

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
(ipd072Aa, pat, Zea mays subsp. mays (L.) Iltis)
 (DP51291, OECD UI: DP-051291-2) の申請書等の概要

目次

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
(1) 供与核酸に関する情報	8
(2) ベクターに関する情報	19
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	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	24
(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	27
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	28
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
第二 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
2 有害物質の産生性	36
3 交雑性	39
4 その他の性質	40
第三 生物多様性影響の総合的評価	41
参考文献	43
緊急措置計画書	51
添付資料	53

第一種使用規程承認申請書

令和 6 年 3 月 29 日

5

農林水産大臣 坂本 哲志 殿

環 境 大 臣 伊藤 信太郎 殿

10

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

15

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

20

25

30

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>ipd072Aa, pat, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (DP51291, OECD UI: DP-Ø51291-2)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬 及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

10 ① 和名、英名及び学名

和名：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

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

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの野生種と見られる植物は現存せず (山田, 2001a)、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, 2001b; OECD, 2003)。

30

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

(2) 使用等の歴史及び現状

35 ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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

40

ような変異種が生じたと考えられる（山田, 2001a; 戸澤, 2005）。1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。

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

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

a. 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等を中心に、全世界で広く栽培されている（戸澤, 2005; OECD, 2003）。

国連食糧農業機関（FAO）によると、2022 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 2 億 347 万 ha であり、上位国は、中国 4,307 万 ha、米国 3,205 万 ha、ブラジル 2,104 万 ha、インド 996 万 ha、アルゼンチン 877 万 ha である（FAO, 2024）。

現在、我が国で栽培されているトウモロコシには、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、2022 年の作付面積は、青刈りデントコーンは約 9 万 6,300 ha（農林水産省, 2023a）、スイートコーンは約 2 万 1,300 ha である（農林水産省, 2023b）。

b. 栽培方法

米国をはじめとする海外の主要栽培国では、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。

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）。

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。

c. 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。2022 年の米国におけるトウモロコシの利用用途の内訳は、46.2%が飼料（8.3%の蒸留粕を含む）、29.6%がエタノール製造、13.8%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, 2023）。

我が国では、2022 年に約 1,527 万トンのトウモロコシを輸入しており、そのう

ちの約 1,145 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, 2024）。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, 2024）。

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、関税制度の下、加熱・圧ぺんすること等が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, 2001a）。

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

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

これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の1.6～2.0倍になったときに幼根（初生根又は種子根）が抽出し、子実発芽となる（戸澤, 2005）。

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

ハ 捕食性又は寄生性

—

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。

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)。

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, 2001a)。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, 2001a; OECD, 2003)。

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

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

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

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

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

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

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、雌花は葉腋について 1~3 本の雌穂を形成し、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, 2001b)。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, 2001b)。一本の雄穂には 1,200~2,000 個の小穂があり、一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている (OECD, 2003)。

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる (西尾, 2002)。

花粉の形状は球形で、直径は 90~120 μm 程度である (中村, 2001)。

受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である (戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐための隔離距離は、林、高層建築物等

の障害物の有無等により異なるものの、200～400 m とされている（千藤, 2001）。

我が国のトウモロコシほ場周辺においてヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) の葉上における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 7 ヲ所のトウモロコシほ場周辺において延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度を調査した結果、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、8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている (Pleasants *et al.*, 2001)。

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

我が国において、運搬時等にこぼれ落ちたトウモロコシがほ場以外で生育していた事例としては、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 個体が報告されている (農林水産省, 2014; 農林水産省, 2017)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

10 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*ipd072Aa, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP51291, OECD UI: DP-Ø51291-2) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (9 ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列を添付資料 1 の Appendix A に示した。

ロ 構成要素の機能

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

20 本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち、供与核酸の構成要素それぞれの機能を表 1 (9 ページ) に示した。第一.2. (3) .イ (20 ページ) で後述するように、本組換えトウモロコシの染色体には、T-DNA 領域のうち FRT1 から FRT87 までの領域 (以下「挿入 DNA 領域」という。) だけが含まれる。このため、本組換えトウモロコシにおける供与核酸は挿入 DNA 領域である。また、本組換えトウモロコシの作出に用いた核酸のうち、供与核酸を除く外側骨格領域の構成要素それぞれの機能を表 2 (11 ページ) に示した。

25 なお、本組換えトウモロコシに導入された遺伝子は、*ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子であり (表 1、9 ページ)、いずれも既に第一種使用規程の承認を受けている DP23211¹⁾に導入されている同名の遺伝子と同一の塩基配列を有する。また、それぞれの遺伝子発現カセットにおけるプロモーター及びターミネーター等の構成及び塩基配列についても DP23211 と同一である。

30

¹⁾ 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 (*DvSSJ1, ipd072Aa, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP23211, OECD UI: DP-Ø23211-2)。

我が国における承認状況；食品：2023 年 3 月 24 日、飼料：2023 年 3 月 30 日、環境：2023 年 5 月 11 日。

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

構成要素		サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
その他	FRT1	48	出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 由来のFLPリコンビナーゼ標的部位 (Proteau <i>et al.</i> , 1986)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット*	<i>pmi</i>	1,216	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI 蛋白質) をコードする遺伝子 (Negrotto <i>et al.</i> , 2000)。コーディング領域の 5'側に 4 塩基、3'側に 36 塩基の非翻訳領域を含む。
	<i>pinII</i> Terminator	311	ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子 (<i>pinII</i>) のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator	742	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank accession KX247647; Dong <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	<i>os-actin</i> Promoter	1,682	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のプロモーター領域 (GenBank accession CP018159; GenBank accession EU155408.1)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>os-actin</i> Intron	469	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のイントロン領域 (GenBank accession CP018159; GenBank accession EU155408.1)。
	<i>pat</i>	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
	CaMV 35S Terminator	194	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。

* *pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターである *ubiZM1* Promoter (*Z. mays* 由来) は、後述する中間系統作成にあたりあらかじめ *loxP* とともに宿主に移入されている。挿入 DNA 領域が当該プロモーターの下流に部位特異的組換えにより挿入され、*pmi* 遺伝子と当該プロモーターが接続される (第一.2. (3) .イ、20 ページ)。

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

構成要素		サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
その他	<i>loxP</i>	34	バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位（Dale and Ow, 1990）。
	<i>sb-ubi</i> Terminator	584	ソルガム（ <i>Sorghum bicolor</i> ）由来のユビキチン遺伝子のターミネーター領域（Phytozome gene ID Sobic.004G049900.1; Abbit, 2017）。転写を停止する。
	<i>sb-gkaf</i> Terminator	464	ソルガム（ <i>S. bicolor</i> ）由来のガンマカフィリン遺伝子のターミネーター領域（de Freitas <i>et al.</i> , 1994）。転写を停止する。
	<i>attB1</i>	24	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位（Invitrogen Gateway [®] クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000; Katzen, 2007）。
	<i>attB2</i>	24	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位（Invitrogen Gateway [®] クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000; Katzen, 2007）。
<i>ipd072Aa</i> 遺伝子発現カセット	BSV (AY) Promoter	414	Banana streak virus (acuminata Yunnan strain) 由来のプロモーター領域（Diehn <i>et al.</i> , 2012）。植物体内での構成的な発現を誘導する。
	<i>zm-HPLV9</i> Intron	856	トウモロコシ（ <i>Z. mays</i> ）由来の推定カルモジュリン5遺伝子のイントロン領域（Abbitt and Shen, 2016）。
	<i>ipd072Aa</i>	261	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 由来のIPD072Aa蛋白質をコードする遺伝子（Schellenberger <i>et al.</i> , 2016）。
	<i>at-T9</i> Terminator	573	シロイヌナズナ（ <i>Arabidopsis thaliana</i> ）由来のマンノース結合蛋白質スーパーファミリーに属する推定蛋白質遺伝子のターミネーター領域（Bhyri, <i>et al.</i> , 2018）。転写を停止する。
その他	<i>attB3</i>	21	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位（Cheo <i>et al.</i> , 2004）。
	FRT87	48	出芽酵母（ <i>S. cerevisiae</i> ）由来の改変型 FLP リコンビナーゼ標的的部位（Tao <i>et al.</i> , 2007）。

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

構成要素		サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
その他	Ti Plasmid Region	50	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)) 由来の Ti プラスミド (pTi) の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Left Border (LB)	25	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の pTi の T-DNA 領域の左側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>spc</i>	789	細菌由来のスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
	pUC <i>ori</i>	589	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド pUC に含まれる DNA 複製起点 (GenBank accession KP700956.1; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetR</i>	651	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の調節遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetA</i>	1,200	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>trfA</i>	1,149	細菌由来のトランス作用複製因子の遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriT</i>	112	細菌由来の DNA 伝達起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>ctl</i>	6,271	細菌由来のセントラルコントロールオペロン領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriV</i>	711	細菌由来の DNA 複製起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virD1</i>	444	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virC1</i>	695	
	<i>virC2</i>	609	
	<i>virG</i>	804	
	<i>virB</i>	9,436	
	pUC <i>ori</i>	589	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド pUC に含まれる DNA 複製起点 (GenBank accession KP700956.1; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Right Border (RB)	25	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の pTi の T-DNA の右側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Ti Plasmid Region	50	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来の pTi の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。

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

構成要素		サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
<i>zm-wus2</i> 遺伝子発現カセット	<i>nos</i> Promoter	322	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)) 由来のpTiのノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。転写を開始する。
	<i>zm-wus2</i>	1,024	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のWUS2蛋白質をコードする遺伝子 (Lowe <i>et al.</i> , 2007)。コーディング領域の5'側に28塩基、3'側に87塩基の非翻訳領域を含む。
	<i>pinII</i> Terminator	311	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
<i>zm-odp2</i> 遺伝子発現カセット	<i>ubiZM1</i> Promoter	900	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>ubiZM1</i> 5' UTR	83	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>ubiZM1</i> Intron	1,013	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>zm-odp2</i>	2,133	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のODP2蛋白質をコードする遺伝子 (GenBank accession XM008676474; Gordon-Kamm <i>et al.</i> , 2013)。
	<i>pinII</i> Terminator	311	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator	742	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank accession KX247647; Dong <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。

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

構成要素		サイズ (bp)	由 来 及 び 機 能
Flp 遺伝子発現カセット	<i>ubiZM1</i> Promoter	900	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>ubiZM1</i> 5' UTR	83	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子の5' 非翻訳領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>ubiZM1</i> Intron	1,013	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>Flp</i> Exon1	634	出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) 由来のリコンビナーゼであるFLP 蛋白質をコードする遺伝子のエクソン1領域 (Dymecki, 1996)。
	<i>st-LS1</i> Intron	189	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来の <i>LS1</i> 遺伝子のイントロン領域 (Eckes <i>et al.</i> , 1986)。
	<i>Flp</i> Exon2	638	出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) 由来のリコンビナーゼであるFLP 蛋白質をコードする遺伝子のエクソン2領域 (Dymecki, 1996)。
	<i>pinII</i> Terminator	311	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
<i>DsRed2</i> 遺伝子発現カセット	CaMV 35S Enhancer	475	カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sエンハンサー領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Kay <i>et al.</i> , 1987)。
	<i>Ltp2</i> Promoter	846	オオムギ (<i>Hordeum vulgare</i>) 由来の糊粉層特異的脂質転移酵素遺伝子のプロモーター領域 (Kalla <i>et al.</i> , 1994)。糊粉層における発現を誘導する。
	<i>DsRed2</i>	678	サンゴ (<i>Discosoma</i> sp.) 由来の赤色蛍光蛋白質をコードする遺伝子。遺伝子内における <i>BstE</i> II切断部位が除去されている (Clontech, 2001)。
	CaMV 35S Terminator	194	カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。
その他	<i>attB4</i>	21	バクテリオファージ λ 由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。
	CaMV 35S Terminator	194	カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980; Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。

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

5 a. 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能

IPD072Aa 蛋白質

10 IPD072Aa 蛋白質は、土壤中に普遍的に存在するグラム陰性桿菌である *P. chlororaphis* に由来する (Schellenberger *et al.*, 2016)。IPD072Aa 蛋白質は 86 アミノ酸残基からなる選択的殺虫蛋白質であり、ウェスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*; 以下「WCR」という。) 等のコウチュウ目昆虫に特異的な殺虫活性を示すことが確認されている。

- IPD072Aa 蛋白質の機能

15 標的害虫である WCR の幼虫に IPD072Aa 蛋白質を混餌投与した後、その縦断切片において IPD072Aa 蛋白質を免疫染色法により検出した結果、IPD072Aa 蛋白質が WCR の中腸上皮に局在していることが確認されるとともに、IPD072Aa 蛋白質投与後の時間経過に伴い中腸上皮細胞が破壊されることが確認された (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。さらに、IPD072Aa 蛋白質は
20 WCR の中腸上皮から調製された刷子縁膜小胞 (brush border membrane vesicles; 以下「BBMV」という。) に結合することから、IPD072Aa 蛋白質は WCR の中腸上皮細胞に存在する受容体に結合すると考えられた (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。一方、IPD072Aa 蛋白質に感受性を示さないチョウ目昆虫のヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) から調製された BBMV
25 には、IPD072Aa 蛋白質は結合しなかった (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。

以上のことから、IPD072Aa 蛋白質は WCR の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、当該細胞を破壊することにより殺虫活性を発揮すると考えられている (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。

30 なお、WCR に殺虫活性を示す Bt 蛋白質 (Cry34Ab1/Cry35Ab1 蛋白質及び mCry3A 蛋白質) への耐性を発達させた WCR に対し、IPD072Aa 蛋白質を産生する遺伝子組換えトウモロコシは抵抗性を示した (Schellenberger *et al.*, 2016)。また、これら Bt 蛋白質と IPD072Aa 蛋白質は、いずれも WCR の BBMV に結合するが互いに競合しないことが確認された (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。これらのことから、IPD072Aa 蛋白質とこれら Bt 蛋白質は WCR
35 の中腸上皮細胞において異なる受容体に結合すると考えられている (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)。

- IPD072Aa 蛋白質の殺虫スペクトル

40 IPD072Aa 蛋白質の標的害虫である WCR に対する殺虫活性は生物検定により確認されており、その LC₅₀ (半数致死濃度) は 26 ppm であった (Boeckman *et al.*, 2019)。なお、WCR の生存率に影響を及ぼさない IPD072Aa 蛋白質の最大濃度 (無影響濃度) を推定したところ、4 ppm であった (添付資料 3)。

また、WCR を除くコウチュウ目昆虫 10 種及びチョウ目昆虫 4 種に、IPD072Aa 蛋白質をあらかじめ定めた期間中混餌投与し、各生物種の生存率への影響を調査した。その結果、調査に用いたコウチュウ目昆虫 10 種のうち、
5 ジュウイチホシウリハムシ (*Diabrotica undecimpunctata*)、チャイロコメノ
ゴムシダマシ (*Tenebrio molitor*)、インゲンテントウ (*Epilachna varivestis*)、
テントウムシの一種 (*Coleomegilla maculata*) 及びサカハチテントウ
(*Hippodamia convergens*) の 5 種には IPD072Aa 蛋白質に対する感受性が
認められた (表 3、16 ページ; Boeckman *et al.*, 2019)。一方、チョウ目昆虫
10 については、試験に用いた IPD072Aa 蛋白質の最大濃度である 1,000 ppm に
おいても生存率への影響は認められなかった (表 3、16 ページ; Boeckman *et*
al., 2019)。

なお、上述の混餌投与試験において感受性が認められたコウチュウ目昆虫の
うち、*C. maculata* 及び *H. convergens* は農業害虫ではなく、非標的生物であ
る。これらの生物種に対する影響について検討するため、本組換えトウモロコ
15 シの栽培ほ場においてこれらの生物種が IPD072Aa 蛋白質に暴露される経路
を考慮し、IPD072Aa 蛋白質の最大暴露量を推定した (添付資料 2)。その結
果、当該推定暴露量は、これらの生物種における IPD072Aa 蛋白質の無影響濃
度 (表 3、16 ページ) を超えるものではないことが確認された (添付資料 2 の
Table2、30 ページ)。

さらに、その他の非標的生物への影響についてハチ目、トビムシ目及びアミ
20 メカゲロウ目を代表する生物種を用いて検討した。栽培中の本組換えトウモロ
コシに産生される IPD072Aa 蛋白質のこれらの生物種における最大暴露量を
推定し、当該暴露量を超える量の IPD072Aa 蛋白質を混餌投与した結果、いず
25 れの生物種についても生存率に影響は認められなかった (表 3、16 ページ; 添
付資料 2 の Table1、27 ページ)。

以上のことから、IPD072Aa 蛋白質は、WCR を含む特定のコウチュウ目昆
虫に特異的な殺虫活性を示すと考えられた。

表 3 IPD072Aa 蛋白質の殺虫スペクトル

目	科	種	無影響濃度* (ppm)
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	4
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	500
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	>1,000
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	<i>Tribolium castaneum</i>	>1,000
		<i>Zophobas morio</i>	>1,000
		<i>Tenebrio molitor</i>	500
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Epilachna varivestis</i>	100
		<i>Cryptolaemus montrouzieri</i>	>1,000
		<i>Coleomegilla maculata</i>	100
		<i>Hippodamia convergens</i>	500
	Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Dalotia coriaria</i> (<i>Atheta coriaria</i>)	>1,000
Lepidoptera (チョウ目)	Nymphalidae (タテハチョウ科)	<i>Vanessa cardui</i>	>1,000
	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	>1,000
	Tortricidae (ハマキガ科)	<i>Cydia pomonella</i>	>1,000
	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Helicoverpa zea</i>	>1,000
Hymenoptera (ハチ目)	Apidae (ミツバチ科)	<i>Apis mellifera</i> (幼虫)	>200 (ng/larva)
		<i>Apis mellifera</i> (成虫)	>1,300 (ng/bee/day)
	Eulophidae (ヒメコバチ科)	<i>Pediobius foveolatus</i>	>2,000 (µg/ml diet)
Neuroptera (アミメカゲロウ目)	Chrysopidae (クサカゲロウ科)	<i>Chrysoperla rufilabris</i>	>2,000
Collembola (トビムシ目)	Isotomidae (ツチトビムシ科)	<i>Folsomia candida</i>	>4,000

* 生存率に影響を生じなかった最大濃度。濃度は、投与飼料 1 mg あたりの IPD072Aa 蛋白質の量 (ng) を示す。試験に用いた濃度上限で影響が認められなかった場合は不等号 (>) により示した。なお、*Diabrotica virgifera virgifera* (WCR) に対する無影響濃度は、LC₅₀ の算出に用いたデータから一般化線形モデルにより推定された値である。

PAT 蛋白質

PAT 蛋白質は *S. viridochromogenes* に由来する。除草剤グルホシネートは、その活性成分である L-グルホシネートによりグルタミン合成酵素活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。PAT 蛋白質は、L-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変え無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する (OECD, 2002)。なお、トウモロコシでの発現を最適化するため *pat* 遺伝子の塩基配列を改変しているが²⁾、産生される PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。

PMI 蛋白質

PMI 蛋白質は *E. coli* に由来し、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する。トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、PMI 蛋白質を産生する植物は炭素源としてマンノースを含む培地において生長することが可能なため、組換え植物の選抜マーカーとして用いられる (Negrotto *et al.*, 2000; 第一.2. (3) .ハ.①、23 ページ)。

b. アレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性

Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) データベース³⁾を用い、IPD072Aa 蛋白質と既知アレルゲンとの相同性を検討した (添付資料 3)。検討においては、連続する 8 アミノ酸以上で完全に一致する配列の検索及び FASTA (version 35.4.4) による連続する 80 アミノ酸残基以上で 35% 以上一致する配列の検索を行った (FAO/WHO, 2001; CODEX, 2003)。その結果、IPD072Aa 蛋白質に既知アレルゲンとの相同性は認められなかった (添付資料 4)。

また、本組換えトウモロコシで産生される PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質のアミノ酸配列は、既に第一種使用規程の承認を受けている *B.t. Cry1F maize line 1507*⁴⁾ 等で産生される PAT 蛋白質及び MIR162⁵⁾ 等で産生される PMI 蛋白質と同一である。これらの蛋白質を産生するそれぞれのトウモロコシは既に商業化され安全に使用されており、これまでにアレルギー誘発性を示したとの報告はない。

²⁾ 塩基配列が改変されているため、添付資料においては *mo-pat* と表記。

³⁾ HESI: Health and Environmental Science Institute によるデータベース (<http://comparedatabase.org>)。2021 年 1 月公表。

⁴⁾ チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t. Cry1F maize line 1507*, OECD UI: DAS-Ø15Ø7-1)。

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

⁵⁾ チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (改変 *vip3A*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MIR162, OECD UI: SYN-IR162-4)。

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

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5 IPD072Aa 蛋白質はコウチュウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、当該細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられているが (Jiménez-Juárez *et al.*, 2023)、酵素として機能するとの報告はない。また、IPD072Aa 蛋白質のアミノ酸配列に、既知の酵素蛋白質のモチーフあるいはドメイン等との相同性は認められていないことから (Schellenberger *et al.*, 2016)、IPD072Aa 蛋白質が酵素活性を有する可能性は低い。

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

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

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

以上のことから、IPD072Aa 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質が、宿主であるトウモロコシの代謝系を変化させる可能性は低いと考えられた。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5 目的遺伝子の導入に用いたベクターはプラスミド PHP74638 であり (図 1、21 ページ)、アグロバクテリウム (*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)) 等由来のプラスミド pSB1 から作製された (Komari *et al.*, 1996)。

ロ 特性

10

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15

プラスミド PHP74638 の塩基数は 66,641 bp であり、挿入 DNA 領域の塩基数は 9,401 bp である (図 1 及び図 2、21 及び 22 ページ)。挿入 DNA 領域を含む T-DNA 領域の塩基配列を添付資料 1 の Appendix A に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20

プラスミド PHP74638 の外側骨格領域には、抗生物質スペクチノマイシン耐性 (*spc*) 遺伝子及びテトラサイクリン耐性 (*tetA*) 遺伝子が含まれている。これらの遺伝子は、微生物を用いてプラスミド PHP74638 を増殖させる際、当該プラスミドを含む微生物を選抜するためのマーカーとして機能する。しかしながら、これら抗生物質耐性遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置するため、宿主の細胞には導入されない。また、PHP74638 の T-DNA 領域のうち、染色体に挿入されなかった外側骨格領域には、*zm-wus2* 遺伝子、*zm-odp2* 遺伝子、*Flp* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子の発現カセットが含まれる。これらの遺伝子は、T-DNA 領域が宿主の細胞に移入された後、染色体に挿入されることなく一過的に蛋白質を産生することにより機能する。*zm-wus2* 遺伝子及び *zm-odp2* 遺伝子は、形質転換における植物体の再生率を向上させる (Lowe *et al.*, 2016)。*Flp* 遺伝子は、FRT1 及び FRT87 において部位特異的組換えを誘導することにより、挿入 DNA 領域を染色体上の意図した位置に挿入することを可能にする (第一.2. (3) .イ、20 ページ)。*DsRed2* 遺伝子は、赤色蛍光による形質転換体の選抜を可能にするが、本組換えトウモロコシの選抜においては利用されていない。これらの遺伝子が宿主の染色体に挿入されていないことは、T₁ 世代における塩基配列解析により確認した (第一.2. (4) .②、24 ページ)。

35

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

40

プラスミド PHP74638 には感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5 挿入 DNA 領域は、*pmi* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ipd072Aa* 遺伝子の発現カセットを含む。プラスミド PHP74638 における挿入 DNA 領域の構成を図 1 (21 ページ) に示した。

10 また、本組換えトウモロコシの染色体に挿入された核酸全体について、図 2 (22 ページ) 及び添付資料 5 の Figure 3 (4 ページ) に示した。本組換えトウモロコシの作出においては、プラスミド PHP74638 に含まれる挿入 DNA 領域を、部位特異的組換えを用いてトウモロコシのゲノム DNA に挿入した。

部位特異的組換えにはリコンビナーゼである FLP 蛋白質を用いた。FLP 蛋白質は標的配列である FRT1 及び FRT87 の配列特異的に組換えを誘導する。

15 はじめに、これらの標的配列を含む挿入標的配列 (Landing Pad sequence; 以下「LP 配列」という。) をアグロバクテリウム法及びパーティクルガン法により非遺伝子組換えトウモロコシ (以下「非組換えトウモロコシ」という。) PHR03 系統に導入し、1 コピーの LP 配列が染色体に挿入され、かつ、その挿入によって内在性遺伝子の破壊が生じていない系統 (以下「中間系統」という。) を選抜した (図 20 2、22 ページ; 添付資料 5)。

次に、PHP74638 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により得られた中間系統に導入した (図 2 A 及び B、22 ページ)。当該 T-DNA 領域は FRT1 及び FRT87 に加え *Flp* 遺伝子発現カセットを含んでいるため、導入に伴い FLP 蛋白質が産生される (図 2 B、22 ページ)。その結果、当該 T-DNA 領域中の FRT1 及び FRT87 と、既に染色体に挿入されている LP 配列中の FRT1 及び FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され (図 2 B 及び C、22 ページ)、当該 T-DNA 領域のうち挿入 DNA 領域 (図 1、21 ページ) だけが染色体上の LP 配列中に挿入された (図 2 D、22 ページ; 添付資料 5)。

30 なお、PHP74638 の T-DNA 領域全体が染色体に挿入される可能性もあったが、後述するように、本組換えトウモロコシの T₁ 世代を用いて、意図した部位特異的組換えだけが生じていることを確認した (第一.2. (4) .②、24 ページ)。

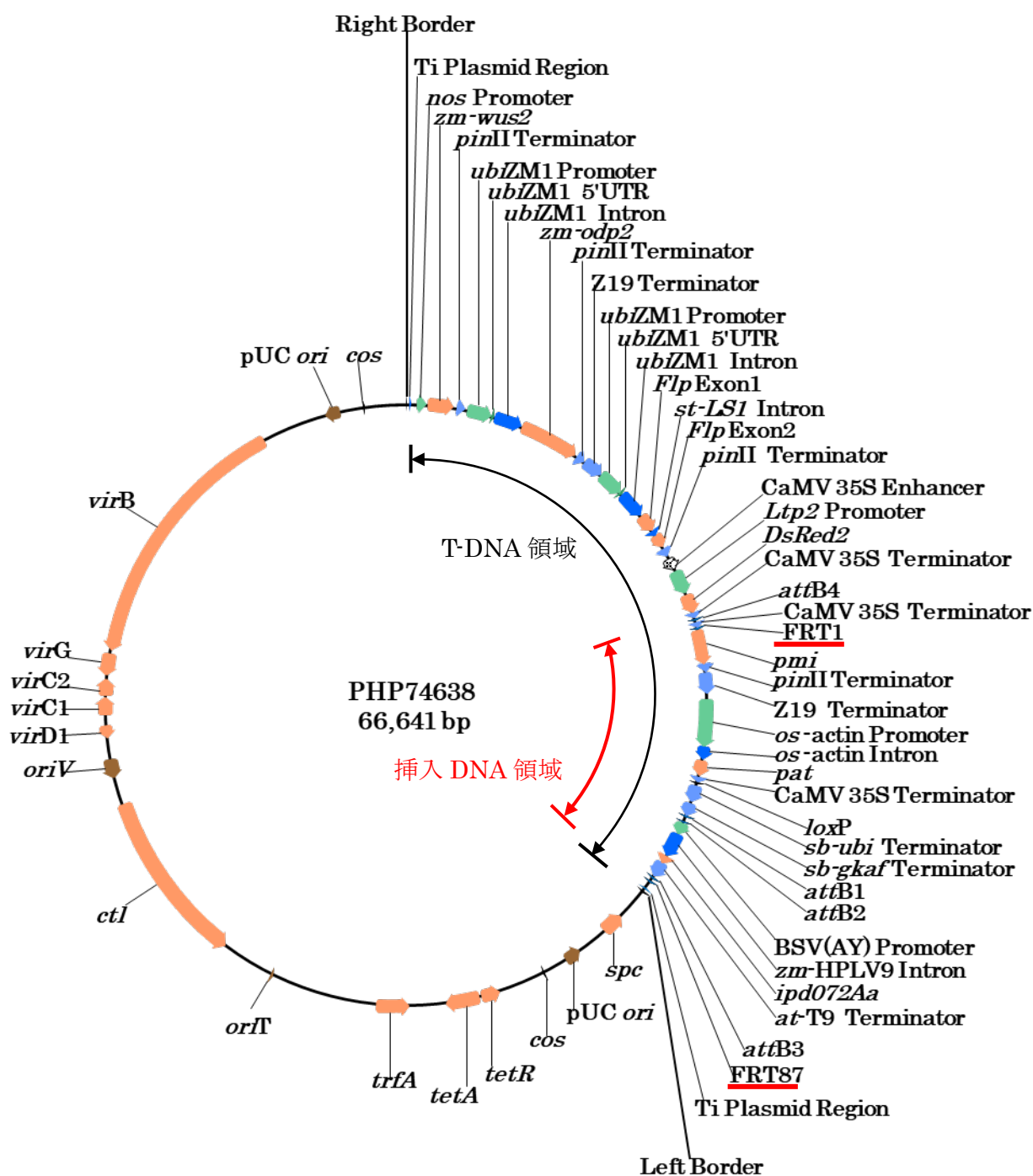


図 1 プラスミド PHP74638 における供与核酸の構成
供与核酸は、赤下線で示した FRT1 及び FRT87 に挟まれた挿入 DNA 領域である。

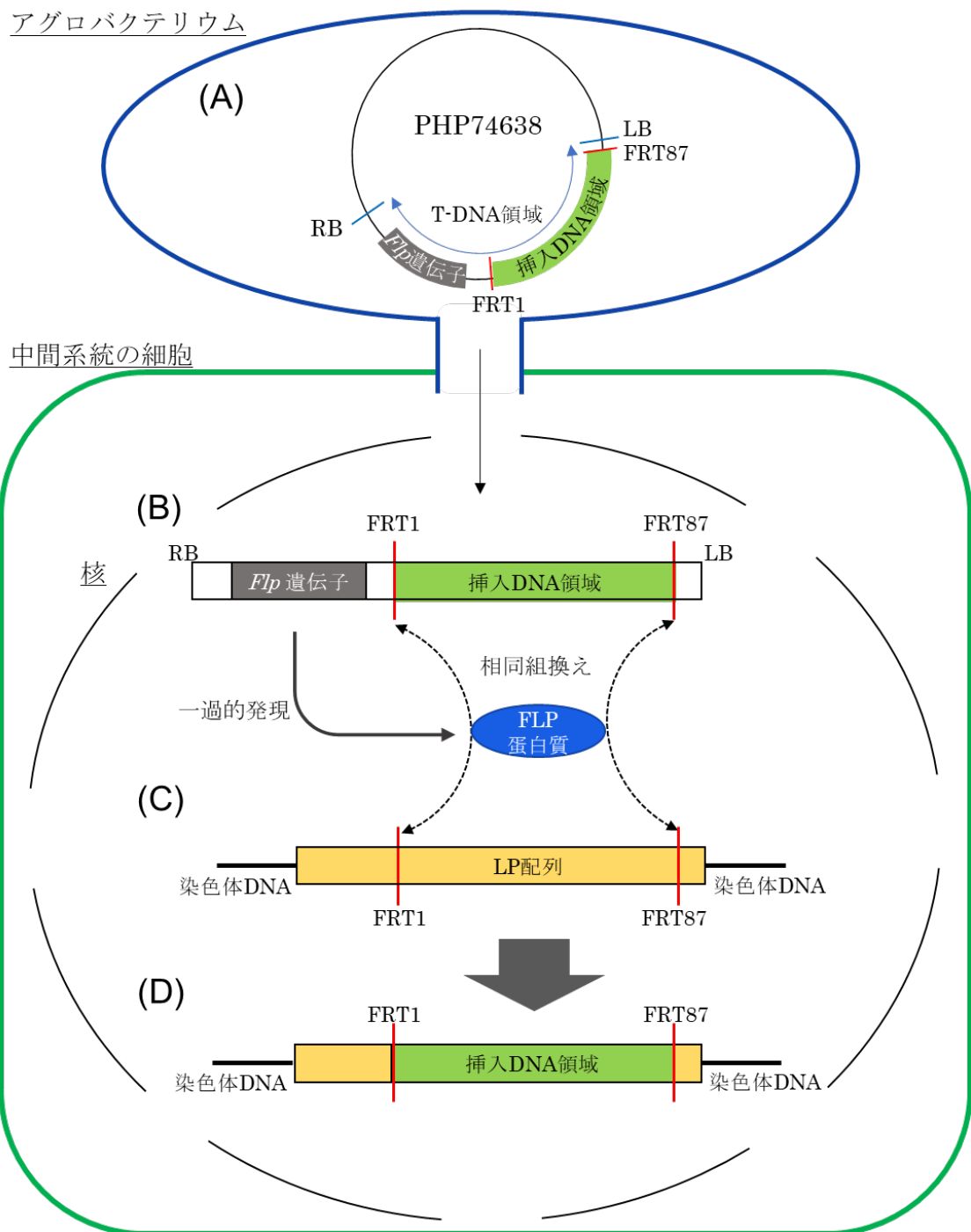


図 2 部位特異的組換えによる本組換えトウモロコシの作出

A: アグロバクテリウム中の導入用プラスミド PHP74638。

B: PHP74638 の T-DNA 領域。アグロバクテリウムから中間系統の細胞に導入され、核内で一過的に FLP 蛋白質を発現する。その後、植物体から失われる。

C: 中間系統の染色体 DNA にあらかじめ組み込まれていた LP 配列。

D: 本組換えトウモロコシ中の挿入 DNA 領域。一過的に発現した FLP 蛋白質の機能により、染色体 DNA 上の LP 配列内の FRT1 及び FRT87 配列と、導入された T-DNA 領域の同じ配列との間で相同組換えが誘起され、両配列に挟まれた領域が置換された。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

10

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

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の菌体の残存の有無

15

20 アグロバクテリウムの除去は、培地に抗生物質セフトキシム及びチメンチンを添加することにより行った。また、PCR 分析により、本組換えトウモロコシの T₁ 世代（図 3、23 ページ）の種子から抽出した DNA 中にプラスミド PHP74638 の外側骨格領域に存在する 5 領域（LB、*spc*、*tetA*、*virG*、RB）が含まれていないことを確認しており、アグロバクテリウムの菌体の残存はないと考えられる（添付資料 6）。

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

30 本組換えトウモロコシの育成経過は図 3（23 ページ）のとおりであり、本図中に、該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を示した。承認対象の範囲は、T₁ 世代以降である。

（社外秘情報につき非開示）

図 3 本組換えトウモロコシの育成経過

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

移入された核酸が植物の染色体に取り込まれると、後代においてメンデルの法則に従い分離する。本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物の分離比を検討するため、T₁、T₂、T₃、T₄及びT₅の5世代（図 3、23 ページ）の葉から抽出した DNA を用いて定量 PCR 分析を行った（添付資料 7）。分析には、各導入遺伝子特異的プライマーペア及び本組換えトウモロコシに移入された核酸の 3'末端とゲノム DNA との接合部位に特異的なプライマーペアを用い、*ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pml* 遺伝子並びに核酸の移入の有無を確認した。その結果、いずれの世代における分離比も、メンデルの法則に従った場合に期待される分離比に適合したことから（表 4、24 ページ）、本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物が染色体上に存在することが確認された。

表 4 本組換えトウモロコシに移入された核酸の複製物の分離比

世代 ¹⁾	分離比の期待値	PCR 分析の結果			P 値 ⁴⁾
	陽性：陰性	サンプル数	陽性 ²⁾	陰性 ³⁾	
T ₁	1 : 1	100	49	51	0.8415
T ₂	3 : 1	100	82	18	0.1060
T ₃	3 : 1	100	74	26	0.8174
T ₄	1 : 0	100	100	0	-
T ₅	1 : 0	100	100	0	-

1) T₄世代以降はホモ接合体。

2) *ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*pml* 遺伝子及び本組換えトウモロコシにおける移入核酸の 3'末端とゲノム DNA との接合部位の全てが検出された個体数。

3) 上記のいずれも検出されなかった個体数。

4) カイ二乗検定。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的有意差有り。

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

本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子のコピー数及び完全性並びに外側骨格領域の有無を、Southern by Sequencing (SbS) 分析 (Zastrow-Hayes *et al.*, 2015; Brink *et al.*, 2019) により調べた（添付資料 8）。

プラスミド由来の DNA がゲノム DNA に挿入されると、両者の間に特異的な接合部位が生じる。SbS 分析においては、宿主に導入されたプラスミドの塩基配列と相同な配列を含むゲノム DNA を選択的に濃縮し、塩基配列解析を行うことにより、ゲノム DNA に挿入された配列及び特異的な接合部位を特定する。

前述のとおり、本組換えトウモロコシの作出においては 1 コピーの LP 配列を有する中間系統を用い、当該 LP 配列中に部位特異的組換えにより PHP74638 由

来の挿入 DNA 領域を挿入している（第一.2. (3) .イ、20 ページ）。したがって、本組換えトウモロコシに挿入 DNA 領域が意図したとおり 1 コピー挿入された場合には、SbS 分析により LP 配列及び挿入 DNA 領域が検出されるとともに、ゲノム DNA との接合部位が LP 配列の 5'末端及び 3'末端にそれぞれ 1 か所ずつ、計 2

本組換えトウモロコシの SbS 分析においては、まず T₁ 世代（図 3、23 ページ）の葉から抽出した全ゲノム DNA を断片化し、ライブラリーを作成した。次に、作成したライブラリーから、導入用プラスミド PHP74638 の全塩基配列を網羅するキャプチャープローブとハイブリダイズするゲノム DNA 断片を選択的に濃縮した。さらに、濃縮されたゲノム DNA 断片の塩基配列を解析し、挿入 DNA 領域を含む LP 配列、PHP74638 の全塩基配列及び宿主ゲノムの塩基配列と照合した。

その結果、供試した T₁ 世代 10 個体のうち 5 個体が PHP74638 由来の DNA を含む組換え体であった。組換え体 5 個体のいずれについても PHP74638 由来の配列として挿入 DNA 領域の配列のみが検出され、その 5'末端及び 3'末端はそれぞれ LP 配列と意図したとおり接合していることが確認された（添付資料 8 の Figure 15～Figure 19; 平均カバレッジ深度 92～136）。また、いずれの組換え体についても LP 配列の 5'末端及び 3'末端と宿主ゲノム DNA との接合領域がそれぞれ 1 か所特定された。このことから、本組換えトウモロコシの T₁ 世代のゲノム DNA には、PHP74638 由来の挿入 DNA 領域が意図したとおり 1 コピー挿入されており、完全長の *ipd072Aa* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットがそれぞれ 1 コピー含まれていることが確認された。

さらに、いずれの組換え体についても PHP74638 由来の配列とゲノム DNA との意図しない接合部位は認められなかったことから、PHP74638 の外側骨格領域がゲノム DNA に挿入されていないことが確認された。

上記に加え、中間系統の作出において用いられたプラスミド（添付資料 5）についても分析を行い、これらのプラスミドに由来する意図しない DNA 断片が本組換えトウモロコシ中に残存していないことが確認されている。

また、各導入遺伝子の配列をプローブとしたサザンブロット分析を、T₁、T₂、T₃、T₄ 及び T₅ の 5 世代（図 3、23 ページ）において実施した結果、移入された核酸の複製物が複数世代にわたり安定して伝達されていることが確認された（添付資料 9）。

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

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

本組換えトウモロコシにおける IPD072Aa 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質の産生量を ELISA 法により分析した（添付資料 10 及び添付資料 11）。2018

年に米国の温室で栽培した本組換えトウモロコシの T₁ 世代及び T₂ 世代（図 3、23 ページ）の 9 葉期の葉及び根並びに 2021 年に北米 6 か所（米国のアイオワ州、イリノイ州、インディアナ州、ペンシルバニア州及びテキサス州各 1 か所並びにカナダのオンタリオ州 1 か所）のほ場で栽培した F₁ 世代（図 3、23 ページ）の 9 葉期の葉及び根、絹糸抽出期の花粉並びに成熟期の子実における分析値を表 5（26 ページ）に示した。

分析の結果、いずれの個体又は世代においてもこれら全ての蛋白質が産生されていることが確認された。

表 5 本組換えトウモロコシにおける各蛋白質の産生量

(ng / mg 乾物重)

遺伝子産物	世代*	採取部位	定量下限値	平均値	標準偏差	最小値 - 最大値
IPD072Aa 蛋白質	T ₁	根	0.11	200	8.4	190 - 210
	T ₂	根	0.11	250	46	200 - 300
	F ₁	根	0.11	140	51	63 - 230
		葉	0.054	69	33	23 - 140
		花粉	0.11	1.2	1.4	0.25 - 7.1
		子実	0.027	4.1	3.6	0.051 - 12
PAT 蛋白質	T ₁	葉	0.11	59	4.6	54 - 66
	T ₂	葉	0.11	44	3.9	39 - 48
	F ₁	根	0.054	26	6.2	14 - 36
		葉	0.11	38	5.9	30 - 49
		花粉	0.22	67	7.5	58 - 83
		子実	0.054	5.7	1.8	2.3 - 9.0
PMI 蛋白質	T ₁	葉	0.54	24	2.6	20 - 27
	T ₂	葉	0.54	9.9	1.8	8.4 - 13
	F ₁	根	0.27	6.9	2.3	2.9 - 12
		葉	0.54	8.9	2.7	4.4 - 14
		花粉	1.1	29	4.4	19 - 37
		子実	0.27	4.1	1.7	1.7 - 9.3

* T₁ 世代及び T₂ 世代は n=5、F₁ 世代は n=24。

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

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

検出及び識別の方法：

- 5 本組換えトウモロコシは、移入された核酸の 3'末端とゲノム DNA との接合部位に特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法による検出及び識別が可能である（添付資料 12）。

感度：

- 10 本法の検出限界値は、非組換えトウモロコシのゲノム DNA に対する本組換えトウモロコシのゲノム DNA の混入率として 0.0084%である（添付資料 12）。

信頼性：

- 15 独立した施設 3 か所において再現性が確認されている（添付資料 12）。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

5

本組換えトウモロコシに付与された特性は、*ipd072Aa* 遺伝子によるコウチュウ目害虫抵抗性、*pat* 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性並びに *pmi* 遺伝子によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性である。

10

本組換えトウモロコシにコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されたことを確認するため、2021 年に米国アイオワ州 3 か所、イリノイ州及びネブラスカ州各 2 か所並びにサウスダコタ州及びウィスコンシン州各 1 か所の計 9 か所のほ場で栽培した本組換えトウモロコシについて、2 葉期～4 葉期に 1 株あたり 750 個の WCR の卵を株元付近の土壌中に接種し、水熟期に根の食害を調査した（添付資料 13）。

15

その結果、本組換えトウモロコシがコウチュウ目害虫に対する抵抗性を有することが確認された（表 6、28 ページ）。

表 6 本組換えトウモロコシにおけるコウチュウ目害虫抵抗性¹⁾

	本組換え トウモロコシ ²⁾	対照の トウモロコシ ³⁾	P 値 ⁴⁾
平均値 ± 標準誤差	0.17 ± 0.06	2.12 ± 0.06	< 0.0001
95%信頼区間	0.0524 – 0.2876	2.0024 – 2.2376	

20

- 1) 下記のスコアを用いて評価した。

0.00 = 根に食害なし。

1.00 = 1 つの節の全ての根当たり又はそれに相当する根が食害を受けている。

2.00 = 2 つの節の全ての根が食害を受けている。

3.00 = 3 つ以上の節の全ての根が食害を受けている（スコア上限）。

25

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

- 2) n = 130。

- 3) n = 120。本組換えトウモロコシと同様の遺伝的背景を有する品種。

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

30

本組換えトウモロコシに除草剤グルホシネート耐性の形質が付与されたことを確認するため、PCR 法によって導入遺伝子の有無を確認した本組換えトウモロコシの T₁、T₂、T₃、T₄ 及び T₅ の 5 世代（第一.2. (4) .①、24 ページ）の各個体について、3～4 葉期に除草剤グルホシネート 0.45 kg a.i.⁶⁾/ha（通常量）を散布し、耐性の有無を目視により調査した（添付資料 7）。

その結果、本組換えトウモロコシが除草剤グルホシネート耐性を有することが確認された（表 7、29 ページ）。

表 7 本組換えトウモロコシにおける除草剤グルホシネート耐性

世代		本組換え トウモロコシ ¹⁾	非組換え トウモロコシ ²⁾
T ₁	耐性個体数 ³⁾ (総個体数)	49 (49)	0 (51)
T ₂	耐性個体数 ³⁾ (総個体数)	82 (82)	0 (18)
T ₃	耐性個体数 ³⁾ (総個体数)	74 (74)	0 (26)
T ₄	耐性個体数 ³⁾ (総個体数)	100 (100)	0 (0)
T ₅	耐性個体数 ³⁾ (総個体数)	100 (100)	0 (0)

1) 各世代において、PCR 分析により *ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*pmi* 遺伝子及び本組換えトウモロコシにおける移入核酸の 3'末端とゲノム DNA との接合部位の全てが検出された個体。

2) 各世代において、PCR 分析により上記のいずれも検出されなかったヌル分離個体。

3) 目視により薬害及び枯死が認められなかった個体を耐性と判定した。

また、前述のとおり（第一.2. (3) .ハ.①、23 ページ）、本組換えトウモロコシが *pmi* 遺伝子によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性を有することが確認されている。

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宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無を確認するため、本組換えトウモロコシの F₁ 世代（図 3、23 ページ）及び対照として同様の遺伝的背景を有する非組換えトウモロコシ PHEJW×PHR03 系統を米国のほ場において栽培し、比較した（添付資料 14 及び 15）⁷⁾。形態及び生育の特性（第一.2.

⁶⁾ active ingredient（活性主成分）

⁷⁾ 本組換えトウモロコシについては、令和 4 年度第 2 回生物多様性影響評価総合検討会（令和 5 年 3

(6) .②.a、30ページ) については、2021年に米国のアイオワ州、イリノイ州及びネブラスカ州各2か所、インディアナ州、ミズーリ州、ペンシルバニア州及びテキサス州各1か所並びにカナダのオンタリオ州2か所の計12か所のほ場で調査した(添付資料14)。また、その他の特性については、2021年～2022年にアイオワ州のほ場1か所において調査した(添付資料15)。各ほ場あたり4反復で栽培し、統計解析により測定値を比較した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として発芽苗数、雄穂開花までの日数、稈長、成熟までの日数、倒伏率、最終株数、脱落雌穂数、子実の含水率、収量及び子実の百粒重の調査結果を評価した(添付資料 14)。その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった(添付資料 14 の Table 17、31 ページ)。

b 生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性を人工気象室において評価した。22℃で2葉期まで育成した本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを、4℃で約2週間生育させた後、低温障害を目視により評価した。試験は4反復で実施し、反復あたりそれぞれ4個体を栽培した。その結果、いずれの個体にも萎凋及び発育不全が認められ、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に違いは認められなかった(添付資料 15 の Table 6、15 ページ)。

c 成体の越冬性

2021年5月24日には場に播種した本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの状態を、成熟後の2021年11月4日に目視により評価した。試験は4反復で実施し、反復あたりそれぞれ8個体を観察した。その結果、いずれの個体も枯死しており、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に違いは認められなかった(添付資料 15 の Table 6、15 ページ及び Appendix B、18 ページ)。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの花粉の充実度及び長径を検鏡した。花粉の充実度については、ヨード・ヨードカリ液染色により評価した。試験は4反復で実施し、反復あたりそれぞれ花粉100個以上を用いて染色率を算出した。また、長径の計測についても4反復で実施し、反復あたりそれぞれ花粉8個を調査した。その結果、いずれの項目についても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められ

月17日開催)において、「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、林野庁長官、環境省自然環境局長通知)第3の(6)に規定される隔離ほ場での情報収集(隔離ほ場試験)は不要と判断されている。

なかった(添付資料 15 の Table 5 及び Table 6、14～15 ページ並びに Appendix A、17 ページ)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

5 種子の生産量について、形態及び生育の特性における収量を用いて評価した。第一.2. (6) .②.a (30 ページ)に記載したとおり、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった(添付資料 14 の Table 17、31 ページ)。

10 脱粒性について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシのいずれについても、収穫時に種子の脱粒が認められたとの報告はなかった。

15 休眠性及び発芽率について、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシから収穫した種子を湿潤状態で 6 日間、23℃で静置した際の発芽率により評価した。試験は 4 反復で実施し、反復あたりそれぞれ 100 粒を調査した。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった(添付資料 15 の Table 6、15 ページ)。

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、交雑率の調査は行わなかった。

g 有害物質の産生性

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

後作試験：

30 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを完熟期まで栽培し、根圏土壌を採取した。採取した土壌を用いて検定植物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した。調査は各土壌 4 反復で実施し、発芽率については反復あたり 24 粒、乾物重については反復あたり 8 株を調査した。その結果、発芽率及び乾物重のいずれについても、本組換えトウモロコシ栽培後土壌と非組換えトウモロコシ栽培後土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった(添付資料 15 の Table 5 及び Table 6、14 及び 15 ページ)。

35

鋤込み試験：

40 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの完熟期の植物体を含む土壌で検定植物のハツカダイコンを栽培し、発芽率及び乾物重を調査した。試験は各土壌 4 反復で実施し、発芽率については反復あたり 24 粒、乾物重については反復あたり 8 株を調査した。その結果、発芽率及び乾物重のいずれについても、本組換えトウモロコシ鋤込み土壌と非組換えトウモロコシ鋤込み土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった(添付資料 15 の Table 5 及び Table 6、14 及び 15 ページ)。

土壌微生物相試験：

5 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシを栽培した後の根圏土壌における微生物数（細菌数、放線菌数及び糸状菌数）を計測した。試験は 4 反復で実施した。その結果、いずれの微生物数についても、本組換えトウモロコシ栽培後土壌と非組換えトウモロコシ栽培後土壌との間に統計学的有意差 ($P<0.05$) は認められなかった（添付資料 15 の Table 7、15 ページ）。

10

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

10 —

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

15 —

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

20

緊急措置計画書を参照。

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

25

—

30

- (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状況は、表 8 (34 ページ) のとおりである。

35

表 8 国外における申請状況

(2024 年 9 月現在)

申請国	目的	申請/承認年月			申請先
米国	無規制栽培	(社外秘情報につき非開示)		申請	米国農務省 (USDA)
	食品・飼料としての利用	2024 年	7 月	確認終了	米国食品医薬品庁 (FDA)
	発現蛋白質の許容値設定免除	(社外秘情報につき非開示)		申請	米国環境保護庁 (EPA)
カナダ	環境安全性、飼料としての利用	2024 年	7 月	承認	カナダ食品検査庁 (CFIA)
	食品としての利用	2024 年	7 月	承認	カナダ保健省機関 (HC)
欧州	輸入	(社外秘情報につき非開示)		申請	欧州食品安全機関 (EFSA)
韓国	食品としての利用	(社外秘情報につき非開示)		申請	食品医薬品安全処 (MFDS)
	飼料としての利用	(社外秘情報につき非開示)		申請	韓国農村振興庁 (RDA)
オーストラリア・ニュージーランド	輸入	2024 年	2 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)

- 5 なお、我が国においては、飼料としての安全性の確認申請を 2023 年 6 月に農林水産省に行った。また、食品としての安全性の確認申請を 2024 年 8 月に消費者庁に行った。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

本組換えトウモロコシには、IPD072Aa 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性、PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性及び PMI 蛋白質によるマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性が付与されているが、いずれも上記特性に関与する形質ではない。したがって、これら付与された形質により本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになるとは考え難い。

実際に、米国のほ場における栽培結果等をもとに、競合における優位性に関わる諸特性 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ並びに種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) について本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシを比較した結果、いずれの特性についても両者の間に相違は認められなかった (第一.2. (6) .②、29 ページ)。

したがって、これら付与された形質により本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになることはなく、競合における優位性が高まることもないと考えられた。

以上のことから、本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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

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。

5

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

10

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

15

本組換えトウモロコシは IPD072Aa 蛋白質によりコウチュウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を示す（第一.2. (1) .ロ.②、18 ページ）。一方、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質及びマンノースを炭素源として含む培地における選抜マーカー特性を付与する PMI 蛋白質が野生動植物に有害性を示すとの報告は無い。

20

これらの蛋白質のうち、IPD072Aa 蛋白質はコウチュウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、当該細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられているが、酵素として機能するとの報告はない。加えて、IPD072Aa 蛋白質は既知の酵素蛋白質のモチーフ又はドメイン等との相同性を有しておらず、酵素活性を有する可能性は低い。また、酵素である PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない。PMI 蛋白質も基質特異性を有し、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒するが、他の天然基質は知られていない。さらに、これらの蛋白質の作用機作は互いに独立していると考えられることから、相互に影響する可能性は低い。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝経路に作用して意図しない有害物質を産生するとは考え難い（第一.2. (1) .ロ.③、18 ページ）。

30

実際に、米国のほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、いずれの調査においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった（第一.2. (6) .②.g、31 ページ）。

35

また、IPD072Aa 蛋白質は既知アレルゲンとの間に有意な相同性を有しておらず、アレルギーを誘発する可能性は低い。PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質についても、これらの蛋白質を産生するトウモロコシは既に商業化され安全に使用されており、これまでにアレルギー誘発性を示したとの報告はない（第一.2. (1) .ロ.②.b、17 ページ）。

40

なお、グルホシネート散布時、PAT 蛋白質により N-アセチル-L-グルホシネートが産生される。しかしながら、本代謝産物の動物に対する毒性はグルホシネートより低く（食品安全委員会、2013）、農薬取締法の下、グルホシネートの分析対象化合物の一つとしてトウモロコシにおける残留基準値が定められ、農薬登録により安全な使用方法が定められ、人畜及び環境に対する安全性が確保されている（日

本食品化学研究振興財団, 2020)。加えて、自然環境下では当該除草剤の散布は想定されない。

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

さらに、特に影響を受けやすいコウチュウ目昆虫として、種としての存続が危惧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が考えられた。また、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、本組換えトウモロコシから飛散した花粉の付着した食草を摂食する場合と、本組換えトウモロコシの植物体を直接摂食する場合が考えられた。しかしながら、本組換えトウモロコシの栽培中に植物体を直接摂食することでコウチュウ目昆虫が受ける影響は、トウモロコシの慣行栽培における殺虫剤散布等の防除によって受ける影響を超えるものではないと考えられる⁸⁾。そのため、本組換えトウモロコシの植物体を直接摂食することでコウチュウ目昆虫が影響を受ける経路は、栽培後に鋤込まれた植物体を腐植質とともに摂食する場合に限定される。

15 これらのことから、山本ら（2003）の評価手法を参考に、環境省のレッドリスト⁹⁾に絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として掲載されているコウチュウ目昆虫のうち、本組換えトウモロコシから飛散した花粉を摂食すること又は土壤に鋤込まれた本組換えトウモロコシの植物体を腐植質とともに摂食することにより影響を受ける可能性のある種を検討した結果、生息地及び食餌の点から 4 種が特定された（表 9、38 ページ）。

⁸⁾ 国内において、トウモロコシ（子実）を適用作物とする殺虫剤として登録、利用されているダイアジノン粒剤や MEP 乳剤等は、コウチュウ目昆虫を含む広範囲の害虫に対して殺虫活性を示す（農林水産消費安全技術センター, 2021a; 2021b）。

⁹⁾ <https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>

表 9 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。

主な参考文献：

- 5 大林延夫, 新里達也共編. (2007). 日本産カミキリムシ. 東海大学出版会.
環境省. (2020). 環境省レッドリスト 2020.
(<https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>)
Accessed May, 2023
野尻湖昆虫グループ. (1985). アトラス・日本のネクイハムシ—化石同定への手引き—. 野尻湖昆虫グループ.
10 林成多. (2005). “日本産ネクイハムシ図鑑—全種の解説—”. 月刊むし 408. むし社.
林成多. (2012). 日本のネクイハムシ. むし社.

(2) 影響の具体的内容の評価

- 15 生物検定の結果、IPD072Aa 蛋白質の殺虫活性はコウチュウ目昆虫に特異的であったが、感受性は種によって異なっていた（第一.2. (1) .ロ.②、14 ページ；表 3、16 ページ）。検定に用いたコウチュウ目昆虫のうち、IPD072Aa 蛋白質の標的害虫である WCR に対する LC₅₀ 値は 26 ppm であった。
- 20 なお、特定された4 種のコウチュウ目昆虫の IPD072Aa 蛋白質に対する感受性は調査されていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

特定されたコウチュウ目昆虫 4 種が自然環境下で本組換えトウモロコシに個体群レベルで暴露される経路として、当該コウチュウ目昆虫の幼虫が、本組換えトウモロコシの栽培ほ場から飛散した花粉を食草と共に摂食する場合及び土壌中に鋤込まれた本組換えトウモロコシの植物体を腐植質と共に栽培ほ場外において摂食する場合が考えられた。

栽培ほ場外に飛散するトウモロコシの花粉量はほ場からの距離に応じて減少することが確認されており（第一.1. (3) .二.④、6 ページ）、我が国における調査としては、栽培ほ場から 10 m 離れたヒマワリの葉上に堆積する花粉量は 10 粒/cm² 以内との報告がある（Shirai and Takahashi, 2005）。また、植物体については、栽培後の鋤込みによりほ場及びその周辺の土壌中で分解される。よって、本組換えトウモロコシの花粉又は土壌中に鋤込まれた植物体が、これら特定された 4 種のコウチュウ目昆虫に継続的に摂取される可能性が生じ得るのは、本組換えトウモロコシの栽培ほ場周辺に限られる。

しかしながら、特定された 4 種のコウチュウ目昆虫のうちアオノネクイハムシ、アカガネネクイハムシ及びキンイロネクイハムシは生息環境が湿地や池等の水際であり、オキナワサビカミキリは竹類以外のイネ科から得られた記録がない。したがって、いずれもトウモロコシ栽培地という限定された環境を主要な生息地とする種ではないと考えられる（農林水産省, 2013; 表 9、38 ページ）。

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主であるトウモロコシが我が国において野生化した事例はなく、また交雑可能な近縁野生種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の自生も報告されていない。このため、本組換えトウモロコシの交雑性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

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。

4 その他の性質

15

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

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

5

競合における優位性：

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

10 本組換えトウモロコシには IPD072Aa 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性、PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性及び PMI 蛋白質による選抜マーカー特性が付与されているが、いずれも上記特性に関与する形質ではない。したがって、これら付与された特性により本組換えトウモロコシが我が国の自然環境下で自生するようになるとは考え難い。

15 実際に、米国のほ場における栽培結果等をもとに、本組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸特性（形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）について評価を行った結果、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。

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

20

有害物質の産生性：

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

25 本組換えトウモロコシ中に産生される IPD072Aa 蛋白質は特定のコウチュウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を示す。また、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質については、野生動植物に対する有害性は報告されていない。

30 これらの蛋白質のうち、IPD072Aa 蛋白質はコウチュウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、当該細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられているが、酵素として機能するとの報告はない。加えて、IPD072Aa 蛋白質は既知の酵素蛋白質のモチーフ或いはドメイン等との相同性を有しておらず、酵素活性を有する可能性は低い。また、酵素である PAT 蛋白質は基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない。PMI 蛋白質も基質特異性を有し、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒するが、他の天然基質は知られていない。さらに、これらの蛋白質の作用機作は互いに独立していることから、相互に影響する可能性は低い。よって、これらの蛋白質が宿主の代謝経路に作用して意図しない有害物質を産生するとは考え難い。

35 実際に、米国のほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの調査においても本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

40 以上のことから、本組換えトウモロコシの有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等としてコウチュウ目昆虫が特定された。さらに、我が国に生息する絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているコウチュウ目昆虫のうち、

本組換えトウモロコシの花粉又は鋤込まれた植物体を腐植質とともに摂取することにより影響を受ける可能性のある野生動植物等として4種が特定された。

- 5 トウモロコシの花粉の飛散数はほ場から10 m離れると極めて少なく(≤ 10 粒/cm²)、植物体は栽培後の鋤込みによりほ場及びその周辺の土壌中で分解されるため、本組換えトウモロコシの花粉や植物体の暴露は、ほ場周辺に限られる。一方、生息地や食草の点から、特定された4種のコウチュウ目昆虫種がトウモロコシ栽培ほ場周辺に局所的に生息している可能性は低いと考えられる。したがって、本組換えトウモロコシの飛散した花粉を食草と一緒に摂食又は植物体を腐植質とともに摂食することにより、
10 特定されたコウチュウ目昆虫種が個体群レベルで影響を受ける可能性は低いと考えられた。

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

交雑性：

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

- 20 以上のことから、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *The Plant Cell* 1: 115-122.
- Abbitt, S.E. and Shen, B., inventors. (2016). Maize and sorghum s-adenosyl-homocysteine hydrolase promoters. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2016109157.
- Abbitt, S.E., inventor. (2017). SB-UBI terminator sequence for gene expression in plants. United States Patent. Patent No. US 9725731 B2.
- Boeckman, C.J., Huang, E., Sturtz, K., Walker, C., Woods, R. and Zhang, J. (2019). Characterization of the Spectrum of Insecticidal Activity for IPD072Aa: A Protein Derived from *Pseudomonas chlororaphis* with Activity Against *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 112: 1190-1196.
- Bhyri, P., Krishnamurthy, N., Narayanan, E., Nott, A. and Sarangi, R.R., inventors. (2018). Plant terminator sequences. United States Patent, Patent No. US 10,059,953 B2.
- Brink, K., Anitha, S., Beatty, M., Anderson, J.A., Lyon, M., Weaver, J. and Dietrich, N. (2019). Comparison of Southern-by-Sequencing (SbS™) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. *Journal of Regulatory Science*. 7: 1-14.
- CFIA. (2012). The biology of *Zea mays* (L.) (maize). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367>). Accessed on January 18th, 2024.
- Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Research*. 14: 2111-2120.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 18: 675-689.

- Clontech. (2001). Living Colors™ DsRed2: Improved red fluorescent protein for use in living cells. Clontechniques. 16: 2-3.
- 5 CODEX. (2003). Proposed draft annex on the assessment of possible allergenicity of the draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Codex Alimentarius Commission. Alinorm 03/34, Appendix IV. pp.57-60.
- 10 Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene. 91: 79-85.
- 15 de Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P. and Leite, A. (1994). Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. Molecular and General Genetics. 245: 177-186.
- 20 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics. 1: 561-573.
- 25 Diehn, S., Lu, A.L. and Simmons, C.R., inventors. (2012). Viral promoter, truncations thereof, and methods of use. United States Patent. Patent No. US 8,338,662 B2.
- 30 Dong, J., Feng, Y., Kumar, D., Zhang, W., Zhu, T., Luo, M.C. and Messing, J. (2016). Analysis of tandem gene copies in maize chromosomal regions reconstructed from long sequence reads. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113: 7949-7956.
- 35 Dymecki, S.M. (1996). A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. Gene. 171: 197-201.
- Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. Molecular and General Genetics. 205: 14-22.
- 40 FAO/WHO. (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology 22-25 January 2001. p10.

FAO. (2024). FAOSTAT.
(<http://www.fao.org/faostat/en/#home>).
Accessed on January 18th, 2024.

- 5 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the
transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3" (9)-
O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.
- 10 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide
sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.
- 15 Freeze, H. H. (2002). Phosphomannose isomerase. *Handbook of
glycosyltransferases and related genes*. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K.
and Fukuda, M., Eds. Springer-Verlag, Tokyo and New York: pp. 595-599.
- 20 Gordon-Kamm, W.J., Helentjaris, T.G., Lowe, K.S., Shen, B., Tarczynski, M.C. and
Zheng, P., inventors. (2013). AP2 domain transcription factor ODP2 (ovule
development protein 2) and methods of use. United States Patent. Patent No.
US 8420893.
- 25 Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982).
Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter
sequences, and characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.
- 30 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro
site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.
- 35 Jiménez-Juárez, N., Oral, J., Nelson, M.E. and Lu, A.L. (2023). IPD072Aa from
Pseudomonas chlororaphis Targets Midgut Epithelial Cells in Killing
Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Applied and
Environmental Microbiology*. 89(3): e01622-22.
- 40 Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C. and Olsen, O.-A.
(1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative
7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in
transgenic rice. *The Plant Journal*. 6: 849-860.
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating
system. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2: 571-589.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S
promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*. 236:
1299-1302.

- Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14(14): 5641-5650.
- 5 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*. 10: 165-174.
- 10 Lowe, K.S., Cahoon, R.E., Scelonge, C.J., Tao, Y., Gordon-Kamm, W.J., Bruce, W.B. and Newman, L.J., inventors. (2007). *Wuschel* (WUS) Gene Homologs. United States Patent. Patent No. US 7256322.
- 15 Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M.-J., Scelonge, C., Lenderts, B., Chamberlin, M., Cushatt, J., Wang, L., Ryan, L., Khan, T., Chow-Yiu, J., Hua, W., Yu, M., Banh, J., Bao, Z., Brink, K., Igo, E., Rudrappa, B., Shamseer, P., Bruce, W., Newman, L., Shen, B., Zheng, P., Bidney, D., Falco, C., Register, J., Zhao, Z.-Y., Xu, D., Jones, T. and Gordon-Kamm, W.
- 20 (2016). Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *The Plant Cell*. 28: 1998-2015.
- Luna, S.V., Figueroa, J.M., Baltazar, B.M., Gomez, R.L., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for
- 25 effective pollen control. *Crop Science*, 41, 1551-1557.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*. 95: 805-815.
- 30 NCGA. (2023). World of Corn 2023.
(<https://ncga.com/world-of-corn-iframe/pdf/WOC-2023.pdf>)
Accessed on January 18th, 2024.
- 35 Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. and Hansen, G. (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*. 19: 798-803.
- 40 OECD. (1999). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.

(<https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf>)

Accessed on November 6th, 2023.

- 5 OECD. (2002). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology,
No. 25. MODULE II: PHOSPHINOTHRICIN. ENV/JM/MONO(2002)14.
(<http://www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf>)
Accessed on November 6th, 2023.
- 10 OECD. (2003). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology,
No. 27: Consensus Document of the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).
ENV/JM/MONO(2003)11.
(<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815758.pdf>).
Accessed on January 18th, 2024.
- 15 Oleson, J.D., Park, Y.-L., Nowatzki, T.M. and Tollefson, J.J. (2005). Node-injury
scale to evaluate root injury by corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae).
Journal of Economic Entomology. 98(1): 1-8.
- 20 Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E.,
Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, P and Jones, G. D. (2001). Corn pollen
deposition on milkweeds in and near cornfields. Proceedings of the National
Academy of Sciences. 98: 11919-11924.
- 25 Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA
sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP
protein of yeast in vitro. Nucleic Acids Research. 14(2): 4787-4802.
- 30 Schellenberger, U., Oral, J., Rosen, B.A., Wei, J.-Z., Zhu, G., Xie, W., McDonald,
M.J., Cerf, D.C., Diehn, S.H., Crane, V.C., Sandahl, G.A., Zhao, J.-Z.,
Nowatzki, T.M., Sethi, A., Liu, L., Pan, Z., Wang, Y., Lu, A.L., Wu, G. and
Liu, L. (2016). A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for
controlling corn rootworms. Science. 354: 634-637.
- 35 Shirai, Y. and Takahashi, M. (2005). Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-
target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. Applied Entomology and
Zoology. 40 (1): 151-159.
- 40 Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT
recombination sites and methods of use. World Intellectual Property
Organization. Application No.PCT/US2006/027380.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Puhler, A.
(1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene

from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene. 70(1): 25-37.

- 5 Wych, R.D. (1988). Production of hybrid seed corn. In G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.), Corn and Corn Improvement (3rd ed.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc.: 565-607.
- 10 Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains-nucleotide-sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33: 103-119.
- 15 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant Genome. 8: 1-15.
- 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.
- 20 菊池一徳. (1987). “トウモロコシの生産と利用”. 光琳. 東京.
- 後藤秀俊, 黒川俊二, 笠井美恵子, 福田美雪, 高橋靖幸, 井上公一, 中井秀一, 山根精一郎, 津田麻衣, 大澤良. (2018). 遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察. 育種学研究. 20: 105-114.
- 25 財務省. (2024). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on January 18th, 2024.
- 30 食品安全委員会. (2013). 農薬評価書 グルホシネート (第3版).
(<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20130612154&fileId=201>).
Accessed on August 1st, 2023.
- 35 瀧澤康孝. (2001). “子実用トウモロコシの栽培” 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 千藤茂行. (2001). “トウモロコシの品種生態 IV 採種”. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 40 戸澤英男. (2005). “トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—”. 農山漁村文化協会. 東京.

- 中村茂文. (2001a). “生育のステージと生理, 生態 I 種子と発芽” 転作全書 第三卷 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 中村茂文. (2001b). “生育のステージと生理, 生態 III 生殖生長期の生理、生態”. 転作
5 全書 第三卷 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. 愛媛.
- 10 日本食品化学研究振興財団. (2020). 農薬等の基準値 品目名：グルホシネート.
(http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=18900).
Accessed on August 1st, 2023.
- 15 農林水産省. (2013). 第 4 次レッドリストの改訂に伴う評価の確認について. 平成 24
年度第 7 回生物多様性影響評価検討会総合検討会.
(https://warp.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/10262996/www.s.affrc.go.jp/docs/committee/diversity/130228/pdf/siryo_9.pdf).
Accessed on January 16th, 2024.
- 20 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.
(http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/pdf/maize_25.pdf).
Accessed on January 18th, 2024.
- 25 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/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-63.pdf>).
Accessed on January 18th, 2024.
- 30 農林水産省. (2023a). 令和 4 年産作物統計（普通作物・飼料作物・工芸農作物）. 令
和 5 年 8 月 31 日公表.
([https://www.e-stat.go.jp/stat-](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001200060&stat_infid=000040091946&tclass4val=0)
35 [search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001200060&stat_infid=000040091946&tclass4val=0](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032288&tclass2=000001032753&tclass3=000001200060&stat_infid=000040091946&tclass4val=0)).
Accessed on January 18th, 2024.
- 40 農林水産省. (2023b). 令和 4 年産野菜生産出荷統計. 令和 5 年 12 月 25 日公表.
([https://www.e-stat.go.jp/stat-](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001212604&stat_infid=000040128922&tclass4val=0)
[search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001212604&stat_infid=000040128922&tclass4val=0](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20220&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001212604&stat_infid=000040128922&tclass4val=0)).

Accessed on January 18th, 2024.

農林水産省. (2024). 飼料をめぐる情勢（イラスト版）. 令和 6 年 3 月.
(https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/).

5 Accessed on March 19, 2024.

農林水産消費安全技術センター. (2021a). ダイアジノン農薬抄録.
(<https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/diazinon/index.htm>)
10 Accessed on January 11th, 2024.

農林水産消費安全技術センター. (2021b). MEP（フェニトロチオン）農薬抄録.
(<https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fenitrothion/index.htm>).
15 Accessed on January 23rd, 2024.

15 山田実. (2001a). “トウモロコシの起源と特性 I 植物としての分類、類縁関係”. 転作
全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.

山田実. (2001b). “トウモロコシの起源と特性 II 栽培の起源と分布”. 転作全書 第三
巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.

20 山本勝利, 大黒俊哉, 松村雄. (2003). “III. 農業環境技術研究所における Bt トウモロ
コシ緊急調査. 5. わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロ
コシ花粉の影響評価”. 農業環境研究叢書. 第 14 号. 独立行政法人農業環境技術
研究所. 茨城.

25

緊急措置計画書

令和 6 年 3 月 29 日

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

10 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*ipd072Aa, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP51291, OECD UI: DP-Ø51291-2) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)の第一種使用等において、今後、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

15

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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

20

(個人名・所属は個人情報につき非開示)

25 2 第一種使用等の状況の把握の方法

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

30 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

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

40 また、必要に応じて、弊社のホームページ等、国内の適切な媒体を通して、一般に広く知らせる。

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

5 本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、弊社は、米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社とともに、我が国向けに輸出している穀物取扱業者、種子取扱業者及び我が国の栽培者等に対して本件を連絡する等の適切な措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

10

本組換えトウモロコシが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的に認められた場合、弊社は、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

15

添付資料（社外秘）

1. Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP74638 (STUDY NUMBER: PHI-2021-146).
2. Environmental Risk Assessment for the Cultivation of Maize Containing Event DP-Ø51291-2: U.S. (STUDY NUMBER: PHI-2022-163).
3. Estimation of IPD072Aa protein NOEC against WCR.
4. Comparison of the Amino Acid Sequence of the IPD072Aa Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens (STUDY NUMBER: PHI-2021-123_202).
5. Overview of Process to Generate Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-R139-Y21).
6. Confirmation of the Absence of Agrobacterium Backbone Regions for Maize Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-R054-Y21).
7. Segregation Analysis and Tissue Production of Multiple Maize Generations Containing Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-2018-035).
8. Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-Ø51291-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2022-120).
9. Characterization of DP-Ø51291-2 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2022-064).
10. Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-034_700).
11. Expression Analysis of Multiple Maize Generations Containing Events DP-ØØ8131-6 and IDP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-R007-Y18).
12. Development and Validation of an Event-Specific Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Detection Method for Maize Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-2022-092_700).
13. Field-Based Corn Rootworm Efficacy of Maize Containing Event DP-Ø51291-2 from the 2021 Growing Season (STUDY NUMBER: PHI-R122-Y21).

14. Agronomic Characteristics and Nutrient Composition of a Maize Line Containing Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-035_001).

5 15. Japan Stage-3 Field and Controlled Environment Testing Maize Event DP-Ø51291-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-107).