS-cp4 epsps</i>	5,319-6,686	<i>Agrobacterium</i> sp. 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	6,687-6,701	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>T-nos</i>	6,702-6,954	<i>A. tumefaciens</i> pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域の配列で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
Intervening Sequence	6,955-7,005	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注8} -ori V	7,006-7,402	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	7,403-8,910	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-rop	8,911-9,102	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	9,103-9,529	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pUC	9,530-10,118	pUC プラスミドに由来する複製開始領域 (Vieira and Messing, 1987)。 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	10,119-10,648	DNA クローニングの際に利用された配列。
aadA	10,649-11,537	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター及びコード配列並びに 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	11,538-11,673	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)

5 注³ L-Leader (リーダー配列)

注⁴ I-Intron (イントロン)

注⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)

注⁶ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁷ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

10 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同一性を有する場合はその旨

5

本組換えトウモロコシにおける *ATHB17Δ113* 蛋白質の影響

本組換えトウモロコシにおける雌穂重の増大への *ATHB17Δ113* 蛋白質の影響を、以下の4項目（以下の1.~4.）に分けて説明する。

- 10
- ・ 第1項目：本組換えトウモロコシの生殖生長初期における雌穂重の向上を示すデータ
 - ・ 第2項目：*ATHB17* 遺伝子に関する文献情報
 - ・ 第3項目：雌穂重増大に係る遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの評価（遺伝子発現解析及び代謝解析の結果をもとに）
- 15
- ・ 第4項目：本組換えトウモロコシにおける雌穂重増大への *ATHB17Δ113* 蛋白質による影響のまとめ

1. 本組換えトウモロコシの生殖生長初期における雌穂重の向上

20

1) *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の雌穂重に与える影響

本組換えトウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の雌穂重に与える影響を明らかにするために、以下の3系統を米国の13カ所⁴ のほ場で2012年に栽培し、絹糸抽出期 (R1) における雌穂の乾燥重を a と c との間及び b と c との間でそれぞれ比較した⁵ (別添資料2及び別添資料3)。

25

- a 本組換えトウモロコシ (R5F1 世代)
- b *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統 (R5F1 世代)⁶
- c 対照の非組換えトウモロコシ

30

その結果、本組換えトウモロコシと MON87406 系統の絹糸抽出期 (R1) にお

⁴ アーカンソー州、アイオワ州 (2カ所)、イリノイ州 (2カ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3カ所) 及びペンシルバニア州 (2カ所)。

⁵ 全ほ場から収集した絹糸抽出期 (R1) の雌穂重のデータを使用して統計処理を行った。

⁶ MON87406 系統は、トウモロコシ品種 LH244 に PV-ZMAP5714 の T-DNA を導入することで作出した別系統の組換えトウモロコシである。MON87406 系統は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有するが、ゲノムにおける導入遺伝子の挿入部位は本組換えトウモロコシと異なり、別のイベントであるため、本申請における承認の範囲 (図 11, p55) には含まれない。

ける雌穂重は、いずれも対照の非組換えトウモロコシと比較して有意に増大していた (表 2, p16; 別添資料 2 の Table 1, p5 及び別添資料 3 の Table 1, p5)。

5

表 2 本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する実験系統及び対照の非組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹ (g/m) (2012 年、米国)⁷

供試系統	供試系統の 平均値 (±SE)	対照の非組換え トウモロコシ ² の 平均値 (±SE)	差異	p-値
本組換え トウモロコシ	144.5 (±8.47)	129.3 (±8.13)	15.2	0.004*
MON87406 系統 ³	144.2 (±8.76)		14.9	0.004*

10

¹ 本実験はほ場ごとに 4 反復で実施し (n=4)、各反復を乱塊法により配置した。本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統及び対照の非組換えトウモロコシについて、全ほ場から収集した絹糸抽出期 (R1) の雌穂重のデータを使用し、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った。13 カ所のほ場の所在地は、アーカンソー州、アイオワ州 (2 カ所)、イリノイ州 (2 カ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3 カ所) 及びペンシルバニア州 (2 カ所) である。なお、ペンシルバニア州の 1 カ所のほ場では、厳しい乾燥が観測された 1 つの反復を除外し、3 反復のデータを採用した。一次雌穂は条の中央 1m にある個体から採取した。この雌穂を 80 °C の乾燥機で十分に乾燥させた後、雌穂重の計測を行った。

15

² 対照の非組換えトウモロコシには、本組換えトウモロコシ及び *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と同じ遺伝的背景をもつ MPA640B 系統を用いた。

20

³ MON87406 系統は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有し、本組換えトウモロコシとは別の系統である。

* 有意差あり (p<0.05)。

25

さらに、異なる遺伝的背景をもつ品種でも絹糸抽出期 (R1) における雌穂重が増大することを確認するため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する別の 2 つの組換え系統 (組換え系統 1 及び組換え系統 2)⁸ それぞれについて 3 品種 (R5F1 世代及び R8F1 世代)⁹ を用意し、最大 3 カ所のほ場において最大 2 年間にわたり

⁷ 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。

⁸ 表 3 (p15) 及び別添資料 4 の供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドである。なお、この商業品種には、Bt 蛋白質 (改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Cry2Ab 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。また、対照のトウモロコシにも同様の Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

⁹ 供試した 3 品種 (NH6214、EXP257 及び NN6306) のうち、NH6214 及び EXP257 については組換え系統 1 と組換え系統 2 のいずれも R5F1 世代である。NN6306 については、組換え系統 1 が R8F1

絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を調査した。組換え系統ごとに、年、品種及びほ場をまとめて統計処理を行った結果、いずれの組換え系統においても対照のトウモロコシと比較して有意な雌穂重の増加が確認された (表 3, p17; 別添資料 4 の Table 3, p12)。

5

以上の結果から、トウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) における雌穂重 (即ち初期のシンクサイズ) を増大させることが確認された。

10

表 3 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹ (g/m²) (2011 年及び 2012 年、米国)¹⁰

供試系統 ²	供試系統の 平均値 (± SE)	対照のトウモロコシ ³ の平均値 (± SE)	差異	p-値
組換え系統 1	99.2 (± 20.68)	93.1 (± 20.68)	6.2	0.006*
組換え系統 2	99.7 (± 20.68)		6.6	0.003*

15

¹ 2011 年及び 2012 年に米国 (イリノイ州) の 2 ヲ所で 3 品種のトウモロコシを栽培し、その雌穂重について、年、品種及びほ場をまとめ、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った (N=109)。

20

² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドである。なお、この商業品種には、Bt 蛋白質 (改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Cry2Ab 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。

25

³ 対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

* 有意差あり (p<0.05)。

2) *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の茎葉の重量に与える影響の有無

30

ATHB17 遺伝子の発現が茎葉の重量に影響を与えるのかどうかを確認するために、1) の a、b 及び c の 3 系統 (p15) を米国の 13 ヲ所のほ場で 2012 年に栽培し、絹糸抽出期 (R1) における茎葉重を、a と c の間及び b と c の間でそれぞれ

世代であり、組換え系統 2 が R5F1 世代である。

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

比較した¹¹ (別添資料 2)。その結果、本組換えトウモロコシと実験系統の絹糸抽出期 (R1) の茎葉重は、いずれも対照の非組換えトウモロコシと比較して統計学的な有意差は認められなかった (表 4, p18; 別添資料 2 の Table 1, p5)。なお、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (脚注 8, p16) においても、茎葉重の変化は見られなかった (表 5, p19; 別添資料 4 の Table 3, p12)。

以上の結果から、*ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) における茎葉重に影響を与えるものではないと結論された。

10

表 4 本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する実験系統及び対照の非組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における茎葉重¹ (g/m) (2012 年、米国)¹²

供試系統	供試系統の 平均値 (± SE)	対照の非組換え トウモロコシ ² の 平均値 (± SE)	差異	p-値
本組換え トウモロコシ	768.1 (± 20.57)	772.3 (± 20.45)	-4.2	0.791
MON87406 系統 ³	800.9 (± 21.31)		28.6	0.073

15

¹本実験はほ場ごとに 4 反復 (n=4) で実施し、各反復を乱塊法により配置した。本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統及び対照の非組換えトウモロコシについて、全ほ場から収集した絹糸抽出期 (R1) の雌穂重のデータを使用し、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った。13 カ所のほ場の所在地は、アーカンソー州、アイオワ州 (2 カ所)、イリノイ州 (2 カ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3 カ所) 及びペンシルバニア州 (2 カ所) である。なお、ペンシルバニア州の 1 カ所のほ場では、厳しい乾燥が観測された 1 つの反復を除外し、3 反復のデータを採用した。条の中央 1m にある個体から、雌穂を除く地上部を採取した。茎葉を 80 °C の乾燥機で十分に乾燥させた後、茎葉重の計測を行った。

20

²対照の非組換えトウモロコシには、本組換えトウモロコシ及び *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と同じ遺伝的背景をもつ MPA640B 系統を用いた。

25

³MON87406 系統は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有し、本組換えトウモロコシとは別の系統である。

¹¹ 全ほ場から収集した絹糸抽出期 (R1) の茎葉重のデータを使用して統計処理を行った。

¹² 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 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における茎葉重¹ (g/m²) (2011 年及び 2012 年、米国)¹³

供試系統 ²	供試系統 の平均値 (± SE)	対照のトウモロコシ ³ の平均値 (± SE)	差異	p-値
組換え系統 1	993.2 (± 18.69)	956.6 (± 18.75)	36.6	0.114
組換え系統 2	951.4 (± 18.62)		-5.1	0.804

¹ 2011 年及び 2012 年に米国 (イリノイ州) の 2 ヲ所で 3 品種のトウモロコシを栽培し、その茎葉重
5 について、年、品種及びほ場をまとめ、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行っ
た (N=108)。

² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品
種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドで
ある。なお、この商業品種には、Bt 蛋白質 (改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Cry2Ab 蛋白質、Cry1A.105
10 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウ
チュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。

³ 対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモ
ロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

15

以上の結論として、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現は、
生殖生長初期における雌穂重を増大させるが、茎葉重に影響を与えるものでは
ないと結論された。

20

2. *ATHB17* 遺伝子に関する文献情報

1) HD-Zip 蛋白質及び *ATHB17* 蛋白質の特性

シロイヌナズナ由来の HB17 蛋白質 (*ATHB17* 蛋白質) は転写因子であり、ホ
25 メオドメインーロイシンジッパー (HD-Zip) ファミリーのクラス II (HD-Zip II)
に属する蛋白質である (別添資料 4, p1) (Ariel et al., 2007; Ciarelli et al., 2008)。
HD-Zip 蛋白質は、標的 DNA への結合に必要なホメオドメイン (HD) を C 末端
にもち、これに隣接して二量体形成に必要なロイシンジッパー (LZ) ドメインが
存在することを特徴とする¹⁴ (Ruberti et al., 1991; Mukherjee et al., 2009)。HD 及

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

¹⁴ HD 及び LZ は植物種以外の真核生物の転写因子にも存在するが、これらの両方が 1 つの蛋白質
に含まれるのは植物の HD-Zip 蛋白質に固有のものである (Ariel et al., 2007)。HD は DNA に結合し、
LZ はホモ二量体及びヘテロ二量体の形成に必要なドメインである (図 2, p18 のパネル B 及び C)

び LZ のアミノ酸配列は HD-Zip II 蛋白質内で高度に保存されている (Ariel et al., 2007)。シロイヌナズナの HD-Zip II 蛋白質は 9 bp のコンセンサス配列 CAAT (G/C) ATTG (クラス II コンセンサス配列) を認識することが報告されている (Sessa et al., 1993)。また、二量体形成については、同じクラスの HD-Zip 蛋白質に属する異なる蛋白質の間や、異種由来の相同な HD-Zip II 蛋白質の間でヘテロ二量体が形成されることがあるが (図 2, p21 のパネル C)、異なるクラスに属する HD-Zip 蛋白質間のヘテロ二量体の形成は報告されていない (Frank et al., 1998)。

シロイヌナズナの 10 種類の HD-Zip II 蛋白質 (Ciarbelli et al., 2008) のうち 8 種類は、EAR (Ethylene responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression) モチーフ (Ohta et al., 2001; Tiwari et al., 2004; Kagale et al., 2010) と呼ばれるリプレッションモチーフをもつ (Ciarbelli et al., 2008; Kagale et al., 2010) (別添資料 4a)。EAR モチーフをもつ転写リプレッサー¹⁵は、その標的遺伝子にコリプレッサー¹⁶を誘導し、下流遺伝子の転写を抑制する (図 2, p21 のパネル B) (Kagale and Rozwadowski, 2011)。ATHB17 遺伝子がコードする ATHB17 蛋白質は、EAR モチーフと類似したアミノ酸配列 (EAR-like モチーフ) を有していること及び標的遺伝子の転写を抑制することが報告されている (別添資料 4a)。また、トウモロコシの HD-Zip II 蛋白質も転写リプレッサーであることが、トウモロコシの HD-Zip II 蛋白質を用いたレポーターアッセイにより示されている (別添資料 4a の Figure 8, p11)。

(Ariel et al., 2007)。HD-Zip 蛋白質が DNA に結合する上で LZ による二量体形成が必要であるため、LZ は蛋白質-DNA 複合体の形成に重要な役割を果たしている (Sessa et al., 1993; Ariel et al., 2007)。LZ を介した二量体形成は HD を DNA の正しい部位に結合させ、HD-Zip 蛋白質/DNA 複合体の形成を促進する (Sessa et al., 1993)。

¹⁵ 転写リプレッサーは DNA や RNA に結合する蛋白質である。転写リプレッサーは遺伝子の上流に結合し、その遺伝子が mRNA に転写されることを防ぐことで、その遺伝子の発現を抑制する。

¹⁶ コリプレッサーは、転写リプレッサーに結合する蛋白質であり、転写リプレッサーへの結合を介して間接的に遺伝子の発現を調節する。

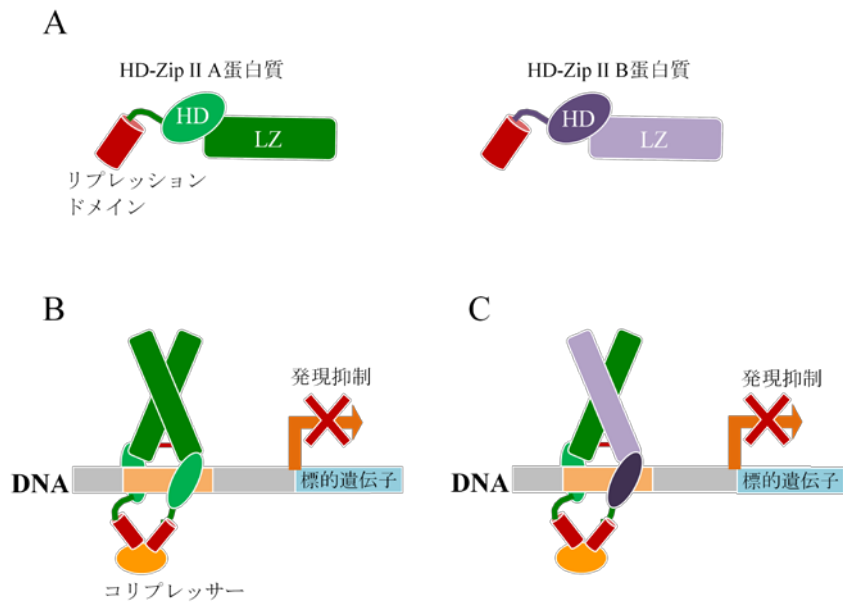


図2 シロイヌナズナで報告されている HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の転写抑制の模式図¹⁷

5 (A) HD-Zip II 蛋白質サブファミリーに属する異なる種類の蛋白質。(B) HD-Zip II 蛋白質は二量体を形成して標的遺伝子の持つ 9 bp のコンセンサス配列に結合し、コリプレッサーの働きを介して標的遺伝子の転写を抑制する。(C) HD-Zip II 蛋白質に属する蛋白質は、同じクラス (HD-Zip II 蛋白質) に属する異なる種類の蛋白質とヘテロ二量体を形成することができるが、異なるクラスに属する HD-Zip 蛋白質とはヘテロ二量体を形成することができない。

10

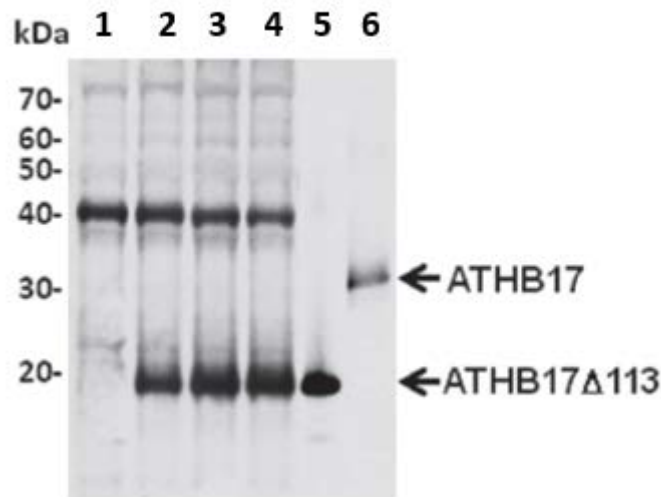
HD-Zip II 蛋白質が関与する生理学上の機能として生長及び発達への関与が挙げられ、避陰反応 (Steindler et al., 1999; Sorin et al., 2009)、光合成 (Hymus et al., 2013)、乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性 (Park et al., 2013) がシロイヌナズナにおいて報告されている。また、シロイヌナズナでは、HD-Zip II 蛋白質に属する HAT1 が適切な子実の生長及び発達に必要であることが示されている

15 (Zúñiga-Mayo et al., 2012)。トウモロコシにおいても、複数の HD-Zip II 蛋白質が主に生殖組織において発現していることが報告されている (別添資料 4a)。

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

2) トウモロコシで発現する *ATHB17*Δ113 蛋白質の特性

本組換えトウモロコシで発現する *ATHB17* mRNA の配列を調べるため、*ATHB17* 遺伝子の転写産物を RT-PCR 法により増幅し、その配列をシーケンス解析により確認した。その結果、*ATHB17* mRNA では、コード領域の 5'末端側の RNA 配列が欠失しており、この mRNA から発現する蛋白質は、完全長の *ATHB17* 蛋白質と比べて、N 末端の 113 アミノ酸が欠失した形で発現すると考えられた (別添資料 5 の Figure 2, p18)。実際に、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統において発現する *ATHB17* 蛋白質をウエスタンブロット分析で調べた結果、検出されたバンドの位置は 113 アミノ酸の欠失を示唆するものであった (図 3, p22; 別添資料 4a の Figure 4, p6)。こうした N 末端の 113 アミノ酸の欠失がトウモロコシにおいて生じた原因は、*ATHB17* mRNA のコード領域に、単子葉植物特有のスプライシングを受ける配列が存在するためである (別添資料 5 の Figure 2, p18)。



15 図 3 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統において発現する *ATHB17*Δ113 蛋白質のウエスタンブロット分析¹⁸

レーン	サンプル
1	非組換えトウモロコシ
2	<i>ATHB17</i> 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統 1
3	<i>ATHB17</i> 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統 2
4	<i>ATHB17</i> 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統 3
5	<i>E.coli</i> で発現させた <i>ATHB17</i> Δ113 蛋白質
6	<i>E.coli</i> で発現させた完全長の <i>ATHB17</i> 蛋白質

¹⁸ 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で発現する ATHB17 蛋白質において欠失している N 末端の 113 アミノ酸は、他の HD-Zip II 蛋白質のリプレッションドメイン (EAR-like モチーフを含む) の大部分に相当する領域である (図 4, p24; 別添資料 4b の Supplementary Figure 1D, p4)。一方、ATHB17Δ113 蛋白質の LZ 及び HD は失われておらず、トウモロコシのプロトプラストでは ATHB17Δ113 蛋白質が他の複数の HD-Zip II 蛋白質とヘテロ二量体を形成することが報告されている (別添資料 4a の Figure 6, p8)。さらに、ATHB17Δ113 蛋白質とトウモロコシ内在性の HD-Zip 蛋白質との二量体の形成についてルミネックス¹⁹ を用いて分析した結果、ATHB17Δ113 蛋白質は 18 種類のトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質のうち少なくとも 13 種²⁰ と二量体を形成するが、他のクラスの HD-Zip 蛋白質 (HD-Zip I 蛋白質、HD-Zip III 蛋白質及び HD-Zip IV 蛋白質) とは二量体を形成しないことが示されている²¹ (別添資料 4a の p6 及び Figure 6, p8)。また、表面プラズモン共鳴を用いた動態解析²² では、ATHB17Δ113 蛋白質が、クラス II のコンセンサス配列と高い結合性をもつことが示されている²³ (別添資料 4a の Table 1, p7)。なお、第一の 2-(1)-ロ-②-3-2)-(B) (p43) に後述するとおり、ATHB17Δ113 蛋白質及びトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が結合すると推測

¹⁹ ルミネックスは、特定の抗体やオリゴヌクレオチドを固定したビーズを用いて標的の蛋白質や特異的な DNA 配列を検出する技術である。本試験では、ATHB17Δ113 蛋白質に特異的な抗体を固定したビーズを用いて、ATHB17Δ113 蛋白質とトウモロコシ内在性の HD-Zip 蛋白質との相互作用を評価した。

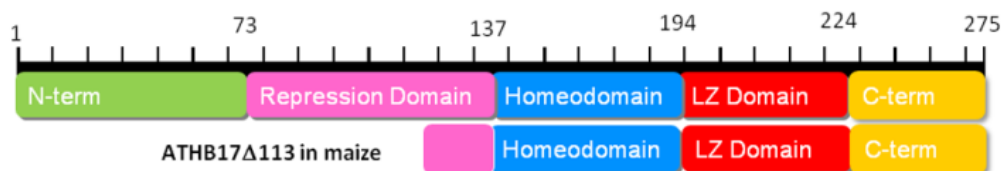
²⁰ トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質は 18 種存在することが知られているが、Rice et al., 2014 (別添資料 4a) の執筆時点で知られていたのはそのうち 15 種であり、さらにこの 15 種のうちクローニングに成功した、13 種のトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質 (Zmhdz18, Zmhdz19, Zmhdz21, Zmhdz24, Zmhdz25, Zmhdz26, Zmhdz29, Zmhdz30, Zmhdz31, Zmhdz32, Zmhdz33, Zmhdz34, Zmhdz35) (別添資料 4a の Figure 6, p8) について検討が行われた。

²¹ 複数の実験結果から、ATHB17 蛋白質は他の HD-Zip II 蛋白質と同様に、HD-Zip I、HD-Zip III 及び HD-Zip IV 蛋白質とはダイマーを形成しないと考えられた。酵母ツーハイブリッド法を用いて ATHB17 蛋白質と相互作用するトウモロコシ蛋白質をスクリーニングした結果、ATHB17 蛋白質と相互作用する蛋白質として HD-Zip II 蛋白質が複数同定されたが、HD-Zip I、HD-Zip III 及び HD-Zip IV 蛋白質は同定されなかった (別添資料 4 a)。さらに、ATHB17Δ113 蛋白質は、解析に供試した 13 種類のトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質と相互作用するが、HD-Zip I 蛋白質とは相互作用しないことがルミネックスを用いた解析から明らかになった (別添資料 4 a)。これを支持する情報として、シロイヌナズナの HD-Zip 蛋白質の蛋白質間相互作用の解析により、異なるクラスの HD-Zip 蛋白質間ではヘテロダイマーを形成することができないという報告がある (Meijer et al., 2000; Deng et al., 2002)。

²² 表面プラズモン共鳴を用いた動態解析は、2 つの異なる物質の結合と解離をリアルタイムで解析する手法である。この試験では、標的となる DNA 配列をセンサーの表面に固定し、センサーと ATHB17Δ113 蛋白質を含む溶液との界面における屈折率を測定することで、2 つの異なる物質の相互作用の特異性を評価した。

²³ なお、ATHB17Δ113 蛋白質がクラス I のコンセンサス配列 (CAAT(A/T)ATTG) にも結合することが示されたが、その結合性はクラス II のコンセンサス配列との結合性に比べて低いものであった (別添資料 4a) の Table 1, p7)。

されるクラス II コンセンサス配列が、40 種のトウモロコシ内在性遺伝子のプロモーター領域において確認されている。



5 図 4 シロイヌナズナにおいて発現する完全長の ATHB17 タンパク質 (上段) 及び本組換えトウモロコシにおいて発現する ATHB17Δ113 タンパク質 (下段) の模式図²⁴

10 以上の結果は、ATHB17Δ113 蛋白質が *in vitro* において、HD-Zip II 蛋白質の二量体形成機能及び DNA への結合能を維持していることを示唆している。しかし、ATHB17Δ113 蛋白質では EAR 様モチーフが失われているため、転写リプレッサーとして機能できないと考えられる (別添資料 4a, p6)。実際に、9 bp のクラス II コンセンサス配列をプロモーター領域に持つ GUS レポーター遺伝子を用いた
15 アッセイによって、ATHB17Δ113 蛋白質は転写リプレッサーとしての機能を持たないことが示された (別添資料 4a の Figure 7A, p9)。

20 以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、二量体を形成してコンセンサス配列に結合することによって、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質を拮抗的に阻害するドミナント・ネガティブ作用²⁵を示すものと考えられた (図 5, p25) (別添資料 4a の p14 及び別添資料 4b の Supplementary Figure 2, p5)。この作用では、内在性 HD-Zip II 蛋白質が ATHB17Δ113 蛋白質による拮抗阻害を受けることにより、①HD-Zip II 蛋白質が結合するコンセンサス配列をプロモーター領域に持つ複数のトウモロコシ内在性遺伝子の発現が向上する、②前述の①により発現が向上した遺伝子から作られる蛋白質が、その下流のトウモロコシ内在性遺伝子の発現を変化させる (図 5,
25

²⁴ 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。

²⁵ ドミナント・ネガティブ作用とは、変異型の遺伝子産物が正常型の遺伝子産物と比較して過剰に発現することにより、正常型の機能を阻害することをいう (Herskowitz, 1987)。さらに近年では、正常型と変異型の量比に関わらず変異型の遺伝子産物が正常型の遺伝子産物の働きを阻害する作用についてもドミナント・ネガティブ作用として解釈されている (Veitia, 2007)。転写因子においては、DNA 結合ドメインを残して転写調節ドメインが取り除かれた場合に、正常型の転写因子の機能が競合的に阻害される現象が、ドミナント・ネガティブ作用の 1 つとして報告されている (Veitia, 2007)。

p25) ことが考えられる。このように、ATHB17 Δ 113 蛋白質は、ドミナント・ネガティブ作用を通じて内在性 HD-Zip II 蛋白質の経路を調節していると推察された。

5

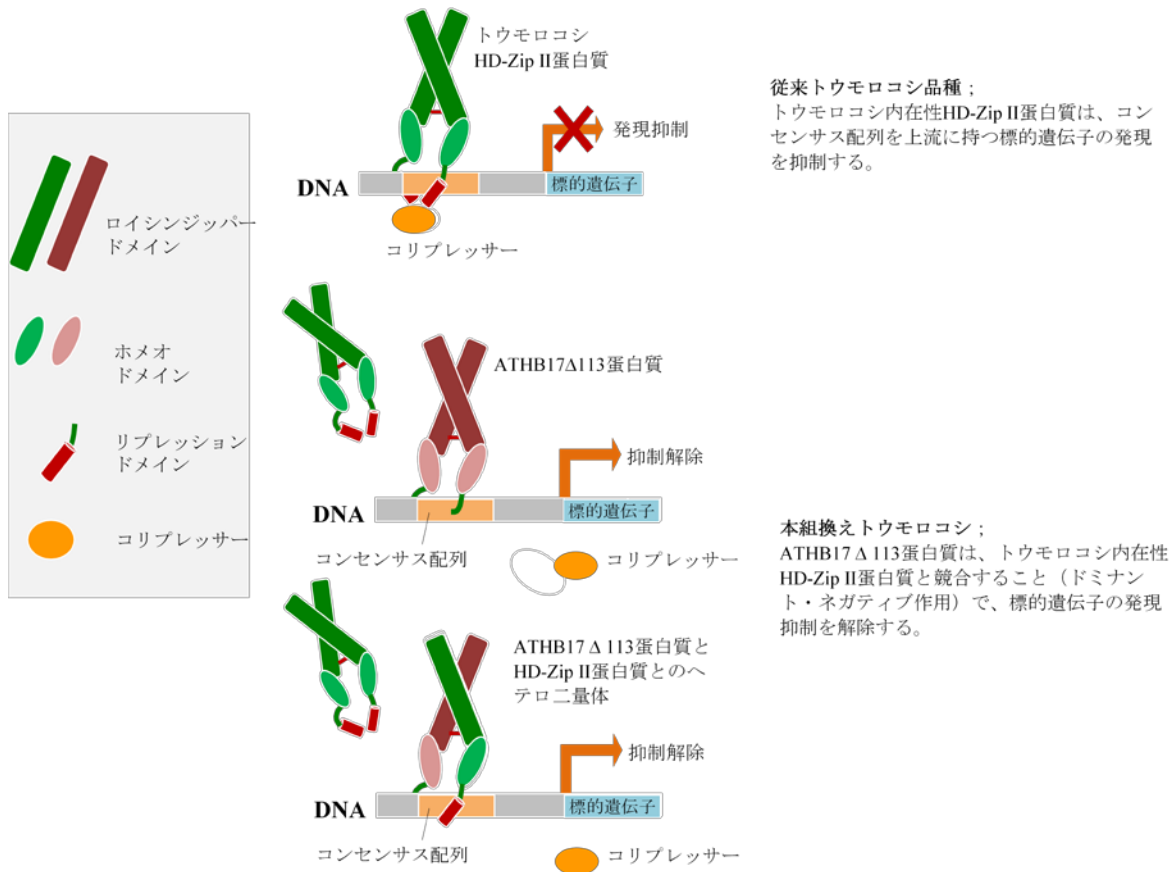


図 5 ATHB17 Δ 113 蛋白質のドミナント・ネガティブ作用によって生じると考えられる、HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の発現抑制の解除を示した模式図²⁶

10 プロモーター領域にコンセンサス配列をもつトウモロコシ内在遺伝子が複数存在することが、本組換えトウモロコシを供試した RNA シークエンス解析及びその結果を基におこなったバイオインフォマティクス解析によって明らかになっている。詳細は、第一の 2-(1)-ロ-②-3-2)-(B) (p43) に記載した。

15

²⁶ 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. 雌穂重増大に係る遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの評価

本組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における雌穂重増大への *ATHB17* 遺伝子の影響を解明するために、(A) 2012 年米国におけるほ場試験及び (B) 2013 年米国における温室試験において、遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの解析を行った。

(A) 2012 年米国におけるほ場試験は、2011 年及び 2012 年に米国で実施したほ場試験の一部である。本試験では、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (脚注 4, p16) (組換え系統 1: R8F1 世代、組換え系統 2: R5F1 世代) 及び対照のトウモロコシを 2012 年の米国 (イリノイ州) の 1 ヶ所のほ場で栽培し、16 葉期 (V16) の雌穂花序及び絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸・胚珠) を RNA シークエンス解析及び代謝解析に供試した。

(B) 2013 年米国における温室試験では、本組換えトウモロコシ (R5F1 世代) 及び対照の非組換えトウモロコシを温室で栽培し、4 つの異なる生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)²⁷) において、雌穂の 2 つの部位 (穂軸・胚珠及び苞葉・穂柄・絹糸) を RNA シークエンス解析及び代謝解析に供試した。なお、温室では環境影響を受けにくい栽培条件下で試験を行うことができるため、より高い感度で遺伝子発現及び代謝の変化を検出できると考えられる。

上記の (A) 2012 年米国におけるほ場試験及び (B) 2013 年米国における温室試験の結果を、1) 形質 (絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大) の確認、2) トウモロコシ内在性遺伝子の発現への影響の評価、及び 3) トウモロコシ内在性の代謝系への影響の評価に分けて以下に述べる。

²⁷ 2013 年米国の温室試験での絹糸抽出期後期 (LR1) は、2012 年米国におけるほ場試験での絹糸抽出期 (R1) と同じ生育段階である。

1) 形質 (絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大) の確認

遺伝子発現解析及び代謝解析に供試した系統で導入遺伝子に由来する形質が発現していることを確認するため、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を評価した。

5

(A) 2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 4)

10 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (脚注 4, p16) 及び対照のトウモロコシについて、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を比較した。その結果、組換え系統 2 では対照のトウモロコシと比較して有意に雌穂重が増大しており、組換え系統 1 では統計学的な有意差はないものの、雌穂重の平均値は対照のトウモロコシよりも大きかった (表 6, p27; 別添資料 4 の Supplementary Table 2B, p9)。

15 表 6 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統¹の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹ (g/m²)²⁸

供試系統 ²	供試系統の 平均値 (± SE)	対照のトウモロ コシ ³ の平均値 (± SE)	対照の トウモロコシ との差異	差異 (%)	p-値
組換え系統 1	61.7 (± 3.31)	54.7 (± 3.31)	6.9	12.7	0.108
組換え系統 2	65.5 (± 3.31)		10.7	19.6	0.014*

¹ 2012 年に米国 (イリノイ州) の 1 ヲ所 (ILWI) において組換え系統 1 及び組換え系統 2 を 18 反復で栽培し、各反復から 5~7 個体の雌穂を採取した。それらの雌穂について雌穂重の測定を行い、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った。

20 ² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドである。なお、この商業品種には、Bt 蛋白質 (改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Cry2Ab 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質) 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。

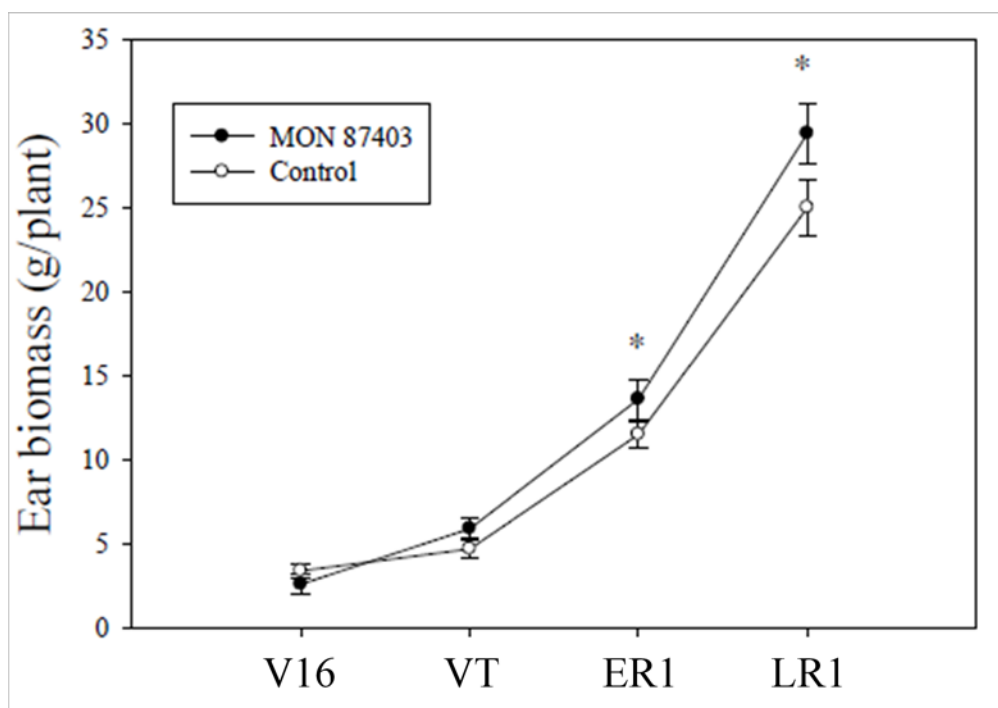
25 ³ 対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

* 有意差あり (p < 0.05)。

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

(B) 2013 年米国における温室試験 (別添資料 6)

5 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、4つの生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)) における雌穂重を経時的に比較した。その結果、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) における本組換えトウモロコシの雌穂重は、対照の非組換えトウモロコシと比較して有意に増加していた (図 6, p28; 別添資料 6 の Figure 3, p21)。



10 図 6 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 4 つの生育段階における雌穂重 (g/個体)²⁹

15 本試験は 4 つの生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)) において実施し (4 反復)、各生育段階で本組換えトウモロコシ (R5F1 世代、遺伝的背景は LH244 × LH287) 及び対照の非組換えトウモロコシ (LH244 × LH287) の雌穂を 6 個ずつ採取した。雌穂重について、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った。
* 有意差あり ($p < 0.05$)。

20 以上の結果から、(A) 2012 年米国におけるほ場試験及び (B) 2013 年米国における温室試験のいずれにおいても、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重が増大することが確認された。

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

2) トウモロコシ内在性遺伝子の発現への影響

5 雌穂における *ATHB17*Δ113 蛋白質の発現がトウモロコシ内在性遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換え系統の雌穂における網羅的な遺伝子発現解析を、(A) 2012 年米国におけるほ場試験と (B) 2013 年米国における温室試験で採取された雌穂サンプルを用いて行った。

10 (A) 2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 4)

ATHB17 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (脚注 4, p16) 及び対照のトウモロコシの 16 葉期 (V16) の雌穂花序及び絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸・胚珠) における遺伝子の発現を、RNA シークエンス解析³⁰ により比較した³¹。RNA シークエンス解析では全ての mRNA を解析の対象とするため、網羅的に発現の変化を測定することができる (Roy et al., 2011)。

20 RNA シークエンス解析の結果、2 つの組換え系統に共通する発現の変化³²が見られた転写産物の数は、雌穂花序で 7 種、雌穂 (穂軸・胚珠) で 2 種であった (表 7, p30; 別添資料 4a) の Table 4~6, p14~15; 別添資料 4d) の Table 1 及び Table 2, p1~2)。本解析で検出された計 76,612 種の転写産物のうち、発現の変化が認められた転写産物の割合は約 0.01% であった。これら計 9 種の転写産物のアノテーション情報から、3 種類の機能的な特性が考えられた (表 8, p31)。

³⁰ RNA シークエンス解析は、遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、次世代シーケンサーを用いて全ての mRNA を解読する手法である。短い mRNA 配列のリードは参照となるゲノム配列や転写配列にマッピングされ、各転写産物にマッピングされたトランスクリプトーム及び配列のリード数が標準化された値として示される。このリード数は発現量を示している。

³¹ 2012 年米国におけるほ場試験では、組換え系統 1、組換え系統 2 及び対照のトウモロコシの各生育段階において 9 個体から雌穂花序または雌穂 (穂軸・胚珠) を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて 1 つのサンプルとした (3 biological replications)。導入遺伝子と最も関連がある転写の変化を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統において共通する遺伝子発現変化の同定を試みた。

³² RNA シークエンス解析では、組換え系統と対照のトウモロコシとの間で転写産物の転写量を比較するために、通常「2 倍以上の発現量の変化が見られ、且つ *fdr_p* 値が 0.05 未満である」という基準が用いられてきた (Illumina, 2011; Kim et al., 2013)。しかし、本実験においてはこの基準では統計学的に有意な差として検出できる発現量の変化が得られなかった。本実験の目的は、微小ではあっても、組換え系統と対照のトウモロコシとの間で、転写量に差のある転写産物を検出することであるため、基準を次の様に緩めた。まず、「2 倍以上の発現量の変化」という基準を破棄し、*p* 値の設定も *fdr_p* 値ではなく、より基準の緩い Raw-*p* 値を採用した。

表 7 対照のトウモロコシと比較して雌穂花序及び雌穂（穂軸・胚珠）における発現量に変化が見られた転写産物の数³³

	発現量に変化が見られた転写産物の数 ¹			
		組換え 系統 1 ²	組換え 系統 2 ²	両系統に共通 する変化 ³
雌穂花序	発現増加	4	15	1
	発現減少	7	9	6
雌穂（穂軸・胚珠）	発現増加	159	3	2
	発現減少	14	2	0

¹対照のトウモロコシと比較して有意差 (Raw-p<0.0001) が認められた転写産物の数。

- 5 ²供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドである。なお、この商業品種には、Bt 蛋白質（改変 Cry1Ab 蛋白質、改変 Cry2Ab 蛋白質、Cry1A.105 蛋白質及び改変 Cry3Bb1 蛋白質）及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。対照のトウモロコシには、
- 10 供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

³対照のトウモロコシと比較し、2つの組換え系統で共通して発現が変化していた転写産物の数を示した。

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

表 8 2012 年米国におけるほ場試験で発現が変化していた遺伝子の特性^{1,34}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合 及び転写	RNA 又は DNA 結 合蛋白質及び転写 因子	● RNA recognition motif containing protein (GRMZM2G008611 (-))
代謝	触媒活性を持つ蛋 白質又は高分子代 謝産物	● glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein (GRMZM2G059129 (+))
ストレス応答	防御応答、障害応答 及びストレス応答 に関与するもの	● heat shock protein (GRMZM2G007729 (-))
その他 ²	その他の機能を持 つもの	GRMZM2G051135 (-), GRMZM2G097135 (-), GRMZM5G841343 (-), GRMZM2G168222 (+)

¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

(+): 発現増加を示した GO カテゴリー

(-): 発現減少を示した遺伝子

5

10

³⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

(B) 2013 年米国における温室試験 (別添資料 7、別添資料 8、別添資料 9 及び別添資料 10)

5 温室で栽培した本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシについて、16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) の4つの生育段階においてRNA シークエンス解析により遺伝子の発現を解析した³⁵。その結果、本組換えトウモロコシにおいて有意な発現の変化を示した転写産物が 8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) において計 1,455 (発現増加が 699、発現減少が 756) 認められた (表 9, p32)。

10

表 9 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で有意な発現の変化が認められた転写産物の数^{1,36}

サンプル	生育段階	発現増加	発現減少
穂軸・胚珠	V16	56	41
	VT	87	36
	ER1	41	17
	LR1	207	482
苞葉・穂柄・絹糸	V16	66	88
	VT	150	23
	ER1	44	24
	LR1	48	45

¹ 対照の非組換えトウモロコシと比較して有意差 (2 倍以上の変化且つ Fdr_p-値が 0.05 未満) が認められた転写産物の数

15

³⁵ 2013 年米国における温室試験では、16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) の各生育段階において 12 個体から穂軸・胚珠と苞葉・穂柄・絹糸を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて 1 つのサンプルとした (4 biological replications)。RNA シークエンス解析では、8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) を行い、これらにおいて本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で 2 倍以上の変化が見られ、且つ Fdr_p-値が 0.05 未満であることを基準として、発現の増加又は減少が認められたもの (表 9, p28) を選抜した。

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

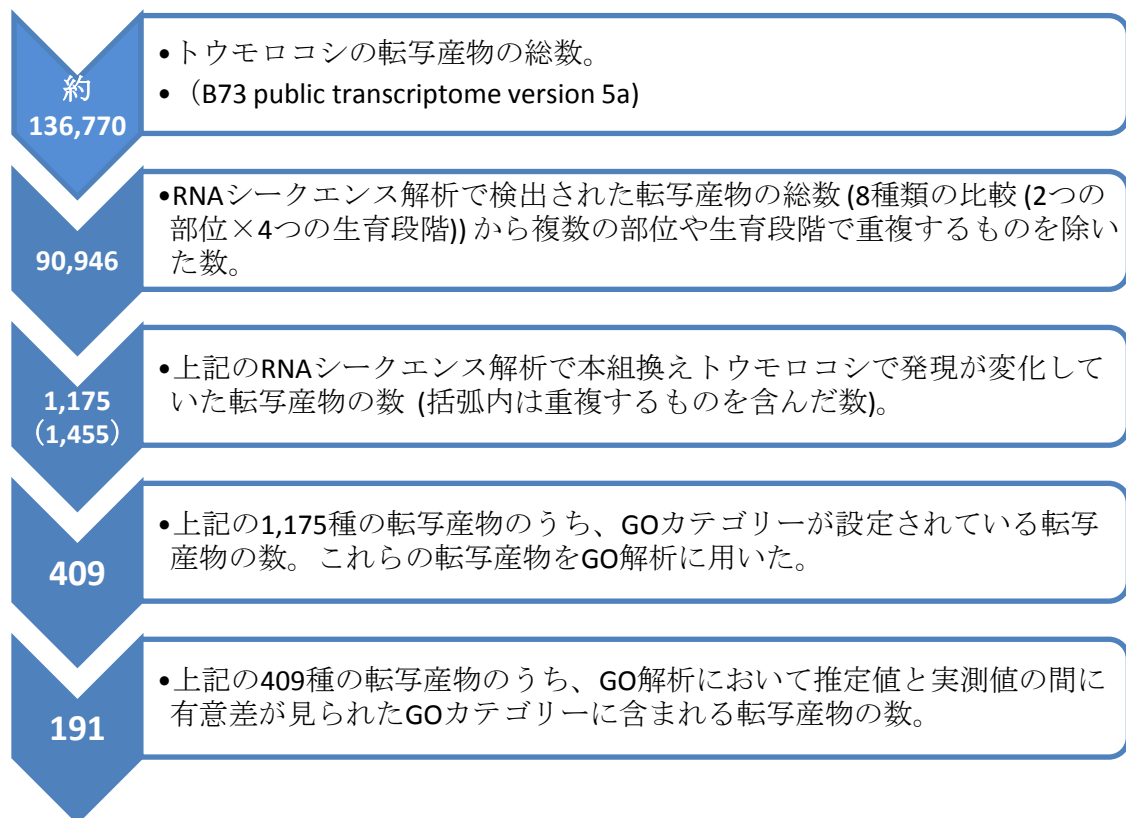


図 7 転写産物データの解析手順³⁷

5 RNA シークエンス解析から得られた遺伝子発現データの解析手順を図 7 (p33) に示した。RNA シークエンス解析における 8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) で有意な発現の変化を示した計 1,455 種の転写産物から、複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除いた結果、1,175 種の転写産物が得られた。本解析で検出された計 90,946 種の転写産物のうち、発現の変化が認められた転写産物の割合は約 1.3%であった。

10 この 1,175 種の転写産物について、遺伝子オントロジー (GO)³⁸ のカテゴリーを調べたところ、409 種の転写産物に GO のカテゴリーが設定されていた (別添資料 7 の Table 1~4, p4~44)。これら 409 種の転写産物には、発現が増加していたものが 174 種、発現が減少していたものが 241 種含まれており、異なる部位や生

³⁷ 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。

³⁸ 遺伝子オントロジー (GO) は、全真核生物に適用できる統一された語彙で遺伝子を定義したものであり、遺伝子の機能に関する情報を得るために使用される (Ashburner et al., 2000; Berardini et al., 2010)。3 つの種類 GO term (Cellular Component (細胞成分, CC)、Molecular Function (分子機能, MF) 及び Biological Process (生体内作用, BP)) を、本組換えトウモロコシにおいて発現が変化していた転写産物 (複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除いた 1,175 個) のカテゴリー分けに用いた。CC は細胞の部位や細部外環境、MF は遺伝子産物の分子レベルでの機能、BP は既知の分子事象群や作用を示すものである。

育段階において発現の増加と減少の両方が確認されたものが 6 種存在していた。なお、409 種の転写産物において、複数の GO のカテゴリーが設定された転写産物が多く見られた。発現が増加していた転写産物における代表的な GO のカテゴリー及びそのカテゴリーに該当する転写産物の数は、DNA binding (25 種)、zinc ion binding (24 種)、nucleic acid binding (19 種)、ATP binding (19 種) 及び nutrient reservoir activity (19 種) であった (図 8, p35)。また、発現が減少していた転写産物では、DNA binding (43 種)、ATP binding (39 種)、zinc ion binding (35 種) 及び binding (27 種) などが代表的な GO のカテゴリーであった (図 9, p36)。これらの遺伝子に付けられたアノテーション情報からは、本組換えトウモロコシで明らかな効果を示していると考えられる代謝経路は特定されなかった。

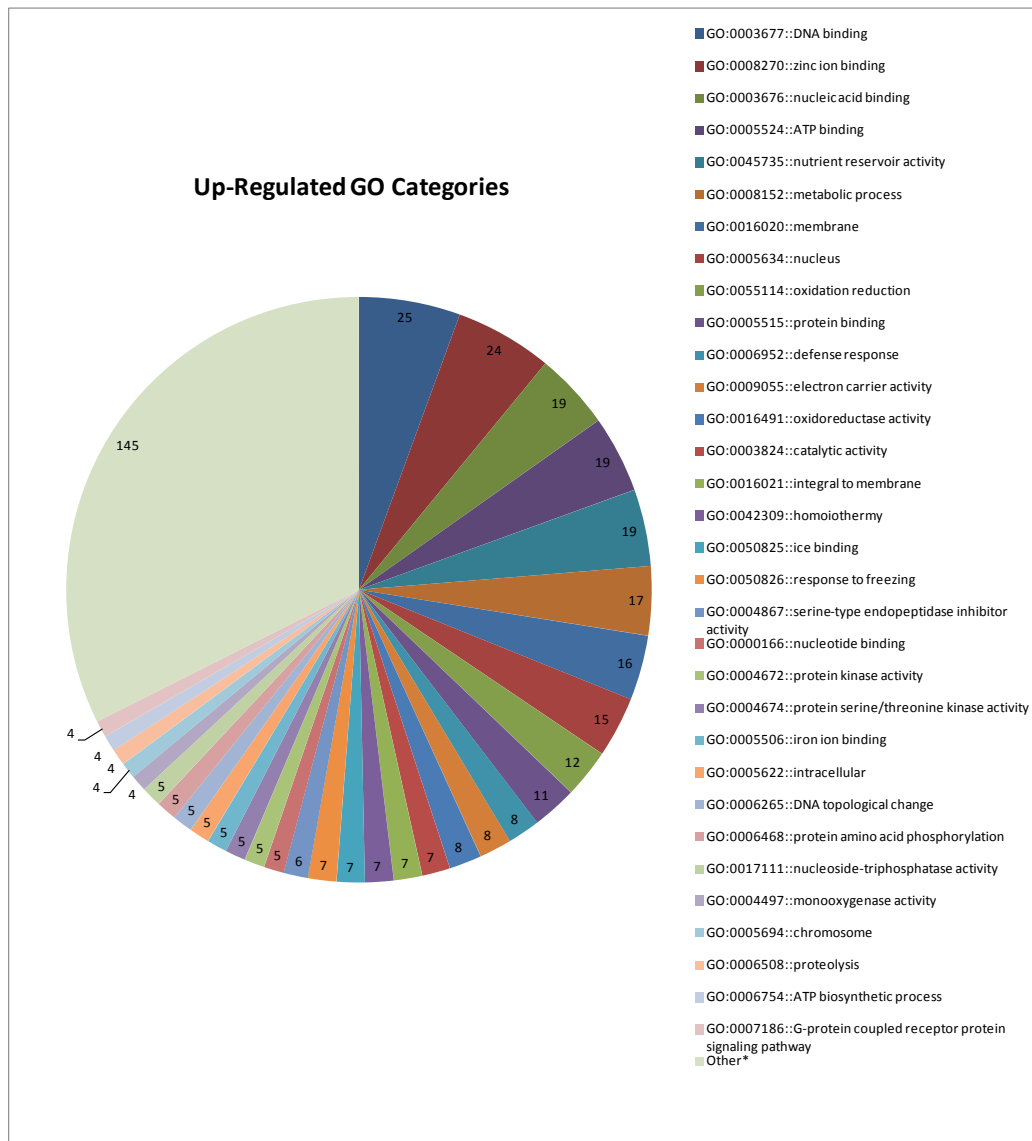


図 8 RNA シークエンス解析において発現が増加していた転写産物の GO カテゴリー³⁹

- 5 統計学的に有意な発現増加が見られた転写産物のうち、複数の生育段階や部位で重複の無い 454 種の GO カテゴリーを *agriGO* (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) を元に調査した。このうち、174 種には 1 つ以上の GO カテゴリーが設定されており、これらの GO カテゴリーの分布を上図に示した。円グラフ中にある数字は、各 GO カテゴリーに属する転写産物の数を示している。3 種以下の転写産物が属する GO カテゴリーはその他として示した。本グラフに含まれている全遺伝子のリストは
- 10 別添資料 7 の Table 5 (p46~49) に記載されている。

³⁹ 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。

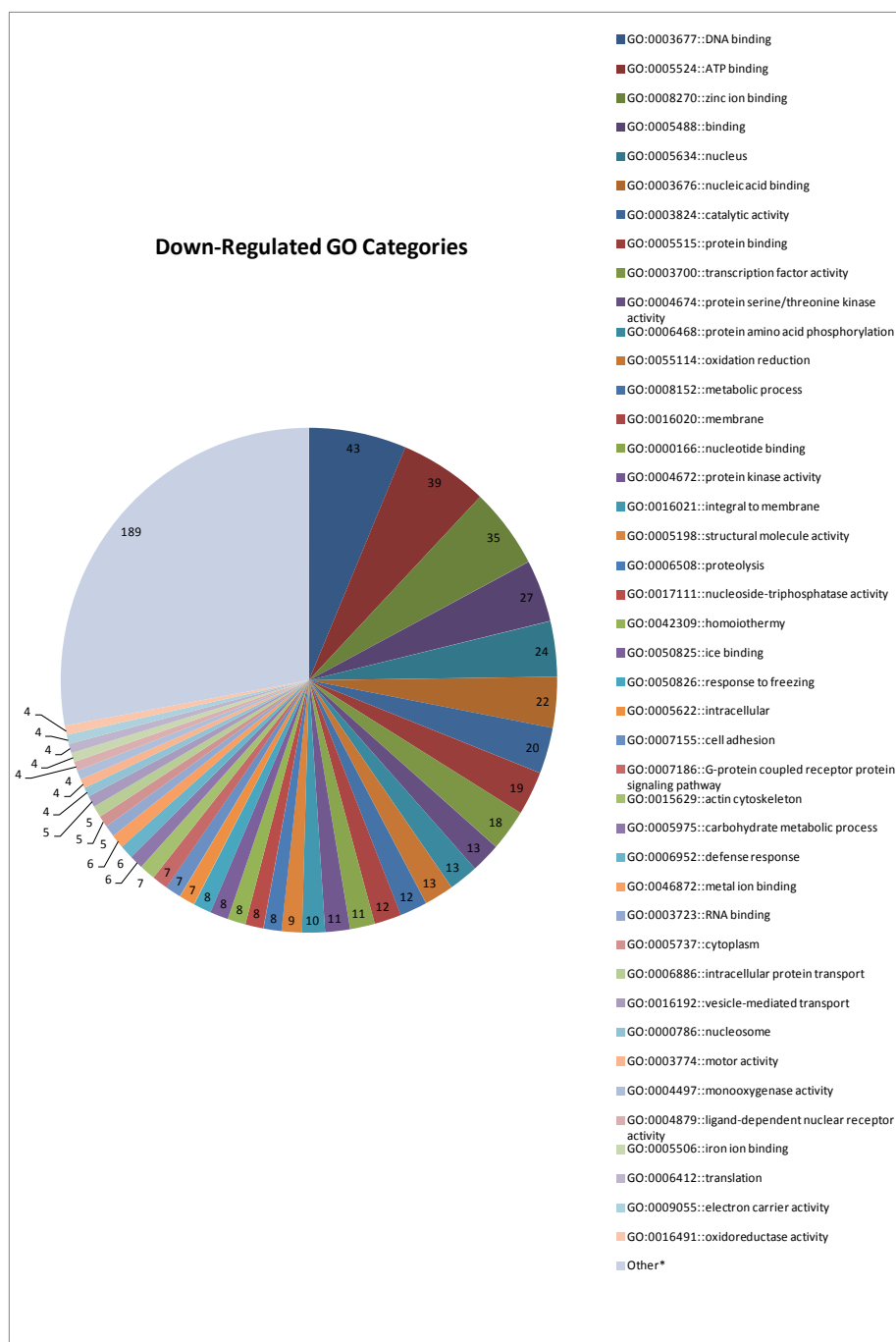


図 9 RNA シークエンス解析において発現が減少していた転写産物の GO カテゴリー⁴⁰

5

統計学的に有意な発現減少が見られた転写産物のうち、複数の生育段階や部位で重複の無い 721 種の GO カテゴリーを agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) を元に調査した。このうち、241 種には 1 つ以上の GO カテゴリーが設定されており、これらの GO カテゴリーの分布を上図に示した。円グラフ中にある数字は、各 GO カテゴリーに属する転写産物の数を示している。3 種以下の転写産物が属する GO カテゴリーはその他として示した。本グラフに含まれている全遺伝子のリストは別添資料 7 の Table 6 (p51~55) に記載されている。

⁴⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

5 図 8 (p35) 及び図 9 (p36) において認められた GO カテゴリーは、トウモロコシゲノム中に比較的多く存在する GO カテゴリーが反映されたものであるか、又は本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の影響を示していると考えられる。そこで、ATHB17Δ113 蛋白質の発現の影響を受けている可能性が高い GO カテゴリーを調べるために、GO 解析⁴¹を行なった。GO 解析は、特定の遺伝子により制御される遺伝子群を推定するために用いられる手法である。本解析では、GO 解析の先行事例 (Paschall et al., 2004) に倣い、 $p < 0.001$ を基準とした。

10 GO 解析の結果、RNA シークエンス解析で発現変化が認められた遺伝子のリストにおいて、本組換えトウモロコシの雌穂で統計学的に有意 ($p < 0.001$) に出現頻度の高い GO カテゴリーがいくつか認められた (表 10, p38~38; 別添資料 8 の Table 2, p15)。これらの GO カテゴリーの情報から、6 種類の機能的な特性が考えられた (表 11, p39)。また、GO 解析において本組換えトウモロコシの雌穂
15 で有意に出現頻度が高かった GO カテゴリーに着目し、これらの GO カテゴリーに属する計 191 種の転写産物の機能を、表 12 (p40~42) 及び別添資料 9 の Table 1, p4~10 及び Table 2, p11~22 に示した。

⁴¹ 一般的に、GO 解析では、ある特定の遺伝子リスト (例えば、発現が変化している遺伝子のリスト) における同じ機能を持つ遺伝子群の割合と、それらの全ゲノム中での割合を統計学的に比較することで、ある特定の遺伝子リストの中で有意に出現頻度が高い遺伝子群を見出すことができる。この情報をもとに、どのような生物学的プロセスにより遺伝子発現変動が起こっているかという仮説を構築することができる (Martin et al., 2004)。GO 解析は、大規模な遺伝子発現データを解釈するために用いられる代表的な手法である。GO 解析には、RNA シークエンス解析における 8 種類の比較 (2つの部位×4つの生育段階) で発現が増加及び減少している転写産物のリストをひとつにまとめたものを供試した。その理由は、1) ATHB17Δ113 蛋白質の発現により影響を受ける一次的な遺伝子発現の変化だけでなく、その結果として生じる二次的な遺伝子発現の変化も合わせて解析対象とする必要があること、及び 2) ATHB17Δ113 蛋白質の発現に起因する遺伝子発現の変化はわずかなものであるため、個々の部位と生育段階では GO 解析に十分な数の遺伝子が同定されなかったこと、の 2 点が挙げられる。

表 10 本組換えトウモロコシの雌穂¹において発現が変動している遺伝子の GO 解析の結果⁴²

	GO_ID	GO カテゴリー	Total Genomic Count ²	RNA-seq Experimental Count ³	Expected Experimental Count (calculated) ⁴	p-値 ⁵
発現増加	GO_MF:GO:0045735	nutrient reservoir activity	120	19	0.5	3.48E-24
	GO_MF:GO:0004867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	90	6	0.4	2.96E-06
	GO_BP:GO:0006952	defense response	236	8	1.0	1.06E-05
	GO_BP:GO:0006265	DNA topological change	84	5	0.4	3.51E-05
	GO_BP:GO:0006270	DNA replication initiation	22	3	0.1	1.10E-04
	GO_BP:GO:0008152	metabolic process	1541	17	6.7	5.00E-04
	GO_BP:GO:0009611	response to wounding	39	3	0.2	6.60E-04
	GO_MF:GO:0003676	nucleic acid binding	1915	19	8.3	8.60E-04
発現減少	GO_MF:GO:0004630	phospholipase D activity	11	2	0.0	1.00E-03
	GO_MF:GO:0005488	binding	782	27	5.4	1.60E-11
	GO_MF:GO:0004559	alpha-mannosidase activity	7	3	0.0	1.12E-05
	GO_MF:GO:0003677	DNA binding	3062	43	21.1	1.25E-05
	GO_MF:GO:0003700	transcription factor activity	964	18	6.6	1.60E-04
	GO_MF:GO:0003774	motor activity	44	4	0.3	2.40E-04
	GO_CC:GO:0015629	actin cytoskeleton	181	7	1.2	2.80E-04
GO_MF:GO:0008270	zinc ion binding	2868	35	19.8	1.00E-03	

¹ 穂軸・胚珠及び苞葉・穂柄・絹糸を対象とした。

² 全ゲノム中に存在する該当 GO ID を持つ遺伝子数

³ 本組換えトウモロコシの雌穂において発現変動が見られた遺伝子数

5 ⁴ Total Genomic Count を基に、RNA シークエンス解析によって同定されると予想された遺伝子数

10 ⁵ それぞれの GO カテゴリーにおいて発現が変化すると予想される遺伝子数を、RNA シークエンス解析において実際に発現が変化していた遺伝子数と統計学的に比較するために、Fisher's Exact Test により統計処理を行なった (p < 0.001 を有意と判定した)。Fisher's Exact Test における超幾何分布は、 K 個の成功状態をもつ M 個の要素よりなる母集団から n 個の要素を非復元抽出したときに x 個の成功状態が含まれている確率を与える分布である。例えば、本試験における nutrient reservoir activity の GO カテゴリーでは、トウモロコシのゲノム情報をもとに、全遺伝子の数 (104,584) を M 、このうち nutrient reservoir activity の GO カテゴリーに属する遺伝子の数 (120) を K とした。さらに、RNA シークエンス解析において有意に発現が増加していた転写産物の数 (454) を n 、このうち nutrient reservoir activity の GO カテゴリーに属する遺伝子の数 (19) を x とし、Fisher's Exact Test により統計処理を行った。

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

表 11 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が有意に変化していた GO カテゴリーの特性^{1,43}

特性		GO カテゴリー
核酸への結合及び転写	RNA 又は DNA 結合蛋白質及び転写因子	Nucleic acid binding (+), DNA binding (-), transcription factor activity (-)
栄養素の貯蔵	発育種子中での栄養素の貯蔵に関与するもの	nutrient reservoir activity (+)
細胞分裂及び細胞分化	DNA 複製及び細胞分裂、細胞分化に関与するもの	DNA replication initiation (+), DNA topological change (+)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	serine-type endopeptidase inhibitor activity (+), metabolic process (+), phospholipase D activity (+), alpha-mannosidase activity (-)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	defense response (+), response to wounding (+)
細胞質運動及び細胞構造	細胞骨格の組織化及び原形質を通る高分子又は細胞小器官の移動に関与するもの	actin cytoskeleton (-), motor activity (-)
その他 ²	上記の分類に属さないもの	binding (-), zinc ion binding (-)

¹ データベース (AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>)) の情報をもとに機能の分類を行った。

5 ² その他の分類には、機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった GO カテゴリーを記載した。

(+): 発現増加を示した GO カテゴリー

(-): 発現減少を示した GO カテゴリー

⁴³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 12 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト⁴⁴

	GO Description	機能	遺伝子数
発現増加	nutrient reservoir activity	Zein seed storage protein	15
		Protease inhibitor	2
		Cupin/glutelin	1
	serin-type endopeptidase inhibitor activity	Potato inhibitor I family	3
		BBTI13 -Bowman- Birk type bran trypsin inhibitor precursor	2
		Protease inhibitor	1
	defense response	S locus-related glycoprotein 1 binding pollen coat protein	4
		Gamma-thionin family protein	2
		Pathogenesis-related protein	1
	DNA topological change	DNA gyrase/topoisomerase IV	1
		Retrotransposon protein	1
	DNA replication initiation	MCM2/3/5 family	3
	metabolic process	UDP-glucuronosyl/and UDP-glucosyl transferase 2	3
		Phospholipase D	3
		Trehalose-phosphate	1
		Flavin monooxygenase	1
		No apical meristem protein	1
		Terpene synthase	1
		Short chain dehydrogenase	1
		Aldehyde dehydrogenase	1
Glutathione S-transferase		1	
Acyltransferase		1	
response to wounding	Potato inhibitor I	3	

⁴⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 12 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト (続き)

	GO Description	機能	遺伝子数
発現増加	nucleic acid binding	Piwi domain containing protein	1
		Replication protein A C terminal	1
		RNA recognition motif	1
	phospholipase D activity	Phospholipase D	2
発現減少	binding	HEAT repeat family protein	5
		Clathrin heavy chain	1
		Phosphatidylinositol 3- and 4- kinase family protein	1
		U-box domain containing protein	1
		Translational activator family protein	1
		Phosphatidylinositol kinase	1
		RST1	1
		Guanine nucleotide exchange family protein	1
	alpha-mannosidase activity	Alpha mannosidase	1
	DNA binding	AP2 transcription factor	6
		KNOTTED-like homeodomain protein	6
		Dof zinc finger domain containing protein	2
		MYB transcription factor	2
		ARID-transcription factor	2
		Heat shock protein DnaJ	1
		Plus-3 domain containing protein	1
		ulp1 protease family	1
		RNA polymerase, Rpb1	1
		NAC transcription factor	1
		RNA dependent RNA polymerase	1
		PWWP domain containing protein	1
		RST1	1
		Type III restriction enzyme	1

表 12 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト (続き)

	GO Description	機能	遺伝子数
発現減少	transcription factor activity	AP2 transcription factor	6
		KNOTTED-like homeodomain protein	5
		WRKY	3
		bZIP transcription factor	2
		C2C2-GATA-transcription factor	1
	motor activity	Myosin head family protein	4
	actin cytoskeleton	LSD1 subclass family protein	1
		Plant thionin family protein precursor	1
		Vta 1 like	1
	zinc ion binding	Plus-3 domain containing protein	1
		Zinc finger	6
		Alpha mannosidase	1
		C2C2-Dof-transcription factor	1
		SNF2 family N-terminal domain	1
		Protein phosphatase 2C	1
		ATPase family associated with various cellular activities (AAA)	1
		C2C2-GATA-transcription factor	1
		Retrotransposon protein	1
	ARID-transcription factor	1	

一般的に植物の表現型が変化している場合は、内在性遺伝子は遺伝子群として変化している可能性が高い。上述した GO 解析は、このように高い頻度で変化している遺伝子群を見出すことが出来る。

5 一方で、遺伝子群としてではなく、個別の遺伝子の発現が大きく変わることにより、表現型が変化することも考えられる。そこで、このような遺伝子を調べるため、本組換えトウモロコシで発現が変化した 1,175 種の転写産物のうち、より大きな発現変化を示した上位 20 種の転写産物のアノテーション情報を、発現増加と発現減少のそれぞれについて調べた (別添資料 10 の Table 1 及び Table 2, p4~6)。これらの転写産物のアノテーション情報から、3 種類の機能的な特性
10 が考えられた (表 13, p44)。

さらに、本組換えトウモロコシにおいて有意に発現が変化していた 1,175 種の転写産物のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列 (p20) を有するものがあるかどうか調査した (別添資料 10 の Table 5 及び
15 Table 6, p8~11)。その結果、40 種の転写産物が当該コンセンサス配列を持つと考えられた。これらのうち、表 14 (p45) の 21 種の転写産物において確認されたアノテーション情報から、4 種類の機能的な特性が考えられた (表 14, p45)。

20

表 13 本組換えトウモロコシで有意な発現の増加及び減少を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種の遺伝子のアノテーション情報の特性^{1, 45}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合及び転写	RNA又はDNA結合蛋白質及び転写因子	● Transcription factor (社外秘につき非開示)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	● Response to abiotic stimulus (社外秘につき非開示)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	● Mitochondrial carrier protein (社外秘につき非開示) ● Tetratricopeptide repeat containing protein (社外秘につき非開示)
その他 ²	その他の機能を持つもの	社外秘につき非開示

- 5 ¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。
- 10 ² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。
(+): 発現増加を示した遺伝子
(-): 発現減少を示した遺伝子

⁴⁵ 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 14 本組換えトウモロコシで有意な発現変化を示した遺伝子のうち、プロモーター領域に HD-Zip II が認識するコンセンサス配列を有する遺伝子のアノテーション情報の特性^{1, 46}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合及び転写	RNA又はDNA結合蛋白質及び転写因子	● Transcription factor (社外秘につき非開示)
細胞分裂及び細胞分化	DNA複製及び細胞分裂、細胞分化に関与するもの	● Cell cycle (社外秘につき非開示) ● Core histone H2A/H2B/H3/H4 (社外秘につき非開示)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	● Response to stress (社外秘につき非開示)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	● Lipid metabolic process (社外秘につき非開示) ● Protein metabolic process (社外秘につき非開示) ● Carbohydrate metabolic process (社外秘につき非開示) ● Mitochondrial 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein (社外秘につき非開示)
その他 ²	その他の機能を持つもの	社外秘につき非開示

¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

(+): 発現増加を示した遺伝子

(-): 発現減少を示した遺伝子

(+/-): 発現増加と発現減少の両方が認められた遺伝子

⁴⁶ 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。

以上の 2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験で得られた遺伝子発現解析の結果 (表 8, p31、表 11, p39、表 13, p44 及び表 14, p45) から、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現が変化した内在性遺伝子の機能グループが少なくとも 6 種類存在することが明らかになった (図 10, p49)。

5

(C) 2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験のデータを用いたバイオインフォマティクスの再解析 (別添資料 11)

10 上述した RNA シークエンス解析のデータを用いたバイオインフォマティクス解析は、本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験の申請時⁴⁷ に提出したものであるため、その後、その後にトウモロコシの転写産物データベース (B73 public transcriptome) に新たな情報が登録され、それが当該 RNA シークエンス解析において発現変化した転写産物に該当することが考えられた。また、当該 RNA シークエンス解析において発現変化した転写産物の機能情報が更新されることも考えられた。そこで、(A) 2012 年米国におけるほ場試験、及び (B) 2013 年米国における温室試験で採取されたサンプルを用いて実施した RNA シークエンス解析のデータについて、最新のトウモロコシの転写産物データベース (B73 public transcriptome version 6a) 及び遺伝子アノテーション情報 (Rice genome annotation project, The Rice Annotation Project Database, The Arabidopsis Information Resource, 20 Maize Genetics and Genomics Database) を用いたバイオインフォマティクス解析を実施し、発現量に変化が見られた転写産物の機能情報を調べた (別添資料 12)。なお、このバイオインフォマティクス解析では、RNA シークエンス解析の結果を用いて転写産物量を評価するソフトウェアについても変更した⁴⁸。

25 再解析の結果、有意な発現量の変化⁴⁹ が認められた転写産物は、2012 年米国におけるほ場試験データで 13 種、2013 年米国における温室試験データで 69 種⁵⁰であった。

⁴⁷ 2012 年米国におけるほ場試験のデータについては 2013 年、2013 年米国における温室試験のデータについては 2014 年にバイオインフォマティクス解析を実施した。

⁴⁸ 隔離ほ場試験の申請時のバイオインフォマティクス解析 (脚注 47 を参照) に使用したソフトウェアでは、RNA シークエンス解析で検出された転写産物の配列 (リード) が転写産物データベース上の複数の遺伝子に共通して一致した場合に、それら複数の遺伝子にリード数を均等に割り当てる方式で発現量を算出していた。これに対して、バイオインフォマティクスの再解析に用いた新しいソフトウェア (RNA-star (v2.3.0), HTSeq-Count (v2.7.6), EdgeR Bioconductor package (v3.6.2)) では、転写産物データベース上の複数種の遺伝子と一致する転写産物の配列は解析対象から除外し、データベースの単一の遺伝子と一致する配列のみを対象として転写産物の発現量を評価する方式が採用されている。

⁴⁹ 2012 年米国におけるほ場試験の再解析では、2 つの組換え系統で共通して有意な発現の変化 (Fdr_p-値が 0.05 未満) が認められた遺伝子を選抜した。また、2013 年米国における温室試験では、RNA シークエンス解析における 8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) のいずれかで、対照の非組換えトウモロコシと比較して 2 倍以上の変化が見られ、且つ Fdr_p-値が 0.05 未満であることを基準として選抜した。

⁵⁰ 複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除くことで得られた転写産物の種類。

2012 年米国におけるほ場試験データで有意な発現量の変化 (脚注 49, p46) が認められた転写産物は 13 種であり、前回 (2013 年⁴⁷⁾) の解析で得られた 9 種よりも多かった。2013 年米国における温室試験データでは、有意な発現量の変化 (脚注 49, p46) を示した転写産物として 112 種が再解析において認められ、このうち複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除いて得られた 69 種は、前回 (2014 年⁴⁷⁾) の解析で得られた 1,175 種よりも少なかった。以上のように発現量の変化が認められた転写産物数が以前の解析と再解析との間で異なっていた主な理由として、トウモロコシの転写産物データベースの更新に伴ってデータベース中の重複する転写産物が除外されることで転写産物データベースの登録数が半減⁵¹したことや、転写産物量を算出するソフトウェアを変更した (脚注 48, p46) ことが挙げられる。

2012 年米国におけるほ場試験データの再解析で同定された 13 種の転写産物のうち、前回 (2013 年⁴⁷⁾) の解析では同定されず、再解析により新たに同定された転写産物は、9 種存在した (別添資料 11 の Table 1, p1)。また、2013 年米国における温室試験データの再解析によって同定された 69 種の転写産物のうち、前回 (2014 年⁴⁷⁾) の解析では同定されず、再解析により新たに同定された転写産物は、29 種 (発現増加: 20 遺伝子、発現減少: 9 遺伝子) 存在した (別添資料 11 の Table 2 及び Table 3, p2~4)。これらの新たに同定された遺伝子 (計 38 種) が属する機能グループは、「核酸への結合及び転写」、「代謝」、「ストレス応答」及び「その他」のいずれかであり (表 15, p48)、これらの機能グループは、前回 (2014 年 11 月時点) の解析で明らかになった、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現が変化した内在性遺伝子の機能グループ 6 種類に含まれる (図 10, p49)。

以上のことから、最新の転写産物データベース及び遺伝子アノテーション情報を用いたバイオインフォマティクス再解析の結果として、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現が変化したと考えられる内在性遺伝子が新たに 38 種同定されたが、これらの遺伝子の属する機能グループは、前回の解析により同定されたものと変わるものではなかった。

30

⁵¹ 隔離ほ場試験の申請時の転写産物データベース (B73 public transcriptome version 5a) における登録数は 136,770 種類、再解析で用いたデータベース (B73 public transcriptome version 6a) における登録数は 63,268 種類である。

表 15 2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験データの再解析で新たに同定された遺伝子の特性^{1, 52}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合及び転写	RNA又はDNA結合蛋白質及び転写因子	<ul style="list-style-type: none"> ● Transcription factor (社外秘につき非開示) ● DNA/RNA binding (社外秘につき非開示)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	<ul style="list-style-type: none"> ● Carbohydrate metabolism (社外秘につき非開示,) ● Protein metabolism (社外秘につき非開示) ● Transport (社外秘につき非開示) ● Oxidoreductase (社外秘につき非開示) ● Receptor (社外秘につき非開示)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	<ul style="list-style-type: none"> ● Stress response (社外秘につき非開示)
その他 ²	その他の機能を持つもの	社外秘につき非開示

¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

(+): 発現増加を示した遺伝子
 (-): 発現減少を示した遺伝子

⁵² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

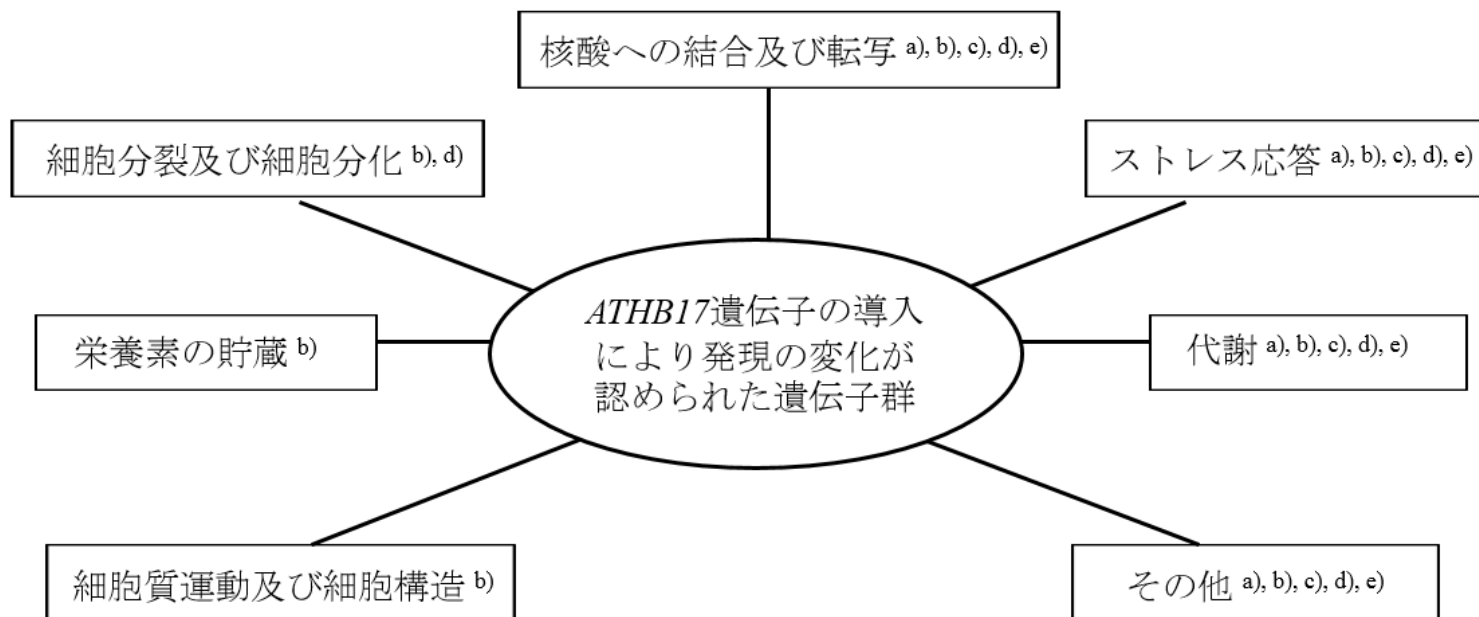


図 10 2012 年及び 2013 年の遺伝子発現解析において、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現の変化が認められた内在性遺伝子の機能グループ⁵³

- 5 a) 2012 年米国におけるほ場試験の RNA シークエンス解析で *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統に共通する遺伝子発現の変化から得られた情報
- b) 2013 年米国における温室試験の GO 解析において出現頻度が有意に変化していた GO カテゴリーから得られた情報
- c) 2013 年米国における温室試験の RNA シークエンス解析で発現が変化した転写産物のうち、より大きな発現変化を示した上位 20 種の転写産物から得られた情報
- 10 d) 2013 年米国における温室試験の RNA シークエンス解析で発現が変化した転写産物のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列を有する遺伝子から得られた情報
- e) 2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験の RNA シークエンス解析結果について、バイオインフォマティクスの再解析をすることによって新たに認められた転写産物から得られた情報
- ※RNA シークエンス解析において発現が変化していた転写産物のうち、アノテーションを持つものを用いて機能グループの分類を行った。

⁵³ 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) トウモロコシ内在性の代謝系への影響 (別添資料 13、別添資料 14 及び別添資料 15)

ATHB17Δ113 蛋白質の発現がトウモロコシの代謝に与える影響を調べるため、トウモロコシの雌穂重の増大に影響する可能性がある主要な代謝産物として、ソースとして利用される炭水化物 (スクロース、グルコース、フルクトース及びデンプン)、主要な窒素源であるアミノ酸⁵⁴及び生長に關与する植物ホルモン⁵⁵を分析した。本分析には、2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験から得られた雌穂を供試した。

(A)2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 13)

ATHB17 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (脚注 4, p16) 及びこれらと同様の遺伝的背景をもつトウモロコシ品種の絹糸抽出期 (R1) における雌穂 (穂軸・胚珠) を用いて代謝解析を行った⁵⁶。

代謝解析の結果、2 項目 (遊離アミノ酸におけるグルタミンの減少及び植物ホルモンにおけるインドール-3-酢酸-アセチルアスパラギン酸 (IAA-Asp) の減少) において 2 つの組換え系統で共通した含有量の変化が観察された (別添資料 13 の Table 1, p16)。

グルタミンの含有量については、2 つの組換え系統において有意な減少 (それぞれ約 16% 及び約 13% の減少) が認められた。しかしながら、発達中の雌穂 (穂軸・胚珠) においてグルタミンを前駆体とする他の主要なアミノ酸 (アスパラギ

⁵⁴ 遊離アミノ酸 (アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン及びバリン) を分析した。

⁵⁵ 以下の 30 種の植物ホルモンを分析した。

アブシジン酸 (ABA)、アブシジン酸グルコースエステル (ABA-GE)、7'-水酸化-アブシジン酸 (7'OH-ABA)、ジヒドロファゼイン酸 (DPA)、ファゼイン酸 (PA)、ジベレリン A1 (GA1)、ジベレリン A3 (GA3)、ジベレリン A4 (GA4)、ジベレリン A8 (GA8)、ジベレリン A9 (GA9)、ジベレリン A12 (GA12)、ジベレリン A20 (GA20)、ジベレリン A34 (GA34)、ジベレリン A53 (GA53)、インドール-3-酢酸 (IAA)、インドール-3-アセチルアラニン (IAA-Ala)、インドール-3-アセチルアスパラギン酸 (IAA-Asp)、インドール-3-アセチルイソロイシン (IAA-Ile)、インドール-3-酢酸メチルエステル (IAA-Me)、インドール-3-アセチルバリン (IAA-Val)、トランス-ゼアチン (tZ)、トランス-ゼアチンリボシド (tZR)、トランス-ゼアチン-9-グルコシド (ZG)、ジヒドロゼアチン (DHZ)、ジヒドロゼアチンリボシド (DHZR)、イソペンテルアデニン (iP)、イソペンテルアデノシン (iPR)、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA) 及びジャスモン酸メチルエステル (MeJA)

⁵⁶ この解析では組換え系統 1、組換え系統 2 及び対照のトウモロコシのそれぞれ 18 個体から雌穂 (穂軸・胚珠) を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて 1 つのサンプルとした (6 biological replications)。本解析では、2 つの組換え系統において共通して含有量に変化している代謝産物を調べることで、ATHB17 遺伝子の影響を受ける代謝産物を考察した。

ン、アスパラギン酸及びグルタミン酸) (Seebauer et al., 2004) に有意な変化は見られなかった。

5 また、IAA-Aspの含有量についても、2つの組換え系統において有意な減少(それぞれ約33%及び約36%の減少)が認められた。しかし、活性型オーキシンであるIAAを含む他の植物ホルモンにおいて、統計学的な有意差は認められなかった。IAA-AspはIAAから生成する代謝産物であり、生育を調節する因子としての活性を有しないことが示されている(Östin et al., 1998)ことから、オーキシン含有量に影響を与えるものではないと考えられる。

10

(B) 2013年米国における温室試験(別添資料14及び別添資料15)

15 温室で栽培した本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシについて、16葉期(V16)、雄穂抽出期(VT)、絹糸抽出期初期(ER1)及び絹糸抽出期後期(LR1)の4つの生育段階において代謝解析を実施した⁵⁷。分析対象は、(A) 2012年米国におけるほ場試験で分析した代謝産物(炭水化物(スクロース、グルコース、フルクトース及びデンプン)、遊離アミノ酸(脚注54、p50)及び植物ホルモン(脚注55、p50))に加えて、全炭素及び全窒素の割合(%)についても調べた。

20 代謝解析の結果、各生育段階及び部位における代謝産物に関して、いくつかの成分で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。しかし、全生育段階で一貫した変化を示す成分や、ある生育段階において両方の部位で一貫した変化を示す成分は認められなかった。各生育段階及び部位において含有量が有意($p < 0.05$)に変化した項目を表16
25 (p52)及び別添資料14のTable 5(p17)に示し、それらの項目について以下に述べる。

⁵⁷ 各生育段階において24個体から穂軸・胚珠と苞葉・穂柄・絹糸を採取し、6個体から得られた組織をまとめて1つのサンプルとした(4 biological replications)。

表 16 各生育段階及び部位において含有量が有意 ($p < 0.05$) に変化した項目の数⁵⁸

成分 (分析項目数)	穂軸・胚珠				苞葉・穂柄・絹糸			
	V16	VT	ER1	LR1	V16	VT	ER1	LR1
遊離アミノ酸 (17)		12				6	2	3
炭水化物 (4)		1	1			1		
植物ホルモン (27)	3	1	4	1	2	1	3	7
全炭素及び全窒素の割合 (%) (2)								

5 ① 遊離アミノ酸

各生育段階の各部位において、のべ 23 項目の遊離アミノ酸に統計学的な有意差が認められた。このうち、苞葉・穂柄・絹糸の雄穂抽出期 (VT) におけるグリシン以外の全ての項目は、有意に減少していた。また、統計学的な有意差が認められた 23 項目中、18 項目が雄穂抽出期 (VT) において変化していた (表 17, p54~55; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

② 炭水化物

穂軸・胚珠の雄穂抽出期 (VT) 及び絹糸抽出期初期 (ER1)、並びに苞葉・穂柄・絹糸の雄穂抽出期 (VT) において、デンプンが有意に増加していた。デンプンは雌穂における貯蔵型の炭水化物であり (Zinselmeier et al., 1999)、雌穂の成長に利用される基質であることが知られているため、デンプンの変化と雌穂重の増大が関連していることが考えられた (表 17, p54~55; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

③ 植物ホルモン

植物ホルモンとして、サイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリン、オーキシン及びジャスモン酸及びサリチル酸を分析した。

サイトカイニン (tZ、tZR、ZG、DHZ、DHZR、iP 及び iPR) において、のべ 10 項目に有意な変化が認められた。これらには、活性型及び不活性型のサイトカイニンが含まれていた (表 17, p54~55; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

アブシジン酸 (ABA、ABA-GE、7'OH-ABA、DPA 及び PA) において、のべ 4 項目に有意な変化が認められた。このうち、3 項目は苞葉・穂柄・絹糸の雄穂抽出期 (VT) 及び絹糸抽出期 (ER1 及び LR1) において認められた (表 17, p54~55;

⁵⁸ 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

別添資料 15 の Table 1, p5)。

5 ジベレリン (GA1、GA3、GA4、GA8、GA9、GA12、GA20、GA34 及び GA53) において、のべ 5 項目に有意な変化が認められた。これらの変化を示した 5 項目には、活性型、不活性型又は合成段階での中間型のジベレリンが含まれる。(表 17, p54~55; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

10 オーキシシン (IAA、IAA-Asp 及び IAA-Me) において、のべ 2 項目に有意な変化が認められた。これらの変化は穂軸・胚珠の絹糸抽出期初期 (ER1) の IAA-Asp 及び絹糸抽出期後期 (LR1) の IAA-Me についてのみ認められたものであり、穂軸・胚珠における他の生育段階及び苞葉・穂柄・絹糸における全ての生育段階において有意差は認められなかった (表 17, p54; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

15 ジャスモン酸及びサリチル酸において、16 葉期 (V16) の穂軸・胚珠において 1 項目 (サリチル酸) が有意に変化していた。しかし、それ以外の生育段階や部位でサリチル酸は変化していなかった (表 17, p54; 別添資料 15 の Table 1, p5)。

20 解析した植物ホルモンのうち、比較的大きな含有量の変化が認められたものとして、絹糸抽出期後期 (LR1) における穂軸・胚珠での IAA-Me の減少が挙げられる。IAA-Me の含有量は対照の非組換えトウモロコシで 113.16 pmol/g であるのに対し、本組換えトウモロコシでは 7.44 pmol/g と 93%減少していた。IAA-Me は不活性型のオーキシシンであり (Li et al., 2008)、活性型のオーキシシンである IAA に転換される。しかし、絹糸抽出期後期 (LR1) の穂軸・胚珠における IAA の含有量は、対照の非組換えトウモロコシで 16.61 pmol/g、本組換えトウモロコシで 8.16 pmol/g であり、両者の間に統計学的な有意差は認められなかった。したがって、本組換えトウモロコシの絹糸抽出期後期 (LR1) における穂軸・胚珠で認められた IAA-Me の減少は、活性型オーキシシンである IAA の含有量に有意な変化をもたらすものではないと考えられた。

30 なお、本組換えトウモロコシで IAA-Me の含有量が減少していたにもかかわらず IAA の含有量が有意に変化していなかったことの原因として、トウモロコシにおける IAA の産生には IAA-Me とは独立した代謝経路であるトリプトファン経路が優先的に働いている (Kriechbaumer et al., 2006) ことが挙げられる。絹糸抽出期後期 (LR1) の穂軸・胚珠におけるトリプトファンの含有量では、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的な有意差は認められなかった (表 17, p54~55)。さらに、IAA の不活性型の分解産物である IAA-Asp においても、絹糸抽出期後期 (LR1) の穂軸・胚珠において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的な有意差は認められなかった (表 17, p54~55)。

表 17 雌穂において複数の生育段階で統計学的に有意な変化が認められた項目⁵⁹

サンプル	成分	生育段階	平均値		差異 (%)	P-値	
			本組換え	対照品種			
			トウモロコシ				
穂軸・胚珠	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Ala	VT	4789.46	5415.44	-11.56	0.001
		Arg	VT	1224.88	1432.38	-14.49	0.011
		Asp	VT	1807.28	2081.01	-13.15	0.011
		Gly	VT	284.97	316.49	-9.96	0.041
		Ile	VT	533.09	584.73	-8.83	0.002
		Leu	VT	630.82	673.33	-6.31	0.021
		Phe	VT	429.88	514.29	-16.41	0.001
		Ser	VT	3365.58	3640.58	-7.55	0.027
		Thr	VT	689.40	730.74	-5.66	0.043
		Trp	VT	116.26	130.47	-10.89	0.044
		Tyr	VT	1007.13	1129.62	-10.84	0.001
	Val	VT	954.31	1075.83	-11.30	0.017	
	炭水化物 ($\mu\text{Moles/g DW}$)	デンプン ^a	VT	724.17	637.43	13.61	0.016
			EARLY R1	1056.52	914.05	15.59	0.002
	植物ホルモン (pmole/g FW)	7'OH-ABA	VT	143.82	163.21	-11.88	0.001
		iP	EARLY R1	0.15	0.32	-51.98	0.000
		iPR	V16	2.89	1.31	120.65	0.000
			EARLY R1	2.92	4.07	-28.32	0.002
		DHZR	V16	0.53	0.74	-29.34	0.022
		GA3	EARLY R1	1.03	0.83	24.51	0.013
		IAA-Asp	EARLY R1	0.70	1.12	-37.37	0.050
		IAA-Me	LATE R1	7.44	113.61	-93.45	0.000
	SA	V16	18.61	13.62	36.65	0.041	
苞葉・穂柄・絹糸	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Arg	LATE R1	323.52	460.02	-29.67	0.014
		Asp	VT	1452.69	1663.59	-12.68	0.007
			EARLY R1	1030.13	1205.78	-14.57	0.019
			LATE R1	904.92	1500.90	-39.71	0.000
		Gln	LATE R1	2522.69	4138.52	-39.04	0.000
		Glu	EARLY R1	2746.01	3168.52	-13.33	0.028
		Gly	VT	365.14	303.24	20.41	0.018
		Ile	VT	514.54	562.96	-8.60	0.016
Leu	VT	689.40	801.16	-13.95	0.000		

⁵⁹ 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 17 雌穂において複数の生育段階で統計学的に有意な変化が認められた項目
(続き)

サンプル	成分		生育段階	平均値		差異 (%)	P-値
				本組換え トウモロコシ	対照品種		
苞葉・穂柄・絹糸	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Phe	VT	457.96	517.55	-11.51	0.003
		Trp	VT	123.19	141.23	-12.77	0.035
	炭水化物 ($\mu\text{Moles/g DW}$)	デンプン ^a	VT	95.28	66.41	43.48	0.042
		植物ホルモン (pmole/g FW)	ABA	VT	704.62	804.64	-12.43
	EARLY R1			167.67	232.56	-27.90	0.026
	DPA		LATE R1	2922.35	2349.67	24.37	0.003
	tZ		EARLY R1	0.94	0.80	17.85	0.001
			LATE R1	1.14	0.87	31.05	0.000
	ZG		LATE R1	172.43	147.77	16.69	0.022
	iP		LATE R1	0.68	0.33	105.59	0.000
	iPR		LATE R1	3.56	4.56	-22.09	0.009
	DHZ		V16	0.17	0.29	-41.12	0.038
	GA1		EARLY R1	0.99	1.49	-33.36	0.025
	GA9		LATE R1	0.12	0.02	516.78	0.017
	GA53		V16	1.61	1.36	18.78	0.040
LATE R1			0.42	0.73	-42.97	0.015	

^a デンプンは乾燥重 1g 当たりのブドウ糖の μMoles で示されている。

5

以上に述べた代謝解析の結果をまとめると、2012 年米国におけるほ場試験では分析した代謝産物のうち 2 項目のみに統計学的に有意な変化が認められ、2013 年の米国における温室試験では代謝産物 (遊離アミノ酸、炭水化物及び植物ホルモン) の複数の項目に変化が認められた。

10

上述した遺伝子発現解析及び代謝解析の結果から、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現により、少なくとも 6 種類の遺伝子群に含まれる内在性遺伝子の発現が変化すると考えられた。また、それに伴う複数の代謝産物の含有量の変化が、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大に関与することが考えられた。

15

4. 本組換えトウモロコシにおける雌穂重増大への ATHB17Δ113 蛋白質による影響のまとめ

5 上述した第1項目、第2項目及び第3項目の結論をまとめると、本組換え
トウモロコシでは、ATHB17Δ113 蛋白質により引き起こされるドミナント・
ネガティブ作用によってトウモロコシ内在性の転写因子であるHD-Zip II蛋白質
が拮抗阻害され、少なくとも6種類の遺伝子群に含まれる内在性遺伝子の
発現が変化すると考えられた。また、それに伴う複数の代謝産物の含有量の
10 変化が、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大に関与することが考えられた。
なお、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって絹糸抽出期 (R1) における雌穂重
が増大することは、ATHB17 蛋白質が属するHD-Zip II蛋白質サブファミリー
に関する以下の先行研究と整合している。

1) HD-Zip II に属する複数の蛋白質 (HAT1 蛋白質、HAT3 蛋白質及びHB4
15 蛋白質) は、適切な子実の生長及び発達に必要である (Reymond et al., 2012;
Zúñiga-Mayo et al., 2012)

2) トウモロコシ内在性HD-Zip II蛋白質のうち13種類の発現パターンを調
べた結果、発達中の雌穂において発現量が高い傾向にあり、生殖生長の制
御に関わっていると考えられる (別添資料 4a の Figure 9, p13)

20 また、遺伝子発現解析において発現量に変化していた転写産物が全転写産
物に占めるの割合は、2013年米国における温室試験で約1.3%と比較的小さく
(第一の2-(1)-ロ-②-3-2)-(B), p33)、2012年米国におけるほ場試験では約0.01%
とさらに小さかった (第一の2-(1)-ロ-②-3-2)-(A), p29)。したがって、栽培条件
25 においてATHB17Δ113蛋白質が本組換えトウモロコシの生育特性に及ぼす影
響は、栽培条件における内在性遺伝子の発現の変動と比較して小さいと考
えられた。これを確認するために、2012年に米国の13カ所⁶⁰のほ場において本
組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、形態・生育
特性の13項目 (苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、
30 緑色保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株
数、最終株数、種子の水分含量、1ブッシュル当たりの種子の重量、単位面積
当たりの収量 (t/ha)) を調査した (別添資料 29)。その結果、本組換えトウモ
ロコシにおいて競合における優位性を高めるような形態・生育特性は認められ
なかった。

35

⁶⁰ アーカンソー州、アイオワ州 (2カ所)、イリノイ州 (2カ所)、インディアナ州、カンザス州、
ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3カ所)、ペンシルバニア州 (2カ所)。

ATHB17 蛋白質と既知のアレルゲンとの類似性の解析

ATHB17Δ113 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
5 か否か AD_2015⁶¹ を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸
によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

10 ATHB17Δ113 蛋白質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質がクラス
II コンセンサス配列へ結合することを阻害することによるドミナント・ネガ
ティブ作用によってトウモロコシ内在性遺伝子の発現に影響を与える。その
影響を受ける代謝経路はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する既
15 存の代謝経路であると考えられる。このことから、新規の代謝産物が発現
することはないと考えられる。したがって、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によ
って既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝系が生じる
ものではないと考えられる。

⁶¹ AD_2015 : FARRP (Food Allergy Research and Resource Program Database) Allergen Online database (FARRP, 2013) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、2015 年 1 月の時点で、1,897 件のアミノ酸配列が含まれる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP5714 は、*Escherichia coli* 由来のベクター pUC (Vieira and Messing, 1987) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p12~14) に記載した。

ロ 特性

10

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-ZMAP5714 の塩基数は 11,673 bp である。なお、PV-ZMAP5714 の塩基配列は別添資料 17 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。また、形質転換個体の選抜マーカーとして、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

25

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

PV-ZMAP5714 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

35

宿主内に移入された PV-ZMAP5714 の構成要素は表 1 (p12~14) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 1 (p11) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMAP5714 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

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 従来トウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚を PV-ZMAP5714 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、未成熟胚をカルベニシリンを添加した組織培養培地へ移した。形質転換している個体を、除草剤グリホサートを添加した培地において選抜した。

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

カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。さらに、本組換えトウモロコシの R5F1 世代の種子⁶²において、形質転換に用いた PV-ZMAP5714 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMAP5714 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 18 の Table 1, p11)。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 分裂細胞から培地上で再分化させて得られた再分化個体 (R0) を土壌に移植した。その後、自殖により導入遺伝子をホモ化し、選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えトウモロコシを選抜した。

35 本組換えトウモロコシの育成図を図 11 (p60) に示した。なお、本申請の対象は、LH244 R3 世代及び LH244 R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

⁶² 収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 20 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

25

図 11 本組換えトウモロコシの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えトウモロコシの T-DNA 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの TI: BC1F1、TI: BC2F1 及び TI: BC3F1 世代において、T-DNA 領域の分離比をカイ二乗検定で分析した。

10

試験に供試する TI: BC1F1 世代 (図 11, p60) を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜し、自殖することで R2 世代を作出した。その後さらに 2 回の自殖をすることで、R4 世代を作出した。T-DNA 領域をホモで有する本組換えトウモロコシの R4 世代を、*ATHB17* 遺伝子を持たない反復親と交配し、T-DNA 領域をヘテロで有する R4F1 世代を作出した。得られた R4F1 世代に対し反復親と戻し交配を行い、TI: BC1F1 世代を作出した。さらに得られた TI: BC1F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を Real-Time TaqMan PCR 法により選抜し、反復親と戻し交配を行って TI:BC2F1 世代を作出した。同様に、TI:BC2F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を反復親と戻し交配することで TI:BC3F1 世代を作出した。これら TI: BC1F1、TI: BC2F1 及び TI: BC3F1 世代において行われた End-Point TaqMan PCR 法による T-DNA 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った (別添資料 19)。

15

20

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に遺伝していることが確認された (表 18, p62; 別添資料 19 の Table 1, p6)。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。

30

表 18 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の分離比⁶³

世代	供試個体数	実測値 ¹		1:1 の分離比の期待値			
		陽性個体数	陰性個体数	陽性個体数	陰性個体数	χ^2	p 値 ²
TI: BC1F1	180	88	92	90.00	90.00	0.09	0.766
TI: BC2F1	178	82	96	89.00	89.00	1.10	0.294
TI: BC3F1	181	101	80	90.50	90.50	2.44	0.119

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

²各世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p<0.05)。

5

⁶³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5 本組換えトウモロコシに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、外側骨格配列の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術⁶⁴ 及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)⁶⁵ 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 20)。以下に、本解析の手法及び本組換えトウモロコシを用いて行なった解析の結果を述べる。

15 NGS では、フラグメント化したゲノム配列から約 100bp の塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて解析することで、植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 12 の①, p66)。なお、導入遺伝子の全配列を検出するため、平均冗長度⁶⁶ 75 以上⁶⁷ で解析を行った。次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの塩基配列と照合⁶⁸ する (図 12 の②, p66)。この結果において導入用プラスミドとの相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出された DNA フラグメントにおいて、外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 12 の②, p66)。さらに、JSA において、DNA フラグメントの塩基配列の一部のみが連続して導入用プラスミドと一致するものを、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列の重複性を比較

⁶⁴ 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

⁶⁵ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えトウモロコシのゲノムの全領域に相当する配列をフラグメントとして増幅し、これらのフラグメントにおいて 100bp 程度の配列を解析する。次に、各フラグメントにおいて得られた 100 bp の配列情報を用い、JSA によって T-DNA 領域と宿主の内臓性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

⁶⁶ 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。

⁶⁷ 冗長度 75 以上の NGS/JSA によって遺伝子組換えダイズの導入遺伝子を十分に検出でき、参照として供試された 0.1 ゲノム等量のプラスミドについても、その配列の 100% を正しく検出できたことが報告されている (Kovalic et al., 2012)。

⁶⁸ BLAST 検索において、*E*-score が 1×10^{-5} 以下且つ 30bp 以上の領域で 96.7% 以上の相同性が認められた配列を選抜した。

解析することで、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 12 の③, p66)。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、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及び塩基配列解析により調べること
5 で、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

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/JSA に供試した結果、本組換えトウモロコシの R3 世代で 246.4Gb (平均冗長度⁶⁹113)、対照の非組換えトウモロコシで 264.5Gb (平均冗長度 106)
10 の塩基配列が得られた (別添資料 20 の Appendix Table 3, p43) ことから、本解析において、十分な冗長度⁷⁰が確保されていることが確認された。本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定され (図 13, p67; 別添資料 20, p29)、これらはそれぞれ T-DNA 領域の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 20 の Appendix Figure 4, p54~55)。対照の非組換えトウモロコシでは、接
15 合領域は特定されなかった (別添資料 20, p29)。さらに、本組換えトウモロコシから得られた全ての DNA フラグメントについて、PV-ZMAP5714 の全配列との相同性を調べた結果、外側骨格領域が含まれていないことが示された (別添資料 20 の補足資料の Figure 1)。

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 T-DNA 領域を含む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA
20 領域のみが導入されていることが確認された (別添資料 20 の Appendix Figure 5, p56、Appendix Figure 6, p57~59 及び Appendix Figure 7, p60~64)。

以上をまとめると、NGS/JSA において検出された接合領域は、T-DNA に起因する接合領域のみであり、PV-ZMAP5714 の外側骨格領域との相同性を持つ
25 接合領域は認められなかったことから、T-DNA 領域以外は挿入されていないことが確認された。また、PCR 及び塩基配列解析により、導入された T-DNA 領域の塩基配列は PV-ZMAP5714 の T-DNA 領域と同一であることが確認された。

よって、本組換えトウモロコシのゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が導入遺伝子として組み込まれており、T-DNA 領域以外は挿入されていないことが確認された。
30

⁶⁹ トウモロコシゲノムに 1 コピーで存在する *pd3* 遺伝子について調べた冗長度の平均値を指標として、本解析が冗長度 75 以上で行われていることを確認している。

⁷⁰ 本解析は、1 ゲノム等量及び 0.1 ゲノム等量の PV-ZMAP5714 が存在する場合に、そのプラスミド配列の 100% 及び 98.83% を検出する感度を有することが示されている (別添資料 20 の Appendix Table 4, p44)。

さらに複数世代 (R3、R4、R4F1、R5 及び R5F1 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS/JSA において、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 20, p32~34)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図 13 (p67) に示した。

5

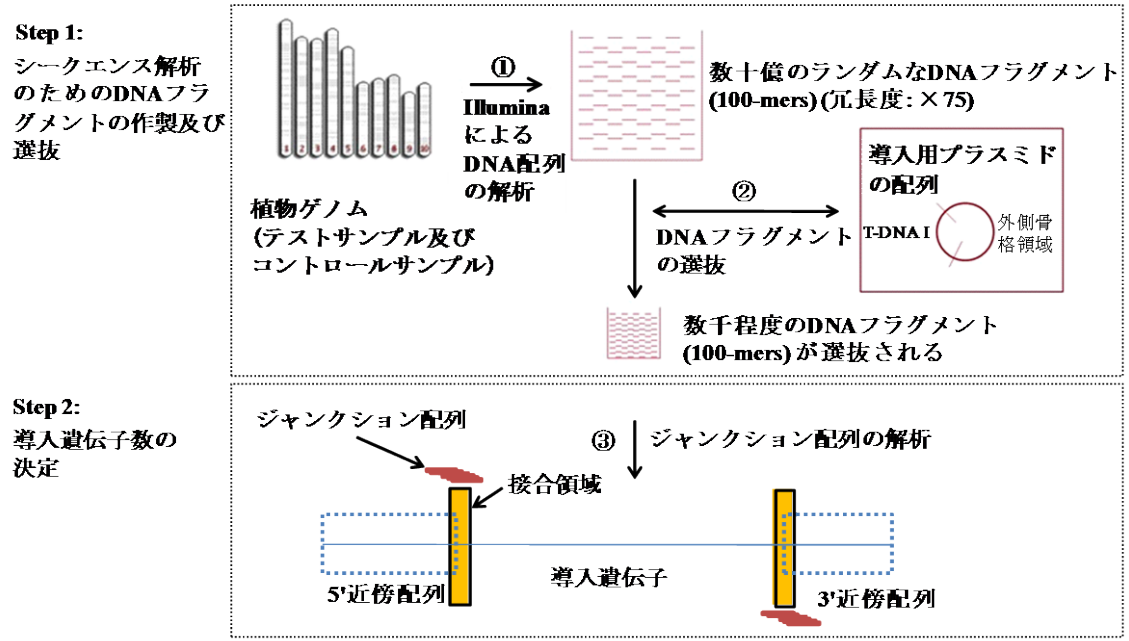


図 12 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)⁷¹

⁷¹ 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。

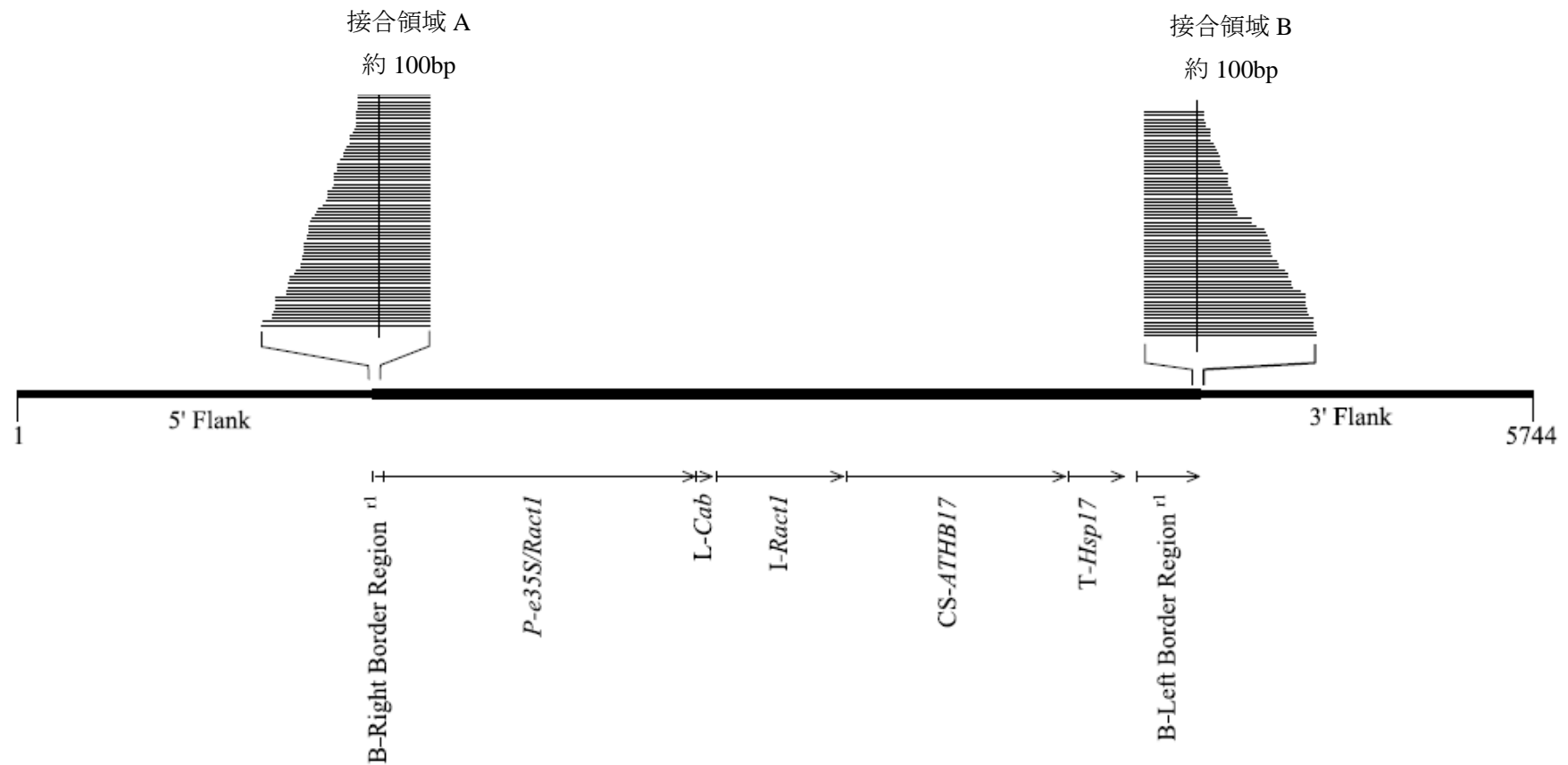


図 13 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図⁷²

5 図は本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。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。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の T-DNA I 領域が PV-ZMAP5714 と一致した配列で導入されており、B-Right Border Region[†] 及び B-Left Border Region[†] はが本組換えトウモロコシにおいて PV-ZMAP5714 と比較して短くなっている。

⁷² 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 20, p29)。

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代 (R3、R4、R4F1、R5 及び R5F1 世代) において ATHB17Δ113 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 16 の Figure 2, p17)。

15 また、2012 年に米国の 5 ヶ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州 (2 ヶ所)、カンザス州及びペンシルバニア州) において、4 反復で栽培した本組換えトウモロコシの葉、根、地上部及び種子での ATHB17Δ113 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 19, p69; 別添資料 21)。その結果、本組換えトウモロコシの葉、根及び地上部において、ATHB17Δ113 蛋白質の発現が確認され、種子では検出限界値未満であった (表 19, p69)。

20

表 19 本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、及び種子における ATHB17Δ113 蛋白質の発現量 (2012 年、米国)⁷³

組織	生育段階 ¹	平均値 (SD) 範囲 [μg/g DW] ²	LOQ/LOD ³ [μg/g DW]
葉	3~4 葉期	0.014 (0.0020) 0.0096 - 0.017	0.00109/0.00049
根	3~4 葉期	0.0023 (0.0016) 0.00083 - 0.0058	0.00078/0.00065
地上部	黄熟期	0.0018 (0.00064) 0.0011 - 0.0035	0.00078/0.00063
種子	成熟期	<LOD (N/A) N/A - N/A	0.00156/0.00028

¹ 採取した各組織の生育段階

5 ² 蛋白質の発現量は、算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重1 g当たりのμgで表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限 - 上限) は全てのほ場で採取されたそれぞれの組織の値を元に計算されている (n=20、ただし根については4つのサンプルで測定ができなかったため n=16)。SD=標準偏差, DW=乾燥重

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

10

⁷³ 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のある場合は、当該伝達性の有無及び程度

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

- (5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10 本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的なプライマーを用いて、Real-Time TaqManPCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 22a)。本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.040% である (別添資料 22b, p15)。本 PCR 法の信頼性については米国モンサント・カンパニーと米国 SGS Brookings 社において検証され、確認されている (別添資料 22b)。

15

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 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

第一の 2-(1)-ロ-② (p15~56) に記載したように、本組換えトウモロコシでは、*ATHB17* 遺伝子が転写された後、mRNA レベルでのスプライシングを受けることでアミノ酸の一部が欠失した *ATHB17Δ113* 蛋白質が発現することにより、生殖生長初期の雌穂バイオマスが増大する。この現象は、HD-Zip II に属する遺伝子の 1 つである *JAB* 遺伝子をノックアウトしたシロイヌナズナにおいて子実にて特異的な生長が変化 (Zúñiga-Mayo et al., 2012) したことから一致する。

25

一方で、シロイヌナズナにおいて *ATHB17* 遺伝子が乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を付与することが報告されている (Park et al., 2013) ことから、これらのストレス耐性が *ATHB17* 遺伝子が発現する本組換えトウモロコシにおいて高まっているかを調べるため、乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性の試験を米国の人工気象室及び温室で行った (別添資料 23、別添資料 24、別添資料 25 及び別添資料 26)。

30

その結果、人工気象室で実施した試験 (別添資料 24 及び別添資料 25) において、重度の乾燥条件及び重度の塩条件のそれぞれでトウモロコシの乾燥重に統計学的有意差は認められなかった。軽度の乾燥条件及び軽度の塩条件で

35

は、人工気象室で実施した試験で、乾燥重において統計学的有意差が認められた (別添資料 24 の Table 2, p7 及び別添資料 25 の Table 2, p7)。そのため、軽度の乾燥条件及び塩条件で反復数を増やして追加の温室試験を行ったところ、乾燥重において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 23 の Table 2, p6 及び別添資料 26 の Table 2, p6)。

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⁷⁴

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。

2015 年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場 (以下、「本隔離ほ場」とする。) において本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験を行った。隔離ほ場試験には、本組換えトウモロコシの R5F1 (LH244 R5 × LH287) 世代を供試した (図 11, p60)。対照の非組換えトウモロコシとしては、本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景を持つ品種 (LH244 × LH287) を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-②-b, p72) は、2012 年に米国の人工気象室において実施した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、9 項目 (雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、稈長 (cm)、着雌穂高 (cm)、分げつ数、成熟期 (月日)、収穫期の地上部重 (kg)、粒型、粒色) について調査した。

統計処理を稈長 (cm)、着雌穂高 (cm) 及び収穫期の地上部重 (kg) に行い、雄穂抽出期 (月日)、絹糸抽出期 (月日)、成熟期 (月日)、粒型、粒色に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わなかった。また、分げつ数については全ての個体で 0 であったため、統計処理を行わなかった。

調査の結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった (別添資料 27 の表 3, p10)。

⁷⁴ 本項目の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社 に帰属する。

b 生育初期における低温耐性

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の生育初期における低温耐性を比較するために、約 8 葉期の植物体を 3 段階の温度条件 (日中/夜間) (適温 : 30°C/22°C、やや低温 : 20°C/15°C、低温 : 15°C/5°C) で人工気象室 (日中 14 時間/夜間 10 時間) において栽培し、調査を行った。低温処理開始後 6 日目、12 日目及び 24 日目に生育段階及び草丈を調査し、低温処理開始後 24 日目の個体の乾燥重について調査を行った (1 個体/反復、20 反復)。

その結果、やや低温の条件ではいずれの項目についても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった (別添資料 28 の Table 2, p7)。

低温の条件では低温処理開始後 12 日目の草丈及び 24 日目の乾燥重において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 28 の Table 2, p7)。低温処理開始後 12 日目の草丈及び 24 日目の乾燥重における本組換えトウモロコシの平均値は、いずれも対照の非組換えトウモロコシの平均値と比較して小さかった。

c 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、通常は、結実後、冬季に自然に枯死する。再生長して栄養繁殖することや、種子を生産することはない。実際に、本隔離ほ場で生育させた本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを成熟期の後も引き続き生育させ、わが国の冬季における生育状況を観察した。2015 年 12 月 1 日に越冬性試験区において栽培された個体を観察した結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも枯死していた (別添資料 27 の図 5, p12)。

d 花粉の稔性及びサイズ

本隔離ほ場で生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから採取した花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれの項目においても、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 27 の図 6 及び表 4, p13)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量：

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

10 有効雌穂数を除く項目について統計処理を行った結果、有効雌穂数を除く5項目において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料27の表5, p14)。なお、有効雌穂数については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの全ての個体が1つの有効雌穂を有しており、分散が0であったため、統計処理は行わなかった。

脱粒性：

15 脱粒性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの成熟期に、目視で苞皮に包まれているか否か、苞皮を取り除いた後の脱粒の有無やその程度を観察した。

20 その結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも、収穫時の雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒は確認されなかった。また苞皮を取り除いた後の雌穂も難脱粒性であり(別添資料27の図7, p15)、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で種子の脱粒性における違いは認められなかった(別添資料27の表5, p14)。

休眠性及び発芽率：

25 休眠性及び発芽率については、本隔離ほ場で生育した本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの収穫後21日目の種子をシャーレ上に静置し、25°Cに設定した恒温器内での発芽個体数を計測した。

30 その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収穫種子の発芽率はいずれも100%であった(別添資料27の表5, p14)。そのため、収穫種子の発芽率については統計処理は行わなかった。

f 交雑率

35 日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

5 本組換えトウモロコシから土壌微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。

その結果、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区の間で、土壌微生物の菌数、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 27 の表 6~8, p17)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

5

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

(2) 使用等の方法

10

—

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

15

—

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

20

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

25

—

(6) 国外における使用等に関する情報

30

本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は表 20 (p76) のとおりである。

表 20 本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況⁷⁵

2017年1月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2014年10月	2015年6月
米国農務省 (USDA)	環境	2014年8月	2015年12月
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2014年6月	2015年11月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2014年6月	2015年11月
オーストラリア・ニュージーランド 食品基準機関 (FSANZ)	食品	2015年6月	2016年4月
欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料	2015年6月	審査中

5

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は表 21 (p76) のとおりである。

表 21 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況⁷⁶

2017年1月現在

10

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ⁷⁷	2016年12月	■ ⁷⁸
農林水産省	飼料 ⁷⁹	2016年12月	■ ⁷⁸
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ⁸⁰ : 隔離ほ場)	2014年2月	2015年6月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程: 一般使用)	2016年9月	—

⁷⁵ 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。

⁷⁶ 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。

⁷⁷ 食品衛生法に基づく。

⁷⁸ 社外秘につき非開示。

⁷⁹ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

⁸⁰ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価⁸¹

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

10

本組換えトウモロコシでは *ATHB17Δ113* 蛋白質が発現することにより、生殖生長初期の雌穂バイオマスが増大する。なお、シロイヌナズナにおいて *ATHB17* 遺伝子が乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を付与することが報告されていることから、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を人工気象室及び温室で調査した。その結果、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性は高まっていないと考えられた(第一の2-(6)-①, p70~71)。

15

20

競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した(第一の2-(6)-②-a, c~e, p71~74)。その結果、統計処理を行った項目では、全ての項目において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。統計処理を行わなかった項目においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に違いは認められなかった。また、生育初期における低温耐性(第一の2-(6)-②-b, p72)を米国の人工気象室において調査した結果、生育初期における低温耐性の試験で、低温処理(15°C/5°C)開始後12日目の草丈及び24日目の乾燥重に統計学的有意差が認められた。低温処理開始後12日目の草丈及び24日目の乾燥重における本組換えトウモロコシの平均値は、いずれも対照の非組換えトウモロコシの平均値と比較して小さかったため、このことが競合における優位性を高めることはないと考えられた。

25

30

35

本組換えトウモロコシでは *ATHB17Δ113* 蛋白質が発現することにより、生殖生長初期の雌穂バイオマスが増大するが、わが国の隔離ほ場試験では、収量に有意差を生じるほどの影響は認められなかった。

⁸¹ 本項目中で、第一の2-(6)-②-a~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

5 また、2012年に米国の13ヵ所のほ場において本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、形態・生育特性の13項目（苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、緑色保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、種子中の水分含量、1ブッシェル当たりの種子の重量、単位面積当たりの収量 (t/ha)）を調査した（別添資料 29）。その結果、本組換えトウモロコシにおいて競合における優位性を高めるような形態・生育特性は認められなかった。

10 さらに、本組換えトウモロコシの隔離ほ場及び米国の人工気象室における試験において、第一の2-(6)-②-b、c、e (p72~73) の項目に記載した本組換えトウモロコシの自然環境下における生存に関与する形質（b. 生育初期における低温耐性、c. 成体の越冬性、e. 種子の脱粒性、休眠性及び発芽率）に違いが
15 なかったことから、生殖生長初期に雌穂バイオマスが増大するという形質のみが付与されることで栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得することはないと考えられた。

20 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。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

30 —

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

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

10 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験（第一の 2-(6)-②-g, p74）を行った。その結果、調査したいずれの項目においても、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった。

15 本組換えトウモロコシ中で発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質と同様の転写因子であり、ATHB17Δ113 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質がコンセンサス配列に結合することを阻害する働きを持つため、その影響を受ける代謝経路はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質が関与する既存の代謝経路であると考えられる。このことから、新規の代謝産物が発現することはないと考えられた。

20 第一の 2-(1)-ロ-②-4 (p56) で記載したように、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現に与える影響は小さいと考えられた。したがって、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、その増減の幅は小さいと考えられた。

25 また、本組換えトウモロコシ中で発現する ATHB17Δ113 蛋白質が既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている（第一の 2-(1)-ロ-②, p57）。

30 以上のことから、有害物質の産生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、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

10

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15

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

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

20

(2) 影響の具体的内容の評価

—

25

(3) 影響の生じやすさの評価

—

30

(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。

35

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

5 トウモロコシは 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に導入した *ATHB17* 遺伝子は、シロイヌナズナにおいて乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性に関与することが報告されている。しかし、本組換えトウモロコシを人工気象室及び温室で試験した結果、乾燥ス
10 レス耐性及び塩ストレス耐性は高まっていないと考えられた。

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で競合における優位性に関わる諸形質 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) を比較検討した結果、生育初期における低温耐性試験の草丈及び乾燥重において
15 統計学的有意差が認められた。検討の結果、生育初期における低温耐性について、本組換えトウモロコシの草丈及び乾燥重は対照の非組換えトウモロコシの平均値と比較して小さかった。したがって、認められた有意差が本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

本組換えトウモロコシは、*ATHB17Δ113* 蛋白質を発現することによって生殖生長初期の雌穂バイオマスが増大するが、この要因のみによって、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、わが国の自然環境下で複数
20 世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得することはないと考えられた。

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

有害物質の産生性：

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

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

本組換えトウモロコシ中で発現する *ATHB17Δ113* 蛋白質は、トウモロコシ内
35 在性の *HD-Zip II* 蛋白質と同様の転写因子であることから、新規の代謝産物を生じるものではないと考えられる。また、本組換えトウモロコシ中で発現する *ATHB17Δ113* 蛋白質が既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さない

ことが確認されている。

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

5 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は無いため、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おそれはないと判断された。

10

以上のことから、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合に、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。

引用文献

- 5 Ariel, F.D., P.A. Manavella, C.A. Dezar and R.L. Chan. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science* 12: 419-426.
- 10 Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25: 25-29.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Berardini, T.Z., D. Li, E. Huala, S. Bridges, S. Burgess, F. McCarthy, S. Carbon, S.E. Lewis, C.J. Mungall, A. Abdulla, V. Wood, E. Feltrin, G. Valle, R.L. Chisholm, P. Fey, P. Gaudet, W. Kibbe, S. Basu, Y. Bushmanova, K. Eilbeck, D.A. Siegele, B. McIntosh, D. Renfro, A. Zweifel, J.C. Hu, M. Ashburner, S. Tweedie, Y. Alam-Faruque, R. Apweiler, A. Auchinchloss, A. Bairoch, D. Barrell, D. Binns, M.C. Blatter, L. Bougueleret, E. Boutet, L. Breuza, A. Bridge, P. Browne, W.M. Chan, E. Coudert, L. Daugherty, E. Dimmer, R. Eberhardt, A. Estreicher, L. Famiglietti, S. Ferro-Rojas, M. Feuermann, R. Foulger, N. Gruaz-Gumowski, U. Hinz, R. Huntley, S. Jimenez, F. Jungo, G. Keller, K. Laiho, D. Legge, P. Lemercier, D. Lieberherr, M. Magrane, C. 30 O'Donovan, I. Pedruzzi, S. Poux, C. Rivoire, B. Roechert, T. Sawford, M. Schneider, E. Stanley, A. Stutz, S. Sundaram, M. Tognolli, I. Xenarios, M.A. Harris, J.I. Deegan, A. Ireland, J. Lomax, P. Jaiswal, M. Chibucos, M.G. Giglio, J. Wortman, L. Hannick, R. Madupu, D. Botstein, K. Dolinski, M.S. Livstone, R. Oughtred, J.A. Blake, C. Bult, A.D. Diehl, M. Dolan, H. Drabkin, J.T. Eppig, D.P. Hill, L. Ni, M. Ringwald, D. 35 Sitnikov, C. Collmer, T. Torto-Alalibo, S. Laulederkind, M. Shimoyama, S. Twigger, P. D'Eustachio, L. Matthews, R. Balakrishnan, G. Binkley, J.M. Cherry, K.R. Christie, M.C. Costanzo, S.R. Engel, D.G. Fisk, J.E. Hirschman, B.C. Hitz, E.L. Hong, C.J.

- Krieger, S.R. Miyasato, R.S. Nash, J. Park, M.S. Skrzypek, S. Weng, E.D. Wong, M. Aslett, J. Chan, R. Kishore, P. Sternberg, K. Van Auke, V.K. Khodiyar, R.C. Lovering, P.J. Talmud, D. Howe and M. Westerfield. 2010. The Gene Ontology in 2010: Extensions and refinements. *Nucleic Acids Research* 38: D331-D335.
- 5
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
10 <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-1-eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].
- 15 Ciarbelli, A.R., A. Ciolfi, S. Salvucci, V. Ruzza, M. Possenti, M. Carabelli, A. Fruscalzo, G. Sessa, G. Morelli and I. Ruberti. 2008. The Arabidopsis homeodomain-leucine zipper II gene family: Diversity and redundancy. *Plant Molecular Biology* 68: 465-478.
- 20 Deng, X., J. Phillips, A.H. Meijer, F. Salamini and D. Bartels. 2002. Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 49: 601-610.
- 25 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- FAO. 2015. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/E> [Accessed April 23, 2015].
- 30 Fisher, K.S. and A.F.E. Palmer. 1983. Maize. Pages 155-180 in *Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- 35 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- 5
- Frank, W., J. Phillips, F. Salamini and D. Bartels. 1998. Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *The Plant Journal* 15: 413-421.
- 10
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- Goodall, G.J. and W. Filipowicz. 1991. Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot
- 15
- plants. *The EMBO Journal* 10: 2635-2644.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 20
- Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219-222.
- Hymus, G.J., S. Cai, E.A. Kohl, H.E. Holtan, C.M. Marion, S. Tiwari, D.R. Maszle, M.R. Lundgren, M.C. Hong, N. Channa, P. Loida, R. Thompson, J.P. Taylor, E. Rice, P.P. Repetti, O.J. Ratcliffe, T.L. Reuber and R.A. Creelman. 2013. Application of HB17, an *Arabidopsis* class II homeodomain-leucine zipper transcription factor, to regulate chloroplast number and photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Botany* 64: 4479-4490.
- 25
- 30
- Illumina. 2011. RNA-Seq data comparison with gene expression microarrays: A cross-platform comparison of differential gene expression analysis. Illumina, Inc., San Diego, California.
- Kagale, S., M.G. Links and K. Rozwadowski. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 1109-1134.
- 35

- Kagale, S. and K. Rozwadowski. 2011. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* 6: 141-146.
- 5
- Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- Kim, Y., S. Park, S.J. Gilmour and M.F. Thomashow. 2013. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 75: 364-376.
- 10
- Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- 15
- 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.
- 20
- Kriechbaumer, V., W.J. Park, A. Gierl and E. Glawischnig. 2006. Auxin biosynthesis in maize. *Plant Biology* 8: 334-339.
- 25
- 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.
- 30
- Leibman, M., J.J. Shryock, M.J. Clements, M.A. Hall, P.J. Loida, A.L. McClerren, Z.P. McKiness, J.R. Phillips, E.A. Rice and S.B. Stark. 2014. Comparative analysis of maize (*Zea mays*) crop performance: Natural variation, incremental improvements and economic impacts. *Plant Biotechnology Journal* 12: 941-950.
- 35
- Li, L., X. Hou, T. Tsuge, M. Ding, T. Aoyama, A. Oka, H. Gu, Y. Zhao and L.-J. Qu. 2008. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in

Arabidopsis. Plant Cell Reports 27: 575-584.

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.

5

Martin, D., C. Brun, E. Remy, P. Mouren, D. Thieffry and B. Jacq. 2004. GOToolBox: Functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. Genome Biology 5: R101.

10

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.

15

McElwain, E.F. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. Nucleic Acids Research 17: 1764.

20

Meijer, A.H., R.J. de Kam, I. d'Erfurth, W. Shen and J.H.C. Hoge. 2000. HD-Zip proteins of families I and II from rice: Interactions and functional properties. Molecular and General Genetics 263: 12-21.

Mukherjee, K., L. Brocchieri and T.R. Bürglin. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. Molecular Biology and Evolution 26: 2775-2794.

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

30 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

35 Ohta, M., K. Matsui, K. Hiratsu, H. Shinshi and M. Ohme-Takagi. 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. The Plant Cell 13: 1959-1968.

- Östin, A., M. Kowalyczk, R.P. Bhalerao and G. Sandberg. 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118: 285-296.
- 5 Padgette, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 10 Park, M.Y., S.-a. Kim, S.-j. Lee and S.Y. Kim. 2013. ATHB17 is a positive regulator of abscisic acid response during early seedling growth. *Molecules and Cells* 35: 125-133.
- Paschall, J.E., M.F. Oleksiak, J.D. VanWye, J.L. Roach, J.A. Whitehead, G.J. Wyckoff, K.J. Kolell and D.L. Crawford. 2004. FunnyBase: A systems level functional annotation of *Fundulus* ESTs for the analysis of gene expression. *BMC Genomics* 5: 96.
- 15 of *Fundulus* ESTs for the analysis of gene expression. *BMC Genomics* 5: 96.
- 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.
- 20 of the United States of America 98: 11919-11924.
- Reymond, M.C., G. Brunoud, A. Chauvet, J.F. Martínez-Garcia, M.-L. Martin-Magniette, F. Monéger and C.P. Scutt. 2012. A light-regulated genetic module was recruited to carpel development in *Arabidopsis* following a structural change to SPATULA. *Plant Cell* 24: 2812-2825.
- 25 SPATULA. *Plant Cell* 24: 2812-2825.
- Ritchie, S.W., J.J. Hanway and G.O. Benson. 1997. How a corn plant develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames, Iowa.
- 30 How a corn plant develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames, Iowa.
- Roy, N.C., E. Altermann, Z.A. Park and W.C. McNabb. 2011. A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies. *Briefings in Functional Genomics* 10: 135-150.
- 35 A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies. *Briefings in Functional Genomics* 10: 135-150.
- Ruberti, I., G. Sessa, S. Lucchetti and G. Morelli. 1991. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO Journal* 10: 1787-1791.

- 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.
- 5
- Seebauer, J.R., S.P. Moose, B.J. Fabbri, L.D. Crossland and F.E. Below. 2004. Amino acid metabolism in maize earshoots. Implications for assimilate preconditioning and nitrogen signaling. *Plant Physiology* 136: 4326-4334.
- 10
- Sessa, G., G. Morelli and I. Ruberti. 1993. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO Journal* 12: 3507-3517.
- Severini, A.D., L. Borrás, M.E. Westgate and A.G. Cirilo. 2011. Kernel number and
15 kernel weight determination in dent and popcorn maize. *Field Crops Research* 120: 360-369.
- 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:
20 151-159.
- Sorin, C., M. Salla-Martret, J. Bou-Torrent, I. Roig-Villanova and J.F. Martínez-García. 2009. ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in
Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* 59: 266-277.
- 25
- 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.
- 30
- Steindler, C., A. Matteucci, G. Sessa, T. Weimar, M. Ohgishi, T. Aoyama, G. Morelli and I. Ruberti. 1999. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235-4245.
- Tiwari, S.B., G. Hagen and T.J. Guilfoyle. 2004. Aux/IAA proteins contain a potent
35 transcriptional repression domain. *The Plant Cell* 16: 533-543.
- Veitia, R.A. 2007. Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations.

The Plant Cell 19: 3843-3851.

Vieira, J. and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in Enzymology 153: 3-11.

5

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.

10

Zúñiga-Mayo, V.M., N. Marsch-Martínez and S. de Folter. 2012. JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in Arabidopsis. The Plant Journal 71: 314-326.

15

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.

20

Zinselmeier, C., B.-R. Jeong and J.S. Boyer. 1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. Plant Physiology 121: 25-36.

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

25

菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京

財務省 2015 財務省貿易統計

(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed Sep1 2015].

30

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

35

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

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

5

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

10 農林水産省 2014a 平成 25 年産野菜出荷統計 平成 26 年 12 月 15 日公表
(<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001128458>) [Accessed Sep 1 2015]

15 農林水産省 2014b 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 Jul 13 2015].

20 農林水産省 2015a 平成 26 年耕地及び作付面積統計 平成 27 年 4 月 17 日公表
(<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129531>) [Accessed Sep 1 2015]

農林水産省 2015b 飼料をめぐる情勢 平成 27 年 4 月公表
(http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siry/pdf/04_meguji_illust_all.pdf)
[Accessed Sep 1 2015]

25 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 28 年 9 月 5 日

5

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

10

第一種使用規程の承認を申請している絹糸抽出期における高雌穂バイオマス
トウモロコシ(*ATHB17, Zea mays subsp. mays (L.) Itis*) (MON87403, OECD UI:
MON-87403-1) (以下「本組換え体」という。)の第一種使用等において、生物
多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を
15 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。

20

平成28年9月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号 (電話番号 03-6264-4790)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請業務 管理・運営課 課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

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

10 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体が環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換え体に対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

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

別添資料リスト

- 別添資料 1 Structural Similarities between the MON 87403 AtHB17Δ113 and Other Proteins (社外秘)
5
- 別添資料 2 Physiological Assessments of Maize MON 87403 in 2012 U.S. Field Trials (MSL0024992) (社外秘)
- 別添資料 3 Physiological Assessments of Maize MON 87406 at R1 Growth Stage in 2012 U.S. Field Trials (MSL0026133)(社外秘)
10
- 別添資料 4 a) Expression of a Truncated ATHB17 Protein in Maize Increases Ear Weight at Silking
b) Supplemental Figures and Tables of Rice et al. 2014 (社外秘)
15 c) *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する2つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重のデータ (社外秘)
d) List of the differentially expressed genes in ear inflorescence and ear in common between two transgenic lines in the 2012 publication field trial (社外秘)
20
- 別添資料 5 Sequence Analysis of the *ATHB17* RNA Transcript Produced in MON 87403 (MSL0024955) (社外秘)
- 別添資料 6 Phenotypic Evaluation of Ear Size in Maize MON 87403 at Multiple Growth Stages under Optimal Conditions in a Greenhouse (MSL0025460) (社外秘)
25
- 別添資料 7 Annotation of Differentially Expressed Genes Identified by Global Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq (RAR-2014-0464) (社外秘)
30
- 別添資料 8 Global Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq (MSL0025328) (社外秘)
- 35 別添資料 9 Annotation of Genes in Enriched GO Categories from Global Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq (RAR-2014-0383) (社外秘)

- 別添資料 10 Additional Annotation of Differentially Expressed Genes Identified in 2013 Greenhouse RNA-seq Experiment (RAR-2014-0544) (社外秘)
- 5 別添資料 11 List of Non-Redundant Genes Newly Identified in the 2012 Field Experiment and the 2013 Greenhouse Experiment (社外秘)
- 別添資料 12 絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ (*ATHB17, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1) の RNA シーケンス再解析について (社外秘)
- 10
- 別添資料 13 Metabolite analyses of R1 Ear Tissue from MON 87403 Maize Grown in the United States in 2012 (MSL0025230) (社外秘)
- 15 別添資料 14 Metabolite Analysis of Multiple Tissues from MON 87403 Grown in a Greenhouse in the United States in 2013 (MSL0025331) (社外秘)
- 別添資料 15 Additional MON 87403 Metabolite Data Table for Japan Stage III Submission (RAR-2014-0465) (社外秘)
- 20
- 別添資料 16 Amended Report for MSL0025012: Demonstration of the Presence of ATHB17Δ113 Protein in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87403 (MSL0025213) (社外秘)
- 25 別添資料 17 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP5714 (pMON 97046) (社外秘)
- 別添資料 18 PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON 87403 (MSL0025488) (社外秘)
- 30
- 別添資料 19 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87403 Across Three Generations (MSL0024676) (社外秘)
- 別添資料 20 Amended Report for MSL0024998: Molecular Characterization of MON 87403 (MSL0025245) (社外秘)
- 35
- 別添資料 21 Assessment of ATHB17Δ113 Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and

Grain Tissues Collected from Maize MON 87403 Produced in United States Field Trials during 2012 (MSL0026598) (社外秘)

- 5 別添資料 22 a) A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87403 (社外秘)
b) In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 87403” using a 200 ng Total DNA Load and 25 µl Reaction Volume for Global Submissions (社外秘)
10 c) Sequence of the 3'-end of the Insert for MON 87403 and Associated Genomic Flanking DNA (社外秘)
- 15 別添資料 23 Assessment of the Effect of Moderate Drought Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Greenhouse Conditions (MSL0025265) (社外秘)
- 別添資料 24 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Drought Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Growth Chamber Conditions (MSL0024983) (社外秘)
- 20 別添資料 25 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Salt Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Growth Chamber Conditions (MSL0024984) (社外秘)
- 25 別添資料 26 Assessment of the Effect of Moderate Salt Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Greenhouse Conditions (MSL0025266) (社外秘)
- 30 別添資料 27 絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ (*ATHB17*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-874Ø3-1) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 別添資料 28 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Cold Stress on Maize MON 87403 in 2012 under Growth Chamber Conditions (MSL0024981) (社外秘)
- 35 別添資料 29 Phenotypic Evaluation and Environmental Interactions of Maize MON 7403 in U.S. Field Trials During 2012 (MSL0025258) (社外秘)