

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 *dmo, pat, ft_t*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI: MON-87429-9) 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	7
イ 基本的特性	7
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	7
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	8
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	9
ホ 病原性	10
ヘ 有害物質の産生性	10
ト その他の情報	10
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	12
イ 構成及び構成要素の由来	12
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	15
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	26
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	30
(2) ベクターに関する情報	36
イ 名称及び由来	36
ロ 特性	36
① ベクターの塩基数及び塩基配列	36
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	36
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	36
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	36
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	36
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	37
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	37
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	37
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	37
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	37
(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	40
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	40
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	42
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	46
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	46
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物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	51

(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.....	51
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	51
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.....	51
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.....	52
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	53
(1) 使用等の内容.....	53
(2) 使用等の方法.....	53
(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.....	54
(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.....	55
(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.....	55
(6) 国外における使用等に関する情報.....	55
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	57
1 競合における優位性.....	57
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	57
(2) 影響の具体的内容の評価.....	57
(3) 影響の生じやすさの評価.....	57
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	58
2 有害物質の産生性.....	58
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	58
(2) 影響の具体的内容の評価.....	59
(3) 影響の生じやすさの評価.....	59
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	59
3 交雑性.....	59
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	59
(2) 影響の具体的内容の評価.....	59
(3) 影響の生じやすさの評価.....	60
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	60
4 その他の性質.....	60
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	61

参考文献.....	63
緊急措置計画書.....	71
隔離ほ場試験計画書.....	73
別添資料リスト.....	86

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

平成 30 年 6 月 20 日

5 農林水産大臣 齋藤 健 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役 ダビッド・ブランコ 印
住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ (改変 <i>dmo, pat, ft_t</i> , 改変 <i>cp4 epsps, Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87429, OECD UI : MON-87429-9)
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：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 36 年 5 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、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及び管理責任者の氏名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照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照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。

	<ul style="list-style-type: none">(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

10

① 和名、英名及び学名

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

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 LH244 である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

25

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

30

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
5 5
と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001; 戸澤, 2005)。1492 年のコロンブスの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 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、2016 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9 千万 ha であり、上位国は、中国 3,895 万 ha、米国 3,511 万 ha、ブラジル 1,496 万 ha、インド 1,020 万 ha、メキシコ 760 万 ha
25 25
である (FAO, 2017)。

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、2016 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 3,400ha で (農林水産省, 2017a)、2015 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,000ha である (農林水産省, 2017b)。
30 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。

5 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。

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

15 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種 (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

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

25 わが国では、2017 年に約 1,531 万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約 1,012 万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる (財務省, 2018)。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている (農林水産省, 2018)。

30 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

5

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

10 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)。

15 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)。

20 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

25

—

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

30

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)。

35 種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い (戸澤, 2005)。氷点下

の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45℃以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている (Wych, 1988)。

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

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

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

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

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

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

なお、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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

5 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)。

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)。

15 受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である(戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐため隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400mとされている(千藤, 2001)。

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

25 また、北米でも全7ヵ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ1,700本以上のトウワタ(*Asclepias syriaca*)を用いて花粉堆積密度の調査が行われている(Pleasant et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から1m、2m、4~5m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。

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

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

—

5 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または生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

10 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, 2017c)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

20 モンサント・カンパニーは、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うこと及び雑草防除のために複数の除草剤に対する耐性を付与することを目的として、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ(改変*dmo*, *pat*, *ft_t*, 改変*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87429, 25 OECD UI: MON-87429-9) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を作出した。

本組換えトウモロコシには改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質により、除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性が付与されている。トウモロコシを含む単子葉植物で花粉における低い活性が報告されている 35S プロモーター (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 30 2005) と雄性組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列により、本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉では発現しないか、発現してもその量はわずかである(表 6, p50)。一方で、本組換えトウモロコシの栄養組織及び雌性組織では、除草剤グリホサート耐性を付与する (Yang et al., 2018 の 35 Figure 3D) のに十分な量の改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現している。

5 上述のように、本組換えトウモロコシの花粉では改変 CP4 EPSPS 蛋白質は
発現しないか、発現してもその量はわずかであり、除草剤グリホサートを本
組換えトウモロコシの雄穂形成初期 (8 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 頃) に 2
10 回散布すると、稔性を有する花粉の形成が阻害される (Yang et al., 2018 の
Figure 3H)。なお、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の組織特異的な発現様式を利用した
遺伝子組換え作物で、同様に除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤
グリホサート耐性の形質をもつ遺伝子組換えトウモロコシが、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 (除草剤グリホサート誘発
10 性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (MON87427, OECD UI:
MON-87427-7) (承認日 : 2013 年 5 月 23 日))。この系統は、第一種使用等の内
容で使用した場合、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。

15 この本組換えトウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用するこ
とにより、図 1 (p12) に示すように本組換えトウモロコシからハイブリッド品
種の種子を効率的に生産することが可能となる。

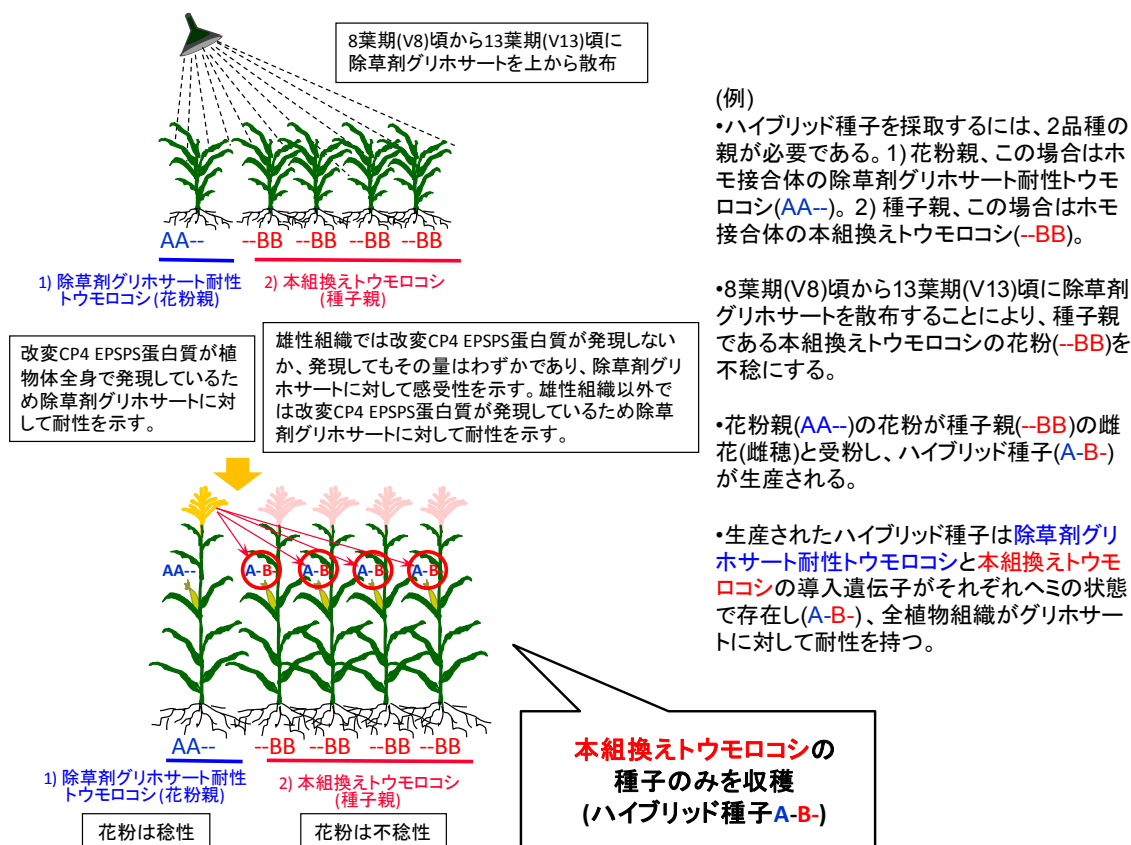


図1 本組換えトウモロコシを用いた効率的なハイブリッド種子の採種方法¹

AA- (花粉親) の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、-BB (種子親) で用いられている 35S プロモーターと異なり、恒常的な転写を誘導するプロモーターである。このため、AA- (花粉親) では改変 CP4 EPSPS 蛋白質が雄性組織を含め植物体全身で発現する。

本組換えトウモロコシには改変 *dmo* 遺伝子から発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。また、*pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質により、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。さらに、*ftt* 遺伝子から発現する FT_T 蛋白質によりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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 5 (p21) 及び表 1 (p22~25) に示した。

5 本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノ
オキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO 蛋白質」とする。) の
アミノ酸配列は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質
の アミノ酸配列と比較して、葉緑体輸送ペプチド APG6 の切断を容易にする
10 目的で N 末端側から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されてい
る。よって、本組換えトウモロコシに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺
伝子」とする。また、本組換えトウモロコシでは、改変 *dmo* 遺伝子発現カセ
ットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、APG6 由来
15 のアミノ酸が全て切り離されたもの及び APG6 由来の 1 アミノ酸 (システイン)
が N 末端に付加されたものの 2 種類の改変 DMO 蛋白質が生じる。本組換え
トウモロコシで発現するこれら 2 種類の改変 DMO 蛋白質を「改変 MON87429
20 DMO 蛋白質」と総称する。なお、一般的に輸送ペプチドは、前駆蛋白質を目
的の葉緑体へ輸送した後、正確に切り離されるが (Della-Cioppa et al., 1986)、
輸送ペプチドの一部が残った状態の蛋白質が葉緑体に存在する例も報告され
ている (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007)。

20 本組換えトウモロコシに導入された *pat* 遺伝子から発現するホスフィノス
リシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (phosphinothricin *N*-acetyltransferase: 以
下、「PAT 蛋白質」とする。) のアミノ酸配列は、プロセッシングにより N 末
端側から 1 番目のメチオニンが取り除かれている以外、*Streptomyces*
viridochromogenes 由来の野生型 PAT 蛋白質と同一のものである (以下、「PAT
25 蛋白質」とする。)。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くの蛋白
質で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。

30 本組換えトウモロコシには、土壌細菌 *Sphingobium herbicidovorans* 由来の
R-2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子 (R-2,4-
Dichlorophenoxypropionate dioxygenase, *Rdpa*) を改変したものが導入されている。
この改変 *Rdpa* 遺伝子から発現する蛋白質のアミノ酸配列は、酵素反応速度を
上げ、同時にトウモロコシ栽培地域の夏季の気温による影響を受けずに蛋白

質が活性を保つように改変され (別添資料 10 の Table 1 及び Figure 4)、野生型 RdpA 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、30 カ所のアミノ酸置換²がある。この改変 *Rdpa* 遺伝子から発現する蛋白質は **F**OPs and **T**wo, Four-D (2,4-D) tolerant, variant **T** (以下、「FT_T 蛋白質」とする。) と呼ばれている (別添資料 10)。よって、本組換えトウモロコシに導入された改変 *Rdpa* 遺伝子を「*ft_t* 遺伝子」、発現する蛋白質を「FT_T 蛋白質」とする。なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する FT_T 蛋白質の推定アミノ酸配列と、野生型 RdpA 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は約 89%である。また、本組換えトウモロコシでは、*ft_t* 遺伝子発現カセットから発現する前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、葉緑体輸送ペプチド MDH 由来の 1 アミノ酸 (アラニン) が N 末端に付加されている。なお、前述したとおり、一般的に輸送ペプチドは、前駆蛋白質を目的の葉緑体へ輸送した後、正確に切り離されるが (Della-Cioppa et al., 1986)、輸送ペプチドの一部が残った状態の蛋白質が葉緑体に存在する例も報告されている (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007)。

本組換えトウモロコシに導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。よって、本組換えトウモロコシに導入された *cp4 epsps* 遺伝子を「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。

本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 MON87429 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質、FT_T 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

² 30カ所の置換場所について、開始コドンに相当するメチオニンを1番目として、アミノ酸の位置を示した。6番目のセリンがトレオニン、9番目のセリンがトレオニン、10番目のグルタミンがアスパラギン、11番目のアルギニンがリシン、12番目のフェニルアラニンがチロシン、13番目のグルタミン酸がアルギニン、14番目のアルギニンがフェニルアラニン、16番目のアラニンがアスパラギン酸、82番目のロイシンがイソロイシン、103番目のグリシンがセリン、105番目のバリンがフェニルアラニン、130番目のアスパラギン酸がグルタミン酸、134番目のヒスチジンがチロシン、145番目のトレオニンがセリン、169番目のアルギニンがリシン、178番目のグルタミンがトレオニン、180番目のアルギニンがトリプトファン、209番目のグリシンがバリン、210番目のセリンがトレオニン、213番目のリシンがアルギニン、214番目のグリシンがアラニン、217番目のバリンがシステイン、224番目のアルギニンがリシン、226番目のグルタミン酸がグルタミン、235番目のプロリンがセリン、246番目のアルギニンがリシン、289番目のグリシンがアラニン、291番目のバリンがアスパラギン酸、292番目のアルギニンがリシン、294番目のアラニンがセリン。

ロ 構成要素の機能

- 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
5 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
(p22~25) に示した。

10 本組換えトウモロコシに導入された 4 つの遺伝子発現カセット (改変 *dmo*,
pat, *ft_t*, 改変 *cp4 epsps*) のうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは組織特異
的発現様式を示す。この発現様式を可能にしているのは、改変 *cp4 epsps* 遺
伝子発現カセットに存在するカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロ
15 モーター及び *mts-siRNA* の標的配列であり (図 2, p16)、本組換えトウモロコシ
中の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、花粉においては発現しないか、発現しても微
量であるのに対し、栄養組織及び雌性組織においては十分な量を発現してい
る。この CaMV 35S プロモーターによる制御と *mts-siRNA* の標的配列による制
御について、以下に記載する。

【CaMV 35S プロモーターによる制御】

20

本組換えトウモロコシの改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、CaMV 35S プロモーター
により発現する。CaMV 35S プロモーターは、一般的に目的遺伝子を全組
織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and
Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物におい
25 ては、花粉における CaMV 35S プロモーターの活性はごくわずかであること
が報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。

【mts-siRNA の標的配列による制御】

RNA 干渉 (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)、micro RNA (miRNA) 及び small interfering RNA (siRNA) により誘導される (Carthew and Sontheimer, 2009)。Yang らによって報告されているトウモロコシ内在性の雄性組織特異的低分子干渉 RNA (**male tissue specific small interfering RNA**) (以下、「mts-siRNA」という。) は、雄穂において内在性遺伝子の発現調節をしていると考えられる (Yang et al., 2018)。

本組換えトウモロコシでは、導入した改変 *cp4 epsps* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域に 201 塩基長の mts-siRNA の標的配列を付加することで (図 2, p16)、上述の内在性の mts-siRNA による RNAi 機構を利用し、雄穂で転写される改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を組織特異的に分解する。

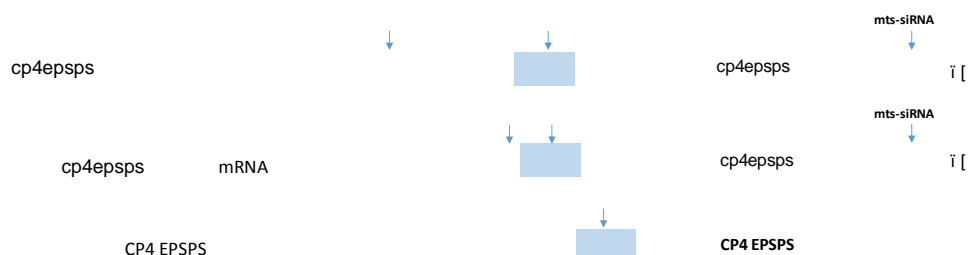


図 2 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA 及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の模式図³

本組換えトウモロコシの雄穂中で mts-siRNA がどのように改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA を分解するか作用機作を、内在性の mts-siRNA による RNAi 機構とともに図 3 (p18) の中の番号に沿って説明する。

以下の図 3 (p18) の最初の 5 つのステップは、これまでに判明している siRNA による RNAi 機構 (Gorski et al., 2017) をもとに、従来トウモロコシにおける内在性の mts-siRNA のプロセスを示している。

³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

