

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(*ecry3.1Ab, mcry3A, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MZIR098, OECD UI: SYN-00098-3) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	2
第 1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
① 和名、英名及び学名	2
② 宿主の品種又は系統名	2
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	2
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
イ、基本的特性	4
ロ、生息又は生育可能な環境の条件	4
ハ、捕食性又は寄生性	5
ニ、繁殖又は増殖の様式	5
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	5
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織 又は器官からの出芽特性	5
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	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	6
ホ、病原性	7
ヘ、有害物質の産生性	7
ト、その他の情報	7
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
イ、構成及び構成要素の由来	8
ロ、構成要素の機能	11
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	11

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(食品としてのアレルギー性を除く)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.....	11
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	14
(2) ベクターに関する情報.....	15
イ、名称及び由来.....	15
ロ、特性.....	16
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	16
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能.....	16
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.....	16
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	16
イ、宿主内に移入された核酸全体の構成.....	16
ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法.....	18
ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	18
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	18
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菌体の残存の有無.....	18
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.....	18
(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..	19
① 移入された核酸の複製物が存在する場所(染色体上、細胞小器官内、原形質内の別).....	19
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.....	20
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.....	21
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.....	21
⑤ ウイルス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.....	22

(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.....	22
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	22
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.....	22
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.....	23
a 形態及び生育の特性.....	23
b 生育初期における低温又は高温耐性.....	27
c 成体の越冬性.....	28
d 花粉の稔性及びサイズ.....	29
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	29
f 交雑率.....	30
g 有害物質の産生性.....	31
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	33
(1) 使用等の内容.....	33
(2) 使用等の方法.....	33
(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.....	33
(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.....	33
(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.....	33
(6) 国外における使用等に関する情報.....	33
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	35
1. 競合における優位性.....	35
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	35
(2) 影響の具体的な内容の評価.....	36
(3) 影響の生じやすさの評価.....	36
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	36
2. 有害物質の産生性.....	36
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	36
(2) 影響の具体的な内容の評価.....	38
(3) 影響の生じやすさの評価.....	38

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	39
3. 交雑性.....	39
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	39
(2) 影響の具体的内容の評価.....	40
(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.....	40
4. その他の性質.....	40
第3 生物多様性影響評価の総合的評価	41
引用文献.....	43
緊急措置計画書.....	49
別紙のリスト	51

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 10 月 4 日

5

農林水産大臣 齋藤 健 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

10

氏名 シンジェンタジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 篠原 聡明
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

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

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>ecry3.1Ab, mcry3A, pat, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MZIR098, OECD UI: SYN-00098-3)
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	—

25

生物多様性影響評価書

第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

10

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15 ② 宿主の品種又は系統名

宿主は、トウモロコシのデント種に属する自殖系統(NP2222)である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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

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

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

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

5
10 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)。

15 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

【主たる栽培地域】

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

20 国連食糧農業機関(FAO)によると、2014 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 8 千万 ha であり、上位国は、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)。

25 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面積は約 9 万 4,100 ha 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 4,100 ha である(農林水産省, 2016)。

【栽培方法】

30 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。

35 北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中～下旬から 5 月中～下旬が最も多い。適正栽植密度は 10 a 当たり 6,000～8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で

行い、生育初期に2~3回行う。収穫期は9月下旬から10月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い(瀧澤, 2001)。

5 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種(F₁)品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

【流通実態及び用途】

10 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)。

15 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)。

20 (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)。

30 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)。

35 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・山田, 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)。

5

ハ、捕食性又は寄生性

—

10 ニ、繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

15 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ヒトの仲介が必要である(OECD, 2003)。

20 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)。

25 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出た後は 6~8 時間以上 0 °C以下の外気にさらされると生存できない(OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12 %、温度 10 °C、相対湿度 55 %以内に保つことが必要である(中村, 2001、OECD, 2003)。

30 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

5 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)。

10 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)。

15 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

20 トウモロコシは雌雄異花序で、雌花は葉腋に着いて1～3本の雌穂を形成し、雄穂は茎の先端に着く(柿本・山田, 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)。

25 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)。

30 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/cm²、イヌホオズキの葉では71.1粒/cm²であった(Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から5 m離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で19.6粒/cm²、イヌホオズキの葉では22.2粒/cm²、ほ場から10 m離れた場合はヒマワリの葉で10粒/cm²以内であった(Shirai and

35

Takahashi, 2005)。

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

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

10 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

15

—

へ、有害物質の産生性

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

ト、その他の情報

25 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)。

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

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(*ecry3.1Ab*, *mcry3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MZIR098, OECD UI: SYN-00098-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)の作出に用いられた供与核

10 酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (8~10 ページ)に示した。

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要素の由来及び機能

構成要素 ^a	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子カセット		
NOS-02 エンハンサー	93	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子 (Bevan <i>et al.</i> , 1983)のエンハンサー配列で、転写活性を高める。
CMP-04 プロモーター	397	<i>Cestrum yellow leaf curling virus</i> 由来のプロモーター配列で、目的遺伝子を恒常的に発現させる(Hohn <i>et al.</i> , 2007)。
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子	1,962	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の 2 種類の <i>cry</i> 遺伝子(<i>mcry3A</i> 遺伝子及び <i>cry1Ab</i> 遺伝子)断片で構成された、特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す eCry3.1Ab 蛋白質をコードする遺伝子。 <i>B. thuringiensis</i> 由来の Cry 蛋白質は互いに構造類似性を有することから、異なる <i>cry</i> 遺伝子間で対応するドメイン同士を交換することでキメラの <i>cry</i> 遺伝子が作製でき、その中から新規の Cry 蛋白質をコードする <i>cry</i> 遺伝子として <i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子を選抜した。eCry3.1Ab 蛋白質をコードする <i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子は、 <i>mcry3A</i> 遺伝子のドメイン I、II 及びドメイン III の 15 アミノ酸をコードする 5'末端側配列及び <i>cry1Ab</i> 遺伝子のドメイン III 以降をコードする 3'末端側配列によって作製された(図 1、10 ページ)。加えて、5'末端に付加したポリリンカー配列に由来する開始コドン(ATG)から eCry3.1Ab 蛋白質の翻訳が始まるため、結果として eCry3.1Ab 蛋白質の N 末端の 22 個のアミノ酸が mCry3A 蛋白質のアミノ酸配列と異なっている(図 1、10 ページ)。なお、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>ecry3.1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI : SYN-05307-1)に導入された <i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子と塩基配列は同一である。 <i>mcry3A</i> 遺伝子 : 以下の <i>mcry3A</i> 遺伝子の項を参照。 <i>cry1Ab</i> 遺伝子 : <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株由来の <i>cry1Ab</i> 遺伝子(Geiser <i>et al.</i> , 1986)をトウモロコシでの発現に最適なコドン配列(Murray <i>et al.</i> , 1989)に変更した遺伝子(Koziel <i>et al.</i> , 1997)で、特定のチョウ目昆虫に殺虫活性を示す Cry1Ab 蛋白質をコードする。

NOS-05-01 ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子由来のターミネーター配列(Bevan <i>et al.</i> , 1983)で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
<i>mcry3A</i> 遺伝子カセット		
Ubi1-18 プロモーター	1,993	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域を含むプロモーター配列で、単子葉植物において目的遺伝子を恒常的に発現させる(Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>mcry3A</i> 遺伝子	1,797	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3A</i> 遺伝子(Sekar <i>et al.</i> , 1987)を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列(Murray <i>et al.</i> , 1989)に変更した、特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す mCry3A 蛋白質をコードする遺伝子。コードする mCry3A 蛋白質は野生型 Cry3A 蛋白質の 48 番目のメチオニンからアミノ酸翻訳が開始される。また、標的であるコウチュウ目昆虫に対する殺虫活性を高めるため、野生型 Cry3A タンパク質の 155~157 番目のアミノ酸配列(バリニン-セリン-セリン)をカテプシン G プロテアーゼ認識配列(アラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニン)に置換している(Chen and Stacy, 2007)。なお、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 <i>cry3Aa2</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MIR604, OECD UI : SYN-IR604-5)に導入された改変 <i>cry3Aa2</i> 遺伝子から名称を変更しているが、塩基配列は同一である。
NOS-20 ターミネーター	277	NOS-05-01 ターミネーターの塩基配列を変更したターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
<i>pat</i> 遺伝子カセット		
35S-04 プロモーター	521	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV)由来のプロモーター配列(Odell <i>et al.</i> , 1985)で、植物において目的遺伝子を恒常的に発現させる。
<i>pat</i> 遺伝子 (<i>pat-08</i>)	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> strain Tü494 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。植物での発現を高めるために野生型の塩基配列(Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)のコドンを最適化しているが、コードする PAT 蛋白質のアミノ酸配列は変更していない。PAT 蛋白質が除草剤グルホシネートをアセチル化して不活化することで、植物に除草剤グルホシネート耐性を付与する(OECD, 1999)。なお、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(改変 <i>cry1Ab</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI : SYN-BT011-1)に導入された <i>pat</i> 遺伝子から塩基配列を変更したが、コードする PAT 蛋白質のアミノ酸配列は同一である。
NOS-05-01 ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子由来のターミネーター配列(Bevan <i>et al.</i> , 1983)で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
境界領域		
LB-01-01	25	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA 左側境界配列で、植物ゲノムへの T-DNA の組み込みに必要(Yadav <i>et al.</i> , 1982)。
RB-01-01	25	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA 右側境界配列で、植物ゲノムへの T-DNA の組み込みに必要(Wang <i>et al.</i> , 1984)。

外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)		
<i>aadA-03</i>	789	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシドアダニルトランスフェラーゼ遺伝子(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ため、細菌の選抜マーカーとして用いた。
<i>virG-01</i>	726	<i>A. tumefaciens</i> の pAD1289 由来の VirGN54D (<i>virG</i>)遺伝子で、アグロバクテリウム法による効率的な植物の形質転換に必要な(Hansen <i>et al.</i> , 1994)。
<i>repA-03</i>	1,074	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来の pVS1 複製蛋白質をコードする遺伝子で、グラム陰性植物寄生細菌中で機能する最小の pVS1 レプリコンの一部(Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
VS1-02 ori	405	<i>P. aeruginosa</i> のプラスミド pVS1 由来の複製起点と分断領域の共通配列で、 <i>A. tumefaciens</i> における複製開始点として機能する(Itoh <i>et al.</i> , 1984)。
ColE1-06 ori	807	大腸菌由来のプラスミドの複製起点(Itoh and Tomizawa, 1979)。

a : 上表の各構成要素のハイフン(-)以降の数字は、シンジェンタ社内において構成要素の機能を変えずに塩基配列のみを変更した際に、変更前の配列と区別する目的で付したものである。
(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

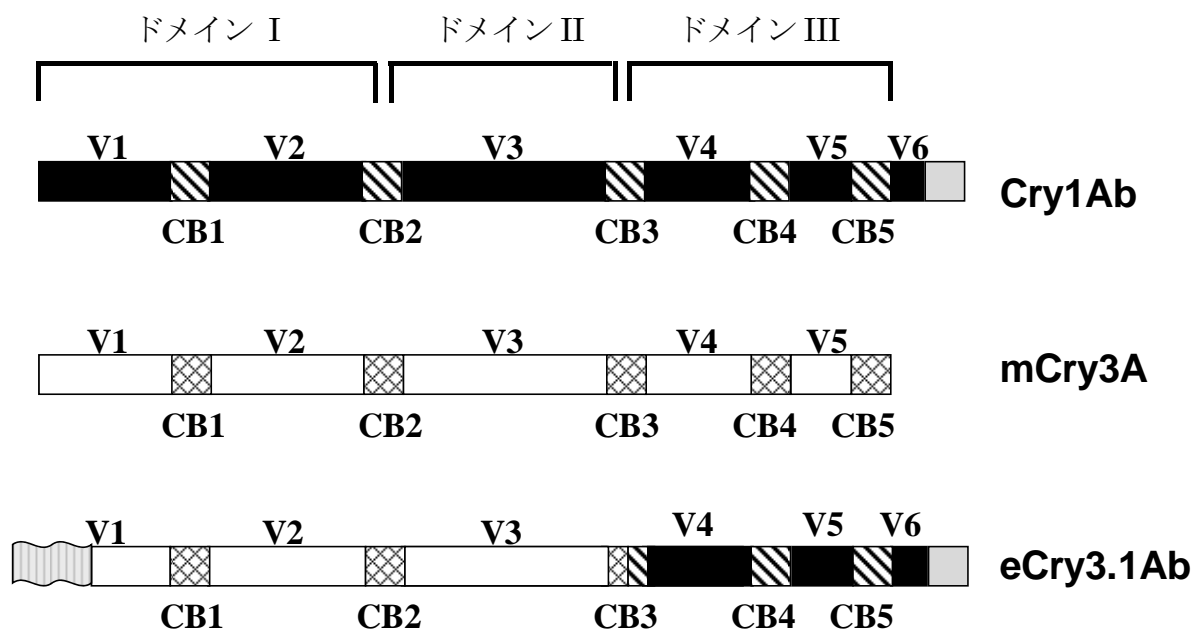


図 1 eCry3.1Ab 蛋白質中のアミノ酸残基の由来を示す模式図

Cry 蛋白質の配列は、構造的特徴から 3 つのドメイン(ドメイン I, II 及び III)に、また、アミノ酸配列の相同性から 5 個の保存領域(conserved block)とその前後の変可領域(variable region)に分類される(Walters *et al.*, 2010)。

10 ■■■ は Cry1Ab 蛋白質の変可領域 1~6(VR1~VR6)を、▨▨▨ は Cry1Ab 蛋白質の保存領域 1~5(CB1~CB5)を、■■■ は Cry1Ab 蛋白質のテール領域を示す。

□□□ は mCry3A 蛋白質の変可領域 1~5(VR1~VR5)を、▨▨▨ は mCry3A 蛋白質の保存領域 1~5(CB1~CB5)を示す。

eCry3.1Ab 蛋白質の〰〰〰 はポリリンカー配列に由来する N 末端の 22 アミノ酸を示す。

15 (本図に記載された情報に係る権利及び責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

ロ、構成要素の機能

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

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を、表 1 (8～10 ページ)に示した。

- 10 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(食品としてのアレルギー性を除く)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

【eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質】

- 15 本組換えトウモロコシに導入した *ecry3.1Ab* 遺伝子及び *mcry3A* 遺伝子がコードする eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す *Bacillus thuringiensis* 由来の Cry 蛋白質である。Cry 蛋白質は、標的昆虫に摂取・消化されると、殺虫活性のある毒素(コア蛋白質)となって昆虫の中腸上皮細胞にある特異的な受容体と結合し、細胞膜に小孔を形成して細胞を破壊することで昆虫を死に至らしめる(OECD, 2007)。なお、標的昆虫の中腸上皮細胞における eCry3.1Ab 蛋白質と mCry3A 蛋白質の結合部位はそれぞれ異なることが示唆されており(Walters *et al.*, 2010)、両蛋白質が同時に発現することで、単独で発現した場合と比べて標的コウチュウ目昆虫の抵抗性獲得がより困難になると期待される。

25 eCry3.1Ab 蛋白質 :

- 30 eCry3.1Ab 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培における主要害虫であるウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*)やノーザンコーンルートワーム(*D. longicornis barberi*)並びに米国のジャガイモ栽培における主要害虫であるコロラドポテトビートル(*Leptinotarsa decemlineata*)といった特定のコウチュウ目(Coleoptera)昆虫に殺虫活性を示す(表 2、12 ページ)。一方で、同じコウチュウ目昆虫であるサザンコーンルートワーム(*D. undecimpunctata*)、テントウムシ(*Coleomegilla maculata*)、ハネカクシ(*Aleochara bilineata*)及びオサムシ(*Poecilus cupreus*) には殺虫活性を示さないことが確認されている(表 2、12 ページ)。なお、eCry3.1Ab 蛋白質の一部はチョウ目(Lepidoptera)昆虫に殺虫活性を示す Cry1Ab 蛋白質由来であるが、eCry3.1Ab 蛋白質は Cry1Ab 蛋白質感受性チョウ目昆虫種であるヨーロッパコーンボーラー

(*Ostrinia nubilalis*)を含めた6種のチョウ目及び1種のカメムシ目(Hemiptera)昆虫に対して殺虫活性を示さないことが確認されている(表 2、12 ページ)。さらに、ミツバチ、ミミズ、ウズラ、マウス、エビ及びナマズといった非標的生物に対する毒性を示さない(Burns and Raybould, 2014)。

5

表 2 eCry3.1Ab 蛋白質に対する昆虫種の感受性(米国シンジェンタ社調査)

目	科	学名 (一般名)	eCry3.1Ab の活性
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Colorado potato beetle:コロラドポテトビートル)	有
		<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (Western corn rootworm:ウエスタンコーンルートワーム)	有
		<i>Diabrotica longicornis barberi</i> (Northern corn rootworm:ノーザンコーンルートワーム)	有
		<i>Diabrotica virgifera zeae</i> (Mexican corn rootworm:メキシカンコーンルートワーム)	有
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i> (Southern corn rootworm:サザンコーンルートワーム/ Spotted cucumber beetle:ジュウイチホシウリハムシ)	無
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Coleomegilla maculata</i> (Pink-spotted ladybird beetle:ピンクスポッテッドレディバードビートル)	無
	Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Aleochara bilineata</i> (Rove beetle:ハネカクシ)	無
	Carabidae (オサムシ科)	<i>Poecilus cupreus</i> (Ground beetle:オサムシ)	無
Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Agrotis ipsilon</i> (Black cutworm:タマヤナガ)	無
		<i>Helicoverpa zea</i> (Corn earworm:コーンイヤールーム)	無
		<i>Spodoptera frugiperda</i> (Fall armyworm:フォールアーミーワーム)	無
		<i>Heliothis virescens</i> (Tobacco budworm:タバコバッドワーム)	無
	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i> (European corn borer:ヨーロッパアンコーンボーラー)	無
	Gelechiidae (キバガ科)	<i>Pectinophora gossypiella</i> (Pink bollworm:ピンクボールワーム)	無
Hemiptera (カメムシ目)	Anthocoridae (ハナカメムシ科)	<i>Orius laevigatus</i> (Flower bug:フラワーバグ)	無

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

mCry3A 蛋白質：

5 mCry3A 蛋白質は、ウエスタンコーンルートワーム、ノーザンコーンルートワーム、コロラドポテトビートル及びバンデッドキューカンバービートル(*D. balteata*)といった特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す(表 3、13 ページ)。一方で、同じコウチュウ目昆虫であるサザンコーンルートワーム、コットンボールウィービル(*Anthonomus grandis*)、テントウムシ(*Coccinella septempunctata*、*Coleomegilla maculata*)、ハネカクシ(*A. bilineata*)及びオサムシ(*P. cupreus*)に殺虫活性を示さないこと、さらに、6 種のチョウ目、1 種のカメムシ目及び 1 種のハエ目(Diptera)昆虫に殺虫活性を示さないことが確認されている(表 3、13 ページ)。加えて、ミツバチ、ミミズ、ウズラ、マウス、ブロイラー及びニジマスといった非標的生物に対する毒性を示さない(US EPA, 2010)。

表 3 mCry3A 蛋白質に対する昆虫種の感受性(米国シンジェンタ社調査)

目	科	学名 (一般名)	mCry3A の活性
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Colorado potato beetle:コロラドポテトビートル)	有
		<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (Western corn rootworm:ウエスタンコーンルートワーム)	有
		<i>Diabrotica longicornis barberi</i> (Northern corn rootworm:ノーザンコーンルートワーム)	有
		<i>Diabrotica balteata</i> (Banded cucumber beetle:バンデッドキューカンバービートル)	有
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i> (Southern corn rootworm:サザンコーンルートワーム/ Spotted cucumber beetle:ジュウイチホシウリハムシ)	無
	Curculionidae (ゾウムシ科)	<i>Anthonomus grandis</i> (Cotton boll weevil:コットンボールウィービル/ワタミゾウムシ)	無
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Coccinella septempunctata</i> (Seven-spotted ladybird beetle:ナナホシテントウ)	無
		<i>Coleomegilla maculate</i> (Pink-spotted ladybird beetle:ピンクスポッテッドレディバードビートル)	無
	Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Aleochara bilineata</i> (Rove beetle:ハネカクシ)	無
	Carabidae (オサムシ科)	<i>Poecilus cupreus</i> (Ground beetle:オサムシ)	無

Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Agrotis ipsilon</i> (Black cutworm:タマヤナガ)	無
		<i>Helicoverpa zea</i> (Corn earworm:コーンイヤールーム)	無
		<i>Spodoptera frugiperda</i> (Fall armyworm:フォールアーミーワーム)	無
		<i>Heliothis virescens</i> (Tobacco budworm:タバコバッドワーム)	無
	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i> (European corn borer:ヨーロッパンコーンボーラー)	無
Hemiptera (カメムシ目)	Gelechiidae (キバガ科)	<i>Pectinophora gossypiella</i> (Pink bollworm:ピンクボールワーム)	無
	Anthracoridae (ハナカメムシ科)	<i>Orius insidiosus</i> (Flower bug:フラワーバグ)	無
Diptera (ハエ目)	Drosophilidae (シヨウジョウバエ科)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly:キイロシヨウジョウバエ)	無

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

【PAT 蛋白質】

- 5 除草剤グルホシネートは、植物において窒素代謝の過程で生成されたアンモニアの無毒化に関与するグルタミン合成酵素の活性を阻害し、アンモニアを蓄積させることによって植物を枯死させる(OECD, 1999)。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)は除草剤グルホシネートをアセチル化して *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝し、グルホシネートによるグルタミン合成酵素の阻害作用を不活性化
- 10 化することによって、植物に除草剤グルホシネート耐性を付与する(OECD, 1999)。

また、eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルギーと相同性を持たないことを、FARRP AllergenOnline Database¹を用いた相同性検索によって 2016 年に確認した。

15

- ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質】

eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫に対してそれぞ

¹ ネブラスカ大学リンカーン校食品科学技術学科の Food Allergy Research and Resource Program により開発・運営されているアレルギーデータベース(<http://allergenonline.org>)。

れ独立して殺虫活性を示すと考えられるが、どちらも *B. thuringiensis* 由来の Cry 蛋白質である。これらの Cry 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており(OECD, 2007)、これまでのところ他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Cry 蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくい。

5

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化することで、*N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝する酵素である。PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い特異性を示すものの、他の各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、
10 過剰の各種アミノ酸の存在下でも、PAT 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応が阻害されることはなかった(OECD, 1999)。

以上のように、Cry 蛋白質である eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は酵素活性を持つとは考えにくく、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有することから、いずれも
15 宿主の代謝系を変化させることは考えにくい。また、これら Cry 蛋白質と PAT 蛋白質それぞれの作用機作は独立していることから、相互に影響することは考えにくい。

なお、本組換えトウモロコシと同じく eCry3.1Ab 蛋白質を発現するコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Event 5307, OECD UI : SYN-Ø53Ø7-1)、mCry3A 蛋白質を発現するコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ(改変 *cry3Aa2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR604, OECD UI : SYN-IR6Ø4-5)、PAT 蛋白質を発現する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(改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt11, OECD UI : SYN-BTØ11-1)が我が国ですでに承認されており(J-BCH, 2017)、その審査においてこれら蛋白質の作用機作が評価されている。
25

(2) ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

30

本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターは pSYN17629 である。このベクターは大腸菌由来の pUC19 等を基に構築された。

ロ、特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 ベクターpSYN17629 の塩基数は 13,821 bp であり、その塩基配列は明らかにされている(別紙 1、35～56 ページ)。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

10 ベクターpSYN17629 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を発現する *aadA* 遺伝子が含まれるものの、本組換えトウモロコシ中にこの遺伝子は導入されていない。

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

15

 ベクターpSYN17629 中に感染性を示すような配列はない。

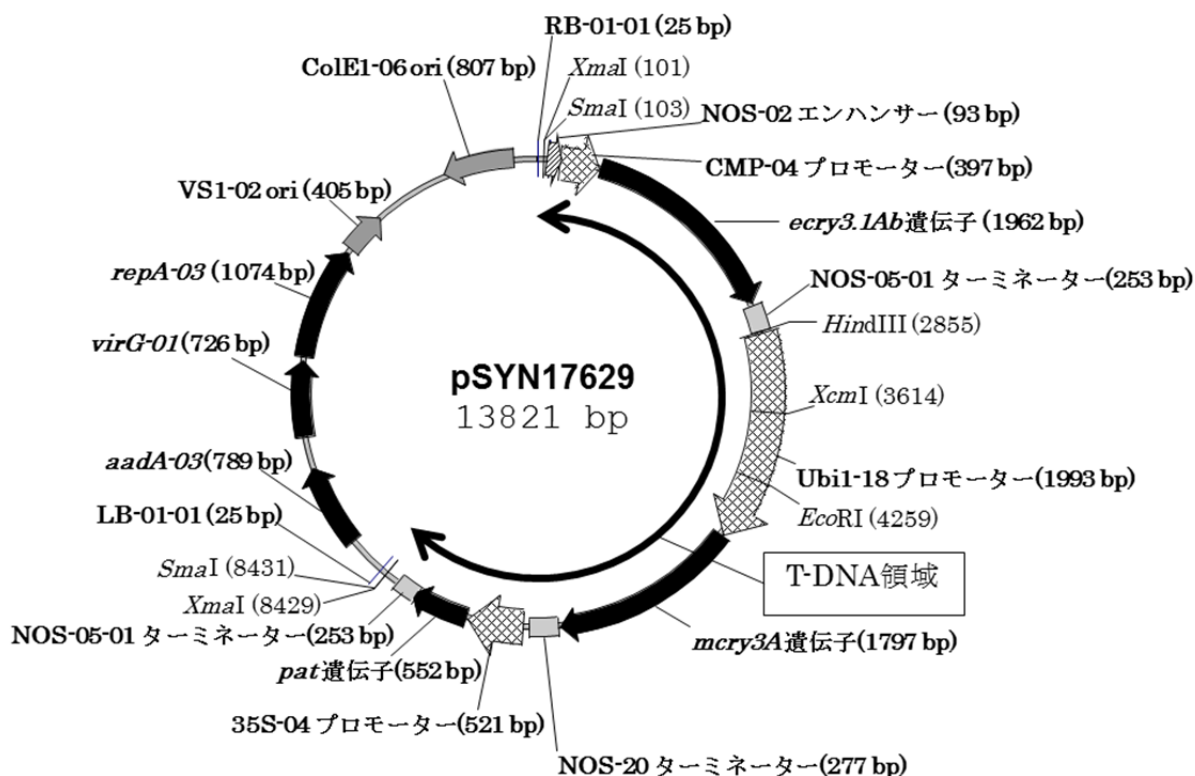
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

20 イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

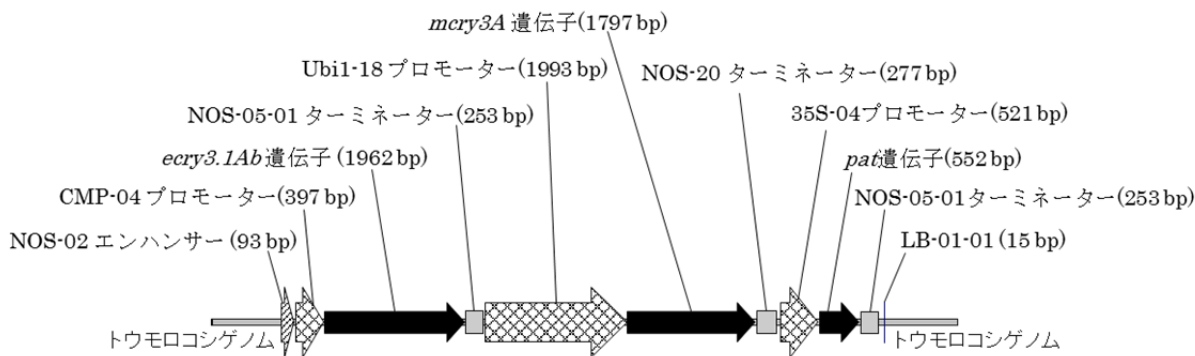
 本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターpSYN17629 の各構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位、本組換えトウモロコシに移入された核酸の構成を図 2 (17 ページ)に示した。

25

(A)



(B)



5

図 2 ベクターpSYN17629 及び本組換えトウモロコシに移入された核酸の構成

(A) : 本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターpSYN17629 の模式図で、RB-01-01 と LB-01-01 に挟まれた部分が T-DNA 領域である。なお、ベクターにおける核酸の構成要素は太字で、制限酵素切断部位は細字で示す。

10 (B) : 本組換えトウモロコシの挿入遺伝子の模式図。ベクターpSYN17629 の T-DNA 領域の 1 コピーがトウモロコシゲノム中の 1 ヲ所に挿入されていたが、境界領域である LB-01-01 の 10 bp 及び RB-01-01 全体とそれに続く 10 bp の非蛋白質コード配列は存在しないことを確認した。挿入遺伝子及びその近傍領域の塩基配列を別紙 2 に示した。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

15

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の導入はアグロバクテリウム法により行った。

5 ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

10 ベクターpSYN17629 を含むアグロバクテリウムと共存培養したトウモロコシ未熟胚を、グルホシネートを含む培地で培養することにより、形質転換細胞を選抜した。

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菌体の残存の有無

15 アグロバクテリウムを除去するために、選抜した形質転換細胞を抗生物質セフトキシムを含む培地に移し、培養した。さらに、本組換えトウモロコシ(図 3 において⑦で示した世代、19 ページ)の種子 3,000 粒を用いてベクターpSYN17629 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えトウモロコシにはベクターpSYN17629 の外側骨格領域は存在しなかった(別紙 3、18 ページ、Table 9)。以上より、
20 本組換えトウモロコシにはアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

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

25

選抜細胞から再分化した植物体について PCR 分析を行い、*ecry3.1Ab* 遺伝子、*mcry3A* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が存在し、ベクターpSYN17629 の外側骨格領域の *aadA* 遺伝子の欠如が確認された本組換えトウモロコシの植物体を形質転換当代(T₀ 世代)として選抜した。

30

本組換えトウモロコシの生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために供試した世代の育成経過を図 3 (19 ページ)に示した。なお、承認申請の対象となるのは、図 3 (19 ページ)で示した 社外秘情報により非開示 である。また、本組換えトウモロコシの我が国における申請状況は表 4 (19 ページ) のとおりである。

35

5 図 3 本組換えトウモロコシの育成図

表 4 我が国における申請及び承認状況 (2018 年 6 月現在)

申請先	目的	申請及び承認状況
農林水産省・環境省	環境 (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) ^a	— ^b
農林水産省・環境省	環境 (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) ^a	2017 年 10 月申請
厚生労働省	食品 ^c	2017 年 12 月承認
農林水産省	飼料 ^d	2018 年 6 月承認

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

- 10 b : 「農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え植物に係る第一種使用規程の承認の申請について」(平成 19 年 12 月 10 日付け 19 消安第 8999 号、環自野発第 071210001 号農林水産省消費・安全局長、農林水産省農林水産技術会議事務局長、林野庁長官、環境省自然環境局長通知)の第 3 の(6)に基づき、2016 年 6 月 23 日の農作物分科会にて、本組換えトウモロコシについて隔離ほ場での情報収集(隔離ほ場試験)は不要と判断された。また、2016 年 8 月 26 日の総合検討会でその旨が報告された。

c : 食品衛生法に基づく。

d : 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。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

20

(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(染色体上、細胞小器官内、原形質内の別)

- 25 本組換えトウモロコシの複数世代(図 3 において④で示した世代、19 ページ)を用いて *ecry3.1Ab* 遺伝子、*mcry3A* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の有無を確認する PCR 分析を行い、挿入遺伝子の分離比評価を行った(別紙 4)。その結果、*ecry3.1Ab* 遺伝子、*mcry3A* 遺伝子及び *pat* 遺伝子のいずれも、各世代における実測値がメンデルの法則に基づく期待値と矛盾しないことから、移入された核酸は染色体上に存在すると考えられた(表 5、20
- 30 ページ)。

表 5 PCR 分析による挿入遺伝子の分離比 (別紙 4、15 ページ、Table 3)

	BC ₂ F ₁		BC ₃ F ₁		BC ₄ F ₁	
	実測値	期待値	実測値	期待値	実測値	期待値
陽性個体数 ^a	85	93	69	70	75	74.5
陰性個体数 ^a	101	93	71	70	74	74.5
合計個体数	186	186	140	140	149	149
カイ二乗値 ^b	1.38		0.03		0.01	

a : 陽性個体は *ecry3.1Ab* 遺伝子、*mcry3A* 遺伝子及び *pat* 遺伝子いずれも陽性、陰性個体はいずれも陰性であった。

b : カイ二乗検定(Strickberger, 1976)により分離比 1:1 に対する適合度を検定した。5%水準での棄却値は 3.84 で(Strickberger, 1976)、上記のカイ二乗値はいずれも棄却値以下なので、実測値はメンデルの分離法則に矛盾しない。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

10 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の複数世代(図 3 において①で示した世代、19 ページ)から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクター pSYN17629 の T-DNA 領域及び外側骨格領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った(別紙 5)。その結果、1 コピーの *ecry3.1Ab* 遺伝子カセット、*mcry3A* 遺伝子カセット及び *pat* 遺伝子カセットからなるベクター pSYN17629 の T-DNA 領域が本組換えトウモロコシの染色体上の 1 ヶ所に挿入され(図 2 の(B)、17 ページ)、ベクター pSYN17629 の外側骨格領域は本組換えトウモロコシに挿入されていないことを確認した(別紙 5、26~54 ページ、Figure 3~12 及び Table 6~10)。さらに、本組換えトウモロコシ(図 3 において③で示した世代、19 ページ)から抽出したゲノム DNA の塩基配列を解析した結果、本組換えトウモロコシの挿入遺伝子の塩基配列はベクター pSYN17629 の T-DNA の塩基配列と一致するものの、境界領域付近の一部の配列は存在しないことを確認した(図 2、17 ページ)。

25

本組換えトウモロコシの複数世代(図 3 において②で示した世代、19 ページ)から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクター pSYN17629 の T-DNA 領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った(別紙 6)。その結果、本組換えトウモロコシの挿入遺伝子は後代へ安定して伝達していることが確認された(別紙 6、24~29 ページ、Figure 3, 4 及び Table 3)。

30

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

5

- 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

2014 年に米国シンジェンタ社の温室において本組換えトウモロコシの複数世代(図 3 において⑤で示した世代、19 ページ)を栽培し、eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により測定した(別紙 7)。6 葉期の葉と根及び絹糸抽出期の花粉における測定結果を表 6(21 ページ)に示す。その結果、本組換えトウモロコシにおいて eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質が複数個体及び複数世代で発現していることが確認された。

15

表 6 本組換えトウモロコシ複数世代における eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量 (別紙 7、15~20 ページ、Table 4~6, 8~10 及び 12~14)

組織 (生育ステージ)	世代	eCry3.1Ab 蛋白質 ^c	mCry3A 蛋白質 ^c	PAT 蛋白質 ^c
		($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) 平均値 (範囲)	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) 平均値 (範囲)	($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) 平均値 (範囲)
葉 ^a (6 葉期)	BC ₁ F ₁	197.09 (137.55~272.45)	61.51 (49.40~76.24)	13.78 (11.82~16.04)
	BC ₃ F ₁	223.86 (168.76~262.13)	53.84 (40.69~67.84)	13.92 (12.59~15.94)
	BC ₅ F ₁	208.49 (164.86~233.41)	41.08 (31.32~52.38)	14.68 (12.07~17.02)
根 ^a (6 葉期)	BC ₁ F ₁	99.24 (62.25~120.56)	45.00 (32.08~55.84)	1.90 (1.38~2.65)
	BC ₃ F ₁	101.38 (61.51~137.50)	43.58 (35.82~47.80)	2.20 (1.60~2.62)
	BC ₅ F ₁	91.75 (70.87~126.10)	43.95 (35.68~56.99)	1.67 (1.41~1.93)
花粉 ^b (絹糸抽出期)	BC ₁ F ₁	<LOD ^d	328.13	<LOD ^e
	BC ₃ F ₁	<LOD ^d	319.90	<LOD ^e
	BC ₅ F ₁	<LOD ^d	329.11	<LOD ^e

a : 4 個体の結果。

b : 花粉は 4 個体から採取した後、1 つにまとめて測定した。

- 20 c : 非組換えトウモロコシ抽出物も分析の対照として各 ELISA プレートに供試し、結果に影響がないことを確認した。

d : 花粉における eCry3.1Ab 蛋白質の検出限界値(LOD)は 0.13 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重。

e : 花粉における PAT 蛋白質の LOD は 0.025 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

25

- ⑤ ウイルス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。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10 本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的なプライマー及びプローブ(図 4、22 ページ)を用いて、PCR 法による検出及び識別が可能である(別紙 8 及び別紙 9)。本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.01 %である(別紙 9、20 ページ、Table 6)。本 PCR 法の信頼性については、自社研究所以外に Eurofins GeneScan USA において検証され、再現性が確認されている(別紙 9、24 ページ、Table 12)。

15

社外情報により非開示

図 4 本組換えトウモロコシ特異的な PCR 法のプライマー及びプローブの結合部位

20

(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

25

30 本組換えトウモロコシに付与された特性は、*ecry3.1Ab* 遺伝子によって発現する eCry3.1Ab 蛋白質及び *mcry3A* 遺伝子によって発現する mCry3A 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性並びに *pat* 遺伝子によって発現する PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性である。本組換えトウモロコシ(図 3 において⑦で示した世代、19 ページ)が標的コウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワームに抵抗性を示すことを、2014 年に米国 3 か所のは場(イリノイ州ブルーミントン、イリノイ州シャーリー及びアイオワ州ネーピア)での生物検定試験によって確認した(別紙 10、13 ページ、Table 5)。また、本組換えトウモロコシ(図 3 において⑥で示した世代、19 ページ)が除草剤グルホシネートに対して耐性を示すことを、2014 年に米国シンジェンタ社の温室での除草剤散布試験によって確認した(別紙 11、11 ページ、Table 1)。

35

本組換えトウモロコシに散布された除草剤グルホシネートは、PAT 蛋白質によりアセチル化され、*N*アセチル-L-グルホシネートへと代謝されるが、動物試験の結果から、*N*アセチル-L-グルホシネートの毒性は親化合物であるグルホシネートより低いと考えられている(食品安全委員会, 2010)。また、本組換えトウモロコシに対するグルホシネートの散布時期や散布量等に既存の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシからの変更はないことから、グルホシネートを散布した際の *N*アセチル-L-グルホシネートの残留量は、本組換えトウモロコシと既存の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシで同程度と考えられる。

10

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

本組換えトウモロコシと分類学上の種であるトウモロコシとの間の相違の有無に関して、以下の a 形態及び生育の特性、b 生育初期における低温耐性、c 成体の越冬性、d 花粉の稔性及びサイズ、e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、g 有害物質の産生性に関する試験を実施した(別紙 12)。

15

a 形態及び生育の特性

20

2013 年に米国 8 カ所のほ場(アイオワ州リッチランド、ネブラスカ州ヨーク、イリノイ州シーモア、アイオワ州バググリー、カンザス州ラード、イリノイ州シュワードソン、イリノイ州ワイオミング及びペンシルベニア州ジャーマンズビル)において、本組換えトウモロコシ(図 3 において⑥で示した世代、19 ページ)、対照の非組換えトウモロコシ及び 6 つの非組換えトウモロコシ商業 F₁ 品種(以下、「参考品種」という。)を栽培した。本組換えトウモロコシについては、除草剤グルホシネートを散布しなかった区(以下、「無散布区」という。)及び散布した区(以下、「散布区」という。)の両方を設けた。これらのトウモロコシについて、形態及び生育に関わる 14 項目(発芽苗数、初期生育程度、開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、着雌穂高、稈長、緑度保持性、転び型倒伏率、挫折型倒伏率、最終株数、脱落雌穂数、種子含水率、種子検定重量及び収量)を調査した(別紙 12 の 2.1、1 ページ)。

25

30

14 項目のうち、発芽苗数、着雌穂高、稈長、緑度保持性、種子含水率、種子検定重量及び収量の 7 項目は、8 カ所のほ場の結果について、(1)無散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシ間、(2)散布区の本組換えトウモロコシと対照の

35

非組換えトウモロコシ間で有意水準 5 %を採用した線形混合モデルを用いて解析を行った(別紙 12 の 2.1.1、1 ページ)。一方、初期生育程度、開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、転び型倒伏率、挫折型倒伏率、最終株数及び脱落雌穂数の 7 項目については、得られたデータを上記の方法で解析しても統計学的有意差に関して十分に信頼性のある結果が得られない可能性があったことから、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシにおける平均値、対照の非組換えトウモロコシにおける平均値及び参考品種における範囲との比較に基づき、分類学上の種であるトウモロコシとの間の相違の有無を評価した(別紙 12 の 2.1.1、1 ページ)。

5

10

その結果、統計解析を行った発芽苗数、着雌穂高、稈長、緑度保持性、種子含水率、種子検定重量及び収量について、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(表 7 及び表 8、25 及び 26 ページ)。また、初期生育程度、開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、転び型倒伏率、挫折型倒伏率、最終株数及び脱落雌穂数については、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で平均値に大きな差は認められず、いずれも同一ほ場内で同時に栽培した参考品種の範囲内であった(表 7 及び表 8、25 及び 26 ページ)。

15

表 7 無散布区の本組換えトウモロコシに関する形態及び生育の特性

調査項目	本組換え トウモロコシ (無散布区) ^a	非組換え トウモロコシ ^a	<i>p</i> 値 ^b	参考品種 ^a
	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)		平均値 (範囲)
発芽苗数	74.9 (65–81)	73.8 (58–80)	0.15	74.6 (59–81)
初期生育程度	5.75 (4–8)	5.97 (4–9)	NA ^b	6.68 (4–9)
開花期までの 日数	58.3 (52–64)	58.3 (52–64)	NA	55.8 (48–65)
絹糸抽出期までの 日数	58.3 (52–63)	58.3 (52–63)	NA	55.8 (47–66)
着雌穂高 (cm)	89.2 (52.7–108)	90.0 (54.4–110)	0.477	99.7 (53.9–133)
稈長 (cm)	233 (152–273)	234 (145–272)	0.778	224 (131–277)
緑度保持性 (%)	46.7 (5–75)	49.5 (5–85)	0.330	37.5 (0–80)
転び型倒伏率 (%)	1.06 (0–16)	0.688 (0–8)	NA	0.766 (0–15)
挫折型倒伏率 (%)	7.03 (0–70)	4.66 (0–34)	NA	3.58 (0–45)
最終株数	61.6 (49–69)	61.7 (51–69)	NA	62.2 (51–71)
脱落雌穂数	0.0625 (0–1)	0.0313 (0–1)	NA	0.0885 (0–3)
種子含水率 (%)	18.7 (14.3–27.0)	19.0 (14.8–27.3)	0.54	18.2 (13.5–30.3)
種子検定重量 (kg/100 L)	67.3 (54.0–82.1)	66.8 (56.4–78.7)	0.498	67.0 (49.7–80.2)
収量 (トン/ha)	10.9 (6.76–14.8)	10.7 (7.05–15.4)	0.555	10.4 (6.47–16.7)

a : 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシは $N=32$ 、参考品種は $N=192$ (6つの参考品種)。

5 b : NA の記載は線形混合モデルを用いた解析を行わなかったことを示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

表 8 散布区の本組換えトウモロコシに関する形態及び生育の特性

調査項目	本組換え トウモロコシ (散布区) ^{a, b}	非組換え トウモロコシ ^b	<i>p</i> 値 ^c	参考品種 ^b
	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)		平均値 (範囲)
発芽苗数	74.3 (59–80)	73.8 (58–80)	0.51	74.6 (59–81)
初期生育程度	5.88 (4–8)	5.97 (4–9)	NA ^c	6.68 (4–9)
開花期までの 日数	58.9 (54–63)	58.3 (52–64)	NA	55.8 (48–65)
絹糸抽出期までの 日数	58.7 (54–63)	58.3 (52–63)	NA	55.8 (47–66)
着雌穂高 (cm)	88.5 (57.8–111)	90.0 (54.4–110)	0.217	99.7 (53.9–133)
稈長 (cm)	235 (172–263)	234 (145–272)	0.888	224 (131–277)
緑度保持性 (%)	49.5 (5–85)	49.5 (5–85)	1.000	37.5 (0–80)
転び型倒伏率 (%)	1.25 (0–16)	0.688 (0–8)	NA	0.766 (0–15)
挫折型倒伏率 (%)	7.25 (0–75)	4.66 (0–34)	NA	3.58 (0–45)
最終株数	61.6 (48–70)	61.7 (51–69)	NA	62.2 (51–71)
脱落雌穂数	0.0938 (0–1)	0.0313 (0–1)	NA	0.0885 (0–3)
種子含水率 (%)	19.1 (14.8–26.1)	19.0 (14.8–27.3)	0.81	18.2 (13.5–30.3)
種子検定重量 (kg/100 L)	66.2 (56.4–80.9)	66.8 (56.4–78.7)	0.418	67.0 (49.7–80.2)
収量 (トン/ha)	10.7 (5.59–16.2)	10.7 (7.05–15.4)	0.978	10.4 (6.47–16.7)

a : 除草剤グルホシネート(0.44~0.47 kg ai/ha) を 3~4 葉期に散布した。

b : 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシは $N=32$ 、参考品種は $N=192$ (6つの参考品種)。

c : NA の記載は線形混合モデルを用いた解析を行わなかったことを示す。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

なお、上記の方法では統計解析をしなかった7つの調査項目(初期生育程度、開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、転び型倒伏率、挫折型倒伏率、最終株数及び脱落雌穂数)については、ほ場ごとに無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシのデータを検討し、データにバラつきが認められたほ場があれば、それらのほ場の結果について統計解析を行った(別紙12の2.1.1、1ページ)。その結果、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシのほ場データ間に明白な又は一定の傾向は見られず、また、脱落雌穂数を除くデータにバラつきがあった6つの調査項目のほ場データに関して統計学的有意差は認められなかった(別紙12の2.1.2、3ページ)。脱落雌穂数に関しては、雌穂の脱落は8ヵ所のほ場の内の3ヵ所で観察されたが、脱落雌穂数はいずれも1つであり、統計解析は行わなかったが、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシや対照の非組換えトウモロコシとの関連は認められなかった。

15 b 生育初期における低温又は高温耐性

2016年にシンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 隔離ほ場施設内の人工気象器において、本組換えトウモロコシ(図3において⑥で示した世代、19ページ)及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、生育初期における低温耐性について調査した(別紙12の2.2、16ページ)。本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを2葉期まで生育した後、冬季を想定した条件下(10°C(明期12時間)/2°C(暗期12時間))に移して生育を観察した。その結果、両トウモロコシともに葉の黄化、葉先の枯れ、著しい生育抑制等の低温による障害が観察された。両トウモロコシにおける障害の程度はいずれも極めて限定された数値を示したものの、有意水準5%を採用したWilcoxon-Mann-Whitney検定を行った結果、統計学的有意差は認められなかった(表9、27ページ)。

表9 生育初期における低温処理による障害の程度

	本組換えトウモロコシ	非組換えトウモロコシ	p値
	平均±標準誤差	平均±標準誤差	
低温障害の程度 ^a	6.8±0.3	6.5±0.3	1.00

a: N=4。低温障害の程度の評価は、生育抑制、萎凋、葉の退色及び葉の壊死斑等の症状から総合的に判断し、次の9つの分類階級を用いて行った。1=0% (健全)、2=1-15%の低温障害、3=16-30%の低温障害、4=31-45%の低温障害、5=46-60%の低温障害、6=61-75%の低温障害、7=76-90%の低温障害、8=91-99%の低温障害、9=100% (完全枯死)

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

c 成体の越冬性

5 トウモロコシは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死する。成熟後に栄養繁殖
するという報告や再度結実して種子を生産するという報告はない。なお、我が国にお
ける運搬等でこぼれ落ちたトウモロコシの生育調査においても、トウモロコシの複数
年におたる生育は確認されていない(本評価書の第 1. 1. (3). ト、7 ページ)。

10 実際に 2016 年に米国の 1 ヲ所のほ場(イリノイ州エル・パソ)で本組換えトウモロ
コシ(図 3 において⑧で示した世代、19 ページ)及び対照の非組換えトウモロコシを栽
培して収穫期の植物体を観察した(別紙 12 の 2.3、17 ページ)。その結果、本組換えト
ウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシはいずれも収穫期に褐変し枯死していた
(図 5、28 ページ)。なお、植物体観察日までの当該地域における最低気温は 8.9 °C で
あった。



15

本組換えトウモロコシ

非組換えトウモロコシ

図 5 収穫期における本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの植物体
(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

20

d 花粉の稔性及びサイズ

2014年に米国の1ヵ所のほ場(ノースカロライナ州メバネ)で、本組換えトウモロコシ(図3において⑥で示した世代、19ページ)、対照の非組換えトウモロコシ及び3つの参考品種を栽培して花粉を採取し、1%ルゴール液で染色して顕微鏡下で花粉の充実度及びサイズを調査した(別紙12の2.4、18ページ)。その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で花粉の充実度及びサイズに統計学的有意差は認められなかった(表10、29ページ)。

10 表 10 花粉の充実度及びサイズ^a

花粉充実度 (%)	本組換え トウモロコシ	非組換え トウモロコシ	<i>p</i> 値	参考品種
平均値	99.2	99.1	0.848	99.3
範囲	98.7–99.3	99.0–99.4		99.0–99.5
花粉サイズ(μm)	本組換え トウモロコシ	非組換え トウモロコシ	<i>p</i> 値	参考品種
平均値	87.4	87.4	0.866	83.5
範囲	86.8–87.9	86.6–88.2		80.9–87.4

a: 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシは $N=16$ 、参考品種は $N=48$ (3つの参考品種)。花粉充実度については有意水準 5%を採用した一般化線形混合モデルを、花粉サイズについては有意水準 5%を採用した線形混合モデルを用いてそれぞれ統計解析を行った。(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

15

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量:

20 本評価書の第 1. 2. (6). ②. a (23 ページ)のとおり、収量に関して、無散布区及び散布区の本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

種子の脱粒性:

25 トウモロコシの種子は雌穂に着生し、雌穂は苞皮で覆われているため、自然に脱粒することはない(本評価書の第 1. 1. (3). ニ. ①、5 ページ)。米国のほ場試験においても、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの雌穂は苞皮で覆われており、自然条件下での脱粒は認められなかった。

種子の休眠性及び発芽率：

2013年に米国の1ヵ所のは場(イリノイ州ブルーミントン)で収穫した本組換えトウモロコシ(図 3 において⑥で示した世代、19 ページ)、対照の非組換えトウモロコシ及び3つの参考品種の種子を用い、2014年に6つの温度条件(10 °C、25 °C、30 °C、10 °C (16 時間)/20 °C (8 時間)、10 °C (16 時間)/30 °C (8 時間)及び20 °C (16 時間)/30 °C (8 時間))における発芽率を調査した(別紙 12 の 2.5、20 ページ)。その結果、いずれの温度条件下においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で発芽率に統計学的有意差は認められなかった(表 11、30 ページ)。

10

表 11 種子の発芽率^a

温度条件	本組換え トウモロコシ	非組換え トウモロコシ	<i>p</i> 値	参考品種
	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)		平均値 (範囲)
10 °C	99.0 (98–100)	99.5 (98–100)	0.303	84.5 (58–99)
25 °C	99.5 (98–100)	99.3 (98–100)	0.664	99.1 (97–100)
30 °C	98.5 (97–100)	99.8 (99–100)	0.121	99.8 (99–100)
10 °C (16 時間) /20 °C (8 時間)	99.0 (98–100)	99.0 (98–100)	1.000	99.0 (96–100)
10 °C (16 時間) /30 °C (8 時間)	99.3 (99–100)	99.3 (99–100)	1.000	99.1 (98–100)
20 °C (16 時間) /30 °C (8 時間)	98.3 (96–100)	98.0 (97–100)	0.811	98.8 (96–100)

a：本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシは $N=4$ 、参考品種は $N=12$ (3つの参考品種)。それぞれ1反復当たり100粒(10 °Cの本組換えトウモロコシの1反復のみ101粒)を供試した。統計解析は有意水準5%を採用した一般化線形混合モデルを用いて行った。

15 (本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

f 交雑率

20 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、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

2016年にシンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 隔離ほ場施設内特定網室において、隔離ほ場から採取した土壌を用いて本組換えトウモロコシ(図3において⑥で示した世代、19ページ)及び対照の非組換えトウモロコシを栽培し、その栽培土壌及び植物体を用いて後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った(別紙12の2.6、21ページ)。ただし、この栽培土壌で計測された糸状菌数が極めて少なかったため(表14、32ページ)、土壌微生物相試験に関してはシンジェンタジャパン株式会社 アグリビジネス営業本部 技術普及センターのほ場から採取した土壌を用いた再試験を実施した(別紙12の2.6、21ページ)。

後作試験：

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの各栽培区の土壌を採取してハツカダイコンを播種した。播種後9日目に発芽率を調査し、播種後14日目に収穫して乾燥重を測定した(別紙12の2.6.1.1、23ページ)。その結果、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった(表12、31ページ)。

表12 後作試験の結果

	本組換えトウモロコシ区	非組換えトウモロコシ区	p値
	平均値±標準誤差	平均値±標準誤差	
発芽率 (%) ^a	100±0	100±0	1.0000
乾燥重 (g) ^b	2.61±0.19	2.73±0.17	0.6852

a : N=4。1反復当たり30粒を供試した。統計解析はアークサイン変換後、有意水準5%を採用した分散分析を行った。

b : N=4。収穫した25個体を1反復として測定。統計解析は有意水準5%を採用した分散分析を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

鋤込み試験：

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの茎葉部を収穫、乾燥、粉碎して調整した粉末と土壌を混和してハツカダイコンを播種した。播種後9日目に発芽率を調査し、播種後14日目に収穫して乾燥重を測定した。その結果、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重について、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった(表13、32ページ)。

表 13 鋤込み試験の結果

	本組換えトウモロコシ区	非組換えトウモロコシ区	p 値
	平均値±標準誤差	平均値±標準誤差	
発芽率 (%) ^a	98.3±1.0	99.2±0.8	0.3632
乾燥重 (g) ^b	3.66±0.23	3.74±0.11	0.7470

a : N=4。1 反復当たり 30 粒を供試した。統計解析はアークサイン変換後、有意水準 5 %を採用した分散分析を行った。

5 b : N=4。収穫した 25 個体を 1 反復として測定。統計解析は有意水準 5 %を採用した分散分析を行った。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

土壌微生物相試験：

10 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの各栽培区から土壌を採取し、希釈平板法により糸状菌、細菌及び放線菌の各コロニー数を計測した後、土壌 1 g 当たりのコロニー形成単位(CFU)に換算して糸状菌数、細菌数及び放線菌数とした(別紙 12 の 2.6.1.3、23 ページ)。その結果、糸状菌数、細菌数及び放線菌数について、いずれも本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった(表 14 及び表 15、32 ページ)。

15

表 14 土壌微生物相試験の結果-1^{ab}

	本組換えトウモロコシ区	非組換えトウモロコシ区	p 値
	平均値±標準誤差	平均値±標準誤差	
糸状菌数 (10 ¹ CFU/g)	27.2±6.5	23.2±3.7	0.6518
細菌数 (10 ⁴ CFU/g)	21.4±3.5	26.1±2.0	0.3802
放線菌数 (10 ³ CFU/g)	11.1±1.9	12.2±0.9	0.6226

a : シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 中央研究所 隔離ほ場の土壌を用いた試験。

b : N=4。5 シャーレを 1 反復として測定。統計解析は有意水準 5 %を採用した枝分かれ分散分析を行った。
(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

20

表 15 土壌微生物相試験の結果-2^{ab}

	本組換えトウモロコシ区	非組換えトウモロコシ区	p 値
	平均値±標準誤差	平均値±標準誤差	
糸状菌数 (10 ⁴ CFU/g)	12.7±1.5	14.6±2.8	0.6579
細菌数 (10 ⁶ CFU/g)	20.6±1.3	18.2±1.4	0.3054
放線菌数 (10 ⁵ CFU/g)	17.0±1.3	18.4±1.0	0.3825

a : シンジェンタジャパン株式会社 アグリビジネス営業本部 技術普及センターの土壌を用いた再試験。

b : N=4。5 シャーレを 1 反復として測定。統計解析は有意水準 5 %を採用した枝分かれ分散分析を行った。
(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

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

添付の「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申請及び承認状況は表 16 (34 ページ)のとおりである。

30

表 16 国外における申請及び承認状況 (2018年6月現在)

申請先	目的	申請・承認状況
米国食品医薬品庁(FDA)	食品、飼料	2016年4月確認終了
米国農務省(USDA)	無規制裁培	2016年3月承認
カナダ保健省(Health Canada)	食品	2016年8月承認
カナダ食品検査庁(CFIA)	飼料、環境	2016年8月承認
オーストラリア・ニュージーランド食品 基準機関(FSANZ)	食品	2016年7月承認

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社に帰属する)

第2 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 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

- 10 本組換えトウモロコシで発現する eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫抵抗性を付与し、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を付与する(本評価書の第 1. 2. (1). ロ. ②、11 ページ)。eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は *B. thuringiensis* 由来の Cry 蛋白質であるが、これら Cry 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられておらず、一方、PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化することで、*N*-アセチル
- 15 *-L*-グルホシネートへと代謝する酵素であるが、高い基質特異性を有することが確認されている(本評価書の第 1. 2. (1). ロ. ③、14 ページ)。これらの知見から、eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現が競合における優位性に関わる諸形質に影響することは考えにくい。
- 20 実際に競合における優位性に関わる諸形質の評価として、米国のほ場及び我が国の隔離ほ場施設内の人工気象器において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを栽培し、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を調査した(本評価書の第 1. 2. (6). ②. a~e、23~29 ページ)。その結果、全ての調査項目において、本組換えトウモロコシと対
- 25 照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差あるいは相違は認められなかった。

- 本組換えトウモロコシは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を示す(本評価書の第 1. 2. (6). ①、22 ページ)。しかし、コウチュウ目害虫による食害はトウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないこと、
- 30 また、自然条件下において除草剤グルホシネートが散布されるとは想定しにくいことから、本組換えトウモロコシに付与された形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

- 以上の知見から本組換えトウモロコシの競合における優位性が非組換えトウモロコシに
- 35 比べて高まる可能性は考えにくく、よって、本組換えトウモロコシについて競合における

優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 —

(3) 影響の生じやすさの評価

—

10

(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。

15

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

20

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性を比較するため、我が国の特定網室において本組換えトウモロコシと
25 対照の非組換えトウモロコシを栽培し、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、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意
差は認められなかった(本評価書の第 1. 2. (6). ②. g、31 ページ)。

本組換えトウモロコシで発現する eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT 蛋白質
30 は、既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている。また、eCry3.1Ab 蛋白質
及び mCry3A 蛋白質はそれぞれ独立して殺虫活性を示し、酵素活性を持たないと考えられ、
PAT 蛋白質は酵素蛋白質であるものの高い基質特異性を有することから、いずれも宿主の
代謝系を変化させるとは考えにくい。さらに、これら Cry 蛋白質と PAT 蛋白質それぞれの
作用機作は独立していることから、相互に影響することは考えにくい(本評価書の第 1. 2.
35 (1). ロ. ③、14 ページ)。これらの知見から、eCry3.1Ab 蛋白質、mCry3A 蛋白質及び PAT

蛋白質が新たな有害物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

本組換えトウモロコシに散布された除草剤グルホシネートは、PAT 蛋白質によってアセチル化されて *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝されるが、動物試験の結果から *N*-アセチル-L-グルホシネートの毒性は親化合物であるグルホシネートより低いと考えられている。また、本組換えトウモロコシに対するグルホシネートの散布時期や散布量等について既存の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシから変更がないことから、グルホシネートを散布した場合の *N*-アセチル-L-グルホシネートの残留量は、本組換えトウモロコシと既存の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシで同程度と考えられる(本評価書の第 1. 2. 10 (6). ①、22 ページ)。これらのことから、除草剤グルホシネートの本組換えトウモロコシへの散布によって生じる *N*-アセチル-L-グルホシネートが有害物質になるとは考えにくい。

本組換えトウモロコシで発現している eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質は、ウエスタンコーンルートワームに代表される特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示すため(本評価書の第 1. 2. (1). ロ. ②、11 ページ)、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考えられた。我が国に生息する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を食餌する場合又は本組換えトウモロコシを直接食餌する場合が想定された。そこで、これらの経路から eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質に暴露され、何らかの影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫を、環境省レッドリスト 2017(環境省, 2017)に掲載されている絶滅危惧種及び準絶滅危惧種のコウチュウ目昆虫から検討した。これらのコウチュウ目昆虫の分布・生息地及び食餌に関する情報を用いて絞り込みを行った結果、影響を受けることが否定できない種として 4 種を特定した(表 17、38 ページ)。

表 17 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫

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

出典：大林延夫, 新里達也. 2007. 日本産カミキリムシ. 東海大学出版会

- 5 野尻湖昆虫グループ. 1985. アトラス・日本のネクイハムシ—化石同定への手引き—. 野尻湖昆虫グループ.
 林成多. 2005. 日本産ネクイハムシ図鑑—全種の解説—. 月刊むし 408 : 2-18.
 林成多. 2012. 日本のネクイハムシ. むし社.

10

(2) 影響の具体的内容の評価

標的昆虫であるウエスタンコーンルートワームに対する eCry3.1Ab 蛋白質及び mCry3A 蛋白質の LC₅₀ 値(半数致死濃度)はそれぞれ 40 µg/mL 及び 1.4 µg/mL である(別

15 紙 13 及び別紙 14)。

(3) 影響の生じやすさの評価

(1)で特定された我が国に生息するコウチュウ目昆虫 4 種が本組換えトウモロコシの花

20 粉又は植物体を摂食することにより影響を受ける可能性について評価した。

我が国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリとイヌホオズキ葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁(0 m)での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm²であった(Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から 5 m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm²以内であった。北米では全 7 カ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタを用いて花粉堆積密度の調査が行われ、トウモロコシ畑から 1 m、2m 及び 4~5 m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は、35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm² 及び 8.1 粒/cm²へと減少していくことが明らかとなっている(Pleasant *et al.*, 2001)。さらに、カナダでも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が調査され、ほ場の縁から 1 m 及び 5 m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm²であったと報告されている(Sears *et al.*, 2000)。これらの調査結果に基づくと、トウモロコシほ場から飛散して周辺植物に堆積する花粉量は、ほ場から遠ざかるごとに減少し、その量は 10 m 以上離れると極めて少なくなると考えられた。また、本組換えトウモロコシの花粉又は植物体を摂食する可能性のあるコウチュウ目昆虫が、本組換えトウモロコシの栽培ほ場周辺に局所的に生息するとは考えにくい。

以上のことから、特定されたコウチュウ目昆虫 4 種が個体群レベルで本組換えトウモロコシによる影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシ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。

25

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

30

トウモロコシは近縁野生種であるテオシントと自然交雑可能であるが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である(OECD, 2003)。我が国にこれら近縁野生種は自生しておらず、自然交雑の可能性はないことから、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

—

5 (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等の判断

10

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。

15 4. その他の性質

上記の他に、本組換えトウモロコシに関して生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる性質はないと判断された。

第3 生物多様性影響評価の総合的評価

【競合における優位性】

5 宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

本組換えトウモロコシで発現するeCry3.1Ab蛋白質、mCry3A蛋白質及びPAT蛋白質は、その作用機作から、競合における優位性に関わる諸形質に影響することは考えにくい。

10 実際に競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を調査した。その結果、全ての調査項目において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差又は相違は認められなかった。また、本組換えトウモロコシには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が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害はトウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないこと、自然条件下において除草剤グルホシ
15 ネットが散布されるとは想定しにくいことから、これらの形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

以上の知見に基づくと、本組換えトウモロコシの競合における優位性が非組換えトウモロコシに比べて高まる可能性は考えにくく、よって、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

【有害物質の産生性】

25 宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。本組換えトウモロコシの有害物質産生性に関し、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間でいずれも統計学的有意差は認められなかった。

30 本組換えトウモロコシで発現しているeCry3.1Ab蛋白質、mCry3A蛋白質及びPAT蛋白質は、既知アレルゲンと相同性を持たないことが確認されている。また、その作用機作から、宿主の代謝系を変化させたり、相互に影響することで新たな有害物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

35 本組換えトウモロコシに散布された除草剤グルホシネートはPAT蛋白質によりNアセチル-L-グルホシネートへと代謝されるが、Nアセチル-L-グルホシネートの毒性はグルホシネートより低いと考えられている。また、グルホシネートの散布時期や散布量等に変更がないことから、グルホシネートを散布した場合のNアセチル-L-グルホシネートの残留量は、本組換えトウモロコシと既存の除草剤グルホシネート耐性トウモロコシで同程度と考

えられる。これらのことから、*N*-アセチル-L-グルホシネートが有害物質になるとは考えにくい。

本組換えトウモロコシにはコウチュウ目害虫抵抗性が付与されており、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性がある野生動植物として、コウチュウ目昆虫4種が特定された。しかし、トウモロコシほ場から飛散して周辺植物に堆積する花粉量は、ほ場から遠ざかるごとに減少し、その量は10 m以上離れると極めて少なくなることが示されており、また、本組換えトウモロコシの花粉又は植物体を摂食する可能性のあるコウチュウ目昆虫が本組換えトウモロコシの栽培ほ場周辺に局所的に生息することは考えにくい。これらのことから、特定されたコウチュウ目昆虫4種が個体群レベルで本組換えトウモロコシによる影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

以上の知見に基づくと、本組換えトウモロコシが有害物質を産生する可能性やコウチュウ目昆虫へ影響を及ぼす可能性は極めて低く、よって、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。

15 【交雑性】

我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種の自生は報告されていない。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された。

20 以上のことから、総合的評価として、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に影響を生ずるおそれはないと判断した。

引用文献

Bevan M, Barnes WM, Chilton MD. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.

5

Burns A, Raybould A. 2014. Nontarget organism effects tests on eCry3.1Ab and their application to the ecological risk assessment for cultivation of Event 5307 maize. *Transgenic Research* 23: 985-994.

10 CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 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>) [Accessed Feb. 25, 2014].

15 Chen E, Stacy C. 2007. Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefore. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,230,167. Washington DC: U.S. Patent Office.

20 Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689.

25 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAOSTAT. (<http://faostat3.fao.org/home/E>) [Accessed June 7, 2016].

Fling ME, Kopf J, 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.

30

Geiser M, Schweizer S, Grimm C. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *kurstaki* HD-1. *Gene* 48: 109-118.

35

- Hansen G, Das A, Chilton MD. 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7603-7607.
- 5 Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O’Gara F, Haas D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 232-237.
- 10 Hohn T, Stavolone L, De Haan P, Ligon H, Kononova M. 2007. Cestrum yellow leaf curling virus promoters. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No.7,166,770. Washington DC: U.S. Patent Office.
- Itoh T, Tomizawa J. 1979. Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA
15 polymerase, ribonuclease H, and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43: 409-417.
- Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.
- 20 J-BCH (日本版バイオセーフティクリアリングハウス). 2017. LMO 関連情報. (http://www.biodic.go.jp/bch/bch_3.html) [Accessed Mar. 28, 2017]
- Koziel MG, Desai NM, Lewis KS, Kramer VC, Warren GW, Evola SV, Crossland LD,
25 Wright MS, Merlin EJ, Launis KL, Rothstein SJ, Bowman CG, Dawson JL, Dunder EM, Pace GM, Suttie JL. 1997. Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. Ciba-Geigy, assignee. U.S. Patent No. 5,625,136. Washington, DC: U.S. Patent Office.
- 30 Luna SV, Figueroa JM, Baltazar BM, Gomez RL, Townsend R, Schoper JB. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41: 1551-1557.
- Murray EE, Lotzer J, Eberle M. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids*
35 *Res*17: 477-498.

NCGA (National Corn Growers Association). 2017. World of Corn 2017. (<http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2017.pdf>) [Accessed Apr. 21, 2017].

5 Odell JT, Nagy F, Chua NH. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

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.
10 ENV/JM/MONO(99)13.

OECD. 2003. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 27. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11.
15

OECD. 2007. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 42. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14.

20 Pleasants JM, Hellmich RL, Dively GP, Sears MK, Stanley-Horn DE, Mattila HR, Foster JE, Clark P, Jones GD. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 98: 11919-11924.

25 Sears MK, Stanley-Horn DE, Matilla HR. 2000. Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. (<http://cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/articles/searsreport.pdf>) [Accessed Apr. 23, 2015].

30 Sekar V, Thompson DV, Maroney MJ, Bookland RG, Adang MJ. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7036-7040.

35

- Shirai Y, Takahashi M. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudaeschnia maia*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- 5 Strickberger MW. 1976. Probability and statistical testing. *In: Genetics*, 2nd ed., New York: Macmillan Publishing Company, pp.140-163.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2010. Biopesticide registration action document. Modified Cry3A protein and the genetic material
10 necessary for its production (via elements of pZM26) in Event MIR604 corn SYN-IR604-8.
(http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/mcry3a-brad.pdf)
[Accessed Feb. 8, 2017].
- 15 Walters FS, deFontes CM, Hart H, Warren GW, Chen JS. 2010. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts Coleopteran activity in eCry3.1Ab, an Engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3082-3088.
- 20 Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
- Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Pühler A. 1988. Nucleotide
25 sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
- Wych RD. 1988. Production of hybrid seed corn. *In: Corn and Corn Improvement*, 3rd ed., Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc., pp. 565-607.
- 30 Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton MD. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 6322-6326.
- 35 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.

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 第三卷 雑穀. 社団法人 農山漁村文化協会. pp. 34-37.

5 環境省. 2017. 環境省レッドリスト 2017. 昆虫類. 平成 29 年 3 月 31 日公表. (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf>) [Accessed July 27, 2017].

菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳.

10 財務省. 2017. 財務省貿易統計. (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed Apr. 20, 2017].

食品安全委員会. 2010. 農薬評価書 グルホシネート. 食品健康影響評価の結果の通知について(平成 22 年 2 月 25 日付け府食第 139 号).

15

千藤茂行. 2001. トウモロコシの品種生態. IV 採種. 転作全書 第三卷 雑穀. 社団法人 農山漁村文化協会. pp. 96-102.

瀧澤康孝. 2001. 子実用トウモロコシの栽培. 転作全書 第三卷 雑穀. 社団法人 農山漁村文化協会. pp. 103-130.

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

25 中村茂文. 2001. 生育のステージと生理, 生態. 転作全書 第三卷 雑穀. 社団法人 農山漁村文化協会. pp. 39-63.

西尾剛. 2002. IV 植物の交配実験. 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. pp. 89-94.

30

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

35

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 Apr. 21, 2017].

- 5 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 Apr. 21, 2017].

農林水産省. 2017b. 飼料をめぐる情勢. 平成 29 年 3 月公表.

- 10 (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/attach/pdf/index-80.pdf)
[Accessed Apr. 20, 2017].

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.

- 15 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170322.html>) [Accessed Mar. 22, 2017].

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ー. 野尻湖昆虫グループ.

- 20 林成多. 2005. 日本産ネクイハムシ図鑑ー全種の解説ー. 月刊むし 408 : 2-18.

林成多. 2012. 日本のネクイハムシ. むし社.

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. 社団法人 農山漁村文

- 25 化協会. pp. 21-33.

緊急措置計画書

平成 29 年 10 月 4 日

5 氏名 シンジェンタジャパン株式会社
 代表取締役社長 篠原 聡明
 住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
 オフィスタワーX

10 第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(*ecry3.1Ab*, *mcry3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Itis) (MZIR098, OECD UI: SYN-00098-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、以下の措置を執ることとする。

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

シンジェンタジャパン株式会社：生物多様性影響管理委員会委員 平成 29 年 10 月現在

氏 名	所 属	電話番号
(管理責任者)	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	
	シンジェンタジャパン株式会社 研究開発本部 バイオテクノロジーレギュラトリー部	

(個人名・職名・電話番号は個人情報により非開示)

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は米国シンジェンタ社と連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者等の使用の可能性がある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

5 報収集を行う。

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

10 弊社は米国シンジェンタ社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者等の取引ルートへ本組換えトウモロコシの適切な管理、取扱い等の生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

15

本組換えトウモロコシの第一種使用等により、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、弊社は米国シンジェンタ社の協力のもと、本組換えトウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置を執るとともに、

20 環境中に放出された本組換えトウモロコシが、環境中で生存しないように不活化するよう措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 本組換えトウモロコシの第一種使用等により、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合には、直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別紙のリスト

- 別紙 1 Plasmid pSYN17629: Plasmid Lineage Analysis and Sequence. Assessment.
5 社外秘情報により非開示
- 別紙 2 Nucleotide Alignment of the MZIR098 Insert and Flanking Sequence with
the pSYN17629 T-DNA. 社外秘情報により非開示
- 10 別紙 3 Event MZIR098 Maize: Confirmation of Absence of *Agrobacterium*
tumefaciens in the MZIR098 F1 generation. Assessment.
社外秘情報により非開示
- 別紙 4 Event MZIR098 Maize: Mendelian Inheritance Analysis. Final Report
15 Amendment 2. 社外秘情報により非開示
- 別紙 5 Event MZIR098 Maize: Insert Copy Number Southern Blot Analysis. Final
Report Amendment 1. 社外秘情報により非開示
- 20 別紙 6 Event MZIR098 Maize: Genetic Stability Analysis of F2, F3, F4, F5, and F1
Generations. Final Report Amendment 2. 社外秘情報により非開示
- 別紙 7 Quantification of eCry3.1Ab, mCry3A, and Phosphinothricin
25 Acetyltransferase in Tissues from Multiple Generations of Maize Derived
from Transformation Event MZIR098. Final Report Amendment 1.
社外秘情報により非開示
- 別紙 8 Event MZIR098 Maize: Real-time, Event-specific Polymerase Chain Reaction
30 Method. Assessment. 社外秘情報により非開示
- 別紙 9 Event MZIR098 Maize: Validation of Real-time, Event-specific Polymerase
Chain Reaction Method. Assessment. 社外秘情報により非開示
- 別紙 10 Insecticidal Efficacy of Event MZIR098 Maize against Western Corn
35 Rootworm in the Field in 2014. Final Report. 社外秘情報により非開示

別紙 11 Tolerance of MZIR098 Maize to Herbicide Products Containing Glufosinate-Ammonium. Final Report Amendment 2.

社外秘情報により非開示

5 別紙 12 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 (ecry3.1Ab, mcry3A, pat, Zea mays subsp. mays (L.) Itis) (MZIR098, OECD UI: SYN-00098-3). 生物多様性影響評価に関わる試験結果報告書.

社外秘情報により非開示

10 別紙 13 Bioactivity of ECRY3.1AB-0208: Western Corn Rootworm.

社外秘情報により非開示

別紙 14 Characterization of Modified Cry3A Test Substance (MCRY3A-0102) and Certificate of Analysis.

社外秘情報により非開示