

絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ
(*ATHB17, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Itlis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1) の
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	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じ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	9
(1) 供与核酸に関する情報	10
イ 構成及び構成要素の由来	10
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.....	77
(2) ベクターに関する情報.....	77
イ 名称及び由来.....	77
ロ 特性.....	77
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	77
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	77
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.....	77
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	78
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	78
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	78
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	78
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	78
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.....	78
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.....	79
(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.....	81
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	81
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.....	83
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.....	87
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.....	87
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.....	90
(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.....	90
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	90
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.....	90

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.....	91
	a 形態及び生育の特性	92
	b 生育初期における低温又は高温耐性	92
	c 成体の越冬性又は越夏性	93
	d 花粉の稔性及びサイズ	93
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	93
	f 交雑率.....	94
	g 有害物質の産生性	94
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	95
(1)	使用等の内容.....	95
(2)	使用等の方法.....	95
(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	96
(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	96
(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	96
(6)	国外における使用等に関する情報.....	96
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	98
1	競合における優位性	98
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	98
(2)	影響の具体的内容の評価.....	100
(3)	影響の生じやすさの評価.....	101
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	101
2	有害物質の産生性	101
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	101
(2)	影響の具体的内容の評価.....	102
(3)	影響の生じやすさの評価.....	102
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	102
3	交雑性	102
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	102
(2)	影響の具体的内容の評価.....	103
(3)	影響の生じやすさの評価.....	103
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	103
4	その他の性質	103
第三	生物多様性影響の総合的評価	104

引用文献	106
緊急措置計画書	119
隔離ほ場試験計画書	121
別添資料リスト	136

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 26 年 2 月 24 日

5 農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 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	絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ (ATHB17, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1)
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 32 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。

	<ul style="list-style-type: none">(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)までに掲げる事項を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

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 LH244 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。

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)。

25

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は、これまでのところ報告はない。

30

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

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

地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある(OECD, 2003)。考古学的検証に基づくと、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。

5
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)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

15

・主たる栽培地域

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

20
国連食糧農業機関(FAO)によると、2010 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 6 千万 ha であり、上位国は、米国 3,536 万 ha、中国 3,495 万 ha、ブラジル 1,420 万 ha、インド 840 万 ha、メキシコ 692 万 ha である(FAOSTAT, 2014)。

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、2012 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 2,000ha で(農林水産省, 2014a)、2012 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,900ha である(農林水産省, 2013)。

・栽培方法

30
海外では、米国をはじめとする主要栽培国において、大型機械を利用した大規模栽培が行われている。

一方、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 10a 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。

5

・流通実態及び用途

世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2012 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、48.7%が飼料 (9.2%の蒸留粕を含む)、30.8%がエタノール製造、8.4%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, 2013)。

わが国では、2013 年に約 1,445 万トンのトウモロコシを輸入している (財務省, 2014)。輸入トウモロコシのうちの約 950 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。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 (配合飼料供給安定機構, 2014)。

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, 2014b)。

20 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—

25

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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

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

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

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

これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の 1.6~2.0

倍になったときに幼根（初生根又は種子根）が抽出し、子実発芽となる（戸澤, 2005）。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH 5.0~8.0 の範囲で栽培可能である（戸澤, 2005）。

5 ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

10

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

15 トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である（OECD, 2003）。

20 種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い（戸澤, 2005）。氷点下の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45 °C以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている（Wych, 1988）。

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

30

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これまでのところない。

35

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じ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)。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、
10 *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は、これまでのところ報告はない。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。
15

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、
20 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
25 (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隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400 m とされている (千藤, 2001)。
30

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 (0 m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/ cm^2 、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/ cm^2 であった (Shirai and Takahashi, 2005)。
35 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/ cm^2 、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/ cm^2 、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、
5 花粉の平均堆積密度は35.4粒/cm²、14.2粒/cm²、そして8.1粒/cm²へと減少して
いくことが明らかとなっている。

さらに、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度を調査しており、ほ場の縁から1m及び5m離れた地点での平均堆積密度は、
10 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)。

15 ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

20

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

ト その他の情報

25

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシの、わが国の畑以外での生育については、熊本県内の港湾で1個体のみ報告されている (農林水産省, 2014b)。

30 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *ATHB17* 遺伝子の導入により、絹糸抽出期 (R1) における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 (*ATHB17*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD
35 UI: MON-87403-1) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。) を開発した。

本組換えトウモロコシでは、*ATHB17* 遺伝子が転写された後、mRNA レベル

でのスプライシングを受けることでアミノ酸の一部が欠失した *ATHB17* 蛋白質 (以下、「*ATHB17Δ113* 蛋白質」という。) が発現することにより、生殖生長初期の雌穂バイオマスが増大する。なお、生殖生長初期の雌穂バイオマスは雌穂重として評価することができる。

5

トウモロコシ (*Z. mays*) では、生殖生長期に葉で生産された同化産物のほとんどが雌穂に蓄積される (Ritchie et al., 1997)。生殖生長初期に雌穂重や雌穂のサイズが増大することで、より多くの同化産物が雌穂に蓄積し、生産性の向上の機会がもたらされる。このことは、生殖成長初期の雌穂重と収穫期の種子数との間に正の相関があること (Fisher and Palmer, 1983; Severini et al., 2011) により示唆されている。

10

なお、本組換えトウモロコシは、より安定した多収性品種の開発を目的として、将来的に多収性の非組換え優良品種や他の組換え系統と掛合わせを行う予定である。

15

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

20

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。

本組換えトウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子はシロイヌナズナに由来する。本組換えトウモロコシでは、mRNA レベルでのスプライシング¹を受けることで、シロイヌナズナで発現する完全長の *ATHB17* 蛋白質と比較して N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* 蛋白質が発現する。

25

なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する *ATHB17Δ113* 蛋白質の推定アミノ酸配列は、別添資料 1 の Figure 1 (p1) に示した。

30

¹スプライシング部位となる RNA 配列は、単子葉植物であるトウモロコシと双子葉植物であるシロイヌナズナの間で異なる (Goodall and Filipowicz, 1991)。*ATHB17* 遺伝子において、コード領域の N 末端から 113 番目のアミノ酸に相当する箇所には、単子葉植物のスプライシング部位となる配列が存在する。このため、トウモロコシでは、*ATHB17* の mRNA が単子葉植物に特異的なスプライシングを受ける。その結果として、シロイヌナズナでは完全長の *ATHB17* 蛋白質が発現するのに対して、トウモロコシでは N 末端の 113 アミノ酸が欠失した *ATHB17* 蛋白質 (即ち *ATHB17Δ113* 蛋白質) が発現する。

ロ 構成要素の機能

5

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

10 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) に示した。

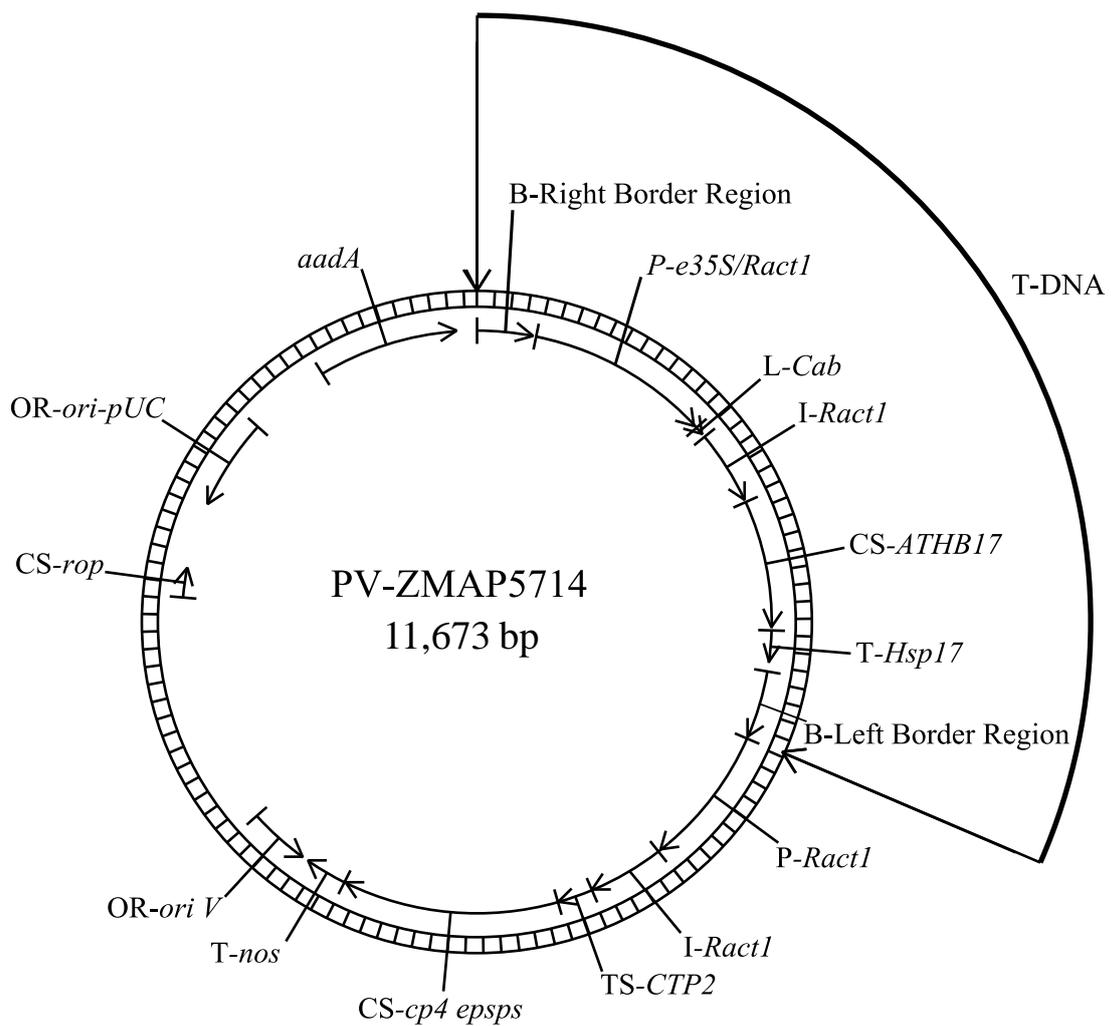


図1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMAP5714 のプラスミドマップ²

²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。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能³

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
T-DNA 領域		
B ^{注1} -Right Border Region	1-357	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する右側境界領域を含む DNA 断片。T-DNA を伝達する際に利用される (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	358-375	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>e35S/Ract1</i>	376-1,556	二重エンハンサー領域を持つ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35SRNA プロモーター (Kay et al., 1987) と <i>Oryza sativa</i> (イネ) 由来のアクチン1 遺伝子のプロモーター (McElroy et al., 1990) からなる、キメラプロモーター。恒常的に目的遺伝子を発現させる。
Intervening Sequence	1,557-1,561	DNA クローニングの際に利用された配列。
L ^{注3} - <i>Cab</i>	1,562-1,622	<i>Triticum aestivum</i> (コムギ) の葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5' 末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる (Lamppa et al., 1985)。
Intervening Sequence	1,623-1,638	DNA クローニングの際に利用された配列。
I ^{注4} - <i>Ract1</i>	1,639-2,118	<i>O. sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy et al., 1990)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	2,119-2,130	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注5} - <i>ATHB17</i>	2,131-2,958	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) 由来のホメオドメイン-ロイシンジッパーファミリーのクラス II (HD-Zip II) 蛋白質に属する <i>ATHB17</i> 蛋白質をコードする遺伝子 (Ariel et al., 2007)。標的遺伝子の発現を抑制する転写因子として機能すると考えられる。本遺伝子をトウモロコシに導入した場合、単子葉植物に特有のスプライシング (図 10,p75) によって、コード配列のうち N 末端側の 113 個のアミノ酸に相当する領域が欠失した mRNA が産生されることが、 <i>ATHB17</i> RNA のシーケンス解析で確認されている (別添資料 13)。また、本組換えトウモロコシで発現する <i>ATHB17</i> 蛋白質 (<i>ATHB17Δ113</i> 蛋白質) において 113 個のアミノ酸が欠失していることは、ウエスタンブロット解析の結果において確認されている (別添資料 14 の Figure 2, p17)。 <i>ATHB17Δ113</i> 蛋白質では、その N 末端に存在するはずのリプレッションドメインが欠失しているため、内在性 HD-Zip II 蛋白質に対してドミナント・ネガティブ作用が生じ、HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の発現抑制を解除すると考えられる (第一-2-(1)-ロ-②-2-1), p25~26)。

³本表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。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
Intervening Sequence	2,959-2,971	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注6} - <i>Hsp17</i>	2,972-3,181	<i>T. aestivum</i> (コムギ) の熱ショック蛋白質 Hsp17 の3'末端非翻訳領域 (McElwain and Spiker, 1989)。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	3,182-3,234	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	3,235-3,676	<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左側境界領域を含む配列 (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシ中には存在しない)		
Intervening Sequence	3,677-3,682	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>P-Ract1</i>	3,683-4,603	<i>O. sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のプロモーター領域 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子を発現させる。
<i>I-Ract1</i>	4,604-5,081	<i>O. sativa</i> (イネ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy et al., 1990)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる (McElroy et al., 1991)。
Intervening Sequence	5,082-5,090	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注7} - <i>CTP2</i>	5,091-5,318	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ) の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>cp4 epsps</i>	5,319-6,686	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子。5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードする (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。
Intervening Sequence	6,687-6,701	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>nos</i>	6,702-6,954	<i>R. radiobacter</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (<i>nos</i>) 遺伝子の3'末端非翻訳領域 (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMAP5714 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置	由来及び機能
Intervening Sequence	6,955-7,005	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注8} -ori V	7,006-7,402	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> 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	7,403-8,910	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-rop	8,911-9,102	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコード配列であり、 <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	9,103-9,529	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pUC	9,530-10,118	pUC プラスミドに由来する複製開始領域 (Vieira and Messing, 1987)。 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	10,119-10,648	DNA クローニングの際に利用された配列。
aadA	10,649-11,537	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及びコード配列並びに 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	11,538-11,673	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹ B-Border (境界配列)

注² P-Promoter (プロモーター)

5 注³ L-Leader (リーダー配列)

注⁴ I-Intron (イントロン)

注⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)

注⁶ T-Transcription Termination Sequence(転写終結配列)

注⁷ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

10 注⁸ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

- 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おける雌穂重の増大への *ATHB17Δ113* 蛋白質の影響を、以下の4項目（以下の1.~4.）に分けて説明する。第1項目では、本組換えトウモロコシの生殖成長初期における雌穂重の向上を示すデータを記載した。第2項目では、*ATHB17* 遺伝子に関する文献情報を記載した。そして、第3項目では、雌穂重増大に係る遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの評価を、遺伝子
10 発現解析及び代謝解析の結果をもとに記載した。最後に、第4項目では、本組換えトウモロコシにおける雌穂重増大への *ATHB17Δ113* 蛋白質による影響のまとめを記載した。

15 1. 本組換えトウモロコシの生殖生長初期における雌穂重の向上

1) *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の雌穂重に与える影響

本組換えトウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の雌穂重に与える影響を明らかにするために、本組換えトウモロコシ (R5F1 世代)、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統 (R5F1 世代)⁴及び対照の非組換えトウモロコシを米国の13カ所⁵のほ場で2012年に栽培し、絹糸抽出期 (R1) における雌穂の乾燥重を本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間及び MON87406 系統と対照の非組換えトウモロコシとの間で
25 それぞれ比較した (別添資料 2 及び別添資料 3)。統計解析は、全ほ場から収集した絹糸抽出期 (R1) の雌穂重のデータを使用した。統計解析の結果、本組換えトウモロコシと MON87406 系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重は、いずれも対照の非組換えトウモロコシと比較して有意に増大していた (表 2, p17; 別添資料 2 の Table 1, p5 及び別添資料 3 の Table 1, p5)。

30

⁴MON87406 系統は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有し、本組換えトウモロコシとは別の系統である。

⁵アーカンソー州、アイオワ州 (2カ所)、イリノイ州 (2カ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3カ所) 及びペンシルバニア州 (2カ所)

表 2 本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する実験系統及び対照の非組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹ (g/m) (2012 年、米国)⁶

供試系統	供試系統の平均 (±SE)	対照の非組換えトウモロコシ ² の平均 (±SE)	差異	p-値
本組換えトウモロコシ	144.5 (±8.47)	129.3 (±8.13)	15.2	0.004*
MON87406 系統 ³	144.2 (±8.76)	129.3 (±8.13)	14.9	0.004*

- 5 ¹ 本実験はほ場ごとに 4 反復で実施し (n=4)、各反復を乱塊法により配置した。本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統及び対照の非組換えトウモロコシの雌穂重について、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った。13 カ所のほ場の所在地は、アーカンソー州、アイオワ州 (2 カ所)、イリノイ州 (2 カ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3 カ所) 及びペンシルバニア州 (2 カ所) である。なお、ペンシルバニア州の 1 カ所のほ場では、厳しい乾燥が観測された 1 つの反復を除外し、3 反復のデータを採用した。一次雌穂は条の中央 1m にある個体から採取した。この雌穂を 80 °C の乾燥機で十分に乾燥させた後、雌穂重の計測を行った。
- 10 ² 対照の非組換えトウモロコシには、本組換えトウモロコシ及び *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と同じ遺伝的背景をもつ MPA640B 系統を用いた。
- 15 ³ MON87406 系統は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有し、本組換えトウモロコシとは別の系統である。
- * 有意差あり (p<0.05)。

20 さらに、異なる遺伝的背景をもつ品種でも絹糸抽出期 (R1) における雌穂重が増大することを確認するために、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (組換え系統 1 及び組換え系統 2)⁷ のそれぞれについて 3 品種 (R5F1 世代及び R8F1 世代)⁸ を用意し、最大 3 カ所のほ場において最大 2 年間にわたり絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を調査した。組換え系統ごとに、年、品種及びほ場をまとめて統計解析を行った結果、いずれの組換え系統においても対照の

25 トウモロコシと比較して有意な雌穂重の増加が確認された (表 3, p18; 別添資料 4 の Table 3, p12)。

⁶ 本表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。

⁷ 表 3 (p15) 及び別添資料 4 の供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。

⁸ 供試した 3 品種 (NH6214、EXP257 及び NN6306) のうち、NH6214 及び EXP257 については組換え系統 1 と組換え系統 2 のいずれも R5F1 世代である。NN6306 については、組換え系統 1 が R8F1 世代であり、組換え系統 2 が R5F1 世代である。

以上の結果から、トウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) における雌穂重 (即ち初期のシンクサイズ) を増大させることが確認された。

5

表 3 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹ (g/m²) (2011 年及び 2012 年、米国)⁹

供試系統 ²	供試系統の 平均値	対照のトウモロ コシ ³ の平均値	対照のトウモロ コシとの差異	p-値
組換え系統 1	99.2	93.1	6.2	0.006*
組換え系統 2	99.7	93.1	6.6	0.003*

10 ¹2011 年及び 2012 年に米国 (イリノイ州) の 2 ヲ所で 3 品種のトウモロコシを栽培し、その雌穂重について、年、品種及びほ場をまとめ、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った (N=109)。

15 ² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。

³ 対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

* 有意差あり (p<0.05)。

⁹本表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。

2) *ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) の茎葉の重量に与える影響の有無

5 *ATHB17* 遺伝子の発現が茎葉の重量に影響を与えるのかどうかを確認するために、本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する実験系統及び対照の非組換えトウモロコシを米国の 13 ヲ所のほ場で 2012 年に栽培し、絹糸抽出期 (R1) における茎葉重を、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間及び実験系統と対照の非組換えトウモロコシとの間でそれぞれ比較した (別添資料 2)。全ほ場を通して統計解析を行った結果、本組換えトウモロコシと実験系統の絹糸抽出期 (R1) の茎葉重は、いずれも対照の非組換えトウモロコシと比較して統計学的な有意差は認められなかった (表 4, p19; 別添資料 2 の Table 1, p5)。なお、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統⁵においても、茎葉重の変化は見られなかった (表 5, p20; 別添資料 4 の Table 3, p12)。

15 以上の結果から、*ATHB17* 遺伝子の発現が絹糸抽出期 (R1) における茎葉重に影響を与えるものではないと結論された。

20 表 4 本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する実験系統及び対照の非組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における茎葉重¹ (g/m) (2012 年、米国)¹⁰

供試系統	供試系統の平均 (±SE)	対照の非組換えトウモロコシ ² の平均 (±SE)	差異	p-値
本組換えトウモロコシ	768.1 (±20.57)	772.3 (±20.45)	-4.2	0.791
MON87406 系統 ³	800.9 (21.31)	772.3 (20.45)	28.6	0.073

25 ¹本実験はほ場ごとに 4 反復 (n=4) で実施し、各反復を乱塊法により配置した。本組換えトウモロコシ、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統及び対照の非組換えトウモロコシの茎葉重について、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った。13 ヲ所のほ場の所在地は、アーカンソー州、アイオワ州 (2 ヲ所)、イリノイ州 (2 ヲ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州 (3 ヲ所) 及びペンシルバニア州 (2 ヲ所) である。なお、ペンシルバニア州の 1 ヲ所のほ場では、厳しい乾燥が観測された 1 つの反復を除外し、3 反復のデータを採用した。条の中央 1m にある個体から、雌穂を除く地上部を採取した。茎葉を 80 °C の乾燥機で十分に乾燥させた後、茎葉重の計測を行った。

30 ²対照の非組換えトウモロコシには、本組換えトウモロコシ及び *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と同じ遺伝的背景をもつ MPA640B 系統を用いた。

³MON87406 系統は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有し、本組換えトウモロコシとは別の系統である。

¹⁰本表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。

表 5 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における茎葉重¹(g/m²) (2011 年及び 2012 年、米国)¹¹

供試系統 ²	供試系統の 平均値	対照のトウモロ コシ ³ の平均値	対照のトウモロ コシとの差異	p-値
組換え系統 1	993.2	956.6	36.6	0.114
組換え系統 2	951.4	956.6	-5.1	0.804

¹2011 年及び 2012 年に米国の主要なトウモロコシ栽培地域内で栽培したトウモロコシの雌穂重について、年、品種及びほ場をまとめ、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った (N=108)。

²供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。

³対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

以上の結論として、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現は、生殖生長初期における雌穂重を増大させるが、茎葉重に影響を与えるものではないと結論された。

2. *ATHB17* 遺伝子に関する文献情報

1) HD-Zip 蛋白質及び *ATHB17* 遺伝子の特性

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の HB17 蛋白質 (*ATHB17* 蛋白質) は転写因子であり、ホメオドメイン-ロイシンジッパー (HD-Zip) ファミリーのクラス II (HD-Zip II) に属する蛋白質である (Ariel et al., 2007; Ciarbelli et al., 2008)。Ariel ら (2007) が報告しているように、幾つかの HD-Zip 蛋白質は、組織や維管束の形成及び分裂組織の維持に関わっており、他のものはホルモンのシグナル伝達や、環境条件への応答に関与している。HD-Zip 蛋白質は、C 末端のホメオドメイン (HD) に隣接してロイシンジッパー (LZ) ドメインを持つことを特徴とする (図 2, p22) (Ruberti et al., 1991; Mukherjee et al., 2009)。HD 及び LZ は植物種以外の真核生物の転写因子にも存在するが、これらの両方が 1 つの蛋白質に含まれるのは植物の HD-Zip 蛋白質に固有のものである (Ariel et al., 2007)。HD は DNA に結合し、LZ はホモ二量体及びヘテロ二量体の形成に必要なドメインである (図 3, p23 のパネル B 及び C) (Ariel et al., 2007)。HD-Zip 蛋白質が DNA に結

¹¹本表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。

合する上で LZ による二量体形成が必要であるため、LZ は蛋白質-DNA 複合体の形成に重要な役割を果たしている (Sessa et al., 1993; Ariel et al., 2007)。LZ を介した二量体形成は HD を DNA の正しい部位に結合させ、HD-Zip 蛋白質/DNA 複合体の形成を促進する (Sessa et al., 1993)。

5

HD-Zip 蛋白質ファミリーには4つのクラス (I、II、III 及び IV) が存在する (表 6, p22)。それぞれのクラスは HD 及び LZ のアミノ酸配列の相同性、遺伝子の構造及びクラス特有のモチーフやドメインの存在により定義されている (図 2, p22) (Ariel et al., 2007)。4つのクラスのうち、HD-Zip I 蛋白質及び HD-Zip II 蛋白質は最も構造が類似しているが、HD-Zip III 蛋白質及び HD-Zip IV 蛋白質は付加的なドメインをもつため HD-Zip I 蛋白質及び HD-Zip II 蛋白質とは構造が大きく異なっている (図 2, p22) (Zhao et al., 2011)。

10

ATHB17 蛋白質は HD-Zip II 蛋白質に属する蛋白質であり (別添資料 4, p1)、LZ 及び HD、酸化還元応答モチーフ及び N 末端モチーフは、HD-Zip II 蛋白質内でアミノ酸配列が高度に保存されている (Ariel et al., 2007)。シロイヌナズナの HD-Zip II 蛋白質は 9 bp のコンセンサス配列 CAAT (G/C) ATTG を認識することが示されており (Sessa et al., 1993)、この配列は他のクラスの HD-Zip 蛋白質が認識するコンセンサス配列とは異なる (表 7, p23)。また、ヘテロ二量体形成は、同じクラスの HD-Zip 蛋白質に属する異なる蛋白質の間や、異種由来の相同な HD-Zip II 蛋白質の間で起こることがあるが (図 3, p23 のパネル C)、異なるクラスに属する HD-Zip 蛋白質間のヘテロ二量体の形成は報告されていない (Frank et al., 1998)。

20

表 6 HD-Zip 蛋白質のサブファミリーについてシロイヌナズナで報告されている機能¹²

サブファミリー	報告されている機能	文献
クラス I	環境ストレスへの応答に関与する	(Agalou et al., 2008) (Qin et al., 2010) (Zhao et al., 2011)
クラス II	避陰反応、光合成、乾燥ストレス耐性、塩ストレス耐性、生殖生長期における生育に関与する	(Nakamura et al., 2006) (Ciarbelli et al., 2008) (Zúñiga-Mayo et al., 2012) (Bou-Torrent et al., 2012) (Turchi et al., 2013) (Park et al., 2013) (Hymus et al., 2013)
クラス III	オーキシン輸送の制御を介した茎頂分裂組織及び腋生分裂組織の形成及び維持に関与する	(McConnell and Barton, 1998) (McConnell et al., 2001) (Ohashi-Ito et al., 2005) (Emery et al., 2003) (Ohashi-Ito and Fukuda, 2003) (Green et al., 2005)
クラス IV	頂端分裂組織の制御及び茎組織の形成	(Rerie et al., 1994) (Lu et al., 1996) (Ito et al., 2002) (Ohashi-Ito et al., 2002) (Nakamura et al., 2006)

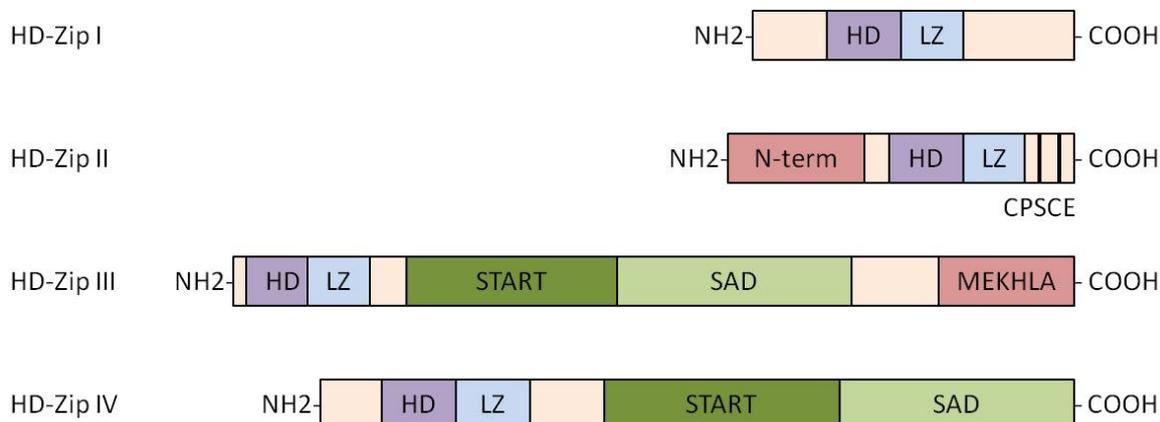


図 2 HD-Zip サブファミリーの特徴を示した模式図¹³

HD: ホメオドメイン、LZ: ロイシンジッパー、N-term: N 末端コンセンサス配列、CPSCE: Cys、Pro、Ser、Cys、Glu アミノ酸残基から名付けられた酸化還元応答モチーフ、START: ステロイド産生急性調節蛋白質関連脂質輸送ドメイン (Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain)、SAD: START 隣接ドメイン (START adjacent domain)、MEKHLA: Met、Glu、Lys、His、Leu、Ala アミノ酸残基が高度に保存されていることから名付けられたドメイン (Ariel et al., 2007)。

¹²本表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。

¹³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。

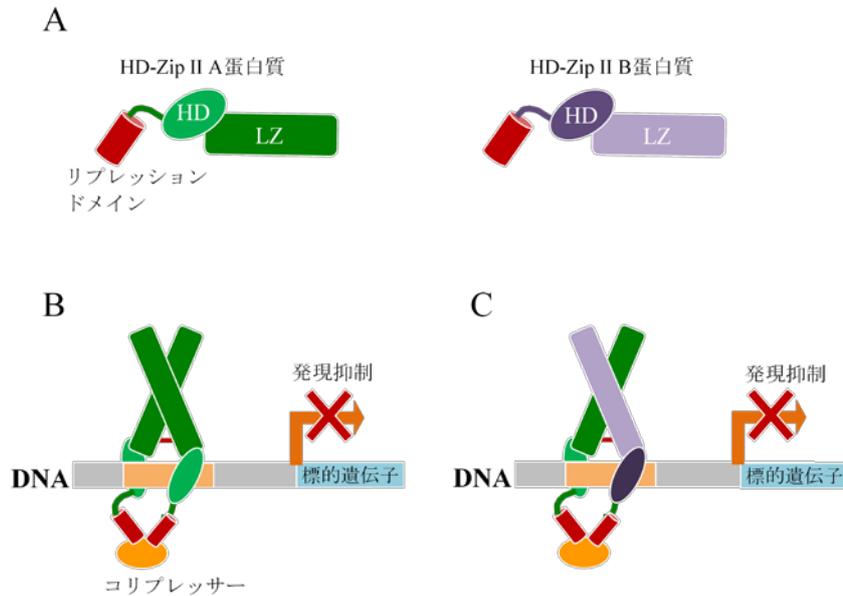


図 3 シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) で報告されている HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の転写抑制の模式図¹⁴

(A) HD-Zip II 蛋白質サブファミリーに属する異なる種類の蛋白質。(B) HD-Zip II 蛋白質は二量体を形成して標的遺伝子の持つ 9 bp のコンセンサス配列に結合し、コリプレッサーの働きを介して標的遺伝子の転写を抑制する。(C) HD-Zip II 蛋白質に属する蛋白質は、同じクラス (HD-Zip II 蛋白質) に属する異なる種類の蛋白質とヘテロ二量体を形成することができるが、異なるクラスに属する HD-Zip 蛋白質とはヘテロ二量体を形成することができない。

表 7 HD-Zip サブファミリーが結合するコンセンサス配列^{1, 15}

HD-Zip のサブファミリー	コンセンサス配列 ²
クラス I ³	CAAT(A/T)ATTG
クラス II ³	CAAT(C/G)ATTG
クラス III	GTAAT(G/C)ATTAC
クラス IV	CATT(A/T)AATG GCATT(A/T)AATGC TAAATG(C/T)A

¹ Ariel et al. (2007) より抜粋。

² 各クラスにおいてコアとなる配列を太字で表した。

³ クラス I 及びクラス II に属するいくつかの HD-Zip 蛋白質は、配列との親和性に関わらずクラス I 及びクラス II のコンセンサス配列のどちらにも結合する (Harris et al., 2011)。しかし、本組換えトウモロコシで発現する ATHB17Δ113 蛋白質については、クラス II のコンセンサス配列との結合性がクラス I のコンセンサス配列との結合性に比べて高いことが確認されている (別添資料 4 の Supplementary Table 1, p6)。

¹⁴ 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。

¹⁵ 本表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。

AtHB2、Oshox1、HAT2などのHD-Zip II蛋白質は、標的遺伝子の上流に結合してその遺伝子の転写を抑制する「転写リプレッサー」として機能する(図 3, p23のパネル B)(Meijer et al., 1997; Steindler et al., 1999; Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002)。既知のリプレッションモチーフのひとつはEAR(Ethylene responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression)モチーフである(Ohta et al., 2001; Tiwari et al., 2004; Kagale et al., 2010)。EARモチーフを有する転写リプレッサー¹⁶は、標的遺伝子にコリプレッサー¹⁷を誘導し、下流遺伝子の転写を抑制している(Kagale et al., 2010)。EARモチーフは、植物において特定された4つの転写リプレッションモチーフの1つであり(Kagale et al., 2010)、シロイヌナズナの10種類のHD-Zip II蛋白質(Ciarbelli et al., 2008)のうち9種類がこのリプレッションモチーフを有する(Kagale et al., 2010)。また、トウモロコシのHD-Zip II蛋白質のレポーターアッセイのデータから、これらのHD-Zip II蛋白質が転写リプレッサーであることが示されている(別添資料 4のFigure 8, p11)。

シロイヌナズナで発現される完全長のATHB17蛋白質とは異なり、本組換えトウモロコシではN末端の113アミノ酸が欠失したATHB17蛋白質が発現する。これは、ATHB17遺伝子のコード領域において単子葉植物でスプライシングを受ける配列が存在するためである。トウモロコシで発現するATHB17蛋白質において欠失しているN末端の113アミノ酸は、他のHD-Zip II蛋白質のリプレシヨンドメイン(EAR様モチーフを含む)の一部に相当する領域である(図 4, p26)(別添資料 4のSupplementary Figure 1D, p4)。一方、ATHB17Δ113蛋白質のLZ及びHDは失われておらず、トウモロコシのプロトプラストではATHB17Δ113蛋白質が他のHD-Zip II蛋白質とヘテロ二量体を形成することが報告されている(別添資料 4のFigure 6, p8)。さらに、ATHB17Δ113蛋白質とトウモロコシ内在性のHD-Zip蛋白質との二量体の形成についてルミネックス¹⁸を用いて分析した結果、ATHB17Δ113蛋白質はHD-Zip II蛋白質と二量体を形成するが、他のクラスのHD-Zip蛋白質(HD-Zip I蛋白質、HD-Zip III蛋白質及びHD-Zip IV蛋白質)とは二量体を形成しないことが示されている(別添資料 4のp6及びFigure 6, p8)。また、表面プラズモン共鳴を用いた動態解析¹⁹では、ATHB17Δ113

¹⁶転写リプレッサーはDNAやRNAに結合する蛋白質である。転写リプレッサーは遺伝子の上流に結合し、その遺伝子がmRNAに転写されることを防ぐことで、その遺伝子の発現を抑制する。

¹⁷コリプレッサーは、転写リプレッサーに結合する蛋白質であり、転写リプレッサーへの結合を介して間接的に遺伝子の発現を調節する。

¹⁸ルミネックスは、特定の抗体やオリゴヌクレオチドを固定したビーズを用いて標的の蛋白質や特異的なDNA配列を検出する技術である。本試験では、ATHB17Δ113蛋白質に特異的な抗体を固定したビーズを用いて、ATHB17Δ113蛋白質とトウモロコシ内在性のHD-Zip蛋白質との相互作用を評価した。

¹⁹表面プラズモン共鳴を用いた動態解析は、2つの異なる物質の結合と解離をリアルタイムで解析する手法である。この試験では、標的となるDNA配列をセンサーの表面に固定し、センサーとATHB17Δ113蛋白質を含む溶液との界面における屈折率を測定することで、2つの異なる物質の相互作用の特異性を評価した。

蛋白質が、クラス II のコンセンサス配列 (表 7, p23) と高い結合性をもつことが示されている (別添資料 4 の Table 1, p7)。なお、ATHB17Δ113 蛋白質がクラス I のコンセンサス配列 (表 7, p23) にも結合する可能性が示されたが、その結合性はクラス II のコンセンサス配列との結合性に比べて低いものであった (別添資料 4 の Table 1, p7)。

以上の結果は、ATHB17Δ113 蛋白質が *in vitro* において、HD-Zip II 蛋白質の二量体形成機能及び DNA への結合能を維持していることを示唆している。しかし、ATHB17Δ113 蛋白質では EAR 様モチーフが失われているため、転写リプレッサーとして機能できない可能性が考えられる (別添資料 4, p6)。実際に、9 bp のコンセンサス配列をプロモーター領域に持つ GUS レポーター遺伝子を用いたアッセイによって、ATHB17Δ113 蛋白質は転写リプレッサーとしての機能を持たないことが示された (別添資料 4 の Figure 7A, p9)。

以上のことから、本組換えトウモロコシで発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、二量体を形成してコンセンサス配列に結合することによって、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質を拮抗的に阻害するドミナント・ネガティブ作用²⁰を示すものと考えられた (図 4, p26) (別添資料 4 の p14 及び別添資料 4 の Supplementary Figure 2, p5)。この作用では、内在性 HD-Zip II 蛋白質が ATHB17Δ113 蛋白質による拮抗阻害を受けることにより、①HD-Zip II 蛋白質が結合するコンセンサス配列をプロモーター領域に持つトウモロコシ内在性遺伝子の発現が向上する、②前述の①により発現が向上した遺伝子から作られる蛋白質が、その下流のトウモロコシ内在性遺伝子の発現を変化させる (図 4, p26) の 2 通りの可能性が考えられる。このように、ATHB17Δ113 蛋白質は、ドミナント・ネガティブ作用を通じて内在性 HD-Zip II 蛋白質の経路を調節していると推察された。

²⁰ドミナント・ネガティブ作用とは、一部分を失ったポリペプチド又は変異したポリペプチドが、野生型の内在性の遺伝子の機能を阻害することである (Veitia, 2007)。例えば、野生型では活性ドメインをもつ転写因子は、その活性ドメインをもたないポリペプチドの存在によって、その転写は競合的に阻害される (Veitia, 2007)。

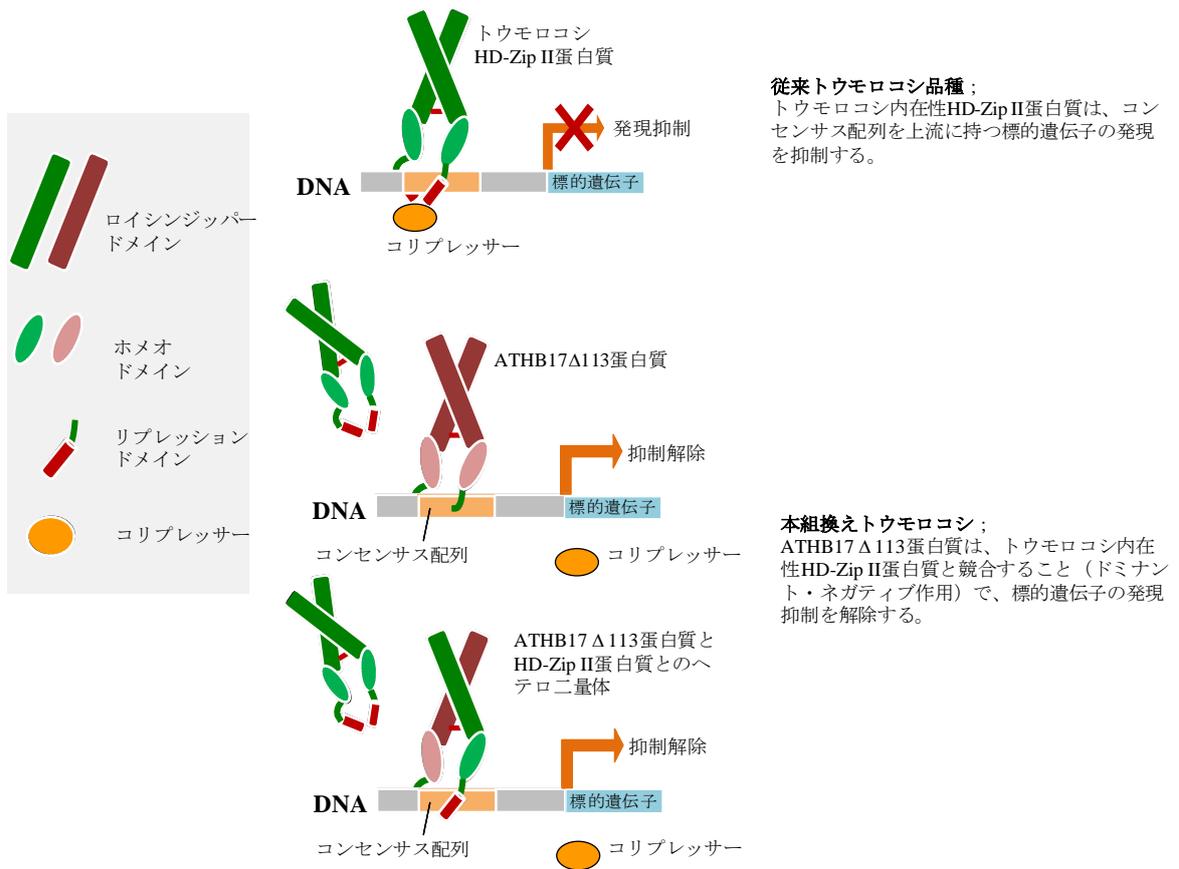


図 4 ATHB17Δ113 蛋白質のドミナント・ネガティブ作用によって生じると考えられる、HD-Zip II 蛋白質による標的遺伝子の発現抑制の解除を示した模式図²¹

²¹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。

2) シロイヌナズナにおける HD-Zip II 蛋白質の機能

5 HD-Zip 蛋白質は、植物の環境条件への応答や生長プロセスの制御に関与することが知られている (Ariel et al., 2007; Ciarbelli et al., 2008; Elhiti and Stasolla, 2009; Harris et al., 2011)。特に HD-Zip II 蛋白質に関しては、以下に示す 4 つの生理学上の機能 (避陰反応、光合成、乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性並びに生殖生長の制御) がシロイヌナズナにおいて報告されている (表 8, p27)。

10 表 8 シロイヌナズナの HD-Zip II 蛋白質の機能²²

遺伝子名	報告されている機能	文献
<i>ATHB17</i>	光合成、乾燥ストレス及び塩ストレスへの応答に関与する	(Park et al., 2013) (Hymus et al., 2013)
<i>ATHB2, HAT1, HAT3, ATHB4</i>	避陰反応/光応答に関与する	(Nakamura et al., 2006) (Ciarbelli et al., 2008) (Sorin et al., 2009)
<i>JAB/HAT1</i>	生殖生長における子実の生長に関与する	(Zúñiga-Mayo et al., 2012)

15 1 つ目の HD-Zip II 蛋白質の生理学上の機能は、避陰反応の制御である。シロイヌナズナには、10 個の *HD-Zip II* 遺伝子が存在し、そのうち 5 個の遺伝子が光の変化に応答することが知られている (Ciarbelli et al., 2008; Harris et al., 2011)。植物体は、隣接して競合する植物体の影を、光の質 (即ち赤色光/遠赤色光比が減少) として感知することで、競合する植物体の存在を認識する (Sorin et al., 2009)。植物体の影への応答は一般的に避陰反応と呼ばれ、その特徴として、主茎の伸長促進、葉の伸長抑制、枝数の減少といった生理学的な変化が観察される (Sorin et al., 2009)。シロイヌナズナの数種の HD-Zip II 蛋白質は、避陰反応におけるシグナル伝達に関与していると報告されている (Steindler et al., 1999; Ciarbelli et al., 2008; Sorin et al., 2009)。HD-Zip II 蛋白質ファミリーに属する *ATHB4* 遺伝子の発現は、光受容体による光の感知後、素早く促進される。シロイヌナズナにおける *ATHB4* 蛋白質の過剰発現では胚軸が伸長し、子葉が細くなる (Sorin et al., 2009)。これらの表現型は、*ATHB2* 蛋白質 (Steindler et al., 1999)、*HAT1* 蛋白質 (Ciarbelli et al., 2008) 及び *HAT2* 蛋白質 (Sawa et al., 2002) を過剰発現させたシロイヌナズナで見られたものと同様である。以上の報告は、幾つかの HD-Zip II 蛋白質が避陰反応に関与していることを示唆している。

²²本表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。

2つ目の HD-Zip II 蛋白質の生理学上の機能は、光合成能力の制御である。シロイヌナズナにおいて、HD-Zip II 蛋白質は、光合成及び葉緑体数の制御に関与していると言われている (Hymus et al., 2013)。シロイヌナズナで *ATHB17* 遺伝子を過剰発現させると、葉の緑色が濃くなり、葉において葉緑体 (クロロフィル II) の含有量及び光合成能力の増大が見られている (Hymus et al., 2013)。さらに、複数の *ATHB17* 遺伝子過剰発現系統において、増加した葉緑体の含有量と、*ATHB17* 遺伝子の mRNA の発現レベルに正の相関が認められた。また、光量を飽和状態にした場合でも、*ATHB17* 遺伝子過剰発現系統の光合成能力は増加していた。これらのデータは、*ATHB17* 遺伝子がシロイヌナズナにおいて光合成能力の向上に関与している可能性を示唆している (Hymus et al., 2013)。

3つ目の HD-Zip II 蛋白質の生理学上の機能は乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性の変化である。シロイヌナズナで *ATHB17* 遺伝子を過剰発現させると、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) への応答が変化し、乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を付与することが報告されている (Park et al., 2013)。

4つ目の HD-Zip II 蛋白質の生理学上の機能は生殖生長器官の生長の制御である。これまでに、シロイヌナズナの *JAB* 遺伝子は生殖生長に関与しており、適切な子実の生長及び発達に必要であることが示されている (Zúñiga-Mayo et al., 2012)。*JAB* 遺伝子をノックアウトしたシロイヌナズナでは、栄養生長期の形態に変化は見られなかったが、生殖生長期に変化がみられ、子実長が野生型と比べて 30~35%に短縮した。さらに、その子実中には 1、2 個の種子しかなく、これは野生型に含まれる種子の 10%以下の量であった (Zúñiga-Mayo et al., 2012)。*JAB* 遺伝子の GUS レポーターアッセイの結果から、*JAB* 遺伝子は生殖生長段階において、花序分裂組織及び生殖生長器官で発現することが示された (Zúñiga-Mayo et al., 2012)。栄養生長期において形態に変化が見られなかった理由については、HD-Zip II 蛋白質に属する HAT2 蛋白質や他の HAT ファミリーの蛋白質が代わりに機能を発揮した可能性が考えられ (Zúñiga-Mayo et al., 2012)、同様の現象は Harris らによる HD-Zip I 蛋白質及び HD-Zip II 蛋白質の総説において述べられている (Harris et al., 2011)。

3. 雌穂重増大に係る遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの評価

本組換えトウモロコシの絹糸抽出期 (R1) における雌穂重増大への *ATHB17* 遺伝子の影響を解明するために、(A) 2012 年米国におけるほ場試験及び(B) 2013 年米国における温室試験において、遺伝子発現レベル及び代謝レベルでの解析を行った。

(A) 2012 年米国におけるほ場試験は、2011 年及び 2012 年に米国で実施したほ場試験の一部である。本試験では、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (p16 の脚注 4 参照) (組換え系統 1: R8F1 世代、組換え系統 2: R5F1 世代) 及び対照のトウモロコシを 2012 年の米国 (イリノイ州) の 1 ヶ所のほ場で栽培し、16 葉期 (V16) の雌穂花序及び絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸/胚珠) を RNA シークエンス解析及び代謝解析に供試した。

(B) 2013 年米国における温室試験では、本組換えトウモロコシ (R5F1 世代) 及び対照の非組換えトウモロコシを温室で栽培し、4 つの異なる生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)²³) において、雌穂の 2 つの部位 (穂軸/胚珠及び苞葉/穂柄/絹糸) を RNA シークエンス解析及び代謝解析に供試した。なお、温室では環境影響を受けにくい栽培条件下で試験を行うことができるため、より高い感度で遺伝子発現及び代謝の変化を検出できると考えられる。

上記の(A) 2012 年米国におけるほ場試験及び(B) 2013 年米国における温室試験の結果を、1) 形質 (絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大) の確認、2) トウモロコシ内在性遺伝子の発現への影響の評価、及び 3) トウモロコシ内在性の代謝系への影響の評価に分けて以下に述べる。

²³2013 年米国の温室試験での絹糸抽出期後期 (LR1) は、2012 年米国におけるほ場試験での絹糸抽出期 (R1) と同じ生育段階である。

1) 形質 (絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大) の確認

遺伝子発現解析及び代謝解析に供試した系統で導入遺伝子に由来する形質が発現していることを確認するため、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を評価した。

5

(A) 2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 4)

10 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統⁵ 及び対照のトウモロコシについて、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重を比較した。その結果、組換え系統 2 では対照のトウモロコシと比較して有意に雌穂重が増大しており、組換え系統 1 では統計学的な有意差はないものの、雌穂重の平均値は対照のトウモロコシよりも大きかった (表 9, p30; 別添資料 4 の Supplementary Table 2B, p9)。

15 表 9 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統¹ の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重¹(g/m²)²⁴

供試系統 ²	供試系統の 平均値	対照のトウ モロコシ ³ の 平均値	対照のトウモ ロコシ との差異	% 差異	p-値
組換え系統 1	61.7	54.7	6.9	12.7	0.108
組換え系統 2	65.5	54.7	10.7	19.6	0.014*

¹ 2012 年に米国 (イリノイ州) の 1 ヲ所 (ILWI) において組換え系統 1 及び組換え系統 2 を 18 反復で栽培し、各反復から 5~7 個体の雌穂を採取した。それらの雌穂について雌穂重の測定を行い、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った。

20 ² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。

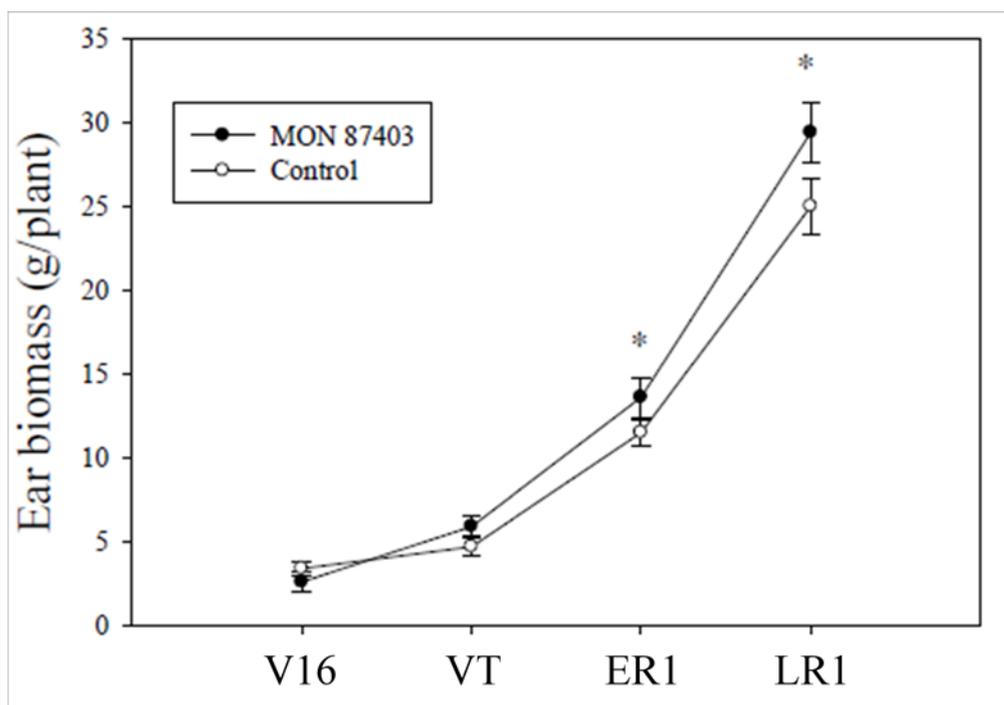
25 ³ 対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

* 有意差あり (p < 0.05)。

²⁴ 本表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。

(B) 2013 年米国における温室試験 (別添資料 5)

5 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について、4つの生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)) における雌穂重を経時的に比較した。その結果、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) における本組換えトウモロコシの雌穂重は、対照の非組換えトウモロコシと比較して有意に増加していた (図 5, p31; 別添資料 5 の Figure 3, p21)。



10 図 5 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの 4 つの生育段階における雌穂重 (g/個体)²⁵

15 本試験は 4 つの生育段階 (16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1)) において実施し (4 反復)、各生育段階で本組換えトウモロコシ (R5F1 世代、遺伝的背景は LH244 × LH287) 及び対照の非組換えトウモロコシ (LH244 × LH287) の雌穂を 6 個ずつ採取した。雌穂重について、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計解析を行った。

* 有意差あり ($p < 0.05$)。

20 以上の結果から、(A) 2012 年米国におけるほ場試験及び(B) 2013 年米国における温室試験のいずれにおいても、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重が増大することが確認された。

²⁵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。

2) トウモロコシ内在性遺伝子の発現への影響

5 雌穂における *ATHB17* Δ113 蛋白質の発現がトウモロコシ内在性遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換え系統の雌穂における網羅的な遺伝子発現解析を、(A) 2012 年米国におけるほ場試験と(B) 2013 年米国における温室試験で採取された雌穂サンプルを用いて行った。

10

(A) 2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 4)

15

ATHB17 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (p16 の脚注 4 参照) 及び対照のトウモロコシの 16 葉期 (V16) の雌穂花序及び絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸/胚珠) における遺伝子の発現を、RNA シークエンス解析²⁶により比較した。RNA シークエンス解析では全ての mRNA を解析の対象とするため、網羅的に発現の変化を測定することができる (Roy et al., 2011)。RNA シークエンス解析では、組換え系統 1、組換え系統 2 及び対照のトウモロコシの各生育段階において 9 個体から雌穂 (穂軸/胚珠) を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて 1 つのサンプルとした (3 biological replications)。

20

25

導入遺伝子と最も関連がある転写の変化を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統において共通する遺伝子発現変化の同定を試みた。RNA シークエンス解析では、組換え系統と対照トウモロコシとの間で転写産物の転写量を比較するために、通常「2 倍以上の発現量の変化が見られ、且つ *fdr_p* 値²⁷が 0.05 未満である」という基準が用いられてきた (Illumina, 2011; Kim et al., 2013)。しかし、本実験においてはこの基準では統計学的に有意な差として検出できる発現量の変化が得られなかった。本実験の目的は、微小ではあっても、組換え系統と対照トウモロコシとの間で、転写量に差のある転写産物を検出することであるため、基準を次の様に緩めた。まず、「2 倍以上の発現量の変化」という基準を破棄し、*p* 値の設定も *fdr_p* 値ではなく、より基準

30

²⁶RNA シークエンス解析は、遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、次世代シーケンサーを用いて全ての mRNA を解読する手法である。短い mRNA 配列のリードは参照となるゲノム配列や転写配列にマッピングされ、各転写産物にマッピングされたトランスクリプトーム及び配列のリード数が標準化された値として示される。このリード数は発現量を示している。

²⁷*fdr_p*-値は、false discovery rate を制御するための Benjamini and Hochberg の検定方式を用いることで得られる *p*-値のことであり、RNA シークエンス解析のような膨大なデータにおける有意差の判定に適している。

の緩い Raw-p 値を採用した。

RNA シークエンス解析の結果、2 つの組換え系統に共通する発現の変化が見られた転写産物の数は、雌穂花序で 7 種、雌穂 (穂軸/胚珠) で 2 種であった (表 10, p33、表 11, p34~35 及び表 12, p36; 別添資料 4 の Table 4, p14, Table 5, p15 及び Table 6, p15)。本解析で検出された計 76,612 種の転写産物のうち、発現の変化が認められた転写産物の割合は約 0.01% であった。これら計 9 種の転写産物のアノテーション情報から、3 種類の機能的な特性が考えられた (表 13, p37)。

表 10 対照のトウモロコシと比較して雌穂花序及び雌穂 (穂軸/胚珠) における発現量に変化が見られた転写産物の数²⁸

	発現量に変化が見られた転写産物の数 ¹			
		組換え系統 1 ²	組換え系統 2 ²	両系統に共通する変化 ³
雌穂花序	発現増加	4	15	1
	発現減少	7	9	6
雌穂 (穂軸/胚珠)	発現増加	159	3	2
	発現減少	14	2	0

¹ 対照のトウモロコシと比較して有意差 ($p < 0.0001$) が認められた転写産物の数。

² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

³ 対照のトウモロコシと比較し、2 つの組換え系統で共通して発現が変化していた転写産物の数を示した。

²⁸ 本表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。

表 11 雌穂花序において *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統で共通して発現が変化していた遺伝子のリスト^{1, 29}

Gene ID	組換え系統 1 ²		組換え系統 2 ²		GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
	Fold Change	p-値	Fold Change	p-値				
GRMZM2G007729	-2.77	2E-06	-2.66	2E-06	N/A	PF00011: Hsp20/alpha	LOC_Os02g52150.1: heat shock 22	heat shock protein 22
GRMZM2G008611	-1.56	4E-06	-1.44	2E-05	GO:0003676::nucleic acid binding	PF00076: RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)	LOC_Os11g40510.1: RNA recognition motif containing protein, putative, expressed	N/A
GRMZM2G051135	-2.40	4E-05	-2.71	2E-05	GO:0003677::DNA binding	PF08523: Multiprotein bridging factor 1	LOC_Os06g39240.1: endothelial differentiation-related factor 1, putative, expressed	N/A
GRMZM2G097135	-5.41	6E-05	-5.09	7E-05	GO:0005515::protein binding	PF00612: IQ calmodulin-binding motif, PF02179: BAG domain	LOC_Os11g31060.1: IQ calmodulinbinding and BAG domain containing protein, putative, expressed	N/A
GRMZM5G823696	-5.29	5E-05	-6.32	4E-05	N/A	N/A	N/A	N/A

²⁹本表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。

Gene ID	組換え系統 1 ²		組換え系統 2 ²		GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
	Fold Change	p-値	Fold Change	p-値				
GRMZM5G841343	-2.23	2E-05	-2.18	2E-05	N/A	PF04419: 4F5 protein family	LOC_Os05g33700.1: 4F5 protein family protein, expressed	N/A
GRMZM5G845499	1.91	4E-05	1.91	4E-05	N/A	N/A	N/A	N/A

¹ 対照のトウモロコシと比較して、2つの組換え系統で共通して有意な発現の変化 (Raw-p <0.0001) が認められた転写産物を示した。対照のトウモロコシと比較した場合の変化の倍率 (Fold Change) 及び p-値 (Raw-p) を2つの組換え系統のそれぞれについて示した。

² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

N/A: 該当なし

表 12 雌穂 (穂軸/胚珠) において *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統で共通して発現が変化していた遺伝子のリスト^{1, 30}

Gene ID	組換え系統 1 ²		組換え系統 2 ²		GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
	Fold Change	p-値	Fold Change	p-値				
GRMZM2G059129	2.23	1.28E-07	1.65	2.66E-05	GO:0006071:: glycerol metabolic process	PF03009: Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family	LOC_Os08g39350.1: glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein, putative, expressed	N/A
GRMZM2G168222	2.16	5.78E-07	1.70	4.12E-05	N/A	N/A	LOC_Os10g27170.1: calmodulinbinding protein, putative, expressed	N/A

¹ 対照のトウモロコシと比較して、2 つの組換え系統で共通して有意な発現の変化 (Raw-p <0.0001) が認められた遺伝子を示した。対照のトウモロコシと比較した場合の変化の倍率 (Fold Change) 及び p-値 (Raw-p) を 2 つの組換え系統のそれぞれについて示した。

5 ² 供試系統のうち、組換え系統 1 は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する MON87406 系統と商業品種とのハイブリッドであり、組換え系統 2 は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。対照のトウモロコシには、供試系統と同じ遺伝的背景をもつ品種を用いた。なお、対照のトウモロコシには、供試系統と同様に、Bt 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が導入されている。

10 N/A: 該当なし

³⁰ 本表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。

表 13 2012 年米国におけるほ場試験で発現が変化していた遺伝子の特性^{1, 31}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合 及び転写	RNA 又は DNA 結 合蛋白質及び転写 因子	● RNA recognition motif containing protein (GRMZM2G008611 (-))
代謝	触媒活性を持つ蛋 白質又は高分子代 謝産物	● glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein (GRMZM2G059129 (-))
ストレス応答	防御応答、障害応答 及びストレス応答 に関与するもの	● heat shock protein (GRMZM2G007729 (-))
その他 ²	その他の機能を持 つもの	GRMZM2G051135 (-), GRMZM2G097135 (-), GRMZM5G841343 (-), GRMZM2G168222 (-)

¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>

5)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

(-): 発現減少を示した遺伝子

³¹ 本表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。

(B) 2013 年米国における温室試験 (別添資料 6、別添資料 7、別添資料 8 及び別添資料 9)

5 温室で栽培した本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシについて、16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) の4つの生育段階において RNA シークエンスにより遺伝子の発現を解析した。各生育段階において 12 個体から穂軸/胚珠と苞葉/穂柄/絹糸を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて1つのサンプルとした (4 biological replications)。

10 RNA シークエンス解析では、8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) を行い、これらにおいて本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で2倍以上の変化が見られ、且つ Fdr_p-値が 0.05 未満であることを基準として、発現の増加又は減少が認められたものを選抜した (表 14, p38)。その結果、本組換えトウモロコシにおいて有意な発現の変化を示した転写産物が 8 種類の比較 (2つの部位×4つの生育段階) において計 1,455 (発現増加が 699、発現減少が 756)

15 認められた。

表 14 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で有意な発現の変化が認められた転写産物の数^{1, 32}

サンプル	生育段階	発現増加	発現減少
穂軸/胚珠	V16	56	41
	VT	87	36
	ER1	41	17
	LR1	207	482
苞葉/穂柄/絹糸	V16	66	88
	VT	150	23
	ER1	44	24
	LR1	48	45

20 ¹対照の非組換えトウモロコシと比較して有意差 (2倍以上の変化且つ Fdr_p-値が 0.05 未満) が認められた転写産物の数

³²本表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。

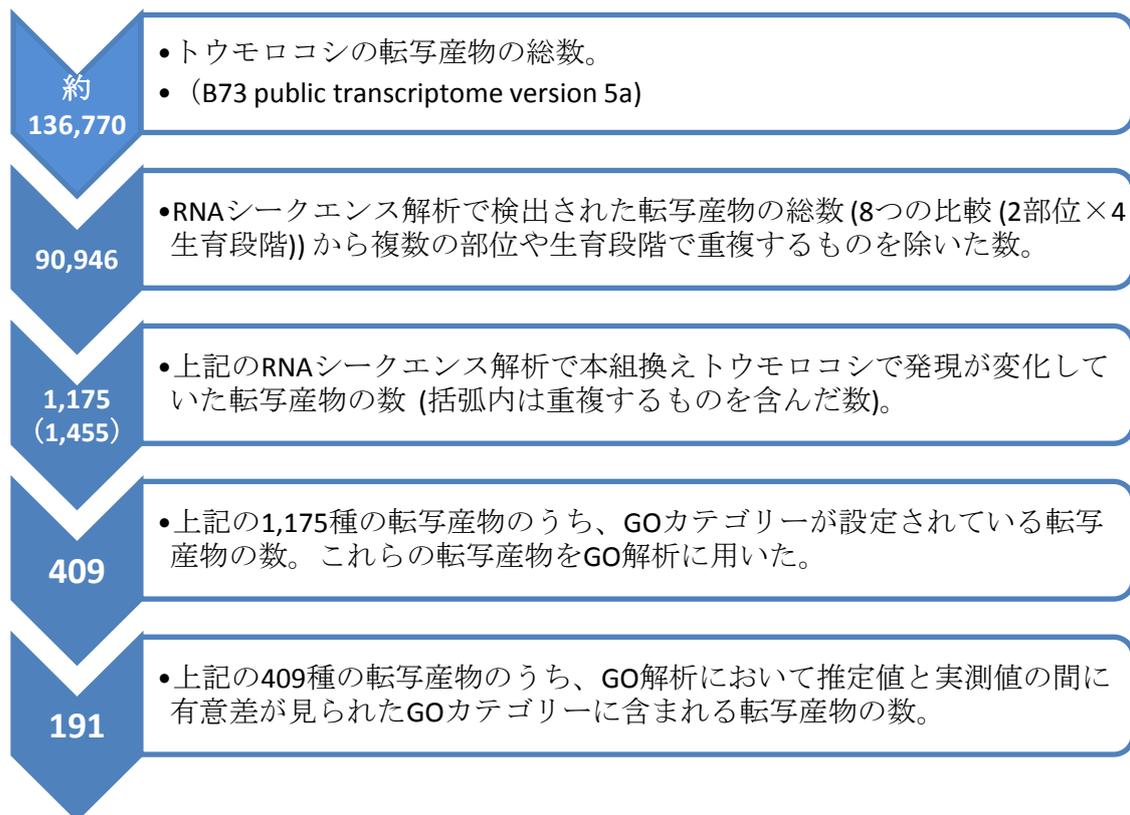


図 6 転写産物データの解析手順³³

5 RNA シーケンス解析から得られた遺伝子発現データの解析手順を図 6 (p39) に示した。RNA シーケンス解析における 8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) で有意な発現の変化を示した計 1,455 種の転写産物から、複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除いた結果、1,175 種の転写産物が得られた。本解析で検出された計 90,946 種の転写産物のうち、発現の変化が認められた転写産物の割合は約 1.3%であった。

10 この 1,175 種の転写産物について、遺伝子オントロジー (GO)³⁴のカテゴリーを調べたところ、409 種の転写産物に GO のカテゴリーが設定されていた (別添資料 6 の Table 1~4, p4~44)。これら 409 種の転写産物には、発現が増加していたものが 174 種、発現が減少していたものが 241 種含まれており、異なる部位や生育

³³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。

³⁴遺伝子オントロジー (GO) は、全真核生物に適用できる統一された語彙で遺伝子を定義したものであり、遺伝子の機能に関する情報を得るために使用される (Ashburner et al., 2000; Berardini et al., 2010)。3 つの種類 GO term (Cellular Component (細胞成分, CC)、Molecular Function (分子機能, MF) 及び Biological Process (生体内作用, BP) を、本組換えトウモロコシにおいて発現が変化していた転写産物 (複数の生育段階や部位で重複する転写産物を除いた 1,175 個) のカテゴリー分けに用いた。CC は細胞の部位や細部外環境、MF は遺伝子産物の分子レベルでの機能、BP は既知の分子事象群や作用を示すものである。

段階において発現の増加と減少の両方が確認されたものが6種存在していた。なお、409種の転写産物において、複数のGOのカテゴリーが設定された転写産物が多く見られた。発現が増加していた転写産物における代表的なGOのカテゴリー及びそのカテゴリーに該当する転写産物の数は、DNA binding (25種)、zinc ion binding (24種)、nucleic acid binding (19種)、ATP binding (19種) 及び nutrient reservoir activity (19種) であった (図 7, p41)。また、発現が減少していた転写産物では、DNA binding (43種)、ATP binding (39種)、zinc ion binding (35種) 及び binding (27種) などが代表的なGOのカテゴリーであった (図 8, p42)。これらの遺伝子に付けられたアノテーション情報からは、本組換えトウモロコシで明らかな効果を示していると考えられる代謝経路は特定されなかった。

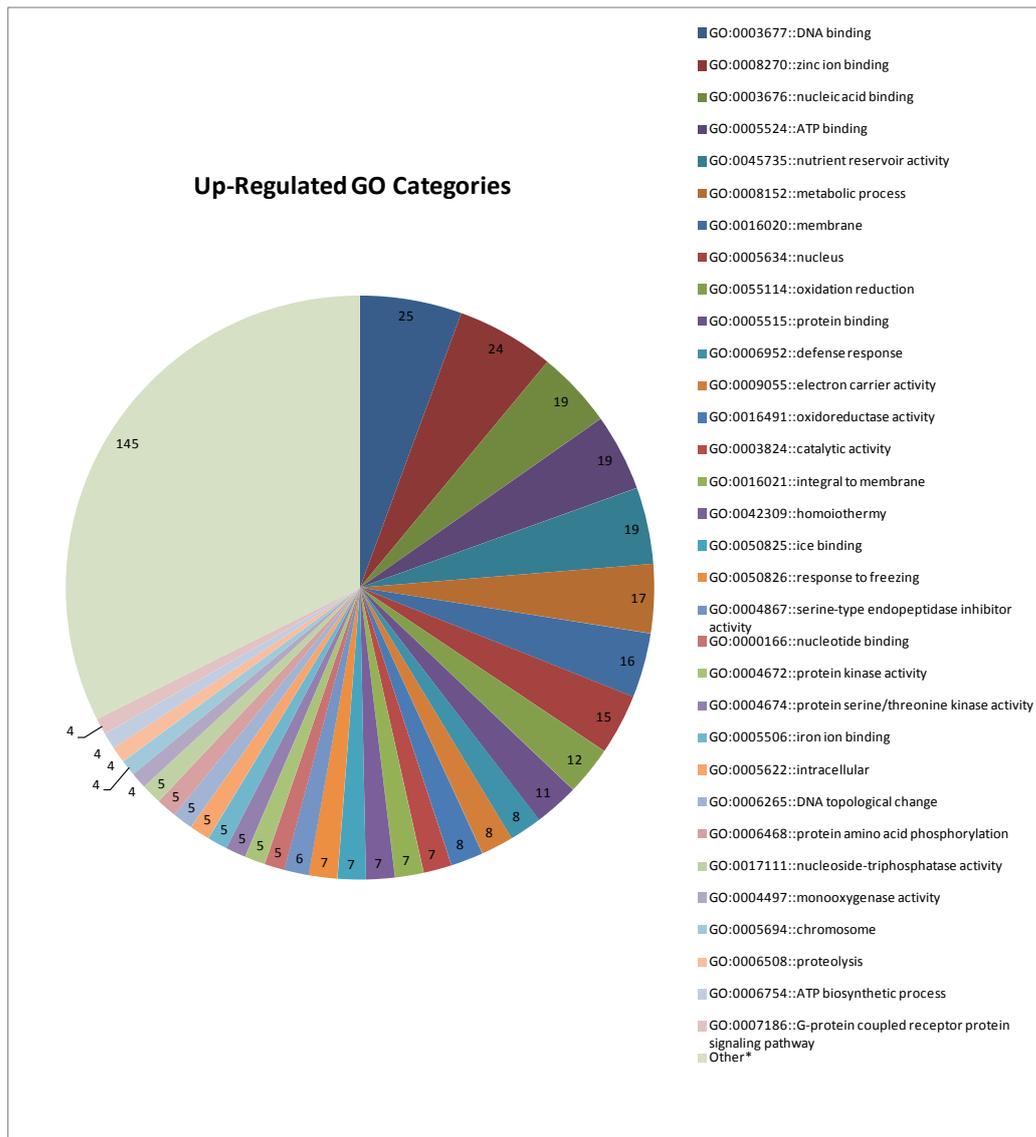


図 7 RNA シークエンス解析において発現が増加していた転写産物の GO カテゴリ —³⁵

5 統計学的に有意な発現増加が見られた転写産物のうち、複数の生育段階や部位で重複の無い 454 種の GO カテゴリを agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) を元に調査した。このうち、174 種には 1 つ以上の GO カテゴリが設定されており、これらの GO カテゴリの分布を上図に示した。円グラフ中にある数字は、各 GO カテゴリに属する転写産物の数を示している。3 種以下の転写産物が属する GO カテゴリはその他として示した。本グラフに含まれている全遺伝子のリストは

10 別添資料 6 の Table 5 (p46~49) に記載されている。

³⁵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。

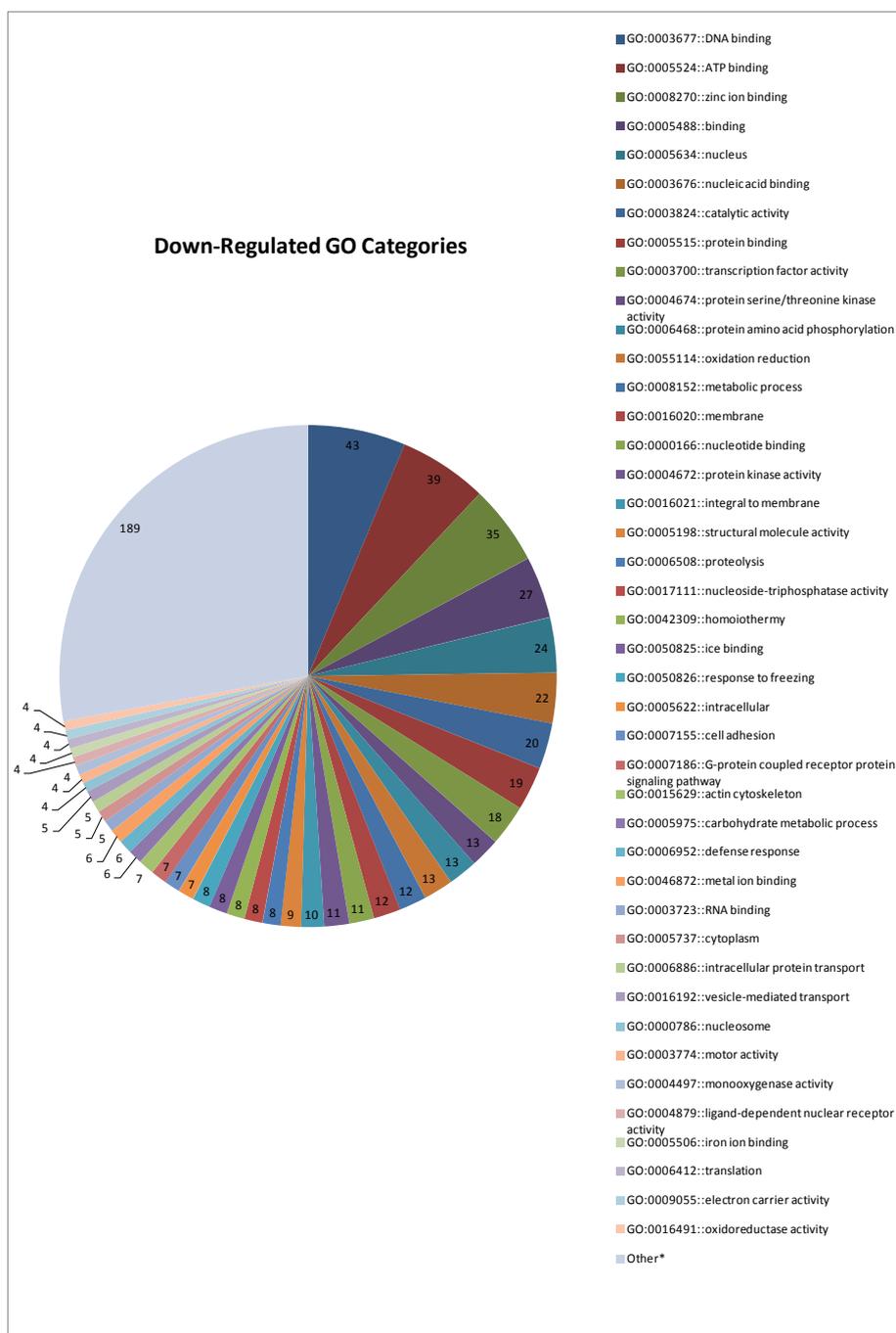


図 8 RNA シーケンス解析において発現が減少していた転写産物の GO カテゴリー³⁶

5 統計学的に有意な発現減少が見られた転写産物のうち、複数の生育段階や部位で重複の無い 721 種の GO カテゴリーを agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) を元に調査した。このうち、241 種には 1 つ以上の GO カテゴリーが設定されており、これらの GO カテゴリーの分布を上図に示した。円グラフ中にある数字は、各 GO カテゴリーに属する転写産物の数を示している。3 種以下の転写産物が属する GO カテゴリーはその他として示した。本グラフに含まれている全遺伝子のリストは別添資料 6 の Table 6 (p51~55) に記載されている。

³⁶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。

5 図 7 (p41) 及び図 8 (p42) において認められた GO カテゴリーは、トウモロコシゲノム中に比較的多く存在する GO カテゴリーが反映されたものであるか、又は本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の影響を示していると考えられる。そこで、ATHB17Δ113 蛋白質の発現の影響を受けている可能性が高い GO カテゴリーを調べるために、GO 解析³⁷を行なった。GO 解析は、特定の遺伝子により制御される遺伝子群を推定するために用いられる手法である。本解析では、GO 解析の先行事例(Paschall et al., 2004) に倣い、 $p < 0.001$ を基準とした。

10 GO 解析の結果、RNA シークエンス解析で発現変化が認められた遺伝子のリストにおいて、本組換えトウモロコシの雌穂で統計学的に有意 ($p < 0.001$) に出現頻度の高い GO カテゴリーがいくつか認められた (表 15, p44~45; 別添資料 7 の Table 2, p15)。これらの GO カテゴリーの情報から、6 種類の機能的な特性が考えられた (表 16, p46)。また、GO 解析において本組換えトウモロコシの雌穂で有意に出現頻度が高かった GO カテゴリーに着目し、これらの GO カテゴリーに属する計 191 種の転写産物の機能を、表 17 (p47~49) 及び別添資料 8 に示した。

³⁷一般的に、GO 解析では、ある特定の遺伝子リスト (例えば、発現が変化している遺伝子のリスト) における同じ機能を持つ遺伝子群の割合と、それらの全ゲノム中での割合を統計学的に比較することで、ある特定の遺伝子リストの中で有意に出現頻度が高い遺伝子群を見出すことができる。この情報をもとに、どのような生物学的プロセスにより遺伝子発現変動が起こっているかという仮説を構築することができる (Martin et al., 2004)。GO 解析は、大規模な遺伝子発現データを解釈するために用いられる代表的な手法である。GO 解析には、RNA シークエンス解析における 8 種類の比較 (2 つの部位×4 つの生育段階) で発現が増加及び減少している転写産物のリストをひとつにまとめたものを供試した。その理由は、1) ATHB17Δ113 蛋白質の発現により影響を受ける一次的な遺伝子発現の変化だけでなく、その結果として生じる二次的な遺伝子発現の変化も合わせて解析対象とする必要があること、及び 2) ATHB17Δ113 蛋白質の発現に起因する遺伝子発現の変化はわずかなものであるため、個々の部位と生育段階では GO 解析に十分な数の遺伝子が同定されなかったこと、の 2 点が挙げられる。

表 15 本組換えトウモロコシの雌穂¹において発現が変動している遺伝子の GO 解析の結果³⁸

	GO_ID	GO カテゴリー	Total Genomic Count ²	RNA-seq Experimental Count ³	Expected Experimental Count (calculated) ⁴	p-値 ⁵
発現増加	GO_MF:GO:0045735	nutrient reservoir activity	120	19	0.5	3.48E-24
	GO_MF:GO:0004867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	90	6	0.4	2.96E-06
	GO_BP:GO:0006952	defense response	236	8	1.0	1.06E-05
	GO_BP:GO:0006265	DNA topological change	84	5	0.4	3.51E-05
	GO_BP:GO:0006270	DNA replication initiation	22	3	0.1	1.10E-04
	GO_BP:GO:0008152	metabolic process	1541	17	6.7	5.00E-04
	GO_BP:GO:0009611	response to wounding	39	3	0.2	6.60E-04
	GO_MF:GO:0003676	nucleic acid binding	1915	19	8.3	8.60E-04
	GO_MF:GO:0004630	phospholipase D activity	11	2	0.0	1.00E-03
発現減少	GO_MF:GO:0005488	binding	782	27	5.4	1.60E-11
	GO_MF:GO:0004559	alpha-mannosidase activity	7	3	0.0	1.12E-05
	GO_MF:GO:0003677	DNA binding	3062	43	21.1	1.25E-05
	GO_MF:GO:0003700	transcription factor activity	964	18	6.6	1.60E-04
	GO_MF:GO:0003774	motor activity	44	4	0.3	2.40E-04
	GO_CC:GO:0015629	actin cytoskeleton	181	7	1.2	2.80E-04
	GO_MF:GO:0008270	zinc ion binding	2868	35	19.8	1.00E-03

³⁸本表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。

¹ 穂軸/胚珠及び苞葉/穂柄/絹糸を対象とした。

² 全ゲノム中に存在する該当 GO ID を持つ遺伝子数

³ 本組換えトウモロコシの雌穂において発現変動が見られた遺伝子数

⁴ Total Genomic Count を基に、RNA シークエンス解析によって同定されると予想された遺伝子数

- 5 ⁵ それぞれの GO カテゴリーにおいて発現が変化すると予想される遺伝子数を、RNA シークエンス解析において実際に発現が変化していた遺伝子数と統計学的に比較するために、Fisher's Exact Test により統計解析を行なった ($p < 0.001$ を有意と判定した)。Fisher's Exact Test における超幾何分布は、 K 個の成功状態をもつ M 個の要素よりなる母集団から n 個の要素を非復元抽出したときに x 個の成功状態が含まれている確率を与える分布である。例えば、本試験における nutrient reservoir activity の GO カテゴリーでは、トウモロコシのゲノム情報をもとに、全遺伝子の数 (104,584) を M 、このうち nutrient reservoir activity の GO カテゴリーに属する遺伝子の数 (120) を K とした。さらに、RNA シークエンス解析において有意に発現が増加していた転写産物の数 (454) を n 、このうち nutrient reservoir activity の GO カテゴリーに属する遺伝子の数 (19) を x とし、Fisher's Exact Test により統計解析を行った。
- 10

表 16 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が有意に変化していた GO カテゴリーの特性^{1, 39}

特性		GO カテゴリー
核酸への結合及び転写	RNA 又は DNA 結合蛋白質及び転写因子	Nucleic acid binding (+), DNA binding (-), transcription factor activity (-)
栄養素の貯蔵	発育種子中での栄養素の貯蔵に関与するもの	nutrient reservoir activity (+)
細胞分裂及び細胞分化	DNA 複製及び細胞分裂、細胞分化に関与するもの	DNA replication initiation (+), DNA topological change (+)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	serine-type endopeptidase inhibitor activity (+), metabolic process (+), phospholipase D activity (+), alpha-mannosidase activity (-)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	defense response (+), response to wounding (+)
細胞質運動及び細胞構造	細胞骨格の組織化及び原形質を通る高分子又は細胞小器官の移動に関与するもの	actin cytoskeleton (-), motor activity (-)
その他 ²	上記の分類に属さないもの	binding (-), zinc ion binding (-)

¹ データベース (AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>)) の情報をもとに機能の分類を行った。

5 ² その他の分類には、機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった GO カテゴリーを記載した。

(+): 発現増加を示した GO カテゴリー

(-): 発現減少を示した GO カテゴリー

³⁹ 本表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。

表 17 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト⁴⁰

	GO Description	機能	遺伝子数
発現増加	nutrient reservoir activity	Zein seed storage protein	15
		Protease inhibitor	2
		Cupin/glutelin	1
	serin-type endopeptidase inhibitor activity	Potato inhibitor I family	3
		BBTI13 -Bowman- Birk type bran trypsin inhibitor precursor	2
		Protease inhibitor	1
	defense response	S locus-related glycoprotein 1 binding pollen coat protein	4
		Gamma-thionin family protein	2
		Pathogenesis-related protein	1
	DNA topological change	DNA gyrase/topoisomerase IV	1
		Retrotransposon protein	1
	DNA replication initiation	MCM2/3/5 family	3
	metabolic process	UDP-glucuronosyl/and UDP-glucosyl transferase 2	3
		Phospholipase D	3
		Trehalose-phosphate	1
		Flavin monooxygenase	1
		No apical meristem protein	1
		Terpene synthase	1
		Short chain dehydrogenase	1
		Aldehyde dehydrogenase	1
Glutathione S-transferase		1	
Acyltransferase		1	
response to wounding	Potato inhibitor I	3	

⁴⁰本表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。

表 17 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト (続き)

	GO Description	機能	遺伝子数
発現増加	nucleic acid binding	Piwi domain containing protein	1
		Replication protein A C terminal	1
		RNA recognition motif	1
	phospholipase D activity	Phospholipase D	2
発現減少	binding	HEAT repeat family protein	5
		Clathrin heavy chain	1
		Phosphatidylinositol 3- and 4- kinase family protein	1
		U-box domain containing protein	1
		Translational activator family protein	1
		Phosphatidylinositol kinase	1
		RST1	1
		Guanine nucleotide exchange family protein	1
	alpha-mannosidase activity	Alpha mannosidase	1
	DNA binding	AP2 transcription factor	6
		KNOTTED-like homeodomain protein	6
		Dof zinc finger domain containing protein	2
		MYB transcription factor	2
		ARID-transcription factor	2
		Heat shock protein DnaJ	1
		Plus-3 domain containing protein	1
		ulp1 protease family	1
		RNA polymerase, Rpb1	1
		NAC transcription factor	1
		RNA dependent RNA polymerase	1
		PWWP domain containing protein	1
		RST1	1
Type III restriction enzyme		1	

表 17 本組換えトウモロコシの雌穂において出現頻度が高い GO カテゴリーに属する遺伝子のリスト (続き)

	GO Description	機能	遺伝子数
発現減少	transcription factor activity	AP2 transcription factor	6
		KNOTTED-like homeodomain protein	5
		WRKY	3
		bZIP transcription factor	2
		C2C2-GATA-transcription factor	1
	motor activity	Myosin head family protein	4
	actin cytoskeleton	LSD1 subclass family protein	1
		Plant thionin family protein precursor	1
		Vta 1 like	1
	zinc ion binding	Plus-3 domain containing protein	1
		Zinc finger	6
		Alpha mannosidase	1
		C2C2-Dof-transcription factor	1
		SNF2 family N-terminal domain	1
		Protein phosphatase 2C	1
		ATPase family associated with various cellular activities (AAA)	1
		C2C2-GATA-transcription factor	1
		Retrotransposon protein	1
		ARID-transcription factor	1

一般的に植物の表現型が変化している場合は、内在性遺伝子は遺伝子群として変化している可能性が高い。上述した GO 解析は、このように高い頻度で変化している遺伝子群を見出すことが出来る。

5 一方で、遺伝子群としてではなく、個別の遺伝子の発現が大きく変わることにより、表現型が変化する可能性も考えられる。そこで、このような遺伝子を調べるため、本組換えトウモロコシで発現が変化した 1,175 種の転写産物のうち、より大きな発現変化を示した上位 20 種の転写産物のアノテーション情報を、発現増加と発現減少のそれぞれについて調べた (表 18, p51~52 及び表 19, p53~55; 別添資料 9 の Table 1, p4~5 及び Table 2, p5~6)。これらの転写産物のアノテーション情報から、3 種類の機能的な特性が考えられた (表 20, p56)。

15 さらに、本組換えトウモロコシにおいて有意に発現が変化していた 1,175 種の転写産物のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列 (表 7, p23) を有するものがあるかどうか調査した (表 21, p57~59 及び表 22, p60~62; 別添資料 9 の Table 5, p8~9 及び Table 6, p9~p11)。その結果、40 種の転写産物が当該コンセンサス配列を持つと考えられた。これらの転写産物のアノテーション情報から、4 種類の機能的な特性が考えられた (表 23, p63)。

20

表 18 本組換えトウモロコシで有意な発現の増加を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種⁴¹

Gene ID	Fold Change	p-値 (fdr p)	GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき非開示	3649.32	1.83E-09	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	385.44	2.35E-05	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	240.73	7.23E-10	GO:0016020::membrane GO:0004981::muscarinic acetylcholine receptor activity	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	139.18	1.12E-25	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	101.03	3.63E-07	N/A	N/A	LOC_Os06g02710.1: expressed protein	N/A
社外秘につき非開示	89.66	2.80E-23	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	35.73	1.30E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	35.46	6.01E-43	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	33.37	1.27E-09	GO:0045735::nutrient reservoir activity	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	30.59	1.63E-12	GO:0005622::intracellular GO:0008270::zinc ion binding	PF04640: PLATZ transcription factor	LOC_Os01g33370.1: zinc-binding protein, putative, expressed	PLATZ-transcription factor 12
社外秘につき非開示	28.56	2.89E-09	GO:0045735::nutrient reservoir activity	PF01559: Zein seed storage protein	N/A	N/A
社外秘につき非開示	25.50	2.25E-08	N/A	PF03181: BURP domain	LOC_Os02g18690.1: BURP domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき非開示	24.79	2.69E-12	GO:0006810::transport GO:0006839::mitochondrial transport GO:0005739::mitochondrion GO:0005743::mitochondrial inner membrane GO:0016020::membrane GO:0005215::transporter activity GO:0005488::binding	PF00153: Mitochondrial carrier protein	LOC_Os02g10800.1: mitochondrial carrier protein, putative, expressed	N/A

⁴¹本表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。

表 18 本組換えトウモロコシで有意な発現の増加を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種 (続き)

Gene ID	Fold Change	p-値 (fdr p)	GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき非開示	24.16	7.49E-07	GO:0009058::biosynthetic process	PF04864: Allinase , PF00155: Amino transferase class I and II	LOC_Os05g07720.1: alliin lyase precursor, putative, expressed	tryptophan aminotransferase related1
社外秘につき非開示	23.17	3.81E-09	N/A	PF03181: BURP domain	LOC_Os02g18690.1: BURP domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき非開示	22.31	4.99E-14	N/A	N/A	LOC_Os12g13960.1: LTPL33 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed	N/A
社外秘につき非開示	21.14	3.05E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	19.79	7.38E-11	N/A	N/A	N/A	basal endosperm transfer layer1
社外秘につき非開示	19.47	4.72E-02	GO:0016020::membrane GO:0005509::calcium ion binding	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	18.40	4.37E-09	N/A	N/A	LOC_Os01g58660.1: LTPL29 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed	N/A

表 19 本組換えトウモロコシで有意な発現の減少を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種⁴²

Gene ID	Fold Change	p-値 (fdr p)	GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき非開示	-59.88	3.63E-03	GO:0003676::nucleic acid binding GO:0003677::DNA binding GO:0004803::transposase activity GO:0008270::zinc ion binding	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-27.89	1.37E-04	N/A	N/A	LOC_Os03g61150.2: expressed protein	N/A
社外秘につき非開示	-26.83	1.79E-04	GO:0003676::nucleic acid binding GO:0003677::DNA binding GO:0004803::transposase activity GO:0008270::zinc ion binding	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-21.00	4.70E-03	GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF00847: AP2 domain	LOC_Os09g28440.1: AP2 domain containing protein, expressed	AP2-EREBP-transcription factor 211
社外秘につき非開示	-20.10	2.99E-04	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-19.65	3.81E-02	GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF00847: AP2 domain	LOC_Os09g35030.1: dehydration-responsive element-binding protein, putative, expressed	DRE-binding protein3
社外秘につき非開示	-16.63	4.03E-02	GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF00847: AP2 domain	LOC_Os09g35020.1: AP2 domain containing protein, expressed	AP2-EREBP-transcription factor 36
社外秘につき非開示	-15.35	4.85E-02	GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF00847: AP2 domain	LOC_Os04g48350.1: dehydration-responsive element-binding protein, putative, expressed	AP2-EREBP-transcription factor 105

⁴²本表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。

表 19 本組換えトウモロコシで有意な発現の減少を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種 (続き)

Gene ID	Fold Change	p-値 (fdr p)	GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき非開示	-13.38	3.58E-04	N/A	N/A	LOC_Os01g56820.1: AGAP000951-PA, putative, expressed	N/A
社外秘につき非開示	-13.06	3.46E-04	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-12.91	4.66E-03	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-12.88	3.25E-03	N/A	PF03168: Late embryogenesis abundant protein	LOC_Os01g59680.1: NHL25, putative, expressed	N/A
社外秘につき非開示	-12.24	2.31E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-10.77	4.28E-02	GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF00847: AP2 domain	LOC_Os09g35030.1: dehydration-responsive element-binding protein, putative, expressed	AP2-EREBP-transcription factor 23
社外秘につき非開示	-10.34	3.76E-02	GO:0003676::nucleic acid binding GO:0008270::zinc ion binding	N/A	N/A	N/A
社外秘につき非開示	-10.19	3.85E-02	GO:0016020::membrane GO:0005096::GTPase activator activity	PF01190: Pollen proteins Ole e I like	LOC_Os03g14140.1: POEI16 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor, expressed	N/A
社外秘につき非開示	-9.85	4.66E-02	N/A	N/A	N/A	N/A

表 19 本組換えトウモロコシで有意な発現の減少を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種 (続き)

Gene ID	Fold Change	p-値 (fdr p)	GO Annotations	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき非開示	-9.81	2.53E-02	N/A	N/A	LOC_Os03g19070.1: long cell-linked locus protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき非開示	-9.71	4.41E-02	N/A	N/A	LOC_Os12g40330.1: expressed protein	N/A
社外秘につき非開示	-9.62	1.34E-04	N/A	PF03145: Seven in absentia protein family	LOC_Os01g55640.1: seven in absentia protein family protein, putative, expressed	N/A

表 20 本組換えトウモロコシで有意な発現の増加及び減少を示した遺伝子のうち、変化の割合が大きかった上位 20 種の遺伝子のアノテーション情報の特性^{1, 43}

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合及び転写	RNA又はDNA結合蛋白質及び転写因子	● Transcription factor (社外秘につき非開示)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	● Response to abiotic stimulus (社外秘につき非開示)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	● Mitochondrial carrier protein (社外秘につき非開示) ● Tetratricopeptide repeat containing protein (社外秘につき非開示)
その他 ²	その他の機能を持つもの	社外秘につき非開示

¹データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

²その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

⁴³本表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。

表 21 本組換えトウモロコシで有意な発現の増加を示した遺伝子のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列が特定されたもの⁴⁴

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	GO:0045735::nutrient reservoir activity	PF01559: Zein seed storage protein	N/A	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0007067::mitosis	PF02301: HORMA domain	LOC_Os04g40940.1: mitotic spindle checkpoint protein MAD2, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0008152::metabolic process	PF00201: UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	LOC_Os10g09990.1: cytokinin-O-glucosyltransferase 3, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0009611::response to wounding GO:0004867::serine-type endopeptidase inhibitor activity	PF00280: Potato inhibitor I family	LOC_Os12g36210.1: inhibitor I family protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	LOC_Os02g21880.1: coiled-coil domain-containing protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00072: Response regulator receiver domain	LOC_Os08g26990.1: response regulator receiver domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF01426: BAH domain , PF00385: Chromo (CHRromatin Organisation MOdifier) domain , PF00145: C-5 cytosine-specific DNA methylase	LOC_Os03g12570.1: expressed protein	DNA methyl transferase2

⁴⁴本表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。

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	N/A	PF00097: Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	LOC_Os05g05280.1: zinc finger family protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF06639: Basal layer antifungal peptide (BAP)	N/A	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00179: Ubiquitin-conjugating enzyme	AT3G13550.1(CIN4,COP10,EMB144,FUS9): Ubiquitin-conjugating enzyme family protein	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00515: Tetratricopeptide repeat , PF07719: Tetratricopeptide repeat , PF07721: Tetratricopeptide repeat	LOC_Os05g43040.1: tetratricopeptide repeat domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF02996: Prefoldin subunit	LOC_Os12g37590.1: prefoldin, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	LOC_Os01g71980.1: rho-GTPase-activating protein-like, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	N/A	maternally expressed gene14
社外秘につき 非開示	N/A	PF06639: Basal layer antifungal peptide (BAP)	N/A	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	N/A	maternally expressed gene3
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	LOC_Os02g12580.1: OsPP2Ac-3 - Phosphatase 2A isoform 3 belonging to family 1, expressed	N/A

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	N/A	PF01397: Terpene synthase, N-terminal domain , PF03936: Terpene synthase family, metal binding domain	LOC_Os02g36210.1: ent-kaurene synthase, chloroplast precursor, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF08246: Cathepsin propeptide inhibitor domain (I29) , PF00112: Papain family cysteine protease	LOC_Os12g17540.1: vignain precursor, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00125: Core histone H2A/H2B/H3/H4	LOC_Os03g53190.1: Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00111: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain	LOC_Os07g01930.1: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein, expressed	N/A

表 22 本組換えトウモロコシで有意な発現の減少を示した遺伝子のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列が特定されたもの⁴⁵

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	GO:0003993::acid phosphatase activity GO:0046872::metal ion binding	PF00149: Calcineurin-like phosphoesterase	LOC_Os09g32840.1: nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0005634::nucleus GO:0003677::DNA binding	PF03790: KNOX1 domain , PF03791: KNOX2 domain	LOC_Os03g51710.2: homeobox protein knotted-1, putative, expressed	knotted related homeobox3
社外秘につき 非開示	GO:0005634::nucleus GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF03790: KNOX1 domain , PF03791: KNOX2 domain , PF03789: ELK domain , PF05920: Homeobox KN domain , PF00046: Homeobox domain	LOC_Os03g51690.1: Homeobox domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0005634::nucleus GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF03790: KNOX1 domain , PF03791: KNOX2 domain , PF03789: ELK domain , PF00046: Homeobox domain	LOC_Os01g19694.1: Homeobox domain containing protein, expressed	Homeobox-transcription factor 74
社外秘につき 非開示	GO:0005634::nucleus GO:0003677::DNA binding GO:0003700::transcription factor activity	PF03790: KNOX1 domain , PF03791: KNOX2 domain , PF03789: ELK domain , PF00046: Homeobox domain	LOC_Os07g03770.1: Homeobox domain containing protein, expressed	gnarley 1
社外秘につき 非開示	GO:0006508::proteolysis GO:0004190::aspartic-type endopeptidase activity	PF00026: Eukaryotic aspartyl protease	LOC_Os08g36530.1: aspartic proteinase nepenthesin precursor, putative, expressed	N/A

⁴⁵本表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。

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	GO:0006629::lipid metabolic process	PF00657: GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	LOC_Os04g47390.1: GDSL-like lipase/acylhydrolase, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	GO:0009611::response to wounding GO:0004867::serine-type endopeptidase inhibitor activity	PF00280: Potato inhibitor I family	LOC_Os12g36210.1: inhibitor I family protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00046: Homeobox domain	LOC_Os03g43930.1: START domain containing protein, expressed	Homeobox-transcription factor 124
社外秘につき 非開示	N/A	PF01501: Glycosyl transferase family 8	LOC_Os01g65780.1: glycosyl transferase, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF10539: Development and cell death domain	LOC_Os01g36950.2: N-rich protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF01535: PPR repeat	LOC_Os10g35240.1: Rf1, mitochondrial precursor, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00069: Protein kinase domain , PF07714: Protein tyrosine kinase	LOC_Os03g02320.1: STE_PAK_Ste20_STLK.3 - STE kinases include homologs to sterile 7, sterile 11 and sterile 20 from yeast, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF06639: Basal layer antifungal peptide (BAP)	N/A	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF02319: E2F/DP family winged-helix DNA-binding domain	LOC_Os02g56560.1: CK1_CaseinKinase_1.6 - CK1 includes the casein kinase 1 kinases, expressed	E2F-DP-transcription factor 215

Gene ID	GO Annotation	PFAM ID	Rice Best Hit	Maize Annotation
社外秘につき 非開示	N/A	PF00782: Dual specificity phosphatase, catalytic domain , PF00102: Protein-tyrosine phosphatase	LOC_Os01g64010.2: dual specificity protein phosphatase, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF12054: Domain of unknown function (DUF3535) , PF02985: HEAT repeat , PF00176: SNF2 family N-terminal domain , PF00271: Helicase conserved C-terminal domain	LOC_Os02g06592.1: SNF2 family N-terminal domain containing protein, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	N/A	LOC_Os02g48964.1: WD-40 repeat family protein, putative, expressed	N/A
社外秘につき 非開示	N/A	PF00046: Homeobox domain	LOC_Os01g63510.1: homeobox domain containing protein, expressed	Homeobox-transcription factor 19
社外秘につき 非開示	N/A	PF00664: ABC transporter transmembrane region , PF00005: ABC transporter	LOC_Os03g04920.1: multidrug resistance-associated protein, putative, expressed	N/A

表 23 本組換えトウモロコシで有意な発現変化を示した遺伝子のうち、プロモーター領域に HD-Zip II が認識するコンセンサス配列を有する遺伝子のアノテーション情報の特性
1, 46

特性		アノテーション (Gene ID)
核酸への結合及び転写	RNA又はDNA結合蛋白質及び転写因子	● Transcription factor (社外秘につき非開示)
細胞分裂及び細胞分化	DNA複製及び細胞分裂、細胞分化に関与するもの	● Cell cycle (社外秘につき非開示) ● Core histone H2A/H2B/H3/H4 (社外秘につき非開示)
ストレス応答	防御応答、障害応答及びストレス応答に関与するもの	● Response to stress (社外秘につき非開示)
代謝	触媒活性を持つ蛋白質又は高分子代謝産物	● Lipid metabolic process (社外秘につき非開示) ● Protein metabolic process (社外秘につき非開示) ● Carbohydrate metabolic process (社外秘につき非開示) ● Mitochondrial 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein (社外秘につき非開示)
その他 ²	その他の機能を持つもの	社外秘につき非開示

¹ データベース (Rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>); Maize Genetics and Genomics Database (<http://www.maizegdb.org/>)) の情報をもとに機能の分類を行った。なお、アノテーションを持たない遺伝子は表から除外した。

² その他の分類には、アノテーションを持つが機能を推定するために十分な情報がデータベース検索から得られなかった遺伝子を記載した。

⁴⁶ 本表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。

以上の 2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における温室試験で得られた遺伝子発現解析の結果 (表 13, p37、表 16, p46、表 20, p56 及び表 23, p63) から、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現が変化した内在性遺伝子の機能グループが少なくとも 6 種類存在することが明らかになった (図 9, p65)。

5

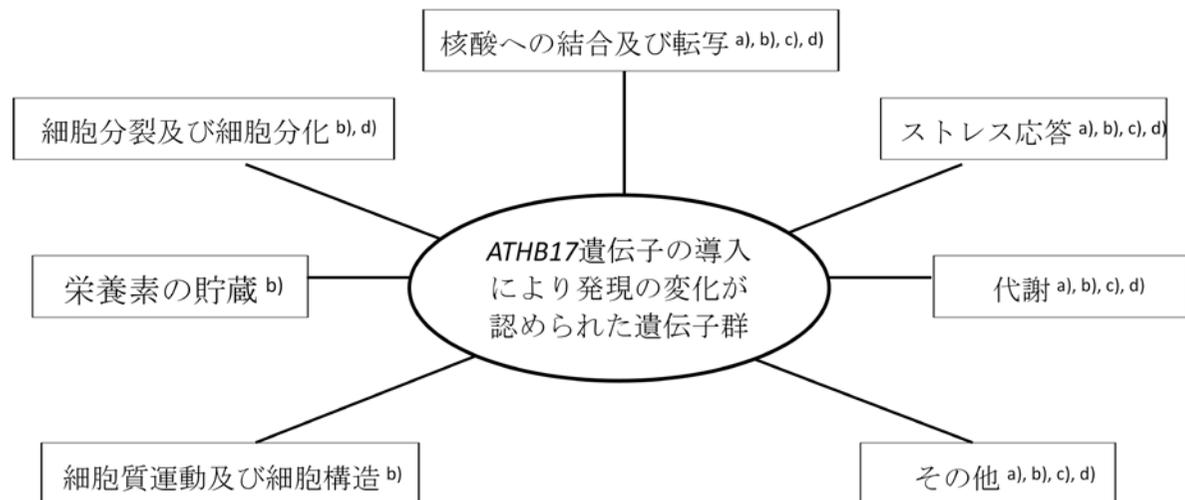


図 9 2012 年及び 2013 年の遺伝子発現解析において、*ATHB17* 遺伝子の導入により発現の変化が認められた内在性遺伝子の機能グループ⁴⁷

- 5 a) 2012 年米国におけるほ場試験の RNA シークエンス解析で *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統に共通する遺伝子発現の変化から得られた情報
- b) 2013 年米国における温室試験の GO 解析において出現頻度が有意に変化していた GO カテゴリーから得られた情報
- 10 c) 2013 年米国における温室試験の RNA シークエンス解析で発現が変化した転写産物のうち、より大きな発現変化を示した上位 20 種の転写産物から得られた情報
- d) 2013 年米国における温室試験の RNA シークエンス解析で発現が変化した転写産物のうち、プロモーター領域に HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列を有する遺伝子から得られた情報
- ※RNA シークエンス解析において発現が変化した転写産物のうち、アノテーションを持つものを用いて機能グループの分類を行った。

⁴⁷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。

3) トウモロコシ内在性の代謝系への影響 (別添資料 10、別添資料 11 及び別添資料 12)

5 ATHB17Δ113 蛋白質の発現がトウモロコシの代謝に与える影響を調べるため、トウモロコシの雌穂重の増大に影響する可能性がある主要な代謝産物 (炭水化物 (スクロース、グルコース、フルクトース及びデンプン)、アミノ酸及び植物ホルモン) の分析を実施した。

10 トウモロコシでソースとして利用される糖の大部分はスクロースであり、スクロースは雌穂の発達において葉から雌穂へと輸送され、雌穂でグルコースやフルクトースへと変換されて生長に利用される (Tang and Boyer, 2013)。また、アミノ酸は形成中の雌穂における窒素源であり、そのまま雌穂の発達に利用されるか、又は他のアミノ酸に変換された後に利用される (Seebauer et al., 2004)。植物ホルモンはトウモロコシの雌穂の生長及び発達に関与することが示唆されて
15 おり (Lejeune et al., 1998; Forestan and Varotto, 2012)、特に HD-Zip II 蛋白質が植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) への応答に関与することがシロイヌナズナにおいて報告されている (Park et al., 2013)。

20 以上のことから、雌穂重の増大に影響する可能性がある代謝産物として、炭水化物 (スクロース、グルコース、フルクトース及びデンプン)、遊離アミノ酸 (アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン及びバリン) 及び植物ホルモン (表 24, p67) に着目し、2012 年米国におけるほ場試験及び 2013 年米国における
25 温室試験から得られた雌穂を対象として分析を行った。

表 24 絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸/胚珠) において分析した植物ホルモン⁴⁸

正式名	略称	正式名	略称
アブシジン酸	ABA	インドール-3-酢酸メチルエステル	IAA-Me
アブシジン酸グルコースエステル	ABA-GE	インドール-3-アセチルイソロイシン	IAA-Ile
7'-水酸化-アブシジン酸	7'OH-ABA	インドール-3-アセチルバリン	IAA-Val
ジヒドロファゼイン酸	DPA	トランス-ゼアチン	tZ
ファゼイン酸	PA	トランス-ゼアチンリボシド	tZR
ジベレリン A1	GA1	トランス-ゼアチン-9-グルコシド	ZG
ジベレリン A3	GA3	ジヒドロゼアチン	DHZ
ジベレリン A4	GA4	ジヒドロゼアチンリボシド	DHZR
ジベレリン A8	GA8	イソペンテルアデニン	iP
ジベレリン A9	GA9	イソペンテルアデノシン	iPR
ジベレリン A12	GA12	サリチル酸	SA
ジベレリン A20	GA20	ジャスモン酸	JA
ジベレリン A34	GA34	ジャスモン酸メチルエステル	MeJA
ジベレリン A53	GA53		
インドール-3-酢酸	IAA		
インドール-3-アセチルアラニン	IAA-Ala		
インドール-3-アセチルアスパラギン酸	IAA-Asp		

⁴⁸本表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。

(A) 2012 年米国におけるほ場試験 (別添資料 10)

5 *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統 (p16 の脚注 4 参照) 及びこれらと同様の遺伝的背景をもつトウモロコシ品種の絹糸抽出期 (R1) における雌穂 (穂軸/胚珠) を用いて代謝解析を行った。この解析では組換え系統 1、組換え系統 2 及び対照のトウモロコシのそれぞれ 18 個体から雌穂 (穂軸/胚珠) を採取し、3 個体から得られた組織をまとめて 1 つのサンプルとした (6 biological replications)。

10 絹糸抽出期 (R1) の雌穂 (穂軸/胚珠) を用いた代謝解析では、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統において共通して含有量が増加している代謝産物を調べることで、*ATHB17* 遺伝子の影響を受ける代謝産物を考察した。代謝解析の結果、2 項目 (遊離アミノ酸におけるグルタミンの減少及び植物ホル
15 モンにおけるインドール-3-酢酸-アセチルアスパラギン酸 (IAA-Asp) の減少) において 2 つの組換え系統で共通した含有量の変化が観察された (別添資料 10 の Table 1, p16)。

グルタミンの含有量については、2 つの組換え系統において有意な減少 (それぞれ約 16% 及び約 13% の減少) が認められた。しかしながら、発達中の雌穂 (穂
20 軸/胚珠) においてグルタミンを前駆体とする他の主要なアミノ酸 (アスパラギン、アスパラギン酸及びグルタミン酸) (Seebauer et al., 2004) に有意な変化は見られなかった。

また、IAA-Asp の含有量についても、2 つの組換え系統において有意な減少 (それぞれ約 33% 及び約 36% の減少) が認められた。しかし、活性型オーキシンである IAA を含む他の植物ホルモンにおいて、統計学的な有意差は認められなかった。IAA-Asp は IAA から生成する代謝産物であり、生育を調節する因子としての活性を有しないことが示されている (Östin et al., 1998) ことから、オーキシン
25 含有量に影響を与えるものではないと考えられる。

30

(B) 2013 年米国における温室試験 (別添資料 11 及び別添資料 12)

35 温室で栽培した本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシについて、16 葉期 (V16)、雄穂抽出期 (VT)、絹糸抽出期初期 (ER1) 及び絹糸抽出期後期 (LR1) の 4 つの生育段階において代謝解析を実施した。各生育段階において 24 個体から穂軸/胚珠と苞葉/穂柄/絹糸を採取し、6 個体から得られた組織を

まとめて1つのサンプルとした (4 biological replications)。分析対象とする代謝産物については、(A) 2012年米国におけるほ場試験と同様に、トウモロコシの雌穂重の増大に影響する可能性がある主要な代謝産物 (炭水化物 (スクロース、グルコース、フルクトース及びデンプン)、遊離アミノ酸及び植物ホルモン) とし、

5

これらに加えて全炭素及び全窒素の割合 (%) についても調べた。

代謝解析の結果、各生育段階及び部位における代謝産物に関して、いくつかの成分で本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。しかし、全生育段階で一貫した変化を示す成分や、ある生育段階において両方の部位で一貫した変化を示す成分は認められなかった。

10

各生育段階及び部位において含有量が有意 ($p < 0.05$) に変化した項目を表 25 (p70) 及び別添資料 11 の Table 5 (p17) に示し、それらの項目について以下に述べる。

表 25 各生育段階及び部位において含有量が有意 ($p < 0.05$) に変化した項目の数⁴⁹

成分 (分析項目数)	穂軸/胚珠				苞葉/穂柄/絹糸			
	V16	VT	ER1	LR1	V16	VT	ER1	LR1
遊離アミノ酸 (17)		12				6	2	3
炭水化物 (4)		1	1			1		
植物ホルモン (27)	3	1	4	1	2	1	3	7
全炭素及び全窒素の割合 (%) (2)								

① 遊離アミノ酸

5 各生育段階の各部位において、のべ 23 項目の遊離アミノ酸に統計学的な有意差が認められた。このうち、苞葉/穂柄/絹糸の雄穂抽出期 (VT) におけるグリシン以外の全ての項目は、有意に減少していた。また、統計学的な有意差が認められた 23 項目中、18 項目が雄穂抽出期 (VT) において変化していた (表 26, p72~73; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

10

② 炭水化物

15 穂軸/胚珠の雄穂抽出期 (VT) 及び絹糸抽出期初期 (ER1)、並びに苞葉/穂柄/絹糸の雄穂抽出期 (VT) において、デンプンが有意に増加していた。デンプンは雌穂における貯蔵型の炭水化物であり (Zinselmeier et al., 1999)、雌穂の成長に利用される基質であることが知られているため、デンプンの変化と雌穂重の増大が関連している可能性が考えられた (表 26, p72~73; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

③ 植物ホルモン

20 植物ホルモンとして、サイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリン、オーキシシン及びジャスモン酸及びサリチル酸を分析した。

サイトカイニン (tZ、tZR、ZG、DHZ、DHZR、iP 及び iPR) において、のべ 10 項目に有意な変化が認められた。これらには、活性型及び不活性型のサイトカイニンが含まれていた (表 26, p72~73; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

25

アブシジン酸 (ABA、ABA-GE、7'OH-ABA、DPA 及び PA) において、のべ 4 項目に有意な変化が認められた。このうち、3 項目は苞葉/穂柄/絹糸の雄穂抽出期 (VT)

⁴⁹本表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。

及び絹糸抽出期初期 (ER1) において認められた (表 26, p72~73; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

ジベレリン (GA1、GA3、GA4、GA8、GA9、GA12、GA20、GA34 及び GA53) において、のべ5項目に有意な変化が認められた。これらの変化を示した5項目には、
5 活性型、不活性型又は合成段階での中間型のジベレリンが含まれる。(表 26, p72~73; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

オーキシシン (IAA、IAA-Asp 及び IAA-Me) において、のべ2項目に有意な変化が認められた。これらの変化は穂軸/胚珠の絹糸抽出期初期 (ER1) の IAA-Asp 及び絹糸
10 抽出期後期 (LR1) の IAA-Me についてのみ認められたものであり、穂軸/胚珠における他の生育段階及び苞葉/穂柄/絹糸における全ての生育段階において有意差は認められなかった (表 26, p72; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

ジャスモン酸及びサリチル酸において、16葉期 (V16) の穂軸/胚珠において1項目
15 (サリチル酸) が有意に変化していた。しかし、それ以外の生育段階や部位でサリチル酸は変化していなかった (表 26, p72; 別添資料 12 の Table 1, p5)。

解析した植物ホルモンのうち、比較的大きな含有量の変化が認められたものとして、絹糸抽出期後期 (LR1) における穂軸/胚珠での IAA-Me の減少が挙げられる。
20 IAA-Me の含有量は対照の非組換えトウモロコシで 113.16 pmol/g であるのに対し、本組換えトウモロコシでは 7.44 pmol/g と 93%減少していた。IAA-Me は不活性型のオーキシシンであり (Li et al., 2008)、活性型のオーキシシンである IAA に転換される。しかし、絹糸抽出期後期 (LR1) の穂軸/胚珠における IAA の含有量は、対照の非組換えトウモロコシで 16.61 pmol/g、本組換えトウモロコシで 8.16 pmol/g であり、両
25 者の間に統計学的な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の絹糸抽出期後期 (LR1) における穂軸/胚珠で認められた IAA-Me の減少は、活性型オーキシシンである IAA の含有量に有意な変化をもたらすものではないと考えられた。

なお、本組換えトウモロコシで IAA-Me の含有量が減少していたにもかかわらず
30 IAA の含有量が有意に変化していなかったことの原因として、トウモロコシにおける IAA の産生には IAA-Me とは独立した代謝経路であるトリプトファン経路が優先的に働いている (Kriechbaumer et al., 2006) ことが挙げられる。絹糸抽出期後期 (LR1) の穂軸/胚珠におけるトリプトファンの含有量では、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的な有意差は認められなかった (別
35 添資料12のTable 1, p5)。さらに、IAAの不活性型の分解産物である IAA-Asp においても、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的な有意差は認められなかった (別添資料12のTable 1, p5)。

表 26 雌穂において複数の生育段階で統計学的に有意な変化が認められた項目⁵⁰

サンプル	成分	生育段階	平均値		差異 (%)	P-値	
			本組換え トウモロコシ	対照品種			
穂軸/胚珠	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Ala	VT	4789.46	5415.44	-11.56	0.001
		Arg	VT	1224.88	1432.38	-14.49	0.011
		Asp	VT	1807.28	2081.01	-13.15	0.011
		Gly	VT	284.97	316.49	-9.96	0.041
		Ile	VT	533.09	584.73	-8.83	0.002
		Leu	VT	630.82	673.33	-6.31	0.021
		Phe	VT	429.88	514.29	-16.41	0.001
		Ser	VT	3365.58	3640.58	-7.55	0.027
		Thr	VT	689.40	730.74	-5.66	0.043
		Trp	VT	116.26	130.47	-10.89	0.044
		Tyr	VT	1007.13	1129.62	-10.84	0.001
	Val	VT	954.31	1075.83	-11.30	0.017	
	炭水化物 ($\mu\text{Moles/g DW}$)	デンプン ^a	VT	724.17	637.43	13.61	0.016
			EARLY R1	1056.52	914.05	15.59	0.002
	植物ホルモン (pmole/g FW)	7'OH-ABA	VT	143.82	163.21	-11.88	0.001
		iP	EARLY R1	0.15	0.32	-51.98	0.000
		iPR	V16	2.89	1.31	120.65	0.000
			EARLY R1	2.92	4.07	-28.32	0.002
		DHZR	V16	0.53	0.74	-29.34	0.022
		GA3	EARLY R1	1.03	0.83	24.51	0.013
		IAA-Asp	EARLY R1	0.70	1.12	-37.37	0.050
		IAA-Me	LATE R1	7.44	113.61	-93.45	0.000
	SA	V16	18.61	13.62	36.65	0.041	
苞葉/穂柄/絹糸	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Arg	LATE R1	323.52	460.02	-29.67	0.014
		Asp	VT	1452.69	1663.59	-12.68	0.007
			EARLY R1	1030.13	1205.78	-14.57	0.019
			LATE R1	904.92	1500.90	-39.71	0.000
		Gln	LATE R1	2522.69	4138.52	-39.04	0.000
		Glu	EARLY R1	2746.01	3168.52	-13.33	0.028
		Gly	VT	365.14	303.24	20.41	0.018
		Ile	VT	514.54	562.96	-8.60	0.016
Leu	VT	689.40	801.16	-13.95	0.000		

⁵⁰本表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。

表 26 雌穂において複数の生育段階で統計学的に有意な変化が認められた項目
(続き)

サンプル	成分		生育段階	平均値		差異 (%)	P-値	
				本組換え トウモロコシ	対照品種			
苞葉/穂柄/絹糸	遊離アミノ酸 ($\mu\text{g/g DW}$)	Phe	VT	457.96	517.55	-11.51	0.003	
		Trp	VT	123.19	141.23	-12.77	0.035	
	炭水化物 ($\mu\text{Moles/g DW}$)	デンプン ^a		VT	95.28	66.41	43.48	0.042
		植物ホルモン (pmole/g FW)	ABA	VT	704.62	804.64	-12.43	0.002
	EARLY R1			167.67	232.56	-27.90	0.026	
	DPA		LATE R1	2922.35	2349.67	24.37	0.003	
	tZ		EARLY R1	0.94	0.80	17.85	0.001	
			LATE R1	1.14	0.87	31.05	0.000	
	ZG		LATE R1	172.43	147.77	16.69	0.022	
	iP		LATE R1	0.68	0.33	105.59	0.000	
	iPR		LATE R1	3.56	4.56	-22.09	0.009	
	DHZ		V16	0.17	0.29	-41.12	0.038	
	GA1		EARLY R1	0.99	1.49	-33.36	0.025	
	GA9		LATE R1	0.12	0.02	516.78	0.017	
	GA53		V16	1.61	1.36	18.78	0.040	
LATE R1		0.42	0.73	-42.97	0.015			

^aデンプンは乾燥重 1g 当たりのブドウ糖の μMoles で示されている。

5

以上に述べた代謝解析の結果をまとめると、2012 年米国におけるほ場試験では分析した代謝産物のうち 2 項目のみに統計学的に有意な変化が認められ、2013 年の米国における温室試験では代謝産物 (遊離アミノ酸、炭水化物及び植物ホルモン) の複数の項目に変化が認められた。

10

上述した遺伝子発現解析及び代謝解析の結果から、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現により、少なくとも 6 種類の遺伝子群に含まれる内在性遺伝子の発現が変化すると考えられた。また、それに伴う複数の代謝産物の含有量の変化が、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大に関与する可能性が考えられた。

15

4. 本組換えトウモロコシにおける雌穂重増大への **ATHB17Δ113** 蛋白質による影響のまとめ

- 5 上述した第 1 項目、第 2 項目及び第 3 項目の結論をまとめると、本組換えトウモロコシでは、**ATHB17Δ113** 蛋白質により引き起こされるドミナント・ネガティブ作用によってトウモロコシ内在性の転写因子である **HD-Zip II** 蛋白質が拮抗阻害され、少なくとも 6 種類の遺伝子群に含まれる内在性遺伝子の発現が変化すると考えられた。また、それに伴う複数の代謝産物の含有量の変化が、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大に関与する可能性が考えられた。

本組換えトウモロコシにおいて N 末端の 113 アミノ酸が欠失した ATHB17 蛋白質が発現することの証明及び ATHB17 蛋白質と既知のアレルゲンとの類似性の解析

5 T-DNA 領域における *ATHB17* 遺伝子発現カセットはイントロンである *I-Ract1* を含んでいる (表 1, p13)。一般的に、mRNA 前駆体のスプライシングは、mRNA 前駆体からのイントロンの除去及びエクソン領域の結合からなる過程である (Simpson and Filipowicz, 1996)。本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* mRNA の配列を調べるため、*ATHB17* 遺伝子の転写産物を RT-PCR 法により増幅し、その配列をシーケンス解析により確認し、*ATHB17* mRNA の配列を別添資料 13

10 に示した。本組換えトウモロコシにおいて、*ATHB17* mRNA はイントロンである *I-Ract1* の大部分及び *ATHB17* 遺伝子の一部を除去するスプライシングを受ける (図 10, p75)。確認された mRNA のスプライシングにより生じたコード配列から、N 末端の 113 個のアミノ酸を持たない ATHB17 蛋白質が発現すると予想された。ATHB17 Δ 113 蛋白質の存在を確認するため、ウエスタンブロット分析を実施した。その結果、予想された分子量に相当するバンドが検出された (別添資料 14

15 の Figure 2, p17)。

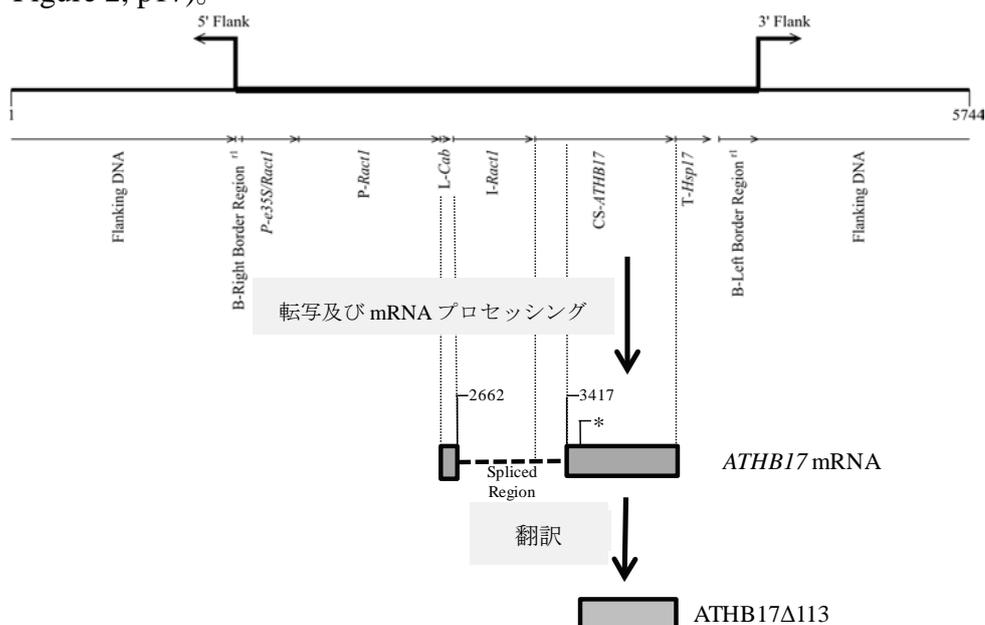


図 10 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図及び *ATHB17* 遺伝子の転写、mRNA プロセッシング及び翻訳の模式図⁵¹

20 *ATHB17* RNA の核酸配列は、RT-PCR の後、サンガー法によるシーケンス解析により決定した。これにより得られた *ATHB17* RNA の核酸配列の情報から、トウモロコシにおける *ATHB17* RNA のスプライシング部位が特定された。この情報から、*ATHB17* RNA はトウモロコシでは、*I-Ract1* 及び *CS-ATHB17* のコード配列のうち翻訳開始領域を含む 5' 末端領域 (図中に点線で示した 2662~3417 の領域) がスプライシングにより切除されると考えられた。スプライシング後の *ATHB17* RNA では、

25 図中の*印で示した部分が翻訳開始サイトになるため、本組換えトウモロコシでは、シロイヌナズナで見られる完全長の *ATHB17* 蛋白質と比較して N 末端の 113 アミノ酸が欠失した *ATHB17* 蛋白質が発現すると予想された。

⁵¹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。

ATHB17Δ113 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か AD_2013⁵²を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

5

⁵² AD_2013 : Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、2013 年 1 月の時点で 1,630 配列が含まれる。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

ATHB17Δ113 蛋白質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質のクラス II
コンセンサス配列への結合を阻害することによるドミナント・ネガティブ作用
によってトウモロコシ内在性遺伝子の発現に影響を与える。その影響を受ける
代謝経路はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する既存の代謝経路であ
ると考えられる。このことから、新規の代謝産物が発現するとは考えにくい。
したがって、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって既存の代謝産物の量が増減す
る可能性はあるが、新規の代謝系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-ZMAP5714 は、*Escherichia coli*
由来のベクター pUC (Vieira and Messing, 1987) などをもとに構築された。

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-ZMAP5714 の塩基数は 11,673
bp である。なお、PV-ZMAP5714 の塩基配列は別添資料 15 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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。また、形質転換個体の選抜マーカーとして、除草剤グリホ
サートに対する耐性を付与する *Agrobacterium sp.* CP4 株由来の *cp4 epsps* 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

5 宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 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に関しては、図 1 (p12) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10

PV-ZMAP5714 の中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される従来トウモロコシ品種 LH244 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

15

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

20 従来トウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚を PV-ZMAP5714 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、未成熟胚をカルベニシリンを添加した組織培養培地へ移した。形質転換している個体を、除草剤グリホサートを添加した培地において選抜した。

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

25

30 カルベニシリンを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。さらに、本組換えトウモロコシの R5F1 世代の種子⁵³において、形質転換に用いた PV-ZMAP5714 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMAP5714 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 16 の Table 1, p11)。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。

⁵³ 収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 20 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

5 分裂細胞から培地上で再分化させて得られた再分化個体 (R0) を土壌に移植した。その後、自殖により導入遺伝子をホモ化し、選抜された個体の後代を解析及び形態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えトウモロコシを選抜した。

10 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子及び蛋白質の発現の安定性及びわが国での隔離ほ場試験に供試する予定の世代等については、図 11 (p80) の育成図に記載した。なお、本申請の対象は、LH244 R3 世代及び LH244 R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

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

25

【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 T-DNA 領域が染色体上に存在し、メンデルの法則に従って遺伝しているかを調べるため、本組換えトウモロコシの TI: BC1F1、TI: BC2F1 及び TI: BC3F1 世代において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した。

10 試験に供試する TI: BC1F1 世代 (図 11, p80) を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜し、自殖することで R2 世代を作出した。その後さらに 2 回の自殖をすることで、R4 世代を作出した。T-DNA 領域をホモで有する本組換えトウモロコシの R4 世代を、*ATHB17* 遺伝子を持たない反復親と交配し、T-DNA 領域をヘテロで有する R4F1 世代を作出した。得られた R4F1 世代に対し反復親と戻し交配を行い、TI: BC1F1 世代を作出した。さらに得られた TI: BC1F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を Real-Time TaqMan PCR 法により選抜し、反復親と戻し交配を行って TI:BC2F1 世代を作出した。同様に、TI:BC2F1 世代で T-DNA 領域をヘテロで有する個体を反復親と戻し交配することで TI:BC3F1 世代を作出した。これら TI: BC1F1、TI: BC2F1 及び TI: BC3F1 世代において行われた End-Point TaqMan PCR 法による T-DNA 領域の有無を確認した結果から分離比を求め、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った (別添資料 17)。

25 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遺伝していることが確認された (表 27, p82; 別添資料 17 の Table 1, p6)。したがって、本組換えトウモロコシの T-DNA 領域は染色体上に存在していると考えられた。

表 27 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の分離比⁵⁴

世代	供試個体数	実測値 ¹		1:1 の分離比の期待値			
		陽性個体数	陰性個体数	陽性個体数	陰性個体数	χ^2	p 値 ²
TI: BC1F1	180	88	92	90.00	90.00	0.09	0.766
TI: BC2F1	178	82	96	89.00	89.00	1.10	0.294
TI: BC3F1	181	101	80	90.50	90.50	2.44	0.119

¹実測値は End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA 領域の有無を確認した。

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 (p<0.05)。

⁵⁴本表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。

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 導入遺伝子のコピー数、非意図的なプラスミド配列の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術⁵⁵及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)⁵⁶ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及びシーケンス解析を実施した (別添資料 18)。以下に、本解析の手法及び本組換えトウモロコシを用いて行なった解析の結果を述べる。

10 NGS では、植物ゲノムを約 100 bp の DNA フラグメントに断片化し、この DNA フラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina) を用いて解析することで、冗長度 75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 12, p85 の ①)。次に、JSA において、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの塩基配列と照合⁵⁷する (図 12, p85 の ②)。この結果において導入用プラスミドとの相同性がある配列及び相同性がない配列の両方をもつ DNA フラグメントを、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列において重複する領域を並べることで、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 12, p85 の ③)。こうして NGS/JSA により接合領域の数を調べ、さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及びシーケンス解析により調べることで、導入遺伝子のコピー数と非意図的なプラスミド配列の有無を判定することが出来る。仮に 1 コピーの導入遺伝子がゲノムの 1 ヲ所に存在する場合には、2 つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。

⁵⁵ 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

⁵⁶ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSA では、まず、NGS により本組換えトウモロコシのゲノムの全領域に相当する配列を 100 bp 程度のフラグメントとして増幅し、次に、これらのフラグメントを JSA によって T-DNA 領域と宿主の内臓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コピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

⁵⁷ BLAST 検索において、*E*-score が 1×10^{-5} 以下且つ 30 bp 以上の領域で 96.7% 以上の相同性が認められた配列を選抜した。

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/JSA に供試した結果、本組換えトウモロコシで 246.4Gb、対照の非組換えトウモロコシで 246.5Gb (それぞれ平均冗長度 75 以上) の塩基配列を解析することができた (別添資料 18 の Appendix Table 3, p43)。本組換えトウモロコシでは 2 つの接合領域が特定され (図 13, p86; 別添資料 18 の p29)、これらはそれぞれ導入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 18 の Figure 4, p54~55)。なお、対照の非組換えトウモロコシでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 18, p29)。

また、本組換えトウモロコシにおいて検出された接合領域及び導入遺伝子を含む領域を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA 領域が導入されていることが確認された (別添資料 18 の Appendix Figure 5, p56、Appendix Figure 6, p57~59 及び Appendix Figure 7, p60~64)。

以上のことから、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 T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された。また、NGS/JSA において検出された接合領域は、導入遺伝子に起因する接合領域のみであり (図 13, p86; 別添資料 18 の p29)、PV-GMIR13196 の外側骨格領域との相同性を持つジャンクション配列は認められなかった (別添資料 18 の追加資料の Figure 1) ことから、外側骨格領域が挿入されていないことが確認された。さらに複数世代 (R3、R4、R4F1、R5 及び R5F1 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS/JSA 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 18, p32~34)。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 13 (p86) に示した。

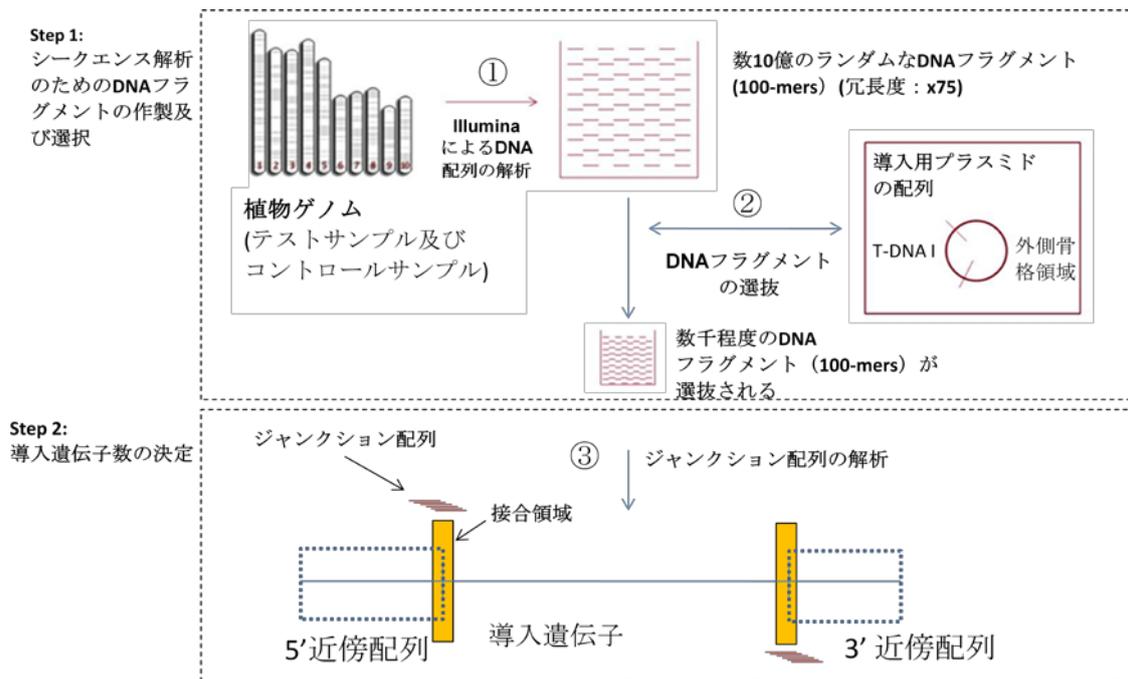


図 12 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., 2012)⁵⁸

5

⁵⁸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。

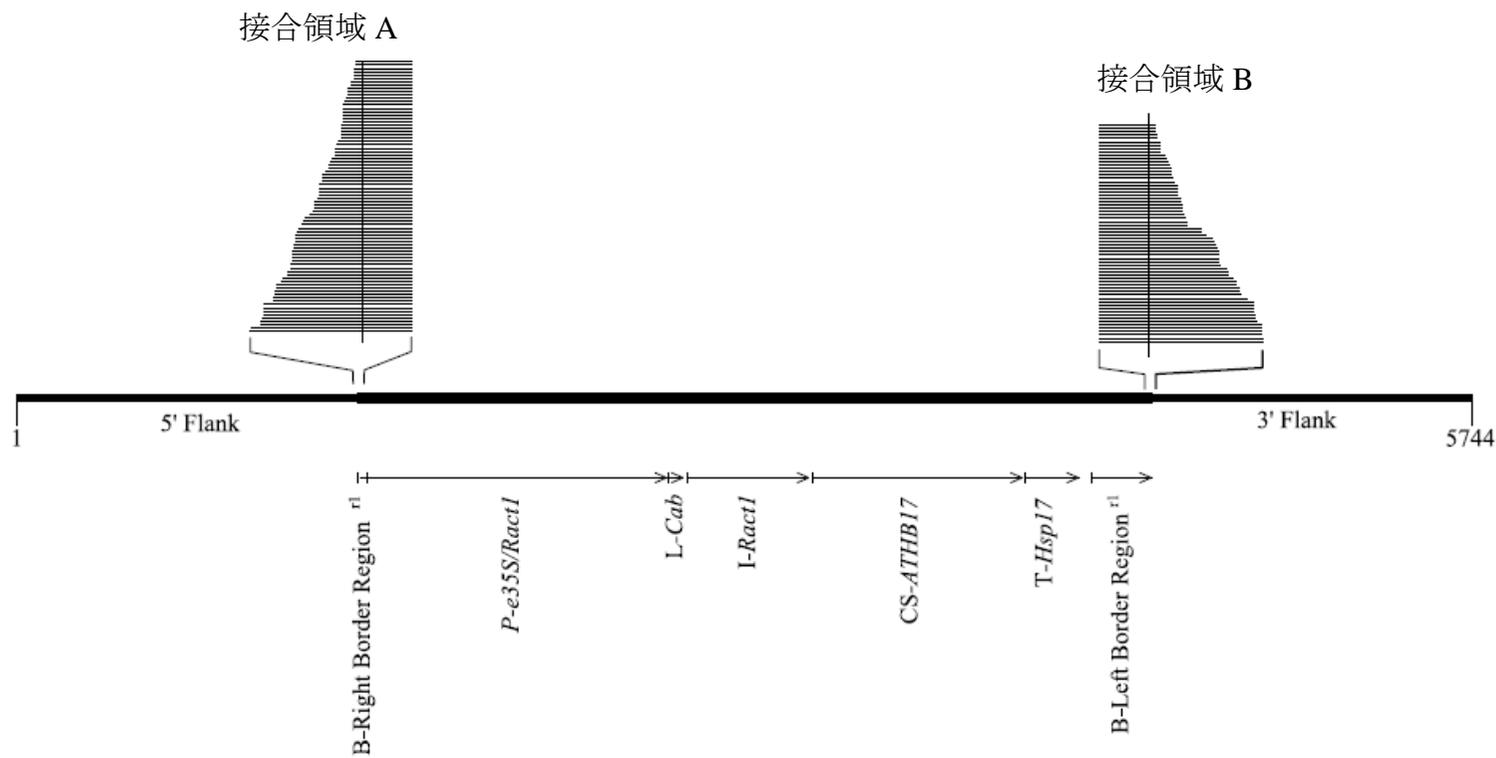


図 13 本組換えトウモロコシの導入遺伝子図⁵⁹

5 図は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。導入遺伝子内の矢印 (→) により、本組換えトウモロコシ中の構成要素の配列の方向を示した。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。

⁵⁹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。

- 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

1 コピーなので該当しない (別添資料 18, p27~35)。

5

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

ウエスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代 (R3、
10 R4、R4F1、R5 及び R5F1 世代) において ATHB17Δ113 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 14 の Figure 2, p17)。

2012 年に米国の 5 ヲ所のほ場 (アーカンソー州、アイオワ州 (2 ヲ所)、カンザス州及びペンシルバニア州) において、4 反復で栽培した本組換えトウモ
15 ロコシの葉、根、地上部、茎葉、花粉、種子及び絹糸での ATHB17Δ113 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 28, p88~89; 別添資料 19)。その結果、本組換えトウモロコシの葉、根 (OSR1 及び OSR2)、地上部及び絹糸において、ATHB17Δ113 蛋白質の発現が確認された (表 28, p88~89; 別添資料 19 の Table 1, p17 及び p18)。それ以外の組織 (根 (OSR3、OSR4、黄熟期及び成
20 熟期)、茎葉、花粉及び種子) における ATHB17Δ113 蛋白質の発現量は定量限界値 (LOQ) 未満であった (表 28, p88~89; 別添資料 19 の Table 1, p17~18)。

表 28 本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、茎葉、花粉、種子及び絹糸における ATHB17Δ113 蛋白質の発現量 (2012 年、米国)⁶⁰

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 (μg/g 乾燥重) ³	LOQ / LOD ⁴ (μg/g 乾燥重)
葉 (OSL1)	3~4 葉期	0.014 (0.0020) 0.0096 – 0.017	0.00109/0.00049
葉 (OSL2)	6~9 葉期	0.0094 (0.0061) 0.0016 – 0.020	0.00109/0.00049
葉 (OSL3)	10~12 葉期	0.0058 (0.0018) 0.0026 – 0.0089	0.00109/0.00049
葉 (OSL4)	雄穂抽出期	0.0041 (0.0017) 0.0014 – 0.0075	0.00109/0.00049
根 (OSR1)	3~4 葉期	0.0023 (0.0016) 0.00083 – 0.0058	0.00078/0.00065
根 (OSR2)	6~9 葉期	0.0012 (0.00037) 0.00081 – 0.0024	0.00078/0.00065
根 (OSR3)	10~12 葉期	<LOQ ⁵ (N/A) N/A – N/A	0.00078/0.00065
根 (OSR4)	雄穂抽出期	<LOD (N/A) N/A – N/A	0.00078/0.00065
根 (黄熟期)	黄熟期	<LOD (N/A) N/A – N/A	0.00078/0.00065
根 (収穫直後)	成熟期	<LOD (N/A) N/A – N/A	0.00078/0.00065

⁶⁰本表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。

表 28 本組換えトウモロコシの葉、根、地上部、茎葉、花粉、種子及び絹糸における ATHB17Δ113 蛋白質の発現量 (2012 年、米国) (続き)

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 (μg/g 乾燥重) ³	LOQ / LOD ⁴ (μg/g 乾燥重)
地上部 (OSWP1)	3~4 葉期	0.015 (0.0057) 0.0036 – 0.023	0.00078/0.00063
地上部 (OSWP2)	6~9 葉期	0.012 (0.0031) 0.0062 – 0.020	0.00078/0.00063
地上部 (OSWP3)	10~12 葉期	0.0087 (0.0020) 0.0060 – 0.013	0.00078/0.00063
地上部 (OSWP4)	雄穂抽出期	0.0044 (0.0015) 0.0023 – 0.0064	0.00078/0.00063
地上部	黄熟期	0.0018 (0.00064) 0.0011 – 0.0035	0.00078/0.00063
茎葉	成熟期	<LOQ (N/A) N/A – N/A	0.00078/0.00063
花粉	絹糸抽出期	<LOD (N/A) N/A – N/A	0.00156/0.00055
種子	成熟期	<LOD (N/A) N/A – N/A	0.00156/0.00028
絹糸	絹糸抽出期	0.0033 (0.0015) 0.0011 – 0.0058	0.00109/0.00019

¹ OSL= over season leaf (葉)、OSR= over season root (根)、OSWP= over season whole plant (地上部)

² 採取した各組織の生育段階

5 ³ 蛋白質の発現量は平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の乾燥重 1g 当たりの μg で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変量係数で除算して求めた。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 – 最大値) は全ての反復で採取されたそれぞれの組織ごとの値を基に計算されている (OSL4、OSR1、OSL2、絹糸を除く全ての組織で n=20。OSL4、OSR1 及び OSL2 は n=16、絹糸は n=17)。

10 ⁴ LOD=検出限界; LOQ=定量限界

⁵ OSR3 については、1 サンプルを除いて LOD 未満であったため、この 1 サンプルについて 2 回の追加分析を実施し、これら 3 回の試験の平均値として発現量を 0.0017 μg/g DW と算出した。

- 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、End-Point TaqManPCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 20)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10 ng であることが推奨されており、葉の一部 (リーフディスク) を用いて検定できる。

15 本法の信頼性については 45 サンプルの本組換えトウモロコシ及び 45 サンプルの非組換えトウモロコシを用いて再現性の確認試験を行った (別添資料 20 の p2)。

- (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 第一-2-(1)-ロ-② (p16~76) に記載したように、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の発現によって絹糸抽出期 (R1) における雌穂重が増大する。この現象は、HD-Zip II に属する遺伝子の 1 つである *JAB* 遺伝子をノックアウトしたシロイヌナズナにおいて子実に特異的な生長が変化 (Zúñiga-Mayo et al., 2012) したと一致する。

30 一方で、シロイヌナズナにおいて *ATHB17* 遺伝子が乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を付与することが報告されている (Park et al., 2013) ことから、これらのストレス耐性が *ATHB17* 遺伝子を発現する本組換えトウモロコシにおいて高まっているかを調べるため、乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性の試験を人工気象室及び温室で行った (別添資料 21、別添資料 22、別添資料 23 及び別添資料 24)。

35

その結果、人工気象室で実施した試験 (別添資料 22 及び別添資料 23) において、重度の乾燥条件及び重度の塩条件のそれぞれでトウモロコシの乾燥

重に統計学的有意差は認められなかった。軽度の乾燥条件及び軽度の塩条件では、人工気象室で実施した試験で、乾燥重において統計学的有意差が認められた (別添資料22の Table 2, p7 及び別添資料23の Table 2, p7)。そのため、軽度の乾燥条件及び塩条件で反復数を増やして追加の温室試験を行ったところ、乾燥重において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 21 の Table 2, p6 及び別添資料 24 の Table 2, p6)。

また、シロイヌナズナにおいて HD-Zip II 蛋白質が、光合成能力の調節や避陰反応のシグナル伝達因子として機能していることが報告されている (Nakamura et al., 2006; Ciarbelli et al., 2008; Sorin et al., 2009; Hymus et al., 2013) ため、光合成速度及び避陰反応を調査した。その結果、これらの項目において本組換えトウモロコシ及び *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する組換えトウモロコシ系統と対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的な有意差は見られなかった (別添資料 21 及び別添資料 25)。

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の宿主は非組換えトウモロコシ品種 LH244 であり、導入遺伝子は *ATHB17* 遺伝子である。

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。

第一-2-(1)-ロ-③ (p77) に記載のとおり、*ATHB17Δ113* 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質と同様の転写因子であり、*ATHB17Δ113* 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質がコンセンサス配列に結合することを阻害する働きを持つため、その影響を受ける代謝経路はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する既存の代謝経路であると考えられる。このことから、新規の代謝産物が産生されるとは考えにくい。したがって、*ATHB17Δ113* 蛋白質の発現によって既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、新規の代謝系が生じるものではないと考えられる。

通常、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が、本組換えトウモロコシにおける *ATHB17* 遺伝子の作用機序 (第一

-2-(1)-ロ-②, p37~38 及び p66~73) において、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大をもたらすプロセスが特定できなかったことを鑑みて、生理学的又は生態学的特性についてのデータについて評価を行い、これらも含めて生物多様性影響評価を行った。

5

a 形態及び生育の特性

10 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の形態及び生育に関する特性を比較するため、2012年に米国の13ヵ所⁶¹のほ場において13項目(苗立ち数、雄穂開花期までの日数、絹糸抽出期までの日数、緑色保持度、着雌穂高、稈長、落下雌穂数、挫折型倒伏株数、転び型倒伏株数、最終株数、種子中の水分含量、1ブッシェル当たりの種子の重量、単位面積当たりの収量(t/ha))を調査し、全ほ場で得られたデータを通して統計解析を行った(別添資料26)。なお、参考品種として各ほ場に4品種の商業栽培品種を供試し、各ほ場において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシを4反復で栽培した。

15 上記の13項目について統計解析を行った結果、着雌穂高において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差が認められた($p<0.05$) (別添資料26のTable 2, p5)。着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが111.1 cm、対照の非組換えトウモロコシが107.5 cmであり、本組換えトウモロコシの方が大きかった。しかし、本組換えトウモロコシの値は、参考として供試した商業栽培品種4品種の平均値の範囲内(86.9~133.2 cm)であった(別添資料26のTable 2, p5)。

25

b 生育初期における低温又は高温耐性

30 本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間の生育初期における低温耐性を比較するために、約8葉期の植物体を3段階の温度条件(日中/夜間)(適温: 30°C/22°C、やや低温: 20°C/15°C、低温: 15°C/5°C)で人工気象室(日中14時間/夜間10時間)において栽培し、調査を行った。低温処理開始後6日目、12日目及び24日目に生育段階を調査し、低温処理開始後24日目の個体の乾燥重について調査を行った(1個体/反復、20反復)。

35 その結果、やや低温の条件ではいずれの項目についても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められな

⁶¹アーカンソー州、アイオワ州(2ヵ所)、イリノイ州(2ヵ所)、インディアナ州、カンザス州、ノースカロライナ州、ネブラスカ州(3ヵ所)、ペンシルバニア州(2ヵ所)

かった (別添資料 27 の Table 2, p7)。

5 低温の条件では低温処理開始後 24 日目の乾燥重において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた (別添資料 27 の Table 2, p7)。低温処理開始後 24 日目における乾燥重の平均値は、本組換えトウモロコシが 130.2 g、対照の非組換えトウモロコシが 144.0 g であり、本組換えトウモロコシの方が小さかった。

c 成体の越冬性又は越夏性

10 トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死する。再生長し栄養繁殖したり、種子を生産したりすることはない。なお、隔離ほ場試験の終了時に本組換えトウモロコシの越冬性を観察する予定である。

15 d 花粉の稔性及びサイズ

20 米国の 1 ヲ所 (アイオワ州) のほ場で栽培された本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種 4 品種から花粉を採取し、その稔性 (充実度) 及びサイズを調査した。その結果、いずれの項目においても本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 28 の Table 2, p15 及び Figure 1, p16)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

25 第一-2-(6)-②-a (p92) に記載したとおり、単位面積当たりの収量に関しては、本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

30 脱粒性については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシはともに、収穫時、雌穂は苞皮に覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

35 種子の休眠性及び発芽率について、米国の 3 ヲ所 (アイオワ州、イリノイ州及びペンシルバニア州) のほ場にて収穫された本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種 4 品種の種子を 4 反復各約 100 粒ずつ温室にて播種し、休眠性と発芽率の調査を行った。温度条件は 20°C 16 時間/30°C 8 時間と、他の 6 つの温度条件 (5°C、10°C、20°C、30°C、10°C 16 時間/20°C 8 時間及び 10°C 16 時間/30°C 8 時間) を採用した。また、発芽種子については正常発芽率と異常発芽率に分けて測定し、非発芽種子について

は枯死種子率、吸水膨潤状態種子率 (viable firm-swollen) 及び硬実種子率に分けて測定した。その結果、すべての項目において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 29 の Table 3, p21)。なお、隔離ほ場試験においても本組換えトウモロコシの種子の休眠性を観察する予定である。

5

f 交雑率

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

10

g 有害物質の産生性

米国の温室において本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び従来の商業栽培品種を用いて鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、検定植物であるレタスの発芽株数、生育段階、草丈、新鮮重、乾燥重に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 30 の Table 1, p5)。なお、隔離ほ場試験において鋤込み試験、後作試験及び土壌微生物相試験を行う予定である。

15

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

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

10 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 32 年 5 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

- 15 (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。
- 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同時に、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

- 25 (1) 本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。
- 30 (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。
- 35 (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。

(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。

5 (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。

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添の試験計画書の図 1 (p128) に示した。

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 2007~2013 年の間に米国、アルゼンチン及びチリにおいて延べ 299 ヲ所のほ場試験が行われているが (表 29, p97)、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 30 (p97) のとおりである。

表 29 海外において本組換えトウモロコシのほ場試験を行ったほ場の数及び国⁶²

年	ほ場の数	国
2007	2	米国
2008	25	米国
2009	27	米国
2010	58	米国
2011	70	米国
2012	52	米国
2012	2	アルゼンチン
2012	4	チリ
2013	59	米国

5 表 30 本組換えトウモロコシの海外における申請予定⁶³

2015年2月現在

申請時期	機関	安全性審査の種類
2014年6月	カナダ保健省 (Health Canada)	食品
2014年6月	カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料
2014年8月	米国農務省 (USDA)	環境
■■■■ ⁶⁴	米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料
■■■■ ⁶⁴	台湾食品薬物管理局 (TFDA)	食品
	欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料
	韓国食品医薬品安全処 (MFDS)	食品
	韓国農村振興庁 (RDA)	環境
	オーストラリア・ニュージーランド 食品基準機関 (FSANZ)	食品
■■■■ ⁶⁴	中国農業部 (MOA)	食品・飼料・環境

⁶²本表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。

⁶³本表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。

⁶⁴社外秘につき非開示。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一-2-(6)-② (p91~94) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性、導入遺伝子の特性及び生理学的又は生態学的特性データから評価を行った。

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

10

トウモロコシは 1579 年に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が自然条件下で自生した例は報告されていない。

15

本組換えトウモロコシで発現する *ATHB17Δ113* 蛋白質は、内在性 *HD-Zip II* 蛋白質と同じコンセンサス配列に結合し、内在性 *HD-Zip II* 蛋白質の標的遺伝子の発現抑制を解除することで、内在性 *HD-Zip II* 蛋白質の影響を受ける下流遺伝子の発現を変化させると考えられる (第一-2-(1)-ロ-②-2-1), p20~26)。実際に、本組換えトウモロコシにおいて複数の遺伝子群における遺伝子発現及び複数の代謝産物の含有量の変化 (図 9, p65; 表 26, p72~73; 別添資料 10 の Table 1, p16) と、絹糸抽出期 (R1) における雌穂重の増大 (表 2, p17) が確認されている。

20

ATHB17Δ113 蛋白質による内在性遺伝子の発現の変化が、本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるかどうかを検討するため、1) 本組換えトウモロコシを用いたほ場試験及びストレス耐性試験の結果、2) *ATHB17* 遺伝子による影響を受けると考えられる内在性遺伝子の範囲とその程度、について以下に考察した。

25

上記の 1) に関して、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの競合における優位性に関わる諸形質 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率; 第一-2-(6)-②-a~e, p92~94) を調査した。その結果、形態及び生育の特性では、着雌穂高において統計学的有意差が認められた。さらに、生育初期における低温耐性の試験では、低温処理 (15°C/5°C) 開始後 24 日目の乾燥重で統計学的有意差が認められた。

35

着雌穂高の平均値は、本組換えトウモロコシが 111.1 cm、対照の非組換えトウモロコシが 107.5 cm であり、本組換えトウモロコシの方が大きかった。

しかし、本組換えトウモロコシの値は、参考として供試した商業栽培品種 4 品種の平均値の範囲内 (86.9~133.2 cm) であった (別添資料 26 の Table 2, p5)。

低温処理開始後 24 日目における乾燥重の平均値は、本組換えトウモロコシが 130.2 g、対照の非組換えトウモロコシが 144.0 g であり、本組換えトウモロコシの方が小さく、その差はわずかであるため、このことが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

したがって、本組換えトウモロコシにおいて、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって生じる内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量の変化は、雌穂重の増大を生じるものの、競合における優位性に関わるほど形態及び生育特性に影響を与えるものではないと考えられた。

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) において *ATHB17* 遺伝子が乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性を付与することが報告されている (Park et al., 2013) ため、本組換えトウモロコシを異なる乾燥条件 (別添資料 21 及び別添資料 22) 及び異なる塩条件 (別添資料 23 及び別添資料 24) で栽培し、生育段階及び乾燥重を対照の非組換えトウモロコシと比較した。

その結果、人工気象室で実施した試験 (別添資料 22 及び別添資料 23) では重度の乾燥条件及び重度の塩条件における乾燥重に統計学的有意差が認められなかったため、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性は高まっていないと考えられた。また、軽度の乾燥条件及び軽度の塩条件については、人工気象室で実施した試験では乾燥重において統計学的有意差が認められた (別添資料 22 の Table 2, p7 及び別添資料 23 の Table 2, p7) が、反復数を増やして行った追加の温室試験では、乾燥重において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 21 の Table 2, p6 及び別添資料 24 の Table 2, p6)。このことから、軽度の乾燥条件及び塩条件においても、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性は高まっていないと考えられた。

したがって、本組換えトウモロコシの乾燥ストレス耐性及び塩ストレス耐性は対照の非組換えトウモロコシと同程度であると考えられた。

上記の 2) に関しては、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に与える影響を遺伝子発現解析及び代謝解析により調査した。2013 年米国における温室試験で実施した遺伝子発現解析の結果、発現が変化していた転写産物の割合は全転写産物の約 1.3% と比較的小さかった (第一-2-(1)-ロ-②-3-2)-(B), p39)。また、2012 年米国におけるほ場試験で実施した遺伝子発現解析では、通常用いられる基準では有意な発現の変化が認められず、より基準の緩い Raw-p 値を採用した場合であっても、全転写産物の約 0.01%

に相当する遺伝子の発現に変化が認められた程度であった (第一-2-(1)-ロ-②-3-2)-(A), p32~33)。代謝産物の含有量に与える影響についても、2013 年米国における温室試験で実施した代謝解析では複数の代謝産物の含有量に変化が認められたが (表 26, p72~73)、2012 年米国におけるほ場試験で実施した代謝解析では、含有量の変化が見られたのは 2 項目 (グルタミン及び IAA-Asp) のみであり、グルタミンを前駆体とする他の主要なアミノ酸や、活性型オーキシンである IAA を含む他の植物ホルモンにおいて有意な変化は認められなかった (別添資料 10 の Table 1, p16)。

5

10

以上のことから、本組換えトウモロコシにおいて ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に与える影響は、ほ場環境下では検出が困難なレベルの小さなものであると考えられた。

15

このように ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に大きな変化を与えないことは、以下に示した ATHB17Δ113 蛋白質の作用機序からも推察できる。

20

本組換えトウモロコシで発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、二量体を形成し HD-Zip II 蛋白質が認識するコンセンサス配列に結合する。さらに、ATHB17Δ113 蛋白質ではリプレッションドメインが欠失しているため、内在性 HD-Zip II 蛋白質のように標的遺伝子の発現を抑制することができない。このため、ATHB17Δ113 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質を拮抗的に阻害するドミナント・ネガティブ作用 (図 4, p26) により、HD-Zip II 蛋白質が結合するコンセンサス配列をプロモーター領域に有する遺伝子や、その下流のトウモロコシ内在性遺伝子の発現を変化させ、これが代謝産物の含有量にも影響を与えると推測された。したがって、ATHB17Δ113 蛋白質が影響を及ぼす遺伝子はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する経路に限定されると考えられる。

25

30

以上のことから、限定された環境で一定の作業要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、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

35

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (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は、限定された環境で一定の作業要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、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考えられた。

2 有害物質の産生性

15 (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 1579 年に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性は報告されていない。

20 ATHB17Δ113 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質と同様の転写因子であり、ATHB17Δ113 蛋白質はトウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質がコンセンサス配列に結合することを阻害する働きを持つため、その影響を受ける代謝経路はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する既存の代謝経路であると考えられる。このことから、新規の代謝産物が発現するとは考えにくい。また、第二-1-(1) (p99~100) で記載したように、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現や代謝産物の含有量に与える影響は小さいと考えられた。したがって、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、その増減の幅は小さいと考えられた。

30 実際に、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの有害物質の産生性の有無を鋤込み試験及び後作試験 (第一-2-(6)-②-g, p94) により比較検討した結果、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 30 の Table 1, p5)。

35 また、本組換えトウモロコシ中で発現する ATHB17Δ113 蛋白質が既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている (第一-2-(1)-ロ-②, p76)。

したがって、本組換えトウモロコシにおいて、ATHB17Δ113 蛋白質の発現によって既存の代謝産物の量が増減する可能性はあるが、ATHB17 遺伝子の発現によって生じる内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量の変化は、有害物質の産生性を変化させるようなものではないと考えられた。

5

以上のことから、限定された環境で一定の作業要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、有害物質の産生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

—

20

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要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、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考えられた。

25

3 交雑性

30

(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。

35

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。

(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は、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

15 4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一-2-(6)-② (p91~94) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性、導入遺伝子の特性及び生理学的又は生態学的特性データを考慮し、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評価した。

10 **競合における優位性：**トウモロコシは 1579 年に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が自然条件下で自生した例は報告されていない。

15 ATHB17Δ113 蛋白質による内在性遺伝子の発現の変化が、本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるかどうかを検討するため、1) 本組換えトウモロコシを用いたほ場試験及びストレス耐性試験の結果、2) *ATHB17* 遺伝子による影響を受けると考えられる内在性遺伝子の範囲とその程度、について考察した。

20 上記の 1) に関しては、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で競合における優位性に関わる諸形質 (形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率) を比較検討した結果、本組換えトウモロコシの競合における優位性は高まっていないと考えられた。また、乾燥ストレス耐性試験及び塩

25 上記の 2) に関しては、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に与える影響は小さいことが、本組換えトウモロコシの遺伝子発現解析及び代謝解析の結果により示唆されている。遺伝子発現解析において検出された全転写産物に占める、発現の変化が認められた転写産物の割合は、温室で栽培された場合で約 1.3%、ほ場で栽培された場合で約 0.01%と小さかった。本組換えトウモロコシの代謝解析においても、温室で栽培された場合には複数の代謝産物の含有量に変化が認められたが、ほ場で栽培された場合に含有量に変化していた代謝産物はグルタミン及び IAA-Asp のみであり、グルタミンを前駆体とする他の主要なアミノ酸や活性型オーキシンである IAA を含む他の植物ホルモンにおいて有意な変化は認められなかった。また、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に大きな変化を与えないことは、ATHB17Δ113 蛋白質の作用機序からも推察できる。

30 本組換えトウモロコシで発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、内在性の HD-Zip II 蛋白質を拮抗的に阻害することで、内在性の HD-Zip II 蛋白質に影響を受ける下流遺伝子の発現が変化すると考えられる。したがって、ATHB17Δ113 蛋白質

質が影響を及ぼす遺伝子はトウモロコシ内在性 HD-Zip II 蛋白質が関与する経路に限定されると考えられる。以上のことから、ATHB17Δ113 蛋白質が内在性遺伝子の発現及び代謝産物の含有量に与える影響は限定的であることが示唆された。

5

したがって、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、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。

10

有害物質の産生性：トウモロコシは 1579 年に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性は報告されていない。

15

本組換えトウモロコシ中で発現する ATHB17Δ113 蛋白質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II 蛋白質と同様の転写因子であることから、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中で発現する ATHB17Δ113 蛋白質が既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有さないことが確認されている。

20

実際に、鋤込み試験及び後作試験の結果から、本組換えトウモロコシによる意図しない有害物質の産生性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を限定された環境で一定の作業要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、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。

25

交雑性：わが国において、トウモロコシと交雑が可能な近縁野生種は無いため、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、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。

30

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。

引用文献

- 5 Agalou, A., S. Purwantomo, E. Övernäs, H. Johannesson, X. Zhu, A. Estiati, R.J. de Kam, P. Engström, I.H. Slamet-Loedin, Z. Zhu, M. Wang, L. Xiong, A.H. Meijer and P.B.F. Ouwkerk. 2008. A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. *Plant Molecular Biology* 66: 87-103.
- Ariel, F.D., P.A. Manavella, C.A. Dezar and R.L. Chan. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science* 12: 419-426.
- 10 Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25: 25-29.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Berardini, T.Z.D. LiE. HualaS. BridgesS. BurgessF. McCarthyS. CarbonS.E. LewisC.J. MungallA. AbdullaV. WoodE. FeltrinG. ValleR.L. ChisholmP. FeyP. GaudetW. KibbeS. BasuY. BushmanovaK. EilbeckD.A. SiegeleB. McIntoshD. RenfroA. ZweifelJ.C. HuM. AshburnerS. TweedieY. Alam-FaruqueR. ApweilerA. AuchinchlossA. BairochD. BarrellD. BinnsM.C. BlatterL. BougueleretE. BoutetL.
- 30 BreuzaA. BridgeP. BrowneW.M. ChanE. CoudertL. DaughertyE. DimmerR. EberhardtA. EstreicherL. FamigliettiS. Ferro-RojasM. FeuermannR. FoulgerN. Gruaz-GumowskiU. HinzR. HuntleyS. JimenezF. JungoG. KellerK. LaihoD. LeggeP. LemercierD. LieberherrM. MagraneC. O'DonovanI. PedruzziS. PouxC. RivoireB. RoechertT. SawfordM. SchneiderE. StanleyA. StutzS. SundaramM. TognolliI.

- XenariosM.A. HarrisJ.I. DeeganA. IrelandJ. LomaxP. JaiswalM. ChibucosM.G. GiglioJ. WortmanL. HannickR. MadupuD. BotsteinK. DolinskiM.S. LivstoneR. OughtredJ.A. BlakeC. BultA.D. DiehlM. DolanH. DrabkinJ.T. EppigD.P. HillL. NiM. RingwaldD. SitnikovC. CollmerT. Torto-AlaliboS. LaulederkindM. ShimoyamaS. TwiggerP.
- 5 D'EustachioL. MatthewsR. BalakrishnanG. BinkleyJ.M. CherryK.R. ChristieM.C. CostanzoS.R. EngelD.G. FiskJ.E. HirschmanB.C. HitzE.L. HongC.J. KriegerS.R. MiyasatoR.S. NashJ. ParkM.S. SkrzypekS. WengE.D. WongM. AslettJ. ChanR. KishoreP. SternbergK. Van AukeV.K. KhodiyarR.C. LoveringP.J. TalmudD. Howe and M. Westerfield. 2010. The Gene Ontology in 2010: Extensions and refinements.
- 10 Nucleic Acids Research 38: D331-D335.
- 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.
- 15 Bou-Torrent, J., M. Salla-Martret, R. Brandt, T. Musielak, J.-C. Palauqui, J.F. Martínez-García and S. Wenkel. 2012. ATHB4 and HAT3, two class II HD-ZIP transcription factors, control leaf development in *Arabidopsis*. Plant Signaling Behavior 7: 1382-1387.
- 20 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].
- 25 Ciarbelli, A.R., A. Ciolfi, S. Salvucci, V. Ruzza, M. Possenti, M. Carabelli, A. Fruscalzo, G. Sessa, G. Morelli and I. Ruberti. 2008. The Arabidopsis homeodomain-leucine zipper II gene family: Diversity and redundancy. Plant Molecular Biology 68: 465-478.
- 30 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.

- Elhiti, M. and C. Stasolla. 2009. Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. *Plant Signaling & Behavior* 4: 86-88.
- Emery, J.F., S.K. Floyd, J. Alvarez, Y. Eshed, N.P. Hawker, A. Izhaki, S.F. Baum and
5 J.L. Bowman. 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology* 13: 1768-1774.
- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization statistical database. Food and
Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
10 <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> [Accessed February 25, 2014].
- Fisher, K.S. and A.F.E. Palmer. 1983. Maize. Pages 155-180 in *Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- 15 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.
- 20 Forestan, C. and S. Varotto. 2012. The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Molecular Plant* 5: 787-798.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L.
25 Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman 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.
- Frank, W., J. Phillips, F. Salamini and D. Bartels. 1998. Two dehydration-inducible
30 transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *The Plant Journal* 15: 413-421.

- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.
- 5 Green, K.A., M.J. Prigge, R.B. Katzman and S.E. Clark. 2005. *CORONA*, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *The Plant Cell* 17: 691-704.
- 10 Harris, J.C., M. Hrmova, S. Lopato and P. Langridge. 2011. Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. *New Phytologist* 190: 823-837.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 15 Hymus, G.J., S. Cai, E.A. Kohl, H.E. Holtan, C.M. Marion, S. Tiwari, D.R. Maszle, M.R. Lundgren, M.C. Hong, N. Channa, P. Loida, R. Thompson, J.P. Taylor, E. Rice, P.P. Repetti, O.J. Ratcliffe, T.L. Reuber and R.A. Creelman. 2013. Application of HB17, an *Arabidopsis* class II homeodomain-leucine zipper transcription factor, to regulate chloroplast number and photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Botany* 64: 4479-4490.
- 20
- Illumina. 2011. RNA-Seq data comparison with gene expression microarrays: A cross-platform comparison of differential gene expression analysis. Illumina, Inc., San Diego, California.
- 25
- Ito, M., Y. Sato and M. Matsuoka. 2002. Involvement of homeobox genes in early body plan of monocot. *International Review of Cytology* 218: 1-35.
- 30 Kagale, S., M.G. Links and K. Rozwadowski. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 1109-1134.

- Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- 5 Kim, Y., S. Park, S.J. Gilmour and M.F. Thomashow. 2013. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 75: 364-376.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 Kriechbaumer, V., W.J. Park, A. Gierl and E. Glawischnig. 2006. Auxin biosynthesis in maize. *Plant Biology* 8: 334-339.
- 25 Lamppa, G.K., G. Morelli and N.-H. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1370-1378.
- 30 Lejeune, P., E. Prinsen, H. Van Onckelen and G. Bernier. 1998. Hormonal control of ear abortion in a stress-sensitive maize (*Zea mays*) inbred. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 481-488.
- Li, L., X. Hou, T. Tsuge, M. Ding, T. Aoyama, A. Oka, H. Gu, Y. Zhao and L.-J. Qu. 2008. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 27: 575-584.

- Lu, P., R. Porat, J.A. Nadeau and S.D. O'Neill. 1996. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *The Plant Cell* 8: 2155-2168.
- 5
- 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.
- 10
- Martin, D., C. Brun, E. Remy, P. Mouren, D. Thieffry and B. Jacq. 2004. GOToolBox: Functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biology* 5: R101.
- McConnell, J.R. and M.K. Barton. 1998. Leaf polarity and meristem formation in
- 15
- Arabidopsis*. *Development* 125: 2935-2942.
- McConnell, J.R., J. Emery, Y. Eshed, N. Bao, J. Bowman and M.K. Barton. 2001. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411: 709-713.
- 20
- McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jenes and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* 231: 150-160.
- 25
- 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.
- McElwain, E.F. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Research* 17: 1764.
- 30
- Meijer, A.H., E. Scarpella, E.L. van Dijk, L. Qin, A.J.C. Taal, S. Rueb, S.E. Harrington, S.R. McCouch, R.A. Schilperoort and J.H.C. Hoge. 1997. Transcriptional repression by

- Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *The Plant Journal* 11: 263-276.
- 5 Mukherjee, K., L. Brocchieri and T.R. Bürglin. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular Biology and Evolution* 26: 2775-2794.
- 10 Nakamura, M., H. Katsumata, M. Abe, N. Yabe, Y. Komeda, K.T. Yamamoto and T. Takahashi. 2006. Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141: 1363-1375.
- NCGA. 2013. The world of corn. National Corn Growers Association, Chesterfield, Missouri.
- 15 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 of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 20 Ohashi-Ito, K., T. Demura and H. Fukuda. 2002. Promotion of transcript accumulation of novel *Zinnia* immature xylem-specific HD-Zip III homeobox genes by brassinosteroids. *Plant and Cell Physiology* 43: 1146-1153.
- 25 Ohashi-Ito, K. and H. Fukuda. 2003. HD-Zip III homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*ATHB-15* (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology* 44: 1350-1358.
- 30 Ohashi-Ito, K., M. Kubo, T. Demura and H. Fukuda. 2005. Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology* 46: 1646-1656.

- Ohgishi, M., A. Oka, G. Morelli, I. Ruberti and T. Aoyama. 2001. Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *The Plant Journal* 25: 389-398.
- 5 Ohta, M., K. Matsui, K. Hiratsu, H. Shinshi and M. Ohme-Takagi. 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *The Plant Cell* 13: 1959-1968.
- Östin, A., M. Kowalczyk, R.P. Bhalerao and G. Sandberg. 1998. Metabolism of
10 indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118: 285-296.
- 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.
- 15
- Park, M.Y., S.-a. Kim, S.-j. Lee and S.Y. Kim. 2013. *ATHB17* is a positive regulator of abscisic acid response during early seedling growth. *Molecules and Cells* 35: 125-133.
- 20
- Paschall, J.E., M.F. Oleksiak, J.D. VanWye, J.L. Roach, J.A. Whitehead, G.J. Wyckoff, K.J. Kolell and D.L. Crawford. 2004. FunnyBase: A systems level functional annotation of *Fundulus* ESTs for the analysis of gene expression. *BMC Genomics* 5: 96.
- 25
- 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.
- 30
- Qin, Y.-F., D.-D. Li, Y.-J. Wu, Z.-H. Liu, J. Zhang, Y. Zheng and X.-B. Li. 2010. Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signaling. *Plant Cell Reports* 29: 1147-1156.

Rerie, W.G., K.A. Feldmann and M.D. Marks. 1994. The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 8: 1388-1399.

5

Ritchie, S.W., J.J. Hanway and G.O. Benson. 1997. How a corn plant develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames, Iowa.

10 Roy, N.C., E. Altermann, Z.A. Park and W.C. McNabb. 2011. A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies. *Briefings in Functional Genomics* 10: 135-150.

15 Ruberti, I., G. Sessa, S. Lucchetti and G. Morelli. 1991. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO Journal* 10: 1787-1791.

20 Sawa, S., M. Ohgishi, H. Goda, K. Higushi, Y. Shimada, S. Yoshida and T. Koshiba. 2002. The *HAT2* gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32: 1011-1022.

25 Sears, M.K., D.E. Stanley-Horn and H.R. Matilla. 2000. Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.

Seebauer, J.R., S.P. Moose, B.J. Fabbri, L.D. Crossland and F.E. Below. 2004. Amino acid metabolism in maize earshoots. Implications for assimilate preconditioning and nitrogen signaling. *Plant Physiology* 136: 4326-4334.

30

Sessa, G., G. Morelli and I. Ruberti. 1993. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO Journal* 12: 3507-3517.

- Severini, A.D., L. Borrás, M.E. Westgate and A.G. Cirilo. 2011. Kernel number and kernel weight determination in dent and popcorn maize. *Field Crops Research* 120: 360-369.
- 5 Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudaizixeria maha*. *Applied Entomology and Zoology* 40: 151-159.
- 10 Simpson, G.G. and W. Filipowicz. 1996. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: Mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* 32: 1-41.
- Sorin, C., M. Salla-Martret, J. Bou-Torrent, I. Roig-Villanova and J.F. Martínez-García. 15 2009. ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 59: 266-277.
- 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* 20 *General Genetics* 181: 8-12.
- Steindler, C., A. Matteucci, G. Sessa, T. Weimar, M. Ohgishi, T. Aoyama, G. Morelli and I. Ruberti. 1999. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235-4245.
- 25 Tang, A.-C. and J.S. Boyer. 2013. Differences in membrane selectivity drive phloem transport to the apoplast from which maize florets develop. *Annals of Botany* 111: 551-562.
- 30 Tiwari, S.B., G. Hagen and T.J. Guilfoyle. 2004. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *The Plant Cell* 16: 533-543.

- Turchi, L., M. Carabelli, V. Ruzza, M. Possenti, M. Sassi, A. Peñalosa, G. Sessa, S. Salvi, V. Forte, G. Morelli and I. Ruberti. 2013. *Arabidopsis* HD-Zip II transcription factors control apical embryo development and meristem function. *Development* 140: 2118-2129.
- 5
- Veitia, R.A. 2007. Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations. *The Plant Cell* 19: 3843-3851.
- Vieira, J. and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 153: 3-11.
- 10
- 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.
- 15
- Zúñiga-Mayo, V.M., N. Marsch-Martínez and S. de Folter. 2012. JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 71: 314-326.
- 20
- 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.
- 25
- Zhao, Y., Y. Zhou, H. Jiang, X. Li, D. Gan, X. Peng, S. Zhu and B. Cheng. 2011. Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize. *PLoS ONE* 6: e28488.
- 30
- Zinselmeier, C., B.-R. Jeong and J.S. Boyer. 1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiology* 121: 25-36.

- 柿本陽一・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
- 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 5 財務省 2014 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed Feb. 25 2014].
- 10 瀧澤康考 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 採取 転作全書 第三巻 雑穀 社団法人 農山漁村文化協会 東京
- 15 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 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
- 20 西尾剛 2002 新農学実験マニュアル 改訂版第 3 版、株式会社ソフトサイエンス社
- 農林水産省 2013 平成 24 年産秋冬野菜、指定野菜に準ずる野菜等の作付け面積、収穫量及び出荷量 平成 25 年 8 月 27 日公表 (http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou12.pdf) [Accessed Feb. 25 2014].
- 25
- 農林水産省 2014a 24 年産飼料作物の収穫量 (全国農業地域別・都道府県別) (2) 青刈りとうもろこし 平成 26 年 1 月 10 日公表 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001106532>) [Accessed Feb. 25 2014].
- 30
- 農林水産省 2014b 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
- 35
- 配合飼料供給安定機構 2014 (<http://mf-kikou.lin.gr.jp/>) [Accessed Feb. 25 2014].

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

5

平成 26 年 2 月 24 日

10

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15

第一種使用規程の承認を申請している絹糸抽出期の絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ(ATHB17, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87403, OECD UI: MON-87403-1) (以下「本組換え体」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。

20

- 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。

平成26年2月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部

*: 管理責任者

25

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

10 容を周知するための方法

実験従事者に直接口頭で伝える。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続する

15 ための具体的な措置の内容

20 具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 の
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

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

日本モンサント株式会社河内研究農場隔離ほ場

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板 4717 番地

3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

図 1 (p128) 参照

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】 (日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部)

2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】 (日本モンサント株式会社 代表取締役社長)

III. 試験期間

承認日から平成 32 年 5 月 31 日まで

IV. 施設概要

部外者の立ち入り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及び管理責任者を明示するための標識、洗い場を設置している (図 2, p129)。

V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

3. 試験区の配置図

図 3 (p130) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 4, p131)。

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。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

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

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 1 (p123) 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 2014 年 10 月 9 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=

表 1 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	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(℃)	(℃)	(℃)	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1988～2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1 月	54.2	3.1	9.2	-2.4	2.2	183.9
2 月	54.9	4	9.9	-1.4	2.5	167.4
3 月	110.1	7.3	13.0	1.9	2.9	166.8
4 月	110.9	12.7	18.5	7.3	3.2	171.6
5 月	119.9	17.4	22.5	13.0	3.2	164.0
6 月	145.4	20.5	25.1	16.9	2.7	119.1
7 月	117.1	24.1	28.9	20.6	2.6	147.6
8 月	118.7	25.6	30.8	22.0	2.5	177.0
9 月	185.3	22.1	26.9	18.5	2.6	129.4
10 月	185.0	16.4	21.6	12.0	2.2	134.3
11 月	88.5	10.5	16.5	5.2	1.9	147.1
12 月	49.2	5.4	11.8	-0.3	2.0	175.5
年	1343.9	14.1	19.6	9.5	2.5	1887.7

5. 台風の襲来歴

① 平年値

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越地方への台風接近数^{注1}の平年値(1981年~2010年の30年平均)は、3.1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2014年10月9日:

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>)。

② 過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

関東甲信地方に台風が接近し^{注1}、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15m/sを超えた個数^{注2}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(2004年5月、2004年8月、2004年10月、2007年9月、2009年10月、2011年9月、2012年6月)^{注3}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2014年10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。

- ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
 - ・ 補強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。

6. 過去10年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にほ場が冠水したことはない。

7. 過去10年における強風の経験とその程度・頻度

^{注1} 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から300km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

^{注2} 台風の強風域の定義が平均風速15m/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)

^{注3} 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、さらに関東甲信越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15m/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15m/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。

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）

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、100年～200年に1回程度起こる大雨により洪水が生じた場合に、水深1.0～2.0mとなると想定されている。

<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/kurashi/iza/tebiki/kouzui/index.html>

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。

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

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。

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図5 (p132～133) 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。

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。

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。

- (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。

5. 作業要領

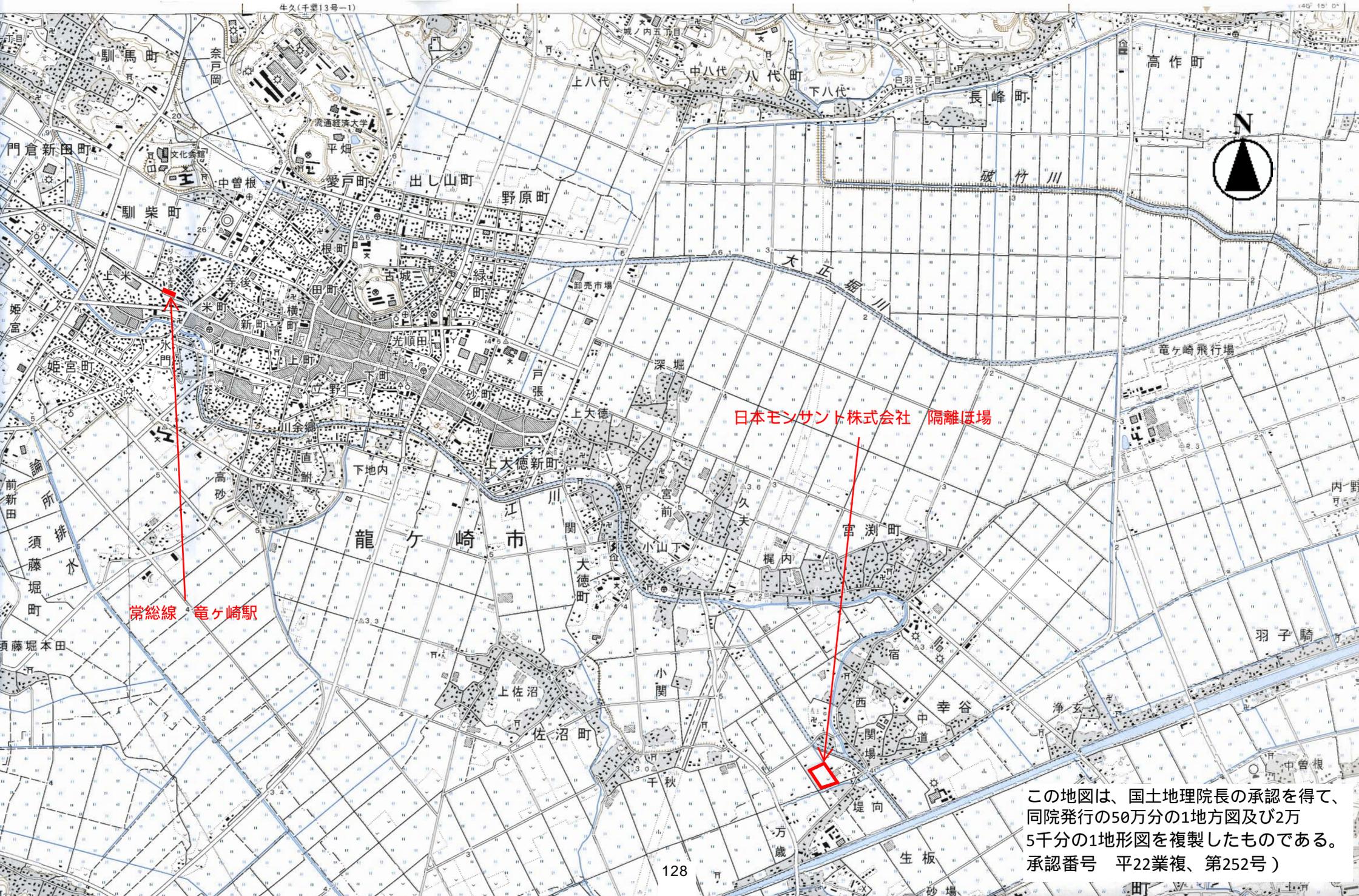
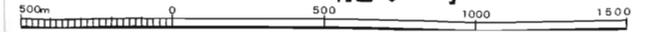
- (1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (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)までに掲げる事項を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。

以上

図1 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置 (赤線で示した箇所)

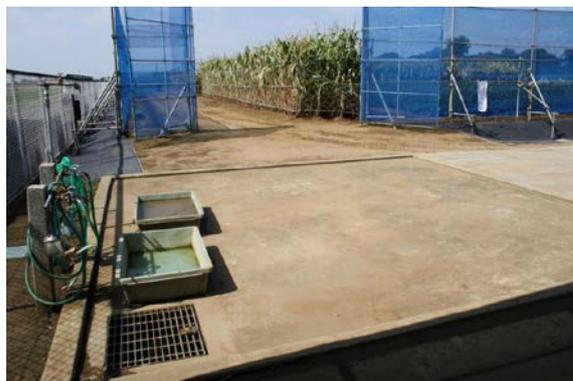
1:25,000

龍ヶ崎



この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。承認番号 平22業複、第252号)

図2 隔離ほ場の設備¹

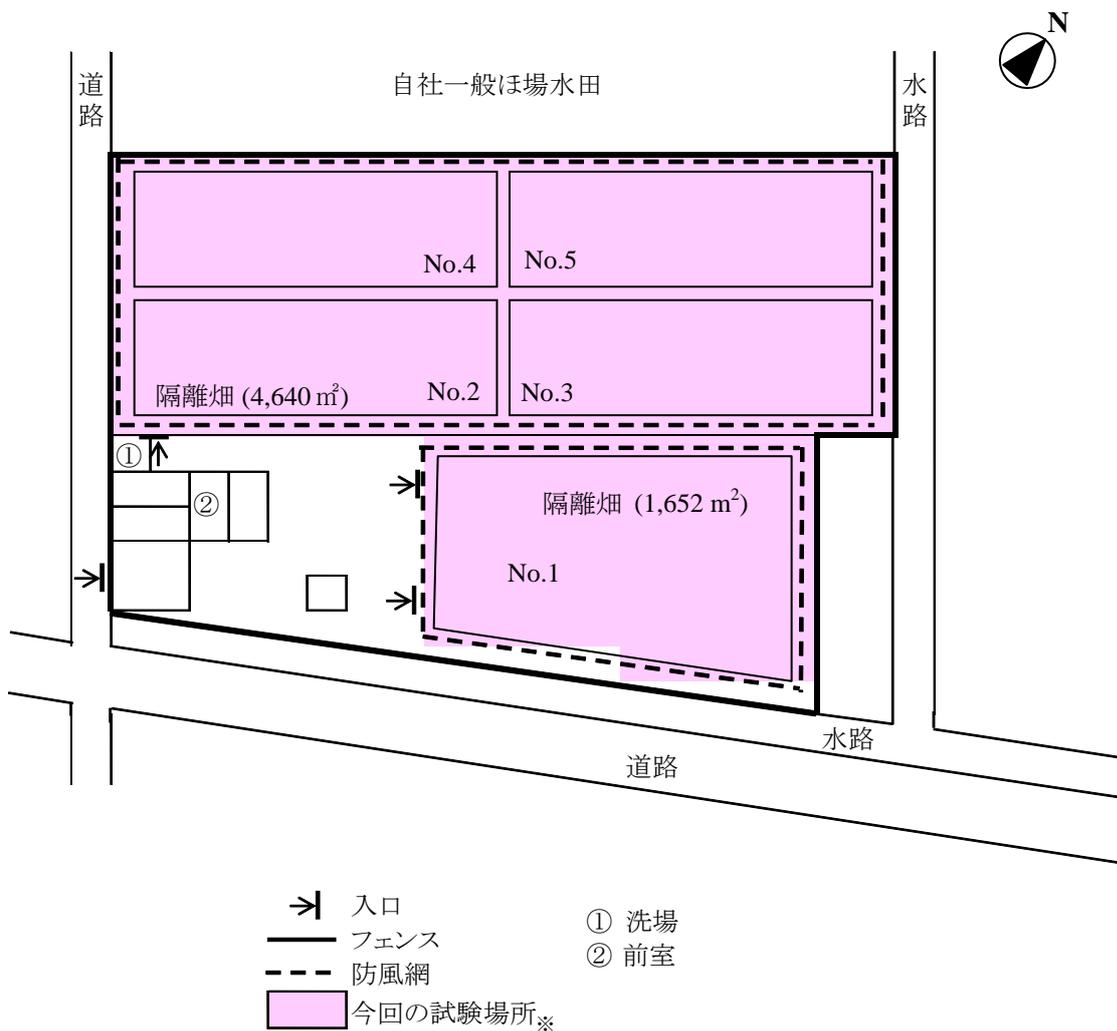


写真上：立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識

写真下：洗い場

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。

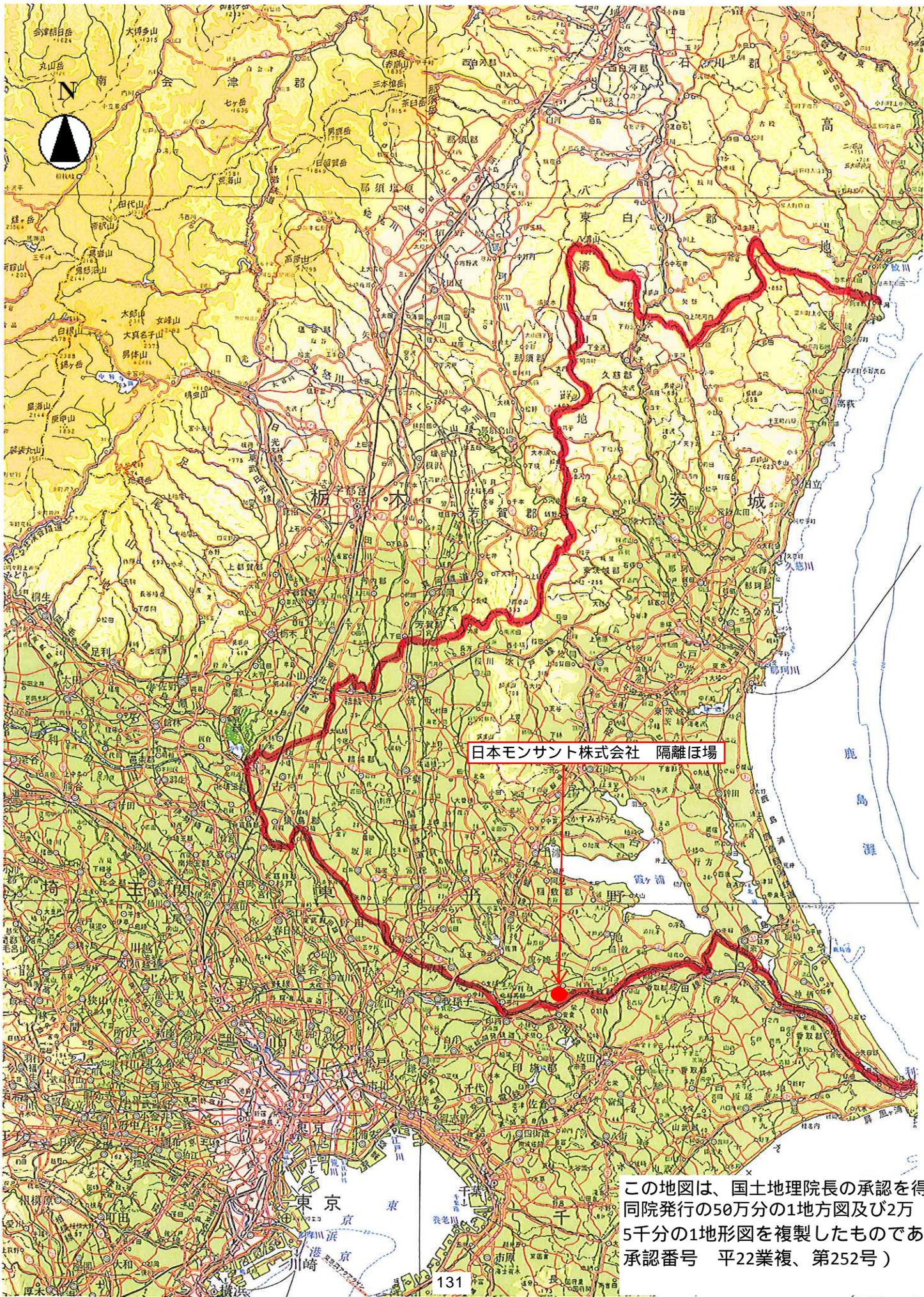
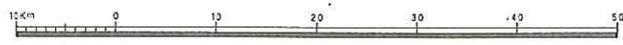
図3 試験区の配置図²



※上記試験場所のうち約 1,000 m²の面積において栽培予定。

²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。

図4 日本モンサント株式会社 隔離ほ場の位置



日本モンサント株式会社 隔離ほ場

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。(承認番号 平22業複、第252号)

図5 隔離ほ場における栽培履歴³

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2011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 ソルガム					←→							
	遺伝子組換え トウモロコシ					←→							
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←→							
	遺伝子組換え ダイズ					←→							
	非遺伝子組換え ダイズ					←→							
No.2	遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ソルガム					←→							
No.3	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ソルガム					←→							
	遺伝子組換え セイヨウナタネ					←→							
No.4	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←→							
	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ	→											
No.5	遺伝子組換え セイヨウナタネ					←→							
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←→							
	非遺伝子組換え ライムギ	→											

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2012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	→											
	遺伝子組換え トウモロコシ					←→							
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←→							
	遺伝子組換え ダイズ					←→							
	非遺伝子組換え ダイズ					←→							
No.2	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ					←→							
No.3	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	遺伝子組換え ワタ					←→							
	非遺伝子組換え ワタ					←→							
No.4	遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ					←→							
No.5	非遺伝子組換え ライムギ	→											
	遺伝子組換え ワタ					←→							
	非遺伝子組換え ワタ					←→							

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。

図5 隔離ほ場における栽培履歴(続き)

ほ場 No.	作物	栽培期間(2013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				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え ワタ				→								
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			
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						←	←	←	←			
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			

ほ場 No.	作物	栽培期間(2014年)(予定も含む)											
		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				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			
No.4	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】

別添資料リスト

- 5 別添資料 1 Structural Similarities between the MON 87403 AtHB17Δ113 and Other Proteins (社外秘)
- 別添資料 2 Physiological Assessments of Maize MON 87403 in 2012 U.S. Field Trials (MSL0024992) (社外秘)
- 10 別添資料 3 Physiological Assessments of Maize MON 87406 at R1 Growth Stage in 2012 U.S. Field Trials (MSL0026133)(社外秘)
- 別添資料 4 a) Expression of a Truncated ATHB17 Protein in Maize Increases Ear Weight at Silking
15 b) Supplemental Figures and Tables of Rice et al. 2014 (社外秘)
c) *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する2つの組換え系統の絹糸抽出期 (R1) における雌穂重のデータ (社外秘)
- 別添資料 5 Phenotypic Evaluation of Ear Size in Maize MON 87403 at Multiple
20 Growth Stages under Optimal Conditions in a Greenhouse (MSL0025460) (社外秘)
- 別添資料 6 Annotation of Differentially Expressed Genes Identified by Global
25 Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq (RAR-2014-0464) (社外秘)
- 別添資料 7 Global Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq
(MSL0025328) (社外秘)
- 30 別添資料 8 Annotation of Genes in Enriched GO Categories from Global Transcriptome Analysis of MON 87403 Using RNA-seq (RAR-2014-0383) (社外秘)
- 35 別添資料 9 Additional Annotation of Differentially Expressed Genes Identified in 2013 Greenhouse RNA-seq Experiment (RAR-2014-0544) (社外秘)

- 別添資料 10 Metabolite analyses of R1 Ear Tissue from MON87403 Maize Grown in the United States in 2012 (MSL0025230) (社外秘)
- 5 別添資料 11 Metabolite Analysis of Multiple Tissues from MON 87403 Grown in a Greenhouse in the United States in 2013 (MSL0025331) (社外秘)
- 別添資料 12 Additional MON87403 Metabolite Data Table for Japan Stage III Submission (RAR-2014-0465) (社外秘)
- 10 別添資料 13 Sequence Analysis of the *ATHB17* RNA Transcript Produced in MON 87403 (MSL0024955) (社外秘)
- 別添資料 14 Amended Report for MSL0025012: Demonstration of the Presence of *ATHB17Δ113* Protein in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87403 (MSL0025213) (社外秘)
- 15 別添資料 15 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP5714 (pMON 97046) (社外秘)
- 別添資料 16 PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce MON 87403 (MSL0025488) (社外秘)
- 20 別添資料 17 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87403 Across Three Generations (MSL0024676) (社外秘)
- 25 別添資料 18 Amended Report for MSL0024998: Molecular Characterization of MON87403 (MSL0025245) (社外秘)
- 別添資料 19 Amended Report for MSL0024991: Assessment of *ATHB17Δ113* Protein Levels in Maize Tissues Collected from MON 87403 Produced in U.S. Field Trials during 2012 (MSL0025215) (社外秘)
- 30 別添資料 20 Method Characterization Summary for Monsanto SOP BQ-QC-10786, Confirming the Presence of the Crop MON 87403 Transformation Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (RAR-2013-0416) (社外秘)
- 35

- 5 別添資料 21 Assessment of the Effect of Moderate Drought Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Greenhouse Conditions (MSL0025265) (社外秘)
- 10 別添資料 22 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Drought Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Growth Chamber Conditions (MSL0024983) (社外秘)
- 15 別添資料 23 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Salt Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Growth Chamber Conditions (MSL0024984) (社外秘)
- 20 別添資料 24 Assessment of the Effect of Moderate Salt Stress on Maize MON 87403 in 2013 under Greenhouse Conditions (MSL0025266) (社外秘)
- 25 別添資料 25 Assessment of the Shade Avoidance Response of Maize Plants Expressing *ATHB17* Under Growth Chamber Conditions in 2008 (MSL0025120) (社外秘)
- 30 別添資料 26 Phenotypic Evaluation of Maize MON 87403 in 2012 US Field Trials (MSL0025191) (社外秘)
- 35 別添資料 27 Assessment of the Effect of Multiple Levels of Cold Stress on Maize MON 87403 in 2012 under Growth Chamber Conditions (MSL0024981) (社外秘)
- 別添資料 28 Pollen Viability and Morphology Evaluation of Maize MON 87403 Grown in a 2012 (MSL0024996) (社外秘)
- 別添資料 29 Dormancy and Germination Evaluation of Maize MON 87403 Using Seed Produced at U. S. Field Sites During 2012 (MSL0025093) (社外秘)
- 別添資料 30 Residual Effects Evaluation of Maize MON 87403 (MSL0024960) (社外秘)