

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 *epspsgrg23 ace5*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *litis*)(Event VCO-Ø1981-5, OECD UI:VCO-Ø1981-5)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理学的及び生態学的特性	3
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	12
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	13
(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	16
(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	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	19
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	22
(1) 使用等の内容	22
(2) 使用等の方法	22
(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	22
(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	22
(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	22
(6) 国外における使用等に関する情報	22
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	23

1. 競合における優位性	23
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	23
(2) 影響の具体的内容の評価	23
(3) 影響の生じやすさの評価	23
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断	23
2. 有害物質の産生性	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	24
(2) 影響の具体的内容の評価	24
(3) 影響の生じやすさの評価	24
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断	24
3. 交雑性	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	25
(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	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	25
4. その他の性質	25
第三 生物多様性影響の総合的評価	26
引用文献	27
別添資料の内容	32

緊急措置計画書

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 3 月 27 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 ジェネクティブ・ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 ブルース・リー
住所 千葉県千葉市緑区大野台一丁目 4 番地 11 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	除草剤グリホサート耐性トウモロコシ（改変 <i>epsps grg23ace5</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> （L.）Iltis）（Event VCO-Ø1981-5, OECD UI: VCO-Ø1981-5）
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	—

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

5 (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

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

10 英名：corn, maize

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

② 宿主の品種又は系統名

15 宿主としてトウモロコシのデント種(近交系統Hi-IIAとHi-IIBを掛け合わせたハイブリッドであるHi-II)を用いた。

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。

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
25 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)。

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。

30 (2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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
35 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、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
5 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。

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
10 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

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(戸澤, 2005、OECD, 2003)。

国連食糧農業機関(FAO)によると、2014 年における全世界のトウモロコシの
20 栽培面積は約 1 億 8 千万 ha であり、上位国は、中国 3,595 万 ha、米国 3,364
万 ha、ブラジル 1,543 万 ha、インド 860 万 ha、メキシコ 706 万 ha である(FAO,
2016)。

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、2016 年の青刈りデントコーンの作付
25 面積は約 9 万 4,100ha で(農林水産省, 2017a)、2015 年のスイートコーンの作付
面積は約 2 万 4,100ha である(農林水産省, 2016)。

・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
30 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。

北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中～下旬から 5 月中～下旬が最も多
い。適正栽植密度は 10a あたり 6,000～8,000 本である。中耕、除草、土寄せは
35 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、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。

5 ・流通実態及び用途

世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2016 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、46.0%が飼料(7.6%の蒸留粕を含む)、28.9%がエタノール製造、15.3%が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった(NCGA, 2017)。

我が国では、2016 年に約 1,534 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 1,051 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, 2017)。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, 2017b)。

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

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

25 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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

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

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

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

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

10 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。

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
25 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
30 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,
35

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
5 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。
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
15 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)。

20 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)。

25 我が国でのトウモロコシは場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁(0m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で81.7粒/cm²、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm²であった(Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から5m離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で19.6
30 粒/cm²、イヌホオズキの葉では22.2粒/cm²、ほ場から10m離れた場合はヒマワリの葉で10粒/cm²以内であった(Shirai and Takahashi, 2005)。

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

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

- 5 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

ヘ 有害物質の産生性

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

ト その他の情報

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

25 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

イ 構成及び構成要素の由来

30

除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (改変 *epsps grg23ace5*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Itis) (Event VCO-Ø1981-5, OECD UI: VCO-Ø1981-5) (以下、「本組換えトウモロコシ」とする。) の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、表 1 (p.7) に示す。また、供与核酸の塩基配列は別添資料 1 に示した。

35

ロ 構成要素の機能

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

5

本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能は、表 1 に示す。

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及び各構成要素の由来及び機能

10

構成要素	ベクター上で の位置	由来及び機能
	サイズ(bp)	
T-DNA 領域 (改変 <i>epsps grg23ace5</i> 遺伝子発現カセット)		
RB	18084-18108	アグロバクテリウム(<i>Rhizobium radiobacter</i>) 由来の T-DNA の右側反復配列 (Zambryski <i>et al.</i> , 1988; Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	25	
<i>ScUbi4</i> 転写制御 領域	18182-19982	サトウキビ(<i>Saccharum officinarum</i>)由来のコビキチン 4 遺伝子の転写制御領域で、 <i>ScUbi4</i> プロモーター (18182-18545)、 <i>ScUbi4</i> 5'非翻訳領域(18546-18624)及び <i>ScUbi4</i> インترون(18625-19982)から構成される。 <i>ScUbi4</i> プロモーターはほとんどの植物組織で遺伝子を恒常的に発現させ、 <i>ScUbi4</i> 5'非翻訳領域及び <i>ScUbi4</i> インترونは発現効率を上げる(Albert and Wei, 2003; Wei <i>et al.</i> , 2003)。
	1801	
<i>mahas</i> CTP	19992-20189	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)由来のアセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)遺伝子由来の色素体輸送ペプチド配列(Fang <i>et al.</i> , 1992)。発現蛋白質の色素体への輸送を可能にする。
	198	
改変 <i>epsps grg23ace5</i>	20199-21440	<i>Arthrobacter globiformis</i> 由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS GRG23 蛋白質)へ突然変異により 10 ヲ所のアミノ酸改変を導入した蛋白質をコードする配列。除草剤グリホサート耐性が付与され、蛋白質熱安定性が改善されている(Schouten <i>et al.</i> , 2010)。
	1242	
<i>35S</i> terminator	21449-21718	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写ターミネーターでポリアデニル化シグナルを含む。この配列により目的遺伝子の転写が終結される(Gardner <i>et al.</i> , 1981)。
	270	
LB	21789-21813	アグロバクテリウム(<i>R. radiobacter</i>)由来の T-DNA の左側反復配列(Thomashow <i>et al.</i> , 1980; Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	25	
プラスミド外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)		
<i>virC</i>	1065-12851	アグロバクテリウム(<i>R. radiobacter</i>) のプラスミド pTiBo542 由来の <i>virC</i> オペロン、 <i>virG</i> 遺伝子、 <i>virB</i> オペロンを含む配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996) 。植物細胞への T-DNA 領域の移行に関与する。
<i>virG</i>		
<i>virB</i>	11787	

構成要素	ベクター上で の位置	由来及び機能
	サイズ(bp)	
ORI ColE1	14869-15947	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のプラスミド pBR322 由来の複製 起点配列を含む断片(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)。
	1079	
<i>blaEc(3')</i>	15948-16408	大腸菌(<i>E. coli</i>)のプラスミド pBR322 由来 β -ラクタマーゼ の C 末端領域を含む配列断片。
	461	
cos	16409-16851	バクテリオファージ λ の付着末端配列を含む断片(Hohn and Collins, 1980)。
	443	
<i>blaEc(5')</i>	16852-17602	大腸菌(<i>E. coli</i>)のプラスミド pBR322 由来 β -ラクタマーゼの N 末端領域を含む配列断片。
	751	
<i>aadA</i>	22989-23777	大腸菌(<i>E. coli</i>)のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)で、ストレプトマイシン及びスペクチノ マイシン耐性を付与する。
	789	
<i>sat2</i>	23778-24359	大腸菌(<i>E. coli</i>)のトランスポゾン Tn7 由来ストレプトスライ シンアセチル基転移酵素を含む配列(Partridge and Hall, 2005)。ストレプトスライシン耐性を付与する。
	582	
ORI ColE1	24617-25695	前述と同じ。
	1079	
<i>blaEc(3')</i>	25696-26156	前述と同じ。
	461	
cos	26157-26594	前述と同じ。
	438	
<i>blaEc(5')</i>	26595-27351	前述と同じ。
	757	
<i>tetR</i>	28080-28719	大腸菌(<i>E. coli</i>)のトランスポゾン Tn1721 由来 <i>tet</i> オペロンの 調節遺伝子(Allmeier <i>et al.</i> , 1992)で、 <i>tetA</i> 遺伝子発現を調節 する。
	640	
<i>tetA</i>	28825-30024	大腸菌(<i>E. coli</i>) のトランスポゾン Tn1721 由来 <i>tet</i> オペロンの 構造遺伝子(Allmeier <i>et al.</i> , 1992)で、抗生物質テトラサイ クリン耐性を付与する。
	1200	
<i>trfA</i> RK2	30655-32844	IncP1 不和合性プラスミド pRK2 由来の複製開始蛋白質遺伝 子を含む断片で遺伝子産物は ORI V RK2 配列に結合し、 <i>R.</i> <i>radiobacter</i> 内で複製を開始するために必須である (Perri and Helinski, 1993) 。
	2190	
ORI T RK2	36259-36370	IncP1 不和合性プラスミド pRK2 由来の接合伝達起点を含む 断片 (Guiney and Yakobson, 1983) で <i>R. radiobacter</i> 内へ 移行する際の起点となる。
	112	
ctl_RK2	38210-44480	IncP1 不和合性プラスミド pRK2 の IncP 中央制御領域を含 む断片 (Macartney <i>et al.</i> , 1997) で <i>R. radiobacter</i> 内への移 行及びプラスミドの分離安定性に寄与する。
	6271	
ORI V RK2	45567-46184	IncP1 不和合性プラスミド pRK2 由来の複製開始点を含む断

構成要素	ベクター上で の位置	由来及び機能
	サイズ(bp)	
	618	片 (Stalker <i>et al.</i> , 1981) で <i>R. radiobacter</i> 内での複製の開始に必要となる。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

- ② 目的遺伝子及び選択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-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下、「EPSPS蛋白質」とする。）は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生ずる可逆反応を触媒する(図1)。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素-基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻害する (Boocock and Coggins, 1983)。その結果、植物は蛋白質の合成に必須の芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン)を合成できなくなり、枯死する。

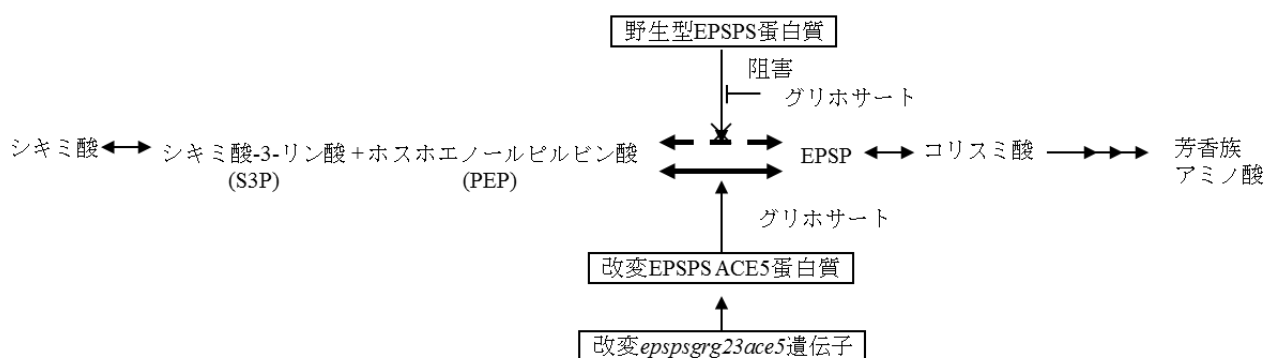


図1 シキミ酸経路におけるグリホサート存在下における改変EPSPS ACE5蛋白質による酵素作用の補完

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

本組換えトウモロコシは導入された改変 *epsps grg23 ace5* 遺伝子産物である改変 EPSPS ACE5 蛋白質を発現するため、除草剤グリホサートの存在下でもシキミ酸合成経路が活性阻害を受けずに生育することができる。改変 EPSPS

ACE5 蛋白質は、*Arthrobacter globiformis* から単離された野生型 EPSPS GRG23 蛋白質を由来とする。野生型 EPSPS GRG23 蛋白質は除草剤グリホサート耐性を有するが、トウモロコシの内在性 EPSPS 蛋白質より蛋白質熱安定性が低いため、通常のトウモロコシの栽培環境下での気温においても機能できる

5 ようにランダム変異を用いてアミノ酸置換を 10 ヶ所導入し、37℃条件下でのスクリーニングを経て、酵素活性の半減期の比較から蛋白質熱安定性が向上したことを確認した改変 EPSPS ACE5 蛋白質が作成された（表 2 及び表 3; Schouten *et al.*, 2010）。なお、改変 EPSPS ACE5 蛋白質は、37℃条件下で 16 時間後も 95%の活性を保持していた(Schouten *et al.*, 2010)。

10

表2 EPSPS GRG23蛋白質と改変EPSPS ACE5蛋白質におけるアミノ酸配列の違い

アミノ酸残基番号*	EPSPS GRG23 蛋白質	改変EPSPS ACE5 蛋白質	アミノ酸残基番号*	EPSPS GRG23 蛋白質	改変EPSPS ACE5 蛋白質
60	アスパラギン	アスパラギン酸	238	セリン	アルギニン
71	ヒスチジン	アスパラギン	270	プロリン	セリン
115	ロイシン	バリン	276	セリン	アルギニン
173	アルギニン	リジン	282	アスパラギン	スレオニン
195	ロイシン	イソロイシン	331	スレオニン	セリン

*N末端からのアミノ酸残基番号

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

15

表 3 37℃における各 EPSPS 蛋白質酵素活性の半減期

	EPSPS ACE5 タンパク質	EPSPS GRG23 タンパク質	トウモロコシ由来 EPSPS タンパク質
酵素活性の半減期	65 時間	10 時間	86 時間

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

また、改変 EPSPS ACE5 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2013 年にデータベース¹を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知の

20 アレルゲンとの相同性は認められなかった。

¹ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) AllergenOnline Database (version 13, <http://www.allergenonline.org/>). 専門家によるピアレビューが行われた既知及び推定アレルゲン蛋白質が登録されている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変 EPSPS ACE5 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質と同様に EPSPS 活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられる (Smart *et al.*, 1985)。なお、スペイン、スロバキア共和国及びチェコ共和国において 2010 年に 6 試験地、2011 年に 3 試験地の合計 9 試験地で栽培された本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの収穫種子におけるアミノ酸組成を調査した。各試験地には、それぞれ本組換えトウモロコシに除草剤グリホサート(1080g ai/ha)を散布した処理区(C)、散布しない未処理区(B)及び除草剤グリホサートを散布しない非組換えトウモロコシ区(A)を設定した。その結果、シキミ酸合成経路を経由して生成される最終生成産物である芳香族アミノ酸のトリプトファン及びフェニルアラニンにおいて統計学的有意差が認められた(表 4, 別添資料 2 及び補遺 1, 補遺 2)。しかしながら、これら有意差が認められたアミノ酸の分析値の平均はいずれも同条件で栽培した 6 つの商業品種の分析値の範囲内であり、本組換えトウモロコシの種子における芳香族アミノ酸組成は対照の非組換えトウモロコシあるいは従来のトウモロコシ系統と同程度であることが示された。したがって、改変 EPSPS ACE5 蛋白質が宿主の代謝経路に及ぼす影響は、従来のトウモロコシ系統で認められる変動範囲を超えるものではないと考えられた。

表 4 本組換えトウモロコシの子実における芳香族アミノ酸組成

項目 (%乾燥重)	非組換えトウモロコシ区 (A)	本組換えトウモロコシ未処理区 (B)	本組換えトウモロコシ処理区 (C)	p 値 ¹ A vs B	p 値 ¹ A vs C	文献値 ²	商業品種の範囲 ³
	平均値±SE	平均値±SE	平均値±SE				
フェニルアラニン	0.475±0.012	0.485±0.014	0.505±0.016	ns	s	0.2-0.9	0.24-0.71
トリプトファン	0.079±0.001	0.080±0.001	0.082±0.001	ns	s	0.03-0.2	0.05-0.09
チロシン	0.382±0.008	0.385±0.009	0.399±0.010	ns	ns	0.1-0.7	0.21-0.52

1: (A) 区と (B) 区及び (A) 区と (C) 区の分析値についてそれぞれ Dunnett 法で p 値を求めた (有意水準 5%; 別添資料 2 補遺 2)。ns:有意差なし。s:有意差あり

2: 文献値の出典は ILSI Crop Composition Database (<https://www.cropcomposition.org/query/index.html>, Version 6.0)。

3: 商業品種の範囲は分析値を両側 99%許容区間で評価した。

(注: 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

また、EPSPS 蛋白質は PEP 及び S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS 蛋白質のシキミ酸の反応性は低く (Gruys *et al.*, 1992)、高い基質特異性を有している。実際に、改変 EPSPS ACE5 蛋白質と基質との親和性を調べたところ、基質である PEP 及び S3P と高い親和性を示した。

5 一方で、植物体内に存在する可能性があり基質と似た化学構造を持つ類縁体として供試されたシキミ酸及び 2-ホスホグリセリン酸とは全く酵素反応を示さなかった。このことから、改変 EPSPS ACE5 蛋白質は、高い基質特異性を有していることが示された。

10 以上のことから、改変 EPSPS ACE5 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

15

本組換えトウモロコシの作出に用いられたベクターはプラスミド pAG3541 であり、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pSB1 及び pSB11 (Komari *et al.*, 1996) を基に構築された (図 2-1, p14)。

20 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pAG3541 の全塩基数は 46,646bp である(別添資料 1)。

25

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド pAG3541 は、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 *aadA* 遺伝子、ストレプトスライシン耐性を付与する *sat2* 遺伝子を含む

30 配列及びテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*) を有している。これらの遺伝子は、本プラスミドを構築する際に必要な選抜マーカーとして機能する。なお、これらの遺伝子を含むプラスミド外側骨格領域が、本組換えトウモロコシに導入されていないことはサザンブロット分析により確認されている(別添資料3)。

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 pAG3541 に感染性を示すような配列は含まれておらず、感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

5

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

プラスミド pAG3541 の構成及び制限酵素による切断部位を図 2-1 (p.14)に示す。宿主内に移入された領域は、RB と LB に挟まれた改変 *epsps grg23ace5*
10 遺伝子発現カセット(T-DNA 領域)である(図 2-2, p.14)。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた(Deblaere *et al.*, 1985)。

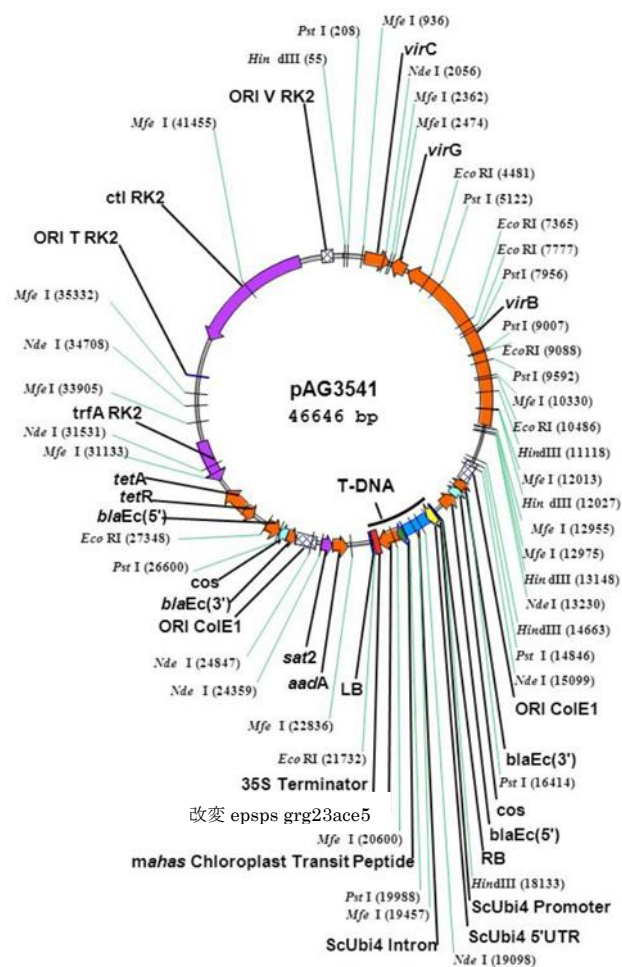


図 2-1 pAG3541 のプラスミド地図及び制限酵素切断部位
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

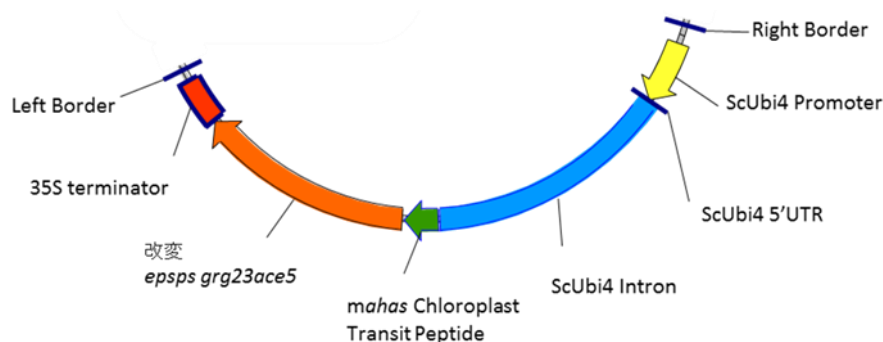


図 2-2 プラスミド pAG3541 の T-DNA 領域の拡大図
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

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方法

形質転換を行ったカルスは、グリホサートを含む培地を用いて選抜した。

5 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

遺伝子導入後、本組換えトウモロコシを選抜する過程で、抗生物質チカルシリン・クラブラン酸合剤(Timentin®)を含む培地で培養し、アグロバクテリウムを除去した。

また、本組換えトウモロコシの種子(30粒)からゲノムDNAを抽出し、T-DNAと外骨格領域にまたがる位置を標的としたPCR分析を行った。その結果、標的とする増幅産物は検出されず、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が残存していないことが確認された(別添資料4)。

15

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

20 選抜した個体を育成し、再度グリホサート耐性を評価し、本組換えトウモロコシT0組換え当代を得た。本組換えトウモロコシの育成経過を図3に示す。また、本申請の対象は、F1及びその後代である。

また、本組換えトウモロコシの我が国における承認及び申請の状況を次に示す(2017年9月現在)。

25 環境²：2013年8月 第一種使用規程承認(隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)

食品³：2015年4月 申請

飼料⁴：2015年4月 申請

30

【社外秘情報につき非開示】

図3 本組換えトウモロコシの育成図

² 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律に基づく。

³ 食品衛生法に基づく。

⁴ 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。

(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 移入した核酸が宿主の染色体上に組み込まれた場合、メンデルの法則に従い分離する。改変 *epsps grg23ace5* 遺伝子導入個体の分離比を検討するため、2008 年及び 2009 年にプエルトリコで栽培された本組換えトウモロコシ (BC0A、BC1A、BC2A 及び BC3A 世代; 図 3, p.15)において、除草剤グリホサート散布に対する耐性個体数及び感受性個体数を調査した。その結果、除草剤グリホサートに対する耐性個体と感受性個体の分離比は、いずれの世代もほぼ 1:1 となり、一遺伝子座支配であると仮定した場合に想定される分離比を示した(表 5; 別添資料 5)。

したがって、本組換えトウモロコシに導入された改変 *epsps grg23ace5* 遺伝子は、トウモロコシ染色体上の一か所に存在していることが確認された。

15

表 5 本組換えトウモロコシにおける除草剤グリホサート耐性・感受性の分離比

世代	供試 個体数	実測値		期待値		耐性率 (%)	X ² 値	p 値 ¹⁾
		耐性	感受性	耐性	感受性			
BC0A ²⁾	28	12	16	14	14	42.9	0.571	0.450
BC1A	153	78	75	76.5	76.5	51.0	0.059	0.808
BC2A	58	29	29	29	29	50	0.000	1.000
BC3A	74	38	36	37	37	51.4	0.054	0.816

1): 3 世代(BC1A, BC2A, BC3A)で得られた分離比について、1:1 の分離比に対するカイ二乗検定を行い、解析した(p<0.05)。

2): BC0A 世代は、供試個体数が少ないため参考データとした。

20 (注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

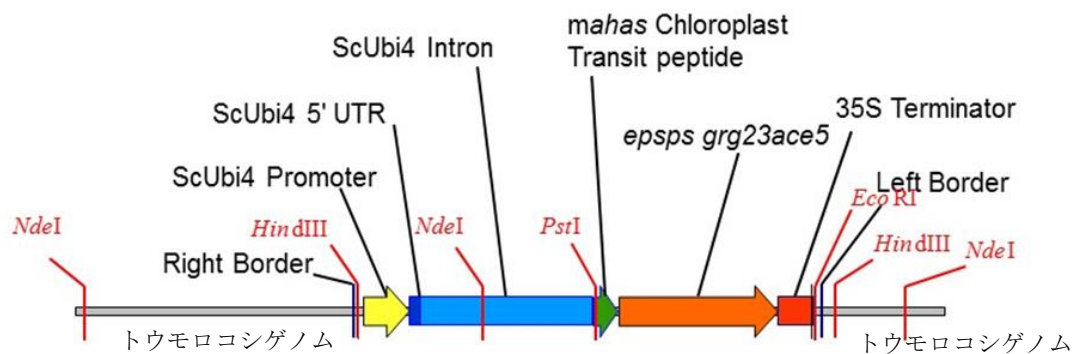
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

25 本組換えトウモロコシ(F1[BC0B]世代; 図 3, p.15)の葉から抽出した DNA を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、1 コピーの T-DNA 領域が挿入されていることが確認された(図 4, p.17; 添付資料 6)。

また、本組換えトウモロコシ(BC1B 世代; 図 3, p.15)に移入された T-DNA 領域及びその両側近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、RB の 22bp

と LB の 16bp の欠失を除き、プラスミド pAG3541 上の T-DNA 領域と完全に一致することが確認された(図 5; 別添資料 7)。

挿入遺伝子の伝達の安定性を確認するため、本組換えトウモロコシの 6 世代 (BC0B、BC1B、BC2B₁、BC1B₂、BC3A₁S4×CH02 及び BC0BS2×B116 世代;
5 図 3, p.15)の葉から抽出した DNA を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、すべての世代において予測されたサイズの断片が確認され、本組換えトウモロコシに移入された挿入 DNA 領域は複数世代において安定して伝達されることが確認された(別添資料 5, 別添資料 8, 別添資料 9)。



10 図 4 本組換えトウモロコシにおける挿入 DNA の概略図
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

Right Border	
T-DNA pAG3541	G TTTACCCGCC AATATATCCT GTCAAACACT GATAGTTTAA
VCO-01981-5	GATCAGTAC.TCAAACACT GATAGTTTAA
Left Border	
T-DNA pAG3541	CTAAGCGTCA ATTTGTTTAC ACCACAATAT ATCCTGCCA
VCO-01981-5	CTAAGCGTCA ATTTGTTTAC ACC.....G TTCTCAGAGG
XXX = Right Border, XXX = Left Border, XXX = T-DNA, ... = deletion, XXX = Maize genomic DNA	

図 5 本組換えトウモロコシ(VCO-01981-5)の挿入部位と
プラスミド pAG3541 の T-DNA 領域の比較

・：RB 及び LB における欠損した塩基を示す

15 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

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

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

本組換えトウモロコシ(BC3A₁S4×CH02 世代; 図 3, p.15)の各組織(葉、根、花粉及び種子)における改変 EPSPS ACE5 蛋白質の発現量を ELISA で分析した。各組織サンプルは、2011 年にスペイン、スロバキア共和国及びチェコ共和国の 3 試験地で一般的なトウモロコシ栽培条件で栽培されたものを用いた。各試験地には、それぞれ第 4 葉期に除草剤グリホサート(1080 g ai/ha)を散布した。各組織のサンプル採取は、葉及び根は第 4 葉期、第 8 葉期、絹糸抽出期、糊熟期及び成熟期、花粉については絹糸抽出期、種子については成熟期にそれぞれ行った。分析の結果、改変 EPSPS ACE5 蛋白質は、いずれの処理区でもすべての組織及び生育時期において検出された(表 6; 別添資料 10)。

表 6 本組換えトウモロコシの各組織及び各生育期における改変 EPSPS ACE5 蛋白質発現量(ng/mg 乾燥重)

生育期	組織	平均値±SD	範囲	LOD	LOQ
V4	葉	31.50 ± 10.75	16.27 - 47.60	0.20	3.11
	根	9.02 ± 2.83	5.17 - 13.47	0.06	0.62
V8	葉	16.26 ± 4.04	10.01 - 22.64	0.20	3.11
	根	6.20 ± 1.33	3.23 - 8.94	0.06	0.62
R1	葉	3.57 ± 0.76	2.43 - 4.95	0.37	1.63
	根	1.01 ± 1.25	0.00 - 3.79	0.18	0.72
	花粉	10.05 ± 2.52	6.66 - 16.21	n.d.	2.18
R4	葉	2.24 ± 0.64	1.34 - 3.39	0.17	0.48
	根	1.36 ± 0.90	0.00 - 2.72	0.10	0.19
R6	葉	1.55 ± 0.89	0.00 - 3.10	0.19	0.50
	根	2.23 ± 1.57	0.00 - 4.42	0.11	0.27
	種子	2.32 ± 0.73	1.50 - 3.99	0.02	0.41

平均値及び標準偏差(SD)は、15 測定値(5 サンプル×3 反復)で算出した。

採取時期: V4: 第 4 葉期、V8: 第 8 葉期、R1: 絹糸抽出期、R4: 糊熟期、R6: 成熟期

それぞれ第 4 葉期に除草剤グリホサート(1080 g ai/ha)を散布した。

n.d. (not determined): 濃度を求める際に使用した OD の中央値+3SD の値が非常に小さいため、LOD を求めることができなかった。

(注: 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

また、2008 年及び 2009 年にプエルトリコで栽培された 4 世代の本組換えトウモロコシ (BC0A、BC1A、BC2A 及び BC3A 世代; 図 3, p.15)に除草剤グリホ

サートを散布処理した結果、いずれの世代においても、ヘテロ接合体に関して想定される耐性個体数と感受性個体数の分離比を示した(表 5, p.16)。

以上のことから、個体間及び世代間において改変 EPSPS ACE5 蛋白質が安定して発現していることが示された。

5

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

本組換えトウモロコシに移入された核酸に伝達を可能とする配列は含まれて
10 おらず、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

15 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、TaqMan® PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 11)。

本 TaqMan® PCR 法の検出限界はゲノム DNA 量比で 0.01%である(別添資料 11)。

本 TaqMan® PCR 法の信頼性については、社内の他に社外の 2 つの施設
20 (Eurofins Analytics France 及び iDna Genetics Ltd.)において施設間互換性があることを確認している(別添資料 11)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

25 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

本組換えトウモロコシは改変 *epsps grg23ace5* 遺伝子の発現により改変 EPSPS ACE5 蛋白質が産生され、除草剤グリホサート耐性を示す。

30

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

2014年に独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
35 那須研究拠点 隔離ほ場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。本組換えトウモロコシ(BC0BS2×B116世代, 図3, p15)と対照の非組換えト

ウモロコシとして本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景で除草剤耐性遺伝子を持たない系統(以下、「非組換えトウモロコシ」とする。)を用いて試験を行い、以下の生理学的又は生態学的特性について相違を検討した。

5 a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を比較するために、種苗特性分類調査報告書(農林水産技術情報協会, 1993)を参考に、播種日、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草丈、分げつ数、着雌穂高、黄熟期、雌穂数、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、粒数、百粒重、粒形及び地上部生体重の計 20 項目について調べた。

その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間では、すべての調査項目において統計学的有意差又は相違は認められなかった(別添資料 12, p.4-8)。

15 b 生育初期における低温耐性

各系統の収穫種子を育苗バットに播種し(各25反復)、2~3葉期まで温室内で栽培後、2014年12月10日に隔離ほ場へ移した。いずれの系統も屋外に放置後7日で完全に枯死したことを確認した(別添資料12, p.10-11)。

20 c 成体の越冬性

2014年5月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収穫後も栽培を続けたところ、いずれの系統も同年11月1日の時点で枯死したことを確認した(別添資料12, p.10-11)。

25 d 花粉の充実度及びサイズ

花粉の充実度(アレキサンダー溶液により染色された花粉の割合)及びサイズについて調査した結果、本組換えトウモロコシ及び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(別添資料12, p.9-10)。

30 e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量：

雌穂の粒列数、一列粒数及び百粒重を調べた結果、本組換えトウモロコシ及び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(別添資料 12, p.7)。

35

脱粒性：

収穫時における種子の脱粒は、組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシともに認められなかった(別添資料 12, p.9-10)。

休眠性及び発芽率：

- 5 収穫後、20 日間風乾した本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの種子を各系統 50 粒ずつ播種した結果、いずれも播種 4 日後にすべて発芽し、休眠性は認められなかった(別添資料 12, p.12)。

f 交雑率

- 10 我が国では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。したがって、交雑率について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及び非組換えトウモロコシの有害物質の産生性を比較
15 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。

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栽培した後の根域土壌を用いて検定作物のハツカダイコンを栽培し、その発芽率、草丈及び乾物重を測定した。その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシの試験区と
20 非組換えトウモロコシの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 12, p.13-14)。

鋤込み試験：

- 25 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの葉と茎の乾燥粉末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、草丈及び乾物重を測定した。その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシの試験区と非組換えトウモロコシの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 12, p.13-14)。

30

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の栽培後土壌を採取し、希釈平板法により、細菌、放線菌及び糸状菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料12, p.13, 15)。
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

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。

5

(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

緊急措置計画書を参照。

20 (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

本組換えトウモロコシの国外における承認状況は、表 6 のとおりである。

表 6 本組換えトウモロコシの国外における承認状況(2017 年 9 月現在)

申請国	申請先機関	申請・承認年月	申請目的
米国	米国食品医薬品庁(FDA)	2013 年 5 月 確認終了	食品、飼料
	米国農務省(USDA)	2013 年 9 月承認	無規制裁培
カナダ	カナダ保健省 (Health Canada)	2014 年 2 月承認	食品
	カナダ食品検査庁(CFIA)	2014 年 2 月承認	環境、飼料

30 (注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

- 5 トウモロコシは我が国に導入されてから長期間の栽培経験があり、その間、自然条件下で自生したとの報告はない。また、我が国においてトウモロコシが野生化し、野生動植物等の生息や生育に影響を与えたという報告もない。

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

10

- 2014 年度に我が国の隔離ほ場試験において、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形質として、形質及び生育の特性(20 項目)、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について、対照となる非組換えトウモロコシと比較した(第一、2、(6)、②、a~e, p.20)。その結果、いずれの項目についても、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又は相違は認められなかった。

- 本組換えトウモロコシには改変 EPSPS ACE5 蛋白質による除草剤グリホサート耐性が付与されているが、除草剤グリホサートの散布が想定されない自然環境下において、本形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

- 20 以上のことから、競合における優位性に起因して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の判断

- 35 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した。

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 トウモロコシが野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質を産生することは知られていない。

隔離ほ場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を行った(第一、2、(6)、②、g, p.21)。その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で、調査したいずれの項目についても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は除草剤グリホサート耐性を付与する改変 EPSPS ACE5 蛋白質を有するが、改変 EPSPS ACE5 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。また、改変 EPSPS ACE5 蛋白質のアミノ酸配列に基づき包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった(第一、2、(1)、ロ②, p.9)。

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関し、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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

30

以上から、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した。

3. 交雑性

35

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種としてテオシントとトリプ
5 本組換えトウモロコシの栽培によって影響を受ける可能性のある野生動植物等
は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

10 _____

(3) 影響の生じやすさの評価

15 _____

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、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した。

20

4. その他の性質

25 _____

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

トウモロコシは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下において雑草化した事例は報告されていない。我が国における隔離ほ場試験において、競合における優位性に関わる形質として、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、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で比較検討した結果、いずれの項目でも系統間に統計学的有意差
10 あるいは相違は認められなかった。

また、改変 *epsps grg23ace5* 遺伝子の発現により本組換えトウモロコシに付与された除草剤グリホサート耐性は、除草剤グリホサートが散布されない自然環境下では、競合において優位に作用することはないと考えられた。

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する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。
15

有害物質の産生性：

これまでに、トウモロコシが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。また、本組換えトウモロコシが有する改変 *EPSPS ACE5* 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することは考え難い。実際に、隔離ほ場試験において、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、調査したい
20 ずれの項目においても、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの試験区間に統計学的有意差は認められなかった。

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した。
25

交雑性：

我が国にトウモロコシと交雑可能な野生植物はない。したがって、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した。
30

よって、以上を総合的に評価し、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、我が国の生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。
35

引用文献

1. Albert, H.H. and Wei, H. (2003) U. S. patent, Promoter of the sugarcane *Uni4* gene.
- 5 2. Allmeier, H., Cresnar, B., Greck, M. and Schmitt, R. (1992) Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein. *Gene*, 111, 11-20.
3. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L.,
10 Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, 95-113.
4. Boocock, M.R. and Coggins, J.R. (1983) Kinetics of
15 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, 154, 127-133.
5. CFIA (Canadian Food Inspection Agency) (2012) The Biology of *Zea mays* (L.) (Maize).
20 (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l/eng/1330985739405/1330985818367>) (Accessed on 2016/11/15).
6. Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van
25 Montagu, M. and Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-method gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13, 4777-4788.
7. Fang, L., Gross, P., Chen, C.-H. and Lillis, M. (1992) Sequence of two
30 acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant molecular biology*, 18, 1185-1187.
8. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2015) FAOSTAT. (<http://faostat3.fao.org/home/E>) (Accessed on 2016/11/15).
35
9. 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.
- 40 10. Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R.J. and Messing, J. (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic acids research*, 9, 2871-2888.

11. Gruys, K.J., Walker, M.C. and Sikorski, J.A. (1992) Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31, 5534-5544.
- 5 12. Guiney, D.G. and Yakobson, E. (1983) Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 3595-3598.
13. Hohn, B. and Collins, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*, 11, 291-298.
- 10 14. 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 : for cell and molecular biology*, 10, 165-174.
- 15 15. Luna, V. S, Figueroa, M. J, Baltazar, M. B, Gomez, L. R, Townsend R, and Schoper, J.B. (2001) Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. *Crop Science*, 41, 1551-1557.
- 20 16. Macartney, D.P., Williams, D.R., Stafford, T. and Thomas, C.M. (1997) Divergence and conservation of the partitioning and global regulation functions in the central control region of the IncP plasmids RK2 and R751. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 7), 2167-2177.
- 25 17. NCGA (National Corn Growers Association) (2017) World of corn 2017. (<http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2017.pdf>) (accessed on 2017/06/0).
- 30 18. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2003) Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, No. 27. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2003) 11.
- 35 (<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815758.pdf>) (accessed on 2014/02/25).
19. Partridge, S.R. and Hall, R.M. (2005) Correctly Identifying the Streptothricin Resistance Gene Cassette. *Journal of Clinical Microbiology*,

43, 4298-4300.

20. Perri, S. and Helinski, D.R. (1993) DNA sequence requirements for interaction of the RK2 replication initiation protein with plasmid origin repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 3662-3669.
21. 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 deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11919-11924.
22. Schouten, L.C., Peters, C.L. and Berg, B.V. (2010) U.S. patent (7,834,249), GRG23 EPSP synthases; compositions and methods of use.
23. Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Matilla, H.R. (2000) Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. (<http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/articles/searsreport.pdf>) (Accessed on 2016/11/15)
24. 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, 151-159.
25. Smart, C.C., Johanning, D., Muller, G. and Amrhein, N. (1985) Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of biological chemistry*, 260, 16338-16346.
26. Stalker, D.M., Thomas, C.M. and Helinski, D.R. (1981) Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular & general genetics* : MGG, 181, 8-12.
27. Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1980) Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell*, 19, 729-739.

28. Wei, H., Wang, M.L., Moore, P.H. and Albert, H.H. (2003) Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *Journal of plant physiology*, 160,
5 1241-1251.
29. Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn.; Sprague GF, Dudley JW, editors. Madison, Wisconsin.: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science of America, Inc., Soil Science of America, Inc.
- 10 30. Zambryski, P. (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review of genetics*, 22, 1-30.
- 15 31. 柿本陽一・山田実 (2001) トウモロコシの起源と特性、III 植物としての特性. 転作全書. 第三巻雑穀, 農山漁村文化協会, p.34-38.
32. 菊池一徳 (1987) トウモロコシの生産と利用. 光琳, p.56.
- 20 33. 財務省 (2017) 財務省貿易統計
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>)
(Accessed on 2017/04/20).
34. 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
25 漁村文化協会, p.103-130.
35. 千藤茂行 (2001) トウモロコシの品種生態. 転作全書. 第三巻雑穀, 農山漁
村文化協会, p.65-102.
- 30 36. 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, p.2-3, p.56-59, p.97, p.112-113, p.127-128, p.177.
37. 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, p.39-63.
- 35 38. 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.

39. 社団法人農林水産技術情報協会[編] (1993) 種苗特性分類調査報告書 種類名：とうもろこし一代雑種親品種. 農林水産技術情報協会.
- 5
40. 農林水産省 (2014) 飼料用トウモロコシの流通・加工実態調査結果報告書 平成 26 年 3 月 26 日公表
(<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140326-01.pdf>)
(Accessed on 2016/11/15).
- 10
41. 農林水産省(2016) 平成 27 年産野菜生産出荷統計 平成 28 年 12 月 2 日公表
(<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001164543>)
(Accessed on 2017/04/21).
- 15
42. 農林水産省(2017a) 平成 28 年耕地及び作付面積統計 平成 29 年 3 月 7 日公表
(<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001172509>)
(Accessed on 2017/04/21).
43. 農林水産省 (2017b) 畜産をめぐる情勢 平成 29 年 3 月公表
20 (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryō/attach/pdf/index-80.pdf)
(Accessed on 2017/04/20).
44. 農林水産省(2017c) 「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
25 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170322.html>) (accessed on 2017/03/22).
45. 山田実 (2001) トウモロコシの期限と特性、I 植物としての分類、類縁関係、II 栽培の起源と分布. 転作全書. 第三巻雑穀, 農山漁村文化協会, p.23-33.
- 30

別添資料の内容

社外秘情報につき非開示

- 別添資料 1 : ベクターpAG3541 の特性と構築方法
- 5 別添資料 2 : EU で栽培された Event VCO-Ø1981-5 の 種子及び植物体における栄養構成成分結果
- 別添資料 2 補遺 1 :
文献値の ILSI database update (v6.0)への更新
- 別添資料 2 補遺 2 :
- 10 EU で栽培された Event VCO-Ø1981-5 の 種子及び植物体における栄養構成成分結果の Dunnett's 統計解析
- 別添資料 3 : Event VCO-Ø1981-5 においてベクター骨格領域が存在するかどうかの確認
- 別添資料 4 : PCR 分析によるアグロバクテリウムの残存の有無の確認
- 15 別添資料 5 : Event VCO-Ø1981-5 の導入遺伝子の特性
- 別添資料 6 : VCO-Ø1981-5F1[BC0B]世代におけるサザンブロット分析
- 別添資料 7 : Event VCO-Ø1981-5 の T-DNA 及び挿入部位の特徴
- 別添資料 8 : BC3A1S4xCH02 世代における Event VCO-Ø1981-5 の遺伝子安定性
- 20 別添資料 9 : BC0BS2xB116 世代における Event VCO-Ø1981-5 の遺伝子安定性
- 別添資料 10 : Event VCO-Ø1981-5 における蛋白質量の評価
- 別添資料 11 : イベント識別法
- 別添資料 12 : 平成 26 年度除草剤グリホサート耐性トウモロコシ(改変 *epsps* *grg23ace5*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Event VCO-Ø1981-5, OECD UI: VCO-Ø1981-5) の隔離ほ場試験結果報告書
- 25