

半矮性トウモロコシ (GA20ox_SUP, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON94804,
OECD UI: MON-94804-4) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
① 和名、英名及び学名	4
② 宿主の品種名又は系統名	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ 基本的特性	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	6
ハ 捕食性又は寄生性	7
ニ 繁殖又は増殖の様式	7
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	7
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	7
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	8
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	8
ホ 病原性	9
ヘ 有害物質の産生性	9
ト その他の情報	9
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	10
(1) 供与核酸に関する情報	11
イ 構成及び構成要素の由来	11
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	16
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	33
(2) ベクターに関する情報	34
イ 名称及び由来.....	34
ロ 特性	34
① ベクターの塩基数及び塩基配列	34
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	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.....	35
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	35
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	35
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	35
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	35
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	35
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	35
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.....	36
(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.....	38
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	38
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	40
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	43
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.....	43
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度.....	46
(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	46
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	46

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.....	46
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.....	46
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	48
(1) 使用等の内容.....	48
(2) 使用等の方法.....	48
(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.....	49
(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.....	49
(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.....	49
(6) 国外における使用等に関する情報.....	49
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	51
1 競合における優位性.....	51
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	51
(2) 影響の具体的内容の評価.....	52
(3) 影響の生じやすさの評価.....	52
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	52
2 有害物質の産生性.....	52
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	52
(2) 影響の具体的内容の評価.....	53
(3) 影響の生じやすさの評価.....	53
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	53
3 交雑性.....	54
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	54
(2) 影響の具体的内容の評価.....	54
(3) 影響の生じやすさの評価.....	54
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	54
4 その他の性質.....	54
第三 生物多様性影響の総合的评价.....	55
参考文献.....	57
緊急措置計画書.....	67
隔離ほ場試験計画書.....	68

別添資料リスト	80
---------------	----

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

2022 年 6 月 29 日

5 農林水産大臣 金子 原二郎 殿
環境大臣 山口 壯 殿

10 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 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	半矮性トウモロコシ (<i>GA20ox_SUP</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名称：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場 使用期間：承認日から 2028 年 5 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 本遺伝子組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。 (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるよ

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

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：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は HCL301 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

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

25

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

30

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

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの

複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づく
と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 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、
5 南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、
スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001; 戸澤, 2005)。
1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。

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

15 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

・主たる栽培地域

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

国連食糧農業機関 (FAO) によると、2020 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 2 億 198 万 ha であり、上位国は、中国 4,126 万 ha、米国 3,337 万 ha、ブラジル 1,825 万 ha、インド 987 万 ha、アルゼンチン 773 万 ha である (FAO, 2020)。

25 現在、わが国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2021 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 5,500 ha で (農林水産省, 2022)、2020 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 2,400 ha である (農林水産省, 2021)。

30 ・栽培方法

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

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

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 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、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

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。2021 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、45.2 %が飼料 (7.1%の蒸留粕を含む)、28.8 %がエタノール製造、16.3 %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, 2022)。

わが国では、2021 年に約 1,523 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 万トンが飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる (財務省, 2021)。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている (農林水産省, 2018)。

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

—

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℃、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)。

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)。

5 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

10

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

15 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。

20 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)。

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)。

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℃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)。

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

35

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

20

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

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)。

35

わ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 (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 Takahashi, 2005)。

また、北米でも全 7 ヲ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度の調査が行われている (Pleasants 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)。

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

—

ヘ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲の野生動植物等の生育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

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

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

バイエルグループは、半矮性トウモロコシ (*GA20ox_SUP*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *ltis*) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4) (以下、「本組換えトウモロコシ」とする。) を作出した。

本組換えトウモロコシには、トウモロコシ内在性のジベレリン 20 酸化酵素遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) を標的とするように設計された逆方向反復配列を発現する *GA20ox_SUP* 抑制カセットが含まれている。この抑制カセットから発現する逆方向反復配列をもつ転写産物 (以下、「*GA20ox_SUP* RNA」とする。) は、RNA 干渉 (RNAi) 機構により認識され、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する。この抑制により、主に茎のジベレリン含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して、節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。

トウモロコシ栽培における倒伏は生産者が毎年直面する主要な課題の 1 つであり、倒伏による推定年間収量損失は、総収量の 5~20%にあたる (Tirado et al., 2021)。本組換えトウモロコシは半矮性 (短稈) という特性により、強風による倒伏被害の軽減が期待できる。

また、従来のトウモロコシ栽培では、稈長が農業機械の噴霧器の高さに達した後に農業機械が畑に入ると植物体を傷つける可能性があるため、生育中期以降に入ることにはできない。しかし、短稈の本組換えトウモロコシを使用する場合、生育中後期においても農業機械を使用できるため、生育段階や病虫害の発生状況に応じて、肥料や農薬を正確に施用することが可能になる。例えば、生育後期に殺菌剤を散布する際に、従来のトウモロコシ栽培では飛行機を使用した空中散布を行っているが、本組換えトウモロコシ栽培では生育後期であっても農業機械を使用し、必要に応じて正確に散布することができる。また、従来のトウモロコシ栽培では、生育期間中の肥料窒素分の流亡を加味した量の窒素を播種前又は生育初期に予め施肥するが、本組換えトウモロコシ栽培では、前述したように生育中後期であっても農業機械で畑に入れるため、植物が最も窒素を必要とする時に必要な量を正確に施肥することが可能となる。そのため、本組換えトウモロコシは肥料や農薬のより最適化された施用を通じて、環境の持続可能性を促進することが期待されている。

なお、本組換えトウモロコシの導入遺伝子と同一の遺伝子をもつ遺伝子組換え作物ではないが、同じジベレリン生合成経路に関わるジベレリン 2 酸化酵素

遺伝子を発現させることでジベレリン含有量を低下させ、半矮性の特性をもつ遺伝子組換えイネが、すでにカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている(半矮性イネ (*OsGA2ox1*, *Oryza sativa* L.) (G-3-3-22) (承認日：2005年5月25日)。この系統は、第一種使用等の内容(農業生物資源研究所内のは場に限
5 定)で使用した場合、わが国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている(農業生物資源研究所, 2004)。

(1) 供与核酸に関する情報

10 イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図1(p12)及び表1(p13~15)に示した。

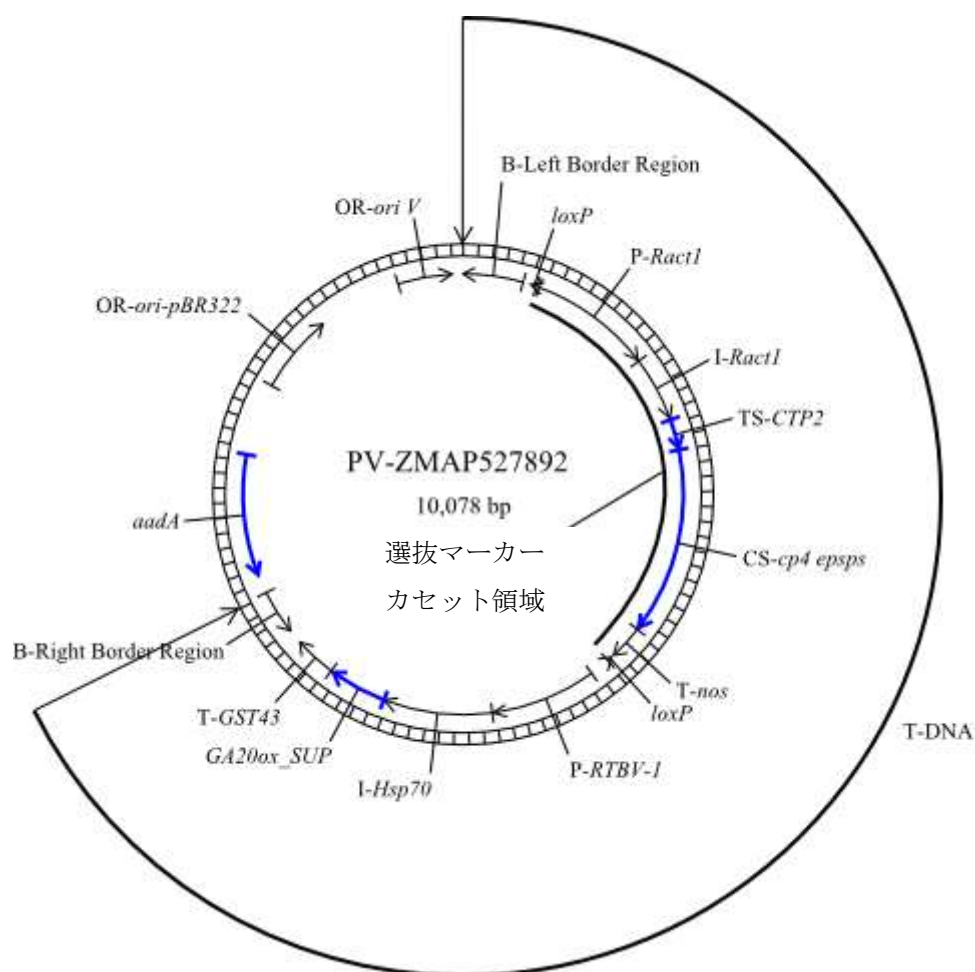
15 なお、本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットに含まれる *GA20ox_SUP* 配列の構成の詳細については、第一の 2-(1)-ロ-②-2-(2)(p18)に記載した。

ロ 構成要素の機能

20

- 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機能は、表1(p13~15)
25 に示した。



5 図1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 のプラスミドマップ¹

本組換えトウモロコシの育成の過程で、T-DNA 領域が導入された R₂ 世代の個体を Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配させることにより、PV-ZMAP527892 の T-DNA 領域のうち、2 つの loxP 配列に挟まれる選抜マーカーカセット領域 (P-Ract1、I-Ract1、TS-CTP2、CS-cp4 epsps、T-nos 及び loxP 配列の 1 つ) を除

10 去し、同領域及び Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した (第一の 2-(3)-ハ-③, p36)。

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B ¹ -Left Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ² - <i>Ract1</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー (McElroy et al., 1990)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
I ³ - <i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のイネアクチン 1 蛋白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ⁴ - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS ⁵ - <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ⁶ - <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>P-RTBV-1</i>	イネツングロ桿菌状ウイルス (RTBV) 由来のプロモーター及びリーダーで維管束の師部組織 (Yin and Beachy, 1995) 及びトウモロコシの節間において優先的に転写を誘導する (Paciorek et al., 2022)。なお、 <i>RTBV-1</i> プロモーターは野生型 <i>RTBV</i> の ORF4 の後半半分を含むが、ORF4 の開始アミノ酸であるメチオニンは含まない。したがって、 <i>RTBV-1</i> プロモーターから蛋白質が発現することはないと考えられる。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>I-Hsp70</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来の熱ショック蛋白質 (HSP70) をコードする <i>hsp70</i> 遺伝子のイントロン及びその近傍領域に存在するエクソン配列の一部 (Rochester et al., 1986)。遺伝子発現の制御に関わり、植物における発現を高める (Brown and Santino, 1997)。
<i>GA20ox_SUP</i>	ジベレリン 20 酸化酵素 3 及び 5 をコードするトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の <i>GA20ox3</i> 遺伝子及び <i>GA20ox5</i> 遺伝子のコード配列 (Song et al., 2011) に由来する 21 塩基長配列 (プラスミド位置: 5,742-5,762) 及びその逆方向反復配列 (プラスミド位置: 5,797-5,817)、並びに <i>GA20ox_SUP</i> の primary micro RNA (pri-miRNA) の基本骨格構造となるイネ (<i>O. sativa</i>) 由来の 3 つの <i>Osa-miR1425</i> フラグメント (Lacombe et al., 2008) (プラスミド位置: 5,630-5,741、5,763-5,796、5,818-6,037) により構成されている配列であり (図 4, p21)、 <i>GA20ox_SUP</i> 抑制カセットの一部を形成する (GenBank accession: OL473856)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>T-GST43</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の複数の 3'末端非翻訳領域の配列を基に作製された 3'末端非翻訳領域 (To et al., 2021)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP527892 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)	
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ⁷ -ori-pBR322	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>Escherichia coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori <i>V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

- 5 ¹ B-Border (境界配列)
- ² P-Promoter (プロモーター)
- ³ I-Intron (イントロン)
- ⁴ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)
- ⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)
- 10 ⁶ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)
- ⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)
- * T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット領域 (P-*Ract1*、I-*Ract1*、TS-*CTP2*、CS-*cp4 epsps*、T-*nos* 及び *loxP* 配列の 1 つ) は、本組換えトウモロコシには存在しない。なお、本組換えトウモロコシに存在する構成要素のみを、別添資料 5 の Appendix Table 2 (p42) に示している。

- 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

本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* RNA は、RNAi 機構に認識され、トウモロコシ内在性のジベレリン 20 酸化酵素遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の発現を抑制する。この抑制により、主に本組換えトウモロコシの茎においてジベレリン含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して、節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。

10

本組換えトウモロコシを矮化する *GA20ox_SUP* 抑制カセットの作用機序を、以下の 3 項目に分けて説明する。

15

1. ジベレリンの植物中での一般的な役割とその生合成経路
2. 標的遺伝子の選定とそれを抑制する「micro RNA (miRNA) 利用による遺伝子発現抑制カセット」の設計
3. 標的遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序

20

1. ジベレリンの植物中での一般的な役割とその生合成経路

25

ジベレリンは、成長に重要な植物ホルモンであり、茎伸長、種子発芽、葉の生育、花成など、様々な植物の発生過程の調節に関与している (Achard and Genschik, 2009; Nelissen et al., 2012)。ジベレリンの生合成は多くの植物種で研究されており、複数の酵素 (*ent*-コパリルニリン酸合成酵素 (CPS)、*ent*-カウレン合成酵素 (KS)、*ent*-カウレン酸化酵素 (KO)、*ent*-カウレン酸酸化酵素 (KAO)、*GA13* 酸化酵素 (*GA13ox*)、*GA20* 酸化酵素 (*GA20ox*)、*GA3* 酸化酵素 (*GA3ox*)、*GA2* 酸化酵素 (*GA2ox*)) によって触媒される (Yamaguchi, 2008) (図 2, p17)。そのままの形で生理活性を示す活性型ジベレリンは、図 2 (p17) に示すように、トランスゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) から合成される。多くの植物種で同定されている主要な活性型ジベレリンは *GA*₁ 及び *GA*₄ である (Binenbaum et al., 2018)。トウモロコシにおける主要な活性型ジベレリンは *GA*₁ であり、成長や発生過程の調節に関与し、特に節間伸長を調節することが知られている (Phinney, 1985)。

30

35

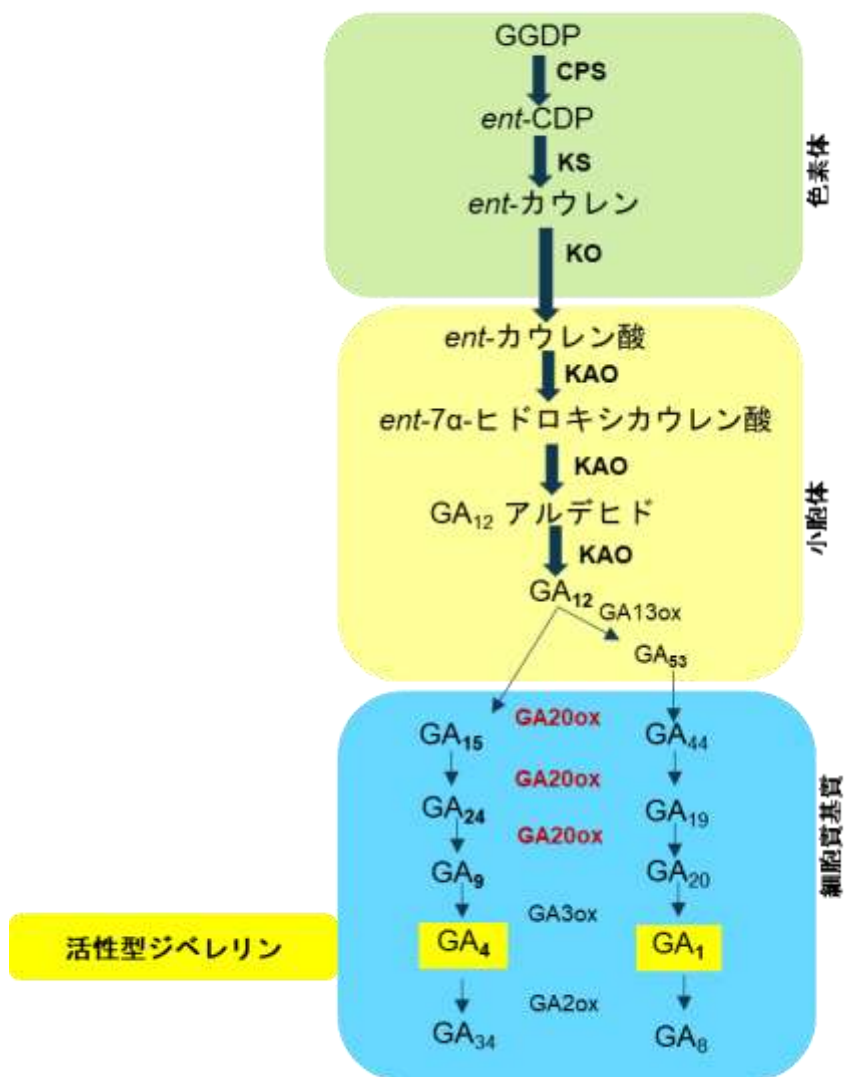


図2 植物におけるジベレリン生合成経路の図 (Binenbaum et al. (2018) を基に作成)³

- 5 GGDP: トランスゲラニルゲラニルニリン酸; *ent*-CDP: *ent*-コパリルニリン酸; CPS: *ent*-コパリルニリン酸合成酵素; KS: *ent*-カウレン合成酵素; KO: *ent*-カウレン酸化酵素; KAO: *ent*-カウレン酸酸化酵素; GA13ox: GA13 酸化酵素; GA3ox: GA3 酸化酵素; GA2ox: GA2 酸化酵素; GA20ox (赤字): 本組換えトウモロコシで発現抑制される *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子が含まれる *GA20ox* 遺伝子ファミリーがコードする GA20
- 10 酸化酵素

³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

2. 標的遺伝子の選定とそれを抑制する「miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセット」の設計

5 (1) 標的の内在性遺伝子の選定

これまでにジベレリン経路において多くの矮性対立遺伝子がトウモロコシにおいて同定されたが、極度の矮化や多面発現により望ましくない表現型が生じるため、トウモロコシの育種や商品化では利用されていない (Fujioka et al., 1988; Bensen et al., 1995; Cassani et al., 2009; Wang et al., 2013; Chen et al., 2014)。

10 また、トウモロコシのジベレリン欠損変異体の多くでは、雌穂に葯 (両性花) が形成される等の花器官への影響が報告されているが (Bensen et al., 1995; Chen et al., 2014)、両性花では種子生産性が低下する可能性がある。以上のことから、主に茎などの栄養組織におけるジベレリン生合成に重要なジベレリン生合成酵素遺伝子を標的遺伝子として選定することとした。

15

GA20 酸化酵素 (GA20ox) (図 2, p17) は、活性型ジベレリン (GA₁ 及び GA₄) を合成するジベレリン生合成経路の最終段階における重要な酵素の 1 つである。緑の革命に貢献した半矮性イネ品種の原因遺伝子が、イネの GA20ox 遺伝子 (OsGA20ox2 (*sd1*)) であり、この遺伝子の機能喪失型変異が半矮性を引き起こすことが知られている (Sasaki et al., 2002)。この半矮性と呼ばれる特性は、草丈は低くなるが穂の大きさは変わらず (菊池, 2005)、花の形成及び受精も正常なものである (Sasaki et al., 2002)。トウモロコシでは、5 つの *ZmGA20ox* 遺伝子が同定されている (Song et al., 2011)。これに加えて、Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)⁴ (Portwood et al., 2019) では、さらに 4 つの推定

20 *ZmGA20ox* 遺伝子の存在が示唆されている。公開されているトウモロコシ遺伝子の転写プロファイルデータベース (Winter et al., 2007; Sekhon et al., 2011) によると、これら 9 つの *ZmGA20ox* 遺伝子の中で *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子は、生殖組織と比べ栄養組織で高い発現量を示す⁵。バイエル社の保有するトウモロコシ系統においても、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び

25 *ZmGA20ox5* 遺伝子の栄養組織における高い発現量が認められた (Paciorek et al., 2022 の Figure 1 (a), p3)。さらに、*ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーの系統発生分析において、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子がイネにおける緑の革命に寄与した OsGA20ox2 (*sd1*) 遺伝子と高い配列相同性を共有していることが明らかにされており、これら 3 つの遺伝子は同じクレード (分岐群) に属する

⁴ <https://www.maizegdb.org>

⁵ http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi

(Song et al., 2011)。以上のことから、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子を標的遺伝子として、これらを抑制することにより、生殖組織に影響を与えることなく、栄養組織、主に茎の節間で活性型ジベレリン含有量を低下させ、稈長が短くなることが期待された。

5

(2) *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の特異的に抑制するための miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセットの設計

前項(1)で選定された標的遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の発現を RNAi 機構によって抑制するために、miRNA 利用による遺伝子発現抑制カセットを新たに開発した。RNAi は、植物を含む真核生物において内在性遺伝子の発現調節のために広く保存されている機構であり (Fire et al., 1998; Jones-Rhoades et al., 2006)、miRNA 及び small interfering RNA (siRNA) により誘導される (Carthew and Sontheimer, 2009)。

本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物は、植物における miRNA の生合成過程を経て、成熟 miRNA になる。この植物における miRNA の生合成過程 (Siomi and Siomi, 2009; Borges and Martienssen, 2015) を図 3 (p20) に示し、図の番号に対応した miRNA の生合成過程を以下に叙述する。

- ステップ 1: miRNA 配列はポリメラーゼ II によって転写される。
- ステップ 2: 転写産物 (RNA) は、primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれるステムループ構造を形成する。
- ステップ 3: pri-miRNA は Dicer Like 1 (DCL1) と呼ばれる酵素により切断され、precursor miRNA (pre-miRNA) となる。
- ステップ 4: pre-miRNA は DCL1 によりさらに切断され、二本鎖の成熟 miRNA となる。
- ステップ 5: DCL1、アルゴノート蛋白質 1 (AGO1)、複数の二本鎖 RNA 結合蛋白質 (dsRBD) 及び二本鎖の成熟 miRNA により RNA-induced silencing complex (RISC) が形成される。
- ステップ 6: RISC 内で二本鎖の成熟 miRNA は、標的 mRNA 認識にかかわる miRNA (ガイド鎖) と、分解される miRNA* (パッセンジャー鎖) に分けられる。
- ステップ 7: この一本鎖成熟 miRNA (ガイド鎖) は、AGO1 に取り込まれる。
- ステップ 8: miRNA を取り込んだ AGO1 複合体は、標的 mRNA 上に存在するガイド鎖と相補的な配列領域に結合し、標的 mRNA を分解する。これにより標的 mRNA を特異的に抑制する。

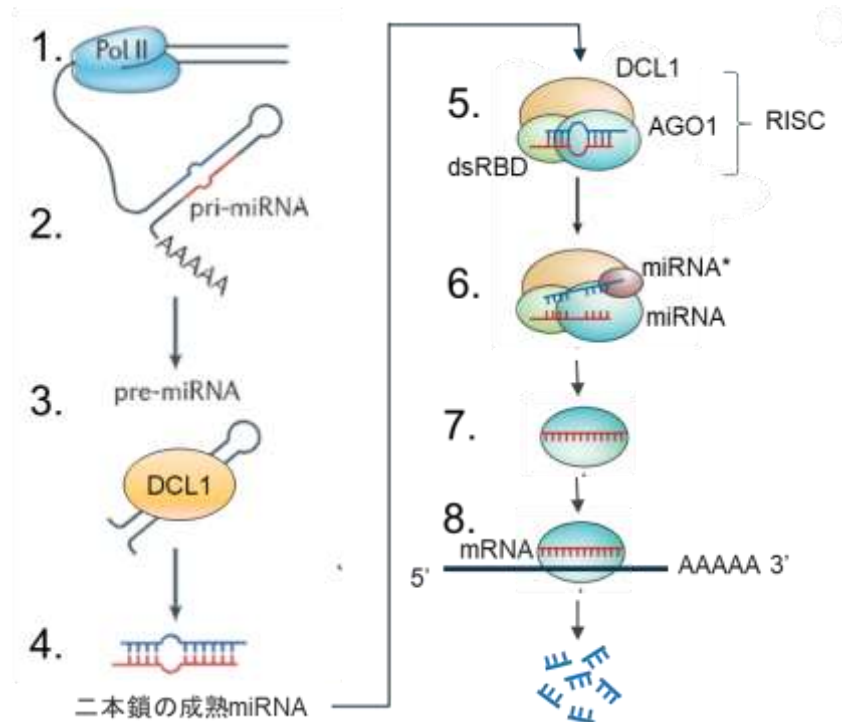


図3 植物における miRNA の生合成過程 (Siomi and Siomi (2009) 及び Borges and Martienssen (2015) を基に作成)⁶

- 5 *GA20ox_SUP* 抑制カセットは、標的遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) のみを正確に抑制し、他の遺伝子の発現を抑制しないように設計されており、*RTBV-1* プロモーター、*HSP70* イントロン、*GA20ox_SUP* 配列及び *GST43* ターミネーターで構成されている (図 4, p21)。*RTBV-1* プロモーターは、維管束の師部組織 (Yin and Beachy, 1995) 及び節間において優先的に転写を誘導する
- 10 (*Paciorek et al.*, 2022)。稈長と直接的に関連する節間において、*GA20ox_SUP* 抑制カセットを転写させ、そこから産生される miRNA により標的遺伝子の発現を抑制するために利用された。*GA20ox_SUP* 配列は、pri-miRNA (以下、「*GA20ox_SUP* の pri-miRNA」とする。) の基本骨格構造となるイネの配列と、21 塩基長の成熟 miRNA (以下、「*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA」とする。) と
- 15 なるトウモロコシの配列により構成されている (図 4, p21)。

⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

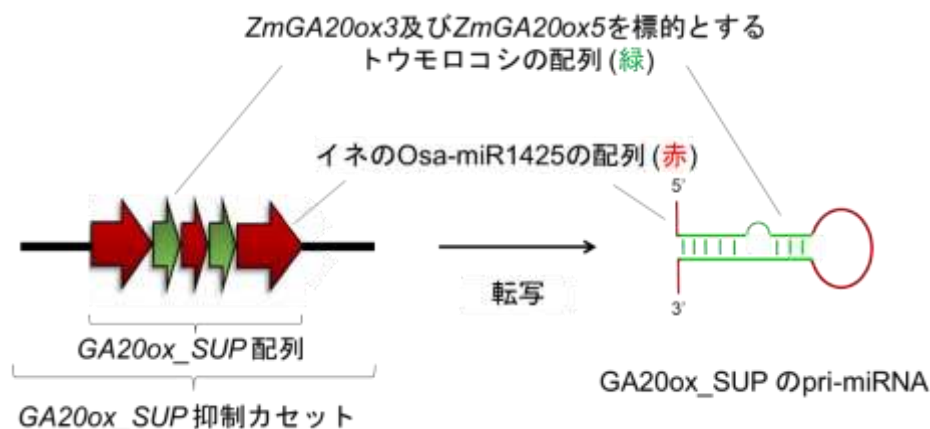


図 4 GA20ox_SUP 配列の構成と GA20ox_SUP の pri-miRNA の設計⁷

GA20ox_SUP の成熟 miRNA の設計にあたっては、まず *ZmGA20ox3* 遺伝子
 5 及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の配列を他の *ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーメンバーの
 配列とアライメントした。そして、miRNA が他の *ZmGA20ox* 遺伝子の発現を
 抑制しないように、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子と同一配列、又
 は最小のミスマッチを有する相同配列である一方で (脚注 17, p34)、他の
ZmGA20ox 遺伝子ファミリーメンバーの配列とのミスマッチを最大化した 21
 10 塩基長以上の配列を miRNA 標的領域候補として特定した。次に、最小自由エ
 ネルギー⁸や GC 含量 (%) などの複数のパラメーターを選定基準 (脚注 17, p34)
 として使用し、複数の miRNA 標的領域候補の中から 1 ヶ所の標的領域
 (*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子のコード領域に存在する 21 塩基長
 配列) を選定した。この標的領域の配列を基に GA20ox_SUP の成熟 miRNA の
 15 配列を設計した (Reynolds et al., 2004; Allen et al., 2005; Schwab et al., 2005)。

GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、*ZmGA20ox3* 遺伝子の転写配列と完全な相補
 性を持ち、*ZmGA20ox5* 遺伝子の転写配列と 1 塩基のミスマッチをもつ (図 5,
 p22)。この 1 塩基のミスマッチは miRNA とその標的転写産物のペアリングに
 重要な miRNA 認識部位のシード領域 (図 5 の黒い枠, p22) の外にあるため、標
 20 的遺伝子 (*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*) の抑制効率は同等になると予測された
 (Paciorek et al., 2022)。

なお、*ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーメンバーに共通するドメインとして
 2OG-FeII_Oxy ドメインがあり、選定された GA20ox_SUP の成熟 miRNA の標

⁷ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会
 社に帰属する。

⁸ 二次構造の安定性の計算であり、二本鎖RNAの対になる塩基 (G:C, G:U, A:Uなど) と対
 にならない塩基 (ループ配列) の強度に影響される。

5 的領域は、*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5* 遺伝子から発現する蛋白質の 2OG-FeII_Oxy ドメインをコードする領域に存在する (図 6, p23)。保存性が高いドメイン領域を標的とした場合であっても、配列の多様性に着目して標的領域を選定し、その配列を基に miRNA の配列を設計することで、特異的に RNAi を誘導することが可能である。このため、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子以外の *ZmGA20ox* 遺伝子ファミリーメンバーは、GA20ox_SUP の成熟 miRNA によって抑制されないと予測された。

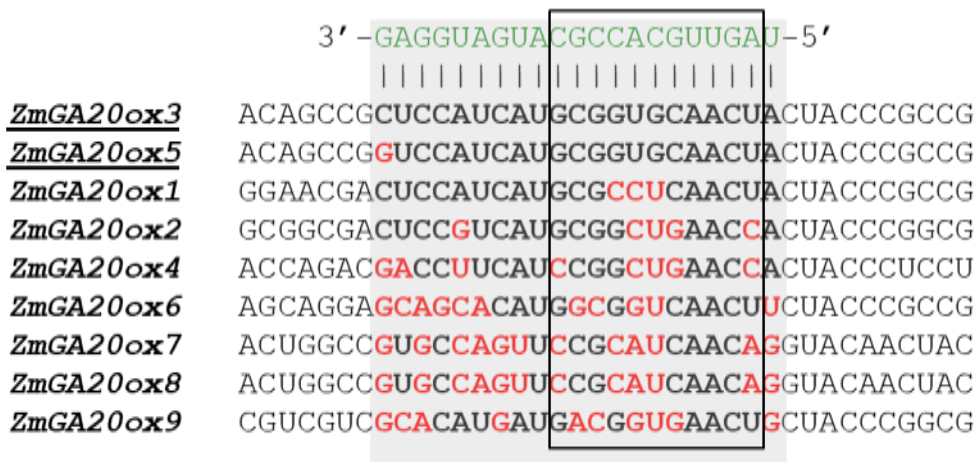


図 5 GA20ox_SUP の成熟 miRNA の配列とトウモロコシで同定された 9 つの *ZmGA20ox* 遺伝子の転写配列とのアライメント⁹

緑の配列は GA20ox_SUP の成熟 miRNA を示す。灰色のエリア内は、GA20ox_SUP の成熟 miRNA とアライメントする領域 (miRNA による効率的な抑制のためには高い相補性が必要とされる領域) を示し、黒の枠内は miRNA 認識部位のシード領域 (ミスマッチが許容されない領域) を示す。赤の塩基は GA20ox_SUP の成熟 miRNA と相補的ではない塩基を、下線は 2 つの標的遺伝子をそれぞれ示す。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 1 (c), p3

⁹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

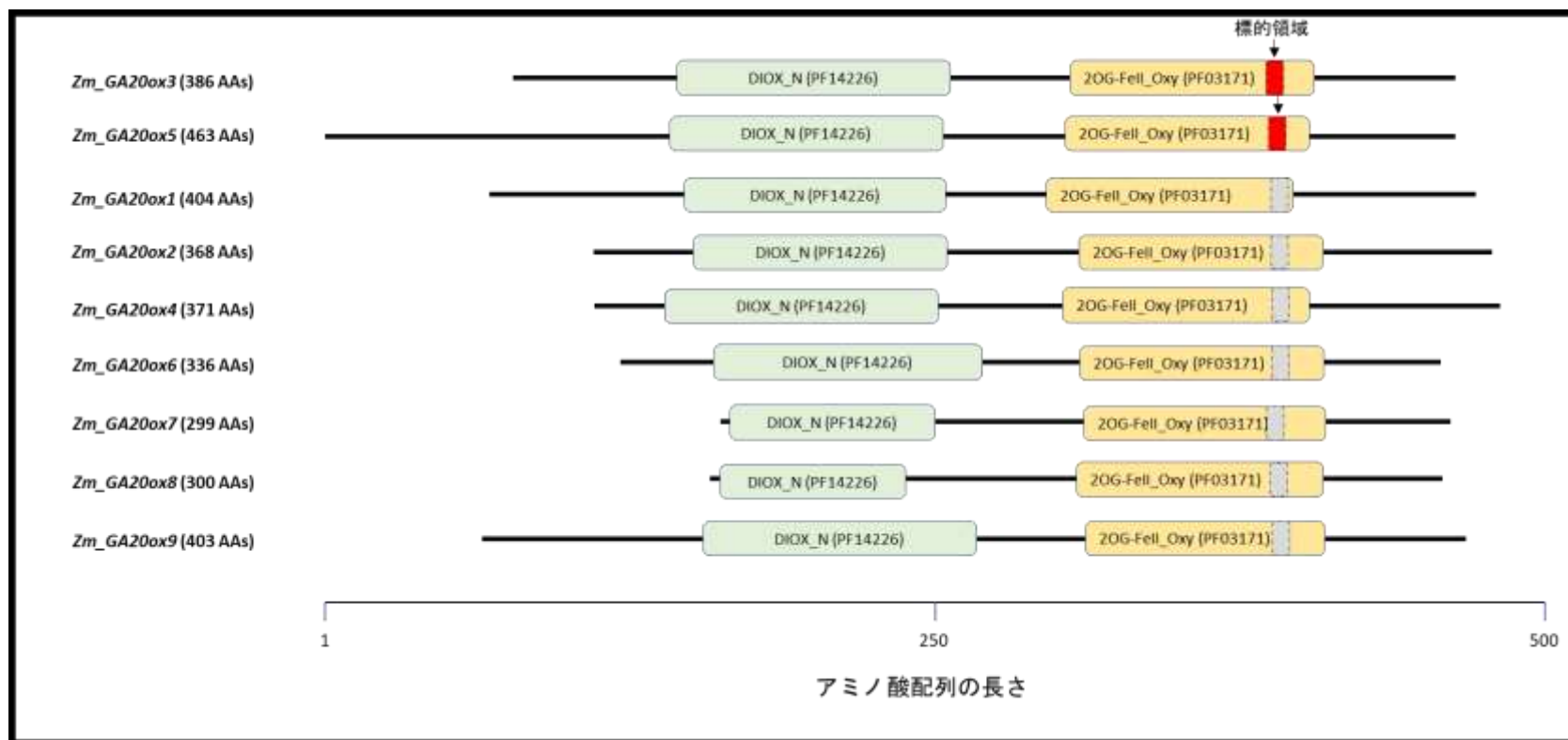


図6 9つの *ZmGA20ox* 遺伝子から発現する蛋白質の模式図¹⁰

GA20ox_SUP の成熟 miRNA の標的領域 (赤色) は、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の転写配列において、これらの遺伝子から発現する蛋白質の 2OG-FeII_Oxy ドメインをコードする領域に存在する。図 5 (p22) で示した他の非標的の *ZmGA20ox* 遺伝子の転写配列とアライメントした領域は灰色で示す。

¹⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

3. 標的遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序

本組換えトウモロコシに導入されている *GA20ox_SUP* 抑制カセットの標的
5 遺伝子の発現抑制から短稈にいたる作用機序は、Paciorek ら (2022) により明
らかにされており、以下の (1)~(3) に詳述した。なお、当試験では、
GA20ox_SUP 抑制カセットを有する 2 つの遺伝子組換えトウモロコシ (組換え
系統 1 及び組換え系統 2)¹¹ と対照のトウモロコシ (対照品種) を米国イリノイ
10 州の 2 カ所のほ場で 2019 年及び 2020 年に栽培し、栄養組織 (例：茎の節間、
葉) 及び生殖組織 (例：花粉、絹糸、雄穂、雌穂、穀粒) からデータを収集した
(Paciorek et al., 2022)。

(1) 標的遺伝子の発現抑制

GA20ox_SUP の成熟 miRNA は遺伝子組換えトウモロコシの茎の節間及び葉
15 で産生されることが確認された (Paciorek et al., 2022 の Figure 1 (d), p3)。この
GA20ox_SUP の成熟 miRNA による標的の内在性遺伝子の抑制を明らかにする
ため、*ZmGA20ox3* 遺伝子と *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現量を、qRT-PCR 法を使用
して測定した。その結果、両標的遺伝子の発現抑制が試験に供試された茎の
節間を含むほぼ全ての組織で確認された (Paciorek et al., 2022 の Figure 2, p4 及
20 び Figure S2)。 *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、ほぼすべての組織において様々
なレベルで発現している可能性があり、このことが茎の節間と葉以外の生殖
組織で確認された両標的遺伝子の発現抑制を説明しうると考えられる。

また、標的遺伝子の発現抑制の特異性を実証するため、2 つの標的遺伝子に
最も近い相同遺伝子である *ZmGA20ox1* 遺伝子の発現量を、栄養組織及び生殖
25 組織で測定した。その結果、供試したほぼ全ての組織において *ZmGA20ox1* 遺
伝子の発現量に有意な影響は観察されなかった (Paciorek et al., 2022 の Figure
S3)。また、有意な発現量の低下が認められているものも 2 つの遺伝子組換え
トウモロコシのうち一方のみで認められているもので、一貫した変化ではな
かった。

30 この結果により、*GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP*

¹¹ 組換え系統1は*GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する本組換えトウモロコシと商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統2は*GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する実験系統と商業品種とのハイブリッドである。両系統は*GA20ox_SUP*抑制カセットのゲノムへの挿入位置が異なる。なお、この商業品種には、Bt蛋白質 (改変Cry1Ab蛋白質、改変Cry2Ab蛋白質、Cry1A.105蛋白質及び改変Cry3Bb1蛋白質) 及び改変CP4 EPSPS蛋白質が導入されており、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グリホサート耐性が付与されている。また、対照のトウモロコシにも同様のBt蛋白質及び改変CP4 EPSPS蛋白質が導入されている。

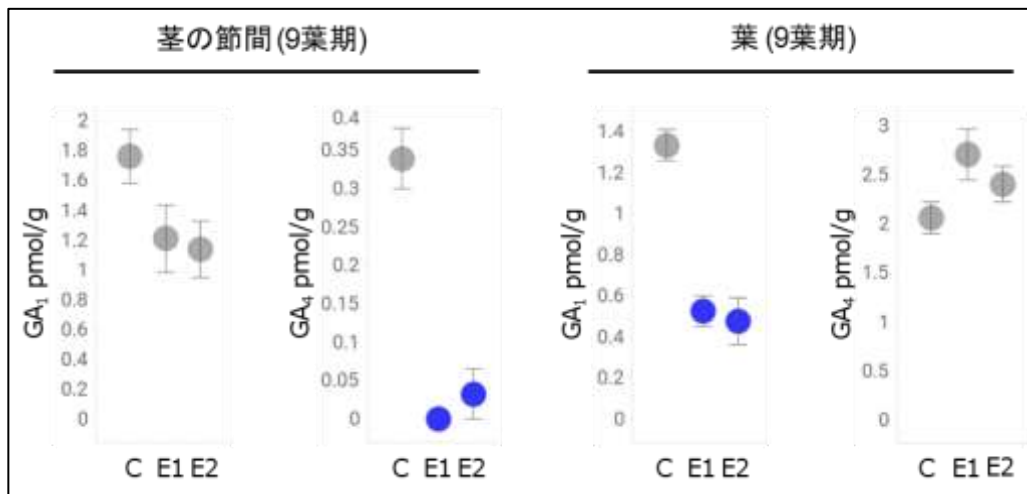
の成熟 miRNA による遺伝子発現抑制は、標的とする *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子に特異的であることが確認された (Paciorek et al., 2022)。

(2) 活性型ジベレリン含有量の低下

- 5 *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現抑制による内在性の活性型ジベレリン含有量への影響を確認するため、栄養組織及び生殖組織において主要な活性型ジベレリン (GA_1 及び GA_4) の含有量 (pmol/g) を分析した (Paciorek et al., 2022)。その結果、栄養組織における GA_1 の含有量 (9 葉期の葉、雄穂抽出期の茎の節間と葉) 及び GA_4 の含有量 (9 葉期の茎の節間) は、2 つの遺伝子組換えトウモロコシにおいて対照品種と比較して有意に低下し (図 7A 及び B, p26)、生殖組織 (花粉、絹糸、雄穂、雌穂、穀粒) では GA_1 及び GA_4 の含有量に有意な低下は認められなかった (図 8, p27)。

- 15 *ZmGA20ox3* 遺伝子と *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現抑制が試験に供試された茎の節間を含むほぼ全ての組織で確認されている (3-(1), p24) が、茎の節間と葉においてのみ活性型ジベレリン含有量に有意な低下が認められた。その理由として、① *RTBV-1* プロモーターにより *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写が茎の節間と葉における維管束組織において優先的に誘導されたことに加え、*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現量は生殖組織と比べ茎の節間と葉を含む栄養組織で高いため、茎の節間と葉では発現抑制の効果が顕著に表れたこと、及び② *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA により抑制されない他の *ZmGA20ox* 遺伝子の機能により生殖組織における活性型ジベレリン含有量が維持されたこと、が考えられる。

A



5

B

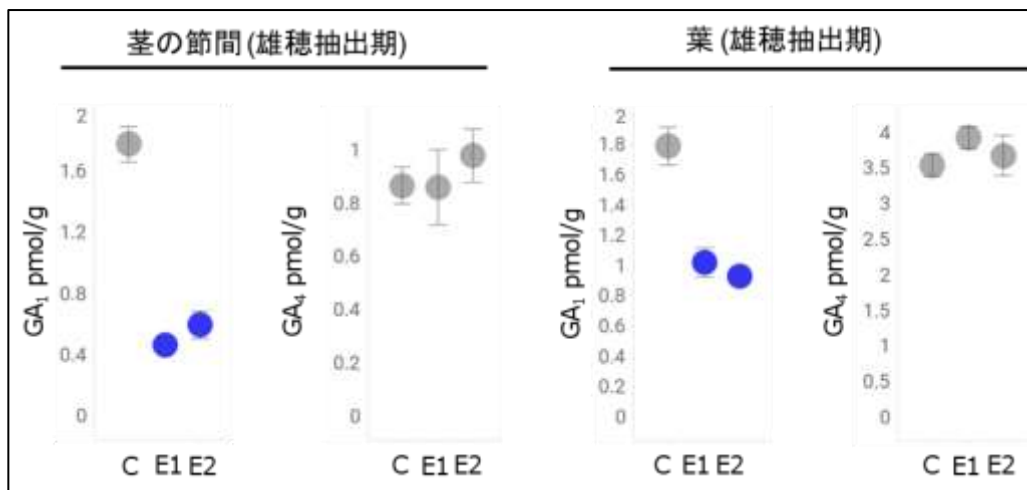


図7 *GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種の栄養組織における活性型ジベレリン (GA₁ 及び GA₄) の含有量¹²

- 10 遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められたものを青色で示し、統計学的有意差が認められなかったものを灰色で示す。エラーバーは標準誤差を表す。C -対照品種、E1 -組換え系統1、E2 -組換え系統2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 3, p5

¹² 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

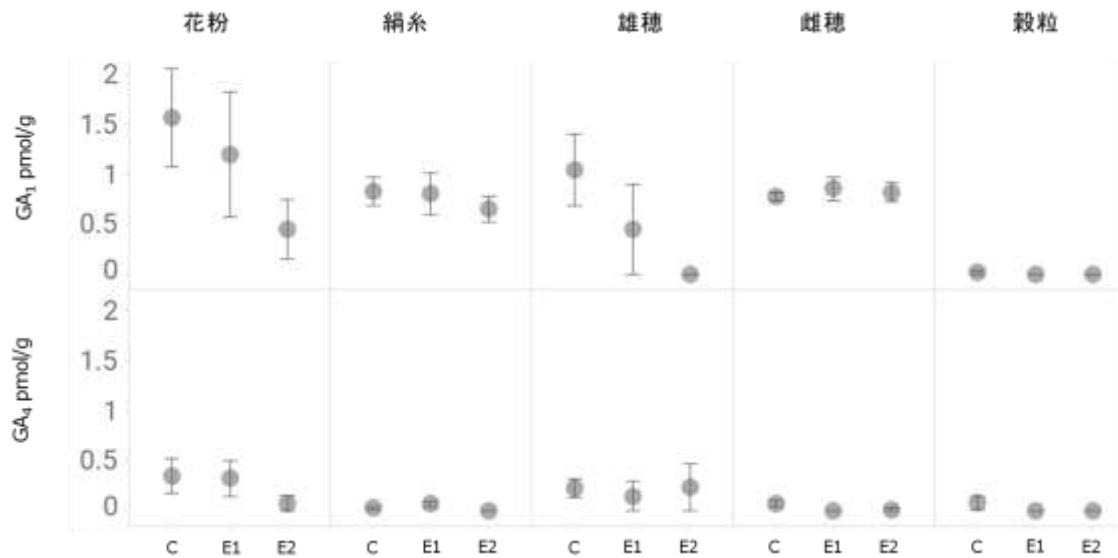


図 8 *GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種の生殖組織における活性型ジベレリン(GA_1 及び GA_4) の含有量¹³

このグラフに示されている全ての値において、遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) は認められなかった (灰色)。エラーバーは標準誤差を表す。C -対照品種、E1 -組換え系統 1、E2 -組換え系統 2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure S4

(3) 短稈化

遺伝子組換えトウモロコシの茎の節間において活性型ジベレリン含有量が低下することによる表現型への意図的な変化を確認するため、茎の節間長、着雌穂高及び稈長を測定した。対照品種と比較して、遺伝子組換えトウモロコシでは、茎の節間長が狭まり、稈長は約 3 分の 2 になった (図 9, p28)。また、稈長が短くなることに伴い、着雌穂高も低くなった (図 9, p28)。なお、節間数と着雌穂節位に変化はなかったことから、遺伝子組換えトウモロコシの茎における器官形成には変化はなかったことを示していた (Paciorek et al., 2022)。

¹³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

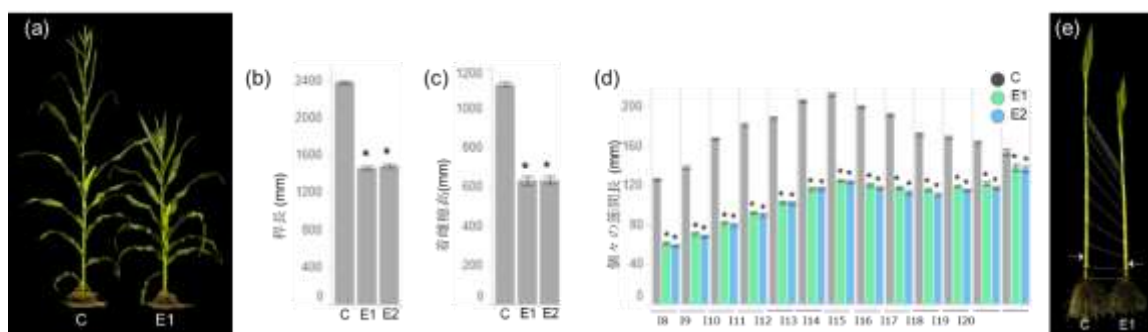


図9 *GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシの形態特性 (米国イリノイ州ジャージービル (ILJE) のほ場で栽培)¹⁴

- 5 (a) R2 生育段階における遺伝子組換えトウモロコシと対照品種の代表的イメージ画像、
(b) 稈長、(c) 着雌穂高、(d) 個々の節間長、(e) V9 生育段階における遺伝子組換えトウ
モロコシと対照品種の代表的イメージ画像。(e) における破線は同じ節を示し、矢印は
細胞レベルの検証に使用された節間を示す。アスタリスクは、遺伝子組換えトウモロ
コシと対照品種との間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められたことを示す。エラーバ
10 ーは標準誤差を表す。グラフ (d) の I8~I20 は、連続する節間の番号付けを示す。C -対
照品種、E1 -組換え系統 1、E2 -組換え系統 2。

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure 4, p5 から改変

- 15 上記の表現型への変化を細胞レベルで検証するため、遺伝子組換えトウモ
ロコシの節間における表皮細胞と柔細胞の縦幅を対照品種と比較して評価し
た。その結果、表皮細胞と柔細胞の縦幅が減少していた (Paciorek et al., 2022 の
Figure 6 (d) 及び (e), p7)。これらの結果により、表皮細胞と柔細胞の縦幅の減
少が個々の節間長を狭め、その結果、植物全体の稈長が短くなったことを示
唆している (Paciorek et al., 2022)。この細胞レベルの観察結果は、ジベレリン
20 欠損変異体で報告された他の研究結果と一致している (Huang et al., 2010; Liu et
al., 2018; Chen et al., 2019)。このことは、ジベレリン依存性細胞伸長の抑制が、
個々の節間長を狭めることに寄与する主要なメカニズムであり、それが短稈
に繋がることを示唆している。

25

上述した活性型ジベレリン含有量の低下による意図的な変化である短稈に
加えて、①その他の栄養組織、及び②生殖組織について、望ましくない変化

¹⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会
社に帰属する。

が生じていないことを確認するためにジベレリンとの関連性が報告されているものを中心に調査した。

① その他の栄養組織における変化

5

茎の節間に加えて、遺伝子組換えトウモロコシの葉でも活性型ジベレリン含有量の低下が認められていることから、葉の表現型への影響を確認するために葉幅、葉長、総葉面積及び葉の総数を測定した。その結果、葉幅がわずかに増加し、葉長が短くなっていた (Paciorek et al., 2022 の Figure 4 (j) 及び (i), p5)。総葉面積及び葉の総数に変化はなかった (Paciorek et al., 2022 の Figure 4 (k) 及び (e), p5)。

また、トウモロコシのジベレリンシグナル伝達変異体で分げつの増加が報告されており (Cassani et al., 2009)、トウモロコシにおいてジベレリンは分げつの発生にも影響を与える可能性がある (Rood, 1985)。しかし、GA20ox_SUP 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシを 2019 年と 2020 年に米国のほ場で試験栽培した結果において、分げつの発生の有無に一貫した差異は認められなかった (Paciorek et al., 2022)。

② 生殖組織における変化

3-(2) (p25) に記載したように、遺伝子組換えトウモロコシの生殖組織において活性型ジベレリン含有量の変化は認められておらず (図 8, p27)、両性花は生じずに雌穂は正常な形態を示したことが確認された (図 10, p30)。さらに、遺伝子組換えトウモロコシにおける生殖成長特性と収量構成要素への影響を評価するため、雄穂抽出期及び絹糸抽出期、雌穂面積、雌穂径、雌穂長、穀粒数、一粒重を測定した。その結果、遺伝子組換えトウモロコシと対照品種との間ではほぼ全ての項目に有意な変化はなく、一部有意な変化が認められた項目 (絹糸抽出期、雌穂面積、雌穂長、一粒重) もほ場間で一貫した差異は認められなかった (表 2 の (a) 及び (b), p31)。

また、遺伝子組換えトウモロコシは、対照品種と同等の苗立ち数 (Paciorek et al., 2022 の Figure S7) によって示されるように、正常な発芽を示した。

以上のことから、GA20ox_SUP 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシでは、表皮細胞と柔細胞の縦幅の減少が個々の節間長を狭め、その結果、稈長が短くなったと考えられる。また、葉幅及び葉長の変化が生じたが、これは葉においても活性型ジベレリン含有量の低下が認められているため予

想されたものである。なお、葉幅及び葉長の変化は総葉面積に影響を与えなかった。一方で、意図しない生殖組織における形態変化は認められなかった。

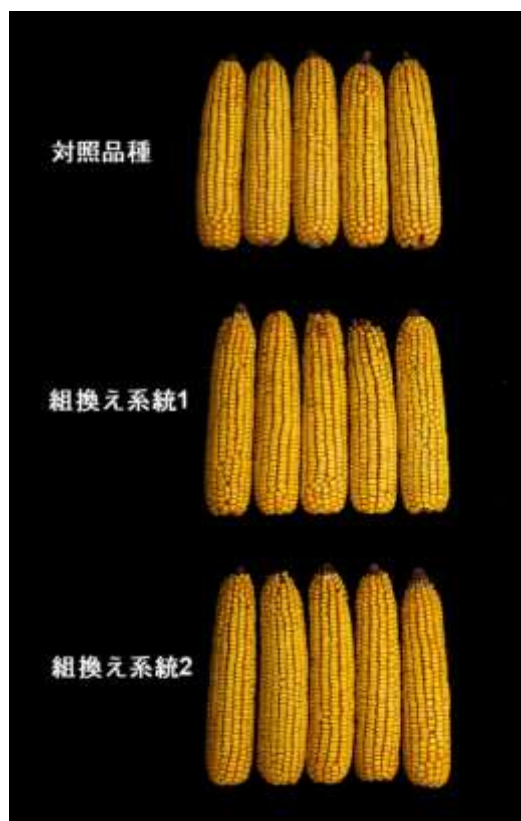


図 10 ほ場で育てた対照品種と 2 つの遺伝子組換えトウモロコシから採取された R6 生育段階における雌穂の形態¹⁵

出典: Paciorek et al. (2022) の Figure S6

¹⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

(a)						(b)					
特性	場所	系統	組換え系統 の平均値	対照品種の 平均値	p-値	特性	場所	系統	組換え系統 の平均値	対照品種の 平均値	p-値
雄穂抽出 期 (日数)	ILJE	E1	68.3	68.5	0.651	雌穂面積 (cm ²)	ILJE	E1	83.9	81.0	0.045*
		E2	68.0	68.5	0.212			E2	83.1	81.0	0.122
	ILMN	E1	66.7	66.5	0.679		ILMN	E1	87.5	86.8	0.720
		E2	65.8	66.5	0.512			E2	83.7	86.8	0.195
絹糸抽出 期 (日数)	ILJE	E1	68.0	68.0	0.955	雌穂径 (cm)	ILJE	E1	5.3	5.3	0.874
		E2	67.8	68.0	0.657			E2	5.2	5.3	0.906
	ILMN	E1	66.0	66.9	0.292		ILMN	E1	5.2	5.1	0.478
		E2	64.5	66.9	0.048*			E2	5.1	5.1	0.579
	ILJE	E1	18.9	18.3	0.008*	雌穂長 (cm)	ILJE	E1	18.9	18.3	0.008*
		E2	18.7	18.3	0.080			E2	18.7	18.3	0.080
	ILMN	E1	19.8	19.6	0.605		ILMN	E1	19.8	19.6	0.605
		E2	19.1	19.6	0.214			E2	19.1	19.6	0.214
	ILJE	E1	587.4	602.2	0.572	穀粒数	ILJE	E1	587.4	602.2	0.572
		E2	624.2	602.2	0.435			E2	624.2	602.2	0.435
	ILMN	E1	696.6	662.8	0.177		ILMN	E1	696.6	662.8	0.177
		E2	652.0	662.8	0.698			E2	652.0	662.8	0.698
	ILJE	E1	387.3	364.7	0.078	一粒重 (mg)	ILJE	E1	387.3	364.7	0.078
		E2	355.8	364.7	0.513			E2	355.8	364.7	0.513
	ILMN	E1	329.2	345.2	0.013*		ILMN	E1	329.2	345.2	0.013*
		E2	336.1	345.2	0.198			E2	336.1	345.2	0.198

表 2 2 カ所のほ場で育てた *GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシの生殖成長特性と第一雌穂の収量構成要素¹⁶

- 5 (a) 50%の個体で雄穂抽出が観察された日までの日数及び 50%の個体で絹糸抽出が観察された日までの日数、(b)遺伝子組換えトウモロコシ及び対照品種における収量構成要素の特性。

雌穂面積：一方向から撮影した画像の表面積で、穀粒がついた領域と穀粒がつかなかった領域の両方を含む、雌穂に属するすべてのピクセルの面積。雌穂径：識別された

- 10 最も長い雌穂の垂直軸のセンチメートル単位の距離。雌穂長：識別された最も長い雌穂の水平軸のセンチメートル単位の距離

アスタリスクは、 $p < 0.05$ での対照品種と遺伝子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ことを示す。ILJE：米国イリノイ州ジャージービル、ILMN：米国イリノイ州モンマス、E1：組換え系統 1、E2 -組換え系統 2。

- 15 出典: Paciorek et al. (2022) の Table 1, p6

4. 本組換えトウモロコシを矮化させる *GA20ox_SUP* 抑制カセットの作用機序のまとめ

- 20 *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA の産生から短稈にいたる作用機序を以下にまとめた。

¹⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- I. *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する (3-(1), p25)。
- II. 標的遺伝子の発現抑制により、栄養組織、主に茎における活性型ジベレリン含有量が低下する (3-(2), p25~27)。
- III. 活性型ジベレリン含有量の低下により、茎の節間における表皮細胞と柔細胞の縦幅が減少することで、節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる (3-(3), p27~28)。

また、茎の節間に加えて、葉においても活性型ジベレリン (GA_1) 含有量の低下が認められており、葉幅がわずかに増加し、葉長が短くなっていた (3-(3)-①, p29)。ジベレリンは細胞分裂及び細胞伸長も促進することが知られているため、活性型ジベレリン (GA_1) 含有量の低下が認められた葉において、葉幅及び葉長の変化は予想されたものである。しかし、葉幅及び葉長の変化は総葉面積に影響を与えなかった。

なお、上述したように、*GA20ox_SUP* 抑制カセットを有する遺伝子組換えトウモロコシの生殖組織においては、活性型ジベレリン含有量の変化は認められず (3-(2), p25)、遺伝子組換えトウモロコシにおける生殖成長特性と収量構成要素のいずれにおいても一貫した差異は認められていない (3-(3)-②, p29~31)。

以上のことから、*GA20ox_SUP* 抑制カセットは、*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA の産生により栄養組織、主に茎における活性型ジベレリン含有量が低下することで意図した半矮性特性を付与すると考えられた。また、葉幅及び葉長の変化が認められたが、これも *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA の産生により葉における活性型ジベレリン含有量が低下したことによるものと考察された。一方で、*GA20ox_SUP* 抑制カセットは生殖組織では形態変化を起こさないことも確認された。

なお、上述したように *GA20ox_SUP* 抑制カセットは、*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA を産生する。miRNA を含む RNA がアレルギー性や毒性をもつという報告はなく、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品局 (FDA) により GRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている (FAO-WHO, 1991; U.S. FDA, 1992)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

ジベレリンは、成長に重要な植物ホルモンであり、茎伸長、種子発芽、葉の生育、花成など、様々な植物の発生過程の調節に関与している (Achard and Genschik, 2009; Nelissen et al., 2012)。GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、ジベレリン生合成経路の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を特異的に抑制する。そのため、影響を受ける代謝系はトウモロコシ内在性 *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子が関与する既存のジベレリン生合成経路であると考えられる。実際に、これらの標的遺伝子の抑制により活性型ジベレリン含有量が低下した栄養組織では、節間や稈長が短くなり、葉幅と葉長に変化が認められたが、活性型ジベレリン含有量の変化が認められない生殖組織においては、生殖成長特性と収量構成要素に一貫した差異は認められていない。

なお、GA20 酸化酵素 (GA20ox) は活性型ジベレリンの含有量を決定する重要な酵素であるため (Oikawa et al., 2004)、イネやトウモロコシの GA 変異体で示されているように GA20ox 遺伝子ファミリーが影響を受けた場合、ジベレリン前駆体の含有量が変わることが考えられる (Spielmeyer et al., 2002; Zhang et al., 2020)。しかし、ジベレリン前駆体は生物学的活性をもたず、生物学的に機能するためには、活性型ジベレリンに変換される必要がある (Hedden and Phillips, 2000; Olszewski et al., 2002; Sponsel, 2003)。そのため、ジベレリン前駆体の含有量の変化による代謝系への影響は活性型ジベレリン含有量の変化による影響に包含されると考えられる。

また、GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を特異的に抑制するように設計されており、標的遺伝子に最も近い相同遺伝子である *ZmGA20ox1* 遺伝子の発現量に影響がないことが確認されている。そのため、標的遺伝子以外の宿主の遺伝子の発現を抑制することはないと考えられる。

実際に、トウモロコシの転写産物データベースを用いて、トウモロコシ中の転写産物の配列と GA20ox_SUP の成熟 miRNA との間で相同性検索¹⁷を行った。その結果、ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の転写産物¹⁸以外のトウモロコシ由来の転写産物には、GA20ox_SUP の成熟 miRNA により抑制され得る他の配列は存在しないことが確認された (別添資料 1)。

以上のことから、GA20ox_SUP の成熟 miRNA の発現によって既存のジベレリン生合成経路における代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるもので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

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP527892 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p13~15) に記載した。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP527892 の全塩基数は 10,078 bp である。なお、PV-ZMAP527892 の塩基配列は別添資料 2 に記載した。

¹⁷基準：①ギャップのない4つ以下のミスマッチ、又は最大1つのギャップのある3つのミスマッチ。②G：Uペアリングは「半分」のミスマッチと見なされるが、ミスマッチは最大5つまで。③GA20ox_SUPの成熟miRNA自体の配列及びそこに相同する領域配列にあるギャップは1つのみ。④ギャップは1塩基長以下。⑤GA20ox_SUPの成熟miRNA配列の10と11番目におけるミスマッチ又はギャップは認められない。⑥GA20ox_SUPの成熟miRNAの5'末端の最初の12塩基には2つ以下のミスマッチ (又は1つのミスマッチと1つのギャップ)のみ。⑦ViennaRNA-2.4.18 (Lorenz et al., 2011) を使用して計算すると、GA20ox_SUPの成熟miRNAの配列及びその相同配列で構成された二重鎖の最小自由エネルギーを、GA20ox_SUPの成熟miRNAの配列及びその完全相同配列で構成された二重鎖の最小自由エネルギーで割った値は、0.75より大きくなければならない。

¹⁸ NCBIデータベースで特定されたジベレリン20酸化酵素3及び4の配列は、それぞれ MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>) のジベレリン20酸化酵素5及び3の配列と同一である。そのため、本文で記載のZmGA20ox3遺伝子がコードするジベレリン20酸化酵素3は、別添資料 1ではジベレリン20酸化酵素4と記載されている。同様に、本文で記載のZmGA20ox5遺伝子がコードするジベレリン20酸化酵素5は、別添資料 1ではジベレリン20酸化酵素3と記載されている。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-ZMAP527892 の構成要素は表 1 (p13~15) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は、図 1 (p12) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMAP527892 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えトウモロコシ品種 HCL301 の未熟胚細胞に導入した。

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

非組換えトウモロコシ品種 HCL301 の未熟胚細胞から採取した分裂組織と PV-ZMAP527892 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB32 株を共置培養した後、除草剤グリホサートを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

スペクチノマイシンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたア

5 グロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えトウモロコシの F₄ 世代の種子¹⁹において、形質転換に用いた PV-ZMAP527892 の外側骨格領域を標的とした PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMAP527892 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 3 の Table 1, p12)。このことから、本組換えトウモロコシには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

10 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

15 形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、R₁ 世代を作出した。R₁ 世代において、1 コピーの T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域をもたない個体を PCR 及び次世代シーケンシング (NGS, Next Generation Sequencing) 解析により選抜した。選抜された R₂ 世代の個体を、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選抜マーカーカセット (P-Ract1、I-Ract1、TS-CTP2、CS-cp4 *epsps*、T-nos) 及び loxP 配列の 1 つが除去された F₁ 世代を作出した。Cre/lox 法では、2 つの lox と呼ばれる標的配列の間に位置する DNA 配列及び片方の lox 配列が、Cre リコンビナーゼによってゲノムから切り出される (Zhang, 2000; Ow, 2007)。以下、PV-ZMAP527892 の T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット及び loxP 配列の 1 つが除去された領域を「導入遺伝子」という。その後、F₁ 個体を自殖して得られた F₂ 世代において、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない 1 個体を選抜した。したがって、本組換えトウモロコシの F₃ 世代以降には、Cre リコンビナーゼ発現カセットは存在しない (第一の 2-(4)-②, p40)。F₂ 世代の選抜個体を自殖して得られた F₃ 世代において、導入遺伝子をホモで有する 1 個体を選抜した。F₃ 世代の選抜個体を自殖し、F₄ 世代を得た。

30 本組換えトウモロコシの育成図を図 11 (p37) に示した。なお、本申請の対象は、F₄ 世代及び F₄ 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

¹⁹ バルクにした収穫種子の中からランダムに約 50 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

20

図 11 本組換えトウモロコシの育成図

【社外秘につき非開示】

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えトウモロコシの導入遺伝子が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの F_4F_2 、 F_4F_3 及び F_4F_4 世代 (図 11, p37) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 4)。

10

分離比検定に供試する世代を作出するために、導入遺伝子をホモで有する F_4 世代を、導入遺伝子をもたないトウモロコシ系統 HCL617 と従来育種法を用いて交配し、導入遺伝子をヘミで有する F_4F_1 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F_4F_1 世代を自殖し、 F_4F_2 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F_4F_2 世代を自殖し、 F_4F_3 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F_4F_3 世代を自殖し、 F_4F_4 世代を得た。 F_4F_2 、 F_4F_3 及び F_4F_4 世代において、Endpoint TaqMan PCR により導入遺伝子の分離比を確認した。

15

その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せずに遺伝していることが確認された (表 3, p39)。したがって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

20

表 3 本組換えトウモロコシの育成過程における導入遺伝子の分離様式²⁰

世代	供試個体数	実測値 ¹ ホモ陽性 個体数	実測値 ¹ ヘミ陽性 個体数	実測値 ¹ 陰性個体数	1:2:1 分離				
					期待値 ホモ陽性 個体数	期待値 ヘミ陽性 個体数	期待値 陰性個体数	χ^2	p値 ²
F ₄ F ₂	336	65	180	91	84.00	168.00	84.00	5.74	0.057
F ₄ F ₃	244	73	110	61	61.00	122.00	61.00	3.54	0.170
F ₄ F ₄	364	98	174	92	91.00	182.00	91.00	0.90	0.637

¹ 実測値は Endpoint TaqMan PCR により、導入遺伝子の有無を確認した。

² 各世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

²⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

- 5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子の塩基配列、並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、NGS 解析²¹ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 5)。
- 10 NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150bp ずつの塩基配列を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度²²75 以上) で解析している。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノムを NGS 解析に供試した結果、本組換えトウモロコシ (F₄ 世代) で 277.0Gb (冗長度平均値 156)、対照の非組換えトウモロコシで 212.1Gb (冗長度平均値
- 15 102) の塩基配列が解析された (別添資料 5 の Appendix Table 3, p43)。
- 解析した塩基配列全てを PV-ZMAP527892 の塩基配列と照合²³した結果、本組換えトウモロコシでは2つの接合領域が特定された (別添資料 5 の p29)。これらはそれぞれ導入遺伝子の 5'及び 3'末端を含む配列であった (別添資料 5 の Appendix Figure 37, p94~95)。対照の非組換えトウモロコシでは、接合領域
- 20 は特定されなかった (別添資料 5 の p29)。またこの解析からは、本組換えトウモロコシには、PV-ZMAP527892 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことも確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 5, p49)。
- さらに、解析した塩基配列全てを Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統の形質転換に用いたベクターPV-ZMOO513642 (別添
- 25 資料 5 の Appendix Figure 2, p46) の塩基配列と照合した。その結果、本組換えトウモロコシには PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないことが確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 6, p50)。
- 以上の解析から、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの

²¹NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロット法と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS解析においては、フラグメント化した大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及び配列並びに非意図的な断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

²²冗長度: ある特定の塩基に対して独立してシーケンスされた回数。冗長度が 75 以上であればすべての導入遺伝子を検出することが可能であることが報告されており、本試験では 1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、推定平均冗長度が 75 以上になる条件で解析を行っている。

²³Bowtie2 v2.3.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012)を使用して、解析した塩基配列をアライメントした。Bowtie2でフラグメントの片側の配列に対するアライメントを行う場合、30bp以上の相同性を検出基準としている。

導入遺伝子が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことが確認された。

5 また、本組換えトウモロコシにおいて検出された導入遺伝子、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の遺伝子が導入されていることが確認された (別添資料 5 の Appendix Figure 8, p52~53 及び Appendix Figure 9, p54~64)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図 12 (p42) に示した。

10 さらに複数世代 (F₄、F₄F₁、F₅、F₅F₁ 及び F₆ 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS 解析において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 5 の p34)。

15

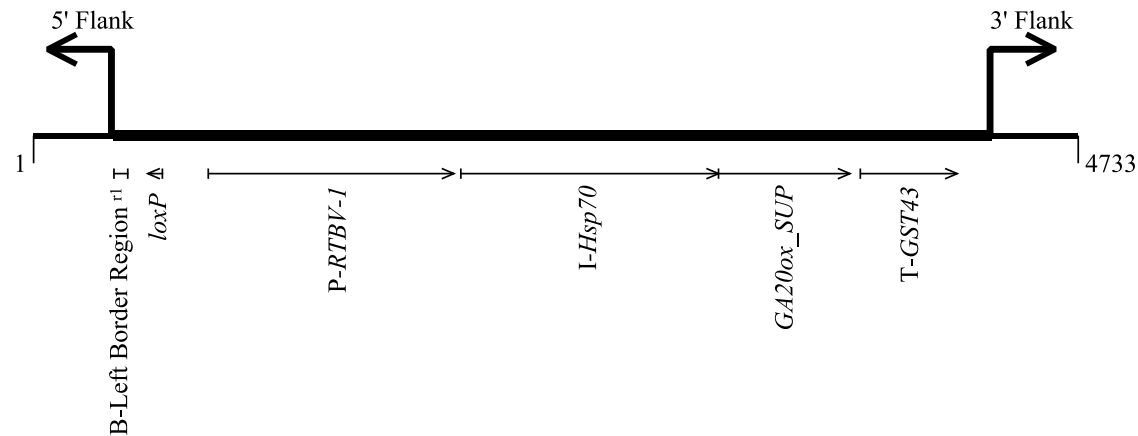


図 12 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図²⁴

- 5 本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えトウモロコシ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。図上部の直角に曲がった矢印は、導入遺伝子と近傍配列の境界を示している。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の導入遺伝子は PV-ZMAP527892 と一致した配列で導入されている。図中の「rl」の表記は、本組換えトウモロコシに導入された B-Left Border Region が PV-ZMAP527892 と比較して短くなっていることを意味する。

10

²⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 5 の p29)。

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

10 本組換えトウモロコシの複数世代 (F₄、F₄F₁、F₅、F₅F₁ 及び F₆ 世代) の葉において GA20ox_SUP RNA 及び成熟 miRNA が安定して発現していることが、ノーザンブロット分析により確認された (別添資料 6 の Figure 3 及び Figure 4, p20~21)。

15 また、2021 年に米国で行った温室試験において本組換えトウモロコシの葉のサンプルを採取し、GA20ox_SUP RNA 及び成熟 miRNA の発現を半定量的ノーザンブロット分析により分析した (別添資料 7)。その結果、本組換えトウモロコシの葉において GA20ox_SUP RNA (約 0.9 kb) (図 13A のレーン 4, p44) 及び GA20ox_SUP の成熟 miRNA (約 21 塩基) (図 14A のレーン 2, p45) 両方の発現が
20 確認された。

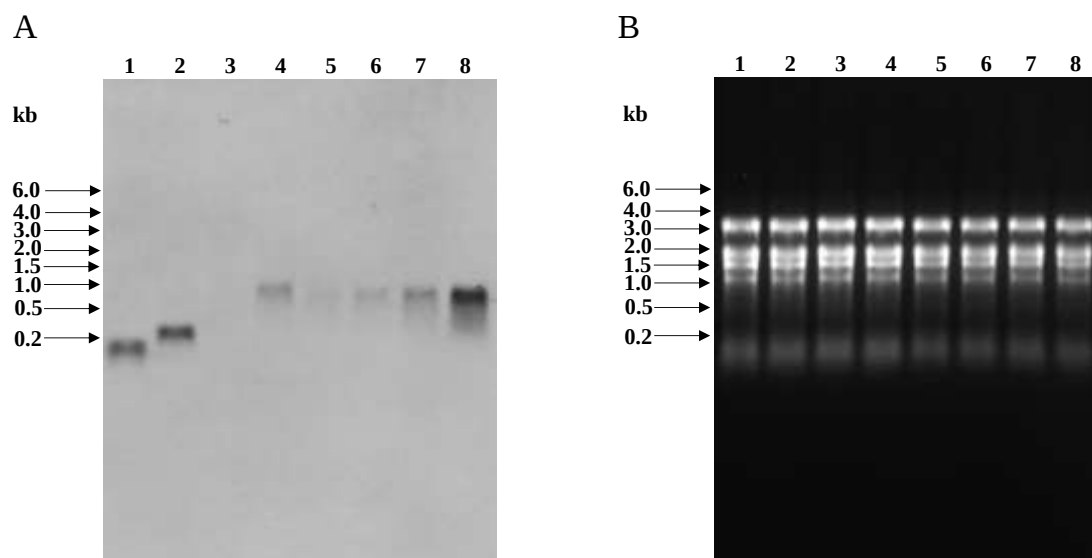


図 13 本組換えトウモロコシの葉における GA20ox_SUP RNA の発現の確認 (ノーザンブロット分析) (2021 年、米国)²⁵

本組換えトウモロコシ及び対照の従来トウモロコシ (対照品種) から抽出した約 10µg の

5 総 RNA を 7%ホルムアルデヒドを含む 1.0%アガロースゲルを用いて分離した。

A : GA20ox_SUP プローブとハイブリダイズしたノーザンブロット分析の結果を示す。

B : ナイロンメンブレンに転写する前のエチジウムブロマイドで染色したホルムアルデヒドを含むアガロースゲルの蛍光画像。

10 レーン

1 対照品種+ GA20ox_SUP プローブテンプレート 1* (2pg)

2 対照品種+ GA20ox_SUP プローブテンプレート 2* (2pg)

3 対照品種

4 本組換えトウモロコシ

15 5 対照品種+ *in vitro* 転写により合成された GA20ox_SUP RNA (5pg)

6 対照品種+ *in vitro* 転写により合成された GA20ox_SUP RNA (10pg)

7 対照品種+ *in vitro* 転写により合成された GA20ox_SUP RNA (25pg)

8 対照品種+ *in vitro* 転写により合成された GA20ox_SUP RNA (50pg)

20 *本試験では GA20ox_SUP RNA の全配列を対象にするため、2 種類のプローブを使用した (プローブ 1 及び 2)。プローブ 1 は GA20ox_SUP RNA の 5'末端の配列に、プローブ 2 は 3'末端の配列に結合するように設計されている。プローブテンプレートとはプローブの基となる DNA 配列であり、プローブ 1 はプローブテンプレート 1 に、プローブ 2 はプローブテンプレート 2 に結合するため、各プローブテンプレートはノーザンブロット分析においてはポジティブコントロールとなる。

²⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

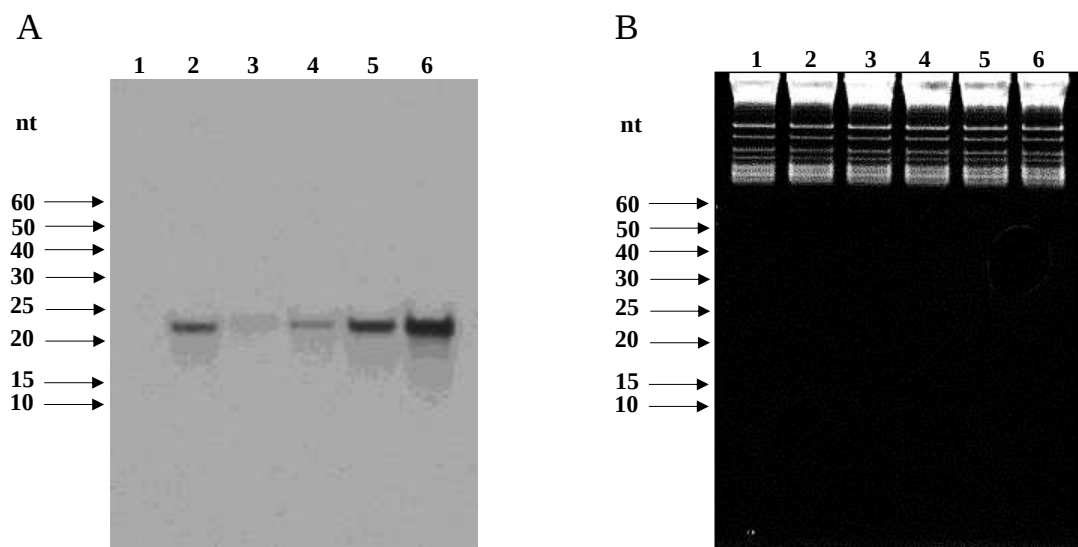


図 14 本組換えトウモロコシの葉における GA20ox_SUP の成熟 miRNA の産生の確認 (ノーザンブロット分析) (2021 年、米国)²⁶

本組換えトウモロコシ及び対照の従来トウモロコシ (対照品種) から抽出した約 10µg の総 RNA を 15% TBE-Urea プレキャストゲルを用いて分離した。

A : DIG 標識 RNA オリゴプローブとハイブリダイズしたノーザンブロット分析の結果を示す。

B : ナイロンメンブレンに転写する前のエチジウムブロマイドで染色した TBE-Urea プレキャストゲルの蛍光画像。

レーン

1 対照品種

2 本組換えトウモロコシ

3 対照品種 + DIG 標識 RNA オリゴプローブ (5pg)

4 対照品種 + DIG 標識 RNA オリゴプローブ (10pg)

5 対照品種 + DIG 標識 RNA オリゴプローブ (25pg)

6 対照品種 + DIG 標識 RNA オリゴプローブ (50pg)

²⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

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

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、Endpoint TaqMan PCR法による検出及び識別が可能である (別添資料 8)。検定に用いる葉の DNA 量は、PCR の 1 反応当たり 5~20 ng であることが推奨されている。

15 本法の再現精度は、40 サンプルの本組換えトウモロコシ及びネガティブコントロールとして供試したトウモロコシ 120 サンプルを用いて確認されている (別添資料 8 の p9)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

25 本組換えトウモロコシへ導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する。これにより、主に茎の活性型ジベレリン含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して、節間が狭まり、その結果、本組換えトウモロコシの稈長が短くなる。また、葉における活性型ジベレリン含有量の低下により、葉幅がわずかに増加し、葉長が短くなる。しかし、
30 葉幅及び葉長の変化は総葉面積に影響を与えない。

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

35

本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 HCL301 であり、

GA20ox_SUP 抑制カセットが導入されている。

宿主であるトウモロコシについて、わが国に交雑可能な近縁野生種は存在しない。

5 第一の 2-(1)-ロ-③ (p33~34) に記載のとおり、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じてジベレリン生合成経路の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の発現を特異的に抑制する。そのため、影響を受ける代謝系はトウモロコシ内在性 ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子が関与する
10 既存のジベレリン生合成経路であると考えられる。実際に、これらの標的遺伝子の抑制により活性型ジベレリン含有量が低下した栄養組織では、節間や稈長が短くなり、葉幅と葉長に変化が認められたが、活性型ジベレリン含有量の変化が認められない生殖組織においては、生殖成長特性と収量構成要素のいずれにおいても一貫した差異は認められていない。

15 また、本組換えトウモロコシで発現する GA20ox_SUP の成熟 miRNA については、ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の転写産物以外にはトウモロコシ内在性の転写産物配列との間に相同性が認められなかったことから、宿主であるトウモロコシの遺伝子の発現を抑制して標的以外の代謝系を変化させることはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p33~34)。

20 以上のことから、GA20ox_SUP の成熟 miRNA の発現によって既存のジベレリン生合成経路における代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるものではないと考えられる。

よって、導入した GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA による影響が、予想された茎と葉以外の組織における宿主の生理学的特性に及ぶとは考えられない。
25

以上のことから、本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると考えられる。

30

なお、本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

①形態及び生育の特性、②成体の越冬性、③花粉の稔性及びサイズ、④種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、⑤有害物質の産生性
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

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

10

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場

使用期間：承認日から 2028 年 5 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

15

(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示した標識を見やすい所に掲げている。

20

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

25

2. 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

30

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

(3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤込む等により、確実に不活化する。

35

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

- (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 5 (7) (1)から(6)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
- 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
- 申請書に添付した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

30 これまで本組換えトウモロコシについて 2018~2022 年の間に米国、アルゼンチン及びブラジルにおいて延べ 190 ヲ所のほ場試験が行われているが(表 4, p50)、対照の非組換えトウモロコシと比較して生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

なお、本組換えトウモロコシの海外における申請予定は表 5 (p50) のとおりである。

表 4 国外において本組換えトウモロコシのは場試験を行ったは場の数及び国²⁷

年	は場の数	国
2018	2	米国
2019	55	米国
2020	76	米国
2020/2021	6	米国、アルゼンチン
2021	45	米国、ブラジル
2021/2022	6	ブラジル

5

表 5 本組換えトウモロコシの海外における申請予定²⁸

2022 年 9 月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期
米国農務省 (USDA)	環境	2022年5月
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2022年7月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2022年7月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	【申請予定】
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	【申請予定】

10

15

²⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

第一の 2-(6)-② (p46~47) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは、栽培化の過程で雑草性や自生能力、すなわち非農耕地で人間の手助けなく繁殖し、個体群を存続させる能力を失っている (OECD, 2003; Nakai et al., 2015; 後藤ら, 2018)。わが国においても、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。自生能力をもたない栽培作物を宿主とした遺伝子組換え作物が競合における優位性を獲得するには、まず自生能力を獲得することが必要であり、それには自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている (後藤ら, 2018)。

本組換えトウモロコシには、*GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA により短稈という半矮性の特性が付与されている。また、第一の 2-(1)-ロ-②-(3)-① (p29) に記載したとおり、茎と同様に活性型ジベレリン含有量が低下した葉組織では、葉幅と葉長にも変化が認められている。

この 2 つの形態変化のうち、半矮性の特性により、本組換えトウモロコシでは、強風条件下等におけるほ場内での倒伏被害が軽減される。しかし、半矮性の特性は前述した自生能力に必須の特性 (種子の脱粒性、休眠性) に関与する特性ではない。このことから、この半矮性の特性をもつことのみが要因で、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生することを可能にするとは考えにくい。

また、ジベレリンは種子の発芽を促進することから、種子における活性型ジベレリン含有量の低下により種子の休眠性が高まる可能性がある。しかし、遺伝子組換えトウモロコシの穀粒では、活性型ジベレリン (GA_1 及び GA_4) の

含有量に有意な低下は認められず、ほ場試験において遺伝子組換えトウモロコシは対照品種と同等の苗立ち数を示し、正常な発芽が認められている (第一の 2-(1)-ロ-②, P29)。そのため、本組換えトウモロコシの種子の休眠性は高まっていないと考えられる。

5

以上のことから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

10

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20

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

2 有害物質の産生性

25

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

30

第一の 2-(1)-ロ-③ (p33~34) に記載のとおり、*GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じてジベレリン生合成経路の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の特異的に抑制する。そのため、影響を受ける代謝系はトウモロコシ内在性 *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子が関与する既存のジベレリン生合成経路であると考えられる。実際に、これらの標的遺伝子の抑制により活性型ジベレリン含有量が低下した栄養組織では、節間や

35

稈長が短くなり、葉幅と葉長に変化が認められたが、活性型ジベレリン含有量の変化が認められない生殖組織においては、生殖成長特性と収量構成要素のいずれにおいても一貫した差異は認められていない。

5 また、本組換えトウモロコシで発現する GA20ox_SUP の成熟 miRNA については、ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5 遺伝子の転写産物以外にはトウモロコシ内在性転写産物の配列との間に相同性が認められなかったことから、宿主であるトウモロコシの遺伝子の発現を抑制して標的以外の代謝系を変化させることはないと考えられる (第一の 2-(1)-ロ-③, p33~34)。

10 以上のことから、GA20ox_SUP の成熟 miRNA の発現によって既存のジベレリン生合成経路における代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるものではないと考えられる。

よって、導入した GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

15 以上のことから、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

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等の判断

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

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

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

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

10

(2) 影響の具体的内容の評価

—

15 (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

20

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

25 4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

第一の 2-(6)-② (p46~47) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入した遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験
5 で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いず
に評価した。

競合における優位性：

10 トウモロコシは、栽培化の過程で自生能力を失っており、わが国においても
これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。栽培作
物であるトウモロコシが自生能力を獲得するには、自生能力に必須の特性であ
る種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている。

本組換えトウモロコシには、GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される
15 GA20ox_SUP の成熟 miRNA により短稈という半矮性の特性が付与されている。
また、茎と同様に活性型ジベレリン含有量が低下した葉では、葉幅と葉長にも
変化が認められている。しかし、半矮性の特性は前述した自生能力に必須の特
性に関与する形質ではない。このことから、この半矮性の特性をもつことのみ
が要因で、これまで栽培作物として品種改良されてきたトウモロコシが、わが
20 国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生することを可能にするとは考
えにくい。

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

25 有害物質の産生性：

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

GA20ox_SUP 抑制カセットから産生される GA20ox_SUP の成熟 miRNA は、
30 RNAi 機構を通じて、トウモロコシ内在性の ZmGA20ox3 遺伝子及び ZmGA20ox5
遺伝子の発現を特異的に抑制するものであることから、新規の代謝産物を生じ
るものではないと考えられる。

また、本組換えトウモロコシで発現する GA20ox_SUP の成熟 miRNA につい
ては、トウモロコシ内在性の転写産物の配列との間に相同性が認められなかつ
35 たことから、宿主であるトウモロコシの遺伝子の発現を抑制して代謝系を変化
させることはないと考えられる。

よって、導入した *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される *GA20ox_SUP* の成熟 *miRNA* が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

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

交雑性：

- わが国において、トウモロコシと自然交雑可能な近縁野生種の自生について
10 報告はないため、影響を受ける可能性のある野生動植物種は特定されない。したがって、本組換えトウモロコシは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

- 以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要
15 領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- Achard, P. and P. Genschik. 2009. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* 60: 1085-1092.
- 5 Allen, E., Z. Xie, A.M. Gustafson and J.C. Carrington. 2005. microRNA-Directed Phasing during *Trans*-Acting siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* 121: 207-221.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 10 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 15 Bensen, R.J., G.S. Johal, V.C. Crane, J.T. Tossberg, P.S. Schnable, R.B. Meeley and S.P. Briggs. 1995. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *The Plant Cell* 7: 75-84.
- 20 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Binenbaum, J., R. Weinstein and E. Shani. 2018. Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends in Plant Science* 23: 410-421.
- 25 Borges, F. and R.A. Martienssen. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Molecular Cell Biology* 16: 727-741.
- 30 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- 35 Cassani, E., E. Bertolini, F. Cerino Badone, M. Landoni, D. Gavina, A. Sirizzotti and R.

- Pilu. 2009. Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the *dwarf8* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement* 24: 375-385.
- 5 CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].
- 10 Chen, Y., M. Hou, L.J. Liu, S. Wu, Y. Shen, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D.R. McCarty and B. Tan. 2014. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiology* 166: 2028-2039.
- Chen, Z., Y. Liu, Y. Yin, Q. Liu, N. Li, X. Liu, X. Li, C. Guo and D. Hao. 2019.
- 15 Development of dwarfish and yield-effective GM maize through passivation of bioactive gibberellin. *Transgenic Research: Associated with the International Society for Transgenic Technologies (ISTT)* 28: 589-599.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 20
- FAO-WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology, report of joint FAO/WHO consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 25
- FAO. 2020. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed March 31, 2022].
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- 30
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 35

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

5

Fujioka, S., H. Yamane, C.R. Spray, M. Katsumi, B.O. Phinney, P. Gaskin, J. Macmillan and N. Takahashi. 1988. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (*D8*) of maize accumulates native gibberellins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 9031-9035.

10

Hedden, P. and A.L. Phillips. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.

15

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

20

Huang, J., D. Tang, Y. Shen, B. Qin, L. Hong, A. You, M. Li, X. Wang, H. Yu, M. Gu and Z. Cheng. 2010. Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics* 37: 23-36.

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

25

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

30

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

35

Lacombe, S., H. Nagasaki, C. Santi, D. Duval, B. Piégu, M. Bangratz, J.-C. Breitler, E.

- Guiderdoni, C. Brugidou, J. Hirsch, X. Cao, C. Brice, O. Panaud, W.M. Karlowski, Y. Sato and M. Echeverria. 2008. Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity on the genomic organisation and expression of miRNA genes in rice. BMC plant biology 8: 123.
- 5
- Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9: 357-359.
- Liu, C., S. Zheng, J. Gui, C. Fu, H. Yu, D. Song, J. Shen, P. Qin, X. Liu, B. Han, Y. Yang and L. Li. 2018. *Shortened basal internodes* encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. Molecular Plant 11: 288-299.
- 10
- Lorenz, R., H. Bernhart Stephan, C. Höner zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, F. Stadler Peter and L. Hofacker Ivo. 2011. ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology 6: 26-26.
- 15
- Luna, S.V., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Science 41: 1551-1557.
- 20
- McElroy, D., W. Zhang, J. Cao and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. The Plant Cell 2: 163-171.
- Nakai, S., K. Hoshikawa, A. Shimono and R. Ohsawa. 2015. Transportability of confined field trial data from cultivation to import countries for environmental risk assessment of genetically modified crops. Transgenic Research 24: 929-944.
- 25
- NCGA. 2022. WORLD OF CORN 2022. <https://ncga.com/world-of-corn-iframe/pdf/WOC-2022.pdf> [Accessed March 31, 2022].
- 30
- Nelissen, H., B. Rymen, Y. Jikumaru, K. Demuynck, M.v. Lijsebettens, Y. Kamiya, D. Inzé and G.T.S. Beemster. 2012. A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. Current Biology 22: 1183-1187.
- 35
- OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in

Biotechnology No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Oikawa, T., M. Koshioka, K. Kojima, H. Yoshida and M. Kawata. 2004. A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Molecular Biology* 55: 687-700.

Olszewski, N., T.P. Sun and F. Gubler. 2002. Gibberellin signalling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: s61-s80.

Ow, D.W. 2007. GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Curr Opin Biotechnol* 18: 115-120.

Paciorek, T., B.J. Chiapelli, J.Y. Wang, M. Paciorek, H. Yang, A. Sant, D.L. Val, J. Boddu, K. Liu, C. Gu, L.F. Brzostowski, H. Wang, E.M. Allen, C.R. Dietrich, K.M. Gillespie, J. Edwards, A. Goldshmidt, A. Neelam and T.L. Slewinski. 2022. Targeted suppression of gibberellin biosynthetic genes *ZmGA20ox3* and *ZmGA20ox5* produces a short stature maize ideotype. *Plant biotechnology journal*.

Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Phinney, B.O. 1985. Gibberellin A₁ dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biologia plantarum* 27: 172-179.

Pleasants, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, H.R. Mattila, J.E. Foster, P. Clark and G.D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11919-11924.

Portwood, J.L., 2nd, M.R. Woodhouse, E.K. Cannon, J.M. Gardiner, L.C. Harper, M.L. Schaeffer, J.R. Walsh, T.Z. Sen, K.T. Cho, D.A. Schott, B.L. Braun, M. Dietze, B. Dunfee, C.G. Elsik, N. Manchanda, E. Coe, M. Sachs, P. Stinard, J. Tolbert, S. Zimmerman and

- C.M. Andorf. 2019. MaizeGDB 2018: The maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic acids research* 47: D1146-D1154.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall and A. Khvorova. 2004.
5 Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22: 326-330.
- Rochester, D.E., J.A. Winer and D.M. Shah. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO Journal* 5: 451-458.
- 10 Rood, S.B. 1985. Application of gibberellic acid to control tillering in early-maturing maize. *Canadian journal of plant science* 65: 901-911.
- Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
15
- Sasaki, A., M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano and M. Matsuoka. 2002. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701-702.
- 20 Schwab, R., J.F. Palatnik, M. Riester, C. Schommer, M. Schmid and D. Weigel. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental cell* 8: 517-527.
- Sears, M.K., D.E. Stanley-Horn and H.R. Matilla. 2000. Preliminary report on the
25 ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- Sekhon, R.S., H. Lin, K.L. Childs, C.N. Hansey, C. Robin Buell, N. De Leon and S.M. Kaeppler. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant journal* 66: 553-563.
30
- Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- 35 Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.

- Song, J., B. Guo, F. Song, H. Peng, Y. Yao, Y. Zhang, Q. Sun and Z. Ni. 2011. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. *Gene* 482: 34-42.
- 5 Spielmeier, W., M.H. Ellis and P.M. Chandler. 2002. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective *gibberellin 20-oxidase* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9043-9048.
- 10 Sponsel, V.M. 2003. Gibberellins. *Encyclopedia of Hormones*. H.L. Henry and A.W. SNorman (eds.). Academic Press, New York.
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General*
15 *Genetics* 181: 8-12.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- 20 Tirado, S.B., C.N. Hirsch and N.M. Springer. 2021. Utilizing temporal measurements from UAVs to assess root lodging in maize and its impact on productivity. *Field Crops Research* 262.
- 25 To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant biotechnology traits. *Frontiers in Plant Science* 12.
- 30 U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register*: 22984-23005.
- 35 Wang, Y., D. Deng, H. Ding, X. Xu, R. Zhang, S. Wang, Y. Bian, Z. Yin and Y. Chen. 2013. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant Dwarf11 (*D11*) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence. *PloS one* 8: e66466.

- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson and N.J. Provart. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS ONE 2: e718-e718.
- 5 Wych, R.D. 1988. Production of hybrid seed corn. Pages 565-607 in Corn and Corn Improvement. Third Edition. G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 10 Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology 59: 225-251.
- Yin, Y.H. and R.N. Beachy. 1995. The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Journal 7: 969-980.
- 15 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 361-370.
- 20 Zhang, J., X. Zhang, R. Chen, L. Yang, K. Fan, Y. Liu, G. Wang, Z. Ren and Y. Liu. 2020. Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of *Gibberellin-Oxidase20-3* using CRISPR/Cas9. Frontiers in Plant Science 11: 1-9.
- 25 Zhang, W.A., P.; Armstrong, C.; Peschke, V.; Shen, A.; Subbarao, S.; Gilbertson, L. 2000. MSL-16939.
- 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 東京
- 30 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 菊池文雄 2005 半矮性 植物育種学辞典 培風館 東京
- 35 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: 105-114

財務省 2021 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
5 [Accessed February 24, 2022]

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

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

独立行政法人 農業生物資源研究所 2004 半矮性イネ (*OsGA2ox1*, *Oryza sativa* L.) (G-3-3-22) 申請書等の概要
15 https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=327&ref_no=1

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

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

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 神奈川

25 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 April 23, 2015]

30 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> [Accessed March 22, 2017]

35 農林水産省 2018 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) [Accessed November 21, 2018]

農 林 水 産 省 2021 承 認 し た 遺 伝 子 組 換 え 農 作 物 数
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/index.html#1>

- 5 農林水産省 2022 令和 3 年産飼料作物の作付 (栽培) 面積及び収穫量、えん麦 (緑肥 用) の 作 付 面 積
https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/attach/pdf/index-51.pdf [Accessed March 31, 2022]
- 10 山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

緊急措置計画書

2022 年 9 月 1 日

5 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 坂田 耕平
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

10 第一種使用規程の承認を申請している半矮性トウモロコシ (GA20ox_SUP, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Itis) (MON94804, OECD UI: MON-94804-4) (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、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

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は以下に示すとおりである。

2022年 9 月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリ ーサイエンス本部長 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリ ーサイエンス本部 種子規制部 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 企業広報 部長 クロップサイエンス ビジネスパートナー
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリ ーサイエンス本部 種子規制部
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリ ーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場 長

*：責任者

隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

5 I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場

10

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

15 3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

20

図 15 (p75) 参照

II. 責任者等

25 1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】(バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部)

30 2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】(バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場長)

35

III. 試験期間

承認日から 2028 年 5 月 31 日まで

5 IV. 施設概要

部外者の立入を防止するためのフェンス (高さ 1.6 m)、立入禁止であることを明示するための標識、洗い場を設置している (図 16, p76)。

10 V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

15

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

20 3. 試験区の配置図

図 17 (p76) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

25

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 18, p77)。

30 2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路 (隔離ほ場のフェンスから約 2.5 m の距離) として利用されている。

35

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

5 隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域 (国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等) はない。なお、上記の自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約 15 km である。

4. 気象条件

10 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ崎市大徳町) における気象データの平年値を表 6 (p70) に示した (気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス 2022 年 2 月 28 日 :

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view)。

15

表 6 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所 (龍ヶ崎市大徳町) における気象データの平年値

要素	降水量	平均気温	日最高気温	日最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020	1991~2020
資料年数	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
1 月	55.4	3.3	9.4	-2.3	2.4	190.8
2 月	52.9	4.3	10.2	-1.2	2.7	172.3
3 月	103.3	7.8	13.5	2.3	3.0	174.3
4 月	109.0	13.0	18.6	7.5	3.4	178.4
5 月	122.6	17.8	22.9	13.5	3.2	179.9
6 月	135.1	21.0	25.4	17.5	2.8	125.7
7 月	128.1	24.6	29.4	21.2	2.7	155.7
8 月	99.4	25.8	30.9	22.2	2.6	183.5
9 月	182.8	22.5	27.2	18.8	2.7	133.9
10 月	212.8	16.9	21.8	12.6	2.4	134.0
11 月	87.5	10.9	16.7	5.6	2.0	148.4
12 月	53.4	5.5	11.7	0.0	2.1	169.1
年	1352.8	14.5	19.8	9.8	2.7	1927.9

5. 台風の襲来暦

① 平年値

- 5 気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信地方への台風接近数²⁹の平年値 (1992 年~2021 年の 30 年平均) は、3.2 個である (気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2022 年 2 月 9 日 :

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)。

10 ② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

- 15 関東甲信地方に台風が接近し²⁹、かつ隔離ほ場最寄の観測地点 (茨城県龍ヶ崎アメダス観測所) において日ごとの最大風速が 15 m/s を超えた個数³⁰を隔離ほ場周辺への台風の接近個数とした。過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数は、合計 7 個 (2012 年 6 月、2013 年 10 月、2016 年 8 月、2017 年 10 月、2018 年 10 月、2019 年 9 月、2019 年 10 月)³¹であった (気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2022 年 2 月 9 日)。

台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- 20 ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
・ 補助支柱などの資材は常に準備しておき、気象情報により取り付ける。

また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

25

²⁹ 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都 (島しょ部を除く)、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から 300 km 以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている。

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

³⁰ 台風の強風域の定義が平均風速 15 m/s であることによる。

(気圧配置 台風に関する用語 (気象庁):

http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html)

³¹ 過去の気象データ検索 (気象庁: <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>) から、地点として龍ヶ崎を選択し、さらに関東甲信地方に台風が接近した年月を選択。該当年月における日ごとの最大風速が 15 m/s を超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が 15 m/s を超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にはほ場が冠水したことはない。

5 7. 過去 10 年における強風の経験とその程度・頻度

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け (策定されている場合)

10

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、想定最大規模降雨によって河道 (利根川・小貝川・霞ヶ浦) が氾濫した場合、水深 0.5~3.0 m となると想定されている (茨城県河内町ホームページ洪水ハザードマップ、アクセス 2022 年 2 月 9 日 : <http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/page/page000262.html>)。

15

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

鳥獣害の被害報告はない。

20 VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

25

なし。

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

わが国には交雑可能な近縁野生種は存在しない。

30

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

35

隔離ほ場における栽培履歴は図 19 (p78) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

5

3. 栽培終了後の利用計画 (ボランティア植物の監視を含む)

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、本組換えトウモロコシの栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

10

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

隔離ほ場は下記 (1)~(4) の設備を備えている。

15

(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であることを明示した標識を見やすい所に掲げている。

20

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

25

5. 作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対象のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

30

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

(3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対象のトウモロコシを隔離ほ場内に鋤込む等により、確実に不活化する。

35

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

- (5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
- (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 5 (7) (1) から (6)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

10

以上



図 15 バイエルクロップサイエンス株式会社 隔離ほ場の位置

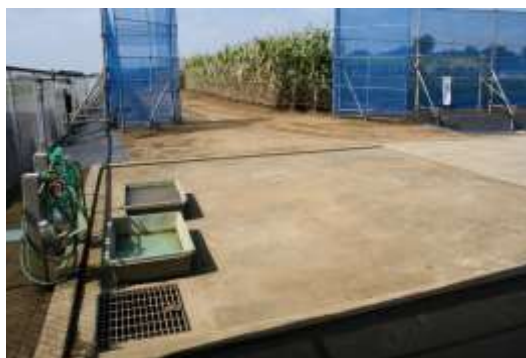
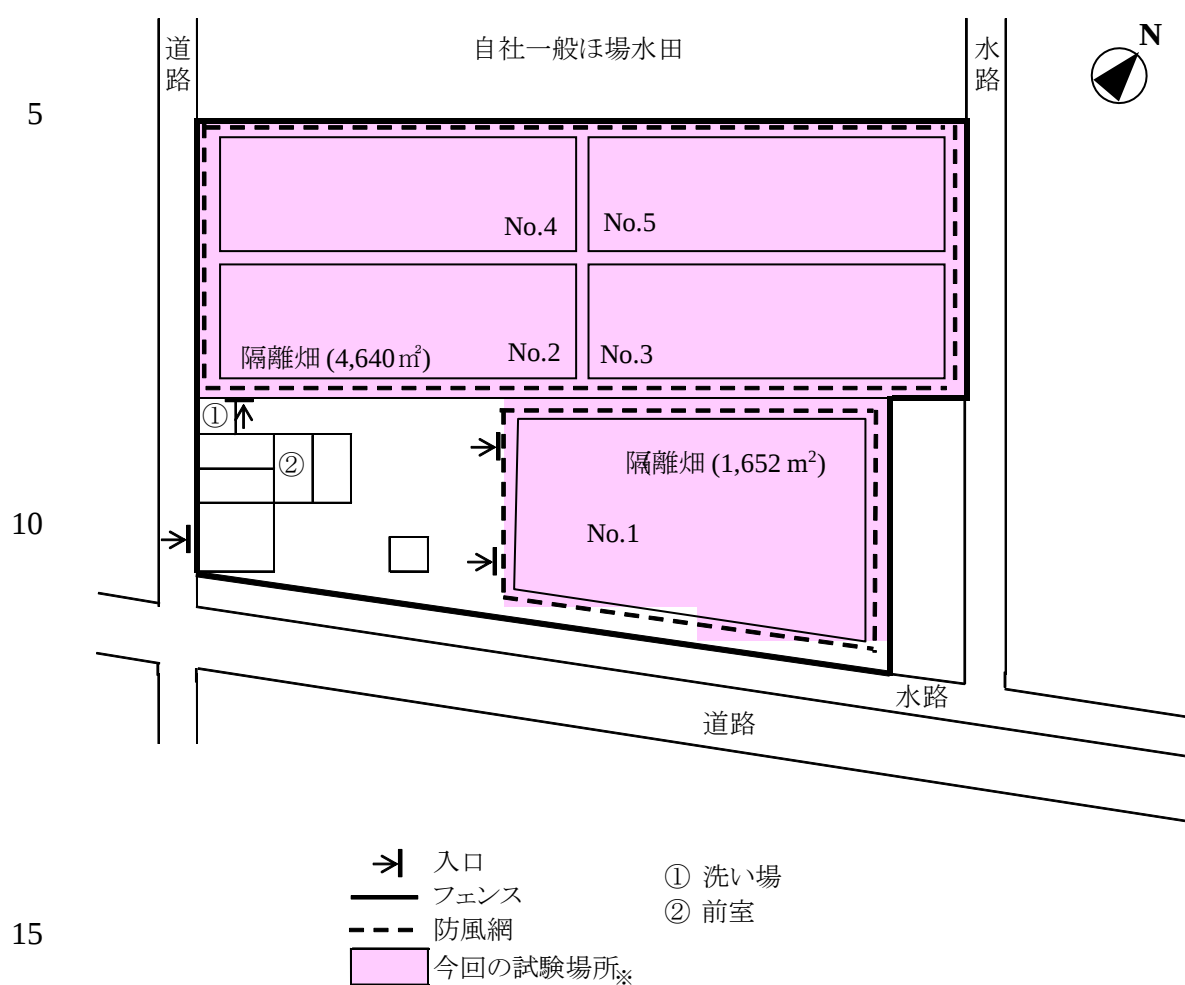


図 16 隔離ほ場の設備³² (左) 立入禁止であることを明示するための標識、(右) 洗い場



※上記試験場所のうち約 1,000 m² の面積において栽培予定。

図 17 試験区の配置図³²

³² 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

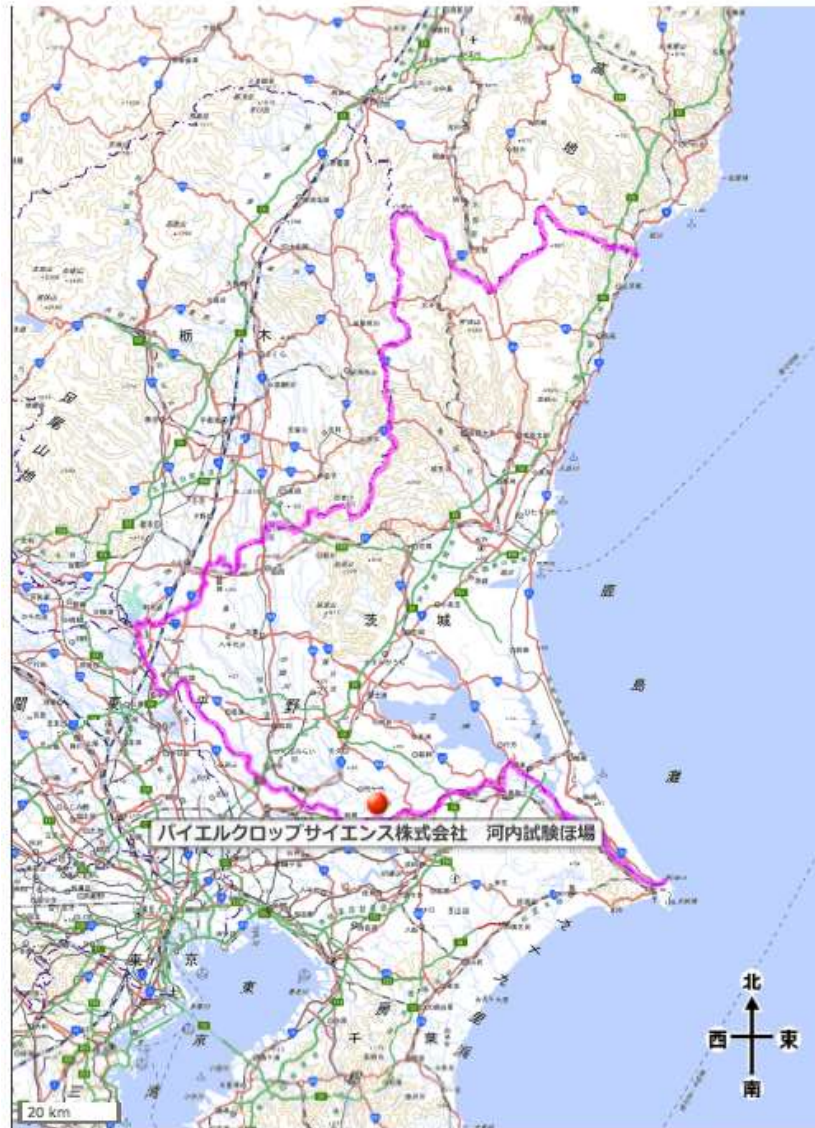


図 18 隔離ほ場の位置 (広域図)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2019年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え スイートコーン					←	←	←	←	←			
	遺伝子組換え スイートコーン					←	←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
No.4	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←			
	遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←	←			
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→									←

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2020年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え スイートコーン					←	←	←	←	←			
	遺伝子組換え スイートコーン					←	←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え ナタネ											←	←
	遺伝子組換え ナタネ											←	←
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え ナタネ											←	←
	遺伝子組換え ナタネ											←	←
No.4	非遺伝子組換え トウモロコシ		→										
	遺伝子組換え トウモロコシ		→										
	非遺伝子組換え テンサイ						←	←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え ライムギ											←	←
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→									←

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2021年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
No.2	非遺伝子組換え ナタネ												
	遺伝子組換え ナタネ						→						
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→									←
	非遺伝子組換え ナタネ									→			
	遺伝子組換え ナタネ									→			
	非遺伝子組換え テンサイ					←	←	←	←	←	←	←	←
No.4	非遺伝子組換え テンサイ									→			
	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	←
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→									←

5 図 19 隔離ほ場における栽培履歴³³

³³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

第二部 隔離ほ場での試験計画

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

別添資料リスト

- 別添資料 1 Bioinformatic evaluation of the GA20ox_SUP mature miRNA sequence against the *Zea mays* transcriptome (TRR0001151) (社外秘)
- 5 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP527892 (社外秘)
- 別添資料 3 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON 94804 (TRR0001333) (社外秘)
- 別添資料 4 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Short Stature Maize MON 94804 Across Three Generations (TRR0001033) (社外秘)
- 10 別添資料 5 Amended from TRR0001453: Molecular Characterization of Short Stature Maize MON 94804 (M-811545-03-1) (社外秘)
- 別添資料 6 Demonstration of the Presence or Absence of GA20ox_SUP Transcripts in Maize Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 94804 (TRR0001372) (社外秘)
- 15 別添資料 7 Analysis of Transcript from GA20ox_SUP Suppression Cassette in Leaf Tissue Collected from MON 94804 (TRR0001332) (社外秘)
- 別添資料 8 Summary of Method for Detecting the Presence of the Corn MON 94804 Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (TRR0001402) (社外秘)