

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ  
 (*ipd079Ea, pat, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis)  
 (DP915635, OECD UI: DP-915635-4) 申請書等の概要

## 目次

第一種使用規程承認申請書 .....	1
生物多様性影響評価書の概要 .....	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 .....	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 .....	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 .....	3
(2) 使用等の歴史及び現状 .....	3
(3) 生理学的及び生態学的特性 .....	5
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 .....	8
(1) 供与核酸に関する情報 .....	8
(2) ベクターに関する情報 .....	22
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	23
(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 .....	26
(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 .....	30
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 .....	31
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 .....	35
(1) 使用等の内容 .....	35
(2) 使用等の方法 .....	35
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法 .....	35
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置 .....	35
(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 .....	35
(6) 国外における使用等に関する情報 .....	35
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	37
1 競合における優位性 .....	37
2 有害物質の産生性 .....	38
3 交雑性 .....	42
4 その他の性質 .....	43
第三 生物多様性影響の総合的評価 .....	44
参考文献 .....	46
提出書類一覧 .....	54
緊急措置計画書 .....	56

第一種使用規程承認申請書

5

令和5年12月12日

農林水産大臣 宮下 一郎 殿

環境大臣 伊藤 信太郎 殿

10

氏名 コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社  
申請者 代表取締役社長 野村 真一郎  
住所 東京都千代田区永田町二丁目11番1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。

20

25

30

35

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ ( <i>ipd079Ea, pat, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (DP915635, OECD UI: DP-915635-4)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	—

## 生物多様性影響評価書の概要

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

###### ① 和名、英名及び学名

10

和名：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

宿主は、イネ科 (Gramineae) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するトウモロコシ (*Z. mays*) のデント種で、系統名は PHR03 である。

20

###### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

25

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

30

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

##### (2) 使用等の歴史及び現状

###### ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づくと、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、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

40

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

## ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

### 10 ・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（戸澤, 2005、OECD, 2003）。

15 国連食糧農業機関（FAO）によると、2016 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9 千万 ha であり、上位国は、中国 3,898 万 ha、米国 3,511 万 ha、ブラジル 1,496 万 ha、インド 1,020 万 ha、メキシコ 760 万 ha である（FAO, 2018）。

20 現在、我が国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2017 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 4,800 ha で（農林水産省, 2018a）、同年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 2,700 ha である（農林水産省, 2018b）。

### ・栽培方法

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

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

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

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

### 35 ・流通実態及び用途

40 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。2017 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.3%が飼料（8.7%の蒸留粕を含む）、30.1%がエタノール製造、13.5%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった（NCGA, 2018）。

我が国では、2017 年に約 1,531 万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約 1,037 万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽

培用と考えられる（財務省, 2018）。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている（農林水産省, 2018c）。

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

5

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

10

—

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15

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

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

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

20

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）。

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）。

25

また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH5.0～8.0の範囲で栽培可能である（戸澤, 2005）。

#### ハ 捕食性又は寄生性

30

—

#### 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

35

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

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

40

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

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

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

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

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

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

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

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

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

2001)。

我が国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及び  
イヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査し  
た研究では、ほ場の縁(0 m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm<sup>2</sup>、  
5 イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm<sup>2</sup>であった (Shirai and Takahashi, 2005)。ま  
た、ほ場から 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<sup>2</sup>、  
イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm<sup>2</sup>、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で  
10 粒/cm<sup>2</sup>以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

また、北米でも全 7 ヶ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワ  
10 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<sup>2</sup>、14.2 粒/cm<sup>2</sup>、そして 8.1 粒/cm<sup>2</sup>へと減  
少していくことが明らかとなっている。

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,  
15 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

20 —

#### 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  
25 響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

#### ト その他の情報

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



## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### 5 イ 構成及び構成要素の由来

10 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*ipd079Ea, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP915635, OECD UI: DP-915635-4) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (9 ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列を添付資料 1 に示した。

#### ロ 構成要素の機能

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

20 供与核酸の構成要素それぞれの機能を表 1 (9 ページ) に示した。第一.2. (3) . イ (23 ページ) で後述するように、本組換えトウモロコシの染色体には、T-DNA 領域のうち FRT1 から FRT6 までの領域 (以下「挿入 DNA 領域」という。) だけが含まれる。このため、本組換えトウモロコシにおける供与核酸は挿入 DNA 領域である。また、本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち、供与核酸を除く外側骨格領域の構成要素それぞれの機能を表 2 (12 ページ) に示した。

25

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
その他	FRT1	48	出芽酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来のFLPリコンビナーゼ標的部位 (Proteau <i>et al.</i> , 1986)。
pmi 遺伝子 発現カセット*	<i>pmi</i>	1,216	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI 蛋白質) をコードする遺伝子 (Negrotto <i>et al.</i> , 2000)。コーディング領域の 5'側に 4 塩基、3'側に 36 塩基の非翻訳領域を含む。
	<i>pinII</i> Terminator	311	ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子 ( <i>pinII</i> ) のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator	742	トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank Accession KX247647; Dong <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。
pat 遺伝子 発現カセット	<i>os-actin</i> Promoter	1,682	イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子のプロモーター領域 (GenBank Accession CP018159; GenBank Accession EU155408.1)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>os-actin</i> Intron	469	イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン領域 (GenBank Accession CP018159; GenBank Accession EU155408.1)。
	<i>pat</i>	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
	CaMV 35S Terminator	194	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。
その他	<i>loxP</i>	34	バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位 (Dale and Ow, 1990)。
	<i>sb-ubi</i> Terminator	584	ソルガム ( <i>Sorghum bicolor</i> ) 由来のコビキチン遺伝子のターミネーター領域 (Phytozome gene ID Sobic.004G049900.1; US Patent US 9725731 [Abbitt, 2017])。転写を停止する。

\**pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターである *ubizM1 Promoter* (*Z. mays* 由来) は、後述する中間系統作成にあたりあらかじめ *loxP* とともに宿主に移入されている。挿入 DNA 領域が当該プロモーターの下流に部位特異的組換えにより挿入され、*pmi* 遺伝子と当該プロモーターが接続される (第一.2. (3) .イ、23 ページ)。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
その他	<i>sb-gkaf</i> Terminator	464 ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来のガンマカフィリン遺伝子のターミネーター領域 (de Freitas <i>et al.</i> , 1994)。転写を停止する。
	<i>attB1</i>	24 バクテリオファージ $\lambda$ 由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway <sup>®</sup> クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000; Katzen, 2007)。
<i>ipd079Ea</i> 遺伝子発現カセット	<i>sb-RCc3</i> Enhancer	1,581 ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来の <i>sb-RCc3</i> 遺伝子のエンハンサー領域。根特異的な活性を示す (WO Patent 2012112411)。
	<i>sb-RCc3</i> Enhancer	1,581 ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来の <i>sb-RCc3</i> 遺伝子のエンハンサー領域。根特異的な活性を示す (WO Patent 2012112411)。
	<i>sb-RCc3</i> Enhancer	1,584 ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来の <i>sb-RCc3</i> 遺伝子のエンハンサー領域。根特異的な活性を示す (WO Patent 2012112411)。
	<i>zm-PCOa</i> Promoter	911 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のmRNA配列であるPCO118362上流のプロモーター領域 (WO Patent 2017222821)。根特異的な活性を示す。
	<i>zm-HPLV9</i> Intron	856 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の <i>zm-HPLV9</i> 遺伝子オーソログ (Phytozome gene ID: Zm00008a029682; WO Patent 2016109157 [Abbitt and Shen, 2016]) のイントロン領域。
	<i>ipd079Ea</i>	1,440 <i>Ophioglossum pendulum</i> 由来の殺虫蛋白質IPD079Eaをコードする遺伝子 (WO Patent 2017023486 [Allen <i>et al.</i> , 2017])。
	<i>sb-SCI-1B</i> Terminator	953 ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来サブチリシン-キモトリプシンインヒビター <i>1B</i> 遺伝子のターミネーター領域 (WO Patent 2018102131 [Abbitt, 2018])。転写を停止する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
その他	Z27G Terminator	460 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) W64 系統由来の 27-kDa ガンマゼイン遺伝子のターミネーター領域 (Das <i>et al.</i> , 1991; Liu <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。
	UBQ14 Terminator	902 シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来のユビキチン 14 遺伝子のターミネーター領域 (Callis <i>et al.</i> , 1995)。転写を停止する。
	In2-1 Terminator	494 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の <i>In2-1</i> 遺伝子のターミネーター領域 (Hershey and Stoner, 1991)。転写を停止する。
	<i>attB2</i>	24 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway <sup>®</sup> クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000; Katzen, 2007)。
その他	<i>attB3</i>	21 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。
	FRT6	48 出芽酵母 ( <i>S. cerevisiae</i> ) 由来の改変型 FLP リコンビナーゼ標的的部位 (Proteau <i>et al.</i> , 1986)。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能	
その他	Ti Plasmid Region	57	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )) 由来の Ti プラスミド (pTi) の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Left Border (LB)	25	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の T-DNA 領域の左側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>spc</i>	789	細菌由来のスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
	<i>colE1 ori</i>	370	大腸菌 ( <i>E.coli</i> ) 由来の DNA 複製起点 (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetR</i>	651	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の調節遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetA</i>	1,200	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>trfA</i>	1,149	細菌由来のトランス作用複製因子の遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriT</i>	367	細菌由来の DNA 伝達起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>ctl</i>	6,271	細菌由来のセントラルコントロールオペロン領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriV</i>	711	細菌由来の DNA 複製起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virD1</i>	444	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virC1</i>	695	
	<i>virC2</i>	609	
	<i>virG</i>	804	
	<i>virB</i>	9,436	
	<i>colE1 ori</i>	370	大腸菌 ( <i>E.coli</i> ) 由来の DNA 複製起点 (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Right Border (RB)	25	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の T-DNA の右側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Ti Plasmid Region	50	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
zm-wus2 遺伝子発現カセット	<i>os-actin Promoter</i>	1,682 イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子 (GenBank Accession CP018159; GenBank Accession EU155408.1) のプロモーター領域。転写を開始する。
	<i>os-actin Intron</i>	469 イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子 (GenBank Accession CP018159; GenBank Accession EU155408.1) のイントロン領域。
	<i>zm-wus2</i>	909 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のWUS2蛋白質をコードする遺伝子 (Mayer <i>et al.</i> , 1998; Lowe <i>et al.</i> , 2016)。
	<i>pinII Terminator</i>	311 ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
zm-odp2 遺伝子発現カセット	<i>ubiZM1 Promoter</i>	900 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>ubiZM1 5' UTR</i>	83 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>ubiZM1 Intron</i>	1,013 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>zm-odp2</i>	2,133 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のODP2 蛋白質をコードする遺伝子 (GenBank Accession XM008676474)。
	<i>pinII Terminator</i>	311 ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator	742 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank Accession KX247647; Dong <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
Flp遺伝子発現カセット	<i>ubiZM1</i> Promoter	900 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>ubiZM1</i> 5' UTR	83 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>ubiZM1</i> Intron	1,013 トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>Flp</i> Exon1	634 出芽酵母 ( <i>S. cerevisiae</i> ) 由来のリコンビナーゼであるFLP蛋白質をコードする遺伝子のエクソン1領域 (Dymecki, 1996)。
	<i>st-LS1</i> Intron	189 ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来の <i>LS1</i> 遺伝子のイントロン領域 (Eckes <i>et al.</i> , 1986)。
	<i>Flp</i> Exon2	638 出芽酵母 ( <i>S. cerevisiae</i> ) 由来のリコンビナーゼであるFLP蛋白質をコードする遺伝子のエクソン2領域 (Dymecki, 1996)。
	<i>pinII</i> Terminator	311 ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	<i>attB4</i>	21 バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。
	CaMV 35S Terminator	194 カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。

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

- 5 a. 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される RNA 又は蛋白質の機能

#### IPD079Ea 蛋白質

10 IPD079Ea 蛋白質は、479 アミノ酸残基からなる選択的殺虫蛋白質であり、*Ophioglossum pendulum* に由来する。*O. pendulum* はシダ植物のハナヤスリ属 (*Ophioglossum*) に分類され、インド、オーストラリア、アフリカの一部地域及び東南アジアに自生しており (Kew Science, 2020)、米国ではフロリダ州に移入分布している (USDA, 2020)。

#### 15 - IPD079Ea 蛋白質の同定及び機能

IPD079 ファミリー蛋白質は、標的害虫であるウェスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*; 以下「WCR」という。) に対する殺虫活性を指標としたスクリーニングによりシダ植物の抽出物から見出され、相同性検索より *O. pendulum* のトランスクリプトームから IPD079Ea 蛋白質をコードする遺伝子が同定された (Allen *et al.*, 2017)。IPD079Ea 蛋白質はアミノ酸配列から、小孔形成蛋白質として知られている MACPF (Membrane Attack Complex/Perforin) スーパーファミリーに属していることが予測された。X線結晶構造解析を行ったところ、実際にその立体構造は N 末端側に小孔形成領域である MACPF ドメインを有していた。また、C 末端側に既知の受容体認識

20

25

ドメインに似たβ-trefoil 構造を有していた (添付資料 2)。

MACPF スーパーファミリーに属する蛋白質 (以下「MACPF 蛋白質」という。) は細菌、哺乳類、菌類及び植物を含む様々な生物に広く分布しており、その多様な機能は免疫、発生及び病原性等に関連する (Anderluh *et al.*, 2014)。細菌の MACPF 蛋白質は病原性に加え、蛋白質の分泌及び栄養吸収等の機能に関連すると考えられている (Anderluh *et al.*, 2014)。また、下等真核生物では、MACPF 蛋白質は不要な細胞及びウイルスに感染した細胞の除去を通じて免疫機能に寄与することが知られている (Anderluh *et al.*, 2014)。

30

トウモロコシを含むゲノム配列が明らかとなっている代表的なイネ科植物においては、MACPF ドメインを有する蛋白質をコードする遺伝子が複数同定されている (Yu *et al.*, 2020)。これらの遺伝子の発現解析から、イネ科植物では MACPF ドメインを有する蛋白質が発生及び環境ストレス応答において機能することが示唆されている (Yu *et al.*, 2020)。また、シロイヌナズナとイネにおける MACPF ドメインを有する蛋白質が植物の防御反応の調節に関与する可能性も報告されている (Noutoshi *et al.*, 2006)。

35

MACPF 蛋白質は標的細胞の細胞膜上の受容体に結合した後、環状複合体を形成し小孔を形成する (Rosado *et al.*, 2008)。細胞膜状での複合体形成時に MACPF 蛋白質はモノマー単位での構造変化を起こし、MACPF ドメイン中のα-helix が伸長することで膜貫通孔を形成することが知られている (Rosado *et*

40



al., 2008)。そこで、標的昆虫の腸内における IPD079Ea 蛋白質の分子構造を確認するため、IPD079Ea 蛋白質を標的害虫である WCR の中腸抽出液と混合した後に電子顕微鏡で観察した。その結果、IPD079Ea 蛋白質がこれまでに報告されている MACPF 蛋白質と同等のサイズの環状複合体を形成することが

5

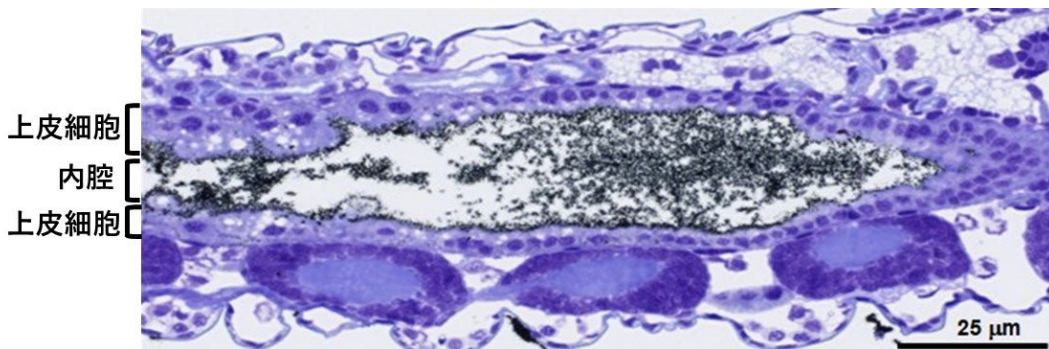
WCR に IPD079Ea 蛋白質を混餌投与した後、その組織断片において IPD079Ea 蛋白質を特異的抗体で染色した結果、IPD079Ea 蛋白質が WCR の中腸内腔及び中腸上皮細胞に局在していることが確認された（図 1、16 ページ）。このことから、IPD079Ea 蛋白質は WCR の中腸上皮細胞に存在する受容体に結合すると考えられた。実際に、中腸上皮刷子縁膜小胞（brush border membrane vesicles ; BBMV）を用いた結合試験の結果、IPD079Ea 蛋白質が WCR の BBMV に結合することが確認された（添付資料 2）。一方、チョウ目昆虫であるアメリカタバコガ（*Helicoverpa zea*）、ツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）及びヨーロッパアワノメイガ（*Ostrinia nubilalis*）の BBMV を用いた同様の試験では、IPD079Ea 蛋白質の BBMV への結合は認められなかった（添付資料 2）。これらの結合試験の結果は、後述する IPD079Ea 蛋白質の殺虫スペクトルと一致している。

10

15

さらに、IPD079Ea 蛋白質の WCR の BBMV に対する結合活性は、WCR に殺虫活性を示す Bt 蛋白質（mCry3Aa 蛋白質及び Cry34Ab1/35Ab1 蛋白質）によって阻害されなかったことから、IPD079Ea 蛋白質とこれらの Bt 蛋白質は WCR の中腸において異なる受容体と結合することが示唆された（添付資料 2）。

20



25

図 1 WCR の中腸における IPD079Ea 蛋白質の局在

WCR に IPD079Ea 蛋白質を混餌投与し、6 時間後にその中腸の超薄切片を作成し、IPD079Ea 蛋白質を特異的抗体で検出した（IPD079Ea 蛋白質の局在は黒色で示される）。

30

IPD079Ea 蛋白質を混餌投与した WCR の 24 時間経過後の中腸を観察すると、対照として人工飼料のみを投与した WCR の中腸と比較し、中腸上皮細胞が顕著に膨潤・破裂し、細胞残渣が内腔内で確認できる。また同試験区では上皮細胞の表面に均一に存在していた微絨毛が破壊され、周辺の筋細胞の集積や幹細胞の増加が観察された（図 2、17 ページ）。

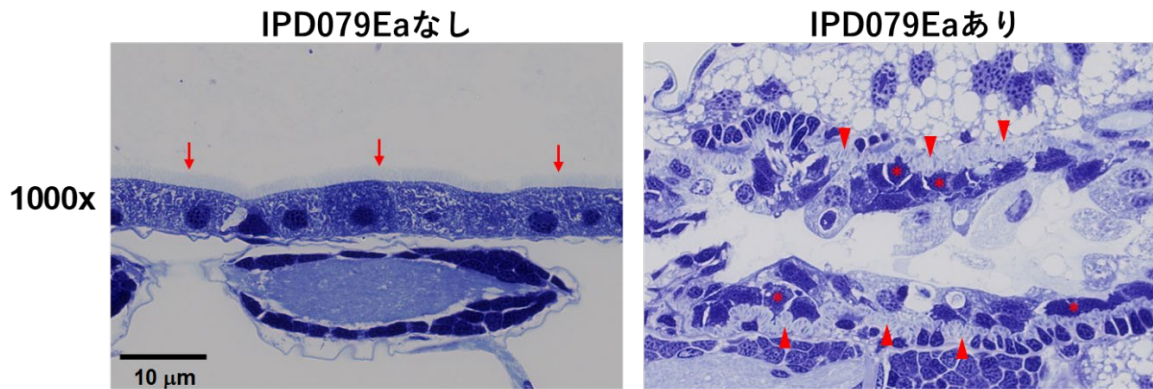


図 2 IPD079Ea 蛋白質投与後の WCR 中腸

WCR に IPD079Ea 蛋白質を混餌投与し、24 時間経過後の中腸を顕微鏡で撮影した。左は IPD079Ea 蛋白質を含まない人工飼料を投与した場合、右は IPD079Ea 蛋白質を投与した場合を示した。図中の矢印は微絨毛を（左）、矢じり及びアスタリスクは筋細胞及び幹細胞を示す（右）。

これらの結果から、IPD079Ea 蛋白質は既知の MACPF 蛋白質と同様の小孔形成機能を有し、WCR の中腸上皮細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられた。

#### - IPD079Ea 蛋白質の殺虫スペクトル

標的害虫である WCR に対する殺虫活性を確認するため、*in vitro* で合成した IPD079Ea 蛋白質を WCR に混餌投与し LC<sub>50</sub> (半数致死濃度) を調査した。その結果、WCR に対する LC<sub>50</sub> は 5.6 ppm であった (表 3、19 ページ; 添付資料 4)。このことから IPD079Ea 蛋白質が WCR に対して十分な殺虫活性を有していることが確認された。

次に、IPD079Ea 蛋白質の殺虫活性がコウチュウ目昆虫に特異的であることを確認するため、WCR を除くコウチュウ目昆虫 9 種及びチョウ目昆虫 4 種に IPD079Ea 蛋白質を混餌投与し、それぞれの昆虫に対する NOEC (生存率に影響を生じなかった最大濃度) を調査した (表 3、19 ページ; 添付資料 4; Boeckman *et al.*, 2022)。その結果、調査した 9 種のコウチュウ目昆虫のうち 7 種については、試験に用いた IPD079Ea 蛋白質の最大濃度である 800 ppm においても生存率への影響は認められなかった。一方で、ジュウイチホシウリハムシ (*Diabrotica undecimpunctata*) 及びインゲンテントウ (*Epilachna varivestis*) の NOEC はそれぞれ 100 ppm 未満及び 10 ppm であり、感受性が認められた。感受性が認められた 2 種のコウチュウ目昆虫について、NOEC の調査に用いた生存率のデータから LC<sub>50</sub> を推定したところ、*D. undecimpunctata* 及び *E. varivestis* の LC<sub>50</sub> は 98.2 ppm 及び 48.8 ppm であった。これらの LC<sub>50</sub> は WCR に対する LC<sub>50</sub> (5.6 ppm) と比較し高いことから、IPD079Ea 蛋白質は調査したコウチュウ目昆虫のうち標的害虫である WCR に対して最も高い殺虫活性を有していることが確認された。なお、*D. undecimpunctata* は標的害虫 WCR の近縁種でありトウモロコシの害虫であ

ること、また *E. varivestis* はダイズの二次害虫でトウモロコシのほ場では発生しないことが知られている。

一方、チョウ目昆虫については、調査した 4 種全てにおいて、試験に用いた IPD079Ea 蛋白質の最大濃度である 800 ppm においても生存率への影響は認められなかった。

5

つづいて、IPD079Ea 蛋白質の非標的生物への影響について検討した。ハチ目、トビムシ目及びアミメカゲロウ目の非標的生物について、本組換えトウモロコシ栽培時における IPD079Ea 蛋白質への最大暴露量を推定した上、当該暴露量を超える量の IPD079Ea 蛋白質を混餌投与した結果、いずれの生物種

10

についても生存率に影響は認められなかった(表 4、20 ページ; 添付資料 5)。

以上のことから、IPD079Ea 蛋白質は、特定のコウチュウ目昆虫に特異的に殺虫活性を示すことが確認された。

表 3 IPD079Ea 蛋白質の殺虫スペクトル

目	科	種	LC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	NOEC <sup>2)</sup> (ppm)
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (WCR)	5.6 (2.9 – 8.3)	—
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	98.2 (43.0 – 142.5) <sup>4)</sup>	<100 <sup>5)</sup>
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	—	800
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	<i>Tenebrio molitor</i>	—	800
		<i>Zophobas morio</i>	—	800
		<i>Tribolium castaneum</i>	—	800
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Epilachna varivestis</i>	48.8 (41.3 – 58.0) <sup>4)</sup>	10
		<i>Coleomegilla maculate</i> <sup>3)</sup>	—	800
		<i>Hippodamia convergens</i> <sup>3)</sup>	—	800
	Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Dalotia coriaria</i> <sup>3)</sup> ( <i>Atheta coriaria</i> )	—	800
Lepidoptera (チョウ目)	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	—	800
	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Helicoverpa zea</i>	—	800
	Nymphalidae (タテハチョウ科)	<i>Vanessa cardui</i>	—	800
	Tortricidae (ハマキガ科)	<i>Cydia pomonella</i>	—	800

1) 半数致死濃度。括弧内は 95%信頼区間。

2) 無影響濃度：生存率に影響を生じなかった最大濃度。

3) 非標的生物。これら以外の 11 種は米国における農業害虫。

4) NOEC の調査に用いた生存率のデータから推定した。

5) *D. undecimpunctata* については、供した IPD079Ea 蛋白質の最小濃度である 100 ppm で生存率に影響がみられたことから <100 ppm とした。また、SAS software (Version 9.4) を用いたプロビット分析により推定した NOEC は 31.3 ppm (95%信頼区間：4.5 – 60.0 ppm) であった。

表 4 IPD079Ea 蛋白質の非標的生物への影響

目	種	生存率への影響*
Hymenoptera (ハチ目)	<i>Apis mellifera</i> (幼生)	無
	<i>Apis mellifera</i> (成体)	無
	<i>Prediobius foveolatus</i>	無
Neuroptera (アミメカゲロウ目)	<i>Chrysoperla rufilabris</i>	無
Collembola (トビムシ目)	<i>Folsomia candida</i>	無

\*各生物種について、本組換えトウモロコシ栽培時における推定最大暴露量を超える量の IPD079Ea 蛋白質を投与し、得られた NOEC (NOED) と推定最大暴露量の比を算出した結果、いずれの生物種もその比は 10 を上回ったこと (Rose, 2007; US-EPA, 2010) から、生存率への影響は認められないと評価した。

5

### PAT 蛋白質

PAT 蛋白質は *S. viridochromogenes* に由来する。除草剤グルホシネートは、その活性成分である L-グルホシネートによりグルタミン合成酵素活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。PAT 蛋白質は、L-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変え無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する (OECD, 2002)。なお、トウモロコシでの発現を最適化するため *pat* 遺伝子の塩基配列を改変しているが<sup>1)</sup>、産生される PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。

10

15

### PMI 蛋白質

PMI 蛋白質は *E. coli* に由来し、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する。トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、PMI 蛋白質を産生する植物は炭素源としてマンノースを含む培地において成長することが可能なため、遺伝子組換え植物の選抜マーカーとして用いられる (Negrotto *et al.*, 2000 ; 第一.2. (3) .ハ.①、26 ページ)。

20

25

b. アレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性

Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) データベース<sup>2)</sup> (2020 年 1 月版) を用い、IPD079Ea 蛋白質と既知アレルギーのアミノ酸配

<sup>1)</sup> 塩基配列が改変されているため、添付資料においては *morpat* と表記。

<sup>2)</sup> Health and Environmental Science Institute (HESI) によるデータベース (<http://comparedatabase.org>)、保持配列数 2,248。

5 列を比較した。その結果、IPD079Ea 蛋白質と相同性を示すアレルゲンは認められなかった（添付資料 6）。また、本組換えトウモロコシで産生される PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質のアミノ酸配列は、既に承認を受けている *B.t. Cry1F maize line 1507*<sup>3)</sup> 等で産生される PAT 蛋白質及び MIR162<sup>4)</sup> 等で産生される PMI 蛋白質と同一であり、既に安全性の評価が終了している。これらの蛋白質を産生するそれぞれのトウモロコシは既に商業化され安全に使用されており、これまでにアレルギー誘発性を示したとの報告はない。

10 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

15 IPD079Ea 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫に対する殺虫活性が認められる一方、試験に用いたコウチュウ目昆虫以外の生物種への殺虫活性は認められていない（表 3 及び表 4、19 及び 20 ページ）。また、当該蛋白質のアミノ酸配列について、既知の酵素蛋白質のモチーフあるいはドメイン等との相同性は認められていない（添付資料 2）。

15 PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない（OECD, 1999）。

20 PMI 蛋白質は基質特異性を有し、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒するが、他の天然基質は知られていない（Freeze, 2002）。

また、これらの蛋白質の作用機作は互いに独立していると考えられることから、相互に影響する可能性は低い。

25 以上のことから、これら蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は低いと考えられた。

---

<sup>3)</sup> チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*cry1F, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t. Cry1F maize line 1507*, OECD UI: DAS-Ø15Ø7-1)。

我が国における承認状況；食品：2002 年 7 月 8 日、飼料：2003 年 3 月 27 日、環境：2005 年 3 月 2 日。

<sup>4)</sup> チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (改変 *vip3A, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI: SYN-IR162-4)。

我が国における承認状況；食品：2010 年 1 月 21 日、飼料：2010 年 6 月 1 日、環境：2010 年 6 月 11 日。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

5 目的遺伝子の導入に用いたベクターはプラスミド PHP83175 であり (図 3、24 ページ)、アグロバクテリウム (*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)) 等由来のプラスミド pSB1 から作製された (GenBank Accession AB027255; Komari *et al.*, 1996)。

### 10 ロ 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

15 プラスミド PHP83175 の塩基数は 74,997 bp であり、挿入 DNA 領域の塩基数は 18,190 bp<sup>5)</sup>である。挿入 DNA 領域を含む T-DNA 領域の塩基配列を添付資料 1 に示した。

#### 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 プラスミド PHP83175 の外側骨格領域には、微生物を用いてプラスミドを増殖させる際に用いた選抜マーカーとして抗生物質スペクチノマイシン耐性 (*spc*) 遺伝子及びテトラサイクリン耐性 (*tetA*) 遺伝子が含まれている。しかしながら、これら抗生物質耐性遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置するため、宿主の細胞には導入されない。また、PHP83175 の T-DNA 領域のうち、染色体に挿入されなかった外側骨格領域には、*zm-wus2* 遺伝子、*zm-odp2* 遺伝子及び *Flp* 遺伝子の発現カセットが含まれる。これらの遺伝子は、T-DNA 領域が宿主の細胞に移入された後、染色体に挿入されることなく一過的に蛋白質を産生することにより機能する。*zm-wus2* 遺伝子及び *zm-odp2* 遺伝子は、形質転換における植物体の再生率を向上させる (Lowe *et al.*, 2016)。*Flp* 遺伝子は、FRT1 及び FRT6 において部位特異的組換えを誘導することにより、挿入 DNA 領域を染色体上の意図した位置に挿入することを可能にする (第一.2. (3) .イ、23 ページ)。これらの遺伝子を含む外側骨格領域が宿主の染色体に挿入されていないことは、T<sub>1</sub> 世代における塩基配列解析により確認した (第一.2. (4) .②、27 ページ)。

#### 35 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

プラスミド PHP83175 は感染を可能とする配列を含まない。

---

<sup>5)</sup> 相同組換えの結果、DP915635 に挿入される 2 つの FRT 配列 (FRT1 及び FRT6) は PHP83175 及び PHP73878 (添付資料 7) の両方のプラスミドに由来する。このため、PHP83175 の挿入 DNA 領域の塩基数は、2 つの FRT 配列を含む塩基数 (18,238 bp) から 1 つの FRT 配列の塩基数 (48 bp) を差し引くことで算出された。

### (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5 挿入 DNA 領域は、*pmi* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ipd079Ea* 遺伝子の発現カセットを含む。プラスミド PHP83175 における挿入 DNA 領域の構成を図 3 (24 ページ) に示した。

10 また、本組換えトウモロコシの染色体に挿入された核酸全体について添付資料 7 及び図 4 (25 ページ) に示した。本組換えトウモロコシの作出においては、プラスミド PHP83175 に含まれる挿入 DNA 領域を、部位特異的組換えを用いてトウモロコシのゲノム DNA に挿入した。

部位特異的組換えにはリコンビナーゼである FLP 蛋白質を用いた。FLP 蛋白質は標的配列である FRT1 及び FRT6 の配列特異的に組換えを誘導する。

15 はじめに、これらの標的配列を含む挿入標的配列 (Landing Pad sequence; 以下「LP 配列」という。) をパーティクルガン法により非遺伝子組換えトウモロコシ (以下「非組換えトウモロコシ」という。) PHR03 系統に導入し、1 コピーの LP 配列が染色体に挿入され、かつその挿入によって内在性遺伝子の破壊が生じていない系統 (以下「中間系統」という。) を選抜した (図 4 の C、25 ページ)。

20 次に、得られた中間系統にアグロバクテリウム法により PHP83175 の T-DNA 領域を導入した (図 4 の A 及び B、25 ページ)。当該 T-DNA 領域は FRT1 及び FRT6 に加え *Flp* 遺伝子発現カセットを含んでいるため、導入に伴い FLP 蛋白質が産生される。その結果、当該 T-DNA 領域中の FRT1 及び FRT6 と、既に染色体に挿入されている LP 配列中の FRT1 及び FRT6 との間で部位特異的組換えが誘導され、当該 T-DNA 領域のうち挿入 DNA 領域 (図 3、24 ページ) だけが染色体上の LP 配列中に挿入された (図 4 の D、25 ページ)。

30 なお、PHP83175 の T-DNA 領域全体が染色体に挿入される可能性もあったが、後述するように、本組換えトウモロコシの T<sub>1</sub> 世代を用いて、意図した部位特異的組換えだけが生じていることを確認した (第一.2. (4) .②、27 ページ)。



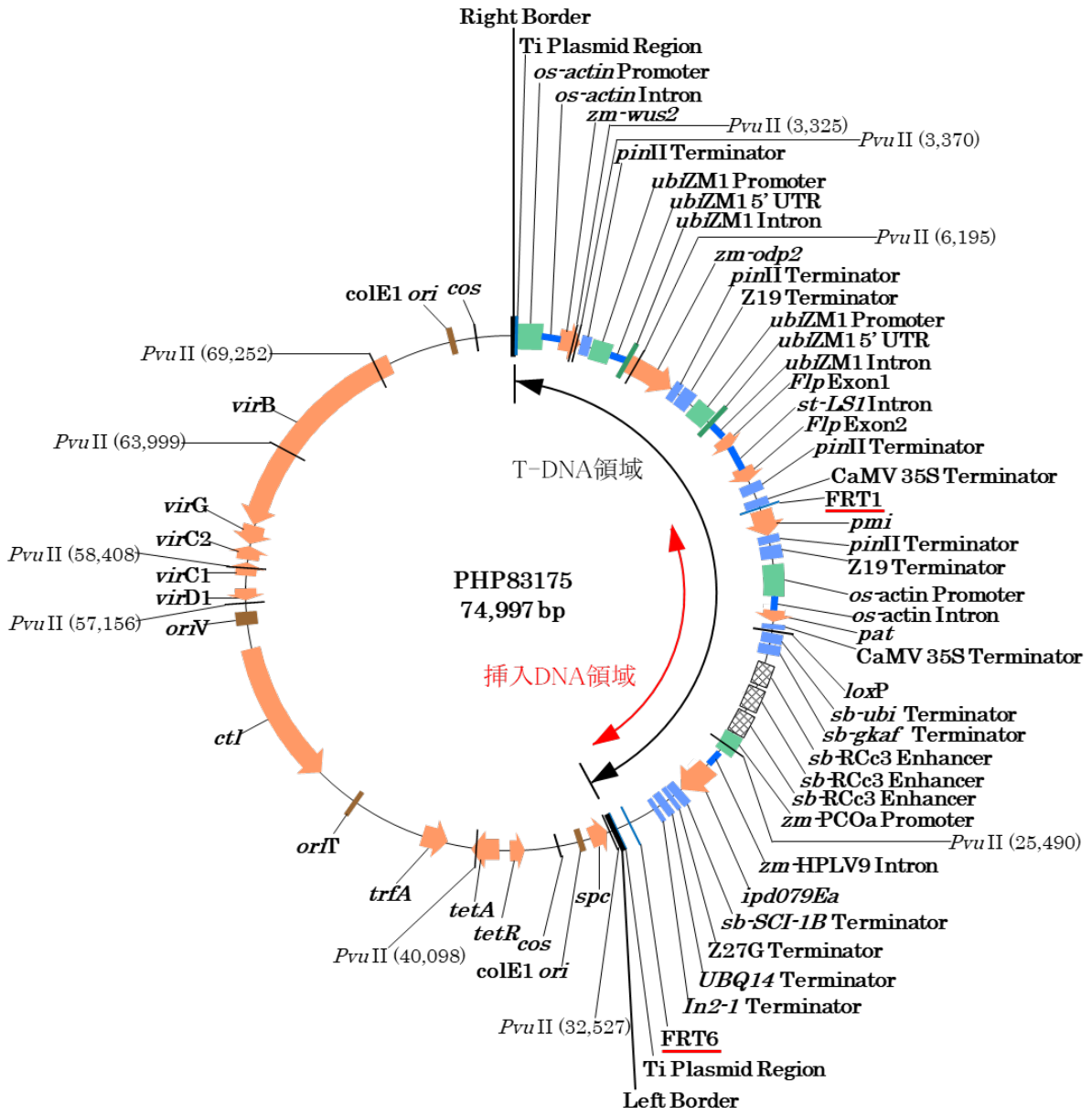


図 3 プラスミド PHP83175 における供与核酸の構成  
 供与核酸は、赤線で示した FRT1 及び FRT6 に挟まれた挿入 DNA 領域である。

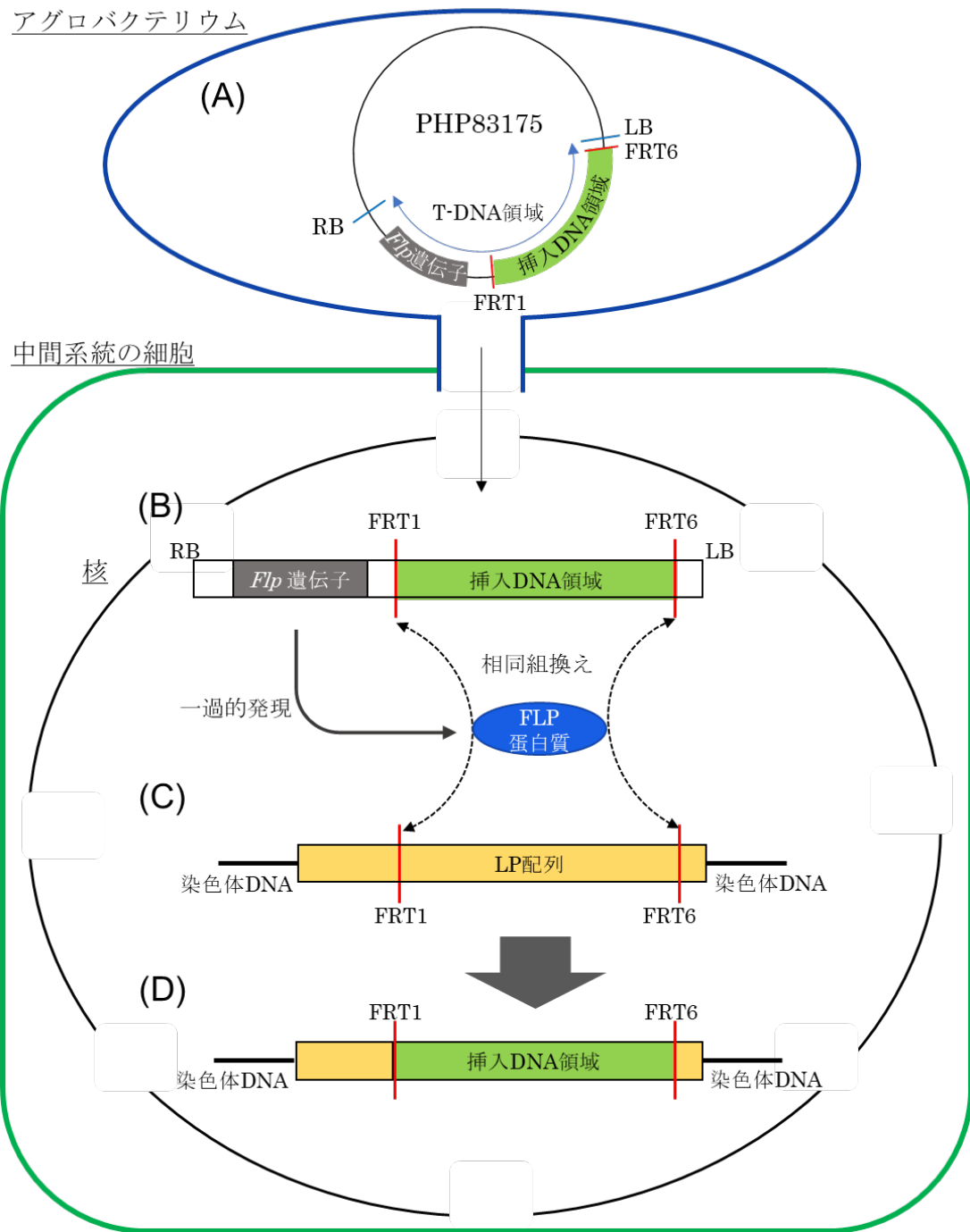


図 4 部位特異的組換えによる本組換えトウモロコシの作出

A: PHP83175 における T-DNA 領域及び挿入 DNA 領域。

B: アグロバクテリウム法により PHR03 系統に導入された挿入 DNA 領域を含む T-DNA 領域。

5 C: 非組換えトウモロコシ PHR03 系統の染色体に挿入された LP 配列。

D: PHR03 系統の染色体上の LP 配列と導入された PHP83175 の T-DNA 領域との間で、FLP 蛋白質による相同組換えが誘導され、FRT1 及び FRT6 に挟まれた領域が置換される。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

5 本組換えトウモロコシの染色体に挿入された核酸のうち、LP 配列についてはパーティクルガン法を、挿入 DNA 領域についてはアグロバクテリウム法を用いて移入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

10 ① 核酸が移入された細胞の選抜方法

核酸が移入された細胞は、炭素源としてマンノースを添加した培地で胚を生育させることにより選抜した。

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

20 アグロバクテリウムの除去は、培地に抗生物質セフトキシム及びチメンチンを添加することにより行った。また、本組換えトウモロコシの T<sub>3</sub> 世代の種子及び T<sub>1</sub> 世代の葉から抽出した DNA 中にプラスミド PHP83175 の外側骨格領域は認められず（添付資料 8 及び添付資料 9）、アグロバクテリウムの菌体の残存はないと考えられた。

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 本組換えトウモロコシの育成経過は図 5（26 ページ）のとおりであり、本図中に、該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を示した。承認対象の範囲は、T<sub>1</sub> 世代以降である。

（社外秘情報につき非開示）

図 5 本組換えトウモロコシの育成経過

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

35 ① 移入された核酸の複製物が存在する場所

移入された核酸が植物の染色体に取り込まれると、後代においてメンデルの法則に従い分離する。本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物の分離比を検討するため、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub> 及び F<sub>1</sub>\*<sup>1</sup> の 5 世代（図 5、26 ページ）の 2 葉期から 4 葉期の葉から抽出した DNA を用いて定量 PCR 分析を行った（添付資料

10)。分析には、導入遺伝子である *ipd079Ea* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の各々に特異的なプライマーを用いた。

5 その結果、いずれの世代における分離比も、メンデルの法則に従った場合に期待される分離比に適合したことから (表 5、27 ページ)、本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物が染色体上に存在することが確認された。

表 5 本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物の分離比

世代	分離比の期待値	PCR 分析の結果			P 値 <sup>3)</sup>
	陽性：陰性	サンプル数	陽性 <sup>1)</sup>	陰性 <sup>2)</sup>	
T <sub>2</sub>	3 : 1	100	79	21	0.3556
T <sub>3</sub>	3 : 1	100	74	26	0.8174
T <sub>4</sub> <sup>4)</sup>	1 : 0	100	100	0	-
T <sub>5</sub> <sup>4)</sup>	1 : 0	100	100	0	-
F <sub>1</sub> * <sup>1)</sup>	1 : 1	100	47	53	0.5485

1) *ipd079Ea* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の全てが検出された個体数。

2) 上記のいずれも検出されなかった個体数。

10 3) カイ二乗検定。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的有意差有り。

4) ホモ接合体。

15 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

本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物のコピー数を確認するため、T<sub>1</sub> 世代 (図 5、26 ページ) の葉から抽出した DNA を断片化し、そのうちプラスミド PHP83175 由来の配列を含む断片について、Southern by Sequence 分析<sup>6)</sup> (以下「SbS 分析」という。) を用いて解析した (添付資料 9)。

20 その結果、供試した 10 個体のうち 5 個体に PHP83175 由来の配列が認められた。これら陽性個体のいずれについても PHP83175 由来の配列として挿入 DNA 領域のみが認められた (添付資料 8 の Figure14B、16B、17B、18B 及び 20B)。

25 前述のとおり、本組換えトウモロコシの作出においては 1 コピーの LP 配列を有する中間系統を用い、当該 LP 配列中に部位特異的組換えにより PHP83175 由来の挿入 DNA 領域を挿入した (第一.2. (3) .イ、23 ページ)。SbS 分析の結果、本組換えトウモロコシ中に LP 配列の 5' 末端及び 3' 末端とトウモロコシ染色体 DNA との接合領域がそれぞれ 1 か所特定されたことから、実際に本組換えトウモロコシ中に LP 配列が 1 コピー含まれることが確認された (添付資料 9 の

6) キャプチャー技術と次世代シーケンズを組み合わせた解析手法。断片化した植物ゲノム全体から、用いたプラスミドの全塩基配列を網羅する特異的なプローブセットを用いて DNA 断片を選択的に回収 (キャプチャー) し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を行う。本法を用いることにより、挿入された DNA 断片及びその近傍の塩基配列情報が得られる (Zastrow-Hayes *et al*, 2015)。

Figure14A、16A、17A、18A 及び 20A)。また、挿入 DNA 領域の 5' 末端及び 3' 末端はそれぞれ LP 配列と接合しており、部位特異的組換えによって挿入 DNA 領域が LP 配列中の意図した位置に挿入されたことが確認された (添付資料 9 の Figure14A、16A、17A、18A 及び 20A)。さらに、挿入 DNA 領域由来の配列と トウモロコシ染色体 DNA との接合は認められなかったことから、LP 配列以外の

5

これらのことから、本組換えトウモロコシの染色体 DNA 中には PHP83175 由来の配列として挿入 DNA 領域だけが 1 コピー挿入されていることが確認された。さらに、T<sub>4</sub> 世代 (図 5、26 ページ) の DNA を用いて、挿入された DNA 全体及びその近傍の塩基配列を Sanger 法により決定した。その結果、*pmi* 遺伝子上流の *ubiZM1 Promoter* 領域での 1 塩基置換を除き、挿入 DNA 領域は意図したとおりの LP 配列中に挿入されていることが確認された (添付資料 11)。

10

さらに、いずれの世代についても PHP83175 由来の配列とゲノム DNA の意図しない接合部位は認められなかったことから、PHP83175 の外側骨格領域がゲノム DNA に挿入されていないことが確認された。

15

なお、中間系統の作出に用いられた他のプラスミド (添付資料 7) についても SbS 分析を行った結果、これらのプラスミドに由来する意図しない DNA 断片が本組換えトウモロコシ中に残存していないことが確認された (添付資料 9)。

20

また、各導入遺伝子の配列をプローブとしたサザンブロット分析を、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 及び T<sub>5</sub> の 5 世代 (図 5、26 ページ) において実施した結果、移入された核酸の複製物が複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認された (添付資料 12)。

25

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

—

30

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

35

2019 年に米国アイオワ州の温室で栽培した本組換えトウモロコシ T<sub>3</sub> 世代及び F<sub>1</sub>\*1 世代 (図 5、26 ページ) の 9 葉期の根及び葉、2019 年に北米 6 か所 (米国のアイオワ州、ネブラスカ州及びペンシルバニア州各 1 か所、イリノイ州 2 か所並びにカナダのオンタリオ州 1 か所) のほ場で栽培した F<sub>1</sub>\*2 世代 (図 5、26 ページ) の 9 葉期の根及び葉、開花期の花粉並びに完熟期の子実を用い、IPD079Ea 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質の産生量を分析した (添付資料 13 及び添付資料 14)。

40

IPD079Ea 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質の産生量を ELISA 法によって分析した結果、いずれの個体にもこれらの蛋白質の全てが産生されていることが

確認された。また、これらの蛋白質が世代間で安定して産生されることが、各世代の9葉期の根又は葉における産生量により確認された（表6、29ページ）。

表6 IPD079Ea 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質の産生量  
(ng / mg 乾物重)

5

遺伝子産物	世代	採取部位	定量下限値	平均値 ± 標準偏差 (最小値 - 最大値)
IPD079Ea 蛋白質	T <sub>3</sub>	根	0.069	22 ± 7.0 (14 - 29)
	F <sub>1</sub> *1	根	0.069	20 ± 3.1 (15 - 23)
	F <sub>1</sub> *2	根	0.069	9.2 ± 5.8 (0.72 - 30)
		葉	0.14	0.83 ± 0.31 (0.33 - 1.6)
		花粉	0.28	0.95 ± 0.18 (0.58 - 1.3)
		子実	0.069	0.18 ± 0.065 (0.075 - 0.36)
PAT 蛋白質	T <sub>3</sub>	葉	0.11	6.3 ± 0.64 (5.6 - 7.2)
	F <sub>1</sub> *1	葉	0.11	5.1 ± 0.63 (4.2 - 5.9)
	F <sub>1</sub> *2	根	0.054	7.3 ± 3.3 (3.6 - 14)
		葉	0.11	4.4 ± 1.3 (2.6 - 8.4)
		花粉	0.22	80 ± 13 (47 - 110)
		子実	0.054	6.4 ± 1.5 (3.9 - 9.9)
PMI 蛋白質	T <sub>3</sub>	葉	0.54	11 ± 2.5 (7.8 - 14)
	F <sub>1</sub> *1	葉	0.54	5.8 ± 0.86 (4.9 - 7.2)
	F <sub>1</sub> *2	根	0.27	4.8 ± 2.1 (1.8 - 9.6)
		葉	0.54	6.6 ± 2.0 (3.4 - 11)
		花粉	1.1	23 ± 2.8 (17 - 26)
子実		0.27	3.1 ± 1.1 (1.5 - 5.7)	

\* T<sub>3</sub> 世代及び F<sub>1</sub>\*1 世代は n=5、F<sub>1</sub>\*2 世代は n=24。いずれの個体も PCR 法により導入遺伝子を有することを確認した。

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達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 移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、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 検出及び識別の方法：

本組換えトウモロコシは、移入された核酸の 3'末端とゲノム DNA との接合部位に特異的なプライマーを用いた定量 PCR 法による検出及び識別が可能である（添付資料 15）。

15 感度：

本法の検出限界値は、非組換えトウモロコシのゲノム DNA に対する本組換えトウモロコシのゲノム DNA の混入率として 0.009%である（添付資料 15）。

信頼性：

20 独立した研究室 2 か所において再現性が得られている（添付資料 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

5

本組換えトウモロコシに付与された特性は、*ipd079Ea* 遺伝子によるコウチュウ目害虫抵抗性、*pat* 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性並びに *pmi* 遺伝子によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性である。

10 本組換えトウモロコシにコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されたことを確認するため、2019年に米国アイオワ州、インディアナ州、サウスダコタ州及びミネソタ州の計7ほ場で栽培した本組換えトウモロコシの F<sub>1</sub>\*2 世代 (図5、26ページ) と対照のトウモロコシを栽培し、2葉期から4葉期に1株あたり750個又は1,500個のWCRの卵を株元接種した後、水熟期に根の食害を調査した (添付資料16)。

15

その結果、本組換えトウモロコシがコウチュウ目害虫抵抗性を有することが確認された (表7、31ページ)。

20 表7 本組換えトウモロコシにおけるコウチュウ目害虫抵抗性<sup>1)</sup>

世代		本組換え トウモロコシ <sup>2)</sup>	対照 トウモロコシ <sup>3)</sup>	P値 <sup>4)</sup>
F <sub>1</sub> *2	平均値 ± 標準偏差	0.16 ± 0.17	2.02 ± 0.80	< 0.0001
	最小値 - 最大値	0.02 - 0.71	0.70 - 3.00	

1) 下記のスコアを用いて評価した。

0.00 = 根に食害なし。

1.00 = 1つの節の全ての根又はそれに相当する根が食害を受けている。

2.00 = 2つの節の全ての根が食害を受けている。

25

3.00 = 3つ以上の節の全ての根が食害を受けている (スコア上限)。

節の一部の根が食害を受けている場合には、当該節の根の総数に対する食害を受けた根の数の割合をスコアに加算した (Oleson *et al.*, 2005)。

2) n = 14。

3) n = 14。本組換えトウモロコシと同様の遺伝背景を有するトウモロコシ (PHR03×PH1KTF系統)。

30

4) 線形混合モデルによる統計解析。P値が0.05未満の場合、統計学的有意差有り。



5 本組換えトウモロコシに除草剤グルホシネート耐性の形質が付与されたことを確認するため、PCR 法によって導入遺伝子の有無を確認した本組換えトウモロコシの T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub> 及び F<sub>1</sub>\*<sup>1</sup> の 5 世代（第一.2. (4) .①、26 ページ）の各個体について、3 葉期から 4 葉期に除草剤グルホシネート 0.65 kg a.i.<sup>7)</sup>/ha（通常量）を散布し、散布 4 日から 6 日後に耐性の有無を目視により調査した（添付資料 10）。その結果、本組換えトウモロコシが除草剤グルホシネート耐性を有することが確認された（表 8、32 ページ）。

表 8 本組換えトウモロコシにおける除草剤グルホシネート耐性

世代		本組換え トウモロコシ <sup>1)</sup>	非組換え トウモロコシ <sup>2)</sup>
T <sub>2</sub>	耐性個体数 <sup>3)</sup> (総個体数)	79 (79)	0 (21)
T <sub>3</sub>	耐性個体数 <sup>3)</sup> (総個体数)	74 (74)	0 (26)
T <sub>4</sub>	耐性個体数 <sup>3)</sup> (総個体数)	100 (100)	0 (0)
T <sub>5</sub>	耐性個体数 <sup>3)</sup> (総個体数)	100 (100)	0 (0)
F <sub>1</sub> * <sup>1</sup>	耐性個体数 <sup>3)</sup> (総個体数)	47 (47)	0 (53)

- 10 1) 各世代において、PCR 分析により *ipd079Ea* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の全てが検出された個体。  
2) 各世代において、PCR 分析により上記のいずれも検出されなかったヌル分離個体。  
3) 目視により葉害及び枯死が認められなかった個体を耐性と判定した。

15 また、前述のとおり（第一.2. (3) .ハ.①、26 ページ）、本組換えトウモロコシが *pmi* 遺伝子によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性を有することが確認されている。

20 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

25 次の a~g の項目を指標として、本組換えトウモロコシと宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無を確認するため、2022 年にコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の遺伝子組換え農作物隔離ほ場において本組換えトウモロコシの栽培試験を行った（添付資料 17）。試験には本組換えトウモロコシの F<sub>1</sub>\*<sup>2</sup> 世代（図 5、26 ページ）及び対照として同様の遺伝的背景を有する非組換えトウモロコシ PHR03×PH1KTF 系統を用いた。

<sup>7)</sup> active ingredient (活性主成分)

a 形態及び生育の特性

5 発芽率、発芽揃い日、雄穂の抽出期、絹糸の抽出期、葉の着生角度、着雌穂高、分けつ数、稈長（雄穂の穂首までの長さ）、地上部重、雌穂の数、雌穂の長さ、雌穂の直径、粒の色及び粒質について調査した（添付資料 17、7 ページ）。

その結果、発芽率及び着雌穂高においては本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）が認められた。その他の調査項目においては、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差や違いは認められなかった（添付資料 17、8 ページ）。

10

b 生育初期における低温耐性

15 2022 年 11 月 10 日に、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシをポットに播種し、温室内で栽培後、2~3 葉期（11 月 29 日）に間引きを行い、6 日後にポットを露地に移した（12 月 5 日）。露地栽培 30 日後（1 月 4 日）に観察した結果、いずれの個体も枯死していた（添付資料 17、9 ページ）。

15

c 成体の越冬性

20 6 月 2 日に播種した本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを、成熟後の 2022 年 11 月 2 日に観察した結果、いずれの個体も枯死していた（添付資料 17、7 及び 8 ページ）

20

d 花粉の稔性及びサイズ

25 花粉の充実度（ヨード・ヨードカリ液染色率）及び長径を調査した結果、いずれも本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（添付資料 17、15 及び 16 ページ）。

25

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

30 種子の生産量について、雌穂の粒列数、一列粒数及び百粒重を調べた結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（添付資料 17、8 ページ）。

30

脱粒性について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのいずれについても、収穫時に種子の脱粒は認められなかった（添付資料 17、8 ページ）。

35

休眠性及び発芽率について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシから収穫した種子を、吸水させた脱脂綿上に室温で静置し発芽個体数を計測した。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも高く、両者の間に統計学的有意差（ $P<0.05$ ）は認められなかった（添付資料 17、9 ページ）。

40

f 交雑率

我が国にトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているとの報告はないことから、交雑率の調査は行わなかった。

g 有害物質の産生性

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの有害物質の産生性を比較するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験により検討した。

5

後作試験：

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを完熟期まで栽培し、根圏土壌を採取した。採取した土壌を用いて検定作物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した（添付資料 17、10 ページ）。

10

その結果、検定植物の発芽率においては本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。一方で、検定植物の乾物重において、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) が認められた。再試験を実施したところ、発芽率及び乾物重のいずれについても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった（添付資料 17、11 ページ）。

15

鋤込み試験：

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの葉身及び葉鞘を培土に添加した土壌で検定作物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した（添付資料 17、12 ページ）。

20

その結果、検定植物の乾物重においては本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。一方で、検定植物の発芽率において、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) が認められた。発芽率についてのみ再試験を実施したところ、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった（添付資料 17、13 ページ）。

25

土壌微生物相試験：

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを栽培した後の土壌における微生物数（細菌数、放線菌数及び糸状菌数）を計測した（添付資料 17、14 ページ）。

30

その結果、いずれについても、本組換えトウモロコシ栽培後土壌と非組換えトウモロコシ栽培後土壌との間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。

35

### 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 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国外における申請状況は表 9 (36 ページ) のとおりである。

表 9 国外における申請状況

(2023年12月現在)

申請国	目的	申請/承認年月			申請先
(社外秘情報につき非開示)					
(社外秘情報につき非開示)					
欧州	輸入	2020年	12月	申請	欧州食品安全機関 (EFSA)
(社外秘情報につき非開示)					
(社外秘情報につき非開示)					
(社外秘情報につき非開示)					

5      なお、我が国においては、2022年2月に食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、2021年11月に飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行っている。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 宿主であるトウモロコシは、我が国において長年にわたる使用実績がある。したがって、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの比較により、影響が生ずる可能性について考察した。

### 1 競合における優位性

#### 10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 植物が自然環境下で他の植物と競合するためには、当該植物が自然環境下で自生する、すなわち人の手を借りずに繁殖し、群落を維持することが必要である。植物の自生には種子の脱粒性及び休眠性が重要であるが、栽培作物であるトウモロコシは栽培化の過程でこれらの特性を失っており、自生することができない (OECD, 2003、後藤ほか, 2018)。これまでに、我が国の自然環境下においてトウモロコシが自生するとの報告はない。

20 本組換えトウモロコシには、IPD079Ea 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性、PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性及び PMI 蛋白質によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性が付与されているが、いずれも上記特性に関与する形質ではない。また、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸特性 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性並びに種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) について隔離ほ場で調査した結果、発芽率及び着雌穂高を除き非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差や違いは認められなかった (第一.2. (6) .②.a、33 ページ)。

30 統計学的有意差が認められた特性のうち、発芽率は休眠性に関与するが、本組換えトウモロコシの発芽率の平均値は 98.96%と非組換えトウモロコシの平均値 96.35%と比べても高い値であったことから、本組換えトウモロコシの種子が休眠性を獲得したとは考え難い。加えて、隔離ほ場で収穫された種子の発芽試験において、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの発芽率はいずれも高く、両者の間に統計学的有意差は認められなかった (第一.2. (6) .②.e、33 ページ)。

35 着雌穂高については、本組換えトウモロコシの平均値 128 cm は非組換えトウモロコシの平均値 137 cm に対して約 7%の違いであり大きな差ではなかったことに加えて (第一.2. (6) .②.e、33 ページ)、これまでに我が国の隔離ほ場試験において対照として用いられた従来品種における変動の範囲内であった (中井ら, 2015)。また、着雌穂高はトウモロコシの自生に関与する特性ではなく、その相違のみにより本組換えトウモロコシの自生が可能になるとは考え難い。

したがって、統計学的有意差が認められたこれらの特性により本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになることはなく、競合における優

位性が高まることもないと考えられた。

以上のことから、本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因して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。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

—

10

(3) 影響の生じやすさの評価

—

15

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

20

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

25

トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

30

本組換えトウモロコシは IPD079Ea 蛋白質によりコウチュウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を示す（第一.2. (1) .ロ.②、21 ページ; Boeckman *et al.*, 2022）。一方、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質及びマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性を付与する PMI 蛋白質が野生動植物等に有害性を示すとの報告は無い。

35

IPD079Ea 蛋白質のアミノ酸配列は既知の酵素蛋白質のモチーフあるいはドメイン等との相同性を有していないことから、IPD079Ea 蛋白質が酵素活性を有する可能性は低い。また、酵素である PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない。PMI 蛋白質も基質特異性を有し、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒するが、他の天然基質は知られていない。さらに、これらの蛋白質の作用機作は互いに独立していると考えられることから、相互に影響する可能性は低い。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝経路に作用して意図しない有害物質を産生するとは考え難い（第一.2. (1) .ロ.③、21 ページ）。

40

5 隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、後作試験における乾物重及び鋤込み試験における発芽率を除き、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった (第一.2. (6) .②.g、34 ページ)。統計学的有意差が認められた後作試験の乾物重について、非組換えトウモロコシの平均値は 186 mg、本組換えトウモロコシの平均値は 168 mg であった。また、鋤込み試験の発芽率について、非組換えトウモロコシの平均値は 97%、本組換えトウモロコシの平均値は 89% であった。

10 しかしながら、上述のとおり、各蛋白質の機能及び作用機作からは、根から分泌され他の植物に影響を与える有害物質及び枯死した後に他の植物に影響を与える有害物質が本組換えトウモロコシに産生されることは考え難いため、後作試験及び鋤込み試験を再度実施し、同様の差異が生じるか確認した (第一.2. (6) .②.g、34 ページ)。その結果、後作試験及び鋤込み試験ともに、調査した項目のいずれにおいても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差  
15 ( $P<0.05$ ) は認められず、両試験のいずれにおいても 2 回の試験間で一貫した差異は認められなかった。加えて、後作試験の乾物重及び鋤込み試験の発芽率の平均値の大小に試験間で一貫した傾向は認められなかった。本組換えトウモロコシで産生される各蛋白質の機能及び作用機作並びに隔離ほ場におけるこれらの試験結果から、本組換えトウモロコシが野生植物及び土壌微生物に影響を与えるよう  
20 な有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。

25 また、IPD079Ea 蛋白質は、既知アレルゲンとの間に有意な相同性を有しておらず、アレルギー誘発性を示す可能性は低い。PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質についても、これらの蛋白質を産生するトウモロコシは既に商業化され安全に使用されており、これまでにアレルギー誘発性を示したとの報告はない (第一.2. (1) .ロ.②.b、20 ページ)。

30 なお、グルホシネート散布時、PAT 蛋白質により *N*-アセチル-L-グルホシネートが産生される。しかしながら、本代謝産物の動物に対する毒性はグルホシネートより低く (食品安全委員会, 2013)、農薬取締法の下、グルホシネートの分析対象化合物の一つとしてトウモロコシにおける残留基準値が定められ、農薬登録により安全な使用方法が定められ、人畜及び環境に対する安全性が確保されている (日本食品化学研究振興財団, 2020)。加えて、自然環境下では当該除草剤の散布は想定されない。

35 以上のことから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてコウチュウ目昆虫が特定された。

40 コウチュウ目昆虫が本組換えトウモロコシに暴露される経路としては、本組換えトウモロコシから飛散した花粉が食草に付着し、それを摂食する場合と、本組換えトウモロコシの植物体を直接摂食する場合が考えられた。しかしながら、本組換えトウモロコシ栽培時において、植物体を直接摂食することでコウチュウ目昆虫が受ける影響は、トウモロコシの慣行栽培における殺虫剤散布等の防除によ



って受ける影響を超えるものでないと考えられる<sup>8)</sup>。そのため、本組換えトウモロコシの植物体を直接摂食することでコウチュウ目昆虫が影響を受ける経路は、栽培後に鋤込まれた植物体を腐植質とともに摂食する場合に限定される。

5       そこで、山本ほか（2003）の評価手法を参考に、環境省のレッドリスト<sup>9)</sup>に絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として掲載されているコウチュウ目昆虫のうち、本組換えトウモロコシの花粉飛散又は栽培後に鋤込まれた植物体を腐植質とともに摂食することにより影響を受ける可能性のある種を検討した。その結果、生息地及び食餌の点から4種が特定された（表 10、41 ページ）。

---

<sup>8)</sup> 国内において、トウモロコシ（子実）を適用作物とする殺虫剤として登録されており、トウモロコシの主要害虫であるチョウ目害虫の防除に利用されるダイアジノン粒剤及びMEP乳剤等は、コウチュウ目を含む広範囲の害虫に対して殺虫活性を示す（農林水産消費安全技術センター、2021a；農林水産消費安全技術センター、2021b）。

<sup>9)</sup> 環境省レッドリスト 2020：<https://www.env.go.jp/press/107905.html>

表 10 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫

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

出典：

- 5 大林延夫・新里達也 (2007) 日本産カミキリムシ 東海大学出版会  
 環境省自然環境局野生生物課 (2020) レッドリスト 2020  
 (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/113667.pdf>)  
 Accessed on July, 2020  
 野尻湖昆虫グループ (1985) アトラス・日本のネクイハムシ—化石同定への手引き—  
 野尻湖昆虫グループ  
 10 林成多 (2005) “日本産ネクイハムシ図鑑—全種の解説—” 月刊むし 408. むし社  
 林成多 (2012) 日本のネクイハムシ むし社

(2) 影響の具体的内容の評価

15 IPD079Ea 蛋白質の標的害虫である WCR に対する LC<sub>50</sub> 値は 5.6 ppm である (第一.2. (1) .ロ.②、15 ページ; 表 3、19 ページ)。

(3) 影響の生じやすさの評価

20 (1) で特定されたコウチュウ目昆虫 4 種が、本組換えトウモロコシから飛散した花粉又は栽培後に鋤込まれた植物体を腐植質とともに摂食することで受けうる影響の生じやすさについて評価した。

花粉については、飛散によりトウモロコシ栽培ほ場周辺に分布している当該昆虫の食草に付着し、それを当該昆虫が摂食する可能性がある。しかしながら、栽培ほ場外に飛散するトウモロコシの花粉量はほ場からの距離に応じて減少することが確認されており（第一.1. (3) .④、6 ページ）、我が国における調査としては、栽培ほ場から 10 m 離れたヒマワリの葉上に堆積する花粉量は 10 粒/cm<sup>2</sup>以内との報告がある（Shirai and Takahashi, 2005）。また、植物体については、栽培後の鋤込みによりほ場及びその周辺の土壌中で分解される。これらのことから、本組換えトウモロコシの花粉や鋤込まれた植物体への暴露は、ほ場周辺に限られると考えられた。

5

10

特定されたコウチュウ目昆虫 4 種の生息地及び食餌の点から（表 10、41 ページ）、これらの昆虫種がトウモロコシ栽培ほ場周辺という限定された環境を主要な生息地としているとは考え難い。

15

以上のことから、特定されたコウチュウ目昆虫が本組換えトウモロコシの花粉に暴露され、個体群レベルで影響を受ける可能性は低いと考えられた。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20

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

### 3 交雑性

25

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

30

宿主であるトウモロコシが我が国において野生化した事例はなく、また交雑可能な近縁野生種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の自生も報告されていない。このため、本組換えトウモロコシの交雑性に起因して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

—

40

#### (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の交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

#### 4 その他の性質

—

5

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

トウモロコシは我が国において長年にわたり栽培されてきたが、野生化して野生動物等の生息又は生育に影響を及ぼしたという報告はない。

5

競合における優位性：

栽培作物であるトウモロコシは栽培化の過程で種子の脱粒性及び休眠性を失っており、自生することができない。

10 本組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸特性（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、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）について国内隔離ほ場で調査した結果、発芽率及び着雌穂高に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。しかしながら、本組換えトウモロコシの発芽率は非組換えトウモロコシと比べても高い値である上、隔離ほ場で収穫された種子の発芽試験において、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの発芽率はい

15 ずれも高く、両者に統計学的有意差は認められなかった。また、本組換えトウモロコシの着雌穂高の平均値は従来品種の範囲内にあり、かつ着雌穂高はトウモロコシの自生に関する特性ではない。種子の生産量等のその他の調査項目に相違はなく、発芽率及び着雌穂高に認められた相違が本組換えトウモロコシを自生させる要因になるとは考え難い。

20 また、本組換えトウモロコシには、IPD079Ea 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性、PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性及び PMI 蛋白質による選抜マーカー特性が付与されているが、いずれもこれらの特性に関する形質ではない。このことから、これらの形質を有することにより本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになるとは考え難い。

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

有害物質の産生性：

30 従来、トウモロコシが野生動物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

本組換えトウモロコシ中に産生される IPD079Ea 蛋白質は、WCR 等の特定のコウチュウ目害虫に対して特異的な殺虫活性を示す。また、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質については、野生動物等に対する有害性は報告されていない。

35 これらの蛋白質のうち、IPD079Ea 蛋白質が酵素活性を有する可能性は低い。また、PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない。PMI 蛋白質も基質特異性を有し、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒するが、他の天然基質は知られていない。さらに、これらの蛋白質の作用機作は互いに独立していると考えられることから、相互に影響する可能性は低い。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝経路に作用して意

40 図しない有害物質を産生するとは考え難い。

隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、後作試験における乾物重及び鋤込み試験における発芽率において本組換えトウモロコ

シと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた。しかしながら、後作試験及び鋤込み試験の再試験では調査した項目のいずれにおいても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められず、また、両試験のいずれにおいても2回の試験間で一貫した差異は認められなかった。本組換えトウモロコシで産生される各蛋白質の機能及び作用機作並びに隔離ほ場におけるこれらの試験結果から、本組換えトウモロコシが野生植物や土壌微生物に影響を与えるような有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。

5

以上のことから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてコウチュウ目昆虫が特定された。さらに、我が国に生息する絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているコウチュウ目昆虫のうち、本組換えトウモロコシの花粉飛散又は植物体を腐植質とともに摂食することにより影響を受ける可能性のある種として4種を特定した。

10

トウモロコシの花粉の飛散はほ場から10m離れると極めて低く( $\leq 10$ 粒/cm<sup>2</sup>)、植物体は栽培後の鋤込みによりほ場及びその周辺の土壌中で分解されるため、本組換えトウモロコシの花粉や植物体への暴露はほ場周辺に限られる。一方、生息地や食草の点から、特定された4種のコウチュウ目昆虫がトウモロコシ栽培ほ場周辺に局所的に生息している可能性は低いと考えられる。したがって、本組換えトウモロコシの花粉の飛散又は植物体を腐植質とともに摂食することにより、特定されたコウチュウ目昆虫種が個体群レベルで影響を受ける可能性は低いと考えられた。

15

20

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

交雑性：

我が国において宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の自生は報告されていないことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

25

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、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないと総合的に判断された。

## 参考文献

- 5 Abbitt, S.E. and Shen, B. (2016). Maize and sorghum s-adenosyl-homocysteine hydrolase promoters. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2016109157 A1.
- Abbitt, S.E. (2017). SB-UBI terminator sequence for gene expression in plants. US Patent. Patent No. US 9725731 B2.
- 10 Abbitt, S.E., Klein, K., Selinger, D. (2018). Transcriptional Terminators for Gene Expression in Plants. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2018102131 A1.
- 15 Allen, S.M., Barry, J., Crane, V., English, J., Fengler, K., Schepers, E. and Udranszky, I. (2017). Plant Derived Insecticidal Proteins and Methods for Their Use. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2017023486 A1.
- 20 An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *The Plant Cell* 1: 115-122.
- 25 Anderluh, G., Kisovec, M., Krasevec, N. and Gilbert, R. (2014). MACPF/CDC Proteins – Agents of Defense, Attack and Invasion. *Distribution of MACPF/CDC Proteins*, eds Anderluh G, Gilbert R (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp 7-30.
- 30 Boeckman, C.J., Ballou, S., Gunderson, T., Huang, E., Linderblood, C., Olson, T., Stolte, B., LeRoy, K., Walker, C., Wang, Y., Woods, R. and Zhang, J. (2022). Characterization of the Spectrum of Activity of IPD079Ea: A Protein Derived From *Ophioglossum pendulum* (Ophioglossales: Ophioglossaceae) With Activity Against Western Corn Rootworm [*Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae)]. *Journal of Economic Entomology*. 115(5): 1531-1538.
- 35 Cajnko, M.M., Mikelj, M., Turk, T., Podobnik, M. and Anderluh, G. (2014). MACPF/CDC Proteins – Agents of Defense, Attack and Invasion. *Membrane Interactions and Cellular Effects of MACPF/CDC Proteins*, eds Anderluh G, Gilbert R (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp 119-144.
- 40 Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.-W. and Vierstra, R.D. (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics*. 139: 921-939.

- CFIA. (2012). The Biology of *Zea mays* (L.) (Maize).  
(<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-eng/1330985739405/1330985818367>).  
5        Accessed on February 25<sup>th</sup>, 2014.
- Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A.  
(2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in  
10        vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment  
expression clones. *Genome Research*. 14: 2111-2120.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin  
15        genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing,  
and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation.  
*Plant Molecular Biology*. 18: 675-689.
- Crow, A., Diehn, S. and Sims, L. (2017). Plant regulatory elements and methods of  
20        use thereof. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO  
2017222821 A2.
- Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific  
25        recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase.  
*Gene*. 91: 79-85.
- Das, O.P., Ward, K., Ray, S. and Messing, J. (1991). Sequence variation between  
alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa Zein locus of maize.  
*Genomics*. 11: 849-856.
- 30        de Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P. and Leite, A. (1994).  
Structural characterization and promoter activity analysis of the  $\gamma$ -kafirin  
gene from sorghum. *Molecular and General Genetics*. 245: 177-186.
- Diehn, S. and Peterson-Burch, B. (2012). Root-Preferred Promoter and Methods of  
35        Use. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2012112411  
A1.
- Dong, J., Feng, Y., Kumar, D., Zhang, W., Zhu, T., Luo, M-C., Messing, J. (2016).  
40        Analysis of tandem gene copies in maize chromosomal regions reconstructed  
from long sequence reads. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
113: 7949-7956.



- Dymecki, S.M. (1996). A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. *Gene*. 171: 197-201.
- 5 Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Molecular and General Genetics*. 205: 14-22.
- FAO. (2018). FAOSTAT.  
10 (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>).  
Accessed on October 23<sup>th</sup>, 2018.
- Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3" (9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.  
15
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.
- 20 Freeze, H. H. (2002). Phosphomannose isomerase. Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds. Springer-Verlag, Tokyo and New York: pp. 595-599.
- Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982).  
25 Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.
- Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.  
30
- Hershey, H.P. and Stoner, T.D. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for RNA species induced by substituted benzenesulfonamides in corn. *Plant Molecular Biology*. 17: 679-690.
- 35 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2: 571-589.
- Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*).  
40 *Nucleic Acids Research*. 14(14): 5641-5650.
- Kew Science. (2020). *Ophioglossum pendulum* L. Plants of the World *online*. (<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:17167>)

860-1).

Accessed on June 23<sup>th</sup>, 2021.

- 5 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*. 10: 165-174.
- 10 Liu, H., Shi, J., Sun, C., Gong, H., Fan, X., Qiu, F., Huang, X., Feng, Q., Zheng, X., Yuan, N., Li, C., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, J., Pan, G., Han, B., Lai, J. and Wu, Y. (2016). Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa  $\gamma$ -zein for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113: 4964-4969.
- 15 Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M.-J., Scelonge, C., Lenderts, B., Chamberlin, M., Cushatt, J., Wang, L., Ryan, L., Khan, T., Chow-Yiu, J., Hua, W., Yu, M., Banh, J., Bao, Z., Brink, K., Igo, E., Rudrappa, B., Shamseer, P., Bruce, W., Newman, L., Shen, B., Zheng, P., Bidney, D., Falco, C., Register, J., Zhao, Z.-Y., Xu, D., Jones, T. and Gordan-Kamm, W.  
20 (2016). Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *The Plant Cell*. 28: 1998-2015.
- Luna, S.V., Figueroa, J.M., Baltazar, B.M., Gomez, R.L., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for  
25 effective pollen control. *Crop Science*. 41: 1551-1557.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*. 95: 805-815.  
30
- NCGA. (2018). World of Corn 2018.  
([http://www.worldofcorn.com/pdf/NCGA\\_WOC2018.pdf](http://www.worldofcorn.com/pdf/NCGA_WOC2018.pdf)).  
Accessed on October 23<sup>th</sup>, 2018.
- 35 Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. and Hansen, G. (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*. 19: 798-803.
- 40 Noutoshi, Y., Kuromori, T., Wada, T., Hirayama, T., Kamiya, A., Imura, Y., Yasuda, M., Nakashita, H., Shirasu, K. and Shinozaki, K. (2006). Loss of *NECROTIC SPOTTED LESIONS1* associates with cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 62: 29-42.

- OECD. (1999). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology  
No. 11: Consensus document on general information concerning the genes  
and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide.  
ENV/JM/MONO(99)13.  
5 (<http://www.zhb.gov.cn/download/5198.pdf>)  
Accessed on March 12<sup>th</sup>, 2018.
- OECD. (2002). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology,  
No. 25. MODULE II: PHOSPHINOTHRICIN. ENV/JM/MONO(2002)14.  
10 (<http://www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf>)  
Accessed on March 12<sup>th</sup>, 2018.
- OECD. (2003). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology,  
No. 27: Consensus Document of the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).  
15 ENV/JM/MONO(2003)11.  
(<http://www.oecd.org/dataoecd/17/40/46815758.pdf>)  
Accessed on February 25<sup>th</sup>, 2014.
- Oleson, J.D., Park, Y.-L., Nowatzki, T.M. and Tollefson, J.J. (2005). Node-injury  
20 scale to evaluate root injury by corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae).  
Journal of Economic Entomology. 98(1): 1-8.
- Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E.,  
Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, P and Jones, G. D. (2001). Corn pollen  
25 deposition on milkweeds in and near cornfields. Proceedings of the National  
Academy of Sciences. 98: 11919-11924.
- Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA  
sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP  
30 protein of yeast in vitro. Nucleic Acids Research. 14(2): 4787-4802.
- Rosado, C.J., Stephanie, K., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M.,  
Voskoboinik, I., Bird, P.I., Trapani, J.A., Whisstock, J.C. and Dunstone, M.A.  
35 (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. Cellular  
Microbiology. 10: 1765-1774.
- Rose, R.I. (2007). White Paper on Tier-Based Testing for the Effects of  
Proteinaceous Insecticidal Plant-Incorporated Protectants on Non-Target  
40 Arthropods for Regulatory Risk Assessments. USDA-APHIS and US  
Environmental Protection Agency.
- Shirai, Y. and Takahashi, M. (2005). Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-  
target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. Applied Entomology and

Zoology. 40 (1): 151-159.

- 5 Tomizawa, J.-I., Ohmori, H. and Bird, R.E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 74: 1865-1869.
- 10 USDA. (2020). Natural Resources Conservation Service.  
(<https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=OPPE>).  
Accessed on June 1<sup>st</sup>, 2021.
- 15 US-EPA. (2010). Biopesticides Registration Action Document: Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Corn Plant-Incorporated Protectants. United States Environmental Protection Agency.
- 20 Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Puhler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene. 70(1): 25-37.
- 25 Wych, R.D. (1988). Production of hybrid seed corn. In G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.), Corn and Corn Improvement (3<sup>rd</sup> ed.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc.: 565-607.
- 30 Yu, L., Liu, D., Chen, S., Dai, Y., Guo, W., Zhang, X., Wang, L., Ma, S., Xiao, M., Qi, H., Xiao, S. and Chen, Q. (2020). Evolution and Expression of the Membrane Attack Complex and Perforin Gene Family in the Poaceae. International Journal of Molecular Sciences. 21(16): 5736.
- 35 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddelloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant Genome. 8: 1-15.
- 40 柿本陽一, 山田実. (2001). “トウモロコシの起源と特性”. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 菊池一徳. (1987). “トウモロコシの生産と利用”. 光琳. 東京.
- 後藤秀俊, 黒川俊二, 笠井美恵子, 福田美雪, 高橋靖幸, 井上公一, 中井秀一, 山根精一郎, 津田麻衣, 大澤良. (2018). 遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察. 育種学研究. 20(2):105-114.

- 財務省. (2018). 財務省貿易統計.  
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).  
Accessed on October 23<sup>th</sup>, 2018.
- 5 食品安全委員会. (2013). 農薬評価書 グルホシネート (第3版).  
(<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20130612154&fileId=201>).  
Accessed on April 27<sup>th</sup>, 2020.
- 10 瀧澤康孝. (2001). “子実用トウモロコシの栽培”. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 千藤茂行. (2001). “トウモロコシの品種生態. IV 採取”. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 15 戸澤英男. (2005). トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—. 農山漁村文化協会. 東京.
- 中井秀一, 干川奏, 山根精一郎, 下野綾子, 大澤良. (2015). 日本における隔離ほ場試験による遺伝子組換えトウモロコシの生物多様性影響評価の実例. 育種学研究. 17:1-5.
- 20 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.
- 25 西尾剛. (2002). 新農学実験マニュアル 改訂第3版. 株式会社ソフトサイエンス社.
- 日本食品化学研究振興財団. (2020). 農薬等の基準値 品目名: グルホシネート.  
([http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide\\_detail?id=18900](http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=18900)).  
30 Accessed on April 27<sup>th</sup>, 2020.
- 農林水産省. (2014). 飼料用トウモロコシの流通・加工実態調査結果報告書 平成26年3月26日公表.  
(<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140326-01.pdf>).  
35 Accessed on April 23<sup>rd</sup>, 2015.
- 農林水産省. (2017). 「平成27年度トウモロコシ生育等実態調査」の結果について 平成29年3月22日公表.  
(<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170322.html>).  
40 Accessed on March 22<sup>nd</sup>, 2017.
- 農林水産省. (2018a). 平成29年産作物統計 (普通作物・飼料作物・工芸農作物) 平成30年7月26日公表.

(<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20170&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001112815>).

Accessed on October 23<sup>th</sup>, 2018.

5

農林水産省. (2018b). 平成 29 年産野菜生産出荷統計 平成 30 年 11 月 12 日公表.

(<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20170&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001121095>)

10

Accessed on November 21<sup>st</sup>, 2018.

農林水産省. (2018c). 飼料をめぐる情勢 平成 30 年 11 月公表.

([http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryu/index.html](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/index.html))

Accessed on November 21<sup>st</sup>, 2018.

15

農林水産消費安全技術センター. (2021a). ダイアジノン農薬抄録.

(<https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/diazinon/index.htm>).

Accessed on December 7<sup>th</sup>, 2023.

20

農林水産消費安全技術センター. (2021b). MEP (フェニトロチオン) 農薬抄録.

(<https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fenitrothion/index.htm>).

Accessed on December 7<sup>th</sup>, 2023.

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.

30

山本勝利, 大黒俊哉, 松村雄. (2003). “III. 農業環境技術研究所における Bt トウモロコシ緊急調査 5. わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価”. 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価. 独立行政法人農業環境技術研究所. 茨城.

## 提出書類一覧

- ・ 緊急措置計画書
- 5
- ・ 添付資料（社外秘情報につき非開示）
1. Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP83175 (STUDY NUMBER: PHI-2019-247).
- 10
2. Summary - IPD079EA Protein Mode of Action.
  3. Summary - Transmission Electron Microscopy Study of IPD079Ea Pore-like Structures.
  4. Summary - LC50 and Spectrum Analysis.
  5. Environmental Risk Assessment for the Cultivation of Maize Containing Event DP-915635-4 - U.S. (STUDY NUMBER: PHI-2020-229).
- 15
6. Comparison of the Amino Acid Sequence of the IPD079Ea Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens (STUDY NUMBER: PHI-2020-106/201).
  7. Overview DP915635 SSI for Japan Stage 3 (STUDY NUMBER: PHI-R002-Y20).
- 20
8. Confirmation of the Absence of Agrobacterium Backbone Regions for Maize Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-R003-Y20).
  9. Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-915635-4 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2020-044).
- 25
10. Segregation Analysis and Tissue Production of Multiple Maize Generations Containing Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-2019-127).
  11. Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-915635-4 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2019-245).
- 30
12. Characterization of DP-915635-4 Maize for Insertion Stability in Five Generations using Southern Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2020-114).
  13. 2-generation protein expression (1 tissue per protein).
  14. Expressed Trait Protein Concentrations of a Maize Line Containing Event DP-915635 4\_U.S. and Canada (REPORT NUMBER: PHI-2019-015\_700).
- 35
15. Development and Validation of an Event-Specific Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Detection Method for Maize Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-2020-154).

16. Field-based CRW Efficacy for DP915635 Maize (Conducted in 13 Locations of North America in 2019).

17. 隔離ほ場試験報告書.



## 緊急措置計画書

令和 5 年 12 月 12 日

5 氏名 コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社  
代表取締役社長 野村 真一郎  
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

10 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*ipd079Ea, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP915635, OECD UI: DP-915635-4) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)の第一種使用等において、今後、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

15

### 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社は緊急措置に適切に対応するための社内委員会を速やかに設置する。社内委員会の構成メンバーを以下の表にまとめた。

20

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

### 2 第一種使用等の状況の把握の方法

25 弊社は、本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡を取り、第一種使用等の状況について情報収集を行う。

### 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

30

米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、米国における本組換えトウモロコシ種子の購入者及び穀物取扱業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的

35

に認められた場合、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、本連絡体制により、関係各者と連絡を取る。  
また、必要に応じて、弊社のホームページ等、国内の適切な媒体を通して、一般に広く知らせる。

### 40 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置をとり、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学

的に認められた場合、弊社は、米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社とともに、我が国向けに輸出している穀物取扱業者、種子取扱業者及び我が国の栽培者等に対して本件を連絡する等の適切な措置を講ずる。

## 5 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

10 本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、弊社は、速やかに農林水産省消費・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連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。